



Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Facultad de Farmacia – Universidad de Sevilla

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE NUEVOS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS:
RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G (NK1 Y CB2) Y FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN (NRF2 Y STAT3) COMO DIANAS TERAPÉUTICAS**

Memoria presentada por la Graduada
Patricia Lerena Pérez para optar al
grado de Doctora por la Universidad
de Sevilla dentro del Programa de
Doctorado en Farmacia

Agradecimientos

Esta tesis no habría sido posible sin la participación de varias personas e instituciones, a las que me gustaría agradecer su esfuerzo y apoyo. En primer lugar, me gustaría mencionar a las directoras de mi tesis, la Dra. Inmaculada Fernández y la Dra. Victoria Valdivia. Agradecer a Inmaculada la oportunidad que me brindó ofreciéndome realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, y por supuesto las innumerables enseñanzas que he adquirido de ella. A Victoria, “viki” para los amigos, su infinita paciencia conmigo y su apoyo en todo momento. Gracias por haber estado ahí siempre que lo he necesitado, por tu eficiencia, y por tu humildad.

A todos mis compañeros de laboratorio: a Gabriel por tu ayuda en el laboratorio y tu paciencia con todos nosotros, a Sara por los buenos momentos compartidos, a Paco cuyo TFG me demostró que también era capaz de enseñar, espero que aprendieras mucho esos meses al igual que hice yo, a Jaime y Vicente, porque hicisteis ese año con nosotros mucho más divertido y especial, y a Rocío y a Manuel, porque de cada uno de vosotros me llevo una enseñanza difícil de olvidar. No podía no hacer una mención especial a Esther, Nazaret y María. Gracias, chicas, por escucharme, por ayudarme en situaciones difíciles, y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas que recordaré siempre. Gracias a María por enseñarme tu predisposición a ayudar siempre, a Nazaret por resolverme las mil dudas que he tenido y por detenerte conmigo siempre que lo he necesitado, vas a ser una profesora excelente y espero verlo, y a Esther, mi compañera de poyata de laboratorio, por enseñarme a ver siempre el lado bueno de las cosas, y en general, a ser mejor persona.

Agradecer también a los siguientes grupos de investigación y sus directores por su colaboración: al Dr. Noureddine Khiar, director del Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Sevilla, por su participación en el planteamiento original de una parte muy importante del trabajo que se presenta; al Dr. José Antonio Pérez Simón del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) por los estudios de actividad antileucémica, que también forman parte de la tesis doctoral de Dña. M^a Teresa Medrano, investigadora

predoctoral de su grupo de investigación; al Dr. Rafael León Martínez del Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQM-CSIC) de Madrid por los estudios de activación del factor de transcripción Nrf2; a los Dres. Miguel López Lázaro y José Manuel Calderón Montaña del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla por los estudios de actividad anticancerosa frente al cáncer de pulmón; a la Dra. Cristina Pintado Losa de la Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica (Toledo) de la Universidad de Castilla – La Mancha por los estudios de actividad anticancerosa frente al neuroblastoma; al Dr. Bernard Mouillac del Instituto de Genómica Funcional (IGF) del Centro Nacional de Investigación Científica (CNRS) de Montpellier por los estudios de actividad antagonista del receptor NK1; al Dr. Juan Ángel Organero del Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímicas y del Instituto de Nanociencia, Nanotecnología y Materiales Moleculares (INAMOL) de la Universidad de Castilla-La Mancha por los estudios de *Molecular Docking*; al Dr. Pablo Gastaminza, uno de los responsables de la “Plataforma de Antivirales” del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) de Madrid por los estudios de actividad antiviral frente al SARS-CoV-2. Al Dr. Eleuterio Álvarez del Servicio de Rayos X del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Sevilla; a la Universidad de Sevilla; y al CITIUS por los servicios prestados de RMN y Espectrometría de Masas.

Y, por último, y no menos importante, a mi familia por su apoyo, a mis padres, que espero que estén orgullosos de este trabajo, que no hubiera podido realizar sin ellos, y en especial a mi hermana Laura, te deseo que tu tesis doctoral te vaya genial, y que disfrutes de esta lectura tanto como yo al realizarla. Y a mi pareja de toda la vida, ahora marido, gracias Jesús por tu infinita paciencia, por soportar todos mis momentos de estrés durante la tesis, y en definitiva por ser mi apoyo incondicional, tanto en esta tesis como en la vida en general.

Abreviaturas, acrónimos y siglas

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

^{13}C -RMN: resonancia magnética nuclear de carbono

^1H -RMN: resonancia magnética nuclear de protón

2,2-DMP: 2,2-dimetoxipropano

2-AG: 2-araquidonilglicerol

2-AGE: 2-araquidonil gliceril étero noladin éter

2D: bidimensional

^{31}P -RMN: resonancia magnética nuclear de fósforo

3D: tridimensional

5-HT₃: 5-hidroxitriptamina

ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2 (*angiotensin-converting enzyme 2*)

ADN: ácido desoxirribonucleico

AEA: *N*-(2-hidroxietil)-araquidonamidao anandamida

AINE.: antiinflamatorios no esteroideos

AMPK: proteína quinasa activadora de AMP (*AMP-activated protein kinase*)

AREs: elementos de respuesta antioxidante (*antioxidant response elements*)

Arg: arginina

ARN: ácido ribonucleico

ASRC: agonistas sintéticos de los receptores cannabinoides

ATF-4: factor de transcripción activador 4 (*activating transcription factor 4*)

AU: afinidad de unión

BAD: promotor de muerte celular asociado a la familia BCL2 (*BCL2-associated death promoter*)

BSA: suero bovino de albúmina (*bovine serum albumin*)

CaMKK β : proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina quinasa 2 β (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 β*)

CB₁R: receptor CB₁(*CB₁receptor*)
CB₂R: receptor CB₂(*CB₂receptor*)
CBD: cannabidiol
CBG: cannabigerol
CBN: cannabinol
CBND: cannabinodiol
CC₅₀: concentración necesaria para alcanzar la mitad de la concentración citotóxica (*50%cytotoxic concentration*)
CKK-8: kit-8 de conteo celular (*cell counting kit-8*)
CD: concentración necesaria para duplicar la actividad específica
CDKs: quinasas dependientes de ciclina (*cyclin-dependent kinase*)
CHO: células de ovario de hámster chino (*Chinese hamster ovary*)
CHOP: proteína homóloga C/EBP (*C/EBP homologous protein*)
CNB: centro nacional de biotecnología
CNRS: centro nacional de investigación científica (*centre national de la recherche scientifique*)
COVID-19: enfermedad del coronavirus 2019 (*coronavirus disease2019*)
CSA: ácido canforsulfónico (*camphorsulfonic acid*)
cuant.: cuantitativo
CYP450: citocromo P450 (*cytochrome P450*)
d: doblete
DAG: diacetón-D-glucosa
DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno
DCG: dicitlohexiliden-D-glucosa
dd: doble doblete.
ddd: doble doblete de dobletes
DFT: teoría del funcional de la densidad (*density functional theory*)

DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's médium*)

DMF: *N,N*-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

dt: doblete de tripletes

e.d.: exceso diasteromérico

e.e.: exceso enantiomérico

E: proteínas de envoltura vírica

EC₅₀: concentración que produce la mitad del efecto máximo (*half maximal effective concentration*)

EC₉₀: concentración que produce el 90% del efecto máximo (*90% effective concentration*)

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

eIF2 α -P: factor 2 α de iniciación de la traslación eucariótica fosforilado (*eukaryotic translation initiation factor 2 α phosphorylated*)

EMA: agencia europea del medicamento (*European medicines agency*)

F.R.: fuera de rango

FAAH: hidrolasa de amidas de ácidos grasos (*fatty acid amide hydrolase*)

FBS: suero fetal bovino (*fetal bovine serum*)

FDA: administración de alimentos y medicamentos de EE. UU. (*food and drug administration*)

FRET: transferencia de energía de resonancia de Förster (*Förster resonance energy transfer*)

Gln: glutamina

Gly: glicina (*glycine*)

GPCRs: receptores acoplados a proteína G (*G protein-coupled receptors*)

GPR-55: receptor acoplado a proteína G 55 (*Gprotein-coupled receptor 55*)

GST: glutatión S-transferasa

H. pylori: Helicobacter pylori

HIF-1 α : factor inducible por hipoxia 1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*)

his: histidina

hNK1R_{wt}: receptor humano NK1 "wild type" (*human NK-1 receptor wild-type*)

HOBt: *N*-hidroxibenzotriazol

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (*high performance liquid chromatography*)

HRP: peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase*)

HSC: células madre hematopoyéticas (*hematopoietic stem cells*)

HTRF: fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (*homogeneous time-resolved fluorescence*)

I.C.: intervalo de confianza

I.S.: índice de selectividad

I.T.: índice terapéutico

IBiS: instituto de biomedicina de Sevilla

IC₁₀₀: concentración necesaria para alcanzar la inhibición máxima (*maximal inhibitory concentration*)

IC₅₀: concentración necesaria para alcanzar la mitad de la inhibición máxima (*half maximal inhibitory concentration*)

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1 (*intercellular adhesion molecule 1*)

IGF: instituto de genómica funcional (*institut de génomique fonctionelle*)

IMDM: medio de Dulbecco modificado por Iscove (*Iscove's modified Dulbecco's media*)

IMP_{asa}: inositol monofosfatasa (*inositol monophosphatase*)

INAMOL: instituto de nanociencia, nanotecnología y materiales moleculares

IP₁: inositol monofosfato (*inositolmonophosphate*)

IP₂: inositol bifosfato (*inositol biphosphates*)

IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato (*inositol 1,4,5-trisphosphate*)

IP₄: inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato (*inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate*)

J: constante de acoplamiento

JAK: quinasa de Janus (*Janus kinase*)

*k*_{act}: constante de activación

Keap1: proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (*Kelch-like ECH-associated protein 1*)

*k*_{inact}: constante de inactivación

Leu: leucina

LHMDS: bis(trimetilsilil)amiduro de litio

log: logaritmo

Lys: lisina (*lysine*)

m: múltiplete

M: proteínas de membrana vírica

MAGL: lipasa monoacilglicerol (*monoacylglycerol lipasa*)

MD: *molecular docking*

MERS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (*middle east respiratory syndrome coronavirus*)

Met: metionina

moi: multiplicidad de infección (*multiplicity of infection*)

mTORC1: diana del complejo de rapamicina 1 en células de mamífero (*mammalian target of rapamycin complex 1*)

mTORC2: diana del complejo de rapamicina 2 en células de mamífero (*mammalian target of rapamycin complex 2*)

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

N: proteínas de la nucleocápsida

NADA: *N*-araquidonoildopamina

NBS: *N*-bromosuccinimida

NIS: *N*-yodosuccinimida (*N-iodosuccinimide*)

NK: célula asesina natural (*natural killer*)

NK1: neuroquinina 1 (*neurokinina 1*)

NK2: neuroquinina 2 (*neurokinina 2*)

NK3: neuroquinina 3 (*neurokinina 3*)

NKA: neuroquinina A (*neurokinina A*)

NKB: neuroquinina B (*neurokinina B*)

Nrf2: factor nuclear derivado del factor eritroide 2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

NSCLC: cáncer de pulmón de "células no pequeñas" (*non-small cell lung cancer*)

NVIQ: náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia

OA: oleamida

OAE: araquidonato de 2-aminoetiloo virodamina

OEA: oleoiletanolamida.

p.f.: punto de fusión.

p21: inhibidor de quinasa 21 dependiente de ciclina

p27: inhibidor de quinasa 27 dependiente de ciclina

p8: proteína reguladora del estrés

PBS: solución salina tamponada con fosfato (*phosphate-buffered saline*)

PEA: *N*-palmitoiletanolamida

Phe: fenilalanina (*phenylalanine*)

PI3K: 1-fosfatidilinositol 3-quinasa (*1-phosphatidylinositol 3-kinase*)

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PKB: proteína quinasa B (*protein kinase B*)

PLC: fosfolipasa C (*phospholipase C*)

PPAR: receptor activado por proliferadores de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor*)

ppm: partes por millón

pRb: proteína del retinoblastoma

Pro: prolina

q: quintuplete

r.d.: relación diastereomérica

R.E.: retículo endoplasmático

RBD: dominio de uniónal receptor (*receptor-binding domain*)

rdto.: rendimiento

RMN: resonancia magnética nuclear

RMSD: raíz del error cuadrático medio (*root mean square deviation*)

RNP: ribonucleoproteínas

RPMI: medio del Instituto Memorial del Parque Roswell (*Roswell Park Memorial Institute medium*)

s.a.: señal ancha

S: proteínas estructurales víricas de las espículas

s: singulete

S: sustrato

SARS-CoV: coronavirus que acusa el síndrome respiratorio agudo grave (*severe acute respiratory syndrome coronavirus*)

SARS-CoV-2: coronavirus tipo 2 que causa el síndrome respiratorio agudo grave (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

SCLC: cáncer de pulmón de "células pequeñas" (*small cell lung cancer*)

SDRA: síndrome de dificultad respiratoria aguda

SDS: dodecil sulfato de sodio (*sodium dodecyl sulfate*)

SEM: error estándar de la media (*standard error of the mean*)

SFN: sulforafano

SP: sustancia P

SPT: palmitoiltransferasa de serina (*serine palmitoyltransferase*)

STAT: activador de la transcripción y transductor de señal (*signal transducer and activator of transcription*)

t.a.: temperatura ambiente

t: triplete

tª: temperatura

TBME: tert-butil metil éter

TBTU: tetrafluoroborato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio

td: triple doblete

Tf₂O: anhídrido trifluorometanosulfónico

TfAd: ácido trifluoroacético deuterado

THC: tetrahidrocannabinol

THF: tetrahidrofurano

TMPRSS2: proteasa transmembrana 2 de serina (*transmembrane protease serine 2*)

TMSOTf: trimetilsilil trifluorometanosulfonato

TRF: fluorescencia resuelta en el tiempo (*time-resolved fluorescence*)

TRIB3: homólogo 3 de Tribbles (*Tribbles-homologue 3*)

TRPM8: subfamilia 8 del receptor de potencial transitorio (*transient receptor potential subfamily M8*)

TRPV1: receptor de potencial transitorio vainilloide 1 (*transient receptor potential vanilloid 1*)

tt: triplete de tripletes

U.V.: ultravioleta

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular 1 (*vascular cell adhesion molecule 1*)

VEGF: factor de crecimiento del endoteliovascular (*vascular endothelial growth factor*)

VEGFR: receptor del factor de crecimiento del endoteliovascular (*vascular endothelial growth factor*)

WST-8: sal de tetrazolio soluble en agua-8 (*water soluble tetrazolium salt 8*)

ΔF : variación de la frecuencia

ΔG : variación de energía libre de Gibbs

λ : longitud de onda

ψ_m : potencial de membrana mitocondrial

Índice

Capítulo I. Introducción general y objetivos	
I.1. Tendencia actual en el tratamiento del cáncer.....	1
I.2. Objetivos generales.....	8
I.3. Bibliografía	9
Capítulo II. Análogos del sulforafano	
Capítulo III. Análogos del aprepitant	
III.1. Antecedentes y objetivos.....	107
III.1.1. Relación del receptor NK1 con el cáncer: antagonistas del receptor NK1.....	110
III.1.2. Antagonistas no peptídicos del receptor NK1 comercializados y en ensayos clínicos	111
III.1.3. Descubrimiento del aprepitant	115
III.1.4. Interacción molecular del CP-99,994, el netupitant y el aprepitant con el receptor NK1	118
III.1.5. Objetivos	120
III.2. Síntesis de análogos del aprepitant: resultados y discusión.....	122
III.2.1. Análogos del aprepitant derivados de L-arabinosa	123
III.2.2. Análogos del aprepitant derivados de D-glucosa	134
III.3. Estudio de la actividad biológica.....	142
III.3.1. Actividad anticancerosa	142
III.3.1.1. Actividad anticancerosa frente a células tumorales de pulmón.....	142
III.3.1.1.1. Resultados del ensayo MTT en células tumorales de pulmón.....	143
III.3.1.2. Actividad anticancerosa frente a neuroblastoma	150
III.3.1.2.1. Resultados del ensayo MTT en células tumorales de neuroblastoma.....	151
III.3.2. Actividad antagonista del receptor NK1: test IP-one.....	156
III.3.2.1. Fundamentos teóricos del test IP-one	156
III.3.2.2. Resultados del test IP-one.....	160

III.3.3. <i>Molecular Docking</i>	164
III.3.3.1. Metodologías de <i>Molecular Docking</i>	165
III.3.3.2. Conceptos básicos en MD: algoritmos de muestreo, funciones matemáticas de puntuación, energía libre de Gibbs y raíz del error cuadrático medio	167
III.3.3.3. <i>Molecular Docking</i> : validación del software Autodock Vina.....	169
III.3.3.4. Resultados de MD del aprepitant y sus análogos con el receptor NK1	170
III.4. Parte experimental.....	181
III.4.1. Síntesis de los derivados de L-arabinosa	181
III.4.2. Síntesis de los derivados de D-glucosa	193
III.4.3. Estudio de la actividad biológica	206
III.4.3.1. Actividad anticancerosa	206
III.4.3.1.1. Actividad anticancerosa frente a células tumorales de pulmón.....	206
III.4.3.1.2. Actividad anticancerosa frente a neuroblastoma	207
III.4.3.2. Actividad antagonista del receptor NK1: test IP-one.....	208
III.4.3.3. <i>Molecular Docking</i>	212
III.5. Bibliografía	212
Capítulo IV. Análogos del PGN128	
<i>Conclusiones</i>	305
<i>Índice de compuestos</i>	313

Capítulo I. Introducción general y objetivos

I.1. Tendencia actual en el tratamiento del cáncer

El cáncer constituye actualmente la segunda causa de fallecimiento en el mundo, por detrás de las enfermedades cardiovasculares o infecciosas según el grado de desarrollo del país. En 2020, el cáncer causó casi 10 millones de fallecimientos y hubo más de 19 millones de nuevos casos en todo el mundo. En España, en 2020 se contabilizaron unas 133.000 muertes causadas por cáncer, de las cuales casi 23.000 se debieron al cáncer de pulmón (1^{er} cáncer con más muertes registradas) y unas 3.700 a leucemia. Desafortunadamente, estas cifras siguen aumentando, siendo la previsión de la OMS para 2030 de unos 24,6 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo, que causarán unas 16,3 millones de muertes (figura 1).^{1,2}

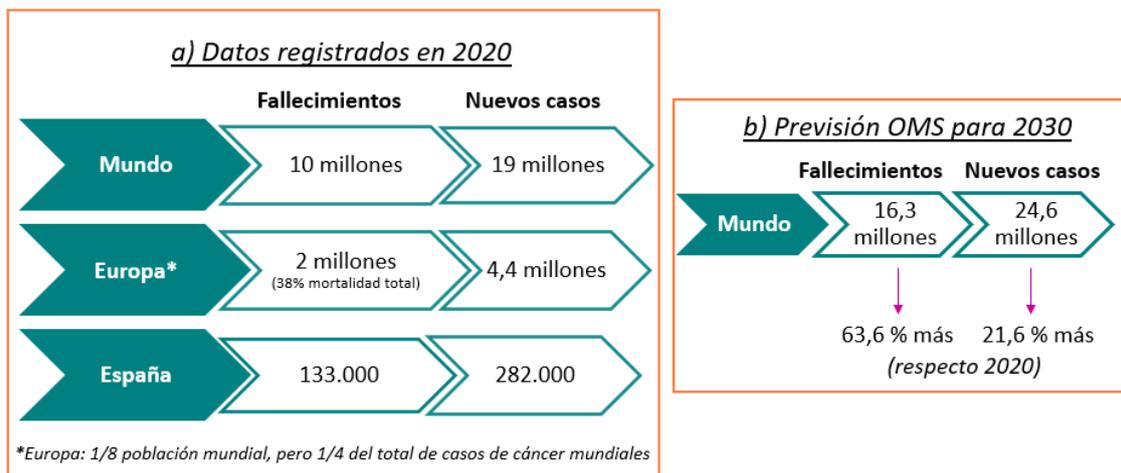


Figura 1. a) Nuevos casos de cáncer y fallecimientos registrados en 2020. b) Previsión de la OMS para 2030. Fuente: OMS¹ y Eurostat.²

La detección de la enfermedad en fases avanzadas y la falta de medios de diagnóstico y tratamiento adecuados suelen ser los problemas más frecuentes relacionados con un mal pronóstico del cáncer.¹ Hay que tener en cuenta que el término cáncer engloba a un gran número de enfermedades relacionadas entre sí, existiendo más de cien tipos diferentes de

Capítulo I. Introducción general y objetivos

cáncer. En todos ellos, un tipo celular comienza a dividirse descontroladamente. Este descontrol, viene originado por cambios en la información genética de la célula, pero la causa concreta por la que ocurren estos cambios no está clara aún, ya que puede deberse a múltiples factores, desde hereditarios hasta ambientales.

Dada la gran incidencia del cáncer, resulta imperiosa la búsqueda de nuevos tratamientos frente a esta patología, que genera un enorme sufrimiento a la población y para la que, desgraciadamente, aún no se ha encontrado una solución definitiva, constituyendo uno de los grandes desafíos de la medicina actual.³ La introducción de los primeros agentes quimioterápicos, como las mostazas nitrogenadas (descubiertas en 1942)⁴ a mediados del siglo XX, y posteriormente los complejos de platino como el cisplatino (aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1978),⁵ el carboplatino (aprobado por la FDA en 1989)⁵ y el oxaliplatino (aprobado por la FDA en 2002),⁵ supusieron un avance importante en la lucha contra el cáncer (figura 2).⁶

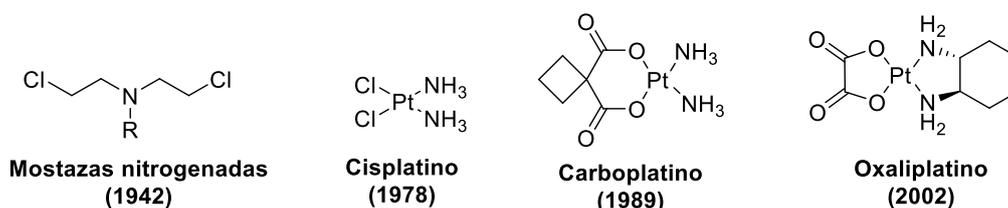


Figura 2. Estructura de los primeros agentes quimioterápicos

Sin embargo, tanto el concepto de “quimioterapia” como el término de “agentes quimioterápicos” es anterior a estos descubrimientos. Se remontan a principios del siglo XX y deben su origen a Paul Ehrlich (1854-1915), un científico polaco con importantes aportaciones en el campo de la microbiología y la inmunología. Entre sus numerosas aportaciones a la ciencia, cabe destacar su conocida teoría de la “bala mágica” y el desarrollo del “salvarsán” un derivado

de arsénico que supuso el primer tratamiento eficaz de la sífilis, estableciendo el principio fundamental de la quimioterapia antimicrobiana y antitumoral: la toxicidad selectiva (figura 3).⁷

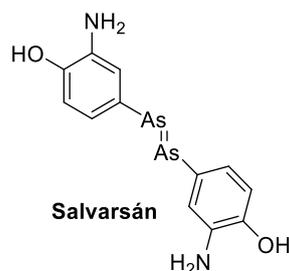


Figura 3. Estructura del salvarsán.

En 1906, Paul Ehrlich publicó un artículo titulado “*Die Aufgabender Chemotherapie*” (las tareas de la quimioterapia), en el que aparecía por primera vez el término quimioterapia, y desde entonces, este término ha estado presente en las publicaciones científicas, en las que ha ido apareciendo con distintos significados, pero todos ellos relacionados siempre con el concepto de afinidad selectiva.⁷ Actualmente, los términos “agente quimioterápico” y “quimioterapia” engloban a los tratamientos o las terapias tanto antimicrobianas como antitumorales.

Los primeros agentes quimioterápicos provocaban un bloqueo no específico de la división celular causando la muerte celular y matando tanto a las células tumorales como a las células sanas, por lo que los intervalos terapéuticos eran muy limitados y causaban importantes efectos secundarios. Con el fin de evitar estos inconvenientes, la tendencia actual en el desarrollo de nuevos tratamientos frente al cáncer propone el desarrollo de fármacos dirigidos a dianas terapéuticas específicas capaces de evitar el crecimiento de células tumorales, presentando a su vez una reducida toxicidad hacia células sanas.⁶ Estas terapias dirigidas pueden ser muy diversas, como por ejemplo: *i*) terapia hormonal; *ii*) inhibidores de la transducción de señal; *iii*) moduladores de la expresión génica; *iv*) inductores de la apoptosis; *v*) inhibidores de la

angiogénesis;³ *vi*) agentes intercalantes del ADN; *vii*) inhibidores de la síntesis de ADN; *viii*) inhibidores o activadores de factores de transcripción específicos, *ix*) inhibidores enzimáticos que inducen apoptosis celular; así como *xi*) agonistas o antagonistas de receptores específicos que desencadenan una respuesta que conduce a la muerte de las células tumorales.⁸ En general, estas terapias se dirigen a dianas que se encuentran sobreexpresadas en células cancerosas, pero no en células sanas, lo que proporciona una mayor selectividad. Otro tipo de tratamiento actual selectivo frente al cáncer es la inmunoterapia con anticuerpos dirigidos, inhibidores de puntos de control, citocinas, etc., capaces de activar el propio sistema inmune del paciente frente a las células cancerosas.⁹

Encontrada en un proyecto más amplio desarrollado en nuestro grupo de investigación, encaminado al desarrollo de moléculas orgánicas pequeñas como nuevas entidades químicas con actividad anticancerosa, en la presente tesis doctoral nos hemos centrado, dentro de las terapias dirigidas, en los factores de transcripción y en los receptores específicos como dianas terapéuticas. En concreto, nuestro interés se ha dirigido hacia: *i*) el factor de transcripción oncogénico STAT3, activo de manera constitutiva en diferentes tipos de cáncer e implicado en procesos de génesis de tumores y en el desarrollo y progresión del cáncer,^{10,11} *ii*) el receptor NK1, un receptor acoplado a proteína G, ya que tanto él como su ligando endógeno, la sustancia P, además de estar expresados en una amplia variedad de tipos de cáncer, están relacionados directamente con la proliferación y la supervivencia de las células tumorales e indirectamente con alteraciones del microambiente tumoral y con procesos implicados en la progresión de tumores,¹² y *iii*) el receptor CB₂, un receptor acoplado a proteína G, cuya activación conduce a la muerte celular por apoptosis o autofagia de las células tumorales así como a la detención del ciclo celular en diferentes tipos de cáncer.¹³

Para el diseño y síntesis de nuevos compuestos de interés terapéutico, la Química Farmacéutica dispone de dos aproximaciones generales: *i*) diseño basado en la estructura de la diana biológica

y *ii*) diseño basado en el ligando. La primera aproximación se basa en el estudio de la diana biológica objetivo, por ejemplo, un receptor, y por lo tanto es indispensable conocer su estructura. La determinación de la estructura de la proteína, aunque no siempre es posible, se basa en estudios de cristalografía de rayos X y RMN, o puede predecirse por analogía con otros receptores conocidos. El conocimiento de sus características estructurales y del modo de unión con su ligando, permite diseñar, mediante métodos computacionales, nuevos ligandos de esta diana. La segunda estrategia, se basa en la estructura de un “cabeza de serie” o fármaco conocido (prototipo) de interés. Mediante el estudio de las relaciones estructura-actividad, se pueden predecir los puntos clave de su estructura y modularla adecuadamente para conseguir mejorar la actividad deseada.¹⁴ En aquellos casos en que es posible, ambas aproximaciones se complementan y su aplicación permite llevar a cabo el diseño de forma más eficiente.

En la presente tesis doctoral, para nuestro diseño, hemos seleccionado tres prototipos diferentes: el sulforafano (SFN), el aprepitant y el derivado PGN128 (figura 4). El SFN, un compuesto fitoquímico presente en vegetales de la familia brasicáceas, posee una demostrada actividad antitumoral frente a diferentes tipos de cáncer, sin embargo, no existe un consenso en cuanto a los mecanismos por los cuales ejerce su acción anticancerosa, debido a su capacidad de interactuar con diferentes dianas biológicas, entre las que cabe destacar el factor de transcripción Nrf2 y la proteína transductora de señal y activadora de la transcripción STAT3. El aprepitant, primer fármaco comercializado como antagonista del receptor NK1, está involucrado en distintas rutas de señalización y de transducción celulares con distintas funciones. El antagonismo del receptor NK1 es útil en patologías muy diversas como náuseas, dolor, inflamación, prurito, depresión y cáncer. Y, por último, PGN128 es un agonista del receptor cannabinoide CB₂ descrito en la bibliografía,¹⁵ y el agonismo de este receptor está relacionado con actividades antitumorales.^{13,16,17}

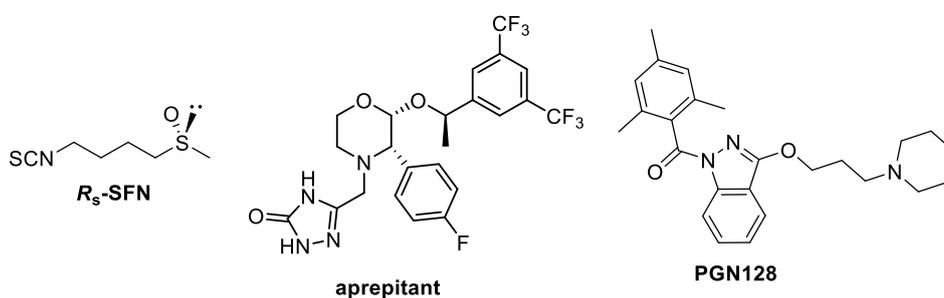


Figura 4. Estructura de los tres compuestos seleccionados como prototipos.

Tanto el receptor NK1 como el receptor CB₂ pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G. La primera descripción que se recoge de estos receptores en la bibliografía en relación con los procesos tumorales data de 1986. Desde entonces, han sido ampliamente estudiados, lo que ha permitido conocer entre otros datos, que se trata de receptores que pertenecen a la mayor familia de proteínas de señalización extracelular del genoma humano y que representan en torno al 5% del total de las proteínas de superficie celular en mamíferos.^{18,19} La importancia de estos receptores radica en su papel regulador de una gran cantidad de funciones celulares, como la señalización por quimioquinas, la proliferación celular, la regulación de la muerte y supervivencia celular, el sentido del olfato, la emesis y la depresión. Además, se ha descubierto que son clave en el crecimiento de los tumores, así como en la angiogénesis y en la metástasis.^{12,18} Actualmente, alrededor del 30% de los fármacos aprobados por la FDA tienen como diana terapéutica a los receptores acoplados a proteína G^{18,19} y muchos de ellos se utilizan como diana en la quimioterapia contra el cáncer.

Llegados a este punto, aunque resulta evidente la importancia de encontrar agentes quimioterápicos selectivos, capaces de actuar sobre las células cancerosas respetando las células sanas, cabe cuestionarse si también es adecuado que sean selectivos frente a una única diana terapéutica. Así, en contraposición al concepto clásico de “un fármaco - una diana - un efecto” aparece el concepto de “*fármacos multidiana*”, para denominar a aquellos que tienen

la capacidad de interactuar con más de una diana biológica para obtener un efecto terapéutico concreto.²⁰ En los últimos tiempos, ha aumentado el interés por este tipo de fármacos para el tratamiento de enfermedades de etiología compleja, que hoy en día siguen sin tener un tratamiento completamente eficaz, como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. Son enfermedades consideradas complejas porque, como indicamos anteriormente, están causadas por factores muy diversos, lo que dificulta la búsqueda de tratamientos basados en su origen o causa. La complejidad de estas enfermedades ha mostrado que los fármacos con una sola diana terapéutica no son necesariamente los más adecuados, al menos por el momento, para lograr los efectos terapéuticos deseados, emergiendo el estudio de los fármacos multidiana como una alternativa terapéutica más adecuada frente a estas patologías.²¹ Un ejemplo de fármaco multidiana comercializado es el lenvatinib (figura 5) que, como tratamiento frente al carcinoma de tiroides, es un inhibidor reversible de múltiples tirosinquinazas (TK), que modula la actividad del receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR), del receptor del factor de células madre (SCFR) y del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), todos ellos implicados en la angiogénesis, el crecimiento del tumor y la progresión del cáncer.^{22,23}

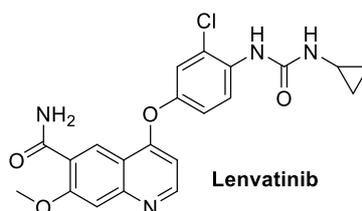


Figura 5. Estructura del lenvatinib como prototipo de fármaco multidiana con actividad anticancerosa.

Con un diseño adecuado de los fármacos multidiana es posible conseguir menor toxicidad y mayor selectividad y eficacia, disminuyendo al mismo tiempo la posibilidad de desarrollo de resistencias frente al fármaco, en comparación con los fármacos dirigidos a una única diana.⁶ Tanto los análogos del SFN como los análogos del aprepitant desarrollados en esta tesis doctoral pueden considerarse fármacos multidiana. El SFN es un fármaco multidiana por su capacidad de interacción con múltiples dianas biológicas como el citocromo P 450 (CYP450), los factores de transcripción nuclear Nrf2 o NF-κB, y el factor de transcripción STAT3, entre otros. Por su parte, el aprepitant, aunque su única diana biológica conocida es el receptor NK1, podría considerarse también como un fármaco multidiana ya que la unión de este receptor a su ligando endógeno, la sustancia P, desencadena su participación en múltiples rutas de señalización intracelulares involucradas en la proliferación celular, la migración celular, la angiogénesis y la inhibición de la apoptosis, elementos favorecedores de la proliferación y supervivencia de las células tumorales. El empleo de antagonistas del receptor NK1 puede anular todas estas rutas, actuando como inhibidores indirectos de diferentes quinasas como la fosfolipasa C (PLC), la fosfatidilinositol quinasa (PI3K), la proteína quinasa B (PKB), la TK, la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la fosfolipasa A, entre otras. Además, el receptor NK1 también tiene la capacidad de activar a otros receptores de membrana adyacentes, como los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y los VEGFR, ambos involucrados en favorecer el proceso tumoral, por lo que el antagonismo del receptor NK1 conllevaría también al bloqueo de estos receptores y sus respectivas rutas de señalización intracelulares.²⁴

1.2. Objetivos generales

Teniendo en cuenta todo lo indicado anteriormente, en esta tesis doctoral nos hemos propuesto los siguientes objetivos generales, que serán concretados en objetivos más específicos en sus respectivos capítulos:

- 1) Diseño y síntesis de tres familias de nuevos agentes anticancerosos, tomando como base la estructura de los correspondientes prototipos: *a)* SFN (capítulo II), *b)* aprepitant (capítulo III) y *c)* PGN128 (capítulo IV). Se pretende encontrar compuestos que sean más activos y selectivos frente al cáncer, con un perfil farmacocinético adecuado.
- 2) Determinación *in vitro* de la actividad anticancerosa de los nuevos análogos sintetizados frente a diferentes tipos de cáncer, como la leucemia, el neuroblastoma o el cáncer de pulmón.
- 3) Determinación *in vitro* de la capacidad para interaccionar con sus correspondientes dianas biológicas, como sería el factor de transcripción Nrf2 en el caso de los análogos del SFN, o el receptor NK1 en el caso del aprepitant.
- 4) Por último, aunque no formaba parte del planteamiento inicial de esta tesis doctoral, durante el transcurso de la misma, la aparición de la pandemia provocada por el coronavirus, impulsó la búsqueda de compuestos activos frente al SARS-CoV-2, por lo que nos planteamos el estudio de la actividad antivírica de todos los compuestos sintetizados.

1.3. Bibliografía

- (1) WHO | World Health Organization <https://www.who.int/> (accessed Nov 21, 2021).
- (2) Home - Eurostat <https://ec.europa.eu/eurostat> (accessed Jan 10, 2022).
- (3) NIH - National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/> (accessed Nov 21, 2021).
- (4) Singh, R. K.; Kumar, S.; Prasad, D. N.; Bhardwaj, T. R. Therapeutic Journey of Nitrogen Mustard as Alkylating Anticancer Agents: Historic to Future Perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 401–433. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.001>.
- (5) Rébé, C.; Demontoux, L.; Pilot, T.; Ghiringhelli, F. Platinum Derivatives Effects on Anticancer Immune Response. *Biomolecules* **2020**, *10* (13), 1–22.

<https://doi.org/10.3390/biom10010013>.

(6) Guo, T.; Ma, S. Recent Advances in the Discovery of Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitors as Anticancer Agents. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 1–22.

<https://doi.org/10.1002/cmdc.202000658>.

(7) García-Sánchez, J. E.; García, E.; Merino, M. L. Cien Años de La Bala Mágica Del Dr. Ehrlich (1909-2009). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2010**, *28* (8), 521–533.

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.07.009>.

(8) Kumar, S.; Ahmad, M. K.; Waseem, M.; Pandey, A. K. Drug Targets for Cancer Treatment: An Overview. *Med. Chem.* **2015**, *5* (3), 115–123. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000252>.

(9) Cancer Research Institute <https://www.cancerresearch.org/> (accessed Jan 10, 2022).

(10) Hahm, E. R.; Singh, S. V. Sulforaphane Inhibits Constitutive and Interleukin-6-Induced Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Prostate Cancer Cells. *Cancer Prev. Res.* **2010**, *3* (4), 484–494. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0250>.

(11) Li, X.; Zhao, Z.; Li, M.; Liu, M.; Bahena, A.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Nambiar, C.; Liu, G. Sulforaphane Promotes Apoptosis, and Inhibits Proliferation and Self-Renewal of Nasopharyngeal Cancer Cells by Targeting STAT Signal through MiRNA-124-3p. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *103* (March), 473–481. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.121>.

(12) Garcia-Recio, S.; Gascón, P. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/495704>.

(13) Velasco, G.; Sánchez, C.; Guzmán, M. Anticancer Mechanisms of Cannabinoids. *Curr. Oncol.* **2016**, *23* (S2), S23–S32. <https://doi.org/10.3747/co.23.3080>.

(14) Aparoy, P.; Reddy, K. K.; Reddanna, P. Structure and Ligand Based Drug Design Strategies in the Development of Novel 5- LOX Inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 3763–3778. <https://doi.org/10.2174/092986712801661112>.

(15) González-Naranjo, P.; Pérez-Macias, N.; Pérez, C.; Roca, C.; Vaca, G.; Girón, R.; Sánchez-

Robles, E.; Martín-Fontelles, M. I.; de Ceballos, M. L.; Martín-Requero, A.; Campillo, N. E.; Páez, J. A. Indazolylketones as New Multitarget Cannabinoid Drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *166*, 90–107. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.030>.

(16) Ramer, R.; Hinz, B. Antitumorigenic Targets of Cannabinoids – Current Status and Implications. *Expert Opin. Ther. Targets* **2016**, *20* (10), 1219–1235. <https://doi.org/10.1080/14728222.2016.1177512>.

(17) Barbado, M. V.; Medrano, M.; Caballero-Velázquez, T.; Álvarez-Laderas, I.; Sánchez-Abarca, L. I.; García-Guerrero, E.; Martín-Sánchez, J.; Rosado, I. V.; Piruat, J. I.; Gonzalez-Naranjo, P.; Campillo, N. E.; Páez, J. A.; Pérez-Simón, J. A. Cannabinoid Derivatives Exert a Potent Anti-Myeloma Activity Both in Vitro and in Vivo. *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 674–685. <https://doi.org/10.1002/ijc.30483>.

(18) Soond, S. M.; Zamyatnin Jr., A. A. Targeting G Protein-Coupled Receptors in Cancer Therapy. In *Advances in Cancer Research*; Elsevier Inc., 2019; pp 49–97. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2019.11.002>.

(19) Bologna, Z.; Teoh, J.-P.; Bayoumi, A. S.; Tang, Y.; Kim, I.-M. Biased g Protein-Coupled Receptor Signaling: New Player in Modulating Physiology and Pathology. *Biomol. Ther.* **2017**, *25* (1), 12–25. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2016.165>.

(20) Morphy, R.; Rankovic, Z. Multitarget Drugs: Strategies and Challenges for Medicinal Chemists. In *The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition)*; Elsevier Ltd., 2008; pp 449–472. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00019-5>.

(21) Bolognesi, M. L.; Cavalli, A. Multitarget Drug Discovery and Polypharmacology. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1190–1192. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600161>.

(22) PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed Nov 30, 2021).

(23) Ramsay, R. R.; Popovic-Nikolic, M. R.; Nikolic, K.; Uliassi, E.; Bolognesi, M. L. A Perspective on Multi-target Drug Discovery and Design for Complex Diseases. *Clin. Transl. Med.* **2018**, *7* (3),

1–14. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0181-2>.

(24) Muñoz, M.; Coveñas, R. Glioma and Neurokinin-1 Receptor Antagonists: A New Therapeutic Approach. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2019**, *19* (1), 92–100. <https://doi.org/10.2174/1871520618666180420165401>.

Capítulo II. Análogos del sulforafano

(Confidencial)

Capítulo III. Análogos del aprepitant

III.1. Antecedentes y objetivos

Las taquicininas constituyen una gran familia de péptidos involucrada en neurotransmisión y procesos inflamatorios. La sustancia P (SP), el primer miembro de esta familia, se descubrió en el año 1931.¹² Se trata de un undecapéptido (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂) de carácter anfifílico, ya que sus grupos amino se encuentran protonados a pH fisiológico y además contiene residuos hidrofóbicos localizados principalmente en la zona C-terminal.¹²⁰ La SP tiene una gran afinidad por el receptor neuroquinina 1 (NK1), un receptor de taquicininas.¹² Concretamente, la zona responsable de su afinidad con el receptor NK1 es la secuencia de 5 aminoácidos (Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂) localizada en el extremo C-terminal del péptido.¹²⁰ Todas las taquicininas presentan el extremo C-terminal carbamoilado y la ausencia de este grupo carbamoilo suprime su actividad (figura 28).^{12,120}

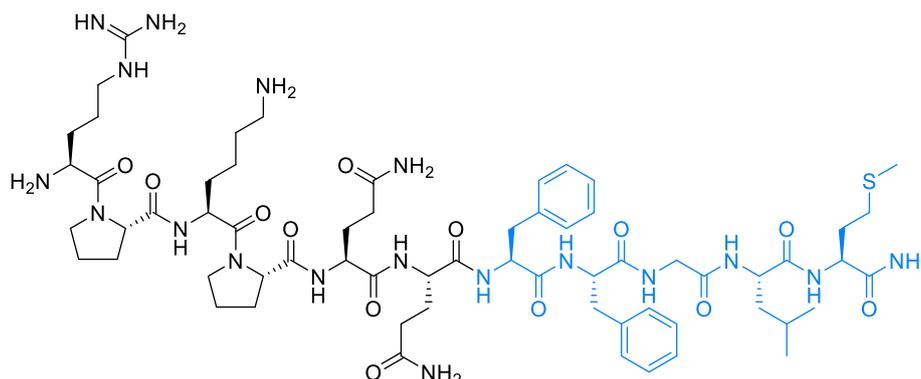


Figura 28. Estructura de la sustancia P. En celeste se indican los aminoácidos (Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂) responsables de su afinidad por el receptor NK1.

Los receptores de taquicininas se dividen en 3 tipos en función de su afinidad por la SP, así, de mayor a menor afinidad se encuentran el receptor NK1, el receptor neuroquinina 2 (NK2), y el receptor neuroquinina 3 (NK3). En cuanto a su localización en el organismo, los receptores NK1 y NK3 se encuentran tanto en el sistema nervioso como en los tejidos periféricos, mientras que

el receptor NK2 se encuentra sólo en los tejidos periféricos, concretamente en el riñón, el hígado, la placenta y el músculo esquelético. Además de su afinidad por la SP, estos receptores también presentan afinidad por otros ligandos endógenos como la neuroquinina A (NKA) y la neuroquinina B (NKB). Sin embargo, el receptor NK1 presenta mayor afinidad por la SP que por los otros ligandos endógenos NKA y NKB.¹²

El receptor NK1 está formado por 406 aminoácidos y tiene un peso molecular de 46 KDa. Pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) y presenta una estructura de tipo helicoidal con 7 dominios transmembrana, con 3 bucles extracelulares (E1, E2, E3) y 4 bucles intracelulares (C1, C2, C3, C4), cuyo extremo *N*-terminal es extracelular y el *C*-terminal intracelular. El dominio C4 está palmitoilado, es decir, se encuentra formando un tioéster entre un residuo de cisteína de la cadena y el ácido palmítico, un ácido graso de la membrana celular. Los bucles extracelulares E2 y E3, están implicados en la unión del receptor con la SP, mientras que el tercer bucle intracelular C3, es el responsable de su unión a la proteína G. Por último, la secuencia próxima al aminoácido *N*-terminal puede sufrir glicosilación, lo que aumenta su afinidad por la SP y permite también la estabilización del receptor NK1 en la membrana plasmática (figura 29).¹²

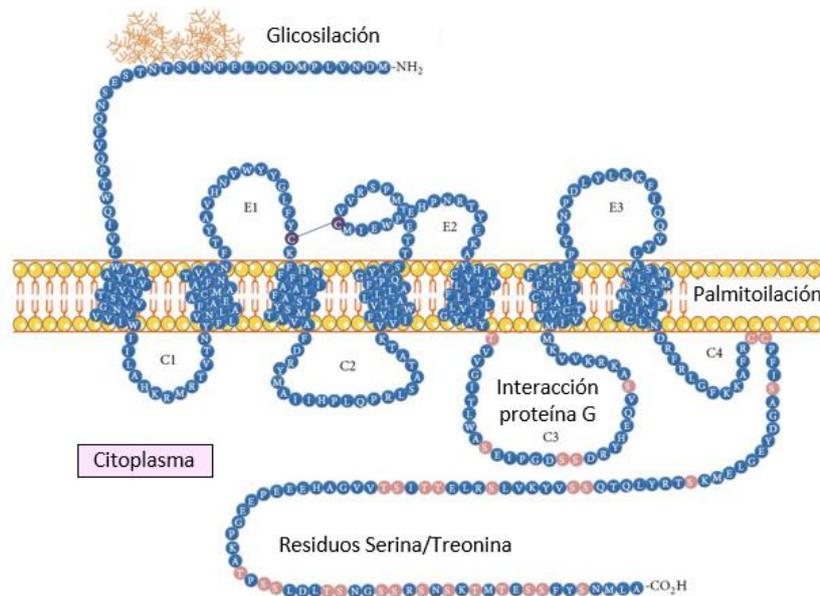


Figura 29. Representación de la estructura del receptor NK1.¹²

Cuando la SP se une al receptor NK1, se produce la activación de la proteína G que, a través de segundos mensajeros, activa diferentes rutas de señalización.¹² Una vez ejercida su acción, la señalización finaliza por medio de diferentes mecanismos, tales como: *i*) degradación de la SP en el fluido extracelular; *ii*) desensibilización del receptor NK1 mediada por la proteína β -arrestina, que produce el desacoplamiento del receptor NK1 y la proteína G, y por tanto la desensibilización. Este receptor puede resensibilizarse (vuelve a acoplarse con la proteína G) o bien *iii*) ser degradado en los lisosomas.¹²¹

El sistema formado por el receptor NK1 y la SP regula una gran cantidad de funciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas en el organismo. Está involucrado en las secreciones endocrinas y paracrinas, la vasodilatación, la transmisión del dolor y la proliferación celular. A nivel cerebral, es un neuromodulador de la homeostasis cerebral que participa en la transmisión sensorial neuronal y está involucrado en el control del vómito. Además, es un regulador hematopoyético con capacidad de modular la respuesta inflamatoria del sistema inmune al estar

expresado en linfocitos, monocitos, macrófagos, células NK (*natural killer*), microglía y en células de la médula ósea tanto de la línea linfoide como mieloide. Debido a estas funciones que presenta en el organismo, el sistema receptor NK1-SP se ha relacionado con el desarrollo de patologías como depresión, estrés, ansiedad, degeneración neuronal, adicción al alcohol, dolor, migraña, enfermedades inflamatorias del intestino, prurito, infecciones bacterianas y virales, emesis y cáncer.^{12,122}

III.1.1. Relación del receptor NK1 con el cáncer: antagonistas del receptor NK1

Tanto la SP como el receptor NK1 están expresados en una amplia variedad de tipos de cáncer como retinoblastoma, glioma, neuroblastoma, astrocitomas, melanoma, cáncer pancreático, laríngeo, gástrico, de colon y de mama. De hecho, hay evidencias experimentales que relacionan directamente las taquicininas con la modulación de la proliferación y la supervivencia de las células tumorales e indirectamente con alteraciones del microambiente tumoral y con procesos relacionados con la progresión de tumores.¹²

La sobreexpresión de los receptores NK1 en células tumorales sugiere la posibilidad de desarrollar un tratamiento antitumoral específico, y consecuentemente, con menos efectos secundarios, mediante el empleo de antagonistas de los receptores NK1 como agentes anticancerosos.

En general, los antagonistas de los receptores NK1 pueden ejercer su acción antitumoral mediante 3 mecanismos: *i)* acción antiproliferativa en células tumorales por inducción de apoptosis, *ii)* inhibición de la angiogénesis en masas tumorales y *iii)* bloqueo de la migración de células tumorales impidiendo la invasión de otros tejidos o metástasis.¹²³

Se pueden diferenciar 2 tipos de antagonistas de los receptores NK1, los peptídicos y los no peptídicos. Los antagonistas de tipo peptídico se basan en modificaciones químicas de la estructura de la SP, los cuales no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y pueden

ser degradados por peptidasas del organismo, pudiendo presentar cierta toxicidad. Por ello, se prefieren los antagonistas no peptídicos. Este tipo de antagonistas, por un lado, son compuestos lipófilos, por lo que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, característica importante en el caso de patologías a nivel del sistema nervioso central y, por otro lado, no pueden ser degradados por peptidasas.¹²³ En cuanto a los sitios de unión al receptor NK1, tanto la SP como los antagonistas peptídicos se unen a los bucles extracelulares del receptor NK1, mientras que los antagonistas no peptídicos, dado su menor tamaño y lipofilia, se unen a los dominios transmembrana del receptor.¹²²

Actualmente, se conoce la estructura exacta del receptor NK1, que se determinó por rayos X a finales de 2018, mediante la cristalización del complejo formado por la unión del receptor a distintos antagonistas de éste.^{124,125} Sin embargo, cuando inicialmente se abordó nuestro estudio, la estructura del receptor NK1 no se conocía aún, por lo que la aproximación más lógica para el diseño de nuevos antagonistas era basarse en la estructura de los ya conocidos.

III.1.2. Antagonistas no peptídicos del receptor NK1 comercializados y en ensayos clínicos

En la figura 30^{22,120} se muestran las estructuras de los fármacos comercializados que son antagonistas no peptídicos del receptor NK1. El aprepitant, comercializado como EMEND® por la empresa Merck desde 2003, fue el primer antagonista del receptor NK1 comercializado,¹² aprobado por la FDA y la EMA para el tratamiento de las náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia (NVIQ) y dos años más tarde, también para el tratamiento de las náuseas y vómitos postoperatorios. Posteriormente, se aprobaron modificaciones del aprepitant como el fosaprepitant, un profármaco del aprepitant,¹²⁰ o Cinvanti® (Heron therapeutics INC, 2017), con una formulación distinta a la de EMEND® para su administración por vía intravenosa en lugar de oral.¹²⁶ Con el paso del tiempo, la FDA y la EMA han aprobado otros antagonistas de los receptores NK1, como el maropitant para el tratamiento de vómitos en veterinaria, el netupitant

Capítulo III. Análogos del aprepitant

o el fosnetupitant en combinación con palonosetrón (antagonista de los receptores 5-HT₃), y el rolapitant, también para el tratamiento de NVIQ.^{120,126} En el caso del casopitant, poco antes de recibir la aprobación de comercialización en 2009, la compañía farmacéutica (GlaxoSmithKline, GSK) retiró su solicitud de autorización a la EMA con el objetivo de realizar más ensayos de seguridad.¹²⁰

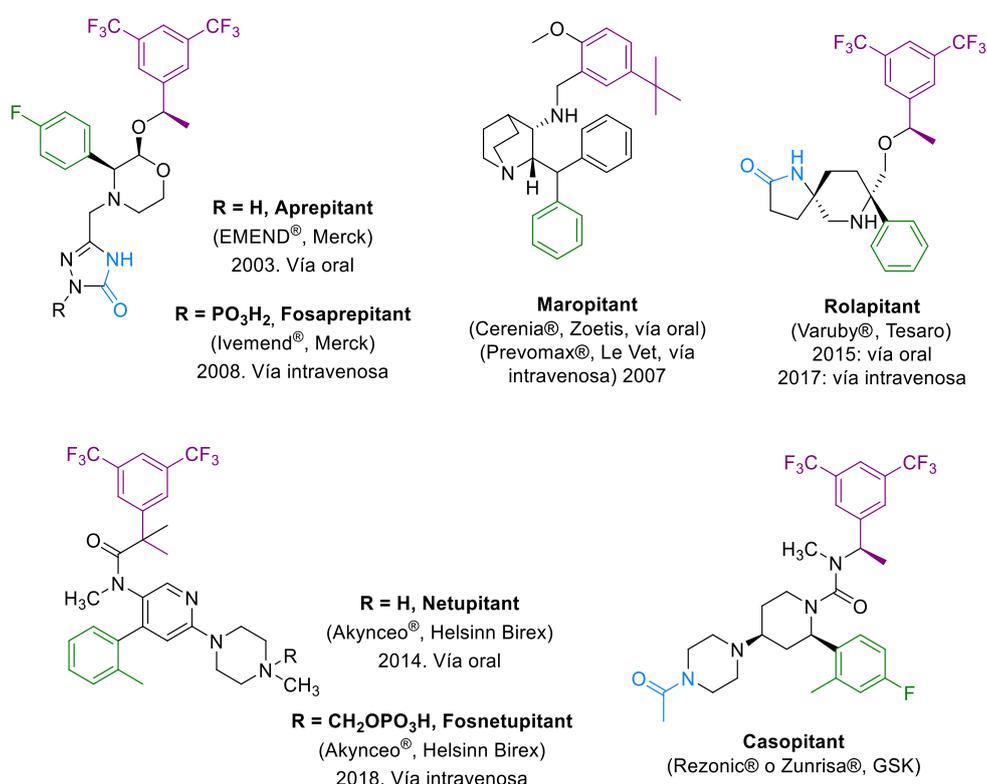


Figura 30. Estructura de los antagonistas de los receptores NK1 comercializados y del casopitant.

Podemos encontrar otra serie de antagonistas de los receptores NK1 en ensayos clínicos, como el vestipitant para el tratamiento de la depresión y de NVIQ, el orvepitant para el tratamiento

de la depresión, el vofopitant para el tratamiento de desórdenes mentales como la esquizofrenia y el serlopitant para el tratamiento de patologías dérmicas como el purito (figura 31).^{106,22}

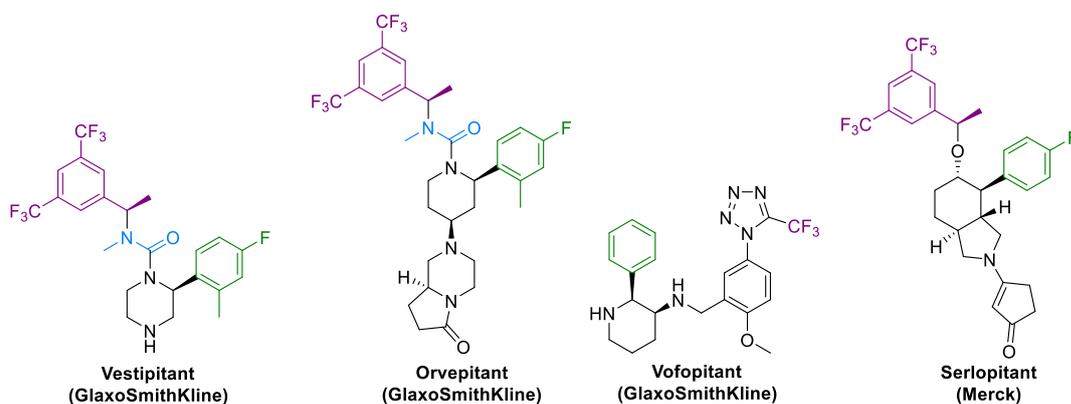


Figura 31. Estructura de los antagonistas de los receptores NK1 que se encuentran en ensayos clínicos.

Aunque todavía no se han realizado ensayos clínicos de ninguno de los antagonistas de los receptores NK1 mencionados con el objetivo de probar su capacidad como agentes antitumorales, existen evidencias preclínicas suficientes que indican que se pueden comportar como agentes anticancerosos.^{12,106} De hecho, el aprepitant ha mostrado *in vitro* propiedades antiproliferativas en líneas tumorales de cáncer de pulmón y neuroblastoma, entre otros (tabla 4).^{12,123}

Tabla 4. Actividad citotóxica del aprepitant (IC₅₀; IC₁₀₀) en diferentes líneas tumorales.

Tipo célula tumoral	Línea celular	IC ₅₀ (μM)	IC ₁₀₀ (μM)
Leucemia linfoblástica aguda B	SD-1	29,4	59,2
Leucemia linfoblástica aguda T	BE-13	19,5	50,0
Carcinoma de mama	BT-474	31,4	59,1
	MCF-7	35,6	64,0
	MDA-MB-468	29,6	57,0
	MT3	40,8	75,3
Carcinoma de colon	SW-403	30,5	60,5
Carcinoma gástrico	23132-87	24,2	52,5
Glioma	GAMG	33,1	66,2
Hepatoblastoma	HepT1	31,1	-
	HUH6	33,2	-
	HepG2	38,6	-
Carcinoma laríngeo	HEp-2	22,7	46,5
Melanoma	MEL-HO	29,6	56,5
Neuroblastoma	SKNBE (2)	24,6	48,8
	IMR-32	27,7	19,6
	KELLY	30,4	49,5
Carcinoma de pulmón	COR-L23	30,0	60,0
	H-69	21,8	45,2
Osteosarcoma	MG-63	28,6	80,0
Carcinoma de páncreas	PA-TU-8902	31,2	63,0
	CAPAN-1	27,4	52,0
Retinoblastoma	Y-79	30,4	59,0

III.1.3. Descubrimiento del aprepitant

Desde que hace aproximadamente tres décadas surgiera el interés por el desarrollo de nuevos antagonistas de los receptores NK1, se ha realizado un gran esfuerzo tanto a nivel industrial como académico centrado en este campo.¹²⁴ Múltiples farmacéuticas, como Novartis, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Eli Lilly, GlaxoSmithKline, Hoffmann-La Roche, Janssen Pharmaceutical Companies of Johnson & Johnson, Merck, Pfizer y Sanofi, entre otras, tienen patentados diferentes antagonistas de los receptores NK1.¹²⁷

En 1991 Pfizer sintetizó el CP-96,345 (figura 32), primer antagonista no peptídico de los receptores NK1. Se trata de un potente antagonista competitivo reversible de los receptores NK1, altamente selectivo frente a los otros subtipos NK2 y NK3.¹²⁸ Sin embargo, el CP-96,345 presenta también afinidad por los canales de calcio de tipo L, responsable de los efectos secundarios adversos observados a nivel cardiovascular.^{129,130} En 1993 la propia Pfizer desarrolló otro antagonista no peptídico de los receptores NK1, el CP-99,994 (figura 32), que presenta también una potente afinidad por los receptores NK1 y selectividad frente a los otros subtipos, pero menor afinidad por los canales de calcio que el anterior.¹²⁹ Posteriormente, Merck, desarrolló en 1996 el L-733,060 (figura 32), otro potente antagonista no peptídico de los receptores NK1, que también posee cierta afinidad por estos canales de calcio.¹³¹

En todos los casos, es importante tener en cuenta la estereoquímica de estos derivados, ya que los enantiómeros con configuración (2*R*,3*R*) mostraron una afinidad hacia el receptor NK1 significativamente inferior que los de configuración (2*S*,3*S*), lo que indica que los receptores NK1 presentan una importante discriminación quiral.^{128,129,131}

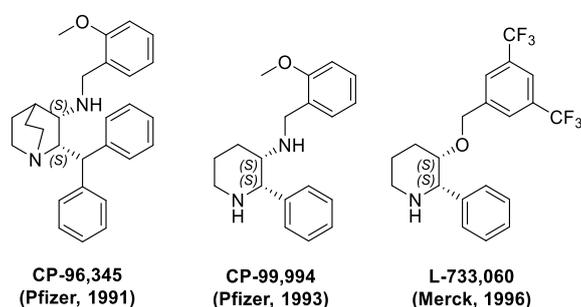


Figura 32. Primeros antagonistas no peptídicos de los receptores NK1.

La afinidad que presentan hacia los canales de calcio fue atribuida a la basicidad del anillo de quinuclidina del CP-96,345 ($pK_a \sim 9$) y de piperidina del CP-99,994 y L-733,060 ($pK_a \sim 8,7$) (figura 32). Para reducir esta basicidad, Merck sintetizó diferentes análogos del L-733,060 (figura 33).¹³⁰

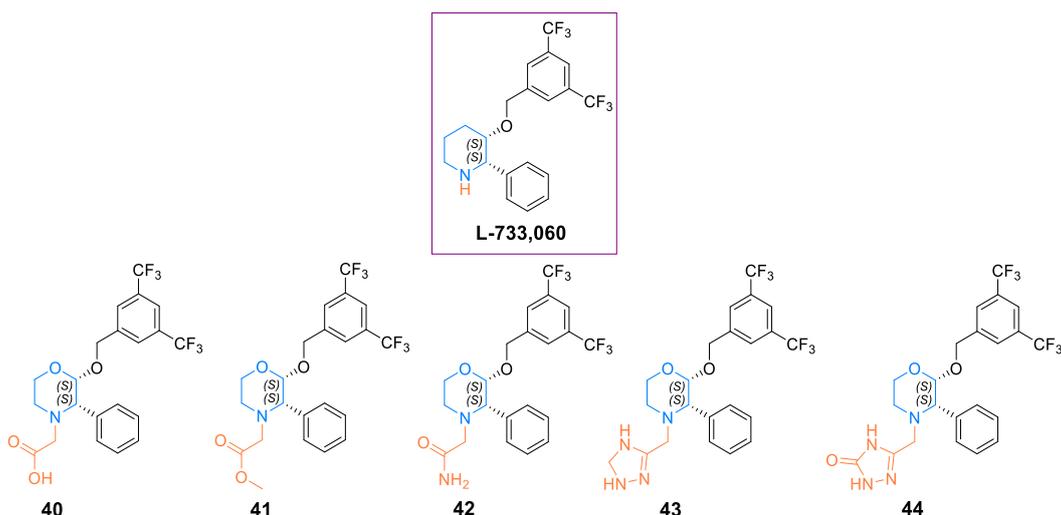


Figura 33. Análogos del L-733,060 sintetizados por Merck para optimizar la capacidad antagonista del receptor NK1.

En estos análogos, se sustituyó el anillo de piperidina de L-733,060 por uno de morfolina y en el nitrógeno de este anillo se unió un grupo metilcarboxílico (**40**), un metiléster (**41**) y una

metilamida (**42**), como grupos atractores de electrones, lo que se tradujo en una reducción de la basicidad y, por tanto, en una disminución de su afinidad hacia los canales de calcio, pero manteniendo su potente afinidad hacia los receptores NK1. Basándose en esta hipótesis, en el nitrógeno del anillo morfolínico se introdujo también un grupo metiltriazol (**43**) y un anillo de metiltriazolona (**44**), como grupos atractores de electrones. De todos los análogos sintetizados, el que presentó mayor afinidad por el receptor NK1 fue el derivado **44**, con un anillo de triazolona, y el de menor afinidad fue el análogo **40**, con un ácido carboxílico como sustituyente. Además, en todos los casos, de los 4 estereoisómeros posibles, sólo los de configuración (2*S*,3*S*) mostraron de nuevo una potente afinidad por los receptores NK1 (figura 33).¹³⁰

En un intento de aumentar la estabilidad metabólica de **44**, evitando la reacción metabólica de fase I de *O*-debencilación observada *in vitro*, se introdujo un grupo metilo en esta posición bencílica (*A*). Por otro lado, también se introdujo un átomo de flúor en la posición *para* del anillo de benceno situado en la posición 3 del anillo de morfolina (*B*) a fin de evitar la hidroxilación en esta posición (figura 34).¹³⁰

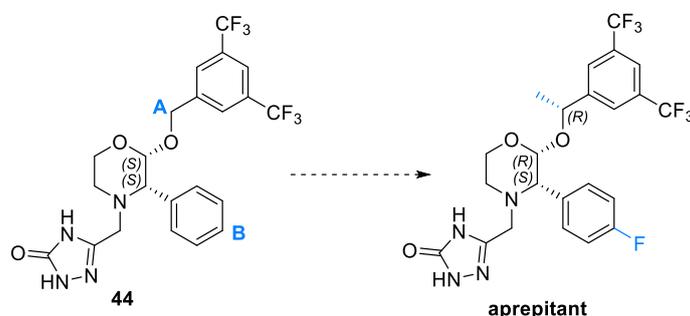


Figura 34. Modificaciones estructurales de **44** para aumentar su estabilidad metabólica, obteniéndose el aprepitant.

Todas estas modificaciones condujeron a la obtención del aprepitant, que presentó una alta selectividad antagonista hacia los receptores NK1 frente a los otros subtipos,¹³⁰ concretamente

un antagonismo 45000 veces superior hacia el receptor NK1 que hacia el receptor NK2 y 3000 veces superior hacia el receptor NK1 que hacia el NK3.¹² Además, también presentó una afinidad muy baja por los canales de calcio de tipo L, debido a la gran disminución de la basicidad del nitrógeno del anillo de morfolina ($pK_a < 3$). El único estereoisómero activo de los ocho posibles en el aprepitant es el de configuración (2*R*,3*S*) en el anillo de morfolina y configuración (*R*) en la posición bencílica.^{130,132}

III.1.4. Interacción molecular del CP-99,994, el netupitant y el aprepitant con el receptor NK1

Aunque existen estudios sobre la posible relación estructura-actividad de los agonistas y antagonistas de los receptores NK1,¹²⁴ las interacciones precisas que tienen lugar entre ellos no se han podido caracterizar hasta hace poco tiempo, al no conocerse la estructura exacta del receptor NK1, determinada a finales de 2018, como ya se indicó anteriormente.¹²⁵ Esto ha permitido entender mejor las bases moleculares de la selectividad y el reconocimiento del ligando por parte del receptor NK1, lo que supone disponer de una herramienta muy útil para el diseño racional de nuevos antagonistas. Por el momento 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 del receptor a cada uno de ellos.¹²⁴

Estos 3 antagonistas son capaces de originar modificaciones conformacionales en el sitio de unión del receptor NK1, con el consecuente efecto antagonista. Mediante el análisis de las interacciones de los diferentes fragmentos presentes en sus estructuras con el receptor NK1, es posible dilucidar qué elementos son clave para un eficiente antagonismo. Para ello, se ha dividido la estructura de los tres antagonistas en un núcleo central resaltado en celeste y diferentes sustituyentes representados como brazo 1 en morado, brazo 2 en verde, junto con un brazo 3 adicional en naranja en el caso del netupitant y el aprepitant (figura 35).¹²⁴

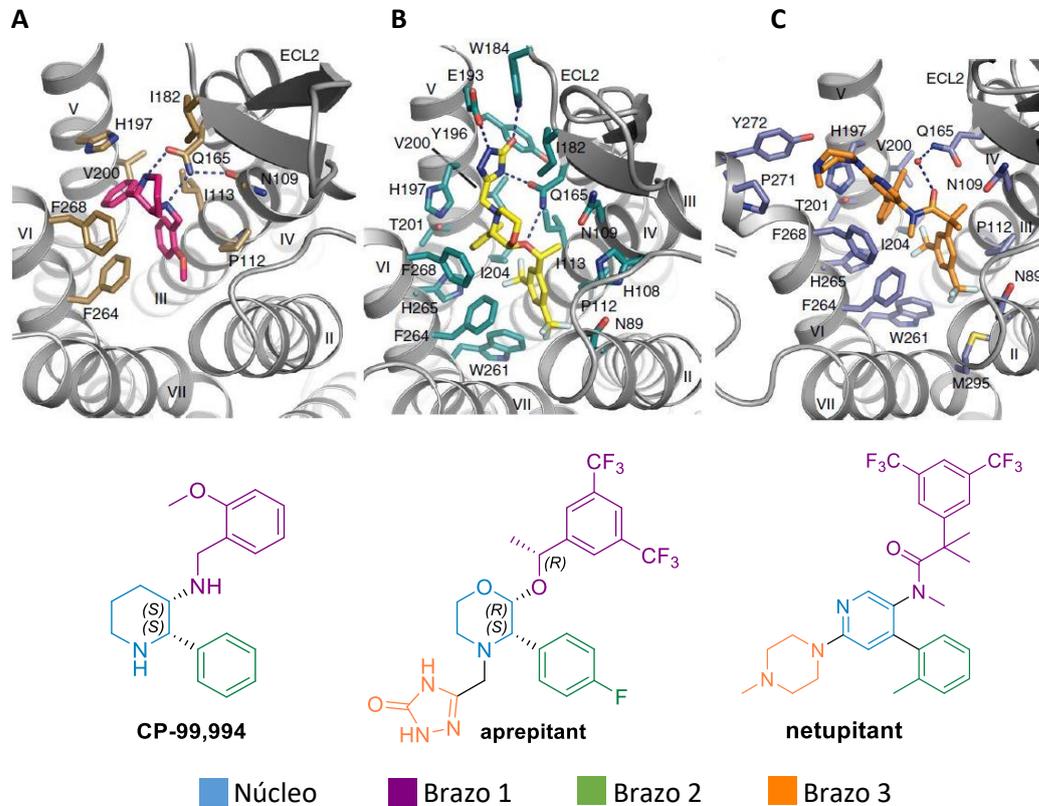


Figura 35. Interacciones de CP-99,994 (A), aprepitant (B) y netupitant (C) con el receptor NK1 (cintas grises). Los residuos del receptor involucrados en la interacción aparecen en naranja (A), celeste (B) y lila (C). Las estructuras de los antagonistas en el interior del receptor aparecen en rosa (A), amarillo (B) y naranja (C). Las interacciones por formación de puentes de hidrógeno aparecen como líneas discontinuas.

Como puede observarse en la figura 35, en todos los casos, el anillo central, el brazo 1 y el brazo 2 interactúan con diferentes aminoácidos del receptor mediante uniones de tipo hidrofóbico y, además, el brazo 1, forma puentes de hidrógeno. En el caso del aprepitant, el metilo de la posición bencílica interactúa adicionalmente con un pequeño sub-bolsillo hidrófobo presente en el receptor. Una diferencia importante entre estos antagonistas es el brazo 3, ausente en CP-99,994 y que, sin embargo, 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, mientras que la presencia de los brazos 1 y 2 como sustituyentes del anillo central de 6 miembros es necesaria para la interacción de los antagonistas con el receptor NK1, la presencia del tercer brazo no parece fundamental para la actividad antagonista, pero proporciona 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.¹²⁴

III.1.5. Objetivos

Basándonos en los antecedentes que acabamos de describir y con el fin de encontrar nuevos antagonistas del receptor NK1 de interés terapéutico, se han propuesto los siguientes objetivos específicos de este capítulo:

1. Síntesis de una quimioteca de análogos del aprepitant manteniendo las zonas estructurales que son clave para su actividad y utilizando hidratos de carbono como plataforma quiral de partida. En el diseño de estos análogos, se han introducido los siguientes elementos de diversidad (figura 36):
 - 1.1. Grupos hidroxilos del anillo de piranosa (de L-arabinosa o D-glucosa) diferentemente protegidos, como puntos de modulación estructural tanto de la actividad como del balance lipófilo/hidrófilo.
 - 1.2. Naturaleza del sustituyente en C-3: hidroxilo o amino.

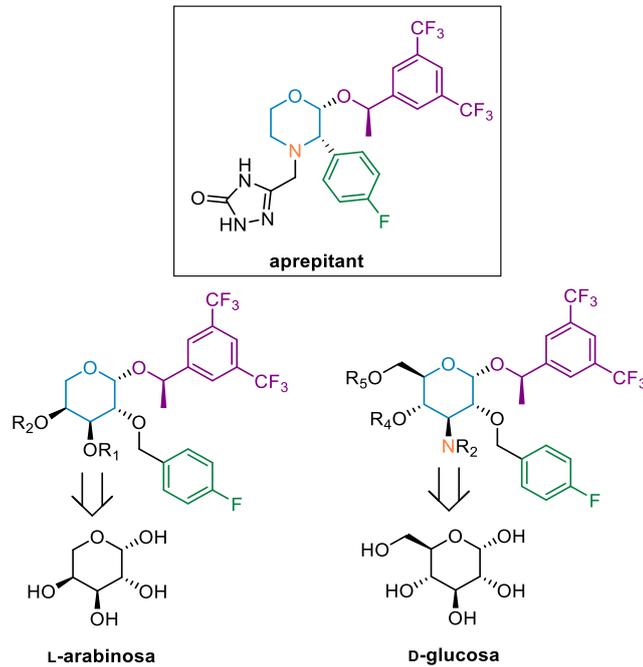


Figura 36. Estructura general de los análogos del aprepitant propuestos, a partir de los carbohidratos L-arabinosa y D-glucosa.

2. Determinación de la actividad biológica de los análogos del aprepitant sintetizados. En concreto se pretende estudiar:
 - 2.1. La actividad citotóxica y selectividad *in vitro* en células tumorales de pulmón y de neuroblastoma, mediante estudios de viabilidad celular
 - 2.2. La actividad como antagonista del receptor NK1.
 - 2.3. La afinidad por el receptor NK1, en relación con su capacidad para desplazar la sustancia P.
3. Realización de cálculos de "Molecular Docking" de los análogos del aprepitant sintetizados, con objeto de predecir *in silico* las interacciones moleculares significativas entre estos análogos y el sitio de interacción del receptor NK1.

III.2. Síntesis de análogos del aprepitant: resultados y discusión

La presencia de tres centros estereogénicos en la estructura del aprepitant constituye una de las principales dificultades que presenta su preparación, ya que implica el desarrollo de una ruta sintética estereoselectiva, que suele ser compleja y de alto coste. Para simplificar esta tarea, en el diseño de nuestros análogos del aprepitant, se ha propuesto el uso de hidratos de carbono como plataforma quiral de partida. De la amplia diversidad de hidratos de carbono comercialmente disponibles, se seleccionaron L-arabinosa, D-glucosa y D-galactosa, por presentar la estereoquímica adecuada en C-2. Además de la útil información quiral que portan, los hidratos de carbono son una materia prima barata (1,26 €/g de L-arabinosa, 0,07 €/g de D-glucosa, y 0,45 €/g de D-galactosa), renovable y fácilmente asequible¹³³ (figura 37).

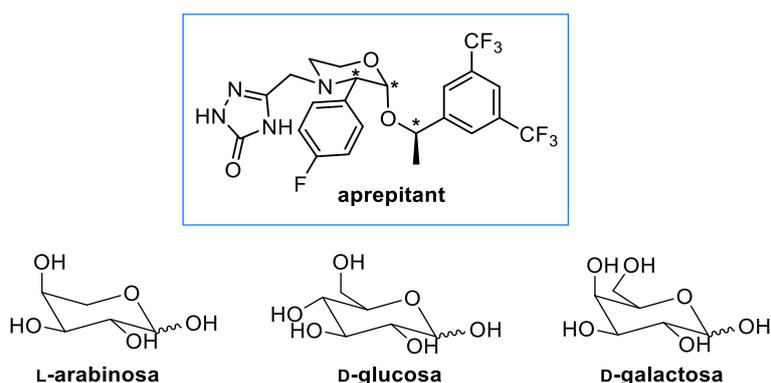


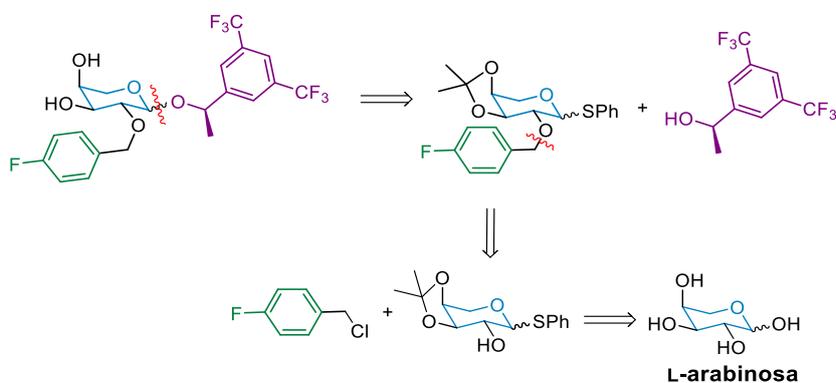
Figura 37. Estructuras de los carbohidratos L-arabinosa, D-glucosa, D-galactosa y del aprepitant.

En todos ellos, se propone el esqueleto de piranosa como isómero del anillo de morfolina presente en el aprepitant. Las diferencias estructurales entre los distintos carbohidratos nos permitirán estudiar la influencia que tiene la introducción de sustituyentes en las posiciones 4 y 5 del anillo de piranosa y la diferente quiralidad de C-4, sobre la actividad (figura 37).

En esta tesis doctoral nos centraremos concretamente en la síntesis de los análogos derivados de L-arabinosa y de D-glucosa, mientras que el estudio de los derivados de D-galactosa forma parte de otra tesis doctoral desarrollada también en nuestro grupo de investigación.

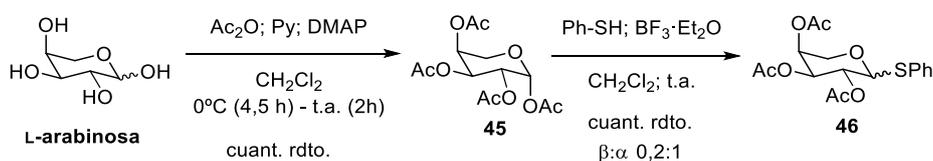
III.2.1. Análogos del aprepitant derivados de L-arabinosa

Para la síntesis de los derivados de L-arabinosa, se propone el análisis retrosintético que se muestra en el esquema 22.



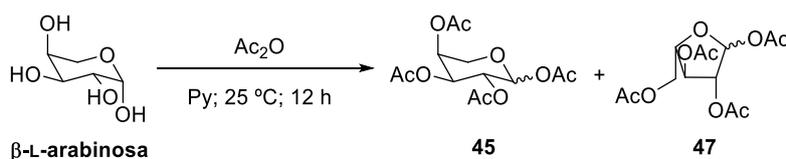
Esquema 22. Análisis retrosintético de los análogos del aprepitant derivados de L-arabinosa.

El tratamiento de L-arabinosa con anhídrido acético, en presencia de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador y piridina como base en CH_2Cl_2 , rinde cuantitativamente el derivado peracetilado **45** que se utiliza directamente en la siguiente reacción sin necesidad de purificación previa (esquema 23).



Esquema 23. Síntesis de los intermedios **45** y **46** de los análogos del aprepitant derivados de L-arabinosa.

A pesar de su aparente simplicidad, en esta reacción es especialmente importante el control de la temperatura, 4,5 horas a 0 °C y 2 horas a temperatura ambiente, para evitar la obtención de una mezcla de reacción compleja, como resultado de la formación de los derivados de furanosa **47** junto con los derivados de piranosa **45** (esquema 24). Por su parte, la presencia de DMAP no sólo incrementa el rendimiento, sino que también favorece la regioselectividad deseada.¹³⁴



Esquema 24. Regioisómeros posibles en la peracetilación de L-arabinosa.¹³⁴

Los resultados obtenidos al intentar escalar esta reacción, utilizando 10 g de L-arabinosa como producto de partida no fueron satisfactorios, observándose mediante ¹H-RMN en la zona de los grupos acetatos (2,18-2,00 ppm), la aparición de otras señales por formación de compuestos no deseados (figura 38-A). Cuando la reacción se lleva a cabo sobre 2 g de L-arabinosa, disminuyen significativamente estas señales (figura 38-B).

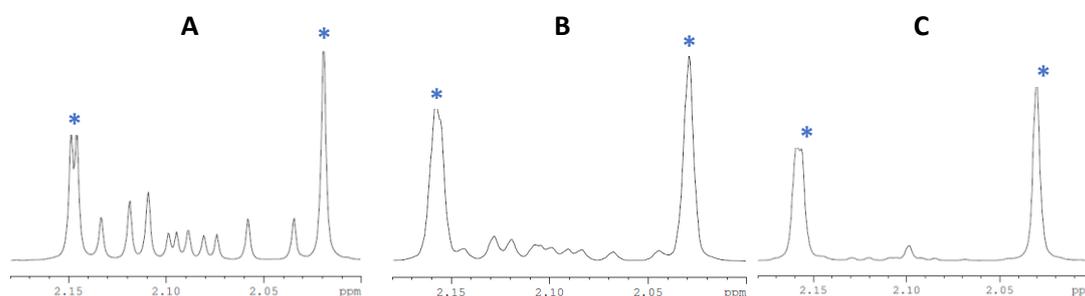
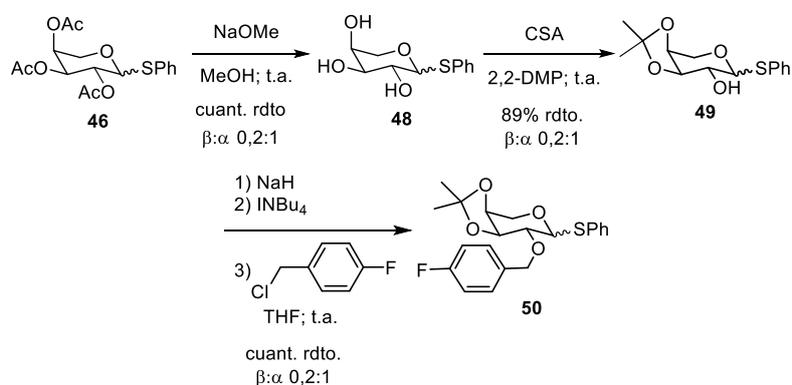


Figura 38. Fragmentos de espectros de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de la obtención de L-arabinosa peracetilada **45** a 25 °C a gran escala (10 g) (A), a 25 °C a menor escala (2 g)¹³⁵ (B) y con control de la temperatura (4,5 horas a 0 °C y 2 horas a t.a.) a menor escala (2 g)¹³⁴ (C). Con un asterisco se indican las señales correspondientes a los protones de los grupos acetilo de **45**.

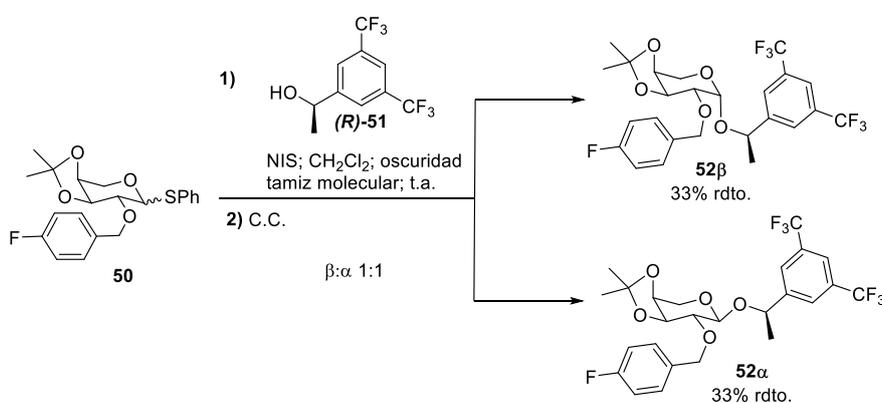
La tioglicosilación del crudo de **45** obtenido a 25 °C (figura 38-B), sin purificación previa, con tiofenol y trifluoruro de boro eterato en CH_2Cl_2 ¹³⁶ (esquema 23) rindió una mezcla compleja de productos, muy difíciles de separar por cromatografía en columna de gel de sílice, obteniéndose el feniltioglicósido peracetilado **46** con rendimiento de sólo el 50%. Cuando se llevó a cabo la tioglicosilación del crudo obtenido a baja temperatura (figura 38-C),¹³⁴ en las mismas condiciones anteriores, se obtuvo el feniltioglicósido peracetilado **46** con rendimiento cuantitativo (esquema 23).

La desacetilación de Zemplen de **46**, mediante tratamiento con una cantidad catalítica de metóxido de sodio en metanol, rindió el feniltioglicósido trihidroxilado **48** con rendimiento cuantitativo, utilizado directamente en la siguiente reacción sin necesidad de purificación. El tratamiento de **48** con 2,2-dimetoxipropano (2,2-DMP) y ácido canforsulfónico (CSA) condujo al 3,4-isopropiliden derivado **49** de manera regioselectiva con un rendimiento del 89%. El posterior tratamiento con cloruro de *p*-fluorobencilo, en presencia de NaH e INBu_4 en THF, nos permitió obtener cuantitativamente el derivado *p*-fluorobencilado **50** (esquema 25).¹³⁶



Esquema 25. Síntesis del derivado *p*-fluorobencilado **50**.

La glicosilación del feniltioglicósido **50**, con el alcohol quiral comercial (*R*)-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etan-1-ol, (*R*)-**51**, condujo a los que ya pueden considerarse como primeros análogos del aprepitant **52 β** y **52 α** , siguiendo dos metodologías sintéticas diferentes. La primera aproximación (metodología A), consiste en la glicosilación directa del feniltioglicósido **50**, utilizando *N*-yodosuccinimida (NIS). De este modo, se obtienen los derivados **52 β** y **52 α** en proporción 1:1 con un rendimiento total del 66% (esquema 26).



Esquema 26. Síntesis de los análogos del aprepitant **52 β** y **52 α** derivados de L-arabinosa – Metodología A.

La separación de ambos diastereoisómeros **52β** y **52α** mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con hexano:acetona 50:1, rinde el anómero **52β** puro. Posteriormente, la mezcla del anómero **52α** con el alcohol de partida (**R**)-**51** se separa con hexano:AcOEt 20:1, obteniéndose así el anómero **52α** puro.

En la tabla 5 se indican los resultados con las diferentes condiciones de reacción utilizadas para la optimización del proceso, consiguiendo incrementar el rendimiento global original del 23% al 66%. Utilizando las condiciones descritas en la literatura (tabla 5, entrada 1),¹³⁷ mediante adición de trimetilsilil trifluorometanosulfonato (TMSOTf) (15 mol%) a 0°C sobre una disolución del feniltioglicósido **50** (100 mol%), el alcohol (**R**)-**51** (110 mol%) y NIS (120 mol%) en CH₂Cl₂ en atmósfera de argón, y manteniéndose en agitación a t.a. hasta la total desaparición del producto de partida **50**, se obtuvo un rendimiento del 33%, considerablemente inferior a los descritos¹³⁷ con otros derivados que oscilaban entre el 60% y el 85%. La adición de tamiz molecular activado de 4 Å (tabla 5, entrada 2), para garantizar las condiciones anhidras, no mejoró el rendimiento de la reacción. El bajo rendimiento obtenido en ambos casos se atribuye a la formación de un subproducto, en una proporción similar a la del producto deseado **52β** y **52α**. Cuando la reacción se llevó a cabo en ausencia de TMSOTf como catalizador, con el fin de evitar la posible degradación del producto de partida por la acción del ácido de Lewis, y en oscuridad, para evitar que la luz diera lugar a la reacción radicalaria descrita para la *N*-bromosuccinimida (NBS),¹³⁸ que consiste en la bromación del sustrato y obtención de succinimida como subproducto, se obtuvieron rendimientos similares a los anteriores (tabla 5, entrada 3).

Cabe destacar que, de acuerdo con los resultados obtenidos en estos ensayos, se deduce que la presencia del catalizador ácido no resulta necesaria en la reacción, por lo que los siguientes ensayos se realizaron en ausencia de catalizador, manteniendo el tamiz molecular de 4 Å, y en ausencia de luz.

Tabla 5. Condiciones de glicosilación del feniltioglicósido **50**.

Entrada	NXS	Tamiz molecular	TMSOTf	Luz/ Oscuridad	t ^a	mol% (<i>R</i>)-51	mol% NXS	rdto. ^d
1 ^a	NIS	No	Sí	Luz	t.a.	110%	120%	33%
2 ^a	NIS	Sí	Sí	Luz	t.a.	110%	120%	33%
3 ^a	NIS	Sí	No	Oscuridad	t.a.	110%	120%	32%
4 ^b	NIS	Sí	No	Oscuridad	t.a.	110%	120%	27%
5 ^b	NIS	Sí	No	Oscuridad	- 40 °C	110%	120%	23%
6 ^b	NBS	Sí	No	Oscuridad	t.a.	110%	120%	---
7 ^c	NIS	Sí	No	Oscuridad	t.a.	200%	100%	66%

^aDisolución del feniltioglicósido **50**, el alcohol (*R*)-51, y NIS a la vez. ^bAdición total de NXS sobre disolución del feniltioglicósido **50** y el alcohol (*R*)-51. ^cAdición fraccionada de NIS sobre la disolución del feniltioglicósido **50** y el alcohol (*R*)-51. ^dProporción β:α 1:1.

El análisis de los espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN y espectrometría de masas nos permitió proponer la estructura del *N*-glicosilderivado representada en la figura 39 para el subproducto **53** formado en estos ensayos.

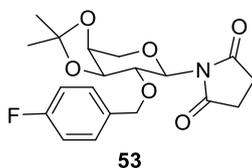


Figura 39. Estructura del subproducto formado en la reacción de glicosilación del feniltioglicósido **50** con el alcohol (*R*)-51 en presencia de NIS.

El análisis del espectro de ¹H-RMN del subproducto **53** muestra diferencias significativas frente al feniltioglicósido **50** de partida (figura 40): *i*) desaparecen las señales (*a*) correspondientes a los 5 protones aromáticos del feniltioglicósido; *ii*) se observa un desplazamiento hacia campo

más bajo del protón anomérico H_1 (*b*) junto con el resto de los protones del anillo de piranosa; y *iii*) aparecen dos nuevos tripletes parcialmente solapados (*c*) para 4 protones que asignamos a los dos metilenos del anillo de succinimida presente en **53**.

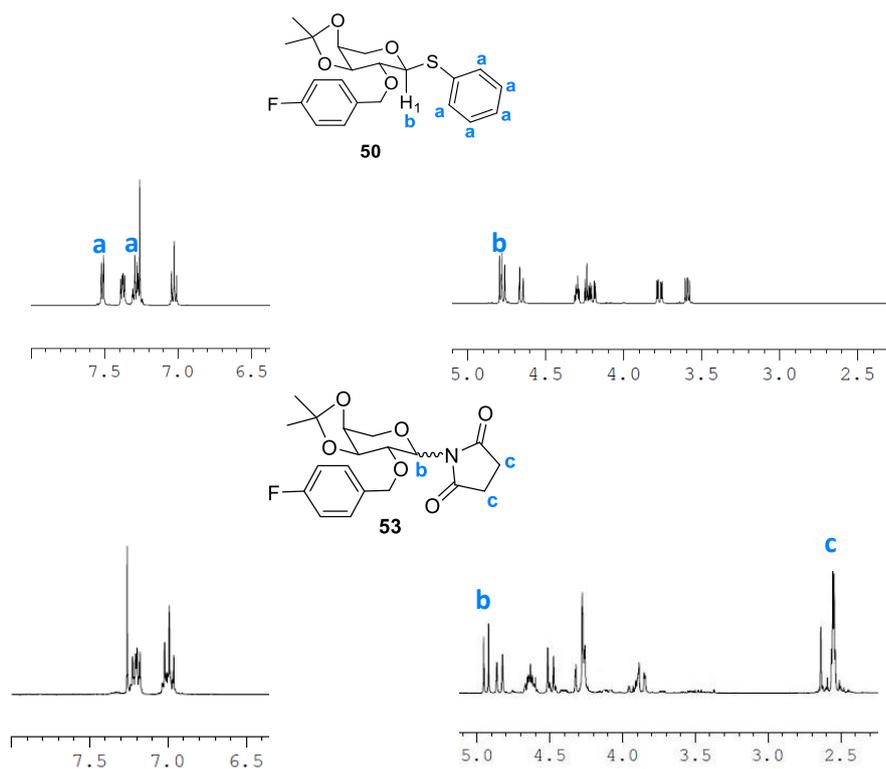


Figura 40. Fragmentos de los espectros de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del feniltioglicósido **50** y del *N*-glicosil succinimido derivado **53**.

Con respecto al espectro de ^{13}C -RMN de **53** (figura 41): *i*) desaparecen las señales (*a*) correspondientes a los carbonos del grupo fenilo de la posición anomérica presentes en **50**; *ii*) aparece una señal a 176,3 ppm (*b*) característica de los carbonos carbonílicos del anillo de succinimida; y *iii*) aparece la señal a 28,0 ppm (*d*) correspondiente a los carbonos de los

metilenos del anillo de succinimida, que solapa con la señal del carbono de uno de los metilos del grupo isopropilo (*c*).

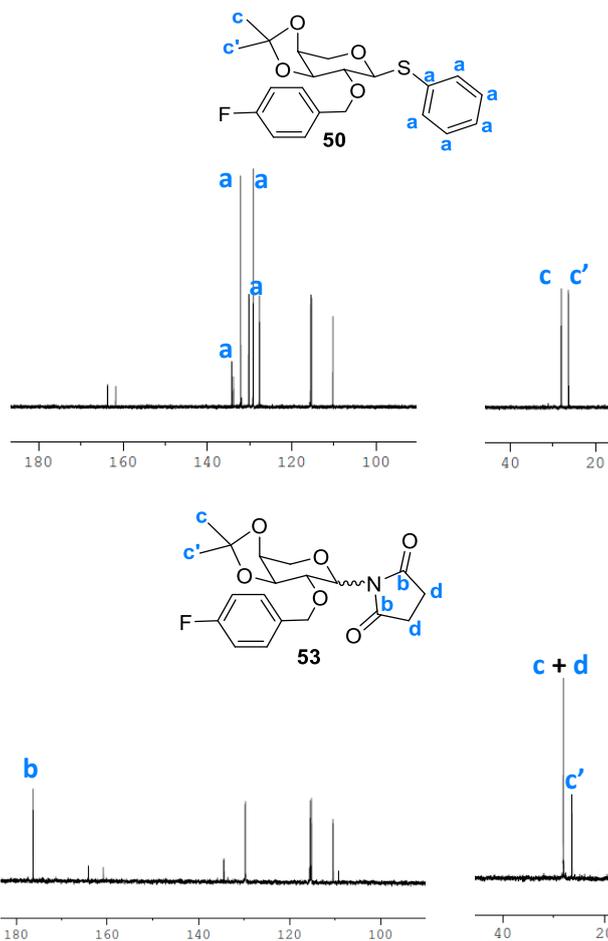
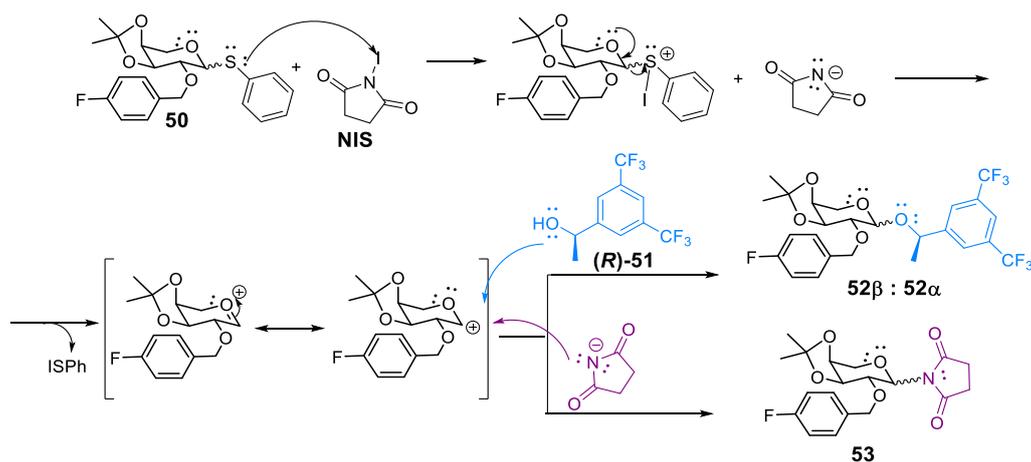


Figura 41. Fragmentos de los espectros de ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3) del feniltioglicósido **50** y del *N*-glicosil succinimido derivado **53**.

El espectro de masas de alta resolución confirmó que efectivamente la masa del producto formado **53** corresponde con la de la estructura propuesta de *N*-succinimido derivado. La

formación de este derivado **53** se puede justificar como resultado del ataque nucleofílico de la NIS sobre el catión oxonio intermedio formado, que compite con el ataque del alcohol (**R**)-**51**, para dar el glicósido deseado **52β:52α** (esquema 27).¹³⁷

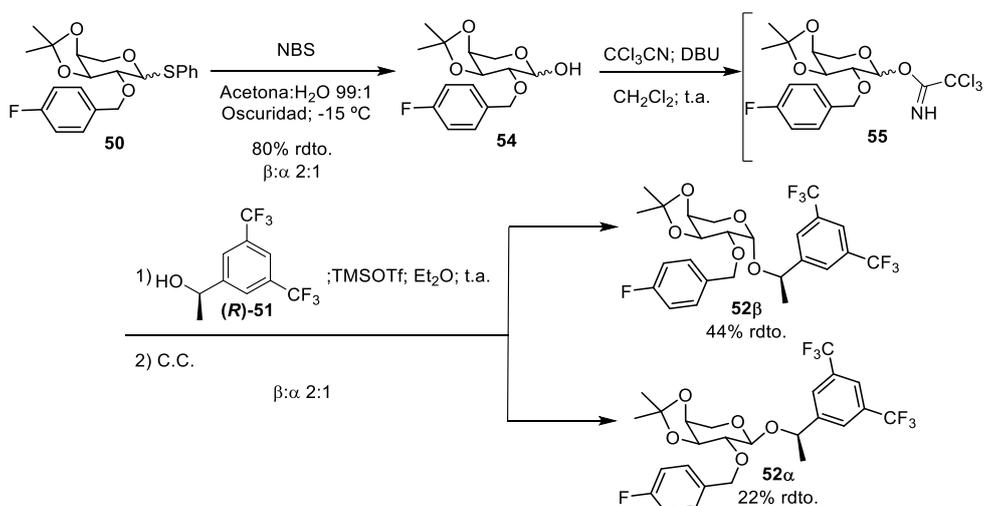


Esquema 27. Mecanismo propuesto de formación del *N*-glicosil succinimido derivado **53**.

Con objeto de evitar la formación de **53** se llevaron a cabo diversas modificaciones de las condiciones de reacción. La modificación exclusiva del orden de reacción de los reactivos (tabla 5, entrada 4) adicionando NIS sobre la disolución del feniltioglicósido **50** y el alcohol (**R**)-**51** en CH₂Cl₂, no condujo a un incremento significativo en el rendimiento del glicósido (27% rdto.). La disminución de la temperatura de reacción a -40° C, manteniendo el orden anterior de adición (tabla 5, entrada 5), tampoco condujo a ninguna mejora (23% rdto.). En realidad, la reacción no tiene lugar a bajas temperaturas y es necesario dejar subir la temperatura hasta t.a. Cuando se sustituyó el promotor NIS por NBS (tabla 5, entrada 6), la reacción tuvo lugar de forma casi instantánea, rindiendo exclusivamente el *N*-glicosil succinimido derivado **53**. Finalmente, se aumentó el alcohol de partida (tabla 5, entrada 7), adicionando NIS (50 mol%) a 0° C sobre una disolución del feniltioglicósido **50** (100 mol%) y el alcohol (**R**)-**51** (200 mol %) en CH₂Cl₂, y se dejó

reaccionar a temperatura ambiente. Cuando la reacción dejó de avanzar, se añadió de nuevo NIS (50 mol%) a 0° C y se dejó de nuevo reaccionar a temperatura ambiente, consumiéndose así el producto de partida **50**. De esta forma se obtuvo el producto deseado **52β:52α** con un rendimiento del 66% y no se observó la formación de **53**.

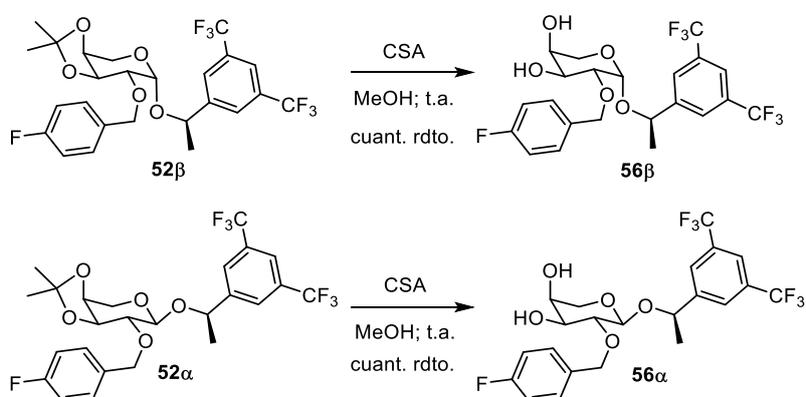
A la vista de los resultados obtenidos decidimos aplicar otra de las metodologías descritas en la literatura que han proporcionado mejores resultados en la síntesis de moléculas complejas, el denominado “método de glicosilación del tricloroacetimidato” desarrollado por Schimidt y col. en 1980.¹³⁹ Los tricloroacetimidatos *O*-glicosilados resultan ser unos excelentes dadores de glicosilo, son fáciles de preparar y se obtienen en general con buenos rendimientos, por lo que para su preparación procedimos en primer lugar a la hidrólisis selectiva del feniltioglicósido **50** con NBS en acetona:H₂O 99:1, para obtener el alcohol **54** que, por tratamiento con tricloroacetimidato y DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno) en CH₂Cl₂, rindió el tricloroacetimidato deseado **55**, que se utilizó directamente en la siguiente reacción sin purificación previa. La reacción del tricloroacetimidato **55** con el alcohol (*R*)-**51** y TMSOTf en Et₂O condujo a los glicósidos deseados **52β** y **52α**, en una proporción β:α 2:1, con un rendimiento total del 66% (esquema 28).¹³⁶ La presencia de tamiz molecular activado de 4 Å¹⁴⁰ no mejoró los resultados obtenidos.



Esquema 28. Síntesis de los análogos del aprepitant **52β** y **52α** derivados de L-arabinosa – Metodología sintética B.

Como ya se comentó anteriormente, para la purificación y separación de ambos anómeros **52β** y **52α**, se realizaron dos columnas cromatográficas. En la primera (eluyente hexano:acetona 50:1) se obtuvo el anómero **52β** puro, y en la segunda columna (eluyente hexano:AcOEt 20:1) se consiguió separar el alcohol **(R)-51** del anómero **52α**. El rendimiento total resultó ser del 66% al igual que en la metodología anterior, pero en este caso se obtuvo mayoritariamente el anómero **52β** que es el que presenta una estereoquímica similar a la del aprepitant en el carbono C-1 del anillo de piranosa.

La hidrólisis del acetal por tratamiento de **52β** y **52α** con CSA en metanol, rindió cuantitativamente los dioles **56β** y **56α** que se pueden considerar como unos nuevos análogos con mayor carácter hidrófilo (esquema 29).¹³⁶

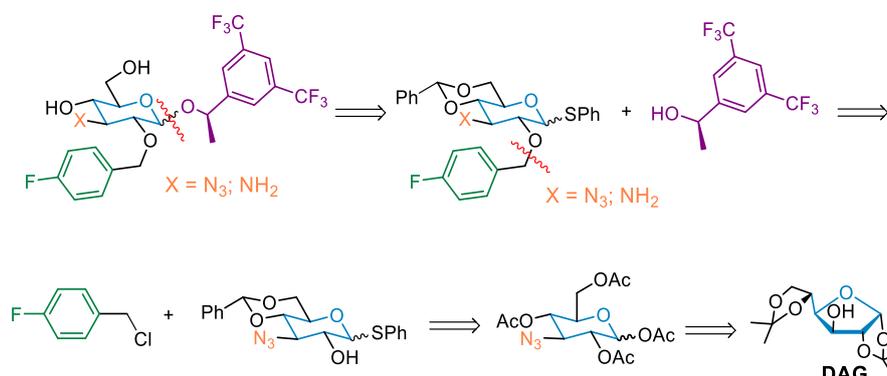


Esquema 29. Síntesis de los análogos del aprepitant derivados de L-arabinosa con mayor carácter hidrofílico **56β** y **56α**.

De esta forma, se han obtenido los análogos del aprepitant **52β** y **52α** y sus derivados más hidrofílicos **56β** y **56α** con un rendimiento global del 47% en ambos casos, calculados a partir de L-arabinosa mediante una ruta sintética compuesta por 7 y 8 etapas respectivamente.

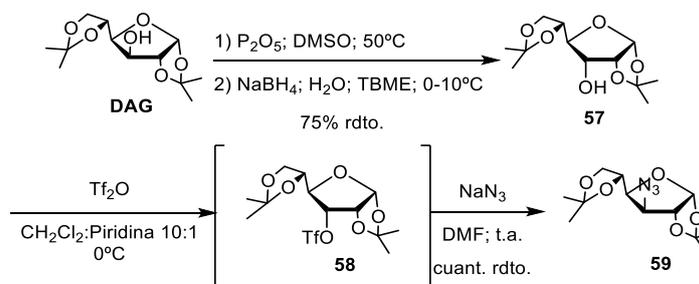
III.2.2. Análogos del aprepitant derivados de D-glucosa

Para la obtención de glicosilderivados con un grupo amino en lugar de hidroxilo en la posición 3 del anillo de piranosa se seleccionó la diacetón-D-glucosa (DAG), un derivado de D-glucosa en forma de furanosa, comercial y de bajo coste, como sustrato de partida, de acuerdo con el esquema retrosintético indicado en el esquema 30. La presencia de un único grupo hidroxilo libre en la posición 3 de la DAG facilita su sustitución por la correspondiente función nitrogenada como veremos a continuación.



Esquema 30. Análisis retrosintético de los análogos del aprepitant derivados de D-glucosa.

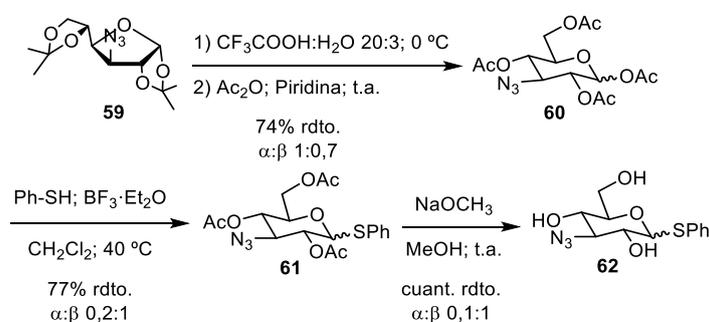
La oxidación de la DAG con P_2O_5 en dimetilsulfóxido (DMSO) a $50^\circ C$, seguida de una reducción con $NaBH_4$ en agua y TBME a $0-10^\circ C$, condujo al epímero en C-3, de configuración *alo* **57** con un rendimiento del 75% (esquema 31).^{141,142} El tratamiento posterior con anhídrido trifluorometanosulfónico (Tf_2O), en una mezcla CH_2Cl_2 :Piridina 10:1, a $0^\circ C$, rindió el triflato **58**, que, por ser relativamente inestable, se hizo reaccionar directamente con NaN_3 en DMF a temperatura ambiente. Se obtuvo así, mediante sustitución nucleofílica, la azida **59** con un rendimiento cuantitativo y con inversión de la configuración en C-3 (esquema 31).^{143,144}



Esquema 31. Síntesis del 3-azido derivado de la DAG, **59**.

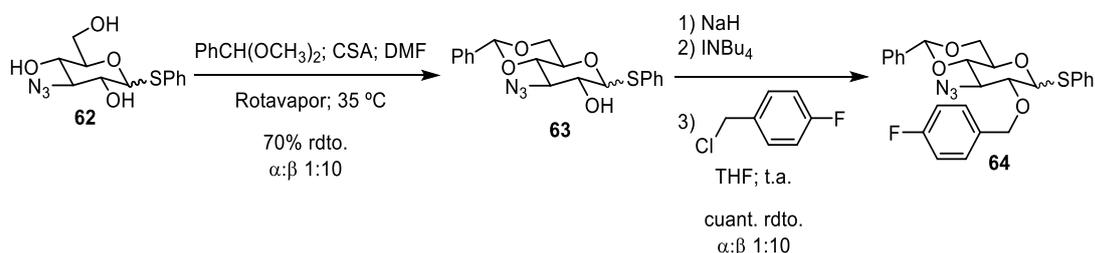
Cuando la azida **59** se sometió a hidrólisis ácida con una mezcla de CF_3COOH : H_2O 20:3 a $0^\circ C$, y posterior acetilación con anhídrido acético en piridina, a temperatura ambiente, se obtuvo el

correspondiente derivado de piranosa peracetilado **60** con un rendimiento del 74%.¹⁴⁵ La tioglicosilación de **60** mediante tratamiento con tiofenol y trifluoruro de boro eterato en CH₂Cl₂ a 40 °C, condujo al feniltioglicósido peracetilado **61** con un rendimiento del 77%.¹⁴⁵ A diferencia de los antecedentes descritos en la literatura¹³⁶ con derivados de D-galactosa y de L-arabinosa, en los que la reacción transcurre con buenos rendimientos a temperatura ambiente, en nuestro caso fue necesario calentara 40 °C,¹⁴⁵ para que la reacción se completara. La desacetilación de **61** en condiciones de Zemplen (metóxido de sodio en metanol a temperatura ambiente) rindió cuantitativamente el derivado trihidroxilado **62** (esquema 32).¹³⁶



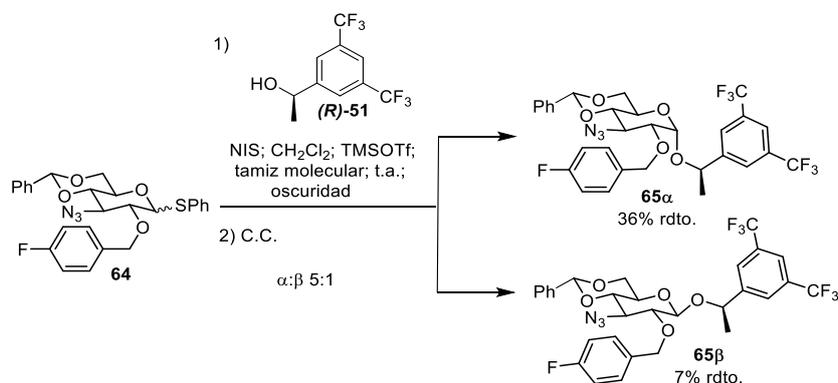
Esquema 32. Síntesis del tioglicósido **62**.

El tratamiento de **62** con dimetoximetil benceno y CSA en DMF, en el rotavapor a 35 °C, permite la protección selectiva de los hidroxilos de las posiciones 4 y 6 mediante la formación del bencilidenacetal **63** con un rendimiento del 70%, que se hace reaccionar con cloruro de *p*-fluorobencilo, en presencia de NaH y INBu₄ en THF a temperatura ambiente, rindiendo cuantitativamente el *p*-fluorobencilderivado **64** (esquema 33).¹³⁶



Esquema 33. Síntesis del *p*-fluorobecilderivado **64**.

Con objeto de llevar a cabo la glicosilación de **64** mediante el método del tricloroacetimidato de Schmidt, se procedió a la hidrólisis del tioglicósido por tratamiento con NBS en acetona:H₂O 99:1 a -15° C,¹³⁶ obteniéndose una mezcla compleja de difícil purificación y muy bajo rendimiento, por lo que se descartó esta metodología. Afortunadamente, la glicosilación del feniltioglicósido **64** con NIS y el alcohol (*R*)-**51**, condujo a los correspondientes glicósidos **65 α** y **65 β** en proporción $\alpha:\beta$ 5:1 con un rendimiento total del 43% (esquema 34).



Esquema 34. Síntesis de los análogos del aprepitant **65 α** y **65 β** derivados de D-glucosa.

En este caso, a diferencia del tioglicósido de L-arabinosa **50** anteriormente mencionado, para que la reacción de glicosilación de **64** tenga lugar resulta ser imprescindible la presencia de TMSOTf como catalizador ácido. En cuanto a la adición de NIS, tanto el rendimiento de ambos

glicósidos como la proporción del anómero α obtenidos fueron superiores cuando la adición se lleva a cabo en una sola vez en lugar de hacerlo en dos porciones (43% rdto. vs 34% rdto. y proporción $\alpha:\beta$: 1:0,2 y 1:0,4, respectivamente).

Por último, decidimos confirmar mediante RMN la disposición ecuatorial del grupo fenilo en el carbono del bencilidenacetal en los glicósidos **65 α** y **65 β** . Para ello, se realizó un experimento ^1H -RMN NOE del derivado **65 α** , irradiando el protón del acetal H_A y determinando cuales son los protones del resto del anillo que sufren una disminución en su intensidad por encontrarse próximos a él en el espacio (figura 42). Si el fenilo se dispone en posición ecuatorial (opción A – figura 42), el protón H_A se encontrará próximo a un protón del anillo aromático H_{ar} y a los protones del anillo de piranosa H_4 y H_6 . Por el contrario, si el fenilo se dispone en posición axial (opción B – Figura 42), el protón H_A se sitúa espacialmente en las proximidades de un protón del anillo aromático H_{ar} y con el protón del anillo de piranosa H_3 .

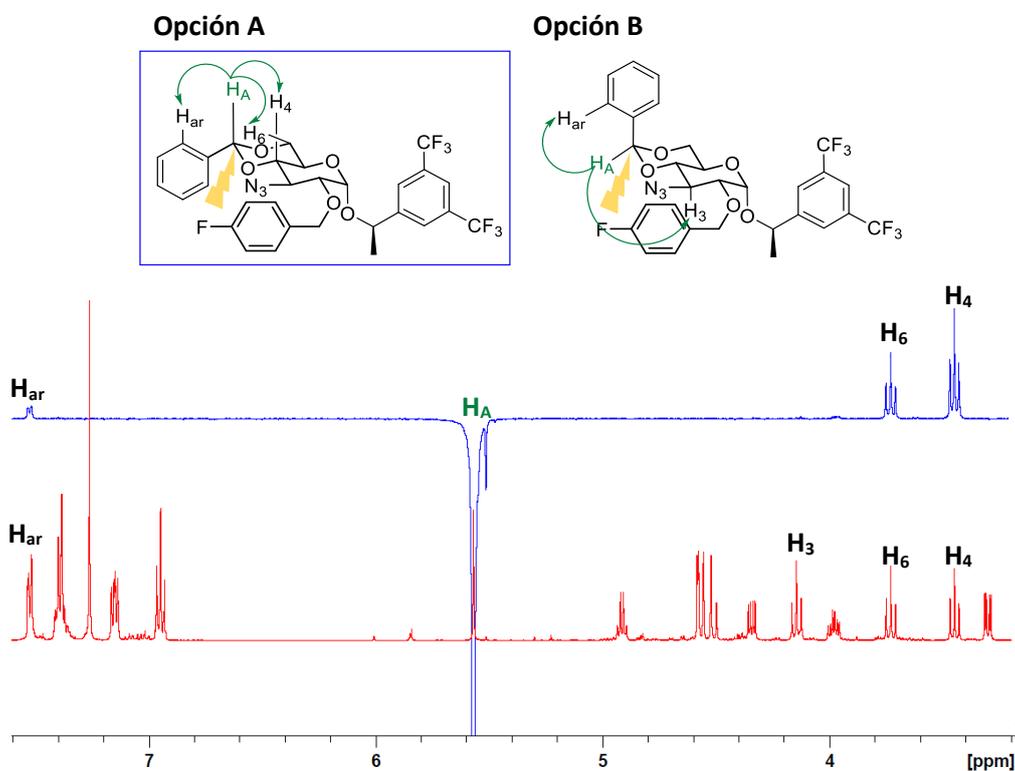


Figura 42. Espectros de ^1H -RMN NOE (azul) y de ^1H -RMN (rojo) de 500 MHz de **65 α** . En verde se indica el protón H_A sobre el que se ha irradiado para la adquisición del espectro.

Como puede observarse en la figura 42, el acoplamiento del protón H_A con los protones H_4 y H_6 nos confirma que el fenilo del grupo bencilidenacetal en el glicósido **65 α** se dispone en posición ecuatorial (opción A).

Cuando se realizó el ^1H -RMN NOE del glicósido **65 β** (figura 43), irradiando de nuevo el protón H_A , se observó una modificación en la intensidad de las señales de los protones H_4 , H_6 , y H_2 , confirmando que el fenilo del grupo bencilidenacetal del derivado **65 β** también se dispone en posición ecuatorial (opción A).

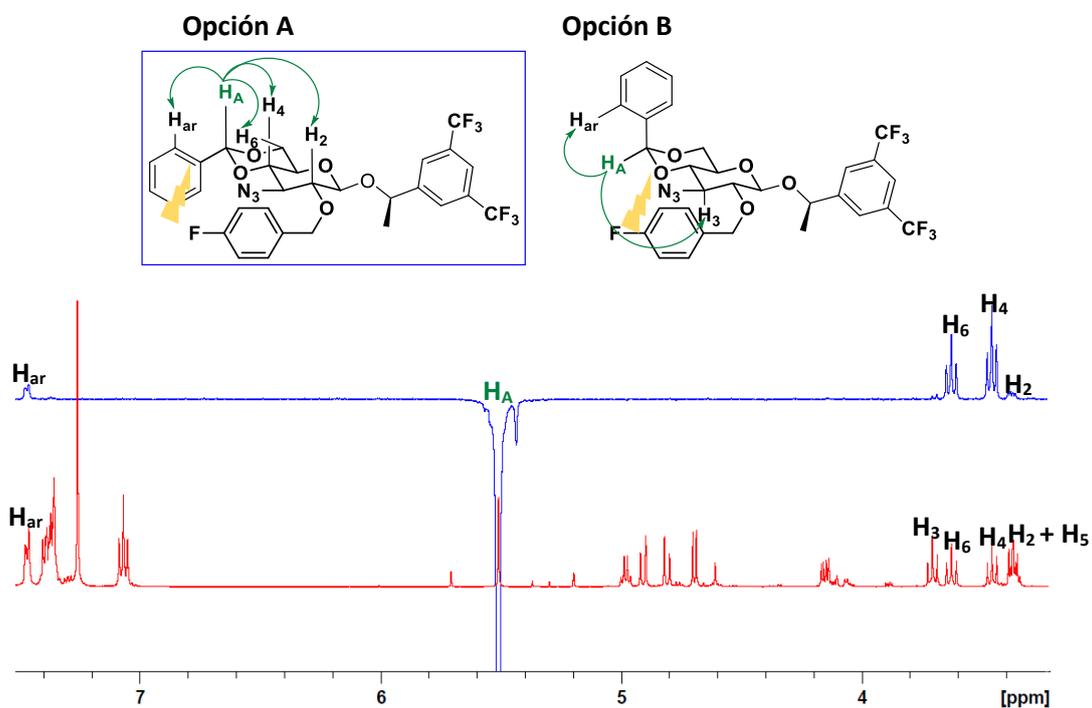
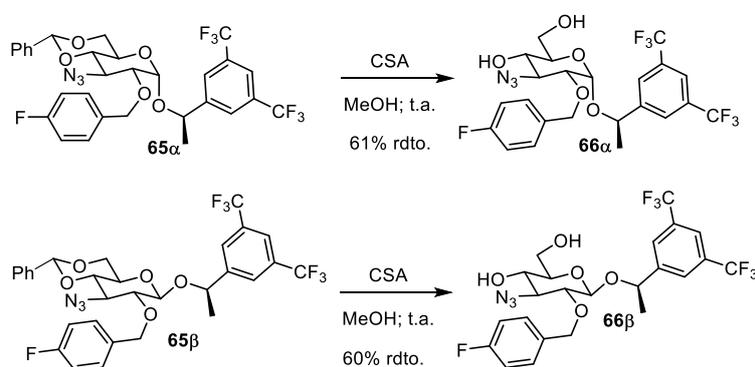


Figura 43. Espectros de ^1H -RMN NOE (azul) y de ^1H -RMN (rojo) de 500 MHz de **65 β** . En verde se indica el protón H_A sobre el que se ha irradiado para la adquisición del espectro.

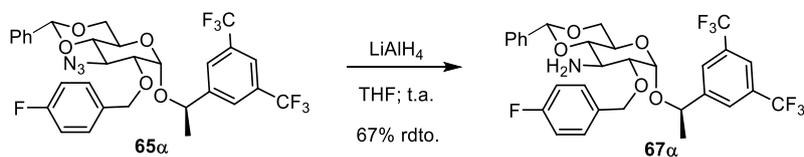
Por último, la metanolisis del acetal de ambos glicósidos **65 α** y **65 β** con CSA en metanol, condujo a los dioles **66 α** y **66 β** con rendimientos del 61% y del 60%, respectivamente (esquema 35).¹³⁶



Esquema 35. Síntesis de los derivados dihidroxilados **66 α** y **66 β** .

En estos derivados, la presencia del grupo azida en la posición 3 del anillo de piranosa, brinda la posibilidad de incorporar un anillo nitrogenado como isótero del anillo de triazolona presente en el aprepitant. Para ello, se han utilizado diferentes condiciones de reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen (Click Chemistry) con CuSO_4 y ácido ascórbico como catalizadores, con diferentes alquinos, disolventes y temperaturas, sin resultados positivos. En general se recupera el producto de partida inalterado o productos de degradación cuando la reacción se lleva a cabo a altas temperaturas. Debido a la limitación de tiempo, no ha sido posible realizar más ensayos en este sentido durante esta tesis doctoral, pero dado su interés en el grupo de investigación se pretende profundizar en el estudio de la optimización de las condiciones idóneas para esta reacción "Click".

Por otra parte, la reducción de la azida con LiAlH_4 en THF, condujo al correspondiente aminoderivado **67 α** con un rendimiento del 67% (esquema 36).



Esquema 36. Síntesis del aminoderivado **67 α** .

La presencia del grupo amino en la posición C-3 de **67 α** confiere a este nuevo análogo una mayor similitud estructural con el aprepitant, que presenta un nitrógeno de tipo amina en el anillo de morfolina. Por otro lado, permite su transformación en diferentes grupos funcionales entre los que se encuentran un anillo de triazolona presente también en el aprepitant.¹³² Este estudio no se incluye entre los objetivos planteados en esta tesis y será llevado a cabo por parte de otros miembros del grupo de investigación.

De esta forma, se han obtenido los azidoderivados análogos del aprepitant **65 α** y **65 β** con un rendimiento global del 13% en una ruta sintética compuesta por 8 etapas, sus derivados más hidrofílicos **66 α** y **66 β** con un rendimiento global del 8% en una ruta sintética compuesta por 9 etapas y, por último, el aminoderivado **67 α** con un rendimiento global del 9% en una ruta sintética compuesta también por 9 etapas, calculados todos estos rendimientos a partir de la DAG como reactivo de partida.

III.3. Estudio de la actividad biológica

III.3.1. Actividad anticancerosa

III.3.1.1. Actividad anticancerosa frente a células tumorales de pulmón

El cáncer de pulmón, junto con el cáncer de mama, es el tipo de cáncer más común, además de ser también la causa de muerte por cáncer más frecuente.¹ Hay 2 tipos de cáncer de pulmón: el cáncer de pulmón de “*células no pequeñas*” (NSCLC), que supone el 85% de los casos de cáncer de pulmón y el cáncer de pulmón de “*células pequeñas*” (SCLC), que supone el 15% restante de los casos, siendo más agresivo que el anterior.³ A pesar de los múltiples ensayos clínicos con agentes quimioterápicos citotóxicos, agentes inhibidores de rutas de señalización de factores de crecimiento y/o radioterapia, en las últimas décadas no se ha producido un incremento significativo de la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón. Estudios encaminados al descubrimiento de nuevos y mejores agentes anticancerosos han puesto de manifiesto la

capacidad que el aprepitant tiene de inhibir, de manera dosis dependiente, el crecimiento de las líneas celulares tumorales de NSCLC y SCLC induciendo muerte celular por apoptosis, asociándose dicha actividad a su carácter antagonista del receptor NK1.¹⁴⁶

Basándonos en estos antecedentes, decidimos estudiar la actividad anticancerosa de los análogos de aprepitant sintetizados frente a células tumorales de pulmón. En colaboración con el grupo de investigación del Dr. Miguel López Lázaro del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, se ha evaluado la citotoxicidad selectiva frente a células tumorales de pulmón de los derivados de L-arabinosa **52β**, **52α**, **56β**, y **56α**, y de los derivados de D-glucosa **65α**, **65β**, **66α**, **66β**, y **67α**. A fin de comparar la actividad de estos derivados con la de un antagonista del receptor NK1 conocido, se ha empleado aprepitant como referencia y como control positivo de citotoxicidad se ha utilizado el conocido fármaco antitumoral cisplatino.

Para evaluar la citotoxicidad selectiva, se ha llevado a cabo el ensayo de viabilidad celular MTT, al igual que en el caso de los análogos del SFN descrito en el capítulo II.

III.3.1.1.1. Resultados del ensayo MTT en células tumorales de pulmón

Para la interpretación de los resultados (figura 44), se representa el porcentaje de viabilidad celular obtenido en el eje de ordenadas frente a las diferentes concentraciones (μM) de los compuestos ensayados en el eje de abscisas, lo que nos permite obtener las curvas de la actividad citotóxica de cada compuesto. A partir de estos datos se ha obtenido el valor de IC_{50} (μM) de los compuestos ensayados tanto en células sanas, HaCaT o MRC-5, como en células tumorales de pulmón A549, lo que ha permitido calcular los I.S. en cada caso, datos recogidos en la tabla 6, donde se ha destacado en amarillo el mejor resultado obtenido.

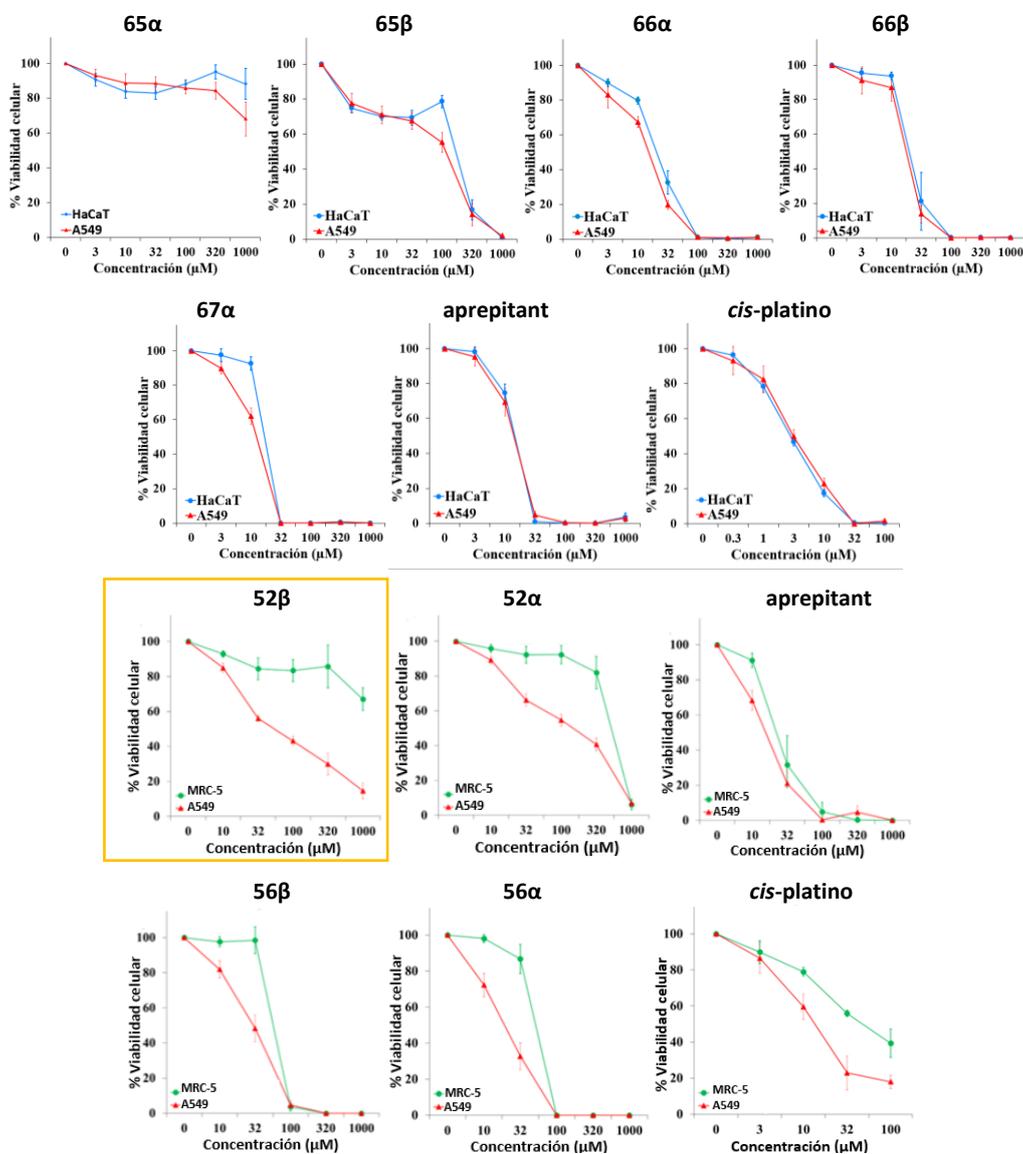
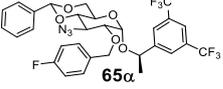
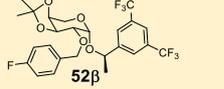
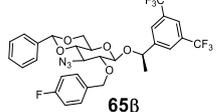
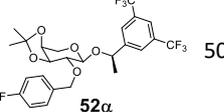
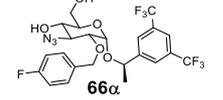
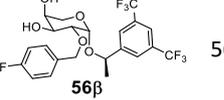
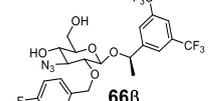
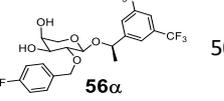
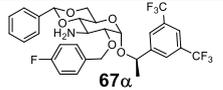
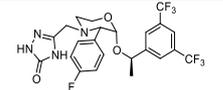
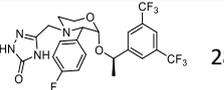
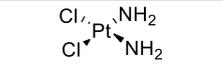
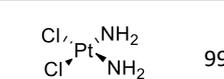


Figura 44. Evaluación actividad citotóxica de los derivados de D-glucosa y L-arabinosa, y de los fármacos aprepitant y cisplatino en células tumorales de pulmón A549 (rojo) y en células sanas de queratinocitos epidérmicos HaCaT (azul) o de pulmón MRC-5 (verde). Todos los datos se expresan como la media \pm SEM.

Tabla 6. Valores de IC₅₀ e I.S. de los derivados de D-glucosa y L-arabinosa, y de los fármacos aprepitant y cisplatino, en células tumorales de pulmón frente a células sanas.

Compuesto	IC ₅₀ ± SEM (μM)			Compuesto	IC ₅₀ ± SEM (μM)		
	Células sanas ^a	Células cancerosas ^c	I.S.		Células sanas ^b	Células cancerosas ^c	I.S.
	HaCaT	A549			MRC-5	A549	
	F.R.	F.R.	---		> 800	59,5 ± 11,4	> 10,7
	172,2±8,7	115,3 ± 25,3	1,7 ± 0,4		503,7±48,7	171,9 ± 47,3	3,9 ± 1,0
	21,6 ± 1,8	15,2 ± 0,7	1,4 ± 0,1		56,2 ± 2,4	31,3 ± 5,6	2,1 ± 0,4
	24,3 ± 6,7	17,9 ± 1,3	1,4 ± 0,4		50,4 ± 3,3	20,8 ± 4,0	2,8 ± 0,7
	16,9 ± 0,5	12,4 ± 0,8	1,4 ± 0,1	---	---	---	---
	14,5 ± 0,8	13,9 ± 1,5	1,1 ± 0,1		28,9 ± 6,8	18,3 ± 3,4	1,5 ± 0,1
aprepitant				aprepitant			
	2,8 ± 0,2	3,4 ± 0,7	0,9 ± 0,2		99,2 ± 37,0	13,5 ± 2,7	8,6 ± 3,9
cisplatino				cisplatino			

^a: células sanas de queratinocitos epidérmicos HaCaT; ^b: células sanas de pulmón MRC-5; ^c: células tumorales de pulmón A549; F.R.: fuera de rango.

Las células sanas HaCaT, empleadas en el ensayo MTT de los derivados de D-glucosa, son un tipo celular que presenta una mayor velocidad de proliferación que las células sanas MRC-5, empleadas en el ensayo MTT de los derivados de L-arabinosa. En este sentido, las células HaCaT pueden verse ligeramente más afectadas por los efectos citotóxicos de los compuestos, pero proporcionan un perfil de selectividad más preciso, al tener una velocidad de proliferación más parecida a la de las células tumorales. Esto justifica la pequeña diferencia en los valores de I.S. obtenidos en el ensayo de MTT del aprepitant con unas y otras células sanas. Sin embargo, las diferencias entre los I.S. de los derivados de D-glucosa y de L-arabinosa son considerablemente mayores, como veremos más adelante, por lo que no se pueden atribuir a que se hayan utilizado células sanas diferentes en ambos ensayos.

En general, a excepción del bencilidenacetal **65 α** derivado de D-glucosa (IC_{50} no alcanzado), todos los derivados de ambas series han presentado actividad citotóxica frente a células tumorales de pulmón, siendo más activos los dioles **66 α** ($IC_{50} = 15,2 \mu M$), **66 β** ($IC_{50} = 17,9 \mu M$), **56 β** ($IC_{50} = 31,3 \mu M$) y **56 α** ($IC_{50} = 20,8 \mu M$) que sus respectivos análogos con un grupo acetal en su estructura **65 β** ($IC_{50} = 115,3 \mu M$), **52 β** ($IC_{50} = 59,5 \mu M$) y **52 α** ($IC_{50} = 171,9 \mu M$), con unos valores de IC_{50} próximos a los del aprepitant (IC_{50} (ensayo D-glucosa) = $13,9 \mu M$; IC_{50} (ensayo L-arabinosa) = $18,3 \mu M$). Si fijamos nuestra atención en los derivados de D-glucosa, el grupo amino aumenta significativamente la actividad citotóxica de **67 α** ($IC_{50} = 12,4 \mu M$) frente a la de la azida análoga **65 α** ($IC_{50} = F.R.$), que no presentó actividad citotóxica suficiente para calcular su IC_{50} .

A pesar de los datos de citotoxicidad, los resultados muestran ausencia de selectividad en los derivados de D-glucosa (I.S.: **65 β** = 1,7; **66 α** , **66 β** y **67 α** = 1,4), al igual que el aprepitant (I.S. = 1,1) y el cisplatino (I.S. = 0,9). En cuanto a la selectividad de los derivados de L-arabinosa, los dioles **56 β** (I.S. = 2,1) y **56 α** (I.S. = 2,8) son menos selectivos que los *isopropilidenderivados* **52 β** (I.S. > 10,7) y **52 α** (I.S. = 3,9).

De todos los derivados ensayados, el bencilidenacetal con grupo amino **67 α** (D-glucosa) es el más citotóxico ($IC_{50} = 12,4 \mu M$), con una actividad similar a la del aprepitant ($IC_{50} = 13,9 \mu M$), mientras que el *isopropilidenderivado* **52 β** (L-arabinosa) es el más selectivo (I.S. > 10,7), con una selectividad mayor que el aprepitant (I.S. = 1,5) y el cisplatino (I.S. = 8,6). Ambos compuestos **67 α** y **52 β** presentan la misma estereoquímica en el carbono anomérico que el aprepitant.

Para realizar un estudio más profundo de la relación estructura-actividad, resulta de especial interés la comparación de los resultados que hemos presentado con los de otros análogos del aprepitant derivados de D-galactosa, obtenidos de forma paralela en el seno del grupo de investigación, cuya estructura y datos de IC_{50} e I.S. se indican en la figura 45. A pesar de la gran similitud estructural, se aprecian diferencias significativas en cuanto a actividad citotóxica y selectividad.

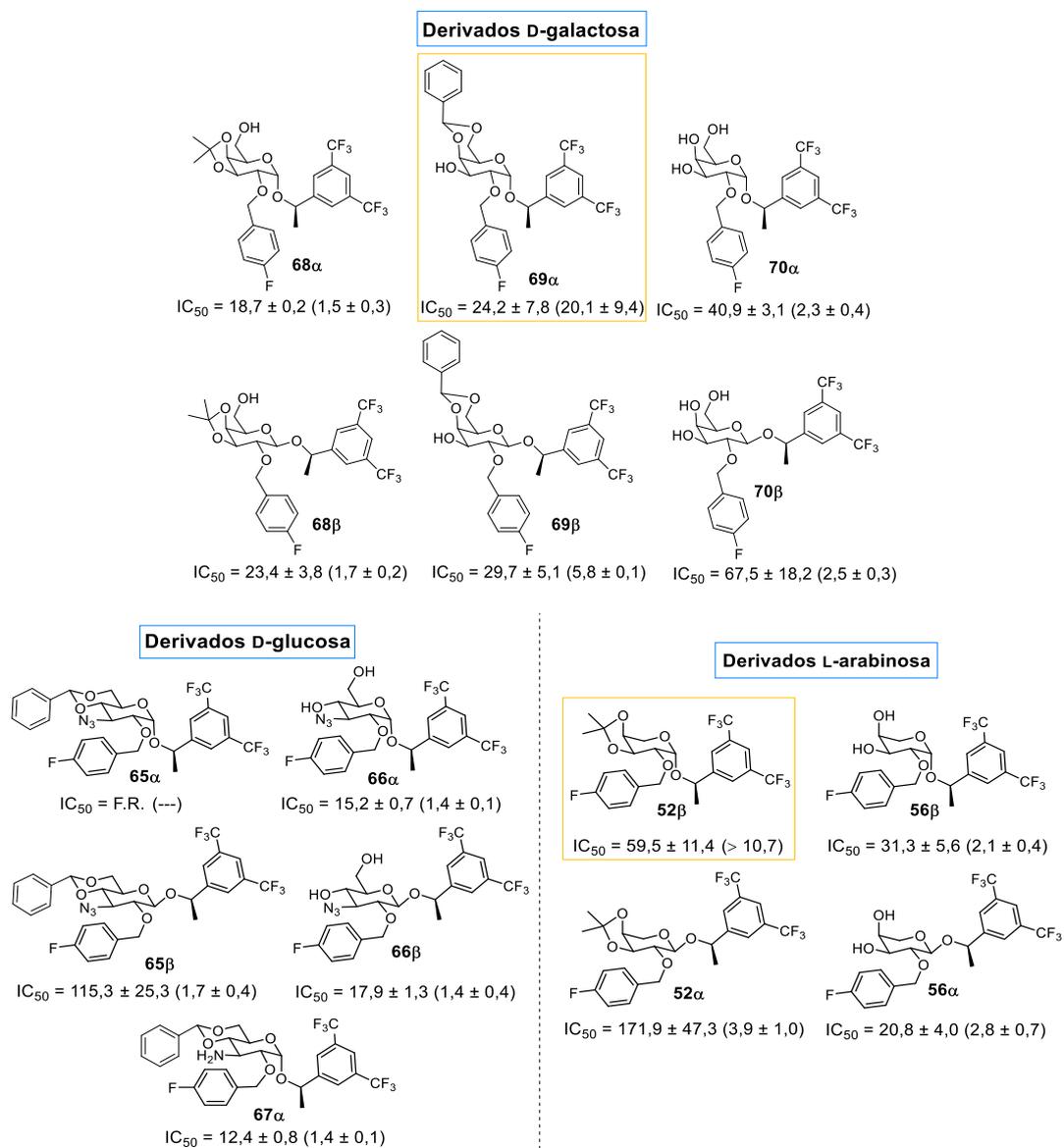


Figura 45. Estructuras de los derivados de D-galactosa, D-glucosa y L-arabinosa, con sus valores de IC₅₀ (μM) en células tumorales de pulmón A549, y su I.S. indicado entre paréntesis.

A diferencia de los derivados de L-arabinosa y D-glucosa, donde los dioles son los compuestos más citotóxicos en ambos casos, en los derivados de D-galactosa, los *isopropilidenacetales* **68 α** ($IC_{50} = 18,7 \mu M$) y **68 β** ($IC_{50} = 23,4 \mu M$) son los más citotóxicos, seguidos por los *bencilidenacetales* **69 α** ($IC_{50} = 24,2 \mu M$) y **69 β** ($IC_{50} = 29,7 \mu M$) y quedando los *trioles* **70 α** ($IC_{50} = 40,9 \mu M$) y **70 β** ($IC_{50} = 67,5 \mu M$) en último lugar.

Si analizamos las diferencias entre los derivados de L-arabinosa y D-galactosa: *i*) la mayor citotoxicidad de los dioles de L-arabinosa **56 β** ($IC_{50} = 31,3 \mu M$) y **56 α** ($IC_{50} = 20,8 \mu M$) con respecto a los *trioles* de D-galactosa **70 α** ($IC_{50} = 40,9 \mu M$) y **70 β** ($IC_{50} = 67,5 \mu M$) indica que el grupo hidroximetileno (D-galactosa) disminuye la actividad citotóxica, aunque la selectividad (I.S.) se mantiene en torno a 2,5 en todos los casos. Por otro lado, *ii*) en los *isopropilidenacetales* derivados la presencia del hidroximetileno aumenta la actividad citotóxica (derivados de D-galactosa **68 α** ($IC_{50} = 18,7 \mu M$; I.S. = 1,5) y **68 β** ($IC_{50} = 23,4 \mu M$; I.S. = 1,7)) y disminuye al mismo tiempo la selectividad, que es mejor en los derivados de L-arabinosa (**52 β** ($IC_{50} = 59,5 \mu M$; I.S. > 10,7) y **52 α** ($IC_{50} = 171,9 \mu M$; I.S. = 3,9)).

En cuanto a las diferencias entre los derivados de D-glucosa y D-galactosa: *i*) los derivados polihidroxiados de D-glucosa (**66 α** ($IC_{50} = 15,2 \mu M$; I.S. = 1,4) y **66 β** ($IC_{50} = 17,9 \mu M$; I.S. = 1,4)) son más activos, pero menos selectivos que los de D-galactosa (**70 α** ($IC_{50} = 40,9 \mu M$; I.S. = 2,3) y **70 β** ($IC_{50} = 67,5 \mu M$; I.S. = 2,5)), debido al grupo azida en C-3. Además, *ii*) se observan importantes diferencias entre los *bencilidenacetales* derivados, ya que los derivados de D-glucosa (**65 α** (IC_{50} no alcanzado); **65 β** ($IC_{50} = 115,3 \mu M$; I.S. = 1,7)) son menos citotóxicos y selectivos que los de D-galactosa (**69 α** ($IC_{50} = 24,2 \mu M$; I.S. = 20,1); **69 β** ($IC_{50} = 29,7 \mu M$; I.S. = 5,8)). De hecho, a pesar de su gran similitud, **65 α** no presenta actividad, mientras que **69 α** es uno de los derivados más activos de su familia. Por otro lado, el aminoderivado de D-glucosa **67 α** ($IC_{50} = 12,4 \mu M$) es más citotóxico que su análogo hidroxilado en C-3 de D-galactosa **69 α** ($IC_{50} = 24,2 \mu M$), pero significativamente menos selectivo (I.S. = 1,4 y 20,1, respectivamente).

En resumen, se puede afirmar que, aunque el bencilidenderivado de 3-amino-D-glucosa **67α** es el que presenta mayor actividad (menor $IC_{50} = 12,4 \mu M$), el bencilidenacetal derivado de D-galactosa **69α** es el más selectivo (mayor I.S. = 20,1), seguido por el isopropilidenacetal derivado de L-arabinosa **52β** (I.S. > 10,7), los tres con la misma estereoquímica en el carbono anomérico que el aprepitant. Cabe resaltar la menor selectividad del aprepitant con I.S. = 1,5.

III.3.1.2. Actividad anticancerosa frente a neuroblastoma

El neuroblastoma es un tipo de cáncer en el que los neuroblastos (tejido nervioso inmaduro) se transforman en células tumorales o neuroblastomas. Es una enfermedad infantil, que se diagnostica en los primeros 5 años de vida. Su aparición más frecuente es en las glándulas suprarrenales, aunque puede aparecer también en el cuello, el tórax o la médula espinal.³ Se trata del tumor sólido extracraneal más común en niños y es el cuarto cáncer infantil más frecuente.¹⁴⁷ La metástasis aparece en el 50% de los casos diagnosticados y principalmente implica la diseminación de la enfermedad a la médula ósea, los tejidos óseos y los nódulos linfáticos.¹⁴⁸ En cuanto al tratamiento, aunque la quimioterapia combinada se ha establecido como terapia de primera línea, produce efectos adversos a largo plazo y no es efectiva en muchos casos. Por tanto, resulta de sumo interés el desarrollo de nuevas terapias frente al neuroblastoma.^{147,149} Se ha descrito que el receptor NK1 se encuentra sobreexpresado en las células humanas de neuroblastoma y que el tratamiento con la sustancia P de líneas celulares de neuroblastoma *in vitro* incrementa su viabilidad celular. Por el contrario, el tratamiento de estas células con el profármaco del aprepitant, fosaprepitant, disminuye la viabilidad celular de manera dosis dependiente, con un amplio intervalo terapéutico.¹⁴⁹

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en colaboración con la Dra. Cristina Pintado Losa de la Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica (Toledo) de la Universidad de Castilla – La

Mancha, decidimos evaluar la citotoxicidad selectiva de los derivados de L-arabinosa sintetizados, **52 β** , **52 α** , **56 β** , y **56 α** , en células tumorales de neuroblastoma.

III.3.1.2.1. Resultados del ensayo MTT en células tumorales de neuroblastoma

Es importante tener en cuenta las líneas celulares seleccionadas a la hora de realizar los ensayos *in vitro* de viabilidad celular, diferenciándose 3 tipos celulares según sus características morfológicas: las células tipo-N que presentan propiedades de neuronas no adrenérgicas, las células tipo-S que expresan fibronectina y vimentina, y las células tipo-I que son como una mezcla de las dos anteriores. Las células tipo-I son las que presentan el mayor potencial de malignidad de las tres, seguidas por las de tipo-N y por último por las de tipo-S. Otra característica importante de las células de neuroblastoma es la presencia del gen *N-myc*. La amplificación de la información genética que codifica para este gen se relaciona con un peor pronóstico de la enfermedad, por la mayor agresividad de estas células tumorales.¹⁴⁷

La evaluación de esta actividad citotóxica de nuestros derivados se realizó mediante ensayos MTT de viabilidad celular utilizando células tumorales de neuroblastoma Kelly y SH-SY5Y, y células sanas de retina RPE-1. La línea celular Kelly es una línea de tipo-N que presenta amplificación del gen *N-myc* y por lo tanto más agresiva que la línea celular SH-SY5Y, que es de tipo-S y no presenta la amplificación para este gen.¹⁴⁷ Los resultados obtenidos se recogen en la figura 46, donde se ha destacado en amarillo el mejor resultado de IC₅₀ y de I.S. de los análogos ensayados.

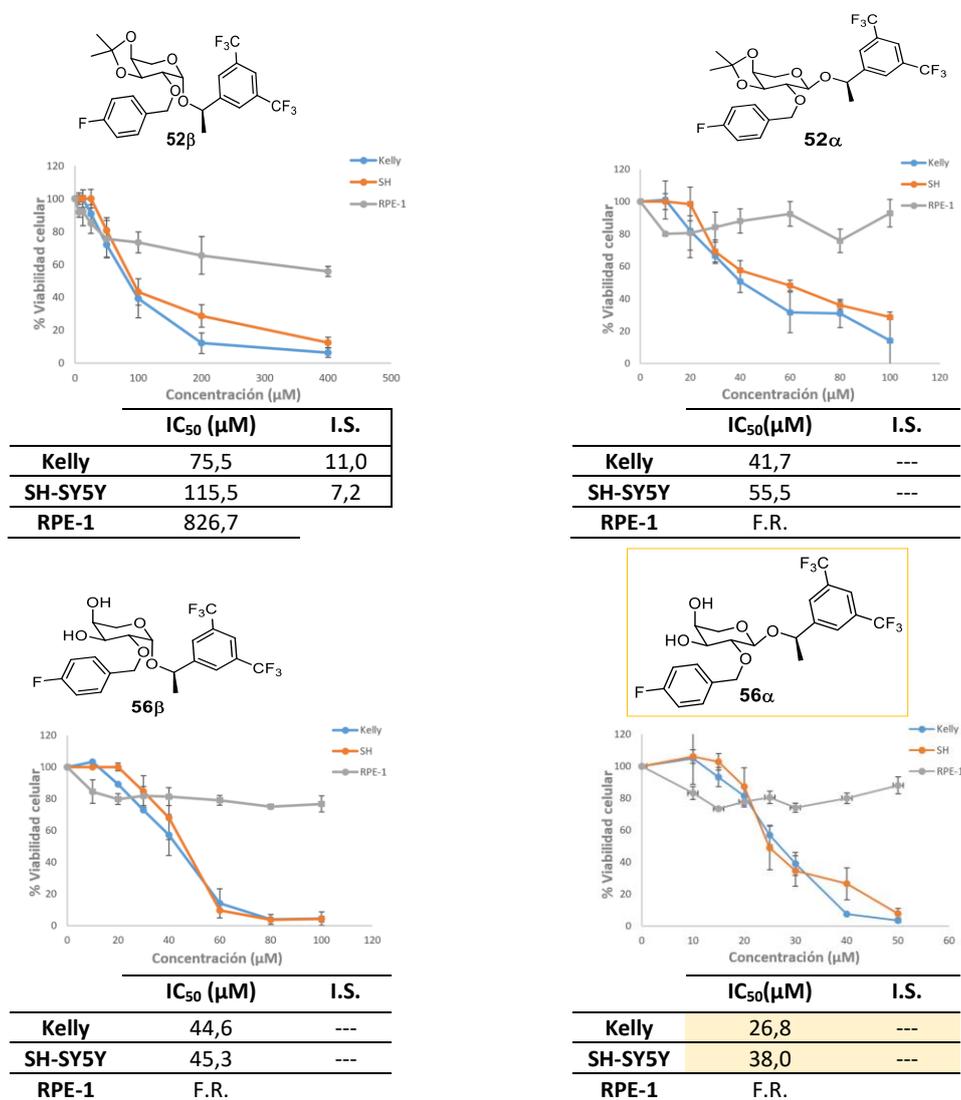


Figura 46. Evaluación actividad citotóxica seletiva en células Kelly (azul), SH-SY5Y (naranja) y RPE-1 (gris). Se indica fuera de rango (F.R.) al no alcanzar la concentración necesaria para calcular el IC₅₀. Todos los datos se expresan como la media ± SEM.

En general, todos los derivados de L-arabinosa han presentado mayor actividad citotóxica hacia la línea celular Kelly, de mayor agresividad, que hacia la línea celular SH-SY5Y, lo cual es un

resultado muy prometedor. En cuanto a la relación estructura-actividad, los dihidroxi derivados **56 β** (IC₅₀ Kelly = 44,6 μ M; IC₅₀ SH-SY5Y = 45,3 μ M) y **56 α** (IC₅₀ Kelly = 26,8 μ M; IC₅₀ SH-SY5Y = 38,0 μ M) presentan mayor actividad que los *isopropiliden* derivados **52 β** (IC₅₀ Kelly = 75,5 μ M; IC₅₀ SH-SY5Y = 115,5 μ M) y **52 α** (IC₅₀ Kelly = 41,7 μ M; IC₅₀ SH-SY5Y = 55,5 μ M) en ambas líneas celulares tumorales. El derivado más activo resulta ser **56 α** .

Cabe destacar que, a diferencia de los resultados obtenidos anteriormente con las células tumorales de pulmón donde los anómeros más activos son aquellos en la conformación más estable del anillo de piranosa, que presentan el aglicón en axial (α en los derivados de D-glucosa y β en los de L-arabinosa), similar a la del anillo de morfolina en el aprepitant, en este caso son más activos los derivados que presentan el aglicón en ecuatorial.

En cuanto a la selectividad, todos los derivados de L-arabinosa son muy selectivos. Sólo se ha podido calcular el I.S. del *isopropiliden*acetato **52 β** debido a que en los demás derivados no se ha alcanzado la concentración necesaria para reducir el crecimiento de las células sanas en un 50% (IC₅₀ de RPE-1), hecho muy positivo ya que proporciona unos intervalos terapéuticos muy amplios.

De nuevo se han comparado estos resultados con los obtenidos en nuestro grupo de investigación con los análogos derivados de D-galactosa (figura 47).

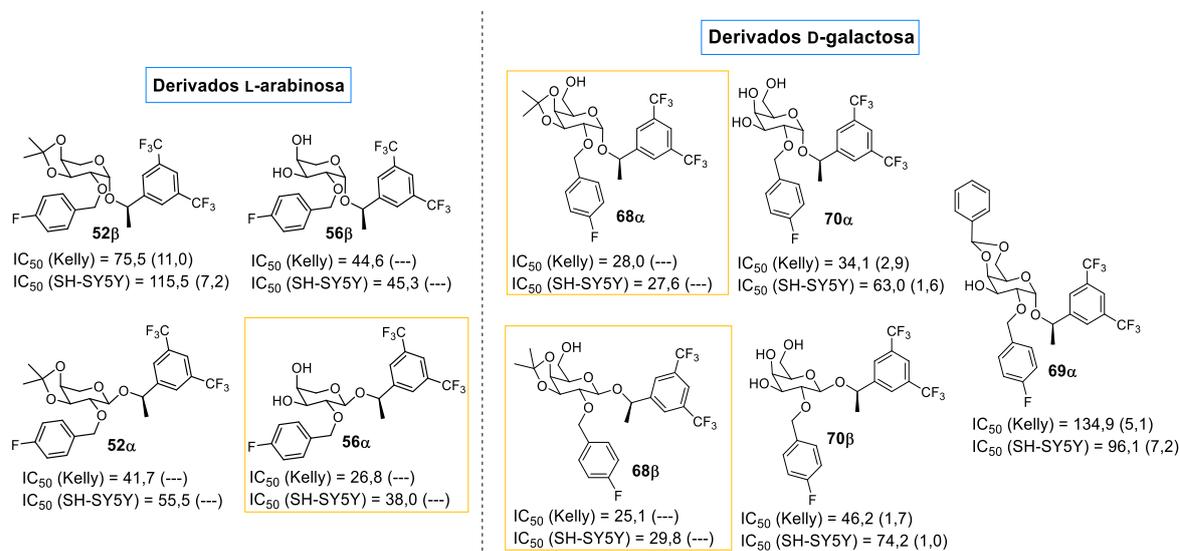


Figura 47. Estructuras de los derivados de D-galactosa y de L-arabinosa, con sus valores de IC_{50} (μ M) en células tumorales de neuroblastoma Kelly y SH-SY5Y, y su I.S. indicado entre paréntesis.

Como se puede observar en la figura 47, los *isopropiliden* derivados de D-galactosa **68 α** y **68 β** , son más citotóxicos y selectivos que los *isopropiliden* derivados de L-arabinosa **52 β** y **52 α** , por lo que la presencia del grupo hidroximetileno en C-5 del anillo de piranosa resulta favorable. Este efecto no se observa en el caso de los derivados polihidroxilados, donde el derivado de L-arabinosa **56 α** es más citotóxico y selectivo que los de D-galactosa **70 α** y **70 β** .

Por último, en la figura 48 se comparan los resultados obtenidos en ambas líneas celulares de neuroblastoma. Se ha representado en un diagrama de barras los valores de IC_{50} (μ M) obtenidos para la línea celular Kelly (azul) y SH-SY5Y (naranja). En la tabla adjunta a la gráfica, se han resaltado en azul los casos en los que los valores de IC_{50} son inferiores, y los de I.S. superiores, para la línea celular Kelly, y en naranja los casos en los que los valores de IC_{50} han sido inferiores, y los de I.S. superiores, para la línea celular SH-SY5Y.

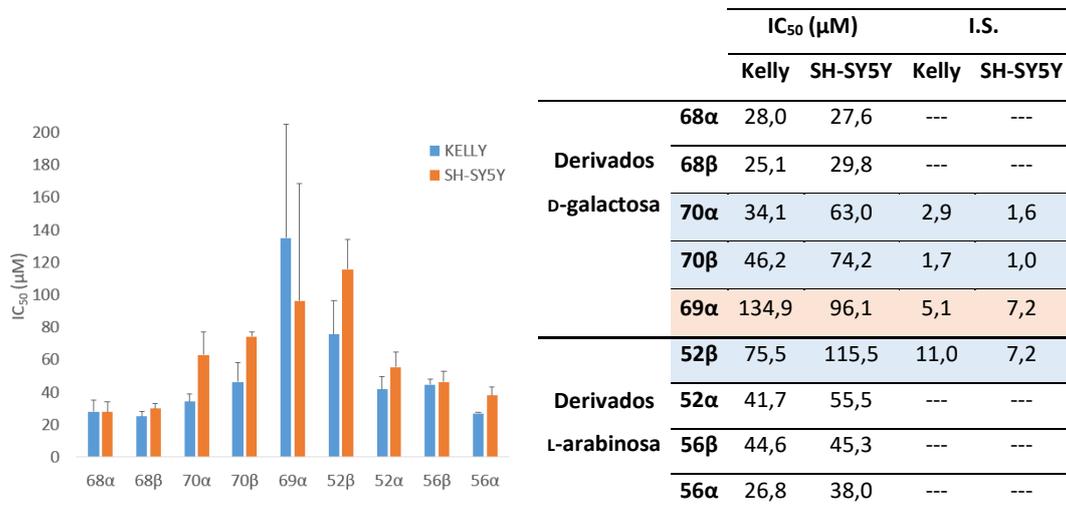


Figura 48. Actividad citotóxica (IC₅₀) de los compuestos ensayados en las dos líneas celulares de neuroblastoma Kelly (azul) y SH-SY5Y (naranja). Por motivos de escala, no se han incluido los valores de IC₅₀ de células sanas RPE-1.

Cabe resaltar que los derivados de D-galactosa, **70α** y **70β** presentan unos valores de IC₅₀ en células Kelly que son aproximadamente la mitad que los obtenidos en células SH-SY5Y. Sin embargo, el bencilidenacetal **69α** tiene un IC₅₀ inferior en células SH-SY5Y que en células Kelly. Los isopropilidenacetales derivados de D-galactosa **68α** y **68β**, no presentan diferencias significativas entre ambas líneas celulares.

Podemos concluir que el derivado dihidroxilado de L-arabinosa **56α**, con valores de IC₅₀ similares a los de los isopropiliden derivados de D-galactosa **68α** y **68β**, se presenta como el compuesto óptimo ya que consigue reducir la viabilidad celular de ambas líneas celulares tumorales a casi un 0% a una concentración 8 veces inferior que los derivados de D-galactosa.

III.3.2. Actividad antagonista del receptor NK1: test IP-one

Una vez obtenidos los resultados de actividad anticancerosa de los análogos del aprepitant es necesario determinar si esta actividad se encuentra directamente relacionada con la actividad como antagonistas del receptor NK1. Este estudio se ha llevado a cabo mediante el denominado “test IP-one” como se describe a continuación.

III.3.2.1. Fundamentos teóricos del test IP-one

El receptor NK1, como componente de la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), concretamente a la familia Gq, como respuesta celular induce una reacción en cadena, activando a la fosfolipasa C que hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) en inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol. El IP₃ se une a los canales de calcio endoplásmicos permitiendo su activación, pasando de estar cerrados a estar abiertos. Esta liberación de calcio al citosol es transitoria, ya que las fosfatasas celulares degradan rápidamente al IP₃, volviendo a cerrarse los canales de calcio. Esto quiere decir que la producción del segundo mensajero intracelular IP₃ es una señal de la activación de GPCRs y la medida de su acumulación constituye un método indirecto para determinar la actividad agonista/antagonista de un ligando por el receptor NK1. Sin embargo, debido a su corta vida media, es muy difícil detectar directamente el IP₃ en el medio celular, ya que las fosfatasas lo pueden hidrolizar directamente a inositol bifosfato (IP₂) o bien fosforilarse para generar inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato (IP₄) antes de ser degradado por diferentes fosfatasas hasta la formación del IP₂. Por último, la degradación del IP₂ a inositol monofosfato (IP₁), seguida de la degradación del IP₁ por la inositol monofosfatasa (IMP_{asa}) conduce finalmente a inositol.

Teniendo en cuenta que es posible impedir la degradación del IP₁ a inositol, una alternativa consiste en detectar la cantidad de IP₁ como una medida indirecta de cuantificación del IP₃ intracelular y, por lo tanto, de la activación de los GPCRs en general, y del receptor NK1 en

particular. El reactivo LiCl es un conocido inhibidor de fosfatasa como la IMP_{asa} , por lo que el pretratamiento *in vitro* de las células con una alta concentración de LiCl permite la acumulación de IP_1 intracelular, y por tanto su medición (figura 49).¹⁵⁰

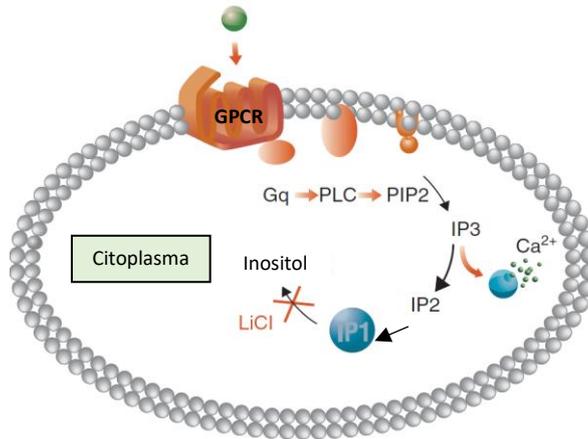


Figura 49. Ruta celular de señalización de los receptores acoplados a proteína Gq con la adición exógena de LiCl. PLC: fosfolipasa C.¹⁵⁰

La detección de la acumulación intracelular de IP_1 se realiza mediante HTRF^{®151} (fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo), que ha demostrado ser eficiente en la caracterización de agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos. Esta metodología combina el fenómeno de FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster) y la técnica TRF (fluorescencia resuelta en el tiempo) para la detección de interacciones biomoleculares por transferencia de energía entre biomoléculas marcadas previamente con un fluoróforo.^{151,152} Básicamente consiste en utilizar un anticuerpo monoclonal específico para IP_1 marcado con un lantánido (donador) y el IP_1 marcado con el fluoróforo d_2 (aceptor) que compite con el IP_1 intracelular por la unión con el anticuerpo. Cuando se excita al donador, éste puede transferir su energía de emisión al aceptor a una longitud de onda (λ) específica. Este fenómeno se conoce como FRET y tiene lugar cuando

el donador (anticuerpo marcado) y el aceptor (IP_1 marcado) están próximos. El fenómeno de FRET, descrito por primera vez en 1946 por Förster, consiste en un proceso físico de transferencia de energía no radiactiva, en el cual la energía absorbida por un fluoróforo donador es transferida sobre otro fluoróforo aceptor, siempre y cuando ambos se encuentren a una distancia de 1-10 nm, de manera que el aceptor también emita fluorescencia.^{153,154} Además de una adecuada distancia entre ambos fluoróforos, para que la transferencia de energía sea eficiente, ambos deben ser compatibles energéticamente (suficiente solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de excitación del aceptor) y la orientación relativa de sus dipolos debe ser adecuada.¹⁵⁴ La fluorescencia que emiten el aceptor y el donador tienen diferente λ , lo que permite que se puedan diferenciar fácilmente mediante un lector de fluorescencia y, de este modo, se pueda cuantificar la interacción. La acumulación de IP_1 intracelular provocada por la activación de los GPCRs, favorece que se desplace el IP_1 marcado del anticuerpo marcado y esto provoca que se inhiba la señal de fluorescencia al no producirse FRET. La inhibición de esta señal de fluorescencia es el parámetro que se mide para determinar la activación de los GPCRs (figura 50).^{150,152}

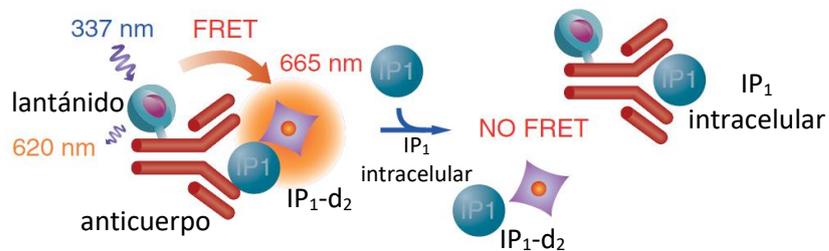


Figura 50. Fundamento teórico del ensayo HTRF[®], donde participa un anticuerpo monoclonal específico para IP_1 marcado con un lantánido (donador) y el IP_1 marcado con el fluoróforo d_2 (aceptor). Las λ mostradas son un ejemplo, ya que pueden variar en función del lantánido utilizado.¹⁵⁰

En el medio celular puede haber otros componentes de naturaleza fluorescente que pueden disminuir la sensibilidad de la medición, al ser detectados también como ruido de fondo por el lector de fluorescencia. Sin embargo, el ruido de fondo suele estar provocado por fluoróforos de vida corta (nanosegundos), por lo que normalmente es transitorio y el empleo de fluoróforos con vidas medias superiores (milisegundos) en el donador, como los lantánidos, permite minimizar el ruido. Los lantánidos más frecuentemente usados son el europio, el terbio y el samario, comúnmente en forma de complejos de quelato o de criptato, por su estabilidad e intensidad de señal. Por ello, se utiliza la técnica TRF que permite medir la excitación y la emisión de ambos fluoróforos de vida larga (donador y aceptor) después de la emisión con disminución de la fluorescencia de fondo de vida corta. El procedimiento consiste en que al producirse la excitación del fluoróforo por un pulso de luz, se realiza una pequeña pausa o tiempo de retardo, del orden de nanosegundos, para que tenga lugar la fluorescencia de vida corta y, a continuación, se mide la señal de fluorescencia que esté emitiendo la muestra. Este intervalo se conoce como ventana de medición (figura 51).¹⁵²

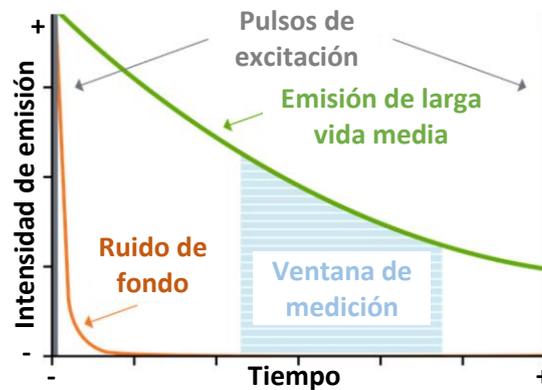


Figura 51. Representación de la emisión de fluorescencia de los componentes de una determinada muestra y la ventana de medición en la técnica TRF.¹⁵²

Los ensayos típicos con HTRF® usan criptato de europio (Eu^{+3} criptato) o Lumi4®-Tb (Tb^{+2} criptato) como donadores y el fluoróforo orgánico XL665 o d_2 , como aceptores para marcar una gran variedad de biomoléculas.^{151,152} El marcaje del IP_1 como aceptor en el HTRF®, da lugar al ensayo conocido como el test IP-one. En nuestro caso, se usó Lumi4®-Tb (Tb^{+2} Criptato) como donador y d_2 como aceptor para detectar la acumulación de IP_1 como indicador de la activación del receptor NK1. Así, los ligandos agonistas del receptor NK1 causarán un incremento de los niveles de IP_1 intracelular en ausencia de la SP, mientras que los ligandos antagonistas del receptor NK1 producirán una disminución de los niveles de IP_1 intracelular en presencia de la SP. En consecuencia, el incremento de los niveles de IP_1 intracelular conducirá a una mayor inhibición de la señal de fluorescencia, lo que indicará la capacidad agonista del ligando. Por el contrario, la disminución de los niveles de IP_1 intracelular conducirá a una menor inhibición de la señal de fluorescencia, lo que indicará la capacidad antagonista del ligando.

III.3.2.2. Resultados del test IP-one

Este ensayo se ha realizado en el Instituto de Genómica Funcional (IGF) del Centro Nacional de Investigación Científica (CNRS) de Montpellier, Francia, en colaboración con el grupo del Dr. Bernard Mouillac.

Una vez que se dispuso de células con el receptor NK1 internalizado, se procedió a realizar los correspondientes ensayos de actividad agonista y antagonista. Para este estudio se seleccionaron los dioles **56 β** y **56 α** por ser los derivados de L-arabinosa con mayor actividad citotóxica, comparando los resultados con los obtenidos con los trioles **70 α** y **70 β** derivados de D-galactosa y con el bencilidenderivado **69 α** , por ser el que ha mostrado mejores resultados en actividad anticancerosa en células tumorales de pulmón. Como control negativo de la liberación del IP_1 se ha utilizado un antagonista del receptor NK1 conocido, el L-732,138, y como control positivo, la SP.

La aplicación del test IP-one a diferentes muestras con distintas concentraciones de todos los compuestos seleccionados, nos ha permitido obtener las curvas dosis-efecto de cada uno de ellos, figura 52, representando la concentración (pmol) de IP₁ detectada (eje “y”) frente a las diferentes concentraciones (log[M]) de los compuestos ensayados (eje “x”). Se obtienen así las curvas de la capacidad agonista o antagonista de estos compuestos y, a partir de ellas, las constantes de activación (k_{act}) o inactivación (k_{inact}) correspondientes, valores que se indican en una tabla adjunta a la gráfica.

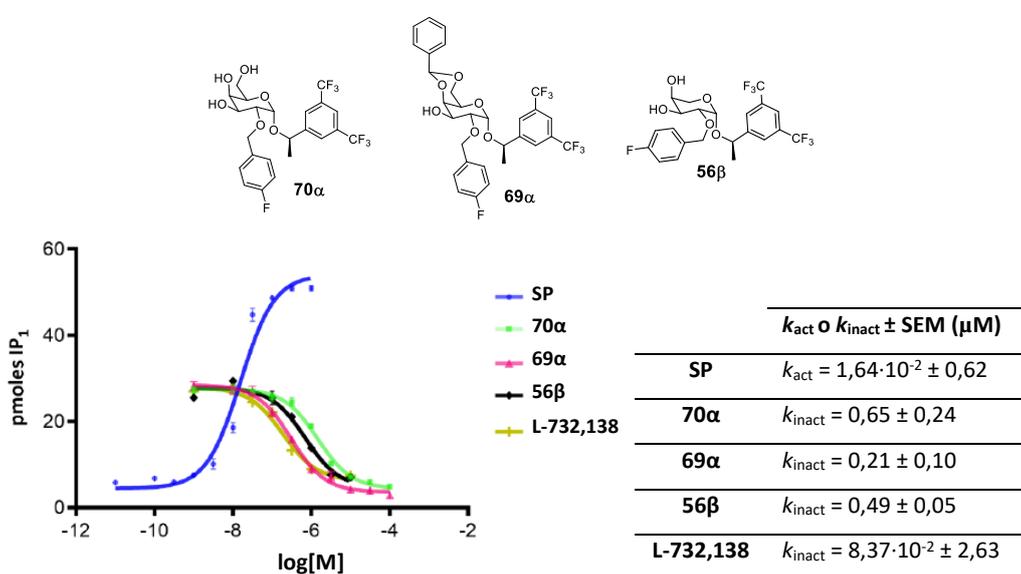


Figura 52. Curva dosis-efecto del agonista SP y de los antagonistas **70 α** y **69 α** (D-galactosa), **56 β** (L-arabinosa) y L-732,138. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM. En la tabla se indican las constantes de activación o inactivación del receptor NK1 (μM) calculadas a partir de la gráfica y de la ecuación de Cheng-Prusoff.^{155,156}

La k_{act} del receptor NK1 correspondiente a la SP se ha calculado a partir de la curva obtenida, ya que equivale a la concentración de la SP a la que se observa el 50% del efecto máximo (EC₅₀). Sin embargo, aunque la concentración de ligando a la que se produce el 50% de inhibición (IC₅₀)

también puede calcularse a partir de la curva obtenida, a diferencia de la EC_{50} , no se puede considerar un indicador directo del antagonismo del receptor. Por ello, ha sido necesario calcular las k_{inact} de los antagonistas con la ecuación de Cheng-Prusoff,^{155,156} donde [S] representa la concentración de sustrato (sustancia P) utilizada:

$$k_{inact} = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{k_{act}}}$$

Se observa una curva sigmoidea característica del efecto agonista (sustancia P) o antagonista (análogos del aprepitant) en la que, con pequeños cambios de concentración del ligando, el efecto aumenta o disminuye rápidamente (figura 52). De los 5 análogos ensayados, los derivados de D-galactosa **69α** (bencilidenacetal) y **70α** (triol) junto con el derivado de L-arabinosa **56β** (diol) son buenos antagonistas o inhibidores de la actividad de la SP. En el caso de **70β** (triol) y **56α** (diol), a pesar de que también han bloqueado la acción de la SP, no ha sido posible calcular su k_{inact} , ya que el efecto inhibitorio producido por ambos no era suficiente como para determinar su IC_{50} . Por lo tanto, para expresar los resultados del test IP-one obtenidos en el caso de estos compuestos, se indica el porcentaje de inhibición de la SP en función de la cantidad de IP_1 detectada a una concentración del ligando de $1 \cdot 10^{-6}$ M (figura 53).

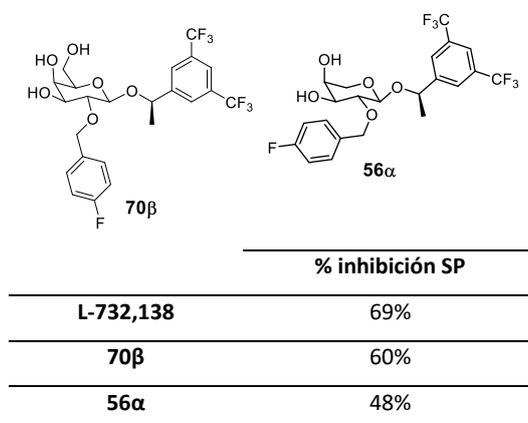


Figura 53. Porcentajes de inhibición de la SP obtenidos por determinación de la cantidad de IP₁ intracelular acumulado con el test IP-one, a una concentración de los ligandos de $1 \cdot 10^{-6}$ M.

Si centramos nuestra atención en los análogos que presentan los grupos hidroxilo libres, tanto el derivado de L-arabinosa **56β** ($k_{inact} = 0,49 \mu\text{M}$) como el derivado de D-galactosa **70α** ($k_{inact} = 0,65 \mu\text{M}$), ambos con el aglicón en axial (al igual que el aprepitant), presentan una mayor actividad antagonista que sus respectivos anómeros (k_{inact} no obtenida al no alcanzarse el IC₅₀). Por otra parte, el bencilidenderivado de D-galactosa **69α** ($k_{inact} = 0,21 \mu\text{M}$) es el de menor valor de k_{inact} , lo que indica que la presencia del grupo bencilidenacetal puede estar directamente relacionada con la mayor actividad antagonista.

El test IP-one permite determinar la actividad antagonista del receptor NK1 de los análogos del aprepitant ensayados, pero no permite conocer la afinidad de estos compuestos por el receptor NK1. Para conocer este dato, de manera complementaria, se ha realizado también el estudio de la capacidad de desplazamiento de la SP marcada con un radioisótopo. Para ello, tras incubar el receptor NK1 con la sustancia P marcada y el análogo del aprepitant correspondiente, se filtra la mezcla, quedando el receptor NK1 unido al ligando, ya sea la SP como el antagonista estudiado, retenido en el filtro. Seguidamente, por medición de la radiactividad del filtro, se

determina la presencia de la SP unida al receptor NK1. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de inhibición de la unión específica control calculado con la siguiente ecuación:^{157,158}

$$100 - [(unión específica medida / unión específica control) \cdot 100]$$

Donde la unión específica medida se refiere a la radiactividad detectada (sustancia P unida al receptor) tras incubar al receptor NK1 con la SP y el análogo del aprepitant correspondiente, y la unión específica control se refiere a la radiactividad detectada en la incubación del receptor NK1 sólo con la SP.

Los ensayos de afinidad fueron realizados por la empresa *Eurofins* y para ello seleccionamos el diol **56β**, por ser el mejor antagonista de los derivados de L-arabinosa según el test IP-one y el isopropilidenderivado **52α**, dada las diferencias estructurales entre ambos, además de dos derivados de D-galactosa **70α** (tríol), por su analogía estructural con **56β**, y el bencilidenderivado **69α**, por ser el antagonista más potente según el test IP-one. En todos los casos, a una concentración de $6 \cdot 10^{-5}$ M del correspondiente derivado, se ha obtenido una inhibición de la unión específica control del 100%, con unos valores de afinidad superiores a los de la propia SP.

III.3.3. Molecular Docking

El *Molecular Docking* (MD) es el método de modelización molecular *in silico* más común en el diseño estructural de fármacos. Desde su primera aparición a mediados de los años 70, el MD ha demostrado ser una importante herramienta para entender cómo interaccionan las moléculas con sus dianas. Sin embargo, no es hasta principios de los años 80 cuando aparece la primera publicación donde se usa el MD para el descubrimiento de fármacos mediante el análisis de sus interacciones con dianas biológicas, y a partir de entonces, ha sido ampliamente utilizado para este fin.^{159,160}

La información obtenida por MD proporciona un modelo de las interacciones a nivel atómico entre una molécula pequeña y una proteína, lo que permite caracterizar tanto el comportamiento de estas moléculas pequeñas o ligandos en el sitio de unión con su proteína diana como dilucidar los procesos bioquímicos fundamentales que tienen lugar. Así, se puede predecir la conformación del ligando, su posición y orientación dentro de su proteína diana y evaluar la afinidad de la unión. El hecho de conocer la localización del sitio de unión del ligando con el receptor antes de realizar el proceso de MD incrementa significativamente la eficiencia del método. En caso de no conocerse dicha localización, existen softwares y servidores *on line* que permiten establecer hipótesis sobre la ubicación del sitio de unión en la proteína. Además, hay un tipo de MD, denominado MD ciego, en el que no se tiene en cuenta la información, que pueda existir o no, sobre el sitio de unión del receptor.¹⁵⁹ Como resultado, existen toda una serie de nuevos usos y aplicaciones emergentes del MD como la identificación y optimización de nuevos fármacos, el diseño de ligandos multidiana, el reposicionamiento de fármacos, la búsqueda y evaluación del perfil de nuevas dianas terapéuticas (cribado inverso), su uso en polifarmacología, la predicción de efectos adversos y la comprensión de las relaciones entre diferentes dianas moleculares involucradas en una enfermedad dada.¹⁶⁰ Generalmente, el MD no se emplea de manera aislada, sino que se aplica junto con otras técnicas tanto *in silico* como experimentales.¹⁵⁹

III.3.3.1. Metodologías de *Molecular Docking*

Dentro de las técnicas de modelización molecular, se pueden diferenciar las aproximaciones basadas en la estructura de la proteína diana y las aproximaciones basadas en el ligando. Los métodos basados en la estructura requieren del conocimiento de la estructura tridimensional (3D) de la diana de interés. En este contexto, el MD es una de las técnicas más utilizadas y con más éxito de entre los métodos *in silico* basados en la estructura que ayudan a predecir las

interacciones que ocurren entre las moléculas y sus dianas biológicas. En general, la combinación de las aproximaciones basadas en la estructura y las aproximaciones basadas en el ligando permite mejorar el poder de predicción de los cribados virtuales. Sin embargo, la posibilidad de aplicar estos métodos en conjunto sólo es posible para aquellas dianas en las que se haya descrito al menos un complejo ligando-proteína cristalizado.¹⁶⁰

Aunque inicialmente se pensaba que las interacciones ligando-proteína diana consistían en un mecanismo de unión rígido, siguiendo el clásico modelo “llave-cerradura”, actualmente se acepta que estas interacciones son flexibles y transcurren con cambios conformacionales durante el propio proceso de unión. Así, un ligando se une selectivamente a la conformación más favorable entre las diferentes conformaciones posibles de la proteína. Se produce entonces un cambio conformacional por el cual el ligando induce que la proteína adopte una conformación que no tendría espontáneamente si no estuviera unida al ligando, para formar un complejo ligando-proteína diana de mínima energía y asegurar así un perfecto ajuste. Este proceso se conoce como “adaptación inducida” y en algunos casos puede implicar el plegamiento parcial de la proteína.¹⁵⁹ Existen tres tipos de metodologías de MD en función de la rigidez o flexibilidad seleccionada del ligando y de la proteína diana: *i)* las estructuras del ligando y de la proteína diana se consideran conformaciones rígidas; *ii)* la conformación del ligando se considera flexible y la de la proteína diana rígida y *iii)* las estructuras del ligando y de la proteína diana se consideran conformacionalmente flexibles. Cuando ambas estructuras se consideran rígidas, la búsqueda en el espacio está muy limitada, al haber menores grados de libertad traslacional y rotacional. Esta metodología, aunque más rápida, aporta resultados predictivos más limitados. Sin embargo, para complejos ligando-proteína diana donde su comportamiento implica introducir el concepto de la adaptación inducida, es de vital importancia considerar la flexibilidad tanto del ligando como de la proteína diana, aunque en este caso, el coste computacional es muy alto. Así, una aproximación que implica un equilibrio

entre la precisión de la predicción y el tiempo computacional consiste en considerar la conformación del ligando flexible mientras se mantiene la conformación de la proteína diana rígida durante el MD, siendo ésta la estrategia más utilizada. Muchos software, como FlexX, GOLD, AutoDock o AutoDock Vina, han adoptado esta aproximación.¹⁵⁹

III.3.3.2. Conceptos básicos en MD: algoritmos de muestreo, funciones matemáticas de puntuación, energía libre de Gibbs y raíz del error cuadrático medio

Para comprender el funcionamiento del MD y los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, es necesario conocer algunos conceptos básicos, que se detallan a continuación.

i) Algoritmos de muestreo

El principal objetivo del MD es realizar una predicción de la estructura del complejo ligando-proteína diana usando métodos computacionales. Esto se consigue gracias al muestreo de las posibles conformaciones del ligando en el sitio activo de la proteína y a la posterior clasificación de estas conformaciones obtenidas mediante un sistema de puntuación establecido. Hay que tener en cuenta que existe un gran número de posibilidades de unión considerando los numerosos grados de libertad traslacional, rotacional y conformacional del ligando y de la proteína diana, por lo que generar todas las posibles conformaciones tendría un elevado coste computacional, siendo necesario desarrollar algoritmos de muestreo para acotar todas las posibilidades existentes. Los algoritmos de muestreo deben ser capaces de reproducir la unión ligando-proteína diana que ocurriría experimentalmente y el sistema de puntuación debe ser capaz de clasificar esta unión con la puntuación más alta de entre todas las conformaciones posibles generadas. Estos algoritmos pueden ser diferentes en función del software de MD empleado. Uno de los algoritmos de muestreo más conocidos es la Dinámica Molecular. La simulación con este algoritmo representaría la flexibilidad del ligando y de la proteína diana de manera más efectiva que otros algoritmos. Idealmente, usando simulaciones de Dinámica

Molecular se podrían obtener modelos con todos los grados de libertad del complejo ligando-proteína diana, pero su alto coste computacional es un inconveniente que impide que se use para el cribado de grandes bases de datos. Por ello, una estrategia habitual en MD consiste en usar sistemas de búsqueda más generales para identificar las conformaciones del ligando, seguido de una simulación extra con la Dinámica Molecular, ya que estas simulaciones son más eficientes en muestreos locales o centralizados.¹⁵⁹

ii) Funciones matemáticas de puntuación

Su objetivo es diferenciar las posiciones de unión correctas de las incorrectas en un tiempo computacional razonable. Hay que tener en cuenta que este sistema de fórmulas matemáticas, que difieren en función del software empleado, realiza estimaciones, por lo que para los cálculos de afinidad de las uniones entre el ligando y la proteína diana, es necesario adoptar diferentes suposiciones y simplificaciones. Las funciones de puntuación asignan, por medio de cálculos, diferentes valores de energía de unión en kcal/mol en función de los diferentes tipos de interacciones entre el ligando y la proteína diana (interacciones electrostáticas, Van del Waals, puentes de hidrógeno, solvataciones, contribución de la entropía, etc.).¹⁵⁹

iii) Energía libre de Gibbs

Un sistema proteína-ligando-disolvente puede considerarse un sistema termodinámico compuesto por el soluto (moléculas de ligando y proteína) y el disolvente. En un sistema dado, existen interacciones complejas e intercambios de calor entre las diferentes sustancias presentes. Las leyes de la termodinámica dictaminan la relación entre estas sustancias y cómo afecta la transferencia de calor a la variación de energía. Así, la asociación entre proteína y ligando es el resultado de varias interacciones e intercambios de energía entre la proteína, el ligando y el disolvente. La energía libre de Gibbs (kcal/mol), es un parámetro termodinámico que mide la capacidad de un sistema de alcanzar el máximo de trabajo reversible a una temperatura y presión constantes. Por analogía con un proceso espontáneo, la unión proteína-

ligando ocurrirá solamente cuando la variación de energía libre de Gibbs (ΔG) del sistema sea negativa al alcanzar un estado de equilibrio a temperatura y presión constantes. El grado de asociación proteína-ligando alcanzado viene dado por la magnitud del valor negativo de ΔG , por lo que puede considerarse que ΔG determina la estabilidad de un determinado complejo proteína-ligando, o lo que es lo mismo, la afinidad de la unión de un ligando con una determinada proteína diana. Hay que tener en cuenta que ΔG define únicamente los estados termodinámicos inicial y final, sin considerar el camino entre los dos estados.¹⁶¹

iv) *Raíz del error cuadrático medio*

La raíz del error cuadrático medio (RMSD) es una medida estadística de la diferencia entre dos estructuras. Se calcula por superposición con una estructura de referencia con el máximo solapamiento posible. Así, la RMSD es una medida de la desviación del solapamiento entre dos estructuras. Idealmente, el valor de la RMSD debería ser cero, pero en la práctica, este valor cero es prácticamente inalcanzable debido a la desviación que provocan los errores estadísticos. Se considera que dos estructuras no presentan diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de RMSD es menor a 2 Å.¹⁶²

III.3.3.3. *Molecular Docking*: validación del software Autodock Vina

Decidimos aprovechar la capacidad de los cálculos de MD de realizar predicciones precisas de la geometría de unión óptima del ligando, así como de las interacciones que se establecen en su unión con la proteína diana, ampliamente reconocida en la bibliografía, aplicándolo a nuestro sistema.^{159,160,163} Con el fin de conocer las interacciones moleculares que se establecen entre el aprepitant y sus análogos y el receptor NK1, se han realizado cálculos de MD en colaboración con el grupo del Dr. Juan Ángel Organero, del Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímicas y del Instituto de Nanociencia, Nanotecnología y Materiales Moleculares (INAMOL), de la Universidad de Castilla-La Mancha. Mediante el empleo tanto de

las posiciones de unión obtenidas por MD como analizando la hidrofobicidad del sitio de unión del receptor NK1, con el software Autodock Vina, se han caracterizado las interacciones intermoleculares entre los diferentes ligandos y el receptor NK1.

Para determinar la idoneidad del software Autodock Vina para nuestro ensayo, se realizó un ensayo de MD con antagonistas conocidos del receptor NK1. Recientemente se ha publicado¹²⁴ la cristalización del receptor NK1 con los ligandos aprepitant, netupitant y CP-99,994. Estos complejos ligando-receptor se encuentran disponibles en las bases de datos (PDB ID aprepitant: 6HLO; PDB ID netupitant: 6HLP; PDB ID CP-99,994: 6HLL). Se realizó un estudio de MD de estos ligandos (aprepitant, netupitant y CP-99,994) y el receptor NK1, para a continuación comparar las predicciones de MD obtenidas de las posiciones de estos ligandos en el receptor NK1 con las posiciones de unión experimentales descritas de los complejos ligando-receptor cristalizados. Esta comparación condujo a valores de RMSD menores de 2 Å (CP-99,994: 0,893 Å; aprepitant: 1,242 Å; netupitant: 1,075 Å). Es decir, los complejos ligando-receptor obtenidos por MD no presentan diferencias estadísticamente significativas con los descritos experimentalmente. Por tanto, se pueden considerar adecuados los protocolos de MD utilizados en el software Autodock Vina para deducir las posiciones de unión correctas y las interacciones de los demás análogos del aprepitant con el receptor NK1.

III.3.3.4. Resultados de MD del aprepitant y sus análogos con el receptor NK1

Se ha realizado un MD ciego, es decir, no se ha limitado el cálculo al centro activo del receptor NK1, aun conociéndolo. Es importante destacar que, aunque no se ha hecho dicha limitación, todos los ligandos ensayados se han posicionado preferentemente en el centro activo descrito en la bibliografía.¹²⁴ Se ha caracterizado así la conformación de los ligandos en el sitio de unión del receptor y la naturaleza de las interacciones intermoleculares entre los diferentes ligandos y el receptor NK1.

A) Resultados de la simulación de las interacciones del aprepitant con el receptor NK1

En primer lugar, se analizaron las interacciones que tienen lugar entre el aprepitant y los aminoácidos del sitio de unión del receptor NK1 y se representan en un diagrama bidimensional (2D) en la figura 54. Estas interacciones se han indicado con el siguiente código de colores: *i*) en verde claro las interacciones de Van der Waals; *ii*) en verde oscuro las interacciones por formación de puente de hidrógeno; *iii*) en azul las interacciones por formación de puente de halógeno, y *iv*) en rosa las interacciones hidrofóbicas (en rosa fuerte las de tipo π - π y en rosa claro las de tipo π -alquil y alquil-alquil). Además, el MD también ha permitido obtener el valor de afinidad de unión (AU) del aprepitant con el receptor NK1, indicado en un recuadro amarillo.

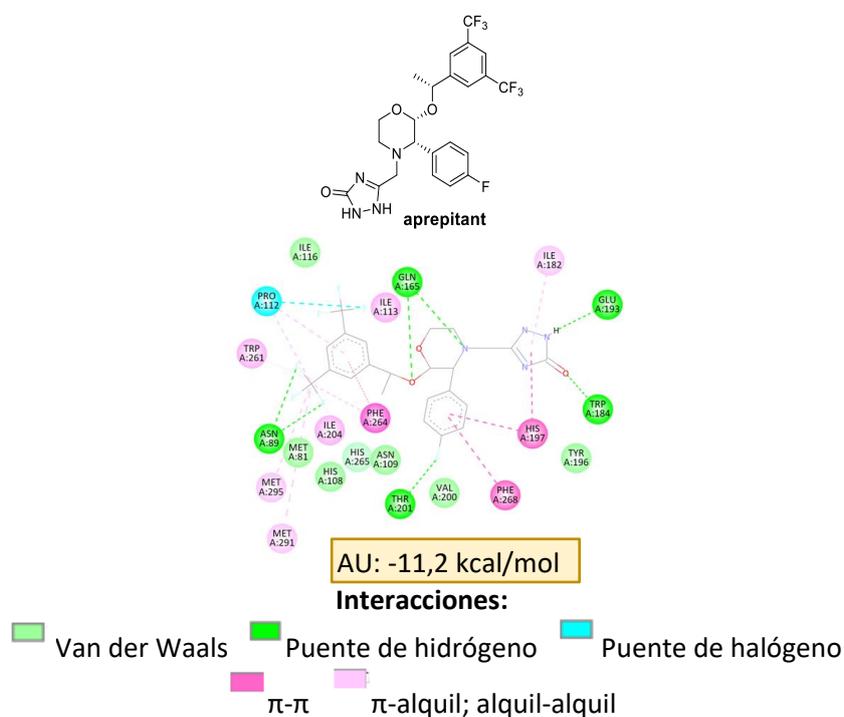


Figura 54. Diagrama 2D de las interacciones del aprepitant con los aminoácidos del receptor NK1, en su región de acoplamiento más probable y su valor de AU (kcal/mol) obtenido con el programa AutoDock Vina®.

Las principales interacciones que se establecen con los diferentes restos de aminoácidos del receptor, representadas en la figura 54, responsables del valor de AU de -11,2 kcal/mol obtenido, son:

- 1) Varias interacciones hidrófobas que se establecen con los anillos aromáticos 3,5-bis-trifluorometilo y *p*-fluorosustituido, y con el anillo de triazolona.
- 2) Los puentes de hidrógeno con el nitrógeno del anillo de morfolina, el oxígeno acetálico, el carbonilo y grupo -NH- del fragmento de triazolona, y con los grupos flúor y trifluorometilo.
- 3) Un puente de halógeno con uno de los grupos trifluorometilo.

Un estudio similar con los análogos del aprepitant sintetizados nos ha permitido determinar las distintas interacciones que se establecen con el receptor NK1 y sus correspondientes valores de AU como se indica a continuación.

B) Interacciones de los derivados de L-arabinosa y de D-glucosa con el receptor NK1.

En las figuras 55 (derivados L-arabinosa) y 56 (derivados D-glucosa) se han representado los diagramas 2D de las interacciones de los diferentes análogos del aprepitant con el receptor NK1, con su correspondiente valor de AU. En la tabla 7 se recogen todos los valores (negativos siempre) de AU de todos los derivados. Cuanto más negativo sea un valor de AU, mayor es la afinidad de unión entre el ligando y el receptor. Para una mayor simplicidad en el análisis de los resultados obtenidos, nos referiremos a ellos siempre en términos de valor absoluto.

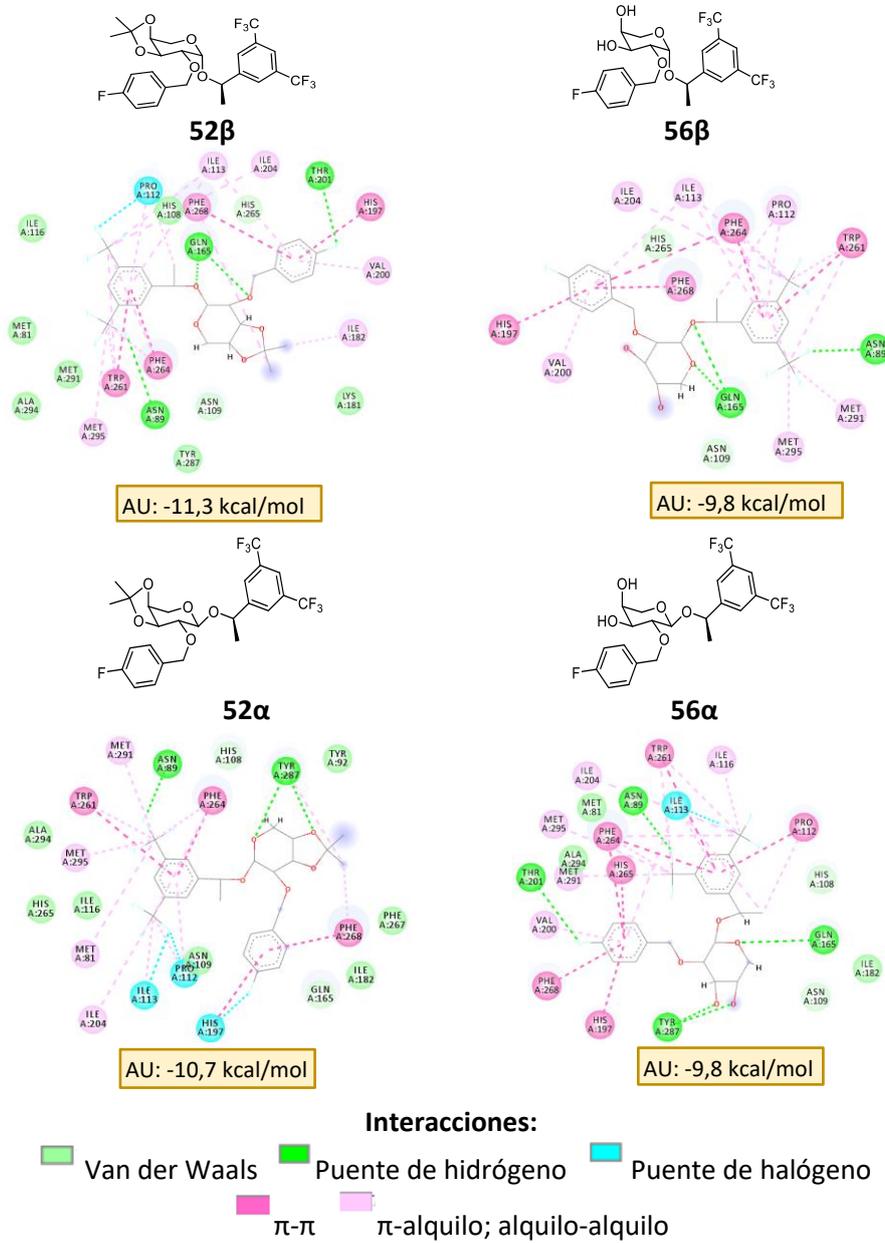


Figura 55. Diagrama 2D de las interacciones los derivados de L-arabinosa con los aminoácidos del receptor NK1, en su región de acoplamiento más probable y sus valores de AU (kcal/mol).

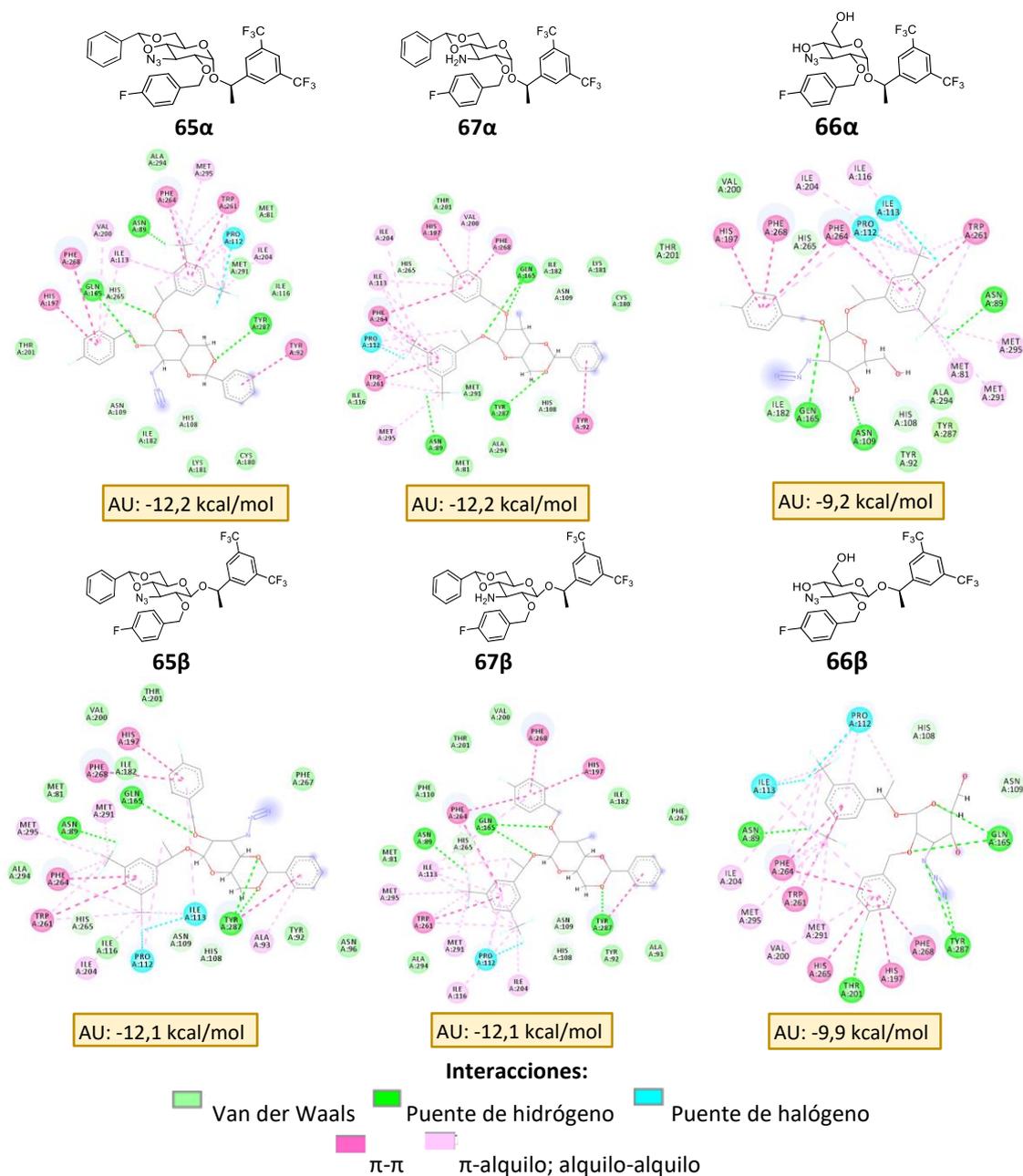


Figura 56. Diagrama 2D de las interacciones de los derivados de D-glucosa con los aminoácidos del receptor NK1, en su región de acoplamiento más probable y sus valores de AU (kcal/mol).

Tabla 7. Valores de AU de los derivados de azúcares estudiados como ligandos, obtenidos con el programa AutoDock Vina®. Se ha resaltado en verde los valores de AU alrededor de -12 kcal/mol, en amarillo de -11 kcal/mol y en azul de -9,5 kcal/mol.

	Ligando	AU (kcal/mol)
	aprepitant	-11,2
Derivados de L-arabinosa	52 β	-11,3
	52 α	-10,7
	56 β	-9,8
	56 α	-9,8
Derivados de D-glucosa	65 α	-12,2
	65 β	-12,1
	67 α	-12,2
	67 β	-12,1
	66 α	-9,2
	66 β	-9,9

Todos los análogos del aprepitant estudiados tienen en común que presentan en su estructura los fragmentos hidrófobos (*R*)-1-[3,5-Bis(trifluorometil)fenil]etilo en la posición anomérica y *p*-fluorobencilo en la posición C-2 del anillo de piranosa. Estos fragmentos se han ubicado, en todos los casos, en la misma región del sitio de unión del receptor NK1, experimentando interacciones similares.

En el caso de los *isopropiliden*acetales derivados de L-arabinosa **52 β** y **52 α** , y los *benciliden*acetales azida **65 α** y **65 β** y amina **67 α** y **67 β** derivados de D-glucosa, las interacciones hidrofóbicas que establecen tanto el grupo *isopropiliden*acetal como el *benciliden*acetal

compensan la ausencia de todas las interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno que establece el anillo de triazolona presente en el aprepitant, dado que sus valores de AU son similares a los del aprepitant (tabla 7). La gran similitud en los valores de AU obtenidos con los derivados de azida (**65 α** y **65 β**) y de amina (**67 α** y **67 β**) se puede deber a que ambos grupos funcionales tienen la capacidad de establecer intensas interacciones intermoleculares con las moléculas de agua, orientándose hacia la parte externa del sitio de unión del receptor NK1. Esta capacidad les confiere una elevada energía de desolvatación, que les impide interactuar con los residuos del sitio de unión del receptor NK1. La presencia de grupos hidrófobos (*isopropilo* y *bencilo*) se puede considerar clave para la estabilización de estos ligandos, ya que los valores de AU para los derivados polihidroxilados de L-arabinosa **56 β** y **56 α** y de D-glucosa **66 α** y **66 β** , que carecen de ellos, resultan ser algo menores, alrededor de -9,5 kcal/mol (tabla 7).

Dadas las pequeñas diferencias de los valores de AU entre los anómeros de los derivados de L-arabinosa y de D-glucosa estudiados (tabla 7), se puede concluir que, en general, no existen diferencias significativas entre las diferentes parejas de anómeros de todos los análogos estudiados.

En el caso de los derivados de D-galactosa estudiados también en nuestro grupo de investigación, los resultados son similares. Así, los derivados polihidroxilados son los de menores valores de AU (azul: AU \approx 9,5 kcal/mol), seguidos por los *isopropilidenderivados* (amarillo: AU \approx 11 kcal/mol), y por último por los derivados con grupo *bencilidenacetal* (verde: AU \approx 12 kcal/mol). Tampoco se han observado diferencias significativas entre los diferentes anómeros (figura 57).

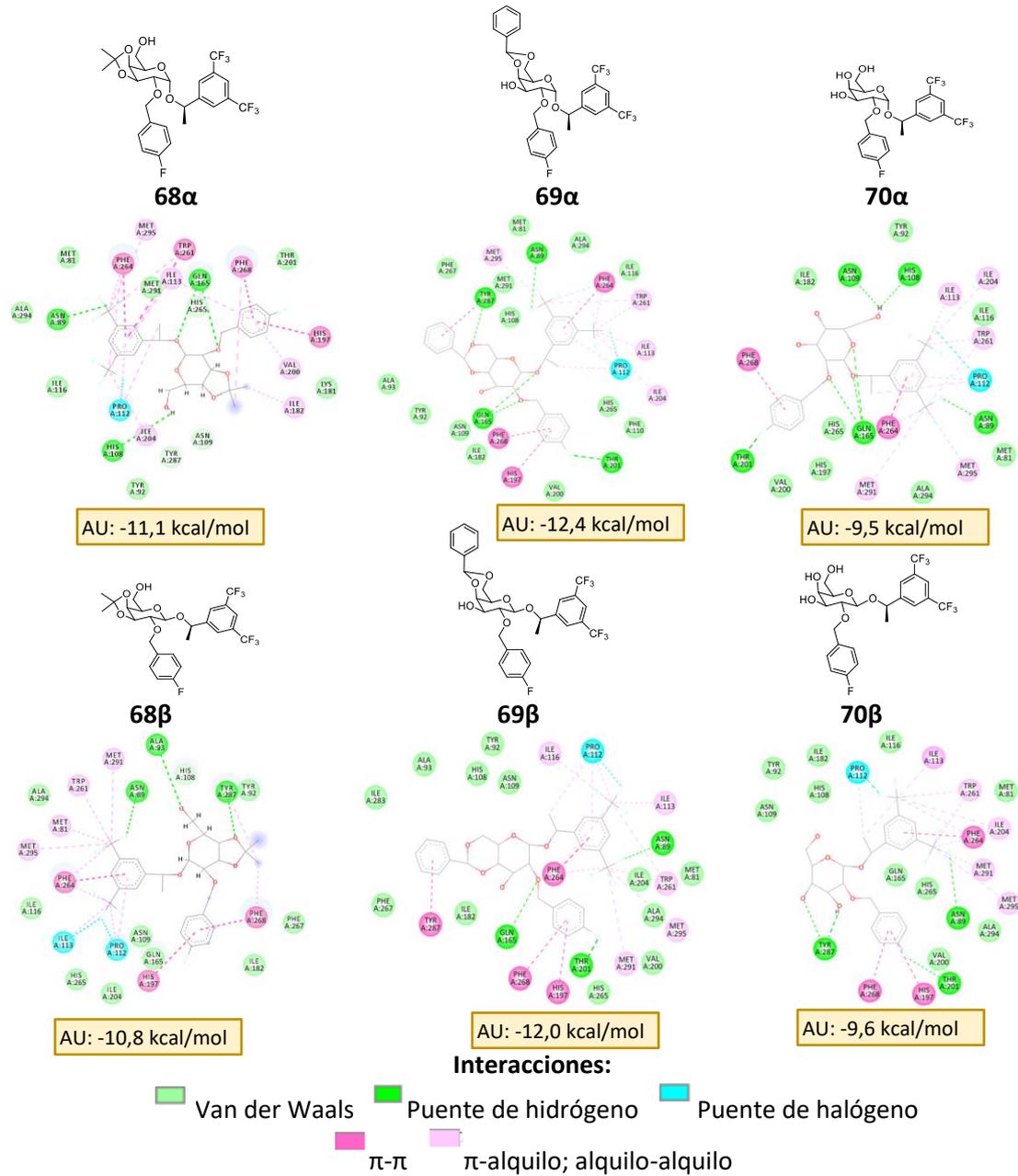


Figura 57. Diagrama 2D de interacciones de los derivados de D-galactosa con los aminoácidos del receptor NK1, en su región de acoplamiento más probable y sus valores de AU (kcal/mol).

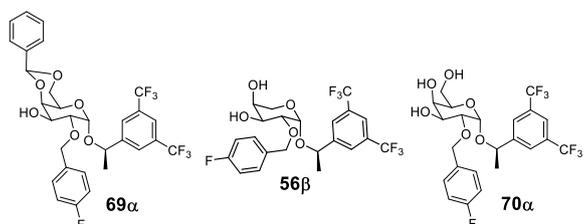
De todos los análogos estudiados, los que presentan el grupo bencilidenacetal (derivados de D-glucosa y D-galactosa) son los que dan lugar a mejores resultados en cuanto a su interacción con el sitio de unión del receptor NK1. Aunque los derivados de D-glucosa y de D-galactosa se diferencian en la estereoquímica de la posición 4 del anillo de piranosa, se obtienen valores de AU similares, alrededor de -12 kcal/mol. La presencia del grupo bencilidenacetal hace que el eje molecular longitudinal de estos derivados sea considerablemente mayor ($\approx 15 \text{ \AA}$) que el de los *isopropilidenderivados* ($\approx 12 \text{ \AA}$) y el de los derivados polihidroxilados ($\approx 11 \text{ \AA}$). El hecho de obtener valores superiores de AU con los primeros puede estar relacionado con su mayor longitud, que les permite interaccionar tanto con residuos de la parte central del sitio de unión del receptor NK1 como con residuos de la parte más externa del mismo. El grupo fenilo del acetal consigue establecer interacciones estabilizantes hidrofóbicas importantes (π - π , π -alquil) y de Van der Waals con residuos que no son posibles en los otros análogos. También es importante indicar que el grupo bencilidenacetal tiene un enlace rotable que proporciona al fenilo mayores grados de libertad dinámicos para ubicarse en la región del centro activo donde lograr un mayor número de interacciones estabilizantes, situación que no se da en el caso de los *isopropilidenderivados*, donde el grupo *isopropilo* se encuentra unido de forma rígida al anillo de piranosa. Los anillos de seis miembros tienen considerablemente menor tensión y más capacidad de deformación y plegamiento que los anillos de cinco miembros, lo que les proporciona mayores grados de libertad dinámicos para establecer a través de sus oxígenos, puentes de hidrógeno con grupos donadores de puentes de hidrógeno de los residuos de la zona central y externa del sitio de unión del receptor NK1.

Por lo tanto, podemos concluir que los fragmentos (*R*)-1-[3,5-Bis(trifluorometil)fenil]etilo en la posición anomérica, y *p*-fluorobencilo en la posición 2 son clave para una adecuada interacción del ligando con el sitio de unión del receptor NK1. Los derivados con un grupo bencilidenacetal en posición C-4 y C-6 del anillo de piranosa presentan los mayores valores de AU (alrededor -12

kcal/mol), por lo que en principio podrían proporcionar mejores resultados de actividad biológica. Aun así, dadas las pequeñas diferencias entre los valores de AU de todos los análogos ensayados (1-2 kcal/mol), los derivados con un grupo *isopropiliden*acetil en posición C-3 y C-4 del anillo de piranosa (AU alrededor -11 kcal/mol) y los derivados polihidroxilados (AU alrededor -9,5 kcal/mol) también son candidatos interesantes en todos los hidratos de carbono ensayados. Estos resultados concuerdan con los del test IP-one, ya que el derivado de D-galactosa con el grupo *benciliden*acetil **69α** presenta la mayor capacidad antagonista del receptor NK1 (k_{inact} **69α** = 0,21 μM) y mayor valor de AU (AU **69α** = -12,4 kcal/mol). Por tanto, es lógico que este *bencilid*enderivado sea el que también conduzca a los mejores resultados de actividad anticancerosa. Así, **69α** (IC₅₀ = 24,2 μM) presenta una de las mayores actividades citotóxicas en cáncer de pulmón, significativamente superior a la de los hidroxiderivados **70α** (IC₅₀ = 40,9 μM) y **70β** (IC₅₀ = 67,5 μM), además de ser el análogo de mayor selectividad (I.S. **69α** = 20,1). Sin embargo, en el caso de los *bencilid*enderivados de D-glucosa, las azidas **65α** (IC₅₀ no alcanzado) y **65β** (IC₅₀ = 115,3 μM) presentan la menor actividad citotóxica en cáncer de pulmón, lo que puede atribuirse a la presencia del grupo azida en C-3 del anillo de piranosa, ya que el aminoderivado **67α** (IC₅₀ = 12,4 μM; I.S. = 1,4) presenta una actividad citotóxica cercana a la del derivado de D-galactosa **69α** (IC₅₀ = 24,2 μM; I.S. = 20,1), aunque su selectividad es mucho menor.

Por lo tanto, se puede observar una correlación entre la actividad antagonista del receptor NK1 y la actividad citotóxica en cáncer de pulmón de los derivados de D-galactosa y L-arabinosa (figura 58). Sin embargo, aunque el aprepitant presenta una actividad antagonista significativamente superior (k_{inact} = 0,02 · 10⁻² μM),¹⁶⁴ en contra de lo que cabría esperar, su actividad citotóxica es tan solo algo mayor (IC₅₀ = 18,3 μM) que la del *benciliden*acetil **69α** (IC₅₀ = 24,2 μM) (figura 58).

Este resultado podría indicar que la actividad anticancerosa en estos derivados no se debe tan solo a su naturaleza como antagonista NK1, pudiendo estar implicados otro tipo de mecanismos.



	k_{inact} (μM)	IC_{50} (μM) (A549) ^a
69α (D-galactosa)	0,21	24,2
56β (L-arabinosa)	0,49	31,3
70α (D-galactosa)	0,65	40,9
Aprepitant	$0,02 \cdot 10^{-2}$ ^b	18,3

Figura 58. Comparativa de la actividad antagonista del receptor NK1 (k_{inact}) y de la actividad citotóxica en cáncer de pulmón (células tumorales A549)^a. ^bValor obtenido de referencia¹⁶⁴

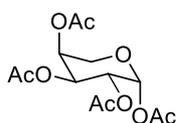
En este sentido apuntan también los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antitumoral en neuroblastoma. El bencilidenacetal derivado de D-galactosa **69 α** es el de menor actividad citotóxica (IC_{50} Kelly = 134,9 μM ; IC_{50} SH-SY5Y = 96,1 μM), a pesar de su mayor actividad antagonista del receptor NK1 (k_{inact} = 0,21 μM). Por su parte, el diol derivado de L-arabinosa **56 α** con mayor actividad citotóxica (IC_{50} Kelly = 26,8 μM ; IC_{50} SH-SY5Y = 38,0 μM), presenta menor actividad antagonista (k_{inact} no obtenida al no alcanzarse el IC_{50}).

Actualmente se están llevando a cabo estudios para determinar posibles mecanismos alternativos de actividad anticancerosa de los derivados sintetizados.

III.4. Parte experimental

III.4.1. Síntesis de los derivados de L-arabinosa

Tetraacetato de β -L-arabinosa, **45**



Sobre una disolución de L-arabinosa (100 mol%, 2 g, 13,3 mmol) y DMAP (10 mol%, 170,0 mg, 1,3 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL), bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se adiciona piridina (800 mol%, 9,0 ml, 106,6 mmol) y se mantiene en agitación a 0 °C durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se adiciona anhídrido acético (700 mol%, 9,0 ml, 93,3 mmol) gota a gota, se mantiene en agitación a 0 °C durante 4,5 horas y a continuación, se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se hidroliza con H_2O destilada a 0 °C, se mantiene a esta temperatura durante 20 minutos y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 10 horas. La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 y las fases orgánicas reunidas se lavan con disolución de HCl 1M, disolución saturada de NaHCO_3 y disolución saturada de NaCl y se secan sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras evaporar el disolvente a presión reducida, se obtiene **45** (4,2 g, 13,2 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: cuant.

P.f.: 80-83 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: +131,2 (c 1, CHCl_3).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 6,35 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H, H_1), 5,40-5,38 (m, 1H, H_4), 5,38-5,34 (m, 2H, H_5 , H_5'), 4,07 (dd, $J = 0,8$ y 13,3 Hz, 1H, H_2), 3,83 (dd, $J = 2,0$ y 13,2 Hz, 1H, H_3), 2,16 (s, 3H, OC(O)CH_3), 2,15 (s, 3H, OC(O)CH_3), 2,03 (s, 6H, OC(O)CH_3) ppm.

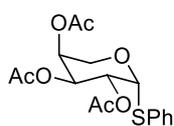
$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 170,5, 170,3, 170,1, 169,3, 90,4, 68,7, 67,2, 66,9, 62,9, 21,0, 21,0, 20,8, 20,7 ppm.

EMAR: calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_9\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 341,0843; encontrado 341,0839 (-1,1393 ppm).

Fenil 2,3,4-tri-O-acetil-1-desoxi-1-tio-L-arabinopiranosido, 46

Sobre una disolución de **45** (100 mol%, 4,1 g, 12,8 mmol) y tiofenol (190 mol%, 2,5 mL, 24,2 mmol) en CH₂Cl₂ (36 mL), bajo atmósfera de argón y a 0 °C, se adiciona gota a gota trifluoruro de boro eterato y se deja en agitación a temperatura ambiente. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 17 horas, la mezcla de reacción se trata con disolución saturada de NaHCO₃. La fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ y las fases orgánicas reunidas se lavan con disolución saturada de NaCl, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. De este modo, se obtiene una mezcla de los dos anómeros β:α en proporción 0,2:1 como un aceite amarillo. Tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: AcOEt 7:1), se obtiene el anómero **46β** (539,0 mg, 1,5 mmol) como un sólido amarillo y el anómero **46α** (3,0 g, 8,0 mmol) como un aceite amarillo, con un rendimiento total cuantitativo.

Fenil 2,3,4-tri-O-acetil-1-desoxi-1-tio-β-L-arabinopiranosido, 46β



P.f.: 65-68 °C.

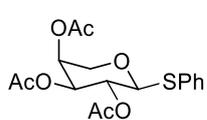
[α]_D²⁰: +211,9 (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,43 (dd, *J* = 1,5 y 8,4 Hz, 2H, SC₆H₅), 7,32-7,24 (m, 3H, SC₆H₅), 5,89 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H, H₁), 5,40-5,35 (m, 2H, H₄,H₅), 5,29 (dd, *J* = 3,4 y 10,3 Hz, 1H, H_{5'}), 4,39 (dd, *J* = 1,6 y 13,1 Hz, 1H, H₂), 3,75 (dd, *J* = 2,9 y 13,1 Hz, 1H, H₃), 2,13 (s, 3H, OC(O)CH₃), 2,11 (s, 3H, OC(O)CH₃), 2,04 (s, 3H, OC(O)CH₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 170,2, 170,1, 169,8, 133,1, 131,6, 129,1, 127,6, 85,9, 68,6, 68,5, 67,7, 61,4, 20,8, 20,8, 20,7 ppm.

EMAR: calculado para C₁₇H₂₀O₇NaS [M+Na]⁺: 391,0822; encontrado 391,0820 (-0,5418 ppm).

Fenil 2,3,4-tri-O-acetil-1-desoxi-1-tio- α -L-arabinopiranosido, 46 α



$[\alpha]_D^{20}$: +2,5 (c 1, CHCl₃).

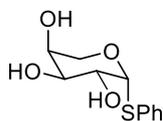
$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl₃): δ 7,50 (dd, $J = 2,0$ y $8,0$ Hz, 2H, SC₆H₅), 7,34-7,29 (m, 3H, SC₆H₅), 5,30-5,27 (m, 1H, H₄), 5,26 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, H₅), 5,11 (dd, $J = 3,4$ y $8,3$ Hz, 1H, H_{5'}), 4,83 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H₁), 4,17 (dd, $J = 4,3$ y $12,7$ Hz, 1H, H₂), 3,68 (dd, $J = 2,2$ y $12,7$ Hz, 1H, H₃), 2,10 (s, 3H, OC(O)CH₃), 2,10 (s, 3H, OC(O)CH₃), 2,06 (s, 3H, OC(O)CH₃) ppm.
 $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl₃): δ 170,3, 170,1, 169,5, 133,5, 132,5, 129,1, 128,1, 87,0, 70,6, 68,7, 67,7, 65,4, 21,0, 21,0, 20,8 ppm.

EMAR: calculado para C₁₇H₂₀O₇NaS: [M+Na]⁺: 391,0822, encontrado 391,0818 (-1,0306 ppm).

Fenil 1-desoxi-1-tio-L-arabinopiranosido, 48

Aunque se han separado ambos anómeros (**46 β** y **46 α**) para su correcta caracterización, para continuar la ruta sintética se utilizan ambos conjuntamente ya que son intermedios de reacción. Esto ha ocurrido con los demás anómeros que se describen por separado en este capítulo III. Por ello, sobre una disolución de la mezcla de los dos anómeros **46 β** y **46 α** (100 mol%, 13,4 g, 36,3 mmol), en metanol (160 mL), se adiciona a 0 °C, sodio (3 mol%, 28,0 mg, 1,2 mmol) y se deja en agitación a temperatura ambiente. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 1 hora, la mezcla de reacción es neutralizada con resina ácida de intercambio iónico (copolímero estireno-divinilbenceno) y se filtra. Se obtiene una mezcla de los dos anómeros **48 β** y **48 α** en proporción β : α 0,2:1, como sólidos amarillos (8,5 g, 35,2 mmol), con un rendimiento total cuantitativo.

Fenil 1-desoxi-1-tio- β -L-arabinopiranosido, 48 β



P.f.: 158-161 °C.

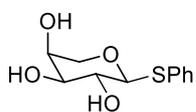
$[\alpha]_D^{20}$: +211,2 (c 1, CH₃OH).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-D₆): δ 7,39 (dd, *J* = 1,3 y 8,5 Hz, 2H, SC₆H₅), 7,31 (td, *J* = 1,8 y 7,5 Hz, 2H, SC₆H₅), 7,22 (tt, *J* = 1,1 y 7,3 Hz, 1H, SC₆H₅), 5,33 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, OH), 5,32 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, H₁), 4,87 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H, OH), 4,60 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, OH), 3,87-3,83 (m, 1H, H₄), 3,83-3,75 (m, 2H, H₅, H_{5'}), 3,64-3,60 (m, 1H, H₂), 3,50 (dd, *J* = 6,5 y 11,0 Hz, 1H, H₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-D₆): δ 135,8, 129,5, 128,9, 126,2, 86,8, 70,6, 70,4, 65,5, 65,1 ppm.

EMAR: calculado para C₁₁H₁₄O₄NaS: [M+Na]⁺: 265,0505, encontrado 265,0508 (1,1097 ppm).

Fenil 1-desoxi-1-tio-α-L-arabinopiranosido, 48α



P.f.: 118-120 °C.

[α]_D²⁰: -54,0 (c 1, CH₃OH).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-D₆): δ 7,40 (dd, *J* = 1,3 y 8,4 Hz, 2H, SC₆H₅), 7,31 (td, *J* = 1,8 y 7,5 Hz, 2H, SC₆H₅), 7,22 (tt, *J* = 1,1 y 7,4 Hz, 1H, SC₆H₅), 5,23 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H, OH), 4,89 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H, OH), 4,82 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H, H₁), 4,61 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H, OH), 3,84 (dd, *J* = 5,7 y 11,4 Hz, 1H, H₅), 3,77-3,72 (m, 1H, H₅), 3,65-3,60 (m, 1H, H₄), 3,54-3,48 (m, 1H, H₂), 3,44 (dd, *J* = 2,7 y 11,4 Hz, 1H, H₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 132,8, 132,4, 129,2, 128,3, 89,4, 74,3, 70,4, 70,0, 68,8 ppm.

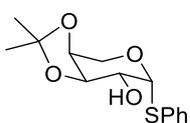
EMAR: calculado para C₁₁H₁₄O₄NaS: [M+Na]⁺: 265,0505, encontrado 265,0507 (0,5975 ppm).

Fenil 1-desoxi-3,4-O-isopropiliden-1-tio-L-arabinopiranosido, 49

La mezcla de los dos anómeros **48β** y **48α** (100 mol%, 8,1 g, 33,9 mmol) y CSA (3 mol%, 236,3 mg, 1,0 mmol), bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se disuelve en 2,2-dimetoxipropano (6000 mol%, 250 mL, 2,0 mol). Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 30 minutos, la mezcla de reacción se neutraliza con Et₃N, se evapora a presión reducida y se coevapora con tolueno. El crudo obtenido se disuelve en la mínima cantidad posible de metanol (4 mL), se adiciona CSA (3 mol%, 236,3 mg, 1,0 mmol) a 0 °C y se

mantiene en agitación durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción se neutraliza con Et₃N, se evapora a presión reducida y se coevapora con tolueno. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: AcOEt 3:1), obteniéndose una mezcla de los dos anómeros **49β** (sólido amarillo) y **49α** (sirupo amarillo) en proporción β:α 0,2:1 (8,5 g, 30,1 mmol), con un rendimiento total del 89%.

Fenil 1-desoxi-3,4-O-isopropiliden-1-tio-β-L-arabinopiranosido, 49β



P.f.: 66-68 °C.

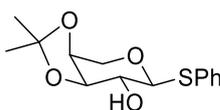
[α]_D²⁰: +248,8 (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,50 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H, SC₆H₅), 7,33-7,25 (m, 3H, SC₆H₅), 5,50 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H, H₁), 4,39 (dd, *J* = 3,2 y 13,3 Hz, 1H, H_{5'}), 4,31-4,27 (m, 1H, H₄), 4,17 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H, H₅), 4,14-4,09 (m, 1H, H₂), 3,96 (dd, *J* = 1,9 y 13,3 Hz, 1H, H₃), 2,37 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H, OH), 1,54 (s, 3H, CH₃), 1,38 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 134,0, 131,6, 129,3, 127,6, 109,7, 88,3, 76,1, 72,7, 70,5, 62,0, 28,2, 26,1 ppm.

EMAR: calculado para C₁₄H₁₈O₄NaS: [M+Na]⁺: 305,0818; encontrado 305,0816 (-0,5724 ppm).

Fenil 1-desoxi-3,4-O-isopropiliden-1-tio-α-L-arabinopiranosido, 49α



[α]_D²⁰: -17,2 (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,55 (dd, *J* = 2,2 y 7,9 Hz, 2H, SC₆H₅), 7,34-7,29 (m, 3H, SC₆H₅), 4,53 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H, H₁), 4,29-4,24 (m, 2H, H₄, H_{5'}), 4,10 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H, H₅), 3,83-3,78 (m, 1H, H₂), 3,65 (ddd, *J* = 2,7, 6,8 y 9,4 Hz, 1H, H₃), 2,49 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, OH), 1,46 (s, 3H, CH₃), 1,36 (s, 3H, CH₃) ppm.

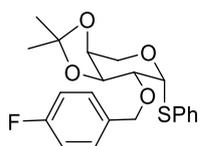
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 132,9, 132,4, 129,2, 128,2, 110,3, 88,4, 78,4, 73,1, 71,7, 65,9, 28,1, 26,3 ppm.

EMAR: calculado para $C_{14}H_{18}O_4NaS$: $[M+Na]^+$: 305,0818; encontrado 305,0818 (-0,0513 ppm).

Fenil 1-desoxi-2-O-(p-fluorobencil)-3,4-O-isopropiliden-1-tio-L-arabinopiranosido, 50

Sobre una disolución de la mezcla de los dos anómeros **49 β** y **49 α** (100 mol%, 8,2 g, 28,9 mmol) en THF (130 mL), se adiciona una disolución de NaH (500 mol%, 3,5 g, 144,6 mmol) en THF (20 mL) y se deja en agitación durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se adiciona INBu₄ (60 mol%, 6,4 g, 17,4 mmol) y tras 30 minutos en agitación, se adiciona cloruro de *p*-fluorobencilo (150 mol%, 5,2 mL, 43,4 mmol). La reacción se deja en agitación a temperatura ambiente, 24 horas. Una vez consumido el producto de partida, la mezcla de reacción se trata con disolución saturada de NH₄Cl. La fase acuosa se extrae con AcOEt y las fases orgánicas reunidas se lavan con disolución saturada de NaCl, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: AcOEt 10:1), obteniéndose una mezcla de los dos anómeros **50 β** (sirupo amarillo) y **50 α** (sólido amarillo) en proporción β : α 0,2:1 (10,7 g, 27,5 mmol), con un rendimiento total cuantitativo.

Fenil 1-desoxi-2-O-(p-fluorobencil)-3,4-O-isopropiliden-1-tio- β -L-arabinopiranosido, 50 β



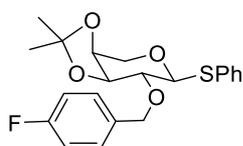
$[\alpha]_D^{20}$: +191,0 (*c* 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,50-7,45 (m, 2H, SC₆H₅), 7,41-7,36 (m, 2H, FC₆H₄), 7,32-7,27 (m, 2H, SC₆H₅), 7,24 (tt, *J* = 1,2 y 6,1 Hz, 1H, SC₆H₅), 7,02 (tt, *J* = 2,9 y 8,7 Hz, 2H, FC₆H₄), 5,59 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H, H₁), 4,74 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H, OCH₂), 4,70 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H, OCH₂), 4,38 (dd, *J* = 2,6 y 13,4 Hz, 1H, H_{5'}), 4,32-4,26 (m, 2H, H₄, H₅), 3,92 (dd, *J* = 1,0 y 13,5 Hz, 1H, H₃), 3,89 (dd, *J* = 5,0 y 5,1 Hz, 1H, H₂), 1,45 (s, 3H, CH₃), 1,36 (s, 3H, CH₃) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 162,6 (d, $J = 246,0$ Hz, FC_6H_4) , 134,9, 133,6 (d, $J = 3,1$ Hz, FC_6H_4), 130,9, 129,8 (d, $J = 8,1$ Hz, FC_6H_4), 129,1, 127,1, 115,4 (d, $J = 21,5$ Hz, FC_6H_4), 109,4, 85,7, 76,5, 74,5, 73,2, 71,9, 61,0, 28,0, 26,1 ppm.

EMAR: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{FNaS}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 413,1193; encontrado 413,1186 (-1,7970 ppm).

Fenil 1-desoxi-2-O-(p-fluorobencil)-3,4-O-isopropiliden-1-tio- α -L-arabinopiranosido, 50 α



P.f.: 48-50 °C.

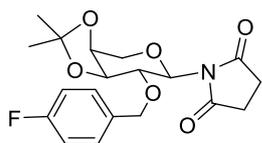
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -16,6 (c 1, CHCl_3).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7,53-7,49 (m, 2H, SC_6H_5), 7,40-7,35 (m, 2H, FC_6H_4), 7,31-7,24 (m, 3H, SC_6H_5), 7,02 (tt, $J = 2,9$ y $8,7$ Hz, 2H, FC_6H_4), 4,79 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, H_1), 4,77 (d, $J = 11,3$ Hz, 1H, OCH_2), 4,65 (d, $J = 11,3$ Hz, 1H, OCH_2), 4,32-4,28 (m, 1H, H_4), 4,23 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H, H_5), 4,20 (dd, $J = 3,9$ y $13,0$ Hz, 1H, H_5'), 3,77 (dd, $J = 3,9$ y $13,0$ Hz, 1H, H_3), 3,59 (dd, $J = 6,0$ y $8,0$ Hz, 1H, H_2), 1,47 (s, 3H, CH_3), 1,37 (s, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 162,6 (d, $J = 245,7$ Hz, FC_6H_4), 134,2, 133,8 (d, $J = 3,2$ Hz, FC_6H_4), 132,1, 130,1 (d, $J = 8,1$ Hz, FC_6H_4), 129,0, 127,6, 115,3, (d, $J = 21,4$ Hz, FC_6H_4), 110,2, 86,5, 78,5, 78,4, 72,8, 72,7, 64,9, 27,9, 26,3 ppm.

EMAR: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{FNaS}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 413,1193; encontrado 413,1188 (-1,3109 ppm).

Succinimidil 1-desoxi-2-O-(p-fluorobencil)-3,4-O-isopropiliden- α -L-arabinopiranosido, 53



El compuesto **53** se ha obtenido como subproducto en la síntesis del glicósido **52** siguiendo la *metodología sintética A* descrita en el apartado de *Resultados y discusión*.

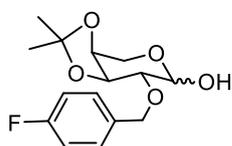
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7,25-7,17 (m, 2H, FC_6H_4), 7,03-6,95 (m, 2H, FC_6H_4), 4,94 (d, $J = 9,9$ Hz, 1H, H_1), 4,84 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H, OCH_2), 4,66-4,61 (m, 1H, H_4), 4,49 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H, OCH_2),

4,34-4,24 (m, 3H, H₅, H_{5'}, H₃), 3,90-3,83 (m, 1H, H₂), 2,56 (t, *J* = 2,70 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2,55 (t, *J* = 2,64 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1,62 (s, 3H, CH₃), 1,40 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 176,3 (s, C(O)), 162,4 (d, *J* = 246,0 Hz, FC₆H₄), 134,3 (d, *J* = 3,1 Hz, FC₆H₄), 129,7 (d, *J* = 8,2 Hz, FC₆H₄), 115,3 (d, *J* = 21,3 Hz, FC₆H₄), 110,4, 80,1, 78,9, 74,8, 73,7, 72,5, 66,2, 28,0, 26,3 ppm.

EMAR: calculado para C₁₉H₂₂O₆NFNa: [M+Na]⁺: 402,1323; encontrado 402,1324 (0,0985 ppm).

2-O-(*p*-fluorobencil)-3,4-O-isopropiliden- α,β -L-arabinopiranosido, 54



Sobre una disolución de la mezcla de los dos anómeros **50 β** y **50 α** (100 mol%, 5,3 g, 13,7 mmol) en una mezcla acetona: H₂O 99:1 (170 mL), en ausencia de luz y a -15 °C, se adiciona N-bromosuccinimida (130 mol%, 3,2 g, 17,9 mmol). Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 15 minutos, la mezcla de reacción se trata con disolución saturada de NaHCO₃. La fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ y las fases orgánicas reunidas se lavan con disolución saturada de NaHCO₃ y disolución saturada de NaCl, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: AcOEt 5:1), obteniéndose **54** como un sólido blanco de la mezcla de los dos anómeros β : α en proporción 2:1 (3,3 g, 11,0 mmol),

Rdto.: 80%

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,38-7,32 (m, 2H _{β} , 2H _{α} , FC₆H₄), 7,05-7,01 (m, 2H _{β} , 2H _{α} , FC₆H₄), 5,17 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H _{β} , H₁), 4,77 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H _{β} , OCH₂), 4,76-4,74 (m, 2H _{α} , OCH₂), 4,73 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H _{α} , H₁), 4,66 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H _{β} , OCH₂), 4,37 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H _{β} , H₅), 4,26-4,21 (m, 1H _{β} , H₄, 2H _{α} , H₄, H₅), 4,15 (dd, *J* = 3,0 y 13,1 Hz, 1H _{β} , H_{5'}), 4,08 (dd, *J* = 2,6 y 13,1 Hz, 1H _{α} , H_{5'}), 3,87 (dd, *J* = 1,8 y 13,1 Hz, 1H _{β} , H₃), 3,82 (dd, *J* = 3,2 y 13,1 Hz, 1H _{α} , H₃), 3,58 (dd, *J* = 3,4 y 6,2 Hz, 1H _{β} , H₂), 3,46 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H _{α} , H₂), 1,47 (s, 3H _{α} , CH₃), 1,45 (s, 3H _{β} , CH₃), 1,36 (s, 3H _{β} , 3H _{α} , CH₃) ppm.

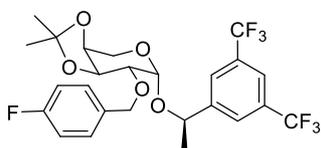
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 162,7 (d, *J*= 246,3 Hz, FC₆H₄), 162,6 (d, *J*= 245,4 Hz, FC₆H₄), 133,9 (d, *J*= 3,7 Hz, FC₆H₄), 133,6 (d, *J*= 2,8 Hz, FC₆H₄), 130,0 (d, *J*= 8,0 Hz, FC₆H₄), 129,9 (d, *J*= 8,1 Hz, FC₆H₄), 115,5 (d, *J*= 21,5 Hz, FC₆H₄), 115,4 (d, *J*= 21,2 Hz, FC₆H₄), 110,1, 109,4, 95,8, 91,1, 79,5, 77,4, 76,4, 74,6, 73,0, 72,8, 72,5, 72,1, 62,8, 60,0, 27,9, 27,8, 26,1, 25,9 ppm.

EMAR: calculado para C₁₅H₁₉O₅FNa: [M+Na]⁺: 321,1109; encontrado 321,1106 (-0,9663 ppm).

(*R*)-{1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etil} 2-*O*-(*p*-fluorobencil)-3,4-*O*-isopropiliden-L-arabinopiranosido, 52

Sobre una disolución de **54** (100 mol%, 1,4 g, 4,7 mmol) en CH₂Cl₂ (35 mL), bajo atmósfera de argón y a 0 °C, se adiciona gota a gota tricloroacetnitrilo (500 mol%, 2,4 mL, 23,7 mmol), y a continuación DBU (100 mol%, 0,7 mL, 4,7 mmol). La reacción se deja en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Seguidamente, la mezcla de reacción se trata con disolución saturada de NaCl. La fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂, y las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Sobre una disolución del intermedio obtenido y (*R*)-1-[3,5-Bis(trifluorometil)fenil]etanol (100 mol%, 1,2 g, 4,7 mmol), en Et₂O (95 mL), bajo atmósfera de argón y a 0 °C, se adiciona gota a gota TMSOTf (10 mol%, 0,1 mL, 0,5 mmol), y se deja subir la temperatura hasta temperatura ambiente. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 24 horas, la mezcla de reacción se trata con disolución saturada de NaHCO₃ y se filtran ambas fases. La fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂, y las fases orgánicas reunidas se lavan con disolución saturada de NaCl, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante dos cromatografías en columna de gel de sílice (hexano: acetona 50:1 y hexano: AcOEt 20:1), obteniéndose una mezcla de los dos anómeros **52β** (sirupo amarillo) y **52α** (sólido amarillo) en proporción β:α 2:1 (1,6 g, 3,0 mmol), con un rendimiento total del 66%.

(R)-{1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etil} 2-*O*-(*p*-fluorobencil)-3,4-*O*-isopropiliden-β-*L*-arabinopiranosido, **52β**



Rdto.: 44%

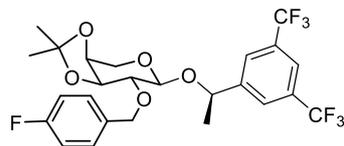
[α]_D²⁰: +124,9 (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,90 (sa, 2H, CF₃C₆H₃), 7,82 (sa, 1H, CF₃C₆H₃), 7,22-7,17 (m, 2H, FC₆H₄), 6,95 (t, *J* = 8,7 Hz, 2H, FC₆H₄), 4,91 (c, *J* = 6,6 Hz, 1H, OCHCH₃), 4,64-4,60 (m, 2H, OCH₂), 4,59 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H, H₁), 4,43 (dd, *J* = 5,7 y 7,7 Hz, 1H, H_{5'}), 4,31-4,26 (m, 1H, H₄), 4,03 (dd, *J* = 2,8 y 13,2 Hz, 1H, H₃), 4,00 (t, *J* = 13,1 Hz, 1H, H₅), 3,44 (dd, *J* = 3,4 y 7,8 Hz, 1H, H₂), 1,52 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H, OCHCH₃), 1,37 (s, 6H, CCH₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 162,5 (d, *J* = 245,5 Hz, FC₆H₄), 145,8 (CF₃C₆H₃), 133,8 (d, *J* = 2,9 Hz, FC₆H₄), 132,0 (c, *J* = 33,2 Hz, CF₃C₆H₃), 129,7 (d, *J* = 8,2 Hz, FC₆H₄), 126,8 (sa, CF₃C₆H₃), 123,4 (c, *J* = 272,6 Hz, CF₃C₆H₃), 121,8 (sept, *J* = 3,8 Hz, CF₃C₆H₃), 115,2 (d, *J* = 21,6 Hz, FC₆H₄), 109,1, 95,1, 76,0, 75,7, 73,6, 72,9, 71,4, 59,3, 28,2, 26,4, 24,5 ppm.

EMAR: calculado para C₂₅H₂₅O₅F₇Na: [M+Na]⁺: 561,1482; encontrado 561,1476 (-1,2257 ppm).

(R)-{1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etil}2-*O*-(*p*-fluorobencil)-3,4-*O*-isopropiliden-α-*L*-arabinopiranosido, **52α**



Rdto.: 22%

P.f.: 45-48 °C

[α]_D²⁰: +14,3 (c 1, CHCl₃).

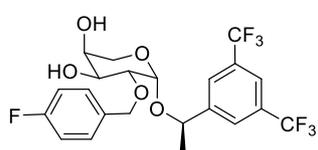
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,80 (sa, 2H, CF₃C₆H₃), 7,78 (sa, 1H, CF₃C₆H₃), 7,40-7,36 (m, 2H, FC₆H₄), 7,04 (tt, *J* = 3,0 y 8,7 Hz, 2H, FC₆H₄), 4,94 (c, *J* = 6,5 Hz, 1H, OCHCH₃), 4,82 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H, OCH₂), 4,79 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H, OCH₂), 4,59 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H, H₁), 4,25 (dt, *J* = 4,4 y 6,3 Hz, 1H, H₄), 4,16 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H, H₅), 3,87 (dd, *J* = 4,5 y 12,8 Hz, 1H, H_{5'}), 3,63 (dd, *J* = 4,3 y 12,8 Hz,

1H, H₃), 3,52 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, H₂), 1,52 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H, OCHCH₃), 1,41 (s, 3H, CCH₃), 1,35 (s, 3H, CCH₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 162,6 (d, *J* = 245,7 Hz, FC₆H₄), 146,6 (CF₃C₆H₃), 134,0 (d, *J* = 2,9 Hz, FC₆H₄), 131,7 (c, *J* = 33,3 Hz, CF₃C₆H₃), 129,9 (d, *J* = 8,0 Hz, FC₆H₄), 126,4 (sa, CF₃C₆H₃), 123,5 (c, *J* = 272,8 Hz, CF₃C₆H₃), 121,4 (sept, *J* = 3,9 Hz, CF₃C₆H₃), 115,3 (d, *J* = 21,3 Hz, FC₆H₄), 110,3, 100,8, 79,7, 78,0, 75,0, 72,9, 72,7, 62,5, 27,8, 26,0, 22,6 ppm.

EMAR: calculado para C₂₅H₂₅O₅F₇Na: [M+Na]⁺: 561,1482; encontrado 561,1473 (-1,7384 ppm).

(R)-{1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-(p-fluorobencil)-β-L-arabinopiranosido, 56β



Sobre una disolución de **52β** (100 mol%, 595,0 mg, 1,1 mmol) en metanol (24 mL), se adiciona una cantidad catalítica de CSA (3 mol%, 7,7 mg, 0,03 mmol) a temperatura ambiente. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 20 horas, la mezcla de reacción se neutraliza con Et₃N (20 mol%, 0,03 mL, 0,2 mmol), se evapora el disolvente a presión reducida y se evapora dos veces con tolueno. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano:AcOEt 1:1), obteniéndose **56β** (424,6 mg, 0,9 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: 77%

P.f.: 91-93 °C.

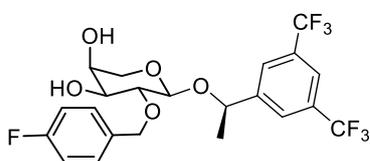
[α]_D²⁰: +121,7 (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,88 (sa, 2H, CF₃C₆H₃), 7,83 (sa, 1H, CF₃C₆H₃), 7,19-7,13 (m, 2H, FC₆H₄), 6,95 (t, *J* = 8,6 Hz, 2H, FC₆H₄), 4,91 (c, *J* = 6,6 Hz, 1H, OCHCH₃), 4,72 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H, H₁), 4,51 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H, OCH₂), 4,33 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H, OCH₂), 4,11 (dd, *J* = 3,4 y 9,7 Hz, 1H, H_{5'}), 4,04-4,00 (m, 1H, H₄), 3,91 (dd, *J* = 1,1 y 12,5 Hz, 1H, H₅), 3,76 (dd, *J* = 1,5 y 12,5 Hz, 1H, H₃), 3,66 (dd, *J* = 3,4 y 9,7 Hz, 1H, H₂), 1,53 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H, OCHCH₃) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125MHz, CDCl_3): δ 162,7 (d, $J = 246,5$ Hz, FC_6H_4), 145,9 ($\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$), 133,4 (d, $J = 3,3$ Hz, FC_6H_4), 132,1 (c, $J = 33,3$ Hz, $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$), 129,8 (d, $J = 8,2$ Hz, FC_6H_4), 126,8 (sa, $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$), 123,4 (c, $J = 272,6$ Hz, $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$), 121,9 (sept, $J = 3,8$ Hz, $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$), 115,5 (d, $J = 21,4$ Hz, FC_6H_4), 95,1, 76,1, 73,0, 72,0, 69,2, 68,7, 62,6, 24,3 ppm.

EMAR: calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{F}_7\text{Na}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 521,1169; encontrado 521,1161 (-1,6470 ppm).

(R)-{1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etil} 2-O-(p-fluorobencil)- α -L-arabinopiranosido, 56 α



Sobre una disolución de **52 α** (100 mol%, 420,0 mg, 0,78 mmol) en metanol (17 mL), se adiciona una cantidad catalítica de CSA (3 mol%, 5,4 mg, 0,02 mmol), a temperatura ambiente. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de

reacción de 20 horas, la mezcla de reacción se neutraliza con Et_3N (20 mol%, 0,02 mL, 0,2 mmol), se evapora el disolvente a presión reducida y se evapora dos veces con tolueno. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: AcOEt 1:1), obteniéndose **56 α** (271,9 mg, 0,5 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: 70%

P.f.: 62-65 $^\circ\text{C}$.

$[\alpha]_D^{20}$: +9,6 (c 1, CHCl_3).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7,81 (sa, 2H, $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$), 7,79 (sa, 1H, $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$), 7,37-7,31 (m, 2H, FC_6H_4), 7,05 (t, $J = 8,6$ Hz, 2H, FC_6H_4), 4,99 (c, $J = 6,5$ Hz, 1H, OCHCH_3), 4,88 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H, OCH_2), 4,70 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H, OCH_2), 4,59 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H, H_1), 3,92-3,88 (m, 1H, H_4), 3,77 (dd, $J = 3,9$ y 12,6 Hz, 1H, H_5), 3,72 (dd, $J = 3,4$ y 8,0 Hz, 1H, H_5'), 3,58 (dd, $J = 6,3$ y 8,0 Hz, 1H, H_2), 3,45 (dd, $J = 1,3$ y 12,6 Hz, 1H, H_3), 1,53 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, OCHCH_3) ppm.

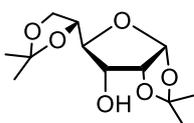
$^{13}\text{C-RMN}$ (125MHz, CDCl_3): δ 162,7 (d, $J = 246,4$ Hz, FC_6H_4), 146,0 ($\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$), 133,9 (d, $J = 3,3$ Hz, FC_6H_4), 131,8 (c, $J = 33,3$ Hz, $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$), 129,8 (d, $J = 8,2$ Hz, FC_6H_4), 126,4 (sa, $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$), 123,4 (c, J

= 272,7 Hz, $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$), 121,6 (sept, $J = 3,7$ Hz, $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_3$), 115,6 (d, $J = 21,6$ Hz, FC_6H_4), 101,0, 78,6, 75,2, 73,7, 72,1, 67,4, 64,7, 22,1 ppm.

EMAR: calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{F}_7\text{Na}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 521,1169; encontrado 521,1162 (-1,5125 ppm).

III.4.2. Síntesis de los derivados de D-glucosa

1,2,5,6-O-isopropiliden-D- α -alofuranosa, **57**



Sobre 25 mL de DMSO, bajo atmósfera de argón y a 18-20 °C, se adiciona lentamente P_2O_5 (100 mol%, 5,5 g, 38,4 mmol). Tras 15 minutos en agitación a 18-20 °C, se adiciona diacetón-D-glucosa (100 mol%, 10 g, 38,4 mmol)

disuelta en 50 mL de DMSO. A continuación, se deja en agitación a 50 °C. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 3 horas, se añade TBME (60 mL) a la mezcla de reacción, se extrae con TBME (40 mL) y las fases orgánicas reunidas se evaporan a presión reducida hasta un volumen de 75 mL. La disolución obtenida es adicionada, a 0-10 °C, sobre una disolución de NaBH_4 (63 mol%, 0,9 g, 24,2 mmol) en H_2O destilada (38 mL). Tras un tiempo de reacción de 30 minutos, se diluye la mezcla de reacción con H_2O destilada, la fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 y las fases orgánicas reunidas se evaporan a presión reducida. El crudo obtenido se disuelve en TBME y se extrae con H_2O destilada. Las fases acuosas reunidas, se extraen con CH_2Cl_2 y se secan sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras evaporar el disolvente a presión reducida, el crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: TBME 2:1), obteniéndose **57** (7,5 g, 28,9 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: 75%

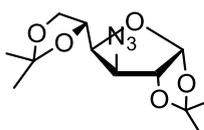
P.f.: 76-78 °C.

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5,81 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H, H_1), 4,61 (dd, $J = 3,9$ y 5,1 Hz, 1H, H_4), 4,30 (td, $J = 4,8$ y 6,6 Hz, 1H, H_5), 4,10-3,99 (m, 3H, H_2 , H_6 , H_6'), 3,82 (dd, $J = 4,8$ y 8,5 Hz, 1H, H_3), 2,52 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, OH), 1,58 (s, 3H, CH_3), 1,46 (s, 3H, CH_3), 1,38 (s, 3H, CH_3), 1,37 (s, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 113,0, 110,0, 104,1, 80,0, 79,2, 75,8, 72,7, 66,1, 26,7, 26,7, 26,5, 25,4 ppm.

EMAR: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 283,1152; encontrado 283,1156 (0,3935 ppm).

3-azido-3-desoxi-1,2,5,6-O-isopropiliden-D-glucofuranosa, **59**



Sobre una disolución de **57** (100 mol%, 5,0 g, 19,2 mmol) en una mezcla CH_2Cl_2 : Piridina 10:1 (55 ml), bajo atmósfera de argón y a 0 °C, se adiciona anhídrido trifluorometanosulfónico (150 mol%, 4,8 mL 28,8 mmol) gota a gota. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 1 hora, la mezcla de reacción se hidroliza con H_2O destilada. La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 y las fases orgánicas reunidas se lavan con disolución saturada de NaCl, se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El triflato **58** intermedio obtenido se disuelve en DMF (500 mL), se añade NaN_3 (500 mol%, 5,8 g, 88,8 mmol) a 0 °C y se deja subir la temperatura hasta temperatura ambiente. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 24 horas, la mezcla de reacción se hidroliza con H_2O destilada. La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 y las fases orgánicas reunidas se lavan con disolución saturada de NaCl, se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. De este modo, se obtiene **59** (5,1 g, 17,8 mmol) como un sirupo naranja.

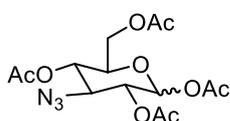
Rdto.: cuant.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5,85 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H, H_1), 4,61 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H, H_4), 4,26-4,21 (m, 1H, H_5), 4,15-4,08 (m, 3H, H_2 , H_6 , H_6'), 3,97 (dd, $J = 8,7$ y $4,9$ Hz, 1H, H_3), 1,51 (s, 3H, CH_3), 1,43 (s, 3H, CH_3), 1,37 (s, 3H, CH_3), 1,32 (s, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 112,5, 109,7, 105,2, 83,6, 80,7, 73,2, 67,8, 66,6, 27,0, 26,8, 26,4, 25,3 ppm.

EMAR: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 308,1217; encontrado 308,1219 (0,6980 ppm).

Tetraacetato de 3-azido-3-desoxi- α,β -D-glucopiranososa, 60



Se disuelve **59** en una mezcla $\text{CF}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ 20:3, a 0 °C. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 1 hora, se evapora a presión reducida y se coevapora con tolueno. El intermedio obtenido se disuelve en piridina (150 mL), bajo atmósfera de argón y a 0 °C, se adiciona anhídrido acético (4900 mol%, 81,7 mL, 864,8 mmol) y se deja subir la temperatura hasta temperatura ambiente. Tras 18 horas, la mezcla de reacción es evaporada a presión reducida coevaporando con tolueno. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: AcOEt 5:1), obteniéndose un aceite amarillo **60** (4,9 g, 13,0 mmol) como una mezcla de los dos anómeros $\alpha:\beta$ en proporción 1:0,7, con un rendimiento total del 74%.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 6,29 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H_α , H_1), 5,66 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H_β , H_1), 5,05-4,98 (m, 1H_α , H_6 , 2H_β , H_6 , H_6'), 4,94 (dd, $J = 3,6$ y $10,7$ Hz, 1H_α , H_6'), 4,25-4,18 (m, 1H_α , H_4 , 1H_β , H_4), 4,08 (td, $J = 2,1$ y $13,0$ Hz, 1H_α , H_5), 4,06-4,00 (m, 1H_α , H_2 , 1H_β , H_2), 3,95 (t, $J = 10,3$ Hz, 1H_α , H_3), 3,78 (ddd, $J = 2,3$, $4,7$ y $9,9$ Hz 1H_β , H_5), 3,68 (t, $J = 10,1$ Hz, 1H_β , H_3), 2,17 (s, 3H_α , CH_3), 2,13 (s, 3H_α , CH_3), 2,12 (s, 3H_β , CH_3), 2,11 (s, 3H_β , CH_3), 2,10 (s, 3H_β , CH_3), 2,09-2,06 (m, 6H_α , 3H_β , CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 170,7, 170,7, 169,5, 169,2, 169,2, 169,1, 169,0, 168,7, 92,1, 88,9, 73,7, 70,3, 70,2, 70,1, 68,0, 68,0, 64,4, 61,7, 61,6, 61,0, 20,9, 20,9, 20,8, 20,7, 20,7, 20,6 ppm.

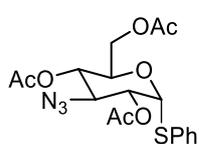
EMAR: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{N}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 396,1014; encontrado 396,1008 (-1,2783 ppm).

Fenil 2,4,6-tri-O-acetil-3-azido-1,3-didesoxi-1-tio-D-glucopiranosido, 61

Sobre una disolución de **60** (100 mol%, 2,0 g, 5,3 mmol) y tiofenol (190 mol%, 1,0 mL, 10,1 mmol) en CH_2Cl_2 (15 ml), bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se adiciona gota a gota trifluoruro de boro eterato y se deja en agitación a 40 °C. Una vez consumido el producto de partida, tras 17 horas, la mezcla de reacción se trata con disolución saturada de NaHCO_3 . La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 y las fases orgánicas reunidas se lavan con disolución saturada de

NaCl, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. De este modo, se obtiene un sólido naranja como una mezcla de los dos anómeros α:β en proporción 0,2:1. Tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: AcOEt 7:1), se obtiene el anómero **61α** (237,4 mg, 0,6 mmol) como un sólido marrón y el anómero **61β** (1,5 g, 3,5 mmol) como un sólido blanco, con un rendimiento total del 77%.

Fenil 2,4,6-tri-O-acetil-3-azido-1,3-didesoxi-1-tio-α-D-glucopiranosido, 61α



P.f.: 102-105 °C.

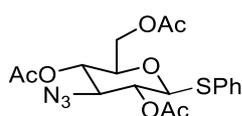
[α]_D²⁰: +167,5 (c 1, CHCl₃)

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,44 (dd, *J* = 1,9 y 8,1 Hz, 2H, SC₆H₅), 7,33-7,28 (m, 3H, SC₆H₅), 5,89 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H, H₁), 4,97 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, H_{6'}), 4,95 (t, *J* = 9,8 Hz, 1H, H₆), 4,50 (ddd, *J* = 2,3, 5,4 y 10,1 Hz, 1H, H₅), 4,22 (dd, *J* = 5,4 y 12,4 Hz, 1H, H₂), 4,03 (dd, *J* = 2,4 y 12,4 Hz, 1H, H₄), 3,94 (t, *J* = 10,3 Hz, 1H, H₃), 2,18 (s, 3H, CH₃), 2,15 (s, 3H, CH₃), 2,01 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 170,7, 169,7, 169,4, 132,3, 132,1, 129,4, 128,1, 85,1, 71,9, 68,6, 68,5, 62,1, 62,1, 20,9, 20,8, 20,8 ppm.

EMAR: calculado para C₁₈H₂₁O₇N₃NaS [M+Na]⁺: 446,0992; encontrado 446,0985 (-1,6109 ppm).

Fenil 2,4,6-tri-O-acetil-3-azido-1,3-didesoxi-1-tio-β-D-glucopiranosido, 61β



P.f.: 134-137 °C.

[α]_D²⁰: -18,2 (c 1, CHCl₃)

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,52-7,48 (m, 2H, SC₆H₅), 7,34-7,29 (m, 3H, SC₆H₅), 4,93 (t, *J* = 9,9 Hz, 1H, H₆), 4,91 (t, *J* = 9,8 Hz, 1H, H_{6'}), 4,66 (d, *J* = 9,9 Hz, 1H, H₁), 4,20-4,16 (m, 2H, H₂, H₅), 3,69-3,64 (m, 2H, H₄, H₃), 2,18 (s, 3H, CH₃), 2,12 (s, 3H, CH₃), 2,08 (s, 3H, CH₃) ppm.

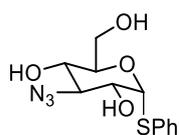
$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 170,7, 169,3, 169,2, 133,1, 132,1, 129,1, 128,5, 86,5, 76,6, 70,3, 68,5, 66,0, 62,4, 20,9, 20,8, 20,7 ppm.

EMAR: calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_7\text{N}_3\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 446,0992; encontrado 446,0987 (-1,3211 ppm).

Fenil 3-azido-1,3-didesoxi-1-tio-D-glucopiranosido, 62

Sobre una disolución de la mezcla de los dos anómeros **61 α** y **61 β** (100 mol%, 5,9 g, 13,9 mmol) en metanol (70 mL), se adiciona a 0 °C sodio (3 mol%, 10,1 mg, 0,5 mmol) y se deja en agitación a temperatura ambiente. Una vez consumido el producto de partida, tras 24 horas, la mezcla de reacción se neutraliza con resina acida y se filtra. Se obtiene una mezcla de los dos anómeros **62 α** y **62 β** (sólidos marrones) en proporción α : β 0,09:1 (4,0 g, 13,6 mmol), con un rendimiento total cuantitativo.

Fenil 3-azido-1,3-didesoxi-1-tio- α -D-glucopiranosido, 62 α



P.f.: 123-126 °C.

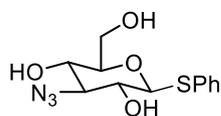
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +294,3 (*c* 1, CH_3OH)

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, DMSO-D_6): δ 7,50 (dd, $J = 1,4$ y $8,5$ Hz, 2H, SC_6H_5), 7,32 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, SC_6H_5), 7,26 (tt, $J = 1,1$ y $7,3$ Hz, 1H, SC_6H_5), 5,93 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H, H_1), 5,57 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H, OH), 5,52 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, OH), 4,54 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H, H_6'), 3,89 (dt, $J = 3,4$ y $9,8$ Hz, 1H, H_6), 3,69-3,64 (m, 1H, H_5), 3,56-3,52 (m, 2H, H_2 , OH), 3,41 (t, $J = 9,9$ Hz, 1H, H_3), 3,28-3,23 (m, 1H, H_4) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, DMSO-D_6): δ 134,3, 131,3, 128,9, 126,8, 88,8, 73,6, 70,1, 67,9, 67,9, 60,0 ppm.

EMAR: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{N}_3\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 320,0675; encontrado 320,0673 (-0,7034 ppm).

Fenil 3-azido-1,3-didesoxi-1-tio-β-D-glucopiranosido, **62β**



P.f.: 156-159 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -52,8 (c 1, CH₃OH)

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, DMSO-D₆): δ 7,49, (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, SC₆H₅), 7,34 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, SC₆H₅), 7,26 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, SC₆H₅), 5,87 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H, OH), 5,55 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H, OH), 4,73 (d, $J = 9,7$ Hz, 1H, H₁), 4,62 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, H_{6'}), 3,69 (ddd, $J = 2,3, 5,6$ y 12,4 Hz, 1H, H₆), 3,51-3,45 (m, 1H, H₅), 3,40 (t, $J = 9,5$ Hz, 1H, H₃), 3,36-3,31 (m, 1H, H₂), 3,21-3,10 (m, 2H, H₄, OH) ppm.

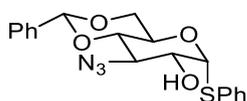
$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, MeOD): δ 134,9, 133,0, 129,9, 128,5, 89,7, 82,4, 73,1, 72,8, 70,0, 62,6 ppm.

EMAR: calculado para C₁₂H₁₅O₄N₃NaS [M+Na]⁺: 320,0675; encontrado 320,0675 (-0,2805 ppm).

Fenil 3-azido-4,6-O-benciliden-1,3-didesoxi-1-tio-D-glucopiranosido, **63**

Sobre una disolución de la mezcla de los dos anómeros **62α** y **62β** (100 mol%, 3,7 g, 12,6 mmol) y CSA (3 mol%, 87,9 mg, 0,4 mmol), en DMF (150 mL), se adiciona dimetoximetil benceno (150 mol%, 2,9 mL, 18,9 mmol) a temperatura ambiente. La reacción se deja rotar a 35 °C en el rotavapor 26 horas. Una vez consumido el producto de partida, la mezcla de reacción se trata con disolución saturada de NaHCO₃. La fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ y las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: AcOEt 10:1), obteniéndose una mezcla de los dos anómeros **63α** y **63β** (sólidos blancos) en proporción α:β 0,09:1 (3,4 g, 8,8 mmol), con un rendimiento total del 70%.

Fenil 3-azido-4,6-O-benciliden-1,3-didesoxi-1-tio-α-D-glucopiranosido, **63α**



P.f.: 146-148 °C.

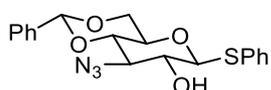
$[\alpha]_D^{20}$: +303,6 (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,53-7,50 (m, 2H, SC₆H₅, CHC₆H₅), 7,42-7,36 (m, 3H, CHC₆H₅), 7,36-7,31 (m, 3H, SC₆H₅), 5,59 (s, 1H, H₇), 5,59 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, H₁), 4,37 (td, *J* = 4,9 y 9,8 Hz, 1H, H₅), 4,31 (dd, *J* = 5,0 y 10,3 Hz, 1H, H_{6'}), 3,92 (ddd, *J* = 5,4, 7,9 y 13,4 Hz, 1H, H₂), 3,78 (t, *J* = 10,1 Hz, 1H, H₆), 3,76 (t, *J* = 9,8 Hz, 1H, H₃), 3,56 (t, *J* = 9,6 Hz, 1H, H₄), 2,50 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, OH) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 136,9, 133,1, 132,5, 129,5, 129,3, 128,5, 128,3, 126,2, 101,8, 91,3, 80,0, 71,7, 68,8, 64,6, 64,3 ppm.

EMAR: calculado para C₁₉H₁₉O₄N₃NaS [M+Na]⁺: 408,0988; encontrado 408,0984 (-1,2122 ppm).

Fenil 3-azido-4,6-O-benciliden-1,3-didesoxi-1-tio-β-D-glucopiranosido, 63β



P.f.: 141-144 °C.

[α]_D²⁰: -17,5 (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,56-7,52 (m, 2H, SC₆H₅), 7,49-7,46 (m, 2H, CHC₆H₅), 7,40-7,33 (m, 3H, SC₆H₅, 3HCHC₆H₅), 5,56 (s, 1H, H₇), 4,63 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H, H₁), 4,40 (dd, *J* = 4,8 y 10,5 Hz, 1H, H_{6'}), 3,78 (t, *J* = 10,2 Hz, 1H, H₆), 3,72 (t, *J* = 9,4 Hz, 1H, H₃), 3,59-3,48 (m, 2H, H₄, H₅), 3,40 (td, *J* = 2,5 y 9,4 Hz, 1H, H₂), 2,61 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H, OH) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 136,8, 133,5, 130,9, 129,4, 129,3, 128,9, 128,5, 126,2, 101,7, 89,3, 79,3, 71,9, 71,6, 68,7, 66,1 ppm.

EMAR: calculado para C₁₉H₁₉O₄N₃NaS [M+Na]⁺: 408,0988; encontrado 408,0982 (-1,5529 ppm).

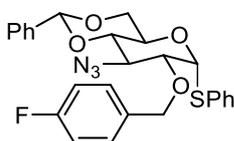
Fenil 3-azido-4,6-O-benciliden-1,3-didesoxi-2-O-(*p*-fluorobencil)-1-tio-D-glucopiranosido, 64

Sobre una disolución de la mezcla de los dos anómeros **63α** y **63β** (100 mol%, 3,7 g, 9,6 mmol) en THF (65 mL), se adiciona una disolución de NaH (500 mol%, 1,2 g, 48,1 mmol) en THF (10 mL), y se deja en agitación durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se adiciona INBu₄ (60 mol%, 2,1 g, 5,8 mmol) y tras 30 minutos en agitación, se adiciona cloruro de *p*-fluorobencilo (150 mol%, 1,7 mL, 14,4 mmol). La reacción se deja en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas.

Capítulo III. Análogos del aprepitant

Una vez consumido el producto de partida, la mezcla de reacción se trata con disolución saturada de NH_4Cl . La fase acuosa se extrae con AcOEt y las fases orgánicas reunidas se lavan con disolución saturada de NaCl , se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: AcOEt 20:1), obteniéndose una mezcla de los dos anómeros **64 α** y **64 β** (sólidos blancos) en proporción $\alpha:\beta$ 0,09:1 (4,5 g, 9,5 mmol), con un rendimiento total cuantitativo.

Fenil 3-azido-4,6-O-benciliden-1,3-didesoxi-2-O-(p-fluorobencil)-1-tio- α -D-glucopiranosido, **64 α**



P.f.: 179-181 °C.

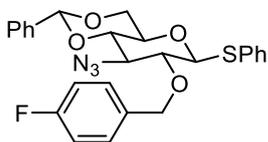
[α]_D²⁰: +181,9 (c 1, CHCl_3).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 7,51 (dd, $J = 2,0$ y $7,8$ Hz, 2H, CHC_6H_5), 7,46 (dd, $J = 1,8$ y $8,2$ Hz, 2H, SC_6H_5), 7,42-7,36 (m, 3H, CHC_6H_5 , 2H, FC_6H_4), 7,35-7,29 (m, 3H, SC_6H_5), 7,04 (tt, $J = 2,9$ y $8,7$ Hz, 2H, FC_6H_4), 5,60 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, H_1), 5,55 (s, 1H, H_7), 4,76 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H, OCH_2), 4,66 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H, OCH_2), 4,40 (td, $J = 4,9$ y $9,9$ Hz, 1H, H_5), 4,20 (dd, $J = 5,0$ y $10,4$ Hz, 1H, H_6), 3,97 (t, $J = 9,9$ Hz, 1H, H_3), 3,75 (dd, $J = 5,5$ y $9,8$ Hz, 1H, H_2), 3,70 (t, $J = 10,3$ Hz, 1H, H_6), 3,47 (t, $J = 9,8$ Hz, 1H, H_4) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 162,8 (d, $J = 247,0$ Hz, FC_6H_4), 136,9, 133,3, 132,8 (d, $J = 3,4$ Hz, FC_6H_4), 132,4, 130,2 (d, $J = 8,2$ Hz, FC_6H_4), 129,3, 129,3, 128,5, 127,9, 126,3, 115,6 (d, $J = 21,3$ Hz, FC_6H_4), 101,9, 87,3, 79,8, 78,3, 72,1, 68,8, 63,7, 62,5 ppm.

EMAR: calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_3\text{FNaS}$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺: 516,1364; encontrado 516,1356 (-1,4209 ppm).

Fenil 3-azido-4,6-O-benciliden-1,3-didesoxi-2-O-(p-fluorobencil)-1-tio- β -D-glucopiranosido, **64 β**



P.f.: 127-130 °C.

[α]_D²⁰: -28,2 (c 1, CHCl_3).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,55-7,51 (m, 2H, SC₆H₅), 7,49 (dd, *J* = 2,1 y 7,9 Hz, 2H, CHC₆H₅), 7,46-7,41 (m, 2H, FC₆H₄), 7,40-7,31 (m, 3H, SC₆H₅, 3H, CHC₆H₅), 7,06 (tt, *J* = 2,8 y 8,7 Hz, 2H, FC₆H₄), 5,57 (s, 1H, H₇), 4,90 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H, OCH₂), 4,79 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H, OCH₂), 4,75 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H, H₁), 4,38 (dd, *J* = 4,7 y 10,7 Hz, 1H, H_{6'}), 3,81-3,74 (m, 2H, H₂, H₅), 3,55-3,46 (m, 2H, H₃, H₆), 3,35 (t, *J* = 9,3 Hz, 1H, H₄) ppm.

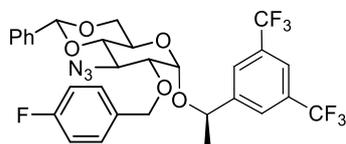
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 162,8 (d, *J* = 246,4 Hz, FC₆H₄), 136,8, 133,3 (d, *J* = 2,9 Hz, FC₆H₄), 132,9, 132,4, 130,5 (d, *J* = 8,2 Hz, FC₆H₄), 129,3, 128,5, 128,3, 126,2, 115,5 (d, *J* = 21,7 Hz, FC₆H₄), 101,6, 88,7, 79,7, 79,3, 75,1, 71,2, 68,8, 67,1 ppm.

EMAR: calculado para C₂₆H₂₄O₄N₃FNaS [M+Na]⁺: 516,1364; encontrado 516,1358 (-1,1560 ppm).

(*R*)-{1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etil}3-azido-4,6-*O*-benciliden-3-desoxi-2-*O*-(*p*-fluorobencil)-*D*-glucopiranosido, 65

Sobre una disolución de la mezcla de los dos anómeros **64α** y **64β** (100 mol%, 1,0 g, 2,1 mmol), (*R*)-1-[3,5-Bis(trifluorometil)fenil]etanol (100 mol%, 540,6 mg, 2,1 mmol) y NIS (100 mol%, 471,1 mg, 2,1 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL), en presencia de tamiz molecular de 4 Å previamente activado en el microondas y a vacío, en ausencia de luz y bajo atmósfera de argón, se adiciona TMSOTf (10 mol%, 0,04 mL, 0,2 mmol) gota a gota, a 0 °C y se deja en agitación a temperatura ambiente. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 3 horas, la mezcla de reacción se neutraliza con Et₃N (700 mol%, 2,0 mL, 14,7 mmol) y se filtra. La fase orgánica se lava con disolución saturada de Na₂S₂O₃, disolución saturada de NaHCO₃ y disolución saturada de NaCl, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: AcOEt 40:1), obteniéndose una mezcla de los dos anómeros **65α** y **65β** (sólidos blancos) en proporción α:β 5:1 (577,3 mg, 0,9 mmol), con un rendimiento total del 43%.

(*R*)-{1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etil} 3-azido-4,6-*O*-benciliden-3-desoxi-2-*O*-(*p*-fluorobencil)- α -*D*-glucopiranosido, **65 α**



Rdto.: 36%

P.f.: 98-100 °C.

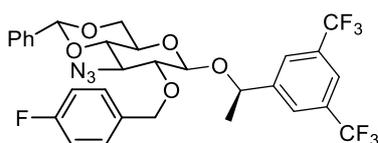
[α]_D²⁰: +17,3 (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,90 (sa, 2H, CF₃C₆H₃), 7,86 (sa, 1H, CF₃C₆H₃), 7,52 (dd, *J* = 1,8 y 7,8 Hz, 2H, CHC₆H₅), 7,42-7,36 (m, 3H, CHC₆H₅), 7,18-7,12 (m, 2H, FC₆H₄), 6,95 (tt, *J* = 2,8 y 8,7 Hz, 2H, FC₆H₄), 5,57 (s, 1H, H₇), 4,91 (c, *J* = 6,6 Hz, 1H, OCHCH₃), 4,58 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H, H₁), 4,57 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H, OCH₂), 4,51 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H, OCH₂), 4,34 (dd, *J* = 4,9 y 10,3 Hz, 1H, H_{6'}), 4,15 (t, *J* = 9,9 Hz, 1H, H₃), 3,98 (td, *J* = 4,8 y 10,0 Hz, 1H, H₅), 3,73 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H, H₆), 3,45 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H, H₄), 3,30 (dd, *J* = 3,6 y 9,9 Hz, 1H, H₂), 1,58 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H, OCHCH₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 162,7 (d, *J* = 246,9 Hz, FC₆H₄), 145,3 (CF₃C₆H₃), 136,8, 132,8 (d, *J* = 3,4 Hz, FC₆H₄), 132,2 (c, *J* = 33,4 Hz, CF₃C₆H₃), 130,0, 129,9 (d, *J* = 8,2 Hz, FC₆H₄), 129,3, 128,5, 127,0 (sa, CF₃C₆H₃), 126,1, 123,4 (c, *J* = 272,7 Hz, CF₃C₆H₃), 122,1 (sept, *J* = 3,6 Hz, CF₃C₆H₃), 115,5 (d, *J* = 21,4 Hz, FC₆H₄), 101,7, 95,1, 80,3, 73,3, 72,7, 69,1, 63,4, 62,0, 24,4 ppm.

EMAR: calculado para C₃₀H₂₆O₅N₃F₇Na [M+Na]⁺: 664,1653; encontrado 664,1649 (-0,5659 ppm).

(*R*)-{1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etil} 3-azido-4,6-*O*-benciliden-3-desoxi-2-*O*-(*p*-fluorobencil)- β -*D*-glucopiranosido, **65 β**



Rdto.: 7%

P.f.: 111-114 °C

[α]_D²⁰: -16,2 (c 1, CHCl₃).

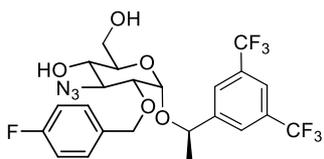
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,81 (sa, 3H, CF₃C₆H₃), 7,47 (dd, *J* = 2,3 y 7,8 Hz, 2H, CHC₆H₅), 7,41-7,34 (m, 3H, CHC₆H₅, 2H, FC₆H₄), 7,07 (tt, *J* = 2,8 y 8,7 Hz, 2H, FC₆H₄), 5,51 (s, 1H, H₇), 4,98 (c, *J* = 6,5 Hz, 1H, OCHCH₃), 4,91 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H, OCH₂), 4,81 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H, OCH₂), 4,69 (d, *J* =

7,6 Hz, 1H, H₁), 4,15 (dd, $J = 4,9$ y $10,6$ Hz, 1H, H_{6'}), 3,70 (t, $J = 9,7$ Hz, 1H, H₃), 3,63 (t, $J = 10,3$ Hz, 1H, H₆), 3,46 (t, $J = 9,6$ Hz, 1H, H₄), 3,40-3,33 (m, 2H, H₂, H₅), 1,58 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, OCHCH₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 162,7 (d, $J = 246,5$ Hz, FC₆H₄), 145,8 (CF₃C₆H₃), 136,8, 133,4 (d, $J = 3,3$ Hz, FC₆H₄), 131,7 (c, $J = 33,2$ Hz, CF₃C₆H₃), 130,2 (d, $J = 8,3$ Hz, FC₆H₄), 129,3, 128,5, 126,5 (sa, CF₃C₆H₃), 126,1, 123,5 (c, $J = 272,6$ Hz, CF₃C₆H₃), 121,6 (sept, $J = 3,8$ Hz, CF₃C₆H₃), 115,6 (d, $J = 21,4$ Hz, FC₆H₄), 102,8, 101,6, 80,5, 79,1, 76,8, 74,7, 68,5, 67,2, 65,0, 22,6 ppm.

EMAR: calculado para C₃₀H₂₆O₅N₃F₇Na [M+Na]⁺: 664,1653; encontrado 664,1648 (-0,7934 ppm).

(R)-{1-[3,5-bis-(trifluorometil)fenil]etil}3-azido-3-desoxi-2-O-(p-fluorobencil)- α -D-glucopiranosido, 66 α



Sobre una disolución de **65 α** (100 mol%, 105,0 mg, 0,2 mmol) en metanol (6 mL), se adiciona una cantidad catalítica de CSA, a temperatura ambiente. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 3 horas y 30 minutos, la mezcla de reacción se neutraliza con Et₃N (20 mol%, 4,6 μ L, 0,03 mmol), se evapora el disolvente a presión reducida y se evapora dos veces con tolueno. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: AcOEt 1:1), obteniéndose **66 α** (54,8 mg, 0,1 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: 61%

P.f.: 160-162 °C.

[α]_D²⁰: +28,9 (c 1, CHCl₃).

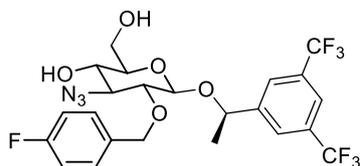
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,88 (sa, 2H, CF₃C₆H₃), 7,85 (sa, 1H, CF₃C₆H₃), 7,17-7,12 (m, 2H, FC₆H₄), 6,94 (tt, $J = 2,9$ y $8,7$ Hz, 2H, FC₆H₄), 4,90 (c, $J = 6,6$ Hz, 1H, OCHCH₃), 4,60 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H, H₁), 4,51 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H, OCH₂), 4,42 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H, OCH₂), 3,96 (t, $J = 9,9$ Hz, 1H, H₃),

3,90-3,82 (m, 2H, H₅, H_{6'}), 3,78 (dt, $J = 3,8$ y $9,7$ Hz, 1H, H₄), 3,45 (t, $J = 9,6$ Hz, 1H, H₆), 3,28 (dd, $J = 3,4$ y $10,2$ Hz, 1H, H₂), 1,55 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, OCHCH₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 162,7 (d, $J = 246,5$ Hz, FC₆H₄), 145,4 (CF₃C₆H₃), 132,8 (d, $J = 3,4$ Hz, FC₆H₄), 132,2 (c, $J = 33,4$ Hz, CF₃C₆H₃), 129,9 (d, $J = 8,2$ Hz, FC₆H₄), 126,9 (sa, CF₃C₆H₃), 123,4 (c, $J = 272,9$ Hz, CF₃C₆H₃), 122,2 (sept, $J = 3,7$ Hz, CF₃C₆H₃), 115,5 (d, $J = 21,5$ Hz, FC₆H₄), 94,0, 77,3, 73,1, 72,3, 71,4, 69,4, 65,4, 62,2, 24,4 ppm.

EMAR: calculado para C₂₃H₂₂O₅N₃F₇Na [M+Na]⁺: 576,1340; encontrado 576,1333 (-1,1661 ppm).

(R)-{1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etil}3-azido-3-desoxi-2-O-(p-fluorobencil)- β -D-glucopiranosido, 66 β



Sobre una disolución de **65 β** (100 mol%, 56,9 mg, 0,09 mmol) en metanol (3,5 mL), se adiciona una cantidad catalítica de CSA, a temperatura ambiente. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 3 horas y 30 minutos, la mezcla de reacción se neutraliza con Et₃N (20 mol%, 2,5 μ L, 0,02 mmol), se evapora el disolvente a presión reducida y se evapora dos veces con tolueno. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: AcOEt 2:1), obteniéndose **66 β** (29,4 mg, 0,05 mmol) como un sólido blanco.

Rdto.: 60 %

P.f.: 116-118 °C.

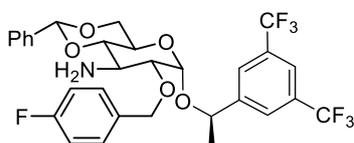
[α]_D²⁰: -23,4 (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,82 (sa, 2H, CF₃C₆H₃), 7,81 (sa, 1H, CF₃C₆H₃), 7,40-7,36 (m, 2H, FC₆H₄), 7,06 (tt, $J = 2,9$ y $8,7$ Hz, 2H, FC₆H₄), 4,97-4,91 (m, 1H, OCHCH₃, 1H, OCH₂), 4,78 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H, OCH₂), 4,64 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H₁), 3,69-3,61 (m, 2H, H₅, H_{6'}), 3,46 (t, $J = 9,5$ Hz, 1H, H₆), 3,42 (t, $J = 9,4$ Hz, 1H, H₃), 3,35 (t, $J = 8,6$ Hz, 1H, H₂), 3,27 (dt, $J = 4,1$ y $8,9$ Hz, 1H, H₄), 1,57 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, OCHCH₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 162,8 (d, *J* = 246,3 Hz, FC₆H₄), 146,3 (CF₃C₆H₃), 133,3 (d, *J* = 3,2 Hz, FC₆H₄), 131,7 (c, *J* = 33,3 Hz, CF₃C₆H₃), 130,3 (d, *J* = 8,1 Hz, FC₆H₄), 126,4 (sa, CF₃C₆H₃), 123,4 (c, *J* = 272,7 Hz, CF₃C₆H₃), 121,6 (sept, *J* = 3,9 Hz, CF₃C₆H₃), 115,7 (d, *J* = 21,5 Hz, FC₆H₄), 102,8, 79,9, 77,1, 75,7, 74,3, 69,3, 68,7, 62,3, 22,9 ppm.

EMAR: calculado para C₂₃H₂₂O₅N₃F₇Na [M+Na]⁺: 576,1340; encontrado 576,1334 (-0,9485 ppm).

(R)-{1-[3,5-bis-(trifluorometil)fenil]etil}3-amino-4,6-O-benciliden-3-desoxi-2-O-(p-fluorobencil)-α-D-glucopiranosido, 67α



Sobre una disolución de **65α** (100 mol%, 79,9 mg, 0,1 mmol) en THF (3 mL), bajo atmósfera de argón y a 0 °C, se adiciona, gota a gota, LiAlH₄ (100 mol%, 0,1 mmol, 0,05 mL) y se mantiene en agitación a temperatura ambiente. Una vez consumido el producto de partida, tras un tiempo de reacción de 1 hora, la mezcla de reacción se hidroliza con 0,04 mL de disolución saturada de Na₂SO₄, y la suspensión obtenida se filtra sobre un lecho de celita y se lava con THF. El filtrado obtenido se evapora a presión reducida y este crudo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (TBME), obteniéndose **67α** (51,1 mg, 0,08 mmol) como un sólido amarillo.

Rdto.: 67 %

P.f.: 87-90 °C.

[α]_D²⁰: +75,1 (c 1, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,90 (sa, 2H, CF₃C₆H₃), 7,85 (sa, 1H, CF₃C₆H₃), 7,50 (dd, *J* = 2,2 y 7,8 Hz, 2H, CHC₆H₅), 7,40-7,36 (m, 3H, CHC₆H₅), 7,17-7,13 (m, 2H, FC₆H₄), 6,95 (t, *J* = 8,6 Hz, 2H, FC₆H₄), 5,53 (s, 1H, H₇), 4,94 (c, *J* = 6,6 Hz, 1H, OCHCH₃), 4,67 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H, H₁), 4,50 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 4,33 (dd, *J* = 4,9 y 10,3 Hz, 1H, H_{6'}), 4,30 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H, OCHCH₃), 3,95 (td, *J* =

4,9 y 10,0 Hz, 1H, H₅), 3,73 (t, $J = 10,3$ Hz, 1H, H₆), 3,59 (t, $J = 9,7$ Hz, 1H, H₃), 3,37 (t, $J = 9,6$ Hz, 1H, H₄), 3,33 (dd, $J = 3,5$ y $9,8$ Hz, 1H, H₂), 1,58 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, OCHCH₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 162,7 (d, $J = 246,7$ Hz, FC₆H₄), 145,7 (CF₃C₆H₃), 137,3, 133,1 (d, $J = 2,9$ Hz, FC₆H₄), 132,2 (c, $J = 33,3$ Hz, CF₃C₆H₃), 129,9 (d, $J = 8,2$ Hz, FC₆H₄), 129,3, 128,5, 126,9 (sa, CF₃C₆H₃), 126,3, 123,4 (c, $J = 272,9$ Hz, CF₃C₆H₃), 122,1 (sept, $J = 3,6$ Hz, CF₃C₆H₃), 115,6 (d, $J = 21,8$ Hz, FC₆H₄), 101,9, 94,4, 82,0, 79,9, 73,1, 72,1, 69,2, 63,2, 51,4, 24,4 ppm.

EMAR: calculado para C₃₀H₂₉O₅NF₇ [M+H]⁺: 616,1928; encontrado 616,1922 (-1,0343 ppm).

III.4.3. Estudio de la actividad biológica

III.4.3.1. Actividad anticancerosa

III.4.3.1.1. Actividad anticancerosa frente a células tumorales de pulmón

Para los derivados de L-arabinosa y de D-galactosa, se han empleado en el ensayo MTT las líneas celulares MRC-5 (células fibroblásticas fetales humanas de pulmón) y A549 (células humanas de cáncer de pulmón de "células no pequeñas") en las mismas condiciones experimentales. En el caso de los derivados de D-glucosa, se han empleado las líneas celulares HaCaT (queratinocitos de epidermis humana) y A549, también en las mismas condiciones experimentales. Las líneas celulares MRC-5, A549 y HaCaT se han adquirido de la Colección Europea de Cultivos Celulares. Las tres se han cultivado en los medios recomendados y de acuerdo con protocolos estándares. Se ha utilizado el medio de cultivo con altos niveles de glucosa DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), suplementado con FBS al 10% (suero fetal bovino), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, en una atmósfera de aire al 95% de humedad, 5% CO₂ y a 37 °C. Los reactivos de los cultivos celulares se han adquirido en Biowest. Las células se han sembrado en placas de 96 pocillos y se han incubado durante 24 horas. Tras este tiempo, antes de medir la viabilidad celular, se han tratado con diferentes concentraciones de los compuestos a estudiar, durante 48 horas en el caso de los derivados de L-arabinosa y de D-galactosa y durante

72 horas en el caso de los derivados de la D-glucosa. Pasado este tiempo, se ha retirado el medio de crecimiento celular y se ha añadido 125 μL de solución de MTT (1 mg/mL en medio) a cada pocillo. Tras 3-4 horas, se han añadido 80 μL al 20% de SDS (dodecil sulfato de sodio) en HCl 20 mM a cada pocillo para disolver el formazán morado insoluble y se ha incubado durante 15 horas a 37 °C. Utilizando un espectrofotómetro lector de placas multi pocillo se ha medido la densidad óptica de cada pocillo a 540 nm para cuantificar la supervivencia celular. Los resultados se han expresado en porcentaje de viabilidad celular con respecto a las células no tratadas (control). Cada compuesto se ha analizado por triplicado y en tres experimentos idénticos e independientes. Para el análisis estadístico de los datos de cada experimento se ha usado el test *t* de *Student* a través del valor *p*. El test *t* de *Student* indica si dos o más valores tienen una diferencia significativa desde el punto de vista estadístico. Se ha representado la media de los tres experimentos indicando el error estándar de la media (\pm SEM) que se representa con barras en cada punto de la gráfica.

III.4.3.1.2. Actividad anticancerosa frente a neuroblastoma

Se ha empleado la línea celular de células sanas RPE-1 (células epiteliales 1 de pigmento retinal humano) y las líneas celulares de neuroblastoma Kelly (92110411, neuroblastoma humano) y SH-SY5Y (neuroblastoma humano de médula ósea). Se ha llevado a cabo el ensayo de viabilidad celular MTT en las mismas condiciones experimentales. Las 3 líneas celulares se han cultivado en los medios recomendados y de acuerdo con protocolos estándares. Las células se han sembrado en placas de 96 pocillos, con una densidad de $3 \cdot 10^4$ células/100 μL y se han incubado durante 24 horas. Tras este tiempo, se han tratado con diferentes concentraciones de los compuestos a estudiar durante 72 horas antes de medir la viabilidad celular. Tras estas 72 horas, se ha retirado el medio de crecimiento celular y se ha añadido 100 μL de solución de MTT (0,5 mg/mL en medio) en cada pocillo. Tras 45 minutos a 37 °C, se ha añadido 100 μL de DMSO a cada

pocillo para disolver el formazán morado insoluble y se ha medido la densidad óptica a 555 nm con un espectrofotómetro lector de placas multipocillo para cuantificar la supervivencia celular. Los resultados se han expresado como porcentaje de viabilidad celular con respecto las células no tratadas (control). Cada compuesto se ha analizado por triplicado y en tres experimentos idénticos e independientes. Para el análisis estadístico de los datos de cada experimento se ha usado el test *t* de *Student* a través del valor *p*. Se ha representado la media de los tres experimentos con su error estándar de la media (\pm SEM) que se representa con barras en cada punto de la gráfica.

III.4.3.2. Actividad antagonista del receptor NK1: test IP-one

Para disponer de células con el receptor NK1 internalizado, se ha alterado la permeabilidad de células de ovario de hámster chino (CHO) por electroporación (280 V, 1 mF). Éstas se han transfectado por medio de un vector que contiene el gen que codifica para la expresión del receptor NK1 y, de esta forma, el gen forme parte del material genético de estas células. Las líneas celulares utilizadas se han obtenido de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Los medios de cultivo y los reactivos de cultivos celulares se han adquirido en Invitrogen. Las células CHO se han cultivado en medio DMEM suplementado con FBS al 10%, 100 U/mL de penicilina y de estreptomina, 2 mM de L-glutamina y aminoácidos no esenciales, en una atmósfera de aire al 95% de humedad, 5% CO₂ y a 37 °C. La transfección transitoria de las células CHO se ha llevado a cabo en un volumen de 300 μ L con un total de 10⁷ células en solución tampón de electroporación (50 mM H₂PO₄, 20 mM CH₃COOK, 20 mM KOH, 26 mM MgSO₄, pH 7,4), y 10 μ g de ADN del plásmido pRK5/NK1 que contiene 500 ng del gen para el receptor humano NK1 *wilde type* (hNK1R_{wt}) y el resto hasta alcanzar la cantidad de 10 μ g era ADN portador (pRK5). Tras la electroporación las células se han suspendido en medio de cultivo complejo y se han sembrado

en placas de cultivo de 96 pocillos. Las placas de cultivo se han cubierto con poliornitina diluida en PBS, se han incubado a 37 °C durante 30 minutos y se han lavado con PBS antes de la siembra. Para medir la expresión de los receptores NK1 en las células CHO, éstas se han transfectado con el mismo vector pRK5 pero marcando el plásmido con la adición de histidina (his) al extremo C-terminal de la secuencia que codifica para el receptor NK1, obteniéndose así el plásmido pRK5/NK1-6-His. De este modo, utilizando posteriormente un anticuerpo primario específico para histidina en un test ELISA,^{113,165} se ha podido determinar la presencia del receptor NK1 en las células transfectadas. Después de 24 horas de la electroporación y transfección (pRK5 Neo-NK1-6-His), las células CHO se han fijado con paraformaldehído al 4% en PBS (solución salina tamponada con fosfato) y tras 5 minutos, se han lavado 3 veces con PBS. A continuación, se ha añadido solución tampón de bloqueo (FBS no complementado al 1% en PBS) y tras 30 minutos, se han añadido los anticuerpos primarios específicos para histidina (0,5 µg/mL). Tras otros 30 minutos, las células se han lavado 3 veces con FBS al 1% en PBS y tras 5 minutos, se han añadido los anticuerpos secundarios marcados (anti-inmunoglobulina de ratón – peroxidasa de rábano picante (HRP), GE Healthcare) en dilución 1/1000. Después de 30 minutos, se han vuelto a lavar 3 veces con FBS al 1% en PBS y otras 3 veces con PBS. A continuación, se ha añadido a cada pocillo 60 µL de PBS y 20 µL del sustrato para la enzima HRP *ELISA SuperSignal™ Femto* (Thermo Fisher Scientific), produciéndose un cambio de color en presencia de la enzima HRP. La luminiscencia se ha detectado usando un lector de placas Wallac Victor 2 (PerkinElmer). Los valores de luminiscencia obtenidos, efectivamente demostraron que el receptor NK1 estaba presente en las células transfectadas.

Una vez obtenidas las células CHO con el receptor NK1 internalizado, se ha procedido a la medida del IP₁ con el test IP-one (Cisbio Bioassays). En una placa de 96 pocillos, se han añadido por cada pocillo 10⁵ células transfectadas/100 µL de medio de cultivo complejo. Tras 24 horas a 37 °C, se ha eliminado el medio y se ha reemplazado por 40 µL de medio de incubación con LiCl, el

compuesto a ensayar y la SP (o sólo la SP y LiCl en el caso del control positivo). Tras 30 minutos de incubación a 37 °C, se han añadido 15 µL de disolución con anticuerpos primarios específicos para IP₁ marcados con Tb⁺²Criptato (donador) y a continuación 15 µL de otra disolución de IP₁ marcado con d₂ (aceptor), ambos disueltos en disolución tampón de lisis. Como control negativo, algunos pocillos solo contenían el anticuerpo marcado con el fluoróforo donador. Tras 1 hora a 37 °C, se ha procedido a su lectura, midiendo la fluorescencia a 620 nm y a 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 ha registrado con un retardo de 50 µs con la finalidad de eliminar el ruido de fondo de la fluorescencia de vida corta derivada de otros componentes. La intensidad de fluorescencia a 620 nm se corresponde con la emisión total de Tb⁺²Criptato y a 665 nm con la emisión a causa de la señal de FRET. La señal específica de FRET se ha calculado con la siguiente ecuación: $\% \Delta F = 100 \cdot (R_{\text{pos}} - R_{\text{neg}}) / (R_{\text{neg}})$, donde R_{pos} es el ratio de fluorescencia (665/620 nm) calculado en los pocillos con Tb⁺²Criptato (donador) y a d₂ (aceptor) y R_{neg} corresponde al mismo ratio, pero para el control negativo incubado sólo con el anticuerpo marcado con el fluoróforo donador. La señal específica de FRET (%ΔF), que es inversamente proporcional a la concentración de IP₁ en las células se ha transformado, a continuación, en la acumulación de IP₁ con una curva de calibrado preparada en la misma placa. Todas las comparaciones entre el efecto agonista y antagonista se han llevado a cabo el mismo día, en el mismo cultivo de células y en la misma placa, con el efecto de la SP como referencia. Las curvas de activación o inhibición se han representado como el logaritmo de las concentraciones del agonista o antagonista y se han ajustado con la ecuación de Hill para obtener la EC₅₀, el coeficiente de Hill y los valores máximos y mínimos.¹⁶⁶ Los resultados se han expresado como la media de tres experimentos independientes con su error estándar de la media (± SEM) que se representa con barras en cada punto de la gráfica. El efecto inhibitor del antagonista NK1 no-peptídico en la acumulación de IP₁ inducida por la SP se ha estudiado de la

misma manera que describen Arunlakshana y Schild.¹⁶⁷ En cuanto al análisis estadístico de los resultados, la significación estadística de las diferencias entre los grupos experimentales se ha determinado mediante un análisis de varianza *one-way* o *two-way* seguido de un test *post hoc* de rango múltiple de Duncan para realizar comparaciones por pares entre las medias. También se ha utilizado el test *t* de Student.

Afinidad por el receptor NK1: desplazamiento de la sustancia P marcada

Se han utilizado células CHO con el receptor NK1 internalizado. Las células CHO se han sometido a tripsinización para romper su membrana celular y esta ruptura se ha detectado por microscopía. También se ha medido el contenido en proteínas de la muestra para establecer el factor de dilución necesario para el ensayo de afinidad. El homogeneizado celular se ha repartido en alícuotas con 36 µg de proteínas y se ha incubado con $6 \cdot 10^{-5}$ M del análogo del aprepitant correspondiente en presencia de 0,8 nM de [³H]SP (sustancia P marcada con el radioisótopo del hidrógeno ³H, protio) a 4 °C durante 90 minutos. Tras filtrar estas alícuotas, los receptores NK1 retenidos en el filtro se han lavado y se ha medido la radiactividad retenida en estos filtros, determinando así las uniones específicas de [³H]SP. Como unión específica control se han empleado alícuotas incubadas sólo con [³H]SP. Las uniones no específicas o uniones de baja afinidad no saturables (inhibición control) se han estimado con 10 µM de [¹²⁵I] L-703,606 (radiomarcador selectivo del receptor NK1, es un análogo yodado del antagonista CP-96,345, en el que su grupo metoxi se ha reemplazado por el radioisótopo del yodo ¹²⁵) en presencia de 0,8 nM de [³H] SP. Cada valor se ha obtenido como la media de tres experimentos independientes con su error estándar de la media (\pm SEM).

III.4.3.3. Molecular Docking

El sitio de unión del receptor NK1 está descrito en la bibliografía,¹⁶⁸ y consiste en un bolsillo profundo y cóncavo con una gran región hidrófoba que puede maximizar favorablemente las interacciones ligando-receptor. Por esta razón, se ha usado el descriptor log P (siendo P = coeficiente de reparto octanol/agua) de los diferentes fragmentos de los ligandos para obtener información sobre sus posibles interacciones en un entorno hidrófobo como es el sitio de unión del receptor NK1. Las estructuras moleculares de los ligandos se han optimizado en base a la Teoría Funcional de la Densidad (DFT) con los fundamentos B3LYP y 6-31G (d, p) implementados en el paquete del software Gaussian 09 Rev.D.O1. Los cálculos de MD se han realizado con AutoDock Vina y AutodockTools Software. La mejor posición de MD y las interacciones que han tenido lugar en la unión ligando-receptor se han visualizado con Discovery Studio Visualizer (Accelrys Software Inc.). Los valores de log P de los ligandos se han calculado con el servidor Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/>).

III.5. Bibliografía

- (1) WHO | World Health Organization <https://www.who.int/> (accessed Nov 21, 2021).
- (3) NIH - National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/> (accessed Nov 21, 2021).
<https://doi.org/10.1002/cmdc.202000658>.
Pharmacother. **2018**, *103* (March), 473–481. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.121>.
- (12) Garcia-Recio, S.; Gascón, P. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/495704>.
- (120) Majkowska-Pilip, A.; Halik, P. K.; Gniazdowska, E. The Significance of Nk1 Receptor Ligands and Their Application in Targeted Radionuclide Tumour Therapy. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (9), 443. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090443>.
- (121) Steinhoff, M. S.; von Mentzer, B.; Geppetti, P.; Pothoulakis, C.; Bunnett, N. W.

Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. *Physiol. Rev.* **2014**, *94* (1), 265–301. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2013>.

(122) Muñoz, M.; Coveñas, R. Involvement of Substance P and the NK-1 Receptor in Human Pathology. *Amino Acids* **2014**, *46* (7), 1727–1750. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1736-9>.

(123) Muñoz, M.; Coveñas, R.; Esteban, F.; Redondo, M. The Substance P/NK-1 Receptor System: NK-1 Receptor Antagonists as Anti-Cancer Drugs. *J. Biosci.* **2015**, *40* (2), 441–463. <https://doi.org/10.1007/s12038-015-9530-8>.

(124) Schöppe, J.; Ehrenmann, J.; Klenk, C.; Rucktooa, P.; Schütz, M.; Doré, A. S.; Plückthun, A. Crystal Structures of the Human Neurokinin 1 Receptor in Complex with Clinically Used Antagonists. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07939-8>.

(125) Yin, J.; Chapman, K.; Clark, L. D.; Shao, Z.; Borek, D.; Xu, Q.; Wang, J.; Rosenbaum, D. M. Crystal Structure of the Human NK 1 Tachykinin Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115* (52), 13264–13269. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812717115>.

(126) Navari, R. M.; Schwartzberg, L. S. Evolving Role of Neurokinin 1-Receptor Antagonists for Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting. *Onco. Targets. Ther.* **2018**, *11*, 6459–6478. <https://doi.org/10.2147/OTT.S158570>.

(127) Huang, S. C.; Korlipara, V. L. Neurokinin-1 Receptor Antagonists: A Comprehensive Patent Survey. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2010**, *20* (8), 1019–1045. <https://doi.org/10.1517/13543776.2010.495121>.

(128) Snider, R. M.; Constantine, J. W.; Lowe III, J. A.; Longo, K. P.; Lebel, W. S.; Woody, H. A.; Drozda, S. E.; Desai, M. C.; Vinick, F. J.; Spencer, R. W.; Hess, H. J. A Potent Nonpeptide Antagonist of the Substance P (NK1) Receptor. *Science*. **1991**, *251*, 435–437.

(129) McLean, S.; Snider, R. M.; Desai, M. C.; Rosen, T.; Bryce, D. K.; Longo, K. P.; Schmidt, A. W.; Heym, J. CP-99,994, a Nonpeptide Antagonist of the Tachykinin NK1 Receptor. *Regul. Pept.* **1993**, *46*, 329–331. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(93\)90075-J](https://doi.org/10.1016/0167-0115(93)90075-J).

- (130) Stocks, M. The Small Molecule Drug Discovery Process - from Target Selection to Candidate Selection. In *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development: Theory and Case Studies*; Elsevier Ltd, 2013; pp 81–126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397176-0.00003-0>.
- (131) Rupniak, N. M. J.; Carlson, E.; Boyce, S.; Webb, J. K.; Hill, R. G. Enantioselective Inhibition of the Formalin Paw Late Phase by the NK1 Receptor Antagonist L-733,060 in Gerbils. *Pain* **1996**, *67*, 189–195. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(96\)03109-0](https://doi.org/10.1016/0304-3959(96)03109-0).
- (132) Brands, K. M. J.; Payack, J. F.; Rosen, J. D.; Nelson, T. D.; Candelario, A.; Huffman, M. A.; Zhao, M. M.; Li, J.; Craig, B.; Song, Z. J.; Tschäen, D. M.; Hansen, K.; Devine, P. N.; Pye, P. J.; Rossen, K.; Dormer, P. G.; Reamer, R. A.; Welch, C. J.; Mathre, D. J.; Tsou, N. N.; McNamara, J. M.; Reider, P. J. Efficient Synthesis of NK1 Receptor Antagonist Aprepitant Using a Crystallization-Induced Diastereoselective Transformation. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (8), 2129–2135. <https://doi.org/10.1021/ja027458g>.
- (133) Lab Equipment and Lab Supplies | Fisher Scientific <https://www.fishersci.es/es/es/home.html> (accessed May 20, 2020).
- (134) Herde, Z. D.; John, P. D.; Alvarez-Fonseca, D.; Satyavolu, J.; Burns, C. T. Stereoselective Acetylation of Hemicellulosic C5-Sugars. *Carbohydr. Res.* **2017**, *443–444*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.03.008>.
- (135) Timmons, S. C.; Jakeman, D. L. Stereospecific Synthesis of Sugar-1-Phosphates and Their Conversion to Sugar Nucleotides. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343* (5), 865–874. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.01.046>.
- (136) Khiar N.; Fernández I.; Recio R.; López M.; Calderón J.M. Antagonistas de Los Receptores NK1 Derivados de Hidratos de Carbono, Método de Obtención y Uso Médico. WO2016189179A1, 2016.
- (137) Tanifum, C. T.; Chang, C. W. T. Sonication-Assisted Oligomannoside Synthesis. *J. Org.*

Chem. **2009**, *74* (2), 634–644. <https://doi.org/10.1021/jo8019835>.

(138) Ji Ram, V.; Sethi, A.; Nath, M.; Pratap, R. Five-Membered Heterocycles. In *The Chemistry of Heterocycles*; Elsevier, 2017; pp 149–478. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101033-4.00005-x>.

(139) Schmidt, R. R.; Kinzy, W. Anomeric-Oxygen Activation for Glycoside Synthesis: The Trichloroacetimidate Method. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21–123. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60150-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60150-X).

(140) Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, A. Glycosidation of Lupane-Type Triterpenoids as Potent in Vitro Cytotoxic Agents. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, *14* (19), 6713–6725. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.05.075>.

(141) Christensen, S.M.; Hansen, H.F.; Koch, T. Molar-Scale Synthesis of 1,2:5,6-Di-O-Isopropylidene- α -D- Allofuranose: DMSO Oxidation of 1,2:5,6-Di-O-Isopropylidene- α -D-Glucofuranose and Subsequent Sodium Borohydride Reduction. *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8* (5), 777–780. <https://doi.org/10.1021/op049903t>.

(142) Sharma, V. K.; Kumar, M.; Olsen, C. E.; Prasad, A. K. Chemoenzymatic Convergent Synthesis of 2'-o,4'-c-Methyleneribonucleosides. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 6336–6341. <https://doi.org/10.1021/jo5008338>.

(143) Gao, Z. G.; Duong, H. T.; Sonina, T.; Kim, S. K.; Van Rompaey, P.; Van Calenbergh, S.; Mamedova, L.; Kim, H. O.; Kim, M. J.; Kim, A. Y.; Liang, B. T.; Jeong, L. S.; Jacobson, K. A. Orthogonal Activation of the Reengineered A3 Adenosine Receptor (Neoceptor) Using Tailored Nucleoside Agonists. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (9), 2689–2702. <https://doi.org/10.1021/jm050968b>.

(144) Figueredo, A. S.; Zamoner, L. O. B.; Rejzek, M.; Field, R. A.; Carvalho, I. Cluster Glycosides and Heteroglycoclusters Presented in Alternative Arrangements. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 4405–4409. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.10.069>.

- (145) Wang, A. P.; Liu, C.; Yang, S.; Zhao, Z.; Lei, P. An Efficient Method to Synthesize Novel 5-O-(6'-Modified)-Mycaminose 14-Membered Ketolides. *Tetrahedron* **2016**, *72* (2), 285–297. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.11.029>.
- (146) Muñoz, M.; Crespo, J. C.; Crespo, J. P.; Coveñas, R. Neurokinin-1 Receptor Antagonist Aprepitant and Radiotherapy, a Successful Combination Therapy in a Patient with Lung Cancer: A Case Report. *Mol. Clin. Oncol.* **2019**, *11* (1), 50–54. <https://doi.org/10.3892/mco.2019.1857>.
- (147) Ferlemann, F. C.; Menon, V.; Condurat, A. L.; Röbler, J.; Pruszek, J. Surface Marker Profiling of SH-SY5Y Cells Enables Small Molecule Screens Identifying BMP4 as a Modulator of Neuroblastoma Differentiation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13497-8>.
- (148) Morandi, F.; Sabatini, F.; Podestà, M.; Airoidi, I. Immunotherapeutic Strategies for Neuroblastoma: Present, Past and Future. *Vaccines* **2021**, *9* (1), 43. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/vaccines9010043>.
- (149) Henssen, A. G.; Odersky, A.; Szymansky, A.; Seiler, M.; Althoff, K.; Beckers, A.; Speleman, F.; Schäfers, S.; De Preter, K.; Astrahanseff, K.; Struck, J.; Schramm, A.; Eggert, A.; Bergmann, A.; Schulte, J. H. Targeting Tachykinin Receptors in Neuroblastoma. *Oncotarget* **2017**, *8* (1), 430–443. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13440>.
- (150) Trinquet, E.; Bouhelal, R.; Dietz, M. Monitoring Gq-Coupled Receptor Response through Inositol Phosphate Quantification with the IP-One Assay. *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, *6* (10), 981–994. <https://doi.org/10.1517/17460441.2011.608658>.
- (151) Basics on HTRF assays | Cisbio - PerkinElmer <https://www.cisbio.eu/> (accessed Jan 11, 2021).
- (152) Time-Resolved Fluorescence TRF / TR-FRET (HTRF) | Molecular Devices <https://www.moleculardevices.com/> (accessed Jan 11, 2021).
- (153) Clegg, R. M. Förster Resonance Energy Transfer-FRET What Is It, Why Do It, and How It's

Done. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*; Gadella, T., Ed.; Elsevier B.V., 2009; pp 1–57. [https://doi.org/10.1016/S0075-7535\(08\)00001-6](https://doi.org/10.1016/S0075-7535(08)00001-6).

(154) Vogel, S. S.; Thaler, C.; Koushik, S. V. Fanciful FRET. *Sci. STKE* **2006**, *2006* (331), 1–9. <https://doi.org/10.1126/stke.3312006re2>.

(155) Cheng, Y.-C.; Prusoff, W. H. Relationship between the Inhibition Constant (K_i) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 per Cent Inhibition (I_{50}) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2).

(156) Cheng, H. C. The Power Issue: Determination of K_B or K_i from IC_{50} - A Closer Look at the Cheng-Prusoff Equation, the Schild Plot and Related Power Equations. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2002**, *46*, 61–71. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(02\)00166-1](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(02)00166-1).

(157) Eurofins-Services

<https://www.eurofinsdiscoveryservices.com/catalogmanagement/viewitem/NK1-Human-Tachykinin-GPCR-Binding-Agonist-Radioligand-Assay-Panlabs/255520#additionalInfo> (accessed Jan 20, 2021).

(158) Heuillet, E.; Ménager, J.; Fardin, V.; Flamand, O.; Bock, M.; Garret, C.; Crespo, A.; Fallourd, A. M.; Doble, A. Characterization of a Human NK1 Tachykinin Receptor in the Astrocytoma Cell Line U 373 MG. *J. Neurochem.* **1993**, *60* (3), 868–876. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03231.x>.

(159) Meng, X.-Y.; Zhang, H.-X.; Mezei, M.; Ciu, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr Comput Aided Drug Des.* **2011**, *7* (2), 146–157.

(160) Pinzi, L.; Rastelli, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.

(161) Du, X.; Li, Y.; Xia, Y. L.; Ai, S. M.; Liang, J.; Sang, P.; Ji, X. L.; Liu, S. Q. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (2), 144. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>.

- (162) Arnittali, M.; Rissanou, A. N.; Harmandaris, V. Structure of Biomolecules Through Molecular Dynamics Simulations. *Procedia Comput. Sci.* **2019**, *156*, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2019.08.181>.
- (163) Guedes, I. A.; de Magalhães, C. S.; Dardenne, L. E. Receptor-Ligand Molecular Docking. *Biophys. Rev.* **2014**, *6* (1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>.
- (164) Rizzi, A.; Campi, B.; Camarda, V.; Molinari, S.; Cantoreggi, S.; Regoli, D.; Pietra, C.; Calo', G. In Vitro and in Vivo Pharmacological Characterization of the Novel NK1 Receptor Selective Antagonist Netupitant. *Peptides* **2012**, *37*, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.06.010>.
- (165) Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, *8*, 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-x](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-x).
- (166) Maurel, D.; Kniazeff, J.; Mathis, G.; Trinquet, E.; Pin, J. P.; Ansanay, H. Cell Surface Detection of Membrane Protein Interaction with Homogeneous Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Technology. *Anal. Biochem.* **2004**, *329*, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.013>.
- (167) Arunlakshana, O.; Schild, H. O. Some Quantitative Uses of Drug Antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **1959**, *14*, 48–58. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1997.tb06793.x>.
- (168) Chen, S.; Lu, M.; Liu, D.; Yang, L.; Yi, C.; Ma, L.; Zhang, H.; Liu, Q.; Frimurer, T. M.; Wang, M.-W.; Schwartz, T. W.; Stevens, R. C.; Wu, B.; Wüthrich, K.; Zhao, Q. Human Substance P Receptor Binding Mode of the Antagonist Drug Aprepitant by NMR and Crystallography. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08568-5>.

Capítulo IV. Análogos del PGN128

(Confidencial)

Conclusiones

Dentro de un proyecto dirigido hacia la búsqueda de nuevos agentes anticancerosos, en esta tesis doctoral se han diseñado tres familias de compuestos, mediante una aproximación basada en la estructura de tres prototipos con actividad anticancerosa demostrada: el sulforafano, el aprepitant y el derivado indazólico PGN128. De los resultados obtenidos pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. El diseño de nuevos **análogos del SFN** aplicando el principio de isosterismo nos ha permitido la síntesis de una quimioteca de isotiocianatos con una importante diversidad estructural (figura 98).

Los estudios *in vitro* de sus actividades biológicas han proporcionado los siguientes resultados:

1.1. En general, todos los derivados sintetizados presentan actividad citotóxica en células tumorales de leucemia, pero con diferente selectividad.

1.2. Todos los análogos estudiados han resultado ser activantes efectivos del factor Nrf2. Además, se ha observado una correlación entre la actividad citotóxica y la capacidad activante Nrf2.

2. Se ha sintetizado una quimioteca de **análogos del aprepitant** utilizando los hidratos de carbono L-arabinosa y D-glucosa como plataforma quiral de partida. Se han incorporado los fragmentos bencílicos (*R*)-1-[3,5-Bis(trifluorometil)fenil]etilo y *p*-fluorobencilo en las posiciones C-1 y C-2 del anillo de piranosa, respectivamente, como elementos estructurales clave para su actividad como antagonista NK1 (figura 99). La diferente funcionalización de los grupos hidroxilo presentes en sus estructuras ha permitido modular la lipofilia de los derivados sintetizados.

Conclusiones

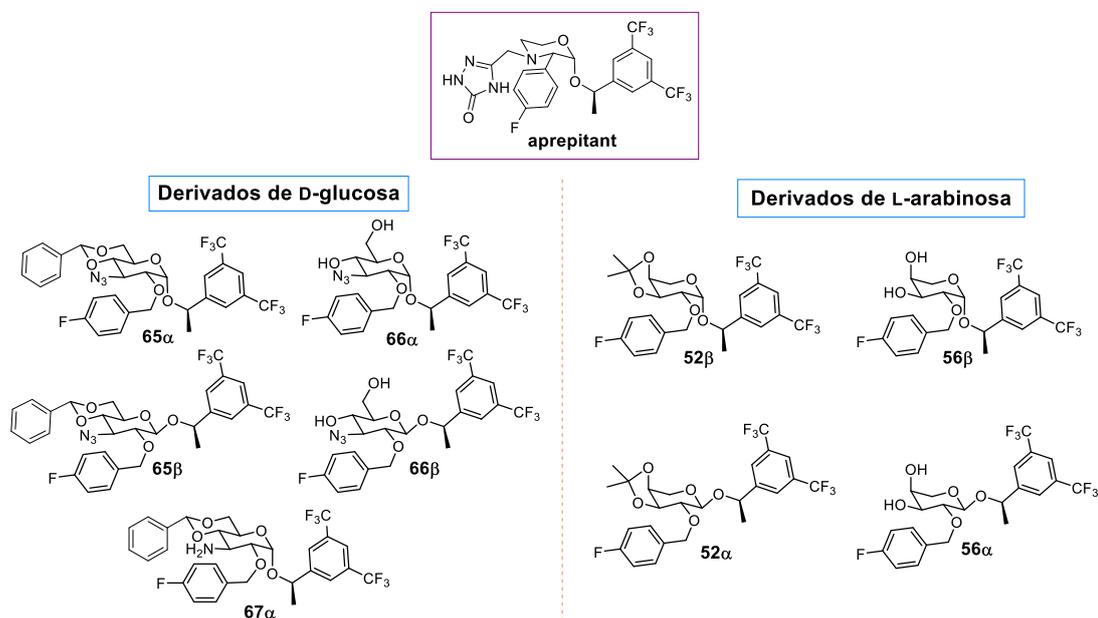


Figura 99. Estructuras de los análogos del aprepitant sintetizados, a partir de los carbohidratos L-arabinosa y D-glucosa.

La introducción del fragmento de bis(trifluorometil)encilo se llevó a cabo mediante una reacción de glicosilación (método del tricloroacetimidato o NIS como reactivo) y el *p*-fluorbencilo mediante *O*-alquilación del hidroxilo en C-2. Los *isopropiliden* derivados de L-arabinosa, **52β** y **52α** se obtuvieron mediante una ruta en 7 etapas con un rendimiento global del 47%. La desprotección por tratamiento con CSA condujo a los dioles **56β** y **56α**.

Los 3-azidodrievados de D-glucosa **65α** y **65β**, se obtuvieron en 8 etapas con un rendimiento global del 13%. La metanolisis condujo a sus derivados dihidroxilados más hidrofílicos **66α** y **66β**.

La reducción del grupo azida de **65α**, rindió el aminoderivado **67α** como análogo del aprepitant.

Los estudios de actividad biológica de los análogos del aprepitant sintetizados permiten extraer las siguientes conclusiones:

2.1. Todos los derivados presentan una importante actividad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales de pulmón y de neuroblastoma, determinada mediante estudios de viabilidad celular. El 3-aminoderivado de D-glucosa **67 α** resulta ser el más citotóxico frente al cáncer de pulmón, mientras que el *isopropilidenderivado* de L-arabinosa **52 β** es el más selectivo. Ambos derivados **67 α** y **52 β** presentan la misma estereoquímica en el carbono anomérico que el *aprepitant*. Por el contrario, la mayor actividad frente a neuroblastoma corresponde al derivado dihidroxilado **56 α** , cuya configuración en el carbono anomérico es opuesta a la del *aprepitant*.

2.2. Los estudios de actividad antagonista del receptor NK1 muestran que el derivado de L-arabinosa dihidroxilado **56 β** , tiene una actividad significativamente superior a la de su anómero **56 α** . Se observa una relación directa entre la actividad antagonista del receptor NK1 y la actividad antitumoral frente a cáncer de pulmón, pero no ocurre así en la actividad citotóxica frente al neuroblastoma. Estos resultados podrían indicar que la actividad anticancerosa no se debe sólo a su capacidad antagonista del receptor NK1, pudiendo estar implicados otro tipo de mecanismos. Actualmente se están llevando a cabo estudios para determinar los posibles mecanismos alternativos de actividad anticancerosa de los derivados sintetizados.

2.3. Para la determinación de la afinidad por el receptor NK1 en relación con la capacidad para desplazar la sustancia P, se seleccionaron el diol **56 β** , por ser el mejor antagonista de los derivados de L-arabinosa y el *isopropilidenderivado* **52 α** . Ambos derivados, a una concentración de $6 \cdot 10^{-5}$ M, son capaces de desplazar el 100% de la SP.

2.4. Los cálculos de "*Molecular Docking*" realizados con objeto de predecir *in silico* las interacciones moleculares significativas entre estos análogos y el sitio de interacción del receptor NK1, muestran que los fragmentos (*R*)-1-[3,5-Bis(trifluorometil)fenil]etilo en la posición anomérica, y *p*-fluorobencilo en la posición C-2 son clave para una adecuada interacción del ligando con el sitio de unión del receptor NK1. De todos los análogos estudiados, los benciliden

Conclusiones

derivados de D-glucosa muestran una interacción más efectiva con el sitio de unión del receptor NK1.

3. Se ha sintetizado una quimioteca de nuevos análogos de PGN128, un conocido agonista CB₂ (figura 100).

En cuanto a los resultados de actividad biológica:

3.1. Estos derivados no han proporcionado resultados satisfactorios como antileucémicos, dada su baja selectividad, sin embargo, han mostrado prometedores resultados como antivirales frente al SARS-CoV-2.

A modo de “corolario”, en la figura 101 se representa el compuesto seleccionado como óptimo para cada una de las tres familias, ya sea como antileucémico, anticanceroso frente a cáncer de pulmón o neuroblastoma, o como antivíricos frente al SARS-CoV-2.

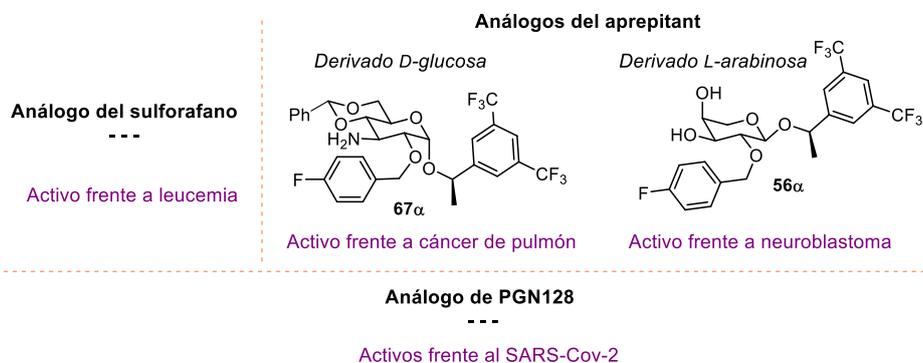


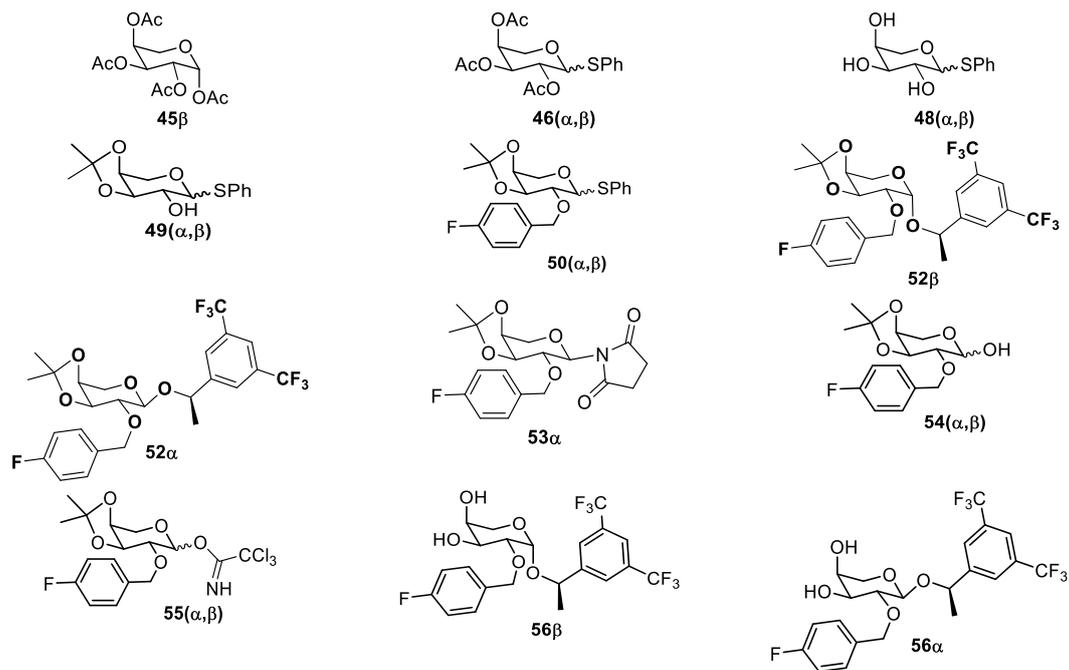
Figura 101. Selección del compuesto óptimo de los sintetizados para cada familia, basándonos en los resultados de actividad biológica.

Índice de compuestos

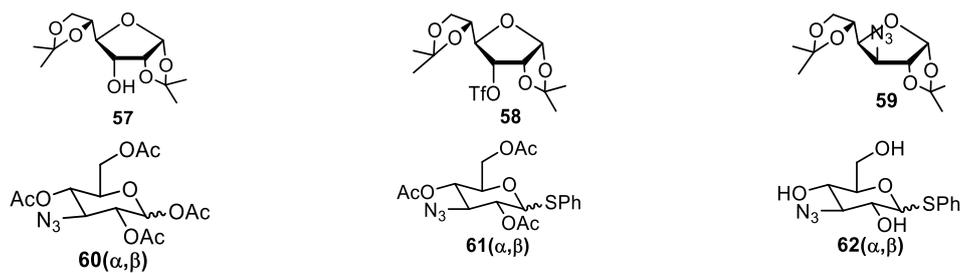
Capítulo II. Análogos del sulforafano

Capítulo III. Análogos del aprepitant

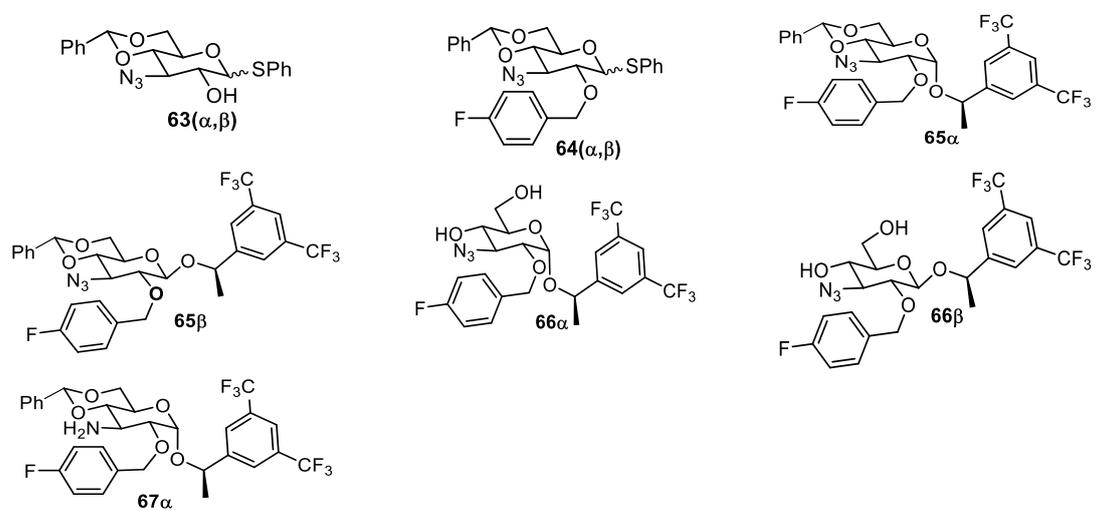
1. Derivados de L-arabinosa



2. Derivados de D-glucosa



Índice de compuestos



Capítulo IV. Análogos del PGN128
