

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Sistemas peguilados para administración de fármacos. Aplicación a cáncer colorrectal y enfermedad de Fabry

Marta Melgarejo Diaz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (**www.tdx.cat**) i a través del Dipòsit Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (**www.tdx.cat**) y a través del Repositorio Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service and by the UB Digital Repository (**diposit.ub.edu**) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Marta Melgarejo Diaz

SISTEMAS PEGUILADOS PARA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS.

APLICACIÓN A CÁNCER COLORRECTAL Y ENFERMEDAD DE FABRY

Tesis Doctoral

2015

Marta Melgarejo Diaz

Universitat de Barcelona

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

SISTEMAS PEGUILADOS PARA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS. APLICACIÓN A CÁNCER COLORRECTAL Y ENFERMEDAD DE FABRY

Marta Melgarejo Diaz

Directora
Dra. Miriam Royo Expósito
Parque Científico de Barcelona

Tutor
Dr. Ernesto Nicolás Galindo
Universidad de Barcelona





ÍNDICE Y ANEXOS

ÍNDICE

ANEXO I: ABREVIATURAS ..... **xi**
ANEXO II: AMINOÁCIDOS UTILIZADOS ..... **xii**
ANEXO III: AGENTES DE ACOPLAMIENTO Y GRUPOS PROTECTORES ..... **xiii**
ANEXO IV: LISTADO DE PRODUCTOS ..... **xiv**

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN **3**
1. POLÍMEROS TERAPÉUTICOS 3
2. CARACTERÍSTICAS DEL PEG 6
3. SEGURIDAD DEL PEG 10
4. UTILIDADES DEL PEG 13
4.1 PEG-PROTEÍNA 13
4.2 PEG-MOLÉCULA PEQUEÑA 15
4.3 PEG COMO MODIFICADOR DE OTROS SISTEMAS 17
BIBLIOGRAFIA **19**

OBJETIVOS GENERALES **27**

CAPÍTULO 1. NANOCONJUGADOS 5FU

INTRODUCCIÓN **31**
1. TIMIDILATO SINTASA 31
2. INHIBIDORES DE LA TIMIDILATO SINTASA 34
2.1 ANTIFOLATOS 35
2.2 FLUOROPIRIMIDINAS 36
2.2.1 MECANISMO DE ACCIÓN DEL 5FU 37
2.2.2 PRO-FÁRMACOS Y NANOCONJUGADOS BASADOS EN 5FU 40
OBJETIVOS **43**
RESULTADOS Y DISCUSIÓN **45**
1. SÍNTESIS DEL DENDRÓN 46
2. DERIVADOS DE 5FU 52
2.1 SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS DE 5FU 52
2.2 ENSAYOS DE ESTABILIDAD A DISTINTOS pHs Y PLASMA 62
3. SÍNTESIS DEL DENDRÓN PARA ENSAYOS *IN VIVO* 69
3.1 SÍNTESIS DEL DENDRÓN-5FU PARA ENSAYOS DE BIODISTRIBUCIÓN 69
3.2 OPTIMIZACIÓN DE LA CONJUGACIÓN DEL FÁRMACO 5FU AL DENDRÓN 75
4. RESULTADOS ENSAYO DE BIODISTRIBUCIÓN 84
CONCLUSIONES **89**
BIBLIOGRAFÍA **91**

CAPÍTULO 2. NANOCONJUGADOS SN38

INTRODUCCIÓN **99**
1. TOPOISOMERASAS 99
2. CAMPTOTECINA Y SUS DERIVADOS 101
3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CAMPTOTECINA Y SUS DERIVADOS 104
4. NUEVOS MÉTODOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE SN38 106
OBJETIVOS **111**
RESULTADOS Y DISCUSIÓN **113**
1. DERIVATIZACIÓN DE LA MOLÉCULA DE SN38 113
2. SÍNTESIS DEL DENDRÓN G1-4PEG27COME-1PEG27Ac (**49**) 115
2.1 SÍNTESIS DEL DENDRÓN G1-4SN38-1Ac (**55**) 122
3. SÍNTESIS DEL OEG-SN38 126
3.1 SÍNTESIS DEL Ac-OEG-SN38 (**60**) 127
3.2 SÍNTESIS DEL PÉPTIDO-OEG-SN38 128
3.2.1 SÍNTESIS DEL BOC-OEG-SN38 (**62**) 129
3.2.2 SÍNTESIS Y ELECCIÓN DEL PÉPTIDO DIRECTOR 129
3.2.3 SÍNTESIS DE TCP-1-OEG-SN38 (**70**) 135
4. SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS OEG-SN38 PARA PRUEBAS *IN VITRO* E *IN VIVO* 137
4.1 SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS OEG-SN38-CF 137
4.2 SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS OEG-SN38-AF750 139
5. RESULTADOS ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO* 142
5.1 RESULTADOS *IN VITRO*: IC_{50} E INTERNALIZACIÓN 143
5.2 RESULTADOS *IN VIVO*: ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN 145
CONCLUSIONES **151**
BIBLIOGRAFIA **153**

CAPÍTULO 3. NANOCONJUGADOS PEG-PROTEÍNA

INTRODUCCIÓN **161**
1. ENFERMEDADES POR ALMACENAMIENTO LISOSÓMICO 161
2. FISIOLOGÍA DEL LISOSOMA 163
3. TRANSPORTE DE LAS HIDROLASAS LISOSOMALES 164
4. IMPORTANCIA DE LOS BIOMARCADORES EN LAS LSD 165
5. TRATAMIENTOS PARA LAS LSD 167
5.1 TRASPLANTE DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS, HSCT 168
5.2 TERAPIA ENZIMÁTICA SUSTITUTIVA, ERT 169
5.3 TERAPIA CON CHAPERONAS, PCT 170
5.4 TERAPIA GÉNICA 171
5.5 TERAPIA POR REDUCCIÓN DE SUBSTRATO, SRT 171
6. ENFERMEDAD DE ANDERSON-FABRY 172
6.1 BIOMARCADORES 175

6.2 TERAPIA SUSTITUTIVA ENZIMÁTICA PARA LA ENFERMEDAD DE ANDERSON-FABRY 176
6.2.1 ERT CON AGALSIDASA ALFA 177
6.2.2 ERT CON AGALSIDASA BETA 177
6.2.3 COMPARATIVA ENTRE AGALSIDASA ALFA Y AGALSIDASA BETA 177
6.3 TERAPIA CON CHAPERONAS PARA LA ENFERMEDAD DE ANDERSON-FABRY 178
6.4 NUEVAS APROXIMACIONES PARA LA ERT EN LA ENFERMEDAD DE ANDERSON-FABRY 178
OBJETIVOS 181
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 183
1. NANOCONJUGADOS PEG- A-GAL A QUE PUEDEN TENER ASOCIADO UN PÉPTIDO DIRECTOR 183
1.1 SÍNTESIS DEL PÉPTIDO DIRECTOR cRGDfK (**79**) 186
1.2 DERIVATIZACIÓN DE HOOC-PEG-NH_2 (**77**) 187
1.3 INTRODUCCIÓN DEL ESPACIADOR HOMOBIFUNCIONAL A MEO-PEG-NH_2 Y PÉPTIDO-PEG-NH_2 191
1.4 CONJUGACIÓN DE LOS PEPTIDO-PEG-NHS Y MEO-PEG-NHS A LA PROTEÍNA α-GAL 193
1.4.1 OPTIMIZACIÓN DE LA CONJUGACIÓN MEO-PEG-A-GAL 194
1.4.2 CONJUGACIÓN DE MeO-PEG-NHS (**90**), RGD-PEG-NHS (**99**), P25-PEG-NHS (**100**) Y P87-PEG-NHS (**101**) A LA PROTEÍNA α-GAL (**91**) Y REPLAGAL (**92**) 204
1.5 UNIÓN DEL FLUORÓFORO ATTO 633 A LOS CONJUGADOS R-PEG-PROTEÍNA 208
1.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VITRO DE LOS CONJUGADOS 211
1.7 EVALUACIÓN IN VITRO EN CÉLULAS DE CULTIVO PRIMARIO 215
2. NANOVESÍCULAS RICAS EN COLESTEROL MODIFICADAS CON UN PÉPTIDO DIRECTOR 219
2.1 SÍNTESIS DEL DERIVADO COLESTEROL-cRGDfK 223
2.2 SÍNTESIS DEL DERIVADO COLESTEROL- cRGDfK CARBAMATO 225
2.3 FORMACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS SUVS CON LOS DERIVADOS DE COLESTEROL-PEG-RGD ÉTER Y CARBAMATO 227
2.4 ENCAPSULACIÓN DE α-GAL A Y RESULTADOS BIOLÓGICOS DE LAS SUVS DPPC:COLESTEROL:COLESTEROL-PEG-RGD ÉTER 231
CONCLUSIONES 235
BIBLIOGRAFIA 237

CONCLUSIONES FINALES 243

EXPERIMENTAL

MATERIALES Y MÉTODOS 249
1. DISOLVENTES Y REACTIVOS 249
2. INSTRUMENTOS UTILIZADOS 250
3. PROTOCOLOS GENERALES DE SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA 251
3.1 SOPORTES POLIMÉRICOS (RESINAS) 251
3.2 RESINA Cl-Trt 252

3.2.1 ACONDICIONAMIENTO DE LA RESINA Cl-Trt 252
3.2.2 INCORPORACIÓN DEL PRIMER AMINOÁCIDO A LA RESINA 252
3.2.3 ELONGACIÓN DE LA CADENA PEPTÍDICA 252
3.2.4 ESCISIÓN DEL PÉPTIDO DE LA RESINA Cl-Trt 253
3.3 RESINA FMOC-RINK-AMIDE MBHA 253
3.3.1 ACONDICIONAMIENTO DE LA RESINA FMOC-RINK-AMIDE MBHA 254
3.3.2 INCORPORACIÓN DEL PRIMER AMINOÁCIDO A LA RESINA 254
3.3.3 ELONGACIÓN DE LA CADENA PEPTÍDICA 254
3.3.4 ESCISIÓN DEL PÉPTIDO DE LA RESINA FMOC-RINK-AMIDE MBHA 254
4. ENSAYOS CUALITATIVOS UTILIZADOS EN SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA 255
4.1 ENSAYO CUALITATIVO CON NINHIDRINA 255
4.2 ENSAYO CUALITATIVO CON CLOROANILO 255
5. ENSAYOS CUANTITATIVOS UTILIZADOS EN SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA 255
5.1 CUANTIFICACIÓN DE GRUPOS FMOC 255
5.2 ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS 256
6. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS 256
6.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF) 256
6.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN COLUMNA MANUAL 257
6.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN COLUMNA AUTOMÁTICA 257
7. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE REVERSA 257
7.1 RP-HPLC ANALÍTICO 257
7.2 RP-HPLC-MS 257
7.3 RP-HPLC-MS SEMIPREPARATIVO 258
8. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR 258
9. DIÁLISIS 258
10. ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF 258
11. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) 259
12. ESPECTROMETRÍA ULTRAVIOLETA (UV) 259
13. ELECTROFORESIS DE GEL 259
BIBLIOGRAFÍA..... 260

E1. NANOCONJUGADOS 5FU 261
E1.1 SÍNTESIS DEL DENDRÓN 261
E.1.1.1 SÍNTESIS DEL BROMURO DE *N,N*-BIS[(*TERC*-BUTOXICARBONIL)METIL]-2-HIDROXIETILAMINA (**3**)..... 261
E.1.1.2 SÍNTESIS DE N'-BENCILOXICARBONILMETIL-N,N,N'',N''-TETRAKIS(TERC-BUTOXICARBONILMETIL)DIETILENTRIAMINA (**4**) 262
E.1.1.3 SÍNTESIS DE N'- BENCILOXICARBONILMETIL -N,N,N'',N''-TETRAKIS(HIDROXICARBONILMETIL)DIETILENTRIAMINA (**5**) 263
E.1.1.4 SÍNTESIS DEL CLORURO DE 1-(ACETAMIDO)-4,7,10-TRIOXA-13-TRIDECANAMINA (**7**) 263
E1.1.5 SÍNTESIS DEL CLORURO DE 1-(BENZILOXICARBONIL-AMINO)-4,7,10-TRIOXA-13-TRIDECANAMINA (**8**) 264
E1.1.6 Síntesis del dendrón G1-4Boc-Bn (**9**)..... 265

E1.1.7 SÍNTESIS DEL DENDRÓN G1-4BOC-COOH (**10**) 266
E1.1.8 SÍNTESIS DEL DENDRÓN G1-4BOC-1AC (**11**) 266
E1.1.9 SÍNTESIS DEL DENDRÓN G1-4BOC-1Z (**13**) 267
E1.2 SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS DE 5FU 268
E1.2.1 SÍNTESIS DE 1-BENCILOXICARBONILOXIMETIL-5-FLUOROURACILO (**17**) 268
E1.2.2 SÍNTESIS DE 1-BENCILOXICARBONILOXIMETIL-3-(HIDROXICARBONILETIL)CARBONILOXIMETIL-5-FLUOROURACILO (**19**) 269
E1.2.3 SÍNTESIS DE 5FUZSUccN_3TOTA-AC (**20**) 270
E1.2.4 SÍNTESIS DE 5FUSUCCN_3TOTA-AC (**21**) 271
E1.2.5 SÍNTESIS DE 1-(HIDROXICARBONILETIL)CARBONILOXIMETIL-5-FLUOROURACILO (**22**) 272
E1.2.6 SÍNTESIS DE 5FUSUCCN_1TOTA-AC (**23**) 272
E1.2.7 SÍNTESIS DE 1-(HIDROXICARBONILHEXIL)CARBONILOXIMETIL-5-FLUOROURACILO (**24**) 273
E1.2.8 SÍNTESIS DEL ÉSTER DE PENTAFLUOROFENOL DE 1-(HIDROXICARBONILHEXIL)CARBONILOXIMETIL-5-FLUOROURACILO (**25**) 274
E1.2.9 SÍNTESIS DE 5FUADIPN_1TOTA-AC (**26**) 275
E1.2.10 SÍNTESIS DEL CARBAMATO DE CLOROMETILO DE 1-(ACETAMIDO)-4,7,10-TRIOXA-13-TRIDECANAMINA (**27**) 275
E1.2.11 SÍNTESIS DE 5FUN_1TOTA-AC CARBAMATO (**28**) 276
E1.2.12 SÍNTESIS DEL CARBAMATO DE CLOROMETILO DE *TERC*-BUTIL-3-AMINOPROPANOATO (**29**) 277
E1.2.13 SÍNTESIS DE (**30**) 277
E1.2.14 SÍNTESIS DE 5FUALAN$_1$TOTA-AC CARBAMATO (**32**) 278
E1.2.15 ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN PLASMA Y EN SOLUCIÓN ACUOSA A DIFERENTES pHs 279
1.2.16 ENSAYOS DE MTT 282
E1.3 SÍNTESIS DEL DENDRON-5FU PARA ENSAYOS *IN VIVO* 282
E1.3.1 SÍNTESIS DE G1-45FU-1AC (**33**) 282
E1.3.2 SÍNTESIS DE G1-45FU-1Z (**34**) 284
E1.3.3 SÍNTESIS DE G1-45FU-1AF750 (**36**) 285
E1.4 ENSAYO DE BIODISTRIBUCIÓN 286
E2. NANOCONJUGADOS SN38 287
E2.1 SÍNTESIS DE SN38-TBDPS (**38**) 287
E2.2 SÍNTESIS DE SN38-TBDPS-GLYBOC (**39**) 287
E2.3 SÍNTESIS DE SN38-TBDPS-GLYNH_2 (**40**) 288
E2.4 SÍNTESIS DE BOC-PEG27-CONH-AC (**42**) 289
E2.5 SÍNTESIS DE $_2$HN-PEG27-CONH-AC (**43**) 290
E2.6 SÍNTESIS DE BOC-PEG27-COME (**44**) 290
E2.7 SÍNTESIS DE $_2$HN-PEG27-COME (**45**) 291
E2.8 SÍNTESIS DE DTPA-4BOC-1COOH CAMBIAR A NOMBRE QUÍMICO (**46**) 291
E2.9 SÍNTESIS DE DTPA-4BOC-1PEG27-AC (**47**) 291
E2.10 SÍNTESIS DE DTPA-4COOH-1PEG27-AC (**48**) 293
E2.11 SÍNTESIS DE G1-4PEG27COME-1PEG27-AC (**49**) 293

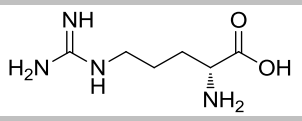
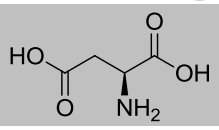
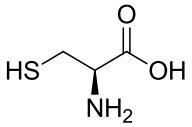
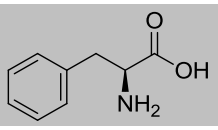
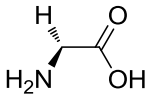
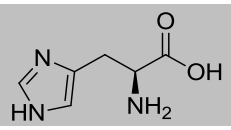
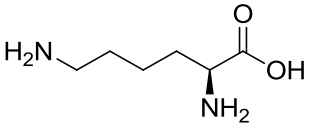
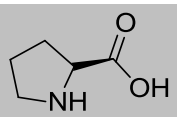
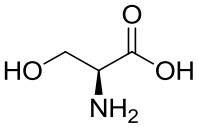
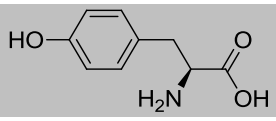
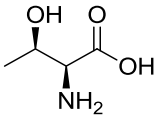
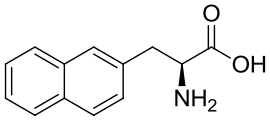
E2.12 SÍNTESIS DE BZADIPICOTBU (**51**) 294
E2.13 SÍNTESIS DE ADIPICOTBU (**52**) 294
E2.14 SÍNTESIS DE SN38-TBDPS-GLYADIPICOTBU (**53**) 295
E2.15 SÍNTESIS DE SN38-TBDPS-GLYADIPICOCOOH (**54**) 296
E2.16 SÍNTESIS DE G1-4SN38TBDPS-1AC (**55**) 297
E2.17 SÍNTESIS DE G1-4SN38-1AC (**56**) 298
E2.18 SÍNTESIS DE $_2$HN-PEG27-COOH (**57**) 299
E2.19 SÍNTESIS DE AC-PEG27-COOH (**58**) 299
E2.20 SÍNTESIS DE AC-OEG-SN38TBDPS (**59**) 300
E2.21 SÍNTESIS AC-OEG-SN38 (**60**) 301
E2.22 SÍNTESIS DE BOC-OEG-SN38TBPS (**61**) 302
E2.23 SÍNTESIS DE BOC-OEG-SN38 (**62**) 303
E2.24 SÍNTESIS DE $_2$HN-OEG-SN38 (**63**) 303
E2.25 SÍNTESIS DE C(TCP-1)-CF (**64**) 304
E2.26 SÍNTESIS DE C(CXCR4) (**65**) 305
E2.27 SÍNTESIS DE C(CXCR4)-CF (**66**) 306
E2.28 ENSAYOS *IN VITRO* PARA SELECCIÓN DE PÉPTIDO DIRECTOR 307
E2.29 SÍNTESIS DE TCP-1 Y SUS DERIVADOS 307
E2.29.1 C(TCP-1)_AC: C(ACHNCYSTHRPROSERPROPHESERHISCYSGLYGLYCOOH) (**67**) 307
E2.29.2 C(TCP-1)_CF: C(CFHNCYSTHRPROSERPROPHESERHISCYSGLYGLYCOOH) (**68**) 308
E2.29.3 C(TCP-1)_NH_2: C($_2$HNCYSTHRPROSERPROPHESERHISCYSGLYGLYCOOH) (**69**) 309
E2.30 SÍNTESIS DE TCP-1-OEG-SN38 (**70**) 310
E2.31 SÍNTESIS DE CF-OEG-SN38 (**71**) 311
E2.32 SÍNTESIS DE CF-TCP-1-OEG-SN38 (**72**) 312
E2.33 SÍNTESIS DE AF750-OEG-SN38 (**73**) 313
E2.34 SÍNTESIS DE $_2$HN-TCP-1-OEG-SN38 (**74**) 313
E2.35 SÍNTESIS DE AF750-TCP-1-OEG-SN38 (**75**) 314
E2.36 ENSAYOS *IN VITRO*: IC_{50} E INTERNALIZACIÓN 314
E2.37 ENSAYOS *IN VIVO*: MTD Y BIODISTRIBUCIÓN 315
E3. NANOCONJUGADOS PEG-PROTEÍNA 317
E3.1 NANOCONJUGADOS PEG- A-GAL A QUE PUEDEN TENER ASOCIADO UN PÉPTIDO DIRECTOR 317
E3.1.1 SINTESIS DE CRGDFK (**79**) 317
E3.1.2 SÍNTESIS DE BOC-PEG-COOH 318
E3.1.3 SÍNTESIS DE PFOH-PEG-BOC 318
E3.1.4 SÍNTESIS DE LOS CONJUGADOS RGD-PEG-NH_2, P25-PEG-NH_2, P87-PEG-NH_2 ... 319
E3.1.5 SÍNTESIS DE R-PEG-NHS 319
E3.1.6 SÍNTESIS DE CONJUGADOS R-PEG-PROTEÍNA 320
E3.1.7 SÍNTESIS DE CONJUGADOS R-PEG-PROTEÍNA-ATTO 633 321
E3.1.8 MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESPECÍFICA DE LOS NANOCONJUGADOS EN TUBO DE ENSAYO 322

E3.1.9 MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESPECÍFICA DE LOS NANOCONJUGADOS EN CÉLULAS DE CULTIVO PRIMARIO 323
E3.2 NANOVESÍCULAS RICAS EN COLESTEROL MODIFICADAS CON UN PÉPTIDO DIRECTOR 323
E3.2.1 SÍNTESIS DEL COLESTEROL-TOSILADO..... 323
E3.2.2 SÍNTESIS DE COLESTEROL-TETRAETILENGLICOL..... 324
E3.2.3 SÍNTESIS DE COLESTEROL-TETRAETILENGLICOL-NHS 325
E3.2.4 SÍNTESIS DEL COLESTEROL-CRGDFK 325
E3.2.5 SÍNTESIS DEL COLESTEROL-CI 326
E3.2.6 SÍNTESIS DEL COLESTEROL-TETRAETILENGLICOL CARBAMATO 326
E3.2.7 SÍNTESIS DEL COLESTEROL-TETRAETILENGLICOL-NHS CARBAMATO 327
E3.2.8 SÍNTESIS DEL COLESTEROL-CRGDFK CARBAMATO 327

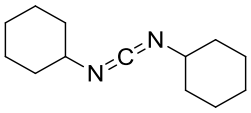
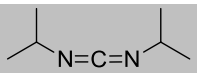
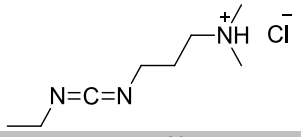
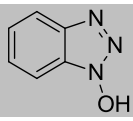
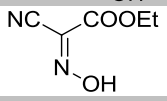
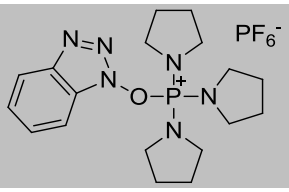
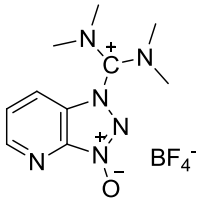
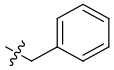
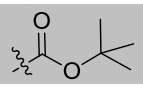
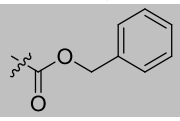
ANEXO I: ABREVIATURAS

Abreviaturas		Abreviaturas	
5-FU	5-Fluorouracilo	**OEG**	Oligoetilenglicol
ACH	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico	**PAMAM**	Poli(amidoamina)
ADN	Ácido desoxirribonucleico	**PBS**	Tampón fosfato salino
AF750	Alexa Fluor 750	**PEG**	Polietilenglicol
ARN	Ácido ribonucleico	**PfpOH**	2,3,4,5,6-pentafluorofenol
Boc-TOTA	1-(*terc*-Butiloxicarbonil-amino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina	**PPh_3**	Trifenilfosfina
CF	Carboxifluoresceína	**RMN**	Resonancia magnética nuclear
CPT	20-(S)-camptotecina	**SN38**	7-Etil-10-hidroxi-camptotecina
CPT-11	7-etil-10[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carboniloxicamptotecina	**SUVS**	Vesículas unilamelares pequeñas
DIEA	*N,N*-Diisopropiletilamina	**$t_{1/2}$**	Tiempo de vida medio
DLS	Dispersión dinámica de luz	**TBAF**	Fluoruro de tetra-*n*-butilamonio
DMAP	4-Dimetilaminopiridina	**TFA**	Ácido trifluoroacético
DMF	*N,N*-Dimetilformamida	**THF**	Tetrahidrofurano
DMSO	Dimetilsulfóxido	**TLS**	Estrés por ausencia de timina
DPD	Dihidropirimidina deshidrogenasa	**TOP I**	Topoisomerasa I
DPPC	fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina	**t_R**	Tiempo de retención
DSG	Glutarato de di(N-succinimidil)	**Tris**	tris(hidroximetil)aminometano
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético	**TS**	Timidilato sintasa
ERT	Terapia enzimática sustitutiva	**α-GAL**	Proteína α-Galactosidasa A
ESI	Ionización por electrospray	**δ**	Desplazamiento químico
FDA	Administración de alimentos y fármacos (de EE.UU)		
Gb3	Globotriaosilceramida		
HMEC-1	células inmortalizadas humanas del endotelio microvascular		
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución		
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.		
HPLC-PDA	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de matriz de fotodiodos		
HT-29	Células de cáncer colorrectal humano		
HTC-116	Células de cáncer colorrectal humano		
LSD	Enfermedades por alamcenamiento lisosómico		
Lyso-Gb3	Globotrioesfingosina		
m/z	Masa/carga		
MAEC	Células de cultivo primario		
MALDI-TOF	Espectrometría de masas de desorción iónica provocada por láser, asistida por matriz y análisis de tiempo de vuelo		
MTD	Dosis máxima tolerada		
NBS	*N*-Bromosuccinimida		
NHS	*N*-Hidroxisuccinimida		

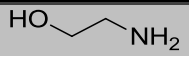
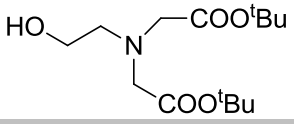
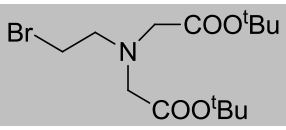
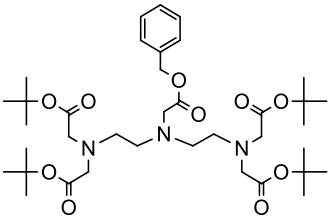
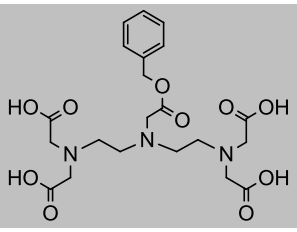
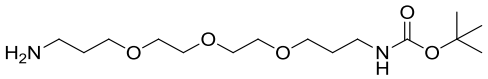
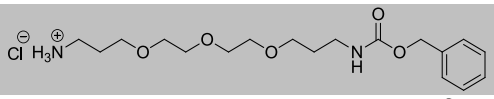
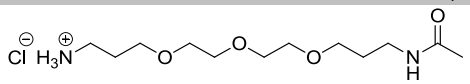
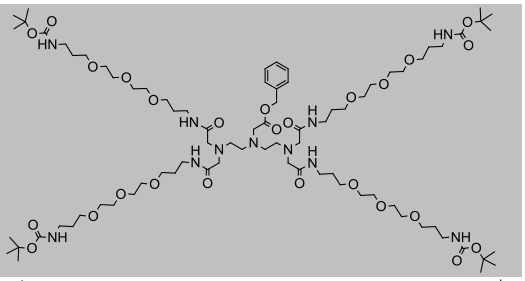
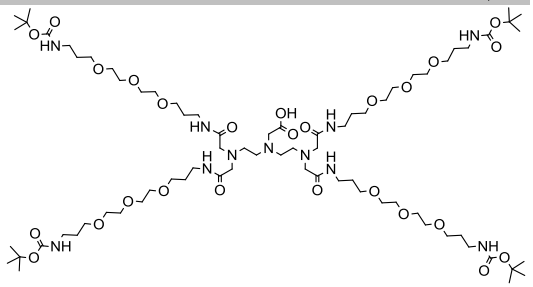
ANEXO II: AMINOÁCIDOS UTILIZADOS

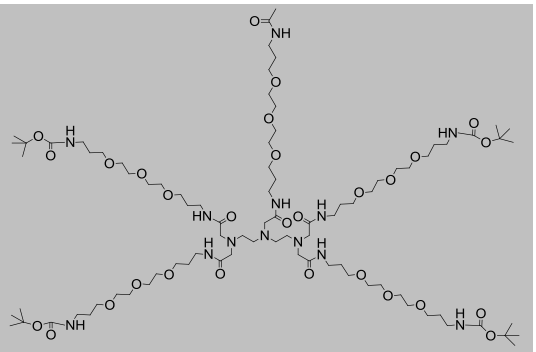
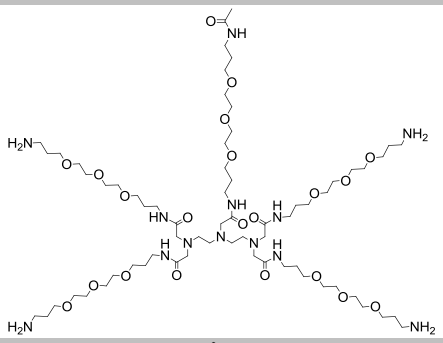
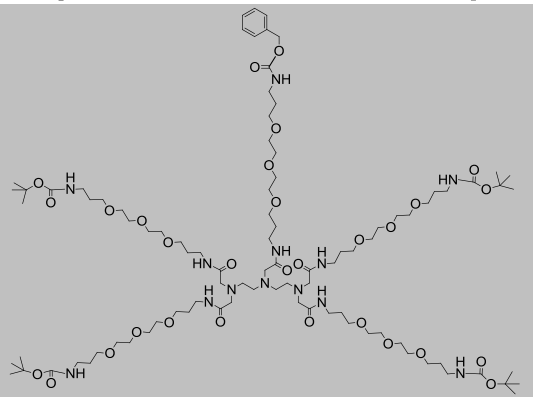
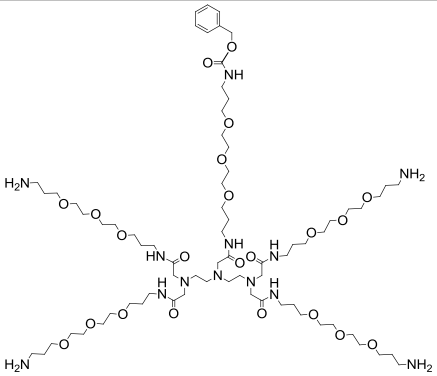
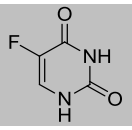
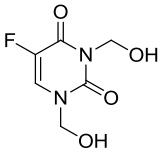
Abreviaturas		Estructura
Aminoácidos naturales		
Arginina	Arg (R)	
Aspártico	Asp (D)	
Cisteína	Cys (C)	
Fenilalanina	Phe (F)	
Glicina	Gly (G)	
Histidina	His (H)	
Lisina	Lys (K)	
Prolina	Pro (P)	
Serina	Ser (S)	
Tirosina	Tyr (Y)	
Treonina	Thr (T)	
Aminóacidos no naturales		
(2-Naftil)-L-Alanina	2-Nal	

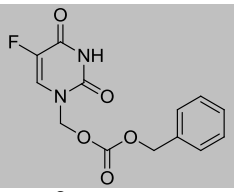
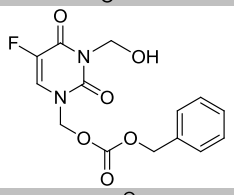
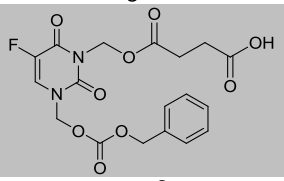
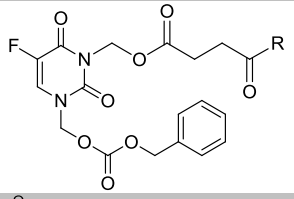
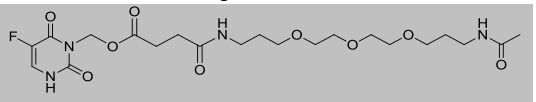
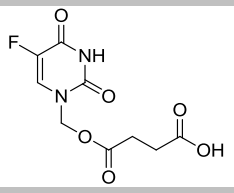
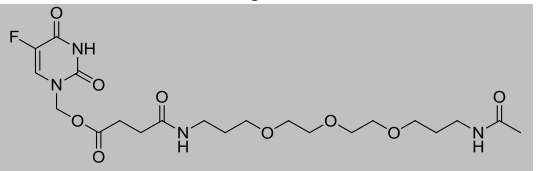
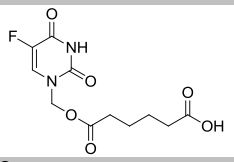
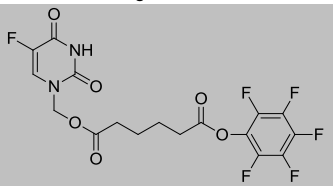
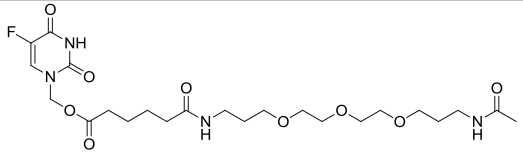
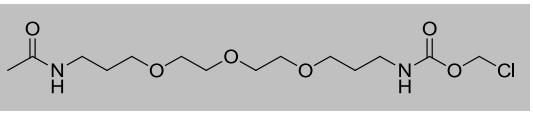
ANEXO III: AGENTES DE ACOPLAMIENTO Y GRUPOS PROTECTORES UTILIZADOS

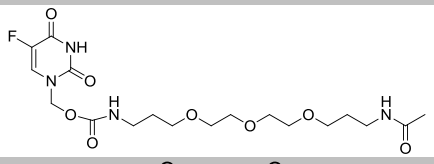
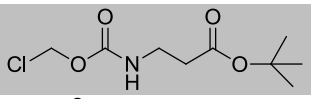
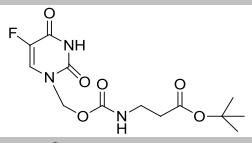
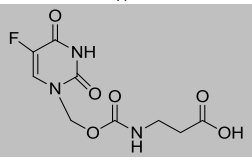
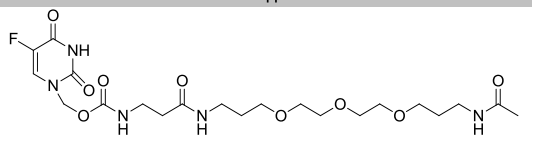
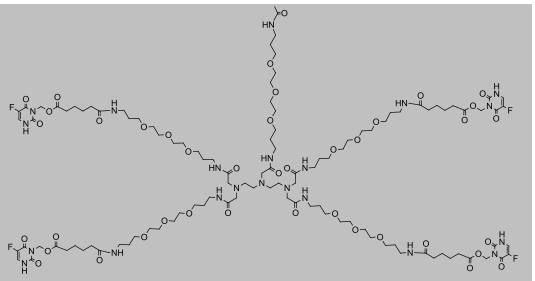
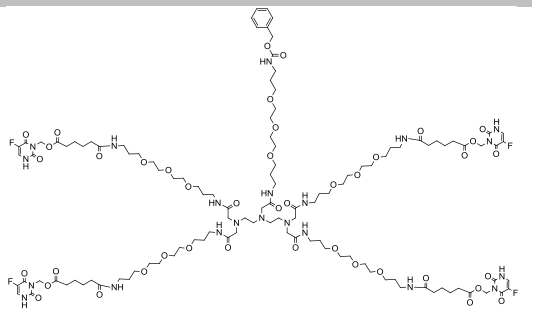
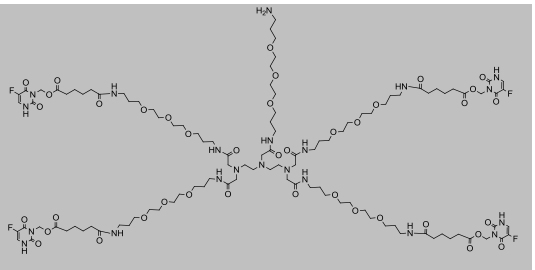
Abreviaturas		Estructura
Agentes de acoplamiento		
DCC	*N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida	
DIPCI	N,N'-Diisopropilcarbodiimida	
EDC·HCl	Hidrocloruro de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol	
Oxima	2-Ciano-2-hidroximinoacetato de etilo	
PyBOP	Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidino)fosfonio	
TBTU	Tetrafluoroborato *N*-óxido de *N*-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-*N*-metilmatanaminio	
***Grupos protectore*s**		
Bn	Bencilo	
Boc	*terc*-Butoxicarbonilo	
^{t}Bu	*terc*-Butilo	
Z	Carboxibencilo	

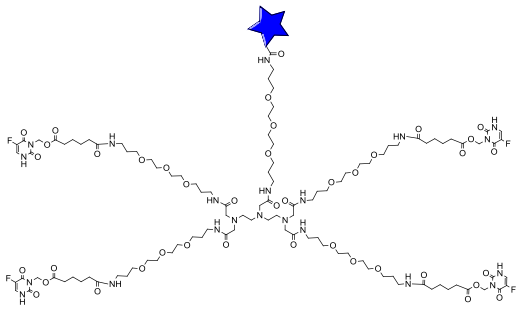
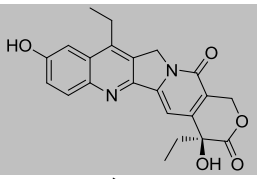
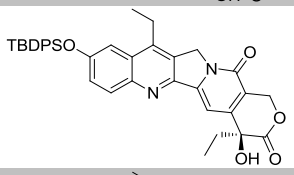
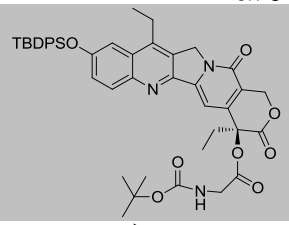
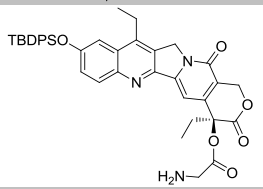
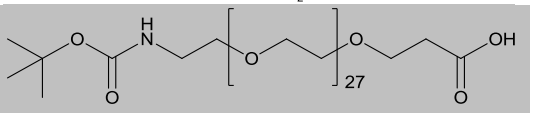
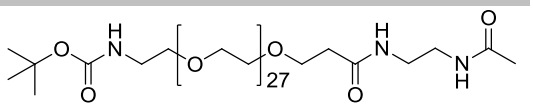
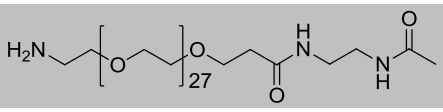
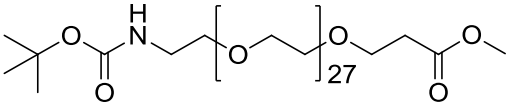
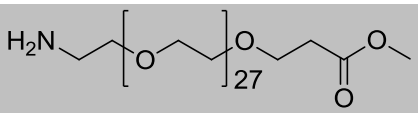
ANEXO IV. LISTADO DE PRODUCTOS

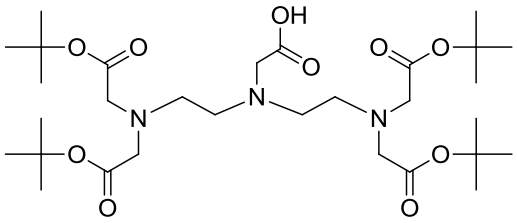
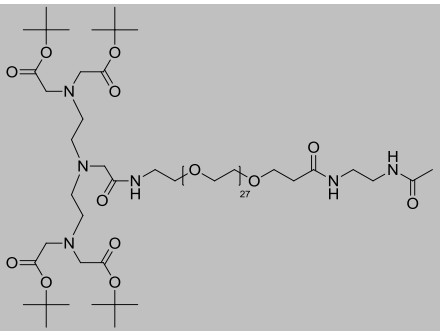
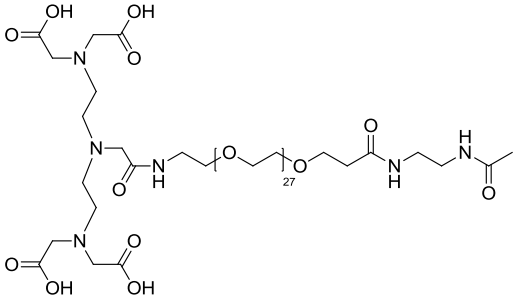
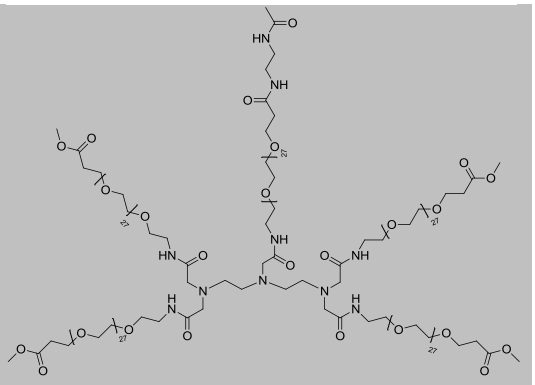
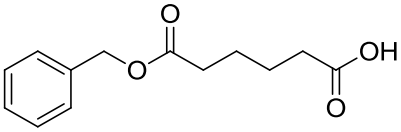
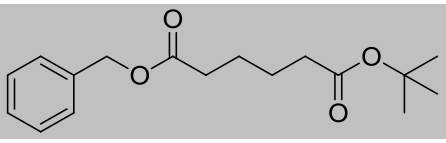
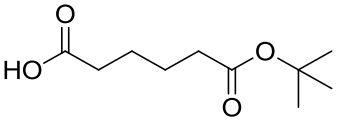
	Nombre	Estructura
1	Etanolamina	
2	*N,N*-bis[(*terc*-butoxicarbonil)metil]-2-hidroxietilamina	
3	Bromuro de *N,N*-Bis[(*terc*-butoxicarbonil)metil]-2-hidroxietilamina	
4	*N'*-benciloxicarbonilmetil-*N,N,N'',N''*-tetrakis(*terc*-butoxicarbonilmetil)dietilentriamina	
5	*N'*- benciloxicarbonilmetil -*N,N,N'',N''*-tetrakis(hidroxicarbonilmetil)dietilentriamina	
6	Boc-TOTA	
7	cloruro de 1-(benziloxicarbonil-amino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina	
8	cloruro de 1-(acetamido)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina	
9	G1-4Boc-Bn	
10	G1-4Boc-COOH	

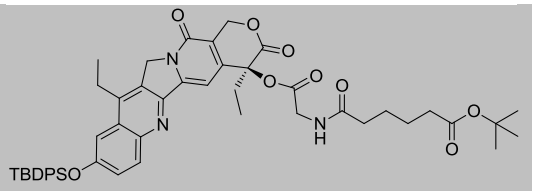
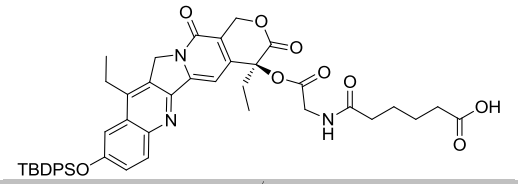
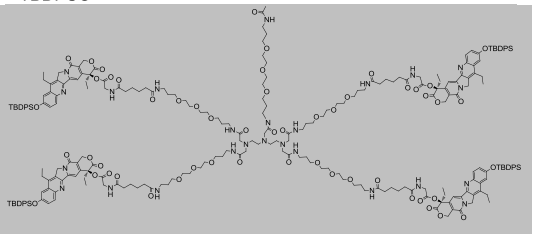
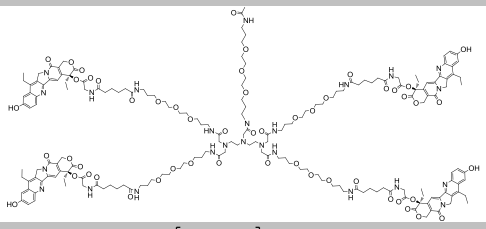
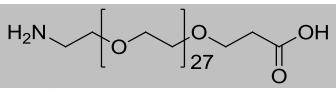
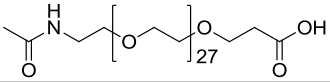
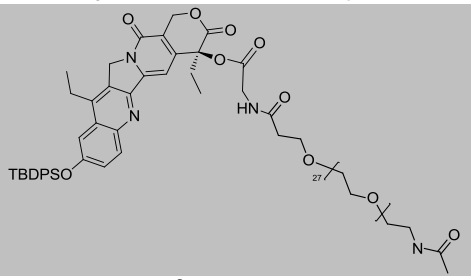
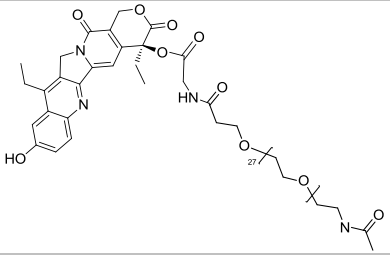
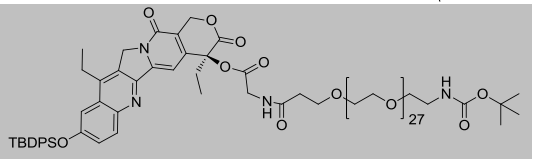
11	G1-4Boc-1Ac	
12	G1-4NH_2-1Ac	
13	G1-4Boc-1Z	
14	G1-4NH_2-1Z	
15	5-Fluorouracilo	
16	1,3-metanol-5-fluorouracilo	

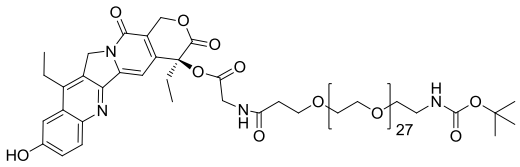
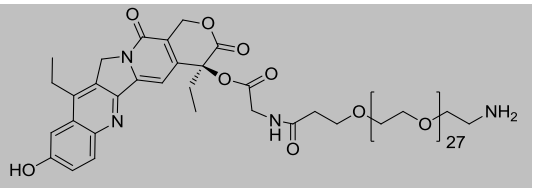
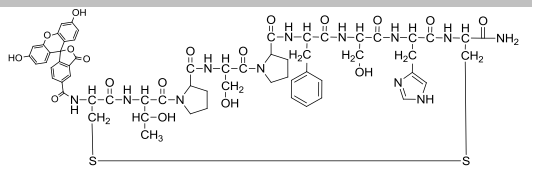
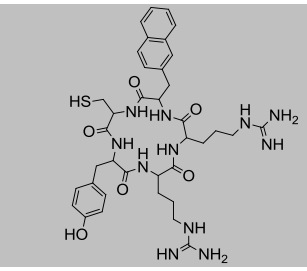
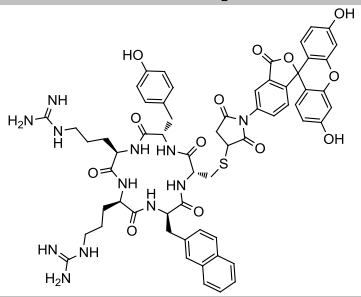
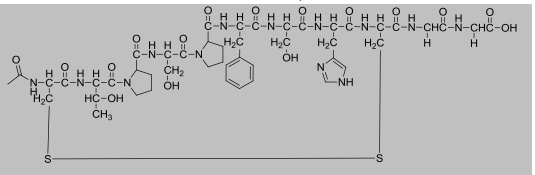
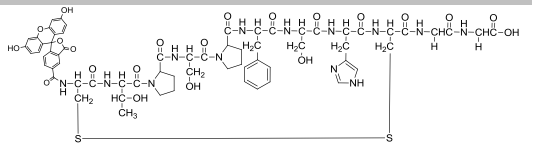
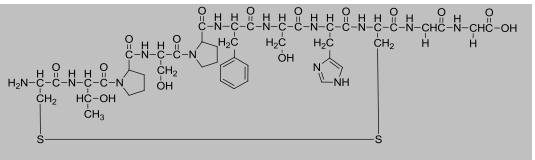
17	1-benciloxicarboniloximetil-5-fluorouracilo	
18	1-benciloxicarboniloximetil-3-metanol-5-fluorouracilo	
19	1-benciloxicarboniloximetil-3-(hidroxicarboniletil)carboniloximetil-5-fluorouracilo	
20	5FUZSuccN$_3$TOTA-Ac	
21	5FUSuccN$_3$TOTA-Ac	
22	1-(hidroxicarboniletil)carboniloximetil-5-fluorouracilo	
23	5FUSuccN$_1$TOTA-Ac	
24	1-(hidroxicarbonilhexil)carboniloximetil-5-fluorouracilo	
25	éster de pentafluorofenol de 1-(hidroxicarbonilhexil)carboniloximetil-5-fluorouracilo	
26	5FUAdipN$_1$TOTA-Ac	
27	carbamato de clorometilo de 1-(acetamido)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina	

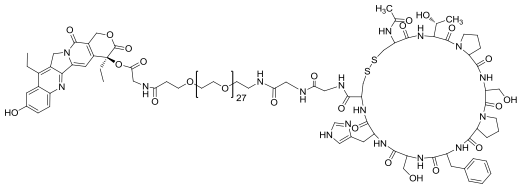
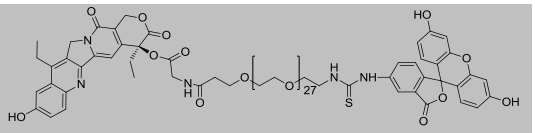
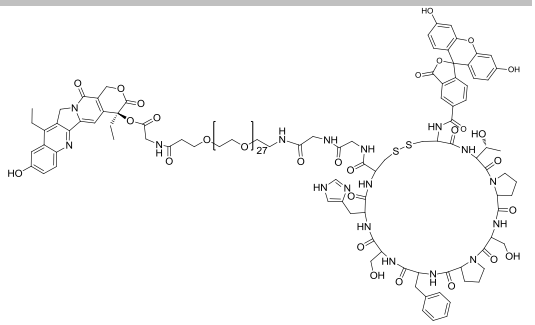
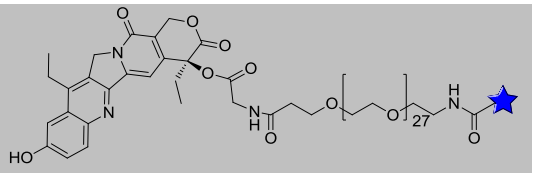
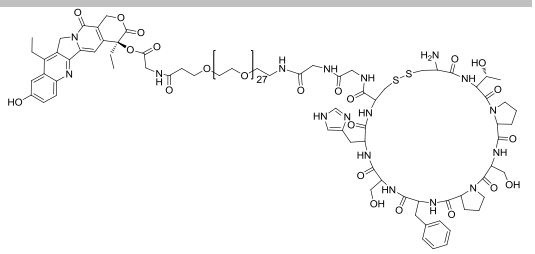
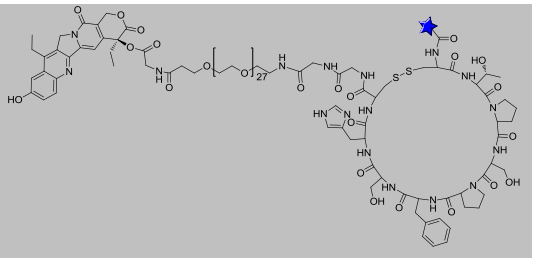
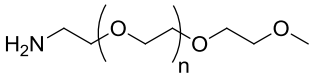
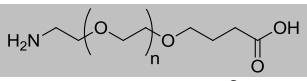
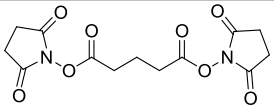
28	5FUN_1TOTA-Ac carbamato	
29	carbamato de clorometilo de *terc*-butil-3-aminopropanoato	
30		
31		
32	5FUAlaN$_1$TOTA-Ac carbamato	
33	G1-45FU-1Ac	
34	G1-45FU-1Z	
35	G1-45FU-1NH_2	

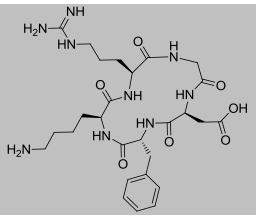
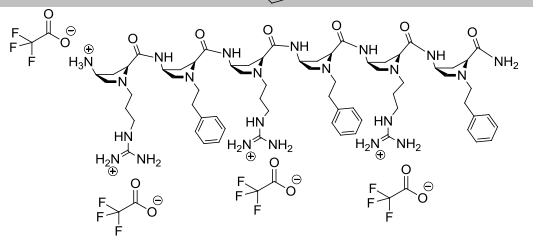
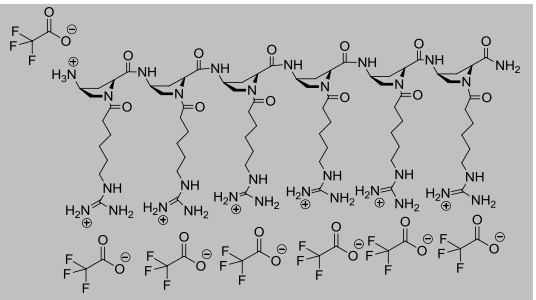
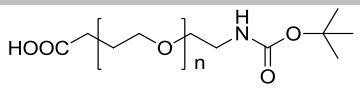
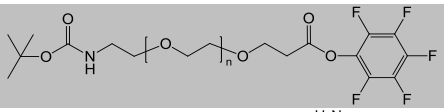
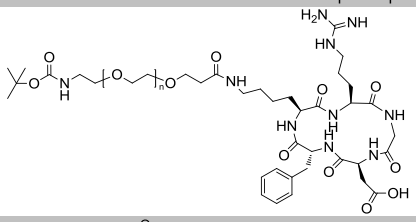
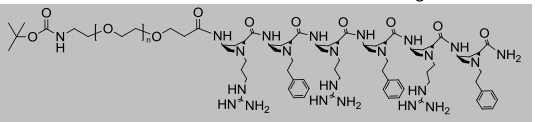
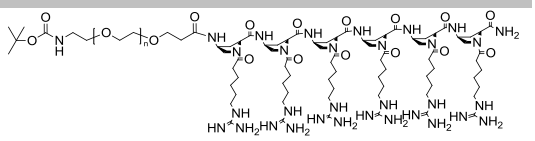
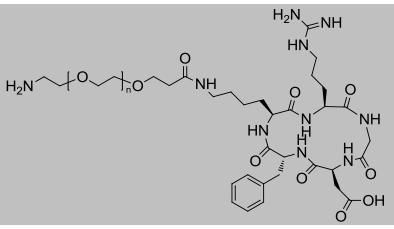
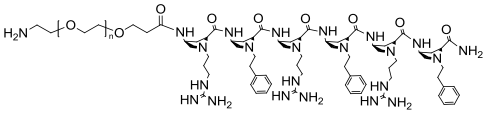
36	G1-45FU-1AF750	
37	SN38	
38	SN38-TBDPS	
39	SN38-TBDPS-GlyBoc	
40	SN38-TBDPS-GlyNH_2	
41	Boc-OEG_{27}-COOH	
42	Boc-OEG_{27}-CONH-Ac	
43	$_2$HN-OEG_{27}-CONH-Ac	
44	Boc-OEG_{27}-COMe	
45	$_2$HN- OEG_{27}-COMe	

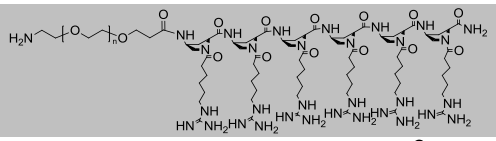
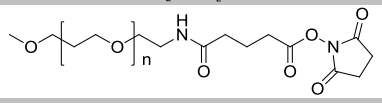
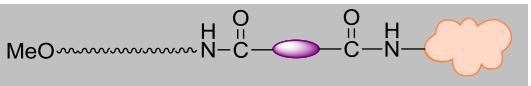
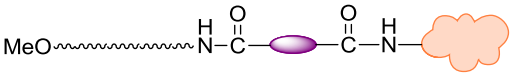
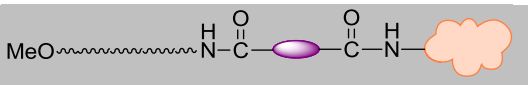
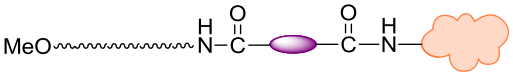
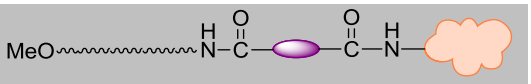
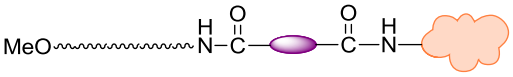
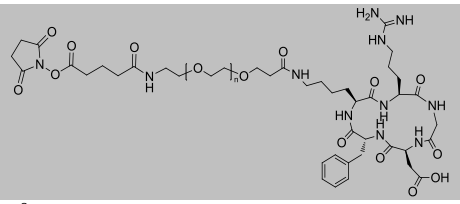
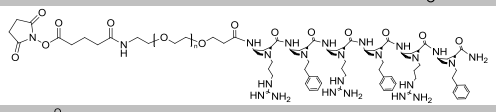
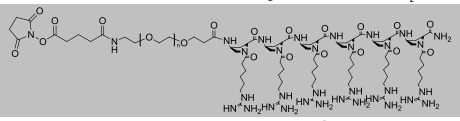
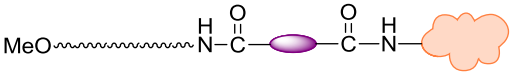
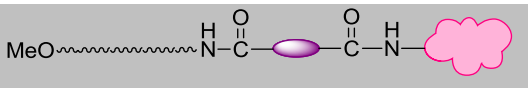
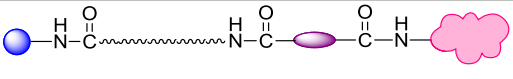
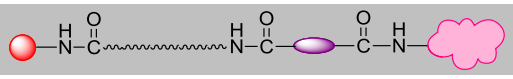
46	DTPA-4Boc-1COOH	
47	DTPA-4Boc-1PEG27-Ac	
48	DTPA-4COOH-1PEG27-Ac	
49	G1-4 $OEG_{27}COMe$-1PEG27Ac	
50	Bz-Adipico-COOH	
51	BzAdipicotBu	
52	AdipicotBu	

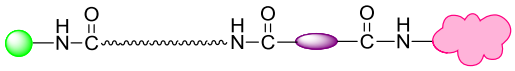
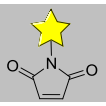
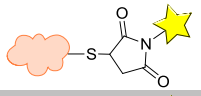
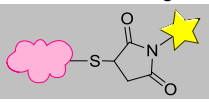
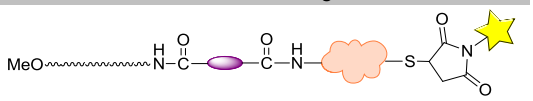
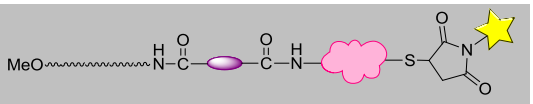
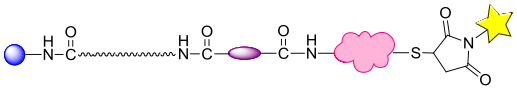
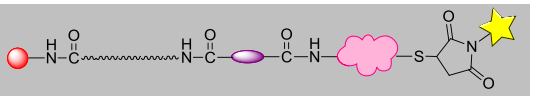
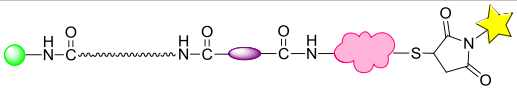
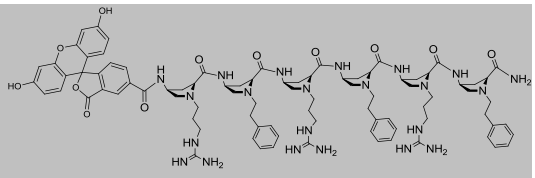
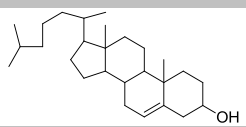
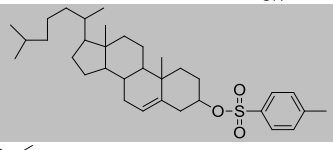
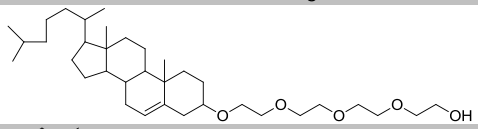
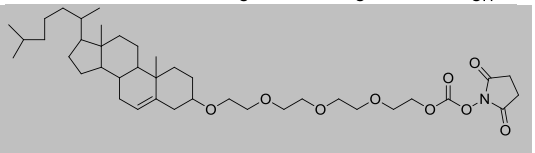
53	SN38-TBDPS-GlyAdipicotBu	
54	SN38-TBDPS-GlyAdipicoCOOH	
55	G1-4SN38-1Ac	
56	G1-4SN38-1Ac	
57	$_2$HN-OEG$_{27}$-COOH	
58	Ac-OEG$_{27}$-COOH	
59	Ac-OEG$_{27}$-SN38TBDPS	
60	Ac-OEG$_{27}$-SN38	
61	Boc-OEG$_{27}$-SN38TBPS	

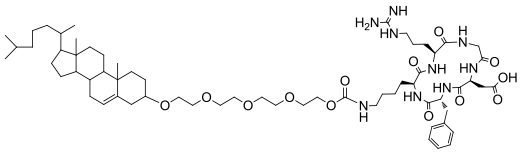
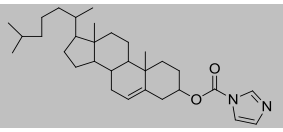
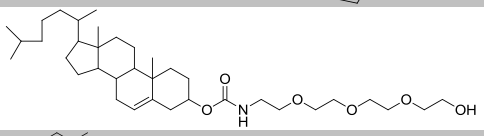
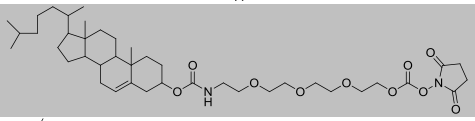
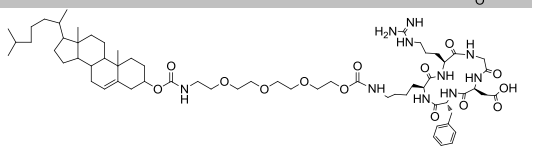
62	Boc-OEG$_{27}$-SN38	
63	$_2$HN-OEG$_{27}$-SN38	
64	c(TCP-1)-CF	
65	c(CXCR4)	
66	c(CXCR4)-CF	
67	c(TCP-1)_Ac	
68	c(TCP-1)_CF	
69	c(TCP-1)_NH$_2$	

70	TCP-1-OEG$_{27}$-SN38	
71	CF-OEG$_{27}$-SN38	
72	CF-TCP-1-OEG$_{27}$-SN38	
73	AF750-OEG$_{27}$-SN38	
74	$_{2}$HN-TCP-1-OEG$_{27}$-SN38	
75	AF750-TCP-1-OEG$_{27}$-SN38	
76	MeO-PEG-NH$_2$	
77	HOOC-PEG-NH$_2$	
78	Glutarato de di(N-succinimidil) (DSG)	

79	c(RGDfK)	
80	P25	
81	P87	
82	Boc-PEG-COOH	
83	PfOH-PEG-Boc	
84	RGD-PEG-NHBoc	
85	P25-PEG-NHBoc	
86	P87-PEG-NHBoc	
87	RGD-PEG-NH_2	
88	P25-PEG-NH_2	

89	P87-PEG-NH_2	
90	MeO-PEG-NHS	
91	α-GAL	
92	Replagal	
93	α-GAL-PEG-Pn2	
94	α-GAL-PEG-Pn5	
95	α-GAL-PEG-Pn10	
96	α-GAL-PEG-Nn2	
97	α-GAL-PEG-Nn6	
98	α-GAL-PEG-Nn12	
99	RGD-PEG-NHS	
100	P25-PEG-NHS	
101	P87-PEG-NHS	
102	MeO-PEG-α-GAL	
103	MeO-PEG-Replagal	
104	RGD-PEG-Replagal	
105	P25-PEG-Replagal	

106	P87-PEG-Replagal	
107	Atto 633-maleimido	
108	α-GAL-Atto 633	
109	Replagal-Atto 633	
110	MeO-PEG-α-GAL-Atto 633	
111	MeO-PEG-Replagal-Atto 633	
112	RGD-PEG-Replagal-Atto-633	
113	P25-PEG-Replagal-Atto 633	
114	P87-PEG-Replagal-Atto 633	
115	P25-CF	
116	Colesterol	
117	colesterol-tosilado	
118	Colesterol-OEG	
119	Colesterol-OEG-NHS	

120	Colesterol-OEG-cRGDfK éter	
121	Colesterol-Im	
122	Colesterol-OEG carbamato	
123	Colesterol-OEG-NHS carbamato	
124	Colesterol-OEG-cRGDfK carbamato	
125	vesículas DPPC:Colesterol:Colesterol-OEG-RGD éter	
126	Vesículoas DPPC:Colesterol:Colesterol-OEG-RGD carbamato	
127	Vesículas DPPC:colesterol	
128	Vesículas DPPC:Colesterol:Colesterol-OEG-RGD :α-GAL (*2,3 µg/mg)*	
129	Vesículas DPPC:Colesterol:Colesterol-OEG-RGD :α-GAL (*5,8 µg/mg)*	
130	Vesículas DPPC:Colesterol:Colesterol-OEG-RGD :α-GAL (*11,3 µg/mg)*	

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El término "**polímero terapéutico**" fue acuñado para describir fármacos poliméricos, proteínas, fármacos y aptámeros conjugados a polímeros, micelas de co-polímeros y vectores no-virales multicomponentes, que en todos los casos algún enlace covalente. Si en este grupo se incluyen los sistemas de administración de fármacos basados en estructuras poliméricas, tipo nanopartículas de PLGA, que simplemente encapsulan (de manera no covalente) agentes terapéuticos, debemos hablar de "**nanomedicinas**".[1]

Considerando el número de publicaciones relacionadas con este tema que han aparecido desde la década de los cuarenta del siglo XX hasta la actualidad (figura 1) se puede apreciar como el número de publicaciones aumenta considerablemente con los años. Cabe destacar que entre los polímeros terapéuticos más referenciados y empleados durante todos estos años encontramos el **polietilenglicol** (**PEG**).

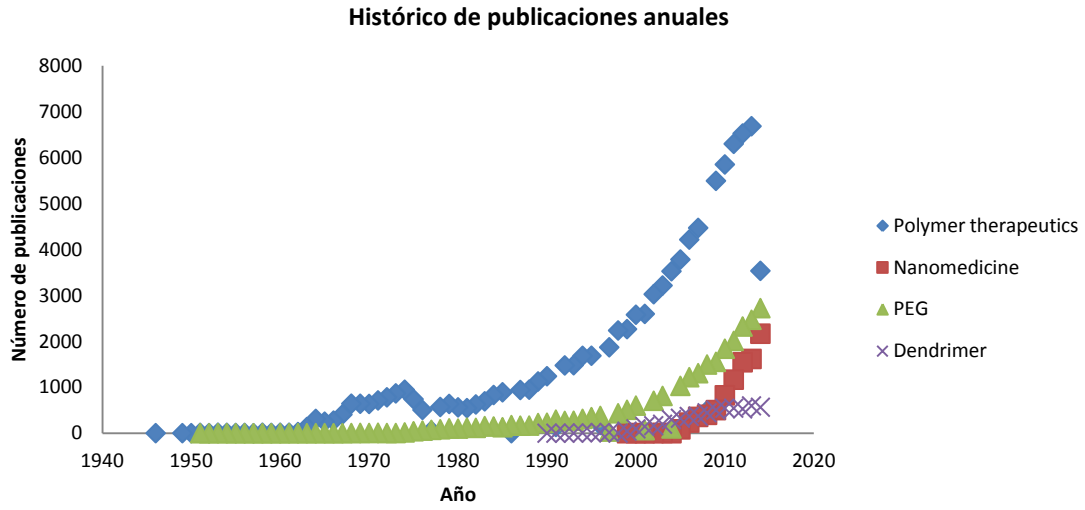


Figura 1. *Comparativa de publicaciones anuales según "pubmed" dedicadas a Polymer therapeutics, Nanomedicine, PEG o Dendrimer.*

1. Polímeros terapéuticos

En 1975, Helmut Ringsdorf, propuso una nueva estrategia para los sistemas de administración de fármacos consistentes en una droga unida a un polímero.[2] Este modelo podía constar de cinco partes bien diferenciadas: cadena polimérica multifuncional, fármaco o droga a administrar, espaciador que une el fármaco con los grupos funcionales del polímero, fragmento direccionador y agente solubilizante que podía ser la propia cadena polimérica. Idealmente los polímeros terapéuticos deben ser solubles en agua, no tóxicos, no imunogénicos, y biodegradables o capaces de ser eliminados por el organismo.[3,4] Las cadenas poliméricas deben contener al menos un punto de unión para la incorporación del fármaco,

que se realizará de manera covalente mediante un enlace que puede ser degradable o no , según el espaciador empleado en cada caso.

La elección de la cadena polimérica que se emplea tiene una gran importancia, ya que de ella depende el **comportamiento farmacocinético y fármacodinámico** del conjugado en su mayoría. Características como el peso molecular, la **polidispersión**, el empaquetamiento, la carga y la hidrofobicidad, definirán la carga total de droga, la solubilidad, la biodistribución y la respuesta del sistema inmune frente al conjugado.[4] Si bien existen un gran número de polímeros terapéuticos, los tipos de estructuras poliméricas más estudiadas en estos se pueden encontrar resumidos en la figura 2 y los polímeros más empleados en la tabla 1.

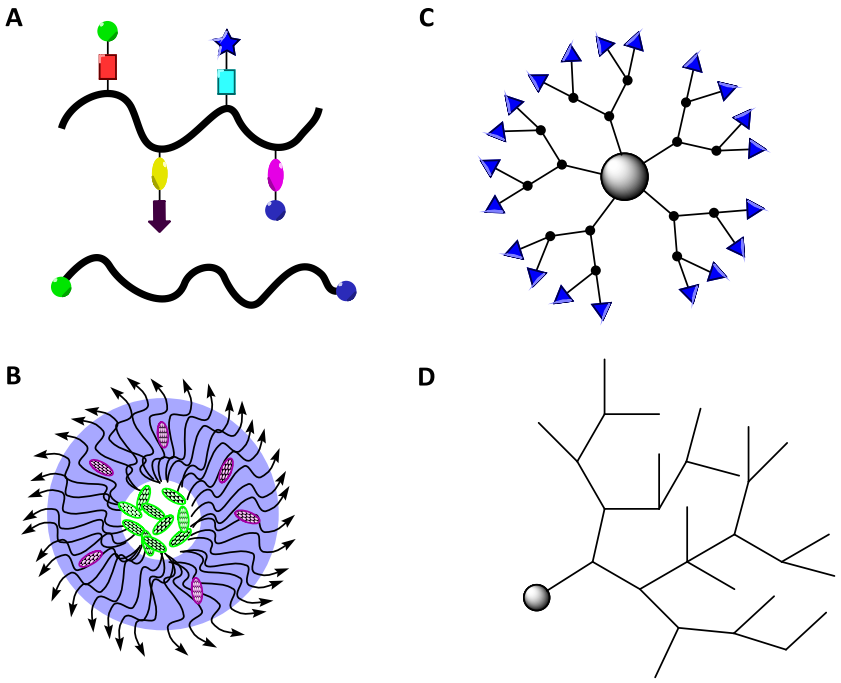
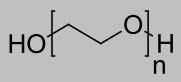
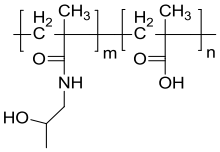
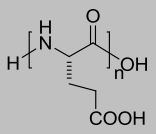
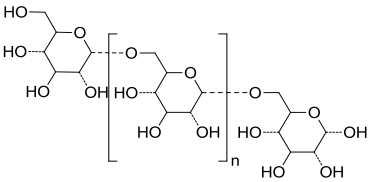
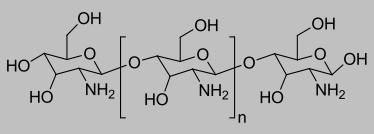


Figura 2. *Polímeros terapéuticos más comunes.* ***A)*** *Polímero lineal multivalente (arriba) o divalente (abajo).* ***B)*** *Micelas. Las micelas son sistemas autoensamblados compuestos por uno o varios polímeros con un extremo hidrofílico que interacciona con el medio acuoso y otro hidrofóbico que forma un núcleo micelar. Los fármacos pueden ser encapsulados en su región hidrofóbica interior o bien incorporarse en su región anfifílica.* ***C)*** *Dendrímero. Están compuestos por un núcleo central,unidades de ramificación, ramas y grupos de la superficie. Los fármacos pueden encapsularse en su interior, o bien unidos de manera covalentemente o por interacciones no-covalentes a través de los grupos funcionales de su superficie.* ***D)*** *Polímeros ramificados. En esta categoría se engloban un gran número de polímeros ramificados, típicamente polidispersos.*

Tabla 1. *Esqueletos poliméricos más empleados. Tabla adaptada de la referencia 3.*

Estructura	Características generales
Polietilenglicol (PEG) 	PEG fue el primer soporte polimérico empleado. Ha sido extensamente utilizado para su conjugación con polipéptidos. PEG está disponible comercialmente y tiene una alta solubilidad en agua y en la mayoría de disolventes orgánicos. Una de sus mayores ventajas es su habilidad para enmascarar la antigenicidad de diversas proteínas y por tanto evitar una respuesta inmune.
Polímero HPMA 	El copolímero de HPMA es una de las plataformas más estudiadas, ha sido empleado durante más de 30 años. La mayoría de los conjugados HPMA-fármaco ha sido desarrollados para el tratamiento del cáncer, siendo el conjugado HPMA-DOX el primer conjugado anticancerígeno en entrar en fase clínica en 1994 (PK1). HPMA es soluble en agua, biocompatible, no-inmunogénico y no biodegradable, aunque hay diversos estudios que hablan de su metabolización tras administración.
Ácido poliglutámico (PGA) 	PGA es un polímero de carácter peptídico que está compuesto por monómeros de ácido gutámico. Es soluble en agua, no tóxico y biodegradable, teniendo la catepsina B un papel esencial en su degradación. El grupo carboxílico de sus cadenas laterales es el punto de unión con los fármacos, proporcionándole multivalencia. El conjugado PGA-PTX (OPAXIO ®) es el conjugado más avanzado en el proceso de aprobación como agente terapéutico. A pesar de esto la dificultad de su caracterización constituye un problema, ya que su estructura depende fuertemente de su contenido en sal y del tipo de contraiones que se encuentran en su cadena.
Dextrano 	El dextrano es un polisacárido natural que contiene monómeros de glucosa. Este biopolímero se caracteriza por contener enlaces 1,6, entre unidades de glucosa. El dextrano está aprobado por las autoridades sanitarias para aumentar el volumen sanguíneo. El dextrano tiene una elevada solubilidad en agua y en la mayoría de disolventes orgánicos. Es biocompatible y biodegradable en sangre y en el tracto gastrointestinal, pero no en los lisosomas. Los grupo hidroxilos primarios y secundarios pueden ser empleados como puntos de unión a fármacos.
Quitosano 	El quitosano es un polisacárido (poli-D-glucosamina), derivado de la deacetilación de la quitina. El quitosano presenta un gran número de ventajas para su uso como polímero terapeútico (bajo coste de producción, biodegradabilidad, biocompatibilidad, adsorción y reciente aprobación por la FDA). El grado de deacetilación de su estructura afecta a su solubilidad, hidrofobicidad, toxicidad y propiedades electrostáticas. Ha sido empleado como transportador de algunos fármacos antitumorales (camptotecina) y de vectores para terapia génica.

La "**PEGuilación**", es decir la unión de PEG a alguna molécula de interés, se ha convertido en un procedimiento bien establecido y estudiado. Es más, los dos primeros conjugados PEG-fármaco fueron aprobados por la FDA en 1990: PEG-adenosina diaminasa, Adagen®, y PEG-asparaginasa, Oncospar®,[5] y actualmente es el método más empleado para mejorar las propiedades farmacocinéticas de péptidos y proteínas.

En la presente tesis doctoral se emplearan cadenas de polioligoetilenglicol (PEG) o **oligoetilenglicol** (**OEG**) como método para desarrollar nuevos sistemas de liberación para fármacos de naturaleza distinta.

2. Características del PEG

El PEG como polímero terapéutico ha sido estudiado durante más de tres décadas, que han generado un número considerable de fármacos aprobados por las autoridades sanitarias (tabla 2), el último de ellos, PLEGRIDY de Biogen Idec Inc., aprobado hace tan solo unos meses (agosto de 2014).[6] Este polímero ha sido escogido por (**1**) su baja inmunogenicidad, antigenicidad y toxicidad; (**2**) su alta solubilidad en agua y en la mayoría de disolventes orgánicos; (**3**) el gran poder de hidratación y flexibilidad de su cadena; y (**4**) su aprobación por parte de la FDA para su uso en humanos.

La composición de las cadenas de PEG permite la coordinación de 2 a 3 moléculas de agua por unidad de óxido de etileno,[7,8] este poder de solvatación unido a la gran flexibilidad de su cadena, son los responsables de su biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y baja antigenicidad del polímero.[9] En el caso concreto de la unión del PEG a proteínas con propiedades farmacológicas, la coordinación de las moléculas de agua a su cadena hace que el tamaño aparente de la cadena de PEG aumente entre 5-10 veces comparado con el tamaño de un proteína globular de igual peso molecular,[10] haciendo que una sola cadena de PEG pueda proporcionar protección a una amplia superficie de la proteína conjugada al PEG.[11-13] El polietilenglicol, solvatado con moléculas de agua, actúa protegiendo el fármaco unido al polímero de la degradación por parte de enzimas, de su rápida eliminación renal y de la interacción del fármaco con las proteínas de superficie de las células minimizando así la respuesta inmune.[7] A esto debemos sumar que los fármacos PEGuilados son también más estables a los cambios de pH y temperatura en comparación a los mismos no PEGuilados.[14] Por tanto la PEGuilación puede conferir a los fármacos conjugados un gran número de beneficios clínicos, como puede ser un aumento del tiempo de circulación en sangre, que aumenta la eficacia, y una disminución de los efectos adversos,[15] y al igual que en otro tipo de fármacos conjugados a polímeros terapéuticos, esto se acaba resumiendo en un aumento de la **dosis máxima tolerada** (**MTD**, máximum tolerated dose) comparada con el fármaco libre. [16]

Tabla 2. *PEG-fármacos aprobados por la FDA, datos extraídos U.S. Food and Drugs Administration (referencia 6). En febrero del 2013, Omontys ha sido retirado del mercado tras la detección de reacciones de hipersensibilidad, incluida la anafilaxis. Abreviaturas: im, vía intramuscular; iv, vía intravenosa; sc; vía subcutánea; SDCI, inmunodeficiencia severa combinada (severe combined immunodeficiency disease); SIDA, síndrome de immunodeficiencia adquirida.*

Conjugados	Indicación	Vía de administración	Año de aprobación	Compañía
PEG-adenosina deaminasa (Adagen)	Síndrome de SCDI	im	1990	Sigma Tau
PEG-asparaginasa (Oncospar)	Leucemia limfoblástica severa	Iv/im	1994	Sigma Tau
Linear PEG-interferon α2b (PEG-Intron)	Hepatitis C, evaluación del cáncer, esclerosis múltiple y SIDA	sc	2001	Schering
Branched PEG-interferon α2a (Pegasys)	Hepatitis C	sc	2002	Hoffman-La Roche
PEG-receptor antagonista hormona del crecimiento (Pegvisomant, Somavert)	Acromegalia	sc	2002	Pfizer
PEG-G-CSF (Pegfilgrastim, Neulasta)	Prevención de la neutropenia asociada con el tratamiento del cáncer con quimioterapia.	sc	2002	Amgen
Branched PEG-anti-VEGF aptámero (Pegaptanib, Macugen)	Degeneración macular asociada a la edad	inyección intravítrea	2004	Valeant Pharm.
PEG-anti-TNF Fab (CDP870; Certolizumab pegol, Cimzia)	Artritis reumatoide y enfermedad de Chron	sc	2008	UCB Inc.
PEGloticasa (Kristexxa)	Gota crónica	iv	2010	Savient Pharm.
Acetato de PEGinesatida (Omontys)	Anemia asociada a la enfermedad crónica de riñon.	iv	2012	Takeda Pharm.
PEGinterferon β1a (PLEGRIDY)	Esclerosis múltiple.	sc	2014	Biogen Idec Inc.

El PEG se obtiene mediante una reacción de polimerización del óxido de etileno o epoxietano mediante catálisis ácida o básica. La reacción de polimerización puede ser iniciada con agua, metanol o con etilenglicol y sus oligómeros. Esta última estrategia, junto con la catálisis básica, es la más adecuada ya que rinde polímeros con una baja polidispersión, es decir con una distribución de pesos moleculares más pequeña. A pesar de esto la polimeración rinde una familia de PEG con pesos moleculares muy distintos que no pueden ser empleados directamente como transportadores de fármacos, pero si como excipientes farmacéuticos o cosméticos, espesantes o PEG3350, que es utilizado como laxante. Para poder ser empleado como polímero terapéutico mediante su conjugación con fármacos es necesario llevar a cabo

un proceso de purificación mediante cromatografía de gel, consiguiendo lotes más homogéneos y por tanto más adecuados para la administración de fármacos. También debemos destacar, que debido a la gran utilidad del PEG, se ha desarrollado un gran número de estrategias para alcanzar la síntesis de polímeros ramificados, monofuncionales, bifuncionales, heterobifuncionales o para obtener cadenas monodispersas, es decir con un único peso molecular.[7-8,17-20] La optimización de los procedimientos de polimerización y purificación de las cadenas de PEG permiten que actualmente sea posible la síntesis de PEGs con una realción de polidispersión M_w/M_n desde 1,01 para PEGs con pesos moleculares por debajo de 5KDa a 1,1 para PEGs con pesos moleculares de hasta 50KDa.[8] Estos avances han dado lugar a lo que algunos autores han calificado como conjugados de PEG de primera y segunda generación.[7-8]

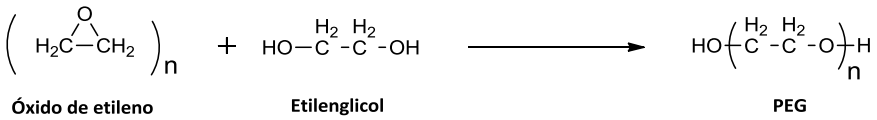


Figura 3. *Reacción de polimerización del óxido de etileno con etilenglicol como iniciador para generar cadenas de PEG.*

Los **conjugados de PEG de primera generación** están basados en polímeros lineales de bajo peso molecular (≤ 12KDa), y en la mayoría de los casos monometileters (mPEG).[7,8] Debido a que eran sintetizados con técnicas aún no demasiado avanzadas, estos PEGs contenían normalmente un alto porcentaje de impurezas directamente relacionadas con la presencia de formas diólicas de la cadena de PEG, que tras la activación y posterior reacción con una proteína pueden rendir conjugados con dos proteínas unidas a una misma cadena de PEG, haciendo que se formen agregados inactivos.[21] En este tipo de conjugados la unión de la cadena polimérica se llevaba a cabo a través de las aminas ε de los residuos de las lisinas contenidos en la proteína.[7] A pesar de estos problemas este tipo de PEGs generaron los primeros fármacos que fueron aprobados para su uso terapéutico: Adagen y Oncospar.

Con los avances en la producción del PEG se alcanzaron los llamados **conjugados de PEG de segunda generación**. Las cadenas de PEG que forman estos conjugadas superaron los problemas de elevada polidispersión, contaminación con dioles y mezclas de isómeros y además permitió la obtención de PEGs ramificados.[7,8] A estas propiedades debemos sumar la gran variedad de formas de activación que permiten las estrategias de síntesis de los PEGs de segunda generación aumentando la selectividad y el incremento de la conjugación de cadenas de PEG a fármacos o proteínas (figura 4).

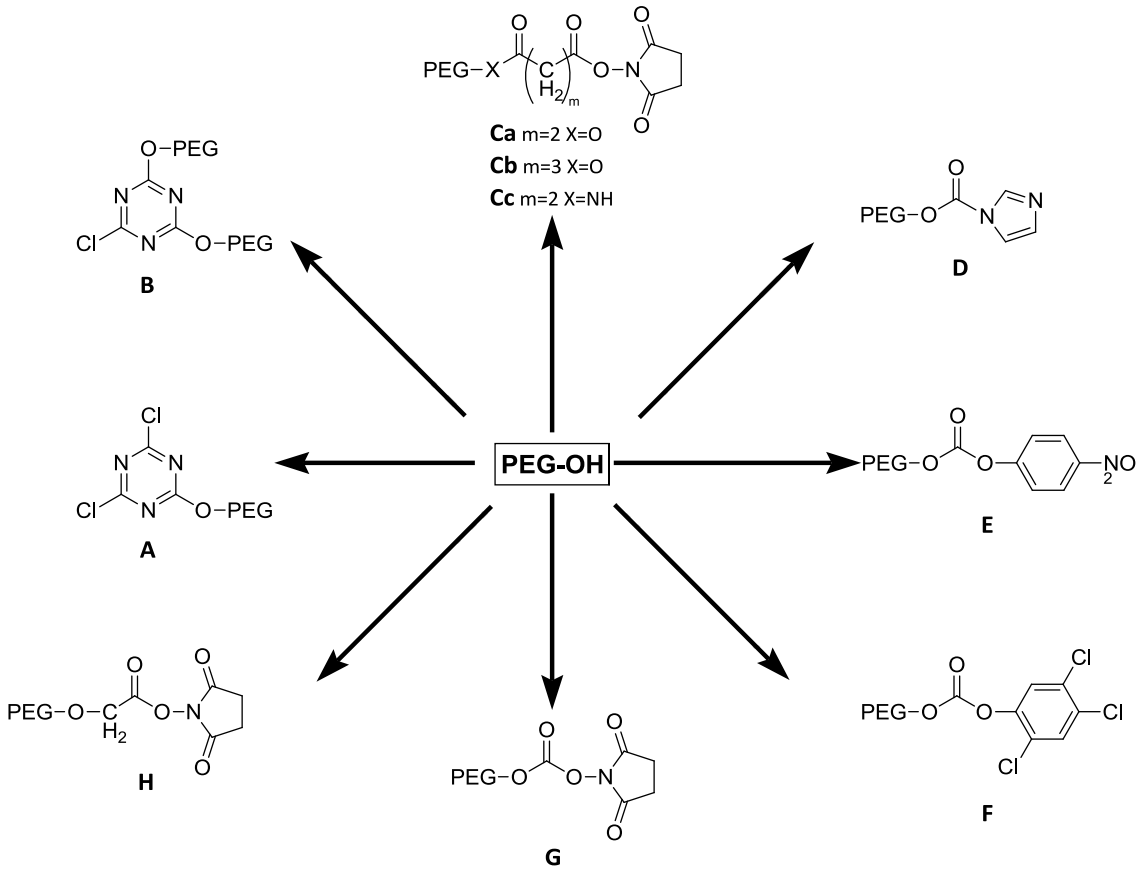


Figura 4. *Métodos clásicos de activación de la molécula de PEG.* ***A)*** *Método de la triclorotriazina.* ***B)*** *Variación del método de la triclorotriazina.* ***Ca)*** *Método del N-hidroxisuccinimido éster de PEG-succinato.* ***Cb)*** *Método del N-hidroxisuccinimido ester de PEG-glutarato* ***Cc)*** *Método del N-hidroxisuccinimido éster de PEG-succinamida.* ***D)*** *Método del éster de imidazol de PEG-imidazoil.* ***E y F)*** *Derivados activados de PEG empleando distintos fenilcarbonatos.* ***G)*** *Método del N-hidroxisuccnimido éster de PEG-succinimidil.* ***H)*** *Método de la formación del éter PEG-2-hidroxiacetato de succinimidil. Figura adaptada de la referencia 7.*

Dentro de la gran variedad de PEGs que encontramos actualmente en el mercado varios de ellos destacan por su amplio uso. El **PEG-propionaldehído** reacciona con grupos amino, preferentemente con los grupos N-terminales de las proteínas,[7] dando lugar a una base de Shiff, que una vez reducida, forma un enlace estable con la peculiaridad de que se mantiene la carga neta de la molécula original. Los derivados **PEG-succinimidil** son los derivados de PEG más comunes para la reacción con aminas. También destacan la aparición de un gran número de derivados para reaccionar selectivamente con tioles (**PEG-maleimido**, **PEG-vinilsulfona**, **PEG-iodoacetamida** o **PEG-disulfuro de orto-piridilo**), evitando así la modificación de los grupos aminos presentes en la molécula original. También se emplean de manera habitual los **PEGs heterobifuncionales**, entre los que destacan aquellos que combinan función amina, ácido carboxílico, alcohol u otro grupo funcional.

Dentro de esta segunda generación de PEGs se han desarrollado también **PEGs ramificados**, **multirama** o **dendronizados**. Los primeros han demostrado ser más efectivos en la retención

de la actividad y protección frente a la degradación por parte de las enzimas proteolíticas de las proteínas conjugadas a él comparadas con la misma proteína conjugada con PEGs lineales.[8,22] Por último, los derivados de PEG multirama y dendronizados han sido desarrollados con el objetivo de aumentar el ratio de fármaco/polímero.[23-24]

3. Seguridad del PEG

La seguridad de la utilización de los polímeros terapéuticos ha sido muy estudiada en los últimos años y es fuente de gran controversia sobre todo en lo que se refiere a polímeros no biodegradables, como el caso de PEG, a pesar de estar este aprobado por la mayoría de agencias (FDA, EMA, etc.) para su uso clínico. Para entender esta controversia se revisaran los principales aspectos de farmacocinética y farmacodinámica que rigen la aprobación de los fármacos según los criterios de **A**bsorción, **D**istribución, **M**etabolismo y **E**xcreción, más comúnmente conocidos como criterios **ADME**, para después focalizarnos en los métodos de excreción del PEG.

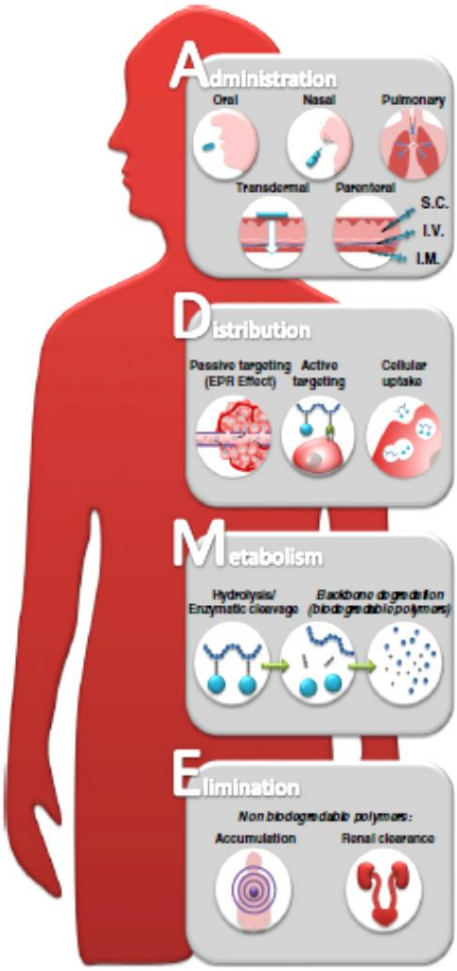


Figura 5. *Representación de los criterios ADME. El primer estadio es la absorción, en la figura este primer paso está representando por la administración del fármaco, ya que del tipo de ruta de administración depende en su mayoría la absorción de cualquier fármaco. Seguida de la distribución, metabolismo del fármaco y la excreción de este. Figura extraída de la referencia 3.*

El primer aspecto a tener en consideración es la **absorción** del fármaco o en nuestro caso concreto del fármaco unido al polímero terapéutico. La absorción se define como los movimientos de una droga hacia el torrente sanguíneo y depende mayoritariamente de la vía de **administración** del fármaco, ya que de ésta dependen las barreras biológicas que tendrá

que atravesar el fármaco. Existen varios tipos de administración (los más comunes se encuentran representados en la figura 4): oral, nasal, pulmonar, transdermal o oftalmológica, parenteral; que se divide en subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) y la inyección intravítrea.

La mayoría de los polímeros terapéuticos se desarrollan para ser administrados de forma parenteral, mayoritariamente intravenosa. Este método de administración tiene una gran ventaja sobre otros métodos, que es la rapidez con el que el fármaco alcanza el torrente sanguíneo. Este método también tiene desventajas, ser la vía de administración menos cómoda para el paciente y el hecho de que con este método el fármaco se expone de modo directo a las enzimas de degradación que se encuentran en el torrente sanguíneo, hecho que puede generar una rápida eliminación del fármaco. Que la eliminación de los fármacos está íntimamente relacionada con el método de administración de los mismos es un hecho y varios estudios que lo demuestran han sido reportados. Por ejemplo, en 1995 Yamaoka *et al.* realizaron una serie de estudios con conjugados de PEG de diferentes pesos moleculares empleando diferentes rutas de administración que demostraron que este tipo de compuestos muestran una velocidad eliminación estrechamente ligada al método de administración siendo i.p. (intraperitoneal)>s.c.>i.m.. Así, la eliminación era más rápida cuando la vía de administración era i.p. y con conjugados con PEGs de menor peso molecular.[25] También hay ejemplos de polímeros que son empleados en otros tipos de administración, como el quitosano, que es empleado frecuentemente para mejorar la administración oral de fármacos.[26]

Una vez el fármaco se encuentra en el torrente sanguíneo el siguiente aspecto a considerar es la **distribución** del mismo. El tamaño, la carga y grupos funcionales de su superficie y sus propiedades mecánicas juegan un papel esencial en su biodistribución, capacidad para alcanzar su diana terapéutica o su eliminación.[3] El tiempo de circulación del polímero-fármaco frente al del fármaco libre aumenta significativamente, debido a que el endotelio de los vasos sanguíneos normales es impermeable a las macromoléculas.

Los conjugados pueden alcanzar su diana terapéutica mediante diferentes estrategias. En el caso del cáncer, es conocido que el tejido tumoral presenta una vascularización descontrolada y un sistema linfático deficiente que favorece la acumulación de macromoléculas en su interior. Esto es el llamado efecto del **aumento de la permeabilidad y retención** (**EPR**, enhanced permeability and retention).[27] El efecto EPR es típico de tejidos tumorales, pero también tiene lugar en enfermedades como la diabetes, la degeneración macular asociada a la edad, los procesos inflamatorios, la artitritis reumatoide y la psoriasis entre otras.[28-29] Tras muchos estudios se ha establecido que los conjugados o nanomedicinas con un diámetro hidrodinámico que oscila entre 20-100 nm presentan el tamaño adecuado para alcanzar este tipo de **direccionamiento pasivo**.[30-32] Como ya se ha comentado la estructura y los grupos funcionales de la superficie que contienen los polímeros terapéuticos y otras nanomedicinas

tienen una gran influencia en su biodistribución. Hay diversos estudios que muestran que las estructuras filamentosas de gran talla molecular presentan un biodistribución más favorable, debido a que su estructura flexible hace que sea más eficiente su entrada celular a través de los huecos que deja la angiogénesis variable de los tumores, que se caracteriza por contener espacios más o menos pequeños.[33-34] Es más de los estudios llevados a cabo por Saad *et al*.[34] se extrae que, al incorporar un péptido director a los sistemas estudiados, en este caso concreto un nanoconjugado con PEG, nanoconjugado con dendrímero de PAMAM y un liposoma, su bisodistribución cambia drásticamente y las diferencias entre las acumulaciones de uno y otro sistema disminuyen.[34] Estos estudios reflejan que al incluir un molécula directora ésta lleva el peso de la biodistribución por lo que se realiza un **direccionamiento activo**, y por tanto el polímero a emplear podría ser elegido en función de sus características físico-químicas (solubilidad, carga neta, etc.) más que en su arquitectura o tamaño.[3]

Uno de los parámetros de estudio que se incluyen en la distribución de los fármacos es la **respuesta inmune**. La respuesta inmune a las macromoléculas viene dada por el sistema reticuloendotelial (RES, reticuloendothelial system) y empieza con el reconocimiento y unión del material extraño a las opsoninas, este proceso es llamado **opsonización**. Tras este proceso de opsonización las macromoléculas son rápidamente eliminadas del torrente sanguíneo. Este proceso de eliminación tiene una relación directa con la acumulación en hígado y bazo.[3] En el caso concreto que nos ocupa, la conjugación con PEG, ha demostrado ser la principal técnica para evitar la opsonización,[3] especialmente en el caso de la conjugación de PEG a proteínas o en la PEGuilación de liposomas.[35-36] Por otro lado cabe destacar que se ha reportado que la administración de conjugados con PEG induce a la formación de anticuerpos anti-PEG IgM, cuya respuesta clínica no es considerada relevante.[37] Si bien es cierto que tras la aparición de este tipo de anticuerpos anti-PEG se ha observado una mayor velocidad en la eliminación del torrente sanguíneo de sistemas tipo PEG-proteína,[38-40] y en algunos casos reacciones alérgicas,[41] algunas severas como en el caso de Omontys.[6]

También existe un debate sobre la posible acumulación del PEG tras su administración prolongada. El PEG no es un polímero biodegrable por lo tanto determinar los modos de eliminación de este polímero es un aspecto muy importante para su uso clínico. Aunque no hay evidencias de problemas de seguridad clínicos asociados a la administración de PEG o PEG-proteínas (este tipo de conjugados son los únicos aprobados actualmente para su uso clínico),[42-43] diversas investigaciones ponen de relevancia la aparición de vacuolas en tejidos de animales a los cuales se les ha administrado conjugados tipo PEG-proteínas, pero sin ninguna evidencia de efectos secundarios nocivos derivados de estos.[44-45] La administración continuada de proteínas PEGiladas a animales ha sido asociada con la vacuolización en macrófagos y/o histocitos en varios órganos y en otro tipo de células como células tubulares renales y células epindemarias de los plexos coroideos.[45-46] Esta acumulación o vacuolización depende de varios factores. Normalmente esta vacuolización tiene lugar tras la degradación del conjugado PEG-proteína, dando lugar a PEG libre o el llamado PEG metabolizado, es decir que se ha desligado

de la proteína. En función del tamaño del PEG tiene lugar una rápida excreción vía renal o bien tiene lugar una acumulación en células cuyo metabolismo es lento y cuyo tiempo de vida es largo, ya que el PEG acumulado debe ser devuelto al torrente sanguíneo mediante exocitosis, proceso que puede ser lento en algunos tipo de células.[47] De todas formas cabe destacar que en ningún momento se ha observado ningún problema asociado a esta acumulación de PEG, pero más estudios serán necesarios en el futuro para asegurar la seguridad de la administración de PEG, sobre todo en aquellos casos en que se haga uso de este tipo de conjugados en enfermedades crónicas.

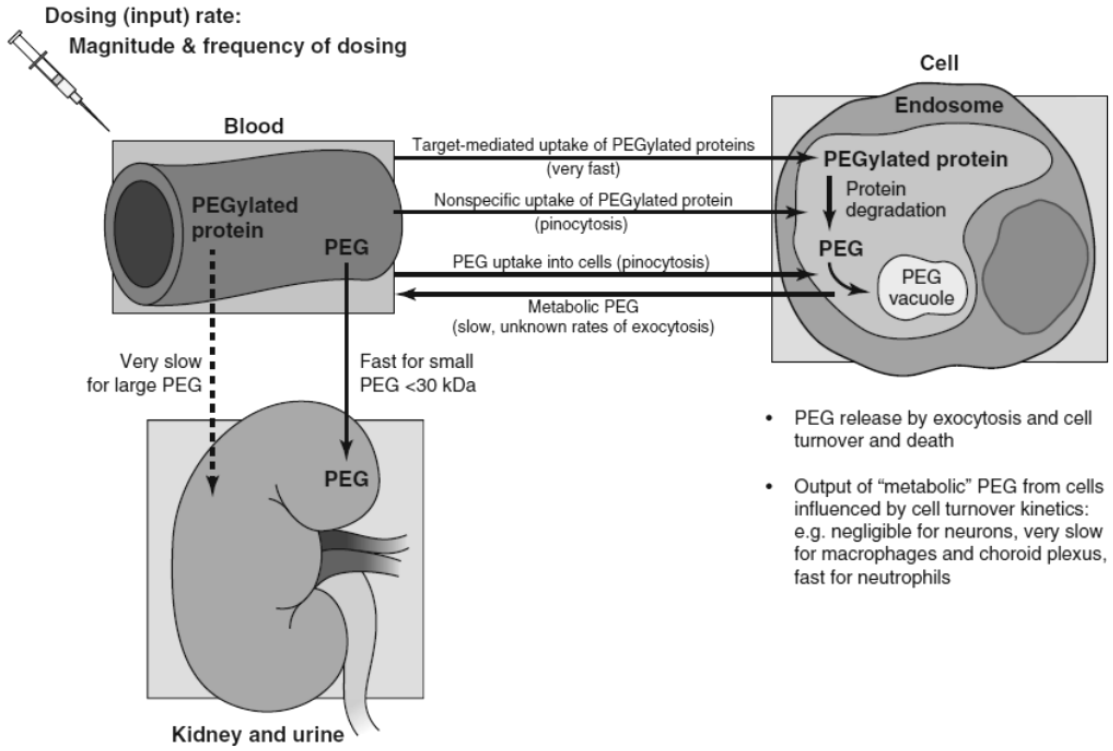


Figura 6. *Distribución del PEG y de los conjugados PEG-proteínas. La distribución de los conjugados PEG-proteínas es dependiente del tamaño del PEG. La potencial acumulación de PEG en los lisosomas (y vacuolización) del PEG no-biodegradable en las células es dependiente de la relación de competación entre la entrada y la salida del PEG-proteína y PEG metabólico, de la dosis administrada y la frecuencia, la filtración renal del mismo, y si la entrada es no-específica o regulada por receptor en los tejidos y diferentes tipos de células, y la relación de exocitosis del PEG. Figura extraída de la referencia 47.*

4. Utilidades del PEG

El PEG se utiliza en numerosos sistemas tanto como plataforma de administración de fármacos o como modificador de otros sistemas.

4.1 PEG-proteína

Todos los sistemas de PEG aprobados para su uso clínico en humanos se basan en proteínas PEGuiladas (tabla 2), excepto en el caso de Macugen que está basado en un aptámero

PEGilado. Estos datos dan una idea de clara de la importancia de los avances y estudios llevados a cabo en el campo de la PEGuilación de proteínas.

Los primeros estudios sobre PEGuilación de proteínas se realizaron en la década de los años 1970 y fueron llevados a cabo por Davies y Abuchowsky empleando la albumina y la catalasa como proteínas modelo.[9,48] Estos estudios demostraron que las proteínas podían ser modificadas manteniendo su actividad, hecho que hasta ese momento era impensable. Desde aquellos estudios hasta la actualidad la PEGuilación de proteínas ha evolucionado de manera extraordinaria, debido a las grandes ventajas que ha demostrado, ya que con este sistema se pueden obtener proteínas con menor immunogenicidad y antigenicidad, con un mayor tiempo de circulación en sangre y estabilidad frente a proteasas.[49]

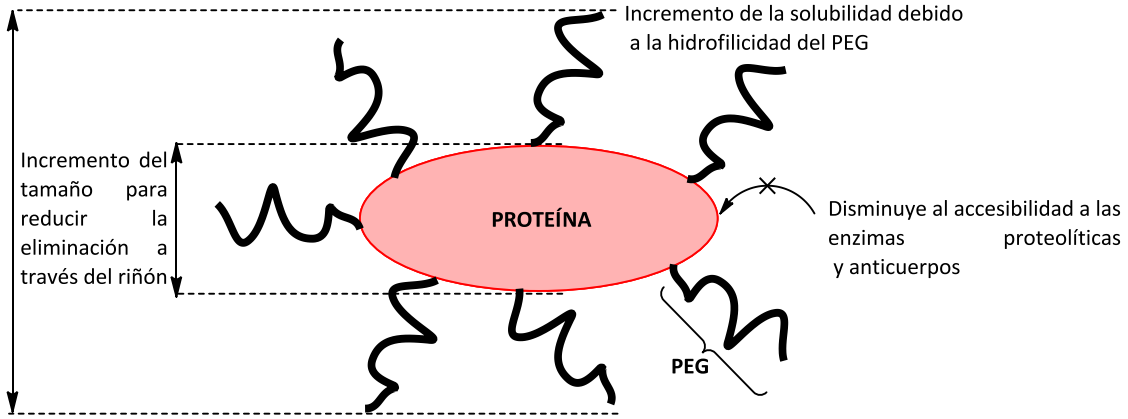


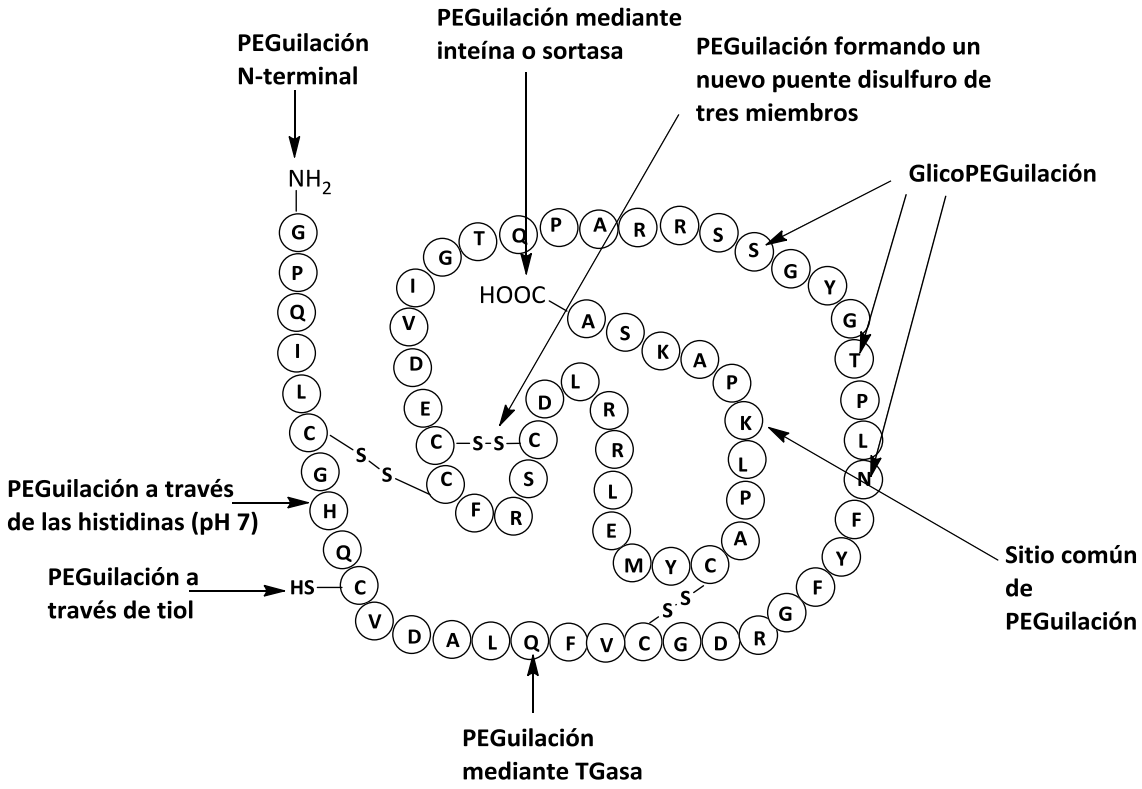
Figura 7. *La figura representa un conjugado de PEG-proteína. El polímero de PEG protege la superficie de la proteína de la degradación por parte de enzimas proteolíticas o anticuerpos. El incremento de tamaño del conjugado respecto a la proteína libre es la base de la reducción de la eliminación renal. Figura adaptada de la referencia 2.*

Como ya se ha comentado en el apartado 2 del presente capítulo de esta tesis, inicialmente la PEGuilación de proteínas fue llevada a cabo de manera al azar a través del grupo amino libre ε presente en el residuo de las lisinas contenidas en la proteína.[7] Actualmente las técnicas existentes han avanzado hasta la obtención de PEGs capaces de ser unidos a otros grupos funcionales de la proteína y de manera totalmente específica en algunos casos.

Si hablamos de la PEGuilación de proteínas a través de los grupos aminos libres contenidos en la proteína se ha avanzado hasta conseguir que la unión del PEG a la proteína sea selectiva. Por ejemplo, la proteína PEGuilada que compone el principio activo de Neulasta (tabla 2) se encuentra PEGuilada selectivamente a través de su **extremo N-terminal**. Esto se consigue aprovechando la diferencia de pKa que se da entre los grupos aminos de los residuos de lisina (pKa 9,3-9,5) y el extremo N-terminal (pKa 7,6-8).[50] Para que esta conjugación sea selectiva al N-terminal se realiza a un pH ácidas suaves (pH 6-6,5) empleando PEG-aldehído.[51-53]

Otro ejemplo significativo de estos conjugados de segundos generación es Cimzia, conjugado en el que la cadena de PEG se encuentra unida a través de los **tioles libres** de las cisteínas de la

proteína.[54] O más recientemente, la unión a través de **puentes disulfuros**, empleando PEGs funcionalizados adecuadamente para obtener puentes de tres miembros (S-C-S), no afectando así a la estructura de la cadena polipeptídica, ya que la distancia relativa entre este nuevo enlace y el puente disulfuro original es depreciable.[55-56] También es posible realizar la conjugación mediante enzimas específicas sobre el **C-terminal** de la proteína y las **glutaminas**, empleando sortasa o transglutaminasa (TGasa), respectivamente.[57-58] Por otro lado cabe destacar que la ingeniería genética a desarrollado procedimientos que permiten incluir **aminoácidos no naturales** con reactividades ortogonales respecto a los aminoácidos naturales que permiten la unión de PEG a cualquier punto de la superficie de la proteína.[54]



*** Cualquier posición puede ser PEGuilada mediante la incorporación de un aminoácido no natural con reactividades ortogonales con respecto a los aminoácidos naturales.**

Figura 8. *Esquema de las posiciones que pueden ser PEGuiladas en una proteína. Figura adaptada de la referencia 54.*

4.2 PEG-Molécula pequeña

Mientras que el PEG ha sido empleado con éxito en la modificación de proteínas terapéuticas, como se ha podido ver en el punto 4.1 del presente capítulo, con numerosos conjugados aprobados para su uso clínico, en cambio los conjugados de PEG con moléculas pequeñas el éxito ha sido menor. Esto es debido a que la carga de droga por unidad de PEG está muy limitada, y que debido a que el PEG es un polímero muy flexible causa, que a pesar de emplear

cadenas de PEG con un gran tamaño molecular, esto no siempre se refleja en una mayor extravasación a los tejidos tumorales por efecto EPR. Los problemas asociados a la baja relación carga droga-polímero están siendo solventados mediante la utilización de estructuras dendriméricas o PEG multi-rama.[23-24, 59-62]

La mayoría de conjugados PEG-molécula pequeña se han llevado a cabo con derivados de la campotetecina, seguramente debido al gran poder solubilizador del PEG y la poca solubilidad de la camptotecina y sus derivados (irinotecan, topotecan, exatecan, SN38 y 9-amino-camptotecina).[35]

Tabla 3. *Conjugados de PEG-molécula pequeña que han entrado en fase clínica como terapia contra el cáncer. Tabla adaptada de la referencia 35.*

Nombre	Fármaco	MW del PEG	Carga de fármaco (% w/w)	Estado desarrollo y utilidades
Pegamotecan (Prothecan)	Captotecina	40 KDa (diol)	1,7	Fase II (suspendido), adenocarcinoma gástrico o gastro-esofágico.
EZN-2208	SN38	40 KDa (PEG de 4 ramas)	3,7	Fase I.
PEG-paclitaxel	Paclitaxel	≥30 KDa	---	Fase I (suspendido).
NKTR-102	Irinotecan	PEG de 4 ramas	---	Fase II, cáncer colorectal, mama, ovárico, cervical.
NKTR-105	Docetaxel	PEG de 4 ramas	---	Fase I, tumores sólidos.

Los conjugados que encontramos en la tabla 3 son los más prometedores hasta el momento. **Pegamotecan** (Enzon Pharmaceuticals, Inc.) es una prodroga que se obtiene de la unión de dos unidades de camptotecina a un PEG diol de 40 KDa mediante un enlace éster en C-20 de la campotecina, este punto de unión disminuye la apertura de la lactona presente en la estructura cíclica de la camptotecina, hecho que provoca la pérdida total de su actividad farmacológica.[63] Una gran desventaja presentada por este conjugado era la baja carga droga/polímero que tan solo alcanza el 1,7% w/w, ya que tan solo se consigue una mezcla de conjugados mono y di-camptotecina.[64] A pesar de alcanzar la fase clínica I no fue posible observar una gran mejoría respecto a la administración de este conjugado en comparación con irinotecan, y destacar también que su toxicidad era similar a la exhibida por la droga libre, por lo que se desprende que la droga sufre un rápida liberación del soporte polimérico.[64] Después de estos resultados la compañía Enzon Pharmaceuticals, Inc. decidión apostar por un nuevo conjugado más prometedor, el **EZN-2208**. En esta ocasión el conjugado EZN-2208 estaba compuesto por la unión del SN38 a través de un éster a un PEG multi-rama de cuatro brazos con un MW de 40 KDa, aumentando así la relación droga/polímero hasta el 3,7%.[62] Actualmente los estudios de este compuesto siguen en desarrollo. Enzon también ha desarrollado conjugados PEG-paclitaxel que actualmente han abandonado, pese haber alcanzado estos la fase clínica I.[35]

Otros dos conjugados muy interesantes son los desarrollados por Nektar therapeutics, los compuestos **NKTR-102** y **NKTR-105**. Ambos conjugados están compuestos por el mismo PEG multi-rama de cuatro ramas, unidos a irinotecan y docetaxel respectivamente. Ambos han mostrado unos buenos resultados in vitro y se están realizando estudios de fase clínica.[65-67]

4.3 PEG como modificador de otros sistemas

Además de los conjugados en que el PEG es el vehículo principal para la administración de fármacos, podemos encontrar muchos ejemplos en la literatura en los que el PEG es empleado como modificador de otro tipo de sistemas, con el fin de aumentar la solubilidad de los mismos o para evitar que sean reconocidos por el sistema inmune.

Entre los sistemas acoplados a PEG más empleados encontramos los liposomas. Diferentes estudios demuestran que la protección de la superficie de esta clase de macromoléculas por parte de polímeros como PEG evitan el reconocimiento de estos sistemas por parte de las proteínas opsonizantes.[68-69] Para llevar a cabo la unión de los liposomas con las cadenas de PEG se suelen emplear poímeros de tipo amfifílico, para que una parte de la cadena se una al liposoma y el otro extremo hidrofílico queda expuesto al exterior. Los polímeros de PEG más empleados para este tipo de conjugación son el PEG-fosfatidil etanolamina (**PEG-PE**) y el copolímero PEG y poli(ácido láctico-co-glicólico) (**PEG-PLGA**).[68]

Entre otros en los que se usan Unidades de PEG como modificadores ejemplos encontramos dendrímeros de PAMAM PEGilados en sus extremos,[70] micelas poliméricas y partículas de oro.[71]

BIBLIOGRAFÍA

[1] R. Duncan; M.J. Vicent. "Polymer therapeutics-prospects for 21st century: The end of the beginning", *Advanced Drug Delivery Review*. **2013**, *65*, 60-70.

[2] H. Ringsdorf. "Structure and properties of pharmacologically active polymers", *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*. **1975**, *51*, 135-153.

[3] E. Markovsky, H. Baabur-Cohen, A. Eldar-Boock, L. Omer, G. Tiram, S. Ferber, P. Ofek, D. Polyak, A. Scomparin, R. Satchi-Fainaro. "Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics", *Journal of Controlled Release*. **2012**, *161*, 446-460.

[4] R. Duncan, R. Gaspar. "Nanomedicine(s) under microscope", *Molecular Pharmaceutics*. **2011**, *8*, 2101-2141.

[5] M.J. Vicent, H. Ringsdorf, R. Duncan. "Polymer therapeutics: Clinical applications and challenges for development". *Advanced Drug Delivery Review*. **2009**, *61*, 1117-1120.

[6] www.fda.gov

[7] J.M. Harris, R.B. Chess. "Effect of pegylation on pharmaceuticals". *Nature Reviews: Drug Discovery*. **2003**, *2*, 214-221.

[8] F.M. Veronese, G. Pasut. "Chapter 5.45: Drug-polymer conjugates". En J.B. Taylor, D.J. Triggle, *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier Ltd, **2004**.

[9] A. Abuchowski, J.R. Mccoy, N.C. Palczuk, T. Van Es, F.F. Davis. "Effect of Covalent Attachment of Polyethylene Glycol on Immunogenicity and Circulating Life of Bovine Liver Catalase", *The Journal of Biological Chemistry*. **1977**, *252*, 3582-3586.

[10] B.N. Manjula, A. Tsai, R. Upadhya, K. Perumalsamy, P.K. Smith, A. Malavalli, K. Vandegriff, R.M. Winslow, M. Intaglietta, M. Prabhakaran, J.M. Friedman, A.S. Acharya. "Site-Specific PEGylation of Hemoglobin at Cys-93(β): Correlation between the Colligative Properties of the PEGylated Protein and the Length of the Conjugated PEG Chain", *Bioconjugate Chem*istry. **2003**, *14*, 464-472.

[11] P.K. Working, M.S. Newman, J. Johnson, J.B. Cornacoff. "Chapter 4: Safety of Poly(ethylene glycol) and Poly(ethylene glycol) Derivatives". En J.M. Harris, S. Zalipsky *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications.* ACS Books, **1997**.

[12] S. Zalipsky, J.M. Harris. "Chapter 1: Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly (ethylene glycol)". En J.M. Harris *Chemistry and Biological Applications of Polyethylene Glycol*. American Chemical Society Symposium Series 680, **1997**.

[13] G. Pasut, A. Guiotto, F.M. Veronese. "Protein, peptide and non-peptide drug PEGylation for therapeutic application", *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **2004**, *14*, 859-894.

[14] C. Monfardini, O. Schiavon, P. Caliceti, M. Morpurgo, J.M. Harris, F.M. Veronese. "A branched monomethoxypolyethylene glycol for protein modification", *Bioconjugate Chemistry.* **1995** , *6*, 62-69.

[15] A. Kozlowski, S.A. Charles, J.M. Harris. "Development of pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C", *BioDrugs*. **2001**, *15*, 419-429.

[16] J. Kopeček. "Polymer-drug conjugates: Origins, progress to date and future directions", *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2013**, *65*, 49-59.

[17] D. Taton, M. Saule, J. Logan, R. Duran, S. Hou, E.l. Chaikof, Y. Gnanou. "Polymerization of Ethylene Oxide with a Calixarene-Based Precursor: Synthesis of Eight-Arm Poly(ethylene oxide) Stars by the Core-First Methodology", *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. **2003**, *41*, 1669-1676.

[18] E.P. Wasserman, I.Annis, L.J. Chopin, P.C. Price, J.L. Petersen, K.A. Abboud. "Ethylene Oxide Polymerization Catalyzed by Aluminum Complexes of Sulfur-Bridged Polyphenols", *Macromolecules.* **2005,** *38,* 322-333.

[19] G. Cheng , X. Fan, W. Tian, Y. Liu, G. Liu. "Study on anionic polymerization of ethylene oxide initiated by ammonium/triisobutylaluminum", *Journal of Polymer Research*. **2010**, *17*, 529-534.

[20] J. Zhao, D. Pahovnik, Y. Gnanou, N. Hadjichristidis. "Phosphazene-Promoted Metal-Free Ring-Opening Polymerization of Ethylene Oxide Initiated by Carboxylic Acid", *Macromolecules*, **2014**, *47*, 1693-1698.

[21] J.M. Dust, Z.H. Fang, J.M. Harris. "Proton NMR characterization of Poly(ethylene glycols) and derivatives", *Macromolecules*. **1990**, *23*, 3742-3746.

[22] F.M. Veronese, P. Caliceti, O. Schiavon. "Branched and Linear Poly(Ethylene Glycol): Influence of the Polymer Structure on Enzymological, Pharmacokinetic, and Immunological Properties of Protein Conjugates", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. **1997**, *12*, 196-207.

[23] Y.H. Choe, C.D. Conover, D. Wu, M. Royzen, R.B. Greenwald. "Anticancer drug delivery systems: N -acyl poly(ethyleneglycol) prodrugs of ara-C I. Efficacy in solid tumors", *Journal of Controlled Release*. **2002**, *79*, 41-53.

[24] O. Schiavon, G. Pasut, S. Moro, P. Orsolini, A. Guiotto, F.M. Veronese. "PEG–Ara-C conjugates for controlled release", *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**, *39*, 123-133.

[25] T. Yamaoka, Y. Tabata, Y. Ikada. "Fate of water-soluble polymers administered via different routes", *Journal of Pharmaceutical Science*. **1995**, *84*, 349-354.

[26] E. Lee, J. Lee, S. Jon. "A novel approach to oral delivery of insulin by conjugating with low molecular weight chitosan", *Bioconjugate Chemistry*. **2010**, *21*, 1720-1723.

[27] H. Maeda. "Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond", *Journal of Controlled Release*. **2012**, *164*, 138-144.

[28] J. Folkman. "Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?", *Nature Reviews Drug Discovery*. **2007**, *6*, 273-286.

[29] J. Sanchis, F. Canal, R. Lucas, M.J. Vicent. "Polymer–drug conjugates for novel molecular targets", *Nanomedicine*. **2010**, *5*, 915-935.

[30] F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, O.C. Farokhzad. "Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles", *Molecular Pharmaceutics*. **2008**, *5*, 505-515.

[31] T. Schluep, J. Cheng, K.T. Khin, M.E. Davis. "Pharmacokinetics and biodistribution of the camptothecin-polymer conjugate IT-101 in rats and tumor-bearing mice", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. **2006**, *57*, 654-662.

[32] S.D. Perrault, C. Walkey, T. Jennings, H.C. Fischer, W.C.W. Chan. "Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design", *Nano Letters*. **2009**, *9*, 1909-1915.

[33] Y. Geng, P. Dalhaimer, S.S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko, D.E. Discher. "Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery", Nature Nanotechnoly. 2007, 2, 249-255.

[34] M. Saad, O.B. Garbuzenko, E. Ber, P. Chandna, J.J. Khandare, V.P. Pozharov, T. Minko. "Receptor targeted polymers, dendrimers, liposomes: which nanocarrier is the most efficient for tumor-specific treatment and imaging?", *Journal of Controlled Release*. **2008**, *130*, 107-114.

[35] G. Pasut, F.M. Veronese. "PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: an overview", *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2009**, *61*, 1177-1188.

[36] A. Gabizon, F. Martin. "Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours", *Drugs*. **1997**, *54*, 15-21.

[37] A.W. Richter, E. Akerblom. "Polyethylene-glycol reactive antibodies in man: Titer distribution in allergic patients treated with monomethoxy polyethylene-glycol modified allergens or placebo, and in healthy blood-donors", *International Archives of Allergy and Immunology*. **1984**, *74*, 36-39.

[38] J.K. Armstrong, G. Hempel, S. Koling, L.S. Chan, T. Fisher, H.J.Meiselman, G. Garratty. "Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients", *Cancer*. **2007**, *110*, 103-111.

[39] N.J. Ganson, S.J. Kelly, E. Scarlett, J.S. Sundy, M.S. Hershfield. "Control of hyperuricemia in subjects with refractory gout, and induction of antibody against poly(-ethylene glycol) (PEG), in a phase I trial of subcutaneous PEGylated urate oxidase", *Arthritis Research & Therapy*. **2006**, *8*, R12.

[40] A.A. van der Eijk, J.M. Vrolijk, B.L. Haagmans. "Antibodies neutralizing peginterferon alfa during retreatment of hepatitis C", *The New England Journal of Medicine*. **2006**, *354*, 1323-1324.

[41] M. Pidaparti, B. Bostrom. "Comparison of allergic reactions to Pegasparaginase given intravenously versus intramuscularly", *Pediatric Blood & Cancer*. **2011**, *59*, 436-439.

[42] C. Fruijtier-Polloth. "Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products", *Toxicology*. **2005**, *214*, 1-38.

[43] R. Webster, E. Didier, P. Harris, N. Siegel, J. Stadler, L. Tilbury, D. Smith. "PEGylated Proteins: Evaluation of Their Safety in the Absence of Definitive Metabolism Studies", *Drug Metabolism and Disposition*. **2007**, *35*, 9-16.

[44] C. Conover, L. Lejeune, R. Linberg, K. Shum, R.G.L. Shorr. "Transitional vacuole formation following a bolus infusion of PEG-hemoglobin in the rat". *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*. **1996**, *24*, 599-611.

[45] A. Bendele, J. Seely, C. Richey, G. Sennello, G. Shopp. "Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins", *Toxicological Sciences*. **1998**, *42*, 152-157.

[46] D.G. Rudmann, J.T. Alston, J.C. Hanson, S. Heidel. "High molecular weight polyethylene glycol cellular distribution and peg-associated cytoplasmic vacuolation is molecular weight dependent and does not require conjugation to proteins", *Toxicologic Pathology*. **2013**, *41*, 970-983.

[47] A. Baumann, D. Tuerck, S. Prabhu, L. Dieckmann, J. Sims. "Pharmacokinetics, metabolism and distribution of PEGs and PEGylated proteins: quo vadis?", *Drug Discovery Today*. **2014**, *19*, 1623-1631.

[48] A. Abuchowski, T. Van Es, N.C. Palczuk, F.F. Davis. "Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol", *The journal of the Biological Chemistry*. **1977**, *252*, 3578-3581.

[49] F.M. Veronese, G. Pasut. "PEGylation,successful approach to drug delivery", *Drug Discovery Today*. **2005**, *10*, 1451-1458.

[50] G. Pasut, F.M. Veronese. "State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research", *Journal of Controlled Release*. **2012**, *161*, 461-472.

[51] O.B. Kinstler, D.N. Brems, L.S. Lauren, A.G. Paige, J.B. Hamburger, M.J. Treuheit. "Characterization and stability of N-terminally pegylated rhG-CSF", *Pharmaceutical Research*. **1995**, *13*, 996-1002.

[52] J. Hu, W. Sebald. "N-terminal specificity of PEGylation of human bone morphogenetic protein-2 at acidic pH", *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, 413, 140-146.

[53] J. Wang, T. Hu, Y. Liu, G. Zhang, G. Ma, Z. Su. "Kinetic and stoichiometric analysis of the modification process for N-terminal PEGylation of staphylokinase", *Analytical Biochemistry*. **2011**, *412*, 114-116.

[54] G. Pasut, F.M. Veronese. "State of art in PEGylation: The great versatility achieves after forty years of research", *Journal of Controlled Release*. **2012**, *161*, 461-472.

[55] S. Shaunak, A. Godwin, J.W. Choi, S. Balan, E. Pedone, D. Vijayarangam, S. Heidelberger, I. Teo, M. Zloh, S. Brocchini. " Site-specific PEGylation of native disulfide bonds in therapeutic proteins", *Nature Chemical Biology*. **2006**, *2*, 312-313.

[56] S. Balan, J.W. Choi, A. Godwin, I. Teo, C.M. Laborde, S. Heidelberger, M. Zloh, S. Shaunak, S. Brocchini. "Site-specific PEGylation of protein disulfide bonds using a three-carbon bridge", *Bioconjugate Chemistry*. **2007**, *18*, 61-76.

[57] A. Fontana, B. Spolaore, A. Mero, F.M. Veronese. "Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase", *Advanced Drugs Delivery Reviews*. **2008**, *60*, 13-28.

[58] M.W. Popp, S.K. Dougan, T.Y. Chuang, E. Spooner, H.L. Ploegh. "Sortase-catalyzed transformations that improve the properties of cytokines", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2011**, *108*, 3169-3174.

[59] G. Pasut, F. Canal, L. Dalla Via, S. Arpicco, F.M. Veronese, O. Schiavon. "Antitumoral activity of PEG-gemcitabine prodrugs targeted by folic acid", *Journal of Controlled Release*. 2008, *127,* 239-248.

[60] M. Zacchigna, F. Cateni, S. Drioli, G.M. Bonora. "Multimeric, Multifunctional Derivatives of Poly(ethylene glycol)", *Polymers*. **2011**, *3*, 1076-1090.

[61] L. Simón-Gracia, D. Pulido, C. Sevrin, C. Granfils, F. Albericio, M. Royo. "Biocompatible, multifunctional, and well-defined OEG-based dendritic platforms for biomedical applications", *Organic&Biomolecular Chemistry*. **2013**, *11*, 4109-4121.

[62] H. Zhao, B. Rubio, P. Sapra, D. Wu, P. Reddy, P. Sai, A. Martinez, Y. Gao, Y. Lozanguiez, C. Longley, L.M. Greenberger, I.D. Horak. "Novel Prodrugs of SN38 Using Multiarm Poly(ethylene glycol) Linkers", *Bioconjugate chemistry*. **2008**, *19*, 849-859.

[63] H. Zhao, C. Lee, P. Sai, Y.H. Choe, M. Boro, A. Pendri, S. Guan, R.B. Greenwald. "20-*O*-Acylcamptothecin Derivatives: Evidence for Lactone Stabilization", *Journal of Organic Chemistry*. **2000**, *65*, 4601-4606.

[64] E.K. Rowinsky, J. Rizzo, L. Ochoa, C.H. Takimoto, B. Forouzesh, G. Schwartz, L.A. Hammond, A. Patnaik, J. Kwiatek, A. Goetz, L. Denis, J. McGuire, A.W. Tolcher. "A Phase I and Pharmacokinetic Study of Pegylated Camptothecin as a 1-Hour Infusion Every 3 Weeks in Patients With Advanced Solid Malignancies", *Journal of Clinical Oncology*. **2003**, *21*, 148-157.

[65] M.A. Eldon, C.M. Staschen, T. Viegas, M. Bentley. "NKTR-102, a novel PEGylatedirinotecan conjugate, results in sustained tumor growth inhibition in mouse models of human colorectal and lung tumors that is associated with increased and sustained tumor SN38 exposure", *AACR-NCI-EORTC International Conference*, San Francisco, **2007** poster C157. https://www.nektar.com/pdf/pipeline/NKTR-102/NKTR-102_aacr_preclinical_pkpd_c157.pdf

[66] D.D. Von Hoff, G.S. Jameson, M.J. Borad, L.S. Rosen, J. Utz, M. Basche, C. Alemany, S. Dhar, L. Acosta, T. Barker, J. Walling, J.T. Hamm. "First phase I trial of NKTR-102 (PEG-Irinotecan) reveals early evidence of broad anti-tumour activity in three different schedules", *20th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics*, Geneva, Switzerland, **2008** poster # 595. https://www.nektar.com/pdf/pipeline/NKTR-102/NKTR-102_poster_595.pdf

[67] R. Wolff, S. Routt, R. Hartsook, J. Riggs, W. Zhang, H. Persson, R. Johnson. "NKTR-105, a novel PEGylated-docetaxel demonstrates superior anti-tumor activity compared to docetaxel in human non-small cell lung and colon cancer xenografts", *20th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics*. Geneva, Switzerland, **2008** poster # 448.

[68] V.P. Torchilin, V.S. Trubetskoy. "Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating?", *Advanced Drug Delivery Reviews*. **1995**, *16*, 141-155.

[69] V.P. Torchilin, M.I. Papisov. "Why do polyethylene glycol-coated liposomes circulate so long?: Molecular Mechanism of Liposome Steric Protection with Polyethylene Glycol: Role of Polymer Chain Flexibility", *Journal of Liposome Research*. **1994**, *4*, 725-739.

[70] S. Thakur, P. Kesharwani, R.K. Tekade, N.K. Jain. "Impact of PEGylation on biopharmaceutical properties of dendrimers", *Polymer*. **2015**, *59*, 67-92.

[71] H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka. " PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications", *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2012**, *64*, 246-255.

OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

1. La síntesis de plataformas dendriméricas basadas en oligoetilenglicol de talla definida, su empleo como plataformas de liberación para el fármaco 5-Fluorouracilo, y la posterior evaluación *in vitro* e *in vivo* de las mismas.

2. La síntesis de plataformas dendriméricas basadas en oligoetilenglicol de talla definida y su empleo como plataformas de liberación para el fármaco SN38. Síntesis de sistemas de oligoetilenglicol compuestos por una cadena lineal unidos al fármaco SN38, con y sin péptido director, y la posterior evaluación *in vitro* e *in vivo* de las mismas.

3.1 PEGilación de la proteína α-Galactosidasa A, en presencia o no de péptidos directores, y la posterior evaluación *in vitro* e *in vivo* de las mismas.

3.2 Diseño y síntesis de un derivado de colesterol unido a una cadena de oligoetilenglicol de talla definida unida a un péptido director con la finalidad de ser incluída como cparte constituyente de un lisosoma basado en colesterol:DPPC.

NANOCONJUGADOS 5FU

Contribuciones a este capítulo: *Los productos* ***17****,* ***19*** *y* ***20*** *fueron sintetizados por la Dra. Lorena Simón, en el desarrollo de su tesis doctoral. Todos los ensayos in vitro e in vivo descritos en este capítulo fueron realizados por el grupo de Drug Delivery and Targetting que lidera el Dr. Simó Schwartz y la plataforma de Functional Validation and Preclinical Research que dirige la Dra. Ibane Abasolo (CIBBIM, Instituto de investigación del Hospital Vall de Hebrón).*

INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años se han realizado grandes esfuerzos para dilucidar las rutas metabólicas y los distintos procesos biológicos implicados en la aparición y desarrollo del cáncer. Durante el empeño de esta tarea se ha establecido una estrecha colaboración entre las diferentes comunidades involucradas, clínica, farmacéutica e investigación básica, con el fin de desarrollar nuevos tratamientos más seguros y eficaces. Esto ha provocado que se haya abandonado la estrategia clásica de desarrollar nuevos agentes citotóxicos inespecíficos de amplio espectro para abordar una nueva vía de desarrollo de agentes que actúen sobre moléculas dianas o rutas metabólicas específicas que presenten un comportamiento aberrante en las células cancerígenas. La estrategia de actuar preferentemente sobre alteraciones tumorales específicas ha dado lugar a nuevos tratamientos eficaces, como por ejemplo el caso del imatinib, un inhibidor de la tirosina quinasa ABR-ABL, que se usa en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (chronic myeloid leukaemia, CML).[1] A pesar de estos nuevos avances, esta estrategia más focalizada no es completamente nueva y se considera a Farber y Heidelberger, cuya investigación dio lugar al descubrimiento de quimioterapéuticos cuya diana es la **timidilato sintasa** (TS), unos pioneros. Estos agentes antitumorales cuya diana de acción es la TS continúan formando parte de los tratamientos más efectivos en la actualidad en diversos tipos de cánceres.[1]

1. Timidilato sintasa.

La timidilato sintasa (TS) es una enzima que cataliza la reacción de metilación reductiva de desoxiuridilato (dUMP) mediante 5,10-metilenotetrahidrofolato, para dar lugar al monofosfato de desoxitimidina (dTMP) y dihidrofolato El dTMP obtenido es posteriormente fosforilado para dar lugar a **trifosfato de desoxitimidina** (**dTPP**; figura 1.1) y el dihidrofolato se recicla para obtener nuevamente 5,10-metilenotetrahidrofolato. El dTPP es un precursor esencial para la replicación y reparación del ADN y esta ruta metabólica es la única fuente intracelular de dTPP. Una disminución de timina (base nitrogenada que compone el dTPP) da lugar a al llamado **estrés por ausencia de timina** (**TLS**, timineless stress), esta situación si ocurre de manera prolongada, da lugar a la muerte celular mediante un mecanismo aún desconocido, del cual sólo se tiene conocimiento que provoca la incorrecta incorporación de uracilo, en vez de timina, en algunos puntos del ADN. Esto da lugar a un mal empaquetamiento del ADN, siendo esto una causa habitual del TLS.[2] Por lo tanto la inhibición de la enzima TS se traduce en la reducción de la síntesis de dTPP, necesaria para la replicación y reparación del ADN, generando TLS y un acumulo de dUMP, substrato de la TS en la célula, que también provocaría daños en el ADN.[3]

La TS se encuentra sobrexpresada en numerosos tipos de tumores y es considerada como agente oncogénico y el motivo por el cual es considerada diana terapéutica para el tratamiento del cáncer, especialmente aquellos de tipo gastrointestinal.[2] Este hecho está

relacionado con una segunda ruta metabólica controlada por la TS, donde ésta en su forma inactiva es capaz de unirse a mARN.[4] En el caso de que se uniera a TSmARN provocaría una sobreexpresión de TS, pero también es posible que se una a p53mARN, proteína estrechamente relacionada con la muerte celular, provocando una disminución de la expresión de la proteína p53.[5]

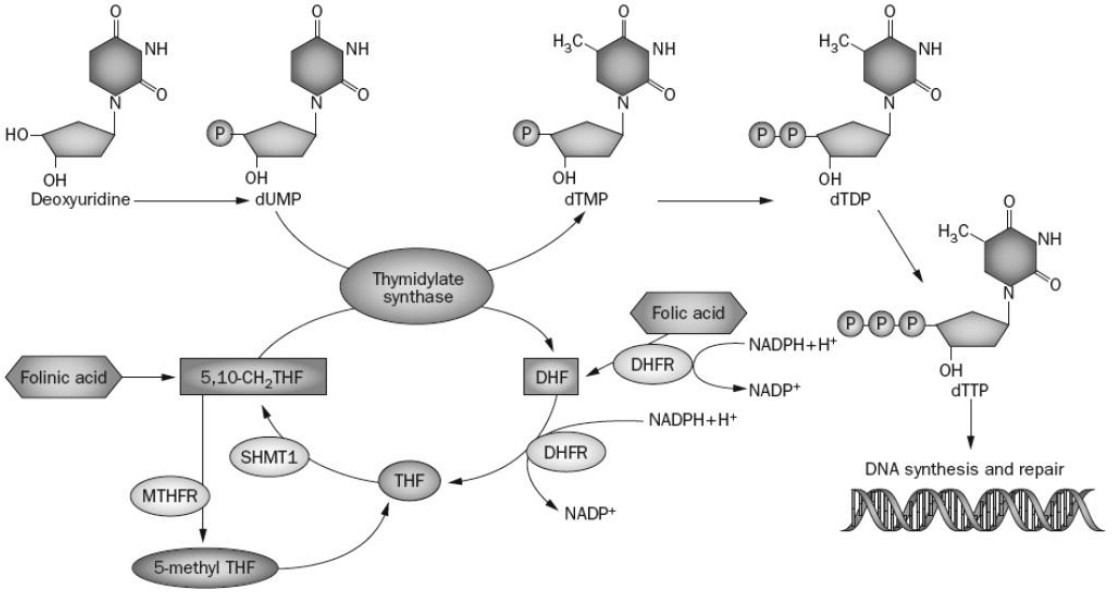


Figura 1.1. *Vía metabólica de la timidilato sintasa. Abreviaciones: 5,10-CH_2THF, 5,10-metilenotetrahidrofolato; 5-methyl THF, 5-metiltetrahidrofolato; DHF, dihidrofolato; DHFR, dihidrofolato reductasa; dTDP, difosfato de desoxitimidina; dTMP, monofosfato de desoxitimidina; dTPP, trifosfato de desoxitimidina; dUMP; monofosfato de desoxiuridilato; MTHFR, tetrahidrofolato de metilo reductasa; SHM1, hidroximetil serina tranferasa; THF, tetrahidrofolato. Figura extraída de la referencia 1.*

La timidilato sintasa presenta una estructura de homodímero en su forma activa, cada subunidad contiene dos centros activos, el sitio de unión para el nucleótido (dUMP) y el del folato (5,10-metilenotetrahidrofolato). Los inhibidores de la TS actúan principalmente en estos sitios de unión y se dividen en dos tipos de compuestos estructuralmente muy diferenciados: los análogos de los folatos (antifolatos) y las fluoropirimidinas.

Una prueba del valor de la TS como diana terapéutica es el gran número de fármacos aprobados para su uso en el tratamiento de tumores que actúan principalmente sobre esta enzima (tabla 1.1).

Tabla 1.1 *Agentes antitumorales que actúan directamente o indirectamente sobre la TS. Tabla adaptada de la referencia 1.*

Agente terapéutico	Clase	Componente activo	Diana primaria y mecanismo *	Coadministración	Indicaciones **
5FU	Fluoropirimidina	5FU	Inhibición de la TS; incoporación de los metabolitos fluorados en ARN y ADN.	Ácido folínico para aumentar la inhibición de la TS.	CRC, cáncer de estomago, células escamosas de cabeza y cuello, mama y páncreas, queratosis actínica y carcinoma de células basales.
FUdR	Fluoropirimidina	FUdR ***	Inhibición de la TS; incoporación de los metabolitos fluorados en ARN y ADN.	---	Cáncer de hígado metastásico.
Capecitabine	Fluoropirimidina	5FU	Inhibición de la TS; incoporación de los metabolitos fluorados en ARN y ADN.	---	CRC, cáncer de estomago y mama.
S-1 (tegafur, CDHP y oxonato de potasio)	Fluoropirimidina	5FU	Inhibición de la TS; incoporación de los metabolitos fluorados en ARN y ADN.	CDHP para prevenir la degradación hepática por DPD. Oxonato de potasio para paliar la toxicidad gastrointestinal.	CRC, NSCL, cáncer de mama metastásico, cabeza y cuello, páncreas y tracto biliar.
Tegafur-uracilo	Fluoropirimidina	5FU	Inhibición de la TS; incoporación de los metabolitos fluorados en ARN y ADN.	Uracil para prevenir la degradación hepática por DPD. Ácido folínico para aumentar la inhibición de la TS.	CRC, cáncer de pulmón, mama, estomago, cabeza y cuello, hígado, vesícula biliar, conducto biliar, páncreas, vesícula, próstata y cervical.
Pemetrexed	Antifolato	Poliglutamato de Pemetrexed	Inhibición de TS, GART, AICART y DHFR.	Pretratamiento con vitamina B12 y ácido fólico para paliar la toxicidad.	NSCLC y mesotelioma.
Raltitrexed	Antifolato	Poliglutamato de Raltitrexed	Inhibición de TS.	---	CRC y mesotelioma.
Metotrexato	Antifolato	Poliglutamato de Metotrexato	Inhibición de TS y DHFR.	Ácido folínico seguido de una dosis alta de metotrexato para paliar la toxicidad.	Leucemia aguda linfoblástica, linfoma de células T y no-Hodgkin, osteosarcoma, cáncer de cabeza y cuello, pulmón y mama.
Pralatrexato	Antifolato	Poliglutamato de Pralatrexato	Inhibición de DHFR.	Pretratamiento con vitamina B12 y ácido fólico para paliar la toxicidad.	Linfoma de células T.

* Ésta no es una lista exhaustiva sobre las dianas primarias y su mecanismo. ** Las indicaciones están referidas a USA, Europa, Canadá, Australia y Japón. *** En algunos casos, 5FUdR puede ser rápidamente metabolizado en tejidos tumorales a 5FU por la timina fosforilasa. Abreviaciones: 5FU, 5-Fluorouracilo; AICART, carboxamida de fosforibosilaminoimidazol formiltranferasa; CDHP, 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina; CRC, cáncer colorrectal; DHFR, dihidrofolato reductasa; DPD, dihidropirimidina deshidrogenasa; FUdR, fluorodesouridina; GART, fosforibosilglicinamida formiltransferasa; NSCLC, cáncer de pulmón de células no pequeñas (non-small-cell lung cáncer); TS, timidilato sintasa.

2. Inhibidores de la timidilato sintasa.

Como ya se ha mencionado anteriormente, existen dos clases de inhibidores de la timidilato sintasa: los antifolatos y las fluoropirimidinas. Cada tipo de compuesto actúa específicamente en el correspondiente centro activo de la TS como el del tetrahidrofolato, en el caso de los antifolatos, y el del dUMP, en el caso de las fluoropirimidinas (figura 1.2). El modo de acción de cada familia de compuestos se explicará detalladamente en los siguientes apartados de este capítulo, prestando especial atención a los derivados de fluoropirimidinas y en concreto al 5-Fluorouracilo (5FU).

a) **b)**

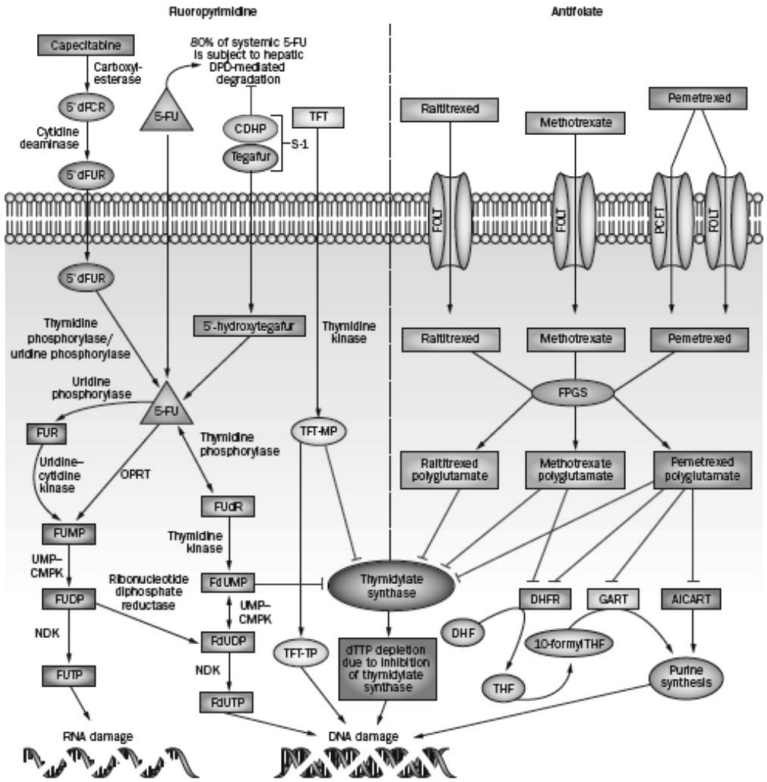


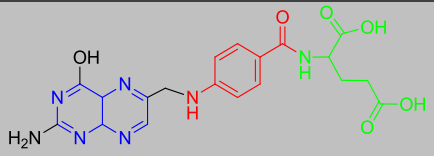
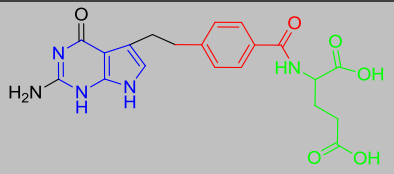
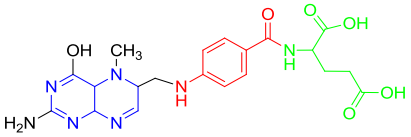
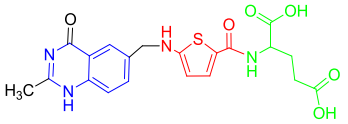
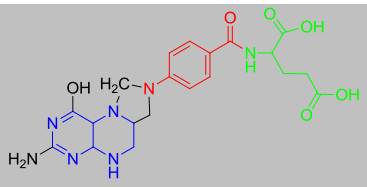
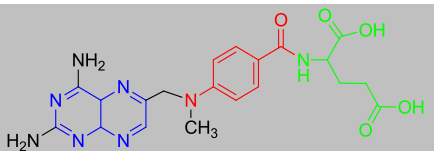
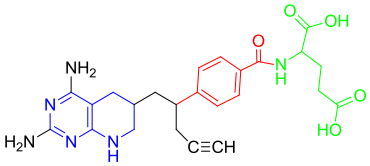
Figura 1.2 *Mecanismo de acción de las fluoropirimidinas (a) y los antifolatos (b). Abreviaciones: 5'dFCR, 5'desoxi-5-fluorocitidina; 5'dFUR, 5'-desoxi-5-fluorouridina; 5-FU, 5-Fluorouracilo; 10-formyl THF, 10-formiltetrahidrofolato; AICAR, carboxamida de fosforibosilaminoimidazol formiltranferasa; CDHP, 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina; DHF, dihidrofolato; DHFR, dihidrofolato reductasa; DPD, dihidropirimidina deshidrogenasa; dTPP, trifosfato de desoxitimidina; dUTP, trifosfato de desoxiuridina; dUTPase, desoxiuridina trifosfatasa; FdUDP, difosfato de fluorodesoxiuridina; FdUMP, monofosfato de fluorodesoxiuridina; FdUTP, trifosfato de fluorodesoxiuridina; FOLT, transportador de folatos 1; FPGS, folipoliglutamato sintetasa; FUDP, difosfato de fluorouridina; FUdR; 5'-fluorodesoxiuridina; FUMP; monofosfato de fluoridina; FUR, fluoridina; FUTP, trifosfato de fluoridina; GART, fosforribosilglicinamida formiltransferasa; NDK, polinucleótido quinasa; OPRT, orotato fosforribosiltransferasa; PCFT, transportador de folato unido a protón; S-1, combinación de CDHP y tegafur; TFT, trifluorotimidina; TFT-MP, monofosfato de trifluorotimidina; TFT-TP, trifosfato de trifluorotimidina; THF, tetrahidrofolato; TS,*

timidilato sintasa; UCK, uridina-citidina quinasa; UMP-CMPK, monofosfato de uridina-monofosfato de citindina quinasa. Figura extraída de la referencia 1.

2.1. Antifolatos

Los folatos son vitaminas B_9 que actúan como donadores de carbono en múltiples procesos biológicos, incluyendo la biosíntesis de *novo* de purinas y de timidilato, el metabolismo de aminoácidos y en reacciones de metilación. Debido al importante papel que juegan los folatos en rutas metabólicas indispensables, en los últimos 65 años se han desarrollado un gran número de antifolatos, moléculas que inhiben las rutas metabólicas en las que participan los folatos, para el tratamiento de un gran número de enfermedades: cáncer, infecciosas de origen microbiano o parasitario y enfermedades inflamatorias crónicas.[6] Los folatos constan de tres componentes estructurales químicos muy diferenciados: un anillo de pteridina, ácido *p*-aminobenzóico (PABA) y un residuo de glutamato (tabla 1.2).

Tabla 1.2 *Estructura química de los folatos participantes en el ciclo metabólico de la TS (figura 1.1) y de los antifolatos empleados como inhibidores de la TS en el tratamiento de cáncer. En la estructura química encontramos destacados cada uno de los componentes estructurales de los folatos y los análogos correspondientes a estos en los antifolatos: en azul, anillo de pteridina; en rojo, ácido p-aminobenzóico; y en verde, residuo de glutamato.*

Folatos del ciclo de la TS	Antifolatos inhibidores de la TS
 **Ácido fólico**	 Pemetrexed
 **5-metil-THF**	 Raltitrexed
 **5,10-CH_2-THF**	 Metrotexato
	 Pralatrexato

La importancia de los folatos en el desarrollo del cáncer fue demostrada ya en 1948 por Farber y Diamond al observar en un grupo de niños con leucemia aguda una aceleración de la enfermedad cuando se les administraba previamente ácido fólico. [7] Propusieron que este efecto podía ser reversible usando antagonistas del ácido fólico como tratamiento, desarrollando el primer antifolato (aminopterina), obteniendo la remisión de la leucemia en 10 de los 16 niños tratados con aminopterina. [7] Estos resultados propiciaron el desarrollo de nuevos antifolatos aptos para el tratamiento del cáncer (tabla 1.1 y tabla 1.2).

El mecanismo de inhibición de la TS por parte de los antifolatos se encuentra descrito en la figura 1.2, b. Los antifolatos más conocidos (Pemetrexed, Raltitrexed, Metrotexato y Pralatrexato) entran al interior de la célula a través de distintos transportadores de folatos; el transportador de folatos (folate transporter, FOLT) también conocido como transportador de folato reducido (reduced folate carrier protein, RFCP) y el transportador de folato unido a protón (proton-coupled folate transporter, PCFT). Una vez en el interior de la célula se activa una cascada metabólica en la que estos compuestos son poliglutamados mediante la folil-poliglutamato sintetasa (folylpolyglutamate synthetasa, FPGS) convirtiéndose de esta manera en potentes agentes inhibidores de la TS y en algunos casos (Metrotexato, Peremetrex y Palatrexato) de la dihidrofolato reductasa (dyhydrofolate reductasa, DHFR). De esta manera se observa la disminución de dTPP en la célula como resultado de la inhibición de la TS y el ciclo de reciclaje de folato. También es posible observar la inhibición de la síntesis de purina, ruta metabólica en la que participa activamente el folato.[1]

A pesar de la eficacia de los antifolatos como antitumorales se ha demostrado que existen varios mecanismos de resistencia desarrollados por las células para minimizar el efecto de los mismos. Entre destaca la pérdida de actividad de los transportadores de folatos, provocando una menor entrada de los antifolatos en la célula mediante la disminución de la expresión de la proteína FOLT y otros transportadores de folatos o la mutación de los mismos para reducir así su afinidad con los antifolatos.[1,6,8] Al efecto de la disminución de la entrada de los antifolatos se debe sumar también el efecto causado por la mutación y sobreexpresión de la TS (similar en el caso de la fluoropirimidinas), una mayor entrada de tetrahidrofolato, la sobreexpresión y mutación de la DHFR para disminuir la afinidad con los antifolatos (esencial en el ciclo de reciclado del dihidrofolato a tetrahidrofolato) y una disminución de la expresión o mutación de la FPGS para disminuir su afinidad con los antifolatos (enzima indispensable para la formación de los antifolatos poliglutamados, verdadera especie activa).[8]

2.2. Fluoropirimidinas

La fluoropirimidina más conocida y estudiada es el 5-Fluorouracilo (5FU), fue sintetizada por primera vez en 1957 por Heidelberger [9] y esta considera como uno de los primeros ejemplos del diseño racional de fármacos. El diseño racional del 5FU se basó en cuatro premisas:[10] la substitución de un átomo de hidrogeno por un átomo de flúor, que conlleva un cambio en las

propiedades fisicoquímicas y farmacológicas;[1,10] la prometedora actividad antitumoral que presentaban algunos derivados de ácidos nucleicos;[1] el hecho de que anteriormente se había reportado que el tejido tumoral de rata incorporaba más uracilo a su ADN en comparación a tejido sano;[11] y por último los resultados de estudios preliminares de derivados sintéticos del uracilo que mostraban actividad antitumoral.[12] Tomando en consideración todo ello, Heilderberger y colaboradores realizaron la síntesis de una familia de uracilos fluorados, que presentaban una prometedora actividad antitumoral, entre los cuales destaca el 5FU. Prueba del valor farmacológico de este compuesto en el tratamiento del cáncer es el hecho de que se ha mantenido como agente quimioterapéutico de amplio espectro durante más de 60 años.

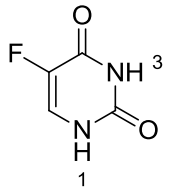


Figura 1.3 *Estructura del 5-Fluorouracilo. El 5FU es un análogo del uracilo con un átomo de flúor en la posición 5 del anillo, en lugar de un átomo de hidrogeno.*

Como se ha mencionado anteriormente el 5FU es ampliamente usado en el tratamiento de varios tipos de cáncer, como el cáncer de mama, colorrectal (CRC), páncreas, cuello y cerebro, gástrico y ovárico, de ahí que se le considere un agente antitumoral de amplio espectro. Se ha de destacar la gran importancia del 5FU en el tratamiento del cáncer colorrectal (CRC), ya que este continúa siendo el agente terapéutico más eficaz. Se detectan cerca de 150000 nuevos casos de CRC anualmente en EEUU, mundialmente 1 millón de nuevos casos, de estos nuevos casos aproximadamente el 20% son metastásicos y se estima que el 50% de los CRC detectados en fase temprana desarrollarán metástasis.[13] La terapia con 5FU aumenta la supervivencia de pacientes con CRC en fase III (fase que se alcanza cuando el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes, pero no a otras partes del cuerpo), en cambio, la tasa de respuesta de un paciente con CRC avanzado solo llega al 10%, pudiendo aumentar al 40-50% en el caso que el 5FU se combine con otros agentes quimioterapéuticos como el Oxaliplatin o Irinotecan.[14]

2.2.1. Mecanismo de acción del 5FU

En la figura 1.2, a se detalla el mecanismo de acción y la ruta metabólica que experimentan el 5FU y algunas de sus prodrogas. Estas últimas solo difieren con respecto al 5FU en el hecho que deben ser convertidas, por acción de enzimas específicas, en 5FU. En el caso de la trifluorotimidina (TFT), cuyo mecanismo de acción también está detallado en la figura 1.2, tan solo es necesaria la acción de la timidina quinasa para convertirlo en un metabolito activo.

El mecanismo de acción del 5FU se basa principalmente en dos tipos de procesos: la inhibición de la TS y la incorporación de fluoronucleótidos en el ADN y ARN. El 5FU entra rápidamente en

la célula, mediante los canales de transporte propios del uracilo,[14] una vez en el citoplasma celular se activa una cascada metabólica que lo transforma en sus diferentes metabolitos activos (figura 1.4, a). El 5FU es convertido mediante un proceso enzimático en sus tres metabolitos activos principales: el monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), el trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) y el trifosfato de fluorouridina (FUTP). El principal mecanismo de activación del 5FU es la conversión de este en monofosfato de fluorouridina (FUMP), esta conversión se realiza directamente vía orotato fosforribosiltransferasa (OPRT) con la fosforribosil pirofosfato (PRPP) como cofactor, o indirectamente vía fluorouridina (FUR) mediante la acción secuencial de la uridina fosforilasa (UP) y la uridina quinasa (UK). En este punto, el FUMP es fosforilado en un primer momento a difosfato de fluorouridina (FUDP), el cual puede ser fosforilado de nuevo a trifosfato de fluorouridina (FUTP), o ser transformado en difosfato de fluorodesoxiuridina (FdUDP) mediante la acción de ribonucleótido reductasa (RR). El FUTP generado puede incorporarse al ARN, interrumpiendo el procesamiento normal y función normal de este a varios niveles: la inhibición del procesamiento del pre-ARNr a ARNr maduro,[15,16] interrumpir la modificación post-transcripcional del ARNt,[17,18] y el ensamblaje y actividad de los complejos ARNs/proteínas, de manera que se inhibe el "splicing" del pre-ARNm.[19,20] El FdUDP puede ser desfosforilado o fosforilado para generar los siguientes metabolitos activos: monofosfato de fluorodesouridina (FdUMP) y trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP), respectivamente. Existe una vía alternativa a través de la timidina fosforilasa y la timidina quinasa para transformar directamente el 5FU en FdUMP. Los metabolitos FdUMP y FdUTP son capaces de inhibir la TS o incorporarse al ADN, respectivamente, causando un daño irreparable en la célula.

El mecanismo de inhibición de la TS por acción del 5FU se encuentra representado en la figura 1.4, b. El metabolito del 5FU, FdUMP, se une a la TS en el centro activo correspondiente al nucleótido, formando un complejo estable terciario con la enzima y el tetrahidrofolato, CH_2THF, bloqueando así la unión del substrato dUMP y inhibiendo la síntesis de dTMP.[1-4,14] Los procesos que se desencadenan tras la inhibición de la TS no son conocidos totalmente, pero se conocen algunas de sus consecuencias. La disminución de la síntesis de dTMP conlleva la disminución de dTPP, lo cual produce alteraciones en los niveles de otros nucleótidos (dNTP) a través de varios mecanismos de compensación, estos desequilibrios en los niveles de nucleótidos afectan de manera grave la síntesis y reparación del ADN.[21] A esto se debe sumar la acumulación de dUMP, el cual puede ser transformado en dUTP; hecho especialmente importante si tenemos en cuenta que las ADN polimerasas utilizan como substrato dUTP y dTPP con igual eficiencia, y el exceso de dUTP puede dar lugar a una incorporación incorrecta de uracilo en el ADN, provocando daños en el mismo.[22,23] De todas maneras se debe tener en cuenta que esta perturbación en la síntesis de ADN por parte de un exceso de dUTP en la célula se ve profundamente afectada por los niveles de desoxiuridina trifosfatasa (dUTPase) presentes, ya que esta enzima es capaz de degradar el dUTP a dUMP, protegiendo así a la célula de los efectos de la acumulación del dUTP sobre el ADN.[24] Otra de las vías de escape de

la célula para evitar daños irreversibles por la inhibición de la TS consiste en la transformación de la timina a dTMP por acción de la timidina quinasa (TK).

a) **b)**

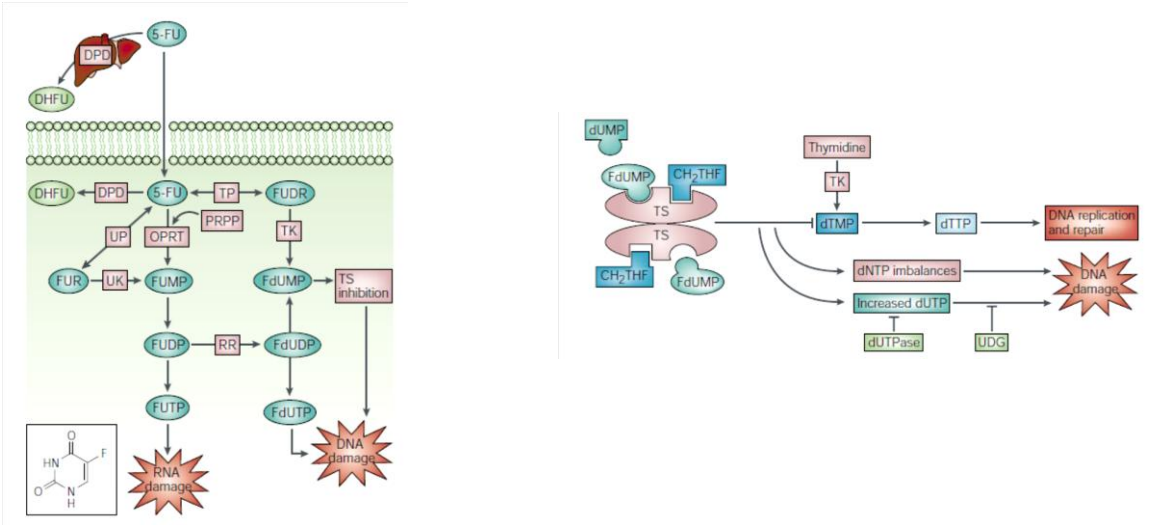


Figura 1.4 *Metabolismo del 5FU (a) y mecanismos de inhibición de la TS (b) por acción del 5FU. Abreviaciones: 5FU, 5-fluorouracilo; CH_2THF, 5,10-metilentetrahidrofolato; DHFU, dihidrofluorouracilo; dNTP, trifosfato de desoxinucleótido; DPD, dihidropirimidina deshidrogenasa; dTMP, monofosfato de desoxitimidina; dTTP, trifosfato de desoxitimidina; dUMP, monofosfato de desoxiuridina; dUTP, trifosfato de desoxiuridina; dUTPase, desoxiuridina trifosfatasa; FUDR, fluorodesoxiuridina; FdUDP, difosfato de fluorodesoxiuridina; FdUMP, monofosfato de fluorodesoxiuridina; FdUTP, trifosfato de fluorodesoxiuridina; FUDP, difosfato de fluorouridina; FUMP, monofosfato de fluorouridina; FUR, fluorouridina; FUTP, trifosfato de fluorouridina; OPRT, orotato fosforribosiltransferasa; PRPP, fosforribosil pirofosfato; RR, ribonucleótido reductasa; TK, timidina quinasa; TP, timidina fosforilasa; TS, timidilato sintasa; UDG, uracil-ADN glicosilasa; UK, uridina quinasa; UP, uridina fosforilasa. Figura extraída de la referencia 14.*

La ruta más importante de catabolismo del 5FU es llevada a cabo por la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), la cual degrada al 5FU a dihidrofluorouracilo (DHFU), inactivándolo. Normalmente, cerca del 85% del 5FU administrado es previamente catabolizado en el hígado, donde la DPD se expresa abundantemente.[25] Los catabolitos del 5FU son eliminados vía enterohepática y eventualmente a través de la orina.[26] La deficiencia de DPD es un desorden autosómico recesivo con una incidencia del 5% en los pacientes con cáncer colorrectal. Pacientes con esta deficiencia pueden experimentar una exposición prolongada al 5-FU no catabolizado, produciendo tal intolerancia que es necesario el cese de la medicación.[27]

Otra importante limitación del 5-FU, a parte de su catabolización a metabolitos inactivos, es su corto tiempo de circulación en sangre (el tiempo de vida media es de 10-20 min) y baja acumulación en el tumor.[28] Con el fin de mejorar la actividad antitumoral del 5FU se han realizado varias estrategias (tabla 1.2) como la biomodulación, un ejemplo de esta es la administración de ácido fólico junto 5FU; la administración conjunta con otros fármacos para

alcanzar un sinérgico entre ambos (administración conjunta con cisplatin, metotrexano, …); el uso de distintos métodos o rutas de administración; el desarrollo de pro-drogras, como la capecitabina o el tegafur, entre otros;[26] y en los últimos años la incorporación del 5FU a plataformas biocompatibles con el fin de mejorar su farmacocinética, es decir la formación de nanomedicinas con el 5FU como principio activo.[29] Esta última estrategia será discutida en este mismo capítulo con más detalle.

Tabla 1.2 *Estrategias empleadas para aumentar el índice terapéutico del 5FU. Tabla adaptada de la referencia 26.*

Estrategia	Ejemplos
Biomodulación	Ácido folínico, levamisole, interferon.
Interacción sinérgica	Cisplatin, metotrexano, radioterapia.
Métodos de administración	Bolo, infusión continua, cronoterapia.
Ruta de administración	Parenteral, enteral
Pro-drogas	Capecitabina, tegafur, S-1.
Nanoconjugados	Dedrímeros, PGA, liposomas.

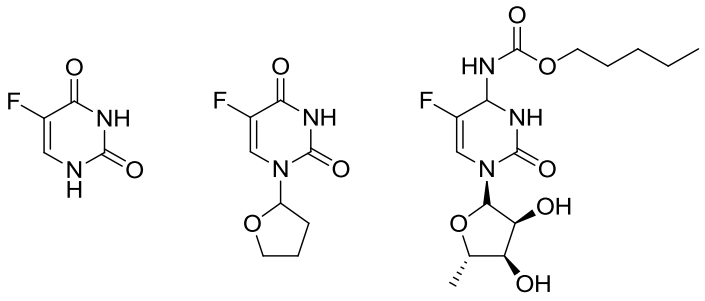
Existen diversos factores que tienen especial relevancia en la respuesta al tratamiento con 5FU. Por ejemplo, se ha observado que pacientes con una menor expresión de TS en sus tejidos tumorales presentan una respuesta más elevada al tratamiento con 5FU.[30] Esto podría parecer una contradicción, ya que el 5FU tiene como diana la TS, pero este fenómeno se explica debido a que la inhibición de la TS por parte del 5FU induce a una sobreexpresión de la misma, pudiendo recuperar la célula la actividad enzimática normal con mayor facilidad si ésta se encuentra sobreexpresada. Otro factor a tener en cuenta son los niveles de la timidina fosforilasa (TP), enzima encargada de convertir reversiblemente el 5FU en FUDR, el cual a su vez es transformado en el metabolito activo dFUMP. Una vez más, los pacientes en los que se encuentra sobreexpresada esta enzima presentan un peor pronóstico, muy probablemente debido al hecho que la TP es un factor de crecimiento de la vascularización del tumor.[31] Y por último recordar la importancia de la expresión de DPD mencionada con anterioridad. Estos factores, conjuntamente con otros como la expresión de p53, podrían ser considerados unos marcadores predictivos independientes para la evaluación de la eficacia de la terapia con 5FU según el paciente.[1]

2.2.2. Pro-fármacos y nanoconjugados basados en 5FU

Un pro-fármaco se define como un derivado bioreversible de un fármaco que bajo una transformación química o enzimática in vivo libera el fármaco activo, el cual puede dar el efecto farmacológico deseado.[33] El desarrollo de pro-fármacos es una estrategia ampliamente empleada con aquellos agentes terapéuticos cuyas características fisicoquímicas, biofarmacéuticas o farmacocinéticas no son las más óptimas. Como ya se ha comentado el uso del 5FU está muy extendido y debido a sus particulares problemas farmacocinéticos se han desarrollado varios pro-fármacos del mismo.

La estrategia más seguida en la síntesis de pro-fármacos del 5FU ha sido la obtención de fluoropirimidinas de administración oral, como el tegafur-uracilo, la capecitabina y el S-1

(combinación de 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina y tegafur) (figura 1.5). A pesar de estos avances las pro-drogas diseñadas no han mostrado una mayor supervivencia en pacientes en comparación con el 5FU.[1]



5-fluorouracilo **Tegafur** **Capecitabina**

Figura 1.5 *Estructura del fármaco 5FU y de sus pro-fárrmacos tegafur y capecitabina.*

Numerosos grupos de investigación han trabajado en la unión tanto de manera covalente como no-covalente del fármaco 5FU con nanotransportadores, como polisácaridos, polímeros biodegradables, nanocápsulas y dendrímeros. En la literatura podemos encontrar ejemplos de la conjugación del 5FU a polímeros de N-(2-hidroxipropil) metracrilamida (HPMA), en este tipo de compuesto se observo un aumento del tiempo de vida media del 5FU en plasma.[34] También encontramos descrito la unión covalente de 5FU a moléculas de PEG y dextrano, disminuyendo la toxicidad y aumentando el porcentaje de la supervivencia en animales tratados con estos nanoconjugados. [35-37]

Por último destacar que entre estos nanoconjugados encontramos descritos ejemplos de la unión del 5FU con dendrímeros de PAMAM de forma no covalente. Estos sistemas producen un aumento de la solubilidad del 5FU y una mayor bidisponibilidad.[38-39]

OBJETIVOS

El objetivo del capítulo 1 es el desarrollo de un vehículo de carácter dendrimérico adecuado para la administración del fármaco 5-Fluorouracilo (5FU). Este nanoconjugado estará basado en un dendrímero de talla pequeña compuesto por un unidad de dietilentriaminopentaacético (DTPA) con ramas de oligoetilenglicol de tamaño definido, modificado en su superficie con un derivado de 5FU.

Los objetivos específicos de este capítulo son:

1 Optimización de la síntesis del vehículo dendrimérico compuesto por una unidad de DTPA con ramas de oligoetilenglicol de tamaño definido para una escala de producción superior a 10g.

2 Síntesis de diferentes derivados de 5FU que presenten una funcionalidad adecuada para su conjugación al vehículo transportador. Evaluación de la estabilidad de estos derivados de 5FU en plasma y a distintos pHs para determinar cuál de ellos es el más idóneo para la conjugación final con el vehículo dendrimérico.

3 Conjugación del vehículo al derivado de 5FU y optimización de la misma.

4 Evaluación in vitro y ensayos de biodistribución del nanoconjugado dendrímero-5FU final.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La nanotecología es, sin ninguna duda, una de las disciplinas emergentes en la actualidad y su aplicabilidad se extiende a numerosos campos en la ciencia.[40] En el caso concreto de la medicina se introduce el concepto de las nanomedicinas, que se pueden definir, según estableció la European Science Foundation, como sistemas complejos de escala nanométrica y formados por al menos dos componentes, siendo uno de ellos el compuesto activo.[41]

En la preparación de este tipo de compuestos, que se denominan nanoconjugados mientras no se haya comprobado que sean aptos para convertirse en medicinas, habitualmente a parte del propio compuesto activo uno de los componentes suele ser un polímero cuya función puede ser muy variada, entre otras actuar como vehículo del fármaco, o recubrir el fármaco de manera que se pueda minimizar la interacción con componentes en el plasma que lo puedan degradar. Existe una gran variedad de sistemas que se pueden emplear en la preparación de estos compuestos, destacando a modo de ejemplo: co-polímeros, micelas, dendrímeros hidrogeles, etc.[42] Además, otros componentes que pueden estar presentes en los nanoconjugados son péptidos directores que permiten llevar el complejo hacia una localización tisular o celular específica, y también fluoróforos que permiten el seguimiento *in vitro e in vivo* del producto. El objetivo del diseño y síntesis de este tipo de compuestos es la de mejorar las propiedades fisicoquímicas del principio activo, como su solubilidad, su rápida degradación, su biodistribución, farmacocinética y biodisponibilidad. En la introducción de este capítulo se ha discutido la importancia de la TS como diana terapéutica contra el cáncer y los problemas que presentan los fármacos que son empleados hasta el momento que tienen esta diana como objetivo, centrándonos principalmente en el uso del 5FU como agente terapéutico. Debido a la problemática que presenta el uso de 5FU libre, en este trabajo se ha realizado una estrategia que se incluye en el área de sistemas de administración de fármacos, y que consiste en la unión del 5FU a un dendrímero desarrollado por nuestro grupo de investigación, con el fin de mejorar la biodistribución y la eficacia terapéutica del 5FU.

Para ello se realizó la síntesis de un dendrón de primera generación compuesto por un núcleo basado en un derivado del ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), con cuatro posiciones equivalentes y una diferenciada, que se denomina punto focal, derivatizado con ramas de oligoetilenglicol (OEG) de talla definida y con funcionalidades distintas. Este dendrón se conjugó de manera covalente a un derivado del 5FU en las cuatro posiciones equivalentes del dendrímero y finalmente se llevaron a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* del nanoconjugado final con tal de determinar su viabilidad como agente terapéutico. La selección del derivado de 5FU con el que se iba a llevar a cabo la conjugación con el dendrón, se realizó mediante la síntesis y posterior evaluación de una pequeña librería de derivados. Basándonos en los resultados obtenidos en la citotoxicidad y en la estabilidad de los distintos derivados en plasma y en medio acuoso a distintos pHs, se pudo seleccionar al derivado 5FU candidato para ser introducido sobre el dendrón y así formar el futuro nanoconjugado (figura 1.6).

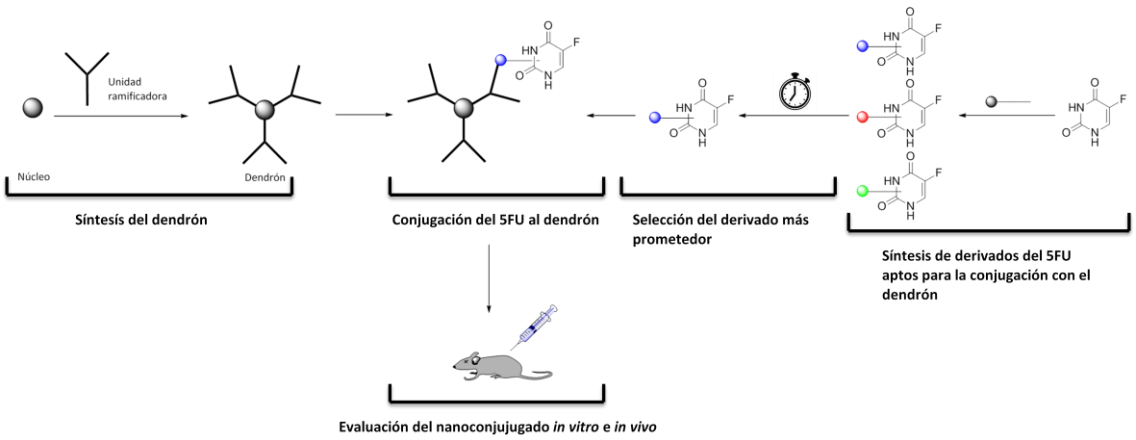


Figura 1.6 *Representación esquemática de la estrategia seguida en este capítulo para la síntesis y evaluación de los nuevos conjugados dendrón-5FU. En la figura se encuentran los principales pasos a seguir: síntesis de los dendrones, síntesis y elección de un derivado de 5FU adecuado para su unión al dendrón, conjugación, y la evaluación final in vitro e in vivo de los nanoconjugados.*

1. Síntesis del dendrón

El nombre dendrímero fue acuñado por Tomalia en 1985, cuyo significa es "parte de un árbol" (en griego, dendros: árbol y meros: parte), refiriéndose a los nuevos polímeros ramificados basados en poli(amidoamina) (PAMAM) que había sintetizado su grupo.[43] Aunque existen referencias anteriores a estos denominados dendrímeros,[44] o las llamadas moléculas "cascada" presentadas por Vötgle en los 70.[45]

Este tipo de polimeros híperramificados presentan una característica muy ventajosa respecto al resto, la multivalencia. Esta multivalencia produce un aumento de la actividad o de la propiedad asociada a la misma comparada con la actividad monomérica correspondiente, este incremento, llamado "clúster" o "dendrítico" se debe generalmente a un efecto cooperativo en donde la actividad del sistema multivalente es mayor que la suma de los de las actividades de los monómeros por separado.[46]

Este tipo de macromoléculas están constituidos por: *i)* núcleo polifuncional*, ii)* unidades de ramificación, iii) ramas y iv) grupos funcionales en la superficie (figura 1.7). Debemos diferenciar entre un dendrímero y un dendrón. Los dendrímeros crecen alrededor de un núcleo, en cambio los dendrones con cuñas dendríticas sin núcleo o con un núcleo asimétrico. Los dendrímeros pueden sintetizarse a través de la unión de varios dendrones, mediante la síntesis convergente de dendrímeros.

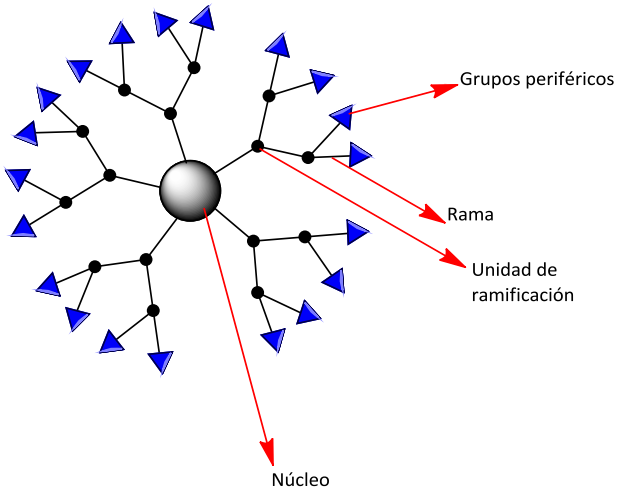


Figura 1.7 *Representación esquemática del dendrímero y sus componentes estructurales.*

Dentro de nuestro grupo de investigación se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de una nueva familia de dendrones basados en núcleo de DTPA y compuesto por ramas de talla definida de OEG. [47-51] Como ya se ha comentado el núcleo del dendrón está basado en un derivado sintético del DTPA, ya que este presenta 5 posiciones susceptibles de ser diferenciadas [47] y es ampliamente empleado como agente quelante en área de radiodiagnosis, radioterapia e imagen de resonancia magnética nuclear.[52-53] El derivado de DTPA con una posición diferenciada (punto focal) respecto a las otras cuatro fue sintetizado en 4 pasos sintéticos (figura 1.8), utilizando la etanolamina (**1**) como material de partida. En el primer paso se hizo reaccionar el bromoacetato de *terc*-butilo y la etanolamina en DMF anhidra y en presencia de $KHCO_3$, para acabar obteniendo con un rendimiento quantitativo la *N,N*-bis[(*terc*-butoxicarbonil)metil]-2-hidroxietilamina (**2**) que se usó en el siguiente paso sin necesidad de purificación alguna, tan solo llevando a cabo una elaboración del crudo consistente en extracciones con éter dietílico. Seguidamente se llevó a cabo la bromación del producto **2** mediante el uso de NBS para obtener el compuesto bromado **3** con un 99% de rendimiento, después de realizar su purificación mediante cromatografía en columna, utilizando SiO_2 como fase estacionaria y un gradiente 5→30% de éter dietílico en hexano como eluyentes. El bromoderivado **3** se hizo reaccionar con tosilato de glicina bencil éster para obtener finalmente el núcleo del dendrón completamente protegido (**4**). Esta reacción se llevó a cabo en un sistema bifásico compuesto por ACN y tampón fosfato 2M a pH8 con el fin de minimizar la aparición de subproductos asociados a la sobrealquilación de la amina terciaria. Debido a la presencia de estos subproductos fue necesario purificar el crudo del compuesto **4** mediante una columna flash utilizando como fase estacionaria alúmina básica y realizando un gradiente 5→30% de acetato de etilo en hexano como fase móvil. Esta síntesis se llevó a cabo en una escala de 16 g, obteniendo finalmente el producto **4** con un 73% de rendimiento y elevada pureza cromatográfica (99%). Mediante este método obtuvimos un núcleo central que contenía cuatro posiciones equivalentes, en forma de éster de *terc*-butilo, adecuadas para la conjugación con el fármaco escogido, y un punto focal, protegido ortogonalmente mediante

un éster bencílico, que nos permitiría la unión a una molécula directora o un fluoróforo en el caso que fuera necesario. Finalmente este núcleo bifuncional **4** se trató con una disolución de HCl 4M en dioxano, calentando a 50 °C durante 3h y finalmente una noche a temperatura ambiente, para obtener el producto **5**, un tetraácido en forma de clorohidrato con un rendimiento quantitativo.

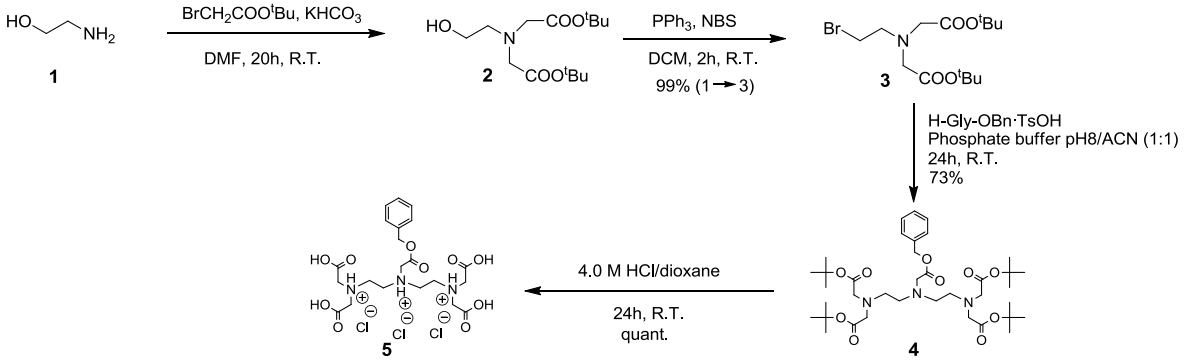


Figura 1.8 *Esquema de síntesis del núcleo basado en DTPA.*

Usando el producto *N'*- benciloxicarbonilmetil -*N,N,N'',N''*-tetrakis(hidroxicarbonilmetil)dietilentriamina (**5**) como núcleo central se llevó a cabo la síntesis del dendrón de primera generación empleado en el presente trabajo. Este dendrón se sintetizó mediante la unión de cuatro unidades de Boc-OEG-NH_2 a los cuatro ácidos libres que contenía el producto **5**. Concretamente la unidades de Boc-OEG-NH_2 empleadas en este capítulo son 1-(*terc*-butoxicarbonil-amino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (**6**, Boc-TOTA). El Boc-TOTA está compuesto por una cadena de OEG de talla definida (320,43 g/mol) que contiene una amina en un extremo y una amina protegida mediante un grupo terc-butoxicarbonil en el extremo opuesto, y que es comercialmente disponible. Esta configuración, dos extremos diferenciados, nos permitió llevar a cabo la unión de cuatro unidades de Boc-TOTA sobre el derivado **5**, de manera que obtuvimos el dendrón **10**, también llamado G1-4Boc-1Bn, mediante la formación de un enlace amida sobre cada uno de los ácidos, usando PyBOP como agente acoplante en medio básico (figura 1.9). Este dendrón G1-4Boc-1Bn es el punto de partida para la obtención de los demás derivados dendríticos empleados en este capítulo para la obtención final de un nanoconjugado apto para su uso como agente transportador del fármaco 5FU.

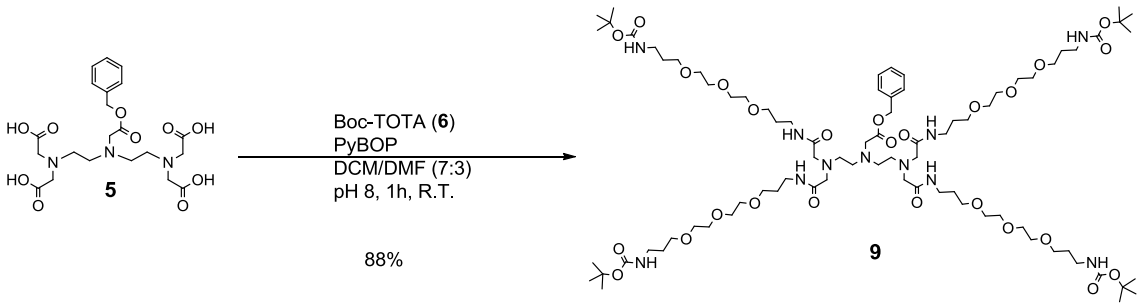


Figura 1.9 *Esquema de síntesis del dendrón G1-4Boc-1Bn.*

Al querer realizar estudios de internalización celular y estudios de biodistribución en animales para evaluar la biodisponibilidad del fármaco que se encontrará unido a nuestra plataforma, se necesitaba introducir una sonda fluorescente adecuada para cada tipo de experimento. Por ello se optó por realizar la unión del fluoróforo a través del punto focal de nuestro dendrón. Con el fin de que el fluoróforo estuviese lo más expuesto posible y fuese así más sencillo, tanto su unión, como minimizar las posibles interacciones que este pudiera tener con el núcleo de DTPA, se decidió incorporar una quinta rama de OEG protegida de manera adecuada. Para mantener la integridad estructural del dendrón se optó por incorporar una rama de la misma talla molecular que las cuatro equivalentes que ya componían el dendrón. Para ello se protegió la amina libre del Boc-TOTA con un grupo benzoxicarbonilo (Z) y posteriormente se eliminó el grupo Boc dejando el amino del otro extremo libre y generándose Z-TOTA (**7**, figura 1.10).[47] Con el fin de preservar la similitud estructural entre las distintas plataformas se decidió incorporar una quinta cadena de OEG en el nanoconjugado que no iba a ser derivatizado con una sonda fluorescente. Así se derivatizó el Boc-TOTA (**6**) para obtener una cadena de OEG que contuviera en uno de sus extremos un grupo acetilo y en el otro un grupo amino libre (**8**, figura 1.10).

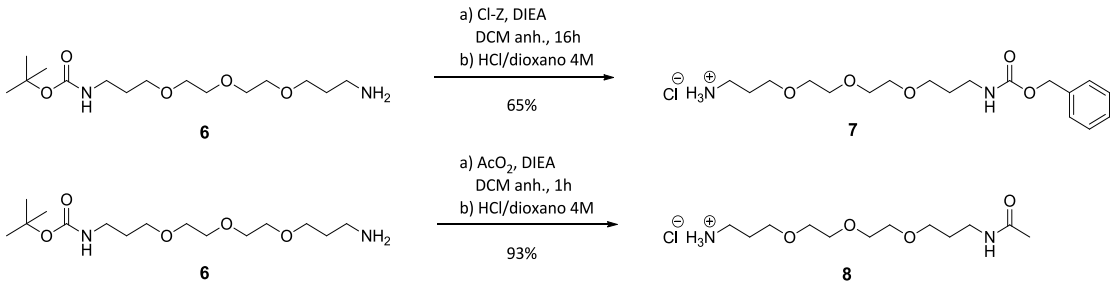


Figura 1.10 *Esquema de síntesis de los derivados Z -TOTA (**7**) y Ac-TOTA (**8**).*

Obtenidos los dos nuevos derivados de TOTA se procedió a la síntesis de los dendrones finales que se utilizarían posteriormente para la conjugación con el 5FU, que consistían en sistemas con cuatro ramas de OEG con una amina protegida con el grupo Boc y una quinta rama de OEG en el punto focal cuya amina terminal podía estar acetilada o protegida con el grupo Z.

Para la síntesis de ambos compuestos se partió del dendrón G1-4Boc-1Bn (**9**), con el cual se procedió a la eliminación del grupo éster de bencilo mediante hidrogenación catalítica usando Pd/C como catalizador y metanol como disolvente. A pesar de que las condiciones utilizadas son las empleadas para la eliminación de este grupo protector, en nuestro caso el uso de estas condiciones generaba un producto secundario al proceder a la incorporación de la quinta rama. Este subproducto correspondía al éster metílico del ácido carboxílico del punto focal del dendrón 9 que se generaba al realizar la activación del ácido libre para la incorporación de la quinta rama. Esto muy posiblemente es debido a la naturaleza del dendrón, que tiene la capacidad de ocluir disolventes al igual que el OEG o el PEG, y por ello no se conseguía eliminar de manera eficiente el metanol que habíamos utilizado como disolvente en la reacción de hidrogenación, lo que daba lugar a la esterificación del ácido en forma de éster metílico. A pesar de que este subproducto representaba un porcentaje muy bajo respecto al producto final, en la mayoría de los casos tan solo por masas, la influencia de la presencia del metanol ocluido se multiplicaba posteriormente al realizar la conjugación con el 5FU, dando lugar a crudos muy sucios. Esto hacía necesario llevar a cabo una purificación mediante HPLC-semipreparativo del nanoconjugado final para poder separar estas trazas del producto final que constituía un método lento, costoso y que hacía disminuir el rendimiento del producto final de manera exagerada. Con el fin de mejorar la obtención del nanoconjugado final y viendo la influencia de las condiciones de hidrogenación del compuesto **9** en subsiguientes etapas de síntesis se decidió optimizar las condiciones de esta etapa de hidrogenación.

Para ello se exploraron hidrogenaciones utilizando 2-propanol como disolvente, este es un alcohol no nucleófilo que minimizaba su posible incorporación en forma de éster en el caso que aún quedarán trazas del mismo en el dendrón ya hidrogenado. Al utilizar estas condiciones se detectó que era muy difícil obtener la completa eliminación del éster bencílico. Se exploró la realización de esta reacción con 2-propanol incrementando los tiempos de reacción a 24h, o usando paladio negro como catalizador realizando las hidrogenaciones a alta presión para obtener la eliminación del grupo éster bencílico y la conversión total a ácido libre. A diferencia de la hidrogenación realizada con metanol como disolvente, en los dendrones con ácido libre (**10**) obtenidos con 2-propanol como disolvente no se observaron productos de incorporación del 2-propanol sobre el dendrón al activar el ácido libre. A pesar de esto resultados la hidrogenación con 2-propanol presentaba varios inconvenientes, como los largos tiempos de reacción, el mayor coste del catalizador empleado y una mayor metódica más compleja, al ser necesario un reactor que soporte altas presiones. Esto nos llevó a explorar una nueva metodología que consistía en la hidrólisis del grupo éster bencílico en medio básico y de manera controlada. Así se procedía a tratar el dendrón **9** disuelto en diclorometano con una solución de NaOH en MeOH, controlando los equivalentes de base y alcanzando una concentración final de 0,1 M NaOH en la disolución final.[54] De esta manera en 1h, la eliminación del grupo bencilo fue completa. El crudo resultante se elaboró para eliminar los restos de NaOH y el MeOH contenido en el mismo. Para ello se evaporó el crudo a sequedad y

posteriormente se redisolvió en DCM/H2O (1:1). La mezcla resultante se acidificó hasta pH 3-4 usando una solución de HCl 1M y a continuación se extrajo el crudo con DCM. Se realizaron extracciones hasta no detectar el producto final G1-4Boc-1COOH **10** en la fase acuosa. A pesar de que la elaboración de este crudo puede llegar a ser algo lenta debido a la dificultad de extraer totalmente el producto final de la fase acuosa, fue el proceso que dió mejores resultados.

Tabla 1.3 *Resumen de las estrategias empleadas en la eliminación del grupo éster bencílico del dendrón* ***9****, con los inconvenientes y ventajas que presentan cada uno de los métodos. En todos los casos se obtuvo la eliminación total del grupo bencilo.*

	Condiciones sintéticas	Ventajas	Inconvenientes
Método 1	H2, Pd/C, MeOH, t.a.	Método rápido y sencillo.	Se detectan la incorporación sobre el ácido carboxílico del punto focal de MeOH. Muy difícil de eliminar todas las trazas de MeOH.
Método 2	H2, Pd/C, 2-propanol, t.a.	No se detecta la incorporación del éster de 2-propanol al activar el dendrón con el ácido libre para la incorporación de la quinta rama de OEG.	Método lento, más de 24h en algunos casos. En algunos casos fue necesario emplear el catalizador carbono sobre paladio negro, mucho más costoso. Para acelerar la reacción es necesario realizar las hidrogenaciones a alta presión.
Método 3	NaOH, DCM:MeOH (9:1), t.a.	Método rápido, sencillo y el menos costoso, al eliminar la participación de un catalizador. No se detecta la incorporación del éster metílico al activar el dendrón con el ácido libre para la incorporación de la quinta rama de OEG. Instrumentación sencilla.	Elaboración sencilla del crudo pero lenta, en algunos casos fue necesario realizar numerosas extracciones con DCM hasta dejar de detectar el producto final en la fase acuosa.

Una vez optimizada la eliminación del éster bencílico contenido en el dendrón **9** se procedió a la incorporación de la quinta rama en la posición focal para obtener los dendrones diseñados para el acoplamiento del fármaco 5FU. Estos dendrones se denominarán: G1-4Boc-1Ac **11** y G1-4Boc-1Z **13**. La síntesis de los mismos se llevó a cabo repitiendo las condiciones ya optimizadas para el acoplamiento de las 4 ramas de OEG contenidas en el dendrón G1-4Boc-1Bn **9**, es decir, usando PyBOP como agente de activante del ácido carboxílico libre presente en el dendrón **10** en medio básico. Utilizando las condiciones de hidrólisis del método 3 y tras el acoplamiento de la quinta rama, solo fue necesaria la elaboración del crudo y mediante varias precipitaciones en hexano para obtener los dendrones **11** y **13** con una alta pureza (figura 1.11).

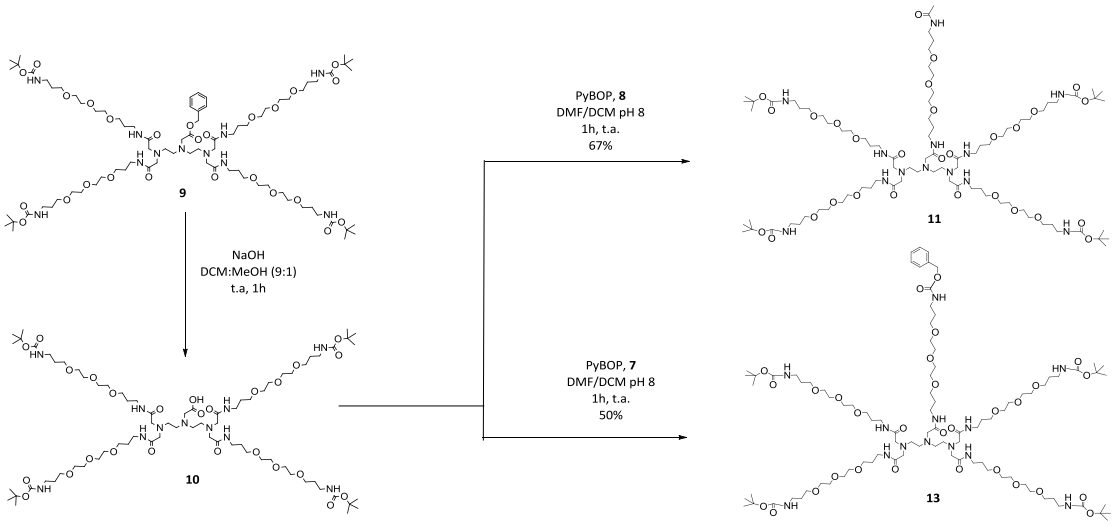


Figura 1.11 *Esquema de síntesis de los dendrones G1-4Boc-1Ac* ***11*** *y G1-4Boc-1Z* ***13****.*

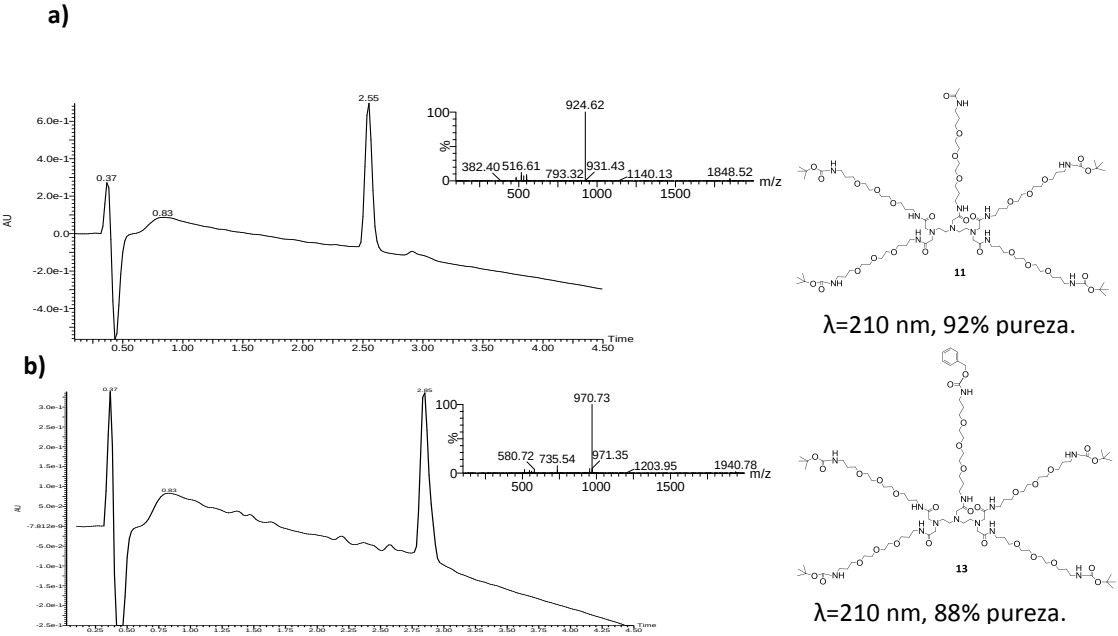


Figura 1.12 *HPLC-MS de los dendrones 11 (**a**) y 13 (**b**). Todos los análisis se realizaron con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0.07% FA) en H_2O (0.1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min.*

2. Derivados de 5FU

2.1 Síntesis de los derivados de 5FU

Como ya se ha comentado en la introducción de este capítulo, es posible encontrar numerosos derivados del 5FU descritos ampliamente en la literatura. Normalmente la derivatización del

5FU tiene lugar sobre los nitrógenos que contiene el ciclo del uracilo (N_1 y N_3, figura 1.3). Se encuentran descritos en la literatura numerosos tipos de derivados, los más comunes pueden ser clasificados en tres grupos: N-alquil-5FU (N-A-5FU), N-alquilcarbonil-5FU (N-AC-5FU) y N-alquilcarboximetil-5FU (N-ACOM-5FU). Los N-A-5FU poseen un enlace N-C, que es difícilmente hidrolizable in vivo, resultando muy estables y no tóxicos.[55] Los N-AC-5FU son muy efectivos en la liberación de 5FU, pero muy inestables en solventes próticos, siendo las propiedades propiedades de estos derivados prácticamente equivalentes a las del 5FU libre debido a su rápida descomposición ($t_{1/2}$=3-5 min en medio tamponado pH 7,1 y 23 ºC).[56] Los derivados N-ACOM-5FU presentan propiedades intermedias, la incorporación de un átomo de oxigeno provoca que el enlace N-C sea más lábil que en el caso de N-A-5FU y 16 veces más estable que N-AC-5FU en las mismas condiciones.[56] El mecanismo de la hidrólisis de los derivados N-ACOM-5FU está representado en la figura 1.13 (**b**) y tiene dos pasos: 1) la hidrólisis del enlace éster, y 2) una rápida pérdida de formaldehido. Este último paso es extremadamente rápido, se estima que este grupo intermedio tiene una vida media de 0,4 s.[57]

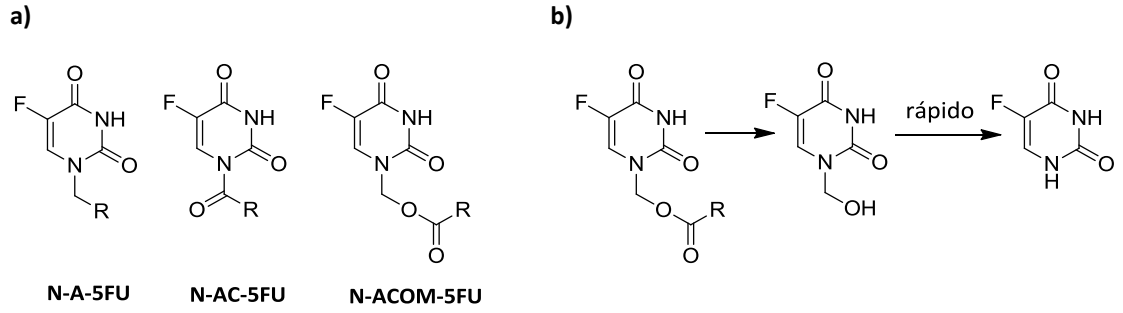


Figura 1.13 a) *Estructura de las tres grandes clases de pro-fármacos.* ***b)*** *Mecanismo de liberación de 5FU de los pro-fármacos tipo N-ACOM-5FU.*

En la tesis doctoral de Lorena Simón se sintetizó un derivado tipo N-ACOM-5FU para su posterior conjugación con el dendrón de primera generación. Este derivado consistía en la formación del derivado N-ACOM-5FU de ácido succínico sobre el N_3 del 5FU. Se escogió realizar la derivatización sobre el N_3 debido a la diferente reactividad de los nitrógenos contenidos en el 5FU reportada en numerosas publicaciones, mostrando una mayor reactividad química del N_1 respecto al N_3. Esto implicaba que una incorporación sobre el N_3 requería de una síntesis más compleja, en contrapartida los derivados de 5FU sobre N_3 eran químicamente más estables y enzimáticamente más lábiles.[57] Estas características hacían de la derivatización a través del N_3 del 5FU una opción más prometedora para la síntesis de un pro-fármaco.

El esquema sintético de este derivado de 5FU sintetizado con anterioridad en el grupo se encuentra descrito en la figura 1.14. El primer paso consistía en hacer reaccionar el 5FU con un gran exceso de formalina (solución acuosa de formaldehido) a 55°C obteniendo el compuesto **16** (1,3-dihidroximetil-5-fluorouracilo),[58-60] que fue usado en el siguiente paso de manera inmediata sin purificación previa. A continuación se hizo reaccionar el producto **16** con un

pequeño exceso de cloroformiato de bencilo en medio básico, obteniendo de esta forma el producto **17** (1-benciloxicarboniloximetil-5-fluorouracilo) de manera selectiva, ya que no se obtuvieron productos de la doble incorporación. Lorena Simón en su tesis doctoral demostró mediante estudios de RMN que el cloroformiato de bencilo no se incorporaba sobre la posición N_3 y solo se detectaba producto de incorporación del benciloxicarbonilo en la posición N_1. Una vez protegida la posición N_1 del anillo de 5FU, se procedió de nueva a incorporar . En esta ocasión se realizó la reacción tan solo con un equivalente de formalina, seguida de la adición de anhídrido succínico que reaccionaba con el alcohol libre de la formalina de la posición N_3. De esta manera se obtuvo el producto 1-benciloxicarboniloximetil-3-(hidroxicarboniletil)carboniloximetil-5-fluorouracilo (**19**).

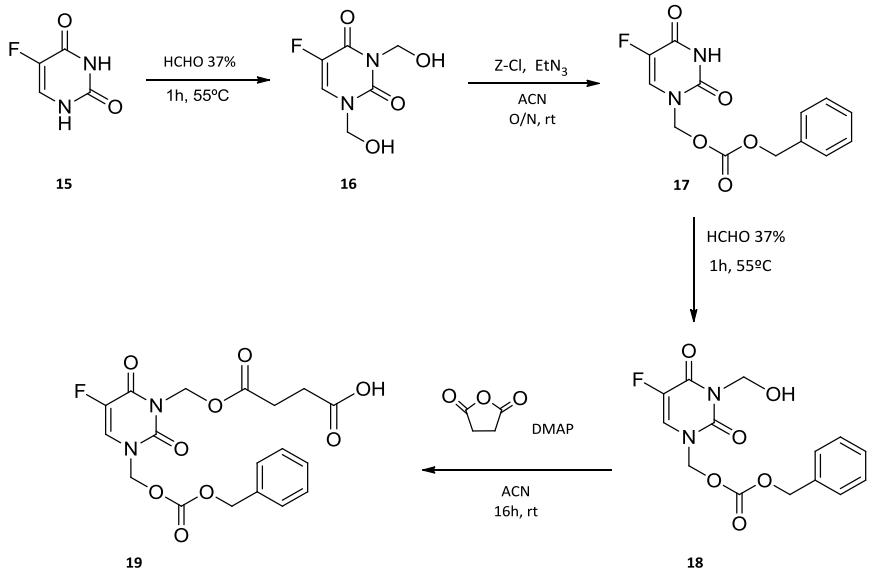


Figura 1.14 *Esquema sintético de 1-benciloxicarboniloximetil-3-(hidroxicarboniletil)carboniloximetil-5-fluorouracilo (**19**)*

Posteriormente el producto **19** se hizo reaccionar con pentafluorofenol para obtener la especie activa del éster de pentafluorofenol del derivado de 5FU con la que se llevó a cabo el acoplamiento al dendrón de primera generación. Finalmente se eliminaron los grupos protectores benciloxicarbonilo que contenían tanto el dendrón como las moléculas de 5FU incorporadas (figura 1.15).

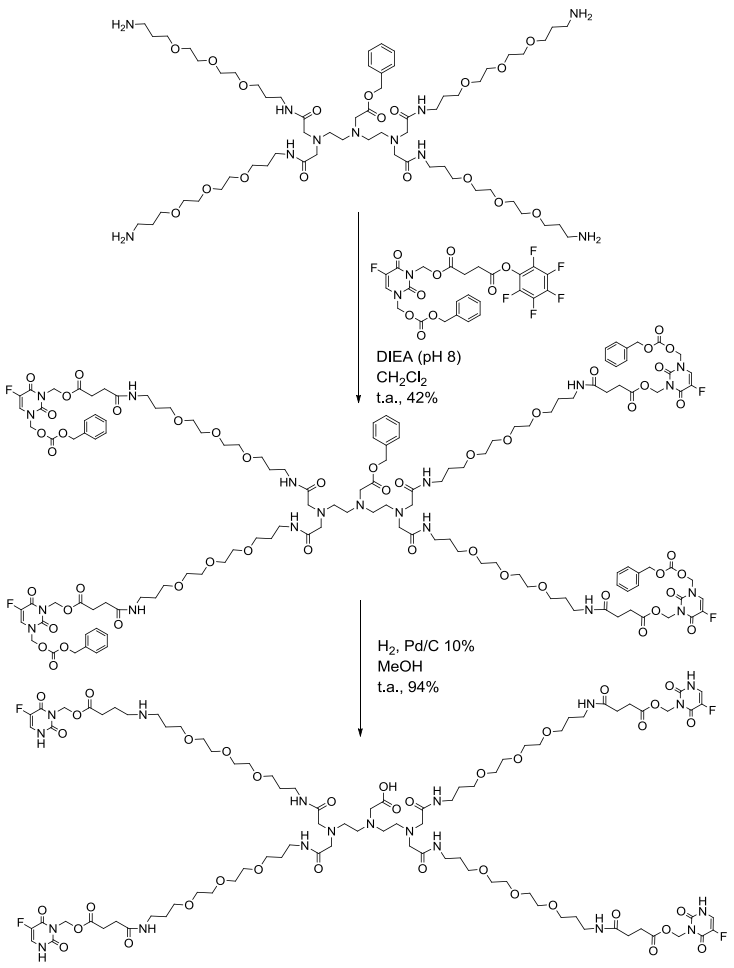


Figura 1.15 *Esquema sintético desarrollado en la tesis de Lorena Simón para la conjugación de 5FU a un dendrón de primera generación.*

A priori, esta estrategia seguida por Lorena Simón era una buena opción para la conjugación del 5FU con el dendrón desarrollado en nuestro grupo de investigación, a pesar de esto, al someter el dendrón a condiciones acuosas básicas muy suaves se pudo observar como el dendrón experimentaba una rápida liberación de las moléculas de 5FU contenidas en él. Estos resultados sugerían que el nitrógeno de la amida que unía el succínico a la rama de OEG podría atacar al grupo carbonilo formando un ciclo de 5 miembros, desplazando el 3-hidroximetil-5-fluorouracilo mediante hidólisis del éster (figura 1.16). Estas conclusiones son apoyadas por datos reportados por otros autores que comparan la estabilidad del enlace que unía el 5FU y una molécula de citarabina en función del espaciador empleado,[61] mostrando que para un mismo tipo de enlace, la longitud del espaciador influenciaba su estabilidad a pH fisiológico7,4 pasando de 9 min (en el caso del ácido succínico) a ser inerte (en el caso del uso del ácido adipíco como espaciador).

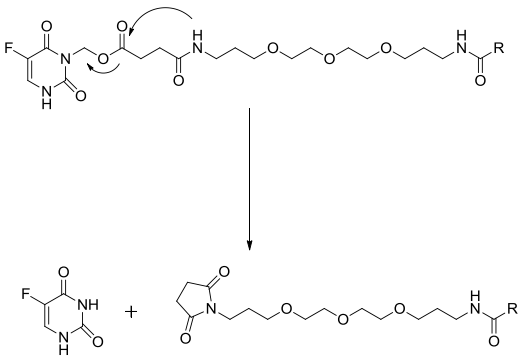


Figura 1.16 *Representación del mecanismo de rotura del éster entre el 5FU y el dendrón de la figura anterior. El grupo R representa el resto del dendrón.*

La inestabilidad mostrada por esta unión hizo que esta estrategia no resultara apropiada para su uso en un sistema cuyo objetivo es la administración *in vivo*, ya que se requiere una unión transportador-fármaco que tenga un tiempo de vida medio que le permita llegar como conjugado a la diana deseada. Además esta inestabilidad también podía suponer un problema en su manipulación química si se desease derivatizar el producto (unir otro tipo de moléculas como fluoróforos o moléculas orientadoras) tras su síntesis. Por este motivo, en el presente proyecto se planteo realizar nuevos derivados de 5FU con nuevos espaciadores y otro tipo de enlaces, para realizar una evaluación previa de la estabilidad de los mismos con el fin de escoger al candidato más prometedor.

Con tal de simplificar el sistema a estudiar se diseñó un modelo 5FU-espaciador-TOTA-Ac, utilizando Ac-TOTA (**8**), que mimetizaba la rama de un dendrón sobre el cual se procedió a estudiar distintos tipos de unión (figura 1.17).

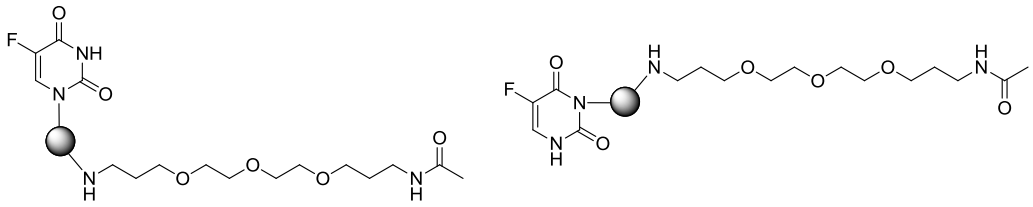


Figura 1.17 *Esquema de la estructura de los modelos, dónde ● representa los diferentes espaciadores ensayados.*

Antes de realizar cambios en el espaciador empleado hasta el momento, ácido succínico, decidimos evaluar la influencia que tenía la incorporación del 5FU al dendrón a través del N_1 o el N_3, y si realmente la diferente estabilidad era lo suficientemente importante como para justificar el esfuerzo sintético que planteaba unir el 5FU a través del N_3 al dendrón, sobre todo si tenemos en cuenta que el objetivo final de este proyecto es la realización de ensayos *in viv*o con ratones, cosa que hace necesaria un planteamiento de síntesis a una escala superior de 1g de los productos seleccionados. Con este fin se llevó a cabo la síntesis de los productos $5FUN_3$SuccTOTA-Ac (**21**) y $5FUN_1$SuccTOTA-Ac (**23**) según el esquema sintético detallado en la figura 1.18 y se evaluó su estabilidad a diferentes pHs y en plasma.

Los resultados de los ensayos de liberación en diferentes soluciones tamponadas y plasma se discutirán en más detalle en el siguiente apartado de este capítulo, pero podemos avanzar que si bien corroboran la mayor labilidad de la conjugación del 5FU a través del N_1 respecto a la conjugación a través del N_3, esta no era tan grande como para no plantear la conjugación a través del N_1 de 5FU como la opción óptima que presenta un compromiso entre labilidad y accesibilidad química, en el caso que aparecieran grandes problemas sintéticos.

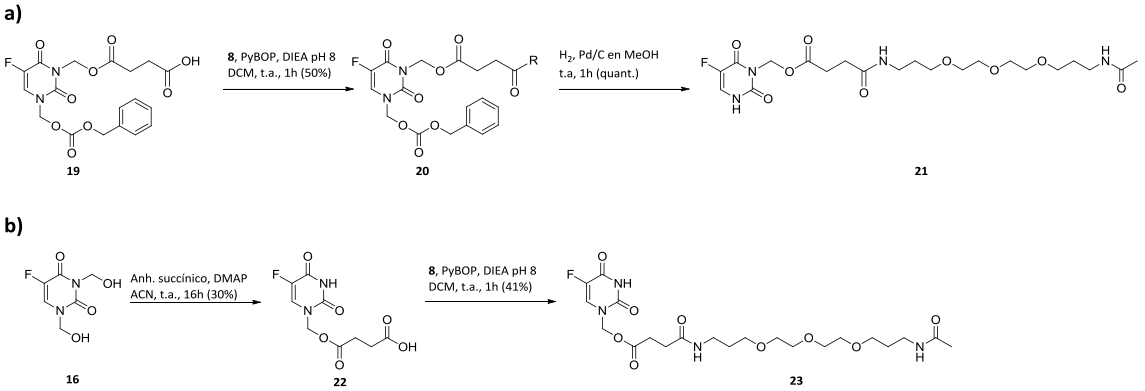


Figura 1.18 *Esquema sintético de los derivados* ***a)*** *5FUN$_3$SuccTOTA-Ac (**21**) y* ***b)*** *5FUN$_1$SuccTOTA-Ac (**23**).*

El primer tipo de modificación ensayada fue la substitución del espaciador succínico de cuatro átomos de carbono por adípico con siete átomos de carbono. Este cambio de espaciador eliminaría la posible reacción secundaria de formación de un ciclo de cinco miembros, que es muy estable (figura 1.16), debido a que el potencial anillo que se formaría en el caso del espaciador derivado del ácido adípico sería un anillo de siete miembros, cuya formación no está favorecida.

Como primera opción se intentó realizar una estrategia similar a la realizada con el derivado 5FU-N1Succ (19) para la formación del derivado correspondiente al ácido adípico (5FU-N1Adip). Para llegar a obtener este derivado se plantearon varias estrategias, primeramente la formación del anhídrido succínico, pero tras ensayar varios métodos no fue posible obtener el anhídrido correspondiente, debido a la dificultad de formación que presenta un anillo de siete miembros, ya que los enlaces se encuentran tensionados. También se ensayó la síntesis de este derivado mediante la incorporación de una molécula de ácido adípico, protegido en uno de sus extremos con un éster de *terc*-butilo, sobre una molécula de 5FU derivatizada (protegido su N_1 con el grupo Z y derivatizado el N_3 con formalina para obtener un alcohol terminal) y la posterior desprotección de este éster en medio ácido. La incorporación de este espaciador en la posición N_3 del 5FU no fue posible, ya que químicamente es muy poco reactivo y ningún método de activación del ácido (ésteres activos, cloruros de ácidos y agentes acoplantes) dieron un resultado final satisfactorio.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad de los derivados 5FUN$_3$SuccTOTA-Ac (**21**) y 5FUN$_1$SuccTOTA-Ac (**23**), que presentaban una diferencia menor de estabilidades, y la imposibilidad de unir el ácido adípico a la posición N_3, demostrando el reto

sintético que suponía la unión del espaciador en esta posición, se seleccionó el N_1 del 5FU como la posición a través de la cual se realizaría la conjugación y ha sido en esta posición en la que se han realizado el resto de modificaciones.

Siguiendo el planteamiento expuesto anteriormente de substituir el ácido succínico por ácido adípico, se procedió a la síntesis del derivado 5FUN_1AdipTOTA-Ac (**26**). Para ello se procedió a incorporar este espaciador mediante el uso del ácido adípico monoprotegido en forma de terc-butilo para evitar posibles reacciones secundarias o empleando el ácido adípico con los dos ácidos libres. Esta última opción proporcionó rendimientos mayores (40% respecto a la inserción del ácido libre frente al 15% de la inserción del ácido monoprotegido), por lo que se decidió usar esta estrategia (figura 1.19). La síntesis se realizó mediante la incorporación de formalina tal y como se ha descrito anteriormente, obteniendo el producto 16, seguido de la incorporación del ácido adípico. Esta incorporación se llevo a cabo disolviendo el producto **16** en DMF y añadiendo a esta solución el ácido adípico, DCC como agente acoplante y DMAP en cantidades catalíticas para favorecer la formación del éster. Tras una filtración y evaporación del disolvente el crudo fue purificado mediante el uso de una columna pre-compactada tipo HLB de fase reversa, usando un gradiente de H_2O→ACN de 0-100% de ACN. De esta manera obteníamos de una manera sencilla, rápida y con rendimientos moderados (40%) el producto 1-(hidroxicarbonilpropil)carboniloximetil-5-fluorouracilo .

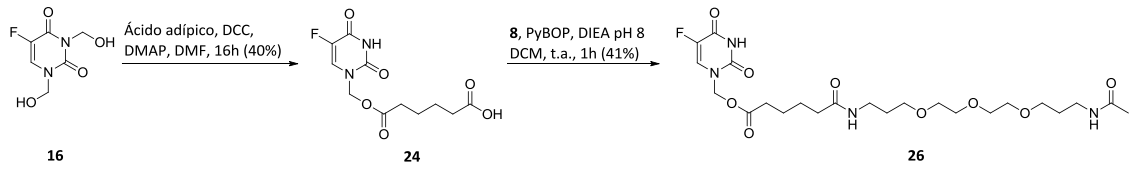
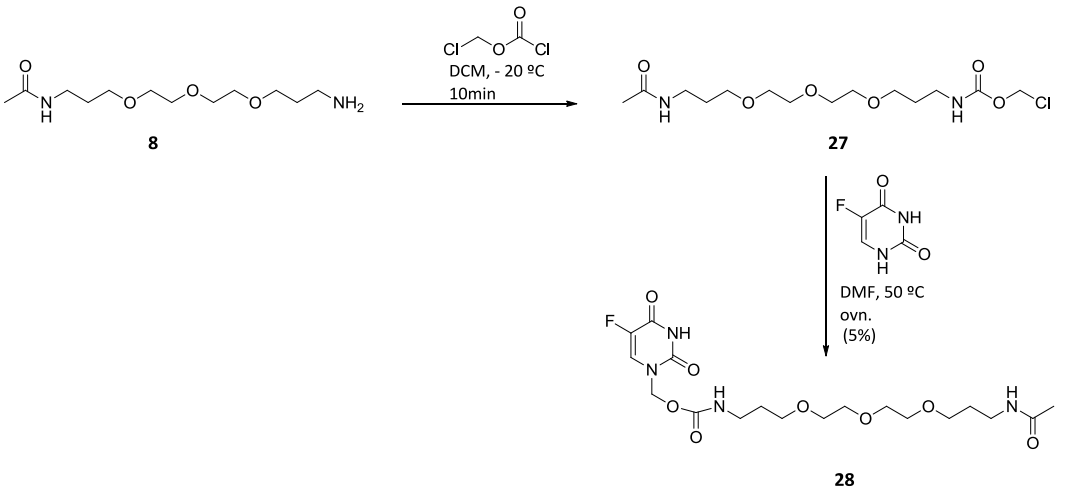


Figura 1.19 *Esquema sintético del derivado 5FUAdipN_1TOTA-Ac (**26**).*

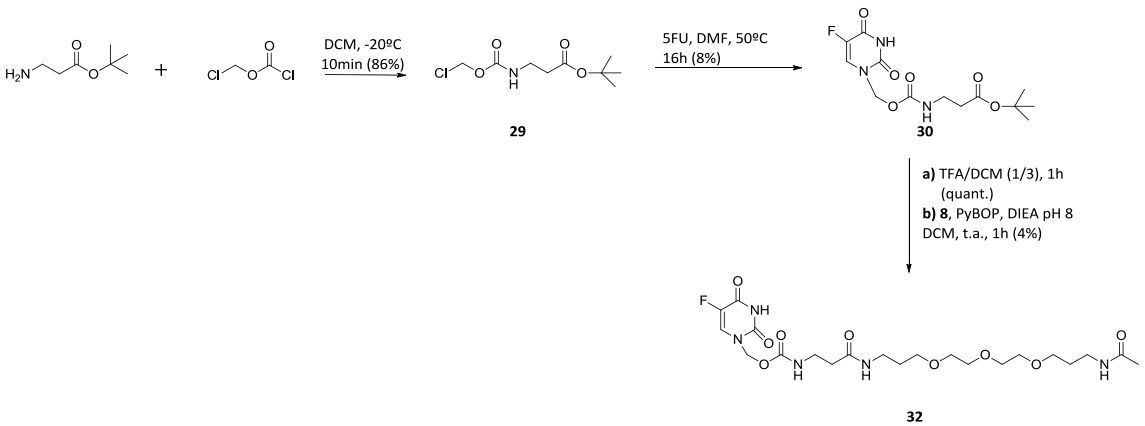
Finalmente y con el objetivo de evaluar otro tipo de unión distinta al enlace éster de los ejemplos anteriores, se procedió a la síntesis del derivado de 5FUN_1TOTA-Ac carbamato (**27**) siguiendo el esquema de síntesis que se detalla en la figura 1.20. Se seleccionó el enlace carbamato, mucho más estable que el éster, con el objetivo de alargar el tiempo de vida en plasma del correspondiente derivado de 5FU. Se consiguió esta unión carbamato a través del N_1 del 5FU activando previamente el Ac-TOTA (**8**) con cloroformiato de clorometilo, dando el producto **27**, sobre el cual se añadió 5FU, generándose el derivado carbamato deseado **28** aunque con unos rendimientos muy bajos (5%).



8 27 28

Figura 1.20 *Estrategia final para la obtención del espaciador mediante enlace carbamato a través del N_1 del 5FU.*

Con el fin de evitar el proceso de la activación de la rama de OEG con cloroformiato de clorometilo, que para el compuesto **28**, un modelo simplificado con una única rama de OEG, es un proceso relativamente sencillo pero que se da con bajos rendimientos, y que podría complicarse cuando se trabajará en la construcción del sistema dendronizado, se planteó la necesidad de desarrollar una metódica más robusta para la conjugación final. Para ello se decidió generar derivados que contenían el enlace carbamato pero con un espaciador entre el 5FU carbamato y el OEG, el espaciador seleccionado fue una β-alanina. Este derivado se sintetizó haciendo reaccionar el cloroformiato de clorometilo con el 3-aminopropanoato de *terc*-butilo, para obtener el correspondiente derivado clorometilado **29** que se hace reaccionar con 5FU dando el compuesto **30**. A este le realizó un tratamiento acidolítico con TFA y posteriormente se procedió al acoplamiento de la rama de OEG (Ac-TOTA, **8**) con PyBOP como agente acoplante en medio básico, obteniendo el llamado producto 5FUN_1βAlaTOTA-Ac carbamato (**32**), el rendimiento global obtenido (< 1%) fue muy bajo debido presumiblemente a los métodos de purificación empleados (HPLC-MS semipreparativo).



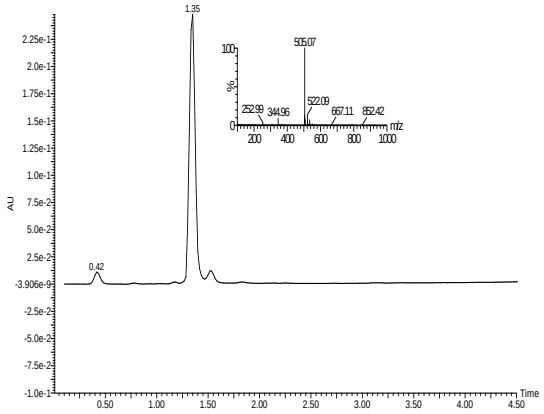
29 30 32

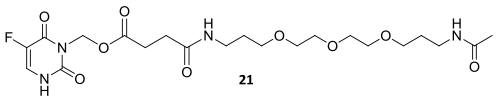
Figura 1.21 *Estrategia para la obtención del producto 5FUN_1βAlaTOTA-Ac carbamato **32**.*

Una vez obtenidos estos modelos se llevaron a cabo pruebas de estabilidad a diferentes pHs en medio acuoso tamponado y en plasma de ratón para tratar de evaluar la estabilidad con el tiempo de los distintos derivados y discernir cuál sería el candidato más adecuado para la conjugación final al dendrón.

Los productos finales del derivado de 5FU unidos a la rama de Ac-TOTA (**21**, **23**, **26**, **28** y **32**) fueron purificados mediante HPLC-MS semipreparativo para asegurar su alta pureza, con el fin de no obtener resultados erróneos o la presencia de impurezas que pudiesen afectar a los ensayos (figura 1.22).

a) 5FUN$_3$SuccTOTA-Ac (**21**)

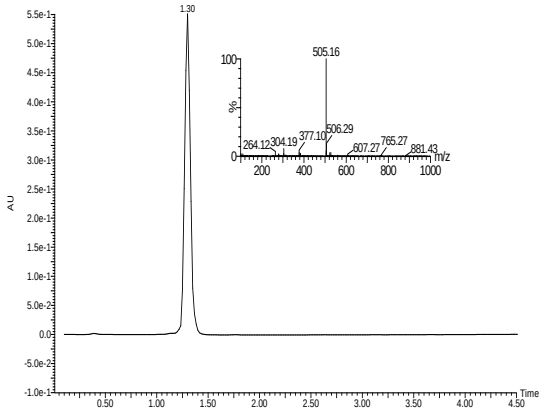


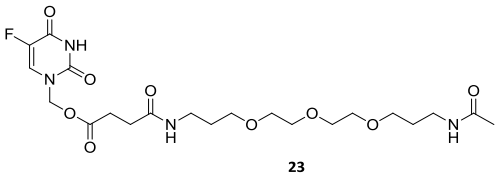


21

XBridge C18 4,6x50 nm 3,5 µm
H_2O (0,1% HCOOH)/ ACN (0,07% HCOOH)
Gradiente 5→100% de ACN (0,07% HCOOH)
t_R = 1,35 min, 91% pureza (λ=260 nm)

b) 5FU N$_1$SuccTOTA-Ac (**23**)

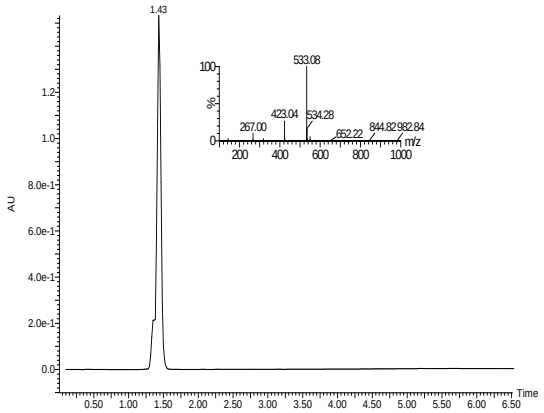


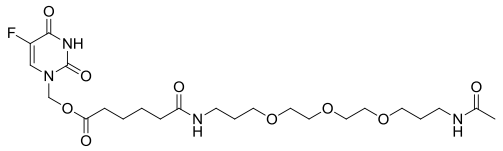


23

XBridge C18 4,6x50 nm 3,5 µm
H_2O (0,1% HCOOH)/ ACN (0,07% HCOOH)
Gradiente 5→100% de ACN (0,07% HCOOH)
t_R = 1,30 min, 99% pureza (λ=260 nm)

c) 5FUN$_1$AdipicTOTA-Ac (**26**)

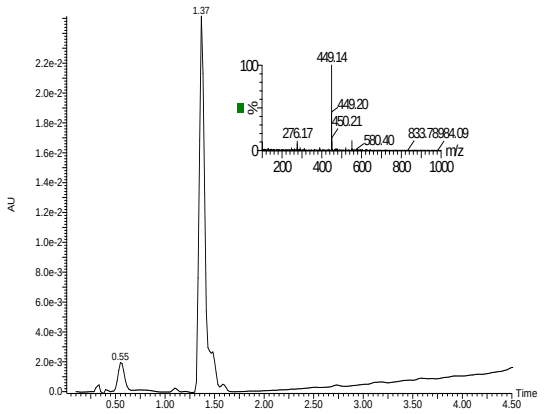


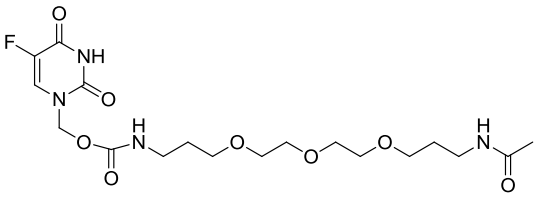


26

XBridge C18 4,6x50 nm 3,5 µm
H_2O (0,1% HCOOH)/ ACN (0,07% HCOOH)
Gradiente 5→100% de ACN (0,07% HCOOH)
t_R = 1,43 min, 83% pureza (λ=260 nm)

d) 5FUN$_1$TOTA-Ac carbamato (**28**)

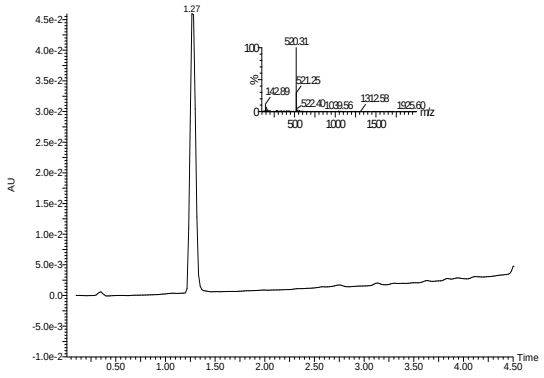


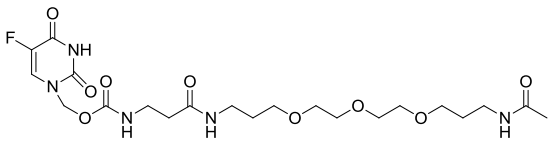


28

XBridge C18 4,6x50 nm 3,5 µm
H_2O (0,1% HCOOH)/ ACN (0,07% HCOOH)
Gradiente 5→100% de ACN (0,07% HCOOH)
t_R = 1,37 min, 82% pureza (λ=260 nm)

e) 5FUN$_1$β-AlaTOTA-Ac carbamato (**32**)





32

XBridge C18 4,6x50 nm 3,5 µm
H_2O (0,1% HCOOH)/ ACN (0,07% HCOOH)
Gradiente 5→100% de ACN (0,07% HCOOH)
t_R = 1,27 min, 99% pureza (λ=260 nm)

Figura 1.22 *Análisis de HPLC-MS de los derivados de 5FU-TOTA-Ac sintetizados para llevar a cabo los ensayos de liberación del fármaco 5FU.*

2.2 Ensayos de estabilidad a distintos pHs y plasma

Con la finalidad de evaluar la estabilidad química en medio acuoso y en plasma de los derivados de 5FU se procedió a realizar pruebas de estabilidad en medio acuoso tamponado a distintos pHS y en plasma ratón.

La estabilidad a distintos pHs se realizó con sistemas tamponados de PBS que se usaron con el pH ajustado a 7,4, 6,5 y 4,5. Se seleccionaron estos pHs teniendo en cuenta las referencias bibliográficas que indican que las células resistentes a fármacos (MDR, Multi Drug Resistant) presentan un pH en sus orgánulos más bajo del de las células sensibles a fármacos (figura 1.23).[62]

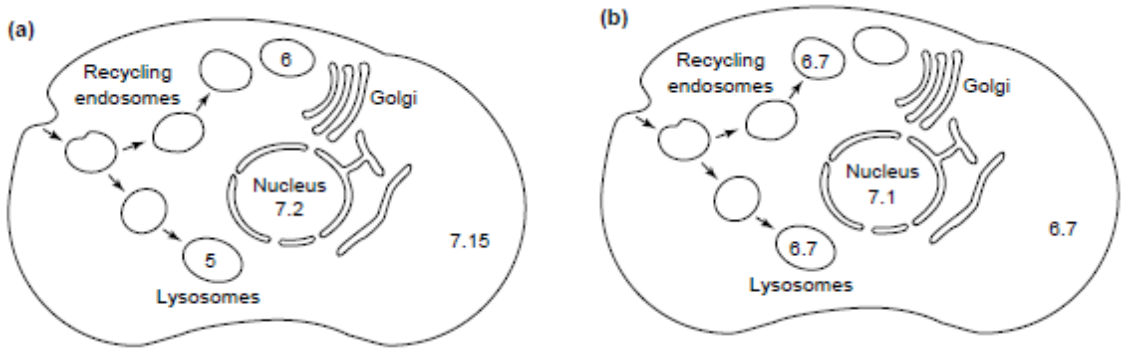


Figura 1.23 *Esquema de los valores de pH en diferentes compartimentos celulares en* ***a)*** *células resistentes (células MDR) y* ***b)*** *células sensibles a los fármacos. Figura extraída de la referencia 63.*

También se decidió llevar a cabo pruebas de liberación en plasma de ratón ya que los ensayos *in vivo* planificados se iban a realizar con ratones. El plasma empleado fue subministrado por el grupo de la Dra. Abasolo (IRVH).

Primeramente se procedió a desarrollar el método analítico cromatográfico (HPLC) más adecuado para realizar el estudio. Para ello se decidió realizar los análisis en un sistema de HPLC con un detector de fotodiodos (HPLC-PDA). El objetivo era obtener un método cromatográfico en el cual pudiera considerarse como medida del 5FU libre la integración del pico correspondiente de 5FU como medida. Durante el desarrollo de este método lo primero que se planteó fue la elección de los eluyentes más adecuados, debido a la naturaleza de los productos, los cuales son presumiblemente lábiles a medio básico, decidimos escoger como eluyente un medio ácido, en concreto H_2O:TFA (99,9:0,1; v/v) y ACN:TFA (99,9:0,1; v/v), para evitar un liberación no controlado del 5FU durante el análisis por HPLC.

En cromatografía cuantitativa, se obtiene la mayor precisión cuando se utiliza un patrón interno debido a que en esta forma se evitan las incertidumbres causadas por la inyección de la muestra. Para realizar este procedimiento, se introduce una cantidad conocida de una substancia que actúa como patrón interno, tanto en las muestras patrón como en las muestras

problema y se utiliza como parámetro analítico el cociente entre el área de los picos del analito sobre la del patrón interno. Para ello es necesario que el pico del patrón interno esté bien separado de los picos de los distintos analitos de la muestra y que sea estable en las condiciones a las que se someterá la muestra durante el proceso de liberación (rotura total de los enlaces OEG-5FU) y análisis. Cuando se utiliza un patrón interno adecuado se logran precisiones relativas de 0,5 a 1%.[64] En nuestro caso se escogió resorcinol como patrón interno, ya que es estable a las condiciones del ensayo a realizar y se trata de una molécula pequeña muy polar, similar al 5FU, y su t_R es lo suficientemente diferente para permitir la correcta cuantificación de los dos picos, el de 5FU y resorcinol.

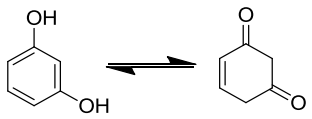
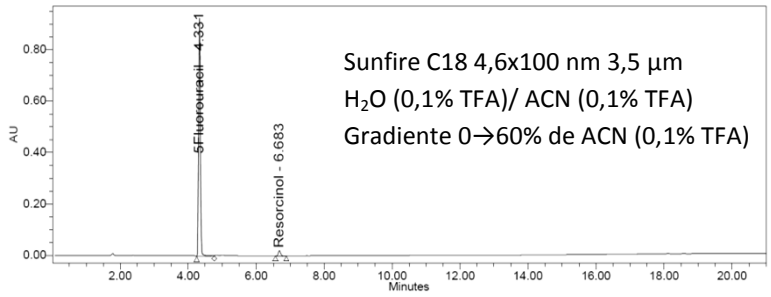


Figura 1.24 *Estructura química y formas resonantes del resorcinol.*

El primer parámetro que se exploró fue la selección de la columna de HPLC (tipo de fase estacionaria que se utilizaría, tamaño de la columna). Se evaluaron distintas columnas encontrando que la columna Waters SunFire C_{18} (4.6 x 100 mm, 3.5 μm) era la más adecuada y empleando un sistema de elución H_2O:TFA (99,9:0,1; v/v) y ACN:TFA (99,9:0,1; v/v) con un gradiente de 0→60% de ACN:TFA (99,9:0,1; v/v). En estas condiciones se llevó a cabo la recta de calibrado del 5FU (figura 1.25). Para ello se realizaron tres rectas de calibrado distintas, tomando tres pesadas diferentes de 5FU. Tanto la disolución más concentrada de 5FU (disolución madre) como las diluciones posteriores se llevaron a cabo empleando una solución de PBS 7.4 que contenía una concentración conocida de resorcinol. Esta recta se repitió si las mediciones de las muestras a analizar no se realizaban en un pequeño espacio de tiempo. En el caso de los productos **21**, **23** y **26** las pruebas de estabilidad se llevaron a cabo de manera simultánea, en cambio los productos **28** y **33** se sintetizaron con posterioridad y por tanto las pruebas también, por lo que fue necesario realizar una nueva recta de calibrado.

a)



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	5Fluorouracil	4.331	3499979	97.50	888901
2	Resorcinol	6.683	89652	2.50	20388

b)

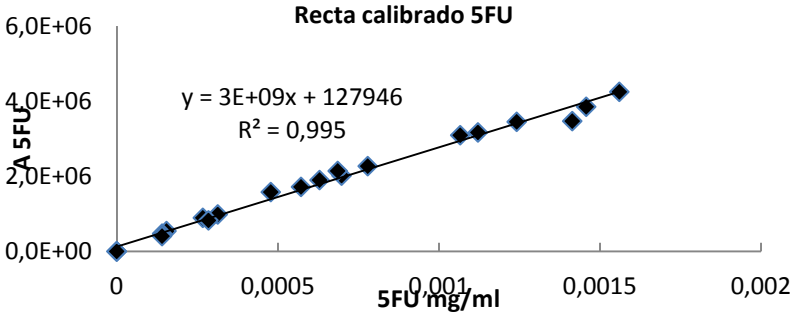


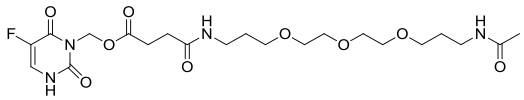
Figura 1.25 a) *Ejemplo de cromatograma en el que se identifican los picos de 5FU (t_R = 4,3) y resorcinol (t_R = 6,7).* ***b)*** *Ejemplo de recta de calibrado final de 5FU*

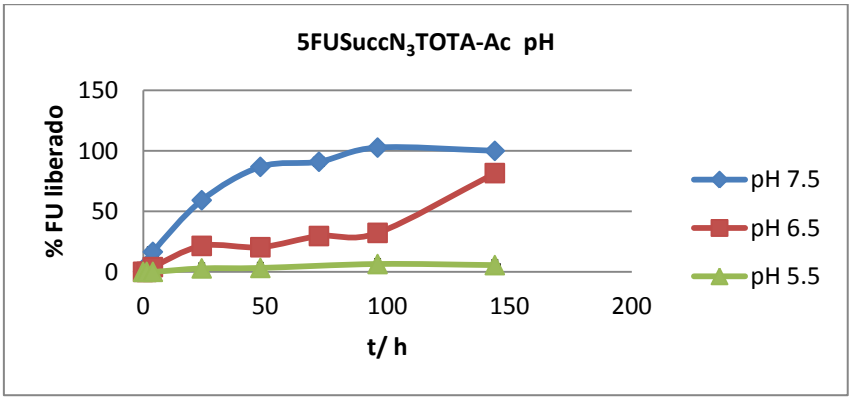
Una vez desarrollado un método analítico adecuado se llevaron a cabo los estudios de estabilidad a tres pHs distintos (pH 7,5, 6,5 y 4,5). Estos ensayos se realizaron incubando los distintos derivados de 5FU por triplicado a 37 °C en cada uno de los sistemas tamponados antes especificados, los cuales contenían la misma cantidad de resorcinol que contenía la recta de calibrado. Durante el análisis se extrajeron alícuotas de cada una de las muestras a tiempos determinados. A menudo estas alícuotas no eran analizadas de manera inmediata por una cuestión puramente técnica, por lo que las muestras fueron acidificadas a pH 4,5 para evitar la liberación no controlada de 5FU.

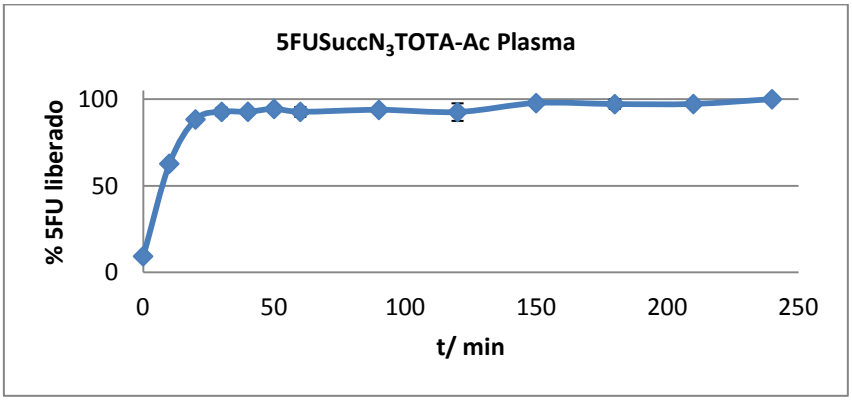
En el caso de los estudios de estabilidad en plasma de ratón el método cromatográfico se tuvo cambiar debido al proceso de recogida de muestra una vez incubada en plasma. Las muestras se incubaron en plasma de ratón a 37 °C extrayendo alícuotas en determinados tiempos. Una vez extraída la muestra se procedía a realizar una precipitación de las proteínas que contenía el plasma mediante la adición de ACN. Este procedimiento es necesario para evitar que estas proteínas del plasma puedan ensuciar el cromatograma y el equipo. Por este motivo las muestras finales a inyectar provenientes de las distintas alícuotas se encontraban disueltas en ACN 100%. Esto obligó a realizar una nueva recta de calibrado del 5FU específica para los ensayos de estabilidad en plasma, donde el 5FU (muestras a analizar y soluciones patrón) se

encontraba disuelto en ACN 100%. En estas condiciones se observó que el 5FU disuelto en ACN 100% daba lugar a cromatogramas con picos anchos y en algunas ocasiones desdoblados. Para evitar esto y viendo que en ellos métodos cromatográficos anteriores, donde las muestras se disolvían en medio tamponado, se procedió a evaporar el ACN de cada una de las muestras correspondientes a la estabilidad en plasma y posteriormente se redisolvieron en una solución tampón a pH 4,5. De esta manera se conseguía el mismo tipo de cromatogramas limpios que en el estudio de estabilidad en solución acuosa.

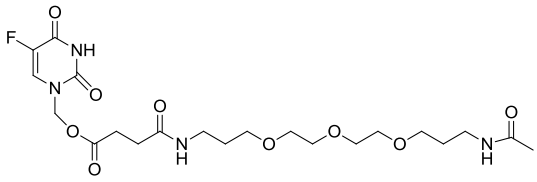
a) 5FUN$_3$SuccTOTA-Ac (**21**)

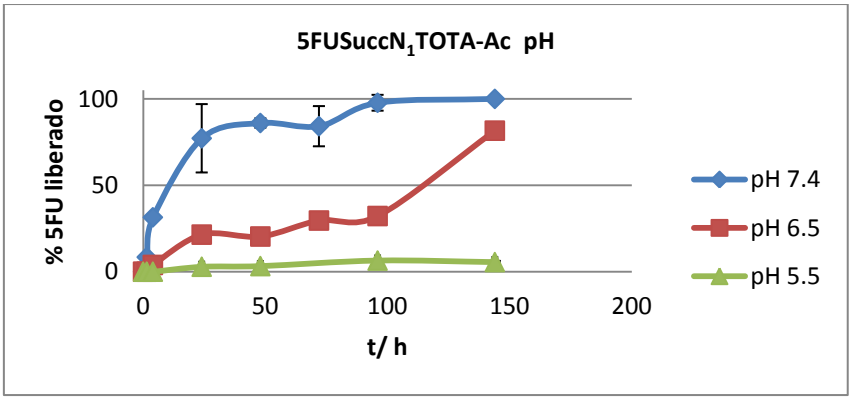


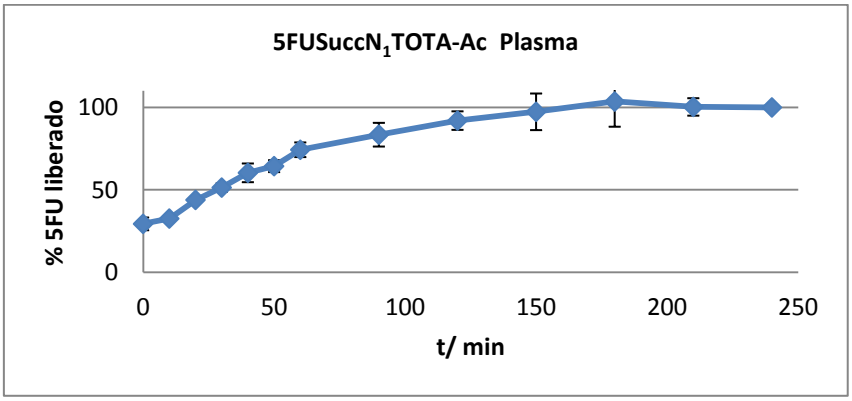




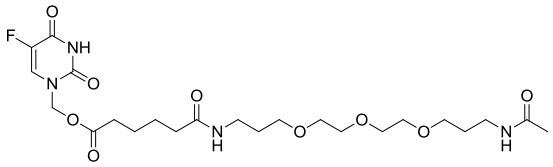
b) 5FUN$_1$SuccTOTA-Ac (**23**)

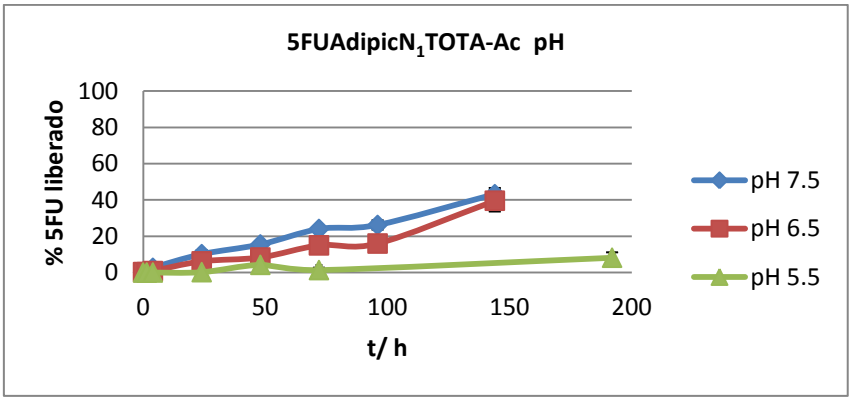


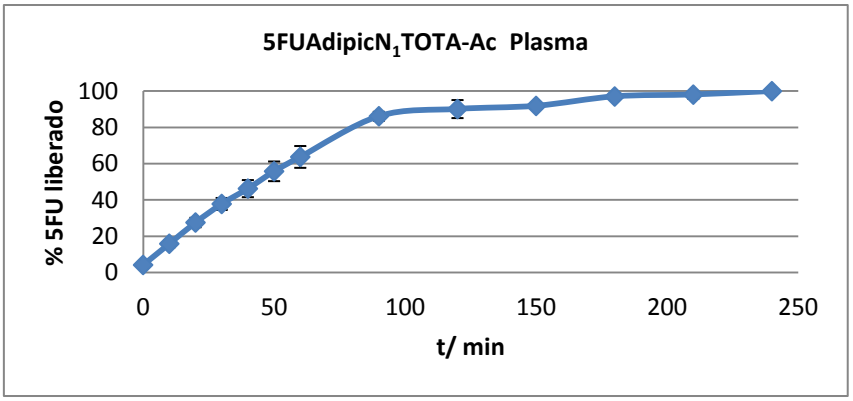




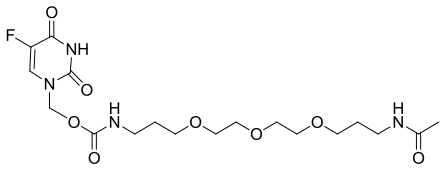
c) 5FUN$_1$AdipicTOTA-Ac (**26**)

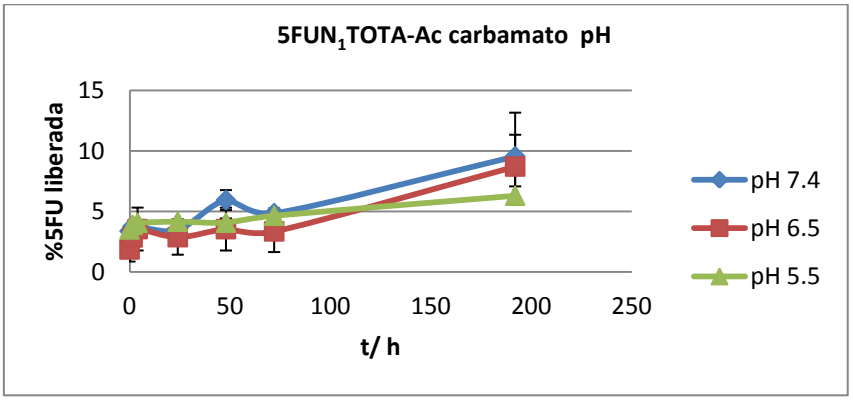






d) 5FUN$_1$TOTA-Ac carbamato (**28**)





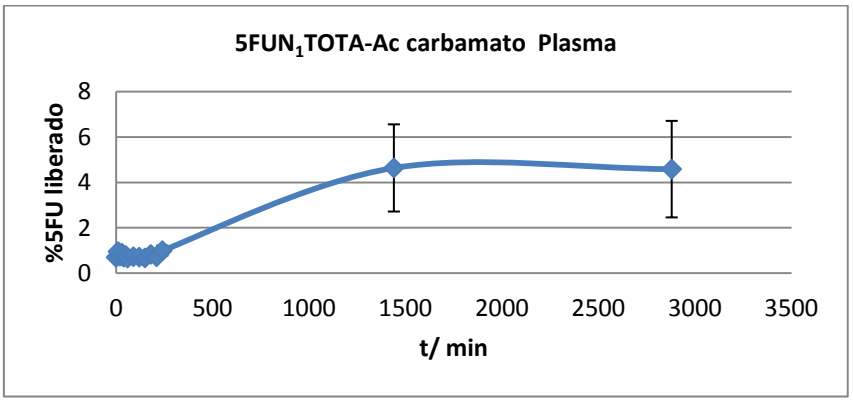


Figura 1.26 *Gráficos de estabilidad en plasma y a distinto pH en tampón fosfato de los compuestos modelo.*

Con los resultados obtenidos podemos determinar que la estabilidad química a diferentes pHs de todos los compuestos es bastante alta, solo superando porcentajes de 5FU cercanas o

superiores al 50% en el caso de los espaciadores basados en ácido succínico, y destacando por su estabilidad el compuesto **28** con la unión carbamato, el cual a todos los pHs estudiados y después de varios días no observa más de un 10% de 5FU libre. El compuesto **32** no aparece en la figura ya que después de una semana no se observó ningún tipo de liberación ni en plasma, ni a diferentes pH.

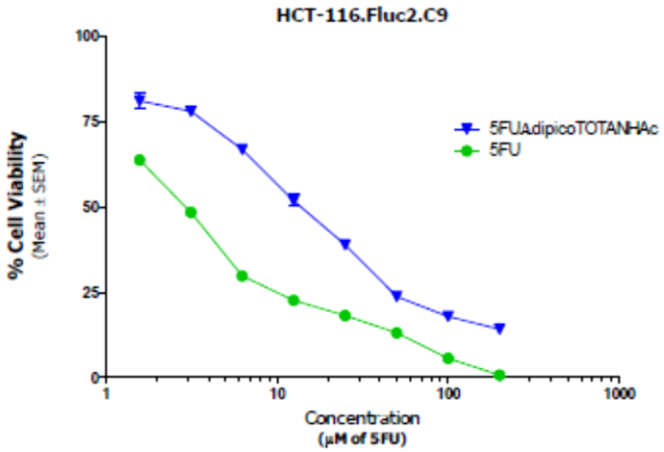
Si comparamos la estabilidad en plasma de los distintos compuestos ensayados las diferencias son más notables. En la bibliografía encontramos descrito la diferente reactividad de N_1 y N_3 de la molécula de 5FU, siendo N_1 enzimáticamente más lábil.[57] Teniendo estos datos en consideración esperaríamos que entre los modelos **21** y **23** (cuyo espaciador basado en ácido succínico está unido al N_3 y al N_1, respectivamente) se observará una mayor labilidad en el compuesto **23**, hecho que se corrobora mostrando este compuesto un $t_{1/2}$ inferior a 10 min, comparado con el $t_{1/2}$ de **21** que es cercano a los 30 min. A pesar de esta diferencia, la estabilidad relativa entre el enlace sobre el N_1 respecto al enlace sobre el N_3 no representa un aumento de estabilidad suficientemente grande como para realizar los esfuerzos sintéticos que se requieren para obtener derivados sobre el N_3. En cambio el modelo **26** (5FUN_1AdipicTOTA-Ac) con un espaciador basado en ácido adípico, presenta un $t_{1/2}$ superior ($t_{1/2}$ > 40 min) al de los modelos **21** y **23**. Estos resultados corroboran la teoría de la mayor labilidad asociada a los espaciadores basados en ácido succínico debido a la formación de un anillo de cinco eslabones estable. Al contrario que los otros modelos, el modelo **28** con una unión tipo carbamato mantiene prácticamente la integridad del sistema después de 48h, observándose solo aproximadamente un 5% de 5FU libre. Resaltar que el modelo **32** muestra una elevada estabilidad en plasma durante una semana, es decir, no se observa 5FU libre.

Básandonos en los resultados obtenidos, el modelo **26** basado en un éster de ácido adípico parecía la mejor opción. Antes de tomar la decisión final se decidió realizar ensayos de citotoxidad *in vitro* del modelo **26** y el modelo **32** para determinar su IC_{50}, y explorar si por algún mecanismo enzimático presente en el modelo celular el 5FU del modelo carbamato (**32**) se liberaría más eficientemente o de manera más prolongada que el **26**. El resumen de estos ensayos se encuentran en la figura 1.27, y se puede ver claramente (figura 1.27, b) como el modelo **32** no presenta actividad citotóxica, presumiblemente debido a que no tiene lugar la liberación del 5FU. En cambio el modelo **26** (figura 1.27, a) muestra actividad citotóxica, aunque su IC50 es un orden de magnitud superior a la del correspondiente 5FU libre. Esto puede ser debido a que la liberación del 5FU del modelo **26** no es instantánea y necesita más tiempo para liberar todo el 5FU y alcanzar la eficacia del fármaco libre.

Teniendo en cuenta estos resultados optamos por la unión del 5FU a través de un éster con un espaciador basado en ácido adípico, inspirándonos en el modelo **26**, como mejor opción. A pesar de que este aún presentara un $t_{1/2}$ no tan elevado como nos gustaría, este tipo de enlace representa un compromiso entre la estabilidad del enlace y la capacidad de liberar de 5FU, ya que los modelo carbamato **28** y **32** eran tan estables que no garantizaban la liberación de 5FU

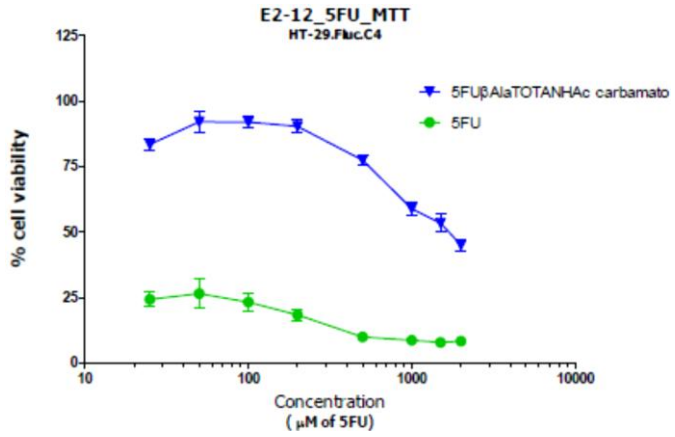
y por tanto la toxicidad de estos sería tan baja que no presentaría efecto farmacológico alguno.

a)



IC_{50} (µM 5FU)	
5FUAdipicN_1TOTA-Ac	5FU
13,88±0,28	2,84±0,34

b)



IC_{50} (µM 5FU)	
5FUAlaN_1TOTA-Ac carbamato	5FU
> 1000	< 20

Figura 1.27 *Determinación del IC50 de los compuestos 5FUN_1AdipicTOTA-Ac (**a**) y 5FUN_1AlaTOTA-Ac carbamato (**b**). Destacar que los dos ensayos no se han realizado con el mismo tipo de células: HCT-116, en el caso del ensayo **a**, y HT-29, en el caso del ensayo **b**.*

3. Síntesis del dendron-5FU para ensayos *in vivo*

Una vez seleccionado el derivado de 5FU más adecuado para conjugación a dendrones, que es el que contiene un 5FU unido a través de su N_1 mediante un enlace éster al ácido adípico que actua como espaciador, se procedió a realizar una síntesis a escala de 1g del conjugado dendrón-5FU final para realizar los ensayos *in vivo* que se habían planteado en el proyecto, estudios de biodistribución y eficacia en ratones.

3.1 Síntesis del dendrón-5FU para ensayos de biodistribución

Los ensayos de biodistribución consisten en una única administración de la droga unida al conjugado, en nuestro caso una dosis de 50 mg equivalentes de 5FU determinada por los grupos Drug Delivery and Targetting que lidera el Dr. Simó Schwartz y la plataforma de

Functional Validation and Preclinical Research que dirige la Dra. Ibane Abasolo (CIBBIM, Instituto de investigación del Hospital Vall de Hebrón), que serán los encargados de realizar los estudios *in vivo*. Este ensayo sería monitorizado *in vivo* y *ex vivo* con un detector IVIS® Spectrum, por lo que es necesario incluir un fluoróforo, con una relación entre el dendrón sin marcar y marcado de 99,94:0,06 %, referenciando sobre la concentración de 5FU. En el desarrollo de este apartado se explicará con mayor detalle la elección del fluoróforo y su unión al dendrón.

En la tesis de Lorena Simón se incorporó el 5FU-succínico al dendrímero mediante la formación previa del éster activo de pentafluorofenol del 5FU-succínico que se hacía reaccionar con el dendrímero durante toda una noche en medio básico. Este proceso presentaba dos inconvenientes importantes que favorecían la prematura liberación de 5FU: el largo tiempo que los compuestos que contenían la unidad 5FU-succínico debían permanecer en medio básico (16h por norma general) y la dificultad de controlar la basicidad en medio orgánico. Por este motivo se decidió explorar el uso del PyBOP como agente de acoplamiento. Si bien es cierto que este agente acoplante también precisa de medio básico, que como ya hemos dicho no favorece a la estabilidad del producto, los tiempos de reacción son mucho más cortos (aprox. 2h) lo que disminuye el riesgo de una hidrólisis prematura del 5FU.

Estas nuevas condiciones se exploraron en primer lugar con 360 mg del dendrón G1-4BOC-1Ac (**11**), el cual fue sometido a un tratamiento acidolítico empleando HCl/dioxano 4M, para obtener el producto **12** (G1-4NH_2-1Ac). Tras eliminar las trazas de ácido mediante co-evaporación con tolueno, se dejó reaccionar el producto **12** con 5 equivalentes de 5FUAdipN_1-COOH (**24**) y 5 equivalentes de PyBOP en medio básico durante 2,5h (figura 1.28). Transcurrido este tiempo se acidificó el crudo de reacción hasta pH 4,5-5 mediante la adición de una solución HCl/dioxano 2M.

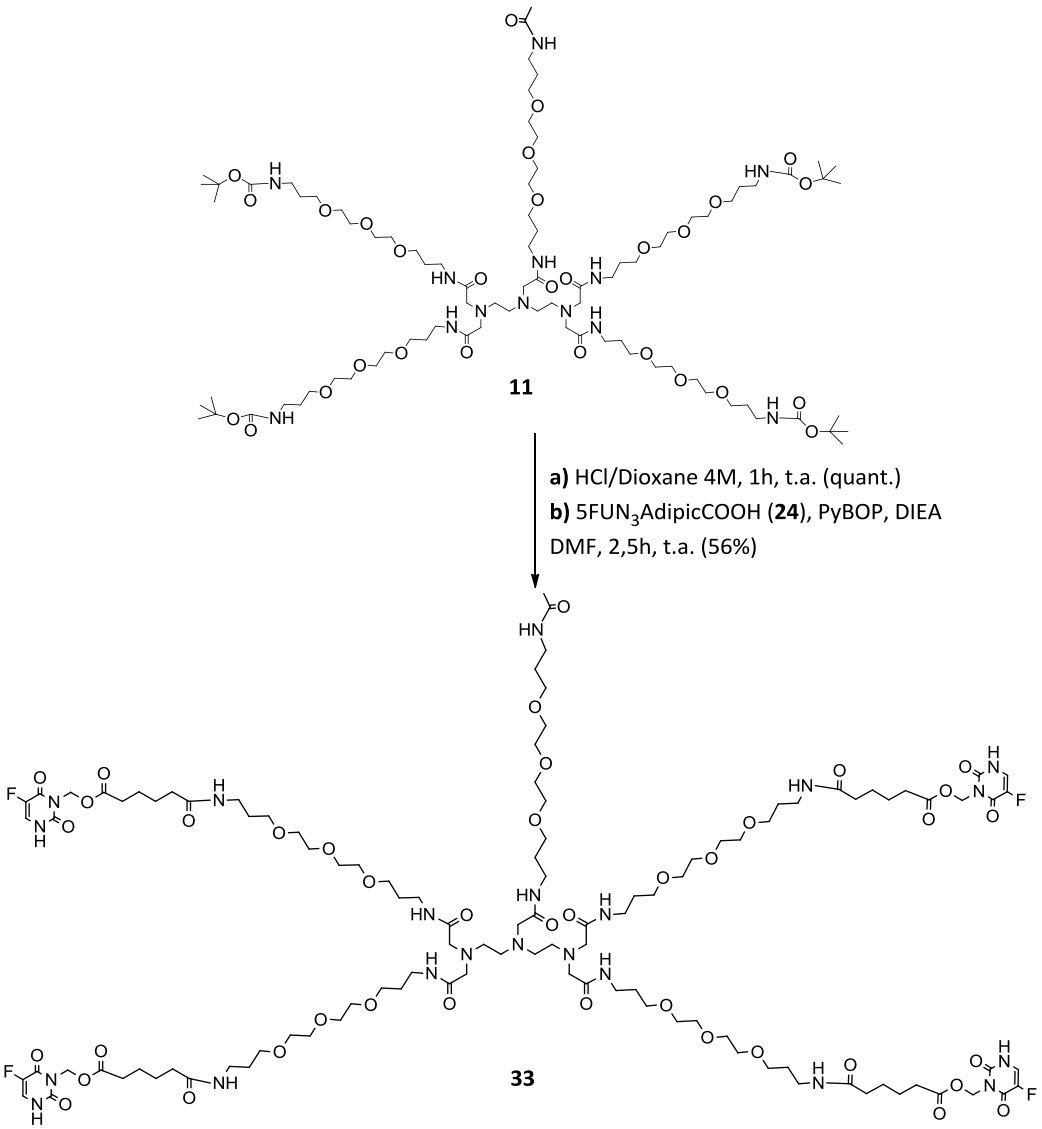


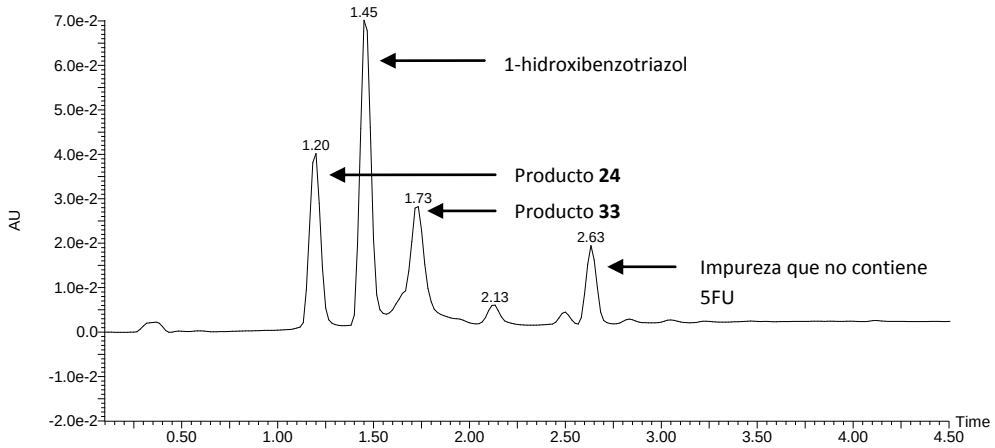
Figura 1.28 *Esquema de síntesis de la estrategia empleado para la formación del producto* ***36*** *con PyBOP como agente de acoplamiento.*

El crudo de esta reacción (figura 1.29) presentaba un aspecto relativamente limpio mediante análisis por HPLC, mostrando el cromatograma el producto final **36** y restos de los reactivos de partida así como productos secundarios del PyBOP. Se intentó elaborar el crudo mediante extracciones acuosas, pero se descartó el procedimiento debido a que el producto final **33** era soluble en agua. Finalmente se optó por purificar el crudo empleando una columna Sephadex G-10 pre-empaquetada PD10 como método de purificación. Este método hizo que el rendimiento disminuyera (56% de rendimiento de purificación) y que no se obtuviera un producto puro, ya que por masas se detectaban productos secundarios en menor porción, cuyas masas correspondían a productos de eliminación temprana del 5FU.

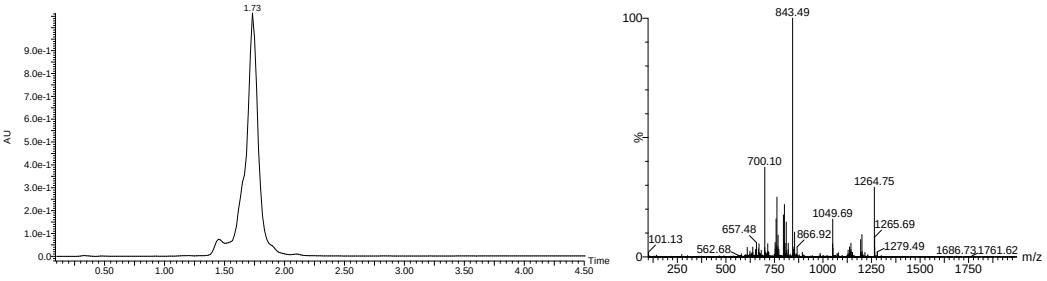
A pesar de estas impurezas y al tratarse de un estudio de biodistribución preliminar se decidió continuar trabajando con este lote y plantear posteriormente un estudio de optimización del acoplamiento del 5FU cuando se procediera a realizar la síntesis del lote destinado a la eficacia

in vivo, donde sí tendría una importancia primordial el hecho de que el sistema se encontrara completo y con una pureza elevada.

a)



b)



c)

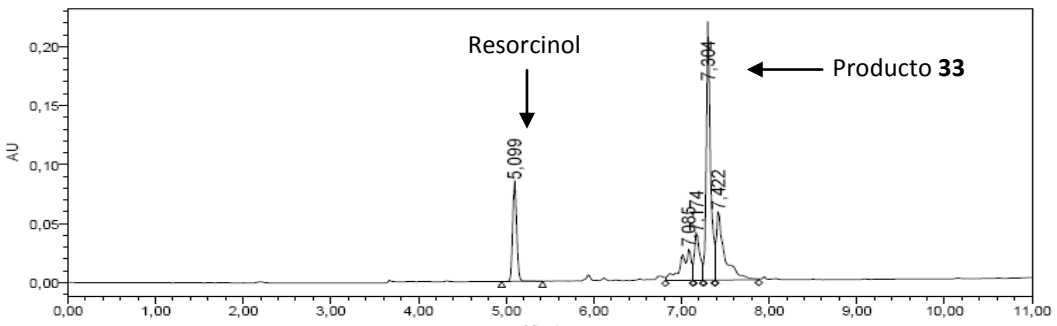


Figura 1.29 *HPCL-MS del crudo del producto **33** (**a**) y del producto **33** tras su purificación por exclusión de tamanño (**b**). Todos los análisis se realizaron con una columna XBridge C18 4,6 x 50 mm, 3,5 µm y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min.* ***c)*** *HPLC del producto final a t=0 de la cuantificación de 5FU. En él se puede observar que el producto no es totalmente puro, presumiblemente contiene subproductos fruto de la liberación temprana del 5FU, ya que todos los picos tienen un UV tipo 5FU (pico máximo a λ=264 nm). Análisis realizado según condiciones: Sunfire C18 4,6x50mm 3,5µm, 0→60% de ACN (0,07% TFA) en H_2O (0,1% TFA) en 8min a flujo 1 ml/min.*

Como se ha comentado al inicio de este punto, era necesario la síntesis de un conjugado marcado con un fluoróforo para el seguimiento del compuesto *in vivo* y *ex vivo* por lo que es necesario un fluoróforo compatible con el instrumental que requiere este procedimiento, en nuestro caso un detector IVIS® Spectrum. El fluoróforo escogido fue Alexa Fluor 750, cuya longitud de onda de emisión resultaba idónea para llevar a cabo los estudios de biodistribución (figura 1.30). Debemos destacar que la relación entre el dendrón sin marcar y marcado debía ser de 99,94:0,06 %, referenciando sobre la concentración de 5FU. Por lo tanto la síntesis de este nuevo dendrón conjugado con 5FU se llevó a cabo a muy pequeña escala, partiendo tan solo de 1 mg de dendrón-5FU, no solo por la poca cantidad de producto necesaria para realizar los ensayos, sino también teniendo en cuenta el elevado coste del fluoróforo.

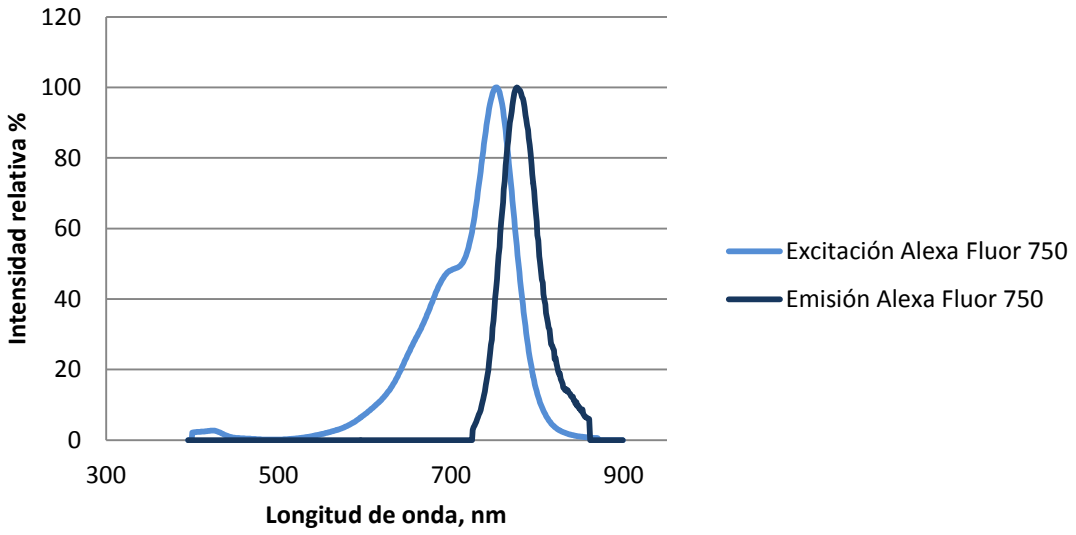
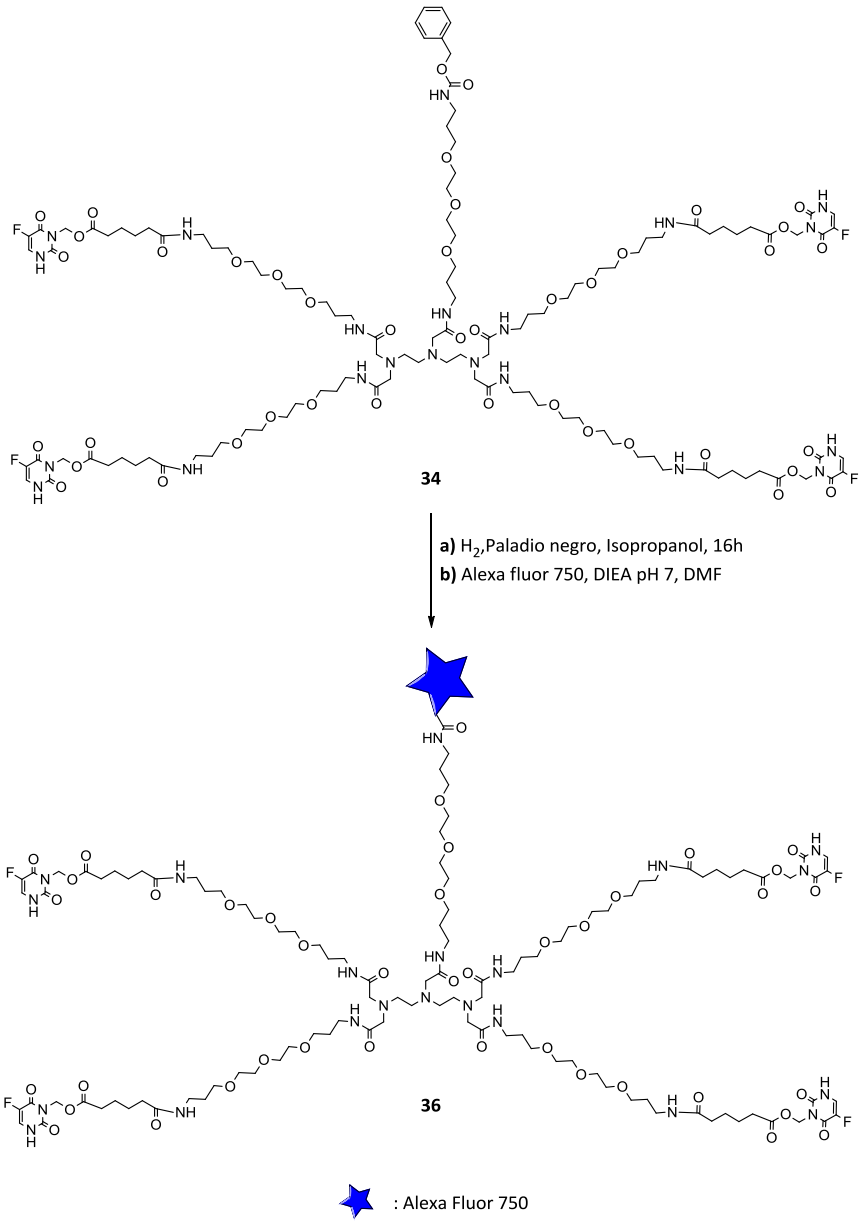


Figura 1.30 *Gráfico de la intensidad relativa de excitación y emisión del fluoróforo Alexa Fluor 750.*

El producto G1-45FU-1AF750 (**36**) fue sintetizado incorporando primero el 5FUAdipN$_1$-COOH (**24**) siguiendo el procedimiento sintético descrito en la figura 1.28. En este caso se partió de G1-4Boc-1Z (**13**), generándose tras la eliminación de los grupos Boc e incorporación del compuesto **24** en cada una de las ramas del dendrón, el producto G1-45FU-1Z (**34**). Este se sometió a un proceso de hidrogenólisis con el fin de eliminar el grupo protector Z situado en la rama unida al punto focal del dendrón, dando lugar a una amina libre sobre la cual se procedería a la conjugación del fluoróforo Alexa Fluor 750. Esta hidrogenólisis se llevó a cabo utilizando paladio negro sobre carbono como catalizador, en isopropanol y en presencia de una atmósfera de H_2. Una vez se obtuvo el dendrón con la amina libre se procedió a la incorporación del fluoróforo Alexa Fluor 750 succinimido éster en DMF a pH 7. Se escogió este pH para no someter el dendrón conjugado con 5FU a un pH más básico con el fin de evitar o minimizar la pérdida temprana del 5FU. Inmediatamente después de que la reacción se completara, se ajustó el pH del crudo a 4-5 con HCl/Dioxano 2M y se purificó con una columna de exclusión por tamaño (PD10). Destacar que el fluoróforo Alexa Fluor 750 no tiene un peso molecular único, es decir no se trata de una molécula monodispersa a diferencia de nuestro

dendrón. El seguimiento de la reacción se realizó mediante HPLC acoplado a un detector de fluorescencia, mucho más sensible que el detector de UV. Así en la traza cromatográfica de los crudos de reacción se pudo observar la aparición de un pico ancho que correspondía al producto **36**, que se encontraba muy cercano al producto Alexa Fluor 750 libre. Mediante esta cromatografía de HPLC con detección de fluorescencia no solo se llevo a cabo el control de la reacción y purificación, sino que mediante el uso de un método cromatográfico similar al empleado con el 5FU, se procedió a la cuantificación del Alexa Fluor 750 del compuesto final **36** ya purificado, con el fin de determinar la cantidad exacta de fluoróforo que contenía el compuesto.

a)



b)

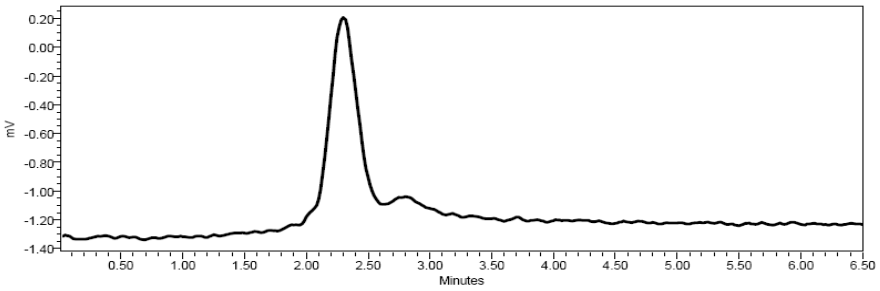
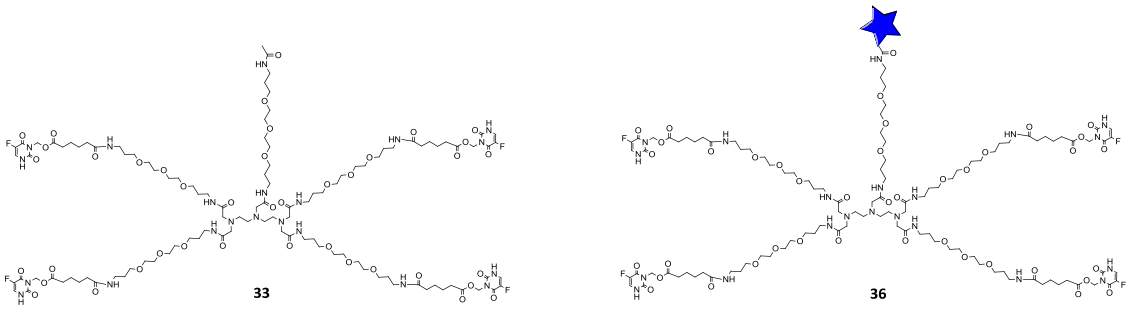


Figura 1.31 a) *Esquema de síntesis de la estrategia empleado para la formación del producto* ***36****.* ***b)*** *Ejemplo de cromatograma obtenido del compuesto* ***36*** *final (Sunfire C18 4,6x50mm 3,5µm, 0→60% de ACN (0,1% TFA) en H2O (0,1% TFA) en 8min a flujo 1 ml/min, empleando las longitudes de onda de absorción: 749 nm y emisión: 775 nm).*

Finalmente, y después haber cuantificado mediante HPLC la cantidad de 5FU y Alexa Fluor 750 en cada uno de los lotes, se llevó a cabo la mezcla de los dos compuestos en la proporción requerida y se filtró la solución resultante a través de un filtro estéril de 0,22 µm y se liofilizó. Los resultados de estos ensayos serán presentados y discutidos en el apartado 4 de este capítulo.



99.94% **0.06%**

mg totales de 5FU	µg totales de Alexa Fluor 750
57 mg	9 µg

Figura 1.32 *Resumen del lote destinado a los ensayos de biodistribución in vivo.*

3.2 Optimización de la conjugación del fármaco 5FU al dendrón

Con el fin de poder disponer de un proceso de síntesis que permitiera obtener el compuesto 36 en cantidades (cercanas a 1g) y pureza adecuadas para realizar los estudios de eficacia in vivo se procedió a la realización de una serie de estudios de optimización de la conjugación del derivado de 5FU al dendrón.

Así estimamos cuales eran los parámetros que se podían estudiar y que pudieran tener un efecto en el resultado final de la síntesis. Basicamente pensamos en que se podía incidir en tres partes del proceso: **a)** el método de incorporación del derivado $5FUN_1$Adipic-COOH (**24**);

b) las bases empleadas para la desprotonación de las aminas primarias de la superficie del dendrón y; **c)** el disolvente empleado en la reacción de conjugación (figura 1.33).

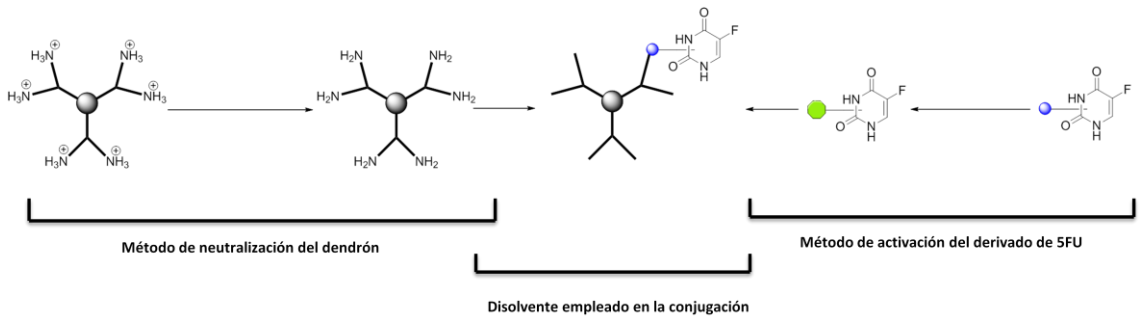


Figura 1.33 *Esquema de los tres procesos que estudiamos para su optimización en la conjugación del 5FU al dendrón.*

Como métodos de incorporación del derivado 5FUN$_1$Adipic-COOH (**24**) se evaluaron la formación del cloruro de ácido del compuesto **24**, el éster activo de pentafluorofenol de este compuesto, el uso como agentes de acomplamiento de los sistemas PyBOP/DIEA y DIC con HOBt como aditivo. La evaluación de distintas bases y la cantidad utilizada de las mismas para neutralizar las aminas de la superficie del dendrón se decidió realizar al observar que la solubilidad del mismo variaba mucho en función de si la neutralización era completa o no. Además este proceso era crucial ya que se tenía que tener un control del pH sobre la reacción bastante estricto ya que la liberación prematura del 5FU la asociábamos a trabajar con pHs básicos.

Los primeros estudios en los métodos de incorporación del derivado **24** al dendrón se llevaron a cabo empleando el cloruro de ácido de **24** como sistema de acoplamineto. Este cloruro de ácido se obtenía mediante reacción del derivado de 5FUN$_1$Adipic-COOH con 3 equivalentes de cloruro de oxoalilo en DCM anhidro a 0 °C añadiendo una gota de DMF anhidra para que actuara como catalizador en la formación del cloruro de ácido. Después de 1h el disolvente se evaporó y el crudo se coevaporó con tolueno para eliminar el exceso y trazas ácidas del cloruro de oxoalilo. La formación del producto fue confirmada mediante HPLC-MS del crudo de reacción disuelto en MeOH, ya que de esta manera si el cloruro de ácido estaba formado se observaba en la traza cromatográfica como producto mayoritario un poco cuya masa correspondía al éster metílico del derivado de 5FU (5FUN$_1$Adipic-COOMe). El cloruro de ácido del derivado de 5FU **24** siempre se obtuvo in situ antes de realizar cada una de las pruebas detalladas en la tabla 1.4. En el caso de los ensayos en el que se procedía a la incorporación de **24** mediante la formación del correspondiente pentafluorofenil éster se empleó la misma estrategia descrita que en el apartado 2.1 de este capítulo. Aquellos ensayos en los que se emplearon los sistemas de acoplamiento PyBOP/DIEA y DIC/HOBt como aditivo, estos se añadieron al crudo de reacción para activar *in situ* el derivado de 5FU (**24**).

Las distintas pruebas de optimización realizadas se encuentran descritas en tabla 1.4 y 1.5. En el ensayo que describe la entrada **A** de la tabla 1.4 se eliminaron los grupos Boc del dendrón

empleando HCl en dioxano 4M, sin tener en cuenta el número de equivalentes de ácido que se añadía a la mezcla, evaporando este crudo posteriormente cuando el dendrón se encontraba totalmente desprotegido. El crudo se disolvion en DCM anh. y se añadió DIEA hasta pH 8, controlando el pH de la mezcla con papel de pH, con la intención desprotonar todas las aminas libres del dendrón. El dendrón desprotegido se disolvió en estas condiciones pero con el tiempo la disolución se volvió turbia, no siendo el dendrón completamente soluble. Como se observa en la traza de HPLC **A** de la figura 1.34 no se observa producto final, tan solo $5FUN_1$Adipic-COOMe (debido a que el crudo se pincho disuelto en MeOH) pudiendo así corroborar que el cloruro de ácido del derivado de 5FU **24** no se había hidrolizado, por lo que no se obtenía el producto final debido a la insolubilidad del dendrón en medio DCM anh. En el ensayo descrito en la entrada **B** de la tabla 1.4 se realizó el ensayo en las mismas condiciones, pero empleando DMF anh. como disolvente, disolvente en el cual el dendrón se disolvía perfectamente. En estas condiciones, tal como se puede observar en la traza de HPLC **B** de la figura 1.34 el cloruro de ácido del derivado de 5FU se hidrolizaba observándose el compuesto **24**. La hidrólisis del cloruro de ácido del derivado de 5FU hacia que no se observará la formación del producto final. Estas condiciones se ensayaron varias veces con DMF anh. de distinta calidad observándose en todas las ocasiones el mismo resultado.

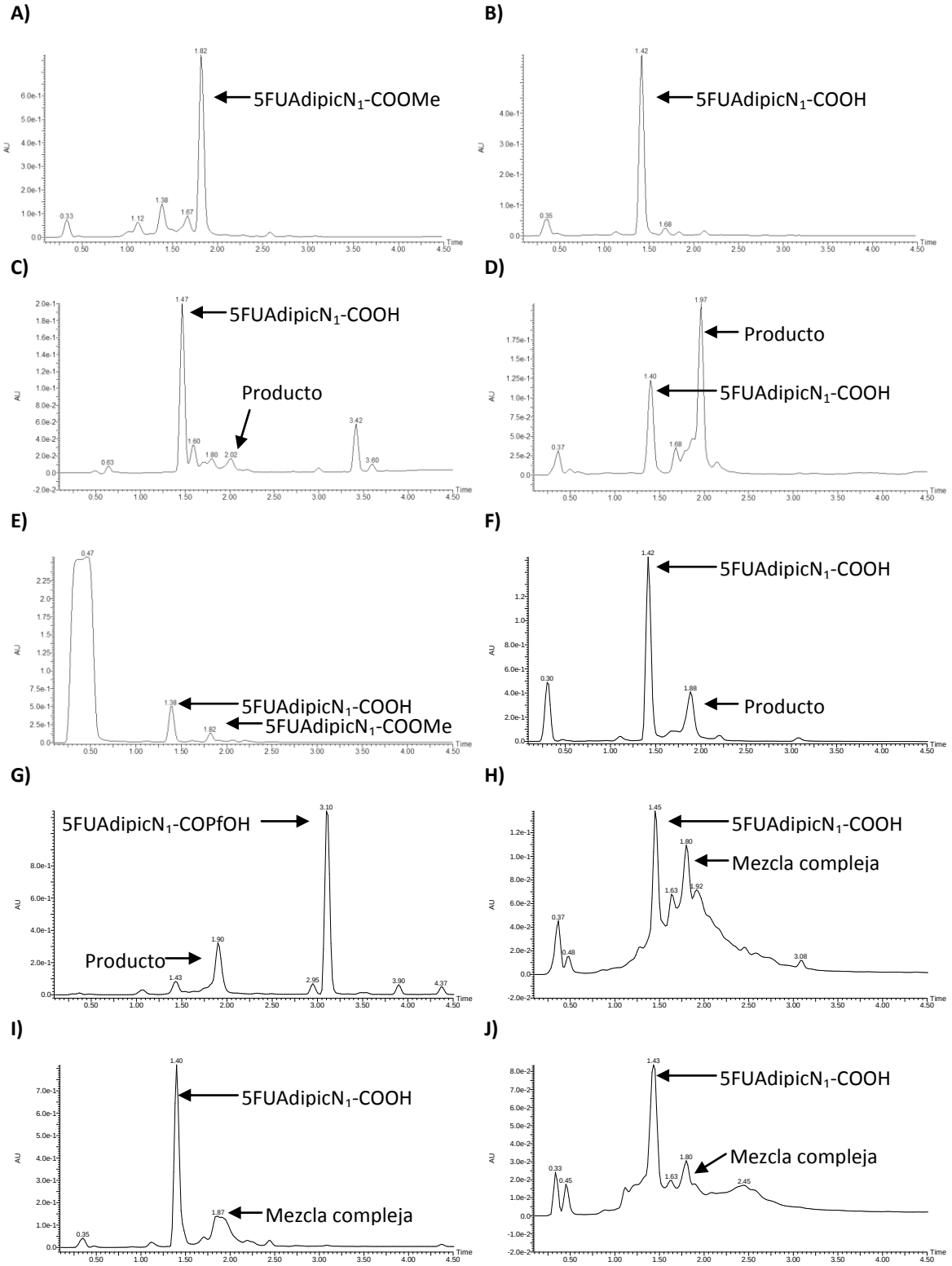
En el ensayo descrito en la entrada **C** de la tabla 1.4 se repitieron las condiciones del ensayo **A**, pero en esta ocasión, una vez disuelto el dendrón en DCM anh. y ajustado su pH a 8 se añadió DMF hasta que se obtuvo una disolución prácticamente transparente y se dejó evolucionar la reacción de acoplamiento a 0 °C. Con estas condiciones pudimos detectar producto final **36** (cromatograma **C**, figura 1.34) y 5FUAdipicoN_1-COOH en elevada proporción, por lo que concluimos que en estas condiciones el cloruro de ácido también se hidrolizaba.

En las condiciones ensayadas en la entrada **D** de la tabala 1.4 se optó por añadir base tanto a la disolución del dendrón que había sufrido el tratamiento acidolítico, como la del cloruro de ácido del derivado de 5FU **24** que procedía de un tratamiento con cloruro de oxoalilo y por lo tanto podía tener trazas de ácido. En los ensayos anteriores habíamos detectado que la solubilidad del dendrón en DCM disminuía al añadir la disolución del cloruro de ácido del derivado de 5FU **24**, ya que éste al reaccionar o mientras se hidrolizaba hacía bajar el pH de la solución, protonando de nuevo las aminas primarias libres del dendrón disminuyendo su reactividad y solubilidad. Al proceder de la manera descrita en la entrada **D** con ambas disoluciones ya a pH 8 antes de mezclarlas se pretendía el ácido clorhídrico que se generaba durante la reacción de acoplamiento. La mezcla de ambas disoluciones mostró una disolución transparente y se detectó el producto final y la desaparición del dendrón que se encontraba en defecto (traza cromatográfica **D**, figura 1.34). En el ensayo E (tabla 1.4) se decidió utilizar piridina como disolvente en la reacción de acoplamiento. Si bien es cierto que la piridina tiene un punto de ebullición muy alto y es un disolvente difícil de eliminar, al tener un carácter básico nos permitía mantener la solución de acoplamiento siempre a pH básico y con capacidad de neutralizar la generación de HCl, además en este disolvente la solubilidad del

dendrón no era un problema. A pesar de haber secado la piridina anhidra sobre tamiz molecular durante toda la noche y de trabajar en condiciones anhidras no se observó el producto final, seguramente debido al hecho que en estas condiciones tiene lugar la hidrólisis del cloruro de ácido de **24**, y no por problemas de solubilidad, ya que la disolución obtenida del crudo era totalmente transparente (traza cromatográfica **E**, figura 1.34).

Tabla 1.4 *Condiciones de reacción empleados en lo ensayos de incorporación del derivado de 5FU 26 al dendrón (entradas A-N). Todos los disolventes empleados en las pruebas de incorporación de 26 al dendrón mediante la formación del cloruro de ácido del mismo son anhidros. En estas pruebas se emplearon 2 lotes diferentes de 5FUN$_1$Adipic-COOH (**24**) que se diferenciaban en el método de purificación de cada uno de ellos, que se encuentra especificado en la tabla. Se especifica el método de purificación ya que el lote de 5FUN$_1$Adipic-COOH (**24**) purificado mediante HPLC-MS Semi-preparativo contiene sales de trifluoroacetato, en cambio cuando la purificación se realiza con una columna pre-empaquetada tipo HLB el producto se aísla en condiciones neutras. La DIEA y piridina empleada empleada en algunos ensayos también eran es anhidras. El término SCX se refiere a las columnas de intercambio iónico pre-empaquetadas que se emplean en la separación de compuestos hidrosolubles básicos, estos compuestos quedan unidos al relleno de sílice de la columna y son escindidos de ella mediante la elución con una solución de NH_3 en MeOH de la concentración adecuada.*

	Disolvente	Purificación de 5FU	Tipo de G1	Desprotección de G1	Neutralización de G1	Activación de 5FU	pH 5FU	pH G1
A	DCM	HLB	13	HCl/Dioxano 4M	DIEA	Cloruro de ácido	---	pH 8
B	DMF	HLB	13	HCl/Dioxano 4M	DIEA	Cloruro de ácido	---	pH 8
C	DCM	HLB	13	HCl/Dioxano 4M	DIEA	Cloruro de ácido	---	pH 8
D	DCM	HLB	13	HCl/Dioxano 4M	DIEA	Cloruro de ácido	DIEA, pH 8	pH 8
E	Piridina	HLB	13	HCl/Dioxano 4M	Piridina	Cloruro de ácido	Piridina	Piridina
F	DCM	HLB	13	HCl/Dioxano 4M	SCX	Cloruro de ácido	DIEA, pH 7	pH 8
G	DCM	HLB	13	HCl/Dioxano 4M	SCX	Éster de PfOH	---	pH 8
H	DCM	Semi-preparativo	13	HCl/Dioxano 4M	SCX	Cloruro de ácido	DIEA, pH 8	pH 6
I	DCM	Semi-preparativo	13	HCl/Dioxano 4M	NH_3 0,1N	Cloruro de ácido	DIEA, pH 8	pH 6
J	DCM	Semi-preparativo	13	HCl/Dioxano 4M	$(NH_4)(HCO_3)$ aq. 1M. Solución a pH 8	Cloruro de ácido	DIEA, pH 7	pH 6
K	DCM	Semi-preparativo	11	HCl/Dioxano 4M, diluido en DCM hasta HCl 2M	NH_3 0,1N	Éster de PfOH	---	pH 6
L	DCM	Semi-preparativo	11	TFA/DCM (1:3)	NH_3 3,5N	Cloruro de ácido	DIEA, pH 7	pH 6
M	DCM	HLB	11	16 eq. de HCl/Dioxano 4M, diluido en DCM hasta HCl 1M	SCX	Cloruro de ácido	DIEA, pH 9	pH 11
N	DCM	HLB	11	16 eq. de HCl/Dioxano 4M, diluido en DCM hasta HCl 1M	SCX	Cloruro de ácido	DIEA, pH 9	pH 8,5


A)
5FUAdipicN1-COOMe
B)
5FUAdipicN1-COOH
C)
5FUAdipicN1-COOH
Producto
D)
Producto
5FUAdipicN1-COOH
E)
5FUAdipicN1-COOH
5FUAdipicN1-COOMe
F)
5FUAdipicN1-COOH
Producto
G)
5FUAdipicN1-COPfOH
Producto
H)
5FUAdipicN1-COOH
Mezcla compleja
I)
5FUAdipicN1-COOH
Mezcla compleja
J)
5FUAdipicN1-COOH
Mezcla compleja

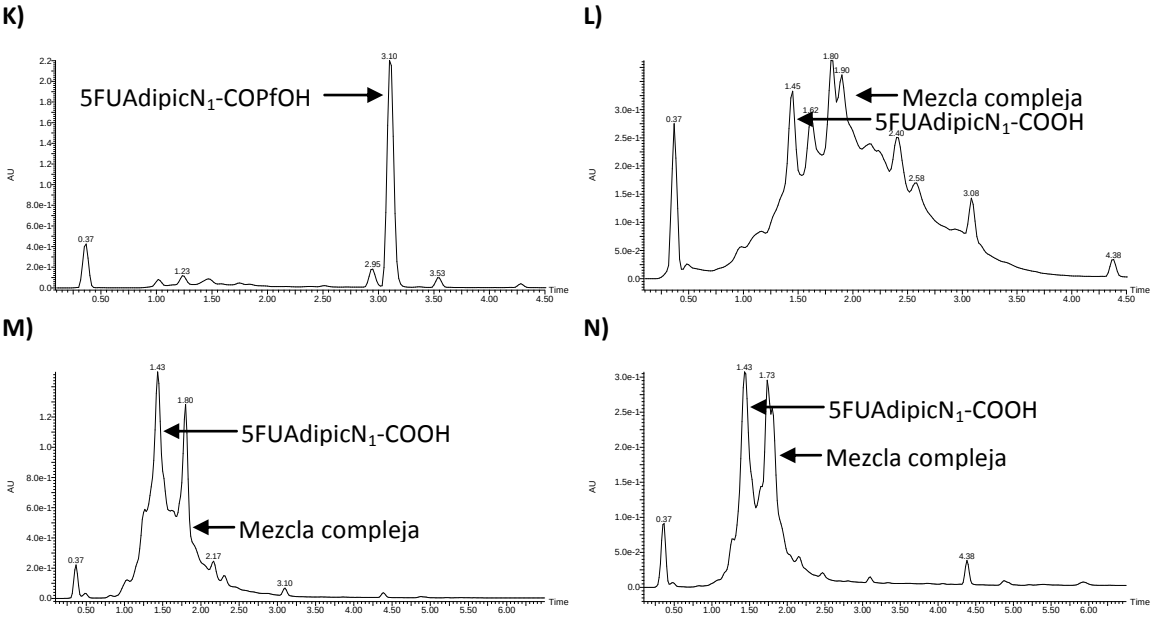


Figura 1.34 *Trazas de HPLC-MS de ensayos de incorporación del derivado de 5FU* ***24*** *al dendrón correspondientes a los ensayos A-N. Todos los análisis se realizaron con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min.*

En los ensayos **F** y **G** (tabla 1.4) se decidió explorar otro método de neutralización del dendrón tras la eliminación de los grupos Boc y evaluar dos procedimientos de incorporación del derivado **24** al dendrón. Para ambos ensayos se utilizó el mismo lote de dendrón **13** que se trató con una solución de HCl en dioxano 4M para eliminar los grupos Boc, seguidamente se evaporó el disolvente del crudo y a continuación se disolvió en H_2O e introducido en una columna pre-empaquetada SCX. Las columnas SCX contienen un relleno capaz de atrapar los compuestos hidrosolubles básicos que se encuentran protonados, posteriormente estos son eluidos de la columna en forma neutra al utilizar como eluyente NH_3 en MeOH. Con este sistema pretendíamos obtener una metodología sencilla, robusta y reproducible para la obtención del dendrón ya neutralizado. El dendrón obtenido tras la SCX después de evaporar el disolvente fue redisuelto en DCM muy fácilmente, quedando solo un poco de precipitado que correspondía a las sales que se filtraron a través de un filtro de 45 µm. El pH de la disolución del dendrón **14** obtenido tras la SCX era de 8. Esta disolución se disolvió en dos partes, con una se procedió a realizar la incorporación de **24** mediante la formación del correspondiente cloruro de ácido, ajustando el pH a 7 de la disolución de este antes de proceder al acoplamiento sobre el dendrón (ensayo **F**, tabla 1.4) y con la otra parte se procedió a incorporar **24** al dendrón mediante la formación previa de su correspondiente éster de pentafluorofenilo (ensayo **G**, tabla 1.4). El seguimiento de ambas reacciones por HPLC-MS mostró en ambos casos un crudo de reacción limpio con presencia del producto final y ausencia del dendrón de partida o de productos correspondientes a incorporaciones parciales de 5FUN_1Adip-COOH (**24**).

Con el fin de confirmar los buenos resultados de los ensayos **F** y **G** se decidió repetir las condiciones **F** para la incorporación de **24**. En este ensayo (entrada **H**, tabla 1.4) el dendrón eluido de la columna SCX y redisuelto en DCM presentaba un pH 6. Como se puede ver en la traza cromatográfica **H** de la figura 1.34 del crudo correspondiente a estas condiciones se obtuvo una mezcla compleja, a pesar de repetir las mismas condiciones que en el ensayo **F**, en la que se detectaba producto final y otros que contenían distintos grados de incorporación del 5FU.

Ya que el único objetivo para realizar la columna de SCX con el dendrón desprotegido **14** era desprotonar las aminas presentes en el mismo y no separarlo de nunguna impureza, se decidió tratar el dendrón directamente con una disolción de NH_3 en MeOH 0,1 N, evaporar, redisolver en DCM y filtrar las sales que se generaran (ensayo **I**, tabla 1.4), con el fin de controlar el NH_3 que se añadía. Procediendo de esta manera, el pH de la solución del dendrón era pH 6 y los resultados de incorporación del derivado de 5FU sobre el dendrón fueron similares a los obtenidos en el ensayo **H** (traza cromatográfica **H**, figura 1.34). Resultados similares se obtuvieron en el ensayo J al emplear una solución acuosa de $(NH_4)(HCO_3)$ para neutralizar el dendrón (traza cromatográfica **J**, figura 1.34). En el caso de los ensayos **K** y **L** (tabla 1.4) se realizó la eliminación de los grupos Boc con otros procedimientos distintos a los empleados hasta ese momento (en el ensayo **K** se usa HCl 2M y en el ensayo **L**, TFA), y para neutralizar luego con una solución NH_3 (NH_3 0,1 N en el caso del ensayo **K** y NH_3 3,5 N en el caso del ensayo **L**), pero sin conseguir resultados satisfactorios.

Era claramente evidente que existía una dificultad en controlar el pH en disoluciones puramente orgánicas, como en nuestro caso, ya que su medida era ficticia, por ello se decidió controlar los equivalentes de ácido que se empleaban en la eliminación de los grupos Boc del dendrón (ensayos **M** y **N,** tabla 1.4). Pero en estos ensayos no se controla el número de equivalentes de la base que se añade para la desprotonación/neutralización del dendrón y se acaban obteniendo resultados muy similares a los anteriores.

Se plantearon tres ensayos más (pruebas **O**-**Q**, tabla 1.5) donde se controlarían tanto los equivalentes de HCl que añadiríamos al dendrón **13** para la eliminación de los grupos Boc, como los equivalentes de base que se emplearían en su neutralización.

El primer efecto que detectamos al controlar los equivalentes de HCl en la desprotección del dendrón **13** fue la ralentización de la reacción de eliminación de los grupos Boc, ya que a partir de este momento necesitaríamos de 4h a 5h para obtener el dendrón totalmente desprotegido, frente a la 1h que era necesaria cuando añadíamos un exceso no controlado de HCl. Ensayamos tres métodos de métodos de incorporación del derivado de 5FU, y el que resultó más adecuado fue la formación del éster de pentafluorofenol, ya que el uso de DIC/HOBt y PyBOP como agentes acoplantes (ensayos **O** y **P**) daban crudos más complejos que con el sistema del éster de pentafluorofenol (figura 1.35). En estos ensayos descartamos el uso del cloruro de ácido como método de activación del compuesto **24** debido a que en ensayos

anteriores determinamos que este método no era compatible con el uso de DMF como disolvente, y en todos los casos se empleó una mezcla DCM/DMF (1:1) como disolvente. Considerando todos los resultados obtenidos se optó por las condiciones **P** para proceder a la síntesis del nanoconjugado dendrón-5FU a una escala superior.

Tabla 1.5 *Condiciones de reacción empleados en los ensayos de incorporación del derivado de 5FU* ***24*** *al dendrón (entradas* ***O****-****Q****). En todos los ensayos descritos el derivado 5FUN1Adipic-COOH (****24****) se purificó mediante una columna pre-empaquetada HLB, de modo que este producto es purificado en medio neutro (G0→100 %B de* H_2O*-ACN,) sin aditivos de carácter ácdio o básico. En todos los ensayos se utilizó* Et_3N *anhidra.*

	Disolvente	Purificación de 5FU	Tipo de G1	Desprotección de G1	Neutralización de G1	Activación de 5FU	pH 5FU	pH G1
O	DCM/DMF	HLB	13	16 eq. de HCl/Dioxano 4M, diluido en DCM hasta HCl 1M	8 eq. Et_3N	PyBOP	---	---
P	DCM/DMF	HLB	13	16 eq. de HCl/Dioxano 4M, diluido en DCM hasta HCl 1M	8 eq. Et_3N	Éster de PfOH	---	---
Q	DCM/DMF	HLB	13	16 eq. de HCl/Dioxano 4M, diluido en DCM hasta HCl 1M	8 eq. Et_3N	DIC/HOBt	---	---

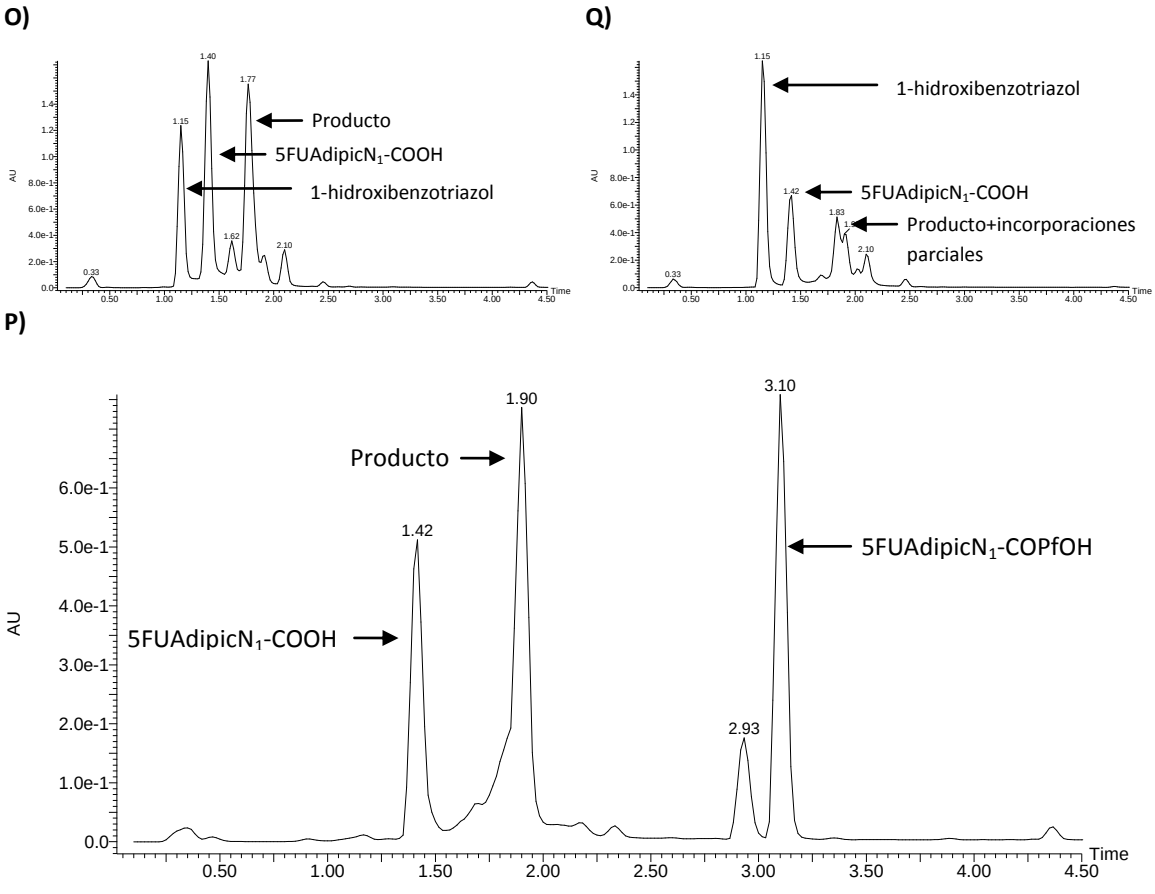


Figura 1.35 *Trazas de HPLC-MS de los ensayos* ***O****-****P*** *de la conjugación del derivado de 5FU* ***24*** *al dendrón. Todos los análisis se realizaron con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en* H_2O *(0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min.*

Con el fin de realizar los experimentos de eficacia terapéutica in vivo se procedió a la síntesis del nanoconjugado a escala suficiente para cumplir los requisitos del ensayo. Para poder

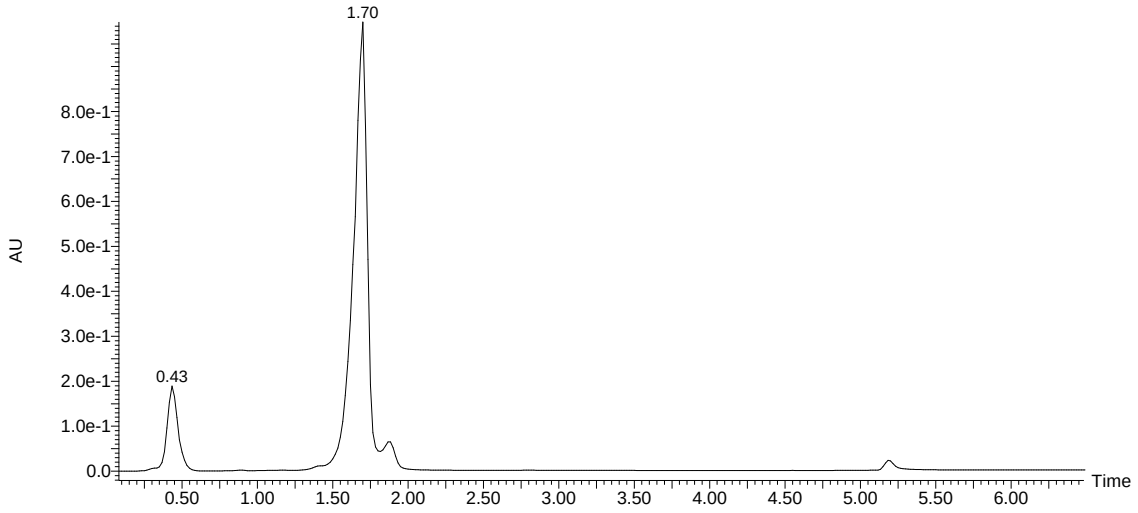
realizar este se debía disponer de una cantidad de nanocongado G1-45FU-1Ac (**33**) que correspondería a 150 mg equivalentes de 5FU. Como ya se ha comentado, finalmente optamos por la estrategia del pentafluorofenil éster como método de activación, partiendo de 587 mg del dendrón 11 y de 565 mg del derivado activado en forma de pentafluorofenil éster 25. La desprotección del dendron se llevó a cabo con 16 eq. de HCl 1M en dioxano y se neutralizó con 8 eq. de Et_3N. Durante la reacción de incorporación tras 16h de reacción se detecto que la reacción no avanzaba y se añadieron 4 eq. más de Et_3N. La reacción se paró cuando ya no se detectó el dendrón de partida o dendrones con incorporaciones parciales de derivado de 5FU, para ello se acidificó hasta pH 4,5 mediante la adición de una solución de HCl en dioxano 1M.

Primeramente se planteó realizar una diálisis en medio MeOH como método de purificación del nanoconjugado, pero se comprobó que el dendrón podía traspasar la membrana de diálisis y por lo tanto no era posible emplear este método. Finalmente y para garantizar la mayor pureza se optó por purificar el nanoconjugado mediante HPLC-MS semi-preparativo. Obteniendo 556 mg del producto final 33, 70% de rendimiento, con un grado de pureza del 79% de pureza (λ=260 nm)

Una vez obtenida la cantidad de nanoconjugado correspondiente a los 150 mg eq. de 5FU se cuantificó la cantidad total de 5FU con el método de HPLC que previamente habíamos desarrollado (apartado 2.2). A pesar de haber tomado todas las precauciones posibles, al realizar el análisis del nanoconjugado descubrimos que había sufrido una liberación parcial temprana y no controlado de 5FU. Esta liberación no se apreciaba cuando empleábamos el método de análisis habitual del laboratorio que consistía en una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min (figura 1.36, a), en cambio empleando una columna Sunfire C18 4,6x50mm 3,5µm y un gradiente 0→60% de ACN (0,1% TFA) en H_2O (0,1% TFA) en 8min a flujo 1 ml/min, se podían apreciar claramente todos los picos correspondientes a dendrones incompletos (figura 1.36).

Debido a esta liberación temprana y no controlada de 5FU se abandonó la realización de los estudios *in vivo* con este nanoconjugado, ya que como se ha comentado en este tipo de estudios es sumamente importante que el dendrón se encuentre completo y la cantidad de 5FU totalmente controlada.

a)



b)

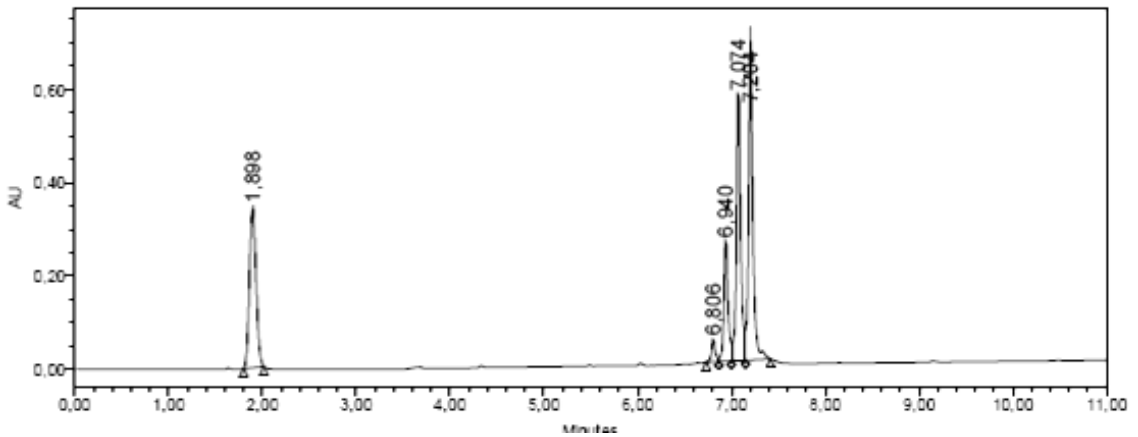


Figura 1.36 *HPLC-MS del nanoconjugado final obtenido.* ***a****) XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min.* ***b****) Sunfire C18 4,6x50mm 3,5µm y un gradiente 0→60% de ACN (0,1% TFA) en H_2O (0,1% TFA) en 8min a flujo 1 ml/min.*

4 Resultados ensayo de biodistribución

Como se ha comentado anteriormente los ensayos de biodistribución in vivo se llevaron a cabo por el grupo del Dr. Schwartz y la Dra. Ibasolo del Hospital Vall de Hebrón de Barcelona, para este ensayo se emplearon los compuestos descritos en el punto 3.1 de este capítulo (figura 1.32). El experimento se realizó en ratones hembra atímicos de edades comprendidas entre las 6 y 8 semanas, a los que previamente se implantó, vía subcutánea, células de cáncer colorrectal humano (HT-29) y se dejó evolucionar el tumor (modelo ortotópico).

Se establecieron seis grupos diferenciados: G0: grupo compuesto por tres ratones, los cuales no fueron tratados, que fueron sacrificados a las 4h, 24h y 72h; G1: grupo compuesto por cuatro ratones tratados con la mezcla dendrón-5FU-AF750, que fueron sacrificados a las 4h;

G2: grupo compuesto por cuatro ratones tratados con 5FU libre, que fueron sacrificados a las 4h; G3: grupo compuesto por cuatro ratones tratados con la mezcla dendrón-5FU-AF750, que fueron sacrificados a las 24h; G4: grupo compuesto por cuatro ratones tratados con 5FU libre, que fueron sacrificados a las 24h y; G5: grupo compuesto por cuatro ratones tratados con la mezcla dendrón-5FU-AF750, que fueron sacrificados a las 72h. Los ratones recibieron una única dosis a t=0 min de 57 mg 5FU/Kg de ratón en el caso de los tratados con la mezcla dendrón-5FU-AF750 y de 50 mg 5FU/Kg de ratón en el caso de los tratados con 5FU libre. A los ratones sacrificados se le extrajeron diferentes tejidos (tumor, plasma, hígado, bazo, riñón, pulmones, corazón, cerebro, músculo y piel) para la determinación *ex vivo* mediante del 5FU acumulado mediante HPLC, y de esta manera poder validar el método de fluorescencia.

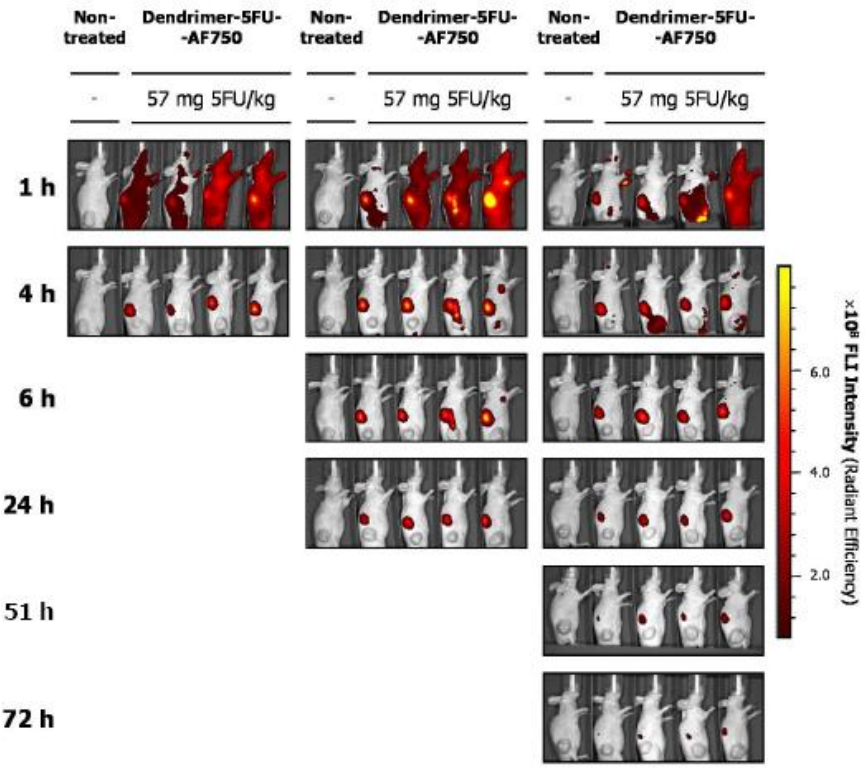
El método de fluorescencia antes mencionado consistía en la determinación de la acumulación en tumor y en el resto del cuerpo midiendo la fluorescencia de la mezcla dendrón-5FU-AF750, que contenía el fluoróforo, a diferentes tiempos, tanto *in vivo* como *ex vivo*, una vez extraídos los tejidos. Esta medida se llevo a cabo mediante el uso de un detector IVIS® Spectrum, con vistas ventrales, laterales y dorsales, en el caso del seguimiento *in vivo*. La señal de fluorescencia fue medida en unidades de eficiencia radiante.

Los primeros resultados que podemos destacar de estos ensayos son que no se detecta ningún tipo de afecto adverso, es decir, toxicidad, a las dosis administradas de 5FU libre y dendrón-5FU-AF750, a los tiempos más largos (72h). Este resultado tiene una especial importancia, ya que demuestra que el dendrón no parece tóxico, y por lo tanto puede ser considerado un buen candidato para la administración de fármacos.

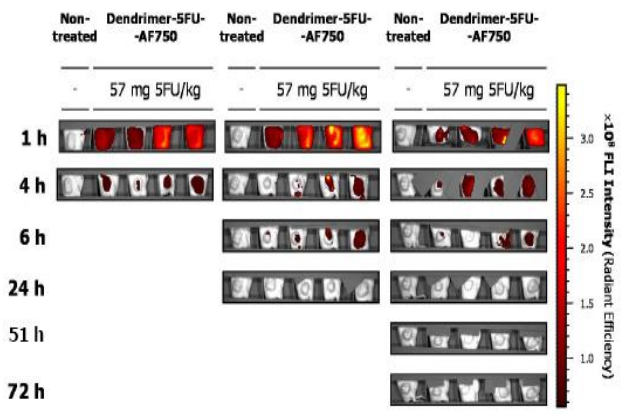
Estos ensayos demostraron que *in vivo* el dendrón-5FU-AFT750 presenta un máximo de acumulación en tumor 4h tras su administración, concentración que disminuye rápidamente en las primeras 24h y se mantiene aproximadamente hasta las 72h (figura 1.37, a y b). Es más, resultados *ex vivo* muestran el mismo comportamiento de la acumulación en tumor (figura 1.37, c).

Estos ensayos también muestran la vía de excreción del nanoconjugado, en nuestro caso el dendrón-5FU-AFT750 se excreta rápidamente por vía renal. Es posible observar una gran acumulación del compuesto en los riñones a las 4h post-administración, la cual va disminuyendo rápidamente hasta las 51h post-administración. Al igual que en el caso anterior estos resultados se reflejan *in vivo* y *ex vivo* (figura 1.38).

a)



b)



c)

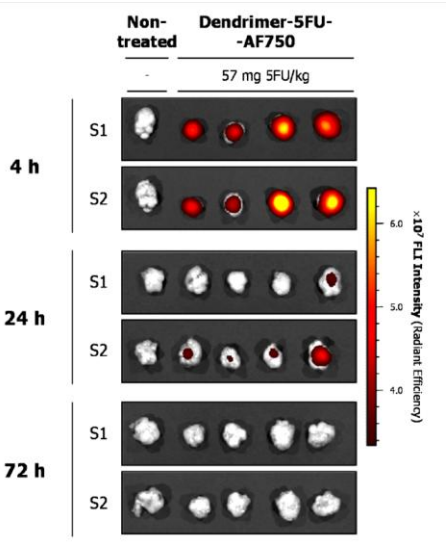


Figura 1.37 *Monitorización no invasiva de la acumulación en función del tiempo en tumor del compuesto dendrón-5FU-AF750 in vivo y ex vivo. La acumulación de Alexa Fluor 750 en el tumor fue medida tras una administración única a 1h, 4h, 6h, 24h, 51h y 72h post-administración. Las escalas de color indican la intensidad relativa de la señal con el paso de tiempo. En la imagen* ***a*** *se muestra la vista lateral del ratón y en la imagen* ***b*** *la vista lateral del ratón con el tumor enmarcado. En la imagen* ***c*** *se muestra la acumulación ex vivo.*

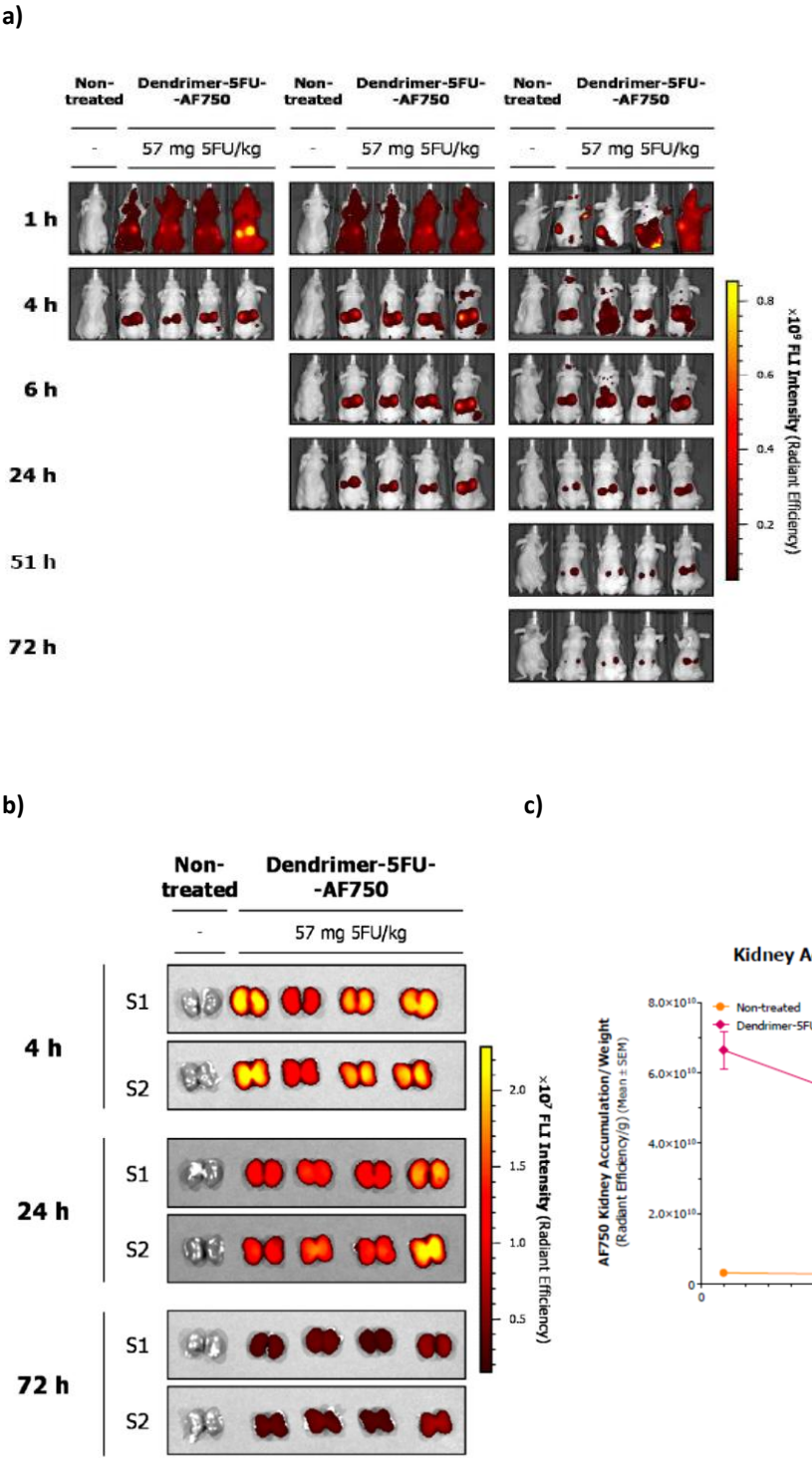


Figura 1.38 *Excreción renal del dendrón-5FU-AF750 en el tiempo. La acumulación de Alexa Fluor 750 en riñón fue medida tras una administración única a 1h, 4h, 6h, 24h, 51h y 72h post-administración. Las escalas de color indican la intensidad relativa de la señal con el paso de tiempo. En la imagen* ***a*** *se muestra una vista dorsal del ratón in vivo, y en la imagen* ***b*** *encontramos la fluorescencia ex vivo detectada, resultado que muestra una elevada correspondencia con la imagen in vivo (****a****). En la imagen* ***c*** *encontramos un gráfica de eficiencia radiante frente a tiempo post-administración que ilustra claramente la rápida excreción vía renal que presenta el nanoconjugado.*

Si tenemos en cuenta todos los datos recopilados del análisis *ex vivo* de los tejidos, se puede concluir que la mayoría del compuesto administrado es excretado vía renal (aprox. 45% del total) durante las primeras 4h post-administración. En este momento es también cuando se detecta la mayor acumulación de nanoconjugado en el tumor, alcanzando esta acumulación aproximadamente el 1% del total administrado y disminuyendo al 0,5% a las 24h. De la misma manera se observa una baja excreción hepática y ninguna acumulación en bazo, pulmones, corazón, cerebro, músculo y plasma (figura 1.39).

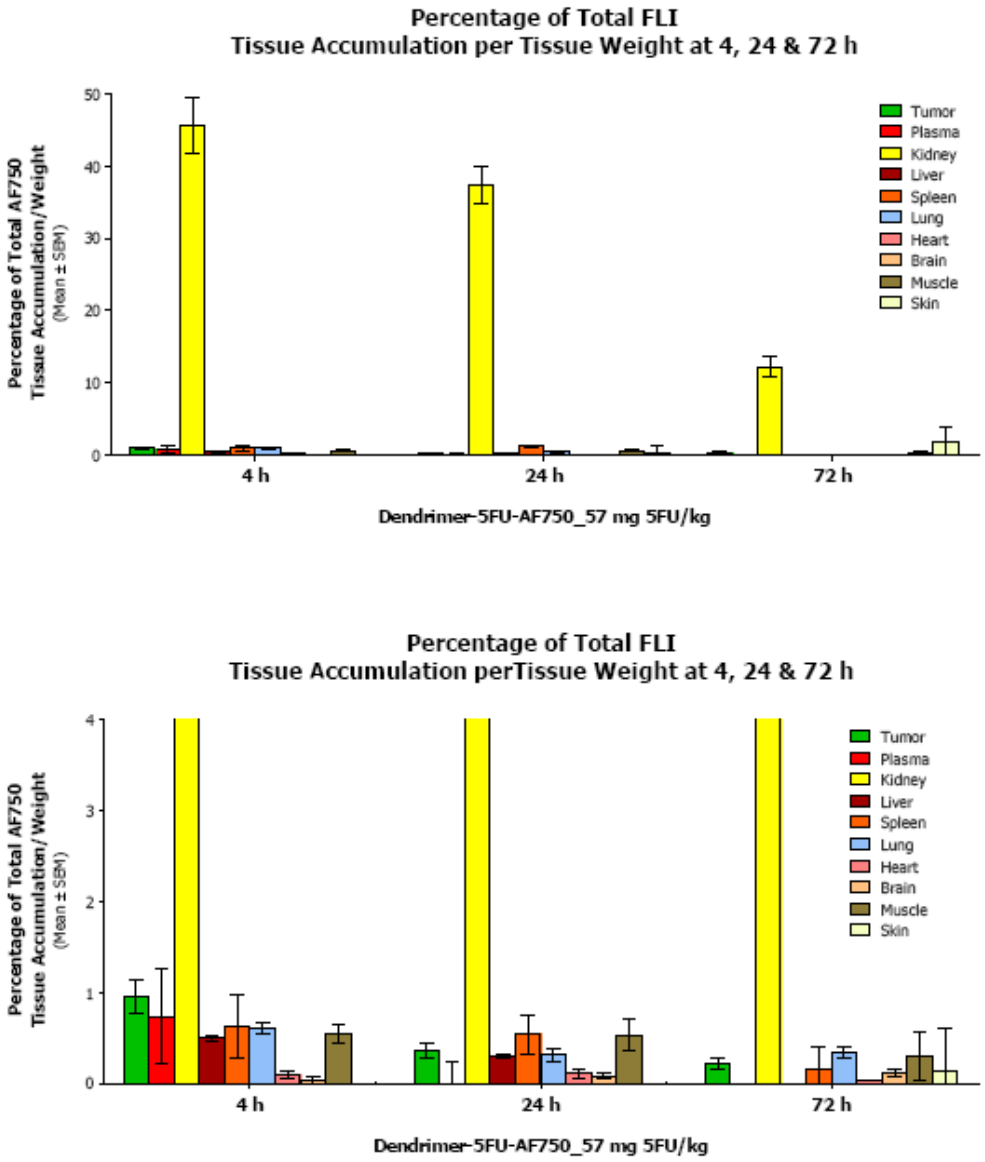


Figura 1.39 *Biosdistribución en tejido del dendrón-5FU-AF750. Porcentaje de acumulación ex vivo en tumor, plasma, riñón, hígado, bazo, pulmón, corazón, cerebro, músculo y piel a las 4h, 24h y 72h post-administración. Los porcentajes corresponden a los valores medios encontrados para cada uno de los tejidos antes mencionados.*

CONCLUSIONES

- Se ha sintetizado el dendrón de G1-4Boc-1Bn (9) a escala superior a 10g, demostrando que el dendrón desarrollado en nuestro grupo de investigación es escalable.
- En el desarrollo de nanoconjugados dendrón-5FU, su uso como sistema de administración del fármaco 5FU se ha visto comprometido debido a la elevada labilidad del enlace éster que conecta el fármaco con el dendrón.
- Este tipo de unión, que ha funcionado y se utiliza ampliamente en otros sistemas, no es compatible con nuestro conjugado, ya que la estructura del dendrón hace que el 5FU quede demasiado expuesto al medio externo.
- Es necesario encontrar un nuevo tipo de enlace apropiado para el 5FU más compatible con nuestra estructura.
- Debido a la baja estabilidad, solo se ha sintetizado el conjugado con G1 y este no presenta una biodistribución compatible con una acumulación en tumor por efecto EPR. Siendo necesario alcanzar generaciones superiores de dendrón para poder evaluar si este efecto tiene lugar con nuestros sistemas.

BIBLIOGRAFÍA

[1] P.M. Wilson, P.V. Danenberg, P.G. Johnston, H.J. Lenz, R.D. Ladner. "Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy", *Nature Reviews Clinical Oncology*. **2014**, *11*, 282-298.

[2] F.G. Berger, S.H. Berger. "Thymidylate Synthase as Chemotherapeutic Drug Target. Where Are We after Fifty Years?", *Cancer Biology & Therapy*. **2006**, *5*, 1238-1241.

[3] S.H. Berger, D.L. Pittman, M.D. Wyatt. "Uracil in DNA: Consequences for carcinogenesis and chemotherapy", *Biochemical Pharmacology*. **2008**,*76*, 697-706.

[4] M.P. Costi, S. Ferrari, A. Venturelli, S. Calò, D. tondi, D. Barlocco. " Thymidylate Synthase Structure, Function and Implication in Drug Discovery". *Current Medicinal Chemistry*. **2005**, *12*, 2241-2258.

[5] J. Liu, J.C. Schmitz, X. Lin, N. Tai, W. Yan, M. Farrell, M. Bailly, T. Chen, E. Chu. " Thymidylate synthase as a translational regulator of cellular gene expression", *Biochimica et Biophysica Acta*. **2002**, *1587*, 174-182.

[6] N. Gonen, Y.G. Assaf. "Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance", *Drug Resistance Updates*. **2012**, *15*, 183-210.

[7] S. Farber, L.K. Diamond, R.D. Mercer, R.F. Sylvester Jr., J.A. Wolff. "Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin)", *The New England Journal of Medicine*. **1948**, *238*, 787-793.

[8] Y.G. Assaraf. "Molecular basis of antifolate resistance", *Cancer Metastasis Reviews*. **2007**, *26*, 153-181.

[9] C. Heidelberger, N.K. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duschinsky, , R.J. Schnitzer, E. Pleven, J. Scheiner. "Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds", *Nature*. **1957**, *178*, 663-666.

[10] J.A. Miller, E.C. Miller, G.C. Finger. "On the Enhancement of Carcinogenicity of 4-Dimethylaminoazobenzene by Fluoro-Substitution", *Cancer Research*. **1953**, *12*, 93-97.

[11] R.J. Rutman, A. Cantarow, K.E. Paschkis. "Studies in 2-Acetylaminofluorene Carcinogenesis. III. The Utilization of Uracil-2-C14 by Preneoplastic Rat Liver and Rat Hepatoma", *Cancer Research*. **1954**, *14*, 119-123.

[12] J.J. Jaffe, R.E. Handshumacher, A.D. Welch. "Studies on the carcinostatic activity in mice of 6-azauracil riboside (azauridine), in comparison with that of 6-azauracil", *Yale Journal of biology and medicine*. **1957**, *30*, 168-175.

[13] J.J. Lee, E. Chu. "Sequencing of Antiangiogenic Agents in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer", *Clinical Colorectal Cancer*. **2014**, *Article in Press*.

[14] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston. "5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies", *Nature Reviews Cancer*. **2003**, *3*, 330-338.

[15] K. Ghoshal, S.T.Jacob. "Specific Inhibition of Pre-Ribosomal RNA Processing in Extracts from the Lymphosarcoma Cells Treated with 5-Fluorouracil", *Cancer Research*. **1994**, *54*, 632-636.

[16] R. Kanamaru, H. Kakuta, T. Sato, C. Ishioka, A. Wakui. "The inhibitory effects of 5-Fluorouracil in the metabolism of preribosomal ans ribosomal RNA in L-1210 cells in vitro", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. **1986**, *17*, 43-46.

[17] D.V. Santi, L.W. Hardy. "Catalytic Mechanism and Inhibition of tRNA (Uracil-5-) methyltransferase: Evidence for Covalent Catalysis", *Biochemistry*. **1987**, *26*, 8599-8606.

[18] K. Randerath, W.C. Tseng, J.S. Harris, L.J. Lu. "Specific effects of 5-fluoropyrimidines and 5-azapyrimidines on modification of the 5 position of pyrimidines, in particular the synthesis of 5-methyluracil and 5-methylcytosine in nucleic acids", *Recent Results in Cancer Research*. **1983**, *84*, 283-297.

[19] J.R. Patton. "Ribonucleoprotein particle assembly and modification of U2 small nuclear RNA containing 5-fluorouridine". *Biochemistry*. **1993**, *32*, 8939-8944.

[20] S.L. Doong, B.J. Dolnick. " 5-Fluorouracil substitution alters pre-mRNA splicing in vitro", *Journal of Biological Chemistry*. **1988**, *263*, 4467-4473.

[21] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston. "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies", *Nature Reviews Cancer*. **2003**, *3*, 330–338 .

[22] S.J. Caradonna, Y.C. Cheng. "The role of deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase, uracil-DNA glycosylase, and DNA polymerase alpha in the metabolism of FUdR in human tumor cells", *Molecular Pharmacology*. **1980**, *18*, 513–520.

[23] R.H. Grafstrom, B.Y. Tseng, M. Goulian. "The incorporation of uracil into animal cell DNA *in vitro"*, *Cell*. **1978**, *15*, 131–140.

[24] S.D. Webley, S.J. Welsh, A.L. Jackman, G.W. Aherne. "The ability to accumulate deoxyuridine triphosphate and cellular response to thymidylate synthase (TS) inhibition, *British Journal of* Cancer. **2001**, *85*, 446–452.

[25] R.B. Diasio, B.E. Harris. "Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil", *Clinical Pharmacokinetics*. **1989**, **16**, 215-237.

[26] D.M. Thomas, J.R. Zalcberg. "5-Fluorouracil: a pharmacological paradigm in the use of cytotoxics", *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. **1998**, *25*, 887-895.

[27] C. Eng. "Toxic effects and their management: daily clinical challenges in the treatment of colorectal cancer", *Nature Reviews Clinical Oncology*. **2009**, *6*, 207-218.

[28] G.C. Daher, B.E. Harris, R.B. Diasio. "Metabolism of pyrimidine analogues and their nucleosides", *Pharmacology & Therapeutics*. **1990**, *48*, 189-222.

[29] J.L. Arias. "Novel Strategies to Improve the Anticancer Action of 5-Fluorouracil by Using Drug Delivery Systems", *Molecules*. **2008**, *13*, 2340-2369.

[30] P.G. Johnston, H.J. Lenz, C.G. Leichman, K.D. Danenberg, C.J. Alegra, P.V. Danenberg, L. Leichman. "Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors", *Cancer Research.* **1995**, *55*, 1407–1412.

[31] Y. Takebayashi, S. Akiyama, S. Akiba, K.Yamada, K. Miyadera, T. Sumizawa, Y. Yamada, F. Murata, T. Aikou. "Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma", *Journal of the National Cancer Institute*. **1996** , *88*, 1110–1117.

[32] D. Salonga, K.D. Danenberg, M. Johnson, R. Metzger, S. Groshen, D.D. Tsao-Wei, H.J. Lenz, C.G. Leichman, L. Leichman, R.B. Diasio, P.V. Danenberg. "Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase", *Clinical Cancer Research.* **2000**, *6*, 1322–1327.

[33] J. Rautio, H. Kumpulainem, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinem, J. Savolainen. "Prodrugs: design and clinical applications", *Nature Reviews Drug Discovery*. **2008**, *7*, 255-270.

[34] F. Yuan, F. Chen, Q.Y. Xiang, X. Qin, Z.R. Zhang, Y. Huang. "Synthesis and characterization of HPMA copolymer-5-FU conjugates", *Chinese Chemical Letters*. **2008**, *19*, 137-140.

[35] M. Nichifor, V. Coessens, E.H. Schacht. "Macromolecular Prodrugs of 5-Fluorouracil. 1: Synthesis and Hydrolytic Stability". *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. **1995**, *10*, 199-222.

[36] M. Nichifor , E.H. Schacht , L.W. Seymour. "Polymeric prodrugs of 5-fluorouracil", *Jounal of Controlled Release*. **1997**, *48*, 165–178.

[37] M. Nichifor, E.H. Schacht, L.W. Seymour. "Macromolecular prodrugs of 5-fluorouracil. 2: Enzymatic degradation", *Jounal of Controlled Release*. **1996**, *39*, 79-92.

[38] A. Buczkowski, S. Sekowski, A. Grala, D. Palecz, K. Milowska, P. Urbaniak, T. Gabryelak, H. Piekarski, B. Palecz. "Interaction between PAMAM-NH2 G4 dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution", *International Journal of Pharmaceutics*. **2011**, *408*, 266–270.

[39] V.V. K. Venuganti, O.P. Perumal. "Effect of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer on skin permeation of5-fluorouracil", *International Journal of Pharmaceutics*. **2008**, *361*, 230–238.

[40] K. Riehemann, S.W. Schneider, T.A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs. "Nanomedicine-Challenge and Perspectives", *Angewandte Chemie International Edition*. **2009**, *48*, 872-897.

[41] European Science Foundation. European Science Foundation Forward Look on Nanomedicine. European Science Foundation [online], http://www.esf.org/ publication/196/ESPB23.pdf (2005).

[42] R. Duncan. "The dawning era of polymer therapeutics", *Nature Reviews Drug Discovery*. **2003**, *2*, 347-360.

[43] D.A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith. "A New Class of Polymers: Starbust-Dendritic Macromolecules", *Polymer Journal*. **1985**, *17*, 117–132.

[44] P.J. Flory. "Molecular Size Distribution in Three Dimensional Polymers. II. Trifunctional Branching Units", *Journal of the American Chemical Society*. **1941**, *63*, 3091–3096

[45] E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle. ""Cascade"- and "Nonskid-Chain-like" Syntheses of Molecular Cavity Topologies", *Synthesis*. **1978**, 2, 155–158.

[46] W. B. Turnbull, J.F. Stoddart. "Design and synthesis of glycodendrimers", *Reviews in Molecular Biotechnology*. **2002**, *90*, 231-255.

[47] D. Pulido, F. Albericio, M. Royo. "Controlling Multivalency and Multimodality: Up to Pentamodal Dendritic Platforms Based on Diethylenetriaminepentaacetic Acid Cores", *Organic Letters*. **2014**, *16*, 1318-1321.

[48] L. Simón-Gracia, D. Pulido, C. Sevrin, C. Granfils, F. Albericio, M. Royo. "Biocompatible, multifunctional, and well-defined OEG-based dendritic platforms for biomedical applications", *Organic&Biomolecular Chemistry*. **2013**, *11*, 4109-4121.

[49] P. Fransen, D. Pulido, C. Sevrin, C. Grandfils, F. Albericio, M. Royo. "High Control, Fast Growth OEG-Based Dendron Synthesis via a Sequential Two-Step Process of Copper-Free Diazo Transfer and Click Chemistry", *Macromolecules.* **2014**, *47*, 2585−2591.

[50] J. Sánchez-Nieves, P. Fransen, D. Pulido, R. Lorente, M.Á. Muñoz-Fernández, F. Albericio, M. Royo, R. Gómez, F.J. de la Mata. "Amphiphilic Cationic CarbosilaneePEG Dendrimers: Synthesis and Applications in Gene Therapy", *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2014**, *76*, 43-52.

[51] R.J. Seelbach, P. Fransen, M. Peroglio, D. Pulido, P. Lopez-Chicon, F. Duttenhoefer, S. Sauerbier, T. Freiman, P. Niemeyer, C. Semino, F. Albericio, M. Alini, M. Royo, A. Mata, D. Eglin. "Multivalent dendrimers presenting spatially controlled clusters of binding epitopes in thermoresponsive hyaluronan hydrogels", *Acta Biomaterialia*. **2014**, ARTICLE IN PRESS.

[52] M.A. Williams, H. Rapoport. "Synthesis of Enantiomerically Pure Diethylenetriaminepentaacetic Acid Analogues. L-Phenylalanine as the Educt for Substitution at the Central Acetic Acid", *The Journal of Organic Chemistry*. **1993**, *58*, 1151-1158.

[53] P.L. Anelli, F. Fedeli, O. Gazzotti, L. Lattuada, G. Lux, F. Rebasti. "L-Glutamic Acid and L-Lysine as Useful Building Blocks for the Preparation of Bifunctional DTPA-like ligands", *Bioconjugate Chemistry*. **1999**, *10*, 137-140.

[54] V. Theodorou, K. Skobridis, A.G. Tzakos, V. Ragoussis. "A simple method for the alkaline hydrolysis of esters", *Tetrahedron Letters*. **2007**, *48,* 8230–8233.

[55] S. Ozaki. "Synthesis and Antitumor Activity of 5-Fluorouracil Derivatives", *Medicinal Research Reviews*. **1996**, *16*, 51-86.

[56] W.J. Roberts, K.B. Sloan. "Topical Delivery of 5-Fluorouracil (5-FU) by 3-Alkylcarbonyloxymethyl-5-FU Prodrugs", *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2003**, *92*, 1028-1036.

[57] A. Buur, H. Bundgaard, E. Falch. "Prodrugs of 5-fluorouracil. IV. Hydrolysis kinetics, bioactivation and physicochemical properties of various N-acyloxymethyl derivatives of 5-fluorouracil", *International Journal of Pharmaceutics*. **1985**, *24*, 43-60.

[58] M. Howard-Sparks, A.M. Al-Ghananeem, A.P. Pearson, P.A. Crooks. "Evaluation of O ^{3a}-, O ^{21}-Di-(*N* ^{1}-methyloxycarbonyl-2,4-dioxo-5-fluoropyrimidinyl)17a-hydroxy-5b-pregnan-20-one as a novel potential antiangiogenic codrug", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **2005**, *20*, 417–428.

[59] S. Ahmad, S. Ozaki, T. Nagase, M. Iigo, R. Tokuzen, A. Hoshi, A. "A Facile Method for Synthesis of N-Acyloxymethyl-5-fluorouracils, as a Class of antitumour Agents", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1987**, *35*, 4137-4143.

[60] T. Nagasae, K. Seike, K. Shiraishi, Y. Yamada, S. Ozaki. **"**Application of the Benzyloxycarbonyloxymethyl Moiety to a Protective Group of 5-Fluorouracil. Selective Alkylation of Amide Nitrogen of the Uracil Ring", *Chemistry Letters*. **1988**, 8, 1381-1384.

[61] F.M. Menger, M.J. Rourk. "Synthesis and Reactivity of 5-Fluorouracil/Cytarabine Mutual Prodrugs", *Journal of Organic Chemistry*. **1997**, *62*, 9083-9088.

[62] S.M. Simon. "Role of organelle pH in tumor cell biology and drug resistance", *Drug Discoveries & Therapeutics.* **1999**, *4*, 32-38.

[63] D.A. Skoog, D.M. West. "24. Introducción a la cromatografia" En *Análisis instrumental.* Interamericana, **1984**.

NANOCONJUGADOS SN38

Contribuciones en este capítulo: *Immaculada Farràs y Patricia Argibay, personal técnico de la Unitat de Químca Combinatòria (UQC) han realizado la síntesis de algunos lotes empleados en el desarrollo de este proyecto del péptido CXCR4 y c(TCP-1)_Ac, respectivamente. Natalia Beteta y Sònia Varón, personal técnico de UQC, pusieron a punto el método cromatográfico para HPLC que se usaría para la cuantificación del SN38 contenido en los conjugados y realizaron estudios de solubilidad de los mismos. Todos los ensayos in vitro o in vivo realizados en este capítulo fueron llevados a cabo por el grupo Drug Delivery and Targetting del Dr. Simó Schwartz y Functional Validation and Preclinical Research de la Dra. Ibane Abasolo (CIBBIM, Instituto de investigación del Hospital Vall de Hebrón).*

INTRODUCCIÓN

En 1966, Wall y Wani aislaron de la corteza del árbol la *Camptotheca acuminata* de origen chino, que se utilizaba en medicina tradicional, la **20-(S)-camptotecina** (**CPT**) y determinaron su potencial como agente antitumoral, a la vez que sus mayores limitaciones: una baja estabilidad y una pobre solubilidad. [1] Pese a ello, en los años 80, la CPT despertó el interés de la comunidad científica, debido a que se determinó su diana molecular: la topoisomerasa I (TOP I). TOP I, enzima con un papel relevante en los procesos de replicación y reparación del ADN, parece ser la única diana de la CPT, lo que convierte a esta en una molécula altamente selectiva y con un gran potencial en su desarrollo como fármaco. [2-9]

1. Topoisomerasas

Las **topoisomerasas** son una familia de enzimas que se encuentran presentes en todas las células procariotas y eucariotas, y cuya función está directamente relacionada con la topología del ADN.

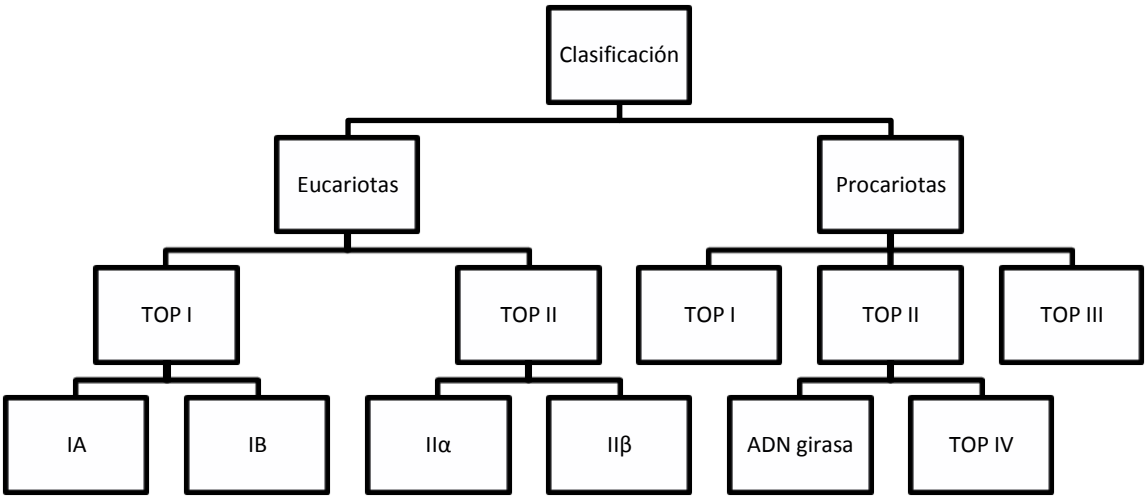


Figura 2.1 *Clasificación de las enzimas topoisomerasas. Figura adaptada de la referencia 10.*

El ADN nuclear es un biopolímero compuesto por nucleótidos de gran longitud, que debe estar altamente compactado para que su empaquetamiento dentro del núcleo celular sea eficiente, por lo que se crean un gran número de dominios y puntos de contacto entre los diferentes dominios. Por el contrario, se requiere que el ADN se convierta en dos hebras separadas la una de la otra con el fin de obtener plantillas eficientes para los procesos de transcripción, replicación y reparación del mismo. Es por este motivo que la estructura altamente compactada del ADN se convierte un problema, ya que la cantidad de giros e interacciones entre los diferentes dominios hacen que la estructura que presenta el ADN sea muy restringida y no permita obtener una estructura de dos hebras separadas necesaria para los procesos

antes mencionados. Es en este punto en el que las enzimas topoisomerasas cobran gran importancia, ya que se unen al ADN simple o de doble hélice, relajando su estructura terciaria y facilitando de este modo la ralización de estos procesos.

En las células eucariotas (figura 2.1) encontramos dos tipos de topoisomerasas: **topoisomerasas tipo I** y **topoisomerasas tipo II**.

Las **topoisomerasas tipo I** (**TOP I**) se unen a la cadena de ADN, aproximándose como si fuera una pinza y cortando una cadena de la doble hélice de ADN, en este momento la cadena complementaria se relaja y se une de nuevo a la cadena que había sido cortada formando un doble hebra. Mediante este proceso se relaja la estructura de la doble hélice de ADN y se vuelve más accesible (figura 2.2). Las topoisomerasas I están divididas en dos subclases: tipo IA y tipo IB.

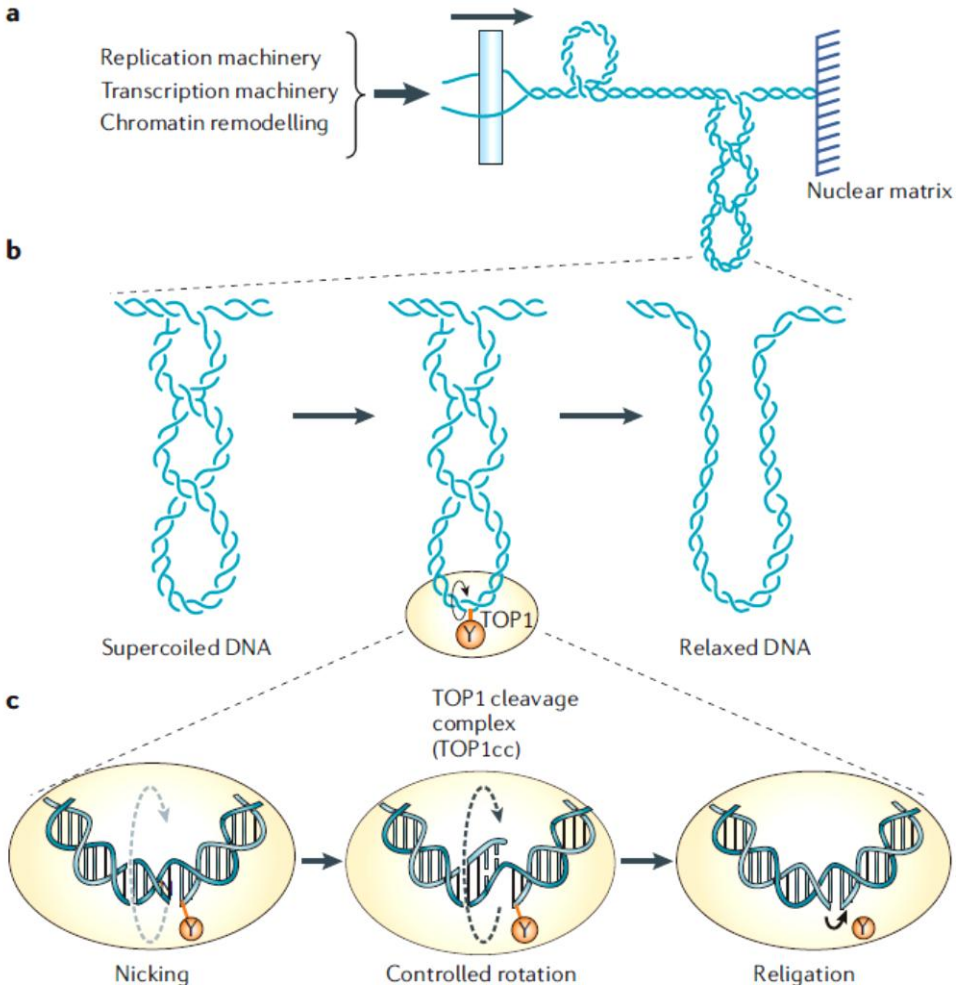


Figura 2.2 a) *Formación del ADN súper-enrollado en el proceso de replicación, transcripción y reparación.* ***b)*** *La actuación de la TOP I hace que la cadena de ADN presente una mayor libertad de rotación de sus enlaces, haciendo posible la relajación de la estructura de la cadena de ADN súper-enrollada.* ***c)*** *Detalle del proceso de corte y rotación de una de las hebras que componen la doble hélice del ADN y su unión posterior. Figura extraída de la referencia 11.*

Las **topoisomerasas tipo II** (**TOP II**) cortan las dos cadenas de la estructura del ADN, permitiendo posteriormente el paso de una cadena a través del hueco formado en la ruptura de la cadena. De esta manera es posible pasar de una estructura súper-enrollada del ADN a una estructura circular del mismo, siendo esta una estructura menos tensionada.

Si bien en este capítulo nos centraremos en el uso de las topoisomerasas como dianas terapéuticas, en concreto de las TOP I, para el tratamiento del cáncer, es relevante destacar su importancia en el caso de antibióticos. Como se puede observar en la figura 2.1 existen varias topoisomerasas exclusivas de las células procariotas, bacterias, entre las que destaca la **ADN girasa**. Esta es la diana terapéutica de **antibióticos** de amplio espectro como son las aminocumarinas [12] y las quinolonas. [13] Estos fármacos inhiben la replicación del ADN bacteriano responsable de la neumonía, tuberculosis o malaria.

Si nos referimos a los fármacos empleados en la inhibición de la topoisomerasa para el tratamiento del cáncer encontramos: la CPT y sus derivados (irinotecan y topotecan), como inhibidores de la TOP I; y entre los inhibidores de la TOP II destacamos la doxorubicina.

2. Camptotecina y sus derivados

La CPT es una quinolina alcaloide que inhibe la TOP I, presentando una remarcable actividad antitumoral, pero su baja solubilidad y los efectos secundarios que se generan tras su administración hacen que no sea posible su viabilidad como fármaco. Todo esto ha propiciado el desarrollo de numerosos análogos de la CPT, dos de los cuales están aprobados por distintas agencias del medicamento y son empleados en el tratamiento clínico del cáncer (irinotecan y topotecan).

Las camptotecinas tienen unas características farmacológicas muy remarcables. La primera de ellas es que la TOP I es su única diana terapéutica, esto se demostró en células de levadura a las se inhibía la TOP I y tras la administración de CPT no se observaba ninguna acción, [14,15] y la presencia de un único punto de mutación estas enzimas TOP I que las convierte en resistentes a la CPT. [16] Segundo, el cambio de estereoquímica del carbono situado en la posición 20 del anillo E de la estructura de la CPT, provoca la inactivación total de la misma (figura 2.3, a). [11,17] En tercer lugar, la CPT penetra en las células de los vertebrados de forma inmediata y se une a la TOP I cc (TOP I complejo de desanclaje, TOP I cleavage complex) con tan sólo una exposición de minutos de las células con el fármaco. Esta unión es totalmente reversible, por lo que su efecto sobre las células puede ser controlado mediante el tiempo de exposición del fármaco a ellas. [11] Y finalmente, la CPT y sus derivados tienen una afinidad relativamente baja con la TOP I, lo que significa que la CPT (la cual se supone que tiene un papel antibiótico en las plantas) fue seleccionada de manera natural por su alta selectividad y no por su eficacia. [11] También es importante destacar su baja solubilidad y el motivo principal por el cual no se puede emplear la CPT en uso clínico.

Algunas de estas características farmacológicas hacen que estos compuestos sean problemáticos para su uso clínico. Al margen de su baja solubilidad, otro problema que presentan la CPT y sus derivados son los largos periodos de tiempo de exposición de la CPT a la enxima TOP I necesarios para conseguir alcanzar eficacia, es decir, que esta exposición provoque un daño real en el ADN y en las células. Por otro lado la CPT y sus derivados provocan serios efectos adversos (leucopenia o diarrea, entre otros) que limitan la dosis máxima tolerada y consecuentemente su eficacia antitumoral. Y por último, su inestabilidad en condiciones de pH fisiológicas, hecho que provoca su rápida inactivación como consecuencia de la hidrólisis de la lactona que compone en anillo E de su estructura. Para la CPT y sus derivados, la forma carboxilato es inactiva como inhibidor de la TOP I y es rápidamente secuestrada por la albumina. Esta inestabilidad hace que tan solo una pequeña porción de la CPT administrada se mantenga en forma de lactona y sea realmente efectiva como inhibidor de la TOP I.

Tabla 2.1 *Derivados de la CPT que se encuentran en estudios clínicos de distintas fases. Actualmente sólo dos de ellos están aprobados para su uso clínico: Irinotecan y Topotecan. Abreviaciones: 5FU, 5-Fluorouracilo; 9-AC, 9-aminoCPT; 9-NC; 9-nitroCPT; FDA, US Food and Drugs Administration; IDEC-132; nomenclatura de de 9-AC; NSCLC, cáncer de pulmón de no células pequeñas (non-small cell lung cancer); PEG, polietilenglicol; SCLC: cáncer de pulmón de células pequeñas (small cell lung cancer) Tabla adaptada de la referencia 11.*

Derivados de la CPT	Estado	Datos remarcables	Indicaciones
Hidrocloruro de topotecan	Aprobado por la FDA (GlaxoSmithKline)	Infusión intravenosa (soluble en agua).	Cáncer metastásico ovárico (segunda línea); SCLC (segunda línea).
Hidrocloruro de irinotecan	Aprobado por la FDA (Pfizer)	Infusión intravenosa (soluble en agua).	Cáncer colorrectal metastásico (primera línea en combinación con 5FU/leucovorina).
9-NC; Rubitecan	Fase clínica II/III (SuperGen)	Administración oral; convertido a 9-AC.	Cáncer pancreático.
9-AC; IDEC-132	Fase clínica II	Infusión intravenosa; oral; intraparenteral.	Cáncer ovárico (intraparenteral)
Mesilato de Exatecan; DE-310	Fase clínica II/III (Daiichi)	Infusión intravenosa.	Varios carcinomas.
Lurtotecan GI-147211 NX 211	Fase clínica II (Gilead)	Infusión intravenosa; liposomal (NX 211)	Carcinomas ováricos y otros.
Gimatecan	Fase clínica II/III (Novartis)	Administración oral; lipofílico.	Glioblastoma, SCLC y tumores sólidos.
PEG-CPT; Prothecan	Fase clínica II (Enzon Inc.)	Derivado peguilado; infusión intravenosa (soluble en agua)	NSCLC y otros tumores sólidos.
Karenitecina; BNP-1350	Fase clínica II (Bionumerik Pharmaceuticals)	Administración oral; lipofílico.	Glioblastomas, melanomas y NSCLC.
Silatecan; DB-67	Preclinica	Lipofílico.	Glioblastomas
Diflotecan; BN 80915	Fase clínica II (Ipsen)	Infusión intravenosa.	Cáncer metastásico avanzado de cólon, mama y próstata.

Las desventajas presentadas por la CPT confrontadas a los resultados prometedores de la misma han provocado que la comunidad científica haya desarrollado un gran número de derivados de la misma intentando mejorar su índice terapéutico. Nos centraremos en los dos

derivados aprobados para su uso clínico, pero como se puede observar en la tabla 2.1, en los que tan solo están representados aquellos derivados que han llegados a fase clínica, el número de derivados sintetizados es muy extenso, prueba de la que la CPT es un fármaco, que si bien necesita mejoras, muy prometedor en el tratamiento del cáncer.

La parte de la CPT que se ha modificado más frecuentemente es su anillo de quinolina. Estos derivados incrementan la solubilidad, la estabilidad de la lactona y la actividad antitumoral de la CPT. Los dos derivados de la CPT aprobados para su uso clínico se encuentran derivatizados en este punto: topotecan y irinotecan. [8]

Topotecan (9-[(dimetilamino)metil]hidroxi-camptotecina) es un análogo de la CPT modificado con una cadena aminoalquílica en la posición 9 del anillo A de la estructura original de la CPT, la presencia de esta amina terciaria en su estructura incrementa su solubilidad. [8,18] Fue aprobado para su uso clínico en 1996 (FDA), y actualmente es un tratamiento de segunda línea en el tratamiento del cáncer ovárico y en el de pulmón de células pequeñas. También se puede encontrar en el mercado una formulación para su administración oral. [17]

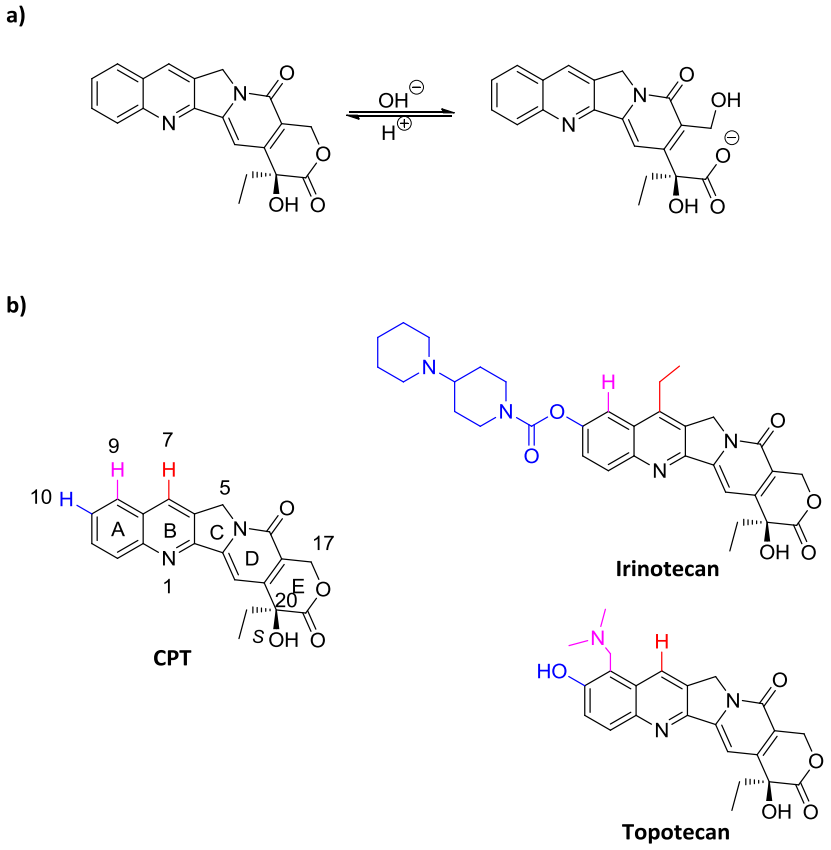


Figura 2.2 a) *Equilibrio de la reacción hidrólisis de la lactona de la CPT, cuya forma carboxilada es inactiva como inhibidor de la TOP I.* ***b)*** *Estructura de la CPT y sus derivados aprobados para uso clínico: irinotecan y topotecan.*

Irinotecan o CPT-11 (7-etil-10[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carboniloxicamptotecina) contiene un grupo etilo en la posición 7 del anillo B y un grupo dipiperidil carbamato en la posición 10 del anillo A. La cadena de dipiperidina incrementa su solubilidad en agua, pero también produce una disminución de su efectividad terapéutica. Este grupo carbamato se metaboliza para dar lugar al SN38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina, **37**), el cual es entre 100 y 1000 veces más citotóxico que irinotecan (figura 2.3). [19] La bioactivación de la prodroga tiene lugar mediante la acción de la carboxilesterasa 2 y microsomas hepáticos presentes ambas mayoritariamente en el hígado. [20] Irinotecan fue aprobado en 1996 por la FDA para su uso en cáncer colorrectal avanzado, se emplea como tratamiento de primera línea solo o en combinación con el fármaco 5FU. [17]

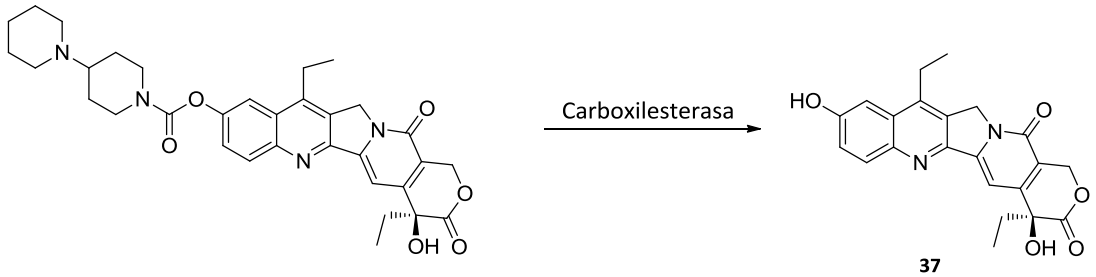


Figura 2.3 *Bioactivación del irinotecan. Eliminación del grupo carbamato presente en el irinotecan por acción de las carboxilesterasas para dar lugar a su forma activa, SN38 (**37**).*

3. Mecanismo de acción de la camptotecina y sus derivados

Como ya se ha comentado anteriormente, el mecanismo de acción de la TOP I consiste en cortar una de las hebras del ADN que componen la doble hélice, de esta manera se acaba formando un complejo TOP I-ADN, también llamado TOP I ccs (TOP I cleavage complex). Es en este punto donde actúan los inhibidores de la TOP I. La CPT y sus derivados se unen de manera reversible al complejo TOP I ccs, en el momento en que la exposición a la droga de este complejo desaparece, la TOP I vuelve a unir la hebra de ADN a la que se encuentra unido, es por este motivo que se puede concluir que la CPT y sus derivados no provocan un daño directo a la célula. El mecanismo por el cual la CPT y sus derivados inducen un daño celular se basa en el hecho de que su unión al complejo TOP I ccs, favorece que este adopte una conformación que provoca la formación de un enlace covalente fosfodiéster con el extremo 5' de la hebra de ADN, esto hace que el proceso de replicación no solo se vea interrumpida, sino que acaba provocando daños irreversibles en la célula, llevando a su apoptosis final. [21] Por este motivo a los inhibidores de la TOP I se les conoce como "envenenadores de la TOPI I". [11] Este mecanismo de acción ha sido confirmado después de observar la desaparición de la muerte celular por efecto de la CPT en presencia de afidicolina, un inhibidor de la DNA polimerasa que bloquea el proceso de replicación en el inicio de la fase S. [22]

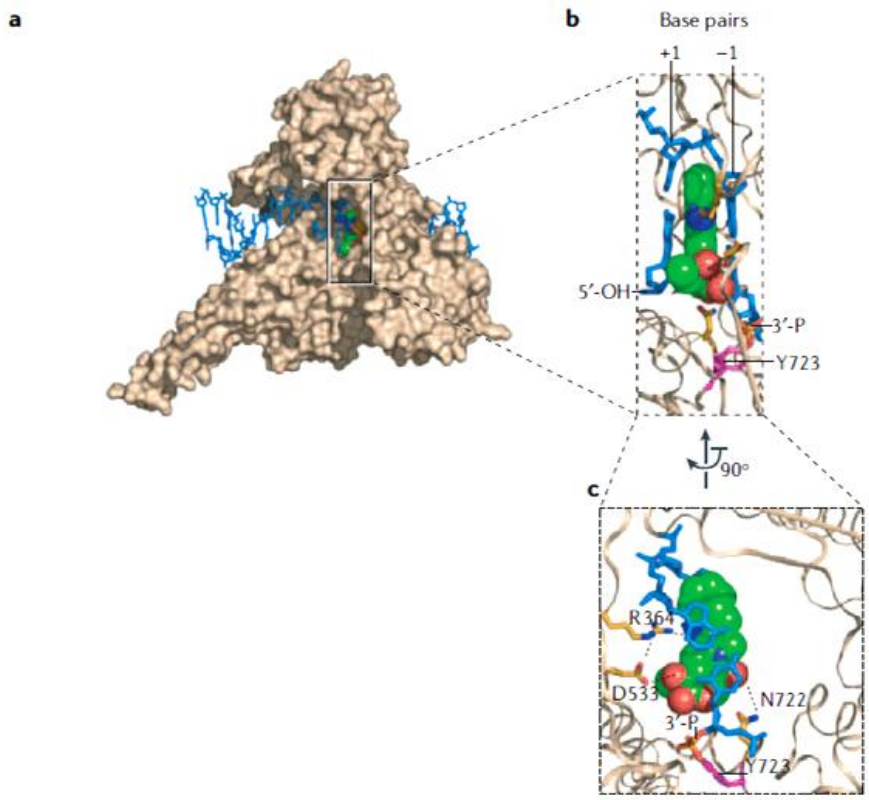


Figura 2.4 a) *Vista del complejo ternario TOP I cc atrapado por la CPT. CPT se muestra en color verde en el centro de la imagen recuadrada. La TOP I se muestra en color marrón y la doble hélice de ADN en color azul.* ***b)*** *Vista ampliada de la posición de rotura inducida por la TOP I y atrapada por la CPT. La CPT (representada en forma esférica con los átomos de carbono en verde, oxígenos en rojo y nitrógeno en azul) se apila entre el par de bases que rodean el punto de rotura de la TOP I.* ***c)*** *Uniones puente de hidrogeno (líneas discontinuas) que se establecen entre la CPT y los residuos de la TOP I. Figura adaptada de la referencia 11.*

También se han determinado algunos mecanismos secundarios independientes de la fase de replicación del ADN. Estos mecanismos incluyen la inhibición de la síntesis de ARN, [23] la apoptosis inducida de las células neuronales por mecanismos independientes de la fase S [24] y el bloqueo de la angiogénesis en las células. [25,26]

Como ya hemos dicho la diana terapéutica de la CPT y sus derivados es la TOP I, lo que hace que el mayor sistema de resistencia desarrollado por las células a su acción consista en generar enzimas TOP I resistentes a la CPT o mecanismos que atacan el complejo TOP I ccs sobre el que actúa la CPT. [27]

Existe otro mecanismo de resistencia de las células a las CPT, que está asociado con los transportadores tipo ABC (ATP-binding cassette) proteínas de membrana cuya sobreexpresión genera una gran resistencia a distintos tipos de fármacos, entre los que se encuentran las CPTs. [11] En este punto quiero destacar un estudio en el que se administró irinotecan conjuntamente con el mesilato de imatinibina, conocido substrato del transportador ABCG2, transportador tipo ABC. La administración conjunta de ambos fármacos provocó la saturación

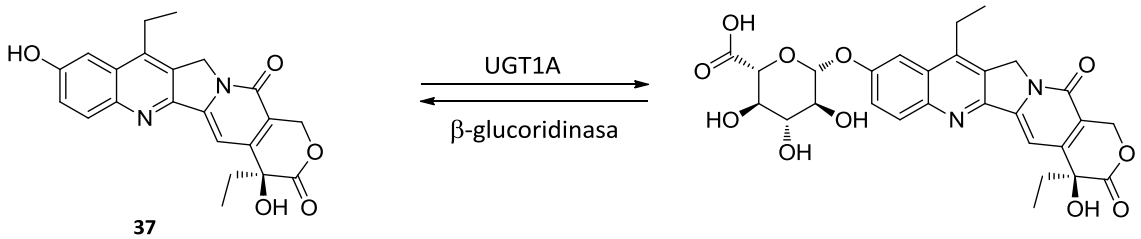
de ABDG2 por la imatibina haciendo que la acumulación celular de irinotecan aumentara. [28] Este estudio demuestra que la combinación de antitumorales con inhibidores de transportadores ABC con el objetivo de saturar este tipo de transportadores y bloquear su acción, puede ser una buena estrategia con el fin de aumentar la actividad antitumoral. [29]

4. Nuevos métodos para la administración de SN38

En el presente proyecto de tesis nos hemos centrado en el derivado de la camptotecina SN38 (**37**). Este es uno de los análogos más activos de la CPT, y por ello ha despertado el interés de un gran número de científicos, pero también se deben detallar las limitaciones que presenta para su uso como fármaco.

En el SN38 (**37**) la presencia del grupo hidroxilo en la posición C_{10} y el etilo en la posición C_7 ayudan incrementar la estabilidad de este compuesto en condiciones fisiológicas, hecho que se manifiesta en un incremento de su potencia comparado con otros derivados de la CPT.[30-32] Pese a esto, SN38 es prácticamente insoluble en agua (11-38 μg/ml) y en la mayoría de de los solventes o aceites indicados para uso clínico, [33-35] haciendo imposible alcanzar dosis efectivas. Tan solo se ha documentado su solubilidad a un concentración del 0,5% (w/w) en DMSO, ácido fórmico y Transcutol® HP, [33] y a concentraciones 0,1M en NaOH, lo que sugiere que la forma carboxilato del SN38 es más soluble. Por otro lado, al igual que en la CPT, el anillo de lactona presenta una hidrólisis reversible. A pH ≤4,5 la lactona se mantiene estable, a pH > 9,0 se encuentra en su forma totalmente hidrolizada, y a pH 6,7 ambas formas se encuentran en equilibrio. [36]

La biodistribución del SN38 se produce de manera principal en el hígado, los riñones y el intestino delgado, después de que la gran parte de este se una con proteínas plasmáticas, principalmente la albumina. [37,38] El SN38 entra en el hígado a través de transportadores de membrana del plasma, ya en el hígado se produce la transformación de parte del SN38 a SN38-glucoronida (SN38G) mediante la uridino-difosfo-glucoronosil transferasa (UGT1A), siendo este metabolito inactivo (figura 2.5). [20,39] El SN38 y SN38G presente en los hepatocitos puede ser conducido al tracto biliar mediante transportadores tipo ABC, seguidos por su eliminación en el intestino. [39] El SN38G se transforma de nuevo en SN38 mediante la acción de las enzimas β-glucoridinasa presentes en el intestino, esta transformación en SN38 se cree que produce diarrea que se observa como efecto adverso tras la administración de irinotecan. [40]



37
SN38 **SN38G**

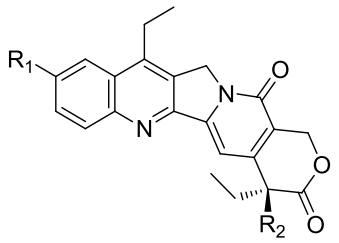
Figura 2.4 *Transformación del SN38 en SN38G mediante la acción de la enzima hepática UGT1A, y hidrólisis de SN38G a SN38 mediante la enzima β-glucoridinasa segregada por las bacterias que componen la flora intestinal.*

Como se ha comentado con anterioridad, si bien el SN38 presenta inconvenientes para su uso clínico en forma libre, se han hecho grandes esfuerzos para superar estos mediante el estudio de nuevas formas de administración y así convertir el SN38 en un nuevo derivado de la CPT apto para tratamiento clínico. En la literatura encontramos un gran número de ejemplos, en la tabla 2.2 podemos encontrar un resumen de aquellos derivados que se encuentran actualmente en fase clínica o preclínica, algunos de ellos serán descritos con más detalle a continuación. [41] Clasificaremos estos derivados en cuatro grupos: prodrogas de carácter hidrofílico, lipofílico, amfifílicas y nanoconjugados.

Las **prodrogas hidrofílicas** son aquellas que se centran en aumentar la solubilidad del SN38. Entre estas prodrogas encontramos la CPT-11 (Irinotecan), único compuesto derivado del SN38aprobado y que ya hemos comentado con detalle anteriormente. Dentro de este grupo encontramos otros ejemplos también muy interesantes como puede ser el compuesto DTS-108. En DTS-108 el SN38 se encuentra unido a un oligopéptido catiónico de 20 aminoácidos de origen humano (Vectocell®) vía enlace éster que incrementa la solubilidad del conjugado de SN38 (>500 mg/ml). [42] El uso del enlace éster hace que la liberación del SN38 de la cadena peptídica sea más rápida y eficiente que en el caso del CPT-11, para el cual es necesario la acción de carboxilesterasa, mayoritariamente presentes en el hígado. Al emplear un enlace éster, el conjugado no necesita alcanzar el hígado para que se lleve a cabo la liberación de la droga, órgano en el cual se tiene lugar la glucoronidación, metabolito inactivo del SN38. [42] También encontramos diferentes conjugados SN38-heterociclos nitrogenados que presentan un incremento en su solubilidad. [30]

Dentro del grupo de **prodrogas hidrofílicas** también encontramos algunos ejemplos en los que se incluyen productos con direccionamiento activo sobre tejidos tumorales. Entre estos destacamos los conjugados droga-anticuerpos, péptidos directores o moléculas que son sustratos con gran afinidad por los tejidos tumorales, ya que las enzimas receptoras de estos se encuentran sobreexpresadas en algunos tipos de tumores. Algunos ejemplos de estos son los conjugados IMMU-130, [43] el SN38 conjugado a indoloquinonas-c(RGDyK) [44] y SN38G. [45]

Tabla 2.2 *Resumen de algunos nuevos derivados de SN38 que se encuentran actualmente en fase clínica o preclínica. Abreviaturas: MTD, dosis máxima tolerada (maximum tolerated dose); PEG, polietilenglicol; OEG, oligoetilenglicol. Tabla adaptada de la referencia 41.*

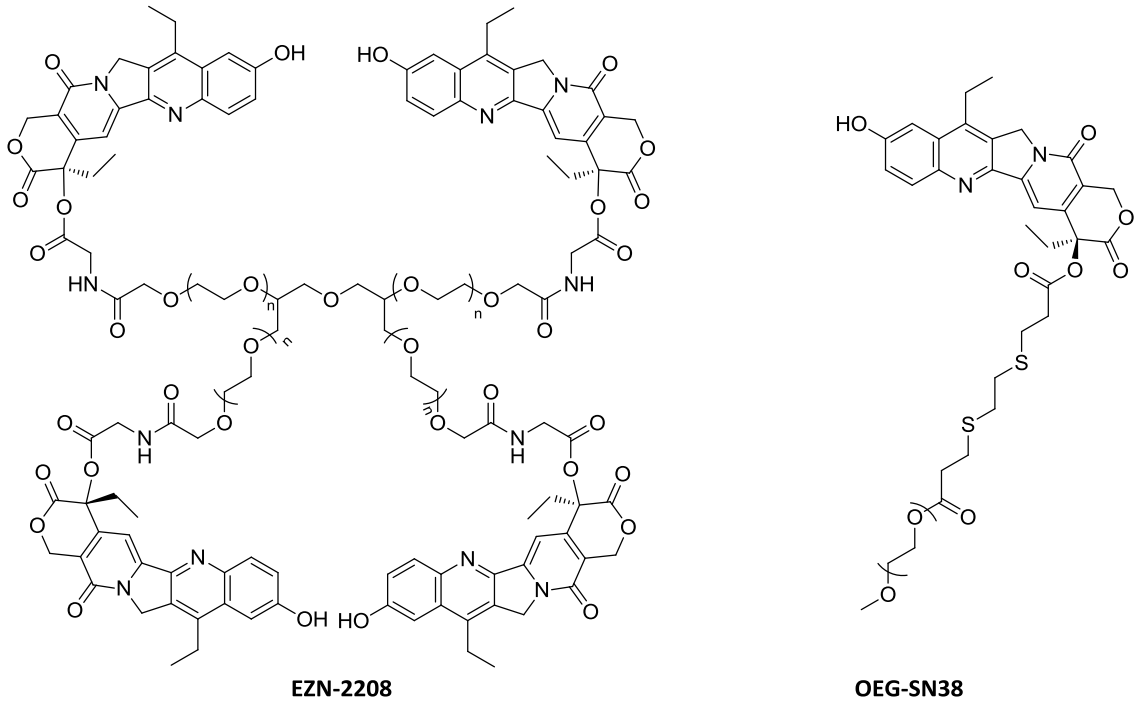


Nombre	Química **R1**	**R2**	**Enlace**	Estadio clínico	MTD (mg/m^2)
Prodrogas hidrofílicas					
CPT-11	Dipiperidina	OH	Carbamato	Comercial	750
DTS-108	Peptido (20 aminoácidos)	OH	Éster	Fase I	416
EZN-2208	OH	PEG-4 ramas	Éster	Fase II	10
IMMU-130	OH o propionato	Aticuerpo (hMN-14)	Carbonato	Fase I	ND
PAMAM-SN38	OH	Poliamidoamina	Éster	Preclínica	ND
Nanografeno peguilado	OH	OH	Van der Waals	Preclínica	ND
SN38-glucoronida	Glucoronida	OH	Carbamato	Preclínica	ND
Prodroga bioreductiva de SN38	Indolequinona-c(RGDyK)	OH	Carbamato	Preclínica	ND
Heterociclo nitrogenado-SN38	Heterociclo nitrogenado	OH	Éter	Preclínica	ND
HPMA-SN38	Carbonato de *terc*-butilo	N-(2-hidroxipropil) metacrilamida	Éster	Preclínica	ND
Prodrogas lipofílicas					
SN2310	Succinato de vitamina E	OH	Éster	Fase I	25
SN38-oleato	Ácido oleico	OH	Éster	Preclínica	ND
Val-SN38	OH	Valina	Éster	Preclínica	ND
Prodrogas amfifílicas					
NK012	PEG-glutamato	OH	Éster de fenilo	Fase II	28
OEG-SN38	OH	Oligoetilenglicol	Éster	Preclínica	ND

También existen los derivados de carácter **lipofílico**, cuyo objetivo es incrementar la solubilidad del SN38 en lípidos y permitir la formulación del fármaco como nanoemulsión en algunos casos. Entre estos encontramos el conjugado Val-SN38, que mejora la acumulación de SN38 en células MCF7, acumulación que se sugiere está asociada a la introducción de valinas en su estructura lo que aumenta la acumulación debido a la acción de los transportadores de aminoácidos presentes en las células que preceden a la incorporación de este compuesto al interior de la célula [46] Otros derivados lipídicos son los conjugados SN2310 y SN38-oleato presentan una mayor solubilidad en formulaciones lipídicas. [47,48]

También encontramos **nanoconjugados** diseñados para mejorar la administración y la solubilidad de SN38. Entre estos encontramos varios de ellos basados en PEG o OEG, debido a su potencial para incrementar la solubilidad en agua. Encontramos nanoconjugados que combinan el PEG con otros otros elementos como los nanoconjugados de SN38 con nanografeno peguilado. Estos aprovechan las interacciones de Van der Waals que se establecen entre el SN38 y las láminas de nanografeno peguiladas para aumentar la solubilidad en agua y la acumulación en las células. [49] Y otros conjugados que se basan únicamente en PEG o OEG, como es el caso del sistema EZN-2208 y OEG-SN38. También encontramos ejemplos en los que el SN38 se incorpora dentro de liposomas, [35] o conjugados con dendrímeros de PAMAM de G3,5 para el desarrollo de formulaciones de administración oral. [50,51]

En el caso de EZN-2208 se trata de la conjugación del SN38 a través del hidroxilo presente en el C_{20} mediante un enlace éster a un PEG ramificado polidisperso de 40KDa. [52,53] Este conjugado exhibe un incremente de su solibilidad en agua, biocompatibilidad y un aumento de la acumulación en tumor debido al efecto EPR (incremento de permeabilidad y rentención, enhanced permeability and retention). [54] Otro nanoconjugado basa únicamente en PEG es el llamado OEG-SN38 de la tabla 2.2. En este conjugado el SN38 se encuentra unido a través de un enlace éster en el hidroxilo del C_{20} a una cadena de OEG de bajo peso molecular, de manera que el nanoconjugado está compuesto por una parte con un marcado carácter hidrofóbico (SN38) y otro con un marcado carácter hidrofílico (OEG) y es capaz de formar micelas que se mantienen estables por más de 35h en medio PBS debido a su carácter **amfifílico**. [55]



EZN-2208 **OEG-SN38**

Figura 2.5 *Representación esquemática de los nanoconjugados EZN-2208 y OEG-SN38.*

OBJETIVOS

El objetivo principal del presente capítulo se centro en el desarrollo de un vehículo adecuado para la administración del fármaco SN38. Así, se evaluó la administración del fármaco SN38 empleando un dendrón de características similares al empleado en el capítulo 1 de la presente tesis, pero incrementando el tamaño de las ramas de oligoetilenglicol que lo componen y la conjugación de este fármaco a una única cadena de oligoetilenglicol monodisperso. También se procedió a estudiar el comportamiento de ambos conjugados cuando se incorpora al sistema un péptido director.

Los objetivos específicos de este capítulo son:

1 Síntesis de un derivado de SN38 que presente una funcionalidad adecuada para su conjugación al vehículo transportador.

2 Síntesis del vehículo dendrimérico compuesto por ramas de oligoetilenglicol monodispersas de talla superior a las detalladas en el capítulo 1 de la presente tesis. Conjugación del dendrón al derivado de SN38.

3 Derivatización del OEG de talla definida para su unión al SN38. Conjugación del OEG derivatizado al derivado de SN38.

4 Síntesis y evaluación *in vitro* del péptido director adecuado para la terapia dirigida. Conjugación del péptido al conjugado del vehículo - SN38.

5 Evaluación *in vitro* y ensayos in vivo de dosis máxima tolerada (MTD, máximum tolerated dosis) y biodistribución del nanoconjugado vehículo-SN38 final con y sin péptido director.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se estudia la unión del fármaco SN38 a un vehículo que mejore sus condiciones farmacocinéticas. Con este objetivo hemos elegido como vehículo sistemas basados en oligoetilenglicol, como ya hicimos en el capítulo 1. A diferencia del capítulo anterior en este caso se plantearon unos objetivos más ambiciosos, ya que no solo pretendiamos evaluar conjugados que utilizaran como vehículo los dendrones desarrollados en nuestro grupo de investigación, detallados en el capítulo 1, si no también establecer una comparativa entre emplear el dendrón como vehículo y una rama de oligoetilenglicol de talla definida, con el objetivo de evaluar la importancia que pueda tener la multivalencia en el sistema. También se pretendía evaluar la presencia de péptidos directores en los nanoconjugados generados para estimar el efecto de un direccionamiento activo en el sistema.Por lo tanto el esquema general del trabajo que se ha realizado en este capítulo queda resumido en la figura 2.6.

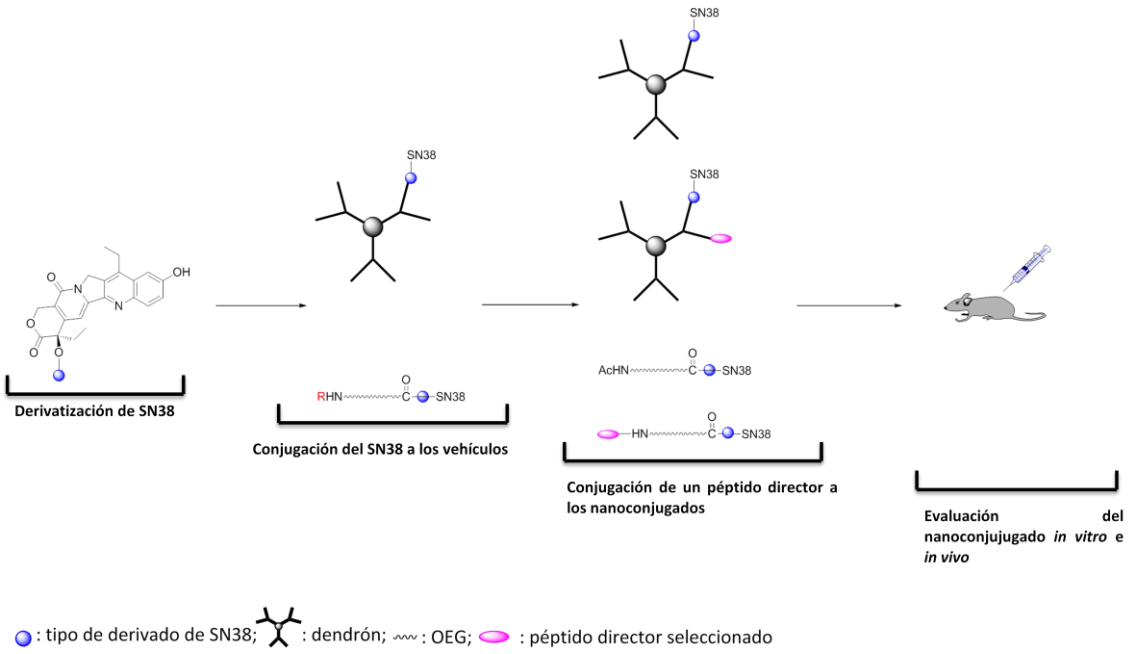


Figura 2.6 *Representación esquemática de la estrategia seguida en este capítulo para la síntesis y evaluación de los nuevos conjugados con el fármaco SN38. En la figura se encuentran los principales pasos a seguir: derivatización del SN38, unión del derivado de SN38 a los vehículos, conjugación de un péptido director a los nanoconjugados para poder evaluar la terapia dirigida, y la evaluación final in vitro e in vivo de los nuevos nanoconjugados.*

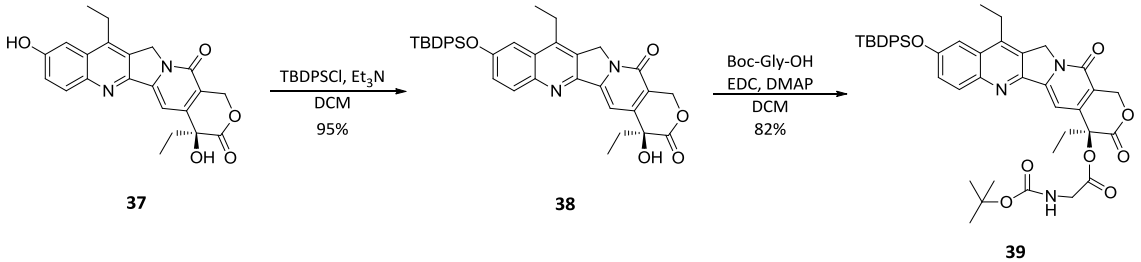
A continuación pasaremos a detallar la metodología y los resultados obtenidos en cada uno de los pasos de este proyecto.

1. Derivatización de la molécula de SN38

Para la realización de este proyecto elegimos la molécula de SN38 entre el resto de derivados de la CPT. Como se ha comentado anteriormente, el Irinotecan es la prodroga del SN38, siendo este último entre 100 y 1000 veces más activo que el Irinotecan, pero presenta serios inconvenientes para su administración como fármaco. [30-32] El mayor inconveniente es su baja solubilidad en agua, que hace imposible que pueda ser administrado a dosis efectivas. [33-35] Teniendo en cuenta esta premisa planteamos unir el SN38 a dos tipos de sistemas basados en oligoetilenglicol (OEG), con el fin de aprovechar el efecto de aumentar la solubilidad en disolventes acuosos que tiene el OEG y tratar de alcanzar una dosis efectiva de SN38. [56]

Para poder desarrollar estos nuevos conjugados, se procedió en primer lugar a sintetizar un derivado adecuado del SN38 para su conjugación a estos sistemas. Después de un estudio bibliográfico se decidió que la unión del SN38 a nuestros sistemas de OEG se realizaría a través del hidroxilo presente en el C_{20}. La selección de realizar la unión al vehículo basado en OEG através del hidroxilo en C_{20} se basa en los estudios realizados por otros grupos de investigación que apuntaban a que la formación de un enlace éster en este punto ayudaba a preservar la lactona presente en el SN38 de una hidrólisis, y por tanto minizaba la inactivación de la molécula. [52-55] Debido al gran número de estudios previos en la bibliografía, concordantes entre ellos sobre la conjugación a través del hidroxilo en C_{20}, y al mayor coste del SN38 respecto al 5FU, decidimos no realizar un estudio de diferentes derivados de SN38 y su evaluación posterior, sino que tomamos como punto de partida el derivado SN38-TBDPS-GlyBoc (**39**, figura 2.7) presente en la bibliografía. [52,53]

La síntesis de este derivado partía de SN38 (**37**), el cual era monoprotegido en el fenol presente en su C10 de manera selectiva en forma de éter de *terc*-butildifenilsililo (TBDPS). Para realizar esta monoprotección, a una suspensión de SN38 en DCM anh. le fue añadida la base y seguidamente el *terc*-butildifenilclorosilano, una vez se detectó la desaparición del producto de partida **37** mediante HPLC-MS, se llevó a cabo la elaboración del crudo y finalmente una purificación mediante cromatografía flash automatizada en columna de silica.De esta manera se obtuvo el producto SN38-TBDPS **38** de forma pura y con un rendimiento mayor (95% de rendimiento, 99% de pureza a λ=266 nm) a los reportados por otros autores. [52] Seguidamente se llevó a cabo la incorporación del aminoácido glicina, con su α-amina protegida en forma de carbamato de *terc*-butilo (Boc), mediante la formación de un enlace éster a través del hidroxilo libre que contenía el producto **38** en el C_{20}. Esta reacción tuvo lugar en medio orgánico (DCM anh.) y empleando EDC como agente acoplante y DMAP como catalizador para la formación del éster. [52] Finalizada la reacción, el crudo se elaboró mediante extracciones básicas y ácidas para obtener el producto **39** en forma pura.



SN38-TBPS (**38**) SN38-TBDPS-GlyBoc (**39**)

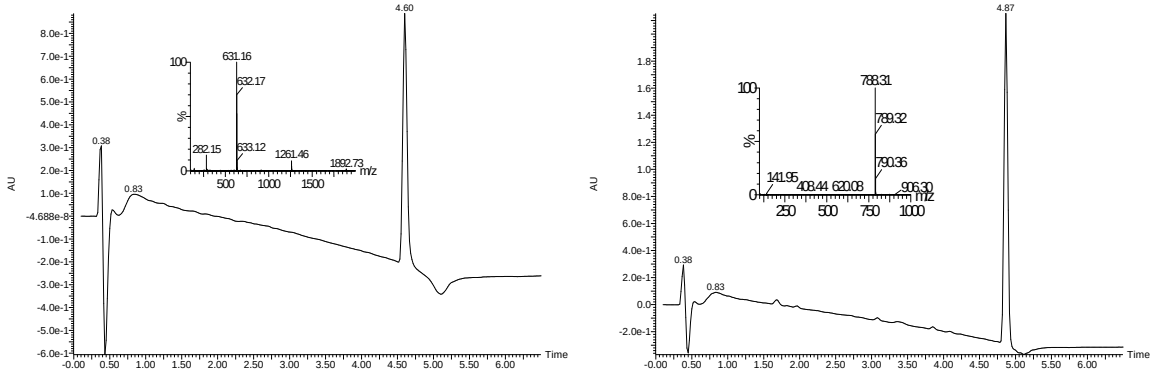
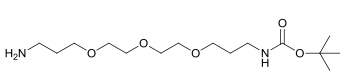


Figura 2.7 *Esquema sintético seguido para la obtención del derivado SN38-TBDPS-GlyBoc (**39**) para su conjugación. HPLC-MS de los derivados **38** y **39**. Todos los análisis de HPLC-MS se realizaron con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min. Metodologia adaptada de la referencia 52.*

2. Síntesis del dendrón G1-4OEG$_{27}$COMe-1OEG$_{27}$Ac (49)

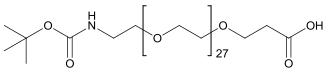
Uno de los vehículos basados en OEG con los que se quería conjugar el SN38 son los dendrones desarrollados en nuestro grupo de investigación, detallados en el capítulo 1 de la presente tesis. A diferencia del 5FU, SN38 es una molécula hidrofóbica de un tamaño superior y con una baja solubilidad en disolventes acuosos. [33-35] Este hecho nos motivó a plantear unos dendrones cuyas ramas, nuevamente basadas en ramas de OEG, tuvieran una longitud superior a la de las ramas de los dendrones explorados en el capítulo 1. De esta manera el MW del dendrón y por tanto aumentaría el peso específico que tendría el OEG respecto el SN38 y su solubilidad en agua aumentaría. Con estas premisas diseñamos un nuevo dendrón, representado en la figura 2.7, que *a priori* presenta unas características más adecuadas para la administración del SN38. En esta figura se puede observar como el dendrón final tiene aproximadamente una masa cuatro veces superior al dendrón diseñado para la administración de 5FU.



PM: 320,42 g/mol

Boc-TOTA

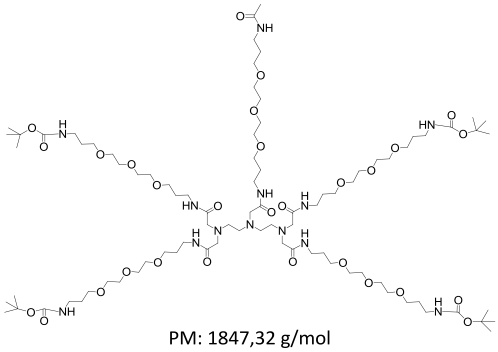
6



PM: 1422,68 g/mol

Boc-OEG27-COOH

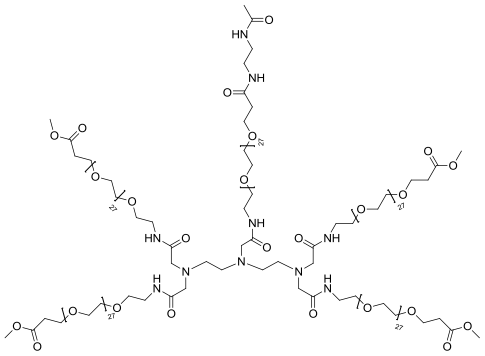
41



PM: 1847,32 g/mol

G1-4Boc-1Ac

11



PM: 7056,32 g/mol

G1-4OEG27COMe-1OEG27Ac

49

Figura 2.6 *Comparativa entre ramas de OEG (**6** y **42**) y entre los dendrones utilizados en el capítulo 1 (**11**) y los dendrones diseñados como vehículos para el SN38 (**49**).*

En la síntesis de este dendrón se plantearon varias modificaciones en el esquema sintético respecto a la síntesis desarrollada para los dendrones del capítulo 1. Para ello, previo a la síntesis del dendrón se realizó la derivatización o protección de la cadena de OEG de la talla seleccionada para las ramas del dendrón. Como en el caso del dendron G1-4Boc-1Ac (**11**), partimos en este caso de una cadena de OEG monodispersa, es decir, de tamaño definido (PM= 1422,68 g/mol). El OEG comercial seleccionada, Boc-OEG_{27}-COOH (**41**) presenta grupos funcionales distintos en sus extremos, un extremo se en forma de ácido carboxílico libre y el otro en forma de amina protegida con un grupo carbamato de *terc*-butilo (Boc). Para la síntesis de nuestro dendrón necesitábamos obtener una cadena de OEG con una amina protegida con el grupo Boc y otra primaria libre en el otro extremo, a través de la cual se incorporaría al núcleo central de DTPA (**4**) mediante un enlace amida. Con este objetivo, exploramos con pequeña cantidad del Boc-OEG_{27}-COOH (**41**) dos estrategias de derivatización para obtener dos tipos de OEG derivados (figura 2.7), uno (**42**) que se uniría al punto focal de nuestro núcleo de DTA (**4**) y otro (**44**) adecuado para formar las cuatro ramas equivalentes del dendrón final **49**.

El derivado Boc-OEG_{27}-CONH-Ac (**42**) contiene la 2-acetomidoetilamina incorporada en el ácido carboxílico mediante una amida (figura 2.7, **a**). Para ello se ha de obtener previamente la 2-acetamidoetilamina, que se sintetiza a partir del 2-acetamidoetil carbamato de *terc* butilo mediante la eliminación del grupo Boc mediante tratamiento con HCl 4M en dioxano. Posteriormente se incorpora la 2-acetamidoetilamina al Boc-OEG_{27}-COOH (**41**) mediante un enlace amida empleando como agente acoplante PyBOP en medio básico.

El derivado de Boc-OEG_{27}-COOMe (**44**) es el éster metílico del ácido carboxílico del compuesto **41**. La protección del ácido carboxílico del Boc-OEG_{27}-COOH (41) en forma de éster, permitirá

la eliminación del grupo Boc del OEG, manteniendo el éster metílico intacto, de manera que no pudiera interferir en el proceso de formación del dendrón (figura 2.7, **b**).

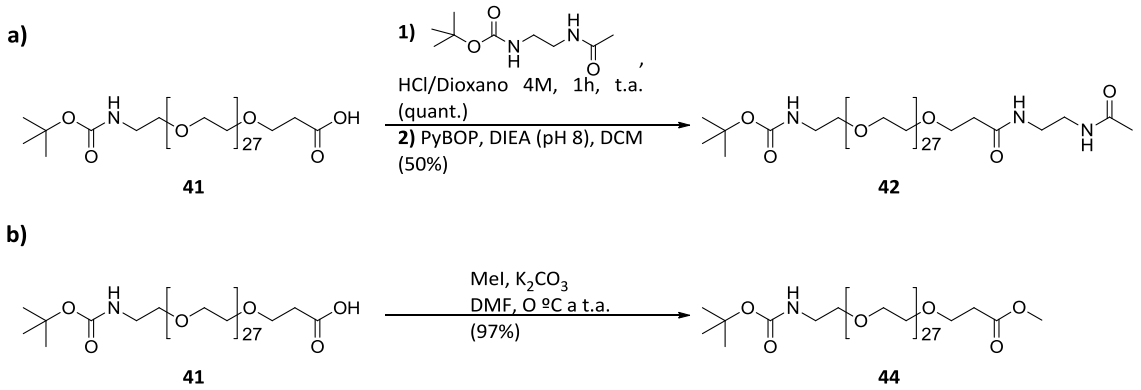


Figura 2.7 *Esquema sintético de la derivatización del OEG Boc-OEG$_{27}$-COOH (**41**) para la síntesis del dendrón **49**. **a)** Derivatización del OEG que se introducirá en el punto focal del núcleo de DTPA (**4**) de nuestros dendrones. **b)** Derivatización del OEG que se introducirá en las cuatro posiciones equivalentes del núcleo de DTPA (**4**) de nuestros dendrones, a las que posteriormente uniremos el fármaco.*

Debemos destacar que el OEG Boc-OEG$_{27}$-COOH (**41**) comercial, a pesar de ser monodisperso, presenta una pequeña dispersión de masas que pudimos ver al analizar por HPLC-MS. Esta dispersión de masas podría afectar al análisis del dendrón, ya que será más complicado encontrar la masa exacta del nuevo dendrón en comparación al dendrón desarrollado en el capítulo 1, G1-4Boc-1Ac (**11**) que contiene ramas de OEG de talla menor y completamente definidas.

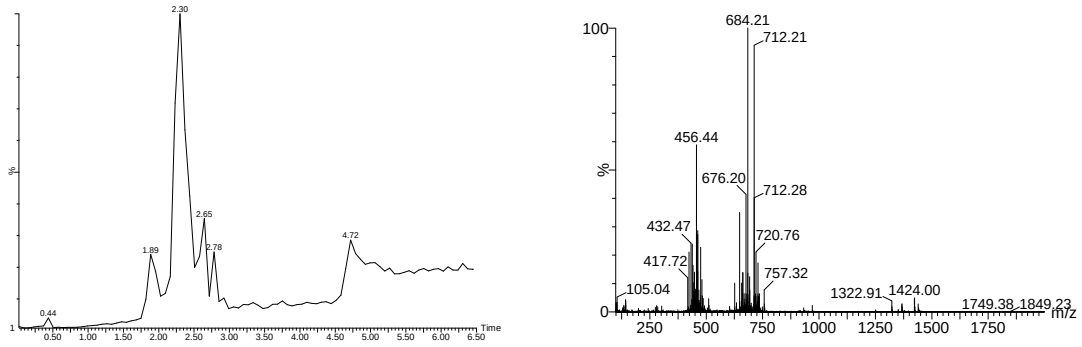


Figura 2.8 *Análisis de HPLC-MS de OEG Boc-OEG$_{27}$-COOH (**41**) comercial. En el UV no es detectable, solo se muestra la traza de MS. El análisis de HPLC-MS se realizó con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min.*

Una vez obtuvimos los dos derivados de OEG necesarios para la síntesis del dendrón G1-4OEG$_{27}$COOMe-1OEG$_{27}$Ac (**49**) se procedió a su síntesis. Para la síntesis de **49** se introdujeron modificaciones en el esquema sintético respecto a la estrategia seguida en el capítulo 1. En este caso se invertía el orden de incorporación de las ramas, es decir, con el fin de evitar interacciones estéricas entre las cuatro ramas equivalentes y la rama unida al punto focal, esta

última es la primera en ser introducida y posteriormente las cuatro ramas equivalentes. La nueva estrategia de síntesis se encuentra detallada en la figura 2.9.

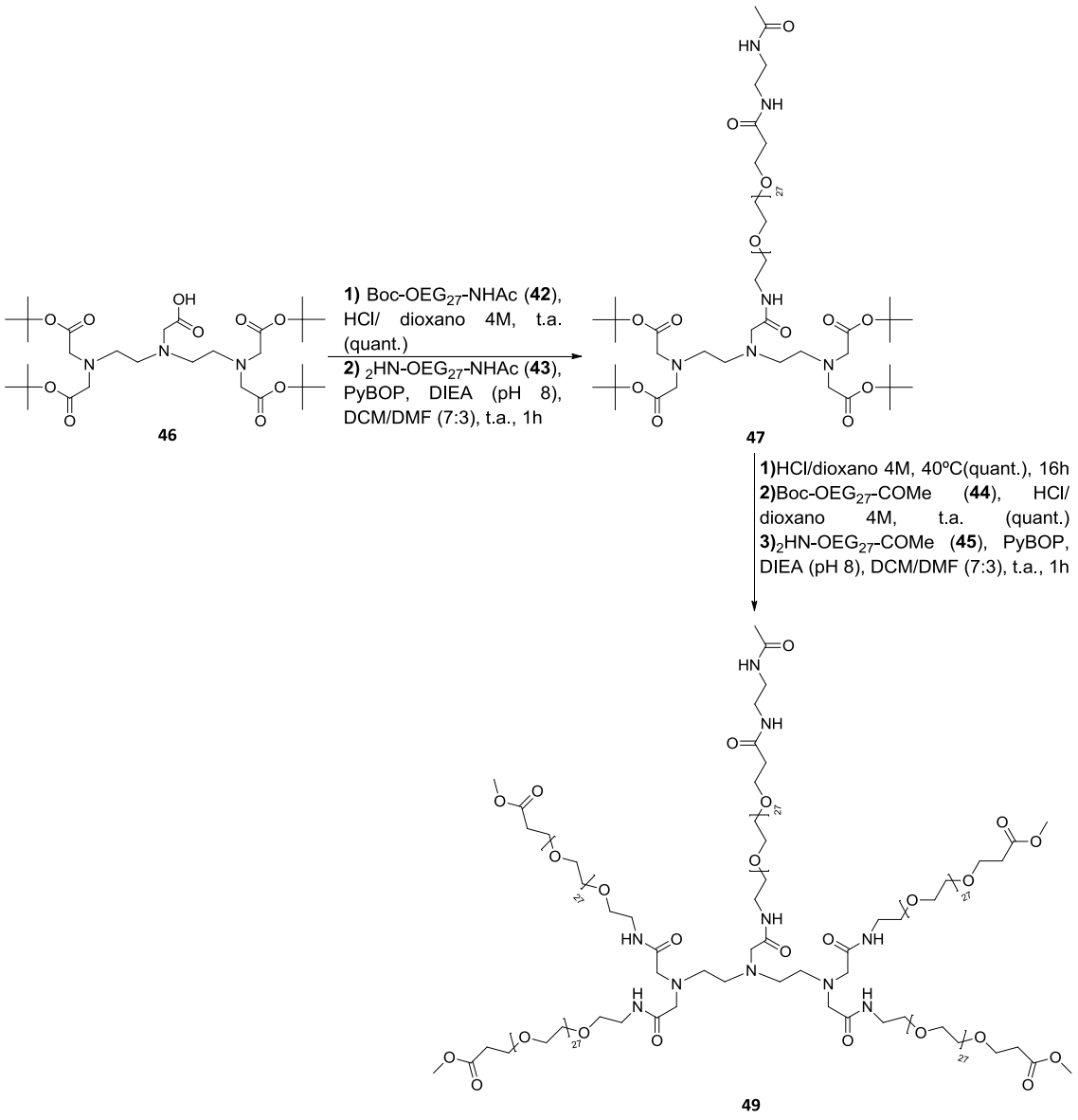


Figura 2.9 *Estrategia sintética diseñada para la síntesis del dendrón G1-4OEG$_{27}$COMe-1OEG$_{27}$Ac (**49**).*

Para la obtención de este dendrón mediante la estrategia descrita se partía del derivado de DPTA **46**, que se obtenía por hidrogenólisis del grupo bencilo del compuesto **4** utilizando Pd/C como catalizador en metanol. Posteriormente se incorporó $_2$HN-OEG$_{27}$-NHAc (**43**) empleando PyBOP como agente acoplante en DCM y añadiendo DIEA a la solución hasta obtener pH 8. La mezcla se dejó reaccionar durante 1h y por HPLC-MS se observó la desaparición del producto de partida **46**. El análisis mediante HPLC-MS resultó complicado, ya que se obtenía un crudo bastante sucio, pero se observaba claramente las masas correspondientes a las especies policargadas del producto final **47**.

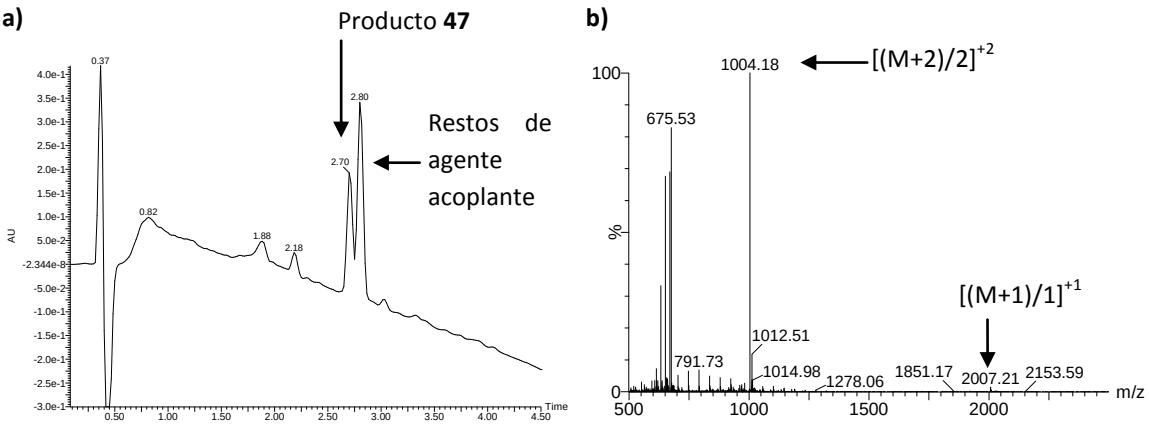


Figura 2.10 a) *Traza cromatográfica obtenida mediante HPLC-MS del crudo de reacción del producto* ***47*** *tras una primera elaboración. Fue necesario realizar precipitaciones en hexano posteriormente, pero en este HPLC se puede observar mejor el producto* ***47*** *por UV.* ***b)*** *Análisis de ESI del crudo, en el que se observa claramente la masa del producto final. El análisis de HPLC-MS se realizó con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min.*

A pesar de que en esta primera reacción no habíamos obtenido unos resultados demasiado óptimos, especialmente en términos de pureza del producto objetivo, decidimos proseguir con la estrategia sintética mostrada en el figura 2.9, con el fin de explorar si era factible la obtención del dendrón final G1-4OEG_{27}COMe-1OEG_{27}Ac (**49**) y luego proceder a la optimización de la misma. También ya se empezó a percibir la necesidad de buscar un sistema alternativo de análisis del compuesto final para su caracterización, ya que debido a la cantidad de éteres de etilo que contiene la cadena de OEG y a su cierta polidispersión su análisis por RMN resulto muy complejo e inexacto para poder confirmar exactamente su estructura final. Así se procedió a eliminar los cuatro grupos *terc*-butilo que actuaban como protectores en forma de éster de los cuatro ácidos carboxílicos equivalentes del derivado de DTPA 47. Esta eliminación se realizó con tratamiento con HCl 4M en dioxano, calentando a 40 °C durante una noche, tras lo cual fue evaporado el crudo a sequedad y coevaporado con tolueno con el fin de eliminar cualquier traza de ácido. En el análisis de MS obtenido mediante HPLC-MS se puede observar claramente la $[(M+1)/1]^+$ y la $[(M+2)/2]^{2+}$ del producto **48**, pero este compuesto no se detectó por UV (figura 2.11, **a**). Se procedió a la incorporación de las cuatro ramas de OEG con el producto obtenido, y para ello se tuvo que eliminar previamente el grupo Boc del compuesto Boc-OEG_{27}-COOMe (**44**) que previamente habíamos sintetizado. Posteriormente se realizó el acoplamiento de $_2$HN-OEG_{27}-COOMe (**45**) sobre las cuatro posiciones equivalentes utilizando PyBOP como agente acoplante. El crudo de reacción nos permitió, tanto por HPLC ni por MALDI, detectar ninguna masa que correlacionara con el producto final (**49**) a pesar de que sí se observaba la desaparición de las masas correspondientes al producto de partida **48** (figura 2.11 **b** y **c**).

Posteriormente se realizaron algunas otras pruebas para la síntesis de este dendrón pero nunca se pudieron detectar masas que claramente se asociaran a su presencia, así que por razones de tiempo para la consecución de este proyecto de tesis decidimos abandonar la estrategia de sintetizar un dendrón con ramas OEG de longitud superior a las del dendrón del capítulo 1. Esta estrategia también se iba a aplicar en el capítulo 3, pero se descartó de igual manera.

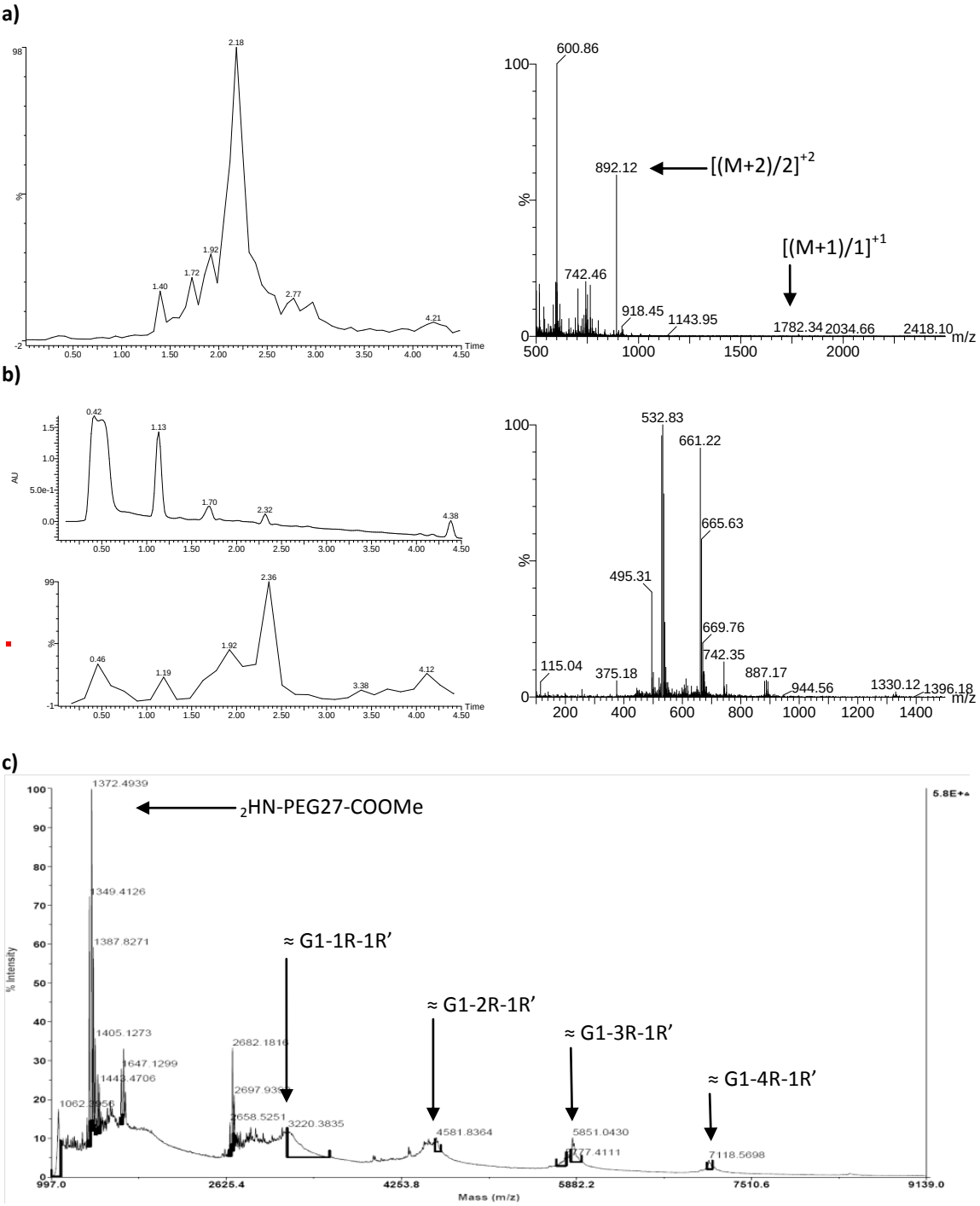


Figura 2.11 a) *Traza cromatográfica del ESI del análisis de HPLC-MS del producto* ***48****. El análisis de HPLC-MS se realizó con una columna XBridge C18 y un gradiente 15→60% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min.* ***b)*** *Análisis del crudo de HPLC-MS del crudo de reacción del producto* ***49****, en el que se puede observar la desaparición del producto de partida* ***48*** *($[(M+1)/1]^+$ 1782 y $[(M+2)/2]^{2+}$ 892), pero no del producto final* ***49****. El análisis de HPLC-MS se realizó con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min.* ***c)*** *MALDI-TOF del crudo de reacción del producto G1-4OEG_{27}COOMe-1OEG_{27}Ac (****49****) en el que se pueden observar masas similares a las del producto final, pero del cual no se puede extraer una conclusión definitiva. La preparación de la muestra de MALDI-TOF se realizó empleando como base 1µl de la matriz ACH, posteriormente se añadió 1µl de la muestra y finalmente 1µl de la matriz SA. Donde R se refiere a $_2$HN-OEG_{27}-COOMe (****45****) y R' a $_2$HN-OEG_{27}-NHAc (****43****).*

2.1 Síntesis del dendrón G1-4SN38-1Ac (55)

Debido a los resultados poco concluyentes con el compuesto en la síntesis del dedrón G1-4OEG$_{27}$COOMe-1OEG$_{27}$Ac, se decidió abandonar la idea inicial de conjugar el SN38 a este dendrón. Con el objetivo de continuar explorando el uso de dendrones OEG como vehículo para la administración del SN38 se decidió explorar la conjugación de este al dendrón empleado en el capítulo 1 que tenía las ramas de talla más pequeñas y que sabíamos que se podían caracterizar con facilidad. Con este fin a partir del dendrón G1-4Boc-1Ac (**11**) se procedió a rediseñar el proceso de obtención de los nanoconjugados de SN38 que habíamos obtenido anteriormente, ya que SN38-TBDPS-GlyBoc (**39**) no era adecuado para realizar la conjugación con el dendrón **11**. Para poder realizar la conjugación a este dendrón se necesitaba un derivado de SN38 que contuviera un ácido carboxílico. Con el fin de aprovechar el trabajo realizado anteriormente se decidió incorporar un residuo de ácido adípico al compuesto SN38-TBDPS-GlyBoc (**39**). La protección del ácido adípico y su incorporación al derivado SN38-TBDPS-GlyNH$_2$ (**40**) se encuentra descrito en la figura 2.12.

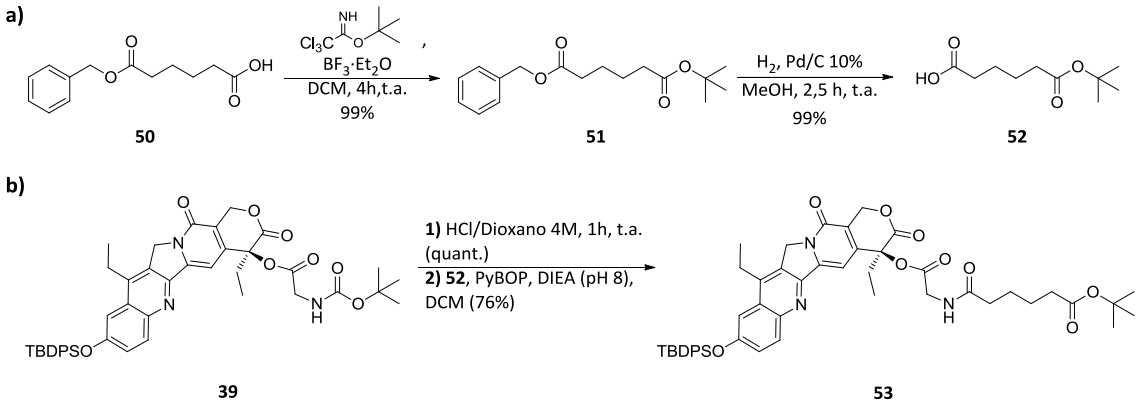


Figura 2.12 *Esquema sintético para la obtención del nuevo derivado de SN38 adecuado para la conjugación al dendrón **11**. **a)** Derivatización de la molécula de ácido adípico para su conjugación con SN38TBDPSGlyBoc (**39**). **b)** Conjugación de la molécula de ácido adípico monoprotegido (**52**) al derivado de SN38, para obtener el derivado SN38TBDPSGlyAdipictBu (**53**).*

Una vez obtenido el derivado de SN38 **53**, se procedió a su incorporación mediante un enlace amida en las cuatro posiciones equivalentes del dendrón **11**. La formación de este enlace amida se realizó empleando PyBOP como agente en medio orgánico básico y se dejó evolucionar la reacción durante aproximadamente 1h. En el crudo de reacción se observa el producto final **55** y productos que concuerdan con pérdidas parciales de los grupos protectores TBDPS. *A priori* el crudo final parece una mezcla compleja, pero tras realizar una columna HLB empleando 50-100% de ACN en H_2O se logró obtener una mezcla compuesta tan solo por los derivados del producto **55** (mezcla de dendrón totalmente protegido y con pérdidas parciales de TBDPS), motivo por el cual no se pudo calcular el rendimiento global de esta reacción. Como la eliminación del grupo TBDPS era el siguiente paso en el proceso de

síntesis se decidió continuar el proceso utilizando la mezcla como producto intermedio (figura 2.13).

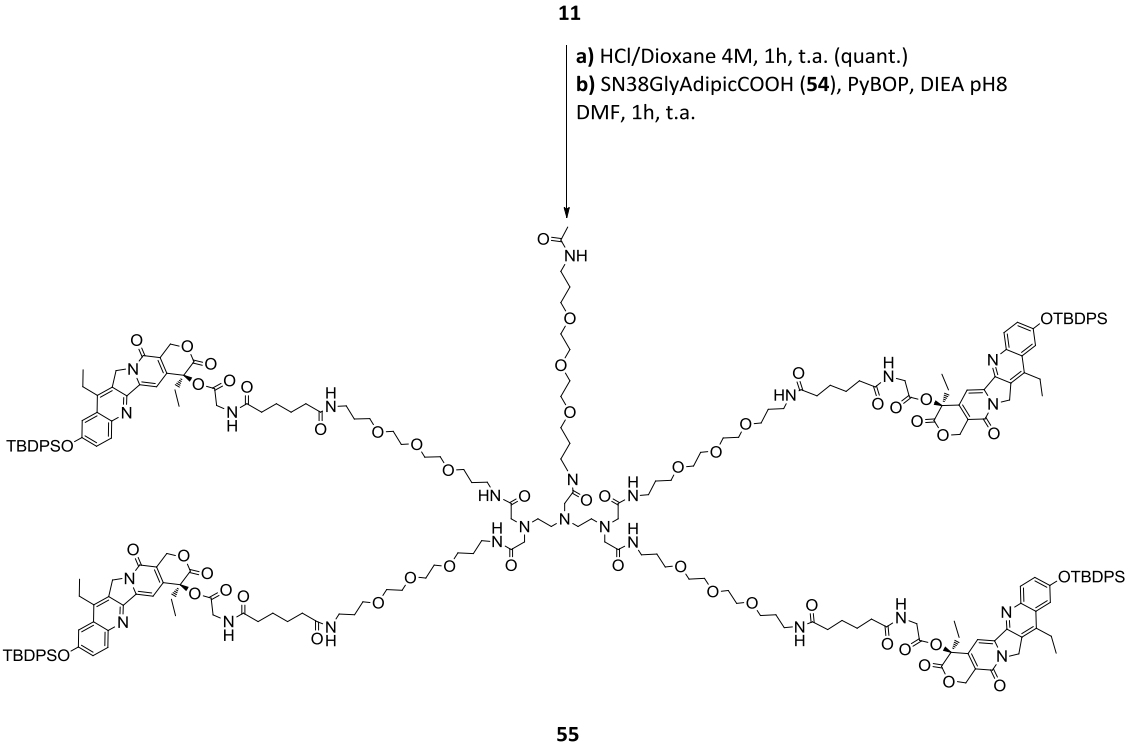


Figura 2.12 *Esquema sintético seguido para la obtención del dendrón G1-4Boc-1Ac (**11**) conjugado con SN38.*

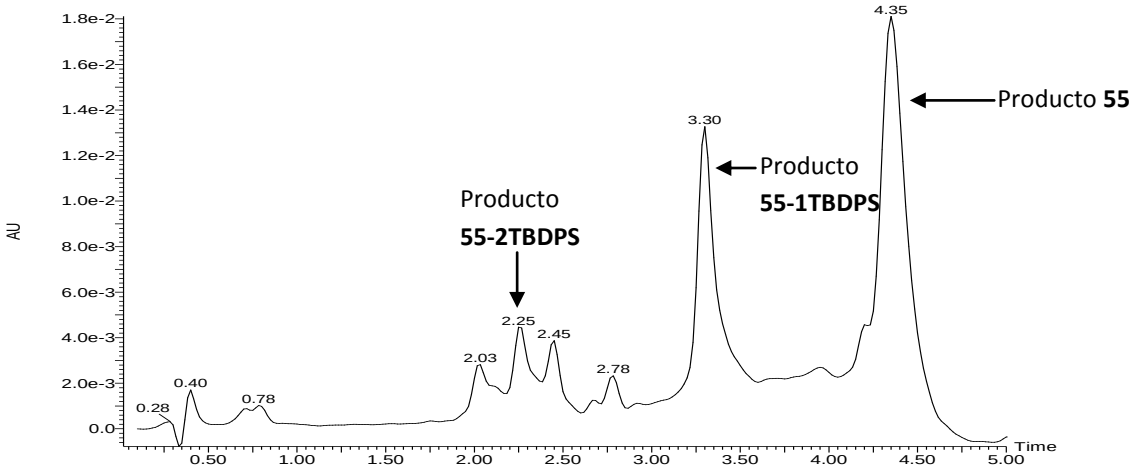


Figura 2.13 *Traza cromatográfica de UV obtenida con HPLC-MS tras la purificación del producto **54**. En él no se observan productos de partidas ni restos de agente acoplante, en cambio se observa una mezcla del producto **55** y productos secundarios cuya masa concuerda con perdidas parciales de TBDPS. El análisis de HPLC-MS se realizó con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min.*

El primer método ensayado para la eliminación de los grupos TBDPS fue con TBAF siguiendo la metodología descrita en la referencia 52. Así una muestra del producto **55**, se disolvió en una solución 1:1 de TBAF 1M en THF y HCl 0,05M (ensayo A, tabla 2.3) y se dejó reaccionando a temperatura ambiente observándose que después de 1h el producto **55** está totalmente desprotegido, pero a la vez se detectó la pérdida de un SN38. Para intentar evitar este efecto indeseado se procedió a realizar un ensayo disminuyendo el número de equivalentes de TBAF (ensayo **B**, tabla 2.3). Así en el ensayo **B** se realizó la reacción de eliminación del TBDPS con 4 eq. de TBAF frente a los 16 eq. utilizados en el ensayo **A**, y se diluyó cuatro veces el crudo en THF, realizando la reacción a baja temperatura con un baño de hielo. A los 15 min de reacción se controló y se observó la eliminación total de todos los grupos TBDPS, por lo que se procedió a parar la reacción siguiendo el proceso de elaboración descrito en la referencia 52 sin ningún éxito, ya que los restos de TBAF que contenía el crudo acaban por descomponer el producto final. Se realizó otro ensayo (entrada **C**, tabla 2.3) repitiendo las condiciones de eliminación del TBDPS, pero empleando un método de eliminación del TBAF distinto que consistía en la incubación del crudo de reacción con la resina DOWEX 50WX8-400 y Ca_2CO_3, [57] pero una vez más se observó la descomposición del producto final. En otro ensayo (entrada **D**, tabla 2.3) se exploran las mismas condiciones de desprotección del conjugado, pero intentando precipitar el crudo de reacción en H_2O aunque sin éxito. En el ensayo **E** (tabla 2.3) se exploró un nuevo método de elaboración que consistió en la precipitación del producto final empleando primero hexano y posteriormente IPA. Para llevar a cabo este proceso de elaboración del crudo fue necesario modificar las condiciones de eliminación de TBDPS. Como ya se ha comprobado que el producto debía pasar el menor tiempo posible en contacto con el TBAF con el fin de evitar su descomposición, se debía eliminar el disolvente acuoso de las condiciones de reacción, ya que este es inmiscible tanto en hexano como en IPA y podía interferir en el proceso de limpieza del crudo y posiblemente favorecería la descomposición del crudo. Por ello en el ensayo **E** (tabla 2.3) se procedió a la eliminación del TBDPS utilizando 4 eq. de TBAF diluido hasta 0,1 M en THF y sobre esta mezcla se añadieron 8 eq. de AcOH, a 0°C, dejando que la reacción evolucionara durante 15 min. al igual que en ocasiones anteriores. Con este método se observó una desprotección total de los grupos hidroxilos protegidos con TBDPS. Pese a que los disolventes empleados eran totalmente miscibles en hexano e IPA, la precipitación no tuvo lugar, por lo que no fue posible recuperar el producto libre de TBAF. Por último se decidieron ensayar estas últimas condiciones de eliminación del TBDPS, y una vez finalizada la reacción se procedió a eliminar los restos de TBAF mediante purificación inmediata del crudo una columna de HLB (ensayo **F**, tabla 2.3) con un gradiente de 0-100 % de ACN en H_2O para obtener finalmente el producto puro, libre de TBAF.

Tabla 2.3 *Resumen de los ensayos realizados para la eliminación de los grupos TBDPS del producto* ***55****. En los ensayos* ***B***-***D*** *la solución de TBAF 1M es diluida cuatro veces en THF, en los ensayos* ***E***-***F*** *la solución de TBAF 1M es diluida diez veces en THF.*

Ensayo	Condiciones experimentales	Observaciones
A	16 eq. TBAF 1M en THF y HCl 0,05M (1:1), a temperatura ambiente durante 1h.	Se observa la desprotección total, pero con pérdidas de SN38.
B	4 eq. TBAF 0,25M en THF y HCl 0,05M (1:1), a 0 °C durante 15 min.	Se observa la desprotección total del TBDPS. Se llevan a cabo extracciones con DCM, pero en la fase orgánica permanece el producto y restos de TBAF que acaban por descomponer el producto **55**.
C	4 eq. TBAF 0,25M en THF y HCl 0,05M (1:1), a 0 °C durante 15 min.	Se observa la desprotección total del TBDPS. Se añade al producto DOWEX 50WX8-400 y Ca_2CO_3, y posteriormente se filtra a través de Celite. [57] El producto descompone.
D	4 eq. TBAF 0,25M en THF y HCl 0,05M (1:1), a 0 °C durante 15 min.	Se observa la desprotección total del TBDPS. Se intenta precipitar en H_2O, pero el producto no precipita y se descompone.
E	4 eq. TBAF 0,1 M y se añaden 8 eq. de AcOH, a 0 °C durante 15 min.	Se observa la desprotección total del TBDPS. Se intenta precipitar en Hexano y IPA, pero el producto no precipita.
F	4 eq. TBAF 0,1 M y se añaden 8 eq. de AcOH, a 0 °C durante 15 min.	Se observa la desprotección total del TBDPS. Se pasa el producto por una columna HLB con un gradiente 0-100% ACN en H_2O. Se obtiene el producto libre de TBAF y sin descomponer.

Finalmente obtuvimos el producto G1-4SN38-1Ac (**56**) con una pureza aproximada del 50% (λ=266 nm). Se observa claramente que el producto no es totalmente puro y por tanto no se pudo calcular el rendimiento de manera conveniente. En cambio se realizaron algunos ensayos de solubilidad con él, con el fin de determinar si valía la pena realizar un esfuerzo sintético en la optimización del producto. Estos ensayos preliminares de solubilidad mostraron una solubilidad similar a la del SN38 libre, por lo que el producto no cumplía con los requisitos de ser un buen vehículo para la administración del SN38 y se abandonó esta estrategia. Estos resultados confirman nuestra hipótesis inicial de que para la administración de SN38 se necesita un dendrón con ramas de talla superior al sintetizado, con el fin de que la relación OEG:SN38 sea grande y el OEG pueda ejercer una influencia solubilizadora para el SN38.

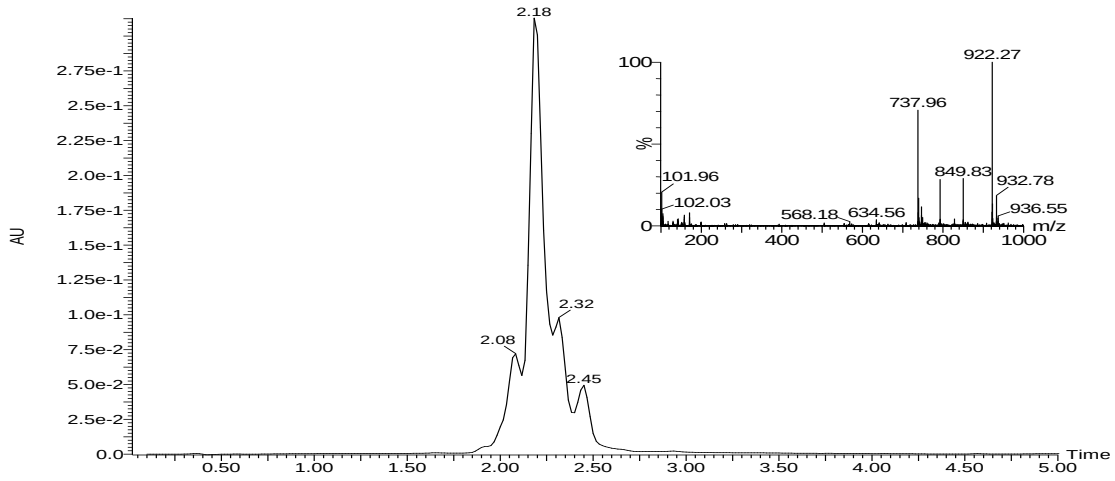


Figura 2.14 *Traza cromatográfica del producto* ***56*** *tras su purificación obtenida mediante HPLC-MS. El análisis de HPLC-MS se realizó con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min.*

3 Síntesis del OEG-SN38

Debido a los problemas encontrados al intentar construir un vehículo de carácter dendrítico basado en OEG, se decidió abandonar esta estrategia y trabajar con cadenas lineales de OEG como vehículo para la administración del SN38. En la figura 2.15 se muestra un esquema general de la estrategia basada en OEGs lineales para vehiculizar el SN38.

Como agente vehiculizador en esta estrategia utilizamos OEG lineal, concretamente el Boc-OEG_{27}-COOH (**41**). Con el fin de explorar el direccionamiento activo se propuso estudiar también la incorporación de un péptido director al conjugado y compararlo con el conjugado que no contenía este, tal y como se puede observar en el esquema 2.15.

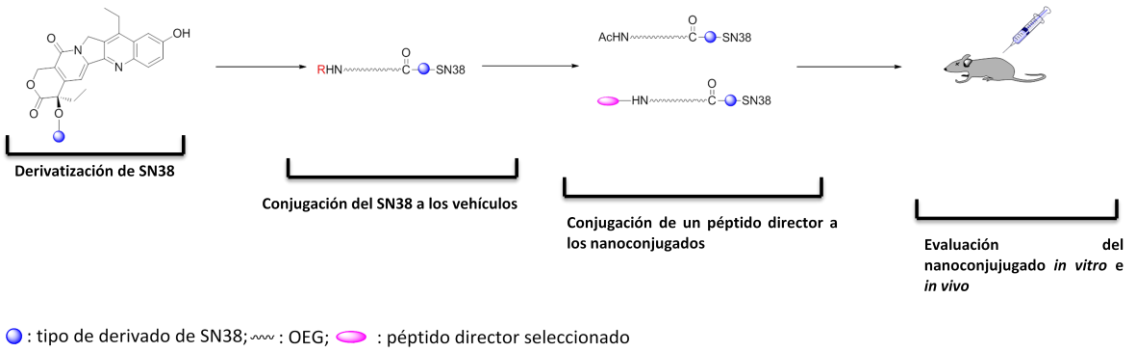


Figura 2.15 *Representación esquemática de la estrategia seguida en este capítulo, tras descartar la unión del SN38 nuestros dendrones. En la figura se encuentran los principales pasos a seguir: derivatización del SN38, unión del derivado de SN38 a los vehículos, conjugación de un péptido director a los nanoconjugados para poder evaluar la terapia dirigida, y la evaluación final in vitro e in vivo de los nuevos nanoconjugados.*

3.1 Síntesis del Ac-OEG-SN38 (60)

En este apartado se detalla la síntesis del conjugado Ac-OEG-SN38 (**58**) que no contiene un péptido director, es decir que no ha sido diseñado para tener un direccionamiento activo al tumor. Este conjugado es el producto resultante de la unión del SN38 a la cadena lineal de OEG, en este caso bloqueado en uno de sus extremos con grupo acetilo y unido a través de otro extremo al SN38.

Para ello se tuvo que derivatizar el Boc-OEG_{27}-COOH (**41**) con el fin de poder introducir el grupo acetilo en el extremo que tiene una amina. El Boc-OEG_{27}-COOH (**41**) contiene un extremo en forma de ácido carboxílico libre, destinado a la unión con el derivado de SN38 **40**, y un extremo amina, originalmente protegido con un grupo carbamato de *terc*-butilo (Boc). Se procedió a la hidrólisis en medio ácido del grupo Boc, genrando el $_2$HN-OEG_{27}-COOH (**57**), que se trató a continuación con anhídrido acético en medio básico, dándose la acetilación de la amina primaria obtenida en el paso anterior, seguido de un tratamiento con anhídrido acético en medio básico, obteniéndose la cadena OEG Ac-OEG_{27}-COOH (**58**) necesaria para la obtención del conjugado con SN38.

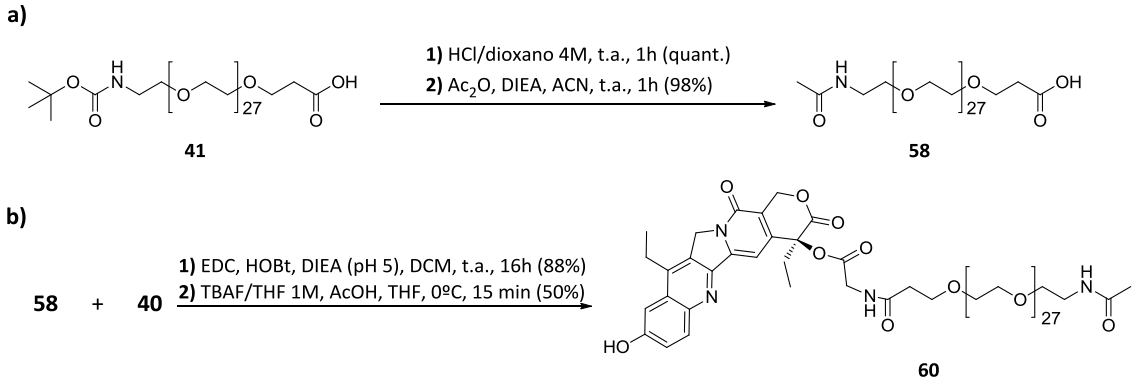


Figura 2.16 a) *Esquema sintético seguido para la obtención del derivado de OEG* ***58****.* ***b)*** *Esquema sintético seguido para la obtención del conjugado final SN38-OEG-Ac (****60****).*

Una vez obtenido el Ac-OEG_{27}-COOH (**58**) se procedió a la realización del acoplamiento de la cadena de OEG con el derivado de SN38TBDPS-$GlyNH_2$ (**40**) empleando como agente acoplante EDC y HOBt como aditivo. Debido a que el derivado **40** provenía de una desprotección en medio ácido se añadió DIEA hasta alcanzar pH 5, ya que este es el pH más adecuado para el uso de EDC como agente acoplante. Se dejó reaccionar la mezcla durante una noche, aproximadamente 16h, transcurrido este tiempo no se detectó producto de partida **40** en el crudo. Con el fin de eliminar el exceso de agentes reactivos (EDC, HOBt y base) y posibles restos del OEG **58**, se procedió a purificar el crudo mediante el crudo mediante una columna de fase reversa HLB, lavando primero con H_2O, luego con H_2O/ACN (1:1) y finalmente con ACN. De esta manera abtenemos el producto **59** en forma de aceite amarillento (88% rendimiento, 90% de pureza a λ=266 nm).

Aún restaba por realizar el último paso de eliminación del grupo TBDPS, que como ya se ha descrito en el apartado 2.1 del presente capítulo, es un paso crucial y delicado. Para realizar este paso se empleó el método **F** (tabla 2.3) desarrollado anteriormente con una pequeña variación. Así se emplearon 4 eq. de TBAF en THF en presencia de AcOH y se dejó reaccionar esta mezcla con el producto a desproteger durante 15 min a 0 °C, pero en esta ocasión, en vez de llevar a cabo una purificación del crudo del producto **59** con una columna HLB, se realizó la purificación con una columna de silica eluyendo con DCM/EtOH (0-50%). De esta manera se obtuvo el producto Ac-OEG-SN38 (**60**) puro en forma de aceite amarillento (50% rendimiento, 98% de pureza a λ=266nm).

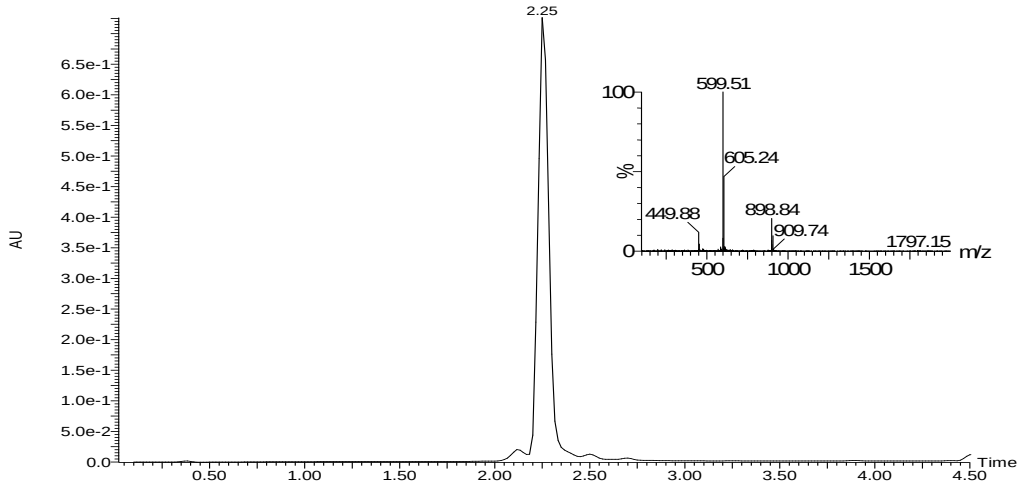


Figura 2.17 *Traza cromatográfica obtenida mediante HPLC-MS del conjugado final SN38-OEG-Ac* ***60****. El análisis de HPLC-MS se realizó con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min.*

Me gustaría resaltar, que a la vista de cuan delicado y crucial era el paso de elimnación del TBDPS en el conjugado y como se observó que este hacía bajar el rendimiento global de la síntesis, se realizaron pruebas de eliminación del TBPDS del derivado SN38-TBDPS-GlyNH_2 (**40**) previo al acoplamiento con la cadena de OEG. A pesar de que esta desprotección se consiguió con mejores rendimientos a los obtenidos de la desprotección con el derivado, el posterior acoplamiento del SN38 con el hidroxilo libre a la cadena de OEG siempre ofreció rendimientos menores y mayores dificultades para su purificación, demostrando la gran importancia de tener el hidroxilo presente en el carbono C_{10} del SN38 protegido para evitar reacciones secundarias.

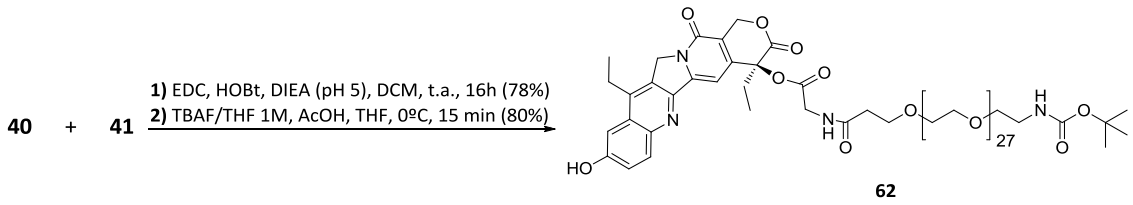
3.2 Síntesis del Péptido-OEG-SN38

Como ya hemos dicho nos propusimos evaluar una método de direccionamiento activo del nanoconjugado de SN38 a través de la unión de este a un péptido director. Para realizar este propósito debíamos contar con una cadena de OEG bifuncional, es decir, que uno de sus extremos contará con grupo funcional adecuado para la conjugación del SN38, en nuestro caso

concreto sería un grupo ácido carboxílico, y otro grupo en su extremo opuesto para la unión a un péptido director adecuado a nuestro proyecto. El Boc-PEG27-COOH con el que contábamos reunía ambos requisitos, ya que en su extremo ácido carboxílico uniríamos el derivado de SN38 **40**, y aún contábamos con el extremo amina para unir el péptido director. A fin de evaluar cuando sería más adecuado llevar a cabo cada una de las uniones, SN38 y péptido, estudiamos los pasos de la síntesis que deberíamos llevar a cabo. Sin duda alguna el paso que nos había resultado más delicado era la desprotección del TBDPS contenido en el hidroxilo del C_{10} del SN38, ya que ésta desprotección requería del uso de TBAF en el medio, y consideramos que estas condiciones de desprotección podrían afectar a la integridad del péptido que quisiéramos conjugar. Es por este motivo que decidimos que la unión del péptido director al conjugado sería el último paso de la síntesis.

3.2.1 Síntesis del Boc-OEG-SN38 (62)

Teniendo en cuenta las premisas expuestas con anterioridad nos dispusimos a realizar la síntesis del derivado Boc-OEG-SN38 (**62**) de igual manera a la expuesta en el apartado 3.1 del presente capítulo. En este caso podíamos emplear el Boc-PEG27-COOH (**41**) comercial directamente, es decir, sin necesidad de derivatizarlo previamente como en los casos anteriores (síntesis del dendrón o conjugado Ac-OEG-SN38). También me gustaría destacar que en este caso el rendimiento de la desprotección del TBDPS es mucho mayor que en casos anteriores, 50% del producto **60** respecto a 80% de rendimiento del producto **62**, relacionamos este aumento con el hecho de que el producto **62** cuenta en su extremo terminal con una amina protegida en forma de carbamato de *terc*-butilo (Boc) en vez de la acetoamida (producto **60)**, y que este grupo Boc puede presentar un comportamiento mucho más adecuado en la purificación a través de una columna de silica, y por tanto hace que la purificación sea más eficiente aumentando la recuperación del producto final durante la misma.



62

Figura 2.18 *Esquema sintético del derivado Boc-OEG-SN38 (**62**).*

Una vez obtenido el producto **62** ya teníamos un derivado adecuado para la conjugación con un péptido director, por lo tanto solo nos faltaba decidir el mejor candidato, hecho que será discutido en el siguiente apartado.

3.2.2 Síntesis y elección del péptido director

En los últimos años la estrategia de unir una secuencia peptídica específica que presente elevada afinidad a determinados receptores que se sobreexpresan en determinados tejidos o tipos celulares a un fármaco o a un nanoconjugado se ha vuelto muy común y ha hecho que se

produzca un incremento de estudios para la búsqueda de nuevas secuencias específicas. [58] Basándonos en esta estrategia decidimos incluir un péptido director a nuestro sistema SN38-OEG y establecer, mediante comparación entre la biodistribución del sistema con y sin péptido director, la validez de este direccionamiento activo en la mejora de los métodos de administración de SN38.

Para la selección del péptido director se decidió realizar una búsqueda bibliográfica de algún candidato que cumpliera con los requisitos necesarios y encontramos varios estudios en los que se describía la secuencia peptídica TCP-1 como específica de tejidos de cáncer colorectal. [58,59] También se seleccionó un péptido específico para receptores CXCR4, íntimamente ligados a los procesos metastásicos que se producen en el cáncer. [60] Con este objetivo se tomó como ejemplo representativo un pentapéptido cíclico desarrollado por H. Tamamura, [61] introduciendo un residuo de cisteína en lugar del original residuo de glicina con el fin de tener un punto de derivatización en la molécula para introducir en primera instancia el fluoróforo carboxifluoresceína con el fin de realizar las pruebas iniciales para determinar qué candidato era mejor para nuestro sistema de estudio. A este pentapéptido lo llamamos c(CXCR4).

a) **b)**

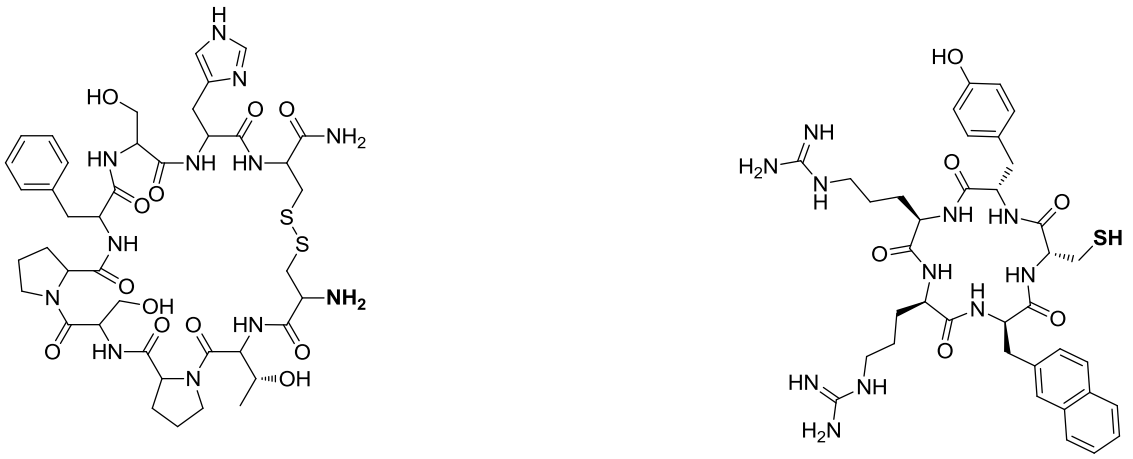
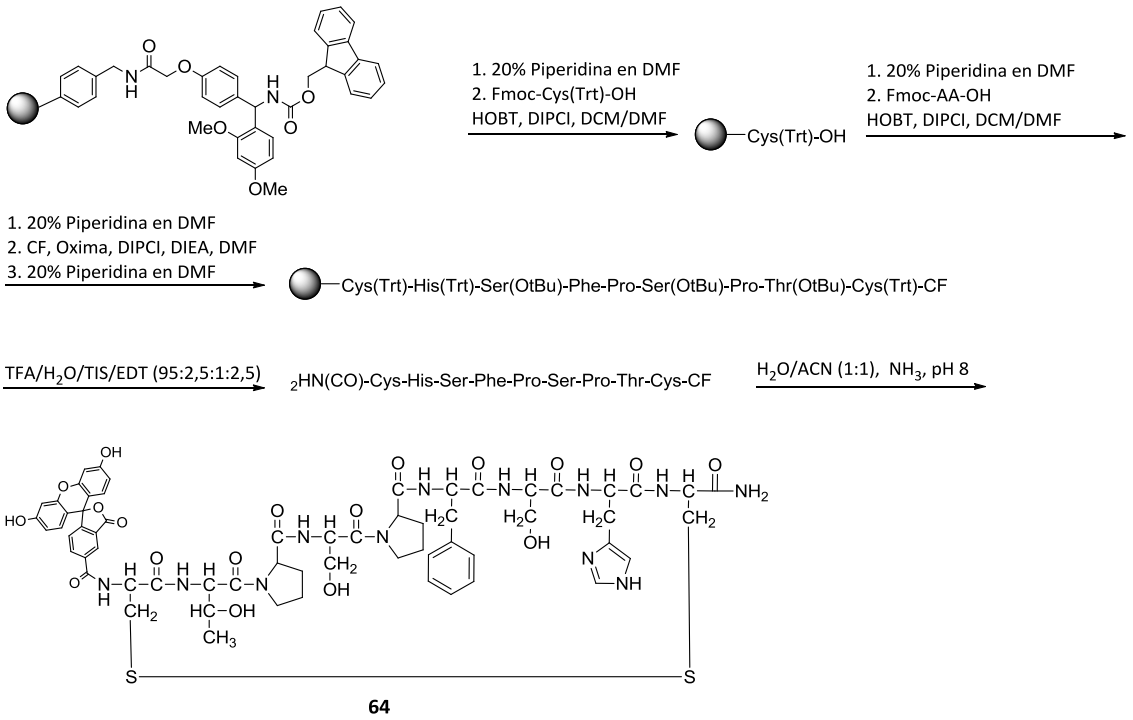


Figura 2.19 *Péptidos escogidos para la evaluación de direccionamiento activo de nuestro conjugado, péptido c(TPC-1) (**a**) y c(CXCR4) (**b**), en negrita se indica el punto de conjugación al fluoróforo carboxifluoresceína.*

Para determinar que péptido director era más adecuado para nuestros propósitos se procedió a la síntesis de ambos péptidos convenientemente derivatizados con el fluoróforo carboxifluoresceína para llevar los estudios de internalización celular mediante citometria de flujo y estudios de microscopia confocal con el candidato más adecuado para proceder a su localización sub-celular.



64

Figura 2.20 *Esquema sintético seguido para la obtención del péptido c(TPC-1-CF) (**64**) en fase sólida empleando la resina Fmoc-Rink-Amide MBHA y estrategia Fmoc/O^{t}Bu.*

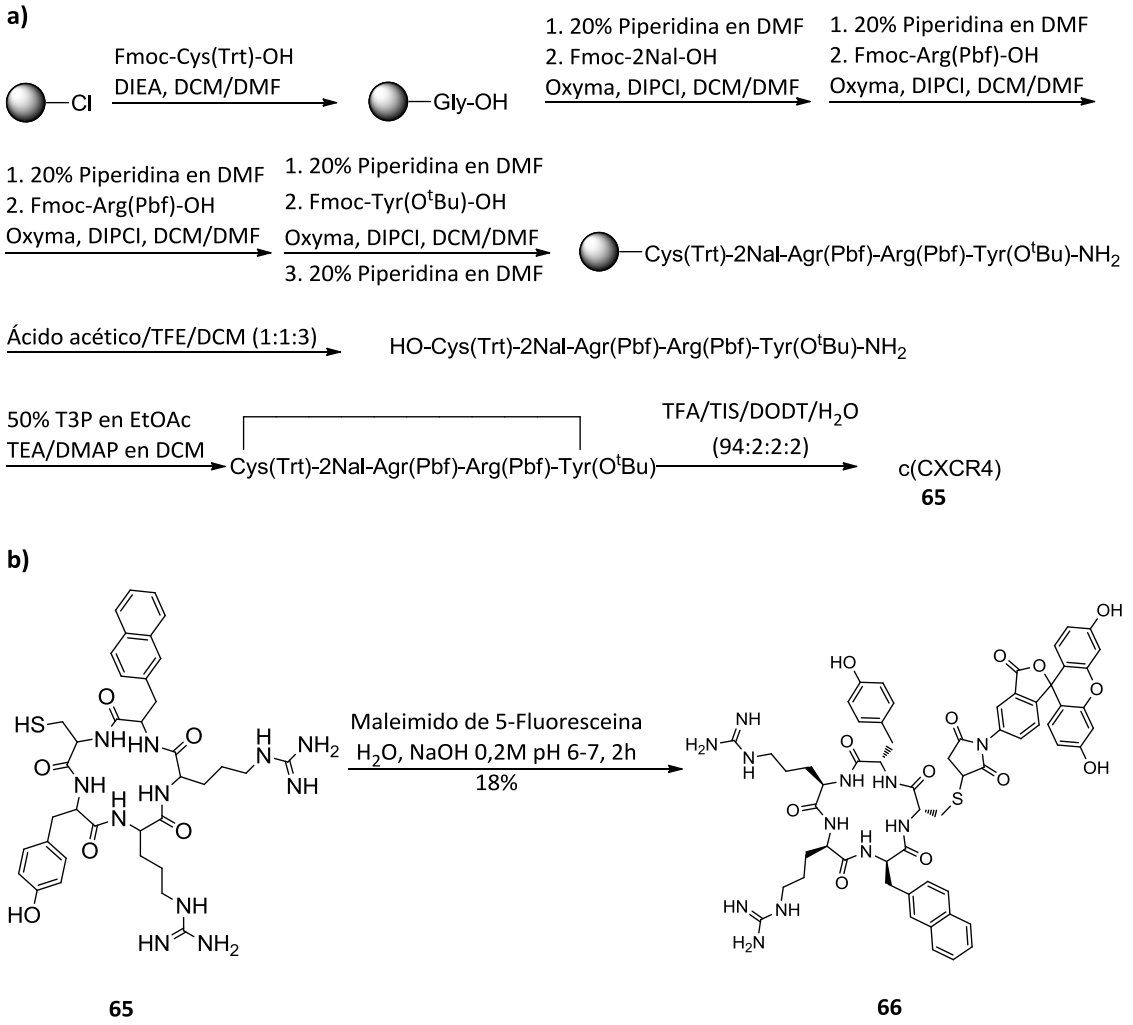
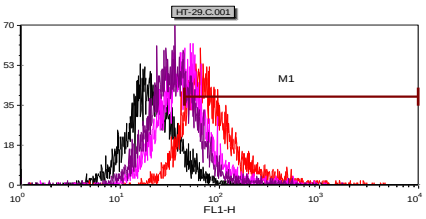
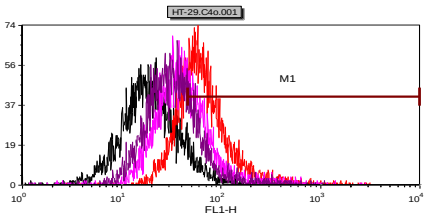
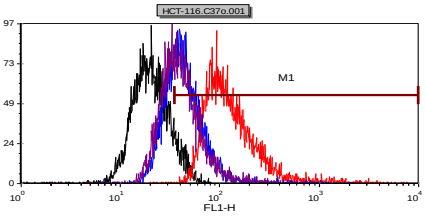
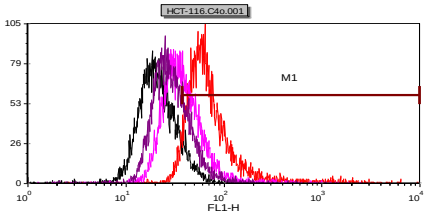
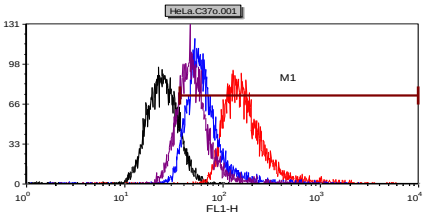
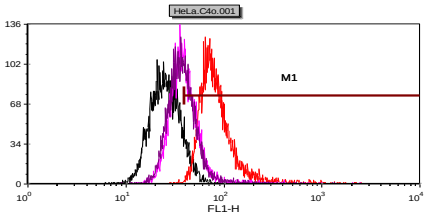
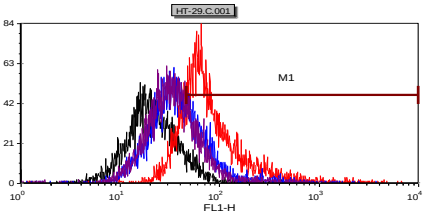
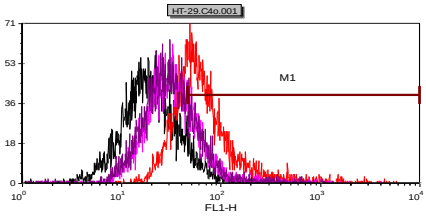
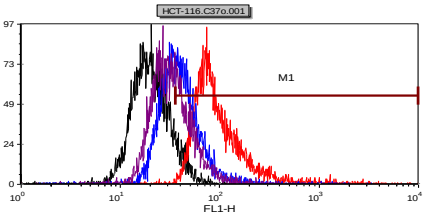
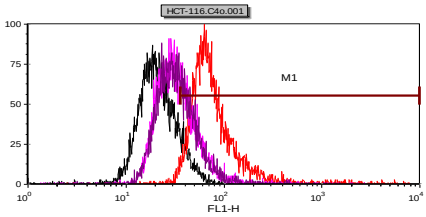
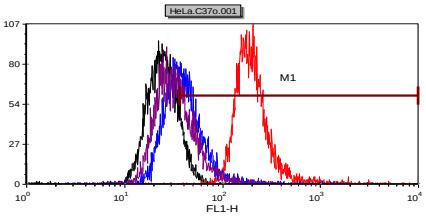
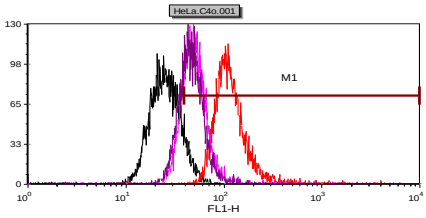


Figura 2.21 a) *Esquema sintético seguido para la obtención del péptido c(CXCR4) (**65**) en fase sólida empleando la resina clorotrtilo y estrategia Fmoc/O^{t}Bu.* ***b)*** *Incorporación del fluoróforo CF a través del tiol libre del residuo de cisteína en solución para obtener el producto c(CXCR4)-CF (**66**).*

Con los dos derivados c(TCP-1)-CF (**64**) y c(CXCR4)-CF (**66**) se llevaron a cabo estudios de internalización mediante citometría de flujo en tres líneas celulares distintas con el fin de determinar qué candidato preentaba mayor capacidad de internalización en estas células. Las líneas celulares empleadas en estos experimentos fueron HeLa (células de cáncer cérvico-uterino humano), HCT-116.Fluc2.C9 (cáncer de colon humano) y HT-29.Fluc.C4 (adenocarcinoma de cáncer colorrectal humano con morfología epitelial) y se determinó la entrada de los péptidos al interior de las células tras 15 min de incubación de los péptidos con las células a 4 y 37ºC, y a tres concentraciones distintas (5, 10 y 100 µM). Las dos temperaturas de incubación están relacionadas con el método de internalización de los péptidos, ya que si a 4 °C la internalización está determinada por un proceso endocítico asociado a receptores. El control negativo de cada uno de los ensayos se realizó empleando células sin péptido. Tras estos estudios (tabla 2.4) se determinó que la mayor capacidad de internalización entre las muestras a 4 y 37 ºC se observaba con el péptido c(TCP-1)-CF (**64**), por lo que se extrae que este péptido es más específico que c(CXCR4)-CF (**66**).

Tabla 2.4 *Tabla de los resultados obtenidos en los ensayos de internalización mediante citometría de flujo a 37 y 4 °C en las tres líneas celulares HT-29.Fluc.C4, HCT-116.Fluc2.C9 y HeLa a diferentes concentraciones: Control (negro), 5 µM (lila), 10 µM (según el gráfico rosa o azul) y 100 µM (rojo) de péptido.*

		37ºC	4ºC
c(TCP-1)-CF (**64**)	HT-29.Fluc.C4		
	HCT-116.Fluc2.C9		
	HeLa		
c(CXCR4)-CF (**66**)	HT-29.Fluc.C4		
	HCT-116.Fluc2.C9		
	HeLa		

Posteriormente se realizaron estudios de microscopia confocal del péptido cTCP-1 en las tres líneas celulares mencionadas anteriormente: HeLa, HCT-116.Fluc2.C9 y HT-29.Fluc.C4 (figura 2.22). Las imágenes de microscopia confocal muestran que cTCP-1 presenta una mayor entrada en las células HCT-116.Fluc2.C9, seguida por la entrada de éste en las células HT-29.Fluc.C4 y por último en células HeLa. Estos resultados demuestran la especificidad por células de cáncer de colon y colorrectal. A pesar de que la capacidad de internalización mostrada por el péptido cTCP-1 no era muy elevada, se decidió continuar con la estrategia de unirlo al conjugado SN38-OEG, ya que lo más interesante de este péptido es su especificidad por las células de cáncer colorrectal (HCT-116.Fluc2.C9) > HT-29.Fluc.C4 (células de cáncer colorrectal) > HeLa (células de cáncer cérvico-uterino humano). [58,59]

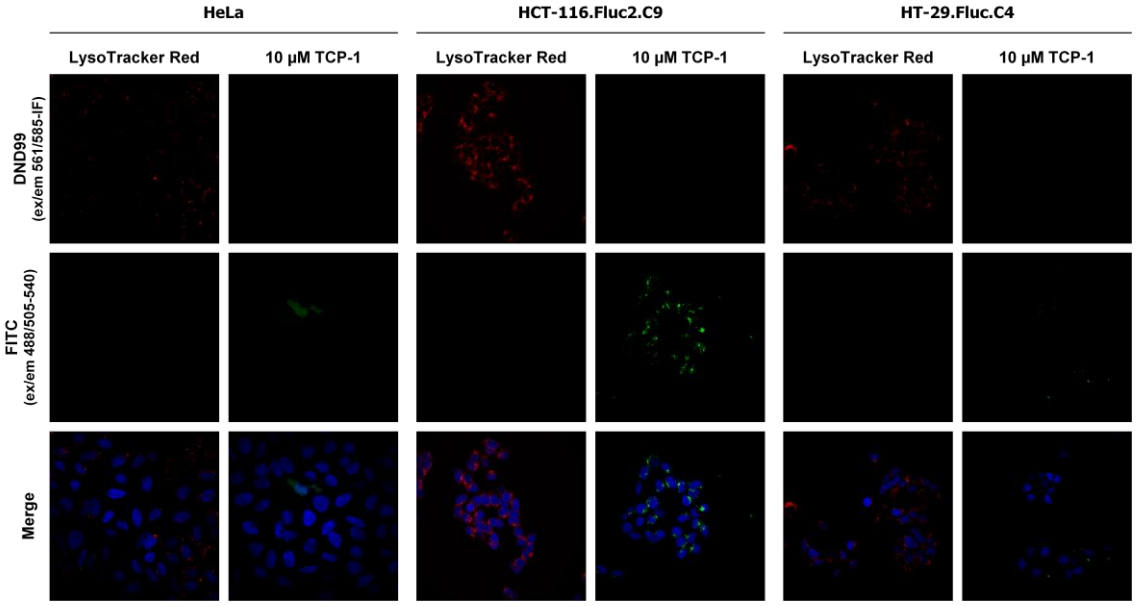
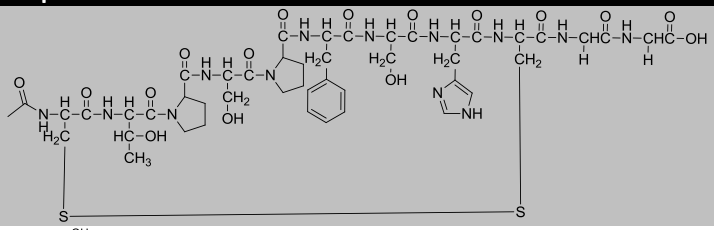
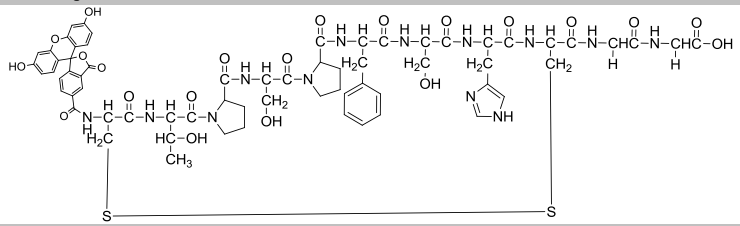
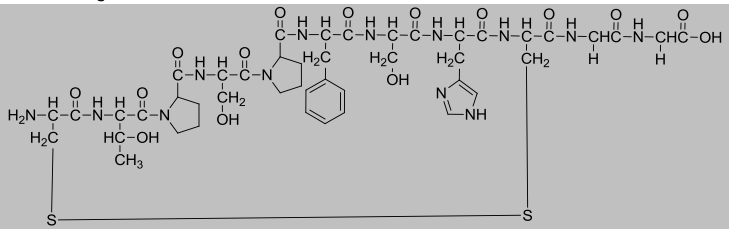


Figura 2.22 *Imágenes de microscoía confocal de la co-incubación con LysoTracker Red y el péptido TCP-1 marcado con FITC en HeLa, HCT-116.Fluc2.C9 y HT-29.Fluc.C4. La mayor incorporación de LysoTracker y péptido se produce en HCT-116.Fluc2.C9, seguida de HT-29.Fluc.C4 y por último en HeLa.*

Para poder realizar la unión del péptido cTCP-1 con el nanoconjugado se intodujeron en éste algunos cambios con respecto a la versión inicial del cTCP-1 previamente sintetizada. En esta nueva versión se introdujeron dos residuos de glicina en el extremo C-terminal del péptido, que actuarían como un espaciador entre el nanoconjugado y el péptido cTCP-1. Para realizar sus síntesis se tuvo que cambiar el soporte polimérico sustituyendo la resina Fmoc-Rink-Amide MBHA que se había utilizado anteriormente por la resina clorotritilo, la cual nos permite obtener el péptido con el extremo ácido carboxílico libre. Disponer de este grupo funcional era necesario, ya que a través de éste se pensaba realizar la unión al conjugado. Con este soporte sólido se sintetizaron de manera paralela tres péptidos distintos basados en cTCP-1 (tabla 2.4). El péptido c(TCP-1)-Ac (**67**) se diseñó como el péptido a ser utilizado como unidad direccionadora en el nanocojugado y presenta el extremo N-terminal acetilado y el extremo C-terminal en forma de ácido carboxílico. El péptido c(TCP-1)-CF (**68**) contiene una molécula de

carboxifluoresceina (CF) en su N-terminal con el fin de ser utilizado en experimentos de internalización mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Y el péptido c(TCP-1)-NH_2 (**69**) con una amina libre en el extremo N-terminal y un ácido libre en el C-terminal. Este derivado peptídico contiene dos puntos reactivos en la misma molécula, el ácido carboxílico sobre el cual se realizaría la unión SN38-OEG y la amina sobre la cual se realizará la conjugación del fluoróforo Alexa 750 con el fin de ser utilizado en los estudios de biodistribución *in vivo*.

Tabla 2.5 *Derivados peptídicos de TCP-1 sintetizados.*

Nombre	Estructura química
c(TCP-1)_Ac (**67**)	
c(TCP-1)_CF (**68**)	
c(TCP-1)_NH_2 (**69**)	

3.2.3 Síntesis de cTCP-1-OEG-SN38 (70)

La síntesis del conjugado cTCP-1-OEG-SN38 se llevó a cabo a partir de los compuestos sintetizados con anterioridad: Boc-OEG-SN38 (**62**) y cTCP-1-Ac (**67**). El derivado Boc-OEG-SN38 presentaba únicamente la amina del extremo terminal del OEG27, ya que se había eliminado con anterioridad el grupo TBDPS del fenol situado en la posición 10 del anillo A, para evitar realizar el tratamiento con TBAF necesario para su eliminación en presencia del péptido. Así, se procedió a la eliminación del grupo Boc presente en **62** mediante un tratamiento acidolítico con HCl 4M en dioxano. Una vez obtenida una amina libre, se procedió a incorporar sobre la misma el péptido cTCP-1-Ac empleando EDC como agente acoplante, HOBt como aditivo, ajustando el pH de la mezcla a 5 mediante la adición de DIEA y dejándola reaccionar a temperatura ambiente durante aproximadamente 16h. Posteriormente el crudo se purificó mediante HPLC-MS semipreparativo, ya que no fue posible realizar otro tipo de purificación al obtenerse crudos muy sucios, presumiblemente debido al hecho que el fenol del C_{10} del SN38 se encuentra desprotegido (5% de rendimiento).

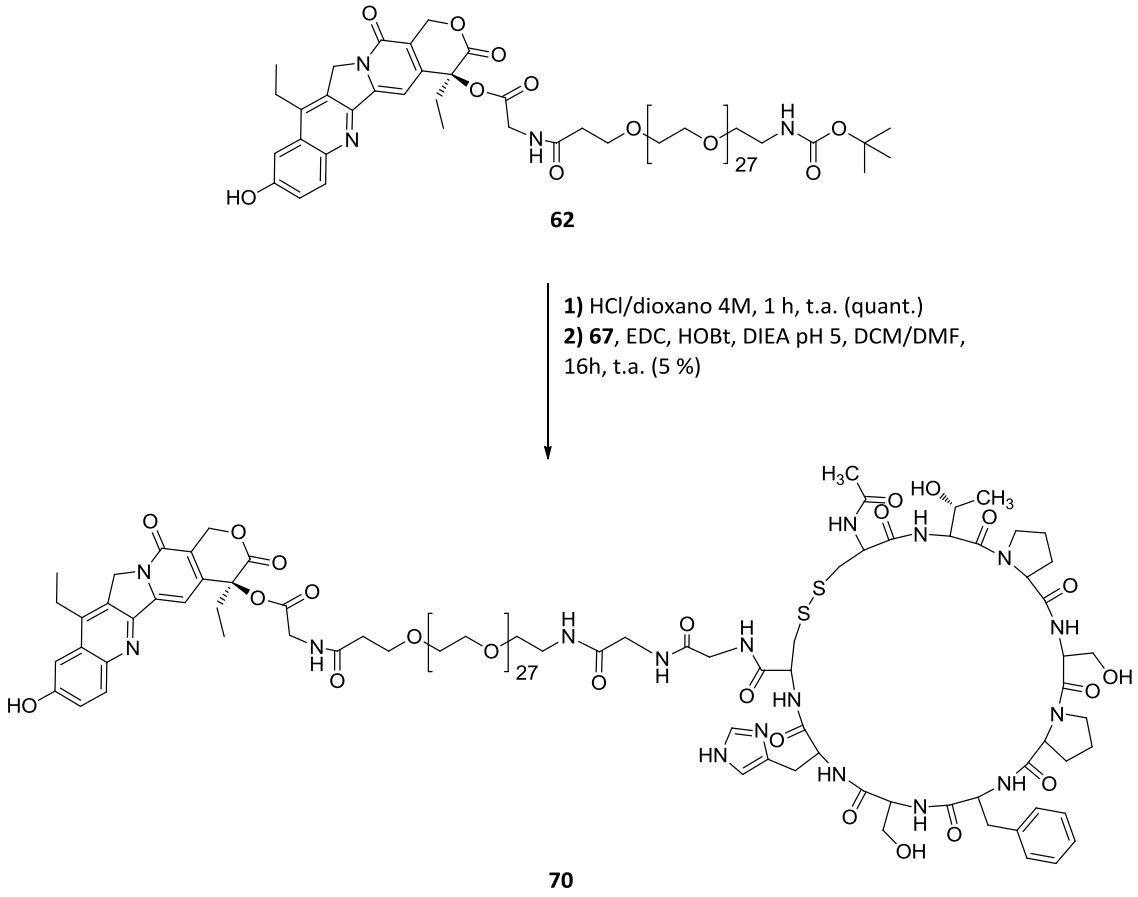


Figura 2.23 *Esquema sintético seguido para la obtención del nanoconjugado cTCP-1-OEG-SN38 (**70**)*

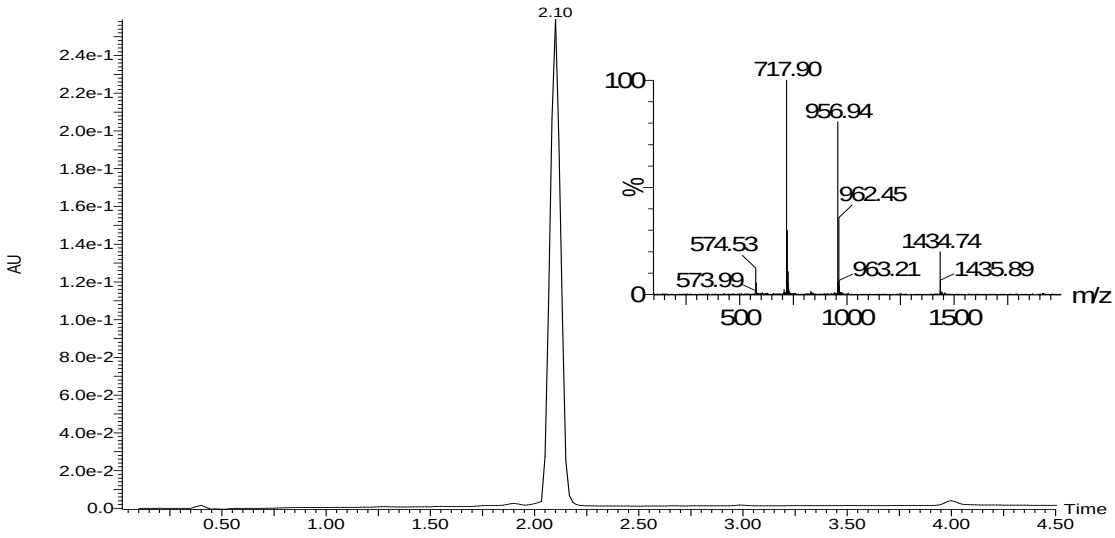


Figura 2.24 *Traza cromatográfica obtenida mediante HPLC-MS del conjugado final cTCP-1-OEG$_{27}$-SN38 **70**. El análisis de HPLC-MS se realizó con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min (λ=266 nm).*

4 Síntesis de derivados que contienen sondas fluorescentes OEG-SN38 para estudios *in vitro* e *in vivo*

Como ya se mencionó con anterioridad en el desarrollo de un nuevo conjugado de OEG-SN38 nos propusimos evaluar el comportamiento del nanoconjugado con y sin péptido director con el fin de determinar si la presencia del péptido cTCP-1 favorecía una acumulación activa en el tumor. Si bien el ensayo más determinante para evaluar la influencia del péptido en la acumulación en tumor del conjugado es la biodistribución *in vivo*, también se decidió hacer una evaluación *in vitro*. Con este objetivo se sintetizaron los conjugados OEG-SN38 y cTCP-1-OEG-SN38 derivatizados con dos sondas fluorescentes distintas, la carboxifluoresceína apropiada para realizar estudios de citometría de flujo y microscopía confocal en células y el Alexa 750, apropiado para su uso en experimentos *in vivo* tal y como se explicó en el capítulo1.

4.1 Síntesis de los derivados OEG-SN38-CF

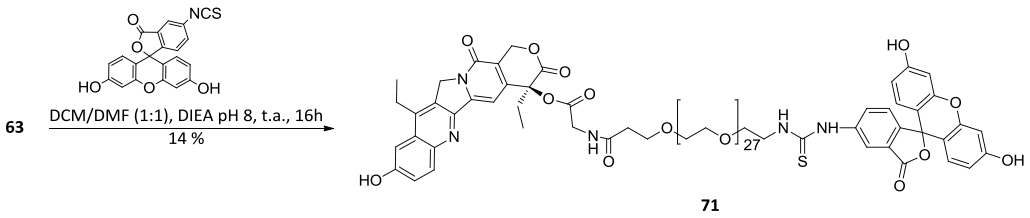
Para llevar a cabo los estudios de internalización in vitro se determinó que era necesario la unión de los conjugados con un fluoróforo compatible con los métodos empleados en este tipo de ensayos. Debido a la experiencia en el grupo y utilidad de la molécula de fluoresceína en este tipo de ensayos se determinó que este sería el fluoróforo al que uniríamos ambos conjugados.

En el caso de los conjugados sin péptido director, la unión del fluoróforo fluoresceína se realizó en solución, empleando como producto de partido el conjugado Boc-OEG-SN38 (**62**). Este fue tratado con una solución de HCl 4M en dioxano para eliminar el grupo Boc tal y como se ha descrito en otras ocasiones, y seguidamente se utilizó el isotiacianato de fluoresceína para su unión en solución. Este compuesto es un derivado activado de fluoresceína ya listo para la conjugación y por tanto solo fue necesario mezclar ambos reactivos, $_2$HN-OEG-SN38 (**63**) y el derivado de fluoresceína, en una solución de DCM/DMF (1:1) ajustando el pH a 8 mediante la adición de DIEA y dejando la reacción evolucionar durante 16h. Finalmente el crudo de reacción fue purificado mediante HPLC-MS semipreparativo, obteniendo el conjugado CF-OEG-SN38 (**71**) puro en forma de aceite anaranjado con un 89% de pureza a 266 nm (8,5 mg, 14% rendimiento).

En el caso del conjugado unido al péptido director c(TCP-1) se siguió otra estrategia para introducir la CF. Como se ha comentado anteriormente, en el momento de realizar la síntesis del péptido director c(TCP-1) ya se consideró la necesidad de tener este péptido conjugado a dos tipo de fluoróforos, fluoresceína y Alexa Fluor 750, por lo que se sintetizaron 3 versiones de éste, dos versiones de este péptido permitirán obtener estos derivados. Tal y como se explicó en el apartado anterior estas distintas versiones del péptido TCP-1 se obtuvieron a partir de una síntesis en fase sólida común de la secuencia péptidica que una vez finalizada se dividió en tres partes. La parte con mayor cantidad de resina (8g) se empleó para la obtención

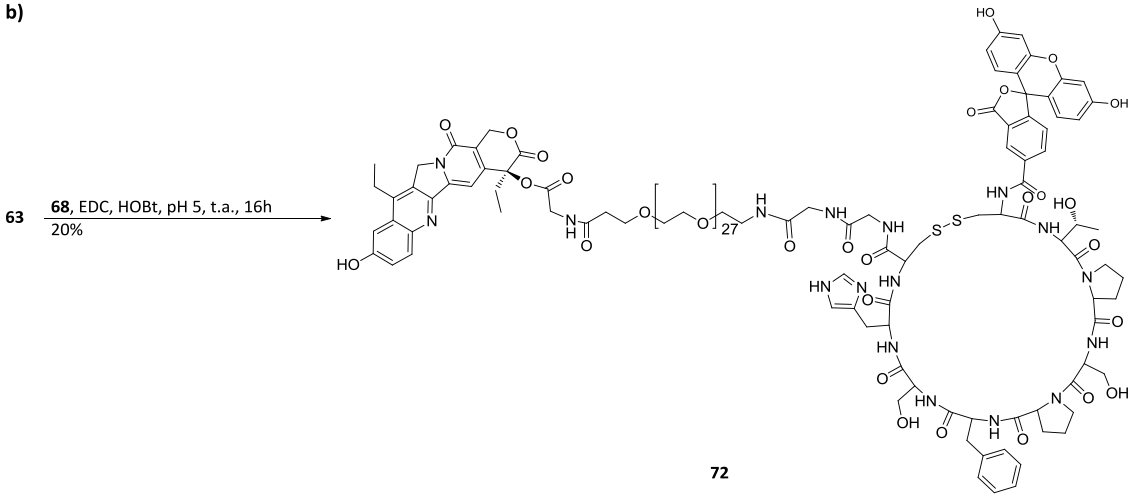
de c(TCP-1)-Ac (**67**). A una pequeña cantidad de peptidil-resina se introdujo una molécula de fluoresceína sobre la amina del extremo N-terminal y se escindió de la resina (c(TCP-1)_CF, **67**). Este se conjugó directamente con el derivado $_2$HN-OEG-SN38 (**63**) empleando la misma estrategia seguida con el conjugado **69**, obteniéndose el conjugado CF-TCP-1-OEG-SN38 (**72**). Este fue purificado mediante HPLC-MS semipreparativo, igual que en el caso anterior con un 99% de pureza a 266 nm (6,6 mg, 20% rendimiento). La tercera parte de peptidil-resina se utilizó para la obtención del peptídico, c(TCP-1)-NH_2 (**69**), cuyo uso se comentará en el siguiente apartado.

a)



71

b)



72

c)

CF-OEG-SN38 (**71**) CF-TCP-1-OEG-SN38 (**72**)

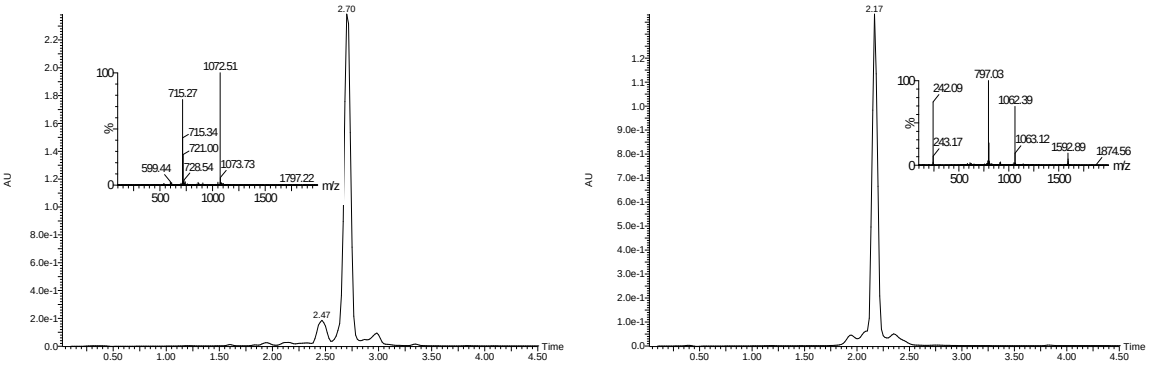


Figura 2.25 *Esquema sintético seguido para la obtención de los conjugados de SN38 derivatizados con fluoresceína.* ***a)*** *Síntesis del conjugado CF-OEG-SN38 (**71,** 89% de pureza a 266nm) y* ***b)*** *síntesis del conjugado CF-TCP-1-OEG-SN38 (**72**, 89% de pureza a 266nm).* ***c)*** *Traza cromatográfica obtenida mediante HPLC-MS de ambos conjugados. El análisis de HPLC-MS se realizó con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min (λ=266 nm).*

Una vez sintetizados y purificados los dos conjugados derivatizados con fluoresceína, se determinó la cantidad obtenida en una solución de volumen exacto de una cantidad exactamente pesada de los mismos con el fin de poder preparar adecuadamente los estudios de internalización y de microcopia confocal. Se determinó la concentración de fluoresceína (concentración que se puede asociar directamente a la concentración de nanoconjugado) que contenía cada uno de los conjugados mediante extrapolación de su absorvancia a 492 nm con una recta de patrón de carboxifluoresceína a distintas concentraciones a esta misma longutud de onda que se realizó utilizando el equipo Nanodrop.

4.2 Síntesis de los derivados OEG-SN38-AF750

Tal y como se ha descrito en el capítulo 1 la realización de los estudios de biodistribución conlleva la incorporación a la muestra a administrar de una pequeña cantidad de nanoconjugado derivatizado con el fluoróforo Alexa Fluor 750. Para realizar la incorporación del Alexa Fluor 750 con los nanoconjugados OEG_{27}-SN38 y cTCP-1-OEG_{27}-SN38 se empleó una estrategia sintética similar a la seguida en la incorporación de la fluoresceína, pero variando el método de purificación de los nanoconjugados finales, ya que ambos conjugados fueron purificados mediante el uso de columna por separación de tamaño con rellano Sephadex G-25 pre-empaquetadas (PD10).

En el caso del conjugado que no contenía péptido director se disolvió $_2$HN-OEG-SN38 (**63**) en DCM/DMF (1:1), ajustando el pH de la solución con DIEA a 8, y a continuación se añadió 1 eq. del fluoróforo Alexa Fluor 750, que recordemos se encuentra activado en forma de éster de N-hixisuccinimida. La mezcla se dejó reaccionar unas 16h, y posteriormente se eliminó el

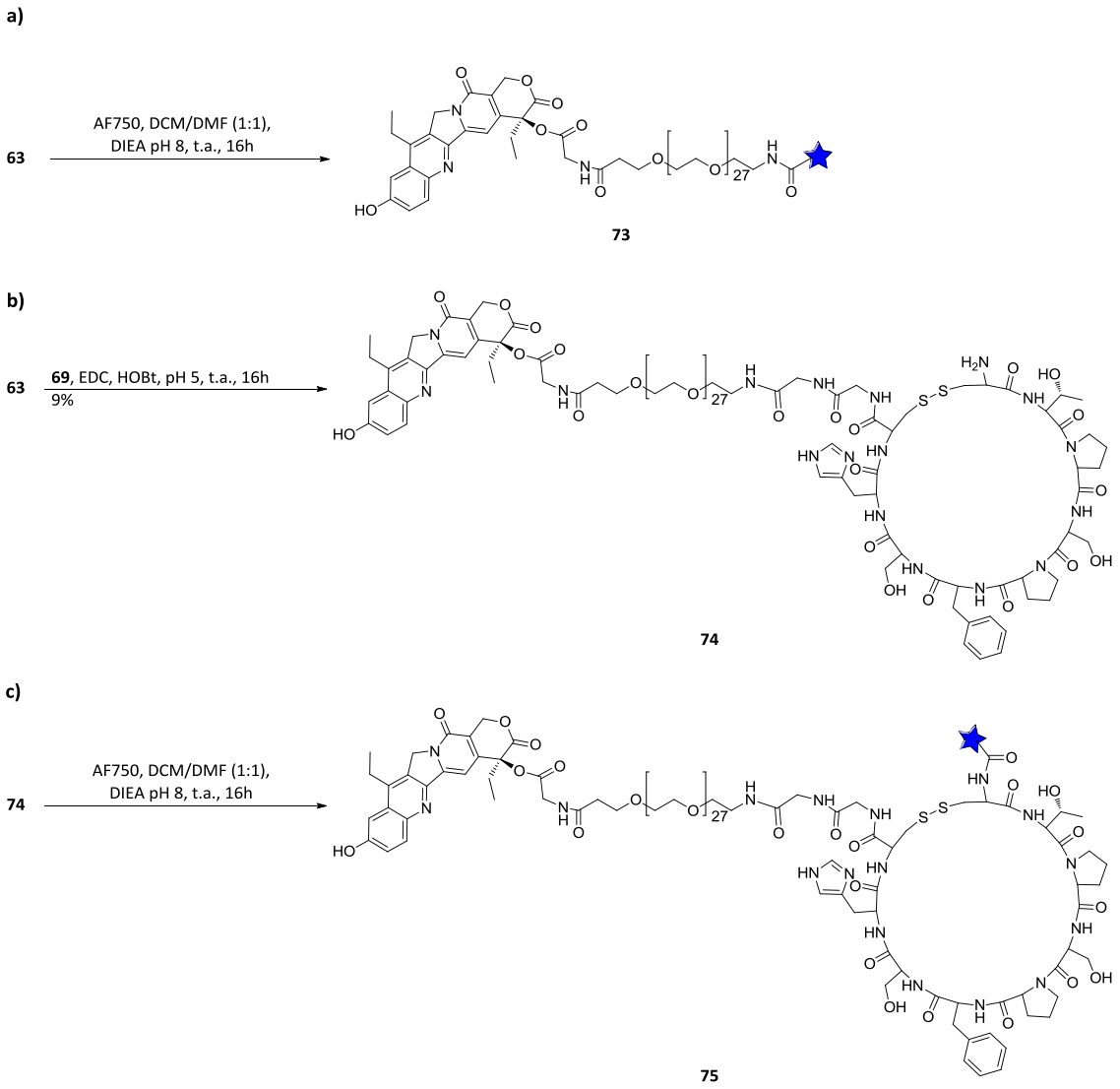
disolvente del crudo, se solubilizó en una mínima cantidad de DMSO, se cargó a una columna PD10 y se eluyó con H_2O. De esta manera se separó el fluoróforo Alexa Fluor 750 que no había reaccionado del producto final AF750-OEG_{27}-SN38 (**73**). Con el fin de determinar que fracciones de la elución contenían el conjugado marcado, se estudió su espectro UV a dos longitudes de onda diferentes (λ= 260 para la detección de SN38 y λ=749 para la detección de AF750) con un equipo nanodrop. Tras este análisis se colectaron aquellas fracciones en las que se observaba un máximo de absorvancia a estas dos longitudes de onda y se liofilizó el conjunto final. Debido a la pequeña cantidad de compuesto con la que se estaba trabajando no se realizó análisis por HPLC.

La formación del conjugado que contenía cTCP-1-OEG_{27}-SN38 marcado con el fluoróforo Alexa Fluor 750 se realizó utilizando uno de los derivados peptídicos del cTCP-1 de los anterioremente mencionados. Debido al elevado coste del fluoróforo Alexa Fluor 750 se descartó llevar a cabo la incorporación de este en fase sólida, como se había hecho con la fluoresceína. Cabe destacar que al no conocer la estructura del fluoróforo Alexa Fluor 750 no podíamos asegurar de que este aguantará las condiciones de escisión del péptido de la resina y su posterior ciclación, siendo esto también el motivo para realizar la incorporación de este fluoróforo una vez el nanoconjugado con e péptido ya está formado. Por lo tanto la estrategia seguida fue realizar la incorporación del derivado péptídico c(TCP-1)-NH_2 (**69**), que tiene el extremo N-terminal en forma de amina libre, al nanoconjugado $_2$HN-OEG_{27}-SN38 (**62**), en este caso el derivado. La unión del conjugado $_2$HN-OEG_{27}-SN38 (**63**) a c(TCP-1)_NH_2 (**69**) se realizó mediante la formación de una amida entre la amina del compuesto **63** y el ácido carboxílico del compuesto **69** aprovechando la mayor accesibilidad de la amina de **63** que la que tiene **69**. El acoplamiento se realizó con EDC como agente acoplante, HOBt como aditivo y ajustando el pH a 5 mediante adición de DIEA. Destacar que este acoplamiento se llevó a cabo a alta dilución para evitar que el péptido pudiese formar un estructura ciclíca. La reacción se dejó evolucionar durante una noche a temperatura ambiente y posteriormente el crudo se purificó mediante cromatografía de alta eficacia con un HPLC-MS semipreparativo. El producto puro $_2$HN-TCP-1-OEG_{27}-SN38 (**74**) obtenido se disolvió en DCM anhidro, a la que se le añadió aproximadamente 1 eq. del fluoróforo Alexa Fluor 750 activado en forma de éster N-hidroxisuccinimida disuelto en DMF anhidra. Como en el caso anterior, esta solución se dejó evolucionar durante una noche y posteriormente se evaporó el disolvente, y se purificó mediante el uso de una columna PD10. Se seleccionaron las fracciones que contenían el nanoconjugado realizando lecturas de absorvancia a 260 nm (característica del SN38) y 749 nm (característica delAlexa Fluor 750) de las muestras con un equipo Nanodrop. Se colectaron aquellas fracciones que presentaban máximo de absorvancia a ambas longitudes de onda y se liofilizó el conjunto. De este modo se obtuvo el producto AF750-TCP-1-OEG_{27}-SN38 (**75**).

En el capítulo anterior se ha detallado la cuantificación del fluoróforo Alexa Fluor 750 en la muestra a administrar *in vivo* mediante un sistema HPLC que tenía un detector de fluorescencia, pero con estos nanoconjugados fue imposible la cuantificación de las muestras

por este método debido a un problema técnico en el sistema de HPLC-fluorescencia. Se estudiaron otras opciones, como cuantificación mediante UV con el sistema nanodrop que empleamos en la determinación de las fracciones del producto tras su purificación, pero no contábamos con una concentración suficientemente grande para realizar su determinación. Por este motivo, en este capítulo, no se realizó la cuantificación del fluoróforo Alexa Fluor 750 de la mezcla de los nanoconjugados y se entregaron al grupo de la Dra. Abasolo y Dr. Schwartz con datos puramente teóricos. Esto podía provocar que las cantidades de fluoróforo que contenían las muestras fueran diferentes y que por tanto se observaran diferencias entre la fluorescencia obtenida con uno y otro producto. La síntesis de los compuestos que contenían la sonda fluorescente, AF750-OEG_{27}-SN38 (**73**) y TCP-1-OEG_{27}-SN38-AF750 (**75**), se llevó a cabo a una escala superior a la que se necesitaba para realizar los ensayos in vivo, así que, con el fin de establecer la posible diferencia en fluorescencia de ambos conjugados, se envío el exceso de los productos **73** y **75** para ver si era posible que el grupo de la Dra. Abasolo determinará la concentración de AF750 de las muestras empleando el detector IVIS® Spectrum que se emplea en la cuantificación de AF750 en los ensayos *in vivo* y ex vivo y como mínimo poder establecer así la relación de fluorescencia entre las muestras.

De la misma manera que en el caso del 5FU (capítulo 1) se llevó a cabo una mezcla entre el producto a ensayar sin sonda fluorescente y que contiene Alexa Fluor 750, a una proporción de 99,94:0,06%. Ambas mezclas se disolvieron en una solución HCl 0,01 M, para asegurarnos que el contraión que contenían era el cloruro, se filtraron a través de un filtro estéril de 0,22 µm y finalmente se liofilizaron. De esta manera se obtuvo en ambos casos un aceite ligeramente verdoso y cuyas cantidades de SN38 se encuentran especificadas en la tabla 2.6.



★ : Alexa Fluor 750

Figura 2.26 *Esquema sintético seguido para la obtención de los conjugados de SN38 marcados con Alexa Fluor 750.* ***a)*** *Síntesis del conjugado AF750-OEG-SN38 (**73**),* ***b)*** *síntesis del conjugado $_2$NH-TCP-1-OEG-SN38 (**74**) y* ***c)*** *síntesis del conjugado AF750-TCP-1-OEG-SN38 (**75**).*

Tabla 2.6 *Resumen de los dos lotes destinados a los ensayos de biodistribución.*

OEG-SN38		TCP-1-OEG-SN38	
10,2 mg/SN38 cuantificados	20 µg AF750 teóricos	8,8 mg/SN38 cuantificados	20 µg AF750 teóricos

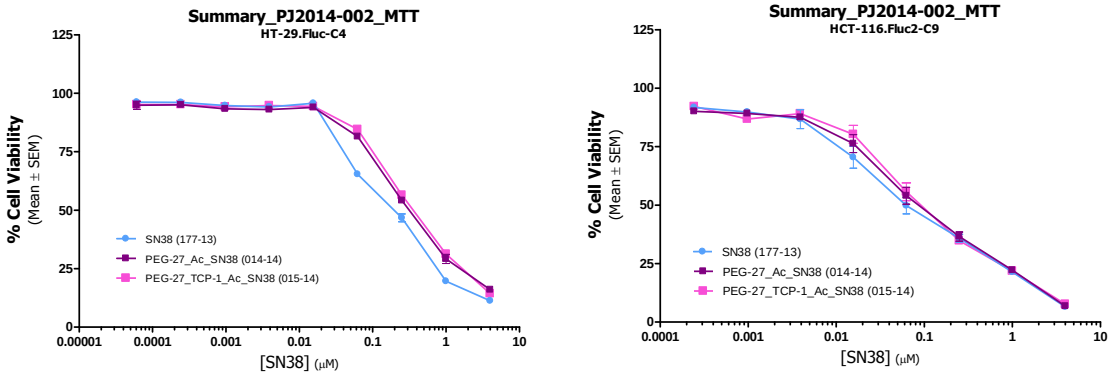
5 Resultados ensayos *in vitro* e *in vivo*

Con los productos anteriormente descritos se realizaron los distintos ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar su potencial como agentes terapéuticos. Así se realizaron ensayos de internalización de ambos conjugados, determinando así la influencia que podía tener la presencia del péptido director seleccionado c(TCP-1), su IC_{50}, cuyo objetivo era determinar la

citotoxicidad del SN38 conjugado con la cadena de OEG, y finalmente se llevó a cabo un ensayo de biodistribución *in vivo* de los mismos, ensayo de mayor relevancia y el que podía proporcionarnos mayores datos.

5.1 Resultados *in vitro*: IC_{50} e internalización

Se realizaron experimentos de citotoxicidad de los compuestos sintetizados en dos líneas celulares distintas: HCT-116.Fluc2.C9 y HT-29.Fluc.C4 y se determinó la IC_{50} en cada caso. Los resultados quedan reflejados en la figura 2.25, y de ellos se pueden extraer tres conclusiones. La primera de ellas es que en los dos casos, los conjugados sintetizados y la droga libre SN38 presentan un comportamiento similar, de lo que podemos extraer que la droga se libera rápidamente en las condiciones ensayadas y que se observa el efecto de la droga libre. El segundo dato que podemos obtener de estos resultados es que ambos conjugados se comportarían igual, es decir, el IC_{50} de ambos es muy similar. Y por último, se puede observar como la línea celular HTC-116.Fluc2-C9 es más sensible al SN38, ya que el IC_{50} cuantificado para esta línea celular es un orden de magnitud menor al hallado con las células HT-29.Fluc-C4 para ambos conjugados.



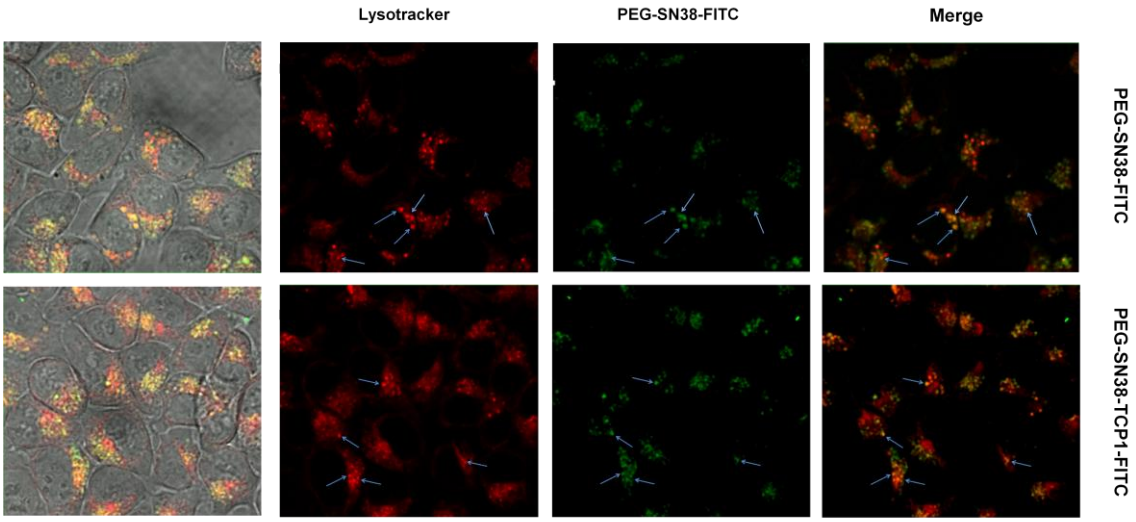
IC_{50} (μM equivalentes de SN38) en HT-29 Fluc-C4			IC_{50} (μM equivalentes de SN38) en HCT-116.Fluc2-C9		
SN38	Ac-OEG-SN38 (60)	TCP-1-OEG-SN38 (70)	SN38	Ac-OEG-SN38 (60)	TCP-1-OEG-SN38 (70)
0,195±0,048	0,352±0,078	0,380±0,041	0,034±0,01	0,050±0,01	0,055±0,01

Figura 2.27 *Resumen de los ensayos realizados en dos líneas celulares distintas (HT-29.Fluc-C4 y HCT-116.Fluc2-C9) para la determinación del IC50 de los conjugados Ac-OEG-SN38 (**60**) y TCP-1-OEG-SN38 (**70**) y del SN38 libre.*

También se realizaron estudios de internalización celular de ambos conjugados derivatizados con carboxifluoresceína, CF-OEG_{27}-SN38 (**71**) y CF-TCP-1-OEG_{27}-SN38 (**72**), en las dos líneas celulares en las que anteriormente se determinó el IC_{50} de los conjugados (HT-29.Fluc-C4 y HCT-116.Fluc2-C9). Para realizar estos estudios se incubaron las células con los ambos conjugados a diferentes concetraciones e incubadas con Lysotracker red a una concentración de 7 μM.

Para poder detectar una fluorescencia adecuada fue necesario emplear una alta concentración de conjugado, por lo que en el caso de los ensayos en la línea celular HT-29.Fluc-C4 incubadas con el conjugado CF-TCP-1-OEG_{27}-SN38 (**72**) se observó mucha muerte celular y no se pudieron extraer resultados concluyentes. En cambio en la línea celular HCT-116.Fluc2-C9 se observó colocalización con los lisosomas con ambos compuestos, CF-OEG_{27}-SN38 (**71**) y CF-TCP-1-OEG_{27}-SN38 (**72**). Y en la línea celular HT-29.Fluc-C4 incubadas con el conjugado CF-OEG_{27}-SN38 (**71**) también se observó colocalización a nivel lisosomal. De estos resultados s epuede establecer que la presencia del péptido director c(TCP-1) no presenta ninguna ventaja para mostrar una mayor internalización respecto a no estar presente en el conjugado. Y que ambos conjugados entran al interior de las células estudiadas mediante un mecanismo endocítico que deriva en su acumulación en los lisosomas. Pese a ello cabe recordar que el péptido cTCP-1 es un péptido director al tejido vascularizado del tumor y es específico de cáncer colorrectal y gástrico, no está descrito como un péptido que facilite la entrada a la célula. [58,59] La especificidad de este péptido sí se verá corroborada en los resultados de los estudios de biodistribución *in vivo*.

a) HCT-116.Fluc2-C9



b) HT-29.Fluc-C4

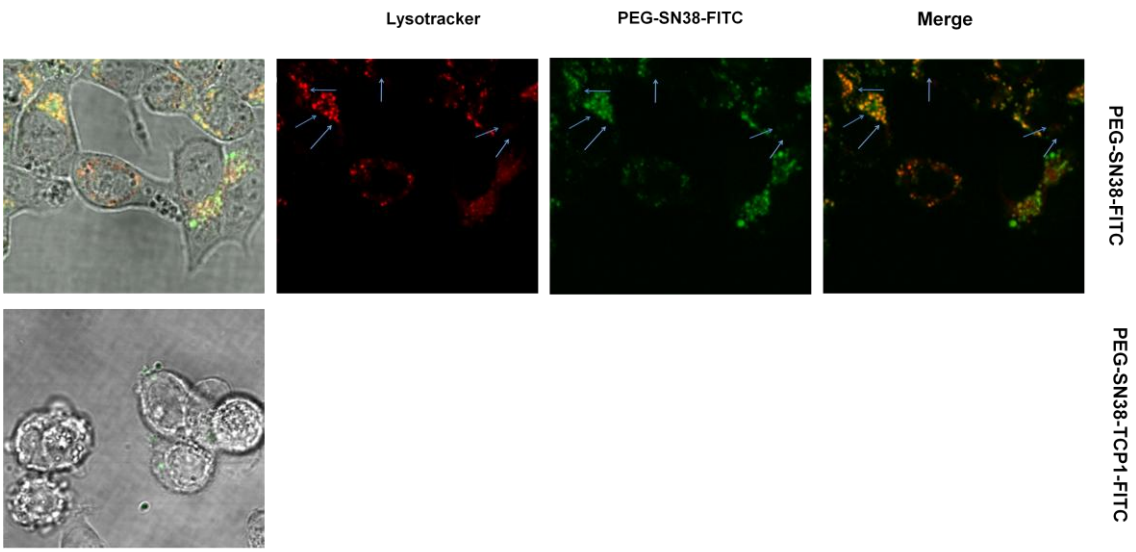


Figura 2.28 *Resumen de los ensayos realizados con los nanoconjugados CF-OEG-SN38 (**71**) y CF-TCP-1-OEG-SN38 (**72**) a XXμM y con un tiempo de incubación de XX h en dos líneas celulares distintas (HCT-116.Fluc2-C9 y HT-29.Fluc-C4)* ***a)*** *Línea celular HCT-116.Fluc2-C9.* ***b)*** *Línea celular HT-29.Fluc-C4. Debido a la alta concentración del nanoconjugado CF-TCP-1-OEG-SN38 (**72**) necesaria para poder ver fluorescencia, se observó en la línea celular HT-29.Fluc-C4 que las células ya estaban en procesos de apoptosis (figura de abajo) y no se pudo comprobar la colocalización con lisosoma.*

5.2 Resultados *in vivo*: estudios de biodistribución

Como ya hemos comentado durante el desarrollo de este capítulo, nuestro objetivo final era la evaluación *in viv*o de los conjugados sintetizados, realizando para este cometido un ensayo de biodistribución similar al planteado en el capítulo 1 de la presente tesis. En este ensayo de biodistribución in vivo los nuevos conjugados basados en SN38 se debían comparar entre ellos,

para poder clarificar el efecto del péptido director mediante la comparación de resultados entre los los conjugados sin y con péptido director. En este ensayo no se trabajó con un grupo con droga libre (SN38) ya que no es posible administrarla debido a su insolubilidad en disolventes adecuados para su administración.

Primeramente se determinó la solubilidad máxima que presentaba el conjugado Ac-OEG-SN38 (**60**) en PBS a un pH de 7,4, que es el disolvente que el grupo de la Dra. Ibasolo determinó como más adecuado para la administración del fármaco. Esta solubilidad máxima se estimó tomando una cantidad de conocida del compuesto, en nuestro caso 37,7 mg de **60** que se disolvieron en su totalidad y alcanzando una viscosidad similar a la del H_2O en 150 µl de PBS pH 7,4. Es decir, determinamos una solubilidad máxima del compuesto **60** es de 250 mg/ml en PBS pH 7,4, que equivaldría a aproximadamente 50 mg/ml de SN38 equivalentes. Este dato demuestra que este tipo de conjugados aportan una importante mejora a la hora de administrar SN38 como fármaco, ya que sería posible la administración en disolventes adecuados de una dosis eficaz, hecho que hasta ahora no es posible debido a la baja solubilidad de la droga libre.

Como hemos comentado, debido a la baja solubilidad de la droga SN38 libre es imposible su administración y por tanto no podrá ser empleada como control en las pruebas de biodistribución y de igual manera no tenemos datos propios de la dosis más adecuada para la administración de éste. Es por este motivo que se acordó diseñar un pequeño experimento orientativo para determinar una dosis adecuada para la administración del fármaco. En nuestro caso realizamos lo que se podría considerar un simulacro de un ensayo de máxima dosis tolerada (**MTD**, Maximum Tolerated Dose) ya que el número de animales empleado era muy bajo y no se puede considerar que se obtuvieran resultados fiables. Para este ensayo se emplearon ratones atímicos que portaban un tumor subcutáneo (en este caso de la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama).

En el ensayo de MTD de los conjugados de SN38 se testaron 5 dosis distintas: 0 (inyección con PBS, vehículo, grupo control), 10, 20, 40, 80 y 160 mg eq. SN38/Kg de ratón. El número de individuos para las diferentes dosis ensayadas variaron, siendo un único ratón en el caso de las concentraciones administradas de 10, 80 y 160 mg eq. SN38/Kg ratón y de tres individuos en el caso de las dosis 0, 20 y 40 mg eq. SN38/Kg ratón. Este bajo número de individuos es el que hace que no podamos considerar estos resultados como concluyentes, pero sí como una buena aproximación.

Tabla 2.7 *Resumen del ensayo preliminar de MTD llevado a cabo para determinar la dosis más adecuada de SN38.*

Dosis administrada (mg eq. SN38/Kg ratón)	Número de ratones	Nº de administraciones	Dosis final administrada (mg eq. SN38/Kg ratón)
0	3	4(2 dosis por semana)	0
10	1	1	10
20	3	4(2 dosis por semana)	80
40	3	4(2 dosis por semana)	160
80	1	1	80
160	1	1	160

Los animales fueron monitorizados durante las dos semanas que duró el experimento sin que se registrará en ningún caso una pérdida significativa de peso del animal (es decir, no hubo un pérdida de peso igual o superior al 10 % respecto el peso inicial), así como tampoco se observó alteraciones en otros parámetros de bienestar animal como pueden ser la movilidad, respuesta a estímulos, hidratación, aspecto general, etc. Debemos destacar que en el caso de los ratones administrados con 80 y 160 mg eq. SN38/Kg ratón a dosis única presentaron cierta toxicidad, ya que se observó apatía, enrojecimiento o respiración irregular en ellos, síntomas de los que se recuperaron después de 3-4 días transcurridos desde la administración de la droga.

Después de este ensayo se determinó que la dosis adecuada para llevar a cabo los experimentos de eficacia sería de 40 mg eq. SN38/Kg ratón 4 veces por semana. En el caso de los ensayos de biodistribución se determinó como una dosis adecuada 20 mg eq. SN38/Kg ratón. Para realizar los ensayos de biodistribución no es necesaria alcanzar una dosis eficaz terapéutica y debemos tener en cuenta también que estas cantidades se ajustaban al producto final con el que contábamos.

Así una vez establecida la dosis se procedió a la realización de los ensayos de biodistribución de los productos Ac-OEG_{27}-SN38 (**60**) y cTCP-1-OEG_{27}-SN38 (**70**) de manera paralela. De esta manera se establecieron cinco grupos diferenciados: G0: grupo compuesto por dos ratones, los cuales no fueron tratados, que fueron sacrificados a las 5 y 25h; G1: grupo dividido en dos subgrupos G1.a y G1.b , cada uno de los cuales estaba compuesto por cuatro individuos, de los cuales uno no presentaba ningún tumor y tres con tumor, tratados con la mezcla del compuesto OEG-SN38 que contenían un porcentaje Alexa Fluor 750 (tabla 2.6). Los individuos de los grupos G1.a y G1.b fueron sacrificados a las 5 y 25h, respectivamente, y; G2: grupo dividido en dos subgrupos G2.a y G2.b, cada uno de los cuales estaba compuesto por cuatro individuos, de los cuales uno no presentaba ningún tumor y tres con tumor, tratados con la mezcla del compuesto TCP-1-OEG_{27}-SN38 que contenían un porcentaje Alexa Fluor 750 (tabla 2.6). Los individuos de los grupos G2.a y G2.b fueron sacrificados a las 5 y 25h, respectivamente. Los ratones recibieron una única dosis a t=0 min de 20 mg eq. SN38/Kg de ratón de las mezclas de nanoconjugado que contenían un procentaje de Alexa Fluor 750 basadas en los conjugados **60** y **70**, y sin ningún tipo de tratamiento en el caso del grupo control G0. A los ratones sacrificados se les extrajó diferentes tejidos (tumor, plasma, hígado,

bazo, riñón, pulmones, corazón, cerebro, músculo y piel) para su posterior determinación *ex vivo* mediante fluorescencia y por UV mediante HPLC de la concentración de SN38 que contenían, y de esta manera poder validar el método de fluorescencia.

El método de fluorescencia antes mencionado consistía en la determinación de la acumulación en tumor y en el resto del cuerpo midiendo la fluorescencia de las mezclas SN38-OEG-AF750, que contenía el fluoróforo, a diferentes tiempos, tanto *in vivo* como *ex vivo*. Esta medida se llevo a cabo usando un detector IVIS® Spectrum, con vistas ventrales, laterales y dorsales, en el caso del seguimiento *in vivo*. La señal de fluorescencia fue medida en unidades de eficiencia radiante.

Debido a que nos había sido imposible determinar la cantidad exacta de AF750 que contenían nuestras por los motivos expuestos anteriormente, se decidió que el grupo de la Dra. Ibasolo y el Dr. Schwartz, que iba a llevar a cabo los experimentos con animales, realizase una aproximación cualitativa de la cantidad de AF750 que contenían las muestras y sobre todo la comparación entre la fluorescencia de una y otra muestra, de tal forma que luego se pudiese extrapolar esta relación a la acumulación que presentaban uno y otro compuesto. Con esta premisa se realizaron diluciones de 0,15 a 20 mg eq. SN38/Kg ratón y se alicuotaron en una placa de 96 pocillos. Tras esto se evaluó la florescencia mostrada empleando el detector IVIS® Spectrum, el mismo que posteriormente se emplearía con las muestras *ex vivo* e *in vivo* de la biodistribución. Las muestras presentaban una correlación lineal correcta entre las diferentes diluciones, es decir, la fluorescencia de AF750 detectada aumentaba de manera lineal conforme aumentaba la concentración de compuesto marcado. Debemos destacar que se aprecia una diferencia sustancial entre la fluorescencia mostrada por la mezcla marcada del conjugado Ac-OEG_{27}-SN38-AF750 y TCP-1-OEG_{27}-SN38-AF750, con lo que concluimos que a pesar de partir teóricamente de la misma cantidad de fluoróforo en las mezclas, el conjugado Ac-OEG_{27}-SN38-AF750 presenta una fluorescencia 1,6 veces mayor que el conjugado TCP-1-OEG_{27}-SN38-AF750. Como consecuencia de esto las imágenes obtenidas tras la administración de los compuestos no pueden ser comparadas de manera inmediata y por tanto era necesario un tratamiento posterior de los datos con el fin de normalizar los datos para poderlos comparar.

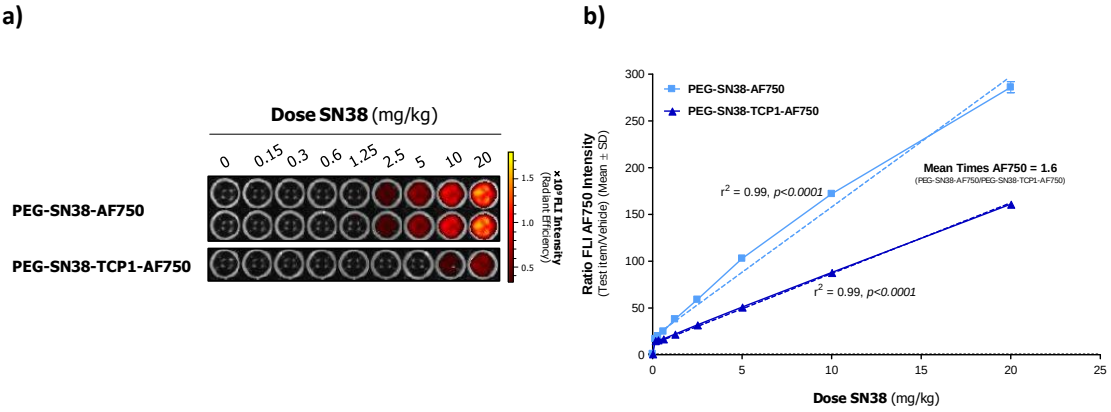


Figura 2.29 *Fluorescencia detectada por IVIS® Spectrum de los compuestos marcados con AF750 Ac-OEG-SN38 y TCP-1-OEG-SN38.* ***a)*** *Imagen representativa de la serie de diluciones realizada en los pocillos de los dos conjugados.* ***b)*** *Cuantificación de la fluorescencia mostrada por los compuestos en unidades de eficiencia radiante. De este gráfico se extrae que la mezcla de Ac-OEG-SN38-AF750 emite una fluorescencia 1,6 veces mayor a igual cantidad de TCP-1-OEG-SN38-AF750.*

Tras la administración de los compuestos no se observa toxicidad alguna asociada a ellos, este hecho era esperable tras ver los resultados obtenidos en el pequeño ensayo de MTD llevado a cabo con anterioridad. En las imágenes *in vivo* se puede observar una acumulación de ambos compuestos en tumor y en bazo, y una rápida eliminación vía renal de los compuestos, como en el caso del dendró-5FU. Una vez más relacionamos esta rápida excreción renal con el pequeño tamaño de nuestros conjugados.

La información más interesante es la extraída *ex vivo*, ya que la determinación de la fluorescencia de los tejidos extraídos nos permite corregir los valores de fluorescencia con los datos obtenidos anteriormente, es decir, que el compuesto que contiene el péptido director TCP-1 presenta una intensidad 1,6 veces menor al compuesto sin péptido. El análisis de estos resultados muestra que tras la administración de los 20 mg eq. SN38/Kg ratón del compuesto Ac-OEG_{27}-SN38 presenta una acumulación que del 5 y 4% tras 5 y 25h post-administración, en cambio el conjugado basado en TCP-1-OEG_{27}-SN38 presenta una acumulación del 8 y 20% a las 5 y 25h post-administración. Por tanto se puede determinar que la incorporación del péptido director TCP-1 al conjugado OEG-SN38 favorece la acumulación del mismo en el tumor a lo largo del tiempo comparado con el nanoconjugado sin péptido director. También se detecta una gran acumulación en riñón, ya que esta es la mayor vía de excreción de los compuestos, y una alta acumulación también en bazo. Ambas acumulaciones de compuesto, tanto en riñón como en bazo, también son detectadas en los ratones que no presentan ningún tumor y a los cuales se les han inyectado los compuestos.

Estos resultados parecen determinar que el compuesto que contiene el péptido director TCP-1 presenta una mayor acumulación en tumor y por tanto se trata del candidato más prometedor para realizar experimentos de eficacia.

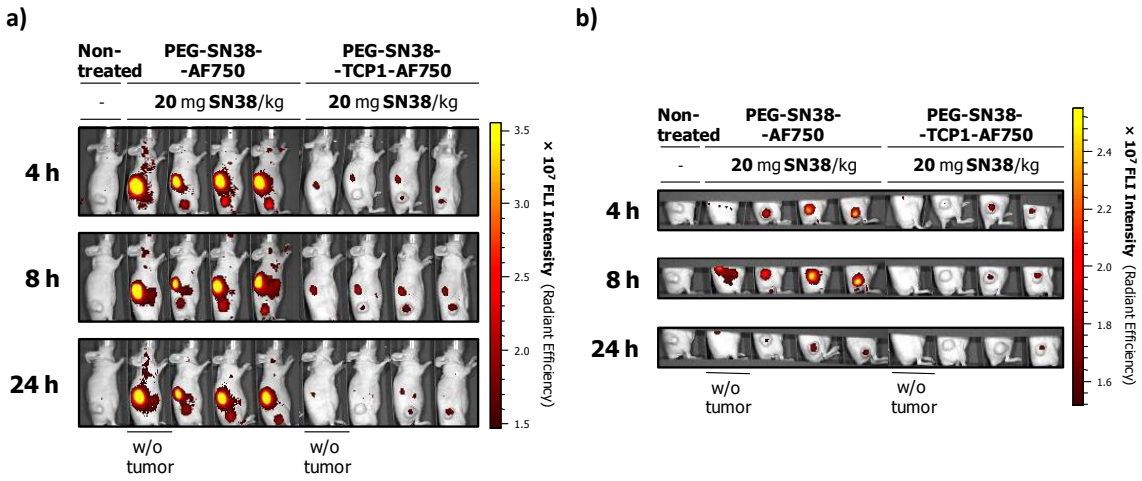


Figura 2.30 *Monitorización no invasiva de la acumulación en función del tiempo en tumor y riñón de los compuestos Ac-OEG-SN38-AF750 y TCP-1-OEG-SN38-AF750. La acumulación de Alexa Fluor 750 fue medida tras una administración única a 4h, 8h y 24h post-administración. Las escalas de color indican la intensidad relativa de la señal con el paso de tiempo. En la imagen* ***a*** *se muestra la vista lateral del ratón y en la imagen* ***b*** *la vista lateral del ratón con el tumor enmarcado.*

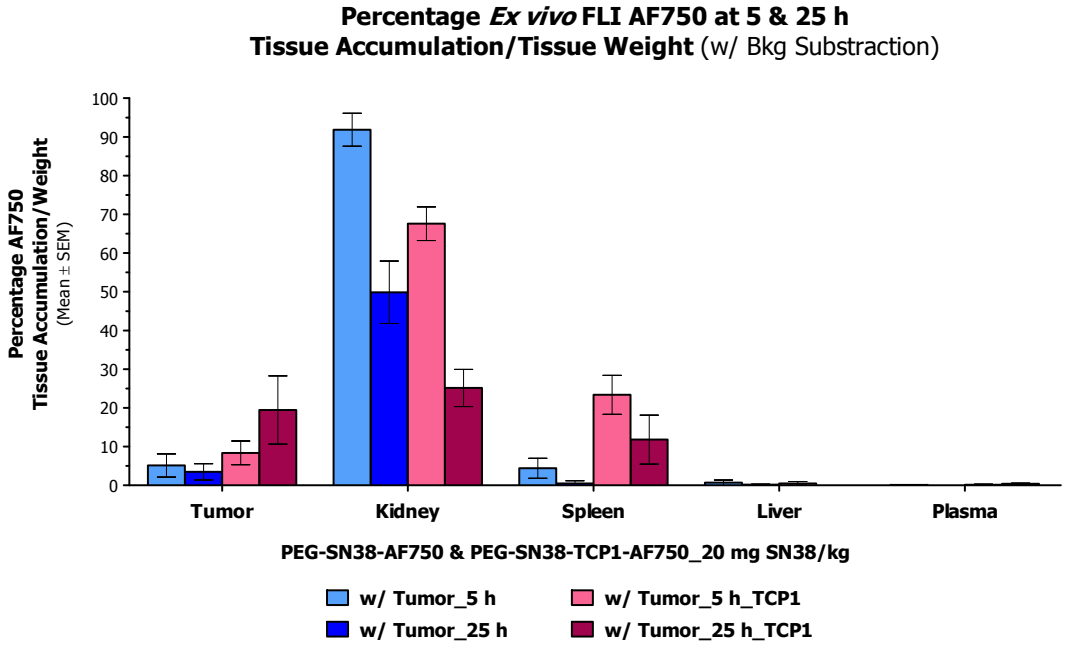


Figura 2.31 *Biosdistribución en tejido de los compuestos Ac-OEG-SN38-AF750 y TCP-1-OEG-SN38-AF750. Porcentaje de acumulación ex vivo en tumor, plasma, riñón, hígado, bazo, pulmón, corazón, cerebro, músculo y piel a las 5h y 25h post-administración. Los porcentajes corresponden a los valores medios encontrados para cada uno de los tejidos antes mencionados con los valores de fluorescencia normalizados (fluorescencia del conjugado TCP-1-OEG-SN38-AF750 1,6 veces menor respecto al conjugado Ac-OEG-SN38-AF750).*

CONCLUSIONES

- Se ha derivatizado adecuadamente el fármaco SN38 para conseguir su posterior unión a diferentes plataformas basadas en OEG.

- La obtención de dendrones con ramas de talla superior al desarrollado en el capítulo 1 se ha mostrado problemática ya que a pesar de observarse la formación de dendrones incompletos (incorporación de una, dos , tres ramas), no se ha detectado el dendrón objetivo final y por tanto no se han reunido suficientes evidencias sobre su formación. El uso de técnicas analíticas o modos de preparación de la muestra más adecuados son necesarios para determinar su formación y consecuentemente tener una herramienta para evaluar los procesos de optimización de su síntesis.

- La síntesis de un nanoconjugado basado en un dendrón con ramas de igual talla a las del capítulo 1, con cuatro moléculas de SN38 incorporadas, no mejora la solubilidad del SN38 debido a la baja relación entre SN38 y las unidades de etilenglicol presentes en las ramas de OEG. Este hecho conjuntamente con los bajos rendimientos de síntesis hizo que no se prosiguiera el trabajo con este nanoconjugado.

- Se ha derivatizado adecuadamente dos cadenas de talla definida de OEG_{27} para su unión con el fármaco SN38.

- Se han explorado los péptidos cTCP-1 y un ligando cíclico de CXCR4 como moléculas directoras específicas a cáncer colorectal, siendo el cTCP-1 el más adecuado para llevar a cabo un direccionamiento activo del nanoconjugado OEG_{27}-SN38.

- Se han diseñado, sintetizados y evaluado biológicamente dos conjugados tipo OEG_{27}-SN38, con y sin péptido director (cTCP-1). Adicionalmente ambos conjugados derivatizados con dos fluoróforos distintos para su uso en ensayos *in vitro* (conjugados derivatizados con CF) e *in vivo* (conjugados derivatizados con Alexa Fluor 750).

- Los conjugados OEG_{27}-SN38 muestran un incremento considerable, superior en 1000 unidades respecto a la droga libre en H_2O, en la solubilidad en agua en comparación al SN38 libre, haciendo posible su administración como agente terapéutico a diferencia de la droga libre. Este dato a su vez corrobora que una adecuada relación de SN38 con unidades de etilenglicol contenidas en el OEG al que está incorporado puede incrementar sustancialmente la solubilidad del mismo.

- Los experimentos de biodistribución *in vivo* con ratones atímicos de edades comprendidas entre las 6 y 8 semanas, a los que previamente se implantó, vía subcutánea, células de cáncer colorrectal humano (HCT-116) y se dejó evolucionar el tumor (modelo ortotópico), mostraron que el conjugado cTCP-1-OEG_{27}-SN38 presentaba una mayor acumulación en tumor que el

conjugado OEG_{27}-SN38, demostrando que el direccionamiento activo favorece la acumulación en tumor.

BIBLIOGRAFÍA

[1] M.E. Wall, M.C. Wani, C.E. Cooke, K.H. Palmer, A.T. McPhail, G.A. Sim. "Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*", *Journal of the American Chemical Society.* **1966**, *88*, 3888-3890.

[2] Y.H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L.F. Liu. "Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I", The *Journal of Biological Chemistry.* **1985**, *260*, 14873–14878.

[3] B. Thomsen, S. Mollerup, B.J. Bonven, R. Frank, H. Blocker, O.F. Nielsen,O. Westergaard. "Sequence specificity of DNA topoisomerase I in the presence and absence of camptothecin", *The EMBO Journal.* **1987**, *6*, 1817–1823.

[4] Y. Pommier, J.M. Covey, D. Kerrigan, J. Markovits, R. Pham. "DNA unwinding and inhibition of mouse leukemia L1210 DNA topoisomerase I by intercalators", *Nucleic Acids Research.* **1987**, *15*, 6713–6731.

[5] C. Jaxel, K.W. Kohn, Y. Pommier. "Topoisomerase I interactions with SV40 DNA in the presence and absence of camptothecin", *Nucleic Acids Research.* **1988**, *16*, 11157–11170.

[6] E. Kjeldsen, S. Mollerup, B. Thomsen, B.J. Bonven, L. Bolund, O. Westergaard. "Sequence-dependent effect of camptothecin on human topoisomerase I DNA cleavage", *Journal of Molecular Biology.* **1988**, *202*, 333–342.

[7] C. Jaxel, K.W. Kohn, M.C. Wani, M.E. Wall, Y. Pommier. "Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for site specific receptor site and a relation to antitumor activity", *Cancer Research.* **1989**, *49*, 1465–1469.

[8] V.J. Venditto, E.E. Simanek. "Cancer Therapies Utilizing the Camptothecins: A Review of the *in Vivo* Literature", *Molecular Pharmaceutics*. **2010,** *7*, 307–349.

[9] K. Legarza, L.X. Yang. "New Molecular Mechanisms of Action of Camptothecin-type Drugs", *Anticancer Research.* **2006**, *26*, 3301-3306.

[10] M.K. Kathiravan, M.M. Khilare, K. Nikoomanesh, A.S. Chothe, K.S. Jain. "Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **2013**, *28*, 419–435.

[11] Y. Pomier. "Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond", *Nature Reviews*. **2006**, *6*, 789-802.

[12] L. Heide. "New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors", *International Journal of Medical Microbiology*. **2014**, *304*, 31–36.

[13] K.J. Aldred, R.J. Kerns, N. Osheroff. "Mechanism of Quinolone Action and Resistance", *Biochemistry*. **2014**, *53*, 1565–1574.

[14] W.K. Eng, L. Faucette, R.K. Johnson, R. Sternglanz. "Evidence that DNA topoisomerase I is necessary for the cytotoxic effects of camptothecin", *Molecular Pharmacology.* ***1988****, 34*, 755-760.

[15] J. Nitiss, J.C. Wang. "DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast" *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America.* **1988***, 85*, 7501-7505.

[16] Y. Pommier, P. Pourquier, Y. Urasaki, J. Wu, G. Laco. "Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance", *Drug Resistance Updates*. **1999**, *2*, 307–318.

[17] S. Basili, S. Moro. "Novel camptothecin derivatives as topoisomerase I inhibitors", *Expert Opinion*. **2009**, *19*, 555-574.

[18] W.D. Kingsbury, J.C. Boehm, D.R. Jakas, K.G. Holden, S.M. Hecht, G. Gallagher, M.J. Caranfa, F.L. McCabe, L.F. Faucette, R.K. Johnson, R.P. Hertzberg. "Synthesis of Water-Soluble (Aminoalky1)camptothecin Analogues: Inhibition of Topoisomerase I and Antitumor Activity", *Journal of Medicinal Chemistry*. **1991**, *34*, 98-107.

[19] R. Hertzberg, M.J. Caranfa, K.G. Holden, D.R. Jakas, G. Gallagher, M.R. Mattern, S.M. Mong, J.O. Bartus, R.K. Johnson, W.D. Kingsbury. "Modification of the hydroxlactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity", *Journal of Medicinal Chemistry.* **1989**, *32*, 715-720.

[20] H.M. Dodds, M.C. Haaz, J.F. Riou, J. Robert, L.P. Rivory. "Identification of a new metabolite of CPT-11 (Irinotecan): pharmacological properties and activation to SN-38", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* **1998**, *286*, 578-583.

[21] K. Legarza, L.X. Yang. "New Molecular Mechanisms of Action of Camptothecin-type Drugs", *Anticancer Research*. **2006**, *26*, 3301-3306.

[22] Y.H. Hsiang, M.G. Lihou, L.F. Liu. "Arrest of Replication Forks by Drug-stabilzed Topoisomerase I-DNA Cleavable Complexes as a Mechanism of Cel Kiling by Camptothecin", *Cancer Research*. **1989**, *49*, 5077-5082.

[23] C. Bendixen, B. Thomsen, J. Alsner, O. Westergaard. "Camptothecin-stabilized topoisomerase I-DNA adducts cause premature termination of transcription", *Biochemistry*. **1990**, *29*, 5613-5619.

[24] E.J. Morris, H. Geller. "Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity", *The Journal of Cell Biology*. **1996**, *134*, 757-770.

[25] K.W. McCrudden, A. Yokoi, A. Thosani, S.Z. Soffer, E.S. Kim, J. Huang, C. Manley, K. O'toole, D.J. Yamashiro, J.J. Kandel JJ, W. Middlesworth. "Topotecan is anti-angiogenic in experimental hepatoblastoma", *Journal of Pediatric Surgery*. **2002**, *37*, 857-861.

[26] H. KamiyamA, S. Takano, K. Tsuboi, A. Matsumura A. "Antiangiogenic effects of SN38 (active metabolite of irinotecan): inhibition of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha)/vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of glioma and growth of endothelial cells", *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. **2005**, *131,* 205-213.

[27] Z.A. Rasheed, E.H. Rubin. "Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs", *Oncogene*. **2003**, *22*, 7296-7304.

[28] P.J. Houghton, G.S. Germain, F.C. Harwood, J.D. Schuetz, C.F. Stewart, E. Buchdunger, P. Traxler. "Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 *in vitro*", *Cancer Research.* **2004**, *64*, 2333-2337.

[29] F.M. Johnson, L.M. Krug, H.T. Tran, S. Shoaf, V.G. Prieto, P. Tamboli, B. Peeples, J. Patel, B.S. Glisson. "Phase I studies of imatinib mesylate combined with cisplatin and irinotecan in patients with small cell lung carcinoma", *Cancer*. **2006**, *106*, 366-374.

[30] Q. Li, X.Q. Deng, Y.-g. Zu, H. Lv, L. Su, L. Yao, Y. Zhang, L. Li. "Cytotoxicity and Topo I targeting activity of substituted 10-nitrogenous heterocyclic aromatic group derivatives of SN-38", *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**, *45*, 3200-3206.

[31] A. Tanizawa, K.W. Kohn, G. Kohlhagen, F. Leteurtre, Y. Pommier. "Differential stabilization of eukaryotic DNA topoisomerase I cleavable complexes by camptothecin derivatives", *Biochemistry*. **1995**, *34*, 7200-7206.

[32] T.G. Burke, Z. Mi. "Ethyl substitution at the 7 position extends the half-life of 10-hydroxycamptothecin in the presence of human serum albumin", *Journal of Medicinal Chemistry*. **1993**, *36*, 2580-2582.

[33] E. Roger, F. Lagarce, J.P. Benoit. "Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of SN38 for oral administration", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **2001**, *79*, 181-188.

[34] P. Sapra, H. Zhao, M. Mehlig, J. Malaby, P. Kraft, C. Longley, L.M. Greenberger, I.D. Horak. "Novel delivery of SN38 markedly inhibits tumor growth in xenografts, including a camptothecin-11 - refractory model", *Clinical Cancer Research*. **2008**, *14,* 1888-1896.

[35] J.A. Zhang, T. Xuan, M. Parmar, L. Ma, S. Ugwu, S. Ali, I. Ahmad. "Development and characterization of a novel liposome-based formulation of SN-38", *International Journal of Pharmaceutics*. **2004**, *270*, 93-107.

[36] R. Thakur, B. Sivakumar, M. Savva. "Thermodynamic studies and loading of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin into mesoporous silica particles MCM-41 in strongly acidic solutions", *The Journal of Physical Chemistry B*. **2010**, *114*, 5903-5911.

[37] Pfizer Injectables, U.S. Physician Prescribing Information for CAMPTOSAR (Irinotecan HCl injection), **2010**. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2002/20571s16lbl.pdf

[38] F. Koizumi, M. Kitagawa, T. Negishi, T. Onda, S.-i. Matsumoto, T. Hamaguchi, Y. Matsumura. "Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors", *Cancer Research*. **2006**, *66*, 10048-10056.

[39] R.H.J. Mathijssen, R.J. van Alphen, J. Verweij, W.J. Loos, K. Nooter, G. Stoter, A. Sparreboom. "Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Irinotecan (CPT-11)", *Clinical Cancer Research.* **2001**, *7*, 2182-2194.

[40] A. Takakura, A. Kurita, T. Asahara, M. Yokoba, M. Yamamoto, S. Ryuge, S. Igawa, Y. Yasuzawa, J. Sasaki, H. Kobayashi, N. Masuda. "Rapid deconjugation of SN-38 glucuronide and adsorption of released free SN-38 by intestinal microorganisms in rat", *Oncology Letters*. **2012**, *3*, 520-524.

[41] V. Bala, S. Rao, B.J. Boyd, C.A. Prestidge. "Prodrug and nanomedicine approaches for the delivery of the camptothecin analogue SN38", *Journal of Controlled Release*. **2013**, *172*, 48-61.

[42] F. Meyer-Losic, C. Nicolazzi, J. Quinonero, F. Ribes, M. Michel, V. Dubois, C. de Coupade, M. Boukaissi, A.S. Chéné, I. Tranchant, V. Arranz, I. Zoubaa, J.S. Fruchart, D. Ravel, J. Kearsey. "DTS-108, A Novel Peptidic Prodrug of SN38: In vivo Efficacy and Toxicokinetic Studies", *Clinical Cancer Research*. **2008**, *14*, 2145-2153.

[43] R.M. Sharkey, M. Juweid, J. Shevitz, T. Behr, R. Dunn, L.C. Swayne, G.Y. Wong, R.D. Blumenthal, G.L. Griffiths, J.A. Siegel, S.O. Leung, H.J. Hansen, D.M. Goldenberg. "Evaluation of a complementarity-determining region-grafted (humanized) anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibody in preclinical and clinical studies", *Cancer Research*. **1995**, *55*, 5935s-5945s.

[44] B. Huang, A. Desai, S. Tang, T.P. Thomas, J.R. Baker. "The synthesis of a c(RGDyK) targeted SN38 prodrug with an indolequinone structure for bioreductive drug release", *Organic Letters*. **2010**, *12*, 1384-1387.

[45] S. Angenault, S. Thirot, F. Schmidt, C. Monneret, B. Pfeiffer, P. Renard. "Cancer chemotherapy: a SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) glucuronide prodrug for treatment by a PMT (Prodrug monoTherapy) strategy", *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. **2003**, *13*, 947-950.

[46] E.Y. Kwak,M.K. Choi, S.G. Yang, C.K. Shim,W.S. Shim. "Investigation into the efficacy of Val-SN-38, a valine-ester prodrug of the anti-cancer agent SN-38", *Biomolecules & Therapeutics*. **2012**, *20*, 326-331.

[47] J.F. Marier, L. Pheng, M.M. Trinh, H.A. Burris, S. Jones, K. Anderson, S. Warner, D. Porubek. "Pharmacokinetics of SN2310, an injectable emulsion that incorporates a new derivative of SN-38 in patients with advanced solid tumors", *Journal of Pharmaceuticals Sciences*. **2001**, *100*, 4536-4545.

[48] B. Lundberg. "Biologically active camptothecin derivatives for incorporation into liposome bilayers and lipid emulsions", *Anticancer Drug Design*. **1998**, *13*, 453-461.

[49] Z. Liu, J.T. Robinson, X. Sun, H. Dai. "PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs", *Journal of American Chemical Society*. **2008**, *130*, 10876-10877.

[50] N. Vijayalakshmi, A. Ray, A.Malugin, H. Ghandehari. "Carboxyl-terminated PAMAM-SN38 conjugates: synthesis, characterization, and in vitro evaluation", *Bioconjugate Chemistry*. **2010**, *21*, 1804-1810.

[51] D.S. Goldberg, N. Vijayalakshmi, P.W. Swaan, H. Ghandehari. "G3.5 PAMAM dendrimers enhance transepithelial transport of SN38 while minimizing gastrointestinal toxicity", *Journal of Controlled Release*. **2011**, *150*, 318–325.

[52] H. Zhao, B. Rubio, P. Sapra, D. Wu, P. Reddy, P. Sai, A. Martinez, Y. Gao, Y. Lozanguiez, C. Longley, L.M. Greenberger, I.D. Horak. "Novel Prodrugs of SN38 Using Multiarm Poly(ethylene glycol) Linkers", *Bioconjugate chemistry*. **2008**, *19*, 849-859.

[53] H. Zhao. "EZN-2208 (PEG-SN38), A 40 kDa Polyethylene Glycol (PEG) Conjugate, As an Anticancer Agent: Review of Preclinical and Clinical Data", *Current Bioactive Compounds.* **2011**, *7,* 3-7.

[54] H. Maeda. "Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond", *Journal of Controlled Release*. **2012**, *164*, 138-144.

[55] H. Zhang, J. Wang, W. Mao, J. Huang, X. Wu, Y. Shen, M. Sui. "Novel SN38 conjugate-forming nanoparticles as anticancer prodrug: *In vitro* and *in vivo* studies", *Journal of Controlled Release*. **2013**, *166*, 147-158.

[56] G. Pasut, F.M. Veronese. "PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview", *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2009**, *61*, 1177-1188.

[57] Y. Kaburagi, Y. Kishi. "Operationally Simple and Efficient Workup Procedure for TBAF-Mediated Desilylation: Application to Halichondrin Synthesis", *Organic Letters.* **2007**, *9*, 723-726.

[58] N. Svensen, J. G.A. Walton, M. Bradley. “Peptides for cell-selective drug delivery”, *Trends in Pharmacological Sciences*. **2012**, *33*, 186-192.

[59] Z. Jie Li, W.K. Kei Wu, S.S. Man Ng, L. Yua, H. Tao Li, C.C. Man Wong, Y. Chun Wu, L. Zhang, S. Xiang Ren, X. Gang Sun, K. Ming Chan, C. Hin Cho. “A novel peptide specifically targeting the vasculature of orthotopic colorectal cancer for imaging detection and drug delivery”, *Journal of Controlled Release*. **2010**, *148*, 292-302.

[60] H. Tamamura, A. Hori, N. Kanzaki, K. Hiramatsu, M. Mizumoto, H. Nakashima, N. Yamamoto, A. Otaka, N. Fujii. “T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer”, *Federation of European Biochemical Societies Letters*. **2003**, *550*, 79-83.

[61] T. Tanaka, W. Nomura, T. Narumi, A. Esaka, S. Oishi, N. Ohashi, K. Itotani, B.J. Evans, Z. Wang, S.C. Peiper, N. Fujii, H. Tamamura. “Structure-activity relationship study on artificial CXCR4 ligands possessing the cyclic pentapeptide scaffold: the exploration of amino acid residues of pentapeptides by substitutions of several aromatic amino acids”, *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2009**, *7*, 3805–3809.

NANOCONJUGADOS PEG-PROTEÍNA

Contribuciones a este capítulo: *La proteína α-Gal fue subministrada por el Dr. Jose Luis Corchero del grupo de Nanotecnología del Instituto de Biotecnología y de Biomedicina de la UAB, dirigido por el Dr. Antonio Villaverde. Los péptido P25 y P87 fueron sintetizados por la Dra. Ximena Pulido, dentro del desarrollo de su tesis doctoral. Immaculada Farràs, miembro del grupo de UQC, llevó a cabo la síntesis de algunos lotes empleados en el desarrollo de este proyecto del péptido cRGDfK, Colesterol-cRGDfK y Colesterol-cRGDfK carbamato. La formación de nanovesículas ricas en colesterol y su caracterización física fue llevada a cabo por el grupo Molecular Nanocience and Organic Materials (Nanomol, ICMAB CSIC, UAB) dirigido por el Dr. Jaume Veciana y la Dra. Nora Ventosa. Todos los ensayos in vitro o in vivo realizados en este capítulo fueron llevados a cabo por el grupo de Drug Delivery and Targetting dirigido por el Dr. Simó Schwartz y la Functional Validation and Preclinical Research Unit dirigida por la Dra. Ibane Abasolo (CIBBIM, Instituto de investigación del Hospital Vall de Hebrón).*

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades por almacenamiento lisosómico.

El **lisosoma** fue descrito por primera vez en 1955 por C. de Duve, [1, 2] su nombre procede de un término griego que significa "cuerpo digestivo". En todas las células, excepto los glóbulos rojos, el sistema digestivo primario son los lisosomas. Los lisosomas reciben sus substratos mediante una gran variedad de mecanismos, que incluyen la endocitosis, fagocitosis y autofagia. Estos substratos son degradados a través de una compleja red de proteínas de membrana, las hidrolasas lisosomales solubles, por orgánulos relacionados íntimamente con los lisosomas y otros componentes celulares.

El descubrimiento del lisosoma por parte de Duve, llevó a H. G. Hers a acuñar el término de **"enfermedades lisosomales innatas"**, al relacionar la enfermedad de Pompe, debida a una deficiencia de la enzima α-Glucosidasa y su consecuente acumulación de glicógeno, con el lisosoma.[3] Posteriormente estas enfermedades se definieron con el término genérico de enfermedades por almacenamiento lisosómico (Lysosomal storage disease, **LSD**).

Las LSD son un grupo de distintas enfermedades genéticas causadas por deficiencias en alguna enzima lisosomal. La ausencia o baja actividad de la enzima deficiente da como resultado la acumulación del substrato de la enzima deficiente en varias células, tejidos y órganos. Las LSD se clasifican en función del tipo de substrato acumulado: esfingolipidosas, mucopolisacaridosas y oligosacaridosas. Varios autores incluyen en esta clasificación las dolencias causadas por el defectos en procesos sintéticos, almacenamiento celular, proteínas de membrana lisosomales y otras proteínas de membrana y defectos en el transporte lisosomal (Tabla 3.1).[4]

La mayoría de las LSD son heredadas de manera **autosómica recesiva**, excepto en el caso de la enfermedad de **Fabry** y el síndrome de Hunter o MPSII que están **ligadas al cromosoma X**. Las LSD son consideradas enfermedades raras, cuya prevalencia varía dependiendo del síndrome del que hablemos siendo la enfermedad de Gaucher la más común y la enfermedad de Fabry la segunda más común. Individualmente la aparición de las LSD varía entre 1 entre 20000 y 1 entre 100000 nacimientos, [5] en cambio, de manera colectiva, la incidencia de LSD varía entre 1 entre 5000 y 1 entre 10000 nacimientos.[6, 7] A pesar de la baja incidencia de las LSD en la mayor parte de la población, es posible encontrar un pequeño número de excepciones. Uno de los ejemplos más llamativos y significativos es el de la población judía askenazí (judíos de origen europeo), esta comunidad presenta una incidencia mayor de la enfermedad de Gaucher de 1 entre 855 nacimientos (frente a 1 entre 57000 nacimientos detectados en la población Australiana)[6] y de 1 entre 3900 nacimientos del síndrome de Tay-Sachs.[6, 8] Esta alta incidencia se produce en poblaciones que han sido, o de alguna manera aún permanecen, genéticamente aisladas por motivos culturales o geográficos.

Estos datos sobre la incidencia de las LSD siempre deben ser tenidos en cuenta como si de estimaciones se tratasen, ya que se piensa que hay un gran número de casos no diagnosticados o diagnosticados erróneamente debido a que los síntomas de estas enfermedades pueden ser no específicos y pueden acabar siendo identificadas como otras enfermedades.

Tabla 3.1. *Clasificación de las LSD, ejemplos de LSD y la encima deficiente y su posible afectación neurológica. Tabla extraída y adaptada de referencia 4.*

Enfermedad	Afectación neuronal	Encima o proteína deficiente
Esfingolipidosas		
Enfermedad de Fabry	+	α-Galactosidasa A
Lipogranulomatosis de Farber	-	Ceramidasa
Enfermedad de Gaucher tipo I	-	β-Glucosidasa
Enfermedad de Gaucher tipo II y III	+	Activador Saposin-C
Enfermedad de Nienmann-Pick tipo A y B	+	Esfingomielinasa
GM1-gangliodosis: variante infantil, juvenil y adulta	+	β-Galactosidasa
GM2-gangliodosis (Sandhoff): variante infantil y juvenil	+	β-Hexosaminidasa A y B
GM2-gangliodosis (Tay-Sachs): variante infantil, juvenil y adulta	+	β-Hexosaminidasa A
GM2-gangliodosis (activador GM2 deficiente)	+	Proteína activadora GM2
GM3-gangliodosis	+	GM3 sintetasa
Leucodistrofia metacromática (infantil tardía, juvenil y adulta)	+	Arilsulfatasa A
Activador esfingolípido deficiente	+	Activador esfingolípido
Mucopolisacaridosas		
MPS I (Scheie, Hurler-Scheie y enfermedad de Hurler)	+	α-Iduronidasa
MPS II (Hunter)	+	Iduronidasa-2-sulfatasa
MPS IIIA (Sanfilippo A)	+	Heparan N-sulfatasa (sulfamidasa)
MPS IIIB (Sanfilippo B)	+	N-acetil-α-glucosaminidasa
MPS IIIC (Sanfilippo C)	+	Acetil-CoA; α-glucosamida N-acetiltransferasa
MPS IIID (Sanfilippo D)	+	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa
MPS IVA (Síndrome de Morquio A)	+	N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa
MPS IVB (Síndrome de Morquio B)	-	β-Galactosidasa
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	+	N-acetilglucosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B)
MPS VII (Enfermedad de Sly)	+	β-Glucuronidasa
MPS IX	+	Hialuronidasa
Enfermedad por almacenamiento de glicógeno		
Pompe (tipo II)	+	α-Glucosidasa
Oligosacaridosas		
α-Manosidosis	+	α-Manosidasa
β-Manosidosis	+	β-Manosidasa
Fucosidosis	+	α-Fucosidasa
Aspartilglucosaminuria	+	Aspartilglucosaminidasa
Enfermedad de Schindler	+	α-N-acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	+	α-Neuraminidasa
Galactosialidosis	+	Proteína protectora lisosomal
Mucolipidosis II (I-cell disease); mucolipidosis III	+	Urina difosfato-N-acetilglucosamina; encima lisosomal N-acetilglucosaminil-1-fosfotranferasa
Desorden de proteínas de membrana integrales		
Cistonosis	-	Cistonosina
Enfermendad de Danon	+	Proteína de membrana asociada al lisosoma 2
Action myoclonus-renal faillure syndrome	-	Proteína de membrane lisosomal 2
Enfermedad de Salla	+	Sialina
Enfermedad de Niemann-Pick tipo C1	+	NCP-1,NCP-2
Mucolipidosis IV	+	Mucolipina
Otras enfermedades adicionales		
Deficiencia múltiple de sulfatasas	+	Factor modificador desulfatasa 2
Niemann-Pick tipo C2	+	NCP-2
Enfermedad de Wolman (infantil); enfermedad por almacenamiento de ésteres de colesterol	-	Lipasa ácida lisosomal
Galactosialidosis	+	Catepsina A

Abreviaciones: MPS, mucopolisacaridosis; NCP-1, Niemann-Pick tipo proteína C1; NCP-2, Niemann-Pick tipo proteína C2

2. Fisiología del lisosoma.

Los **lisosomas** son vesículas membranosas que contienen enzimas hidrolíticas para la digestión controlada de macromoléculas. Están presentes en todas las células, excepto en los glóbulos rojos. Contenidos en los lisosomas encontramos más de 50 tipos de enzimas hidrolíticas, entre ellas proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasas y sulfatasas. Todas ellas son hidrolasas ácidas, estas hidrolasas alcanzan su actividad óptima a un pH cercano a 5, que es el pH que mantiene el interior del lisosoma. El hecho que estas enzimas sean activas a pH ácido proporciona un mecanismo extra de seguridad en la célula, ya que si alguna de ella se escapa al citosol, cuyo pH es aproximadamente 7,2, la enzima no llevara a cabo ninguna degradación sobre los componentes contenidos en este.

El lisosoma no cuenta solo con un interior característico (pH 5 y gran cantidad de enzimas), sino que cuenta con un membrana externa característica. Esta membrana contiene receptores específicos que permiten el escape de sus productos de digestión (aminoácidos, azúcares y nucleótido entre otros), captación de enzimas lisosomales provenientes del aparato de Golgi y una bomba de protones que mantiene el pH ácido del lisosoma. La mayoría de las proteínas de membrana lisosomales están altamente glucosiladas, lo cual puede protegerlas de las proteasas contenidas en el interior del lisosoma.

Como ya se ha comentado, los lisosomas reciben sus sustratos mediante diversos mecanismos que incluyen la **endocitosis**, **fagocitosis** y **autofagia**. También hay autores que abogan por una cuarta ruta de degradación proteica, donde algunas proteínas citosólicas, que contienen en su superficie la secuencia KFERQ, serían transportadas directamente a los lisosomas para ser degradadas.[9]

Nos centraremos en las tres principales rutas (Figura 3.1). La **endocitosis** tiene lugar cuando las moléculas son transferidas a unas pequeñas e irregulares membranas llamadas *endosomas tempranos*. En este momento, algunas de las moléculas endocitadas son seleccionadas y recicladas a la membrana citoplasmática y otras son transportadas a los *endosomas tardíos*. El pH de estos endosomas también es ácido, aproximadamente 6.5, dónde empieza el proceso digestivo. Mediante un mecanismo aún desconocido estos endosomas tardíos se convierten en lisosomas, donde tiene lugar el proceso digestivo final.

La **autofagia** es un mecanismo secundario de todas las células mediante el cual la célula aporta materiales a los lisosomas para su destrucción. Un ejemplo de autofagia es el que tiene lugar en las células hepáticas, donde las mitocondrias tienen una vida media de 10 días. Estas mitocondrias de rechazo son envueltas por una membrana procedente del retículo endoplasmático, generándose un *autofagosoma*. Este autofagosoma se fusiona con el lisosoma o con un endosoma tardío y se lleva a cabo el proceso de digestión.

Por última, la tercera ruta más común es la denominada **fagocitosis**. La fagocitosis es llevada a cabo únicamente por células especializadas, en vertebrados: macrófagos y neutrófilos. En esta ruta metabólica se ingieren partículas de gran tamaño, como microorganismos y restos de células, vía grandes vesículas llamadas *fagosomas*. Estos fagosomas tienen un tamaño proporcional al del material fagocitado, pudiendo alcanzar incluso el mismo tamaño que la célula fagocítica. El fagosoma se fusiona con el lisosoma llevando a cabo el proceso el proceso digestivo. La fagocitosis desempeña un importante papel en la función inmunitaria.

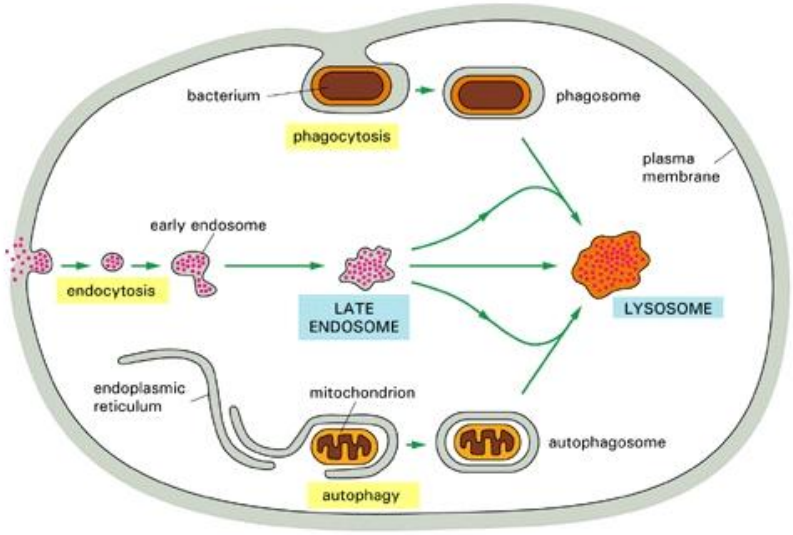


Figura 3.1. *Principales rutas digestivas del lisosoma: endocitosis, autofagia y fagocitosis. Figura extraída de la referencia 9.*

3. Transporte de las hidrolasas lisosomales.

En este punto nos centraremos en la vía de transporte de las enzima lisosomales y la importancia del receptor **manosa 6-fosfato** (**M6P**) (Figura 3.2), no solo en el transporte de las enzimas endógenas sino también en el que se puede seguir con la administración de una enzima lisosomal con fines terapéuticos, lo que se conoce como terapia enzimática sustitutiva (enzyme replacement therapy, **ERT**).

Las enzimas lisosomales son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso y transportadas a través del complejo de Golgi. Estas hidrolasas son empaquetadas en vesículas de transporte hasta formar un endosoma tardío. Las enzimas son reconocidas gracias a la presencia de un único marcador en forma de M6P, los cuales son añadidos exclusivamente a los N-oligosacáridos de estas enzimas mientras están en el lumen de la red del *cis* Golgi. Esta reacción de marcaje específico es llevada a cabo por la GlcNAc-fosfotranferasa. Un mal funcionamiento en GlcNAc-fosfotransfera causa dos LSD diferentes, Mucopilidosis I y Mucopilidosis II. [10]

Los MP6 son reconocidos por los receptores M6P, proteínas trans-membrana presentes en el *trans* Golgi, agrupados y transportados mediante vesículas con receptores específicos a los endosomas tardíos.

El receptor M6P se une a su oligosacárido específico a un pH 7 y lo libera a pH 6, es decir al llegar al endosoma tardío. En los endosomas se produce la eliminación del grupo fosfato de la enzima, convirtiéndose esta en totalmente funcional. Las vesículas con los receptores M6P son reciclados y enviados de nuevo al complejo de Golgi.

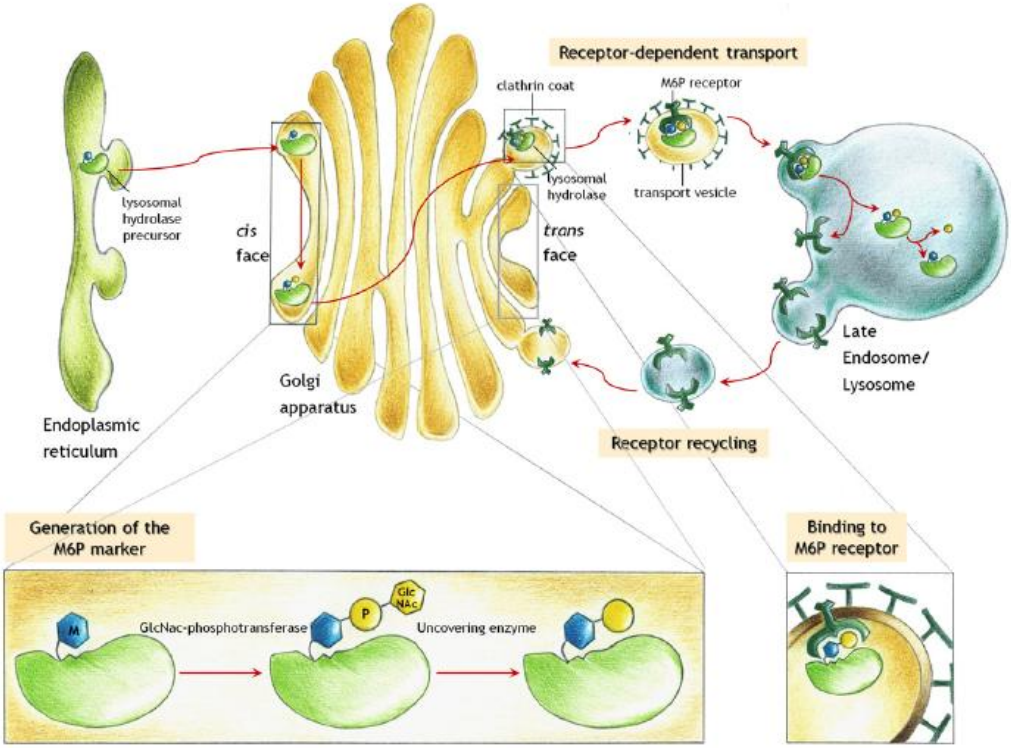


Figura 3.2. *Representación de la vía de transporte de las enzimas lisosomales desde el retículo endoplasmático al endosoma tardío/lisosoma. Figura extraída de la referencia 11.*

Destacar que un porcentaje variable de la nueva enzima lisosomal sintetizada que no se une al receptor de M6P en el complejo de Golgi es secretada. Estas enzimas extracelulares pueden unirse a los receptores M6P de la membrana plasmática. Las enzimas alcanzan el lisosoma mediante un mecanismo de endocitosis. Este mecanismo es un prerrequisito esencial para la eficacia de la terapia enzimática sustitutiva (ERT).[11] Este direccionamiento, junto con otros, serán discutidos con más detalle en el punto 4.4.1.

4. Importancia de los biomarcadores en los LSD.

Un **biomarcador** es un indicador de la presencia o alcance de un proceso biológico que está directamente relacionado con las manifestaciones clínicas y consecuencias de un determinado

desorden. [13] Las características ideales de los biomarcadores se encuentran resumidas en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. *Características ideales de un biomarcador. Tabla adaptada de la referencia 13.*

Características ideales de un biomarcador
Fácil de cuantificar en material clínico accesible (ejemplos: plasma, orina).
Abundancia no sujeta a una gran variación en la población general.
Representación del alcance de la enfermedad en todos los sitios.
Niveles específicamente elevados en la enfermedad determinada.
No afectado por condiciones no relacionadas con la enfermedad.
Niveles elevados en la enfermedad determinada sin solaparse con los niveles de individuos no tratados o individuos sanos.
Su abundancia varía rápidamente como respuesta al tratamiento, de la misma manera que los parámetros clínico-patológicos de la enfermedad.
Su medida es fiable, rápida, reproducible y barata.

El diagnostico y evaluación de nuevos tratamientos en las LSD se han visto afectados positivamente con el incipiente desarrollo de nuevos conocimientos y técnicas en el ámbito de la biología. Gracias a estos avances se han descubierto gran número de biomarcadores, útiles, no sólo para el seguimiento de la enfermedad, sino también para la evaluación y aprobación por parte de las autoridades sanitarias de nuevos tratamientos. En un informe reciente de la Agencia Europea de Medicamentos (European Medicines Agency, EMA) sobre biomarcadores, se destaca que: "Los biomarcadores juegan un importante papel en el desarrollo de nuevos fármacos. Como una nueva variable en el diseño o determinación del punto final en pruebas clínicas, se espera que contribuyan en aumentar la proporción de éxito y rapidez del proceso de desarrollo de nuevos fármacos. Los biomarcadores son la clave para alejarse de "una dosis para todos" y conseguir "el fármaco adecuado a la dosis adecuada para el paciente adecuado". Por tanto, los biomarcadores juegan un papel importante para los científicos y la industria de desarrollo de fármacos y para los procesos de aprobado de un fármaco". [12]

Los biomarcadores tienen un especial interés en las llamadas enfermedades huérfanas o raras. Según la EMA y la FDA (Food and Drug Administration) una enfermedad es considerada huérfana o rara cuando su incidencia es menor a 1 entre 2000 y 1 entre 1000 nacimientos, [14, 15] respectivamente. El conjunto de las LSD pertenecería a este grupo, su incidencia es de 1 entre 5000 y 1 entre 10000 nacimientos. [6,7] Los pacientes de enfermedades raras tienen derecho a tratamientos de la misma calidad, seguridad y eficacia que los de enfermedades más mayoritarias, pero debido a la baja incidencia de la enfermedad rara se enfrentan a distintos problemas. Esta baja incidencia hace que el número de personas en las pruebas clínicas sea muy bajo, convirtiendo el desarrollo de estos fármacos en un proceso caro y en una inversión de alto riesgo. Por este motivo las fases clínicas deben ser capaces de demostrar una alta eficacia y resultados beneficiosos a gran escala. Para compensar el limitado número de pacientes y evitar procedimientos invasivos (biopsias), los biomarcadores pueden servir como indicadores de las respuestas al tratamiento. Idealmente deberían reflejar la extensión de la enfermedad de cada participante durante la prueba clínica.

Encontramos dos grandes clases de biomarcadores para las LSD. El primer grupo de **biomarcadores directos** son aquellos que incluyen las moléculas cuya acumulación está

directamente relacionada con la enfermedad. Este tipo de biomarcadores normalmente reflejan el alcance del daño en los tejidos afectados por la enfermedad, pero en algunas ocasiones pueden encontrarse en el plasma, orina y otros fluidos corporales. Un ejemplo de esta subclase es la **globotriaosilceramida** (**Gb3**)[16]. Este es el principal producto de depósito en los lisosomas en la enfermedad de Fabry. Este biomarcador, sus características y problemas, serán discutidos en el apartado 6.1 de este capítulo con más detalle.

La otra gran clase de biomarcadores son los llamados **biomarcadores indirectos**. Estos biomarcadores incluyen moléculas cuyas concentraciones se ven incrementadas como consecuencia de la activación de procesos compensatorios usados por la célula para disminuir los daños provocados por la enfermedad. Como ejemplo encontramos quitotriosidasa en la enfermedad de Gaucher. La acumulación de glucocerebrosidasa en los macrófagos provoca que estos secreten quitinasa como respuesta compensatoria.

5. Tratamientos para las LSD.

Durante las últimas dos décadas la investigación en el campo de las LSD ha avanzado considerablemente, dando lugar a la aparición de nuevas estrategias terapéuticas, que podrían llegar a ser usadas en el tratamiento de otras enfermedades genéticas. [11] No podemos obviar la gran importancia que ha tenido el desarrollo de nuevas técnicas que permiten una producción, purificación y manipulación a gran escala de nuevas drogas de carácter biológico, como proteínas recombinantes y vectores virales, unido a las nuevas legislaciones sobre fármacos huérfanos, que han impulsado a las compañías farmacéuticas a invertir en enfermedades raras. [17]

La mayoría de las estrategias terapéuticas para las LSD consisten en incrementar el nivel de la enzima deficiente en células y tejidos (figura 3.3). Estas estrategias incluyen el **trasplante de precursores hematopoyéticos**, más conocido como trasplante de médula ósea, (haematopoietic stem cell transplantation, **HSCT**), la **terapia enzimática sustitutiva** (**ERT**), la terapia con **chaperonas** (pharmacological chaperone therapy, **PCT**) y la **terapia génica** (gene therapy, **GT**). Otra estrategia alternativa es la basada en la disminución de la síntesis del sustrato almacenado en los lisosomas, conocida como **terapia por reducción de sustrato** (substrate reduction therapy, **SRT**).

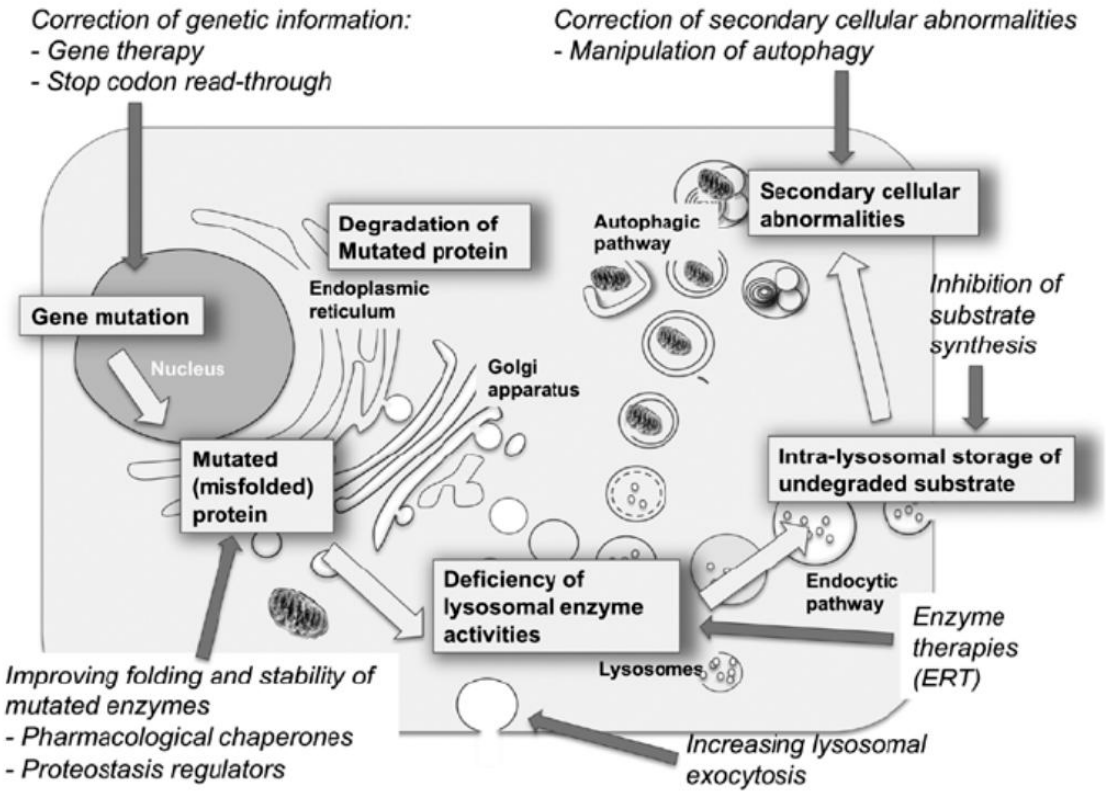


Figura 3.3.*Cascada patogénica de los LSD (flechas y cuadros blancos). Las LSD son debidas a la síntesis de proteínas mutadas y su actividad en defecto en la función lisosomal. Este mal funcionamiento resulta en un almacenamiento de substrato no degradado en los lisosomas y desencadena otros fallos secundarios en la célula. Cada uno de estos eventos se convierten en potenciales dianas terapéuticas mediante diferentes estrategias (cursivas y flechas grises). Figura adaptada de la referencia 18.*

5.1. Trasplante de precursores hematopoyéticos, HSCT

El **HSCT** fue el primer tratamiento aplicado para las LSD. Tradicionalmente se ha usado el trasplante de médula ósea en este tipo de tratamiento, pero en los últimos años se ha empezado a usar el cordón umbilical como fuente de precursores hematopoyéticos. [18]

El HSCT consiste en el uso de precursores hematopoyéticos procedentes de un donante sano como agente terapéutico. Podemos conseguir un efecto doble mediante el uso de este tratamiento. El primero es la repoblación de tejidos específicos por las células sanas del donante, y el segundo y más importante la secreción de proteínas lisosomales funcionales en el torrente sanguíneo que pueden ser endocitadas por el lisosoma, corrigiendo su defecto en los tejidos afectados. Otro punto importante, es que estas nuevas proteínas funcionales pueden alcanzar el cerebro.

A pesar de esto, ensayos clínicos han demostrado que el uso de HSCT es útil en unos poco casos (MPS I, MPS VI, enfermedad de Krabe y en algunas formas de leucodistrofía metacromática.) [19] A este limitado uso debemos sumar una significativa mortalidad unida al

proceso, la limitación de encontrar donantes y la baja eficacia en la reparación de tejidos como el hueso y el corazón.

5.2. Terapia enzimática sustitutiva, ERT

En 1964, Christian de Duve fue el primero en sugerir que la terapia enzimática sustitutiva (Ezyme Replacement Therapy, **ERT**) podría mejorar la vida de los pacientes de LSD. [20] Esta terapia consistía en la administración de la enzima deficiente en el paciente mediante infusión, esperando así restablecer los valores normales. Pronto se evidenciaron los problemas a los que se tendrían que enfrentar antes de que la ERT fuese una realidad. En esos años aún no existían las técnicas para la producción a gran escala de enzimas recombinantes, y los modelos animales para las LSD aún no eran una realidad. En 1968, la Dra. Elizabeth Neufeld demostró que el defecto metabólico de un cultivo de fibroblastos procedentes de un paciente con MPS (acumulo de mucopolisacaridosas) podía ser compensado mediante la adición de factores correctivos segregados por células sanas, y en estudios posteriores demostró que estos factores correctivos eran en realidad enzimas que eran transportadas al interior de la célula mediante receptores M6P. [11] Estos hallazgos, unidos al hecho de que en la mayoría de las LSD se mantiene una actividad residual de la enzima defectiva, permiten tratamientos eficaces sin llegar a restablecer totalmente la actividad normal de la célula, proporcionaron las bases para el diseño racional de la ERT. En la década de los 70 se llevaron a cabo estudios pilotos con varias LSD (Fabry, Gaucher, Pompe y Sandhoff) en los que se evidenció un nuevo problema, la ERT no era una terapia eficaz para aquellas enfermedades con una afectación neuronal severa.

En los años 90 la ERT llego a su gran punto de inflexión. Por un lado, las investigaciones de Brady y colaboradores llegaron a fase clínica y obtuvieron unos resultados muy positivos en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. [21] Este hito junto a la aparición de técnicas de clonación de cDNA abrieron el camino a desarrollar nuevas ERT para varias LSD. Las técnicas de clonación de cDNA permitieron producir de forma industrial grandes cantidades de enzimas recombinantes y desarrollar modelos animales necesarios para la evaluación de las terapias. La mayoría de enzimas lisosomales recombinantes se producen en células CHO (Chinese Hamster Ovarian) debido a su fácil y rápido crecimiento y al hecho de que sus modificaciones post-transcripción son prácticamente idénticas a la de las células humanas. A esto debemos sumar el hecho que las enzimas sintetizadas son secretadas en su gran mayoría al medio de cultivo facilitando así su purificación.

Años de estudio en el campo de la ERT nos han dejado algunas claves importantes al respecto. La primera de ellas es que la biodistribución y la liberación de la enzima en los distintos tejidos depende de los receptores M6P, por tanto es importante que la enzima recombinante mantenga un patrón **de glicosilación** similiar al humano. La biodistribución a algunos tejidos sigue siendo un problema a resolver, por ejemplo mediante el empleo de moléculas directoras o infusión directa en algunos tejidos. Actualmente seis LSD son tratadas mediante ERT

(Gaucher, Fabry, MPS, α-Manosidosis, NPC tipo B y Pompe), en la tabla 3.3 se encuentran resumidos los tejidos que son más fáciles o más difíciles de alcanzar en función de cada enfermedad.

Tabla 3.3.*Tabla resumen de las enfermedades tratadas mediante ERT y los tejidos más fáciles y más difíciles de alcanzar por las enzimas. Tabla adaptada de la referencia 20.*

Enfermedad	Subtipo	Fácil de alcanzar	Difícil de alcanzar
Gaucher	Tipo 1	Bazo, hígado, médula ósea.	Hueso.
	Tipo 2 y 3	Bazo, hígado, médula ósea.	Hueso, cerebro.
Fabry	Clásico y tardío	Endotelio vascular.	Riñones, corazón.
MPS	Todas	Bazo, hígado, médula ósea.	Hueso, cerebro, cartílago.
α-Manidosis	-	Bazo, hígado, médula ósea.	Hueso, cerebro.
NPC	Tipo B	Bazo, hígado, médula ósea.	Macrófagos alveolares.
Pompe	Infantil	-	Corazón, musculatura lisa, músculo esquelético.
	Tardío	-	Musculatura lisa, músculo esquelético respiratorio.

La dosis de enzima administrada en ERT tiene una gran importancia y es un factor crítico en la biodistribución y eliminación de la misma. Por ejemplo en el caso de la enfermedad de Fabry solo entre un 0,1% y un 1% de la dosis administrada alcanza el riñón y el corazón, por lo que es necesaria una dosis adecuada, generalmente bastante alta, para obtener algún efecto beneficioso en este tipo de tejidos. Destacar que la ERT precisa un **tratamiento continuado**, ya que de la misma manera que la acumulación de sustrato en los tejidos es reversible por efecto de la ERT, una nueva acumulación de sustrato e incluso una intensificación de los efectos clínicos puede ocurrir si el tratamiento es interrumpido o detenido. [22]

A pesar de que la ERT ha demostrado ser segura y bien tolerada por la mayoría de pacientes, es frecuente la aparición de anticuerpos como **respuesta inmunológica** a la administración de enzima. Esta respuesta no suele tener efectos adversos graves, pero es posible que la eficacia de la enzima subministrada disminuya.

Por último es necesario evaluar el coste de este tipo de terapia, que suele ser mucho más costosa que las terapias tradicionales basadas en moléculas pequeñas sintetizadas químicamente. A pesar de todos los problemas mencionados, la ERT sigue siendo la mejor estrategia para el tratamiento de las LSD. [18]

5.3. Terapia con Chaperonas, PCT

A menudo en las LSD una mutación en las enzimas lisosomales es la causante de plegamiento incorrecto de las mismas, provocando la pérdida de su actividad, ya que estas proteínas con un incorrecto empaquetamiento serían descartadas automáticamente por el ER al ser identificadas como defectuosas. En este hecho se basa la terapia con **chaperonas**. Las chaperonas son moléculas pequeñas que actúan como ligando con las proteínas mutantes, esta interacción promueve que la enzima mutada adopte mayoritariamente la conformación adecuada, aumentando así su estabilidad y haciendo que pueda alcanzar los lisosomas.

Una chaperona ideal consistiría en una molécula pequeña que selectivamente se uniría a nuestra enzima diana disociándose en el pH ácido que se encuentra en los lisosomas. La mayoría de chaperonas se unen al centro activo de la enzima, aunque también puede tratarse de ligandos alostéricos. [23] Un caso concreto será discutido con más detalle en el punto 4.6.2.

5.4. Terapia génica

La terapia genética abre un abanico de posibilidades enormes y muy esperanzadoras en el caso de las LSD. La terapia génica consiste en la liberación de la copia normal del **gen** que codifica la enzima defectuosa, haciendo así posible la síntesis de la enzima normal por el paciente.

Las LSD son enfermedades monogénicas, es decir, un único gen defectuoso provoca el fallo. A pesar de ser monogénicas, las células lisosomales están presentes en todo el cuerpo, convirtiendo las LSD en enfermedades multisistémicas. A priori esta ubiquidad presente en las LSD las excluirías de este tipo de tratamiento, ya que actualmente no se han desarrollado técnicas adecuadas para realizar trasplantes generalizados, pero una vez más el receptor M6P juega un papel importante. La terapia génica es posible en las LSD ya que mediante el tráfico presente en la célula a través de los receptores M6P, una célula con la copia del gen normal puede secretar enzimas normales que serán asimiladas en las células adyacentes a través de los receptores M6P de su membrana. A pesar de este tráfico intercelular, el CNS sigue siendo inalcanzable a niveles terapéuticos.

Los vectores víricos más usados en los estudios de las LSD son el lentivirus recombinante, el adenovirus asociado (adeno-associated viruses, AAV) y el adenovirus (Ad). Se han aplicado dos tipos de terapia génica, las llamadas, *ex vivo* e *in vivo*. La terapia ex vivo consiste en el trasplante de células modificadas en el paciente. La in vivo consiste en la inyección directa del vector genético directamente en un tejido o en el torrente sanguíneo. [24]

El mayor problema de la terapia génica reside en el hecho que aún no ha sido demostrada su seguridad, siendo la posibilidad de carcinogénesis el mayor obstáculo para su aplicación clínica. También resaltar que hay estudios que demuestran que los vectores génicos provocan una sobreexpresión de los niveles de enzimas lisosomales, el resultado de esta sobreexpresión aún no ha sido evaluado en humanos. [18, 24]

5.5. Terapia por reducción de substrato, SRT

La **SRT** se basa en el concepto de reducir el substrato acumulado mediante la interrupción o alteración de los procesos biosintéticos que dan lugar a la síntesis o aparición del substrato, ayudando así a restablecer el equilibrio entre su síntesis y su catabolismo en los lisosomas. Generalmente se trata de moléculas pequeñas que se comportan como inhibidores de alguna enzima involucrada en el proceso de biosíntesis de los substratos. Una de las grandes ventajas de la SRT y la PCT reside en el hecho de que al ser estrategias que se basan en moléculas pequeñas, estas pueden ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (**blood brain**

barrier, **BBB**), haciendo así posible el tratamiento de las LSD con una alta afectación neurológica. El mayor problema de esta estrategia se encuentra en la falta de especificidad de la inhibición de los sustratos y el desequilibrio a largo plazo que puede causar en las rutas metabólicas. [25]

Actualmente tan solo el **miglustat** (N-butyldeoxygalactonojirimycin) ha sido aprobado para uso clínico en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y, en Europa, también para el tratamiento de la enfermedad NCP. [26] SRT se ha propuesto en varios estudios preclínicos para el tratamiento de otras LSD como la enfermedad de Sandhoff, Fabry y Pompe. [18]

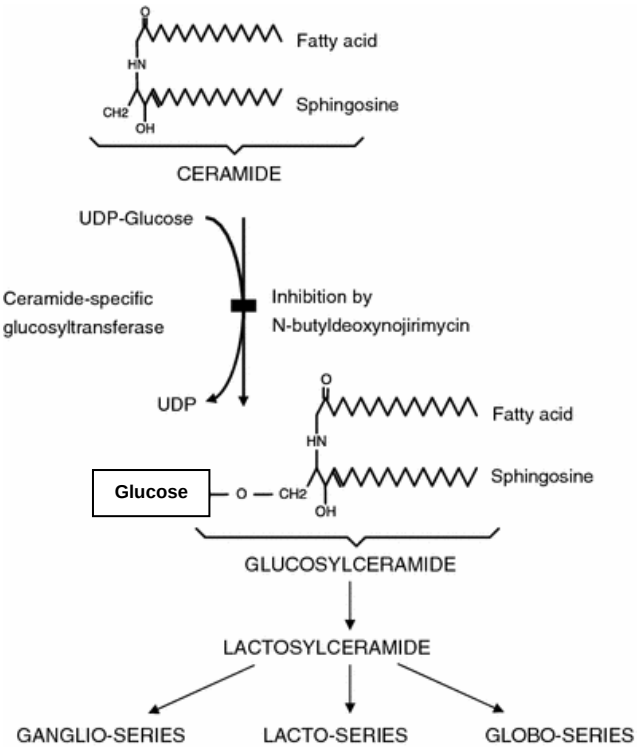


Figura 3.4. *Mecanismo de acción de miglustat. Figura extraída de la referencia 11.*

6. Enfermedad de Anderson-Fabry

En la presente tesis nos hemos centrado en el estudio de posibles alternativas terapéuticas para la **enfermedad de Anderson-Fabry** (Fabry disease, **FD**).

En 1968, los dermatólogos W. Anderson y J. Fabry describieron simultáneamente por primera vez un caso de "angiokeratoma corporis diffusum". Casi cien años más tarde, en 1967, Brady y colaboradores determinaron que se trataba de una LSD provocada por la deficiencia de la enzima **α-Galactosidasa A** (**α-GAL A**). Esta deficiencia deriva en la acumulación de **Gb3** y, de su forma deacilada, globotrioesfingosina (**lyso-Gb3**).[27]

Los glicoesfingolípidos son una parte esencial de la doble capa lipídica intra y extracelular de las membranas humanas. La α-GAL A hidroliza los enlaces α-galactosídicos de los esfingolípidos, glicoproteínas y polisacáridos, haciendo posible el reciclaje de los componentes

de la membrana. [28] Un fallo en esta proteína provoca la acumulación de esfingolípidos en los lisosomas, empezando a aparecer esta acumulación durante la vida fetal.

La α-GAL A es una glicoproteína homodimérica con un peso aproximado de 46 KDa por monómero. Cada monómero contiene dos dominios diferenciados, un dominio $(\beta/\ \alpha)_8$ que contiene el centro activo y otro dominio C-terminal que contiene ocho hebras β (Figura 3.5).

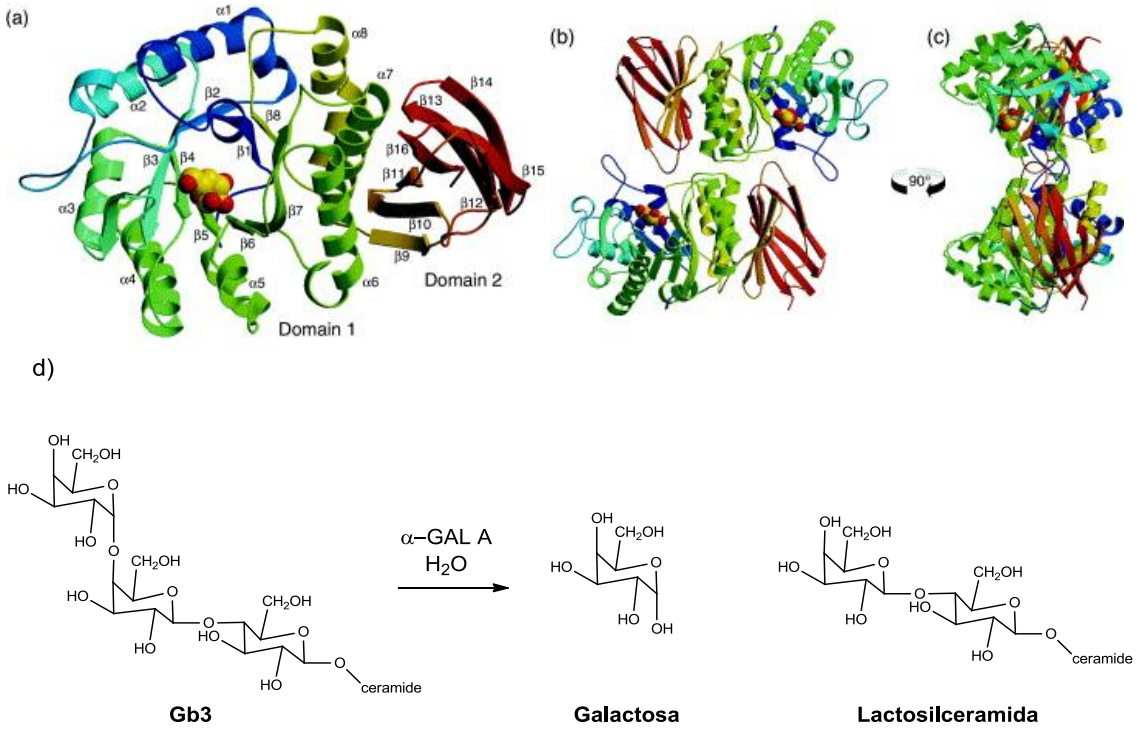


Figura 3.5.*Estructura de α-GAL A. a) Monómero de α-GAL A. El monómero esta coloreado de N-terminal (azul) a C-terminal (rojo). El dominio 1 contiene el centro activo en el centro de las hebras* β *en el barril* $(\beta/\ \alpha)_8$*, mientras que el dominio 2 contiene hebras anti paralelas* β*. El ligando galactosa se muestra en color rojo y amarillo. b) y c) son dos vistas del homodímero de α-GAL A. d) mecanismo de acción de la α-GAL A. Figura adaptada extraída de la referencia 29.*

Las mutaciones de α-GAL A son muy diversas, aproximadamente el 65% de estas mutaciones son debidas a mutaciones sustitutivas o sin sentido (missense or nonsense), un 5% son debidas a mutaciones en los intrones (splicing mutations), un 22% pequeñas delaciones/pequeñas inserciones o mutaciones regulatorias, y solo un 6% son debidas a grandes delaciones/inserciones. Las mutaciones sustitutivas o sin sentido no afectan al centro activo, pero dan lugar a la pérdida parcial de la actividad de la proteína o la inestabilidad de la estructura de esta. En el resto de los casos no se observa ninguna actividad residual de la proteína. [28]

Como ya se dijo en punto 4.5, la enfermedad de Fabry es un trastorno hereditario ligado al cromosoma X. Los hijos de hombres afectados por la enfermedad no desarrollan la enfermedad en ningún caso, mientras que las hijas son heterocigotas. Las mujeres heterocigotas pueden transmitir el alelo mutado tanto a hijos como a hijas. A pesar de ser una

enfermedad de carácter recesivo, debido al proceso aleatorio de activación del cromosoma X llamado lionización, es habitual en mujeres heterocigotas desarrollar la enfermedad, si bien es cierto que está suele ser menos virulenta y aparecer de manera más tardía que en los hombres.[30]

La enfermedad de Fabry es la segunda LSD más común, se estima que el número de individuos afectados va desde 1 entre 476000 personas y 1 entre 117000 personas. Debido a su gran variedad de síntomas y las grandes diferencias que se encuentran entre cada uno de los pacientes, su diagnóstico suele ser complicado y por tanto su prevalencia puede ser mucho mayor. Estudios en neonatos han demostrado que FD presenta una incidencia muy superior a la esperada, por ejemplo un estudio de estas características en Italia dio como resultado una incidencia de mayor a 1 entre aprox. 3100 individuos (ejemplos de este tipo de estudios se encuentran resumidos en la tabla 3.4).[31]

Tabla 3.4.*Tabla resumen de estudios en diferentes países y años sobre la prevalencia de FD. Tabla adaptada de la referencia 31.*

Método	Período de estudio	Número total de casos	Prevalencia	País
Incidencia en el nacimiento (número de diagnósticos enzimáticos positivos en neonatos y prenatales dividido por el número de nacimientos).	1980-1996	36	1:117000	Australia
Incidencia en el nacimiento (número de neonatos afectados en un período de tiempo divido entre el número total de nacimientos del mismo período).	1970-1996	27	1:476000	Holanda
Incidencia en mujeres con antecedentes familiares.	1980-1995	60	1:345000	Reino unido
Incidencia en hombres.	1980-1995	98	1:370000	Reino Unido
Incidencia en el nacimiento (número de neonatos afectados en un período de tiempo divido entre el número total de nacimientos del mismo período).	1997-2002	1	1:666000	Turquía
Incidencia en el nacimiento (número de diagnósticos enzimáticos positivos en neonatos y prenatales dividido por el número de nacimientos).	1982-2001	1	1:833000	Norte de Portugal
Estudio en neonatos.	2004-2006	12	1:3300	Norte de Italia
Estudio en neonatos.	2006-2008	73	1:1250	Taiwán

Como se ha comentado anteriormente las LSD muestran manifestaciones multisistémicas y muy variadas. En el caso de FD clásica podemos diferenciar 3 estadios diferenciados:

- Niñez: los síntomas más tempranos que se aprecian en este estadio inicial son el dolor neuropático.
- Edad comprendida entre los 20 y los 30 años: Empiezan a aparecer signos de la enfermedad en varios órganos. La proteinuria es signo de que la función renal comienza a estar afectada y se empiezan a producir problemas cardíacos (arritmias, cardiomiopatía).
- Mayores de 30 años: La afectación de los diferentes órganos es mayor, se detectan problemas graves en la función renal, cerebrovascular y cardiovascular como consecuencia de la enfermedad. La esperanza de vida se reduce en unos 20 años en hombres y 10 años en mujeres.

6.1. Biomarcadores

A pesar de los intentos y esfuerzos, no ha sido posible hallar un biomarcador adecuado para la FD. El **Gb3** es el producto de almacenamiento primario de la FD, durante años este ha sido el biomarcador usado para demostrar la eficacia de la ERT en el tratamiento de FD, pero investigaciones posteriores demuestran que no se trata de un biomarcador tan fiable como se pensó en un primer momento. Varios estudios han demostrado que los valores de Gb3 hallados en plasma no siempre se corresponden con la virulencia de la enfermedad, por ejemplo es detectable un alto valor de Gb3 en plasma en hombres jóvenes que no se correspondería con un estadio inicial de la enfermedad y por el contrario se han detectado valores normales de Gb3 en plasma en mujeres heterocigotas sintomáticas. [32] A estos datos debemos sumar el hecho que se han detectado valores altos de Gb3 en individuos sanos. [31]

El **lyso-Gb3** es la forma deacilada del Gb3, y en contraste con este último presenta unos valores especialmente elevados en hombres y mujeres afectados por FD. En el caso del lyso-Gb3 los individuos sanos presentan valores bajos de este. También se ha investigado la correlación de los valores de lyso-Gb3 con la virulencia de la FD.

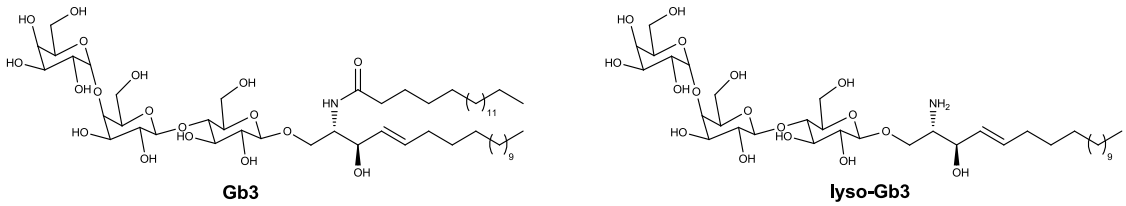


Figura 3.6.*Estructura de Gb3 y lyso-Gb3.*

En los estudios llevados a cabo por S.S. Rombach y colaboradores los valores de lyso-Gb3 son significativamente más elevados en los afectados por la FD que en los individuos control. Estos valores son significativos incluso en el caso de mujeres heterocigotas. El resultado más importante que podemos extraer de los estudios llevados a cabo con el lyso-Gb3, es que este biomarcador presenta una correlación con la virulencia de la enfermedad, es decir, es capaz de predecir la afectación de la enfermedad (prognosis). [31]También se han llevado a cabo estudios para determinar si el lyso-Gb3 podría ser un biomarcador útil para determinar la eficacia de la ERT (única terapia hasta ahora aplicada). En la figura 3.7 b) se puede distinguir un descenso más pronunciado del lyso-Gb3 en pacientes tratados con ERT, esta diferencia mayor facilita determinar la eficacia de la terapia. [32] Actualmente se llevan a cabo diversos estudios para corroborar el uso de lyso-Gb3 como biomarcador deFD en su diagnóstico y seguimiento.

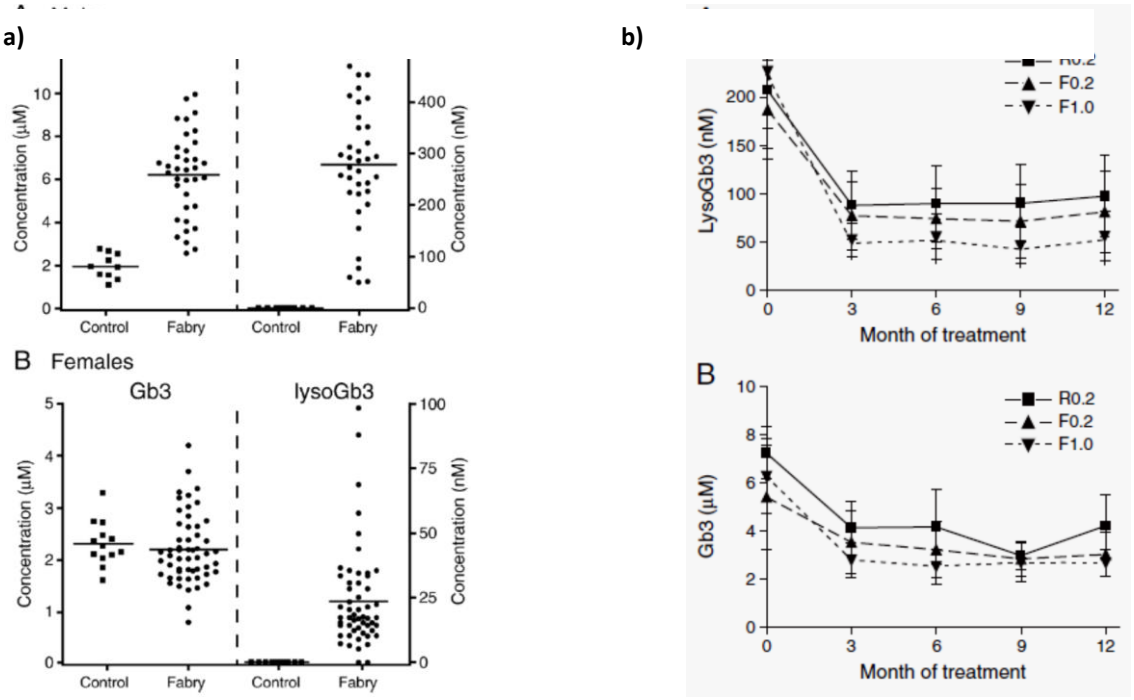


Figura 3.7.*Valores de Gb3 y lyso-Gb3 en plasma.* ***a)*** *comparación entre los valores de Gb3 y lyso-Gb3 en pacientes e individuos control, tanto en hombres (****A****) como en mujeres (****B****). En este punto se observa claramente que los valores de Gb3 para mujeres sanas y afectadas son similares, incluso llegando a ser inferiores en pacientes FD. En cambio en el caso de lyso-Gb3 las diferencias entre los pacientes y los individuos control son mucho mayores. Figura adaptada de la referencia 32.* ***b)*** *efecto del tratamiento por ERT en los valores de lyso-Gb3 y Gb3 en plasma.* ***A)*** *Valores de lyso-Gb3 en pacientes hombres Fabry antes y después de 3, 6, 9 y 12 meses de tratamiento.* ***B)*** *Valores de Gb3 en pacientes hombres Fabry antes y después de 3, 6, 9 y 12 meses de tratamiento; F1.0, tratamiento con agalsidasa beta a 1,0 mg/Kg. Figura adaptada de la referencia 33.*

6.2. Terapia sustitutiva enzimática para la enfermedad de Anderson-Fabry

El primer paso en el desarrollo de una ERT para FD fue dado por Sweeley y Klionsky al identificar el Gb3 como principal producto de acumulo. [34] Cuatro años más tarde Brady y colaboradores identificaron que la enzima deficiente en FD era la α-GAL A, la cual cataliza la hidrólisis de la galactosa terminal del Gb3. [35] Después de estos descubrimientos la α-GAL A fue aislada de una porción de tejido intestinal y posteriormente de tejido placentario humano. [36]

Los estudios con la enzima aislada del tejido placentario humano demostraron que la enzima α-GAL A estaba presente en forma de dos isozimas, **agalsidasa alfa** y **agalsidasa beta**. En 1973 se inyectó por primera vez la enzima purificada procedente de tejido placentario humano a dos pacientes de la FD, esta inyección dio como resultado una disminución breve pero significativa de los niveles de Gb3, igualmente se detectó una rápida desaparición de la enzima lisosomal en sangre.[36] Estas primeras investigaciones fueron la base del desarrollo de la ERT para FD.

Después de años de investigación para la producción y purificación a gran escala de esta enzima lisosomal, en 2001 aparecieron en el mercado los dos únicos tratamientos existentes, agalsidasa alfa (**Replagal**, Shire Human Genetic Therapies, Cambridge, MA, infusiones de 0,2 mg/Kg) y la agalsidasa beta (**Fabrazyme**, Genzyme Corporation, Cambridge, MA, infusiones de 1mg/Kg). Ambos tratamientos están aprobados en Europa, pero tan solo Frabazyme está aprobado para su uso en EEUU.[37]

6.2.1. ERT con agalsidasa alfa

El preparado de agalsidasa alfa o Replagal se produce en una línea celular humana por activación génica. Es administrada a través de una infusión intravenosa a una concentración de 0,2mg/Kg cada dos semanas durante 40 minutos. Su vida media en el torrente sanguíneo es de 108±17 minutos en hombres y de 89±28 minutos en mujeres. Su volumen de distribución es aproximadamente del 17% del peso corporal en ambos géneros.[38]

Los tratamientos de larga duración con Replagal han demostrado mejorar la vida del paciente, pero no han mostrado no ser eficaces en pacientes con una afectación renal, cardíaca y cerebrovascular severa. [36] El mayor efecto secundario del tratamiento con Replagal es la generación de anticuerpos en un 13.7% de los pacientes, causando trastornos leves o medios.[39]

6.2.2. ERT con agalsidasa beta

El preparado de agalsidasa beta o Fabrazyme se produce en células CHO. Es administrada mediante infusión intravenosa a una concentración de 1mg/Kg cada dos semanas durante 300 minutos. Su vida media en sangre es de entre 80 y 120 minutos y su volumen de distribución estacionario fue de 8,3-48,8 l. En junio del 2009 Genzyme comunicó que existía una contaminación de tipo vírico, y la producción de Fabrazyme ha permanecido parada desde entonces.

6.2.3. Comparativa entre agalsidasa alfa y agalsidasa beta

La comparación de la eficacia terapéutica entre la agalsida alfa y la agalsidasa beta es limitada debido los pocos estudios clínicos realizados y los diferentes criterios de elección de pacientes. En estudios con ratones no se aprecian diferencias terapéuticas entre ambos preparados

En una población de características similares, Van Breeman y colaboradores describió un comportamiento similar de la reducción de Gb3 en pacientes tratados con agalsida alfa 0,2 mg/Kg, agalsidasa beta 0,2 mg/Kg y agalsidasa beta 1 mg/Kg (figura 3.7, b)). [33]

Debido a las restricciones de uso de Fabrazyme a partir del 2009, se han llevado a cabo estudios de la reacción de los pacientes al cambiar de Fabrazyme a Replagal. En estos estudios se han observado la misma tendencia de mejoría en la función renal, cardiovascular y condiciones de vida en los pacientes antes del cambio de tratamiento. [37]

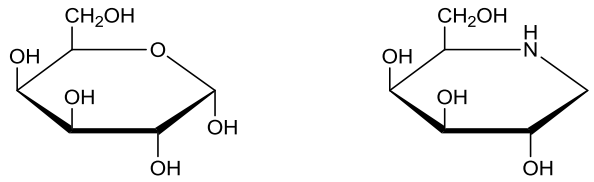
6.3. Terapia con chaperonas para la enfermedad de Anderson-Fabry

Los afectados por la FD presentan mutaciones en la enzima α-GAL A, la mayoría de estas mutaciones no afectan al centro activo de la proteína, sino a la estabilidad de su estructura terciaria. La terapia con chaperonas aumenta la estabilidad de la estructura terciaria de las proteínas y provoca que puedan realizar su función en el lisosoma.

El ligando natural de la α-GAL A es la galactosa, esta es la molécula que se encuentra expuesta en el extremo de la cadena de carbohidratos que componen el Gb3. A pesar de esto la galactosa no es un candidato idóneo como chaperona ya que es rápidamente metabolizado en células y tejidos, y una concentración elevada de galactosa puede provocar efectos adversos. [41]

Un análogo de la galactosa, la **1-deoxigalactonojirimicina** (**DGJ**) ha demostrado ser un candidato viable como chaperona (figura 3.8). Desarrollado por Amicus Therapeutics bajo el nombre de AT1001 o migalastat, actualmente se encuentra en fase clínica 3.

DGJ ha demostrado aumentar la actividad de α-GAL A y reducir la concentración de Gb3 *in vivo*, lo más destacable de estos estudios reside en el hecho que se ha observado una reducción de Gb3 en el CNS. [42] También se están llevando a cabo estudios de terapia combinada DGJ/ERT, en estos estudios también se observa una reducción mayor de sustrato que con la clásica ERT.[43]



Galactosa **DGJ**

Figura 3.8. *Estructura de la galactosa y su análogo DGJ.*

6.4. Nuevas aproximaciones para la ERT en la enfermedad de Anderson-Fabry

A pesar de que ERT es la terapia más eficaz hasta ahora aplicada presenta grandes desventajas. Como ya hemos dicho es frecuente la aparición de respuesta inmune debido a las infusiones periódicas de la enzima, presenta una baja biodisponibilidad, ya que las enzimas presentan un corto tiempo de vida media, y su biodistribución es deficiente, en muchos de los tejidos afectados más severamente (corazón, riñón, hueso) la ERT presenta una baja eficacia terapéutica.

Estos inconvenientes asociados a la ERT han impulsado a la búsqueda de nuevos métodos de mejora para la administración de enzimas. Una de las primeras estrategias estudiadas fue la basada en enzimas quiméricas. Las enzimas quiméricas son enzimas que contienen un péptido director en uno de sus extremos. La idea de incluir estos péptidos es evitar la entrada

dependiente de la glicosilación (receptores M6P) que se da en la mayoría de los tratamientos por ERT. En los casos de la enfermedad de Krabbe y MPS se han desarrollado enzimas quiméricas para la internalización dependiente de los receptores M6PR. A pesar de esto se ha demostrado que los problemas asociados a la respuesta inmune siguen existiendo en este tipo de tratamientos.[25]

Una manera de minimizar la respuesta inmune es la de enmascarar la proteína a través de nanoconjugados con polietilenglicol (PEG) o mediante su encapsulación en nanovesículas. En el caso de nanoconjugados enzima-PEG hay estudios desarrollados en un modelo animal de acumulación de dextrano en lisosomas que demuestran que estos presentan una mayor eficacia de eliminación de acúmulos de dextrano en hígado que la enzima libre.[44] También encontramos ejemplos dentro de la enfermedad Gaucher de una mejora significativa a través de la encapsulación de la β-glucoronidasa en vesículas liposomales.[45]

En el caso concreto de la enfermedad de Fabry varios artículos reflejan el mismo objetivo de mejorar la ERT con α-GAL A. Encontramos un interesante estudio llevado a cabo por Genzyme en el que la conjugación de la algasida alfa con PEG ramificado, unido a péptidos directores, exhibe unos prometedores resultados. Estos conjugados aumentaron el tiempo de vida media de la enzima 20 veces, pero los péptidos directores empleados no presentaron una importante mejora en la internalización de los nanoconjugados.[46]

En el campo de la encapsulación de la proteína α-GAL A también se han realizado diferentes aproximaciones. Una de ellas consiste en la encapsulación de la proteína en nanovesículas de colesterol, con resultados que apoyan su posible uso como nanomedicina.[47] Por otra parte, estudios de formación de complejos de polielectrolítos (PECs) entre la α-GAL A y cadenas de trimetil quitosano, presentan un aumento de la actividad *in vitro* respecto α-GAL A libre.[48]

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es desarrollar nuevos sistemas de administración de la α-GAL A con el fin de mejorar su biodisponibilidad y biodistribución. Para ello se decidió explorar dos tipos de sistemas:

1. Nanoconjugados PEG- α-GAL A que pueden tener asociado un péptido director.
2. Nanovesículas ricas en colesterol modificadas con un péptido director.

Los objetivos específicos del presente capítulo son:

1.1. Síntesis y optimización de cadenas polidispersas de polietilenglicol de talla media derivatizadas para su unión a la enzima lisosomal α-GAL A.
1.2. Síntesis, purificación y caracterización del péptido director cRGDfK.
1.3. Unión de péptidos directores a la cadena de polietilenglicol previamente derivatizada.
1.4. Síntesis de los distintos nanoconjugados α-GAL A-PEG (Replagal y la sintetizada por el Dr. Corchero)
1.5. Evaluación in vitro (ensayo de actividad enzimática y actividad en cultivo celular primario) de los conjugados.
1.6. Evaluación del poder de penetración de los conjugados unidos a péptidos directores en comparación con la proteína y los conjugados con polietilenglicol mediante técnicas espectroscópicas.

2.1. Síntesis, purificación y caracterización de un derivado del péptido director cRGDfK adecuado para su integración en vesículas de colesterol.
2.2. Cuantificación del péptido cRGDfK contenido en las vesículas de colesterol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Nanoconjugados PEG- α-GAL A que pueden tener asociado un péptido director

La conjugación de péptidos y proteínas con **polietilenglicol** (**PEG**), comúnmente llamada **PEGuilación**, es un procedimiento muy utilizado para aumentar su potencial terapéutico. Mediante la conjugación con PEG podemos proteger la superficie de la proteína, ya que está documentado que el PEG genera interacciones con las moléculas de agua adyacentes generando una capa de hidratación protectora.[25] Además, al aumentar con su presencia la talla molecular del nanoconjugado, reduce su eliminación por ultrafiltración renal (hecho especialmente remarcable en la PEGuilación de péptidos), previniendo la respuesta inmune y reduciendo su degradación por enzimas proteolíticas. En resumen, la conjugación con PEG puede modificar las características físico-químicas y la biodistribución de una proteína.[49]

Existe en la bibliografía estudios realizados por Genzyme corporation, empresa desarrolladora de Fabrazyme, basados en la incorporación de PEG ramificados de alto peso molecular, 40KDa, de conjugados con péptidos directores que muestran resultados prometedores en el campo de la conjugación de α-Gal A a PEGs.[46] Basándonos en esta línea seguida por Genzyme y otros ejemplos que se han aplicado a otras enfermedades lisosomales, por ejemplo el modelo basado en la acumulación de dextrano en lisosomas,[25] en un principio nos planteamos la PEGilación de la α-GAL A como estrategia para la obtención de nuevos nanoconjugados con propiedades mejoradas.

Para ello en principio se plantearon dos aproximaciones:

a) PEGilación de α-GAL A con PEG lineal polidisperso de 5 KDa.

b) PEGilación de la α-GAL A con dendrímeros basados en PEG (similares a los descritos en el primer capítulo de la presente tesis).

En ambas aproximaciones se planteó la generación de nanoconjugados PEG- α-GAL A que podían contener o no un péptido director. Así en la aproximación que conjugaba la α-GAL A con PEGs lineales se planteó el uso de cuatro tipos de PEG lineal que se diferencian en la modificación que contiene en uno de sus extremos. Uno de ellos es un PEG monofuncionalizado éter metílico y los otros tres son derivados de un PEG bifuncional que tienen uno de sus extremos incorporados tres péptidos directores distintos (figura 3.9). De esta manera comparando los nanoconjugados con péptido director o sin él se pretendía evaluar el efecto de estos péptidos directores en la eficacia del nanoconjugado. La PEGilación con dendrímeros DTPA-PEG, con ramas de talla superior a los descritos en el capítulo 1, se

abandonó después de constatar la dificultad sintética que estos presentaban al incorporar ramas de tamaño superior, discusión expuesta en el capítulo 2.

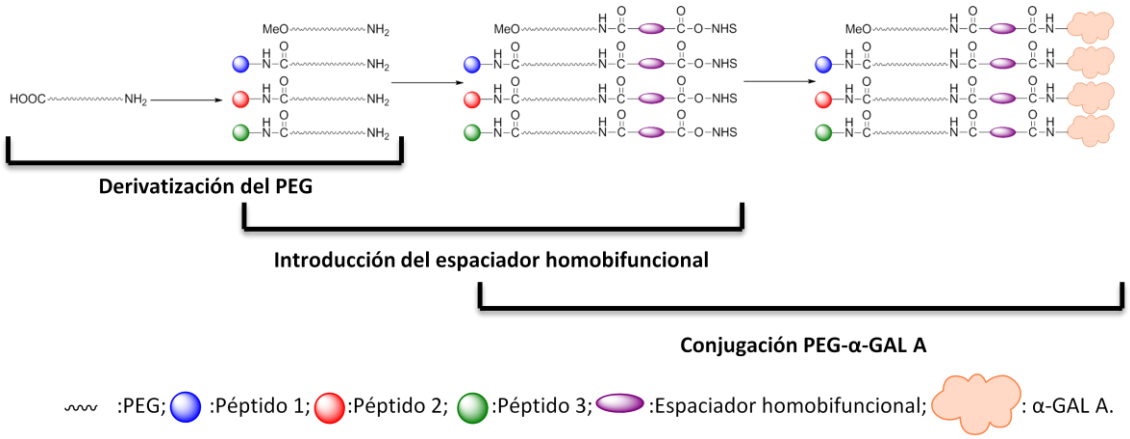
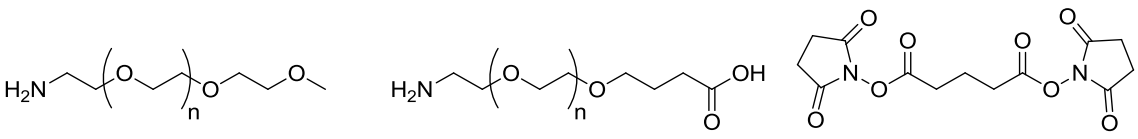


Figura 3.9. *Representación esquemática de la estrategia seguida en este capítulo para la conjugación de PEGs lineales sin y con péptidos directores a α-GAL A. En la figura se encuentran especificados los principales pasos para la obtención del nanoconjugado final: derivatización de las cadenas de PEG en los casos que sea necesario, pre-activación de las cadenas de PEG previa a su conjugación con la proteína y conjugación final a la proteína α-GAL A.*

La conjugación de PEGs u otro tipo de polímeros a proteínas se puede realizar a través de los grupos funcionales de algunos aminoácidos presentes en su secuencia. Las lisinas que contienen una amina primaria en la posición ε de su cadena lateral son uno de los residuos más considerados en estrategias de conjugación mediante la formación de un enlace amida con un ácido carboxílico presente en la molécula a conjugar. En nuestro caso se escogieron PEGs lineales, polidispersos y con un peso molécular aproximado de 5 KDa que presentaban una función amino en uno de sus extremos y el otro tenía un grupo éter metílico (PEG monofuncional) o ácido carboxílico (PEG bifuncional) a través del cual se introducirían los péptidos directores (figura 3.10).



76 **77** **78**

Figura 3.10. *Representación de las cadenas de PEG empleadas en este proyecto. La cadena **76** fue desteñida a su conjugación directa con la proteína. La cadena **77** fue empleada en la estrategia de conjugar la proteína con un péptido director. El espaciador bifuncional empleado en la preactivación del PEG se representado en la figura, **78**.*

En el caso del los PEGs derivatizados con un péptido, poder conjugar directamente el PEG-péptido a la proteína era necesario un PEG lineal diácido carboxílico monoprotegido que no estaba disponible comercialmente. Esto nos obligó a trabajar con PEGs lineales bifuncionales

con extremo amino y ácido carboxílico, donde el péptido se introducía a través del extremo ácido carboxílico. Al tener estos PEGs en el otro extremo un grupo amino fue necesario cambiar la funcionalidad de este extremo mediante su modificación con un espaciador homobifuncional que contiene dos ácidos carboxílicos activados en forma de éster de N-hidroxisuccinimida, el glutarato de di(N-succinimidil) (DSG, **78**) (figura 3.10). Este espaciador reacciona con amina en medios orgánico y acuoso formando amidas, siendo óptimo para la conjugación de proteínas. Por coherencia en el diseño de los nanoconjugados en el casa del PEG lineal monofuncional se escogió con función amina que también se derivatizó con el espaciador DSG (**78**).

Como se ha mencionado previamente en este proyecto se propuso evaluar el efecto que podría tener la presencia de un péptido director en el conjugado PEG-α-GAL A. Con este propósito se decidió evaluar tres péptidos diferentes (figura 3.11).

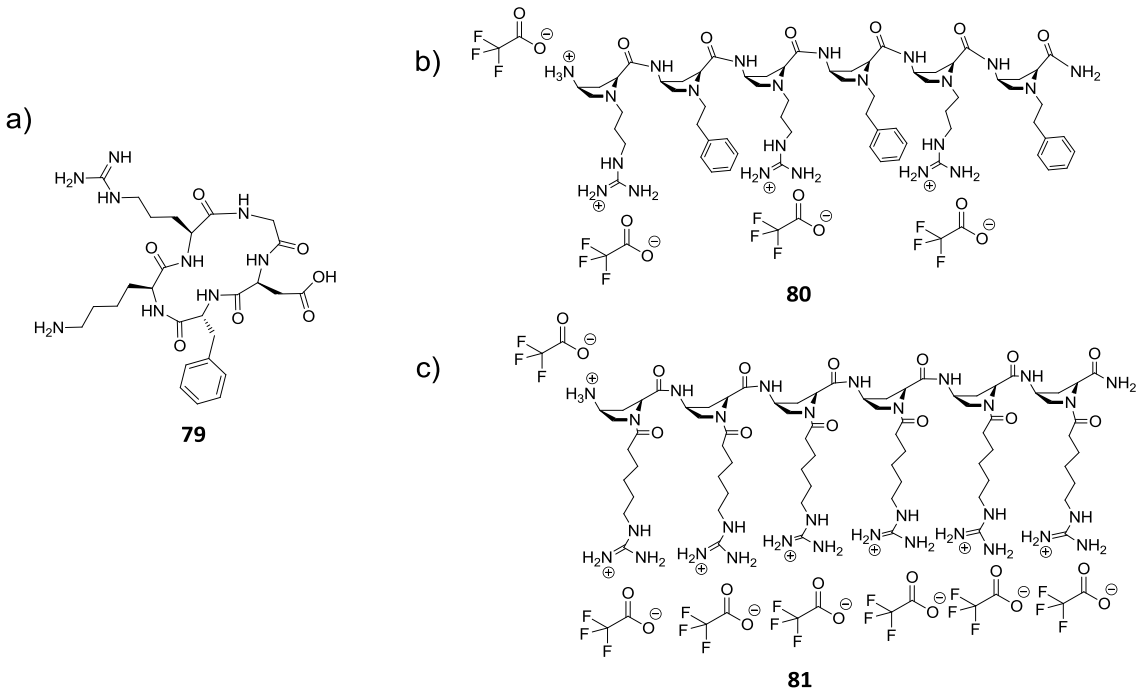


Figura 3.11. *Representación de los tres péptidos directores empleados en este proyecto.* ***a)*** *ciclo(RGDfK) (**79**),* ***b)*** *P25 (**80**),* ***c)*** *P87 (**81**).*

El primer péptido pertenece al grupo de los llamados péptidos RGD. En esta clase de péptidos, caracterizados por tener un motivo Arginina-Glicina-Aspártico (RGD), es conocida su afinidad por receptores específicos de células endoteliales y en concreto por integrinas, que son receptores transmembranales que se encuentran expresados en las células endoteliales.[50, 51] Decidimos optar por un péptido cíclico RGD, ciclo(RGDfK) (**79**), debido a las ventajas que presentan los péptidos cíclicos respecto al resto de péptidos lineales. [51]

Los otros dos péptidos (**80** y **81**) han sido desarrollados dentro de un proyecto de investigación propio del grupo y son γ-péptidos que presentan propiedades similares a los llamados péptidos con capacidad de atravesar la membrana celular (Cell penetrating peptides). La

síntesis y purificación de estos péptidos fue llevada a cabo por Ximena Pulido. Estos péptidos fueron seleccionados de una biblioteca peptídica en un ensayo de internalización con distintas líneas celulares donde mostraron una buena capacidad de atravesar la membrana celular. Además en experimentos de localización subcelular mediante microscopia confocal se determinó que estos péptidos presentan acumulación en lisosomas. Se seleccionaron tres de estos péptidos y se estimó su capacidad de entrada en células MAEC (Mouse Aortic Endotelial Cells) y su localización subcelular, focalizándonos principalmente en la acumulación en lisosomas (colocalización con LysoTracker Red). De los tres péptidos ensayados se determinó que los péptidos P25 (**80**) y P87 (**81**) eran los mejores candidatos, siendo P87 (**81**) el más potente, con mejor acumulación en lisosomas. Estos ensayos se realizaron en colaboración con los grupos del Dr. Schwartz y la Dra. Abasolo del Hospital Vall d'Hebrón.

1.1 Síntesis del péptido director cRGDfK

Este péptido fue sintetizado siguiendo el procedimiento descrito por Jun O. Liu y colaboradores al que se introdujeron pequeñas modificaciones (figura 3.12). [52]

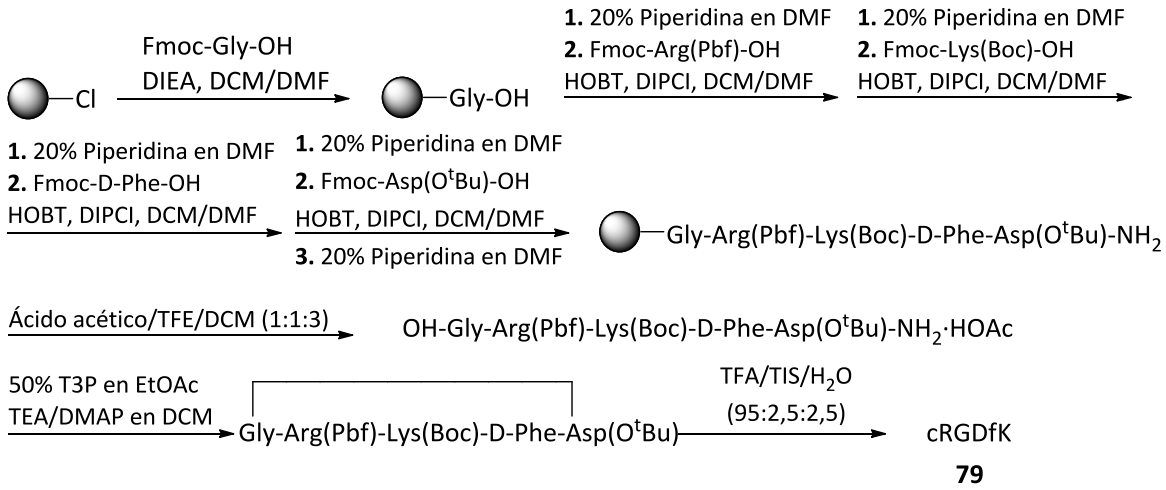


Figura 3.12. *Esquema de síntesis en fase sólida de cRGDfK.*

La síntesis del péptido se llevó a cabo empleando la resina 2-clorotritilo y se utilizaron condiciones estándar de la síntesis en fase en sólida para la elongación de la cadena peptídica. Se empleó el grupo Fmoc como protector temporal de la amina en α de los aminoácidos utilizados en el proceso de síntesis y los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales fueron: Lys (Boc), Asp (O^tBu), Arg (Pbf). Una vez incorporados todos los aminoácidos la acidólisis del péptido de la resina se efectuó mediante un único tratamiento de una hora con la mezcla Ácido acético/TFE/DCM (1:1:3). De esta manera se escindió el péptido manteniendo intactos los protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos. La ciclación se llevó a cabo entre el extremo N-terminal, del que previo a la acidólisis se había eliminado el grupo Fmoc, y el C-terminal mediante la formación de un enlace amida usando como agente acoplante una solución de anhídrido propilfosfónico, T3P. Cuando el análisis por HPLC-MS determinó la desaparición del producto de partida lineal, la mezcla del crudo se

evaporó a sequedad y se llevó a cabo la eliminación de todos los grupos protectores de las cadenas laterales con una mezcla TFA/TIS/H_2O (95:2.5:2.5). Este crudo final fue purificado mediante HPLC-MS semipreparativo, obteniendo el péptido final totalmente desprotegido con una pureza del 99% y un rendimiento final del 15% (Figura 3.13).

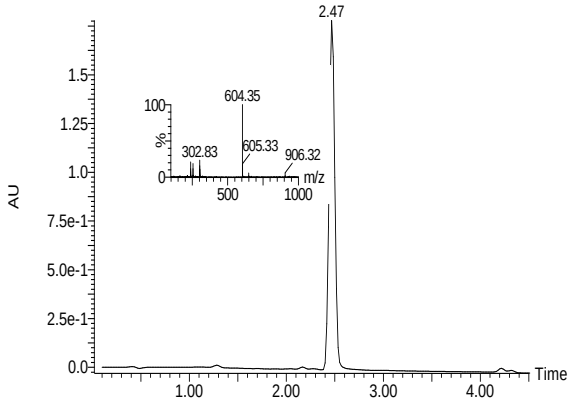


Figura 3.13. *Análisis por HPLC-MS del péptido puro final c(RGDfK). El análisis se realizó con una columna XBridge C18 y un gradiente 0→15% de ACN en NH_4HCO_3 20mM en 3.5 minutos a flujo de 1,6 ml/min.*

1.2 Derivatización de HOOC-PEG-NH_2

Al querer evaluar la presencia de péptidos directores en el nanoconjugado PEG-α-GAL A a través de la unión de los mismos al extremo terminal ácido carboxílico de HOOC-PEG-NH_2 (**77**) y su posterior conjugación de estos derivados a la enzima recombinante fue necesario derivatizar el PEG bifuncional adecuadamente. Con este propósito se diseñó el esquema sintético de derivatización del HOOC-PEG-NH_2 (**77**) que se encuentra representado en la figura 3.14.

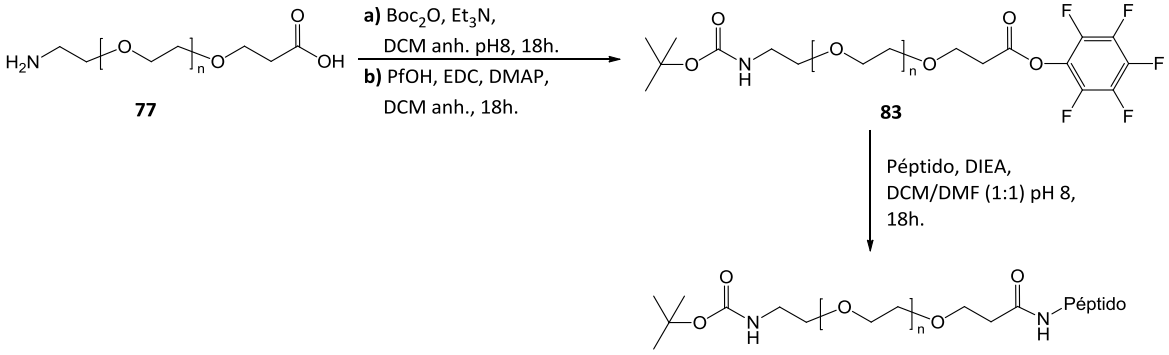


Figura 3.14. *Esquema sintético de derivatización y acoplamiento del PEG a los tres péptidos directores.*

El PEG HOOC-PEG-NH_2 (**77**) es un PEG bifuncional, cuyo extremo con un grupo funcional amino fue el escogido para su unión a la proteína α-GAL A y el extremo que contiene un grupo ácido carboxílico fue el destinado a la unión con los péptidos directores. La presencia de una amina libre durante la incorporación al péptido puede dar lugar a reacciones secundarias, como el auto-ensamblaje de las cadenas de PEG, es decir la formación de dímeros de PEG. Con el fin de

evitar la posibles reacciones secundarias se determinó que era necesaria la protección del grupo amino de la cadena de PEG mediante la incorporación de un grupo Boc. La elección de este grupo protector respondía a la necesidad de encontrar un grupo estable en las condiciones de reacción de los diferentes puntos de la derivatización del PEG y con unas condiciones de eliminación (condiciones ácidas) que no supusieran poner en riesgo la integridad de los péptidos. Todos los péptidos habían sufrido una acidólisis final durante su proceso de síntesis que demostraba que su integridad no se vería afectada al someterlos a las condiciones de medio ácido necesarias para la eliminación del grupo Boc. Así, se dejó reaccionar el PEG durante una noche con anhídrido de *terc*-butoxicarbonilo (Boc_2O) en medio básico. La eliminación de los reactivos en exceso se llevo a cabo mediante un sencillo procedimiento de precipitación con TBME, obteniendo el producto puro con un rendimiento cercano al cuantitativo, 98%. Con este sencillo procedimiento obtendríamos el derivado HOOC-PEG-NHBoc (**82**) adecuado para introducir los péptidos directores con una mayor eficacia.

Para incorporar los distintos péptidos al PEG se optó por activar el ácido carboxílico del PEG mediante la formación de un éster de pentafluorofenol (PfOH). De esta manera podríamos incorporar los distintos péptidos a la rama de PEG en unas condiciones muy suaves, minimizando las reacciones secundarias o la degradación del péptido, moléculas normalmente muy sensibles. Este método era el más adecuado en el caso del péptido c(RGDfK) (**79**), cuya estructura cuenta con un ácido carboxílico y una amina libre. En este caso si hubiésemos optado por un método de activación del ácido carboxílico *in situ*, como sería la utilización de agentes acoplantes tipo carbodiimida, corríamos el riesgo que se formarán especies diméricas del péptido. La activación con el éster de pentafluorofenol se llevó a cabo en DCM anh. y como agente de acoplamiento se usó EDC y DMAP como agente catalítico. Después de dejar evolucionar la reacción durante una noche se llevaron a cabo extracciones ácidas (5% de ácido cítrico) y básicas (NaOH 1N) con el fin de eliminar el exceso de EDC, DMAP y pentafluofofenol. El producto **83** permaneció en la fase orgánica, obteniendo finalmente el producto con un rendimiento del 95%. A pesar de que las masas del PEG no se apreciaban con exactitud, debido al alto peso molecular de la cadena de PEG y a su polidispersión, la reacción fue controlada por HPLC-MS. Durante el transcurso de la reacción fue fácilmente observable la aparición de un pico en la traza cromatográfica del UV a t_R: 3,03 min, que presentaba el mismo tiempo de retención que el pentafluorofenol, y cuyo espectro de UV correspondía al grupo pentafluorofenol, pero que presentaba en su espectro de MS una distribución de masas que correspondería a la presencia de PEG polidisperso. Después de elaborar la reacción y analizar la fase acuosa y la fase orgánica obtenidas, se apreció que el pico a t_R: 3,03 min en la fase acuosa no presentaba distribución de masas, por lo que concluimos que se trataba del exceso de pentafluorofenol, compuesto del que tampoco se detecta la masa. Por otra parte, el pico a t_R: 3,03 min en la fase orgánica presentaba el espectro de UV característico del pentafluorofenol y la distribución de masas correspondiente a la presencia de PEG, por lo que

el producto **83** se había formado correctamente y permanecía en la fase orgánica durante las extracciones llevadas a cabo como método de elaboración (figura 3.15).

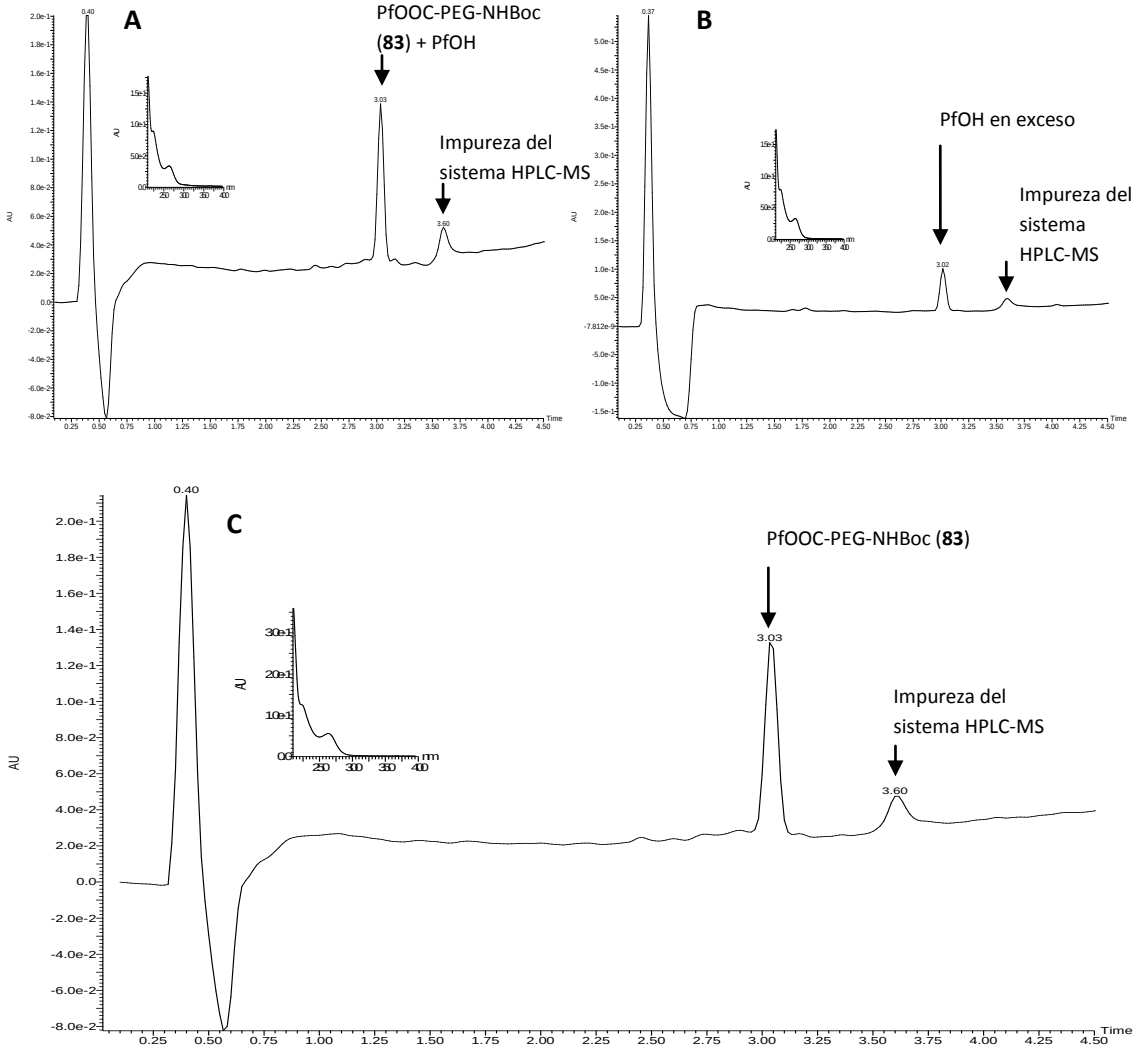


Figura 3.15. *Trazas cromatográficas del análisis de reacción de la formación del ester activado de pentafluorofenol. Todos los análisis se realizaron con una columna XSelect C18 y un gradiente 5→100% de ACN (0,07% FA) en H_2O (0,1% FA) en 4,5 minutos a flujo 2 ml/min. La traza cromatográfica* ***A*** *corresponde al crudo de la reacción, tan solo se observa un pico, este pico tiene el espectro de UV del pentafluorofenol y una distribución de masas que se relaciona con el PEG polidisperso. Esto es debido a que el exceso de pentafluorofenol y nuestro producto de reacción aparecen al mismo tiempo de retención. En la traza cromatográfica* ***B*** *se observa el análisis de la fase acuosa obtenida tras la elaboración de la reacción, esta vez el pico que a parece a 3,03 minutos es mucho menos intenso y tan solo presenta el espectro de UV del pentafluorofenol, ya que no se observa ninguna distribución de masas. Por último encontramos el análisis de la fase orgánica. En la traza cromatográfica* ***C*** *observamos nuestro pico de 3,03 minutos con el espectro de UV característico del pentafluorofenol y la distribución de masas típica de PEG. Asumimos que hemos eliminado todo el pentafluorofenol en exceso.*

La incorporación del PfOH-PEG-NHBoc (**83**) a los diferentes péptidos se llevó a cabo mediante la formación de un enlace amida. Así, sobre el PEG en con el ácido carboxílico en forma de

éster de pentafluorofenol se añadía el péptido en las condiciones adecuadas. La reacción se llevó a cabo disolviendo el PfOH-PEG-NHBoc (**83**) en la mínima cantidad de DCM (aprox. 1ml) y el péptido en DMF (aprox. 1ml) y posteriormente ajustando la solución a pH 8 mediante la adición de DIEA, de esta manera nos asegurabamos que la amina de los péptidos se encontraba desprotonada. El éster de pentafluorofenol es un éster activo con una reactividad media, por lo que se dejó evolucionar la reacción durante una noche con el propósito de conseguir que todo el PfOH-PEG-NHBoc (**83**) reaccionara con el péptido.

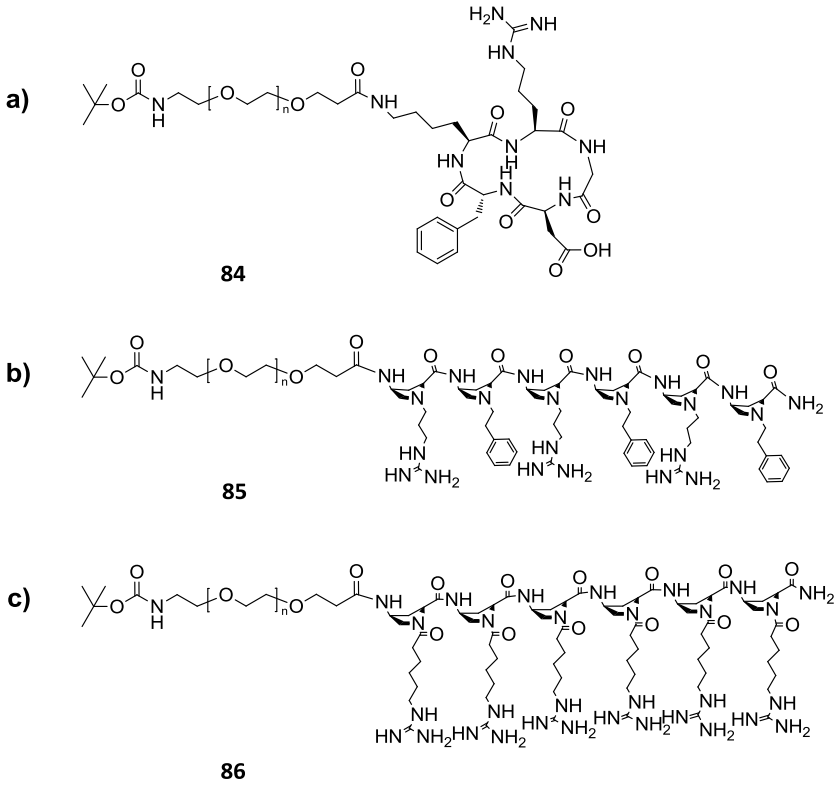


Figura 3.16. *Conjugados Péptido-PEG-Boc obtenidos:* ***a)*** *RGD-PEG-NHBoc (**84**);* ***b)*** *P25-PEG-NHBoc (**85**);* ***c)*** *P87-PEG-NHBoc (**86**).*

La purificación de estos derivados se realizó mediante un método de purificación suave, que nos permitiera recuperar la mayor parte del producto, debido a que trabajamos a muy pequeña escala. Para ello se decidió usar un método cromatográfico por separación de tamaño como técnica de purificación, utilizando unas columnas pre-empaquetadas PD-10 que contienen Sephadex G-25. La elección de este método nos permitió añadir un exceso de péptido (3 eq. respecto al PfOOC-PEG-NHBoc (**83**) de partida) en la reacción de incorporación al PEG ya que este método nos facilitaba la separación del péptido libre del conjugado final, debido a la diferencia entre sus pesos moleculares. El crudo de la reacción fue evaporado y redisuelto en un cantidad mínima de agua. Esta mezcla se cargo directamente en la columna y se eluyó con H_2O, las diferentes fracciones fueron analizadas por MALDI-TOF con tal de determinar las fracciones puras de producto. De esta manera obtuvimos los conjugados puros con rendimientos entre 30%-50% aproximadamente dependiendo del péptido (figura 3.16).

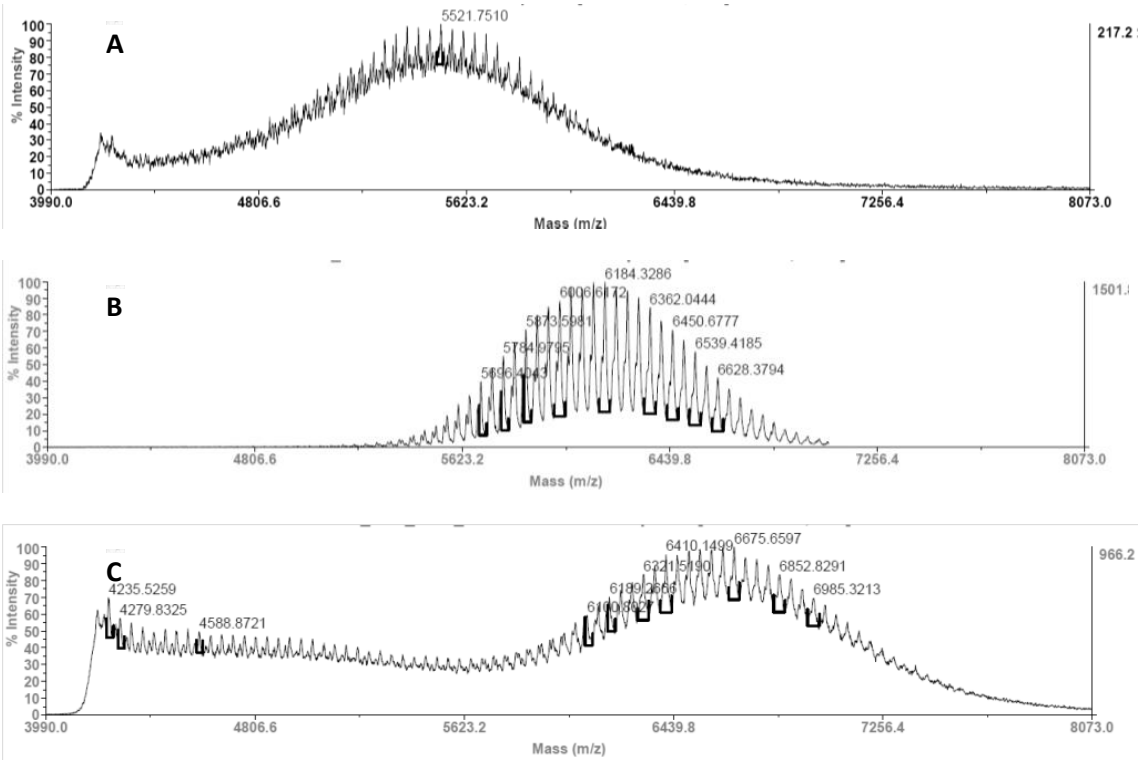


Figura 3.16. *Espectros de MALDI-TOF de los conjugados.* ***A)*** *RGD-PEG-NHBoc (**84**),* ***B)*** *P25-PEG-NHBoc (**85**) y* ***C)*** *P87-PEG-NHBoc (**86**).*

Cada uno de los derivados fue sometido a un tratamiento de una solución de HCl en dioxano 4M con el propósito de eliminar el grupo Boc. De esta manera obteníamos los conjugados RGD-PEG-NH_2 (**87**), P25-PEG-NH_2 (**88**) y P87-PEG-NH_2 (**89**) finales para la introducción del espaciador homobifuncional DSG (**78**).

1.3 Introducción del espaciador homobifuncional a MeO-PEG-NH_2 y Péptido-PEG-NH_2

La introducción del espaciador homobifuncional a R-PEG-NH_2 (dónde R puede representar: OMe, cRGDfK, P25 y P87) se realizó mediante la reacción del grupo amino del PEG con DSG (figura 3.17). La reacción se llevó a cabo en medio orgánico (DCM) a alta dilución con el objeto de evitar o minimizar la formación de dímeros (aprox. 0,2M), a pH 8 mediante la adición de DIEA. La reacción se dejó evolucionar durante una noche con los distintos lotes que se realizó.

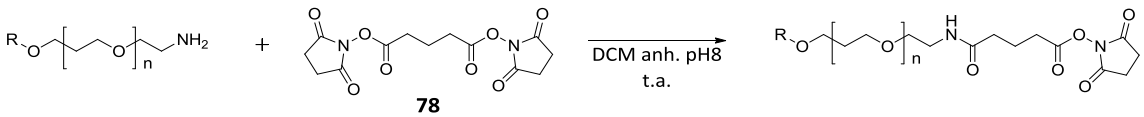


Figura 3.17. *Esquema de síntesis de R-PEG-NHS, donde R representa: OMe, cRGDfK, P25 y P87.*

Inicialmente la reacción fue optimizada utilizando MeO-PEG-NH_2 (**78**), ya que este reactivo era de origen comercial y no implicaba el esfuerzo sintético de los derivados de Péptido-PEG-NH_2. Con este reactivo fueron explorados dos métodos de elaboración diferentes del crudo de reacción.

El primer método de elaboración consistía en la extracción del crudo de introducción del espaciador con una solución acuosa básica ($NaHCO_3$ sat.) y posteriormente ácida (5% de ácido cítrico) con el objetivo de limpiar el crudo de reactivos en exceso como DSG (**78**) y DIEA. La fase acuosa fue analizada y se consideró despreciable la cantidad de MeO-PEG-NHS que había en ella, ya que la mayoría del MeO-PEG-NHS (**91**) se encontraba en la fase orgánica. En el apartado 1.4.1 del presente capítulo se discutirá de la idoneidad de este método de elaboración.

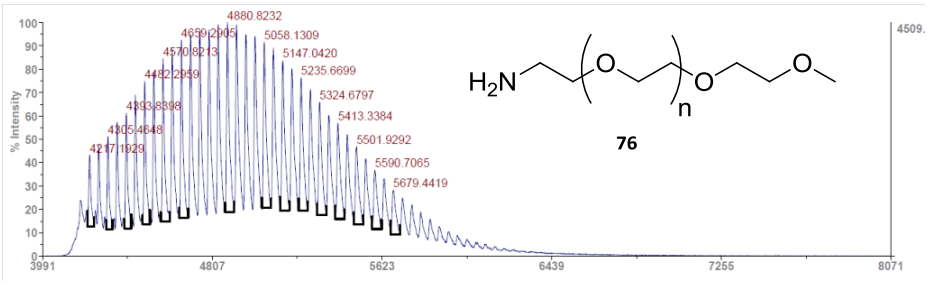
Posteriormente se optó por otro método de elaboración que demostró ser más eficaz. Una vez completada la reacción, el disolvente fue evaporado. Este crudo fue redisuelto en DCM, en un volumen cinco veces inferior al de la reacción original, y precipitado con TBME frío tres veces. De esta manera se obtenía un sólido blanco esponjoso como precipitado. Esta estrategia aprovechaba la baja solubilidad que tiene el PEG en TBME. Este sólido fue disuelto en la mínima cantidad de agua y liofilizado. El análisis de este sólido demostró que se trataba de la cadena de PEG activada sin rastros de ningún otro reactivo (78% de rendimiento). Este método mostró ser más óptimo ya que al no tratar el crudo con soluciones acuosas se evitaba la hidrólisis prematura del derivado de N-hidroxisuccinmido éster del MeO-PEG-NHS (**90**).

Cabe destacar que el análisis y caracterización de este tipo de compuestos fue dificultosa siendo solo posible su caracterización mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, ya que en esta técnica el espectro mostraba claramente un apreciable incremento en la masa de MeO-PEG-NHS (**90**) de aproximadamente 200 unidades con respecto al PEG de partida. Esta diferencia es comparable al incremento teórico de la masa del PEG después de la unión al espaciador homobifuncional: 212 unidades de masa (figura 3.18).

Destacar que en ningún caso se observó, mediante análisis de MALDI-TOF, la formación de dímeros.

La introducción del espaciador homobifuncional DSG a los conjugados cRDfK-PEG-NH_2 (**87**), P25-PEG-NH_2 (**88**) y P87-PEG-NH_2 (**89**) se llevaron a cabo en las mismas condiciones de reacción ensayadas con MeO-PEG-NH_2 (**76**) y usando el segundo método de elaboración del crudo con unos rendimientos 65-78%.

a)



b)

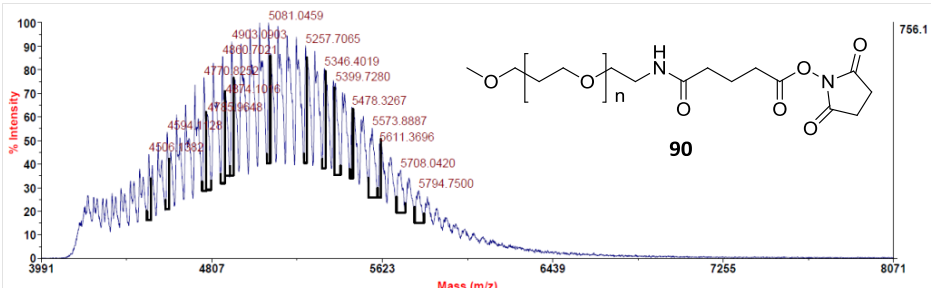


Figura 3.18. *Espectros de MALDI-TOF de MeO-PEG-NH_2 comercial (**a**, **76**) y MeO-PEG-NHS (**b**, **90**). Es posible apreciar un desplazamiento de 200 unidades de masa debido a la introducción del espaciador homobifuncional DSG*

1.4 Conjugación de los Péptido-PEG-NHS y MeO-PEG-NHS a la proteína α-GAL A

Como ya se ha comentado el principal objetivo de este proyecto era la conjugación de la proteína α-GAL A a diferentes modelos de PEG lineales polidispersos previamente derivatizados. Este proyecto se encuentra enmarcado dentro de un consorcio de grupos que trabajan en estrecha colaboración en el diseño y desarrollo de nuevos sistemas de administración de α-GAL A. En este consorcio la tarea de los participantes Dr. Villaverde y Dr. Corchero era la de desarrollar un nuevo método para expresar la proteína α-GAL A y su posterior subministro al resto de participantes.[53] Debido al hecho de que la actividad que presentaba esta proteína era mucho menor a la que presentaban las actuales enzimas comerciales, se decidió realizar también estudios de conjugación con la proteína α-Gal A producida por Shire, Replagal. A partir de este momento denominaremos simplemente como α-GAL (**91**) a la proteína producida por el consorcio y con el nombre comercial Replagal (**92**) a la enzima producida por Shire.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la conjugación de α-GAL A a los distintos derivados de PEG se realizaría a través de las cadenas laterales de las lisinas. La α-GAL A contiene 17 lisinas, se ha de destacar que es el único aminoácido del que no se han encontrado mutaciones entre los pacientes enfermos de Fabry. [54] Esta conjugación se llevó a cabo mediante la formación de un enlace amida entre las aminas contenidas en la proteína y el ácido carboxílico activado en forma de éster de N-hidroxisuccinimida de los derivados de PEG. Este tipo de enlace es un enlace no lábil, es decir las cadenas de PEG permanecerán unidas a la proteína durante su función enzimática. La incorporación de las cadenas de PEG era aleatoria debido a

la dificultad de realizar una conjugación selectiva de cadenas de PEG sobre proteínas, pero se intentó que el ratio de PEG, es decir que el número de cadenas de PEG incorporadas, fuera similar en todos los nanoconjugados finales.

El proceso de conjugación se llevó a cabo mediante un proceso de incubación de los distintos derivados de PEG con la proteína en un medio tamponado acuoso (PBS a pH 7). Una vez finalizada la reacción se añadía una solución de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 40 mM (figura 3.19). El Tris contiene una amina primaria en su estructura que reacciona con el R-PEG-NHS que queda en el medio, evitando así que la reacción de conjugación continué durante el proceso de purificación. El conjugado PEG-α-GAL A fue dializado usando un membrana con un tamaño de poro de 20 KDa frente a un tampón AcONa a pH 6,5.

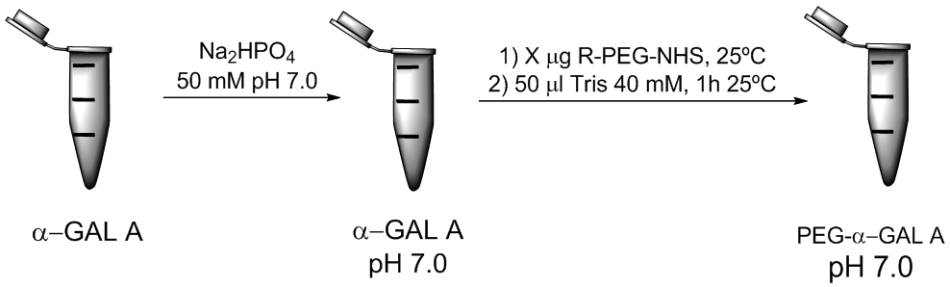


Figura 3.19. *Representación esquemática del proceso de conjugación de la α-Gal con el PEG.*

De la misma manera que en el caso de la introducción del espaciador homobifuncional la reacción de conjugación fue optimizada usando MeO-PEG-NHS (**90**) como modelo debido a su fácil obtención. Para llevar a cabo la conjugación se usó la proteína α-GAL (**91**) ya que el consorcio podía subministrar unas cantidades mayores respecto a la cantidad de Replagal (**92**) que se disponía.

1.4.1 Optimización de la conjugación MeO-PEG-α-GAL

Una vez decidido establecido el proceso de conjugación, entre la proteína y los derivados de PEG, se debía decidir la cantidad de derivado de PEG a utilizar en el proceso que diera unas condiciones de conjugación más eficientes.

Inicialmente se decidieron ensayar dos tipos de aproximaciones. En la primera se establecería el exceso de PEG que se añadiría a la reacción con un cálculo sencillo teniendo en cuenta tan solo la masa molecular de la proteína (fórmula 1, figura 3.20). En la seguna aproximación se determinaría este exceso de PEG teniendo en cuenta el número de lisinas que contenía la proteína según la fórmula 2 (figura 3.20).[55]

Fórmula 1:

$$\text{PEG } (\mu\text{gr}) = \text{proteina}(\mu\text{gr}) \times \frac{\text{mol proteína}}{\text{PM proteína}} \times \frac{\text{mol PEG}}{\text{mol proteína}} \times \frac{\text{PM PEG}}{\text{mol PEG}}$$

Fórmula 2:

$$\text{PEG } (\mu\text{gr}) = \text{proteina}(\mu\text{gr}) \times \frac{\text{mol proteína}}{\text{PM proteína}} \times \text{No. subunidades proteína} \times \frac{\text{No. lisinas}}{\text{No. Subunidad proteína}} \times \frac{\text{mol PEG}}{\text{mol lisinas}} \times \text{PM PEG}$$

Figura 3.20. *Fórmulas usadas para calcular el exceso de PEG empleado en cada caso. Dónde: PM protéina: 50KDa; PM PEG: 5 KDa; No. Subunidades proteína: 2; No. Lisinas: 34.*

En los primeros ensayos de conjugación se llevo a cabo la activación del MeO-PEG-NH_2 (**76**) mediante el método descrito en el apartado 1.3 y elaborando el crudo de reacción usando el primer método, es decir llevando a cabo extracciones acuosas para eliminar el exceso de reactivos. Añadimos diferentes excesos de PEG basándonos en las dos aproximaciones descritas anteriormente, en la tabla 3.5 se encuentran especificados la cantidad añadida en cada una de las pruebas.

Tabla 3.5. *Exceso de PEG añadido en cada ensayo y sus cantidades equivalente en mg de PEG. En todos los casos se parte de 300 µg de α-GAL.*

Método	α-GAL (91)	Exceso de PEG 91	Peso teórico PEG 90 /mg	Nombre
Según la fórmula 1, teniendo en cuenta el PM de la proteína.	300 µg	2	0,06	α-GAL-PEG-Pn2 (**94**)
		5	0,14	α-GAL-PEG-Pn5 (**95**)
		10	0,24	α-GAL-PEG-Pn10 (**96**)
Según la fórmula 2, teniendo en cuenta el número de lisinas.	300 µg	2,3	2,39	α-GAL-PEG-Nn2 (**97**)
		5,8	5,98	α-GAL-PEG-Nn6 (**98**)
		11,7	11,96	α-GAL-PEG-Nn12(**99**)

La proteína α-GAL **91** subministrada por Dr. Corchero se encontraba en una solución tampón de AcOH/AcONa a pH 4,5 a una concentración de 1mg/ml de proteína. Esta proteína fue alicuotada en fracciones de unos 300 µg y conservada a -80°C, de esta manera se evitaba someter a procesos de congelación/descongelación a las fracciones de proteína que no iban a ser usadas de manera inmediata. Los procesos de congelación/descongelación pueden afectar a la estructura terciaria de la proteína teniendo una relación directa a una pérdida de actividad de la misma.

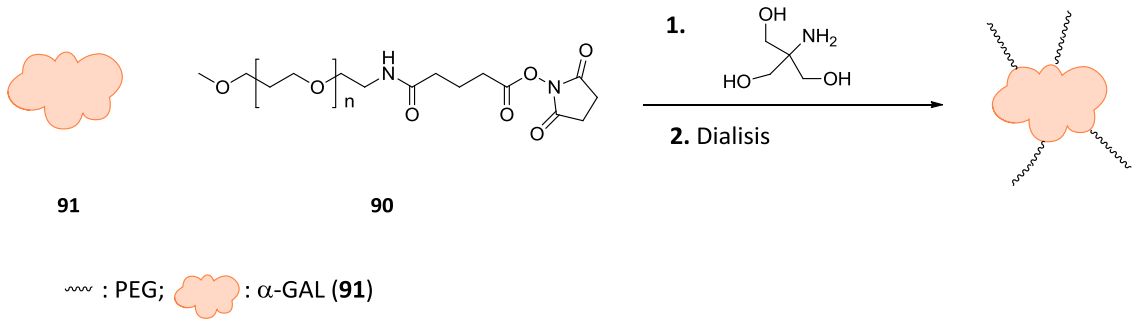


Figura 3.21. *Representación esquemática de la conjugación con MeO-PEG-NHS (**90**) y α-GAL (**91**).*

Se tomaron seis alícuotas de proteína α-GAL (**91**) para realizar los primeros ensayos de conjugación. Esta proteína se encontraba en una solución tamponada de AcOH/AcONa 10mM a pH 4,5, lo que hacía que las aminas ε de las cadenas laterales de los residuos de lisinas de la proteína se encontraban protonadas. Para facilitar la desprotonación de estas aminas se reajustó el pH de la solución a pH 6,5-7. En un primer momento se intentó llevar a cabo este reajuste de pH usando una solución PBS 50mM a pH 7, pero era necesario añadir una gran cantidad de la solución de PBS para alcanzar un pH cercano a 6,5, por lo que finalmente se decidió usar para este propósito una disolución Na_2HPO_4 50mM. Mediante el uso de esta disolución alcanzábamos pH 7 pudiendo mantener la proteína a la concentración pre-establecida (1mg/ml). Sobre esta solución de la proteína con el pH ajustado a 7 se añadieron cantidades determinadas de MeO-PEG-NHS (**90**) (detalladas en la tabla 3.5) disueltas en la mínima cantidad de agua milliQ. En esta primera aproximación se llevó a cabo una incubación de la proteína con el PEG de 1h y posteriormente la reacción se detuvo por la addición de 50 µl de una solución de Tris 40 mM durante 1h más. Inmediatamente después los crudos de reacción fueron dializados durante una noche con una membrana de 20 KDa frente a una solución tampón AcOH/AcONa 10mM a pH 4,5, con el fin de devolver a la proteína al medio original en el que se encontraba. Este cambio de medio, de pH neutro a pH ácido, puede facilitar la eliminación del PEG sobrante, ya que a pH ácido el plegamiento de la estructura terciaria de la proteína a-GAL A se vuelve más abierta debido a la repulsión que se da entre las cargas positivas cercanas en la secuencia proteica, evitando así que el PEG sobrante quede ocluido en el interior de una estructura más plegada.

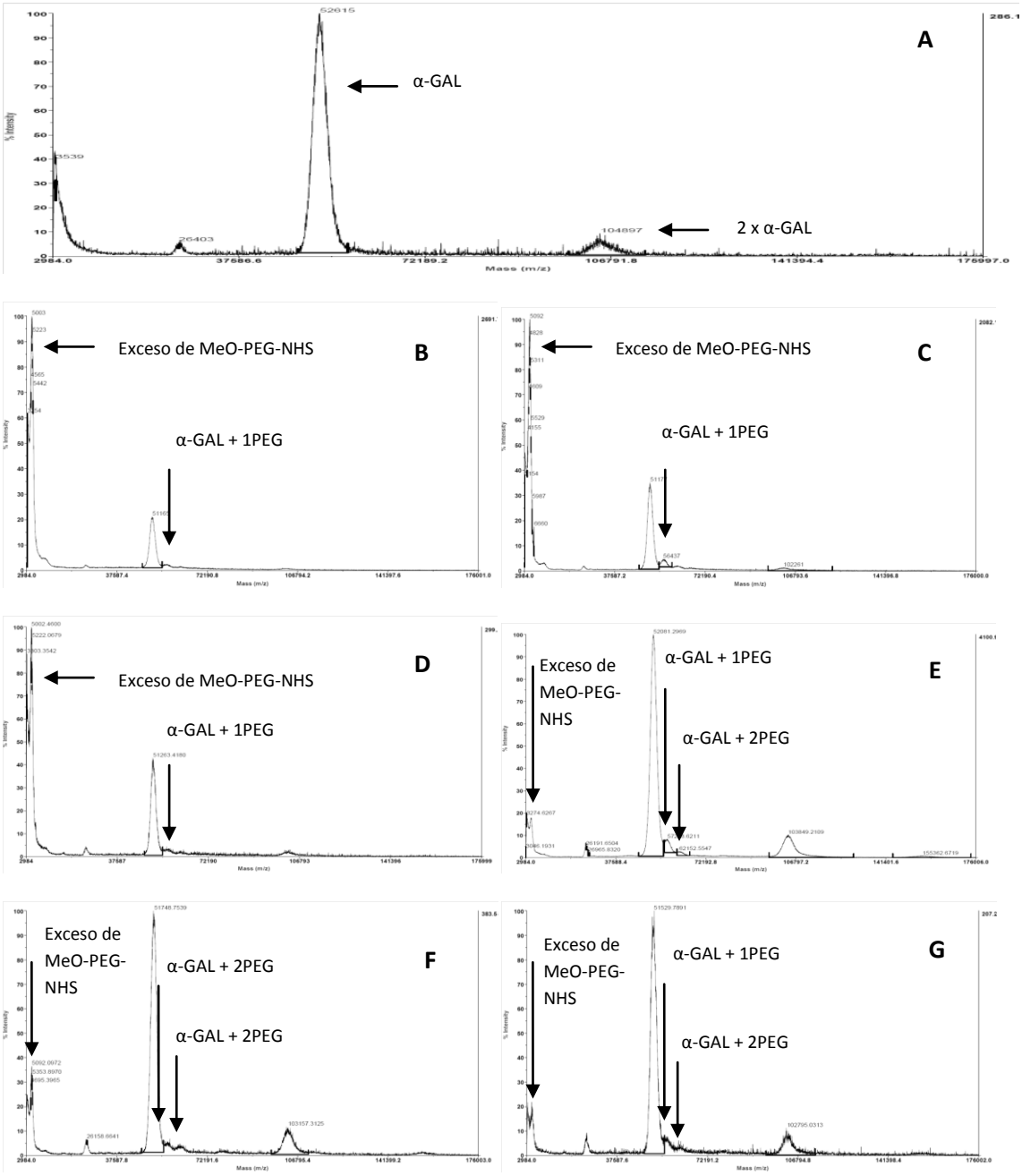


Figura 3.22. *Espectros de MALDI-TOF de la proteína α-GAL y los conjugados MeO-PEG-α-GAL. Donde:* ***A)*** *α-GAL (**91**);* ***B)*** *α-GAL-PEG-Nn2 (**96**);* ***C)*** *α-GAL-PEG-Nn6 (**97**);* ***D)*** *α-GAL-PEG-Nn12 (**98**);* ***E)*** *α-GAL-PEG-Pn2 (**93**);* ***F)*** *α-GAL-PEG-Pn5 (**94**);* ***G)*** *α-GAL-PEG-Pn10 (**95**). En todos los casos se observa una gran cantidad de α-GAL libre que indica una conjugación poco eficiente y una gran cantidad de PEG sobrante que no ha sido eliminado de manera eficiente en el proceso de diálisis de la proteína. Destacar que a pesar de que la conjugación no ha sido muy eficiente son más claramente observables el producto de conjugación correspondientes a la incorporación de dos PEGs en aquellos crudos de reacción donde de se ha trabajado con un exceso menor de PEG (MALDI-TOF* ***E, F*** *y* ***G**).*

Finalizadas las reacciones de la conjugación se realizó el análisis de las muestras mediante MALDI-TOF usando el ácido sinapínico (SA) como matriz (figura 3.22). A pesar del estudio con diferentes excesos de equivalentes de PEG y el gran exceso de PEG (**90**) que no conseguíamos

eliminar en algunas de las condiciones exploradas, en los espectros de MALDI-TOF solo se observa una gran cantidad de proteína α-GAL libre (**91**) y una pequeña cantidad de α-GAL conjugada a una sola cadena de PEG en la mayoría de casos y a dos cadenas de PEG en algunos casos. Estos resultados podían ser debidos a que la conjugación no había tenido lugar correctamente o bien que el método de análisis no fuera completamente adecuado ya que la presencia de PEG en las muestras puede alterar la forma en que estas ionizan, y también se debe tener en cuenta que la conjugación de PEG en una proteína puede alterar su distribución de cargas modificando su patrón de ionización. En todas las muestras se observa un gran exceso de PEG, a pesar de haber realizado un proceso de diálisis con una membrana de diálisis de tamaño de poro suficientemente grande para permitir el paso del PEG. La presencia de este PEG puede ser debida a los excesos de PEG utilizados que pueden llegar a obturar los poros de la membrana haciendo que el proceso de diálisis no sea tan eficiente como cabría esperar.

Con el motivo de estimar la eficiencia de la conjugación mediante otra técnica se llevó a cabo una electroforesis de gel (SDS) de las distintas muestras. Este análisis se realizó con un gel que contenía un 8% de poliacrimilamida, se añadió en cada pocillo 5 µl de cada una de las muestras y finalmente se realizó un revelado con Comassie Blue y posteriormente un teñido con plata para comparar ambos reveladores (figura 3.23). A pesar de que se podían apreciar pequeñas bandas a MW superiores a α-GAL-A en alguna de las muestras, los resultados seguían sin ser concluyentes debido a que no se apreciaba una diferencia de masa molecular suficiente como para determinar el número de PEG que contenía nuestros conjugados.

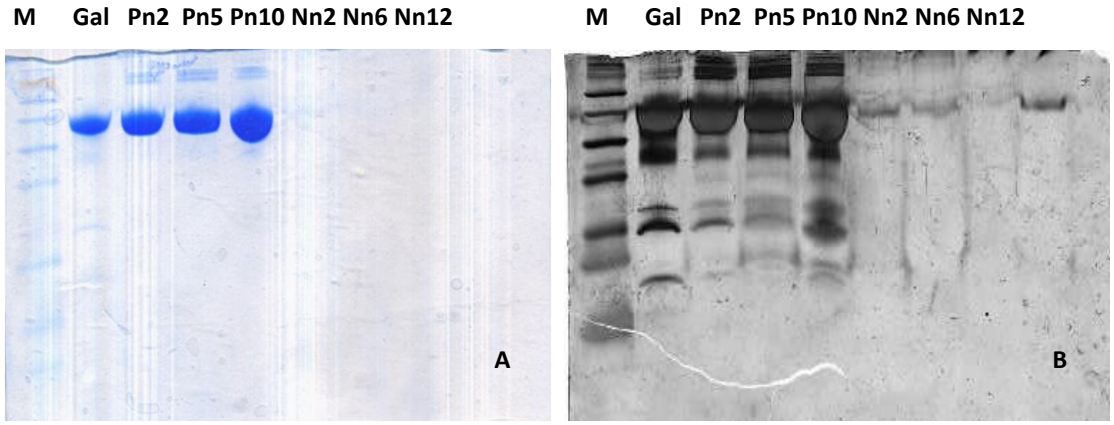


Figura 3.23. *Gel con el 8% de poliacrilamida. En la primera imagen (A) encontramos el gel revelado con ComassieBlue y en la segunda imagen (B) encontramos el revelado con tinción de plata. Las muestras están representadas en la parte superior de cada uno de los geles donde: M: marcador; Gal: α-GAL libre (**91**); Pn2: α-GAL-PEG-Pn2 (**93**); Pn5: α-GAL-PEG-Pn5 (**94**); Pn10: α-GAL-PEG-Pn10 (**95**); Nn2: α-GAL-PEG-Nn2 (**96**); Nn6: α-GAL-PEG-Nn6 (**97**); Nn12: α-GAL-PEG-Nn12 (**98**).*

En estos geles también podemos apreciar que a pesar de haber partido de la misma cantidad de α-GAL inicial, parece que en los conjugados α-GAL-PEG-Nn2 (**96**), α-GAL-PEG-Nn6 (**97**) y α-GAL-PEG-Nn12 (**98**) contienen mucho menos proteína que en los conjugados α-GAL-PEG-Pn2

(**93**), α-GAL-PEG-Pn5 (**94**) y α-GAL-PEG-Pn10 (**95**). Estos resultados fueron confirmados por el grupo de la Dra. Abasolo al realizar una cuantificación de la α-GAL mediante la técnica Western Blot (tabla 3.6). Mediante la cuantificación de la proteína podemos observas que a pesar de seguir el mismo proceso de síntesis y purificación para todos los conjugados, la recuperación de proteína en los diferentes ensayos fue muy diferente. Destacar también que la concentración de α-GAL de la que partíamos también era mucho menor a la esperada.

Tabla 3.6. *Cuantificación de la concentración real de proteína por Western Blot.*

Compuesto	Concentración teórica de la proteína (µg/ml)	Concentración real de la proteína por Western Blot (µg/ml)
α-GAL-PEG-Pn2 (**93**)	120	74
α-GAL-PEG-Pn5 (**94**)	110	49
α-GAL-PEG-Pn10 (**95**)	120	106
α-GAL-PEG-Nn2 (**96**)	210	66
α-GAL-PEG-Nn6 (**97**)	150	53
α-GAL-PEG-Nn12 (**98**)	27	64
α-GAL (**91**)	1000	417

A pesar de la imposibilidad de caracterizar totalmente los conjugados y el bajo porcentaje de conjugación de PEG obtenido, se llevaron a cabo estudios de actividad *in vitro* en colaboración con el Hospital Vall d'Hebrón. Estos estudios serán descritos con más detalle en el punto 1.6 de este capítulo.

Dada la baja proporción de PEG conjugado obtenida con estos ensayos se sopesaron otro tipo de aproximaciones. Así se decidió explorar la conjugación de PEG a la proteína realizando la incorporación del espaciador homobifuncional DSG (**78**) directamente a la proteína, dejando esta activada para la posterior incorporación de las cadenas de PEG. Para ello se siguió un procedimiento similar descrito por Genzyme adaptado a nuestro caso concreto (figura 3.24).[46]

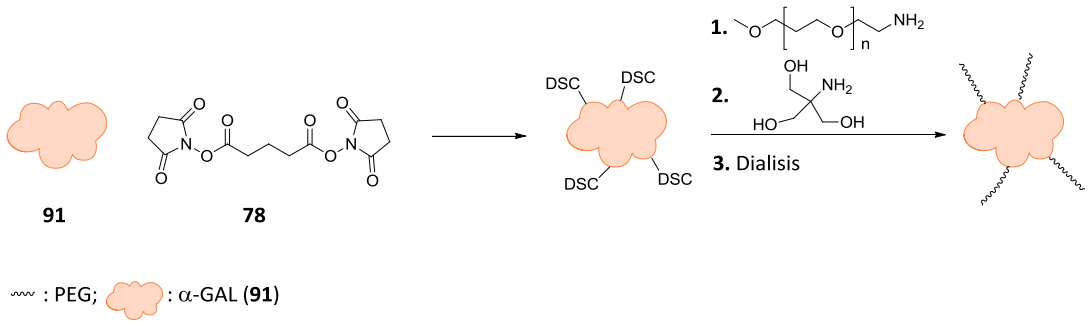


Figura 3.24. *Representación de la activación in situ de la proteína α-GAL (**91**) mediante la incubación con el espaciador homobifuncional DSG (**78**) y su posterior conjugación con MeO-PEG-NH_2 (**76**).*

En este caso se usaron 250 µg teóricos de la proteína α-GAL (**91**) y 100 eq. del espaciador homobifuncional DSG (**78**), calculados usando la fórmula 1 de la figura 3.20, (la misma proporción que utilizan en la referencia 46) con diferentes tiempo de incubación, que se encuentran detallados en la tabla 3.7. En todos los casos realizó un primer ajuste de pH hasta alcanzar un pH 7 con la solución de Na_2HPO_4 50mM, y posteriormente se procedió a la incubación de la proteína con el espaciador homobifuncional DSG (**78**). Pasado el tiempo de

incubación establecido para cada caso, se añadieron 200 eq. de MeO-PEG-NH_2 (**76**) comercial sin ninguna derivatización previa, calculados usando la fórmula 1 de la figura 3.20. Posteriormente todos los crudos correspondientes a las distintas condiciones se les anñadió una cantidad de una solución de Tris 40 mM y se dejaron reaccionar durante 1h.

Paralelamente a estos ensayos se realizó una prueba usando el procedimiento descrito en la figura 3.21, es decir, incubando la proteína con 100 eq. de MeO-PEG-NHS (**90**), calculados usando la fórmula 1 de la figura 3.20, durante 1h (se escogió la proporción de 100 eq. para que el ensayo tuviera coherencia con los equivalentes de DSG (**78**) del nuevo método de conjugación) y su posterior tratamiento con la solución de Tris 40mM (ensayo **E**, tabla 3.7). En este ensayo el MeO-PEG-NHS (**90**) fue elaborado usando el segundo método descrito en el punto 1.3 de este capítulo. La elección de este nuevo método de elaboración fue debida a la sospecha de que el primer método de elaboración, basado en extracciones acuosas como método de eliminar los reactivos en exceso y recuperar el producto MEO-PEG-NHS (**91**) en forma pura, podía provocar la hidrólisis de una parte del éster de hidroxisuccinimida contenido en el extremo ácido del PEG y por tanto dando lugar a una conjugación poco efectiva.

Por último se realizó un ensayo para determinar cómo podían afectar las condiciones de reacción utilizadas a la α-GAL (**91**) libre y a su detección mediante MALDI-TOF. La proteína fue sometida a las mismas condiciones de reacción (sin añadir PEG ni espaciador homobifuncional DSG), solo añadiéndole la solución de Tris 40 mM.

Tabla 3.7. *Tabla en la que se encuentran representados las cantidades empleadas en cada ensayo y los tiempos de incubación. El OMe-PEG-NHS fue pesado y disuelto en 300 µl de agua milliQ justo antes de adicionarlo.*

Ensayo	DSG (78)		OMe-PEG-NH_2 (76)		OMe-PEG-NHS (90)		Tris 40 mM	
	µl *	t (h)	µl **	t (h)	µg	t (h)	µl	t (h)
A	---	---	---	---	---	---	50	1
B	100	1	300	1	---	---	50	1
C	100	1	300	2	---	---	50	1
D	100	2	300	2	---	---	50	1
E	---	---	---	---	2,5	1	50	1

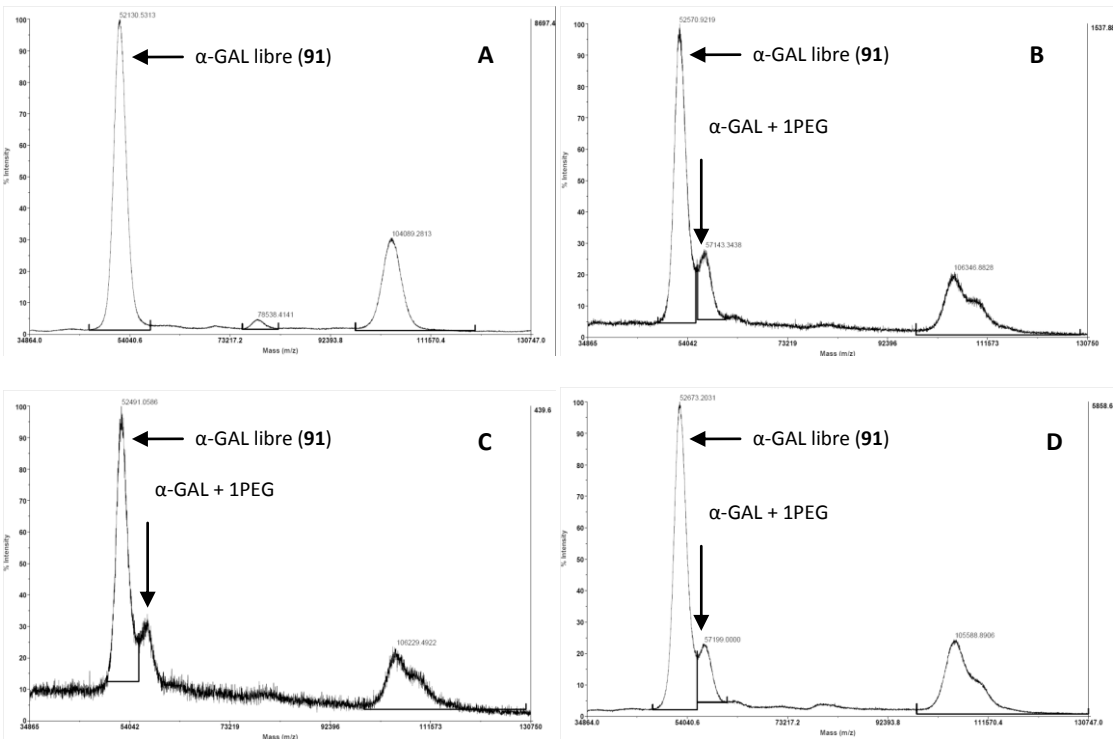
*Como las cantidades a pesar eran muy pequeñas se realizaron soluciones madres de DSG (**78**) y OMe-PEG-NH_2 (**76**). *Solución de DSG (**78**): 1 mg/ml; **Solución de OMe-PEG-NH_2 (**76**): 10 mg/ml.*

Debido a que en ensayos anteriores se había visto que la diálisis durante una noche no conseguía eliminar el exceso de PEG de las muestras, en todos los casos de este ensayo se realizo un proceso de diálisis más largo, de tres días, para comprobar si al aumentar el tiempo de diálisis el PEG no conjugado que aún se encontraba en el crudo de reacción era totalmente eliminado.

Se analizaron los crudos finales de los distintos ensayos mediante MALDI-TOF, usando SA como matriz (figura 3.25). El espectro MALDI-TOF de la proteína libre demostró que esta no había sufrido ningún cambio, aunque no teníamos constancia de si su actividad se veía afectada por

la condiciones de reacción. Por otro lado comprobamos que el nuevo método consistente en incubar el espaciador homobifuncional **78** con la proteína para posteriormente realizar la conjugación con el PEG no ofrecía mayores ratios de incorporación del PEG **76**, pues en todos los casos ensayados y a pesar de la variación en los tiempos de incubación, solo se apreció la conjugación de una única unidad de MeO-PEG-NH_2 (**76**) y la mayoría de la proteína α-GAL (**91**) no había incorporado ninguna cadena de MeO-PEG-NH_2 (**76**). En cambio, en el ensayo **E**, el que se realizó la conjugación usando MeO-PEG-NHS (**90**), aislado mediante precipitación sin usar procesos de extracción en medio acuoso, conseguimos observar un ratio de incorporación de PEG mucho mayor y una disminución significativa de la proteína libre. En este se puede observar que se ha incorporado mayoritariamente una cadena de MeO-PEG-NHS (**90**), pero también se observan con claridad las masas correspondientes a los conjugados derivados de la incorporación de 2 y 3 cadenas de MeO-PEG-NHS (**90**). Estos ratios de PEG son similares a los obtenidos por Genzyme, que detectan una incorporación de 2-3 unidades de PEG por cada unidad de α-GAL A.[46]

Estos resultados demuestran que la hidrólisis prematura del éster activo de N-hidroxisuccinimida que contiene el MeO-PEG-NHS (**90**) debida al primer método de elaboración fue la causante de la baja conjugación mostrada en los primeros ensayos (figura 3.22). Probablemente la baja conjugación obtenida con el nuevo método de conjugación ensayado es producto del mismo efecto de hidrólisis del éster de N-(hidroxisuccinmida) al permanecer este durante varias horas en solución acuosa.



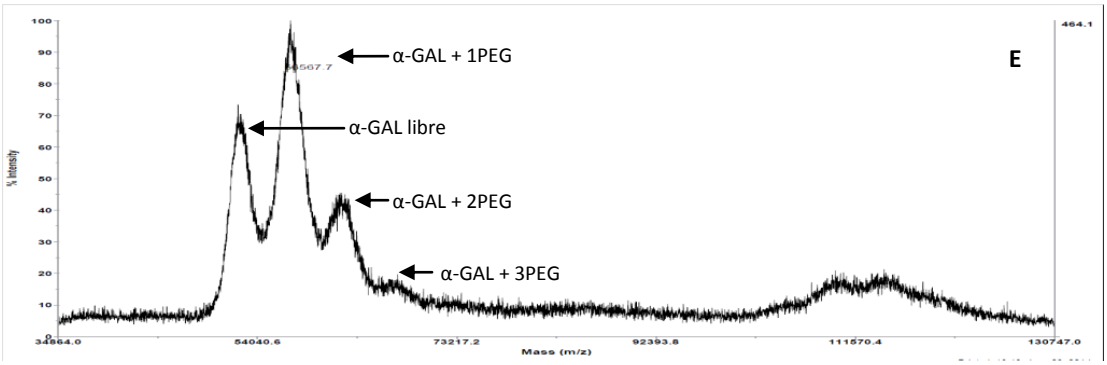
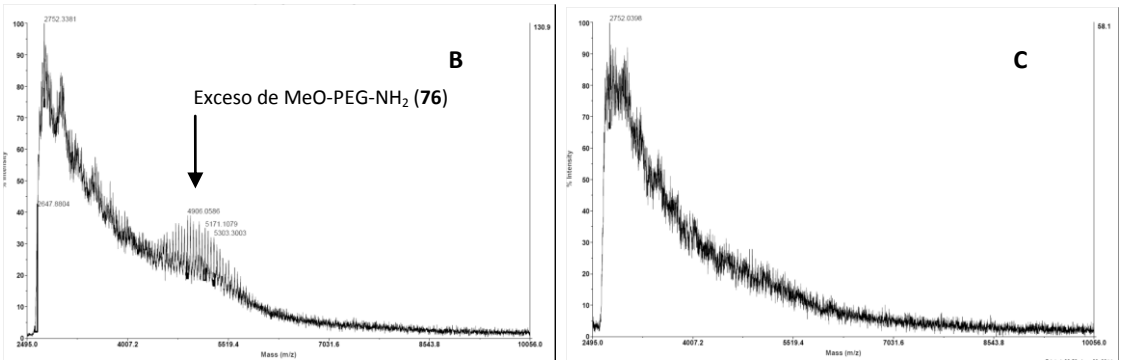


Figura 3.25. *Espectros de MALFI-TOF de los nanoconjugados obtenidos en los ensayos **A**-**E**. En el espectro **A**, que corresponde a la proteína α-GAL libre* (**91**)*, no se aprecia ninguna diferencia significativa respecto al espectro **A** de la figura 3.22 que corresponde a la proteína sin haber estado sometida a ningún tratamiento. Los espectros **B**-**D** corresponden a los ensayos de incorporación in situ del espaciador homobifuncional DSG sobre la proteína, en los cuales se aprecia únicamente la incorporación de una cadena de MeO-PEG-NH_2 (**76**). En cambio en el espectro **E**, correspondiente a la incubación de la proteína y MeO-PEG-NHS (**90**) durante 1h, este último elaborado mediante un proceso de precipitación en TBME, presenta productos de la incorporación mayoritaria de una cadena de PEG, de dos cadenas de PEG e incluso un pico minoritario cuya masa se correspondía a la incorporación de tres cadenas de PEG.*

Por último, se realizaron análisis mediante MALDI-TOF en un rango de masas de 2500-10000 unidades para determinar si se había eliminado completamente el exceso de los derivados de PEG añadidos, en el caso de las pruebas de B-D se trataba del derivado de PEG MeO-PEG-NH_2 (**76**) y del derivado de PEG MeO-PEG-NHS (**90**) en el caso de **E**. En los casos **C** y **E** se observó la desaparición total del PEG en exceso, y en los casos **B** y **D** se observó que aún restaba en el medio una pequeña cantidad de PEG. Con este último análisis determinamos que alargar el tiempo de diálisis de los conjugados permitía una eliminación efectiva del exceso de PEG necesario para llevar a cabo la conjugación (figura 3.26).



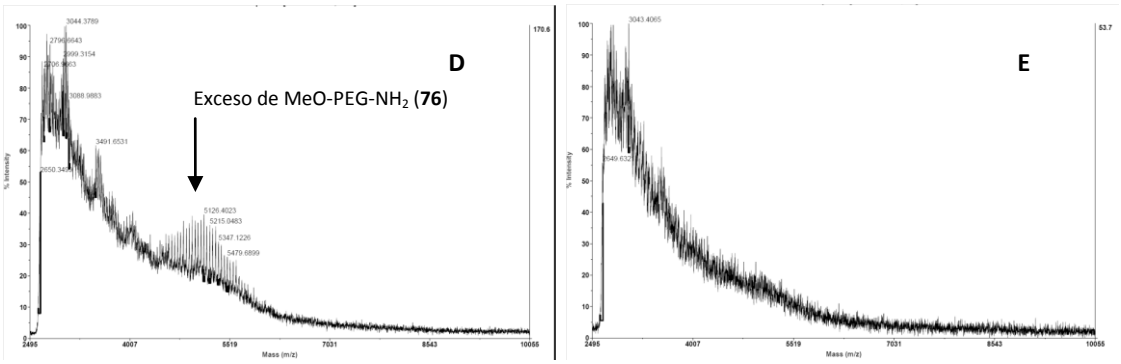


Figura 3.25. *Espectro de MALFI-TOF de las pruebas **B**-**E** en el rango de masas de 2500-10000. Solo se observa exceso de OMe-PEG-NH_2 (**76**) en los casos **B** y **D**.*

Después de estos prometedores resultados, se decidió evaluar el efecto de aumentar el tiempo de incubación y los equivalentes de MeO-PEG-NHS (**90**). El procedo de incubación se llevó a cabo siguiendo el realizado en el ensayo **E**, con el que habíamos obtenido los mejores resultados, y usando el mismo lote de MeO-PEG-NHS (**90**) utilizado en este ensayo (tabla 3.7). Las cantidades empleadas se encuentran detalladas en la tabla3.8. En los dos ensayos se emplearon 250 µg de proteína α-GAL teóricos.

Tabla 3.8. *Cantidades detalladas del MeO-PEG-NHS (**90**) empleado en los dos nuevos ensayos, en ambos casos se partió de 250 µg de proteína α-GAL (**91**) teóricos.*

Ensayo	OMe-PEG-NHS (90)		Tris 40 mM	
	µg	t (h)	µl	t (h)
F	2,3	2	50	1
G	5,2	2	50	1

A pesar de aumentar el tiempo de incubación del proceso de conjugación a dos horas y en el ensayo **G** doblar la cantidad de equivalentes de MeO-PEG-NHS (**90**) obtuvimos una conjugación inferior a la del primer caso, ya que en los dos casos el producto mayoritario no era el derivado α-GAL-1PEG, sino que este se encontraba en una proporción similar a la de la proteína libre. A pesar de esto, en ambos ensayos se observa el producto de la conjugación de dos y tres PEGs (figura 3.26). Atribuimos estos nuevos resultados a la hidrólisis prematura del éster de N-(hidroxisuccinimida) debido al tiempo que este llevaba sintetizado, por lo que en posteriores ensayos el espaciador homobifuncional DSG (**78**) era introducido en la cadena de PEG e inmediatamente después se realizaba la conjugación a la proteína. A pesar del problema de hidrólisis que pudiese tener el producto MeO-PEG-NHS (**90**) no se observan grandes diferencias al doblar la cantidad de PEG añadida a la proteína α-GAL (**91**).

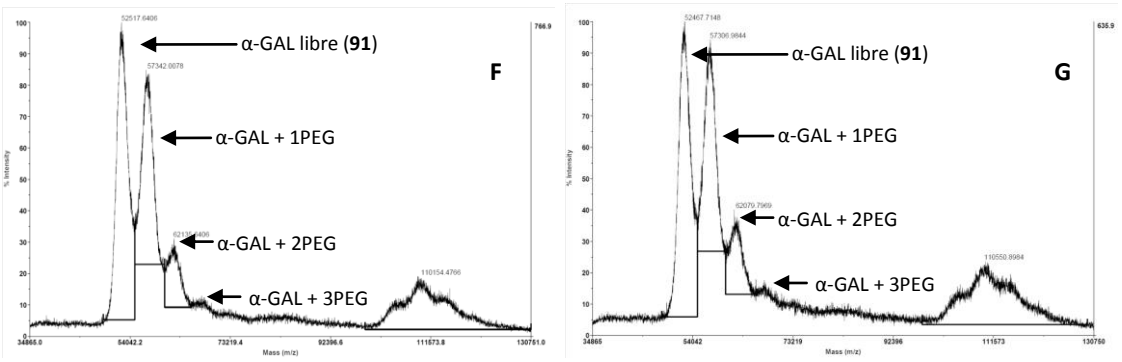


Figura 3.26. *Espectros MALDI-TOF de los conjugados obtenidos en los ensayos **F** y **G** (tabla 3.8).*

Tras la realización de todos estos ensayos se puedo establecer que las mejores condiciones para realizar la conjugación de las cadenas de PEG con la proteína α-GAL son: 100 eq de R-PEG-NHS incubados durante 1h con la proteína α-GAL a pH 7, seguidos del tratamiento de 1h con una solución de Tris 40 mM, y finalmente dializados durante 3 días con una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 20 KDa.

1.4.2 Conjugación de OMe-PEG-NHS (90), RGD-PEG-NHS (99), P25-PEG-NHS (100) Y P87-PEG-NHS (101) a la proteína α-GAL (91) y Replagal (92).

Como ya se ha mencionado anteriormente la actividad mostrada por α-GAL (**91**), enzima recombinante expresada por el Dr. J.L. Corchero, era menor a la mostrada por la enzima comercial Replagal (**92**) (tabla 3.9). Debido a este motivo se decidieron realizar los conjugados finales (aquellos que iban a someterse a pruebas de actividad *in vitro* en tubo de ensayo y células de cultivo primario) con α-GAL (**91**) y Replagal (**92**) con tal de evaluar la actividad de los conjugados de ambas proteínas.

Tabla 3.9. *Tabla en la que se encuentra expresada la actividad enzimática específica de las proteínas α-GAL (**91**) y Replagal (**92**). Tabla adaptada de la referencia 53.*

	Vector usado para la expresión α-GAL (91)		
	pReceiver-M10	POpinE-GLA	Replagal (**92**)
Actividad enzimática específica [µmol/(h mg)]	1,770±225	1,947±259	3,900

En el caso de los conjugados péptido-PEG-NHS se contaba con una cantidad muy limitada de alguno de los péptidos a conjugar por lo que se decidió realizar su conjugación únicamente con la proteína Replagal (**92**). Los conjugados que se obtendrían son los representados en la figura 3.27.

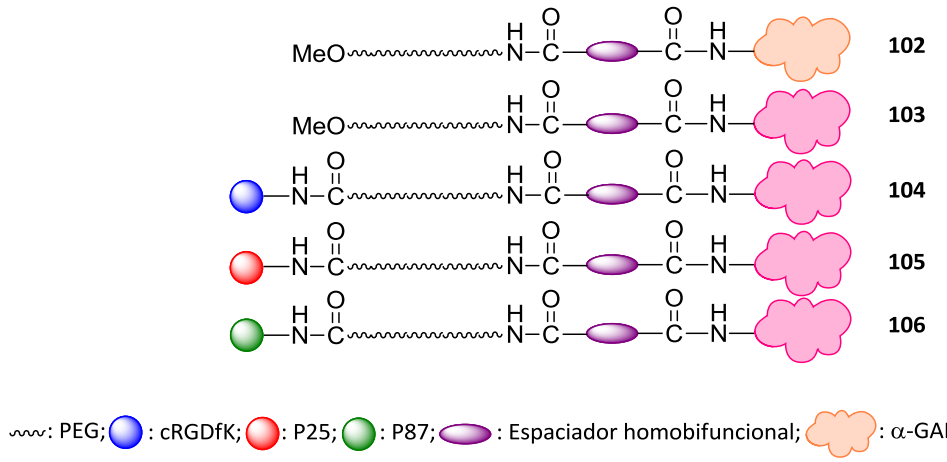


Figura 3.27. *Representación esquemática de los conjugados finales.*

EL proceso de conjugación final para la obtención de los nanoconjugados se realizó en todos los casos con 100 eq. de R-PEG-NHS, siendo estos utilizados inmediatamente después de ser sintetizados para evitar la posible hidrólisis prematura del éster de N-(hidroxisuccinimida) contenido en el extremo ácido de estos PEGs, con el fin de evitara una conjugación poco eficiente. En la obtención de todos los nanoconjugados se utilizaron 250 µl de proteína de partida, la concentración de los cuales era de 0.92 mg/ml para α-GAL (**91**, cuantificados por Western Blot) y de 1 mg/ml para Replagal (**92**). Se decidió someter a cada una de las proteínas empleadas (α-GAL **91** y Replagal **92**) a las mismas condiciones del proceso de conjugación, incluido el proceso de diálisis, con el fin de determinar posteriormente su actividad y compararla con la actividad de la proteína sin haber sufrido todo el proceso. La diálisis final en todos los nanoconjugados se realizó con una membrana de 200 KDa, como en los casos anteriores, contra una solución tampón de AcONa 0,01M a pH 6. A pesar de que la proteína Replagal (**92**) se subministraba en una solución tamponada de PBS a pH 6 se substituyó el tampón PBS por AcONa porque el análisis final medante MALDI-TOF de los nanoconjugados dializados con el tampón de PBS presentaba dificultades ya que las sales de este saturaban por completo el espectro de MALDI-TOF.

Una variante entre los distintos nanoconjugados fue el tiempo de incubación (tabla 3.10). En el caso de las conjugaciones llevadas a cabo con MeO-PEG-NHS (**90**) se emplearon dos horas para la conjugación del mismo con ambas proteínas, en cambio en el caso de Péptido-PEG-NHS la conjugación fue controlada a diferentes tiempos de reacción para establecer el tiempo de conjugación óptimo. En la tabla 3.10 se encuentran descritos los tiempos finales de conjugación óptimos hallados en cada caso.

Tabla 3.10. *Condiciones y cantidades usadas en los conjugados finales de MeO-PEG-α-GAL (**102**), MeO-PEG-Replagal (**103**), RGD-PEG-Replagal (**104**), P25-PEG-Replagal (**105**) y P87-PEG-Replagal (**106**). También se especifican las condiciones a las que se sometieron las proteínas libres con el fin de evaluar si su actividad sufre algún cambio como consecuencia de las mismas.*

Conjugado	R-PEG-NHS			Tris 40 mM	
	R	mg	t (h)	µl	t (h)
α-GAL (**91**)	---	---	---	50	1
MeO-PEG-α-GAL (**102**)	MeO	2,6	2	50	1
Replagal (**92**)	---	---	---	50	1
MeO-PEG-Replagal (**103**)	MeO	2,9	2	50	1
RGD-PEG-Replagal (**104**)	cRGDfK	3,1	24	50	1
P25-PEG-Replagal (**105**)	P25	3,1	24	50	1
P87-PEG-Replagal (**106**)	P87	2,8	3,5	50	1

En todos los casos se emplearon 250 µl de proteína, la concentración de α-GAL (91**) era de 0,92 mg/ml (cuantificados por Western Blot) y en el caso de Replagal (**92**) de 1 mg/ml.*

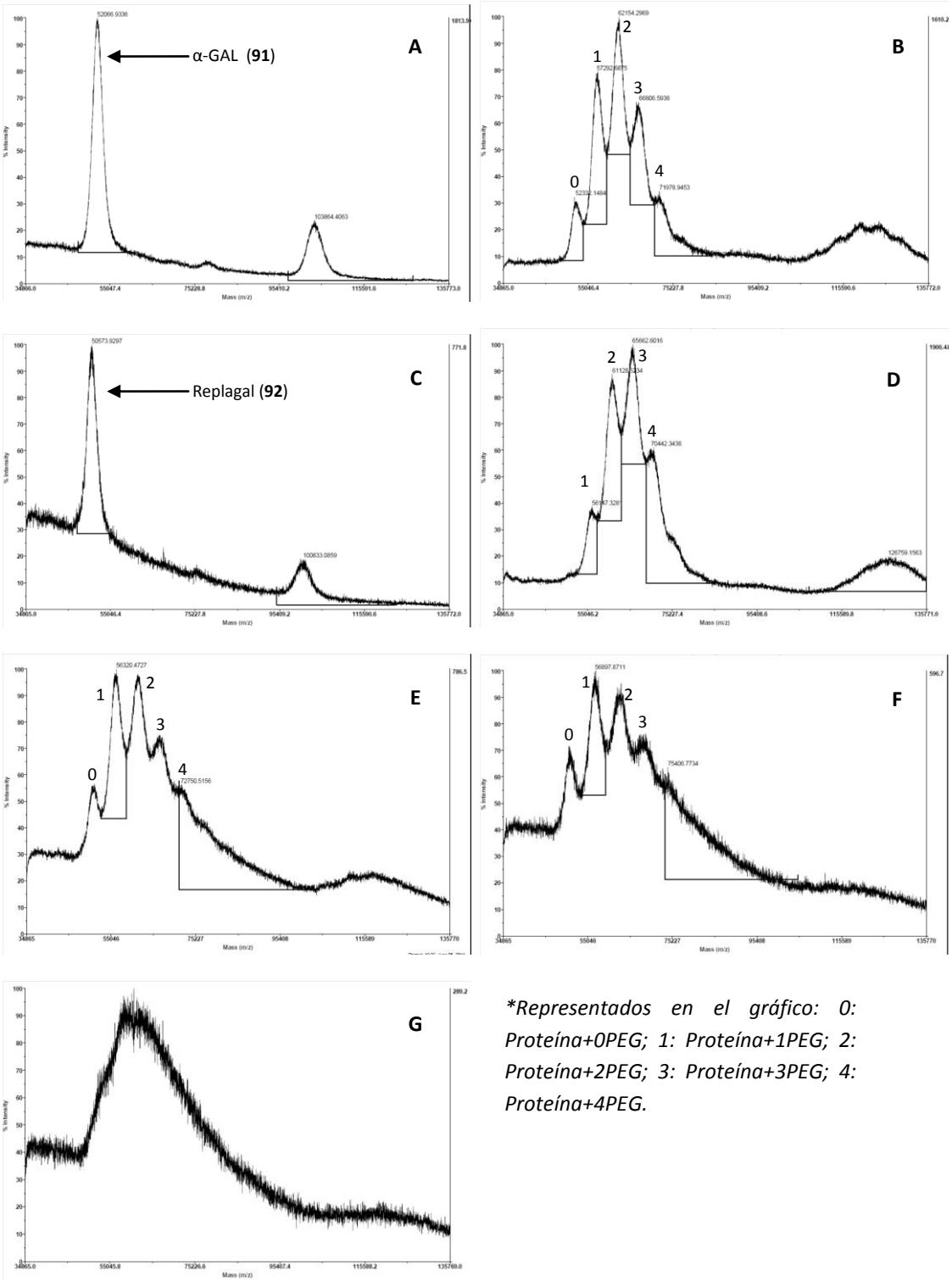
En el caso de los conjugados con MeO-PEG-NHS (**90**) podemos comparar la conjugación con las dos proteínas de origen distinto bajo las mismas condiciones de reacción (figura 3.28). El análisis por MALDI-TOF determinó que en el conjugado MeO-PEG-α-GAL (**102**) se observaba el conjugado α-GAL+2PEG (masa≈62000) como producto mayoritario y la proteína libre aparecía de manera muy minoritaria. En cambio en el caso de Replagal la conjugación (conjugado **103**) parecía que había sido más efectiva, ya que la proteína libre Replagal (**92**) había desaparecido prácticamente en su totalidad y el conjugado Replagal+3PEG era el mayoritario (masa≈65000).

La conjugación de RGD-PEG-NHS (**99**) a Replagal fue detenida a las 24h después de no observar que aumentase el grado de conjugación respecto a las 4h de conjugación. Esta conjugación (conjugado **104**) dio como productos mayoritarios los conjugados Replagal+1PEG y Replagal+2PEGs, y se podía observar claramente la proteína Replagal libre, pero como especie muy minoritaria. También es posible observar claramente las masas de los productos correspondientes a Replagal+3PEGs y Replagal+4PEGs (figura 3.28, espectro **E**).

La conjugación de P25-PEG-NHS (**100**) a Replagal se analizó a las 2,5h, 3,5h, 5h y 24h. Los análisis llevados entre las 5h y las 24h no mostraban ningún incremento significativo de las especies con distinto ratio de cadenas de PEG. Este conjugado muestra un patrón muy similar al conjugado RGD-PEG-Replagal (**104**). En ambos casos los productos mayoritarios corresponden a Replagal+1PEG y Replagal+2PEGs, y una cantidad minoritaria, pero claramente apreciable, de Replagal libre (figura 3.28, espectro **F**).

Para la obtención del conjugado P87-PEG-Replagal (**106**) se realizó una incubación durante 3,5h, realizando un análisis previó a las 2,5h. En este caso fue imposible identificar ningún tipo de conjugado, debido a que después de la conjugación el MALDI-TOF tan solo mostraba una banda ancha de 48000-75000 unidades de masa aproximadamente. La aparición de esta banda, que también se observa en el producto analizado después de las diálisis que eliminaría todo el P87-PEG no conjugado a la proteína, nos indica que la proteína ha sufrido algún cambio, por lo que podemos decir que la conjugación se ha realizado. Asociamos este espectro

de masas tan poco definido como un efecto del gran número de grupos guanidinio que contiene el péptido P87 (**81**) (figura 3.11, **c**).



**Representados en el gráfico: 0: Proteína+0PEG; 1: Proteína+1PEG; 2: Proteína+2PEG; 3: Proteína+3PEG; 4: Proteína+4PEG.*

Figura 3.28. *Espectros de MALDI-TOF de los conjugados y las proteínas libres. Dónde **A**: α-GAL libre (**91**); **B**: Meo-PEG-α-GAL (**102**); **C**: Replagal libre (**92**); **D**: MeO-PEG-Replagal (**103**); **E**: RGD-PEG-Replagal (**104**); **F**: P25-PEG-Replagal (**105**); **G**: P87-PEG-Replagal (**106**). En los espectros **B, D**-**G** se pueden apreciar conjugados de 0-4 PEGs.*

Finalmente tras el proceso de diálisis se obtuvieron los conjugados a la concentración teórica detallada en la tabla 3.11 y se procedió a su caracterización mediante electroforesis de gel (figura 3.29). Lo primero que podemos destacar en el gel de electroforesis de la figura 3.29 es la disminución significativa de la proteína libre, e incluso la desaparición de esta en el caso del conjugado **102** (línea **3**, figura 3.29), consecuentes con las especies detectadas mediante MALDI-TOF, en las que la proteína libre era minoritaria en todos los casos. En todos los casos se observan especies con un peso molecular superior al de la proteína libre.

Tabla 3.11. *Detalle de los nanoconjugados y proteína libre obtenidos tras la diálisis.*

	Conjugado o Proteína libre	n PEGs	µg teóricos	µl tras la diálisis	Concentración teórica mg/ml
1	α-GAL (**91**)	0	230	600	0,38
2	Replagal (**92**)	0	250	600	0,41
3	MeO-PEG-α-GAL (**102**)	0, 1, 2, 3 ,4	230	1000	0,23
4	MeO-PEG-Replagal (**103**)	1, 2, 3, 4	250	1000	0,25
5	RGD-PEG-Replagal (**104**)	0,1,2,3,4	250	800	0,31
6	P25-PEG-Replagal (**105**)	0,1,2,3	250	1000	0,25
7	P87-PEG-Replagal (**106**)	ND	250	1000	0,25

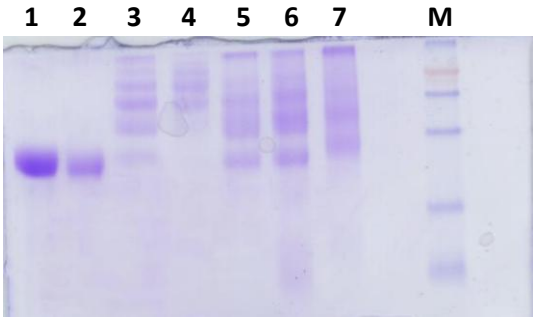


Figura 3.29. *Gel de electroforesis con el 8% de poliacrilamida. Donde:* ***1****: α-GAL (****91****);* ***2****: Replagal (****92****);* ***3****: MeO-PEG- α-GAL (****102****);* ***4****: MeO-PEG-Replagal (****103****);* ***5****: RGD-PEG-Replagal (****104****);* ***6****: P25-PEG-Replagal (****105****);* ***7****: P87-PEG-Replagal (****106****) y* ***M****: marcador.*

1.5 Unión del fluoróforo Atto 633 a los conjugados R-PEG-Proteína

Además de evaluar la actividad enzimática de los nanoconjugados *in vitro* en tubo de ensayo y en células, también se pretendía determinar mediante el efecto en la internalización y la acumulación subcelular del péptido director en los nanoconjugados desarrollados mediante un estudio con microscopia confocal. Así, se pretendia determinar si los nanoconjugados que contienen un péptido director tienen una mayor capacidad de internalización en células que la proteína libre y los nanoconjugados PEGilados que no contengan un péptido director. Con este fin se decidió sintetizar nanoconjugados análogos a los descritos en el apartado 1.4.2. que incorporaran un fluoróforo en su estructura. El fluoróforo elegido fue el Atto 633 debido a los filtros disponibles de los instrumentos con los que se iban a realizar los ensayos y que el espectro de absorción-emisión de éste no presentaba ninguna incompatibilidad con el espectro de absorción-emisión de Lyso Tracker Red DND-99, usado para la tinción de los

lisosomas (figura 3.30) con lo que podía ser utilizado para realizar experimentos de colocalización.

Se optó por incorporar el fluoróforo directamente a la proteína de los nanoconjugados a través de grupos funcionales presentes en la misma y se decidió realizar su incorporación un vez realizada la PEGilación de las proteínas. De esta manera la presencia del fluoróforo no modificaba el patrón de incorporación de los derivados PEG a la proteína, ya que su incorporación se realizaba posteriormente.

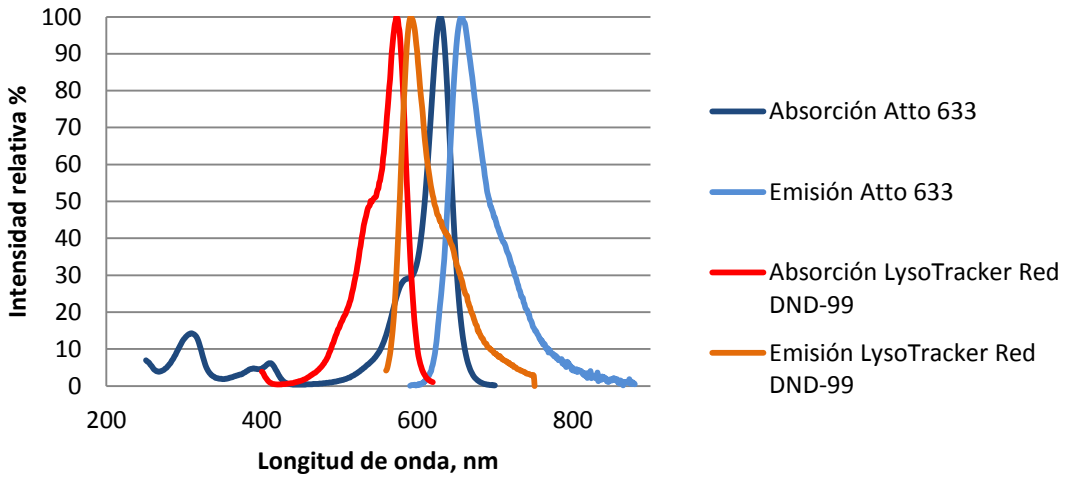


Figura 3.30. *Espectros de emisión y absorción de los dos fluoróforos: Lyso Tracker Red DND-99 y Atto 633 en los que se puede ver que no hay interacción entre los máximos de ambos fluoróforos. El gráfico se ha realizado a partir de los datos subministrados por los proveedores: Invitrogen para LysoTracker Red DND-99 y Atto-tech para Atto 633.*

Un punto importante a considerar es el tipo de química a realizar para la incorporación del fluoróforo Atto 633, es decir a través de un grupo funcional presente en la proteína se pensaba realizar la conjugación del mismo. En un primer momento sopesamos el uso del Atto 633 derivado como éster de N-(hidroxisuccinimida), por lo tanto el acoplamiento a los nanoconjugados se realizaría a través de las aminas libres contenidas en la proteína. Esta estrategia fue descartada ya que suponíamos que la proporción de fluoróforo acoplado presentaría una gran variación de la proteína libre a los nanoconjugados, ya que una parte de las aminas accesibles contenidas en los nanoconjugados habían reaccionado con las cadenas de PEG formando enlaces amida y por tanto no presentarían reactividad ninguna. Finalmente se optó por realizar la conjugación del fluoróforo a través de los grupos tiol (-SH) libres contenidos en la proteína (figura 3.31). Para ello se utilizó un derivado maleimido de Atto 633.

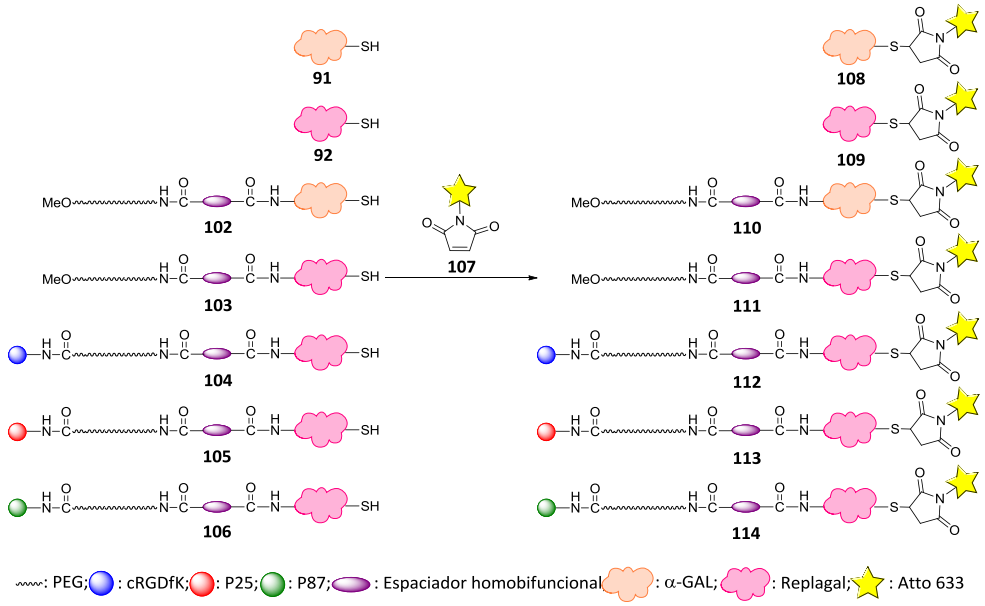


Figura 3.31. *Representación esquemática de la conugación de Atto 633-maleimido a los nanoconjugados.*

En la mayoría de casos cuando se quiere realizar una conjugación sobre los grupos tiol contenidos en una proteína se realiza un tratameinto previo reductor, usando por ejemplo el reactivo de Cleland (ditiotreitol, DTT), con el fin de reducir a grupos tiol libres a aquellos tioles que se encuentren en forma de puentes disulfuro. Como queríamos llevar a cabo ensayos de internalización con estas proteínas y evitar cambios importantes en su estructura terciaria decidimos llevar a cabo la conjugación de Atto 633-maleimido (**107**) sin realizar ningún tratamiento reductor previo. De esta manera tan solo actuaríamos sobre aquellos tioles que se encontrarán en forma reducida en la estructura nativa de la proteína y sin provocar cambios estructurales debidos a la reducción de puentes disulfuros. Para llevar a cabo la conjugación se tomó aproximadamente la mitad de cada uno de los nanoconjugados descritos en el apartado 1.4.2, es decir, se partió de unos 115 µg teóricos aquellos conjugados de α-GAL y de 125 µg teóricos para los conjugados de Replagal. El pH de todos los nanoconjugados se ajustó a 7,5 mediante la adición de una solución de Na_2HPO_4 50 mM. Una vez ajustado el pH, se añadieron a las mezclas de reacción aproximadamente 50 eq. de Atto 633-maleimido (**107**) tornándose la solución de color azul intenso y se dejó reaccionar durante dos horas protegida de la luz. Transcurrido este tiempo se procedió a la eliminación del exceso de Atto 633-maleimido (**107**) que no había reaccionado. Inicialmente se intentó realizar una diálisis, método que fue rápidamente descartado ya que después de un día de diálisis se podía apreciar claramente como la membrana se había tornado de color azul. Esto era debido a que el fluoróforo se quedaba ocluido en el poro de la membrana haciendo este procedimiento muy poco eficaz. Por ello se decidió realizar una separación mediante cromatografía de eaxclusión por tamaño usando las columnas Sephadex G-25 pre-empaquetadas (PD10), usadas ya en el punto 1.2, eluyendo con una solución tamponada de AcONa 0,01M pH 6. Este método dio como resultado la eliminación del Atto 633-maleimido (**107**) sobrante y la recuperación de los

conjugados Proteína-Atto 633 en todos los casos. Para determinar cual eran las fracciones que contenían los conjugados Proteína-Atto 633 se analizaron las mismas mediante espectometría ultravioleta (Nanodrop) y se escogieron aquellas fracciones que presentaban absorción a 280 nm (absorvancia característica de las proteínas) y a 633 nm (absorvancia característica de Atto 633). A pesar de que era posible la detección por UV, en la mayoría de los casos la absorvancia era tan baja que su medida tan solo fue fiable a nivel cualitativo, pero fue imposible cuantificar la cantidad de Atto 633 contenido en los nanoconjugados. Tampoco se pudieron caracterizar los conjugados a nivel MALDI-TOF ya que la presencia del floróforo hacia que los nanoconjudos no se ionizaran en las condiciones ensayadas.

Tabla 3.12. *Detalle de las cantidades de proteína y fluoróforo empleados y la concentración teórica final de proteína obtenida.*

Nanoconjugado	µg teóricos de proteína	µg de Atto 633-maleimido (107)*	Concentración teórica (mg/ml)
α-GAL-Atto 633 (**108**)	115	96	0,115
Replagal-Atto 633 (**109**)	125	96	0,125
MeO-PEG-α-GAL-Atto 633 (**110**)	115	96	0,076
MeO-PEG-Replagal-Atto 633 (**111**)	125	96	0,125
RGD-PEG-Replagal-Atto-633 (**112**)	125	96	0,125
P25-PEG-Replagal-Atto 633 (**113**)	125	96	0,125
P87-PEG-Replagal-Atto 633 (**114**)	125	96	0,125

** 1mg de Atto 633-maleimido (**107**) fue disuelto en 250 µl de DMSO anhidro (4mg/ml de Atto 633-maleimido), para cada muestra se emplearon 24 µl de esta solución madre.*

1.6 Evaluación de la actividad in vitro en tubo de ensayo y en células de cultivo primario de los conjugados

Una vez obtenidos los nanoconjugados se procedió a determinar su actividad *in vitro* en tubo de ensayo y en células de cultivo primario. En los ensayos *in vitro* en tubo de ensayo se determinará la capacidad hidrolítica de los enlaces α-galactosídicos por parte de los conjugados. En este caso los conjugados serán incubados con un sustrato propio de la α-Gal A, el cual al ser hidrolizado su enlace α-galactosídico liberará un fluróforo, la cuantificación de este último nos proporcionará la actividad enzimática de cada uno de los conjugados. En cambio en los ensayos de actividad in vitro realizados con células de cultivo primario se evaluará la disminución de los depósitos de Gb3 presentes en las células.

Primeramente se evaluaron los primeros nanoconjugados sintetizados (presentados en el apartado 1.4.1 del presente capítulo). Después de determinar la concentración de proteína real de los conjugados, fue determinada su actividad *in vitro* en tubo de ensayo (ver materiales y métodos). Los resultados se presentan en la tabla 3.13.

Tabla 3.13 *Actividad enzimática de los primeros nanoconjugados sintetizados.*

Compuesto	Concentración real de la proteína por Western Blot (µg/ml)	Actividad enzimática (µmol/h/mg)	Actividad enzimática (U/ml)
α-GAL-PEG-Pn2 (**93**)	74	391	0,482
α-GAL-PEG-Pn5 (**94**)	49	280	0,229
α-GAL-PEG-Pn10 (**95**)	106	543	0,956
α-GAL-PEG-Nn2 (**96**)	66	429	0,473
α-GAL-PEG-Nn6 (**97**)	53	244	0,217
α-GAL-PEG-Nn12 (**98**)	64	316	0,34
α-GAL (**91**)	417	1761	12,23

Todos estos nanoconjugados (**91**, **93**-**98**) mostraron una gran pérdida de actividad en comparación a la proteína libre. Este hecho puede estar asociado a que estos primeros conjugados se obtuvieron con un método de conjugación y una purificación posterior muy poco optimizada, y por lo tanto no pueden ser considerados como resultados significativos. También se realizaron los ensayos para la determinación de la actividad *in vitro* en células de cultivo primario. En estos ensayos, más costosos por la necesidad de cultivar tipo MAEC del conjugado α-GAL-PEG-Pn10 (**95)**, que era el que había mostrado una actividad más prometedora. También se evaluó la actividad en células del producto comercial Replagal (**92**) y α-GAL (**91**) libre para comparar los resultados con el nanoconjugado α-GAL-PEG-Pn10 (**95**) (figura 3.32 y tabla 3.13).

Estos ensayos demostrarón que la peguilación de la α-GAL (**91**) reduce la actividad enzimática (medida *in vitro*) aproximadamente 3 veces, siendo 1761 µmol/h/mg para la α-GAL (**91**) libre a 543 µmol/h/mg para α-GAL-PEG-Pn10 (**95**). De igual manera en cultivo celular, al compara el efecto de la proteína según su concentración (figura 3.32, **a**), la α-GAL-PEG-Pn10 (**95**) es aproximadamente 3 veces menos activa con respecto a la proteína libre, con valores de IC50 que van de 0,376 µg/ml para la α-GAL (**91**) libre a 1,274 µg/ml para α-GAL-PEG-Pn10 (**95**). Sin embargo si se comparan ambas proteínas según su concentración de actividad (figura 3.32, **b**), es decir si tomamos una cantidad de proteína libre y conjugado en función de su actividad como la unidad de medida, la α-GAL-PEG-Pn10 (**95**) es más activa que la α-GAL (**91**) libre, con valores de IC50 que van de 0,05 U/ml para α-GAL (**91**) libre a 0,0115 U/ml de α-GAL-PEG-Pn10 (**95**). Esto puede ser debido a que la proteína α-GAL-PEG-Pn10 muestra una mayor estabilidad debido a la protección que le confieren los PEGs.

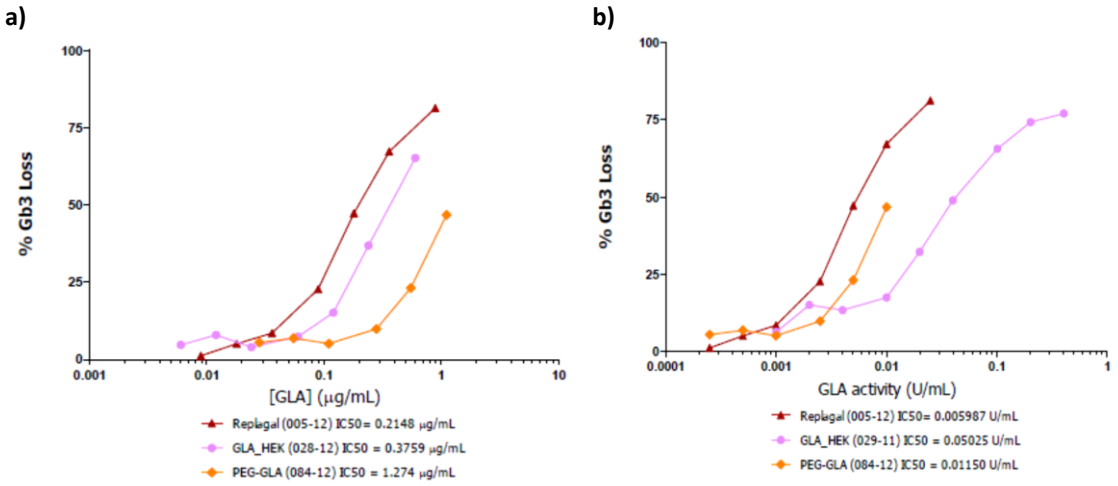


Figura 3.32 *Efecto de α-GAL-PEG-Pn10 (**95**), en µg/ml (a) o según su concentración de actividad U/ml (b), en la reducción de la acumulación de NBD-Gb3 en cultivo de células endoteliales de ratón. En el mismo experimento se ha incluido como control el compuesto comercial Replagal y α-GAL para poder compararlo con α-GAL-PEG-Pn10 (**95**).*

Tabla 3.14 *Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos con células MAEC del nanoconjugado α-GAL-PEG-Pn10 (**95**).*

Compuesto	Concentración de proteína (µg/ml)	Actividad enzimática (µmol/h/mg)	Actividad enzimática (U/ml)	Actividad en cultivo IC_{50} (µg/ml)	(U/ml)
Replagal (**92**)	1000	1687	28,12	0,215	0,00597
α-GAL (**91**)	173	2518	7,252	0,376	0,05025
α-GAL-PEG-Pn10 (**95**)	106	543	0,956	1,274	0,01150

Posteriormente se procedió a realizar estos ensayos con los nanoconjugados descritos en la tabla 3.15. El primer paso fue la determinación de la concentración real de proteína de cada una de las muestras, dando concentraciones próximas a las teóricas en el caso de los conjugados tipo GAL-PEG y mucho menores en el caso de los conjugados tipo GAL-PEG-Atto. Esta diferencia se puede asociar a la realización de un paso de purificación extra, empleando una PD10, en los conjugados tipo GAL-PEG-Atto.

Seguidamente se determinó la actividad *in vitro* de los nanoconjugados, e igual que en el caso anterior, en la mayoría de casos se observó una pérdida de la actividad de la proteína. Esta disminución de la actividad era mucho más acentuada en el caso de los conjugados que contenían Atto 633. En la entrada 1 de la tabla 3.15 encontramos los resultados relativos a la proteína Replagal (**92**) que sometimos a los mismo tratamientos de cambio de pH y diálisis que a nuestros conjugados y en la entrada 15 encontramos los resultados correspondientes a la proteína Replagal (**92**) comercial. Si comparamos la actividad enzimática de ambas con la correspondiente proteína libre se puede observar un ligera disminución de la misma (por ejemplo: 1122 µmol/h/mg de Replagal tratado respecto 1794 µmol/h/mg de Replagal comercial), pero sin mostrar un pérdida de actividad extremadamente pronunciada, lo que nos

indica que nuestro procedimiento experimental tiene un bajo efecto sobre la proteína. Cabe destacar la alta actividad que exhibe el conjugado P25-PEG-Replagal (**104**) con 9049 µmol/h/mg, superando casi en 5 veces la actividad de la proteína comercial Replagal.

Tabla 3.15 *Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos con los nanoconjugados finales.*

	Compuesto	Concentración de proteína teórica (µg/ml)	Concentración de proteína real (µg/ml)	Relación concentración (real/teórica)	Actividad enzimática	
					µmol/h/mg	U/mL
1	Replagal (**92**)	410	297	0,7	1122	5,554
2	Replagal-Atto 633 (**109**)	125	18	0,1	14	0,004
3	α-GAL (**91**)	383	478	1,2	911	7,264
4	α-GAL-Atto 633 (**108**)	115	36	0,3	553	0,335
5	RGD-PEG-Replagal (**104**)	312	303	1,0	692	3,500
6	RGD-PEG-Replagal-Atto-633 (**112**)	125	115	0,9	130	0,249
7	P25-PEG-Replagal (**105**)	250	342	1,4	9049	51,63
8	P25-PEG-Replagal-Atto 633 (**113**)	125	71	0,6	8	0,010
9	P87-PEG-Replagal (**106**)	250	254	1,0	798	3,375
10	P87-PEG-Replagal-Atto 633 (**114**)	125	50	0,4	5	0,004
11	MeO-PEG-Replagal (**103**)	250	344	1,4	739	4,238
12	MeO-PEG-Replagal-Atto 633 (**111**)	125	56	0,5	62	0,059
13	MeO-PEG-α-GAL (**102**)	250	244	1,0	825	3,353
14	MeO-PEG-α-GAL-Atto 633 (**110**)	76	43	0,6	250	0,181
15	Replagal commercial (**92**)	1000	---	---	1794	29,90

En los ensayos celulares con células MAEC de los nanoconjugados a una concentración de 0,25 µg/ml (figura 3.33), se puede observar que los conjugados con péptidos directores disminuyen de manera más eficiente los depósitos de NBD-Gb_3, siendo en este caso Replagal (**92**) algo más eficaz que los conjugados.

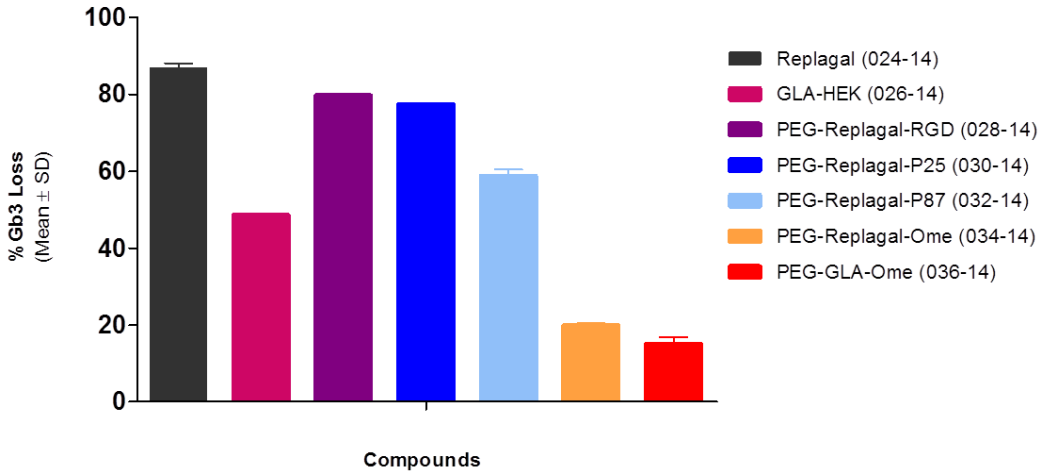


Figura 3.33 *Resultados sobre el efecto de los conjugados en la pérdida de Gb3 en células MAEC KO respecto la α-GAL y Replagal que portan. Se muestran los datos representados a 0,25 µg/ml en concetración proteíca.*

1.7 Internalización de los conjugados

Con aquellos conjugados que contenían el fluoróforo Artto 633 se procedió a determinar la internalización que estos presentaban respecto a las proteínas libre Replagal y α-GAL y el efecto en la internalización celular de los péptidos directores en aquellos nanoconjugados que los contenían.

Debido a la imposibilidad de determinar la concentración de Atto 633 presente en los nanoconjugados empleando detección por UV, el primer paso seguido por el grupo de la Dra. Abasolo fue la determinación de la cantidad de Atto 633 contenida mediante técnicas disponibles en su laboratorio (determinación por fluorescencia). Estos resultados se encuentran en la tabla 3.16, y en ellos se puede observar que los conjugados presentan entre 1-2 µg Atto 633/ml equivalente de proteína y los resultados de citometría de flujo para determinar la internalización de los conjugados fue corregido respecto estos valores.

Tabla 3.16 *Determinación de la cantidad de Atto 633*

Compuesto	Concentración de proteína teórica (µg/ml)	Ratio Atto (µg/ml equiv. proteína)
Replagal-Atto 633 (**109**)	18	1,1
α-GAL-Atto 633 (**110**)	36	1,1
RGD-PEG-Replagal-Atto-633 (**112**)	115	2,0
P25-PEG-Replagal-Atto 633 (**113**)	71	2,1
P87-PEG-Replagal-Atto 633 (**114**)	50	1,6
MeO-PEG-Replagal-Atto 633 (**111**)	56	1,5
MeO-PEG-α-GAL-Atto 633 (**110**)	43	1

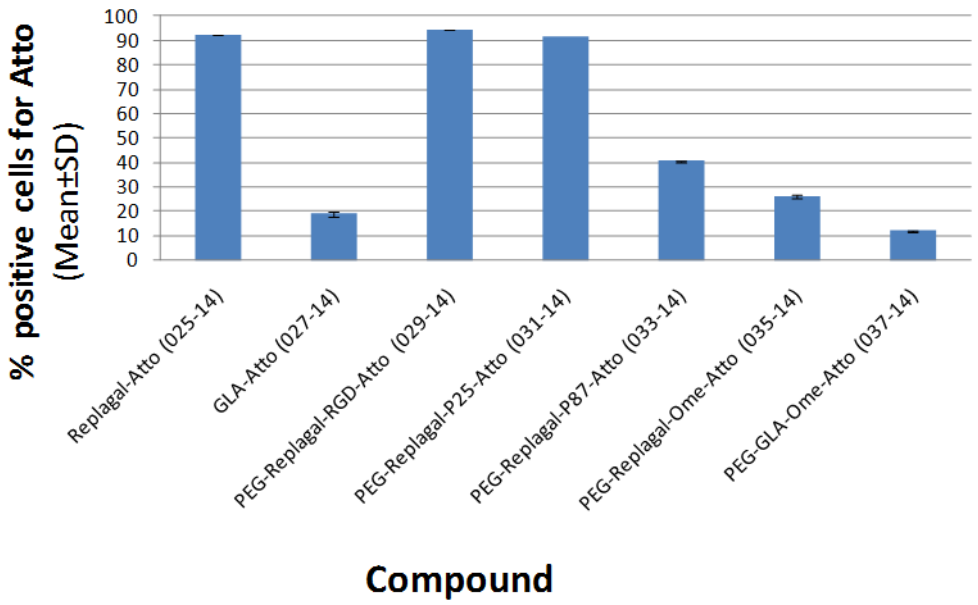


Figura 3.34 *Resultados internalización de los conjugados en células MAEC KO. Se muestran los datos representados a 1 µg/ml en concentración proteica.*

Los ensayos de internalización determinan que los conjugados Péptido-PEG-Replagal-Atto 633 presentan una mayor internalización celular respecto al resto de conjugados, destacando los conjugados P25-PEG-Replagal-Atto 633 (**113**) y RGD-PEG-Replagal-Atto-633 (**112**), los cuales presentan una internalización celular similar a la de Replagal-Atto 633 libre (**109**). La α-GAL-Atto 633 (**108**) presenta un internalización celular muy inferior a la de Replagal-Atto 633 (**109**).

También se realizó un estudio de localización sub-celular mediante microscopia confocal con el conjugado P25-PEG-Replagal-Atto 633 (**113**), ya que este era el conjugado más prometedor en términos de actividad e internalización. Los resultados se pueden observar en las imágenes de la figura 3.35. Estas imágenes reflejan que el conjugado P25-PEG-Replagal-Atto 633 (**113**) colocaliza con los lisosomas, zonas anaranjadas señaladas con flechas, y la internalización y no-colocalización con el lisosoma de parte del conjugado (redondeado en la imagen). Estos resultados se corresponden a la perfección con los estudios de microscopia confocal realizados con el Péptido P25 marcado con carboxifluoresceína (P25-CF, **115**) y que sirvieron para seleccionar este péptido entre otros de la misma familia (figura 3.35, **b**).

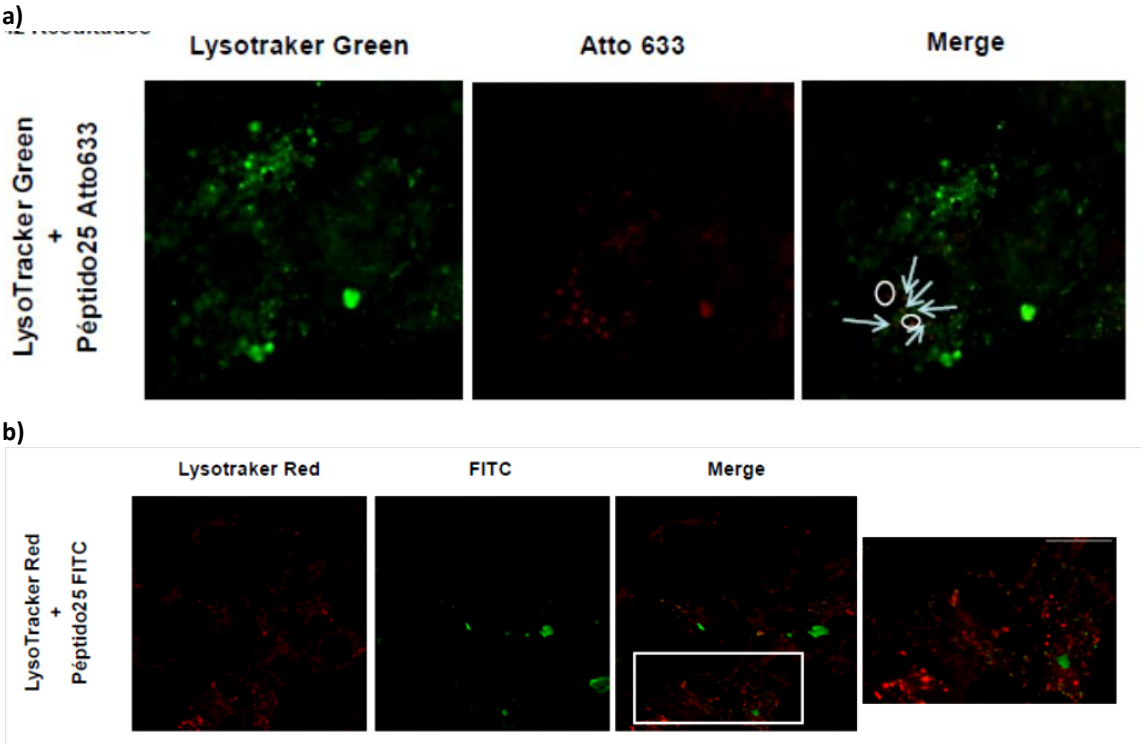


Figura 3.35 *Imágenes de microscopia confocal del conjugado P25-PEG-Replagal-Atto 633 (**113**) (**a**) y del péptido P25-CF (**115**) (**b**) en células de cultivo primario MAEC y colocalización con Lysotracker Green. En ambos casos se observa colocalización con el lisosoma, zonas anaranjadas presentes en las figuras.*

2. Nanovesículas ricas en colesterol modificadas con un péptido director

La segunda estrategia explorada para la obtención de nuevos sistemas de administración de la α-GAL A consistió en la encapsulación de esta proteína en nanovesículas cuya composición es rica en colesterol. Las vesículas formadas por lípidos son llamadas **liposomas**, estos son estructuras esféricas y cerradas formadas por una o varias bicapas lipídicas que contienen una fase acuosa en su interior y entre las bicapas lipídicas (figura 3.32). [56]

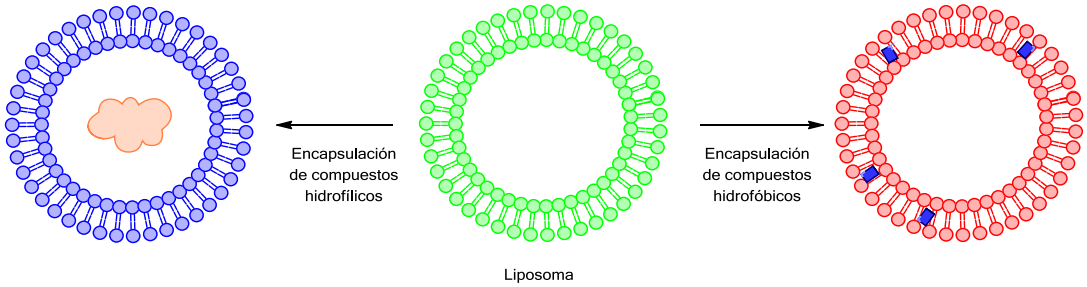


Figura 3.32. *Representación esquemática de los liposomas, formados por una bicapa lipídica. La cavidad interior de este tipo de vesículas contiene un medio acuoso dónde es posible la encapsulación de compuestos hidrofílicos como las proteínas, a diferencia de su membrana lipídica donde es posible encapsular compuestos hidrofóbicos.*

Desde el 1965, año en que A. Banham publicó el primer estudio que demostró que los fosfolípidos en un medio acuoso pueden formar estructuras cerradas bicapa,[57] hasta nuestros días, la investigación en el campo de los lisosomas ha avanzado de manera extraordinaria. Habitualmente los lisosomas se clasifican en función de su tamaño y el número de bicapas que contienen, tabla 3.13, y presentan unas propiedades biológicas adecuadas para su uso como sistemas de administración de fármacos. Por este motivo la investigación sobre su uso como sistemas de administración de fármacos se ha explorado ampliamente, dando lugar en 1994 al primer fármaco en el mercado basado en una formulacón lisosomal, Ambisome (tabla 3.14).[58]

Tabla 3.13. *Tipos y características biológicas más importes de los liposomas. Tabla adaptada de la referencia 56.*

Tipos de liposomas
Vesículas multilamelares: su tamaño va de 500 a 50000 nm y están formadas por numerosas bicapas concéntricas.
Vesículas pequeñas unilamelares: su tamaño es de aprox. 100 nm y están compuestas por una única bicapa.
Vesículas grandes unilamelares: su tamaño ronda entre los 200 y los 800 nm.
Liposomas de larga circulación: liposomas modificados (normalmente con polímeros) que son capaces de circular en el torrente sanguíneo durante horas.
Inmunoliposomas: liposomas unidos a anticuerpos y que presentan acumulo en las zonas de reconocimiento del anticuerpo
Propiedades biológicas de los liposomas
Los liposomas son biocompatibles
Los liposomas son capaces de encapsular compuestos hidrofílicos en su interior y compuestos hidrofóbicos en su membrana lipídica.
Los fármacos incoroporados en los liposomas quedan protegidos de las condiciones externas.
Los liposomas proporcionan una oportunidad extraordinaria para la liberación de fármacos en las células y en compartimentos específicos sub-celulares.
Tamaño, carga y las propiedades de su superficie pueden ser fácilmente modificados añadiendo nuevos ingredientes a la mezcla lipídica o variando las el método de preparación.

Tabla 3.14. *Fármacos basados en formulaciones lisosomales aprobados o en fase clínica avanzada. Tabla adaptada de la referencia 56.*

Fármaco activo	**Nombre comercial**	**Indicaciones**
Daunorubicina	DaunoXome	Sarcoma de Kaposi
Doxorubicina	Mycet	Terapia combinada para el cáncer de mama recurrente.
Doxorubicina en PEG-liposomas	Doxil/Caelyx	Sarcoma de Kaposi; cáncer de ovario; cáncer de mama recurrente
Amfotericina B	AmBisome	Infecciones fúngicas.
Citarabina	DepoCyt	Meningitis linfomatosa.
Vincristina	Onco TCS	Linfoma no-Hodgkin
Lurtotecan	NX211	Cáncer de ovario.
Nistatina	Nylotran	Agente tópico antifúngico.
Ácido retinóico	Altragen	Leucemia promielocítica aguda, linfoma no-Hodgkin; carcinoma de las células renales; sarcoma de Kaposi.
Compuestos platinados	Platar	Tumores sólidos.
Anamicina		Tumores resistentes a la Doxorubicina.
Gen E1A		Varios tumores.
Plásmido de DNA que codifica HLA-B7 y α2-microglobulina	Allovectin-7	Melanoma metastásico.
Liposomas para varios fármacos y agentes diagnósticos (lipoMASC)	------	Aplicaciones varias

En este proyecto nos basaremos en la utilización de **vesículas pequeñas unilamelares** (small unilamellar vesicles, **SUVs**) para la encapsulación de la proteína. Los métodos convencionales de preparación de SUVs consisten en disolver los fosfolípidos y otros componentes hidrofóbicos en disolvente orgánico (etanol o éter) e añadirlos en una solución acuosa tamponada. En el caso de usar etanol la aparición de las SUVs ocurre de manera espontánea, en cambio usando éter las SUVs son formadas al evaporar la fase orgánica. Otro método muy

empleado también consiste en la formación espontánea de vesículas multilamelares (multilamellar vesicles, MLVs) que mediante tratamientos mecánicos, como sonicación, homogenización y extrusión, se convierten en SUVs y vesículas unilamelares grandes (large unilamellar vesicles, LUVs) y que finalmente mediante son separadas por tamaño.[59] Este proceso presenta grandes desventajas: procesos multi-etapa para la obtención de las vesículas, baja reproducibilidad (indispensable para su aplicación biomédica), procesos largos, alto consumo de energía y un limitado control en el tamaño de partícula de los productos finales.[60] Debido a estos problemas asociados a los métodos clásicos en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para su obtención que emplean los fluidos supercríticos, principalmente el CO_2.[61] Los fluidos supercríticos tienen un poder de solvatación mayor y los cambios de presión, que modulan gran parte de las propiedades de los fluidos supercríticos, se propagan de manera más homogénea y uniforme que la temperatura y los cambios de solvente. Por este motivo, el uso de fluidos supercríticos, proporciona un mayor control y modulación de las características estructurales del material final (tamaño, distribución de tamaño, porosidad, naturaleza polimórfica, morfología, etc) que los disolventes orgánicos convencionales. [60]

Las SUVs empleadas en este proyecto se obtuvieron mediante un método de fabricación llamado DELOS-SUPS (Despresurización de soluciones orgánicas líquidas expandidas) desarrollado por el grupo de los Drs. J. Veciana y N. Ventosa. Este método consiste en la solubilización de los componentes vesiculares en etanol y esta solución es introducida en un reactor de alta presión a presión ambiental a la temperatura de trabajo escogida. Seguidamente la solución es expandida volumétricamente con CO_2 comprimido hasta alcanzar la concentración molar adecuada, alcanzando la presión de trabajo. El sistema es mantenido a la temperatura y presión de trabajo durante aproximadamente una hora hasta conseguir un sistema homogéneo y lograr un equilibrio térmico. Finalmente la fase orgánica expandida se despresuriza sobre una solución acuosa, manteniendo la presión de trabajo constante (figura 3.33).[47]

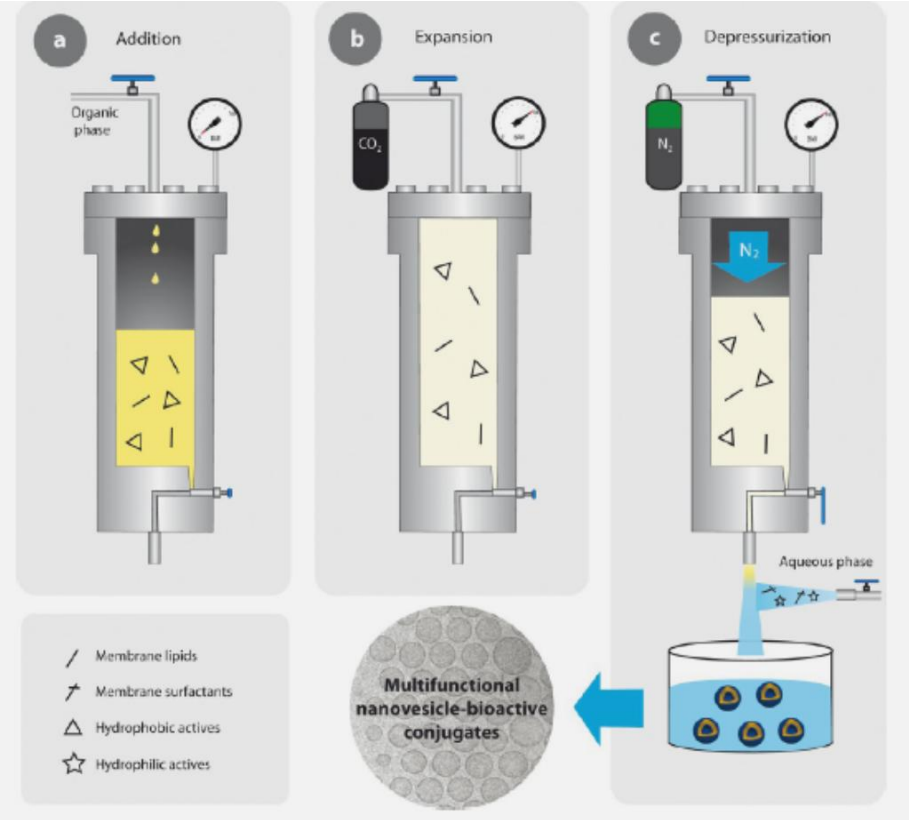


Figura 3.33. *Representación esquemática de la metodología DELOS-SUPS para la preparación de nanovesículas. El procedimiento incluye un primer paso de adición (a) de una solución oránica que contiene los componentes lipídicos de la membrana y las posibles moléculas hidrofóbicas activas para la conjugación en un autoclave a la temperatura de trabajo y a presión atmosférica, seguida de la incorporación del CO2 (b) para producir una solución orgánica expandida, a una concentración molar, presión de trabajo y temperatura de trabajo dadas y finalmente, la despresurización del sistema (c) de la solución orgánica expandida sobre una solución acuosa, la cual puede contener moléculas hidrofílicas activas para su encapsulación en las nanovesículas. Figura extraída de la referencia 62.*

En esta estrategia los componentes lipídicos que componen las vesículas son tres: colesterol, el fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y una molécula de colesterol previamente modificada que contenga el péptido director cRGDfK, detallado en el punto 1.1 de este capítulo (figura 3.34). La formación de este conjugado colesterol-RGD se llevó a cabo mediante la derivatización previa del hidroxilo presente en la molécula de colesterol con una cadena de OEG, de peso molecuar definido por lo tanto con una talla determinada y completamente monodisperso, con un grupo funcional adecuado para su unión con el péptido cRGDfK, que anclado a través de la ε-amina contenida en su residuo de lisina. Optamos por esta composición debido a que de esta manera se obtenía un conjugado con un componente lípidico que podía entrar a formar parte de la vesícula como componente constitutivo y que a la vez proporcionaba un direccionamiento a través del péptido director asociado. Se decidió incluir un espaciador tipo OEG entre la molécula de colesterol y el péptido director para evitar posibles interacciones entre ellas y consideramos que incluir este espaciador OEG hacía más

probable que el péptido director cRGDfK tuviera menos interacciones con la membrana de la vesícula y favoreciera a una mayor exposición de este.

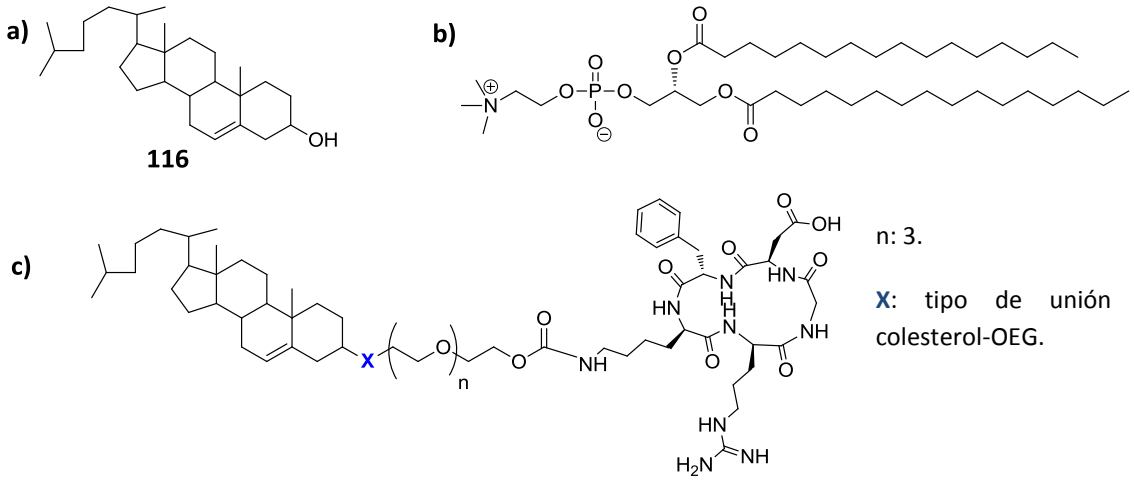


Figura 3.34. *Componentes lipídicos de las SUVs estudiadas en este proyecto, dónde a)colesterol, b) DPPC y c) derivado colesterol-RGD desarrollado en este capítulo.*

En la bibliografía se encuentran descritas vesículas que han sido funcionalizadas con PEG y un péptido RGD, como es el caso de los conjugados descritos por P. Dubey,[63] conjugados colesterol-PEG-fármaco,[64] y otros tipos de vesículas funcionalizadas con PEG,[65] que han presentado mejoras respecto a su tiempo de vida media y una liberación más efectiva y eficiente. Debemos destacar que en todos los casos descritos en la bibliografía la unión entre el colesterol de la membrana y la cadena de OEG es llevada a cabo mediante enlaces éster o carbamato. Debido a este motivo se ensayaron dos tipos de enlaces diferentes como método de unión entre el colesterol y el OEG, el enlace éter (menos lábil que enlace éster) y el enlace carbamato, con tal de determinar si existía alguna diferencia entre ellos. La unión del OEG al péptido director se llevó a cabo en todos los casos mediante un enlace carbamato.

2.1 Síntesis del derivado Colesterol-cRGDfK éter

La síntesis del derivado de colesterol-cRGDfK éter se llevó a cabo según el esquema de síntesis representado en la figura 3.35.

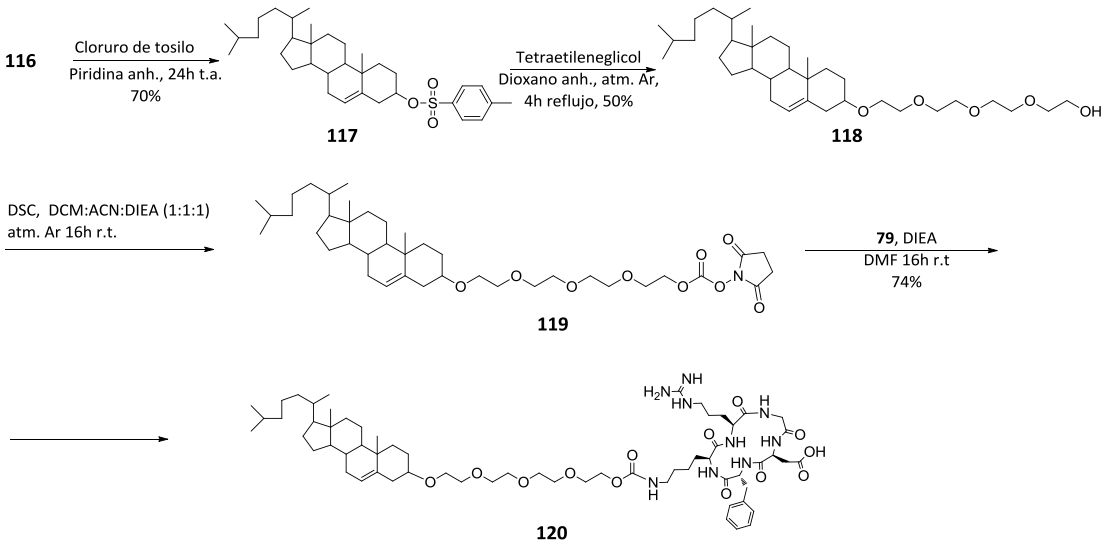


Figura 3.35. *Esquema sintético del derivado de colestrol-RGD éter.*

La obtención de este derivado se inició mediante la tosilación del grupo hidroxilo presente en la molécula de colesterol (**116**), esta incorporación del grupo tosilo se llevó a cabo en piridina anh. y mediante la adición de un ligero exceso de cloruro de tosilo.[66, 67] Finalmente después de 24h se realizó la elaboración del crudo y tras una recristalización en éter de petróleo se obtuvo el producto colesterol-tosilo (**117**) puro con un 70% de rendimiento. A continuación se introdujo una cadena de tetraetilenglicol, haciendo reaccionar el producto anterior, colesterol-tosilo, con un gran exceso de tetraetilenglicol (20 eq) en dioxano a reflujo durante 4h.[66,67] La purificación del crudo obtenido se llevó a cabo mediante cromatografía con alúmina básica (DCM/MeOH 0-5 %), obteniendo el producto en forma de aceite amarillento con un 50% de rendimiento. El hidroxilo terminal de la cadena de tetraetilenglicol es el único grupo funcional presente en la molécula que ofrece la posibilidad de unión del péptido director cRGDfK (**79**), por este motivo se procedió a derivatizar este hidroxilo con un grupo carbonato de N-succinimidilo a través de hacer reaccionar el hidroxilo terminal del tetraetilenglicol presente con 3 eq. de DSC en medio orgánico básico en atmosfera inerte de argón durante 16h.[68,69] Tras evaporar el disolvente de la fase orgánica, el crudo de reacción fue elaborado mediante una única extracción con agua. Finalmente la fase orgánica fue secada con $MgSO_4$, filtrada y evaporada, el producto fue usado en la siguiente reacción sin necesidad de ser purificado. Por último se incorporó el péptido cRGDfK sobre el extremo colesterol-OEG-NHS (**119**) en medio orgánico (DMF) y a temperatura ambiente durante 16h. Después de evaporar el disolvente orgánico el crudo se precipitó tres veces con TBME para obtener finalmente el conjugado colesterol-OEG-RGD (**120**).

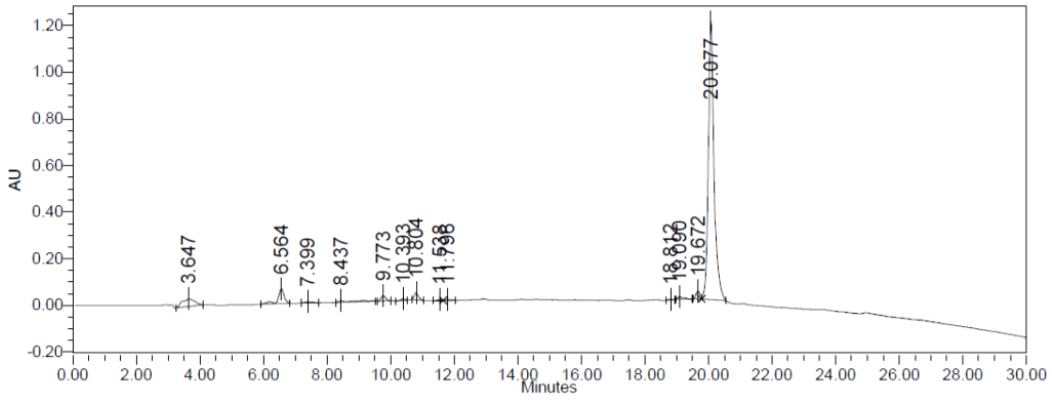


Figura 3.36. *Traza cromatográfica de HPLC del producto final colesterol-OEG-RGD éter (**120**). Symmetry 300™ C_4 (4.6 x 250 mm, 5 µm), 5→100% de CH_3CN 0.1% TFA en H_2O 0.1% TFA en 30 min, 1ml/min, 82%, λ=210 nm.*

2.2 Síntesis del derivado Colesterol-cRGDfK carbamato

El producto colesterol-cRGDfK carbamato difería respecto al producto colesterol-OEG-RGD éter (**120**) únicamente en el enlace usado en la unión del OEG al colesterol. Su esquema sintético se encuentra representado en la figura 3.37.

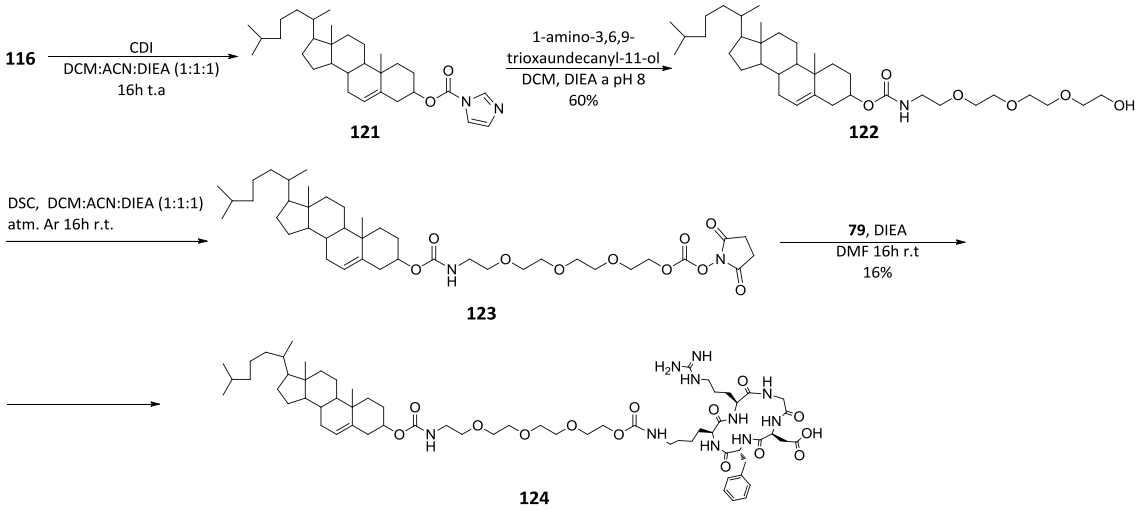
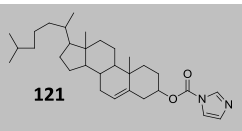


Figura 3.37. *Esquema sintético del derivado de colestrol-RGD carbamato (**124**).*

Para poder obtener el derivado con unión carbamato entre el colesterol y el OEG, se debía derivatizar adecuadamente el grupo hidroxilo del colesterol en un grupo tipo carbonato de N-succinimidilo o carbonil de imidazol. Primeramente exploramos la opción de convertir el hidróxilo del colesterol en un grupo carbonato de N-succidimidilo siguiendo el método descrito en el punto 2.1 con el extremo hidroxilo del tetraetilenglicol para su acoplamiento al péptido director. Tanto en condiciones similares a las empleadas con la molécula colesterol-tetraetilenglicol del punto 2.1 y otras condiciones, no se consiguió obtener el producto objeto en ningún caso (tabla 3.34). Se decidió optar por la formación de un carbonil de imidazol, y para ello se disolvió el colesterol en una mezcla DCM:ACN:DIPEA y adicionamos 10 eq. de CDI, dejamos reaccionar toda la noche a temperatura ambiente.

Tabla 3.34. *Detalle de los reactivos y disolventes empleados en la optimización de la reacción de formación de un derivado de colesterol adecuado para la formación de un enlace carbamato con el espaciador PEG.*

Ensayo	Reactivo (equivalentes)	Disolvente y condiciones	Producto
1	DSC (3 eq)	DCM:ACN:DIEA (1:1:1), t.a.	No detectado
2	DSC (10 eq)	Piridina	No detectado
3	DSC (10 eq)	Piridina, reflujo	No detectado
4	Fosgeno (3eq) + DSC (10 eq)	DCM	No detectado
5	CDI (10 eq)	DCM:ACN:DIEA (1:1:1), t.a.	 **121**

Una vez la reacción se completó, el disolvente fue evaporado y se lavó el crudo mediante extracciones con agua, utilizándose este compuesto directamente en la próxima reacción. En este caso y debido a la necesidad de que la cadena de OEG contuviese en uno de sus extremos una amina terminal usamos el 1-amino-3,6,9-trioxaundecanyl-11-ol como espaciador, esta cadena de OEG bifuncional presenta una amina primaria y un grupo hidróxilo como grupos terminales y tiene un tamaño equivalente al del tetraetilenglicol. En este caso la cadena de OEG, 1-amino-3,6,9-trioxaundecanyl-11-ol, se incorporó al conjugado colesterol-Im (**121**) en medio orgánico (DCM) a pH 8, pH alcanzado mediante la adición de DIPEA en el medio. Se dejó evolucionar la reacción durante 16h a temperatura ambiente y posteriormente se llevaron a cabo lavados con agua, y finalmente se purificó mediante una columna de silica con AcOEt como eluyente de manera isocrática. Finalmente se obtuvo el producto con un rendimiento del 60%. Las siguientes reacciones, incorporación del grupo carbonato de N-succinimidilo sobre el extremo hidroxilo del compuesto OEG-Im y acoplamiento posterior del péptido RGD (**79**), se llevaron a cabo de la misma manera que con el conjugado colesterol-RGD éter, pero cabe destacar que el rendimiento de la incorporación del péptido cRGDfK (**79**) sobre este conjugado fue mucho menor, tan solo 17% de rendimiento.

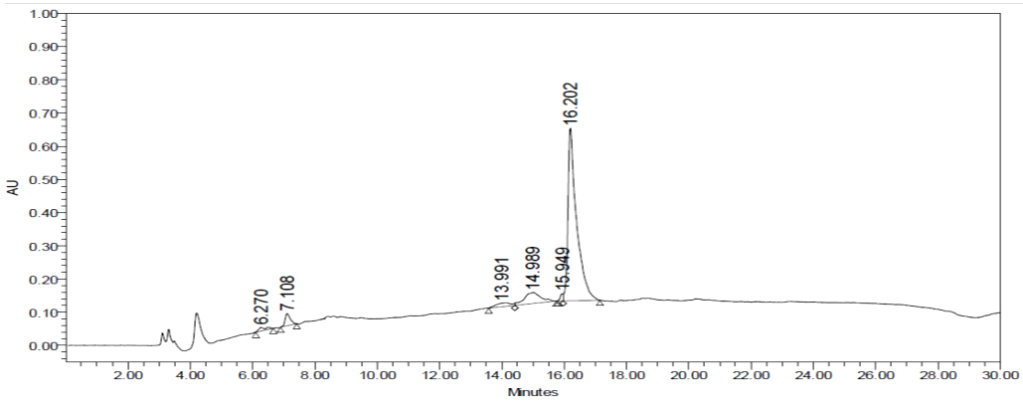


Figura 3.38 *Traza cromatográfica de HPLC del compuesto del producto final colesterol-OEG-RGD carbamato (**124**) obtenido. Symmetry 300™ C_4 (4.6 x 250 mm, 5 μm), 5→100% de CH_3CN 0.1% TFA en H_2O 0.1% TFA en 30 min, 1ml/min, 81%, λ=210 nm.*

2.3 Formación y comparación de las SUVs con los derivados de colesterol-PEG-RGD éter (120) y carbamato (124)

La formación de las vesículas por parte del grupo de los Drs. J.Veciana y N. Ventosa se llevó a cabo usando el método DELOS-SUPS descrito anteriormente. Se tomaron 8 mg de colesterol, 24 mg de DPPC y 4 mg del conjugado colesterol-OEG-RGD éter (**120**) y se disolvieron en 1,2 ml de etanol. Esta disolución se introdujo en un reactor de alta presión de 6 ml de volumen a presión atmosférica y temperatura de trabajo T_W= 35 °C. A este reactor se adicionó CO_2 comprimido, produciendo la expansión volumétrica de la disolución para una fracción molar X_{CO2}= 0,7 y una presión de trabajo de P_W= 10 MPa. Con el objetivo de alcanzar la total homogenización y el equilibrio térmico de la solución, el sistema se dejó durante aproximadamente 60 minutos a 10 MPa y 35 °C. Finalmente se despresurizó la disolución orgánica expandida desde la presión de trabajo has la presión atmosférica, esta despresurización se llevó a cabo sobre 24 ml de una disolución acuosa. En este último paso una corriente de N_2 a 10 MPa se utilizó como émbolo para empujar la solución de colesterol en etanol con el objetivo de mantener constante la presión de trabajo dentro del reactor durante la despresurización. Estos ensayos dieron como resultado unas vesículas DPPC:Colesterol:Colesterol-OEG-RGD éter (10:6:1) (**125**) con una apariencia de macroscópica de solución opalescente dispersa, de las cuales fueron determinados su tamaño medio, la distribución de tamaño de partícula y su potencial Z mediante el uso de dispersión dinámica de luz (Dinamic Light Scattering, DLS) a 25 °C. En la tabla 3.35 se muestran los resultados obtenidos, y en la figura 3.39 podemos encontrar una comparación del tamaño y distribución del tamaño de las vesículas por DLS.

Tabla 3.35. *Tamaño medio de las partículas, índice de polidispersidad y potencial Z de diferentes lotes de vesículas DPPC:Colesterol:Colesterol-OEG-RGD, este último puede contener una unión éter o carbamato entre el colesterol y la cadena de OEG. Tabla adaptada de la referencia 70.*

Composición	Tamaño medio (nm) (±SD*)	PDI** (±SD*)	Potencial Z (±SD)
DPPC:Colesterol:Colesterol-PEG-OGD éter (**125**) (1.3 mM: 0.8 mM: 0.1 mM)	157.7 (± 0.8)	0.182 (± 0.010)	+ 32.4 (± 2.4)
	128.8 (± 0.2)	0.235 (± 0.017)	+ 30.4 (± 1.4)
DPPC:Colesterol:Colesterol-PEG-OGD carbamato (**126**) (1.3 mM: 0.8 mM: 0.1 mM)	141.5 (± 1.8)	0.357 (± 0.005)	- 9.5 (± 0.2)
	117.9 (± 0.6)	0.357 (± 0.008)	- 0.9 (± 0.3)

** Desviación estándar de tres medidas consecutivas del mismo lote. ** Índice de polidispersidad.*

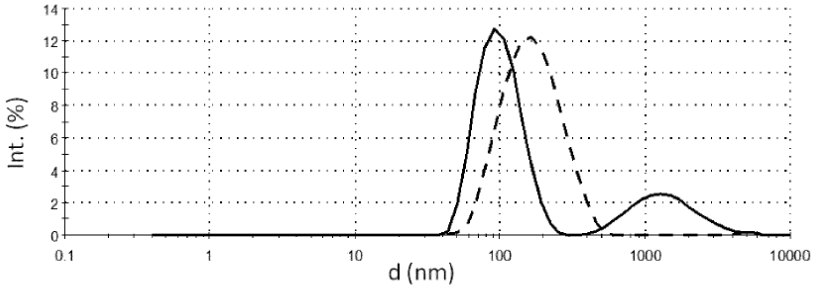


Figura 3.39. *Comparación del tamaño y distribución de partículas de los conjugados DPPC:Colesterol:Colesterol-OEG-RGD éter (**125**) (--) y DPPC:Colesterol:Colesterol-OEG-RGD carbamato (**126**) (–). Figura extraída de la referencia 70.*

Estos resultados muestran que la elección del tipo de enlace para la unión colesterol-OEG (en nuestro caso, éter o carbamato) confiere diferentes propiedades a las vesículas. Los diferentes lotes de vesículas compuestas por DPPC:Colesterol:Colesterol-OEG-RGD éter (**125**) no presentaron problemas de estabilidad a corto plazo y presentaron una distribución de tamaño e índices de polidispersidad pequeños, lo que las hace atractivas para su utilización como agentes terapéuticos. El índice de polidispersidad mostrada por las vesículas de composición DPPC:Colesterol:Colesterol-PEG-RGD carbamato (**126**) fue mayor, en este caso la distribución es bimodal, en comparación con la distribución monomodal que presentan los conjugados de colesterol-PEG-RGD éter (figura 3.39). Además debemos destacar que las vesículas formadas con el conjugado colesterol-PEG-RGD éter presentan un potencial Z mayor (alrededor de + 30 mV), coincidiendo con los valores de potencial Z de los sistemas coloidales estables en el tiempo. Por tanto se concluye que las vesículas que contienen el conjugado colesterol-PEG-RGD éter presentan unas mejores propiedades que las vesículas que contienen el conjugado colesterol-PEG-RGD carbamato. [70] Las vesículas formadas por DPPC:colesterol:colesterol-PEG-RGD éter (**125**) y vesículas sintetizadas por el método DELOS-SUPS compuestas únicamente por DPPD:colesterol fueron analizadas por Cryo-TEM para determinar el aspecto y lameridad que presentaban (figura 3.40).[62] En la figura se observa claramente como el Cryo-TEM de las vesículas que contienen el colesterol-PEG-RGD éter (**120**) presentan una estructura unilamelar prácticamente en su totalidad, a diferencia de las vesículas tan solo formadas por DPPC:colesterol (**127**) cuya distribución de tamaño es mucho mayor y con un marcado carácter multilamelar.

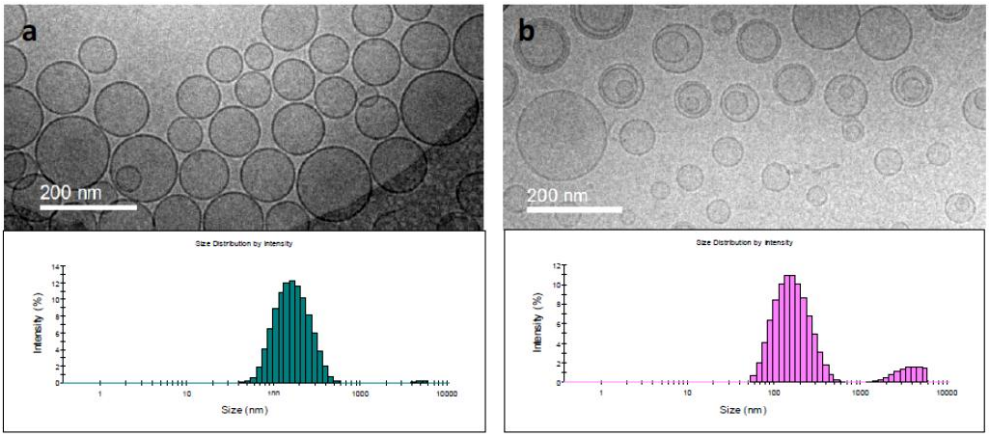


Figura 3.40. *Imágenes de cryo-TEM Obtenidas para las vesículas compuestas por DPP:colesterol:colesterol-PEG-RGD éter (**125**, **a**) respecto a las vesículas compuestas únicamente por DPPC:colesterol (**127**, **b**). Figura extraída de referencia 62.*

Finalmente, se decidió realizar la cuantificación del péptido director cRGDfK contenido en las nanovesículas que contenían colesterol-PEG-RGD éter estudiadas anteriormente mediante análisis de aminoácidos. En todos los casos, durante el proceso de obtención las vesículas obtenidas son separadas de los componentes que no han sido integrados usando filtros de centrifugación (Centricon, Merck Millipore) con diferente limite de peso molecular, de 30 KDa y 100 KDa. Con este tratamiento se separan el exceso de componentes lipídicos no integrados. Las vesículas son finalmente resuspendidas de nuevo. Para el análisis de las nanovesículas **125** se tomaron para su análisis cuatro muestras diferentes: la primera muestra correspondía a las mezcla que obteníamos directamente del reactor, la segunda muestra se trataba de las vesículas filtradas para separar los restos de componentes lipídicos no integrados, la tercera muestra eran las aguas de diafiltración (en las que deberían estar los restos de componentes lipídicos no integrados) y la cuarta muestra era los lavados con etanol del reactor, ya que la solubilidad de los conjugados colesterol-PEG-RGD era muy limitada y sospechábamos que podía precipitar en las condiciones de reacción (tabla 3.36). En el caso de las soluciones vesiculares y las aguas de centrifugación se tomaron 500 µl, y en el caso de los lavados se trataba de una muestra sólida que fue resuspendida en 500 µl para realizar la hidrólisis de los aminoácidos. Esta hidrólisis se llevo a cabo en HCl 6M durante 1h a 110 °C, en un tubo cerrado de alta presión kimax, en presencia del patrón ácido α-aminobutírico (aaba). Posteriormente las muestras fueron evaporadas y redisueltas en 500 µl de HCl 20 mM, cada una de estas soluciones fue derivatizada según el método AccQ-Tag de Waters y analizada mediante HPLC. El análisis de las muestras revelaban que todo el colesterol-PEG-RGD éter (**120**) contenido en la solución final de las vesículas se encontraba integrado en las vesículas, ya que la concentración hallada en la solución final de las vesículas y la concentración hallada en la muestra vesícular tras el procedimiento de filtración es prácticamente igual y el contenido peptídico del agua de diafiltración es cercano a cero. En cambio la integración de colesterol-OEG-RGD éter (**120**) es cercana al 45%. El análisis de los restos del lavado del reactor revelan restos de colesterol-OEG-RGD por lo que deducimos que hay una parte del colesterol-OEG-RGD éter (**120**) que no

se encuentran disuelto en la solución de componentes lipídicos inicial y hecho que repercute en el porcentaje de integración de este compuesto en las vesículas. Por ello pensamos que si se pudiera encontrar un disolvente adecuado para la formación de las vesículas en el que el nanoconjugado fuese totalmente soluble la integración sería mucho mayor, incluso cercana al 100%.

Tabla 3.41. *Cuantificación del contenido peptídico de diferentes estadios de la formación de las vesículas compuestas por DPPC:colesterol:colesterol-OEG-RGD éter (**125**).*

Muestra	Cuantificación 1	Cuantificación 2	Cuantificación media
DPPC:colesterol:colesterol-OEG-RGD teórico	---	---	0.1 mg/ml
DPPC:colesterol:colesterol-OEG-RGD total	0.043 mg/ml	---	0.043 mg/ml
DPPC:colesterol:colesterol-OEG-RGD centrifugado	0.044 mg/ml	0.043 mg/ml	0.043 mg/ml
Aguas del centrifugado	0.002 mg/ml	0.002 mg/ml	0.002 mg/ml
Restos del reactor	131 µg	---	131 µg

Finalmente se llevaron a cabo estudios de internalización celular de las vesículas cuyo objetivo era demostrar que la presencia del péptido cRGDfK (**79**) en las nanovesículas favorecía una mayor entrada celular de las mismas. Para llevar a cabo estos estudios se incubaron las soluciones vesiculares compuestas por DPPC:colesterol (**127**) o DPPC:colesterol-PEG-RGD éter (**125**) con una disolución etanólica 0,6 nM de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina (DiD), fluoróforo capaz de integrarse en la membrana lipídica, durante 30 min. Pasado este tiempo se eliminó el fluoróforo DiD en exceso de las muestras usando una columna de separación de tamaño Sephadex G-25 con una solución tampón de PBS como eluyente. Estos estudios de internalización se llevaron a cabo con células CDC/EU.HMEC-1 (HMEC-1), las células HMEC-1 son células inmortalizadas humanas del endotelio microvascular que retienen la morfología, fenotipo y características funcionales de las células endoteliales microvasculares normales humanas. Para los experimentos de citometría de flujo, las células HMEC-1 se incubaron con los liposomas marcados con DiD durante 3h a 16 °C y 37 °C, y posteriormente lavadas con una solución tampón fosfato de Dulbecco (DPBS). En los ensayos de internalización las células HMEC-1 fueron incubadas con los liposomas marcados con DiD durante 3h a 37 °C, lavadas, y finalmente incubadas durante min a 37 °C con Lysotracker verde DND-26, con tal de marcar los compartimentos lisosomales/endosomales. Las imágenes obtenidas por microscopia confocal mostraron una mayor entrada celular y una clara colocalización de los liposomas DPPC:colesterol:colesterol-OEG-RGD éter (**125**) con los lisosomas marcados con DND-26. Esto demuestra que el péptido cRGDfK (**79**) realiza su función de péptido director favoreciendo la entrada celular de las nanovesículas mediante endocitosis y su acumulación en los lisosomas (figura 3.41, **c**). Esta mayor internalización es mucho más clara al analizar los resultados obtenidos por citometría de flujo, ya que la fluorescencia de las células incubadas con los liposomas DPPC:colesterol:colesterol-OEG-RGD éter (**125)** aumenta hasta el 85%, respecto al aumento del 4% de los liposomas compuestos únicamente por DPPC:colesterol (**127**) (figura 3.41, **d** y **e**).

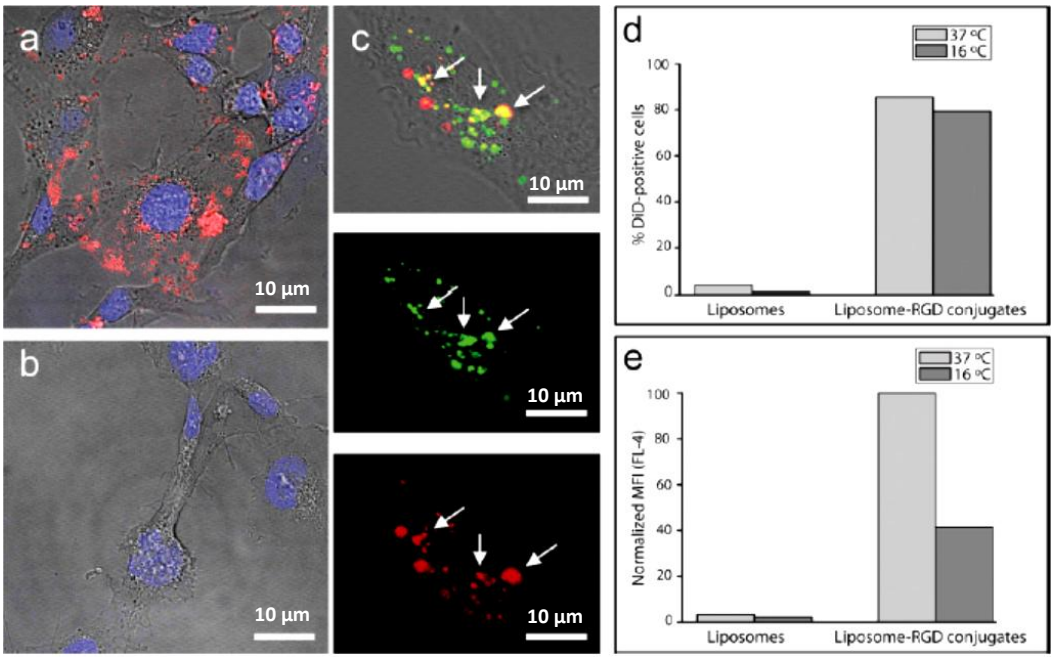


Figura 3.41. *Internalización de las nanovesículas en células endoteliales evaluadas por fluorescencia. Imágenes confocales de células HMEC-1 incubadas durante 3h a 37 °C con (**a**) liposomas compuestos por DPPC:colesterol:colesterol-PEG-RGD éter **125** (rojo) a 0,3 mg/ml y (**b**) liposomas compuestos por DPPC:colesterol **127**, cuyo núcleo se encuentra teñido con Hoechst 33342 (azul). La colocalización de los liposomas con colesterol-PEG-RGD éter **125** (rojo) y los lisosomas (verde) se muestra en la imagen **c** superior, dónde las flechas indican la colocalización, las señales independientes se muestran en las imágenes inferiores. (**d**) Cuantificaciónpor citometría de flujo de la fracción de células que han internalizado los diferentes tipos de liposomas como porcentaje (%) de délulas positivas a Did respecto al total de las células contadas. (**e**) Intesidad de fluorescencia media (mean fluorescence intensity, MFI) de DiD las células normalizadas respecto la intesidad máxima de fluorescencia. Figura adaptada de la referencia 62.*

2.4 Encapsulación de α-GAL A en las SUVs DPPC:Colesterol:Colesterol-OEG-RGD éter (125) y resultados biológicos

Debido a los prometedores resultados obtenidos en la formación, caracterización físico-química e internalización de las vesículas de DPPC:colesterol:colesterol-PEG-RGD éter (**125**) se decidió llevar a cabo la encapsulación de la proteína α-GAL (**91**) y evaluar su viabilidad como agente de administración de α-GAL A para la enfermedad de Fabry. La formación y encapsulación de la proteína α-GAL (**91**) en las SUVs se realizó empleando la metodología DELOS-SUPS, detallada en el punto 2.3 de este capítulo, pero despresurizando la solución orgánica expandida de los componentes lípidicos sobre una solución tamponada acuosa que contenía la proteína α-GAL (**91**) a diferentes concentraciones (8.5, 20.0 y 42.5 µg/ml) (figura 3.42).

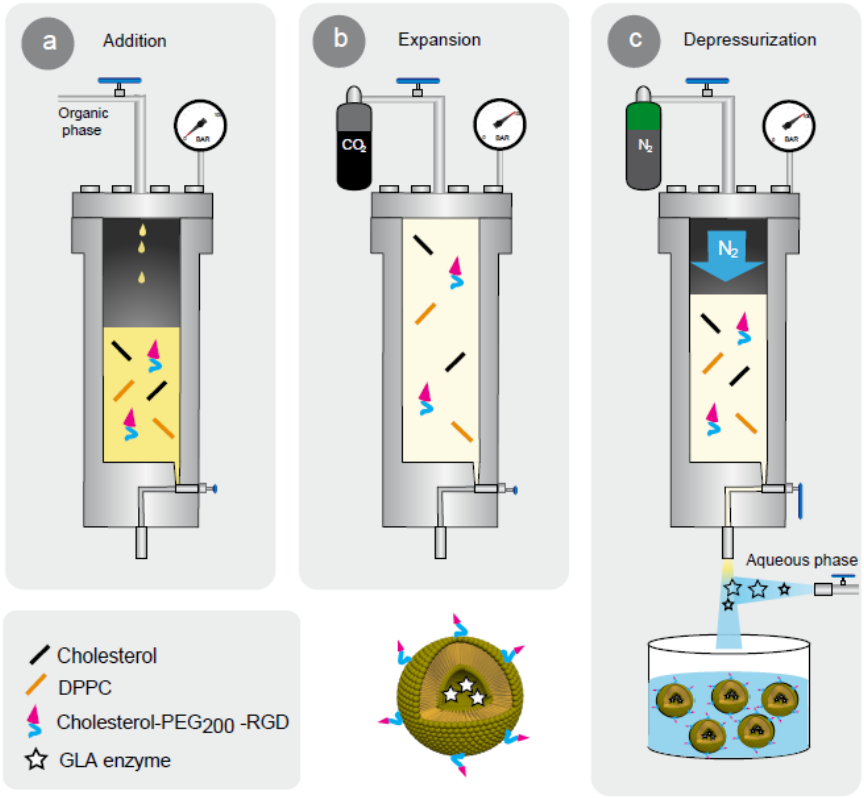


Figura 3.42. *Representación de la metodología DELOS-SUPS para la formación de SUVs compuestas por DPPC:colesterol:colesterol-PEG-RGD éter (**125**) y encapsulación de la proteína α-GAL (**91**). Figura extraída de la referencia 47.*

La cantidad de α-GAL contenida en las vesículas fue determinada por Western Blot. También se procedió a estudiar si la actividad de la proteína se había visto afectada por el proceso, para ello se realizaron ensayos para determinar la actividad específica de la misma. Se hicieron tres tipos de medidas de la actividad específica en distintos pasos de su proceso de obtención. Como ya se ha comentado con anterioridad, las vesículas se forman en el momento de la despresurización de la solución orgánica expandida que contiene los componentes lipídicos, por tanto al finalizar el proceso DELOS-SUPS la fase acuosa contiene las vesículas y los componentes lipídicos libres que no han entrado a formar de la vesículay junto con, en este caso concreto, parte de la proteína α-GAL (**91**) que no ha sido encapsulada, esta mezcla puede ser separada por separación de tamaño. En este caso concreto se determinó la actividad específica de **i)** la mezcla final de α-GAL libre y α-GAL encapsulada; **ii)** α-GAL encapsulada; y **iii)** α-GAL libre en el agua de tres lotes diferentes (lotes **A**-**C**). Destacar que la actividad específica de la α-GAL encapsulada es mayor que la actividad específica que presenta la misma libre o de la mezcla de α-GAL encapsulada y α-GAL (**91**) libre. La actividad específica de la α-GAL encapsulada, respecto a la α-GAL libre, es tres veces mayor en los casos **A** y **B**, y 1.3 veces mayor en el caso **C**.

Tabla 3.42.*Tabla en la que se muestra, para cada uno de los casos testados, la eficiencia de encapsulación, la cantidad determinada por Western Blot de α-GAL encapsulada, y la actividad enzimática específica hallada. Tabla adaptada de la referencia 47.*

	Sol. inicial α-GAL (μg/ml)	EE* (%)	α-GAL encapsulada **(μg/mg)	Actividad enzimática específica (mol 4-MV/mg GAL/h)		
				Mezcla total	α-GAL encapsulada	α-GAL libre
A	8.5	39±10	2.3	913±27	924±89	304±14
B	20	37±9	5.8	846±270	1253±65	400±49
C	42.5	38±8	11.3	879±140	705±88	548±200

**Eficiencia de encapsulación; ** masa de la α-GAL encapsulada dividida por la masa total de los componentes que forman la vesícula.*

También se procedió a la realización del estudio de la morfología de estas nuevas nanovesículas mediante Cryo-TEM. En las imágenes tomadas de las vesículas se observa como la unilamelaridad y la baja distribución de tamaño se pierde por efecto de una mayor encapsulación de la proteína (figura 3.43). Esta pérdida de las propiedades de las SUVs podría estar relacionada con la disminución de la actividad enzimática específica (de ser 3 veces más activa en los casos **A** y **B** a ser tan sólo 1,3 veces más activa en el caso **C**).

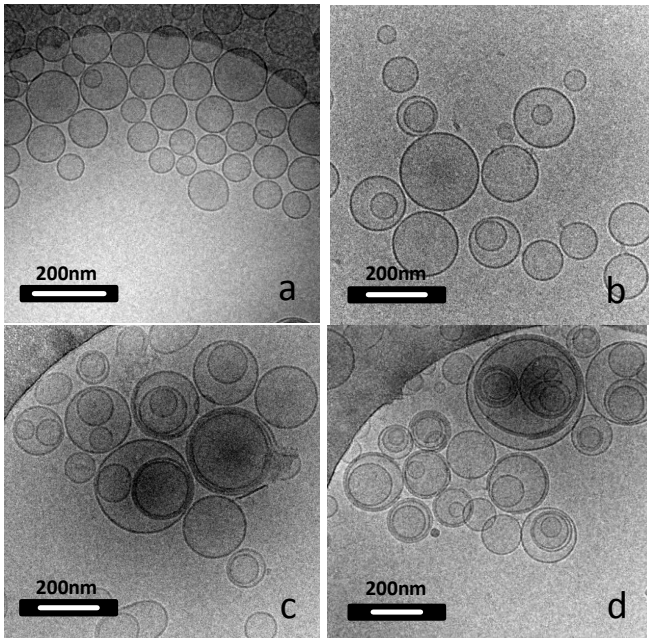


Figura 3.43. *Imágenes tomadas con la técnica Cryo-TEM que muestra la morfología de los conjugados con diferentes concentraciones de α-GAL. Lisosomas compuestos por DPPC:colesterol:colesterol-PEG-RGD éter que contienen* ***a)*** *0 μg/mg (****125****);* ***b)*** *2,3 μg/mg (****128****);* ***c)*** *5,8 μg/mg (****129****); y* ***c)*** *11,3 μg/mg(****130****) de α-GAL. Figura adaptada de la referencia 47.*

De la misma manera se realizaron ensayos de internalización celular y citometría de flujo con los conjugados **A** y **B**, que eran los más prometedores. Estos ensayos pusieron de manifiesto que las vesículas **125** no contenían α-GAL encapsulada tenían un mayor poder de internalización, seguido de los conconjugadas con 2,3 μ/mg (**128**) y con 5,8 μg/mg (**129**) (figura 3.44).

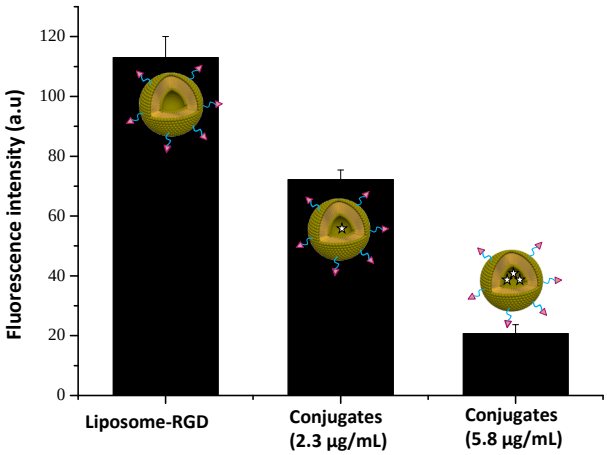


Figura 3.44. *Internalización celular de los liposomas con o sin α-GAL determinada por citometría de flujo. Figura extraída de la referencia 47.*

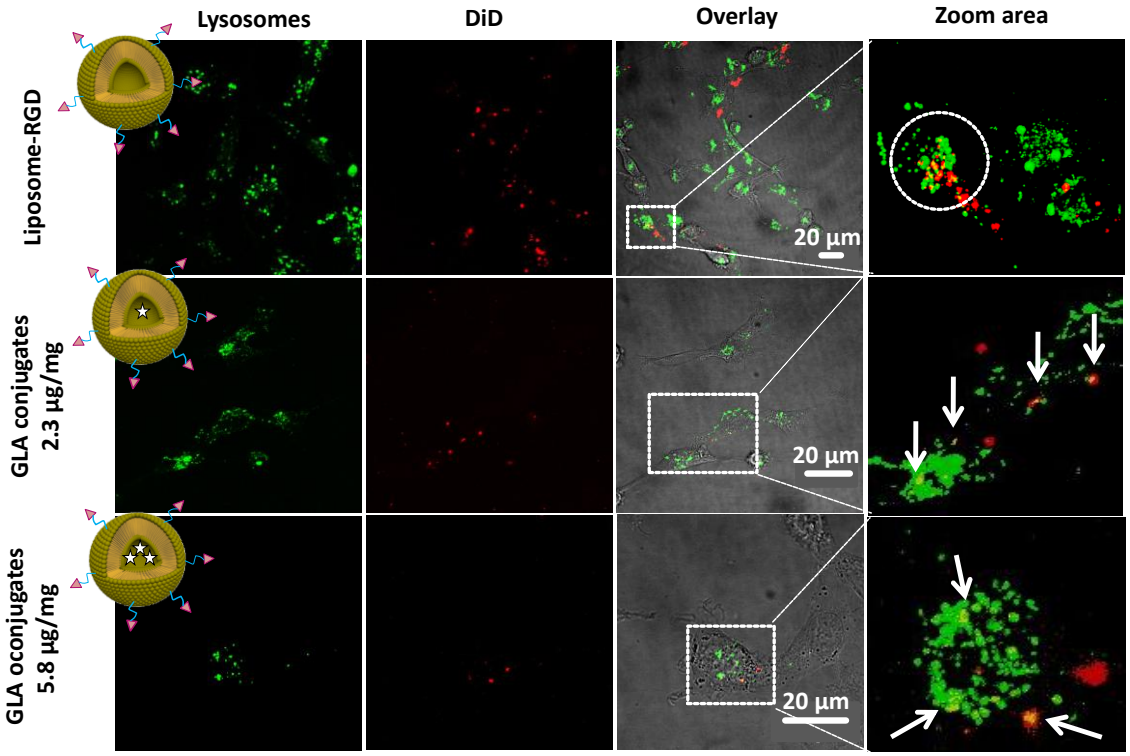


Figura 3.45. *Imágenes de microscopía confocal de la internalización y colocalización de los liposomas encapsulados o no con α-GAL con el lisosoma. Las flechas señalan la colocalización con el lisosoma de los diferentes liposomas. Figura extraída de la referencia 47.*

CONCLUSIONES

En referencia a los nanoconjugados PEG-α-GAL:

- Se ha optimizado un método de conjugación PEG-α-GAL, tanto monofuncional como bifuncional, que presenta un patrón de incorporación de cadenas de PEG sobre la α-GAL similar en ambos casos (incorporación de 1 a 3 PEGs).
- Se ha determinado que el parámetro clave para una buena incorporación de PEG es el proceso de activación del mismo más que de los equivalentes o del tiempo de incubación con la proteína.
- Los conjugados de α-GAL y Replagal, obtenidos con las condiciones optimizadas, presentan el mismo patrón de incorporación de PEG. Demostrando que no hay diferencias respecto a la accesibilidad de ambas proteínas.
- A parte de la PEGilación de α-GAL con PEG monofuncional, se ha realizado una PEGilación con PEGs modificados con péptidos directores, cRGDfK, P25 y P87, que habían mostrado habilidad para atravesar las membranas de los fibroblastos. Los patrones de PEGilación del α-Gal o Replagal con los derivados péptido-PEG son similares a los anteriores.
- En general, se ha demostrado que las condiciones de conjugación y purificación no afectan de manera notable a la actividad exhibida por la proteína original.
- Los conjugados de Replagal-PEG-RGD y Replagal-PEG-P25 presentan una actividad similar al Replagal comercial en células; y el conjugado Replagal-PEG-P87 presenta una actividad inferior a los antes mencionados. En cambio los conjugados que no contienen péptido director, tanto en el caso de Replegal como de α-GAL, la actividad decrece drásticamente.
- La internalización de los nanoconjugados en células MAEC muestra mayor entrada celular en los conjugados que contenían los péptidos cRGDfK y P25, y también una acumulación en los lisosomas.
- Los conjugados Replagal-PEG-RGD y Replagal-PEG-P25 son potenciales candidatos para posteriores estudios.

En referencia a las nanovesículas ricas en colesterol (SUV):

- Se ha puesto a punto la síntesis de un sistema colesterol-OEG-RGD, explorando diferentes tipos de unión del OEG al colesterol (éter y carbamato). Estas unidades se han empleado para la formación de SUVs compuestas por colesterol:DPPC, siendo posible así la incorporación de un péptido al sistema.
- La unidad que contiene una unión éter entre el Colesterol y la cadena de tetraetilenglicol da lugar a SUVs unilamelares de elevada homogeneidad de tamaño. El uso de otras unidades de colesterol-tetraetilenglicol, que contaban con otro tipo de enlace, da lugar a SUVs más heterogéneas.
- Las SUVs que contienen Colesterol-PEG-RGD éter presentan una internalización mucho mayor que las SUVs sin péptido director.

- Las SUVs que contienen Colesterol-PEG-RGD éter han permitido encapsular la proteína α-GAL a diferentes concentraciones y la evaluación de su internalización. Demostrando que a una concentración de 2,3 µg/ml de proteína, el sistema presenta una buena internalización y acumulación el lisosoma.

BIBLIOGRAFÍA

[1] C. de Duve. "The lysosome turns fifty", *Nature Cell Biology*. **2005**, *7*, 847-849.

[2] C. de Duve, B.C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, F. Appelmans. "Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue", *Biochem. J*. **1955**, *60*, 604-617.

[3] H.G. Hers, "α-Glucosidase Deficiency in Generalized Glycogen-Storage Disease (Pompe's Disease)". *Biochem. J*. **1963**, *86*, 11-16.

[4] R. Naaman Boustany, "Lysosomal storage diseases-the horizon expands*", Nature reviews. Neurology*. **2013**, *9*, 583-598.

[5] J.M.F.G. Aerts, W.W. Kallemeijn, W. Wegdam, M.J. Feraz, M.J. van Breemen, N. Dekker, G. Krammer,B.J. Poorthuis, J.E.M. Groener, J. Cox-Brinkman, S.M. Rombach, C.E.M. Hollak, G.E. Linthorst, M.D. Writte, H. Gold, G.A. van der Marel, H.S. Overkleeft, R.G. Boot. "Biomarkers in the diagnosis of lysosomal storage disorders: proteins, lipids, and inhibodies". *J Inherit Metab Dis*, **2011**, *34*, 605-619.

[6] P.J. Meikle, J.J. Hopwood, A.E. Clague, W.F. Carey. "Prevalence of lysosomal storage disorders". *JAMA*, **1999**, *281*, 249-254.

[7] B.J.H.M Poorthius, R.A. Wevers, W.J. Kleijer, J.E.M. Groemer, J.G.N. de Jong, S. van Weely, K.E. Niezen-Koning, O-P- van Diggelen, "The frequency of lysosomal storage disease in the Netherlands". *Hum Genet*, **1999**, *105*, 151-156.

[8] M. Fuller, P-J-Meikle, J.J. Hopwood, "Chapter 2: Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview". En A. Mehta, M. Beck, G. Sunder-Plassmann, *Fabry disease: Perspectives from 5 years of FOS*. Oxford: Oxford Pharmagenesis, **2006**.

[9] Biología molecular de la célula, libro del despacho de Miriam

[10] M.F. Coutinho, M.J. Prata, S. Alves, "Mannose-6-phosphate pathway: A review on its role in lysosomal function and dysfunction". *Molecular Genetics and Metabolism*, **2012**, *105*, 542-550.

[11] M. Beck, "New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy". *Human Genet*, **2007**, *121*, 1-22.

[12]http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/11/WC500012540.pdf

[13] T.M.Cox, "Biomarkers in lysosomal storage diseases: a review". *Acta Paedeatrica*, **2005**, *94*, 39-42.

[14]http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Brochure/2011/03/WC500104234.pdf

[15] http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2013-06-12/pdf/2013-13930.pdf

[16] T.M.Cox, "Chapter 9: Biomarkers in lysosomal storage diseases". En A. Mehta, M. Beck, G. Sunder-Plassmann, *Fabry disease: Perspectives from 5 years of FOS*. Oxford: Oxford Pharmagenesis, **2006**.

[17] E. Beutler, "Lysosomal storage diseases: natural history and ethical and economics aspects". *Molecular Genetics and Metabolism*, **2006**, *88*, 208-215.

[18] G. Parenti, C. Pignata, P. Vajro, M. Salerno, "New strategies for the treatment of lysosomal storage diseases (Review)". *International Journal of Molecular Medicine*, **2013**, *31*, 11-20.

[19] P. J. Orchard, B. R. Blazar, J. Wagner, L. Charnas, W. Krivit, J. Tolar, "Hematopoietic cell Therapy for Metabolic Disease". *The Journal of pediatrics*, **2007**, *151*, 340-346.

[20] R.J.Desnik, E.H. Schuchman, "Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Diseases: Lessons from 20 Years of Experience and Remaining Challenges". *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*, **2012**, *13*, 307-335.

[21] R.O. Brady, P.G. Pentchev, A.E. Gal, S.R. Hibbert, A.S. Dekaban, "Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency-Use of Purified Glucocerebrosidase in Gaucher's Disease". *N Engl J Med*, **1974**, *291*, 989-993.

[22] N.W. Barton, F.S. Furbish, G.J. Murray, M. Garfield, R.O.Brady, "Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease". *Proc. Natl. Acad. USA*, **1990**, *87*, 1913-1916.

[23] R.E. Boyd, G. Lee, P. Rybczynski, E.R. Benjamin, R. Khanna, B.A. Wustman, K.J. Valenzano, "Pharmacological Chaperones as Therapeutics for Lysosomal Storage Diseases". *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 2705-2725.

[24] M.S. Sands, B.L. Davidson, "Gene Therapy for Lysosomal Storage Diseases". *Molecular Therapy*, **2006**, *13*, 839-849.

[25] S. Muro, "New biotechnological and nanomedicine strategies for treatment of lysosomal storage disorders". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **2010**, *2*, 189-204.

[26] F.M. Platt, M. Jeyakumar, "Substrate reduction therapy". *Acta Paediatrica*, **2008**, *97*, 88-93.

[27] R. Schiffmann, "Fabry disease". *Pharmacology&Therapeutics*, **2009**, *122*, 65-77.

[28] F. Cecchi, B. Tomberli, A. Morrone, "Anderson-fabry, the histrionic disease: from genetics to clinical management". *Cardiogenetics*, **2013**, *3*, 13-23.

[29] S.C. Garman, D.N. Garboczi, "The Molecular Defect Leading to Fabry Disease: Structure of Human α-Galactosidase". *J. Mol. Biol.*, **2004**, *337*, 319-335.

[30] D.P. Germain, "Chapter 7: General aspects of X-linked diseases". En A. Mehta, M. Beck, G. Sunder-Plassmann, *Fabry disease: Perspectives from 5 years of FOS*. Oxford: Oxford Pharmagenesis, **2006**.

[31] D.P. Germain, "Fabry disease". *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **2010**, *5*, 30-79.

[32] S.M. Rombach, N. Dekker, M.G.Bouwman, G.E. Linthorst, A.H. Zwinderman, F.A. Wijburg, S. Kuiper, M.A. vd Bergh Weerman, J.E.M. Groenes, B.J. Poorthuis, C.E.M. Hollak, J.M.F.G. Aerts, "Plasma globotriaosylphingosine: Diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease". *Biochimica et Biophysica Acta*, **2010**, *1802*, 741-748.

[33] M.J. van Breemen, S.M. Rombach, N. Dekker, B.J. Poorthius, G.E. Linthorst, A.H. Zwinderman, F. Breunig, c. Wanner, J.M. Aerts, C.E. Hollak, "Reduction of elevated plasma globotriaosylphingosine in patients with classic Fabry disease following enzyme replacement therapy". *Biochimica et Biophysica Acta*, **2011**, *1812*, 70-76.

[34] C.C. Sweeley, B. Klionsky, "Fabry's Disease: Classification as a Sphingolipidosis and Partial Characterization of a Novel Glycolipid". *J. Biol. Chem*., **1963**, *238*, 3148-3150.

[35] R.O. Brady, A.e. Gal, R.M. Bradley, E. Mårtensson, "The Metabolism of Ceramide Trihexosides: I. Purification and properties of an enzyme that cleaves the terminal galactose molecule of galactosylgalactosylglucosylceramide". *J. Biol. Chem*., **1967**, *242*, 1021-1026.

[36] R. Schiffmann, R.O. Brady, "Chapter 36: Development of enzyme replacement therapy for Fabry disease". En A. Mehta, M. Beck, G. Sunder-Plassmann, *Fabry disease: Perspectives from 5 years of FOS*. Oxford: Oxford Pharmagenesis, **2006**.

[37] A. Pisani, B. Visciano, G. Diez Roux, M. Sabbatini, C. Porto, G. Parenti, M. Imbriaco, "Enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: State of the art and review of the literature". *Molecular Genetics and Metabolism*, **2012**, *107*, 267-275.

[38] www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document.../WC500053612.pdf

[39] U. Ramaswami, "Update of role of agalsidasa alfa in management of Fabry disease". *Drug Design, Development and Therapy*, **2011**, *5*, 155-173.

[40] www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document.../WC500020547.pdf

[41] Y. Suzuki, "Chaperone therapy update: Fabry disease, G_{M1}-gangliosidosis and Gaucher disease". *Brain & Development*, **2013**, *35*, 515-523.

[42] R. Khanna, R. Soska, Y. Lun, J. Feng, M. Frascella, B. Young, N. Brignol, L. Pellegrino, S.A. Sitaraman, R.J. Desnick, E.R. Benjamin, D.J. Lockhart, K.J. Valenzano, "The Pharmacological Chaperone 1-Deoxygalactonojirimycin Reduces Tissue Globotriaosylceramide Levels in a Mouse Model of Fabry Disease". *Molecular Therapy*, **2010**, *18*, 23-33.

[43] E.R. Benjamin, R. Khanna, A. Schilling, J.J. Flanagan, L.J. Pellegrino, N. Brignol, Y. Lun, D. Guillem, B.E. Ranes, M. Frascella, R. Soska, J. Feng, L. Dungan, B. Young, D.J. Lockhart, K.J. Valenzano, "Co-administration With the Pharmacological Chaperone AT1001 Increases Recombinant Human α-Galactosidase A Tissue Uptake and Improves Substrate Reduction in Fabry Mice". *Molecular Therapy*, **2012**, *20*, 717-726.

[44] S. Mumtaz, B.K. Bachhawat, "Enhanced intracellular stability and efficacy of PEG modified dextranase in the treatment of a model storage disorder". *Biochim Biophys Acta*, **1994**, *1199*, 175-182.

[45] L.D. Steger, R.J. Desnick, "Enzyme therapy. VI: comparative in vivo fates and effects on lysosomal integrity of enzyme entrapped in negatively and positively charged liposomes". *Biochim Biophys Acta*, **1977**, 464, 530-546.

[46] J.E. Stefano, L. Hou, D. Honey, J. Kyazike, A. Park, Q. Zhou, C.Q. Pan, T. Edmuns, "In vitro and in vivo evaluation of a non-cabohydrate targeting platform for lysosomal proteins". *Journal of controlled release*, **2009**, *135*, 113-118.

[47] I. Cabrera, I. Abasolo, J.L. Corchero, E. Elizondo, P. Rivera, S. Sala, M. Rivas, M. Melgarejo, D. Pulido, M. Royo, A. Villaverde, M.F. García-Parajo, S. Schwartz Jr., N. Ventosa, J. Veciana. "RGD-functionalized Liposomes loaded with α-Galactosidase A as a Potential Nanomedicine for the Fabry's Disease". *Artículo en preparación*.

[48] M.I. Giannotti, O. Esteban, M. Oliva, M.F. García-Parajo, F. Sanz, "pH-Responsive Polysaccharide-Based Polyelectrolyte Complexes As Nanocarriers for Lysosomal Delivery of Therapeutic Proteins". *Biomacromolecules*, **2011**, *12*, 2524-2533.

[49] F.M. Veronese, "Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions". *Biomaterials*, **2001**, *22*, 405-417.

[50] E. Ruoslahti, " RGD and other recognition sequences for integrins". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, **1996***, 12,* 697-715*.*

[51] K. Temming, R.M. Schiffelers, G. Molema, R.J. Kok, "RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature". *Drug Resistance Updates,* **2005***, 8,* 381-402*.*

[52] X. Dai, Z. Su, J.O. Lui, "An improved synthesis of a selective αvβ3-integrin antagonist cyclo(-RGDfK-)". *Tetrahedron Letters,* **2000***, 41,* 6295-6298*.*

[53] J.L. Corchero, R. Mendoza, J. Lorenzo, V. Rodríguez-Sureda, C. Domínguez, E. Vazquez, N. Ferrer-Miralles, A. Villaverde, "Integrated Approach to Produce a Recombinant, His-Tagged Human α-Galactosidase A in Mammalian Cells". *Biotechnol. Prog.*, **2011**, *27*, 1206-1217.

[54] S.C. Garman, D.N. Garboczi, "Structural basis of Fabry disease". *Molecular Genetics and Metabolism*, **2002**, *77*, 3-11.

[55] A. Gámez, L. Wang, M. Straub, M.G. Patch, R.C. Stevens, "Toward PKU Enzyme Replacement Therapy: PEGylation with Activity Retention for Three Forms of recombinant Phenylalanine Hydroxylase". *Molecular Therapy*, **2004**, *9*, 124-129.

[56] V.P. Torchilin, "Recent advantatges with liposomes as pharmaceutical carriers". *Nature Reviews*, **2005**, *4*, 145-160.

[57] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids". *Journal of Molecular Biology*, **1965**, *13*, 238-252.

[58] R.N. Davidson, L. Di Martino, L. Gradoni, R. Giacchino, R. Russo, G.B. Gaeta, R. Pempinello, S. Scott, F. Raimondi, A. Cascio, T. Prestileo, L. Caldeira, R. J. Wilkinson, A.D.M. Bryceson, "Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial". *Quarterly Journal of Medicine*, **199**4, *87*, 75-81.

[59] Y.P. Patil, S. Jadhav, "Novel methods for liposome preparation". *Chemistry and Physics of Lipids*, **2014**, *177*, 8-18.

[60] M. Cano-Sarabia, N. Ventosa, S. Sala, C. Patiño, R. Arranz, J. Veciana, "Preparation of Uniform Rich Cholesterol Unilamellar Nanovesicles Using CO_2-Explanded Solvents". *Langmuir*, **2008**, *24*, 2433-2437.

[61] L. Lesoin, O. boutin, C. Crampon, E. Badens, "CO_2/water/surfactant ternary systems and liposome formation using supercritical CO_2: A review". *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2011**, *377*, 1-14.

[62] I. Cabrera, E. Elizondo, O. Esteban, J.L. corchero, M. Melgarejo, D. Pulido, A. Córdoba, A. Moreno, U. Unzueta, E. Vazquez, I. Abasolo, S. Schwartz Jr., A. Villaverde, F. Albericio, M. Royo, M.F. García-Parajo, N. Ventosa, J. Veciana. "Multifunctional Nanovesicles-Bioactive Conjugates Prepared by a One-Step Scalable Method Using CO_2-Expanded Solvents". *Nano Letters*, **2013**, *13*, 3766-3774.

[63] P. Dubey, V. Mishra, S. Jain, S. Mahora, S.P. Vyas, "Liposomes Modified with Cyclic RGD Peptide for Tumor Targeting". *Journal of Drug Targeting*, **2004**, *12*, 257-264.

[64] X. Pan X., G. Wu, W. Yang, R.F. Barth, W. Tjarks, R.J. Lee, "Synthesis of cetubimax-immunoliposomes via cholesterol-based membrane anchor for targeting of EGFR". *Bioconjugate chemistry*, **2007**, *18*, 101-108.

[65] Y. Negishi, D. Omata, H. Iijima, N. Hamano, Y. Endo-Takahashi, M. Nomizu, Y. Aramaki, "Preparation and Characterization of Laminin-Derived Peptide AG73-Coated Liposomes as a Selective Gene Delivery Tool". *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2010**, *33*, 1766-1769.

[66] T. Masuda, H. Akita, T. Nishio, K. Niikura, K. Kogure, K. Ijiro, H. Harashima, "Development of lipid particles targeted via sugar–lipid conjugates as novel nuclear gene delivery system". *Biomaterials*, **2008**, *29*, 709-723.

[67] V. Barragan-Montero, J. Winum, J.P. Molès, E. Juan, C. Clavel, J.L. Montero, "Synthesis and properties of isocannabinoid and cholesterol derivatized rhamnosurfactants: application to liposomal targeting of keratinocytes and skin". *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, *40*, 1022-1029.

[68] J.M. Antos, G.M. Miller, G.M. Grotenbreg, H.L. Ploegh, "Lipid Modification of Proteins through Sortase-Catalyzed Transpeptidation". *Journal of the American Chemical Society*, **2008**, *130,* 16338-16343.

[69] N. Matsumori, N. Tamada, K. Nozu, H. Okazaki, T. Oishi, M. Murata, "Design and Synthesis os Sphingomyelin-Cholesterol Conjugates and Their Formation of Ordered Membranes". *Chemistry European Journal*, **2011**, *17*, 8568-8575.

[70] Patente WO 2014/001509 A1

CONCLUSIONES

En la presente tesis se ha presentado la utilización del polímero terapéutico polietilenglicol (PEG) para mejorar la farmacocinética y farmacodinámica de diferentes fármacos de naturaleza muy distinta. Y por último el empleo de este mismo polímero como modificador de otras macromoléculas a través de la síntesis de un derivado de este polímero para la formación como constituyente de una vesícula unilamelar pequeña (SUV) y su introducción de un péptido director.

La primera aproximación consistió en la síntesis a escala superior de 10 g de una estructura dendrimérica con un núcleo de DTPA y ramas de talla molecular definida de oligoetilenglicol (OEG) que presentaba cuatro posiciones equivalentes y una diferenciada, denominada punto focal, para su unión al fármaco antitumoral 5-Fluorouracilo (5FU).

Se llevo a cabo un estudio de diferentes espaciadores, con naturalezas diferentes, para la unión entre la molécula de 5FU y el dendrón basado en OEG, dando especial importancia para la elección del derivado más adecuado en la liberación del fármaco que estos presentaban en medio acuoso a diferentes pHs y en plasma de ratón. Siendo elegido finalmente un espaciador basado en ácido adípico y cuya unión con el fármaco era un enlace éster.

Se optimizó la unión del fármaco a la estructura dendrimérica y el acoplamiento de un fluoróforo adecuado para llevar a cabo estudios de biodistrubución en ratones. Estos ensayos demostraron que el dendrón no se acumulaba específicamente en tumor pero sí que este presentaba una rápida excreción renal, presumiblemente debido a su pequeño tamaño. No se pudieron llevar a cabo estudios de eficacia in vivo, a pesar de los grandes esfuerzos realizados, debido a una gran labilidad del enlace entre el dendrón y el fármaco.

Se concluye que este tipo de estructuras, dendrón de talla molecular pequeña, con el enlace éster como método de unión del fármaco no es compatible con nuestro sistema, ya que la estructura del dendrón hace que el 5FU quede demasiado expuesto al medio externo. Por lo que sería necesario el estudio de dendrones de generaciones superiores para la administración del fármaco 5FU y si estos nuevos conjugados son capaces de presentar una acumulación superior en tumor por efecto EPR.

Seguidamente se evaluó la síntesis de los dendrones presentados en el capítulo 1 de la presente tesis para la administración del derivado de la campteotecina, 7-Etil-10-hidroxi-camptotecina (SN38), con el fin de aumentar la solubilidad de este fármaco por efecto el efecto solubilizador que presenta el OEG. Debido a que en este caso el peso molecular del fármaco que se quería unir al dendrón, SN38, era mayor a la del 5FU y su insolubilidad en solventes acuosos muy alta, se decidió emplear ramas de talla molecular aproximadamente cuatro veces superior al planteado en el capítulo 1.

Se sintetizó un derivado apropiado para la unión de SN38 al dendrón. Este derivado estbaa compuesto por un espaciador capaz de unirse en forma de amida al dendrón y a través de un enlace éster al fármaco. La unión de este espaciador a SN38 se llevó a cabo a través del hidroxilo presente en el C_{20} de su estructura, protegiendo así la lactona que forma parte de su estructura y cuya hidrólisis provoca la perdida de actividad farmacológica de la droga. Este derivado se obtuvo con buenos rendimientos, incluso superando aquellos descritos en la bibliografía existente.

El dendrón de talla molécular cuatro veces superior al planteado en el capítulo 1 no pudo ser llevado a cabo. A pesar de que existían evidencias experimentales, como la desaparición del producto de partida y la aparición en el espectro de MALDI-TOF del crudo de reacción de esta macromolécula de picos con masas moleculares similares a las esperadas, no se pudo determinar con exactitud la formación de este compuesto, por lo que se abandonó esta estrategia. Se decidió emplear el dendrón empleado en el capítulo 1 para la conjugación de este conjugado, pero como en un principio habíamos propuesto este tipo de dendrón era de un tamaño pequeño y no se conseguía obtener con él una solubilidad adecuada para el fármaco SN38.

Debido a estos resultados, se diseñó un nuevo sistema en el que no se emplearía una estructura dendrimérica sino una lineal. Ésta nueva estrategia se basaba en la utilización de una cadena lineal de OEG de talla definida bifuncional que sería unida en uno de sus extremos al SN38 y su extremo opuesto capado en forma de acetoamida o unido a un péptido director para llevar a cabo un direccionamiento activo del conjugado.

Se sintetizaron varios péptidos y fueron sometidos a ensayos in vitro de su internalización, obteniendo así un candidato adecuado, el péptido TCP-1.

Tras estos ensayos se llevó a cabo la síntesis de los conjugados OEG-SN38 con su extremo N-terminal en forma de acetoamida o unida al péptido director TCP-1, destacar que ambos conjugados aumentaron la solubilidad del SN38 de manera extraordinaria haciendo posible su administración como agentes terapéuticos a diferencia de lo que ocurre con la droga libre. De manera paralela se sintetizaron ambos conjugados con dos fluoróforos diferentes, carboxifluoresceína y Alexa Fluor 750, adecuados para la realización de ensayos *in vitro e in vivo*, respectivamente.

Los ensayos de biodistribución llevados a cabo con este tipo de conjugados demostraron que el direccionamiento activo de este conjugado era más eficaz que el direccionamiento pasivo del conjugado sin péptido, ya que se observa una mayor acumulación en tumor de aquellos conjugados que presentaban en su estructura el péptido director TCP-1.

También se ha estudiado la PEGilación de proteínas para la mejora del tratamiento actual basada en terapia sustitutiva para la enfermedad de Fabry, un enfermedad rara derivado de un

deficiencia proteína que tiene como consecuencia la acumulación en el lisosoma de globotriaosilceramida (Gb3).

Con este objetivo se llevo a cabo la optimización de un método de conjugación PEG-α-GAL, tanto monofuncional como bifuncional, que presenta un incorporación de cadenas de PEG similar en dos proteínas obtenidas de manera diferente, α-GAL y Replegal. Estos conjugados presentaban el mismo patrón de incorporación de PEG. Demostrando que no hay diferencias respecto a la accesibilidad de ambas proteínas.

A parte de la PEGilación simple, se ha realizado una PEGilación con péptidos directores, cRGDfK, P25 y P87, que han demostrado capacidad para atravesar las membranas de los fibroblastos con un patrón de PEGilación similar entre ellos.

Los conjugados de Replagal-PEG-RGD y Replagal-PEG-P25 presentan una actividad similar al Replagal comercial en células; y el conjugado Replagal-PEG-P87 presenta una actividad inferior a los antes mencionados. En cambio los conjugados que no contienen péptido director, tanto en el caso de Replegal como de α-GAL, la actividad decrece drásticamente. Es más se observó, mediante ensayos de internalización de los conjugados en células MAEC, que los conjugados que contenían los péptidos cRGDfK y P25 presentan una mayor entrada celular y colocalización lisosomal.

Si tenemos en cuenta lo realizado con PEG como modificador de otros sistemas de administración, podemos concluir que se ha puesto a punto la síntesis de un sistema colesterol-PEG-RGD, explorando diferentes tipos de unión del OEG al colesterol, que se han empleado en la formación de SUVs.

La unidad que contiene una unión éter entre el Colesterol y la cadena de tetraetilenglicol da lugar a SUVs unilamelares de elevada homogeneidad de tamaño, mientras que el uso de otras unidades de colesterol-tetraetilenglicol, que contaban con otro el enlace carbamato, dan lugar a SUVs más heterogéneas. Si evaluó la influencia que tenía el péptido RGD en este tipo de sistemas y se determinó que las SUVs que contienen Colesterol-PEG-RGD éter presentan una internalización mucho mayor que las SUVs sin péptido director.

Por lo tanto, esta tesis doctoral es un ejemplo de la versatilidad del polímero terapéutico PEG para su utilización en biomedicina y la influencia que tiene un péptido director en este tipo de sistemas de administración.

EXPERIMENTAL

MATERIALES Y METÓDOS

1 Disolventes y reactivos

A continuación se presenta un tabla con los disolventes usados y algunos de los reactivos más usados durante el desarrollo de este trabajo (Tabla 1).

Tabla 1. *Disolventes y reactivos.*

Abreviatura	Nombre	Calidad	Casa comercial
	1, 4-dioxano	Síntesis	---
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	Reactivo 99%	Iris biotech
HOBt	1-hidroxibenzotriazol	Reactivo 99%	Iris biotech
DMAP	4-dimetilaminopiridina	Reactivo 99%	Sigma-Aldrich
AcOEt	Acetato de etilo	Síntesis	Scharlau
	Acetona	Síntesis	Panreac
ACN	Acetonitrilo	Análisis	Scharlau
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	MALDI	---
AcOH	Ácido acético	Síntesis	Panreac
	Ácido citríco	Reactivo 99%	Panreac
HCl 4M	Ácido clorhídrico 4M en 1,4-dioxano	Síntesis	Sigma-Aldrich
FA	Ácido fórmico	Análisis	Merck
SA	Ácido sinapínico	MALDI	----
TFA	Ácido trifluoroacético	Análisis	Fluorochem
ACH	Ácido-α-ciano-4-hidrocinámico	MALDI	---
	Agua	milliQ	
Ac_2O	Anhídrido acético	Síntesis	Panreac
	Bicarbonato de sodio	Reactivo 99%	Panreac
	Cloruro de sodio	Reactivo 99%	Panreac
DCM	Diclorometano	Síntesis	Scharlau
Et_2O	Dietiléter	Síntesis	---
DMF	Dimetilformamida	Síntesis	----
DMSO	Dimetilsulfóxido	Síntesis	----
Boc_2O	Di-tert-butil-dicarbonato	Reactivo 99%	Sigma-Aldrich
EDT	Etanditiol	Reactivo 90%	Sigma-Aldrich
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tri-tripirrolidinifosfonio	Reactivo 98%	Iris biotech
MeOH	Metanol	Síntesis, Análisis	Scharlau, ----
DIEA	N, N- diisopropiletilamina	Síntesis	Sigma-Aldrich
DIC	N, N'-diisopropilcarbodiimida	Reactivo 99%	Sigma-Aldrich
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida	Reactivo 99%	Sigma-Aldrich
Boc-TOTA	N-Boc-4, 7, 10-trioxa-1, 13-tridecandiamina	Reactivo 99%	Iris botiech
Hex	n-Hexano	Síntesis	Scharlau
PfOH	Pentafluorofenol	Reactivo 99%	Sigma-Aldrich
	Piperidina	Síntesis	SDS
	Sulfato de magnesio	Reactivo 99%	Panreac
TBME	Tert-butilmetiléter	Síntesis	---
TEA	Trietilamina	Síntesis	Sigma-Aldrich
TIS	Triisopropilsilano	Reactivo 99%	Sigma-Aldrich

Todos los disolventes fueron usados sin purificación adicional.

a) Para las reacciones en que fue necesario utilizar DCM anhídro, este fue destilado sobre CaH_2.

b) El agua destilada fue filtrada con un sistema milli-Q Academic A10 (Millipore), resistividad superior a 18 MΩ/cm.

2 Instrumentos utilizados

Instrumentos generales:

Agitador orbital:	Heildoph UNIMAX 1010.
Balanzas:	Mettler Toledo PB3002-S, 2 cifras significantes. Sartorius, CP224S, 4 cifras significantes. Mettler Toledo AT261 Detlarange, 5 cifras significantes.
Centrífuga eppendorffs:	Beckman Coulter, 5415D eppendorf. Centrifuga para tubos de 1,5 y 2 ml.
Centrífuga:	Beckman Coulter Allegra 21 R. Centrifuga para tubos de 15 y 50 ml.
Espectrofotómetro UV:	Shimadzu UV-250IPC.
Evaporador:	Rotavapor Heildoph Labarota 400B.
HPLC-analítico:	Módulo Waters Alliance 2695 equipado por dos bombas, un mezclador de alta presión, un autoinyector, un detector UV-visible multicanal Photodiode Array Detector 996.
HPLC-analítico 2:	Módulo Waters Alliance 2695 equipado por dos bombas, un mezclador de alta presión, un autoinyector, un detector UV-visible Dual λ Absorbance Detector 2487.
HPLC-MS analítico:	Módulo Waters Alliance 2695 equipado por dos bombas, un mezclador de alta presión, un autoinyector, un detector UV-visible multicanal Photodiode Array Detector 996 y un espectrómetro de masas Micromass ZQ.
HPLC-MS semipreparativo:	Módulo Waters 600 Controller equipado por dos bombas, un mezclador de alta presión, un módulo Waters Alliance 2767 Sample Manager con un inyector y colector de fracciones. Detector UV-visible Dual λ Absorbance Detector 2487 y un espectrómetro de masas Micromass ZQ.
Liofilizadores:	VirTis modelo Genesis. Christ modelo Alpha 1-4 LD.
MALDI-TOF:	Perseptive Biosystems Mariner (Plataforma de Proteómica, PCB). ABSciex 4800 Maldi-TOF/TOF (CCiTUB, Facuiltad de Química UB).
pH-metro:	pH-metro Crisol modelo GLP21.
RMN:	Varian Mercury 400MHz (CCiTUB, PCB).

Instrumentos empleados en el laboratorio del CIBBIM-Nanomedicine (Hospital Vall d'Hebrón) para los experimentos *in vitro* e *in vivo*:

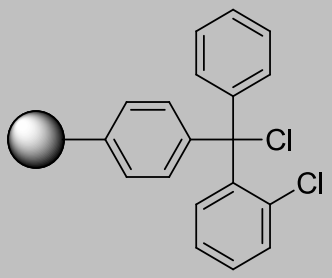
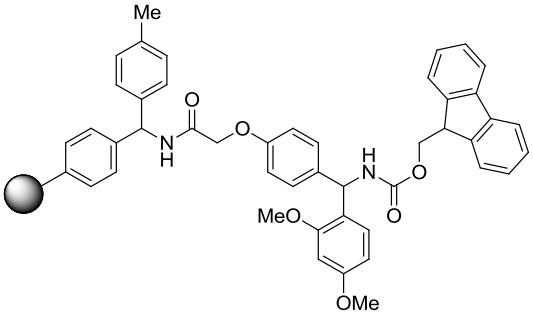
Balanzas:	OHAUS, Adventurer Pro AV 4101 AS (RADWAG) AS 220/C/2 OHAUS Pioneer
Espectrómetro para placas de Elisa:	Biotek, Epoch
Microscopio confocal:	FV1000, Olympus
Citometro de flujo:	FacsCalibur
Incubadora:	AutoFlow IR direct heat
Contador autométicо de células:	Countess, Invitrogen
Sistema de escáner *in vivo:*	VIS Spectrum, Perkin-Elmer

3 Protocolos generales de síntesis en fase sólida

3.1 Soportes poliméricos (resinas)

La síntesis en fase sólida de los péptidos descritos en el presente trabajo se lleva a cabo usando las resinas resumidas en la Tabla 2. En todos los casos se han usado soportes poliméricos de estireno entrecruzado con un 1% de divinilbenceno.

Tabla 2. *Resinas usadas en la síntesis peptídica.*

Abreviatura	Nombre	Estructura
Cl-Trt	2-Clorotritilo	
Fmoc-Rink-Amide MBHA	Fmoc-Rink-Amida MBHA	

La síntesis en fase sólida de manera manual se lleva a cabo en jeringuillas, de tamaño variable en función de la cantidad de resina empleada, provistas de un filtro poroso en su extremo, que actúan a modo de reactores, o en placas filtrantes de borosilicato acoplados a un sistema de vacío, en los casos en que la cantidad de resina supera los 5g. El exceso de disolvente y reactivos se elimina mediante filtración al vacío.

3.2 Resina Cl-Trt

Esta resina se emplea en la mayoría de los casos descritos en este trabajo. Antes de llevar a cabo la síntesis peptídica es necesario llevar a cabo un tratamiento inicial a la resina. Este tratamiento tiene como fin hinchar la resina y la eliminación de posibles impurezas que puedan contener los soportes poliméricos. Este tratamiento varía en función de la resina y su funcionalización.

3.2.1 Acondicionamiento de la resina Cl-Trt

Debido a la labilidad de esta resina durante la síntesis llevada a cabo con este soporte se usa DCM filtrado a través de alúmina básica, eliminando así las trazas ácidas que pueda contener el disolvente. El acondicionamiento de la resina se lleva a cabo según el protocolo descrito en la Tabla 3.

Tabla 3. *Acondicionamiento de la resina Cl-Trt.*

Procedimiento	Reactivos	Ciclos	Tiempo/ciclos
Lavado	DCM	5	1 min
Lavado	DMF	5	1 min
Lavado	DCM	4	1 min
Lavado	DCM	1	10 min

3.2.2 Incorporación del primer aminoácido a la resina

La incorporación del primer aminoácido sobre esta resina consiste en la formación de un enlace éster, el procedimiento a seguir se detalla en la Tabla 4. Al finalizar el procedimiento se lleva a cabo la filtración y lavado de la resina.

Tabla 4. *Incorporación del primer aminoácido sobre resina Cl-Trt.*

Procedimiento	Reactivos	Ciclos	Tiempo/ciclos
Lavado	DMF	5	1 min
Lavado	DCM	5	1 min
Acoplamiento	A.A/DIEA (1/10mmol)*	1	55 min
Eliminación de puntos reactivos	MeOH(0,8 ml/g resina)	1	10 min
Lavado	DMF	3	1 min
Lavado	DCM	5	1 min

*******La cantidad de DIEA se añade en dos veces: primero 3mmol que se dejan reaccionar con el aminoácido y la resina durante 10' y seguidamente los 7mmol restantes que se dejan reaccionar durante 45'.*

3.2.3 Elongación de la cadena peptídica

En todos los casos se usa estrategia Fmoc para la síntesis peptídica. Los siguientes aminoácidos se incorporan mediante la formación de un enlace amida, usando agentes de acoplamiento tipo carbodiimida. Los aminoácidos se incorporan en forma Fmoc-aa, con su cadena lateral protegida dependiendo de la naturaleza de esta. El procedimiento se encuentra descrito en la Tabla 5.

Tabla 5. *Elongación de la cadena peptídica.*

Procedimiento	Reactivos	Ciclo	Tiempo/ciclo
Lavado	DMF	3	1 min
Lavado	DCM	3	1 min
Desprotección	Piperidina 20%/DMF	1	2 min
		2	10 min
Lavado	DMF	3	1 min
Lavado	DCM	3	1 min
Acoplamiento	Fmoc-aa/agente acoplante	1	1 h
Lavado	DMF	3	1 min
Lavado	DCM	3	1 min

3.2.4 Escisión del péptido de la resina Cl-Trt

En el mismo reactor en el que se realiza la síntesis se adiciona la solución acidolítica. La composición depende de la resina empleada y del tipo de producto que queramos obtener (péptido completamente desprotegido o péptido completamente protegido). Las mezclas acidolíticas que se emplean en este trabajo y el tiempo empleado en la escisión se encuentran detalladas a continuación (Tabla 6).

Tabla 6. *Mezclas acidóliticas empleadas.*

Producto	Mezcla acidolítica	Tiempo
Péptido protegido	DCM/TFE/AcOH 3:1:1	1 h
Péptido desprotegido	DCM/TFA 98:2	6x2 min

La desprotección total de los grupos protectores de las cadenas laterales de todos los aminoácidos que componen el péptido se lleva a cabo usando mezclas TFA/H_2O/TIS/EDT, variando la proporción de estos componentes en función de cada péptido. Estas proporciones se encuentran especificadas según cada caso.

3.3 Resina Fmoc-Rink-Amide MBHA

Esta resina cuenta con una menor labilidad en comparación con la resina anterior, por lo cual no fue necesario usar DCM filtrado a través de alumina básica.

3.3.1 Acondicionamiento de la Resina Fmoc-Rink-Amide MBHA

El protocolo de acondicionamiento de la resina se encuentra descrito en la Tabla 7.

Tabla 7. *Acondicionamiento de la Fmoc-Rink-Amide MBHA.*

Procedimiento	Reactivo	Ciclo	Tiempo/ciclo
Lavado	DCM	3	1 min
Hinchamiento	TFA 40%/ DCM	1	30 min
Lavado	DCM	3	1 min
Lavado	MeOH	2	1 min
Lavado	DCM	1	1 min
Neutralización	DIEA 5% /DCM	3	3 min
Lavado	DCM	5	1 min
Desprotección	Piperidina 20%/DMF	1 2	2 min 10 min
Lavado	DMF	3	1 min
Lavado	DMF	3	1 min

3.3.2 Incorporación del primer aminoácido a la resina

En este caso el primer aminoácido se incorpora a través de la formación de un enlace amida, siguiendo el procedimiento detallado en la Tabla 8.

Tabla 8 *Incorporación del primer aminoácido sobre resina Fmoc-Rink-Amide MBHA.*

Procedimiento	Reactivos	Ciclos	Tiempo/ciclos
Lavado	DMF	5	1 min
Lavado	DCM	5	1 min
Acoplamiento	Fmoc-aa/agente acoplante	1	1 h
Lavado	DMF	3	1 min
Lavado	DCM	5	1 min
Eliminación de puntos reactivos	AcO_2(5 eq)/DIEA (10 eq)	1	15 min
Lavado	DMF	3	1 min
Lavado	DCM	5	1 min

3.3.3 Elongación de la cadena peptídica

Se sigue el procedimiento descrito en la Tabla E1.5.

3.3.4 Escisión del péptido de la resina Fmoc-Rink-Amide MBHA

En las síntesis realizadas sobre este soporte polimérico se usa la mezcla acidolítica TFA/H_2O/TIS/EDT 95:2,5:1:2,5 en todos los casos, durante 4h, obteniendo el producto escindido del soporte completamente desprotegido.

4 Ensayos cualitativos utilizados en síntesis en fase sólida

4.1 Ensayo cualitativo con ninhidrina [1]

Este ensayo, también llamado test de Kaiser, permite detectar aminas primarias en un polímero. Este proceso puede servir como control cualitativo durante la elongación de la secuencia peptídica. En un tubo de vidrio se toma una pequeña alícuota de resina limpia y seca y se añaden 6 gotas del reactivo A y 2 gotas del reactivo B. A continuación se calienta el tubo durante 3 min a 110 ºC. Transcurrido este tiempo se comprueba el color de la solución. Una coloración amarilla indica que no hay aminas primarias libres en la muestra, en cambio una coloración azul-lilacea indica la presencia de aminas libres.

La preparación de los reactivos A y B se detallan a continuación:

Reactivo A: Se disuelven 40 g de fenol en 10 ml de EtOH absoluto (solución 1). Para hacer la solución 2, se disuelven 2 ml de KCN 10mM acuoso en 100 ml de piridina recién destilada sobre ninhidrina. Las soluciones se agitan por separado con 4 g de resina Amberlite MB-3 durante 45 min. Después se filtran y se mezclan.

Reactivo B: Se prepara una disolución de 2.5 g de ninhidrina en 50 ml de EtOH absoluto

4.2 Ensayo cualitativo con cloroanilo [2]

Este ensayo permite detectar la presencia de aminas secundarias libres en un polímero. En un tubo de vidrio se toma una pequeña alícuota de resina limpia y seca y se añaden 5 gotas de la solución de cloroanilo y 20 gotas de acetona. Se deja reaccionar la mezcla 5 min a temperatura ambiente. Una coloración amarilla indica la ausencia de aminas secundarias libres, en cambio, una coloración verde-azulada indica su presencia en el polímero.

Disolución de cloroanilo: Preparar una solución de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloroanilo) en tolueno.

5 Ensayos cuantitativos utilizados en síntesis en fase sólida

5.1 Cuantificación de grupos Fmoc

La cuantificación de Fmoc se lleva a cabo mediante espectofotometría UV. El primer paso es la desprotección del Fmoc a través de tres tratamientos con Piperidina 20% en DMF (2 min,10 min,10 min) y posteriores lavados con DMF, estos filtrados se recogen en un matraz y se enrasan con DMF y se mide la absorvancia del aducto que se forma entre la piperidina y el Fmoc, el N-(9-fluorenilmetil)piperidina (ξ=5800 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$). La absorvancia se determina a 290 nm y mediante la ecuación de Lambert-Beer se determina la cantidad de aducto en la muestra y por tanto la de Fmoc en la muestra.

5.2 Análisis de aminoácidos

La muestra a analizar y 20 µl de una solución de patrón interno de ácido aminobutírico (aaba) de concentración 0,1 M, la mezcla se hidroliza en un tubo cerrado kimax con una solución de HCl 6M (durante 16h a 110 ºC). Posteriormente esta mezcla se evapora a sequedad y se redisuelve en 0,5 ml de HCl 20 mM i se filtra a través de un filtro de 20 µm. Una alíquota del filtrado se derivatiza con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamto según el método AccQ-Tag de Waters. Una vez derivatizados, la mezcla de aminoácidos se analiza en un sistema HPLC modelo WATERS 600 con deterctor WATERS 2487 usando una columna Nova-Pack C18 (4µm) Waters (3,9x150 mm) a una longitud de onda de 254 nm.

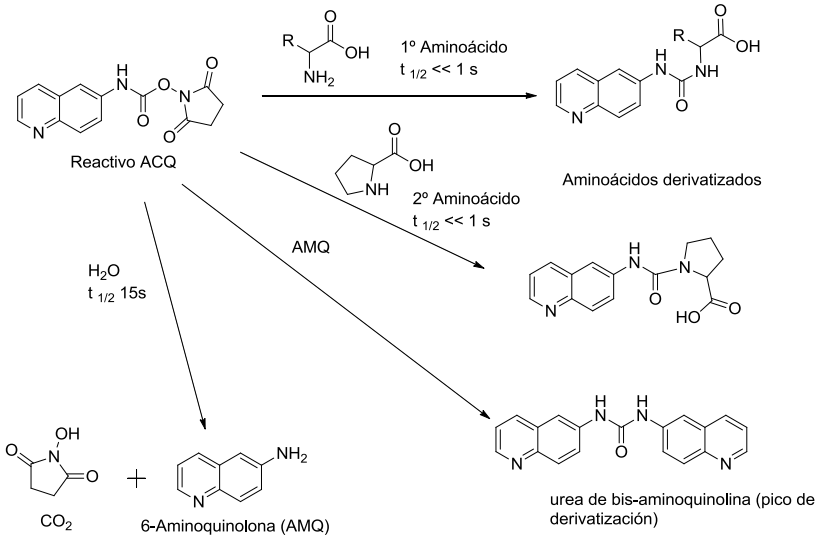


Figura 1. *Esquema de derivatización con el reactivo ACQ.*

6 Métodos cromatográficos

6.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía se ha realizado sobre cromatofolios de silica y cromatofolios de alúmina básica (ambos de Merck). Las mezclas de elución dependen de la molécula. Existen diferentes tipos de revelado para las capas finas teniendo en cuenta el tipo de muestra:

Revelado UV: Detección de grupos cromóforos. Se realiza colocando la placa bajo una lámpara ultravioleta.

Revelado con ninhidrina: Detección de grupos amino. La placa se sumerge en la solución y se calienta con una pistola de aire caliente. El revelador consiste en una disolución de 1.5 g de ninhidrina en 500 ml de etanol con 5 ml de ácido acético.

Revelado con permanganato: La placa se sumerge en la solución del revelador y se calienta con una pistola de aire caliente. El revelador se prepara disolviendo 3 g de $KMnO_4$ con 20 g de K_2CO_3 en 300 ml de H_2O, a la solución se añade 5 ml de NaOH 5%.

Revelado con ácido fosfomolíbdico: La placa se sumerge en la solución del revelador y se calienta con una pistola de aire caliente. El revelador se prepara disolviendo 10 g de ácido fosfomolíbdico en 100 ml de etanol.

6.2 Cromatografía líquida en columna manual

La cromatografía en columna se ha realizado sobre gel de sílice (SDS) y alúmina básica (Aldrich). Los eluyentes empleados difieren en cada caso.

6.3 Cromatografía líquida en columna automática

Para la cromatografía en fase normal automática se usaron columnas preempaquetadas de sílica Redisep (47 a 60 μm). La elección de la columna se decide en función de la cantidad de crudo a purificar, así como los eluyentes empleados en función de la naturaleza de cada uno de los compuestos.

7 Cromatografía líquida en fase reversa

7.1 RP-HPLC analítico

Los análisis por RP-HPLC analítico se realizaron con los equipos detallados en el apartado E1.2. Las columnas empleadas se encuentran detalladas a continuación:

Waters XBridge, C_{18} (4.6 x 50 mm, 3.5 μm)

Waters XSelect, C_{18} (4.6 x 50 mm, 3.5 μm)

Waters SunFire C_{18} (4.6 x 100 mm, 3.5 μm)

Waters Symmetry 300^{TM} C_4 (4.6 x 250 mm, 5 μm)

Los disolventes, así como el flujo, que se emplearon variaron en función del equipo y producto, estos se encuentran especificados en cada caso.

7.2 RP-HPLC-MS

Los análisis por RP-HPLC-MS se realizaron con los equipos detallados en el apartado E1.2. Las columnas usadas:

Waters XBridge, C_{18} (4.6 x 50 mm, 3.5 μm)

Waters XSelect, C_{18} (4.6 x 50 mm, 3.5 μm)

Las fases móviles usadas y flujos fueron los siguientes:

Medio ácido: A: H_2O-FA (99,9:0,1), B: ACN-FA (99,93:0,07); flujo 2ml/min.

Medio básico: A: H_2O-NH_4HCO_3 20 Mm, B: ACN; flujo 1,6 ml/min; T: 50 ºC.

7.3 RP-HPL-MS semipreparativo

Las purificaciones de productos mediante RP-HPLC-MS se realizaron con el quipo especificado en el apartado E1.2. Las columnas usadas se especifican a continuación:

Waters XBridge, C_{18} (19 x 100 mm, 5 μm)

Waters XSelect, C_{18} (19 x 100 mm, 5 μm)

Waters Sunfire, C_{18} (19 x 100 mm, 5 μm)

El flujo usado en todos los casos es de 16ml/min. La fase móvil y gradientes, así como la columna empleada, se especifica en cada caso.

8 Cromatografía de exclusión molecular

Para la eliminación del exceso de fluoróforo en dendrímeros-Alexa, SN38-PEG-Alexa y conjugados de proteína-Atto 633 y la separación del exceso de péptido director en los conjugados Péptido-PEG-NHBoc se usaron columnas precompactadas PD10 procedentes de GE Healthcare, usando H_2O para eluir en el caso de los conjugados de antitumorales y de tampón acetato pH 6.0 en el caso de los conjugados de proteínas.

9 Diálisis

Los conjugados de PEG-proteína descritos en el capítulo de la presente tesis fueron purificados empleando una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 20 KDa de la marca comercial Spectrumlabs ®. La membrana fue previamente hidratada con la solución de diálisis a emplear. Los conjugas a purificar se introdujeron en el interior de la membrana y se llevo a cabo la diálisis para rendir los conjugados sin restos de PEG sobrante durante la conjugación.

10 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Los experimentos de MALDI-TOF se llevaron a cabo en la Plataforma de Proteómica del PCB, excepto en los casos cuyo producto de análisis eran las proteínas α-Galactosidasa A y sus conjugados, que fueron llevados a cabo en la Unidad de Espectrometria de masas de caracterización molecular de los CCiTUB.

Las matrices empleadas son las siguientes:

ACH: Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (10,0 mg de ACH en 1ml de H_2O:ACN:TFA 0:1:0,1).

SA: Ácido sinapínico (10,0 mg de SA en 1ml de H_2O:ACN:TFA 0:1:0,1).

La preparación de la muestra a analizar se realiza mezclando 1µl de matriz y 1 µl de una solución del producto a analizar. 1 µl de la mezcla anterior se deposita en la placa y se deja secar para su posterior análisis. El análisis se realizó utilizando el modo reflector positivo y en el caso de las proteínas α-Galactosidasa A y sus conjugados, así como los PEGs de talla grande que se le conjugaron, en modo lineal positivo. Las intensidades de laser usadas variaron en función del compuesto a analizar.

11 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{1}H, ^{13}C y ^{19}F se han realizado en un equipo Varian Mercury 400MHz de la Unidad de RMN de Campo Alto de los Servicios Cientifico-Técnicos de la UB. Los disolventes utilizados fueron cloroformo deuterado ($CDCl_3$), metanol deuterado (CD_3OH), dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-d6) y agua deuterada (D_2O).Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto al disolvente empleado. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz y la multiplicidad de las señales se indica de la siguiente manera: s (singulete), d (doblete), t (triplete), m (multiplete).

12 Espectrometría Ultravioleta (UV)

Las medidas de absorbancia se han llevado a cabo en espectrofotómetro Shimadzu UV-250IPC. Las cubetas utilizadas son de cuarzo y con una l=1cm.

13 Electroforesis de gel

La electroforesis de gel fue llevada a cabo en un sistema vertical Mini Protean Hoefer con un sistema de subministro de energía para electroforesis Supply EPS 601 (GE Healthcare, Life Sciences). Las muestras se cargaron y corrieron en una SDS-PAGE (electroforesis en gel depoliacrilamida con dodecilsulfato sódico, en inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), empleando un gel al 10 % Tris SDS-poliacrilamida (30% acrilamida/Solución 37,5:1; 2,6% C, Bio-Rad; 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS; 13 µl/20 ml gel TEMED; 100 µl/20 ml gel de persulfato de amonio; GE Helathcare), en un sistema de tris-glicina Laemmli (110V, 20 mA/gel, temperatura ambiente; tampón Tris 25mM, glicina 192 mM, 0,1% SDS, pH 8,6). La tinción se realizó con Comassie Blue al 0,025% en disolución con metanol (40%) y acético (7%). Las proteínas del gel se fijan gracias al ácido acético y al mismo tiempo se tiñen. El colorante en exceso que se incorpora en el gel se eliminó destiñendo con una disolución de composición idéntica excepto por el colorante. Las proteínas se detectan como bandas azules contra un fondo claro. Para asignar el peso molecular de las bandas se emplearon 4 µl de maracador BenchMarkTM Protein Ladder 10747-012 (Invitrogen).

BIBLIOGRAFIA

[1] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook. “Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides”, *Analytical Biochemistry.* **1970**, *34*, 595-598.

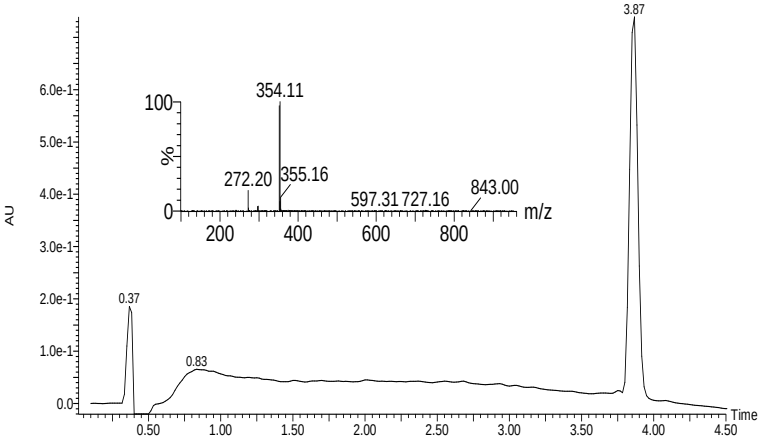
[2] T. Christensen. “A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil”, *Acta Chemica Scandinavica, Series B: Organic Chemistry and Biochemistry.* **1979**, *33*, 760-766.

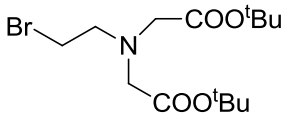
E1. NANOCONJUGADOS 5FU

E1.1 Síntesis del dendrón

E1.1.1 Síntesis de N,N-Bis[(terc-butoxicarbonil)metil]-2-bromoetilamina (3)

A una disolución de bromoacetato de *terc*-butilo (27 ml, 182,8 mmol, 2,2 eq) en DMF anhidra (60 mL) se añadió $KHCO_3$ (20,4 g, 203,7 mmol, 2,5 eq). La suspensión se enfrió hasta 0° C, se añadió etanolamina (**1**) (5 ml, 82,8 mmol, 1,0 eq.) con una jeringa durante un periodo de 5 min y la solución se dejó en agitación a 0 °C durante 30 min bajo atmósfera de argón. Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente y se agitó durante 22 h. Transcurrido este tiempo, se evaporó la mayor parte de DMF y se añadieron 50 ml de una solución saturada de $NaHCO_3$. La mezcla resultante se extrajo con éter dietílico (3×50 mL) y la combinación de extractos orgánicos se lavó con una solución de NaCl saturada. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó para la obtención del producto *N,N*-bis[(*terc*-butoxicarbonil)metil]-2-hidroxietilamina (**2**) (24,0 g, 83 mmol) en forma de aceite transparente. Este crudo se disolvió en DCM (200 ml), se añadió PPh_3 (24,4 g, 93,0 mmol, 1,1 eq) y la solución se enfrió a 0 °C. Posteriormente se añadió NBS sólida (16,3 g, 91,5 mmol, 1,1 eq) durante un periodo de 5 min y la mezcla se agitó durante 2 h a 0 °C. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó y se obtuvo un residuo semisólido que fue triturado con éter dietílico. El sólido se separó por filtración al vacío y se lavó con éter dietílico (4 x 20 ml). La fase etérea se evaporó a sequedad obteniéndose un producto oleoso que se purificó mediante cromatografía en columna, utilizando SiO_2 como fase estacionaria y un gradiente 5→30% de éter dietílico en hexano como eluyentes. Se obtuvieron 23,9 g del compuesto bromado **3** en forma de aceite transparente (82,6 mmol, 99%).





HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 3,87 min, λ=220 nm (99%).

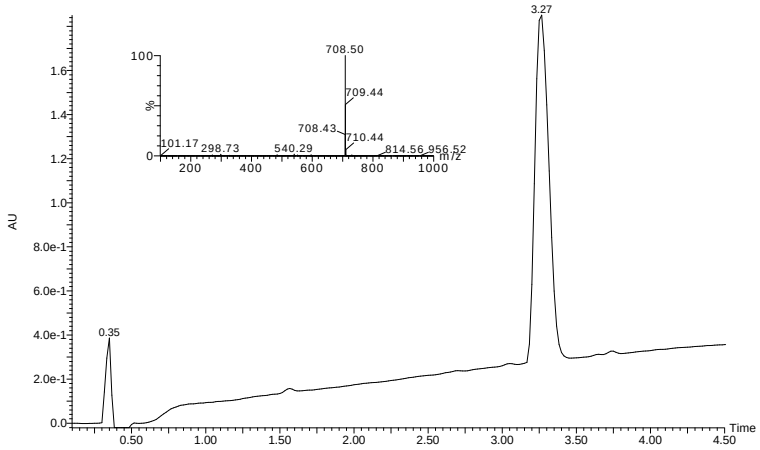
EM (ESI): m/z= 354,1 $[M+H]^+$, Masa calculada: 352,2.

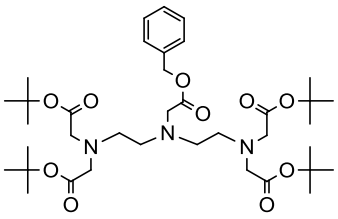
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,46 (s, 18H); 3,14 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 3,44 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 3,48 (s, 4H).

^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 28,3; 30,4; 56,6; 56,8; 81,4; 170,7.

E1.1.2 Síntesis de *N'*-benciloxicarbonilmetil-*N,N,N'',N''*-tetrakis(*terc*-butoxicarbonilmetil)dietilentriamina (4)

A una mezcla del tosilato del éster bencílico de glicina (10,9 g, 32,3 mmol, 1,0 eq.) y el bromoderivado **3** (23.9 g, 82.6 mmol, 2.5 eq) en CH_3CN (400 ml) se añadieron 350 ml de tampón fosfato (2 M, pH 8) y la mezcla se agitó vigorosamente durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se evaporó el CH_3CN de la mezcla y el crudo se extrajo con DCM (1x100 ml). La fase acuosa se extrajo nuevamente con DCM (1x50 ml) y las fases orgánicas conjuntas se lavaron con una solución saturada de NaCl (1x100 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna utilizando alúmina básica como fase estacionaria y un gradiente 5→30% de acetato de etilo en hexano como eluyentes. Se obtuvieron 16,72 g del compuesto **4** (23,6 mmol, 73%) en forma de un aceite transparente.





HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 3,27 min, λ=210 nm (99%).

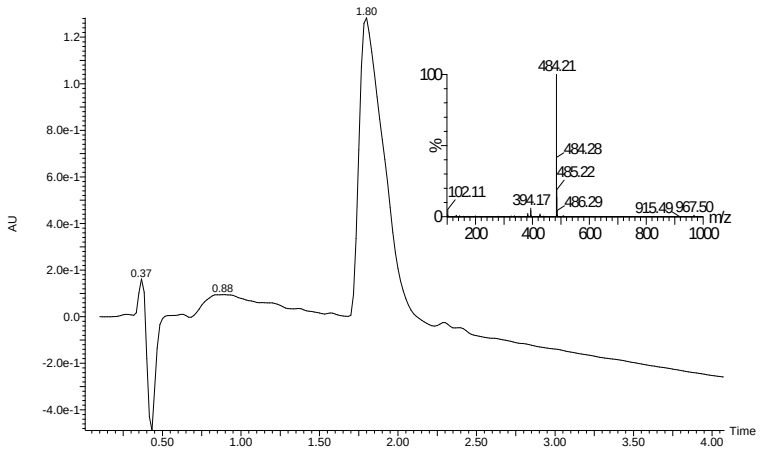
EM (ESI): m/z= 708,5 $[M+H]^+$, Masa calculada: 707,89.

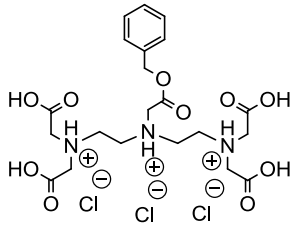
^{1}H RMN (400 MHz, CDCl3) δ 1,44 (s, 36H); 2,82 (s, 8H); 3,42 (s, 8H); 3,59 (s, 2H); 5,12 (s, 2H); 7,30-7,34 (m, 5H);

^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 28,3; 52,4; 52,9; 55,0; 56,2; 66,1; 81,0; 128,3; 128,4; 128,6; 136,0; 170,7; 171,5.

E1.1.3 Síntesis de *N'*- benciloxicarbonilmetil -*N,N,N'',N''*-tetrakis(carboximetil)dietilentriamina tri-hidroclururo (5)

El compuesto **4** (7,9 g, 11,1 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en 30 ml de una solución 4 M de HCl en dioxano (120 mmol, 11 eq). La mezcla se calentó durante 3h a 50 °C y posteriormente se dejó en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla HCl/dioxano se eliminó por evaporación y el crudo resultante se disolvió en dioxano y se coevaporó con dioxano (2x20 ml) dándo lugar al producto **5** en forma de un sólido blanco (6,5 g, 11 mmol, 98%). Este producto se utilizó en el paso siguiente de síntesis sin purificación previa.





HPLC analítico: **HPLC analítico**: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 1,80 min, λ=210 nm (98%).

EM (ESI): m/z= 484,2 $[M+H]^+$, Masa calculada: 483,47.

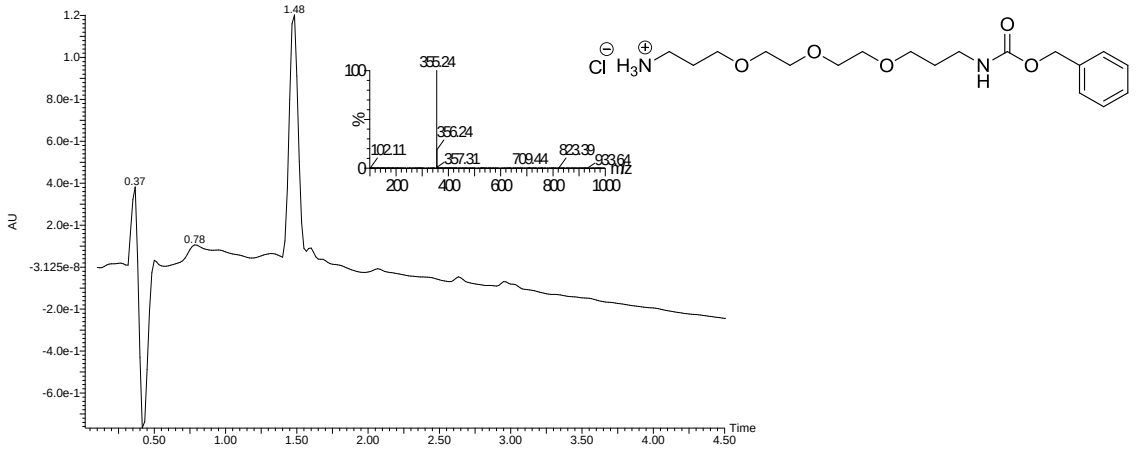
^{1}H RMN (400 MHz, D_2O) δ 3,09 (t, *J* = 6,2 Hz, 4H); 3,46 (t, *J* = 6,2 Hz, 4H); 3,63 (s, 2H); 4,14 (s, 8H); 5,17 (s, 2H); 7.39 (s, 5H).

^{13}C RMN (101 MHz, D_2O) δ 173,2; 168,98; 165,31; 129,05; 129,04; 128,85; 67,89; 55,46; 54,26; 53,51; 49,51.

E1.1.4 Síntesis del hidrocloruro de 1-(benciloxicarbonil-amino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (7)

A una disolución de 1-(*terc*-butoxicarbonil-amino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (**6**) (1,0 g, 3,2 mmol, 1,0 eq.) en DCM anhidro (3 ml) y DIEA (1,6 ml, 9,2 mmol, 2,9 eq) se añadió gota a gota el cloruro de benciloxicarbonilo (0,6 ml, 4,2 mmol, 1,3 eq.) y se dejó reaccionar la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se llevaron a cabo extracciones del crudo con $NaHCO_3$ sat. (3x5ml), ácido cítrico al 0,5% (p/v) (2x5 ml) y con una solución saturada de NaCl (2x5 ml). La fase orgánica resultante se secó con $MgSO_4$ y se evaporó hasta sequedad. El crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna usando SiO_2 como fase estacionaria, con un gradiente 0→5 % de MeOH en DCM. El producto obtenido se disolvió en

una solución 4 M de HCl en dioxano (3 mL, 12 mmol, 3,7 eq) y se dejó reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. Tras este tiempo la mezcla HCl/dioxano se evaporó a sequedad, dando lugar al producto con **8** (0,8 g, 2,1 mmol, 65%).



HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 1,48 min, λ=210 nm (76%).

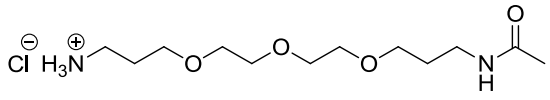
EM (ESI): m/z= 355,2 $[M+H]^+$, Masa calculada: 390,90.

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,67-1,83 (m, 4H); 2,81 (t, *J*= 6,8 Hz, 2H); 3,26-3,34 (m, 2H); 3,47-3,65 (m, 12H); 5,08 (s, 2H); 5,68 (bs, NH); 7,27-7,37 (m, 5H).

^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$,) δ 29,5; 32,4; 39,1; 39,5; 66,5; 69,5; 70,2; 70,2; 70,6; 70,6; 128,0; 128,1; 128,5; 136,9; 156,7.

E1.1.5 Síntesis del hidrocloruro de 1-(acetamido)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (8)

A una disolución de 1-(*terc*-butoxicarbonil-amino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (**6**) (3,0 g, 9,3 mmol, 1,0 eq.) en DCM anhidro (5 mL) se añadieron Ac_2O (1,4 ml, 14,8 mmol, 1,6 eq.) y DIEA (4,9 ml, 28,0 mmol, 3,0 eq.) y se dejó reaccionar la mezcla durante 1h a temperatura ambiente. A continuación, se evaporó el disolvente y se realizaron coevaporaciones del crudo con tolueno (3 x 15 ml). El aceite amarillento resultante se disolvió en una solución 4M de HCl en dioxano (6 ml, 24 mmol, 2,5 eq.) y se dejó reaccionar durante 1h a temperatura ambiente. Tras este tiempo, la mezcla HCl/dioxano se evaporó a sequedad. El crudo obtenido se disolvió en H_2O (20 ml) y se llevó a cabo un lavado con DCM (20 ml). La fase acuosa resultante se liofilizó, obteniéndose así el producto **7** en forma de un aceite amarillento (2,7 g, 8,6 mmol, 93%).



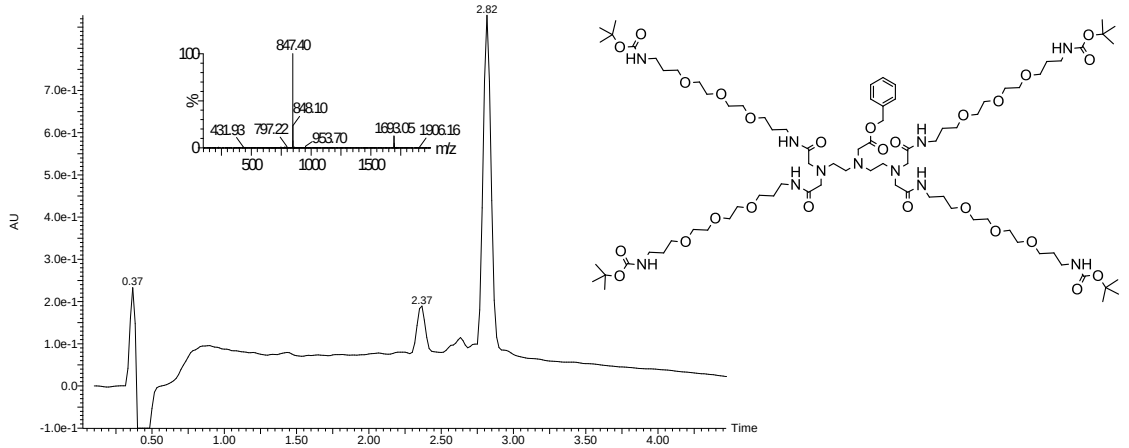
EM (ESI): m/z= 263,0 $[M+H]^+$, Masa calculada: 298,81.

^{1}H RMN (400 MHz, D_2O) δ 1,80 (q, *J* = 6,6 Hz, 2H); 1,94 - 1,98 (m, 2H); 2,00 (s, 3H); 3,13 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H); 3,26 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H); 3,59 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H); 3,65 - 3,74 (m, 10H).

^{13}C RMN (101 MHz, D_2O) δ 21,79; 26,42; 28,10; 36,36; 37,62; 68,23; 68,28; 69,21; 69,35; 69,45; 69,51; 173,94.

E1.1.6 Síntesis del dendrón G1-4Boc-Bn (9)

A una disolución del compuesto **5** (6,6 g, 11,1 mmol, 1,0 eq) en DCM/DMF (7:3) (800 ml) se añadió PyBOP (28,1 g, 53,9 mmol, 4,8 eq) y una disolución de 1-(*terc*-butoxicarbonil-amino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (**6**) (17,1 g, 53,3 mmol, 4,8 eq) en 10 mL de DCM. El pH se ajustó a 8 con DIEA y la mezcla resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los disolventes se evaporaron hasta sequedad. El crudo resultante se disolvió en DCM (300 ml) y se lavó con una solución acuosa al 5% de $NaHCO_3$ (6×300 ml), una solución de ácido cítrico 0,5% (p/v) (6x300 ml) y una solución acuosa saturada de NaCl (6×300 ml). La fase orgánica se secó con $MgSO_4$ y se evaporó a sequedad. El crudo resultante se precipitó de la siguiente manera en tubos de polipropileno de 50 mL para centrífuga (dada la cantidad de crudo el proceso se repitió en varios tubos): 5 ml de una disolución del crudo en DCM se introdujeron en el tubo y seguidamente se añadieron 45 ml de hexano. La mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó. El sobrenadante se descartó y el aceite anaranjado restante se sometió al mismo proceso de precipitación descrito anteriormente (x3). Se obtuvieron 17,2 g del producto **9** (10.1 mmol, 90%) en forma de aceite amarillento.



HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 2,82 min, λ=210 nm (80%).

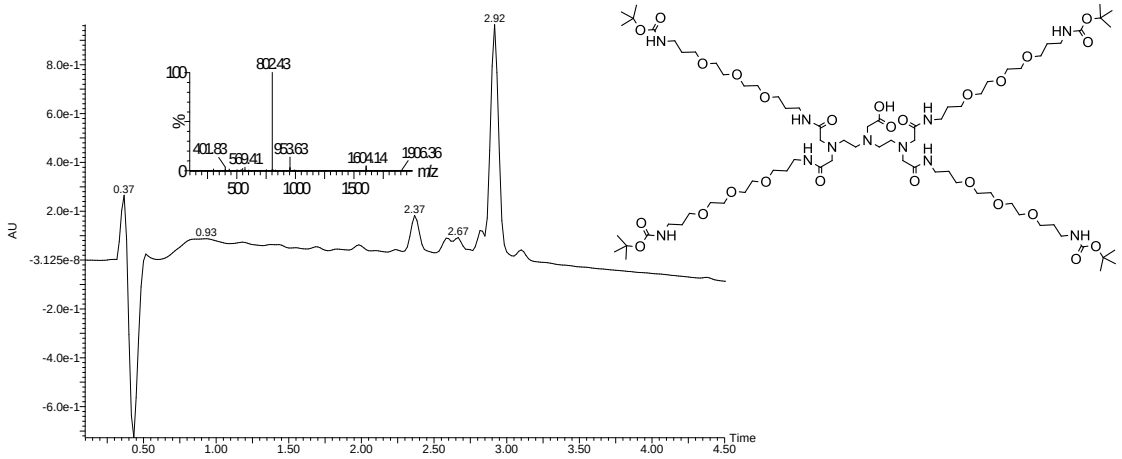
EM (ESI): m/z= 1693,0 $[M+H]^+$, m/z= 847,4 $[M+2H]^+/2$ Masa calculada: 1693,11.

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,43 (s, 36H); 1,71-1,84 (m, 16H); 2,67 (m, 8H); 3,12-3,25 (m, 16H); 3,32 (q, *J* = 6.6 Hz, 8H); 3,41 (s, 2H); 3,52 (dt, *J* = 6.1, 3.6 Hz, 16H); 3,55-3,65 (m, 32H); 5,05 (bs, NH); 5,13 (s, 2H); 7,30-7,40 (m, 5H); 7,56 (bs, NH).

^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 28,44; 29,44; 29,67; 37,06; 38,43; 46,23; 46,27; 52,41; 58,86; 69,31; 69,45; 70,14; 70,15; 70,45; 70,48; 78,84; 128,31; 128,63; 156,03; 170,63.

E1.1.7 Síntesis del dendrón G1-4Boc-COOH (10)

A una disolución del compuesto **9** (2,0 g, 1,2 mmol, 1,0 eq.) en 15,3 ml de DCM se añadieron 767 µl de una disolución 2M de NaOH en MeOH (1,5 mmol, 1,2 eq.) (concentración final: 0,1 M NaOH), para obtener una concentración final de 0,1 M de NaOH. La mezcla se agitó durante 1h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente a sequedad y, a continuación, se disolvió el crudo en una mezcla de H_2O: DCM (1:1, v/v) (20 ml), se ajustó el pH de la fase acuosa a pH 3-4 con una solución de HCl 1M y se separaron las dos fases. La fase acuosa se extrajo con DCM hasta no detectar la presencia del producto deseado (HPLC). Finalmente, las fases orgánicas conjuntas se secaron con $MgSO_4$ y se evaporaron, para obtener así el producto puro en forma de un aceite amarillento (1,5 g, 0,9 mmol, 81%).



HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 2,92 min, λ=210 nm (83%).

EM (ESI): m/z= 802,4 $[M+H]^+$, m/z= 1604.1 $[M+2H]^+/2$ Masa calculada: 1602,99.

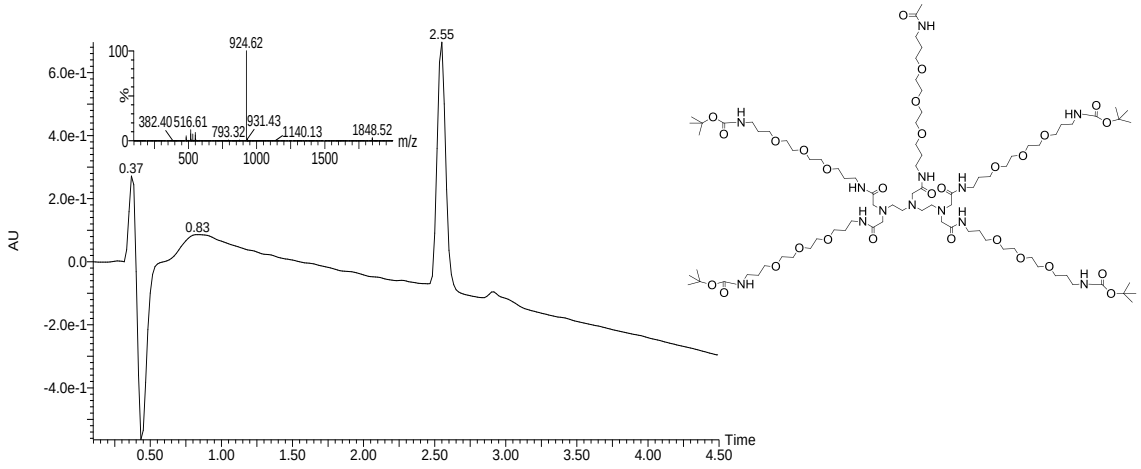
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,43 (s, 36H); 1,70-1,86 (m, 16H); 2,88 (bs, 4H); 3,05 (bs, 4H); 3,14-3,25 (m, 10H); 3,28 (s, 4H); 3,29-3,38 (m, 8H); 3,48-3,55 (m, 16H); 3,55-3,68 (m, 36H); 5,13 (bs, NH); 7,73 (bs, NH).

^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 28,6; 29,4; 29,8; 29,9; 37,3; 38,5; 52,3; 53,7; 55,9; 59,0; 69,5; 69,5; 70,1; 70,2; 70,2; 70,3; 70,5; 70,6; 70,6; 79,0; 156,2; 170,5.

E1.1.8 Síntesis del dendrón G1-4Boc-1Ac (11)

El producto **10** (2,5 g, 1,5 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en una mezcla DCM:DMF (100 ml, 7:3 v/v) y sobre esta solución se añadió hidrocloruro de 1-(acetamido)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina

(**8**) (0,7 g, 2,4 mmol, 1,6 eq.) y PyBOP (1,2 g, 2,3 mmol, 1,5 eq.). Esta solución fue llevada a pH 8 mediante la adición de DIEA y se dejó reaccionar durante 1h a temperatura ambiente. A continuación se evaporó el disolvente a sequedad y el crudo resultante se disolvió en DCM (100 ml). Posteriormente se llevaron a cabo lavados con una solución acuosa al 5% p/v de $NaHCO_3$ (3×100 ml), una solución de ácido cítrico 0,5% p/v (3x100 ml) y una solución acuosa saturada de NaCl (3×100 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó. El aceite resultante se transfirió a dos tubos de centrífuga de 50 ml disuelto en 5 ml de DCM y se añadieron 45 ml de hexano. La mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó. El sobrenadante se descartó y el aceite anaranjado restante se sometió al mismo proceso de precipitación hasta obtener el producto puro. Se obtuvieron 2,2 g del producto **11** en forma de una aceite amarillento (1,1 mmol, 79%).



HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 2,55 min, λ=210 nm (92%).

EM (ESI): m/z= 924,6 $[M+H]^+$, m/z= 1848,5 $[M+2H]^+/2$ Masa calculada: 1847,32.

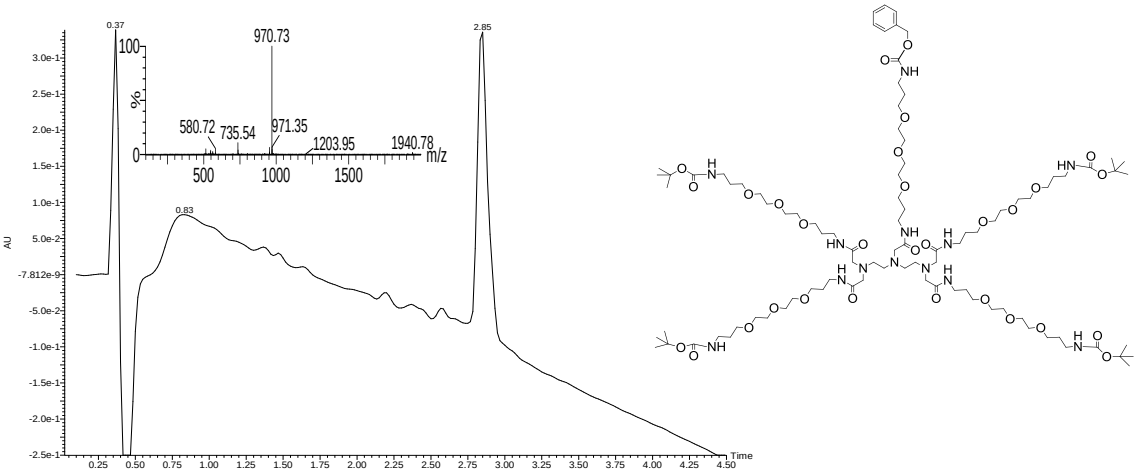
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ

^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ

E1.1.9 Síntesis del dendrón G1-4Boc-1Z (13)

El producto **10** (1,5 g, 0,9 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en una mezcla DCM:DMF (100 ml, 7:3 v/v) y sobre esta solución se añadió hidrocloruro de 1-(benciloxicarbonil-amino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (**7**) (0,5 g, 1,3 mmol, 1,4 eq.) y PyBOP (0,8 g, 1,5 mmol, 1,7 eq.). Esta solución fue llevada a pH 8 mediante la adición de DIEA y se dejó reaccionar durante 1h a temperatura ambiente. A continuación se evaporó el disolvente a sequedad y el crudo resultante se disolvió en DCM (100 ml). Posteriormente se llevaron a cabo lavados con una solución acuosa al 5% p/v de $NaHCO_3$ (3×100 ml), una solución de ácido cítrico 0,5% p/v (3x100 ml) y una solución acuosa saturada de NaCl (3×100 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó. El aceite

resultante se transfirió a dos tubos de centrífuga de 50 ml disuelto en 5 ml de DCM y se añadieron 45 ml de hexano. La mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó. El sobrenadante se descartó y el aceite anaranjado restante se sometió al mismo proceso de precipitación hasta obtener el producto puro. Se obtuvieron 1,6 g del producto **13** en forma de una aceite amarillento (0,8 mmol, 91%).



HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 2,85 min, λ=210 nm (88%).

EM (ESI): m/z= 970,7 $[M+H]^+$, m/z= 1940,7 $[M+2H]^+/2$ Masa calculada: 1939,41.

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,43 (s, 36H); 1,70-1,84 (m, 20H); 3,13-3,25 (m, 12H); 3,25-3,42 (m, 20H); 3,44-3,55 (m, 26H); 3,55-3,67 (m, 40H); 5,07 (s, 2H); 5,11 (bs, NH); 5,60 (bs, NH); 7,29-7,37 (m, 5H); 7,84 (bs, NH).

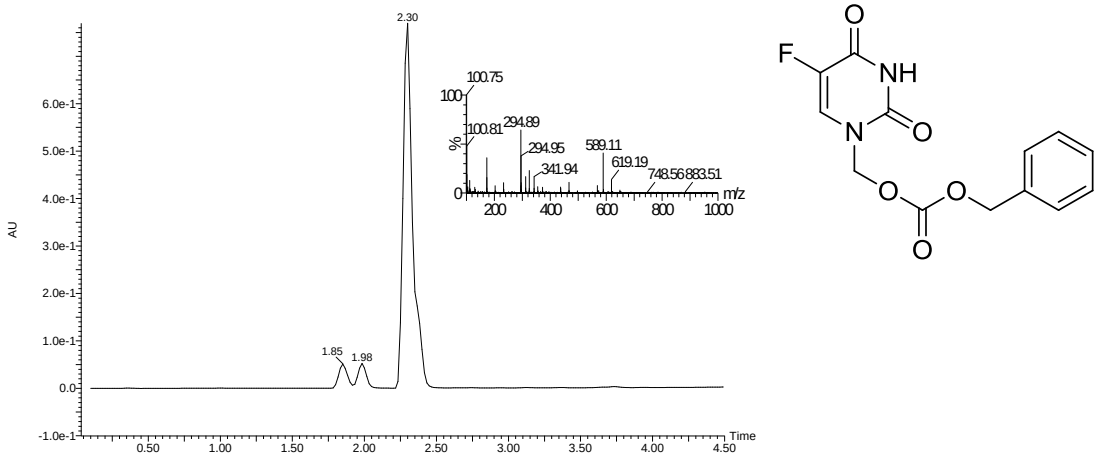
^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 28,6; 29,4; 29,6; 29,8; 37,3; 38,5; 39,1; 53,0; 58,6; 66,5; 69,4; 69,5; 70,2; 70,2; 70,5; 70,6; 79,0; 128,1; 128,1; 128,6; 136,9; 156,2; 156,7; 170,6.

E1.2 Síntesis de los derivados de 5FU

E1.2.1 Síntesis de 1-benciloxicarboniloximetil-5-fluorouracilo (17)

A una mezcla de 5-Fluorouracilo (**15**) sólido (1,5 g, 11,5 mmol, 1,0 eq.) y formalina (37% de HCHO en agua, 1,9 ml, 25,3 mmol, 2,2 eq) se agitó durante 1 h a 55 °C. La disolución resultante se evaporó hasta total eliminación del agua (evitando la polimerización de la formalina manteniendo el baño del rotavapor a una temperatura baja) para obtener un aceite incoloro. El producto resultante (**16**) se disolvió en CH_3CN anhidro y se añadió Et_3N (2,4 ml, 17,2 mmol, 1,5 eq). Posteriormente, se añadió gota a gota cloroformiato de bencilo (2,4 ml, 15,6 mmol, 1,4 eq) y la mezcla se dejó reaccionar en agitación vigorosa durante toda la noche, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón. La suspensión obtenida se evaporó hasta sequedad y el crudo se purificó mediante cromatografía en columna usando SiO_2 como fase

estacionaria, con un gradiente de 0→30% de AcOEt en CH_2Cl_2 como eluyentes. Se obtuvieron 2,3 g del producto **17** en forma de un sólido blanco (7,8 mmol, 68%).



HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 2,30 min, λ=260 nm (85%).

EM (ESI): m/z= 294,8 $[M+H]^+$. Masa calculada: 294,25.

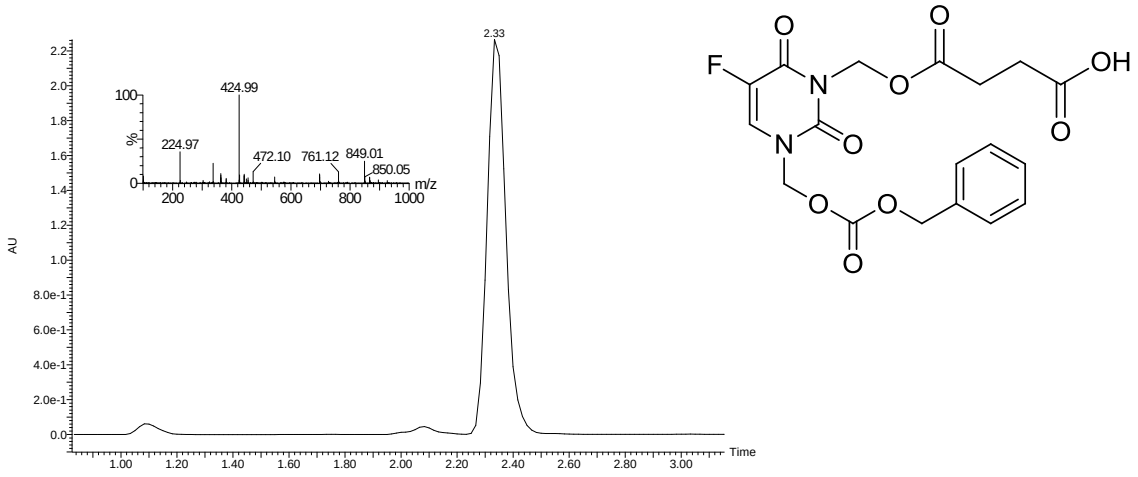
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO) δ: 5,18 (s, 2 H); 5,62 (s, 2 H); 7,39 (m, 5 H); 8,14 (d, *J*=6,54 Hz, 1 H); 12,01 (sa, NH).

^{13}C RMN (101 MHz, DMSO) δ: 69,43; 73,30; 128,23; 128,43; 129,09; 129,43; 134,93; 140,53; 149,14; 153,35; 157,18.

^{19}F RMN (376 MHz, DMSO) δ: -169,90 (d, *J*=6,03 Hz).

E1.2.2 Síntesis de 1-benciloxicarboniloximetil-3-(hidroxicarboniletil)carboniloximetil-5-fluorouracilo (19)

El producto **17** (1,00 g, 3,4 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en 5 mL de CH_3CN anhidro y a continuación se adicionó formalina (37% de HCHO en agua, 0,33 mL, 3,4 mmol, 1,0 eq). La disolución se agitó durante 1 h a 55 °C y, transcurrido este tiempo, se evaporó la mezcla hasta sequedad. El aceite incoloro obtenido (**18**) se disolvió en 5 ml de CH_3CN anhidro y se adicionó anhídrido succínico (1,02 g, 10,2 mmol, 3,0 eq) y DMAP (208 mg, 1,7 mmol, 0,5 eq). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche bajo atmósfera de argón. El crudo obtenido se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna utilizando un equipo automático de purificación, SiO_2 como fase estacionaria y un gradiente de 0→40% de AcOEt en DCM (0,5% de AcOH en cada disolvente) como eluyentes. El producto obtenido (**19**) se liofilizó para eliminar totalmente el ácido acético y se obtuvieron así 0,8 g de un sólido blanco (2,0 mmol, 61%).



HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 2,33 min, λ=260 nm (95%).

EM (ESI): m/z= 424,9 $[M+H]^+$. Masa calculada: 424,33.

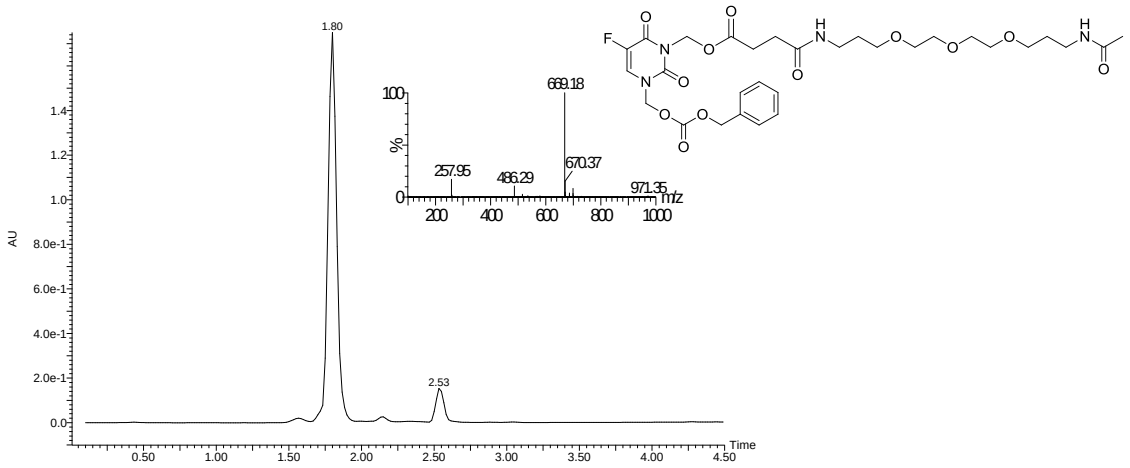
^{1}H RMN (400 MHz, MeOH-d4) δ: 2,59 (m, 4 H); 5,19 (s, 2 H); 5,72 (s, 2 H); 5,93 (s, 2 H); 7,3-7,4 (m, 5 H); 7,00 (d, *J*=5,95 Hz, 1 H).

^{13}C RMN (101 MHz, MeOH-d4) δ: 28,59; 64,66; 70,81; 73,39; 128,50; 128,71; 129,97; 134,12; 138,36; 140,73; 149,03; 154,69; 170,75; 176,86.

^{19}F RMN (376 MHz, MeOH-d4) δ: -167,95 (d, *J*=5,85 Hz).

E1.2.3 Síntesis de 5FUZSuccN$_3$TOTA-Ac (20)

A una disolución del producto **19** (60 mg, 0,1 mmol, 1,0 eq.) y el producto hidrocloruro de 1-(acetamido)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (**8**) (82 mg, 0,3 mmol, 3,0 eq.), una vez disueltos en DCM (15 ml), se añadió PyBOP (211 mg, 0,4 mmol, 4,0 eq.) y se ajustó el pH de la mezcla a 8 mediante la adición de DIEA. La disolución se agitó durante 1h a temperatura ambiente y, tras este tiempo, el crudo se elaboró realizando lavados con H_2O (3x20 ml) y finalmente con una solución acuosa saturada de NaCl (3x20 ml). La fase orgánica se secó con $MgSO_4$ y se evaporó. El crudo obtenido se disolvió en DCM (5 mL), se trasvasó a un tubo de polipropileno de 50 mL y se añadió hexano (40 mL). La mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó. El sobrenadante se descartó y el aceite precipitado se sometió a un nuevo proceso de precipitación (CH_2Cl_2-hexano) tal y como se ha descrito anteriormente. Finalmente, se obtuvieron 37 mg del producto **20** (0,05 mmol, 50%)

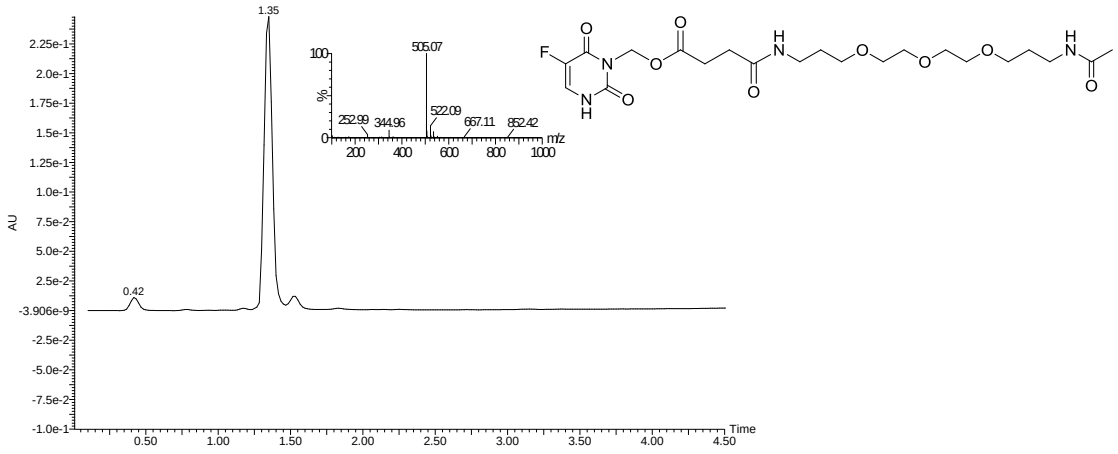


HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 1,80 min, λ=260 nm (93%).

EM (ESI): m/z= 669,1 $[M+H]^+$. Masa calculada: 668,66.

E1.2.4 Síntesis de 5FUSuccN$_3$TOTA-Ac (21)

El producto **20** (37,0 mg, 0,05 mmol, 1,0) se disolvió en 10 ml de MeOH y se añadió un 10% de Pd/C (4 mg, 10% en peso). La suspensión resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de H_2. Transcurrido este tiempo, el catalizador se eliminó por filtración a través de Celite y se evaporó el disolvente a sequedad. De esta manera se obtuvo el producto **21** en forma de un aceite amarillento (28 mg, 0,05 mmol, cuant.)

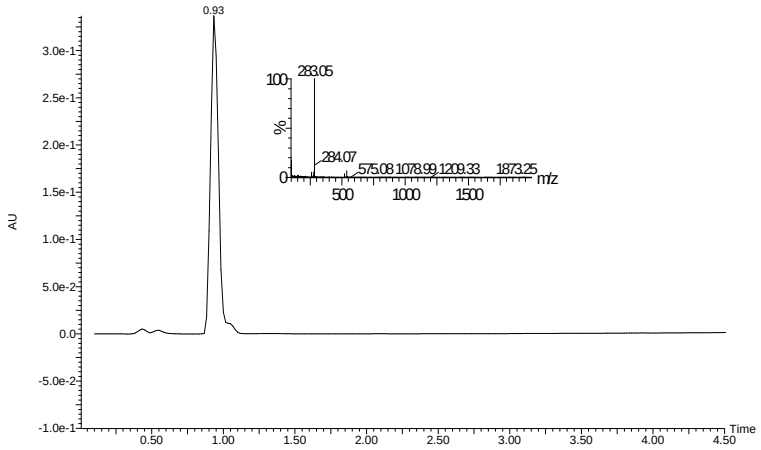


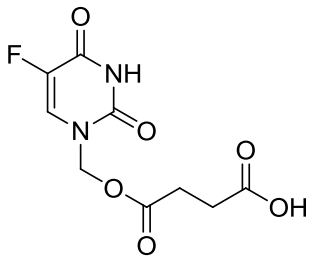
HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 1,35 min, λ=260 nm (91%).

EM (ESI): m/z= 505,07 $[M+H]^+$. Masa calculada: 504,51.

E1.2.5 Síntesis de 1-(hidroxicarboniletil)carboniloximetil-5-fluorouracilo (22)

Una mezcla de 5-Fluorouracilo (**15**) (104,0 mg, 0,8 mmol, 1,0 eq.) y formalina (37% de HCHO en agua, 0.36 mL, 4.8 mmol, 6.0 eq) se agitó durante 1 h a 55 ºC. La disolución resultante se evaporó hasta la total eliminación del agua (evitando la polimerización de la formalina manteniendo el baño del rotavapor a una temperatura baja) y se obtuvo un aceite incoloro. El producto resultante (**16**) se disolvió en CH_3CN anhidro y se añadió anhídrido succínico (240,0 mg, 2,4 mmol, 3,0 eq) y DMAP (48,0 mg, 0,4 mmol, 0,5 eq). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 3h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo el crudo fue evaporado y finalmente purificado mediante cromatografía automática usando SiO_2 como fase estacionaria, con un gradiente de 0→40% de AcOEt en DCM (0,5% de AcOH en cada disolvente). El producto obtenido (**22**) se liofilizó para eliminar totalmente el ácido acético y se obtuvieron así 57 mg de un sólido blanco (0,2 mmol, 25%).



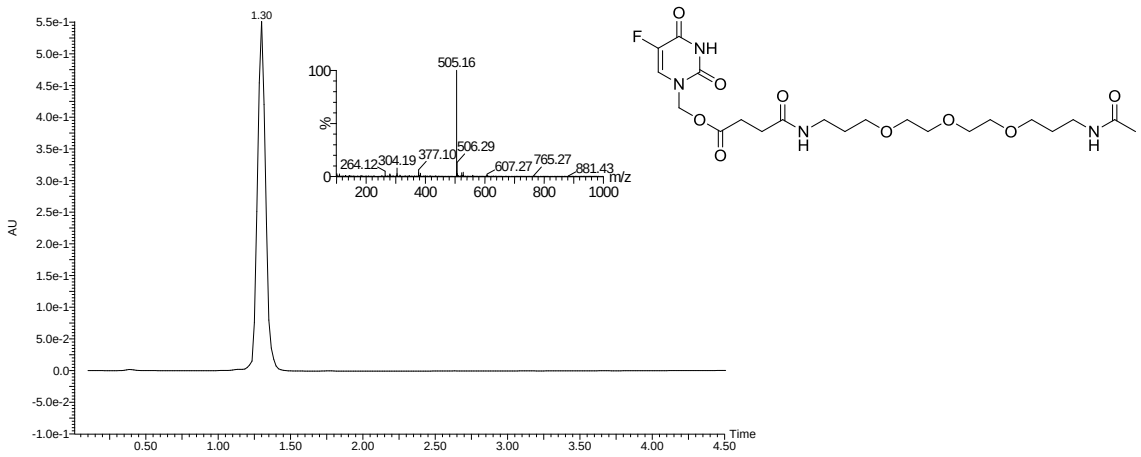


HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 0,93 min, λ=260 nm (98%).

EM (ESI): m/z= 282,9 $[M+Na]^+$. Masa calculada: 260,18.

E1.2.6 Síntesis de 5FUSuccN$_1$TOTA-Ac (23)

A una disolución del producto **22** (28,0 mg, 0,1 mmol, 1,0 eq.) y el hidrocloruro de 1-(acetamido)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (**8**) (86,0 mg, 0,3 mmol, 3,0 eq.) en DMF (10 ml), se añadió PyBOP (172,0 mg, 0,3 mmol, 3,0 eq.) y se ajustó el pH a 8 mediante la adición de DIEA. La mezcla se agitó durante 1h a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el disolvente a sequedad y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna utilizando un equipo automático de purificación en fase reversa (C_{18}) y un gradiente de 0→100% de CH_3CN en H_2O (0,1% de HCOOH en ambos disolventes) como eluyentes. De esta manera se obtuvo el producto **23** (31,0 mg, 0,06 mmol, 61%).

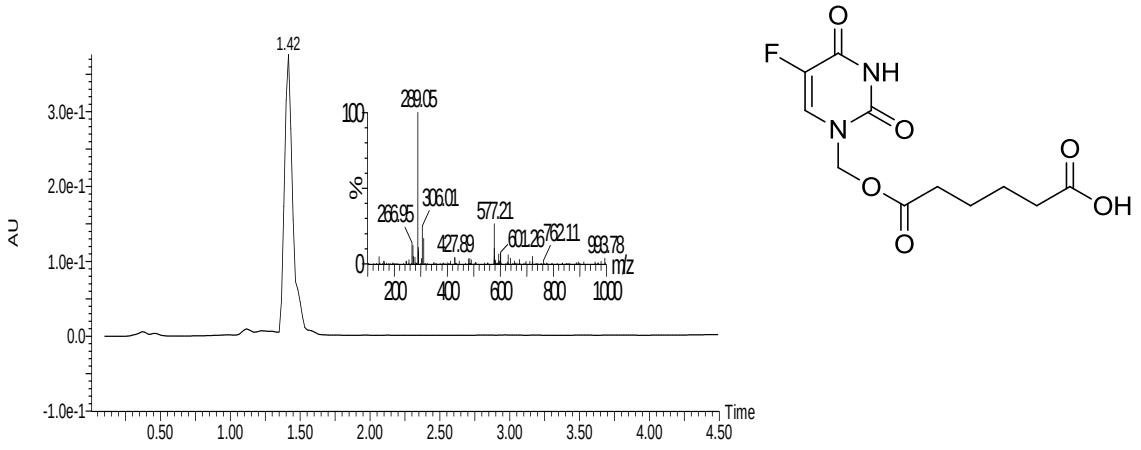


HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 1,30 min, λ=260 nm (99%).

EM (ESI): m/z= 505,1 $[M+H]^+$. Masa calculada: 504,51.

E1.2.7 Síntesis de 1-(hidroxicarbonilbutil)carboniloximetil-5-fluorouracilo (24)

Una mezcla de 5-Fluorouracilo (**15**) (1,6 g, 12,3 mmol, 1,0 eq.) y formalina (37% HCOH en agua, 5 ml, 66,7 mmol, 5,4 eq.) se agitó durante 1h a 55 °C. La disolución resultante se evaporó hasta la total eliminación de agua para dar lugar al producto **16**. El producto **16** se disolvió en DMF (30ml) y se añadió a esta solución el ácido adípico (7,2 g, 49,2 mmol, 4 eq.), DCC (6,6 g, 31,9 mmol, 2,6 eq.) y DMAP (0,6 g, 4,9 mmol, 0,4 eq.). Se dejó evolucionar la reaccionar durante 16 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se filtró el crudo y la solución se evaporó a sequedad. El crudo resultante se purificó mediante una columna Waters Porapak Rxn ® de 1 g empleando un gradiente de 0→100% de CH_3CN en H_2O. Después de liofilizar las fracciones puras se obtuvieron 1,38 g del producto puro **24** (4,8 mmol, 45%).



HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 1,42 min, λ=260 nm (90%).

EM (ESI): m/z= 289,0 $[M+H]^+$. Masa calculada: 288,23.

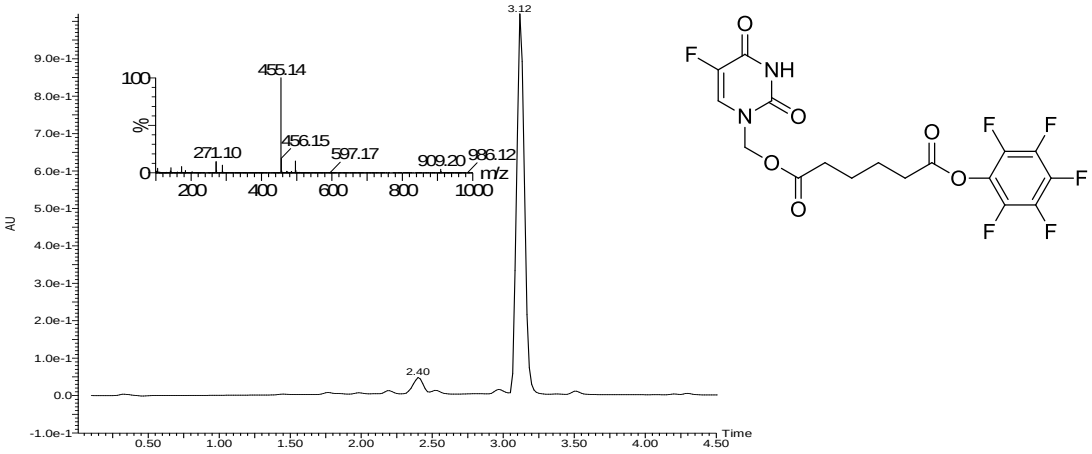
^{1}H RMN (400 MHz, MeOH-d4) δ 1,57-1,71 (m, 4H); 2,26-2,32 (m, 2H); 2,38 -2,45 (m, 2H); 5,65 (s, 2H); 7,92 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H).

^{13}C RMN (101 MHz, MeOH-d4) δ 25,17; 25,42; 34,23; 37,71; 71,62; 130,52 (d, J=34,4 Hz); 141,43 (d, J=234,1 Hz); 151,10; 159,63 (d, J=26,4 Hz); 174,49; 177,48.

^{19}F RMN (376 MHz, MeOH-d4) δ -163,90 (d, *J* = 6,6 Hz).

E1.2.8 Síntesis del éster de pentafluorofenol de 1-(hidroxicarbonilbutil)carboniloximetil-5-fluorouracilo (25)

A una disolución del producto **24** (1,38 g, 4,8 mmol, 1,0 eq.) en una mezcla DCM /DMF (20 ml, 1:1 v/v) se añadió EDC (1,4 g, 7,3 mmol, 1,5 eq.), pentafluorofenol (1,3 g, 7,0 mmol, 1,5 eq.) y DMAP (0,3 g, 2,4 mmol, 0,5 eq.) y se dejó reaccionar durante 4h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se evaporó a sequedad la mezcla de reacción. El crudo resultante se disolvió en CH_2Cl_2 (30 ml) y se llevaron a cabo lavados con solución acuosa al 5% de $NaHCO_3$ (3x30 ml), una disolución acuosa de ácido cítrico al 0,5% (3x30 ml) y con una solución acuosa saturada de NaCl (3x30 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se eliminó el disolvente hasta sequedad, obteniéndose 1,68 g del producto **25** (3,7 mmol, 78%) como un sólido blanco, que se utilizó directamente sin purificar.



HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= min, λ=260 nm (95%).

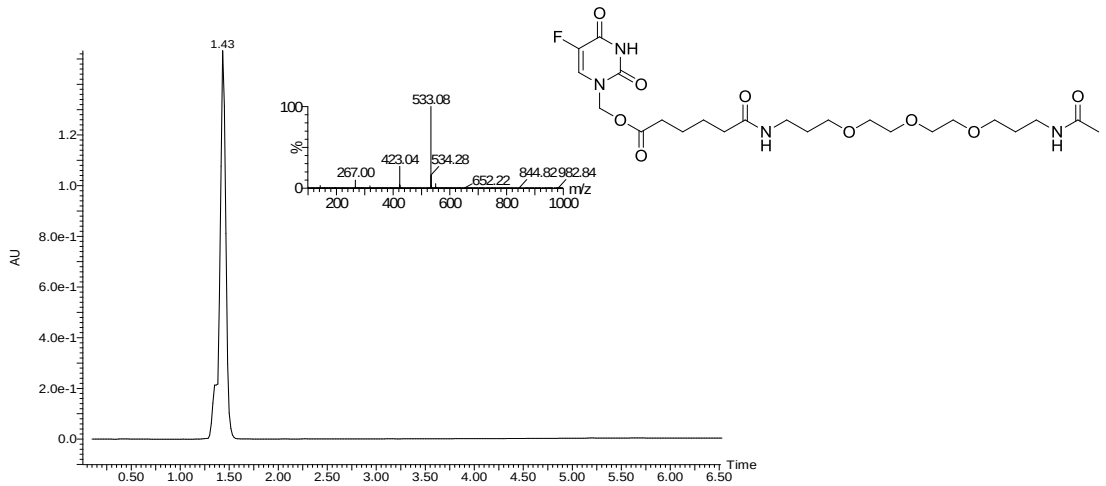
EM (ESI): m/z= 455,1 $[M+H]^+$. Masa calculada: 454,28.

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,80 (ttt, *J* = 9,5, 4,7, 2,4 Hz, 4H); 2,48 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H); 2,71 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H); 5,66 (s, 2H); 7,62 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H).

^{19}F RMN (376 MHz, $CDCl_3$) δ -164,28 (d, *J* = 5,3 Hz); -162,50 - -162,02 (m); -157,92 (t, *J* = 21,7 Hz); -153,28 - -152,69 (m).

E1.2.9 Síntesis de 5FUAdipN$_1$TOTA-Ac (26)

Auna disolución del producto **24** (51 mg, 0,08 mmol, 1,0 eq.) y el hidrocloruro de 1-(acetamido)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (**8**) (108,0 mg, 0,4 mmol, 4,8 eq.) en DMF (10 ml), se añadió PyBOP (279 mg, 0,5 mmol, 6,7 eq.) y se ajustó el pH de la mezcla a 8 mediante la adición de DIEA. La disolución se agitó durante 1h a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el disolvente a sequedad y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna utilizando un equipo automático de purificación en fase reversa (C_{18}) y un gradiente de 0→100% de ACN en H_2O (0,1% de HCOOH en ambos disolventes) como eluyentes. De esta manera se obtuvo el producto **26** (11,8 mg, 0,02 mmol, 28%).

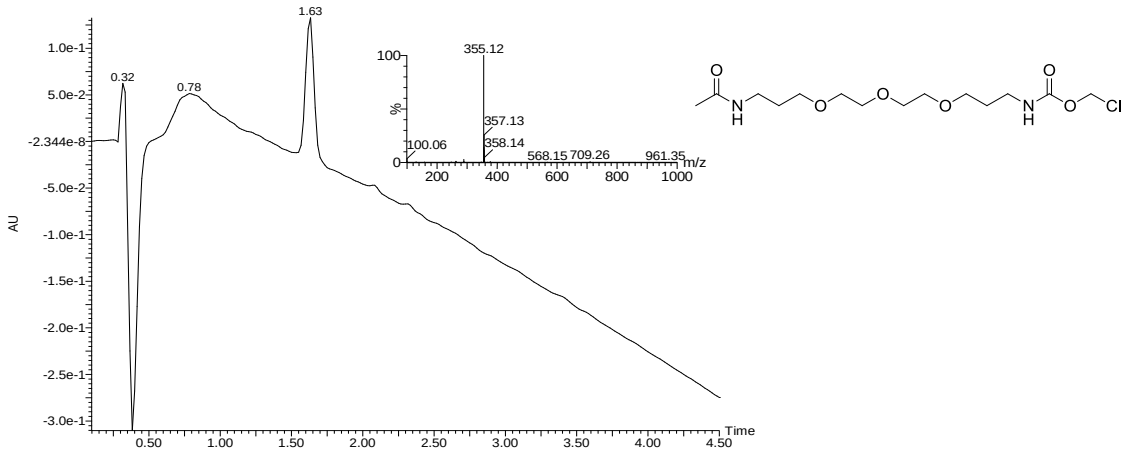


HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 1,43 min, λ=260 nm (83%).

EM (ESI): m/z= 533,1 $[M+H]^+$. Masa calculada: 532,56.

E1.2.10 Síntesis del carbamato de clorometilo de 1-(acetamido)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (27)

El producto hidrocloruro de 1-(acetamido)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (**8**, 52,0 mg, 0,19 mmol, 1,0 eq) se disolvió en DMF anhidra (2 ml) y la solución se enfrió a -20 ^oC. A continuación, se añadió NEt_3 (50 μL, 0,3 mmol, 1,6 eq) y cloroformiato de clorometilo (28 mg, 0,21 mmol, 1,1 eq). La mezcla resultante se agitó durante 15 min a -20 ^oC y, tras este tiempo, se evaporó el disolvente hasta sequedad. El crudo obtenido del producto **27** se utilizó de manera inmediata en la siguiente reacción sin purificación previa.

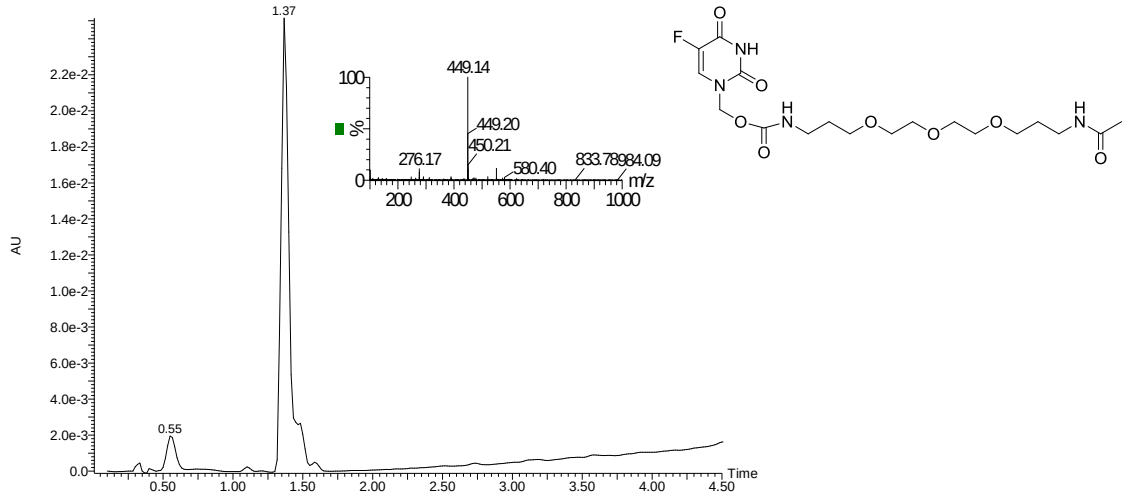


HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 1,63 min, λ=210 nm.

EM (ESI): m/z= 355,1 $[M+H]^+$. Masa calculada: 354,83.

E1.2.11 Síntesis de 5FUN$_1$TOTA-Ac carbamato (28)

Se disolvió el crudo del producto **27** (0,19 mmol teóricos, 1,0 eq.) en DMF anhidra (2 ml) y a esta solución se añadió 5-Fluorouracilo (**15**) (23,3 mg, 0,18 mmol, 1,0 eq.) y Et_3N (75 µl, 0,45 mmol, 2,5 eq.). Esta mezcla se dejó reaccionar a 50 °C durante 48h. Finalmente el crudo se evaporó a sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna utilizando un equipo automático de purificación en fase reversa (C_{18}) y un gradiente de 0→100% de CH_3CN en H_2O (0,1% de HCOOH en ambos disolvente) como eluyentes. De esta manera se obtuvo el producto **28** (6 mg, 0,01 mmol, 5%).

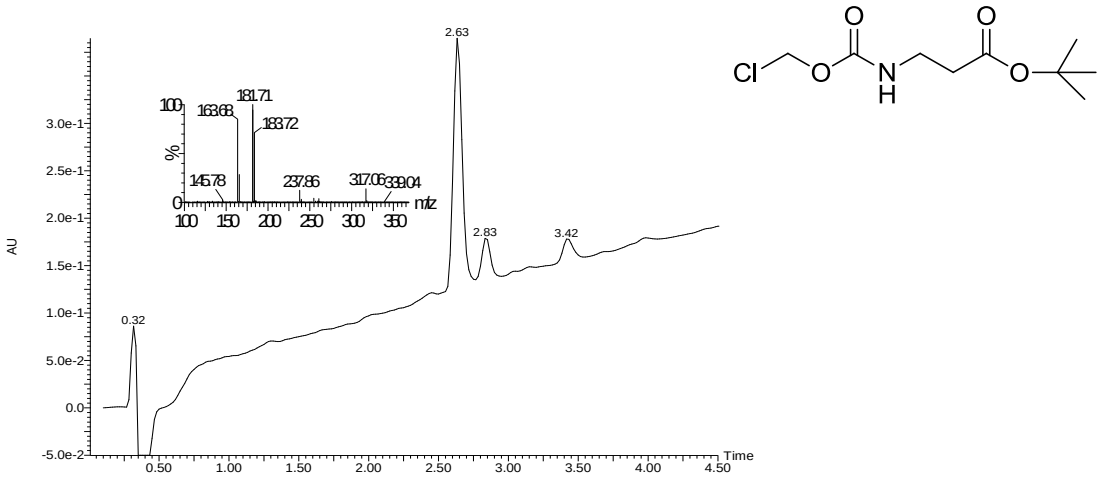


HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 1,37 min, λ=260 nm (82%).

EM (ESI): m/z= 449,1 $[M+H]^+$. Masa calculada: 448,44.

E1.2.12 Síntesis del carbamato de 3-(clorometoxicarbonil-amino)propanoato de *terc*-butilo (29)

El producto 3-amino-propanoato de *terc*-butilo (523,0 mg, 2,8 mmol, 1,0 eq) se disolvió en DMF anhidra (5 mL) y la solución se enfrió a -20 °C. A continuación, se añadió DIEA (948 µL, 5,4 mmol, 1,9 eq) y cloroformiato de clorometilo (286 µL, 3,2 mmol, 1,1 eq). La mezcla resultante se agitó durante 15 min a -20 °C y, tras este tiempo, se evaporó el disolvente hasta sequedad. El crudo se disolvió en DCM (5 ml) y se llevaron a cabo extracciones con una solución acuosa al 5% de $NaHCO_3$ (3x5 ml), una disolución acuosa de ácido cítrico al 0,5% (3x5 ml) y con una solución acuosa saturada de NaCl (3x5 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se eliminó el disolvente hasta sequedad, obteniéndose 585 mg del producto **29** (2,4 mmol, 86%) que se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

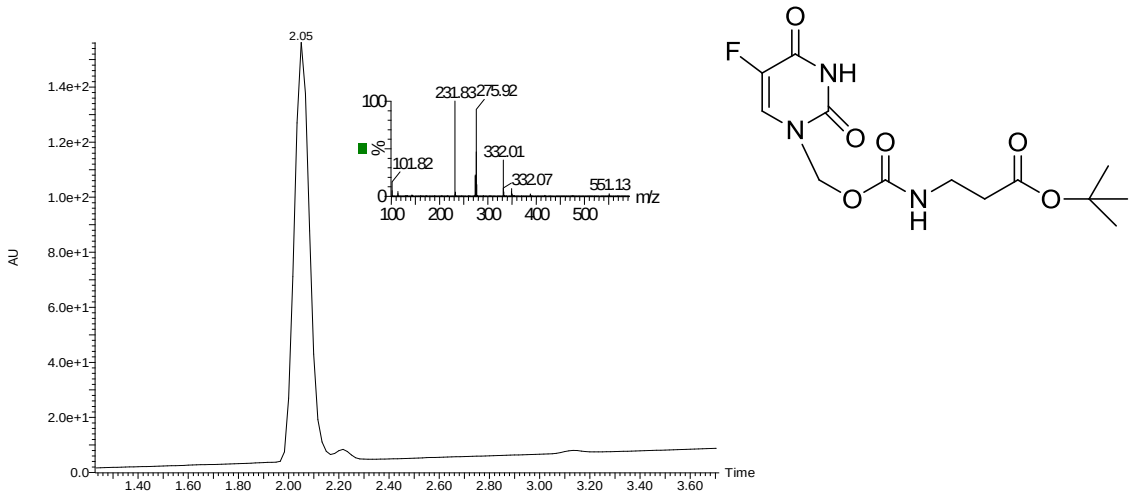


HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 2,63 min, λ=220 nm (82%).

EM (ESI): m/z= 181,7$[M\text{-}tBu+H]^+$, 237,8 $[M+H]^+$. Masa calculada: 237,68.

E1.2.13 Síntesis del compuesto (30)

Se disolvió el crudo del producto **29** (585 mg, 2,4 mmol teóricos, 1,0 eq.) en DMF anh (10 ml), y a esta solución se añadió 5-Fluorouracilo (**15**) (263 mg, 4,5 mmol, 1,8 eq.) y DIEA (1 ml, 5,7 mmol, 2,3 eq.). Esta solución se agitó a 60 °C durante 4h. Tras este tiempo, el crudo de reacción se evaporó a sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna utilizando un equipo automático de purificación en fase reversa (C_{18}) y un gradiente de 0→100% de CH_3CN en H_2O (0,1% de HCOOH en ambos disolventes) como eluyentes. De esta manera se obtuvo el producto **30** (71,9 mg, 0,2 mmol, 8%).



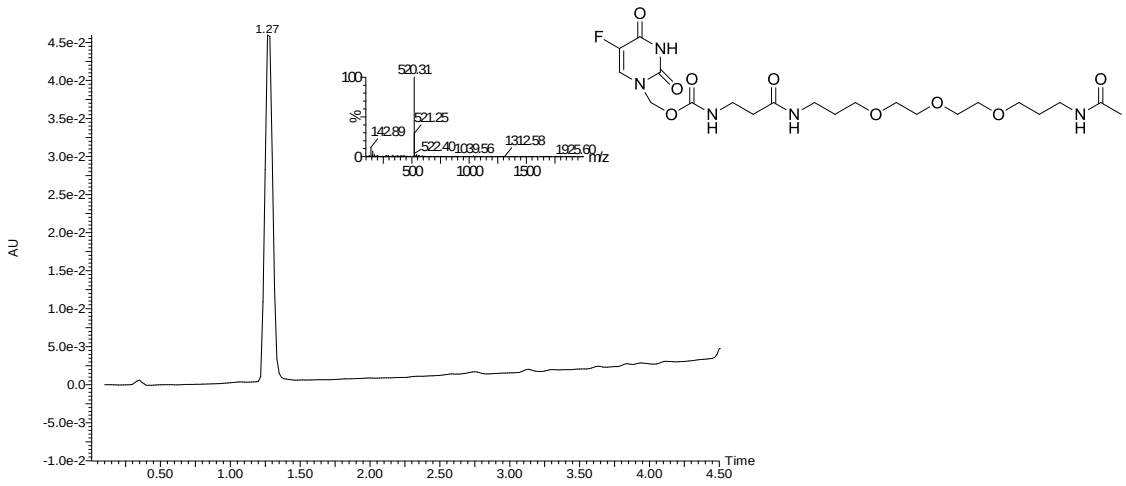
HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 2,08 min, λ=260 nm (97%).

EM (ESI): m/z= 231,8 $[M\text{-}Boc+H]^+$; 275,9 $[M\text{-}tBu+H]^+$; 332,0 $[M+H]^+$. Masa calculada: 331,30.

E1.2.14 Síntesis de 5FUAlaN$_1$TOTA-Ac carbamato (32)

El producto **30** (35,9 mg, 0,1 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en una solución de HCl en dioxano (4M) (500 µl, 2,0 mmol, 2,0 eq.) y la mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, este crudo se evaporó a sequedad y se coevaporó con tolueno (2 x 10 ml) para dar lugar al producto **31**, que fue empleado en la siguiente reacción sin purificación previa.

A una disolución del producto **31** (0,1 mmol teóricos) y el producto hidrocloruro de 1-(acetamido)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (**8**) (42,8 mg, 0,15 mmol, 1,5 eq.) en DMF (5 ml), se añadió PyBOP (84,1 mg, 0,16 mmol, 1,6 eq.) y se ajustó el pH a 8 mediante la adición de DIEA. La mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. El crudo resultante se evaporó a sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna utilizando un equipo automático de purificación en fase reversa (C_{18}) y un gradiente de 0→100% de CH_3CN en H_2O (0,1% de HCOOH en ambos disolventes) como eluyentes. De esta manera se obtuvo el producto **32** (2,2 mg, 4,2 µmol, 4%).



HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 1,27 min, λ=260 nm (99%).

EM (ESI): m/z= 520,3 $[M+H]^+$. Masa calculada: 519,52.

E1.2.15 Ensayos de estabilidad en plasma y en solución acuosa a diferentes pHs

MÉTODO CROMATOGRÁFICO Y RECTA DE CALIBRADO DE 5FU

La recta de calibrado se realizó en las condiciones cromatográficas siguientes:

Equipo: Módulo Waters Alliance 2695 equipado por dos bombas, un mezclador de alta presión, un autoinyector, un detector UV-visible multicanal Photodiode Array Detector 996.

Columna: Sunfire C_{18} 4,6x100 nm 3,5 μm (Waters®)

Gradiente: 0→60% de CH_3CN (0,1% TFA) en H_2O (0,1% TFA) en t=10min, λ=260 nm.

Se pesaron 15 mg de 5FU y se disolvieron en 50 ml de una solución de PBS 0,01 M que contenía 65mg/l del patrón interno resorcinol, obteniendo así la solución madre A. Mediante diferentes diluciones se obtiene el árbol de diluciones correspondiente a la recta de calibrado de 5-Fluorouracilo (figura E1.1).). La solución madre **A** y las correspondientes diluciones (**B**-**G**) se prepararon por triplicado.

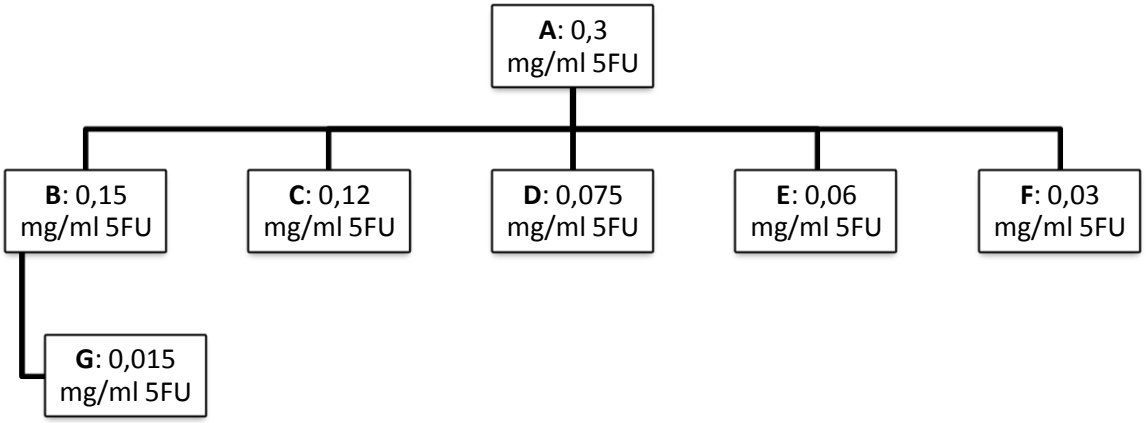


Figura E1.1 *Árbol de diluciones para la obtención de la recta de calibrado de 5-Fluorouracilo.*

ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN SOLUCIÓN ACUOSA A DIFERENTES pHs

Se disolvieron 5 tabletas de PBS (Sigma Aldrich) en 1 l de H_2O MilliQ para conseguir una solución 0,01 M de PBS 7,4. A esta solución se añadió el patrón interno resorcinol (65 mg) y de esta manera se obtuvo la solución de referencia de PBS a pH 7,4. Esta misma solución se utilizó para obtener las dos soluciones de referencia a pH 6,5 y pH 5,5. Para ello, se acidificó la solución madre con HCl 37% hasta obtener el pH deseado en cada caso. De esta manera se obtuvieron las 3 disoluciones (todas con la misma concentración de resorcinol) para llevar a cabo el estudio de la estabilidad de los derivados de 5-Fluorouracilo en soluciones acuosas a diferentes pHs.

Los productos a ensayar (**21**, **23**, **26**, **28** y **32**) se disolvieron en H_2O MilliQ hasta obtener una concentración teórica de 0,5 mg 5FU/ml. Se añadieron 5 µl de estas soluciones a un eppendorf que contenía 100 µl de cada tampón PBS a diferentes pHs. Este procedimiento se hizo por triplicado para cada compuesto y por cada tampón. Finalmente, también se incluyó en el estudio un eppendorf control que contenía 5 µl de H_2O MilliQ y 100 µl de cada una de las disoluciones de PBS a diferentes pHs. En los tiempos establecidos se tomó una muestra de 5 µl de cada ensayo y se diluyeron en 40 µl de PBS 0,01M a pH 5,5. Se inyectarón 20 µl de cada una de las muestras en el HPLC según las condiciones cromatográficas antes mencionadas.

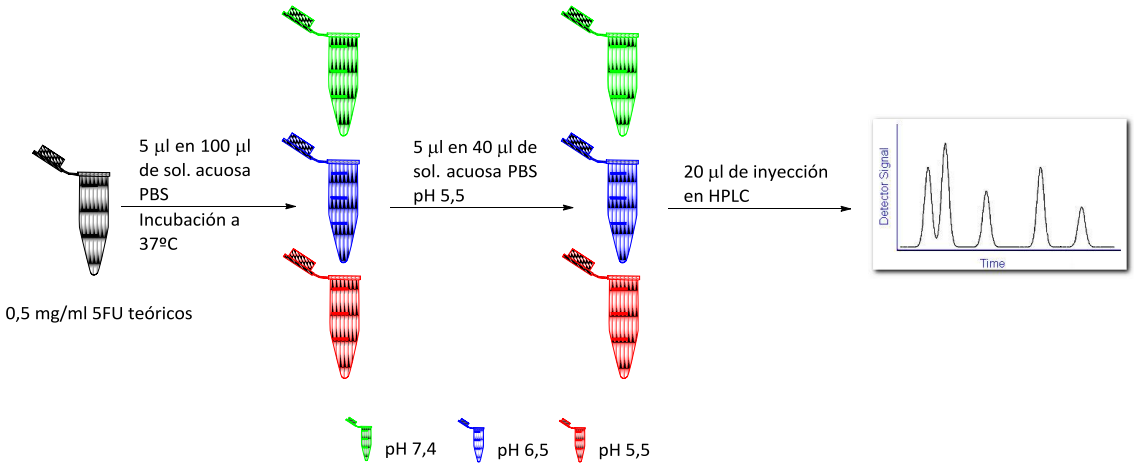


Figura E1.2 *Esquema del procedimiento seguido para el estudio de estabilidad de los derivados de 5-Fluorouracilo en solución acuosa a diferentes pHs.*

ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN PLASMA DE RATÓN

Los productos a ensayar (**21**, **23**, **26**, **28** y **3**2) se disolvieron en H_2O MilliQ hasta obtener una concentración teórica de 0,5 mg 5FU/ml. Se añadieron 5 µl de estas soluciones a un eppendorf que contenía 100 µl de plasma de ratón (subministrado por el grupo de la Dra. Abasolo). Este procedimiento se hizo por triplicado para cada compuesto. Finalmente, también se incluyó en el estudio un eppendorf control que contenía 5 µl de H_2O MilliQ y 100 µl de de plasma de ratón. En los tiempos establecidos se tomó una muestra de 5 µl de cada ensayo y se añadieron 40 µl de CH_3CN 100 % y se centrifugó la muestra. El sólido se descartó y el sobrenadante se evaporó a sequedad. A continuación, se disolvió el crudo resultante en 40 µl de PBS 0,01M a pH 5,5 (con el patrón interno resorcinol a una concentración conocida). Se inyectaron 20 µl de cada una de las muestras en el HPLC según las condiciones cromatográficas antes mencionadas.

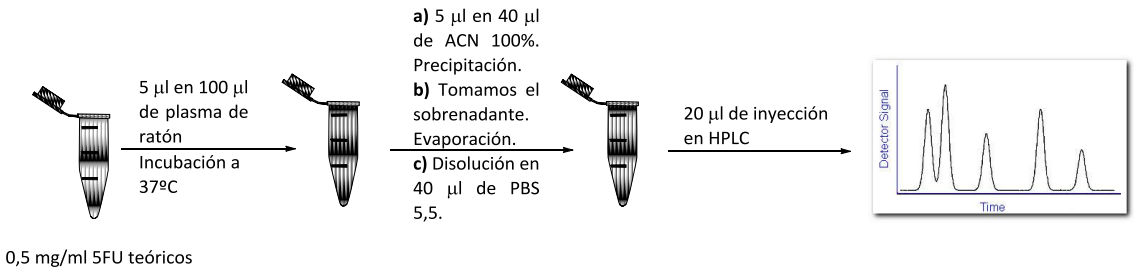


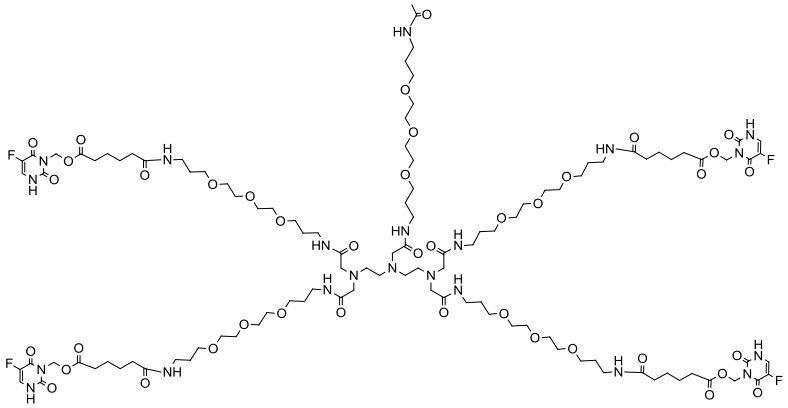
Figura E1.3 *Esquema del procedimiento seguido para el estudio de estabilidad de los derivados de 5-fluorouracilo en plasma de ratón*

1.2.16 Ensayos de MTT

Las líneas celulares HT-29-Luc y HTC-116 se sembraron (90µl/pocillo) en placas estándar de 96 pocillos utilizando medio de cultivo sin antibiótico. Las células HT-29-Luc y HTC-116 se trataron durante 72 h con disoluciones de diferentes concentraciones de **5-FU**, producto **26** y producto **32** o con PBS (experimento control). Transcurrido el tiempo de incubación, las células se incubaron con 10 µL de una solución 5 mg/mL de MTT en PBS durante 4 h a 37 °C. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 180 µl de DMSO y se dejó en agitación durante 20 min xx °C. La densidad óptica se midió a 590 nm mediante un espectrofotómetro con lector de placas. El porcentaje de viabilidad se expresó tomando el control con PBS como 100% de viabilidad celular.

E1.3 Síntesis del dendron-5FU para ensayos *in vivo*

E1.3.1 Síntesis de G1-45FU-1Ac (33)*

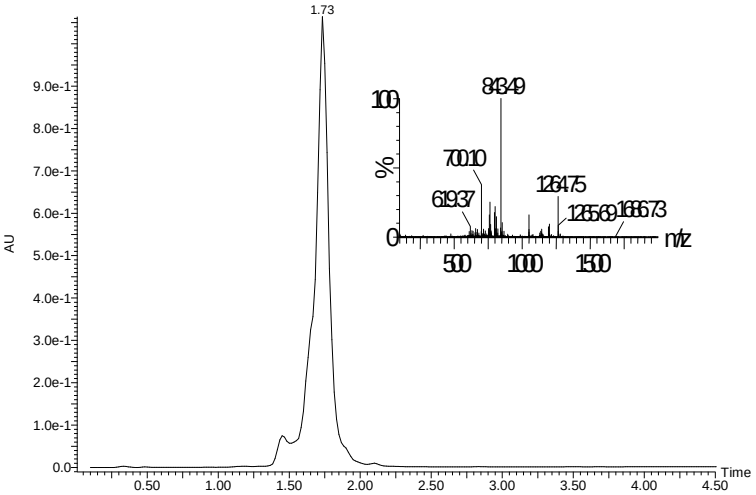


MÉTODO A

El dendrón G1-4Boc-1Ac (**11**) (360 mg, 0,19 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en aproximadamente 2 ml de HCl en dioxano (4M) y se agitó la solución durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el disolvente y se coevaporó el crudo con tolueno (2 x 5 ml), obteniendo así el producto **12** que se utilizó sin previa purificación en la siguiente etapa de síntesis.

El producto **12** (0,19 mmol teóricos, 1,0 eq.) se disolvió en DMF anh. (20 ml) y a esta solución se añadió el 1-(hidroxicarbonilhexil)carboniloximetil-5-fluorouracilo (**24**) (295 mg, 1,02 mmol, 5,2 eq.) y PyBOP (486 mg, 0,93 mmol, 4,9 eq.). El pH de la solución se ajustó a 8 mediante la adición de DIEA. Se dejó reaccionar la mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente. A continuación, la solución se acidificó hasta pH 4,5-5 con una solución HCl en dioxano (2M). El crudo resultante se purificó mediante cromatografía por exclusión molecular empleando una columna pre-empaqueta PD10 (GE Healthcare) y H_2O milli Q como eluyente. De esta manera se obtuvieron 282 mg del producto **33** (0,11 mmol, 59%). También se llevó a cabo la

cuantificación por HPLC del contenido total de 5-Fluorouracilo en la muestra, obteniéndose como resultado un total de 57 mg de 5-Fluorouracilo.



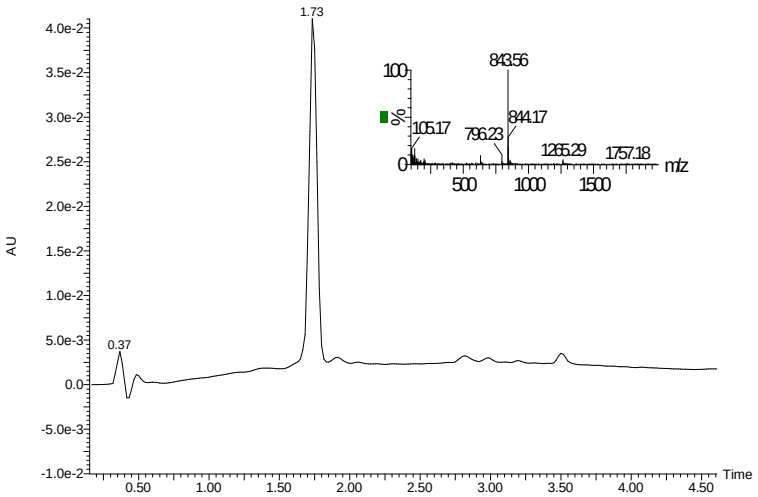
HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 1,73 min, λ=260 nm.

EM (ESI): m/z= 843,5 $[M+3H]^+/3$; 1264,7 $[M+2H]^+/2$. Masa calculada: 2527,71.

MÉTODO B

Auna disolución del dendrón **11** (587 mg, 0,31 mmol, 1,0 eq.) en 3,8 ml de dioxano se añadió 1,2 ml de HCl en dioxano 4M (4,8 mmol, 15 eq.) y agitó la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el disolvente y se neutralizó el crudo añadiendo 355 µl de Et_3N (2,5 mmol, 8,0 eq.), obteniendo así el producto **12** G1-NH_2-1Ac que se utilizó sin previa purificación en la siguiente etapa de síntesis.

El producto **12** (0,31 mmol teóricos, 1,0 eq.) se disolvió en DMF anh. (7 ml) y a esta solución se le añadió el éster de pentafluorofenol de 1-(hidroxicarbonilhexil)carboniloximetil-5-fluorouracilo (**25**) (565 mg, 1,24 mmol, 4,0 eq.) disuelto en 50 ml de DCM anh. Esta solución amarillenta translucida se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Tras este tiempo se añadió más Et_3N (88 µl, 0,6 mmol, 2,0 eq.) y después de 48h se detectó la desaparición del producto de partida 12. A continuación, se añadió al crudo HCl en dioxano 4M (433 µl, 1,7 mmol, 5,6 eq.). La mezcla resultante se evaporó a sequedad y se purificó mediante HPLC-semipreparativo empleando la columna Sunfire C_{18} (19 x 100 mm, 5 μm) con un gradiente 25→35% de CH_3CN (0,1% TFA) en H_2O (0,1% TFA) en 5 min. El producto puro se liofilizó y, posteriormente, se repitió por duplicado el proceso de liofilización, en este caso empleado una solución de HCl 0,01 M para disolver la muestra con el fin de intercambiar el contraión trifluoroacetato por cloruro. Finalmente se obtuvo el producto **33** (556 mg, 0,22 mmol, 70%, 115 mg equivalentes de 5-fluorouracilo).

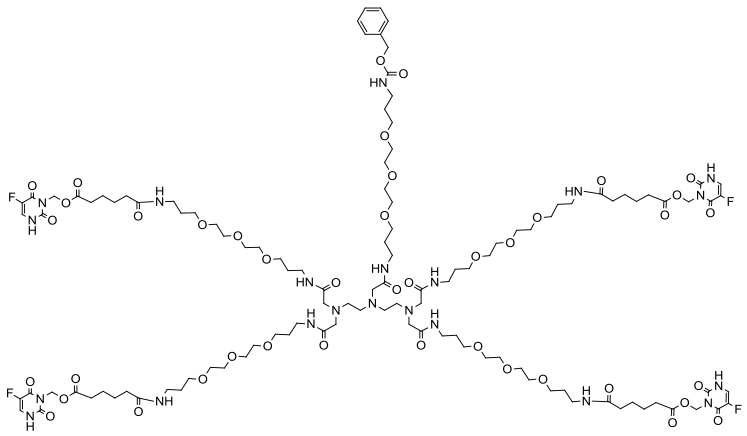


HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 1,73 min, λ=260 nm (79%).

EM (ESI): m/z= 843,5 $[M+3H]^+/3$; 1265,2 $[M+2H]^+/2$. Masa calculada: 2527,71.

***** Como se comenta en el capítulo 1 de la presente tesis el producto presenta una liberación temprana de 5FU que impide calcular su pureza y determinar su RMN de forma correcta.*

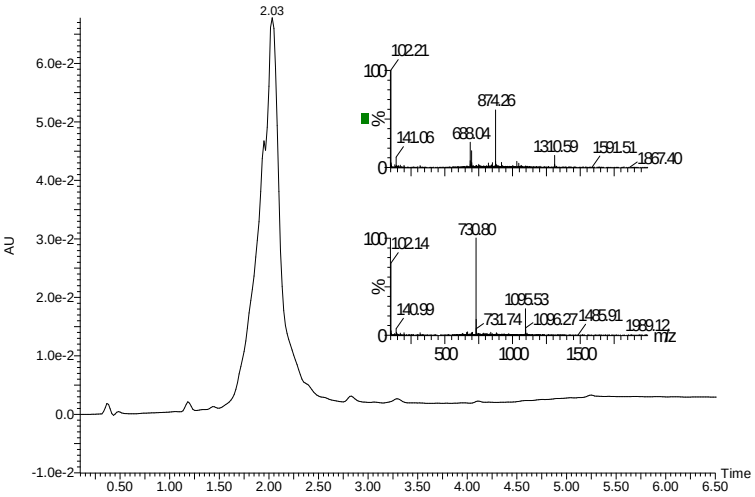
E1.3.2 Síntesis de G1-45FU-1Z (34) **



El dendrón **13** (149 mg, 0,07 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en 2 ml de HCl en dioxano 4 M y se agitó la solución durante 1h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el disolvente y se coevaporó el crudo con tolueno (2 x 5 ml), obteniendo así el producto **14** que se utilizó sin previa purificación en la siguiente etapa de síntesis.

El producto **14** (0,07 mmol teóricos, 1,0 eq.) se disolvió en DMF anh. (10 ml) y a esta solución se añadió el 1-(hidroxicarbonilhexil)carboniloximetil-5-fluorouracilo(**24**) (96 mg, 0,33 mmol, 4,7 eq.) y PyBOP (200 mg, 0,38 mmol, 5,4 eq.). El pH de la solución se ajustó a pH 8 mediante la adición de DIEA. Se dejó reaccionar la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. A

continuación, la solución se acidificó hasta pH 4,5-5 con una solución HCl en dioxano (2 M). El crudo resultante se purificó mediante cromatografía por exclusión molecular empleando una columna pre-empaqueta PD10 (GE Healthcare) y H_2O milli-Q como eluyente. De esta manera se obtuvieron 55 mg del producto **34** (0,02 mmol, 30%).



HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 2,03 min, λ=260 nm (60%).

EM (ESI): m/z= 874,3 $[M+3H]^+/3$; 1310,6 $[M+2H]^+/2$. Masa calculada: 2619,80.

******* *Como se comenta en el capítulo 1 de la presente tesis el producto presenta una liberación temprana de 5FU que impide calcular su pureza y determinar su RMN de forma correcta.*

E1.3.3 Síntesis de G1-45FU-1AF750 (36)

Se disolvió el producto **34** (55 mg, 0,02 mmol, 1,0 eq.) en isopropanol (2 ml) y a esta solución se añadió un 10% en peso de paladio negro en peso (5 mg). La suspensión resultante se agitó durante 16 h bajo atmósfera de H_2 a temperatura ambiente. El catalizador se eliminó por filtración a través de celite y el disolvente se evaporó hasta sequedad, obteniendo el producto **35** de manera cuantitativa (49,7 mg, 0,02 mmol).

Para realizar el acoplamiento de AF750 se disolvió 1 mg del dendrón **35** (0,4 μmol, 13 eq.), el producto **35** fue disuelto en DMF anh. y se añadió 40 μg del fluoróforo AF750 (0,03 μmol) en forma de éster de succinimida. El pH de la solución se ajustó a 8 mediante la adición de DIEA y el crudo se agitó, protegido de la luz, durante 16 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el crudo se evaporó y se purificó mediante cromatografía por exclusión molecular empleando una columna pre-empaqueta PD10 (GE Healthcare) y H_2O milli-Q como eluyente. Se tomaron las fracciones puras y se cuantificó el producto mediante un HPLC con detector de fluorescencia empleando una columna Sunfire C_{18} 4,6x100 nm 3,5 μm, un gradiente 0→60% de CH_3CN (0,1% TFA) en H_2O (0,1% TFA) en 10min y una longitud de onda de absorción de 749 nm y de emisión 775 nm. De esta manera se determinó la cantidad total de 12 μg equivalentes de

AF750 (0,009 µmol, 30%), de los cuales se tomaron 9 µg equivalentes para las pruebas de biodistribución (apartado 4 del capítulo).

E1.4 Ensayo de biodistribución

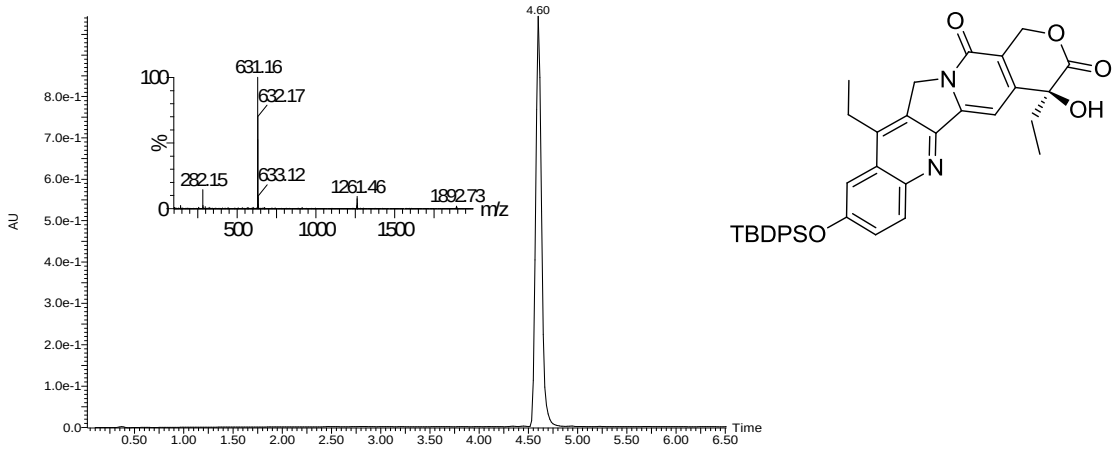
El ensayo se llevó a cabo con ratones hembras atímicos de entre 6 y 8 semanas de edad. A los ratones se les inyectó, subcutáneamente, en el flanco trasero derecho 100 µl de PBS que contenían 10^6 células HT-29-Luc. Una vez los tumores alcanzaron un volumen adecuado, los ratones fueron distribuidos según el volumen del tumor y su bioluminiscencia.

Posteriormente los ratones fueron tratados con la mezcla dendrón-5FU-AF750 mediante administración intravenosa. Transcurridas 4, 24 y 72h post-administración, tumor, plasma, hígado, bazo, riñones, pulmones, corazón, cerebro, músculo y piel fueron extraídos y congelados para la posterior determinación por HPLC del 5-Fluorouracilo contenido en los diferentes órganos si se estimara necesario. Simultáneamente se determinó la acumulación en tumor y la biodistribución de la mezcla dendrón-5FU-AF750 mediante una medida no invasiva por FLI con vistas ventrales, laterales y dorsales. También se determinó la acumulación de 5-Fluorouracilo en tejido mediante FLI de los tejidos *ex vivo*.

E2. NANOCONJUGADOS SN38

E2.1 Síntesis de SN38-TBDPS (38)

A una suspensión de SN38 (1,00 g, 2,5 mmol, **37**) en 50 ml de DCM anhidro se añadió Et_3N anhidra (1,6 ml, 11,4 mmol, 4,5 eq) y TBDPS-Cl lentamente (2,6 ml, 9,9 mmol, 4 eq.). Esta suspensión se llevo a reflujo durante la noche. El crudo de reacción se elaboró realizando extracciones frente HCl 0,2 N (2 x 50 ml), $NaHCO_3$ sat. (2 x 50 ml) y NaCl sat. (2 x 50 ml). Finalmente la fase orgánica se secó con MgSO4, se filtró el sólido y se evaporó la fase orgánica obtenida. Este crudo de reacción fue purificado mediante cromatografía en columna automática de silica (DCM/MeOH, 0-5%). Se obtuvo el compuesto en forma de sólido amarillo (1,53 g, 95% rendimiento).



HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOH en 4,5 min, t_R=4,60 min, 99%, λ=266 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{38}H_{38}N_2O_5Si$: 630,25. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 631,16 $[(M+1)/1]^+$.

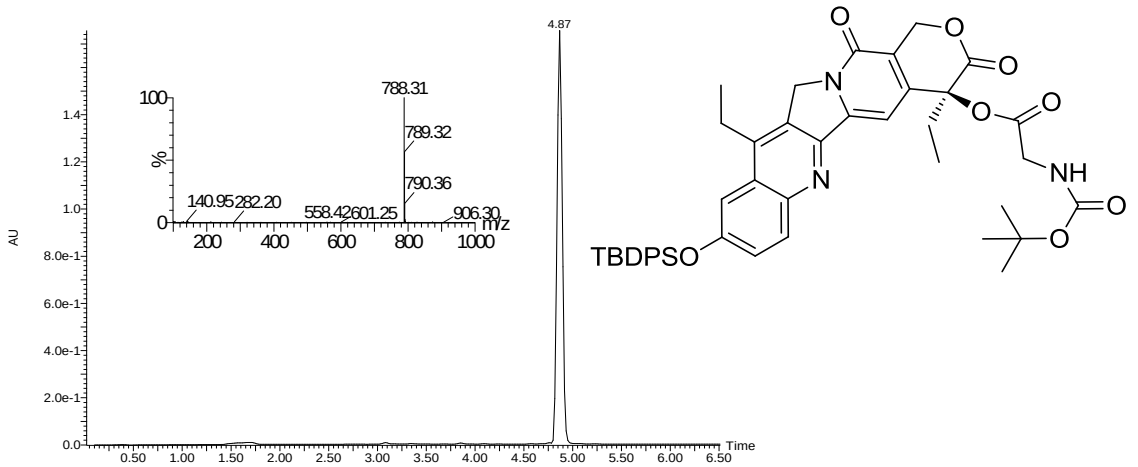
RMN de ^{1}H (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 0,90 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H); 1,00 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H); 1,18 (s, 9H); 1,79-1,95 (m, 2H); 2,64 (q, *J* = 7,7 Hz, 2H); 3,97 (s, 1H); 5,11 (s, 2H); 5,27 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H); 5,71 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H); 7,08 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H); 7,36-7,49 (m, 7H); 7,59 (s, 1H); 7,75-7,80 (m, 4H); 8,05 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H).

RMN de ^{13}C (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,96; 13,43; 19,67; 23,02; 26,66; 31,70; 49,44; 66,46; 72,96; 97,59; 110,40; 117,93; 126,01; 126,93; 127,99; 128,15; 128,17; 130,36; 130,38; 132,04; 132,33; 132,35; 135,63; 143,91; 145,40; 147,47; 149,91; 150,32; 155,12; 157,82; 174,10.

E2.2 Síntesis de SN38-TBDPS-GlyBoc (39)

En un balón se disolvió el compuesto SN38-TBDPS (1,537 g, 2,5 mmol, **38**) en 50 ml de DCM anhidro, a esta solución se añadió Gly-Boc (0,659 g, 3,5 mmol, 1,4 eq.), EDC (0,686 g, 3,5 mmol,

1,4 eq.) y DMAP (0,138 g, 1,1 mmol, 0,4 eq.), la solución se dejo agitando a 0 °C hasta que se observo la desaparición del producto de partida SN38-TBDPS **38** (4h - 1 noche). El crudo de reacción se lavó con $NaHCO_3$ 0.5% (2 x 50 ml), H_2O (2 x 50 ml), HCl 0,1N (2 X 50 ml) y NaCl sat. (2 x 50 ml). Finalmente la fase orgánica se secó con $MgSO_4$, obteniendo así el compuesto en forma de sólido amarillo (1,632 g, 82% rendimiento).



HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=4,87 min, 99%, λ=266 nm.

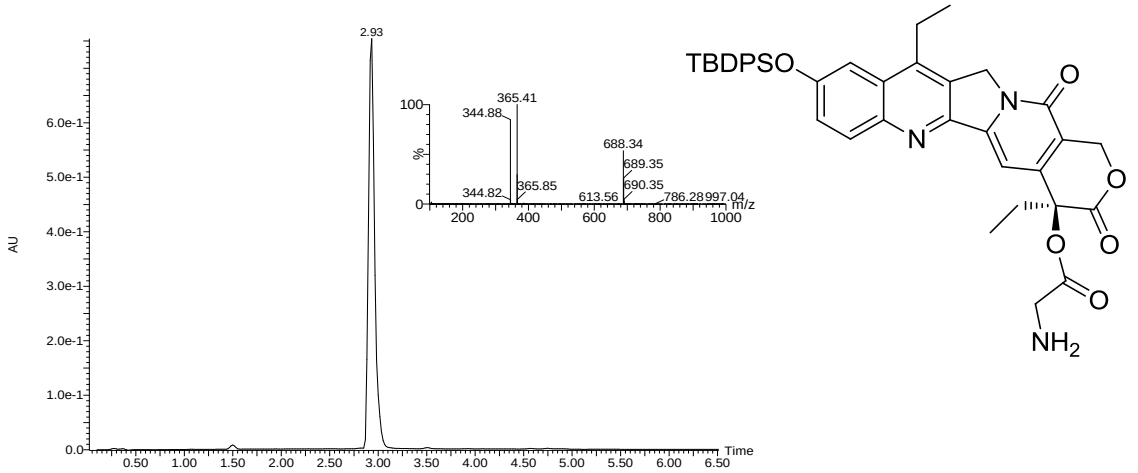
Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{45}H_{49}N_3O_8Si$: 787,33. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 788.31 $[(M+1)/1]^+$.

RMN de ^{1}H (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 0,89 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H); 0,96 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H); 1,18 (s, 9H); 1,40 (s, 9H); 2,01-2,35 (m, 2H) ; 2,64 (q, *J* = 7,6 Hz, 2H); 3,97-4,25 (m, 2H); 5,10 (d, *J* = 1,9 Hz, 2H); 5,37 (d, *J* = 17,1 Hz, 1H); 5,66 (d, *J* = 17,1 Hz, 1H); 7,06-7,18 (m, 2H); 7, 33-7,52 (m, 8H); 7,77 (dt, *J* = 8,2, 1,7 Hz, 4H); 8,05 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H).

RMN de ^{13}C (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,67; 13,45; 19,67; 23,03; 26,66; 28,40; 31,86; 42,51; 49,36; 67,25; 76,94; 80,25; 95,61; 110,48; 119,34; 126,10; 126,80; 128,04; 128,15; 128,17; 130,37; 130,39; 131,90; 132,32; 135,62; 144,04; 145,33; 145,59; 147,47; 149,69; 155,17; 155,55; 157,51; 167,38; 169,57.

E2.3 Síntesis de SN38-TBDPS-GlyNH_2 (40)

Se tomo le compuesto SN38-TBDPS-GlyBoc (0,351 g, 0,4 mmol, **39**) en un balón y se anñadió HCl 4M en dioxano hasta cubrirlo (aprox. 1 ml) y se dejo agitando en un agitador mecánico sin núcleo hasta la desaparición del producto de partida (aprox. 1h). Después de tres coevaporaciones con tolueno se obtuvo el producto en forma de sólido amarillo brillante (0,349 mg, 98% rendimiento).



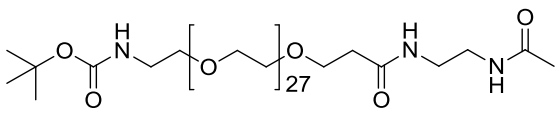
HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=2,93 min, 99%, λ=266 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{40}H_{41}N_3O_6Si$: 687,86. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 688,34 $[(M+1)/1]^+$, 365,41 $[(M+K+1)/2]^{2+}$, 344,88 $[(M+2)/2]^{2+}$.

RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_4OD) δ 0,88-0,93 (m, 3H); 1,07 (dd, *J* = 10,3, 7,4 Hz, 3H); 1,19 (s, 9H); 2,24 (m, 3H); 2,74 (q, *J* = 7,7 Hz, 2H); 4,39 (d, *J* = 17,6 Hz, 1H); 4,48 (d, *J* = 17,6 Hz, 1H); 5,27 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H); 5,42 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 5,52 (dd, *J* = 17,1, 14,6 Hz, 1H); 5,65 (dd, *J* = 17,1, 14,4 Hz, 1H); 7,22 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H); 7,36-7,53 (m, 11H); 7,61 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H); 7,64-7,79 (m, 7H); 7,79-7,86 (m, 4H).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CD_4OD) δ 8,04; 13,58; 13,74; 20,22; 26,85; 27,20; 40,80; 41,17; 48,36; 48,57; 48,79; 49,00; 49,21; 49,43; 49,64; 51,08; 51,39; 67,60; 79,48; 106,93; 128,80; 129,36; 130,26; 130,84; 131,73; 136,55; 136,66; 136,68; 167,91.

E2.4 Síntesis de Boc-OEG$_{27}$-CONH-Ac (42)



Primeramente se tomó el producto comercial carbamato de *terc*-butilo de 2-acetoamidoetilo (3,54 mg, 0,02 mmol, 1 eq.), se introdujo en un balón y se disolvió en HCl 4M en dioxano (aprox. 1 ml). Se dejó reaccionar la mezcla durante 1h y se evaporó a sequedad, coevaporando con tolueno, para acabar obteniendo el producto con una amina libre en uno de sus extremos, *N*-(2-aminoetil)acetoamida de manera cuantitativa.

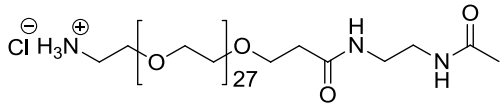
Este producto se hizo reaccionar seguidamente con Boc-PEG27-COOH (30,0 mg, 0,02 mmol) en DCM anhidro (5 ml). A esta disolución se añadió PyBOP (18,3 mg, 0,03 mmol, 1,8 eq.) como agente acoplante, y el pH de la solución fue ajustado a pH 8 mediante la adición de DIEA. Se dejó reaccionar durante 1h la mezcla. El crudo de reacción se elaboró realizando extracciones frente ácido cítrico 0,5% (2 x 5 ml), $NaHCO_3$ sat. (2 x 5 ml) y NaCl sat. (2 x 5 ml). Finalmente la

fase orgánica se secó con $MgSO_4$, se filtró el sólido y se evaporó la fase orgánica, obteniendo el producto Boc-PEG27-CONH-Ac (**42**) sin mayor purificación (20,0 mg, 0,01 mmol, 50% de rendimiento).

HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 2,23 min, no se detecta por UV.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{68}H_{135}N_3O_{32}$: 1506,80. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1524,01 $[(M+H_2O)/1]^+$, 771,32 $[(M+2)/2+18]^{2+}$.

E2.5 Síntesis de $_2$HN- OEG$_{27}$-CONH-Ac (43)

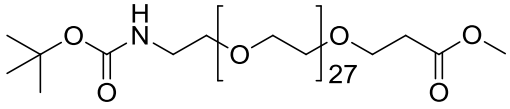


Se disolvió la totalidad del producto **42** obtenido (20 mg, 0,01 mmol) y se disolvió en HCl 4M en dioxano (aprox. 2 ml). Se dejó reaccionar la mezcla durante 1h y se evaporó a sequedad, coevaporando con tolueno, para acabar obteniendo el producto puro de manera cuantitativa (0,01 mmol, 100% de rendimiento).

HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 1,56 min, no se detecta por UV.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{63}H_{128}ClN_3O_{30}$: 1443,15. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 704,29 $[(M+2)/2]^{2+}$.

E2.6 Síntesis de Boc- OEG$_{27}$-COMe (44)

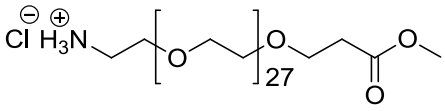


Tomo el producto Boc-PEG27-COOH (121,3 mg, 0,08 mmol, **41**) y disuelvo en 5 ml de DMF, al que se le añade K_2CO_3 (12,9 mg, 0,09 mmo, 1,1 eq.) y se enfría la solución mediante un baño de hielo a 0 ºC. A esta solución añado gota a gota yodometano (10,6 µl, 0,17 mmol, 2,1 eq.), en vitrina y empleando una máscara de gases como precaución. Se deja evolucionar la reacción durante 2h. Tras este tiempo añado 5 ml de H_2O, con el fin de destruir el exceso de yodometano y evaporó a sequedad. Tomo el crudo seco, redisuelvo en AcOEt (10 ml) y extraigo con H_2O (2 x 20 ml). Esta fase acuosa es lavada con DCM (2 x 30 ml). Finalmente las dos fases orgánicas fueron unidas y secadas con $MgSO_4$, se filtró el sólido y se evaporó la fase orgánica combinada, obteniendo el producto Boc-PEG27-COMe (**44**) sin mayor purificación (119,3 mg, 0,08 mmol, 97% de rendimiento).

HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 2,46 min, no se detecta por UV.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{65}H_{129}NO_{32}$: 1436,71. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1454,05 $[(M+H_2O)/1]^+$, 736,26 $[(M+2)/2+18]^{2+}$

E2.7 Síntesis de $_2$HN- OEG$_{27}$-COMe (45)



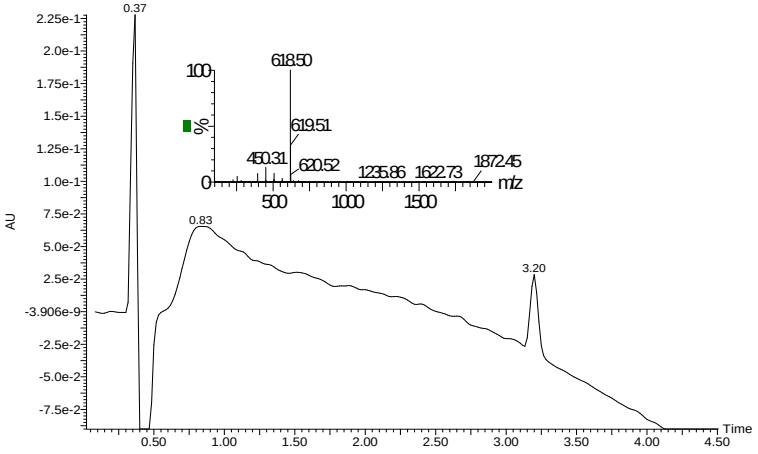
Se disolvió la totalidad del producto **44** obtenido (119,3 mg, 0,08 mmol) y se disolvió en HCl 4M en dioxano (aprox. 2 ml). Se dejó reaccionar la mezcla durante 1h y se evaporó a sequedad, coevaporando con tolueno, para acabar obteniendo el producto puro de manera cuantitativa (0,08 mmol, 100% de rendimiento).

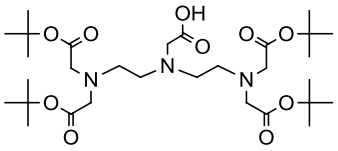
HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 1,73 min, no se detecta por UV.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{60}H_{122}ClNO_{30}$: 1373,05. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1336,97 $[(M+1)/1]^+$, 669,26 $[(M+2)/2]^{2+}$, 446,45 $[(M+3)/3]^{3+}$.

E2.8 Síntesis de DTPA-4Boc-1COOH (46)

El producto **4** (1,5 g, 2,1 mmol) se disolvió en isopropanol (50 mL) y a la solución se añadió 10% de Pd/C (256,7 mg, 10% en peso). La suspensión resultante se agitó durante una noche bajo atmósfera de H_2 a temperatura ambiente. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de Celite y el disolvente se evaporó hasta sequedad. Obteniendo así el producto **46** puro en forma de aceite amarillento (1,3 g, 2,1 mmol, 97% de rendimiento).





HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 3,20 min, 99%, λ=210 nm.

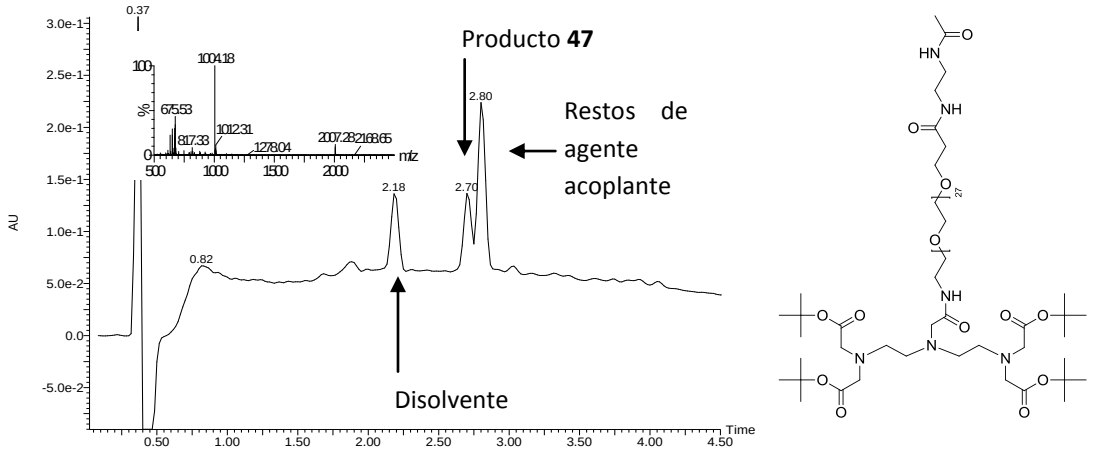
Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{30}H_{55}N_3O_{10}$: 617,77. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 618,50 $[(M+1)/1]^+$.

E2.9 Síntesis de DTPA-4^{t}Bu-1 OEG$_{27}$-Ac (47)

Se tomó el producto $_2$HN-PEG27-CONH-Ac (**43**) de la síntesis descrita en el apartado E2.5 en su totalidad (0,01 mmol, 1,1 eq.) y se introdujo en un balón junto con el producto **46** (7,9 mg, 0,01 mmol) y se disolvieron ambos compuestos en DCM anhídro (1 ml). A esta solución se le

añadió el agente acoplante PyBOP (7,3 mg, 0,01 mmol, 1,2 eq.) y finalmente se ajustó el pH a 8 mediante la adición de DIEA. Se dejó evolucionar durante 1h la reacción a temperatura ambiente y finalmente el crudo se lavó con una solución acuosa al 5% de $NaHCO_3$ (2×5 ml), una solución de ácido cítrico 0,5% (2x 5 ml) y una solución acuosa de $NaCl_{sat.}$(2x5 ml). La fase orgánica se secó con $MgSO_4$ y se evaporó. Tras este procedimiento se pudo observar la desaparición del producto de partida **46**, pero no se observaron claramente las masas del producto. Posteriormente el aceite resultante se transfirió a un tubo de centrífuga de 15 ml disuelto en 1 ml de DCM y se añadieron 14 ml de hexano. La mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó. El sobrenadante se descartó y el aceite anaranjado restante se sometió al mismo proceso de precipitación hasta obtener el producto puro. Se recuperó este producto y se continuó con la síntesis, ya que se trataba de una prueba de concepto.

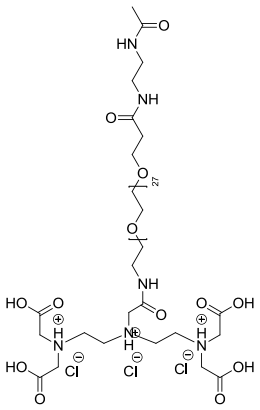
*El producto puro no se observa con claridad por lo que presento el HPLC-MS del crudo tras la primera elaboración.



HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 2,70 min.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{93}H_{180}N_6O_{39}$: 2006,44. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 2007,28 $[(M+1)/1]^+$, 1004,18 $[(M+2)/2]^{2+}$.

E2.10 Síntesis de DTPA-4COOH-1 OEG_{27}-Ac (48)

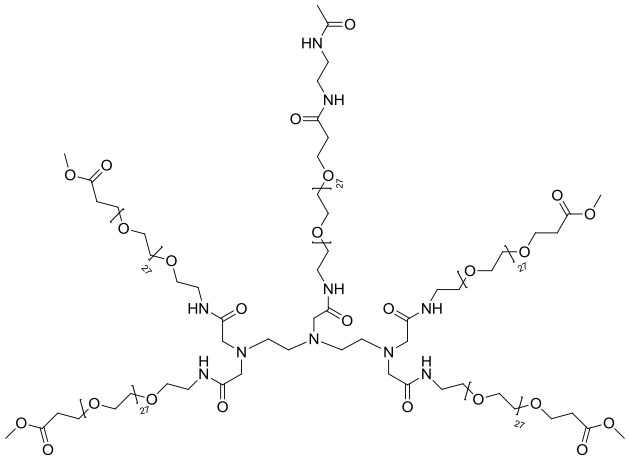


Todo el compuesto **47** obtenido (0,01 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en 2 ml de una solución 4 M de HCl en dioxano (8 mmol, 800 eq). La mezcla se calentó durante 16h a 40 °C. La mezcla HCl/dioxano se eliminó por evaporación y el crudo resultante se disolvió en dioxano y se coevaporó con dioxano (2x5 ml) dando lugar al producto **48** en forma de aceite anaranjado (19 mg, 0,01 mmol, quant.). Este producto se utilizó en el paso siguiente de síntesis sin purificación previa.

HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 15→60% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 2,70 min, no se observa por UV.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{77}H_{151}Cl_3N_6O_{39}$: 1891,40. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1782,34 $[(M+1)/1]^{1+}$; 892,12 $[(M+2)/2]^{2+}$.

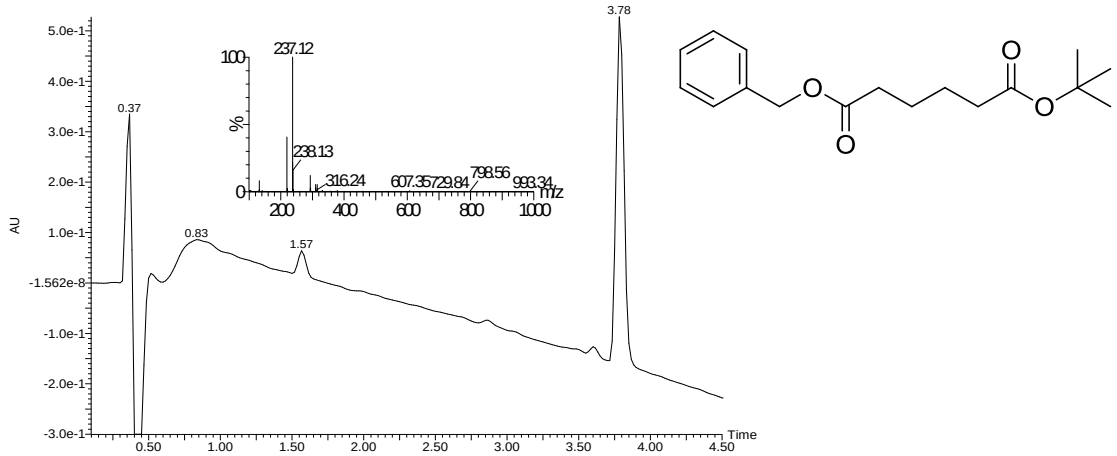
E2.11 Síntesis de G1-4OEG_{27}COMe-1 OEG_{27}-Ac (49)



A una disolución del compuesto **48** (10 mg, 0,005 mmol, 1,0 eq) en DCM/DMF (7:3) (10 ml) se añadió PyBOP (15,4 mg, 0,03 mmol, 6 eq) y el compuesto **45** (38,9 mg, 0,03 mmol, 6 eq). El pH se ajustó a 8 con DIEA y la mezcla resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los disolventes se evaporaron hasta sequedad. El crudo resultante se disolvió en DCM (10 ml) y se lavó con una solución acuosa al 5% de $NaHCO_3$ (3×10 ml), una solución de ácido cítrico 0,5% (p/v) (3x10 ml) y una solución acuosa saturada de NaCl (3×10 ml). La fase orgánica se secó con $MgSO_4$ y se evaporó a sequedad. El crudo resultante se precipitó de la siguiente manera en tubos de polipropileno de 15 mL para centrífuga: 1 ml de una disolución del crudo en DCM se introdujeron en el tubo y seguidamente se añadieron 13 ml de hexano. La mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó. El sobrenadante se descartó y el aceite anaranjado restante se sometió al mismo proceso de precipitación descrito anteriormente (x3). El crudo de reacción nos permitió, tanto por HPLC ni por MALDI, detectar ninguna masa que correlacionara con el producto final (**49**).

E2.12 Síntesis de BzAdipico^{t}Bu (51)

Se tomó el producto comercial Bz-Adipico-COOH (1,014 g, 4,3mmol, **50**) y se disolvió en DCM (25 ml) a 0ºC, se añadió ^{t}Bu-tricloroacetimidato (1,5 ml, 8,4 mmol, 2 eq.). A esta solución se añadió gota a gota $BF_3{\cdot}Et_2O$ (13 µl, 0,1 mmol, 0,02 eq.). Se dejó reaccionar durante 4h. Finalmente, se añadieron 25 ml de K_2CO_3 10% aq. y se extrajo la fase orgánica. Esta fue evaporada y redisuelta en heptano. Aparecen un precipitado sólido que fue separado y tras evaporar el heptano se obtuvo el producto en forma de aceite transparente (1,250 g, 99% rendimiento).



HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=3,78 min, 89%, λ=210 nm.

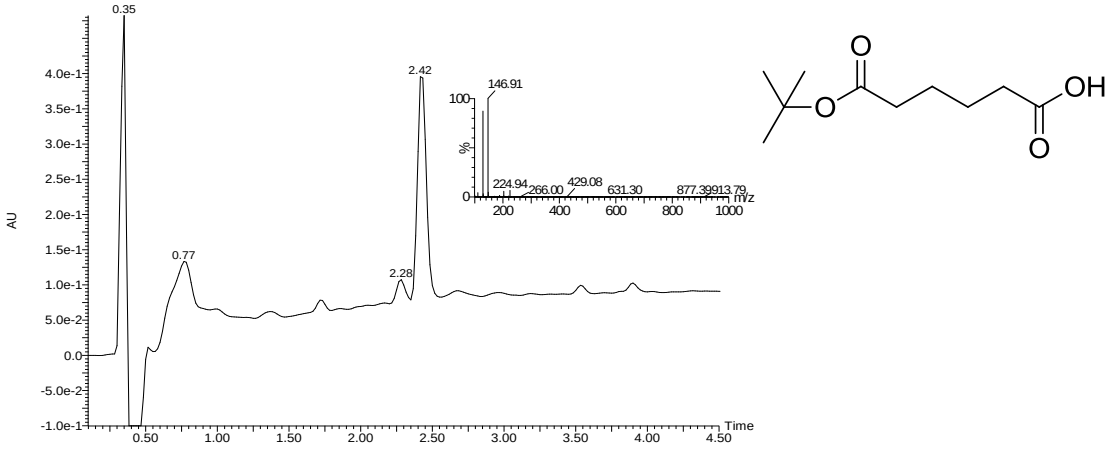
Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{17}H_{24}O_4$: 292,37. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 293,20 $[(M+1)/1]^+$, 237,12 $[(M-^{t}Bu)]^+$.

RMN de ^{1}H (400 MHz, Methanol-d_4) δ 1,43 (s, 9H), 1,54-1,69 (m, 4H), 2,22 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,38 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 5,11 (s, 2H), 7,28-7,37 (m, 4H).

RMN de ^{13}C (101 MHz, Methanol-d_4) δ 25,41, 25,60, 28,33, 34,68, 35,99, 67,18, 81,45, 129,16, 129,20, 129,52, 137,68, 174,63, 174,82.

E2.13 Síntesis de Adipico^{t}Bu (52)

Se tomó Bz-adipico-tBu (1,250 g, 4,3 mmol) y se disolvió en MeOH (aprox. 10 ml). El balón se purgó con argón y se añadió Pd/C 10 % (0,145 g, aprox. 10% en peso). La suspensión se agito en atmósfera de hidrogeno durante 1,5 h. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de Celite y el disolvente fue evaporado, obteniendo el producto puro en forma de aceite-sólido blanquecino (0,862, 99% rendimiento).



HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=2,42 min, 87%, λ=220 nm.

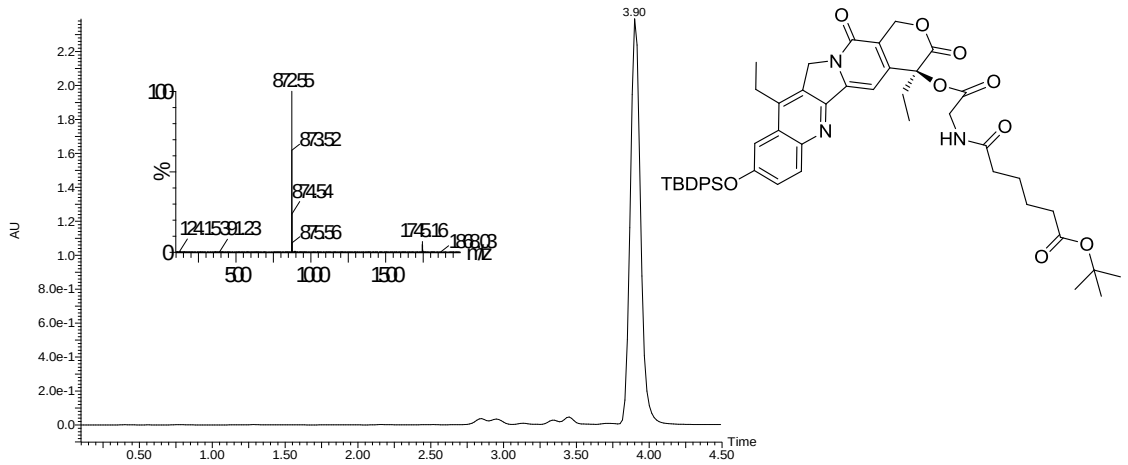
Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{10}H_{18}O_4$: 202,25. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 202,97 $[(M+1)/1]^+$, 146,91 $[(M-^tBu)/1]^+$.

RMN de ^{1}H (400 MHz, Methanol-d_4) δ 1,44 (s, 9H), 1,58-1,65 (m, 4H), 2,21-2,31 (m, 4H).

RMN de ^{13}C (101 MHz, Methanol-d_4) δ 24,28, 24,35, 26,93, 33,88, 34,70, 80,02, 173,34, 177,56.

E2.14 Síntesis de SN38-TBDPS-GlyAdipico^{t}Bu (53)

Se disolvió el producto SN38-Gly-Boc (0,404 g, 0,5 mmol, **39**) y se eliminó el grupo Boc según se detalla en E2.3. El producto obtenido se disolvió en DCM/DMF (1:1) y se añadió HOOC-Adipico-tBu (0,201 g, 0,9 mmol, 2 eq., **52**) y PyBOP (0,404 g, 0,8 mmol, 1,5 eq.) como agente acoplante. El pH de la solución se ajustó a pH8 con Et_3N. Después de 1h se evaporó el disolvente y se disolvió el crudo en la mínima cantidad de DMF. El crudo se purifico en una HLB, lavando primero con H_2O/ACN (50:50) para eliminar todas las impurezas y recuperando el producto puro con ACN 100%. El producto **53** se obtuvo en forma de aceite amarillo (0,342 g, 76% rendimiento).

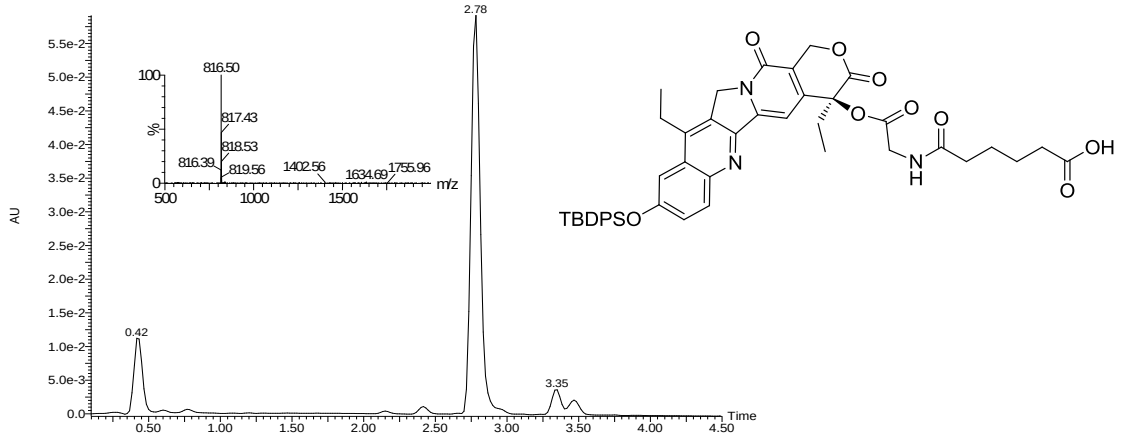


HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=3,90 min, 99%, λ=266 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{50}H_{57}N_3O_9Si$: 871,39. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 872,55 $[(M+1)/1]^+$.

E2.15 Síntesis de SN38-TBDPS-GlyAdipicoCOOH (54)

Se añadió HCl/Dioxano 4M hasta cubrir a SN38TBDPSGlyAdipicotBu (0,351 g, 0,4mmol, **53**). Se dejo reaccionar con agitación mecánica durante 1h, se evaporó el disolvente y se obtuvo el producto en forma de sólido amarillo (0,349 g, 98% rendimiento).



HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 50→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=2,78 min, 78%, λ=266 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{46}H_{49}N_3O_9Si$: 815,98. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 816,50 $[(M+1)/1]^+$.

RMN de ^{1}H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 0,93 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H), 0,98 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,18 (s, 9H), 1,70 (td, *J* = 12,3, 6,4 Hz, 2H), 2,03-2,19 (m, 2H), 2,28-2,39 (m, 6H), 2,68-2,79 (m, 4H), 4,06

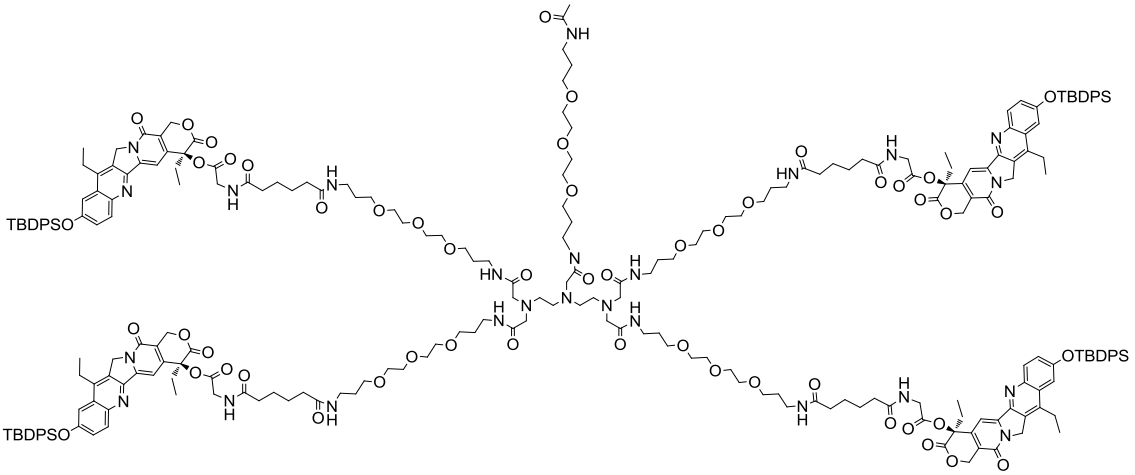
(dd, *J* = 17,8, 4,5 Hz, 1H), 4,55 (dd, *J* = 17,8, 6,6 Hz, 1H), 5,31 (d, *J* = 17,4 Hz, 1H), 5,62 (d, *J* = 17,4 Hz, 1H), 7,14 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,35-7,52 (m, 11H), 7,71-7,79 (m, 6H), 8,60 (s, 1H).

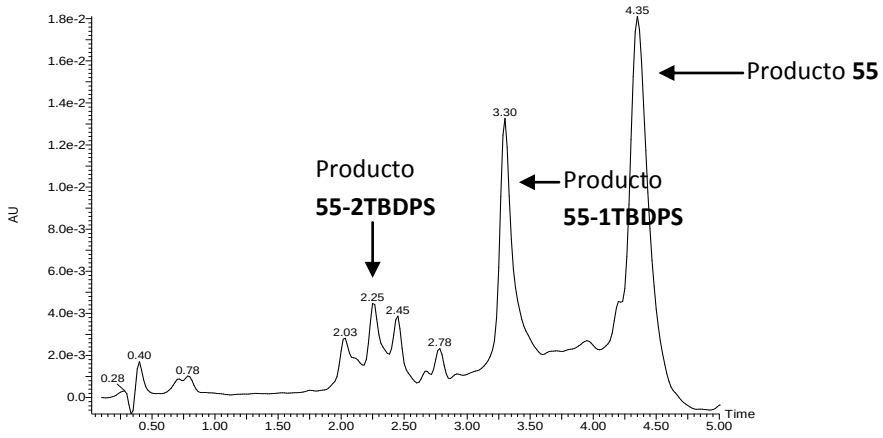
RMN de ^{13}C (101 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,63, 13,22, 19,51, 24,18, 24,74, 26,39, 33,53, 35,56, 41,06, 66,39, 67,06, 76,40, 110,78, 128,25, 128,27, 130,58, 130,62, 135,38, 156,81, 169,15, 176,50.

E2.16 Síntesis de G1-4SN38TBDPS-1Ac (55)

El dendrón G1-4Boc-1Ac (**11**) (90,9 mg, 0,05 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en aproximadamente 590 µl de dioxano y se añadió 197 µl HCl en dioxano (4M) y se agitó la solución durante 16h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el disolvente y se coevaporó el crudo con tolueno (2 x 5 ml), obteniendo así el producto **12** que se utilizó sin previa purificación en la siguiente etapa de síntesis.

El producto **12** (0,05 mmol teóricos, 1,0 eq.) se disolvió en DMF anh. (5 ml) y a esta solución se añadió el SN38-TBDPS-GlyAdipicoCOOH (**54**) (250,8 mg, 0,3 mmol, 6 eq.) y PyBOP (154 mg, 0,3 mmol, 6 eq.). El pH de la solución se ajustó a 8 mediante la adición de 180 µl de DIEA (1,0 mmol, 20 eq.). Se dejó reaccionar la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se evaporó el disolvente a sequedad y el crudo resultante se disolvió en DCM (10 ml). Posteriormente se llevaron a cabo lavados con una solución acuosa al 5% p/v de $NaHCO_3$ (3×10 ml), una solución de ácido cítrico 0,5% p/v (3x10 ml) y una solución acuosa saturada de NaCl (3×10 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó. El aceite resultante se purificó mediante una columna HLB con un gradiente 50→100% de ACN en H_2O, obteniendo el producto **55** en forma de mezcla de dendrón totalmente protegido y con pérdidas parciales de TBDPS.



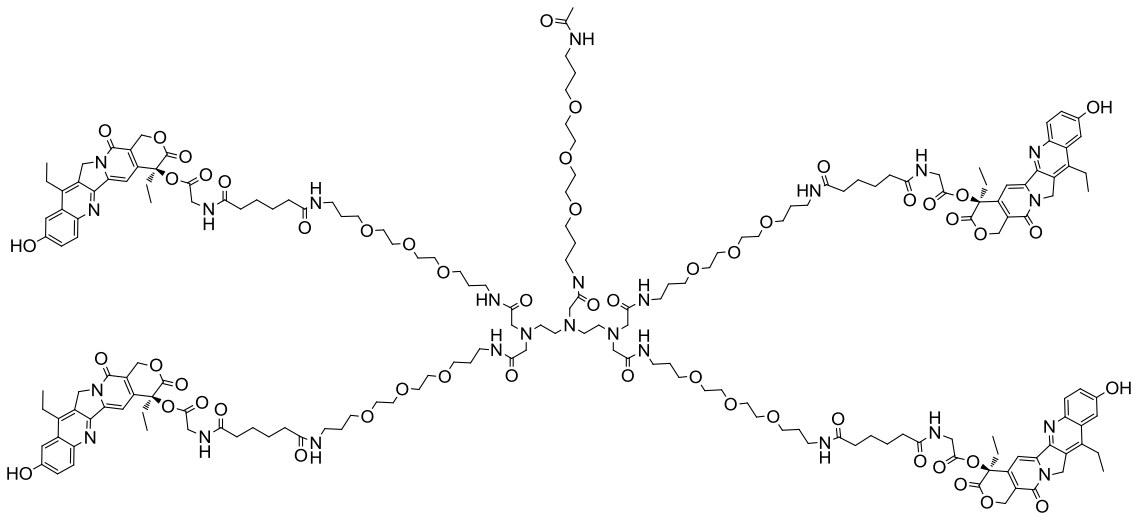


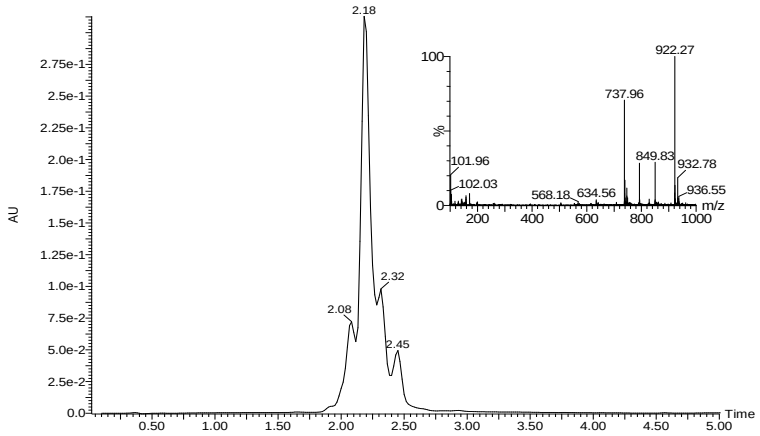
HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 50→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, λ=266 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{250}H_{323}N_{25}O_{53}Si_4$: 4638,72. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1547,74 $[(M+3)/3]^{3+}$, 1160,53 $[(M+4)/4]^{4+}$, 928,73 $[(M+5)/5]^{5+}$, 774,20 $[(M+6)/6]^{6+}$, 1467,79 $[(M\text{-}1TBDPS+3)/3]^{3+}$, 1100,62 $[(M\text{-}1TBDPS+4)/4]^{4+}$, 881,46 $[(M\text{-}1TBDPS+5)/5]^{5+}$, 734,80 $[(M\text{-}1TBDPS+6)/6]^{6+}$.

E2.17 Síntesis de G1-4SN38-1Ac (56)

El compuesto G1-4SN38-TBDPS-1Ac (64,7 mg, 0,01 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en 7 ml de THF y se enfrío en un baño de hielo. A esta disolución se añadieron 200 µl de AcOH (3,4 mmol, 340 eq.) y 1 ml de TBAF 1M en THF gota a gota (1 mmol, 100 eq.). La mezcla se dejó reaccionar durante 15 min. Tras este tiempo el crudo se evaporó a sequedad y se purificó de manera inmediatamente mediante una columna HLB con un gradiente 0→100% de ACN en H_2O. De esta manera se obtuvo el compuesto G1-4SN38-1Ac con una pureza del 50% a λ=266 nm (31,8 mg, 62% rendimiento).



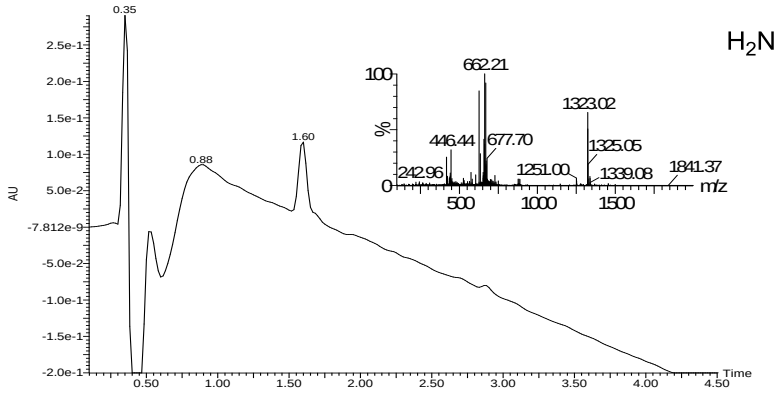


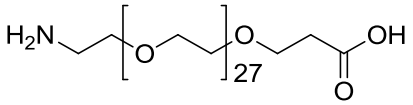
HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 0→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=2,16 min, 50%, λ=266 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{186}H_{251}N_{25}O_{53}$: 3685,12. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 922,27 $[(M+4)/4]^{4+}$, 737,96 $[(M+5)/5]^{5+}$.

E2.18 Síntesis de $_2$HN- OEG$_{27}$-COOH (57)

Se tomó el producto comercial Boc-OEG$_{27}$-COOH (0,254 g, 0,1 mmol,) y se añadió HCl 4M en dioxano (aprox. 0,5 ml) durante 1h, obteniendo el producto puro (100% rendimiento). Este producto fue evaporado y liofilizado para eliminar las trazas de ácido del producto.





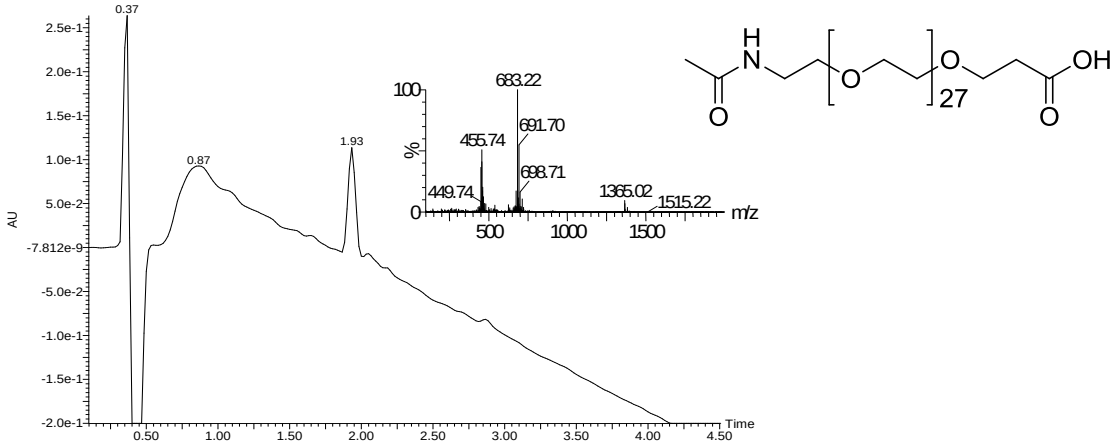
HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=1,60 min, λ=220 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{59}H_{119}NO_{30}$: 1322,56. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1323,02 $[(M+1)/1]^{+}$, 662,21 $[(M+2)/2]^{2+}$.

E2.19 Síntesis de Ac-OEG$_{27}$-COOH (58)

Sin ningún tratamiento posterior se disolvió el producto $_2$HN-PEG27-COOH en ACN anhidro (1ml) y se añadieron Ac_2O (26 µl, 0,2 mmol, 2 eq.) y DIEA (47 µl, 0,2 mmol, 2 eq.) Después de 1h se observa la desaparición del producto de partida. Se evaporó el ACN de la mezcla de

reacción y se disolvió en la mínima cantidad de DCM (aprox. 1 ml), después de esto el crudo fue precipitado primero en hexano (2 x 15ml) y finalmente en Et_2O (2 x 15 ml). El sólido blanco fue liofilizado, obteniendo el producto en forma de sólido blanco esponjoso (0,258 mg, 98% rendimiento).

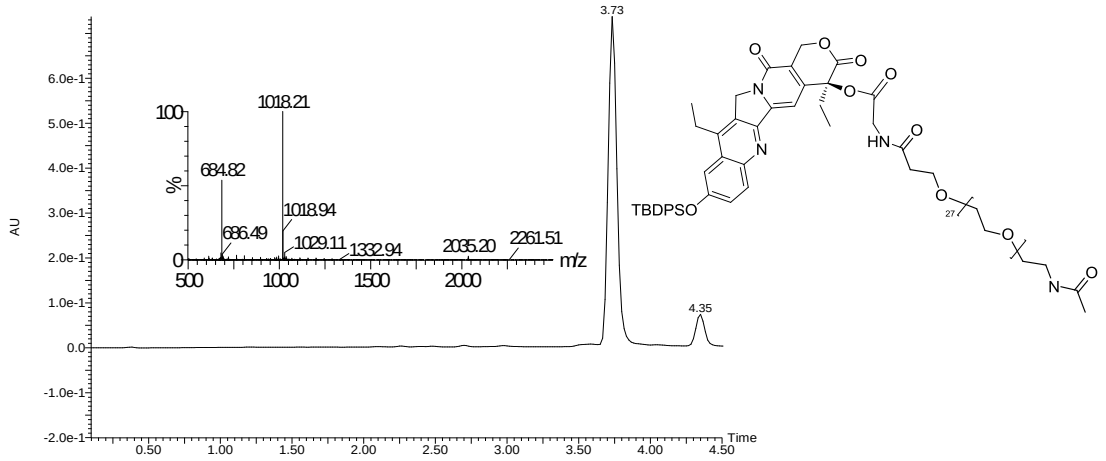


HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=1,93 min, 99%, λ=220 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{61}H_{121}NO_{31}$: 1364,60. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1365,02 $[(M+1)/1]^+$, 683,22 $[(M+2)/2]^{2+}$, 455,74 $[(M+3)/3]^{3+}$.

E3.20 Síntesis de Ac-OEG_{27}-SN38TBDPS (59)

Se tomó el producto SN38TBDPSGlyBoc (0,609 mg, 0,7 mmol, 1 eq.) y se realizó un tratamiento con HCl 4M en dioxano, según lo descrito en el punto E2.3, para obtener SN38-TBDPS-Gly-NH_2. Este producto se disolvió en DCM anhidro y se le añadieron Ac-PEG27-COOH (1,085 g, 0,7 mmol, 1eq.), EDC (0,185 mg, 0,9 mmol, 1,1 eq.) y HOBt (0,153 mg, 1,1 mmol, 1,5 eq.). El pH de la solución fue llevado a pH 5 añadiendo DIEA. Se dejo agitando toda la noche a temperatura ambiente. El crudo se evaporó y se disolvió en la mínima cantidad de DMF, esta solución se purifico mediante una columna de fase reversa HLB, lavando primero con H_2O (aprox. 100 ml), luego con H_2O/ACN (1:1) y finalmente con ACN. De esta manera obtenemos el producto en forma de aceite amarillento (1,400 g, 88% rendimiento).

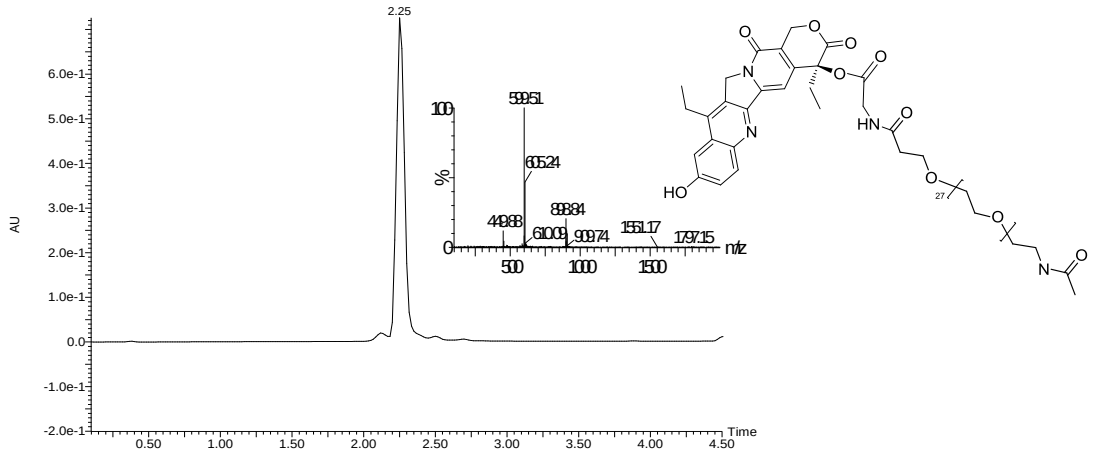


HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=3,73 min, 90%, λ=266 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{101}H_{160}N_4O_{36}Si$: 2034,44. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 2035,20 [(M+1)/1]+, 1018,21 [(M+2)/2]2+, 684,82 [(M+3)/3]3+.

E3.21 Síntesis Ac-OEG$_{27}$-SN38 (60)

El producto SN38TBDPS-PEG27-Ac (1,400 g, 0,70 mmol) se disolvió en THF (60 ml) y se acidificó con AcOH (120 µl, 2,0 mmol, 2,8 eq.). A esta solución, mientras se agitaba en un baño de hielo, se añadió gota a gota TBAF 1M en THF (2,2 ml, 2,2 mmol, 3,1 eq.). La reacción se dejo en agitación durante 15 min. El crudo de reacción fue absorbido en silica y se purificó de manera inmediata mediante una pequeña columna de silica, eluyendo con DCM/EtOH (0-50%). De esta manera se obtuvo el producto en forma de aceite amarillento (0,610 g, 50% rendimiento).



HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=2,255 min, 97%, λ=220 nm.

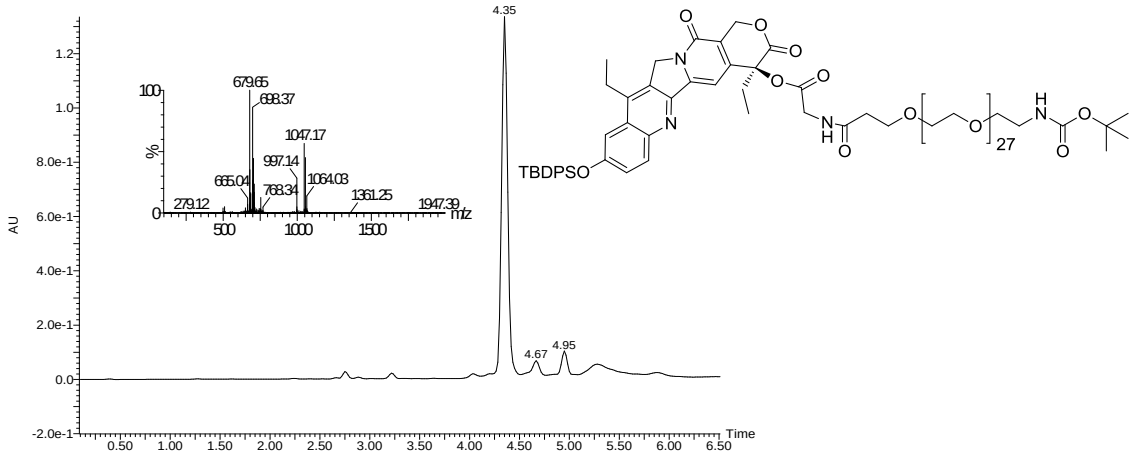
Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{85}H_{142}N_4O_{36}$: 1796,04. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1796,08 $[(M+1)/1]^+$, 898,84 $[(M+2)/2]^{2+}$, 599,51 $[(M+3)/3]^{3+}$.

RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 0,91 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H), 1,29 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H), 1,79 (s, 3H), 2,14 (qd, *J* = 6,9 Hz, 2,9 Hz, 2H), 2,37 (td, *J* = 6,5 Hz, 3,2 Hz, 2H), 3,09 (q, *J* = 7,5 Hz, 2H), 3,17 (q, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,39 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 3,42-3,55 (m, 107H), 3,57-3,64 (m, 2H), 4,00 (dd, *J* = 17,9, 5,9 Hz, 1H), 4,16 (dd, *J* = 17,9, 6,0 Hz, 1H), 5,29 (d, *J* = 2,2 Hz, 2H), 5,48 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 7,39-7,46 (m, 2H), 8,01- 8,08 (m, 1H), 8,39 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H).

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6) δ 7,48; 13,36; 22,53; 38,54; 38,90; 39,10; 39,31; 39,52; 39,73; 39,78; 39,94; 40,15; 66,51; 69,14; 69,48; 69,56; 69,72; 69,77; 76,20; 109,54; 117,97; 148,55; 158,61; 167,10; 169,17; 170,56; 199,12.

E2.22 Síntesis de Boc-OEG$_{27}$-SN38TBPS (61)

Se tomó el producto SN38TBDPSGlyBoc (0,296 mg, 0,37 mmol, 1,2 eq.) y se realizó un tratamiento con HCl 4M en dioxano, según lo descrito en el punto E2.3, para obtener SN38-TBDPS-Gly-NH2. Este producto se disolvió en DCM anhidro y se le añadieron Boc-PEG27-COOH (0,452 g, 0,31 mmol), EDC (0,073 g, 0,38 mmol, 1,2 eq.) y HOBt (0,048 g, 0,35 mmol, 1,1 eq.). El pH de la solución fue llevado a pH 5 añadiendo DIEA. Se dejo agitando toda la noche a temperatura ambiente. El crudo se evaporó y se disolvió en la mínima cantidad de DMF, esta solución se purifico mediante una columna de fase reversa HLB, lavando primero con H_2O (aprox. 100 ml), luego con H_2O/ACN (1:1) y finalmente con ACN. De esta manera obtenemos el producto en forma de aceite amarillento (0,524 g, 78% rendimiento).

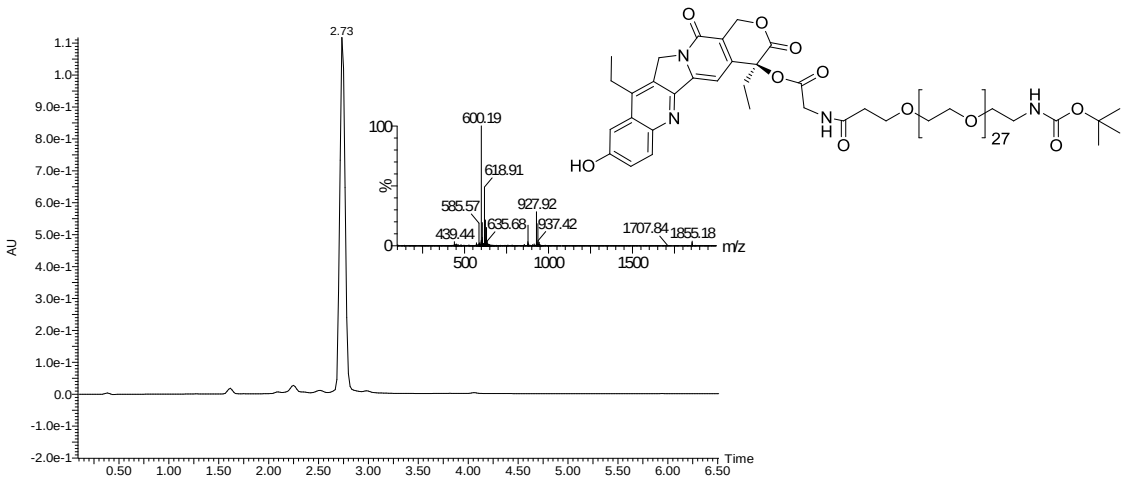


HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=4,35 min, 76%, λ=220 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{88}H_{148}N_4O_{37}$: 2092,52. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1047,17 $[(M+2)/2]^{2+}$.

E2.23 Síntesis de Boc-OEG$_{27}$-SN38 (62)

El producto SN38TBDPS-PEG27-Boc (0,596 g, 0,28 mmol) se disolvió en THF (25 ml) y se acidificó con AcOH (50 µl, 0,87 mmol, 3,1 eq.). A esta solución, mientras se agitaba en un baño de hielo, se añadió gota a gota TBAF 1M en THF (890 µl, 0,89 mmol, 3,1 eq.). La reacción se dejo en agitación durante 15 min. El crudo de reacción fue absorbido en silica y se purificó de manera inmediata mediante una pequeña columna de silica, eluyendo con DCM/EtOH (0-50%). De esta manera se obtuvo el producto en forma de aceite amarillento (0,430 g, 80% rendimiento).

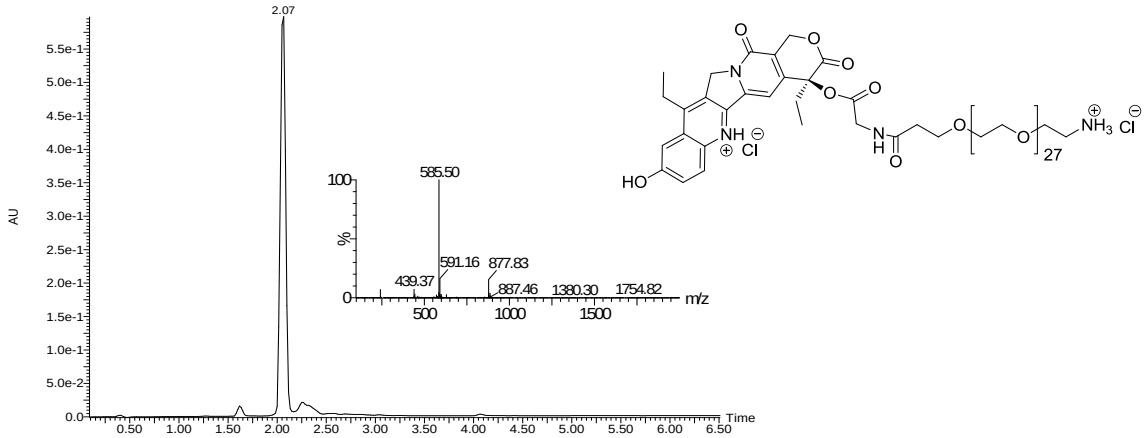


HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=2,73 min, 93%, λ=220 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{88}H_{148}N_4O_{37}$: 1854,12. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1855,18 $[(M+1)/1]^+$, 927,92 $[(M+2)/2]^{2+}$, 618,91 $[(M+3)/3]^{3+}$.

E2.24 Síntesis de $_2$HN-OEG$_{27}$-SN38 (63)

En un balón se toma SN38-Gly-OEG$_{27}$-NHBoc (0,430 g, 0,23 mmol) y se añade hasta cubrir el aceite HCl 4M en dioxano (aprox. 4 ml). Después de 1 hora aproximadamente el crudo de reacción es evaporado y coevaporado con tolueno para eliminar las trazas ácidas, obteniendo producto SN38-Gly-OEG$_{27}$-NH_2 (0,398 mg, 98% rendimiento).

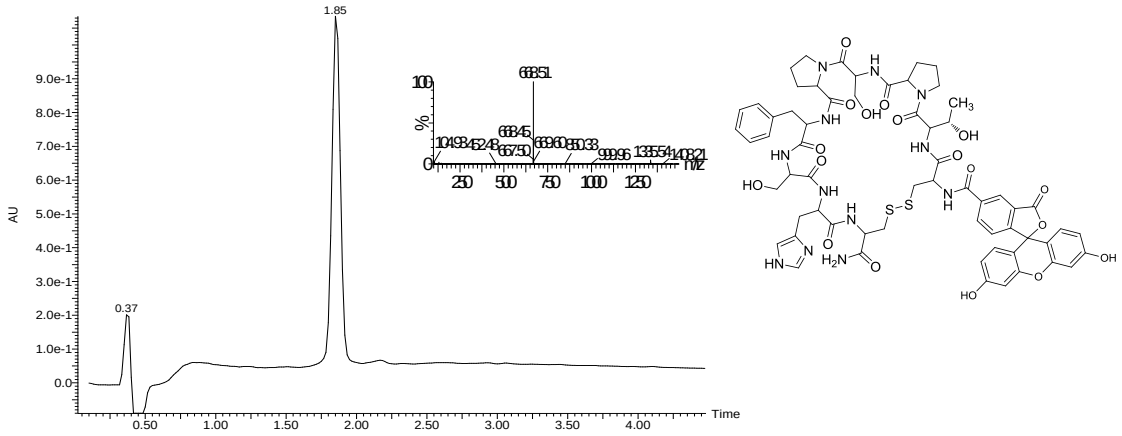


HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=2,07 min, 37%, λ=266 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{83}H_{142}Cl_2N_4O_{35}$: 1826,93. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1754,82 $[(M+1)/1]^+$, 877,83 $[(M+2)/2]^{2+}$, 585,50 $[(M+3)/3]^{3+}$.

E2.25 Síntesis de c(TCP-1)-CF (64)

Se tomaron 0,99 g de resina Fmoc-Rink-Amida MBHA, adecuando a una funcionalización de 0,52 mmol/g resina, y se llevo a cabo la síntesis usando la metódica descrita el apartado 3.3 del apartado de materiales y métodos, usando como agente de acoplamiento DIPCI y HOBt como aditivo. Después de la desprotección del grupo Fmoc del último aminoácido se tomaron 0,77 g de resina y se acoplo la carboxifluoresceína empleando DIPCI como agente de acoplamiento y oxyma pure como aditivo, ajustando a medio básico el acoplamiento con DIEA. Una vez finalizado este acoplamiento se realizaron lavados de la resina con piperidina al 50%. El péptido se desancló de la resina con una mezcla TFA/H_2O/TIS/EDT (10 ml, 95:2,5:1:2,5, v/v) durante 4 h a temperatura ambiente. A continuación se realizaron lavados de la resina con la mezcla TFA/H_2O/TIS/EDT (2X5 ml, 95:2,5:1:2,5, v/v) y DCM (3x5 ml). Finalmente se evaporó a sequedad la mezcla de escisión del péptido de la resina, y se precipitó en TBME (3X45 ml) obteniendo de esta manera el péptido desanclando con las cadenas laterales totalmente desprotegidas. El sólido anaranjado obtenido se liofilizó. El sólido liofilizado se purificó mediante HPLC semipreparativo empleando la columna XBridge C_{18} (19 x 100 mm, 5 µm) con un gradiente 20→50% de CH_3CN en H_2O (0,1% HCOOH) como eluyentes en 5 min. Las fracciones puras se liofilizaron conjuntamente para obtener el péptido. El péptido puro se disolvió en una solución de H_2O/ACN (1:1) hasta una concentración de 0,5 mg péptido/ml y se ajustó el pH a 8 con NH_3. Se burbujeó aire y se dejó reaccionar durante 24 h. Tras esta etapa no fue necesaria una purificación posterior. Se obtienen 1,8 mg (2% rendimiento) del producto en forma de un sólido anaranjado.

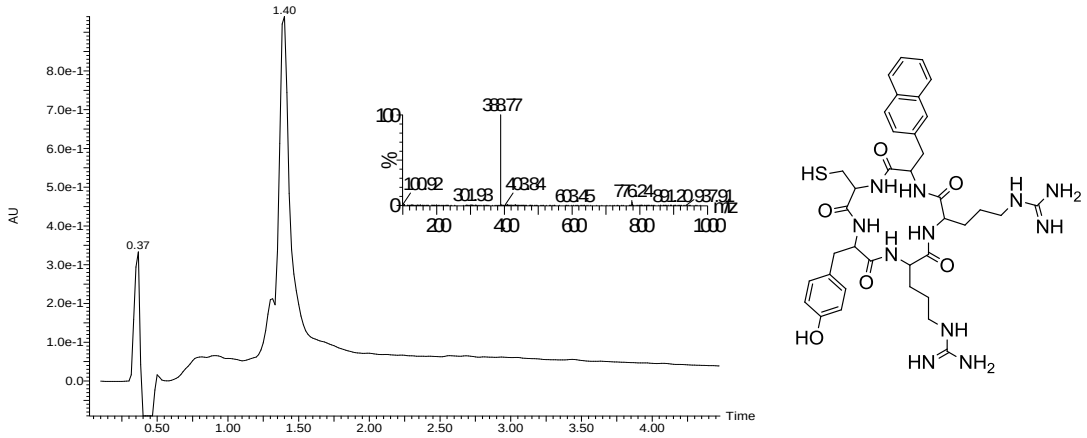


HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=1,85 min, 99%, λ=220 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{62}H_{68}N_{12}O_{18}S_2$: 1333,40. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1335,54 $[(M+1)/1]^+$, 668,51 $[(M+2)/2]^{2+}$.

E2.26 Síntesis de c(CXCR4) (65)

Se tomaron 316,8 mg de resina Cl-Trt, adecuando a una funcionalización de 0,63 mmol/g resina, y se llevo a cabo la síntesis usando la metódica descrita el apartado 3.2 del apartado de materiales y métodos, usando como agente de acoplamiento DIPCI y oxyma pure como aditivo. Después de la desprotección del grupo Fmoc del último aminoácido, el péptido se desancló de la resina con una mezcla $CH_3COOH/TFE/CH_2Cl_2$ (10 ml, 1:1:3, v/v) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se realizaron lavados de la resina con la mezcla $CH_3COOH/TFE/CH_2Cl_2$ (2X10 ml, 1:1:3, v/v) y CH_2Cl_2 (3x10 ml). Finalmente se evaporó a sequedad la mezcla de escisión del péptido de la resina, obteniendo de esta manera el péptido desanclando con las cadenas laterales totalmente protegidas. Posteriormente, el péptido escindido de la resina se disolvió en 5 ml de CH_2Cl_2 y se añadió gota a gota en una solución al 50% de anhídrido polipropilfosfónico (T3P) en AcOEt (1 ml), Et_3N (1 ml), DMAP (5 mg) en 20 ml de CH_2Cl_2 y se dejo agitando la mezcla durante 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente se evaporó a sequedad la mezcla de ciclación del péptido anteriormente descrita y se llevo a cabo un tratamiento acidolítico para la eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales del péptido cíclico empleando una mezcla TFA/H_2O/DODT/TIS (10 ml, 94:2:2:2, v/v/v) durante 16 h a temperatura ambiente. El crudo se evaporó a sequedad y se precipitó con TBME frío (3x45 ml). El sólido blanco obtenido se liofilizó. El sólido liofilizado se purificó mediante HPLC semipreparativo empleando la columna XBridge C_{18} (19 x 100 mm, 5 μm) con un gradiente 25→60% de CH_3CN en H_2O (0,1% TFA) como eluyentes en 5 min. Las fracciones puras se liofilizaron conjuntamente para obtener el péptido c(CXCR4) en forma de un sólido blanco (15,3 mg, 0,01 mmol, 5% rendimiento).

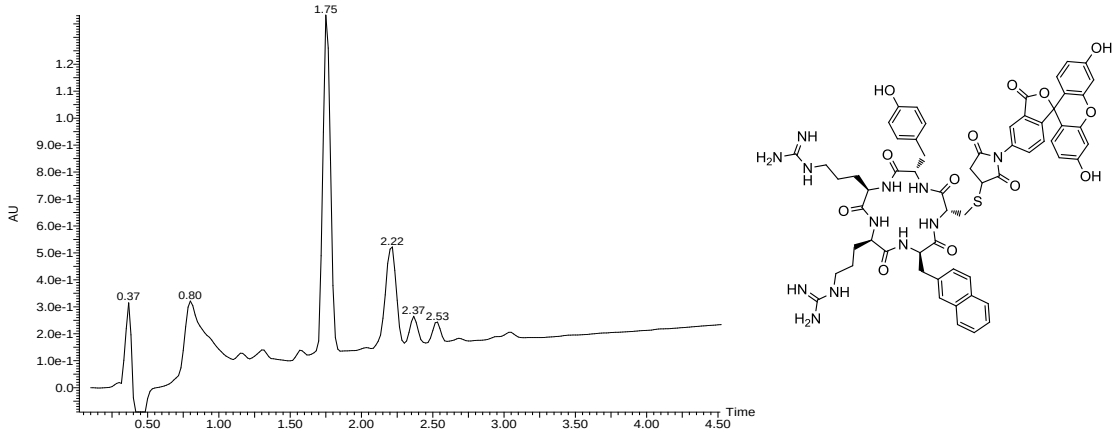


HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=1,40 min, 91%, λ=220 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{37}H_{49}N_{11}O_6S$: 775,92. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 776,24 $[(M+1)/1]^+$, 388,77 $[(M+2)/2]^{2+}$.

E2.27 Síntesis de c(CXCR4)-CF (66)

Se toman 10 mg de c(CXCR4) (0,01 mmol, 1,0 eq.) y se disuelven en H_2O, ajustando su pH a 7 mediante la adición de NH_3. A esta solución se añadió la 5,6-carboxifluoresceína éster de succinimidilo (5,5 mg, 0,012 mmol, 1,2 eq.) y se dejo reaccionar durante 16h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el crudo se evaporó y se purificó mediante HPLC semipreparativo empleando la columna XBridge C_{18} (19 x 100 mm, 5 µm) con un gradiente 25→40% de CH_3CN en H_2O (0,1% TFA) como eluyentes en 5 min. Las fracciones puras se liofilizaron conjuntamente para obtener el péptido c(CXCR4)-CF en forma de un sólido anaranjado (2,2 mg, 0,001 mmol, 18% rendimiento).



HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R=1,75 min, 64%, λ=220 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{61}H_{62}N_{12}O_{13}S$: 1203,43.

E2.28 Ensayos *in vitro* para selección de péptido director

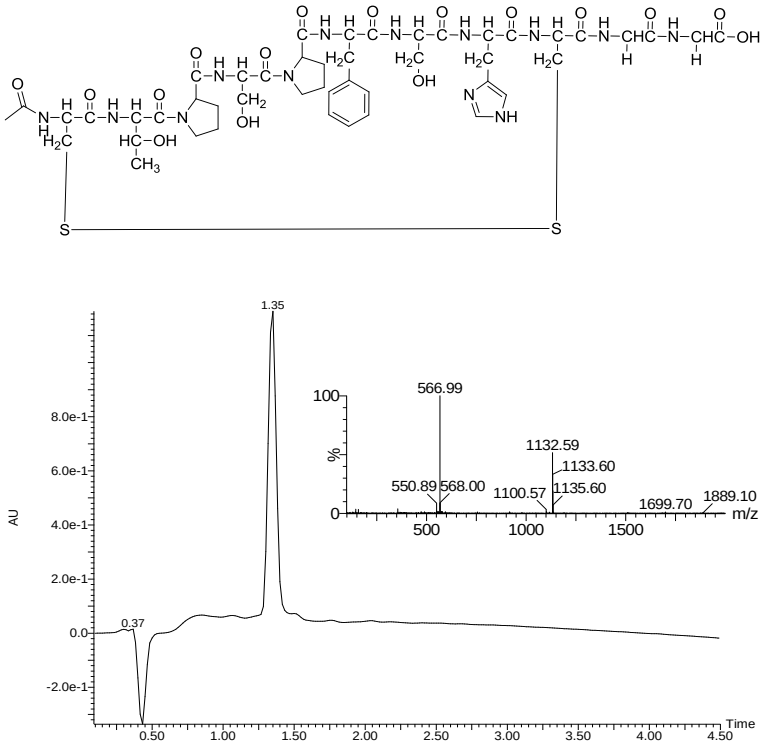
Las líneas celulares HT-29-Luc y HTC-116 se sembraron (90µl/pocillo) en placas estándar de 96 pocillos utilizando medio de cultivo sin antibiótico. Las células HT-29-Luc y HTC-116 se trataron durante 15 min con disoluciones de diferentes concentraciones (5, 10 y 100 µM) de los péptidos **64**, **66** y sin péptido como control a 4 °C y 37 °C. La tinción vital se llevó a cabo con 7AAD y la fluorescencia fue leída con el equipo FACScalibur.

E2.29 Síntesis de TCP-1 y sus derivados

Se tomaron 10,0236 g de resina Cl-Trt, adecuando a una funcionalización de 0,27 mmol/g resina, y se llevo a cabo la síntesis usando la metódica descrita el apartado 3.2 del presente capítulo, usando como agente acoplante DIPCI y HOBt como aditivo. Después de la desprotección del grupo Fmoc del último aminoácido, se separó la resina en tres partes. Dos partes de aproximadamente 1 g y la tercera que contenía la gran mayoría de resina, aprox. 8g. Estas tres resinas fueron tratadas en su último paso de manera diferente y será especificado a continuación.

E2.29.1 c(TCP-1)_Ac: c(AcHNCysThrProSerProPheSerHisCysGlyGlyCOOH) (67)

La mayor parte de la resina fue destinada a la obtención del péptido c(TCP-1)_Ac (**67**). La porción de 8 g de resina contenía el péptido unido a la resina con el extremo amina libre, este extremo amino libre fue acetilado empleando un mezcla Ac_2O (612 µl, 6,5 mmol, 3 eq.) y DIEA (1 ml, 5,7 mmol, 3 eq.). El péptido unido a la resina se trató directamente con la solución acidolítica para escindir el péptido totalmente desprotegido de la resina. Posteriormente el crudo de desprotección obtenido fue evaporado hasta obtener una pasta semisólida y finalmente precipitada en TBME (3 x 40 ml). El sólido obtenido se redisolvió en H_2O y fue liofilizado. Este sólido fue purificado mediante HPLC-MS semipreparativo empleando una columna XBridge C_{18} (19 x 100 mm, 5 µm) con un gradiente 10→30% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 5min a flujo 16 ml/min. El péptido purificado y posterioremente liofilizado, se disolvió en una solución de H_2O/ACN (1:1) hasta una concentración de 0,5 mg péptido/ml y se ajustó el pH a 8 con NH_3. Se burbujeó aire y se dejó reaccionar durante 24 h. Tras esta etapa no fue necesaria una purificación posterior. Se obtienen 0,423 g (15 % rendimiento).

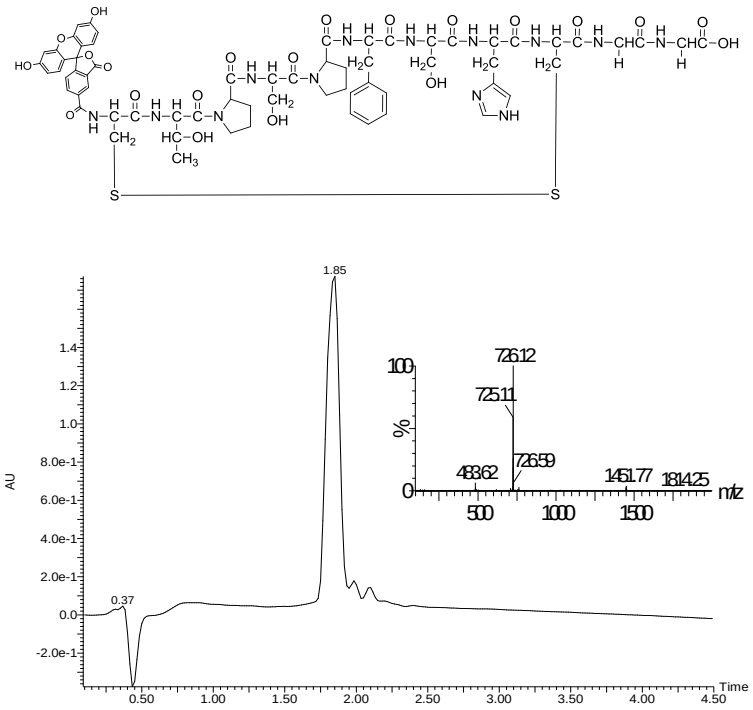


HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 1,35 min, 99%, λ=220 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{47}H_{65}N_{13}O_{16}S_2$: 1132,23. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1132,99 $[(M+1)/1]^+$, 566,99 $[(M+2)/2]^{2+}$.

E2.29.2 c(TCP-1)_CF: c(CFHNCysThrProSerProPheSerHisCysGlyGlyCOOH) (68)

A la primera porción de resina de 1g se le acopló una molécula de carboxifluoresceina (CF) en el extremo amina terminal antes de ser escindida de la resina. Esta molécula de CF (312,4 mg, 0,8 mmol, 3 eq.) fue introducida mediante el procedimiento empleado con el resto de aminoácidos, perocomo método de acoplamiento se empleó la mezcla de oxyma pure (172,1 mg, 1,2 mmol, 4,4 eq.), DIPCI (125 µl, 0,8 mmol, 3 eq.) y DIEA (282 µl, 0,8 mmol, 6 eq.) Tras el acoplamiento la resina fue lavada con una solución al 20% de piperidina de DMF, para evitar que se incorporen dos moléculas de CF. El péptido fue escindido de la resina y se precipito en TBME según lo descrito anteriormente, y liofilizado. Este crudo fue purificado mediante HPLC-MS semipreparativo empleando una columna XBridge C_{18} (19 x 100 mm, 5 µm) con un gradiente 20→50% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 5min a flujo 16 ml/min. El péptido purificado y posterioremente liofilizado, se disolvió en una solución de H_2O/ACN (1:1) hasta una concentración de 0,5 mg péptido/ml y se ajustó el pH a 8 con NH_3. Se burbujeó aire y se dejó reaccionar durante 24 h. Tras esta etapa no fue necesaria una purificación posterior. Se obtienen 0,022 g (5 % rendimiento).

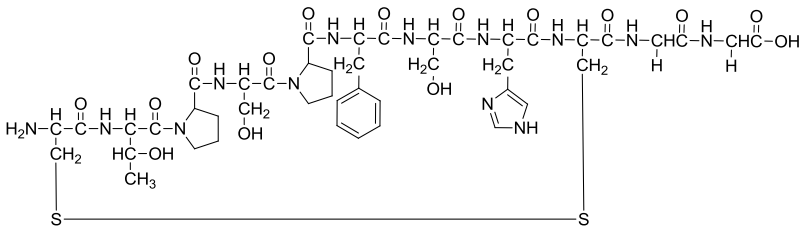


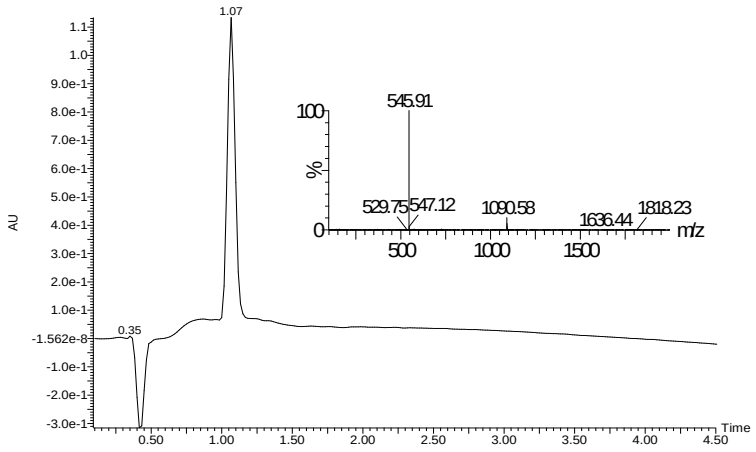
HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 1,83 min, 92%, λ=220 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{66}H_{73}N_{13}O_{21}S_2$: 1448,49. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1451,77 $[(M+1)/1]^+$, 726,12 $[(M+2)/2]^{2+}$.

E2.29.3 c(TCP-1)_NH_2: c($_2$HNCysThrProSerProPheSerHisCysGlyGlyCOOH) (69)

La porción restante de 1 g de resina se trató directamente con la solución acidolítica para escindir el péptido totalmente desprotegido de la resina. Posteriormente el crudo de desprotección obtenido fue evaporado hasta obtener una pasta semisólida y finalmente precipitada en TBME (3 x 40 ml). El sólido obtenido se redisolvió en H_2O y fue liofilizado. Este sólido fue purificado mediante HPLC-MS semipreparativo empleando una columna XBridge C_{18} (19 x 100 mm, 5 µm) con un gradiente 10→25% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 5min a flujo 16 ml/min. El péptido purificado y posterioremente liofilizado, se disolvió en una solución de H_2O/ACN (1:1) hasta una concentración de 0,5 mg péptido/ml y se ajustó el pH a 8 con NH_3. Se burbujeó aire y se dejó reaccionar durante 24 h. Tras esta etapa no fue necesaria una purificación posterior. Se obtienen 0,212 g (5 % rendimiento).



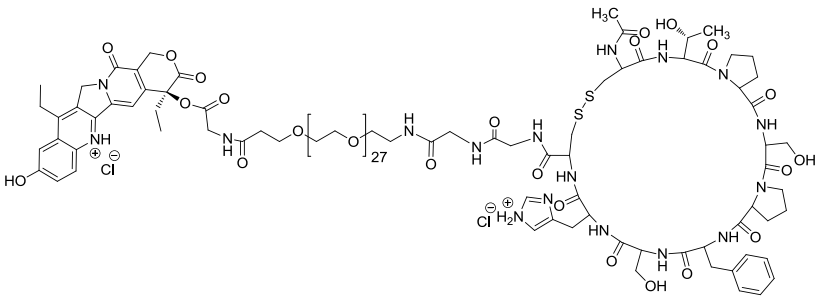


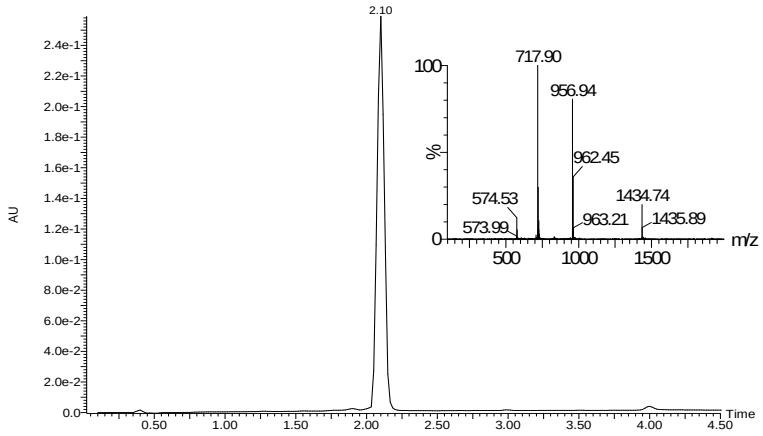
HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 1,07 min, 99%, λ=220 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{45}H_{63}N_{13}O_{15}S_2$: 1090,19. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1090,58 $[(M+1)/1]^+$, 545,91 $[(M+2)/2]^{2+}$.

E2.30 Síntesis de TCP-1-OEG$_{27}$-SN38 (70)

Se disolvió el compuesto **63** (398 mg, 0,22 mmol, 1,0 eq.) en 40 ml de DMF, a esta disolución se añadió el péptido c(TCP-1)_Ac (**67**) (432 mg, 0,38 mmol, 1,7 eq.), EDC (152 mg, 0,79 mmol, 3,6 eq.) y HOBt (97 mg, 0,63 mmol, 2,8 eq.). La mezcla se dejó reaccionar durante 16h, transcurrido este tiempo, el disolvente fue evaporado. El crudo se purificó mediante HPLC-MS semipreparativo empleando una columna Sunfire C_{18} (19 x 100 mm, 5 µm) con un gradiente 25→40% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 6,5 min a flujo 16 ml/min. Tras liofilizar se obtuvo el compuesto **70** en forma de aceite amarillento con un 99% de pureza (32,1 mg, 0,01 mmol, 5% rendimiento).



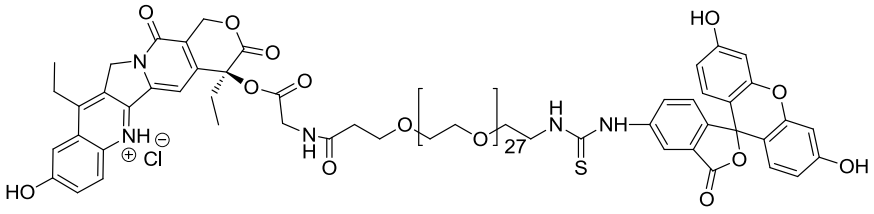


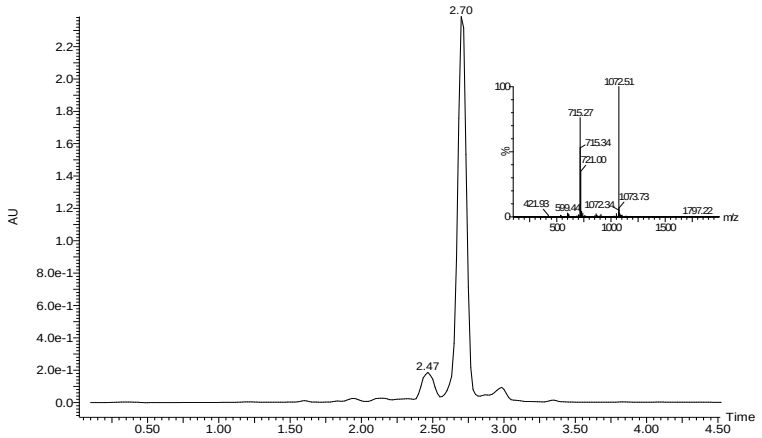
HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 2,10 min, 99%, λ=266 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{130}H_{205}Cl_2N_{17}O_{50}S_2$: 2941,14. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1434,74 $[(M+2)/2]^{2+}$, 956,94 $[(M+3)/3]^{3+}$, 717,90 $[(M+4)/4]^{4+}$.

E2.31 Síntesis de CF-OEG$_{27}$-SN38 (71)

Se disolvió el SN38-Gly-OEG$_{27}$-NH_2 (63, 51,92 mg, 0,028 mmol, 1,0 eq.) en una mezcla de DCM/DMF (5 ml) y se añadió isocianato de fluoresceína (31,2 mg, 0,08 mmol, 2,86 eq.). Posteriormente se ajustó el pH a 8 con DIEA y se dejó reaccionar durante 16h. Tras este tiempo el crudo se eliminó el disolvente a sequedad y se purificó mediante HPLC-MS semipreparativo empleando una columna Sunfire C_{18} (19 x 100 mm, 5 µm) con un gradiente 40→41% de CH_3CN 0,1 % TFA en H_2O 0,1 % TFA en 12 min a flujo 16 ml/min. Tras liofilizar se obtuvo el compuesto **71** en forma de aceite amarillento con un 89% de pureza (8,5 mg, 0,003 mmol, 14% rendimiento).



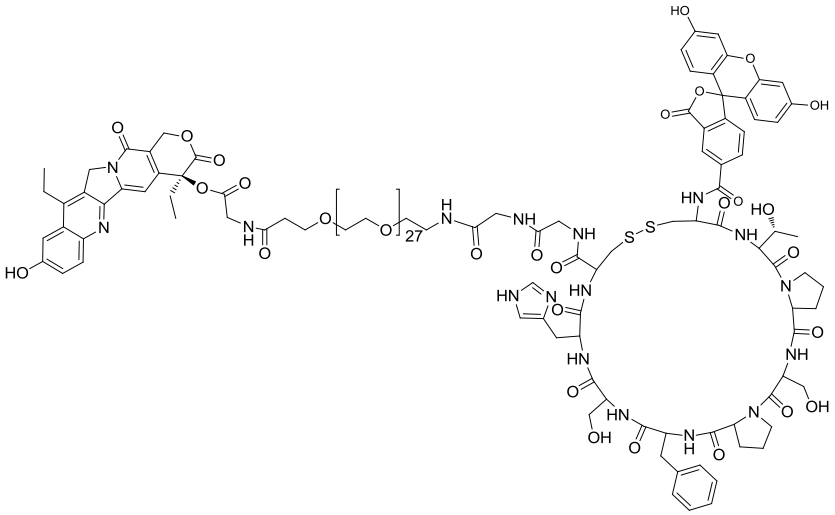


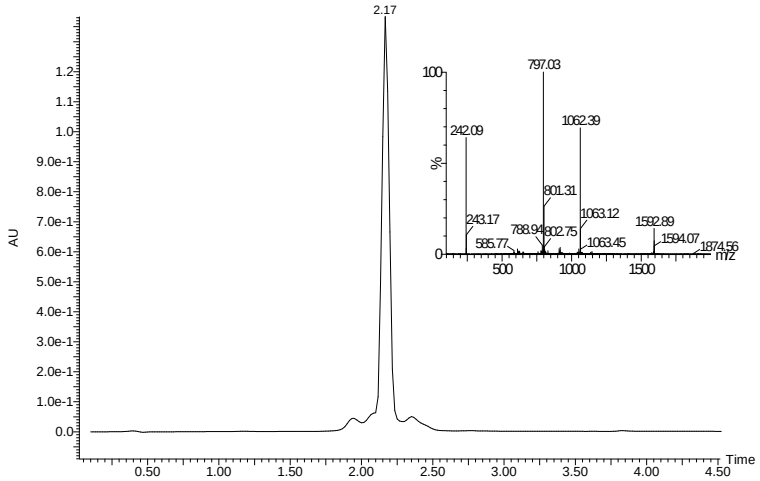
HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 2,70 min, 89%, λ=266 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{104}H_{152}Cl_2N_5O_{40}S$: 2179,85. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1072,51 $[(M+2)/2]^{2+}$, 715,27 $[(M+3)/3]^{3+}$.

E2.32 Síntesis de CF-TCP-1-OEG$_{27}$-SN38 (72)

Se disolvió el compuesto **63** (32,3 mg, 0,017 mmol, 1,7 eq.) en 2 ml de DMF, a esta disolución se añadió el péptido c(TCP-1)_CF (**68**) (14,9 mg, 0,010 mmol, 1,0 eq.), EDC (3,8 mg, 0,020 mmol, 2,0 eq.) y HOBt (2,1 mg, 0,013 mmol, 1,3 eq.). La mezcla se dejó reaccionar durante 16h, transcurrido este tiempo, el disolvente fue evaporado. El crudo se purificó mediante HPLC-MS semipreparativo empleando una columna Sunfire C_{18} (19 x 100 mm, 5 µm) con un gradiente 35→45% de CH_3CN 0,1 % TFA en H_2O 0,1 % TFA en 6,5 min a flujo 16 ml/min. Tras liofilizar se obtuvo el compuesto **72** en forma de aceite amarillento con un 99% de pureza (6,6 mg, 0,002 mmol, 20% rendimiento).





HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 2,17 min, 89%, λ=266 nm.

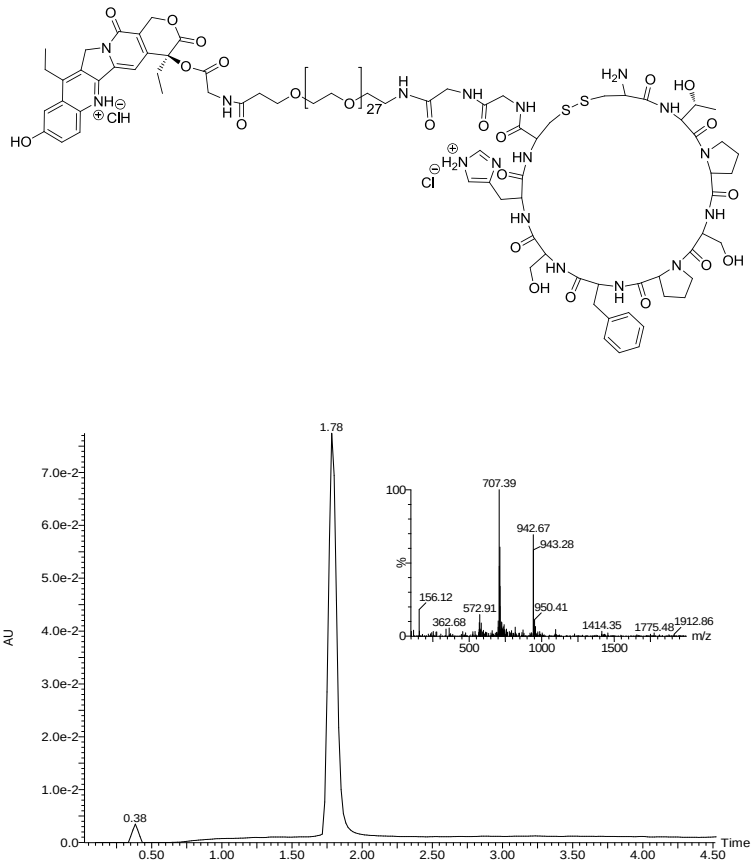
Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{149}H_{213}Cl_2N_{17}O_{55}S_2$: 3257,40. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1592,89 $[(M+2)/2]^{2+}$, 1062,39 $[(M+3)/3]^{3+}$, 797,03 $[(M+4)/4]^{4+}$.

E2.33 Síntesis de AF750-OEG$_{27}$-SN38 (73)

Para realizar el acoplamiento de AF750 se disolvió 0,6 mg del compuesto **63** (0,32 µmol, 8,9 eq.) en 500 µl de DMF anh. y se añadió 47 µg del fluoróforo AF750 (0,036 µmol) en forma de éster de succinimida. El pH de la solución se ajustó a 8 mediante la adición de DIEA y el crudo se agitó, protegido de la luz, durante 16 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el crudo se evaporó y se purificó mediante cromatografía por exclusión molecular empleando una columna pre-empaqueta PD10 (GE Healthcare) y H_2O milli-Q como eluyente. Se tomaron las fracciones puras. No fue posible cuantificar la cantidad total de producto obtenido.

E2.34 Síntesis de $_2$HN-TCP-1-OEG$_{27}$-SN38 (74)

Se disolvió el compuesto **63** (63,4 mg, 0,034 mmol, 4,8 eq.) en 10 ml de DMF, a esta disolución se añadió el péptido c(TCP-1)_NH_2 (**68**) (10,7 mg, 0,007 mmol, 1,0 eq.), EDC (6,4 mg, 0,030 mmol, 4,7 eq.) y HOBt (4,0 mg, 0,028 mmol, 4 eq.). La mezcla se dejó reaccionar durante 16h, transcurrido este tiempo, el disolvente fue evaporado. El crudo se purificó mediante HPLC-MS semipreparativo empleando una columna Sunfire C_{18} (19 x 100 mm, 5 µm) con un gradiente 20→35% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 5 min a flujo 16 ml/min. Tras liofilizar se obtuvo el compuesto **74** con un 99% de pureza (8,8 mg, 3 µmol, 9% rendimiento).



HPLC analítico: Xselect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1 % HCOOH en H_2O 0,1 % HCOOC en 4,5 min, t_R= 1,78 min, 99%, λ=266 nm.

Espectrometría de masas: Masa teórica para $C_{128}H_{203}Cl_2N_{17}O_{49}S_2$: 2899,10. Masa experimental detectada por HPLC-MS: 1414,35 $[(M+2)/2]^{2+}$, 942,67 $[(M+3)/3]^{3+}$, 707,39 $[(M+4)/4]^{4+}$.

E2.35 Síntesis de AF750-TCP-1-OEG$_{27}$-SN38 (75)

Para realizar el acoplamiento de AF750 se disolvió 0,2 mg del compuesto **74** (0,068 µmol, 1,1 eq.) en 500 µl de DMF anh. y se añadió 83 µg del fluoróforo AF750 (0,06 µmol) en forma de éster de succinimida. El pH de la solución se ajustó a 8 mediante la adición de DIEA y el crudo se agitó, protegido de la luz, durante 16 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el crudo se evaporó y se purificó mediante cromatografía por exclusión molecular empleando una columna pre-empaqueta PD10 (GE Healthcare) y H_2O milli-Q como eluyente. Se tomaron las fracciones puras. No fue posible cuantificar la cantidad total de producto obtenido.

E2.36 Ensayos in vitro: IC50 e internalización

Las líneas celulares HT-29-Luc y HTC-116 se sembraron (90µl/pocillo) en placas estándar de 96 pocillos utilizando medio de cultivo sin antibiótico. Las células HT-29-Luc y HTC-116 se trataron durante 72 h con disoluciones de diferentes concentraciones de **SN38**, producto **60** y producto **72** o con PBS (experimento control). Transcurrido el tiempo de incubación, las células se

incubaron con 10 µL de una solución 5 mg/mL de MTT en PBS durante 4 h a 37 °C. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 180 µl de DMSO y se dejó en agitación durante 20 min 37 °C. La densidad óptica se midió a 590 nm mediante un espectrofotómetro con lector de placas. El porcentaje de viabilidad se expresó tomando el control con PBS como 100% de viabilidad celular.

E2.37 Ensayos in vivo: MTD y biodistribución

El ensayo se llevó a cabo con ratones hembras atímicos de entre 6 y 8 semanas de edad. A los ratones se les inyectó, subcutáneamente, en el flanco trasero derecho 100 µl de PBS que contenían 10^6 células HCT-116.Fluc2-C9. Una vez los tumores alcanzaron un volumen adecuado, los ratones fueron distribuidos según el volumen del tumor y su bioluminiscencia.

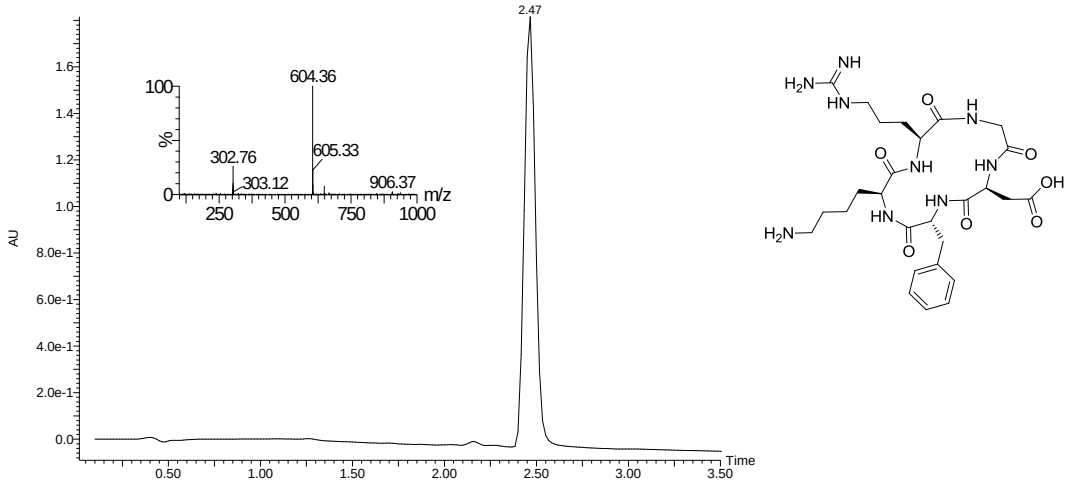
Posteriormente los ratones fueron tratados con las mezclas AF750-OEG_{27}-SN38 y AF750-TCP-1-OEG_{27}-SN38 mediante administración intravenosa. Transcurridas 5 y 25h post-administración, tumor, plasma, hígado, bazo, riñones, pulmones, corazón, cerebro, músculo y piel fueron extraídos y congelados para la posterior determinación por HPLC del SN38 contenido en los diferentes órganos si se estimara necesario. Simultáneamente se determinó la acumulación en tumor y la biodistribución de las mezclas AF750-OEG_{27}-SN38 y AF750-TCP-1-OEG_{27}-SN38 mediante una medida no invasiva por FLI con vistas ventrales, laterales y dorsales. También se determinó la acumulación de SN38 en tejido mediante FLI de los tejidos *ex vivo*.

E3. NANOCONJUGADOS PEG-PROTEÍNA

E3.1 Nanoconjugados PEG- α-GAL A que pueden tener asociado un péptido director

E3.1.1 Sintesis de cRGDfK (79)

Se tomaron 2,05 g de resina Cl-Trt, adecuando a una funcionalización de 1 mmol/g resina, y se llevo a cabo la síntesis usando la metódica descrita el apartado 3.2 del apartado de materiales y métodos, usando como agente de acoplamiento TBTU y HOBt como aditivo, ajustando a medio básico cada acoplamiento con DIEA. Después de la desprotección del grupo Fmoc del último aminoácido, el péptido se desancló de la resina con una mezcla $CH_3COOH/TFE/CH_2Cl_2$ (30 ml, 1:1:3, v/v) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se realizaron lavados de la resina con la mezcla $CH_3COOH/TFE/CH_2Cl_2$ (2X30 ml, 1:1:3, v/v) y CH_2Cl_2 (3x30 ml). Finalmente se evaporó a sequedad la mezcla de escisión del péptido de la resina, obteniendo de esta manera el péptido desanclando con las cadenas laterales totalmente protegidas. Posteriormente, el péptido escindido de la resina se disolvió en 25 ml de CH_2Cl_2 y se añadió gota a gota en una solución al 50% de anhídrido polipropilfosfónico (T3P) en AcOEt (7 ml), Et_3N (8 ml), DMAP (25,03 mg) en 1 l de CH_2Cl_2 y se dejo agitando la mezcla durante 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente se evaporó a sequedad la mezcla de ciclación del péptido anteriormente descrita y se llevo a cabo un tratamiento acidolítico para la eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales del péptido cíclico empleando una mezcla $TFA/H_2O/TIS$ (50 ml, 95:2,5:2,5, v/v/v) durante 2 h a temperatura ambiente. El crudo se evaporó a sequedad y se precipitó con TBME frío (3x45 ml). El sólido blanco obtenido se liofilizó. El sólido liofilizado se purificó mediante HPLC semipreparativo empleando la columna XBridge C_{18} (19 x 100 mm, 5 μm) con un gradiente 0→15% de CH_3CN en una solución acuosa de NH_4HCO_3 (20 Mm) como eluyentes en 8 min. Las fracciones puras se liofilizaron conjuntamente para obtener el péptido cRGDfK en forma de un sólido blanco (180,9 mg, 0,29 mmol, 14%).



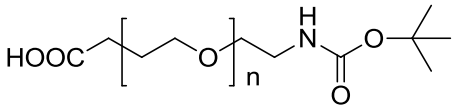
HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN en NH_4HCO_3 20 mM en 3,5 min, 1,6 ml/min, t_R= 2,47 min, λ=210 nm (99%).

EM (ESI): m/z= 604,3 $[M+H]^+$, Masa calculada: 603,67 (99% 210 nm).

MALDI-TOF (ACH): 604,24 $[M+H]^+$.

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS: Asp:0,673, Gly: 0,734, Arg: 0,780, Lys: 0,677, Phe: 0,632

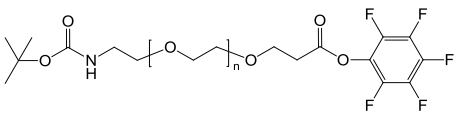
E3.1.2 Síntesis de Boc-PEG-COOH (82)



Se disolvió el producto comercial $_2$HN-PEG-COOH **77** (0,100 g, 0,02 mmol) en DCM anh. (10 ml) y se ajustó la solución a pH 8 con Et_3N. A esta solución se añadió anhidrído de Boc (6,5 mg, 0,03 mmol, 1,5 eq.) poco a poco y se dejó reaccionando toda la noche a temperatura ambiente. Se evaporó el crudo de reacción y se precipitó con TMBE, obteniendo el producto puro **82** (0,101 g, 0,02 mmol, 98%).

MALDI-TOF (ACH): aprox. 5215 $[M+H]^+$.

E3.1.3 Síntesis de PfOH-PEG-Boc (83)



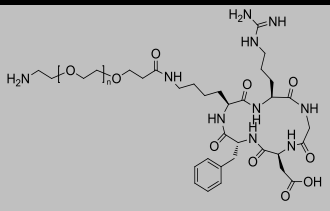
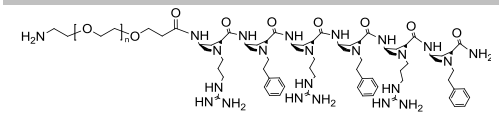
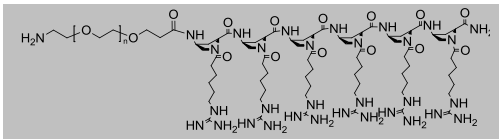
Se introdujo en un balón HOOC-PEG-Boc (**82**, 0,100 mg, 0,02 mmol) junto con PfOH (6,1 mg, 0,03 mmol, 1,5 eq.), EDC (5,9 mg, 0,03mmol, 1,5 eq.) y DMAP (2,6 mg, 0,02 mmol, 1 eq.) y se disolvió en 10 ml de DCM anh. Después de dejarlo reaccionar durante 18 h, se realizaron extracciones con NaOH 1N (2x5 ml) y ácido cítrico 0,5% (p/v) (2x5 ml). La fase orgánica se secó con MgSO4 y se evaporó el disolvente orgánico a sequedad, obteniendo el producto puro **83** (0,098 g, 0,02 mmol, 95%).

HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R= 3,0 min, λ=220 nm.

E3.1.4 Síntesis de los conjugados RGD-PEG-NH_2 (87), P25-PEG-NH_2 (88), P87-PEG-NH_2 (89)

Se disolvió en una mezcla de DMF/CH_2Cl_2 (10 ml, 1:1) el compuesto **83** (1 mmol, 1,0 eq.) y los péptidos cRGDfK, P25 y P87 (3,0 eq.) y se ajustó a pH 8 con DIEA. El crudo de reacción se dejó agitando toda la noche, se evaporó el disolvente orgánico a sequedad. Posteriormente, se disolvió el crudo en H_2O y se purificó mediante cromatografía por exclusión molecular empleando una columna pre-empaqueta PD10 (GE Healthcare) y H_2O milli Q como eluyente. De esta manera se obtuvieron los productos RGD-PEG-Boc (**84**), P25-PEG-Boc (**85**) y P87-PEG-Boc (**86**). Cantidades y rendimientos recogidos en la tabla E3.1.

Tabla E3.1. *Estructura, mg empleados de los productos de partida, mg obtenidos de Péptido-PEG-Boc y rendimientos de las dos etapas de síntesis.*

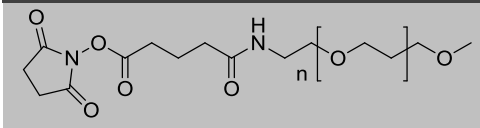
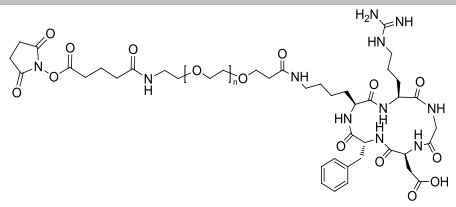
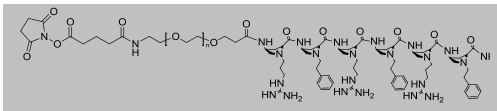
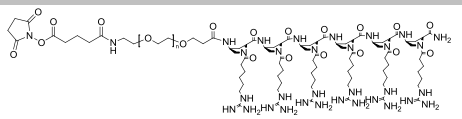
Compuesto	Péptido	mg PfOH-PEG-Boc	mg péptido	mg R-PEG-Boc	η R-PEG-Boc
 **87**	cRGDfK	50,2	18,0	17,2	32%
 **88**	P25	11,1	10,4	6,2	52%
 **89**	P87	10,9	12,2	3,9	30%

Finalmente los tres compuestos fueron tratados con una solución de HCl en dioxano (4M) (1 ml) durante 1 h a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente orgánico a sequedad para obtener los productos RGD-PEG-NH_2 (**87**), P25-PEG- NH_2 (**88**) y P87-PEG- NH_2 (**89**) (cuant.).

E3.1.5 Síntesis de R-PEG-NHS

En un balón se introdujo R-PEG-NH_2 (1 mmol, 1,0 eq.) y el espaciador homobifuncional glutarato de di(N-succinimidil) (DSG) (5,0 eq.). Se disolvió en CH_2Cl_2 anh. (5 ml, alta dilución para evitar la formación de dímeros) y se ajustó a pH 8 con DIEA. Se dejó reaccionar toda la noche. Posteriormente, se evaporó el disolvente y se disolvió en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 (1ml), esta solución se precipitó con TMBE (3x13 ml). Se recuperó el solidó blanco precipitado y se liofilizó obteniendo los productos MeO-PEG-NHS (**90**), RGD-PEG-NHS (**99**), P25-PEG-NHS (**100**) y P87-PEG-NHS (**101**). Cantidades y rendimientos recogidos en la tabla E3.2.

Tabla E3.2. *Estructura, mg empleados de los productos de partida, mg obtenidos de R-PEG-DSC y rendimientos de la etapa de síntesis.*

Compuesto	R	mg R-PEG-Boc	mg DSG	mg R-PEG-NHS	η R-PEG-NHS
 **90**	MeO	10,5	3,1	8,2	78%
 **99**	cRGDfK	10,2	3,5	6,9	65%
 **100**	P25	6,2	3,1	4,2	65%
 **101**	P87	3,9	2,2	2,8	70%

E3.1.6 Síntesis de conjugados R-PEG-Proteína:

Se tomaron 250 µl de proteína y se ajustó a pH 7 con una solución de Na_2HPO_4 50 mM. A esta solución, se añadió R-PEG-NHS y se dejó incubando en función del R-PEG-DSC usado. Inmediatamente después de finalizar la conjugación se incorporaron 50 µl de una solución de Tris 40 mM durante 1 h. Todas las conjugaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente excepto las conjugaciones en las que se usa P25-PEG-NHS (**100**) y P87-PEG-NHS (**101**) que se llevaron a cabo a 4 °C. Una vez finalizado el tratamiento con Tris los conjugados se purificaron mediante un proceso de diálisis de tres días con una membrana de 20 KDa frente a una solución tampón de AcONa 0,01 M a pH 6,5. Cantidades recogidas en la tabla E3.3.

Tabla E3.3. *Condiciones y cantidades usadas en los conjugados finales de MeO-PEG-α-GAL (**102**), MeO-PEG-Replagal (**103**), RGD-PEG-Replagal (**104**), P25-PEG-Replagal (**105**) y P87-PEG-Replagal (**106**). También se especifican las condiciones a las que se sometieron las proteínas libres.*

Conjugado	R-PEG-NHS			Tris 40 mM		n PEGs	Concentración teórica (mg/ml)
	R	mg	t (h)	µl	t (h)		
α-GAL (**91**)	---	---	---	50	1	0	0,38
MeO-PEG-α-GAL (**102**)	MeO	2,6	2	50	1	0, 1, 2, 3 ,4	0,41
Replagal (**92**)	---	---	---	50	1	0	0,23
MeO-PEG-Replagal (**103**)	MeO	2,9	2	50	1	1, 2, 3, 4	0,25
RGD-PEG-Replagal (**104**)	cRGDfK	3,1	24	50	1	0,1,2,3,4	0,31
P25-PEG-Replagal (**105**)	P25	3,1	24 (4°C)	50	1 (4°C)	0,1,2,3	0,25
P87-PEG-Replagal (**106**)	P87	2,8	3,5 (4°C)	50	1 (4°C)	ND	0,25

**En todos los casos se emplearon 250 µl de proteína, la concentración de α-GAL era de 0,92 mg/ml (cuantificados por Western Blot) y en el caso de Replagal de 1 mg/ml. Dónde ND significa no determinado.*

E3.1.7 Síntesis de conjugados R-PEG-Proteína-Atto 633

El pH de R-PEG-Proteína se ajustó a pH 7,5 con una solución de Na_2HPO_4 50 mM y se añadió a esta solución 50,0 eq. del fluoróforo comercial Atto 633-maleimido. Se dejó incubar la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente y protegida de la luz. Finalmente se llevó a cabo una purificación mediante cromatografía por exclusión molecular empleando una columna pre-empaqueta PD10 (GE Healthcare) y una solución tamponada de AcONa 0,01 M a pH 6,5 como eluyente. Cantidades de los productos de partida empleados y concentración final teórica de proteína recogidos en la tabla E3.4.

Tabla E3.4. *Detalle de las cantidades de proteína y fluoróforo empleados y la concentración teórica final de proteína obtenida.*

Nanoconjugado	µg teóricos de proteína	µg de Atto 633-maleimido*	Concentración teórica (mg/ml)
α-GAL-Atto 633 (**108**)	115	96	0,115
Replagal-Atto 633 (**109**)	125	96	0,125
MeO-PEG-α-GAL-Atto 633 (**110**)	115	96	0,076
MeO-PEG-Replagal-Atto 633 (**111**)	125	96	0,125
RGD-PEG-Replagal-Atto-633 (**112**)	125	96	0,125
P25-PEG-Replagal-Atto 633 (**113**)	125	96	0,125
P87-PEG-Replagal-Atto 633 (**114**)	125	96	0,125

** 1mg de Atto 633-maleimido se disolvió en 250 µl de DMSO anh. (4 mg/ml de Atto 633-maleimido), para cada muestra se emplearon 24 µl de esta solución madre.*

E3.1.8 Método de determinación de la actividad enzimática específica de los nanoconjugados en tubo de ensayo

Preparación del tampón del sustrato (acético-acetato, pH 4,5)

Soluciones patrón	
Ácido acético, 0,01 M	59 µl de ácido acético, enrasar a 100ml con agua Milli Q
Acetato de sodio, 0,01 M	82 mg de acetato de sodio, enrasar a 100 ml con agua Milli Q

Se tomó 100 ml de la solución de acetato de sodio en un vaso y se llevó al pH-metro. Mientras la solución está en agitación, se añade la solución de acético 0,01M hasta alcanzar un pH de 4,5. Se conserva el tampón congelado a -20 ºC.

Preparación del sustrato α-GAL-T (4-methylumbelliferyl-a-D-galactopyranoside 2,46 mM)

4-MU-α-D-GalPyr	ml tampón del sustrato
0,0084 g	10 ml
0,0168 g	20ml

Se disuelve la 4-MU-α-D-GalPyr en el tampón del sustrato. Se hacen alícuotas de 1 ml. Se guarda a -20 ºC hasta el día de la valoración.

Preparación del sustrato de la α-Gal-A

El substrato de la α-Gal-A es una mezcla 1:9 (v/v) de solución 1M de N-acetil-D-galactosamina y de sustrato α-Gal-T, respectivamente. El volumen final depende del número de muestras en la valoración (se necesitan 100 µl de sustrato por tubo). Se prepara el mismo día de la valoración.

Preparación de la solución de N-acetil-D-galactosamina1M:

Se añade al vial de 100 mg de N-acetil-D-galactosamina, 452,1 µl de tampón del sustrato. Se cierra, agita y guarada a -20 ºC hasta el día de la valoración.

Preparación del tampon de glicina 100mM, pH 10,4:

Se pesan 7,507 g de glicina. Se disuelve en 800 ml de agua. Se ajusta a pH 10,4 con NaOH 5N. Se enrasa a 1 l y se conserva a temperatura ambiente.

Protocolo:

1. Se pipetea en tubos de plástico de 3 ml, por duplicado, 25 µl de agua (blancos) o muestra.
2. Se añade a cada tubo 100µl de sustrato α-GAL A.
3. Se vortean los tubos y se pasan a un baño de 37 ºC. Se incuban 1 h con agitación vigorosa.

4. Se para la reacción añadiendo 1,25ml de tampón glicina 100 mM.
5. Se prepara la estándar de 4-MU: rango 25-500 ng/ml.
6. Se lee la fluorescencia de blancos y muestras en el fluorímetro (λ_{ex} 365nm/λ_{em} 450nm).
7. Se resta el valor del blanco a las muestras y se calcula la actividad enzimática según:

   nmol/h/mg: (ng/ml)x(1/proteína)x(factor de dilución)x0,2775

   µmol/h/mg: (ng/ml)x(1/proteína)x(factor de dilución)x0,2775x10^{-03}

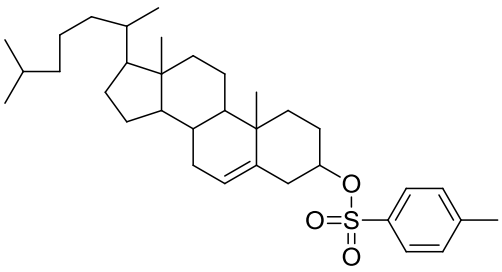
E3.1.9 Método de determinación de la actividad enzimática específica de los nanoconjugados en células de cultivo primario

Células endoteliales aórticas de ratón de cultivo primario (MAEC) de ratón deficientes en α-Gal A (Gla^{tmKul1}) se aislaron siguiendo el procedimiento descrito por Shu y colaboradores*. El origen endotélico de las células aisladas se confirma mediante una tinción CD105. Para los ensayos de actividad, células de entre 2 y 5 pases se sembraron en placas de 24 pocillos y se conservaron a 37 °C y 5% de CO_2. 24 h después de sembrar las células, 8 µM de NBD-Gb3 se añadieron al cultivo junto con los compuestos a testar. Después de una incubación de 48 h, las células se tratan con tripsina y la señal fluorescente de NBD-Gb3 se analiza mediante citometría de flujo. Para calcular el porcentaje de señal fluorescente de NBD, se establece como 100% la fluorescencia de las células control (sin tratamiento) y el resto de valores son normalizados respecto este.

Dado que α-Gal A reduce los depósitos de Gb_3, el porcentaje de Gb_3 perdido (% Gb_3 perdido = 100- % señal NBD-Gb_3) se emplea como método de ilustrar los resultados.

E3.2 Nanovesículas ricas en colesterol modificadas con un péptido director.

E3.2.1 Síntesis del colesterol-tosilado (117)



A una solución de colesterol (**116**, 1,006 g, 2,60 mmol, 1,0 eq.) en piridina anh. (12 ml) se añadió el cloruro de tosilo (1,004g, 5,26 mmol, 2,0 eq.,) y la solución se dejó agitando durante 24 h a temperatura ambiente. Sobre la solución se añadió 5 ml de H_2O y se extrajo el crudo con DCM (3x6 ml). En la fase orgánica se añadió Et_2O

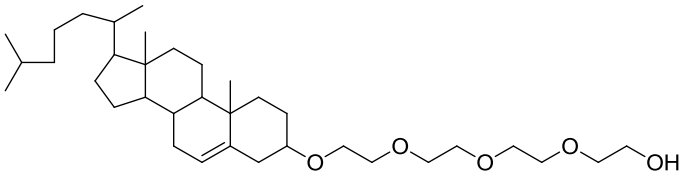
(disolución total) y posteriormente se secó con $MgSO_4$, se filtró y se eliminó el disolvente hasta sequedad. El crudo se recristalizó en éter de petróleo, obteniéndose un sólido blanco (0,969g, 1,79 mmol, 69%).

HPLC analítico: XBridge, C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de MeOH en CH_3CN 0,1 % TFA en 4,5 min, 2 ml/min, t_R=2,7 min, λ=210 nm (89%).

^{1}H RMN (400MHz, $CDCl_3$) δ 0,65 (s, 3H); 0,85 (d, 1,6 Hz, 3H); 0,87 (d, 2Hz, 3H); 0,90 (d, 6,8Hz, 3H); 0,96 (s, 3H); 2,44 (s, 3H); 5,3 (m, 1H); 7,33 (d, 8,0 Hz, 2H); 7,79 (d, 8,3 Hz, 2H).

^{13}C RMN (101MHz, $CDCl_3$) δ 11,98; 18,84; 19,28; 21,13; 21,77; 22,70; 22,95; 23,95; 24,38; 28,15; 28,33; 28,77; 31,89; 31,99; 35,89; 36,31; 36,49; 37,03; 39,01; 39,65; 39,80; 42,43; 50,05; 56,25; 56,79; 82,54; 123,65; 127,77; 129,87; 134,85; 139,00; 144,52.

E3.2.2 Síntesis de Colesterol-OEG (118)



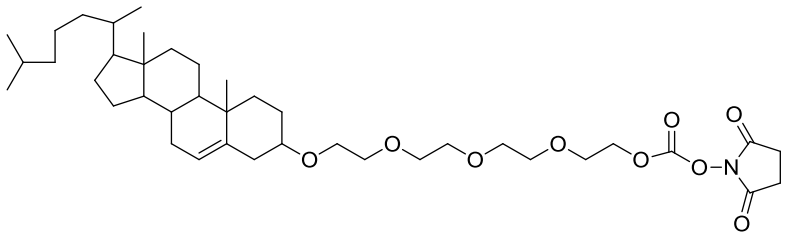
A una solución de colesterol tosilo (**117**, 0,503 g, 0,93 mmol, 1,0 eq.) en 5 ml de 1,4-dioxano anh., se adicionó tetraetilenglicol (3,591 g, 18,48 mmol, 3,19 ml, 20,0 eq.) y se dejó reaccionar la mezcla durante 4 h a reflujo bajo atmósfera de argón. La solución resultante se evaporó a sequedad y posteriormente se disolvió en 20 ml de DCM y se lavó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (2x20 ml), H_2O (3 x 20 ml) y una solución acuosa saturada de NaCl (1x20 ml). Las fases acuosas resultantes se volvieron a extraer con 20 ml DCM. Finalmente, se combinaron las fases orgánicas y se secaron con $MgSO_4$. Posteriormente, el disolvente orgánico se evaporó a sequedad y se purificó el crudo mediante cromatografía en columna usando como fase estacionaria alúmina básica y un gradiente 0→5% de MeOH en DCM como eluyentes. De esta manera se obtuvo el producto **118** en forma de aceite amarillento (0,260 g, 0,46 mmol, 50%).

HPLC analítico: XBridge C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de MeOH en CH_3CN 0,1 % TFA en 4,5 min, 2 ml/min, t_R=2,6 min, λ=210 nm (73%).

^{1}H RMN (400MHz, $CDCl_3$) δ 0,67 (s, 3H); 0,85 (d, 1,6Hz, 3H); 0,87 (d, 1,6Hz, 3H); 0,91 (d, 6,4Hz, 3H); 0,99 (s, 3H); 3,18 (m, 1H); 3,67 (m, 16H).

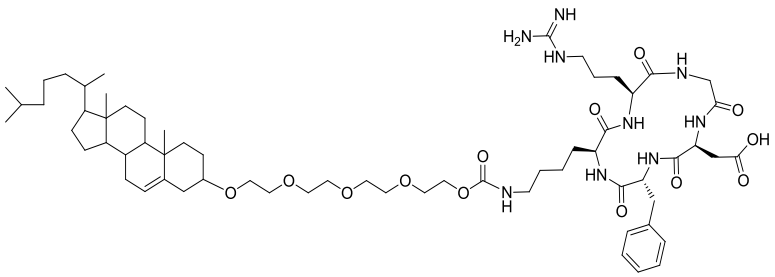
^{13}C RMN (101MHz, $CDCl_3$) δ 12,00; 18,86; 19,51; 21,21; 22,70; 22,96; 23,97; 24,43; 28,15; 28,37; 28,43; 32,04; 32,09; 35,92; 36,33; 37,01; 37,37; 39,11; 39,66; 39,93; 42,47; 50,33; 56,30; 56,93; 61,87; 67,36; 72,40-70,82; 79,69; 121,71; 141,07.

E3.2.3 Síntesis de Colesterol-OEG-NHS (119)



El compuesto Colesterol-OEG (**118**, 0,274 g, 0,48 mmol 1,0 eq.) se disolvió en 9 ml de una mezcla DCM:ACN:DIEA (1:1:1, v/v/v), y se añadió DSC (0,2746 g, 8,45 mmol, 18,0 eq.). La mezcla se agitó en atmosfera de argón a temperatura ambiente y después de 16 h se observó la desaparición del producto de partida. Se evaporó el disolvente a sequedad y el crudo se disolvió en 5 ml DCM. Esta fase orgánica se lavó con 5 ml de agua, se secó con $MgSO_4$ y finalmente se evaporó el disolvente a sequedad. El crudo se utilizó para la siguiente reacción sin realizar ninguna purificación adicional.

E3.2.4 Síntesis del Colesterol-cRGDfK éter (120)



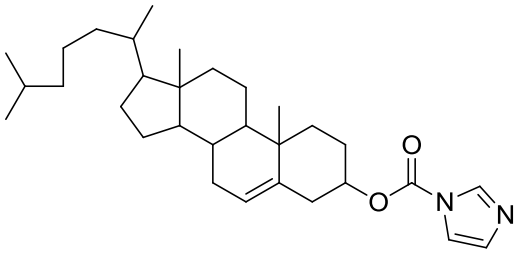
Se disolvió el compuesto Colesterol-OEG-NHS (**119**, 69 mg, 0,09 mmol, 1,0 eq.) en 5 ml de DMF anh. y se le añadió DIEA (32 µl, 0,18 mmol, 2,0 eq.) y el péptido cRGDfK (66 mg, 0,10 mmol, 1,0 eq.). La reacción se dejó en agitación durante 16 h hasta observar la desaparición del péptido (control por HPLC-MS). Se eliminó el disolvente y el crudo se precipitó en TMBE (3x15 ml). El compuesto final **120** se obtuvo como un sólido blanco (55 mg, 0,05 mmol, 51%).

HPLC analítico: Symmetry 300^{TM} C_4 (4,6 x 250 mm, 5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07% HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 30 min, 1 ml/min, t_R= 17,31 min; Symmetry 300^{TM} C_4 (4,6 x 250 mm, 5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1% TFA en H_2O 0,1% TFA en 30 min, 1ml/min, t_R: 20,1 min, λ=210 nm (82%).

EM (ESI): m/z= 1192,8 $[M+1]^+$. Masa calculada: 1192,53.

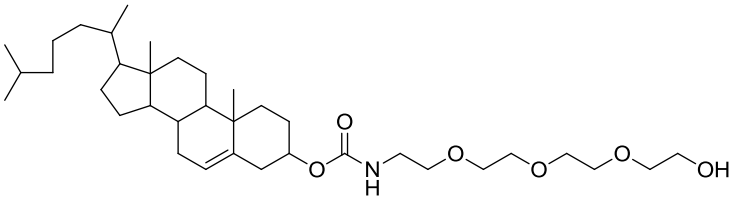
Análisis de aminoácidos: Asp: 0,99, Gly: 1,18, Arg: 1,15, Lys: 0,92, Phe: 1,04.

E3.2.5 Síntesis del Colesterol-Im (121)



Se disolvió el colesterol (**116**, 0,200 g, 0,51 mmol, 1,0 eq.) en 9 ml de una mezcla DCM:ACN:DIEA (1:1:1, v/v/v) y a esta mezcla se añadió el CDI (0,852 g, 5,24 mmol, 10,0 eq.). Se dejó reaccionar toda la noche a temperatura ambiente, y se observó la aparición del producto deseado. Se evaporó el disolvente a sequedad y el crudo se disolvió en 5 ml DCM. Esta fase orgánica se lavó con 5ml de agua. Finalmente, esta disolución se secó con $MgSO_4$, se filtró y se evaporó el disolvente a sequedad. El crudo se usó para la siguiente reacción sin realizar ninguna purificación adicional.

E3.2.6 Síntesis del Colesterol-OEG carbamato (122)



Se tomó el compuesto Colesterol-Im (**121**, 110,0 mg, 0,22 mmol, 1,0 eq.) y se disolvió en 10 ml de DCM, y se añadió 1-amino-3,6,9-trioxaundecanil-11-ol (0,153 g, 0,79 mmol, 3,5 eq.), a continuación se ajustó la solución a pH 8 usando DIEA. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente, controlando su avance mediante HPLC-MS, hasta que se observó la desaparición del producto de partida. Se eliminó el disolvente y se lavó el crudo haciendo extracciones con H_2O. El crudo final se purificó mediante cromatografía en columna empleando SiO_2 y un gradiente isocrático de AcOEt como eluyente. De esta manera se obtuvo el compuesto **122** en forma de un aceite amarillento (80,2 mg, 0,13 mmol, 60%).

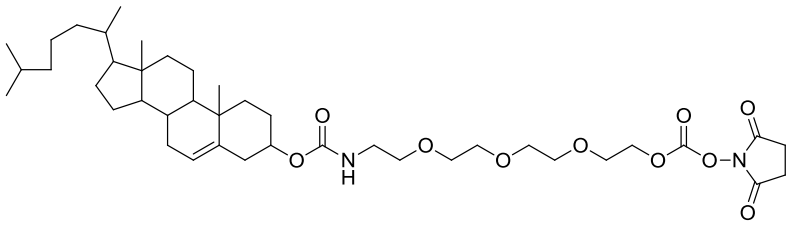
HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 μm), 5→100% de MeOH en CH_3CN 0,07 % HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R=1,87 min; Symmetry 300™ C_4 (4,6 x 250 mm, 5 μm), 5→100% de CH_3CN 0,1% TFA en H_2O 0,1% TFA en 30 min, 1 ml/min, t_R: 21,8 min, λ=210 nm (95%).

EM (ESI): m/z= 606,5 $[M+H]^+$. Masa calculada: 605,89.

^{1}H RMN (400MHz, $CDCl_3$) δ 0,680 (s, 3H); 0,86 (d, 1,8Hz, 3H); 0,87 (d, 1,8Hz, 3H); 0,91 (d, 6,5Hz, 3H); 1,01 (s, 3H); 3,36 (m, 1H); 3,65 (m, 16H).

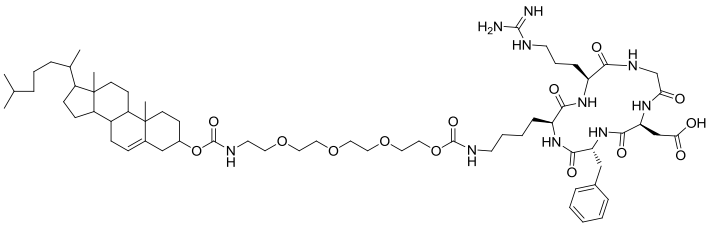
^{13}C RMN (101MHz, $CDCl_3$) δ 12,00; 18,85; 19,48; 21,18; 22,70; 22,96; 23,97; 24,43; 28,15; 28,35; 28,37; 32,02; 32,05; 35,93; 36,32; 36,71; 37,15; 38,75; 39,66; 39,88; 40,85; 42,45; 50,15; 56,27; 56,83; 61,79; 70,25-70,56; 70,74; 122,53; 140,07; 156,58.

E3.2.7 Síntesis del Colesterol-OEG-NHS carbamato (123)



Se tomó el compuesto Colesterol-OEG carbamato (**122**, 80 mg, 0,13 mmol, 1,0 eq.) y se hizo reaccionar con DSC (0,316 g, 0,49 mmol, 3,7 eq.) en 9 ml de una mezcla DCM:ACN:DIEA (1:1:1, v/v/v) durante 16 h a temperatura ambiente. Cuando se detectó la desaparición del compuesto de partida, se evaporó el disolvente a sequedad y se disolvió el crudo en 5ml de DCM y se lavó con H_2O. Se secó la fase orgánica con $MgSO_4$, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniendo un crudo listo para ser usado sin ninguna purificación adicional.

E3.2.8 Síntesis del Colesterol-OEG-cRGDfK carbamato (124)



Se disolvió la totalidad del compuesto Colesterol-OEG-NHS (**123**, 0,13 mmol teóricos, 1,6 eq.) en 5 ml de DMF anh. y se añadió DIEA (60 µl, 3,4 mmol, 40,0 eq.) y el péptido cRGDfK (51 mg, 0,08 mmol, 1,0 eq.). La reacción se dejó en agitación durante 16 h a temperatura ambiente hasta observar la desaparición del péptido cRGDfK (control por HPLC-MS). Se eliminó el disolvente y el crudo se precipitó en TMBE (3x15 ml), finalmente se lavó con agua. De esta manera se obtuvo el producto en forma de sólido blanco (17 mg, 0,01 mmol, 12%).

HPLC analítico: XSelect C_{18} (4,6 x 50 mm, 3,5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,07 % HCOOH en H_2O 0,1% HCOOH en 4,5 min, 2 ml/min, t_R=1,03 min; Symmetry 300^{TM} C_4 (4,6 x 250 mm, 5 µm), 5→100% de CH_3CN 0,1% TFA en H_2O 0,1% TFA en 30 min, 1 ml/min, t_R: 16,2 min, λ=210 nm (81%).

EM (ESI): m/z= 1235,9 $[M+1]^+$. Masa calculada: 1235,55.

Análisis de aminóacidos: Asp: 0,99, Gly: 1,18, Arg: 1,15, Lys: 0,92, Phe: 1,04.