



Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica.

Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla

**Derivados de D-Galactosa como Antagonistas de los Receptores
NK1 de Interés Terapéutico: Aproximaciones al Diseño de
Nuevos Nanosistemas Teranósticos**

Memoria Presentada por la Graduada

Esther Pozo Torres para optar

al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla

dentro del Programa de Doctorado en Farmacia

Agradecimientos

Ryunosuke Satoro dijo: "Individualmente, somos una gota. Juntos, somos un océano" en mi opinión, no hay verdad mayor a esta.

Cuando comencé a trabajar para la Profesora Inmaculada Fernández, no era más que una graduada en Biología que estaba acabando de hacer su Máster en Investigación Biomédica. Desconocía por completo el mundo de la química orgánica y cómo se trabajaba en un laboratorio de síntesis. Sin embargo, esta extraordinaria mujer me hizo una entrevista y decidió que iba a contratarme y, además, me iba a enseñar todo lo que pudiese acerca de este campo que ahora tanto admiro y valoro. No sé cómo ocurrió, mi madre siempre me ha dicho que más vale caer en gracia que ser gracioso, y así debió ser, lo único que sé es que en julio de 2016 entré a formar parte del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, en el grupo de Estereoquímica y Síntesis Asimétrica y, por todo esto, le estoy infinitamente agradecida Profesora.

Durante un año aproximadamente, estuve trabajando como Investigadora para un proyecto conjunto entre la Dra. Fernández y la empresa farmacéutica EVGEN, en este punto me gustaría destacar y agradecer a la Dra. Nora Khiar todo lo que fue capaz de enseñarme en tan sólo un mes. Fue paciente, constante y dulce conmigo, en ningún momento dudó que iba a ser capaz de llegar a donde quisiera, desde aquí muchísimas gracias de todo corazón.

Más tarde, durante este año conocí a una de las mejores personas y profesionales que me he encontrado en ciencia, el Dr. Gabriel Borrego. Es imposible que pueda describir en estas líneas todo lo que me has ayudado y enseñado, así que sólo puedo decirte gracias, amigo. Y como olvidar a mi querido Salvatore Spina cuya sonrisa, optimismo y encanto alegraba cada uno de mis días, mil gracias mi Sol.

Pasado este año, la Dra. Inmaculada Fernández, me ofreció realizar la Tesis Doctoral con ella, y por supuesto acepté. En este momento se unió a mi pequeño grupo el Dr. Manuel Pernía, el cual codirige esta Tesis y me ha enseñado todo lo que sé sobre nanotecnología, además de darme más de una golpe de realidad en el funcionamiento del mundo científico. Muchas gracias, Dr. Pernía.

Continuando con el equipo, también me gustaría agradecer a todo el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica por haberme acogido con cariño, a todas las personas que están y a aquellas que ya se fueron, gracias.

Así mismo, esta Tesis no hubiese podido completarse sin la colaboración de: (i) el Dr. Nouredine Khiar, Investigador Científico del CSIC; (ii) los Drs. Miguel López Lázaro y José Manuel Calderón pertenecientes al Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la US; (iii) el Dr. Juan Ángel Organero, del departamento de Química Física de la UCLM; (iv) el Dr. Bernard Mouillac, del IGF de la Universidad de Montpellier; (v) el Dr. Pablo Gastaminaza del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid); (vi) y el grupo de Investigación de la Dra. María Luisa García (BIONAND, Málaga), donde pude realizar una estancia que me proporcionó diversos conocimientos sobre varias técnicas tanto biológicas como de imagen. Quiero agradecer, no sólo a la Dra. García, sino también al Dr. Carlos Caro y al doctorando José María Páez por toda su ayuda.

Sobra decir, que todas aquellas personas que hayan realizado una Tesis Doctoral y hayan vivido para contarlo, saben lo importante que es la gente que te rodea. En este sentido, yo he tenido muchísima suerte, he podido contar con unas compañeras maravillosas, donde nunca ha habido rivalidad, sino todo lo contrario, trabajo en equipo, ayuda y enseñanza. Desde aquí quiero agradecer todo lo que han hecho por mí Patricia Lerena, su maravilloso orden y extraordinaria capacidad de hacerlo todo bien. Nazaret Moreno y sus incalculables conocimientos de Química Orgánica gracias a los cuales he podido sacar adelante más de un problema. Y a María García por su dedicación, comprensión y capacidad de superación que

es simplemente inspirador. No me gustaría terminar este párrafo sin agradecer a la Dra. Rocío Recio toda la ayuda que me ha prestado y los ánimos que he recibido de su parte, así como a la Dra. Victoria Valdivia, por su humildad, conocimiento y, aunque no sé si ella misma es consciente, los momentos de risas que nos ha hecho vivir. Muchas gracias a todas.

No es ninguna sorpresa decir, que no habría llegado hasta aquí sin el apoyo incondicional y constante de mis seres queridos. Tengo la maravillosa suerte de tener una familia inmejorable, unos padres que siempre han confiado en mí, que nunca han dejado de apoyarme, que creen ciegamente en todo lo que yo creo y que han dado hasta lo que no tienen porque llegase este momento, me faltaría vida para agradecerlos todo ese amor. Pero aún soy más afortunada si cabe, porque tengo unos segundos padres, mis abuelos, dos ángeles que siempre están conmigo desde que nací hasta ahora y que nunca me han dejado caer. Por último, mis dos hermanas, Caro, eres mi hermana menor, aunque a veces no lo parece, tu fuerza, determinación y amor propio es algo que admiro profundamente de ti y tener la suerte de tenerte en mi vida, no sólo como hermana si no como amiga, me hace la persona más feliz del mundo. Gema, has sido mi hermana mayor, la que siempre me ha cuidado, comprendido y amado por encima de todo y de todos, eres un ser increíble y te agradezco que siempre estes ahí.

A mi pareja, Andoni, creo que no hay palabras en este mundo para agradecerte que hayas permanecido a mi lado sin flaquear ni un segundo durante más de cinco años. Y no sólo porque aguantar a un doctorando es un deporte de riesgo, si no por todo lo demás. Te quiero y agradezco el día que apareciste en mi vida.

A mis amigos, que, aunque esté bastante trillado, es la familia que uno escoge, y yo, tengo los mejores, los de toda la vida Gloria, María, María José, Jose, los que vinieron en la Facultad, Abel, Rodri, Iván, y aquellos que han “derivado de ellos” Fran, Carlos, Rodri’s Family. Habéis sido y sois uno de los pilares que me sostiene, los que mejor me conocen, los que han llorado

y reído conmigo, los que han luchado tanto como yo para que esté hoy aquí, de todo corazón millones de gracias.

*“La felicidad puede hallarse
hasta en los más oscuros momentos
si somos capaces de usar bien la luz”.*

Albus Dumbledore,
Harry Potter y el Prisionero de Azkaban.

Abreviaturas y Acrónimos

$[\alpha]^{20}_D$: poder rotatorio

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ar: argón

ATP: adenosina trifosfato

c: cuartete

CSA: ácido D(+)-10-canforsulfónico

col: colaboradores

d: doblete

DCM: diclorometano

DMEN: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMF: N, N-dimetilformamida

DMMB: dimetoximetil benceno

DMP: 2,2-dimetoxipropano

DIPEA: diisopropiletilamina

EDC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EMAR: espectroscopía de masas de alta resolución

FRET: transferencia de energía de resonancia de Förster

g: gramos

GDP: guanosina difosfato

GPCRs: receptores acoplados a proteína G (*G Protein-Coupled Receptors*)

GTP: guanosina trifosfato

h: horas

HOBt: hidroxibenzotriazol

IONPs: nanopartículas de óxido de hierro

M: molar

m: multiplete

mg: miligramos

MHz: megahertzios

min.: minutos

mL: mililitros

μ L: microlitros

μ g: microgramos

μ M: micromolar

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-(2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NBS: N-bromosuccinimida

nM: nanomolar

NK1R: receptor NK1

NOESY: espectroscopía de efecto nuclear Overhauser (nuclear Overhauser enhancement spectroscopy)

NP: nanopartícula

NPM: nanopartícula magnética

RH: recombinación homóloga

RMN: resonancia magnética nuclear

ROS: especies reactivas de oxígeno

s: singulete

SP: sustancia P

t: triplete

t.a.: temperatura ambiente

TBAF: fluoruro de tetrabutil amonio

TBDPSiCl: *terc*-butildifenilsilano

THF: tetrahidrofurano

TMSOTf: trifluorometanosulfonato de trimetilsililo

UV: ultravioleta

Índice

I. Introducción y objetivos.....	1
I.1. Nanomedicina y teranóstica	1
I.2. Nanomedicina y sistemas desarrollados para su aplicación médica	2
I.3. Nanopartículas magnéticas.....	4
I.3.1 Aplicaciones médicas de las nanopartículas de óxido de hierro (IONPs).....	5
I.4. Objetivos	12
II. Antagonistas del receptor NK1 basados en carbohidratos.....	14
II.1. Introducción y objetivos.....	14
II.1.1. Los receptores NK1 y la sustancia P	14
II.1.2. Objetivos	28
II.2. Resultados y discusión	30
II.2.1. Síntesis de antagonistas NK1R derivados de D-galactosa	30
II.2.2. Actividad anticancerosa	41
II.2.3. Evaluación del efecto antagonista de los receptores NK1	54
II.2.4. Estudios computacionales: docking	58
II.2.5. Evaluación del efecto antivírico contra el COVID-19	64
II.3. Conclusiones.....	67
II.4. Parte experimental.....	69
II.4.1. Métodos generales.....	69
II.4.2. Síntesis de análogos de antagonistas de los receptores NK1	71
II.4.3. Ensayos biológicos.....	87
III. Funcionalización de nanopartículas magnéticas: diseño y síntesis de ligandos	105
III.1. Introducción y objetivos.....	105
III.1.1. Nanotecnología	105
III.1.2. Nanomateriales	107

III.1.3. Objetivos	115
III.2. Resultados y discusión	117
III.2.1. Síntesis de ligandos derivados de catecol y funcionalización de IONPs	117
III.2.2. Síntesis de ligandos derivados de ácido fosfónico y funcionalización de IONPs ...	150
III.3. Conclusiones.....	156
III.4. Parte experimental.....	158
III.4.1. Métodos generales.....	158
III.4.2. Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro	159
III.4.3. Síntesis de ligandos derivados de catecol	159
III.4.4. Síntesis de ligandos derivados de ácido fosfónico	168
III.4.5. Funcionalización de nanopartículas de óxido de hierro	172
III.4.6. Caracterización de nanopartículas de óxido de hierro y ligandos	173
III.4.7. Ensayos biológicos.....	178
IV. Bibliografía	182
Anexos	203

Capítulo I. Introducción y objetivos

I. Introducción y objetivos

I.1. Nanomedicina y teranóstica

La aplicación de la nanotecnología en las ciencias de la salud ha promovido la aparición de un área de investigación denominada nanomedicina, que tiene como principal objetivo el desarrollo de herramientas que sirvan para prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades de una forma más precisa, eficaz y personalizada.¹ En concreto, caben destacar tres campos en los que las aportaciones de la nanotecnología resultan fundamentales para la consecución de avances significativos con fines médicos:

1. Liberación de fármacos. La investigación en este campo está enfocada a desarrollar nanosistemas capaces de transportar y liberar fármacos de manera controlada en una determinada diana con fines terapéuticos.^{2,3}
2. Diagnóstico. Su objetivo se centra en el diseño de nanodispositivos capaces de identificar cualquier enfermedad por medio de nanosistemas de imagen o nanobiosensores, los cuales contienen un componente biológico capaz de detectar a tiempo real y con una alta sensibilidad un objetivo determinado.³
3. Terapia y diagnóstico (teranóstica). La investigación desarrollada en este campo pretende crear nanodispositivos capaces de identificar y tratar al mismo tiempo una enfermedad determinada.³

El término teranóstica fue utilizado por primera vez en el año 2002 por John Funkhouser, presidente y gerente general de la farmacéutica PharmaNetics, al referirse a la capacidad de un único sistema de combinar el diagnóstico de una enfermedad y su posible tratamiento. A este tipo de sistema se le dio el nombre de agente teranóstico.⁴ La función diagnóstica de los agentes teranósticos informa de la presencia de una enfermedad, su estado y su posible respuesta a un determinado tratamiento. Por otra parte, la función terapéutica del agente, como su propio

nombre indica, es la capacidad de tratar la enfermedad y curarla sin producir efectos secundarios nocivos.⁵ De esta manera, con un solo dispositivo sería posible diagnosticar y tratar una determinada afección.

I.2. Nanomedicina y sistemas desarrollados para su aplicación médica

Actualmente existe un número importante de nanosistemas que permiten el diagnóstico, la prevención y, en consecuencia, el entendimiento de los procesos fisiopatológicos que intervienen en el origen y el curso de una enfermedad determinada,³ sin embargo, no todos presentan capacidad terapéutica.

En este sentido cabe destacar los siguientes tipos de nanosistemas terapéuticos recogidos en la Figura 1.

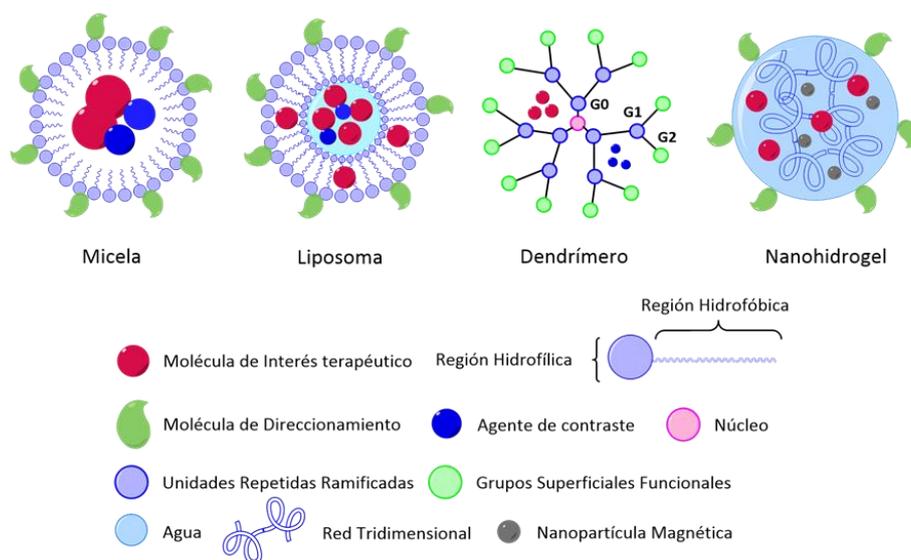


Figura 1. Estructura de los diferentes nanosistemas descritos: micelas, liposomas, dendrímeros y nanohidrogeles.

- Micelas: son nanoestructuras formadas por el autoensamblaje de moléculas anfifílicas, normalmente polímeros. Las micelas pueden albergar en su interior distintos compuestos como, lípidos, antimicrobianos, antivíricos, antitumorales etc., permitiéndoles viajar por el organismo del huésped sin ser eliminados por el sistema fagocítico mononuclear.⁶ Además, también puede contener agentes de contraste para un diagnóstico monitorizado. Estos agentes también se pueden unir a la superficie de la micela, así como diferentes ligandos que les proporciona especificidad hacia diferentes dianas (Figura 1).

- Liposomas: son nanovesículas cuya estructura se basa en un tipo o varios de fosfolípidos, integrados en una o más bicapas, que poseen un espacio acuoso central y espacios interlaminares. En estos espacios pueden insertarse diversos tipos de moléculas, como, fármacos, moléculas de interés terapéutico o agentes de contraste entre otros, según sea su naturaleza hidrofílica (espacio acuoso), lipofílica o anfifílica (espacio interlaminares). Además, al ser los fosfolípidos los principales componentes de la membrana celular, los liposomas se difunden en los tejidos con mucha facilidad.⁷ Al igual que las micelas, a los liposomas se les puede unir a la superficie diferentes ligandos que les proporciona especificidad hacia diferentes dianas y agentes de contraste para permitir el diagnóstico monitorizado de la terapia (Figura 1).^{7,8}

- Dendrímeros: son moléculas compuestas por polímeros como, por ejemplo, poliamidoamina (PAMAM), polipropilenoimina (PPI) o poli-L-lisina (PLL), siendo los PAMAM los más ampliamente estudiados.⁹ Los dendrímeros poseen una estructura en forma de árbol con tres partes diferenciadas: (i) un núcleo, que en el caso de los PAMAM suele ser de etilendiamina, (ii) una zona intermedia que consta de unidades repetitivas ramificadas y en la que cada capa o unidad repetida supone una nueva generación (G0, G1, G2 etc.) y, por último, (iii) una zona exterior multivalente, que puede ser diseñada para contener diversidad de grupos funcionales donde destacan los grupos amino o carboxilato, que hacen al dendrímero muy reactivo y le permite interactuar con sustratos para realizar posteriormente una liberación controlada del

material encapsulado.^{9,10} De esta forma, los dendrímeros pueden actuar como transportadores de fármacos o de moléculas de interés terapéutico y, además, también pueden incorporar agentes de contraste para el diagnóstico de enfermedades (Figura 1).¹¹

- Nanohidrogeles: son hidrogeles a escala nanométrica formados por una red tridimensional reticulada producida por la asociación de polímeros, que suelen contener grupos hidrofílicos (-OH, -COOH o NH₂), a través de puentes de hidrógeno, capaces de absorber una gran cantidad de agua sin disolverse debido a los enlaces físicos y químicos formados entre sus cadenas,^{12,13} existiendo en un estado de la materia entre sólido y líquido a diferencia de otros nanosistemas.^{14,15}

Los nanohidrogeles pueden utilizarse en teranóstica para la liberación controlada de fármacos, siendo estos nanosistemas los que pueden albergar mayor cantidad de fármaco en comparación con los descritos anteriormente. Esto se debe a que su componente principal es el agua y por tanto existe un espacio mayor para la incorporación de moléculas de interés.^{16,17} Así mismo, se les puede unir a la superficie diferentes ligandos que les proporciona especificidad hacia diferentes objetivos, es decir pueden ser vectorizados hacia las moléculas diana.¹⁷ Un aspecto muy interesante de los nanohidrogeles es la posibilidad de almacenar dentro de ellos nanopartículas magnéticas, las cuales son excelentes medios para el diagnóstico basado en la resonancia magnética de imagen (RMI) y también como agentes terapéuticos (Figura 1).¹⁸

Como veremos más adelante, este tipo de nanopartículas magnéticas será una de las herramientas básicas en el diseño de los nanosistemas desarrollados en esta Tesis Doctoral.

I.3. Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) son nanoestructuras formadas por elementos magnéticos, tales como los átomos de Fe, Mn, Co o Ni, que tienen la capacidad de agregarse en presencia de un campo magnético externo y dispersarse cuando se elimina la fuente magnética. Entre los diferentes tipos de NPMs, nos centraremos en las NPs óxido-magnéticas,

concretamente en las NPs de óxido de hierro superparamagnéticas (IONPs, del inglés "iron oxide nanoparticles"),^{19,20} que se describirán con más detalle en el capítulo III de esta Tesis Doctoral. Para poder utilizar las IONPs en aplicaciones biomédicas es de vital importancia la funcionalización de su superficie para aumentar la biocompatibilidad y evitar o disminuir los efectos citotóxicos.²¹ Una correcta funcionalización debe: (i) evitar la agregación de las IONPs, es decir mantenerlas monodispersas y estables, conservando sus propiedades magnéticas, (ii) permitir la solubilización en medios fisiológicos, (iii) evitar o retardar el reconocimiento por el sistema fagocítico mononuclear del huésped y (iv) proporcionar grupos funcionales libres para, posteriormente, poder unirlos a biomoléculas de interés (Figura 2).²²

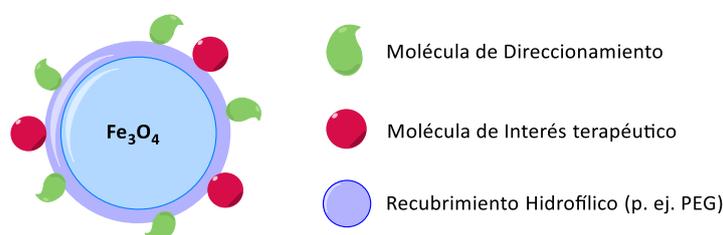


Figura 2. Esquema representativo de IONPs funcionalizadas.

I.3.1 Aplicaciones médicas de las nanopartículas de óxido de hierro (IONPs)

Las IONPs tienen multitud de utilidades en el campo de la medicina, como describiremos de forma resumida a continuación:

- **Resonancia magnética de imagen**

La resonancia magnética de imagen (RMI) es una técnica de diagnóstico no invasiva que produce imágenes anatómicas tridimensionales detalladas, sin el uso de radiación dañina para el paciente. Se basa en una tecnología sofisticada que estimula y detecta el cambio en la dirección del eje de rotación de los protones que se encuentran en el agua que compone los tejidos vivos.²³ La RMI emplea fuertes imanes que producen un potente campo magnético que obliga a

los protones a alinearse con ese campo. Cuando se aplican pulsos de radiofrecuencia, los protones son estimulados y giran, alejándose de la situación original de equilibrio, luchando contra la fuerza del campo magnético. Una vez que se apaga el pulso, los protones tienden a relajarse mediante dos tipos de procesos: longitudinal (T_1) y transversal (T_2).²⁴ La resonancia magnética hace un registro de estos procesos de relajación, y luego los reconstruye en imágenes en escala de grises. Las imágenes ponderadas en T_1 dan un contraste claro y brillante (denominado contraste positivo) mientras que las imágenes ponderadas en T_2 dan un contraste oscuro (denominado contraste negativo).²⁵

Los agentes de contraste (ACs) en RMI son sustancias que mejoran la información que nos aporta el diagnóstico de imagen. La función de éstos es disminuir los tiempos de relajación T_1 y T_2 , aumentando el contraste en la región de interés y mejorando, por tanto, la imagen que obtenemos en la zona de estudio.^{25,26} A pesar de que los ACs en RMI se cataloguen como T_1 o T_2 , existe la posibilidad de preparar ACs duales, es decir, que puedan comportarse como ACs T_1 y T_2 simultáneamente.²⁷ Este comportamiento viene determinado por el cociente entre los valores de ambas relajatividades, r_2 y r_1 , de dicho AC. Así, la ratio r_2/r_1 será la que nos proporcione la información sobre qué tipo de agente es el compuesto a evaluar. Si la ratio r_2/r_1 se encuentra entre valores de 1 y 3, el AC será T_1 . Si, por el contrario, es mayor a 10 el AC será T_2 ; y, por último, si la ratio ofrece un valor entre 3 y 10 estaremos ante un AC dual tanto T_1 como T_2 .

Uno de los ACs para RMI más utilizados en clínica son las complexonas de gadolinio que tienen un papel importante en la imagen de contraste T_1 , acortando el tiempo de relajación de los protones de las moléculas de agua vecinas. Sin embargo, debido a la rápida eliminación a través de la orina y a su toxicidad (directamente asociada con la fibrosis sistémica nefrogénica y con acumulaciones en el cerebro), su uso se encuentra actualmente limitado, resultando de sumo interés el desarrollo de nuevos agentes de contraste con mínima toxicidad y propiedades multifuncionales.²⁷

Para cubrir esta necesidad se han desarrollado como alternativa las IONPs recubiertas con ligandos biológicamente compatibles (p.ej. PEG), con gran estabilidad química y no tóxicas para el organismo. Las IONPs funcionalizadas, con tamaños del núcleo mayores de 10 nm suelen exhibir capacidad de contraste T_2 , ya que la saturación magnética aumenta proporcionalmente con un aumento del tamaño.^{25,28} No obstante, las IONPs de menor tamaño presentan capacidades como AC T_1 (Figura 3).^{25,28}

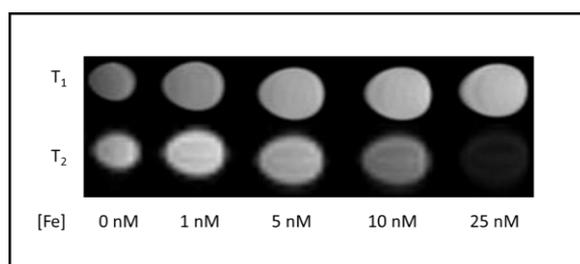


Figura 3. Phantoms de IONPs a diferentes concentraciones ponderadas para T_1 y T_2 .²⁹

Algunos ejemplos de agentes de contraste comercializados basados en IONPs son:

- Feridex® (Guerbet) y Resovist® (Schering): IONPs recubiertas de dextrano y carboxidex-trano respectivamente, con un tamaño hidrodinámico aproximado de 150 nm para la primera y 60 nm para la segunda y con cargas superficiales neutras. Se han empleado para obtener imágenes de hígado (tumores hepáticos) ponderadas en T_2 .^{30,31}
- Sinerem® (Guerbet): IONPs recubiertas de dextrano con un tamaño hidrodinámico medio (30 nm aprox.) y carga superficial neutra. Se han empleado para obtener imágenes de cánceres pélvicos, como próstata, vejiga, útero o cuello del útero, pudiendo visualizar los macrófagos o los nódulos linfáticos ponderadas en T_1 y T_2 .³²

- **Vectorización**

Las IONPs pueden ser direccionadas hasta la zona de interés, favoreciendo su aplicación como ACs en el diagnóstico de enfermedades mediante RMI. En este punto hay que diferenciar dos tipos de vectorización o “targeting”, pasivo y activo.

- La **vectorización pasiva** aprovecha las propiedades físico-químicas intrínsecas de las IONPs, como es el tamaño inherente, para llegar específicamente a un tejido concreto. El direccionamiento pasivo se debe al efecto de permeabilidad y retención incrementadas (efecto EPR, del inglés *Enhanced Permeability and Retention*) en el tejido diana, por el cual las NPs menores a 200 nm entran fácilmente al intersticio del tumor a través de su vasculatura ya que las células del endotelio vascular se encuentran más separadas y, además, a consecuencia de la disminución de la circulación linfática, las NPs se quedan retenidas y se acumulan en el tumor, mientras que en el tejido sano las células endoteliales de los vasos sanguíneos están fuertemente unidas y forman una barrera que imposibilita la salida de las NPs.³³ Sin embargo, esta vectorización pasiva depende de la captación de NPs por parte de las células cancerígenas (Figura 4).³⁴

- La **vectorización activa** se basa en la unión de un agente de direccionamiento a la superficie de la NP, por ejemplo, un ligando cuyo receptor se encuentre sobreexpresado en las células cancerígenas, anticuerpos, proteínas etc., que dirige a las NPs hasta la zona tumoral. Una vez que las NPs han llegado a la superficie de las células tumorales pueden ser interiorizadas por las mismas a través de endocitosis mediada por un receptor.³³ Una variante de la vectorización activa consiste en la aplicación de un campo magnético que dirigirá a las NPs hacia su diana. Esta propiedad es única para las IONPs (Figura 4).³⁴

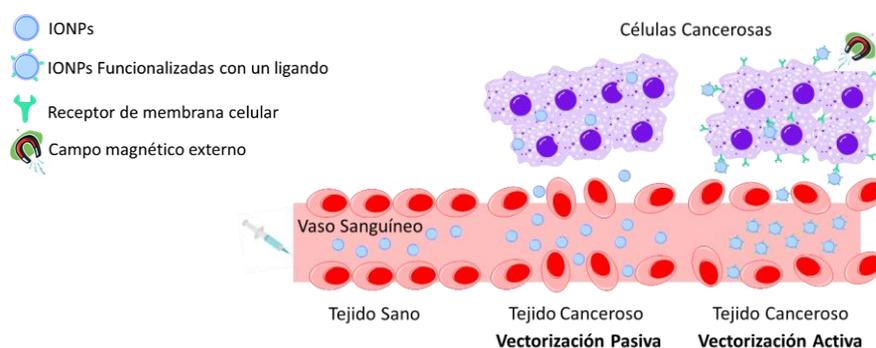


Figura 4. Representación de la vectorización pasiva y activa en tejido canceroso y su comparación en tejido sano.

Sin embargo, la vectorización no sólo puede utilizarse para diagnóstico sino también para el tratamiento **en la liberación controlada de fármacos**. Como se indicó anteriormente, la vectorización activa de las IONPs permite que vayan directamente hasta la zona de interés, y una vez aquí, si llevan incorporado un determinado fármaco, podrán liberarlo como respuesta a un estímulo, por ejemplo, cambios en el pH o en la temperatura.³⁵ Actualmente existen numerosos estudios para desarrollar sistemas de liberación controlada de fármacos a partir de NPs, entre los que cabe resaltar el dispositivo desarrollado por Y. Su y col.,³⁶ basado en IONPs superparamagnéticas mesoporosas (SPMIONs), que consiste en cargar el principio activo, paquitaxel, en los pequeños poros de la NP, para posteriormente recubrirlas con lactoferrina. La función de la lactoferrina es encapsular a los principios activos para evitar su liberación antes de lo deseado además de aumentar su biocompatibilidad y prevenir su captación por el sistema fagocítico mononuclear. Además, en este caso, la lactoferrina, actúa como agente de vectorización debido a que el tumor sobre el que se ensaya (tumor cerebral) tiene el receptor de lactoferrina sobreexpresado. Una vez que las SPMIONs están dentro del tumor se aplica un campo magnético alterno, que provoca un aumento de la temperatura, desencadenando la liberación del fármaco.³⁶ Por su parte, K. Hayashi y col.,³⁷ han creado un sistema basado en IONPs

superparamagnéticas que tienen unido el fármaco doxorubicina y están funcionalizadas por polímeros cuyas propiedades cambian con la temperatura. Los polímeros están compuestos por una red de cadenas entrelazadas cuyos enlaces, por encima de una determinada temperatura, se debilitan provocando la liberación del fármaco.^{37,38}

- **Hipertermia magnética**

La hipertermia es la capacidad que presentan las IONPs de absorber la energía que proviene de un campo magnético externo y liberarla en forma de calor (como se comentó en el apartado anterior).³⁹

Las IONPs en disolución tienen sus momentos magnéticos orientados al azar, de forma que, en ausencia de un campo magnético, la suspensión no presenta magnetización neta.⁴⁰ Cuando se someten a un campo magnético alterno las NPs absorben la energía que desprende dicho campo y sus momentos magnéticos comienzan a rotar para intentar vencer la barrera energética generada, principalmente, por la anisotropía, para alinearse con el campo magnético. Seguidamente, cuando el campo magnético cesa, la energía absorbida se disipa en forma de calor al relajarse los momentos magnéticos de las NPs, para alcanzar de nuevo la situación de equilibrio.^{40,41}

Dentro de la hipertermia magnética, los sistemas formados por IONPs funcionalizadas con vectores dirigidos a las células cancerígenas suponen un enorme avance dentro de este tipo de terapias, ya que, se acumulan una mayor cantidad de IONPs en la zona de interés y, en consecuencia, se disminuye la dosis necesaria para alcanzar la muerte tumoral.⁴² De esta forma, cuando las NPs se localizan en el tumor, se aplica un campo magnético alterno que provoca un aumento de la temperatura (entre los 43-45 °C), produciendo la apoptosis celular selectiva de las células cancerígenas (Figura 5).⁴³

Se ha observado que las células tumorales a menudo presentan una mayor sensibilidad al incremento de la temperatura (superior a 41 °C) en comparación con las células sanas.⁴³ La combinación de esta terapia junto con tratamientos tradicionales como la quimioterapia o radioterapia hacen que las células se vuelvan más sensibles al tratamiento convencional. Es importante resaltar que si los valores de temperatura superan los 45 °C (termoablación) se corre el riesgo de inducir la muerte celular por necrosis provocando una respuesta inflamatoria por parte del organismo del huésped y, además, generando un efecto citotóxico tanto en células tumorales como en células sanas.⁴⁴ En este sentido cabe destacar el sistema desarrollado por la farmacéutica MagForce para llevar a cabo una terapia contra el cáncer basada en la hipertermia magnética.⁴⁵

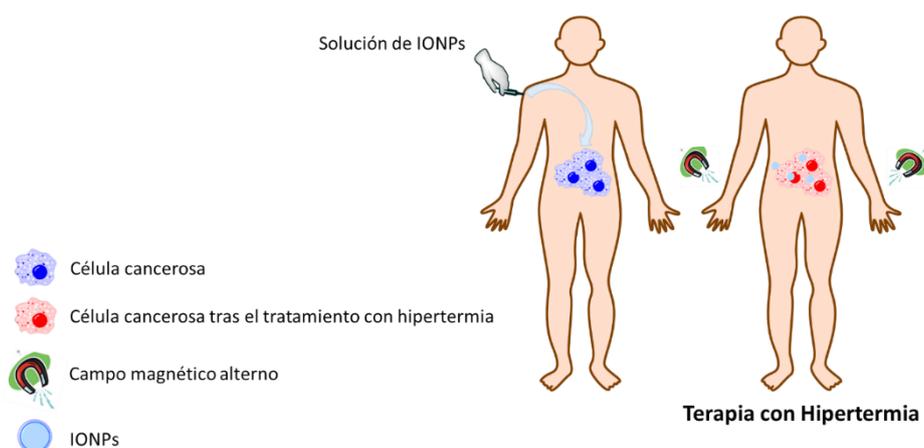


Figura 5. Tratamiento contra el cáncer basado en hipertermia magnética.

Como hemos indicado hasta aquí, es evidente que las IONPs proporcionan una herramienta fundamental para el diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades en general, y del cáncer en particular, que combinadas con métodos tradicionales permiten un mejor pronóstico de la enfermedad. En la Figura 6, se ilustra un resumen de las aplicaciones descritas anteriormente.

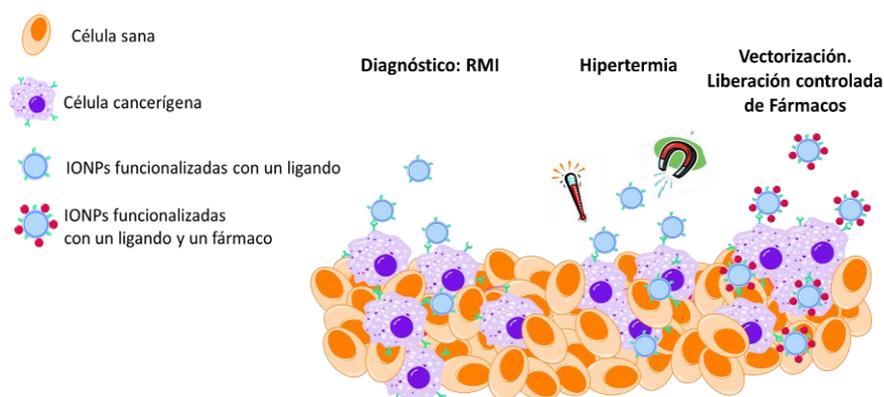


Figura 6. Aplicaciones teranósticas de las IONPs.

Por último, cabe comentar que, junto con las aplicaciones descritas anteriormente, las IONPs también pueden ser utilizadas en **terapia génica** y **reparación de tejidos**, aplicaciones que no describiremos en detalle por apartarse del objetivo principal de esta Tesis Doctoral, que como veremos a continuación se centra en el tratamiento del cáncer.

I.4. Objetivos

Dentro de un proyecto de investigación más amplio que se viene desarrollando en nuestro grupo de investigación, encaminado al diseño y síntesis de nuevos nanosistemas con aplicaciones biomédicas, en concreto micelas y NPs magnéticas,^{46,47} en esta Tesis Doctoral nos planteamos como **objetivo general** el *diseño y síntesis de nuevos nanosistemas teranósticos, basados en nanopartículas magnéticas, para su aplicación en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.*

La consecución de este objetivo general implica el desarrollo de dos tareas fundamentales, descritas en los capítulos II y III de esta Memoria, que constituyen a su vez dos **objetivos parciales**:

- **Objetivo 1º:** *Desarrollo y síntesis de una biomolécula adecuada como agente de vectorización con actividad anticancerosa.* (Capítulo II)

En concreto, proponemos la síntesis de un análogo del Aprepitant, un antagonista NK1 con actividad anticancerosa, como agente de vectorización, utilizando D-galactosa como compuesto de partida. Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación centrado en el receptor NK1 como diana terapéutica para el desarrollo de nuevos agentes anticancerosos.

- **Objetivo 2º:** *Diseño y síntesis de IONPs debidamente funcionalizadas para su posterior bioconjugación.* (Capítulo III)

Nos proponemos sintetizar IONPs de un tamaño adecuado para su posterior funcionalización con ligandos que permitan su solubilización en medio acuoso, las hagan biocompatibles, y permitan su posterior bioconjugación con el agente de vectorización desarrollado anteriormente (compuesto antagonista NK1). El diseño y síntesis de los nuevos ligandos con las características adecuadas, constituye el cuerpo fundamental de este capítulo.

Capítulo II. Antagonistas del receptor NK1 basados en carbohidratos

II. Antagonistas del receptor NK1 basados en carbohidratos

II.1. Introducción y objetivos

II.1.1. Los receptores NK1 y la sustancia P

El receptor NK1 pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G y su ligando endógeno es la sustancia P (SP). Ambos participan en multitud de procesos biológicos en el organismo y están implicados en una gran cantidad de patologías humanas, por lo que el estudio de su funcionamiento resulta de enorme interés.

- **La sustancia P**

La SP es una proteína perteneciente a una familia de neuropéptidos llamados taquicininas, que además incluye a la neuroquinina A (NK-A), neuroquinina B (NK-B), neuroquinina K (NK-K) y neuropéptido γ^{48} . Concretamente es un undecapéptido formado por los siguientes aminoácidos: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (Figura 7).⁴⁹

En 1931, los científicos Ulf Von Euler y John H. Gaddum, tratando de encontrar acetilcolina en extractos hipotalámicos e intestinales equinos, describieron por primera vez la presencia de un factor resistente a la atropina con potentes propiedades hipertensoras y contráctiles del músculo liso.⁵⁰ Estos científicos la llamaron sustancia P haciendo referencia al polvo obtenido después del procedimiento de extracción, el cual mantenía su actividad biológica.⁵¹ En 1953, el científico Lemberk F. la propuso como la primera molécula neuroactiva que actuaba como neurotransmisor dentro de la familia de las taquicininas,⁵² debido a su localización neuronal y concentración preferente en los terminales sinápticos. En 1971, Chang y colaboradores la identificaron en el hipotálamo bovino como una proteína undecapéptida y determinaron sus aminoácidos.⁴⁹

complejo se disocie. Finalmente, se comprueba que el receptor NK1 vuelve a estar presente en la membrana plasmática mientras que la SP se degrada en el interior del endosoma.⁶⁰

Mediante estudios radioinmunológicos, inmunohistoquímicos y técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC),⁶¹⁻⁶³ junto con el aislamiento, purificación y caracterización química de la SP, se ha conseguido crear un mapa *in vivo* de la misma. La SP está ampliamente distribuida por el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) de todos los mamíferos y participa en numerosos procesos biológicos tales como:⁶⁴

(i) Percepción del dolor. La SP junto con el glutamato se encuentra en el axón terminal presináptico y se propone que la SP sensibiliza a las neuronas postsinápticas frente al glutamato, ayudando en la transmisión de señales de dolor al área somatosensorial del cerebro.⁶⁵⁻⁶⁸

(ii) Inflamación neurogénica. Las neuronas sensoriales liberan productos neurosecretores en el área del tejido dañado, entre los que se encuentra la SP⁶⁹ que conduce, entre otros procesos, a la vasodilatación y la quimiotaxis de las células del sistema inmunitario. De esta forma, el sistema nervioso dirige al sistema inmunológico al sitio de daño/infección.⁷⁰ La inflamación neurogénica está implicada en muchos procesos patológicos, como el eccema, la dermatitis, la psoriasis, las migrañas, el asma, la fibromialgia y la rosácea.⁷¹

(iii) Sistema inmunitario. La SP parece contribuir a la atracción de las células inmunitarias hacia el lugar de inflamación, influyendo en la respuesta de los neutrófilos a la IL-1 β y estimulando la expresión de la IL-8.⁷²

(iv) Funciones cardiovasculares. La SP es conocida como un potente vasodilatador y está involucrada en la regulación de la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la isquemia, la reperfusión, la respuesta cardíaca al estrés y la angiogénesis.⁷³ Al estar presente en el músculo cardíaco pueden influir en su patogenia, como el infarto de miocardio, la miocarditis y la lesión por reperfusión.⁷⁴

(v) Sistema respiratorio. La SP induce la constricción de las células del músculo liso bronquial, lo que reduce el diámetro de las vías respiratorias y desencadena la desgranulación de los mastocitos en el tejido pulmonar, lo que provoca asma y/o bronquitis crónica.^{75,76}

(vi) Funciones gastrointestinales. Una función bien conocida de la SP es su papel en el reflejo del vómito. En el SNC, concretamente en el bulbo raquídeo, se encuentran el área postrema y núcleo solitario, que controlan el reflejo del vómito y contienen altos niveles de SP.^{77,78}

(vii) Sistema tegumentario. La SP provoca inflamación neurogénica, como ya se mencionó anteriormente, lo que provoca la liberación de histaminas y conducen a los cinco signos cardinales de la inflamación: enrojecimiento, calor, hinchazón, dolor y pérdida de función.⁷⁹

Adicionalmente, se ha sugerido que los neuropéptidos, y en particular la SP, juegan un papel principal en los mecanismos de protección y reparación de los tejidos. La SP actúa sobre dichos tejidos por vía del receptor de alta afinidad NK1, aunque en circunstancias especiales, como por ejemplo altas concentraciones del péptido, también puede interactuar con los receptores NK2 y NK3.⁸⁰

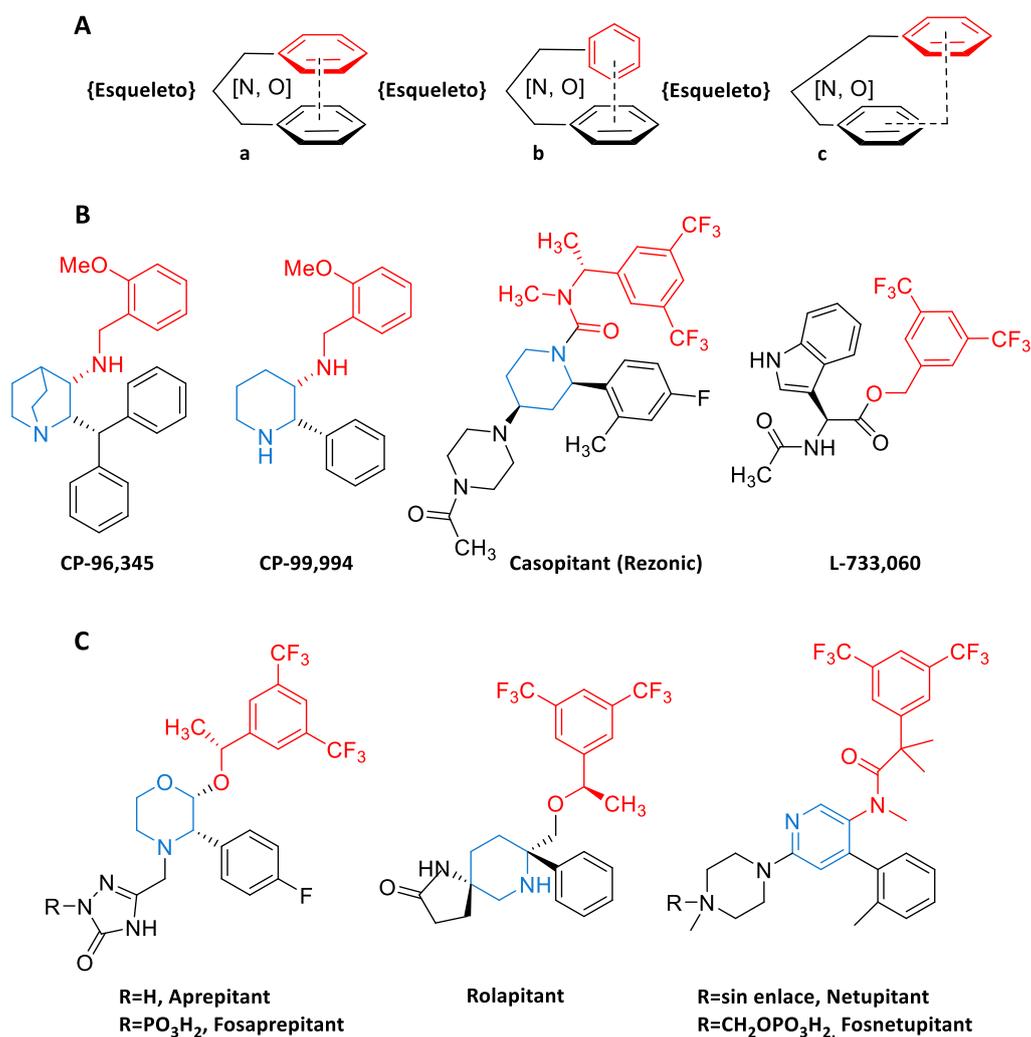
Por lo tanto, no es de extrañar que el análisis de la SP, así como su interacción con el receptor NK1, sea objeto de importantes estudios debido a su presencia en todos los procesos fisiológicos y fisiopatológicos anteriormente descritos. Los antagonistas de la SP han sido y siguen siendo desarrollados para su uso clínico a fin de evitar los vómitos inducidos por la quimioterapia, desórdenes neurológicos y psiquiátricos, desórdenes respiratorios, cardiovasculares e inmunes y dolor crónico.⁸¹

Cabe destacar que, recientemente, se ha podido constatar la presencia de una mayor cantidad de receptores NK1 en la membrana celular de las células cancerosas, convirtiendo a estos receptores en una diana terapéutica más importante aún y aumentando el interés en el

desarrollo de antagonistas de la SP como posibles inhibidores del crecimiento del tumor.⁸² En base a esta premisa, se plantea el desarrollo del primer capítulo de esta Tesis Doctoral.

- **Características estructurales de los antagonistas de los receptores NK1**

Tras el descubrimiento de CP-96,345 ((2S,3S)-cis-2-(difenilmetil)-N-[(2-metoxifenil)metil]-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-amina) como primer antagonista no-peptídico del receptor NK1, se han desarrollado un gran número de antagonistas de los receptores NK1. Los estudios de relación estructura-actividad han permitido establecer un modelo de farmacóforo, consistente en un esqueleto heterocíclico sustituido con al menos dos anillos aromáticos con orientación *cis* (Esquema **1A**). En algunos casos, la orientación fija entre estos dos grupos aromáticos, puede ser paralela “cara a cara” (Esquema **1Aa**), perpendicular “en forma de T” (Esquema **1Ab**), o una disposición “en forma de L” (Esquema **1Ac**).^{83a}



Esquema 1. (A) Esquema general del farmacóforo antagonista de los receptores NK1 no peptídico. (B) Estructuras y visualización en color de las diferencias y similitudes de algunos antagonistas pioneros del receptor NK1. (C) Antagonistas del receptor NK1 comercializados.

Como esqueletos se han utilizado diferentes heterociclos, tales como la quinuclidina en CP-96,345, la piperidina en CP-99,994, Casopitant y Rolapitant, un anillo de morfolina en

Aprepitant, un anillo de piridina en Netupitant, o una simple cadena acíclica en L-733,060 (Esquema **1B** y **1C**). El uso de un esqueleto heterocíclico saturado con dos carbonos sustituidos implica que la molécula es quiral con al menos dos centros estereogénicos. En concreto, tanto el Aprepitant como el Ralopitant tienen tres centros quirales, y sólo uno de los ocho posibles diastereoisómeros tiene la actividad deseada. Acceder al compuesto deseado como un solo enantiómero es un desafío, requiere mucho tiempo y es muy costoso. El sistema de Merck, desarrollado para la síntesis del Aprepitant, implica un proceso de hidrogenación asimétrica catalítica junto con una transformación diastereoselectiva inducida por cristalización. El diseño de nuevos antagonistas cuya síntesis sea simple y que muestren una elevada actividad constituye una tarea de gran interés.

- **Receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCR)**

Los denominados receptores acoplados a proteínas G o GPCR (G Protein-Coupled Receptors) constituyen una de las mayores familias de receptores celulares y suponen entre el 3-5 % de los genes funcionales del genoma de mamíferos.^{83b} En el ser humano existen más de 800 GPCR diferentes, ubicados en diversos sistemas, que participan en distintas funciones fisiológicas como la visión, el olfato, el gusto, funciones neurológicas, cardiovasculares, endocrinas y reproductivas.⁸⁴ Esto se debe a que dichos receptores pueden unirse a una gran variedad de ligandos de distinta naturaleza y tamaño como hormonas, neurotransmisores, iones, factores de crecimiento, autacoides y proteínas, entre otros,⁸⁵ abriendo una enorme ventana de posibilidades para el tratamiento farmacológico de diversas enfermedades. No es extraño por ello, que se estime que los GPCR sean el blanco terapéutico de al menos un 40 % de los fármacos utilizados en la práctica médica. Por citar algunos de los más destacables, Zyprexa® (antipsicótico) de Lilly Medical, Clarinex® (antihistamínico) de Merck & Co., Zelnorm® (síndrome del intestino irritable y el estreñimiento) de Novartis, Aprepitant Accord® (antiemético, náuseas producidas por la quimioterapia antineoplásica moderada) de Accord Healthcare, Ivemend®

(Fosaprepitant, profármaco del Aprepitant, antiemético, náuseas producidas por la quimioterapia) de Merck, Varubi® o Varuby®, Ralopitant (antiemético, náuseas producidas por la quimioterapia) de Tesaro, Akynzeo®, Netupitant (antiemético, náuseas producidas por la quimioterapia) de Helsinn Birex, o recientemente aprobado Rezonnic® o Zunrisa® (Casopitant, antiemético, náuseas producidas por la quimioterapia) de GlaxoSmithKline.^{86a,b} Como veremos más adelante, el Aprepitant constituye un pilar fundamental en el planteamiento de nuestro trabajo.

Todos los miembros de esta familia de receptores comparten una organización estructural característica, están constituidos por una cadena de aminoácidos en forma de α -hélice cuyo extremo amino terminal se localiza en la parte extracelular y el extremo carboxilo terminal se encuentra en la parte intracelular (citoplasma). La cadena de aminoácidos se dispone formando 7 dominios transmembranales hidrófobos, estos dominios se unen entre sí por tres asas o bucles intracelulares (i1, i2, i3) y tres bucles extracelulares (e1, e2, e3) (Figura 8).⁸⁷ No obstante, los receptores no son estructuras rígidas que alternen sólo dos estados: una conformación activa (unida al ligando) y otra inactiva (sin ligando), sino que pueden adoptar innumerables conformaciones dependiendo del ligando que se les una.^{84,85}

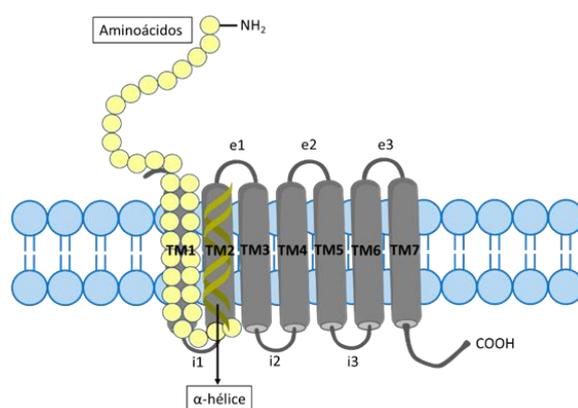


Figura 8. Estructura lineal del receptor acoplado a proteínas G.

Para entender su funcionamiento, explicaremos brevemente la estructura de la proteína G (*guanine nucleotide-binding regulatory proteins*), que puede ser monomérica o heterotrimérica, siendo estas últimas las que nos ocupan. Las proteínas G heterotriméricas están formadas, como su propio nombre indica, por tres subunidades, α , β y γ , que se unen a la membrana plasmática por las subunidades α y γ mediante estructuras hidrofóbicas (ácido graso o isoprenoide) quedando la subunidad β unida a γ . Cuando se encuentran inactivas, una molécula de guanosín difosfato (GDP) está unida a la subunidad α , por el contrario, cuando se activan por la unión de un ligando se provoca el cambio de GDP a guanosín trifosfato (GTP) y la proteína se disgrega quedando por un lado la subunidad α y por otro el dímero β - γ lo cual provoca una respuesta biológica (Figura 9).⁸⁸

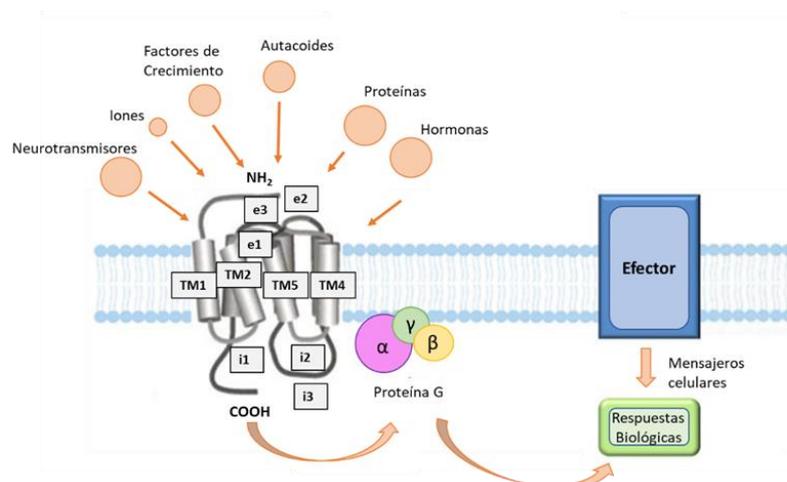


Figura 9. Esquema representativo de los GPCR y su activación. (Imagen modificada de la Tesis Doctoral de la Dra. Rocío Recio).

Una vez descrita la estructura de la proteína G, explicaremos el funcionamiento de los receptores acoplados a dichas proteínas. Cuando se produce la unión de un ligando al receptor,

este cambia su conformación y a su vez provoca cambios conformacionales en los extremos amino y carboxilo de la subunidad α de la proteína G, haciendo que pierda afinidad por GDP y este se separe entrando en su lugar una molécula de GTP (A). La unión de GTP a la subunidad α hace que el trímero se disocie y quede la subunidad α -GTP por un lado y el dímero β - γ por otro (B).^{89,90} Ambas moléculas actúan por separado sobre una amplia gama de efectores diferentes como la adenilato ciclasa, la fosfodiesterasa, la fosfolipasa C o canales iónicos que a su vez ponen en marcha una determinada respuesta biológica. Finalmente, cuando el ligando se separa del receptor, se produce la hidrólisis de GTP a GDP (C) lo que causa la disociación de la subunidad α del efector y se reasocia con el dímero β - γ y todo el sistema vuelve a quedar en reposo, inactivo (D) (Figura 10).^{89,90}

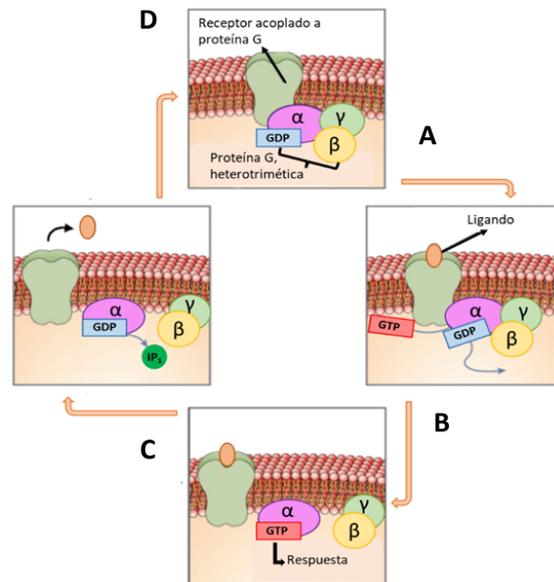


Figura 10. Proceso de activación y desactivación de los receptores acoplados a proteínas G. (Imagen modificada de “Moléculas señaladoras y receptores celulares”: figura 5 de OpenStax College, Biología).

Los GPCR se clasifican en siete familias atendiendo a la homología de su estructura y similitud funcional. De esta forma tenemos:

(i) Clase A, es la familia más grande y representa el 80 % de los GPCR en los seres humanos, son receptores semejantes a la rodopsina. Los receptores clase A se dividen a su vez en 6 grupos o subfamilias: grupo α , grupo β , grupo γ , grupo δ , grupo κ y grupo μ . Dentro del grupo α (receptores aminérgicos) encontramos 6 tipos de receptores:⁹¹ 1) Receptores adrenérgicos, 2) Receptores muscarínicos, 3) Receptores dopaminérgicos, 4) Receptores histaminérgicos, 5) Receptores serotoninérgicos, 6) Receptores de trazas de aminos.

(ii) Clase B, receptores de la familia de la secretina.

(iii) Clase C, receptores metabotrópicos de glutamato.

(iv) Clase D, receptores fúngicos involucrados en la determinación sexual.

(v) Clase E, receptores de AMPc.

(vi) Clase F, Frizzled.

(vii) Familia de adhesión.

En este capítulo nos centraremos en los receptores de clase A, que son la mayoría de los receptores que tienen interés terapéutico, y concretamente en el receptor NK1.

- **El receptor NK1**

El receptor NK1 es un receptor de membrana perteneciente a los GPCR, con estructura similar al resto de receptores pertenecientes a esta familia y de un tamaño aproximado de 47 kDa.

En humanos están presentes dos isoformas del receptor NK1 que se diferencian entre sí en la longitud del extremo carboxilo terminal. De esta forma encontramos una isoforma “larga” que contiene 407 aminoácidos (aa) y otra “corta” compuesta por 311 aa, a esta también se le llama

isoforma truncada. Esta configuración altera la eficiencia con la que el receptor se une a su ligando específico y a sistemas efectores. La isoforma larga del receptor NK1 se localiza en sitios concretos del cerebro humano, mientras que la forma corta está presente en todo el SNC y tejidos periféricos.^{92a,b}

Es de gran interés conocer cómo interaccionan las moléculas con este receptor y para ello es necesario saber la estructura exacta del mismo, la cual fue determinada a finales de 2018.⁹³ De una manera simple y resumida, el sitio de unión del receptor NK1 está formado por un bolsillo profundo cóncavo con una gran región hidrofóbica la cual puede maximizar el contacto entre la proteína y el ligando. La mayoría de los aminoácidos localizados en el fondo del sitio de unión tienen carácter hidrofóbico o anfipático mientras que los localizados en la región superior del sitio de unión tienen carácter hidrofílico y poseen una gran capacidad para donar o aceptar puentes de H.⁹⁴ Este gran hallazgo ha permitido entender mejor las bases moleculares de la selectividad y el reconocimiento del ligando por parte del receptor NK1.

Hasta la fecha, se han descrito las interacciones del receptor NK1 con los antagonistas no peptídicos CP-99,994, Aprepitant y Netupitant, mediante la cristalización del complejo formado por la unión de cada uno de ellos a dicho receptor.⁹⁵ Como se ha explicado anteriormente, cada ligando es capaz de originar modificaciones conformacionales en el sitio de unión del receptor NK1. Mediante el análisis de las interacciones de los diferentes fragmentos presentes en la estructura de estos antagonistas con el receptor NK1, es posible dilucidar qué elementos son claves para un efecto antagonista eficiente.

Para su estudio, se ha dividido la estructura de los tres antagonistas en distintas áreas o fragmentos comunes: un núcleo central (azul claro) y diferentes sustituyentes representados como brazo 1 (morado), brazo 2 (verde) y brazo 3 (naranja) este último presente sólo en el caso del Aprepitant y el Netupitant (Figura 11).⁹³

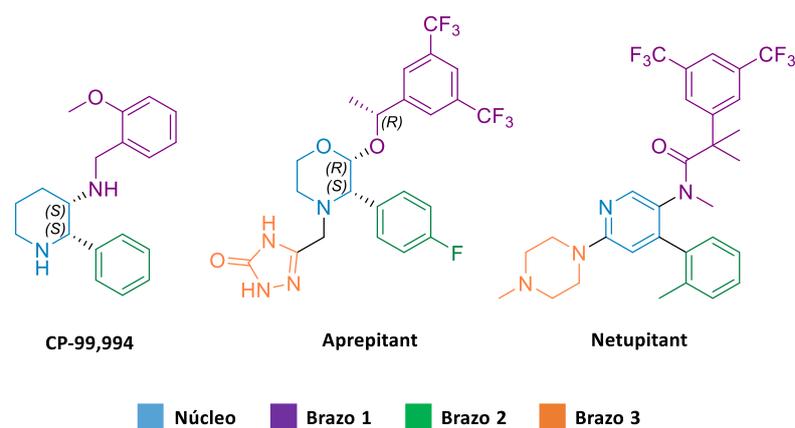


Figura 11. Estructura de los antagonistas CP-99,994, Aprepitant y Netupitant

Como se observa en las tres estructuras de la Figura 12, el núcleo central, el brazo 1 y el brazo 2 interactúan con diferentes aminoácidos del receptor mediante interacciones de tipo hidrofóbicas. Además, el brazo 1 forma puentes de hidrógeno con la región media superior del sitio de unión, aumentando la afinidad por el receptor. En el caso del Aprepitant, el metilo de la posición bencílica interactúa adicionalmente con un pequeño sub-bolsillo hidrófobo presente en el receptor. El brazo 3 presente en el Aprepitant y el Netupitant establece interacciones de tipo hidrofóbicas y por formación de puentes de hidrógeno en diferentes zonas del receptor. De acuerdo con los resultados, para la interacción de los antagonistas con el receptor NK1 es necesaria la presencia de los brazos 1 y 2 como sustituyentes del anillo central de 6 miembros. Sin embargo, la presencia del tercer brazo no parece fundamental para la actividad antagonista, pero otorga una mayor afinidad hacia el receptor NK1. Toda esta información proporciona una base estructural racional del antagonismo de los receptores NK1 y facilita, por tanto, el diseño de nuevos agentes terapéuticos con el receptor NK1 como diana.⁹³⁻⁹⁵

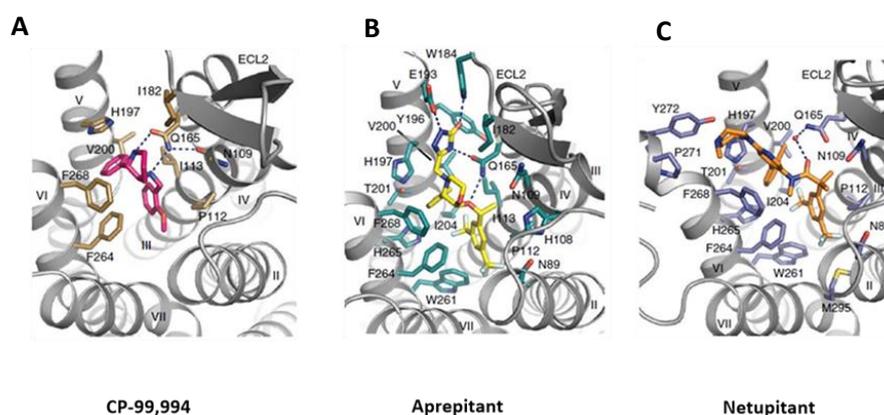


Figura 12. Interacciones de CP-99,994 (A), Aprepitant (B) y Netupitant (C) con el receptor NK1. El receptor NK1 está representado por bucles grises, los residuos del receptor involucrados en la interacción en cada caso aparecen en naranja (A), azul (B) y azul oscuro (C). Las estructuras de los antagonistas en el interior del receptor aparecen en rosa (A), amarillo (B) y naranja (C). Las interacciones por formación de puentes de hidrógeno aparecen como líneas discontinuas.

- **El receptor NK1 y la SP en la proliferación del cáncer**

Como se ha comentado anteriormente, la SP está implicada en numerosos procesos fisiológicos y patológicos y está ampliamente distribuida por el SNC y el SNP. En los últimos años, numerosos autores han defendido que el SNC podría ser capaz de monitorizar y modular la formación de tumores a través de interacciones del eje neuro-inmuno-endocrino, en donde la SP juega un papel fundamental.^{96,97} En este sentido es importante señalar la implicación de la SP en procesos de mitogénesis y neoangiogénesis, tanto de células sanas como tumorales.^{97,98}

La neoangiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos es de vital importancia en la enfermedad del cáncer ya que garantiza oxígeno y alimento para las células cancerosas permitiendo que estas no paren de crecer y dividirse (mitogénesis). Este proceso biológico se ha asociado a un aumento en la expresión de los receptores NK1 en la membrana externa de células

tumorales y se ha demostrado la presencia tanto de la SP como de receptores NK1 en la mayoría de los vasos sanguíneos intra y peritumorales en una gran variedad de los cánceres estudiados.^{99,100} Entre los numerosos estudios llevados a cabo para demostrar la acción favorecedora del crecimiento y proliferación tumoral por parte de la SP al unirse al receptor NK1, cabe destacar la inhibición observada en el proceso de angiogénesis en cáncer hepático en ratones usando Aprepitant como antagonista NK1.¹⁰¹

II.1.2. Objetivos

En base a estos antecedentes, en este capítulo de la presente Tesis Doctoral nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Síntesis de nuevos análogos del Aprepitant.

Con el fin de obtener nuevos antagonistas NK1, efectivos y selectivos, se propone la síntesis de análogos del fármaco Aprepitant, utilizando hidratos de carbono como reactivos de partida, ya que constituyen una alternativa simple y económica para acceder a compuestos heterocíclicos con múltiples centros quirales.

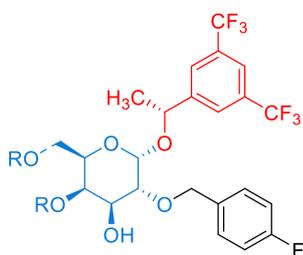


Figura 13. Molécula análoga al fármaco Aprepitant tomando como base quiral la D-galactosa

Entre las diferentes aldohexosas comerciales, seleccionamos D-galactosa como carbohidrato de partida (Figura 13).

La estructura de los análogos que planteamos presenta en la posición anomérica el fragmento 3,5-bis(trifluorometil)bencilo (brazo 1) y el grupo *p*-fluorobencilo en la posición 2 (brazo 2), presentes ambos en el Aprepitant.

2. Determinación de la actividad antagonista NK1 de los derivados sintetizados.

La actividad antagonista de los compuestos se determinará estudiando su capacidad para inhibir la respuesta del receptor NK1, mediante el Test IPone.

3. Estudio de la capacidad anticancerosa de los derivados de D-galactosa sintetizados.

Para valorar la capacidad anticancerosa de los nuevos derivados se realizarán ensayos de citotoxicidad selectiva en diferentes líneas celulares, mediante el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y el ensayo del 7-hidroxi-10-oxidofenoxazina-10-ium-3-ona (Resazurina).

II.2. Resultados y discusión

II.2.1. Síntesis de antagonistas NK1R derivados de D-galactosa

Teniendo en cuenta que cuando se abordó este proyecto no se conocía la estructura del receptor NK1, la aproximación que aplicamos para el diseño de nuevos antagonistas se basa en la analogía con la estructura de uno de los antagonistas conocidos de este receptor, el Aprepitant, un derivado morfolínico con tres centros quirales en su estructura. Una alternativa simple y económica para acceder a compuestos heterocíclicos con múltiples centros quirales consiste en utilizar reactivos de partida que ya dispongan de una quiralidad definida, como es el caso de los carbohidratos.

Los hidratos de carbono son compuestos con una gran riqueza estereoquímica, presentan un gran número de centros quirales, con grupos hidroxilos en prácticamente todos los carbonos, lo que permite modular fácilmente sus características estéricas, electrónicas y tridimensionales. Además, son biomoléculas abundantes, accesibles a gran escala y de bajo precio.

En concreto, la estructura del derivado que planteamos incorporaría en la posición anomérica el fragmento 3,5-bis(trifluorometil)bencilo, presente en muchos antagonistas de los receptores NK1, incluyendo todos los comercializados actualmente. Por otra parte, como segundo fragmento aromático, proponemos la incorporación en la posición 2 del carbohidrato, el grupo *p*-fluorofenilo presente en el Aprepitant, Fosaprepitant, y otros antagonistas selectivos descritos anteriormente. Por último, la presencia de los hidroxilos de las posiciones 3, 4 y 6 del carbohidrato, brindan la oportunidad de introducir diferentes grupos, como el *O*-benciliden acetal (Figura 14), permitiendo modular la lipofilia de los correspondientes derivados. Hay que tener en cuenta que cuando los grupos aromáticos 3,5-bis(trifluorometil)bencilo y *p*-fluorofenilo se encuentran en la cara α del anillo de piranosa, se puede establecer entre ellos una interacción intramolecular de tipo π - π stacking que se ha propuesto que desempeña un papel importante en su actividad antagonista.

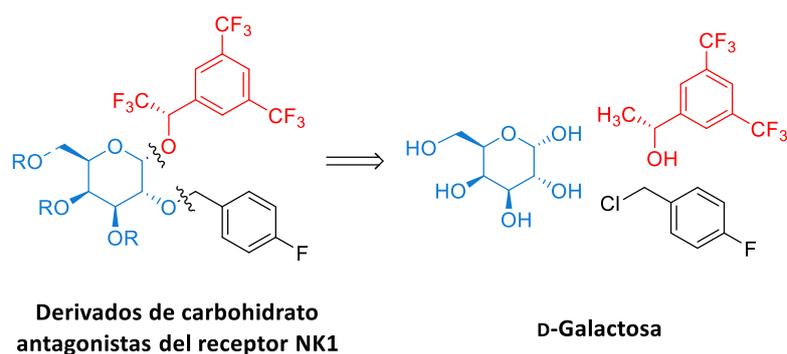
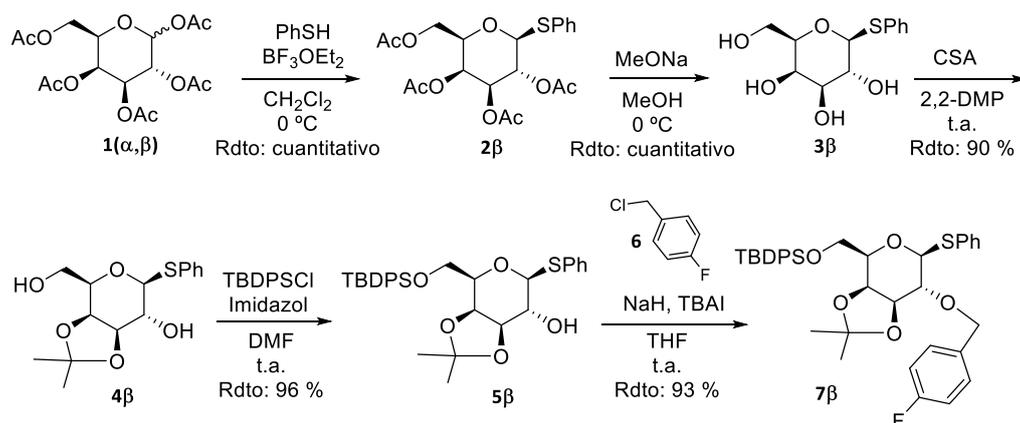


Figura 14. Estructura general y esquema retrosintético del antagonista del receptor NK1 basado en el carbohidrato D-galactosa.

Para llevar a cabo nuestro objetivo, la elección del carbohidrato inicial, así como la secuencia seguida para implementar los sustituyentes es crucial. Desde un punto de vista sintético, se trata de utilizar el azúcar adecuado y una secuencia sintética que permita la funcionalización selectiva del hidroxilo en C2, e introducir el aglicón en la cara α del carbohidrato. Teniendo en cuenta estas consideraciones, entre todas las hexopiranosas, seleccionamos la D-galactosa debido a la diferente reactividad de sus grupos hidroxilos, gracias a la disposición *cis* de los hidroxilos en C3 y C4. Además, tendremos en cuenta que la glicosilación en disposición α , requiere de la presencia de un grupo no participante en el C2 durante dicha etapa.

Por lo tanto, utilizando pentaacetato de D-galactosa (α , β) como reactivo comercial de partida, la primera etapa de nuestra ruta sintética ha consistido en la tioglicosilación por tratamiento con tiofenol en presencia de trifluoruro de boro eterato, rindiendo cuantitativamente el feniltioglicósido correspondiente, como un único anómero **2 β** . A continuación, se realizó una desacetilación de Zemplén, utilizando una cantidad catalítica de MeONa como base en MeOH a 0 °C, para dar el derivado tetrahidroxilado **3 β** . Seguidamente, tiene lugar la formación del 3,4-isopropilidén acetal **4 β** , mediante el tratamiento con una cantidad catalítica de ácido 10-canforsulfónico en 2,2-dimetoxipropano (2,2-DMP), con un rendimiento del 90 % (Esquema **2**).



Esquema 2. Síntesis del derivado de *p*-fluorobencil D-galactosa (**7β**)

La introducción regioselectiva del fragmento aromático *p*-fluorobencílico en la posición 2 se basa en la diferencia de reactividad que presentan los hidroxilos primario y secundario. En concreto, la sililación regioselectiva del alcohol primario de **4β** con cloruro de *tert*-butildifenilsililo e imidazol, en DMF a t.a., rinde el derivado mono hidroxilado **5β** con alto rendimiento (96 %). A continuación, se introdujo el fragmento *p*-fluorobencílico en el C2 utilizando NaH como base y añadiendo yoduro de tetrabutilamonio y cloruro de *p*-fluorobencilo en THF. De este modo, en tan solo cinco pasos se ha sintetizado el derivado **7β** con muy buen rendimiento global (Esquema 2).

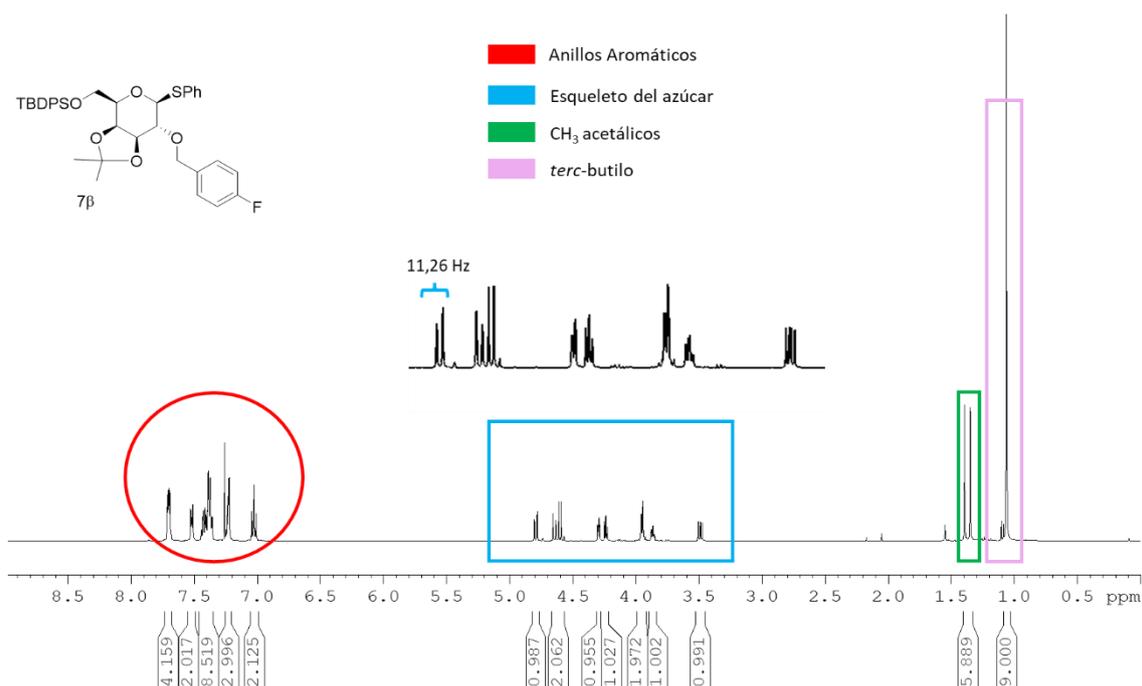
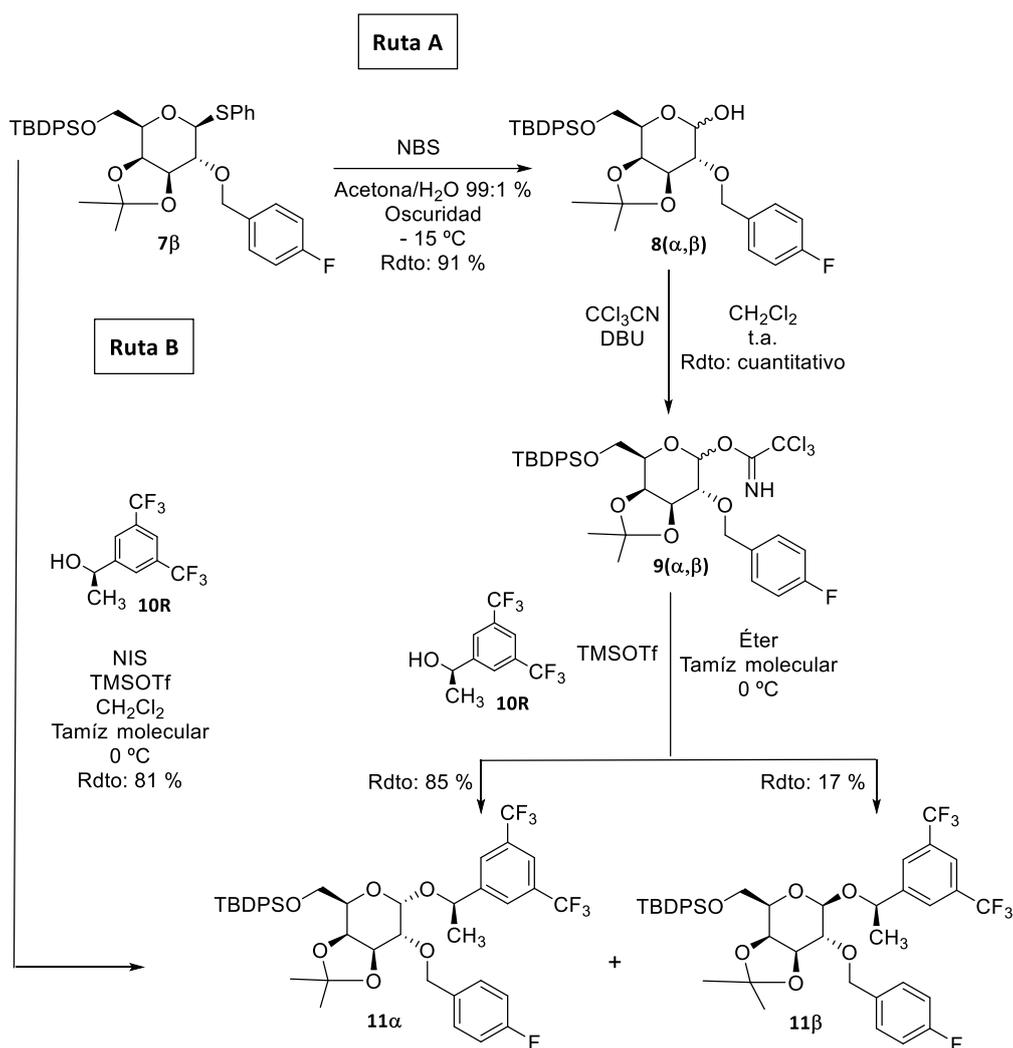


Figura 15. Espectro ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto **7β**.

En la Figura 15 se muestra el espectro de RMN de protones de **7β**, donde se pueden observar las señales correspondientes a los protones de los anillos aromáticos (círculo rojo), al esqueleto del azúcar (recuadro azul), los dos CH₃ correspondientes al acetal formado entre los hidroxilos de las posiciones 3 y 4 (recuadro verde) y por último los tres grupos CH₃ del *tert*-butilo del silileter presente en el C6 (recuadro violeta). Se muestra también la zona del esqueleto del azúcar ampliada, para poder apreciar con más claridad que se trata del anómero β, ya que la constante de acoplamiento $J_{1,2}$ de la señal del protón anomérico tiene un valor de 11,26 Hz, como corresponde a una disposición *anti* de los protones acoplados de las posiciones 1 y 2.

La introducción del fragmento (*R*)-1-[3,5-bis(trifluorometil)-fenil]etan-1-ol en la posición anomérica se llevó a cabo siguiendo dos aproximaciones diferentes (Ruta A y B), como se indica

en el Esquema 3. La primera ruta (Ruta A, Esquema 3) está basada en la reacción de glicosilación del tricloroacetimidato correspondiente. Para ello, el tratamiento de compuesto **7 β** con NBS en acetona húmeda rinde la mezcla de ambos anómeros del lactol **8(α , β)**, en proporción 1:3, que mediante tratamiento posterior con tricloroacetoniitrilo, catalizado con DBU, rinde el tricloroacetimidato correspondiente como una mezcla 1:2 de los anómeros, **9 α** y **9 β** . A continuación, se llevó a cabo la glicosilación sobre la mezcla de ambos tricloroacetimidatos diastereoisómeros con el alcohol quiral (*R*)-1-[3,5-bis(trifluorometil)-fenil]etan-1-ol (**10*R***) en presencia de triflato de trimetilsililo, obteniéndose la mezcla de anómeros del derivado *O*-glicosilado **11(α , β)**, que fueron fácilmente separados mediante columna cromatográfica dando como resultado los *O*-glicosilderivados **11 α** y **11 β** con un rendimiento de 83 % y 17%, respectivamente.



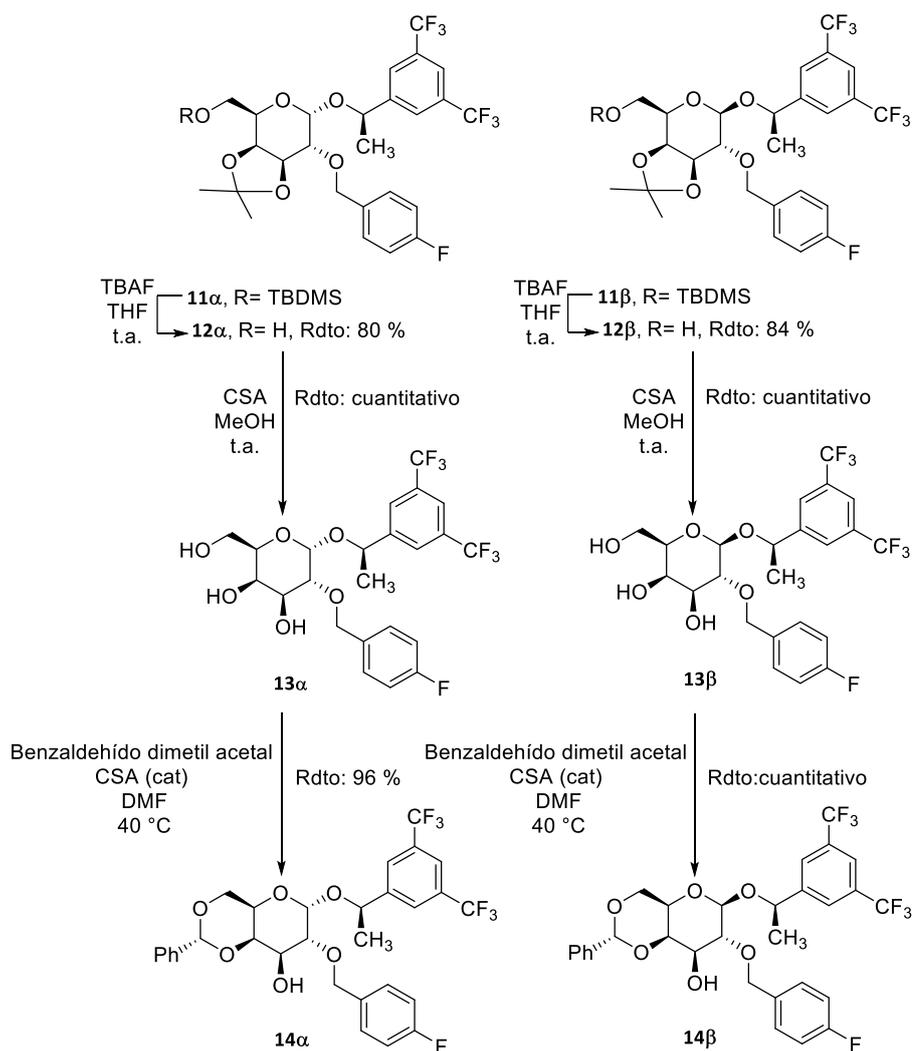
Esquema 3. Síntesis de **11α** y **11β** por glicosilación del derivado **7β** de *p*-fluorobencil D-galactosa.

Como ruta alternativa (Ruta B, Esquema 3), el alcohol (*R*)-1-[3,5-bis(trifluorometil)-fenil]etan-1-ol (**10R**) fue incorporado en la posición anomérica utilizando el tioglicósido **7β** como donador de glicosilo y una mezcla de NIS/trifluorometanosulfonato de trimetilsililo como activador en

presencia de tamiz molecular (4 Å). Se obtuvo así una mezcla equimolecular de ambos anómeros **11**(α , β) con alto rendimiento (81 %).

Por lo tanto, ambas rutas nos han permitido obtener lo que ya pueden considerarse como primeros análogos del Aprepitant, que se caracterizan por ser derivados conformacionalmente rígidos de D-galactosa debido a la presencia del acetal cíclico condensado con el anillo de piranosa.

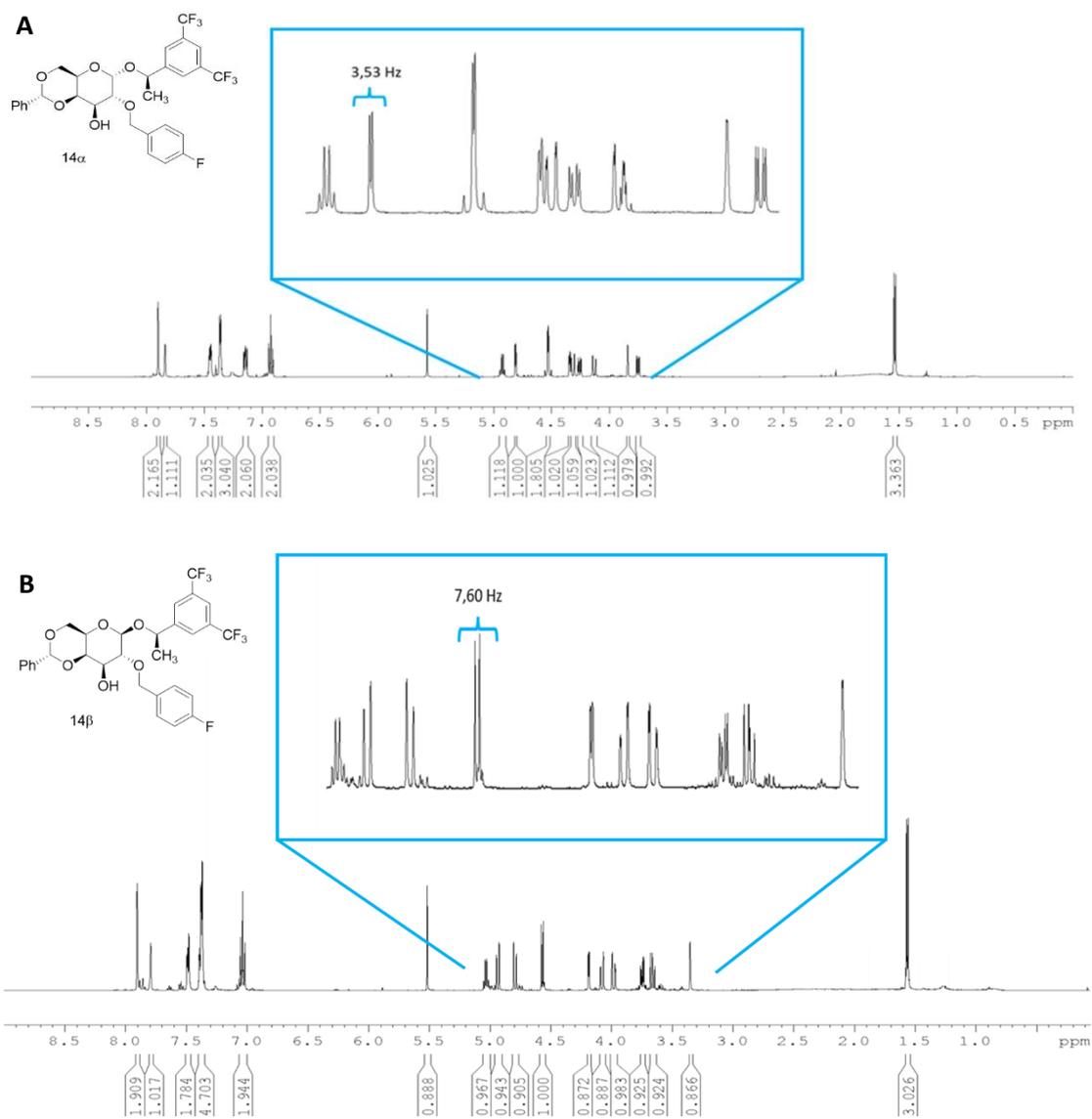
A pesar de que la mayoría de los análogos de antagonistas de los receptores NK1 conocidos, el isómero *cis* (en C1-C2), que en nuestro caso correspondería al anómero α , es el que presenta mayor actividad, decidimos estudiar la actividad de ambos anómeros. Por lo tanto, una vez separados cromatográficamente, aplicamos de forma paralela la misma ruta sintética con cada anómero.



Esquema 4. Desprotección y protección de los grupos hidroxilos en las posiciones 3,4 y 6 de los derivados de D-galactosa.

A continuación, se realizó la desprotección de los grupos hidroxilos en las posiciones C3, C4 y C6, y las siguientes incorporaciones de grupos protectores en ambos anómeros (Esquema 4). Esto nos brinda la oportunidad de modular la lipofilia de los derivados y, al mismo tiempo,

estudiar la relación estructura-actividad. La desililación del *O*-silil éter en la posición C6 de ambos anómeros de **11** con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) condujo al compuesto monohidroxilado **12** con buenos rendimientos (80 y 84 % para α y β respectivamente). La hidrólisis ácida del 3,4-dimetil acetal de **12 α** y **12 β** proporcionó el derivado trihidroxilado con rendimiento cuantitativo para ambos anómeros **13 α** y **13 β** . Finalmente, la formación del 4,6-*O*-benciliden acetal, nos permite obtener los correspondientes monoalcoholes con rendimientos del 95 % para **14 α** y cuantitativo para **14 β** (Esquema 4). Como veremos más adelante, en estos derivados la presencia del anillo de fenilo de la función acetálica resulta ser fundamental ya que permite establecer nuevas interacciones hidrófobas y/o estabilizadoras de tipo π - π stacking con algunos aminoácidos del receptor NK1. En la Figura 16 se representan los espectros de RMN de protones de ambos bencilidenderivados **14 α** y **14 β** .



En la zona del espectro de RMN correspondiente al esqueleto del azúcar de ambos diastereoisómeros (Figura 16), se observa que se trata de productos diastereomericamente puros que presentan patrones de acoplamientos diferentes.

Por último, cabe destacar que en la última etapa de protección regioselectiva de los carbonos C4 y C6 de los anómeros **13 α** y **13 β** trihidroxilados, se genera un nuevo centro estereogénico en el carbono acetálico, observándose la formación de sólo uno de los dos posibles bencilidenacetales diastereoisómeros. La configuración asignada al compuesto formado corresponde al producto termodinámicamente más estable que dispone el grupo Ph en ecuatorial. Para confirmar esta asignación, es decir, la configuración absoluta *R* del carbono acetálico, tanto para el diastereoisómero **14 α** como para el **14 β** , se realizaron experimentos selectivos NOESY1D, cuyos resultados se recogen en las Figuras 17 y 18 respectivamente.

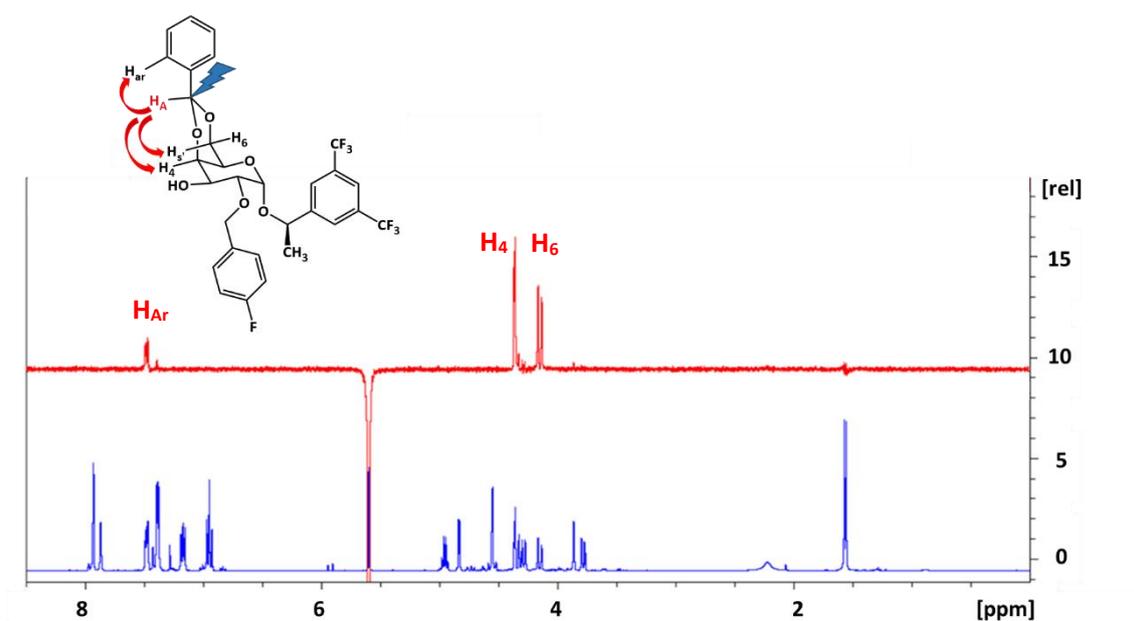


Figura 17. Asignación de la configuración del compuesto **14 α** mediante experimentos NOESY1D.

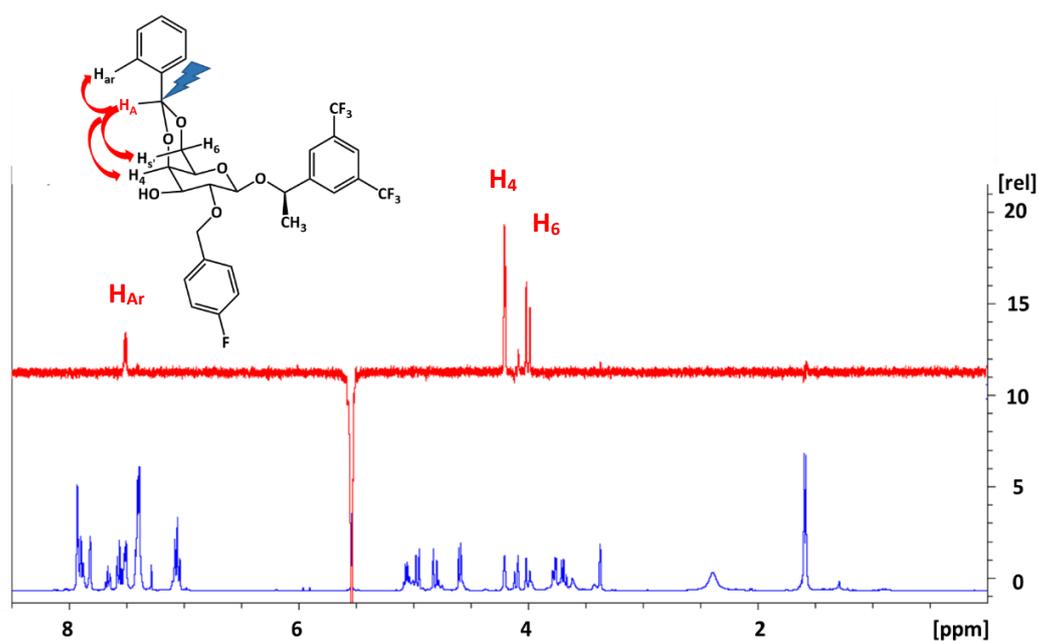


Figura 18. Asignación de la configuración del compuesto **14β** mediante experimentos NOESY1D.

Estos espectros NOESY1D, con excitación selectiva del protón del acetal, mostraron tres conjuntos de señales correspondientes al protón aromático, H4 y H6 del azúcar. Si bien las interacciones NOE observadas con el protón aromático y H6 sería compatible con ambas configuraciones del carbono acetálico, la interacción NOE observada con H4 es claramente indicativa de la configuración *R* para el C del acetal.

II.2.2. Actividad anticancerosa

En primer lugar, se procedió a evaluar la citotoxicidad de los derivados **12α**, **12β**, **13α**, **13β**, **14α** y **14β** frente a dos líneas celulares: células sanas de pulmón MRC-5 y células de cáncer de pulmón A549, usando el ensayo de viabilidad celular MTT (descrito en la parte experimental).

Es importante recordar que una limitación clave de la mayoría de los medicamentos anticancerosos es que, además de dirigirse a las células cancerosas, también actúan sobre las células sanas, por lo que, al desarrollar nuevos agentes anticancerosos, resulta imprescindible llevar a cabo estudios de selectividad citotóxica utilizando como control células sanas que tengan un índice de replicación similar a las cancerosas.

En nuestro estudio, ambas líneas celulares fueron expuestas a diferentes concentraciones de los derivados sintetizados durante 48 h antes de cuantificar la viabilidad celular. Como compuestos de referencia se utilizaron el propio Aprepitant, como fármaco con actividad antagonista de los receptores NK1 que presenta también una capacidad citotóxica demostrada, y el Cisplatino, fármaco anticanceroso utilizado en quimioterapia para el tratamiento de varios tipos de cánceres y los resultados obtenidos se indican en la Tabla 1. En esta tabla se recogen los valores de IC₅₀ para ambas líneas celulares y el índice de selectividad (IS) calculado dividiendo el valor de IC₅₀ obtenido en la línea celular sana entre el de la línea celular cancerosa. En azul se indica el compuesto que muestra mayor selectividad.

Tabla 1. Valores de IC₅₀ de los derivados de carbohidratos sintetizados, Aprepitant y Cisplatino en células de cáncer de pulmón (A549) vs células sanas de pulmón (MRC-5). ^a El índice de selectividad es la media de los índices de selectividad calculados en cada experimento individual.

Entrada	Compuestos	IC ₅₀ (Media ± SEM; μM)		Índice de Selectividad ^a
		MRC-5	A549	
1	12α	27,8 ± 5,7	18,7 ± 0,2	1,5 ± 0,3
2	12β	39,7 ± 4,2	23,4 ± 3,8	1,7 ± 0,2
3	13α	92,23 ± 16,7	46,4 ± 10,0	2,5 ± 0,4
4	13β	155,7 ± 29,6	67,5 ± 18,2	2,5 ± 0,3
5	14α	248,2 ± 113,0	23,1 ± 6,9	23,0 ± 9,4
6	14β	130,8 ± 10,7	29,7 ± 5,1	5,8 ± 1,0
7	Aprepitant	28,9 ± 6,8	18,3 ± 3,4	1,5 ± 0,1
8	Cisplatino	97,8 ± 57,7	14,8 ± 3,8	5,6 ± 3,9

Como puede observarse en la Tabla 1, todos los derivados de carbohidratos estudiados mostraron cierta citotoxicidad selectiva frente a la línea celular cancerosa, es decir, para una concentración dada, las células cancerosas A549 son más sensibles que las células sanas MRC-5. Los isopropilidenacetales **12 α** , **12 β** , y el Aprepitant, presentan una importante actividad citotóxica pero baja selectividad con valores de IS entre 1,5 y 1,7 (entradas **1**, **2** y **7**, Tabla 1). Los derivados trihidroxilados **13 α** y **13 β** mostraron una menor actividad, con valores de IC₅₀ superiores, pero una selectividad algo superior, con valores de IS que indican que la línea celular cancerosa A549 es aproximadamente 2 veces más sensible a los compuestos que la línea celular sana MRC-5 (entradas **3** y **4**, Tabla 1). El compuesto **14 β** , presentó una actividad y selectividad significativamente superior, similar esta última a la del Cisplatino (entradas **6** y **8**, Tabla 1). De todos los derivados sintetizados, la citotoxicidad selectiva más alta corresponde al diastereoisómero **14 α** , con un IS superior al del Cisplatino y unos valores de IC₅₀ relativamente bajos (**23,1 ± 6,9 μ M**) (entrada **5**, Tabla 1). En general, los nuevos análogos sintetizados mostraron una selectividad igual o superior a la del Aprepitant.

El análisis de estos resultados muestra que, por un lado, la desprotección de los grupos hidroxilo en las posiciones C3, C4, y C6 en los derivados **12 α** y **12 β** va asociada a una disminución de la actividad citotóxica (compuestos **13 α** y **13 β**) aunque se duplica la selectividad. Por otro lado, la protección de los hidroxilos en C4 y como bencilidenacetal en el compuesto **14** aumenta de forma muy significativa la selectividad sin comprometer la citotoxicidad contra las células cancerosas (entradas **5** y **6**, Tabla 1). Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados, seleccionamos el compuesto **14 α** como el compuesto óptimo para profundizar en los estudios de actividad anticancerosa.

A continuación, se procedió a estudiar la citotoxicidad de **14 α** frente a otras líneas celulares cancerosas, de mama y piel, MCF-7 (células cáncer de mama) y UACC-62 (células cáncer de piel) y las correspondientes líneas celulares sanas, MCF-10 (células sanas de mama) y VH-10 (células

sanas de piel). Para medir la viabilidad celular, al igual que anteriormente, se utilizó el ensayo MTT, exponiendo las distintas líneas celulares durante 48 h a diferentes concentraciones del derivado **14α** (0, 3, 10, 32, 100, 320 μM).

Por una parte, los datos obtenidos nos muestran una citotoxicidad 10 veces superior frente a las células de cáncer de mama MCF-7 que frente a las células sanas MCF-10, con valores de IC₅₀ 23,9 ± 5,0 y 291,3 ± 52,6 respectivamente (Figura 19). De forma análoga, mostró una actividad citotóxica selectiva frente a la línea celular de melanoma UACC-62. En este caso, las células cancerosas fueron 4,3 veces más sensibles al efecto citotóxico de **14α** que las células sanas VH-10, con valores de IC₅₀ 31,9 ± 6,0 y 117,9 ± 12,3 respectivamente (Figura 19). Por lo tanto, el compuesto seleccionado **14α** mostraba una citotoxicidad similar frente a los tres tipos de líneas celulares cancerosas estudiadas hasta ese momento, A549, MCF-7 y UACC-62, con valores de IC₅₀ comprendidos entre 25 y 30 μM.

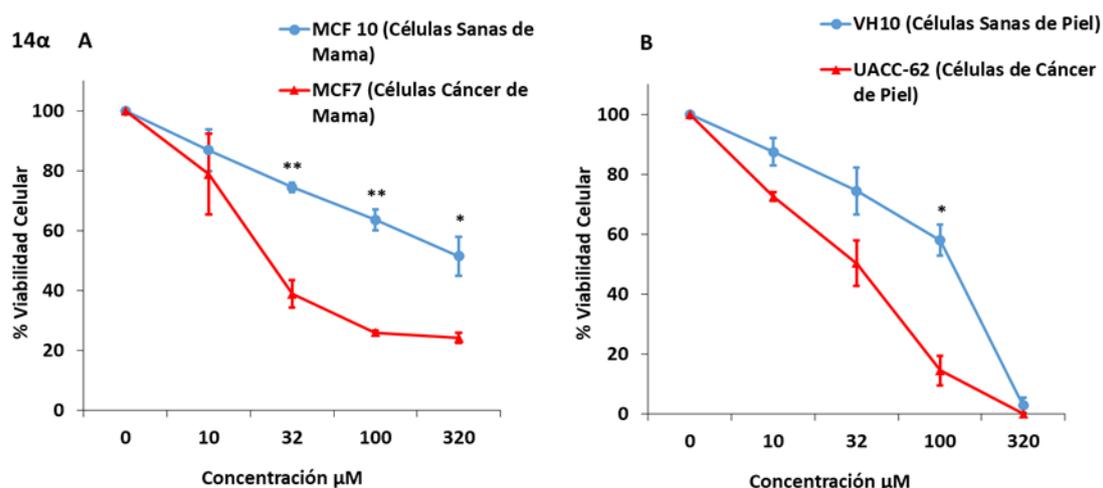


Figura 19. Estudios de viabilidad celular del compuesto **14α** frente a células de mama (A) y células de piel (B).

Ante estos buenos resultados, decidimos extender el estudio a nuevas líneas celulares para evaluar la amplitud del espectro de acción de **14 α** como agente anticanceroso. En este caso la viabilidad celular se estudió mediante el ensayo de resazurina. Para dicho estudio se utilizaron trece líneas celulares cancerosas humanas nuevas: HT-29 (célula de cáncer colorrectal humanas), A64-CLS (células de adenoma de la glándula submaxilar humanas), T-24 (células de cáncer de vejiga humanas), MDA-MB-231 (células de cáncer de mama triple negativo humanas), GAMG (células de glioblastoma humanas), HNO-97 (células de cáncer de lengua humanas), MeWo (células de cáncer de piel humanas), PC-3 (células de cáncer de próstata humanas), Sk-Br-3 (células de cáncer de mama HER2 positivas humanas), An3Ca (células de cáncer de endometrio humanas), Sk-OV-3 (células de cáncer de ovarios humanas), HepG-2 **2** (células de cáncer de hígado humanas) y KATO-III (células de cáncer de estómago humanas). Para realizar estos ensayos, se aumentó el tiempo de exposición de las células al compuesto **14 α** , concretamente 96 h, teniendo en cuenta que algunas de estas líneas tienen ciclos celulares más largos (24-48 h). Para el estudio de selectividad, como célula sana de referencia se utilizó la línea celular HaCaT (células sanas de piel humanas). Como fármaco anticanceroso de referencia se utilizó el Cisplatino. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla **2**.

Tabla 2. Valores de IC₅₀ e índice de selectividad de los compuestos **14α** y Cisplatino en distintas líneas celulares humanas.

Entrada	Líneas Celulares	14α		Cisplatino	
		IC ₅₀ (Media ± SEM; μM)	Índice Selectivo (vs. HaCaT: media ± SEM)	IC ₅₀ (Media ± SEM; μM)	Índice Selectivo (vs. HaCaT: media ± SEM)
1	HaCaT	596,6 ± 8,7		2,1 ± 0,7	
2	GAMG	183,8 ± 1,9	3,2 ± 0,0	3,2 ± 0,9	0,7 ± 0,0
3	HNO97	175,1 ± 73,9	4,1 ± 1,7	2,5 ± 0,4	0,8 ± 0,1
4	A64-CLS	236,5 ± 15,7	2,5 ± 0,2	4,5 ± 1,2	0,5 ± 0,0
5	MeWo	112,9 ± 16,1	5,4 ± 0,8	2,2 ± 1,1	1,0 ± 0,1
6	T-24	490,8 ± 249,5	1,7 ± 0,8	1,6 ± 0,5	1,3 ± 0,0
7	PC-3	149,4 ± 44,0	4,4 ± 1,2	3,1 ± 0,2	0,7 ± 0,2
8	Sk-Br-3	192,4 ± 14,8	3,1 ± 0,2	4,3 ± 0,9	0,5 ± 0,1
9	MDA-MB-231	332,2 ± 32,8	1,8 ± 0,2	10,2 ± 6,3	0,3 ± 0,1
10	AN3Ca	137,9 ± 6,4	4,3 ± 0,1	1,8 ± 1,4	2,1 ± 1,2
11	Sk-OV-3	153,1 ± 28,4	4,0 ± 0,8	4,3 ± 0,5	0,5 ± 0,2
12	KATO-III	28,8 ± 11,7	24,7 ± 9,8	1,8 ± 0,2	1,2 ± 0,5
13	HepG2	133,3 ± 95,9	9,4 ± 6,8	1,8 ± 0,2	1,2 ± 0,2
14	HT-29	256,0 ± 107,9	2,9 ± 1,2	4,9 ± 0,8	0,4 ± 0,1

El compuesto **14α** mostró baja actividad y selectividad en el caso de las líneas de cáncer de, T-24 y MDA-MB-231 con IS de 1,7 aproximadamente (entradas **6** y **9**, Tabla **2**), y una actividad moderada algo menos que el doble, frente a las células de cáncer A64-CLS y HT-29 con valores entre 2,5 y 2,9 respectivamente (entradas **14** y **4**, Tabla **2**). Presentan una marcada actividad citotóxica selectiva frente a GAMG, HNO-97, MeWo, PC-3, Sk-Br-3, An3Ca y Sk-OV-3, valores

inferiores de IC₅₀ e índices de selectividad superiores a 3 (entradas **2**, **3**, **5**, **7**, **8**, **10** y **11**, Tabla **2**).

Los mejores resultados se obtuvieron con las líneas celulares de cáncer, HepG-2 y KATO-III, que fueron al menos 9 veces más vulnerables al compuesto **14α** que las células sanas HaCaT (entradas **13** y **12**, Tabla **2**). En este sentido, se observa la mayor actividad citotóxica frente a las células KATO-III (entrada **12**, Tabla **2**).

En todos los casos la actividad citotóxica del Cisplatino es superior a la de **14α**, sin embargo, resulta interesante hacer un estudio comparativo de la selectividad de ambos compuestos, como se representa en la gráfica de la Figura **20**.

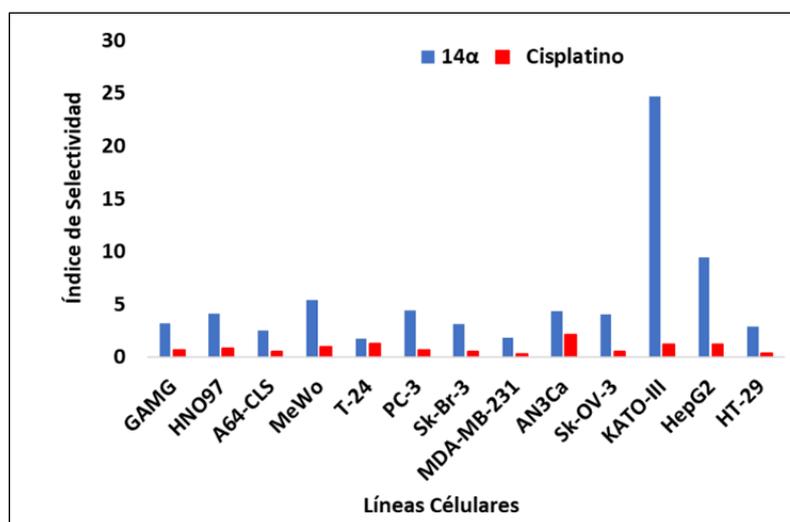


Figura 20. Gráfica comparativa de los índices de selectividad del compuesto **14α** y el fármaco anticanceroso cisplatino sobre distintas líneas celulares.

Como puede observarse en la figura anterior, la mayor diferencia de selectividad a favor de **14 α** se observa, sobre todo, por orden descendente, en las líneas celulares KATO-III y HepG-2, seguidas de MeWo, PC-3 y HNO97.

La mayor selectividad de los antagonistas NK1 como anticanceroso podría justificarse teniendo en cuenta que, como se indicó anteriormente, los receptores NK1 se encuentran implicados en la proliferación celular y están sobreexpresados en la membrana de las células tumorales, así como, en la mayoría de los vasos sanguíneos intra y peritumorales de los cánceres estudiados.

- **Estudios de los mecanismos de acción responsables de la actividad anticancerosa**

Una vez comprobada la capacidad anticancerosa selectiva del compuesto **14 α** , nuestro siguiente objetivo fue estudiar el posible mecanismo implicado en dicha capacidad.

En primer lugar, nos planteamos si la **inhibición de la glucólisis** podría ser uno de los posibles mecanismos involucrado en la actividad anticancerosa selectiva de nuestros derivados. Las células tumorales necesitan una mayor cantidad de energía para sobrevivir que las células normales. Una de las principales rutas para obtener energía es la glucólisis, en la cual, a partir de la oxidación de una molécula de glucosa dos moléculas de NAD⁺ son reducidas a NADH y se obtienen dos moléculas de ATP y dos piruvatos. Las dos moléculas de ATP pueden utilizarse como fuente de energía inmediata para realizar el trabajo metabólico. Así mismo, la molécula de NADH puede reducir el piruvato a lactato (fermentación láctica) esto hace posible oxidar el NADH a NAD⁺ de nuevo, y permite que la glucólisis continúe y se siga generando ATP.^{102,103,104}

En consecuencia, decidimos medir la concentración de glucosa y lactato en células cancerosas A549 sin tratar y en células expuestas durante 8 h a **14 α** y a dicloroacetato (por separado), un conocido inhibidor de la glucólisis. A diferencia del dicloroacetato, **14 α** no reduce el consumo

de glucosa o la producción de lactato, lo que indica que dicho compuesto no interfiere (inhibe) en el proceso de la glucólisis (Figura 21).

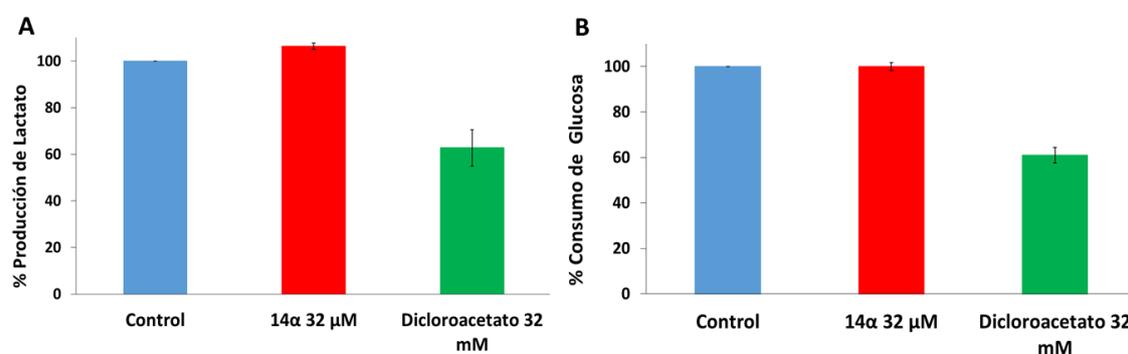


Figura 21. Gráficas comparativas de la producción de lactato (A) y la consumición de glucosa (B) para el compuesto **14α** y el conocido inhibidor de la glucólisis dicloroacetato. Como control se utilizaron células cancerosas A549 sin ningún tipo de tratamiento.

Descartado este primer supuesto, nos centramos en las **especies reactivas de oxígeno (ROS)**. Las especies reactivas de oxígeno se producen como consecuencia del metabolismo fisiológico aeróbico normal de la célula. La cadena de transporte de electrones en las mitocondrias, los peroxisomas, las NADPH oxidasas, la óxido nítrico sintasa desacoplada (NOS) y el sistema del citocromo P450 son las fuentes más importantes de producción de ROS. Las ROS son moduladores cruciales de las funciones celulares.¹⁰⁵ En bajas concentraciones, son esenciales en la señalización celular, la inducción de la respuesta mitogénica o la participación en la defensa contra agentes infecciosos. Sin embargo, un exceso o desequilibrio en la producción de ROS provoca estrés oxidativo y daños celulares irreversibles, induciendo pérdida de la viabilidad celular y promoviendo la proliferación celular ilimitada en procesos tumorales.¹⁰⁶

Esto último es de gran interés, ya que es bien conocido que el nivel basal de especies reactivas de oxígeno en células tumorales es mayor que en células sanas, lo que, a su vez, provoca que las

células tumorales sean más sensibles a la inducción exógena de ROS.^{106,107} Partiendo de esta premisa, diversos estudios muestran que el Aprepitant y otros antagonistas de los receptores NK1 como SR140333 (Figura 22) aumentan la producción mitocondrial de ROS y provocan la muerte celular programada (apoptosis).¹⁰⁸ Para estudiar si en nuestro caso la generación de ROS se encuentra implicada en el efecto citotóxico selectivo del compuesto **14α**, se trataron las células cancerosas A549 con **14α** durante 48 h en presencia y ausencia de tres antioxidantes: N-acetilcisteína (capacidad antioxidante a través del sistema de glutatión), catalasa (enzima degradante de peróxido de hidrógeno), y Mn (III) pentacloruro de tetrakis (1-metil-4-piridil) porfirina (MnTMPyP, eliminador de aniones superóxido). Los resultados muestran que ninguno de estos tres antioxidantes reduce la citotoxicidad del compuesto **14α** en las células A549, lo que sugiere que los efectos anticancerígenos tampoco están mediados por la producción de ROS (Figura 23).

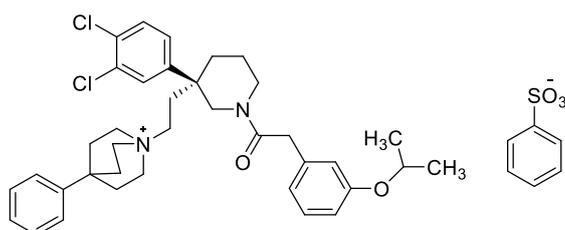


Figura 22. Estructura del benzenosulfonato de 1-[2-[(3S)-3-(3,4-diclorofenil)-1-[(m-isopropoxifenil)acetil]-3-piperidil]etil]-4-fenilquinuclidinio, **SR140333**.

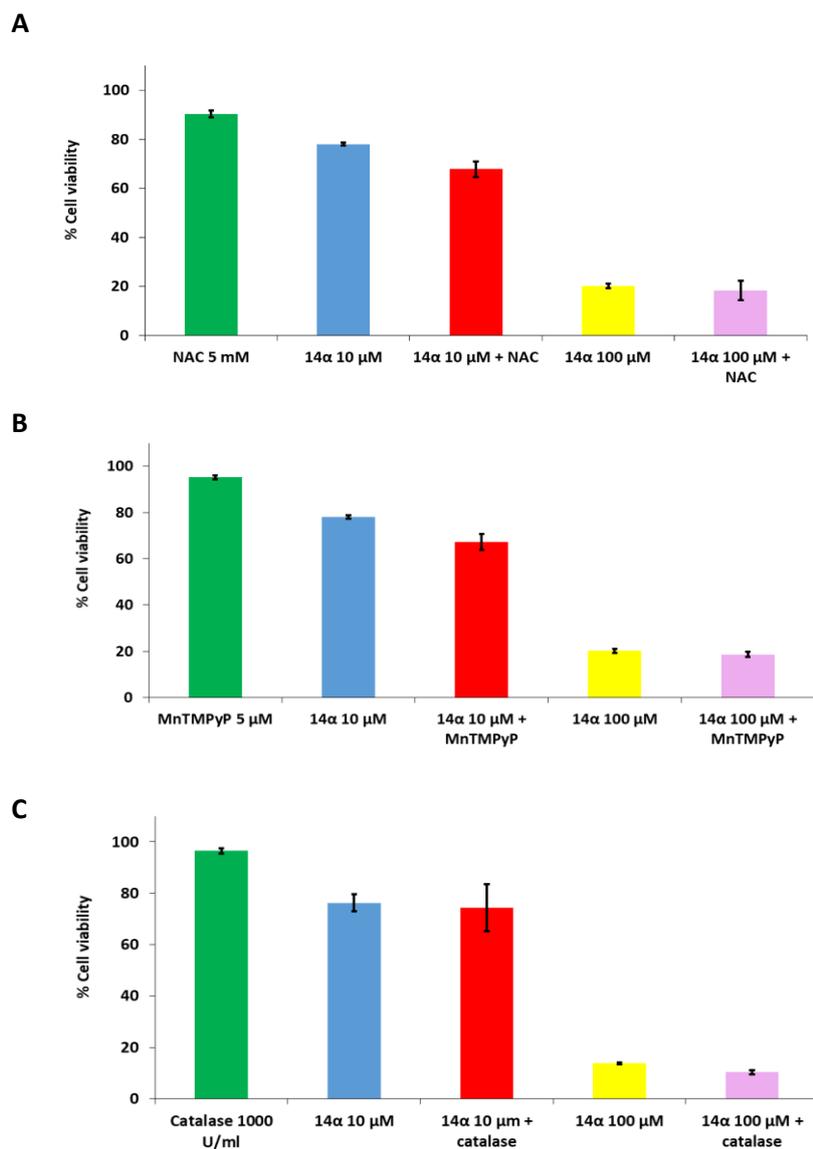


Figura 23. Gráficas comparativas de viabilidad celular tratando a las células A549 con los antioxidantes N-acetilcisteína (A), MnTMPyP (B) y catalasa (C) junto con el compuesto **14α**.

Por último, decidimos estudiar si la actividad anticancerosa selectiva de nuestro compuesto **14α** se debía a que incapacitaba a las células para que reparasen daños ocasionados en el ADN. Los daños en el ADN pueden generar cambios en la expresión de genes, en el crecimiento celular e incluso provocar tumores. Estos daños pueden ser atribuidos a diversos procesos metabólicos tanto endógenos (ROS y nitrógeno) como exógenos (luz ultravioleta, rayos X, ciertos metales).¹⁰⁹ Se ha estimado que cada célula puede experimentar hasta 10^5 lesiones espontáneas en un día, lo cual indica que la molécula de ADN es constantemente agredida y alterada por distintos factores.¹¹⁰

Las células cuentan con mecanismos complejos que vigilan la integridad del ADN activando vías de reparación.^{110,111} Los procesos de reparación del ADN reconocen, remueven y reparan errores en la molécula, constituyendo los principales mecanismos celulares que garantizan la estabilidad genética y, consecuentemente, la propia supervivencia celular.¹¹⁰⁻¹¹² Uno de estos procesos es la recombinación homóloga (RH), la cual detecta y repara daños, especialmente en la fase G2 del ciclo celular.¹¹² Básicamente, se utiliza la información del cromosoma homólogo que coincide con la del dañado (o de una cromátida hermana si el ADN se ha copiado) para reparar la fragmentación. En este proceso se acercan los dos cromosomas homólogos y se utiliza la región sin daños del homólogo o la cromátida como molde para sustituir la región dañada del cromosoma roto. La eficiencia del proceso se debe a la proximidad entre las cromátidas hermanas que tienen información idéntica, de esta forma es activada una cascada de reacciones junto con las proteínas de reparación que bloquean el ciclo celular.^{111,112} Este tipo de medio de restauración es el más utilizado por las células para corregir roturas nocivas que se producen en ambas hebras de ADN, conocidas como roturas de doble hebra (Figura **24**).¹⁰⁹⁻¹¹²

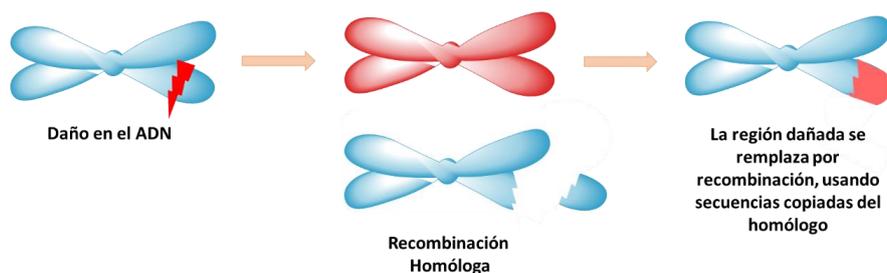


Figura 24. Reparación de ADN celular mediante recombinação homóloga.

En base a esto, muchos fármacos anticancerosos provocan la **inhibición en la síntesis de ADN** bloqueando la horquilla de replicación, o causando daños en el ADN existente, lo que finalmente causa la muerte celular.¹¹³ Diversos tipos de cánceres son deficientes en el mecanismo de recombinação homóloga y por tanto son más sensibles a este tipo de fármacos.^{114,115} Debido a que los datos sugieren que el bloqueo de los receptores NK1 disminuye la síntesis de ADN a través de la vía MAPK,^{116,117} estudiamos si las células que son deficientes en el proceso de recombinação homóloga son más sensibles al compuesto **14 α** .

Para ello, utilizamos el ensayo MTT, tratando las líneas celulares VC-8 (células de pulmón de hámster chino (V-79) mutadas en el gen BRCA2) y VC8B2 (células VC-8 complementadas con el gen BRCA2 humano) deficientes y eficientes en el proceso de RH respectivamente, con nuestro derivado **14 α** durante 24 h. Después de un periodo de recuperación de 48 h, se estimó la viabilidad celular. Las células VC-8 fueron ligeramente más sensibles a **14 α** que las células VC8B2. Los valores de IC₅₀ en VC-8 y VC8B2 fueron 36,5 ± 4,9 y 63,7 ± 11,1 respectivamente. Estos datos sugieren que la posible generación de daño celular producido por **14 α** el cual puede ser reparado por RH, podría contribuir a la citotoxicidad de este compuesto (Figura 25).

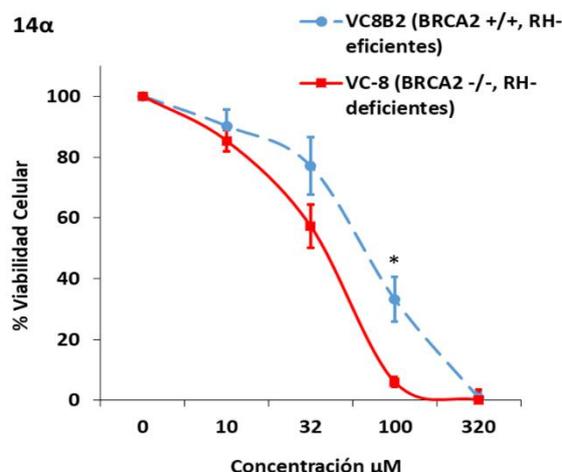


Figura 25. Viabilidad celular del compuesto **14α** en células eficientes (VC8B2) y deficientes (VC-8) en el proceso de recombinación homóloga.

II.2.3. Evaluación del efecto antagonista de los receptores NK1

Por último, se realizaron ensayos para confirmar la actividad antagonista de los nuevos derivados de carbohidratos frente a los receptores NK1 y su correlación con el efecto anticanceroso observado. La actividad antagonista de los compuestos fue determinada usando el test IPone el cual mide su capacidad para inhibir la respuesta de los receptores NK1.

La unión de la SP al receptor NK1 activa a la enzima fosfolipasa C β (PLC β), conduciendo a la hidrólisis de fosfolípidos de membrana derivados del inositol (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂)) que da lugar a la formación de segundos mensajeros intracelulares tales como diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃).¹¹⁸ Por tanto, la medida del nivel de acumulación de IP₃ es un método que indica el acoplamiento del receptor a la proteína G, y de manera indirecta, la afinidad de un ligando por el receptor NK1. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el IP₃ se degrada rápidamente a inositol 4,5-bifosfato (IP₂), siguiendo la cascada de desfosforilación

del inositol hasta mioinositol pasando por inositol 1-monofosfato (IP₁). De hecho, es la cantidad de IP₁ acumulada en la célula la que determinamos experimentalmente. Para llevar a cabo dicho estudio se utiliza, como se ha mencionado anteriormente, el Test IPone.

- **Test IPone**

El test IPone es un inmunoensayo desarrollado por la empresa Cisbio¹¹⁹ que utiliza cloruro de litio para evitar la degradación de IP₁, provocando así su acumulación en la célula y permitiendo su detección. La acumulación de IP₁ es, por tanto, un indicador del funcionamiento del receptor. Ligandos agonistas del receptor NK1 provocarán un aumento de los niveles de IP₁, viéndose éstos reducidos por acción de un ligando con actividad antagonista (Figura 32, parte experimental).

Para llevar a cabo estas medidas se utiliza una técnica de fluorescencia (ver parte experimental) y seleccionamos dos de los derivados que hemos sintetizado: el benzalacetal de D-galactosa **14α**, que presenta la mayor actividad anticancerosa selectiva, y su análogo trihidroxilado **13α**, con una actividad intermedia. Como compuesto control se usó el éster 3,5(bis-trifluorometil)benzílico del N-acetil-L-triptófano (L732,128), cuya actividad antagonista del receptor NK1 es bien conocida a nivel molecular. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 26.

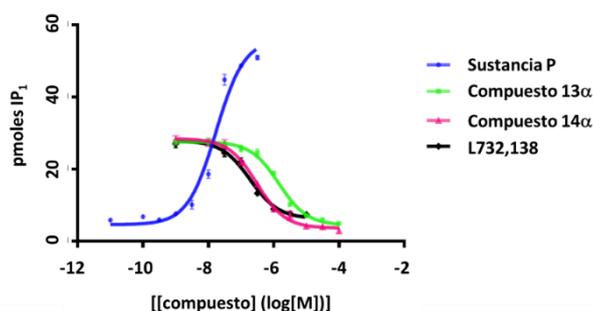


Figura 26. Curvas de concentración-respuesta para los efectos agonista y antagonista de SP (azul), L732,138 (negro) y los derivados de D-galactosa, **13α** (verde) y **14α** (rosa), utilizando el ensayo IPone.

Como puede observarse en esta Figura **26**, ambos derivados de la D-galactosa mostraron un efecto inhibitorio significativo de la actividad de la SP y, por lo tanto, pueden considerarse como antagonistas de los receptores NK1. Específicamente, los valores de k_{inact} para los derivados de D-galactosa **13α** y **14α** son $0,65 \pm 0,23$ y $0,20 \pm 0,10$ μM respectivamente. Comparando estos valores de k_{inact} con los del Aprepitant (k_{inact} de $0,023 \times 10^{-2}$ μM) observamos que hay una cierta correlación entre la actividad anticancerosa y la capacidad antagonista de estos compuestos (Tabla **3**).

Tabla 3. Valores del efecto antagonista sobre los receptores NK1 y de la actividad anticancerígena de los derivados **13α**, **14α** y del Aprepitant.

Compuestos	Actividad de los antagonistas sobre receptores NK1		Actividad anticancerosa contra la línea celular A549
	IC ₅₀ (Media ± SEM; μM)	K _{inac} (Media ± SEM; μM)	IC ₅₀ (Media ± SEM; μM)
Aprepitant	1,41 x 10 ⁻³	0,023 x 10 ⁻²	18,3 ± 3,4
13α	1,100 ± 0,404	0,651 ± 0,239	40,9 ± 3,1
14α	0,353 ± 0,173	0,209 ± 0,103	24,2 ± 5,4

De esta forma, podemos clasificar los diferentes compuestos analizados en función de ambas actividades, según los valores de k_{inact} y de los valores de IC₅₀ obtenidos en los ensayos de actividad anticancerosa: Aprepitant > **14α** > **13α**. Es decir, a mayor actividad antagonista, mayor actividad anticancerosa. Aunque el mecanismo exacto de la actividad antitumoral de los antagonistas NK1 no se conoce con detalle y es objeto de múltiples estudios de investigación, los resultados obtenidos indican que la actividad anticancerosa obtenida con los derivados de carbohidrato podría estar mediada, al menos en parte, por los receptores NK1.

Por último, estudiamos la afinidad de nuestro mejor antagonista para con el receptor NK1, **14α**, midiendo el desplazamiento que provoca de la SP marcada isotópicamente, [¹²⁵I]SP, en células U-373MG. Los estudios revelan que el compuesto **14α** tiene una excelente afinidad por el receptor NK1 con valores de IC₅₀ = 50,4 nM y K_i = 22,4 nM.

II.2.4. Estudios computacionales: docking

Para conseguir entender las similitudes y diferencias de las interacciones que envuelven el reconocimiento molecular de los derivados **13 α** , **13 β** , **14 α** , **14 β** y el fármaco Aprepitant con el receptor NK1, realizamos cálculos computacionales de docking (Figura 27). El docking o “acoplamiento molecular automatizado”, consiste en predecir la conformación y posición óptima de dos moléculas: el ligando y el receptor, que en nuestro caso aplicaremos a los distintos antagonistas estudiados y el receptor NK1. Se trata de determinar el complejo molecular energéticamente más estable teniendo en cuenta las diferentes interacciones enlazantes que se pueden establecer entre ambos.¹²⁰ Estos cálculos se basan en las predicciones precisas de las geometrías óptimas de unión del ligando y las interacciones de unión ligando-receptor.

Los valores obtenidos correspondientes a las energías de unión fueron -9,5; -9,6; -12,0; -12,4 y -11,2 kcal/mol para **13 α** , **13 β** , **14 α** , **14 β** y Aprepitant respectivamente.

El resultado del estudio de los complejos óptimos ligando-NK1R revela que todos los derivados de carbohidratos muestran una superposición espacialmente significativa de los fragmentos hidrófobos 3,5,-bis(trifluorometil)-fenilo y 4-fluorofenilo (Figura 27).

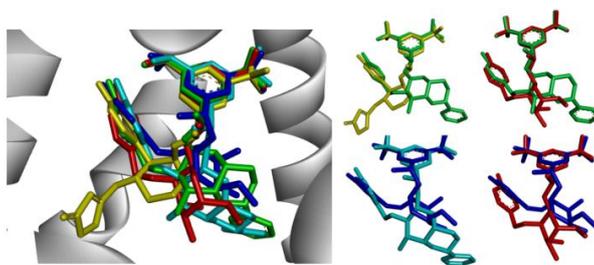


Figura 27. Superposición de los sitios de unión del Aprepitant (amarillo), **13 α** (rojo), **13 β** (azul oscuro), **14 α** (verde), **14 β** (azul claro) unidos al receptor NK1.

El sitio de unión del receptor NK1 es conocido y consiste en un profundo bolsillo cóncavo con una gran región hidrofóbica que permite maximizar el contacto entre la proteína y el ligando. Por esta razón, usamos el coeficiente de reparto octanol-agua (o $\log P$) de los diferentes fragmentos de los ligandos para obtener información sobre los patrones de interacción de estos con el sitio de unión del receptor. Las regiones fuertemente hidrofobas del sitio de unión del receptor están ocupadas habitualmente por fragmentos hidrofobos de ligandos, estableciéndose interacciones de unión de ligando-proteína complementarias. Los resultados obtenidos se indican en la Figura 28.

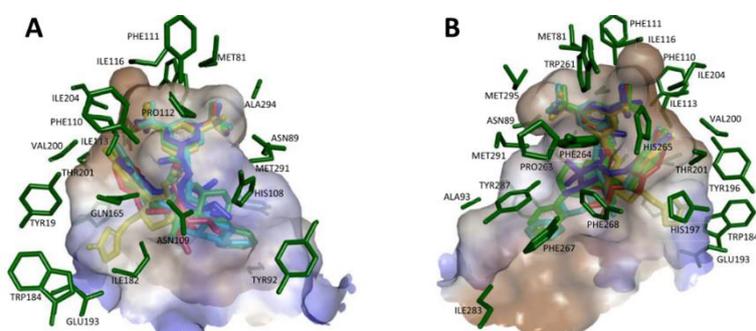


Figura 28. Residuos del sitio de unión (verde oscuro), superficie de hidrofobicidad y zonas de acoplamiento para Aprepitant (amarillo), **13 α** (rojo), **13 β** (azul oscuro) y **14 α** (verde), **14 β** (azul claro), acoplados con el receptor NK1R. La vista superior (A) e inferior (B) están en los lados izquierdo y derecho, respectivamente. El color marrón representa la superficie más hidrofóbica y el color azul, la menos hidrofóbica.

La Figura 28 muestra que la mayoría de los aminoácidos localizados en el fondo del sitio de unión del receptor NK1 tienen carácter hidrofóbico o anfipático (Ile113, Ile126, Ile204, Ala294, Met81, Met295, Met291, Phe110, Phe111, Phe264, Trp261, Tyr196). Por un lado, la Figura 28A corresponde a una vista superior de la región media del sitio de unión del receptor, caracterizado por la presencia de aminoácidos cargados/hidrofílicos con una gran capacidad para donar o

aceptar enlaces de H (Gln165, His108, Asn109). Por su parte, la Figura **28B** muestra una vista inferior de la región media del sitio de unión del receptor donde se encuentran los aminoácidos hidrofóbicos (Phe264 y Phe268).

Además, podemos encontrar desde una vista superior en el lado izquierdo de la región exterior del sitio de unión, un residuo aceptor de puentes de hidrógeno, Glu193, acompañado por otros aminoácidos con notable capacidad para aceptar o donar enlaces de hidrógeno (Trp184, Tyr196, His197). El lado opuesto de esta región exterior está rodeado principalmente por residuos de Ala93, Phe287, Ile283 y Tyr287.

El análisis de las interacciones en los complejos proteína-ligando (Figura **29**) muestra que los fragmentos aromáticos fluorados hidrofóbicos de todos los derivados de carbohidratos estudiados, 3,5,-bis(trifluorometil)fenilo ($\log P=3,70$) y *p*-fluorofenilo ($\log P = 2,10$), se localizan en la parte inferior del sitio de unión. Ambos fragmentos establecen una gran cantidad de interacciones hidrofóbicas como las interacciones de tipo π - π stacking con Phe268, His197 y Phe264, interacciones π -alquilo con Pro112, e interacciones alquilo-alquilo con Met295, Phe264, Met291, Ile113, Ile204 y Trp261 (Figura **29**). Además, se observan dos tipos de interacciones mediante formación de puentes de hidrógeno (los valores entre paréntesis en la Figura **29** reflejan el rango de distancias de interacción encontrado): (i) Puentes de Hidrógeno débiles entre fragmentos de fluorometilo y grupos amino de Asn89 (2,51 - 2,65 Å) y Thr201 (2,36 - 3,22 Å), y (ii) Enlaces de halógeno entre algunos átomos de flúor del fragmento 3,5,-bis (trifluorometil)fenilo y el grupo carbonilo de Pro112 (3,36 – 3,48 Å). Este tipo de interacciones suelen estar presentes en muchos complejos proteína-ligando.^{121,122}

Los residuos no hidrófobos Gln165, Asn109 e His108 están en la parte central del bolsillo de unión, donde se colocan los grupos O-sustituidos y los fragmentos centrales de los ligandos. Los átomos de oxígeno O-1 y O-2 y el grupo amino de Gln165 establecen dos puentes de hidrógeno con longitudes de 2,52 y 2,67 Å para **14 α** , y 2,49 y 2,91 Å para **13 α** , lo que contribuye en gran medida a la estabilización de estos ligandos en el sitio de unión (Figura **29B** y **29D**).

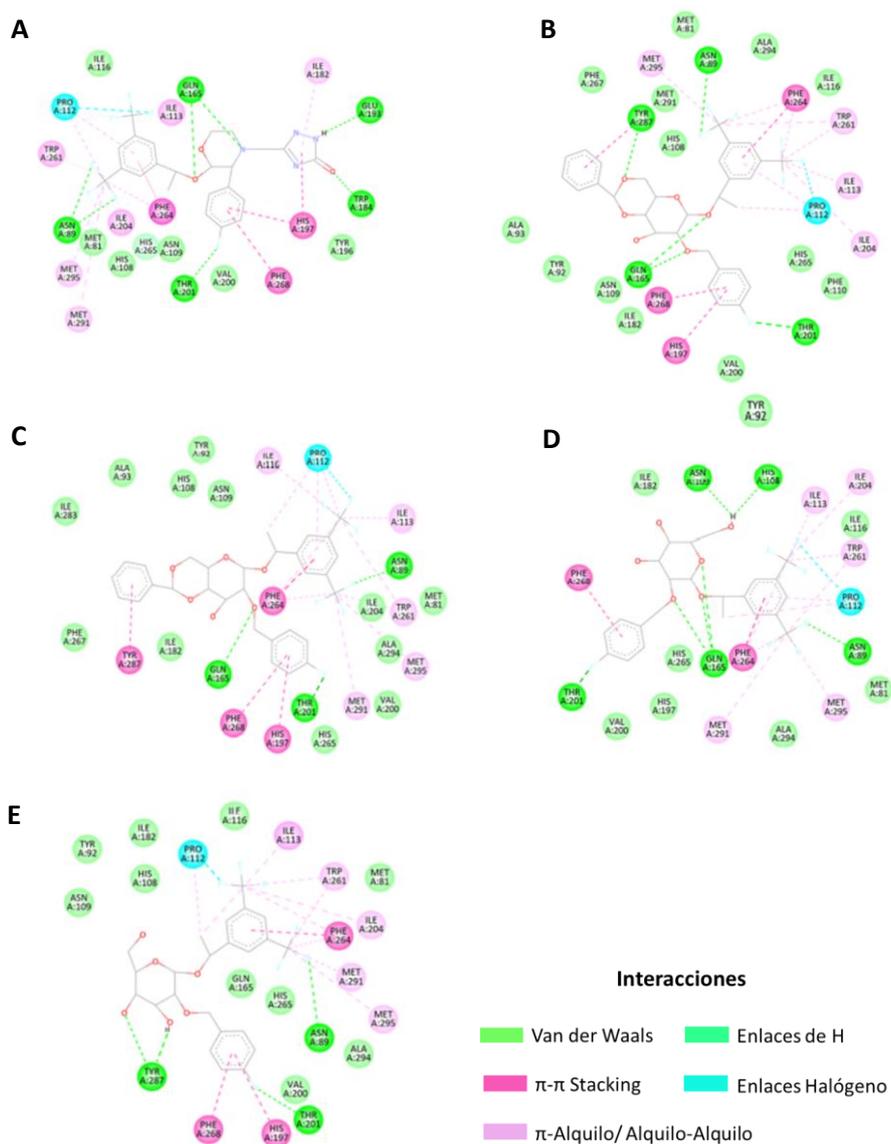


Figura 29. Vista bidimensional de los tipos de interacciones del Aprepitant (A), 14 α (B), 14 β (C), 13 α (D) y 13 β (E) con los aminoácidos que rodean el receptor NK1.

Teniendo en cuenta la información que proporcionan ambas Figuras **28 y 29**, se pueden extraer las siguientes conclusiones. Los cálculos indican que el fragmento de piranosilo en **14 α** y **14 β** es un resto hidrofílico moderado ($\text{Log } P = -0,42$), que puede establecer contactos estrechos con los aminoácidos polares Asn109 e His108 como se indicaba en la Figura **29A**. Teniendo en cuenta que como se desprende de la Figura **29B** el gran carácter hidrofóbico del lado opuesto de la región de unión media se debe principalmente a la presencia de residuos de Phe268 y Phe264, una hidrofobicidad baja del ligando implicaría una capacidad de unión más débil con estos residuos. Sin embargo, la hidrofilia moderada del esqueleto de piranosa en **14 α** y **14 β** da como resultado cálculos de acoplamiento molecular o docking favorables.

El átomo de oxígeno O-6 participa en la formación de puentes de hidrógeno fuertes con Tyr287 en **14 α** (2,16 Å) pero no en **14 β** , sugiriendo que el primero presenta mejores requerimientos estructurales para la unión con el receptor (Figura **29B y 29C**).

En cuanto a los compuestos **13 α** y **13 β** , las distintas orientaciones espaciales de sus fragmentos de piranosilo hidroxilados conducen a diferentes interacciones intermoleculares. El grupo amino del residuo Glu165 establece puentes de hidrógeno (2,82 Å) con el átomo de oxígeno del fragmento de piranosa del ligando **13 α** . Además, el grupo carbonilo de Asn109 (2,52 Å) y el nitrógeno básico de His108 (2,16 Å) forma puentes de hidrógeno con el grupo hidroxilo en la posición 6 (Figura **28D**). En el caso de **13 β** , los grupos hidroxilo que se encuentran en la posición 3 y 4 y el átomo de oxígeno de Tyr268 actúan como donadores de puentes de hidrógeno (2,17 Å) y aceptores (2,00 Å) respectivamente (Figura **29E**).

Por último, en lo que al Aprepitant se refiere, destaca la formación de dos puentes de hidrógeno entre el grupo amino de Glu165 y los átomos de oxígeno (2,29 Å) y nitrógeno (2,67 Å) ubicados en lados opuestos del anillo de morfolina. Esto provoca un anclaje óptimo de este fragmento dentro de la región central del sitio de unión del receptor. Además, el valor de $\text{log } P$ de este fragmento (-0,41) es similar al del fragmento de piranosa de los derivados de galactosa, lo que

permite también el establecimiento de interacciones con residuos hidrofóbicos de la región de unión media.

Junto con el Aprepitant, los únicos ligandos que tienen fragmentos en la región externa del sitio de unión del receptor son los derivados **14 α** y **14 β** . El Aprepitant dispone el grupo triazolona, mientras que los otros dos derivados de galactosa tienen el grupo fenilo del fragmento del benciliden acetal. Estos fragmentos están situados en diferentes regiones de unión (Figura 29). El grupo triazolona está ubicado en una región más polar del sitio de unión, e interactúa a través de fuertes enlaces de hidrógeno con Glu193 (2,04 Å) y Trp184 (1,67 Å) y establece interacciones de tipo π - π stacking e interacciones π -alquilo con His197 y Ile182, respectivamente. Por el contrario, los grupos bencilidenos ($\log P = 1,94$) de los compuestos **14 α** y **14 β** están rodeados de residuos apolares como Ala93 y Phe267 y establecen interacciones de tipo π - π stacking con Tyr287.

De acuerdo con todo lo que hemos comentado, como conclusión se puede proponer que las interacciones hidrofóbicas y π - π stacking juegan un papel muy importante en la afinidad de unión en la parte inferior del sitio de unión de todos los ligandos. Por su parte, las interacciones de enlaces de hidrógeno parecen ser el factor clave para el acoplamiento en la región de unión media, donde el residuo de Gln165 juega un papel importante. La presencia de fragmentos moleculares en la región de unión externa resulta ser decisiva para aumentar la fuerza de unión ligando-receptor. La naturaleza diferente de los residuos en ubicaciones separadas de la región externa del sitio de unión del receptor permite que un fragmento hidrofílico aumente la afinidad de unión a través de interacciones de puentes de hidrógeno en el caso del Aprepitant, o a través de interacciones hidrofóbicas fuertes en los derivados de galactosa **14 α** y **14 β** .

II.2.5. Evaluación del efecto antivírico contra el COVID-19

El periodo final de esta Tesis coincidió en el tiempo con la aparición de la inesperada pandemia a causa del virus COVID-19, que a fecha de hoy ha provocado más de 6,3 millones de muertes en todo el mundo. Las condiciones de vida y de trabajo de miles de millones de personas en todo el mundo se vieron interrumpidos debido a las diferentes formas de distanciamiento social. La economía mundial se debilitó notablemente como resultado del cierre de negocios y las restricciones a los viajes. Para luchar contra esta pandemia, científicos y médicos de todo el mundo llevaron a cabo un gran esfuerzo para la elucidación de la estructura del virus, mecanismos de infección y dinámica de transmisión, así como en la identificación de agentes antivirales y de diagnóstico precisos para la detección del virus. Estos estudios han permitido en un tiempo récord determinar la estructura y el mecanismo de acción del SARS-CoV-2 a nivel atómico.¹²³

Como un hito sin precedentes, en nueve meses estuvo disponible la primera vacuna eficaz contra la COVID-19 y actualmente disponemos de al menos cinco vacunas para hacer frente a la pandemia.

Durante las primeras etapas de esta pandemia, junto con el desarrollo de nuevos métodos que permitieran detener su progresión, la comunidad científica centró sus esfuerzos en el desarrollo de nuevos agentes antivíricos utilizando principalmente dos tipos de estrategias, el reposicionamiento de fármacos con actividad antiviral conocida y el descubrimiento de nuevos fármacos. Teniendo en cuenta que el espacio químico de los antivirales es relativamente reducido, la segunda aproximación resulta de especial interés y fueron muchos los grupos de investigación que abordaron esta tarea, comenzando por un cribado sistemático de diferentes quimiotecas de compuestos con actividades biológicas muy diversas.

En este sentido, nuestro grupo de investigación participó en un cribado realizado por el grupo de "Interacciones Virus-Huésped en la Infección por el Virus de Hepatitis B" perteneciente al

Centro Nacional de Biotecnología (CNB) proporcionando diferentes colecciones de compuestos, entre las que se encontraban los antagonistas NK1 descritos en esta memoria: **12 α** , **12 β** , **13 α** , **13 β** , **14 α** y **14 β** , para determinar su actividad antivírica frente al coronavirus del catarro común 229E-GFP. Se tomó este tipo de coronavirus, el cual se conoce que infecta humanos, como sistema de referencia para seleccionar los compuestos más activos, ya que esta cepa no es tan agresiva, y, por tanto, no se necesita un laboratorio de nivel de seguridad máximo para hacer el primer cribado. Los compuestos que pasan este primer cribado, se testan posteriormente frente al SARS-CoV-2. A continuación, se describe el resultado de estos primeros estudios preliminares.

El estudio consistió en someter a células Huh7 (células de cáncer de hígado humanas) a una mezcla del correspondiente compuesto (concentración 10 μ M) y el inóculo viral. Transcurridas 72 h tras el inicio de la infección/tratamiento, se determinó la incidencia de infección por fluorometría y la toxicidad mediante la evaluación de la biomasa total de células por pocillo en réplicas biológicas en placas de análisis independientes. Los primeros resultados mostraron que los compuestos **12 β** y **14 α** mostraban cierta actividad antiviral, con reducciones de un 70 % aproximadamente en los niveles de infección y los compuestos **12 α** , **13 α** y **14 β** presentaban actividad antiviral frente al coronavirus 229E-GFP, reduciendo los niveles de infección al menos un 90 %, en ausencia en todos los casos de citotoxicidad aparente. Teniendo en cuenta el interés de los resultados obtenidos, se llevaron a cabo nuevos análisis con los tres compuestos más activos para calcular su índice terapéutico. Para ello se determinaron las concentraciones a las que se alcanza un 50 y 90 % de inhibición (EC_{50} y EC_{90}), así como las concentraciones citotóxicas (CC_{50}).

Para ello, al igual que en el caso anterior, los compuestos a distintas concentraciones (50 μ M - 22 nM) fueron diluidos y dichas diluciones se mezclaron con el inóculo viral antes de añadirlo sobre las células para obtener un amplio rango de concentraciones finales. Transcurridas 72 h tras el inicio de la infección/tratamiento, se determinó la eficiencia de la infección de la misma forma que en el ensayo anterior. Los datos se muestran como concentraciones efectivas, es

decir, las concentraciones a las que se alcanza un 50 y 90 % de la eficiencia de infección (EC_{50} y EC_{90}), y las concentraciones citotóxicas (IC_{50}), así como el índice terapéutico (IT), Tabla 4.

Tabla 4. Valores de EC_{50} , EC_{90} , IC_{50} e ITC de los derivados de carbohidratos con mejores resultados, así como del control (Aprepitant). En verde señalamos el compuesto con los mejores valores.

Entrada	Compuestos	EC_{50} (μM)	EC_{90} (μM)	IC_{50} (μM)	ITC (CC_{50}/EC_{50})
1	Aprepitant	6,5	14	16	2,5
2	12α	9	13	30	3.33
3	13α	5	13	50	10
4	14β	4	6	> 50	> 12,5

Los resultados muestran que los antagonistas del receptor NK1 **12 α** , **13 α** y **14 β** presentan una actividad antiviral EC_{50} entre 4 - 9 μM y EC_{90} entre 6 -13 μM . Teniendo en cuenta la citotoxicidad, los resultados indican que el compuesto **14 β** presenta el mejor perfil terapéutico de los tres compuestos estudiados. Según se desprende de la Tabla 4, en comparación con el Aprepitant, los tres derivados de carbohidratos presentan menor citotoxicidad, con valores superiores de IC_{50} , por lo que tienen mejor perfil terapéutico.

II.3. Conclusiones

En este capítulo se ha llevado a cabo la síntesis de nuevos antagonistas del receptor NK1 basados en su analogía estructural con el Aprepitant, un antagonista conocido de dicho receptor. Para ellos sea ha utilizado D-galactosa como reactivo de partida y se ha llevado a cabo su posterior evaluación como agentes anticancerosos frente una amplia gama de líneas células cancerosas.

Todos los compuestos preparados, derivados de D-galactosa, han mostrado una importante actividad antagonista del receptor NK1, con una actividad anticancerosa de amplio espectro y una selectividad importante, comparable al cisplatino.

Esta estrategia nos ha permitido identificar el derivado de D-galactosa **14 α** , como el derivado óptimo, con un efecto antagonista del receptor NK1 significativo (k_{inact} $0.209 \pm 0.103 \mu\text{M}$) y una alta afinidad de unión ($IC_{50} = 50.4 \text{ nM}$, $K_i = 22.4 \text{ nM}$ midiendo el desplazamiento de [^{125}I] SP de del receptor NK1).

Se ha observado una correlación entre las actividades antagonista y anticancerosa al comparar la potencia de la actividad inhibidora del receptor NK1 de este derivado **14 α** con el derivado trihidroxilado **13 α** y la del Aprepitant.

Cabe destacar que este derivado **14 α** ha mostrado una marcada actividad citotóxica selectiva frente a 12 tipos diferentes de líneas celulares de cáncer. Aún más interesante es la selectividad observada, siendo las líneas cancerosas hasta 20 veces más sensibles que las líneas celulares no malignas al tratamiento con **14 α** .

Los estudios de “docking” han proporcionado una información importante sobre el papel clave del fragmento de 4,6-O-benciliden acetal presente en **14 α** como el responsable más probable de su mayor afinidad por el receptor NK1.

En conjunto, estos resultados indican la posibilidad de usar antagonistas del receptor NK1 basados en carbohidratos en general, y el producto **14 α** en particular, como fármacos anticancerosos selectivos.

II.4. Parte experimental

II.4.1. Métodos generales

(i) Disolventes y reactivos

Los disolventes utilizados fueron suministrados por Fisher Scientific, Aldrich y Scharlab, y se secaron mediante el siguiente procedimiento: i) activación de 200 g de tamiz molecular de 4 Å en un matraz seco de fondo redondo, para ello se realizan 3 ciclos de calentamiento-enfriamiento bajo Ar. Los calentamientos se realizaron en intervalos de 3-1-1 min. ii) Se vierte el tamiz activado sobre el disolvente correspondiente y se cierra con septum. iii) Se burbujea Ar durante 3 min. el disolvente. iv) Finalmente, se sella con Parafilm.

Los disolventes usados han sido: diclorometano (DCM), metanol, N,N-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), acetona, éter etílico, 2,2-dimetoxipropano (DMP), acetato de etilo, hexano y tolueno. Además, para el tratamiento de algunas de las reacciones se utilizaron disoluciones acuosas saturadas de NaCl, NH₄Cl y NaHCO₃, y para eliminar todo resto de agua en la fase orgánica Na₂SO₄ anhidro.

Los reactivos suministrados por Fisher Scientific y Aldrich fueron usados directamente sin ninguna purificación previa.

(ii) Técnicas y aparatos

El seguimiento de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando cromatoplasas de gel de sílice tipo 60F₂₅H de un espesor de capa de 0,2 mm (Merck). El análisis de las placas se ha llevado a cabo en una lámpara de UV de 254/365 nm y mediante revelado con ácido fosfomolibdico o ácido sulfúrico.

La purificación y separación de los productos de las reacciones se ha realizado mediante cromatografía en columna bajo presión (cromatografía flash), utilizando como fase estacionaria

gel de sílice de tipo 60, con un tamaño de partícula de 35-70 μm (Merck). En cada caso se indica la fase móvil empleada, así como la composición y las proporciones del eluyente de la fase móvil en volumen-volumen. Además, en uno de los casos la purificación se realizó utilizando celita (Fluka).

Los puntos de fusión (P.f.) se han determinado en un aparato Gallemkamp en tubos capilares abiertos.

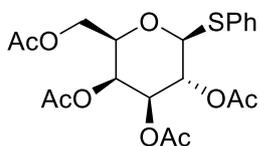
Las rotaciones ópticas $[\alpha]_D^{20}$ se han determinado en un polarímetro Perkin-Elmer 341MC, empleando luz amarilla de Na ($\lambda = 589 \text{ nm}$) y celdas de 1 dm de longitud. En cada caso se indica el disolvente utilizado, así como la concentración (c en g/100 mL).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se han realizado a temperatura ambiente utilizando disolventes deuterados los cuales se encuentran indicados en cada caso. Los desplazamientos químicos (en ppm) se han referido al disolvente utilizado. Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se han registrado en los aparatos Bruker DRX-300 y DRX-500. En cada caso se indican el número de protones (calculado por integración) y el valor de las constantes de acoplamiento J (Hz).

Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) se han registrado en un espectrómetro Kratos EM-80RFA 241 MC usando técnicas de impacto electrónico o FAB.

II.4.2. Síntesis de análogos de antagonistas de los receptores NK1

Fenil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-β-D-galactopiranosido (2β)



Sobre una disolución de pentaacetato de D-galactosa (**1α:1β**) (15 g, 34,46 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (50 mL), a 0 °C y bajo atmósfera de Ar, se adiciona gota a gota trifluoruro de boro eterato (21,83 mL, 153,84 mmol) y tiofenol (7,5 mL, 73,07 mmol). La reacción se mantiene bajo agitación a temperatura ambiente (t.a.). Tras 16 h, se adiciona disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (80 mL), se separan las dos fases y la fase acuosa se trata con CH₂Cl₂ (5 x 50 mL) para extraer los compuestos orgánicos. La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl (80 mL), seguidamente se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a vacío. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna, usando AcOEt/hexano en proporción 1:4 como eluyente, obteniéndose el producto **2β** (15,16 g, 34,45 mmol) como un aceite amarillo.

Rdto.: cuantitativo.

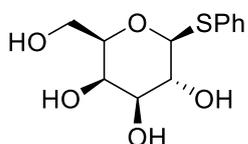
[α]²⁰_D: +3,6° (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7,52-7,46 (m, 2H), 7,32-7,30 (m, 3H), 5,41 (dd, *J* = 1,0 y 3,2 Hz, 1H), 5,23 (t, *J* = 10,0 Hz, 1H), 5,04 (dd, *J* = 3,3 y 9,9 Hz, 1H), 4,71 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 4,18 (dd, *J* = 7,0 y 11,3 Hz, 1H), 4,11 (dd, *J* = 6,2 y 11,4 Hz, 1H), 3,95-3,92 (m, 1H), 2,11 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 1,97 (s, 3H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 170,4, 170,3, 170,1, 169,5, 132,7, 132,6, 129,0, 128,3, 86,7, 74,5, 72,1, 67,4, 67,3, 61,7, 20,9, 20,8, 20,7 ppm.

EMAR: calculado para C₂₀H₂₄O₉SNa [M+Na]⁺: 463,1033; encontrado: 463,1027 (-1,3817 ppm).

Fenil 1-tio- β -D-galactopiranosido (**3 β**)



Sobre una disolución del tioglicósido **2 β** (3,96 g, 9,00 mmol) en MeOH (45 mL) se adiciona una disolución de metóxido de sodio 1 M en MeOH (36 mL) a 0 °C. Tras agitar durante 3 h, la reacción se neutraliza con resina ácida, se filtra y se evapora el disolvente a vacío, obteniéndose el producto **3 β** (2,40 g, 8,82 mmol) como un sólido blanco, que es utilizado directamente en la siguiente reacción sin necesidad de purificación previa.

Rdto.: cuantitativo.

P.f.: 120-121 °C.

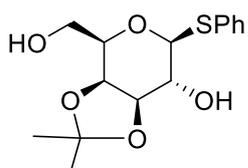
[α]²⁰_D: -28,3° (c 1, MeOH).

¹H-RMN (500 MHz, MeOD) δ : 7,56-7,54 (m, 2H), 7,30-7,27 (m, 2H), 7,24-7,21 (m, 1H), 4,59 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 3,90 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 3,78-3,74 (m, 1H), 3,72-3,69 (m, 1H), 3,61 (t, J = 9,5 Hz, 1H), 3,57 (t, J = 6,1 Hz, 1H), 3,50 (dd, J = 3,3 y 9,2 Hz, 1H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, MeOD) δ : 136,1, 132,2, 129,8, 128,0, 90,3, 80,6, 76,4, 71,0, 70,4, 62,6 ppm.

EMAR: calculado para C₁₂H₁₆O₅SNa [M+Na]⁺: 295,0616; encontrado: 295,0605 (+3,600 ppm).

Fenil 3,4-O-isopropiliden-1-tio- β -D-galactopiranosido (**4 β**)



Sobre una suspensión del derivado polihidroxiado **3 β** (15,55 g, 57,01 mmol) en 100 mL de DMP, a t.a. y bajo atmósfera de Ar, se adiciona ácido de D(+)-10-canforsulfónico (CSA) (3,97 g, 17,10 mmol). Transcurridas 3 h, se añade Et₃N para neutralizar el CSA y se evapora el disolvente a vacío. El residuo obtenido se disuelve en la mínima cantidad posible de tolueno y se evapora a vacío. Tras repetir este proceso tres veces, se obtiene el acetal mixto junto con una pequeña cantidad

del diol deseado. El crudo obtenido se disuelve en MeOH (100 mL), se le añade CSA (3,97 g, 17,10 mmol) a 0 °C y se calienta a t.a. agitando durante 5 min. A continuación, se neutraliza con Et₃N de nuevo y se coevapora tres veces con tolueno. El crudo es purificado por cromatografía en columna utilizando AcOEt/hexano en proporción 1:1 como eluyente, obteniéndose el producto **4β** (15,91 g, 51,01 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: 90 %.

P.f.: 94-96 °C.

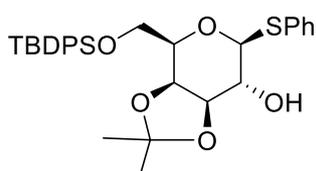
[α]²⁰_D: + 3,7° (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7,54-7,52 (m, 2H), 7,33-7,28 (m, 3H), 4,47 (d, *J* = 10,2 Hz, 1H), 4,18 (dd, *J* = 2,2 y 5,5 Hz, 1H), 4,13-4,09 (m, 1H), 3,99 (dd, *J* = 7,2 y 11,7 Hz, 1H), 3,89-3,86 (m, 1H), 3,81 (dd, *J* = 4 y 11,6 Hz, 1H), 3,56 (dd, *J* = 6,9 y 10,1 Hz, 1H), 1,41 (s, 3H), 1,33 (s, 3H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 132,7, 131,9, 129,2, 128,3, 110,6, 87,9, 79,3, 77,2, 74,0, 71,6, 62,7, 28,1, 26,5 ppm.

EMAR: calculado para C₁₅H₂₀O₅SNa [M+Na]⁺: 335,0924; encontrado: 335,0920 (-1,2134 ppm).

Fenil 3,4-*O*-isopropiliden-6-*O*-*terc*-butildifenilsilil-1-tio-β-D-galactopiranosido (**5β**)



Sobre una disolución de **4β** (103,10 mg, 0,33 mmol) en DMF (70 mL) se adiciona cloruro de *terc*-butildifenilsilano (TBDPSiCl) (0,11 mL, 0,41 mmol) e imidazol (34 mg, 0,83 mmol) a t.a. y bajo atmósfera de Ar. Transcurrida una noche, se evapora la DMF.

Seguidamente, se añade una disolución saturada de NH₄Cl (80 mL) para neutralizar la reacción. Los extractos orgánicos son extraídos de la fase acuosa con CH₂Cl₂ (5 x 50 mL). La fase orgánica obtenida se lava con una disolución saturada de NaHCO₃ (80 mL) y de NaCl (80 mL). El residuo orgánico se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a vacío. La mezcla se

purifica mediante columna cromatográfica usando AcOEt/hexano en proporción 1:5 como eluyente, obteniéndose el producto **5β** (174,49 mg, 0,32 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: 96 %.

P.f.: 65-67 °C.

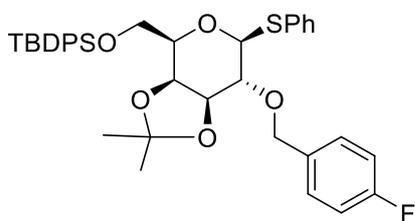
[α]²⁰_D: +3,3° (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7,74-7,68 (m, 4H), 7,56-7,51 (m, 2H), 7,45-7,40 (m, 2H), 7,40-7,35 (m, 4H), 7,27 (d, *J* = 2,5 Hz, 3H), 4,48 (d, *J* = 10,2 Hz, 1H), 4,28 (dd, *J* = 1,8 y 5,3 Hz, 1H), 4,10-4,06 (m, 1H), 4-3,94 (m, 2H), 3,94-3,89 (m, 1H), 3,58-3,53 (m, 1H), 1,37 (d, *J* = 39, 7 Hz, 6H), 1,06 (s, 9H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 135,8, 133,5, 132,6, 132,4, 129,9, 129,8, 129,1, 128,1, 128,0, 127,9, 127,8, 110,2, 88,4, 79,1, 73,4, 71,7, 63,1, 28,2, 26,9, 26,4, 19,3 ppm.

EMAR: calculado para C₃₁H₃₈O₅SSiNa [M+Na]⁺: 573,2101; encontrado: 573,2092 (-1,6556 ppm).

Fenil 1-*O*-(*p*-fluorobencil)-3,4-*O*-isopropiliden-6-*O*-terc-butildifenilsilil-1-tio-β-D-galactopiranosido (**7β**)



Sobre una disolución de **5β** (439 mg, 0,8 mmol) en THF (10 mL) se añade NaH (57,45 mg, 2,4 mmol) disuelto en THF y se deja en agitación durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se añade yoduro de tetrabutilamonio (NBu₄) (118,2 mg, 0,32 mmol) y tras 30 min. se adiciona cloruro de *p*-fluorobencilo **6** (0,14 mL, 1,2 mmol) en THF. Todo a t.a. y bajo atmósfera de Ar. La reacción finaliza tras 48 h en agitación, se le añade una disolución saturada NH₄Cl (80 mL) para neutralizarla. Los extractos orgánicos son extraídos de la fase acuosa con AcOEt (5 x 50 mL) y se lavan con una disolución saturada de NaHCO₃ (80 mL) y de NaCl (80 mL), se secan con Na₂SO₄

anhidro, se filtran y se evaporan. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna usando AcOEt/hexano 1:15 como eluyente obteniéndose **7β** (493 mg, 0,74 mmol) como un aceite amarillo.

Rdto.: 93 %.

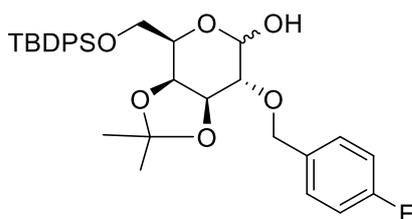
[α]²⁰_D: +8,4° (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7,72-7,81 (m, 4H), 7,54-7,49 (m, 2H), 7,45-7,34 (m, 8H), 7,25-7,29 (m, 3H), 7,02 (t, *J* = 8,8 Hz, 2H), 4,79 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H), 4,64 (d, *J* = 11,2 Hz, 1H), 4,60 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 4,29 (dd, *J* = 5,5 y 1,9 Hz, 1H), 4,23 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 3,97-3,92 (m, 2H), 3,86 (td, *J* = 6,4 y 1,9 Hz, 1H), 3,49 (dd, *J* = 9,7 y 6,3 Hz, 1H), 1,40 (s, 3H), 1,36 (s, 3H), 1,12 (s, 9H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162,5 (d, *J* = 245,5 Hz), 135,8, 134,0, 133,9 (d, *J* = 3,1 Hz), 133,5 (d, *J* = 1,8 Hz), 131,9, 130,1 (d, *J* = 8,0 Hz), 129,8 (d, *J* = 1,8 Hz), 128,9, 127,8 (d, *J* = 7,5 Hz), 127,4, 115,3, 115,1, 110,0, 86,6, 79,9, 78,4, 73,6, 72,9, 63,1, 28,0, 26,9, 26,5, 19,3 ppm.

EMAR: calculado para C₃₈H₄₃FO₅SSiNa [M+Na]⁺: 681,2477; encontrado: 681,2489 (+1,8130 ppm).

2-*O*-(*p*-fluorobencil)-3,4-isopropiliden-6-*O*-*terc*-butildifenilsilil- α,β -D-galactopiranososa (8)



Sobre una disolución de **7β** (3,02 g, 4,59 mmol) en acetona (120 mL) al 99 % y agua al 1% en ausencia de luz y a -15 °C, se adiciona N-bromosuccinimida (NBS) (1,03 g, 5,78 mmol) y se mantiene en agitación durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, la reacción se trata con una disolución saturada de NaHCO₃ (80 mL) y los extractos orgánicos son extraídos de la fase acuosa con CH₂Cl₂ (5 x 50 mL). La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaCl 80 mL). La mezcla se

seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora a vacío. El residuo obtenido se purifica por columna cromatográfica usando AcOEt/hexano en proporción 1:8 como eluyente, obteniéndose **8α:8β** (2,37 g, 4,18 mmol) como un sirupo amarillo con una proporción α:β 1:3.

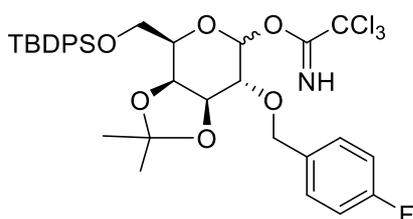
Rdto.: 91 %.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7,73-7,65 (m, 4H_α, 4H_β), 7,43-7,31 (m, 8H_α, 8H_β), 7,05-7,00 (m, 2H_α, 2H_β), 5,15 (t, *J* = 3,5 Hz, 0,6H_α), 4,78-4,73 (m, 1H_α, 1H_β), 4,79-4,72 (m, 1,3H_α, 1,3H_β), 4,65 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H_β), 4,32-4,36 (m, 1,3H_α, 1,3H_β), 4,34-4,27 (m, 1H_α y 1H_β), 4,23 (t, *J* = 6,1 Hz, 0,3H_α), 3,96-3,80 (m, 1,6H_α, 1,6H_β), 3,97-3,7 (m, 1,7H_α y 1,7H_β), 3,86-3,89 (m, 0,7H_β), 3,55 (dd, *J* = 5,9 y 3,7 Hz, 0,6H_β), 3,37 (t, *J* = 6,5 Hz, 0,3H_α), 2,98 (d, *J* = 6,4 Hz, 0,3H_α), 2,92 (d, *J* = 4,6 Hz, 0,6H_β), 2,63 (s, 0,3H_α), 2,17 (d, *J* = 2,1 Hz, 1β), 1,40 (d, *J* = 5,7 Hz, 3H_β), 1,36 (s, 3H_β), 1,25 (s, 1H_β) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162,7, (d, *J* = 245,6 Hz), 135,9, 135,8, 133,9 (d, *J* = 3,5 Hz), 133,8, 133,7 (d, *J* = 3,2 Hz), 133,5, 130,0 (d, *J* = 8,2 Hz), 129,9 (d, *J* = 8,5 Hz), 129,8, 127,8, 115,5 (d, *J* = 21,3 Hz), 115,3 (d, *J* = 21,1 Hz), 110,0, 109,5, 96,3, 91,0, 80,1, 78,0, 76,4, 74,7, 73,3, 72,8, 72,5, 72,2, 68,6, 63,0, 62,8, 27,8, 27,0, 26,1, 19,4 ppm.

EMAR: calculado para C₃₂H₃₉FO₆SiNa [M+Na]⁺: 589,2392; encontrado: 589,2383 (-1,6340 ppm).

Tricloroacetimidato de 2-O-(*p*-fluorobencil)-3,4-isopropiliden-6-O-*terc*-butildifenilsilil-α,β-D-galactopiranososa (**9**)



Sobre una disolución de **8α:8β** (2,17 g, 3,84 mmol) en CH₂Cl₂ (50 mL) se adiciona CCl₃CN (3,85 mL, 38,43 mmol) y DBU (0,17 mL, 1,15 mmol) a t.a. La reacción se mantiene con agitación durante 24 h, seguidamente, se adiciona una disolución saturada de NaCl (80 mL). Los extractos

orgánicos son extraídos de la fase acuosa con CH_2Cl_2 (5 x 50 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora a vacío, obteniéndose **9 α :9 β** (2,72 g, 3,84 mmol) como un sirupo marrón con una proporción α : β 1:2.

Rdto.: cuantitativo.

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ : 8,61 (d, J = 3,7 Hz, 2H α , 2H β), 7,73-7,60 (m, 9H α , 9H β), 7,46-7,28 (m, 18H α , 18H β), 7,07-6,94 (m, 4H α , 4H β), 6,38 (d, J = 3,4 Hz, 0,7H α), 5,71 (d, J = 8,1 Hz, 1H β), 4,79 (d, J = 2,1 Hz, 2H β), 4,70 (d, J = 6,3 Hz, 1,3H α), 4,45-4,37 (m, 2H α , 2H β), 4,35 (dd, J = 5,7 y 1,9 Hz, 1,5H β), 4,27 (t, J = 6,0 Hz, 1H β), 3,37 (t, J = 6,4 Hz, 0,2H α), 2,99 (d, J = 6,7 Hz, 0,2H α), 2,92 (d, J = 5,0 Hz, 0,1H α), 1,32 (d, J = 2,0 Hz, 5,3H α , 5,3H β), 1,35 (d, J = 1,2 Hz, 5,8H α , 5,8H β), 1,04 (d, J = 3,4 Hz, 15H α , 15H β).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ : 161,3, 135,8, 133,9, 133,8, 133,6, 133,5, 130,1, 130,0, 129,8, 129,5, 127,8, 127,7, 115,4, 115,3, 115,2, 115,1, 110,1, 109,5, 97,8, 94,5, 81,4, 91,1, 79,1, 78,3, 75,6, 75,1, 74,2, 73,3, 72,9, 72,8, 71,8, 70,8, 62,7, 62,5, 28,1, 27,9, 26,9, 26,3, 19,4 ppm.

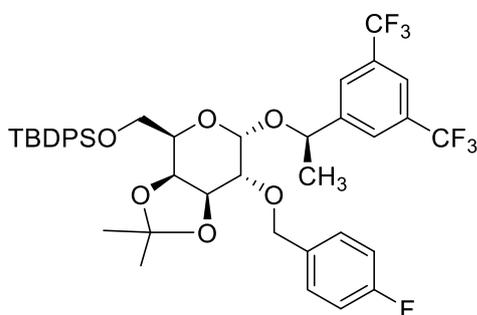
EMAR: calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{Cl}_3\text{FNO}_9\text{SiNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 732,1488; encontrado: 732,1471 (-2,3777 ppm).

(*R*)-{1-[3,5-bis-(trifluorometil) fenil]etil} 2-*O*-*p*-fluorobencil-3,4-*O*-isopropiliden-6-*O*-*terc*-butil difenilsilil- α , β -D-galactopiranósido (11)

Sobre una disolución de los tricloroacetimidatos **9 α :9 β** (0,16 g, 0,22 mmol) y (*R*)-1[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etanol **10** (0,17 g, 0,67 mmol) en éter etílico bajo atmósfera de Ar, con 200 mg de tamiz molecular (4 Å) y a 0 °C, se adiciona trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSOTf) (2,8 mL, 0,015 mmol). La reacción se mantiene bajo agitación durante 24 h a t.a. A continuación, se adiciona una disolución saturada de NaHCO_3 (80 mL). La mezcla se filtra a través de celita, y seguidamente, los extractos orgánicos se extraen de la fase acuosa con CH_2Cl_2 (5 x 50

mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora a vacío. Se obtiene un residuo de color anaranjado constituido por una mezcla de los dos glicósidos anómeros **11α:11β** en proporción 1:4. Tras purificación por columna cromatográfica, eluyendo con AcOEt/hexano en proporción 1:15, se obtiene el anómero **11α** (1,817 mg, 2,25 mmol) como producto mayoritario con un rendimiento del 83 % y el anómero minoritario **11β** (376 mg, 0,46mmol) con un rendimiento del 17 %.

Anómero α: (R)-{1-[3,5-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-p-fluorobencil-3,4-O-isopropiliden-6-O-terc-butildifenilsilil-α-D-galactopiranósido (11α).



Rdto: 83 %.

[α]²⁰_D: +87,4° (c 1, CHCl₃).

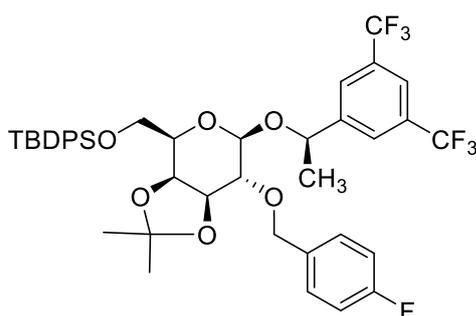
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7,86 (s, 2H), 7,82 (s, 1H), 7,73-7,70 (m, 4H), 7,46-7,37 (m, 6H), 7,21-7,18 (m, 2H), 6,97-6,92 (m, 2H), 4,91 (c, *J* = 6,6 Hz, 1H), 4,61 (d, *J* = 3,1 Hz, 2H), 4,58 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 4,42 (dd, *J* = 5,5 y 7,8 Hz, 1H), 4,29 (dd, *J* = 2,5 y 5,5 Hz, 1H), 4,18 (td, *J* = 2,4 y 6,4 Hz, 1H), 3,98-3,89 (m, 2H), 3,42 (dd, *J* = 3,7 y 7,8 Hz, 1H), 1,49 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,33 (s, 3H), 1,32 (s, 3H), 1,10 (s, 9H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162,5 (d, *J*_{C-F} = 244,8 Hz), 145,9, 135,8, 133,9 (d, *J*_{C-F} = 3,2 Hz), 133,7, 133,6, 132,1 (c, *J*_{C-F} = 33,5 Hz), 123,0, 129,7 (d, *J*_{C-F} = 8,3 Hz), 127,9, 126,9 (d, *J*_{C-F} = 2,4 Hz), 123,5

(c, $J_{C-F} = 272,9$ Hz), 121,9, 115,3 (d, $J_{C-F} = 21,4$ Hz), 109,4, 95,0, 76,3, 76,1, 73,5, 72,6, 71,5, 68,9, 63,4, 28,3, 27,0, 26,6, 24,5, 22,8, 19,5 ppm.

EMAR: calculado para $C_{42}H_{45}F_7O_6SiNa$ $[M+Na]^+$: 829,2771; encontrado: 829,2811 (+4,1000 ppm).

Anómero β : (R)-{1-[3,5-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-p-fluorobencil-3,4-O-isopropiliden-6-O-terc-butil difenilsilil- β -D-galactopiranosido (11 β)



Rdto: 83 %.

$[\alpha]^{20}_D$: +21,2° (c 1, $CHCl_3$).

1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7,85 (s, 1H), 7,79-7,74 (m, 3H), 7,66-7,61 (m, 4H), 7,43-7,32 (m, 7H), 7,05-7,00 (m, 2H), 4,97 (c, $J = 6,5$ Hz, 1H), 4,82 (s, 2H), 4,46 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 4,25 (dd, $J = 1,7$ y 5,5 Hz, 1H), 4,17 (dd, $J = 5,8$ y 6,7 Hz, 1H), 3,87 (dd, $J = 6,0$ y 8,5 Hz, 1H), 3,77-3,71 (m, 2H), 3,42 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 1,50 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H), 1,36 (s, 3H), 1,33 (s, 3H), 1,02 (s, 9H) ppm.

^{13}C -RMN (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 162,6 (d, $J_{C-F} = 245,2$ Hz), 148,4, 146,3, 135,8, 135,7, 134,1 (d, $J_{C-F} = 3,1$ Hz), 133,6, 133,4, 131,9 (c, $J_{C-F} = 33,1$ Hz), 131,6 (c, $J_{C-F} = 33,1$ Hz), 129,9 (d, $J_{C-F} = 8,2$ Hz), 129,9, 127,9, 127,8, 125,8 (d, $J_{C-F} = 2,2$ Hz), 123,5 (c, $J_{C-F} = 272,3$ Hz), 121,4, 115,3 (d, $J_{C-F} = 21,5$ Hz), 110,1, 100,8, 79,7, 79,3, 75,0, 73,6, 73,4, 73,1, 62,6, 28,0, 26,9, 26,4, 25,8, 22,3, 19,3 ppm.

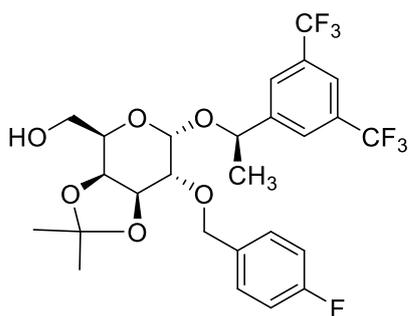
EMAR: calculado para $C_{42}H_{45}F_7O_6SiNa$ $[M+Na]^+$: 829,2771; encontrado: 829,2809 (+4,5000 ppm).

(R)-{1-[3,5-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-*p*-fluorobencil-3,4-O-isopropiliden- α,β -D-galactopiranosido (12)

- Procedimiento general

Sobre una disolución de **11 α** o **11 β** (100 mol%) en THF y bajo atmósfera de Ar se adiciona fluoruro de tetrabutil amonio (TBAF) (500 mol%) y se mantiene agitando a t.a. durante 1 h. Después se adiciona una disolución saturada de NaCl (80 mL), y los extractos orgánicos son extraídos de la fase acuosa con AcOEt (5 x 50 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora a vacío. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna usando AcOEt /hexano 1:4 como eluyente.

Anómero α : (R)-{1-[3,5-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-*p*-fluorobencil-3,4-O-isopropiliden- α -D-galactopiranosido (12 α)



Se sintetiza siguiendo el método general a partir de **11 α** (0,70 g, 0,87 mmol) en THF (20 mL) y TBAF (1,26 mL, 4,35 mmol). Se obtiene **12 α** (0,40 g, 0,70 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: 80 %.

P.f.: 109-111 °C.

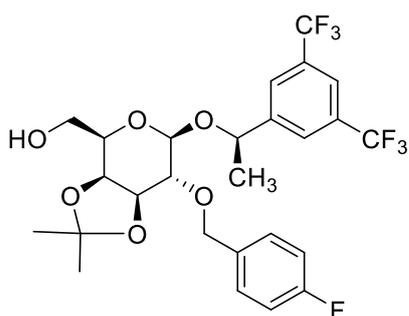
[α]²⁰_D: +105,5° (c 1, CHCl₃).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,90 (s, 2H), 7,82 (s, 1H), 7,18 (dd, $J = 8,5$ y $5,5$ Hz, 2H), 6,94 (t, $J = 8,6$ Hz, 2H), 4,92 (c, $J = 6,6$ Hz, 1H), 4,29 (dd, $J = 5,5$ y $2,6$ Hz, 1H), 4,18-4,16 (m, 1H), 3,99-3,95 (m, 1H) 3,89-3,84 (m, 1H), 3,42 (dd, $J = 8,0$ y $3,6$ Hz, 1H), 2,24 (dd, $J = 9,2$ y $3,1$ Hz, 1H), 1,51 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 1,34 (d, $J = 9,4$ Hz, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125MHz, CDCl_3) δ : 162,5 (d, $J_{\text{C-F}} = 245,6$ Hz), 145,7, 133,7 (d, $J_{\text{C-F}} = 3,3$ Hz), 132,0 (c, $J_{\text{C-F}} = 33,2$ Hz), 129,7 (d, $J_{\text{C-F}} = 8,15$ Hz), 126,8, 124,5, 122,3, 121,9, 121,8, 120,1, 115,3 (d, $J_{\text{C-F}} = 21,7$ Hz), 109,7, 95,2, 76,3, 75,7, 74,7, 73,0, 71,5, 68,1, 62,9, 28,2, 26,6, 24,5 ppm.

EMAR: calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{F}_7\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 591,1588; encontrado 591,1578 (-1,6699 ppm).

Anómero β : (R)-{1-[3,5-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-p-fluorobencil-3,4-O-isopropiliden- β -D-galactopiranosido (12 β)



Se sintetiza siguiendo el método general a partir de **11 β** (0,37 g, 0,46 mmol) en THF (20 mL) y TBAF (0,67 mL, 2,33 mmol). Se obtiene **12 β** (0,22 g, 0,39 mmol) como un sólido amarillo claro.

Rdto.: 84 %.

P.f.: 108-110 °C.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$: +28,5° (c 1, CHCl_3).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,84 (s, 2H), 7,79 (s, 1H), 7,37 (dd, $J = 8,4$ y $5,5$ Hz, 2H), 7,03 (t, $J = 8,7$ Hz, 2H), 4,97 (c, $J = 13$ y $6,5$ Hz, 1H), 4,82 (s, 2H), 4,49 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 4,19 (t, $J = 5,8$ Hz,

1H), 4,11 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H), 3,80-3,76 (m, 1H), 3,72-3,67 (m, 2H), 3,44 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 1,68 (s, 1H), 1,54 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H), 1,32 (d, $J = 26,3$ Hz, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 162,6 (d, $J_{\text{C-F}} = 245,5$ Hz), 146,5, 134,0 (d, $J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz), 131,7 (c, $J_{\text{C-F}} = 32,9$ Hz), 129,9 (d, $J_{\text{C-F}} = 8,0$ Hz), 126,7, 126,5 (d, $J_{\text{C-F}} = 2,8$ Hz), 124,6, 122,4, 121,6, 121,5, 120,2, 115,3 (d, $J_{\text{C-F}} = 21,1$ Hz), 110,5, 101,6, 79,5 (d, $J_{\text{C-F}} = 29,5$ Hz), 76,3, 73,9, 73,6, 73,0, 62,4, 27,9, 26,4, 22,8 ppm.

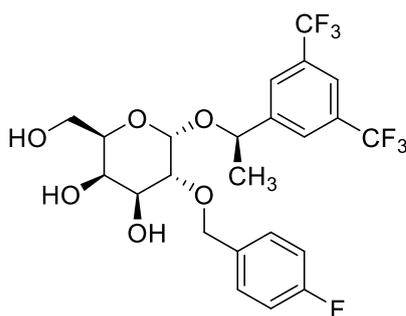
EMAR: calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{F}_7\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 591,1588; encontrado: 591,1580 (-1,3219 ppm).

(R)-{1-[3,4-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-p-fluorobencil- α,β -D-galactopiranósido (13)

- Procedimiento general

Sobre una disolución de **12 α** o **12 β** (100 mol%) en MeOH se adiciona una cantidad catalítica de CSA (3 mol%) y se agita a t.a. durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se añade Et_3N para neutralizar el CSA y se coevapora con tolueno tres veces a vacío. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía por columna utilizando AcOEt/hexano 1:1 como eluyente.

Anómero α : (R)-{1-[3,4-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-p-fluorobencil- α -D-galactopiranósido (13 α)



Se sintetiza utilizando el protocolo general a partir de **12 α** (4,69 g, 5,81 mmol) en MeOH (100 mL) con CSA (0,04 g, 0,17 mmol). Se obtiene **13 α** (2,15 g, 4,18 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: cuantitativo.

P.f.: 147-149 °C.

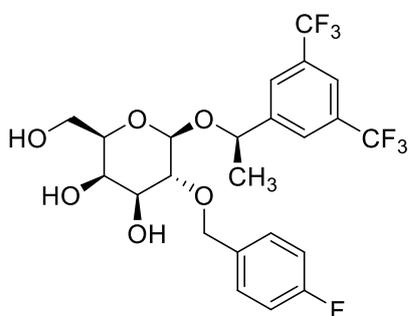
[α]²⁰_D: +121,5° (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,89 (s, 2H), 7,83 (s, 1H), 7, 15 (dd, $J = 8,5$ y $5,5$ Hz, 2H), 6,96 (t, $J = 8,6$ Hz, 2H), 4,92 (c, $J = 6,6$ Hz, 1H), 4,79 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 4,52 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H), 4,34 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H), 4,16-4,15 (m, 1H), 4,13-4,10 (m, 1H), 4,02-3,96 (m, 2H), 3,92-3,87 (m, 1H), 3,69 (dd, $J = 9,7$ y $3,5$ Hz, 1H), 2,78 (s, 1H), 2,38 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 2,28 (dd, $J = 7,8$ y $4,0$ Hz, 1H), 1,54 (s, 3H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ : 161,7 (d, $J_{C-F} = 246,7$ Hz), 144,8, 132,3, 131,3, 131,0, 128,8 (d, $J_{C-F} = 8,2$ Hz), 125,8 (d, $J_{C-F} = 2,7$ Hz), 114,7 (d, $J_{C-F} = 21,5$ Hz), 94,1, 74,9, 72,3, 71,1, 69,8, 68,9, 68,1, 62,4, 23,4 ppm.

EMAR: calculado para C₂₃H₂₃F₇O₆Na [M+Na]⁺: 551,1275; encontrado: 551,1267 (-1,5079 ppm).

Anómero β : (R)-{1-[3,4-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-p-fluorobencil- β -D-galactopiranosido (13 β)



Se sintetiza utilizando el método general a partir de **12 β** (1,00 g, 1,24 mmol) en MeOH (100 mL) con CSA (0,01 g, 0,04 mmol). Se obtiene **13 β** (0,58 g, 1,12 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: cuantitativo.

P.f.: 142-145 °C.

$[\alpha]^{20}_D$: +25,3° (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7,85 (s, 2H), 7,79 (s, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,36 (dd, J = 8,0 y 5,6 Hz, 2H), 7,06 (t, J = 8,6 Hz, 2H), 5,01-4,96 (m, 2H), 4,74 (d, J = 5,7 Hz, 1H), 3,97 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 3,80-3,76 (m, 1H), 3,72-3,76 (m, 1H), 3,63-3,56 (m, 2H), 3,43 (dd, J = 5,6 y 4,7 Hz, 1H), 1,56 (d, J = 6,5 Hz, 4H), 1,25 (s, 2H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162,7 (d, J_{C-F} = 246,5 Hz), 146,4, 134,1, 131,8, 131,6, 129,9 (d, J_{C-F} = 8,0 Hz), 126,6, 124,6, 122,4, 121,5, 115,7 (d, J_{C-F} = 21,7), 102,6, 79,2, 76,7, 74,3, 73,4, 69,5, 62,7, 29,8, 22,9 ppm.

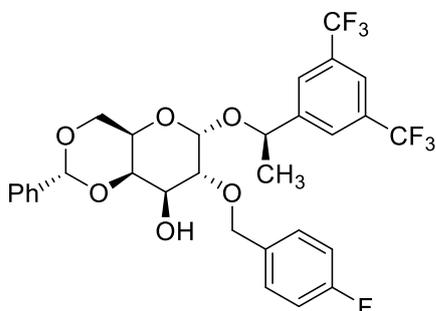
EMAR: calculado para C₂₃H₂₃F₇O₆Na [M+Na]⁺: 551,1275; encontrado: 551,1267 (-1,4429 ppm).

(R)-{1-[3,4-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-p-fluorobencil-(R)-4,5-O-benciliden-α,β - D-galactopiranosido (14)

- Procedimiento general

Sobre una disolución de **13α** o **13β** (100 mol%) en DMF se adiciona dimetoximetil benceno (DMMB) (110 mol%) y una cantidad catalítica de CSA (3 mol%). La reacción se mantiene rotando a 40 °C en el rotavapor durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, se para la reacción neutralizándola con una disolución saturada de NaHCO₃ (80 mL). Los extractos orgánicos son extraídos de la fase acuosa con CH₂Cl₂ (5 x 50 mL). La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaCl (80 mL), se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora a vacío. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando AcOEt/hexano en proporción 1:4.

Anómero α : (R)-{1-[3,4-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-p-fluorobencil-(R)-4,5-O-benciliden- α -D-galactopiranosido (14 α**)**



Se sintetiza siguiendo el procedimiento general a partir de **13 α** (0,10 g, 0,19 mmol) en DMF (15 mL) y DMMB (0,32 mL, 0,21 mmol). Se obtiene **14 α** (0,11 g, 0,18 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: 95 %.

P.f.: 173-174 °C.

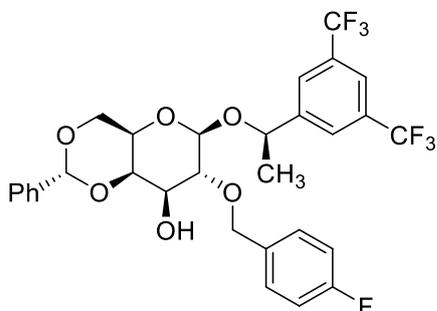
[α]²⁰_D: +94,6 (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,89 (s, 2H), 7,83 (s, 1H), 7,46-7,43 (m, 2H), 7,36 (t, J = 3,2 Hz, 3H), 7,14 (dd, J = 8,6 y 5,5 Hz, 2H), 6,92 (t, J = 8,7 Hz, 2H), 4,92 (c, J = 6,6 Hz, 1H), 4,8 (d, J = 3,5 Hz, 1H), 4,55-4,49 (m, 2H), 4,34 (dd, J = 3,6 y 0,8 Hz, 1H), 4,31 (dd, J = 12,6 y 1,4 Hz, 1H), 4,25 (dd, J = 10 y 3,7 Hz, 1H), 4,14 (d, J = 1,7 Hz, 0,5H), 4,12-4,11 (m, 0,5H), 3,8 (d, J = 0,95 Hz, 1H), 3,75 (dd, J = 9,9 y 3,5 Hz, 1H), 1,53 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 1,27-1,24 (m, 2H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ : 174,1, 163,6, 162,9, 161,7, 145,8, 133,4 (d, J_{C-F} = 3,7 Hz), 132,5, 132,2, 131,9, 131,7, 129,8 (d, J_{C-F} = 8,2 Hz), 126,8 (d, J_{C-F} = 3,6 Hz), 124,5, 122,3, 121,9, 115,5 (d, J_{C-F} = 21,5 Hz), 95,1, 75,9, 73,2, 72,1, 70,7, 69,9, 69,2, 63,2, 36,7, 31,7, 24,4, 20,6.ppm.

EMAR: calculado para C₃₀H₂₇F₇O₆Na [M+Na]⁺: 639,1588; encontrado: 639,1582 (-0,8736 ppm).

Anómero β : (R)-{1-[3,4-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-p-fluorobencil-(R)-[4,5-O-benciliden]- β -D-galactopiranosido (14 β**)**



Se sintetiza siguiendo el procedimiento general a partir de **13 β** (44 mg, 0,08 mmol) en DMF (10 mL) y DMMB (0,01 mL, 0,09 mmol). Se obtiene **14 β** (53 mg, 0,08 mmol) como un sólido amarillo claro.

Rdto.: cuantitativo.

P.f.: 116-117 °C.

[α]²⁰_D: -2,85° (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,89 (s, 2H), 7,83 (s, 1H), 7,48-7,41 (m, 2H), 7,39-7,33 (m, 3H), 7,18-7,10 (m, 2H), 6,92 (t, J = 8,8 Hz, 2H), 5,57 (s, 1H), 4,92 (c, J = 6,6 Hz, 1H), 4,81 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 4,52 (d, J = 3,2 Hz, 2H), 4,34 (d, J = 2,9 Hz, 1H), 4,31 (dd, J = 11,3 y 1,4 Hz, 1H), 4,25 (dd, J = 10,1 y 3,7 Hz, 1H), 4,12 (dd, J = 12,6 y 1,6 Hz, 1H), 3,83 (s, 1H), 3,75 (dd, J = 9,9 y 3,36 Hz, 1H), 1,53 (d, J = 6,7 Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ : 163,5, 161,6, 145,6, 137,7, 134,4 (d, J_{C-F} = 3,1 Hz), 131,5 (c, J_{C-F} = 33,2 Hz), , 129,7 (d, J_{C-F} = 8,2 Hz), 129,4, 129,1, 128,4, 126,6 (d, J_{C-F} = 3,1 Hz), , 124,6, 122,5, 121,3 (t, J_{C-F} = 3,8), 120,3, 115,6 (d, J_{C-F} = 21,7 Hz), 115,3 (d, J_{C-F} = 21,5 Hz), 101,7 (d, J_{C-F} = 52,0 Hz), 79,8, , 76,1, 75,5, 74,5, 74,3 (d, J_{C-F} = 2,7 Hz), 73,4, 72,6, 69,4, 69,0, 66,7, 62,6, 29,8, 22,8 ppm.

EMAR: calculado para C₃₀H₂₇F₇O₆Na [M+Na]⁺: 639,1588; encontrado: 639,1582 (-0,8736 ppm).

II.4.3. Ensayos biológicos

- **Líneas celulares**

MRC-5 (células sanas de pulmón humanas) y **A549** (células de cáncer de pulmón humanas) se obtuvieron de *European Collection of Cell Cultures*. **HaCaT** (células sanas de piel humanas) fueron cedidas por el Dr. Motilva (servicio de línea celular; L#300493-4212). **MDA-MB-231** (células de cáncer de mama triple negativo humanas) fueron adquiridas a través de *American Type Culture Collection (ATCC)*. **UACC-62** (células de cáncer de piel humanas) se obtuvieron del Instituto Nacional del Cáncer. **VH-10** (células sanas de piel humanas), **HepG-2** (células de cáncer de hígado humanas), **PC-3** (células de cáncer de próstata humanas) y **HT-29** (célula de cáncer colorrectal humanas), **VC-8** (células de pulmón de hámster chino (V-79) mutadas en el gen BRCA2) y **VC8B2** (células VC-8 complementadas con el gen BRCA2 humano) fueron donadas por el Dr. Helleday (Instituto Karolinska, Suecia). **GAMG** (células de glioblastoma humanas) fueron cedidas por el Dr. Ayala (Universidad de Sevilla). **HNO-97** (células de cáncer de lengua humanas), **A64-CLS** (células de adenoma de la glándula submaxilar humanas), **AN3Ca** (células de cáncer de endometrio humanas), **Sk-OV-3** (células de cáncer de ovarios humanas), **KATO-III** (células de cáncer de estómago humanas), **Sk-Br-3** (células de cáncer de mama HER2 positivas humanas), **T-24** (células de cáncer de vejiga humanas), **MeWo** (células de cáncer de piel humanas), fueron adquiridas a través del Servicio de Líneas Celulares (CLS). **MCF-7** (células de cáncer de mama humanas) y **MCF-10** (células sanas epiteliales de mama humanas) fueron cedidas por los Dr. Ruano y Dr. Daza (Universidad de Sevilla). **U-373MG** (Células de glioblastoma humanas) fueron proporcionadas por los laboratorios Eurofins Cerep France. **CHO** (células sanas de ovario de hámster chino) fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection*.

Las distintas líneas celulares fueron mantenidas en los medios recomendados y sembradas acorde a los protocolos estándares establecidos. MRC-5, VH-10, A549, MCF-7, HaCaT, MDA-MB-231, HT-29, GAMG, Sk-Br-3, MeWo, HNO-97, A64-CLS, AN3Ca, SK-OV-3, HepG-2, VC8B2, VC-8,

U-373MG y CHO se mantuvieron en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEN) con alto contenido en glucosa. PC-3 y T-24 crecieron en DMEN enriquecido con nutrientes F12 (DMEN-F12). UACC-62, se sembraron en Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640). KATO-III crecieron en Ham's F12. Excepto MCF-10, todos los medios fueron suplementados con 10 % de FBS, 100 U/mL de penicilina y estreptomina. La línea celular MCF-10 se mantuvo en una mezcla 1:1 de los medios DMEN y Ham's F12 suplementados con 20 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico, 100 ng/mL de toxina del cólera, 10 µg/mL de insulina, 500 ng/mL de hidrocortisona (95 %) y suero de caballo (5 %). Todas las células crecieron en atmósfera húmeda, 95 % de aire y 5 % de CO₂ a 37 °C. Los reactivos de cultivo celular fueron suministrados por Biowest.

- **Ensayos de viabilidad celular**

- Ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Este ensayo mide la viabilidad celular a partir de la actividad biológica de sus mitocondrias. Básicamente, consiste en la reducción metabólica del MTT, realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, a un compuesto de color morado llamado (*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano (formazán) lo que permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas y por tanto la viabilidad celular (Figura 30). La cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas. Los resultados se obtienen midiendo la absorbancia o densidad óptica (DO) de cada pocillo a través de un espectrofotómetro microplaca.^{119,124}

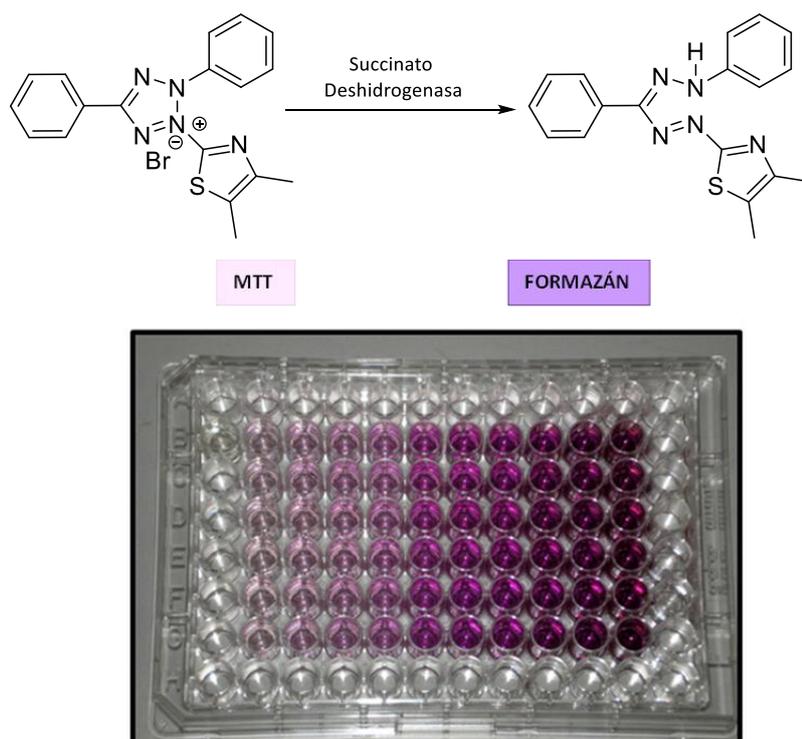


Figura 30. Reducción de MTT a Formazán (arriba). Placa ELISA donde puede comprobarse de manera visual la proporción de células vivas. Cuanto mayor es la intensidad de color, mayor es la cantidad de células viables.

En primer lugar, se estudiaron los 6 productos finales de los derivados de carbohidratos, **12 α** , **12 β** , **13 α** , **13 β** , **14 α** y **14 β** , para hacer un primer cribado sobre la actividad anticancerosa selectiva de los mismos. Para una mejor comparación se estudiaron junto al fármaco Aprepitant, que es un antagonista conocido y bien estudiado de los receptores NK1, y con el fármaco Cisplatino, el cual se utiliza de forma rutinaria como medicamento anticanceroso en clínica.

Para llevar a cabo los ensayos, se sembraron 5×10^3 células por pocillo y 3×10^3 células por pocillo las líneas celulares MRC-5 y A549 respectivamente, en placas ELISA de 96 pocillos y se dejaron crecer durante 24 h. Seguidamente, dichas células fueron tratadas con distintas

concentraciones de los compuestos anteriormente mencionados: 0, 3, 10, 32, 100, 320 y 1000 μM y se incubaron durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de crecimiento y se añadió 125 μL de una solución de MTT en medio de cultivo (1 mg/mL) a cada pocillo y se dejó actuar durante 3 h. A continuación, se adicionó 80 μL de dodecilsulfato sódico (SDS) al 20 % en HCl 20 nM, para disolver el posible producto formado, formazán, y se incubaron las placas durante 15 h a 37 °C. La absorbancia de cada pocillo se midió con un espectrofotómetro multiplacas a 540 nm para cuantificar la supervivencia celular (lector de placas multimodal Synergy HT, BIO-TEC, CITIUS).

Debido a los excelentes resultados obtenidos especialmente con el compuesto **14 α** , los siguientes ensayos biológicos se realizan con dicho compuesto.

Para seguir observando su capacidad anticancerosa selectiva se somete al compuesto **14 α** al ensayo MTT de nuevo. En este caso las líneas celulares utilizadas fueron MCF-7, MCF-10, UACC-62 y VH-10. Se siguieron las mismas condiciones del experimento descritas anteriormente, cultivándose 5×10^3 células por pocillo en las líneas celulares sanas (MCF-10 y VH-10) y 3×10^3 células por pocillo en las líneas celulares cancerosas (MCF-7 y UACC-62).

Una vez estudiado la actividad citotoxicidad mediante el ensayo con MTT, se procedió a estudiar también la viabilidad celular del compuesto **14 α** mediante el ensayo de resazurina.

- Ensayo del 7-hidroxi-10-oxidofenoxazina-10-ium-3-ona (Resazurina)

Al igual que el experimento MTT, el ensayo de resazurina consiste en determinar la viabilidad celular a partir de la actividad metabólica de sus mitocondrias. En este caso el compuesto que se reduce a partir de las enzimas NADH deshidrogenasas es la resazurina. Este compuesto es de color azul no fluorescente en estado oxidado, cuando es reducido al compuesto 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona (resorufina) se vuelve de color rosa y emite una señal fluorescente, lo que permite determinar la funcionabilidad mitocondrial y por tanto la viabilidad celular. La cantidad

de resorufina es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Los resultados se obtienen midiendo la absorbancia o DO de cada pocillo a través de un espectrofotómetro multiplaca, o a diferencia del ensayo anterior, también podrían obtenerse por fluorimetría ya que el compuesto resultante es muy fluorescente(Figura 31).^{125,126}

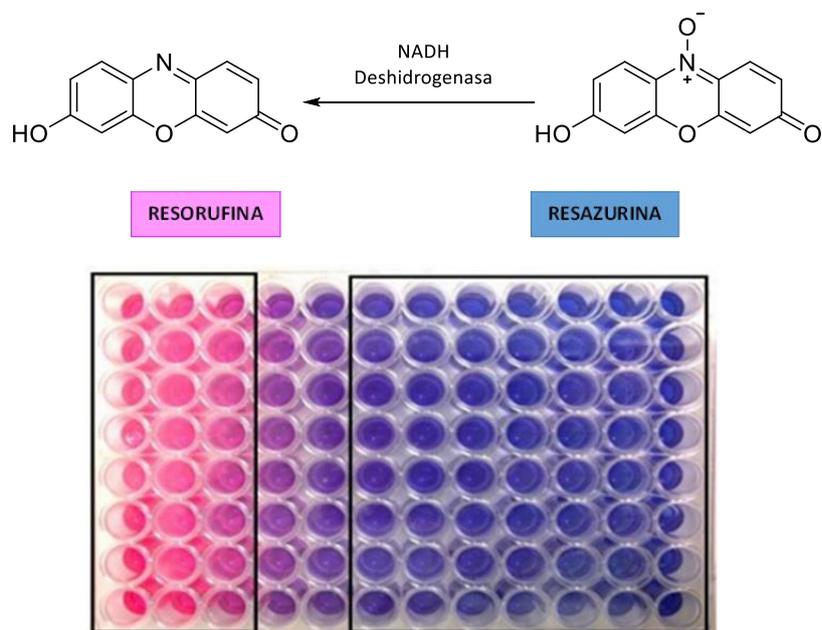


Figura 31. Reducción de Resorufina a Resazurina. Placa de ELISA donde puede comprobarse de manera visual las células vivas, aquellas que tiñen el pocillo de rosa.

Para llevar a cabo los ensayos se sembraron las siguientes líneas celulares: HaCaT, GAMG, HNO-97, A64-CLS, MeWo, T-24, PC-3, Sk-Br-3, MDA-MB-231, AN3Ca, Sk-OV-3, KATO-III, HepG-2 y HT-29. De la línea celular HaCaT (células sanas) se sembraron 5×10^3 células por pocillo, del resto de líneas celulares cancerosas se sembraron 3×10^3 células por pocillo, en placas ELISA de 96 pocillos y se dejaron crecer durante 24 h. Seguidamente, dichas células fueron tratadas con distintas concentraciones (0, 3, 10, 32, 100, 320 y 1000 μM) de los compuestos **14 α** y Cisplatino durante 96 h. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de crecimiento y se añadió 150 μL de

una disolución de resazurina en medio de cultivo (20 µg/mL) a cada pocillo y se dejó actuar durante 3 h. La absorbancia de cada pocillo se midió con un espectrofotómetro multiplaca a 540-620 nm para cuantificar la supervivencia celular (lector de placas multimodal Synergy HT, BIO-TEC, CITIUS).

En ambos ensayos, los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular en relación con las células no tratadas (controles). Todos los datos se promediaron a partir de 2-5 experimentos independientes y se expresaron como las medias \pm error estándar de la media (SEM), concretamente se utilizó el valor IC_{50} el cual representa la mínima cantidad de producto que es necesario para inhibir un proceso biológico concreto en un 50 %, en nuestro caso la viabilidad celular. Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba t-Student. Un valor de $p > 0,05$ no se considera estadísticamente significativo y no está representado por ningún símbolo. Un valor de $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo y se indica con un asterisco (*), un valor de $p < 0,01$ se indica con doble asterisco (**) y un valor de $p < 0,001$ se indica con un triple asterisco (***)).

También indicamos los índices de selectividad (IS) los cuales son útiles para evaluar el potencial anticanceroso *in vitro*. Los IS se calcularon como la media del valor IC_{50} en la línea celular sana dividido por la IC_{50} en la línea celular de cáncer obtenida en cada experimento independiente.

- **Estudios de los mecanismos de acción responsables de la actividad anticancerosa**
 - Estudio de inhibición de la glucólisis

Como se explica detalladamente en el apartado de Resultados y Discusión de este Capítulo, uno de los medios principales que tienen las células para obtener energía es la glucólisis, en base a esto decidimos evaluar si nuestro compuesto **14 α** presentaba un comportamiento inhibitorio de la glucólisis. Para ello medimos la concentración de glucosa y lactato en la línea celular A549 sin

tratar, tratadas con el antagonista NK1 **14 α** y tratadas con dicloroacetato, inhibidor de la glucólisis.

En el estudio se sembraron 4×10^5 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Después de 10 h, se renovó el medio y se agregó una disolución de **14 α** (32 μ M, en el medio correspondiente) a un grupo celular, dicloroacetato (32 μ M, en el medio correspondiente) a otro grupo celular y se dejó un tercer grupo sin tratar. Las células se mantuvieron expuestas a los compuestos durante 8 h. Finalmente, las concentraciones de glucosa y de lactato se determinaron en sobrenadantes celulares utilizando el analizador *Accutrend Plus* junto con tiras de glucosa *Accutrend* y tiras *BM-Lactate* (Roche Diagnostics).

Los resultados se expresaron como porcentaje de producción de lactato y porcentaje de consumo de glucosa, y se muestran como la media \pm SEM (IC_{50}) de los experimentos independientes.

○ Estudio de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

En este caso se determina si la actividad anticancerosa de nuestro compuesto **14 α** se debe a un aumento de la producción de ROS provocada por este.

Para llevar a cabo el estudio se utilizó el ensayo MTT (descrito anteriormente). Se eligió la línea celular cancerosa A549 de la cual se sembró 3×10^3 células por pocillo en placas ELISA de 96 pocillos y se dejaron crecer durante 24 h. Seguidamente, dichas células fueron tratadas con **14 α** durante 48 h en presencia y ausencia de tres antioxidantes: N-acetilcisteína (NAC), catalasa y Mn (III) pentacloruro de tetrakis (1-metil-4-piridil) porfirina (MnTMPyP). Se realizaron 3 experimentos diferentes con cada uno de los antioxidantes y **14 α** . Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes, por una parte, se trataron las células con cada uno de los antioxidantes en una cantidad de 5 mM (NAC, catalasa o MnTMPyP). Seguidamente, otro grupo celular se trató sólo con el compuesto **14 α** en dos concentraciones diferentes 10 y 100 μ m y, por último, otros

dos grupos celulares se trataron con una mezcla de cada uno de los antioxidantes y **14 α** en las dos concentraciones distintas 10 μM de **14 α** + 5 mM de antioxidante, y 100 μM de **14 α** + 5 mM de antioxidante (Figura 32).

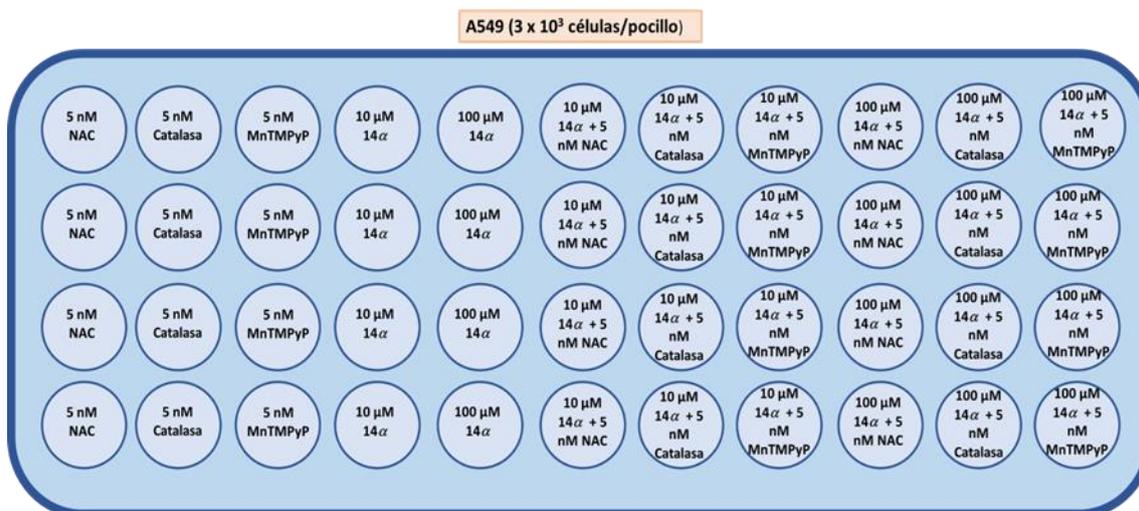


Figura 32. Esquema de la placa ELISA del estudio ROS.

Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio de crecimiento y se añadió 125 μL de solución MTT en medio de cultivo (1 mg/mL) a cada pocillo y se dejó actuar durante 3 h. A continuación, se adicionó 80 μL de SDS al 20 % en HCl 20 nM, para disolver el posible producto formado, formazán, y se incubaron las placas durante 15 h a 37 °C. La absorbancia de cada pocillo se midió con un espectrofotómetro multiplacas a 540 nm para cuantificar la supervivencia celular.

Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular en relación con las células tratadas sólo con el compuesto **14 α** . Todos los datos se promediaron a partir de 3 experimentos independientes y se expresaron como la medias \pm SEM (IC_{50}) de los experimentos independientes.

○ Estudio del daño en el ADN celular

El objetivo es determinar si la capacidad de recuperación de las células cancerígenas a daños celulares se ve perjudicada al ser tratadas dichas células con nuestro compuesto **14α**. En concreto, nos centramos en el proceso de reparación de daños basado en la recombinación homóloga (RH), proceso que se detalla detenidamente en el apartado de Resultados y discusión. Para dicho estudio utilizamos células deficientes y eficientes en el proceso de RH.

Para llevar a cabo el estudio, se utilizó el ensayo MTT (descrito anteriormente) con las líneas celulares VC-8, deficiente en el proceso de recombinación homóloga y VC8-B2, competentes en el proceso de recombinación homóloga. Se sembraron 5×10^3 células por pocillo en placas ELISA de 96 pocillos y se dejaron crecer durante 24 h. Seguidamente dichas células fueron tratadas con **14α** a distintas concentraciones (10, 32, 100 y 320 μM) y se incubaron otras 24 h. Después de un periodo de recuperación de 48 h, se retiró el medio de cultivo y se añadió 125 μL de solución MTT en medio de cultivo (1 mg/mL) a cada pocillo y se dejó actuar durante 3 h. A continuación, se adicionó 80 μL de SDS al 20 % en HCl 20 nM, para disolver el posible producto formado, formazán, y se incubaron las placas durante 15 h a 37 °C. La absorbancia de cada pocillo se midió con un espectrofotómetro multiplacas a 540 nm para cuantificar la supervivencia celular.

Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular en relación con las células no tratadas con **14α**. Todos los datos se promediaron a partir de 3 experimentos independientes y se expresaron como la medias \pm SEM (IC_{50}) de los experimentos independientes.

- Evaluación del efecto antagonista sobre los receptores NK1. Test IPone

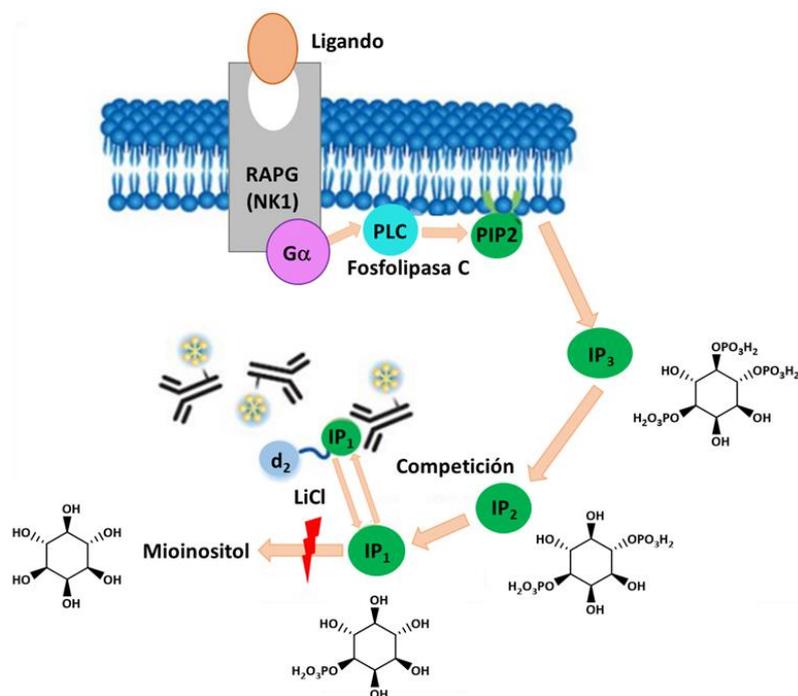


Figura 33. Representación esquemática de la producción de IP₁ por parte de la célula y su detección. Imagen tomada de la Tesis Doctoral de Rocío Recio, modificada.

La detección de inositol 1-monofosfato (IP₁) mediante el test IPone es una técnica muy eficaz para detectar el efecto antagonista o agonista de nuestro compuesto. Se basa, a grandes rasgos, en la utilización de un anticuerpo monoclonal específico para el IP₁ marcado con criptato de terbio, donde el IP₁ está a su vez marcado con el fluoróforo d₂ (Figura 33).

Entre los dos fluoróforos tiene lugar una transferencia de energía que permite la detección de IP₁ mediante el llamado fenómeno FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).¹²⁷ Esta

técnica se basa en una transferencia de energía no radiactiva de un fluoróforo excitado (donador) sobre otro fluoróforo (aceptor) si ambos se encuentran a la distancia adecuada.

El inmunoensayo mide la competición entre el IP₁ nativo producido por la célula y el IP₁ marcado con el aceptor d₂ (Figuras 33 y 34). Si no se produce fluorescencia querrá decir que la célula tiene una mayor cantidad de IP₁ nativo y que por tanto la molécula es agonista o, por el contrario, si sí se produce querrá decir que hay menos cantidad de este y la molécula es antagonista.

En nuestro caso, para cuantificar el IP₁ producido por la célula realizamos un ensayo basado en la técnica HTRF® (una variante de la técnica FRET), en la cual usamos Lumi4®-Tb (Tb₂ + Criptato) como donador y d₂ como aceptor (Figura 34)

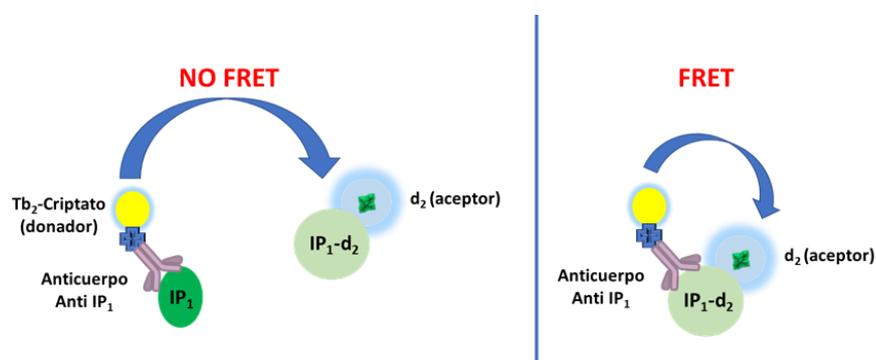


Figura 34. Esquema representativo del fenómeno de FRET que tiene lugar en el test IPone.

En concreto, se han realizado estudios tanto de actividad agonista como antagonista de **14α** y **13α**, así como del compuesto derivado de éster 3,5(bis-trifluorometil)benzílico de N-acetil-L-triptófano (**L732,138**), que hemos usado como sustrato de referencia antagonista (control negativo) y de la SP, para obtener un sustrato de referencia agonista (control positivo).

Para este ensayo se han utilizado células transfectadas mediante electroporación de manera transitoria a través de un vector plasmídico que contiene la secuencia genética que codifica para

el receptor NK1 y para genes de resistencia a la ampicilina y la neomicina (pRK5). Para medir la expresión del receptor transfectado, se ha incluido en este mismo vector un gen reportero 6-His anclado al C-terminal del receptor NK-1, dando lugar al plásmido pRK5/NK1-6-His. De este modo, utilizando un anticuerpo primario anti-6-His mediante un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) se pudo determinar la presencia del receptor NK1 en las células transfectadas.¹²⁸ Además, nos permitió obtener las condiciones idóneas para llevar a cabo el Test IPone.

Es importante indicar que el plásmido se ha obtenido mediante transfección bacteriana,¹²⁹ utilizando la bacteria *Escherichia coli*. Este proceso permite la introducción de plásmidos naturales o artificiales dentro de bacterias para obtener múltiples copias de los mismos, de una forma fácil y rápida.

Para llevar a cabo el estudio se utilizó la línea celular **CHO** (célula de ovario de hámster chino). A continuación, se explicarán los distintos pasos del ensayo IPone:

(i) **Transfección:** por electroporación se realizó la transfección transitoria del plásmido a la línea celular **CHO** en un volumen total de 300 μ L de buffer de electroporación (50 mM K_2HPO_4 , 20 mM CH_3COOK , 20 mM KOH y 26 mM $MgSO_4$, pH 7,4), el cual contenía 10 μ g de ADN plasmídico (pRK5-Nk1-6-His), y una concentración de 107 células **CHO**. Tras la electroporación (280 V, 1 mF, Gene Zapper 450/2500; IBI, New Haven, CT), las células se suspendieron en medio completo y se sembraron en placas ELISA de 96 pocillos con una densidad de 105 células por pocillo. Las placas se cubrieron con poliornitina diluida en PBS, se incubaron a 37 °C durante 30 min. y, finalmente, se lavaron con PBS antes de sembrarlas.

(ii) **Test ELISA:** se utiliza para medir la expresión de los receptores transfectados. Las células se transfectaron con el plásmido pRK5-NK1-6-His, y después de 24 h de la electroporación, se fijaron en placas ELISA con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 5 min. y, a continuación, se lavaron 3 veces con PBS. Seguidamente, se realizó una etapa de bloqueo (para evitar que se

unieran de manera inespecífica otras moléculas que pueden alterar los resultados) añadiéndole a cada pocillo una solución de PBS + 1 % de FBS y realizando una incubación de 30 min. Para terminar la parte de bloqueo, las células se volvieron a lavar 5 veces con la solución de PBS + 1 % de FBS. Después, se añadió el anticuerpo primario anti-6His (0,5 µg/ML) y se incubó durante 30 min. (este anticuerpo se unirá al plásmido el cual contiene el gen reportero 6His). Una vez terminada la incubación, se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con la solución PBS + 1% FBS para eliminar todo aquello que no se había fijado. En el siguiente paso, se añadió el anticuerpo secundario o anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (1/1000; Amersham, Orsay, Francia). Este no es más que un anticuerpo unido a una enzima, en este caso la peroxidasa el cual se unirá al anticuerpo primario de forma selectiva. Tras añadir el anticuerpo conjugado las células se incubaron durante 30 min. Pasado ese tiempo, las células se lavaron 3 veces con la solución PBS + 1 % de FBS. Finalmente, se añadieron a los pocillos una solución que contenía 60 µL de PBS y 20 µL de Supersignal ELISA Femto (Perbio-Pierce, Brebières, Francia) y se incubó durante 30 min. La solución ELISA está compuesta por un substrato para la encima peroxidasa, (unida al anticuerpo secundario o anticuerpo anti-ratón) que suele ser H₂O₂ y un cromógeno, en nuestro caso OPD (O-Fenilendiamina) . Al verter la solución sobre los pocillos, aquellos que tengan el anticuerpo secundario unido reaccionaran con el substrato de la solución y el O₂ generado hará que el cromógeno se oxide, haciendo que el medio del pocillo cambie de color. La luminiscencia se leyó usando un Wallac Victor 2 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Courtaboeuf, Francia).

(iii) **Acumulación de segundo mensajero (IP₁):** la activación e inhibición de la ruta de IP₁ por los agonistas y antagonistas del receptor NK1 respectivamente, se determinó usando el kit IPone (Cisbio Bioassays, Bagnols-sur-Cèze, Francia). Tras la transfección, 105 células se distribuyeron en 100 µL de medio de cultivo completo a una placa ELISA de 96 pocillos. Tras 24 h, el medio se eliminó y se reemplazó por 40 µL de medio de incubación que contenía el agonista y/o antagonista en la concentración adecuada. El ensayo HTRF (para medir la señal de FRET) se

realizó tal y como se describió anteriormente. Tras 30 min. de incubación a 37 °C con el agonista, se añadieron a los pocillos 15 µL del anticuerpo (donador) y 15 µL del competidor (aceptor) diluido en el tampón de lisis proporcionado en el kit. Como control negativo, algunos pocillos sólo contenían el anticuerpo marcado con el fluoróforo donador.

Después de 1 h de incubación a t.a., la emisión de fluorescencia se midió a 620 nm y 665 nm con un fluorómetro RubyStar (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania) equipado con un láser de nitrógeno como fuente de excitación (337 nm). La lectura de 400 µs se registró con un retardo de 50 µs con la finalidad de eliminar el ruido de fondo de la fluorescencia de corta vida derivada del anticuerpo marcado con el fluoróforo acepto. La intensidad de fluorescencia se corresponde a la emisión total de criptato de terbio y la señal de FRET, respectivamente. La señal específica FRET se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\Delta F \% = 100 \times \frac{R_{pos} - R_{neg}}{R_{neg}}$$

- R_{pos} : ratio de fluorescencia (620 nm-665 nm) calculado en los pocillos con los anticuerpos marcados tanto con donador como con acepto.
- R_{neg} : ratio de fluorescencia (620 nm-665 nm) calculado en los pocillos con los anticuerpos marcados con donador.

La señal de FRET (ΔF %), es inversamente proporcional a la concentración de IP_1 en las células. Dicha señal se transforma en acumulación de IP_1 utilizando una curva de calibración preparada en la misma placa. Es importante destacar que todas las comparaciones entre el efecto agonista y antagonista se realizaron el mismo día, en el mismo cultivo y la misma placa, y frente al efecto de la SP. Los experimentos se repitieron al menos 3 veces en cultivos diferentes.

Las curvas de activación/inhibición se representaron como el logaritmo de las concentraciones de agonista o antagonista y se ajustaron con la ecuación de Hill, la cual describe cómo un ligando se unirá a una proteína receptora en presencia de otros ligandos (unión cooperativa), para obtener:

- EC_{50} : representa la mínima concentración de un compuesto donde se observa el 50 % del efecto máximo que ejerce el mismo, y equivale a la constante de activación (K).
- Valores máximos y mínimos.
- Coeficiente de Hill (n): expresión numérica que indica la fracción de una macromolécula (ej. Receptor) saturada por un ligando. Este indicador estima el grado de cooperatividad en el proceso de unión. Un coeficiente de 1 indica que la unión es un proceso independiente de la presencia de otros ligandos. Los coeficientes $n > 1$ indican una propensión positiva a la unión, mientras que aquellos $n < 1$ indican una propensión negativa.

La ecuación para obtener el coeficiente de Hill es la siguiente:

$$\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d}$$

- θ : porcentaje de sitios de unión ocupados.
- L: concentración de ligandos libres.
- n: coeficiente de Hill que representa el grado de cooperatividad.

- K_d : constante de disociación y es igual a la concentración de ligando cuando la mitad de los sitios de unión están llenos.

El efecto inhibitorio de los antagonistas NK1 no peptídicos se estudió siguiendo el protocolo de Arunlakshana and Schild.¹³⁰ A la preincubación durante 10 min le siguió la incubación de 30 min. con el antagonista y la SP. La acumulación de IP_1 se midió como se ha explicado anteriormente. A diferencia de la activación, la inhibición no se puede obtener de manera directa, para ello es necesario calcular la K_{inact} utilizando la siguiente ecuación:

$$K_{inact} = \frac{IC_{50}}{\left[\frac{[h] + K_{act}}{K_{act}} \right]}$$

- IC_{50} : concentración mínima a la cual el ligando produce el 50 % de inhibición.
- $[h]$: concentración del ligando utilizado para la estimulación en presencia del antagonista.
- K_{act} : constante de activación del ligando agonista (EC_{50}).

- **Ensayos de afinidad ligando-receptor**

El ensayo de afinidad o de unión fue realizado por los laboratorios Eurofins Cerep (Francia). La afinidad de unión del receptor por el compuesto **14 α** fue determinado midiendo la capacidad de éste para desplazar a la SP, [¹²⁵I]SP (0,005 nM) en células U-373MG. Para definir la unión no específica se utilizó [Sar9, Met(O2)11]-SP (1 μ M) incubándola durante 30 min.

La unión específica del ligando a los receptores se define como la diferencia entre la unión total y la unión inespecífica determinada por un exceso de ligando no marcado. Todos los datos se promediaron a partir de 5 experimentos independientes, y los resultados se expresan como:

- Porcentaje de unión específica de control:

$$\left[\frac{\text{UEM}}{\text{UEC}} \right] \times 100$$

- Porcentaje de inhibición de la unión específica de control, obtenido en presencia de los compuestos de estudio:

$$\left\{ 100 \left[\frac{\text{UEM}}{\text{UEC}} \right] \times 100 \right\}$$

- UEM: unión específica medida
- UEC: unión específica de control.

Para determinar el IC_{50} y el coeficiente de Hill (n) se realizó un análisis de la curva de competencia generada a partir de la media de los valores obtenidos en los diferentes experimentos, y se utilizó la siguiente ecuación de Hill:

$$\left\{ Y = D + \left[\frac{A - D}{\left(1 + \frac{C}{C_{50}} \right)} \right] \times n \right\}$$

- Y: unión específica.
- D: unión específica mínima.
- A: unión específica máxima.
- C: concentración del compuesto.
- C_{50} es IC_{50} .
- n: coeficiente de Hill

Este análisis se realizó utilizando un software desarrollado en Cerep (Hill software) y validado por comparación con los datos generados por el software comercial SigmaPlot 4.0 para Windows (©1997 de SPSS Inc.).

La constante de inhibición (K_i) se calculó utilizando la ecuación de Cheng Prusoff:

$$\left\{ K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \left(\frac{L}{K_D}\right)\right)} \right\}$$

- L: concentración del radioligando en el ensayo.
- K_D : afinidad del radioligando por el receptor. Para determinarla se utiliza un diagrama de dispersión.

Capítulo III. Funcionalización de nanopartículas magnéticas: diseño y síntesis de ligandos

III. Funcionalización de nanopartículas magnéticas: diseño y síntesis de ligandos

III.1. Introducción y objetivos

III.1.1. Nanotecnología

La nanotecnología es la ciencia que involucra la caracterización, fabricación y/o manipulación de estructuras, dispositivos o materiales que tienen al menos una dimensión en la escala nanométrica, entre 1-100 nm.¹³¹ Existen numerosas definiciones de nanotecnología, no obstante, la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de EE.UU.¹³² sólo la considera como tal si cumple los siguientes propósitos:

- Investigación y desarrollo tecnológico a nivel atómico, molecular o macromolecular en escala nanométrica.
- Creación y uso de estructuras, dispositivos y sistemas que tienen propiedades y funciones novedosas debido a su pequeño tamaño.
- Habilidad de controlar y trabajar en escala atómica.

En la actualidad, el desarrollo de nanotecnologías se considera un área de investigación interdisciplinaria que reúne a investigadores teóricos y experimentales de diversos campos tales como biología, química, física e ingeniería.¹³³ El desarrollo de herramientas analíticas modernas, que pueden detectar y caracterizar los diversos aspectos fisicoquímicos de los materiales a nanoescala, ha impulsado aún más los progresos en este campo. La nanotecnología ha comenzado a proporcionar un método sistemático para el estudio y el ajuste de los materiales para adaptarse a aplicaciones específicas, desde la creación de procesadores más rápidos en el campo de la electrónica, al uso de nuevos materiales en la construcción, pasando por biosensores para control medioambiental o baterías energéticas más eficientes. También, en el campo de la biomedicina ha irrumpido con fuerza, tanto para el diagnóstico de enfermedades

como para su tratamiento.¹³⁴ Este último punto, como se ha indicado en el capítulo anterior, es en el que nos hemos centrado en nuestro proyecto de Tesis y constituye el eje fundamental del presente capítulo.

- **Breve historia de la nanotecnología**

A pesar de que la nanotecnología es un término relativamente moderno, en la línea de tiempo aparecen ejemplos premodernos de nanotecnología, junto con descubrimientos e hitos de la era moderna que han supuesto un avance conceptual (Figura 35). El ejemplo más antiguo que se conoce es el de La Copa de Lycurgus (Roma, siglo IV), vidrio dicróico donde el oro y la plata coloidales permiten que al incidir la luz sobre ella desde el exterior se vea verde opaco, y cuando la luz brilla en el interior se vea roja translúcida. Otro ejemplo, quizás más conocido, es el de las vidrieras de las catedrales europeas (siglos IV-XV) que deben sus ricos colores a la presencia de nanopartículas de cloruro de oro y otros óxidos y cloruros metálicos. Ya en la era moderna, gracias a una instrumentación científica cada vez más sofisticada, se desarrollaron herramientas más avanzadas, por ejemplo, Erwin Müller en 1936 inventó el microscopio de efecto de campo, permitiendo obtener imágenes de materiales con resolución casi atómica.¹³² No obstante, no fue hasta 1959 cuando el físico Richard Feynman, al que muchos consideran el padre de la nanotecnología, dio su célebre conferencia titulada “There’s Plenty of Room at the Bottom” ante la Sociedad Americana de Física, describiendo procesos para manipular y controlar la materia a nivel de átomos y moléculas individuales, insistiendo en el gran potencial que se escondía tras estas técnicas.¹³⁵ Años más tarde, Norio Taniguchi fue quien acuñó el término “Nanotecnología” y en 1981, con el descubrimiento del microscopio de efecto túnel por parte de los científicos Heinrich Rohrer y Gerd Binnig, se pudieron ver por primera vez átomos individuales,¹³⁶ comenzando así la denominada “Nanotecnología Moderna” que permite estudiar y manipular las moléculas a escala atómica. Este descubrimiento les valió el Premio Nobel de Física en 1986. Otro gran logro para este campo se debe al francés Jean Pierre Sauvage, el británico J. Frasser

Stoddart y el holandés Bernard Feringa que por sus aportaciones al diseño y síntesis de máquinas moleculares obtuvieron el Premio Nóbel de Química en 2016. Con este descubrimiento los premiados miniaturizaron máquinas y llevaron la química hacia una nueva dimensión.^{137,138}

A continuación, presentamos algunas de las fechas y acontecimientos más destacados en el campo de la nanotecnología acaecidos hasta la actualidad.¹³⁸

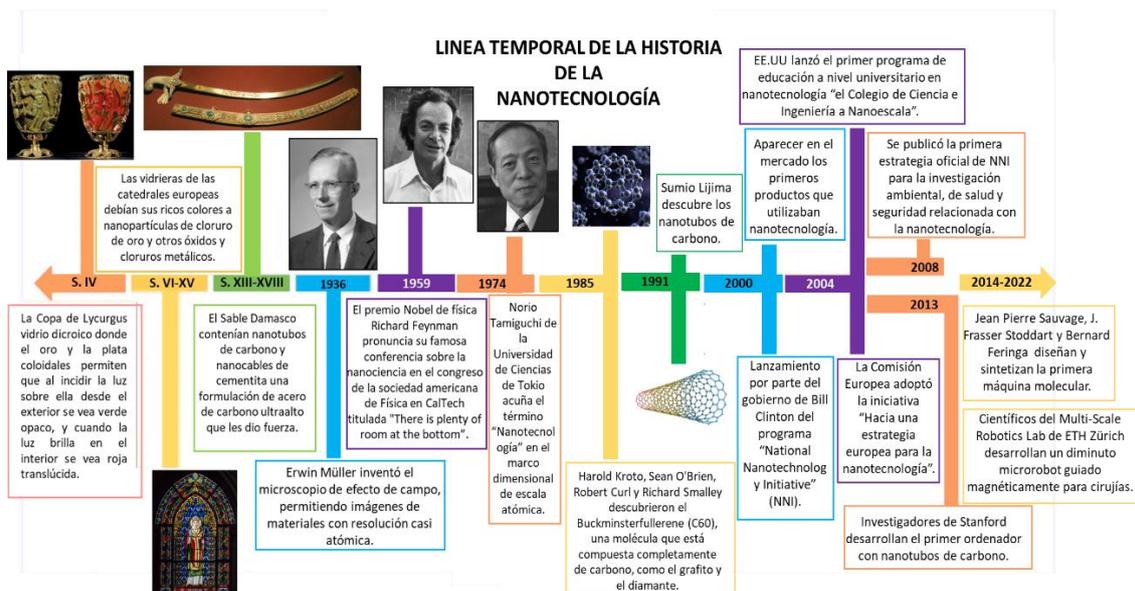


Figura 35. Resumen de la línea temporal de la historia de la nanotecnología.

III.1.2. Nanomateriales

Los nanomateriales (NMs) se definen como materiales que tienen una o varias dimensiones en el rango nanométrico, y como resultado de su pequeño tamaño presentan propiedades fisicoquímicas que difieren del mismo material a mayor tamaño.¹³⁹ La reducción del tamaño de la materia por debajo de un tamaño crítico, aumenta la superficie específica (relación

superficie/volumen) lo que lleva a su vez a una mayor reactividad y al dominio de los efectos cuánticos.¹⁴⁰

Existen dos aproximaciones para la preparación de NMs, por un lado, las que se denominan métodos descendentes, Top-Down, y por otra los métodos ascendentes, Bottom-Up.

- Top-Down: se basa en la reducción de tamaño. El material de partida se reduce usando métodos mecánicos o químicos para llegar al material con el tamaño deseado. Este método utiliza procedimientos tradicionales de taller o microfabricación para cortar y dar forma. Las estrategias más usuales son la trituración mecánica, el uso de láser o la vaporización.^{141,142}
- Bottom-Up: se basa en la construcción de la estructura deseada átomo por átomo, molécula por molécula o cluster por cluster. Se parte de una estructura nanométrica que mediante autoensamblado da lugar a una estructura de mayor complejidad molecular, funcional y con propiedades específicas. Esta técnica es la más habitual para la síntesis de NPs, siendo los procedimientos más habituales la cristalización, descomposición capa a capa, extracción y vaporización de disolventes.^{141,142}

Para comprender y apreciar adecuadamente la diversidad de los NMs se requiere alguna forma de clasificación. Los NMs pueden clasificarse de varias formas dependiendo de diferentes factores tales como: composición, morfología, uniformidad, aglomeración, dimensionalidad, etc. Por ejemplo:

(i) Según su morfología, generalmente se encuentran NMs en forma esférica, ovalada, cúbica, prisma, helicoidal o pilar.¹⁴³

(ii) Conforme al número de dimensiones dentro de la nanoescala se observan los NMs: 0-dimensionales (0D), todas sus dimensiones en el rango nanométrico (NPs); unidimensionales (1D), dos de sus dimensiones en el rango nanométrico (nanocilindros, nanofibras);

bidimensionales (2D), una dimensión en el rango nanométrico (nanoláminas) y tridimensionales (3D), material no nanométrico.¹⁴⁴

(iii) De acuerdo a su composición química, donde diferenciamos entre NMs orgánicos e inorgánicos. Las NPs de metal, de óxido de metal, quantum dots y sílice mesoporosa, son NMs inorgánicos. Los NMs basados principalmente en carbono e hidrógeno se definen como NMs orgánicos, incluidos los polímeros compactos (nanoesferas, nanocápsulas), micelas, liposomas, dendrímeros y nanogeles. Debido a la gran cantidad de estudios y aplicaciones, las formas alotrópicas del carbono como el grafeno, los nanotubos de carbono y los fullerenos, se consideran una clase separada de nanomaterial con una amplia gama de morfologías (Figura 36).^{145,146}

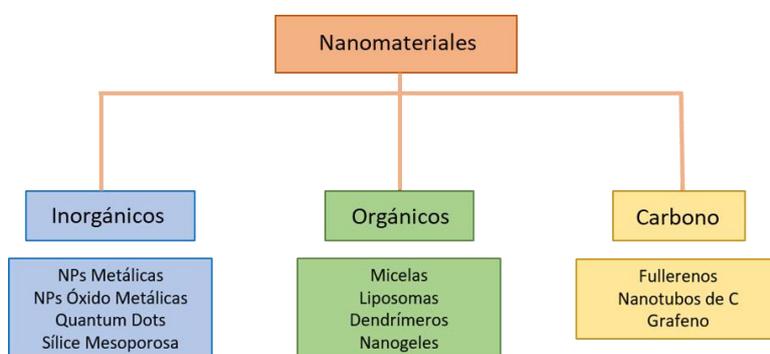


Figura 36. Esquema clasificación de nanomateriales.

En este trabajo usaremos esta última clasificación centrándonos en los NMs inorgánicos, concretamente en las NPs metálicas basadas en óxido metálicos.

III.1.2.1. Nanomateriales inorgánicos: nanopartículas metálicas

Como se ha indicado anteriormente, los NMs a base de metal, óxido de metal, quantum dots y sílice mesoporosa, son NMs inorgánicos. Los NMs inorgánicos que presentan normalmente

tamaños inferiores a 100 nm y se componen de uno o varios elementos metálicos se denominan NPs metálicas. Estas NPs incluyen comúnmente átomos de Ag, Au, Cu, Pd, Pt, Re, Ru, Zn, Co, Al, Cd, Pb, Fe o Ni, y pueden estar constituidas por un solo tipo de átomo, como las NPs de oro o por combinación de varios átomos, como las NPs de Fe_3O_4 .¹⁴⁵ Estas últimas se consideran una variación de las NPs metálicas y se denominan NPs óxido-metálicas, las cuales se forman por reacción entre el oxígeno electronegativo y el metal electropositivo. Las más abundantes suelen ser Al_2O_3 , TiO_2 , Fe_3O_4 , Fe_2O_3 , SiO_2 , ZnO y CeO_2 , pudiéndose modificar y dar como resultado hetero-estructuras y óxidos mixtos.¹⁴⁵

Las NPs metálicas muestran características interesantes como resonancia de plasmón de superficie (SPR), alta reactividad y/o amplia absorción en el espectro electromagnético. Debido a esto, las NPs son materiales muy interesantes para numerosas aplicaciones prácticas en diversos campos de conocimiento.¹⁴⁵ En biología y biomedicina, por ejemplo, pueden usarse para el bioetiquetado, ya que producen patrones luminiscentes y permiten llevar a cabo técnicas como la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). No obstante, lo más llamativo y el motivo por el cual las NPs metálicas son objeto de gran estudio en la actualidad es por su capacidad para actuar como agentes teranósticos, como ya se ha explicado detalladamente en el Capítulo I. En este sentido las NPs metálicas magnéticas son las que están despertando mayor interés en el campo de la medicina.

III.1.2.2. Nanopartículas magnéticas

Las NPs magnéticas están formadas por elementos magnéticos como Fe, Mn, Co o Ni, y dependiendo del tamaño, composición y morfología, pueden exhibir un comportamiento ferromagnético, paramagnético o superparamagnético. Las NPMs tienden a agregarse en presencia de un campo magnético externo, y en el caso de las NPs paramagnéticas y superparamagnéticas, son fácilmente dispersadas al eliminar la fuente magnética. Las NPs superparamagnéticas tienen una susceptibilidad magnética más alta que las paramagnéticas.¹⁴⁶⁻

¹⁴⁸ Por el contrario, en las NPMs ferromagnéticas, persiste cierta magnetización después de retirar la fuente magnética.¹⁴⁹

Entre los distintos tipos de NPMs que existen nos hemos interesado por las NPMs de óxido de hierro superparamagnéticas (IONPs), siendo la magnetita Fe_3O_4 , la hematita $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, o la maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ algunos de sus ejemplos más representativos. En este Capítulo, nos centraremos concretamente en las NPs de magnetita, constituidas químicamente por un óxido mixto de hierro con un 27,6 % de O y 72,4 % de Fe. La magnetita cristaliza es un sistema cúbico centrado en las caras con estructura de espinela inversa, como se ilustra en la Figura 37. Su relación estequiométrica de cationes puede expresarse en la forma $\text{Fe}^{+3}(\text{Fe}^{+2}\text{Fe}^{+3})\text{O}_4$. Su celda unitaria está compuesta por 56 átomos de los cuales 32 son de O y 24 de Fe, de los cuales 16 están en forma férrica (Fe^{+3}) y 8 en forma ferrosa (Fe^{+2}). Los átomos de O forman una celda unitaria cúbica centrada en las caras y los cationes de Fe están alojados en los espacios intersticiales. Las posiciones tetraédricas corresponden específicamente a cationes Fe^{+3} y en las posiciones octaédricas se alojan cationes $\text{Fe}^{+2}\text{Fe}^{+3}$ por igual.¹⁵⁰

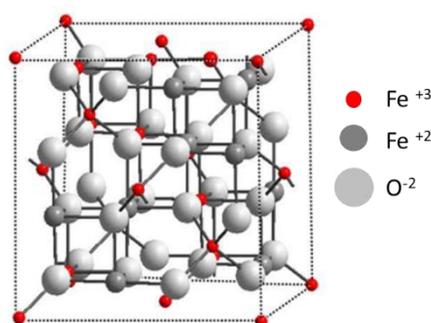


Figura 37. Estructura de espinela inversa de magnetita (Fe_3O_4) (Noval at col).

- **Síntesis de nanopartículas magnéticas**

En cuanto a su síntesis, existen aproximaciones eficientes para conseguir IONPs con una forma y tamaño determinada, de manera estable y monodispersa (NPs no agregadas), pudiéndose dividir en dos grandes grupos: métodos físicos y métodos químicos.¹⁵¹⁻¹⁵³

- Métodos físicos: A este tipo corresponden la electrodeposición o la deposición en fase gaseosa. Producen NMs con un alto grado de pureza y son fácilmente escalables. Sin embargo, es difícil controlar ciertas variables importantes para la aplicabilidad de las NPs, como la geometría, lo que lleva a descartar esta clase de métodos.¹⁵¹⁻¹⁵⁴

- Métodos químicos, ofrecen un mejor control sobre la homogeneidad, tamaño, morfología, geometría y propiedades magnéticas. Son reproducibles y escalables, y no requieren una purificación compleja ni cara después de su síntesis. Existen numerosos procesos químicos, en este trabajo hablaremos de los dos más importantes: co-precipitación (método más utilizado industrialmente) y descomposición térmica (método elegido en esta Tesis Doctoral).¹⁵¹⁻¹⁵⁴

- Co-precipitación: es un método sencillo y eficiente. Básicamente consiste en la reacción de sales ferrosas (Fe^{+2}) con sales férricas (Fe^{+3}) en medio acuoso. La precipitación se induce por la adición de una base al medio (p.ej. NH_4OH) en condiciones de atmósfera inerte. El control del tamaño de las NPs se realiza variando la acidez, la fuerza iónica, la temperatura, y/o la proporción Fe^{+2} : Fe^{+3} .¹⁵¹⁻¹⁵⁴
- Descomposición térmica: mediante este método se consigue la síntesis de NPs monodispersas y cristalinas, con un estrecho control del tamaño de partícula. El proceso ocurre por la descomposición a altas temperaturas de un precursor orgánico de hierro (p.ej. oleato de hierro, $\text{Fe}(\text{acac})_3$) en un disolvente orgánico (p.ej. octadeceno) que contienen un agente surfactante (normalmente ácido oleico). El control de las características físi-

cas de las NPs se puede llevar a cabo variando la rampa de temperatura durante el calentamiento, la proporción entre los reactivos, o el disolvente (Figura 38). El principal inconveniente de esta estrategia es el escalado industrial, debido a las altas temperaturas necesarias (entre 260 y 320 °C) y el requerimiento de disolventes orgánicos, generalmente tóxicos.¹⁵¹⁻¹⁵⁴

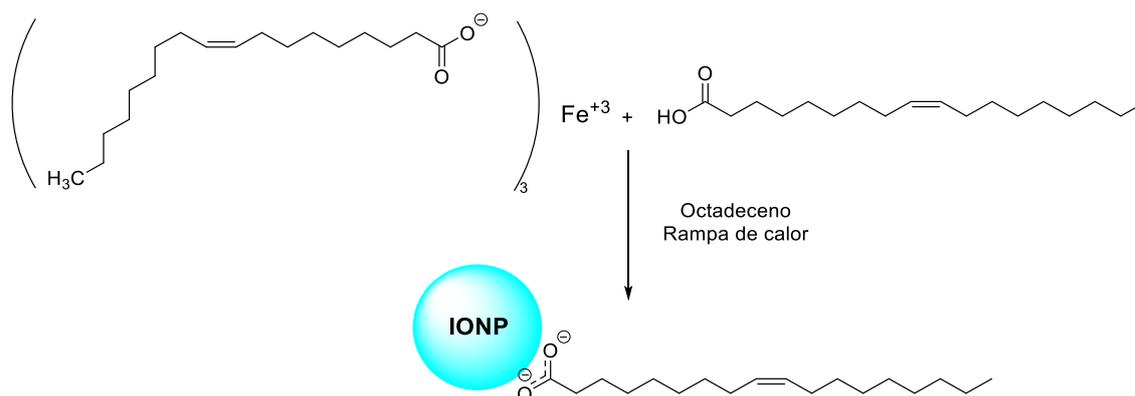


Figura 38. Síntesis de NPs de óxido de hierro utilizando el método de descomposición térmica.

- **Funcionalización de nanopartículas magnéticas**

Una de las consideraciones más importantes para la aplicación de las NPs magnéticas en el campo de la medicina es el recubrimiento orgánico que presenten, ya que ello le permitirá llevar a cabo la función para las que han sido diseñadas. En general, el recubrimiento tiene dos funciones principales: (i) Proteger a las partículas del sistema inmune del huésped, haciendo que escapen o pasen inadvertidas por el sistema fagocítico mononuclear; y (ii) otorgar a las NPs una función específica, ya sea la de unirse selectivamente a un tipo de células, liberar un fármaco sólo en determinadas condiciones o promover su internalización traspasando la membrana celular.¹⁵⁴

Existe una gran cantidad de materiales que pueden utilizarse para el recubrimiento de las NPs y su elección va a depender del objetivo final que busquemos. En la bibliografía podemos encontrar diferentes compuestos que pueden ser usados para la funcionalización de las NPs, como, por ejemplo, pequeñas moléculas orgánicas con capacidad de estabilizar las NPs en medios fisiológicos; y polímeros, compuestos orgánicos de alto peso molecular que presentan, por una parte, cadenas alquílicas hidrofóbicas, y por otra, grupos funcionales con capacidad de estabilizar las NPs en medios acuosos.^{154,155} En este Capítulo nos vamos a centrar en el recubrimiento de tipo polimérico.

El recubrimiento con polímeros puede realizarse junto con la síntesis de las NPs o después de esta. Existe una gran variedad de polímeros utilizados, tales como el dextrano, el polietilenglicol (PEG), la polietilenimina (PEI), el polietilmetacrilato (PEMA), el ácido poliacrílico (PAA), el poli (anhídrido maleico –alt-1- octadeceno (PMAO), o la polivinilpirrolidona (PVP).^{154,155} Generalmente, todos ellos son materiales biocompatibles, además, presentan diferentes grupos funcionales terminales que posibilitan su unión con otros compuestos como: agentes terapéuticos, material genético, agentes bioactivos o ligandos frente a dianas específicas.^{154,155} Además, la diferencia de cada polímero proporcionará una característica determinada a las NPs permitiendo controlar y modular el carácter hidrofílico y la carga superficial de estas, por lo que será recomendable el uso de uno u otro según el objetivo final que se busca.

El PEG proporciona a las NPs una carga superficial externa neutra en condiciones fisiológicas que disminuye la interacción con las proteínas y moléculas del plasma sanguíneo, lo que será de vital importancia para evitar el reconocimiento por el sistema inmune del huésped, y la consecuente eliminación del torrente sanguíneo antes de que realicen su misión.¹⁵⁶

Para llevar a cabo la funcionalización de las NPs mediante el intercambio de ligando, se necesita la preparación previa de un ligando que reaccione, por un lado, fuertemente con la superficie de las NPs de óxido de hierro, desplazando al agente surfactante que las protege, y, por otro

lado, que tenga grupos funcionales expuestos hacia el exterior que permitan su bioconjugación con determinadas biomoléculas.¹⁵⁷

En base a estos antecedentes, en esta parte de la Tesis nos proponemos sintetizar IONPs para su posterior funcionalización con ligandos que permitan su solubilización en medio acuoso, las hagan biocompatibles y permitan su posterior bioconjugación con un antagonista NK1 como agente de vectorización. En la Figura 39 se representa esquemáticamente la estructura general del diseño de nuestros ligandos.

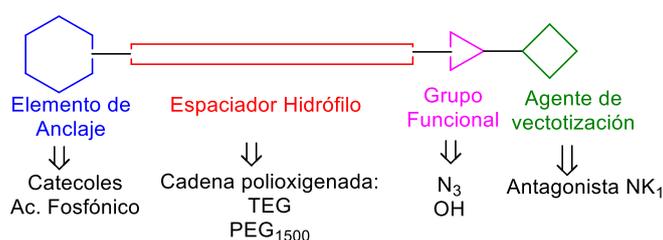


Figura 39. Esquema representativo de la estructura general de nuestro ligando

III.1.3. Objetivos

1. Síntesis y optimización de ligandos heterobifuncionales que permitan solubilizar nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (IONPs) en medio acuoso y su posterior bioconjugación.

1.1. Para su optimización se modificarán tres elementos fundamentales de su estructura:

(i) la naturaleza de los grupos funcionales que actúan como elementos de anclajes a las IONPs: derivados de catecoles y ácido fosfónico.

(ii) longitud del espaciador derivado de polietilenglicol (PEG de peso 200 Da y 1500 Da).

(iii) naturaleza del grupo funcional terminal del espaciador (azida y alcohol) para la posterior bioconjugación.

1.2. Estudio de la estabilidad de las IONPs funcionalizadas con los ligandos.

Teniendo en cuenta que el tamaño de las NPs depende de diversos factores, tales como la concentración de sales o la presencia de proteínas, nos proponemos estudiar la estabilidad coloidal de las NPs funcionalizadas en H₂O, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y suero fetal bovino (FBS).

1.3. Llevaremos a cabo estudios de citotoxicidad celular de los ligandos, así como de las NPs funcionalizadas con dichos ligandos (estudios de morfología y viabilidad celular) mediante ensayos MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindo).

2. *Vectorización del ligando seleccionado mediante su bioconjugación con un antagonista NK1, que le aporte al mismo tiempo actividad como agente anticanceroso.*

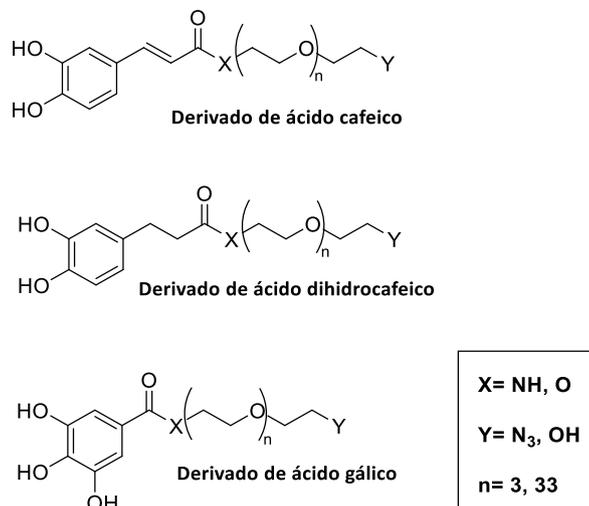
III.2. Resultados y discusión

III.2.1. Síntesis de ligandos derivados de catecol y funcionalización de IONPs

Las IONPs sintetizadas mediante la técnica de descomposición térmica produce NPs insolubles en medios acuosos debido a la presencia de agentes estabilizadores hidrófobos (también llamados surfactantes) como el ácido oleico recubriendo la su superficie. Por lo tanto, para llevar a cabo aplicaciones en el campo de la medicina es imprescindible realizar modificaciones en la superficie para transformar estas IONPs en materiales estables en agua, y que además permitan introducir otras funcionalidades como fármacos y/o vectores que amplíen las aplicaciones de estos materiales. Entre las distintas aproximaciones descritas para llevar a cabo esta tarea destacan principalmente dos por su simplicidad y efectividad, una basada en el intercambio de ligandos y otra basada en el recubrimiento polimérico o encapsulamiento en el interior de micelas o liposomas. En esta Tesis Doctoral, nos hemos centrado en la primera de estas aproximaciones.

El intercambio de ligandos conlleva la síntesis de entidades moleculares que sean capaces de interactuar fuertemente con la superficie de las IONPs desplazando al surfactante, permitiendo la incorporación de diferentes biomoléculas de interés, y la dispersión de las NPs en medios acuosos. Para ello, en el diseño de la estructura de nuestros ligandos (Figura 39, Capítulo III. Introducción), propusimos en primer lugar un catecol como grupo de anclaje, en ellos, los oxígenos fenólicos interactúan fuertemente con los átomos de Fe de la superficie de las IONPs, como es el caso de los derivados del ácido gálico descritos previamente por nuestro grupo de investigación.¹⁵⁸ Además, estos ligandos deben presentar un espaciador que aumente la hidrofilia de las IONPs permitiendo su dispersión en agua. En este sentido la molécula de polietilenglicol (PEG) es una cadena polioxigenada versátil e ideal para el intercambio de ligandos. Esta molécula aumenta la hidrofilia del ligando, se puede modular fácilmente para incorporar tanto los grupos de anclajes como otras biomoléculas de interés y ayuda a reducir la

adsorción de proteínas en el plasma sanguíneo, evitando la rápida actuación del sistema fagocítico mononuclear mejorando la circulación en sangre del nanomaterial administrado.



Esquema 5: Estructura de los ligandos diseñados.

Para la estabilización de IONPs en medios acuosos mediante el intercambio de ligandos, se abordó la síntesis de ligandos derivados de catecol con PEG (200 y 1500 Da) como se indica a continuación.

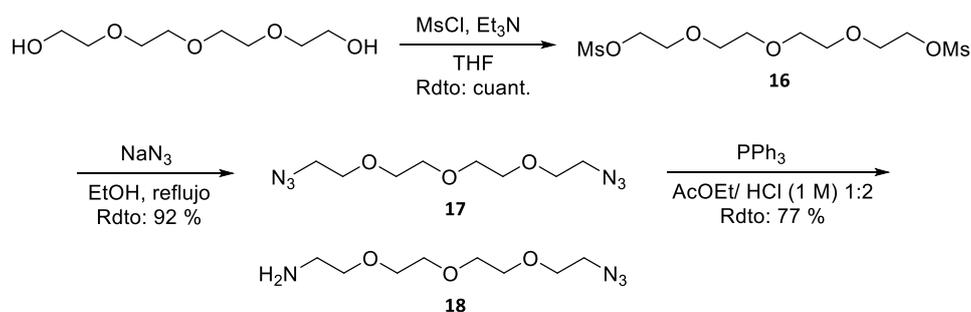
- **Síntesis de ligandos derivados de catecol**

Para la síntesis de nuestros ligandos, se utilizaron tres tipos de catecoles derivados de ácido cafeico, ácido dihidrocafeico y ácido gálico. Todos ellos presentan dos OH de tipo fenólico que serán los responsables de la unión con la IONP. Sin embargo, cabe esperar que las importantes diferencias de tipo electrónico entre estos compuestos como resultado de los distintos patrones de conjugación que presentan afecten tanto a la interacción de los ligandos con la superficie de las IONPs, como al rendimiento en la síntesis de los correspondientes derivados.

La síntesis de estos ligandos se realizó mediante el acoplamiento del grupo carboxilo del catecol correspondiente con uno de los extremos del espaciador PEG heterobifuncional, en forma de éster o amida, quedando disponible el otro extremo para la posterior incorporación de alguna biomolécula (Esquema 5).

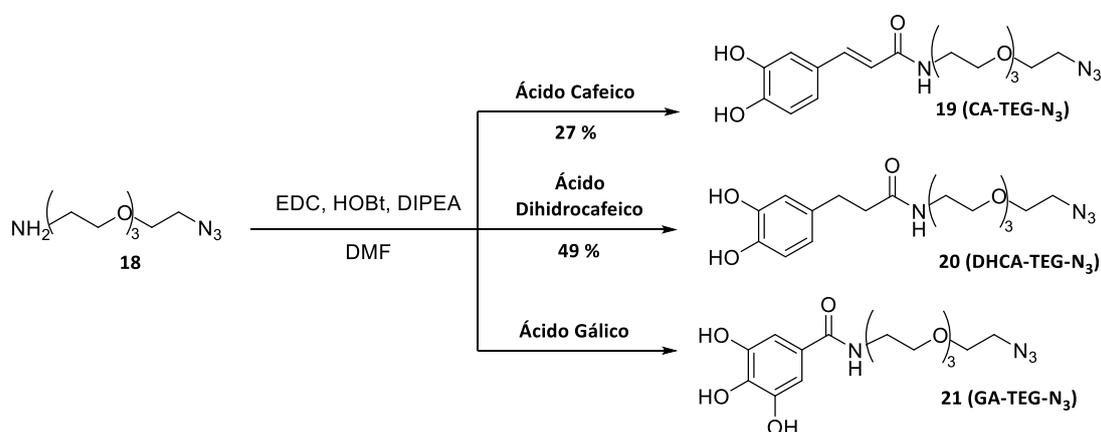
En primer lugar, se eligió como espaciador el tetraetilenglicol (TEG, PEG de 200 Da), que gracias a su bajo peso molecular permite la purificación de sus derivados por cromatografía en columna. Como grupos funcionales de los extremos se seleccionaron los grupos amino, para la unión con el catecol, y azida, para la posterior incorporación de biomoléculas mediante reacción de tipo click o posterior transformación en otro grupo funcional.

En primer lugar, se procedió (Mattoussi and col.)¹⁵⁹ a la mesilación del TEG, añadiendo MsCl (250 mol%) y Et₃N a 0 °C, a una disolución en THF, obteniéndose el dimesilato MsO-TEG-OMs (**16**) con rendimiento cuantitativo. La sustitución nucleofílica sobre el compuesto **1**, sin purificación previa, utilizando NaN₃ (150 mol%) en etanol a reflujo, rinde la diazida N₃-TEG-N₃ (**17**) con un rendimiento del 92 %. Seguidamente, se realiza la monoreducción de uno de los dos grupos azida mediante la adición de una disolución de PPh₃ en AcOEt a 0 °C, a una disolución de la diazida **2** en AcOEt/HCl (1 M), obteniéndose el monoamino derivado H₂N-TEG-N₃ (**18**) con un rendimiento elevado (77 %) (Esquema 6).



Esquema 6. Síntesis del espaciador derivado de tetraetilenglicol H₂N-TEG-N₃ **18**.

La unión entre el espaciador H₂N-TEG-N₃ y el catecol se llevó a cabo mediante la formación de la amida correspondiente,¹⁵⁹ utilizando una carbodiimida para la activación del ácido carboxílico, en presencia de HOBt que mejora la capacidad del ácido como grupo saliente y diisopropiletilamina (DIPEA) como base. Aunque inicialmente la reacción se llevó a cabo en presencia de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente de acoplamiento, los problemas de eliminación de los restos de DCC y de la urea formada dificultan la purificación del producto obtenido. La utilización de otra carbodiimida, la N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), presentó los mismos problemas. Afortunadamente, la utilización de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como agente de acoplamiento permitió la purificación del producto deseado gracias a la solubilidad de la EDC y su correspondiente urea en medio ácido acuoso (Esquema 7).

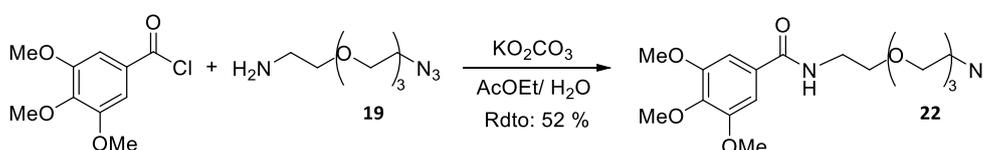


Esquema 7. Síntesis de los ligandos derivado de catecol-TEG-N₃ **19**, **20** y **21**.

Tras la purificación cromatográfica, se obtuvieron las amidas con rendimientos del 27 % en el caso del derivado del ácido cafeico **19** y del 49 % para el derivado del ácido dihidrocafeico **20**. La amida derivada del ácido gálico **21**, no pudo ser purificada mediante columna cromatográfica debido a su alta polaridad (Esquema 7). El menor rendimiento obtenido en el caso del ácido

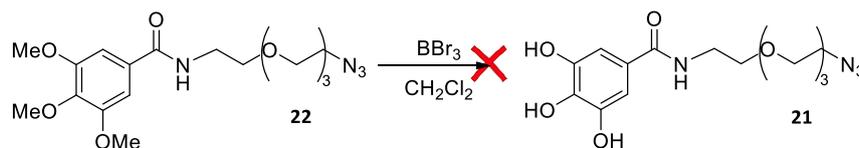
cafeico frente al dihidrocafeico puede justificarse en base a su menor reactividad por la conjugación del ácido carboxílico con el doble enlace y el anillo aromático.

En el caso del derivado de ácido gálico **21**, se buscaron otras rutas alternativas para solucionar los problemas de purificación. La primera alternativa se basó en utilizar como compuesto de partida el cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo, es decir, el cloruro derivado de ácido gálico con los hidroxilos protegidos. Así, la reacción de acoplamiento entre el cloruro de ácido comercial y la amina **19** en presencia de K_2CO_3 como base a $0\text{ }^\circ\text{C}$ rindió la amida deseada **22** con rendimiento moderado (52 %) (Esquema 8).



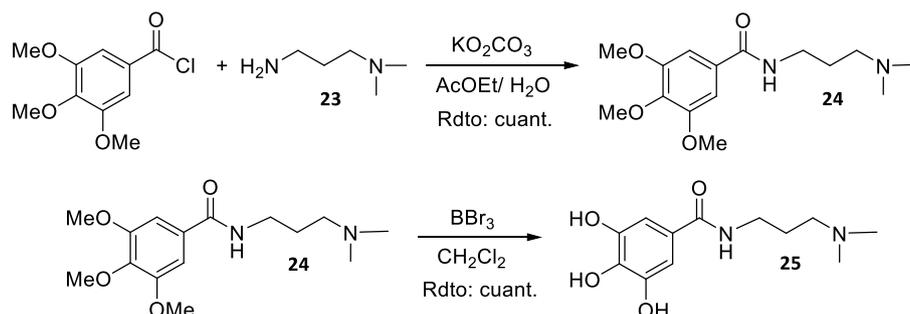
Esquema 8. Síntesis del derivado **22**.

Los intentos de desprotección de los metil éteres para obtener el derivado fenólico trihidroxilado **21**, mediante tratamiento de **22** con BBr_3 en DCM a $0\text{ }^\circ\text{C}$, fueron infructuosos, obteniéndose una mezcla compleja de varios productos, de los cuales ninguno resultó ser el compuesto deseado **21** (Esquema 9).



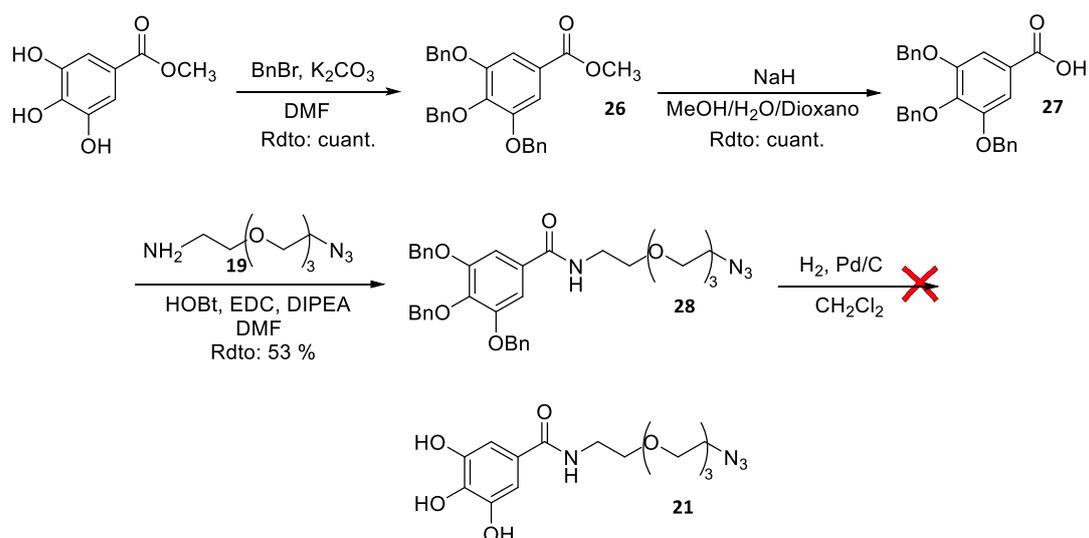
Esquema 9. Desprotección de los OH del derivado **22** para obtener el ligando **21**.

En este sentido cabe destacar que el tratamiento de la amida **25** con condiciones idénticas a las aplicadas a **23**, rinde el producto trihidroxilado **26** con buen rendimiento (Esquema **10**), por lo que el resultado obtenido con el derivado **23** puede atribuirse a la presencia de la cadena polioxygenada. Cabe esperar que, en estas condiciones de reacción, la ruptura de los éteres de la cadena polioxygenada compitan con la desprotección de los metil éteres aromáticos.



Esquema 10. Síntesis del derivado de ácido gálico con espaciador de cadena carbonada **25**.

Como alternativa para la síntesis del ligando derivado del ácido gálico **21**, consideramos la protección de los hidroxilos fenólicos como éteres bencilicos. Para ello, se hizo reaccionar el 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo comercial, con BrBn , en presencia de K_2CO_3 , obteniendo el compuesto tribencilado **26** con rendimiento cuantitativo, que se transformó en el correspondiente ácido carboxílico **27** utilizando NaH disuelto en $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{dioxano}$ 1:1:1 (Esquema **11**).



Esquema 11. Síntesis del ligando GA-TEG-N₃ **21**.

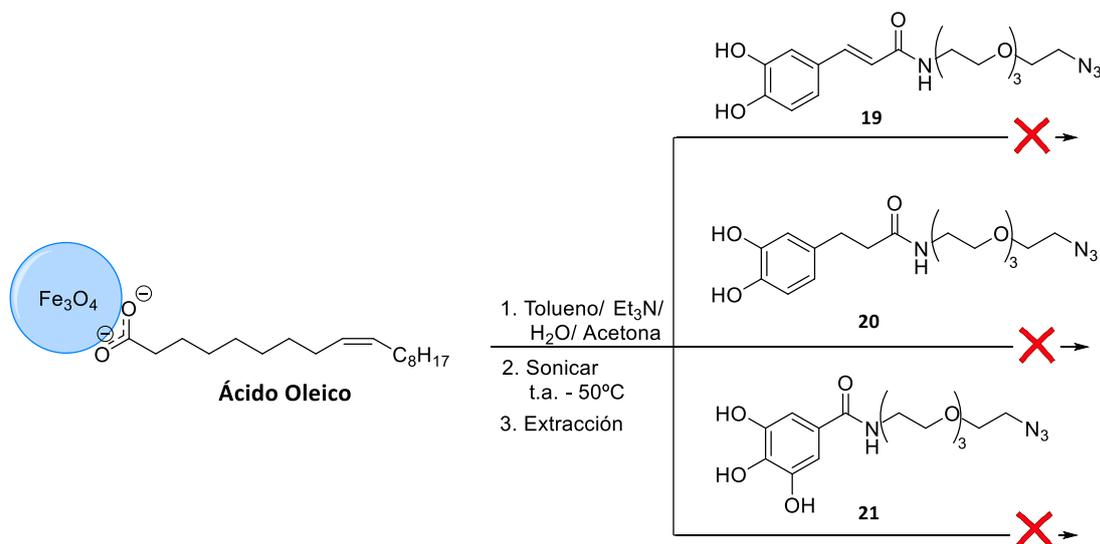
La incorporación del espaciador **18**, en condiciones similares a las descritas anteriormente, rindió la amida deseada **28** con un rendimiento del 53 %. Desafortunadamente, la desprotección de los hidroxilos fenólicos de **28** mediante hidrogenolisis en DCM utilizando Pd/C, no condujo al ligando deseado **21**, y en su lugar se obtuvieron mezclas de productos semidesprotegidos (Esquema **11**).

Llegados a este punto, decidimos utilizar el ligando derivado del ácido gálico **21**, obtenido originalmente (Esquema **7**) sin purificación previa, en el proceso de intercambio de ligando sobre las IONPs como veremos a continuación.

- **Funcionalización de IONPs con ligandos derivados de Catecol-TEG-N₃**

Una vez preparados los ligandos **19**, **20** y **21**, se llevaron a cabo las funcionalizaciones de las IONPs mediante el procedimiento de intercambio de ligando desarrollado por Pellegrino y col.¹⁶⁰

Las IONPs seleccionadas para este estudio presentaban una morfología esférica con un diámetro de 12 nm. Cuando se agitó la mezcla que contiene las IONPs, el correspondiente ligando y Et₃N como base, no se produjo con ninguno de los ligandos, **19**, **20** y **21**, la solubilización de las IONPs en agua (Esquema **12**).



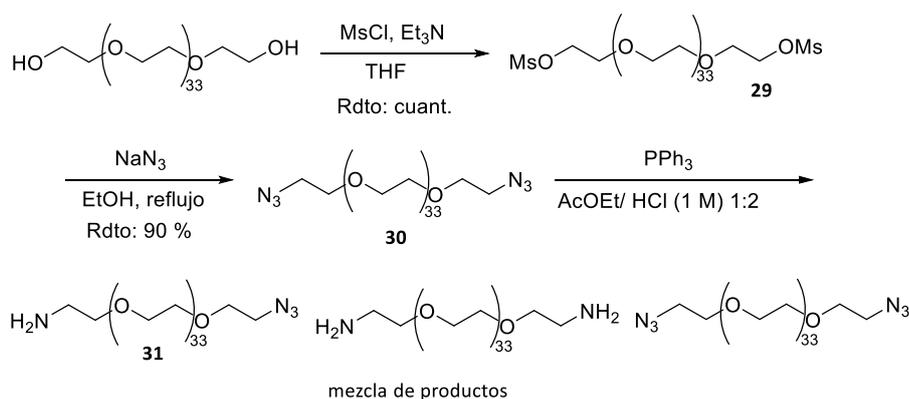
Esquema 12. Funcionalización de IONPs con el ligando TEG unido a los catecoles ácido cafeico (**19**), dihidrocafeico (**20**) y gálico (**21**).

Este resultado se puede justificar teniendo en cuenta la relativamente baja hidrofilia del ligando catecol-TEG-N₃ que resulta no ser suficiente para estabilizar el sistema completo de IONPs en agua. Por lo tanto, rediseñamos el ligando aumentando la longitud del espaciador PEG de 200 Da hasta 1500 Da (llamado desde ahora PEG₁₅₀₀).

- **Síntesis de los ligandos catecol-PEG₁₅₀₀-N₃**

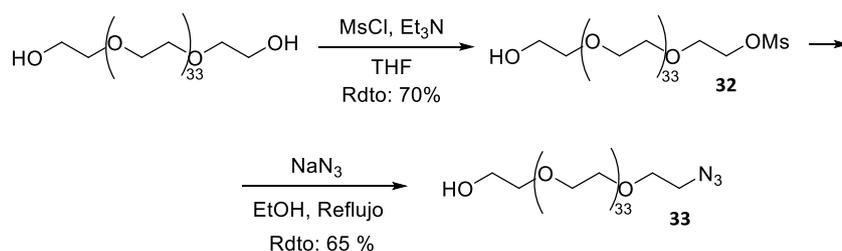
Siguiendo una ruta similar a la anteriormente descrita para la preparación del TEG heterobifuncional **18** (Esquema **6**), se procedió en primer lugar a la síntesis de la diazida N₃-

PEG₁₅₀₀-N₃ (**30**) con un rendimiento elevado (90 %, Esquema **13**). Sin embargo, la posterior reducción rindió en este caso una mezcla de la mono y diamina, junto con producto de partida, debido a la alta solubilidad del producto H₂N-PEG₁₅₀₀-N₃ (**31**) tanto en el medio orgánico como en el medio ácido acuoso (Esquema **13**).



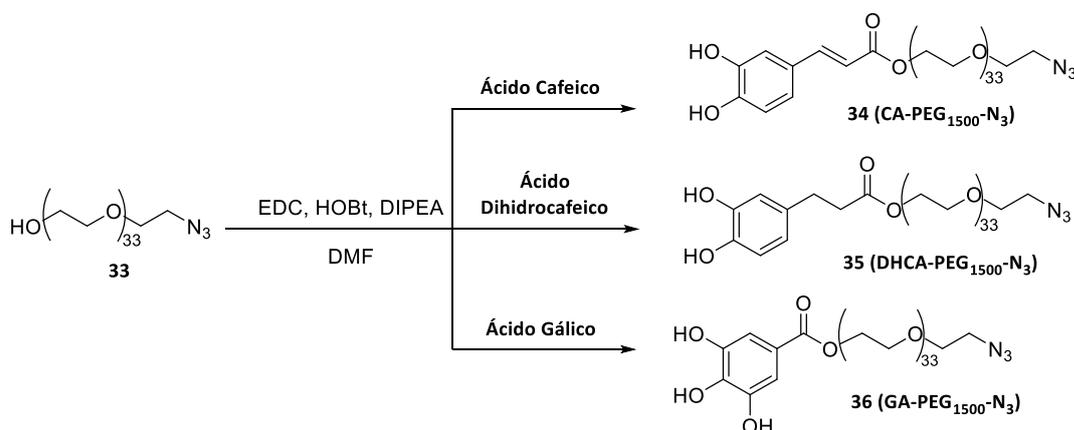
Esquema 13. Síntesis del espaciador heterobifuncional H₂N-PEG₁₅₀₀-N₃ (**31**).

Por lo tanto, abordamos una ruta alternativa (Esquema **14**), que implica la monomesilación de uno de los OH del PEG₁₅₀₀ comercial, mediante tratamiento con MsCl en presencia de Et₃N como base, obteniéndose HO-PEG₁₅₀₀-OMs (**32**) con un rendimiento elevado del 70 %.¹⁶¹ La incorporación posterior de la azida, mediante sustitución nucleofílica del grupo mesilato, condujo al espaciador heterobifuncional deseado HO-PEG₁₅₀₀-N₃ (**33**) con un 65 % de rendimiento (Esquema **14**).



Esquema 14. Síntesis del espaciador heterobifuncional HO-PEG₁₅₀₀-N₃ (**33**).

Una vez obtenido el espaciador **33** derivado de PEG₁₅₀₀, procedimos a la síntesis de los ligandos **34**, **35** y **36** mediante su esterificación con los catecoles correspondientes (Esquema **15**). Al igual que en el caso del ligando **22**, estos nuevos ligandos derivados de PEG₁₅₀₀ tampoco pudieron ser purificados por cromatografía debido a su alta polaridad, y fueron usados directamente para la funcionalización de IONPs como comentaremos más adelante, en el apartado III.1.4. (Esquema **16**).¹⁶²⁻¹⁶⁴

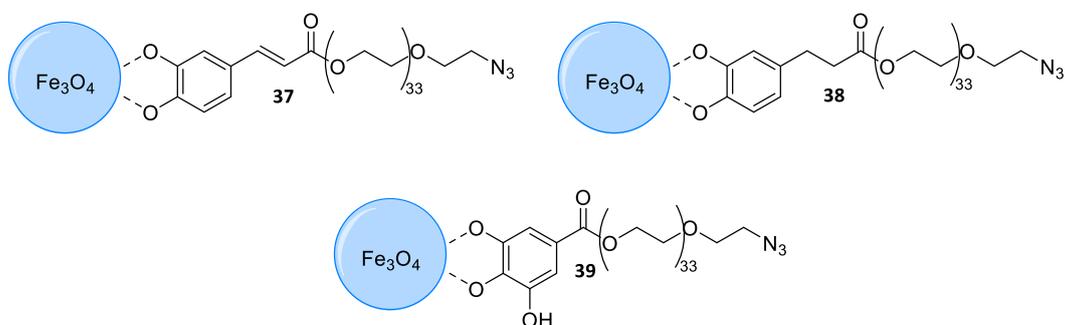


Esquema 15. Síntesis de ligandos PEG₁₅₀₀-N₃ derivados de catecol **34**, **35** y **36**. (No se indican los rendimientos ya que estos productos no pudieron ser purificados).

- **Funcionalización de IONPs con ligandos catecol-PEG₁₅₀₀-N₃**

La funcionalización de la superficie de las IONPs con los ligandos PEG₁₅₀₀ derivados de catecol **34**, **35** y **36** se abordó siguiendo el procedimiento de intercambio de ligandos descrito anteriormente.

En este caso, la funcionalización se realizó con éxito y las IONPs se transfirieron rápidamente a la fase acuosa, confirmando así que el problema observado anteriormente con los ligandos derivados de TEG era debido a su baja hidrofilia. Este problema desaparece al verse incrementada la hidrofilia considerablemente en los nuevos ligandos con el aumento de la longitud de la cadena polioxigenada de PEG (Esquema **16**).



Esquema 16. IONPs funcionalizadas con los ligandos PEG₁₅₀₀-N₃ derivados de catecol: ácido cafeico (**37**), ácido dihidrocafeico (**38**) y ácido gálico (**39**).

Para determinar el rendimiento de la funcionalización de las IONPs se cuantificó la cantidad de Fe transferida al agua ya que la única procedencia posible de Fe es de la estructura cristalina de la NP. Para ello, se determinaron, mediante ICP-MS, las cantidades de Fe de las IONPs antes y después del intercambio de ligando.

Los porcentajes de funcionalización determinados fueron del 11 %, 3 % y 18 %, para las nanopartículas funcionalizadas con los ligandos derivados del ácido cafeico **34**, dihidrocafeico **35** y gálico **36**, respectivamente. A pesar del bajo rendimiento observado por RMN, en la síntesis del ligando GA-PEG₁₅₀₀-N₃ **36**, este produjo junto con el ligando **34** derivado del cafeico, la mayor transferencia de IONPs a la fase acuosa. Con respecto al ligando **35** derivado del dihidrocafeico, se obtuvo un porcentaje de intercambio de ligando 6 veces inferior. Este resultado puede justificarse en base a la mayor acidez de los hidroxilos del anillo aromático del derivado del gálico frente a los del dihidrocafeico, como se ha comentado anteriormente, favoreciendo la unión con la superficie de las NPs.

En general, la baja transferencia de IONPs a la fase acuosa podría deberse a varios factores como, por ejemplo, una agitación demasiado suave y un alto valor de pH del medio en el intercambio de ligando. En la bibliografía se encuentra descrito que el proceso de intercambio de ligando en las IONPs depende tanto de la carga del surfactante, en nuestro caso ácido oleico, como de la carga del grupo de anclaje del ligando a intercambiar, siendo óptimo cuando la superficie de las IONPs está cargada positivamente y los grupos de anclajes de los ligandos tienen carga negativa.¹⁶⁵ Las IONPs sintetizadas presentan cargas superficiales positivas a un pH < 6,8. Sin embargo, los derivados del cafeico (**34**), dihidrocafeico (**35**) y gálico (**36**), presentan valores altos de pK_a (pK_a >9), lo que hace que no sea posible obtener un valor de pH adecuado que sea compatible con ambas cargas.

Como alternativa para poder optimizar el rendimiento de la funcionalización de las IONPs se llevó a cabo una variación del procedimiento utilizado anteriormente. La mezcla de las IONPs en tolueno junto con el correspondiente ligando se sonicaron durante 1 h y seguidamente se incubaron a 50 °C durante 4 h.¹⁵⁸ Este tratamiento más energético permitiría facilitar el reemplazo de las moléculas de ácido oleico por los ligandos derivados de catecol e interactuar de manera más eficaz con la superficie de las IONPs.

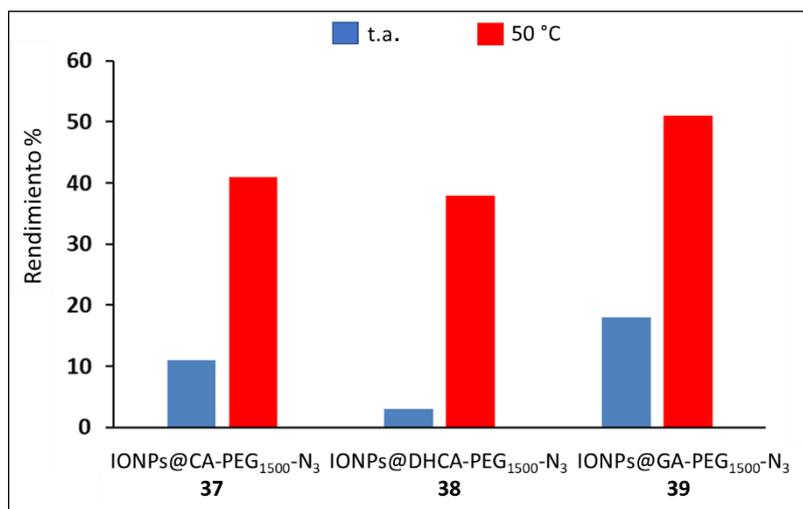


Figura 40. Gráfica comparativa de los rendimientos en la funcionalización de las IONPs con los ligandos PEG₁₅₀₀-N₃ derivados de catecol, **34** y **35** y **36** a t.a. y a 50 °C.

De esta forma se consigue una mayor transferencia de IONPs a la fase acuosa, como se muestra en la Figura 40. Los ligandos GA-PEG₁₅₀₀-N₃ (**36**) y CA-PEG₁₅₀₀-N₃ (**34**) presentaron los rendimientos más altos con valores de 51 % y 41 % respectivamente, como cabía esperar considerando sus similares características estereo-electrónicas, en comparación con el ligando DHCA-PEG₁₅₀₀-N₃ (**35**) que obtuvo un rendimiento del 38 %. Las imágenes TEM mostraron que las IONPs funcionalizadas con el ligando **36** derivado del ácido gálico estaban bien dispersas, sin presencia de agregados. Por el contrario, las imágenes TEM de las IONPs funcionalizadas con los ligandos **34** y **35**, derivados del ácido cafeico y dihidrocafeico respectivamente, mostraron la presencia de agregados (Figura 41).

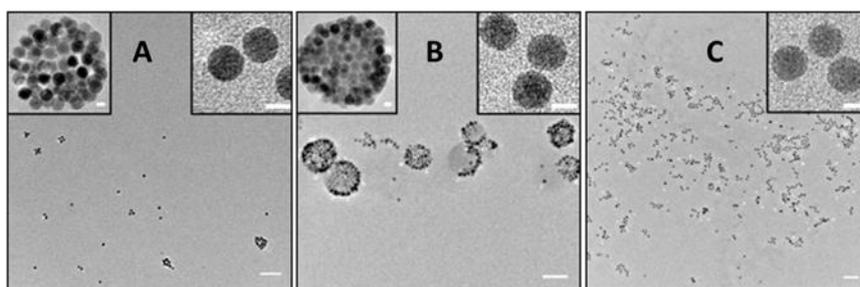
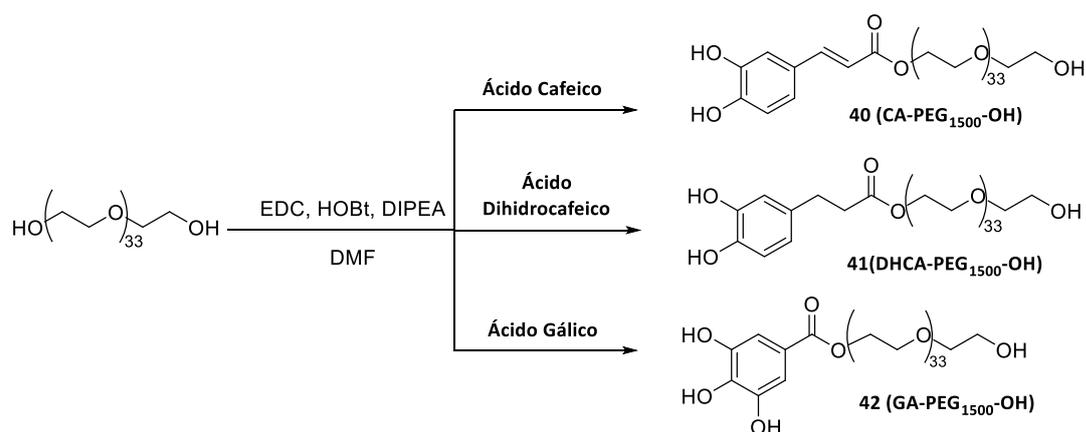


Figura 41. Imágenes TEM correspondientes a las IONPs funcionalizadas con el ligando PEG₁₅₀₀-N₃ **34**, derivado del ácido cafeico (**A**), **35**, del ácido dihidrocafeico (**B**) y **36**, del ácido gálico (**C**). La barra de escala corresponde a 200 nm para las imágenes TEM de bajo aumento y a 10 nm para las inserciones (zona aumentada).

- **Síntesis de los ligandos catecol-PEG₁₅₀₀-OH**

Los ligandos PEG₁₅₀₀-OH derivados de catecol con un grupo hidroxilo terminal fueron sintetizados para determinar el efecto en comparación con el grupo azida en el intercambio de ligando sobre las IONPs.

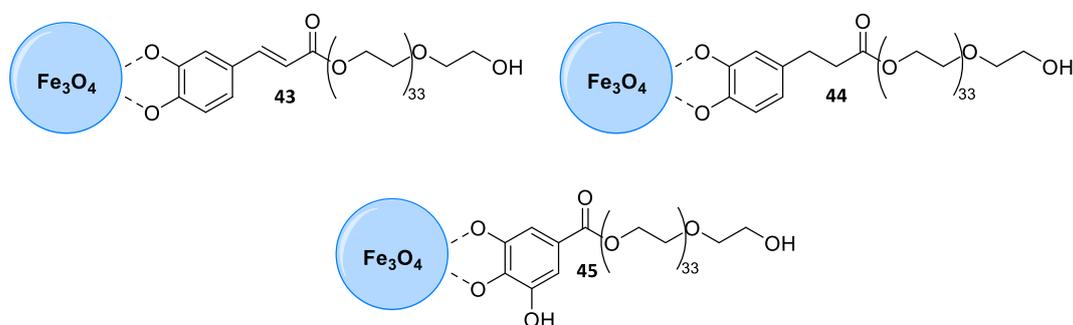
La preparación de estos ligandos se llevó a cabo en una etapa, mediante esterificación, del espaciador HO-PEG₁₅₀₀-OH comercial con cada uno de los catecoles. Para ello, se disolvió el catecol correspondiente en DMF junto con los reactivos HOBt, EDC y DIPEA. De esta forma, se obtuvieron los ligandos PEG₁₅₀₀-OH **40**, **41** y **42** derivados del ácido cafeico, dihidrocafeico y ácido gálico, respectivamente, como una mezcla junto con el PEG₁₅₀₀ de partida y la proporción de los diésteres correspondientes que pudiesen haberse formado. Al igual que los ligandos derivados de PEG₁₅₀₀-N₃, estos ligandos fueron usados en el proceso de funcionalización de IONPs sin purificación previa. (Esquema **17**).



Esquema 17. Síntesis del ligandos PEG₁₅₀₀-OH derivados de catecol **40**, **41** y **42**. (Los rendimientos no se indican ya que estos productos no pudieron ser purificados).

- **Funcionalización de IONPs con ligandos catecol-PEG₁₅₀₀-OH**

El intercambio de ligandos de la superficie de las IONPs con los ligandos PEG₁₅₀₀-OH derivados de catecol se llevó a cabo siguiendo los dos procedimientos descritos previamente: (i) a temperatura ambiente y (ii) en condiciones “más energéticas” (Esquema 18).



Esquema 18. IONPs funcionalizadas con los ligandos PEG₁₅₀₀-OH derivados del ácido cafeico (**43**), ácido dihidrocafeico (**44**) y ácido gálico (**45**).

En primer lugar, cuando se funcionalizaron las IONPs empleando el método más suave, se comprobó que los tres ligandos **40**, **41** y **42** reemplazaban a las moléculas de ácido oleico de la superficie de las IONPs transfiriéndolas con éxito al medio acuoso, con rendimientos de 13,6 % y 6,5 % y 23,0 %, respectivamente. Cabe resaltar, que estos rendimientos son más altos que los obtenidos siguiendo el mismo procedimiento para los azido derivados análogos **34**, **35** y **36**.

Al igual que ocurrió con estos últimos ligandos, también se mejoraron los resultados de funcionalización de las IONPs cuando se aplicó el proceso de intercambio de ligandos más energético. Los rendimientos obtenidos para cada uno de los ligandos fueron los siguientes: CA-PEG₁₅₀₀-OH (**40**) 28 %, DHCA-PEG₁₅₀₀-OH (**41**) 29 % y GA-PEG₁₅₀₀-OH (**42**) 61 % (Figura 42).

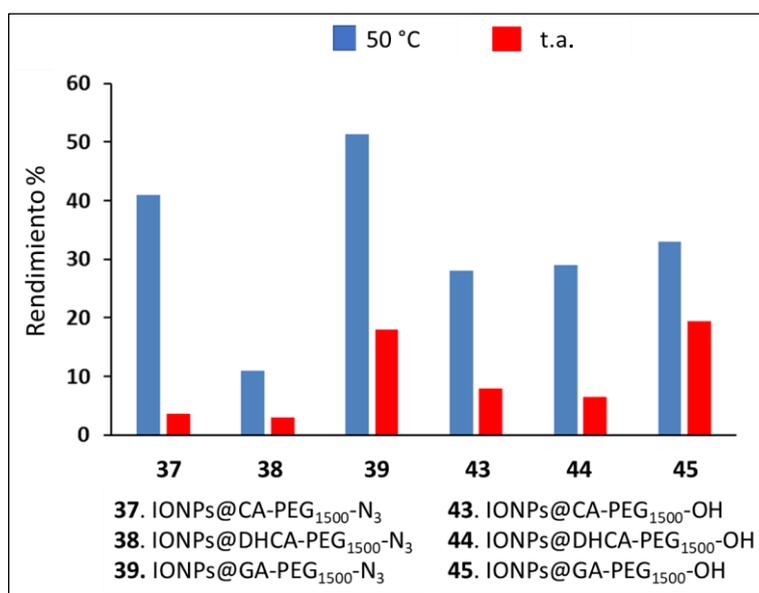


Figura 42. Gráfica comparativa de los rendimientos en el proceso de intercambio de ligando a t.a. y a 50 °C para la obtención de las IONPs funcionalizadas **34**, **35** y **36** con los ligandos PEG₁₅₀₀-N₃ y **40**, **41** y **42** con los ligandos PEG₁₅₀₀-OH derivados de catecol.

Cabe destacar que, mientras que los rendimientos de funcionalización de las IONPs mediante el procedimiento suave con los ligandos de PEG₁₅₀₀-OH fueron superiores a los de los ligandos de PEG₁₅₀₀-N₃, no ocurrió así al utilizar condiciones más energéticas, donde se observó bastante diferencia entre los ligandos derivados del ácido gálico PEG₁₅₀₀-N₃ **36** frente a su análogo PEG₁₅₀₀-OH **42** con unos rendimientos de 51 % para el primero y 33 % para el segundo. Algo parecido se observa con los ligandos derivados del ácido cafeico PEG₁₅₀₀-N₃ **34** y PEG₁₅₀₀-OH **40** con unos rendimientos de 41 % y 28 % respectivamente (este resultado se justificará en el siguiente apartado). No obstante, existe una salvedad en el caso de los compuestos PEG₁₅₀₀-N₃ **35** y PEG₁₅₀₀-OH **41**, derivados del ácido dihidrocafeico, siendo este último el que presenta un rendimiento superior, 29 % frente a 11 % del derivado N₃.

Las imágenes TEM de las IONPs **43**, **44** y **45**, funcionalizadas con los tres ligandos PEG₁₅₀₀-OH derivados de catecol **40**, **41** y **42** mostraron la presencia de NPs monodispersas y la ausencia de agregados, al igual que la funcionalización de IONPs **26** con el ligando PEG₁₅₀₀-N₃ derivado del ácido gálico (**23**) (Figura **43**).

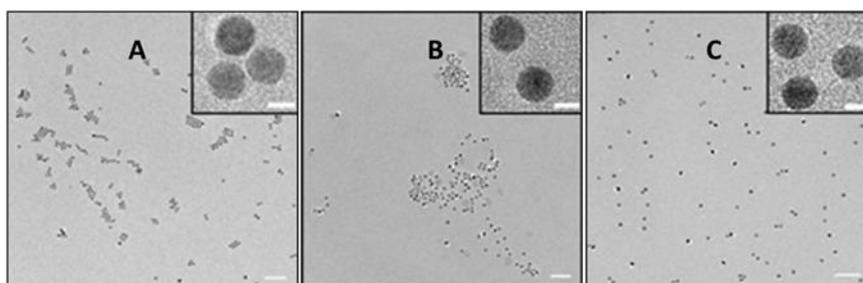


Figura 43. Imágenes TEM correspondientes a las IONPs funcionalizadas con el ligando PEG₁₅₀₀-OH derivado del ácido cafeico **43** (A), ácido dihidrocafeico **44** (B) y ácido gálico **45** (C). La barra de escala corresponde a 200 nm para las imágenes TEM de bajo aumento y a 10 nm para las inserciones (zona aumentada).

La situación observada en el TEM nos permite justificar los inesperados altos rendimientos con que transcurren las funcionalizaciones de las IONPs con los ligandos PEG₁₅₀₀-N₃ derivados de cafeico (**34**) y dihidrocafeico (**34**) con respecto a los ligandos similares de PEG₁₅₀₀-OH (**40** y **41**). La formación de agregados durante el intercambio en los derivados de N₃ incrementa la transferencia de IONPs al agua respecto a los derivados de OH, aumentando así el rendimiento de funcionalización calculado.

En definitiva, estos resultados confirman la importancia de la naturaleza del grupo terminal del ligando, alcohol o azida, en la funcionalización de las IONPs (Figura **43**).

III.2.1.1. Estudios de estabilidad coloidal de las IONPs

La caracterización mediante el TEM de las IONPs funcionalizadas con los diferentes ligandos de PEG₁₅₀₀ nos proporciona información sobre su tamaño sin considerar el componente orgánico que las rodea, el medio donde se encuentran dispersadas. Por consiguiente, para realizar un análisis más exhaustivo sobre la estabilidad coloidal de las IONPs funcionalizadas, determinamos en diversos medios la variación del tamaño hidrodinámico de las IONPs a lo largo del tiempo. El tamaño hidrodinámico de las NPs depende de las interacciones del componente orgánico que se ancla sobre las NPs con el medio, con las sales, proteínas y otras moléculas presentes en dicho medio.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ Por lo tanto, analizamos el comportamiento de estas IONPs funcionalizadas en un medio que simula las condiciones fisiológicas de pH y concentración de NaCl, y en un medio que presente además los principales componentes del plasma sanguíneo, como son las proteínas.

En concreto, la estabilidad coloidal de las diferentes IONPs funcionalizadas se estudiaron en tres medios: H₂O, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y suero fetal bovino (FBS) (Figuras **44-46**).

En primer lugar, se estudió la estabilidad coloidal de las IONPs funcionalizadas en H₂O a lo largo del tiempo. Las IONPs funcionalizadas con los ligandos derivados de PEG₁₅₀₀-OH (**43**, **44** y **45**)

mostraron tamaños hidrodinámicos muy estables durante todo el tiempo de análisis, 168 h, con valores en el rango de 21-26 nm de diámetro (Figura 44). Esto claramente confirma la gran estabilidad de estas IONPs funcionalizadas en H₂O, tal y como se ha demostrado previamente en nuestro grupo de investigación.¹⁵⁸ Por otro lado, la funcionalización de IONPs con los ligandos derivados de PEG₁₅₀₀-N₃ (**37**, **38** y **39**), mostraron igualmente una gran estabilidad frente al tiempo, con valores de tamaño hidrodinámico en el rango de 25-48 nm para los diferentes derivados de catecoles (Figura 44). Se puede observar que las IONPs funcionalizadas con el ligando PEG₁₅₀₀-N₃ derivado de ácido gálico (**37**) presentan un tamaño similar, aproximadamente de 25 nm, a las IONPs funcionalizadas con su análogo el derivado de PEG₁₅₀₀-OH (**45**). Por el contrario, las IONPs funcionalizadas con ligandos PEG₁₅₀₀-N₃ derivados de ácido cafeico (**37**) y dihidrocafeico (**38**), presentaron valores de tamaño hidrodinámico ligeramente superiores a las IONPs funcionalizadas con los análogos hidroxilados (**43** y **44**), 42 y 48 nm respectivamente, debido a la formación de pequeños agregados durante el proceso de intercambio de ligandos como se pudo observar en el TEM.

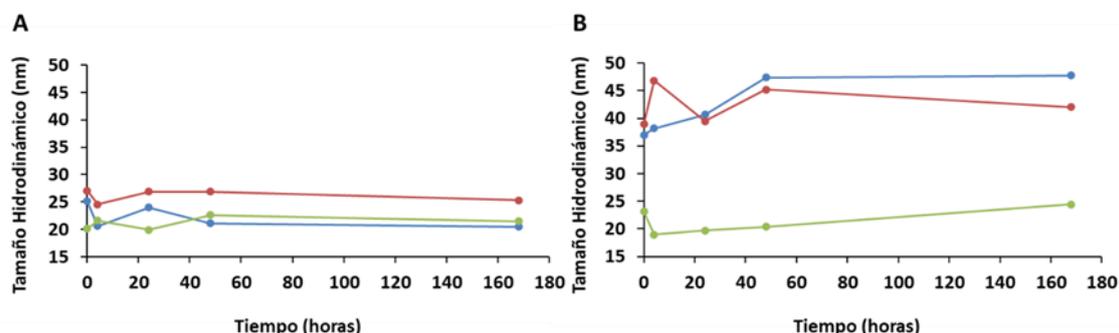


Figura 44. Representación del Tamaño hidrodinámico vs Tiempo de las IONPs funcionalizadas con los ligandos derivados de catecol-PEG₁₅₀₀-OH, **43-45** (A) y catecol-PEG₁₅₀₀-N₃, **37-39** (B) en H₂O. CA-PEG₁₅₀₀ (azul), DHCA-PEG₁₅₀₀ (rojo) y GA-PEG₁₅₀₀ (verde).

Debido a que el objetivo final de nuestras IONPs es la preparación de nanomedicinas con administración intravenosa, realizamos los estudios de estabilidad en PBS y FBS, obteniendo NPs estables durante todo el tiempo de estudio en ambos medios. En PBS, los tamaños de las IONPs funcionalizadas con derivados de PEG₁₅₀₀-OH (**43**, **44** y **45**) se mantuvieron estables con valores de tamaño hidrodinámico en el rango de 17-28 nm y algo superiores, alrededor de 39 nm, para el ligando PEG₁₅₀₀-N₃ derivado de ácido gálico (**39**). Los otros dos ligandos, que forman agregados, presentaron valores entre los 46-70 nm y 83-95 nm para ácido cafeico (**37**) y dihidrocafeico (**38**), respectivamente (Figura 45).

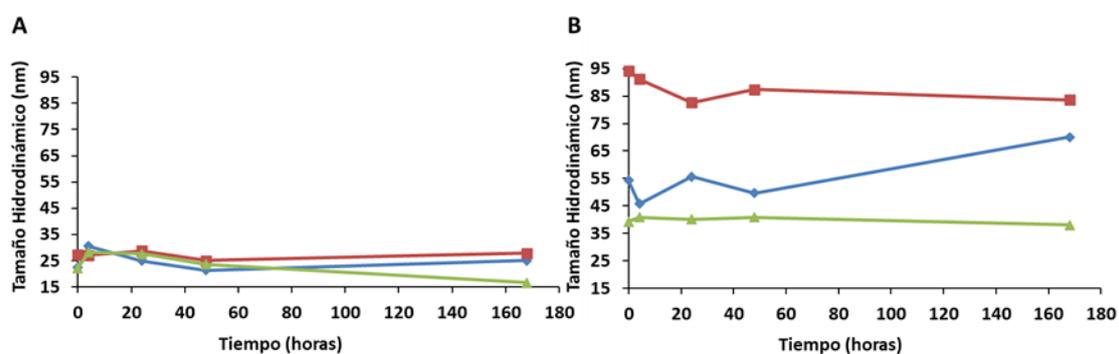


Figura 45. Representación del Tamaño hidrodinámico vs Tiempo de las IONPs funcionalizadas con los ligandos derivados de catecol-PEG₁₅₀₀-OH, **43-45** (A) y catecol-PEG₁₅₀₀-N₃, **37-39** (B) en PBS. CA-PEG₁₅₀₀ (azul), DHCA-PEG₁₅₀₀ (rojo) y GA-PEG₁₅₀₀ (verde).

En el medio FBS, se observa un ligero incremento de los tamaños hidrodinámicos en las IONPs funcionalizadas con PEG₁₅₀₀-OH (**43**, **44** y **45**) con respecto a los otros medios, con valores que oscilan entre 24 y 39 nm (Figura 46). Esto podría ser debido a la adsorción de las proteínas del medio formando la denominada “*protein corona*”. Las IONPs funcionalizadas con PEG₁₅₀₀-N₃ derivado del ácido gálico (**39**) presenta también un ligero aumento en su tamaño hidrodinámico (34 a 48 nm). No obstante, en el caso de las IONPs funcionalizadas con PEG₁₅₀₀-N₃ derivados del

ácido cafeico (**37**) y dihidrocafeico (**38**), no solo no se observa un incremento de tamaño hidrodinámico con respecto a los medios anteriores, sino que este es menor, de entre 26 a 30 nm para el primero y entre 49 a 62 nm para el segundo. Esto podría deberse a la imposibilidad del grupo azida para formar enlaces por puente de H con los componentes del medio.

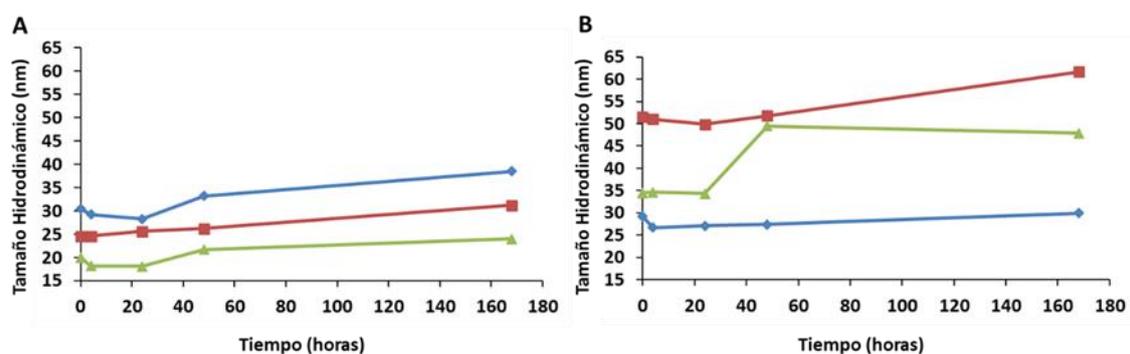


Figura 46. Representación del Tamaño hidrodinámico vs Tiempo de las IONPs funcionalizadas con los ligandos derivados de catecol-PEG₁₅₀₀-OH, **43-45 (A)** y catecol-PEG₁₅₀₀-N₃, **37-39 (B)** en FBS. CA-PEG₁₅₀₀ (azul), DHCA-PEG₁₅₀₀ (rojo) y GA-PEG₁₅₀₀ (verde).

En resumen, las IONPs no presentaron diferencias notables en sus tamaños hidrodinámicos a lo largo del tiempo en los diferentes medios (Tabla 5), excepto aquellas funcionalizadas con CA-PEG₁₅₀₀-N₃ (**37**) y DHCA-PEG₁₅₀₀-N₃ (**38**) que formaron agregados durante el proceso de funcionalización, como mostraron las imágenes TEM.

Tabla 5. Comparación del tamaño hidrodinámico de las IONPs funcionalizadas con ligandos PEG₁₅₀₀-N₃, **37-39** y PEG₁₅₀₀-OH, **43-45** derivados de catecol en diferentes medios tras 1 semana.

IONPs@ligandos	(IONP)	Tamaño hidrodinámico (nm)		
		H ₂ O	PBS	FBS
CA-PEG ₁₅₀₀ -N ₃	37	47,7 ± 2,7	70,0 ± 15	29,9 ± 0,3
DHCA-PEG ₁₅₀₀ -N ₃	38	42,1 ± 7,0	83,6 ± 11,4	61,7 ± 2,7
GA-PEG ₁₅₀₀ -N ₃	39	24,4 ± 10	38,0 ± 1,2	47,9 ± 9,9
CA-PEG ₁₅₀₀ -OH	43	20,5 ± 2,4	25,0 ± 1,6	38,5 ± 5,7
DHCA-PEG ₁₅₀₀ -OH	44	25,3 ± 2,6	27,8 ± 2,6	31,2 ± 0,3
GA-PEG ₁₅₀₀ -OH	45	21,5 ± 0,9	16,6 ± 2,9	24,0 ± 0,3

III.2.1.2 Caracterización de las IONPs funcionalizadas

- **Análisis mediante espectroscopía de IR**

Debido al carácter magnético de las NPs, no se pudo determinar la presencia de los ligandos PEG₁₅₀₀ sobre su superficie mediante RMN. Por lo tanto, aunque la estabilidad de estas IONPs en medio acuoso indica la presencia de estos ligandos, para demostrarlo se aplicaron otra serie de técnicas como la espectroscopia IR.

El análisis FT-IR confirmó la presencia de los ligandos PEG₁₅₀₀ como puede verse en la Figura 47. En el caso de las IONPs funcionalizadas con ligandos PEG₁₅₀₀-OH, **43**, **44** y **45**, se observan las bandas de absorción principales del ligando en el espectro: de tensión de enlace C-H (3000-2700 cm⁻¹), tensión de enlace C=C (1600-1400 cm⁻¹), flexión de enlace C-H (1466 cm⁻¹, 1359 cm⁻¹ y 1341 cm⁻¹), tensión de enlace C-O (1268 cm⁻¹, 1238 cm⁻¹), tensión de enlace C-O-C (1092 cm⁻¹), flexión de enlace fuera del plano (942 cm⁻¹) y flexión aromática fuera del plano (900-675 cm⁻¹). Por otro lado, en las IONPs funcionalizadas con ligandos PEG₁₅₀₀-N₃, **37**, **38** y **39**, se observan las

mismas bandas descritas anteriormente, con una pequeña, pero al mismo tiempo importante diferencia, la aparición de una banda a 2105 cm^{-1} que puede asignarse a una vibración de tensión de enlace $\text{N}=\text{N}=\text{N}$.

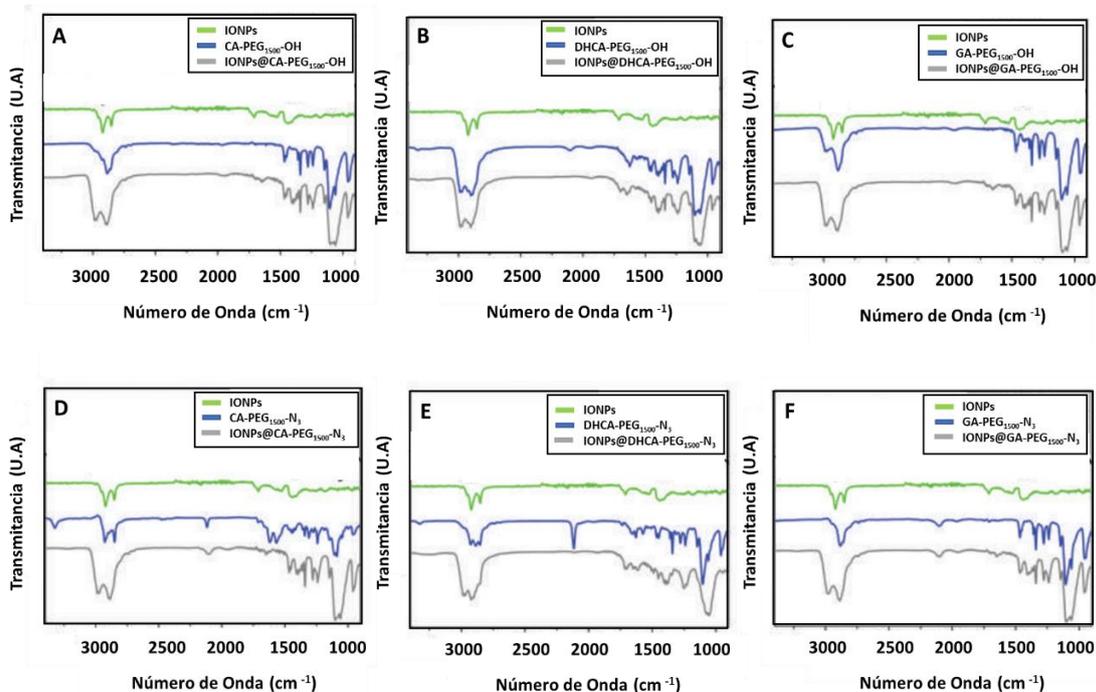


Figura 47. Comparación de espectros de FT-IR de las IONPs antes de funcionalizar (color verde), ligando $\text{PEG}_{1500}\text{-OH}$ derivados de ácido cafeico **40** (A), dihidrocafeico **41** (B) y gálico **42** (C) y con los ligandos $\text{PEG}_{1500}\text{-N}_3$ derivados de ácido cafeico **34** (D), dihidrocafeico **34** (E) y gálico **36** (F) (color azul) e IONPs funcionalizadas con ligando $\text{PEG}_{1500}\text{-OH}$ derivados de ácido cafeico **43** (A), dihidrocafeico **44** (B) y gálico **45** (C) y con los ligandos $\text{PEG}_{1500}\text{-N}_3$ derivados de ácido cafeico **37** (D), dihidrocafeico **38** (E) y gálico **39** (F) (color gris).

- **Análisis termogravimétrico (TGA)**

Para determinar el porcentaje de componente orgánico que contienen las IONPs, se llevó a cabo el análisis mediante la técnica de termogravimetría. Los resultados mostraron que las IONPs **45** y **39** funcionalizadas (que produjeron NPs monodispersas) con ligandos PEG₁₅₀₀-OH y PEG₁₅₀₀-N₃ derivado del gálico, proporcionaron valores similares de componente orgánico adherido a la superficie de las NPs, entre el 52 y 63 %. Sin embargo, las otras dos funcionalizaciones de IONPs con los ligandos PEG₁₅₀₀-N₃ presentaron mayores porcentajes de componente orgánico, 74 % y 76 % para el derivado de cafeico **37** y dihidrocafeico **38** respectivamente, debido posiblemente a la formación de agregados que resultaron en el proceso de intercambio de ligandos (Figura **48**).

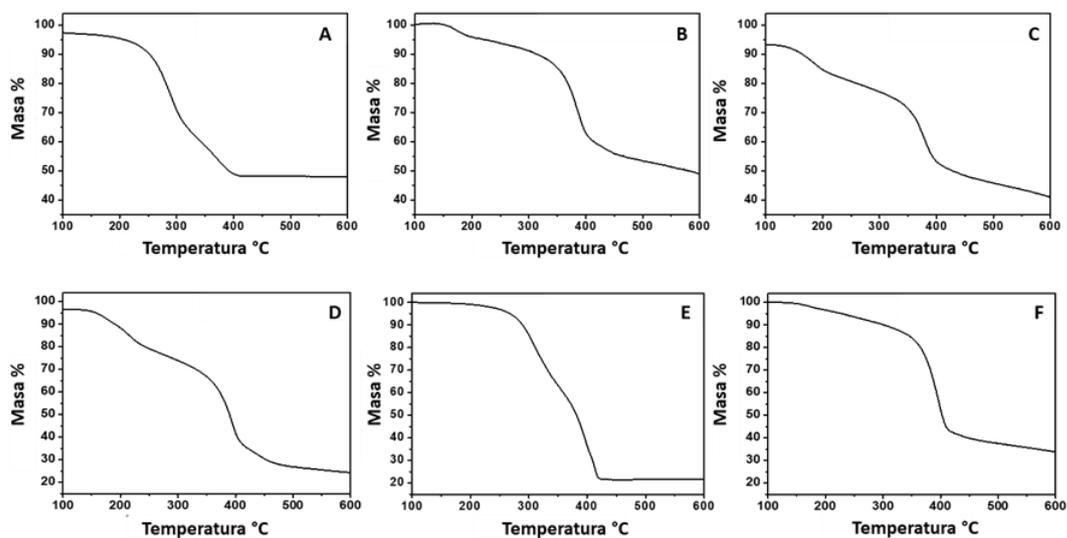


Figura 48. Análisis termogravimétrico de las IONPs funcionalizadas con los ligandos PEG₁₅₀₀-OH derivados de ácido cafeico **43** (A), dihidrocafeico **44** (B) y gálico **45** (C) y con los ligandos PEG₁₅₀₀-N₃ derivados de ácido cafeico **37** (D), dihidrocafeico **38** (E) y gálico **39** (F).

- **Capacidad como agente de contraste en resonancia magnética de imagen**

Para evaluar el potencial de las IONPs funcionalizadas como agentes de contraste negativo para RMI, se midió la relajación transversal r_2 en bajo y alto campo magnético (Figura 49). En principio no se esperan grandes diferencias en la capacidad como agente de contraste T_2 entre las diferentes IONPs funcionalizadas, ya que esta propiedad depende exclusivamente del núcleo magnético y no de los ligandos unidos a su superficie. Sin embargo, una funcionalización deficiente, que produzca la formación de pequeños agregados, nos llevaría a observar diferencias en los valores de relajatividad.

El análisis de las IONPs **43**, **44** y **45** funcionalizadas con ligandos PEG₁₅₀₀-OH mostraron relajaciones r_2 similares para los tres ligandos, con valores de r_2 que varían de 49,7 a 63,6 mM⁻¹ s⁻¹ en campo magnético bajo y de 128,6 a 133,3 mM⁻¹ s⁻¹ en campo magnético alto (Figura 49). La similitud de los valores r_2 se justifica en base a que todas las IONPs tienen el mismo núcleo magnético.

Cabe destacar que los valores de r_2 obtenidos a campo alto son superiores a los de campo bajo. Al tener los mismos núcleos magnéticos, este efecto se observa con todos los agentes de contraste, debido a que la relajatividad depende del campo magnético aplicado.

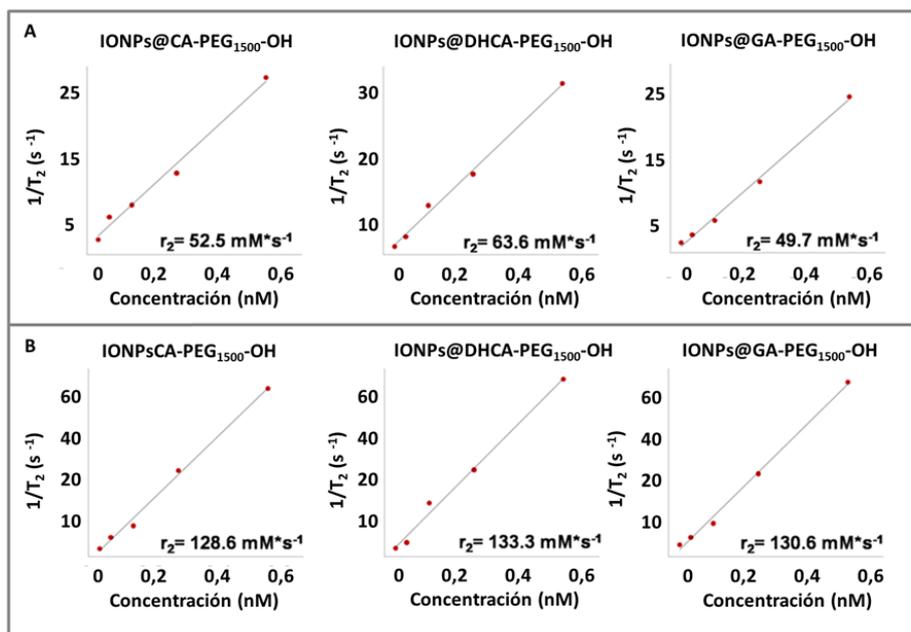


Figura 49. Gráficas $1/T_2$ sobre concentración de Fe de las IONPs funcionalizadas con ligandos PEG₁₅₀₀-OH (**43**, **44** y **45**) a estudios a campo magnético bajo (**A**) (1,5 T) y estudios a campo magnético alto (**B**) (9,4 T).

Al analizar las IONPs **37**, **38** y **39**, funcionalizadas con los ligandos PEG₁₅₀₀-N₃, se observa, al igual que en los estudios de estabilidad coloidal y TGA, que las IONPs funcionalizadas con el derivado de gálico, **39**, presenta valores de r_2 de $72,6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $167,9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a campo bajo y alto respectivamente, similares a las IONPs **43**, **44** y **45**, funcionalizadas con PEG₁₅₀₀-OH (Figura 49). En cambio, las IONPs funcionalizadas con ligandos PEG₁₅₀₀-N₃ derivados de cafeico, **37**, y dihidrocafeico, **38**, presentaron valores de r_2 muy inferiores a las otras IONPs, en concreto, valores de r_2 de $39 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $31,2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a campo bajo, y $71 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $28 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a campo alto respectivamente (Figura 50). La importante disminución observada en el valor de r_2 a campo

magnético alto para las IONPs funcionalizadas con DHCA-PEG₁₅₀₀-N₃ (**38**) puede justificarse en base a la precipitación de las NPs en el transcurso del experimento.

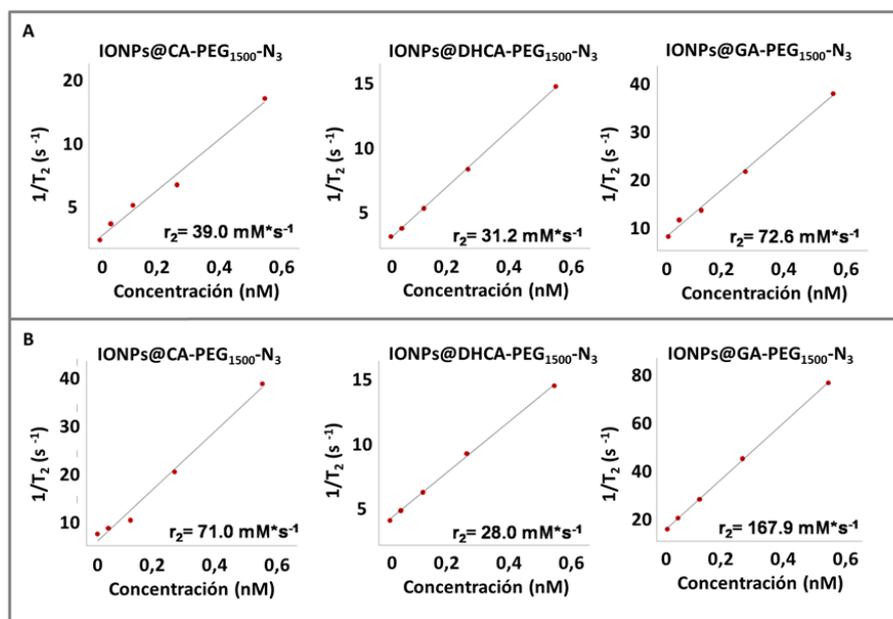


Figura 50. Gráficas 1/T₂ sobre concentración de Fe de las IONPs funcionalizadas con ligandos PEG₁₅₀₀-N₃ (**37**, **38** y **39**) a estudios a campo magnético bajo (**A**) (1,5 T) y estudios a campo magnético alto (**B**) (9,4 T).

Por otra parte, aunque las IONPs tienen una clara característica de agente de contraste negativo en RMI, se procedió a estudiar la relajatividad longitudinal r_1 , es decir la capacidad como agente de contraste positivo. Como era de esperar, todas las IONPs funcionalizadas mostraron valores de r_1 muy bajos en ambos campos magnéticos, lo que indica que las IONPs se comportan exclusivamente como agentes de contraste T₂ (Figura 51).

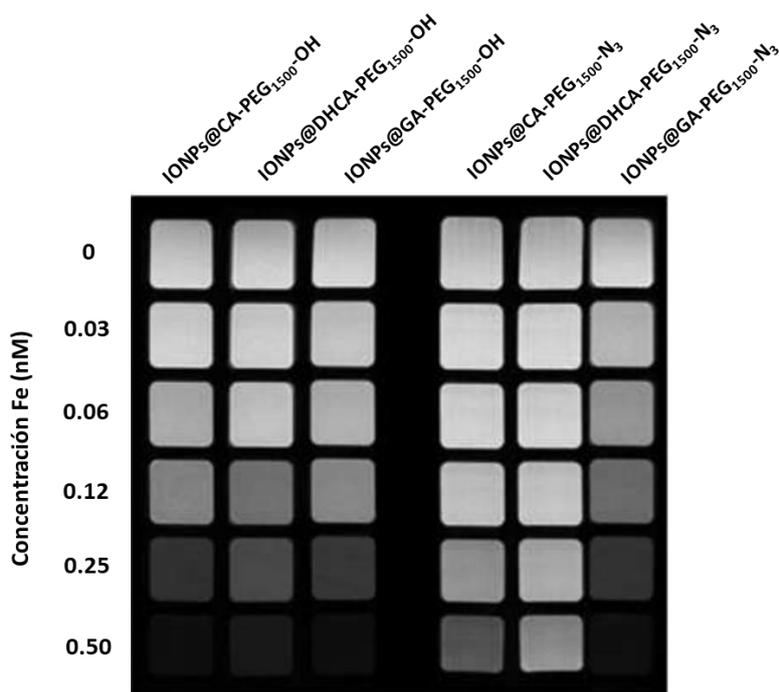


Figura 51. Resonancia magnética ponderada en T_2 *in vitro* a 9,4 T de las IONPs funcionalizadas (37-39 y 43-45).

III.2.1.3 Ensayos biológicos de las IONPs funcionalizadas 37-39 y 43-45

Una de las características más importantes que han de cumplir las NPs para su aplicación médica es la biocompatibilidad, es decir, la capacidad de llevar a cabo su función, ya sea diagnóstica, como tratamiento o ambas (teranósticas) sin provocar toxicidad ni efectos secundarios en los pacientes a los que se les apliquen.^{169,170}

En este trabajo concretamente, el estudio de la toxicidad de nuestros ligandos, así como de las NPs magnéticas de óxido de Fe funcionalizadas con dichos ligandos es de vital importancia, debido a que existen varios estudios en los que se ha descrito que algunos compuestos fenólicos muestran efectos citotóxicos por daño oxidativo a biomoléculas como ADN y/o proteínas.^{171,172}

La biocompatibilidad de las NPs funcionalizadas se determinó mediante una evaluación de citotoxicidad celular incluyendo: estudios de morfología y viabilidad celular mediante ensayos MTT (metabolismo mitocondrial) y DAPI (tinción de núcleos celulares vivos y muertos). La utilización de ambos métodos nos permite asegurar que, en las medidas de viabilidad celular los porcentajes de células vivas y muertas son correctos y no hay falsos positivos. Hay que tener en cuenta que a veces puede ocurrir que en la medida de la funcionabilidad de las mitocondrias en el ensayo MTT el porcentaje de viabilidad celular disminuye porque, aunque la célula aún sigue viva, algunas de las mitocondrias han comenzado a morir y, por lo tanto, no pueden realizar el proceso de reducción del compuesto MTT a formazán, sin embargo, la célula aún está viva. Esta situación puede comprobarse con la tinción DAPI puesto que el núcleo de dicha célula estaría teñido de azul y no de rojo.

Como se indica en la parte experimental, se utilizó la línea celular HFF-1 exponiendo las células a concentraciones crecientes de ligando o NPs funcionalizadas (0,1 µg/mL-100 µg/mL). Los resultados se describen a continuación:

- Ligandos: para todas las concentraciones el ligando GA-PEG₁₅₀₀-OH (**42**) proporcionó mejores resultados, mostrando una viabilidad del 98 % a la máxima concentración de 100 µg/mL. A este le siguen los ligandos CA-PEG₁₅₀₀-OH (**40**) y CA-PEG₁₅₀₀-N₃ (**34**), con una viabilidad celular del 80 % a la máxima concentración. El ligando GA-PEG₁₅₀₀-N₃ (**36**) mostraba cierta citotoxicidad desde el comienzo, obteniéndose una media de supervivencia celular del 77 % en todas las concentraciones. Por último, los ligandos derivados de DHCA mostraron los porcentajes más bajos de supervivencia celular con las concentraciones más altas de NPs. El DHCA-PEG₁₅₀₀-N₃ (**35**) mostró una viabilidad celular de 70 % y 50 % para las concentraciones de 50 y 100 µg/mL respectivamente ($p < 0,05$). El DHCA-PEG₁₅₀₀-OH (**41**) mostró la mayor citotoxicidad, exhibiendo una viabilidad celular de 38 % para la concentración de 50 µg/mL y de 28 % para la concentración de 100 µg/mL ($p < 0,05$). (Figura 52).

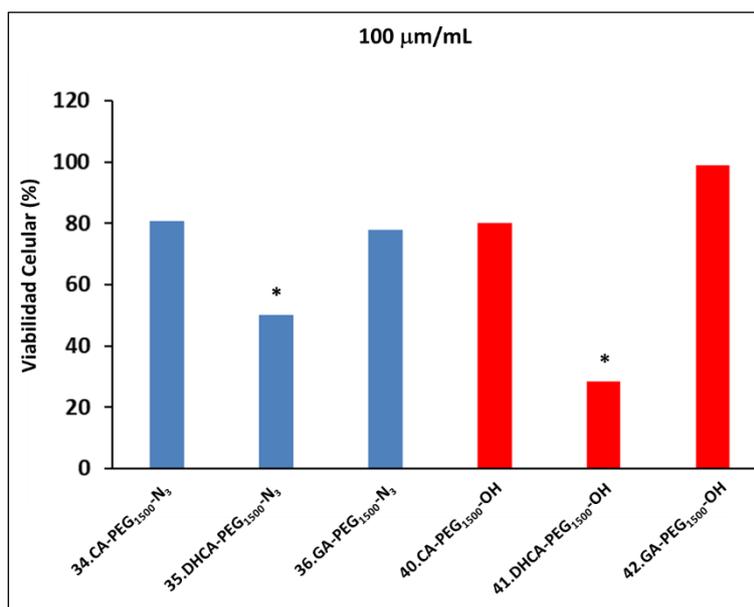
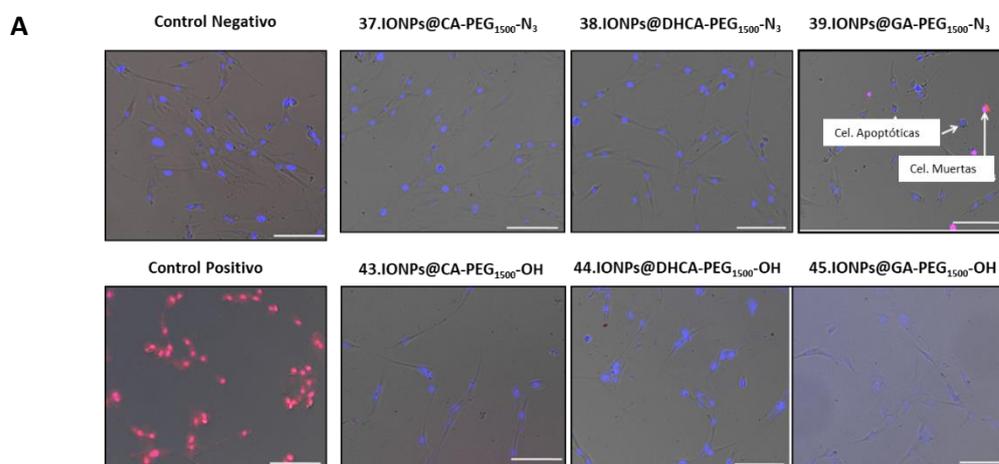


Figura 52. Esquema representativo de viabilidad celular para cada ligando a la concentración máxima de 100 µg/mL. En color azul los ligandos PEG₁₅₀₀-N₃ (**34**, **35** y **36**) y en rojo los ligandos PEG₁₅₀₀-OH (**40**, **41** y **42**). (*) muestra los valores estadísticamente significativos (p <0,05).

- IONPs funcionalizadas con los ligandos: las NPs **45** y **39**, funcionalizadas con los ligandos GA-PEG₁₅₀₀-OH y GA-PEG₁₅₀₀-N₃ respectivamente, no mostraron ningún efecto adverso sobre las células tratadas, obteniendo 100% de viabilidad para todas las concentraciones. Lo mismo ocurre para las IONPs **43** y **37**, funcionalizadas con los ligandos CA-PEG₁₅₀₀-OH y CA-PEG₁₅₀₀-N₃, que tan sólo mostraron una leve disminución de la viabilidad celular (inferior al 20 %) a una concentración de 100 µg/mL (Figura 53). Por lo tanto, podemos decir que estos resultados indican que estas NPs son unas candidatas prometedoras para aplicaciones biomédicas. Por el contrario, las NPs **44**, funcionalizadas con DHCA-PEG₁₅₀₀-OH, indujeron una disminución significativa en la viabilidad celular, medida mediante el ensayo MTT, que llega a ser inferior al 80 % a una concentración de 100 µg/mL (p <0,05), indicando que estas IONPs afectan

negativamente al metabolismo del fibroblasto. Sin embargo, el análisis con DAPI o mediante la visualización de la morfología celular no mostró ningún efecto sobre la viabilidad celular de dichos fibroblastos. Por lo tanto, podemos concluir que la presencia de IONPs funcionalizadas con DHCA-PEG₁₅₀₀-OH afecta a las mitocondrias celulares, pero no provocan una muerte instantánea sino una muerte más lenta (Figura 53).

En el caso de las NPs **38**, funcionalizadas con DHCA-PEG₁₅₀₀-N₃, el MTT mostró una disminución de la viabilidad celular a partir de una concentración de NPs de 10 µg/mL con un porcentaje de supervivencia celular del 85 %, que disminuye a medida que aumenta la concentración de NPs, llegando a un porcentaje de viabilidad celular del 50 % a la concentración de 100 µg/mL ($p < 0,05$) (Figura 53). Por su parte, el ensayo DAPI mostró resultados similares y, por lo tanto, nos indica que en este caso la pérdida de la actividad mitocondrial provoca la muerte de las células. Por consiguiente, estos datos demuestran que las IONPs funcionalizadas con los ligandos derivados del catecol DHCA-PEG₁₅₀₀ (**38** y **44**) no son una buena opción para su aplicación clínica.



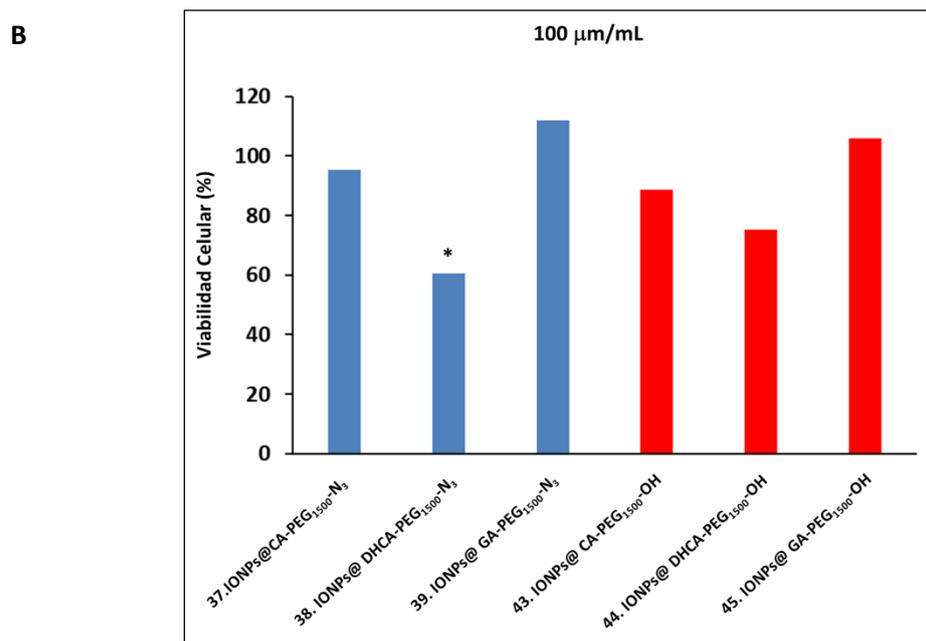


Figura 53. A. Imágenes de viabilidad celular obtenidas mediante la técnica DAPI para las NPs funcionalizadas con cada ligando a la concentración máxima de 100 µg/mL. Se puede ver la combinación de campo brillante (gris) donde se aprecia la morfología celular, DAPI (azul) células vivas y TO-PRO-3 Iodine (rojo) células muertas. La barra de escala corresponde a 50 nm. **B.** esquema representativo de viabilidad celular, medida por el ensayo MTT, para las NPs funcionalizadas con cada ligando a la concentración máxima de 100 µg/mL. En color azul las IONPs funcionalizadas con los ligandos PEG₁₅₀₀-N₃ (**37**, **38** y **39**) y en rojo las IONPs funcionalizadas con los ligandos PEG₁₅₀₀-OH (**43**, **44** y **45**). (*) muestra los valores estadísticamente significativos (p < 0,05).

Es interesante reseñar que, si comparamos la viabilidad de los ligandos libres frente a la viabilidad de las IONPs funcionalizadas con dichos ligandos, el porcentaje de supervivencia es significativamente superior en el segundo caso. Este resultado se puede justificar en base a la

toxicidad que provoca en el entorno celular los OH fenólicos de los catecoles cuyo efecto desaparece al unirse a la superficie de las IONPs.

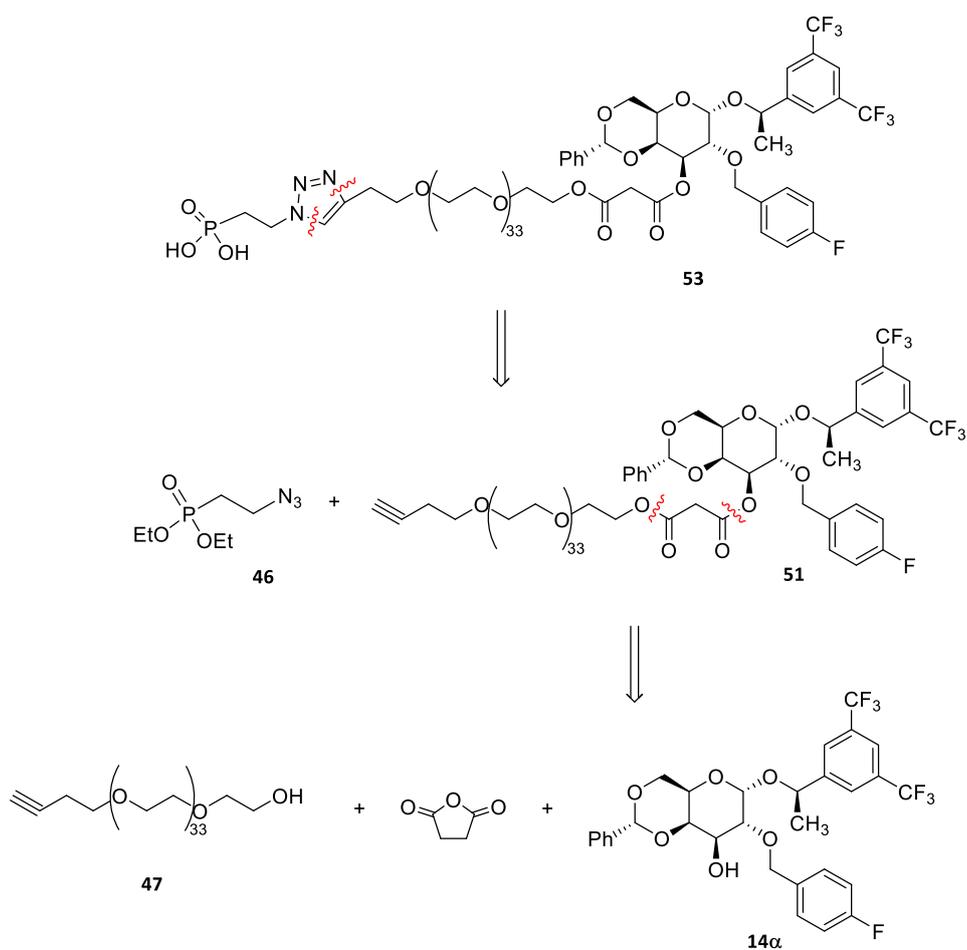
Una vez determinados los ligandos óptimos para la obtención de IONPs carentes de toxicidad y estables coloidalmente en medios acuosos, la siguiente etapa consiste en la incorporación de los antagonistas de los receptores NK1, sintetizados en el capítulo anterior.

Sin embargo, estos ligandos derivados de PEG₁₅₀₀ (**34**, **34**, **36** y **42**), que resultaron ser óptimos para la funcionalización de las IONPs, presentaban varios inconvenientes. Por una parte, la imposibilidad de su purificación en la etapa de incorporación del derivado de catecol al derivado de PEG₁₅₀₀ y, por otra parte, la posibilidad de reacción de los OH fenólicos de los catecoles dificultando la incorporación de nuestros análogos y/o formando productos secundarios difíciles de eliminar posteriormente. En concreto, los intentos para realizar la cicloadición 1,3 dipolar de Huisgen, catalizada por Cu (I), entre el ligando GA-PEG₁₅₀₀-N₃ (**36**) y un alquino resultaron infructuosos debido a que los OH fenólicos se unen al cobre impidiendo realizar su actividad catalítica.

Para superar esta dificultad, diseñamos una ruta alternativa para acceder a nuevos ligandos que presentan grupos de anclaje a la superficie de las IONPs basados en derivados de ácido fosfónico. Como describiremos a continuación, estos ligandos han mostrado una gran versatilidad sintética pudiéndose purificar en todas sus etapas como derivados de esteres fosfónicos y posteriormente, una vez liberados los correspondientes ácidos, son capaces de interaccionar de manera eficiente con la superficie de las IONPs.

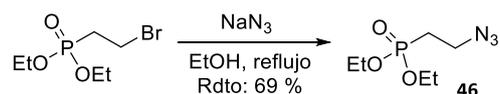
III.2.2. Síntesis de ligandos derivados de ácido fosfónico y funcionalización de IONPs

Para llevar a cabo la síntesis de un nuevo ligando derivado de ácido fosfónico **53** propusimos el siguiente esquema retrosintético (Esquema **19**).



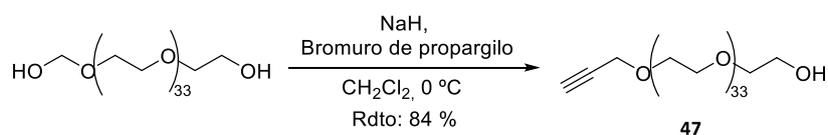
Esquema **19**. Retrosíntesis del ligando derivado de ácido fosfónico **53**.

La primera etapa de la nueva ruta sintética consiste en la preparación del 2-azidoetil fosfonato de dietilo (**46**) (Esquema **20**). La presencia del grupo azida en este derivado es de vital importancia para poder incorporar de forma eficiente el espaciador PEG₁₅₀₀ mediante una reacción tipo click. El tratamiento del 2-bromoetilfosfonato de dietilo con NaN₃ en etanol a reflujo, permite obtener la azida deseada **46** con un rendimiento del 69 %.



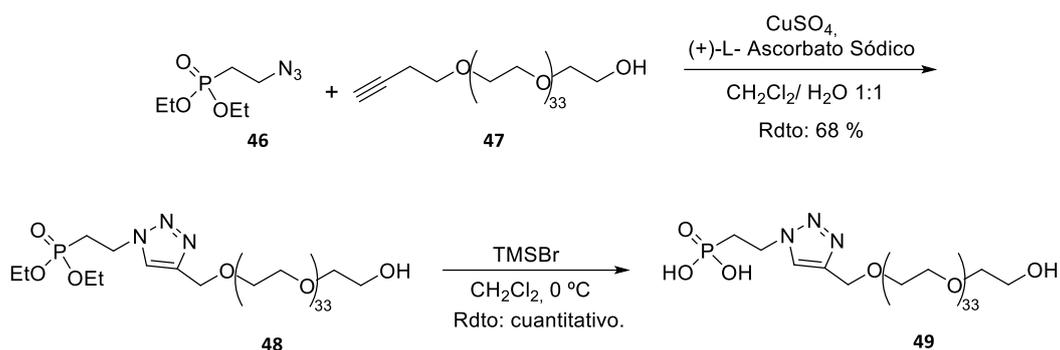
Esquema 20. Síntesis del fosfonato **46**.

Por otra parte, llevamos a cabo la síntesis del ligando heterobifuncional alquino-PEG₁₅₀₀-OH **47**. Para ello, se disuelve el PEG₁₅₀₀ comercial en CH₂Cl₂ y se añade NaH y bromuro de propargilo a 0 °C, obteniéndose el producto deseado **47** con un rendimiento del 84 % (Esquema **21**).



Esquema 21. Síntesis del espaciador alquilo-PEG₁₅₀₀-OH **47**.

A continuación, se procedió a la cicloadición 1,3 dipolar catalizada por Cu (I), añadiendo a una disolución de la azida **46** y el alquino terminal **47** en CH₂Cl₂, una disolución de CuSO₄ y ascorbato sódico en H₂O. De esta forma se obtuvo el triazol deseado **48** con un rendimiento del 68 % (Esquema **22**). Finalmente, se llevó a cabo la desprotección de los grupos etilos de **48** mediante tratamiento con un gran exceso de bromuro de trimetilsilano a 0 °C, obteniéndose el derivado del ácido alquil-fosfónico **49** con rendimiento cuantitativo (Esquema **22**).



Esquema 22. Síntesis del ligando fosfónico-PEG₁₅₀₀-OH **48** y su desprotección dando el compuesto **49**.

- **Funcionalización de las IONPs con el ligando fosfónico-PEG₁₅₀₀-OH**

La funcionalización de la superficie de las IONPs con el ligando PEG₁₅₀₀-OH derivado de ácido fosfónico (**49**) se realizó siguiendo el procedimiento general de intercambio de ligandos con calentamiento, descrito anteriormente. El TEM y en el análisis del tamaño hidrodinámico mostraron que las IONPs funcionalizadas eran estables y monodispersas (Figura **54**).

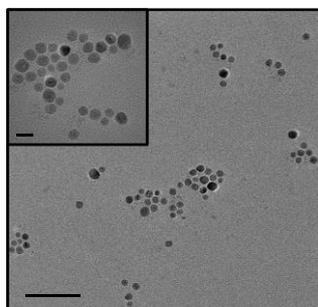
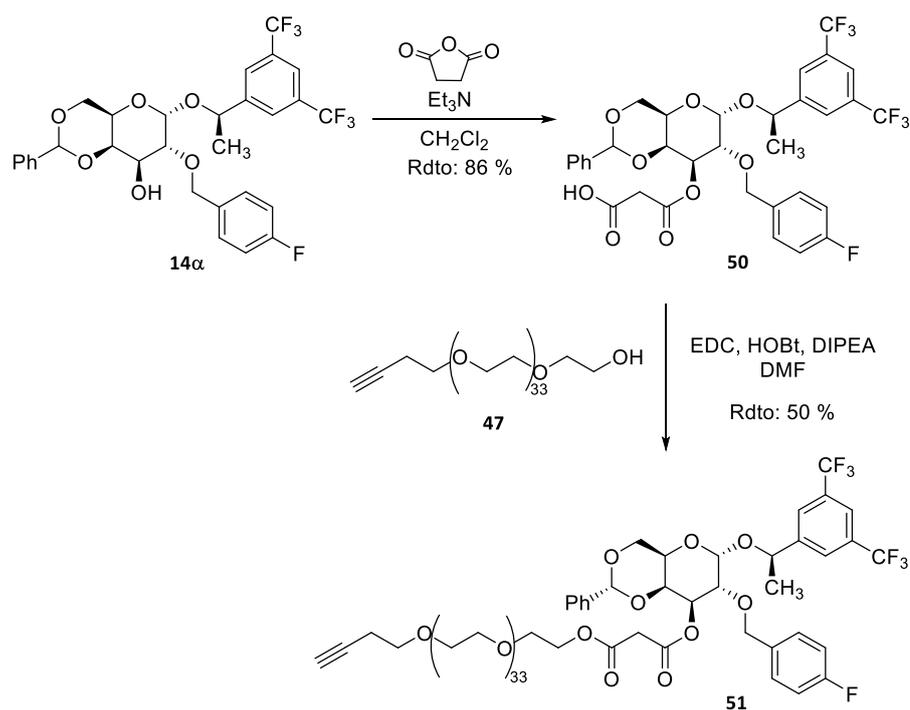


Figura 54. Imagen TEM de las IONPs funcionalizadas con el ligando PEG₁₅₀₀-OH derivado de ácido fosfónico (**49**). La barra de escala corresponde a 100 nm para las imágenes TEM de bajo aumento y a 20 nm para las inserciones (zona aumentada).

Tras comprobar que el ligando **49** presentaba la posibilidad de purificación en las distintas etapas, con la completa desprotección del éster fosfónico de manera cuantitativa y, lo más importante, que era capaz de funcionalizar las IONPs, se procedió a la conjugación del ligando con un antagonista del receptor NK1. Sin embargo, para evitar la formación de productos secundarios y facilitar la purificación, decidimos modificar el orden de la secuencia de las reacciones, uniendo primero el espaciador heterobifuncional alquino-PEG₁₅₀₀-OH **47** al antagonista NK1 y después conectarlo al fosfonato **46**, para finalmente realizar la desprotección.

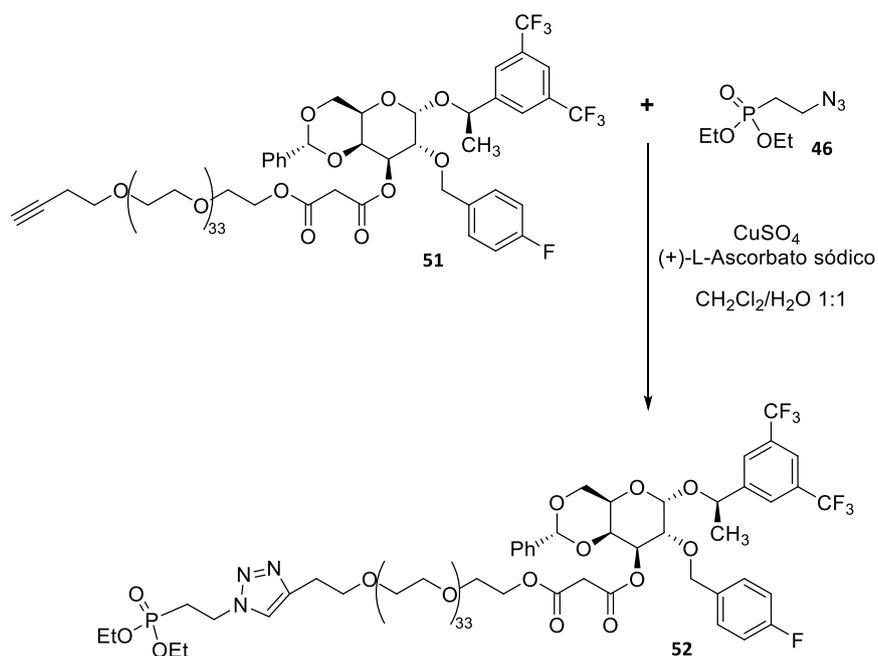
Para llevar a cabo la funcionalización, seleccionamos el derivado de galactosa **14 α** , sintetizado como se indicó en el capítulo anterior, por ser el derivado que había proporcionado mejores resultados como antagonista NK1 y como agente anticanceroso. El antagonista **14 α** se derivatizó como ácido carboxílico, para poder conjugarlo como éster con el alcohol **47** (Esquema **23**). Para ello, se hizo reaccionar **14 α** con anhídrido succínico, obteniéndose el hemisuccinato **50** con un 86 % de rendimiento (Esquema **23**).



Esquema 23. Síntesis del alquino **51** mediante esterificación del hemisuccinato **50**.

El hemisuccinato **50** se unió al espaciador heterobifuncional PEG₁₅₀₀ **47** mediante la formación de un éster, obteniéndose el alquinilderivado **51** con un 50 % de rendimiento.

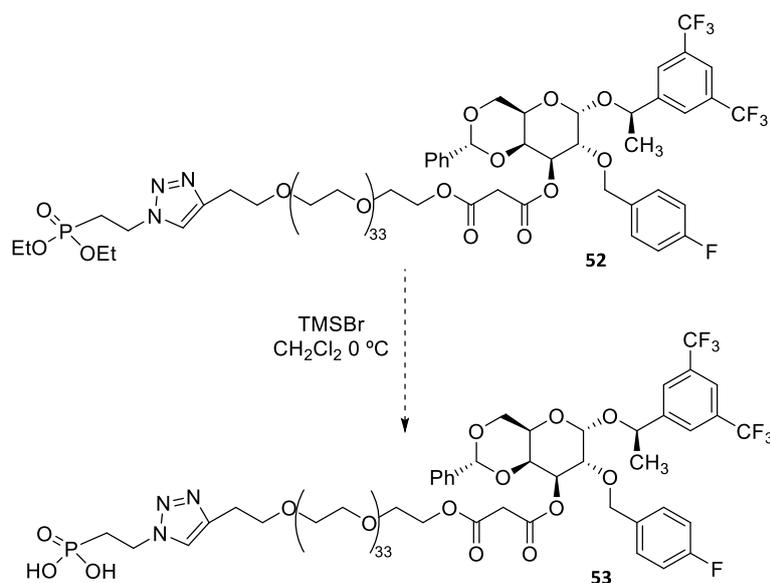
Por último, procedimos a su unión con el derivado de fosfonato **46** mediante la reacción click de cicloadición catalizada con Cu (I), obteniéndose el triazol **52** cuya purificación ha resultado ser dificultosa, y se ha estimado un rendimiento del 50 % aproximadamente (Esquema **24**).



Esquema 24. Cicloadición 1,3 del alquino **51** y la azida **46** para dar el triazol **52**.

Llegados a este punto, disponemos del ligando fosforado deseado conjugado con el antagonista como agente de vectorización y anticanceroso.

La etapa siguiente implica la desprotección del éster fosfónico mediante tratamiento de **52** con TMSBr en DCM a $0\text{ }^\circ\text{C}$ (Esquema **25**), para proceder luego al intercambio de ligando. Sin embargo, dada la limitación del tiempo, la síntesis y los estudios posteriores de caracterización de las IONPs bioconjugadas y sus aplicaciones biológicas se llevarán a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. M. L. García Martín del BIONAND (Málaga) y forma parte de una Tesis Doctoral actualmente en curso.



Esquema 25. Desprotección de los grupos EtO del compuesto **52** para obtener el compuesto desprotegido **53**.

III.3. Conclusiones

Se han preparado IONPs estables en medios acuosos funcionalizadas con ligandos polioxigenados basados en dos tipos de grupos de anclaje: (i) derivados de catecoles (ácido cafeico, ácido dihidrocafeico y ácido gálico) y (ii) ácido fosfónico. Los espaciadores polioxigenados fueron sintetizados a partir de cadenas hetero-bifuncionales de PEG de diferente tamaño, TEG de 200 Da y PEG de 1500 Da de peso. Solo las IONPs funcionalizadas con ligandos basados en PEG_{1500} resultaron estables en agua.

Se ha optimizado notablemente la transferencia de IONPs a medios acuosos mediante el procedimiento de intercambio de ligandos. La sonicación previa de la mezcla durante 1 h y la posterior incubación a $50\text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 h facilita el reemplazo de las moléculas de ácido oleico

por nuestros ligandos, incrementando hasta un 300 % la cantidad de IONPs transferidas en comparación con el método clásico.

Las IONPs funcionalizadas con ligandos basados en catecoles como grupo de anclaje presentaron en general excelentes características como agente de contraste T_2 en RMI con ausencia de citotoxicidad en células, excepto las IONPs funcionalizadas con ligandos derivados de dihidrocafeico, los cuales mostraron toxicidad a altas concentraciones.

Los problemas de purificación de los ligandos derivados de catecoles, y la imposibilidad de realizar con ellos la bioconjugación mediante cicloadición 1,3 dipolar de Huisgen catalizada por Cu (I), nos llevó a sintetizar un ligando derivado de PEG₁₅₀₀ basado en el ácido fosfónico como grupo de anclaje e incorporar como agente de vectorización un antagonista NK1 con actividad anticancerosa, sintetizado previamente, obteniendo con buen rendimiento global el ligando deseado.

III.4. Parte experimental

III.4.1. Métodos generales

(i) Disolventes y reactivos

Los disolventes utilizados fueron suministrados por Fisher Scientific, Aldrich y Scharlab, y se secaron mediante el siguiente procedimiento: (i) activación de 200 g de tamiz molecular de 4 Å en un matraz seco de fondo redondo, para ello se realizan 3 ciclos de calentamiento-enfriamiento bajo Ar. Los calentamientos se realizaron en intervalos de 3-1-1 min. (ii) Se vierte el tamiz activado sobre 1 L del disolvente correspondiente y se cierra con septum. (iii) Se burbujea Ar durante 3 min. en el disolvente. (iv) Finalmente, se sella con Parafilm.

Los disolventes usados han sido: diclorometano (DCM), metanol, etanol, N,N-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), acetona, acetato de etilo, hexano, 1-octadeceno, agua, cloroformo y tolueno. Además, para el tratamiento de algunas de las reacciones se utilizaron disoluciones acuosas saturadas de NaCl, NH₄Cl y NaHCO₃, y para eliminar todo resto de agua en la fase orgánica, Na₂SO₄ anhidro.

Los reactivos suministrados por Fisher Scientific y Aldrich fueron usados directamente sin purificación previa.

(ii) Técnicas y aparatos

Las técnicas y aparatos utilizados en este capítulo son idénticos a los descritos en el Capítulo II.

III.4.2. Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro

- **Síntesis de oleato de hierro**

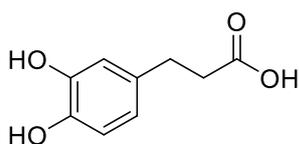
Se disuelve una mezcla de cloruro de hierro (III) (10,80 g, 40 mmol) y oleato de sodio (36,50 g, 120,00 mmol) en EtOH (80 mL), agua destilada (60 mL) y hexano (140 mL). La mezcla resultante se agita, calentando a 60 °C, durante 4 h bajo atmósfera de Ar. Seguidamente, la mezcla se enfría a t.a. y la fase orgánica se separa, y se lava con agua destilada (3 x 50 mL). Por último, los disolventes de la fase orgánica se evaporan a vacío obteniéndose el producto deseado (36,00 g) como un sirupo marrón con rendimiento cuantitativo.

- **Síntesis de IONPs**

Se disuelve una mezcla de oleato de hierro (1,00 g, 1,10 mmol) y ácido oleico (0,30 g, 1,00 mmol) en 1-octadeceno (6,50 mL). La mezcla se agita y se calienta hasta 320 °C durante 1 h (rampa de calentamiento de 3 °C/min.) bajo atmósfera de Ar. Después, la mezcla se enfría a t.a., se lava con una mezcla de EtOH/acetona 1:1, (2 x 30 mL) para favorecer la precipitación y se centrifuga a 450 rcf. Finalmente, las IONPs se resuspenden en tolueno (5 mL).

III.4.3. Síntesis de ligandos derivados de catecol

Ácido dihidrocafeico (Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propiónico) (15)



Sobre una disolución de ácido cafeico (1,60 g, 8,90 mmol) en MeOH (20 mL) se añade un 10 % de Pd/C (0,10 g) bajo atmósfera de H₂. La mezcla se mantiene agitando a t.a. durante 24 h, se filtra sobre celita y se evapora a vacío. El crudo se purifica mediante columna cromatográfica usando acetato de etilo como eluyente, obteniéndose el compuesto **1** (1,38 g, 7,57 mmol) como un sólido marrón claro.

Rdto.: 86 %.

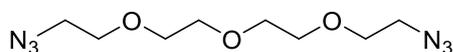
P.f.: 223 °C.

¹H-RMN (500 MHz, MeOD) δ : 6,66 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,64 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 6,52 (dd, $J = 8,0$ Hz, $J = 2,0$ Hz, 1H), 2,75 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 2,51 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, MeOD) δ : 177,0, 146,2, 144,6, 133,8, 120,5, 116,4, 37,2, 31,5 ppm.

EMAR: calculado para C₉H₁₀O₄Na [M+Na]⁺: 205,0471; encontrado: 205,0466 (-2,5831 ppm).

3,6,9-trioxaundecan-1,11 diazida (**17**)



Sobre una disolución de TEG (48,00 g, 0,25 mol) en THF (200 mL) bajo atmósfera de Ar, con agitación y a 0 °C,

se añaden Et₃N (85 mL, 0,62 mol) y cloruro de metanosulfonilo (44 mL, 0,57 mol) gota a gota. Se deja que la temperatura de la reacción llegue hasta t.a. y se mantiene agitando durante 24 h. Después se evapora el disolvente y el crudo se disuelve en CH₂Cl₂ (100 mL). La disolución obtenida se lava sucesivamente con disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 50 mL) y disolución saturada de NaCl (1 x 50 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a vacío. El residuo obtenido se utiliza en el siguiente paso sin purificar.

El residuo se disuelve en EtOH (150 mL), se adiciona NaN₃ (48,20 g, 0,74 mol) y se calienta a reflujo de etanol. La reacción se mantiene con agitación durante 24 h. Después, se evapora el disolvente, y el residuo se disuelve en CH₂Cl₂ (100 mL) y la fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl (50 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora a vacío. El residuo obtenido se purifica por columna cromatográfica usando CH₂Cl₂/MeOH en proporción 20:1 como eluyente, obteniéndose **17** (56,00 g, 0,23 mol) como un líquido amarillo.

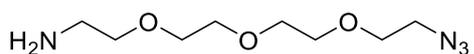
Rdto.: 92 %.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 3,67-3,62 (m, 12H), 3,36(t, $J = 5,2$ Hz, 4H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 70,7, 70,1, 50,8 ppm.

EMAR: calculado para C₈H₁₆N₆O₃Na [M+Na]⁺: 267,1176; encontrado: 267,1172 (-1,4528 ppm).

11-amino-3,6,9-trioxaundecan-1-azida (**18**)



Sobre una disolución de la diazida **17** (15,00 g, 59,50 mmol) en 100 mL de la mezcla 2:1 AcOEt y HCl (1 M)

se adiciona gota a gota, bajo agitación y a 0 °C, una disolución de PPh₃ (17,10 g, 65,40 mmol) en AcOEt (20 mL). La reacción se mantiene agitando a t.a. durante 10 h. Transcurrido este tiempo, la fase acuosa se separa, se lava con AcOEt (4 x 50 mL), hasta comprobar por TLC la extracción total de PPh₃, y se lleva a pH básico añadiendo KOH sólido a 0 °C. El compuesto deseado se extrae de la fase acuosa con CH₂Cl₂ (5 x 50 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora a vacío obteniéndose **18** (10,00 g, 45,81 mmol) como un líquido amarillo.

Rdto.: 77 %.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 3,57-3,46 (m, 10H), 3,43 (t, *J* = 5,3 Hz, 2H), 3,26 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 2,79 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 71,6, 70,4, 70,3, 69,9, 69,8, 50,5, 41,0 ppm.

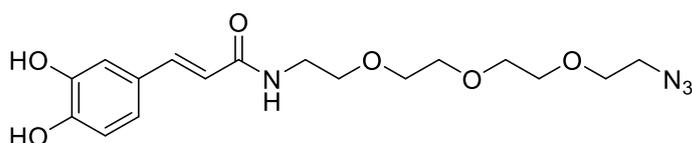
EMAR: calculado para C₈H₁₉N₄O₃ [M+H]⁺: 219,1452; encontrado: 219,1446 (-2,4831 ppm).

- Procedimiento general para la reacción de amidación entre los derivados de catecol y la amina **18**

Sobre una disolución de **18** (218,10 mg, 1,00 mmol) en DMF (10 mL), bajo atmósfera de Ar, agitación y a 0 °C, se adicionan EDC (286,50 mg, 1,50 mmol), HOBt (202,50 mg, 1,20 mmol), DIPEA (522,57 μL, 3,0 mmol) y una disolución del catecol correspondiente (1,00 mmol) en DMF

(5 mL) gota a gota. Tras agitar durante 24 h a t.a., se evapora la DMF a vacío, se añaden CH₂Cl₂ (100 mL) y una disolución de HCl 1M (50 mL). Los extractos orgánicos se lavan sucesivamente con disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 50 mL) y de NaCl (50 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a vacío. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna usando CH₂Cl₂/MeOH en proporción 30:1 como eluyente.

(E) 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-aza-7,10,13-trioxa-3-oxo-pentadecan-1-en-15-azida (19)



A partir de ácido cafeico (180,16 mg, 1,00 mmol) y **18** (218,10 mg, 1,00 mmol), siguiendo el

procedimiento general descrito, se obtiene la amida **19** (102,00 mg, 0,26 mmol) como un sirupo marrón claro.

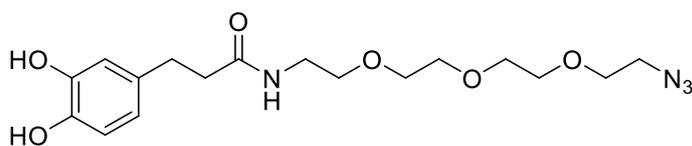
Rdto.: 26 %.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7,46 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H), 7,1 (s, 1H), 6,9-6,7 (m, 2H), 6,18 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H), 3,69-3,51 (m, 14H), 3,32 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 167,5, 147,0, 144,7, 141,9, 127,4, 121,7, 117,7, 115,8, 114,7, 70,7, 70,6, 70,3, 70,1, 50,8, 39,8 ppm.

EMAR: calculado para C₁₇H₂₄N₄O₆Na [M+Na]⁺: 403,1588; encontrado: 403,1581 (-1,6458 ppm).

N-(11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-il) 3-(3,4-dihidroxifenil)propanamida (20)



A partir de ácido dihidrocafeico **15** (182,00 mg, 1,00 mmol) y **18** (218,10 mg, 1,00 mmol), siguiendo

el procedimiento general descrito, se obtiene la amida **20** (189,00 mg, 0,49 mmol) como un sirupo marrón claro.

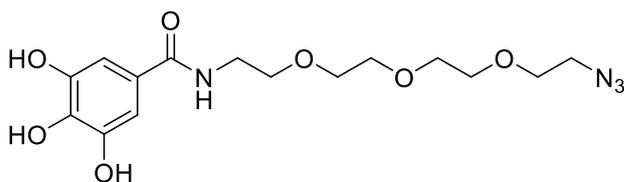
Rdto.: 49 %

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 6,77 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,72 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 6,57 (dd, *J* = 8,2 Hz y 2,0 Hz, 1H), 6,20-6,18 (m, 1H), 3,69-3,62 (m, 8H), 3,58-3,54 (m, 2H), 3,46-3,43 (m, 2H) 3,40-3,35 (m, 4H), 2,81 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,43 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 173,3, 144,2, 143,1, 132,9, 120,4, 115,7, 70,8, 70,7, 70,2, 70,1, 69,9, 50,8, 39,5, 38,6, 31,2 ppm.

EMAR: calculado para C₁₇H₂₆N₄O₆Na [M+Na]⁺: 405,1745; encontrado: 405,1740 (-1,2676 ppm).

***N*-(11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-il) 3,4,5-trihidroxibenzamida (**21**)**



A partir de ácido gálico (172,00 mg, 1,00 mmol) y **18** (218,10 mg, 1,00 mmol), siguiendo el procedimiento general descrito, se obtuvo la amida **21** que no

pudo ser purificada por cromatografía en columna ya que al introducirlo para intentar purificarlo se descomponía. La espectroscopia de masas de alta resolución confirmó la presencia del compuesto deseado.

EMAR: calculado para C₁₅H₂₃N₄O₇Na [M+Na]⁺: 371.1555; encontrado: 371.1561 (-1,3427 ppm).

HO-PEG₁₅₀₀-N₃ (33**)**



Sobre una disolución de PEG₁₅₀₀ (40,00 g, 26,70 mmol) en THF (200 mL) se añaden a 0 °C, bajo atmósfera de Ar y con agitación,

Et₃N (5,00 mL, 32,00 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (2,06 mL, 26,70 mmol) gota a gota. Se

deja que la reacción alcance la t.a. y se mantiene agitando durante 24 h. Después se evapora el disolvente y el crudo se disuelve en CH_2Cl_2 (100 mL). La disolución obtenida se lava sucesivamente con disolución saturada de NaHCO_3 (3 x 50 mL) y de NaCl (50 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a vacío. El crudo se utiliza en el siguiente paso sin purificar.

Se disuelve el crudo en EtOH (100 mL), se adiciona NaN_3 (2,20 g, 40,00 mmol) y se calienta a reflujo de etanol. La reacción se mantiene con agitación durante 24 h. Después, se evapora el disolvente, y el residuo se disuelve en CH_2Cl_2 (100 mL). La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaCl (50 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora a vacío. El residuo obtenido se purifica por columna cromatográfica usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ en proporción 20:1 como eluyente, obteniéndose **33** (13,00 g, 17,40 mol) como un sólido blanco.

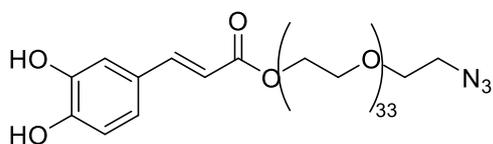
Rdto.: 65 %.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 3,67-3,52 (m $\text{CH}_2\text{-PEG}$), 3,32 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 2,81 (s, 1H) ppm.

- *Procedimiento general para la síntesis de ligandos Catecol-PEG₁₅₀₀ **34-36 y 40-42***

A partir del azida-alcohol derivado de PEG_{1500} **33** o PEG_{1500} (1,00 mmol) y el catecol correspondiente (1,00 mmol) se sigue el procedimiento general descrito para el acoplamiento entre catecol y derivado de TEG. Los compuestos obtenidos no pudieron ser purificados por cromatografía en columna, por lo que no se pudo determinar el rendimiento de la reacción, pero se pudo confirmar la formación del compuesto deseado mediante espectroscopia de resonancia de protones e IR.

CA-PEG₁₅₀₀-N₃ (34)

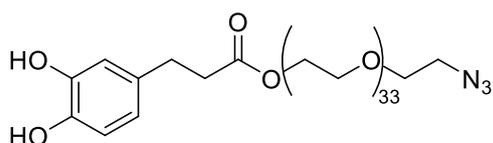


El éster **34** se obtiene a partir de ácido cafeico (180,16 mg, 1,00 mmol) y el alcohol **33** (1,52 g, 1,00 mmol) siguiendo el procedimiento general descrito para la síntesis de ligandos derivados de catecol-PEG₁₅₀₀.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,76 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H), 7,25-6,70 (m, 2H), 6,55-6,40 (m, 1H), 6,28 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H), 4,15-4,12, (m, 2H), 3,90-3,48 (m, 132H, CH₂-PEG₁₅₀₀), 3,40 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H), 3,24-3,17 (m, 2H) ppm.

FT-IR (cm⁻¹): 3000-2700 (tensión O-H), 2111 (tensión N=N=N), 1357 (flexión C-H), 1341 (flexión C-H), 1275 (tensión C-O), 1241 (tensión C-O), 1100 (tensión C-O-C), 958 (flexión C-H).

DHCA-PEG₁₅₀₀-N₃ (35)

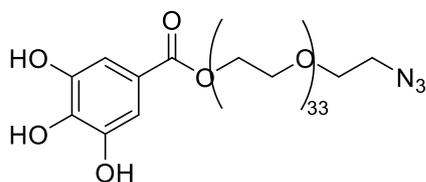


El éster **35** se obtiene a partir de ácido dihidrocafeico (182,00 mg, 1,00 mmol) y el alcohol **33** (1,52 g, 1,00 mmol) siguiendo el procedimiento general descrito para la síntesis de ligandos derivados de catecol-PEG₁₅₀₀.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 6,80-6,71 (m, 2H), 6,57-6,53 (m, 1H), 4,66 (s, 1H), 4,23-4,19, (m, 2H), 3,89-3,64 (m, 135H, CH₂-PEG₁₅₀₀), 3,37 (t, *J* = 5,1 Hz 2H), 2,92-2,81 (m, 2H), 2,68-2,54 (m, 2H) ppm.

FT-IR (cm⁻¹): 3000-2700 (tensión O-H), 2118 (tensión N=N=N), 1467 (flexión C-H), 1359 (flexión C-H), 1341 (flexión C-H), 1276 (tensión C-O), 1240 (tensión C-O), 1105 (tensión C-O-C), 961 (flexión C-H).

GA-PEG₁₅₀₀-N₃ (36)

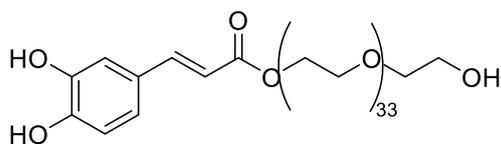


El éster **36** se obtiene a partir de ácido gálico (172,00 mg, 1,00 mmol) y el alcohol **33** (1,52 g, 1,00 mmol), siguiendo el procedimiento general descrito para la síntesis de ligandos derivados de catecol-PEG₁₅₀₀.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,1 (s, 2H), 4,33-4,13 (m, 2H), 3,88-3,58 (m, 132 H, CH₂-PEG), 3,41-3,36 (m, 2H) ppm.

FT-IR (cm⁻¹): 3000-2700 (tensión O-H), 2105 (tensión N=N=N), 1466 (flexión C-H), 1359 (flexión C-H), 1340 (flexión C-H), 1279 (tensión C-O), 1238 (tensión C-O), 1102 (tensión C-O-C), 956 (flexión C-H).

CA-PEG₁₅₀₀-OH (40)



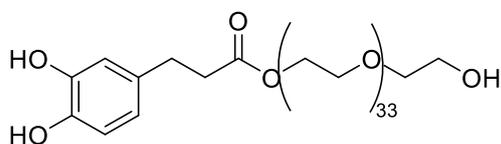
El éster **40** se obtiene a partir de ácido cafeico (180,16 mg, 1,00 mmol) y PEG₁₅₀₀ (1,50 g, 1,00 mmol), siguiendo el procedimiento general descrito

para la síntesis de ligandos derivados de catecol-PEG₁₅₀₀.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,60 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H), 7,20-7,02 (m, 1H), 6,96-6,77 (m, 1H), 6,60-6,48 (m, 1H), 6,26 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H), 4,20-4,17 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,78-3,59 (m, 132H, CH₂-PEG), 3,22-3,15 (m, 2H) ppm.

FT-IR (cm⁻¹): 3000-2700 (tensión O-H), 1466 (flexión C-H), 1359 (flexión C-H), 1341 (flexión C-H), 1268 (tensión C-O), 1238 (tensión C-O), 1092 (tensión C-O-C), 942 (flexión C-H).

DHCA-PEG₁₅₀₀-OH (41)

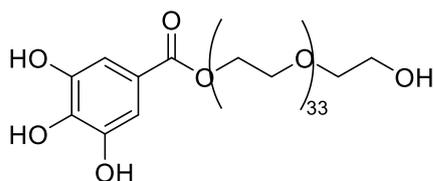


El éster **41** se obtiene a partir de ácido dihidrocafeico (182,00 mg, 1,00 mmol) y PEG₁₅₀₀ (1,50 g, 1,00 mmol), siguiendo el procedimiento general descrito para la síntesis de ligandos derivados de catecol-PEG₁₅₀₀.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 6,95-6,64 (m, 2H), 6,52-6,46 (m, 1H), 4,22-4,16, (m, 2H), 3,71-3,53 (m, 132H, CH₂-PEG), 3,20-3,13 (m, 2H), 2,89-2,76 (m, 2H), 2,65-2,54 (m, 2H) ppm.

FT-IR (cm⁻¹): 3000-2700 (tensión O-H), 1466 (flexión C-H), 1359 (flexión C-H), 1341 (flexión C-H), 1279 (tensión C-O), 1238 (tensión C-O), 1092 (tensión C-O-C), 945 (flexión C-H).

GA-PEG₁₅₀₀-OH (42)



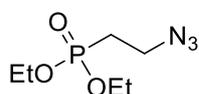
El éster **42** se obtiene a partir de ácido gálico (172,00 mg, 1,00 mmol) y PEG₁₅₀₀ (1,50 g, 1,00 mmol), siguiendo el procedimiento general descrito para la síntesis de ligandos derivados de catecol-PEG₁₅₀₀.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 6,92 (s, 2H), 4,15-4,12 (m, 2H), 3,67-3,54 (m, 132H, CH₂-PEG), 3,18-3,10 (m, 2H) ppm.

FT-IR (cm⁻¹): 3000-2700 (tensión O-H), 1466 (flexión C-H), 1359 (flexión C-H), 1341 (flexión C-H), 1268 (tensión C-O), 1238 (tensión C-O), 1092 (tensión C-O-C), 942 (flexión C-H).

III.4.4. Síntesis de ligandos derivados de ácido fosfónico

(2-azidoetil)-fosfonato de dietilo (46)



Sobre una disolución de 2-bromoetilfosfonato de dietilo (500,00 mg, 2,04 mmol) en EtOH (10 mL) bajo atmósfera de Ar y agitación, se añade NaN_3 (298,00 mg, 6,12 mmol) y se calienta a reflujo. La reacción se mantiene en agitación durante 24 h. Después, se evapora el disolvente, y el residuo se disuelve en CH_2Cl_2 (50 mL). La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaCl (30 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora a vacío. El residuo obtenido se purifica por columna cromatográfica usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ en proporción 20:1 como eluyente, obteniéndose la azida **46** (290,00 mg, 1,39 mmol) como un líquido amarillo.

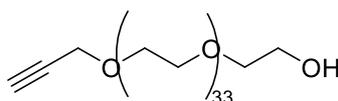
Rdto.: 69 %.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 4,14-4,03 (m, 4H), 3,50 (dt, $J = 12,0$ y $7,7$ Hz, 2H), 2,03 (dt, $J = 18,5$ y $7,7$ Hz, 2H), 1,30 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 62,0 (d, $J = 6,6$ Hz), 45,5 (d, $J = 1,8$ Hz), 26,1 (d, $J = 140,7$ Hz), 16,4 (d, $J = 6,0$ Hz) ppm.

EMAR: calculado para $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_3\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 230,0665; encontrado: 230,0664 (-0,1401 ppm).

HO-PEG₁₅₀₀-Alquino (47)



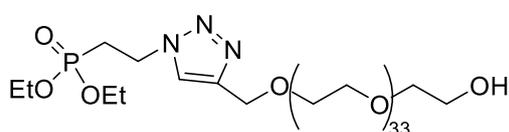
Sobre una disolución de PEG₁₅₀₀ (4,50 g, 3,00 mmol) en CH_2Cl_2 (30 mL) bajo atmósfera de Ar, con agitación y a 0 °C se añade una disolución de NaH (0,36 mg, 15,00 mmol) en THF (3 mL) gota a gota. Se deja que la reacción alcance la t.a. y se mantiene agitando durante 1 h. A continuación, se añade a 0 °C, bromuro de propargilo (0,10 mL, 1,00 mmol) gota a gota y se mantiene agitando a t.a durante 24 h adicionales. Después, la reacción se detiene añadiendo MeOH (50 mL) y

evaporando a sequedad. El residuo obtenido se purifica por columna cromatográfica usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ en proporción 20:1 como eluyente, obteniéndose **47** (1,30 g, 0,86 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: 84 %.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 4,18 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 3,70-3,58 (m, 132H, $\text{CH}_2\text{-PEG}$), 2,42 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H) ppm.

Fosfonato-PEG₁₅₀₀-OH (**48**)



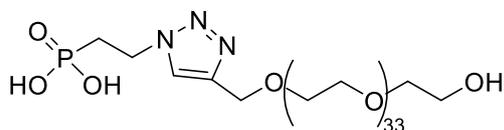
Sobre una disolución de la azida **46** (133,50 mg, 0,64 mmol) en CH_2Cl_2 (5 mL) bajo atmósfera de Ar, con agitación y a t.a. se añaden el alquino derivado

de PEG₁₅₀₀ **47** (500,00 mg, 0,33 mmol), una disolución de CuSO_4 (7,50 mg, 0,05 mmol) en H_2O (2,50 mL) y una disolución de ácido ascórbico (28,50 mg, 0,15 mmol) en H_2O (2,50 mL). La mezcla se agita a t.a. durante 24 h. Después, se añade CH_2Cl_2 (50 mL) y la fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl (30 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora a vacío. El residuo obtenido se purifica por columna cromatográfica usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ en proporción 15:1 como eluyente, obteniéndose el triazol **48** (392,00 mg, 0,22 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: 68 %.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,64 (s, 1H), 4,72 (s, 1H), 4,67 (s, 2H), 4,64-4,60 (m, 2H), 4,14-4,02 (m, 4H), 3,72-3,57 (m, 132H, $\text{CH}_2\text{-PEG}$), 2,47-2,40 (m, 2H), 1,30 (t, $J = 7,08$ Hz, 6H) ppm.

Ácido fosfónico-PEG₁₅₀₀-OH (49)



Sobre una disolución del éster dietil fosfónico **48** (637,00 mg, 0,36 mmol) en acetonitrilo (5 mL) bajo atmósfera de Ar, con agitación y a 0 °C se añade,

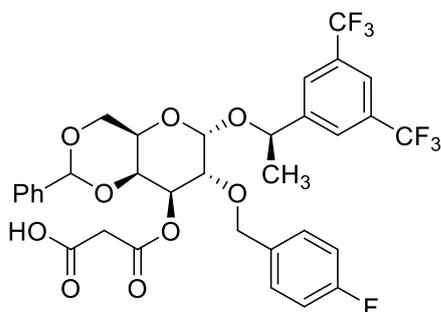
gota a gota, bromuro de trimetilsilano (1,90 mL, 14,4 mmol). Se deja que la reacción alcance la t.a. y se mantiene agitando durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, la reacción se detiene con MeOH (10 mL) y se continúa agitando 6 h. Después, se elimina el disolvente a vacío obteniéndose el ácido fosfónico **49** (616,00 mg) como un líquido amarillo.

Rdto.: cuantitativo

¹H-RMN (500 MHz, MeOD) δ: 8,25 (s, 1H), 7,25 (sa, 1H), 7,07 (sa, 1H), 6,90 (sa, 1H), 4,66-4,65 (m, 3H), 4,12 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 3,64-3,44 (m, 132H, CH₂-PEG), 2,80 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 2,41-2,30 (m, 2H) ppm.

³¹P-RMN (120 MHz, MeOD) δ: 26,2 ppm.

Hemisuccinato de (*R*)-{1-[3,4-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-*O*-*p*-fluorobencil-(*R*)-4,5-*O*-benciliden- α -D-galactopiranosido (50)



Sobre una disolución de anhídrido succínico (33,00 mg, 0,33 mmol) en CH₂Cl₂ (3,50 mL) bajo atmósfera de Ar, con agitación y a t.a., se añaden una disolución del alcohol **14 α** (169,00 mg, 0,27 mmol) en CH₂Cl₂ (3,50 mL) y Et₃N (0,06 mL, 0,41 mL). La reacción se mantiene agitando a t.a. durante 24 h. Después, se evapora el

disolvente a vacío y el residuo obtenido se purifica por columna cromatográfica usando CH₂Cl₂/MeOH en proporción 30:1 como eluyente, obteniéndose el éster succínico **50** (204,00 mg) como un líquido amarillo.

Rdto.: 86%

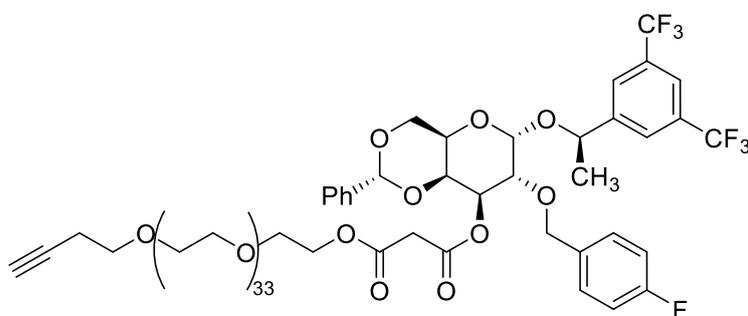
$[\alpha]_D^{20}$: (c 1, CHCl₃)

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,89 (s, 2H), 7,83 (s, 1H), 7,45-7,43 (m, 2H), 7,40-7,34 (m, 3H), 7,13-7,07 (m, 2H), 6,95-6,88 (m, 2H), 5,50 (s, 1H), 5,42 (dd, $J = 10,6$ y $3,5$ Hz, 1H), 4,94 (c, $J = 4,6$ Hz, 1H), 4,76 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 4,49 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 4,47 (s, 2H), 4,29 (dd, $J = 12,6$ y $1,4$ Hz, 1H), 4,08 (dd, $J = 12,6$ y $1,6$ Hz, 1H), 4,03 (dd, $J = 10,6$ y $3,5$ Hz, 1H), 3,85 (s, 1H), 2,72-2,56 (m, 4H), 1,53 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ : 175,3, 170,8, 161,4 (d, $J_{C-F} = 246,1$ Hz), 144,4, 136,6, 132,4 (d, $J_{C-F} = 3,0$ Hz), 131,0 (d, $J_{C-F} = 33,2$ Hz), 128,4 (d, $J_{C-F} = 7,8$ Hz), 128,0, 127,2 (d, $J_{C-F} = 2,7$ Hz), 127,1, 125,9 (d, $J_{C-F} = 3,4$ Hz), 125,1, 123,3 (c, $J_{C-F} = 272,4$ Hz), 120,8, 114,2 (d, $J_{C-F} = 21,2$ Hz), 99,7, 94,8, 76,1, 73,0, 72,0, 71,6 (d, $J_{C-F} = 3,7$ Hz), 70,3, 68,1, 61,8, 27,9, 27,5, 23,2 ppm.

EMAR: calculado para C₃₄H₃₁F₇O₉Na [M+Na]⁺: 739,1749; encontrado: 739,1738 (-1,3951 ppm).

(R)-{1-[3,4-bis-(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-p-fluorobencil-(R)-4,5-O-benciliden- α -D-galactopiranosido y alquiniil-PEG₁₅₀₀OH (51)



Sobre una disolución del hemisuccinato **50** (100,00 mg, 0,14 mmol) en CH₂Cl₂ (1,50 mL), bajo atmósfera de Ar, con agitación y a t.a., se añaden una disolución del alcohol **47** (105,00 mg, 0,07 mmol) en CH₂Cl₂ (1,50 mL), una disolución de HOBT (19,00 mg, 0,14 mmol) en CH₂Cl₂ (0,50 mL)

y por último EDC (0,02 mL, 0,14 mmol). Tras agitar la reacción durante 24 h a t.a., se añaden CH_2Cl_2 (100 mL) y disolución 1 M de HCl (50 mL). Los extractos orgánicos se aíslan y se lavan sucesivamente con disolución saturada de NaHCO_3 (3 x 50 mL) y de NaCl (1 x 50 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a vacío. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ en proporción 20:1 como eluyente, obteniéndose **51** (78,00 mg, 0,35 mmol) como un líquido amarillo.

Rdto.: 50%.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,90 (s, 2H), 7,85 (s, 1H), 7,46-7,44 (m, 2H), 7,38-7,36 (m, 3H), 7,14-7,11 (m, 2H), 6,95-6,91 (m, 2H), 5,53 (s, 1H), 5,43 (dd, $J = 10,6$ y $3,5$ Hz, 1H), 4,96 (c, $J = 4,6$ Hz, 1H), 4,77 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 4,52-4,49 (m, 3H), 4,49 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 4,47 (s, 2H), 4,30 (dd, $J = 12,6$ y $1,4$ Hz, 1H), 4,23-4,18 (m, 3H), 4,11 (dd, $J = 12,6$ y $1,6$ Hz, 1H), 4,05 (dd, $J = 10,6$ y $3,5$ Hz, 1H), 3,85 (s, 1H), 3,68-3,64 (m, 132H; $\text{CH}_2\text{-PEG}$), 2,70-2,65 (m, 4H), 2,45 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H), 1,55 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H) ppm.

III.4.5. Funcionalización de nanopartículas de óxido de hierro

- **Protocolo 1**

En un embudo de decantación se añaden una solución de IONPs en tolueno (1,00 mL, 10,00 g de Fe/L), una disolución del correspondiente ligando en cloroformo (1,00 mL, 0,10 mM) y Et_3N (50 μL). La mezcla se agita vigorosamente durante un minuto y se diluye con tolueno (5 mL), agua mili-Q (5 mL) y acetona (10 mL). Se vuelve a agitar durante un minuto, se transfiere a un embudo de decantación, se recoge la fase acuosa y se eliminan a vacío los restos de disolvente orgánico que pueda contener. Las IONPs funcionalizadas contenidas en esta fase acuosa se purifican para eliminar el ligando libre mediante centrifugación en filtros de centrífuga (tamaño de corte: 100 kDa) a 450 rcf, hasta que el filtrado queda completamente transparente. Finalmente, las IONPs resuspendidas en el correspondiente medio se centrifugan a 150 rcf

durante 5 min., colocando un imán (0,6 T) en la parte inferior durante 5 min. para eliminar los agregados depositados, recogiendo por último la suspensión libre de agregados.

- **Protocolo 2**

En un vial se añaden sobre una disolución de IONPs en tolueno (1,00 mL, 10,00 g de Fe/L), una disolución del correspondiente ligando en cloroformo (1,00 mL, 0,10 mM) y Et₃N (50 µL). La mezcla se sonica durante 1 h. Seguidamente, la mezcla se calienta a 50 °C durante 4 h y se transfiere a un embudo de decantación. A partir de este punto se sigue el protocolo 1 descrito anteriormente.

III.4.6. Caracterización de nanopartículas de óxido de hierro y ligandos

- **Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

El TEM es un instrumento en el cual se hace pasar un haz de electrones a través de una muestra ultrafina que es insertada en el aparato mediante una sonda porta muestras. Cuando se produce la colisión de los electrones con la muestra, dependiendo de la composición y grosor de la misma, se produce una gradación entre los electrones que atraviesan directamente la muestra y los que son desviados.^{173,174} Todos ellos son modulados por unas lentes que forman una imagen que, seguidamente se amplía y enfoca en una cámara CCD (del inglés “*charge-coupled device*”). Esta imagen está formada por una combinación de distintos tonos de grises que corresponde a la densidad de electrones en cada zona de la muestra (a mayor densidad de electrones la zona es más oscura y viceversa).^{173,174} Dependiendo del material, la aceleración de los electrones puede ser de entre 100-300 kV. Los niveles más bajos de energía permiten analizar elementos más ligeros causando el menor daño posible.¹⁷⁵

La gran ventaja que ofrece el TEM frente a otras técnicas de microscopía es su elevado rango de magnificación, así como de resolución.¹⁷⁵

En esta tesis doctoral hemos obtenido las imágenes TEM utilizando un microscopio FEI Tecnai G2 trabajando con un voltaje de aceleración de electrones de 100 kV. Las muestras fueron preparadas de la siguiente forma: se depositó una gota de la solución de las correspondientes IONPs (~1 g/L de Fe) en una rejilla de cobre recubierta de carbono y se dejó que el disolvente se evaporase lentamente. Los diámetros se calcularon haciendo una media de los diámetros medidos en al menos cien NPs.¹⁵⁸

- **Dispersión dinámica de luz (DLS)**

La DLS es una técnica físico-química utilizada para determinar la distribución de tamaños de partículas en suspensión (tamaño hidrodinámico). Para llevar a cabo las medidas, esta técnica tiene en cuenta la variación de la intensidad de dispersión de las partículas en el tiempo.¹⁷⁶ La luz láser se dispersa en todas las direcciones posibles al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión. Los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada. Además, la intensidad dependerá de la posición en ese momento de las NPs, es decir, del movimiento browniano. Las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión (coeficiente de difusión). Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), se acelera la variación de la intensidad de dispersión y viceversa, si las partículas se mueven de forma más lenta (partículas grandes) se ralentiza la variación de la intensidad de dispersión.¹⁷⁷

En este trabajo las medidas de distribución de las IONPs se han realizado en un Zetasizer Nano ZS90. Las IONPs se diluyeron en el medio correspondiente (agua milli-Q, tampón PBS o medio FBS) a una concentración de 50 mg/L de Fe. Para llevar a cabo las medidas se utilizaron cubetas desechables tipo ZENO118. Se configuró el índice de refracción en 2,420, con un ángulo de detección de 173° de retrodispersión. Se realizaron tres medidas con una duración automática.

Como modelo de análisis se eligió una resolución normal y, por último, para medir la distribución de tamaños se seleccionó la media numérica.¹⁵⁸

- **Espectroscopía infrarroja por transformada de fourier (FT-IR)**

La FT-IR es una técnica que surge como resultado de la unión de la espectroscopía de infrarrojo (IR) con la microscopía óptica. En la espectroscopía IR, la radiación pasa a través de una muestra, parte de esa radiación es absorbida por la muestra y otra parte se transmite.¹⁷⁸ La radiación absorbida provoca una serie de vibraciones características las cuales se asocian a distintos grupos funcionales de la molécula de estudio. Al realizar una medida de FT-IR se obtiene un espectro en el que se observan distintas señales asociadas a distintos movimientos vibracionales.¹⁷⁹

Los espectros FT-IR se realizaron con un espectrómetro FT-IR-4100 Jasco utilizando un accesorio ART de reflexión única (MIRacle ATR, PIKE Technologies) acoplado a un detector de telurio de cadmio y mercurio enfriado con nitrógeno líquido. Todos los espectros se registraron en un rango de frecuencias entre 3500-800 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1} y acumulando 50 scans.

Una disolución en agua de las IONPs funcionalizadas (100 μL , 1g Fe/L) o 5,00 mg de los ligandos derivados de PEG₁₅₀₀ se depositaron en un portaobjetos y se llevaron a sequedad para realizar el estudio.

- **Análisis termogravimétrico (TGA)**

El TGA es una técnica experimental que se utiliza para determinar la masa de una muestra mediante el estudio de los procesos de descomposición térmica de masa de dicha muestra. Para ello, esta técnica estudia la temperatura y/o el tiempo que tarda la muestra de estudio en descomponerse.¹⁸⁰ Los resultados se muestran como una curva termogravimétrica en la que se representa la masa o el porcentaje de masa perdido frente a la temperatura y/o el tiempo.¹⁸¹

En nuestro caso, las muestras sólidas de IONPs (5 mg aprox.) se depositaron en un crisol de platino y se introdujeron en el sistema Mettler-Toledo (TGA/DSC 1). La temperatura se aumentó poco a poco mediante una rampa de calentamiento de 10 °C/min. desde 30 °C hasta 600 °C. Todo el proceso se realizó bajo un flujo de N₂ (50 mL/min.).

- **Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)**

El ICP-MS es una técnica de análisis inorgánico altamente sensible cuya función es determinar y/o cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica a excepción del H, C, N, O, F, Cl, S, I, Br y gases nobles. Esta técnica tiene la capacidad de hacer las mediciones a concentraciones muy bajas del elemento/s de estudio (analito), hasta 1-10 ng del elemento por litro de solución.¹⁸²

Básicamente, la técnica consiste en transformar la muestra, que se encuentra en estado líquido, en un fino aerosol que es dirigido hacia un plasma de Ar cuya temperatura llega a alcanzar los 10.000 K. El aerosol es sometido a distintos procesos que provocan la atomización e ionización. En este punto, los iones generados pasan por un espectrómetro de masas donde son analizados y separados según su relación masa/carga (m/z).¹⁸³

Las muestras de NPs para el análisis ICP-MS se digirieron previamente de la siguiente forma: a 25,00 µL de una disolución de IONPs en un matraz aforado de 25,00 mL se añadió 2,50 mL de agua regia recién preparada. Después de 12 h, se le añadió agua destilada hasta completar los 25,00 mL.

- **Resonancia magnética de imagen**

Como se detalló en la introducción, la RMI es una tecnología no invasiva que permite obtener imágenes anatómicas tridimensionales detalladas. Para aumentar la nitidez de las imágenes se utilizan, principalmente, agentes de contraste (AC) que presentan un átomo paramagnético

responsable de la relajación de los protones de las moléculas de agua vecinas, como por ejemplo complexonas de Gd o IONPs.

○ Relajatividad y propiedades como agentes de contraste

La RMI emplea una corriente de radiofrecuencia, los protones son estimulados y giran fuera del equilibrio, luchando contra la fuerza del campo magnético. Una vez que se apaga el pulso, los protones se relajan dando lugar a procesos de relajación longitudinal (r_1) y transversal (r_2) resultando valores diferentes dependiendo del entorno en el que se encuentren dichos protones.¹⁸⁴ Los agentes de contraste mejoran la información que nos aporta un diagnóstico de imagen disminuyendo los tiempos de relajación T_1 y T_2 , aumentando el contraste en la región de interés y mejorando, por tanto, la imagen que obtenemos de la zona a estudiar.¹⁸⁵

Para evaluar la capacidad como AC en RMI se miden dos parámetros: la relajatividad longitudinal (r_1) y la relajatividad transversal (r_2). Un incremento del valor de relajatividad produce un aumento del contraste, positivo (señal más brillante, denominado AC tipo T_1) o negativo (señal más oscura, denominado AC tipo T_2).¹⁸⁵

Las relajatividades r_1 y r_2 se calcularon a campo bajo (o clínico) y a campo alto (o preclínico), utilizando los instrumentos Bruker Minispec a 1,5 T y Bruker Biospec a 9,4 T respectivamente. Se prepararon concentraciones de IONPs entre 0,50 nM y 0,03 mM de Fe en agua o medio fisiológico a 37 °C. T_1 se determinó utilizando secuencias de inversión-recuperación/recuperación de saturación. T_2 se determinó usando la secuencia Carl-Purcell-Meiboom-Gill.

Las relajatividades r_1 y r_2 en campo alto se midieron en un sistema de resonancia magnética equipado con gradientes con un campo de 400 mT m⁻¹ y un resonador “bird-cage” en cuadratura de 40 mm a 25 °C. Los valores de T_1 se determinan utilizando una secuencia eco-espín de recuperación de saturación (valores de TR, *repetition time*, de 50 ms a 10 s) y los de T_2 a partir

de una secuencia de 64 ecos Carl-Purcell-Meiboom-Gill (valores de TE, *echo time*, de 7,5 ms a 650 ms).

Las regiones de interés se dibujaron en la primera imagen de la secuencia de imágenes y los valores de intensidad se extrajeron y ajustaron usando las siguientes ecuaciones:

$$M_Z(t) = M_0(1 - e^{-TR/T_1})$$

$$M_{XY}(t) = M_0 e^{-TE/T_1}$$

- M_Z y M_{xy} : intensidad de la señal en el tiempo TR o TE.
- M_0 : intensidad de la señal en el equilibrio.

III.4.7. Ensayos biológicos

III.4.7.1. Métodos generales

(i) Disolventes y reactivos

Se usaron los siguientes disolventes y reactivos suministrados por Fisher Scientific y Aldrich: medio de cultivo celular Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), suero fetal bovino (FBS), penicilina, estreptomicina, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), marcador de fluorimetría TO-PRO-3 yoduro.

(ii) Técnicas y aparatos

Para medir la citotoxicidad celular se eligieron los ensayos MTT y DAPI. Los materiales y aparatos necesarios fueron: placas ELISA de 96 pocillos, estufa de cultivo, un lector de microplacas de absorbancia (Dynatech MR7000 instruments) y el software Operetta Harmony®. El estudio de la morfología celular se realizó sobre las células utilizadas en el ensayo DAPI. Las imágenes se

obtuvieron a partir del sistema de imagen Perkin Elmer Operetta (PerkinElmer) con una lente de 20x.

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences Inc.*), la viabilidad celular se expresó como la media \pm la desviación estándar (IC_{50}). La prueba *t* de student o el análisis de la varianza se utilizaron para determinar las diferencias significativas entre los grupos de las NPs y/o las condiciones experimentales. El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.

- **Estudios citotoxicidad celular**

- Ensayo de viabilidad celular MTT

El ensayo MTT se realizó con la línea celular HFF-1 (fibroblastos de prepucio humanas) de las que se sembraron 1×10^4 células por pocillo en placas ELISA de 96 pocillos (200 μ L de células diluidas en DMEN por pocillo, 5 repeticiones por muestra). Se dejaron crecer durante 24 h en una estufa de crecimiento celular a 37 °C con un 5 % de volumen de CO_2 y unos valores de humedad en torno al 95 %. Transcurrido ese tiempo, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco el cual contenía las IONPs funcionalizadas en varias concentraciones que iban desde 0,1 μ g de NPs/mL hasta 100 μ g de NPs/mL. Después de 24 h, el sobrenadante de cada pocillo volvió a ser reemplazado por 200 μ L de medio fresco el cual contenía 0,5 mg/mL del reactivo MTT, y las células se incubaron durante 2 h en las mismas condiciones anteriores. Después, se retiró el medio y los cristales de formazán formados se solubilizaron añadiendo 200 μ L de DMSO a cada pocillo y agitando la mezcla vigorosamente.

En este ensayo también se prepararon dos controles para evaluar correctamente la citotoxicidad: (i) Control negativo: células no expuestas a las IONPs funcionalizadas y (ii) Control positivo, células expuestas a etanol (20 % v/v) durante 15 min. antes de llevar a cabo el tratamiento.

La viabilidad celular relativa (VCR) (%) y su error se calcularon a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular relativa (\%)} = \frac{[\text{Abs}] \text{ Test} - [\text{Abs}] \text{ Control Pos.}}{[\text{Abs}] \text{ Control Neg.} - [\text{Abs}] \text{ Control Pos.}} \times 100$$

$$\text{Error (\%)} = \text{VCR}(\text{Test}) \times \sqrt{\left(\frac{[\sigma] \text{ Test}}{[\text{Abs}] \text{ Test}}\right)^2 + \left(\frac{[\sigma] \text{ Control}}{[\text{Abs}] \text{ Control}}\right)^2}$$

Donde σ es la desviación estándar, y la [Abs] es la absorbancia a 550 nm.

○ Ensayo de viabilidad celular DAPI

El ensayo DAPI se realizó siguiendo el mismo protocolo establecido en el estudio MTT, en lo referente a la línea celular, HFF-1, número de pocillos y concentraciones de IONPs funcionalizadas. Al igual que en el estudio MTT, también se preparó un control positivo en el que las células estuvieron expuestas a etanol (20 % v/v) durante 15 min. antes de llevar a cabo el tratamiento DAPI. Pasados los 15 min., todos los pocillos se tiñeron con DAPI (dilución 1: 3000) para marcar los núcleos en todas las células, observándose un marcado más fuerte en células vivas, y con TO-PRO-3 yoduro para marcar sólo las células muertas (dilución 1: 1000).

Finalmente, las imágenes se obtuvieron con el sistema de imagen Perkin Elmer Operetta High Content con una lente 20x. Se analizaron cada una de las réplicas de cada condición tomando 10 imágenes aleatorias de 10 zonas distintas de un mismo pocillo. Para cada uno de los campos, se capturaron imágenes de campo brillante y de fluorescencia para los marcadores DAPI y TO-PRO-3 yoduro. Los porcentajes de mortalidad celular se calcularon de forma automática mediante el software Operetta Harmony. Este sistema identifica todos los núcleos celulares (vivos y muertos) a partir de la tinción con DAPI y asegura las células muertas calculando el número de núcleos que también poseen altos niveles de tinción con TO-PRO-3 yoduro.

- Estudios de morfología celular

El estudio de morfología celular se realizó a partir de las células utilizadas en el ensayo DAPI. Para ello, se tomaron imágenes con el instrumento Perkin Elmer Operetta de cada una de las réplicas de cada condición, tomando 10 imágenes aleatorias de 10 zonas distintas de un mismo pocillo. Para cada uno de los campos se capturaron imágenes de campo brillante y fluorescencia para los marcadores DAPI y TO-PRO-3 yoduro. De este modo, podemos discernir la morfología celular.

Capítulo IV. Bibliografía

IV. Bibliografía

1. B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan. Nanomedicine. *The New England Journal of Medicine*. **2010**, *363*, 2434-2443.
2. R. Duncan. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2003**, *2*, 347-360.
3. R. Duncan, R. Gaspar. Nanomedicine(s) under the microscope. *Molecular Pharmaceutics*. **2011**, *8*, 2101-2141.
4. J. Funkhouser. Reinventing pharma: The theranostic revolution. *Current Drug Discovery Technologies*. **2002**, *2*, 17-19
5. J. V. Jokerst, S. S. Gambhir. Molecular imaging with theranostic nanoparticles. *Accounts of Chemical Research*. **2011**, *44*, 1050-1060.
6. S. K. Sahoo, V. Labhasetwar. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*. **2003**, *8*, 1112-1120.
7. D. F. Emerich, C. G. Thanos. Targeted nanoparticles-based drug delivery and diagnosis. *Journal of Drug Targeting*. **2007**, *15*, 163-183.
8. C. Chen, D. Han, C. Cai, X. Tang. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of Controlled Release*. **2010**, *142*, 299-311.
9. L. Palmerston-Mendes, J. Pan, V. Torchilin. Dendrimers as nanocarriers for nucleic acid and drug delivery in cancer therapy. *Molecules*. **2017**, *22*, 1401-1421.
10. K. Sato.; J. Anzai. Dendrimers in layer-by-layer assemblies: synthesis and applications. *Molecules*. **2013**, *18*, 8440-8460.

11. B. Klajnert, M. Bryszewska. Dendrimers: properties and application. *Acta Biochimica Polica*. **2001**, *48*, 199-208.
12. S. Vinogradov, T. Bronich, A. Kabanov. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2002**, *54*, 134-147.
13. W. Weitai, Z. Shuiqin. Hybrid micro-/nanogels for optical sensing and intracellular imaging. *Nano Reviews*. **2010**, *1*, 1-17.
14. T. Hoare, D. Kohane. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. *Polymer*. **2008**, *49*, 1993-2007.
15. N. Peppas, J. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer. Hydrogels in Biology and Medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Advanced Materials*. **2006**, *18*, 1345-1360.
16. A. Kabanov.; S. Vinogradov. Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angewandte Chemie International Edition*. **2009**, *48*, 5418-5429.
17. R. T. Chacko, J. Ventura, J. Zhuang, S. Thayumanavan. Polymer nanogels: a versatile nanoscopic drug delivery platform. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2012**, *64*, 836-851.
18. F. Danhier, E. Ansorena, J. Silva, R. Coco, V. Pr at. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical application. *Journal of Controlled Release*. **2012**, *161*, 505-522.
19. I. Chakraborty, T. Pradeep. Atomically precise clusters of noble metals: Emerging link between atoms and nanoparticles. *Chemical Reviews*. **2017**, *117*, 8208-8271.
20. P. D. Stevens, J. Fan, H. M. R. Gardimalla, M. Yen, Y. Gao. Superparamagnetic nanoparticle-supported catalysis of Suzuki cross-coupling reactions. *Organic Letters*. **2005**, *7*, 2085-2088.

21. M. M. El-Hammadi, J. L. Arias. Iron oxide-based multifunctional nanoparticulate systems for biomedical applications: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*. **2015**, *25*, 691-709.
22. J. H. Lee, M. V. Yigit, D. Mazumdar, Y. Lu. Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2010**, *62*, 592-605.
23. www.nibib.nih.gov
24. Z. Zhou, R. Tian, Z. Wang, Z. Yang, Y. Liu, G. Liu, R. Wang, J. Gao, J. Song, L. Nie, X. Chen. Artificial local magnetic field inhomogeneity enhances T₂ relaxivity. *Nature communications*. **2017**, *8*, 15468.
25. S. Tae-Hyun, C. Young Seon, K. Soojin, C. Jinwoo. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging. *Chemical Society Reviews*. **2015**, *44*, 4501-4516.
26. D. Kim, J. Kim, Y. Park, N. Lee, T. Hyeon. Recent development of inorganic nanoparticles for biomedical imaging. *ACS Central Science*. **2018**, *4*, 324-336.
27. B. H. Kim, N. Lee, H. Kim, K. An, Y. Park, Y. Choi, K. Shin, Y. Lee, S. G. Kwon, H. B. Na, J. G. Park, T. Y. Ahn, Y. W. Kim, W. K. Moon, S. H. Choi, T. Hyeon. Large-scale synthesis of uniform and extremely small-sized iron oxide nanoparticles for high-resolution T₁ magnetic resonance imaging contrast agents. *Journal of the American Chemical Society*. **2011**, *133*, 12624-12631.
28. H. Wei, O. T. Bruns, M. G. Kaul, E. C. Hansen, M. Barck, A. Wisniewska, O. Chen, Y. Chen, N. Li, S. Okada, J. M. Cordero, M. Heine, C. T. Farrar, D. M. Montana, G. Adam, H. Ittrich, A. Jasanoff, P. Nielsen, M. G. Bawendi. Exceedingly small iron oxide nanoparticles as positive MRI contrast agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2017**, *144*, 2325-2330.
29. A. Laromaine, A. Roig, S. Suárez-García, J. Lorenzo, D. Ruiz Molina, F. Novio. Dual T₁/T₂ MRI contrast agent based on hybrid SPION@coordination polymer nanoparticles. *RSC Advances*. **2015**, *5*, 86779-86783.

30. T. Lammers, L. Y. Rizzo, G. Storm, F. Kiessling. Personalized nanomedicine. *Clinical Cancer Research*. **2012**, *18*, 4889-4894.
31. L. Y. Rizzo, B. Theek, G. Storm, F. Kiessling. Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications. *Current Opinion in Biotechnology*. **2013**, *4*, 1159-1166.
32. D. Mohammadali, K. Roemhild, N. I. Drude, S. von Stillfried. Iron oxide nanoparticles: diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2019**, *138*, 302-325.
33. V. Nandwana, M. De, S. Chu, M. Jaiswal, M. Rotz, T. J. Meade, V. P. Dravid. Teranostic magnetic nanostructures (MNs) for cancer. *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer*. **2015**, *166*, 51-83.
34. B. Chertok, A. E. David, V. C. Yang. Polyethyleneimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration. *Biomaterials*. **2010**, *31*, 6317-6324.
35. J. H. Ryu, H. Koo, I. C. Sun, S. H. Yuk, K. Choi, K. Kim, I. C. Kwon. Tumor-targeting multi-functional nanoparticles for theragnosis: new paradigm for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2012**, *64*, 1447-1458.
36. Y. Su, J. Fang, C. Liao, C. Lin, Y. Li, S. Hu. Targeted mesoporous iron oxide nanoparticles-encapsulated perfluorohexane and a hydrophobic drug for deep tumor penetration and therapy. *Theranostics*. **2015**; *5*, 1233-1248.
37. K. Hayashi K, M. Nakamura, H. Miki, S. Ozaki, M. Abe, T. Matsumoto. Magnetically responsive smart nanoparticles for cancer treatment with a combination of magnetic hyperthermia and remote-control drug release. *Theranostics*. **2014**; *4*, 834-844.
38. S. Mura S, J. Nicolas, P. Couvreur. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials*. **2013**; *12*, 991-1003.

39. Y. Dongwon, L. Jae Hyun, S. Tae-Hyun, C. Jin-Woo. Theranostic magnetic nanoparticles. *Accounts of Chemical Research*. **2011**, *44*, 863-874.
40. Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Ones, J. J. Dobson. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*. **2003**, *36*, 167-181.
41. A. J. Giustini, A. A. Petryk, S. A. Cassim, J. A. Tate, I. Baker, P. J. Hoopes. Magnetic nanoparticles hyperthermia in cancer treatment. *Nano Life*. **2013**, *1*, 1-23.
42. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2012**, *64*, 24-36.
43. A. B. Salunkhe, V. M. Khot, S. H. Pawar. Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: a status review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2014**, *14*, 572-594.
44. D. Chang, M. Lim, J. A. C. M Goos, R. Qiao, Y. Yee, F. M. Mansfeld, M. Jackson, T. P. Davis, M. Kavallaris. Biologically targeted magnetic hyperthermia: potential and limitation. *Frontiers in Pharmacology*. **2018**, *9*.
45. https://www.magforce.com/en/home/our_therapy/.
46. V. Valdivia, R. Gimeno-Ferrero, M. Pernía Leal, C. Paggiaro, A. M. Fernández-Romero, M. L. González-Rodríguez, I. Fernández. Biologically relevant micellar nanocarrier systems for drug encapsulation and functionalization of metallic nanoparticles. *Nanomaterials*. **2022**, *12*, 1753.
47. C. Caro, F. Gámez, P. Quaresma, J. M. Páez-Muñoz, A. Domínguez, J. R. Pearson, M. Pernía Leal, A. M. Beltrán, Y. Fernández-Afonso, J. M. de la Fuente, R. Franco, E. Pereira, M. L. García-Martín. Fe₃O₄-Au core-shell nanoparticles as a multimodal platform for *In Vivo* imaging and focused photothermal therapy. *Pharmaceutics*. **2021**, *13*, 416.

48. V. Erspamer. Amphibian skin peptides in mammals -looking ahead. *Trends Neurosciences*. **1983**, *6*, 200-201.
49. M. M. Chang, S. E. Leeman, H. D. Amino-acid sequence of substance P. *Nature New Biology*. **1971**, *232*, 86-87.
50. U. S. Von Euler, J. H. Gaddum. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *The Journal of Physiology*. **1931**, *72*, 74-87.
51. J. H. Gaddum, H. O. Schild. Depressor substances in extracts of intestine. *The Journal of Physiology*. **1934**, *83*, 1-14.
52. F. Lemberk. Mitteilung Das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den Dorsalen Wurzeln des Rückenmarks. *Nauryn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Phatologie und Farmacologie*. **1953**, *219*, 193-213.
53. S. Harrison, P. Geppetti. Substance P. *The International Journal of Biochemistry y Cell Biology*. **2001**, *33*, 555-576.
54. D. Regoli, G. Drapeau, S. Dion, P. D'Orleans-Juste. Receptors for substance P and related neurokinins. *Pharmacology*. **1989**, *38*,1-15.
55. S. G. Mcdonald, D. Boyd. Regulation of Substance P Receptor Affinity by Guanine Nucleotide-Binding Proteins. *Journal of Neurochemistry*. **1989**, *53*, 264-272.
56. N. P. Gerard, L. A. Garraway, R. L. Eddy Jr, T. B. Shows, H. Iijima, J. L. Paquet, G. Craig, G. Human Substance P Receptor (NK-1): Organization of the Gene, Chromosome Localization, and Functional Expression of cDNA Clones. *Biochemistry*. **1991**, *30*, 10640-10646.
57. F. C. Martin, A. C. Charles, M. J. Sanderson, J. E. Merill. Substance P stimulates IL-1 production by astrocytes via intracellular calcium. *Brain Research*. **1992**, *599*, 13-18.

58. A. Kavelaars, D. Broeke, F. Jeurissen, J. Kardux, A. Meijer, R. Franklin, E. W. Gelfand, C. J. Heijnen. Activation of human monocytes via a non-neurokinin substance P receptor that is coupled to Gi protein, calcium, phospholipase D, MAP kinase, and IL-6 production. *The Journal of Immunology*. **1994**, *153*, 3691- 3699.
59. W. Luo, T. R. Sharif, M. Sharif. Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Research*. **1996**, *56*, 4983-4991.
60. E. F. Grady, A. M. Garland, P. D. Gamp, M. Lovett, D. G. Payan, N.W. Bunnett. Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven transmembrane domains NK1 receptor. *Molecular Biology of the Cell*. **1995**, *6*, 509-524.
61. T. Hökfelt, J. O. Kellerth, G. Nilsson, B. Pernow. Substance P: Localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science*. **1975**, *190*, 889- 890.
62. B. Pernow. Substance P. *Pharmacological Reviews*. **1983**, *35*, 85-141.
63. J. E. Maggio. "Kassinin" in mammals: the newest tachykinins. *Peptides*. **1985**, *6*, 237-243.
64. T. Hökfelt, B. Pernow, J. Wahren. Substance P: a Pioneer amongst neuropeptides. *Journal of Internal Medicine*. **2001**, *249*, 27-40.
65. F. Conti, S. De Biasi, R. Giuffrida, A. Rustioni. Substance P-containing projections in the dorsal columns of rats and cats. *Neuroscience*. **1990**, *34*, 607-621.
66. K. Nishiyama, S. Kwak, S. Murayama, I. Kanazawa. Substance P is a possible neurotransmitter in the rat spinothalamic tract. *Neuroscience Research*. **1995**, *21*, 261-266.
67. R. P. Dum, D. J. Levinthal, P. L. Strick. The spinothalamic system targets motor and sensory areas in the cerebral cortex of monkeys. *Journal of Neuroscience*. **2009**, *29*, 14223-14235.

68. Y. De Koninck, J. L. Henry. Substance P-mediated slow excitatory postsynaptic potential elicited in dorsal horn neurons in vivo by noxious stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*. **1991**, *88*, 11344-11348.
69. O. Gouin, K. L'Herondelle, N. Lebonvallet, C. Le Gall-Ianotto, M. Sakka, V. Buhé, E. Plée-Gautier, J. L. Carré, L. Lefevre, L. Misery, R. Le Garrec. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell*. **2017**, *8*, 644-661.
70. M. K. Herbert, P. Holzer. Neurogenic inflammation. I. Basic mechanisms, physiology and pharmacology. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. **2002**, *37*, 314-325.
71. J. E. Choi, A. Di Nardo. Skin neurogenic inflammation. *Seminars in Immunopathology*. **2018**, *40*, 249-259.
72. A. Ahluwalia, C. De Felipe, J. O'Brien, S. P. Hunt, M. Perretti. Impaired IL-1beta-induced neutrophil accumulation in tachykinin NK1 receptor knockout mice. *British Journal of Pharmacology*. **1998**, *124*, 1013-1015.
73. E. Mistrova, P. Kruzliak, M. Chottova Dvorakova. Role of substance P in the cardiovascular system. *Neuropeptides*. **2016**, *58*, 41-51.
74. H. M. Dehlin, S. P. Levick. Substance P in heart failure: the good and the bad. *International Journal of Cardiology*. **2014**, *170*, 270-277.
75. L. G. Heaney, L. J. Cross, C. F. Stanford, M. Ennis. Substance P induces histamine release from human pulmonary mast cells. *Clinical Experimental Allergy*. **1995**, *25*, 179-86.
76. S. Harrison, P. Geppetti. Substance P. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **2001**, *33*, 555-576.

77. N. A. Darmani, Y. Wang, J. Abad, A. P. Ray, G. R. Thrush, J. Ramirez. Utilization of the least shrew as a rapid and selective screening model for the antiemetic potential and brain penetration of substance P and NK1 receptor antagonists. *Brain Research*. **2008**, *1214*, 58-72.
78. A. P. Ray, S. Chebolu, J. Ramirez, N. A. Darmani. Ablation of least shrew central neurokinin NK1 receptors reduces GR73632-induced vomiting. *Behavioral Neuroscience*. **2009**, *123*, 701-706.
79. J. C. Foreman. Substance P and calcitonin gene-related peptide: effects on mast cells and in human skin. *International Archives of Allergy and Immunology*. **1987**, *82*, 366-371.
80. L. Quatara, C. A. Maggi. The tachykinin NK1 receptor. Part II: Distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides*. **1998**, *32*, 1-49.
81. A. A. Bremer, N. D. Boyd, S. E. Leeman. Substance P. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. <https://onlinelibrary.wiley.com/>
82. R. Recio, E. Vengut-Climent, B. Mouillac, H. Orcel, M. López-Lázaro, J. M. Calderón-Montaño, E. Álvarez, N. Khiar I. Fernández. Design, synthesis and biological studies of a library of NK1-Receptor Ligands Based don a 5-arylthiosubstituted 2-amino-4,6-diaryl-3-cyano-4H-pyran core: Switch from antagonist to agonist effect by chemical modification. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2017**, *138*, 644-660.
83. a) T. Yamamoto, P. Nair, N. E. Jacobsen, V. Kulkarni, P. Davis, S. Ma, E. Navratilova, H. I. Yamamura, T. W. Vanderah, F. Porreca, J. Lai, V. J. Hruby. Biological and conformational evaluation of bifunctional compounds for opioid receptor agonist and neurokinin 1 receptor antagonists possessing two penicillamines. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**, *53*, 5491-5501.
b) R. J. Lefkowitz. Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. **2004**, *25*, 413-422.

84. N. R. Latorraca, A. J. Venkatakrisnan, R. O. Dror. GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chemical Reviews*. **2016**, *117*, 139-155.
85. R. B. Penn, A. N. Pronin, J. L. Benovic. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends in Cardiovascular Medicine*. **2000**, *10*, 81-89.
86. a) S. R. George, B. F. O'Dowd, S. R. Lee. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, *1*, 808-820. b) A. Majkowska-Pilip, H. P. Krzysztof, E. Gniazdowska. The significance of NK1 receptor ligands and their application in targeted radionuclide tumour therapy. *Pharmaceutics*. **2019**, *11*, 443.
87. J. M. Baldwin. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *The EMBO Journal*. **1993**, *12*, 693-1703.
88. M. A. Wall, D. E. Coleman, E. Lee, J. A. Iiguez-Lluhi, B. A. Posner, A. Gilman, S R. Sprang. The Structure of the G Protein Heterotrimer $G_{i\alpha 1}\beta_1\gamma_2$. *Cell*. **1995**, *83*, 1047-1058.
89. D. G. Lambright, J. P. Noel, H. E. Hamm, P. B. Sigler. Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature*. **1994**, *369*, 621-628.
90. H. E. Hamm. The many faces of G protein signaling. *Journal of Biological Chemistry*. **1998**, *273*, 669-672.
91. D. Zhang, Q. Zhao, B. Wu. Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Molecules and Cells*. **2015**, *38*, 836-842.
92. a) I. D. Alves, D. Delaroche, B. Mouillac, Z. Salamon, G. Tollin, V. J. Hruby, S. Lavielle, S, S. Sagan. The Two NK-1 Binding Sites Correspond to Distinct, Independent, and Non-Interconvertible Receptor Conformational States as Confirmed by Plasmon-Waveguide Resonance Spectroscopy. *Biochemistry*. **2006**, *45*, 5309-5318. b) D. Teller, T. Okada, C. Behnke, K. Palczewski, R. Stenkamp. Advances in determination of a high-resolution three-dimensional

structure of rhodopsin a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Biochemistry*. **2001**, *40*, 7761-7772.

93. J. Schöppe, J. Ehrenmann, C. Klenk, P. Rucktooa, M. Schütz, A. Doré, A. Plückthun. Crystal structures of the human neurokinin 1 receptor in complex with clinically used antagonists. *Nature Communications*. **2019**, *10*, 1-11.

94. J. Yin, K. Chapman, L. D. Clark, Z. Shao, D. Borek, Q. Xu, J. Wang, D. M. Rosenbaum. Crystal structure of the human NK1 tachykinin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2018**, *115*, 13264-13269.

95. S. Chen, M. Lu, D. Liu, L. Yang, C. Yi, L. Ma, H. Zhang, Q. Liu, T. M. Frimurer, M. Wang, T. W. Schwartz, R. C. Stevens, B. Wu, K. Wüthrich, Q. Zhao. Human substance P receptor binding mode of the antagonist drug Aprepitant by NMR and crystallography. *Nature Communications*. **2019**, *10*, 638.

96. Y. Gidron, H. Perry, M. Glennie. Does the vagus nerve inform the brain about preclinical tumours and modulate them? *Lancet Oncology*. **2005**, *6*, 245-248.

97. B. Mravec, Y. Gidron, B. Kukanova, J. Bizik, A. Kiss, I. Hulin. Neuralendocrine-immune complex in the central modulation of tumorigenesis: facts, assumptions, and hypotheses. *Journal of Neuroimmunology*. **2006**, *180*, 104-116.

98. M. Muñoz, R. Coveñas. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in cancer progression. *Peptides*. **2013**, *48*, 1-9.

99. M. Muñoz, R. Coveñas, F. Esteban, M. Redondo. The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs. *Journal of Biosciences*. **2015**, *40*, 441-463.

100. I. M. Hennig, J. A. Laissue, U. Horisberger, J. C. Reubi. Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *International Journal of Cancer*. **1995**, *61*, 786-792.

101. M. Muñoz, M. Rosso, R. Coveñas. Neurokinin-1 Receptor Antagonists in Lung Cancer Therapy. *Lett Drug Design Discovery*. **2017**, *14*, 1465-1476.
102. M. López-Lázaro. The Warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents in Medical Chemistry*. **2008**, *8*, 305-312.
103. C. Martin-Cordero, A. J. Leon-González, J. M. Calderon-Montano, E. Burgos-Moron, M. Lopez-Lazaro. Pro-oxidant natural products as anticancer agents. *Current Drug Targets*. **2012**, *13*, 1006-1028.
104. S. Galadari, A. Rahman, S. Pallichankandy, F. Thayyullathil. Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress? *Free Radical Biology y Medicine-Journals*. **2017**, *104*, 144-164.
105. C. R. Reczek, N. S. Chandel. The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Annual Review of Cancer Biology*. **2017**, *1*, 79-98.
106. J. E. Linley, L. Ooi, L. Pettinger, H. Kirton, J. P. Boyle, C. Peers, N. Gamper. Reactive oxygen species are second messengers of neurokinin signaling in peripheral sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **2012**, *109*, 1578-1586.
107. D. J. Chang, K. A. Cimprich. DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nature Chemical Biology*. **2009**, *5*, 82-90.
108. M. C. Poirier, A. Weston. DNA Damage, DNA Repair, and Mutagenesis. *Encyclopedia of Cancer. Second Edition. New York: Academic Press*. **2002**, 79-87.
113. J. M. Calderón-Montaño, E. Burgos-Morón, M. L. Orta, M. López-Lázaro. Effect of DNA repair deficiencies on the cytotoxicity of drugs used in cancer therapy (Review). *Current Medicinal Chemistry*. **2014**, *21*, 3419-3454.

110. N. B. Watson, W. G. McGregor. Cellular Responses to DNA Damage. *Comprehensive Toxicology. Second Edition. Oxford: Elsevier. 2010*, 377-402.
111. J. W. Harper, S. J. Elledge. The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular Cell. 2007*, 28, 739-745.
112. C. Arnaudeau, E. Tenorio Miranda, D. Jenssen, T. Helleday. Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research. 2000*, 461, 221-228.
113. C. J. Lord, A. Ashworth. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature. 2012*, 481, 287-294.
114. M. Rosso, M. Muñoz, M. Berger. The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. *The Scientific World Journal. 2012*, 1-21.
115. S. García-Recio, P. Gascón. Biological and pharmacological aspects of the NK1-receptor. *Biomed Research International. 2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/495704>
116. S. G. Rhee, K. D. Choi. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *Journal of Biological Chemistry. 1992*, 267, 12393-12396.
117. www.cisbio.eu
118. J. A. Plumb. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Culture. 2004*, 88,165-169.
119. S. Anoopkumar-Dukie, J. B. Carey, T. Conere, E. O'Sullivan, F. N. Van Pelt, A. Allshire. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *The British Journal of Radiology. 2005*, 78, 945-947.
120. H. X. Zhang, G. H. Du, J. T. Zhang. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica. 2004*, 24, 385-389.

121. G. Ciapetti, E. Cenni, L. Pratelli, A. Pizzoferrato. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*. **1993**, *14*, 359-364.
122. a) R. Recio, P. Lereña, E. Pozo, J. M. Calderón-Montaña, E. Burgos-Morón, M. López-Lázaro, V. Valdivia, M. Pernía Leal, B. Mouillac, J. A. Organero, N. Khiar, I. Fernández. Carbohydrate-based NK1R antagonists with broad-spectrum anticancer activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2021**, *64*, 10350-10370. b) G. Ciapetti, E. Cenni, L. Pratelli, A. Pizzoferrato. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*. **1993**, *14*, 359-364.
123. J. A. Plumb. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Culture*. **2004**, *88*, 165-169.
124. H. X. Zhang, G. H. Du, J. T. Zhang. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*. **2004**, *24*, 385-389.
125. R. M. Clegg. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. *Elsevier*. **2009**, *33*, 1-57.
126. E. Engvall, P. Perlman. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. **1971**, *8*, 871-874.
127. S. Fiedler, R. Wirth. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Analytical Biochemistry*. **1988**, *170*, 38-44.
128. O. Arunlakshana, H. O. Schild. Some quantitative uses of drug antagonists. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. **1959**, *14*, 48-58.
129. D. Nelson, M. Cox. **2004**. Glycolysis, Gluconeogenesis and the Pentose Phosphate Pathway. *Lehninger's Principles of Biochemistry*. 4th Edition, Chapter 14, 521-559. Madison, Wisconsin (EE.UU.) W. H. Freeman and Company

130. X. S. Chen, L. Y. Li, Y. Guan, J. M. Yang, Y. Cheng. Anticancer strategies based on the metabolic profile of tumor cells: therapeutic targeting of the Warburg effect. *Acta Pharmacologica Sinica*. **2016**, *27*, 1013-1019.
131. A. L. Porter, J. Youtie, P. Shapira, D. J. Schoeneck. Refining search terms for nanotechnology. *Journal of Nanoparticle Research*. **2008**, *10*, 715-728.
132. www.nano.gov
133. N. Kumar, S. S. Ray. Synthesis and functionalization of nanomaterials. *Processing of Polymer-based Nanocomposite*. **2018**, 15-55.
134. W. G. Kreyling, M. Semmler-Behnke, Q. Chaudhry. *A complementary definition of nanomaterial*. **2010**, *5*, 165-168.
135. G. Marquesda Costa, C. Mustansar Hussain. Safety risk, ELSI (ethical, legal, social issues), and economics of nanomaterials. *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry*. **2020**, *17*, 434-446.
136. R. P. Feynman. There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*. **1960**, 22-36.
137. G. Binnig, H. Rohrer. Scanning tunneling microscopy. *Surface Science*. **1983**, *126*, 236-244.
138. J. C. Barnes, C.A. Mirkin. Profile of Jean-Pierre Sauvage, Sir J. Fraser Stoddart, and Bernard L. Feringa, 2016 Nobel Laureates in Chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. **2017**, *114*, 620-625.
139. Una historia sobre la evolución humana y los avances tecnológicos. Los nanomateriales a lo largo del tiempo: Edad Antigua, Media y Moderna. Universidad de Burgos.
140. S. Lara, A. Perez-Potti. Applications of nanomaterials for immunosensing. *Biosensors*. **2018**, *8*, 104.

141. W. G. Kreyling, M. Semmler-Behnke, Q. Chaudhry. A complementary definition of nanomaterial. *Nanotoday*. **2010**, *5*, 165-168.
142. Y. Wang, Y. Xia. Bottom-up and top-down approaches to the synthesis of monodispersed spherical colloids of low melting-point metals. *Nano Letters*. **2004**, *4*, 2057-2050.
143. M. Kundu, P. Pramanik, A. Maity, D. C. Joshi, S. H. Wani, P. Krishnan, A. Mukherjee, K. Shubha. Engineered nanomaterials: classification and strategies for physicochemical characterization and advanced analytical techniques for the measurement of nanomaterials in plant samples. *Advances in Phytonanotechnology*. **2019**, *2*, 17-43.
144. A. Barhoum, A. S. H. Makhlof. Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructure. *Elsevier*. **2018**, *12*, 341-384.
145. C. Buzea, I. Pacheco, K. Robbie. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. **2007**, *2*.
146. S. Sinha Ray, N. Kumar. Synthesis and functionalization of nanomaterials. *Processing of Polymer-based Nanocomposites*. **2018**, *277*, 15-55.
147. I. Chakraborty, T. Pradeep. Atomically precise clusters of noble metals: Emerging link between atoms and nanoparticles. *Chemical Reviews*. **2017**, *117*, 8208-8271.
148. P. D. Stevens, J. Fan, H. M. R. Gardimalla, M. Yen, Y. Gao. Superparamagnetic nanoparticle-supported catalysis of Suzuki cross-coupling reactions. *Organic Letters*. **2005**, *7*, 2085-2088.
149. D. Patel, J. Y. Moon, Y. Chang, T. J. Kim, G. H. Lee. Poly (D, L-lactide-co-glycolide) coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: synthesis characterization and in vivo study as MRI contrast agent. *Colloids and surfaces a: physicochemical and engineering aspects*. **2008**, *313*, 91-94.

150. H. Gavilán, S. K. Avugadda, T. Fernández-Cabada, N. Soni, M. Cassani, B. T. Mai, R. Chantrell, T. Pellegrino. Magnetic nanoparticles and cluster for magnetic hyperthermia: optimizing their heat performance and developing combinatorial therapies to tackle cancer. *Chemical Society Reviews*. **2021**, *50*, 11614-11667.
151. V. Noval Lara. Sistemas magnéticos estructurados tipo core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ basados en magnetita (Fe_3O_4): diseño, caracterización y aplicaciones en catálisis heterogénea. *ResearchGate*. **2016**.
152. C. Pascal, J. L. Pascal, F. Favier, M. L. Elidrissi Moubtassim, C. Payen. Electrochemical synthesis for the control of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticle size. Morphology, microstructure, and magnetic behavior. *Chemistry of Materials*. **1999**, *11*, 141-147.
153. A. A. Bharde, R. Y. Parikh, M. Baidakova, S. Jouen, B. Hannoer, T. Enoki, B. L. V. Prasad, Y. S. Shouche, S. Ogale, M. Sastry. Bacteria-mediated precursor-dependent biosynthesis of superparamagnetic iron oxide and iron sulfide nanoparticles. *Langmuir*. **2008**, *24*, 5787-5794.
154. J. W. Moon, T. J. Phelps, H. Vali, Y. Roh. Extracellular synthesis of magnetite and metal-substituted magnetite nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **2006**, *6*, 3517-3520.
155. M. M. El-Hammadi, J. L. Arias. Iron oxide-based multifunctional nanoparticulate systems for biomedical applications: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*. **2015**, *25*, 691-709.
156. M. Pernía-Leal, C. Muñoz-Hernández, C. C. Berry, M. L. García-Martín. In vivo pharmacokinetics of T_2 contrast agents based on iron oxide nanoparticles: optimization of blood circulation times. *RSC Advances*. **2015**, *5*, 76883-76891.

157. M. Pernía-Leal, S. Rivera-Fernández, J. M. Franco, D. Pozo, M. Jesús, M. L. García-Martín. Long-circulating PEGylated manganese ferrite nanoparticles for MRI-based molecular imaging. *Nanoscale*. **2015**, *7*, 2050-2059.
158. E. Pozo-Torres, C. Caro, A. Avasthi, J. M. Páez-Muñoz, M. L. García-Martín, I. Fernández, M. Pernía Leal. Clickable iron oxide NPs based on catechol derived ligands: synthesis and characterization. *Soft Matter*. **2020**, *16*, 3257-3266.
159. K. Susumu, H. T. Uyeda, I. L. Medintz, H. Mattoussi. Design of biotin-functionalized luminescent quantum dots. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2007**, *2007*, 1-7.
160. R. Di Corato, N. C. Bigall, A. Ragusa, D. Dorfs, A. Genovese, R. Marotta, L. Manna, T. Pellegrino. Multifunctional nanobeads based on quantum dots and magnetic nanoparticles: synthesis and cancer targeting and sorting. *ACS Nano*. **2011**, *5*, 1109-1121.
161. N. Khair, M. Pernía-Leal, R. Baati, C. Ruhlmann, C. Mioskowski, P. Schultz, I. Fernández. Tailoring carbon nanotube surfaces with glyconanorings: new bionanomaterials with specific lectin affinity. *Chemical Communications*. **2009**, 4121-4123.
162. M. Pernía-Leal, C. Caro, M. L. García-Martín. Shedding light on zwitterionic magnetic nanoparticles: limitations for *in vivo* applications. *Nanoscale*, **2017**, *9*, 8176-8184.
163. M. Pernía-Leal, C. Muñoz-Hernández, C. C. Berry, M. L. García-Martín. *In vivo* pharmacokinetics of T_2 contrast agents based on iron oxide nanoparticles: optimization of blood circulation times. *RSC Advances*. **2015**, *5*, 76883-76891.
164. M. Pernía-Leal, S. Rivera-Fernández, J. M. Franco, D. Pozo, J. M. de la Fuente, M. L. García-Martín. Long-circulating PEGylated manganese ferrite nanoparticles for MRI-based molecular imaging. *Nanoscale*. **2015**, *7*, 2050-2059.

165. G. Lamanna, M. Kuentz-Stötz, H. Mamlouk-Chaouachi, C. Ghobril, B. Basly, A. Bertin, I. Miladi, C. Billotey, G. Pourroy, S. Begin-Colin, D. Felder-Flesch. Dendronized iron oxide nanoparticles for multimodal imaging. *Biomaterials*. **2011**, *32*, 8562-8573.
166. E. Amstad, M. Textor, E. Reimhult. Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale*. **2011**, *3*, 2819-2843.
167. J. Hühn, C. Carrillo-Carrión, M. G. Soliman, C. Pfeiffer, D. Valdeperez, A. Masood, I. Chakraborty, L. Zhu, M. Gallego, Z. Yue, M. Carril, N. Feliu, A. Escudero, A. M. Alkilany, B. Pelaz, P. del Pino, W. J. Parak. Selected standard protocols for the synthesis, phase transfer, and characterization of inorganic colloidal nanoparticles. *Chemistry of Materials*. **2017**, *29*, 399-461.
168. B. Pelaz, P. del Pino, P. Maffre, R. Hartmann, M. Gallego, S. Rivera-Fernández, J. M. de la Fuente, G. Ulrich Nienhaus, W. J. Park. Surface functionalization of nanoparticles with polyethylene glycol: effects on protein adsorption and cellular uptake. *ACS Nano*. **2015**, *9*, 6996-7008.
169. U. O. Häfeli, J. S Riffle, L. Harris-Shekhawat, A. Carmichael-Baranauskas, F. Mark, J. P. Dailey, D. Bardenstein. Cell uptake and *in vitro* toxicity of magnetic nanoparticles suitable for drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*. **2009**, *6*, 1417-1428.
170. Q. Feng, Y. Liu, J. Huang, K. Chen, J. Huang, K. Xiao. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Scientific Report*. **2018**, *8*.
171. C. A. Gomes, T. Girão da Cruz, J. L. Andrade, N. Milhazes, F. Borgesand, M. P. M. Marques. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: A structure-activity study. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2003**, *46*, 5395-5401.
172. S. Sumbul, M. A. Ahmad, A. Mohd, A. Mohd. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. **2011**, *3*, 361-367.

173. M. Winey, J. B. Meehl, E. T. O'Toole, T. H. Giddings, D.G. Drubin. Conventional transmission electron microscopy. *Molecular Biology of the cell*. **2017**, *25*, 319-426.
174. Servicio de microscopía electrónica. Universitat Politècnica de València. **2020**.
175. R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir*. **2005**, *21*, 10644-10654.
176. J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Pate. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*. **2016**, *8*, 409-427.
177. A. Cuadros-Moreno, R. Casañas Pimentel, E. San Martín-Martínez, J. Yañes Fernández. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education*. **2014**, *8*, 4311-4315.
178. A. Dutta. Spectroscopic methods for nanomaterials characterization. *Micro and Nano Technologies*. **2017**, *4*, 73-93.
179. L. Wang, Z. Tang, W. Yan, H. Yang, Q. Wang, S. Chen. Porous carbon-supported gold nanoparticles for oxygen reduction reaction: Effects of nanoparticle size. *ACS Applied Materials and Interfaces*. **2016**, *8*, 20635-20641.
180. Standard terminology relating to thermal analysis and rheology. *ASTM International*. **2016**. <http://staging.astm.org/Standards/E473.htm>.
181. R. Bottom. Principles and applications of thermal analysis. *Blackwell Publishing*. **2008**.
182. T. Howard. Inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Practices and techniques*. **2001**.
183. Unidad de Análisis Elemental. Universidad Autónoma de Madrid.

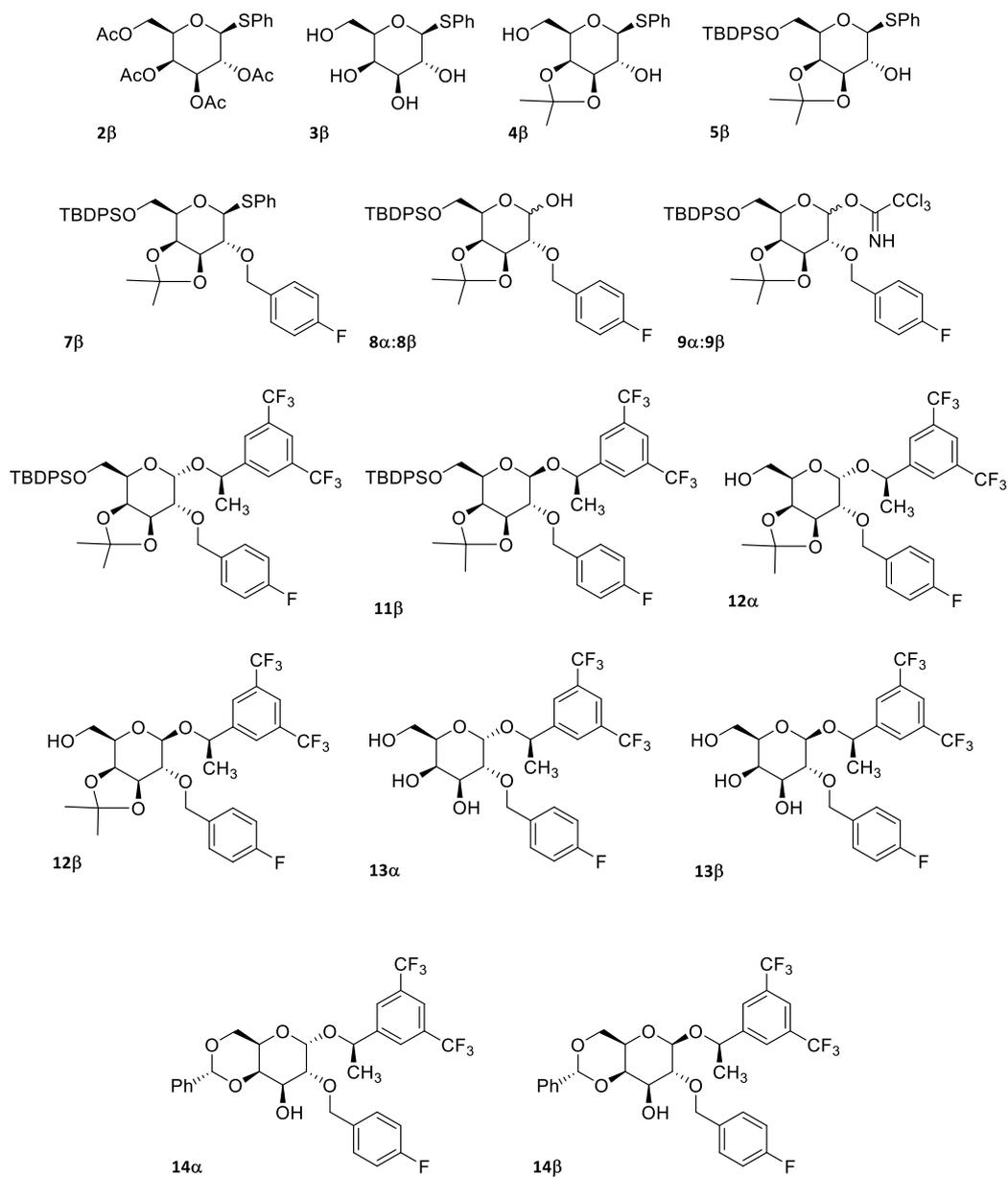
184. Z. Zijian, T. Rui, W. Zhenyu, Y. Zhen, L. Yijing, L. Gang, W. Ruifang, G. Jinhao, S. Jibin, N. Liming, C. Xiaoyuan. Artificial local magnetic field inhomogeneity enhances T2 relaxivity. *Nature Communications*. **2017**, *8*.

185. T. H. Shin, C. Youngseon, S. Kim, J. Cheon. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging. *Chemical Society Reviews Journal*. **2015**, *44*, 4501-4516.

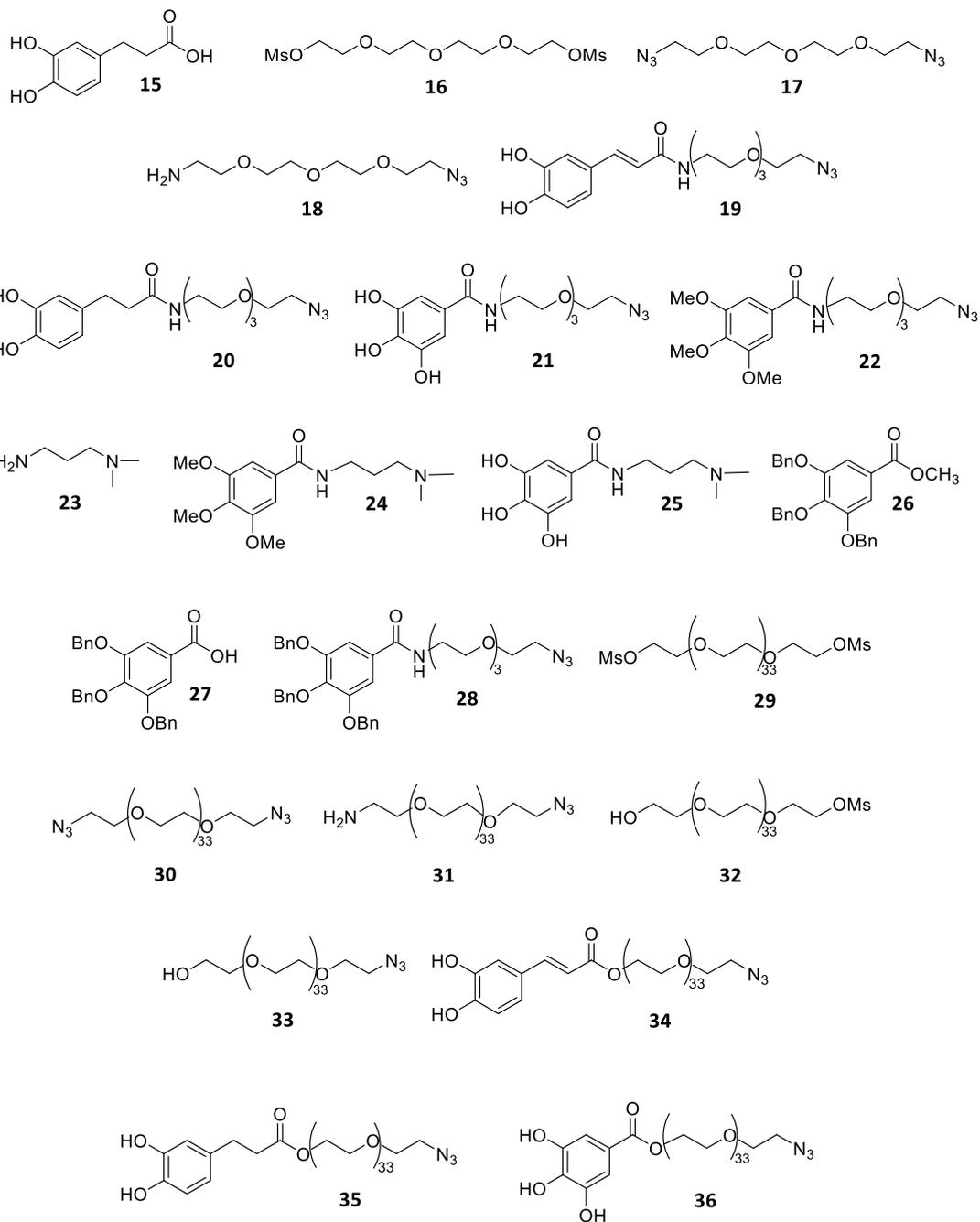
Anexos. Moléculas sintetizadas: estructuras

Anexos

Capítulo II. Antagonistas del receptor NK1 basados en carbohidratos



Capítulo III. Funcionalización de nanopartículas magnéticas: diseño y síntesis de ligandos



Capítulo III. Funcionalización de nanopartículas magnéticas: diseño y síntesis de ligandos

