



**UNIVERSITAT
JAUME·I**

**DESARROLLO DE TRIAZOLES Y
TETRAZOLES COMO AGENTES
INMUNOMODULADORES Y
DISRUPTORES DEL MICROAMBIENTE
TUMORAL**

Alberto Pla López

Miguel Carda Usó
Eva Falomir Ventura

Octubre 2023



**UNIVERSITAT
JAUME·I**

**Programa de Doctorado en Ciencias
Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I**

DESARROLLO DE TRIAZOLES Y TETRAZOLES COMO AGENTES INMUNOMODULADORES Y DISRUPTORES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

**Memoria presentada por Alberto Pla López para optar al grado de
doctor por la Universitat Jaume I**

Alberto Pla López

Miguel Carda Usó

Eva Falomir Ventura

Castelló de la Plana, octubre 2023

FINANCIACIÓN

Agencias financiadoras del doctorando:

- Subvención para la contratación de personal investigador de carácter predoctoral (ACIF), concedida por la Generalitat Valenciana, para el proyecto “Desarrollo de compuestos con actividad antiangiogénica e inmunomoduladora” (ACIF/2020/341).

Agencias financiadoras del proyecto de investigación o de los recursos materiales específicos del grupo de investigación:

- Proyecto financiado por la Universitat Jaume I. “Programa grupos de investigación en activo en captación de recursos del plan estatal” (GACUJI/2022/05).
- Proyecto PID2021-126277OB-100 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa.



- Proyecto financiado por la Universitat Jaume I. “Descubrimiento de moléculas multidiana anticáncer y estudio de su efecto sobre el microambiente tumoral mediante modelos 3D” (UJI-B2021-46).
- Proyecto financiado por la Universitat Jaume I. “*In silico*, síntesis y evaluación biológica de agentes anticáncer multidiana con efecto inmunomodulador, antiangiogénico y antivascular” (UJI-B2018-38).

- Proyecto financiado por el Ministerio de Economía y competitividad. “En busca de una nueva generación de agentes anticancerosos multidiana. Desde lo *in silico* hasta lo *in vitro* y desde moléculas pequeñas hasta los nanofármacos” (RTI2018-097345-B-100).

Licencia Creative Commons

Licencia CC Reconocimiento - No comercial - Compartir igual (BY-NC-SA).



AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el grupo *Joining Medicine and Chemistry (JMC)*, en el departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales de la Universitat Jaume I bajo la dirección de Miguel Carda Usó y Eva Falomir Ventura. Me gustaría agradecer a ambos por abrirme las puertas del grupo desde el primer día y acogerme cuando aún era un estudiante del primer curso del grado en Química ahora hace casi nueve años.

A Miguel, gracias por las explicaciones sobre reacciones, mecanismos, espectros y por contar con tanto entusiasmo los nuevos fármacos y las nuevas dianas que encontrabas cada día para tu asignatura del máster, pero también gracias por las mil y una anécdotas contadas de la forma más graciosa, el comentario sobre el resultado del fútbol después de cada partido y las horas pasadas en el despacho solucionando problemas informáticos. Estos ratitos también han contribuido a esta Tesis.

Eva, de verdad que lo tuyo es especial. Eres ejemplo de pasión, esfuerzo y superación en todo lo que haces. Siempre te has preocupado por cómo iba todo, tanto la Tesis como lo que no era la Tesis, y, aunque no te lo creas, sin tu dedicación y empeño las cosas hubieran sido mucho más difíciles. Gracias por transmitir todo esto al día a día, porque a pesar de que en algunas ocasiones no viera la forma de que los ensayos salieran, de que los datos cuadraran o de dar forma a los resultados, siempre me has apoyado, animado y hecho que confiara en que al final iba a salir bien: “poc a poc...” Conseguir eso no es nada fácil, y ya lo creo que lo consigues.

También me gustaría agradecer a la gente con la que he coincidido en el grupo. A Ana M., Raúl y Laura, los que me recibieron el primer día y me dejaron que les pudiera ayudar para que yo aprendiese. Y a todos los estudiantes a los que he intentado enseñar y ayudar de la mejor manera

posible. A Olaya, Benjamín, Jenni, Laura F., Alejandro, José Carlos, Laura C., Marikena, Paula, Rubén y Raquel. Gracias a todos por haber sido grandes estudiantes que me habéis ayudado de muchas formas diferentes y que me habéis hecho estar muy a gusto con vosotros.

Cómo me iba a olvidar de mis chicas. Con las que he pasado horas y horas en el laboratorio, en el despacho, en las comidas... La verdad que no hubiera podido escoger a nadie mejor como compañeras para este viaje. A Celia, la del holi al llegar, gracias por mejorar todas las tardes que venías. Tus charlas vespertinas me hacían continuar un buen día o sacar una sonrisa si el día no era tan bueno. A Raquel, la que te hace reír sólo con verla reír a ella, gracias por todos los buenos momentos compartidos desde hace nueve años. He compartido toda mi estancia en el grupo contigo y estoy muy contento que así haya sido. A Amelia, la que le pone toda la vitalidad del mundo a las cosas, gracias por ser tan apasionada con lo que te gusta. Metódica e intensa puede parecer un cóctel explosivo, pero siempre me has aportado ese extra de energía cuando hacía falta. En este punto también me gustaría agradecer a Juanjo, que, aunque no formase parte del grupo, como si lo hubiese sido. Gracias por todas las comidas compartidas y por completar el gran grupo que hemos formado durante estos años. A vosotros, espero que esta amistad dure para siempre.

No me quiero olvidar de los compañeros y amigos con los que coincidí en la carrera y que siempre se han preocupado de cómo me iba todo. A Pablo, por todas las prácticas de la carrera, sus memorias y sus cervezas; a David, por coincidir desde el instituto; a Sergio, por compartir tantos momentos con Musicajedrez; a Mar, por tener siempre un mensaje de apoyo; y a José Juan, por ser el "mestre" de Lluca. También quiero acordarme de todos los becarios con los que he coincidido en la universidad y que han aportado su granito de arena para ayudarme y apoyarme.

A todos los amigos que la música me ha dado. Gracias por saber escucharme cuando contaba mis avances y también por aguantarme cuando necesitaba descargar mis quejas y mis penas. Estoy muy contento y orgulloso de poder ser músico y haber podido conocer a gente tan especial que no hubiera podido conocer de no ser por la música. De corazón, gracias.

Por último, me gustaría agradecer de forma especial a mis padres, Juanlu y Ana. Son muchos los días y las circunstancias para llegar hasta este punto y sin vosotros no hubiera sido posible. Gracias por vuestra paciencia para soportar mis frustraciones, por vuestra confianza que, aunque pueda no aparentarlo, siempre me ha ayudado a continuar hacia adelante y por ser el apoyo número uno para afrontar las adversidades. A vosotros os debo todo lo que he conseguido.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|---|---|
| ACS- American Chemical Society | CK2- Casein Kinase 2 |
| ADCP- Antibody Dependent Cellular Phagocytosis | CMI- Concentración Mínima Inhibitoria |
| ADME- Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción | c-Myc- Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog |
| ADN- Ácido Desoxirribonucleico | CQDs- Carbon Quantum Dots |
| ADP- Adenosindifosfato | CTLA-4- Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 |
| APC- Antigen Presenting Cells | DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| APCI- Atmospheric Pressure Chemical Ionization | DMF- Dimetilformamida |
| ARN- Ácido Ribonucleico | DMSO- Dimetilsulfóxido |
| ATL- Adult T cell Leukemia | dsDNA- double stranded DNA |
| ATP- Adenosintrifosfato | DSF- Differential Scanning Fluorimetry |
| AZT- Azidotimidina | dsRNA- double stranded RNA |
| A-549- Línea celular de adenocarcinoma de pulmón | <i>E. coli-</i> <i>Escherichia coli</i> |
| BMS- Bristol Myers Squibb | EDC- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida |
| CCL2- C-C Chemokine Motif Ligand 2 | EGM- Endothelial Cell Growth Medium |
| CCR2- C-C Chemokine Receptor Type 2 | EHS- Engelbreth-Holm-Swarm |
| CD- Cluster of Differentiation | ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |

EPR- Enhance Permeability and Retention Effect

ESI- Electrospray Ionization

FBS- Fetal Bovine Serum

FDA- Food & Drug Administration

FITC- Fluorescein Isothiocyanate

FSC- Forward Scatter

FTIR- Fourier Transformed Infrared Spectroscopy

GLOBOCAN- Global Cancer Observatory

gp- glicoproteína

HEK-293- Línea celular embrionaria de riñón humano

HIF-1- Hypoxia-Inducible Factor

HLH- α -Helix-Loop- α -Helix

HMEC-1- línea celular humana del endotelio microvascular

HRP- Horseradish Peroxidase

HTLV-1- Human T-lymphotropic Virus

1

HT-29- Línea celular de adenocarcinoma de colon

IFN- γ - Interferón γ

Ig- Inmunoglobulina

IL- Interleucina

IP- Inhibidor de Proteasa

IRTNN- Inhibidor de la Transcriptasa Reversa No análogo de Nucleósido

ITIM- Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif

ITRN- Inhibidor de la Transcriptasa Reversa análogo de Nucleósido

ITSM- Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif

IUPAC- International Union for Pure and Applied Chemistry

LB- Luria Bertani

LCK- Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LZ- Leucine Zip

MAX- Myc Associated Protein X

MCF-7- Línea celular de adenocarcinoma de mama

MEDI- Medicinal Chemistry Division of the American Chemical Society

MHC- Major Histocompatibility Complexes

MOPS- Ácido 3-(N-morfolin)propanosulfónico

MS- Mass Spectrometry

MTS- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol

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

NAD- Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NF- κ B- Nuclear Factor Kappa Light chain enhancer of activated B cells

NHS- N-hidroxisuccinimida

NK- Natural Killer

PBS- Phosphate Buffered Saline

PD-1- Protein Death-1

PD-L1- Protein Death Ligand-1

PES- Phenazine Ethosulfate

PEG- Polietilenglicol

PGF- Placental Growth Factor

PS- Fosfatidilserina

PTEN- Phosphatase and Tensin homolog

PTS- Protein Thermal Shift

QSAR- Quantitative Structure Activity Relationship

RMN- Resonancia Magnética Nuclear

RPMI- Roswell Park Memorial Institute

RTK- Receptor Tirosina-Kinasa

SARS- Severe Acute Respiratory Syndrome

S. aureus- *Staphylococcus aureus*

SDA- Sabouraud Dextrose Agar

SHP-2- Src Homology Region 2 domain-containing phosphatase 2

SIDA- Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SIRP α - Signal Regulatory Protein Alpha

SSC- Side Scatter

ssDNA- single stranded DNA

ssRNA- single stranded RNA

STAT3- Signal Transducers and
Activators of Transcription 3

TAD- N-terminal Transactivation
Domain

TAM- Tumor Associated
Macrophages

TARGA- Terapia Antirretroviral de
Gran Actividad

TCR- T cell receptor

T_m- Melting Temperature

TMB- 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

TME- Tumor Microenvironment

TNF- α - Tumor Necrosis Alfa

TP53- Tumor Protein 53

UV- Ultravioleta

VEGF- Vascular Endothelial Growth
Factor

VEGFR- Vascular Endothelial Growth
Factor Receptor

VIH- Virus de la Inmunodeficiencia
Humana

WST- Water-soluble Tetrazolium Salt

ZAP70- Zeta chain of T cell receptor
Associated Protein kinase 70

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral se enmarca en el área de la Química Médica y se centra en el diseño, síntesis y evaluación biológica de compuestos orgánicos con potencial efecto antitumoral e inmunomodulador. Teniendo en cuenta que, cada año, se diagnostican casi 20 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo, y que esta enfermedad causa cerca de 10 millones de muertes anuales, la búsqueda de nuevas terapias para hacer frente a esta enfermedad adquiere una gran relevancia.

Uno de los graves problemas de los tratamientos clásicos frente al cáncer, tales como la radioterapia o la quimioterapia, es el de la aparición de multitud de efectos secundarios como consecuencia, en el caso de la quimioterapia, de la falta de especificidad de los fármacos empleados. Para disminuir la cantidad y gravedad de estos efectos secundarios se está potenciando el uso de las terapias dirigidas, entre las que destaca el uso de la inmunoterapia. El sistema inmune se encuentra debilitado o inhibido en los pacientes oncológicos y con la inmunoterapia se pretenden encontrar nuevos fármacos que sean capaces de reactivar el sistema inmune del paciente para que éste pueda combatir el cáncer de una manera mucho más eficaz.

Un tumor no se encuentra formado únicamente por una agrupación de células aberrantes, sino que también está constituido por otras células como las necróticas, las estromales y las inmunes. Todos estos elementos conforman el conocido como microambiente tumoral (TME, *Tumor Microenvironment*) y, para abordar el tratamiento del cáncer, resulta fundamental conocer en profundidad los mecanismos mediante los cuales los componentes del TME contribuyen a la expansión de la enfermedad

Una de las proteínas involucradas en el microambiente tumoral es la denominada PD-L1 (*Protein Death Ligand-1*), la cual se encuentra sobre-expresada en la superficie de las células cancerosas. Su unión con PD-1 (*Protein Death-1*), presente en la superficie de las células defensivas, induce

una cascada de señalización que desemboca en la inhibición de la destrucción de célula cancerosa por parte del sistema inmune.

La secreción de citoquinas por parte de los linfocitos del TME también supone un punto de interés en la búsqueda de nuevos compuestos capaces de actuar sobre el TME. Dos de las citoquinas más relevantes son la IL-6 (Interleucina-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor- α*). IL-6 se encuentra relacionada directamente, entre otros procesos, con el crecimiento tumoral, la inflamación de las zonas próximas a éste y la evasión del sistema inmune y, recientemente, se ha demostrado que la reducción de la cantidad de IL-6 presente en el TME aumenta la actividad del sistema inmune, al mismo tiempo que decrece el tamaño del tumor. Por otro lado, TNF- α puede ser secretado al medio por parte de las células tumorales o por parte del sistema inmune, por lo que una regulación de esta citoquina también resulta de gran importancia antineoplásica.

La angiogénesis se define como el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. La angiogénesis tumoral genera una red de vasos sanguíneos que rodean al tumor y que le aportan a éste por un lado los nutrientes y el oxígeno necesario para su rápido crecimiento y, por otro lado, le permiten la eliminación de sus desechos metabólicos. La proteína VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) y sus receptores tirosina-quinasa asociados, como el VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor-2*), juegan un papel clave en la angiogénesis tumoral. La unión del VEGF al VEGFR-2 inicia una ruta de señalización intracelular que conduce a la activación de la angiogénesis.

Por último, el oncogen c-Myc y su factor de transcripción asociado desempeñan un papel central en multitud de procesos cancerosos, entre ellos la regulación de la capacidad inmunomoduladora de las células tumorales frente a las células del sistema inmune, el proceso de angiogénesis o las características apoptóticas de la célula. Por tanto, el bloqueo de c-Myc se ha

erigido como uno de los puntos inmunológicos de mayor interés en la búsqueda de nuevas terapias contra el cáncer.

Algunos tratamientos de inmunoterapia emplean anticuerpos monoclonales para bloquear dianas biológicas clave en la enfermedad oncológica. Recientemente también se está apostando por la investigación de pequeñas moléculas orgánicas como alternativa a los anticuerpos monoclonales. Por este motivo, el grupo de investigación donde se ha llevado a cabo esta Tesis Doctoral se centra en el desarrollo de moléculas orgánicas de bajo peso molecular que muestren una actividad antitumoral mediante el bloqueo de una o varias de las dianas biológicas anteriormente mencionadas.

Las estructuras orgánicas sintetizadas y evaluadas en esta Tesis se basaron en resultados previos obtenidos en el grupo de investigación. Así, en el grupo se había demostrado que las moléculas de tipo (*E*)-4-estirilnilina exhibían una actividad antitumoral prometedora, por lo que los compuestos sintetizados en esta Tesis están basados en esta estructura, en la que se ha cambiado el doble enlace *E* por un anillo central de triazol o tetrazol como conector de los dos anillos aromáticos. Este anillo central ejerce el papel de espaciador rígido entre los dos anillos, al igual que el doble enlace, pero la presencia del anillo heterocíclico, altamente nitrogenado, podría facilitar la unión de esta clase de compuestos a los centros activos de las dianas biológicas mediante interacciones π -stacking o como aceptor de enlaces de hidrógeno.

Para esta Tesis Doctoral se desarrollaron cuatro familias de compuestos, las cuales se muestran en la Figura 1.

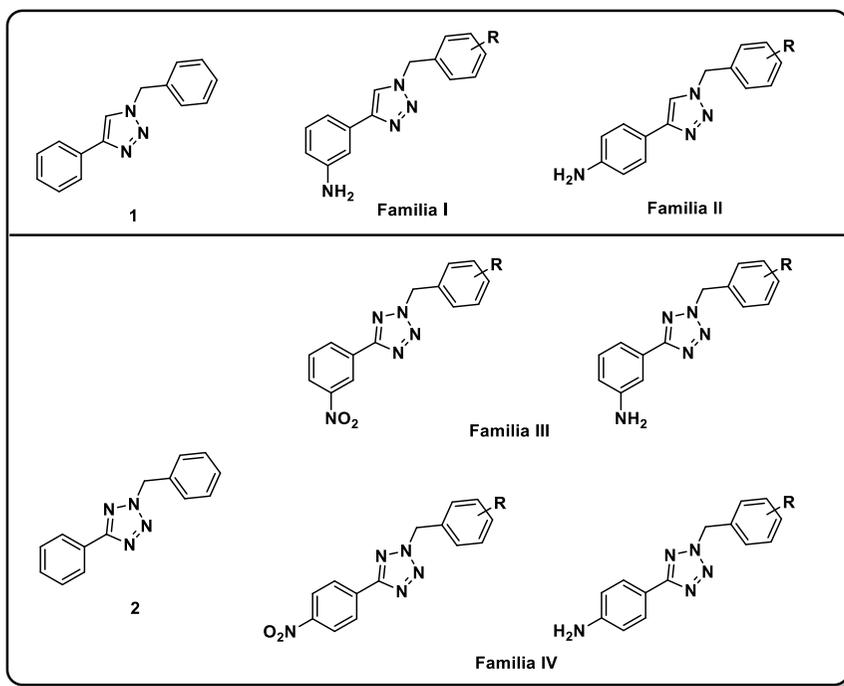


Figura 1. Estructuras generales de las cuatro familias de compuestos que se han sintetizado en esta Tesis Doctoral.

Se decidió estudiar la diferencia entre la posición relativa 1,3 y 1,4 del grupo amino en el anillo de fenilo, por lo que las familias **I** y **II** son las que están formadas por un anillo de fenilo y otro de bencilo con un anillo de triazol como espaciador entre ambos, mientras que en las familias **III** y **IV** el espaciador es de tipo tetrazol. Además, también se sintetizó el triazol (compuesto **1**) y el tetrazol (compuesto **2**) que no contienen sustituyentes en los anillos de fenilo. Para las familias **III** y **IV** el objetivo inicial era el de obtener los aminotetrazoles mediante cicloadición de los correspondientes aminobenzonitrilos con azida sódica, pero esta reacción no funcionó bien, por lo que se optó por la obtención indirecta de los aminotetrazoles de las familias **III** y **IV** mediante preparación de los correspondientes nitrotetrazoles, seguida de su alquilación con haluros de bencilo y de reducción final a los aminotetrazoles.

Los triazoles (compuesto **1** y familias **I** y **II**) fueron obtenidos mediante reacción de cicloadición tipo *click* entre el correspondiente alquino y las correspondientes azidas de bencilo.

Una vez sintetizados, purificados y caracterizados todos los compuestos, se procedió a realizar la evaluación biológica de los mismos en relación a la:

- Viabilidad celular frente a las líneas celulares que se indican a continuación:
 - HT-29: adenocarcinoma de colon.
 - A-549: adenocarcinoma de pulmón.
 - MCF-7: adenocarcinoma de mama.
 - HEK-293: células embrionarias de riñón.
- Interacción con proteínas relacionadas con el proceso tumoral, como PD-L1, IL-6, TNF- α , VEGFR-2 y c-Myc.
- Capacidad inmunomoduladora en condiciones similares a las del microambiente tumoral mediante la evaluación de la:
 - Viabilidad en co-cultivo celular empleando la línea HT-29 y líneas de células defensivas como Jurkat-T o THP-1.
- Actividad antiangiogénica y antivascular.
- Promoción del proceso de apoptosis.

Los resultados más destacados para cada familia se indican a continuación.

- *Evaluación biológica del compuesto 1 y de los compuestos de la familia I*

Los compuestos más destacados, así como los resultados más prometedores, se muestran en la Figura 2.

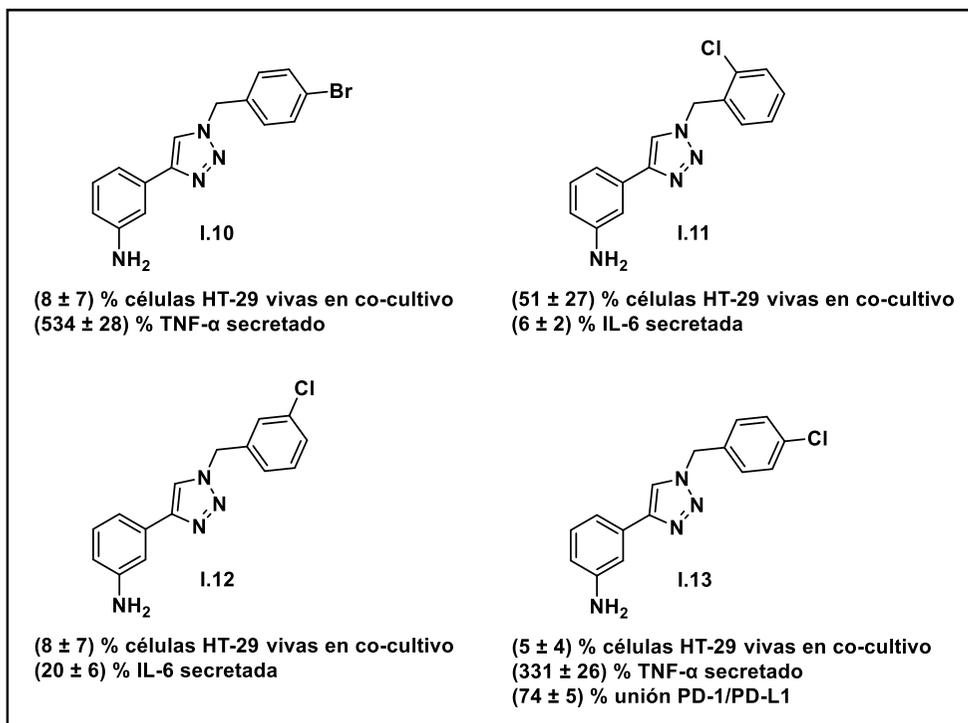


Figura 2. Compuestos de la familia I con los resultados más prometedores.

- *Evaluación biológica de los compuestos de la familia II*

Los compuestos más destacados, así como los resultados más prometedores, son los que se muestran en la Figura 3.

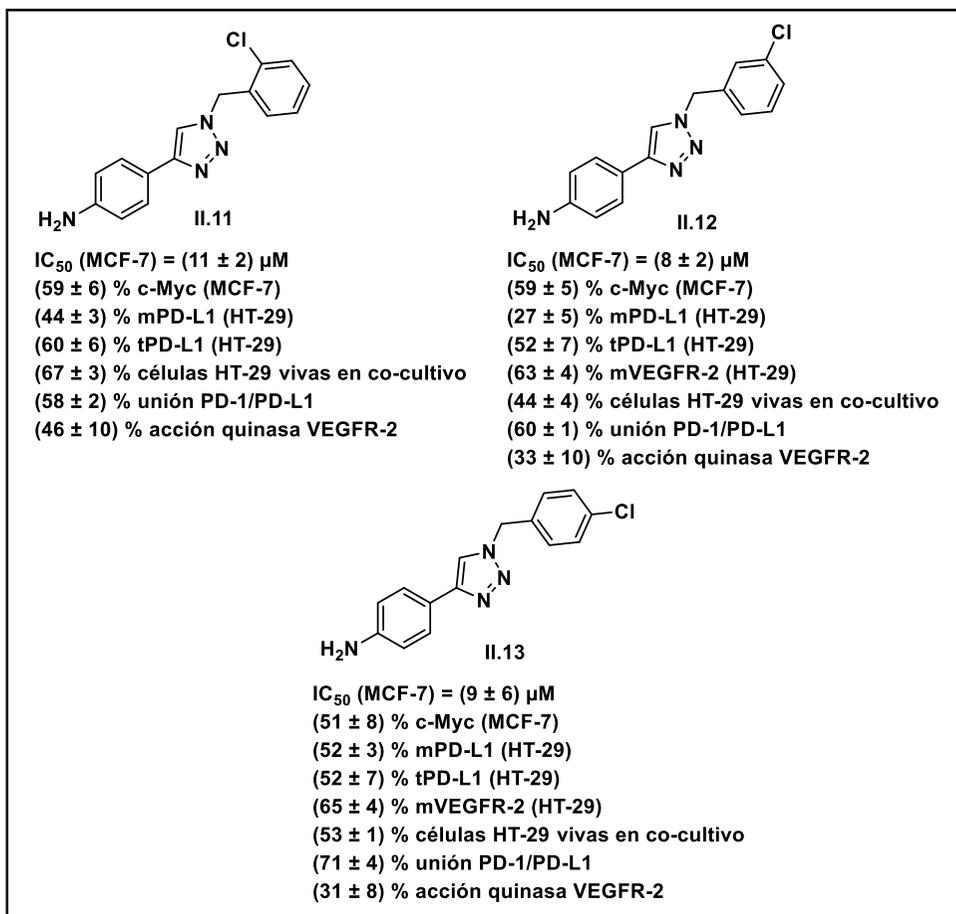


Figura 3. Compuestos de la familia II con los resultados más prometedores.

- *Evaluación biológica del compuesto 2 y de los compuestos de la familia III*

Los compuestos más destacados, así como los resultados más prometedores, son los que se muestran en la Figura 4.

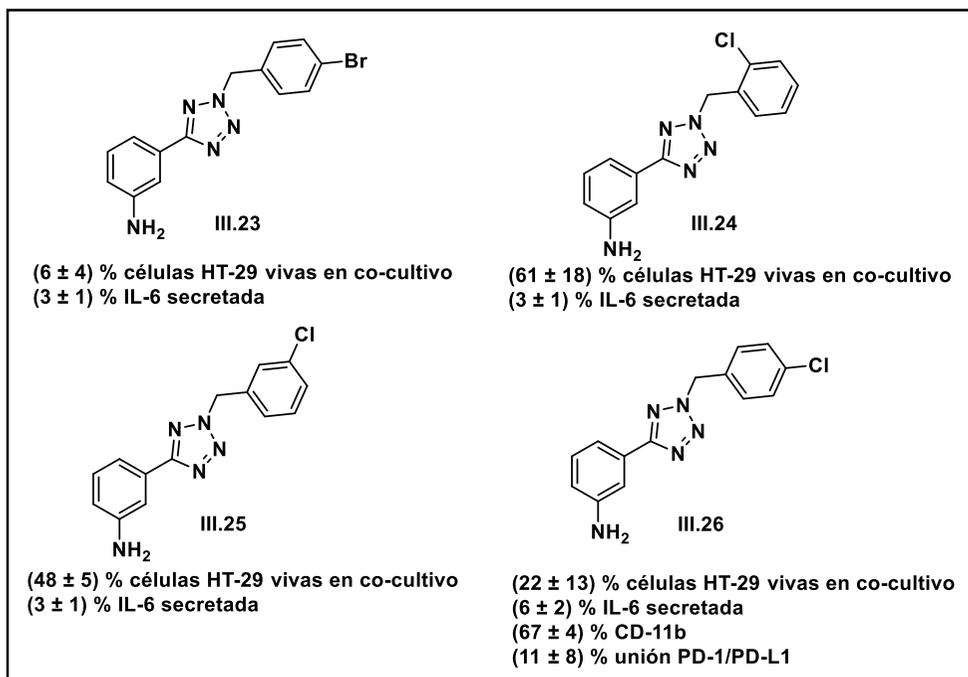


Figura 4. Compuestos de la familia III con los resultados más prometedores.

- *Evaluación biológica de los compuestos de la familia IV*

Los compuestos más destacados, así como los resultados más prometedores, son los que se muestran en la Figura 5.

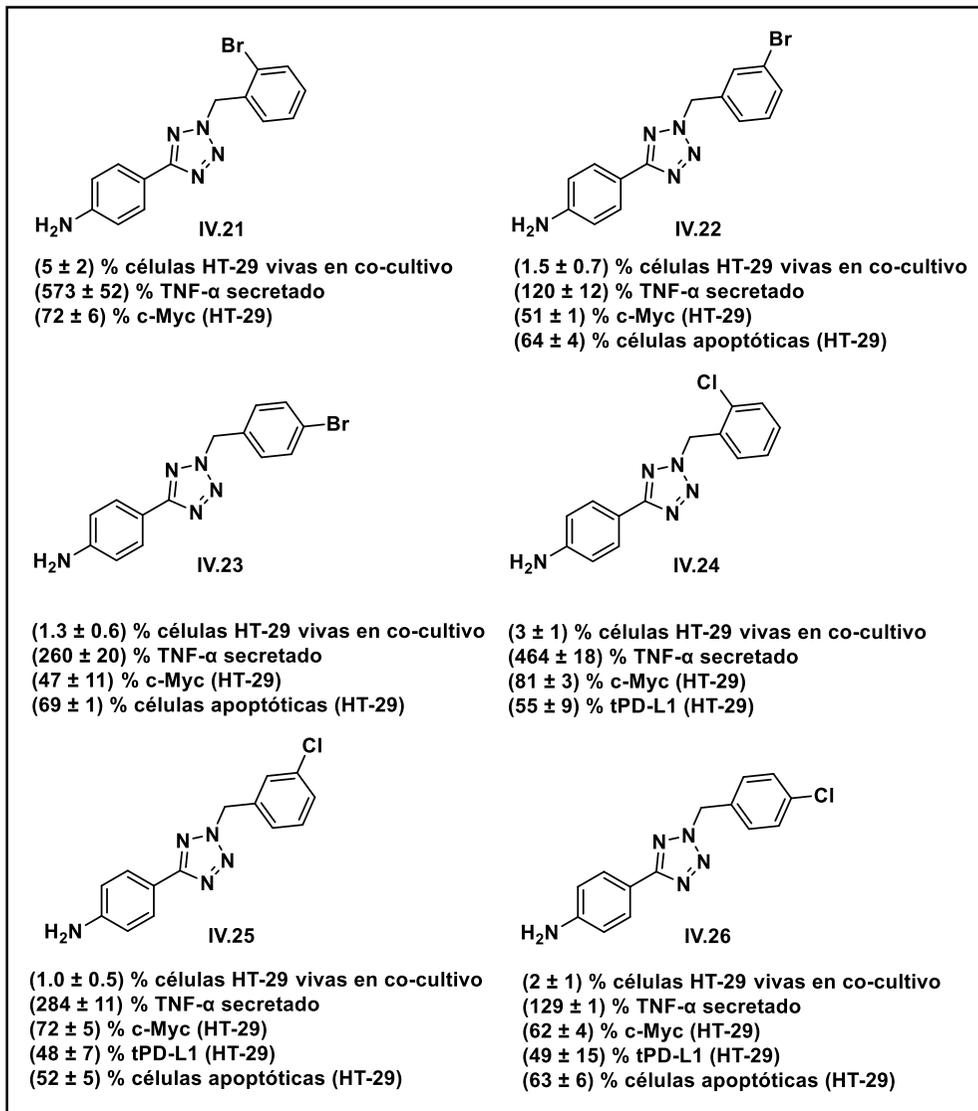


Figura 5. Compuestos de la familia IV con los resultados más prometedores.

Como conclusión general, teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, se puede afirmar que los aminotetrazoles con el grupo amino en posición *para* (familia **IV**) son los que muestran una mayor capacidad inmunomoduladora, pues, en los ensayos de viabilidad celular en co-cultivo, son los que reducen en mayor medida la cantidad de células tumorales vivas sin disminuir la cantidad de células defensivas.

Por otro lado, la posición y el sustituyente óptimos en el anillo de bencilo resultan ser la *para*-Br. Además, los resultados frente a las distintas dianas biológicas sugieren que los mecanismos de acción biológica pueden ser distintos en cada compuesto, por lo que en el futuro se pretende ampliar la evaluación biológica para determinar de una forma más precisa estos mecanismos, así como detectar el lugar de acción de los derivados mediante estudios de colocalización celular.

La vida sin música sería un error

Friedrich Nietzsche

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Química Médica | 1 |
| 1.2. Fármacos quimioterapéuticos..... | 5 |
| 1.2.1. Antibióticos | 7 |
| 1.2.2. Antivirales..... | 13 |
| 1.2.3. Antimicóticos | 19 |
| 1.2.4. Antineoplásicos | 22 |
| 1.3. Terapias dirigidas contra el cáncer | 31 |
| 1.3.1. Señas de identidad del cáncer..... | 31 |
| 1.3.2. Inmunoterapia..... | 41 |
| 1.3.2.1. Células del sistema inmune y microambiente tumoral | 43 |
| 1.3.2.2. Angiogénesis..... | 55 |
| 1.3.3. Desarrollo de nanofármacos | 61 |
| 1.4. Antecedentes y contexto investigador | 66 |
| CAPÍTULO 2. OBJETIVOS..... | 71 |
| CAPÍTULO 3. SÍNTESIS DE DERIVADOS TIPO TRIAZOL Y TETRAZOL | 73 |
| 3.1. Síntesis de los compuestos tipo triazol (compuesto 1 y familias I y II).. | 73 |
| 3.2. Síntesis de los compuestos tipo tetrazol (compuesto 2 y familias III y IV)..... | 77 |
| 3.3. Sección experimental | 82 |
| 3.3.1. Técnicas generales..... | 82 |
| 3.3.2. Procedimiento general para la formación de los bromuros de bencilo 3-6 | 83 |
| 3.3.3. Procedimiento general para la formación de las azidas de bencilo 7-19 | 85 |
| 3.3.4. Procedimiento general para la formación de los triazoles (compuesto 1 y familias I y II) mediante reacción tipo <i>Click</i> | 90 |
| 3.3.5. Datos físicos y espectroscópicos de los triazoles (compuesto 1 y familias I y II)..... | 90 |
| 3.3.6. Procedimiento general para la formación de los tetrazoles 23- 25 | 108 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.7. Procedimiento general para la N-alquilación de los tetrazoles (compuesto 2 y familias III.1-III.13 y IV.1-IV.13) | 110 |
| 3.3.8. Procedimiento general para la reducción de los tetrazoles (III.14-III.26 ; IV.14-IV.26) | 110 |
| 3.3.9. Datos físicos y espectroscópicos de los tetrazoles (compuesto 2 y familias III y IV) | 111 |

CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LA CAPACIDAD ANTITUMORAL147

| | |
|--|-----|
| 4.1. Estudio de la interacción directa con PD-L1 | 147 |
| 4.2. Estudio del bloqueo PD-1/PD-L1 | 149 |
| 4.3. Estudio de la actividad inhibitoria quinasa | 151 |
| 4.4. Líneas celulares humanas empleadas..... | 153 |
| 4.4.1. Líneas celulares humanas tumorales..... | 153 |
| 4.4.2. Líneas celulares humanas no tumorales..... | 154 |
| 4.4.3. Líneas celulares humanas sanas..... | 155 |
| 4.5. Estudio de la viabilidad celular | 155 |
| 4.5.1. Determinación del IC ₅₀ en monocultivo mediante ensayo MTT... 156 | |
| 4.5.2. Determinación del porcentaje de células vivas en co-cultivo mediante citometría de flujo..... | 158 |
| 4.6. Estudio de la expresión de las proteínas PD-L1, CD-47, VEGFR-2 y c-Myc | 159 |
| 4.7. Estudio del efecto en la secreción de IL-6 y TNF- α | 161 |
| 4.8. Estudio de la actividad proapoptótica | 161 |
| 4.9. Estudio de la actividad antiangiogénica y antivascolar | 162 |
| 4.10. Evaluación biológica del compuesto 1 y de los compuestos de la familia I | 164 |
| 4.10.1. Interacción directa con PD-L1..... | 164 |
| 4.10.2. Viabilidad celular en monocultivo | 164 |
| 4.10.3. Viabilidad celular en co-cultivo | 165 |
| 4.10.4. Efecto sobre la expresión de CD-47 y PD-L1..... | 166 |
| 4.10.5. Efecto en la secreción de IL-6 y TNF- α | 167 |
| 4.10.6. Acción antiangiogénica y antivascolar..... | 168 |
| 4.10.7. Efecto sobre el bloqueo de PD-1/PD-L1 | 170 |

| | |
|--|-----|
| 4.10.8. Efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR-2 | 170 |
| 4.10.9. Conclusiones | 171 |
| 4.11. Evaluación biológica de los compuestos de la familia II | 176 |
| 4.11.1. Interacción directa con PD-L1 | 176 |
| 4.11.2. Viabilidad celular en monocultivo | 176 |
| 4.11.3. Efecto sobre la expresión de PD-L1, VEGFR-2 y c-Myc..... | 178 |
| 4.11.4. Viabilidad celular en co-cultivo | 181 |
| 4.11.5. Acción antiangiogénica y antivascular | 182 |
| 4.11.6. Efecto sobre el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 | 184 |
| 4.11.7. Efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR-2..... | 184 |
| 4.11.8. Conclusiones | 185 |
| 4.12. Evaluación biológica del compuesto 2 y de los compuestos de la familia III | 191 |
| 4.12.1. Interacción directa con PD-L1 | 191 |
| 4.12.2. Viabilidad celular en monocultivo | 192 |
| 4.12.3. Viabilidad celular en co-cultivo | 193 |
| 4.12.4. Efecto sobre la expresión de PD-L1, CD-47, VEGFR-2 y c-Myc..... | 195 |
| 4.12.5. Efecto en la secreción de IL-6 y TNF- α | 199 |
| 4.12.6. Efecto sobre la expresión de CD-80 y CD-11b..... | 200 |
| 4.12.7. Acción antiangiogénica y antivascular..... | 201 |
| 4.12.8. Efecto sobre el bloqueo de PD-1/PD-L1 | 204 |
| 4.12.9. Efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR-2 | 204 |
| 4.12.10. Conclusiones | 205 |
| 4.13. Evaluación biológica de los compuestos de la familia IV | 211 |
| 4.13.1. Interacción directa con PD-L1 | 211 |
| 4.13.2. Viabilidad celular en monocultivo | 212 |
| 4.13.3. Viabilidad celular en co-cultivo | 213 |
| 4.13.4. Efecto sobre la expresión de PD-L1, CD-47, VEGFR-2 y c-Myc..... | 218 |
| 4.13.5. Efecto sobre el monocultivo de THP-1 | 221 |
| 4.13.6. Efecto en la secreción de IL-6 y TNF- α | 222 |

| | |
|--|------------|
| 4.13.7. Efecto sobre el bloqueo de PD-1/PD-L1 | 224 |
| 4.13.8. Efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR-2 | 225 |
| 4.13.9. Estudio del efecto proapoptótico | 226 |
| 4.13.10. Conclusiones | 228 |
| 4.14. Estudio de la actividad antitumoral de nanocompuestos..... | 234 |
| 4.15. Sección experimental | 238 |
| 4.15.1. Protocolos y técnicas generales..... | 239 |
| 4.15.1.1. Ensayo de interacción directa con PD-L1..... | 239 |
| 4.15.1.2. Ensayo de bloqueo PD-1/PD-L1..... | 239 |
| 4.15.1.3. Ensayo de actividad inhibitoria quinasa | 239 |
| 4.15.1.4. Mantenimiento de los cultivos celulares y recuento celular. | 240 |
| 4.15.1.5. Ensayo de viabilidad celular en monocultivo. Determinación del IC ₅₀ mediante ensayo MTT | 241 |
| 4.15.1.6. Ensayo de viabilidad celular en co-cultivo. Determinación del porcentaje de células vivas mediante citometría de flujo | 241 |
| 4.15.1.7. Determinación de la expresión de las proteínas PD-L1, CD-47, VEGFR-2 y c-Myc mediante citometría de flujo | 242 |
| 4.15.1.8. Determinación del efecto en la secreción de IL-6 y TNF- α .. | 242 |
| 4.15.1.9. Determinación de la actividad proapoptótica | 243 |
| 4.15.1.10. Determinación de la actividad antiangiogénica y antivascular..... | 243 |
| CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA, ANTIVIRAL Y ANTIMICÓTICA..... | 245 |
| 5.1. Estudio de la actividad antibacteriana..... | 245 |
| 5.2. Estudio de la actividad antiviral..... | 249 |
| 5.3. Estudio de la actividad antimicótica | 253 |
| CAPÍTULO 6. COMUNICACIONES EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL | 261 |
| 6.1. Comunicaciones en congresos..... | 261 |
| 6.2. Publicaciones | 261 |
| CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES GENERALES..... | 263 |
| CAPÍTULO 8. ESPECTROS SELECCIONADOS | 275 |

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El aumento de la esperanza de vida y la mejora del bienestar social han sido dos de los objetivos primordiales de las sociedades modernas, los cuales han ido en creciente ascensión a lo largo de los años. Esto se encuentra indudablemente relacionado con la búsqueda de nuevos fármacos y tratamientos para hacer frente a enfermedades que han provocado un gran impacto en el devenir de la humanidad. En este sentido, la Química Médica ha jugado un papel crucial en la búsqueda y el desarrollo de nuevos fármacos que han permitido combatir muy eficazmente, e incluso erradicar, muchas enfermedades, entre las que cabe incluir a las ocasionadas por infecciones bacterianas y víricas.¹

1.1. Química Médica

El término Química Médica fue acuñado por primera vez en 1948 al renombrarse la División de la Química de los Productos Medicinales de la *American Chemical Society* (ACS),² la cual pasó a llamarse División de Química Médica (MEDI). Más tarde, ya en 1973, la IUPAC le otorgó una descripción concreta, definiéndola como el “descubrimiento, desarrollo, identificación e interpretación del modo de acción de compuestos biológicamente activos a nivel molecular”.³ Cabe recalcar la diferencia con la farmacología, ya que esta última no contempla tanto el diseño y la síntesis de los compuestos, sino que se centra más bien en su acción biológica.

El concepto fármaco, en sentido estricto, hace referencia a cualquier sustancia química que se pueda utilizar tanto en el tratamiento como en la

¹ Piret, J.; Boivin, G. Pandemics Throughout History. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 631736. DOI: 10.3389/fmicb.2020.631736.

² Woster, P.M. Foreword: American Chemical Society Division of Medicinal Chemistry. Celebrating 100 Years of Excellence. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7333-7338. DOI:10.1021/jm901089d.

³ IUPAC, *Information Bulletin, Tech. Rep.* **1974**, *13*.

prevención y diagnóstico de una enfermedad.⁴ Aunque los términos fármaco y medicamento a veces se emplean como si fueran sinónimos, existen sutiles diferencias entre ambos. Así, un medicamento puede contener varios fármacos o principios activos en su composición, a la que, usualmente, se le añaden otros productos, denominados excipientes, con el objetivo de administrar más cómodamente el fármaco. Para que un compuesto, bien sea de origen natural o sintético, pueda tratarse como fármaco y, por ende, comercializarse como medicamento debe superar un proceso que consta de 4 fases principales⁵ (véase la Figura 1.1).

FASES DE DESARROLLO DE UN MEDICAMENTO

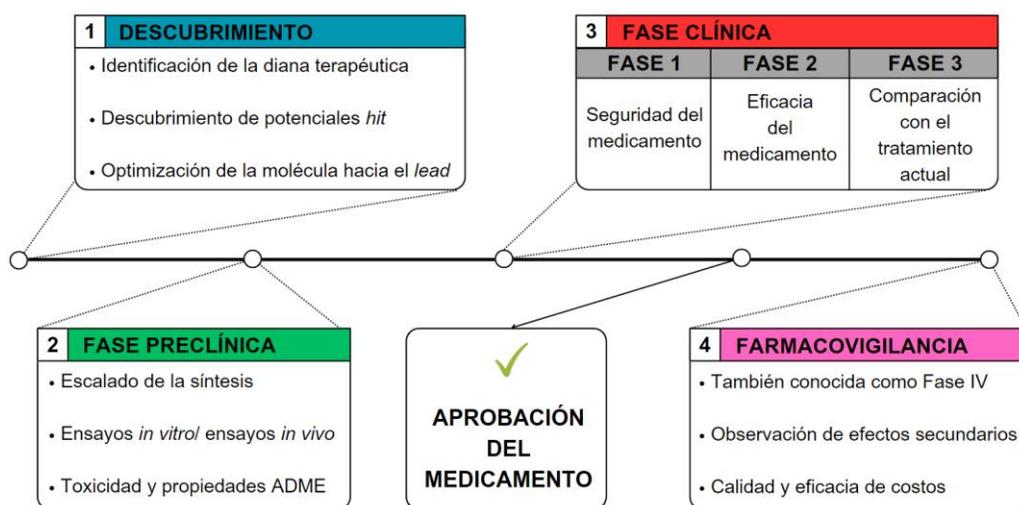


Figura 1.1. Fases de desarrollo de un medicamento.⁶

En la primera etapa se procede a la identificación de la diana terapéutica que se encuentre relacionada con la enfermedad que se quiere tratar. Ésta suele ser una proteína, pero también puede ser otro tipo de biomolécula como un lípido, un ácido nucleico, una hormona, etc. Posteriormente, se procede al diseño de un conjunto de compuestos que tengan potencial actividad frente a

⁴ Flórez Beledo, J.; Armijo Simón, Mediavilla Martínez, A. Farmacología Humana, 6ª ed. Elsevier. **2013**. ISBN-10.8445823167.

⁵ Rang, H.P.; Dale, M.M. Farmacología, 9ª ed. Elsevier. **2020**. ISBN-10.8491135588.

⁶ Figura creada por el autor de esta Tesis Doctoral.

la diana escogida. En la actualidad este paso se encuentra altamente favorecido por el avance de la tecnología. Gracias a estudios computacionales, como el *docking*,⁷ se puede simular la diana de interés y estimar cuáles podrían ser las moléculas capaces de interactuar con la diana biológica. A partir de los datos obtenidos en los estudios de *docking*, se pueden diseñar y sintetizar baterías de moléculas (*hits*) en las que se introducen pequeños cambios estructurales, que son refinados mediante las herramientas computacionales. Así, los estudios cuantitativos de relación estructura-actividad (QSAR)⁸ permiten mejorar las estructuras objetivo y seguir adelante con aquellas que han mostrado mejores resultados (*lead*).

En la segunda fase, todavía preclínica, se diseñan y se optimizan los procesos de síntesis del fármaco y se realizan ensayos biológicos *in vitro* con el fin de obtener resultados toxicológicos y de eficacia del fármaco. Si éstos son satisfactorios, se pasa a ensayar los fármacos en modelos animales mediante experimentos *in vivo*. Ya en este punto, además de valorar la toxicidad y efectividad del posible fármaco, se deben tener en cuenta otros factores, como pueden ser las propiedades farmacocinéticas.

A diferencia de la farmacodinamia, en la que se estudia cómo actúan los fármacos en los seres vivos, en la farmacocinética se estudian los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) que experimenta el fármaco en el organismo.⁹

⁷ Silverman, R.B.; Holladay, M.W. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 3ª ed. Elsevier. **2015**. ISBN:9780123820303.

⁸ Saldívar-González, F.; Prieto-Martínez, F.D.; Medina-Franco, J.L. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educ. Quim.* **2017**, *28*, 51-58. DOI:10.1016/j.eq.2016.06.002.

⁹ DiPiro, J.T.; *DiPiro's Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 12a ed. McGraw Hill. **2023**. ISBN: 978-1-264-26454-4.

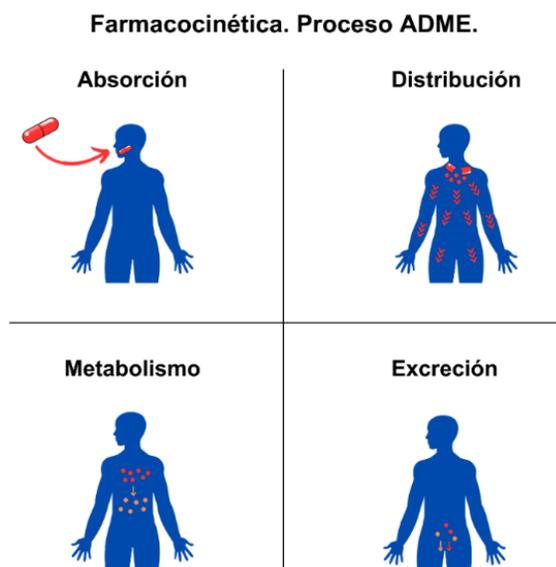


Figura 1.2. Proceso ADME.⁶

Como se puede ver en la Figura 1.2, el proceso ADME consta de cuatro etapas fundamentales: absorción, que es el proceso que sufre el fármaco antes de entrar en la circulación sistémica; distribución, proceso mediante el cual el fármaco se dispersa a través de los tejidos y fluidos del organismo; metabolismo, en el que el fármaco experimenta cambios en su estructura química debida a la acción de órganos o tejidos, principalmente el hígado, los riñones, la piel o el tracto digestivo; y excreción, proceso mediante el cual el fármaco y sus metabolitos son eliminados del organismo.¹⁰

Si el potencial fármaco supera los ensayos preclínicos entrará en la fase clínica, en la que ya se realizan ensayos con humanos. Esta etapa, a su vez, se divide en tres: fase I, fase II y fase III. De manera muy general: en la fase I, en la que es optimizado el sistema de administración, prima la seguridad del fármaco en su acción sobre el paciente; en la fase II se analiza el grado de eficacia del fármaco en el ser humano; y por último en la fase III se

¹⁰ Alqahtani, S. *In silico* ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert Opin, Drug Metab. Toxicol.* **2017**, 13, 1147-1158. DOI: 10.1080/17425255.2017.1389897.

comparan los resultados obtenidos con el fármaco estudiado con los que ofrecen otros fármacos ya comercializados.

Finalmente, una vez reunidos todos los resultados obtenidos a lo largo de todas las fases, el nuevo medicamento es aprobado, o rechazado, por las autoridades sanitarias. Sin embargo, el proceso no termina en este punto, pues existe una etapa final, denominada fase IV, o de farmacovigilancia, en la que, entre otros factores, se controlan los posibles efectos secundarios no conocidos hasta el momento.¹¹

Se puede concluir pues que la Química Médica tiene una importancia capital en las dos primeras fases del desarrollo de un nuevo fármaco.¹²

1.2. Fármacos quimioterapéuticos

Contrariamente a la concepción actual del término, un fármaco quimioterapéutico no hace referencia únicamente a los tratamientos frente al cáncer, sino que se refiere a cualquier sustancia que es tóxica de manera selectiva para microorganismos invasores y que presenta idealmente mínimos o nulos efectos para el huésped. En este sentido, se puede considerar a las células tumorales como “invasores” internos.⁵

El primer fármaco quimioterapéutico data de 1904, cuando el científico Paul Ehrlich sintetizó el salvarsán (véase la Figura 1.3).¹³ Ehrlich y su estudiante postdoctoral Shiga habían centrado su investigación en los tripanosomas de origen africano, que son los parásitos causantes de la tripanosomiasis africana humana, también llamada enfermedad del sueño. En sus estudios, Ehrlich se percató del potencial biológico que tenía el atoxilo, un derivado de arsénico que se había utilizado hasta el momento como tratamiento para la enfermedad del sueño en África, pero que producía ceguera como grave

¹¹ Sedgwick, P. Phases of clinical trials. *Brit. Med. J.* **2011**, 343. DOI:10.1136/bmj.d6068.

¹² Sriram, D.; Yogeewari, P. *Medicinal Chemistry*, 2^a ed. Pearson. **2010**. ISBN-10. 9788131731444.

¹³ Sepkowitz, K.A. One hundred years of Salvarsan. *N. Engl. J. Med.* **2011**, 365, 291-293. DOI: 10.1056/NEJMp1105345.

efecto secundario. A pesar de ello, Ehrlich pensaba que la introducción de pequeñas modificaciones estructurales en el atoxilo lograría mejorar su seguridad y eliminar sus efectos secundarios.

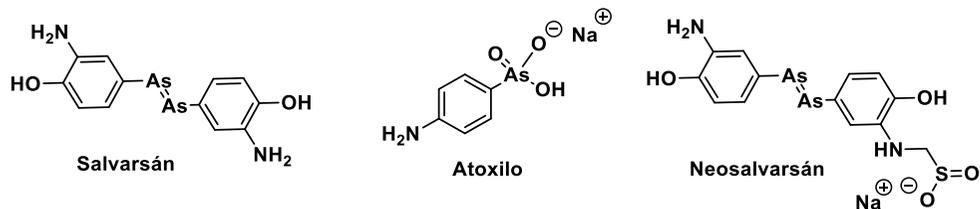


Figura 1.3. Estructuras del salvarsán, atoxilo y neosalvarsán.

Un año más tarde, Uhlenhuth y Salmon revelaron que el atoxilo no sólo se mostraba activo frente a los tripanosomas, sino que también era efectivo contra las espiroquetas aviarias. Ehrlich llegó a sintetizar más de 600 compuestos derivados del atoxilo, con el fin de encontrar alguno que resultara ser óptimo para el tratamiento, tanto de la tripanosomiasis como de la infección por las espiroquetas aviarias. El salvarsán, que él denominó “compuesto 606”, mostró excelentes resultados frente a ambas infecciones, además de presentar gran actividad frente a la infección por *Treponema pallidum*, causante de la sífilis. Ya en 1912, y después de que el salvarsán fuese ampliamente utilizado, se empezaron a reportar mayores efectos secundarios de los conocidos, así que se prepararon más de 300 nuevos derivados con el fin de reducir su toxicidad y mejorar su solubilidad en agua. Finalmente, el compuesto número 914 resultó ser el más activo y seguro, y pasó a comercializarse como neosalvarsán (véase la estructura en la Figura 1.3). Actualmente, ambos compuestos se encuentran en desuso ya que existen tratamientos mucho menos tóxicos.

1.2.1. Antibióticos

Las bacterias son organismos procariotas que, a diferencia de los eucariotas, no presentan una membrana nuclear que separa el material genético de los orgánulos del citoplasma. En la actualidad, las bacterias siguen constituyendo el organismo responsable de la mayor parte de infecciones que sufre el ser humano.

Una forma de clasificar los diferentes tipos de bacterias es en función de su forma, que pueden ser de tipo esférico (cocos), en forma de barra (bacilos), en curva (vibrios), helicoidal (espirilos) o filamentosas. Otra forma de ordenar a estos organismos se basa en el color que se obtiene cuando son teñidas con la denominada tinción de Gram:

- Las bacterias Gram-positivas, son las que dan una coloración morada.
- Las bacterias Gram-negativas, son las que dan una coloración rojiza.

En la Figura 1.4 se muestran las estructuras generales de las bacterias, con un nucleoide o región donde se encuentra el ADN circular, y el citoplasma en el que se ubican plásmidos, ribosomas, vacuolas, etc. La envoltura de las bacterias Gram-positivas consta de una membrana plasmática y una pared celular, dejando entre sí un espacio conocido como espacio periplásmico. En las Gram-negativas, además de las barreras anteriores existe una segunda membrana lipídica que recubre la pared celular, generando así dos espacios periplásmicos.¹⁴

¹⁴ Rao, A.S. Introduction to Microbiology, 1ª ed. PHI Learning. 2004. ISBN: 8120312171, 9788120312173.

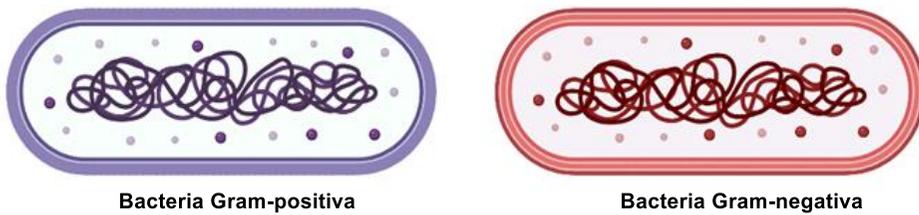


Figura 1.4. Estructura de una bacteria Gram-positiva y de una Gram-negativa.¹⁵

Algunas de las bacterias con mayor incidencia en la salud humana son la *Escherichia coli* (*E. coli*) y la *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (véase la Figura 1.5).¹⁶

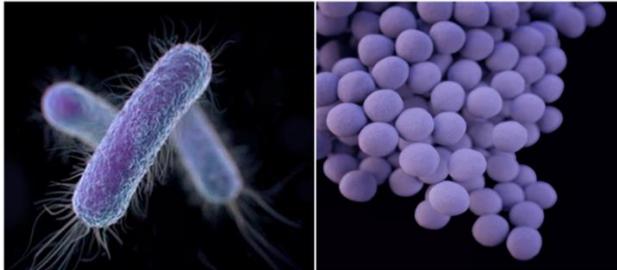


Figura 1.5. Imágenes de *E. coli* y de *S. aureus*.¹⁷

E. coli es una bacteria Gram-negativa que reside habitualmente en la flora intestinal del ser humano sin causar ninguna enfermedad pero que, sin embargo, puede causarla en pacientes inmunodeprimidos o cuando se producen alteraciones en las barreras gastrointestinales.¹⁸ A pesar de que existen cientos de cepas conocidas de *E. coli*, no todas son igual de

¹⁵ Figura creada por el autor de esta Tesis Doctoral empleando BioRender.

¹⁶ Frickmann, H.; Hahn, A.; Berlec, S.; Ulrich, J.; Jansson, M.; Schwarz, N.G. On the etiological relevance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in superficial and deep infections -a hypothesis-forming, retrospective assessment. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **2019**, *9*, 124-130. DOI: [org/10.1556/1886.2019.00021](https://doi.org/10.1556/1886.2019.00021).

¹⁷ <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/16638-e-coli-infection>;
<https://outbreaknewstoday.com/staphylococcus-aureus-uncontrolled-diabetes-appear-to-be-the-perfect-environment-to-thrive-13042/> (consultadas el 3 de mayo de 2023).

¹⁸ Jang, J.; Hur, H.G.; Sadowsky, M.J.; Byappanahalli, M.N.; Yan, T.; Ishii, S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *123*, 570-581. DOI: 10.1111/jam.13468.

virulentas, pudiendo algunas de ellas desarrollar enfermedades que van desde una gastroenteritis leve hasta un fallo renal.¹⁹

Por su parte, *S. aureus* es una bacteria Gram-positiva que se caracteriza por ser una de las más oportunistas a la hora de causar una infección en el ser humano, teniendo un elevado porcentaje de morbilidad y mortalidad en el mundo.²⁰ La bacteria puede colonizar algunos individuos sin llegar a desarrollar una enfermedad, pero en cuanto el organismo se vuelve vulnerable, la bacteria se desarrolla rápidamente causando enfermedades de diversos niveles de gravedad, que van desde una infección cutánea a una neumonía.²¹

El origen de los antibióticos data de 1928 con el descubrimiento de la penicilina. El doctor Alexander Fleming detectó que en una placa de estafilococos se había producido una contaminación por un hongo del género *Penicillium* y, como consecuencia, alrededor del hongo se había detenido el crecimiento bacteriano. Al notar este efecto consiguió aislar el hongo y llegó a la conclusión de que éste generaba una sustancia con actividad antibacteriana, a la que denominó penicilina. Este descubrimiento se considera uno de los más importantes de la historia de la medicina, pues es indiscutible la importancia que han adquirido los antibióticos en la sociedad actual.²²

Casi en paralelo al descubrimiento de la penicilina por A. Fleming, a principios de la década de 1930 un equipo de investigadores de los laboratorios Bayer en Alemania, dirigido por G. Domagk, estaba estudiando las propiedades antibacterianas de colorantes sintéticos. Uno de ellos, de

¹⁹ Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 123-140. DOI: 10.1038/nrmicro818.

²⁰ Lowy, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 520-532. DOI: 10.1056/NEJM199808203390806.

²¹ Howden, B.P.; Giulieri, S.G.; Lung, T.W.F.; Baines, S.L.; Sharkey, L.K.; Lee, J.Y.H. et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaption. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, *21*, 380-395. DOI: 10.1038/s41579-023-00852.

²² Gaynes, R. The Discovery of Penicillin-New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 849-853. DOI: 10.3201/eid2305.161556.

color rojo intenso denominado prontosil, protegía a los ratones de laboratorio contra el ataque de estreptococos. En 1935, Domagk suministro prontosil a su hija, gravemente enferma por una infección estreptocócica, y ésta se curó. Otras curaciones debidas a la administración de prontosil generalizaron el uso de este compuesto para el tratamiento de infecciones bacterianas.²³ El prontosil era inactivo *in vitro* y solo exhibía su acción antibacteriana *in vivo*. Pronto se descubrió que el fármaco se metabolizaba en el hígado para originar la 4-aminobencenosulfonamida (sulfanilamida), que es el verdadero agente antibacteriano (véase la Figura 1.6).

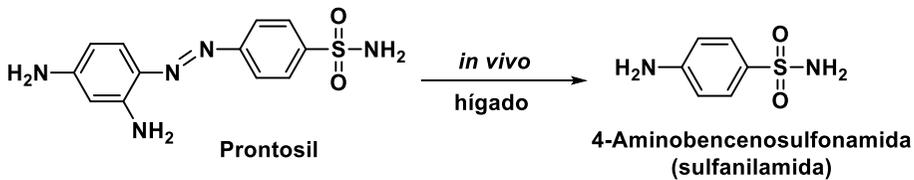


Figura 1.6. Conversión *in vivo* del prontosil.

El descubrimiento del prontosil le valió a Domagk el Premio Nobel de Medicina en 1939, que recibió después de la II Guerra Mundial en 1947.

Desde entonces se han estado desarrollando multitud de antibióticos que se pueden clasificar en dos grupos: los bactericidas, que son aquellos que producen la muerte de la bacteria responsable de la infección, y los bacteriostáticos, que se limitan a detener el crecimiento bacteriano para que sean las defensas del organismo las encargadas de eliminar al invasor. Dentro de estos dos grupos existen diferentes clases de fármacos con efecto antibacteriano que se agrupan en función de su unidad estructural principal y su mecanismo de acción (véase la Tabla 1.1).²⁴

²³ Iyer, H.V. History revisited-Prontosil red. *J. Emerg. Med.* **2008**, 35, 209-210. DOI: 10.1016/j.jemermed.2007.07.064.

²⁴ Lancini, G.; Lorenzetti, R. *Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites*, 1^a ed. Springer US, **2013**. ISBN: 1475795246.

Tabla 1.1. Clasificación de las principales clases de antibióticos en función de su mecanismo de acción.

| MECANISMO | TIPO | |
|-----------|--|---|
| | BACTERICIDAS | BACTERIOSTÁTICOS |
| 1 | - | - Sulfamidas - Trimetoprim |
| 2 | - β-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenems) - Fosfomicina - Vancomicina - Nitrofurantoínas | - |
| 3 | - Polimixina | - |
| 4 | - Aminoglicósidos | - Macrólidos - Lincosamidas - Tetraciclinas - Oxazolidinonas - Anfencoles |
| 5 | - Fluoroquinolonas - Rifamicinas | - |

- | | |
|--|---|
| <p>1. Inhibición del metabolismo celular (antimetabolitos)</p> <p>2. Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana</p> <p>3. Interacción con la membrana plasmática</p> | <p>4. Disrupción de la síntesis de proteínas</p> <p>5. Inhibición de la transcripción y replicación del ácido nucleico bacteriano</p> |
|--|---|

En la Figura 1.7 se muestran las estructuras de algunos de los antibióticos más representativos:

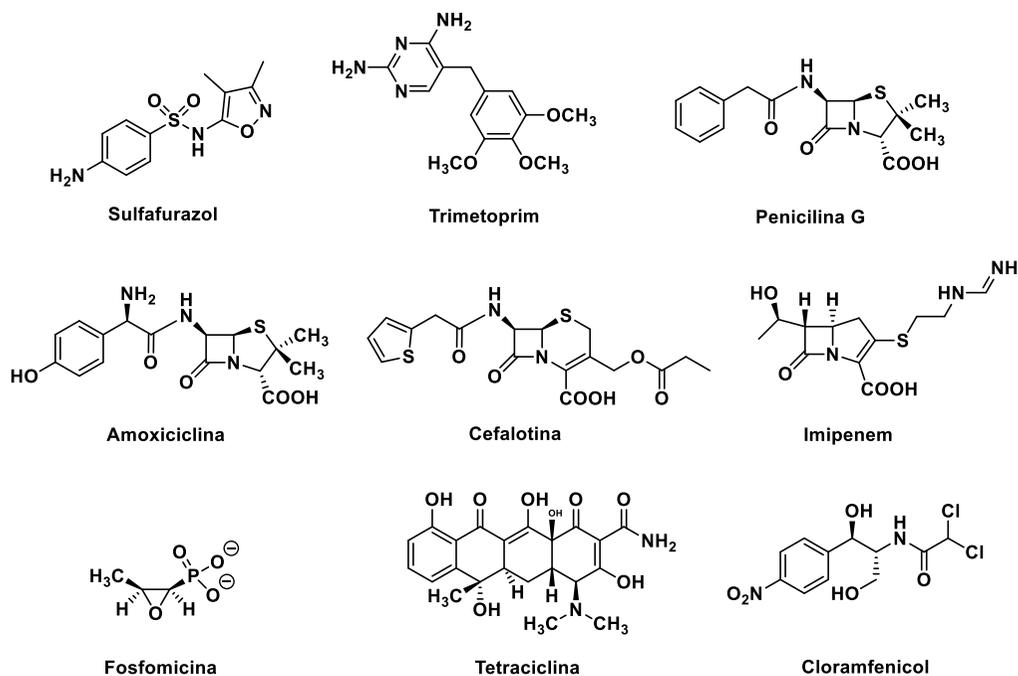


Figura 1.7. Estructuras de algunos de los antibióticos más usuales.

Uno de los principales problemas que surgieron, y que en este momento sigue vigente, es la adquisición de resistencia a los antibióticos. Un medicamento empleado para evitar la resistencia bacteriana a las penicilinas es el que combina la amoxiciclina con el ácido clavulánico. El ácido clavulánico, que al igual que la amoxiciclina contiene un anillo β -lactámico, no tiene actividad antimicrobiana. Sin embargo, su misión es la de actuar como inhibidor de las β -lactamasas bacterianas que son, en gran medida, responsables de la resistencia a las penicilinas.

Actualmente están surgiendo algunas cepas de bacterias que presentan multitud de resistencias a diversos tipos de fármacos, convirtiéndose en súper-resistentes.²⁵ Es por esto por lo que la búsqueda de nuevos tipos de

²⁵ Munita, J.M.; Arias, C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

fármacos capaces de mostrar actividad frente a estas nuevas cepas es de vital importancia en el combate contra estas nuevas bacterias.²⁶

1.2.2. Antivirales

Etimológicamente, la palabra virus proviene del latín *virus* que significa toxina o veneno. Los virus son agentes infecciosos de tamaño microscópico compuestos por fragmentos de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que, una vez infectado el huésped, aprovechan su sistema biológico para realizar múltiples copias de sí mismos y expandirse por el organismo infectado. Estructuralmente, tal y como se muestra en la Figura 1.8, constan de una cadena de ácido nucleico en el centro de la partícula vírica, rodeada de un conjunto de proteínas, denominadas cápside, que protegen el material genético de la acción de enzimas u otros factores que pueden deteriorarlo. A su vez, todo ello se encuentra recubierto de una capa lipoproteica.²⁷

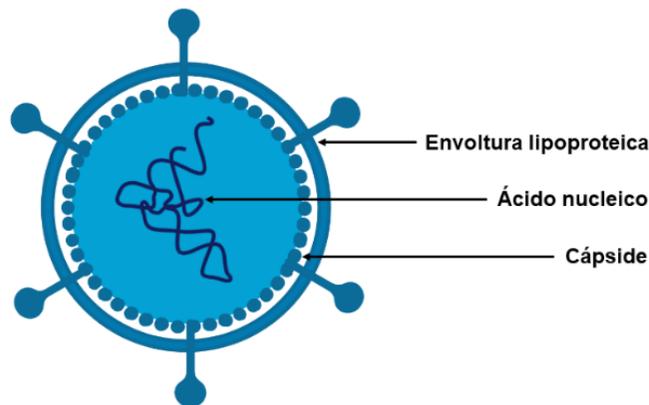


Figura 1.8. Estructura general de un virus.¹⁵

²⁶ Devasahayam, G.; Scheld, W.M.; Hoffman, P.S. Newer antibacterial drugs for a new century. *Expert. Opin. Investig. Drugs*. **2010**, *19*, 215-34. DOI: 10.1517/13543780903505092.

²⁷ Shors, T. *Virus. Estudio molecular con orientación clínica*, 1ª ed. Panamericana. **2009**. ISBN: 9500618796.

Los virus se pueden clasificar en función del ácido nucleico que contienen en:

- Virus de ARN de cadena sencilla o ssRNA (*single stranded RNA*).
- Virus de ARN de cadena doble o dsRNA (*double stranded RNA*).
- Virus de ADN de cadena sencilla o ssDNA (*single stranded DNA*).
- Virus de ADN de cadena doble o dsDNA (*double stranded DNA*).

La gran diferencia entre los virus de ADN y los de ARN es su lugar de replicación. Mientras que los de ADN se replican en el núcleo de la célula infectada, los de ARN lo hacen en el citoplasma. Por otro lado, dentro de los virus tipo ssRNA se pueden diferenciar los monocatenarios positivos y los negativos. A diferencia de los positivos, los negativos son aquellos en los que el ARN viral no puede actuar como ARN mensajero y traducirse directamente en proteínas, sino que previamente se debe convertir en positivo mediante una ARN polimerasa o transcriptasa.²⁸ Algunas de las enfermedades más conocidas provocadas por una infección vírica son el resfriado común (ssRNA+), la gripe (ssRNA-), la gastroenteritis (dsRNA) o la varicela o herpes zóster (dsDNA). Los menos conocidos hasta la fecha son los virus tipo ssDNA, entre los que destacan los virus *Circoviridae* y los *Parvoviridae*.

Especial relevancia ha cobrado en los últimos años el virus SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome*), causante de la pandemia por COVID-19. Perteneciente a la familia ssRNA+, el SARS-CoV-2 ha infectado a más de 600 millones de personas en el mundo a marzo de 2023²⁹ y su aparición paralizó la actividad mundial, obligando a establecer medidas de confinamiento para frenar su expansión (véase la estructura del SARS-CoV2 en la Figura 1.9).

²⁸ Prats, G. Microbiología Clínica, 1ª ed. Panamericana. 2006. ISBN: 9788479039714.

²⁹ Li, S.; Liu, X.; Liu, G.; Liu, C. Biomimetic Nanotechnology for SARS-CoV-2 Treatment. *Viruses* 2023, 15, 596. DOI: 10.3390/v15030596.

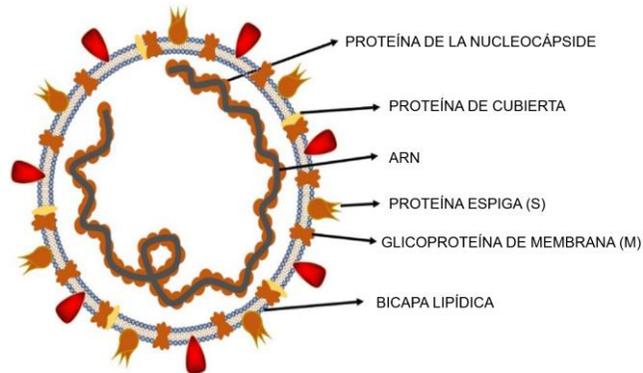


Figura 1.9. Estructura del SARS-CoV-2.³⁰

Como consecuencia de la pandemia provocada por el SARS-CoV-2, se desató una carrera contrarreloj para poder hallar un tratamiento efectivo en el menor tiempo posible. Uno de los primeros fármacos que surgió fue el remdesivir, que fue originalmente diseñado para combatir el virus del ébola. A pesar de que se obtuvieron resultados clínicos favorables en el 68% de los pacientes a los que les fue administrado el remdesivir,³¹ no fue hasta la aparición de las vacunas cuando se pudo avanzar en la lucha contra el virus.

Las vacunas son utilizadas para prevenir las infecciones causadas por un organismo invasor. En el caso de los virus, consisten, tradicionalmente, en virus vivos atenuados, virus muertos o proteínas virales (antígenos) y su misión es la de provocar la inmunidad humoral y celular mediada por los linfocitos B y T, respectivamente. Las vacunas ARN, que surgieron para el tratamiento del virus SARS-CoV-2, fueron desarrolladas por la empresa farmacéutica americana Pfizer y la empresa de biotecnología alemana BioNTech. Estas vacunas han supuesto una revolución pues su manera de producir inmunidad en el organismo es a través de ARN mensajero.³² De

³⁰ Shereen, M.A.; Khan, S.; Kazmi, A.; Bashir, N.; Siddique, R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J. Adv. Res.* **2020**, *24*, 91-98. DOI: 10.1016/j.jare.2020.03.005.

³¹ Grein, J.; Ohmagari, N.; Shin, D.; Diaz, G.; Asperges, E.; Castagna, A. et al. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 2327-2336. DOI: 10.1056/NEJMoa2007016.

³² Verbeke, R.; Lentacker, I.; De Smedt, S.C.; Dewitte, H. The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *J. Control Release* **2021**, *10*, 511-520. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.03.043.

hecho, en este año 2023, el Premio Nobel de Medicina ha sido entregado a K. Karikó y D. Weismann por el descubrimiento de la modificación de nucleósidos gracias al cual se pudieron desarrollar vacunas basadas en ARN mensajero para el SARS-CoV-2.³³ Tras la administración intramuscular, el ARN mensajero llega a las células y se traduce en la proteína S del virus. Las células del sistema inmunitario reconocen a esta proteína cuando es expuesta en la cara exterior de la membrana celular, lo que desencadena el proceso de inmunidad (véase la Figura 1.10).³⁴

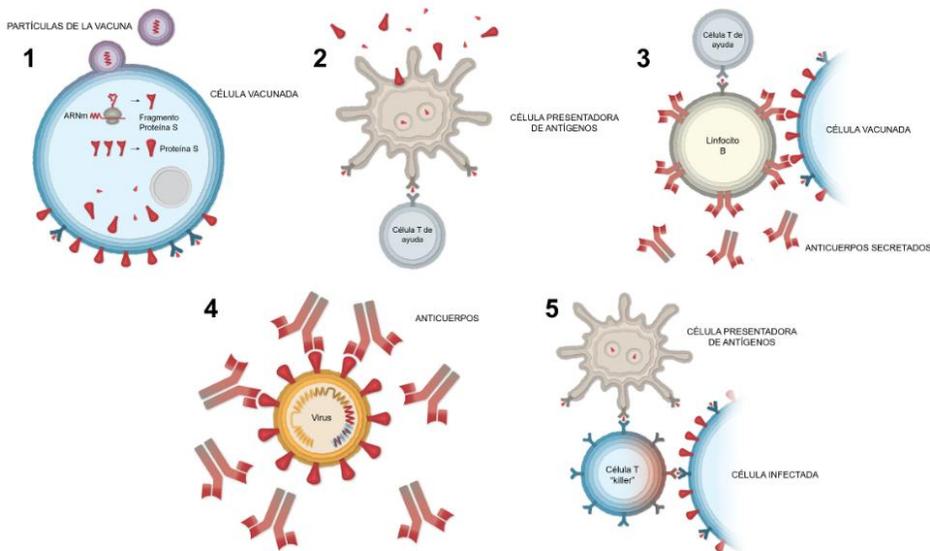


Figura 1.10. Inmunización del SARS-CoV-2 con las vacunas ARN.^{30,32}

En el grupo de virus ssRNA se encuentran los que contienen un fragmento de ARN monocatenario retrotranscrito. Esta clase de virus se replican en la célula hospedadora mediante la retrotranscripción del ARN viral en ADN viral con la ayuda de una transcriptasa inversa. Una vez transformado en ADN, éste se integra en el genoma huésped por acción de las integrasas y, a partir de ahí, genera copias de sí mismo. Es el caso del virus de la

³³ Véase <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2023/press-release/> (consultada el 10 de octubre de 2023).

³⁴ <https://www.nytimes.com/interactive/2020/health/pfizer-biontech-covid-19-vaccine.html> (consultada el 26 de abril del 2023).

inmunodeficiencia humana (VIH), descubierto por Luc Montaigner en 1983. Este virus es el responsable de la enfermedad del SIDA (Síndrome de la Inmunodeficiencia Humana), la cual produce un deterioro físico sostenido en el tiempo como consecuencia de un debilitamiento del sistema inmunitario.³⁵

En la actualidad se conocen dos tipos de VIH: el VIH-1, que es el virus originalmente descubierto y que presenta mayor virulencia y capacidad infecciosa, y el VIH-2, que se encuentra, de manera casi exclusiva, confinado en países de África occidental. La estructura y el ciclo de vida del virus se muestran en la Figura 1.11.

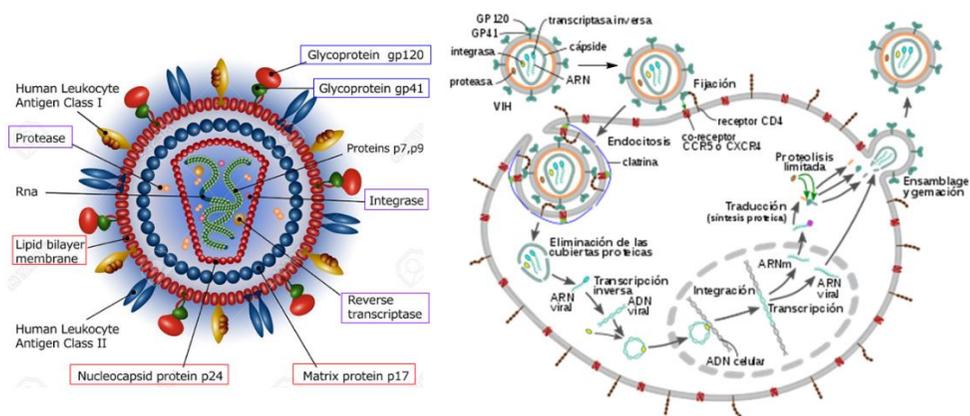


Figura 1.11. Estructura y ciclo de vida del VIH.³⁶

El virus se fija mediante la unión de las proteínas gp41-gp120 del VIH a los receptores CD4+ de los linfocitos T. Después, el virus entra en la célula hospedadora mediante endocitosis. Una vez dentro de la célula, se libera el ARN viral y, junto con las enzimas virales, se produce en el citoplasma la transcripción inversa. El ADN viral se acopla con las integrasas para poder insertarse en el genoma de la célula. En este punto es posible que el virus entre en latencia por un periodo indeterminado, o que la célula infectada

³⁵ Gallo, R.C.; Montaigner, L. The Discovery of HIV as the Cause of AIDS. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2283-2285. DOI: 10.1056/NEJMp038194.

³⁶<https://www.istockphoto.com/es/vector/diagrama-de-estructura-de-part%C3%ADculas-de-virus-vih-gm940226006-257041169> (consultada el 28 de abril del 2023).

emplee la polimerasa para generar ARN viral y ARNm viral que, a su vez, se traducen en las proteínas necesarias para el ensamblaje de una nueva partícula vírica. Los nuevos viriones salen al exterior de la célula por gemación, es decir, adquiriendo parte de la membrana lipoproteica, en la cual se encuentran las glicoproteínas gp41 y gp120, necesarias para infectar una nueva célula huésped.³⁷

En el tratamiento del SIDA se utilizan combinaciones de fármacos, conocidas como TARGA (Terapia Antirretroviral de Gran Actividad), que contienen un inhibidor de la transcriptasa reversa análogo de nucleósido (ITRN), como puede ser el AZT, un inhibidor de la transcriptasa reversa no análogo de nucleósido (ITRNN), como la nevirapina, y un inhibidor de proteasa (IP), como el indinavir.³⁸

Por lo que respecta a los fármacos que se emplean contra infecciones de virus no retrovirales, se distinguen tres grandes grupos:

- Inhibidores de la ADN polimerasa vírica, como el aciclovir.
- Inhibidores del desmantelamiento de la cubierta vírica y de la neuraminidasa, como el oseltamivir.
- Biofármacos e inmunomoduladores, como la ribavirina.

En la Figura 1.12 se representan las estructuras químicas de algunos fármacos antivirales.³⁹

³⁷ Hemelaar, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 182-192. DOI: 10.1016/j.molmed.2011.12.001.

³⁸ Murphy, E.L.; Collier, A.C.; Kalish, L.A.; Assmann, S.F.; Para, M.F.; Flanigan, T.P. et al. Highly Active Antiretroviral Therapy Decreases Mortality and Morbidity in Patients with Advanced HIV Disease. *Ann. Inter. Med.* **2001**, *135*, 17-26. DOI: 10.7326/0003-4819-135-1-200107030-00005.

³⁹ Kausar, S.; Khan, F.; Mujeeb, M.; Akram, M.; Riaz, M.; Rasool, G et al. A review: Mechanism of action of antiviral drugs. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2021**, *35*. DOI: 10.1177/20587384211002621.

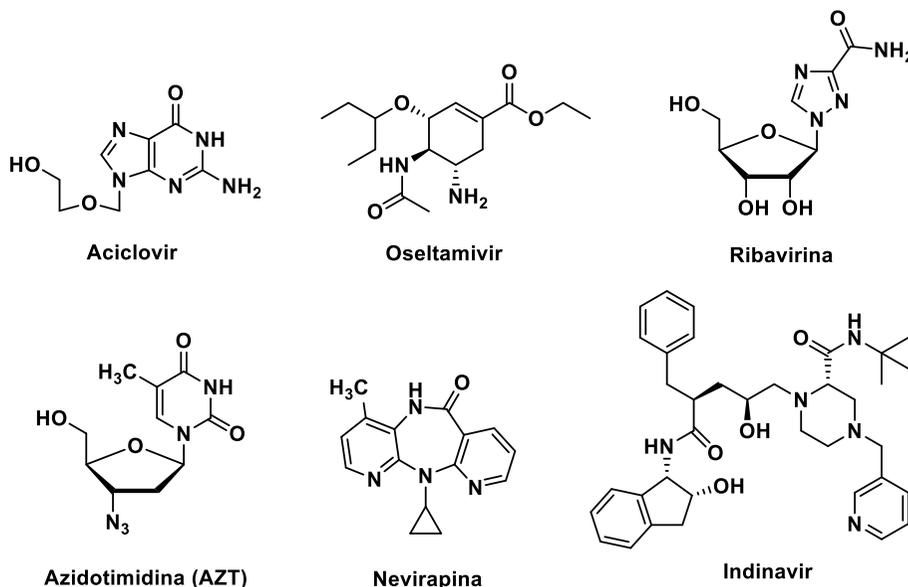


Figura 1.12. Estructura química de algunos antivirales.

1.2.3. Antimicóticos

Los hongos, del latín *fungus*, son organismos eucariotas no móviles pertenecientes al reino Fungi que juegan un papel fundamental en la preservación de la biosfera, pues muchos de ellos se encargan de descomponer la materia orgánica.⁴⁰ Además, pueden producir sustancias de interés en la medicina, como se ha comentado anteriormente en el caso de la penicilina. Se caracterizan por no poder sintetizar sus propios nutrientes al no tener clorofila y, como consecuencia, se ven obligados a vivir como parásitos de las plantas o de los animales.

A pesar de que algunos de ellos conviven con el organismo humano, se estima que alrededor de unas 50 especies, de las miles existentes, son capaces de desarrollar en el ser humano una infección por hongos

⁴⁰ Morad, H.O.J.; Wild, A.M.; Wiehr, S.; Davies, G.; Maurer, A.; Pichler, B.J. et al. Pre-clinical Imaging of Invasive Candidiasis Using ImmunoPET/MR. *Front. Microbiol.* **2018**, 23. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01996.

(micosis).⁴¹ Para poder establecer una clasificación de los hongos patógenos se debe tener en cuenta la capacidad que tienen algunos por formar hifas, unas prolongaciones de carácter filamentosas que en algunas ocasiones se pueden unir para formar una malla filamentosas conocida como micelio. De esta manera, los hongos se pueden agrupar en cuatro grandes grupos:

- Levaduras, como *Cryptococcus neoformans*.
- Hongos levaduriformes que generan estructuras similares al micelio, como *Candida albicans*.
- Hongos con estructura tipo micelio, como *Asperigillus fumigatus*.
- Hongos que se adaptan al entorno, pudiendo crecer como levadura o como estructura filamentosas, como *Histoplasma capsulatum*.

Por lo general, las infecciones micóticas suelen ser *superficiales* y no revestir grandes complicaciones, pero el abuso de antibióticos, que destruyen las bacterias competidoras de los hongos, el incremento de los pacientes inmunodeprimidos como consecuencia de la expansión del SIDA, o el uso de inmunosupresores en pacientes oncológicos, han dado lugar a infecciones más severas. Estas micosis se consideran *infecciones oportunistas*, pues deben darse unas condiciones propicias en el huésped para que el hongo pueda desarrollar la infección. A excepción de éstas, que generalmente se agravan por ser sistémicas, las micosis *superficiales* se clasifican generalmente en dos grupos: las *dermatomicosis*, que infectan principalmente a la piel, los pelos y las uñas, y las *candidiasis*, que se producen en las mucosas oral y vaginal, así como en la piel.⁵

Uno de los géneros más comunes en las micosis es el *Candida*.⁴² A su vez, dentro del género destacan las especies *Candida albicans* (responsable de

⁴¹ Guarro, J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* **2012**, *30*, 33-39. DOI: 10.1016/j.eimc.2011.09.006.

⁴² Mukaremera, L.; Lee, K.K.; Mora-Montes, H.M.; Gow, N.A.R. *Candida albicans* Yeast, Pseudohyphal, and Hyphal Morphogenesis Differentially Affects Immune Recognition. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 629. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00629.

más del 70% de las infecciones fúngicas en todo el mundo),⁴³ *Candida krusei* y *Candida glabrata* (véase la Figura 1.13).

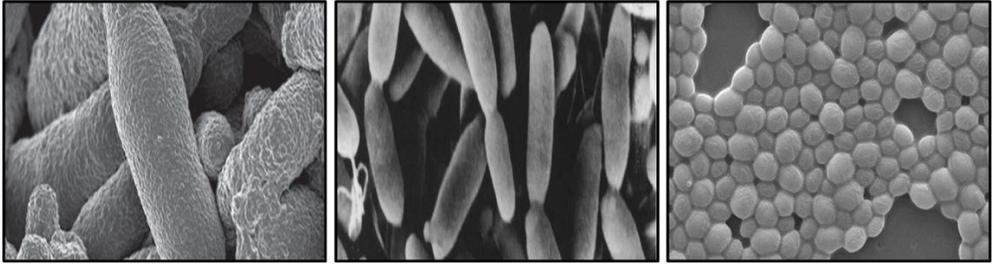


Figura 1.13. Imágenes de *Candida albicans*, *Candida krusei* y *Candida glabrata*.^{44,45,46}

En el tratamiento de las infecciones fúngicas se emplean tanto productos naturales, que son generalmente de tipo macromolecular, como sintéticos. Dentro del primer grupo se encuentran los polienos (como la anfotericina B) y las equinocandinas (como la capsosungina). En cuanto a los sintéticos, fundamentalmente se emplean aquellos que contienen un anillo central de tipo azol, bien sea de imidazol, como el clotrimazol,⁴⁷ o de triazol como el fluconazol,⁴⁸ como se indica en la Figura 1.14.

⁴³ Talapko, J.; Juzbašić, M.; Matijević, T.; Pustijanac, E.; Bekić, S.; Kotris, I. et al. *Candida Albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J. Fungi*, **2021**, *7*, 79. DOI: 10.3390/jof7020079.

⁴⁴ Staniszewska, M.; Bondaryk, M.; Swoboda-Kopec, E.; Siennicka, K.; Sygitowicz, G.; Kurzatkowski, W. *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Braz. J. Microbiol.* **2013**, *44*, 813-821. DOI: 10.1590/S1517-83822013005000056.

⁴⁵ Samaranayake, Y.H.; Samaranayake, L.P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J. Med. Microbiol.* **1994**, *41*, 295-310. DOI: 10.1099/00222615-41-5-295.

⁴⁶ Rodrigues, C.F.; Silva, S.; Henriques, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *33*, 673-688. DOI: 10.1007/s10096-013-2009-3.

⁴⁷ Crowley, P.D.; Gallagher, H.C. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*, 611-617. DOI: 10.1111/jam.12554.

⁴⁸ T. Pasko, M.T.; Piscitelli, S.C.; Van Slooten, A.D. Fluconazole: A New Triazole Antifungal Agent. *DICP*. **1990**, *24*, 860-867. DOI: 10.1177/106002809002400914.

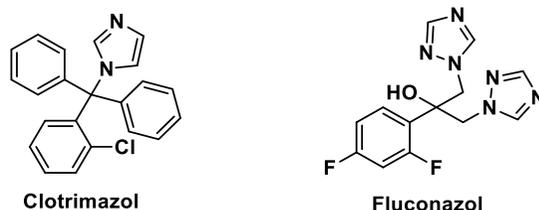


Figura 1.14. Estructuras del clotrimazol y del fluconazol.

1.2.4. Antineoplásicos

El cáncer se define como un complejo y numeroso grupo de enfermedades que tienen en común la proliferación descontrolada de células aberrantes que aprovechan el torrente sanguíneo y/o el sistema linfático como vías de diseminación para colonizar otros órganos o tejidos, en el proceso conocido como metástasis.⁴⁹

En la actualidad se diagnostican cada año en el mundo entre 19 y 20 millones de nuevos casos de cáncer, produciéndose alrededor de 10 millones de muertes anuales debidas a esta enfermedad.⁵⁰ El cáncer es, después de las enfermedades cardiovasculares, la segunda causa mundial de muertes.^{51,52}

La morbilidad de una enfermedad hace referencia al número de personas que enferman en un período de tiempo determinado y en una población específica.

⁴⁹ Chaffer, C.L.; Weinberg, R.A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* **2011**, *331*, 1559-1564. DOI: 10.1126/science.1203543.

⁵⁰ Chhikara, B.S.; Parang, K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chem Biol. Lett.* **2023**, *10* (1), 451.

⁵¹ Glovaci, D.; Fan, W.; Wong, N.D. Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Curr. Cardiol. Rep.* **2019**, *21*(4), 21. DOI: 10.1007/s11886-019-1107-y.

⁵² Ma, L.Y.; Chen, W.W.; Gao, R.L.; Liu, L.S.; Zhu, M.L.; Wang, Y.J. et al. China cardiovascular diseases report 2018: An updated summary. *J. Geriatr. Cardiol.* **2020**, *17* (1), 1-8. DOI: 10.11909/j.issn.1671-5411.2020.01.001.

La mortalidad, por otro lado, hace referencia al número de personas que mueren por una causa específica en un período de tiempo determinado y en una población específica.

De acuerdo con los datos publicados por GLOBOCAN 2020 (véase la Figura 1.15),⁵³ el cáncer de mama es el que provoca un mayor número de nuevos casos, con un 11.7% del total, seguido de cerca por el de pulmón y el de colon, con un 11.4% y un 10.0%, respectivamente. En cuanto a mortalidad, el de pulmón es claramente el mayor responsable de las muertes anuales registradas por cáncer, con un porcentaje del 18%. A continuación, le sigue el cáncer de colon (9.4%) y el de hígado (8.3%). Si se observan los datos separados por sexos, los cánceres más detectados en hombres son los de pulmón (14.3%), próstata (14.1%) y colon (10.6%), mientras que los de pulmón (21.5%), hígado (10.5%) y colon (9.3%) son los que tienen un porcentaje de mortalidad más elevado. En el caso de las mujeres, las neoplasias de mama, colon y pulmón son las tres con mayor morbilidad (24.5%, 9.4% y 8.4%) y mortalidad (15.5%, 9.5% y 13.7%).

⁵³ Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality WorldWide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.*, **2021**, *71*, 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

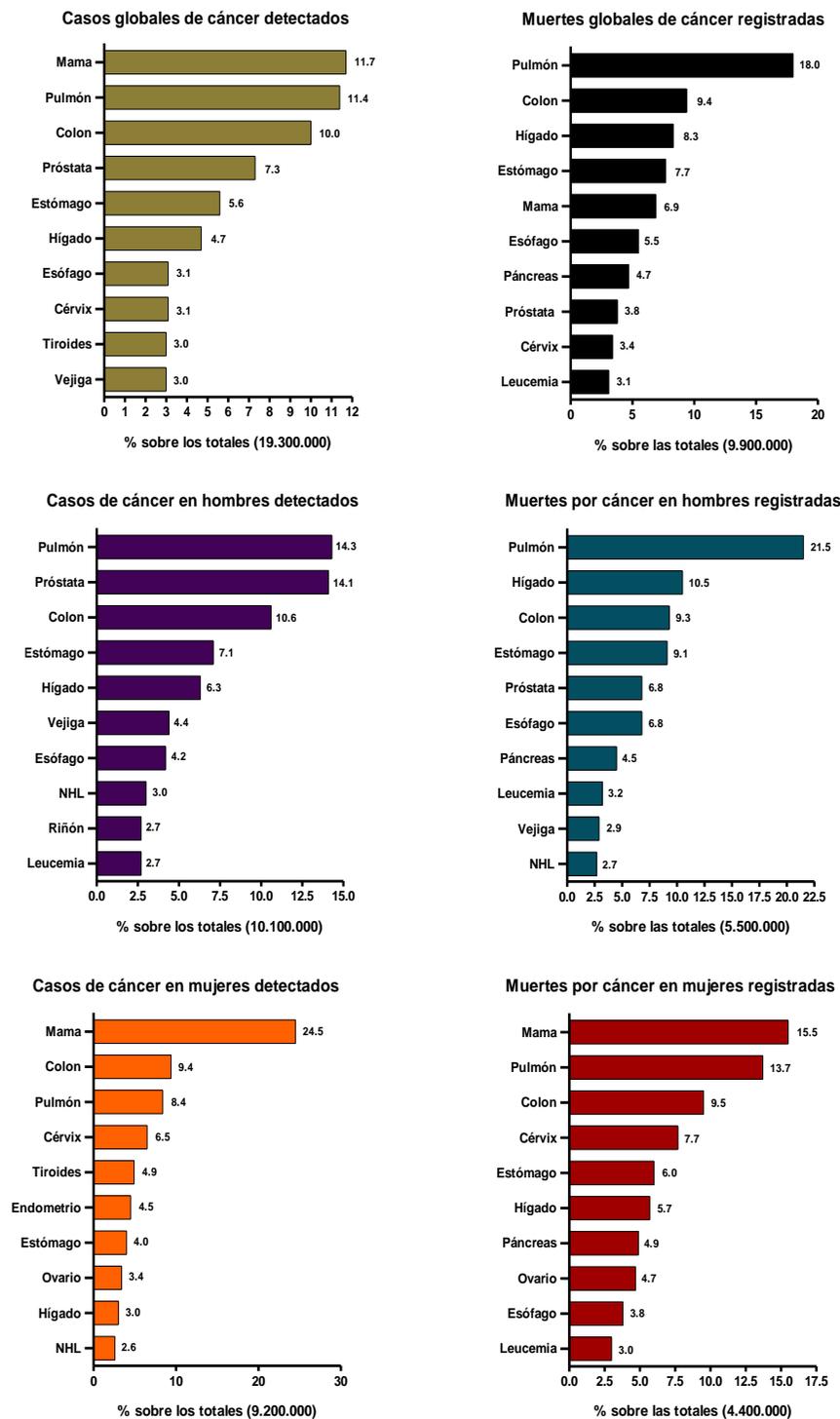


Figura 1.15. Morbilidad y mortalidad del cáncer en 2020.⁶

Sin embargo, no todas las neoplasias son igual de agresivas, ya que algunas de ellas presentan una mayor tasa de mortalidad relativa teniendo en cuenta los casos que se diagnostican. En la Figura 1.16 se muestra de manera conjunta la incidencia de los tipos de cáncer más detectados, juntamente con su mortalidad relativa. Destacan los cánceres de páncreas, hígado y pulmón como los que más mortalidad presentan, con un 92,2%, 83,6% y 78,6%, respectivamente.⁵²

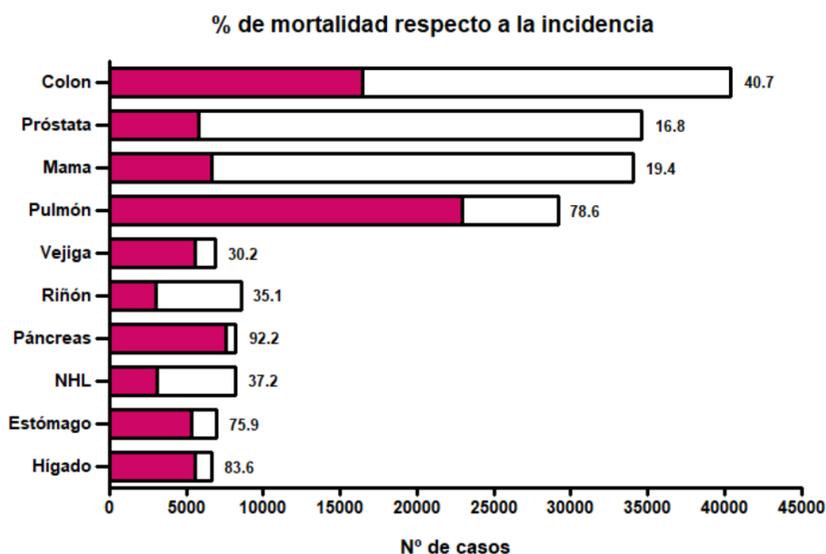


Figura 1.16. Incidencia y mortalidad relativa de los tipos de cáncer más comunes.⁶

En España se estima que, para 2040, se producirá un aumento en la incidencia y la mortalidad del cáncer. Para la primera se espera un incremento de más de un 30%, pasando de unos 260.000 casos detectados en 2020 a unos 341.000 en 2040. Por otro lado, la mortalidad se cree que puede aumentar más de un 40%, desde las 112.000 defunciones en 2020 a las 159.000 en 2040. En la Figura 1.17 se indican los nuevos casos de cáncer estimados para 2023 según el órgano principal afectado.⁵⁴

⁵⁴ Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2023. https://seom.org/images/Las_cifras_del_Cancer_en_Espana_2023.pdf (consultada el 8 de mayo de 2023).

ESTIMACIÓN DE NUEVOS CASOS DETECTADOS DE
CÁNCER EN ESPAÑA EN 2023
(279.260)*

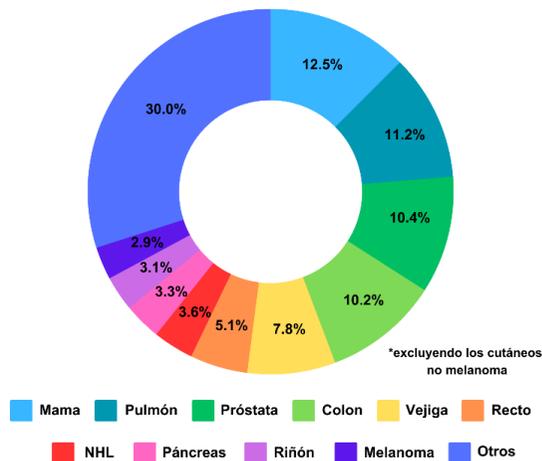


Figura 1.17. Estimación de nuevos casos de cáncer en España en 2023.⁶

El proceso de carcinogénesis tiene un origen genómico. Los agentes responsables de producir cáncer (cancerígenos) suelen afectar directamente al material genético de los individuos. La mayoría de procesos cancerosos se desencadenan como consecuencia de una acumulación de mutaciones en el ADN, que pueden variar desde un simple cambio de bases nitrogenadas en una secuencia genética hasta una gran modificación de los cromosomas, como ocurre en las translocaciones. Así, la acumulación de pequeñas o grandes alteraciones en el genoma, durante un periodo de tiempo prolongado, está en la base del proceso canceroso y explica la mayor incidencia del cáncer con el aumento de la edad.⁵⁵

Entre los factores de riesgo que pueden facilitar el proceso tumoral destacan la exposición constante o prolongada a radiaciones ionizantes, como la UV, o a sustancias químicas mutagénicas, los malos hábitos de salud, como dietas no saludables, ausencia de ejercicio físico, alcoholismo o tabaquismo, o infección recurrente por virus o bacterias que puedan interferir

⁵⁵ Pecorino, L. *Molecular Biology of Cancer. Mechanisms, Targets, and Therapeutic*, 5ª ed. Oxford University Press. 2021. ISBN: 9780198833024.

en el material genético.⁵⁶ Sin embargo, algunos individuos, bien sea por herencia genética o predisposición a alteraciones “naturales” del genoma, desarrollan de igual manera un tumor, aun habiendo evitado a lo largo de su vida los factores de riesgo arriba indicados.

Las alteraciones genéticas que favorecen el proceso carcinogénico son las que llevan a la generación de oncogenes y de genes supresores de tumores. Estas alteraciones intervienen en los procesos de crecimiento celular, descontrolándose éste por la acción de los oncogenes o por la inacción de los genes supresores de tumores.⁵⁷

Los tumores son masas de tejido sin ninguna función fisiológica. Los tumores benignos crecen de manera local y no se extienden a otros órganos o tejidos. Por el contrario, los tumores malignos son los que entran en metástasis, colonizando otros órganos o tejidos diferentes de aquellos en los que se originaron. Estos tumores, además, pueden reaparecer una vez se han eliminado del organismo. Dentro de los malignos, y dependiendo del órgano o el tejido invadido, se pueden diferenciar cinco grandes tipos:⁵⁸

- Carcinomas, que se originan en las células epiteliales que cubren la superficie de los órganos o tejidos. Es destacable mencionar el subgrupo de los adenocarcinomas, que se forman en aquellos órganos o tejidos que secretan líquido o moco, como puede ser la mama, el colon o el pulmón.
- Sarcomas, que se forman a partir del tejido conjuntivo del que derivan los huesos, cartílagos, músculos o tejido graso.

⁵⁶ Tran, K. B., Lang, J.J.; Compton, K.; Xu, R.; Acheson, A.R.; Henrikson, H.J.; et al. The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010-2019: a systemic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* **2022**, *400*, 563-591. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01438-6.

⁵⁷ Zhu, K.; Liu, Q.; Zhou, Y.; Tao, C.; Zhao, Z.; Sun, J. et al. Oncogenes and tumor suppressor genes: comparative genomics and networks perspectives. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 1-11. DOI: 10.1186/1471-2164-16-S7-S8.

⁵⁸ <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html> (consultada el 9 de mayo de 2023).

- Mielomas, que tienen su inicio en las células plasmáticas de la médula ósea.
- Leucemias, que tienen su origen en la médula ósea, por lo que se ven afectados los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas.
- Linfomas, que se inician en el sistema linfático.

Por otro lado, en función del grado de avance en el proceso de metástasis y del tamaño del tumor, se pueden diferenciar cinco estadios de la enfermedad (véase la Figura 1.18):⁵⁹

- Estadio 0. El cáncer se encuentra localizado en el órgano o tejido de origen y no se ha extendido a otros.
- Estadio I. No se ha producido un crecimiento penetrante en los tejidos adyacentes ni se ha metastatizado a ningún ganglio linfático ni otras partes.
- Estadio II y Estadio III. En este caso el tumor sí que ha profundizado en los tejidos adyacentes al lugar de origen y existe la posibilidad de una metástasis a los ganglios linfáticos.
- Estadio IV. Conocido también como cáncer metastásico. Es el grado más avanzado, en el cual el tumor se ha diseminado a otros órganos o tejidos del organismo.

⁵⁹ Bajaj, J.; Diaz, E.; Reya, T. Stem cells in cancer initiation and progression. *J. Cell. Biol.* **2020**, *219*, 1-12. DOI: 10.1083/jcb.201911053.

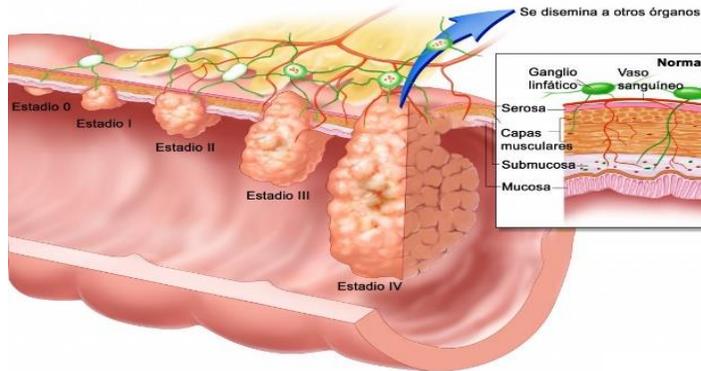


Figura 1.18. Estadios del cáncer.⁶⁰

El ciclo celular es el proceso mediante el cual una célula madre se divide en dos células hijas con igual carga genética.⁶¹ Como se indica en la Figura 1.19, este proceso consta de cuatro fases: fase G1, fase S, fase G2 y fase de mitosis. A su vez, la mitosis se divide en cuatro subfases: profase, metafase, anafase y telofase. Por último, cuando ésta ha finalizado se produce el proceso de citocinesis.

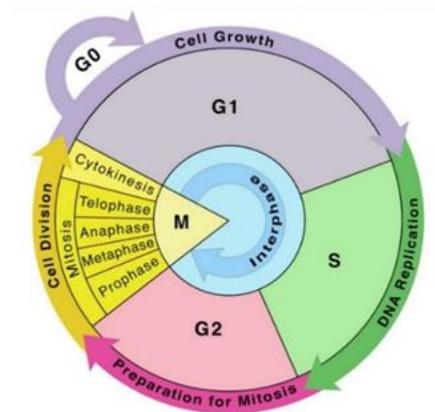


Figura 1.19. Fases del ciclo celular y del proceso de mitosis.⁶²

⁶⁰ <https://www.rodrigoazolas.cl/web/patologias/cancer-colorrectal/> (consultada el 9 de mayo de 2023).

⁶¹ Matthews, H.K.; Bertoli, C.; de Bruin, R.A. Cell cycle control in cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, *23*, 74-88. DOI: 10.1038/s41580-021-00404-3.

⁶² <https://www.sciencefacts.net/cell-cycle.html> (consultada el 10 de mayo de 2023).

Para que la célula pueda dividirse, uno de los eventos imprescindibles es la formación del huso mitótico, que se encarga de la separación de los cromosomas. El huso mitótico está constituido, básicamente, por un conjunto de microtúbulos formados a partir de una proteína conocida como tubulina. Esta proteína es una de las dianas biológicas más estudiadas para encontrar fármacos efectivos contra el proceso de mitosis.⁶³

Los fármacos clásicos que se han empleado en el tratamiento del cáncer se dividen en ciclo-específicos, que son los que actúan en algún punto del ciclo celular, y en ciclo-inespecíficos, que son los que afectan a la célula tumoral en cualquier punto de su desarrollo. En la Tabla 1.2 se muestra una clasificación de los antineoplásicos tradicionales que se caracterizan por ser poco específicos, no dirigidos y, por tanto, generar bastantes efectos secundarios en el paciente.⁵

Tabla 1.2. Clasificación de los antineoplásicos tradicionales en función de su mecanismo de acción.⁵

| TIPO | GRUPO | EJEMPLO | MECANISMO |
|---------------------------------|--|---|--|
| <i>Antimetabolitos</i> | <ul style="list-style-type: none"> - Antagonistas de folato - Vía de las pirimidinas - Vía de las purinas | <ul style="list-style-type: none"> - Metrotexato - Fluoroacilo | Bloqueo de la síntesis de ADN y/o ARN |
| <i>Alquilantes</i> | <ul style="list-style-type: none"> - Mostazas nitrogenadas - Nitrosoureas - Compuestos de platino | <ul style="list-style-type: none"> - Clorambucilo - Cisplatino | Formación de enlaces cruzados entre cadenas de ADN |
| <i>Derivados de plantas</i> | <ul style="list-style-type: none"> - Taxanos - Alcaloides de la vinca - Camptotecinas | <ul style="list-style-type: none"> - Paclitaxel (Taxol®) - Docetaxel (Taxotere®) - Vincristina | Impedimento de la formación del huso mitótico (tubulina) |
| <i>Antibióticos citotóxicos</i> | <ul style="list-style-type: none"> - Antraciclina | <ul style="list-style-type: none"> - Doxorrubicina | Efectos sobre la síntesis de ADN y la acción de la topoisomerasa |

⁶³ Jordan, M., Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 253-265. DOI: 10.1038/nrc1317.

En la Figura 1.20 se muestran las estructuras químicas de algunos fármacos antineoplásicos.

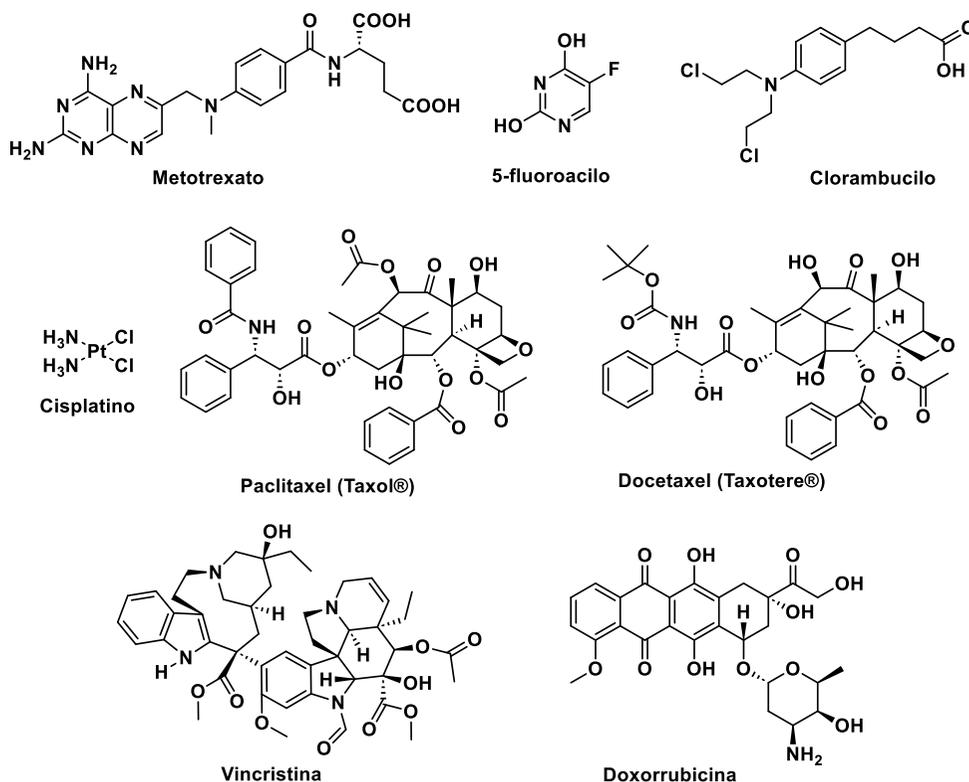


Figura 1.20. Estructura química de algunos fármacos antineoplásicos clásicos.

1.3. Terapias dirigidas contra el cáncer

1.3.1. Señas de identidad del cáncer

En el año 2000, los biólogos Douglas Hanahan y Robert Weinberg publicaron un trabajo donde recogían seis características comunes a todos los tipos de cáncer. Más tarde, en 2011, los mismos autores expandieron el número de estas características a un total de diez. Recientemente, en 2022, el propio Hanahan añadió otras cuatro características más, por lo que en la actualidad se conocen catorce señas de identidad que son comunes en todos

los cánceres.^{64,65,66} Estas características o señas de identidad se indican en la Figura 1.21.

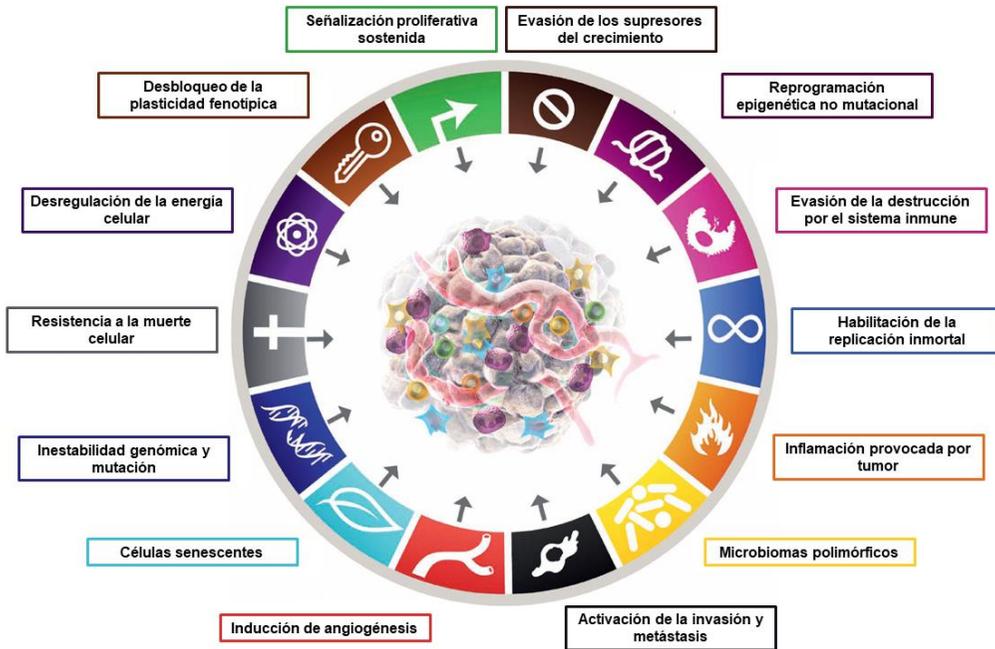


Figura 1.21. Características comunes a todos los tipos de cáncer.⁶⁶

I. Señalización proliferativa sostenida

La proliferación descontrolada de las células tumorales es debida a la desregulación de los factores de crecimiento. En una célula sana estos factores se unen a su receptor asociado en la membrana celular, lo que inicia una cascada de señalización que controla el número de células en el tejido. En las células tumorales, por el contrario, se produce una sobreexpresión de los factores de crecimiento que provoca el aumento descontrolado del

⁶⁴ Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

⁶⁵ Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

⁶⁶ Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 31-46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

crecimiento celular.⁶⁷ Uno de los mayores responsables de esta desregulación es el oncogen c-Myc y su factor de transcripción asociado.⁶⁸

II. Evasión de los supresores del crecimiento

Esta característica se encuentra íntimamente relacionada con la anterior, pues el aumento en el ritmo de crecimiento celular va asociado a la evasión de los inhibidores de la proliferación.⁶⁹

III. Reprogramación epigenética no mutacional

Además de los cambios genéticos que implican mutaciones más o menos acusadas en el genoma, se cree que muchos cambios epigenéticos, que no implican variaciones en la secuencia genética, están involucrados en procesos como la diferenciación celular o la formación de tejidos y órganos que, en última instancia, también favorecen la carcinogénesis.⁷⁰

IV. Evasión de la destrucción por el sistema inmune

El sistema inmune del organismo se encuentra en constante vigilancia con el fin de detectar las células aberrantes y proceder rápidamente a su destrucción. Para evitar la acción del sistema inmune, las células tumorales poseen diferentes mecanismos de acción, entre los que destacan la unión de la proteína PD-1 (*Protein Death-1*) con el ligando PD-L1 (*Protein Death Ligand-1*) o la unión del receptor SIRP α (*Signal Regulatory Protein Alpha*) con el ligando CD-47 (*Cluster of Differentiation 47*). La sobreexpresión de PD-L1

⁶⁷ Feitelson, M. A.; Arzumanyan, A.; Kulathinal, R.J.; Blain, S.W.; Holcombe, R.F.; Mahajna, J. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35*, 25-54. DOI: 10.1016/j.semcancer.2015.02.006.

⁶⁸ Gabay, M.; Li, Y, Felsher D.W. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*(6). DOI: 10.1101/cshperspect.a014241.

⁶⁹ Amin, A.R.M.R.; Karpowicz, P.A.; Carey, T.E.; Arbiser, J.; Nahta, R.; Chen, Z.G. et al. Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35*, 55-77. DOI: 10.1016/j.semcancer.2015.02.005.

⁷⁰ Suvà, M.L.; Riggi, N.; Bernstein, B.E. Epigenetic Reprogramming in Cancer. *Science* **2013**, *339*, 1567-1570. DOI: 10.1126/science.1230184.

y de CD-47 permite a las células cancerosas evadir la acción del sistema inmune.⁷¹

V. Habilitación de la replicación inmortal

Los telómeros de los cromosomas confieren a la célula sana un número de replicas finito, debido a su acortamiento en cada ciclo celular. Sin embargo, las células tumorales sobreexpresan la enzima telomerasa, que se encarga de regenerar el extremo del telómero. El resultado es la adquisición de un poder de replicación infinito.⁷²

VI. Inflamación provocada por tumor

Cuando se produce una situación de inflamación en el organismo, éste se encarga de dotar a la zona de más recursos biológicos en forma de factores de crecimiento, nutrientes, oxígeno, etc. En un tumor, y en su microambiente tumoral asociado, se intenta simular esta situación de inflamación para aprovecharse de la respuesta del organismo y continuar con su crecimiento y expansión.⁷³

VII. Microbiomas polimórficos

Un microbioma se define como el conjunto de hongos o bacterias que habitan una determinada zona del organismo y que son responsables de la estabilidad o inestabilidad de dicha zona, como ocurre en el tracto gastrointestinal. Se ha encontrado la existencia de microorganismos, principalmente bacterias, dentro de los tumores sólidos que ayudan a que éstos puedan ejercer el resto de las características que se enumeran. Por tanto, la identificación de estos microorganismos, y la clasificación de los

⁷¹ González, H.; Hagerling, C.; Werb, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* **2018**, *32*, 1267-1284. DOI: 10.1101/gad.314617.118.

⁷² Shay, J.; Zou, Y.; Hiyama, E.; Wright, W.E. Telomerase and cancer. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 677-685. DOI: 10.1093/hmg/10.7.677.

⁷³ Coussens, L. M.; Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **2002**, *420*, 860-867. DOI: 10.1038/nature01322.

tumores en función de ellos, está abriendo nuevas vías de investigación en el combate contra la enfermedad cancerosa.⁷⁴

VIII. Activación de la invasión y de la metástasis

Los tumores malignos, como se ha comentado, son aquellos capaces de aprovecharse de las vías del organismo, tales como el torrente sanguíneo y/o el sistema linfático, para migrar del órgano o tejido de origen hacia nuevos objetivos, en el proceso conocido como metástasis.⁷⁵

IX. Inducción de la angiogénesis

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes, El objetivo de la acción angiogénica es, por un lado, el de aportar el oxígeno y los nutrientes necesarios para el adecuado crecimiento celular y, por otro, el de servir como vía de excreción de los residuos resultantes del metabolismo celular. En un ambiente tumoral, la neovasculatura que se forma es caótica e inmadura, lo que facilita el desprendimiento de las células tumorales y su acceso al sistema sanguíneo, iniciándose de esta forma el proceso de metástasis. En la angiogénesis tumoral juega un papel clave la proteína VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) y sus receptores asociados VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3.⁷⁶

X. Células senescentes

Las células senescentes son capaces de liberar sustancias tóxicas que pueden dañar a las células adyacentes e inducirles una situación de inflamación. El microambiente tumoral se encuentra plagado de células senescentes que se encargan de “reclutar” nuevas células vecinas. El

⁷⁴ Lythgoe, M.P.; Mullish, B.H.; Frampton, A.E.; Krell, J. Polymorphic microbes: a new emerging hallmark of cancer. *Trends Microbiol.* **2022**, *30*, 1131-1134. DOI: 10.1016/j.tim.2022.08.004.

⁷⁵ Geiger, T. R.; Peeper, D. S. Metastasis mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, *1796*, 293-308. DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.07.006.

⁷⁶ Bielenberg, D. R.; Zetter, B. R. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer J.* **2015**, *21*, 267–273. DOI: 10.1097/PPO.000000000000138.

mecanismo de acción de estas células senescentes también se ha convertido en un nuevo objeto de estudio en las terapias contra el cáncer.⁷⁷

XI. Inestabilidad genómica y mutación

Para que se produzcan el resto de las características se debe producir una acumulación de mutaciones en el genoma, a un ritmo mucho mayor del habitual. Es destacable remarcar el papel de la proteína TP53 (*Tumor Protein 53*) o p53, conocida como “el guardián del genoma”, la cual es una de las principales encargadas de regular estas alteraciones.⁷⁸

XII. Resistencia a la muerte celular

Una célula entra en apoptosis o muerte celular generalmente por estrés fisiológico, pero también es posible que el organismo detecte una anomalía en la propia célula y, de forma automática, ordene su autodestrucción. Aquí juega un papel fundamental, de nuevo, el supresor tumoral TP53. Por contra, durante el proceso de transformación de una célula sana en una neoplásica se produce una pérdida de este supresor, por lo que la célula se vuelve resistente al proceso de apoptosis.⁷⁹

XIII. Desregulación de la energía celular

Existen dos principales vías de obtención de energía para que una célula sana pueda realizar sus funciones vitales: la aeróbica, en la que se produce una degradación de la glucosa en piruvato y, posteriormente, en dióxido de carbono, y la anaeróbica, o ruta de la glicólisis, en la que no interviene la mitocondria y por tanto no es necesario el aporte de oxígeno. En el tejido tumoral se produce la reprogramación de las vías de obtención de energía, por lo que se potencia la ruta de la glicólisis en favor de la aeróbica y,

⁷⁷ Wang, B.; Kohli, J.; Demaria, M. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends Cancer* **2020**, *6*, 838-857. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.05.004.

⁷⁸ Ozaki, T.; Nakagawara, A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers* **2011**, *3*, 994-1013. DOI: 10.3390/cancers3010994.

⁷⁹ Fulda, S. Tumor resistance to apoptosis. *Int. J. Cancer*. **2009**, *124*, 511-515. DOI: 10.1002/ijc.24064.

consecuentemente, no se produce dependencia del oxígeno para el aporte energético.⁸⁰

XIV. Desbloqueo de la plasticidad fenotípica

En los tejidos sanos, y después de la mitosis, se produce el proceso de diferenciación celular. Una vez alcanzado este punto, el organismo se regula a sí mismo de manera que se detiene el crecimiento celular. Sin embargo, los tejidos tumorales son capaces de escapar de este punto de diferenciación, por lo que no existe una barrera al crecimiento y la división celular.⁸¹

Las señas de identidad propuestas por Hanahan y Weinberg han sido revisadas por otros investigadores que han añadido, reestructurado y/o simplificado las propuestas de aquéllos. Así, en el año 2017, Fouad y Aanei publicaron un trabajo en el que definían *hallmark* como una característica ventajosa, evolutivamente adquirida, que promovería la transformación de células fenotípicamente normales en células malignas, incrementado de esta forma la progresión de dichas células a costa del tejido huésped.⁸²

El proceso de transformación de células sanas en células tumorales se describe gráficamente en la Figura 1.22. Así, las agresiones que actúan continuamente sobre las células provocan alteraciones que transforman su genética (o epigenética), el número y la disposición de los cromosomas y las interacciones heterotípicas. En el camino hacia la transformación cancerosa las células pasan por ciclos de selección clonal evolutiva que conducen a la adquisición de las características distintivas del cáncer.

⁸⁰ DeBerardinis, R. J.; Chandel, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* **2016**, *5*. DOI: 10.1126/sciadv.1600200.

⁸¹ Bhatia, S.; Wang, P.; Toh, A.; Thompson, E.W. New Insights Into the Role of Phenotypic Plasticity and EMT in Driving Cancer Progression. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 1-18. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00071.

⁸² Fouad, Y.A.; Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7(5)*,1016-1036.

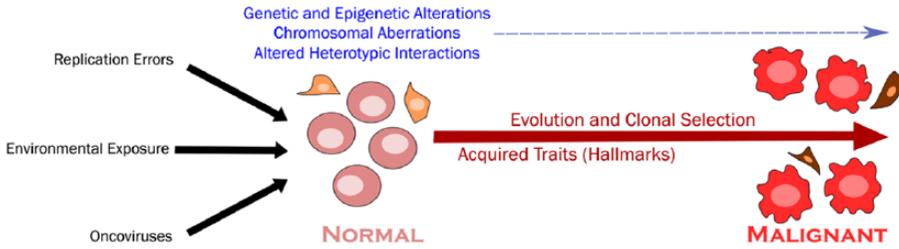


Figura 1.22. Transformación de células sanas en cancerosas.⁸²

Fouad y Aanei han reestructurado los diez *hallmarks* que propusieron Hanahan y Weinberg en 2011 y han reducido su número a siete. Estas siete señas de identidad del cáncer se muestran en la Figura 1.23.

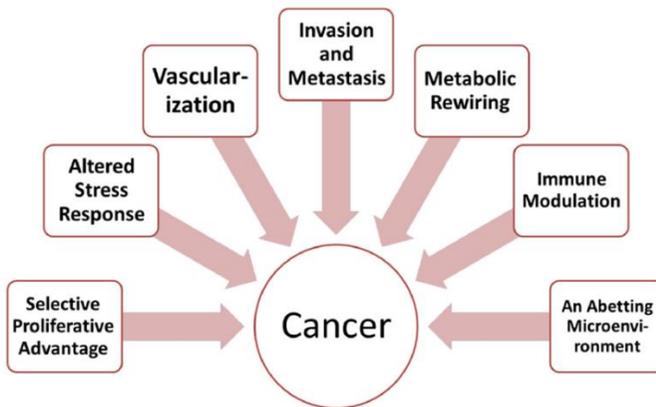


Figura 1.23. Las siete señas de identidad del cáncer propuestas por Fouad y Aanei.⁸²

Fouad y Aanei consideran que a medida que la comprensión sobre esta enfermedad avanza existe un solapamiento de las dos primeras señas de Hanahan y Weinberg que hacen referencia a la autosuficiencia de las células tumorales en cuanto a factores de crecimiento y a la evasión de los factores supresores del mismo.

Además, afirman que la clasificación de los genes reguladores del cáncer en oncogenes y genes supresores de tumores puede, a veces, dificultar el entendimiento de la biología del cáncer. Por este motivo, proponen considerar a los promotores y supresores del crecimiento en un contexto evolutivo en el cual las células compiten. En esta lucha evolutiva vencen las células con

mejor capacidad para manejar esos factores y, por tanto, con mayor capacidad proliferativa. Para Fouad y Aanei esta capacidad constituye una señal de identidad que ellos denominan *ventaja proliferativa selectiva*.

En relación a la evasión de la apoptosis y a la capacidad replicativa ilimitada, Fouad y Aanei afirman que la apoptosis es muy frecuente en células cancerosas, incluso especulan que ésta juega un papel relevante en la evolución de las células malignas y en la progresión tumoral. Para Fouad y Aanei la apoptosis y la senescencia se deben interpretar como tensiones a las que se enfrentan las células cancerosas, lo que lleva a seleccionar sólo aquellas que muestren una mejor adaptación o que puedan utilizar dichas tensiones para su propio beneficio. A esta señal de identidad la denominan como *respuesta a la alteración del estrés*. En esta señal de identidad también engloban a la inestabilidad genómica y a la mutación, en la que está alterada la respuesta al daño sufrido por el ADN.

Fouad y Aanei mantienen las señales de identidad de Hanahan y Weinberg relacionadas con la inducción de la angiogénesis y con la invasión de los tejidos y la metástasis, pero las nombran como *vascularización e invasión y metástasis*.

En lo referente a la estimulación del tumor causada por la inflamación, están en desacuerdo con englobarlo como una entidad separada, como lo hicieron Hanahan y Weinberg. Para Fouad y Aanei los componentes celulares inflamatorios en los tumores no son más que miembros activos del sistema inmune y que no siempre la inflamación provoca la expansión del tumor. Según estos autores, en algunos casos la inflamación podría detener el avance del tumor, por ello la inflamación debería estar incluida en la señal de identidad conocida como *respuesta inmune*.

A pesar de que la idea de que los *hallmarks* confieren un gran base racional a la hora de estudiar el cáncer, Fouad y Aanei insisten en que el cáncer no es una enfermedad única y que existen muchos aspectos diferentes entre los

distintos tipos de cánceres. Por ejemplo, la vascularización puede ser una importante señal de identidad del cáncer, pero no lo es en tumores poco vascularizados que no dependen mucho de esa característica.

Welch y Hurst han propuesto nuevas señales de identidad, pero circunscritas al proceso de metástasis.⁸³ Según estos autores, en la metástasis se pueden encontrar cuatro señales de identidad que son: la movilidad e invasión, la capacidad para modular el sitio secundario o los microambientes locales, la plasticidad y la capacidad para colonizar tejidos secundarios.

En la Figura 1.24 se indican las cuatro señales de identidad de la metástasis, marcadas en rojo en la figura. El proceso de metástasis comienza (paso 1 en la Figura 1.24) con el crecimiento de las células cancerosas, el reclutamiento de células inflamatorias, la inducción de la angiogénesis y el establecimiento de nichos premetastásicos (flecha gris en la Figura 1.24). En el paso 2, las células cancerosas comienzan la invasión mediante una migración colectiva, o aprovechándose, como células individuales, del estroma circundante y de una serie de mecanismos de movilidad.

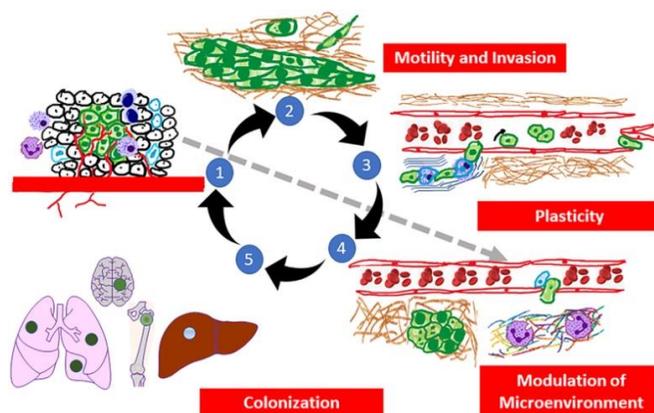


Figura 1.24. Etapas en el proceso de metástasis.⁸³

En el paso 3, las células inmunitarias que se infiltran en el tumor primario se asocian con células tumorales, que se apropian de las funciones invasivas

⁸³ Welch, D.R.; Hurst, D.R. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 3011-3027. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0458.

de las células inmunitarias para entrar en la vasculatura (intravasación). Una vez dentro de la vasculatura, las células tumorales, usualmente, circulan a lo largo del endotelio, pero también pueden formar émbolos homotípicos (células tumorales-células tumorales) o heterotípicos (células tumorales-células inmunitarias/plaquetas). Después, las células tumorales se adhieren al endotelio, o se detienen si el diámetro del vaso es demasiado pequeño para atravesarlo. La matriz extracelular, que utilizaron las células tumorales para invadir el estroma circundante, también se reorganiza y puede provocar la liberación de matriquinas (pequeños péptidos endógenos que intervienen en la regeneración del tejido cutáneo) que afectan al comportamiento de las células tumorales y/o a las del estroma. En el paso 4 se produce la detención/adherencia de las células tumorales, que salen de los vasos (extravasación) e interactúan con nichos premetastásicos, lo que permite la proliferación y colonización de sitios secundarios. En el paso 5 se produce la colonización, que depende de la combinación de las células tumorales con factores específicos de cada tejido. Las células en diseminación colonizan selectivamente diferentes tejidos, pudiendo ocurrir también el proceso de diseminación adicional, es decir, metástasis a partir de metástasis.

1.3.2. Inmunoterapia

Los tratamientos clásicos que se han usado para combatir el cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Usualmente se utilizan los tres tratamientos combinados, ya que antes y/o después de la extirpación del tumor el paciente suele ser sometido a sesiones de radioterapia y/o quimioterapia. En la radioterapia se emplean radiaciones ionizantes, como pueden ser rayos X, γ ó partículas α , para eliminar las células tumorales del organismo. Los fármacos empleados en la quimioterapia se pueden

diferenciar en citotóxicos, que son aquellos que eliminan las células, y en antitumorales, que son los que frenan el crecimiento y la división celular.⁸⁴

La falta de especificidad de muchos tratamientos de quimioterapia provoca efectos secundarios en el paciente. En los últimos años se han empezado a utilizar nuevos tratamientos de quimioterapia que actúan sobre las proteínas que controlan la forma mediante la cual se multiplican, dividen y diseminan las células cancerosas. Estas terapias, que han sido denominadas terapias dirigidas, son más específicas que las tradicionales, por lo que, usualmente, provocan menos efectos secundarios que éstas.^{85,86}

Dentro de las terapias dirigidas destaca la inmunoterapia, la cual pretende encontrar fármacos que reactiven el sistema inmune del paciente para que sea éste quien elimine a las células tumorales.⁸⁷ El primer indicio que se tiene del uso de la inmunoterapia, como terapia frente al cáncer, data de 1890, cuando tras el fallecimiento de una joven en Nueva York, debido a un sarcoma, el cirujano William Coley investigó acerca de casos similares y descubrió que un tumor de un paciente había desaparecido tras verse afectado por una infección bacteriana. A partir de este momento, W. Coley realizó diversos experimentos infectando con bacterias a pacientes oncológicos. En algunos casos observó una respuesta positiva. Las ideas de W. Coley fueron aparcadas en favor de los tratamientos de radioterapia y quimioterapia.⁸⁸ No obstante, las investigaciones de James P. Allison acerca

⁸⁴ Alam, M.S.; Hossain, M.A.; Algoul, S.; Majumader, M.A.A.; Al-Mamun, M.A.; Sexton, G. et al. Multi-objective multi-drug scheduling schemes for cell cycle specific cancer treatment. *Comput. Chem, Eng.* **2013**, *58*, 14-32. DOI: 10.1016/j.compchemeng.2013.05.021.

⁸⁵ Debela, D.T.; Muzazu, S.G.Y.; Heraro, K.D., Tayamika Ndalama, M.T.; et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med.* **2021**, *9*. DOI: 10.1177/20503121211034366.

⁸⁶ Baudino, T.A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr. Drug. Discov. Technol.* **2015**, *12*, 3-20. DOI: 10.2174/1570163812666150602144310.

⁸⁷ Abbott, M.; Ustoyev, Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Semin. Oncol.* **2019**, *5*, 1-5. DOI: 10.1016/j.soncn.2019.08.002.

⁸⁸ Dobosz, P.; Dzieciatkowski, T. The intriguing history of cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1-10. DOI: org/10.3389/fimmu.2019.02965.

de la proteína CTLA-4⁸⁹ y de T. Honjo sobre PD-1,⁹⁰ que fueron reconocidas con el Premio Nobel de Medicina en 2018, han llevado a considerar a la inmunoterapia como una alternativa a tener muy en cuenta en los tratamientos oncológicos.

1.3.2.1. Células del sistema inmune y microambiente tumoral

El sistema inmune del cuerpo humano engloba una compleja red de células, tejidos y órganos que, junto con las sustancias por éstos segregadas, tiene como misión el combate de las infecciones. Las células del sistema inmune derivan de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea y se pueden clasificar, de manera general, en función de su pertenencia al sistema inmune innato o adaptativo.

En la Tabla 1.3 se indican las principales células del sistema inmune. Los linfocitos son las células del sistema inmune que se encargan de realizar la inmunovigilancia del organismo, pues son capaces de reconocer a las células cancerígenas como extrañas y proceder luego a su eliminación. Los linfocitos B tienen la función de sintetizar y secretar anticuerpos capaces de reconocer antígenos que se encuentran libres, sin necesidad de la presentación de éstos por ningún receptor específico. A diferencia de los linfocitos B, los T, denominadas así por su maduración en el timo, necesitan actuar mediante una unión receptor-ligando.⁹¹ Para ello, precisan de células presentadoras de antígenos (APCs, *Antigen Presenting Cells*), entre las que destacan las células dendríticas y los macrófagos, que son capaces de reconocer proteínas extrañas y transformarlas en pequeños péptidos que son presentados a los receptores de las células T (TCR, *T cell receptor*) unidos a los complejos mayores de histocompatibilidad (MHCs, *Major*

⁸⁹ Leach, D.R.; Krummel, M.F.; Allison, J.P. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* **1996**, *271*, 1734-1736. DOI: 10.1126/science.271.5256.1734.

⁹⁰ Ishida, Y.; Agata, Y.; Shibahara, K.; Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO J.* **1992**, *11*, 3887-3895. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.

⁹¹ Crotty, S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 185-189. DOI: 10.1038/nri3803.

Histocompatibility Complexes). Existen dos principales activaciones: la que deriva de la unión entre los complejos MHC-I y las células T CD8+ y la que deriva de la unión de los MHC-II a las células T CD4+.⁹²

Tabla 1.3. Clasificación de las células del sistema inmune.¹⁵

| CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE | |
|---|--|
| RESPUESTA INMUNE INNATA | RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA |
|  MONOCITOS |  LINFOCITOS B |
|  MACRÓFAGOS |  LINFOCITOS T |
|  MASTOCITOS | |
|  CÉLULAS DENDRÍTICAS | |
|  NATURAL KILLER (NK) | |
|  NEUTRÓFILOS | |
|  EOSINÓFILOS | |
|  BASÓFILOS | |

A pesar de ser la principal vía de activación, la unión MHC-TCR no es la única. Para que exista una activación completa se debe producir una coestimulación mediante la unión del receptor CD28 de la célula T con el ligando B7 de las APCs. La activación de las células T se detiene mediante la secreción de la proteína CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), la cual compite con CD28 por la unión con B7, tal y como se muestra en la Figura 1.25. Debido a que la unión CTLA-4/B7 es más fuerte, la coestimulación no

⁹² Kumar, V.; Sercarz, E. An integrative model of regulation centered on recognition of TCR peptide/MHC complexes. *Immunol. Rev.* **2001**, *182*, 113-121. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2001.1820109.x.

se produce y, por tanto, se detiene la activación T.⁹³ Las células cancerosas evitan su destrucción por el sistema inmune inhibiendo la expresión de B7 en los MHCs y/o provocando la sobreexpresión de CTLA-4.

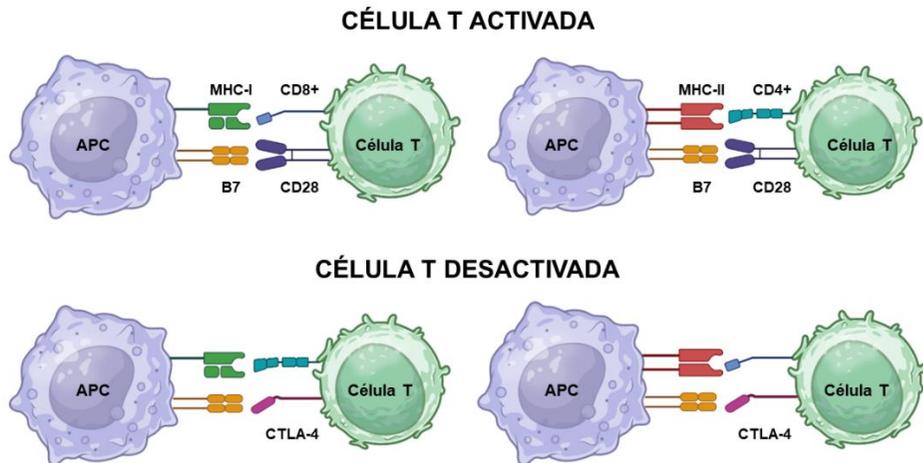


Figura 1.25. Activación y desactivación de las células T.¹⁵

Otro de los puntos de control del sistema inmune es la unión PD-1/PD-L1. Como ya se ha comentado con anterioridad, PD-1 es un receptor que se encuentra en la superficie de las células del sistema inmunitario y su unión con PD-L1 conduce a una cascada de reacciones que finalizan en la evasión de la destrucción celular. A pesar de que PD-1 también se puede unir a otro ligando similar, conocido como PD-L2, la unión con PD-L1 es mucho más frecuente debido a la mayor expresión de este ligando, tanto en células sanas como en las tumorales, siendo esta unión objeto de muchos estudios inmunoterapéuticos.⁹⁴

PD-1 es una proteína que consta de 288 aminoácidos y presenta tres dominios principales: el dominio N-terminal extracelular, un dominio

⁹³ Sherif, A.; Winerdal, M.E.; Winqvist, O. Sentinel lymph node detection in urinary bladder cancer-A gateway to advanced translational research and cellular immunotherapy minireview. *Egypt. J. Urol.* **2016**, *22*, 1-8.

⁹⁴ Zak, K.M.; Grudnik, P.; Magiera, K.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T.A. Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure* **2017**, *25*, 1163-1174. DOI: 10.1016/j.str.2017.06.011.

transmembrana y el dominio citoplasmático C-terminal. El dominio C-terminal se encuentra conectado con una cadena de receptores denominados ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) y ITSM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*), que desencadenan las señales químicas responsables de la evasión de la destrucción de la célula a cargo de las células T. Por otro lado, PD-L1 tiene la misma estructura de tres dominios, pero en este caso consta de dos aminoácidos más que PD-1, y su principal diferencia es que no se encuentra unido a ITIM e ITSM.⁹⁵

En la Figura 1.26 se muestra la ruta de señalización derivada de la unión PD-1/PD-L1.⁹⁶

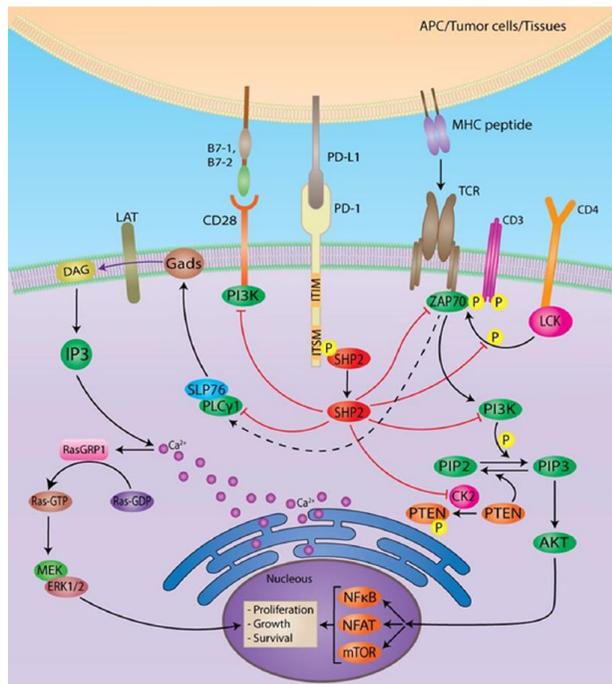


Figura 1.26. Ruta de señalización celular derivada de la unión PD-1/PD-L1.⁹⁶

⁹⁵ Han, Y.; Liu, D.; Li, L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2020**, *10*, 727-742.

⁹⁶ Salmaninejad, A.; Valilou, S.F.; Shabgah, A.G.; Aslani, S.; Alimardani, M.; Pasdar, A. et al. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 16824-16837. DOI: 10.1002/jcp.28358.

Al unirse PD-L1 a PD-1, los receptores ITIM e ITSM, localizados en el extremo del dominio C-terminal de PD-1, inician la cascada de señalización con la fosforilación de ITSM. A este receptor se le puede unir SHP-2 (*Src Homology Region 2 domain-containing phosphatase 2*), que es el receptor encargado de anular varias vías de señalización, como puede ser la fosforilación de la proteína ZAP70 a cargo de LCK, o la fosforilación de la proteína PTEN a cargo de CK2. Esta ruta de señalización provoca la inactivación de las células T mediante la inhibición de las uniones MHC-TCR y CD-28-B7.

Uno de los mecanismos que utilizan las células tumorales para evadir su destrucción por el sistema inmune es la sobreexpresión en su superficie de PD-L1.⁹⁷ Esta sobreexpresión es, en parte, consecuencia de la secreción de interferón IFN- γ por las células T activadas o de las células NK, que tiene lugar cuando se produce una situación de inflamación.⁹⁸ Sin embargo, las células tumorales se han adaptado para que la expresión de IFN- γ promueva la sobreexpresión de PD-L1, de manera que al unirse con PD-1 conduzca a una situación de exhaustividad de las células T y las haga entrar en fase apoptótica.

Por todo ello, en los últimos años se han desarrollado terapias biológicas destinadas a bloquear la unión PD-1/PD-L1. El primer tratamiento efectivo se consiguió con el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia PD-1 (nivolumab, pembrolizumab o cemiplibab) o PD-L1 (atezolizumab, avelumab o durvamalab). Estos tratamientos son muy específicos, pero no carecen de inconvenientes tales como los asociados a problemas de administración inmunogenicidad y toxicidad. Una alternativa al empleo de anticuerpos monoclonales reside en el uso de pequeñas moléculas capaces de bloquear

⁹⁷ Pla-López, A.; Martínez-Colomina, P.; Cañada-García, L.; Fuertes-Monge, L.; Orellana-Palacios, J.O.; Valderrama-Martínez, A. et al. Aryl Azoles Based Scaffolds for Disrupting Tumor Microenvironment. *Bioorg. Med. Chem.* **2023**, *95*, 117490. DOI: 10.1016/j.bmc.2023.117490.

⁹⁸ Zaidi, M.R. The Interferon-Gamma Paradox in Cancer. *J. Interferon Cytokine Res.* **2019**, *39*, 30-38. DOI: 10.1089/jir.2018.0087.

la interacción PD-1/PD-L1. En 2015, la compañía farmacéutica Bristol Myers Squibb (BMS) sintetizó un conjunto de moléculas capaces de inhibir la interacción PD-1/PD-L1.

En la Figura 1.27 se pueden ver las estructuras de los compuestos BMS⁹⁹ que inhiben la interacción PD-1/PD-L1 mediante su unión selectiva a PD-L1. En esta figura se marca en negro la parte de 2-metil-3-(fenoximetil)-1,1'-bifenilo que es común a todos los compuestos BMS.

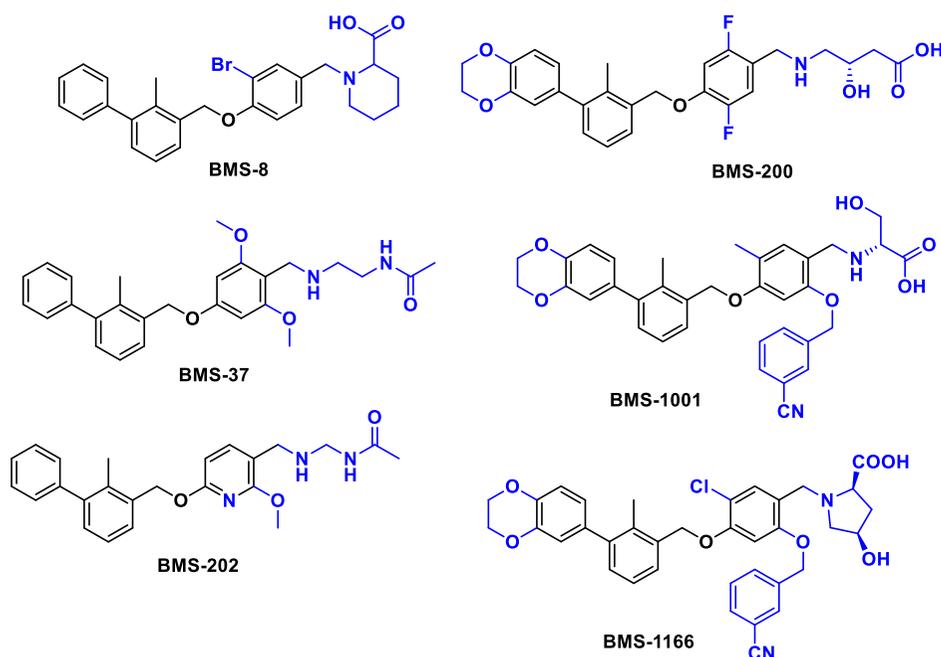


Figura 1.27. Inhibidores de la unión PD-1/PD-L1 desarrollados por BMS.

Los compuestos de BMS bloquean el sitio de unión con PD-1 induciendo la dimerización de PD-L1. En la Figura 1.28 se pueden ver las interacciones, obtenidas mediante cálculos *docking*, que establece el compuesto BMS-1001 con la proteína PD-L1. Así, el fragmento 2,3-dihidro-1,4-benzodioxina establece interacciones de apilamiento π - π con el residuo Tyr56 y el grupo

⁹⁹ Skalniak, L.; Zak, K.M.; Guzik, K.; Magiera, K.; Musielak, B.; Pachota, M. et al. Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells. *Oncotarget* **2017**, 8, 72167-72181. DOI: 10.18632/oncotarget.20050.

ácido (2*R*)-2-amino-3-hidroxipropanoico forma enlaces de hidrógeno con los carbonilos de los residuos Asp122, Tyr123, Lys124 y con el carbonilo de la cadena principal del residuo Phe19. Además, el grupo 3-cianobencilo establece parcialmente interacciones de apilamiento π - π con el residuo Tyr123 y enlaces de hidrógeno con el residuo Arg125.¹⁰⁰

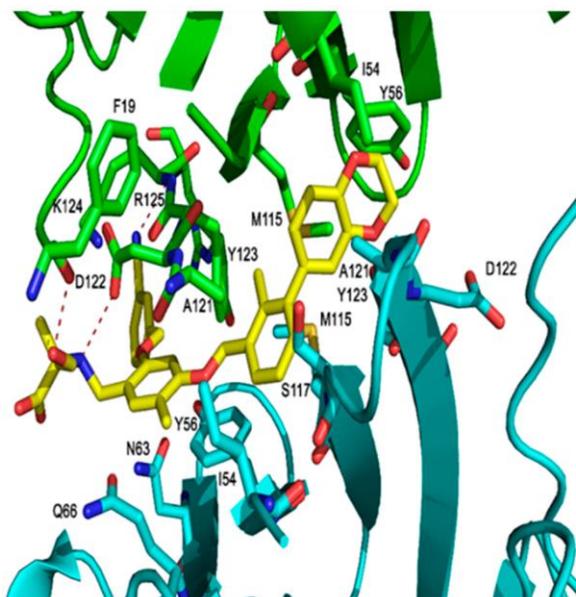


Figura 1.28. Interacciones de BMS-1001 con PD-L1.¹⁰⁰

Las células del sistema inmune pertenecientes a la respuesta innata también ejercen su papel en la defensa del organismo, ya que trabajan de manera conjunta con las células adaptativas. Por ejemplo, además del ya comentado papel de las APCs, las células NK presentan algunos receptores, como el NKG2D, que reconocen ligandos que se encuentran sobreexpresados en las células cancerosas, segregando posteriormente gránulos citotóxicos que eliminan a las células tumorales. En cuanto a la función de los neutrófilos, basófilos, eosinófilos y mastocitos, ésta es parecida

¹⁰⁰ Almahmoud, S.; Zhong, H.A. Molecular Modeling Studies on the Binding Mode of the PD-1/PD-L1 Complex Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1-15. DOI: 10.3390/ijms20184654.

entre sí, ya que se encargan de segregar factores que regulan el proceso de inflamación derivado de un proceso infeccioso.¹⁰¹

Los macrófagos también pueden eliminar células tumorales a través de un proceso de fagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP, *Antibody Dependent Cellular Phagocytosis*). Uno de los puntos de regulación clave es la unión entre el receptor SIRP α , expresado en la superficie de los macrófagos, y su ligando asociado CD-47. Esta proteína transmembrana de 323 aminoácidos pertenece a la familia de las inmunoglobulinas (Ig). Contiene un dominio N-terminal extracelular, cinco dominios putativos hidrofóbicos, y un dominio C-terminal corto citoplasmático.¹⁰² En las células tumorales CD-47 se encuentra sobreexpresada en la superficie y su unión con SIRP α provoca la inhibición de la fagocitosis por los macrófagos.

En la Figura 1.29 se pueden ver las diversas vías que llevan al aumento de la expresión de CD-47 en la superficie celular.¹⁰³ Una de estas vías se debe a la sobreexpresión de las citoquinas IL-6, TNF- α o IL-1 β , las cuales inducen la expresión de IL-6, vía STAT3, o de NF- κ B en el caso de TNF- α y IL-1 β .

Otra ruta de activación es la que se sigue en condiciones de hipoxia mediante activación del gen HIF-1. Por último, también destaca el oncogen MYC como regulador de la expresión de CD-47, así como multitud de microARNs.

¹⁰¹ Geering, B.; Stoeckle, C.; Conus, S.; Simon, H.U. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol.* **2013**, *34*, 398-409. DOI: [10.1016/j.it.2013.04.002](https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.002).

¹⁰² Brown, E.J.; Frazier, W.A. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 130-135. DOI: [10.1016/s0962-8924\(00\)01906-1](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01906-1).

¹⁰³ Huang, C.Y.; Ye, Z.H.; Huang, M.Y.; Lu, J.J. Regulation of CD47 expression in cancer cells. *Transl. Oncol.* **2020**, *13*, 100862. DOI: [10.1016/j.tranon.2020.100862](https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100862).

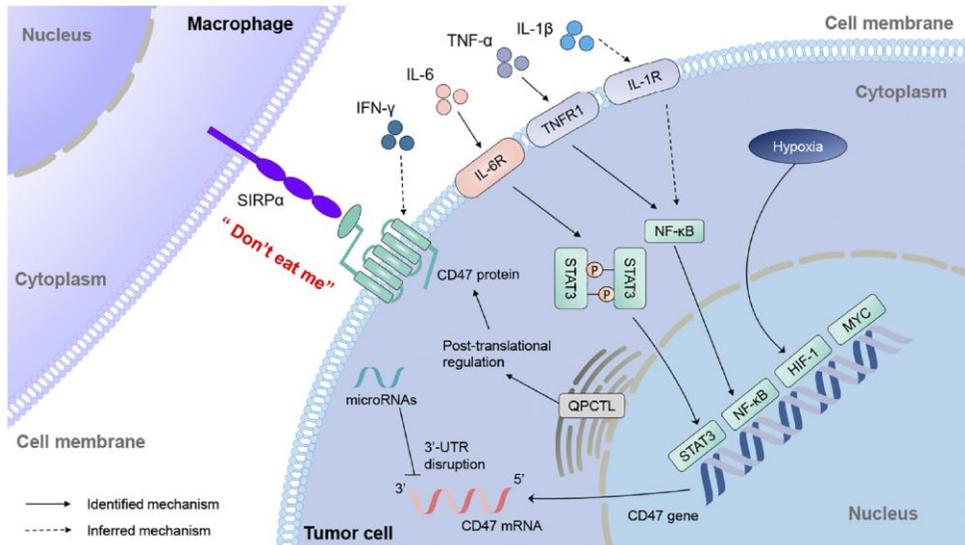


Figura 1.29. Mecanismos reguladores de la expresión de CD-47.¹⁰³

El eje SIRP α -CD-47 es uno de los puntos de control más estudiados actualmente en la búsqueda de nuevos tratamientos oncológicos. Uno de los fármacos más prometedores es el anticuerpo monoclonal magrolimab, que se encuentra en fase clínica para el tratamiento de leucemias y síndromes mielodisplásicos.¹⁰⁴

Para poder diseñar nuevas estrategias frente al cáncer es necesario tener en cuenta que un tumor no solo implica la masa sólida de células aberrantes que lo conforman, sino todas las células de los alrededores y la matriz extracelular, que configuran el microambiente tumoral (TME: *Tumor Microenvironment*).^{105,106} El TME se ha convertido recientemente en foco de muchos estudios, pues entre las células no malignas que lo constituyen se

¹⁰⁴ Kent, A.; Pollyea, D.A. Top advances of the year: Leukemia. *Cancer* **2023**, *129*, 981-985. DOI: 10.1002/cncr.34619.

¹⁰⁵ Martín-Beltrán, C.; Gil-Edo, R.; Hernández-Ribelles, G.; Agut, R.; Marí-Mezquita, P.; Carda, M. et al. Aryl Urea Based Scaffolds for Multitarget Drug Discovery in Anticancer Immunotherapies. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 337. DOI: 10.3390/ph14040337.

¹⁰⁶ Pla-López, A.; Carda, M.; Falomir, E. Tetrazole derivatives as potent immunomodulatory agents in tumor microenvironment. *Biomed. Pharmacother.* **2023**. Aceptado el 6 de octubre de 2023. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115668.

encuentran células del sistema inmune, tanto innato como adaptativo (Figura 1.30).¹⁰⁷

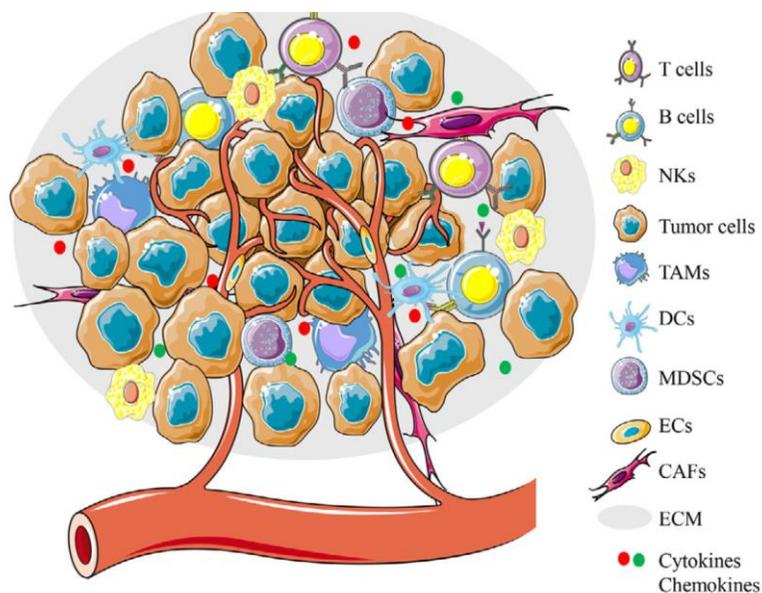


Figura 1.30. Componentes principales del TME.¹⁰⁸

Los TAM (*Tumor Associated Macrophage*) del microambiente tumoral se han convertido en objetivo de nuevas terapias anticancerígenas por múltiples motivos pues se ha demostrado que juegan un papel crucial en el proceso de metástasis, contribuyen a la inestabilidad genómica y muestran una clara importancia en la evasión del sistema inmune, ya que se encuentran involucrados en la sobreexpresión de PD-L1, pero también de los ligandos B7, necesarios para la activación de las células T.^{108,109}

¹⁰⁷ Shi, R.; Tang, Y.; Miao, H. Metabolism in tumor microenvironment: Implications for cancer immunotherapy. *MedComm.* **2020**, *1*, 47-68. DOI: 10.1002/mco2.6.

¹⁰⁸ Poltavets, A.S.; Vishnyakova, P.A.; Elchaninov, A.V.; Sukhikh, G.T.; Fatkhudinov, T. K. Macrophage Modification Strategies for Efficient Cell Therapy. *Cells* **2020**, *9*, 1535. DOI:10.3390/cells9061535.

¹⁰⁹ Guerriero, J.L. Macrophages: The Road Less Traveled, Changing Anticancer Therapy. *Trends Mol. Med.* **2018**, *24*, 472-489. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.03.006.

Investigaciones recientes apuntan a que la formación de este tipo de macrófagos se debe, en su mayoría, a la deficiencia de la quimioquina receptora 1 (CX3CR1) en la población Ly6C^{hi} de monocitos.¹¹⁰

Una vez formados los primeros TAM, las células tumorales segregan una serie de citoquinas, como CCR2 (*C-C Chemokine Receptor Type 2*) o CCL2 (*C-C Chemokine Motif Ligand 2*), que contribuyen al reclutamiento de otras poblaciones de monocitos que pueden adherirse al TME e incrementar la población de TAM. Dentro de los TAM se pueden diferenciar dos subtipos en función del nivel de citoquinas a las que se encuentren expuestos: TAM M1, que exhiben capacidades proinflamatorias y TAM M2, que tienen propiedades antiinflamatorias. Sin embargo, no es especialmente relevante el tipo de TAM presente, pues son intercambiables gracias a la exposición de otras citoquinas, por lo que es el propio TME el encargado de generar o transformar los subtipos de TAM de acuerdo con las necesidades de crecimiento.¹¹⁰

La sobreexpresión de PD-L1,¹¹¹ de CD-47,¹¹² o el reclutamiento de TAM¹¹³ para contribuir al crecimiento del TME vienen regulados por múltiples factores, pero uno de los nexos centrales de control es el oncogen c-Myc. Éste codifica un factor de transcripción que regula procesos relacionados con la carcinogénesis a través de genes implicados en el metabolismo y en el crecimiento celular. En células sanas, donde existe una expresión de la proteína Myc adecuada, se estimula el crecimiento de una manera óptima y controlada. Sin embargo, en las células tumorales se produce una

¹¹⁰ Yin, M.; Shen, J.; Yu, S.; Fei, J.; Zhu, X.; Zhao, J. et al. Tumor-Associated Macrophages (TAMs): A Critical Activator in Ovarian Cancer Metastasis. *OncoTargets Ther.* **2019**, *12*, 8687-8699. DOI:10.2147/OTT.S216355.

¹¹¹ Kim, E. Y.; Kim, A.; Kim, S.K.; Chang, Y.S. MYC expression correlates with PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2017**, *110*, 63-67. DOI: 10.1016/j.lungcan.2017.06.006.

¹¹² Ren, S.; Cai, Y.; Hu, S.; Liu, J.; Zhao, Y.; Ding, M. et al. Berberine exerts anti-tumor activity in diffuse large B-cell lymphoma by modulating c-myc/CD47 axis. *Biochem. Pharmacol.* **2021**, *188*, 114576. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114576.

¹¹³ Pello, O.M.; De Pizzol, M.; Mirolo, M.; Soucek, L.; Zammataro, L.; Amabile, A. Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. *Blood* **2012**, *119*, 411-421. DOI: 10.1182/blood-2011-02-339911.

sobreexpresión de esta proteína,¹¹⁴ por lo que todos los genes implicados en el proceso tumoral se ven afectados, lo que favorece el crecimiento celular descontrolado.

El factor de transcripción codificado por el oncogen c-Myc es una proteína de 439 aminoácidos que consta de tres dominios claramente diferenciados: el dominio N-terminal (de unos 140 aminoácidos), que a su vez contiene una región TAD (*N-terminal Transactivation Domain*) necesaria para la actividad de transcripción, un dominio central que controla las características apoptóticas de la proteína, y un dominio C-terminal (con un total de 90 aminoácidos), que es necesario para poder asociarse con la proteína MAX (*Myc Associated Protein X*).¹¹⁵ Para poder ejercer todas las funciones de la proteína, c-Myc necesita conformar un dímero con MAX en forma de complejos de cremallera de leucina (LZ, *Leucine Zip*), generando así un sistema HLH (*α -Helix-Loop- α -Helix*). Esta unión es necesaria para que el heterodímero se pueda unir al ADN y alterarlo genéticamente en beneficio de la carcinogénesis. Una vez formado, el sistema reconoce una secuencia de bases nitrogenadas concretas conocidas como cajas E (5'-CACGTG-3') e interacciona gracias a su dominio N-terminal.

c-Myc se ha revelado como una diana biológica de interés debido a la gran cantidad de procesos en los que se encuentra involucrado y a que las células tumorales necesitan de una activación sostenida de c-Myc para poder continuar su desarrollo, lo que se conoce como adicción oncogénica.¹¹⁶ Algunos de los métodos que se pretenden aplicar en la terapia frente a c-Myc son la reducción de la transducción de la proteína mediante el silenciado de su oncogen asociado, o mediante el bloqueo de la dimerización con MAX.

¹¹⁴ Felsher, D.W.; Bishop, J.M. Reversible Tumorigenesis by MYC in Hematopoietic Lineages. *Mol. Cell* **1999**, *4*, 199-207. DOI:10.1016/s1097-2765(00)80367-6.

¹¹⁵ Allen-Petersen, B.L.; Sears, R.C. Mission Possible: Advances in MYC Therapeutic Targeting in Cancer. *Biodrugs* **2019**, *33*, 539-553. DOI: 10.1007/s40259-019-00370-5.

¹¹⁶ Huang, H.; Weng, H.; Zhou, H.; Qu, L. Attacking c-Myc: targeted and combined therapies for cancer. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 6543-6554. DOI: 10.2174/1381612820666140826153203.

Recientemente, la proteína de bajo peso molecular Omomyc desarrollada en el Instituto Vall d'Hebron, ha alcanzado la fase clínica después de más de 20 años de ensayos. Omomyc bloquea la unión del dímero Myc/MAX a las cajas E del ADN mediante su conversión en un dímero similar al complejo Myc/MAX.¹¹⁷ En la Figura 1.31 se muestra una representación del heterodímero Myc-MAX y su unión con las cajas E del ADN, así como la misma situación para el homodímero Omomyc-Omomyc.

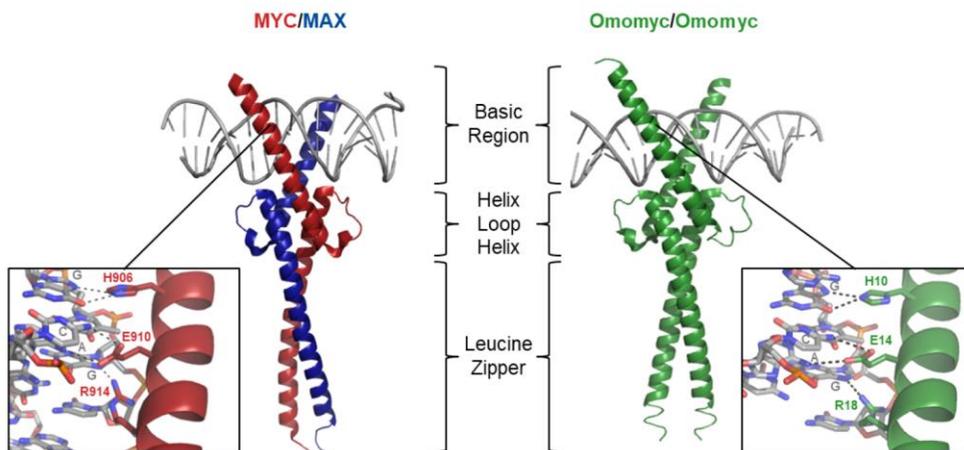


Figura 1.31. Complejos Myc/MAX y Omomyc/Omomyc e interacción con las cajas E del ADN.¹¹⁷

1.3.2.2. Angiogenesis

El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos, o angiogenesis, está controlado por un delicado equilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos, tal y como se muestra en la Figura 1.32.

En función de la proporción entre factores activadores e inhibidores se pueden diferenciar dos clases de angiogenesis: la fisiológica o normal, que se da cuando la proporción se encuentra en equilibrio y por lo tanto solo se estimula el proceso de angiogenesis cuando sea necesario, como en la

¹¹⁷ Massó-Vallés, D.; Soucek, L. Blocking Myc to treat cancer: reflecting on two decades of omomyc. *Cells* **2020**, *9*, 883. DOI: 10.3390/cells9040883.

cicatrización de heridas o en la embriogénesis, y la patológica o anormal, que se produce cuando el equilibrio se ve alterado.¹¹⁸

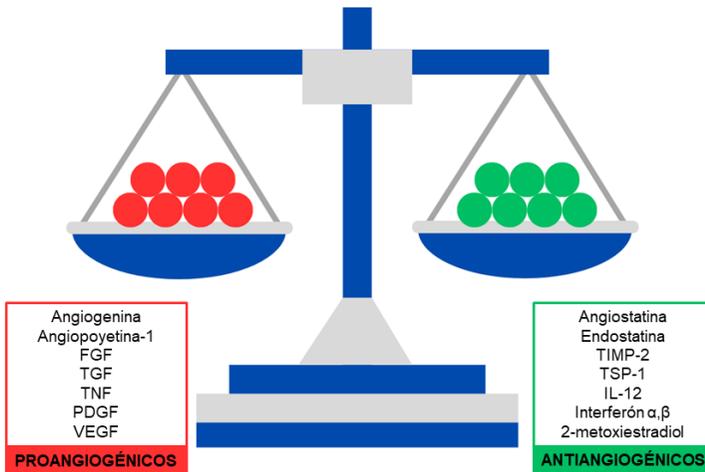


Figura 1.32. Equilibrio entre activadores e inhibidores de la angiogénesis.⁶

En la angiogénesis patológica o anormal se pueden dar dos subgrupos:

- Angiogénesis activada, en la que dominan los factores proangiogénicos y es típica de los procesos neoplásicos. La angiogénesis activada también se encuentra implicada en otras enfermedades como pueden la diabetes, la cirrosis o el SIDA.
- Angiogénesis inhibida, en la que los factores antiangiogénicos son los predominantes. La angiogénesis inhibida se corresponde con un mal funcionamiento de las células epiteliales, lo que deriva en problemas en la cicatrización de heridas o en la regeneración de los tejidos.

Las proteínas VEGF, o factores de crecimiento del endotelio vascular, juegan un papel clave en la angiogénesis. Los VEGF fueron descubiertos por Ferrara y Henzel en 1989 cuando consiguieron aislar la proteína de células

¹¹⁸ Martínez-Ezquerro, J.D.; Herrera, L.A. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología* **2006**, 1, 83-88.

foliculares de la pituitaria bovina.¹¹⁹ Existen hasta un total de seis tipos de VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y PGF (*Placental Growth Factor*). A pesar de que cada uno de ellos desempeña una función, el más conocido y con un papel más relevante es el VEGF-A, al que tradicionalmente se le adjudica el término VEGF. Además, VEGF-A se presenta en diferentes isoformas que contienen desde 121 a 206 aminoácidos, siendo predominante la isoforma VEGF-A 165.¹²⁰

En el proceso de angiogénesis, VEGF se une a sus receptores VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, que tienen actividad tirosina-quinasa (RTKs). Estos receptores son proteínas transmembrana con un dominio extracelular que actúa de receptor del ligando externo y otro dominio intracelular que es el que tiene actividad tirosina-quinasa. La transferencia del grupo fosfato, con sus dos cargas negativas asociadas, provoca un cambio conformacional en el biocompuesto que es fosforilado, lo que inicia el proceso de señalización celular (véase la Figura 1.33).¹²¹

¹¹⁹ Ferrara, N.; Henzel, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *161*, 851-858. DOI: 10.1016/0006-291x(89)92678-8.

¹²⁰ Staton, C.A.; Kumar, I.; Reed, M.W.R.; Brown, N.J. Neuropilins in physiological and pathological angiogenesis. *J. Pathol.* **2007**, *212*, 237-248. DOI: 10.1002/path.2182.

¹²¹ Reményi, A.; Good, M.C.; Lim, W.A. Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 676-685. DOI: 10.1016/j.sbi.2006.10.008.

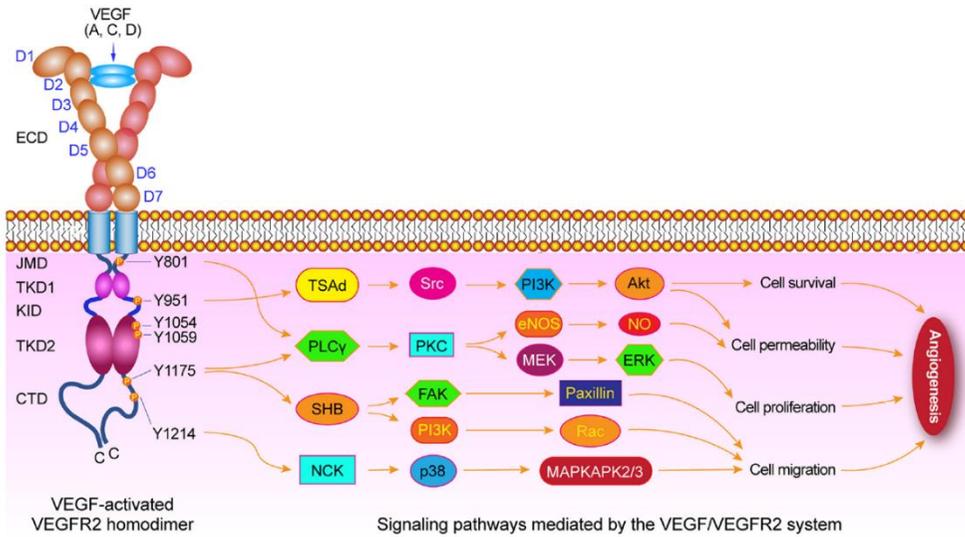


Figura 1.33. Cascada de señalización VEGF-VEGFR-2.¹²²

El receptor VEGFR-2, al igual que sus homólogos VEGFR-1 y VEGFR-3, es un receptor transmembrana conformado por un dominio extracelular que consta de siete subunidades semejantes a inmunoglobulina, un dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana y un dominio intracelular que es el responsable de la actividad quinasa. La dimerización de VEGFR-2 y su unión a VEGF provoca una compleja cascada de señalización celular que inicia o favorece la angiogénesis mediante la supervivencia de las células endoteliales, el aumento de su permeabilidad y su proliferación y la migración a otros tejidos.¹²²

En los procesos cancerosos, la red de vasos sanguíneos que rodea al tumor es caótica e inmadura, lo que facilita la metástasis mediante el desprendimiento de células del tumor, la entrada de éstas en el torrente sanguíneo y su diseminación a otros órganos o tejidos.

¹²² Wang, X.; Bove, A.M.; Simone, G.; Ma, B. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 1-12. DOI: 10.3389/fcell.2020.599281.

La producción de factores proangiogénicos, por acción de las células tumorales, provoca un rápido crecimiento del tumor. Cuando esto ocurre, las células centrales del tumor se encuentran muy alejadas de los vasos sanguíneos y entran en estado de hipoxia, lo que les impide conseguir el oxígeno necesario para su crecimiento. El déficit de oxígeno activa el factor inducible de hipoxia (HIF-1 α , *Hypoxia Induced Factor*), que promueve la expresión de factores proangiogénicos, entre ellos el VEGF.¹²³ Por otro lado, las células cancerosas sobreexpresan en su membrana el receptor VEGFR-2 lo que incrementa la interacción con su ligando VEGF y activa la angiogénesis tumoral.¹²⁴

Debido a que la angiogénesis fisiológica tiene una relevancia relativamente pequeña en adultos, la angiogénesis tumoral se ha convertido en uno de los objetivos de las terapias biológicas.¹²⁵ Aunque serían de esperar efectos secundarios reducidos en los tratamientos antiangiogénicos, se han encontrado casos con afectaciones cardiovasculares en algunos pacientes tratados con fármacos antiangiogénicos.¹²⁶

La aplicación de las terapias antiangiogénicas debería conducir a la detención del crecimiento tumoral, pero en la práctica esta clase de tratamientos sólo son capaces de detener el crecimiento del tumor de manera temporal, no siendo capaces de conseguir su total erradicación.¹²⁷ Por este

¹²³ Ahluwalia, A.; Tarnawski, A.S. Critical Role of Hypoxia Sensor-Hif-1 α in VEGF Gene Activation. Implications for Angiogenesis and Tissue Injury Healing. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 90-97. DOI: 10.2174/092986712803413944.

¹²⁴ Ghalehbandi, S.; Yuzugulen, J.; Pranjol, M.Z.I.; Pourgholami, M.H. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *Eur. J. Pharm.* **2023**, *949*, 175586. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.175586.

¹²⁵ Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **2015**, *438*, 932-936. DOI: 10.1038/nature04478.

¹²⁶ Verheul, H.M.W.; Pinedo, H.M. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 475-485. DOI: 10.1038/nrc2152.

¹²⁷ Casanovas, O.; Hicklin, D.J.; Bergers, G.; Hanahan, D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 299-309. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.09.005.

motivo, los fármacos antiangiogénicos se suelen administrar en combinación con otros que sí son capaces de eliminar las células tumorales.¹²⁸

Una de las estrategias que se siguen para inhibir el proceso angiogénico es la de impedir la unión de la proteína VEGF-A al receptor VEGFR-2, lo que se consigue con el anticuerpo monoclonal bevacizumab (Avastin®). El anticuerpo se une de manera selectiva a VEGF-A y bloquea su unión a VEGFR-2.^{129,130}

Otra alternativa es el empleo de pequeñas moléculas no peptídicas que actúen inhibiendo la acción quinasa del receptor. Este es el modo de acción del sorafenib, sunitinib, pazopanib, axitinib, regorafenib, apatinib, lenvatinib, cabozantinib, tivozanib y fruquintinib, cuyas estructuras y año de aprobación por las agencias reguladoras de los medicamentos se pueden ver en la Figura 1.34. Conviene mencionar que estos compuestos no inhiben únicamente la acción de VEGFR, sino que también muestran acción inhibitoria de muchas otras quinasas.^{131,132}

¹²⁸ Ma, J.; Waxman, D.J. Combination of Anti-angiogenesis with Chemotherapy for More Effective Cancer Treatment. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 3670-3684. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0715.

¹²⁹ Kazazi-Hyseni, F.; Beijnen, J.H.; Schellens, J.H.M. Bevacizumab. *Oncologist.* **2010**, *15*, 819-825. DOI: 10.1634/theoncologist.2009-0317.

¹³⁰ Garcia, J.; Hurwitz, H.I.; Sandler, A.B.; Miles, D.; Coleman, R.L.; Deurloo, R.; Chinot, O.L. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat. Rev.* **2020**, *86*, 102017. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.102017.

¹³¹ Lopes-Coelho, F.; Martins, F.; Pereira, S.A.; Serpa, J. Anti-Angiogenic Therapy: Current Challenges and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*(7), 3765. DOI: 10.3390/ijms22073765.

¹³² Liu, Y.; Li, Y.; Wang, Y.; Lin, C.; Zhang, D.; Chen, J. et al. Recent progress on vascular endothelial growth factor receptor inhibitors with dual targeting capabilities for tumor therapy. *J. Hematol. Oncol.* **2022**, *15*. DOI: 10.1186/s13045-022-01310-7.

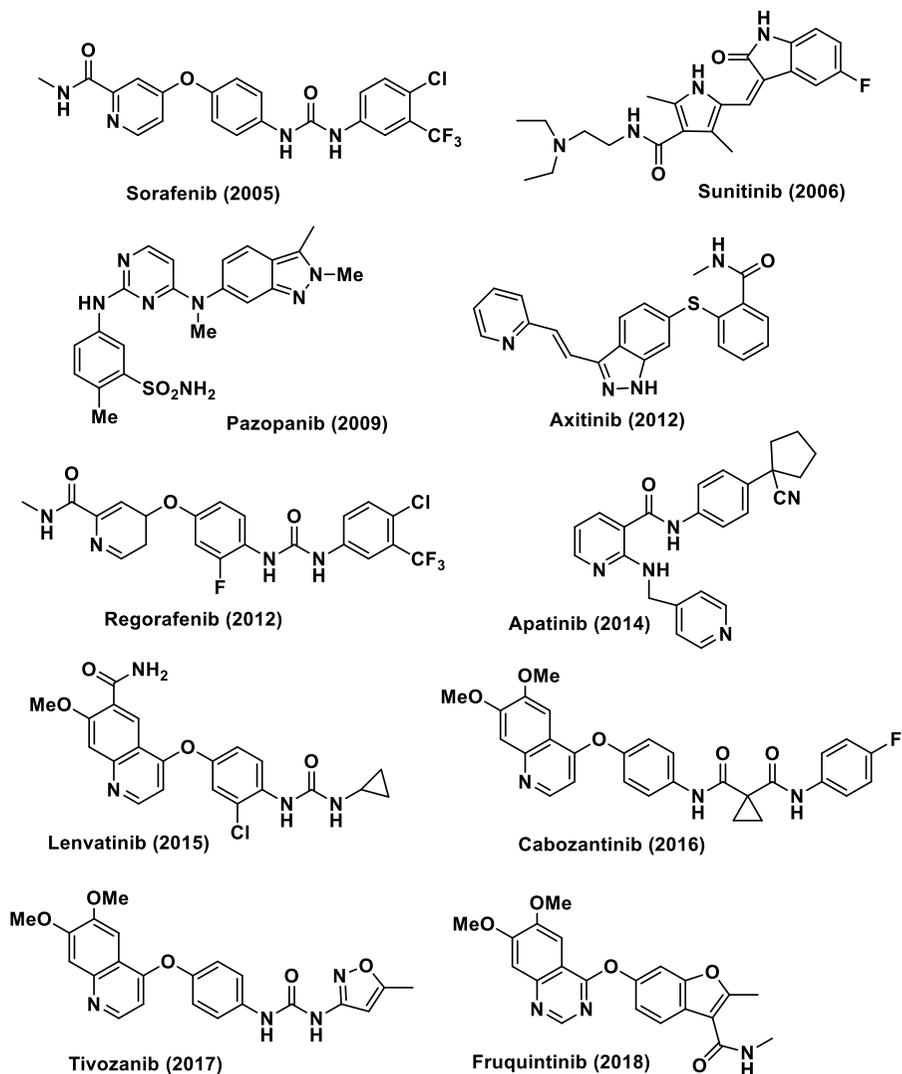


Figura 1.34. Estructura de fármacos inhibidores de VEGFR.

1.3.3. Desarrollo de nanofármacos

Los fármacos clásicos suelen tener una biodisponibilidad baja, pues son degradados con facilidad por el organismo antes de llegar a su sitio de acción. Además, muchos tienen dificultades para superar las diferentes barreras biológicas que se encuentran a lo largo del camino, siendo la barrera

hematoencefálica una de las más complejas de atravesar,¹³³ lo que dificulta en gran medida el acceso de los fármacos al cerebro. Esto explica el desarrollo del concepto de *drug delivery systems*, o de nuevos sistemas que permitan el acceso de los fármacos a su diana. Con estos sistemas se pretenden mejorar las propiedades farmacocinéticas de los fármacos, aumentando su afinidad, su biodisponibilidad y su facilidad para sortear barreras biológicas del organismo. La nanomedicina está enfocada, en gran medida, al diseño y desarrollo de nanosistemas para la liberación controlada de fármacos. Se puede definir un nanofármaco como una biomolécula asociada a una nanopartícula que sirve como vehículo para transportar a aquélla hasta su diana.¹³⁴

Existen multitud de sistemas de transporte para la elaboración de nanofármacos, tales como el encapsulamiento de fármacos en liposomas, el diseño de inmunoconjugados proteína-fármaco o ADN-fármaco, el empleo de virus como vectores, o la conjugación a polímeros.¹³⁵ Uno de los mayores retos a los que se enfrenta la nanomedicina es el de la liberación controlada del fármaco, pues el sistema de transporte elegido debe ser capaz de llegar hasta la diana y una vez allí debe ser capaz de liberar el fármaco. Muchos nanofármacos han sido diseñados de manera que la unión (*linker*) entre el sistema de transporte y el propio fármaco sea escindida como consecuencia de cambios fisiológicos. Por ejemplo, en el caso de los nanofármacos destinados a tratar el cáncer es muy común que el *linker* sea lábil a pH ácido,

¹³³ Yang, R.; Wei, T.; Goldberg, H.; Wang, W.; Cullion, K.; Kohane, D.S. Getting Drugs Across Biological Barriers. *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1606596. DOI: 10.1002/adma.201606596.

¹³⁴ Tiwari, G.; Tiwari, R.; Sriwastawa, B.; Bhati, L.; Pandey, S.; Pandey, P. et al. Drug delivery systems: An updated review. *Int. J. Pharm. Investig.* **2012**, *2*, 2-11. DOI: 10.4103/2230-973X.96920.

¹³⁵ Jubeli, E.; Moine, L.; Vergnaud-Gauduchon, J.; Barratt, G. E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. *J. Controlled Release* **2012**, *158*, 194-206. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.09.084.

que es la condición que se da en el TME, donde el pH es ligeramente más bajo que el fisiológico.¹³⁶

Los nanofármacos anticancerígenos son capaces de acumularse en el tumor aprovechándose del efecto EPR (*Enhance Permeability and Retention Effect*).¹³⁷ Este efecto provoca que las moléculas de tamaño relativamente grande se adentren en la vasculatura del tumor y no puedan eliminarse, por lo que se produce su acumulación. Esto es debido a que, como ya se ha comentado, los nuevos vasos sanguíneos que se forman como consecuencia de la angiogénesis tumoral son caóticos y dejan fenestraciones que permiten la entrada de moléculas grandes, pero impiden su salida. Además, en los tejidos tumorales el drenaje linfático no es efectivo, por lo que estas macromoléculas no son eficientemente eliminadas.¹³⁸ El primer nanofármaco, denominado Doxil[®], fue aprobado por la FDA en 1995. Este nanofármaco, que se utiliza en el tratamiento del cáncer de ovario, está constituido por el quimioterápico clásico doxorubicina encapsulado en liposomas recubiertos por una capa del polímero polietilenglicol (PEG).¹³⁹

En la Figura 1.35 se indica un esquema del efecto EPR,¹⁴⁰ así como la estructura del nanofármaco Doxil[®].

¹³⁶ Apostolova, P.; Pearce, E.L. Lactic acid and lactate: revisiting the physiological roles in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* **2022**, *43*, 969-977. DOI: org/10.1016/j.it.2022.10.005.

¹³⁷ Iyer, A.K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today.* **2006**, *11*, 812-818. DOI: 10.1016/j.drudis.2006.07.005.

¹³⁸ Vicent, M.J.; Duncan, R. Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 39-47. DOI: 10.1016/j.tibtech.2005.11.006.

¹³⁹ Sugiyama, T.; Kumagai, S. Pegylated Liposomal Doxorubicin for Advanced Ovarian Cancer in Women Who are Refractory to Both Platinum- and Paclitaxel-Based Chemotherapy Regimens. *Clin. Med. Ther.* **2009**, *1*, 1227-1236. DOI: 10.4137/CMT.S2219.

¹⁴⁰ Grumezescu, A.M. Multifunctional systems for combined delivery, biosensing and diagnostics, 1a ed **2017**. Elsevier. ISBN: 978-0-323-52725-5

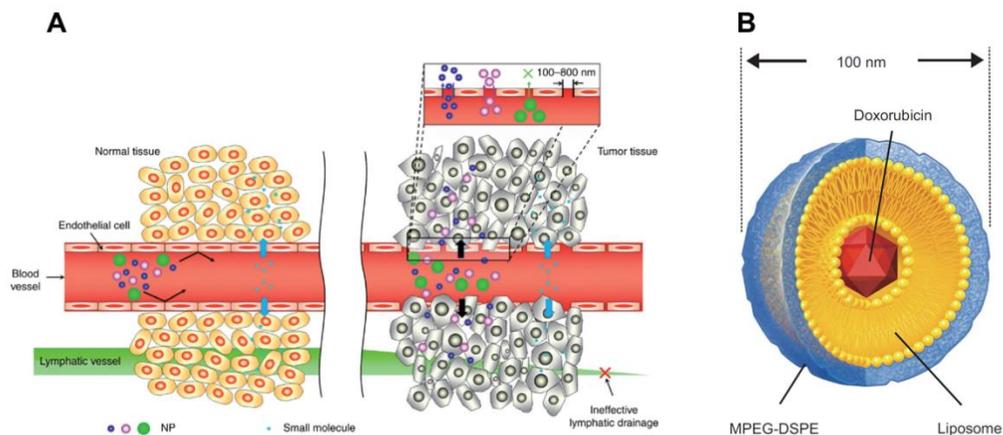


Figura 1.35. (A) Efecto EPR.¹⁴¹ (B) Estructura del Doxil®.¹⁴⁰

Otro sistema de transporte que está en auge es el que emplea nanopartículas de carbono, también conocidas como *Carbon Quantum Dots* (CQDs). De hecho, en este año 2023, los descubridores de los puntos cuánticos (*Quantum Dots*) Mounji G. Bawendi, Louis E. Brus y Alexei I. Ekimov han sido galardonados con el Premio Nobel de Química.¹⁴² Los CQDs son partículas de menos de 10 nm de diámetro que presentan una elevada fluorescencia y que están mostrando una gran aplicabilidad en el ámbito biotecnológico, pues se pueden emplear, además de en la terapia anticáncer,¹⁴³ como biosensores o como sondas fluorescentes.^{144,145}

¹⁴¹ Alasvand, N.; Urbanska, A.M.; Rahmati, M.; Saeidifar, M.; Gungor-Ozkerim, P.S.; Sefat, F. et al. Therapeutic Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Drugs. *Multifunctional systems for combined delivery, biosensing and diagnostics* **2017**, 245-259. DOI: 10.1016/B978-0-323-52725-5.00013-7.

¹⁴² Véase <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2023/press-release/> (consultada el 5 de octubre de 2023).

¹⁴³ Probst, C.E.; Zrazhevskiy, P.; Bagalkot, V.; Gao, X. Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2013**, 65, 703-718. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.036.

¹⁴⁴ Doñate-Buendía, C.; Torres-Mendieta, R.; Pyatenko, A.; Falomir, E.; Fernández-Alonso, M.; Mínguez-Vega, G. Fabrication by Laser Irradiation in a Continuous Flow Jet of Carbon Quantum Dots for Fluorescence Imaging. *ACS Omega* **2018**, 3, 2735-2742. DOI: 10.1021/acsomega.7b02082.

¹⁴⁵ Zhu, C.; Chen, Z.; Gao, S.; Goh, B.L.; Samsudin, I.B.; Lwe, K.W. et al. Recent advances in non-toxic quantum dots and their biomedical applications. *Prog. Nat. Sci.* **2019**, 29, 628-640. DOI: 10.1016/j.pnsc.2019.11.007.

Una forma de preparar estas nanopartículas de carbono es mediante el empleo de una luz láser. El láser permite obtener las nanopartículas a gran escala, sin necesidad prácticamente de purificarlas y bajo un control preciso de los parámetros de producción. Este método de síntesis, denominado *bulk-target*, consiste en hacer incidir la luz láser sobre la muestra de carbono en polvo, la cual se encuentra suspendida en un disolvente.¹⁴⁶ Este disolvente puede variar desde un disolvente orgánico prático, como el etanol, hasta polímeros como el PEG. Al producirse el contacto se forman las nanopartículas agregadas con restos de radicales orgánicos en su superficie, susceptibles de reaccionar químicamente con grupos funcionales del fármaco de interés. De esta manera, se puede establecer un enlace covalente entre el fármaco y el CQD.

En la Figura 1.36 se muestra la obtención de CQDs a partir de carbono en polvo mediante ablación láser.¹⁴⁷

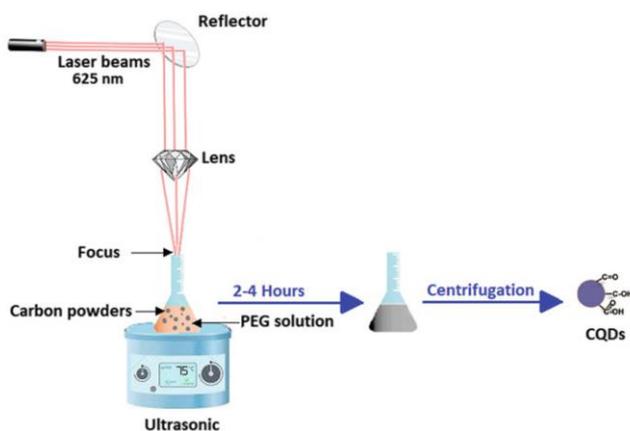


Figura 1.36. Ablación láser para la obtención de CQDs.¹⁴⁸

¹⁴⁶ Li, X.; Wang, H.; Shimizu, Y.; Pyatenko, A.; Kawaguchi, K.; Koshizaki, N. Preparation of carbon quantum dots with tunable photoluminescence by rapid laser passivation in ordinary organic solvents. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 932-934. DOI: 10.1039/c0cc03552a.

¹⁴⁷ Shorgar, N.; Bhati, I.; Jhalora, P. Chapter 4 - Laser ablation synthesis of quantum dots. *Quantum Dots. Fundamentals, Synthesis and Applications.* **2023**, 53-75. DOI: 10.1016/B978-0-12-824153-0.00004-5.

¹⁴⁸ Behboudi, H.; Mehdipour, G.; Safari, N.; Pourmadadi, M.; Saei, A.; Omid, M. et al. Carbon Quantum Dots in Nanobiotechnology. *Nanomaterials for advanced biological applications.* **2019**, 145-179.

1.4. Antecedentes y contexto investigador

Una de las estrategias para el diseño racional de nuevos fármacos es el uso de estructuras de productos naturales que son intrínsecamente activos contra las enfermedades de interés. En el caso de los agentes anticancerígenos, la colchicina,¹⁴⁹ la aminocombretastatina,¹⁵⁰ el resveratrol,¹⁵¹ o análogos derivados de ellos, se han mostrado como posibles candidatos a ser utilizados como agentes contra el cáncer.

En estudios realizados previamente en el grupo de investigación donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral se evaluó la acción biológica anticáncer de derivados de resveratrol, un producto natural obtenido de las raíces del eléboro blanco (*Veratrum grandiflorum*).¹⁵² En la Figura 1.37 se muestran las estructuras tanto del resveratrol como del derivado que mostró unos mejores resultados.

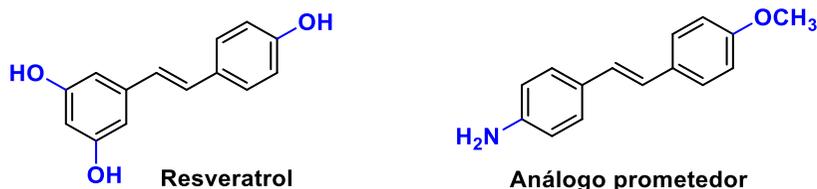


Figura 1.37. Estructura química del resveratrol y de uno de los análogos sintetizados.

¹⁴⁹ Marzo-Mas, A.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J.A. Effects on tubulin polymerization and down-regulation of c-Myc, hTERT and VEGF genes by colchicine haloacetyl and haloaroyl derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 591-600. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.03.019.

¹⁵⁰ Conesa-Milián, L.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Meyen, E.; Liekens, S. et al. Synthesis and biological evaluation of carbamates derived from aminocombretastatin A-4 as vascular disrupting agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *147*, 183-193. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.01.058.

¹⁵¹ Martí-Centelles, R.; Cejudo-Marín, R.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J.A. Inhibition of VEGF expression in cancer cells and endothelial cell differentiation by synthetic stilbene derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3010-3015. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.03.072.

¹⁵² Martí-Centelles, R.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J.A. Inhibitory effect of cytotoxic stilbenes related to resveratrol on the expression of the VEGF, hTERT and c-Myc genes. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 488-496. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.09.014.

La estructura común contiene dos anillos aromáticos separados por un doble enlace de configuración *E*. La diferencia más llamativa del análogo es la presencia del grupo amino que sustituye a los dos grupos hidroxilo en el anillo de tipo catecol.¹⁵²

Por otro lado, una gran variedad de fármacos se caracteriza por contener en sus estructuras fragmentos heterocíclicos aromáticos, entre los que se pueden encontrar los anillos de triazol o tetrazol.¹⁵³ En la Figura 1.38 se muestran las estructuras de algunos fármacos que contienen anillos de triazol o tetrazol.

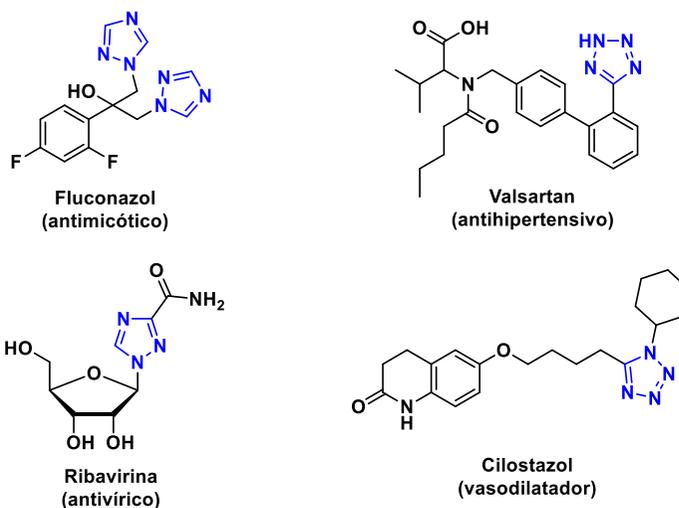


Figura 1.38. Estructura química de fármacos comerciales que contienen anillos de triazol o tetrazol en su estructura.

Con todo ello, en la Figura 1.39 se muestra la propuesta de estructuras generales de los compuestos a sintetizar en la presente Tesis Doctoral, las cuales tienen su origen en la estructura del análogo de resveratrol de la Figura

¹⁵³ Al-Mulla, A. A review: Biological Importance of Heterocyclic Compounds. *Der Pharma Chem.* **2017**, 9, 141-147.

1.38, así como en los estudios *docking* previos realizados en las proteínas PD-L1 y VEGFR-2.¹⁵⁴

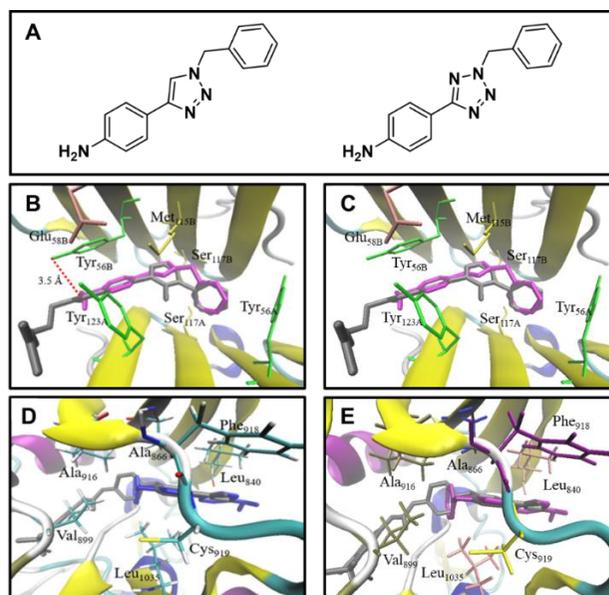


Figura 1.39. (A) Ejemplos de la estructura de los compuestos tipo triazol y tetrazol a sintetizar. (B) Interacciones de la estructura tipo triazol (magenta) con PD-L1 superpuesta con BMS-202 (gris). (C) Interacciones de la estructura tipo tetrazol (magenta) con PD-L1 superpuesta con BMS-202 (gris). (D) Interacciones de la estructura tipo triazol (azul) con VEGFR-2 superpuesta con sorafenib (gris). (E) Interacciones de la estructura tipo tetrazol (magenta) con VEGFR-2 superpuesta con sorafenib (gris).¹⁵⁴

Se ha planteado el uso de anillos de triazol y tetrazol como espaciadores rígidos entre el anillo fenílico y el bencílico en sustitución del enlace de configuración *E* y la inclusión del grupo amino en el anillo fenílico en posiciones relativas *meta* y *para*. El grupo amino aporta versatilidad a la estructura, ya que puede establecer más enlaces de hidrógeno que el grupo hidroxilo y permite, además, posteriores modificaciones químicas mediante su conversión en amidas, aminas secundarias, terciarias, etc.

¹⁵⁴ Pla-López, A.; Castillo, R.; Cejudo-Marín, R.; García-Pedrero, O.; Bakir-Laso, M.; Falomir, E. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Small Molecules as Potential Anticancer Multitarget Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7049. DOI: 10.3390/ijms23137049.

Con respecto a las interacciones con el centro activo de PD-L1 (Figura 1.39 B y D), se observa que las estructuras propuestas se sitúan en la cavidad hidrofóbica formada por los residuos Tyr56, Ser117 y Tyr123 de la cadena A y Tyr56, Met115 y Ser117 de la cadena B. Además, la Tyr56A crea una interacción de tipo apilamiento T con la parte bencílica de las estructuras, mientras que el grupo hidroxilo de Tyr56B crea un enlace de hidrógeno con el grupo amino de las mismas. Por lo que respecta a las interacciones que se establecen en el dominio quinasa de VEGFR-2 (Figura 1.39 C y E), las estructuras se colocan en una posición semejante a la del sorafenib en la zona más hidrofóbica del dominio formado por los residuos Leu740, Ala886, Val899, Phe918 y Leu1035.

CAPÍTULO 2.

OBJETIVOS

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del grupo de investigación donde se ha llevado a cabo esta Tesis Doctoral es el desarrollo de pequeñas moléculas con potencial acción antitumoral a través del bloqueo, preferentemente de manera simultánea, de diversas dianas biológicas implicadas en el mantenimiento del llamado microambiente tumoral. Por ello, los objetivos específicos planteados en esta Tesis son los siguientes:

1) Síntesis, purificación y caracterización de cuatro familias de compuestos basadas en un anillo central de tipo triazol o tetrazol. En la Figura 2.1 se muestran las estructuras químicas generales de estas cuatro familias.

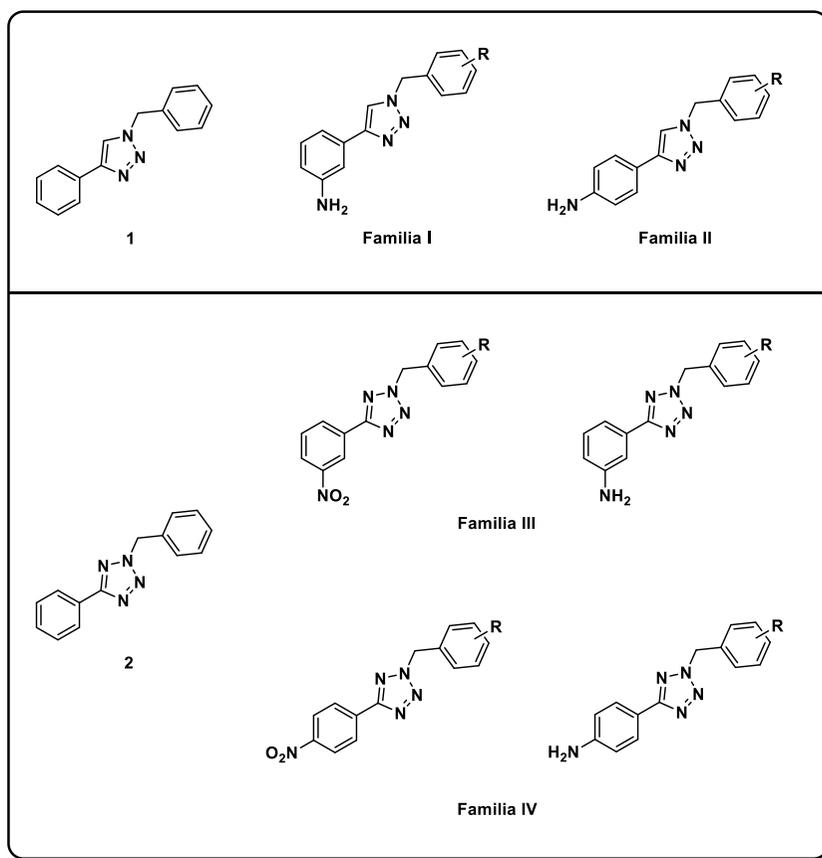


Figura 2.1. Estructuras generales de las cuatro familias de compuestos propuestas como objetivos sintéticos en esta Tesis Doctoral.

Las cuatro familias se caracterizan por la presencia de un grupo amino en el anillo de fenilo que, de acuerdo con lo expuesto en el apartado 1.4 en el capítulo de Introducción, aporta flexibilidad sintética a la estructura. En el caso de las familias **I** y **II**, el espaciador entre el anillo de fenilo y el de bencilo es un anillo de tipo triazol, mientras que en las familias **III** y **IV** el espaciador es de tipo tetrazol. El objetivo preliminar en los compuestos de las familias **III** y **IV** era obtener directamente los aminoderivados por reacción de cicloadición entre los correspondientes aminobenzonitrilos y azida sódica, pero esta reacción nunca funcionó. Por ello, se optó por llevar a cabo la reacción entre los correspondientes nitrobenzonitrilos y azida sódica. Es por ello por lo que las familias **III** y **IV** están compuestas por nitrotetrazoles y por aminotetrazoles. En la parte izquierda de la Figura 2.1 se puede ver la estructura del triazol más simple (compuesto **1**), que no contiene sustituyentes en el anillo de fenilo, y la del tetrazol más simple (compuesto **2**), que tampoco contiene sustituyentes en el anillo de fenilo.

2) Evaluación de la actividad biológica de todas las familias de compuestos sintetizadas. En este apartado se evaluará la:

- Viabilidad celular frente a distintas líneas celulares.
- Interacción con proteínas relacionadas con el proceso tumoral, como PD-L1, CD-47, IL-6, TNF- α , c-Myc y VEGFR-2.
- Capacidad inmunomoduladora en unas condiciones similares a las del microambiente tumoral.
- Actividad antiangiogénica y antivascolar.
- Promoción del proceso de apoptosis.

CAPÍTULO 3.
SÍNTESIS DE DERIVADOS TIPO
TRIAZOL Y TETRAZOL

CAPÍTULO 3. SÍNTESIS DE DERIVADOS TIPO TRIAZOL Y TETRAZOL

En este capítulo se describen las rutas sintéticas seguidas para obtener los compuestos de las cuatro familias objetivo. Como se ha apuntado anteriormente, la estructura principal de todos los compuestos se basa en un anillo central de tipo triazol o tetrazol.

En primer lugar, se sintetizaron los dos compuestos más simples de tipo triazol y tetrazol (véase la Figura 3.1).

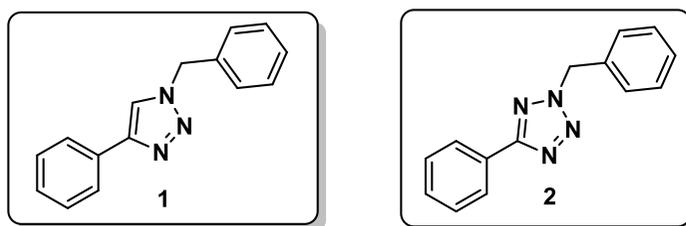
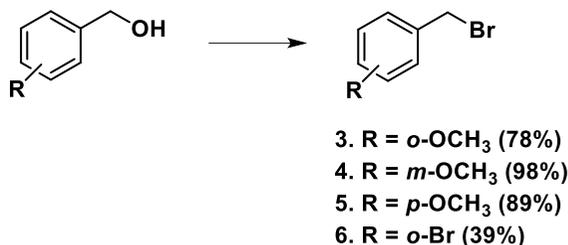


Figura 3.1. Estructura de los compuestos 1 y 2.

3.1. Síntesis de los compuestos tipo triazol (compuesto 1 y familias I y II)

Para la obtención de los compuestos de tipo triazol se hizo necesario, en primer lugar, obtener los bromuros de bencilo **3-6** que se muestran en el Esquema 3.1. Estos compuestos se sintetizaron a partir de los correspondientes alcoholes bencílicos mediante reacción con PBr_3 en CH_2Cl_2 durante 2 horas a temperatura ambiente (véase el Esquema 3.1).¹⁵⁵

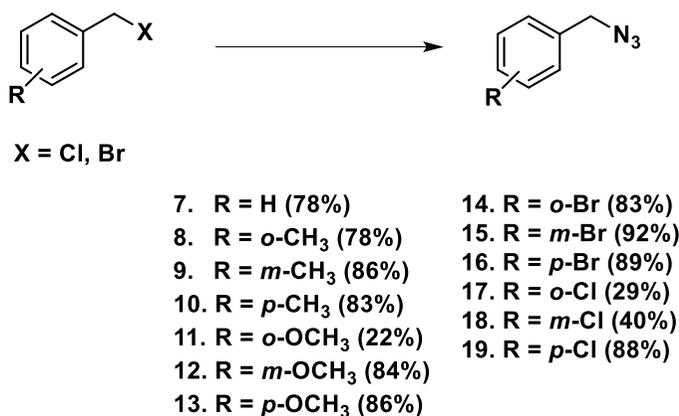
¹⁵⁵ Firdaus, M., Marliyana, S.D., Razak, M.F. Initial study on the synthesis of 1-(4'-isopropilbenzil)-1,10-phenantrolium bromide from cuminy alcohol, a potent antimalarial. *A/P Conf. Proc.* **2020**, 2237. DOI: 10.1063/5.0005341.



Esquema 3.1. Reactivos y condiciones: PBr₃, CH₂Cl₂, t.a., 2h.

Sólo se tuvo que llevar a cabo la síntesis de los bromuros de bencilo **3-6** porque el resto de haluros de bencilo, necesarios para las siguientes reacciones, eran comercialmente accesibles.

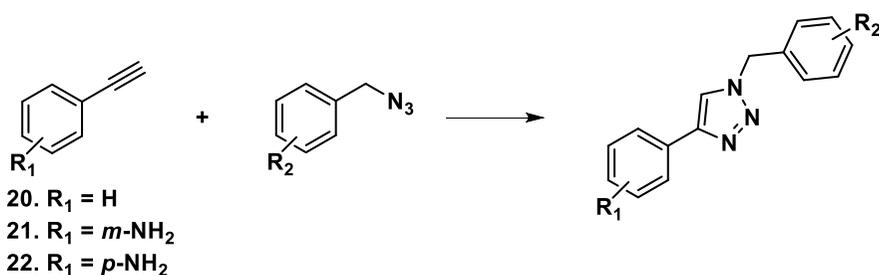
El siguiente paso en el esquema de síntesis fue la conversión de los haluros de bencilo en las correspondientes azidas de bencilo. Este proceso se llevó a cabo mediante reacción tipo S_N² entre los respectivos halogenuros de bencilo y azida sódica en una mezcla acetona:agua (4:1; v/v) a temperatura ambiente durante 24 horas.¹⁵⁶ En el Esquema 3.2 se indican las estructuras de las azidas de bencilo **7-19** sintetizadas.



Esquema 3.2. Reactivos y condiciones: NaN₃, acetona:agua (4:1; v/v), t.a., 24h.

¹⁵⁶ Campbell-Verduyn, L. et al. Copper-free "click": 1,3-dipolar cycloaddition of azides and arynes. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 3461-3463. DOI: 10.1039/b812403e.

Una vez obtenidas las azidas **7-19**, éstas se hicieron reaccionar juntamente con los alquinos **20-22**, comercialmente accesibles, mediante una reacción de cicloadición 1,3-dipolar tipo *Click*.^{157,158} Para llevar a cabo este proceso, las azidas de bencilo, disueltas en una mezcla DMF:agua (9:1; v/v), se hicieron reaccionar con los correspondientes alquinos en presencia de CuSO₄·5H₂O y de ascorbato sódico. De esta manera, y tal y como se muestra en el Esquema 3.3, se obtuvo el compuesto **1** y los derivados de las familias I (I.1-I.13) y II (II.1-II.13).



1. R₁ = H; R₂ = H (35%)

I.1. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = H (20%)

I.2. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = *o*-CH₃ (63%)

I.3. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = *m*-CH₃ (62%)

I.4. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = *p*-CH₃ (76%)

I.5. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = *o*-OCH₃ (55%)

I.6. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = *m*-OCH₃ (59%)

I.7. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = *p*-OCH₃ (69%)

I.8. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = *o*-Br (38%)

I.9. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = *m*-Br (65%)

I.10. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = *p*-Br (17%)

I.11. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = *o*-Cl (42%)

I.12. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = *m*-Cl (78%)

I.13. R₁ = *m*-NH₂; R₂ = *p*-Cl (20%)

II.1. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = H (34%)

II.2. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = *o*-CH₃ (25%)

II.3. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = *m*-CH₃ (42%)

II.4. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = *p*-CH₃ (58%)

II.5. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = *o*-OCH₃ (52%)

II.6. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = *m*-OCH₃ (17%)

II.7. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = *p*-OCH₃ (38%)

II.8. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = *o*-Br (52%)

II.9. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = *m*-Br (73%)

II.10. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = *p*-Br (88%)

II.11. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = *o*-Cl (39%)

II.12. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = *m*-Cl (39%)

II.13. R₁ = *p*-NH₂; R₂ = *p*-Cl (72%)

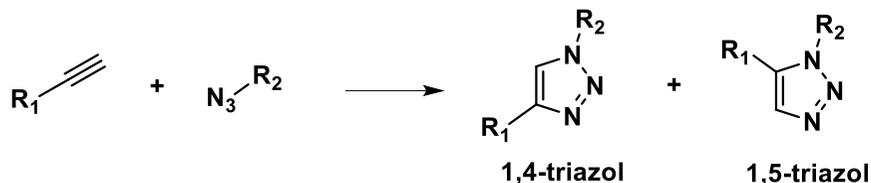
Esquema 3.3. Reactivos y condiciones: DMF:agua (9:1; v/v), CuSO₄·5H₂O, ascorbato sódico, 60°C, 4h.

¹⁵⁷ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599. DOI: 10.1002/1521-3773(20020715)41.

¹⁵⁸ Las reacciones *click* desarrolladas por K. B. Sharpless fueron galardonadas con el Premio Nobel de Química en el año 2022, compartido con C. Bertozzi y M. Meldal. Para la lectura del Premio Nobel concedido a K. B. Sharpless véase:

<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/sharpless/lecture/> (consultada el 5 de octubre de 2023).

Cabe destacar que la reacción entre una azida y un alquino puede dar lugar a dos triazoles regioisoméricos: el 1,4-triazol y el 1,5-triazol (véase el Esquema 3.4).



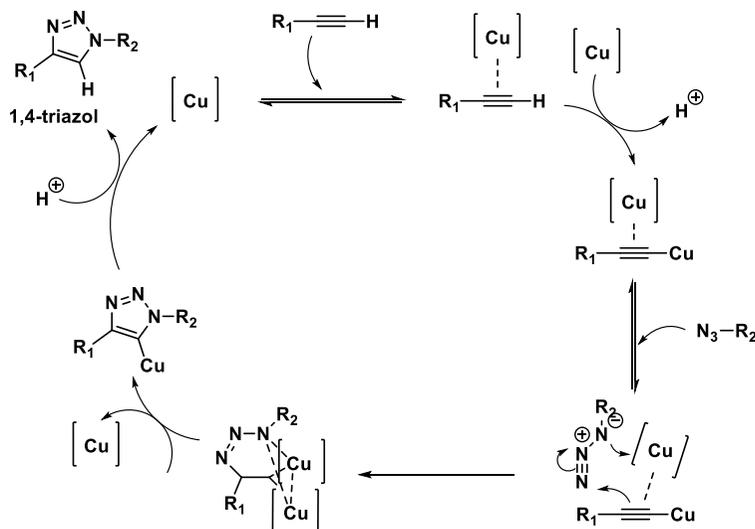
Esquema 3.4. Formación de los dos triazoles regioisoméricos.

La formación de uno u otro regioisómero depende del catalizador que se emplee en la reacción. Si se usa un catalizador de Ru, se obtendrá el regioisómero 1,5. En cambio, para obtener el regioisómero 1,4, se debe optar por un catalizador de Cu (I).¹⁵⁹

En el Esquema 3.5 se muestra el mecanismo de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar tipo *Click*.¹⁶⁰ El catalizador de Cu(I) se genera *in situ* por reducción de la sal de Cu(II) con ascorbato sódico.¹⁵⁷ El Cu(I) forma un acetiluro de cobre mediante un enlace tipo σ C-Cu. Éste se coordina a través de un enlace tipo π con la azida, formándose así un anillo de seis miembros que contiene un átomo de Cu. Un segundo átomo de Cu estabiliza este anillo actuando como ligando dador. Posteriormente, el átomo de Cu queda expulsado del ciclo, produciéndose una reducción a un anillo de cinco miembros. Finalmente, se produce una protonólisis que libera el 1,4-triazol y regenera el catalizador de Cu (I).

¹⁵⁹ Singh, M.S., Chowdhury, S., Koley, S. Advances of azide-alkyne cycloaddition-click chemistry over the recent decade. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 5257-5283. DOI: 10.1016/j.tet.2016.07.044.

¹⁶⁰ Worell, B.T., Malik, J.A., Fokin, V.V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science* **2013**, *340*, 457-460. DOI: 10.1126/science.1229506.

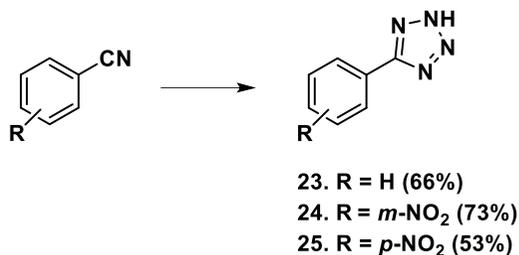


Esquema 3.5. Mecanismo de la reacción *Click*.

3.2. Síntesis de los compuestos tipo tetrazol (compuesto 2 y familias III y IV)

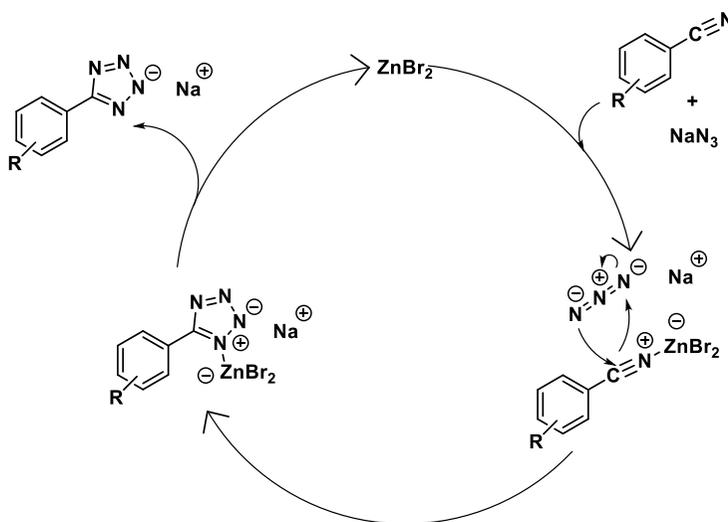
Para la obtención de estos derivados se requirió, en primer lugar, de la preparación de los aril-tetrazoles **23-25**. La reacción de cicloadición entre el correspondiente benzonitrilo y la azida sódica se llevó a cabo en una mezcla *i*-PrOH:agua (1:2, v/v) en presencia de $ZnBr_2$ como catalizador durante 24 horas a $100^\circ C$. El producto de esta reacción es el fenil-tetrazolato, que se convierte en el fenil-tetrazol mediante adición de una disolución acuosa de ácido cítrico al 10% (véase el Esquema 3.6).

Los intentos de obtención de los aminofenil-tetrazoles, por cicloadición entre la azida sódica y los correspondientes aminobenzonitrilos, fueron infructuosos y en ningún caso proporcionaron los productos esperados, obteniéndose en su lugar compuestos de tipo polimérico. Por ello, se optó por realizar las reacciones de cicloadición de la azida sódica con los correspondientes nitrobenzonitrilos, lo que permitió la obtención de los nitrofenil-tetrazoles **24** y **25** (véase el Esquema 3.6).



Esquema 3.6. Reactivos y condiciones: NaN₃, ZnBr₂, *i*-PrOH:agua (1:2, v/v), 100°C, 24 h; luego ácido cítrico acuoso al 10%.

El mecanismo de estas reacciones de cicloadición se muestra en el Esquema 3.7.¹⁶¹ El ZnBr₂ juega un papel fundamental al acelerar la reacción por coordinación con el átomo de nitrógeno del grupo nitrilo.¹⁶² La cicloadición 1,3-dipolar entre el nitrilo activado y el anión azida forma el anillo de tetrazolato coordinado al ZnBr₂. La posterior eliminación del ZnBr₂ forma el tetrazolato sódico y regenera el catalizador, que inicia un nuevo ciclo catalítico.

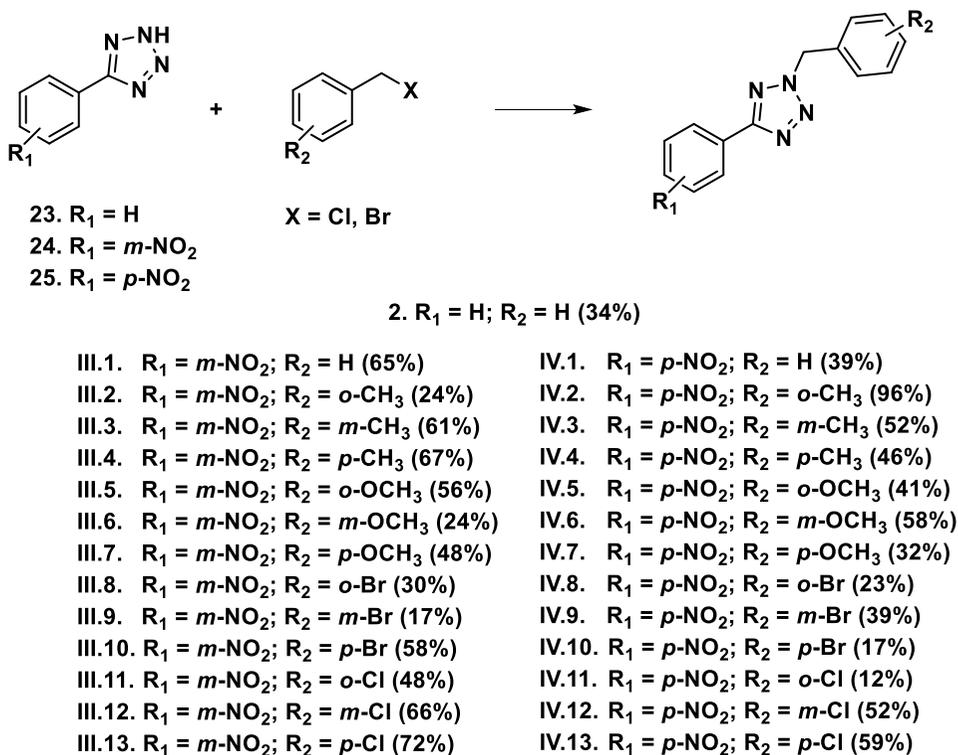


Esquema 3.7. Mecanismo para la formación de tetrazoles.

¹⁶¹ Roh, J., Vávrová, K.; Hrabálek, A. Synthesis and Functionalization of 5-Substituted Tetrazoles. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 6101-6118. DOI: 10.1002/ejoc.201200469.

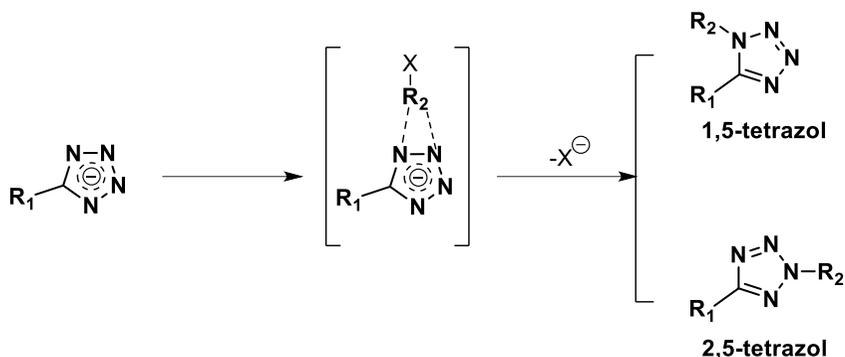
¹⁶² Akhlaghini, B.; Rezazadeh, S. A Novel Approach for the Synthesis of 5-Substituted-1*H*-tetrazoles. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, 23, 2197-2203. DOI: 10.1590/S0103-50532013005000005.

Los tetrazoles **23-25** se hicieron reaccionar con los correspondientes halogenuros de bencilo mediante una reacción de *N*-alquilación tipo S_N^2 (véase el Esquema 3.8). Para ello, se empleó acetonitrilo como disolvente, NaH como base para desprotonar el tetrazol y NaI en cantidades catalíticas. La reacción se calentó a 60°C durante 24 horas y permitió la obtención del compuesto **2** y los derivados de las familias III (III.1-III.13) y IV (IV.1-IV.13).



Esquema 3.8. Reactivos y condiciones: NaH, ACN, NaI (cat.), 60°C, 24h.

De nuevo, y como en el caso de los triazoles, existe un posible problema de regioisomería. Como se aprecia en el Esquema 3.9, la deslocalización de carga negativa que se puede producir por el anillo de tetrazol podría originar los regioisómeros 1,5 y 2,5.¹⁶¹



Esquema 3.9. Formación de los dos posibles tetrazoles regioisoméricos.

Existen diversas variables de las cuales depende la proporción de regioisómeros: disolvente empleado, temperatura de reacción, tamaño del sustituyente, etc. Como en los espectros obtenidos sólo se apreciaba la formación de un único compuesto, se realizó una cristalografía de rayos X de uno de los compuestos, en este caso del derivado **III.4**. Tal y como se aprecia en la Figura 3.2, la técnica reveló la obtención del regioisómero 2,5. La explicación más plausible a este hecho sería el impedimento estérico que se produciría en la eventual formación del regioisómero 1,5. También se deben tener en cuenta cuestiones electrónicas, ya que el anillo de fenilo se coloca en posición coplanar al anillo de tetrazol, tratando así de alcanzar la máxima superposición orbital, lo que provoca el bloqueo estérico de la posición contigua y, por tanto, la formación del regioisómero 2,5.

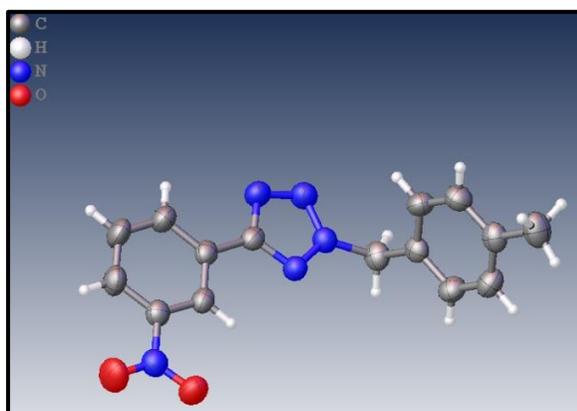
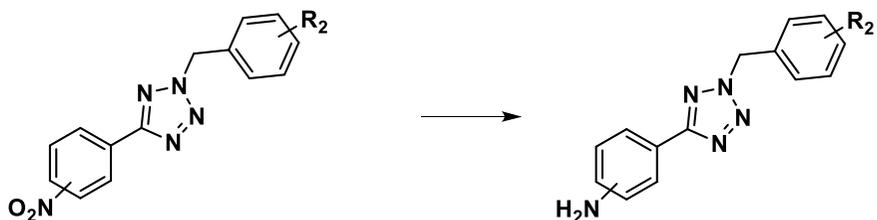


Figura 3.2. Cristalografía de rayos X del compuesto **III.4**.

Por último, se llevó a cabo la reducción del grupo nitro a grupo amino empleando como reductor Zn en polvo y AcOH glacial como disolvente y dador de protones (véase el Esquema 3.10).¹⁰⁵ La reacción se dejó en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente, lo que permitió la obtención de los aminotetrazoles pertenecientes a las familias III (III.14-III.26) y IV (IV.14-IV.26).



- III.14. *m*-NH₂; R₂ = H (77%)
- III.15. *m*-NH₂; R₂ = *o*-CH₃ (76%)
- III.16. *m*-NH₂; R₂ = *m*-CH₃ (76%)
- III.17. *m*-NH₂; R₂ = *p*-CH₃ (76%)
- III.18. *m*-NH₂; R₂ = *o*-OCH₃ (65%)
- III.19. *m*-NH₂; R₂ = *m*-OCH₃ (53%)
- III.20. *m*-NH₂; R₂ = *p*-OCH₃ (65%)
- III.21. *m*-NH₂; R₂ = *o*-Br (72%)
- III.22. *m*-NH₂; R₂ = *m*-Br (62%)
- III.23. *m*-NH₂; R₂ = *p*-Br (78%)
- III.24. *m*-NH₂; R₂ = *o*-Cl (80%)
- III.25. *m*-NH₂; R₂ = *m*-Cl (78%)
- III.26. *m*-NH₂; R₂ = *p*-Cl (76%)

- IV.14. *p*-NH₂; R₂ = H (71%)
- IV.15. *p*-NH₂; R₂ = *o*-CH₃ (93%)
- IV.16. *p*-NH₂; R₂ = *m*-CH₃ (46%)
- IV.17. *p*-NH₂; R₂ = *p*-CH₃ (63%)
- IV.18. *p*-NH₂; R₂ = *o*-OCH₃ (58%)
- IV.19. *p*-NH₂; R₂ = *m*-OCH₃ (82%)
- IV.20. *p*-NH₂; R₂ = *p*-OCH₃ (62%)
- IV.21. *p*-NH₂; R₂ = *o*-Br (86%)
- IV.22. *p*-NH₂; R₂ = *m*-Br (41%)
- IV.23. *p*-NH₂; R₂ = *p*-Br (59%)
- IV.24. *p*-NH₂; R₂ = *o*-Cl (48%)
- IV.25. *p*-NH₂; R₂ = *m*-Cl (93%)
- IV.26. *p*-NH₂; R₂ = *p*-Cl (75%)

Esquema 3.10. Reactivos y condiciones: Zn, AcOH glacial, oscuridad, t.a., 1 h.

3.3. Sección experimental

3.3.1. Técnicas generales

Todos los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) han sido obtenidos haciendo uso de los espectrómetros Bruker Avance III HD de 300 y 400 MHz. La frecuencia de operación aproximada es, respectivamente, de 300 y 400 MHz para el ^1H y de 75 y 100 MHz para el ^{13}C . Para la disolución de los productos se han utilizado diferentes disolventes deuterados en función de su disponibilidad y de la solubilidad de los propios productos. Concretamente se han utilizado: CDCl_3 , MeOD, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ y $\text{DMSO}-d_6$. Los desplazamientos químicos (δ) se encuentran expresados en ppm tras referenciar los picos característicos del disolvente utilizado. De esta manera, las referencias son $\delta = 7.27$ ppm para ^1H y $\delta = 77.0$ ppm para ^{13}C en el caso del CDCl_3 ; $\delta = 3.31$ ppm para ^1H y $\delta = 49.0$ ppm para ^{13}C en el caso del MeOD; $\delta = 2.05$ ppm para ^1H y $\delta = 29.8$ ppm para ^{13}C en el caso del $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$; y $\delta = 2.50$ ppm para ^1H y $\delta = 39.5$ ppm para ^{13}C en el caso del $\text{DMSO}-d_6$. La multiplicidad para los espectros de ^1H se ha expresado como: “s” para un singlete, “d” para un doblete, “t” para un triplete, “c” para un cuadruplete y “m” para un multiplete. Además, en algunos se ha utilizado los términos “ancho” para indicar señales características del grupo NH_2 y “aparente” para determinar una multiplicidad similar a los anteriores términos. En cuanto a las medidas de espectroscopia infrarroja (IR) se han utilizado placas de KBr empleando el espectrómetro Jasco FT/IR-6200 o el Agilent Cary 630 FTIR. En este caso sólo se indican las señales características de los enlaces presentes en las moléculas. Por lo que respecta a las medidas de espectrometría de masas (MS) se ha utilizado un espectrómetro de masas Q-TOF (Waters, Manchester, UK) con fuente de ionización ESI y APCI y diseño Z-spray (voltaje capilar de 3.5 kV aplicado en sentido positivo y voltaje de cono de 20 V). Se indica el valor correspondiente al pico molecular. La totalidad de estos equipos se encuentran localizados en los Servicios

Centrales de Instrumentación Científica de la UJI. Los puntos de fusión han sido determinados empleando el equipo Digital SMP10, Stuart Cientific.

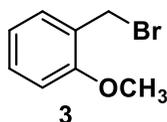
Para la cromatografía de capa fina se han utilizado placas de gel de sílice Merck 5554. Los crudos de reacción impuros se purificaron mediante columna de cromatografía sobre gel de sílice.

Los reactivos utilizados en las reacciones han sido adquiridos de proveedores tales como Aldrich, Merck o Scharlab.

3.3.2. Procedimiento general para la formación de los bromuros de bencilo 3-6

A una disolución del correspondiente alcohol bencílico (10 mmol, 1eq.) en CH_2Cl_2 (15 mL) se le añadió gota a gota PBr_3 (1 eq.) manteniendo el sistema a 0°C . A continuación, se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego la reacción se vertió sobre una disolución saturada de NaHCO_3 (20 mL) y se extrajo la fase acuosa con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. Finalmente, el disolvente se evaporó en el rotavapor. Aquellos residuos que precisaron de purificación se cromatografiaron sobre gel de sílice empleando como fase móvil hexano:AcOEt (95:5).

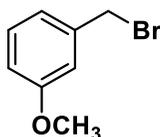
1-(Bromometil)-2-metoxibenceno (3)



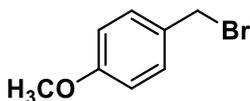
Rendimiento = 78 %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.36-7.28 (m, 2H), 6.94 (td, J = 8, 1 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 3.91 (s, 3H) ppm.

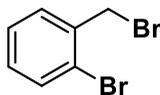
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 157.3 (C), 130.8 (CH), 130.1 (CH), 126.0 (C), 120.5 (CH), 110.8 (CH), 55.5 (CH_2), 28.9 (CH_3) ppm.

1-(Bromometil)-3-metoxibenceno (4)

4

Rendimiento = 98 %.**RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.34 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.07 (d aparente, J = 8 Hz, 1H), 7.04 (t, J = 4 Hz, 1H), 6.94 (ddd, J = 8, 3, 1 Hz, 1H), 4.54 (s, 2H), 3.85 (s, 3H) ppm.**RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃) δ = 159.6 (C), 139.0 (C), 130.0 (CH), 121.1 (CH), 114.3 (CH), 114.0 (CH), 55.0 (CH₂), 33.5 (CH₃) ppm.**1-(Bromometil)-4-metoxibenceno (5)**

5

Rendimiento = 89 %.**RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.38 (d, J = 8 Hz, 2H), 6.93 (dd, J = 12 Hz, 2H), 4.56 (s, 2H), 3.82 (s, 3H) ppm.**RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃) δ = 159.9 (C), 130.3 (C), 129.7 (CH), 114.0 (CH), 55.1 (CH₂), 34.0 (CH₃) ppm.**1-Bromo-2-(bromometil)benceno (6)**

6

Rendimiento = 39 %.

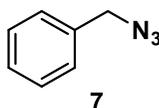
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.44 (dd, J = 8, 1 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 8, 2 Hz, 1H), 7.16 (td, J = 8, 1 Hz, 1H), 7.03 (td, J = 8, 2 Hz, 1H), 4.46 (s, 2H) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 137.1 (C), 133.4 (CH), 131.3 (CH), 130.2 (C), 128.0 (CH), 124.5 (CH), 33.5 (CH₂) ppm.

3.3.3. Procedimiento general para la formación de las azidas de bencilo 7-19

A una disolución de NaN₃ (15 mmol, 1.5 eq.) en una mezcla acetona:agua (4:1 v/v, 50 mL) se le añadió el correspondiente halogenuro de bencilo (10 mmol, 1 eq.) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 10 mL de CH₂Cl₂ y se vertió la reacción sobre salmuera (15 mL). La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ y las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se filtraron. Finalmente, el disolvente se evaporó en el rotavapor. Aquellos residuos que precisaron de purificación se cromatografiaron sobre gel de sílice empleando como fase móvil hexano.

(Azidometil)benceno (7)

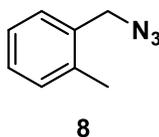


Rendimiento = 78 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.58-7.24 (m, 5H), 4.31 (s, 2H) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 135.6 (C), 128.8 (CH), 128.2 (CH), 128.2 (CH), 54.7 (CH₂) ppm.

1-(Azidometil)-2-metilbenceno (8)

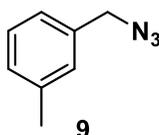


Rendimiento = 78 %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.45-7.39 (m, 4H), 4.46 (s, 2H), 2.53 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 136.8 (C), 133.6 (C), 130.7 (CH), 129.3 (CH), 128.6 (CH), 126.3 (CH), 53.0 (CH), 18.9 (CH_3) ppm.

1-(Azidometil)-3-metilbenceno (9)

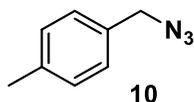


Rendimiento = 86 %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.42 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.27-7.25 (m, 3H), 4.4 (s, 2H), 2.52 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 138.8 (C), 135.7 (C), 129.3 (CH), 129.2 (CH), 129.0 (CH), 125.6 (CH), 55.0 (CH_2), 21.6 (CH_3) ppm.

1-(Azidometil)-4-metilbenceno (10)

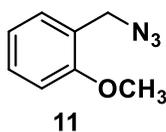


Rendimiento = 83 %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.35 (m, 4H), 4.39 (s, 2H), 2.51 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 137.9 (C), 132.3 (C), 129.3 (CH), 128.1 (CH), 54.3 (CH_2), 20.9 (CH_3) ppm.

1-(Azidometil)-2-metoxibenceno (11)

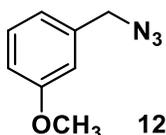


Rendimiento = 22 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.21 (td, J = 8, 2 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 8, 2 Hz, 1H), 6.84 (td, J = 8, 4 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 8 Hz, 1H), 4.25 (s, 2H), 3.74 (s, 3H) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 157.5 (C), 130.0 (CH), 129.6 (CH), 123.7 (C), 120.5 (CH), 110.4 (CH), 55.3 (CH₃), 49.8 (CH₂) ppm.

1-(Azidometil)-3-metoxibenceno (12)

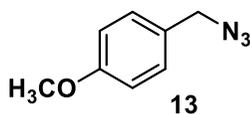


Rendimiento = 84 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.16 (td, J = 8, 4 Hz, 1H), 6.78-6.74 (m, 3H), 4.15 (s, 2H), 3.65 (s, 3H) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 159.7 (C), 136.6 (C), 129.6 (CH), 120.1 (CH), 113.6 (CH), 113.4 (CH), 54.7 (CH₃), 54.5 (CH₂) ppm.

1-(Azidometil)-4-metoxibenceno (13)



Rendimiento = 86 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.12 (d, J = 8 Hz, 2H), 6.79 (d, J = 8 Hz, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.67 (s, 3H) ppm.

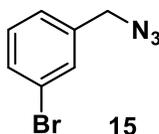
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 159.2 (C), 129.3 (CH), 126.9 (C), 113.6 (CH), 54.8 (CH₂), 53.9 (CH₃) ppm.

1-(Azidometil)-2-bromobenceno (14)

Rendimiento = 83 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.43 (dd, J = 8, 1 Hz, 1H), 7.19 (dtd, J = 9, 8, 2 Hz, 2H), 7.02 (td, J = 8, 2 Hz, 1H), 4.31 (s, 2H) ppm.

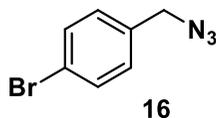
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 134.9 (C), 132.9 (C), 129.9 (CH), 129.7 (CH), 127.7 (CH), 123.6 (CH), 54.5 (CH₂) ppm.

1-(Azidometil)-3-bromobenceno (15)

Rendimiento = 92 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.41-6.89 (m, 4H), 4.22 (s, 2H) ppm.

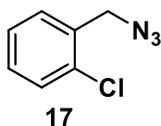
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 137.8 (C), 131.4 (C), 131.1 (CH), 130.5 (CH), 126.7 (CH), 122.9 (CH), 54.0 (CH₂) ppm.

1-(Azidometil)-4-bromobenceno (16)

Rendimiento = 89 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.33 (dt, J = 8, 2 Hz, 2H), 7.01 (d, J = 4 Hz, 2H), 4.21 (s, 2H) ppm.

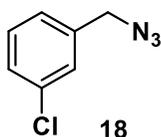
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 134.3 (C), 131.8 (C), 129.7 (CH), 122.1 (CH), 53.9 (CH₂) ppm.

1-(Azidometil)-2-clorobenceno (17)

Rendimiento = 29 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.32-7.26 (m, 2H), 7.20-7.14 (m, 2H), 4.37 (s, 2H) ppm.

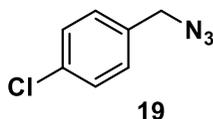
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 133.7 (C), 133.3 (C), 129.8 (CH), 129.6 (CH), 129.5 (CH), 127.0 (CH), 52.2 (CH₂) ppm.

1-(Azidometil)-3-clorobenceno (18)

Rendimiento = 40 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.24-7.19 (m, 3H), 7.13-7.07 (m, 1H), 4.22 (s, 2H) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 137.3 (C), 134.7 (C), 129.8 (CH), 128.2 (CH), 128.0 (CH), 126.1 (CH), 54.0 (CH₂) ppm.

1-(Azidometil)-4-clorobenceno (19)

Rendimiento = 88 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.23 (d, J = 8 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 8 Hz, 2H), 4.21 (s, 2H) ppm.

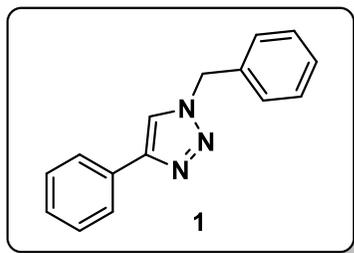
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ = 134.5 (C), 134.2 (C), 129.8 (CH), 129.3 (CH), 54.3 (CH₂) ppm.

3.3.4. Procedimiento general para la formación de los triazoles (compuesto 1 y familias I y II) mediante reacción tipo *Click*

A una disolución de la correspondiente azida de bencilo (3 mmol, 1.2 eq.) en una mezcla DMF:agua (9:1 v/v, 25 mL) se le añadió, secuencialmente, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.1 mmol, 0.1 eq.) y ascorbato sódico (0.13 mmol, 0.1 eq.) disueltos en la mínima cantidad de agua posible. A continuación, se añadió el correspondiente alquino (2.5 mmol, 1 eq.) y se dejó la reacción en agitación a 60°C durante 4 horas. Luego, la reacción se vertió sobre AcOEt (20 mL) y se añadió salmuera (10 mL) y la fase acuosa se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se filtraron. Tras evaporar el disolvente en el rotavapor, el residuo restante se sometió a un proceso de purificación mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando como fase móvil hexano:AcOEt (1:1).

3.3.5. Datos físicos y espectroscópicos de los triazoles (compuesto 1 y familias I y II)

1-Bencil-4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol (1)



Rendimiento = 35 %.

Punto de fusión = 127-129°C (sólido blanco).

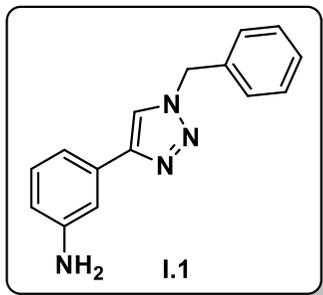
IR ν_{max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 7.80 (dd, $J=6, 3$ Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.44-7.27 (m, 8H), 5.58 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 148.8 (C), 135.2 (C), 131.1 (C), 129.7 (CH), 129.4 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 126.3 (CH), 120.0 (CH), 54.8 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 236.1188 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3$: 236.1182.

3-(1-Bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.1)



Rendimiento = 20 %.

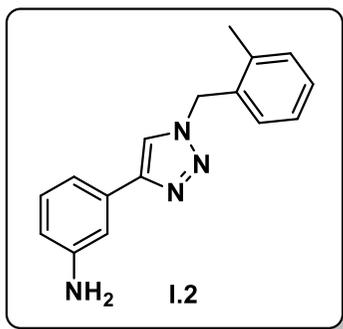
Punto de fusión = 144-146°C (sólido anaranjado).

IR ν_{max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.45 (s, 1H), 7.42-7.32 (m, 5H), 7.11 (t aparente, 1H), 7.06 (t, J = 8.0, 1H), 6.95 (dt, $J=7.6$, 1 Hz, 1H), 6.53 (ddd, $J=8$, 2.4, 1.2 Hz, 1H) 5.62 (s, 2H), 5.14 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 149.0 (C), 147.3 (C), 136.1 (C), 131.1 (C), 129.3 (CH), 128.7 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (CH), 121.0 (CH), 113.6 (CH), 113.0 (CH), 110.5 (s), 52.9 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 251.1291 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4$: 251.1297.

3-(1-(2-Metilbencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.2)

Rendimiento = 63 %.

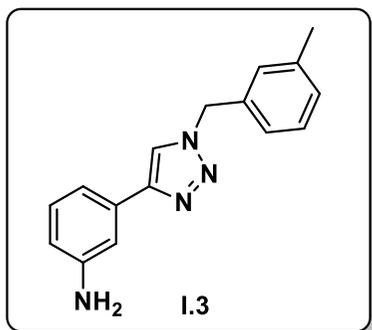
Punto de fusión = 132-134°C (sólido marrón oscuro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 8.33 (s, 1H), 7.28-7.18 (m, 3H), 7.13-7.08 (m, 2H), 7.05 (t aparente, 1H), 6.96 (t, $J=8$ Hz, 1H), 6.93 (dt, $J=7.6$, 1 Hz, 1H), 6.52 (ddd, $J=8, 2.4, 1.2$ Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 2.34 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 149.0 (C), 147.2 (C), 136.2 (C), 134.2 (C), 131.1 (C), 130.4 (CH), 129.3 (CH), 128.6 (CH), 128.3 (CH), 126.3 (CH), 121.0 (CH), 113.6 (CH), 113.0 (CH), 110.5 (CH), 51.0 (CH_2), 18.6 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 265.1447 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4$: 265.1453.

3-(1-(3-Metilbencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.3)

Rendimiento = 62 %.

Punto de fusión = 107-109°C (sólido marrón claro).

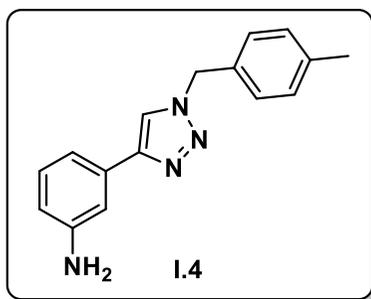
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.43 (s, 1H), 7.26 (t, J=8 Hz, 1H), 7.18-7.12 (m, 3H), 7.11 (t aparente, 1H), 7.06 (t, J=8 Hz, 1H), 6.94 (dt, J=7.6, 1 Hz, 1H), 6.53 (ddd, J= 8, 2.4, 1.2 Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 5.15 (s, 2H), 2.29 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 149.0 (C), 147.3 (C), 138.0 (C), 136.0 (C), 131.1 (C), 129.3 (CH), 128.7 (CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 125.0 (CH), 121.0 (CH), 113.6 (CH), 113.1 (CH), 110.5 (CH), 52.9 (CH₂), 20.9 (CH₃) ppm.

HR ESMS m/z 265.1447 (M+H)⁺. Calculado para C₁₆H₁₆N₄: 265.1453.

3-(1-(4-Metilbencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.4)



Rendimiento = 76 %.

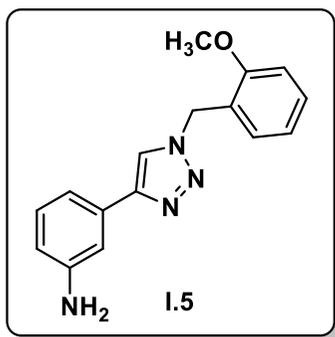
Punto de fusión = 139-141°C (sólido marrón claro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.40 (s, 1H), 7.22 (dd, J=16, 8 Hz, 4H), 7.08 (t aparente, 1H), 7.05 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.92 (dt, J=7.6, 1 Hz, 1H), 6.51 (ddd, J=8, 2.3, 1 Hz, 1H), 5.55 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 2.28 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 149.0 (C), 147.3 (C), 137.4 (C), 132.5 (C), 131.1 (C), 129.3 (CH), 129.2 (CH) 127.9 (CH), 120.9 (CH), 113.6 (CH), 113.0 (CH), 110.5 (CH), 52.7 (CH₂), 20.7 (CH₃) ppm.

HR ESMS m/z 265.1448 (M+H)⁺. Calculado para C₁₆H₁₆N₄: 265.1453.

3-(1-(2-Metoxibencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.5)

Rendimiento = 55 %.

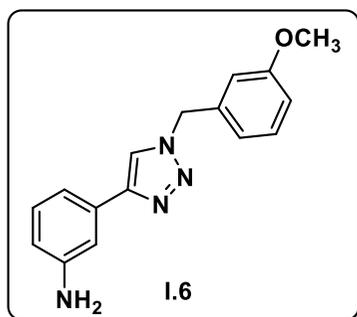
Punto de fusión = 121-123°C (sólido anaranjado).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.28 (s, 1H), 7.35 (td, $J=8$, 1 Hz, 1H), 7.13 (dd, $J=7.6$, 1.6 Hz, 1H), 7.08 (t, $J=2$ Hz 1H), 7.07-7.03 (m, 2H), 6.95 (ddd, $J=7.6$, 2, 1.2, 2H), 5.55 (s, 2H), 5.1 (s ancho, 2H), 3.83 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 156.8 (C), 149.0 (C), 146.9 (C), 131.2 (C), 129.9 (CH), 129.4 (CH), 129.2 (CH), 123.5 (CH), 121.0 (CH), 120.5 (CH), 113.5 (C), 113.1 (CH), 111.2 (CH), 110.4 (CH), 55.5 (CH₃), 48.2 (CH₂) ppm.

HR ESMS m/z 281.1403 (M+H)⁺. Calculado para C₁₆H₁₆N₄O: 281.1402.

3-(1-(3-Metoxibencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.6)

Rendimiento = 59 %.

Punto de fusión = 115-116°C (sólido marrón oscuro).

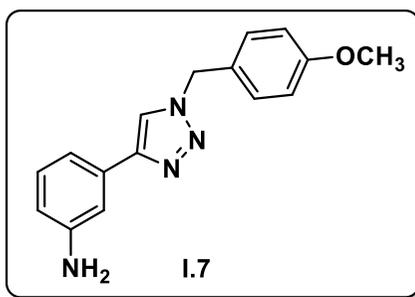
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 8.44 (s, 1H), 7.30 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.10 (t aparente, 1H), 7.06 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.95-6.87 (m, 4H), 6.52 (ddd, J = 8.0, 2.3, 1.0 Hz, 1H), 5.57 (s, 2H), 5.18 (s ancho, 2H), 3.74 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 159.5 (C), 148.8 (C), 147.3 (C), 137.5 (C), 131.1 (C), 129.9 (CH), 129.3 (CH), 121.1 (CH), 120.0 (CH), 113.7 (CH), 113.6 (CH), 113.5 (CH), 113.1 (CH), 110.5 (CH), 55.1 (CH_2), 52.8 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 281.1398 (M+H)⁺. Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$: 281.1402.

3-(1-(4-Metoxibencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.7)



Rendimiento = 69 %.

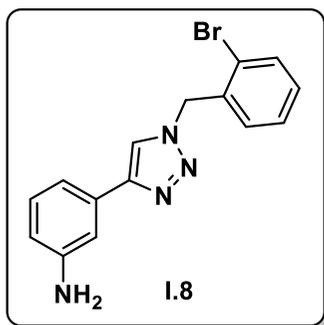
Punto de fusión = 112-114°C (sólido anaranjado).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 8.38 (s, 1H), 7.32 (dd, J = 7.9, 1.2 Hz, 2H), 7.08 (t aparente, 1H), 7.05 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.96-6.90 (m, 3H), 6.51 (ddd, J =8, 2.3, 1 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.11 (s ancho, 2H), 3.74 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 159.0 (C), 148.9 (C), 147.2 (C), 131.0 (C), 129.4 (CH), 129.2 (CH), 127.9 (C), 120.6 (CH), 114.0 (CH), 113.5 (CH), 112.9 (CH), 110.4 (CH), 55.0 (CH_2), 52.4 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 281.1399 (M+H)⁺. Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$: 281.1402.

3-(1-(2-Bromobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.8)

Rendimiento = 38 %.

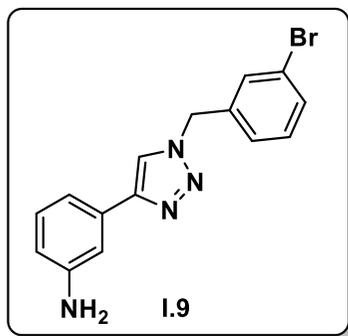
Punto de fusión = 117-118°C (sólido marrón oscuro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 8.40 (s, 1H), 7.70 (dd, $J=7.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.42 (td, $J=7.5, 1.2$ Hz, 1H), 7.32 (td, $J=7.7, 1.7$ Hz, 1H), 7.19 (dd, $J=7.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.10 (t aparente, 1H), 7.06 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.95 (dt, $J=7.6, 1$ Hz, 1H), 6.53 (ddd, $J=8, 2.3, 1$ Hz, 1H), 5.70 (s, 2H), 5.16 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 149.0 (C), 147.1 (C), 134.9 (C), 132.9 (CH), 131.0 (C), 130.4 (CH), 129.3 (CH), 129.2 (CH), 128.3 (CH), 122.8 (C), 121.5 (CH), 113.7 (CH), 113.1 (CH), 110.5 (CH), 53.0 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 329.0396 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrN}_4$: 329.0402.

3-(1-(3-Bromobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.9)

Rendimiento = 65 %.

Punto de fusión = 107-109°C (sólido marrón claro).

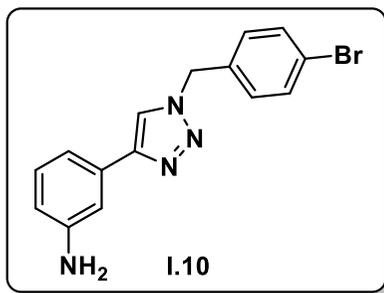
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.48 (s, 1H), 7.59-7.52 (m, 2H), 7.38-7.32 (m, 2H), 7.10 (t aparente, 1H), 7.06 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.95 (dt, J =7.6, 1 Hz, 1H), 6.53 (ddd, J = 8, 2.3, 1 Hz, 1H), 5.63 (s, 2H), 5.15 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ =149.0 (C), 147.4 (C), 138.7 (C), 131.0 (CH), 130.9 (CH), 130.6 (CH), 129.3 (CH), 129.2 (CH), 127.0 (CH), 121.8 (C), 121.2 (CH), 113.6 (CH), 113.0 (CH), 110.5 (CH), 52.1 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 329.0395 (M+H) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrN}_4$: 329.0402.

3-(1-(4-Bromobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.10)



Rendimiento = 17 %.

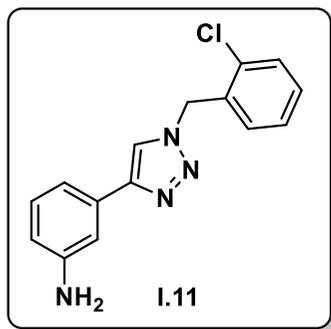
Punto de fusión = 174-176°C (sólido anaranjado).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.44 (s, 1H), 7.64-7.53 (m, 2H), 7.34-7.24 (m, 2H), 7.10 (t aparente, 1H), 7.05 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.92 (dt, J =7.6, 1 Hz, 1H), 6.52 (ddd, J = 8, 2.3, 1 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.13 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ =149.0 (C), 147.4 (C), 135.5 (C), 131.7 (CH), 131.0 (C), 130.1 (CH), 129.3 (CH), 121.4 (CH), 121.1 (CH), 113.6 (CH), 113.0 (CH), 110.5 (CH), 52.2 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 329.0397 (M+H) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrN}_4$: 329.0402.

3-(1-(2-Clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.11)

Rendimiento = 42 %.

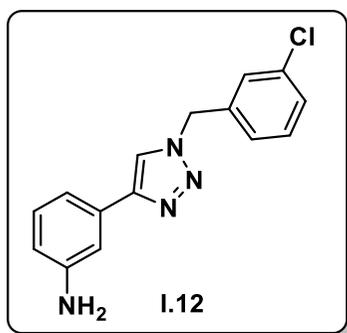
Punto de fusión = 107-109°C (sólido marrón oscuro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.41 (s, 1H), 7.53 (dd, $J=7.9$, 1.2 Hz, 1H), 7.43-7.34 (m, 2H), 7.25 (dd, $J=7.3$, 2 Hz, 1H), 7.10 (t aparente, 1H), 7.06 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.91(dt, $J=7.6$, 1 Hz, 1H), 6.52 (ddd, $J = 8$, 2.3, 1 Hz, 1H), 5.72 (s, 2H), 5.13 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 148.9 (C), 147.0 (C), 133.2 (C), 132.5 (C), 130.9 (C), 130.3 (CH), 130.1 (CH), 129.5 (CH), 129.2 (CH), 127.6 (CH), 121.3 (CH), 113.5 (CH), 113.0 (CH), 110.4 (CH), 50.5 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 285.0902 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_4$: 285.0907.

3-(1-(3-Clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.12)

Rendimiento = 78 %.

Punto de fusión = 105-106°C (sólido marrón oscuro).

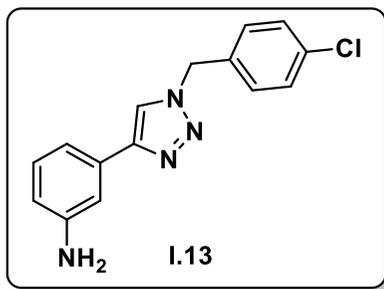
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.48 (s, 1H), 7.45-7.39 (m, 3H), 7.32-7.28 (m, 1H), 7.10 (t aparente, 1H), 7.06 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.91 (dt, $J=7.6$, 1 Hz, 1H), 6.53 (ddd, $J=8$, 2.3, 1 Hz, 1H), 5.64 (s, 2H), 5.15 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ =149.0 (C), 147.4 (C), 138.5 (C), 133.3 (C), 131.0 (C), 130.7 (CH), 129.3 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (CH), 126.6 (CH), 121.2 (CH), 113.7 (CH), 113.1 (CH), 110.5 (CH), 52.1 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 285.0901 (M+H)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_4$: 285.0907.

3-(1-(4-Clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (I.13)



Rendimiento = 20 %.

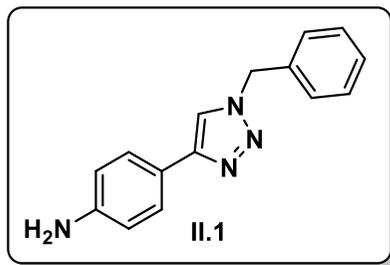
Punto de fusión = 151-152°C (sólido marrón claro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.44 (s, 1H), 7.48-7.41 (m, 2H), 7.40-7.34 (m, 2H), 7.10 (t aparente, 1H), 7.05 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.92 (dt, $J=7.6$, 1 Hz, 1H), 6.52 (ddd, $J=8$, 2.3, 1 Hz, 1H), 5.63 (s, 2H), 5.13 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ =149.0 (C), 147.4 (C), 135.1 (C), 132.8 (C), 131.0 (C), 129.8 (CH), 129.3 (CH), 128.8 (CH), 121.1 (CH), 113.6 (CH), 113.0 (CH), 110.5 (CH), 52.1 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 285.0903 (M+H)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_4$: 285.0907.

4-(1-Bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.1)

Rendimiento = 34 %.

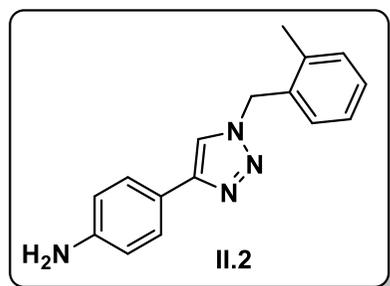
Punto de fusión = 180-181°C (sólido marrón oscuro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.31 (s, 1H), 7.50 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.42-7.28 (m, 5H), 6.60 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 5.57 (s, 2H), 5.28 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 148.9 (C), 147.6 (C), 136.2 (C), 128.7 (CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 126.1 (CH), 119.3 (CH), 118.4 (C), 114.0 (CH), 52.8 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 251.1297 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4$: 251.1301.

4-(1-(2-Metilbencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.2)

Rendimiento = 25 %.

Punto de fusión = 131-133°C (sólido marrón claro).

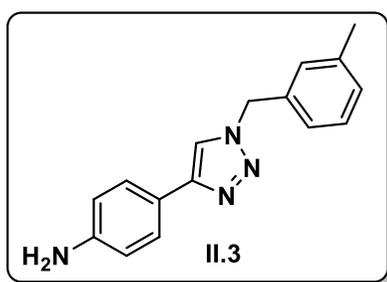
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 7.78 (d, 8.8 Hz, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.23-7.05 (m, 4H), 6.59 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 5.44 (s, 2H), 3.55 (s ancho, 2H), 2.21 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 148.4 (C), 146.6 (C), 137.0 (C), 132.8 (C), 131.1 (CH), 129.4 (CH), 129.1 (CH), 126.9 (CH), 126.7 (CH), 121.1 (C), 118.1 (CH), 115.3 (CH), 52.4 (CH_2), 19.1 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 265.1451 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4$: 265.1453.

4-(1-(3-Metilbencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.3)



Rendimiento = 42 %.

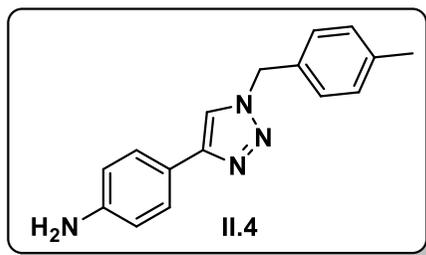
Punto de fusión = 128-129°C (sólido marrón claro).

IR ν_{max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.30 (s, 1H), 7.48 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.27 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.20-7.08 (m, 4H), 6.60 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 5.54 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 2.23 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 149.1 (C), 147.6 (C), 137.9 (C), 136.1 (C), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 126.1 (CH), 124.9 (CH), 119.2 (CH), 118.3 (C), 113.9 (CH), 52.8 (CH_2), 20.9 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 265.1452 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4$: 265.1453.

4-(1-(4-Metilbencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.4)

Rendimiento = 58 %.

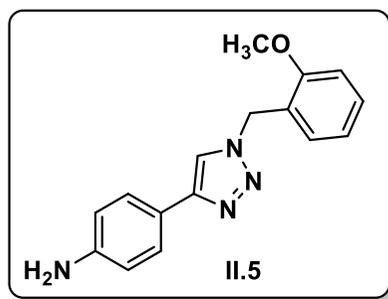
Punto de fusión = 130-132°C (sólido marrón claro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.23 (s, 1H), 7.48 (d, J= 8.7 Hz, 2H), 7.23 (d, J= 8.4 Hz, 2H), 7.19 (d, J= 8.4 Hz, 2H), 6.59 (d, J=8.7 Hz, 2H), 5.52 (s, 2H), 5.21 (s, 2H), 2,29 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 148.6 (C), 147.6 (C), 137.3 (C), 133.1 (C), 129.2 (CH), 127.8 (CH), 126.1 (CH), 119.1 (CH), 118.3 (C), 113.9 (CH), 52.6 (CH₂), 20.5 (CH₃) ppm.

HR ESMS m/z 265.1452 (M+H)⁺. Calculado para C₁₆H₁₆N₄: 265.1453.

4-(1-(2-Metoxibencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.5)

Rendimiento = 52 %.

Punto de fusión = 166-167°C (sólido marrón oscuro).

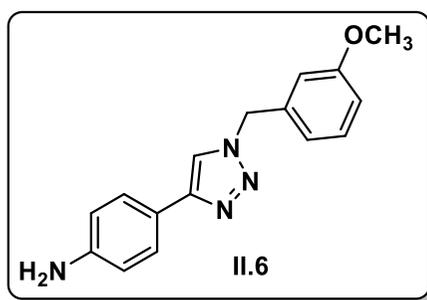
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ = 7.94 (s, 1H), 7.49 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.32 (td, $J=8, 4$ Hz, 1H), 7.19 (dd, $J=8, 4$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J=12$ Hz, 1H), 6.93 (td, $J=8, 1$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.55 (s, 2H), 3.85 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ = 158.6 (C), 149.3 (C), 149.1 (C), 131.2 (CH), 130.7 (CH), 127.5 (CH), 124.3 (C), 121.7 (CH), 120.8 (C), 120.5 (CH), 116.2 (CH), 111.8 (CH), 55.8 (CH₃), 50.2 (CH₂) ppm.

HR ESMS m/z 281.1402 (M+H)⁺. Calculado para C₁₆H₁₆N₄O: 281.1404.

4-(1-(3-Metoxibencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.6)



Rendimiento = 17 %.

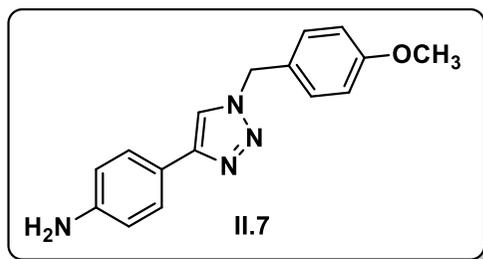
Punto de fusión = 103-105°C (sólido marrón oscuro).

IR ν_{max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm⁻¹.

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ = 8.05 (s, 1H), 7.51 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.30-7.22 (m, 1H), 6.92-6.85 (m, 3H), 6.73 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.53 (s, 2H), 3.75 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ = 161.8 (C), 150.2 (C), 149.7 (C), 138.5 (C), 131.4 (CH), 128.0 (CH), 121.4 (CH), 121.3 (C), 120.9 (CH), 116.6 (CH), 115.3 (CH), 114.8 (CH), 56.0 (CH₂), 55.0 (CH₃) ppm.

HR ESMS m/z 281.1397 (M+H)⁺. Calculado para C₁₆H₁₆N₄O: 281.1404.

4-(1-(4-Metoxibencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.7)

Rendimiento = 38 %.

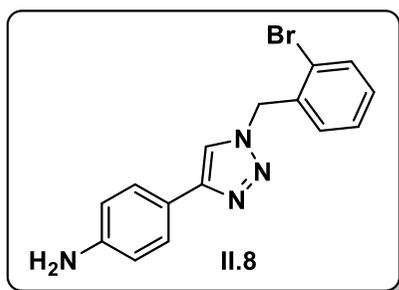
Punto de fusión = 132-134°C (sólido marrón claro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ = 8.01 (s, 1H), 7.50 (d, J=8 Hz, 2H), 7.30 (d, J=8 Hz, 2H), 6.92 (d, J=8 Hz, 2H), 6.74 (d, J=8 Hz, 2H), 5.50 (s, 2H), 3.77 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ = 161.4 (C), 149.9 (C), 149.4 (C), 130.6 (CH), 128.8 (C), 127.7 (CH), 121.1 (C), 120.3 (CH), 116.4 (CH), 115.4 (CH), 55.7 (CH₃), 54.5 (CH₂) ppm.

HR ESMS m/z 281.1402 (M+H)⁺. Calculado para C₁₆H₁₆N₄O: 281.1404.

4-(1-(2-Bromobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.8)

Rendimiento = 52 %.

Punto de fusión = 133-134°C (sólido marrón oscuro).

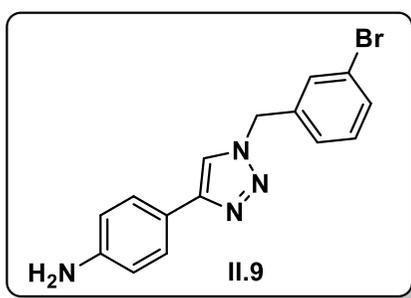
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, MeOD) δ = 8.04 (s, 1H), 7.63 (dd, $J=7.9$, 1.2 Hz, 1H), 7.51 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.34 (td, $J=7.5$, 1.2 Hz, 1H), 7.24 (td, $J=7.5$, 1.7 Hz, 1H), 7.17 (dd, $J=7.5$, 1.7 Hz, 1H), 6.73 (d, $J=8.7$, 2H), 5.68 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, MeOD) δ = 149.8 (C), 149.6 (C), 136.0 (C), 134.3 (CH), 131.5 (CH), 131.4 (CH), 129.3 (CH), 127.8 (CH), 124.4 (C), 121.1 (CH), 120.9 (C), 116.4 (CH), 54.9 (CH₂) ppm.

HR ESMS m/z 329.0395 (M+H)⁺. Calculado para C₁₅H₁₃BrN₄: 329.0402.

4-(1-(3-Bromobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.9)



Rendimiento = 73 %.

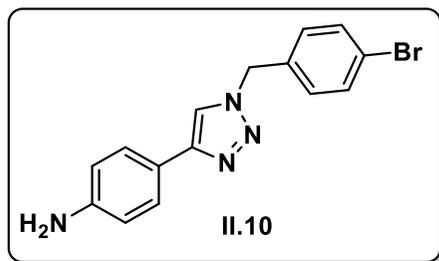
Punto de fusión = 134-135°C (sólido marrón claro).

IR ν_{max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm⁻¹.

RMN ^1H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.35 (s, 1H), 7.57-7.52 (m, 2H), 7.49 (d, $J=9$ Hz, 2H), 7.38-7.30 (m, 2H), 6.60 (d, $J=9$ Hz, 2H), 5.61 (s, 2H), 5.24 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 148.6 (C), 147.7 (C), 138.8 (CH), 131.0 (CH), 130.6 (CH), 126.9 (CH), 126.2 (CH), 121.8 (C), 119.4 (C), 118.1 (C), 113.9 (CH), 52.0 (CH₂) ppm.

HR ESMS m/z 329.0400 (M+H)⁺. Calculado para C₁₅H₁₃BrN₄: 329.0402.

4-(1-(4-Bromobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.10)

Rendimiento = 88 %.

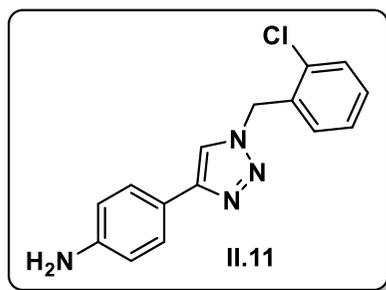
Punto de fusión = 169-170°C (sólido marrón claro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) δ = 8.08 (s, 1H), 7.53 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J=9$ Hz, 2H), 6.66 (d, $J=9$ Hz, 2H), 5.58 (s 2H), 4.71 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) δ = 148.3 (C), 148.2 (C), 135.7 (C), 131.7 (CH), 129.9 (CH), 126.3 (CH), 121.5 (C), 119.7 (C), 118.5 (CH), 114.2 (CH), 52.4 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 329.0395 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrN}_4$: 329.0402.

4-(1-(2-Clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.11)

Rendimiento = 39 %.

Punto de fusión = 112-115°C (sólido marrón oscuro).

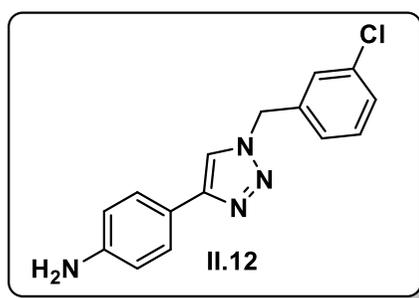
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ = 8.03 (s, 1H), 7.52 (d, J=8 Hz, 2H), 7.44 (dd, J=8, 4 Hz, 1H), 7.36-7.26 (m, 2H), 7.22 (d ancho, J= 8 Hz, 1H), 6.74 (d, J=8 Hz, 2H), 5.68 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ = 150.0 (C), 149.6 (C), 134.8 (C), 134.5 (C), 131.6 (CH), 131.5 (CH), 131.1 (CH), 128.8 (CH), 128.0 (CH), 121.2 (CH), 121.1 (C), 116.6 (CH), 52.5 (CH₂) ppm.

HR ESMS m/z 285.0912 (M+H)⁺. Calculado para C₁₅H₁₃ClN₄: 285.0907.

4-(1-(3-Clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.12)



Rendimiento = 39 %.

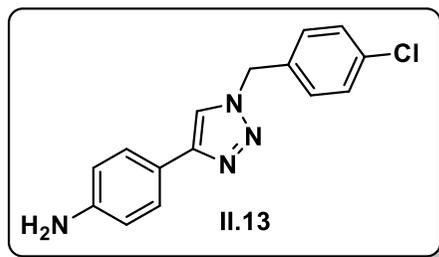
Punto de fusión = 143-144°C (sólido marrón claro).

IR ν_{max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm⁻¹.

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ = 8.12 (s, 1H), 7.53 (d, J=8 Hz, 2H), 7.40-7.33 (m, 3H), 7.29-7.24 (m, 1H), 6.75 (d, J=8 Hz, 2H), 5.58 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ = 150.1 (C), 149.6 (C), 139.2 (C), 135.7 (C), 131.5 (CH), 129.6 (CH), 129.0 (CH), 127.7 (CH), 127.4 (CH), 120.9 (C), 120.6 (CH), 116.4 (CH), 54.0 (CH₂) ppm.

HR ESMS m/z 285.0908 (M+H)⁺. Calculado para C₁₅H₁₃ClN₄: 285.0907.

4-(1-(4-Chlorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)anilina (II.13)

Rendimiento = 72 %.

Punto de fusión = 164-166°C (sólido marrón oscuro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

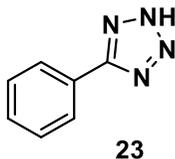
RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ = 8.09 (s, 1H), 7.52 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J=8$ Hz, 2H), 6.75 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.58 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ = 150.3 (C), 149.8 (C), 135.9 (C), 135.6 (C), 130.9 (CH), 130.3 (CH), 127.9 (CH), 121.2 (C), 120.8 (CH), 116.5 (CH), 54.3 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 285.0903 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_4$: 285.0907.

3.3.6. Procedimiento general para la formación de los tetrazoles 23-25

A una mezcla del correspondiente nitrilo (10 mmol, 1 eq.), NaN_3 (20 mmol, 2 eq.) y ZnBr_2 (5 mmol, 0.5 eq.) se le añadió 135 mL de una mezcla *i*-PrOH:agua (1:2) y la reacción se agitó a 90°C durante 24 horas. Finalizado este tiempo, se añadió una disolución al 10% de ácido cítrico (50 mL) y AcOEt (30 mL). La fase acuosa se extrajo con AcOEt y las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se filtraron. Finalmente, el disolvente se evaporó en el rotavapor. el residuo obtenido se sometió a un proceso de purificación mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando como fase móvil hexano:AcOEt (1:1; 4:6; 3:7).

5-Fenil-2H-tetrazol (23)

Rendimiento = 66 %.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.10-8.00 (m, 2H), 7.65-7.55 (m, 3H) ppm.

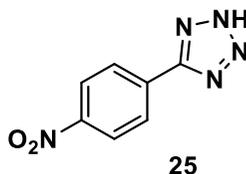
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 155.2 (C), 131.2 (CH), 129.4 (CH), 126.9 (CH), 124.3 (C), ppm.

5-(3-Nitrofenil)-2H-tetrazol (24)

Rendimiento = 73 %.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.83 (t aparente, J = 8 Hz, 1H), 8.47 (ddd, J = 8, 2, 1 Hz, 1H), 8.41 (ddd, J = 8.3, 2.3, 1 Hz, 1H), 7.90 (t, J = 8 Hz, 1H) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 155.0 (C), 148.3 (C), 133.0 (CH), 131.2 (CH), 126.2 (C), 125.5 (CH), 121.5 (CH) ppm.

5-(4-Nitrofenil)-2H-tetrazol (25)

Rendimiento = 53 %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.46 (dt, J = 9, 2 Hz, 2H), 8.3 (dt, J = 9, 2 Hz, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 156.0 (C), 149.2 (C), 131.2 (C), 128.7 (CH), 125.1 (CH) ppm.

3.3.7. Procedimiento general para la N-alkilación de los tetrazoles (compuesto 2 y familias III.1-III.13 y IV.1-IV.13)

Se lavó una suspensión de NaH en aceite mineral (0.5 mmol, 1 eq.) con pentano (3 x 1.25 mL) bajo atmósfera inerte. A continuación, se enfrió a 0°C y se añadió acetonitrilo seco (3 mL). Después de 5 minutos se añadió el correspondiente tetrazol (0.5 mmol, 1 eq.) disuelto en la mínima cantidad posible de acetonitrilo. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se añadió el correspondiente halogenuro de bencilo (0.55 mmol, 1.1 eq.) y una cantidad catalítica de NaI. La reacción se dejó agitando a 60°C durante 24 horas. Tras esto, se vertió la reacción sobre una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (10 mL) y la fase acuosa se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se filtraron. Finalmente, el disolvente se evaporó en el rotavapor. El residuo obtenido se sometió a un proceso de purificación mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando como fase móvil hexano:AcOEt (9:1; 8:2; 7:3).

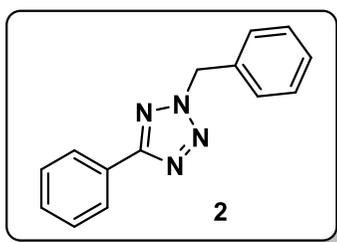
3.3.8. Procedimiento general para la reducción de los tetrazoles (III.14-III.26; IV.14-IV.26)

A una disolución del correspondiente nitroderivado (1 eq.) en AcOH glacial (32.6 mL/mmol) se le añadió Zn en polvo (147 eq.). Se dejó la reacción agitando vigorosamente a temperatura ambiente protegida de la luz durante 1h. Transcurrido este tiempo, se filtró sobre Celite y se lavó con AcOEt. El filtrado de la reacción se neutralizó utilizando una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y Na_2CO_3 hasta pH básico (10-11). La fase acuosa se extrajo con AcOEt y las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron

sobre MgSO_4 y se filtraron. Finalmente, el disolvente se evaporó en el rotavapor. El residuo obtenido se sometió a un proceso de purificación mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando como fase móvil hexano:AcOEt (1:1).

3.3.9. Datos físicos y espectroscópicos de los tetrazoles (compuesto 2 y familias III y IV)

2-Bencil-5-fenil-2*H*-tetrazol (2)



Rendimiento = 34 %.

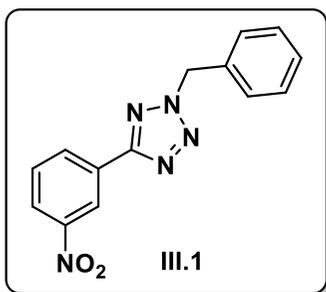
Punto de fusión = 71-72°C (sólido blanco).

IR ν_{max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.05-8.00 (m, 2H), 7.35-7.20 (m, 8H), 5.65 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 165.5 (C), 133.4 (C), 130.3 (CH), 129.1 (CH), 128.9 (CH), 128.8 (CH), 128.4 (CH), 127.5 (C), 126.9 (CH), 56.8 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 237.1141 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4$: 237.1140.

2-Bencil-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.1)

Rendimiento = 65 %.

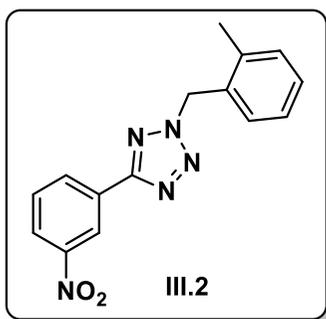
Punto de fusión = 102-103°C (sólido anaranjado).

IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.77 (s aparente, 1H), 8.27 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.09 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.47 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J=8$, 2 Hz, 2H), 7.27-7.18 (m, 3H), 5.68 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.5 (C), 148.7 (C), 133.1 (C), 132.4 (CH), 130.0 (CH), 129.1 (C), 129.0 (2XCH), 128.5 (CH), 124.8 (CH), 121.7 (CH), 57.1 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 282.0991 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4$: 282.0995.

2-(2-Metilbencil)-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.2)

Rendimiento = 13 %.

Punto de fusión = 90-91°C (sólido marrón oscuro).

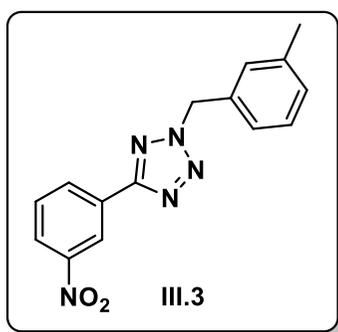
IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.95 (s aparente, 1H), 8.46 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.29 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.65 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J=4$ Hz, 1H), 7.33-7.23 (m, 3H), 5.87 (s, 2H), 2.50 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.4 (C), 148.7 (C), 137.1 (C), 132.6 (CH), 131.3 (C), 131.0 (CH), 130.1 (2XCH), 129.5 (CH), 129.2 (C), 126.7 (CH), 124.6 (CH), 121.8 (CH), 55.2 (CH_2), 19.6 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 296.1141 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$: 296.1147.

2-(3-Metilbencil)-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.3)



Rendimiento = 61 %.

Punto de fusión = 105-107°C (sólido marrón claro).

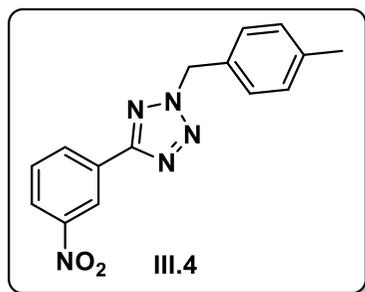
IR ν_{max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.97 (s aparente, 1H), 8.47 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.29 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.65 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.32-7.18 (m, 4H), 5.81 (s, 2H), 2.37 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.5 (C), 148.7 (C), 139.0 (C), 133.0 (C), 132.6 (CH), 130.1 (CH), 130.0 (CH), 129.3 (C), 129.2 (CH), 129.1 (CH), 125.7 (CH), 124.7 (CH), 121.8 (CH), 57.3 (CH_2), 21.3 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 296.1143 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$: 296.1147.

2-(4-Metilbencil)-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.4)



Rendimiento = 67 %.

Punto de fusión = 99-100°C (sólido amarillento).

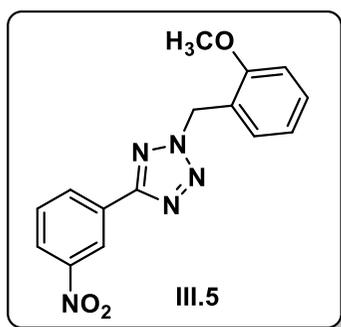
IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.93 (s aparente, 1H), 8.42 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.25 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.65 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J=8$ H, 2H), 7.18 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.77 (s, 2H), 2.32 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.5 (C), 148.7 (C), 139.1 (C), 132.5 (CH), 130.2 (C), 130.0 (CH), 129.8 (CH), 129.2 (C), 128.5 (CH), 124.7 (CH), 121.7 (CH), 56.9 (CH_2), 21.2 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 296.1143 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$: 296.1147.

2-(2-Metoxibencil)-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.5)



Rendimiento = 56 %.

Punto de fusión = 102-103°C (sólido anaranjado).

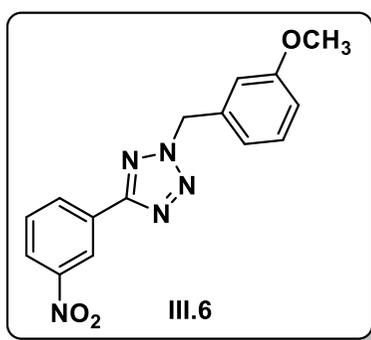
IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.87 (s aparente, 1H), 8.38 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.18 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.55 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.27 (td, 8, 1Hz, 1H), 7.16 (dd, $J=8$, 1Hz, 1H), 6.91-6.83 (m, 2H), 5.78 (s, 2H), 3.77 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.3 (C), 157.4 (C), 148.7 (C), 132.6 (CH), 130.7 (CH), 130.3 (CH), 130.0 (CH), 129.4 (C), 125.0 (CH), 122.0 (CH), 121.5 (C), 120.8 (CH), 111.0 (CH), 55.7 (CH_3), 52.2 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 334.1093 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$: 312.1097.

2-(3-Metoxibencil)-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.6)



Rendimiento = 24 %.

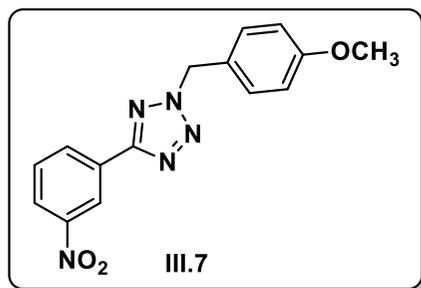
Punto de fusión = 93-94°C (sólido amarillento).

IR ν_{max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.82 (s aparente, 1H), 8.32 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.14 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.51 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.17 (t, 8 Hz, 1H), 6.90-6.82 (m, 2H), 6.77 (dd, $J=8$, 2 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 3.67 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.5 (C), 160.1 (C), 148.6 (C), 134.4 (C), 132.5 (CH), 130.3 (CH), 130.0 (CH), 129.2 (C), 124.7 (CH), 121.7 (CH), 120.6 (CH), 114.5 (CH), 114.2 (CH), 57.0 (CH_2), 55.6 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 334.1096 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$: 312.1097.

2-(4-Metoxibencil)-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.7)

Rendimiento = 48 %.

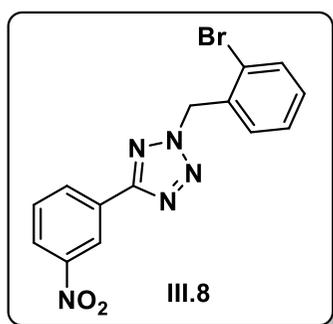
Punto de fusión = 149-150°C (sólido amarillento).

IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.95 (s aparente, 1H), 8.36 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.28 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.65 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J=8$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.75 (s, 2H), 3.79 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.6 (C), 160.3 (C), 148.7 (C), 132.6 (C), 130.3 (CH), 129.3 (C), 125.1 (C), 124.8 (CH), 122.0 (CH), 114.5 (CH), 114.2 (CH), 56.8 (CH_2), 55.5 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 334.1089 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$: 312.1097.

2-(2-Bromobencil)-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.8)

Rendimiento = 30 %.

Punto de fusión = 104-106°C (sólido marrón claro).

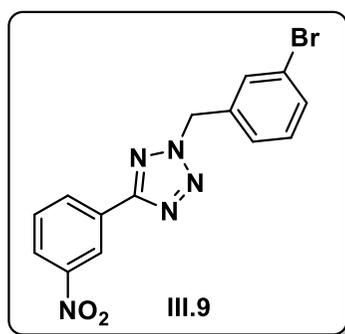
IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.97 (s aparente, 1H), 8.48 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.31 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.67 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.65 (dd, $J=8$, 2 Hz, 1H), 7.35 (td, $J=8$, 2 Hz, 1H), 7.29-7.23 (m, 2H), 5.99 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.7 (C), 148.8 (C), 133.5 (CH), 132.7 (CH), 132.6 (C), 130.9 (CH), 130.6 (CH), 130.1 (CH), 129.2 (C), 128.3 (CH), 125.1 (CH), 123.8 (C), 122.2 (CH), 56.9 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 360.0092 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrN}_5\text{O}_2$: 360.0096.

2-(3-Bromobencil)-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.9)



Rendimiento = 17 %.

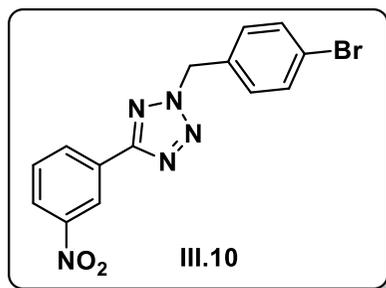
Punto de fusión = 119-121°C (sólido marrón claro).

IR ν_{max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.95 (s aparente, 1H), 8.46 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.29 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.65 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.57 (s aparente, 1H), 7.50 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7.26 (t, $J=8$ Hz, 1H), 5.77 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.7 (C), 148.8 (C), 135.1 (C), 132.6 (CH), 132.5 (CH), 131.7 (CH), 130.8 (CH), 130.2 (CH), 129.1 (C), 127.3 (CH), 125.0 (CH), 123.2 (C), 122.0 (CH), 56.4 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 360.0104 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrN}_5\text{O}_2$: 360.0096.

2-(4-Bromobencil)-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.10)

Rendimiento = 58 %.

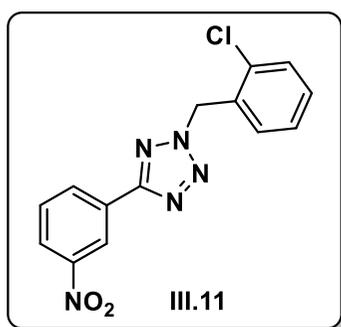
Punto de fusión = 114-116°C (sólido amarillento).

IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.96 (s aparente, 1H), 8.46 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.31 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.67 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.76 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.9 (C), 148.7 (C), 132.7 (CH), 132.5 (CH), 132.0 (C), 130.4 (CH), 130.2 (CH), 129.1 (C), 125.1 (CH), 123.7 (C), 122.1 (CH), 56.6 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 360.0091 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrN}_5\text{O}_2$: 360.0096.

2-(2-Clorobencil)-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.11)

Rendimiento = 48 %.

Punto de fusión = 105-107°C (sólido amarillento).

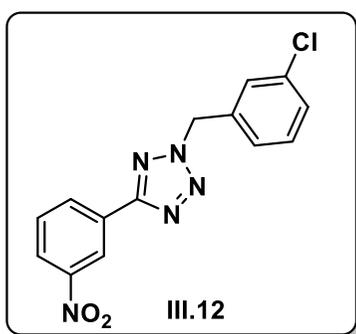
IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.87 (s aparente, 1H), 8.40 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.22 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.60 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7.31-7.24 (m, 3H), 5.94 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.4 (C), 148.5 (C), 133.7 (C), 132.5 (CH), 130.7 (C), 130.6 (CH), 130.5 (CH), 130.0 (CH), 129.9 (CH), 128.9 (C), 127.4 (CH), 124.7 (CH), 121.7 (CH), 54.4 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 316.0596 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2$: 316.0601.

2-(3-Clorobencil)-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.12)



Rendimiento = 66 %.

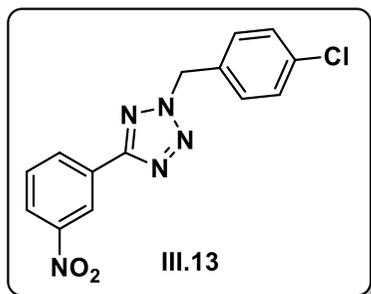
Punto de fusión = 102-103°C (sólido marrón claro).

IR ν_{max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.94 (s aparente, 1H), 8.44 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.28 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.65 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.42 (s aparente, 1H), 7.35-7.30 (m, 3H), 5.80 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.7 (C), 148.6 (C), 135.0 (C), 134.8 (C), 132.6 (CH), 130.5 (CH), 130.1 (CH), 129.5 (CH), 129.0 (C), 128.7 (CH), 126.7 (CH), 125.0 (CH), 121.8 (CH), 56.4 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 316.0599 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2$: 316.0601.

2-(4-Clorobencil)-5-(3-nitrofenil)-2H-tetrazol (III.13)

Rendimiento = 72 %.

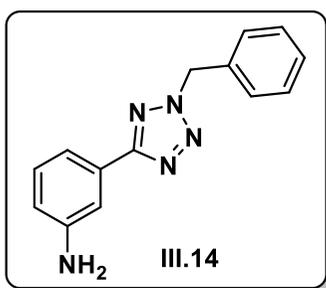
Punto de fusión = 111-113°C (sólido marrón claro).

IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.96 (s aparente, 1H), 8.47 (dd, $J=8$, 3Hz, 1H), 8.30 (ddd, $J=8$, 2, 1 Hz, 1H), 7.66 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.41-7.35 (m, 4H), 5.80 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 163.8 (C), 148.7 (C), 135.5 (C), 132.6 (CH), 131.4 (C), 130.2 (CH), 130.1 (CH), 129.5 (CH), 129.1 (C), 125.1 (CH), 121.9 (CH), 56.5 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 316.0594 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2$: 316.0601.

3-(2-Bencil-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.14)

Rendimiento = 77 %.

Punto de fusión = 94-95°C (sólido marrón claro).

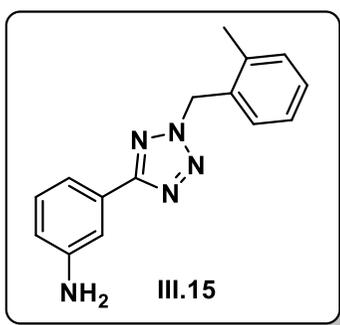
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.42 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7.36 (s aparente, 1H), 7.30-7.20 (m, 5H), 7.11 (t, $J=8$ Hz, 1H), 6.63 (dd, $J=8$, 2 Hz, 1H), 5.65 (s, 2H), 3.70 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 165.5 (C), 146.9 (C), 133.4 (C), 129.9 (CH), 128.9 (CH), 128.8 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (C), 117.1 (CH), 117.0 (CH), 113.2 (CH), 56.7 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 252.1247 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_5$: 252.1249.

3-(2-(2-Metilbencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.15)



Rendimiento = 76 %.

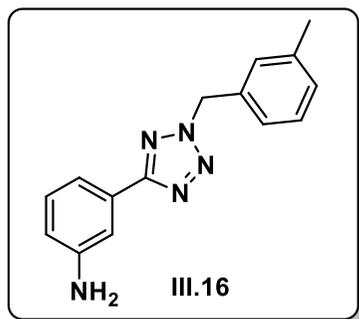
Punto de fusión = 95-96°C (sólido anaranjado).

IR ν_{max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 7.30-7.20 (m, 5H), 7.18-7.12 (m, 2H), 6.70-6.64 (m, 1H), 5.95 (s, 2H), 5.34 (s ancho, 2H), 2.35 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 164.8 (C), 149.3 (C), 136.8 (C), 132.2 (C), 130.5 (CH), 129.6 (CH), 129.5 (CH), 128.8 (CH), 127.2 (C), 126.3 (CH), 115.8 (CH), 113.6 (CH), 111.3 (CH), 54.3 (CH_2), 18.6 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 266.1398 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5$: 266.1406.

3-(2-(3-Metilbencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.16)

Rendimiento = 76 %.

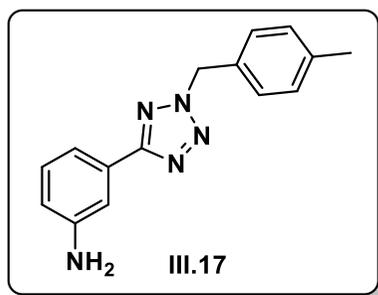
Punto de fusión = 97-98°C (sólido anaranjado).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.31-7.26 (m, 2H), 7.22-7.12 (m, 5H), 6.68 (dt, $J=8$, 1 Hz, 1H), 5.90 (s, 2H), 5.35 (s ancho, 2H), 2.29 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 164.9 (C), 149.3 (C), 138.2 (C), 134.1 (C), 129.6 (CH), 129.2 (CH), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 127.3 (C), 125.3 (CH), 115.8 (CH), 113.5 (CH), 111.2 (CH), 56.0 (CH_2), 20.8 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 266.1400 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5$: 266.1406.

3-(2-(4-Metilbencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.17)

Rendimiento = 76 %.

Punto de fusión = 102-103°C (sólido marrón claro).

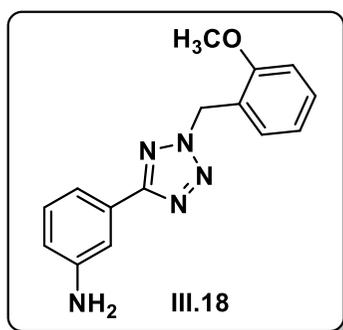
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.31-7.26 (m, 3H), 7.21 (d, J=8 Hz, 2H), 7.18-7.12 (m, 2H), 6.70-6.65 (m, 1H), 5.89 (s, 2H), 5.33 (s ancho, 2H), 2.28 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 164.9 (C), 149.3 (C), 138.0 (C), 131.2 (C), 129.6 (CH), 129.4 (CH), 128.3 (CH), 127.3 (C), 115.8 (CH), 113.5 (CH), 111.3 (CH), 55.7 (CH₂), 20.6 (CH₃) ppm.

HR ESMS m/z 266.1403 (M+H)⁺. Calculado para C₁₅H₁₅N₅: 266.1406.

3-(2-(2-Metoxibencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.18)



Rendimiento = 65 %.

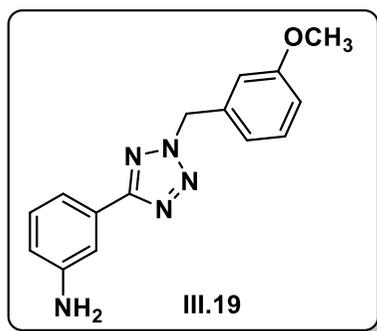
Punto de fusión = 108-109°C (sólido amarillento).

IR ν_{max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.38 (td, J=8, 2 Hz, 1H), 7.27-7.25 (m, 2H), 7.17-7.13 (m, 2H), 7.07 (d, J=8 Hz, 1H), 6.97 (td, J=8, 2 Hz, 1H), 6.70-6.64 (m, 1H), 5.85 (s, 2H), 5.35 (s ancho, 2H), 3.77 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 164.6 (C), 157.1 (C), 149.2 (C), 130.4 (CH), 130.3 (CH), 129.6 (CH), 127.3 (C), 121.7 (C), 120.5 (CH), 115.7 (CH), 113.6 (CH), 111.3 (CH), 111.2 (CH), 55.7 (CH₃), 51.5 (CH₂) ppm.

HR ESMS m/z 282.1352 (M+H)⁺. Calculado para C₁₅H₁₅N₅O: 282.1355.

3-(2-(3-Metoxibencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.19)

Rendimiento = 53 %.

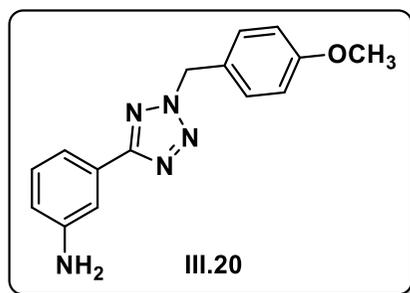
Punto de fusión = 107-108°C (sólido amarillento).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.32 (t, J=8 Hz, 2H), 7.23-7.15 (m, 2H), 6.98-6.96 (m, 1H), 6.95-6.90 (m, 2H), 6.70 (dt, J=8, 1 Hz), 5.93 (s, 2H), 3.75 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 164.8 (C), 159.4 (C), 148.2 (C), 135.5 (C), 130.0 (CH), 129.7 (CH), 127.2 (C), 120.2 (CH), 116.5 (CH), 114.4 (CH), 114.0 (CH), 113.9 (CH), 112.0 (CH), 55.6 (CH $_2$), 55.2 (CH $_3$) ppm.

HR ESMS m/z 282.1348 (M+H) $^+$. Calculado para C $_{15}$ H $_{15}$ N $_5$ O: 282.1355.

3-(2-(4-Metoxibencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.20)

Rendimiento = 65 %.

Punto de fusión = 104-105°C (sólido marrón claro).

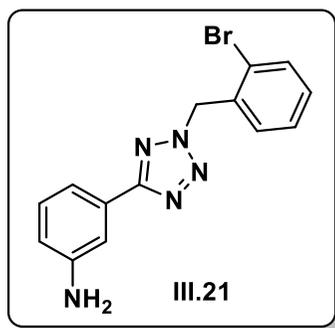
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.37 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.29-7.26 (m, 1H), 7.18-7.12 (m, 2H), 6.95 (d, $J=8$ Hz, 2H), 6.67 (dt, $J=8$, 1 Hz, 1H), 5.86 (s, 2H), 5.35 (s ancho, 2H), 3.74 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 164.8 (C), 159.4 (C), 149.3 (C), 130.0 (CH), 129.6 (CH), 127.3 (C), 126.1 (C), 115.8 (CH), 114.2 (CH), 113.6 (CH), 111.4 (CH), 55.6 (CH_2), 55.2 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 282.1346 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}$: 282.1355.

3-(2-(2-Bromobencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.21)



Rendimiento = 72 %.

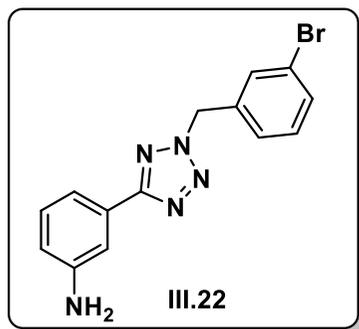
Punto de fusión = 109-111°C (sólido anaranjado).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.72 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J=4$ Hz, 2H), 7.40-7.33 (m, 1H), 7.27-7.24 (m, 1H), 7.17-7.13 (m, 2H), 6.70-6.66 (m, 1H), 6.03 (s, 2H), 5.37 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 164.8 (C), 149.3 (C), 133.0 (CH), 131.8 (CH), 130.9 (CH), 129.6 (CH), 128.7 (C), 128.2 (CH), 127.2 (C), 123.5 (C), 115.8 (CH), 113.6 (CH), 111.3 (CH), 56.2 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 330.0345 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{BrN}_5$: 330.0354.

3-(2-(3-Bromobencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.22)

Rendimiento = 62 %.

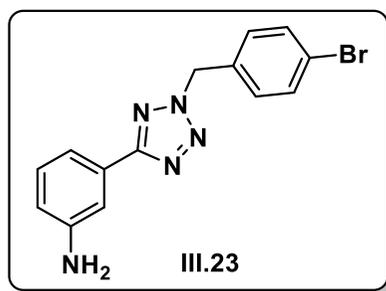
Punto de fusión = 104-106°C (sólido amarillento).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.65 (s, 1H), 7.61-7.56 (m, 1H), 7.40-7.35 (m, 2H), 7.29-7.26 (m, 1H), 7.18-7.14 (m, 2H), 6.68 (dt, $J=8$, 1 Hz, 1H), 5.99 (s, 2H), 5.37 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 165.1 (C), 149.4 (C), 136.6 (C), 131.5 (CH), 131.3 (CH), 131.2 (CH), 129.7 (CH), 127.5 (CH), 127.3 (C), 121.8 (C), 115.9 (CH), 113.6 (CH), 111.3 (CH), 55.2 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 330.0359 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{BrN}_5$: 330.0354.

3-(2-(4-Bromobencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.23)

Rendimiento = 78 %.

Punto de fusión = 113-115°C (sólido anaranjado).

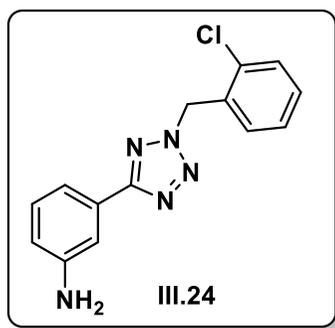
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.61 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.28-7.26 (m, 1H), 7.17-7.13 (m, 2H), 6.68 (dt, $J=8$, 1 Hz, 1H), 5.96 (s, 2H), 5.37 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 165.5 (C), 149.7 (C), 134.0 (C), 132.3 (CH), 131.0 (CH), 130.1 (CH), 127.6 (C), 122.4 (C), 116.3 (CH), 114.2 (CH), 111.7 (CH), 55.6 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 330.0346 (M+H)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{BrN}_5$: 330.0354.

3-(2-(2-Clorobencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.24)



Rendimiento = 80 %.

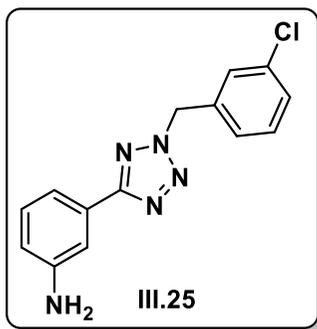
Punto de fusión = 95-97°C (sólido anaranjado).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.55 (dt, $J=8$, 2 Hz, 1H), 7.50 (t, $J=4$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J=8$, 2 Hz, 1H), 7.31 (td, $J=8$, 4 Hz, 1H), 7.26 (t, $J=8$ Hz, 2H), 7.18 (dd, $J=8$, 2 Hz, 1H), 6.77 (dd, $J=8$, 2 Hz, 1H), 5.95 (s, 2H), 3.68 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 165.6 (C), 147.0 (C), 133.6 (C), 131.3 (C), 130.3 (CH), 130.1 (CH), 129.8 (CH), 129.7 (CH), 128.2 (C), 127.3 (CH), 117.0 (CH), 116.9 (CH) 113.2 (CH), 54.0 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 286.0857 (M+H)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClN}_5$: 286.0859.

3-(2-(3-Clorobencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.25)

Rendimiento = 78 %.

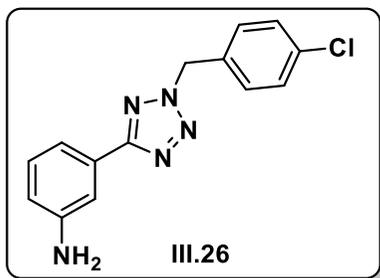
Punto de fusión = 80-83°C (sólido marrón claro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.53-7.51 (m, 1H), 7.47-7.42 (m, 2H), 7.37-7.32 (m, 1H), 7.30-7.27 (m, 1H), 7.20-7.13 (m, 2H), 7.68 (dt, $J=8$, 2 Hz, 1H), 5.98 (s, 2H), 5.34 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 165.1 (C), 149.3 (C), 136.4 (C), 133.3 (C), 130.7 (CH), 129.6 (CH), 128.6 (CH), 128.2 (CH), 127.2 (C), 127.0 (CH), 115.9 (CH), 113.6 (CH), 111.2 (CH), 55.1 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 286.0853 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClN}_5$: 286.0859.

3-(2-(4-Clorobencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (III.26)

Rendimiento = 76 %.

Punto de fusión = 103-104°C (sólido marrón claro).

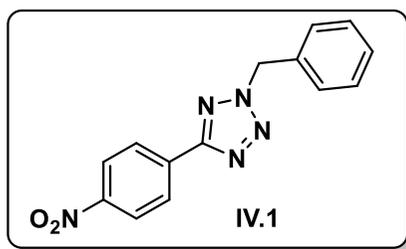
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.47 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.31-7.27 (m, 1H), 7.20-7.13 (m, 2H), 6.68 (dt, $J=8$, 2 Hz, 1H), 5.97 (s, 2H), 5.34 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 165.1 (C), 149.3 (C), 133.3 (C), 133.1 (C), 130.3 (CH), 129.6 (CH), 128.8 (CH), 127.2 (C), 115.8 (CH), 113.6 (CH), 111.2 (CH), 55.2 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 286.0856 (M+H)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClN}_5$: 286.0859.

2-Bencil-5-(4-nitrofenil)-2H-tetrazol (IV.1)



Rendimiento = 39 %.

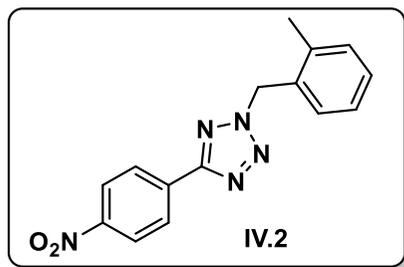
Punto de fusión = 143-144°C (sólido amarillento).

IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.32 (s, 4H), 7.47-7.35 (m, 5H), 5.84 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.7 (C), 149.0 (C), 133.4 (C), 133.0 (C), 129.4 (CH), 129.2 (CH), 128.6 (CH), 127.8 (CH), 124.3 (CH), 57.3 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 282.0991 (M+H)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4$: 282.0995.

2-(2-Metilbencil)-5-(4-nitrofenil)-2H-tetrazol (IV.2)

Rendimiento = 96 %.

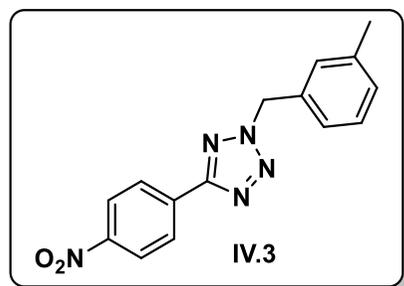
Punto de fusión = 127-128°C (sólido amarillento).

IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.23 (s, 4H), 7.30-7.11 (m, 5H), 5.76 (s, 2H), 2.24 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.5 (C), 149.0 (C), 137.2 (C), 133.4 (C), 131.3 (C), 131.1 (CH), 130.2 (CH), 129.6 (CH), 127.7 (CH), 126.7 (CH), 124.3 (CH), 55.2 (CH_2), 19.4 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 296.1144 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$: 296.1147.

2-(3-Metilbencil)-5-(4-nitrofenil)-2H-tetrazol (IV.3)

Rendimiento = 52 %.

Punto de fusión = 127-128°C (sólido amarillento).

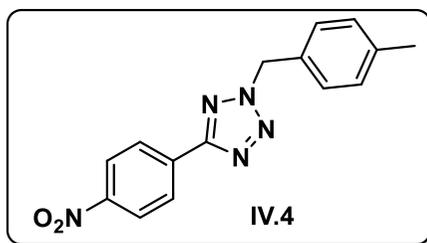
IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.24 (s, 4H), 7.25-7.05 (m, 5H), 5.71 (s, 2H), 2.27 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.6 (C), 149.0 (C), 139.2 (C), 133.4 (C), 132.8 (C), 130.1 (CH), 129.3 (CH), 129.2 (CH), 127.7 (CH), 125.7 (CH), 124.3 (CH), 57.3 (CH_2), 21.4 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 296.1150 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$: 296.1147.

2-(4-Metilbencil)-5-(4-nitrofenil)-2H-tetrazol (IV.4)



Rendimiento = 46 %.

Punto de fusión = 164-165°C (sólido anaranjado).

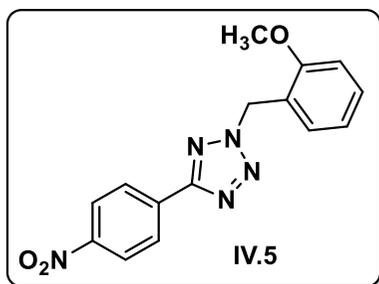
IR ν_{max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.32 (s, 4H), 7.35 (d, $J=6$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J=6$ Hz, 2H), 5.79 (s, 2H), 2.35 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.7 (C), 149.0 (C), 139.4 (C), 133.4 (C), 130.0 (C), 129.8 (CH), 128.7 (CH), 127.7 (CH), 124.3 (CH), 57.2 (CH_2), 21.3 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 296.1143 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$: 296.1147.

2-(2-Metoxibencil)-5-(4-nitrofenil)-2H-tetrazol (IV.5)



Rendimiento = 41 %.

Punto de fusión = 148-149°C (sólido blanco).

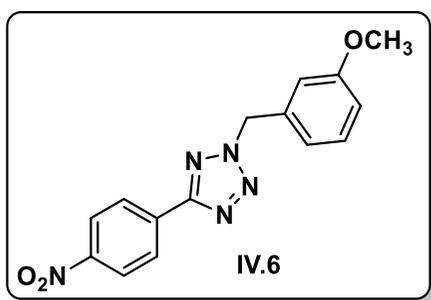
IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.23 (s, 4H), 7.29 (td, $J=6, 3$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J=6, 3$ Hz, 1H), 6.93-6.83 (m, 2H), 5.79 (s, 2H), 3.78 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.3 (C), 157.5 (C), 148.8 (C), 133.6 (C), 130.7 (CH), 130.3 (CH), 127.7 (CH), 124.3 (CH), 121.4 (C), 120.9 (CH), 111.0 (CH), 55.7 (CH_3), 52.3 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 334.0913 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$: 334.0916.

2-(3-Metoxibencil)-5-(4-nitrofenil)-2H-tetrazol (IV.6)



Rendimiento = 58 %.

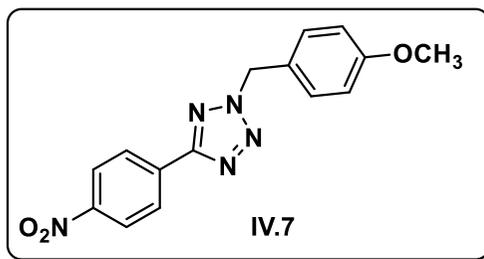
Punto de fusión = 132-133°C (sólido marrón claro).

IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.32 (s, 4H), 7.31 (t, $J=6$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=6$ Hz, 1H), 6.96-6.88 (m, 2H), 5.80 (s, 2H), 3.80 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.7 (C), 160.2 (C), 149.0 (C), 134.4 (C), 133.4 (C), 130.4 (CH), 127.8 (CH), 124.3 (CH), 120.8 (CH), 114.6 (CH), 114.3 (CH), 57.3 (CH_2), 55.4 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 334.0921 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$: 334.0916.

2-(4-Metoxibencil)-5-(4-nitrofenil)-2H-tetrazol (IV.7)

Rendimiento = 32 %.

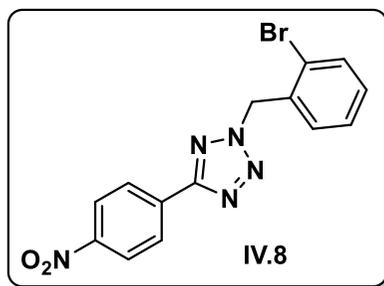
Punto de fusión = 157-158°C (sólido marrón claro).

IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.31 (s, 4H), 7.40 (d, $J=9$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J=9$ Hz, 2H), 5.76 (d, 2H), 3.80 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.6 (C), 160.4 (C), 149.0 (C), 133.4 (C), 130.3 (CH), 127.7 (CH), 125.0 (C), 124.3 (CH), 114.6 (CH), 56.8 (CH_2), 55.5 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 334.0924 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$: 334.0916.

2-(2-Bromobencil)-5-(4-nitrofenil)-2H-tetrazol (IV.8)

Rendimiento = 23 %.

Punto de fusión = 164-165°C (sólido amarillento).

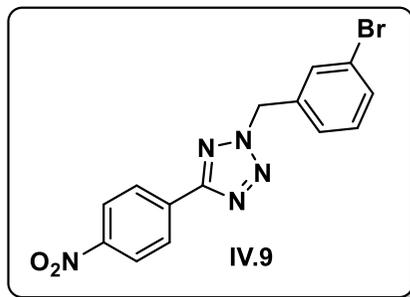
IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.33 (s, 4H), 7.65 (dd, $J=9$, 3 Hz, 1H), 7.34 (td, $J=9$, 3 Hz, 1H), 7.28-7.22 (m, 2H), 5.98 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.7 (C), 149.1 (C), 133.6 (CH), 133.3 (C), 132.6 (C), 130.8 (CH), 130.6 (CH), 128.3 (CH), 127.8 (CH), 124.3 (CH), 123.9 (C), 57.0 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 360.0095 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrN}_5\text{O}_2$: 360.0096.

2-(3-Bromobencil)-5-(4-nitrofenil)-2*H*-tetrazol (IV.9)



Rendimiento = 39 %.

Punto de fusión = 133-134°C (sólido amarillento).

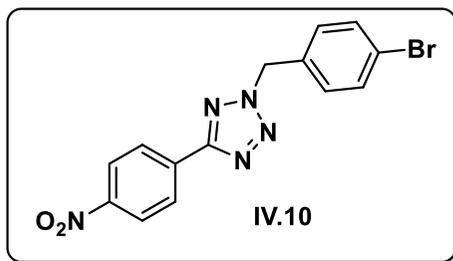
IR ν_{max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.33 (s, 4H), 7.60 (t aparente, 1H), 7.52 (dt, $J=9, 3$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J=6$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J=6$ Hz, 1H), 5.80 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.9 (C), 149.2 (C), 135.0 (C), 133.5 (C), 132.6 (CH), 131.7 (CH), 130.8 (CH), 127.9 (CH), 127.3 (C), 124.3 (CH), 123.2 (C), 56.5 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 360.0094 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrN}_5\text{O}_2$: 360.0096.

2-(4-Bromobencil)-5-(4-nitrofenil)-2*H*-tetrazol (IV.10)



Rendimiento = 17 %.

Punto de fusión = 152-153°C (sólido amarillento).

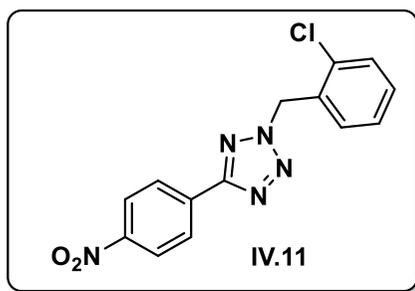
IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.33 (s, 4H), 7.53 (d, $J=9$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J=9$ Hz, 2H), 5.78 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.8 (C), 149.1 (C), 133.3 (C), 132.5 (CH), 131.8 (C), 130.4 (CH), 127.7 (CH), 124.3 (CH), 123.7 (C), 56.6 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 360.0094 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrN}_5\text{O}_2$: 360.0096.

2-(2-Clorobencil)-5-(4-nitrofenil)-2H-tetrazol (IV.11)



Rendimiento = 12 %.

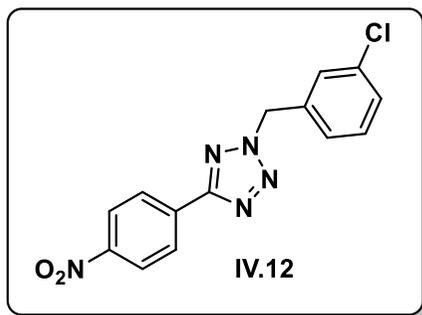
Punto de fusión = 149-150°C (sólido anaranjado).

IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.33 (s, 4H), 7.47 (dd, $J=6, 3$ Hz, 1H), 7.38-7.28 (m, 3H), 5.98 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.7 (C), 149.1 (C), 134.1 (C), 133.3 (C), 130.8 (C), 130.7 (CH), 130.6 (CH), 130.3 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 124.3 (CH), 54.5 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 316.0600 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2$: 316.0601.

2-(3-Clorobencil)-5-(4-nitrofenil)-2H-tetrazol (IV.12)

Rendimiento = 52 %.

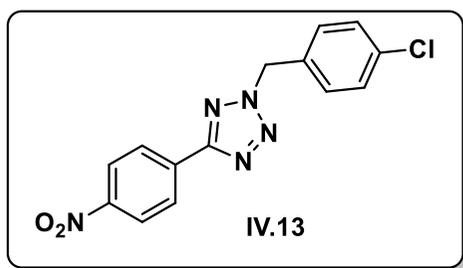
Punto de fusión = 125-126°C (sólido amarillento).

IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.32 (s, 4H), 7.45-7.30 (m, 4H), 5.81 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.8 (C), 149.0 (C), 135.3 (C), 134.7 (C), 133.3 (C), 130.5 (CH), 129.6 (CH), 128.8 (CH), 127.8 (CH), 126.7 (CH), 124.4 (CH), 56.5 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 316.0598 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2$: 316.0601.

2-(4-Clorobencil)-5-(4-nitrofenil)-2H-tetrazol (IV.13)

Rendimiento = 59 %.

Punto de fusión = 150-151°C (sólido amarillento).

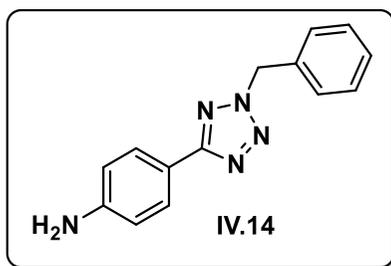
IR ν_{\max} 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1523.7, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.33 (s, 4H), 7.38 (s, 4H), 5.80 (s, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 163.7 (C), 149.0 (C), 135.5 (C), 133.4 (C), 131.4 (C), 130.1 (CH), 129.5 (CH), 127.7 (CH), 124.3 (CH), 56.5 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 316.0593 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2$: 316.0601.

4-(2-Bencil-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.14)



Rendimiento = 71 %.

Punto de fusión = 137-138°C (sólido marrón claro).

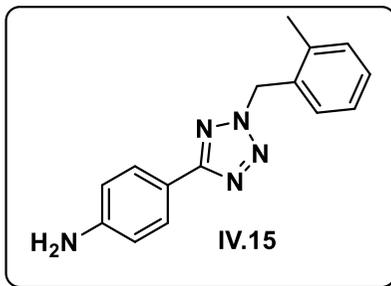
IR ν_{max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 7.69 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.43-7.33 (m, 5H), 6.65 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.90 (s, 2H), 5.57 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 164.8 (C), 150.9 (C), 134.3 (C), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 127.5 (CH), 113.7 (C), 113.6 (CH), 55.7 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 252.1253 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_5$: 252.1249.

4-(2-(2-Metilbencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.15)



Rendimiento = 93 %.

Punto de fusión = 113-114°C (sólido amarillento).

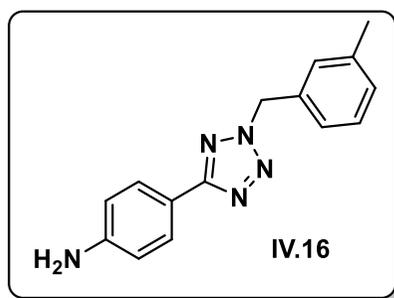
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.68 (d, $J=8$ Hz, 7.30-7.20 (m, 4H), 6.65 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.90 (s, 2H), 5.57 (s ancho, 2H), 2.35 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 165.0 (C), 150.8 (C), 136.8 (C), 132.5 (C), 130.5 (CH), 129.4 (CH), 128.7 (CH), 127.5 (CH), 126.2 (CH), 113.7 (C), 113.6 (CH), 54.0 (CH_2), 18.6 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 266.1400 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5$: 266.1406.

4-(2-(3-Metilbencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.16)



Rendimiento = 46 %.

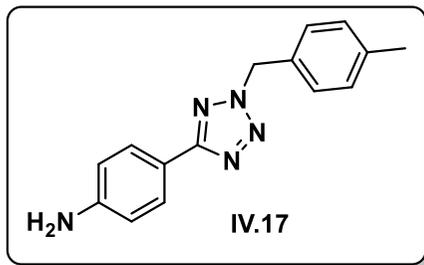
Punto de fusión = 112-114°C (sólido anaranjado).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.69 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.28 (t, $J=8$ Hz, 2H), 7.19-7.14 (m, 3H), 6.65 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.85 (s, 2H), 5.59 (s ancho, 2H), 2.28 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 165.2 (C), 150.9 (C), 138.1 (C), 134.3 (C), 129.2 (CH), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 127.5 (CH), 125.3 (CH), 113.7 (C), 113.6 (CH), 55.7 (CH_2), 20.9 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 266.1409 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5$: 266.1406.

4-(2-(4-Metilbencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.17)

Rendimiento = 63 %.

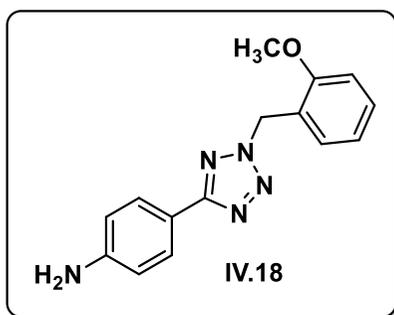
Punto de fusión = 117-118°C (sólido marrón claro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.68 (d, J=8 Hz, 2H), 7.27 (d, J=8 Hz, 2H), 7.19 (d, J=8 Hz, 2H), 6.65 (d, J=8 Hz, 2H), 5.83 (s, 2H), 5.58 (s ancho, 2H), 2.28 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 165.2 (C), 150.8 (C), 137.9 (C), 131.4 (C), 129.4 (CH), 128.2 (CH), 127.4 (CH), 113.8 (C), 113.7 (CH), 55.5 (CH₂), 20.7 (CH₃) ppm.

HR ESMS m/z 266.1408 (M+H)⁺. Calculado para C₁₅H₁₅N₅: 266.1406.

4-(2-(2-Metoxibencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.18)

Rendimiento = 58 %.

Punto de fusión = 141-142°C (sólido blanco).

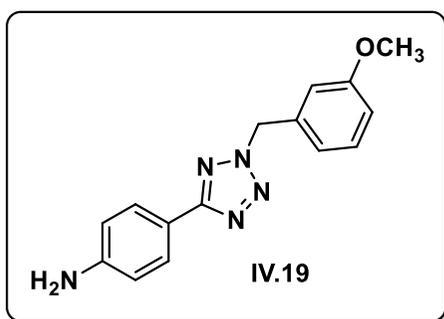
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.68 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.37 (td, $J=8$, 4 Hz, 1H), 7.23 (dd, $J=8$, 4 Hz, 1H), 7.07 (dd, $J=8$, 1 Hz, 1H), 6.97 (td, $J=8$, 1Hz, 1H), 5.80 (s, 2H), 5.55 (s ancho, 2H), 3.78 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 164.8 (C), 157.1 (C), 150.5 (C), 130.3 (CH), 130.2 (CH), 127.5 (CH), 121.8 (C), 120.5 (CH), 114.0 (C), 113.8 (CH), 111.3 (CH), 55.6 (CH_3), 51.2 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 282.1348 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}$: 282.1355.

4-(2-(3-Metoxibencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.19)



Rendimiento = 82 %.

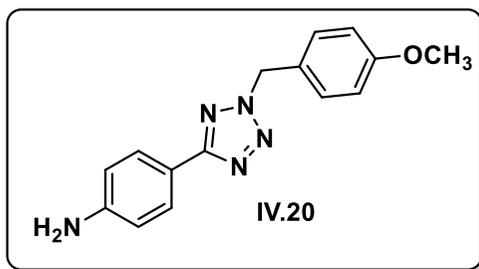
Punto de fusión = 88-89°C (sólido anaranjado).

IR ν_{max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.70 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=8$ Hz, 1H), 6.97-6.87 (m, 3H), 6.66 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.87 (s, 2H), 5.57 (s ancho), 3.74 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 165.1 (C), 159.4 (C), 150.9 (C), 135.8 (C), 129.9 (CH), 127.5 (CH), 120.2 (CH), 113.9 (CH), 113.8 (CH), 113.7 (C), 113.6 (CH), 55.6 (CH_2), 55.1 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 282.1357 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}$: 282.1355.

4-(2-(4-Metoxibencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.20)

Rendimiento = 62 %.

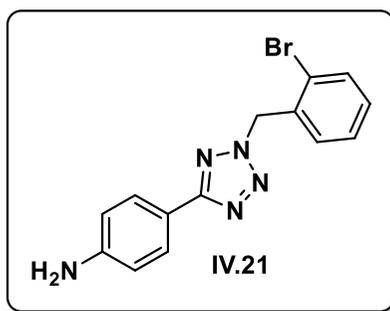
Punto de fusión = 124-126°C (sólido marrón claro).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 1213.6 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.68 (d, J=8 Hz, 2H), 7.35 (d, J=8 Hz, 2H), 6.95 (d, J=8 Hz, 2H), 6.65 (d, J=8 Hz, 2H), 5.80 (s, 2H), 5.56 (s ancho, 2H), 3.74 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 165.1 (C), 159.2 (C), 150.8 (C), 129.8 (C), 127.5 (CH), 126.2 (C), 114.3 (CH), 113.8 (C), 113.7 (CH), 55.3 (CH_2), 55.2 (CH_3) ppm.

HR ESMS m/z 282.1359 (M+H) $^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}$: 282.1355.

4-(2-(2-Bromobencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.21)

Rendimiento = 86 %.

Punto de fusión = 122-124°C (sólido amarillento).

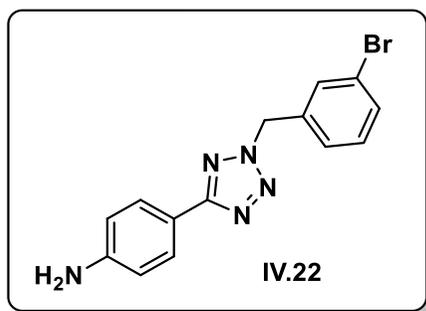
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.95 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.62 (dd, $J=8$, 1 Hz, 1H), 7.28 (td, $J=8$, 1Hz, 1H), 7.21(td, $J=8$, 1Hz, 1H), 7.08 (dd, $J=8$, 1 Hz, 1H), 6.73 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.93 (s, 2H), 3.9 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ = 165.8 (C), 148.6 (C), 133.4 (C), 133.3 (CH), 130.4 (CH), 129.9 (CH), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 123.4 (C), 117.5 (C), 115.0 (CH), 56.4 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 330.0352 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{BrN}_5$: 330.0354.

4-(2-(3-Bromobencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.22)



Rendimiento = 86 %.

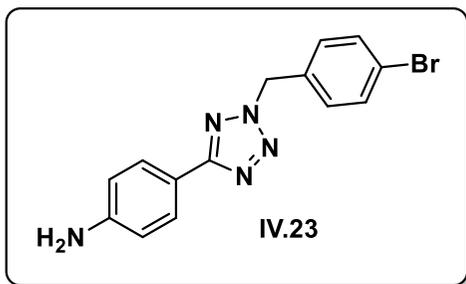
Punto de fusión = 122-124°C (sólido amarillento).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 7.70 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.63 (s aparente, 1H), 7.59-7.56 (m, 1H), 7.37 (d, $J=8$ Hz, 2H), 6.66 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.93 (s, 2H), 5.59 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 165.3 (C), 151.0 (C), 136.8 (C), 131.4 (CH), 131.0 (CH), 130.9 (CH), 127.5 (CH), 127.3 (CH), 121.8 (C), 113.7 (CH), 113.6 (C), 54.7 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 330.0352 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{BrN}_5$: 330.0354.

4-(2-(4-Bromobencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.23)

Rendimiento = 59 %.

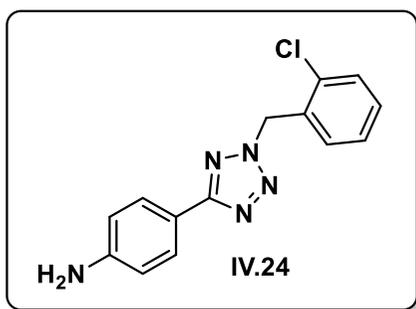
Punto de fusión = 110-112°C (sólido anaranjado).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 588.2 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.68 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J=8$ Hz, 2H), 6.65 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.90 (s, 2H), 5.58 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 165.3 (C), 150.9 (C), 133.8 (C), 131.7 (CH), 130.5 (CH), 127.5 (CH), 121.7 (C), 113.6 (CH), 113.5 (C), 55.0 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 330.0354 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{BrN}_5$: 330.0354.

4-(2-(2-Clorobencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.24)

Rendimiento = 48 %.

Punto de fusión = 129-131°C (sólido amarillento).

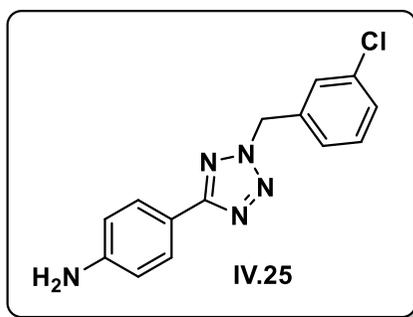
IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.67 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.56-7.52 (m, 1H), 7.47-7.37 (m, 3H), 6.65 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 5.58 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 165.0 (C), 150.9 (C), 133.1 (C), 131.5 (C), 131.4 (CH), 130.6 (CH), 129.7 (CH), 127.7 (CH), 127.5 (CH), 113.7 (CH), 113.6 (C), 53.7 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 286.0852 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClN}_5$: 286.0859.

4-(2-(3-Clorobencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.25)



Rendimiento = 93 %.

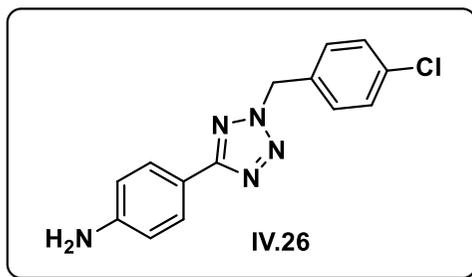
Punto de fusión = 104-105°C (sólido amarillento).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.71 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.48 (s aparente, 1H), 7.44-7.41 (m, 2H), 7.34-7.31 (m, 1H), 6.68 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.93 (s, 2H), 5.60 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 165.3 (C), 151.0 (C), 136.6 (C), 133.2 (C), 130.7 (CH), 128.5 (CH), 128.2 (CH), 127.5 (CH), 126.8 (CH), 113.7 (CH), 113.6 (C), 54.8 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 286.0860 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClN}_5$: 286.0859.

4-(2-(4-Clorobencil)-2H-tetrazol-5-il)anilina (IV.26)

Rendimiento = 75 %.

Punto de fusión = 112-113°C (sólido amarillento).

IR ν_{\max} 3309.9, 3205.5, 3004.2, 2836.5, 1652.3, 1613.9, 1494.7, 1248.7, 746.4 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.68 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.47 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J=8$ Hz, 2H), 6.65 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.93 (s, 2H), 5.59 (s ancho, 2H) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 165.3 (C), 151.0 (C), 133.4 (C), 133.2 (C), 130.3 (CH), 128.8 (CH), 127.5 (CH), 113.7 (CH), 113.6 (C), 54.8 (CH_2) ppm.

HR ESMS m/z 286.0863 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClN}_5$: 286.0859.

**CAPÍTULO 4.
EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE
LA CAPACIDAD ANTITUMORAL**

CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LA CAPACIDAD ANTITUMORAL

Tras sintetizar, purificar y caracterizar todos los compuestos, se procedió a realizar su evaluación biológica. En este capítulo se describen los ensayos llevados a cabo, así como los resultados obtenidos para cada una de las cuatro familias de compuestos.

Dichos ensayos fueron realizados en los laboratorios del grupo *Joining Medicine and Chemistry*, ubicados en el departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universitat Jaume I.

4.1. Estudio de la interacción directa con PD-L1

Uno de los estudios iniciales realizados para el *screening* de fármacos es la interacción directa con la proteína de interés. Estos ensayos, conocidos como PTS (*Protein Thermal Shift*), miden la estabilidad térmica de la proteína cuando se encuentra unida a un ligando, pudiendo ser éste un cofactor o un inhibidor. Cuando una molécula se une a una proteína ocurren una serie de reacciones que energéticamente producen un cambio en la estabilidad conformacional de la proteína. Esto se traduce en una diferencia del punto medio de las curvas de fusión cuando la proteína se encuentra unida a un ligando y cuando se encuentra libre.¹⁶³ Por tanto, a mayor modificación de temperatura, mayor afinidad del ligando por la proteína. Si la temperatura de fusión (T_m) disminuye, el ligando desestabiliza la proteína, mientras que si aumenta, la estabiliza.

Estos cambios en la temperatura de fusión son obtenidos gracias a técnicas que se basan en el fenómeno de la fluorescencia, por lo que los ensayos PTS también son conocidos como DSF (*Differential Scanning*

¹⁶³ McMahon, R.M.; Scanlon, M.J.; Martin, J.L. Interrogating Fragments Using a Protein Thermal Shift Assay. *Aust. J. Chem.* **2013**, *66*, 1502-1506. DOI: 10.1071/CH13279.

Fluorimetry). Uno de los compuestos más empleados en los ensayos PTS es el Naranja SYPRO,¹⁶⁴ cuya estructura se muestra en la Figura 4.1.

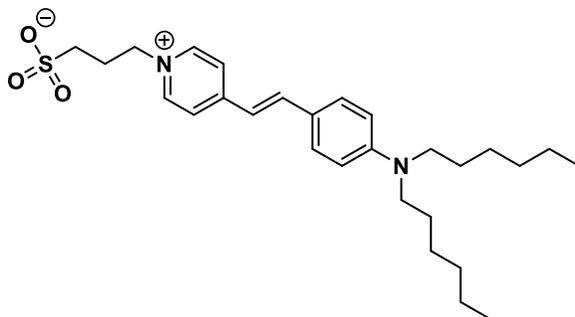


Figura 4.1. Estructura química del fluoróforo Naranja SYPRO.

Este compuesto presenta el máximo de excitación a 472 nm y el de emisión a 569 nm, y su alto carácter hidrófobo permite detectar si una proteína se encuentra plegada o desplegada. Así, a temperaturas bajas la proteína no muestra zonas hidrófobas, pues se encuentra perfectamente plegada y, por tanto, el fluoróforo no se puede unir. A medida que se va aumentando la temperatura, la proteína se va desplegando y expone las zonas más hidrófobas, que son susceptibles de unirse al fluoróforo.¹⁶² Como consecuencia de esta unión, se puede representar la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura (véase la Figura 4.2) y determinar así el valor de T_m , que corresponde a la temperatura en la que las zonas hidrofóbicas de la proteína han quedado expuestas.

¹⁶⁴ Kroeger, T.; Frieg, B.; Zhang, T.; Hansen, F.K.; Marmann, A.; Proksch, P. et al. EDTA aggregates induce SYPRO orange-based fluorescence in thermal shift assay. *PLoS One* **2013**, 12, 5. DOI: 10.1371/journal.pone.0177024.

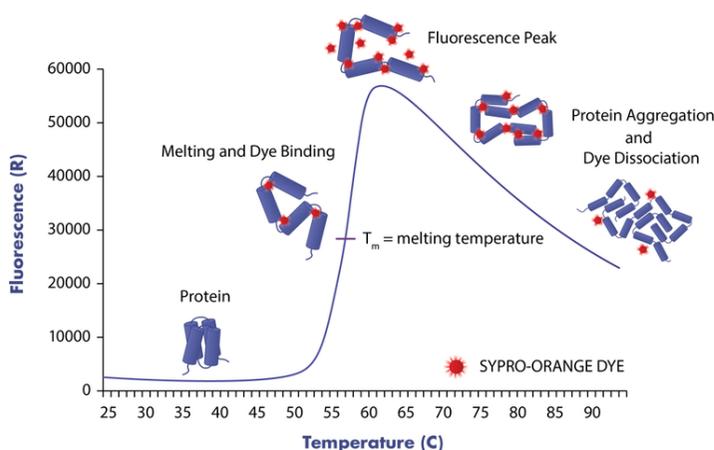


Figura 4.2. Ejemplo de gráfica de un ensayo PTS.¹⁶⁵

En esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo ensayos PTS con la proteína PD-L1, cuya T_m cuando se encuentra libre es de 34°C. Para ello, se empleó un equipo PCR a tiempo real, el cual requiere de muy poca cantidad de proteína para su uso.

4.2. Estudio del bloqueo PD-1/PD-L1

El ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) permite detectar la cantidad de un antígeno presente en una muestra líquida mediante la unión con su anticuerpo específico. Se trata de una técnica muy sensible capaz de detectar mínimas cantidades de antígeno y es la base de la detección de proteínas específicas de virus como el SARS-CoV-2 o el VIH, así como la detección de hormonas en los test de embarazo,¹⁶⁶ entre otras muchas aplicaciones.

¹⁶⁵ <https://www.reactionbiology.com/services/biophysical-assays/thermal-shift-assay-tsa> (consultada el 14 de julio de 2023).

¹⁶⁶ Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D.E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Pathol.* **1978**, *31*, 507-520. DOI: 10.1136/jcp.31.6.507.

Se pueden diferenciar varios tipos de ensayos ELISA, entre los que destacan los ensayos directos, los indirectos o los de tipo sándwich (véase la Figura 4.3).¹⁶⁷

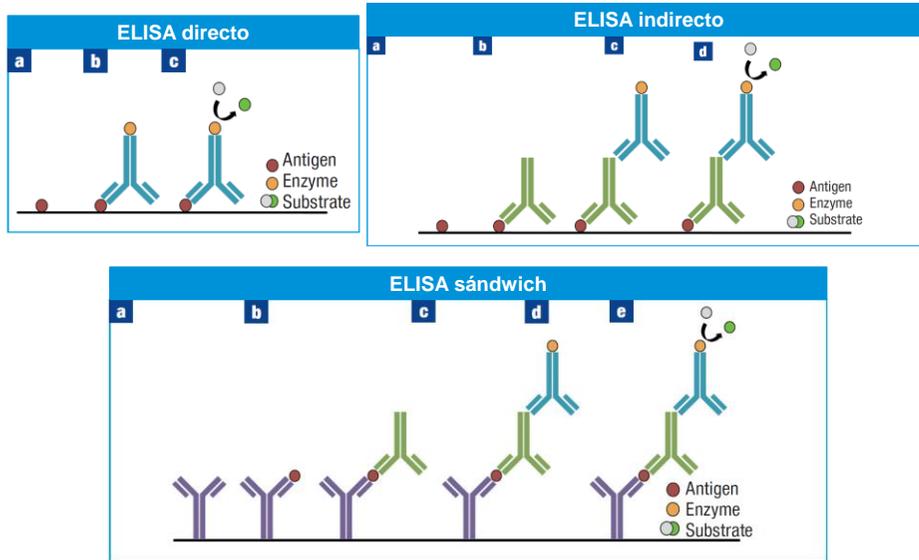


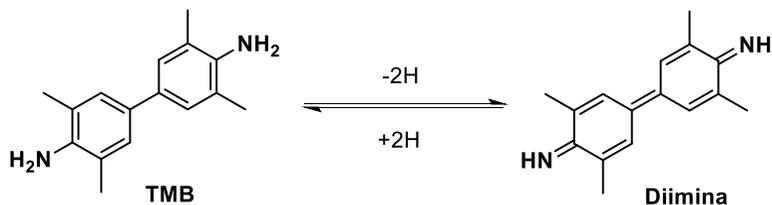
Figura 4.3. Tipos de ensayos ELISA.⁵

En los ensayos directos, el antígeno de la muestra se une al fondo del pocillo y luego se añade un anticuerpo primario que puede ser reconocido directamente por el sustrato. En los ensayos indirectos se necesita de un segundo anticuerpo secundario intermedio. Estos anticuerpos secundarios son obtenidos gracias al sistema inmune de otros animales, como el de los conejos, tras serles inyectados los anticuerpos primarios. En el caso del ensayo tipo sándwich, el antígeno se encuentra entre dos anticuerpos primarios.

El último anticuerpo lleva conjugada la enzima HRP (*Horseradish peroxidase*), que es la responsable de la reacción química que permite detectar los antígenos. En esta reacción se produce la oxidación del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), incoloro, a un compuesto tipo diimina de

¹⁶⁷ Shah, K.; Maghsoudlou, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br. J. Hosp. Med.* **2016**, *77*, 98-101. DOI: 10.12968/hmed.2016.77.7.C98.

coloración azulada (véase el Esquema 4.1). Finalmente, se añade una solución ácida para parar la reacción y poder medir la absorbancia en un espectrofotómetro, cuyo máximo de absorción se encuentra a 450 nm.



Esquema 4.1. Reacción de oxidación de TMB a diimina.

Si se desea cuantificar el bloqueo de la unión PD-1/PD-L1, se recubre el fondo del pocillo con una de las dos proteínas (en esta Tesis Doctoral se optó por PD-L1) para añadir posteriormente el compuesto a la concentración de interés juntamente con la otra proteína. Tras dejar incubar un tiempo, se realiza el protocolo de ELISA anteriormente descrito. Si el compuesto es capaz de bloquear la unión de ambas proteínas, al realizar los lavados el anticuerpo que reconoce a la proteína no anclada al fondo del pocillo no la podrá encontrar en la muestra, por lo que no producirá una absorbancia que pueda ser detectada, estableciéndose una relación inversamente proporcional entre la absorbancia medida y la capacidad de bloqueo del compuesto.

4.3. Estudio de la actividad inhibitoria quinasa

La actividad quinasa de cualquier proteína se puede medir gracias al método utilizado con el Kit *ADP-Glo™ Assay*. El principio de este ensayo se muestra en la Figura 4.4.

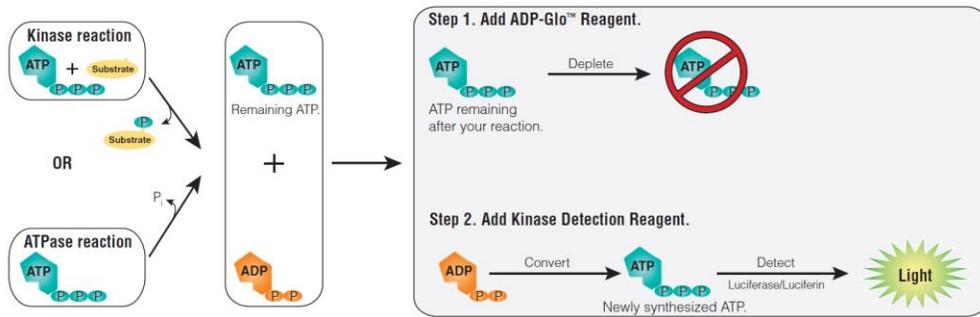
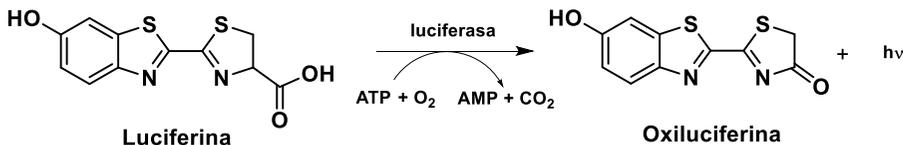


Figura 4.4. Principio de funcionamiento del ensayo ADP-Glo™.¹⁶⁸

En una reacción de tipo quinasas, el ATP se encarga de aportar un grupo fosfato al sustrato que se va a fosforilar, generándose, por cada reacción de fosforilación, una molécula de ADP. En este ensayo, se añade la quinasas a estudiar (en esta Tesis Doctoral la proteína VEGFR-2) y la reacción tiene lugar consumiendo las moléculas de ATP necesarias de acuerdo a la cantidad de sustrato presente, por lo que el número de moléculas de ADP formadas es directamente proporcional a esta cantidad, mientras que el número de moléculas de ATP sobrantes es inversamente proporcional. Una vez la reacción ha tenido lugar, se añade el reactivo ADP-Glo™, que se encarga de eliminar todas aquellas moléculas de ATP que no se han consumido en la reacción. Después de un tiempo de incubación, se añade un segundo reactivo que transforma las moléculas de ADP, que se han generado como consecuencia de la acción quinasas, en ATP. Finalmente, se añade luciferina y la enzima luciferasa que, en presencia de ATP, es capaz de transformar este sustrato en oxiluciferina,¹⁶⁷ tal y como se muestra en el Esquema 4.2.



Esquema 4.2. Reacción de reducción de la luciferina a oxiluciferina.

¹⁶⁸ Manual del Kit ADP-Glo™ Kinase Assay. "Using the Kinase Enzyme Systems with the ADP-Glo™ Assay".

La bioluminiscencia que produce esta reacción permite establecer una relación directa entre la bioluminiscencia producida y la actividad de la quinasa. Por ejemplo, si el compuesto es capaz de limitar la acción quinasa de VEGFR-2, se producirán menos moléculas de ADP susceptibles de ser transformadas en ATP y por tanto se generará menos bioluminiscencia.

4.4. Líneas celulares humanas empleadas

Para determinar la capacidad antitumoral de los compuestos se emplearon diversas líneas celulares humanas, tanto tumorales, no tumorales, como sanas. Estas líneas celulares se mantienen a -196°C en nitrógeno líquido, y cuando se necesitan son descongeladas hasta una temperatura de 37°C .

4.4.1. Líneas celulares humanas tumorales

En la Figura 4.5 se muestran las tres líneas celulares humanas tumorales, utilizadas en esta Tesis Doctoral:

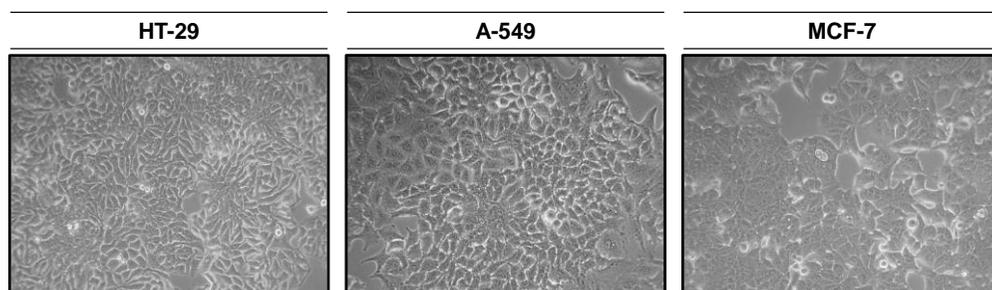


Figura 4.5. Líneas celulares humanas tumorales empleadas.

La línea celular HT-29 se encuentra formada por células pertenecientes a adenocarcinoma de colon que fueron aisladas por primera vez en 1964 de un tumor primario de una mujer caucásica de 44 años.¹⁶⁹ Por su parte, la línea A-549 se compone de células de adenocarcinoma de pulmón alveolar basal, obtenidas, en 1972, de un paciente caucásico de 58 años.¹⁷⁰ En cuanto a la

¹⁶⁹ Verhoeckx, K.; Cotter, P.; López-Expósito, I.; Kleiveland, C.; Lea, T.; Mackie, A. et al. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, 1a ed. Springer. **2015**. ISBN-10.3319353667.

¹⁷⁰ <https://www.synthego.com/a549-cells#overview> (consultada el 4 de julio de 2023).

línea tumoral MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation*), se corresponde con células de un tipo de cáncer de mama que fueron obtenidas, en 1973, a partir de un derrame pleural de una paciente metastásica de 69 años.¹⁷¹

4.4.2. Líneas celulares humanas no tumorales

En la Figura 4.6 se muestran las dos líneas celulares humanas no tumorales utilizadas en esta Tesis Doctoral:

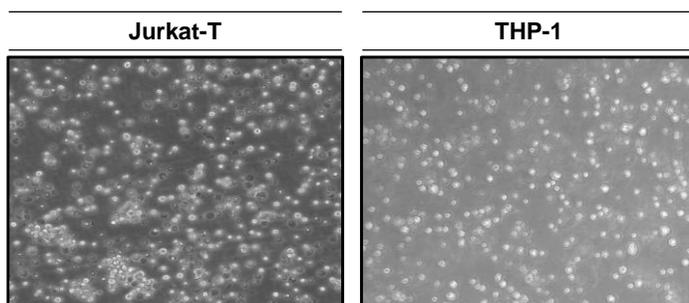


Figura 4.6. Líneas celulares humanas no tumorales empleadas.¹⁷²

Las células Jurkat-T son linfocitos T inmortalizados extraídos, en 1977, de un paciente de 14 años con leucemia linfoblástica aguda.¹⁷³ Por otro lado, la línea celular THP-1 está formada por monocitos aislados, en 1980, de un paciente de 1 año con leucemia monocítica aguda.¹⁷⁴

¹⁷¹ Comşa, Ş.; Cîmpean, A.; Raica, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 3147-3154.

¹⁷² <https://cls.shop/THP-1/300356>; <https://cls.shop/Jurkat/302147> (consultadas el 16 de septiembre de 2023).

¹⁷³ Gioia, L.; Siddique, A.; Head, S.R.; Salomon D.R.; Su, A.I. A genoma-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 334. DOI: 10.1186/s12864-018-4718-6.

¹⁷⁴ Chanput, W.; Mes, J.J.; Wichers, H.J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *23*, 37-45. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.08.002.

4.4.3. Líneas celulares humanas sanas

En la Figura 4.7 se muestran las dos líneas celulares humanas no tumorales utilizadas en esta Tesis Doctoral:

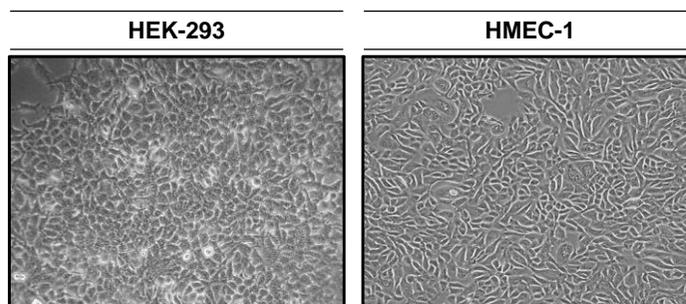


Figura 4.7. Líneas celulares humanas sanas empleadas.¹⁷⁵

La línea HEK-293 está constituida por células embrionarias de riñón y se obtuvo tras la modificación de las células HEK originales de un feto sano abortado con un ADN de adenovirus, que se insertó en el cromosoma 19 de estas células. El número 293 hace referencia al experimento del científico que realizó esta modificación.¹⁷⁶ Por último, las células HMEC-1 (*Human Microvasculature Endothelial Cell*) proceden de la transformación de muestras humanas a través del uso de un plásmido conocido como pSVT, confiriéndoles así características muy similares a las células endoteliales primarias.¹⁷⁷

4.5. Estudio de la viabilidad celular

Se define la viabilidad celular como la cantidad de células que son capaces de ejercer sus correspondientes acciones metabólicas. Para determinar la viabilidad celular de cultivos celulares se pueden emplear diversas técnicas

¹⁷⁵ https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/Primary-and-Stem-Cells/p/00000000000185047/HMEC-%E2%80%93-Human-Mammary-Epithelial-Cells;https://cls.shop/Jurkat/302147 (consultadas el 16 de septiembre de 2023).

¹⁷⁶ <https://www.synthego.com/hek293> (consultada el 5 de julio de 2023).

¹⁷⁷ Muñoz-Vega, M.; Massó, F.; Páez, A.; Carreón-Torres, E.; Cabrera-Fuentes, H.A.; Fragoso, J.M. et al. Characterization of immortalized human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) for the study of HDL functionality. *Lipids in Health Dis.* **2018**, *17*, 44. DOI: 10.3390/ijms19113394.

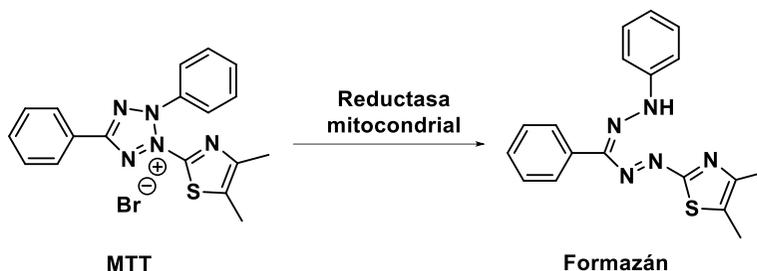
que se diferencian entre sí según su complejidad, entre las que destacan el ensayo de exclusión de tripano, el ensayo MTT, el recuento celular mediante citometría de flujo o el uso de la microscopia Raman.¹⁷⁸ En esta Tesis Doctoral se ha utilizado la técnica de exclusión de tripano para determinar la densidad celular y distribuir en los pocillos un número determinado de células a la hora de preparar los diferentes ensayos, mientras que el MTT se ha empleado en los ensayos de determinación del valor de IC₅₀ de cada compuesto en cada una de las líneas celulares estudiadas. Por último, la citometría de flujo se ha usado para determinar el número de células vivas de cada población celular en los ensayos sobre co-cultivos celulares.

4.5.1. Determinación del IC₅₀ en monocultivo mediante ensayo MTT

Para la determinación de la viabilidad celular en monocultivo se hizo uso del ensayo MTT. Éste consiste en la determinación del parámetro IC₅₀, que se define como la concentración de compuesto a la cual se reduce la viabilidad celular a la mitad respecto a un control correspondiente a las células tratadas con DMSO. El ensayo se basa en la reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), de color amarillo, a formazán, de color violeta, gracias a la acción de la enzima reductasa mitocondrial,¹⁷⁹ tal y como se indica en el Esquema 4.3.

¹⁷⁸ Stoddart, M.J.; Cell Viability Assays: Introduction. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *740*, 1-6. DOI: 10.1007/978-1-61779-108-6_1.

¹⁷⁹ Stockert, J.C.; Blázquez-Castro, A.; Cañete, M.; Horobin, R.W.; Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product in lipids droplets. *Acta Histochem.* **2012**, *114*, 785-796. DOI: 10.1016/j.acthis.2012.01.006.



Esquema 4.3. Reducción del MTT a formazán.

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico y se basa en la solubilidad del MTT en agua y en la insolubilidad del formazán en este disolvente. Si la célula, tras estar en contacto con el compuesto, sigue siendo metabólicamente viable será capaz de convertir el MTT en formazán. Después de 3 horas de tratamiento, el formazán generado se redisuelve en DMSO y se mide su absorbancia a 550 nm, mediante un colorímetro o lector de microplacas.¹⁸⁰ Una vez obtenidos los valores de absorbancia se hace uso del programa *GraphPad Prism 4*, el cual ajusta los valores de concentración de compuesto con los de absorbancia a una representación sinusoidal en la que el punto de inflexión se corresponde con el valor del IC_{50} (véase la Figura 4.8).

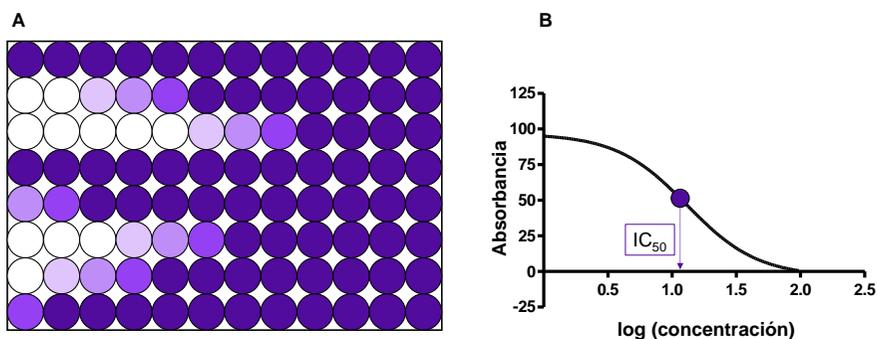


Figura 4.8. (A) Simulación de una placa correspondiente al ensayo MTT. (B) Gráfica sinusoidal que refleja el valor del parámetro IC_{50} .

¹⁸⁰ Han, M.; Li, J.; Tan, Q.; Sun, Y.; Wang, Y. Limitations of the use of MTT assay for screening in drug discovery. *J. Chin. Pharm. Sci.* **2010**, *19*, 195-200. DOI: 10.5246/JCPS.2010.03.027.

4.5.2. Determinación del porcentaje de células vivas en co-cultivo mediante citometría de flujo

En un estudio de co-cultivo celular se ponen en contacto, de forma simultánea, dos o más líneas celulares con el fin de estudiar su evolución cuando se establecen interacciones entre ambas células. En inmunoterapia resulta habitual realizar estudios en el que se cultivan en conjunto una línea celular tumoral con una línea no tumoral, usualmente perteneciente al sistema inmune. En esta Tesis Doctoral se han realizado estudios de co-cultivo celular usando la línea tumoral HT-29 y las células Jurkat-T o los monocitos THP-1 como líneas relativas al sistema inmune.

Para medir la viabilidad celular en estos ensayos se utilizó la técnica de la citometría de flujo. Esta técnica es capaz de contar y clasificar las partículas, en este caso células, en función de su tamaño, morfología e, incluso, fluorescencia. En la Figura 4.9 se muestra esquemáticamente el funcionamiento de un citómetro de flujo.

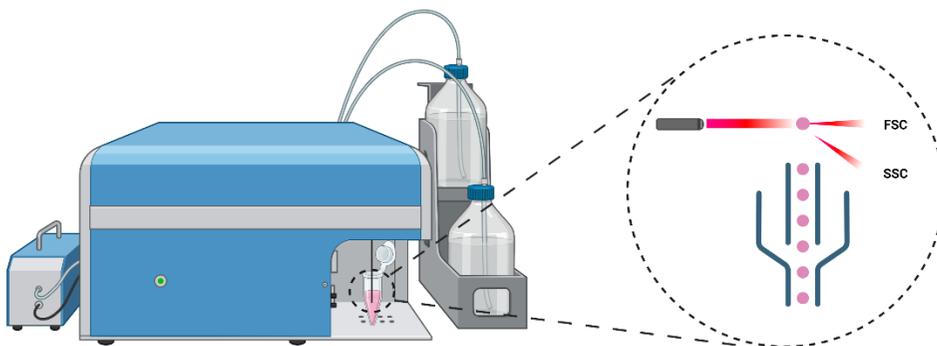


Figura 4.9. Esquema de un citómetro de flujo.¹⁵

La muestra ha de contener células suspendidas en una disolución tampón, la cual es succionada al interior del equipo. Las células se hacen pasar por la llamada cámara de flujo, que es un tubo capilar que permite el paso individualizado de las células por efecto Venturi, distribuyéndose de manera ordenada una detrás de otra. A continuación, una luz láser incide sobre cada

partícula, la cual es difractada y recogida por dos detectores. Uno de ellos, situado en la misma dirección de la luz incidente (FSC, *Forward Scatter*), indica el tamaño de la partícula, mientras que otro se encuentra situado en un ángulo de 90° (SSC, *Side Scatter*) e indica la morfología de la misma.¹⁸¹ De esta forma, se pueden diferenciar varias poblaciones que pueden estar presentes en la muestra. En la Figura 4.10 se muestran dos gráficas que permiten diferenciar la población tumoral, por lo general más grande y compleja, de la defensiva.

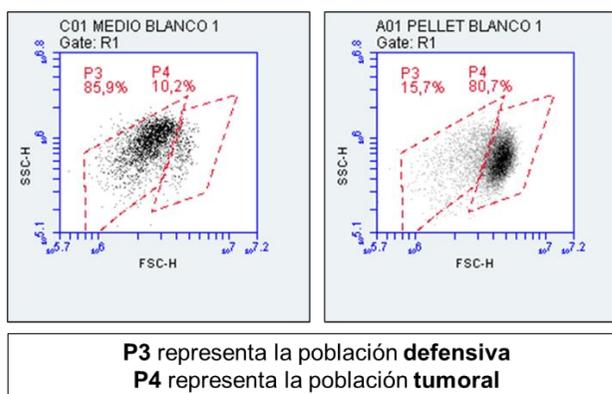


Figura 4.10. Gráficas obtenidas mediante citometría de flujo en las que se diferencian la población tumoral de la defensiva.

4.6. Estudio de la expresión de las proteínas PD-L1, CD-47, VEGFR-2 y c-Myc

Para determinar la expresión de las proteínas diana se empleó también la citometría de flujo. Esta técnica resulta muy versátil, pues es capaz de medir la fluorescencia de cada partícula de la muestra. Para ello, después del tratamiento de las células con los compuestos sintetizados, se realiza un protocolo de tratamiento de muestra en el que se añaden los anticuerpos que reconocen las proteínas que se quieren estudiar. Estos anticuerpos llevan conjugado un fluoróforo que emite fluorescencia cuando la luz láser del

¹⁸¹ McKinnon, K.M. Flow cytometry: An Overview. *Curr. Protoc. Immunol.* **2018**, 120, 1-11. DOI: 10.1002/cpim.40.

citómetro incide sobre la muestra. Los fluoróforos emiten fotones, que son captados por los detectores del equipo, y permiten establecer una relación directa entre la intensidad de la fluorescencia y la cantidad de proteína presente en la muestra.¹⁸² Actualmente existen en el mercado multitud de fluoróforos. En esta Tesis Doctoral se emplearon el FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*) y el AlexaFluor-647®, cuyas estructuras se muestran en la Figura 4.11. La longitud de onda máxima de excitación de FITC es 494 nm y la de emisión 520 nm, mientras que para el AlexaFluor-647® son de 650 nm y 668 nm, respectivamente.¹⁸³

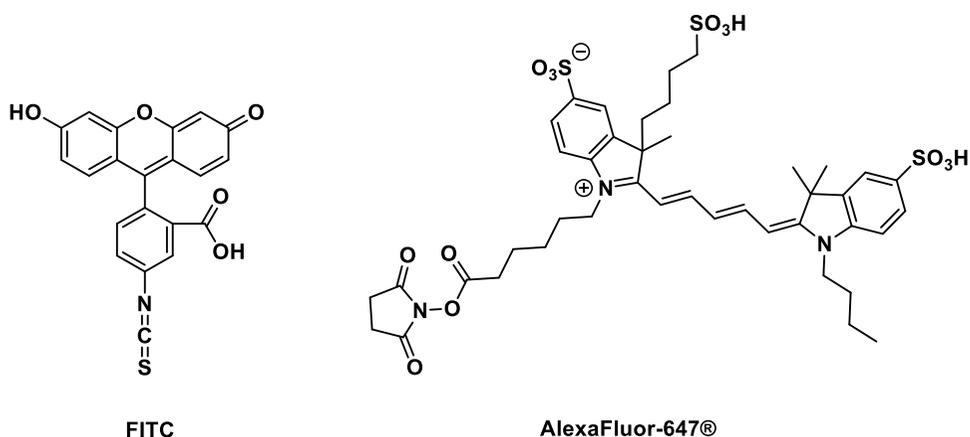


Figura 4.11. Estructura química de las moléculas de FITC y AlexaFluor-647®.

Por otra parte, las proteínas que se encuentran expresadas en la membrana celular, como PD-L1, CD-47 o VEGFR-2, también pueden detectarse en relación a su cantidad total presente en la célula. Esto se debe tener en cuenta en el protocolo de tratamiento de la muestra. Si sólo se desea detectar la cantidad de proteína expresada en la membrana celular, únicamente es necesario fijar las células con formaldehído o etanol antes de añadir los anticuerpos. Por el contrario, si se desea obtener la cuantificación

¹⁸² Terai, T.; Nagano, T. Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging. *Eur. J. Physiol.* **2013**, *465*, 347-359. DOI: 10.1007/s00424-013-1234-z

¹⁸³ <https://www.umc.edu/cancerinstitute/Cancer-Research/Core-Facilities/Flow%20Cytometry%20Core/Resources/Commonly-Used-Fluorochromes-and-Properties.html> (consultada el 16 de septiembre de 2023).

de la proteína total presente en la célula se debe permeabilizar, además, la membrana con detergentes como el Tritón B.

4.7. Estudio del efecto en la secreción de IL-6 y TNF- α

Como se ha comentado en el apartado 1.3.2.1, las proteínas IL-6 y TNF- α tienen una importancia notable en el avance del proceso tumoral, pues son secretadas al exterior de la célula y promueven diversos factores de crecimiento y evasión inmune. Para cuantificar la cantidad de proteína secretada, después del tratamiento de las células tumorales con los productos, se empleó, al igual que en el punto 4.2, la técnica ELISA.

4.8. Estudio de la actividad proapoptótica

Para determinar la capacidad proapoptótica de los compuestos, las células, después del tratamiento con éstos, se resuspendieron en el tampón adecuado y se trataron con yoduro de propidio y Anexina-V. El yoduro de propidio, cuya estructura química se puede ver en la Figura 4.12 (A), es un intercalante de ADN. En una célula viable no es capaz de alcanzar el núcleo celular porque no puede atravesar ni la membrana plasmática ni la nuclear. Sin embargo, las células apoptóticas presentan alteraciones en la estructura de su membrana plasmática que permiten que el yoduro de propidio sea capaz de entrar en la célula e interactuar con el ADN. De esta manera, al intercalarse en el material genético, queda retenido en la célula y cuando ésta es irradiada por una luz láser azul (488 nm) se produce la excitación del yoduro de propidio con emisión de fluorescencia a 633 nm. Esta emisión es registrada por los detectores del citómetro de flujo y pone de manifiesto que la célula está en apoptosis.

De la misma manera, la Anexina-V es una proteína que reconoce a una proteína endomembrana conocida como fosfatidilserina (PS). En una célula viable, el reconocimiento no es posible, pues PS se encuentra en la cara interior de la célula y la Anexina-V no puede atravesar la membrana

plasmática, pero en una célula en proceso de apoptosis la membrana se desconfigura de manera que PS queda expuesta al exterior celular y es fácilmente reconocible por la Anexina-V.¹⁸⁴ Ésta, a su vez, se encuentra conjugada a FITC, y la irradiación con un láser azul provoca la emisión de fluorescencia a 520 nm, que se puede detectar en el citómetro de flujo. De esta manera, la emisión de fluorescencia en los canales del citómetro aporta la información necesaria para determinar el porcentaje de células apoptóticas de una muestra.

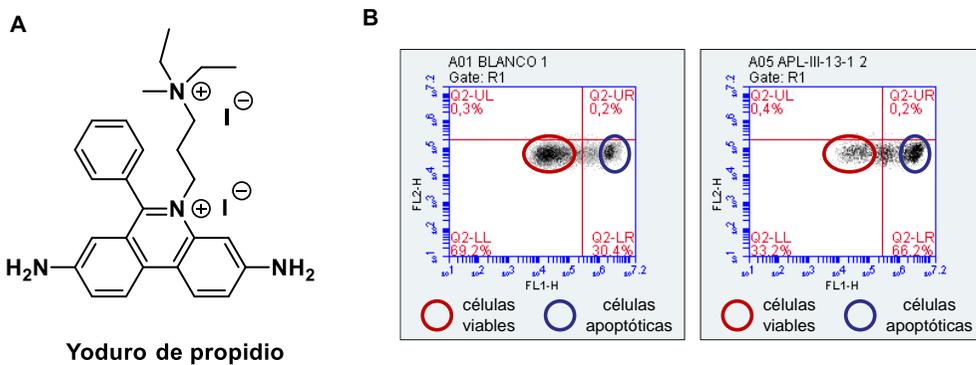


Figura 4.12. (A) Estructura química del yoduro de propidio. (B) Gráficas obtenidas mediante citometría de flujo de una muestra celular control y de una muestra celular en apoptosis.

4.9. Estudio de la actividad antiangiogénica y antivascular

La acción antiangiogénica de un compuesto se puede evaluar, *in vitro*, observando la capacidad de éste de interactuar con estructuras tubulares formadas por células endoteliales muy semejantes a la red de capilares que se forman *in vivo*. Para facilitar el proceso de tubulogénesis se añade a la placa de cultivo un soporte conocido como Matrigel®.¹⁸⁵ Esta matriz se encuentra formada fundamentalmente por un extracto de membrana basal

¹⁸⁴ Crowley, L.C.; Marfell, B.J; Scott, A.P.; Waterhouse, N.J. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *11*, 953-957. DOI: 10.1101/pdb.prot087288.

¹⁸⁵ Passaniti, A.; Kleinman, H.K.; Martin, G.R. Matrigel: history/background, uses, and future applications. *J. Cell. Commun. Signal.* **2022**, *16*, 621-626. DOI: 10.1007/s12079-021-00643-1.

obtenida de un sarcoma de ratón conocido como EHS (*Engelbreth-Holm-Swarm*) que permite que se diferencien sobre ella las células endoteliales, disponiéndose en estructuras tubulares tridimensionales.

Una de las líneas celulares más empleadas para este ensayo son las HMEC-1, ya que se encuentran en la capa más exterior de las redes endoteliales de los vasos sanguíneos. Sin embargo, en el microambiente tumoral, el tumor se aprovecha de más tipos de células para desarrollar el proceso de angiogénesis, proceso que se conoce como mimetismo vasculogénico.¹⁸⁶ Este proceso se encuentra relacionado con la gran facilidad que muestran los tumores en la formación de nuevos vasos sanguíneos, los cuales suministran nutrientes y oxígeno a los tumores y favorecen el proceso de metástasis. En este sentido, las células HEK-293 se pueden utilizar como una aproximación al aprovechamiento de células por parte del tumor para desarrollar el mimetismo vasculogénico.¹⁸⁷

En este tipo de ensayos se puede medir la capacidad antiangiogénica y antivascular de un compuesto. Los compuestos antiangiogénicos son aquellos que exhiben una inhibición de la formación de la red vascular, mientras que los antivascuales son aquellos capaces de romper los vasos sanguíneos ya preexistentes.

En esta Tesis Doctoral se emplearon tanto las líneas HMEC-1 como las HEK-293 para evaluar la capacidad antiangiogénica y antivascular de algunos compuestos a las 24 h y 48 h.

¹⁸⁶ Qiao, L.; Liang, N.; Zhang, J.; Xie, J.; Liu, F.; Xu, D. et al. Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **2015**, *19*, 315-326. DOI: 10.1111/jcmm.12496.

¹⁸⁷ Folberg, R.; Hendrix, M.J.; Manioti, A. J. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 361-381. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64739-6.

4.10. Evaluación biológica del compuesto 1 y de los compuestos de la familia I

4.10.1. Interacción directa con PD-L1

En primer lugar, se realizó un estudio de la interacción entre los compuestos y la proteína PD-L1 de manera directa mediante la técnica PTS. Los valores de desplazamiento de la temperatura de fusión se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Valores de ΔT_m del compuesto 1 y los compuestos de la familia I.

| Compuesto | ΔT_m (°C) | Compuesto | ΔT_m (°C) |
|-----------|-------------------|-----------|-------------------|
| 1 | -3.3 | I.7 | -0.86 |
| I.1 | -0.89 | I.8 | -1.33 |
| I.2 | -3.03 | I.9 | -1.46 |
| I.3 | -2.64 | I.10 | -4.49 |
| I.4 | -1.44 | I.11 | -4.52 |
| I.5 | -0.44 | I.12 | -0.75 |
| I.6 | -1.46 | I.13 | -2.35 |

Todos los compuestos producen una desviación negativa de T_m respecto a la temperatura del control. Los compuestos que provocan mayor desplazamiento de T_m son los que contienen un sustituyente bromo en posición relativa *para* (I.10) y un sustituyente cloro en posición relativa *orto* (I.11).

4.10.2. Viabilidad celular en monocultivo

La viabilidad celular del compuesto 1 y la de los compuestos de la familia I se evaluó determinando el valor de IC_{50} en las líneas celulares HT-29, A-549, MCF-7 y HEK-293 después de 48 h en contacto con los compuestos. Todos

los compuestos muestran un IC_{50} mayor a $100 \mu M$ a excepción del compuesto **1** en la línea MCF-7, con un IC_{50} de $65 \mu M$.

4.10.3. Viabilidad celular en co-cultivo

La viabilidad celular en la línea HT-29 también se evaluó en co-cultivo con la línea THP-1, empleando una proporción 1:5 de células cancerosas frente a células del sistema inmune, respectivamente. Ambas líneas celulares fueron puestas en contacto con los compuestos a una concentración de $100 \mu M$ durante 48 h y, transcurrido ese tiempo, se determinó la densidad de las diferentes poblaciones de células viables mediante la técnica de citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 4.13.

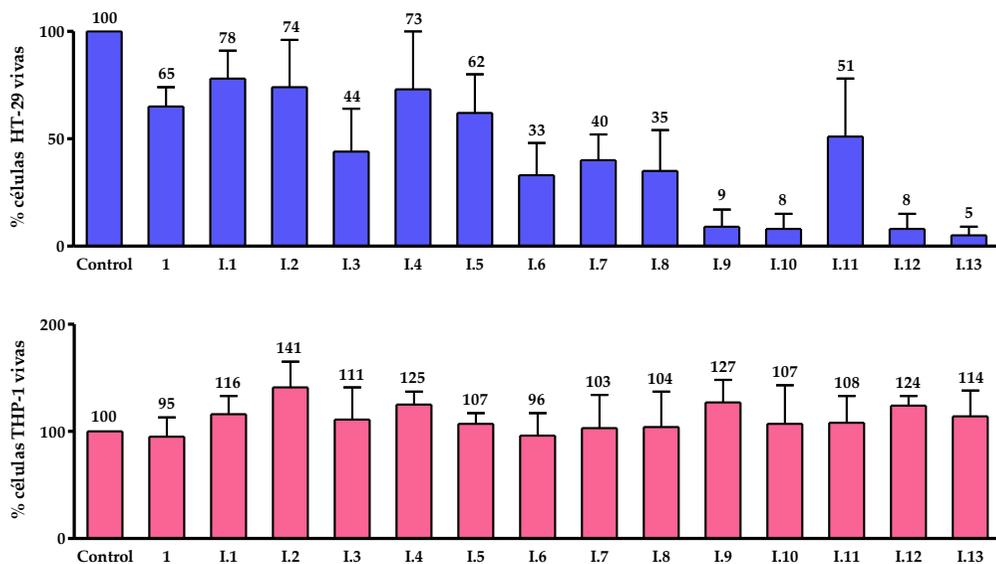


Figura 4.13. Porcentaje de células vivas en co-cultivo HT-29/THP-1 en presencia del compuesto **1** y los compuestos de la familia **I**.

Todos los compuestos se mostraron activos en este ensayo, siendo los más activos los que tienen sustituyentes en posiciones relativas *meta* y, especialmente, *para*. Los compuestos más potentes fueron los halogenados, como el **I.9** (*m*-bromo), el **I.10** (*p*-bromo), el **I.12** (*m*-cloro) y el **I.13** (*p*-cloro), que fueron capaces de reducir más de un 90% la viabilidad de las células HT-

29 con respecto al control (células tratadas sólo con DMSO). Por otra parte, la viabilidad de THP-1 no es afectada en exceso por los compuestos, con excepción del **I.2** (*o*-metilo), **I.4** (*p*-metilo) y **I.9** (*m*-bromo), que fueron capaces de aumentar ligeramente la viabilidad celular con respecto al control.

En la Figura 4.14 se muestran las imágenes tomadas a las 48 h de tratamiento del co-cultivo HT-29/THP-1 con los compuestos **I.10** y **I.13** a 100 μ M. Se puede observar que el número de células decrece drásticamente y que la morfología se ve claramente afectada, observándose células con un aspecto más redondeado y contraído que en el control.

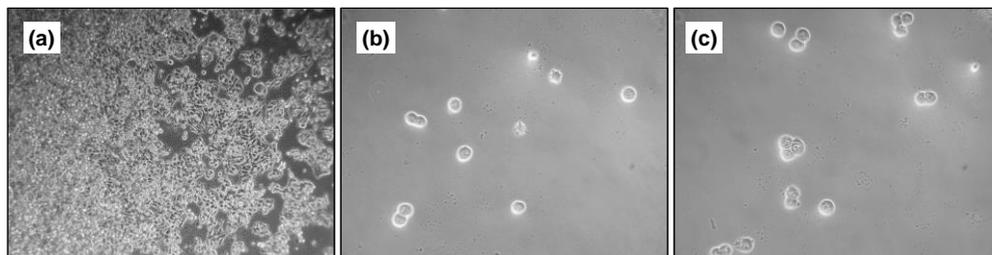


Figura 4.14. Efecto de los compuestos sobre la morfología de las células HT-29 en co-cultivo con THP-1 después de 48 h de tratamiento con dosis de 100 μ M de: (a) DMSO (control); (b) **I.10**; (c) **I.13**.

4.10.4. Efecto sobre la expresión de CD-47 y PD-L1

En el estudio de co-cultivo realizado con el compuesto **1** y los compuestos de la familia **I** se midió también, mediante citometría de flujo, la expresión relativa de las proteínas de membrana CD-47 y PD-L1 en las células cancerosas HT-29. Los resultados se muestran en la Figura 4.15.

En general, la acción de los derivados es moderada en cuanto al efecto sobre la expresión de CD-47 y nula en PD-L1. Destaca únicamente el compuesto **I.5** (*m*-metoxilo), que es capaz de reducir la expresión de CD-47 a un 62%.

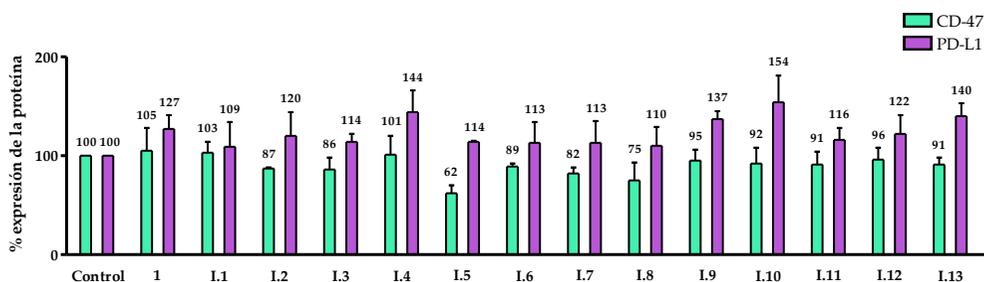


Figura 4.15. Porcentaje de expresión de las proteínas CD-47 y PD-L1 en HT-29 co-cultivadas con THP-1 en presencia del compuesto **1** y los compuestos de la familia **I** respecto al control.

4.10.5. Efecto en la secreción de IL-6 y TNF- α

En este ensayo, realizado mediante la técnica de ELISA, se seleccionaron los mejores compuestos de la familia **I** con el fin de determinar los niveles de secreción de IL-6 y TNF- α en monocultivo de HT-29 y en co-cultivo con THP-1. Los compuestos seleccionados fueron el bromoderivado **I.10** y los cloroderivados **I.11-I.13**. Se utilizaron como muestras los medios de cultivo después del correspondiente tratamiento con los compuestos a una concentración de 100 μ M. Los resultados se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Concentración y tanto por cien relativo al control de IL-6 y TNF- α en el medio de co-cultivo HT-29/THP-1 para los compuestos **I.10-I.13**.

| Compuesto | Concentración IL-6 (pg/mL) | % de IL-6 en el medio | Concentración TNF- α (pg/mL) | % de TNF- α en el medio |
|-------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Control | 192 \pm 16 | 100 | 58 \pm 8 | 100 |
| I.10 | 183 \pm 19 | 95 \pm 2 | 293 \pm 25 | 534 \pm 28 |
| I.11 | 12 \pm 2 | 6 \pm 2 | 52 \pm 6 | 91 \pm 2 |
| I.12 | 38 \pm 5 | 20 \pm 6 | 59 \pm 11 | 102 \pm 6 |
| I.13 | 189 \pm 21 | 98 \pm 12 | 190 \pm 11 | 331 \pm 26 |

Los resultados en monocultivo de HT-29 no muestran ninguna modificación en la secreción de IL-6. Sin embargo, en co-cultivo con THP-1 hay que destacar a los cloroderivados **I.11** (*orto*) y **I.12** (*meta*), que provocan más de un 80% de inhibición de la secreción de esta citoquina proinflamatoria.

Por lo que respecta al TNF- α , de nuevo los resultados en monocultivo no ofrecen ninguna variación en los niveles de secreción. De hecho, se observó que los niveles de TNF- α secretados por las células tumorales HT-29 eran tan bajos que no se pudieron detectar por ELISA ni en el control ni en los medios procedentes de los correspondientes tratamientos. Por el contrario, en el co-cultivo destacan los compuestos **I.10** (*p*-bromo) y **I.13** (*p*-cloro) debido a su acusado incremento en la liberación de la citoquina al medio celular.

4.10.6. Acción antiangiogénica y antivascolar

Los compuestos **I.10** (*p*-bromo) y **I.13** (*p*-cloro) fueron seleccionados para estudiar su capacidad de reducción de la red de vasos sanguíneos que se forma en el TME, bien sea mediante bloqueo de la formación de nuevos vasos (capacidad antiangiogénica), o bien mediante la destrucción de los ya existentes (capacidad antivascolar). En primer lugar, se estudió la actividad antiangiogénica empleando las células HMEC-1 sembradas sobre Matrigel®, siendo añadidos, al mismo tiempo, los compuestos a una concentración de 100 μ M. En la Figura 4.16 se muestran las fotografías tomadas a las 24 h.

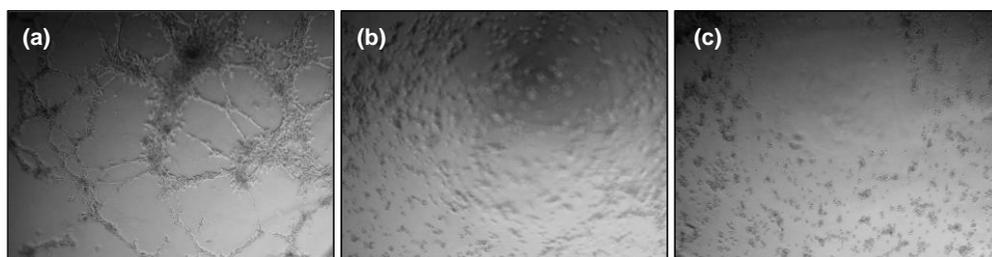


Figura 4.16. Efecto antiangiogénico de (a) DMSO; (b) **I.10** 100 μ M; (c) **I.13** 100 μ M.

Como se puede apreciar en la Figura 4.16, los resultados son satisfactorios para ambos compuestos a la concentración ensayada, pues la red de vasos no se ha formado, a diferencia de lo que ocurre en la muestra control. Sin embargo, a concentraciones por debajo de 75 μ M el efecto que se observa es muy leve. En este ensayo, se midió la acción del sorafenib como control

positivo, cuya concentración mínima necesaria para evitar la formación de los vasos sanguíneos es de 10 μM .

Por otra parte, para evaluar la capacidad de los compuestos en la inhibición del proceso de mimetismo vasculogénico y, en definitiva, establecer su potencial como agentes antivascuales dentro del TME, se optó por sembrar las células HEK-293 en el mismo soporte Matrigel® y añadir, transcurridas 24 h, los compuestos a una concentración de 100 μM . En la Figura 4.17 se muestran las fotografías tomadas a las 24 h de adición de los compuestos.

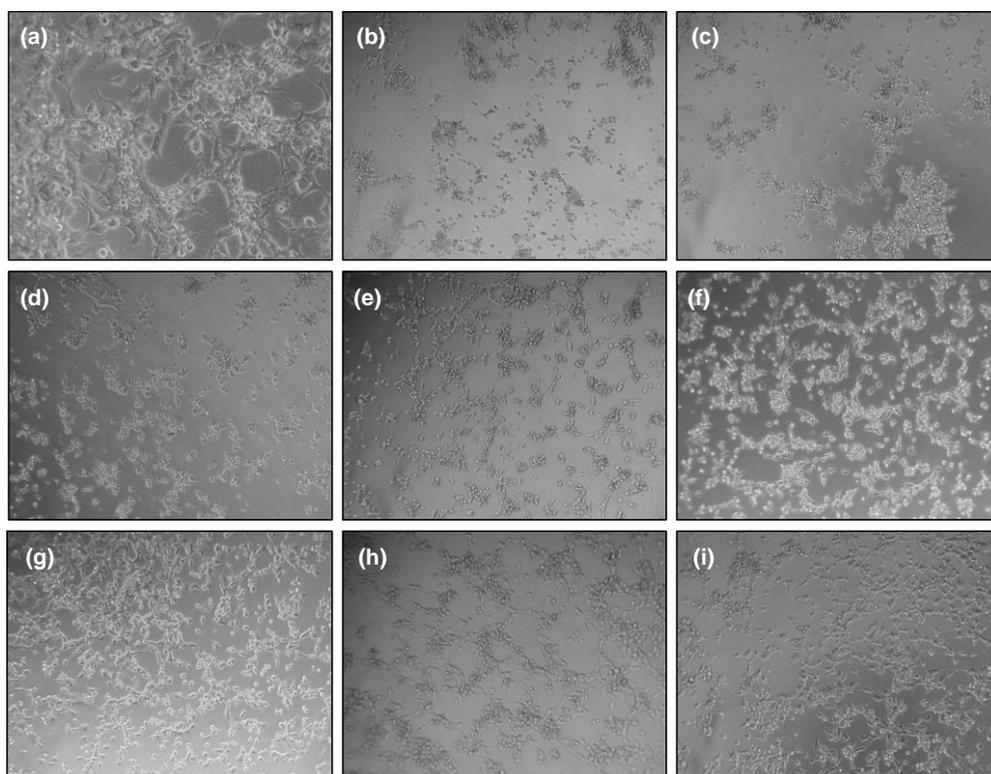


Figura 4.17. Efecto antivascular de (a) DMSO; (b) sorafenib 100 μM ; (c) sorafenib 50 μM ; (d) sorafenib 25 μM ; (e) sorafenib 12.5 μM ; (f) sorafenib 6.25 μM ; (g) sorafenib 3.17 μM ; (h) **I.10** 100 μM ; (i) **I.13** 100 μM .

De nuevo, las fotografías tomadas a 100 μM muestran actividad para todos los casos frente al mimetismo vasculogénico. De la misma forma que sucede con el ensayo antiangiogénico, el efecto que se observa para los compuestos

por debajo de 75 μM es prácticamente nulo. También se evaluó el sorafenib para comprobar su actividad en estas condiciones. Con este compuesto, la mínima concentración necesaria para afectar a la vasculatura ya formada se encuentra entre 6.25 μM y 12.5 μM .

4.10.7. Efecto sobre el bloqueo de PD-1/PD-L1

Para determinar la capacidad de bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 se escogió el producto **I.13** (*p*-cloro), que se ensayó a una concentración de 20 μM , juntamente al compuesto BMS-8 como compuesto de referencia. Los resultados obtenidos se recogen en el Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Porcentaje, relativo al control, de unión PD-1/PD-L1 para el compuesto **I.13** y para el BMS-8.

| Compuesto | Dosis (μM) | % de unión PD-1/PD-L1 |
|--------------|-------------------------|-----------------------|
| Control | - | 100 |
| I.13 | 20 | 74 \pm 5 |
| BMS-8 | 20 | 19 \pm 2 |

En la Tabla 4.3 se puede ver que el BMS-8 es capaz de inhibir más de un 80% la unión de estas proteínas, mientras que el cloroderivado **I.13** es capaz de inhibir este bloqueo en porcentajes de inhibición cercanos al 25%.

4.10.8. Efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR-2

El efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR-2 fue evaluado de nuevo para el producto **I.13** a una concentración de 100 μM , junto con el sunitinib como compuesto de referencia, el cual fue empleado a una concentración de 2 μM , (véase la Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Porcentaje, relativo al control, de actividad quinasa de VEGFR-2 para el compuesto **I.13** y para el sunitinib.

| Compuesto | Dosis (μM) | % acción quinasa |
|-------------|-------------------------|------------------|
| Control | - | 100 |
| I.13 | 100 | 95 \pm 20 |
| Sunitinib | 2 | 56 \pm 1 |

De acuerdo con los resultados de la Tabla 4.4 cabe concluir que el compuesto **I.13** no muestra ninguna acción significativa en la actividad quinasa, mientras que el sunitinib es capaz de inhibir la acción de la quinasa un 45% a una concentración mucho menor.

4.10.9. Conclusiones

En primer lugar, la interacción directa con la proteína PD-L1 refleja una disminución de la temperatura de fusión en todos los casos, por lo que se puede afirmar que, independientemente del sustituyente del anillo de bencilo, los triazoles de la familia **I** son capaces de desestabilizar PD-L1, pues a menor T_m , menor estabilidad de la proteína.

El compuesto **1** y los compuestos de la familia **I** no muestran ninguna acción sobre la viabilidad celular en el monocultivo de las tres líneas celulares tumorales, ni sobre la línea no tumoral. Sin embargo, cuando la línea HT-29 se co-cultiva con las células monocíticas THP-1 los compuestos sí muestran actividad en relación a la viabilidad de las células tumorales. En este sentido, la posición de los sustituyentes en el anillo bencílico influye en el grado de actividad del compuesto, observándose mayor actividad con los derivados halogenados *para*-sustituidos, y con los no halogenados sustituidos en *meta* (véase Figura 4.18).

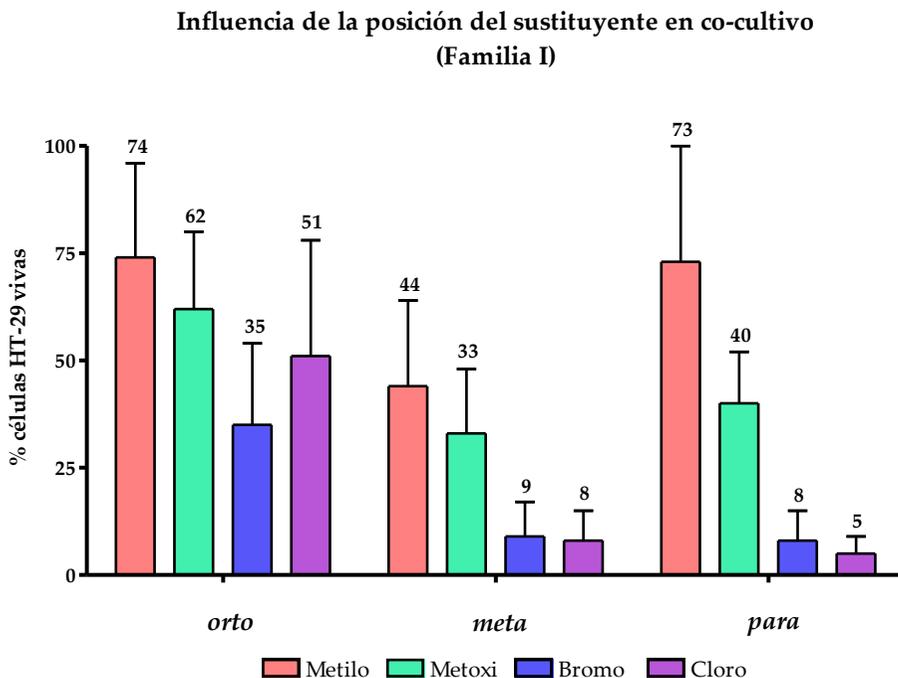


Figura 4.18. Influencia de la posición del sustituyente en el co-cultivo HT-29/THP-1 para los compuestos de la familia I.

Los compuestos que presentan un bromo (**I.9** y **I.10**) o un cloro (**I.12** y **I.13**) en *para* son los más potentes, pues son capaces de reducir la viabilidad celular de HT-29 a menos de un 10%. Es destacable mencionar que la mayoría de los compuestos no presentan una acción muy significativa frente a la viabilidad de THP-1.

En el estudio de co-cultivo también se evaluó la actividad biológica frente a las dianas CD-47 y PD-L1 en las células HT-29. Sin embargo, sólo el compuesto **I.5** (*m*-metoxilo) presenta una acción relevante frente a CD-47, exhibiendo valores de inhibición cercanos al 40%.

A pesar de que no se observa una acción reseñable sobre la expresión de PD-L1 en la membrana de las células tumorales, se decidió estudiar el compuesto **I.13** (*p*-cloro) a una concentración de 20 μM para determinar si era capaz de bloquear la unión PD-1/PD-L1, ya que en el ensayo PTS este compuesto exhibe un valor de desplazamiento de T_m prometedor y, además,

es el que menos porcentaje de células vivas muestra en el co-cultivo. Los resultados indican que este compuesto es capaz de reducir un 25 % la unión entre ambas proteínas.

Por otro lado, el compuesto **I.10** (*p*-bromo) y los tres haloderivados (**I.11**-**I.12**) fueron seleccionados, en función de los resultados de viabilidad en co-cultivo, para estudiar su actividad frente a la secreción de las citoquinas IL-6 y TNF- α (véase la Figura 4.19).

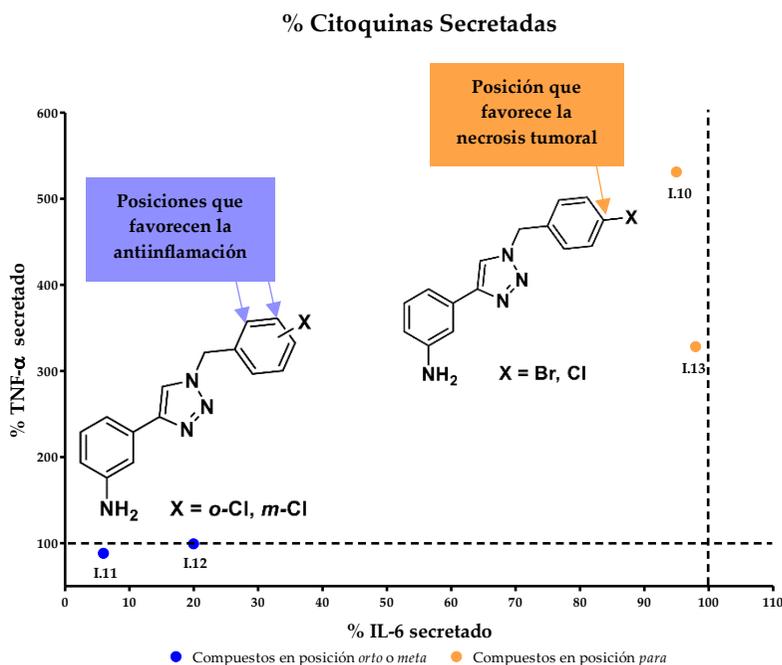


Figura 4.19. Influencia de la posición del sustituyente en el porcentaje de citoquinas secretadas al medio en co-cultivo HT-29/THP-1.

Se observa que los compuestos **I.11** (*o*-cloro) y **I.12** (*m*-cloro) son capaces de inhibir más de un 80% la secreción de IL-6 sin influir en el nivel del TNF- α en el medio del co-cultivo HT-29/THP-1, lo que implica un prometedor efecto anti-inflamatorio que podría desestabilizar el microambiente tumoral. Teniendo en cuenta su efecto sobre la viabilidad de las células tumorales en el ensayo de co-cultivo, se puede suponer que, al menos, el compuesto **I.12** (*m*-cloro) es un prometedor agente disruptor del microambiente tumoral y

reductor de la inflamación. Por otro lado, los derivados **I.10** (*p*-bromo) y **I.13** (*p*-cloro) apenas afectan al nivel de secreción de IL-6 pero son capaces de potenciar la secreción de TNF- α al medio extracelular.

A la vista de los resultados, se puede afirmar que la posición relativa 1,4 es estructuralmente relevante para el aumento de la secreción de TNF- α , con una mayor actividad cuando el átomo es el de bromo. Recientemente, se ha demostrado que esta citoquina es un agente mediador en las respuestas inmunitarias antitumorales,¹⁸⁸ por lo que una mayor cantidad de TNF- α , liberado por parte de las células del sistema defensivo, favorece la acción inmunológica sobre el tumor. De hecho, dependiendo del contexto, el TNF- α puede mediar señales a favor de la supervivencia o de la muerte de las células tumorales. Así, la potencial citotoxicidad del TNF- α producido por células defensivas puede ser un componente importante con efecto antitumoral en los mamíferos.¹⁸⁹

Se observa que, en monocultivo de HT-29, los compuestos no influyen en la secreción del TNF- α en ningún caso, por lo que los derivados están estimulando a las células defensivas, monocitos y macrófagos, para que secreten la citoquina y potencien el efecto antitumoral en el co-cultivo.

El factor de necrosis tumoral (TNF) está estrechamente relacionado con la diferenciación y la proliferación de las células tumorales y la formación de la neovascularización tumoral.¹⁸⁸ Por ello se escogieron los derivados **I.10** y **I.13**, que aumentaban considerablemente los niveles de TNF- α , con el fin de estudiar su acción sobre el mimetismo vasculogénico. Se decidió evaluar su acción antiangiogénica sobre células HMEC-1 y su capacidad antivascular sobre células HEK-293. Las imágenes obtenidas en ambos estudios, adquiridas a las 24 h y a 100 μ M, muestran que, efectivamente, los dos

¹⁸⁸ Laha, D.; Grant, R.; Mishra, P., Nilubol, N. The Role of Tumor Necrosis Factor in Manipulating the Immunological Response of Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 656908. DOI: 10.3389/fimmu.2021.656908.

¹⁸⁹ Freeman, A.J.; Kearney, C.J.; Silke, J.; Oliaro, J. Unleashing TNF cytotoxicity to enhance cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* **2021**, *42*, 1128-1142. DOI: 10.1016/j.it.2021.10.003.

derivados interfieren en la formación de nuevos vasos o en la destrucción de los ya existentes. Por debajo de 75 μM , el efecto observado es prácticamente nulo.

Por tanto, en la Figura 4.20 se muestran las estructuras de los triazoles de la familia I que muestran una actividad biológica más prometedora.

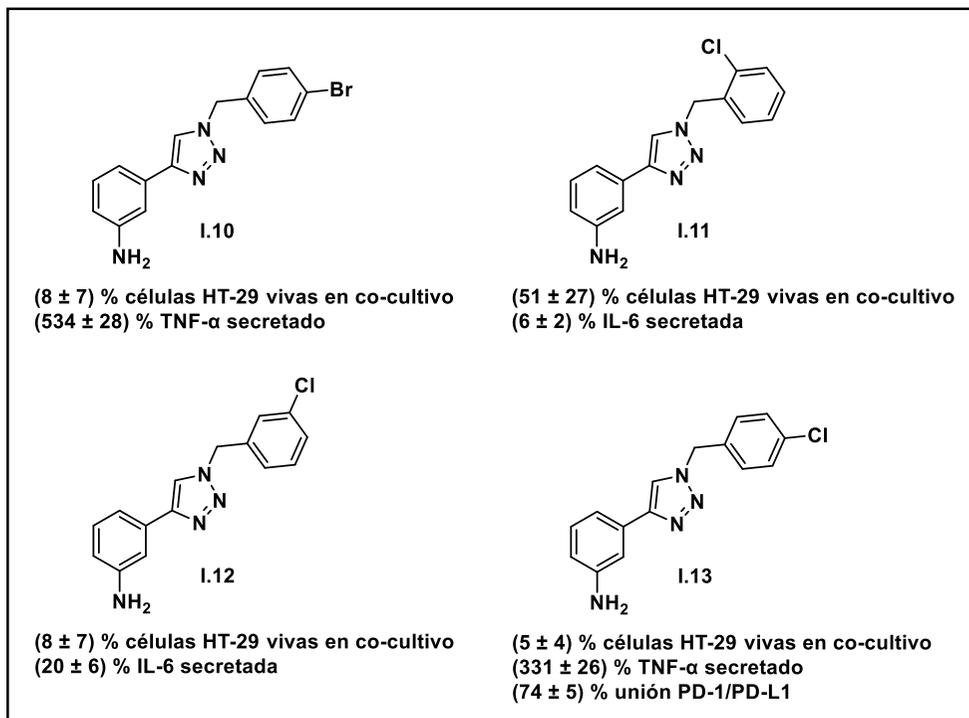


Figura 4.20. Compuestos de la familia I con los resultados más prometedores.

4.11. Evaluación biológica de los compuestos de la familia II

4.11.1. Interacción directa con PD-L1

En primer lugar, se realizó un estudio de la interacción directa entre los compuestos y la proteína PD-L1 mediante la técnica PTS. Los valores de desplazamiento de la temperatura de fusión se muestran en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Valores de ΔT_m de los compuestos de la familia II.

| Compuesto | ΔT_m (°C) | Compuesto | ΔT_m (°C) |
|-----------|-------------------|-----------|-------------------|
| II.1 | -3.42 | II.8 | +4.66 |
| II.2 | -4.61 | II.9 | -0.69 |
| II.3 | -4.75 | II.10 | +4.81 |
| II.4 | -2.43 | II.11 | -4.15 |
| II.5 | -6.00 | II.12 | -7.91 |
| II.6 | -3.27 | II.13 | -4.75 |
| II.7 | -4.88 | | |

Los resultados muestran que todos los compuestos, a excepción de los derivados **II.8** (*o*-bromo) y **II.10** (*p*-bromo), disminuyen la T_m , siendo los compuestos que contienen el sustituyente *o*-metoxilo (**II.5**) y *m*-cloro (**II.12**) los que provocan un cambio más significativo.

4.11.2. Viabilidad celular en monocultivo

La viabilidad celular de los compuestos de la familia II se evaluó determinando el valor de IC_{50} en las líneas celulares HT-29, A-549, MCF-7 y HEK-293, tal y como se indica en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Valores de IC₅₀ de los compuestos de la familia II.

| Compuesto | IC ₅₀ (μM) | | | |
|-----------|-----------------------|-------------|-----------|---------|
| | HT-29 | A-549 | MCF-7 | HEK-293 |
| II.1 | 2 ± 1 | >100 | 1.0 ± 0.5 | >100 |
| II.2 | 7 ± 1 | 4 ± 3 | 4 ± 1 | >100 |
| II.3 | 9 ± 6 | 0.7 ± 0.4 | 2.1 ± 0.6 | 63 ± 34 |
| II.4 | 8 ± 2 | 1.7 ± 0.7 | 4 ± 1 | 4 ± 2 |
| II.5 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| II.6 | >100 | >100 | 12 ± 5 | >100 |
| II.7 | >100 | >100 | 6 ± 4 | >100 |
| II.8 | 3.7 ± 1.7 | 0.45 ± 0.16 | 5 ± 1 | >100 |
| II.9 | 8.5 ± 1.3 | 2.7 ± 0.5 | 8 ± 4 | 4 ± 3 |
| II.10 | 14 ± 6 | 8 ± 2 | 8 ± 1 | >100 |
| II.11 | >100 | >100 | 11 ± 2 | >100 |
| II.12 | >100 | >100 | 8 ± 2 | >100 |
| II.13 | >100 | >100 | 9 ± 6 | >100 |

De acuerdo con los valores de IC₅₀, los compuestos son en general menos tóxicos en la línea no tumoral HEK-293 que en las tres líneas celulares tumorales ensayadas. Mientras que los compuestos que tienen un sustituyente metoxilo (**II.5-II.7**) o cloro (**II.11-II.13**) muestran valores de IC₅₀ por encima de 100 μM en las líneas HT-29 y A-549, los compuestos que contienen un grupo metilo (**II.2-II.4**) o bromo (**II.8-II.10**) en su estructura presentan valores en el rango micromolar bajo. Por lo que respecta a la línea MCF-7, todos los compuestos, a excepción del **II.5** (*o*-metoxilo), muestran una acción remarcable, exhibiendo valores de IC₅₀ entre 4 y 12 μM.

Este ensayo permitió establecer las dosis a utilizar en los posteriores ensayos biológicos, las cuales se muestran en la Tabla 4.7. También se

muestran las dosis del BMS-8 y del sorafenib, que se utilizaron en los distintos ensayos llevados a cabo posteriormente.

Tabla 4.7. Dosis utilizadas en los ensayos biológicos posteriores.

| Compuesto | Dosis ensayada (μM) | | |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|
| | HT-29 | A-549 | MCF-7 |
| II.1 | 100 | 100 | 10 |
| II.2 | 10 | 10 | 10 |
| II.3 | 10 | 10 | 10 |
| II.4 | 10 | 10 | 10 |
| II.5 | 100 | 100 | 100 |
| II.6 | 100 | 100 | 10 |
| II.7 | 100 | 100 | 10 |
| II.8 | 10 | 10 | 10 |
| II.9 | 10 | 10 | 10 |
| II.10 | 10 | 10 | 10 |
| II.11 | 100 | 100 | 10 |
| II.12 | 100 | 100 | 10 |
| II.13 | 100 | 100 | 10 |
| Sorafenib | 100 | 100 | 100 |
| BMS-8 | 100 | 100 | 100 |

4.11.3. Efecto sobre la expresión de PD-L1, VEGFR-2 y c-Myc

Para evaluar la acción sobre las proteínas diana, se decidió, en primer lugar, estudiar la capacidad de inhibición de las proteínas de membrana PD-L1 y VEGFR-2 en las tres líneas celulares tumorales (HT-29, A-549 y MCF-7). Después de 24 h en contacto con los compuestos, la expresión de las

proteínas fue medida empleando la citometría de flujo. También se evaluó el efecto del BMS-8 sobre mPD-L1 y el del sorafenib sobre mVEGFR-2. En la Tabla 4.8 se muestran los valores obtenidos como porcentaje de expresión en comparación con el control.

Tabla 4.8. Porcentaje de expresión de PD-L1 y VEGFR-2 de membrana para los compuestos de la familia II, BMS-8 y sorafenib en HT-29, A-549 y MCF-7.

| Compuesto | % expresión de proteína | | | | | |
|------------------|-------------------------|---------------|---------|----------|---------|----------|
| | HT-29 | | A-549 | | MCF-7 | |
| | mPD-L1 | mVEGFR-2 | mPD-L1 | mVEGFR-2 | mPD-L1 | mVEGFR-2 |
| II.1 | >100 | 95 ± 6 | >100 | >100 | 94 ± 5 | >100 |
| II.2 | 74 ± 13 | 87 ± 1 | 90 ± 6 | >100 | 84 ± 11 | >100 |
| II.3 | 66 ± 21 | 93 ± 1 | 86 ± 17 | >100 | >100 | >100 |
| II.4 | 87 ± 14 | 81 ± 1 | 88 ± 21 | >100 | 89 ± 5 | >100 |
| II.5 | 61 ± 22 | 93 ± 1 | 89 ± 9 | >100 | 81 ± 2 | >100 |
| II.6 | >100 | 94 ± 1 | >100 | >100 | 96 ± 5 | >100 |
| II.7 | >100 | 92 ± 14 | 95 ± 8 | >100 | 91 ± 9 | >100 |
| II.8 | 86 ± 11 | 84 ± 8 | 88 ± 12 | >100 | 91 ± 10 | >100 |
| II.9 | 87 ± 17 | >100 | >100 | >100 | 87 ± 17 | >100 |
| II.10 | 94 ± 15 | 85 ± 7 | 76 ± 4 | >100 | 84 ± 23 | >100 |
| II.11 | 44 ± 3 | 92 ± 5 | 95 ± 5 | >100 | 83 ± 7 | >100 |
| II.12 | 27 ± 5 | 63 ± 4 | 82 ± 18 | >100 | 90 ± 2 | >100 |
| II.13 | 38 ± 5 | 65 ± 4 | >100 | >100 | 86 ± 3 | >100 |
| BMS-8 | 95 ± 12 | - | 99 ± 10 | - | 90 ± 8 | - |
| Sorafenib | - | 85 ± 5 | - | 80 ± 8 | - | 85 ± 5 |

En líneas generales, los compuestos no muestran una acción muy significativa en las líneas celulares ensayadas. Sin embargo, sí que resulta interesante remarcar la acción de los cloroderivados **II.11-II.13** en la línea HT-29. El derivado que tiene el sustituyente cloro en posición *orto* (**II.11**) es capaz de reducir la expresión de PD-L1 a la mitad, mientras que los sustituyentes en posiciones *meta* (**II.12**) y *para* (**II.13**) muestran porcentajes de inhibición

aún mayores, alcanzando el 70%. Además, éstos últimos también son capaces de reducir la expresión de VEGFR-2 hasta un 65%.

Debido a que se trata de moléculas de pequeño tamaño, se decidió estudiar la posible acción de los compuestos en dianas que se encuentran en el interior de la célula. Así, se realizó el mismo estudio para determinar la expresión total de la proteína PD-L1 (tanto de membrana como citosólica) y de la proteína c-Myc, que se encuentra, preferentemente, en el núcleo celular. Los resultados se muestran en la Tabla 4.9. Se han omitido aquellos compuestos que no muestran actividad en ninguna de las dianas ensayadas.

Tabla 4.9. Porcentaje de expresión de PD-L1 total y c-Myc para los compuestos de la familia II y BMS-8 en HT-29, A-549 y MCF-7.

| Compuesto | % expresión de proteína | | | | | |
|-----------|-------------------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| | HT-29 | | A-549 | | MCF-7 | |
| | tPD-L1 | c-Myc | tPD-L1 | c-Myc | tPD-L1 | c-Myc |
| II.1 | >100 | >100 | 98 ± 3 | >100 | >100 | 60 ± 3 |
| II.3 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 78 ± 7 |
| II.4 | >100 | >100 | 56 ± 19 | >100 | >100 | 63 ± 2 |
| II.5 | 70 ± 11 | >100 | 91 ± 4 | >100 | >100 | 53 ± 3 |
| II.6 | 85 ± 17 | >100 | >100 | >100 | >100 | 55 ± 5 |
| II.7 | 67 ± 3 | 74 ± 23 | 54 ± 6 | 69 ± 9 | >100 | 62 ± 7 |
| II.8 | 45 ± 3 | >100 | 56 ± 7 | >100 | >100 | 57 ± 8 |
| II.9 | 48 ± 7 | >100 | 76 ± 1 | >100 | >100 | 56 ± 10 |
| II.10 | 51 ± 2 | >100 | 80 ± 12 | 82 ± 4 | >100 | 64 ± 6 |
| II.11 | 60 ± 6 | >100 | 78 ± 9 | >100 | >100 | 59 ± 6 |
| II.12 | 52 ± 7 | >100 | 75 ± 10 | >100 | 69 ± 7 | 59 ± 5 |
| II.13 | 52 ± 3 | 84 ± 5 | 81 ± 15 | >100 | 61 ± 14 | 51 ± 8 |
| BMS-8 | 62 ± 3 | 99 ± 7 | 66 ± 8 | >100 | 68 ± 5 | 60 ± 7 |

Los resultados muestran una acción semejante en todos los compuestos para las líneas HT-29 y A-549, mientras que se observa una actividad

diferente en MCF-7. Por lo que respecta a la actividad frente a PD-L1 en HT-29, los compuestos que contienen un sustituyente halógeno (**II.8-II.13**) son los más activos, mostrando un porcentaje de inhibición cercano al 40-50%, mientras que los derivados con un sustituyente metoxilo (**II.5-II.7**) presentan una acción moderada, destacando el derivado *p*-metoxilo (**II.7**) con un porcentaje de inhibición de alrededor del 35%. En cuanto a la línea A-549, destacan los derivados *p*-metilo (**II.4**), *p*-metoxilo (**II.7**) y *o*-bromo (**II.8**) como los más activos, con valores cercanos al 50% de expresión. Por último, en la línea MCF-7, sólo los derivados *m*-cloro (**II.12**) y *p*-cloro (**II.13**) muestran actividad, con valores de expresión de un 60%, semejantes al del BMS-8.

En cuanto a la actividad frente a c-Myc, el derivado *p*-metoxilo (**II.7**) es el único que muestra acción en las tres líneas celulares con valores de inhibición sobre el 30%. El derivado *p*-bromo (**II.10**) tiene un efecto bajo en A-549, mostrando un porcentaje de inhibición cercano al 20%. Es interesante destacar la línea MCF-7, ya que en ella todos los compuestos, a excepción del *o*-metilo (**II.2**), mostraron valores de expresión de c-Myc de alrededor del 50-60%.

4.11.4. Viabilidad celular en co-cultivo

A la vista de la capacidad de algunos compuestos para inhibir la proteína PD-L1, se decidió estudiar su efecto sobre la viabilidad celular en co-cultivo de células tumorales HT-29 y de células defensivas Jurkat-T. Para ello, se añadieron los clorocompuestos **II.11-II.13** y el BMS-8 a un co-cultivo celular formado por HT-29 y células Jurkat-T estimuladas con IFN- γ para aumentar la expresión de PD-1 en su superficie. Se empleó una proporción de 1:5 de células cancerosas frente a células del sistema inmune. Tras 24 h de incubación, el número de células vivas de ambas líneas celulares se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Porcentaje relativo al control de células vivas en co-cultivo HT-29/Jurkat-T en presencia de los compuestos **II.11-II.13** y BMS-8.

| Compuesto | % de células vivas en co-cultivo HT-29/Jurkat-T | |
|--------------|---|----------|
| | HT-29 | Jurkat-T |
| II.11 | 67 ± 3 | 80 ± 3 |
| II.12 | 44 ± 4 | 79 ± 9 |
| II.13 | 53 ± 1 | 99 ± 11 |
| BMS-8 | 51 ± 8 | 110 ± 4 |

De acuerdo con los resultados anteriores, se puede observar que todos los compuestos son capaces de reducir la viabilidad celular de HT-29 a niveles similares a los del BMS-8, a pesar de que la dosis empleada no es para nada citotóxica en el monocultivo de HT-29 (véase la Tabla 4.6). Este hecho se podría correlacionar con el efecto sobre la expresión de PD-L1 mostrada en las Tablas 4.8 y 4.9. Por otra parte, la población de las células Jurkat-T apenas se ve afectada.

4.11.5. Acción antiangiogénica y antivascolar

Los cloroderivados **II.11-II.13** fueron escogidos para estudiar su capacidad antiangiogénica (bloqueo de la formación de nuevos vasos acción) y antivascolar (destrucción de los ya existentes). Para el estudio de la acción antiangiogénica las células HMEC-1 fueron sembradas sobre Matrigel®, al mismo tiempo que eran añadidos los compuestos a una concentración de 100 μ M. En la Figura 4.21 se muestran las fotografías tomadas a las 24 h.

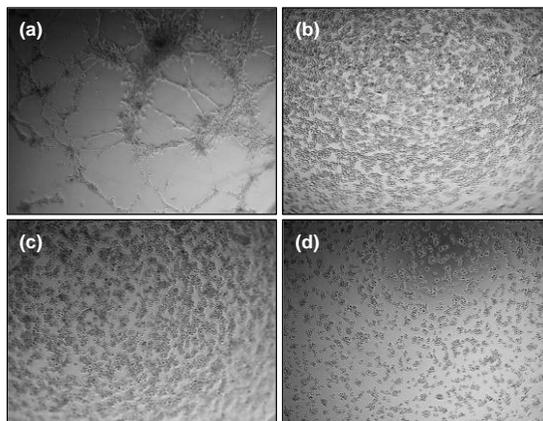


Figura 4.21. Efecto antiangiogénico de (a) DMSO; (b) **II.11** 100 μM ; (c) **II.12** 100 μM ; (d) **II.13** 100 μM .

Para los tres compuestos, las imágenes muestran la interferencia de los compuestos en la formación de nuevas redes de microtúbulos. Se puede apreciar que la mayoría de las células se agregan, formando grupos celulares pequeños que se asocian, pero no llegan a formar ninguna red de microtúbulos.

Para evaluar la capacidad antivascular, las HMEC-1 sembradas se dejaron crecer durante 24 h para promover la formación de los microtúbulos. A continuación, se añadieron los compuestos a 100 μM y se tomaron fotografías 24 h después. En la Figura 4.22 se muestran dichas fotografías.

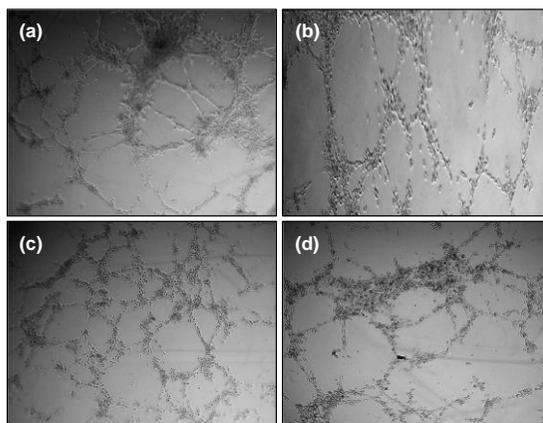


Figura 4.22. Efecto antivascular de (a) DMSO; (b) **II.11** 100 μM ; (c) **II.12** 100 μM ; (d) **II.13** 100 μM .

Las imágenes muestran la alteración de la red de microtúbulos ya formados, rompiéndose en algún caso la conexión entre ellos.

4.11.6. Efecto sobre el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1

Para determinar la capacidad de bloqueo de la unión PD-1/PD-L1 se escogieron los cloroderivados **II.11-I.13**. En la Tabla 4.11 se muestran los resultados para estos compuestos y para el BMS-8.

Tabla 4.11. Porcentaje, relativo al control, de la unión PD-1/PD-L1 para los compuestos **II.11-II.13** y BMS-8.

| Compuesto | Dosis (μM) | % de unión PD-1/PD-L1 |
|----------------|-------------------------|-----------------------|
| Control | - | 100 |
| II.11 | 150 | 58 \pm 2 |
| II.12 | 150 | 60 \pm 1 |
| II.13 | 150 | 71 \pm 4 |
| BMS-8 | 20 | 19 \pm 2 |

De acuerdo con los datos obtenidos, los tres compuestos son capaces de bloquear la interacción PD-1/PD-L1, destacando el compuesto **II.11** (*orto*) y **II.12** (*meta*) con porcentajes de inhibición de más del 40%. También hay que tener en cuenta al compuesto **II.13** (*para*), que muestra porcentajes de inhibición de alrededor del 30%.

4.11.7. Efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR-2

El posible efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR-2 fue evaluado de nuevo para la serie de cloroderivados **II.11-II.13**, ensayados en esta ocasión a 100 μM (véase la Tabla 4.12).

Tabla 4.12. Porcentaje, relativo al control, de actividad quinasa de VEGFR-2 para los compuestos **II.11-II.13** y para el sunitinib.

| Compuesto | Dosis (μM) | % acción quinasa |
|-----------|-------------------------|------------------|
| Control | - | 100 |
| II.11 | 100 | 46 \pm 10 |
| II.12 | 100 | 33 \pm 10 |
| II.13 | 100 | 31 \pm 8 |
| Sunitinib | 2 | 56 \pm 1 |

Los resultados obtenidos son muy prometedores, pues los tres compuestos son capaces de limitar la acción quinasa de VEGFR-2. Concretamente, los derivados **II.12** (*meta*) y **II.13** (*para*) muestran valores de inhibición por encima del 60%, mientras que el compuesto **II.11** (*orto*) es capaz de bloquear la acción por encima del 45%.

4.11.8. Conclusiones

Los compuestos de la familia **II** muestran una actividad frente a la viabilidad celular en monocultivo mucho mayor en las líneas tumorales que en la línea no tumoral, siendo la línea más sensible la MCF-7, en la que el IC_{50} de la gran mayoría de los compuestos se encuentra entre 4 y 12 μM .

En la Figura 4.23 se muestran los valores de IC_{50} en escala logarítmica para las tres líneas celulares tumorales. En ella se puede observar que en las líneas HT-29 y A-549 los derivados que contienen un grupo metilo (**II.2-II.4**) y bromo (**II.8-II.10**) muestran unos valores de IC_{50} en el rango micromolar bajo, mientras que las series que contienen el grupo metoxilo (**II.5-II.7**) y cloro (**II.11-II.13**) no muestran citotoxicidad. Se debe destacar a los compuestos *m*-metilo (**II.3**) y *o*-bromo (**II.8**), ya que presentan valores negativos, lo cual indica que se encuentran en el rango de concentraciones nanomolares altas.

También cabe mencionar que, en general, estos compuestos no se muestran citotóxicos frente a la línea HEK-293.

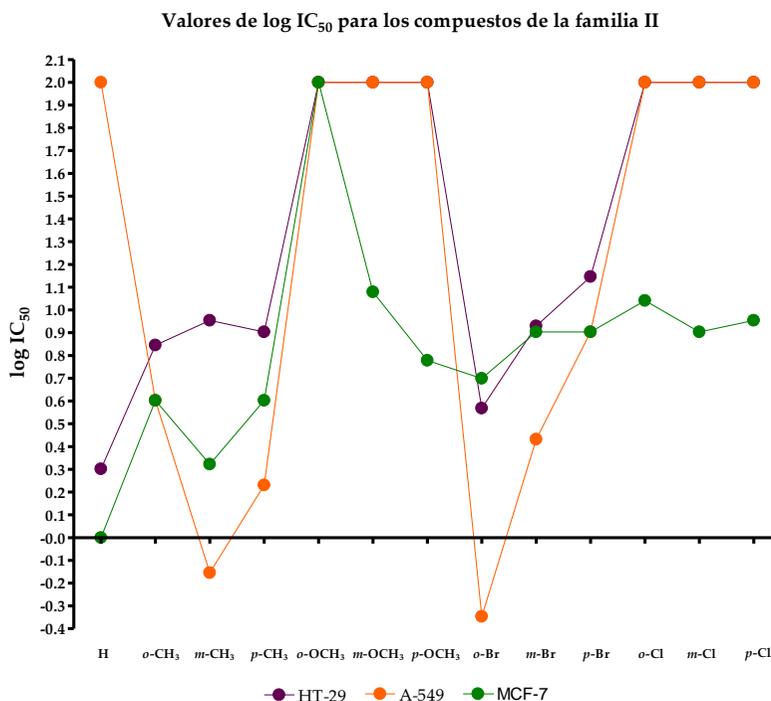


Figura 4.23. Valores de IC_{50} en escala logarítmica para todos los derivados de la familia II en las tres líneas celulares tumorales.

En líneas generales se puede decir que un sustituyente con un efecto inductivo electrón-atrayente, como el metoxilo, hace que la actividad frente a la viabilidad celular se vea disminuida, mientras que las células son más susceptibles a la acción de los compuestos a medida que aumenta la capacidad electrón-dadora del sustituyente en el anillo bencílico.

El mayor efecto frente a la viabilidad celular sobre la línea MCF-7 sugiere que los compuestos actúan a través de un mecanismo de acción diferente en esta línea celular. Si se compara el efecto de los compuestos sobre c-Myc en cada línea celular, se observa que, en general, apenas tienen un efecto en HT-29 y A-549, mientras que en la línea MCF-7 prácticamente todos los compuestos tienen valores de expresión de c-Myc de alrededor del 50-60% (véase la Figura 4.24).

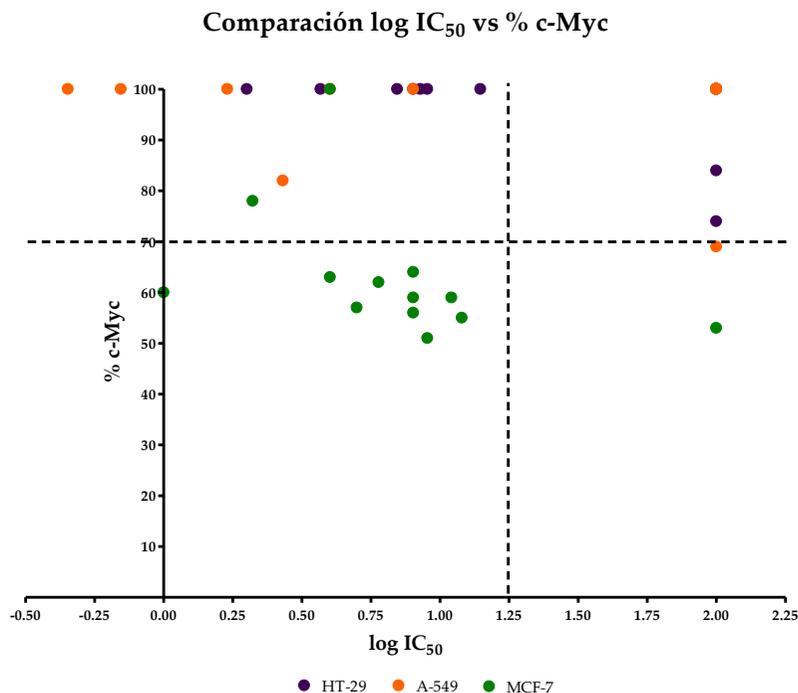


Figura 4.24. Comparación entre los valores de IC₅₀ en escala logarítmica frente al porcentaje de expresión de c-Myc para todos los derivados de la familia II en las tres líneas celulares tumorales.

Esta actividad anti-c-Myc es casi exclusiva de la línea MCF-7, lo que se puede correlacionar con el mayor efecto frente a la viabilidad celular de estos compuestos y con sus valores de IC₅₀ tan bajos, sobre todo cuando se comparan con los exhibidos en las otras líneas celulares estudiadas.

Respecto al efecto sobre PD-L1 y VEGFR-2, los compuestos se muestran más activos en la línea HT-29, especialmente aquellos que contienen un átomo halogenado en su estructura (**II.8-II.13**). De entre estos, los resultados exhibidos por los cloroderivados (**II.11-II.13**) son más potentes aún que los de los bromoderivados (**II.8-II.10**).

La actividad frente a la proteína PD-L1 de membrana muestra que el cloroderivado **II.12** (*meta*) es el que exhibe mayor inhibición, con valores alrededor del 75%. Este compuesto, juntamente con el **II.13** (*para*), se muestra activo también frente a VEGFR-2 de membrana, inhibiendo esta

diana un 40%. Por lo que respecta a PD-L1 total, todos los haloderivados muestran una capacidad de inhibición destacable, ya que los niveles de expresión se reducen hasta el 60%. El hecho de que los bromoderivados sean más activos frente a la proteína total y los cloroderivados no lo sean, podría ser atribuido a la mayor lipofilia de los bromoderivados, que facilitaría su entrada en la célula.

Para confirmar la hipótesis de que la inhibición de PD-L1 puede potenciar el efecto antitumoral de las células defensivas se llevaron a cabo ensayos de co-cultivo celular con las líneas HT-29 y Jurkat-T. En este ensayo se observó que la viabilidad celular de HT-29, a diferencia de lo ocurrido en monocultivo, sí se ve afectada cuando estas células están en contacto con las inmunitarias Jurkat-T. También se realizó un ensayo ELISA competitivo entre PD-1/PD-L1 con el fin de cuantificar el bloqueo provocado por los compuestos. De nuevo, se obtuvieron valores de inhibición elevados. Por lo tanto, se podría concluir que la capacidad de inhibición de PD-L1 y de bloqueo de la unión con PD-1 mostrada por los compuestos **II.11-II.13** es la responsable de su acción inmunomoduladora (véase la Figura 4.25).

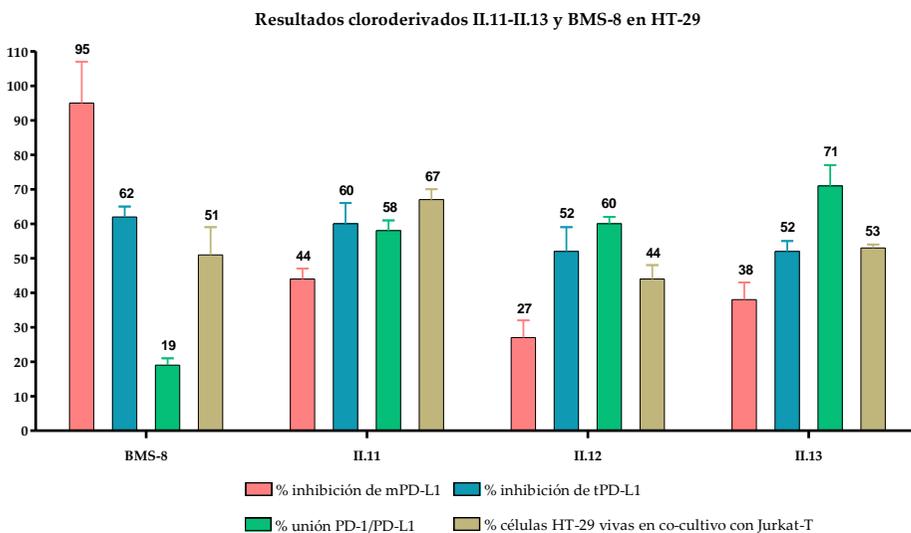


Figura 4.25. Resumen de los resultados obtenidos para los cloroderivados **II.11-II.13** y BMS-8.

En la Figura 4.26 (A) se muestran las imágenes obtenidas mediante estudios *docking* de la superposición del compuesto **II.13** (*p*-cloro), en color naranja, con el BMS-202, en color gris, en el centro activo de PD-L1. Como se puede apreciar, el anillo de fenilo unido directamente al anillo de triazol en el compuesto **II.13** establece una interacción de tipo π -stacking con el residuo Tyr56 de la cadena B de PD-L1, al mismo tiempo que el átomo de cloro establece una interacción de tipo *T*-stacking con el mismo residuo, pero de la cadena A.

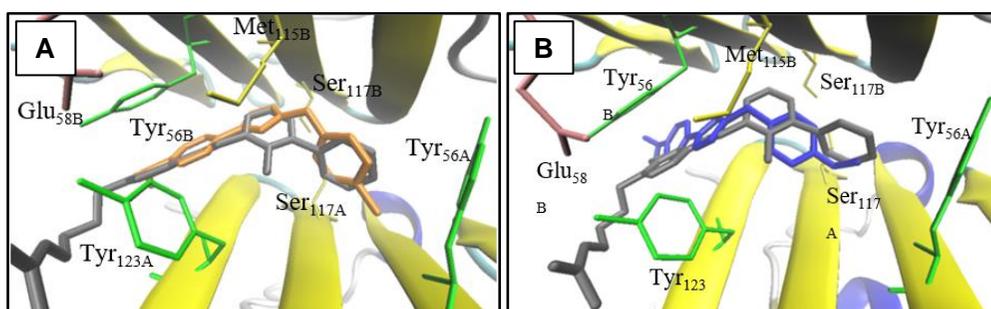


Figura 4.26. (A) Superposición del compuesto **II.13** (naranja) y del BMS-202 (gris) en el centro activo de PD-L1. (B) Superposición del compuesto **II.7** (azul) y del BMS-202 (gris) en el centro activo de PD-L1.

En la Figura 4.26 (B) se muestra, a modo de comparación, la superposición del compuesto **II.7** (*p*-metoxilo), en color azul, con el BMS-202, en color gris, en el centro activo de PD-L1. Se puede ver que la mayor longitud del grupo metoxilo hace que la molécula se desplace hacia la izquierda, perdiéndose la interacción π -stacking con el residuo Tyr56 de la cadena B, lo que podría explicar la menor actividad de **II.7** en relación con **II.13**.

Por otro lado, los cloroderivados también son prometedores agentes antiangiogénicos y antivasculares, pues se observan unos efectos moderados sobre la proteína VEGFR-2, unos valores de inhibición por encima del 60% frente a su actividad quinasa, así como un efecto desestabilizador en cuanto a la formación y destrucción de las redes de microtúbulos formadas por las células HMEC-1.

Por tanto, en la Figura 4.27 se muestran los triazoles de la familia II que muestran una actividad biológica más prometedora.

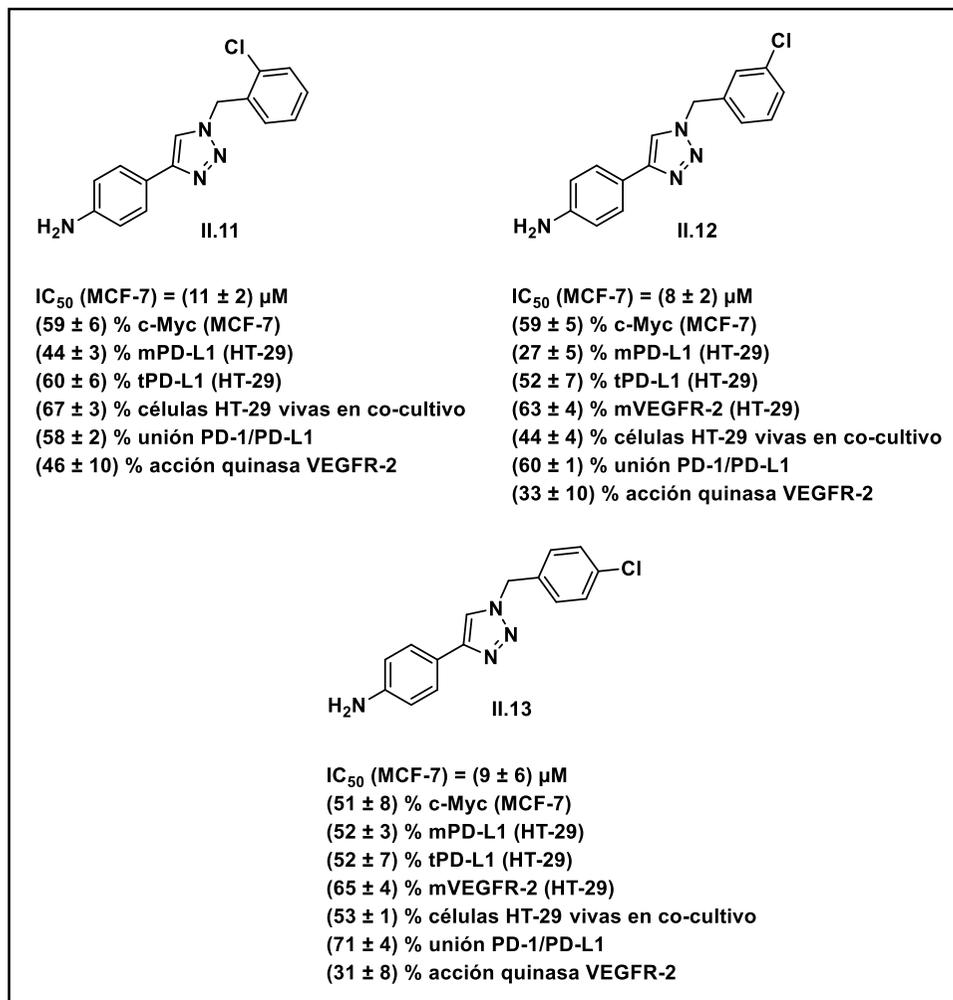


Figura 4.27. Compuestos de la familia II con los resultados más prometedores.

4.12. Evaluación biológica del compuesto 2 y de los compuestos de la familia III

4.12.1. Interacción directa con PD-L1

En primer lugar, se realizó un estudio de la interacción entre los compuestos y la proteína PD-L1 de manera directa mediante la técnica PTS. Los valores de desplazamiento de la temperatura de fusión se muestran en la Tabla 4.13.

Tabla 4.13. Valores de ΔT_m del compuesto 2 y los compuestos de la familia III.

| Compuesto | ΔT_m (°C) | Compuesto | ΔT_m (°C) |
|-----------|-------------------|-----------|-------------------|
| 2 | -3.16 | III.14 | -6.13 |
| III.1 | +6.05 | III.15 | +6.76 |
| III.2 | +4.44 | III.16 | +5.45 |
| III.3 | +4.94 | III.17 | -5.12 |
| III.4 | +4.44 | III.18 | +4.65 |
| III.5 | +1.66 | III.19 | +3.55 |
| III.6 | -4.86 | III.20 | +4.41 |
| III.7 | +2.95 | III.21 | +0.68 |
| III.8 | -5.85 | III.22 | +3.06 |
| III.9 | -0.08 | III.23 | +2.49 |
| III.10 | -5.12 | III.24 | +4.31 |
| III.11 | -5.01 | III.25 | +5.24 |
| III.12 | -2.18 | III.26 | +3.74 |
| III.13 | -0.52 | | |

La mayoría de los compuestos producen una desviación bastante pronunciada de T_m respecto a la temperatura del control. Los compuestos que presentan un mayor desplazamiento son los que contienen un anillo de bencilo (**III.1** y **III.14**) y de metilbencilo (**III.2-III.4** y **III.15-III.17**) unido al grupo tetrazol.

4.12.2. Viabilidad celular en monocultivo

La viabilidad celular del compuesto **2** y de los compuestos de la familia **II** se evaluó determinando el valor de IC_{50} en las líneas celulares HT-29, A-549, MCF-7 y HEK-293. La mayoría de los compuestos resultan inactivos a concentraciones inferiores a 100 μM , por lo que en la Tabla 4.14 solo se muestran los valores de IC_{50} de los compuestos más activos.

Tabla 4.14. Valores de IC_{50} de los compuestos más activos de la familia **III**.

| Compuesto | IC_{50} (μM) | | | |
|---------------|-----------------------|------------|------------|-------------|
| | HT-29 | A-549 | MCF-7 | HEK-293 |
| III.10 | >100 | 39 \pm 1 | >100 | >100 |
| III.11 | 81 \pm 12 | >100 | >100 | >100 |
| III.13 | >100 | >100 | 84 \pm 7 | >100 |
| III.23 | >100 | >100 | 44 \pm 1 | >100 |
| III.25 | 81 \pm 12 | >100 | 88 \pm 8 | >100 |
| III.26 | 72 \pm 41 | >100 | >100 | 91 \pm 22 |

La mayoría de los derivados no muestran acción sobre las líneas ensayadas. Sin embargo, algunos de ellos exhiben actividades moderadas, con valores de IC_{50} por encima de 35 μM . Los compuestos más destacables son **III.10** y **III.23**, que contienen una unidad *p*-bromobencílica y mostraron valores de IC_{50} inferiores a 50 μM .

4.12.3. Viabilidad celular en co-cultivo

La viabilidad celular en la línea HT-29 también se evaluó en co-cultivo con la línea THP-1, empleando una proporción de 1:5 de células cancerosas frente a células del sistema inmune. Ambas líneas celulares fueron puestas en contacto con los compuestos a una concentración de 100 μ M durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, las densidades de las diferentes poblaciones celulares se determinaron mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 4.28.

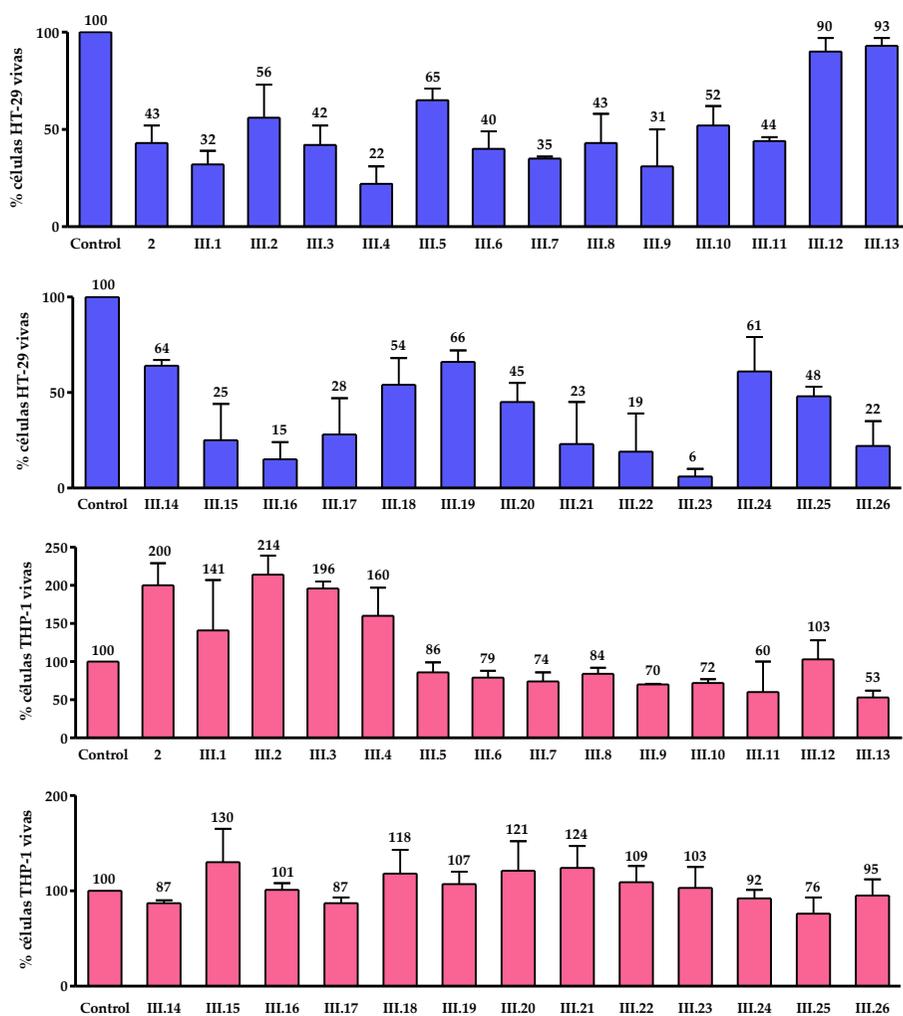


Figura 4.28. Porcentaje de células vivas en co-cultivo HT-29/THP-1 en presencia del compuesto 2 y los compuestos de la familia III.

En general, los aminotetrazoles (**III.14-III.26**) muestran una actividad superior a los nitrotetrazoles. De nuevo, al igual que sucede con la familia **I**, las posiciones relativas *meta* y *para* generan estructuras con mayor actividad que las que presentan sustituyentes en posición relativa *orto*, destacando los compuestos halogenados (**III.21-III.26**).

La mayor reducción de la viabilidad celular de las células HT-29 se consigue con los compuestos **III.22** (*m*-bromo) y **III.23** (*p*-bromo), que exhiben valores inferiores al 20%. No obstante, no hay que desestimar a los nitrotetrazoles **III.4** (*p*-metilo) y **III.9** (*m*-bromo), ni a los aminotetrazoles con sustituyente metilo (**III.15-III.17**), con sustituyente bromo en posición *orto* (**III.21**) y con sustituyente cloro en posición *para* (**III.26**). Estos compuestos muestran valores de viabilidad celular por debajo del 30% en todos los casos. En relación a la viabilidad celular de las THP-1 en co-cultivo resulta importante remarcar la acción de los derivados **2** y **III.1-III.4**, pues estimulan de forma muy activa la viabilidad celular.

En la Figura 4.29 se muestran las imágenes del co-cultivo HT-29/THP-1 48 h después de la adición de los compuestos con grupo metoxilo en su estructura (**III.5-III.7** y **III.18-III.20**) a 100 μ M. Se puede apreciar que el número de células decrece drásticamente y su morfología se ve claramente afectada, adoptando un aspecto más redondeado y contraído que en el control.

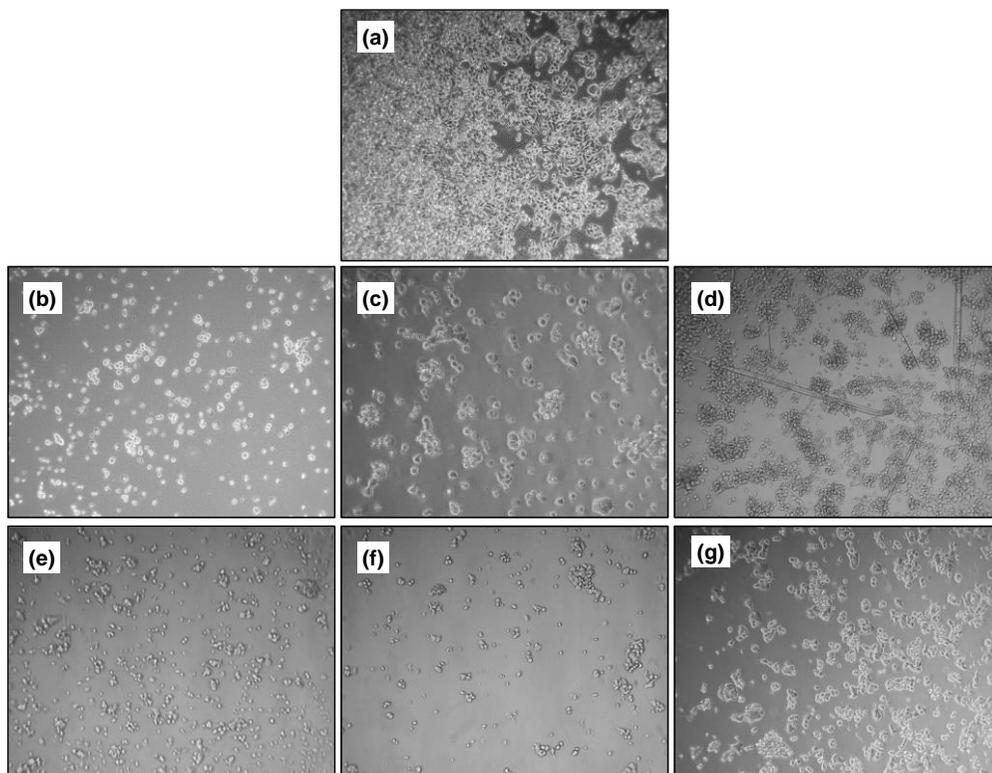


Figura 4.29. Efecto de los compuestos sobre la morfología de las HT-29 en el co-cultivo con THP-1 después de 48 h de tratamiento con dosis de 100 μM de: (a) DMSO; (b) III.5; (c) III.6; (d) III.7; (e) III.18; (f) III.19; (g) III.20.

4.12.4. Efecto sobre la expresión de PD-L1, CD-47, VEGFR-2 y c-Myc

El efecto de los compuestos de la familia III sobre la expresión de las proteínas PD-L1, VEGFR-2 se midió tanto en la membrana celular como en la totalidad de la célula, así como también se midió la expresión de c-Myc. Tras incubar las células HT-29 en monocultivo con los compuestos durante 48 h a una concentración de 100 μM , se analizaron las muestras mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.15. Se han omitido aquellos compuestos que no muestran actividad en ninguna de las dianas ensayadas.

Tabla 4.15. Porcentaje de expresión de mPD-L1, tPD-L1, mVEGFR-2, tVEGFR-2 y c-Myc para el compuesto **2** y los compuestos de la familia **III** en HT-29.

| Compuesto | % expresión de proteína en HT-29 | | | | |
|---------------|----------------------------------|---------|----------------|----------|----------------|
| | mPD-L1 | tPD-L1 | c-Myc | mVEGFR-2 | tVEGFR-2 |
| 2 | 95 ± 1 | >100 | 89 ± 6 | 96 ± 0 | >100 |
| III.1 | 66 ± 1 | >100 | 82 ± 12 | >100 | >100 |
| III.2 | 64 ± 4 | 94 ± 9 | 91 ± 18 | >100 | 72 ± 21 |
| III.3 | 65 ± 2 | 97 ± 10 | 89 ± 17 | >100 | 84 ± 47 |
| III.4 | 63 ± 5 | 92 ± 9 | 78 ± 16 | >100 | 65 ± 28 |
| III.5 | 89 ± 2 | 92 ± 24 | 86 ± 6 | >100 | 55 ± 6 |
| III.6 | 83 ± 17 | >100 | 75 ± 6 | >100 | 42 ± 1 |
| III.7 | 84 ± 2 | 89 ± 6 | >100 | 88 | 39 ± 14 |
| III.8 | >100 | 97 ± 9 | 90 ± 8 | >100 | 75 ± 6 |
| III.9 | >100 | 88 ± 12 | 76 ± 2 | 100 ± 0 | 60 ± 6 |
| III.10 | >100 | 93 ± 11 | 72 ± 4 | 96 ± 1 | 71 ± 3 |
| III.11 | 98 ± 1 | 89 ± 13 | 86 ± 4 | 97 ± 2 | 53 ± 13 |
| III.12 | >100 | 90 ± 20 | >100 | 97 ± 3 | >100 |
| III.13 | 93 ± 2 | 87 ± 8 | 90 ± 20 | 95 ± 2 | 45 ± 28 |
| III.16 | >100 | 81 ± 8 | >100 | >100 | >100 |
| III.18 | 97 ± 6 | >100 | 97 ± 10 | 99 ± 12 | >100 |
| III.19 | >100 | >100 | 86 ± 7 | 76 ± 2 | >100 |
| III.20 | >100 | 99 ± 16 | 75 ± 8 | >100 | 75 ± 2 |
| III.21 | 64 ± 1 | >100 | 90 ± 16 | >100 | 92 ± 34 |
| III.22 | 66 ± 6 | >100 | 83 ± 15 | >100 | >100 |
| III.23 | 92 ± 21 | >100 | 76 ± 14 | >100 | >100 |
| III.24 | 95 ± 1 | >100 | >100 | 96 ± 1 | 92 ± 6 |
| III.25 | >100 | 97 ± 11 | 76 ± 6 | 97 ± 2 | 99 ± 8 |
| III.26 | >100 | 99 ± 14 | 80 ± 6 | >100 | 96 ± 7 |

En líneas generales, ninguno de los compuestos de la familia **III** es capaz de reducir la expresión de PD-L1 total en las células tumorales, aunque, algunos de ellos sí muestran cierta acción sobre esta proteína en la membrana celular. Destacan el nitroderivado **III.1**, sin sustituyente en el anillo de bencilo, los nitroderivados **III.2-III.4**, con sustituyente metilo en el anillo de bencilo, y los aminotetrazoles **III.21** y **III.22**, que contienen un átomo de bromo en posiciones relativas *orto* y *meta*, respectivamente. Todos estos compuestos son capaces de inhibir la expresión de la proteína en la membrana (mPD-L1) alrededor de un 35%.

Por lo que respecta a VEGFR-2, ninguno de los compuestos es capaz de inhibir su expresión en la membrana, aunque algunos sí se muestran activos en el total de la proteína. En este sentido, los nitrotetrazoles que contienen un sustituyente metoxilo (**III.5-III.7**), un sustituyente bromo en posición relativa *meta* (**III.9**) y un sustituyente cloro en posiciones relativas *orto* (**III.11**) y *para* (**III.13**) son los más activos, inhibiendo en más de un 45% la proteína respecto al control.

Por último, en referencia a c-Myc, los nitrotetrazoles **III.4** (*p*-metilo), **III.6** (*m*-metoxilo), **III.9** (*m*-bromo) y **III.10** (*p*-bromo), juntamente con los aminotetrazoles **III.20** (*p*-metoxilo), **III.23** (*p*-bromo) y **III.25** (*m*-cloro) son los más activos, reduciendo la expresión de esta proteína hasta un 75% respecto al control. En este caso es importante remarcar que independientemente del grupo nitro o amino, los compuestos con el sustituyente *p*-bromo se encuentran entre los más activos.

También se llevó a cabo un estudio de la expresión de las proteínas de membrana CD-47 y PD-L1 en las células HT-29 co-cultivadas con monocitos THP-1 para el compuesto **2** y los compuestos de la familia **III**, el cual se llevó a cabo mediante citometría de flujo. En la Figura 4.30 se recogen los resultados como porcentaje de expresión relativa al control de cada diana biológica según el tratamiento con cada uno de los compuestos.

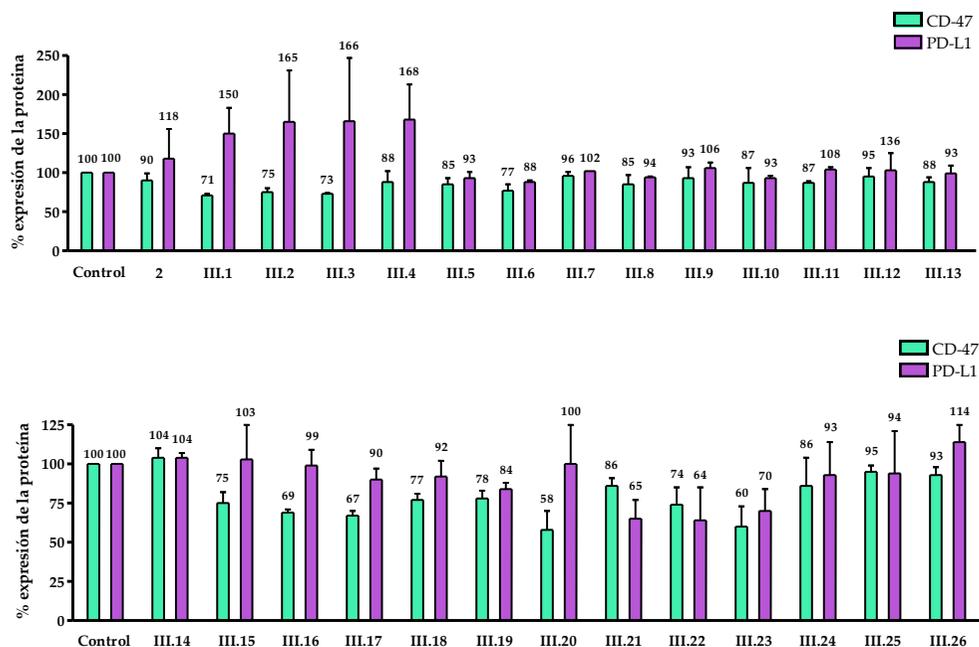


Figura 4.30. Porcentaje de expresión de las proteínas CD-47 y PD-L1 en co-cultivo HT-29/THP-1 en presencia del compuesto **2** y los compuestos de la familia **III**.

En general, la acción de los derivados es moderada en cuanto a la expresión de CD-47 y nula en PD-L1. Los aminotetrazoles más activos frente a CD-47 son los compuestos **III.16** (*m*-metilo), **III.17** (*p*-metilo), **III.20** (*p*-metoxilo) y **III.21-III.23** (bromoderivados), mostrando más de un 30% de inhibición. Cabe destacar a los bromoderivados, ya que son los únicos que, además, son capaces de inhibir la presencia de PD-L1 de membrana hasta un 70%. De nuevo se observa la misma tendencia que en el ensayo de viabilidad celular, ya que los compuestos con sustituyentes en *meta* y *para* son más activos que los compuestos con sustituyentes en *orto*, destacando especialmente los compuestos halogenados.

4.12.5. Efecto en la secreción de IL-6 y TNF- α

Los mejores compuestos de la familia **III** se seleccionaron para determinar, mediante técnica ELISA, los niveles de secreción de IL-6 y TNF- α en monocultivo de HT-29 y en co-cultivo con THP-1. Los compuestos seleccionados fueron el bromoderivado **III.23** y los cloroderivados **III.24-III.26**. Se utilizaron como muestras los medios de cultivo después del tratamiento de las células con los compuestos a una concentración de 100 μ M. Los resultados se muestran en la Tabla 4.16.

Tabla 4.16. Concentración y tanto por cien relativo al control de IL-6 y TNF- α en el medio de co-cultivo HT-29/THP-1 para los compuestos **III.23-III.26**.

| Compuesto | Concentración IL-6 (pg/mL) | % de IL-6 en el medio | Concentración TNF- α (pg/mL) | % de TNF- α en el medio |
|---------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Control | 192 \pm 16 | 100 | 58 \pm 8 | 100 |
| III.23 | 5 \pm 1 | 3 \pm 1 | 40 \pm 8 | 68 \pm 4 |
| III.24 | 6 \pm 1 | 3 \pm 1 | 50 \pm 8 | 88 \pm 2 |
| III.25 | 6 \pm 1 | 3 \pm 1 | 50 \pm 11 | 87 \pm 7 |
| III.26 | 11 \pm 3 | 6 \pm 2 | 48 \pm 11 | 83 \pm 8 |

Los resultados en monocultivo de HT-29 no muestran ninguna modificación en la secreción de IL-6. Sin embargo, cabe mencionar que en co-cultivo con THP-1 los cuatro compuestos ensayados muestran valores de inhibición de la secreción de la citoquina por encima del 95%, lo que pone de manifiesto el efecto anti-inflamatorio de los mismos.

Por lo que respecta al TNF- α , de nuevo los resultados en monocultivo no ofrecen ninguna variación en los niveles de secreción. En co-cultivo los compuestos no afectan en gran medida a la liberación de esta citoquina, siendo el bromoderivado **III.23** el que se muestra un poco más activo, con una inhibición del TNF- α de un 30% en relación al control.

4.12.6. Efecto sobre la expresión de CD-80 y CD-11b

Los marcadores CD (del inglés *Cluster of Differentiation*) son antígenos ubicados en la superficie celular de los leucocitos humanos. El CD-80 es un marcador que indica el grado de diferenciación entre monocitos y macrófagos. Por otro lado, el marcador CD-11b aporta información sobre la acción de los macrófagos en el TME, pues se han detectado niveles de expresión altos de CD-11b en aquellos macrófagos reclutados por el tumor (TAMs) implicados en la inflamación y en la propagación del tumor, entre otros procesos.^{190,191}

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio anterior, que ponían de manifiesto el potencial efecto anti-inflamatorio de los compuestos **III.24-III.26**, se decidió estudiar la influencia de estos compuestos sobre la expresión de CD-80 y CD-11b en la membrana de los monocitos THP-1. Para ello, se empleó como muestra el medio de cultivo de los ensayos de co-cultivo descritos en el apartado 4.12.3 y que recogían la población de células monocíticas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.17.

Tabla 4.17. Porcentaje de expresión de CD-11b en THP-1 en muestras de co-cultivo HT-29/THP-1 para los compuestos **III.24-III.26**.

| Compuesto | % expresión de CD-11b |
|-----------|-----------------------|
| Control | 100 |
| III.24 | 67 ± 2 |
| III.25 | 63 ± 3 |
| III.26 | 67 ± 4 |

¹⁹⁰ Sandilands, G.P.; Ahmed, Z.; Perry, N.; Davison, M.; Lupton, N.; Young, B. Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology* **2005**, *114*, 354-368. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.02114.x.

¹⁹¹ Jiménez-Urbe, A.P.; Valencia-Martínez, H.; Carballo-Uicab, G.; Vallejo-Castillo, L.; Medina-Rivero, E.; Chacón-Salinas, R. et al. CD80 Expression Correlates with IL-6 Production in THP-1-Like Macrophages Costimulated with LPS and Dialyzable Leukocyte Extract (Transferon®). *J. Immunol. Res.* **2019**, 1-9. DOI: 10.1155/2019/2198508.

En cuanto al marcador CD-80, ninguno de los tres compuestos produce variaciones significativas. Sin embargo, el marcador CD-11b sí se ve reducido en su expresión hasta valores cercanos al 65% por acción de los compuestos.

4.12.7. Acción antiangiogénica y antivascolar

Los aminotetrazoles que contienen un halógeno en su estructura (**III.21-III.26**) fueron los seleccionados para estudiar su interacción con la red de vasos sanguíneos que se forma en el TME, bien bloqueando la formación de nuevos vasos (capacidad antiangiogénica), bien destruyendo los ya existentes (capacidad antivascolar). En primer lugar, se estudió la actividad antiangiogénica empleando las células HMEC-1, que fueron sembradas sobre Matrigel® añadiendo, al mismo tiempo, los compuestos a una concentración de 100 μM . En la Figura 4.31 se muestran las fotografías tomadas a las 24 h.

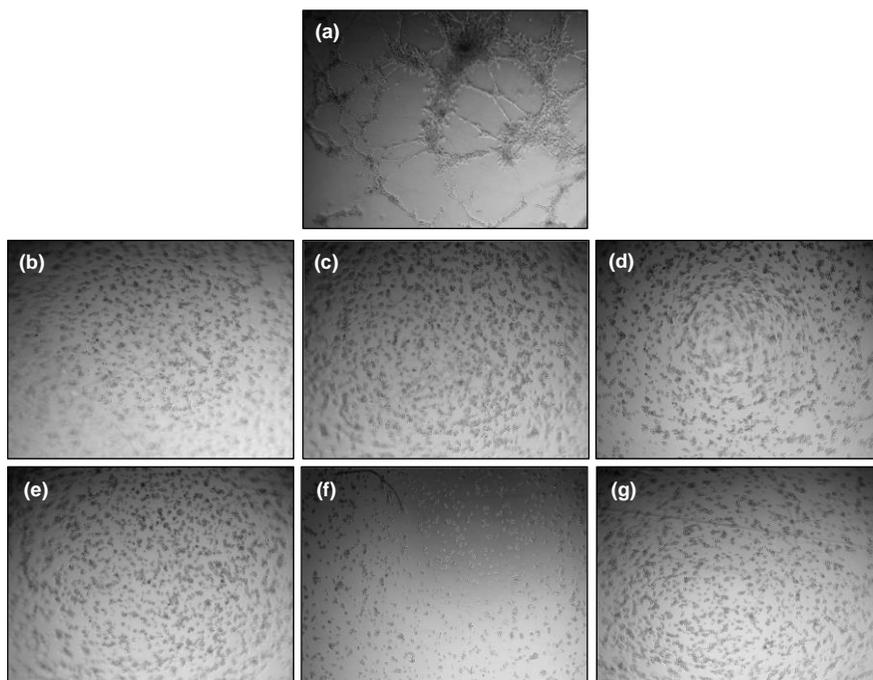


Figura 4.31. Efecto antiangiogénico de (a) DMSO; (b) **III.21** 100 μM ; (c) **III.22** 100 μM ; (d) **III.23** 100 μM ; (e) **III.24** 100 μM ; (f) **III.25** 100 μM ; (g) **III.26** 100 μM .

Como se puede ver en la Figura 4.31, todos los compuestos muestran resultados satisfactorios a la concentración ensayada, pues impiden la formación de la red de vasos, lo que contrasta con lo observado en la muestra control. Conviene señalar que este efecto es muy leve cuando se emplean concentraciones por debajo de 75 μM . En este ensayo se utilizó el sorafenib como control positivo. Con este compuesto la concentración mínima necesaria para impedir la formación de los vasos sanguíneos es de 10 μM .

La evaluación de la capacidad antivascular se llevó a cabo sembrando las células HEK-293 en el mismo soporte Matrigel® seguida de la adición, transcurridas 24 h, de los compuestos a una concentración de 100 μM . Con este ensayo se pretendía observar la acción de los compuestos sobre el mimetismo vasculogénico que se desarrolla en el TME. En la Figura 4.32 se muestran las fotografías tomadas a las 24 h después de la adición de los compuestos.

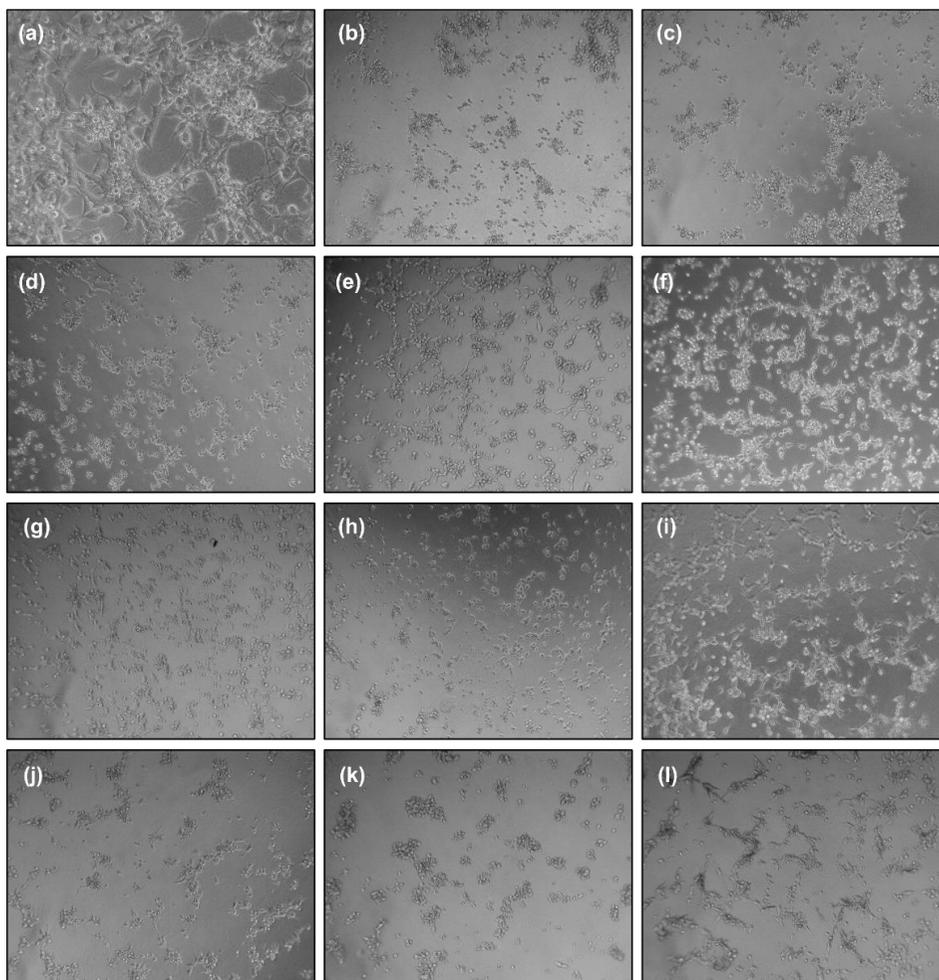


Figura 4.32. Efecto antivascular de (a) DMSO; (b) sorafenib 100 μM ; (c) sorafenib 50 μM ; (d) sorafenib 25 μM ; (e) sorafenib 12.5 μM ; (f) sorafenib 6.25 μM ; (g) **III.21** 100 μM ; (h) **III.22** 100 μM ; (i) **III.23** 100 μM ; (j) **III.24** 100 μM ; (k) **III.25** 100 μM ; (l) **III.26** 100 μM .

Las fotografías tomadas a 100 μM muestran actividad en todos los compuestos ensayados, aunque hay que mencionar que, al igual que sucede en el ensayo antiangiogénico, el efecto que se observa por debajo de 75 μM es prácticamente nulo. En este ensayo también se probó la acción del sorafenib. Como se puede ver en la Figura 4.32, la mínima concentración que requiere el sorafenib para afectar a la vasculatura formada está entre 6.25 μM y 12.5 μM .

4.12.8. Efecto sobre el bloqueo de PD-1/PD-L1

Para evaluar el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 se escogió el aminoderivado **III.26** (*p*-cloro) en base a los resultados obtenidos. Este compuesto se ensayó a una gradación de concentraciones, que comenzó a partir de 20 μM . Los resultados se muestran en la Tabla 4.18.

Tabla 4.18. Porcentaje, relativo al control, de unión PD-1/PD-L1 para el compuesto **III.26** y BMS-8.

| Compuesto | Dosis (μM) | % de unión PD-1/PD-L1 |
|----------------|-------------------------|-----------------------|
| Control | - | 100 |
| III.26 | 20 | 11 \pm 8 |
| III.26 | 2 | 82 \pm 2 |
| III.26 | 1 | 82 \pm 2 |
| III.26 | 0.5 | 85 \pm 1 |
| III.26 | 0.25 | 89 \pm 2 |
| III.26 | 0.125 | 91 \pm 6 |
| III.26 | 0.0625 | 96 \pm 7 |
| BMS-8 | 20 | 19 \pm 2 |

Aunque por debajo de la concentración máxima no existe capacidad de bloqueo, a 20 μM el compuesto es capaz de bloquear la unión PD-1/PD-L1 más de un 80%.

4.12.9. Efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR-2

El efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR-2 se evaluó, de nuevo, con el compuesto **III.26** a una concentración 100 μM .

Tabla 4.19. Porcentaje, relativo al control, de actividad quinasa de VEGFR-2 para el compuesto **III.26** y el sunitinib.

| Compuesto | Dosis (μM) | % acción quinasa |
|---------------|-------------------------|------------------|
| Control | - | 100 |
| III.26 | 100 | 119 \pm 3 |
| Sunitinib | 2 | 56 \pm 1 |

En la Tabla 4.19 se puede ver que el compuesto **III.26** no muestra ninguna acción significativa en la inhibición de la acción quinasa de VEGFR-2.

4.12.10. Conclusiones

Los compuestos de la familia **III** no muestran, por lo general, una actividad frente a la viabilidad celular destacable en monocultivo. El nitroderivado **III.10** y el aminoderivado **III.23**, que contienen un átomo de bromo en el anillo de bencilo en posición 1,4, son los únicos que exhiben valores de IC_{50} inferiores a 50 μM .

Por lo que respecta a PD-L1, el ensayo de interacción directa con esta proteína revela que, a diferencia de los compuestos de la familia **I**, casi todos los aminoderivados de la familia **III** (**III.14-III.26**) estabilizan la proteína, pues provocan un aumento en la T_m . Con los compuestos halogenados se observa una inversión en la desviación de la T_m , pues los nitrohalogenados desestabilizan la proteína, mientras que los aminohalogenados la estabilizan (véase la Figura 4.33).

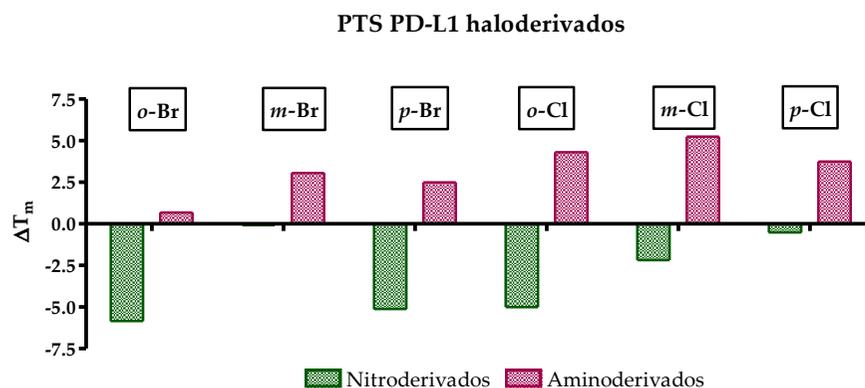


Figura 4.33. Valores de ΔT_m (PD-L1) para los haloderivados de la familia III.

Esta inversión en la desviación de la T_m , podría ser explicada de la siguiente forma: los aminoderivados podrían ser capaces de establecer más interacciones con residuos negativos del centro activo de la proteína por protonación de su grupo amino, mientras que los nitrotetrazaoles no podrían llevar a cabo este tipo de interacciones ante su imposibilidad de protonación.

La expresión de las proteínas c-Myc, VEGFR-2 y PD-L1, estas dos últimas tanto de membrana como total, se midió en la línea tumoral HT-29. En relación a c-Myc, de nuevo destacan los compuestos **III.10** y **III.23** como los más activos, ya que los valores de inhibición rondan el 25%. En cuanto a VEGFR-2, los compuestos no muestran acción frente a su expresión en la membrana, pero alguno de ellos si muestran acción en la expresión total, destacando algunos nitrotetrazaoles con sustituyentes halogenados (**III.9**, **III.11**, **III.13**). Por último, en PD-L1 sucede lo contrario que en VEGFR-2, pues la proteína total no se ve afectada por la acción de los compuestos, mientras que la de membrana sí se ve reducida en un 35 % cuando se tratan las células con algunos compuestos, como los aminoderivados **III.21** (*o*-bromo) y **III.22** (*m*-bromo).

Con el fin de estudiar más a fondo la capacidad inmunomoduladora de los compuestos, se decidió realizar un estudio de viabilidad celular en la línea HT-29 co-cultivada con THP-1. En este caso, y a diferencia del monocultivo,

los compuestos sí presentan actividad. Los resultados muestran una tendencia similar a los de la familia I, pues los compuestos más activos son los que contienen halógenos en *para* (véase la Figura 4.34).

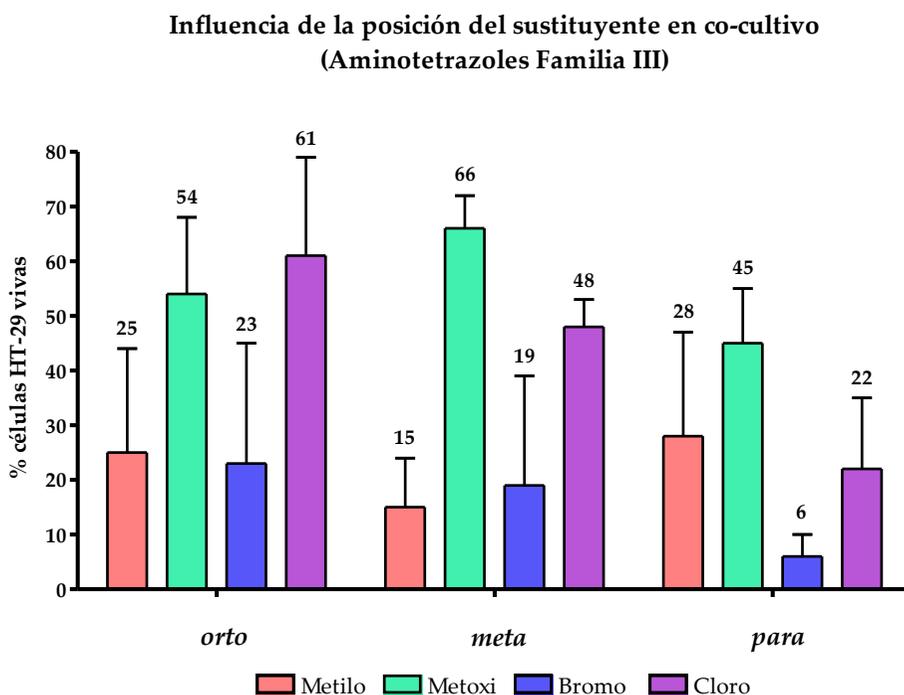


Figura 4.34. Influencia de la posición del sustituyente en co-cultivo HT-29/THP-1 para los aminocompuestos de la familia III.

En la Figura 4.35 se compara la acción de los nitroderivados y aminoderivados de esta familia en relación al porcentaje de células HT-29 vivas.

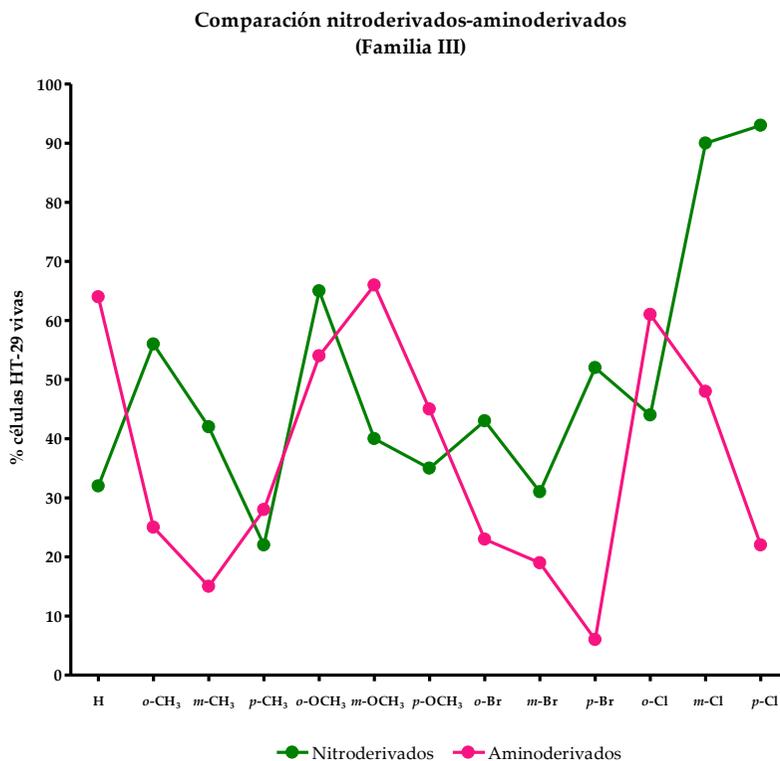


Figura 4.35. Comparación del porcentaje de células vivas entre los nitroderivados y los aminoderivados de la familia III en co-cultivo HT-29/THP-1.

En general, y a igualdad de sustituyente en el anillo de bencilo, los aminoderivados (III.14-III.26) son más activos que los nitroderivados (III.1-III.14). Sin embargo, no se observa una tendencia similar para las series de sustituyentes correspondientes. Los compuestos con unos valores más interesantes son los aminotetrazoles III.16 (*m*-metilo), III.22 (*m*-bromo) y III.23 (*p*-bromo), con una reducción de la viabilidad celular de HT-29 por encima del 80%. En cuanto a la viabilidad de THP-1 hay que destacar a los compuestos 2 y III.1-III.4, que exhiben una capacidad de aumento de la viabilidad bastante acusada.

Para determinar posibles causas de este incremento de actividad en co-cultivo frente al monocultivo se realizó un ensayo ELISA competitivo entre PD-1/PD-L1. Con este estudio se pretendía observar si los compuestos eran

capaces de bloquear la unión entre estas dos proteínas. Se escogió el aminotetrazol **III.26** (*p*-cloro), el cual muestra una capacidad de inhibición del 20%. Otra de las posibilidades para justificar la mayor actividad en co-cultivo reside en el hecho de que tanto los cloroderivados **III.24-III.26** como el bromotetrazol **III.23** muestran una elevada capacidad de inhibición de la citoquina IL-6, con valores de inhibición por encima del 90%. Esta citoquina se encuentra presente en el TME y promueve el crecimiento del tumor, la inflamación de las zonas adyacentes, así como la evasión del sistema inmune.^{192,193} Recientemente se ha observado que una disminución de la secreción de IL-6 conduce a una reducción en el tamaño del tumor y a un incremento en la respuesta inmunitaria frente al mismo.^{194,195}

En el ensayo de co-cultivo celular también se midió la expresión de algunas proteínas de interés. Por lo que respecta a la población tumoral, algunos compuestos muestran una acción moderada sobre la proteína CD-47, destacando de nuevo los bromoderivados **III.21-III.23**, con unos porcentajes de inhibición cercanos al 30%. En cuanto al medio secretado, en el que se encuentran las células THP-1, se observa que los cloroderivados **III.24-III.26** son capaces de inhibir la expresión de CD-11b en más de un 30%.

Los haloderivados **III.21-III.26** fueron escogidos para determinar su capacidad antiangiogénica y antivascular. Para ello, se emplearon tanto las células HMEC-1 como HEK-293. La actividad antiangiogénica observada sobre las células endoteliales muestra que todos los compuestos son capaces de inhibir la formación de nuevas redes de microtúbulos a una concentración de 100 μ M, aunque por debajo de 75 μ M el efecto observado

¹⁹² Fisher, D.T.; Appenheimer, M.M.; Evans, S.S. The Two Faces of IL-6 in the Tumor Microenvironment. *Semin. Immunol.* **2014**, *26*, 38-47. DOI: 10.1016/j.smim.2014.01.008.

¹⁹³ Chonov, D.C.; Ignatova, M.M.K.; Ananiev, J.R.; Gulubova, M.V. IL-6 Activities in the Tumour Microenvironment. Part 1. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **2019**, *7*, 2391. DOI: 10.3889/oamjms.2019.589.

¹⁹⁴ Hirano, T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int. Immunol.* **2021**, *33*, 127-148. DOI: 10.1093/intimm/dxaa078.

¹⁹⁵ Liu, Q.; Yu, S.; Li, A.; Xu, H.; Han, X.; Wu, K. Targeting interleukin-6 to relieve immunosuppression in tumor microenvironment. *Tumor. Biol.* **2017**, *39*, 1-11. DOI: 10.1177/1010428317712445.

es despreciable. La misma conclusión cabe extraer sobre la capacidad antivascolar de los compuestos en las células HEK-293.

Por tanto, en la Figura 4.36 se muestran los tetrazoles de la familia III que muestran una actividad biológica más prometedora.

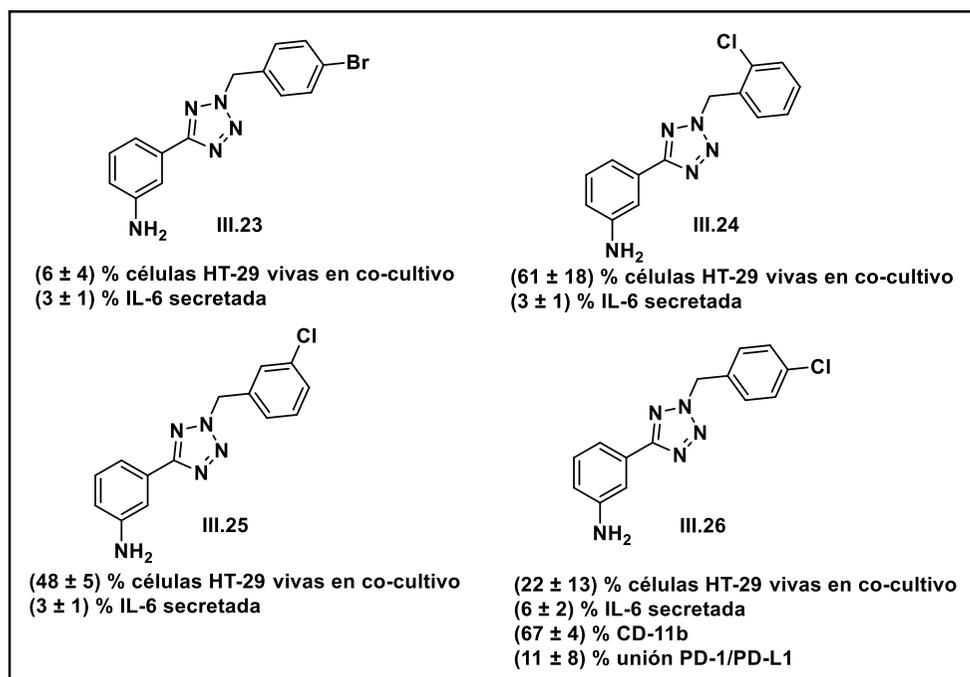


Figura 4.36. Compuestos de la familia III con los resultados más prometedores.

4.13. Evaluación biológica de los compuestos de la familia IV

4.13.1. Interacción directa con PD-L1

En primer lugar, se realizó un estudio de la interacción entre los compuestos y la proteína PD-L1 de manera directa mediante la técnica PTS. Los valores de desplazamiento de la temperatura de fusión se muestran en la Tabla 4.20.

Tabla 4.20. Valores de ΔT_m de los compuestos de la familia IV.

| Compuesto | ΔT_m (°C) | Compuesto | ΔT_m (°C) |
|-----------|-------------------|-----------|-------------------|
| IV.1 | -3.16 | IV.14 | +1.14 |
| IV.2 | -3.95 | IV.15 | -6.15 |
| IV.3 | -3.79 | IV.16 | -3.85 |
| IV.4 | -4.06 | IV.17 | +4.55 |
| IV.5 | -2.56 | IV.18 | -6.02 |
| IV.6 | -4.95 | IV.19 | -6.25 |
| IV.7 | -1.62 | IV.20 | -4.68 |
| IV.8 | -4.06 | IV.21 | +2.33 |
| IV.9 | -3.48 | IV.22 | -5.13 |
| IV.10 | -2.47 | IV.23 | -4.44 |
| IV.11 | -0.76 | IV.24 | +0.60 |
| IV.12 | -4.96 | IV.25 | -5.53 |
| IV.13 | -5.77 | IV.26 | -6.34 |

Todos los compuestos, exceptuando a los aminoderivados **IV.14** (bencilo), **IV.17** (*p*-metilo), **IV.21** (*o*-bromo) y **IV.24** (*o*-cloro), disminuyen la T_m . En general, los compuestos que contienen un grupo amino (**IV.14-IV.26**) exhiben valores de desplazamiento mayores que aquellos que contienen un grupo nitro en su estructura (**IV.1-IV.13**), siendo los compuestos con un sustituyente

metoxilo en la parte bencílica (**IV.18-IV.20**) los que muestran una diferencia más acusada.

4.13.2. Viabilidad celular en monocultivo

La viabilidad celular de los compuestos de la familia **IV** se evaluó determinando el valor de IC_{50} en las líneas celulares HT-29, A-549, MCF-7 y HEK-293. La mayoría de los compuestos resultan inactivos a concentraciones inferiores a 100 μM , por lo que en la Tabla 4.21 sólo se muestran los valores de IC_{50} de los compuestos más activos.

Tabla 4.21. Valores de IC_{50} de los compuestos más activos de la familia **IV**.

| Compuesto | IC_{50} (μM) | | | |
|--------------|-----------------------|-------------|------------|-------------|
| | HT-29 | A-549 | MCF-7 | HEK-293 |
| IV.4 | 66 \pm 5 | 33 \pm 17 | 35 \pm 6 | >100 |
| IV.11 | 8 \pm 2 | >100 | >100 | >100 |
| IV.12 | 29 \pm 13 | >100 | >100 | >100 |
| IV.16 | >100 | 94 \pm 15 | >100 | >100 |
| IV.17 | 68 \pm 7 | 54 \pm 2 | 71 \pm 5 | 59 \pm 14 |
| IV.23 | 72 \pm 4 | 38 \pm 1 | 69 \pm 6 | >100 |
| IV.26 | 60 \pm 20 | >100 | 53 \pm 7 | >100 |

En líneas generales, estos compuestos son más activos en las líneas tumorales que en la línea no tumoral HEK-293, donde sólo el compuesto con un grupo amino y un sustituyente *p*-metilo (**IV.17**) muestra actividad por debajo de 100 μM . Es importante destacar el compuesto con un grupo nitro y un sustituyente *p*-metilo (**IV.4**) como el más activo de entre todos los que lo son en las tres líneas celulares tumorales.

4.13.3. Viabilidad celular en co-cultivo

Se decidió estudiar la viabilidad celular en un co-cultivo de células tumorales HT-29 y de monocitos THP-1. En primer lugar, se ensayaron todos los compuestos de la familia **IV** a una concentración de 100 μ M, durante 48 h, empleando una proporción 1:5 de células cancerosas frente a células del sistema inmune, respectivamente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se determinó mediante citometría de flujo la densidad de células vivas de cada población. Los resultados se muestran en la Figura 4.37 como porcentaje relativo de células vivas respecto al control.

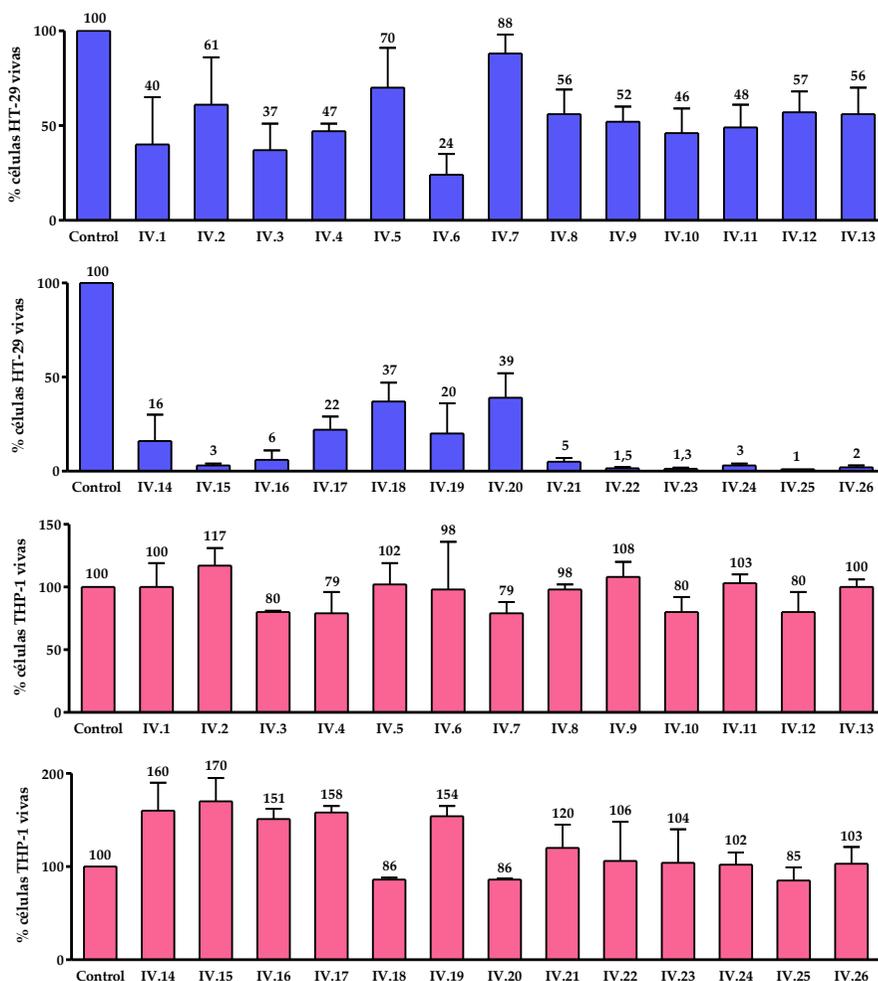


Figura 4.37. Porcentaje de células vivas en co-cultivo HT-29/THP-1 (proporción 1:5) en presencia de los compuestos de la familia **IV**.

Los derivados con un grupo nitro (**IV.1-IV.13**) son generalmente menos potentes en la inhibición de la viabilidad celular de HT-29 que los que contienen un grupo amino (**IV.14-IV.26**). Destacan los compuestos con un sustituyente *m*-metilo (**IV.3**) y *m*-metoxilo (**IV.6**) como los más activos de la subfamilia de nitroderivados, mostrando valores de inhibición sobre el 75%. Por otro lado, los compuestos con un sustituyente *o*-metilo (**IV.15**), *m*-metilo (**IV.16**) y con halógenos (**IV.21-IV.26**) son los más destacados en la subfamilia de los aminoderivados. La acción de estos compuestos es sumamente destacable porque todos ellos muestran valores de reducción de las células tumorales vivas mayores al 95% a una concentración a la que no se producía apenas efecto en la viabilidad celular en monocultivo de HT-29. Además, también se ha determinado la viabilidad celular en la población de monocitos THP-1. Se ha observado que no solo no decrece el número de células vivas, sino que algunos aminoderivados, como los que contienen un sustituyente metilo, como (**IV.15-IV.17**), son capaces de estimular la viabilidad de los monocitos dando lugar a valores por encima de un 150% de células vivas respecto al control.

A la vista de estos prometedores resultados se decidió ampliar el estudio para una selección de los compuestos más activos. Se optó por los derivados **IV.15** (*o*-metilo), **IV.16** (*m*-metilo) y los halogenados **IV.21-IV.26**. Con el fin de estudiar la influencia de la proporción de células cancerosas y de células del sistema inmune, se repitieron las mismas condiciones que en el ensayo anterior, pero variando las proporciones de las poblaciones. Se ensayaron proporciones 1:2.5; 1:1 y 2:1. Dicho estudio se realizó a 100 μM y a 10 μM . Los resultados se muestran en la Figura 4.38.

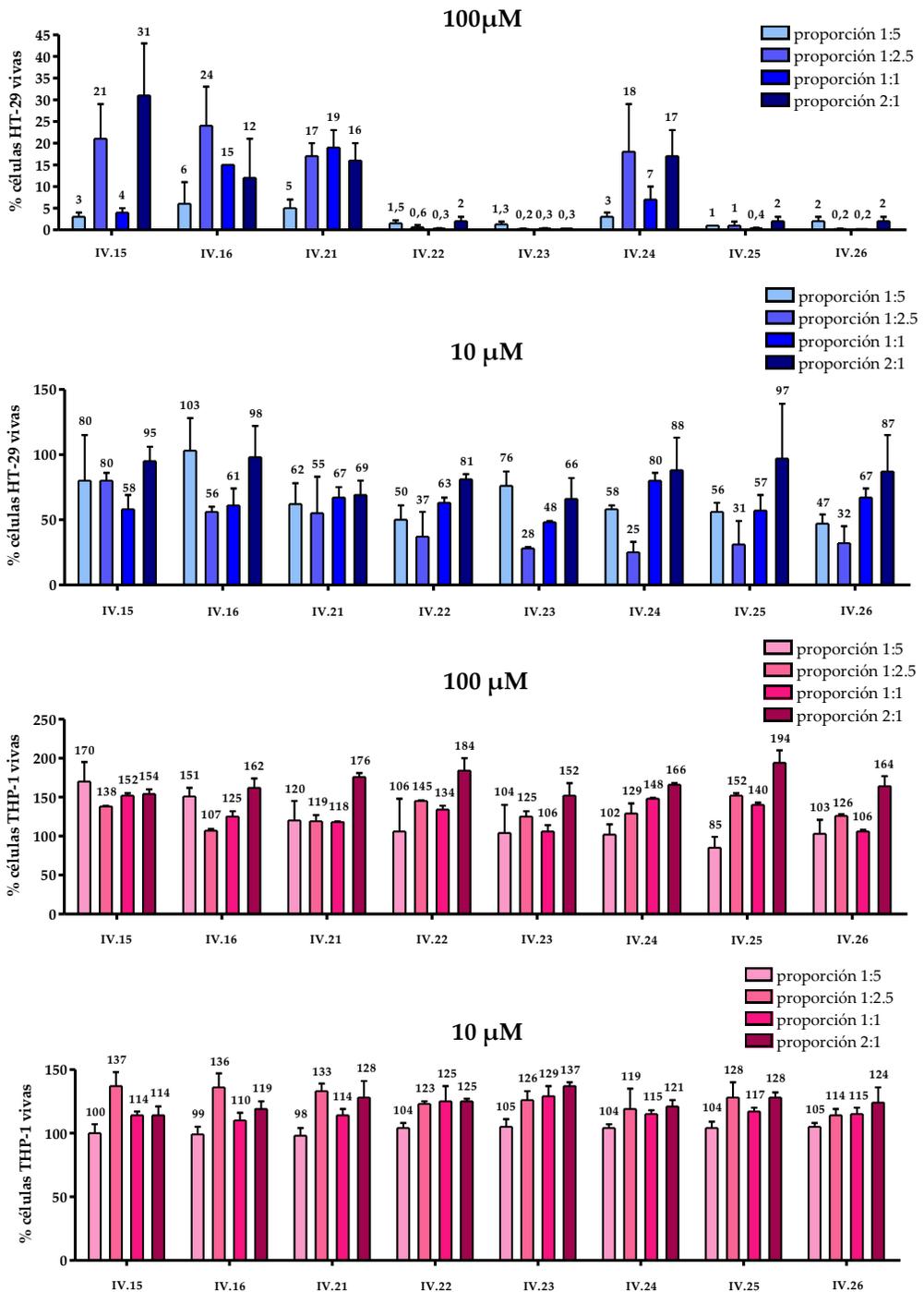


Figura 4.38. Porcentaje de células vivas en diferentes proporciones de cultivo HT-29/THP-1, a 100 µM y a 10 µM, en presencia de una selección de compuestos de la familia IV.

Los resultados a 100 μM indican que los compuestos con sustituyentes halogenados en posiciones relativas *meta* (**IV.22** y **IV.25**) y *para* (**IV.23** y **IV.26**) reducen la cantidad, relativa al control, de células tumorales vivas HT-29, independientemente de la proporción de células del sistema inmune. Tras 48 h de tratamiento del co-cultivo con los compuestos, se obtiene un porcentaje de células HT-29 vivas menor al 5% en comparación con las muestras no tratadas y ningún efecto sobre las THP-1. El resto de los compuestos se mantienen muy activos en cuanto a la inhibición de la viabilidad celular tumoral, mostrando porcentajes de inhibición mayores al 70% en todos los casos. Es destacable mencionar que los mejores resultados se obtienen para las proporciones 1:5 y 1:1.

En relación al estudio realizado a 10 μM , se observa un efecto menor para cada compuesto y proporción utilizada. En todos los casos se observa que la peor proporción de células tumorales frente a células del sistema inmune es la 2:1, obteniéndose porcentajes de inhibición inferiores al 20%. Resulta curioso el hecho de que los mejores resultados en el co-cultivo se obtienen no con la proporción relativa de poblaciones celulares 1:5, sino 1:2.5 y 1:1. El compuesto **IV.21** (*o*-bromo) es el único que exhibe el mismo efecto, independientemente de las proporciones celulares, dando como resultados porcentajes de inhibición cercanos al 40%. Los compuestos más efectivos a esta concentración son, de nuevo, los compuestos con sustituyentes halogenados en posiciones relativas *meta* (**IV.22** y **IV.25**) y *para* (**IV.23** y **IV.26**), destacando especialmente en la proporción 1:2.5.

Por último, se seleccionaron los cloroderivados **IV.24-IV.26** para determinar su IC_{50} frente a HT-29 en co-cultivo con THP-1. Para ello, se escogieron las proporciones 1:1 y 2:1 y se ensayaron los compuestos a una concentración intermedia entre 100 μM y 10 μM (25 μM). De esta manera se obtuvieron los valores de viabilidad celular de HT-29 y THP-1 en el co-cultivo para las tres concentraciones ensayadas en ambas proporciones tal y como se muestra en la Figura 4.39.

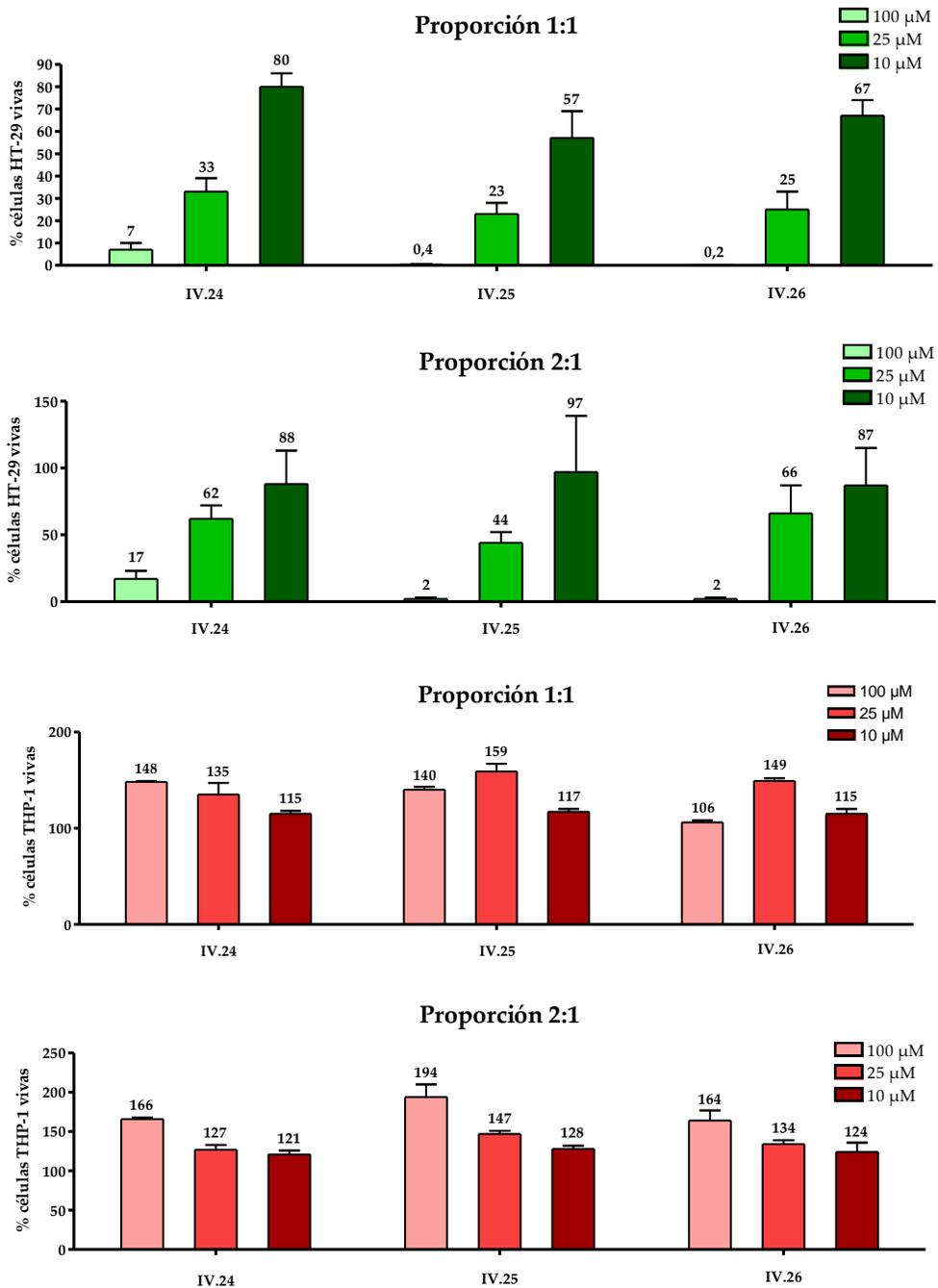


Figura 4.39. Porcentaje de viabilidad celular en diferentes proporciones y a diferentes concentraciones de co-cultivo HT-29/THP-1 en presencia de los compuestos IV.24-IV.26.

De acuerdo con los datos obtenidos en este ensayo, los valores de IC_{50} para HT-29 en el co-cultivo con THP-1 son entre cuatro y ocho veces inferiores a los que se obtienen en el monocultivo de HT-29 (véase la Figura 4.40).

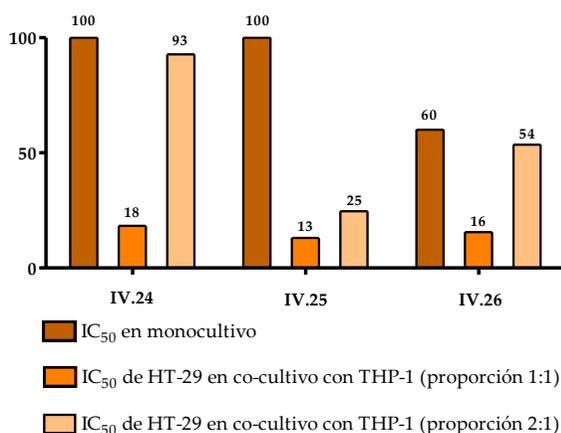


Figura 4.40. Valores de IC_{50} (μM) de HT-29 para los compuestos **IV.24-IV.26** en monocultivo y en diferentes proporciones de co-cultivo HT-29/THP-1.

4.13.4. Efecto sobre la expresión de PD-L1, CD-47, VEGFR-2 y c-Myc

Para evaluar el efecto sobre las proteínas diana se midió, mediante citometría de flujo, la expresión de PD-L1 de membrana y total, VEGFR-2 de membrana y total, CD-47 de membrana y c-Myc tras incubación de todos los compuestos de la familia **IV**, durante 48 h, en un monocultivo de HT-29 a una concentración de $100 \mu\text{M}$. Algunos de ellos no exhibieron ninguna actividad significativa, por lo que en la Tabla 4.22 sólo se muestran los resultados más relevantes.

Tabla 4.22. Porcentaje de expresión de mPD-L1, tPD-L1, mVEGFR-2, tVEGFR-2, c-Myc y mCD-47 para una selección de compuestos de la familia IV en HT-29 a 100 μ M.

| Compuesto | % expresión de proteína en HT-29 | | | | | |
|--------------|----------------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | mPD-L1 | tPD-L1 | mVEGFR-2 | tVEGFR-2 | c-Myc | mCD-47 |
| IV.8 | 51 \pm 9 | >100 | >100 | >100 | >100 | 96 \pm 6 |
| IV.9 | 99 \pm 3 | >100 | >100 | 91 \pm 8 | >100 | 91 \pm 12 |
| IV.10 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 86 \pm 4 |
| IV.11 | 66 \pm 15 | >100 | >100 | >100 | >100 | 96 \pm 1 |
| IV.12 | 94 \pm 2 | >100 | 97 \pm 0 | 96 \pm 7 | 55 \pm 16 | 68 \pm 20 |
| IV.13 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 90 \pm 14 |
| IV.21 | 97 \pm 6 | >100 | >100 | 92 \pm 16 | 72 \pm 6 | 95 \pm 8 |
| IV.22 | 95 \pm 5 | >100 | >100 | >100 | 51 \pm 1 | 93 \pm 6 |
| IV.23 | 96 \pm 3 | >100 | >100 | >100 | 47 \pm 11 | 88 \pm 10 |
| IV.24 | 97 \pm 6 | 55 \pm 9 | 86 \pm 2 | >100 | 81 \pm 3 | 91 \pm 7 |
| IV.25 | 98 \pm 9 | 48 \pm 7 | 90 \pm 11 | >100 | 72 \pm 5 | 94 \pm 11 |
| IV.26 | >100 | 49 \pm 15 | >100 | >100 | 62 \pm 4 | 97 \pm 5 |

De la tabla anterior se deduce que los aminoderivados (**IV.14-IV.26**) son más activos que los nitroderivados (**IV.1-IV.13**), siendo los compuestos con un sustituyente bromo (**IV.21-IV.23**) y cloro (**IV.24-IV.26**) los que exhiben mayor potencia. A excepción del nitroderivado **IV.8** (*o*-bromo), que consigue una reducción de la expresión de PD-L1 de membrana cercana al 50%, y el nitroderivado **IV.12** (*m*-cloro), con una inhibición alrededor del 25% sobre CD-47 de membrana, los efectos sobre las estas dianas y sobre VEGFR-2 son débiles. Sin embargo, se observa actividad biológica de algunos compuestos frente a PD-L1 total y c-Myc. Los cloroderivados **IV.24-IV.26** muestran una inhibición cercana al 50% para PD-L1 total, mientras que el nitroderivado **IV.12** (*m*-cloro) y los aminotetrazoles que contienen un halógeno (**IV.21-IV.26**) muestran acción frente a la expresión de c-Myc, reduciéndose ésta hasta un 65-70%. Por tanto, se observa que la presencia de un halógeno en posiciones

relativas *meta* y *para* en el anillo de bencilo es estructuralmente relevante para aumentar la capacidad inhibitoria de c-Myc y también de PD-L1, lo que podría tener relación también con la capacidad antitumoral de los mismos en presencia de los monocitos (véase la Figura 4.37).

A continuación, se decidió llevar a cabo un estudio de relación dosis-respuesta con los cloroderivados **IV.24-IV.26**. Así, se ensayaron los tres compuestos a una concentración de 10 μM en las mismas condiciones que en el anterior ensayo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.23.

Tabla 4.23. Porcentaje de expresión de mPD-L1, tPD-L1, mVEGFR-2, tVEGFR-2, mCD-47 y tCD-47 para los compuestos **IV.24-IV.26** en HT-29 a 10 μM .

| Compuesto | % expresión de proteína en HT-29 | | | | | |
|--------------|----------------------------------|-------------|------------|------------|------------------------------|-------------------------------|
| | mPD-L1 | tPD-L1 | mVEGFR-2 | tVEGFR-2 | mCD-47 | tCD-47 |
| IV.24 | 99 \pm 2 | >100 | >100 | 93 \pm 9 | 84 \pm 5 | 79 \pm 26 |
| IV.25 | 92 \pm 1 | 92 \pm 20 | >100 | 78 \pm 3 | 80 \pm 2 | 69 \pm 5 |
| IV.26 | 95 \pm 3 | 96 \pm 3 | 95 \pm 5 | 96 \pm 8 | 88 \pm 4 | 69 \pm 14 |

No se observa ningún efecto sobre c-Myc y muy poco sobre PD-L1 y VEGFR-2. Para el caso de CD-47, el efecto es mayor que a 100 μM , con valores de inhibición en la membrana cercanos al 20% y al 30% en la proteína total.

Se puede concluir que la inhibición sobre c-Myc y PD-L1 sí que resulta ser dependiente de la dosis mientras que en el caso de CD-47 no lo es, ya que se observa una mayor acción a concentraciones menores.

Aprovechando el estudio de co-cultivo realizado con los compuestos de la familia **IV** se midió también, mediante citometría de flujo, la expresión de las proteínas de membrana CD-47 y PD-L1 en las células tumorales. Los valores obtenidos se muestran en la Figura 4.41.

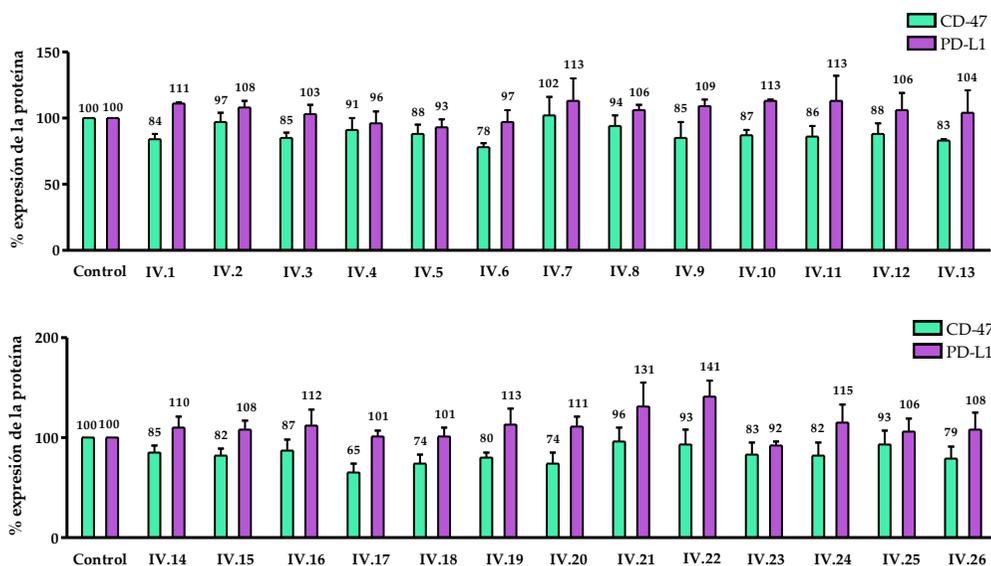


Figura 4.41. Porcentaje de expresión de las proteínas CD-47 y PD-L1 en HT-29 en co-cultivo con THP-1 en presencia de los compuestos de la familia IV.

La acción sobre CD-47 es moderada mientras que no se observa ninguna actividad sobre PD-L1. A pesar de ello, de nuevo se observa que los aminoderivados (IV.14-IV.26) son ligeramente más activos que los nitroderivados (IV.1-IV.13).

4.13.5. Efecto sobre el monocultivo de THP-1

Se seleccionaron los cloroderivados IV.24-IV.26 para estudiar su efecto sobre monocultivos de monocitos THP-1, a 100 μM y a 10 μM . A su vez, se determinó la expresión de PD-L1 de membrana en esta línea celular. Los resultados se muestran en la Figura 4.42.

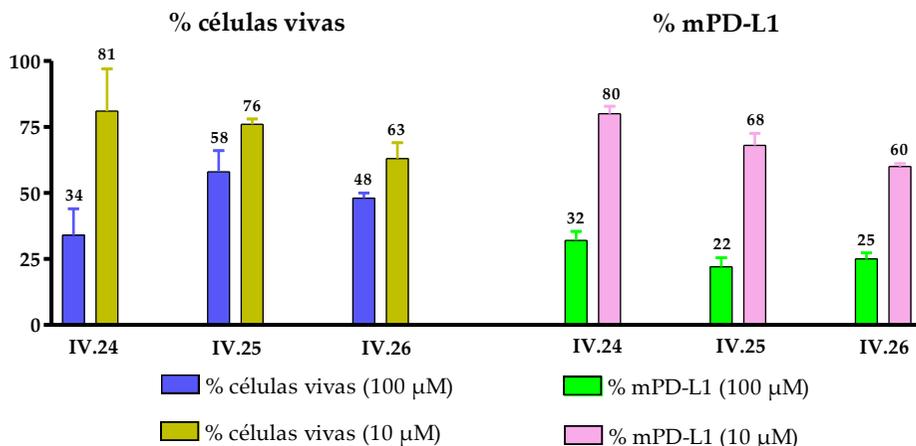


Figura 4.42. Porcentaje de células vivas y expresión de PD-L1 de membrana en THP-1 en presencia de los compuestos **IV.24-IV.26**, a 100 μM y a 10 μM .

Se observa que la viabilidad celular se ve afectada a valores cercanos al 50% para la concentración de 100 μM , pero estas cifras aumentan cuando los compuestos se añaden a una concentración de 10 μM . Siguiendo el mismo patrón, los compuestos inhiben más del 70% de PD-L1 de membrana para la concentración de 100 μM , mientras que a 10 μM la expresión se ve reducida a valores alrededor del 60% para los compuestos **IV.25** y **IV.26**.

4.13.6. Efecto en la secreción de IL-6 y TNF- α

Se seleccionaron los haloderivados **IV.21-IV.26** para determinar los niveles de secreción de IL-6 y TNF- α en monocultivo de HT-29 y en co-cultivo con THP-1 mediante técnica ELISA. Se utilizaron como muestras los medios de cultivo después de haber tratado las células con los compuestos a una concentración de 100 μM . Los resultados se muestran en las Tablas 4.24 y 4.25.

Tabla 4.24. Concentración y tanto por cien relativo al control de IL-6 en el medio de co-cultivo HT-29/THP-1 para los compuestos **IV.21-IV.26**.

| Compuesto | Concentración IL-6 (pg/mL) | % de IL-6 en el medio |
|----------------|----------------------------|-----------------------|
| Control | 192 ± 16 | 100 |
| IV.21 | 207 ± 21 | 108 ± 6 |
| IV.22 | 190 ± 18 | 99 ± 14 |
| IV.23 | 209 ± 16 | 109 ± 13 |
| IV.24 | 193 ± 11 | 100 ± 10 |
| IV.25 | 187 ± 6 | 97 ± 8 |
| IV.26 | 191 ± 4 | 100 ± 7 |

En el caso de IL-6, ninguno de los compuestos ensayados produjo una alteración en los niveles de secreción de esta citoquina. Sin embargo, con el fin de comparar resultados y establecer una aproximación a lo que sucede en el TME, para el TNF- α se emplearon las proporciones 1:5 y 2:1 de los medios de co-cultivo. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.25.

Tabla 4.25. Concentración y tanto por cien relativo al control de TNF- α en el medio de co-cultivo HT-29/THP-1 (proporciones 1:5 y 2:1) para los compuestos **IV.21-IV.26**.

| Compuesto | Concentración TNF- α (pg/mL) (proporción 1:5) | % de TNF- α en el medio (proporción 1:5) | Concentración TNF- α (pg/mL) (proporción 2:1) | % de TNF- α en el medio (proporción 2:1) |
|----------------|--|---|--|---|
| Control | 58 ± 8 | 100 | 6.9 ± 0.2 | 100 |
| IV.21 | 328 ± 39 | 573 ± 52 | 166 ± 46 | 2429 ± 121 |
| IV.22 | 70 ± 11 | 120 ± 12 | 290 ± 64 | 4225 ± 106 |
| IV.23 | 149 ± 32 | 260 ± 20 | 322 ± 9 | 4691 ± 133 |
| IV.24 | 266 ± 45 | 464 ± 18 | 194 ± 22 | 2825 ± 470 |
| IV.25 | 163 ± 29 | 284 ± 11 | 221 ± 8 | 3217 ± 117 |
| IV.26 | 74 ± 17 | 129 ± 1 | 270 ± 59 | 3938 ± 250 |

En el control, se observa que la cantidad de TNF- α secretado al medio es mayor cuanto menor es la proporción de células HT-29 respecto a las THP-1. Concretamente, la cantidad de TNF- α es casi diez veces mayor en la proporción 1:5 que en la 2:1. Todos los compuestos ensayados para ambas proporciones muestran valores de la citoquina superiores a la muestra control. En el caso de la proporción 1:5, los derivados con sustituyentes en posición relativa *orto* (**IV.21** y **IV.24**) secretan 5 veces más TNF- α que los controles, mientras que los derivados en posición relativa *meta* (**IV.22** y **IV.25**) y *para* (**IV.23** y **IV.26**) secretan 2.5 y 1.25 veces más, respectivamente. Por otro lado, se observa una tendencia diferente en la proporción 2:1, ya que los derivados *meta* secretan 25 veces más citoquina que los controles y el resto de los compuestos alrededor de unas 40 veces más.

4.13.7. Efecto sobre el bloqueo de PD-1/PD-L1

Para determinar la capacidad de bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 se escogió el aminoderivado **IV.26** (*p*-cloro) en base a los resultados obtenidos, el cual se ensayó a una concentración de 20 μ M.

Tabla 4.26. Tanto por cien relativo al control de unión PD-1/PD-L1 para el compuesto **IV.26** y BMS-8.

| Compuesto | Dosis (μ M) | % de unión PD-1/PD-L1 |
|--------------|------------------|-----------------------|
| Control | - | 100 |
| IV.26 | 20 | 84 \pm 5 |
| BMS-8 | 20 | 19 \pm 2 |

Los resultados de la Tabla 4.26 muestran que el compuesto **IV.26** es capaz de inhibir ligeramente el bloqueo de ambas proteínas, con porcentajes de inhibición de alrededor del 10-15%.

4.13.8. Efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR-2

El posible efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR-2 fue evaluado de nuevo para el aminoderivado **IV.26**. En este caso, se realizó el ensayo a diferentes concentraciones para determinar si existía una relación dosis-respuesta. Los resultados se muestran en la Tabla 4.27.

Tabla 4.27. Porcentaje, relativo al control, de actividad quinasa de VEGFR-2 para el compuesto **IV.26** en función de la concentración inicial y proporción de moléculas protonadas y desprotonadas en el equilibrio en medio acuoso.

| Concentración IV.26 (μM) | % actividad quinasa de VEGFR-2 | Concentración real de R-NH ₂ (μM) | Concentración real de R-NH ₃ ⁺ (μM) | % de R-NH ₃ ⁺ presente en el equilibrio |
|---------------------------------------|--------------------------------|---|--|---|
| 100 | 70 ± 1 | 94.99 | 5.01 | 5.01 |
| 50 | 94 ± 39 | 46.51 | 3.49 | 6.98 |
| 25 | 81 ± 2 | 22.58 | 2.42 | 9.68 |
| 12.5 | 65 ± 1 | 10.84 | 1.66 | 13.28 |
| 6.25 | 60 ± 4 | 5.13 | 1.12 | 17.92 |
| 3.12 | 56 ± 2 | 2.37 | 0.75 | 24.04 |
| 0.2 | 68 ± 2 | 0.09 | 0.11 | 55.00 |
| 0 | 100 | - | - | - |

De acuerdo con los resultados, se observa que la actividad antiquinasa del compuesto va aumentando a medida que disminuye la concentración. Una hipótesis que explicaría estos resultados se basa en el hecho de que las aminas, en medio acuoso y a pH fisiológico, están en equilibrio con su forma protonada y podría suceder que la afinidad sobre VEGFR-2, cuyo dominio es intracelular, sea mayor para la molécula protonada que para la forma neutra, pudiéndose establecer interacciones de tipo iónico con residuos básicos del lugar de acción del compuesto.

Para comprobar esta hipótesis, se calculó el valor de la constante K_b para el equilibrio que se establece entre la forma neutra y la protonada del compuesto **IV.26**, siendo este valor de $10^{-6.57}$ M. Con este dato es posible

calcular las concentraciones de las dos especies en el equilibrio, la cual varía en función de la concentración inicial a la que se encuentran. Tal y como se observa en la Tabla 4.27, la proporción de la forma protonada va aumentando a medida que la concentración inicial disminuye, lo que explicaría la mayor actividad antiquinasa al disminuir la dosis de compuesto.

Sin embargo, a concentraciones mayores a la óptima ($3.12 \mu\text{M}$), las moléculas protonadas no son capaces de entrar en la célula debido a su carga, porque se encontrarían más solvatadas y serían repelidas en mayor medida por la membrana celular. Por otro lado, a concentraciones inferiores a la óptima ($0.2 \mu\text{M}$) el efecto que se observa es mucho menos potente.

4.13.9. Estudio del efecto proapoptótico

Los aminotetrazoles que contienen un halógeno en su estructura en posición relativa *meta* (IV.22 y IV.25) y *para* (IV.23 y IV.26) fueron seleccionados para estudiar su capacidad para inducir la apoptosis en células HT-29. Los resultados después del correspondiente tratamiento con los compuestos a $100 \mu\text{M}$ durante 24 h se muestran en la Figura 4.43.

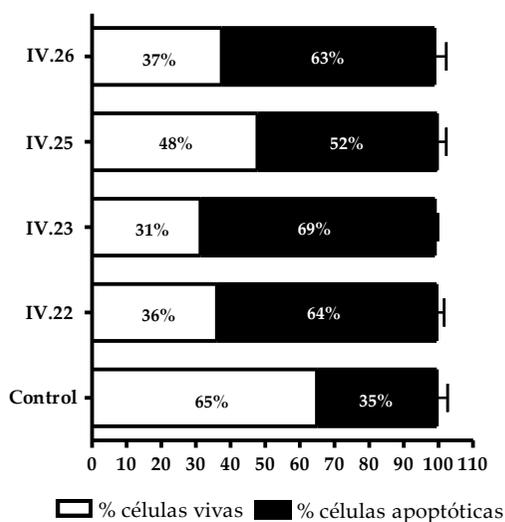


Figura 4.43. Efecto proapoptótico de los compuestos IV.22-IV.23 y IV.25-IV.26.

Todos los compuestos ensayados promueven el proceso de apoptosis ya que más de un 60% de células apoptóticas son detectadas en las muestras, en comparación con el 35% que se detectan en el control. Entre todos, destaca el compuesto **IV.23** (*p*-bromo) con cerca de un 70% de células apoptóticas.

Como se aprecia en la Figura 4.44, las células HT-29 sufrieron cambios en su morfología típicos del proceso de apoptosis al tratarlas con los compuestos a 100 μ M durante 24 h. Dichos cambios incluyen fragmentación nuclear, hemorragia de membrana, contracción celular, cuerpos apoptóticos o condensación nuclear.

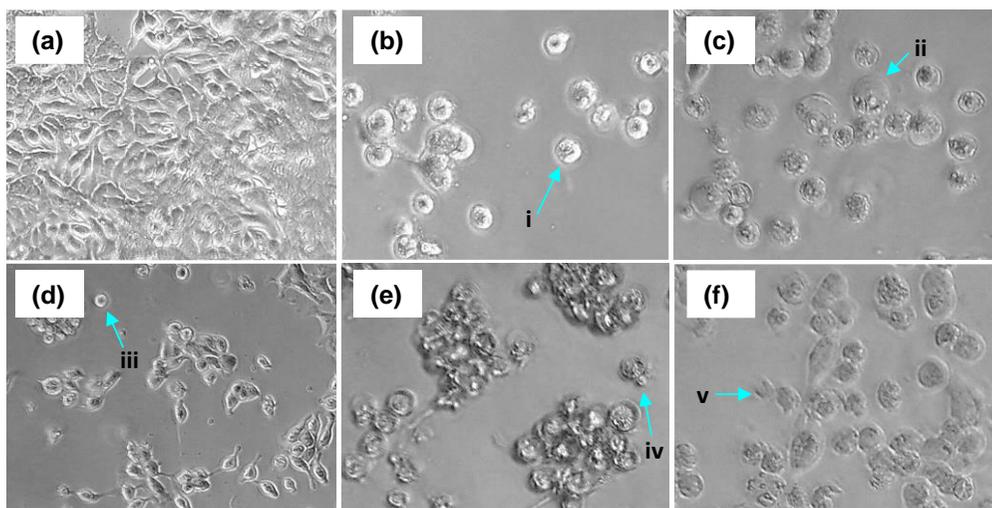


Figura 4.44. Cambios morfológicos sufridos por las células HT-29 tras 24h de incubación con (a) DMSO (control); (b) **IV.22** 100 μ M; (c) **IV.23** 100 μ M (d) **IV.24** 100 μ M; (e) **IV.25** 100 μ M; (f) **IV.26** 100 μ M. Flechas: i. Fragmentación nuclear, ii. Hemorragia de membrana, iii. Contracción celular, iv. Cuerpos apoptóticos, v. Condensación nuclear.

4.13.10. Conclusiones

Los compuestos de la familia **IV** muestran en general una actividad frente a la viabilidad celular baja en monocultivo para todas las líneas celulares ensayadas. Destaca la línea HT-29, donde el nitroderivado **IV.4** (*p*-metilo) y los aminoderivados **IV.17** (*p*-metilo), **IV.23** (*p*-bromo) y **IV.26** (*p*-cloro) muestran valores de IC₅₀ en el rango micromolar. Estos resultados sugieren la idea de que la presencia de un grupo amino en el anillo de fenilo, así como la presencia de un sustituyente de tipo metilo, bromo o cloro en el anillo bencílico de la estructura, disminuye el IC₅₀ de los compuestos. Además, cuando el sustituyente bencílico se encuentra en posición relativa 1,4, la actividad biológica aumenta.

Esta característica estructural también se extrapola a los efectos sobre las dianas. Para todas ellas, se observa, en monocultivo, que a dosis de 100 µM los aminoderivados (**IV.14-IV.26**) son mucho más activos que los nitroderivados (**IV.1-IV.13**), destacando aquellos que contienen un halógeno en su estructura (**IV.21-IV.26**). Sin embargo, ninguno de los compuestos muestra una acción muy potente frente a las dianas, exceptuando su acción sobre PD-L1 total y c-Myc. En relación a PD-L1, los cloroderivados **IV.24-IV.26** exhiben valores de inhibición de alrededor del 50%, mientras que para c-Myc destaca el nitroderivado **IV.12** (*m*-cloro) y los compuestos halogenados **IV.21-IV.26**, los cuales son capaces de inhibir la expresión de la proteína en valores cercanos al 30-45%. Se observa que la presencia de un átomo halogenado en posición relativa 1,3 o 1,4 en el anillo bencílico es responsable del aumento de actividad frente a c-Myc. Además, el efecto sobre PD-L1 es dependiente de la dosis que se utiliza, a diferencia del efecto que se observa sobre CD-47 (véase Figura 4.45).

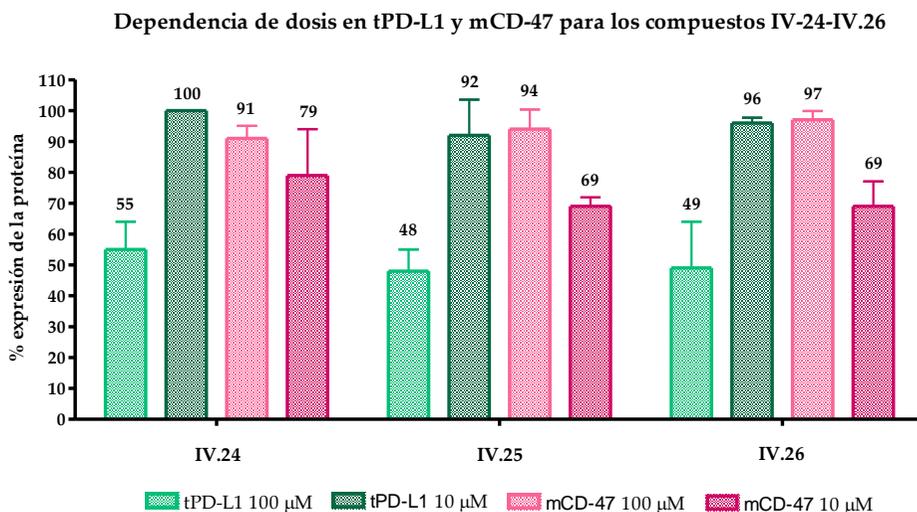


Figura 4.45. Dependencia de dosis en tPD-L1 y mCD-47 para los compuestos **IV.24-IV.26**.

A concentraciones de 10 μ M, los cloroderivados **IV.24-IV.26** muestran una inhibición del 25% sobre CD-47, mientras que su acción a 100 μ M es prácticamente nula. Esto revela que los compuestos de la familia **IV** tienen diversos modos de acción en función de la proteína diana.

Los haloderivados **IV.22** (*m*-bromo), **IV.23** (*p*-bromo), **IV.25** (*m*-cloro) y **IV.26** (*p*-cloro) también muestran una actividad proapoptótica a 100 μ M. A esta concentración las células sufren grandes cambios en su morfología con alrededor de un 65% de población celular en apoptosis. Esta capacidad de inducir apoptosis en las células tumorales se relaciona con la capacidad inhibitoria de c-Myc (véase la Figura 4.46), confirmándose así la relación entre la inhibición de esta proteína y el efecto proapoptótico.

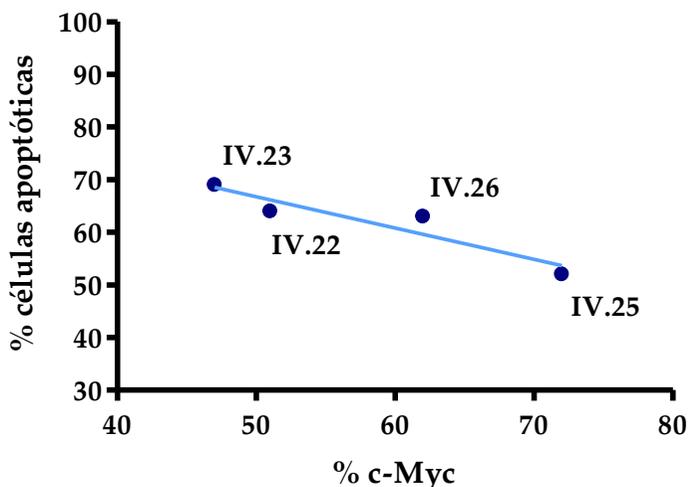


Figura 4.46. Correlación entre la inhibición de c-Myc y el efecto proapoptótico de los compuestos **IV.22**, **IV.23**, **IV.25** y **IV.26**.

También se evaluó la acción antiquinasa del compuesto **IV.26** sobre VEGFR-2. Este derivado muestra mayor actividad cuanto menor es su concentración, hasta llegar a una concentración óptima. Esto puede ser debido a la mayor proporción de moléculas con el grupo amino protonado y, como consecuencia, al establecimiento de mayores interacciones en el dominio quinasa intracelular de VEGFR-2. Sin embargo, si el número de moléculas cargadas es demasiado grande, éstas no son capaces de atravesar la membrana celular por repulsión o por ser demasiado grandes al tener una mayor esfera de solvatación. Uno de los estudios a futuro que se plantea es investigar más exhaustivamente el dominio quinasa de VEGFR-2 mediante *docking* o dinámica molecular para poder establecer con mayor claridad las interacciones que se pueden producir con este compuesto.

Por lo que respecta a la viabilidad celular en co-cultivo, se observa como en un co-cultivo de HT-29 con células THP-1 la presencia de un grupo electrón-dador, como el grupo amino, aumenta, en esta familia, el efecto frente a la viabilidad celular de manera drástica, en comparación con el efecto que muestran los compuestos con el grupo nitro electrón-atrayente (véase la Figura 4.47).

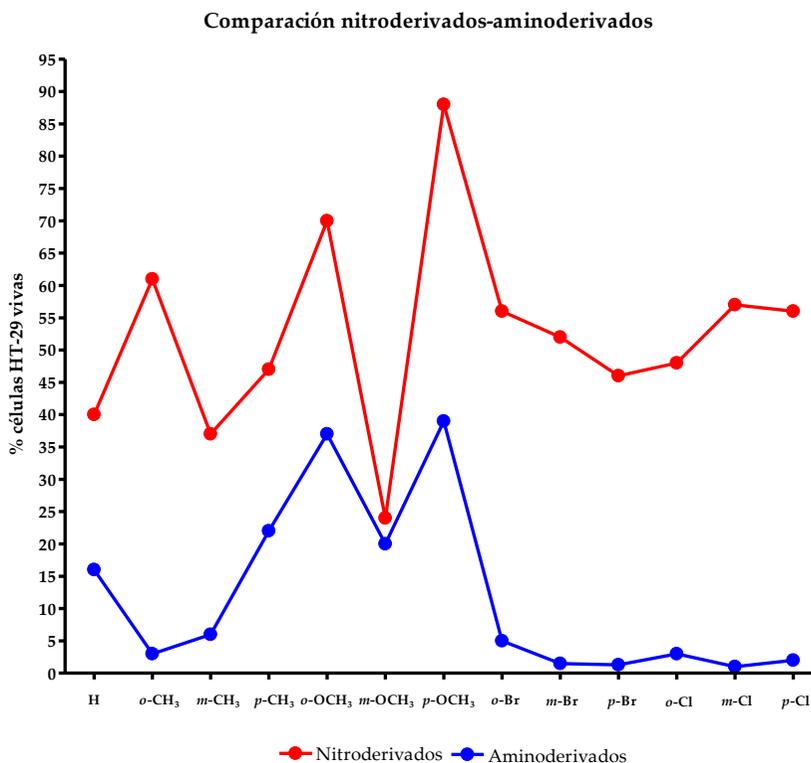


Figura 4.47. Comparación del porcentaje de células vivas entre los nitroderivados y los aminoderivados de la familia **IV** en co-cultivo HT-29/THP-1.

A diferencia de la familia **III**, con los compuestos de la familia **IV** se observa, en general, una tendencia similar entre los nitroderivados y los aminoderivados. Además, para un mismo sustituyente el porcentaje de células vivas es menor en los compuestos con un grupo amino en todos los casos, y sobre todo en los que contienen un halógeno, donde la diferencia es muy acusada. Así, los nitroderivados **IV.1-IV.13** muestran unos porcentajes de células tumorales vivas entre el 40-85%, mientras que los aminoderivados **IV.14-IV.26** lo rebajan hasta un 5-30%, destacando aquellos con un halógeno en su estructura (**IV.21-IV.26**) como los más potentes. En este estudio es remarcable señalar que ninguno de los compuestos afecta a la viabilidad de las células THP-1.

A partir de este estudio de co-cultivo se seleccionaron los compuestos **IV.15** (*o*-metilo), **IV.16** (*m*-metilo) y los haloderivados **IV.21-IV.26** para ampliar el estudio sobre viabilidad celular empleando diversas proporciones de células cancerosas y monocíticas, y a las concentraciones de 100 μM y 10 μM . Se confirmó la gran capacidad inmunomoduladora de los compuestos con un halógeno en posiciones *meta* (**IV.22** y **IV.25**) y *para* (**IV.23** y **IV.26**), ya que el porcentaje de células tumorales vivas a 100 μM se mantiene por debajo del 5%, mientras que a 10 μM cae por debajo de 30% en todos los casos. En este sentido, el IC_{50} para los tres cloroderivados (**IV.24-IV.26**) disminuye desde 100 μM en monocultivo de HT-29 hasta valores cercanos a 15 μM en co-cultivo con THP-1 (proporción 1:5). Esto significa que, en un entorno mucho más complejo, como el que se da en el co-cultivo con las células monocíticas, el efecto frente a la viabilidad celular aumenta considerablemente. El mecanismo de acción necesita de más estudios, pero por el momento se puede decir que los tres compuestos reducen la viabilidad de las THP-1 hasta valores cercanos al 35-50% a una concentración de 100 μM cuando éstas se encuentran en monocultivo. Estos valores se correlacionan con una inhibición de la proteína PD-L1 en la superficie de estas células del 65-75%. A dosis inferiores (10 μM) este efecto continúa siendo significativo. Otro de los motivos, por los cuales la actividad frente a la viabilidad celular se ve aumentada drásticamente en co-cultivos celulares, podría ser el aumento en la secreción al medio de la citoquina TNF- α . Como se ha comentado en el apartado 4.10.9, un aumento en la secreción de TNF- α desemboca en una respuesta inmunitaria mucho más eficiente.

Por tanto, en la Figura 4.48 se muestran aquellos tetrazoles de la familia **IV** que muestran una actividad biológica más prometedora.

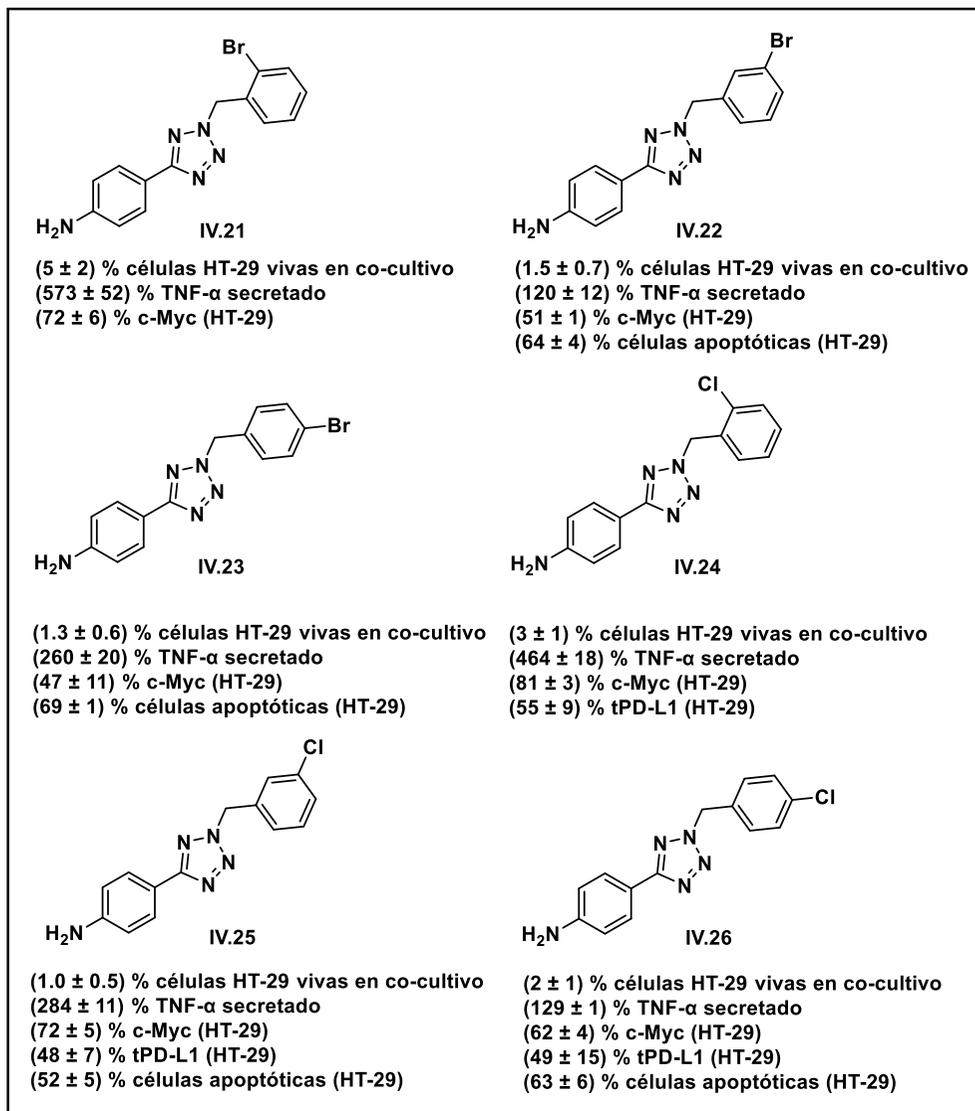


Figura 4.48. Compuestos de la familia IV con los resultados más prometedores.

4.14. Estudio de la actividad antitumoral de nanocompuestos

En esta Tesis Doctoral también se ha explorado el uso de nanopartículas tipo CQD (*Carbon Quantum Dots*, Puntos Cuánticos de Carbono) con el fin de generar nanocompuestos capaces de aumentar la potencia antitumoral de algunos de los derivados sintéticos. Estos nanocompuestos, al tener un tamaño mucho mayor al del compuesto sin la nanopartícula, tienen una mayor accesibilidad al tumor, por lo que se produce una acumulación del nanocompuesto en el sitio de acción, lo que debería incrementar su actividad.¹³⁷ Para estos ensayos, los CQD fueron sintetizados¹⁴⁴ y suministrados por el grupo GROC-UJI (Grupo de Investigación de Óptica), coordinado por la Dra. Gladis Mínguez y ubicado en el departamento de Física de la Universitat Jaume I.

Existen dos tipos de interacción entre los CQD y compuestos con grupos amino, tal y como se muestra en la Figura 4.49. Por un lado, mediante una reacción de acoplamiento peptídico, por ejemplo empleando EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida), se puede establecer un enlace covalente de tipo amida entre los restos carboxílicos del CQD y el grupo amino de los compuestos. Por otro lado, la presencia de los grupos carboxilo en el CQD permite el intercambio de un protón con el grupo amino, lo que lleva al establecimiento de una interacción iónica entre la carga positiva del grupo amino protonado y la carga negativa del grupo carboxilato.

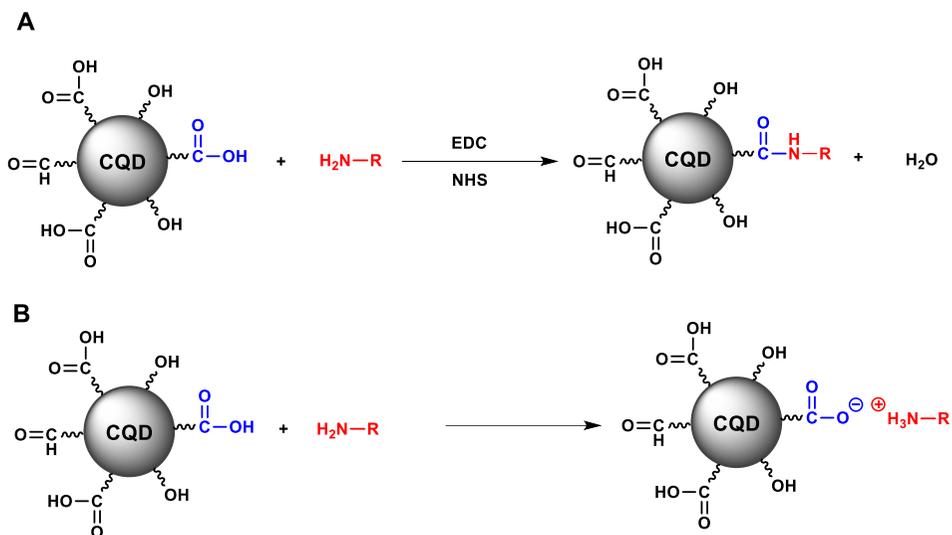


Figura 4.49. (A) Unión covalente entre el CQD y un compuesto amínico mediante enlaces covalentes de amida. (B) Unión entre el CQD y un compuesto amínico mediante interacciones iónicas.

Para establecer dicha interacción iónica se realizaron dos pruebas preliminares. La primera de ellas consistió en mezclar el mismo volumen del compuesto de interés disuelto en etanol con la suspensión de CQD en el mismo disolvente, para obtener una mezcla de reacción con el compuesto a una concentración de 10 μM y los CQD a 1.25 ng/mL. Esta mezcla de reacción se dejó en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente durante 90 minutos a la máxima potencia. La otra alternativa fue añadir directamente, y por separado en el medio de cultivo donde se iba a realizar el ensayo, los volúmenes necesarios para obtener estas concentraciones. De acuerdo con una prueba inicial se decidió por esta última opción, pues fue la que proporcionó mejores resultados.

En base a los resultados obtenidos para las cuatro familias de compuestos, se seleccionaron para este estudio los aminotriazoles **I.13** y **II.13** y los aminotetrazoles **III.26** y **IV.26**. Todos ellos tienen en común la presencia de un átomo de cloro en posición *para* en el anillo bencílico. Para estos compuestos ya se había realizado el ensayo de co-cultivo celular con la línea

HT-29 y una línea celular defensiva (THP-1 o Jurkat-T). El objetivo ahora era evaluar el ensayo en co-cultivo pero en presencia de los CQD. Con respecto a la concentración, se optó por ensayar los compuestos a 10 μM , pues la actividad biológica a esta concentración es menos elevada. De esta manera, se pretendía observar si la combinación con la nanopartícula incrementaba dicha actividad. La nanopartícula CQD, por su parte, se ensayó a una concentración de 1.25 ng/mL. Se decidió realizar el ensayo empleando como línea defensiva los monocitos THP-1 en las proporciones de células tumorales/células defensivas de 1:5 y 1:1. Ambas líneas celulares fueron puestas en contacto durante 48 h conjuntamente con los productos con CQD y sin CQD. Transcurridas las 48 h, las densidades de ambas poblaciones celulares se contaron mediante la técnica de citometría de flujo. Los resultados del ensayo se muestran en las Figuras 4.50 y 4.51.

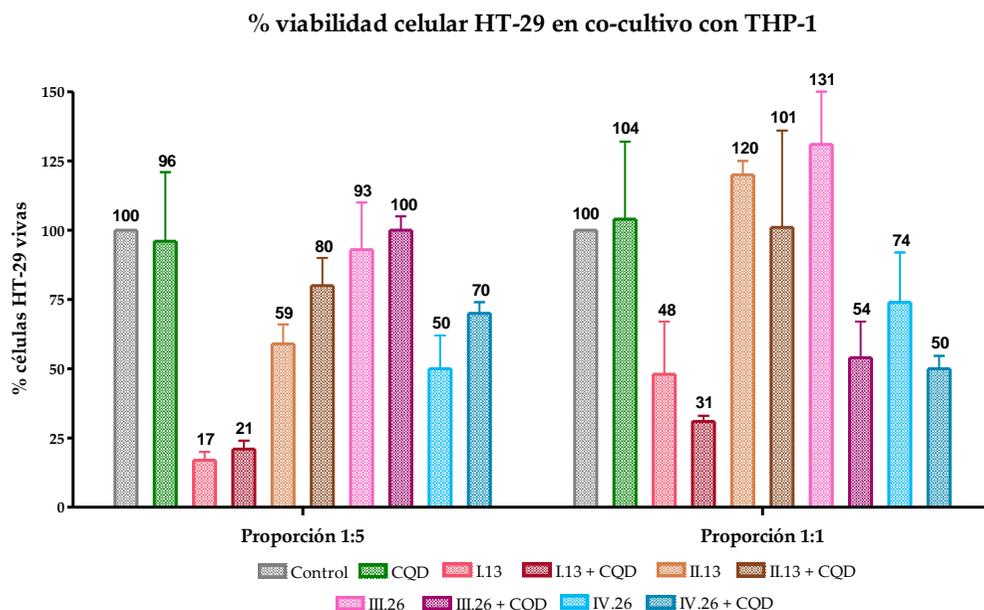


Figura 4.50. Porcentaje de células HT-29 vivas en co-cultivo HT-29/THP-1 en contacto con el CQD y con los compuestos **I.13**, **II.13**, **III.26** y **IV.26** sin y con CQD.

Para ambas proporciones, los CQD de por sí no afectan a la viabilidad de las células tumorales (véase la Figura 4.50). Cuando se empleó la proporción

1:5, se pudo observar que la combinación de los CQD con los compuestos no repercute en una mejora de la actividad biológica. Sin embargo, los resultados cuando se empleó la proporción 1:1 sí que fueron más alentadores, pues la viabilidad celular de las células HT-29 se vió reducida en aquellos casos en los que se combinaban los CQD y el compuesto frente a aquellos en los que sólo se añadía el compuesto. En especial destaca el tetrazol **III.26**, que pasa de una viabilidad celular de más de un 130% en solitario a menos de un 60% cuando se combina con los CQD.

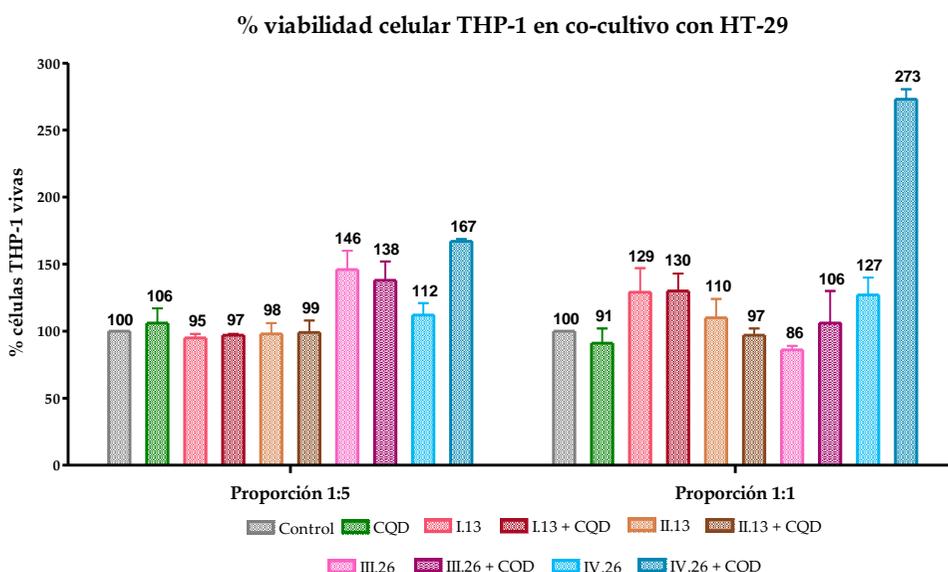


Figura 4.51. Porcentaje de células THP-1 vivas en co-cultivo HT-29/THP-1 en contacto con el CQD y con los compuestos **I.13**, **II.13**, **III.26** y **IV.26** sin y con CQD.

Para la viabilidad de las THP-1 de nuevo se observa que los CQD por sí mismos no afectan a este valor (véase la Figura 4.51). Para la proporción 1:5 se nota un aumento considerable con el compuesto **IV.26**, que pasa de una viabilidad de más del 110% a más de un 165%. Por otro lado, existe un comportamiento similar para la proporción 1:1, aunque en este caso la diferencia es mucho más acusada, pues para el compuesto **IV.26** se obtiene una estimulación mucho más elevada cuando se combina con los CQD, doblándose los valores de viabilidad. Con la proporción 1:1 también hay que

destacar al tetrazol **III.26**, ya que provoca un ligero aumento en la viabilidad celular de las células THP-1.

Estos resultados son muy interesantes y precisan de un estudio mucho más elaborado que ilustre de una manera más clara las ventajas e inconvenientes que tiene el uso de los CQD como sistema de unión para la eventual formación del nanocompuesto.

En un futuro se pretenden realizar ensayos en los que la unión entre el compuesto y el CQD sea de tipo covalente para poder corroborar y comparar los resultados. Esta coordinación a la nanopartícula fluorescente permitirá, además, llevar a cabo un estudio de colocalización del compuesto en la célula y conocer mejor su acción biológica, saber dónde actúa dentro de la célula y, en definitiva, indagar en el mecanismo de acción de este tipo de derivados estructurales.

4.15. Sección experimental

Todos los compuestos fueron disueltos en DMSO a una concentración de 20 mM preparados para su posterior uso. Los plásticos necesarios para los cultivos celulares fueron adquiridos a *Thermo Scientific BioLite*. Para realizar el ensayo de *Protein Thermal Shift* se ha empleado un equipo de PCR (*StepOne™ Real-Time PCR System*). Por otro lado, para los resultados obtenidos gracias a la técnica de citometría de flujo se ha hecho uso de un equipo *Accuri®C6*, situado en los Servicios Centrales de Instrumentación Científica de la UJI. Además, aquellos resultados que han implicado valores de absorbancia han sido medidos gracias al espectrofotómetro para microplacas *Multiskan™ FC* de *Thermo Scientific™*. La bioluminiscencia fue detectada mediante el *Varioskan™ LUX* de *Thermo Scientific™*.

4.15.1. Protocolos y técnicas generales

4.15.1.1. Ensayo de interacción directa con PD-L1

Para el ensayo se han empleado el *Protein Thermal Shift Dye Kit™* (número de referencia 4461146) y placas *MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate 0.1mL* (número de referencia 4375816) de la casa *appliedbiosystems*. En cada pocillo se añaden 5 μ L de *buffer*, 2 μ L de proteína PD-L1 a una concentración de 0.1 mg/mL, 2 μ L del producto a ensayar a una concentración 0.5 mM y 8.5 μ L de agua estéril. En el caso de los controles, para evaluar la acción del producto por sí mismo se sustituye el volumen de proteína por el mismo volumen de agua estéril y para comprobar el valor de T_m de la proteína se sustituye el volumen de producto por el mismo volumen de agua estéril. Finalmente, a todos los pocillos se le añaden 2.5 μ L del tinte Naranja SYPRO 8X. Previamente, el tinte se debe diluir con *buffer* a esta concentración partiendo de un stock 1000X.

Todo el contenido de cada pocillo se homogeniza con una pipeta y los pocillos se cubren con plástico adherente y se centrifugan con la ayuda de una centrífuga de placas. Después, se introducen en el equipo y se realiza la curva de calentamiento entre 15°C y 99°C.

4.15.1.2. Ensayo de bloqueo PD-1/PD-L1

Para determinar la actividad sobre el bloqueo PD-1/PD-L1 se utiliza el kit *PD-1(Biotinylated): PD-L1 Inhibitor Screening ELISA Kit* (*AcroBiosystems*, número de referencia EP-101).

4.15.1.3. Ensayo de actividad inhibitoria quinasa

Para determinar la actividad inhibitoria quinasa se utiliza el kit *ADP-Glo™ Kinase Assay* (*Promega*, número de referencia V6930).

4.15.1.4. Mantenimiento de los cultivos celulares y recuento celular

Las células HT-29, A-549, MCF-7, HEK-293, Jurkat-T y THP-1 fueron cultivadas en un medio de cultivo comprado a *Gibco* (Grand Island, NY), que se encuentra formado por *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) obtenido de *Harlan-Seralab* (Belton, U.K.). Además, el medio contiene glucosa (1g/L), L-glutamina (1% (v/v)), anfotericina B (1% (v/v)) y penicilina-estreptomina (1% (v/v)). Estos aditivos proporcionan los nutrientes necesarios y regulan el pH a niveles adecuados para el rápido crecimiento celular al mismo tiempo que evitan contaminaciones por microorganismos como hongos o bacterias. Por su parte, las HMEC-1 fueron cultivadas en el mismo medio DMEM, pero bajo en glucosa.

Las células se mantienen congeladas a -196°C en nitrógeno listas para su uso. Cuando se requiere, se atemperan a 37°C y su contenido se centrifuga 5 minutos a 4000 rpm y se elimina el sobrenadante. El pellet se resuspende en medio de cultivo y se traspasa a una placa Petri de 10 cm de diámetro. Para congelar las células, éstas se recogen para traspasarlas a un criotubo. Para ello, se elimina el medio de cultivo y se lava con aproximadamente 10 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*). A continuación, se añade 1 mL de tripsina para que se escinda el enlace establecido entre las células y la placa y se incuba a 37°C durante 5-10 minutos. Se recogen con medio de cultivo y se centrifugan 5 minutos a 4000 rpm. Finalmente, se elimina el sobrenadante y se resuspenden con 900 mL de FBS y 100 mL de DMSO.

Para realizar un recuento celular y determinar un valor de densidad celular, una forma sencilla es utilizar el ensayo de exclusión del azul de tripano. En este ensayo, una alícuota de la suspensión celular se homogeniza con la misma alícuota del colorante azul de tripano. Esta mezcla se deposita sobre un cristal con forma similar a un portaobjetos denominado cámara Neubauer.

En el centro de la cámara se hallan cuatro cuadrículas de 1 mm x 1mm, de manera que el volumen de cada uno de estos cuadrantes es de 0.1 μ L. El ensayo se basa en que el colorante es capaz de atravesar la membrana celular de aquellas células muertas, tiñéndolas de azul. Por el contrario, si las células se encuentran vivas, el azul de tripano no es capaz de teñirlas y en el microscopio se verán blancas y brillantes, por lo que se puede realizar su recuento.

4.15.1.5. Ensayo de viabilidad celular en monocultivo. Determinación del IC₅₀ mediante ensayo MTT

En placas de 96 pocillos, 5 x 10³ células por pocillo son incubadas con diluciones seriales de los compuestos a testear en un volumen total de 100 μ L de medio de cultivo. Después de 48 horas de incubación (37°C, 5% de CO₂ en una atmosfera húmeda), se añaden 10 μ L de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; *Sigma Chemical Co.*) a una concentración de 5 mg/mL en PBS a cada pocillo y la placa se incubó por 3 horas más (37°C). Después, el sobrenadante se elimina y se añaden 100 μ L de DMSO para disolver los cristales de formazán formados. Finalmente, la absorbancia se mide a 550 nm en el espectrofotómetro.

Para todas las concentraciones de compuesto, la viabilidad celular se expresa como el porcentaje de la ratio entre la absorbancia media de las células tratadas y la de las células no tratadas. Se realizan tres réplicas y los valores de IC₅₀ son determinados gráficamente empleando el programa *GraphPad Prism 4*.

4.15.1.6. Ensayo de viabilidad celular en co-cultivo. Determinación del porcentaje de células vivas mediante citometría de flujo

En este ensayo se emplean placas de 12 pocillos, donde se siembran 10⁵ células HT-29/pocillo y se incuban durante 24h a 37°C. A continuación, el medio se sustituye por medio de cultivo suplementado con Interferón- γ (10

ng/mL; humano, *Invitrogen*®), que contiene la proporción necesaria de THP-1 por pocillo (5×10^5 , 2.5×10^5 , 10^5 o 5×10^4) y, posteriormente, se añaden los compuestos a la concentración deseada, empleando como control el DMSO. Después de 24h o 48h de incubación, se emplean los sobrenadantes como muestras para determinar el número de células THP-1 vivas. Por otra parte, las células cancerosas se recogen para proceder a su recuento. Ambas poblaciones celulares son fijadas con formaldehído (4% v/v en PBS) y contadas mediante citometría de flujo.

4.15.1.7. Determinación de la expresión de las proteínas PD-L1, CD-47, VEGFR-2 y c-Myc mediante citometría de flujo

Para estudiar el efecto sobre las dianas biológicas, tanto en monocultivo como en co-cultivo, una vez las células son recogidas de la placa, se realizan varios lavados con PBS antes de fijarlas con formaldehído (4% v/v en PBS). Después, se marcan con los anticuerpos correspondientes a aquellas dianas de interés. Para detectar PD-L1, VEGFR-2 y CD-47 de membrana se emplean *AlexaFluor*® 647 *Rabbit Monoclonal Anti-PD-L1* (ab215251), *FITC Mouse Monoclonal Anti-Human VEGFR-2* (ab184903) y *FITC Mouse Monoclonal Anti-CD-47* (ab134484), respectivamente. Sin embargo, para detectar la cantidad de proteína total, así como de c-Myc (*FITC Rabbit Monoclonal Anti-c-Myc* (ab223913)), es necesario tratar las células con un detergente que permeabiliza la membrana celular, en este caso Triton™ X-100 (0.5% v/v en PBS).

4.15.1.8. Determinación del efecto en la secreción de IL-6 y TNF- α

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre la secreción de IL-6, 10^5 células por pocillo son incubadas 48h con la correspondiente dosis del compuesto a ensayar en un volumen total de 500 μ L de medio de cultivo. Éste medio de cultivo se recoge y se utiliza como muestra en el kit *Invitrogen*® *Human IL-6 ELISA* (número de referencia KHC0061).

Por su parte, para estudiar el efecto de los compuestos sobre la secreción de TNF- α , se realiza el mismo procedimiento que para IL-6 pero empleando el kit *Invitrogen® Human TNF- α ELISA* (número de referencia KAC1751).

4.15.1.9. Determinación de la actividad proapoptótica

Para estudiar la actividad proapoptótica de los compuestos se utiliza el kit *BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection* (número de referencia 556547). De manera breve, después de recoger las células con acutasa, éstas son resuspendidas en 1X *Binding Buffer* para obtener una concentración de 10^5 células/mL. Después de esto, a una alícuota de 100 μ L se le añaden 5 μ L de Anexina-V-FITC y 5 μ L de yoduro de propidio. Finalmente, la actividad proapoptótica es medida mediante citometría de flujo.

4.15.1.10. Determinación de la actividad antiangiogénica y antivascular

Para este ensayo se emplean las placas *IBIDI μ -slide angiogenesis* (IBIDI, Martinsried, Alemania) y las *Corning® Matrigel® Matrix Cellware* (BioCoat™, Bedford, EEUU). Además, las células utilizadas para el ensayo son cultivadas en el medio EGM-2MV suplementado con EGM-2MV *SingleQuots*.

En los ensayos utilizando las placas *IBIDI μ -slide angiogenesis* y con el fin de determinar la actividad antiangiogénica, los pocillos de las placas son recubiertos con 12 μ L de Matrigel® (10 mg/mL, *BD Biosciences*) a 4°C. Después de la gelatinización a 37°C durante 30 minutos, las células HMEC-1 son sembradas a una concentración de 2×10^4 células/pocillo en 25 μ L de medio de cultivo y son incubadas durante 30 minutos a 37°C. A continuación, los compuestos se añaden disueltos en 25 μ L de medio de cultivo y se deja incubar durante 24h a 37°C para observar los efectos correspondientes. Por otro lado, en los ensayos para determinar la capacidad antivascular, el procedimiento es el mismo, aunque antes de añadir los compuestos se deja

incubar por 24h a 37°C las muestras para que la red de microtúbulos esté formada.

En el caso de los ensayos utilizando las placas *Corning® Matrigel® Matrix Cellware*, 80 µL de medio de cultivo son añadidos a cada pocillo de la placa y se deja incubando durante 24h a 37°C. Después de eliminar el medio, 5×10^4 células/pocillo son sembradas en 80 µL de medio de cultivo. Si se desea observar la capacidad antiangiogénica, se añaden a continuación 20 µL de los compuestos disueltos a la concentración de estudio en medio de cultivo y se deja incubar 24h a 37°C para observar los efectos. Por el contrario, si se pretende determinar la acción antivascular, de nuevo se deja incubar 24h a 37°C antes de añadir los compuestos.

**CAPÍTULO 5.
EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE
LA CAPACIDAD
ANTIBACTERIANA, ANTIVIRAL
Y ANTIMICÓTICA**

CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA, ANTIVIRAL Y ANTIMICÓTICA

En este capítulo se detallan algunos ensayos preliminares realizados con el fin de ampliar las áreas de acción biológica de los compuestos sintetizados en esta Tesis Doctoral. Estas nuevas acciones biológicas incluyen estudios de actividad biológica frente a bacterias, virus y hongos.

5.1. Estudio de la actividad antibacteriana

Los ensayos para evaluar la actividad antibacteriana se llevaron a cabo en los laboratorios del grupo de investigación BBUji (Bioquímica y Biotecnología), dirigido por la Dra. Begonya Vicedo y ubicados en el departamento de Biología, Bioquímica y Ciencias Naturales de la Universitat Jaume I.

En ellos se estudió si la presencia de los compuestos ejercía alguna acción en el crecimiento bacteriano de *E. coli* o de *S. aureus*. Para ello, se cultivaron las cepas de *E. coli* NCIMB 9484 y de *S. aureus* ATCC 29213, obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), en placas de agar Luria Bertani (LB) a 37°C. Para preparar el inóculo de las bacterias, éstas se recogieron, tras 24h, en MgSO₄ (10 mM) estéril y se midió la densidad óptica de la suspensión a 600 nm para obtener, tras ajustarla, una densidad bacteriana de 10⁷ ufc/mL de *E. coli* y de 10⁸ ufc/mL de *S. aureus*.

Para cada bacteria se utilizó una placa de 96 pocillos de microtitulación diferente. En ellas, se añadieron 2 µL de las respectivas suspensiones bacterianas, lo que se corresponde con 10⁵ ufc/mL de *E. coli* y con 10⁶ ufc/mL de *S. aureus*, y se añadió medio LB hasta completar un volumen final de 200 µL. A este medio se le añadió previamente la cantidad de producto disuelto en DMSO necesaria para tener en el pocillo una concentración final de 100 µM. Como control positivo, únicamente se añadió medio LB, mientras que se

emplearon controles negativos tanto del medio LB como de los compuestos sin inóculo. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24h y se obtuvieron medidas de densidad óptica a 600 nm cada 10 minutos empleando el espectrofotómetro para microplacas *Multiskan™ FC* de *Thermo Scientific™*.

Se escogieron para estos ensayos tanto los triazoles como los tetrazoles que presentan un grupo amino en posición *meta* en el anillo de fenilo y un átomo de cloro en el anillo de bencilo, es decir, los derivados **I.11**, **I.12**, **I.13**, **III.24**, **III.25** y **III.26**. En primer lugar, se midió la densidad óptica de los compuestos en ausencia de bacteria para detectar si alguno de ellos presentaba valores de absorbancia destacables. En la Figura 5.1 se muestran los resultados obtenidos.

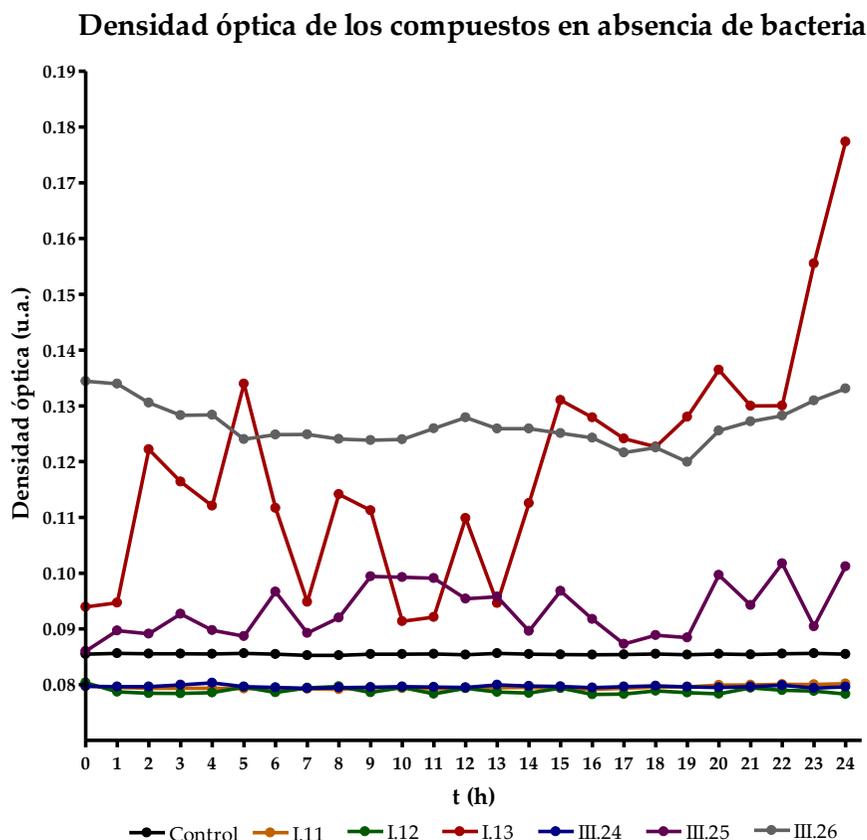


Figura 5.1. Densidad óptica a lo largo de 24h de los compuestos en ausencia de bacteria.

Se observa que los dos compuestos que contienen el átomo de cloro en posición *para*, **I.13** y **III.26**, muestran valores de densidad óptica destacables de por sí, especialmente el triazol **I.13**, los cuales fluctúan bastante. Por tanto, se decidió descartar estos compuestos para los ensayos para evitar posibles errores en la interpretación de resultados.

En la Figura 5.2 se muestran los resultados para la *E. coli*.

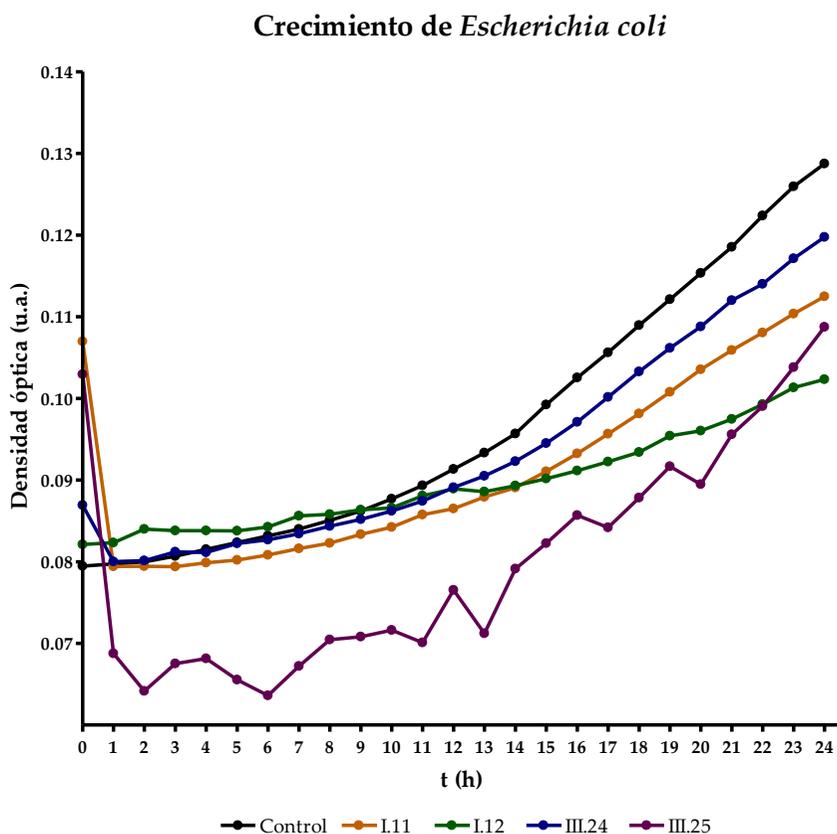


Figura 5.2. Densidad óptica a lo largo de 24 h de los compuestos en contacto con *E. coli*.

Se puede apreciar como a las 24 h el crecimiento de la bacteria en presencia de los cuatro compuestos es menor que el control. El tetrazol **III.25** (*m*-cloro) destaca especialmente entre los compuestos ensayados, pues, a pesar de que a tiempo inicial la cantidad de bacteria presente es superior al control, rápidamente decrece y durante más de 20 horas retrasa claramente

el crecimiento bacteriano en comparación con el control. Entre el resto de compuestos todos sufren un comportamiento semejante, retrasando ligeramente el crecimiento de la bacteria.

Por otro lado, en la Figura 5.3 se muestran los resultados para *S. aureus*.

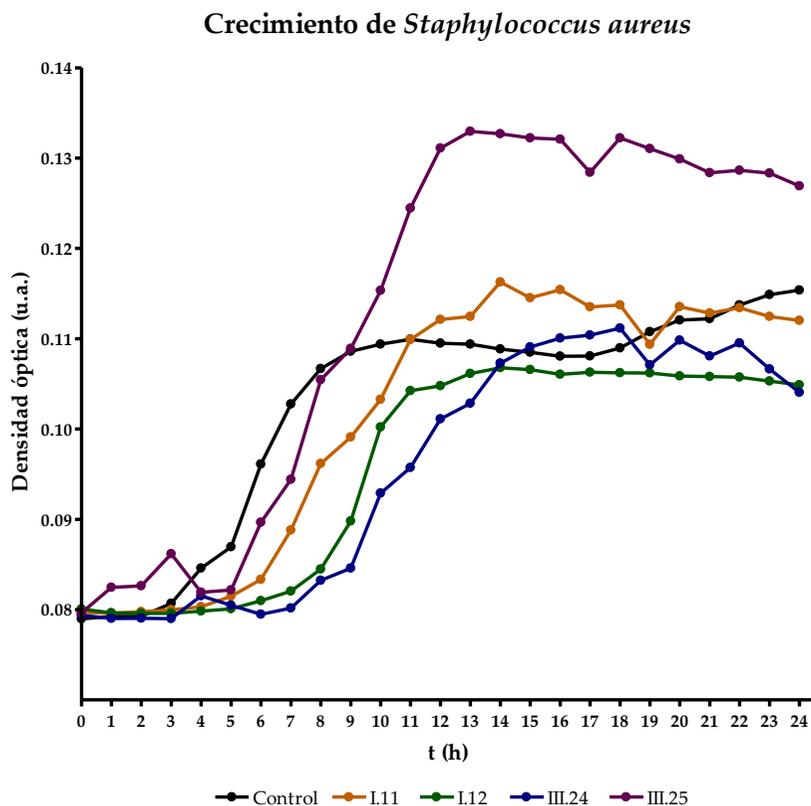


Figura 5.3. Densidad óptica a lo largo de 24h de los compuestos en contacto con *S. aureus*.

En este caso el tetrazol **III.25** resulta no ser óptimo para tratar esta bacteria, pues parece que la bacteria se aprovecha del compuesto para nutrirse y aumentar su crecimiento. Sin embargo, los otros tres derivados son capaces de retrasar la proliferación bacteriana y de inhibirla ligeramente.

En un futuro se pretende repetir estos ensayos para confirmar los resultados obtenidos para estas dos bacterias. Para el caso de los dos compuestos que no han podido ser ensayados mediante este método se

pretende estudiar su comportamiento mediante el método de las diluciones seriadas y recuento de colonias. También se plantea el ensayo con otros compuestos de esta Tesis Doctoral y con otras bacterias.

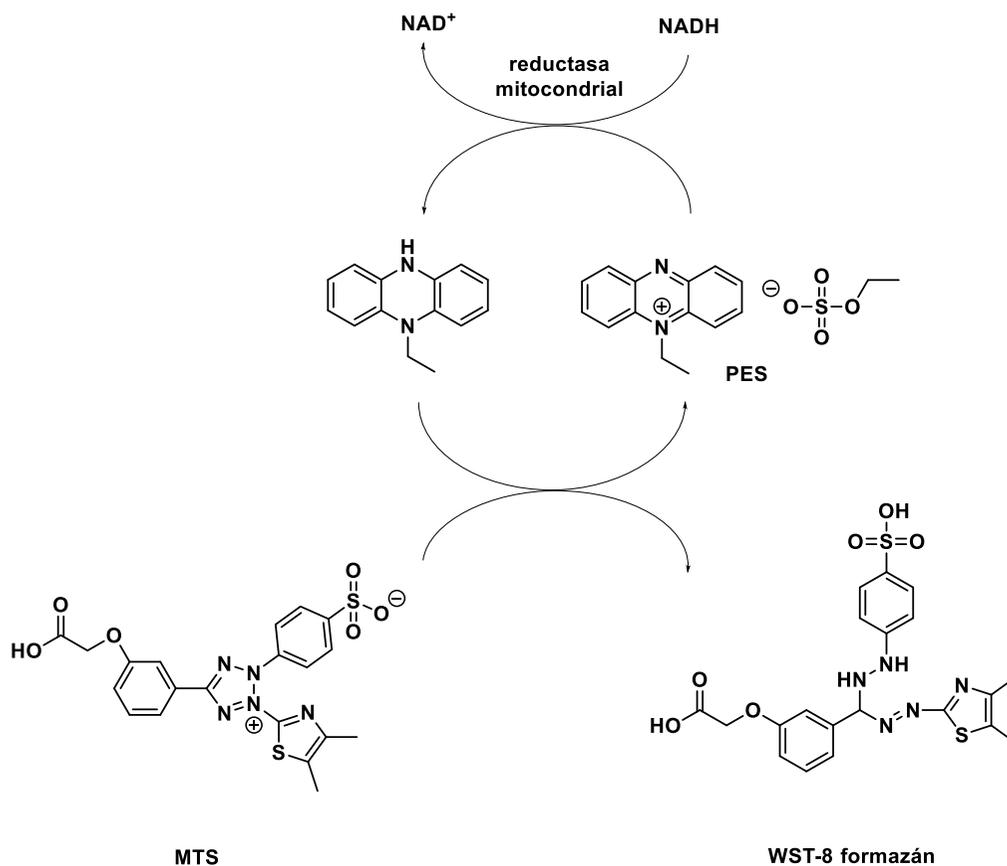
5.2. Estudio de la actividad antiviral

Los ensayos para determinar la actividad antiviral fueron realizados en el laboratorio de Virología y Quimioterapia dirigido por el Dr Dominique Schols, ubicados en el *Rega Institute*, asociado a la universidad KU Leuven (Bélgica). En ellos se determinó el IC₅₀ y el EC₅₀ de las células MT-4 una vez son infectadas tanto con una cepa del virus VIH-1 como con otra del VIH-2. El EC₅₀ se define como la concentración de compuesto a la cual se inhibe el 50% del efecto citopatogénico inducido por el virus en la línea celular. Las células MT-4 se corresponden a una línea de linfocitos T con el marcador CD4+. Estas células fueron obtenidas por primera vez por co-cultivo de células T humanas de tipo 1 seropositivas al virus linfotrópico (HTLV-1) de un varón japonés de 50 años con células T de leucemia de adulto (ATL) y linfocitos de sangre de cordón umbilical.¹⁹⁶ Por otro lado, para la infección se empleó la cepa NL4.3 para el VIH-1 y la ROD para el VIH-2.

El ensayo empleado es un ensayo colorimétrico muy semejante al ensayo MTT explicado en el apartado 4.5.1, conocido como MTS/PES. El MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol] es un compuesto que se encuentra estabilizado por un aceptor de electrones, el etosulfato de fenazina (PES, *phenazine ethosulfate*). Este compuesto ejerce de intermediario y transfiere un electrón al MTS, que proviene de la oxidación del NADH a NAD⁺ debido a la actividad metabólica de la célula, reduciendo el MTS a la forma soluble WST-8 formazán (véase el Esquema 5.1).

¹⁹⁶ Fernández, M.V.; Delviks-Frankenberry, K.A.; Scheiblin, D.A.; Happel, C.; Pathak, V.K.; Freed, E.O. Authentication Analysis of MT-4 Cells Distributed by the National Institutes of Health AIDS Reagent Program. *J. Virol.* **2019**, *93*, 1-8. DOI: 10.1128/jvi.01390-19.

Una de las ventajas de este método frente al del MTT es que el formazán generado es una forma soluble en agua de una sal de tetrazolio (WST, *Water-Soluble Tetrazolium salt*), por lo que no es necesario el uso de DMSO para redissolver los cristales de formazán que se forman en el ensayo.



Esquema 5.1. Reducción del MTS a WST-8 formazán.

Las células MT-4 fueron cultivadas a una concentración de 5×10^5 células/mL dos días antes del ensayo en un medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado con 10% (v/v) de FBS y 1% (v/v) de glutamina. Pasados los dos días, se realiza el protocolo de infección. Para ello, los compuestos a ensayar fueron diluidos en placas de 96 pocillos en un volumen final de 100 μL de medio de cultivo a una concentración al doble de la deseada. En esta misma placa se añadieron 100 μL de medio de cultivo a

los pocillos destinados al control de células y a los de control del virus. Las células cultivadas se contaron, centrifugaron y resuspendieron a una concentración de 10^6 células/mL. Se añadieron 50 μ L/pocillo, lo cual se corresponde con 50.000 células en cada pocillo, y se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C y con 5% CO_2 . A continuación, se añadieron 50 μ L de medio de cultivo a los pocillos de control de células y 50 μ L del virus a infectar a una concentración de 5 pg/mL, determinada por titración. Las placas fueron incubadas 5 días a 37°C y con 5% CO_2 .

Transcurrido este tiempo, el efecto citopatogénico (CPE, *cytopathogenic effect*) fue observado en el microscopio. Se eliminaron 100 μ L de sobrenadante y se añadieron 50 μ L de una disolución MTS/PES. Tras incubar 2 horas a 37°C y con 5% CO_2 , se añadieron 50 μ L de Triton-X-100 (0.5%) a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 490 y 700 nm empleando un equipo *VersaMax Microplate Reader*.

Uno de los compuestos conocidos por mostrar una acción frente al VIH-1, y que se utilizó en este ensayo como compuesto de referencia, es el AMD3100 o plerixafor. Esta molécula de pequeño tamaño, cuya estructura se muestra en la Figura 5.4, es capaz de inhibir el co-receptor CXCR4, implicado en el proceso de infección del VIH-1.¹⁹⁷

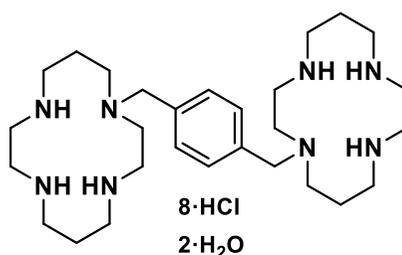


Figura 5.4. Estructura química del compuesto AMD3100.

¹⁹⁷ Donzella, G.A.; Schols, D.; Lin, S.W.; Esté, J.A.; Nagashima, K.A.; Maddon, P.J. et al. AMD1300, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR-4 co-receptor. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 72-77. DOI: 10.1038/nm0198-072.

Se ensayó una batería de compuestos que incluye compuestos de las familias **II**, **III** y **IV**, así como el compuesto **2**. No todos los derivados ensayados exhiben actividad biológica, por lo que en la Tabla 5.1 se muestran aquellos compuestos que sí lo hacen, así como el compuesto de referencia AMD3100.

Tabla 5.1. Valores de IC₅₀ para células MT-4 y de EC₅₀ tras la infección con NL4.3 y ROD para una selección de compuestos y para el AMD3100.

| Compuesto | IC ₅₀ (μM) | EC ₅₀ (μM) | |
|----------------|-----------------------|-----------------------|-------------|
| | | VIH-1 (NL4.3) | VIH-2 (ROD) |
| II.2 | 206.9 | 73.100 | 47.600 |
| II.8 | 166.3 | 79.800 | 34.400 |
| II.9 | >100 | >100 | 48.800 |
| II.11 | 187.8 | 41.500 | 40.600 |
| II.12 | >100 | >100 | 60.300 |
| II.13 | 206.2 | 73.400 | 52.100 |
| 2 | 134.0 | 78.500 | 55.500 |
| III.23 | 185.3 | 44.500 | 64.100 |
| IV.14 | 237.5 | 96.800 | 47.800 |
| IV.15 | 113.6 | 62.800 | >113.6 |
| AMD3100 | >12.1 | 0.015 | 0.021 |

Los resultados que se muestran son los de aquellos compuestos cuyo valor de EC₅₀ se encuentra por debajo del IC₅₀ en alguna de las dos cepas, aunque todos los derivados muestran una actividad leve y muy lejana a la del compuesto de referencia. Así, con respecto a la infección por VIH-1 destacan el triazol **II.11** (grupo amino en posición *para* y átomo de cloro en posición *orto*) y el tetrazol **III.23** (grupo amino en posición *meta* y átomo de bromo en posición *para*), mostrando valores de EC₅₀ por debajo de 45 μM. En relación

a la infección por VIH-2 resalta el triazol **II.8** (grupo amino en posición *para* y átomo de bromo en posición *orto*) con un EC_{50} inferior a 35 μ M.

En un futuro se desean continuar estos estudios de actividad antiviral con más compuestos y ampliando la investigación a otros tipos de virus.

5.3. Estudio de la actividad antimicótica

Por último, los ensayos llevados a cabo con el fin de determinar la actividad antimicótica de los compuestos se realizaron en los laboratorios del grupo MicroBio (Microbiología de los Patógenos Oportunistas y su Impacto en Salud Humana), dirigido por la Dra. Rosa de Llanos y ubicados en la Unidad Predepartamental de Medicina de la Universitat Jaume I.

En estos ensayos se pretendió obtener un valor aproximado de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a tres géneros diferentes de levaduras: *Candida albicans*, *Candida krusei* y *Candida glabrata*. En primer lugar, se debe preparar un medio tipo agar SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) para poder cultivar las levaduras. Para ello, se disponen las cantidades deseadas para obtener una concentración de 65 g/L en agua destilada y, tras autoclavar, se vierte el agar en placas Petri de 10 cm de diámetro. Una vez secas, se puede proceder a la siembra de las levaduras. Se pipetea 20 μ L de un glicerinado en el que se encuentra cada *Candida* y se depositan sobre una placa Petri. Con la ayuda de un asa de siembra se aplica el método del sembrado en triple estría y se deja crecer la levadura a 35°C durante, al menos, 24h. Por otra parte, se prepara el medio de cultivo que se va a utilizar en el ensayo. Éste se debe preparar a 2X, pues posteriormente en el protocolo se producirá una dilución 1:2. El medio se encuentra formado por RPMI-1640 suplementado con glucosa (2% (v/v)) y ácido 3-(N-morfolin)propanosulfónico (MOPS, 0.165 mol/L). Tras añadir las cantidades necesarias y agitar hasta disolución, se ajusta el pH a 7, se filtra empleando filtros de 0.22 μ m y se almacena hasta su uso.

Para la determinación de la CMI se empleó el método Eucast¹⁹⁸ que, de nuevo, experimentalmente se asemeja bastante al ensayo MTT. En una placa de 96 pocillos se realizaron diluciones seriadas de los compuestos a ensayar empleando el medio de cultivo RPMI-2X para obtener concentraciones al doble de lo deseado y un volumen final de 100 μ L. En esta misma placa también se destinaron unos pocillos a diferentes controles. Por un lado, los controles positivos de la levadura, para comprobar el correcto crecimiento de la misma, en los que se añadieron 100 μ L únicamente de medio de cultivo. Otros pocillos se utilizaron para medir la absorbancia de los compuestos cuando no se encuentran en contacto con la levadura, mientras que otros se emplearon para medir la absorbancia de la placa. Por otro lado, se preparó un inóculo de la levadura que se deseaba ensayar. La concentración de la levadura se determinó gracias a un densitómetro McFarland. La escala McFarland permite establecer unos estándares de turbidez que se asocian al número aproximado de células en suspensión necesarias para preparar inóculos.¹⁹⁹ De esta manera, en un tubo McFarland se suspendieron en agua estéril colonias de levaduras recogidas de la placa Petri donde se habían cultivado y se ajustaron a una concentración de 0.5 McFarland, para que se tuviesen aproximadamente entre $1-5 \times 10^6$ células/mL. Tras esto, se diluyó 10 veces para así tener una suspensión de $1-5 \times 10^5$ células/mL. De esta suspensión se añadieron 100 μ L a cada pocillo que contenía producto, así como a los pocillos de control positivo, lo que supone un total de entre 10000 y 50000 células en cada pocillo. Por su parte, a los pocillos de control de los compuestos y a los de la placa se sustituyó este volumen por 100 μ L de agua estéril. La placa se dejó incubando a 35°C durante 24h.

¹⁹⁸ Cuenca-Estrella, M.; Gadea-Gironés, I.; Martín-Mazuelos, E.; Pernán-García, J.; Pontón, J.; Rodríguez-Tudela, J. L. Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **2006**, *21*.

¹⁹⁹ Zapata, A.; Ramirez-Arcos S. A comparative study of McFarland turbidity standards and the Densimat photometer to determine bacterial cell density. *Curr. Microbiol.* **2015**, *70*, 907-909. DOI: 10.1007/s00284-015-0801-2.

Transcurrido ese tiempo, la CMI se puede determinar cualitativamente y cuantitativamente. La determinación cualitativa se realizó mediante la observación directa. Cuando se produce crecimiento fúngico, el nivel de glucosa del medio disminuye y consecuentemente el pH. Esto provoca que el indicador rojo de fenol que se encuentra en el medio vire de un tono rojo a uno amarillo. Además, el crecimiento fúngico también produce una turbidez en el pocillo. Por otro lado, la determinación cuantitativa se realizó mediante la medida de la absorbancia a 650 nm empleando un espectrofotómetro, en este caso el *Multiskan™ FC* de *Thermo Scientific™*.

Se escogieron los clorotetrazoles **III.24**, **III.25** y **III.26** como compuestos a ensayar, además de añadir también el fluconazol como control positivo. Los resultados cualitativos se muestran en las Figuras 5.5, 5.7 y 5.9, mientras que los cuantitativos se muestran en las Figuras 5.6, 5.8 y 5.10.

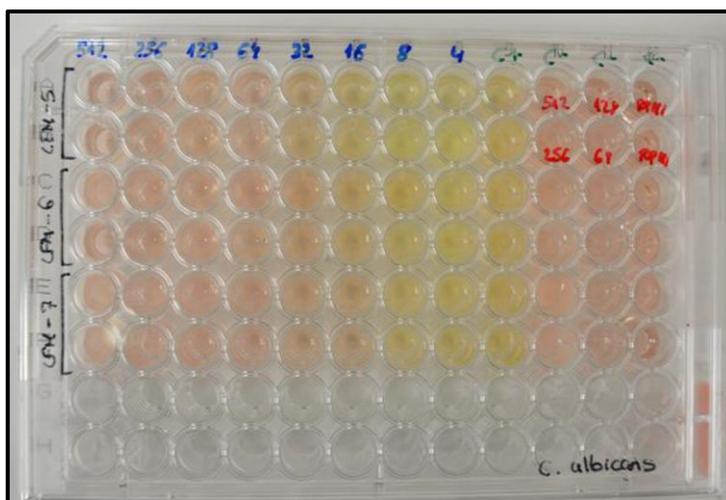


Figura 5.5. Fotografía de la placa de *Candida albicans* a las 24h.

Para el género *Candida albicans* cualitativamente se puede observar cómo a partir de las concentraciones de 8 y 4 $\mu\text{g/mL}$ se produce un cambio de color y la aparición de turbidez para los tres compuestos ensayados. Además, para el compuesto **III.24** (o-cloro, primeras dos filas de la placa) ya se empiezan a

ver estas características en los pocillos correspondientes a las concentraciones de 32 y 16 $\mu\text{g/mL}$.

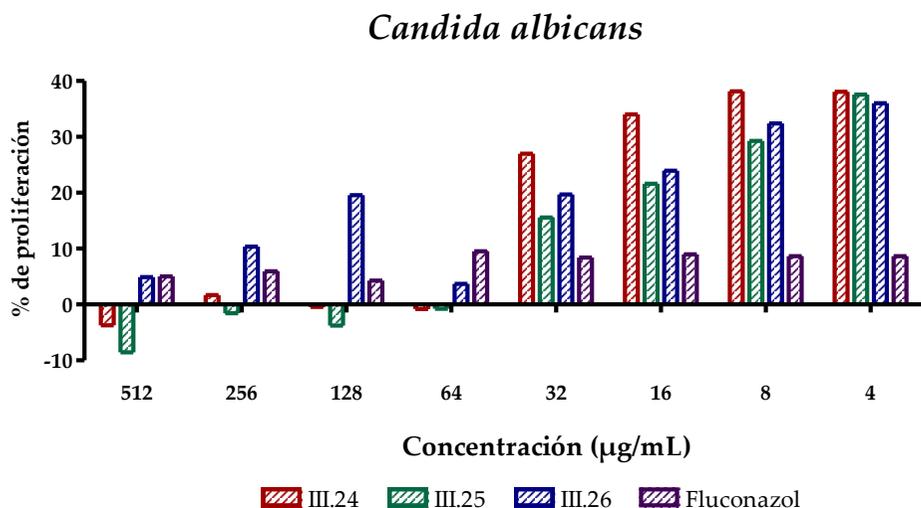


Figura 5.6. Porcentajes de la proliferación de *Candida albicans*.

Tras medir los valores de absorbancia y compararlos con el valor del control, las observaciones realizadas cualitativamente fueron confirmadas de manera cuantitativa. A concentraciones por debajo de 64 $\mu\text{g/mL}$, el porcentaje de *Candida albicans* que ha proliferado sufre un salto destacable, por lo que se puede decir que la CMI determinada para los tres compuestos es de 64 $\mu\text{g/mL}$. Se debe destacar que, a pesar de ello, el compuesto **III.26** (*p*-cloro) es el menos activo de los tres, pues ofrece unos porcentajes menores. Algunos valores son ligeramente negativos debido a que la absorbancia del control supera a la del pocillo que contiene el compuesto con el inóculo. Además, a pesar de que en las concentraciones de 256 y 128 $\mu\text{g/mL}$ no se observa cualitativamente crecimiento fúngico, los valores de absorbancia son relativamente altos, lo que se traduce en un porcentaje más elevado. Esto se debe a la elevada insolubilidad de este compuesto en medio acuoso, la cual provoca una turbidez mayor de la esperada. En general, a medida que la concentración de los compuestos disminuye la proliferación fúngica crece.

Por su parte, el fluconazol se muestra activo a todas las concentraciones ensayadas.

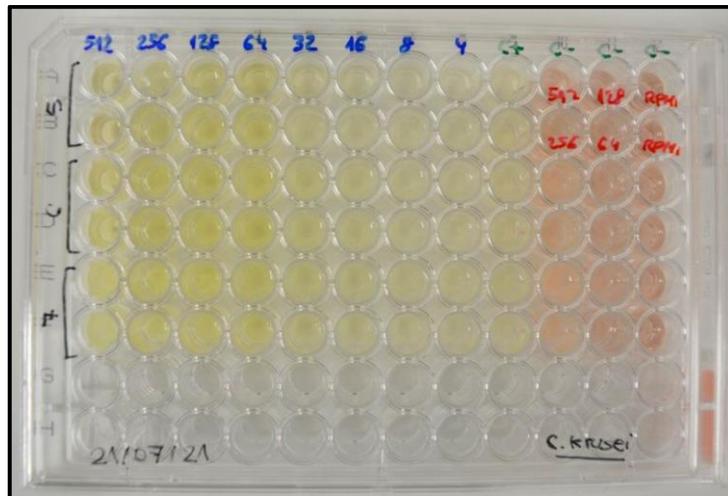


Figura 5.7. Fotografía de la placa de *Candida krusei* a las 24h.

En el caso de *Candida krusei* cualitativamente se puede apreciar cómo ninguna de las concentraciones ensayadas de los tres compuestos es capaz de frenar el crecimiento fúngico puesto que todos los pocillos han virado a amarillo y ha surgido turbidez.

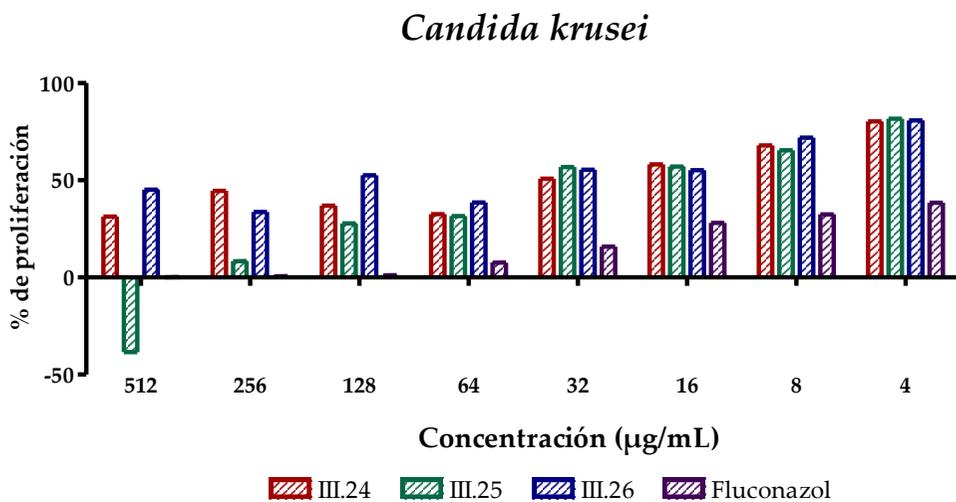


Figura 5.8. Porcentajes de la proliferación de *Candida krusei*.

Cuantitativamente se observa como todos los compuestos muestran porcentajes de proliferación celular similares para todas las concentraciones, por lo que no existe una actividad antimicótica destacable para *Candida krusei*. Se observa de nuevo un valor negativo para el compuesto III.25 (m-cloro) debido a la mayor turbidez en el pocillo sin inóculo. Además, este género se muestra resistente al fluconazol a las concentraciones más diluidas.

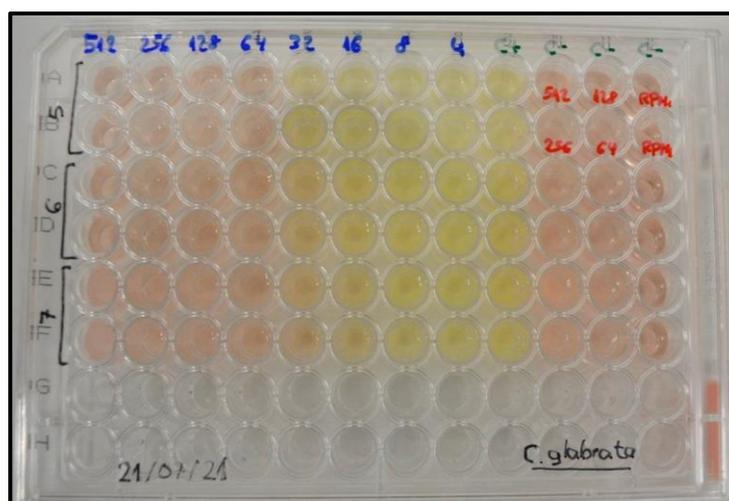


Figura 5.9. Fotografía de la placa de *Candida glabrata* a las 24h.

Finalmente, para *Candida glabrata* los resultados cualitativos son muy similares a los de *Candida albicans*, pues a concentraciones menores de 64 $\mu\text{g/mL}$ se produce el cambio de color y turbidez, mientras que por encima de esta concentración se produce actividad antimicótica.

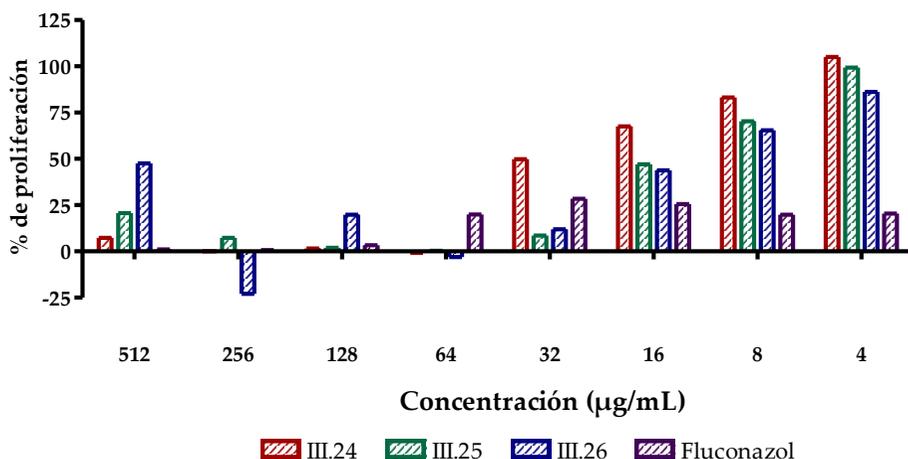
Candida glabrata

Figura 5.10. Porcentajes de la proliferación de *Candida glabrata*.

Se puede observar que para el compuesto **III.24** (*o*-cloro), el valor de la CMI se encuentra en 64 µg/mL, mientras que para los derivados **III.25** (*m*-cloro) y **III.26** (*p*-cloro) la CMI es de 32 µg/mL. De nuevo, a pesar de que no se observa crecimiento fúngico, se observan valores inusualmente elevados a concentraciones de 512 µg/mL como consecuencia de la alta insolubilidad de los compuestos.

En un futuro se desean añadir compuestos de otras familias a este estudio para poder tener una visión más global del potencial antimicótico de los derivados de esta Tesis Doctoral. Además, en caso de tener una serie de compuestos en los que se observe una acción frente a las levaduras, y no presenten citotoxicidad en líneas celulares sanas por tener un valor de IC₅₀ elevado, se pueden probar *in vivo* en modelos de larvas como puede ser la *Galleria mellonella*.

**CAPÍTULO 6.
COMUNICACIONES EN
CONGRESOS Y
PUBLICACIONES DERIVADAS
DE ESTA TESIS DOCTORAL**

CAPÍTULO 6. COMUNICACIONES EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

6.1. Comunicaciones en congresos

- Póster. "Synthesis and biological evaluation of tetrazole derivatives as inhibitors of cancer targets". A. Pla, E. Falomir, M. Carda. XXXVIII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química. Granada, junio de 2022.
- Póster. "Synthesis and biological evaluation of triazole derivatives as inhibitors of cancer multitargets". A. Pla, E. Falomir, M. Carda. The 3rd Molecules Medicinal Chemistry Symposium, Shaping Medicinal Chemistry for the New Decade. Roma (Italia), julio de 2022.

6.2. Publicaciones

- Pla-López, A.; Castillo, R.; Cejudo-Marín, R.; García-Pedrero, O.; Bakir-Laso, M.; Falomir, E.; Carda, M. Synthesis and Biological Evaluation of Small Molecules as Potential Anticancer Multitarget Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7049. DOI: 10.3390/ijms23137049.
- Pla-López, A.; Martínez-Colomina, P.; Cañada-García, L.; Fuertes-Monge, L.; Orellana-Palacios, J.C.; Valderrama-Martínez, A.; Pérez-Sosa, M.; Carda, M.; Falomir, E. Aryl Azoles Based Scaffolds for Disrupting Tumor Microenvironment. *Bioorg. Med. Chem.* **2023**, *95*, 117490. DOI: 10.1016/j.bmc.2023.117490.
- Pla-López, A.; Carda, M.; Falomir, E. Tetrazole derivatives as potent immunomodulatory agents in tumor microenvironment. *Biomed. Pharmacother.* **2023**. Aceptado el 6 de octubre de 2023. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115668.

CAPÍTULO 7.

CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES GENERALES

Se puede afirmar que los objetivos planteados para esta Tesis Doctoral se han logrado de manera satisfactoria, pues por un lado se han sintetizado, purificado y caracterizado cuatro familias de compuestos basadas en un anillo central de tipo triazol o tetrazol y, posteriormente, se ha evaluado su capacidad como agentes anticancerígenos, al mismo tiempo que se han ensayado otras capacidades biológicas tales como las antibacterianas, antivirales o antimicóticas.

Los compuestos estudiados en esta Tesis Doctoral se han agrupado en cuatro familias. Las dos primeras (familias **I** y **II**) contienen compuestos que presentan un anillo central de triazol y las dos últimas (familias **III** y **IV**) están formadas por compuestos que presentan un anillo central de tetrazol.

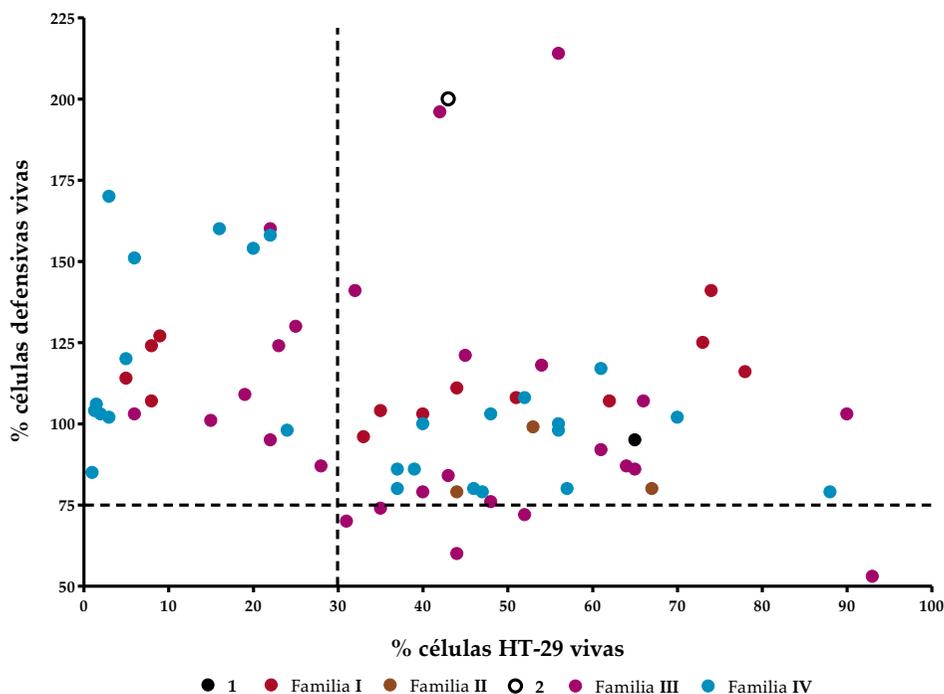
Para evaluar su capacidad inmunomoduladora se llevaron a cabo ensayos de co-cultivo celular con células HT-29 y células defensivas con el fin de determinar el porcentaje de células vivas de ambas poblaciones. En la Figura 7.1 se representa el porcentaje de células HT-29 vivas frente al porcentaje de células defensivas vivas para todos los compuestos ensayados.

Los compuestos más prometedores son los que muestran mayor capacidad de disminución de células tumorales sin, al menos, reducir la cantidad de células defensivas. En esta gráfica se han seleccionado los compuestos que exhiben un porcentaje de células tumorales vivas menor del 30% y un porcentaje de células defensivas vivas mayor del 75%. Esta selección de compuestos queda, por tanto, situada en el cuadrante superior izquierdo de la gráfica. De esta manera, la muestra de compuestos queda reducida a un total de 24. De entre éstos, 4 pertenecen a la familia **I** (16.7%), 8 a la familia **III** (33.3%) y 12 a la familia **IV** (50%).

Los tetrazoles muestran, en general, una mayor capacidad inmunomoduladora que los triazoles, pues representan más de un 80% de

los compuestos seleccionados de acuerdo con las condiciones propuestas. Además, la posición *para* favorece aún más esta acción biológica, pues la familia IV, formada por tetrazoles *para*-sustituidos en el anillo de fenilo, constituye el 50% de los compuestos seleccionados.

Co-cultivo HT-29/células defensivas



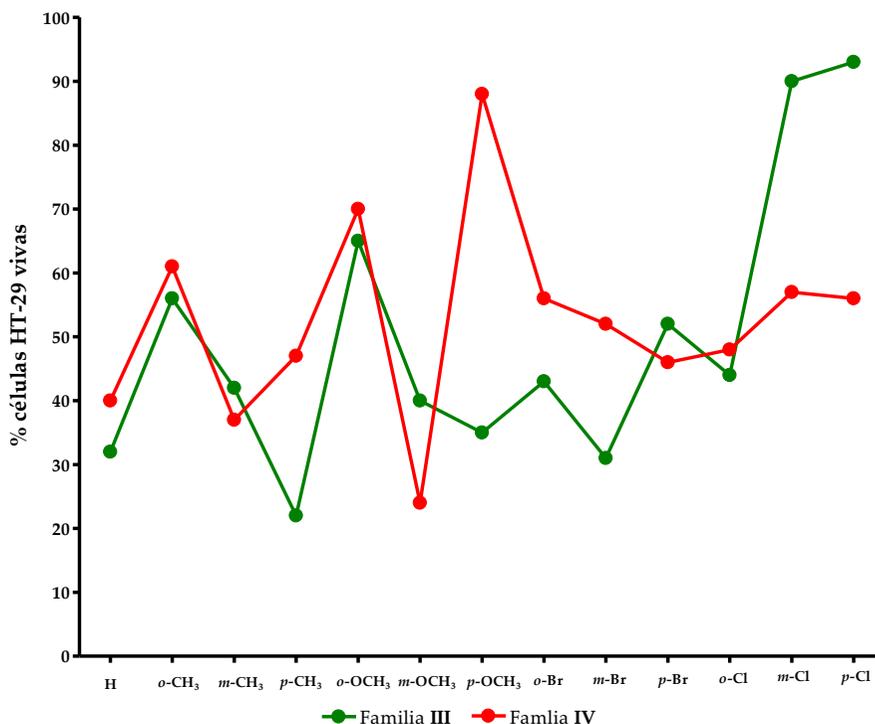
Comparación nitroderivados
(Familias III y IV)

Figura 7.2. Comparación del porcentaje de células HT-29 vivas en los ensayos de co-cultivo celular con células defensivas de los nitrotetrazoles de las familias III y IV.

La comparación de los aminotetrazoles de las familias III y IV se indica en la Figura 7.3. En este caso sí que se observa una tendencia muy clara. Todos los compuestos siguen una tendencia similar (las líneas rosa y azul transcurren en paralelo), con excepción de la posición *m*-metoxilo. Este sustituyente es el que provoca una menor actividad en la familia III (compuesto III.19), mientras que en la familia IV es el que da lugar a una mayor actividad (compuesto IV.19) dentro de la serie de los aminotetrazoles metoxilados.

Comparación aminoderivados (Familias III y IV)

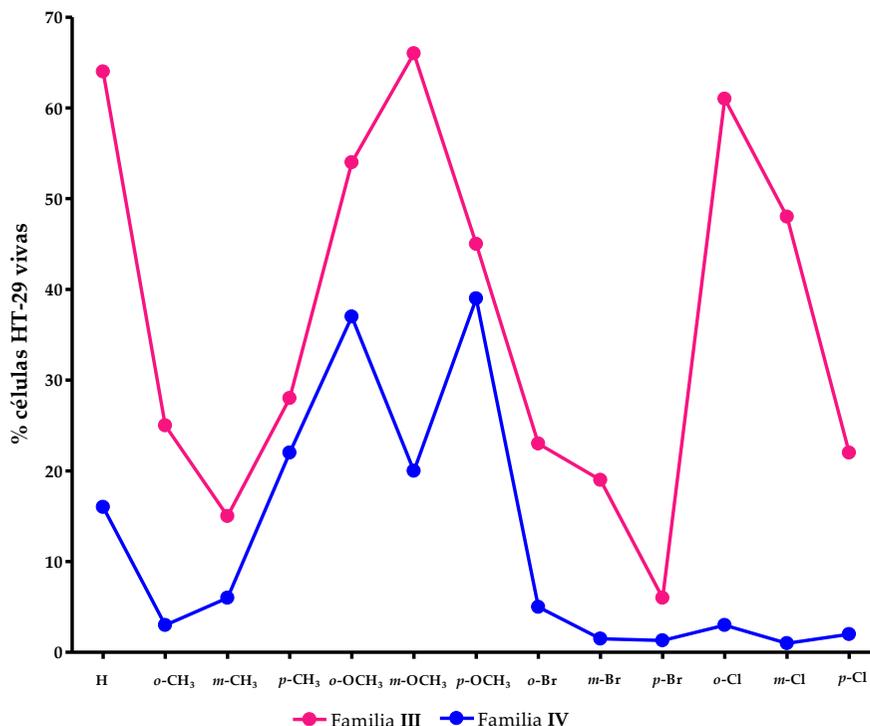


Figura 7.3. Comparación del porcentaje de células HT-29 vivas en los ensayos de co-cultivo celular con células defensivas de los aminotetrazoles de las familias III y IV.

Por último, en la Figura 7.4 se han incluido en una misma gráfica todos los compuestos de las familias III y IV. Esta figura reafirma que los aminotetrazoles de la familia IV (grupo amino en *para*) son los que muestran una mayor actividad, independientemente de los sustituyentes en el anillo de bencilo, seguidos de los aminotetrazoles de la familia III (grupo amino en posición *meta*). La actividad de los nitrotetrazoles es más o menos similar en ambas familias.

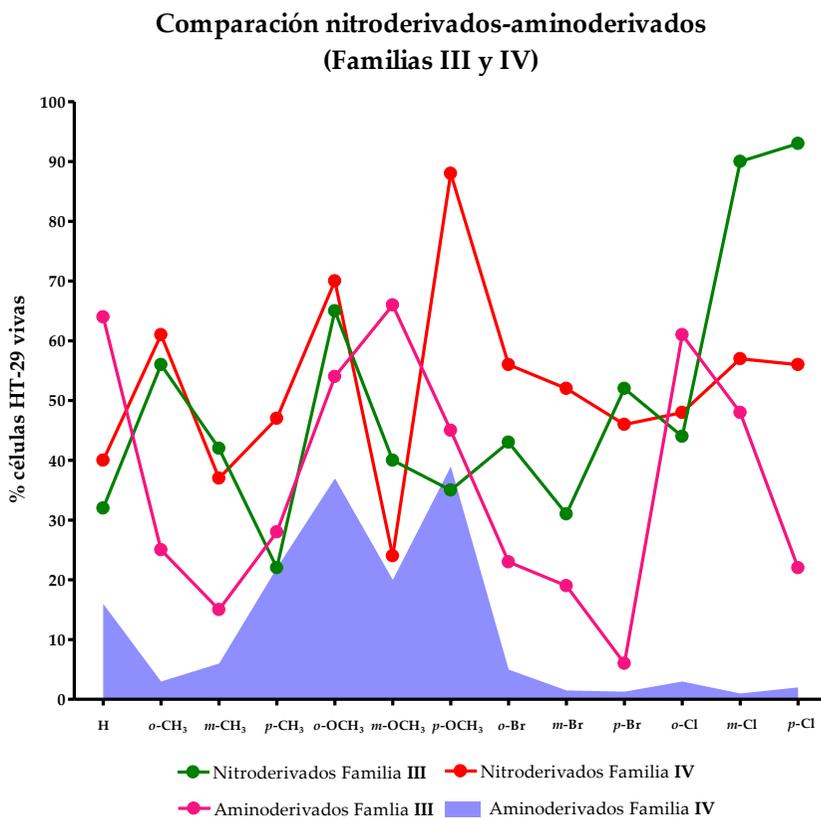


Figura 7.4. Comparación del porcentaje de células HT-29 vivas en los ensayos de co-cultivo celular con células defensivas de los compuestos de las familias III y IV.

En la Figura 7.5 se ha ampliado la zona de los compuestos seleccionados de la Figura 7.1. Se observa que la mitad de los compuestos, aproximadamente, exhiben un porcentaje de células vivas HT-29 inferior al 10%, predominando de nuevo la presencia de compuestos de la familia IV.

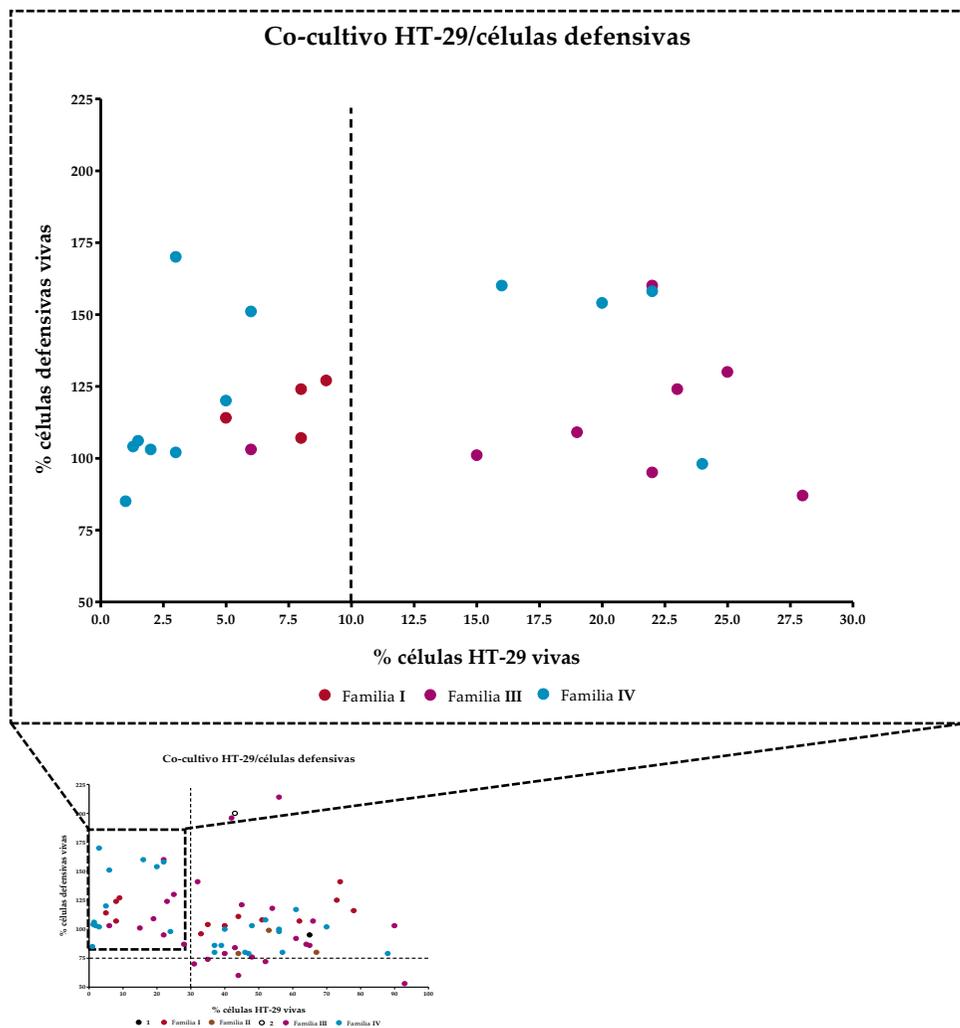


Figura 7.5. Selección de compuestos con unas mejores capacidades inmunomoduladoras en los ensayos de co-cultivo celular.

La Figura 7.5 permite identificar a los 24 compuestos con una mayor capacidad inmunomoduladora en los ensayos de co-cultivo celular. Las estructuras de estos compuestos se pueden ver en la Figura 7.6.

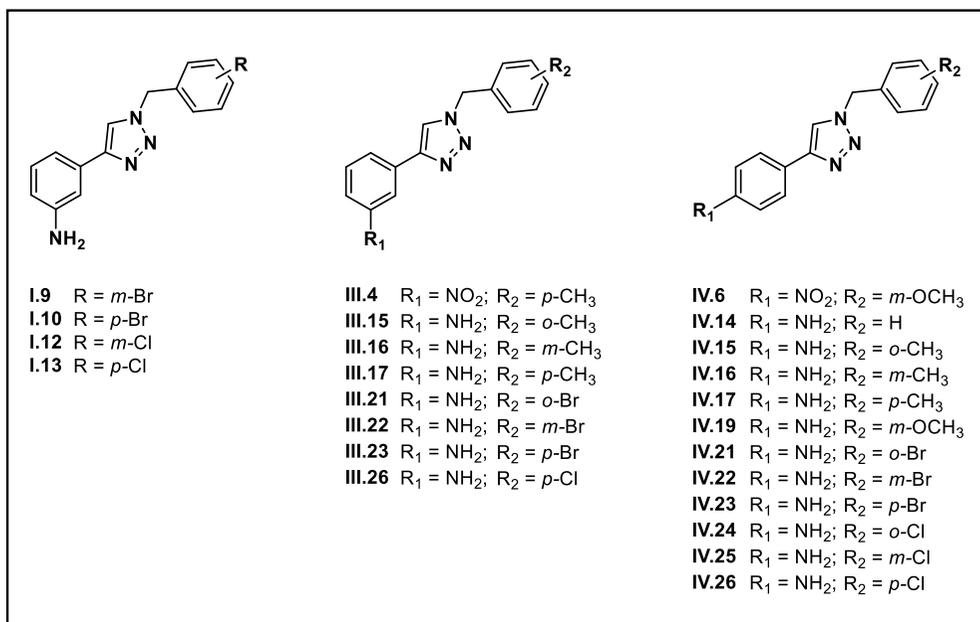


Figura 7.6. Estructuras de los compuestos con mayor capacidad inmunomoduladora.

En la familia **III** el sustituyente *p*-CH₃ se encuentra tanto en el nitroderivado como en el aminoderivado (compuestos **III.4** y **III.17**), de lo que se deduce que esta posición es la más activa para este tipo de sustituyente. El mismo hecho sucede en la familia **IV** con el sustituyente *m*-OCH₃ (compuestos **IV.6** y **IV.19**). Una hipótesis para la explicación de esta coincidencia es que en los compuestos **III.4** y **IV.6** el grupo nitro esté actuando como un precursor del grupo amino, pues se sabe que, algunos fármacos, experimentan la reducción del grupo nitro a grupo amino en el interior de la célula.²⁰⁰

Por otro lado, en la Figura 7.6 se puede ver que en los aminotetrazoles de ambas familias están presentes los tres compuestos con sustituyentes metilo (compuestos **III.15**, **III.16** y **III.17** de la familia **III** y compuestos **IV.15**, **IV.16** y **IV.17** en la familia **IV**), así como los tres compuestos con sustituyentes bromo (compuestos **III.21**, **III.22** y **III.23** de la familia **III** y compuestos **IV.21**, **IV.22** y

²⁰⁰ Nepali, K.; Lee, H.Y.; Liou, J.P. Nitro-Group-Containing Drugs. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 2851-2893. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00147.

IV.23 de la familia **IV**) y los compuestos con sustituyente *p*-cloro (**III.26** de la familia **III** y **IV.26** de la familia **IV**).

Si se consideran las tres familias de compuestos implicadas, se observa que los compuestos con sustituyentes *m*-Br, *p*-Br y *p*-Cl son los más activos, ya que se encuentran presentes en las tres familias (compuestos **I.9**, **I.10** y **I.13** de la familia **I**, compuestos **III.22**, **III.23** y **III.26** de la familia **III** y compuestos **IV.22**, **IV.23** y **IV.26** de la familia **IV**). En la Figura 7.7 se representan de manera acumulativa el porcentaje de células HT-29 vivas para los tres compuestos que presentan esta sustitución en el anillo de bencilo.

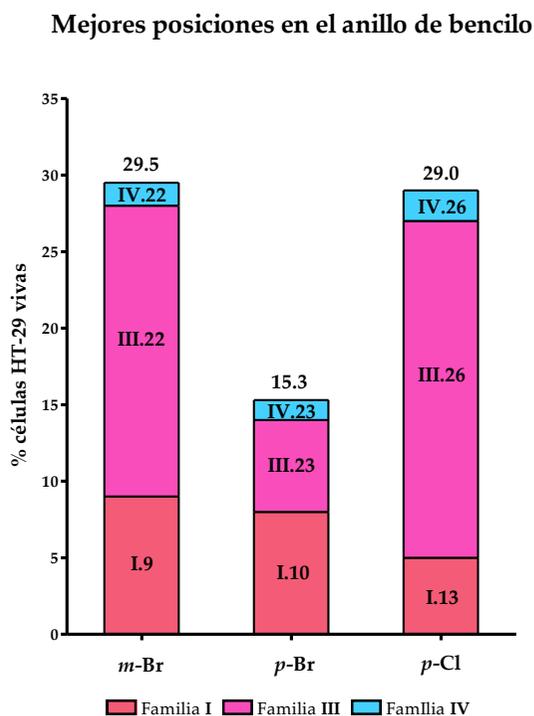


Figura 7.7. Acumulación del porcentaje de células HT-29 vivas en co-cultivo con células defensivas para las tres mejores sustituciones del anillo de bencilo.

Tal y como se puede ver en la figura anterior, las posiciones *m*-Br y *p*-Cl muestran un valor acumulativo para el porcentaje de células HT-29 vivas muy similar (menos de un 30%), mientras que la posición *p*-Br se destaca como la

mejor en términos de capacidad inmunomoduladora (alrededor de un 15% de células vivas HT-29).

En cuanto a la inhibición de las dianas biológicas, en la Figura 7.8 se compara la influencia de las posiciones *meta* o *para* del grupo amino en los tetrazoles en relación a su capacidad para inhibir IL-6 y TNF- α .

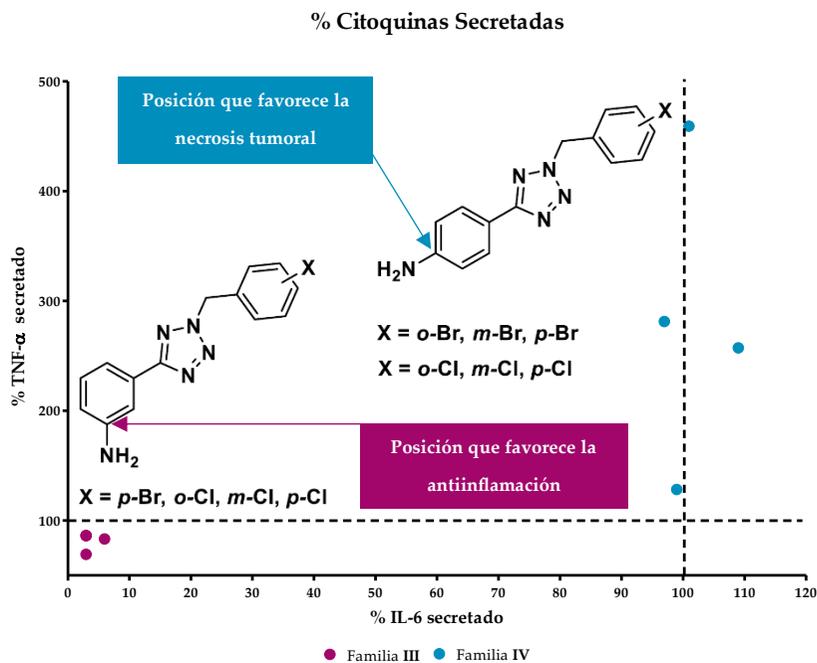


Figura 7.8. Influencia de la posición del sustituyente amino en el porcentaje de citoquinas secretadas al medio en co-cultivo HT-29/THP-1.

De nuevo se observa que, al igual que sucede en la familia I con la posición del sustituyente en el anillo de bencilo, la posición *meta* favorece la antiinflamación y la posición *para* favorece la necrosis tumoral.

En relación a la actividad antiangiogénica y antivascular, se puede concluir que la gran mayoría de los compuestos se muestran activos frente a la inhibición de la formación de vasos sanguíneos y frente a la destrucción de los ya existentes en concentraciones de 100 μ M, aunque por debajo de 75 μ M muchos de ellos no muestran una acción significativa.

Con respecto a c-Myc, se ha demostrado en esta Tesis Doctoral que para los compuestos **IV.22**, **IV.23**, **IV.25** y **IV.26** existe una correlación entre la inhibición de la expresión de esta proteína y el efecto proapoptótico que ejercen estos tetrazoles.

En relación a PD-L1, el ensayo PTS revela que la presencia del anillo de triazol produce una desestabilización de la proteína, pues los compuestos de las dos familias de triazoles (familias **I** y **II**) provocan una disminución en la T_m . La presencia del anillo de tetrazol no da lugar a una tendencia tan clara en el efecto sobre esta proteína.

En el estudio del bloqueo de la unión PD-1/PD-L1 y de la actividad quinasa de VEGFR-2 se seleccionaron los derivados con un grupo amino y un sustituyente *p*-cloro de las cuatro familias. Los resultados se muestran en la Figura 7.9.

Comparación entre los *p*-cloroderivados

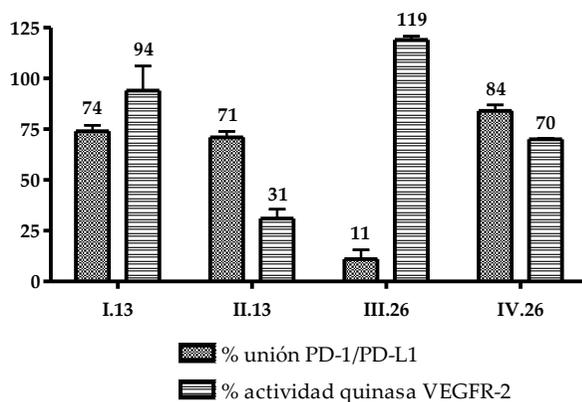


Figura 7.9. Porcentaje de unión PD-1/PD-L1 y de actividad quinasa de VEGFR-2 en presencia de los compuestos **I.13**, **II.13**, **III.26** y **IV.26**.

El triazol **II.13** es el compuesto con mayor acción inhibitoria de la actividad quinasa de VEGFR-2, reduciéndola hasta un 30%, mientras que el compuesto **III.26** es el que más bloquea la unión PD-1/PD-L1, exhibiendo valores cercanos al 10%.

Estos resultados reflejan la diversidad de mecanismos por los cuales los compuestos sintetizados en esta Tesis Doctoral son capaces de mostrar una actividad antitumoral. Por ejemplo, el compuesto **IV.26**, que muestra una gran actividad en los ensayos en co-cultivo y una capacidad proapoptótica, no se muestra muy activo en el bloqueo PD-1/PD-L1 y en la disminución de la actividad quinasa de VEGFR-2.

Por todo ello, en un futuro se pretende estudiar de forma más exhaustiva el mecanismo de acción de estos compuestos, así como determinar el lugar de acción mediante estudios de colocalización celular.

CAPÍTULO 8.

ESPECTROS SELECCIONADOS

