

Desarrollo de nuevos análogos de ligandos de receptores D_2 que incorporan una unidad dicarbocloso-dodecaborano: marcaje con carbono-11 y evaluación *ex vivo* e *in vivo*

Naiara Vázquez Martínez
Donostia, 2012

**AUTORIZACION DEL/LA DIRECTOR/A DE TESIS
PARA SU PRESENTACION**

Dr. Jordi Llop Roig con N.I.F. 46570467-K como Director de la Tesis Doctoral: “Desarrollo de nuevos análogos de ligandos de receptores D₂ que incorporan una unidad dicarba-*closo*-dodecaborano: marcaje con carbono-11 y evaluación *ex vivo* e *in vivo*”, realizada en el Departamento de Radioquímica de la Unidad de Imagen Molecular del Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales (CICbiomaGUNE) y en el Departamento de Química Orgánica I por la Doctoranda Doña Naiara Vázquez Martínez ,autorizo la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En Donostia a 15 de Febrero de 2012.

EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS

Fdo.:



**AUTORIZACION DEL PONENTE DE TESIS
PARA SU PRESENTACION**

Dr. Claudio Palomo Nicolau como Ponente de la Tesis Doctoral: “Desarrollo de nuevos análogos de ligandos de receptores D₂ que incorporan una unidad dicarba-*closo*-dodecaborano: marcaje con carbono-11 y evaluación *ex vivo* e *in vivo*” realizada en el Departamento de Radioquímica de la Unidad de Imagen Molecular del Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales (CICbiomaGUNE) y en el Departamento de Química Orgánica I por la Doctoranda Doña Naiara Vázquez Martínez y dirigida por el Dr. Jordi Llop Roig autorizo la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En Donostia a 15 de Febrero de 2012

EL PONENTE DE LA TESIS

Fdo.:

CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

El Consejo del Departamento de Química Orgánica I,
en reunión celebrada el día de de 2012 ha acordado dar la conformidad a la
admisión a trámite de presentación de la Tesis Doctoral titulada “Desarrollo de nuevos análogos de
ligandos de receptores D₂ que incorporan una unidad dicarba-*closo*-dodecaborano: marcaje con
carbono-11 y evaluación *ex vivo* e *in vivo*”, dirigida por el Dr. Jordi Llop Roig y presentada por
Doña Naiara Vázquez Martínez ante este Departamento.

En Donostia a de de 2012

Vº Bº DIRECTOR/A DEL DEPARTAMENTO SECRETARIO/A DEL DEPARTAMENTO

Fdo.:

Fdo.:

ACTA DE GRADO DE DOCTOR
ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL

DOCTORANDO Doña Naiara Vázquez Martínez

TITULO DE LA TESIS: “Desarrollo de nuevos análogos de ligandos de receptores D₂ que incorporan una unidad dicarba-*closo*-dodecaborano: marcaje con carbono-11 y evaluación *ex vivo* e *in vivo*”

El Tribunal designado por la Subcomisión de Doctorado de la UPV/EHU para calificar la Tesis Doctoral arriba indicada y reunido en el día de la fecha, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por _____ la calificación de:
unanimidad ó mayoría

Idioma/s defensa:

En Donostia a de de 2012

EL/LA PRESIDENTE/A,

EL/LA SECRETARIO/A,

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a:

Dr/a:

VOCAL 1º,

VOCAL 2º,

VOCAL 3º,

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a:

Dr/a:

Dr/a:

EL/LA DOCTORANDO/A,

Fdo.:

ÍNDICE

RESUMEN

AGRADECIMIENTOS

INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1. El sistema nervioso
 - 1.1. Organización del Sistema Nervioso
 - 1.2. Células del Sistema Nervioso
 - 1.2.1. Neuronas
 - 1.2.2. Células Gliales
 - 1.3. Anatomía del Sistema Nervioso
 - 1.3.1. Sistema Nervioso Periférico
 - 1.3.2. Sistema Nervioso Central
 - 1.4. Función del Sistema Nervioso
 - 1.5. Patologías del Sistema Nervioso
2. Imagen Molecular
 - 2.1. Aspectos generales
 - 2.2. PET: Tomografía por Emisión de Positrones
 - 2.2.1. Visión general
 - 2.2.2. Isótopos PET: aspectos generales
 - 2.2.3. Isótopos PET: producción
 - 2.2.4. Radiotrazadores
 - 2.3. Técnicas de imagen *in vitro*
3. Radioquímica
 - 3.1. Aspectos generales
 - 3.2. Radioquímica con Carbono-11
 - 3.2.1. Reacciones de ^{11}C -metilación
 - 3.2.2. Reacciones de Grignard
 - 3.2.3. Reacciones de ^{11}C -carbonilación
 - 3.2.4. Otras reacciones de incorporación de Carbono-11
 - 3.3. Radioquímica con Fluor-18
 - 3.3.1. Fluoración electrofílica
 - 3.3.2. Fluoración nucleofílica
 - 3.3.3. Otras estrategias de fluoración
 - 3.4. Radioquímica con Oxígeno-15
 - 3.5. Radioquímica con Nitrógeno-13
4. Química del carborano

ÍNDICE

- 4.1. Introducción
- 4.2. Estructura y propiedades
- 4.3. Síntesis y reactividad
- 4.4. Los carboranos en la química médica
- 4.5. Los carboranos y la imagen molecular
- 5. Justificación y Objetivos

PARTE A: DISEÑO Y SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE LIGANDOS DE RECEPTORES D₂ Y CB₁ QUE INCORPORAN UNA UNIDAD DICARBA-CLOSO-DODECABORANO

CAPÍTULO 1: SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE LIGANDOS DE RECEPTORES D₂

- 1. Aspectos biológicos
 - 1.1. Introducción
 - 1.2. Sistema dopaminérgico
 - 1.3. Imagen del sistema dopaminérgico
 - 1.4. Farmacología de los receptores dopaminérgicos
 - 1.5. Función de la dopamina
- 2. Antecedentes
 - 2.1. Ligandos de la familia de receptores tipo-D₂
- 3. Resultados y discusión
 - 3.1. Síntesis de ligandos
 - 3.2. Caracterización de ligandos
- 4. Conclusiones

CAPÍTULO 2: SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE LIGANDOS DE RECEPTORES CB₁

- 1. Aspectos biológicos
 - 1.1. Introducción
 - 1.2. Receptores cannabinoides
 - 1.3. Clasificación de los cannabinoides
 - 1.3.1. Fitocannabinoides
 - 1.3.2. Endocannabinoides
 - 1.3.3. Cannabinoides sintéticos
 - 1.4. Imagen del sistema cannabinoide
- 2. Antecedentes
 - 2.1. Ligandos agonistas de receptores cannabinoides
 - 2.2. Ligandos antagonistas de receptores cannabinoides

ÍNDICE

- 2.2.1. Diarilpirazoles
- 3. Resultados y discusión
- 4. Conclusiones

PARTE B: APLICACIÓN DE LOS ANÁLOGOS DE LIGANDOS DOPAMINÉRGICOS EN EL CAMPO DE LA IMAGEN MOLECULAR: MARCAJE CON CARBONO-11 Y EVALUACIÓN *EX VIVO* E *IN VIVO*

CAPÍTULO 3: SÍNTESIS DE RADIOTRAZADORES PET CON CARBONO-11

- 1. Síntesis de [¹¹C]Racloprida con alta actividad específica
 - 1.1. Metodología
 - 1.1.1. Procedimiento general para la producción de [¹¹C]MeI
 - 1.1.2. Síntesis de [¹¹C]Racloprida
 - 1.2. Resultados y discusión
 - 1.3. Conclusiones
- 2. Síntesis de 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano
 - 2.1. Metodología
 - 2.1.1. Procedimiento general para la producción de [¹¹C]MeI
 - 2.1.2. Síntesis de 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano
 - 2.2. Resultados y discusión
 - 2.3. Conclusiones

CAPÍTULO 4: ESTUDIOS DE IMAGEN *EX VIVO* E *IN VIVO* DE LIGANDOS DOPAMINÉRGICOS

- 1. Ensayos de desplazamiento *ex vivo* con [³H]Racloprida
 - 1.1. Metodología
 - 1.1.1. Procedimiento general
 - 1.1.2. Ensayo *ex vivo* con los ligando **4**, **9** y **14**
 - 1.2. Resultados y discusión
 - 1.3. Conclusiones
- 2. Ensayo de biodistribución *in vivo* con el radiotrazador 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano
 - 2.1. Metodología
 - 2.1.1. Estudio *in vivo* con microPET
 - 2.1.2. Estudio *ex vivo* de autorradiografía
 - 2.2. Resultados y discusión
 - 2.3. Conclusiones

ÍNDICE

CONCLUSIONES FINALES

PARTE EXPERIMENTAL

1. Técnicas experimentales
2. Síntesis de derivados dopaminérgicos
3. Síntesis de derivados cannabinoides

ANEXO I: ESPECTROS DE RMN

ANEXO II: ABREVIATURAS

RESUMEN

La imagen molecular es una disciplina que aglutina un conjunto de técnicas no invasivas que permiten la visualización de las funciones celulares y el seguimiento de los procesos moleculares en organismos vivos. La Tomografía por Emisión de Positrones (PET) es una de las técnicas más sensibles y específicas existentes, que se basa en la administración de compuestos marcados con radionucleidos emisores de positrones (generalmente de vida media corta).

El presente trabajo de Tesis Doctoral describe la síntesis y posterior evaluación *ex vivo* e *in vivo* de una familia de análogos de ligandos de receptores dopaminérgicos y cannabinoides.

En primer lugar se describen las estrategias utilizadas para la funcionalización de una unidad dicarba-*c/oso*-dodecaborano con el fin de sintetizar una pequeña librería de ligandos: análogos de la Racloprida, un ligando antagonista de receptores dopaminérgicos D₂, y análogos del Rimonabant, un ligando antagonista de receptores cannabinoides CB₁. Se ha explorado la estabilidad de los ligandos dopaminérgicos sintetizados así como la posible formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares en este tipo de estructuras.

En segundo lugar se describe la aplicación de los análogos de ligandos dopaminérgicos en el campo de la imagen molecular. Por un lado, se utiliza la técnica de la autorradiografía *ex vivo* para estudiar la afinidad de los diferentes ligandos dopaminérgicos hacia los receptores D₂. Por otro lado, se describe la estrategia sintética utilizada para el marcaje con carbono-11 de ligandos dopaminérgicos y su posterior evaluación *in vivo* para estudiar su biodistribución.

En conclusión, se ha llevado a cabo el proceso completo de diseño, síntesis, caracterización y evaluación (*ex vivo* e *in vivo*) de análogos de ligandos dopaminérgicos.

AGRADECIMIENTOS

Como bien dijo un gran amigo, ésta es la única página de esta memoria que es realmente mía. Es por eso que desearía empezar dando gracias al Prof. Manuel Martín-Lomas, quien me dio la oportunidad de entrar a formar parte de CICbiomaGUNE y permitió mi cambio de grupo a mitad del proceso. En segundo lugar me gustaría dar gracias a mi supervisor, el Dr. Jordi Llop, que me aceptó en su grupo y me dio la oportunidad de llevar a cabo una tesis en tan poco tiempo. Gracias por abrirme las puertas al mundo de la Imagen Molecular y por ser mi guía en todo este proceso. Gracias también al Dr. Claudio Palomo, por aceptar ser mi tutor.

Un agradecimiento especial para mis antiguos compañeros Eli, Raquel y Juan por hacer mis días más llevaderos. A Nere, por ser amiga, hermana y terapeuta. Las noches de series no son las mismas sin ti! A Antonio, mi “sweet” postdoc, que ha sido mi gran maestro, mi apoyo constante, mi consejero y, lo más importante, mi amigo. Sin duda alguna, que te cruzaras en mi camino ha sido una de las mejores cosas que me han ocurrido en la vida. He aprendido muchísimo contigo y es gracias a ti que hoy puedo estar escribiendo esta página; porque siempre has estado dispuesto a echarme una mano cuando estaba perdida. No puedo olvidarme de las personas que se fueron, mis mesetarias, con quienes he vivido los mejores momentos en estos cuatro años: Merce, culpable del castigo infligido con villancicos... quién te animaría a ti a traer ese CD al labo! (le dimos más vueltas que al de Bustamante; y eso es mucho decir!!); y Maria José, mi primera gran hermana, a quien no hay día en que no eche de menos. No tengo palabras para describir la gran persona que eres y lo especial que has sido para mí. Fuiste mi mayor apoyo en el peor momento de mi vida y sigues siendo la mejor amiga que una pueda desear.

Muchas gracias a mi nanoCarlos, por su apoyo y comprensión, y por estar siempre dispuesto a echar una mano. Y ahora..... ¿quién me va a informar sobre las tendencias de moda?, ¿quién me cantará como una rana afónica? No cambies nunca, porque así, tal cual, eres genial.

Gracias también a mi rubia, a Zuriñe, por esa capacidad infinita de aguante, por proporcionar racionalidad a las cosas cuando las necesitan y por tener siempre una sonrisa para mí. Gracias por la complicidad que hemos creado, que hasta las palabras nos sobran para comunicarnos; y eso, amiga, no es fácil de conseguir. Eres la persona más importante de todo este grupo, sin ti nada funcionaría y siempre estás dispuesta a aprender cosas nuevas. No dejes que nadie te diga lo contrario, porque tú vales un montón!

He de agradecer también al resto de mis compañeros de grupo María, Quique, Vijay, Vanessa, Abraham y al resto de las personas que, de una u otra manera, han participado en los experimentos; así como al personal de administración, mantenimiento e IT. Me gustaría agradecer especialmente a David, Paola, Josune y al resto de las personas que hacen que mi tiempo de comida sea uno de los mejores momentos del día.

Gracias a mi claretiano favorito, Dani, que ha sido capaz de editar los mejores espectros de boro que se hayan visto nunca; y a Javi, que se ha peleado con mis carboranos como nadie.

Especialmente me gustaría dar gracias a losu, por darle sentido a mi día a día. Tú eres compañero, amigo, confidente, apoyo incondicional. Sin duda alguna, lo más valioso que me llevo de este sitio. Gracias estar siempre a mi lado, dándome ánimos, haciéndome reír. Gracias por formar parte de mi vida.

No puedo olvidarme de dar gracias a mis txatungas, Miha y Gaby, dos tesoros que tuve la suerte de encontrar entre estas paredes, que siempre que las he necesitado han estado ahí; para hablar, para llorar, para reír... Da igual que la distancia nos mantenga apartadas; siempre seréis parte de mi vida. Vosotras me entendéis como nadie y sin vosotras no hubiera podido superar los malos momentos.

A mi loki Yaiza, una de las mejores personas que han pasado por aquí. Siempre dispuesta a “lo que sea, donde sea”; gracias por ser como eres, por mostrarme la mejor cara de Donosti, por esas tardes de cañas, esas noches locas, en definitiva, gracias por todo.

No puedo olvidarme de todos mis amigos, que siempre han estado ahí, en especial de mi kuadrikapi, de Alba y Varo; de mis soles de Erasmus Susu, Ruth, Amparo y Carol, con quienes he compartido los mejores momentos y los peores; viajes, risas, broncas, besos y abrazos.

Gracias también a la Dra. Salaberría, que me ayudó a afrontar mis problemas y miedos; y a poner prioridades en mi vida. A la música, que calma las fieras; en especial a la de Malú, que sabe estar más encabronada que nadie; y eso es una ayuda.

Para terminar, me gustaría dar gracias a mi aita y mi hermana, mi única familia. Gracias por estar ahí apoyándome, dándome ánimos y fuerzas y queriéndome. Han sido los años más difíciles para nosotros, pero hemos salido adelante, porque es así como debe ser. Sólo queda mirar hacia adelante y acordarse de los buenos momentos.

Han sido cuatro años duros y todos vosotros habéis hecho que me sienta la persona más afortunada por teneros en mi vida. Gracias.

¡SOY UN JUNCO HUECO!

INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1. El Sistema Nervioso
 2. Imagen Molecular
 3. Radioquímica
 4. Química del carborano
 5. Justificación y Objetivos
-

1. EL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso es una red de millones de células especializadas, denominadas neuronas, unidas entre ellas de una manera altamente organizada que se caracteriza por su capacidad para recibir y emitir información. Relaciona y controla diferentes órganos del cuerpo animal. Las neuronas están diseñadas para transportar estímulos eléctricos rápidamente a largas distancias y se unen las unas a las otras dando lugar a mecanismos reflejos. En la mayoría de estos mecanismos las neuronas se comunican mediante señales químicas, denominadas neurotransmisores, a través de un pequeño espacio dando lugar a la sinapsis, que es la función básica del sistema nervioso. Por otro lado, también es posible que la señal eléctrica pase directamente de una célula a otra mediante enlaces espaciales, aunque estos mecanismos son bastante escasos.

Los mecanismos reflejos en el sistema nervioso no deben seguir necesariamente una línea recta desde una neurona a otra. Una neurona tiene la capacidad de influir en múltiples neuronas, y varias neuronas pueden afectar la función de una única neurona.

1.1. Organización del sistema nervioso

En la mayoría de los animales el sistema nervioso puede considerarse dividido, principalmente, en dos partes: sistema nervioso central y sistema nervioso periférico. Los receptores sensoriales están continuamente monitorizando las condiciones tanto del medio interno como externo. Estos receptores mandan la información a través de las neuronas aferentes o sensoriales hacia el sistema nervioso central, el cual está compuesto por el cerebro y la médula espinal. Las neuronas del sistema nervioso central integran la información que reciben y determinan si es necesaria una respuesta. Las señales que dirigen una respuesta apropiada son enviadas a través de las neuronas eferentes hacia las células del cuerpo. Las neuronas aferentes y eferentes forman el sistema nervioso periférico.

Las neuronas eferentes del sistema nervioso periférico se pueden subdividir en i) somáticas, que son las que controlan las funciones voluntarias; y ii) autónomas, que controlan aquellas funciones involuntarias.

A su vez, en la subdivisión autónoma se puede diferenciar entre los sistemas simpático y parasimpático, que pueden ser distinguidos entre sí por su organización anatómica y por las sustancias químicas que usan para comunicarse con las células objetivo.

Actualmente está recibiendo cierta atención la posibilidad de clasificar el sistema nervioso con una tercera división; el sistema nervioso entérico, que consistiría en una red de neuronas situada en la pared digestiva, que estaría frecuentemente controlada por el sistema nervioso autónomo aunque podría también funcionar de una manera autónoma¹.

1.2. Células del sistema nervioso

El sistema nervioso está compuesto básicamente por dos tipos de células: las células de soporte, conocidas como células gliales; y las neuronas, que forman parte de la unidad funcional del sistema nervioso².

1.2.1. Neuronas

Las neuronas son un tipo especial de células cuya propiedad fundamental consiste en la comunicación con otras células por medio de un mecanismo denominado *sinapsis*, que consiste, a su vez, en la transmisión de señales, tanto químicas como eléctricas, a través de membranas.

Se pueden considerar divididas, fundamentalmente, en tres partes, como muestra la Figura 1.1:

- Soma o cuerpo celular: es la parte voluminosa que contiene al núcleo; es decir, toda la información que dirige la actividad de la neurona.
- Dendritas: son las prolongaciones cortas que se originan del soma neural.
- Axón: es una prolongación única y larga cuya función es la de transportar el impulso nervioso desde el soma hasta otro lugar del sistema.

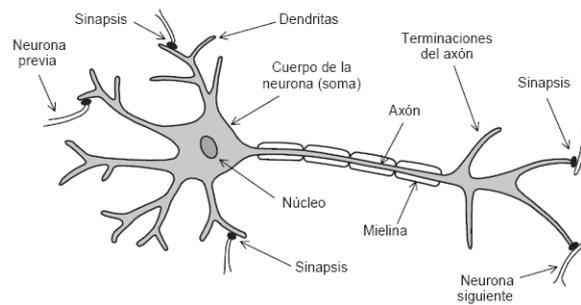


Figura 1.1: Estructura básica de una neurona.

Las neuronas en el sistema nervioso pueden clasificarse estructural o funcionalmente. Así, estructuralmente las neuronas se clasifican por el número de procesos que originan desde el cuerpo celular (soma), mientras que funcionalmente, las neuronas pueden clasificarse en neuronas aferentes o sensoriales, interneuronas y neuronas eferentes o motoras, que se diferencian en la dirección de transferencia de la información.

1.2.2. Células gliales

Las células gliales son células no neuronales que participan en la transmisión de señales del sistema nervioso³, interviniendo en el procesamiento cerebral de la información pero no de manera directa. Son entre 10 y 50 veces más numerosas que las neuronas en el sistema nervioso central. Cumple funciones de sostén y nutrición, y son fundamentales en el desarrollo de las redes neuronales. Se estima que en el cerebro humano el número de células gliales es igual al de neuronas, aunque las proporciones varían de una región a otra⁴. Pese a no estar directamente involucradas en el procesamiento de la información, se cree que poseen ciertas funciones vitales tales como:

- Hacen de soporte a las neuronas, proveyendo al cerebro de estructura. A veces también aíslan y separan grupos neuronales y conexiones sinápticas unas de otras.
- Producen la mielina, que se usa para aislar los axones neuronales.
- Cumplen importantes tareas de administración de señales entre neuronas.
- Ayudan a formar una barrera impermeable sobre el cerebro (barrera hematoencefálica) que previene la entrada de sustancias tóxicas hacia su interior.

1.3. Anatomía del sistema nervioso

El sistema nervioso de los animales vertebrados, incluyendo a los humanos, se puede considerar dividido en Sistema Nervioso Central (SNC), que incluye el cerebro y la médula espinal, y Sistema Nervioso Periférico (SNP), que consta de los nervios craneales y espinales y sus ganglios².

1.3.1. Sistema Nervioso Periférico

El sistema nervioso periférico está constituido por un conjunto de nervios y ganglios nerviosos. Se llaman nervios a los haces de fibras nerviosas que se encuentran fuera del neuroeje; ganglios, a unas agrupaciones de células nerviosas intercaladas a lo largo del recorrido de los nervios o en sus raíces. La diferencia con el sistema nervioso central está en que éste no está protegido por huesos o por la barrera hematoencefálica¹. Es el que coordina, regula e integra los órganos internos.

1.3.2. Sistema Nervioso Central

El comportamiento humano está controlado por el sistema nervioso central¹, que está constituido por el encéfalo y la médula espinal (ver Figura 1.2). Es por eso que la protección de estos centros de control es extremadamente importante, y en el caso de los vertebrados, el encéfalo y la médula espinal están recubiertos tanto de tejido como de hueso. En el caso del encéfalo, la protección ósea consiste en el cráneo; mientras que para la médula espinal, poseemos la columna vertebral. Ambas partes están protegidas, además, por tres membranas, denominadas genéricamente meninges (duramadre, aracnoides y piamadre). El sistema nervioso central es el encargado de recibir y procesar las sensaciones recogidas por los diferentes sentidos y de transmitir las órdenes de respuesta de forma precisa a los distintos efectores.

La *médula espinal* es la parte más extensa del SNC que comunica el encéfalo con el resto del cuerpo, siendo la responsable final de la locomoción corporal. El *encéfalo*, por el contrario, está compartimentado en varias regiones, cada una de las cuales realiza diferentes funciones. Se puede considerar compuesto principalmente por tres regiones: cerebro, cerebelo y tallo encefálico (ver Figura 1.2).

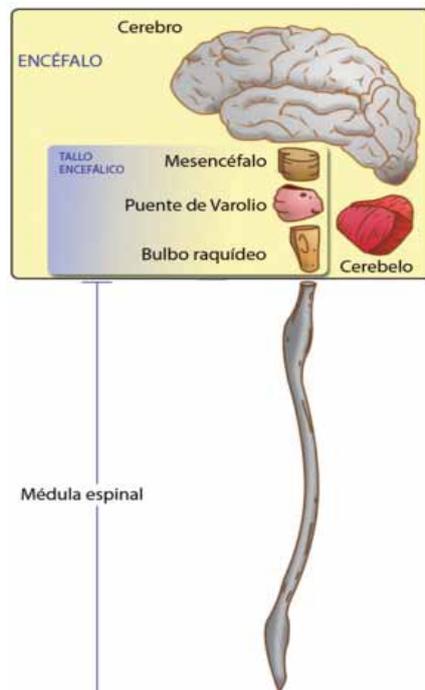


Figura 1.2: División anatómica del sistema nervioso central.

Barrera hematoencefálica

Debido a que el cerebro es el principal centro de control del cuerpo, sus células han de ser protegidas de sustancias potencialmente peligrosas en la sangre. Debido a eso, los capilares del cerebro son mucho menos permeables que los capilares del resto del cuerpo, y excluyen muchas moléculas que atraviesan paredes celulares en otras partes del cuerpo. Estos capilares forman la conocida barrera hematoencefálica (BHE)^{1,2}, cuya limitada permeabilidad funciona como mecanismo de protección cerebral. Marca la separación de la circulación sanguínea y del líquido cerebroespinal en el sistema nervioso central, consistiendo en una serie de uniones selectivas entre las células endoteliales de las vesículas del SNC que restringe el paso de determinadas sustancias ajenas.

Un desarrollo y función normal del cerebro requiere de un gran número de compuestos que deberían ser capaces de cruzar la barrera hematoencefálica. La entrada hacia el fluido cerebroespinal es posible a través de tres mecanismos: (i) por difusión de sustancias liposolubles, (ii) por transporte de sustancias hidrosolubles específicas, mediado por receptores dependientes de energía, (iii) a través de canales iónicos.

Esta barrera se hace patente a los especialistas clínicos cuando es necesario tratar una patología que afecta al sistema nervioso central y el fármaco no consigue

pasar la barrera⁵. Es el caso, por ejemplo, de muchos antibióticos que, aunque sean los idóneos en la lucha contra el germen causal de la meningitis, no pueden escogerse por su imposibilidad de paso a través de la barrera; o el de la mayoría de los citostáticos, de nula utilidad en la lucha contra los tumores primarios del sistema nervioso central por la misma razón.

La barrera hematoencefálica es necesaria para mantener un medio extracelular estable en el sistema nervioso central, que puede detectar indirectamente la actividad sináptica de cada circuito neuronal, en función de los cambios de concentración de iones y neurotransmisores que genera dicha actividad⁶. Cada circuito se encuentra rodeado por su propio espacio extracelular independiente; de modo que un cambio de concentración de iones y neurotransmisores, causado por la despolarización neuronal y la transmisión sináptica, puede confinarse, únicamente, al espacio extracelular del circuito activo. Para que las células gliales puedan apreciar estos cambios es necesario que no haya interferencias en el espacio extracelular y que exista un aislamiento de éste con respecto a la sangre.

1.4. Función del sistema nervioso

La función básica del sistema nervioso es mandar señales de una célula a otra o de una parte del cuerpo a otra. Si se traslada esto a un nivel mayor, se podría decir que su función principal consiste en controlar al cuerpo². El sistema nervioso extrae información del medio a través de los receptores sensoriales, envía las señales, las descifra, procesa la información y emite una respuesta.

Sinapsis

La sinapsis es la unión intercelular entre neuronas para llevar a cabo la transmisión de impulsos nerviosos. El impulso nervioso se inicia con una descarga química que origina una corriente eléctrica en la membrana de la célula presináptica. Posteriormente el impulso nervioso llega al extremo del axón, zona por donde se conecta una neurona con la vecina (neurona postsináptica), donde la misma neurona ha segregado neurotransmisores que son los encargados de excitar o inhibir la acción de la neurona vecina. La mayoría de las neuronas envían señales a través del axón en forma de ondas electroquímicas llamadas potenciales de acción; pero existen algunos tipos capaces de comunicarse vía dendrita.

Desde el punto de vista funcional, la neurona tiene tres zonas principales, pero solamente dos de ellas (dendritas y axón) son las encargadas de establecer las relaciones sinápticas. Las dendritas reciben la información procedente de otra neurona y el axón es el encargado de conectar con la siguiente neurona. Estas conexiones pueden establecerse a muy corto alcance (del orden de micrómetros) o a distancias mucho mayores.

La sinapsis puede ser química o eléctrica; de manera que la eléctrica produce conexiones eléctricas directas entre neuronas, mientras que la sinapsis química es más común.

1.5. Patologías del sistema nervioso

El sistema nervioso es susceptible a una gran cantidad de disfunciones como resultado de defectos genéticos, daños psíquicos, infecciones, etc. El sistema nervioso central está protegido tanto por barreras físicas como químicas². Físicamente el cerebro está rodeado por membranas que a su vez están protegidas por hueso. Químicamente el cerebro está aislado por la conocida barrera hematoencefálica, que previene la entrada de agentes externos hacia el interior del sistema nervioso central. Estas protecciones hacen que el sistema nervioso central sea menos vulnerable que el sistema nervioso periférico. Sin embargo, las lesiones en el sistema nervioso central resultan ser de consecuencias mayores que las del sistema nervioso periférico.

Entre las enfermedades del sistema nervioso central, podemos encontrar infecciones como la meningitis o enfermedades neurodegenerativas, tales como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, el Parkinsonismo o la enfermedad de Huntington. El objetivo de estudio de esta tesis está focalizado en la investigación de nuevos radiotrazadores PET para la detección de este tipo de patologías.

- *Esclerosis múltiple*: se caracteriza por la aparición de focos desmielinizantes en la sustancia blanca que por lo general comienzan por el nervio óptico, la medula espinal o el cerebelo.
- *Enfermedad de Alzheimer*: es un trastorno degenerativo del encéfalo que se caracteriza por el deterioro cognitivo y los trastornos en la conducta.
- *Enfermedad de Parkinson*: es un trastorno neurodegenerativo que conduce a una incapacidad progresiva como consecuencia de la destrucción de las neuronas de la sustancia negra.

- *Enfermedad de Huntington*: es un trastorno genético hereditario consistente en degeneración neuronal constante y progresiva.

En cuanto a las enfermedades del sistema nervioso periférico, algunas surgen como resultado de otras enfermedades, como los problemas neurológicos de los diabéticos. Otros trastornos, como el *Síndrome de Guillane-Barre*, ocurren después de una infección viral. Otros más, a consecuencia de la compresión de un nervio, como el síndrome del túnel del carpo, etc.

¹Silverthorn, D.U; Human physiology, an integrated approach; *Prentice Hall*, **2001**.

²Kandel, E.R; Schwartz, J.H; Jessell, T.M; Principles of neural sciences; *McGraw-Hill*, **2000**.

³Allen, N.J; Barres, B.A; Glia – more than just brain glue; *Nature*, **2009**, 457, 675-677.

⁴Azevedo, F.A; Carvalho, L.R; Grinberg, L.T; Farfel, J.M; Ferreti, R.E; Leite, R.E; Filho, W.J; Lent, R; Herculano-Houzel, S; Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain, *J. Comp. Neuro.* **2009**, 513 (5), 532-541.

⁵Cordon-CARdo, C; O'Brien, J.P; Casals, D; Rittman-Grauer, L; Biedler, J.L; Melaned, M.R; Bertino, J.R; Multidrug-resistence gene P-glycoprotein is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 695-698.

⁶Pascual-Garvi, J.M; González-Llanos, F; Prieto-Arribas, R; Cerdá, S; Roda, J.M; La barrera hemotoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central; *Rev. Neurol.* **2004**, 38 (6), 565-581.

2. IMAGEN MOLECULAR

2.1. Aspectos generales

La imagen molecular emergió a principios del siglo veintiuno como disciplina para unir los campos de la biología molecular y la imagen *in vivo*. Puede definirse como un conjunto de técnicas no invasivas que permiten la visualización de las funciones celulares y el seguimiento de los procesos moleculares en organismos vivos. Las técnicas de imagen molecular difieren de las técnicas tradicionales de imagen en que éstas utilizan biomarcadores para trazar las trayectorias. Estos biomarcadores interactúan químicamente con su alrededor y como consecuencia alteran la imagen de acuerdo con los cambios moleculares que se llevan a cabo en el área de interés a analizar. Esta habilidad de detectar los pequeños cambios moleculares abre un gran abanico de posibilidades para su aplicación en la medicina actual, desde la pronta detección hasta el tratamiento de enfermedades¹⁻⁵.

Existe una amplia variedad de modalidades que pueden ser usadas como técnicas no invasivas de imagen (ver Tabla 2.1 para su comparación). Entre ellas, la PET (Tomografía por Emisión de Positrones), la SPECT (Tomografía por Emisión de Fotón Único), la MRI (Imagen por Resonancia Magnética), y las técnicas de imagen óptica (BLI y FLI) son consideradas de imagen molecular.

Técnica de Imagen	Forma de Energía	Resolución espacial (mm)		Tiempo adquisición fotograma	Masa requerida	Sensibilidad detección	Profundidad penetración
		Clínica	Animal	(s)	(ng)	(Mol/l)	(mm)
PET	Aniquilación fotones	3-8	1-3	1-300	1-100	10^{-11} - 10^{-12}	>300
SPECT	Fotones γ	5-12	1-4	60-2000	1-1000	10^{-10} - 10^{-11}	>300
CT	Rayos X	0.5-1	0.03-0.4	1-300	-	-	>300
RMI	Radiofrecuencia	0.2-0.1	0.025-0.1	50-3000	10^3 - 10^6	10^{-3} - 10^{-5}	>300
BLI	Luz Vis-IR	-	3-10	10-300	10^3 - 10^6	10^{-13} - 10^{-16}	1-10
FLI	Luz Vis-IR	-	2-10	10-2000	10^3 - 10^6	10^{-9} - 10^{-11}	1-20

Tabla 2.1: Modalidades de técnicas *in vivo* de imagen molecular no invasivas. Modificada de: Vallabhajosula, S; Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT; Springer, 2009.

De entre todas las técnicas de Imagen Molecular, el presente trabajo se enmarca en el área de las Técnicas Nucleares de Imagen, y más concretamente en la PET. Las técnicas nucleares⁶ tienen la ventaja de presentar una alta sensibilidad intrínseca y una limitada profundidad de penetración. La PET (Tomografía por Emisión de Positrones), además, presenta la ventaja adicional de ser totalmente cuantitativa y ofrece una mayor resolución espacial que la SPECT (Tomografía Computerizada por Emisión de Fotón Único).

2.2. PET: Tomografía por Emisión de Positrones

2.2.1. Visión general

La tomografía por emisión de positrones es una de las técnicas más sensibles y específicas existentes para la visualización de procesos moleculares *in vivo* de una manera no invasiva. Se basa en la administración de compuestos marcados con radionucleidos emisores de positrones (generalmente de vida media corta) para obtener imágenes tridimensionales de procesos funcionales, tanto en animales como en humanos. Los isótopos más comunes que se usan como radionucleidos en PET son Flúor-18, Carbono-11, Nitrógeno-13 y Oxígeno-15 (ver Tabla 2.2 para propiedades físicas). Estos radionucleidos son incorporados en compuestos biológicamente activos que tienen una función específica en organismos vivos⁷.

Radionucleido	Vida media (min)	Modo/Producto Decaimiento	Max. Energía (MeV)	Energía más probable (MeV)	Rango máximo(mm)
Flúor-18	109.8	97% β^+ 3% EC* Oxígeno-18	0.69	0.202	2.4
Carbono-11	20.4	100% β^+ Boro-11	0.96	0.326	4.1
Nitrógeno-13	9.98	100% β^+ Carbono-13	1.19	0.432	5.4
Oxígeno-15	2.05	100% β^+ Nitrógeno-15	1.70	0.650	8.0

Tabla 2.2: Características físicas de los radionucleidos más comunes. *EC: Captura Electrónica. Obtenida de: Welch, M.J; Redvanly, C.S; Handbook of radiopharmaceuticals: Radiochemistry and applications; Wiley, 2005.

El decaimiento espontáneo de un emisor de positrones produce un positrón, que recorre cierta distancia (dependiendo de su energía) para finalmente interactuar con un electrón de un átomo situado alrededor. Este proceso se denomina aniquilación, y como resultado se obtiene la emisión de dos fotones gamma de misma energía y dirección y con sentidos opuestos (511KeV/fotón, emitidos a 180° el uno del otro; Figura 2.1). La tomografía por emisión de positrones se basa en la detección de estos rayos gamma. Cuando un trazador que contiene un emisor de positrones es

administrado en un organismo, los rayos gamma de alta energía producidos, que tienen un alto poder de penetración, escapan del cuerpo y son detectados por un anillo de detectores externo “en coincidencia”, es decir, son detectados al mismo tiempo. Como consecuencia de la detección de múltiples fenómenos de este tipo se consigue la reconstrucción de una imagen tridimensional que contiene información sobre la distribución espacio-temporal del radiotrazador en el organismo.

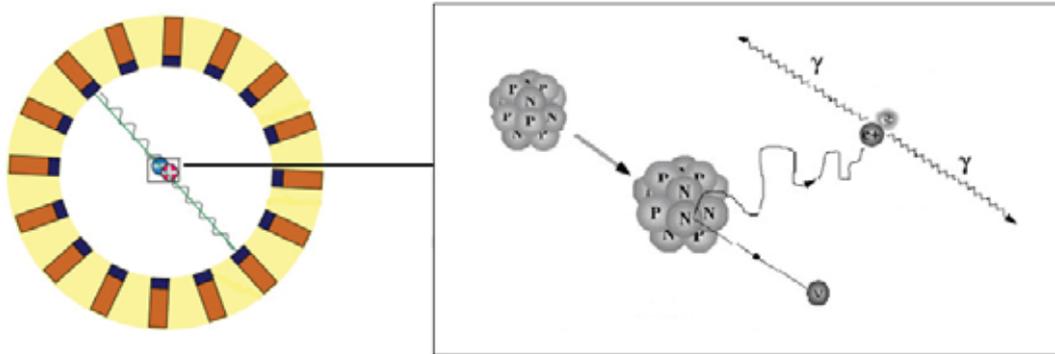


Figura 2.1: Proceso de aniquilación de un emisor de positrones que conlleva la formación de dos rayos gamma de 511KeV a aproximadamente 180° el uno del otro.

La resolución espacial de la PET es más baja que la que se puede obtener con otras técnicas de imagen (anatómicas) como la resonancia magnética de imagen (RMI) o la tomografía computerizada (TC), pero la información sobre procesos biológicos y fisiológicos puede obtenerse a nivel molecular⁸. Varias restricciones físicas⁹ hacen que la resolución espacial de los escáneres clínicos sea de 2-3mm y de 0.5-1mm en preclínicos¹⁰.

La PET se utilizó por primera vez en estudios oncológicos en los 70 y hoy en día es una tecnología totalmente aceptada y utilizada en estudios clínicos. La alta sensibilidad de esta técnica permite el uso de concentraciones de trazador menores que la dosis efectiva farmacológica (escalas sintéticas típicas del orden de 0.2μmol), lo cual facilita la disponibilidad, para estudios clínicos, de muchos radiotrazadores¹¹.

Pese a que la tecnología PET puede ser aplicada para abordar múltiples cuestiones fisiológicas, biológicas y médicas, tanto en el área preclínica como en clínica, la realización de estudios PET requiere, como se ha expuesto anteriormente, de la utilización de un radiotrazador marcado con un isótopo emisor de positrones; por lo tanto, es necesario el continuo desarrollo de nuevos trazadores. Este proceso requiere de un enfoque multidisciplinar, que incluye: (i) la selección de objetivos diana, (ii) la síntesis orgánica, tanto de compuestos de referencia como de precursores, (iii) el marcaje radiactivo, (iv) la evaluación *in vitro* e *in vivo* y (v) la interpretación de los resultados en términos cinéticos.

El primer paso en el desarrollo de nuevos radiotrazadores PET es la identificación de una diana terapéutica, que generalmente consiste en una enzima, un transportador, un receptor o cualquier otra biomolécula que tenga alta afinidad de unión. Teniendo en cuenta la limitada resolución de la PET, el volumen del tejido correspondiente debe ser compatible con la resolución de la cámara PET. En ciertos casos la alta afinidad del radiotrazador es un factor limitante y se requieren, por tanto, ciertas modificaciones para reducirla, como es el caso de ciertos estudios de desplazamiento.

Identificada la diana terapéutica, se procede a diseñar un radiotrazador adecuado para la misma basado en su estructura biológica y en el screening de una librería de compuestos, eligiendo así los mejores ligandos.

Además, antes de llevar a cabo estudios con la molécula marcada radiactivamente, hay una serie de experimentos *in vitro* que pueden realizarse usando el compuesto no radiactivo, como es el caso de los estudios de metabolismo, unión y afinidad. Sólo los compuestos que den los mejores resultados en los ensayos *in vitro* (en cuanto a la farmacocinética y a la afinidad por la diana terapéutica) son seleccionados para posteriores estudios *in vivo*.

En cuanto a los estudios *in vivo*, el primer factor a tener en cuenta es la elección del radionucleido, cuyas características físicas definirán la aplicabilidad del compuesto marcado. Así, la energía del positrón tiene un efecto en la resolución de la imagen, mientras que el tiempo de vida media del radionucleido debería ser lo suficientemente largo como para llevar a cabo el marcaje, la purificación, la formulación y el control de calidad del producto final, además de permitir posteriormente efectuar el estudio de imagen. Además, el tiempo de vida media del radioisótopo debería corresponder con la vida media biológica del radiotrazador, para permitir un estudio farmacocinético completo con la mínima exposición.

Una vez que el radiotrazador está listo para su uso, pueden llevarse a cabo ciertos ensayos *in vitro* (determinación de la unión y estabilidad en plasma) antes de proceder a realizar los estudios *in vivo*. Los primeros ensayos *in vivo* para un nuevo radiotrazador consisten en estudios de biodistribución para determinar, así, sus propiedades farmacocinéticas. Si la resolución de la técnica no resulta suficiente, pueden llevarse a cabo estudios *ex vivo* de autorradiografía para visualizar la distribución del radiotrazador, aunque en este caso no es posible llevar a cabo estudios longitudinales con el animal. Por otro lado, la PET permite evaluar, en un único estudio la distribución espacio-temporal del radiotrazador tras la administración (generalmente entre 1 y 8 horas), disminuyendo de este modo el número de animales necesarios para la evaluación de un compuesto.

2.2.2. Isótopos PET: aspectos generales

Entre todos los radionucleidos existentes solamente unos pocos tienen las propiedades físicas adecuadas para convertirse en candidatos adecuados para la preparación de radiotrazadores. En el caso particular de los emisores de positrones, son cuatro los radioisótopos utilizados: Carbono-11, Nitrógeno-13, Flúor-18 y Oxígeno-15. Su utilización es debida a que (i) pueden ser producidos con rendimientos relativamente altos en ciclotrones disponibles comercialmente, (ii) pueden ser incorporados fácilmente en una biomolécula, (iii) su modo de decaimiento es próximo al 100% de emisiones de positrones y (iv) sus isótopos estables están presentes en todas las moléculas orgánicas. Esta última característica no es cierta en el caso del flúor, pero sin embargo en muchos casos la sustitución de un grupo hidroxilo (o un átomo de hidrógeno) por un átomo de flúor no altera drásticamente el comportamiento biológico de la molécula.

Muchos emisores de positrones pueden ser generados en un ciclotrón, donde un blanco específico es irradiado con protones de alta energía (8-19MeV) para producir una reacción nuclear con la consecuente formación del emisor de positrones deseado. El número de reacciones que pueden llevarse a cabo en el blanco depende de muchos factores. Así, la energía del haz de protones y la composición química del mismo blanco (incluyendo sus impurezas) definen los radioisótopos producidos durante el bombardeo. Por otro lado, la forma química del producto final puede ser modificada cambiando tanto la composición química como el estado físico del blanco durante la irradiación.

Entre todos los isótopos PET, el Flúor-18 es probablemente el isótopo más ampliamente utilizado, especialmente en aplicaciones clínicas. El Flúor-18 forma enlaces covalentes fuertes con átomos de carbono y puede ser incorporado en una gran variedad de moléculas orgánicas; es más, la sustitución de un átomo de hidrógeno por un átomo de flúor solamente causa pequeñas alteraciones estéricas en la molécula. En algunos casos particulares las propiedades biológicas del radiotrazador han sido, incluso, mejoradas respecto a la molécula original (como es el caso de la 2-[¹⁸F]fluoro-2-desoxy-D-glucosa ([¹⁸F]FDG), un radiotrazador utilizado en entorno clínico para el diagnóstico de ciertos tipos de cáncer). El Flúor-18 tiene un rango de positrón reducido y su tiempo de vida media es relativamente largo (109.8min), permitiendo la síntesis de una amplia variedad de moléculas complejas con rendimientos radioquímicos aceptables. Su vida media relativamente larga permite la comercialización de radiotrazadores como herramientas de diagnóstico en el entorno clínico-asistencial.

Otros emisores de positrones como el Carbono-11 y el Nitrógeno-13 tienen un gran potencial para la preparación de radiotrazadores fuera del entorno clínico-

asistencial. El proceso de comercialización de radiotrazadores con estos dos emisores de positrones presenta algunas dificultades debido a su corta vida media (20.4 y 9.98min, respectivamente). El Carbono-11 puede ser obtenido en ciclotrones en diferentes formas químicas, dependiendo del material irradiado y de las condiciones de irradiación (material del blanco, presión, temperatura, tamaño del blanco, etc.); sin embargo, son dos las formas químicas de precursores radiactivos más utilizadas para marcar moléculas: $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (obtenido por irradiación de mezclas de N_2/O_2) y $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ (obtenido por irradiación de mezclas de N_2/H_2). El Nitrógeno-13 se produce mediante la irradiación de disoluciones acuosas de etanol y se obtiene en la forma química $[^{13}\text{N}]\text{NH}_4^+$. Esta especie radioquímica tiene aplicación directa en el ambiente clínico como marcador de perfusión.

El Oxígeno-15 es el isótopo emisor de positrones de vida media más corta (2.05min). Históricamente es uno de los primeros radioisótopos artificiales producidos con deuterones de baja energía en un ciclotrón. No tiene muchas aplicaciones debido a su corto período de vida media, y es principalmente utilizado directamente tal y como se produce (inhalado) o para sintetizar $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$.

2.2.3. Isótopos PET: producción

Un ciclotrón (ver Figura 2.2) es un acelerador de partículas en el cual se utilizan un campo eléctrico para acelerar iones, como H^- o D^- , y un campo magnético para guiarlos en una trayectoria espiral. El campo eléctrico se genera mediante aplicación de una diferencia de potencial eléctrico entre dos electrodos, llamados *dees* y *counter-dees*, que están conectados a una fuente de corriente alterna (generador de radiofrecuencias). Los iones negativos se generan en la fuente de iones, situada en el centro del ciclotrón, como consecuencia de la aplicación de un alto voltaje eléctrico sobre un gas (hidrógeno o deuterio) presente en el medio. Estos iones negativos son extraídos del centro del ciclotrón mediante la aplicación de un campo eléctrico. Cuando el *dee* tiene polaridad positiva, el *counter-dee* tiene polaridad negativa. Así, el ión es acelerado hacia el *dee* por el campo eléctrico. Una vez que el ión penetra en el agujero del *dee* pasa a experimentar solamente el campo magnético. Cuando el ión sale del *dee*, a consecuencia de la inversión de la polaridad, el ión es acelerado de nuevo hacia el *counter-dee*. El mismo proceso se repite en el otro electrodo, continuando hasta que el ión sale del alcance del campo magnético, debido a que en cada vuelta se aumenta tanto el radio orbital como la velocidad del ión. Cuando el radio adquiere un cierto valor crítico el ión negativo choca contra una lámina de carbono (*stripper*) que le arranca dos electrones al ión, convirtiéndolo en un ión positivo. Este ión positivo experimenta la misma fuerza en la misma dirección, pero en sentido contrario, abandonando el campo magnético y continuando hacia el blanco (target) deseado, donde colisiona con el material presente dentro del blanco generando los átomos radiactivos deseados. Se

denomina target o blanco al contenedor donde se introduce el material (normalmente un gas o un líquido, aunque también se utilizan materiales sólidos) para ser irradiado.

Antes de la colisión con el blanco, el ión presenta una energía que resulta ser igual a la suma de las energías de las aceleraciones individuales que ha experimentado el ión entre los electrodos.

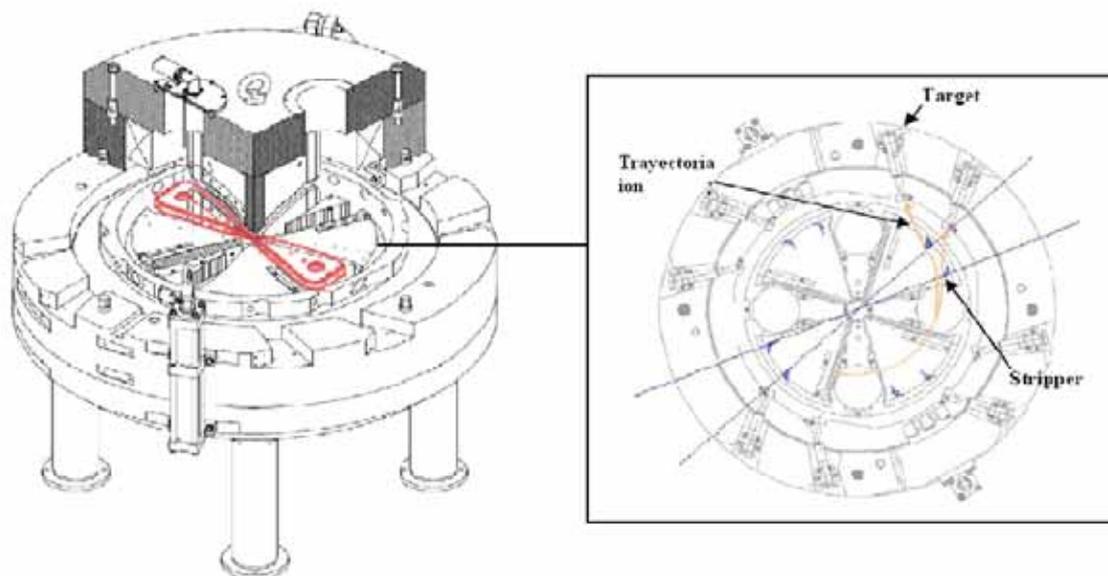


Figura 2.2: Vista general del cuerpo de un ciclotrón IBA Cyclone 18/9 (izquierda) con los electrodos donde se aplica el campo eléctrico (en rojo) y vista de un plano (derecha) donde se observa la trayectoria de los iones acelerados. Adaptado de: IBA users manual.

Producción de radioisótopos convencionales

Existen diferentes reacciones nucleares para producir Flúor-18 (ver Tabla 2.3); sin embargo son dos las más comúnmente utilizadas: $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ y $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$, ya que ambas requieren energías moderadas de partículas y un bombardeo a corriente baja para obtener rendimientos aceptables. La primera reacción nuclear ($^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$) se utiliza para preparar Flúor-18 como $^{18}\text{F}_2$ (carrier-added), mientras que la segunda ($^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$) se utiliza para preparar $^{18}\text{F}^-$ (non carrier-added: método de preparación de radioisótopos libre de isótopos estables del elemento). En los últimos años la reacción nuclear $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ está siendo utilizada para producir $^{18}\text{F}_2$ ¹². Cuando la reacción $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ es utilizada, es necesario adicionar F_2 no radiactivo en el target debido a que el F_2 es muy reactivo y puede ser absorbido en las paredes del target y en las líneas de transferencia. Este esencial paso recibe el nombre de pasivación y es crítico para obtener buenos rendimientos.

En cuanto a la producción de Carbono-11 (ver Tabla 2.3), la reacción más ampliamente utilizada es $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$, que parte de nitrógeno como gas a irradiar. Sin

embargo puede dar lugar a la producción de dos formas químicas diferentes dependiendo de la mezcla de gases utilizada. En presencia de oxígeno (0.5%), se forma la especie química $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$; mientras que en presencia de hidrógeno (5%), se puede obtener $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$.

Existen varias reacciones para producir Nitrógeno-13; sin embargo, normalmente la producción de este isótopo ha estado enfocada hacia la obtención de la especie $[^{13}\text{N}]\text{NH}_4^+$, como un marcador de perfusión¹³. En este caso el Nitrógeno-13 se genera bombardeando mezclas de agua/etanol con protones de alta energía ($^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$, como reacción nuclear, ver Tabla 2.3)¹⁴. La función del etanol es la de actuar como scavenger, aumentando la proporción de la especie $[^{13}\text{N}]\text{NH}_4^+$ respecto de las también generadas $[^{13}\text{N}]\text{NO}_2^-$ y $[^{13}\text{N}]\text{NO}_3^-$.

La reacción nuclear más utilizada para la producción de Oxígeno-15 (ver Tabla 2.3) es $^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$, donde mezclas de N_2/O_2 (1%) son irradiadas con protones de alta energía para obtener la especie $[^{15}\text{O}]\text{O}_2$. La posterior reacción con hidrógeno, bajo condiciones catalíticas, produce $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$, que es un marcador del flujo sanguíneo¹⁵.

Reacción nuclear	Rango energía (MeV)	Abundancia natural (%)
$^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$	0-15	90.5
$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	4-14	0.2
$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$	7-15	99.6
$^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$	8-15	99.8
$^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$	2-10	99.6

Tabla 2.3: Reacciones nucleares más comunes para la obtención de los radioisótopos Flúor-18, Carbono-11, Nitrógeno-13 y Oxígeno-15. Obtenido de: Welch, M.J; Redvanly, C.S; Handbook of radiopharmaceuticals: Radiochemistry and applications; Wiley, 2005.

2.2.4 Radiotrazadores

Un radiotrazador puede definirse como una sustancia que contiene un átomo radiactivo para permitir su detección y medida de una manera más sencilla. El átomo radiactivo define las propiedades físicas del radiotrazador, mientras que la estructura química de la molécula unida al radioisótopo define las propiedades biológicas del mismo. Los radiotrazadores tienen múltiples aplicaciones pero es especialmente relevante en el desarrollo de fármacos y en la evaluación de la respuesta en terapias específicas¹⁶.

El uso de ligandos apropiados para imagen molecular por PET dependerá del desarrollo de adecuados trazadores y de procedimientos eficientes para su marcaje. En una situación ideal, los radiotrazadores interaccionarán únicamente con la molécula diana de interés y no se observarán acumulaciones inespecíficas. Sin embargo el radiofármaco ideal no existe. Algunos criterios a tener en cuenta son:

- Alta afinidad por su diana terapéutica (bajo K_d). Esta característica permite obtener imágenes PET de alto contraste.
- Alta especificidad. Es necesaria porque la interacción del radiotrazador con otro tipo de moléculas interferiría con la señal deseada.
- “Fácil” marcaje radiactivo. Se requiere un procedimiento con un buen rendimiento radioquímico. Hay una serie de parámetros a considerar como la posición del marcaje, el tiempo de reacción, la elección del radioisótopo y la radiactividad específica.
- No es deseable un rápido metabolismo ya que la presencia de metabolitos radiactivos disminuye la relación señal-ruido en las imágenes obtenidas.
- Lipofilia del radiotrazador. Este parámetro es importante ya que determina la habilidad de la molécula de atravesar membranas celulares y barreras como la hematoencefálica.
- Baja toxicidad.

Tiempo de vida media

Una consideración importante en la producción de radiotrazadores PET es la vida media del radionucleido. Para mantener un alto rendimiento radioquímico y una radiactividad específica elevada el radiotrazador debería ser producido en el tiempo de 2 o 3 ciclos de vida media del radionucleido. El reducido período de semidesintegración de isótopos PET como Carbono-11, Nitrógeno-13 y Oxígeno-15 permite que la aplicación de estos isótopos en estudios *in vivo* no suponga una dosis de radiación de importancia para el sujeto, y que además se puedan llevar a cabo estudios repetitivos en un mismo sujeto en un corto intervalo de tiempo. Sin embargo, estos cortos tiempos de vida media no permiten llevar a cabo síntesis complejas con estos isótopos, haciendo necesaria, además, la presencia de una instalación compleja *in situ* que permita su generación y posterior tratamiento (ciclotrón y laboratorio de radiosíntesis). Por otro lado, el período de semidesintegración del Flúor-18, de 110 minutos, permite tanto síntesis complejas como el transporte de radiofármacos de centros satélite, sin necesidad de generarlos *in situ*.

Concepto de microdosis

El desarrollo de fármacos es un proceso largo, complejo y muy costoso. Además, un producto en desarrollo clínico tiene solamente un 8% de probabilidad de acabar en el mercado.

La sensibilidad del PET hace que sea posible la detección de radiotrazadores a concentraciones bajas (del orden de picomolar). Por tanto, al enfrentarnos a la evaluación de una nueva entidad química, es posible efectuar su marcaje y determinar

las propiedades farmacocinéticas mediante PET sin haber efectuado estudios exhaustivos de toxicidad. Estos estudios PET en los que se utilizan cantidades tan pequeñas son conocidos como estudios PET de microdosis, Fase 0 de estudios clínicos o *First-time-in-humans*.

2.3. Técnicas de Imagen *In Vitro*

Las primeras imágenes científicas tomadas de estudios *in vitro* con tejido de cerebros humanos se remontan a finales del siglo diecinueve de la mano de Retzius y Cajal y han servido como base para el desarrollo de la imagen actual en el campo de las neurociencias¹⁷.

La autorradiografía (ARG) es una poderosa técnica de imagen molecular *in vitro* (o *ex vivo*) cuantitativa y de alta resolución, utilizada para estudiar la distribución de radioligandos en modelos biológicos. Fue establecida como herramienta para la investigación toxicológica ya a principios de 1950 y ha llegado a convertirse en una técnica ampliamente utilizada tanto en estudios toxicológicos como farmacológicos; sobre todo como consecuencia del desarrollo de la técnica de autorradiografía de cuerpo completo. El objeto de estos estudios era la caracterización del destino final de los radioligandos inyectados. En las técnicas *in vitro* de unión de radioligandos, como los ensayos homogéneos de unión o la autorradiografía de radioligandos, el compuesto marcado radiactivamente funciona como trazador para la detección de componentes endógenos, como los receptores. Estas técnicas *in vitro* son de gran importancia para la caracterización de radioligandos; de hecho, las técnicas de imagen *in vivo* PET y SPECT fueron desarrolladas en base a los ensayos de unión *in vitro*¹⁸.

La elección del método *in vitro* depende de la disponibilidad y propiedades de los ligandos, así como del método de detección. Los cambios patológicos pueden ser estudiados en tejidos *postmortem*, los acontecimientos en curso pueden ser observados en cortes de cultivos de tejidos, y los procesos graves o inducidos pueden ser creados *in vivo* y detectados *ex vivo*. Los métodos más comunes de visualización son los reveladores, la fluorescencia y el decaimiento radiactivo. Es posible utilizar una amplia variedad de ligandos, como tintes, oligonucleótidos, toxinas o compuestos farmacéuticos. En cuanto a la detección del decaimiento radiactivo, tradicionalmente se ha llevado a cabo usando films sensibles de radiaciones β o emulsiones. Sin embargo durante la última década, los films han sido sustituidos por placas de fósforo y por otras tecnologías más sofisticadas como la patentada por la compañía Biospace (β -imager¹⁷).

Las técnicas por imagen *in vivo* presentan sus obvias ventajas, como la posibilidad de seguir el proceso de una enfermedad o los efectos de un tratamiento de manera longitudinal. Sin embargo las ventajas y desventajas de la imagen *in vitro* frente a la *in vivo* hacen que ambas metodologías sean complementarias. Mientras la resolución *in vivo* (de las técnicas de imagen nuclear) es del rango de milímetros, la mayoría de los sistemas *in vitro* ofrecen resoluciones sub-milimétricas.

Hay una serie de criterios a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo ensayos *in vitro* o *in vivo* para un determinado radioligando. Muchas de las propiedades básicas deben ser caracterizadas mediante ensayos de unión *in vitro* sobre criosecciones previamente preparadas, mientras que otras propiedades han de estudiarse mediante ensayos *in vivo*. En los compuestos nuevos que se desean utilizar en estudios de imagen es preferible utilizar métodos *in vitro* para su previa caracterización. Una primera determinación de la afinidad y selectividad de la nueva entidad química a estudiar suele llevarse a cabo mediante un screening *in vitro*, utilizando tejido animal o cultivos celulares. Hay una serie de variables que pueden ser estudiadas de esta manera, como la selectividad por ciertos receptores, las cinéticas de radioligando-receptor, detalles de la distribución cerebral, etc. Una vez identificado el sistema diana, se selecciona un biomarcador para poder estudiar las propiedades farmacocinéticas.

Un interesante ejemplo sobre el desarrollo de un radioligando lo podemos encontrar en el campo de las benzamidas sustituidas. La Racloprida (ver Figura 2.3), un antagonista de los receptores dopaminérgicos D₂, fue desarrollado y caracterizado en sistemas *in vitro* para su uso tanto en estudios *in vitro* de unión y autorradiografía (³H]Racloprida), como en estudios de unión *in vivo* y PET (¹¹C]Racloprida).

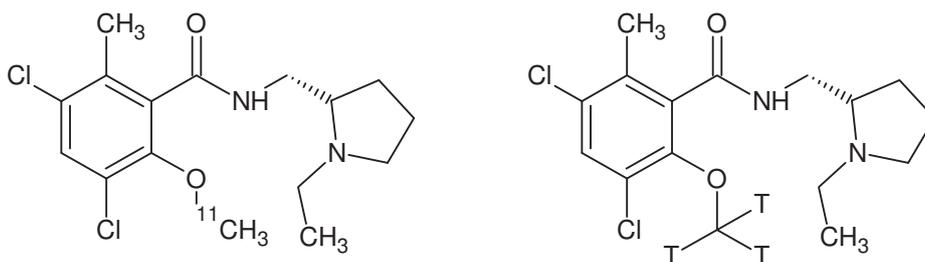


Figura 2.3: Estructuras químicas de [¹¹C]Racloprida (izquierda) y [³H]Racloprida (derecha)

¹Vallabhajosula, S; Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT; *Springer*, 2009.

²Herschman, H.R; Molecular Imaging: Looking at problems, seeing solutions; *Science*, 2003, 302, 605-608.

Introducción, justificación y objetivos

- ³Hilderbrand, S.A; Weissleder, R; Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 71-79.
- ⁴Li, Z; Conti, P.S; Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, 62, 1031-1051.
- ⁵Achilefu, S; Introduction to concepts and strategies for molecular imaging; *Chem. Rev.* **2010**, 110 (5), 2575-2578.
- ⁶Pimlott, S.L; Sutherland, A; Molecular tracers for PET and SPECT imaging of disease; *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 149-162.
- ⁷Welch, M.J; Redvanly, C.S; Handbook of radiopharmaceuticals: Radiochemistry and applications; *Wiley*, **2005**.
- ⁸Price, P; PET as potential tool for imaging molecular mechanisms of oncology in man; *Trends Mol. Med.* **2001**, 7(10), 442-446.
- ⁹Rudin, M; Molecular imaging: Basic principles and applications in biomedical research; *Imperial college Press*; **2005**.
- ¹⁰Gupta, N; Price, P.M; Aboagye, E.O; PET for *in vivo* pharmacokinetic and pharmacodynamic measurements; *Eur. J. Cancer*, **2002**, 38, 2094-2107.
- ¹¹Serdons, K; Verbruggen, A; Bormans, G.M; Developing new molecular imaging probes for PET; *Methods*, **2009**, 48, 104-111.
- ¹²Chirakal, R; Adams, R.M; Firnau, G; Schrobilgen, G.J; Coates, G; Garnett, E.S; Electrophilic ¹⁸F from a Siemens 11MeV proton-only cyclotron; *Nucl. Med. Biol.* **1995**, 22(1), 111-116.
- ¹³Wijins, W; Camici, P.G; The value of quantitative myocardial perfusion imaging with positron emission tomography in coronary artery disease; *Herz*, **1997**, 22(2), 87-95.
- ¹⁴Tilbury, R.S; Dahl, J.R; ¹³N species formed by proton irradiation of water; *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1997**, 13, 208.
- ¹⁵Bacharach, S.L; Libutti, S.K; Carrasquillo, J.A; Measuring tumor blood flow with H₂¹⁵O: practical considerations; *Nucl. Med. Biol.* **2000**, 27, 671-676.
- ¹⁶Saleem, A; Aboagye, E.O; Price, P.M; *In vivo* monitoring of drugs using radiotracers techniques; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, 41, 21-39.
- ¹⁷Långström, B; Andrén, P.E; Lindhe, Ö; Svedberg, M; Hall, H; *In vitro* imaging techniques in neurodegenerative diseases; *Mol. Imaging Biol.* **2007**, 9, 161-175.
- ¹⁸Doudet, D.J; Neurodegenerative diseases; *Mol. Imaging Biol.* **2007**, 9, 159-160.

3. RADIOQUÍMICA

3.1. Aspectos Generales

El marcaje radiactivo es una reacción química en la cual un radionucleido es incorporado en la molécula deseada para formar un radiotrazador. Durante las últimas décadas se han desarrollado muchas rutas sintéticas para preparar radiotrazadores PET; la mayoría de las cuales incorporan Carbono -11 o Flúor-18, que poseen una vida media más larga que el Nitrógeno-13 y el Oxígeno-15 (ver Tabla 3.1). En algunos casos, es necesario un paso previo al marcaje de protección de los grupos reactivos que podrían dificultar el marcaje. En este caso el proceso requiere de un paso final de desprotección después del marcaje radiactivo. Debido a la corta vida media de los radionucleidos PET, se han desarrollado métodos para aumentar el rendimiento radioquímico o para acortar el tiempo de reacción, como es el caso de las reacciones en microondas o la tecnología de los microfluidos.

Radionucleido	$t_{1/2}$ (min)	Reacción nuclear	Blanco	Producto	Producto de decay
^{11}C	20.4	$^{14}\text{N}(\rho, \alpha) ^{11}\text{C}$	$\text{N}_2(+\text{O}_2)$ $\text{N}_2(+\text{H}_2)$	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$	^{11}B
^{13}N	9.97	$^{16}\text{O}(\rho, \alpha) ^{13}\text{N}$	H_2O $\text{H}_2\text{O} + \text{EtOH}$	$[^{13}\text{N}]\text{NO}_x$ $[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$	^{13}C
^{15}O	2.04	$^{15}\text{N}(d, n) ^{15}\text{O}$	$\text{N}_2(+\text{O}_2)$	$[^{15}\text{O}]\text{O}_2$	^{15}N
^{18}F	110	$^{20}\text{Ne}(d, \alpha) ^{18}\text{F}$ $^{18}\text{O}(\rho, n) ^{18}\text{F}$	$\text{Ne}(+\text{F}_2)$ $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ $^{18}\text{F}^-$	^{18}O

Tabla 3.1: Radionucleidos PET más comunes y sus características. Obtenido de: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8998-9033.

En un laboratorio de investigación en radioquímica, donde el principal objetivo es el desarrollo de nuevas especies marcadas radiactivamente, es importante contar tanto con un equipamiento versátil como con una gran capacidad de implementación de nuevas estrategias sintéticas. Los laboratorios de radiosíntesis utilizan “celdas calientes”, que son básicamente versiones plomadas de las clásicas vitrinas a tamaño menor. El radionucleido es transferido desde el ciclotrón hasta la celda caliente, donde es transformado en la especie química radiactiva deseada tras una serie de reacciones. Normalmente se utilizan módulos robotizados controlados a través de un ordenador para minimizar la exposición a la radiactividad por parte del usuario.

A la dificultad de trabajar con radiosótopos PET de vida media corta hay que añadirle el inconveniente de la obtención de minúsculas cantidades de los mismos en el ciclotrón (del orden de picomol a nanomol). Debido a esto, hay un vasto exceso estequiométrico del reactivo de partida (precursor), lo que resulta en una cinética de

reacción de “primer orden”. Como ventaja cabe destacar que reacciones que requieren de muchas horas o días pueden llevarse a cabo en pocos minutos y la presencia de impurezas (químicas) se hace casi inexistente. Por otro lado, antes de administrar un radiotrazador PET a un paciente es necesario que éste cumpla determinados parámetros de calidad farmacéutica. Los controles de calidad para radiotrazadores y radiofármacos son similares a los aplicados a fármacos no radiactivos: test fisicoquímicos (impurezas químicas, pH, estado físico) y biológicos (esterilidad, toxicidad).

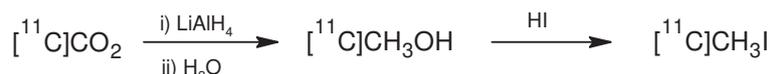
Dos conceptos fundamentales a tener en cuenta son el rendimiento radioquímico (RCY: radiochemical yield) de la radiosíntesis y la actividad específica (SA: specific activity) del compuesto final marcado radiactivamente.

a) El *rendimiento radioquímico* es función del rendimiento químico y del tiempo de vida media del radioisótopo; se expresa generalmente como la cantidad de radiotrazador obtenido relativo a la cantidad inicial de isótopo radiactivo, en porcentaje (rendimiento no corregido por decaimiento). Sin embargo, en ocasiones se corrige por decaimiento (al tiempo del final de la irradiación) la actividad obtenida al final de la síntesis; en este caso el rendimiento obtenido se denomina rendimiento corregido por decaimiento o EOB.

b) La *actividad específica* para un isótopo específico, o una mezcla de isótopos, es la actividad de un material dividido por la masa del material; es decir, puede definirse como la relación entre los compuestos marcado y no marcado. Pese a que los valores de actividad específica para isótopos PET son muy altos (341.1, 699.3, 3394.0 y 63.3 TBq/ μ mol para Carbono-11, Nitrógeno-13, Oxígeno-15 y Flúor-18, respectivamente), estos valores se encuentran, normalmente, muy lejos (entre 10 y 10000 veces superiores) de aquellos valores obtenidos cuando se sintetizan los radiotrazadores. Esta disminución es debida al proceso de dilución con el isótopo no radiactivo que se produce durante la producción del radionucleido y en la manipulación y preparación del radiotrazador. Cuando este proceso de dilución es significativo y la actividad específica obtenida está muy lejos de su valor teórico, el decaimiento del radionucleido no sólo reduce la actividad final del compuesto marcado, sino que también reduce la actividad específica en un factor de 2 para cada período de semidesintegración. De esta manera, la actividad específica de un radiotrazador disminuye también con el tiempo.

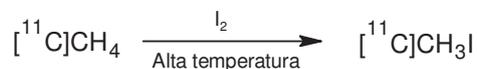
3.2.1. Reacciones de ^{11}C -metilación

La ^{11}C -metilación, que lleva a la incorporación de un grupo $[^{11}\text{C}]$ metilo ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3$) en un compuesto dado, es el método más utilizado para introducir carbono-11 en las moléculas orgánicas. El $[^{11}\text{C}]$ yoduro de metilo ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$), el agente de metilación más ampliamente utilizado, puede prepararse por el método “húmedo” (“wet” method)¹ o por la reacción de yodación gas-sólido (gas-solid iodination)². El método “húmedo” empieza con la transformación del $[^{11}\text{C}]$ dióxido de carbono ($[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$) en $[^{11}\text{C}]$ metanol ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$) a través de una reducción con hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4) y seguido de una yodación con ácido yodhídrico (HI) (ver Esquema 3.2). Estos pasos se llevan a cabo fácilmente, empezando por atrapar el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en LiAlH_4 . A continuación se elimina el disolvente (normalmente tetrahidrofurano (THF)) usando vacío y/o un gas inerte y calor. Más tarde la sal de aluminio formada ha de ser enfriada para adicionar el ácido yodhídrico. Después de adicionar el HI , la mezcla debe ser calentada para destilar el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ utilizando un gas inerte.



Esquema 3.2: Metodología sintética para la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$.

El método alternativo consiste en el uso de $[^{11}\text{C}]$ metano ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$) en vez de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en la síntesis del agente metilante $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$. El $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$, obtenido directamente desde el ciclotrón, es utilizado en una reacción de yodación gas-sólida a alta temperatura para producir $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$. El paso de yodación se lleva a cabo en un tubo de cuarzo que contiene yodo molecular (I_2) gaseoso a 720°C . La alta temperatura permite la disociación del yodo molecular y la reacción con el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ (ver Esquema 3.3)³. La desventaja de esta metodología es la baja eficiencia de la reacción radicalaria, por lo que el gas debe ser recirculado varias veces para obtener rendimientos aceptables.



Esquema 3.3: Metodología sintética para la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$.

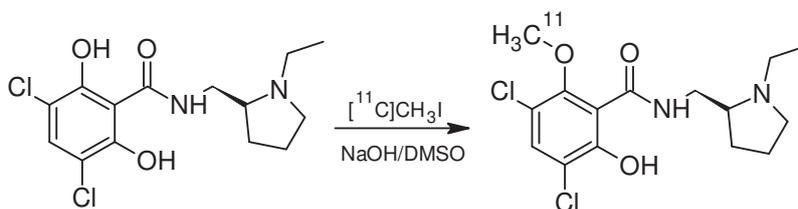
Un método alternativo de metilación consiste en el uso de $[^{11}\text{C}]$ triflato de metilo ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$), que es altamente reactivo y volátil, lo que lo convierten en un reactivo ideal para reacciones rápidas de metilación. Éste se prepara pasando $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ gaseoso a través de una columna de triflato de plata a 200°C ⁴. Otros agentes

alquilantes han sido desarrollados, como [^{11}C] yoduro de etilo, [^{11}C] yoduro de propilo, [^{11}C] yoduro de butilo y [^{11}C] yoduro de benzilo⁵.

3.2.1.1 ^{11}C -metilaciones nucleofílicas

Las reacciones de metilación, incluyendo las llevadas a cabo con [^{11}C]CH₃I y [^{11}C]CH₃OTf, son sustituciones nucleofílicas realizadas sobre un precursor que, normalmente, suele ser una amina, un alcohol o un grupo tiol. La simplicidad y los cortos tiempos de reacción que requiere este paso han convertido a esta estrategia de metilación en una de las más utilizadas en la producción de compuestos marcados con carbono-11.

Cabe destacar, como ejemplo, el desarrollo de los “métodos por captura de disolvente” (captive solvent methods), donde el precursor radiactivo es atrapado en una disolución de precursor no radiactivo dentro de un reactor tubular (tipo *loop* de HPLC). Los sistemas automáticos de purificación y de flujo continuo de reacción con *loops* como reactores están siendo ampliamente utilizados en estos procedimientos debido a su fácil manejo y versatilidad. Por ese motivo estos métodos son conocidos como métodos “*in loop*” y consisten en el revestimiento de la pared interna del *loop* con cantidades micromolares del precursor no radiactivo disuelto en su disolvente, por donde se hace pasar un flujo gaseoso de [^{11}C]CH₃OTf o [^{11}C]CH₃I. Estos métodos han sido utilizados para marcar una gran variedad de compuestos biológicos, incluyendo la [^{11}C]Racloprida (ver Esquema 3.4), debido a que permiten obtener buenos rendimientos radioquímicos, buenas purezas (tanto química como radioquímica) y con cortos tiempos de reacción⁶. Se trata de una metodología eficiente que, además, minimiza el uso de disolvente y la cantidad de precursor y se lleva a cabo con pérdidas mínimas del compuesto marcado ya que el crudo de reacción puede ser introducido directamente en el HPLC para su purificación.



Esquema 3.4: ^{11}C -metilación para producir [^{11}C]Racloprida.

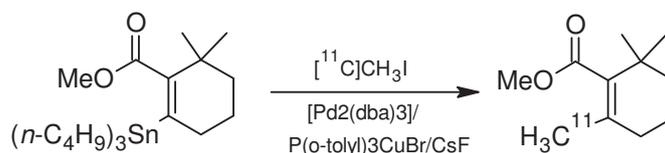
Otra estrategia de ^{11}C -metilación muy utilizada es la que utiliza polímeros. Consiste en utilizar linkers anclados a soportes sólidos sobre los que se llevan a cabo las reacciones. El precursor no radiactivo se ancla sobre el soporte sólido y se trata con el precursor radiactivo. El compuesto no marcado que no reacciona queda anclado en

la resina, mientras que el compuesto final marcado se libera sin necesidad de una purificación final⁷.

3.2.1.2 ¹¹C-metilaciones mediadas por paladio

En las últimas décadas muchos grupos han desarrollado un amplio número de estrategias sintéticas para la formación de enlaces C-C, C-O y C-N por medio de reacciones catalizadas con paladio. Estas estrategias han sido aplicadas, con éxito, para la preparación de compuestos marcados con carbono-11; aunque debido al exceso estequiométrico empleado de paladio en radioquímica, estas reacciones pasan a conocerse como reacciones mediadas por paladio en vez de reacciones catalizadas por paladio.

La reacción más ampliamente utilizada ha sido la reacción tipo Stille (ver Esquema 3.5)⁸, donde se utilizan grupos derivados de estaño, que son compatibles con muchos grupos funcionales y otorgan a la molécula baja polaridad, lo que facilita una rápida separación cromatográfica del compuesto marcado. La desventaja de usar esta metodología radica en la toxicidad, que puede causar problemas en los estudios *in vivo*. Otro método muy utilizado en radioquímica es la reacción de Suzuki, que da mayores rendimientos radioquímicos, especialmente cuando se utiliza el microondas⁹.



Esquema 3.5: Reacción tipo Stille para la formación de un compuesto marcado con carbono-11 usando [¹¹C]CH₃I.

3.2.2. Reacciones de Grignard

Como en el caso anterior, el [¹¹C]CO₂ puede ser utilizado directamente después de su obtención del ciclotrón, haciéndolo reaccionar con reactivos organometálicos de Grignard para formar haluros de [¹¹C]carboximagnesio que son transformados en ácidos [¹¹C]carboxílicos. Estas especies ácidas pueden ser convertidas en otras más reactivas y entonces, hacerlas reaccionar con aminas para formar [¹¹C]amidas o [¹¹C]ureas¹⁰. En el Esquema 3.6 puede verse un ejemplo de la aplicación de este tipo de reactivos para la formación de radiotrazadores.



Esquema 3.6: Síntesis del [¹¹C]acetato, un radiotrazador utilizado en el diagnóstico de cáncer de próstata.

3.2.3. Reacciones de ¹¹C-carbonilación

El marcaje de compuestos con [¹¹C]CO resulta interesante por dos razones: (i) la gran variedad de moléculas biológicamente activas que contienen grupos carbonilo y (ii) la posibilidad de obtener [¹¹C]CO a través de una reducción de [¹¹C]CO₂ sobre zinc o molibdeno. El método de ¹¹C-carbonilación más ampliamente utilizado es el mediado por paladio, que fue desarrollado por Långstrom para marcar moléculas biológicas incluyendo imidas, cetonas, amidas y acrilamidas¹¹.

Este método de carbonilación mediado por paladio procede a través de un ciclo catalítico que consta de tres pasos: (i) adición oxidativa de un haluro de arilo sobre Pd⁰, (ii) inserción y migración de monóxido de carbono ([¹¹C]CO) para formar el complejo con paladio y (iii) ataque nucleofílico y eliminación reductiva para formar el producto carbonilado. La reacción viene limitada por el paso de inserción del [¹¹C]CO, que posee una pobre reactividad debido a su baja solubilidad en disolventes orgánicos a bajas presiones de CO.

3.2.4. Otras reacciones de incorporación de carbono-11

Aunque las reacciones de [¹¹C]alquilación más comúnmente utilizadas para la preparación de radiotrazadores PET son las que ya se han expuesto anteriormente, existen otras rutas sintéticas con gran aplicabilidad. El [¹¹C]Fosgeno¹² ha sido desarrollado como sintón para el marcaje con carbono-11, aunque la metodología posee ciertas dificultades en cuanto a su producción en una manera reproducible. Otro precursor radiactivo utilizado es el [¹¹C] cianuro de hidrógeno ([¹¹C]HCN), que es producto de partida en reacciones de [¹¹C]cianación y suele ser preparado por reducción de [¹¹C]CO₂ en [¹¹C]CH₄ usando hidrógeno molecular (H₂) sobre Nickel, seguido de su conversión en [¹¹C]HCN por reacción con amoníaco (NH₃) sobre platino¹³.

3.3. Radioquímica con Flúor-18

El Flúor-18 es el radionucleido más utilizado en imagen por PET. El desarrollado y extendido uso de la [^{18}F]FDG, el radiotrazador PET más comúnmente utilizado en diagnóstico por imagen y evaluación del tratamiento de cáncer, ha incrementado el interés de la investigación en imagen por PET¹⁴. El uso tan común del ^{18}F es debido a sus favorables características físicas y nucleares: un corto pero manejable tiempo de vida medio (110min) que permite una ruta sintética de varios pasos, y una gran resolución en las imágenes de PET (energía necesaria para la producción de ^{18}F : 4-14 MeV).

Existen dos evidentes desventajas en el uso de ^{18}F para el marcaje de moléculas: (i) una escasa fuente de moléculas orgánicas biológicamente activas con grupos flúor; y (ii) la incerteza de que la inserción de un átomo de flúor no natural pueda causar variaciones en las propiedades biológicas del compuesto.

La variedad de estrategias sintéticas por las que un isótopo ^{18}F puede introducirse en un compuesto determinado es, en comparación con las estrategias de carbono-11, bastante limitada. Éstas pueden dividirse en : 1) Fluoración directa, donde el isótopo ^{18}F se introduce “directamente” en la molécula de interés en un único paso, y 2) Fluoración indirecta, que requiere rutas sintéticas de varios pasos. La fluoración directa puede ser nucleofílica o electrofílica.

3.3.1. Fluoración electrofílica

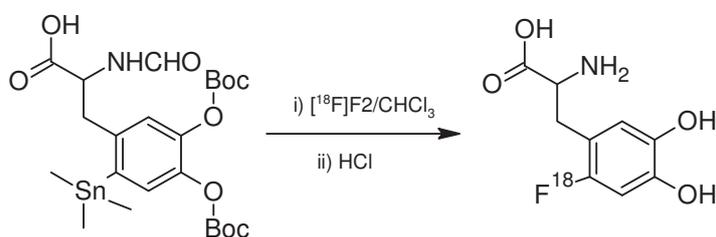
La fluoración electrofílica es actualmente menos utilizada que la nucleofílica por tres motivos: 1) generalmente rinde productos marcados con baja actividad específica debido al proceso de producción del [^{18}F] flúor molecular ($[\text{F}_2]$); 2) el marcaje con $[\text{F}_2]$ es generalmente inespecífico y puede dar mezclas de productos y 3) la producción de Flúor-18 como $[\text{F}_2]$ resulta técnicamente mucho más complicada que la producción de [^{18}F] ión fluoruro ($[\text{F}^-]$) y ofrece rendimientos mucho más bajos.

Aunque la fluoración nucleofílica es más común, la electrofílica ha jugado un importante papel en el desarrollo de moléculas marcadas con Flúor-18 para imagen por PET. La primera síntesis del radiotrazador PET más importante, [^{18}F]FDG, fue llevada a cabo por fluoración electrofílica¹⁵. También caben destacar la [^{18}F]fluoro-L-DOPA¹⁶ y 2-L- $[\text{F}]$ fluorotirosina^{14b}.

El precursor radiactivo más común para fluoraciones electrofílicas es $[\text{F}_2]$, que se obtiene de las siguientes reacciones nucleares: $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ y $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$, y puede

ser utilizado tal cual o convertido en un derivado menos reactivo de [^{18}F] acetil hipofluorito ($\text{CH}_3\text{COO}[^{18}\text{F}]\text{F}$), que a su vez ha sido utilizado en el marcaje radiactivo de péptidos cíclicos para detección de tumores.

Una de las fluoraciones más importantes en radioquímica es la preparación de la [^{18}F]FDOPA¹⁶, un radiotrazador usado para estudiar el metabolismo de la dopamina presináptica para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson. La ruta sintética (ver Esquema 3.7) consiste en la sustitución electrofílica directa sobre el precursor seguida de una hidrólisis ácida de los grupos protectores. Finalmente se purifica mediante HPLC.



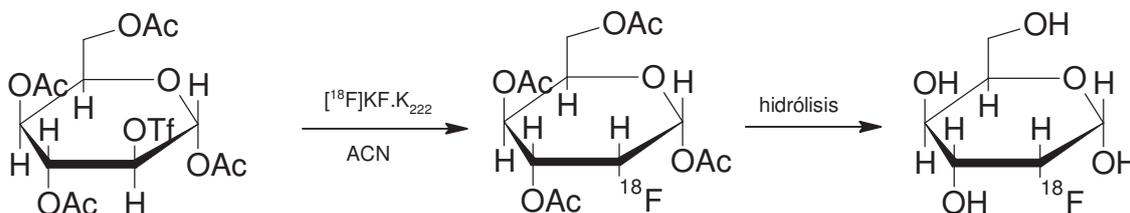
Esquema 3.7: Síntesis de [^{18}F]FDOPA.

3.3.2. Fluoración nucleofílica

Las reacciones de fluoración nucleofílicas son utilizadas de manera rutinaria para producir eficientemente algunos de los radiotrazadores PET más importantes, como [^{18}F]FDG (ver Esquema 3.8) y [^{18}F] 3-desoxy-3-[^{18}F]-fluorotimidina ([^{18}F]FLT¹⁷). Existen, principalmente, dos vías para llevar a cabo este tipo de reacciones:

- Sustitución directa de un grupo saliente apropiado por [^{18}F]F⁻ en el precursor deseado, que puede continuar con una hidrólisis de los grupos protectores.
- Preparación de un agente de fluoración intermedio por sustitución nucleofílica, seguido de una segunda reacción para llevar a cabo finalmente el paso de desprotección.

La producción de [^{18}F]F⁻ se lleva a cabo a través de la reacción nuclear $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ a partir de agua enriquecida ([^{18}O]H₂O). El $^{18}\text{F}^-$ proveniente del blanco de flúor es atrapado en una columna de intercambio iónico que permite la recuperación del agua enriquecida [^{18}O]H₂O. El $^{18}\text{F}^-$ atrapado es eluido de la columna usando carbonato potásico en una disolución de agua/acetonitrilo. El fluoruro acuoso obtenido es, sin embargo, un nucleófilo pobre debido a su alto nivel de solvatación. La adición de un catalizador de transferencia de fase, kryptofix-222(K₂₂₂), seguido de la eliminación del agua del medio resulta ser crucial para mejorar la reactividad del $^{18}\text{F}^-$ en reacciones de sustitución nucleofílicas.

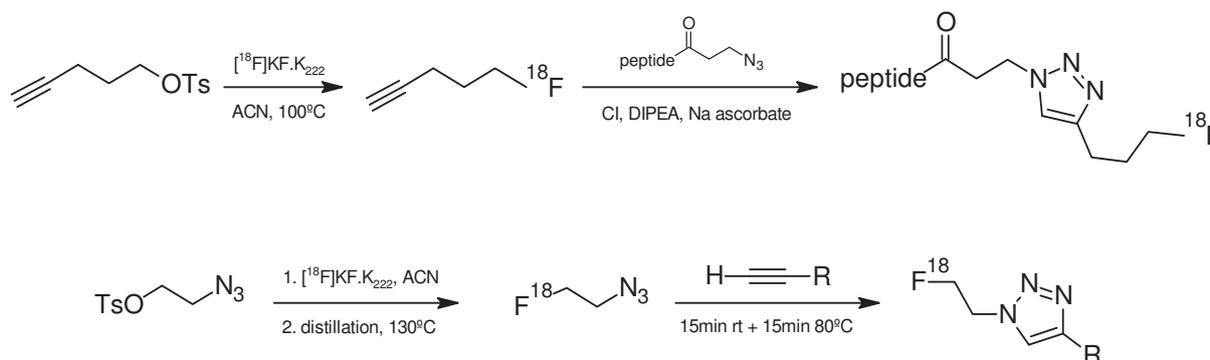


Esquema 3.8: Síntesis de [¹⁸F]FDG.

3.3.3. Otras estrategias de fluoración

La [¹⁸F]fluoración indirecta con grupos prostéticos adecuados es una alternativa interesante para las sustituciones nucleofílicas y electrofílicas debido a que puede ser llevada a cabo en condiciones suaves, limitando la formación de subproductos.

Una estrategia desarrollada recientemente es la “click chemistry”, que consiste en la formación de anillos de triazol por cicloadición de alquinos a azidas (ver Esquema 3.9). Esta reacción ha sido llevada a cabo en el campo de la radioquímica debido a su velocidad, selectividad y simplicidad bajo condiciones suaves. Una posible limitación de este método es la posibilidad de descomposición del catalizador de cobre bajo condiciones ácidas.

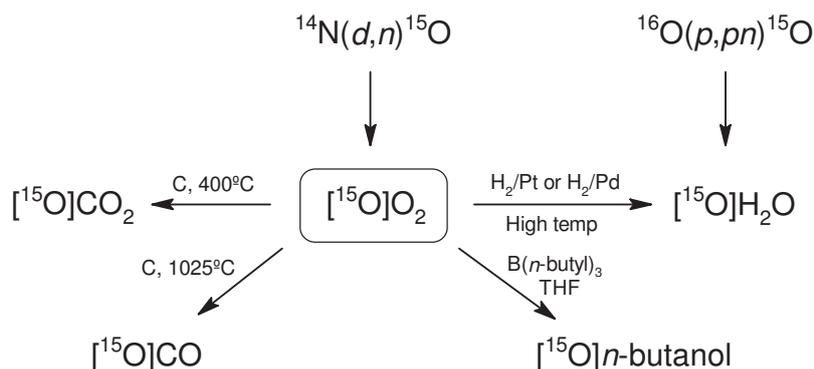


Esquema 3.9: Ejemplo de reacciones de “click chemistry”.

3.4. Radioquímica con Oxígeno-15

El radionucleido Oxígeno-15 es una elección muy atractiva para la radiosíntesis ya que su isótopo estable Oxígeno-16 está presente en la mayoría de las moléculas biológicamente activas. Sin embargo, debido a su extremadamente corta vida media (2min) no es comúnmente utilizado en aplicaciones PET. Sin embargo, productos químicos simples como [¹⁵O]CO₂ y [¹⁵O]H₂O pueden ser obtenidos directamente del

ciclotrón y convertidos rápidamente, sin necesidad de purificación, en otra serie de compuestos (ver Esquema 3.10). Los primeros ensayos de imagen con PET fueron llevados a cabo utilizando $[^{15}\text{O}]\text{O}_2$, $[^{15}\text{O}]\text{CO}$ y $[^{15}\text{O}]\text{CO}_2$ debido a que los primeros ciclotrones eran generadores de partículas de deuterio para la producción de Oxígeno-15.



Esquema 3.10: Síntesis de compuestos simples con Oxígeno-15. Obtenido de: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8998-9033.

El Oxígeno-15 es producido, comúnmente, a través de la reacción nuclear $^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$, donde la irradiación de gas nitrógeno con un contenido de oxígeno inferior al 5% genera el precursor $[^{15}\text{O}]\text{O}_2$.

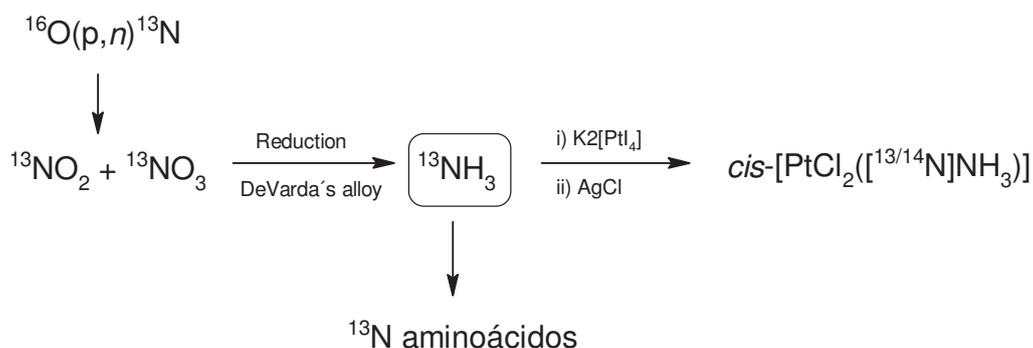
Una aplicación común del Oxígeno-15 es el estudio del flujo sanguíneo cerebral con $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ ¹⁸. Existen tres formas de producir $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$: i) por conversión de $[^{15}\text{O}]\text{O}_2$ en $[^{15}\text{O}]\text{CO}_2$, cuya posterior inhalación hace que se convierta en $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ en los pulmones por acción de una enzima, ii) por conversión de $[^{15}\text{O}]\text{O}_2$ en $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ a través de una reducción sobre platino o paladio a alta temperatura; o iii) por bombardeo de $[^{16}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ con protones (ver Esquema 3.10).

3.5. Radioquímica con Nitrógeno-13

Como en el caso del Oxígeno-15, el Nitrógeno-13 es también un radionucleido muy interesante debido a la abundancia de su isótopo estable, Nitrógeno-14, en la mayoría de los compuestos orgánicos biológicamente activos. Sin embargo, tiene una vida media corta de 9.98min, lo que limita su aplicabilidad como radionucleido PET.

El Nitrógeno-13 es producido en el ciclotrón a través de la reacción nuclear $^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$ como nitrato o nitrito en agua ($[^{13}\text{N}]\text{NO}_x$). Una posterior reducción con la

aleación de DeVarda (Al/Cu/Zn) rinde la más comúnmente utilizada fuente de ^{13}N , $[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$ ¹⁹ (ver Esquema 3.11), que se utiliza directamente en la medida del flujo sanguíneo del miocardio. Otra aplicación del Nitrógeno-13 incluye la producción de aminoácidos marcados con ^{13}N .



Esquema 3.11: Síntesis de compuestos PET marcados con Nitrógeno-13. Obtenido de: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8998-9033.

El Nitrógeno-13 ha sido utilizado para la producción de $[^{13}\text{N}]\text{cis-platin}$ ²⁰, un anticancerígeno muy utilizado (ver Esquema 3.11). Varias metodologías sintéticas, con muy bajos rendimientos, han sido publicadas para su síntesis, pero recientemente ha sido desarrollado un nuevo método más conveniente, que utiliza una resina de intercambio iónico en fase sólida. El método consiste en un proceso de dos pasos que combina la reacción y la posterior purificación: en un primer paso el $[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$ gaseoso se hace reaccionar con una sal de tetraiodoplatino unida a una resina intercambiadora de iones; y en un segundo paso la especie intermedia formada es transformada en el producto final $[^{13}\text{N}]\text{cis-platin}$ a través de una reacción de intercambio de ligandos utilizando cloruro de plata sólido. La síntesis total puede ser llevada a cabo en tan sólo 15 minutos.

A parte de la producción de aminoácidos, el Nitrógeno-13 también ha sido utilizado para la síntesis de otras especies marcadas, como aminas²¹, nitrosoureas²², nitrosaminas²³, nitrosotioles²⁴ y compuestos azo²⁵.

¹Langstrom, B; Lundqvist, H; The preparation of ^{11}C -methyl iodide and its use in the synthesis of ^{11}C -methyl-L-methionine; *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1976**, 27, 357-363.

²Larse, P; Ulin, J; Dahlstrom, K; Jensen, M; Synthesis of $[^{11}\text{C}]\text{iodomethane}$ by iodination of $[^{11}\text{C}]\text{methane}$; *Appl. Radiat. Isot.* **1997**, 48(2), 153-157.

Introducción, justificación y objetivos

- ³Ferrieri, R.A; Production and application of synthetic precursors labeled with carbon-11 and fluorine-18; *Brookhaven National Laboratory*, **2001**.
- ⁴Jewett, D.M; A simple synthesis of [¹¹C]methyl triflate; *Appl. Radiat. Isot.* **1992**, 43(11), 1383-1385.
- ⁵Langstrom, B; Antoni, G; Gullberg, P; Halldin, C; Nagren, K; Rimland, A; Svard, H; The synthesis of 1-¹¹C-labelled ethyl, propyl, butyl and isobutyl iodides and examples of alkylation reactions; *Appl. Radiat. Isot.* **1986**, 37(11), 1141-1145.
- ⁶Wilson, A. A; Garcia, A; Jin, L; Houle, S; Radiotracer synthesis for [¹¹C]-iodomethane: a remarkably simple captive solvent method; *Nucl. Med. Biol.* **2000**, 27(6), 529-532.
- ⁷(a) Lemaire, C; Plenevaux, J.A; Del Fiore, G; Brihaye, C; Le Bars, D; COmar, D; Luxen, A; Solid phase extraction: an alternative to the use of rotator evaporators for solvent removal in the rapid formulation of PET radiopharmaceuticals; *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1999**, 42, 63-75; (b) Maclean, D; Zhu, J; Chen, M; Hale, R; Satymurthy, N; Barrio, J. R; Safety-catch linker strategies for the production of radiopharmaceuticals labeled with positron-emitting isotopes; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10168-10169.
- ⁸Andersson, Y; Cheng, A; Langstrom, B; Palladium-promoted coupling reactions of [¹¹C]methyl iodide with organotin and organoboron compounds; *Acta Chem. Scand.* **1995**, 49, 683-688.
- ⁹Hamill, T. G; Krause, S; Ryan, C; Bonnefous, C; Govek, S; Seiders, T. J; Cosford, N. D. P; Roppe, J; Kamenecka, T; Patel, S; Gibson, R. E; Sanabria, S; Riffel, K; Eng, W. S; King, C; Yang, X. Q; Green, M-D; O'Malley, S. S; Hargreaves, R; Burns, H. D; Synthesis, characterization and first successful monkey imaging studies of metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) PET radiotracers; *Synapse*, **2005**, 56(4), 205-216.
- ¹⁰Hwang, D. R; Simpson, N. R; Montoya, J; Mann, J. J; Laruelle, M; An improved one-pot procedure for the preparation of [¹¹C-carbonyl]-WAY100635; *Nucl. Med. Biol.* **1999**, 26(7), 815-819.
- ¹¹(a) Khilberg, T; Långström, B; Ferm, T; Eriksson, J; Methods and apparatus for productions and use of [¹¹C]carbon monoxide in labeling synthesis; *International patent application*, PCT/IB2005/001939, **2005**; (b) Itsenko, O; Kihlberg, T; Långström, B; Labeling of aliphatic carboxylic acids using [¹¹C]carbon monoxide; *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 798-802; (c) Itsenko, O; Khilberg, T; Långström, B; Synthesis of aliphatic [carbonyl-¹¹C]esters using [¹¹C]carbon monoxide; *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 17, 3830-3834; (d) Rahman, O; Khilberg, T; Långström, B; Aryl triflates and [¹¹C]/(¹³C)carbon monoxide in the synthesis of ¹¹C-/¹³C-amides; *J. Org. Chem.* **2003**, 68(9), 3558-3562; (e) Karimi, F; Khilberg, T; Långström, B; [¹¹C]/(¹³C)carbon monoxide in palladium-mediated synthesis of imides; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2001**, 1, 1528-1531.
- ¹²Landais, P; Crouzel, C; A new synthesis of carbon-11 labelled phosgene; *Appl. Radiat. Isot.* **1987**, 38, 297-300.
- ¹³Andersson, Y; Bergstrom, M; Långström, B; Synthesis of ¹¹C-labelled benzamide compounds as potential tracers for Poly(ADP-ribose) synthetase; *Appl. Radiat. Isot.* **1994**, 45, 707-714.
- ¹⁴(a) Gambhir, S. S; Czernin, J; Schwimmer, J; Silverman, D. H. S; Coleman, E; Phelps, M. E; A tabulated summary of the FDG PET literature; *J. Nucl. Med.* **2001**, 42, 1S-93S; (b) Wienhard, K; Herholz, K; Coenen, H. H; Rudolf, J; Kling, P; Stockling, G. et al; Increased amino acid transport into brain tumors

Introducción, justificación y objetivos

measured by PET of L-(2-¹⁸F)fluorotyrosine; *J. Nucl. Med.* **1991**, 32(7), 1338-1346; (c) Flanagan, F. L.; Dehdasti, F.; Siegel, B. A.; PET in breast cancer; *Semin. Nucl. Med.* **1998**, 28(4), 2.

¹⁵Ehrenkauf, R. E.; Potocki, J. F.; Jewett, D. M.; Simple synthesis of F-18-labeled 2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose: concise communication; *J. Nucl. Med.* **1984**, 25, 333-337.

¹⁶De Vries, E.; Luurtsema, G.; Brüssermann, M.; Elsinga, P.; Vaalburg, W.; Fully automated synthesis module for the high yield one-pot preparation of 6-[¹⁸F]fluoro-L-DOPA; *Appl. Radiat. Isot.* **1999**, 51, 389-394.

¹⁷Been, L. B.; Suurmeijer, A. J. H.; Cobben, D. C. P.; Jager, P. L.; Hoekstra, H. J.; Elsinga, P. H.; [¹⁸F]FLT-PET in oncology: current status and opportunities; *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2004**, 31, 1659-1672.

¹⁸Jones, S. C.; Greenberg, J. H.; Dann, R.; Robinson, G. D.; Kushner, M.; Alavi, A.; Reivich, M.; Cerebral blood flow with the continuous infusion of Oxygen-15-labeled water; *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1985**, 5, 566-575.

¹⁹(a) Suzuki, K.; Yoshida, Y.; Shikano, N.; Kubodera, A.; Development of an automated system for the quick production of ¹³N-labeled compounds with high specific activity using anhydrous [¹³N]NH₃; *Appl. Radiat. Isot.* **1999**, 50, 1033-1038; (b) Sobczyk, D. P.; van Grondelle, J.; de Jong, A. M.; de Voigt, M. J. A.; van Santen, R. A.; Production of chemically pure gaseous [¹³N]NH₃ pulses for PEP studies using a modified DeVarda reduction; *Appl. Radiat. Isot.* **2002**, 57, 201-207.

²⁰Holschbach, M.; Hamkens, W.; Steinbach, A.; Hamacher, K.; Stöcklin, G.; [¹³N]Cisplatin: a fast and efficient on-line synthesis using a solid state support; *Appl. Radiat. Isot.* **1997**, 47, 739-744.

²¹(a) Finn, R. D.; Christman, D. R.; Wolf, A. P.; A rapid synthesis of nitrogen-13 labelled amphetamine; *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1981**, 18, 909-913; (b) Tominaga, T.; Inoue, O.; Suzuki, K.; Yamasaki, T.; Hirobe, N. M.; Synthesis of ¹³N-labeled amines by reduction of ¹³N-labeled amides; *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1986**, 37, 1209-1212.

²²Pettit, W. A.; Tilbury, R. S.; Digenis, G. A.; Mortara, R. H.; A convenient synthesis of ¹³N-BCNU; *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1977**, 13, 119-122.

²³Gómez-Vallejo, V.; Kato, K.; Hanyu, M.; Minegishi, K.; Borrell, J. I.; Llop, J.; Efficient system for the preparation of [¹³N]labeled nitrosamines; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1913-1915.

²⁴(a) Llop, J.; Gómez-Vallejo, V.; Bosque, M.; Quincoces, G.; Peñuelas, I.; Synthesis of S-[¹³N]nitrosoglutathione (¹³N-GSNO) as new potential PET imaging agent; *Appl. Radiat. Isot.* **2009**, 67, 95-99; (b) Gómez-Vallejo, V.; Kato, K.; Oliden, I.; Calvo, J.; Baz, Z.; Borrell, J. I.; Llop, J.; Fully automated synthesis of ¹³N-labeled nitrosothiols; *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 2990-2993.

²⁵Gómez-Vallejo, V.; Borrell, J. I.; Llop, J.; A conveniente síntesis of ¹³N-labelled azo compounds: A new route for the preparation of amyloid Imaging PET probes; *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 5318-5323.

4. QUÍMICA DEL CARBORANO

4.1. Introducción

Durante la última década, el papel de los carboranos tanto en la química orgánica como en la química inorgánica ha cambiado drásticamente, debido a que la química del carborano ha ido expandiéndose hacia áreas de química médica e imagen molecular¹.

Los heteroboranos poliédricos han sido objeto de estudio durante los últimos 40 años. Un subconjunto de esta extensa clase de compuestos lo forman los dicarba-*closo*-dodecaboranos, comúnmente conocidos como carboranos (una abreviatura de la familia de compuestos que la IUPAC denomina carbaboranos), que tienen como fórmula general: $C_2B_{10}H_{12}$. La síntesis y propiedades de los dicarba-*closo*-dodecaboranos fueron descritas por primera vez a finales de 1963² y su química es una de las más completas en el campo de los boranos y heteroboranos.

Los carboranos icosaédricos presentan propiedades inusuales tales como: i) un alto contenido en boro; ii) una alta estabilidad térmica y química; iii) una superficie hidrofóbica; y iv) una geometría esférica³.

BNCT: Boron Neutron Capture Therapy (Terapia de la captura del neutrón del boro)

Históricamente, la principal aplicación de la química de los carboranos dentro de la química médica se encuentra en el campo de la terapia conocida como BNCT (Boron Neutron Capture Therapy o Terapia de la captura del neutrón del boro), que fue propuesta inicialmente por Locher en 1936. Es una terapia binaria de radiación que tiene la habilidad de “matar” selectivamente células tumorosas dentro de tejidos sanos y normales^{4,5}. En esta modalidad terapéutica, se parte de la administración de compuestos con alto contenido en átomos de Boro-10 (^{10}B) que se hacen llegar a las células malignas de modo intravenoso. A continuación el isótopo no radiactivo de ^{10}B capta neutrones, como consecuencia de una irradiación focalizada sobre la zona a tratar con neutrones térmicos de baja energía, rindiendo dos núcleos: $^4He^{2+}$, que es un núcleo de alta energía (partícula α) y $^7Li^{3+}$ (ver Esquema 4.1). Los núcleos de 7Li y 4He son de pequeño rango (aproximadamente del diámetro de una célula) y son capaces de causar un daño significativo en la célula tumoral sin dañar el resto del tejido sano.

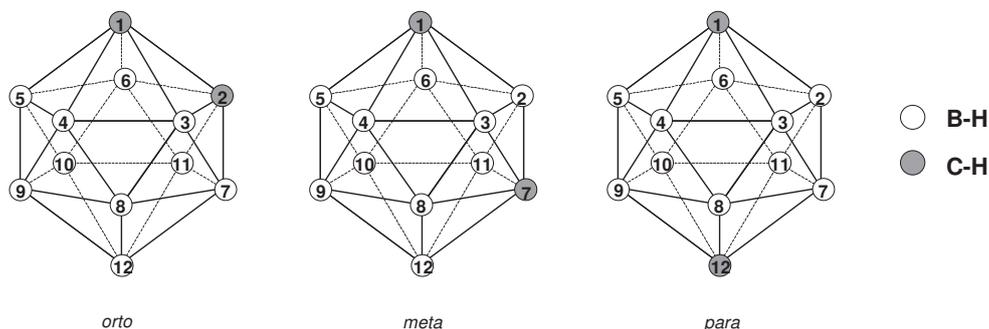


Figura 4.1: Estructura y numeración de los átomos de los clusters *orto*-, *meta*- y *para*-carborano.

La síntesis del *orto*-carborano fue publicada por primera vez en 1963 por dos grupos^{2,10}. Los *orto*-carboranos son sintetizados a partir de la reacción de acetilenos, incluyendo tanto los alquinos mono-sustituidos como di-sustituidos, con $B_{10}H_{12}L_2$, que se genera, normalmente *in situ*, a partir del decaborano ($B_{10}H_{14}$) y de una base de Lewis débil ($L = CH_3CN, RSR, R_3N$). Las reacciones tienen lugar en acetonitrilo o tolueno como disolvente y son calentadas varias horas (6-24h). La reacción de $B_{10}H_{12}L_2$ con el acetileno puede llevarse a cabo en presencia de un amplio espectro de grupos funcionales, incluyendo ésteres, haluros, carbamatos, éteres, grupos nitro, etc. Sin embargo la reacción no puede transcurrir en presencia de especies nucleofílicas como alcoholes, ácidos o aminas. En este caso, los grupos funcionales con carácter nucleofílico deben protegerse antes de la conversión del alquino en carborano, debido a que los grupos polares degradan el complejo $B_{10}H_{12}L_2$, obteniendo muy pobres rendimientos para el compuesto deseado. De todas formas, los rendimientos obtenidos para la síntesis de carboranos son bastante modestos, rondando el 40-60%.

Los isómeros *meta*- y *para*-carborano se preparan a partir del *orto*-carborano por isomerización térmica bajo atmósfera inerte. A 400-500°C el *orto*-carborano se convierte en *meta*-carborano; el cual rinde el *para*-carborano^{11,13} a 600-700°C. El mecanismo de isomerización ha sido objeto de cierto interés¹²⁻¹⁵.

Un aspecto único de la química de los carboranos es que los átomos de carbono y los de boro presentan reactividades ortogonales. Por un lado, los grupos CH de la caja del carborano son débilmente ácidos (pK_a (*orto*) = 22.0, pK_a (*meta*) = 25.6, pK_a (*para*) = 26.8)¹⁶ y pueden desprotonarse fácilmente generando nucleófilos. Por otro lado, los vértices de boro son altamente reactivos en presencia de especies electrofílicas. Por tanto, es posible sintetizar regioselectivamente una amplia variedad de carboranos derivados en C y/o en B sin necesidad de utilizar una compleja estrategia de grupos protectores¹.

Caracterización

Los carboranos pueden caracterizarse rápidamente por medio de métodos tradicionales como la cristalografía de Rayos X, la resonancia magnética nuclear (RMN), la espectroscopía por infrarrojos (IR), etc^{3,16-18}. Por otro lado, también es posible monitorizar el progreso de una reacción en la que intervenga la unidad de carborano por medio de cromatografía de capa fina (TLC), utilizando varios reveladores.

En el caso particular del IR, hay varios datos de frecuencias típicas que pueden considerarse importantes a la hora de caracterizar el derivado de carborano. Para el enlace BH hay dos frecuencias: 2600cm^{-1} para el *closo*-carborano y 2520cm^{-1} para el derivado *nido*-carborano. Para el enlace CH las frecuencias importantes son: 3065cm^{-1} (*para*), 3070cm^{-1} (*meta*) y 3079cm^{-1} (*orto*).

En cuanto a la resonancia magnética nuclear, cabe destacar que los carboranos exhiben una señal ancha entre 3.00 y -0.75 ppm en $^1\text{H-NMR}$ para los protones unidos directamente a los átomos de boro. Sin embargo los protones unidos a los átomos de carbono (CH) aparecen como singletes bien definidos entre 2 y 3.5 ppm. En el caso de los carboranos en su forma *nido*, exhiben un característico doblete entre -2.5 y -3.0 ppm. Pese a que los dos isótopos de boro (^{10}B y ^{11}B) son activos, solamente el más abundante (80.3%), el ^{11}B , es utilizado en RMN¹⁷. El espectro de resonancia de boro consiste en una serie de señales dobles como consecuencia del acoplamiento con sus átomos de hidrógeno ($J = 125\text{-}205\text{ Hz}$).

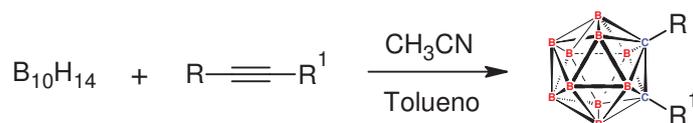
La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede utilizarse para caracterizar la pureza de los derivados de carborano y para medir los valores de $\log P$ (coeficiente de partición o de reparto)¹⁹, que se usan para estimar la distribución de los fármacos en el cuerpo. Los fármacos con elevados coeficientes de partición son hidrófobos y se encuentran preferentemente en entornos hidrofóbicos como las capas lipídicas de las células; mientras que los fármacos con bajos coeficientes de partición son hidrofílicos y se encuentran en entornos hidrofílicos como el suero sanguíneo.

4.3. Síntesis y reactividad

Los dicarba-*closo*-dodecaboranos han sido los carboranos más investigados durante los últimos 40 años. El primer *orto*-carborano fue obtenido por reacción del acetileno con un complejo formado previamente a partir del decaborano y una base de

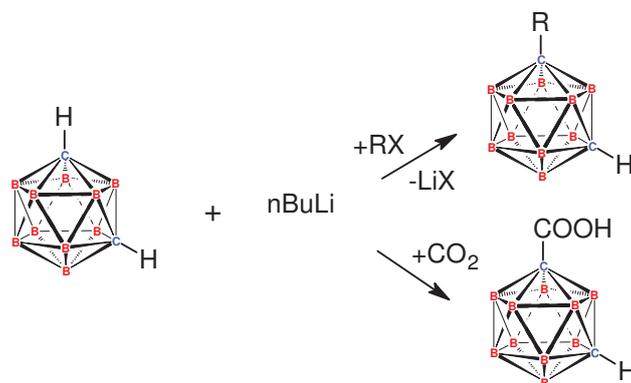
Lewis^{2,10}. Desde entonces una amplia variedad de rutas sintéticas han sido empleadas para incorporar diferentes sustituyentes en el *closo*-carborano^{3,20-22}. Sin embargo, la mayoría de los derivados de carborano han sido preparados a partir de alquinos sustituidos o por litiación del carborano seguido de una adición electrofílica.

La llamada “inserción alquina” es un método que parte del decaborano, que se encuentra disponible comercialmente, y un alquino en un disolvente orgánico, calentando a reflujo (ver Esquema 4.2). Los dos átomos de carbono alquilínicos son incorporados a la caja de borano para generar un clúster de C₂B₁₀, donde los sustituyentes del alquino quedan en posición *exo* respecto al cluster. Así, pueden obtenerse *closo*-carboranos tanto mono-¹⁰ como difuncionalizados²³ con rendimientos modestos (20-40%). Sin embargo, publicaciones recientes muestran que la eficiencia de este tipo de reacciones puede incrementarse introduciendo un líquido iónico en el medio de reacción²⁴. Las reacciones de inserción de alquinos no son apropiadas para alquinos que contengan grupos nucleofílicos, ya que deben ser protegidos primeramente. De hecho, esta metodología es únicamente aplicable para la preparación de derivados de *orto*-carborano.



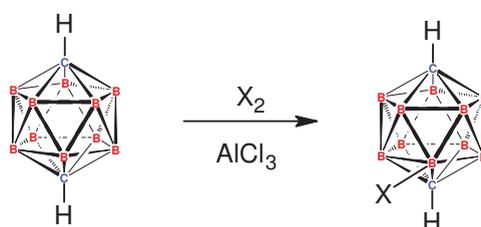
Esquema 4.2: Inserción de alquinos para generar *closo-orto*-carboranos sustituidos (R, R¹ = alquilo, arilo).

La segunda ruta de síntesis de estos derivados implica la desprotonación de uno o de los dos protones CH por medio de una base fuerte, generalmente un reactivo derivado de litio (MeLi, nBuLi, PhLi, etc), seguido de una adición electrofílica con un reactivo electrófilo, como haluros de alquilo o arilo, halógenos, aldehídos, CO₂, cloruros de ácido, etc. El impedimento estérico de los carboranos requiere que el agente electrófilo sea razonadamente reactivo y poco impedido para proceder con rendimientos decentes. Dependiendo de la estequiometría elegida y de la concentración de la reacción, se obtendrá el carborano mono- o disustituido. Un ejemplo de esta metodología es la inserción de un grupo ácido carboxílico (ver Esquema 4.3), que puede ser derivatizado a posteriori para convertirse en grupos funcionales biológicamente importantes, como las amidas. Una ventaja de este método es que puede ser aplicado tanto al *orto*, como al *meta* y al *para*-carborano; aunque la acidez de los protones CH de los tres isómeros decrece en el orden de *orto*>*meta*>*para*²⁵. Esto es debido a la alta electronegatividad del carbono próximo en el caso del isómero *orto*, comparada con la de los vértices de boro adyacentes en los otros dos isómeros.



Esquema 4.3: Síntesis del closo-*meta*-carborano monosustituido vía litiación/adición electrofílica.

Menos común es la sustitución electrofílica sobre el vértice de BH, que sí es posible debido a los enlaces deslocalizados presentes en el carborano. Esta metodología se lleva a cabo por reacción del carborano con un halógeno en presencia de un ácido de Lewis, como cloruro de aluminio (AlCl_3) (ver Esquema 4.4)^{19, 26}. A partir de este derivado es posible llevar a cabo una siguiente sustitución sobre el vértice BX. También es posible convertir los vértices del *para*-carborano monohalogenado en deca-B-metil-*p*-carborano, undecametil-*p*-carborano e incluso dodecametil-*p*-carborano²⁷. De hecho, este último compuesto puede considerarse como un sustituto estereoquímico del C_{60} ²⁸.

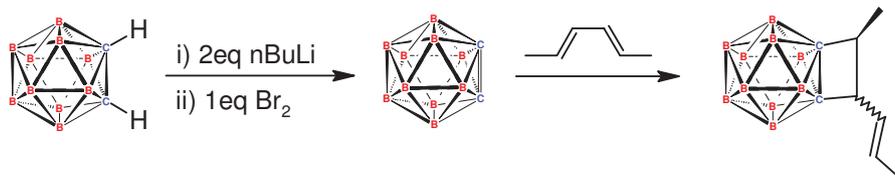


Esquema 4.4: Halogenación del closo-*para*-carborano sobre el vértice BH.

La derivatización de los vértices de boro puede ser llevada a cabo usando un gran número de estrategias. El tratamiento del *orto*-carborano en amoníaco líquido con metales alcalinos (Na, K), seguido de una oxidación por medio de manganato de potasio(VII) o cloruro de cobre(I) (KMnO_4 o CuCl), da como resultado la formación del 3-amino-*orto*-carborano²⁹. El grupo amino puede ser convertido posteriormente en otros grupos funcionales por medio de la formación del ión de diazonio.

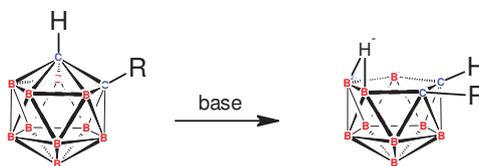
Por último, cabe destacar las reacciones de cicloadición, que han ido emergiendo recientemente como una ruta alternativa e interesante para derivatizar *orto*-carboranos. Como se puede ver en el Esquema 4.5³⁰, el tratamiento del *orto*-carborano con *n*-butil litio ($n\text{BuLi}$), seguido de una adición de bromo molecular (Br_2) da

como resultado la formación de un carboranilalqueno. Estas especies sufren cicloadiciones con una amplia variedad de moléculas orgánicas insaturadas, incluyendo dienos, tiofenos y alquinos dando lugar a reacciones de cicloadición Diels-Alder tipo 2 + 2 y 4 + 2³¹. Pese a que a menudo se obtienen mezclas de productos, estas reacciones dan lugar a compuestos que no se pueden obtener a través de ninguna otra vía sintética.



Esquema 4.5: Derivatización del *ortho*-carborano vía cicloadición.

En cuanto a la reactividad, los *closo*-carboranos en presencia de una base apropiada se degradan, formando la especie monoaniónica *nido*-carborano [H₂C₂B₉H₁₀]⁻ por pérdida de uno de los átomos de boro^{3, 20}. El átomo de hidrógeno unido al ahora ausente décimo vértice de boro, queda formando un puente entre dos de las unidades BH (ver Esquema 4.6). Bases fuertes como hidróxido de sodio (NaOH) degradan rápidamente los *closo*-carboranos y por ello no son apropiadas para aquellas especies que contengan grupos funcionales reactivos o sensibles a bases. El método más común de generar *nido*-carboranos es el que sigue el procedimiento de Wade³², donde la especie *closo* se calienta en agua o en mezclas de disolventes acuosos (sin base) en presencia de iones fluoruros. El agua, en este caso, actúa como base, llevando a cabo la deboronación, que es acompañada por la formación del ácido bórico [B(OH)₃]_x. Este último es rápidamente convertido en BF₄⁻ por acción de los iones de fluoruro. El flúor, presente como MF (M = Na, K) o RN₄F (R = H, alquilo), previene que la reacción de deboronación se pare debido al cúmulo de ácido *in situ*, y desplaza el equilibrio termodinámico hacia la especie BF₄⁻, que dirige la reacción hacia su finalización.



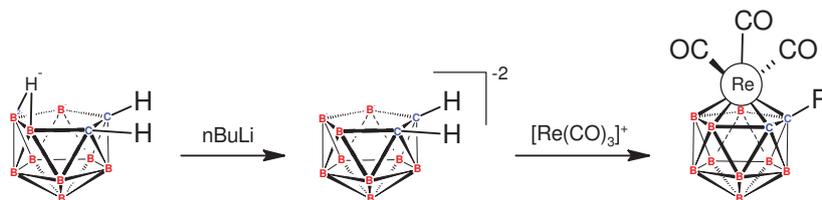
Esquema 4.6: Formación de la especie *nido*-carborano por deboronación.

Las condiciones necesarias para formar la especie *nido* son altamente dependientes de la naturaleza de los sustituyentes. Los *closo*-carboranos que llevan sustituyentes básicos o electrón-atractores fuertes (como ésteres o aldehídos) en uno de los vértices de CH, forman más rápidamente la especie *nido* que aquellos que

poseen los sustituyentes electrón-dadores. De hecho, algunos pueden deboronar una posición en agua a temperatura ambiente en ausencia de iones fluoruros³³. El grado de degradación depende del disolvente y no ocurre para todos los sustituyentes electrón-atradores (por ejemplo, con los carbamatos). Por otro lado, esta degradación en condiciones neutras no se da en los isómeros *meta*.

Los *nido*-carboranos son estables indefinidamente en disolución y así pueden sufrir un amplio número de reacciones bajo las condiciones adecuadas. La adición de haluros de boro sustituidos del tipo RBX_2 ($\text{X} = \text{Br}, \text{I}$) da como resultado la regeneración de la caja, formando el *closo*-carborano de nuevo a partir de la forma *nido*³⁴. Este nuevo *closo*-carborano contendrá, además, un vértice BR ($\text{R} = \text{alquilo, arilo}$) adyacente a los dos vértices de carbono de la caja. Por otro lado, la estructura *nido* se mantiene con reacciones con halógenos X_2 ($\text{X} = \text{Br}, \text{I}$). En este caso se da una adición electrofílica sobre el puente formado entre los dos vértices BH, dando lugar a un cluster monohalogenado³⁵. Este tipo de compuestos han sido muy utilizados recientemente en la producción de nuevos radiofármacos.

Cabe destacar el caso de los metalocarboranos. El puente de hidrógeno existente en la forma *nido* puede ser destruido con una base fuerte como nBuLi o epóxido de talio (TIOEt) para formar el dianión $[\text{H}_2\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_9]^{2-}$ (ver Esquema 4.7). Así, el *nido*-carborano puede actuar como ligando para una amplia variedad de metales de los bloques d y p, exhibiendo diferentes heptacidades ($\eta = 2-5$), dependiendo de los requerimientos electrónicos del metal.



Esquema 4.7: Desprotonación y metalación del *nido-orto*-carborano.

Debido a que la reactividad de los *nido*-carboranos decrece sustancialmente desde el *orto* hasta *meta* y *para*, la mayoría de los metalocarboranos descritos en la literatura contienen el isómero *orto*.

Por otro lado, la similitud en la reactividad entre los átomos B3/B6 y B2/B3 en los isómeros *orto* y *meta*-carborano tiene importantes implicaciones en la química médica. Cuando carboranos sustituidos son convertidos en sus correspondientes formas *nido*, se produce una mezcla enantiomérica 1:1. Estos enantiómeros pueden ser separados por recristalización, usando un contador de iones quiral, o por HPLC³⁶.

4.4. Los carboranos en la química médica

Durante la pasada década el papel de los carboranos en la química inorgánica ha cambiado drásticamente como consecuencia de la expansión de la química del carborano hacia áreas de *drug discovery* e imagen molecular. El interés inicial por los carboranos en la química médica es resultado de su alto contenido en boro y su estabilidad al catabolismo, que son importantes criterios a tener en cuenta en la terapia del BNCT. Sin embargo la química médica del carborano está actualmente envuelta en un campo de aplicación más amplio. Más recientemente se ha demostrado que los carboranos pueden ser utilizados para mejorar las interacciones hidrofóbicas entre los fármacos y sus receptores y para incrementar la estabilidad *in vivo*; y por lo tanto, la biodisponibilidad de compuestos que normalmente son rápidamente metabolizados¹. Estas propiedades, junto con su química, que incluye la oportunidad de marcar los clústeres con radionucleidos de diagnóstico, hacen de los carboranos una familia atractiva de sintones a partir de los cuales poder preparar nuevos fármacos y radiofármacos.

Cuando se prepara una serie de derivados de un farmacóforo específico, resulta una opción interesante considerar la incorporación del dicarba-*closo*-dodecaborano como sustituyente o parte de la molécula básica, especialmente si las interacciones hidrofóbicas son un componente importante en la unión al receptor.

Los carboranos pueden incorporarse en biomoléculas a través de diferentes estrategias, siempre dependiendo del tipo de enlace que quiera formarse con él. Normalmente, se considera la unidad de dicarba-*closo*-dodecaborano como sustituto de un grupo fenilo, ya que el volumen ocupado por el carborano es similar al movimiento tridimensional de un grupo fenilo¹⁰.

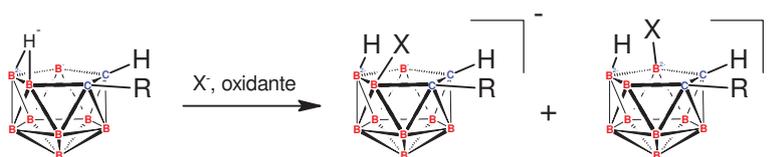
El desarrollo de nuevos métodos para la preparación de carboranos funcionalizados es una parte esencial de la química médica de los carboranos y actualmente sigue siendo objeto de estudio.

4.5. Los carboranos y la imagen molecular

Desde el trabajo pionero de Hawthorne en 1985³⁷, Wilbur³⁸, Sjöberg, Tomalchev y otros han dado importantes pasos en el uso de los carboranos para su radiohalogenación en biomoléculas. El método general de radiohalogenación parte del

Introducción, justificación y objetivos

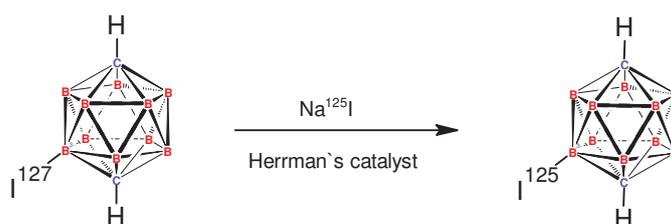
nido-carborano, que es tratado con yodo radiactivo ($I-131$), que es ampliamente utilizado en medicina nuclear para el tratamiento del hipertiroidismo, en presencia de un agente oxidante (ver Esquema 4.8) para preparar el derivado yodado radiactivo deseado.



Esquema 4.8: Método general de radiohalogenación de *nido*-carboranos.

Pese a que los *nido*-carboranos han sido más utilizados que sus formas *closo* en las radiohalogenaciones, debido a sus cortos tiempos de síntesis y su solubilidad en agua, se ha demostrado que la naturaleza hidrofóbica del *closo*-carborano no impide su utilización como radiofármaco, lo que lo convierte en un interesante candidato para experimentos de PET y SPECT.

Sjöberg y Tolmachev focalizaron sus primeros experimentos en reacciones de halogenación con Iodo- 125^{39} . Su estrategia se basaba en la preparación de los derivados yodados no radiactivos de los isómeros *orto*, *meta* y *para*-carborano usando una metodología previamente establecida, que eran posteriormente intercambiados con yodo radiactivo (ver Esquema 4.9). Para llevar a cabo esta reacción de intercambio de yodo es necesario utilizar un catalizador de paladio ($[Pd(dba)_3]$), que rinde aproximadamente un 80% de conversión. Cambiando este catalizador por el catalizador de Herrmann el rendimiento aumenta por encima del 90%⁴⁰.



Esquema 4.9: Radioyodación de 2-iodo-para-carborane.

¹Valliant, J.F; Guenther, K.J; King, A.S; Morel, P; Schaffer, P; Sogbein, O.O; Stephenson, K.A; The medicinal chemistry of carboranes, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232, 173-230.

Introducción, justificación y objetivos

- ²Fein, M.M; Bobinski, J; Mayes, N; Schwartz, N; Cohen, M.S; Carboranes I: The preparation and chemistry of 1-isopropenylcarborane and its derivatives (a new family of stable clovoboranes); *Inorg. Chem.* **1963**, 2, 1111-1115.
- ³Bregadze, V.I; Dicarba-closo-dodecaboranes $C_2B_{10}H_{12}$ and their derivatives; *Chem. Rev.* **1992**, 92, 209-223.
- ⁴Barth, R.F; Coderre, J.A; Vicente, M.G; Blue, T.E; Boron Neutron Capture Therapy of cancer: current status and future prospects; *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11, 3987-4002.
- ⁵Hawthorne, M.F; Maderna, A; Applications of radiolabeled boron clusters to the diagnosis and treatment of cancer; *Chem. Rev.* **1999**, 99, 3421-3434.
- ⁶Javid, M; Brownell, G.L; Sweet, W.H: The possible use of neutron-capturing isotopes such boron-10 in the treatment of neoplasm. II. Computation of the radiation energies in normal and neoplastic brain; *J. Clin. Invest.* **1952**, 31, 604-610.
- ⁷Hawthorne, M.F; New horizons for therapy based on the boron neutron capture reaction; *Mol. Med. Today*, **1998**, 4, 174-181.
- ⁸(a)Armstrong, A.F; Valliant, J.F; The bioinorganic and medicinal chemistry of carboranes: from new drug discovery to molecular imaging and therapy; *Dalton Trans.* **2007**, 4240-4251; (b) Endo, Y; Ijima, T; Yamakoshi, Y; Fukasawa, H; Shudo, K. J; *Med. Chem.* **1999**, 42, 1501-1504; (c) Ogawa, T; Ohta, K; Yoshimi, T; Yamazaki, H; Suzuki, T; Ohta, S; Endo, Y; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3943-3946.
- ⁹(a) Muetterties, E. L; Knoth, W. H; Polyhedral boranes; *Marcel Dekker*, New York, **1968**; (b) Grimes, R. N; Carboranes; *Academic Press*, New York, **1970**; (c) Casanova, J; The borane, carborane, carbocation continuum; *Wiley*, New York, **1998**.
- ¹⁰Heying, T.L; Ager, J.W; Clark, S.L; Mangold, D.J; Goldstein, H.L; Hillman, M; Polak, R.J; Szymanski, J.W; A new series of organoboranes. I. Carboranes from the reaction of decaborane with acetylenic compounds; *Inorg. Chem.* **1963**, 2 (6), 1089-1092.
- ¹¹Papetti, S; Heying, T.L; p-carborane (1, 12-dicarboclovdodecaborane (12)); *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2295.
- ¹²Hoffmann, R; Lipscomb, W.N; Intramolecular isomerization and transformations in carboranes and substituted polyhedral molecules; *Inorg. Chem.* **1963**, 2 (1), 231-232.
- ¹³Grafstein, D; Dvorak, J; Neocarboranes, a new family of stable organoboranes isomeric with the carboranes; *Inorg. Chem.* **1963**, 2 (6), 1128-1133.
- ¹⁴Kaeszi, H.D; Bau, R; Beall, H.A; Lipscomb, W.N; Rearrangements in the icosahedral carboranes, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89 (16), 4218-4220.
- ¹⁵Kaczmarczyk, A; Dobrott, R.D; Lipscomb, W.N; Reactions of $B_{10}H_{10}^{2-}$ ion; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1962**, 48, 729-733.
- ¹⁶Leites, L.A; Vibrational spectroscopy of carboranes and parent boranes and its capabilities in carborane chemistry, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 279-323.

Introducción, justificación y objetivos

- ¹⁷Heřmánek, S; ¹¹B NMR spectra of boranes, main-group heteroboranes and substituted derivatives. Factors influencing chemical shifts of skeletal atoms; *Chem. Rev.* **1992**, 92, 325-362.
- ¹⁸Reynhardt, E.C; ¹³C, ¹⁰B, and ¹¹B NMR in *o*-carborane; *J. Mag. Res.* **1986**, 69, 337-343.
- ¹⁹Yamamoto, K; Endo, Y; Utility of boron clusters for drug design. Hansch-Fujita hydrophobic parameters π of dicarba-*closo*-dodecaboranyl groups; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2389-2392.
- ²⁰Williams, R.E; The polyborane, carborane, carbocation continuum: architectural patterns; *Chem. Rev.* **1992**, 92, 177-207.
- ²¹Grimes, R.N; Metallocarboranes in the new millennium; *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 200-202, 773-811.
- ²²Deng, L; Xie, Z; A journey from 12-vertex to 14-vertex carboranes and to 15-vertex metallocarboranes; *Organometallics*, **2007**, 26, 1832-1845.
- ²³Fein, M.M; Grafstein, D; Paustian, J.E; Bobinski, J; Lichstein, B.M; Mayes, N; Schartz, N.N; Cohen, M.S; Carboranes II. The preparation of 1- and 1,2-substituted carboranes; *Inorg. Chem.* **1963**, 2, 1115-1119.
- ²⁴(a) Kusari, U; Li, Y; Bradley, M.G; Sneddon, L.G; Polyborane reactions in ionic liquids: new efficient routes to functionalized decaborane and *o*-carborane clusters; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8662-8663; (b) Li, Y; Kusari, U; Carroll, P.J; Bradley, M.G; Sneddon, L.G; Polyborane reactions in ionic liquids; *Pure Appl. Chem.* **2006**, 78, 1349-1355.
- ²⁵Shatenshtein, A.I; Zakharkin, L.I; Petrov, E.S; Yakovleva, E.A; Yakushin, F.S; Vukmirovich, Z; Isaeva, G.G; Kalinin, V.N; The equilibrium and kinetic acidities of isomeric carborane methines; *J. Organomet. Chem.* **1970**, 23, 313-332.
- ²⁶Jiang, W; Knobler, C.B; Curtis, C.E; Mortimer, M.D; Hawthorne, M.F; Iodination reactions of icosahedral para-carborane and the synthesis of carborane derivatives with boron-carbon bonds; *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 3491-3498.
- ²⁷Jiang, W; Knobler, C.B; Mortimer, M.D; Hawthorne, M.F; A camouflaged icosahedral carborane: dodecamethyl-1,12-dicarba-*closo*-dodecaborane(12) and related compounds; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1332-1334.
- ²⁸Herzog, A; Knobler, C.B; Hawthorne, M.F; Maderna, A; Siebert, W; Camouflaged carboranes as surrogates for C₆₀: syntheses of functionalized derivatives by selective hydroxyalkylation; *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1045-1048.
- ²⁹(a) Zakharkin, L.I; Kalinin, V.N; Gedymin, V.V; Synthesis and some reaction of 3-amino-*o*-carboranes; *J. Organomet. Chem.* **1963**, 16, 371-379; (b) Kasar, R.A; Knudsen, G.M; Kahl, S.B; Synthesis of 3-amino-1-carboxy-*o*-carborane and an improved, general method for the synthesis of all three C-amino-C-carboxycarboranes; *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 2936-2940.
- ³⁰Gingrich, H.L; Ghosh, T; Huang, Q; Jones, M; 1,2-dehydro-*o*-carborane; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4082-4083.
- ³¹(a) Ghosh, T; Gingrich, H.L; Kam, C.K; Mobraaten, E.C; Jones, M; Reactions of 1,2-dehydro-*o*-carborane with dienes; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1313-1318; (b) Deng, L; Chan, H-S; Xie, Z;

Introducción, justificación y objetivos

Nickel-mediated regioselective [2 + 2 + 2] cycloaddition of carbonyne with alkynes; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 7728-7729; (c) Ho, D.M; Cunningham, R.J; Brewer, J.A; Bian, N; Jones, M; Reaction of 1,2-dehydro-o-carborane with acetylenes. Synthesis and structure of a carborane analogue of benzocyclobutadiene; *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 5274-5278; (d) Barnett-Thamattoor, L; Zheng, G; Ho, D.M; Jones, M; reactions of 1,2-dehydro-o-carborane with thiophenes. Cycloadditions and an easy synthesis of "Benzo-o-carborane"; *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 7311-7315.

³²Fox, M.A; MacBride, H; Wade, K; Fluoride-ion deboronation of p-fluorophenyl-ortho- and meta-carboranes. NMR evidence for the new fluoroborate, HOBHF_2^- ; *Polyhedron*, **1997**, 16, 2499-2507.

³³Powell, C.L; Schulze, M; Black, S.J; Thompson, A.S; Threadgill, M.D; Closo-nido cage degradation of 1-(substituted-phenyl)-1,2-dicarbododecaborane(12)s in wet DMSO under neutral conditions; *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 1251-1254.

³⁴(a) Hawthorne, M.F; Wegner, P.A; The reconstruction of the 1,2-dicarbododecaborane(12) structure by boron-atom insertion with (3)-1,2-dicarbollide ions; *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 896-901; (b) Hawthorne, M.F; Wegner, P.A; B-phenyl-1,2-dicarbododecaborane(12) from $\text{B}_9\text{C}_2\text{H}_{11}^{2-}$ through an insertion reaction; *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 4392-4393.

³⁵Olse, F.P; Hawthorne, M.F; Halodicarbaundecaborate(11) ions; *Inorg. Chem.* **1965**, 4, 1839-1840.

³⁶(a) Svantesson, E; Pettersson, J; Olin, Å; Marjides, K; Sjöberg, S; A kinetic study of the self-degradation of o-carboranylalanine to nido-carboranylalanine in solution; *Acta Chim. Scand.* **1999**, 53, 731-736; (b) Grüner, B; Holub, J; Plešek, J; Vaněk, T; Votavová, H; high-performance liquid chromatographic enantiomeric resolution in the ten-vertex carborane series. Comparison of acetyl- and native β -cyclodextrin bonded chiral stationary phases; *J. Chromatogr. A*; **1998**, 793, 249-256.

³⁷Mizusawa, E.A; Thompson, M.R; Hawthorne, M.F; Synthesis and antibody-labeling studies with the p-isothiocyanatobenzene derivatives of 1,2-dicarbododecaborane(12) and the dodecahydro-7,8-dicarbododecaborate(1-) ion for neutron-capture therapy of human cancer. Crystal and molecular structure of $\text{Cs}^+[\text{nido-7-(p-C}_6\text{H}_4\text{NCS)-9-I-7,8-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11}]^-$; *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 1911-1916.

³⁸Wilbur, D. S; Hamlin, D. K; Livesey, J. C; Srivastava, R. R; Laramore, G. E; Griffin, T. W; Synthesis and radioiodination of a nido-1,2-carboranyl derivative of 2-nitroimidazole; *Nucl. Med. Biol.* **1994**, 21, 601-611.

³⁹Eriksson, L; Tolmachev, V; Sjöberg, S; Feasibility of palladium-catalyzed isotopic exchange between sodium [^{125}I] and 2-iodo-para-carborane; *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2003**, 46, 623-631.

⁴⁰Winberg, K. J; Barberá, G; Eriksson, L; Teixidor, F; Tolmachev, V; Viñas, C; Sjöberg, S; High yield [^{125}I]iodide-labeling of iodinated carboranes by palladium-catalyzed isotopic exchange; *J. Organomet. Chem.* **2003**, 680, 188-192.

5. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La singularidad de las instalaciones de la Unidad de Imagen Molecular ubicada en el centro de investigación cooperativa en biomateriales CICbiomaGUNE y que inició su actividad en el año 2010, ofrece una oportunidad única y excepcional de llevar a cabo labores de investigación científica en un área de conocimiento en continuo auge y desarrollo, debido a que es la primera unidad de imagen *in vivo* en el entorno preclínico localizada en el País Vasco. La Unidad de Imagen Molecular alberga, en sus 900 m², tanto equipamientos de alto valor tecnológico como un ciclotrón y diferentes modalidades de técnicas de imagen (PET, SPECT, TC y RMI), como un completo animalario, lo que le ha valido su consideración como Instalación Científico-Tecnológica Singular (ICTS) por el Ministerio español de Ciencia e Innovación. Tanto su importancia como su naturaleza estratégica de investigación justifican su disponibilidad a todos los grupos de investigación y a la sociedad en general, proveyendo servicios y colaboración a toda la comunidad científica nacional e internacional y convirtiéndola en herramienta esencial para el desarrollo de investigaciones científico-tecnológicas competitivas y de calidad.

El presente trabajo es la primera Tesis Doctoral desarrollada íntegramente y defendida en el País Vasco en las áreas de conocimiento de radioquímica e imagen *in vivo* mediante PET. Debido a esta excepcional circunstancia se ha llevado a cabo un esfuerzo adicional en la parte de Introducción teórica recogiendo y difundiendo los aspectos más relevantes de las disciplinas de imagen molecular y radioquímica con el humilde propósito de que pueda servir como “documento de referencia” tanto a futuros estudiantes de tesis doctoral como a científicos y profesionales que puedan no estar muy familiarizados con estas áreas de conocimiento.

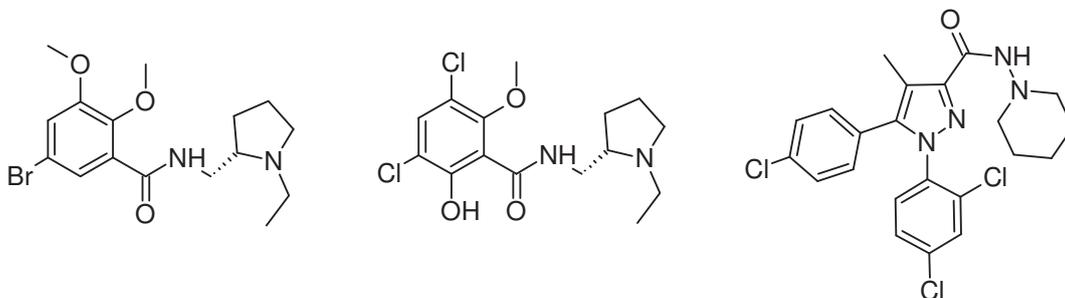
El trabajo científico realizado en esta Tesis Doctoral titulada “Desarrollo de nuevos análogos de ligandos de receptores D₂ que incorporan una unidad dicarba-closo-dodecaborano: marcaje con carbono-11 y evaluación *ex vivo* e *in vivo*” se ha llevado a cabo en las instalaciones de la Unidad de Imagen Molecular de CICbiomaGUNE, lo que ha posibilitado que la presente Tesis resulte ser un trabajo multidisciplinar que abarca desde la síntesis orgánica hasta la utilización de las técnicas de imagen molecular para una evaluación preliminar de los compuestos desarrollados.

Como ya se ha expuesto anteriormente, la imagen molecular es un campo de investigación en continuo crecimiento y expansión, debido a que aporta importante información sobre funciones celulares y procesos moleculares de una manera no

invasiva. Como consecuencia, el objetivo principal de este trabajo científico es la síntesis de nuevos radiotrazadores PET para la visualización de procesos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson.

Por otro lado, la síntesis orgánica de los compuestos que a continuación se describen se basa en la utilización de una unidad de dicarba-*closo*-dodecaborano como estructura básica en sustitución de un anillo de fenilo para la preparación de los compuestos deseados. Pese a que la química de los carboranos es conocida y utilizada desde hace varias décadas, la preparación de radiotrazadores basados en su estructura ha sido escasamente abordada. De hecho, a parte de ciertos avances en el marcaje radiactivo de metalocarboranos y la utilización del Iodo-125, podría decirse que este campo de investigación permanece inexplorado, sobre todo con radioisótopos de vida media corta. Por tanto, uno de los objetivos de este trabajo es desarrollar un método efectivo y reproducible para la radiosíntesis de derivados de carborano incorporando el radionucleido Carbono-11.

Para ello, el trabajo que a continuación se expondrá viene dividido en dos partes: la primera parte viene dedicada a la síntesis de una pequeña librería de ligandos, dopaminérgicos y cannabinoides (análogos de la Racloprida y FLB-457, y del Rimonabant, respectivamente. Ver Esquema 5.1), conteniendo una unidad de dicarba-*closo*-dodecaborano; la segunda parte está dedicada a la aplicación de los ligandos dopaminérgicos descritos en el campo de la imagen molecular, tanto *ex vivo* como *in vivo*.



Esquema 5.1: Estructuras químicas del FLB-457 (izquierda), Racloprida (centro) y Rimonabant (derecha).

Por tanto, los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral son:

1. Desarrollar una estrategia sintética para la obtención de los derivados análogos de benzamidas sustituidas deseadas, incorporando una unidad de dicarba-*closo*-dodecaborano.

2. Desarrollar una estrategia sintética para la obtención de los compuestos precursores y de referencia necesarios para la radiosíntesis con carbono-11 de los derivados de carborano deseados.
3. Llevar a cabo estudios de estabilidad de los ligandos de referencia.
4. Desarrollar una estrategia sintética para la obtención de los derivados análogos de diaril pirazoles, incorporando una unidad de dicarba-*closo*-dodecaborano.
5. Desarrollar una estrategia de síntesis eficaz y reproducible del radiotrazador PET [¹¹C]Racloprida con alta actividad específica para llevar a cabo experimentos de desplazamiento *ex vivo*.
6. Desarrollar una estrategia de síntesis eficaz y reproducible del radiotrazador 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano para llevar a cabo estudios de imagen *in vivo*.
7. Llevar a cabo estudios de desplazamiento *ex vivo* con los ligandos dopaminérgicos de referencia para evaluar su afinidad por los receptores dopaminérgicos D₂.
8. Llevar a cabo el estudio de imagen *in vivo* del radiotrazador PET 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano para determinar su patrón de biodistribución y evaluar su potencial aplicación como radiotrazador PET.

PARTE I

**SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE LIGANDOS DE RECEPTORES D₂ Y CB₁
QUE INCORPORAN UNA UNIDAD DICARBA-CLOSO-
DODECABORANO**

CAPÍTULO 1

SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE LIGANDOS DE RECEPTORES D₂

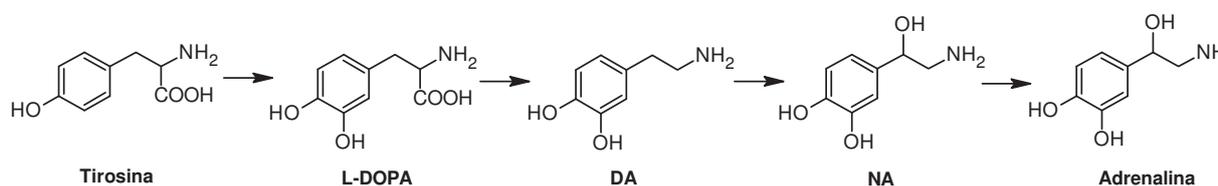
1. Aspectos biológicos
 - 1.1. Introducción
 - 1.2. Sistema dopaminérgico
 - 1.3. Imagen del sistema dopaminérgico
 - 1.4. Farmacología de los receptores dopaminérgicos
 - 1.5. Función de la dopamina
 2. Antecedentes
 - 2.1. Ligandos de la familia de receptores tipo-D₂
 3. Resultados y discusión
 - 3.1. Síntesis de ligandos
 - 3.2. Caracterización de ligandos
 4. Conclusiones
-

1. ASPECTOS BIOLÓGICOS

1.1. Introducción

La dopamina (DA) es una sustancia natural que, junto con la adrenalina y la noradrenalina (NA) pertenece a un grupo de neurotransmisores denominados catecolaminas. Poseen un grupo aromático común (3,4-dihidroxifenilo o catecol) y una cadena lateral etilamino con diversas modificaciones¹. Las tres sustancias constituyen tres eslabones seguidos en la cadena de síntesis de catecolaminas (ver Esquema 1.1), que requiere la actividad de cuatro enzimas. Debido a que estas enzimas no siempre se expresan juntas en todas las células, se pueden diferenciar células que producen cada una de las sustancias independientemente.

El precursor de la síntesis de la dopamina es el aminoácido aromático tirosina. Son dos las reacciones que transforman la tirosina en dopamina: la primera, que viene catalizada por la enzima tirosina-hidroxilasa (TH), convierte la tirosina en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA); mientras que la segunda reacción produce una descarboxilación en la L-DOPA para dar lugar a la DA.



Esquema 1.1: Síntesis de catecolaminas.

No todos los pasos de esta ruta sintética tienen lugar en el mismo espacio biológico, sino que ocurren en diferentes espacios metabólicos y su paso a través de diferentes membranas² es posible gracias a la existencia de enzimas y transportadores.

1.2. Sistema dopaminérgico

Además de ser la precursora de la noradrenalina, la DA se comporta como neurotransmisor independiente en diferentes lugares del sistema nervioso, tanto central como periférico. Todos los receptores dopaminérgicos pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR = G-protein coupled receptor)¹.

Las neuronas dopaminérgicas se localizan, preferentemente, en el SNC, dando origen a varios sistemas neuronales dopaminérgicos (nigroestriado, mesolímbico, mesocortical y tuberoinfundibular) que están íntimamente relacionados con aquellos procesos en los que el movimiento y la ejecución de tareas constituyen un elemento clave. El sistema mesolímbico, junto con el sistema mesocortical, juega un importante papel en ciertas enfermedades psiquiátricas, como la drogadicción o la esquizofrenia; ya que ambos están envueltos en la cognición y emoción^{1, 3}.

El sistema dopaminérgico cerebral está implicado en la fisiopatología de múltiples desórdenes neuronales y del comportamiento, incluyendo la enfermedad de Parkinson y otros desórdenes del movimiento y la actividad; así como la esquizofrenia, la manía, la depresión, la drogodependencia, los desórdenes alimenticios, etc.

Receptores dopaminérgicos

Para ejercer sus efectos, la DA se une a unos receptores específicos situados en la superficie (membrana) de las células objetivo (ver Figura 1.1), que pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G estimuladoras (D₁ y D₅) o inhibitoras (D₂, D₃ y D₄) con una estructura de siete segmentos transmembrana (7TM)^{1,4}.

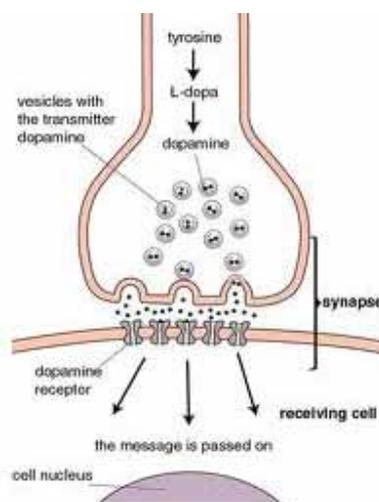


Figura 1.1: Sistema dopaminérgico: síntesis de DA y receptores dopaminérgicos.

En 1979 Keibian y Calne⁵ propusieron que la DA ejercía su efecto debido a la unión a dos tipos mayoritarios de receptores. Así, la división más aceptada entre los receptores dopaminérgicos se basa en los diferentes patrones farmacológicos de afinidad y clasifica los cinco tipos de receptores en dos subfamilias: receptores tipo D₁ y receptores tipo D₂.

La subfamilia tipo D₁ incluye a los receptores D₁ y D₅ y está asociada a la activación de la enzima adenililciclase. Los receptores de esta familia desempeñan un importante papel en el control de la actividad motora.

La subfamilia tipo D₂ incluye a los receptores D₂, D₃ y D₄ y está asociada a la inhibición de la adenililciclase o a la apertura de canales de K⁺ que provoca hiperpolarización.

1.3. Imagen del sistema dopaminérgico

Las técnicas de imagen nuclear (PET y SPECT) proporcionan un medio no invasivo de estudio del cerebro vivo y son métodos altamente deseados para los estudios clínicos de desórdenes neurológicos.

El sistema dopaminérgico puede ser visualizado utilizando radioligandos específicos para receptores D₁ y D₂. Como puede observarse en la Figura 1.2 existen varios radiotrazadores conocidos que actúan a diferentes niveles de la función sináptica.

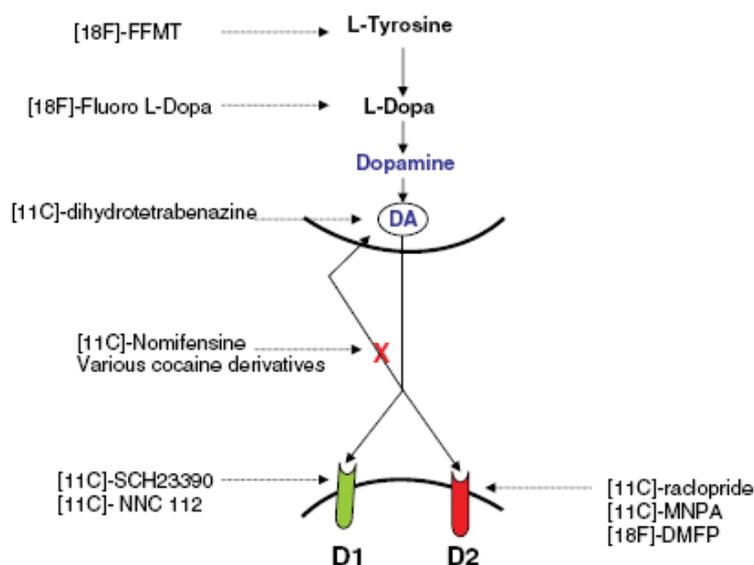


Figura 1.2: Descripción de una sinapsis dopaminérgica y de varios radiotrazadores PET disponibles. La L-Tirosina es convertida en L-DOPA, que a continuación sufre una descarboxilación para formar DA. La DA es empaquetada en unas vesículas que son secretadas en el espacio sináptico. A continuación la DA se une a los receptores postsinápticos D₁ y D₂, que están relacionados con desórdenes del movimiento. Figura obtenida de: Sioka, C; Fotopoulos, A; Kyritsis, A. P; Recent advances in PET imaging for evaluation of Parkinson's disease; *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2010, 37, 1594-1603.

1.4. Farmacología de los receptores dopaminérgicos

Los compuestos dirigidos hacia las proteínas de membrana de los diferentes receptores dopaminérgicos pueden activar (función agonista) o inhibir (función antagonista) sus funciones biológicas, así como proveer una tratamiento racional para el mal funcionamiento de estos subtipos de receptores⁶. Sin embargo, la búsqueda de nuevos ligandos que resulten totalmente selectivos para cada subtipo de receptor sigue siendo un reto actualmente.

El receptor D₁ es el más abundante, encontrándose principalmente en el córtex cerebral. Hace dos décadas que el compuesto SCH-23390 fue introducido como primer antagonista D₁ selectivo; sin embargo el posterior desarrollo tanto de nuevos antagonistas D₁ puros como de agonistas D₁ selectivos, ha tenido un éxito muy limitado. Debido a que los receptores D₁ requieren más DA para ser activados que los D₂, parece ser que los desórdenes que involucran deficiencia de DA, como la enfermedad de Parkinson, tienen un importante impacto en la funcionalidad de los receptores D₁.

Actualmente la familia de receptores tipo D₂ (D₂, D₃ y D₄) está siendo objeto de gran interés terapéutico, incluyendo su identificación como sitios primarios de acción de muchos fármacos antiparkinsonianos y antipsicóticos. Esta familia representa el mayor grupo de moléculas bioactivas objetivo; las cuales implican más de un 25% de los fármacos comerciales⁷. Mientras que los receptores dopaminérgicos antagonistas de esta familia prevalecen como antipsicóticos de primera elección, los agonistas son utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la disquinesia, la hiperprolactinemia y el síndrome de las piernas inquietas⁸.

El receptor D₂ es el segundo tipo de receptores dopaminérgicos más abundante y se encuentra altamente concentrado en el cuerpo estriado. Junto con el inmediato precursor de la DA (la L-DOPA), ciertos agonistas D₂ parciales o totales se usan ampliamente en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

El receptor D₃ posee funciones inciertas y sus niveles de expresión son muy inferiores a aquellos presentados por los D₂. La distribución anatómica selectiva de los receptores D₃ en el cerebro, conocido por estar asociado con la cognición y las funciones emocionales, sugiere que los receptores D₃ estén involucrados en un gran número de desórdenes neurológicos y psiquiátricos, fomentando así el desarrollo de ligandos selectivos por el receptor D₃^{9, 10}.

Los receptores D₄ son el tercer subtipo de la familia tipo D₂ y pueden encontrarse por ejemplo, en el córtex cerebral, pero en mucha menor densidad en

comparación con el resto de subtipos de receptores. El papel del receptor D₄ como objetivo farmacológico es controvertido¹¹ aunque parece ser que están asociados al desorden conocido como trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH).

1.5. Función de la dopamina

La importancia de la DA en el control del movimiento queda demostrada en condiciones patológicas como la enfermedad de Parkinson; que está caracterizada por una fuerte reducción de la DA debido a una degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Generalmente, los agonistas aumentan la función de la DA, aumentando así la actividad motora mientras que los antagonistas poseen el efecto contrario⁴.

La DA ha sido asociada con varias enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer o la esquizofrenia. Ha sido demostrado que una progresiva pérdida de neuronas dopaminérgicas que contienen neuromelanina en el SNC induce una disminución de DA en el estriado. Este déficit induce síntomas motores asociados con la enfermedad de Parkinson como bradicinesia, temblores, rigidez y pérdida del control postural¹².

2. ANTECEDENTES

Durante las últimas décadas, el uso de ligandos dopaminérgicos ha ido asentándose como una herramienta indispensable en el desarrollo de fármacos para el SNC. Se han establecido ciertas estructuras moleculares básicas que parecen estar asociadas con las propiedades dopaminérgicas y que conllevan el desarrollo de un buen número de productos farmacéuticos de utilidad. Entre ellos se pueden incluir las ergolinas, aporfinas, benzacepinas, aminotetralinas, aril-piperazinas y aril-piperidinas^{13,14}. Con la intención de potenciar las interacciones con los sitios de unión de los receptores o promover propiedades farmacológicas particulares, indoles, tiazoles y quinolinas sustituidas son frecuentemente incorporadas en estas estructuras.

Pese a la amplia variedad de ligandos dopaminérgicos existentes, el presente trabajo se centrará en el desarrollo de análogos de ligandos dopaminérgicos D₂, y en concreto en la familia de las benzamidas sustituidas.

2.1. Ligandos de la familia de receptores tipo-D₂

Ninguno de los fármacos dopaminérgicos presentes en el mercado puede considerarse altamente selectivo por ningún receptor en particular y las contribuciones individuales de los receptores D₂, D₃ y D₄ en las respectivas enfermedades no han sido comprendidas completamente⁸. De hecho, los programas existentes de desarrollo de fármacos dopaminérgicos no han tenido, por el momento, un gran éxito en el desarrollo de agonistas que puedan diferenciar completamente los distintos receptores.

Ligandos de receptores D₂

Debido a la gran abundancia de los receptores D₂, éstos han sido objeto de intensos estudios para el desarrollo de nuevos ligandos con estructuras variables. A continuación se presentan varios ejemplos pertenecientes a familias estructurales diversas.

Las *tetrahydroisoquinolinas* son los alcaloides naturales más abundantes y poseen un amplio rango de actividades biológicas. Esta familia de compuestos incluye las 1-bencil-tetrahydro-isoquinolinas (BTHIQ) y las aporfinas (ver Figura 1.3); ambas con estructuras similares a la DA y que interactúan tanto con los receptores dopaminérgicos D₁ como con los D₂^{15, 16}.

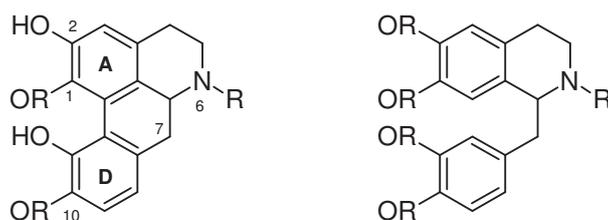


Figura 1.3: Estructuras básicas de las aporfinas (izquierda) y BTHIQs (derecha).

Por otro lado las *piperazinas* o *piperidinas* disustituidas representan una de las más amplias categorías de estructuras químicas con propiedades dopaminérgicas. Un gran número de antipsicóticos con potente actividad D₂-antagonista son parte de esta familia, como por ejemplo el Haloperidol o la Risperidona.

En adición a la familia de las piperidinas o piperazinas sustituidas, las *dibenzo(di)acepinas* constituyen otra familia de compuestos presentes en fármacos antipsicóticos. Aquí se pueden incluir compuestos como clozapina y olanzapina. Estos

fármacos presentan una actividad D₂-antagonista moderada junto con una alta potencia por los receptores de serotonina 5-HT_{2A}¹³.

Benzamidas sustituidas

Dentro de este grupo cabe destacar la familia de las *benzamidas quirales*, que carecen de actividad respecto a los receptores D₁¹⁷ y presentan efectos insignificantes en otros receptores¹⁸. Hace más de dos décadas¹⁹ que fue descubierta esta familia de compuestos y algunos de estos análogos presentan altas afinidades ($K_d \approx 10^{-9}$ M) hacia los receptores D₂. Estos potentes efectos antidopaminérgicos han sido confirmados a través de metodologías *in vivo* de unión, así como por medio de estudios de comportamiento¹⁸. La estructura química de estos compuestos los convierte en potentes candidatos para su utilización como radioligandos debido a su fácil marcaje radiactivo.

Las técnicas de imagen PET y SPECT de receptores dopaminérgicos D₂ se basan en el uso tanto de radioligandos antagonistas ([¹¹C]Racloprida, [¹¹C]NMSP y [¹²³I]IBZM) como agonistas dopaminérgicos de esta familia de compuestos.

La Racloprida, una benzamida sustituida, fue identificada inicialmente como un prometedor radioligando para estudios de autorradiografía de receptores D_{2/3}, basado en su capacidad de unión reversible y desplazable tanto en membranas de estriado de ratas como en el estriado de ratas vivas²⁰. La unión específica de la [¹¹C]Racloprida fue medida por PET en cerebros humanos²¹, y su éxito ha abierto la puerta a un consecuente desarrollo de otros derivados de benzamidas, incluyendo [¹¹C]FLB 457 para estudios PET y [¹²³I]IBZM para estudios SPECT.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez revisadas y comentadas las principales estrategias aparecidas en la bibliografía referente a ligandos de receptores dopaminérgicos, se pasará a la descripción y posterior discusión de los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas acerca de la síntesis de ligandos dopaminérgicos D₂ para su futura aplicación como radiotrazadores PET.

La importancia del desarrollo de herramientas para la visualización *in vivo* tanto de la densidad como de la función de los receptores dopaminérgicos que ha tenido lugar durante las últimas décadas, ha impulsado enormemente la utilización de técnicas de imagen, y en especial, de la PET. Muchos radioligandos, como la [¹¹C]Racloprida²², [¹¹C]FLB457²³ (ver Figura 1.4) y otras benzamidas enantioméricas sustituidas²⁴

marcadas con Carbono-11 y Flúor-18, que son relativamente selectivas hacia los receptores D₂, han sido aplicados para la visualización de los receptores D₂ y D₃.

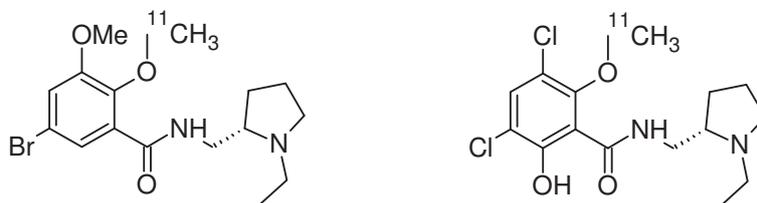


Figura 1.4: Estructuras químicas del [¹¹C]FLB 457 (izquierda) y [¹¹C]Racloprida (derecha).

Paralelamente, recientes estudios SAR llevados a cabo sobre ligandos de receptores D₂²⁵ han demostrado que la presencia de sustituyentes en diferentes posiciones del anillo de fenilo juega un importante papel en la actividad biológica de los ligandos. Así, tanto la geometría como las propiedades físico-químicas de los sustituyentes del anillo parecen ser un factor importante en la afinidad de los ligandos por los receptores D₂.

Por otro lado, como ha sido descrito por Endo y colaboradores²⁶, las estructuras de 1,2- y 1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano (*orto*- y *meta*-carborano), pueden actuar como estructuras hidrofóbicas de varias moléculas biológicamente activas, debido a que tanto sus estructuras espaciales como la superficie hidrofóbica facilitan la interacción con los residuos hidrofóbicos de los receptores del “bolsillo” de unión del ligando. Estos carboranos icosaédricos, de fórmula empírica C₂B₁₀H₁₂, muestran una alta versatilidad química y buena estabilidad térmica y fotoquímica en el rango del UV-Visible.

Por tanto, basándose en la propuesta de Endo y considerando que la unidad de carborano presenta un volumen rotacional similar al de un anillo de fenilo y un marcado carácter hidrofóbico, se han desarrollado una serie de análogos de los antagonistas D₂ Racloprida y FLB 457; introduciendo diferentes clústeres de carborano (*orto*-, *meta*- y metil-*orto*-carborano) (ver Figura 1.5) como farmacóforos hidrofóbicos en sustitución de los grupos fenilo. La introducción del clúster de carborano puede tener un efecto positivo tanto en la estabilidad *in vivo* como en la afinidad de estos nuevos ligandos por los receptores D₂.

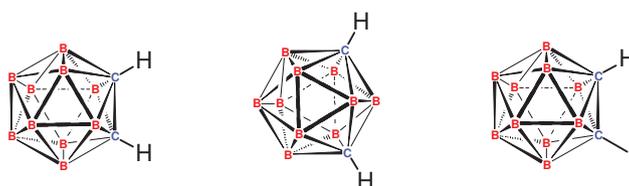
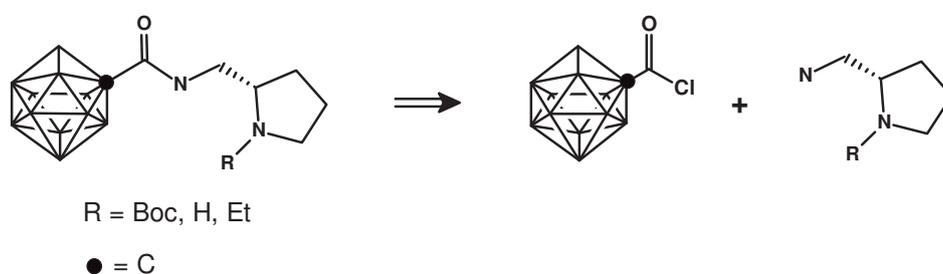


Figura 1.5: Clústeres de *orto*-carborano (izquierda), *meta*-carborano (centro) y metil-*orto*-carborano (derecha), que sustituyen al anillo de fenilo de estructuras tipo Racloprida y FLB 457.

A continuación se detallará la síntesis de estos ligandos dopaminérgicos D₂, así como los ensayos *ex vivo* de autorradiografía (ARG) llevados a cabo con los compuestos de referencia (**4**, **9** y **14**) y con [³H]Racloprida²⁷ (Capítulo 4).

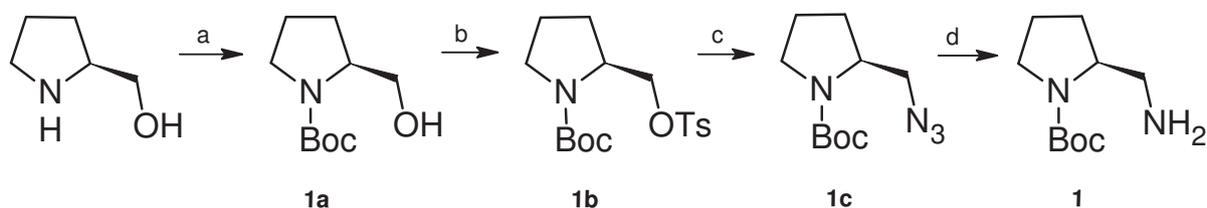
3.1. Síntesis de ligandos

A la hora de diseñar una ruta sintética (ver Esquema 1.2) para la obtención de las ligandos dopaminérgicos D₂ finales, se optó por la condensación de la amina pirrolidínica correspondiente con el derivado de cloruro de ácido de cada clúster de carborano.



Esquema 1.2: Ruta retrosintética diseñada para la obtención de los ligandos dopaminérgicos D₂ deseados.

Para llevar a cabo este método era necesario partir de un derivado carbonílico del clúster de carborano y de la amino-metil-pirrolidina correspondiente. Debido a que se deseaba disponer tanto de los análogos de referencia (R = Etilo) de los ligandos dopaminérgicos como de sus precursores (R = H) para su futuro marcaje radiactivo y su evaluación como radiotrazadores, era necesario diseñar una ruta sintética para acceder al compuesto pirrolidínico deseado (ver Esquema 1.3) que fuese de fácil acceso. Se decidió proteger la función amina del anillo de pirrol con un grupo tert-butoxi-carbonilo (Boc), debido a que su fácil y rápida desprotección para acceder al compuesto precursor en medio ácido no afectaría al resto de la molécula.



Esquema 1.3: Ruta sintética diseñada para la síntesis de la amina (S)-2-aminoetil-1-Boc-pirrolidina **1**. Condiciones: (a) Boc₂O, NaHCO₃ (s), H₂O/THF; (b) TsCl, piridina; (c) NaN₃, DMSO, microondas; (d) i) PPh₃, DMF, ii) H₂O.

Partiendo del compuesto comercial (*S*)-(+)-2-aminometil-pirrolidina, se protegió la función amina pirrolidínica con el grupo protector Boc bajo condiciones acuosas, usando di-*tert*-butil-dicarbonato (Boc₂O) en presencia de bicarbonato sódico (NaHCO₃) como base, para obtener el compuesto **1a** cuantitativamente. A continuación, se protegió la función alcohólica con un grupo *p*-toluen-sulfonilo, en presencia de piridina como base para absorber el cloruro de hidrógeno liberado, obteniendo el compuesto **1b** con buen rendimiento (72%). Dicho compuesto fue convertido en la azida correspondiente **1c** a través de una rápida sustitución nucleofílica asistida por microondas. Para optimizar esta reacción se realizaron una serie de experimentos variando los siguientes parámetros (ver Tabla 3.1): disolvente, equivalentes de azida, temperatura y tiempo de reacción. De esta manera, se comprobó que en dimetil formamida (DMF), con 3 equivalentes de azida sódica (NaN₃) a 80°C durante 2 minutos (entrada 1, Tabla 1.1), la reacción no evolucionaba, pero aumentando el tiempo se obtenía cierto avance en la reacción (entrada 2, Tabla 1.1). Por tanto, en primer lugar se decidió incrementar la cantidad de NaN₃ a 5 equivalentes y aumentar el tiempo de reacción. De esta manera la reacción evolucionaba considerablemente pese a que el rendimiento era escaso (25%) (entrada 3, Tabla 1.1). Aumentando la temperatura a 100°C (entrada 4, Tabla 1.1) se observó que el rendimiento a penas mejoraba; por lo que finalmente se decidió cambiar el disolvente, a dimetil sulfóxido (DMSO). Se calentó la reacción a 120°C durante 5 min obteniendo un rendimiento bueno (67%) para el compuesto **1c** (entrada 5, Tabla 1.1).

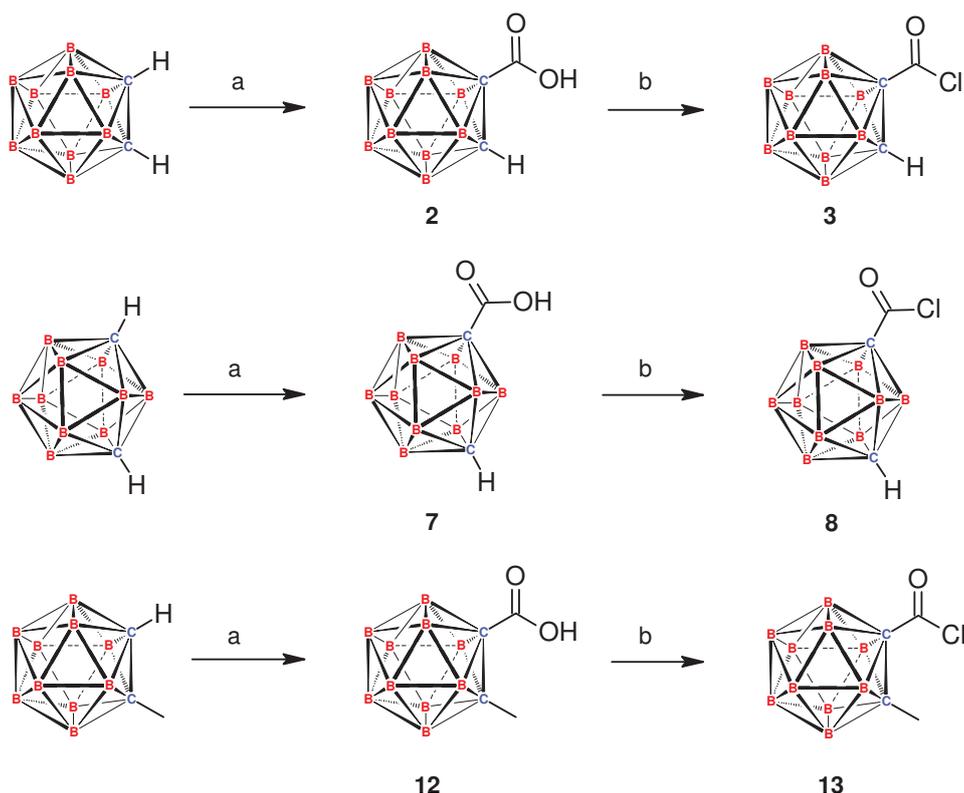
	Eq NaN ₃	Disolvente	Tiempo(min)	T ^a (°C)	Comentario
1	3	DMF	2	80	No reacción
2	3	DMF	3	80	Poca evolución
3	5	DMF	3	90	25%
4	5	DMF	5	100	30%
5	5	DMSO	5	120	67%

Tabla 1.1: Resumen de las pruebas llevadas a cabo para optimizar la sustitución nucleofílica de **1b** por **1c**.

Finalmente, la azida **1c** fue reducida a la amina primaria **1** con un buen rendimiento (70%)²⁸ en condiciones suaves a través de una reacción tipo Staudinger²⁹, que consiste en la reducción de azidas utilizando trifenilfosfina (PPh₃), que reacciona con la azida para generar una fosfazida, que sufre la pérdida de nitrógeno molecular (N₂) para formar un iminofosforano. La presencia de agua hace posible la obtención de la amina junto con la formación de un óxido de fosfina muy estable.

Paralelamente se prepararon los cloruros de ácido de los clústeres de carborano (ver Esquema 1.4). Se sintetizaron previamente los ácidos carboxílicos de los correspondientes carboranos, usando una metodología bien descrita anteriormente por Kahl³⁰ en la literatura. Así, el *orto*-carborano fue disuelto en dietil éter (Et₂O) anhidro, bajo atmósfera inerte, y enfriado a -78°C y a continuación se adicionó *n*BuLi como base poco a poco. La adición de anhídrido carbónico (CO₂) sólido y el tratamiento posterior

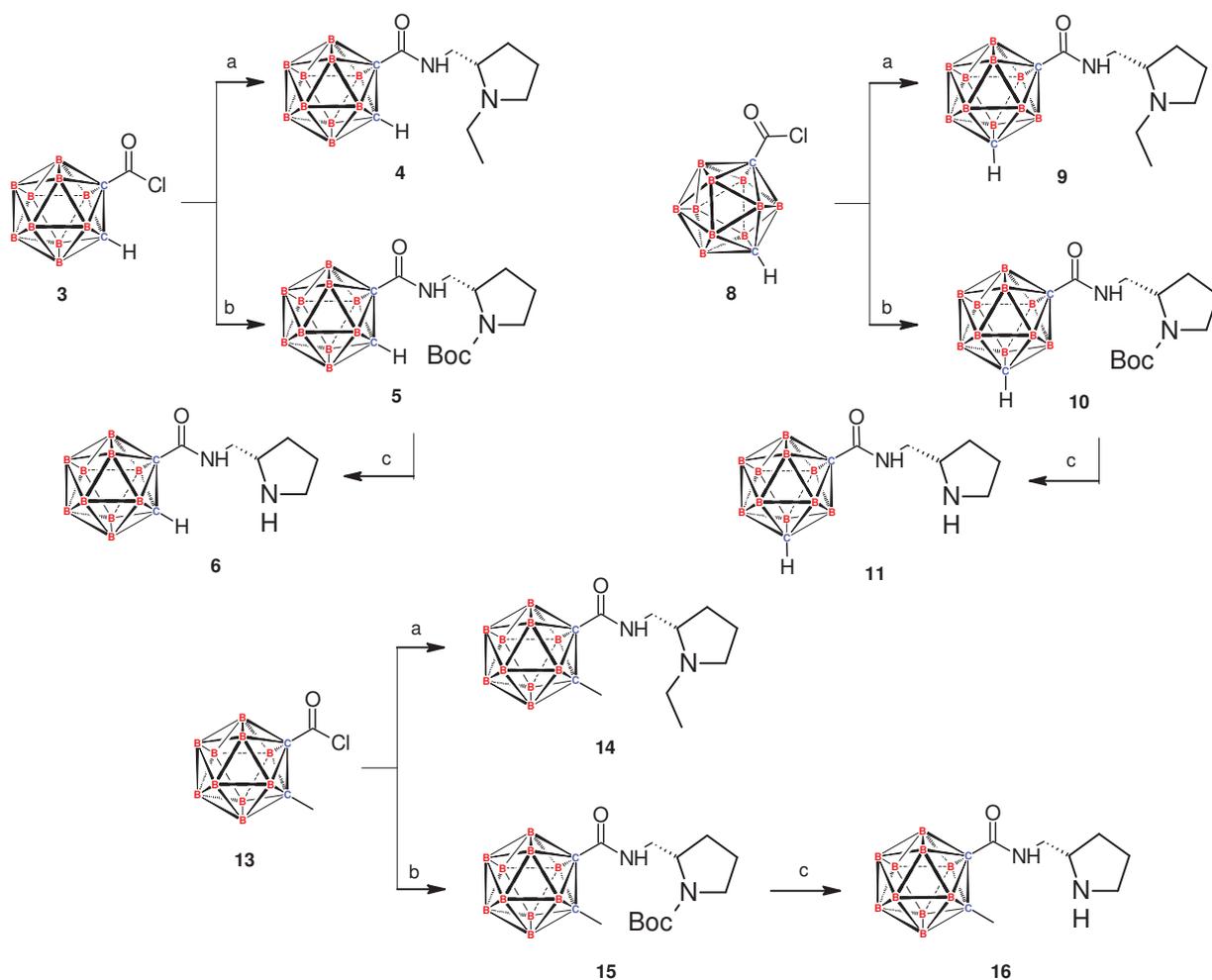
con agua resultó en la obtención del correspondiente monoácido **2** con un 75% de rendimiento. Este ácido carboxílico, disuelto en Tolueno anhidro, fue puesto a reaccionar con pentacloruro de fósforo (PCl₅) para obtener, después de una destilación (120°C, 5mm Hg) el compuesto deseado **3** con un buen rendimiento (75%). De una manera análoga, se procedió a la síntesis de los ácidos **7** y **12** y de sus cloruros de ácido **8** y **13**, obteniéndolos con buenos rendimientos (68%, 100%, 85% y 92%, respectivamente).



Esquema 1.4: Ruta sintética llevada a cabo para obtener los ácidos carboxílicos y sus cloruros de ácido derivados de los clústeres de carborano. Condiciones: (a) i) nBuLi, Et₂Oanh, -78°C, ii) CO₂, -78°C-rt, iii) H₂O; (b) PCl₅, Tolueno anh, destilación.

Por otro lado, la obtención de los ligandos finales se llevó a cabo mediante la condensación de los cloruros de ácido de los clústeres de carborano recién sintetizados con las aminas correspondientes, tanto la comercial como la sintetizada. Así, el cloruro de ácido **3** se disolvió en diclorometano (DCM) anhidro, se enfrió a 0°C y se hizo reaccionar con las aminas (*S*)-(-)-2-aminometil-1-etilpirrolidina (comercial) y (*S*)-2-aminometil-1-Boc-pirrolidina **1** (ver Esquema 1.5) para obtener los compuestos **4** y **5** respectivamente. La presencia de un grupo carbonilo en C₁ en el compuesto **3** activa el clúster de carborano, que puede ser rápidamente convertido en su forma *nido* por eliminación de uno de los átomos de boro conectado directamente con C₁ y C₂. Esta reacción paralela no deseada puede ocurrir tanto en presencia de una sustancia

nucleofílica como de una base fuerte. Además, también se comprobó que, por un lado tiempos largos de reacción, y por otro, temperaturas altas favorecerían esta reacción indeseada. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo la reacción de condensación a temperatura entre 0 y 25°C, y usando trietilamina (TEA) como base. Bajo estas condiciones suaves de reacción se obtuvieron buenos rendimientos para los compuestos sintetizados **4** y **5** (75% y 86%, respectivamente).



Esquema 1.5: Síntesis de los ligandos dopaminérgicos D₂ finales. Condiciones: (a) (S)-(-)-2-aminometil-1-etilpirrolidina, DCM anh, TEA, 0°C-rt; (b) **1**, DCManh, TEA, 0°C-rt; (c) TFA, DCM, 0°C-rt.

Si siguiendo el mismo procedimiento se aislaron los compuestos **9** y **10** haciendo reaccionar el cloruro de ácido **7** con la correspondiente amina enantiomérica. En este caso, ambas especies fueron sintetizadas con buenos rendimientos (70% y 81%, respectivamente) y sin observar la formación de la especie *nido* indeseada. En cuanto a los compuestos **14** y **15**, ambos fueron sintetizados usando la misma metodología aunque con rendimientos sustancialmente menores (46% y 47% para **14** y **15**, respectivamente). Esta disminución en el rendimiento puede ser debida a dos motivos:

- i) la disminución de la electrofilia en C₂ debido al carácter electro-donador del grupo metilo en C₁.
- ii) el impedimento estérico existente en el clúster de carborano debido a la presencia del grupo metilo en C₁, que dificulta el acercamiento de la amina enantiomérica y por tanto, la posibilidad de reaccionar con él.

Los compuestos finales **6**, **11** y **16** fueron aislados en forma de sal de trifluoroacetato con rendimientos cuantitativos, después del tratamiento de los compuestos **5**, **10** y **15** respectivamente, con ácido trifluoroacético (TFA) en DCM. Estos compuestos fueron sintetizados con el fin de ser utilizados en un futuro como precursores para la radiosíntesis de los compuestos de referencia **4**, **9** y **14** para su aplicación como radiotrazadores PET en la visualización de receptores dopaminérgicos D₂.

Enlace de hidrógeno intramolecular

Los inesperados valores, más elevados, de desplazamiento químico observados para el hidrógeno C₂-H del clúster de *orto*-carborano para el compuesto **4**, en comparación con los obtenidos para su correspondiente monoácido **2** (4.26 vs 4.01 ppm, ver Tabla 1.2), sugerían la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular. Esta hipótesis era también apoyada por el desplazamiento menos significativo observado en el caso del compuesto *meta*-carborano **9** con respecto a su monoácido **7** (2.99 vs 3.01 ppm, ver Tabla 1.2).

Esta capacidad de formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares en los derivados de *orto*-carborano en disolución ya había sido observada anteriormente³¹, pese a que el número de ejemplos no es demasiado elevado. Debido a este hecho, se llevaron a cabo una serie de experimentos, siguiendo la aproximación de Endo³¹, para apoyar esta hipótesis.

Compuesto	δ_{CDCl_3} (ppm)	$\delta_{\text{DMSO-}d_6}$ (ppm)	$\delta_{\text{DMSO-}d_6} - \delta_{\text{CDCl}_3}$ (ppm)
2	4.01	5.29	1.28
4	4.26	5.31	1.05
7	3.01	4.20	1.19
9	2.99	4.19	1.20

Tabla 1.2: Valores del desplazamiento químico en ¹H NMR del hidrógeno C₂-H en los compuestos **2**, **4**, **7**, **9** en DMSO-*d*₆ y CDCl₃.

De acuerdo con los trabajos publicados previamente³², disolventes con átomos aceptores de enlaces de hidrógeno, como dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆), son capaces de formar enlaces de hidrógeno intermoleculares, dando lugar a desplazamientos químicos hacia campo más bajo. En el caso del compuesto **4**, y tomando como referencia el desplazamiento químico obtenido en cloroformo deuterado (CDCl₃) (4.26 ppm), el uso de DMSO-*d*₆ desplaza la señal a campo más bajo (5.31 ppm; $\delta_{\text{DMSO-}d_6} - \delta_{\text{CDCl}_3} = 1.05$ ppm). En el caso del monoácido **2** el desplazamiento

debido al efecto del disolvente es más importante ($\delta_{\text{DMSO-}d_6} - \delta_{\text{CDCl}_3} = 1.28$ ppm). Esta diferencia entre ambos valores apunta a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular en **4** probablemente entre el hidrógeno C₂-H de la caja de carborano y el átomo de nitrógeno del anillo de pirrolidina.

En el caso del compuesto **9**, el desplazamiento químico obtenido para el C₂-H del clúster de *meta*-carborano en CDCl₃ es de 2.99 ppm. En este caso, el uso de DMSO-*d*₆ también desplaza la señal hacia campo más bajo (4.19 ppm; $\delta_{\text{DMSO-}d_6} - \delta_{\text{CDCl}_3} = 1.2$ ppm, ver Tabla 3.2). Sin embargo, comparando los valores de desplazamiento de este compuesto con los del compuesto monoácido **7** ($\delta_{\text{DMSO-}d_6} - \delta_{\text{CDCl}_3} = 1.19$ ppm, ver Tabla 2.2), el desplazamiento debido al efecto del disolvente es similar en ambos casos; lo que sugiere que no existe formación de enlace de hidrógeno intramolecular en el caso del clúster *meta*.

Estabilidad de los ligandos

Con el fin de evaluar la posible aplicación de las nuevas estructuras desarrolladas como ligandos de los receptores dopaminérgicos D₂, se comprobó la estabilidad de los compuestos **4**, **9** y **14** en diferentes disolventes como acetonitrilo, metanol y una mezcla de agua/etanol : 9/1 (ACN, MeOH y H₂O/EtOH:9/1) a temperatura ambiente (25°C) por HPLC-MS³³. La formación de la especie *nido* fue observada en el caso del compuesto **4** (ver Figura 1.6) en disolventes próticos (MeOH y H₂O/MeOH:9/1), donde al menos un 80% del producto fue convertido en su forma *nido* en menos de 8 horas. Esta degradación, por el contrario, no fue observada en acetonitrilo, donde la totalidad del compuesto mantuvo su forma *cliso*. Por otro lado, el compuesto **9** se mostró estable en todos los disolventes durante el tiempo de estudio (8 horas) (ver Figura 1.7). El compuesto **14** resultó también estable en las mismas condiciones.

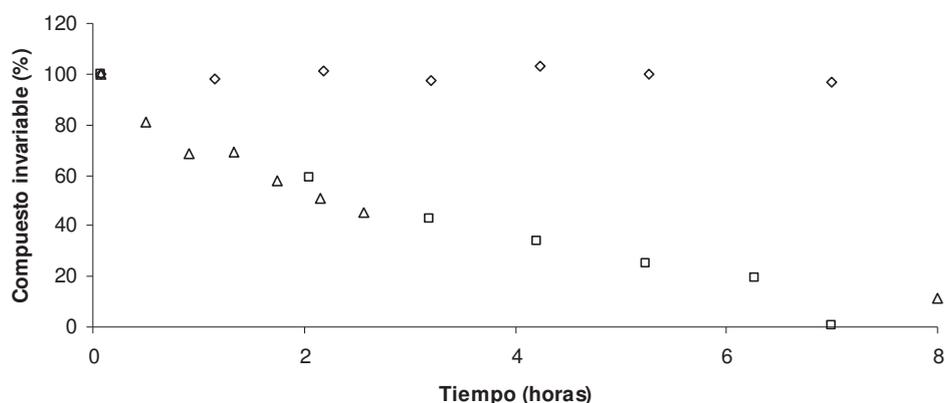


Figura 1.6: Estabilidad, medida por HPLC-MS del compuesto **4** en ACN (rombos), MeOH (cuadrados) y EtOH/H₂O: 1/9 (triángulos). La estabilidad está expresada en porcentaje de compuesto inicial invariable respecto del tiempo.

La estabilidad de los compuestos **9** (ver Figura 1.7) y **14** (comportamiento similar a **9**) en H₂O/EtOH : 9/1 (mezcla típica utilizada en formulación de disoluciones a inyectar en seres vivos) es un factor importante a tener en cuenta para el futuro marcaje radiactivo de los compuestos de referencia y su posterior evaluación.

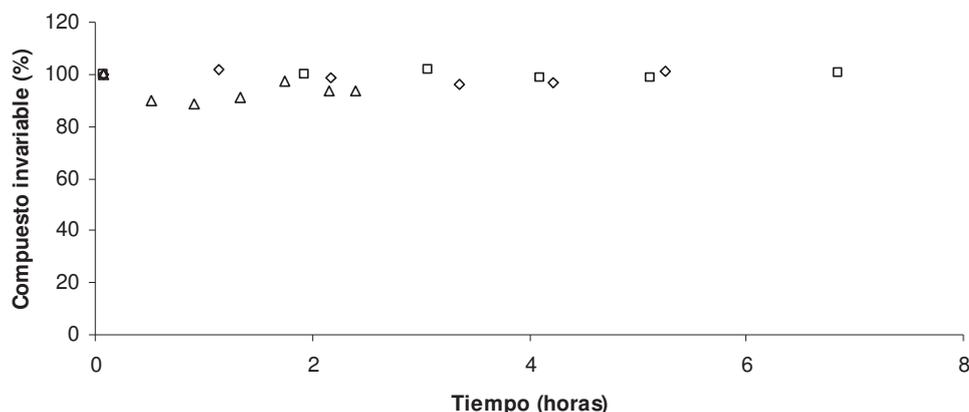


Figura 1.7: Estabilidad, medida por HPLC-MS, del compuesto **9** en ACN (rombos), MeOH (cuadrados) y EtOH/H₂O: 1/9 (triángulos). La estabilidad está expresada en porcentaje de compuesto inicial invariable respecto del tiempo.

3.2. Caracterización de ligandos

La complejidad de los compuestos poliédricos que contienen boro hace que un proceso aparentemente simple como la asignación espectroscópica y estructural, resulte en ocasiones difícil y laboriosa.

Los *closo*-carboranos icosaédricos han sido descritos como sistemas aromáticos tridimensionales³⁴ y las implicaciones de las interacciones electrónicas con los sustituyentes han resultado de un particular interés desde los primeros estudios llevados a cabo con estos compuestos. Los resultados obtenidos remarcan la notable diferencia existente entre los carboranos y el resto de los grupos presentes en la química orgánica.

A continuación se expondrá la metodología llevada a cabo para la caracterización de los ligandos descritos anteriormente. Para todos los compuestos que presentan el clúster de carborano, se han realizado varios experimentos de RMN, acoplados y desacoplados, debido a la existencia de acoplamiento vecinal entre los átomos de boro y los protones que están unidos directamente a ellos.

- a) ¹H RMN: espectro de RMN de protón.

- b) $\{^1\text{H}-^{11}\text{B}\}$ RMN: espectro de RMN de protón desacoplado de boro.
- c) ^{11}B RMN: espectro de RMN de boro.
- d) $\{^{11}\text{B}-^1\text{H}\}$ RMN: espectro de RMN de boro desacoplado de protón.
- e) ^{13}C RMN: espectro de RMN de carbono.
- f) COSY RMN: espectro de RMN bidimensional de correlación protón-protón.
- g) HSQC RMN: espectro de RMN bidimensional de correlación protón-carbono. También se utilizó un espectro HSQC monodimensional.
- h) DEPT 135 RMN: espectro de RMN donde aparecen los carbonos primarios y terciarios hacia arriba y los secundarios hacia abajo.
- i) NOE RMN: espectro de RMN espacial, donde se obtiene información sobre la distribución espacial que rodea a un átomo en concreto.

En primer lugar, como se puede ver en la Tabla 1.3, se procedió a la caracterización de los carboranos de partida (*orto*-, *meta*- y 1-metil-*orto*-carborano: ver Figura 1.8 para su estructura y numeración).

Carborano	$\{^1\text{H}-^{11}\text{B}\}$ RMN (ppm)			$\{^{11}\text{B}-^1\text{H}\}$ RMN (ppm)					
<i>Orto</i> -	2.10-2.28 (BH)		3.53 (CH)	B 3(6) -14.95	B 4,5(7,11) -13.80		B 8(10) -9.37	B 9(12) -2.50	
<i>Meta</i> -	2.08-2.62 (BH)		2.89 (CH)	B 2(3) -16.96	B 4,6(8,11) -13.28		B 9(10) -10.50	B 5(12) -6.63	
1-CH ₃ - <i>orto</i> -	2.01 (CH ₃)	2.08-2.31 (BH)	3.54 (CH)	B 4(5) -12.69	B 3(6) -11.30	B 7(11) -10.54	B 8(10) -9.11	B 12 -6.69	B 9 -1.68

Tabla 1.3: Caracterización de los clústeres de carborano iniciales. Los espectros de RMN fueron llevados a cabo usando CDCl₃.

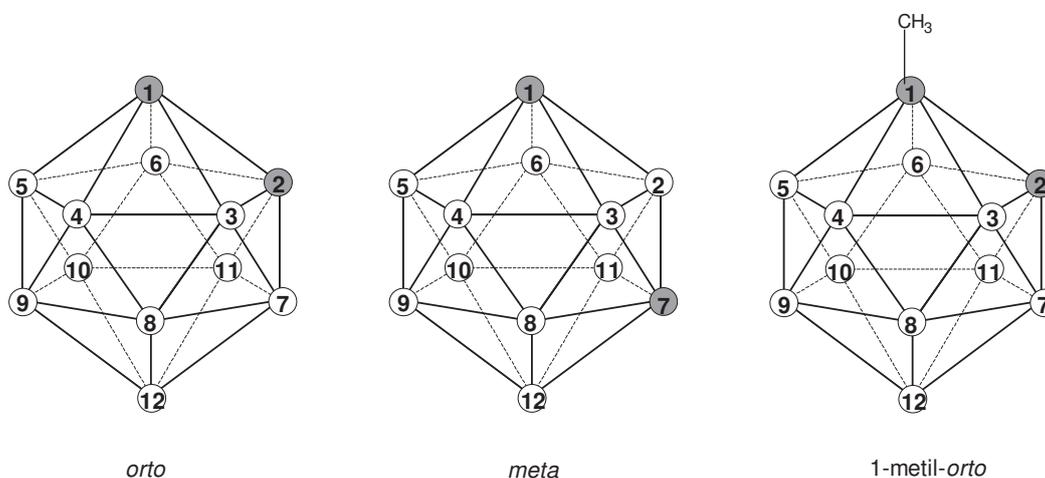


Figura 1.8: Estructura y numeración de los vértices de los clústeres de carborano de partida.

En la siguiente Figura 1.9 puede verse un ejemplo de espectros de resonancia de ^{11}B y $\{^{11}\text{B}-^1\text{H}\}$ (respectivamente).

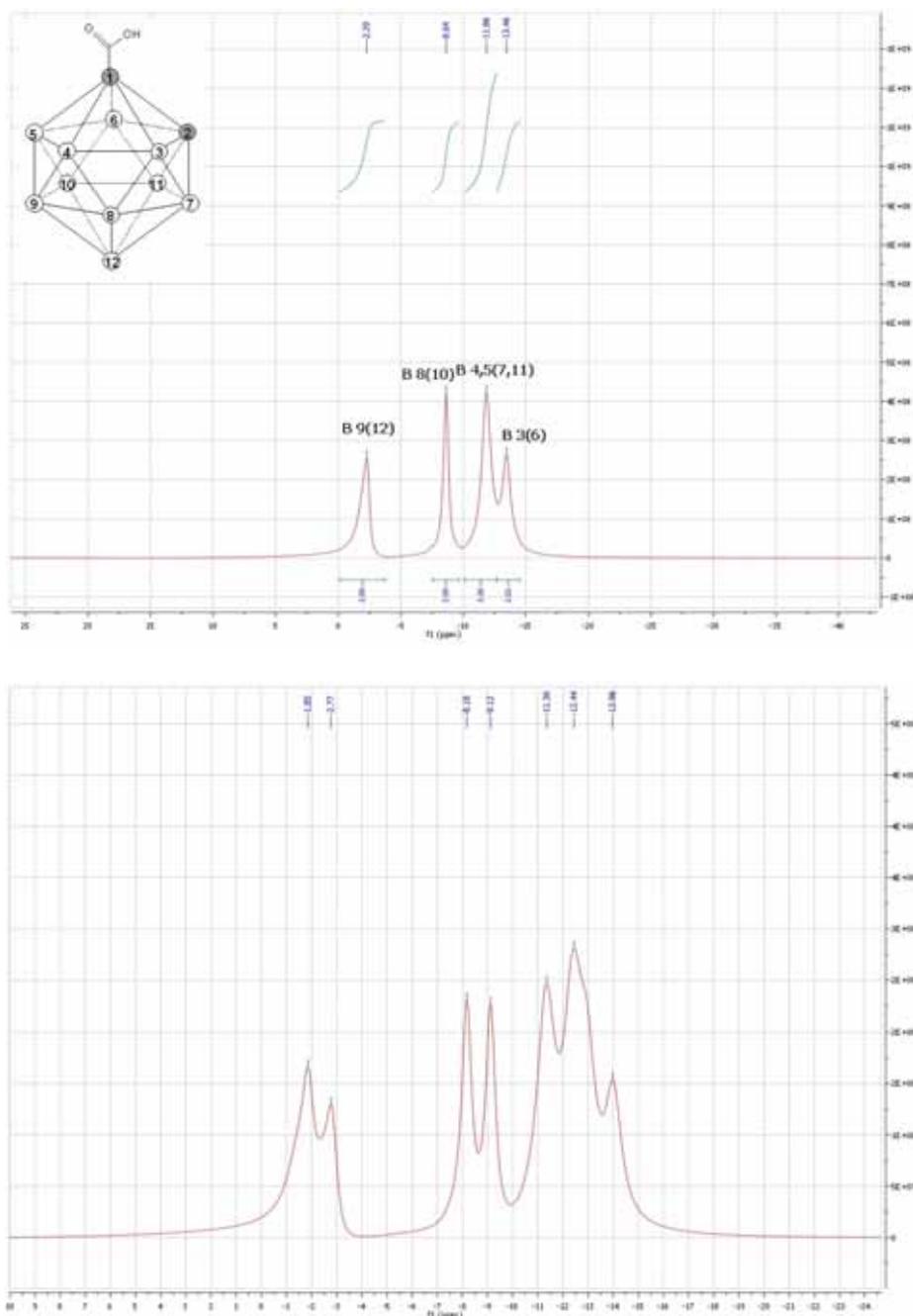


Figura 1.9: Espectros de $\{^{11}\text{B}-^1\text{H}\}$ RMN (espectro superior) y ^{11}B RMN (espectro inferior) del ácido carboxílico **2**. Como se puede observar el número de señales en el espectro acoplado (inferior) es el doble del desacoplado (superior).

A través del solapamiento de ambos espectros se observa que el espectro acoplado presenta el doble de señales que el desacoplado, debido al desdoblamiento que presentan por el acoplamiento del átomo de boro con su protón.

Para la asignación de las señales correspondientes a los protones unidos a los átomos de boro (BH), es suficiente solapar los espectros de resonancia de protón y de

protón desacoplado; de manera que aquellas señales que sufren una modificación (señales que en el espectro de $\{^1\text{H}-^{11}\text{B}\}$ RMN aumentan de altura con respecto al espectro de ^1H RMN), son las correspondientes a los BH (Figura 1.10 para ejemplo en el caso del *orto*-carborano de partida). Este procedimiento es de gran utilidad cuando la estructura del compuesto a elucidar es más compleja y presenta señales de otros protones en la misma zona que los BH. Al solapar los espectros acoplado y desacoplado, puede confirmarse, paralelamente, la presencia de protones no pertenecientes al clúster de carborano.

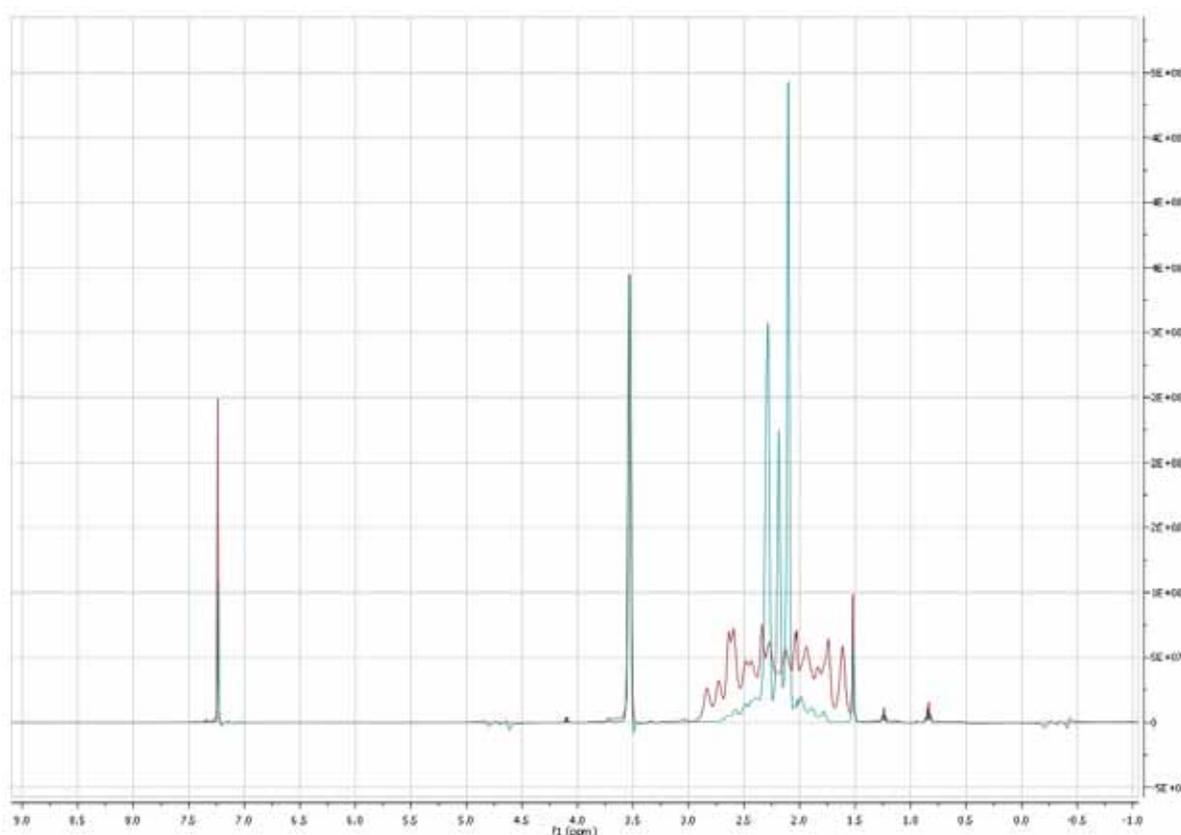


Figura 1.10: Solapamiento de los espectros de resonancia ^1H RMN (rojo) y $\{^1\text{H}-^{11}\text{B}\}$ RMN (verde) del *orto*-carborano de partida. Las señales que ven modificada su altura corresponden a los BH del clúster (1.7-2.7ppm), mientras que la señal que no varía (3.5ppm) corresponde con un H no unido directamente al B (CH).

Utilizando los datos de desplazamiento obtenidos, se procedió a la caracterización de todos los compuestos que contenían un clúster de carborano.

En el caso del *orto*-carborano, se sintetizaron, en primer lugar, el ácido carboxílico **2** y el cloruro de ácido **3**. Los datos espectroscópicos obtenidos para ambos compuestos vienen resumidos a continuación:

a) 1-COOH-*orto*-carborano **2**:

- $\{^1\text{H}-^{11}\text{B}\}$ RMN (δ , CDCl_3): 2.19-2.44 (BH), 4.03 ($\text{C}_2\text{-H}$), 9.76 ($\text{C}_1\text{-COOH}$).

- {¹¹B-¹H} RMN (δ, CDCl₃): -13.46 (3,6), -11.86 (4,5,7,11), -8.64 (8,10), -2.29 (9,12).
 - ¹³C RMN (δ, CDCl₃): 57.16 (C₂-H), 68.62 (C₁-COOH), 163.28 (CO).
- b) 1-COCl-orto-carborano 3:
- {¹H-¹¹B} RMN (δ, CDCl₃): 2.05-2.57 (BH), 4.10 (C₂-H).
 - {¹¹B-¹H} RMN (δ, CDCl₃): -13.16 (3,6), -11.55 (4,5,7,11), -8.53 (8,10), -2.06 (12), -1.38 (9).
 - ¹³C RMN (δ, CDCl₃): 57.45 (C₂-H), 74.44 (C₁-COCl), 164.76 (CO).

En base a estos datos de desplazamiento, se procedió a la caracterización de los compuestos acoplados. A continuación se muestra la caracterización del compuesto de referencia **4**, que presenta una estructura compleja de *orto*-carborano, con señales de otros protones CH sobre la misma zona que los protones BH.

- 1) En primer lugar se define la zona correspondiente a las señales debidas a los protones BH, partiendo de los espectros de ¹H RMN (ver Figura 1.11) y {¹H-¹¹B} RMN y solapándolos (ver Figura 1.12). La zona correspondiente a los BH es aquella que presenta una variación en la altura de las señales (1.78-2.77 ppm). Además, se comprueba la existencia en esta misma zona de señales de protones no pertenecientes al clúster de carborano.

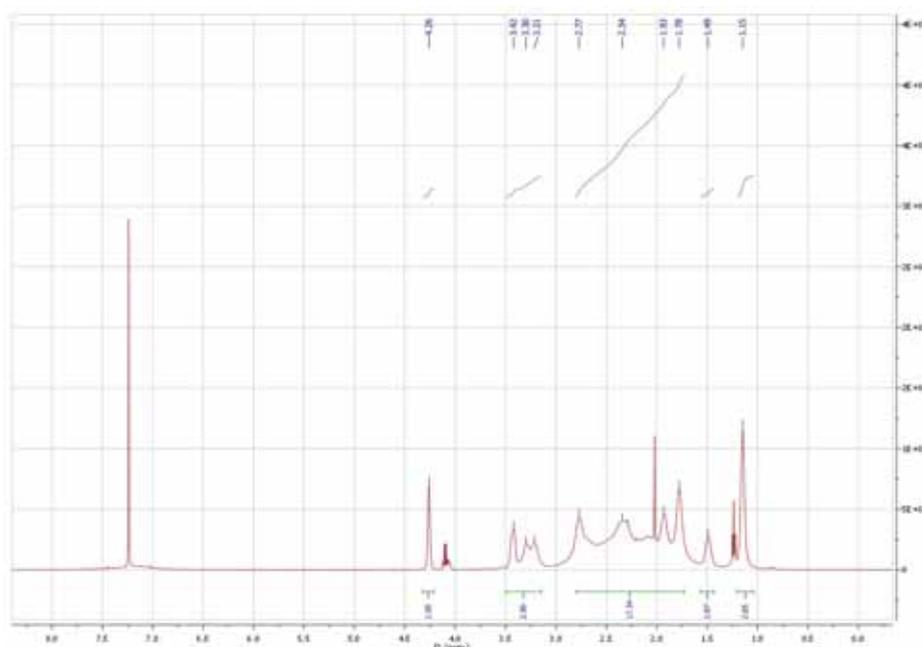


Figura 1.11: Espectro de ¹H RMN del compuesto de referencia **4**.

Como se puede ver en la integración del espectro en la zona comprendida entre 1.78 y 2.77 ppm aparece una señal que integra para 17H.

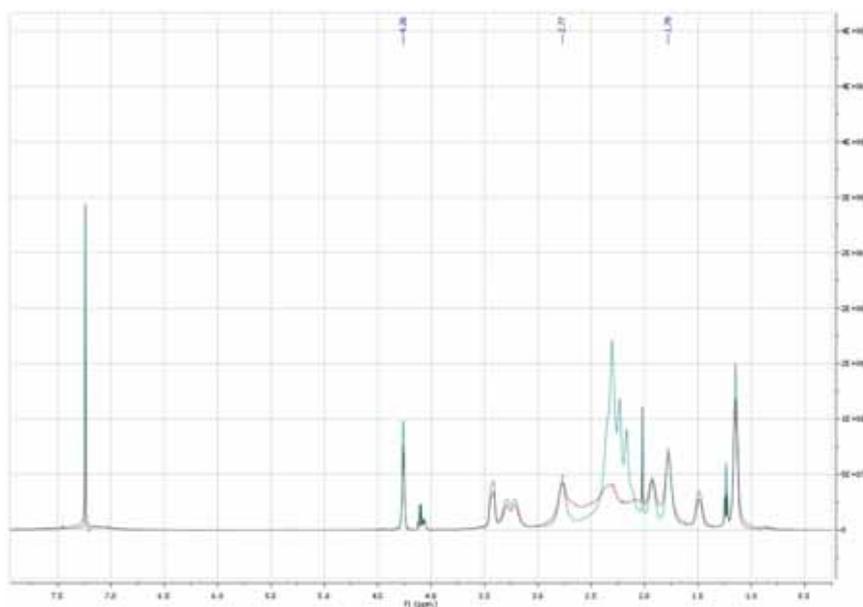


Figura 1.12: Solapamiento de los espectros ¹H RMN (rojo) y {¹H-¹¹B} RMN (verde) del compuesto 4.

Del espectro solapado (Figura 1.12) puede obtenerse información sobre esos 17H; es decir, puede comprobarse que a parte de los 10BH, en esa misma zona hay 7CH no pertenecientes al clúster de carborano.

- 2) Mediante un experimento 1D HSQC (ver Figura 1.13) puede obtenerse un espectro monodimensional que relaciona C-H. De esta manera se puede discriminar entre protones unidos a carbono y aquellos que lo están a átomos de boro (que no aparecerán).

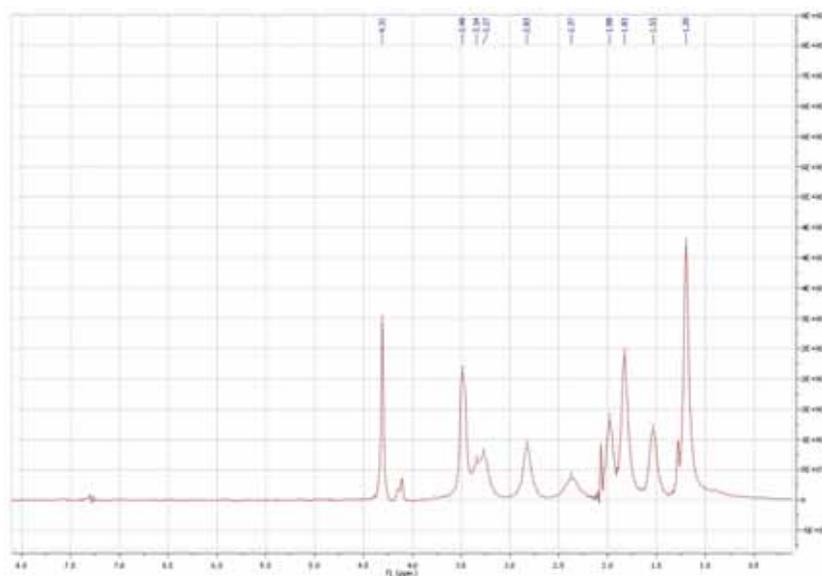


Figura 1.13: Espectro 1D HSQC del compuesto 4.

Como se puede observar en el espectro de la Figura 1.13, en la zona comprendida entre 1.78 y 2.77 ppm aparecen protones unidos a carbono; es decir, queda probada la existencia de señales de CH en la zona correspondiente a los BH.

- 3) Mediante la interpretación de los experimentos 2D COSY (ver Figura 1.14) y 2D HSQC (ver Figura 1.15) puede obtenerse información tanto sobre el C₂-H del clúster de carborano como sobre el resto de los CH. Por medio del espectro 2D COSY, se define la señal del C₂-H del clúster, ya que será aquella que no se acople con ningún otro protón. Así también, por medio del espectro 2D HSQC se puede asignar el carbono correspondiente a esa señal de protón. A través de la interpretación de este espectro bidimensional, también se obtiene una información importante: los protones de los centros CH₂ (carbonos secundarios) se desdoblan, dando diferentes valores de desplazamiento, debido a que son centros diastereotópicos.

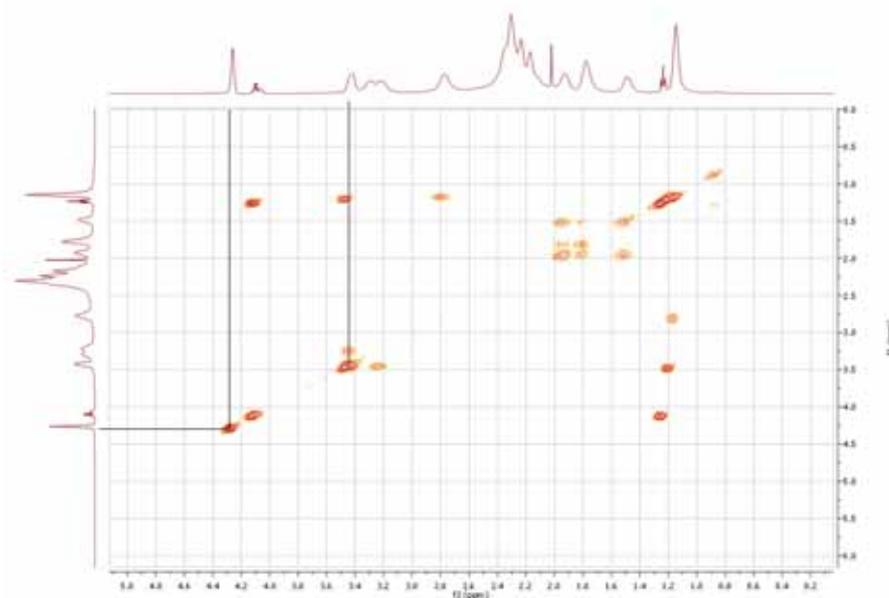


Figura 1.14: Espectro 2D COSY del compuesto 4.

Como puede observarse en el espectro de la Figura 1.14, la señal que aparece a 4.26 ppm no sufre acoplamiento con otro protón; por lo que se trata de la señal CH (C₂-H) del clúster de carborano. En esta figura puede observarse el acoplamiento de diferentes grupos de señales entre sí como consecuencia de la proximidad entre ellos; ya que pertenecen a grupos vecinales distintos.

De la interpretación del espectro 2D HSQC (Figura 1.15) se obtiene el desplazamiento del carbono del C₂-H del clúster: 56.74 ppm. Queda asignado, por tanto, el carbono terciario del clúster de *orto*-carborano.

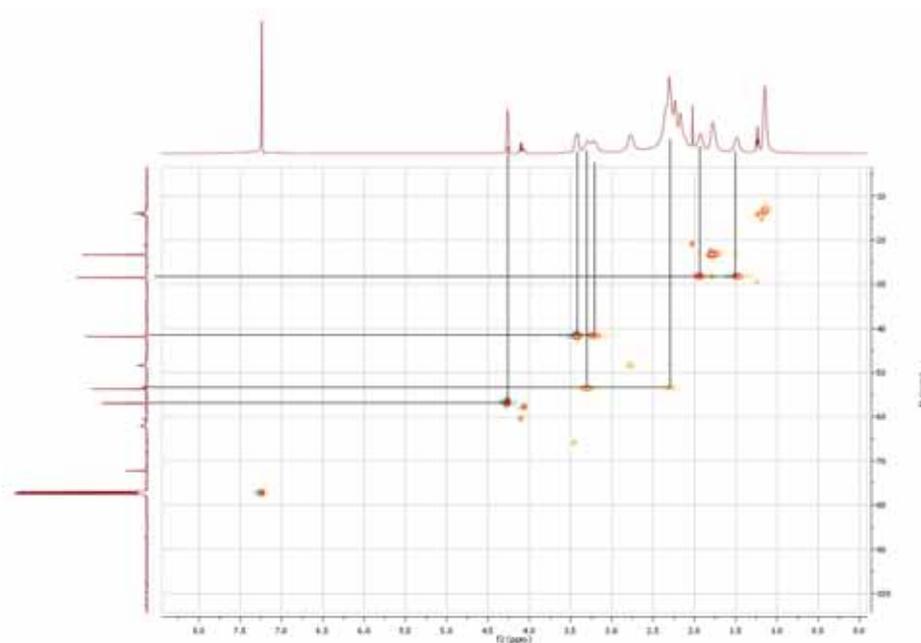


Figura 1.15: Espectro 2D HSQC del compuesto 4.

- 4) Mediante un experimento DEPT (ver Figura 1.16) se puede diferenciar entre los CH₂ (carbonos secundarios) y los CH (carbonos terciarios) y CH₃ (carbonos primarios).

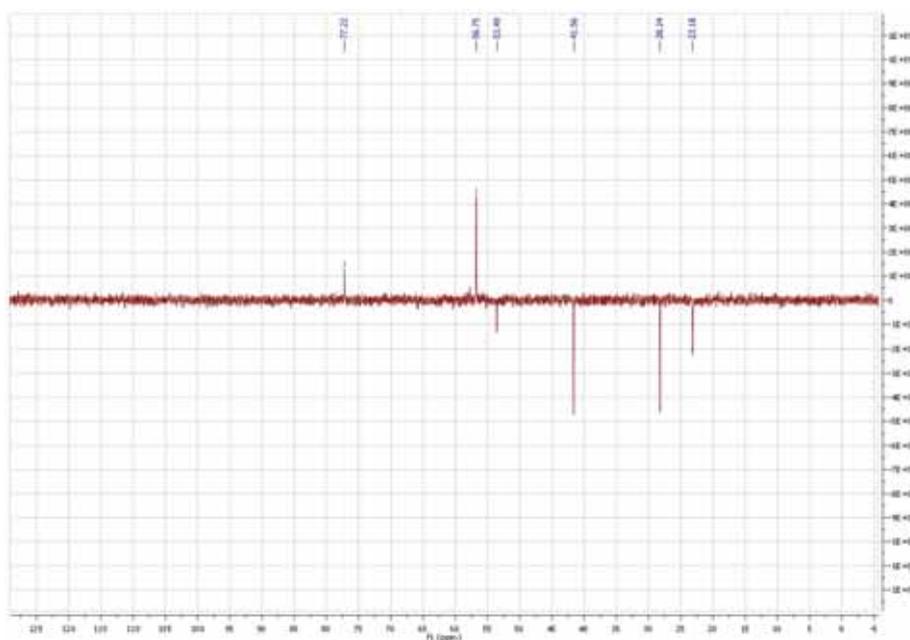


Figura 1.16: Espectro DEPT del compuesto 4.

Conocido el número y tipo de átomos de carbono (C₁, C₂-H, CO, 5 x CH₂, 1 x CH y 1 x CH₃) que presenta el compuesto **4**, mediante la interpretación del espectro DEPT se diferencian dos grupos de señales (hacia arriba y hacia abajo, que corresponden a los CH y CH₃, y a los CH₂ respectivamente): un CH a 77.22 ppm, que corresponde al CHCl₃; un CH a 56.75 ppm, que corresponde al C₂-H como se ha comprobado anteriormente; y 4 señales de CH₂ (53.49, 41.56, 28.24 y 23.18 ppm). Volviendo sobre el espectro 2D HSQC con los desplazamientos químicos de estos cuatro carbonos, puede observarse que 3 de estas señales tienen sus protones desdoblados (53.49, 41.56 y 28.24 ppm), mientras que una señal los presenta al mismo valor de desplazamiento (23.18 ppm).

Por otro lado, se sabe que sólo hay una señal de CH₃ (la del grupo etilo), que debe salir a valores de campo alto y que sólo puede acoplarse con el CH₂ vecinal. Como se puede ver en el espectro de ¹H RMN, a 1.15 ppm hay un singlete que integra para 3 protones. Comprobando esa señal en el espectro 2D COSY, se observa que presenta acoplamiento con una señal que sale a 2.80 ppm. Comparando estas dos señales con los espectros 2D HSQC y DEPT, se observa que la señal de 1.15 ppm que integra para 3 protones tiene un carbono a 13.8 ppm y que la señal de 2.80 ppm presenta un carbono con protones desdoblados hacia 48.3 ppm. Esta señal era la que faltaba en el DEPT y, por tanto, quedan asignadas las señales correspondientes al grupo etilo del compuesto.

En este momento, quedan por asignar las señales del anillo de pirrolidina y el CH₂ unido a la función amida. Sabiendo que el átomo de nitrógeno es más electronegativo que el carbono, desapantallará más los protones cercanos a él, desplazando sus señales a campo más bajo, es decir, aparecerán a valores mayores de desplazamiento químico. Retomando el espectro de ¹H RMN, el COSY y el 1D HSQC, se comprueba que a valores entre 1.49 y 1.90 ppm hay un grupo de señales que integra para 4 protones; y entre 2.30 y 3.50 ppm hay señales que integran, en total, para 7 protones, de los cuales se ha demostrado que 2 pertenecen al CH₂ del grupo etilo. Analizando el COSY, se observa que las señales a campo alto se acoplan entre sí, y que podrían corresponder a los dos carbonos secundarios del anillo de pirrolidina que están directamente unidos a carbonos.

- 5) Mediante la interpretación de espectros NOE se pueden conocer los centros cercanos espacialmente a aquel que está siendo saturado. Como se puede ver en la Figura 1.17, se irradia sobre el centro CH₃ (se hace un NOE selectivo sobre este centro para comprobar qué disposición espacial presenta, es decir, qué centros se encuentran cercanos espacialmente a él), que ha sido ya asignado definitivamente.

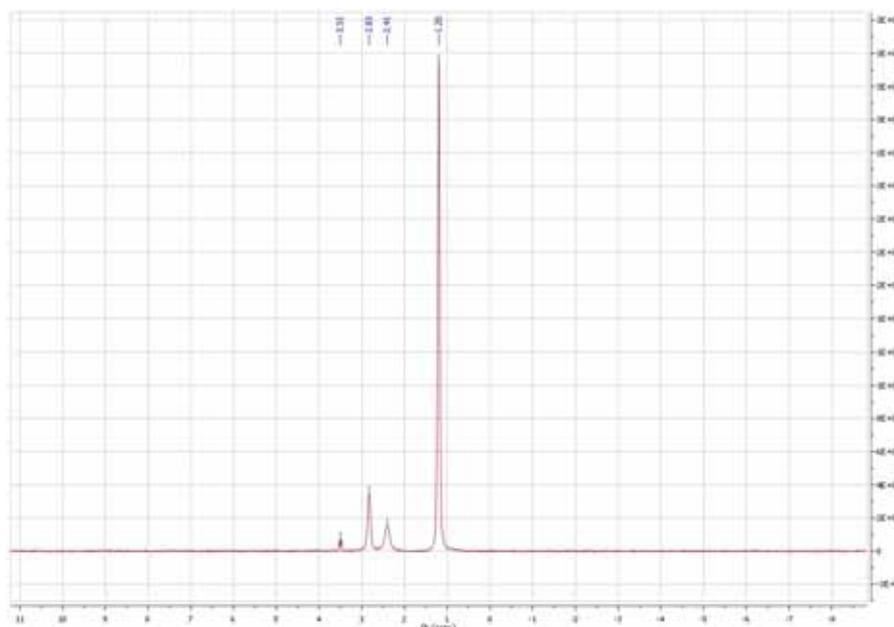


Figura 1.17: Espectro NOE sobre CH₃ (1.20 ppm) del compuesto 4.

En este espectro se observa la presencia de una señal alta (1.20 ppm) perteneciente al CH₃ como consecuencia de su irradiación selectiva. El resto de las señales (2.4, 2.8 y 3.5 ppm (señales no referenciadas respecto del CDCl₃)) que aparecen son debidas a los diferentes centros que se encuentran cercanos en el espacio al grupo irradiado. La diferencia en intensidad de estas señales es debida a la diferente proximidad de los distintos centros; de manera que cuanto más intensa sea la señal, el centro en cuestión se encontrará más cercano al irradiado. Sabiendo que el CH₃ tiene cercanos en el espacio al CH₂ de su mismo grupo etilo y al CH₂ pirrolidínico unido directamente al átomo de nitrógeno y que se ha asignado ya el CH₂ del etilo (2.2 y 2.8 ppm aproximadamente), se puede asignar la señal de 2.4 ppm a uno de los protones del CH₂ pirrolidínico.

Aplicando un NEO selectivo, a continuación, sobre este nuevo centro (2.4 ppm), se obtiene un espectro NOE (ver Figura 1.18) de su entorno espacial.

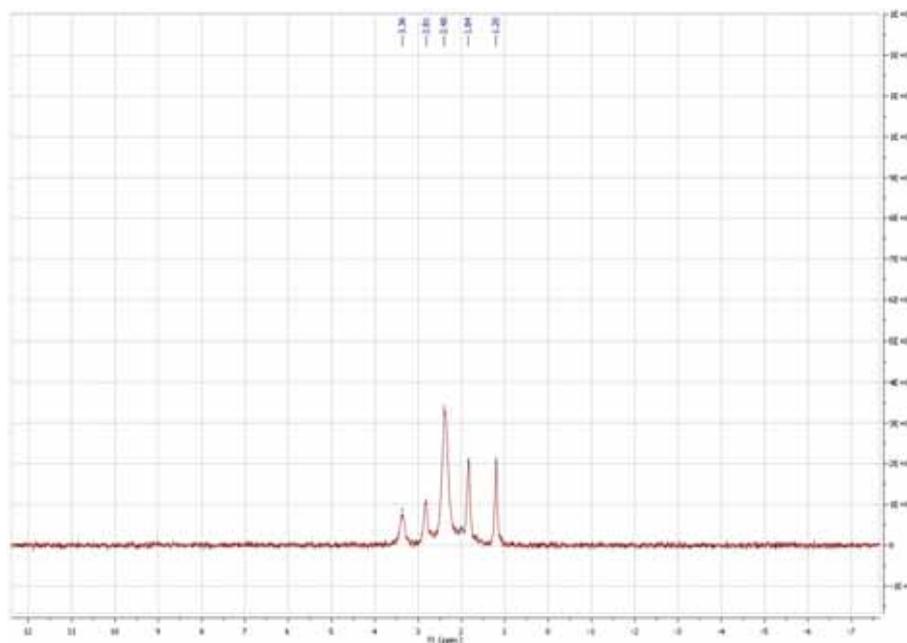


Figura 1.18: Espectro NOE sobre la señal a 2.40 ppm del compuesto 4.

Analizando este espectro se observa que la señal de protón a 2.40 ppm ve preferentemente dos señales a 1.84 y 1.20 ppm; y otras señales a 2.81 y 3.36 ppm, en menor medida. Comparando estas señales con los espectros de ¹H RMN, COSY y 1D HSQC, se comprueba que la señal de 1.20 ppm corresponde al CH₃ del etilo, la de 2.80 ppm, al CH₂ del etilo y la de 1.8 ppm al CH₂ pirrolidínico que tiene al lado. Queda, por tanto, asignada la señal de este CH₂ (1.78 ppm en ¹H RMN y 23.11 ppm en ¹³C RMN), y se puede asignar, por COSY, la del otro centro CH₂ pirrolidínico a alto campo; que resulta ser de 1.49 y 1.93 ppm en ¹H RMN y 28.26 ppm en ¹³C RMN. Quedan, de esta manera, asignados los dos centros del anillo de pirrolidina que no tienen sus carbonos unidos directamente a nitrógeno.

Llegados a este punto, faltan por asignar, solamente, dos CH₂ y un CH, todos ellos unidos directamente a un átomo de nitrógeno. Analizando el 2D HSQC se comprueba que la señal de 2.40 ppm, que se ha asignado a uno de los H del CH₂ pirrolidínico unido a nitrógeno, comparte carbono (a desplazamiento químico de 53.3 ppm) con la señal de protón a 3.3 ppm. Queda asignado el carbono secundario del anillo de pirrolidina.

El único CH₂ que quedaba sin asignar (el metileno unido directamente al enlace amídico), queda automáticamente asignado: 3.2 y 3.43 ppm por ¹H RMN y 41.8 ppm por ¹³C RMN. El CH pirrolidínico queda también asignando: 2.76 ppm por ¹H RMN y 48.3 ppm por ¹³C RMN.

- 6) Se procede a la asignación total de todos los centros en $\{^1\text{H}-^{11}\text{B}\}$ RMN (ver Figura 1.19), ^{13}C RMN (ver Figura 1.20) y $\{^{11}\text{B}-^1\text{H}\}$ RMN (ver Figura 1.21).

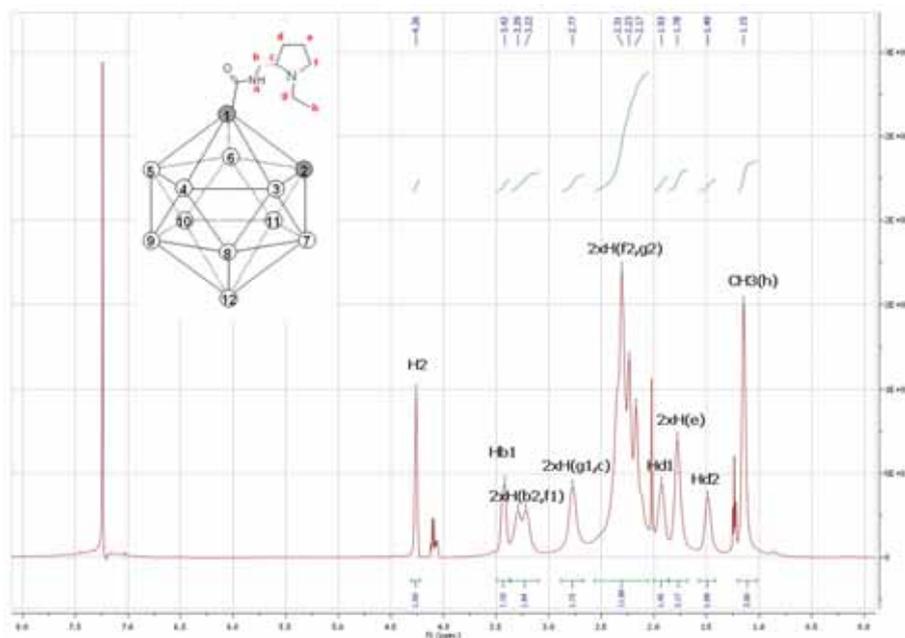


Figura 1.19: Espectro $\{^1\text{H}-^{11}\text{B}\}$ RMN del compuesto 4, asignado.

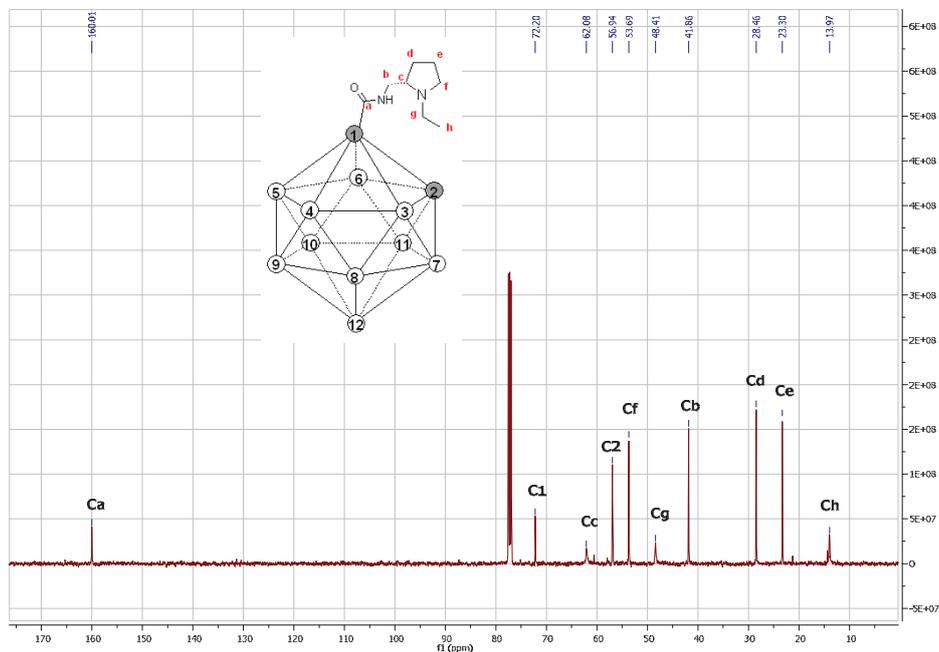


Figura 1.20: Espectro ^{13}C RMN del compuesto 4, asignado.

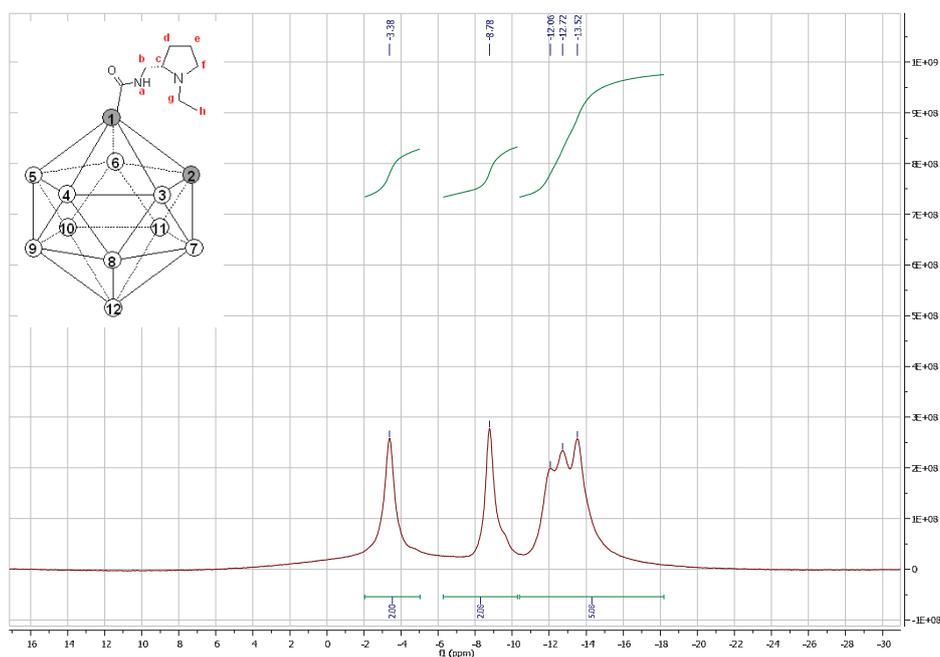


Figura 1.21: Espectro $\{^{11}\text{B}-^1\text{H}\}$ RMN del compuesto **4**.

El mismo procedimiento se siguió para la total caracterización de todos los ligandos dopaminérgicos sintetizados.

Todos los compuestos finales sintetizados fueron caracterizados también mediante espectroscopía de masas. Se llevaron a cabo experimentos de espectroscopía de masa exacta de alta resolución, obteniendo los valores deseados (ver Tabla 1.4) con desviaciones de 1 ppm para el compuesto final **4** ($[\text{M}+\text{H}]^+$), menor de 1 ppm para el compuesto **5** ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), de 1 ppm para el compuesto **6** ($[\text{M}+\text{H}]^+$), de 1 ppm para el compuesto **9** ($[\text{M}+\text{H}]^+$), de 1 ppm para el compuesto **10** ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), de 2 ppm para el compuesto **11** ($[\text{M}+\text{H}]^+$), de 1 ppm para el compuesto **14** ($[\text{M}+\text{H}]^+$), de 7 ppm para el compuesto **15** ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) y de 32 ppm para el compuesto **16** ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

COMPUESTO	MASA OBTENIDA	MASA TEÓRICA
4	296.325	296.324
5	390.327	390.327
6	268.291	268.292
9	299.312	299.313
10	393.317	393.316
11	271.279	272.281
14	313.327	313.328
15	407.329	407.332
16	285.265	285.297

Tabla 1.4: Resumen de los datos obtenidos de masa exacta para los compuestos finales indicados.

4. CONCLUSIONES

Descrita la metodología y los resultados obtenidos en la síntesis de análogos de ligandos dopaminérgicos, puede concluirse lo siguiente:

1. La reacción de los cloruros de ácido de *orto*-, *meta*- y *para*-carborano con las aminas (*S*)-(-)-2-aminometil-1-etilpirrolidina (comercial) y (*S*)-2-aminometil-1-Boc-pirrolidina **1** lleva a la formación de las correspondientes amidas **4**, **5**, **9**, **10**, **14** y **15**, con estructura análoga al ligando de receptores D₂ Racloprida, con buenos rendimientos (75%, 86%, 70%, 81%, 46% y 47% respectivamente) y de manera reproducible.
2. El tratamiento de los compuestos **5**, **10** y **15** con ácido trifluoroacético para el aislamiento de los compuestos precursores **6**, **11** y **16** tiene lugar de manera cuantitativa y reproducible.
3. La caracterización estructural de los compuestos puede llevarse a cabo inequívocamente mediante RMN.
4. Existen enlaces de hidrógeno intramoleculares en disolución en los compuestos derivados de *orto*-carborano monosustituido a través del centro C-H del clúster.
5. El enlace de hidrógeno no se observa en derivados de *meta*-carborano debido a la diferente posición relativa de los átomos de carbono del clúster.

6. El compuesto **4**, derivado de la estructura de *orto*-carborano monosustituida, es estable en ACN y se degrada hacia su forma *nido* en disolventes próticos como MeOH y H₂O/EtOH:9/1. Por el contrario, los compuestos **9** y **14**, derivados de las estructuras de *meta*-carborano y *orto*-carborano disustituido respectivamente, son estables tanto en ACN, como en MeOH y H₂O/EtOH:9/1.

¹Flórez, J; Farmacología humana, *Masson, S. A;* **1998**.

²Cumming, P; Imaging Dopamine; *Cambridge University Press,* **2009**.

³Skinbjerg, M; Dopamine D₂ receptor pharmacology: in vitro analyses and in vivo PET imaging; *Karolinska Institutet,* **2009**.

⁴Vallone, D; Picetti, R; Borrelli, E; Structure and function of dopamine receptors; *Neurosci. Behav. Rev.* **2000**, 24, 125-132.

⁵Kababian, J. W; Calne, D. B; Multiple receptors for dopamine, *Nature*, **1979**, 277, 93-96.

⁶Zhang, A; Neumeyer, J. L; Baldessarini, R. J; Recent progress in development of dopamine receptor subtype-selective agents: potential therapeutics for neurological and psychiatric disorders; *Chem. Rev.* **2007**, 107, 274-302.

⁷Overington, J. P; Lazikani, B. A; Hopkins, A. L; How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 993-996.

⁸Löber, S; Hübner, H; Tschammer, N; Gmeiner, P; Recent advances in the search for D₃- and D₄-selective drugs: probes, models and candidates; *Trends in Pharmacological Sciences*, **2011**, 32, 148-157.

⁹Hackling, A. E; Stark, H; Dopamine D₃ receptor ligands with antagonist properties; *ChemBioChem*, **2002**, 3, 946-961.

¹⁰Newman, A. H; Grundt, P; Nader, M. A; Dopamine D₃ receptor partial agonists and antagonists as potential abuse therapeutic agents; *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3663-3679.

¹¹Rondou, P; Haegeman, G; Van Craenenbroeck, K; The dopamine D₄ receptor: biochemical and signaling properties; *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, 67, 1971-1986.

¹²Arias-Carrión, O; Stamelou, M; Murillo-Rodríguez, E; Menéndez-González, M; Pöppel, E; Dopaminergic reward system: a short integrative review; *Int. Arch. Med.* **2010**, 3 (24).

¹³Kebabian, J. W; Tarazi, F. I; Kula, N. S; Baldessarini, R. S; Compounds selective for dopamine receptor subtypes; *Drug Discovery Today*, **1997**, 2, 333-340.

¹⁴Rowley, M; Bristow, L. J; Hutson, P. H; Current and novel approaches to the drug treatment of schizophrenia; *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 477-501.

- ¹⁵Protais, P; Arbaoui, J; Bakkali, E. H; Effects of various isoquinoline alkaloids on in vitro 3H-dopamine by rat striatal synaptosomes; *J. Nat. Prod.* **1995**, 58, 1475-1484.
- ¹⁶Cabedo, N; Protais, P; Cassels, B. K; Cortes, D; Synthesis and dopamine receptor selectivity of the benzyltetrahydroisoquinoline, (*R*)-(+)-*nor*-Roefractine; *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 709-712.
- ¹⁷Spano, P. F; Govoni, S; Trabucchi, M; Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system; *Adv. Bio-chem. Psychopharmacol.* **1978**, 19, 155-165.
- ¹⁸Farde, L; Ehrin, E; Eriksson, L; Greitz, T; Hall, H; Hedström, C. G; Litton, J. E; Sedvall, G; Substituted benzamides as ligands for visualization of dopamine receptor binding in the human brain by positron emission tomography; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 3863-3867.
- ¹⁹(a) de Paulis, T; Hall, H; Ögren, S. O; Wägner, A; Stensland, B; Csöreg, I; Synthesis, crystal structure and antidopaminergic properties of eticlopride (FLB 131); *Eur. J. Med. Chem.* **1985**, 20, 273-276; (b) Köhler, C; Hall, H; Ögren, S. O; Gawell, L; Specific in vitro and in vivo binding of 3H-raclopride. A potent substituted benzamide drug with high affinity for dopamine D-2 receptors in the rat brain; *Biochem. Pharmacol.* **1985**, 34, 2251-2259.
- ²⁰Köhler, C; Hall, H; Ögren, S. O; Gawell, L; Specific in vitro and in vivo binding of ³H-Raclopride: a potent substituted benzamide drug with high affinity for dopamine D-2 receptors in the rat brain; *Biochem. Pharmacol.* **1985**, 34, 2251-2259.
- ²¹Farde, L; Hall, H; Ehrin, E; Sedvall, G; Quantitative analysis of D₂ dopamine receptor binding in the living human brain by PET; *Science*, **1986**, 231(4735) 258-261.
- ²²Talvik, M; Nordström, A. L; Okubo, Y; Olsson, H; Borg, J; Halldin, C; Farde, L; Dopamine D₂ receptor binding in drug-naïve patients with schizophrenia examined with raclopride-C11 and positron emission tomography; *Psychiat. Res-Neuroim.* **2006**, 148(2-3), 165-173.
- ²³Vilkman, H; Kajander, J; Aalto, S; Vahlberg, T; Nägren, K; Allonen, T; Syvälahti, E; Hietala, J; The effects of lorazepam on extrastriatal dopamine D₂/3 receptors – a positron emission tomography study with [¹¹C]FLB 457; *J. Eur. Neuropsychopharm.* **2006**, 16(S4), S266.
- ²⁴(a) Langer, O; Halldin, C; Dollé, F; Swahn, C. G; Olsson, H; Karlsson, P; Hall, H; Sandell, J; Lundkvist, C; Vaufray, F; Loc'h, C; Crouzel, C; Mazière, B; Farde, L; Carbon-11 Epidepride: a suitable radioligand for PET investigations of striatal and extrastriatal dopamine D₂ receptors; *Nucl. Med. Biol.* **1999**, 26, 509-518; (b) Airaksinen, A. J; Nag, S; Finnema, S. J; Mukherjee, J; Chattopadhyay, S; Gulyás, B; Farde, L; Halldin, C; [¹¹C]Cyclopropyl-FLB 457: a PET radioligand for low densities of dopamine D₂ receptors; *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 6467-6473; (c) Mukherjee, J; Yang, Z. Y; Brown, T; Roemer, J; Cooper, M; ¹⁸F-desmethoxyfallypride: a fluorine-18 labeled radiotracer with properties similar to carbon-11 raclopride for PET imaging studies of dopamine D₂ receptors; *Life Sciences*, **1996**, 59, 669-678.
- ²⁵Samanta, S; Debnath, B; Gayen, S; Ghosh, B; Basu, A; Srikanth, K; Jha, T; QSAR modeling on dopamine D₂ receptor binding affinity of 6-methoxy benzamides; *Il Farmaco*, **2005**, 60, 818-825.
- ²⁶(a) Endo, Y; Iijima, T; Yamakoshi, Y; Yamaguchi, M; Fukasawa, H; Shudo, K; Potent estrogenic agonists bearing Dicarba-closo-dodecaborane as a hydrophobic pharmacophore; *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1501-1504; (b) Ogawa, T; Ohta, K; Yoshimi, T; Yamazaki, H; Suzuki, T; Ohta, S; Endo, Y; *m*-Carborane bisphenol structure as a pharmacophore for selective estrogen receptor modulators; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3943-3946.

²⁷[³H]Racloprida: 1mCi (37MBq), 60-87Ci (2220-3219GBq)/mmol, PerkinElmer Ink.

²⁸Tang, W; Ng, S. C; Facile synthesis of mono-6-amino-6-deoxy- α -, β -, γ -cyclodextrin hydrochlorides for molecular recognition, chiral separation and drug delivery; *Nature Protocols*, **2008**, 3, 691-697.

²⁹(a) Tian, W. Q; Wang, Y. A; Mechanisms of Staudinger reactions within density functional theory; *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4299-4308; (b) Lin, F. L; Hoyt, H. M; van Halbeek, H; Bergman, R. G; Bertozzi, C. R; Mechanistic investigations of the Staudinger ligation; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2688-2695.

³⁰(a) Kahl, S. B; Kasar, R. A; Simple, high-yield synthesis of polyhedral carborane amino acids; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1223-1224; (b) Kasar, R. A; Knudsen, G. M; Kahl, S. B; Synthesis of 3-amino-1-carboxy-*ortho*-carborane and an improved, general method for the synthesis of all three C-amino-C-carboxycarboranes; *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 2936-2940.

³¹(a) Ohta, K; Yamazaki, H; Endo, Y; NMR study of 1-aryl-1,2-dicarba-*closo*-dodecaboranes: intramolecular C-H-O hydrogen bonding in solution; *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 1937-1940; (b) Alekseyeva, E. S; Batsanov, A. S; Boyd, L. A; Fox, M. A; Hibbert, T. G; Howard, J. A. K; MacBride, J. A. H; Mackinnon, A; Wade, K; Intra- and inter-molecular carboranyl C-H-N hydrogen bonds in pyridyl-containing *ortho*-carboranes; *Dalton Trans.* **2003**, 475-482; (c) Cappelli, A; Giorgi, G; Anzini, M; Vomero, S; Ristori, S; Rossi, C; Donati, A; Characterization of persistent intramolecular C-H-X(N, O) bonds in solid state and solution; *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 3177-3183.

³²(a) Gosfrey, P. D; Grigsby, W. J; Nichols, P. J; Raston, C. L; Aza-crown ether: 1,2-dicarbododecaborane (12) supramolecular assemblies; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9283-9284; (b) Cowley, A. H; Lomelí, V; Voigt, A; Synthesis and characterization of a terminal borylene (boranediyl) complex; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6401-6402; (c) Macías, R; Rath, N. P; Barton, L; Synthesis and characterization of a new dicage *ortho*-carborane with a supramolecular structure directed by intramolecular C-H-carborane-O bonds; *J. Organomet. Chem.* **1999**, 581, 39-44.

³³Los análisis por UPLC/ESI-MS fueron llevados a cabo usando un módulo de separación AQUITY UPLC acoplado a un espectrómetro de masas LCT TOF Premier XE (Waters, Manchester, UK). Se uso una columna C18 Acquity BEH (1.7 μ m, 5 mm, 2.1 mm) como fase estacionaria. Las disoluciones buffer utilizadas fueron A (MeOH) y B (H₂O y 0.1% HCOOH). La columna fue eluída con un gradiente lineal: t = 0 min, 95% B; t = 3 min, 1% B; t = 4 min, 1% B; t = 5 min, 95% B. El tiempo total fue de 5 min, el volumen inyectado de 5 μ l y el flujo de 600 μ l/min. La detección fue llevada a cabo en modo positivo, monitorizando el pico isotópico más abundante del espectro de masas (M-H⁺): compuesto **4** (C₁₀H₂₆B₁₀N₂O, m/z = 299.31, tiempo de retención = 2.58 min), forma *nido* de **4** (C₁₀H₂₅B₉N₂O, m/z = 288.29, tiempo de retención = 1.70 min), compuesto **9** (C₁₀H₂₆B₁₀N₂O, m/z = 299.31, tiempo de retención = 2.28 min) y compuesto **14** (C₁₁H₂₈B₁₀N₂O, m/z = 313.33, tiempo de retención = 2.65 min).

³⁴Olah, G. A; Prasash, G. K. S; Williams, R. E; Fidd, L. E; Wade, K; Hypercarborn Chemistry, Wiley, Ney York, **1987**.

CAPÍTULO 2

SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE LIGANDOS DE RECEPTORES CB₁

1. Aspectos biológicos
 - 1.1. Introducción
 - 1.2. Receptores cannabinoides
 - 1.3. Clasificación de los cannabinoides
 - 1.4. Imagen del sistema cannabinoide
 2. Antecedentes
 - 2.1. Ligandos agonistas de receptores cannabinoides
 - 2.2. Ligandos antagonistas de receptores cannabinoides
 3. Resultados y discusión
 4. Conclusiones
-

1. ASPECTOS BIOLÓGICOS

1.1. Introducción

Hace menos de 20 años, el campo de estudio del cannabis en particular y de los cannabinoides en general era considerado una minoría, un área de investigación tranquila y casi inexplorada. Actualmente, la escena es otra.

El término “cannabinoide” fue asignado, originalmente, a un colectivo de hidrocarburos aromáticos C₂₁ que contenían oxígeno y que tenían lugar en la planta *Cannabis sativa*. Sin embargo este término se ha generalizado y actualmente es utilizado para todos los compuestos, tanto naturales como sintéticos, que puedan imitar las funciones de los metabolitos secundarios encontrados en la planta o presentar estructuras parecidas a éstos. De esta manera, se denomina cannabinoide a todo compuesto químico perteneciente a la familia de los terpenofenoles que activa los receptores cannabinoides presentes en el organismo.

El mayor componente psicoactivo de la planta *Cannabis sativa* es el conocido Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (ver Figura 2.1), que fue caracterizado y sintetizado en 1964¹ y que ha servido como prototipo para la síntesis de numerosos análogos como potenciales agentes farmacológicos. Se cree que el THC es el cannabinoide farmacológicamente más activo no sólo en su forma herbal (marihuana) sino también en forma de resina (hashish). Debido a su alta liposolubilidad y a su baja hidrosolubilidad, se pensó inicialmente que debía sus propiedades farmacológicas a una habilidad de perturbar los componentes fosfolipídicos de las membranas biológicas². Sin embargo esta teoría dio un giro a principios de los años 80 con el descubrimiento, en tejidos de mamíferos, de receptores cannabinoides específicos. De hecho, la mayoría de los efectos del THC están mediados por sus acciones como agonista sobre los receptores cannabinoides.

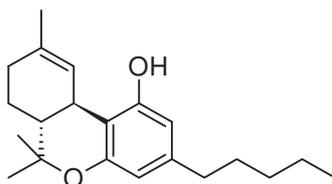


Figura 2.1: Estructura del Δ^9 -THC, el principal componente psicoactivo del cannabis.

1.2. Receptores cannabinoides

Hasta ahora, han sido identificados dos tipos de receptores cannabinoides: los CB₁ y los CB₂³. Los receptores CB₁ fueron identificados en 1990 en USA en el laboratorio de Tom Bonner⁴; mientras que los receptores CB₂ lo fueron en Reino Unido en 1993 por Sean Munro⁴. Estos dos tipos de receptores se diferencian en el modo de transmitir la señal y en su distribución en los diferentes tejidos. Tanto los CB₁ como los CB₂ son receptores asociados a proteínas G_{i/o} que inhiben la actividad de la enzima adenililciclase y que promueven la actividad de ciertas proteínas quinasas que responden a estímulos extracelulares y regulan varias actividades celulares.

Los receptores CB₁ son expresados en el sistema nervioso central, en el periférico y en algunas células no neuronales. Los receptores CB₁ se hallan en abundancia en las regiones del cerebro responsables del movimiento⁵, del procesamiento de la memoria y de la modulación del dolor. Estos receptores parecen ser los responsables de los efectos eufóricos y anticonvulsivos del cannabis.

Los receptores CB₂ son expresados, principalmente, en células del sistema inmunitario, como en los leucocitos, el bazo y las amígdalas. Este tipo de receptores parece ser el responsable de la acción antiinflamatoria del cannabis⁶.

1.3. Clasificación de los cannabinoides

Atendiendo al modo en cómo son producidos, los cannabinoides pueden clasificarse en tres tipos principalmente:

- Fitocannabinoides o cannabinoides herbarios: son aquellos que son sintetizados de una manera natural por la planta de cannabis.
- Cannabinoides endógenos: son aquellos producidos por organismos animales y por el cuerpo humano.
- Cannabinoides sintéticos: son aquellos compuestos, sintetizados por el hombre, que presentan algún tipo de similitud con los naturales y los endógenos, ya sea estructural o funcional.

1.3.1. Fitocannabinoides

También reciben el nombre de cannabinoides naturales, y son conocidos únicamente porque se producen en una cantidad significativa en la planta de cannabis.

Todos estos compuestos derivan de una única estructura (cannabigerol: CBG) y difieren entre sí en el proceso mediante el cual el precursor es ciclado. Dentro de esta familia caben destacar el Tetrahidrocannabinol (THC) (ver Figura 2.1), el Cannabidiol (CBD) y el Cannabinol (CBN) (ver Figura 2.2).

Han sido identificados más de 60 cannabinoides en el cannabis; la mayoría pertenecientes a una de las 10 subclases principales⁷, de las cuales los más abundantes son, como ya se ha comentado anteriormente, los de tipo CBG. La presencia de cannabinoides varía según la variedad del cannabis y, por lo general, en una planta se encuentran solamente tres o cuatro cannabinoides en concentraciones superiores al 0.1%.

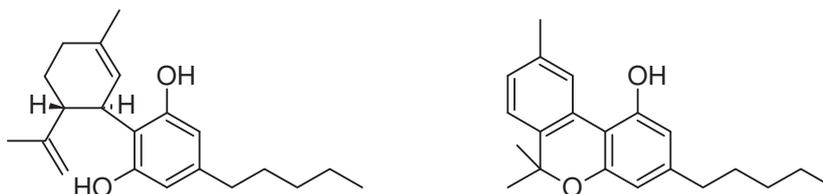


Figura 2.2: Estructuras de los fitocannabinoides CBD (a la izquierda) y CBN (a la derecha).

El *THC* es el componente psicoactivo principal de la planta. Parece que tiene propiedades analgésicas, aliviando el dolor moderado, y neuroprotectoras. Presenta, aproximadamente, la misma afinidad tanto por los receptores CB₁ como por los CB₂. Es el responsable del estado de euforia asociado con el consumo de cannabis debido a su unión con los receptores CB₁.

1.3.2. Endocannabinoides

Como consecuencia del descubrimiento de los receptores cannabinoides se demostró que ciertos tejidos podían producir agonistas endógenos para esos mismos receptores, todos ellos derivados del ácido araquidónico⁸. Estas sustancias endógenas son conocidas como endocannabinoides; que junto con los receptores cannabinoides constituyen lo que se conoce como “sistema cannabinoide”.

Son cinco los endocannabinoides conocidos, pero los más investigados han sido la Anandamida y el 2-Araquidonoilglicerol (ver Figura 2.3), que son, normalmente, sintetizados bajo demanda en vez de almacenados.

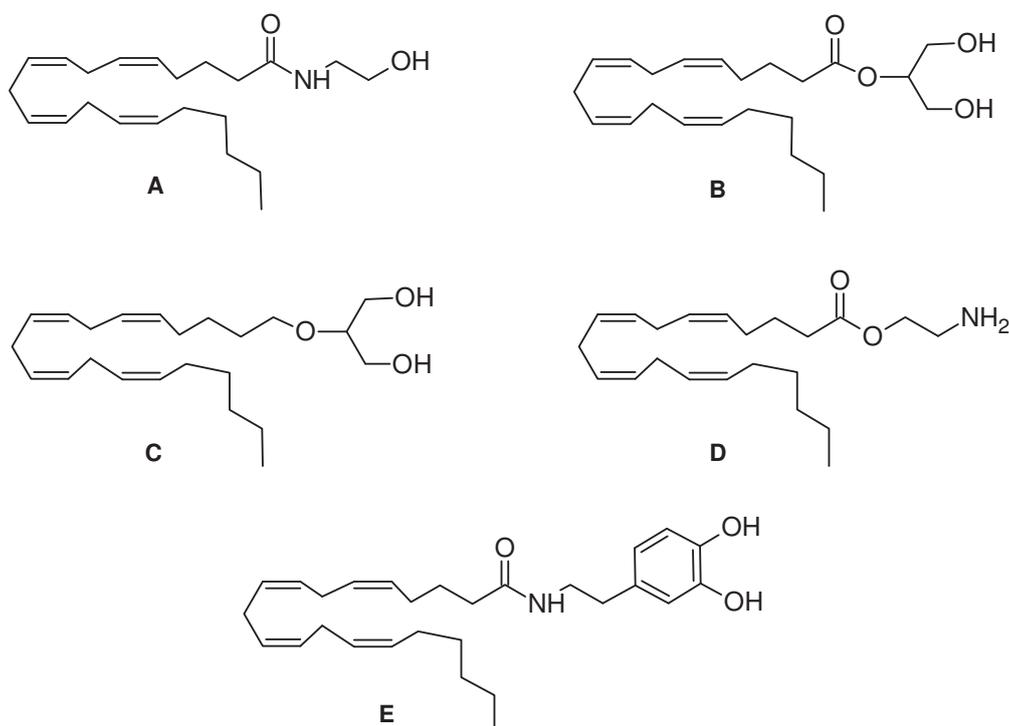


Figura 2.3: Estructuras de los cinco endocannabinoides conocidos: **A** (Anandamida), **B** (2-Araquidonoilglicerol), **C** (Noladin éter), **D** (N-Araquidonoil-dopamina) y **E** (Virodamina).

Función

Los endocannabinoides funcionan como mensajeros intercelulares lipídicos, señalando moléculas secretadas en una célula y activando los receptores cannabinoides necesarios de las células presentes a su alrededor. La diferencia con respecto a otros neurotransmisores radica en que los endocannabinoides presentan una señalización retrógrada⁴.

Señal retrógrada

Los neurotransmisores convencionales son liberados de una célula presináptica y activados por los receptores apropiados en una célula postsináptica. Por el contrario, el caso de los endocannabinoides se define como retrógrado porque realizan la misma función pero en sentido contrario; es decir, son liberados en la célula postsináptica y activados en la célula presináptica, donde los receptores se encuentran concentrados en los axones, en zonas donde los neurotransmisores convencionales son normalmente liberados.

Este sistema de transmisión permite a la célula postsináptica controlar su propia entrada de tráfico; ya que el efecto de esta célula depende de la naturaleza del neurotransmisor convencional que está siendo controlado.

1.3.3. Cannabinoides sintéticos

Históricamente, la síntesis química de los cannabinoides se basaba en la estructura de los fitocannabinoides, de los cuales un amplio número han sido sintetizados y testados, sobre todo en el grupo de Roger Adams⁹.

Dentro de este grupo cabe destacar compuestos como el Nabilone y el Rimonabant (SR141716), que son parte de medicamentos; y compuestos como el CP-55940 y HU-210.

1.4. Imagen del sistema cannabinoide

Varios ligandos de receptores cannabinoides han sido marcados con tritio y utilizados para determinar las afinidades por los receptores CB₁ y CB₂ de cannabinoides mediante ensayos de desplazamiento y para establecer los patrones de distribución de estos receptores^{3, 10}.

El ensayo más comúnmente empleado usando células o membranas celulares es el ensayo de unión de [³⁵S]GTPγS¹¹ ([³⁵S]guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate)) y los ensayos cíclicos de AMP.

2. ANTECEDENTES

El descubrimiento y la clonación de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, así como el aislamiento y caracterización de dos familias de ligandos cannabinoides endógenos, representadas por la anadamida y el 2-arquinoilglicerol han abierto nuevos horizontes en este nuevo campo de la biología. Además, un considerable número de análogos cannabinoides pertenecientes a diversas clases estructurales de compuestos ha sido sintetizado y testado, aportando importante información sobre los requerimientos estructurales para el reconocimiento y activación de los receptores.

2.1. Ligandos agonistas de receptores cannabinoides

Dentro de este grupo de ligandos pueden encontrarse tanto derivados de estructuras clásicas de la familia del THC, como estructuras de aminoalquilindoles e icosanoides entre otros.

Los compuestos más investigados de esta familia son: Δ^9 -THC (ver Figura 2.1), Δ^8 -THC y HU-210 (ver Figura 2.4). De todos estos compuestos, el Δ^9 -THC es, como ya se ha explicado anteriormente, el principal constituyente psicoactivo del cannabis. El Δ^8 -THC es también un psicoactivo de la planta, mientras que el HU-210 es un compuesto sintético.

Durante el transcurso de extensos ensayos SAR sobre la actividad analgésica de los derivados cannabinoides, fueron sintetizados unos análogos nuevos que carecían del anillo de dihidropirano del THC. Dentro de esta serie, el compuesto CP47497 representa el prototipo de estos análogos cannabinoides (ver Figura 2.4) con estructuras bicíclicas e incluso tricíclicas¹². El compuesto CP55940 (ver Figura 2.4) se convirtió en uno de los mejores agonistas cannabinoides. Presenta una lipofilia menor que el THC y su forma tritiada, [³H]CP55940 permitió el descubrimiento y posterior caracterización de los receptores cannabinoides CB₁¹³.

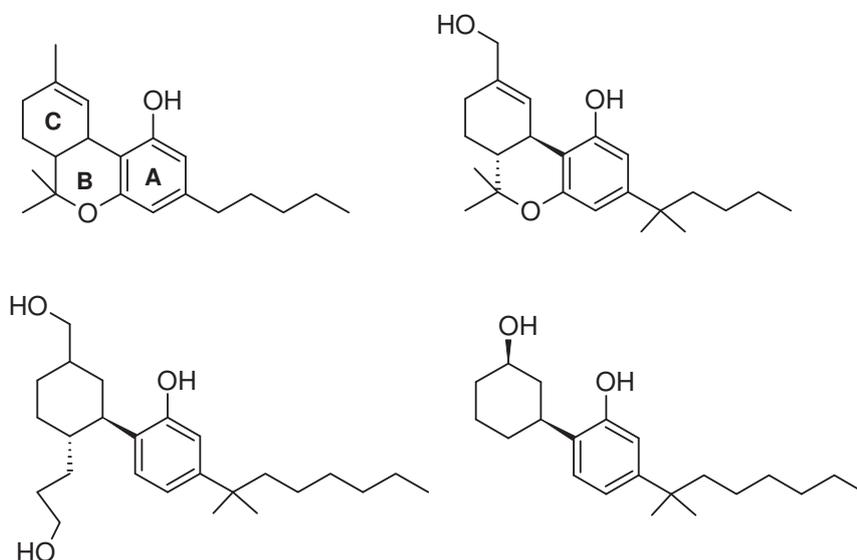


Figura 2.4: Estructuras de los cannabinoides clásicos Δ^8 -THC (arriba a la izquierda), HU-210 (arriba a la derecha) y de los cannabinoides no clásicos CP55940 (abajo a la izquierda) y CP47497 (abajo a la derecha).

2.2. Ligandos antagonistas de receptores cannabinoides

2.2.1. Diarilpirazoles

El compuesto prototipo de esta serie es el SR141716A (ver Figura 2.5), conocido también como Rimonabant, un ligando potente y selectivo de los receptores CB₁. El SR144528 (ver Figura 2.5), otro ligando de esta serie, es un ligando potente y selectivo por los receptores CB₂. Existen evidencias de que estos compuestos producen, por sí solos, efectos inversos a aquellos producidos por los ligandos agonistas cannabinoides¹⁰. Esta idea se basa en la habilidad que presentan los receptores CB₁ y CB₂ de exhibir actividad de transducción de señal en ausencia de agonistas exógenos o endógenos.

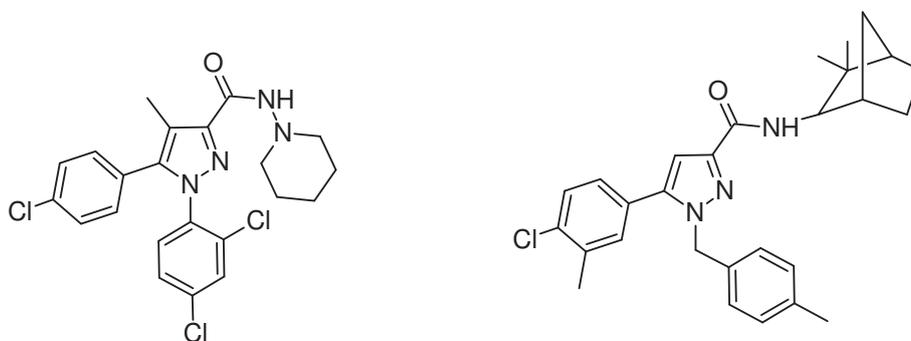


Figura 2.5: Estructuras de los diarilpirazoles SR141716A (izquierda) y SR144528 (derecha), antagonistas selectivos para los receptores CB₁ y CB₂, respectivamente.

Es el compuesto *SR141716A* el que se ha tomado como referencia a la hora de sintetizar análogos en esta Tesis. Fue el primer antagonista selectivo CB₁¹⁴ comercializado, cuyo efecto principal es la reducción del apetito. Fue sintetizado por primera vez en los Laboratorios Sanofi en 1994. Desde entonces han sido sintetizados varios análogos, incluyendo ciertos radiotrazadores PET y SPECT¹⁵ (ver Figura 2.6).

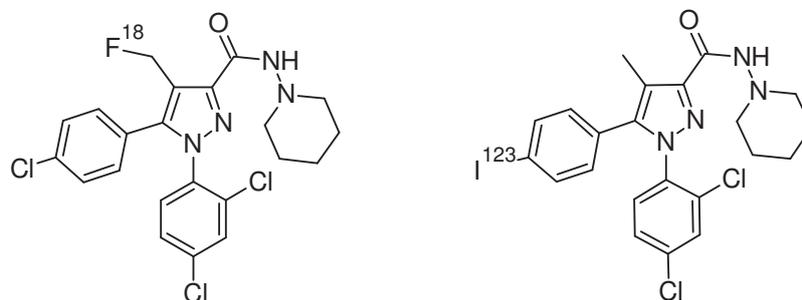


Figura 2.6: Estructuras de los radiotrazadores PET Y SPECT análogos del SR141716A: [¹⁸F]SR144385 y [¹²³I]AM251.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los productos derivados de la planta *Cannabis sativa* son algunas de las drogas más antiguas y más comúnmente utilizadas en el mundo. Junto con el extendido uso de la marihuana y la drogodependencia causada por el consumo abusivo de ciertos estupefacientes, existen otras propiedades bien conocidas de los compuestos cannabinoides en el área terapéutica que incluyen la analgesia¹⁶, la antiémesis (evita el vómito)¹⁷ y el estímulo del apetito¹⁸.

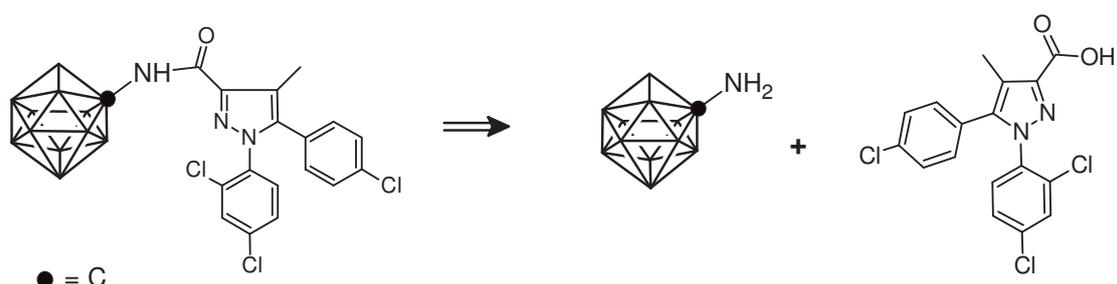
Pese a que la aplicación de las técnicas de imagen al estudio del sistema cannabinoide es muy reciente comparada con la de otras drogas de abuso, experimentos de autorradiografía han dado información de alta calidad sobre la distribución de los receptores cannabinoides en el cerebro y sobre los efectos de las drogas cannabinoides en el metabolismo cerebral. Por un lado, estudios SAR recientes llevados a cabo sobre ligandos cannabinoides de diarilpirazoles¹⁹ han mostrado que la presencia de diferentes derivados de la alquilamida juegan un papel importante en la actividad biológica de los ligandos, en cuanto que parecen ser un factor importante de control de afinidad para los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂.

Por otro lado, como ha sido descrito por Endo y colaboradores²⁰, las estructuras de 1,2- y 1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano (*orto*- y *meta*-carborano), pueden actuar como estructuras hidrofóbicas de varias moléculas biológicamente activas, debido a que tanto sus estructuras espaciales como la superficie hidrofóbica que presentan facilitan la interacción con los residuos hidrofóbicos de los receptores del “bolsillo” de unión del ligando.

Así pues, basándose en la propuesta de Endo y considerando que la unidad de carborano presenta un volumen rotacional similar al de un anillo de fenilo y que tiene un marcado carácter hidrofóbico, se han desarrollado una serie de análogos de los antagonistas Rimonabant (SR141716A, CB₁ antagonista) y SR144528 (CB₂ antagonista); introduciendo diferentes clústeres de carborano (*orto*-, *meta*- y metil-*orto*-carborano) como farmacóforos hidrofóbicos en sustitución del resto alquílico de la alquilamida. Aunque no han podido efectuarse ensayos de caracterización *in vitro* o *in vivo* de los compuestos desarrollados en el marco de esta tesis doctoral, se postula que la incorporación de los clústeres de carborano podría modular positivamente la afinidad y selectividad de los compuestos desarrollados hacia los receptores CB₁.

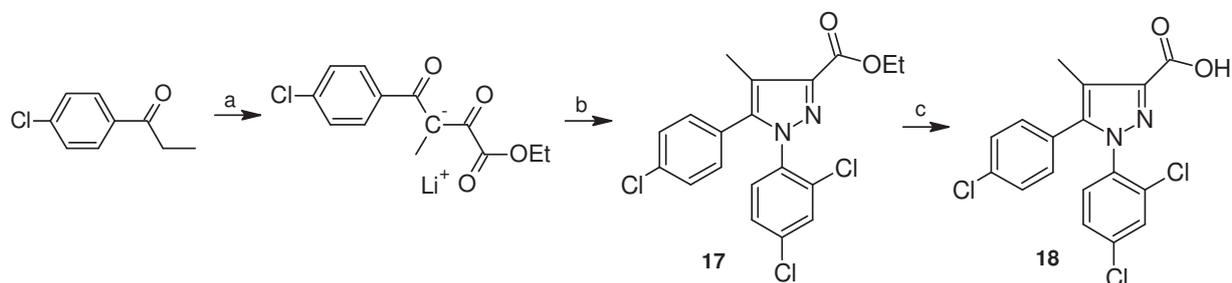
Síntesis de ligandos cannabinoides

A la hora de diseñar una ruta sintética (ver Esquema 2.1) para la obtención de los ligandos cannabinoides deseados, se optó por la condensación final del ácido carboxílico diarilpirazolínico, previamente sintetizado, con la amina derivada de cada clúster de carborano.



Esquema 2.1: Ruta retrosintética diseñada para la obtención de los ligandos cannabinoides deseados, que consiste en la condensación del ácido carboxílico diarilpirazolínico y la amina correspondiente del clúster de carborano.

Para llevar a cabo esta ruta sintética fue necesaria la síntesis previa del ácido carboxílico diarilpirazolínico **18** (ver Esquema 2.2) que había sido anteriormente publicada por Pertwee y colaboradores para el desarrollo de ligandos análogos de SR141716A²¹.



Esquema 2.2: Ruta sintética llevada a cabo para la síntesis del ácido carboxílico **18**. Condiciones: (a) i) LiHMDS, Et₂O anh, -78°C, ii) Dietil oxalato, rt; (b) i) Hidrocloruro de 2,4-diclorofenilhidrazina, EtOH, ii) HAc, reflux; (c) LiOH, THF/H₂O, 0°C-rt.

Capítulo 2: Síntesis de análogos de ligandos de receptores CB₁

Partiendo de la 4-cloropropiofenona comercial se preparó la sal de litio intermedia por reacción con dietil oxalato en presencia de hexametildisilazida de litio (LiHMDS) como base. Esta sal se hizo reaccionar con el hidrocloreuro de la 2,4-diclorofenilhidrazina para obtener el éster etílico **17** con un rendimiento bajo (20%) después de varios lavados y centrifugados. El éster etílico fue hidrolizado completamente a ácido carboxílico (ver Figura 2.7 para espectro ¹H-RMN y Figura 2.8 para espectro de ¹³C-RMN, con la señal del grupo metilo asignada) por reacción con hidróxido de litio en tetrahidrofurano/agua con rendimiento cuantitativo. Este procedimiento difiere del publicado ya que en las condiciones descritas por los autores, que realizaron la hidrólisis con hidróxido potásico en metanol, se obtuvieron mezclas del compuesto hidrolizado y del éster metílico correspondiente.

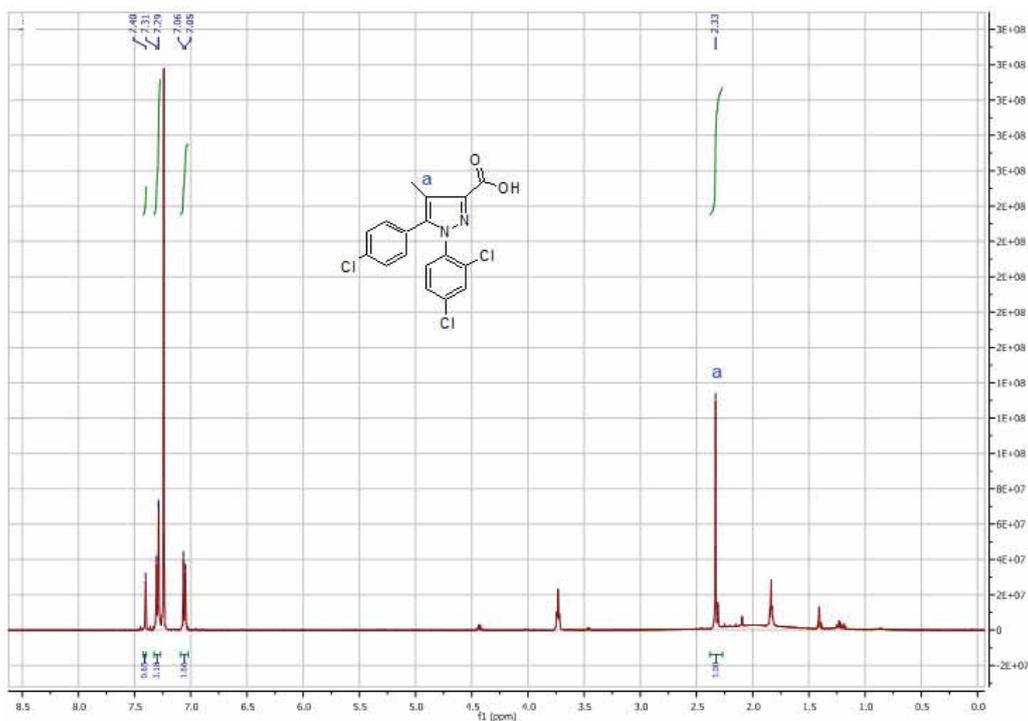


Figura 2.7: Espectro ¹H-RMN del ácido carboxílico **18**. A $\delta = 2.33$ ppm se puede ver el singlete correspondiente al grupo metilo.

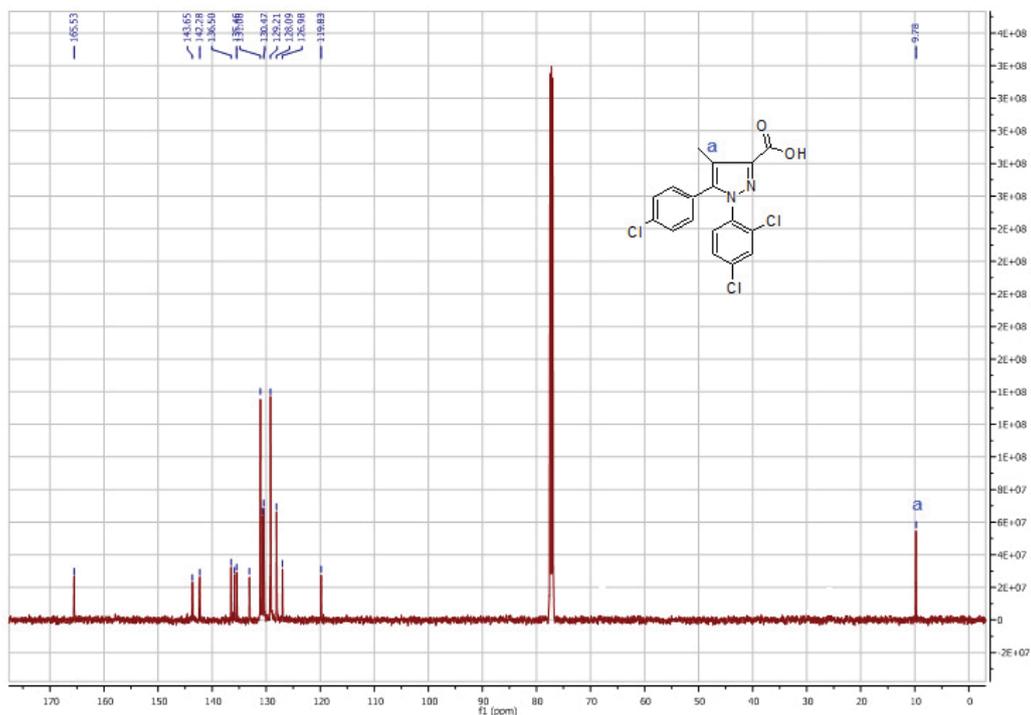
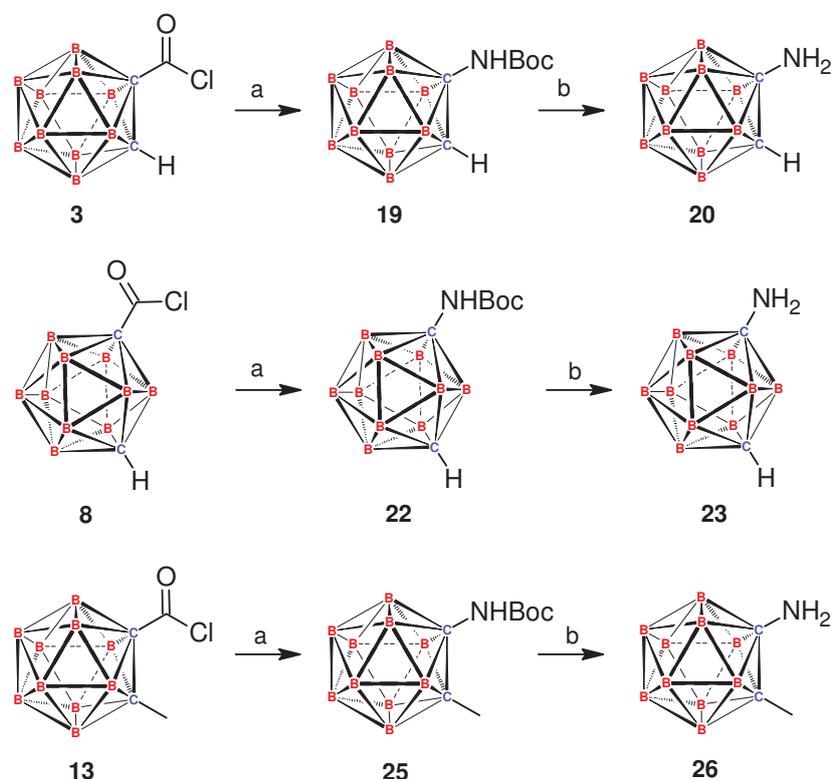


Figura 2.8: Espectro ¹³C-RMN del ácido carboxílico **18**. A $\delta = 9.73$ ppm aparece la señal del grupo metilo.

Por otro lado, era necesario preparar las aminas derivadas de los clústeres de carborano (ver Esquemas 2.3 y 3.4). Para ello se decidió partir de los mono-ácidos carboxílicos correspondientes, que se sintetizaron según la metodología descrita en la literatura por Kahl y colaboradores²². Así, el *orto*-carborano fue disuelto en dietil éter anhidro, bajo atmósfera inerte, y enfriado a -78°C . A continuación se adicionó *n*BuLi como base poco a poco. Tras la adición de CO₂ sólido y el tratamiento posterior con agua se obtuvo el correspondiente monoácido **2** con un 75% de rendimiento. Este ácido carboxílico, disuelto en Tolueno anhidro, fue puesto a reaccionar con pentacloruro de fósforo para obtener, después de una destilación (120°C , 5mm Hg), el cloruro de ácido **3** con un buen rendimiento (75%). De una manera análoga, se procedió a la síntesis de los ácidos **7** y **12** y de sus cloruros de ácido **8** y **13**, obteniéndolos todos ellos con muy buenos rendimientos (68% para el compuesto **7**, 85% para el **8**, 98% para el **12** y 92% para el **13**).



Esquema 2.3: Ruta sintética llevada a cabo para obtener las aminas derivadas de los clústeres de carborano (1,2-dicarbido-*closo*-dodecaborano, 1,7-dicarbido-*closo*-dodecaborano y 1-metil-1,2-dicarbido-*closo*-dodecaborano). Condiciones: (a) i) TMSN₃, Tolueno, reflujo; ii) ^tBuOH, reflujo; (b) TFA, DCM, 0°C-rt.

Sintetizados los cloruros de ácido **3**, **8** y **13**, se utilizó una metodología descrita también por Kahl^{22b} para preparar las correspondientes aminas primarias. Para sintetizar la amina protegida con Boc **19** (ver Figura 2.9 para espectro {¹H-¹¹B}-RMN), se trató el cloruro de ácido **3** con trimetilsilil azida bajo un reflujo de Tolueno según el procedimiento de Washburne y Peterson²³. Esta transposición de Curtius dió como resultado un 1-isocianato-*orto*-carborano intermedio que, bajo reflujo de ter-butanol rindió la amina protegida con Boc **19** con un rendimiento del 34%. Esta amina fue tratada posteriormente con ácido trifluoroacético en diclorometano como disolvente a 0°C para obtener la amina primaria **20** (ver Figura 2.10 para espectro {¹H-¹¹B}-RMN) con un rendimiento cuantitativo.

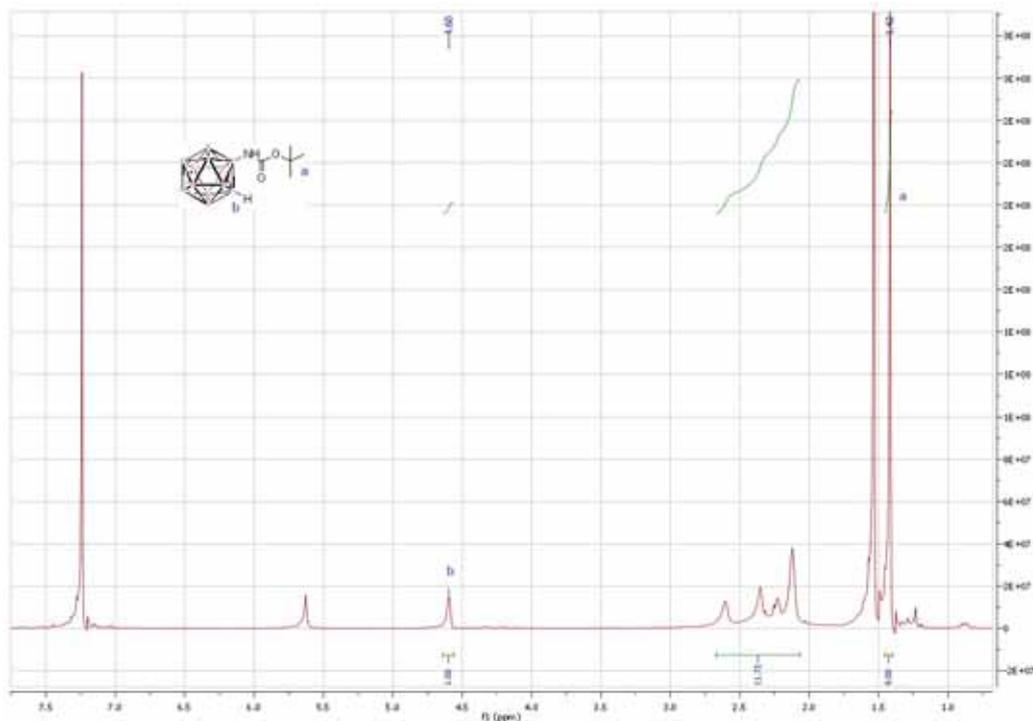


Figura 2.9: Espectro de ¹H-RMN desacoplado de la amina protegida **19**. A $\delta = 4.60\text{ppm}$ aparece el protón del clúster de carborano.

Siguiendo el mismo procedimiento se aislaron las aminas **23** y **26** con rendimientos cuantitativos a partir de las aminas protegidas **22** y **25**, respectivamente, que se obtuvieron a través de la misma reacción modificada de Curtius, con rendimientos del 11% y 36% respectivamente.

Debido a que los rendimientos globales de las aminas primarias finales **20**, **23** y **26** eran bajos (11%, 34% y 36%, respectivamente), se probó a aislar los isocianatos correspondientes, a través de la reacción de Curtius (trimetilsilil azida (TMSN₃) en tolueno a reflujo) con los cloruros de ácido **3**, **8** y **13** respectivamente, y a hacerlos reaccionar, posteriormente, con hidróxido de litio en tetrahidrofurano/agua. Los rendimientos globales para la síntesis de las aminas primarias finales a través de este nuevo procedimiento resultaron igualmente bajos y comparables con los ya obtenidos anteriormente.

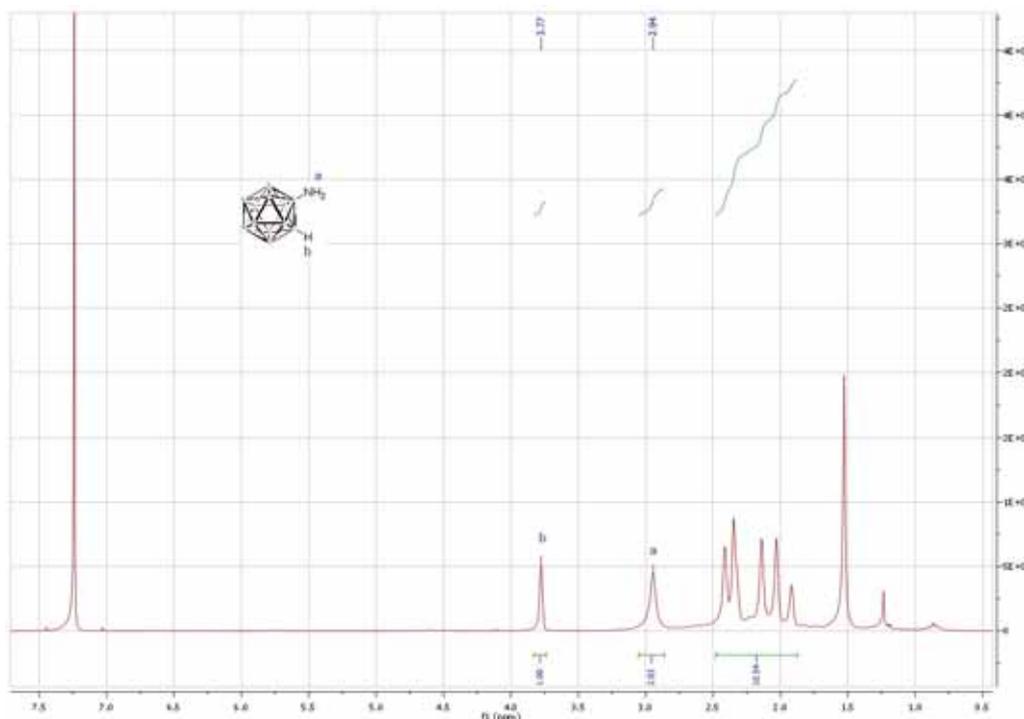


Figura 2.10: Espectro de ¹H-RMN desacoplado de la amina **20**. A $\delta = 3.77\text{ppm}$ aparece el protón del clúster de carborano y a $\delta = 2.94\text{ppm}$, los protones de la amina primaria.

El Esquema 2.4 describe las condiciones óptimas encontradas para la obtención de los compuestos finales **21**, **24** y **27**. Para llegar a estas condiciones se llevó a cabo la serie de experimentos que viene descrita en la Tabla 2.1.

	18 (equivalentes)	R-NH ₂ (eq)	SOCl ₂	Condiciones	Comentarios
1	1	1.5	3.3eq	DCM, TEA, 0°C-rt	No se da reacción
2	1	1.5	1mL	DCM, TEA, 0°C-rt	No se da reacción
3	1	1.5	1mL	DCM, DIPEA, 0°C-rt	No se da reacción
4	1	1.5	-	DIC (1.5eq), NHS (1.5), DMF, rt	No se da reacción
5	1	1	-	HOAT (1.5eq), DIC 81.5), DMF, rt	No se da reacción
6	1	1.5	1mL	MW: 150°C, 20min	Rendimiento del 5%

Tabla 2.1: Condiciones probadas para la síntesis de las amidas finales.

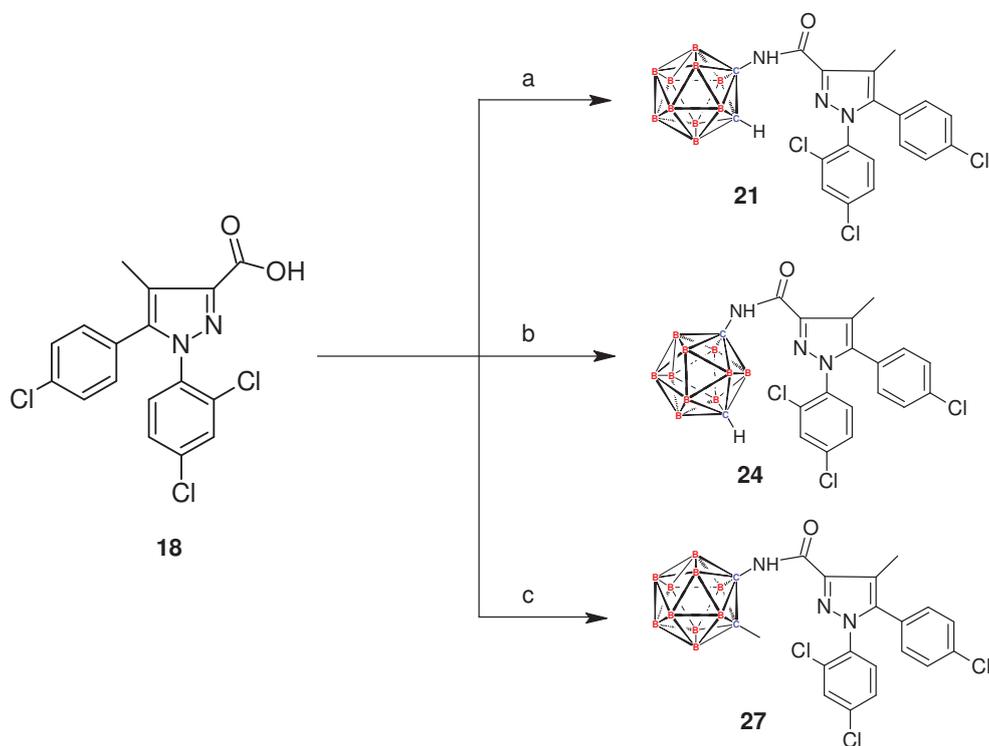
En primer lugar se abordó el acoplamiento como en el caso de los ligandos dopaminérgicos (ver Esquema 3.5, Capítulo 3), en diclorometano con trietilamina como base a temperatura ambiente (ver entrada 1, Tabla 2.1). Esta metodología no resultó exitosa, por lo que en primer lugar se decidió adicionar cloruro de tionilo (SOCl₂) como codisolvente (ver entrada 2, Tabla 2.1) para asegurar la total formación del cloruro de ácido. Esta nueva metodología no funcionó, por lo que se decidió cambiar la base. Así,

se adicionó diisopropiletilamina (DIPEA) (ver entrada 3, Tabla 2.1), que al ser más básica podría desplazar mejor el equilibrio; sin embargo, el cambio de base tampoco afectó a la reacción. Ya que el acoplamiento llevado a cabo con los dopaminérgicos no funcionaba con los cannabinoides, se optó por utilizar la diisopropialcarbodiimida (DIC) en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) (ver entrada 4, Tabla 2.1) para activar el ácido carboxílico y poder ser atacado por la amina más fácilmente. También se probó con azo-hidroxibenzotriazol (HOAT), en presencia de DIC (ver entrada 5, Tabla 2.1), pero ninguna de las dos metodologías dio resultado. Una de las hipótesis que se barajó como causa de la falta de reacción era que los reactivos de partida (amina y ácido carboxílico) eran demasiado voluminosos y no reaccionaban por el impedimento estérico.

Basándose en estudios publicados anteriores²⁴, se decidió calentar la reacción. Una prueba en microondas a 150°C rindió el compuesto deseado final con bajo rendimiento (ver entrada 6, Tabla 2.1). Un aumento del tiempo de reacción resultó en un aumento de rendimiento.

Así, el ácido carboxílico **18** se disolvió en Tolueno anhidro, bajo atmósfera inerte y se adicionó cloruro de tionilo (SOCl₂). La reacción se calentó a reflujo durante 3 horas, obteniendo el cloruro de ácido, *in situ*, después de evaporar el disolvente bajo atmósfera inerte. Por otro lado, en un vial de microondas, bajo atmósfera inerte, se disolvió el 1-amino-*orto*-carborano **20** en Tolueno anhidro y sobre esta disolución se adicionó el cloruro de ácido recién sintetizado disuelto en Tolueno anhidro. La reacción se calentó en el microondas a 150°C bajo presión durante 50 minutos, obteniendo la amida final **21** (ver Figura 2.11 para espectro {¹H-¹¹B}-RMN) con un rendimiento del 43% después de ser purificada.

Se utilizó el mismo procedimiento para la obtención de las amidas finales **24** y **27** a partir de sus correspondientes aminas **23** y **26**, respectivamente, con rendimientos del 32% y 10%.



Esquema 2.4: Procedimiento sintético empleado para la obtención de las amidas finales **21**, **24** y **27**. Condiciones: (a) i) SOCl₂, Tolueno, reflujo; ii) **20**, Tolueno, MW: 150°C, 50min; (b) i) SOCl₂, Tolueno, reflujo; ii) **23**, Tolueno, MW: 150°C, 50min; (c) SOCl₂, Tolueno, reflujo, ii) **26**, Tolueno, MW: 150°C, 50min.

Todos los compuestos finales sintetizados fueron caracterizados por RMN y espectrometría de masas.

A continuación se incluyen los espectros de resonancia {¹H-¹¹B}-RMN (Figura 2.11), ¹³C-RMN (Figura 2.12) y {¹¹B-¹H}-RMN (Figura 2.13) del compuesto final **21** remarcando las señales más relevantes, como el protón del clúster de carborano o el metilo del grupo diarilbenzopirazolínico insertado.

Capítulo 2: Síntesis de análogos de ligandos de receptores CB₁

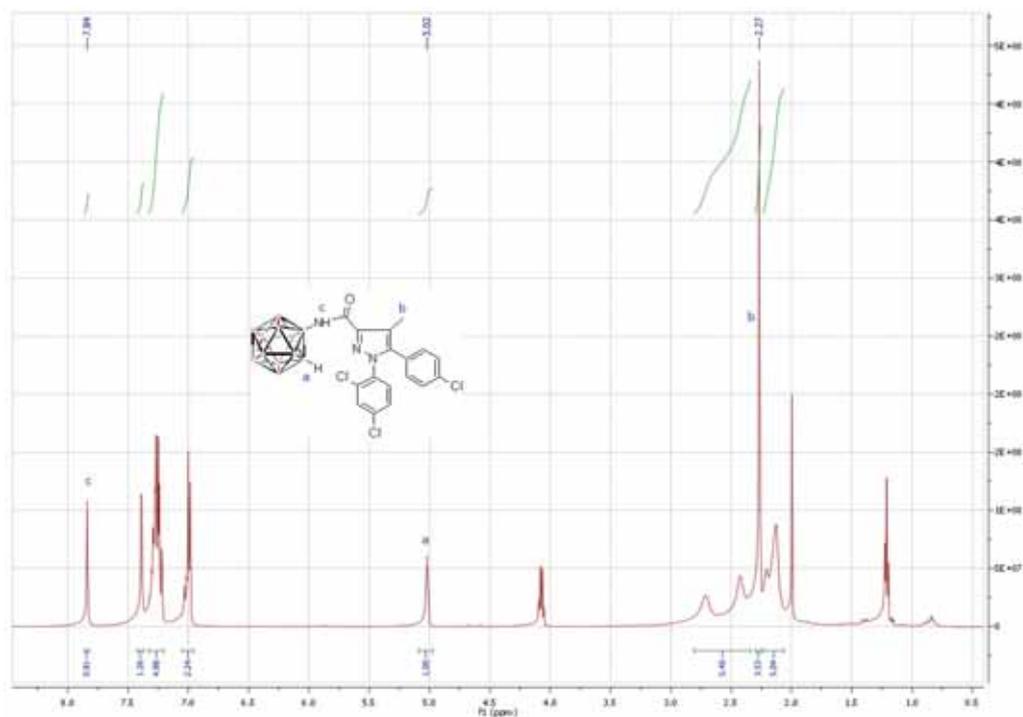


Figura 2.11: Espectro de ¹H-RMN desacoplado de la amida **21**. A $\delta = 5.01$ ppm aparece el protón del clúster de carborano, a $\delta = 7.83$ ppm, el protón de la amida y a $\delta = 2.26$ ppm el grupo metilo del diarilbenzopirazol.

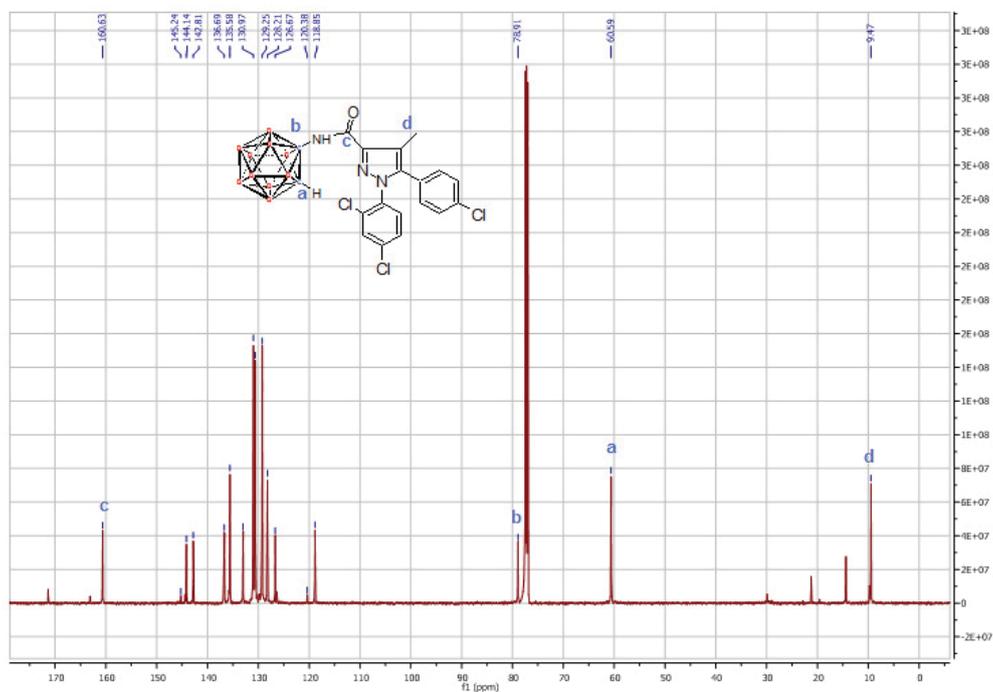


Figura 2.12: Espectro de ¹³C-RMN de la amida **21**. A $\delta = 9.47$ ppm aparece la señal del grupo metilo, a $\delta = 60.59$ ppm el CH del clúster de carborano, a $\delta = 78.91$ ppm el carbono cuaternario del clúster de carborano y a $\delta = 160.63$ el carbonilo del enlace amida.

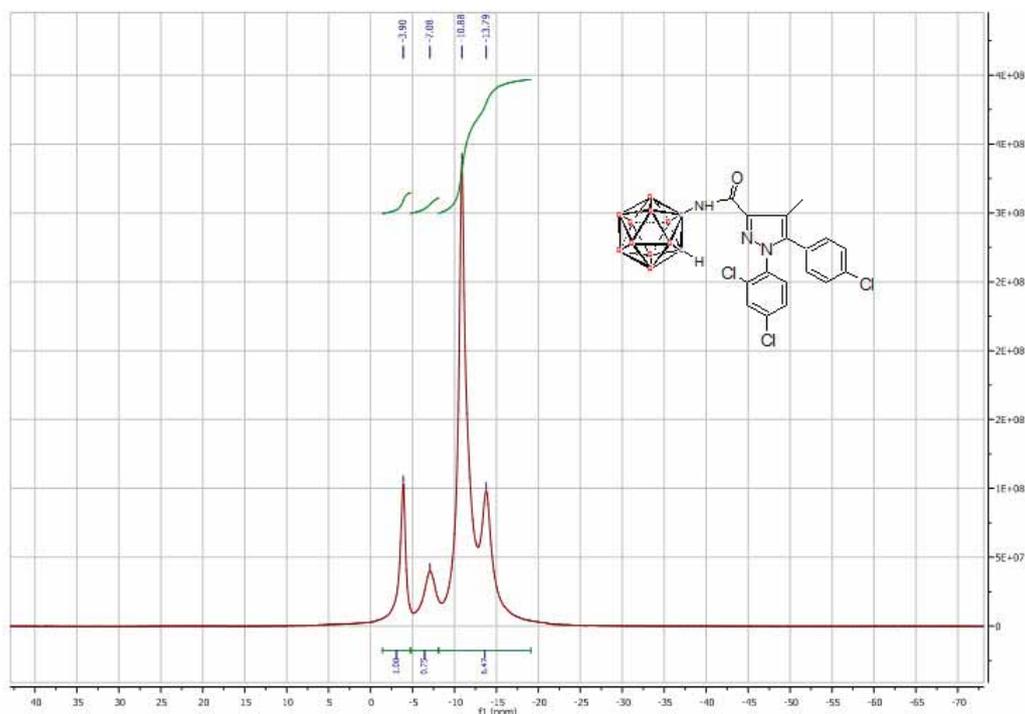


Figura 2.13: Espectro de ¹¹B-RMN desacoplado de la amida 21.

Todos los compuestos finales sintetizados fueron caracterizados también mediante espectroscopía de masas. Así, se llevaron a cabo experimentos de masa exacta de alta resolución, obteniendo los valores esperados (ver Tabla 2.2) con desviaciones de 1 ppm para el compuesto final **21** ([M+Na]⁺), menor de 1 ppm para el compuesto **24** ([M-H]⁻) y de 2.5 ppm para el **27** ([M-H]⁻).

COMPUESTO	MASA OBTENIDA	MASA TEÓRICA
1	545.1721	545.1722
2	521.1744	521.1746
3	535.1891	535.1904

Tabla 2.2: Resumen de los datos obtenidos de masa exacta para los compuestos **21**, **24** y **27**.

Capítulo 2: Síntesis de análogos de ligandos de receptores CB₁

Como se puede ver en la Figura 2.14, el espectro de masas de los compuestos de carborano presenta un perfil característico debido a la distribución isotópica del boro.

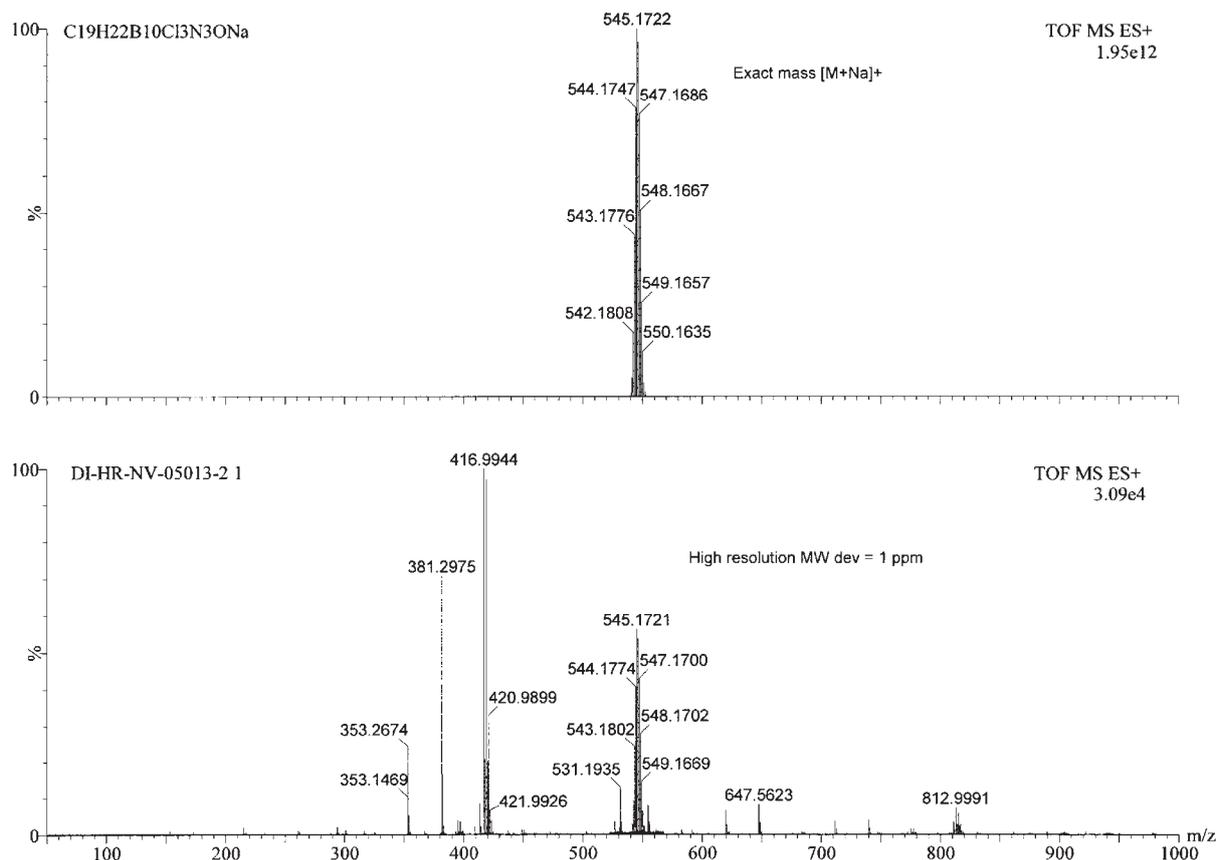


Figura 2.14: Espectro de masa exacta de alta resolución del compuesto final **21**. Arriba aparece el perfil de masa exacta teórica calculada para la fórmula química C₁₉H₂₂B₁₀Cl₃N₃ONa ([M+Na]⁺), mientras que en el espectro de abajo viene dada la masa exacta obtenida en el espectrómetro por inyección directa del compuesto **21**.

4. CONCLUSIONES

Descrita la metodología sintética utilizada y los resultados obtenidos, puede concluirse lo siguiente:

1. La reacción de las aminas **20**, **23** y **26** con el ácido carboxílico **18** en microondas durante 50 minutos a 150°C lleva a la formación de las correspondientes amidas

Capítulo 2: Síntesis de análogos de ligandos de receptores CB₁

finales **21**, **24** y **27**, con estructura análoga al ligando de receptores CB₁ Rimonabant, con unos rendimientos del 43%, 32% y 10%, respectivamente.

2. La caracterización estructural de los compuestos puede llevarse a cabo inequívocamente mediante RMN.

¹Gaoni, Y; Mechoulam, R; Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish; *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86(8), 1646-1647.

²Pertwee, R. G; The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids; *Pharmacol. Ther.* **1988**, 36, 189-261.

³Howlett, A. C; Barth, F; Bonner, T. I; Cabral, G; Casellas, P; Devane, W. A; Felder, C. C; Herkenham, M; Mackie, K; Martin, B. R; Mechoulam, R; Pertwee, R. G; International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors; *Pharmacol. Rev.* **2002**, 54, 161-202.

⁴Pertwee, R. G; Cannabinoids: Handbook of experimental pharmacology; *Springer*, **2005**.

⁵Iverse, L; Cannabis and the brain; *Brain*, **2003**, 126, 1252-1270.

⁶Pacher, P; Mechoulam, R; Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system?; *Prog. Lipid. Res.* **2011**, 50(2), 193-211.

⁷El Sholy, M; Chemical constituents of cannabis. In: Grotenhermen, F; Russo, E; editors. Cannabis and cannabinoids: pharmacology, toxicology and therapeutic potential. Binghamton/New York: *Haworth Press*, **2002**.

⁸Di Marzo, V; Melck, D; Bisogno, T; De Petrocellis, L; Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligand with neuromodulatory action; *Trends Neurosci.* **1998**, 21, 521-528.

⁹Mechoulam, R; Hanuš, L; A historical overview of chemical research on cannabinoids; *Chem. Phys. Lipids*, **2000**, 108, 1-13.

¹⁰Pertwee, R. G; Pharmacology of cannabinoid receptor ligands; *Curr. Med. Chem.* **1999**, 6, 635-664.

¹¹Sim, L. J; Hampson, R. E; Deadwyler, S. A; Childers, S. R; Effects of chronic treatment with Δ^9 -THC on cannabinoid-stimulated [³⁵S]GTP γ S autoradiography in rat brain; *J. Neurosci.* **1996**, 16, 8057-8066.

¹²(a) Melvin, L. S; Johnson, M. R; Harbert, C. A; Milne, G. M; Weissman, A; A cannabinoid derived prototypical analgesic; *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 67-71; (b) Melvin, L. S; Milne, G. G; Johnson, M. R; Subramaniam, B; Wilken, G. H; Howlett, A. C; Structure-activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs; *Mol. Pharmacol.* **1993**, 44, 1008-1015.

¹³Devane, W. A; Dysarz, F. A; Johnson, M. R; Melvin, L. S; Howlett, A. C; Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain; *Mol. Pharmacol.* **1988**, 34, 605-613.

Capítulo 2: Síntesis de análogos de ligandos de receptores CB₁

¹⁴Rinaldi-Carmona, M; Barth, F; Héaulme, M; Alonso, R; Shire, D; Congy, C; Soubrié, P; Breliere, J. C; Le Fur, G; Biochemical and pharmacological characterization of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist; *Life Sci.* **1995**, 56, 1941-1947.

¹⁵(a) Mathews, W. B; Ravert, H. T; Musachio, J. L; Frank, R. A; Rinaldi-Carmona, M; Barth, F; Dannals, R. F; Synthesis of [¹⁸F]SR144385: a selective radioligand for positron emission tomography studies of brain cannabinoid receptors; *J. Labeled Cpd. Radiopharm.* **1999**, 42, 589-596; (b) Lan, R; Gatley, S. J; Makryannis, A; Preparation of iodine-123 labeled AM251: a potential SPECT radioligand for the brain cannabinoid CB₁ receptors; *J. Labeled Cpd. Radiopharm.* **1996**, 38, 875-881.

¹⁶Li, J; Daughters, R. S; Bullis, C; Bengiamin, R; Stucky, M. W; Brennan, J; Simone, D. A; The cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 mesylate blocks the development of hyperalgesia produced by capsaicin in rats; *Pain*, **1999**, 81, 25-33.

¹⁷Gonzalez-Rosales, F; Walsh, D; Intractable anusea and vomiting due to gastrointestinal mucosal metastases relieved by tetrahydrocannabinol (dronabinol); *J. Pain Symptom Manage.* **1997**, 14, 311-314.

¹⁸Williams, C. M; Kirkham, T. C; Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB₁) receptors; *Psychopharmacology*, **1999**, 143, 315-317.

¹⁹Rinaldi-Carmona, M; Barth, F; Millan, J; Derocq, J. M; Casellas, P; Congry, C; Oustric, D; Sarran, M; Bouaboula, M; Calandra, B. et al; SR144528, the first potent and selective antagonist of the CB₂ cannabinoid receptor; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, 284, 644-650.

²⁰(a) Endo, Y; Iijima, T; Yamakoshi, Y; Yamaguchi, M; Fukasawa, H; Shudo, K; Potent estrogenic agonists bearing Dicarba-*closo*-dodecaborane as a hydrophobic pharmacophore; *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1501-1504; (b) Ogawa, T; Ohta, K; Yoshimi, T; Yamazaki, H; Suzuki, T; Ohta, S; Endo, Y; *m*-Carborane bisphenol structure as a pharmacophore for selective estrogen receptor modulators; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3943-3946.

²¹Lan, R; Liu, Q; Fan, P; Lin, S; Fernando, R. R; McCallion, D; Pertwee, R; Makryannis, A; Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonist; *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 769-776.

²²(a) Kahl, S. B; Kasar, R. A; Simple, high-yield synthesis of polyhedral carborane amino acids; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1223-1224; (b) Kasar, R. A; Knudsen, G. M; Kahl, S. B; Synthesis of 3-amino-1-carboxy-*o*-carborane and an improved, general method for the synthesis of all three C-amino-C-carboxycarboranes; *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 2936-2940.

²³Washburne, S. S; Peterson, W. R. Jr; *Synth. Commun.* **1972**, 2, 227-230.

²⁴Endo, Y; Yaguchi, K; Kawachi, E; Kagechika, H; Polymethylcarborane as a novel bioactive moiety: derivatives with potent retinoid antagonist activity; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 1733-1736.

PARTE II

**APLICACIÓN DE LOS ANÁLOGOS DE LIGANDOS
DOPAMINÉRGICOS EN EL CAMPO DE LA IMAGEN MOLECULAR:
MARCAJE CON CARBONO-11 Y EVALUACIÓN *EX VIVO* E *IN VIVO***

CAPÍTULO 3

SÍNTESIS DE RADIOTRAZADORES PET CON CARBONO-11

1. Síntesis de [¹¹C]Racloprida con alta actividad específica
 - 1.1. Metodología
 - 1.2. Resultados y discusión
 - 1.3. Conclusiones
 2. Síntesis de 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano
 - 2.1. Metodología
 - 2.2. Resultados y discussion
 - 2.3. Conclusiones
-

En el presente capítulo se describirán y, posteriormente, discutirán los resultados obtenidos en las investigaciones llevadas a cabo sobre la síntesis de los radiotrazadores [^{11}C]Racloprida, con alta actividad específica, y del ligando dopaminérgico 1-(N-(1-[Metil- ^{11}C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*c/oso*-dodecaborano. Por un lado, la síntesis de [^{11}C]Racloprida con alta actividad específica¹ fue llevada a cabo con el objetivo de utilizar este radiotrazador en el desarrollo de los ensayos *ex vivo* de autorradiografía con los ligandos dopaminérgicos **4**, **9** y **14**, como se explicará en el Capítulo 4. Por otro lado, la síntesis del radiotrazador PET 1-(N-(1-[Metil- ^{11}C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*c/oso*-dodecaborano fue llevada a cabo con el objetivo de determinar su patrón de biodistribución (ensayos *in vivo*) y evaluar su potencial aplicación para la visualización de los receptores dopaminérgicos post-sinápticos D₂.

1. Síntesis de [^{11}C]Racloprida con alta actividad específica

Ligandos PET potentes y selectivos para receptores D₂, como [^{11}C]Racloprida, [^{11}C]FLB 457 y [^{18}F]Faliprida, han sido utilizados en la búsqueda de receptores en el córtex cerebral de cerebros humanos *in vivo*². La ARG es una técnica muy útil para medir la densidad de los receptores D₂ en el estriado cerebral; sin embargo, los ensayos de desplazamiento competitivo pueden presentar disminución de la unión específica por los receptores D₂ debido a la presencia del compuesto competidor frío (sin marcaje radiactivo), que puede revelar posibilidad de unión inespecífica por parte del radioligando.

Un estudio publicado recientemente por Suzuki y colaboradores³, muestra que la utilización de [^{11}C]Racloprida de alta actividad específica disminuye el efecto de la posible unión inespecífica debida al competidor frío usado en los ensayos de desplazamiento.

Basándose en esta afirmación y utilizando un método desarrollado en el grupo¹, se procedió a la síntesis de [^{11}C]Racloprida con elevada actividad específica consistente en la combinación de módulos de síntesis comerciales para llevar a cabo todos los pasos sintéticos (producción del agente [^{11}C]metilante ([^{11}C]MeI), metilación, purificación y reformulación) a través de un proceso totalmente automatizado.

1.1. Metodología

1.1.1. Procedimiento general para la producción de [¹¹C]MeI

La síntesis de [¹¹C]CH₃I fue llevada a cabo mediante un módulo de síntesis TRACERlab FXc Pro de GE Healthcare (ver Figura 3.1 para los esquemas). El [¹¹C]CH₄ fue generado in situ en un ciclotrón a través de un bombardeo (corriente del blanco = 22 μA, corriente integrada = 2 μAh) con una mezcla gaseosa de N₂/H₂ (99/1, presión inicial = 16 bar) con protones de alta energía (18MeV). El gas radiactivo fue inicialmente atrapado en una trampa Carbosphere 60/80 a una temperatura de -140°C, posteriormente fue desorbido por calentamiento a 80°C y finalmente se hizo reaccionar con I₂ a 720°C para formar la especie [¹¹C]CH₃I en un proceso en fase gaseosa. El [¹¹C]CH₃I recién sintetizado fue retenido selectivamente en una trampa con Porapak™ Q a temperatura ambiente, mientras que el [¹¹C]CH₄ que no había reaccionado fue recirculado. Al final de este proceso, que consistió en 8-9 ciclos, la trampa de Porapak™ Q fue calentada a 190°C y el [¹¹C]CH₃I retenido hasta el momento fue entonces destilado bajo un flujo continuo de helio (20 mL/min). Esta corriente gaseosa se pasó a través de una trampa que contenía P₂O₅ y Ascarite II® antes de introducirla en el loop de reacción (ver Figura 3.1; sistema AutoLoop™) para llevar a cabo la síntesis de [¹¹C]Racloprida.

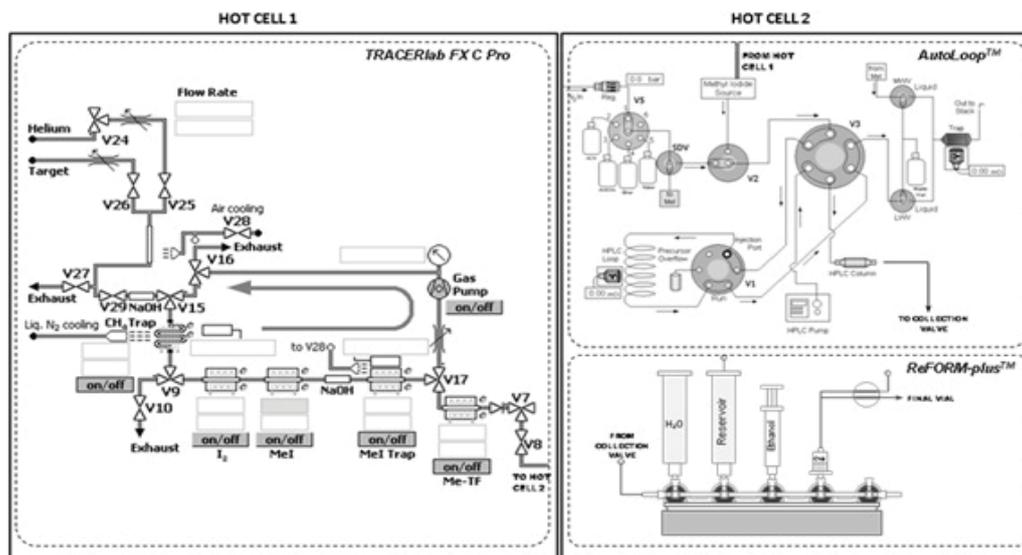
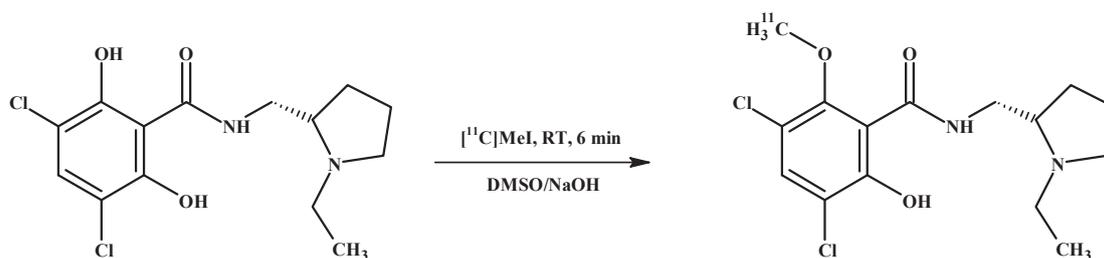


Figura 3.1: Diagrama esquemático del sistema de producción de [¹¹C]MeI (TRACERlab FX C Pro), del sistema de ¹¹C-metilación (AutoLoop™) y del sistema de reformulación (ReFORM-plus™) para la síntesis de [¹¹C]Racloprida. El sistema de producción de [¹¹C]MeI fue instalado en una celda plomada y los sistemas de AutoLoop™ y ReFORM plus™ en otra celda plomada contigua. El [¹¹C]MeI fue producido en el módulo TRACERlab FX C Pro (celda caliente 1) y transferido al loop de HPLC (que contenía la disolución del precursor, en la celda caliente 2) a través de un flujo continuo de N₂. Acabado el proceso de atrapado de [¹¹C]MeI, se llevó a cabo la reacción de metilación y el crudo fue enviado al sistema de HPLC; donde la fracción deseada fue colectada en el Reservoir (previamente acondicionado con 20mL de agua; ReFORM-plus™, celda caliente 2) y reformulada usando un cartucho C-18.

1.1.2. Síntesis de [¹¹C]Racloprida

El [¹¹C]CH₃I sintetizado mediante el proceso explicado anteriormente, fue atrapado en un loop de HPLC de acero inoxidable de 2mL (ver Figura 3.1; sistema AutoLoop™) precargado con una disolución de 1 mg de (S)-O-desmetilracloprida⁴ en 80μL de dimetilsulfóxido y 3 μL de una disolución acuosa de hidróxido sódico 5M. Acabado este proceso, se llevó a cabo la reacción durante 6 minutos a temperatura ambiente (ver Esquema 3.1 para esquema sintético). El crudo de reacción se purificó en un sistema de HPLC con un detector radiométrico y uno de UV. Se utilizó como fase estacionaria una columna C18 (Supelcosil™ LC-ABZ+; 250x10 mm, 5 μm) y como fase móvil una mezcla de una disolución acuosa de formiato amónico 100 mM a pH = 3.9/ACN 62/38 con un flujo de 5 mL/min. Bajo estas condiciones la fracción purificada de [¹¹C]Racloprida fue colectada a un tiempo de retención de 11-12 min y reformulada usando el sistema ReFORM-plus™ (ver Figura 3.1; celda caliente de síntesis 2) por dilución con 20mL de agua, atrapamiento del radiotrazador en un cartucho C-18, que fue lavado con agua y posterior elución con 1mL de EtOH y 9mL de una disolución fisiológica. Finalmente se filtró a través de un filtro de 0.22μm.



Esquema 3.1: Reacción llevada a cabo para la síntesis de [¹¹C]Racloprida.

La cantidad final del radiotrazador fue medida en un calibrador de dosis y una muestra fue sometida a control de calidad. La pureza radioquímica y la actividad específica fueron determinadas por HPLC con un detector UV ($\lambda = 254$ nm) y radiométrico. Como fase estacionaria se utilizó una columna RP-C18 (Mediterranean Sea18, 4.6x250 mm, 5μm) y como fase móvil, una mezcla de una disolución acuosa 100 mM de formiato amónico a pH = 3.9/ACN 60/40. Bajo estas condiciones la [¹¹C]Racloprida fue detectada a un tiempo de retención de 8.4 min.

1.2. Resultados y discusión

Como se ha explicado anteriormente en la Introducción, el [^{11}C]MeI puede ser producido a través de dos estrategias diferentes de marcaje con Carbono-11. La primera estrategia, denominada históricamente como método “húmedo” (“wet” method), consiste en la producción de [^{11}C]CO₂ en un ciclotrón, el cual se reduce con hidruro de litio y aluminio (LiAlH₄) y posteriormente se le añade ácido yodídrico (HI) y agua para formar la especie [^{11}C]CH₃I, que es destilada bajo el flujo continuo de un gas inerte⁵. La segunda estrategia, denominada método de “fase gaseosa” (“gas phase” method), aprovecha la conversión del [^{11}C]CH₄ (producido por reducción del [^{11}C]CO₂ generado en el ciclotrón o por irradiación directa con una mezcla gaseosa N₂/H₂ con protones de alta energía⁶) en [^{11}C]CH₃I por yodación gaseosa de radicales libres a alta temperatura⁷. El método de fase gaseosa ofrece, normalmente, rendimientos radioquímicos menores pero actividades específicas mucho mayores, especialmente cuando el [^{11}C]CH₄ es generado directamente en el ciclotrón⁸. Por tanto, esta es la razón por la cual este último método (producción directa de [^{11}C]CH₄ en el ciclotrón) fue el elegido en este trabajo para la síntesis de [^{11}C]Racloprida.

Pese a que la [^{11}C]Racloprida ha sido ampliamente utilizada, su radiosíntesis sigue siendo delicada y por tanto, protagonista de diversas discrepancias en la literatura. En la síntesis original, publicada por Ehrin y colaboradores⁹, se utilizaban grandes cantidades de precursor (2.5-3.5mg) para conseguir rendimientos radioquímicos significativos; de manera que cuando la cantidad de precursor disminuía, el rendimiento radioquímico disminuía considerablemente. Utilizando un método alternativo, desarrollado por Ishiwata y colaboradores¹⁰, era posible obtener rendimientos entorno al 11-14% (referidos al [^{11}C]MeI) y actividades específicas en el rango de 33-91 GBq/ μmol utilizando pequeñas cantidades de precursor (0.3-0.5mg), pese a que era necesario un precalentamiento (80-120°C, 5-6 min) de la disolución del precursor. Recientemente, Wilson y colaboradores introdujeron el uso del “método por captura de disolvente” (captive solvent method) para preparar [^{11}C]Racloprida con un 9-15% de rendimiento radioquímico (referido al [^{11}C]CO₂, sin corregir) y con valores de actividad específica entorno a 55 GBq/ μmol ¹¹. Pese a que esta última metodología representa una alternativa muy interesante, la necesidad de establecer un procedimiento de limpieza, no totalmente automatizado, entre las diferentes producciones y el hecho de que el proceso completo sea llevado a cabo en una única celda plomada limita el rendimiento del sistema. Por otro lado, los valores de actividad específica podrían no ser suficientes para llevar a cabo determinados estudios *in vivo*. Con los datos obtenidos con la metodología puesta a punto en el grupo es posible

obtener rendimientos ($51.3 \pm 11.2\%$ vs 11-14%) y actividades específicas (109 ± 20 vs 33-91 GBq/ μmol) mayores que las publicadas por Ishiwata y colaboradores¹⁰.

Bajo las condiciones anteriormente descritas para la obtención de [¹¹C]Racloprida se llevaron a cabo un total de 30 síntesis. Al final de las síntesis, se obtuvieron valores de radiactividad de 23 ± 5 mCi (851 ± 185 MBq) para [¹¹C]Racloprida pura en un tiempo total de síntesis de 40 minutos (rendimiento radioquímico (RCY) = $51.3 \pm 11.2\%$ referido al [¹¹C]MeI, corregido el decaimiento (DC)). La pureza radioquímica (RCP) (identidad confirmada por coelución con el estándar de referencia) fue del 99.5% en todos los casos y los valores de actividad específica (SA) al final de la síntesis (EOS) fueron de 109 ± 20 GBq/ μmol .

La implementación de unas condiciones adecuadas de HPLC y la relativa escasa presencia de impurezas radiactivas (ver Figura 3.2) permitió la recolección de la fracción deseada en un periodo corto de tiempo y rindió el radiotrazador final con altas purzas química y radioquímica.

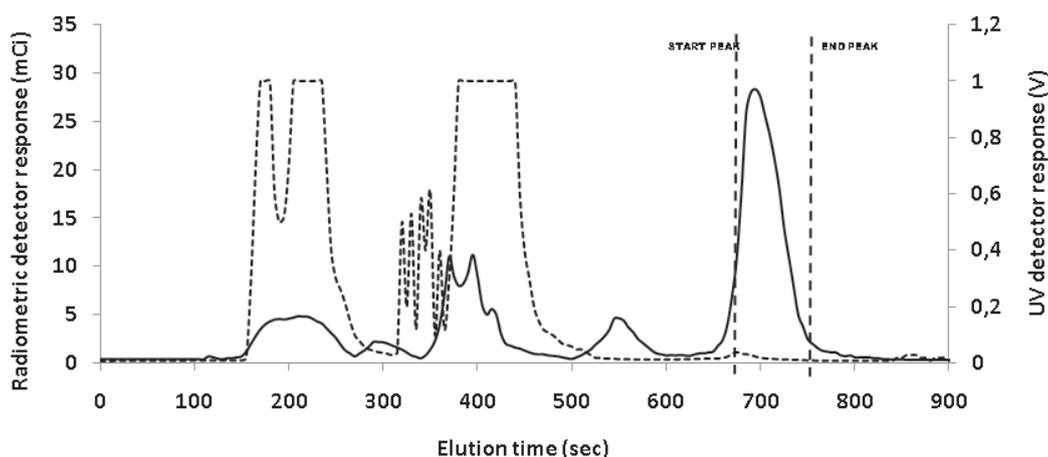


Figura 3.2: Perfil cromatográfico correspondiente a la purificación de la [¹¹C]Racloprida bajo las condiciones descritas. Se muestran los perfiles del detector radiométrico (línea continua) y del detector UV (línea punteada).

Los resultados obtenidos bajo esta metodología demuestran que aprovechando (i) el proceso implementado automatizado de limpieza del sistema AutoLoop (agua + acetona + dietil éter + secado con flujo de N₂), (ii) el hecho de que dos módulos de síntesis fueron instalados en celdas plomadas diferentes y contiguas (ver Figura 3.1), (iii) la utilización de kits de un único uso para la formulación final, (iv) los rendimientos radioquímicos altos (lo que permitió llevar a cabo síntesis con cantidades pequeñas de [¹¹C]CH₄), (v) el hecho de que no fue necesario un proceso de lavado en el módulo entre las diferentes síntesis y (vi) la instalación de contenedores plomados para el almacenaje de los desechos, pueden llevarse a cabo varias síntesis de [¹¹C]Racloprida

con alta actividad específica durante un único día (6-7 en nuestro caso). Por otro lado, esta metodología permite que la intervención del operario sea mínima para síntesis consecutivas con lo que se minimiza la exposición a la radiación.

1.3. Conclusiones

1. La metodología, totalmente automatizada, puesta a punto en el grupo permite la producción de [^{11}C]Racloprida con buen rendimiento radioquímico y alta actividad específica.
2. Gracias a la especial configuración creada utilizando tres módulos automatizados comerciales y dos celdas calientes separadas y contiguas, es posible llevar a cabo producciones consecutivas con la mínima intervención del operario y la mínima exposición a la radiación.

2. Síntesis de 1-(N-(1-[Metil- ^{11}C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarbocloso-dodecaborano

El desarrollo de una nueva generación de escáneres PET/CT y el aumento de la instalación de ciclotrones han convertido a la PET en una técnica ampliamente utilizada tanto en ambiente clínico como en preclínico. De entre todos los emisores de positrones, el ^{11}C (vida media de 20.4 min y máxima energía de positrón de 960.5 KeV) y el ^{18}F (vida media de 109.8 min y máxima energía de positrón de 633.6 KeV) han sido, de lejos, los radionucleidos más utilizados debido a su versátil química, a su relativa vida media larga y a los altos rendimientos obtenidos en durante su producción en los ciclotrones comerciales. Sin embargo, la posibilidad de llevar a cabo estudios con radiotrazadores marcados con Carbono-11 queda supeditada a la capacidad de producción de los laboratorios radioquímicos, debido a que es necesaria una producción por cada adquisición PET deseada.

Por otro lado y como consecuencia de la evolución de las tecnologías de visualización *in vivo*, es de suma importancia el continuo desarrollo de nuevos radiotrazadores potentes y específicos para la visualización de las funciones celulares y el seguimiento de los diversos procesos moleculares a estudio. Por este motivo, el

objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el de sintetizar nuevos radiotrazadores PET para la visualización de los receptores dopaminérgicos D₂.

2.1. Metodología

2.1.1. Procedimiento general para la producción de [¹¹C]MeI

La síntesis de [¹¹C]CH₃I fue llevada a cabo usando el módulo de síntesis TRACERlab FXc Pro bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para la síntesis de la [¹¹C]Racloprida.

En la Figura 3.3 aparece esquematizado el proceso de síntesis de [¹¹C]CH₃I en el módulo comercial, donde pueden observarse dos gráficas correspondientes a (i) la actividad presente en la trampa Carbosphere 60/80, donde debido a la presencia del [¹¹C]CH₄ la curva muestra una región de subida, correspondiente a la llegada de la actividad cuando se vacía el target irradiado del ciclotrón, y posteriormente una zona de bajada con oscilaciones que corresponde a los diferentes ciclos de formación de [¹¹C]CH₃I que se retiene en la trampa de PorapakTM Q y (ii) la actividad presente en la trampa PorapakTM Q debido a la presencia del [¹¹C]CH₃I sintetizado a partir del calentamiento de [¹¹C]CH₄ con I₂ a 720°C. Tras una zona de plateau, la curva muestra una zona de bajada correspondiente a la destilación del [¹¹C]CH₃I hacia el módulo AutoLoop, donde se produce posteriormente la metilación del precursor no radiactivo.

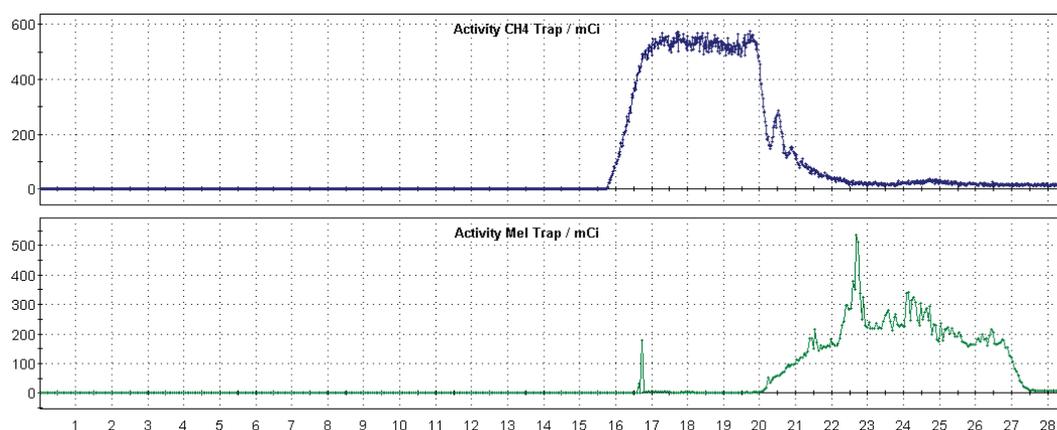
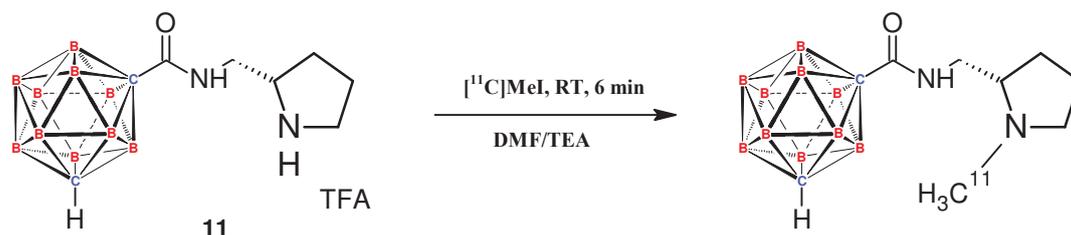


Figura 3.3: Gráfico de síntesis de [¹¹C]CH₃I en el módulo comercial TRACERlab FXc Pro. Se muestran los perfiles de actividades en las trampas Carbosphere 60/80 (azul) y PorapakTM Q (verde).

2.1.2. Síntesis de 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano

El [¹¹C]CH₃ sintetizado mediante el proceso anteriormente descrito fue atrapado en un loop de HPLC de acero inoxidable de 2mL (ver Figura 3.1) precargado con una disolución de 1 mg de 1-(2-metilen-pirrolidin-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano **11** en 100 μL de dimetilformamida (DMF) y en presencia de 10 μL de trietilamina. Acabado este proceso, se llevó a cabo la reacción durante 6 minutos a temperatura ambiente (ver Esquema 3.2).



Esquema 3.2: Reacción llevada a cabo para la síntesis de 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano.

El crudo de reacción se purificó en un sistema de HPLC con detector radiométrico y UV. Se utilizó como fase estacionaria una columna C18 (Supelcosil™ LC-ABZ+; 250x10 mm, 5 μm) y como fase móvil una mezcla de ACN/H₂O 90/10 con un flujo de 5 mL/min. Bajo estas condiciones la fracción purificada del radiotrazador fue colectada a un tiempo de retención de 21 min (ver Figura 3.4 para perfil cromatográfico), utilizando detectores radiométricos y de UV.

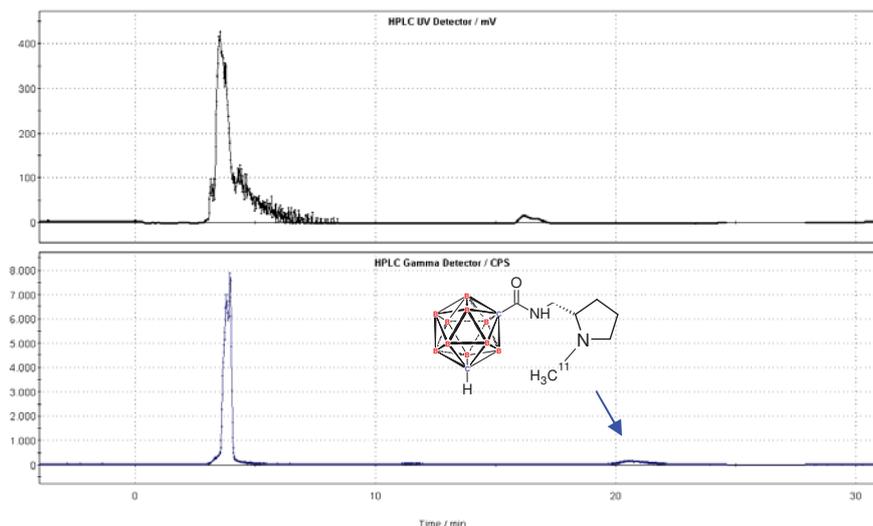


Figura 3.4: Perfil cromatográfico de la purificación del radiotrazador sintetizado. La fracción recolectada deseada presenta un $t_R = 21$ min. Se muestran los perfiles en UV (negro) y radiactivo (azul).

Capítulo 3: Síntesis de radiotrazadores PET con carbono-11

La fracción colectada fue diluida en 20 mL de agua inyectable y la disolución resultante se circuló por un cartucho de extracción en fase sólida tipo C-18, donde se retuvo el radiotrazador de manera selectiva, eliminando así los disolventes procedentes de la purificación cromatográfica. Tras lavar el cartucho con agua, el radiotrazador se eluyó con 1 mL de etanol absoluto y se reconstituyó con 9 mL de suero fisiológico para obtener una disolución que, tras ser filtrada con un filtro de 0.22 μm , estaba lista para ser administrada.

La cantidad de radiactividad final del radiotrazador fue medida en un calibrador de dosis y una muestra fue sometida a control de calidad. La pureza radioquímica y la actividad específica fueron determinadas por HPLC con un detector UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) y radiométrico. Como fase estacionaria se utilizó una columna C18 (Eclipse XDB C18, 4.6x150 mm, 5 μm) y como fase móvil, una mezcla de ACN/H₂O 75/25 a 1 mL/min. Como puede observarse en la Figura 3.5, bajo estas condiciones el radiotrazador fue detectado a un tiempo de retención de 11 min.

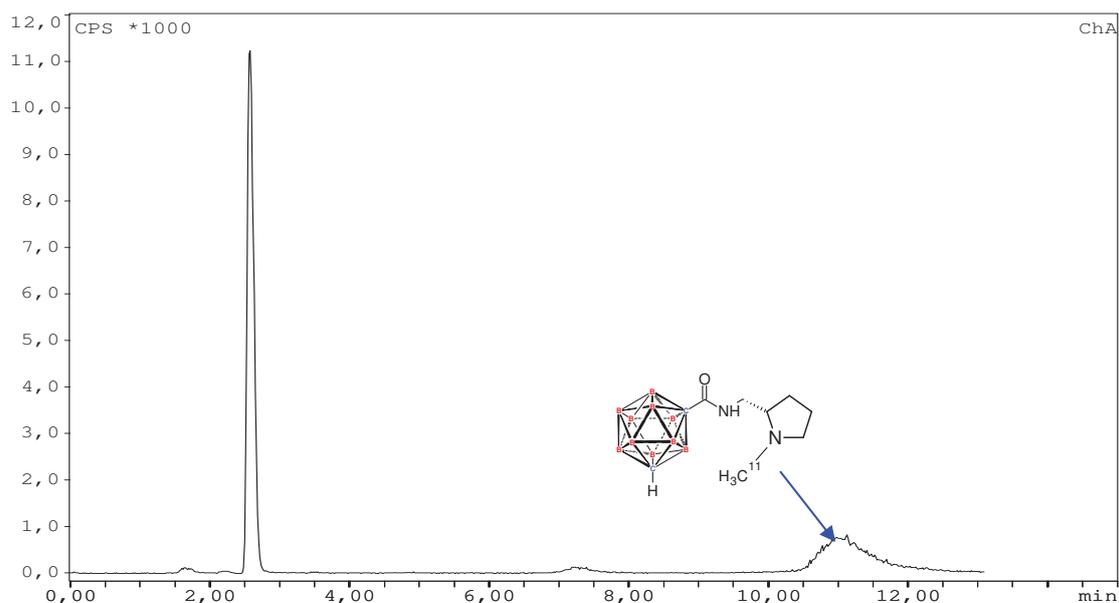


Figura 3.5: Perfil de HPLC analítico de la síntesis del radiotrazador (mezcla de reacción antes de purificar). El pico presente a 11 min es el correspondiente al radiotrazador sintetizado, mientras que los picos entorno a 2 min y a 3 min son, respectivamente, metanol y [¹¹C]CH₃l.

2.2. Resultados y discusión

Como se ha explicado anteriormente la producción de [¹¹C]MeI es una metodología bien descrita e implementada en el grupo¹ y que puede llevarse a cabo con buenos rendimientos radioquímicos y actividades específicas en un proceso reproducible.

En cuanto a la síntesis del radiotrazador 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarbociclo-dodecaborano resultó ser una tarea más difícil de llevar a cabo. Las condiciones de síntesis descritas anteriormente para este radiotrazador son las que rinden la mejor conversión radioquímica (RCC), del 31.4%, de todas las condiciones experimentales probadas.

Como puede observarse en la Tabla 3.1 fueron varias las condiciones experimentales probadas para llevar a cabo la síntesis del radiotrazador con [¹¹C]CH₃I. Se realizaron pruebas en disolventes diferentes (DMF y DMSO) y con cantidades de base diferentes. Así se comprobó que el cambio de disolvente de dimetilformamida a dimetilsulfóxido no rendía la reacción; mientras que un aumento de la cantidad de base aumentaba considerablemente la conversión radioquímica, que fue máxima con 72 μmol de base (10 μL). Superada esta cantidad la conversión radioquímica se mantenía, más o menos, constante.

Precursor (mg)	Base	Base (μmol)	Disolvente	V disolvente (μL)	Tiempo de reacción (min)	RCC (%)
1	TEA	14.4	DMF	100	6	8.2±3.3
1	TEA	28.8	DMF	100	6	9.0±1.8
1	TEA	72	DMF	100	6	31.4±4.8
1	TEA	144	DMF	100	6	30.3±4.4
1	TEA	14.4	DMSO	100	6	0
1	TEA	28.8	DMSO	100	6	0
1	TEA	72	DMSO	100	6	0
1	TEA	144	DMSO	100	6	0

Tabla 3.1: Resumen de las condiciones probadas para la síntesis de radiotrazador con [¹¹C]CH₃I.

Considerando los bajos valores obtenidos de conversión radioquímica en la síntesis con [¹¹C]CH₃I, se decidió llevar a cabo una serie de pruebas experimentales adicionales utilizando [¹¹C]CH₃OTf como agente metilante en sustitución de [¹¹C]CH₃I. La síntesis de [¹¹C]CH₃OTf se llevó a cabo haciendo pasar el flujo de [¹¹C]CH₃I por una trampa conteniendo 150-200 mg de triflato de plata en un proceso continuo a 180°C

bajo un flujo de helio (20 mL/min). De esta manera fueron probadas varias condiciones experimentales utilizando como disolventes DMF y DMSO y como bases TEA y 2,4,6-trimetilpiridina. Desafortunadamente, bajo ninguna de las condiciones probadas tuvo lugar reacción alguna. Como puede observarse en la Figura 3.6, que recoge el perfil cromatográfico de una de estas pruebas, la reacción del precursor con el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ no tiene lugar ya que no se detecta presencia de ningún compuesto a 11 minutos.

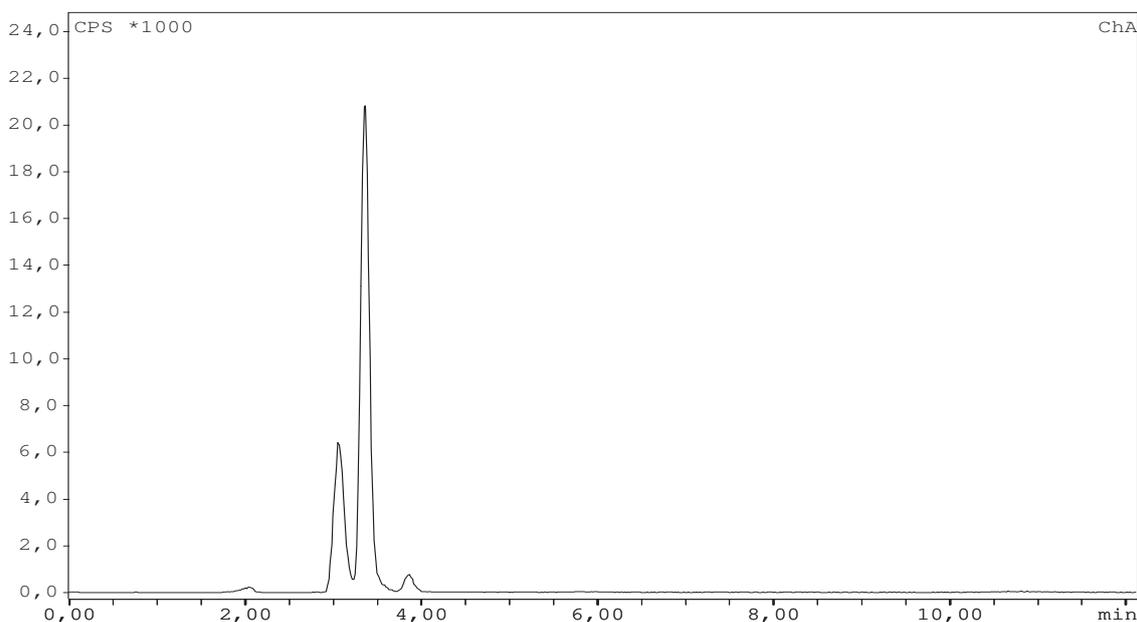


Figura 3.6: Perfil de HPLC de la reacción del precursor con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$. No se detecta producto a 11 minutos. Los compuestos radiactivos formados no se identificaron. El pico a 3 min corresponde al $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ que no se ha convertido en $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$.

Para efectuar la identificación inequívoca del radiotrazador sintetizado en las condiciones óptimas de síntesis (entrada 3, Tabla 3.1) se decidió dejar decaer la fracción purificada y analizarla por HPLC-MS (m/z calculada para $\text{C}_9\text{H}_{24}\text{B}_{10}\text{N}_2\text{OH}$: 285.330 $[\text{M}+\text{H}]^+$; encontrada 286.283) (ver Figura 3.7).

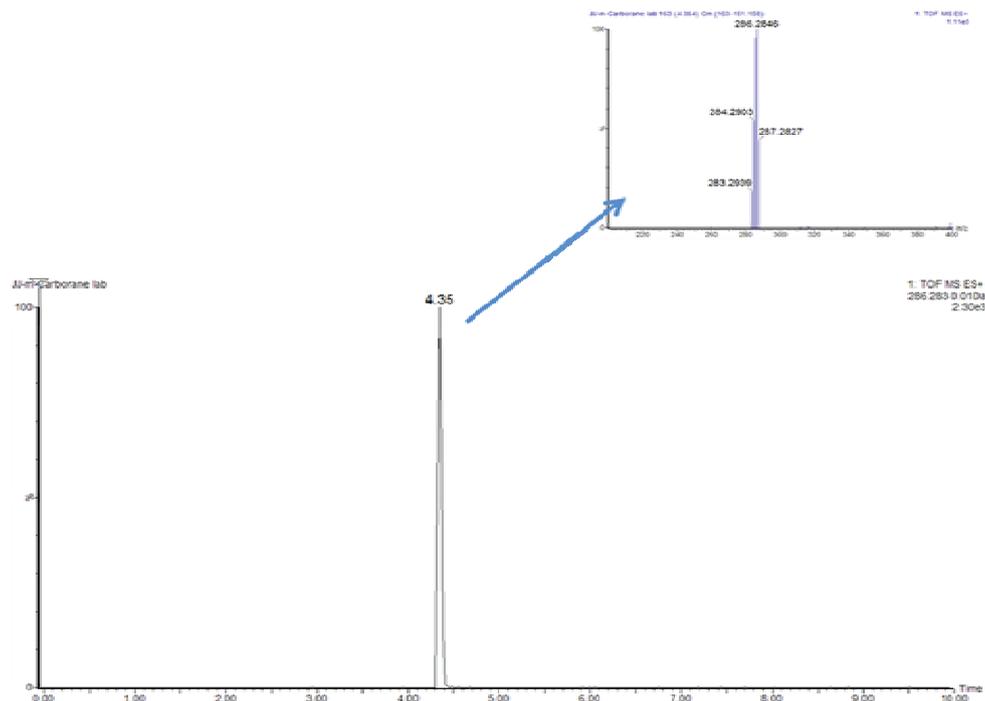


Figura 3.7: Cromatograma de HPLC-MS correspondiente a la fracción purificada del radiotrazador deseado.

Bajo esas mismas condiciones se llevó a cabo una única síntesis completa para la obtención del radiotrazador 1-(N-(1-[Metil- ^{11}C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*c/oso*-dodecaborano, que tuvo como objetivo la utilización del mismo en un ensayo de biodistribución.

Al final de la síntesis se obtuvieron 10 mCi en un tiempo total de síntesis de 40 minutos (rendimiento radioquímico = 5% sin corregir). La pureza radioquímica fue >99% y el valor de actividad específica al final de la síntesis fue de 120 GBq/ μmol .

2.3. Conclusiones

1. La metodología aquí descrita permite la síntesis del radiotrazador 1-(N-(1-[Metil- ^{11}C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*c/oso*-dodecaborano de manera reproducible con un rendimiento radioquímico del 5% (sin corregir) y una conversión radioquímica del 31.4%.

2. A pesar de los bajos valores de conversión radioquímica y rendimiento radioquímico, se han podido llevar a cabo estudios *in vivo* con el radiotrazador sintetizado.

¹Gómez-Vallejo, V; Llop, J; Fully automated and reproducible radiosynthesis of high specific activity [¹¹C]raclopride and [¹¹C]Pittsburg compound-B using the combination of two commercial synthesizers; *Nucl. Med. Commun.* **2011**, 32, 1011-1017.

²(a) Delforge, J; Bottlaender, M; Loc'h, C; Guenther, I; Fuseau, C; Bendriem, B, Syrota, A; Mazière, B; Quantitation of extrastriatal D₂ receptors using a very high-affinity ligand (FLB 457) and the multi-injection approach; *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1999**, 94, 471-478; (b) Riccardi, P; Li, R; Ansari, M. S; Zald, D; Park, S; Dawant, B; Anderson, S; Doop, M; Woodward, N; Schoenberg, E; Schmidt, D; Baldwin, R; Kessler, R; Amphetamine-induced displacement of [¹⁸F]Fallypride in striatum and extrastriatal regions in humans; *Neuropsychopharmacology*, **2006**, 31, 1016-1026; (c) Boileau, I; Dagher, A; Leyton, M; Welfeld, K; Booij, L; Diksic, M; Benkelfat, C; Conditioned dopamine release in humans: a positron emission tomography [¹¹C]Raclopride study with amphetamine; *J. Neurosci.* **2007**, 27, 3998-4003.

³Noguchi, J; Zhang, M. R; Yanamoto, K; Nakao, R; Suzuki, K; In vitro binding of [¹¹C]Raclopride with ultrahigh specific activity in rat brain determined by homogenate assay and autoradiography; *Nucl. Med. Biol.* **2008**, 35, 19-27.

⁴Huayi Isotope CO. 1 mg por cada síntesis.

⁵Langstrom, B; Lundqvist, H; The preparation of ¹¹C-Methyl Iodide and its use in the synthesis of ¹¹C-Methyl-L-Methionine; *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1976**, 27, 357-363.

⁶(a) Buckley, K. R; Huser, J; Jivan, S; McDonald, R; Ruth, T. J; [¹¹C]Methane production in small volume, high pressure gas targets; *Radiochim. Acta*, **2000**, 88, 201-205; (b) Helus, F; Hanosh, M; Layer, K; Maier-Borst, W; Yield ratio of [¹¹C]-CO₂, [¹¹C]-CO and [¹¹C]-CH₄ from the irradiation of N₂/H₂ mixtures in the gas target; *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1986**, 23, 1195-1198.

⁷(a) Larse, P; Ulin, J; Dahlstrom, K; A new method for production of ¹¹C-labelled methyl iodide from ¹¹C-methane; *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1995**, 37, 73-75; (b) Link, J. M; Clark, J. C; Larsen, P; Krohn, K. A; Production of [¹¹C]methyl iodide by reaction of ¹¹CH₄ with I₂; *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1995**, 37, 76-78.

⁸(a) Noguchi, J; Suzuki, K; Automated synthesis of the ultra high specific activity of [¹¹C]R0154513 and its application in an extremely low concentration region to an ARG study; *Nucl. Med. Biol.* **2003**, 30, 335-343; (b) Noguchi, J; Zhang, M. R; Suzuki, K; Application of Ultra high Specific Activity [¹¹C]Compounds to in vitro ARG; *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2003**, 46, s240.

⁹Ehrin, E; Gawell, L; Hogberg, T; de Pauli, T; Strom, P; Synthesis of [methoxy-³H]- and [methoxy-¹¹C]-labelled raclopride. Specific dopamine-D₂ receptor ligands; *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1987**, 24, 931-940.

Capítulo 3: Síntesis de radiotrazadores PET con carbono-11

¹⁰Ishiwata, K; Ishii, S. I; Senda, M; An alternative synthesis of [¹¹C]raclopride for routine use; *Ann. Nuc. Med.* **1999**, 13, 195-197.

¹¹Wilson, A. A; Garcia, A; Houle, S; Vasdev, N; Utility of commercial radiosynthetic modules in captive solvent [¹¹C]-methylation reactions; *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2009**, 52, 490-492.

CAPÍTULO 4

ESTUDIOS DE IMAGEN *EX VIVO* E *IN VIVO* DE LIGANDOS DOPAMINÉRGICOS

1. Ensayos de desplazamiento *ex vivo* con [³H]Racloprida
 - 1.1. Metodología
 - 1.2. Resultados y discusión
 - 1.3. Conclusiones
 2. Ensayo de biodistribución *in vivo* con el radiotrazador 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*c/oso*-dodecaborano
 - 2.1. Metodología
 - 2.2. Resultados y discusión
 - 2.3. Conclusiones
-

La imagen molecular permite tanto la visualización de una diana molecular específica en un animal vivo como el seguimiento de la distribución y el efecto directo de un fármaco en el mismo animal; todo ello en un proceso que a penas tiene lugar en pocos minutos.

A lo largo de los anteriores capítulos de la presente tesis se ha presentado la ruta sintética para la preparación de una pequeña librería de análogos de ligandos de receptores D₂, así como la metodología llevada a cabo para la preparación del radiotrazador 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano. A continuación se presentarán y explicarán una serie de ensayos *ex vivo* llevados a cabo con los ligandos dopaminérgicos **4**, **9** y **14**, cuya síntesis ha sido presentada anteriormente en el Capítulo 1, y el ensayo de biodistribución *in vivo* llevado a cabo con el radiotrazador 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano sintetizado *in situ* siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 3.

1. Ensayos de desplazamiento *ex vivo* con [³H]Racloprida

Como ha sido expuesto anteriormente en la Introducción de la presente Tesis, la autorradiografía es una técnica de imagen *ex vivo*, cuantitativa y de alta resolución cuya finalidad es la caracterización de radioligandos, donde éstos funcionan como trazadores para la detección de componentes endógenos. Este tipo de técnicas son de gran importancia en el campo de las neurociencias y han sido especialmente utilizadas en estudios de distribución y función de receptores. La utilización de esta técnica o de otras técnicas *in vitro*, como cultivos celulares, suele ser conveniente antes de realizar estudios *in vivo*, ya que aportan cierta información importante que podría evitar estudios innecesarios.

Existen tres tipos de protocolos para llevar a cabo ensayos de unión de radioligandos:

- a) Experimentos de unión por *saturación*, que miden el equilibrio de la unión a varias concentraciones de radioligando. Analiza la relación entre la unión y la concentración del ligando para determinar el número de sitios de unión (B_{max}) y la afinidad del ligando (K_d).
- b) Experimentos de unión *competitivos*, que son aquellos que miden el equilibrio de unión de una única concentración de radioligando a varias concentraciones de

un competidor no marcado radiactivamente. Este experimento determina la afinidad del ligando competidor por los receptores (K_i).

- c) Experimentos *cinéticos*, que miden la unión, a varios tiempos, para determinar las constantes de asociación y disociación del radioligando.

Sintetizados los ligandos dopaminérgicos D_2 deseados (ver Parte I, Capítulo 1), se decidió llevar a cabo una serie de estudios de desplazamiento competitivos *ex vivo* por ARG con los compuestos de referencia **4**, **9** y **14**, ya que son aquellos que presentan una estructura análoga a la Racloprida.

Los ensayos *ex vivo* fueron llevados a cabo utilizando el radiotrazador [^3H]Racloprida (producto comercial) en lugar de [^{11}C]Racloprida (ver Capítulo 3). A lo largo de este capítulo se mostrarán y explicarán los motivos que llevaron al cambio de radiotrazador.

1.1. Metodología

1.1.1. Procedimiento general

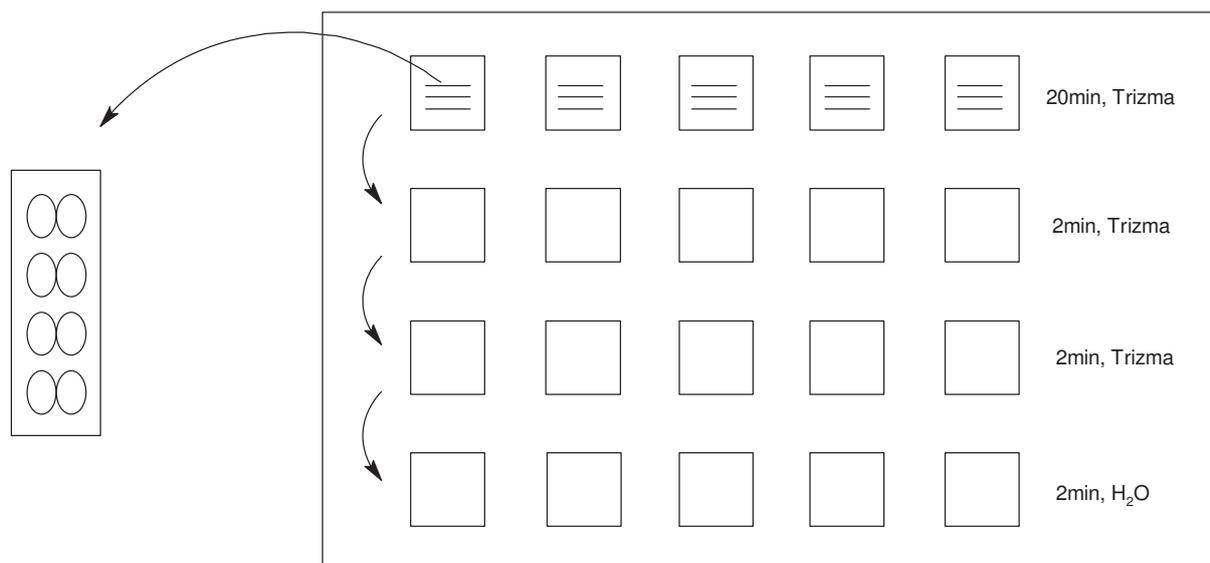
A continuación se explicará, de una manera general, el experimento llevado a cabo con cada uno de los compuestos elegidos y posteriormente se detallarán las condiciones específicas de cada caso y los resultados obtenidos por medio de esta técnica para cada compuesto.

Para comenzar con los experimentos era necesario preparar un banco de tejido animal. Para ello, varias ratas fueron sacrificadas, de acuerdo con las normas establecidas de ética de animales de experimentación existentes, y sus cerebros fueron extraídos, congelados y guardados. Posteriormente se realizaron secciones de $20\mu\text{m}$ de grosor de la zona cerebral correspondiente al estriado, donde se acumulan principalmente los receptores dopaminérgicos D_2 , con un microtomo. Estas secciones fueron depositadas sobre portaobjetos de cristal, colocando 4 secciones en cada uno de los portaobjetos.

Una vez preparado el banco de tejido animal, era necesario definir los parámetros del experimento. Teniendo en cuenta el número máximo de portaobjetos (15) que pueden utilizarse en cada experimento de autorradiografía, se decidió llevar a cabo dos ensayos para cada compuesto de referencia (**4**, **9** y **14**), con un rango de entre 8 y 10 concentraciones diferentes para cada uno. Así, a cada concentración de cada compuesto le correspondían varios cortes cerebrales. Como se observará a

continuación, las concentraciones finales (en la cubeta de reacción) de los compuestos varían en cada caso particular.

Como se puede observar en el Esquema 4.1, se prepararon varias cubetas de reacción con una disolución tampón de Trizma¹, preparada previamente, a pH = 7.4 y mantenida a 4°C, donde se colocaron los cestillos necesarios, con sus portaobjetos, que fueron sumergidos en la disolución tampón. A continuación se añadió, en primer lugar una disolución de [³H]Racloprida comercial², y posteriormente diferentes volúmenes de la disolución del compuesto a estudiar; de forma que en cada cubeta hubiera una concentración diferente y conocida. Para poder cuantificar los cortes cerebrales al final del experimento se realizó un blanco. La disolución final se dejó incubar durante 20 minutos y posteriormente los portaobjetos fueron pasados a otra serie de cubetas, conteniendo 200mL de Trizma, para ser lavados durante 2 minutos. A continuación se llevó a cabo otro lavado con Trizma y finalmente un último lavado con H₂O. Entonces los portaobjetos fueron secados y colocados sobre la placa de la ARG, donde se procedió a la toma de datos.



Esquema 4.1: Representación esquemática general del ensayo de desplazamiento, donde se muestra un portaobjetos (a la izquierda de la imagen) con los cortes cerebrales, y el ensayo *ex vivo* (a la derecha), donde aparecen las cubetas necesarias con sus correspondientes portaobjetos, y los lavados llevados a cabo.

1.1.2. Ensayo *ex vivo* con los ligandos 4, 9 y 14

En primer lugar se prepararon las disoluciones necesarias de los compuestos **4**, **9** y **14** con las que poder obtener las concentraciones finales deseadas para cada compuesto en las cubetas de incubación (ver Tabla 4.1). De esta manera se prepararon una serie de disoluciones madre de los diferentes compuestos en ACN/H₂O:1/1 a partir de las cuales obtener, por dilución, las concentraciones finales

Capítulo 4: Estudios de imagen *ex vivo* e *in vivo* de ligandos dopaminérgicos

deseadas. Con el fin de mantener el volumen final constante e igual en todas las cubetas de reacción, se decidió adicionar en cada cubeta 1 mL de una disolución en EtOH que contenía el volumen de cada compuesto (**4**, **9** o **14**) necesario para cada concentración particular.

COMPUESTO	CONCENTRACIONES (nM)
4	0.0, 0.1, 1.3, 0.8, 2.7, 6.0, 26.7, 101.1, 303.2 y 1010.7
9	0.0, 0.2, 0.6, 1.8, 6.1, 13.8, 46.0 y 459.4
14	0.0, 0.1, 0.5, 1.4, 4.7, 10.5, 35.1, 221.7 y 665.0

Tabla 4.1: Resumen de las concentraciones finales (en las cubetas de reacción) de los compuestos **4**, **9** y **14** utilizados en los ensayos *ex vivo*.

Para iniciar el experimento se sumergieron en el tampón los portaobjetos necesarios en las cubetas, por medio de cestillos, y se procedió a la adición de una disolución de [³H]Racloprida comercial, con una actividad de 1mCi/mL, de manera que la concentración del radioligando en la cubeta de reacción resultara aproximadamente de 136nM. A continuación se adicionó 1mL de cada disolución del compuesto (**4**, **9** o **14**) a diferentes concentraciones en EtOH en las cubetas correspondientes; dejando incubar la disolución final durante 20 minutos. Entonces los cestillos se sacaron de las disoluciones y se introdujeron en las siguientes cubetas, que contenían 200mL del buffer de Trizma, para su lavado durante 2 minutos. A continuación se llevó a cabo otro lavado más con Trizma durante 2 minutos y un lavado final con agua de 2 minutos de duración. Finalizados los lavados, los portaobjetos fueron depositados sobre una placa calefactora a 45°C para su secado. Finalmente fueron introducidos y analizados mediante ARG.

En las Figuras 4.1 y 4.2 se muestran las imágenes obtenidas para los compuestos **4** y **9**, respectivamente, como consecuencia de los experimentos, donde puede observarse la distribución de los receptores D₂ ocupados por la [³H]Racloprida (en rojo), que disminuye a medida que la concentración del ligando no radiactivo aumenta debido a que el radioligando es desplazado por éste.

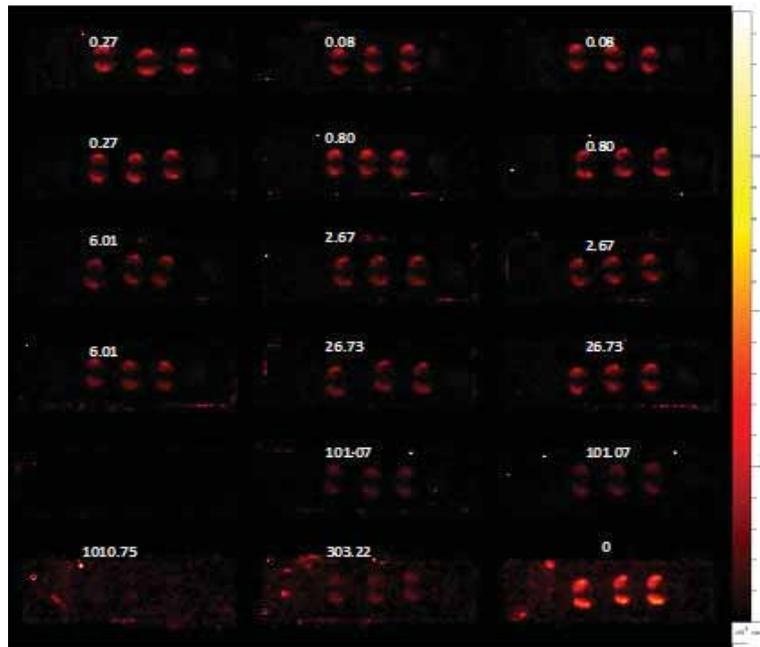


Figura 4.1: Visualización de los receptores D₂ ocupados por la [³H]Racloprida a diferentes concentraciones de ligando no radiactivo 4. Como puede observarse, la visualización de los receptores es menor cuanto mayor es la concentración empleada de ligando no radiactivo 4 debido a que esta mayor concentración es capaz de desplazar en mayor medida el radioligando.

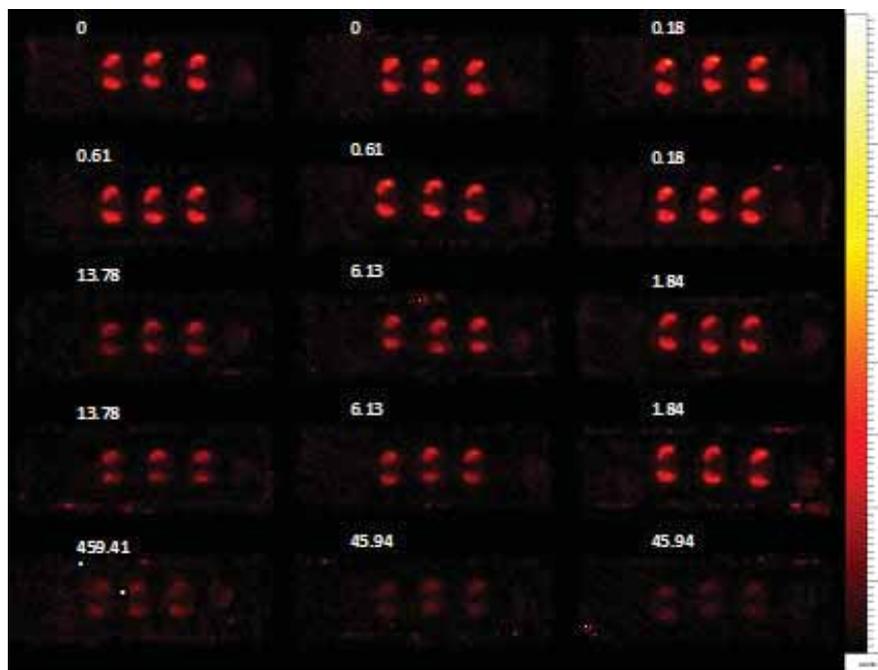


Figura 4.2: Visualización de los receptores dopaminérgicos D₂ ocupados por la [³H]Racloprida, a diferentes concentraciones de ligando no radiactivo 9. Como puede observarse, la visualización de los receptores es menor cuanto mayor es la concentración empleada de ligando no radiactivo 9 debido a que esta mayor concentración es capaz de desplazar en mayor medida el radioligando.

1.2. Resultados y discusión

Como se ha comentado anteriormente, inicialmente se llevaron a cabo los ensayos *ex vivo* con el radiotrazador [^{11}C]Racloprida, sintetizado *in situ* siguiendo la metodología expuesta en el Capítulo 3. Se llevaron a cabo tres repeticiones para cada compuesto, con su rango de concentraciones, y se observó que la medición de la radioactividad por parte del equipo de autorradiografía variaba según la posición del portaobjetos y el tiempo de adquisición; lo que no proporcionaba datos fiables. Inicialmente se pensó que este hecho se debía a una mala calibración del equipo; por lo que se decidió llevar a cabo un estudio para confirmar este punto. El estudio consistía en cuantificar la radioactividad de dos muestras de actividad conocida de ambos radiotrazadores, [^3H]Racloprida y [^{11}C]Racloprida, de manera que pudiesen establecerse ciertos patrones de comparación entre ambos. Así, por una parte se depositaron 6 gotas del radiotrazador [^{11}C]Racloprida con una actividad de $0.01\mu\text{Ci}$ en cada portaobjetos y se procedió a su cuantificación por autorradiografía. Por otro lado se llevó a cabo el mismo estudio con unos patrones de [^3H]Racloprida con la misma actividad en cada portaobjetos. En la Figura 4.3, vienen representadas las cuantificaciones para cada uno de los radiotrazadores. Como puede observarse en ambos casos, la cuantificación es desigual para cada posición del portaobjetos. En cuanto a la desviación respecto al promedio de la cuantificación varía de un radiotrazador a otro. En el caso del radiotrazador [^{11}C]Racloprida llega a ser de hasta un 50% arriba y abajo en ciertas posiciones, mientras que para la [^3H]Racloprida esta desviación resulta ser más suave, no superando el 10% de desviación.

Analizando los datos obtenidos mediante este estudio se puede llegar a la conclusión de que la posible mala calibración del equipo queda descartada, ya que en ese caso la desviación debería de ser igual en ambos radiotrazadores. Por lo tanto la causa de esta diferencia debería de ser justificada en base a la diferencia de la naturaleza de los dos radionucleidos utilizados. El carbono-11 es un radionucleido emisor de positrones que desprende una energía de 0.96MeV ; mientras que el Tritio es un emisor beta que desprende una energía de 18.6KeV . Es decir, el carbono-11 emite una energía cincuenta veces superior que el Tritio; y por lo tanto puede concluirse que el equipo de autorradiografía utilizado no es capaz de cuantificar de manera precisa la radioactividad presente en las muestras de radionucleidos emisores de positrones debido a la alta energía que desprenden. Debido a esto, se decidió llevar a cabo los experimentos *ex vivo* utilizando el radiotrazador [^3H]Racloprida.

Capítulo 4: Estudios de imagen *ex vivo* e *in vivo* de ligandos dopaminérgicos

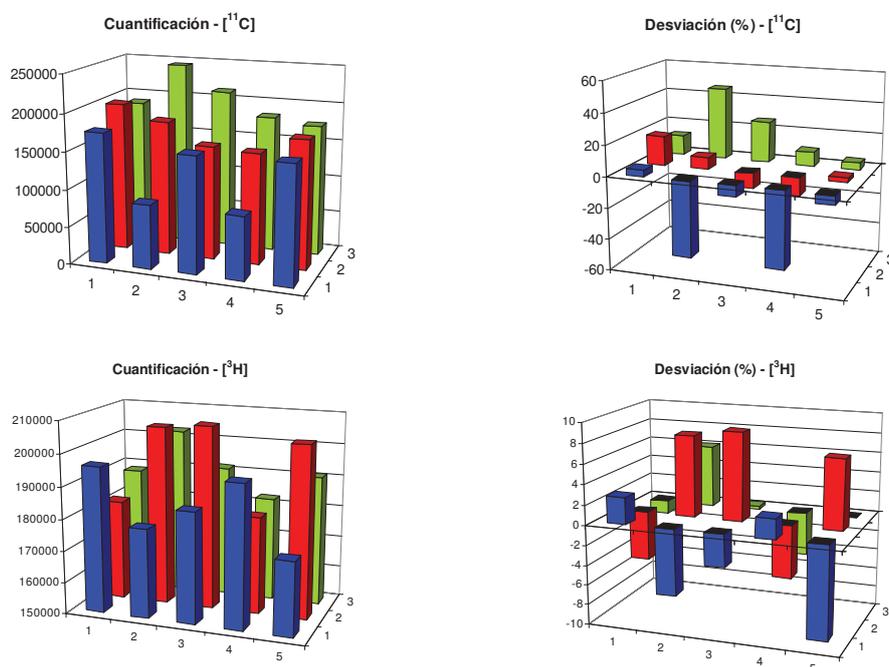


Figura 4.3: Gráficas de la cuantificación de la radiactividad (izquierda) y desviación de la cuantificación (derecha) para los radiotrazadores $[^{11}\text{C}]$ Racloprida (arriba) y $[^3\text{H}]$ Racloprida (abajo). Las columnas representan los 15 portaobjetos usados en cada ensayo, ordenados en 3 columnas (azul, rojo y verde) con 5 filas cada uno.

Así se llevaron a cabo los estudios de desplazamiento *ex vivo* con el radiotrazador $[^3\text{H}]$ Racloprida según la metodología descrita anteriormente. La radiactividad presente en las regiones cerebrales al cabo de 1 hora de adquisición de imagen se determinó en forma de cuentas por minuto/ mm^2 (cpm/ mm^2) tomando regiones de interés (ROIs) de aproximadamente misma área para las diferentes regiones cerebrales. De esta manera para cada concentración de ligando (L) se calculó una media del valor de cpm/ mm^2 y se representó frente a su concentración en forma de $\log [L]$. Estos datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 4, para obtener los valores de K_i (afinidad del ligando no radiactivo por los sitios de unión) y de IC_{50} (concentración que inhibe el 50% del radioligando) de los diferentes ligandos ensayados. El valor de la constante de afinidad viene calculado mediante un análisis basado en la ecuación de Cheng y Prusoff³.

En la siguiente Tabla 4.2 vienen resumidos los datos obtenidos y el índice de correlación que indica el ajuste de los datos a la ecuación de Cheng y Prusoff. Como puede observarse en todos los casos, los datos obtenidos se ajustan muy bien a la ecuación, ya que sus coeficientes de correlación son próximos a 1.

Capítulo 4: Estudios de imagen *ex vivo* e *in vivo* de ligandos dopaminérgicos

COMPUESTO	R ²	Ki (nM)	Log(IC ₅₀)
4	0.937	0.511	1.527±0.232
9	0.989	0.162	1.027±0.091
14	0.981	0.572	1.575±0.157

Tabla 4.2: Resumen de los valores obtenidos de afinidad y logIC₅₀ para cada compuesto estudiado y su índice de correlación.

Comparando estos valores con el valor de afinidad descrito en la literatura⁴ para el radioligando de referencia [³H]Racloprida (K_D ≈ 2.1nM), puede concluirse que los ligandos dopaminérgicos sintetizados presentan una afinidad por los receptores D₂ superior a la propia Racloprida. Por otro lado la concentración de ligando necesaria para la inhibición del 50% de la unión del radiotrazador con los receptores D₂ (33.61nM, 10.64nM y 37.61nM para los ligandos **4**, **9** y **14**, respectivamente) es bastante baja, lo que convierte a esta pequeña librería de ligandos dopaminérgicos en potenciales candidatos como radiotrazadores para la visualización de los receptores dopaminérgicos D₂.

Representado los valores obtenidos al analizar las imágenes, de cpm/mm² respecto al log[L], podemos obtener las curvas de desplazamiento competitivo (ver Figura 4.4) de los tres ligandos estudiados.

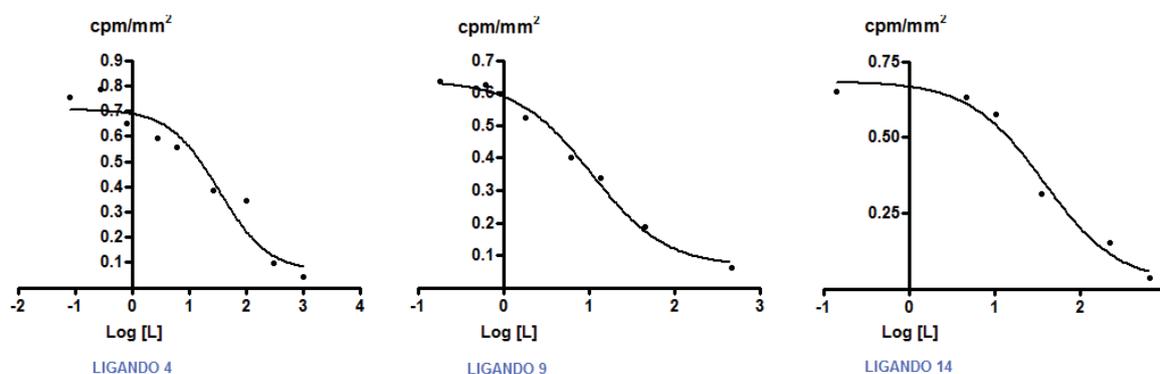


Figura 4.4: Curvas de desplazamiento competitivo (Log [L] vs cpm/mm²) de la [³H]Racloprida con los ligandos no radiactivos **4**, **9** y **14** en el cuerpo estriado del cerebro de ratas.

1.3. Conclusiones

1. La librería de ligandos dopaminérgicos descrita durante la presente Tesis presenta valores muy buenos de afinidad hacia los receptores D₂ presentes en

el estriado cerebral; lo que los convierte en potenciales candidatos con los que llevar a cabo estudios de imagen *in vivo*.

2. La metodología descrita para llevar a cabo los ensayos de imagen *ex vivo* con [³H]Racloprida es fiable y reproducible; mientras que la utilización de radiotrazadores emisores de positrones es incompatible con el equipo de autorradiografía utilizado, ya que los datos que aporta no son fiables.

2. Ensayo de biodistribución *in vivo* con el radiotrazador 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*c/oso*-dodecaborano

2.1. Metodología

2.1.1. Estudio *in vivo* con microPET

Para llevar a cabo el estudio *in vivo* se utilizó una rata macho⁵ de un peso aproximado de 175-225g. El animal fue mantenido y manipulado de acuerdo con las Prácticas de mantenimiento y cuidado de animales de laboratorio (Guidelines for Accommodation and Care of Animals; European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes) y prácticas internas. Todos los estudios que conllevan la utilización de animales de experimentación fueron previamente aprobados por el Comité de Ética Animal de CICbiomaGUNE. Las adquisiciones PET fueron llevados a cabo usando el sistema PET-CT eXploreVista-CT para animales pequeños (GE Healthcare).

Antes de llevar a cabo la adquisición, el animal fue anestesiado con 1.5% (v/v) de isoflurano y colocado en el escáner. A continuación, le fueron administrados 300µCi del radiotrazador 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*c/oso*-dodecaborano, sintetizado mediante la metodología descrita anteriormente en el Capítulo 3, disueltos en 200µL de suero fisiológico con etanol al 10% a través de la vena de la cola en modo bolus. La adquisición de imágenes dinámicas con la PET-CT fue llevada a cabo inmediatamente (fotogramas: 2x10s, 4x60s, 4x120s). Para adquirir las imágenes del cuerpo completo, se definieron cuatro “camas” por cada fotograma y se llevó a cabo un escaneo de CT (energía de Rayos-X: 40 KV, intensidad: 140 µA) para la corrección de la atenuación al final del estudio. Las imágenes fueron reconstruidas (random and scatter corrected) usando el algoritmo iterativo OSEM2D (número de iteraciones: 2), generando una imagen de dimensiones 175x175x220 con una resolución espacial axial de 1.5 mm de anchura a media altura (FWHM) en el

centro del campo de visión (FOV). Las imágenes de PET-CT fueron registradas usando la herramienta de análisis PMOD. Se dibujaron regiones de interés (ROIs) en diferentes órganos sobre las imágenes de CT para obtener las curvas de tiempo-actividad para cada órgano como Bq/cm³. Los datos obtenidos se normalizaron teniendo en cuenta la dosis inyectada. Se extrajeron muestras de sangre a diferentes tiempos después de la administración del radiotrazador y fueron analizadas en un contador gamma. Terminada la adquisición de imágenes, el animal fue sacrificado por eutanasia sin previa recuperación de la anestesia.

2.1.2. Estudio *ex vivo* de autorradiografía

Con el fin de determinar la unión del radiotrazador con los receptores D₂, se llevó a cabo un estudio de imagen *ex vivo* de autorradiografía, siguiendo la misma metodología descrita anteriormente, en este mismo capítulo, para los ensayos de desplazamiento de los análogos de ligandos de receptores D₂. Para eso se realizaron tres cortes de 20 µm de cerebro de la parte estriada y un corte adicional de la parte del cerebelo (ver Figura 4.5) y a continuación se incubaron con 1 mCi de radiotrazador disuelto en 200 mL de PBS (buffer salino de fosfato).



Figura 4.5: Foto de los 3 cortes de estriado y del cerebelo (derecha) seleccionados.

Conocida la distribución de los receptores dopaminérgicos D₂, por medio del análisis de los datos correspondientes de la adquisición de la cantidad de radiactividad presente en los diferentes cortes, puede determinarse la especificidad de unión del ligando estudiado.

2.2. Resultados y discusión

Como se ha explicado anteriormente, se llevó a cabo un experimento *ex vivo* de autorradiografía con una disolución de 1 mCi del radiotrazador 1-(N-(1-[Metil- ^{11}C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano disuelto en 200 mL de PBS con el fin de determinar la unión del radiotrazador con los receptores dopaminérgicos. Teniendo en cuenta que los receptores D_2 se encuentran, principalmente, en el cuerpo estriado del cerebro, se realizaron varios cortes cerebrales, seleccionando tres cortes de la parte estriada y uno del cerebelo (donde la presencia de receptores D_2 es prácticamente nula) para llevar a cabo el experimento. Analizando los datos obtenidos por medio de este experimento (ver Figura 4.6) se observó presencia del radiotrazador en todas las subestructuras cerebrales; a partir de los datos obtenidos se puede concluir que el radiotrazador 1-(N-(1-[Metil- ^{11}C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano presenta unión inespecífica. Este hecho es debido, posiblemente, al marcado carácter hidrofóbico del radiotrazador (debido posiblemente a la presencia del clúster de carborano) de modo que presenta elevada afinidad por las membranas celulares.

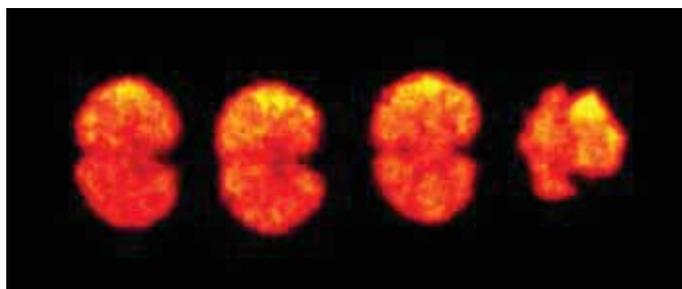


Figura 4.6: Imagen de autorradiografía que muestra presencia del radiotrazador en todas las subestructuras cerebrales: estriado (tres cortes de la izquierda) y cerebelo (corte de la derecha).

En cuanto al estudio *in vivo* en PET de la biodistribución del radiotrazador 1-(N-(1-[Metil- ^{11}C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano, como se ha explicado anteriormente, sobre la imagen de CT fueron tomadas varias regiones de interés (ROIs) sobre los diferentes órganos: corazón, vejiga, hígado, cerebro, estómago, intestino, riñones (izquierdo y derecho), testículos y pulmones. Estas ROIs se aplicaron a las imágenes PET y se determinó la concentración de radiactividad regional para cada fotograma, corregida por decaimiento y expresada como valor captado estandarizado (SUV : standardized uptake value), de acuerdo con la ecuación de Bergstrom⁶. Estos valores SUV vienen dados por el programa de análisis de datos.

Capítulo 4: Estudios de imagen *ex vivo* e *in vivo* de ligandos dopaminérgicos

La cuantificación de la presencia del radiotrazador en los diferentes órganos vendrá representada en curvas de actividad-tiempo ($\log(\%ID/cc)$ vs t). Los datos de cuantificación fueron adquiridos a diferentes tiempos durante una hora de adquisición total de la imagen. En la Figura 4.7 viene representada la actividad presente en cada órgano a diferentes tiempos.

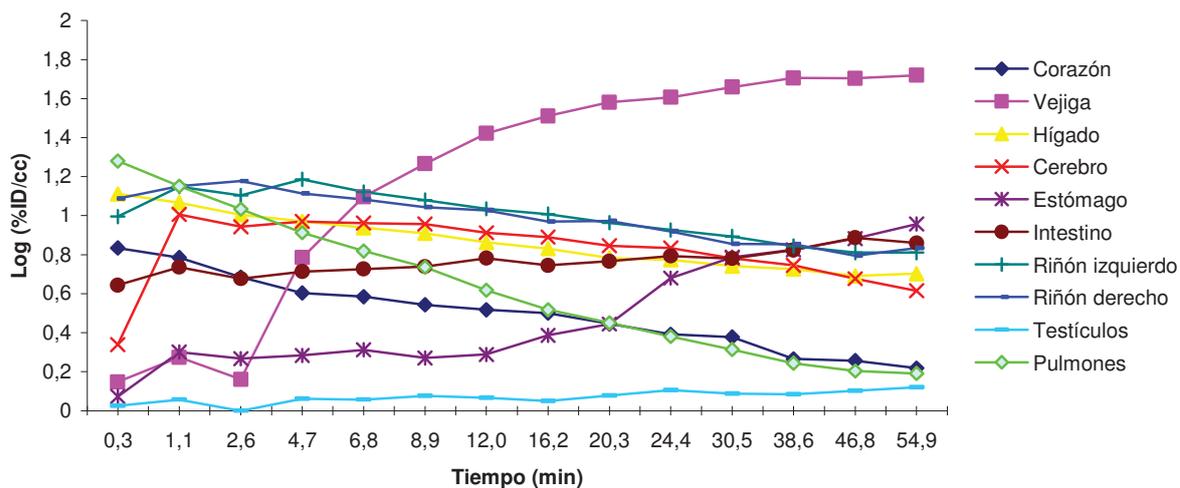


Figura 4.7: Comparación de las curvas de tiempo-actividad obtenidas para los diferentes órganos analizados durante una hora de adquisición total de imágenes.

Analizando los datos obtenidos, se puede observar que la cinética del radiotrazador en el cerebro es rápida, presentando el mayor pico de radiactividad del 10.13% de la dosis inyectada durante el primer minuto. Este dato también indica la capacidad del radiotrazador de cruzar la barrera hematoencefálica. Por otro lado, a partir de los 5 minutos de la inyección el radiotrazador comienza a ser eliminado por la orina, como viene representado en la curva correspondiente a la vejiga. En cuanto al resto de los órganos examinados, los riñones, los pulmones y el hígado presentan una acumulación algo superior al 10% de la dosis inyectada.

Por otro lado, las muestras de sangre tomadas a diferentes tiempos de adquisición, fueron pesadas y analizadas en un contador gamma para calcular la radiactividad presente en ellas. Los datos obtenidos de esta medición fueron representados en una curva de tiempo-actividad ($\%ID/g$ vs t), como puede observarse en la Figura 4.8.

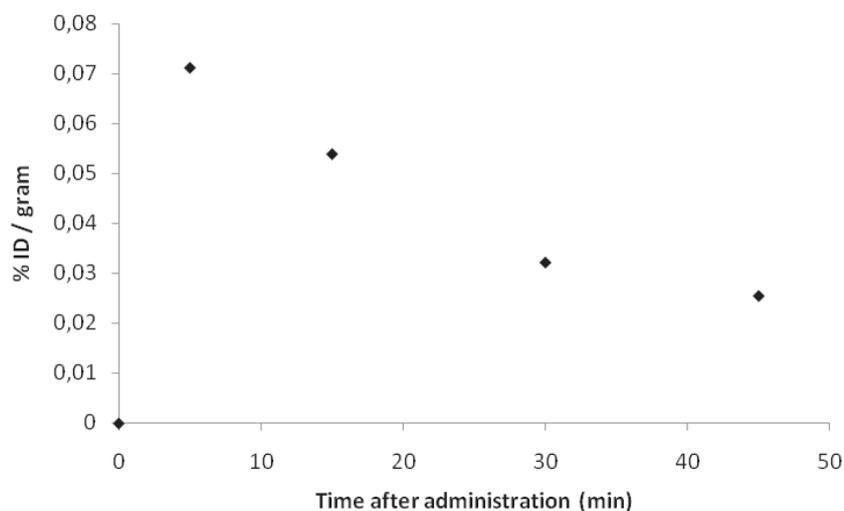


Figura 4.8: Curva de actividad (%ID/g) vs tiempo (min) correspondiente al análisis de las muestras de sangre tomadas durante la adquisición de la imagen *in vivo*.

De estos datos se puede concluir que la presencia del radiotrazador en la sangre no es significativa y por tanto las curvas actividad-tiempo presentadas en la Figura 4.7 representan la actividad real en los tejidos, sin estar enmascarada por la actividad en la sangre que los irriga.

En la Figura 4.9 puede observarse la imagen de cuerpo completo obtenida durante el experimento *in vivo*, donde aparece la biodistribución del nuevo radiotrazador sintetizado y analizado.

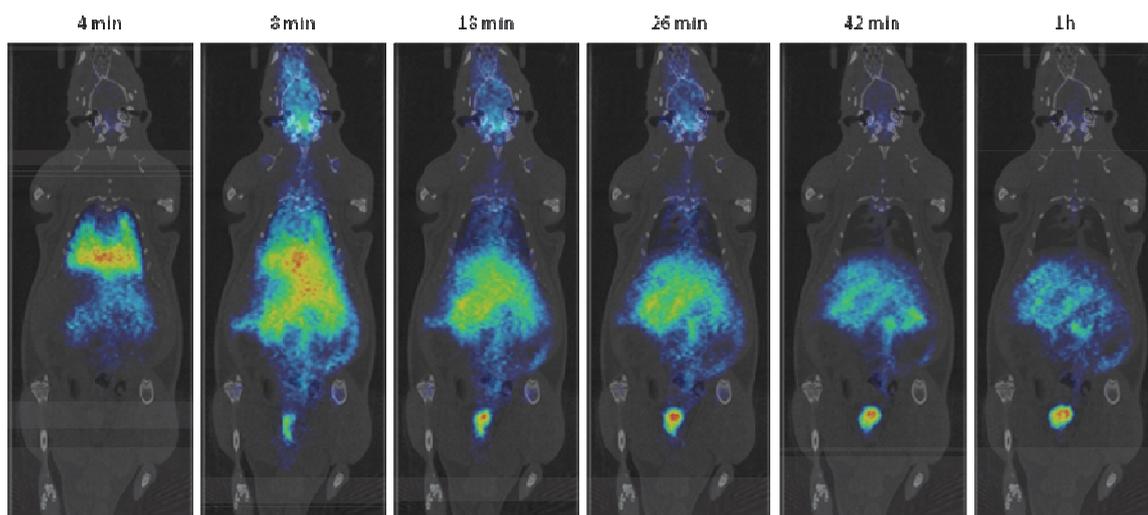


Figura 4.9: Biodistribución *in vivo* del radiotrazador 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-closo-dodecaborano en una rata macho.

En la Figura 4.10 puede verse el ratio estriado/cerebelo para los diferentes fotogramas. En todos los casos se obtiene un valor inferior a 1, hecho que confirma que el radiotrazador presenta una elevada captación inespecífica.

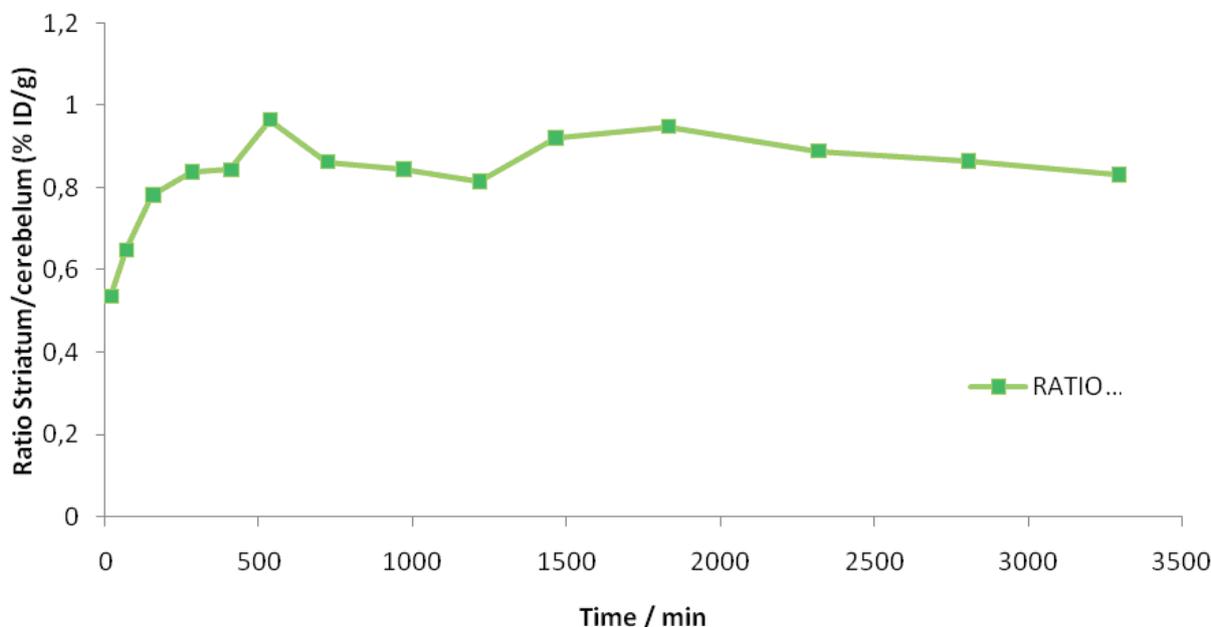


Figura 4.10: Gráfica del ratio estriado/cerebelo para los diferentes fotogramas adquiridos.

3. Conclusiones

1. El radiotrazador 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarbocloso-dodecaborano es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.
2. El radiotrazador presenta una elevada captación inespecífica debido al carácter hidrofóbico del mismo.
3. El radiotrazador es eliminado a través de la orina a partir de los diez minutos de administración, mientras que su presencia en otros órganos periféricos es a penas apreciable.

¹Se prepararon 10L de la disolución buffer de Trizma de la siguiente manera: Sobre H₂O se adicionaron 7.74g/L de Triz hydrochloride (50mM) y 7.01g/L de NaCl (120mM). A continuación se adicionó, poco a poco, una disolución de NaOH 1M hasta alcanzar pH = 7.4. La disolución se mantuvo a 4°C.

Capítulo 4: Estudios de imagen *ex vivo* e *in vivo* de ligandos dopaminérgicos

²PerkinElmer Inc. Fórmula molecular: $C_{15}H_{20}Cl_2N_2O_3$. Actividad Específica: 60-87 Ci (2220-3219 GBq/mmol). Concentración: 1 mCi/mL.

³Cheng, Y. C; Prussoff, W. H; Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (K_{50}) of an enzymatic reaction; *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3102.

⁴(a) Lidow, M. S; Goldman-Rakic, P. S; Rakic, P; Innis, R. B; Dopamine D_2 receptors in the cerebral cortex: distribution and pharmacological characterization with [3H]Raclopride; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1989**, *86*, 6412-6416; (b) Kohler, C; Hall, H; Ogren, S. O; Gawell, L; Specific in vitro binding of 3H-raclopride. A potent substituted benzamide drug with high affinity for dopamine D-2 receptors in the rat brain; *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 2251-2259.

⁵Rata macho: Sprague-Dawley, de 7-8 semanas, Harlan, Udine, Italia.

⁶Bergstrom, M; Grahnen, A; Langstrom, B; Positron emisión tomography microdosing: a new concept with application in tracer and early clinical drug development; *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2003**, *59*, 357-366.

CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES FINALES

1. Se ha desarrollado una metodología sintética para la obtención de derivados análogos de benzamidas sustituidas que incorporan una unidad de dicarba-*closo*-dodecaborano reproducible y con buenos rendimientos. Para los compuestos finales **4**, **5**, **9**, **10**, **14** y **15** los rendimientos obtenidos han sido del 75%, 86%, 70%, 81%, 46% y 47% respectivamente.
2. Se ha desarrollado una estrategia sintética para la obtención de los compuestos precursores (**6**, **11** y **16**) y de referencia (**4**, **9** y **14**) con el fin de llevar a cabo su marcaje con carbono-11.
3. Los estudios de estabilidad de los ligandos análogos de receptores dopaminérgicos muestran que en presencia de medios próticos los derivados de *orto*-carborano monosustituídos pierden una unidad BH, formando los derivados *nido* correspondientes.
4. Se ha desarrollado una metodología sintética reproducible para la obtención de derivados análogos de diaril pirazoles que incorporan una unidad de dicarba-*closo*-dodecaborano.
5. Se ha desarrollado una estrategia de síntesis para la obtención del radiotrazador PET [¹¹C]Racloprida con alta actividad específica eficaz, reproducible y totalmente automatizada.
6. Se ha desarrollado una estrategia sintética eficaz y reproducible para el marcaje con carbono-11 de análogos de ligandos de receptores dopaminérgicos que incorporan una unidad de dicarba-*closo*-dodecaborano.
7. Los estudios de desplazamiento *ex vivo* llevados a cabo con análogos de ligandos dopaminérgicos muestran que su afinidad por los receptores dopaminérgicos D₂ es superior a la Racloprida, convirtiéndolos en potenciales candidatos como radiotrazadores para la visualización de receptores dopaminérgicos D₂.

CONCLUSIONES FINALES

8. El estudio de biodistribución *in vivo* del radiotrazador PET 1-(N-(1-[Metil-¹¹C]-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-*closo*-dodecaborano muestra que este ligando es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

CAPÍTULO 5

PARTE EXPERIMENTAL

1. Técnicas experimentales
 2. Síntesis de análogos de ligandos de receptores D₂
 3. Síntesis de análogos de ligandos de receptores CB₁
-

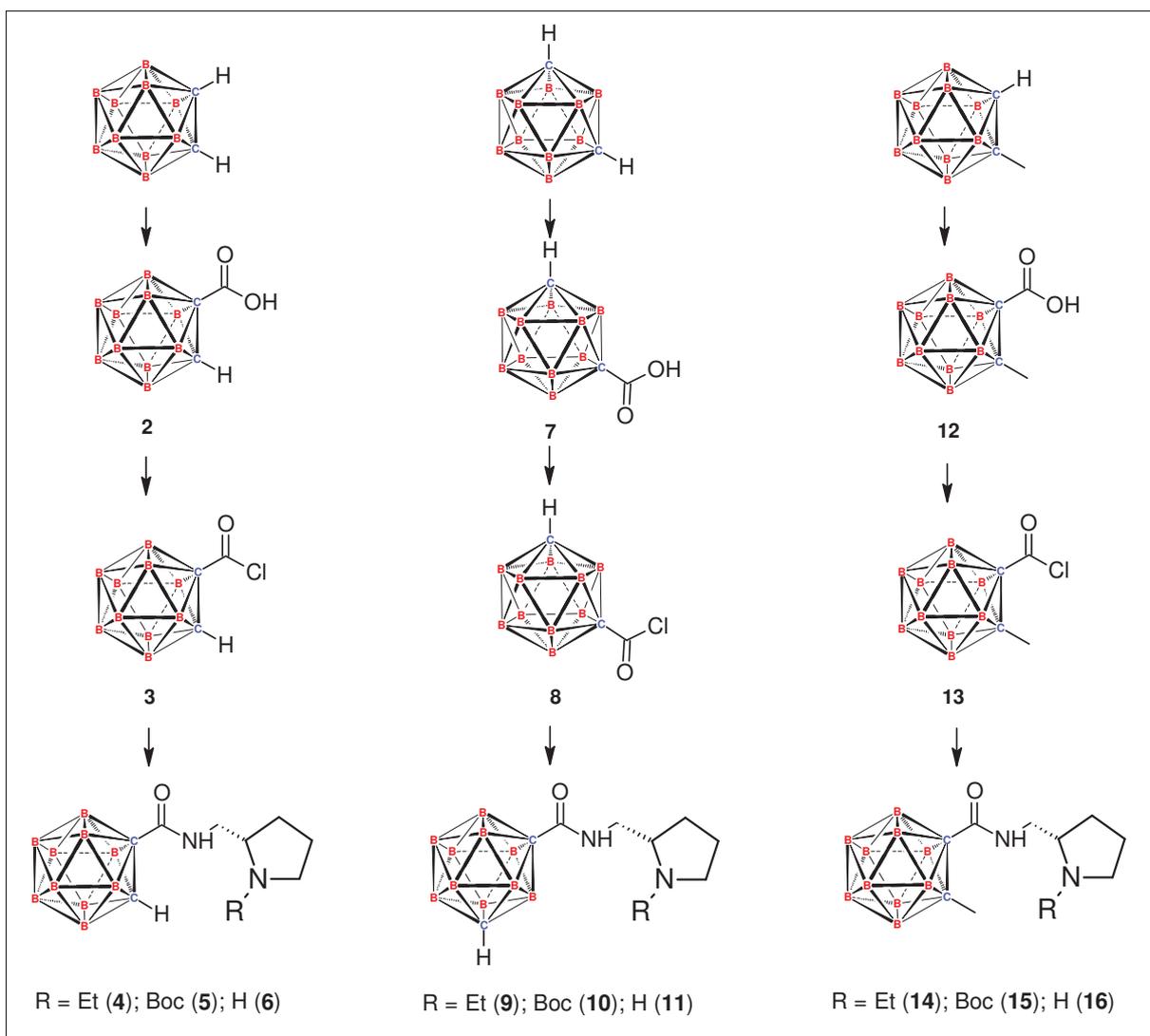
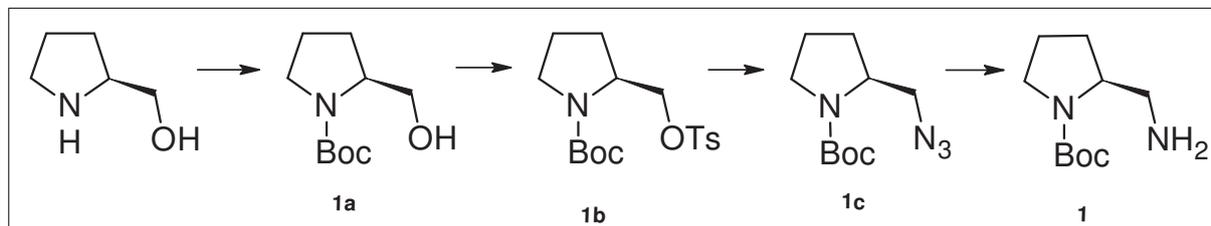
1. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

RMN: Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón, carbono y boro (^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{11}B -RMN) monodimensionales y bidimensionales se realizaron a 20-25°C en un espectrofotómetro Bruker Avance II (500 MHz para ^1H , 125.77 MHz para ^{13}C y 160.46 MHz para ^{11}B desacoplado) utilizando cloroformo deuterado como disolvente y patrón interno: CDCl_3 , $\delta = 7.26$ (^1H) y 77.16 ppm (^{13}C). Los desplazamientos químicos están dados en δ (ppm) con respecto a tetrametilsilano y las constantes de acoplamiento (J) en Hercios (Hz).

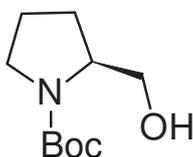
EM: Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro Waters AQUITY UPLC acoplado a un LCT TOF Premier XE.

Varios: Las reacciones se monitorizaron por cromatografía en capa fina con cromatofolios de silicagel ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ de Macherey-Nagel, utilizando como revelador luz UV ($\lambda = 254\text{nm}$ y 360nm) o reactivos reveladores como AgNO_3 , ninhidrina y ácido fosfomolibdico. Para las separaciones cromatográficas en columna se utilizó silicagel Scharlau 70-230 mesh ASTM. Las reacciones con microondas se llevaron a cabo en un microondas Biotage Initiator.

2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE LIGANDOS DE RECEPTORES D₂



2-Hidroximetil-pirrolidin-1-tert-butiléster **1a**:

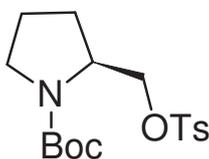


Sobre una disolución enfriada a 0°C de (S)-(+)-2-pirrolidinmetanol (0.2mL, 2.027mmol) en una mezcla de THF/H₂O : 1/1 (12mL), se adicionan NaHCO₃ (0.5g, 6.08mmol) y Boc₂O (0.6mL, 2.43mmol). La mezcla final se agita a 0°C durante 30 minutos y a continuación se deja atemperar, agitándola durante 14 horas. La reacción se para adicionando NH₄Cl saturado y se extrae con Et₂O (3x25mL). La combinación de los extractos orgánicos se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora a sequedad, obteniéndose el compuesto deseado **1a** (0.41g, rendimiento cuantitativo) sin necesidad de ser purificado.

¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.45 (s, 9H, Boc), 1.57 (s, 1H, CH₂-C-CH₂OH), 1.85-1.73 (m, 2H, CH₂-pirrolidina), 2.05-1.95 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂OH), 3.31-3.26 (m, 1H, CH₂-NBoc), 3.46-3.41 (m, 1H, CH₂-NBoc), 3.63-3.54 (dd, 2H, CH₂-OH), 3.95-3.90 (m, 1H, CH-CH₂OH).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 24.20, 28.68, 28.97, 47.66, 60.34, 68.11, 80.47, 201.07.

2-(Toluen-4-sulfoniloximetil)-pirrolidin-1-tertbutiléster **1b**:



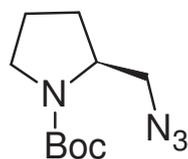
1b

Sobre una disolución de **1a** (2.4g, 11.9mmol) en piridina anhidra (20mL), bajo atmósfera inerte, se adiciona TsCl (3.4g, 17.85mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente hasta que la TLC (Hexano/AcOEt : 2/1) muestra la desaparición del producto de partida. A continuación, la disolución se diluye en agua (60mL) y se extrae con AcOEt (3x100mL). La combinación de los extractos orgánicos se lava con una disolución saturada de NaCl, se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El crudo obtenido se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de Hexano/AcOEt : 4/1, para obtener el compuesto deseado **2b** (3.05g, 72%).

¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.38 (s, 9H, Boc), 1.72-1.83 (m, 2H, CH₂-pirrolidina), 1.84-1.93 (m, 2H, CH₂-CH-CH₂OH), 2.42 (s, 3H, CH₃), 3.21-3.31 (m, 2H, CH₂-NBoc), 3.86-3.95 (bs, 1H, CH-CH₂OTs), 4.07 (d, 2H, CH₂-OTs), 2.04 (bs, 2H, Ar), 7.75 (d, 2H, Ar).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 21.84, 24.03, 27.84, 28.56, 47.15, 55.75, 70.17, 79.82, 128.09, 130.09, 133.15, 145.10, 169.05.

2-Azidometil-pirrolidin-1-tertbutiléster **1c**:



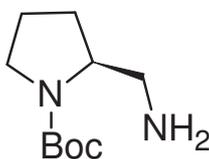
1c

En un vial de microondas se disuelve el compuesto **2b** (0.6g, 1.7mmol) en DMSO (12mL) y se adiciona NaN₃ (0.6g, 8.5mmol). La mezcla se calienta a 120°C durante 5 minutos bajo presión en el microondas. A continuación la reacción resultante se trata con una disolución saturada de NH₄Cl (50mL) y se extrae con AcOEt (3x60mL). La combinación de los extractos orgánicos se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El crudo obtenido se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de Hexano/AcOEt : 9/1 para obtener el compuesto **2c** (0.35g, 67%).

¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.45 (s, 9H, Boc), 1.78-1.98 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂N₃, CH₂-pirrolidina), 3.28-3.57 (m, 4H, CH₂-N₃, CH₂-NBoc), 3.90 (m, 1H, CH-CH₂N₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 23.22, 28.71, 29.69, 46.83, 52.93, 56.73, 79.83, 154.80.

2-Aminoetil-pirrolidin-1-tertbutiléster 1:

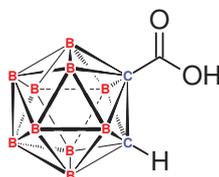


Sobre una disolución de **1c** (0.28g, 1.3mmol) en DMF (2.5mL), se adiciona PPh₃ (0.4g, 1.4mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación se adiciona H₂O (0.25mL) y la reacción se calienta a reflujo durante 3 horas más. Después de atemperar la reacción, se evapora a sequedad y el crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de AcOEt/EtOH en un gradiente de 1/1 a 0/1, con 1% TEA, para obtener el compuesto deseado **1** (0.17g, 70%).

¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.44 (s, 9H, Boc), 1.76-2.05 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂NH₂, CH₂-pirrolidina), 2.66-2.88 (m, 2H, CH₂-NH₂), 3.26-3.45 (m, 2H, CH₂-NBoc), 3.68-3.85 (m, 1H, CH-CH₂-NH₂).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 23.29, 28.66, 28.90, 45.52, 46.80, 59.53, 79.52, 154.98.

1,2-Dicarba-closo-dodecaborano-1-ácido carboxílico 2:



2

Bajo atmósfera inerte, se disuelve el *orto*-carborano (0.1g, 0.69mmol) en Et₂O anhidro (8mL) y se enfría la disolución a -78°C. A continuación se adiciona, gota a gota, *n*BuLi (0.48mL, 0.76mmol) y la mezcla final se agita a -78°C durante 30 minutos. Entonces se adiciona CO₂ (s), se agita durante 1 hora a -78°C; y a continuación se deja que la reacción adquiera temperatura ambiente. Una vez atemperada la reacción, se evapora el disolvente y el residuo obtenido se redissuelve en H₂O (60mL) y se lava con Hexano (2x50mL), para eliminar el *orto*-carborano de partida que no haya reaccionado. La fase acuosa resultante se acidifica con HCl 1M hasta pH = 1-2 y se extrae con Hexano (3x75mL). La combinación de los extractos orgánicos se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora a sequedad, obteniendo el compuesto deseado **2** (0.092g, 70%).

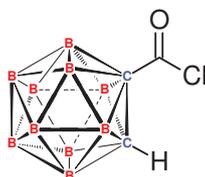
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 2.19-2.44 (m, 10H, BH), 4.03 (s, 1H, CH-carborano), 9.76 (s, 1H, COOH).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 57.16, 68.62, 163.28.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -13.46, -11.86, -8.64, -2.29.

Parte Experimental

1,2-Dicarba-closo-dodecaborano-1-cloruro de ácido 3:



3

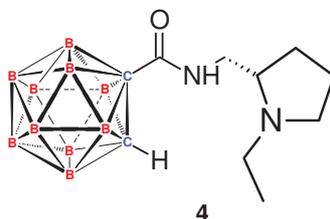
Bajo atmósfera inerte se disuelve el compuesto **2** (0.3g, 1.6mmol) en Tolueno anhidro (3mL), se adiciona, poco a poco PCl_5 (0.37g, 1.75mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 14 horas. A continuación se trasvasa a un horno de bolas y a 110°C se codestilan el tolueno y el oxiclورو de fósforo. Entonces se deja atemperar, se cambia el matraz bajo atmósfera inerte y a 120°C y 5mm se destila el compuesto deseado **3** (0.29g, 87%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500MHz): δ 2.05-2.57 (m, 10H, BH), 4.10 (s, 1H, CH-carborano).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125.77MHz): δ 57.45, 74.44, 164.76.

$^{11}\text{B NMR}$ (CDCl_3 , 160.46MHz, desacoplado): δ -13.16, -11.55, -8.53, -2.06, -1.38.

1-(N-(1-Etil-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,2-dicarba-closo-dodecaborano **4**:



Bajo atmósfera inerte, se disuelve el cloruro de ácido **3** (0.25g, 1.21mmol) en DCM anhidro (5mL) y la mezcla se enfría a 0°C. A continuación se adiciona una disolución de (S)-(-)-2-aminoetil-1-etilpirrolidina (0.17mL, 1.21mmol) en DCM anhidro (3mL) y TEA (0.17mL, 1.21mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora y entonces se evapora a sequedad. El crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de (AcOEt/EtOH : 9/1), para obtener el compuesto deseado **4** (0.27g, 75%).

¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.15 (s, 3H, CH₃), 1.49 (s, 1H, CH₂-CHNEt), 1.78 (s, 2H, CH₂-CH₂NEt), 1.93 (s, 1H, CH₂-CHNEt), 2.11-2.40 (m, 12H, BH, CH₂-CH₃, CH₂-NEt), 2.77 (s, 2H, CH₂-CH₃, CH-NEt), 3.20-3.29 (m, 2H, CH₂-NH, CH₂-NEt), 3.42 (s, 1H, CH₂-NH), 4.26 (s, 1H, CH-carborano).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 13.97, 23.30, 28.46, 41.86, 48.41, 53.69, 56.94, 62.08, 72.20, 160.01.

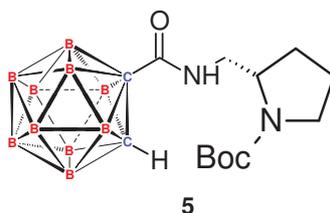
¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -13.52, -12.72, -12.06, -8.78, -3.38.

HRMS (ESI): *m/z* calculada para C₁₀H₂₆B₁₀N₂OH: 296.324 [M+H]⁺; encontrada 296.325.

Parte Experimental

1-(N-(1-tertbutil-éster-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,2-dicarba-closo-dodecaborano

5:



Bajo atmósfera inerte, se disuelve el cloruro de ácido **3** (0.26g, 1.26mmol) en DCM anhidro (5mL) y la mezcla se enfría a 0°C. A continuación se adiciona la amina **1** (0.25g, 1.26mmol) disuelta en DCM anhidro (3mL) y TEA (0.17mL, 1.26mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y finalmente se evapora a sequedad. El crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de (Hexano/AcOEt : 8/2), para obtener el compuesto deseado **5** (0.4g, 86%).

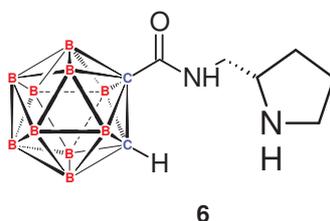
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.47 (s, 9H, Boc), 1.57-1.61 (m, 1H, CH₂-CHNBoc), 1.81-1.87 (m, 2H, CH₂-CH₂NBoc), 1.99-2.07 (m, 1H, CH₂-CHNBoc), 2.15-2.40 (s, 10H, BH), 3.09 (s, 1H, CH₂-NBoc), 3.30-3.42 (m, 3H, CH₂-NH, CH₂-NBoc), 4.04 (s, 1H, CH-NBoc), 4.24 (s, 1H, CH-carborano), 8.54 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 24.20, 28.68, 29.90, 47.53, 48.53, 55.76, 57.15, 72.35, 81.04, 157.37, 160.22.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -13.72, -12.56, -8.89, -3.47.

HRMS (ESI): *m/z* calculada para C₁₃H₃₀B₁₀N₂O₃Na: 390.327 [M+Na]⁺; obtenida 390.327.

1-(2-metilen-pirrolidin-formamida)-1,2-dicarba-closo-dodecaborano 6:



Bajo atmósfera inerte, se disuelve el compuesto **5** (0.4g, 1.07mmol) en DCM anhidro (7mL) y la mezcla se enfría a 0°C. A continuación se adiciona TFA (1.6mL, 21.5mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente la reacción se evapora a sequedad para obtener el compuesto deseado **6** (0.455g, rendimiento cuantitativo) como sal de trifluoroacetato.

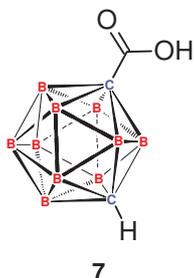
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.66-1.74 (m, 1H, CH₂-CHNH), 1.97-2.01 (m, 2H, CH₂-CH₂NH), 2.03-2.05 (m, 1H, CH₂-CHNH), 2.05-2.20 (m, 10H, BH), 3.28-3.35 (m, 2H, CH₂-NH), 3.55-3.64 (m, 2H, CH₂-NHCO), 3.84 (m, 1H, CH-CH₂NHCO), 4.24 (s, 1H, CH-carborano), 8.66 (s, 1H, NH), 9.18 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 24.30, 27.69, 41.94, 46.29, 57.23, 60.36, 71.27, 112.37, 114.66, 116.96, 119.25, 161.74, 162.06.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -12.88, -8.56, -2.99.

HRMS (ESI): m/z calculada para C₈H₂₂B₁₀N₂OH: 268.292 [M+H]⁺; encontrada 268.291.

1,7-Dicarba-closo-dodecaborano-1-ácido carboxílico 7:



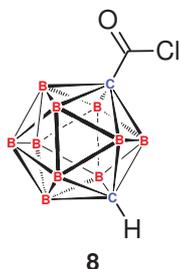
Bajo atmósfera inerte, se disuelve el *meta*-carborano (1g, 6.94mmol) en Et₂O anhidro (70mL) y se enfría a -78°C. A continuación se adiciona, gota a gota *n*BuLi (4.8mL, 7.63mmol) y la mezcla se agita 1 hora a -78°C. Entonces se adiciona CO₂ (s) y la reacción se deja agitando durante 2 horas a -78°C. Finalmente se atempera, se evapora el disolvente y el residuo se redissuelve en H₂O (60mL). La fase acuosa se lava con Hexano (2x50mL) y luego se acidifica con HCl 1M. A continuación se extrae con Et₂O (3x70mL). La combinación de los extractos orgánicos se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora a sequedad, obteniendo el compuesto deseado **7** (0.9g, 68%).

¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 2.16-2.53 (m, 9H, BH), 2.92 (s, 1H, BH), 3.00 (s, 1H, CH-carborano), 8.55 (s, 1H, COOH).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 55.03, 71.56, 166.88.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -15.67, -13.22, -11.30, -10.58, -6.63, -4.91.

1,7-Dicarba-closo-dodecaborano-1-cloruro de ácido **8**:



Bajo atmósfera inerte se disuelve el compuesto **7** (0.4g, 2.12mmol) en Tolueno anhidro (5mL) y se adiciona, poco a poco, PCl_5 (0.49g, 2.34mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 14 horas. A continuación se trasvasa a un horno de bolas y a 110°C se codestilan el tolueno y el oxiclورو de fósforo. Entonces se deja atemperar, se cambia el matraz bajo atmósfera inerte y a 125°C y 5mm se destila el compuesto deseado **8** (0.37g, 85%).

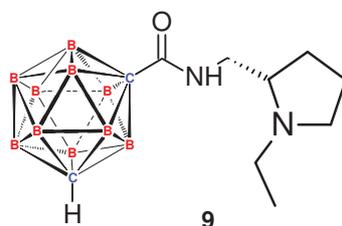
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500MHz): δ 2.17-2.54 (m, 9H, BH), 2.92 (s, 1H, BH), 3.01 (s, 1H, CH-carborano).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125.77MHz): δ 55.19, 79.97, 164.15.

$^{11}\text{B NMR}$ (CDCl_3 , 160.46MHz, desacoplado): δ -15.41, -12.99, -10.94, -10.38, -6.02, -4.43.

Parte Experimental

1-(N-(1-Etil-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-closo-dodecaborano **9**:



Bajo atmósfera inerte, se disuelve el cloruro de ácido **8** (0.12g, 0.58mmol) en DCM anhidro (3mL) y la mezcla se enfría a 0°C. A continuación se adiciona una disolución de (S)-(-)-2-aminoetil-1-etilpirrolidina (0.08mL, 0.58mmol) en DCM anhidro (2mL) y TEA (0.08mL, 0.58mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas y finalmente se evapora a sequedad. El crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de AcOEt/EtOH : 8/2, para obtener el compuesto deseado **9** (0.12g, 70%).

¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.08 (s, 3H, CH₃-CH₂N), 1.41 (s, 1H, CH₂-CHNEt), 1.57-1.70 (m, 2H, CH₂-CH₂NEt), 1.84 (s, 1H, CH₂-CHNEt), 2.14 (s, 1H, CH₂-N), 2.23 (s, 1H, CH₂-NEt), 2.07-2.78 (m, 9H, BH), 2.49 (s, 1H, CH-NEt), 2.68 (s, 1H, CH₂-N), 2.94 (s, 1H, BH), 2.99 (s, 1H, CH-carborano), 3.05 (s, 1H, CH₂-NHCO), 3.17 (s, 1H, CH₂-NEt), 3.34 (s, 1H, CH₂-NHCO), 6.69 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 14.42, 23.25, 28.42, 41.66, 48.27, 53.68, 54.99, 61.87, 76.08, 160.85.

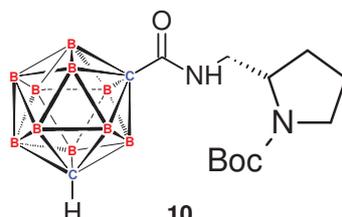
¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -15.85, -13.40, -11.69, -11.02, -7.87, -5.88.

HRMS (ESI): *m/z* calculada para C₁₀H₂₆B₁₀N₂OH: 299.313 [M+H]⁺; encontrada 299.312.

Parte Experimental

1-(N-(1-tertbutil-éster-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,7-dicarba-closo-dodecaborano

10:



Bajo atmósfera inerte, se disuelve el cloruro de ácido **8** (0.13g, 0.65mmol) en DCM anhidro (3mL) y la mezcla se enfría a 0°C. A continuación se adiciona la amina **1** (0.13g, 0.65mmol) disuelta en DCM anhidro (3mL) y TEA (0.09mL, 0.65mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 14 horas y finalmente se evapora a sequedad. El crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de (Hexano/AcOEt : 8/2), para obtener el compuesto deseado **10** (0.2g, 81%).

¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.43 (s, 9H, Boc), 1.56 (s, 1H, CH₂-CHNBoc), 1.79-1.81 (m, 2H, CH₂-CH₂NBoc), 1.92-1.98 (m, 1H, CH₂-CHNBoc), 2.07-2.51 (m, 9H, BH), 2.89 (s, 1H, BH), 2.95-3.04 (m, 2H, CH₂-NHCO, CH-carborano), 3.24-3.33 (m, 3H, CH₂-NHCO, CH₂-NBoc), 3.57 (s, 1H, CHNBoc), 7.95 (s, 1H, NH-CO).

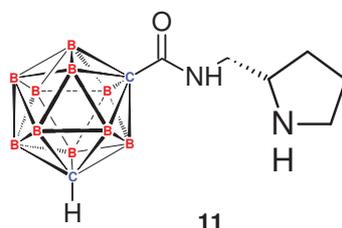
¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 24.08, 28.57, 29.71, 47.29, 47.98, 54.74, 55.61, 76.02, 80.54, 156.96, 161.02.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -15.73, -13.42, -11.48, -10.95, -7.70, -5.46.

HRMS (ESI): *m/z* calculada para C₁₃H₃₀B₁₀N₂O₃Na: 393.316 [M+Na]⁺; encontrada 393.317.

Parte Experimental

1-(2-metilen-pirrolidin-formamida)-1,7-dicarba-closo-dodecaborano **11**:



Bajo atmósfera inerte, se disuelve el compuesto **10** (0.19g, 0.513mmol) en DCM anhidro (3mL) y la mezcla se enfría a 0°C. A continuación se adiciona TFA (0.78mL, 10.26mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente la reacción se evapora a sequedad para obtener el compuesto deseado **11** (0.23g, rendimiento cuantitativo) como sal de trifluoroacetato.

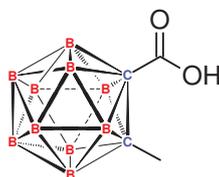
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.65-1.72 (m, 1H, CH₂-CHNHTFA), 1.96-2.42 (m, 9H, BH), 2.00-2.03 (m, 2H, CH₂-CH₂NHTFA), 2.12-2.13 (m, 1H, CH₂-CHNHTFA), 2.87 (s, 1H, BH), 3.03 (s, 1H, CH-carborano), 3.27-3.34 (m, 2H, CH₂-NHTFA), 3.50-3.58 (m, 2H, CH₂-NHCO), 3.85 (s, 1H, CH-CH₂NHCO), 7.28 (s, 1H, NH-CO), 8.56 (s, 1H, NH-TFA), 9.19 (s, 1H, NH-TFA).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 24.21, 27.62, 42.02, 46.21, 55.25, 60.40, 74.47, 115 (112.34, 114.64, 116.94, 119.23), 161.5 (161.14, 161.44, 161.75, 162.06), 163.55.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -15.77, -13.10, -11.59, -10.70, -5.70.

HRMS (ESI): *m/z* calculada para C₈H₂₂B₁₀N₂OH: 271.281 [M+H]⁺; encontrada 271.279.

1-Metil-1,2-Dicarba-closo-dodecaborano-2-ácido carboxílico **12**:



12

Bajo atmósfera inerte, se disuelve el metil-*orto*-carborano (1g, 6.32mmol) en Et₂O anhidro (60mL) y se enfría a 0°C. A continuación se adiciona, lentamente, *n*BuLi (4.7mL, 7.58mmol) y la mezcla se agita a 0°C durante 2 horas. Entonces se enfría a -78°C y se adiciona CO₂ (s), dejando agitar la reacción durante 1 hora más. A continuación se deja atemperar y se evapora el disolvente. El crudo resultante se redissuelve en H₂O (60mL) y se lava con Hexano (2x50mL). La fase acuosa se acidifica con HCl 1M y a continuación se extrae con Et₂O (3x70mL). La combinación de los extractos orgánicos se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra, obteniéndose el compuesto deseado **12** (1.3g, rendimiento cuantitativo).

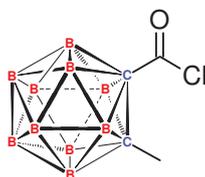
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 2.14 (s, 3H, CH₃-carborano), 2.20-2.48 (m, 10H, BH), 8.90 (s, 1H, COOH).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 24.84, 71.77, 75.93, 164.95.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -10.43, -9.50, -5.50, -0.65.

Parte Experimental

1-Metil-1,2-Dicarba-closo-dodecaborano-2-cloruro de ácido **13**:



13

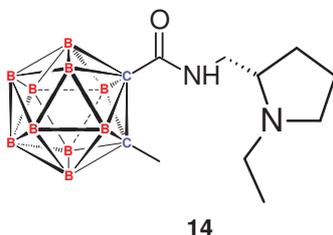
Bajo atmósfera inerte se disuelve el compuesto **12** (0.3g, 1.48mmol) en Tolueno anhidro (3mL) y se adiciona, poco a poco PCl_5 (0.34g, 1.63mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente 14 horas. A continuación se trasvasa a un horno de bolas y a 110°C se codestilan el tolueno y el oxiclورو de fósforo. Entonces se deja atemperar, se cambia el matraz bajo atmósfera inerte y a 125°C y 10mm se destila el compuesto deseado **13** (0.28g, 92%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500MHz): δ 2.14 (s, 3H, CH_3 -carborano), 2.19-2.54 (m, 10H, BH).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125.77MHz): δ 24.81, 77.79, 77.92, 163.37.

$^{11}\text{B NMR}$ (CDCl_3 , 160.46MHz, desacoplado): δ -10.11, -9.13, -5.39, 0.10.

1-Metil-2-(N-(1-Etil-2-metilen-pirrolidina)-formamida)-1,2-dicarba-closo-dodecaborano **14**:



Bajo atmósfera inerte se disuelve el cloruro de ácido **13** (0.15g, 0.68mmol) en DCM anhidro (3mL) y se enfría a 0°C. A continuación se adiciona TEA (0.09mL, 0.68mmol) y una disolución de (S)-(-)-2-aminoetil-1-etilpirrolidina (0.09mL, 0.68mmol) en DCM anhidro (2mL). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y finalmente se evapora a sequedad. El residuo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de AcOEt/EtOH : 8/2, para obtener el compuesto deseado **14** (0.097g, 46%).

¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.14-1.17 (t, 3H, CH₃-CH₂(NEt)), 1.47-1.53 (m, 1H, CH₂-CHNEt), 1.76-1.80 (m, 2H, CH₂-CH₂NEt), 1.91-1.98 (m, 1H, CH₂-CHNEt), 2.09 (s, 3H, CH₃-carborano), 2.15-2.52 (m, 10H, BH), 2.25-2.36 (m, 2H, CH₂-CH₃(NEt), CH₂-NEt), 2.79-2.83 (m, 2H, CH-CH₂NHCO, CH₂-CH₃(NEt)), 3.23-3.31 (m, 2H, CH₂-NEt, CH₂-NHCO), 3.44-3.49 (m, 1H, CH₂-NHCO), 7.44 (s, 1H, NH).

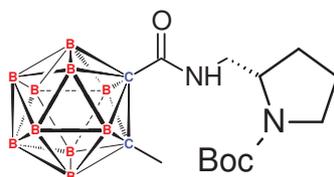
¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 13.73, 23.25, 24.47, 28.50, 41.83, 48.70, 53.75, 62.50, 75.74, 75.96, 158.77.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -11.15, -9.92, -5.53, -1.91.

HRMS (ESI): m/z calculada para C₁₁H₂₈B₁₀N₂OH: 313.328 [M+H]⁺; encontrada 313.327.

Parte Experimental

1-Metil-2-(N-(1-tertbutil-éster-2-metilen-pirrolidin)-formamida)-1,2-dicarba-closo-dodecaborano **15**:



15

Bajo atmósfera inerte se disuelve el cloruro de ácido **13** (0.27g, 1.22mmol) en DCM anhidro (4mL) y se enfría a 0°C. A continuación se adiciona TEA (0.17mL, 1.22mmol) y una disolución de la amina **1** (0.24g, 1.22mmol) en DCM anhidro (2mL). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas y se evapora a sequedad. El crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de Hexano/AcOEt : 8/2, para obtener el compuesto deseado **15** (0.22g, 47%).

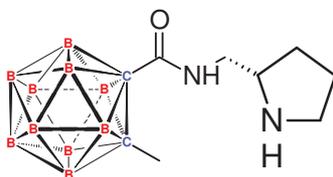
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.48 (s, 9H, Boc), 1.58-1.62 (m, 1H, CH₂-CHNBoc), 1.82-1.89 (m, 2H, CH₂-CH₂NBoc), 2.01-2.04 (m, 1H, CH₂-CHNBoc), 2.07 (s, 3H, CH₃-carborano), 2.11-2.54 (m, 10H, BH), 3.09-3.13 (m, 1H, CH₂-NHCO), 3.30-3.40 (m, 3H, CH₂-NHCO, CH₂-NBoc), 4.06 (s, 1H, CH-CH₂NHCO), 8.60 (s, 1H, NH-CO).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 24.23, 24.44, 28.68, 29.93, 47.50, 48.53, 55.72, 75.98, 76.21, 81.00, 157.29, 158.86.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -12.70, -11.17, -10.00, -6.71, -5.56, -2.02.

HRMS (ESI): *m/z* calculada para C₁₄H₃₂B₁₀N₂O₃Na: 407.332 [M+Na]⁺; encontrada 407.329.

1-Metil-2-(2-metilen-pirrolidin-formamida)-1,2-dicarba-closo-dodecaborano **16**:



16

Bajo atmósfera inerte se disuelve el compuesto **15** (0.22g, 0.58mmol) en DCM anhidro (8mL) y se enfría a 0°C. A continuación se adiciona TFA (0.9mL, 11.55mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Entonces la reacción se evapora a sequedad para obtener el compuesto deseado **16** (0.3g, rendimiento cuantitativo) como sal de trifluoroacetato.

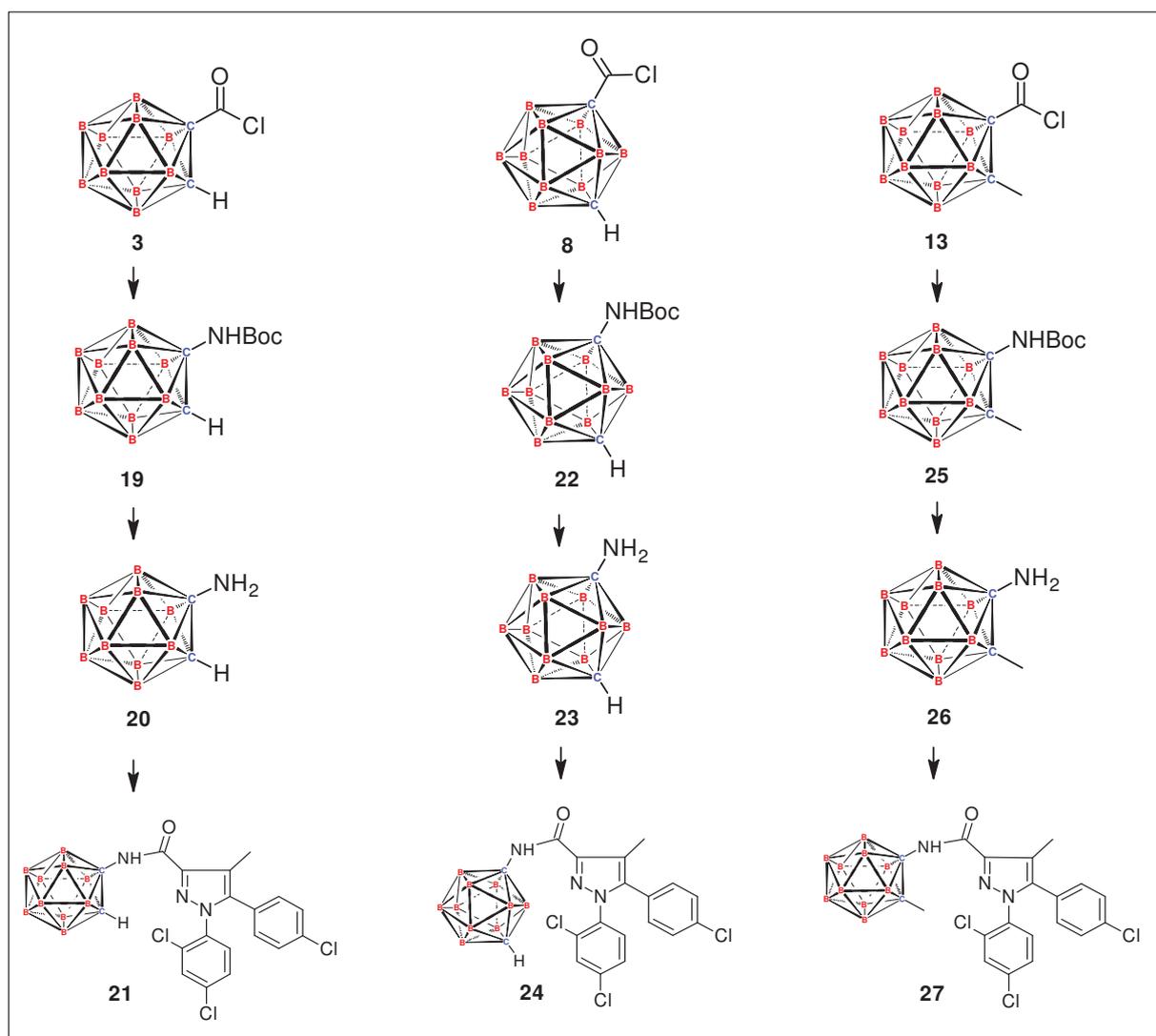
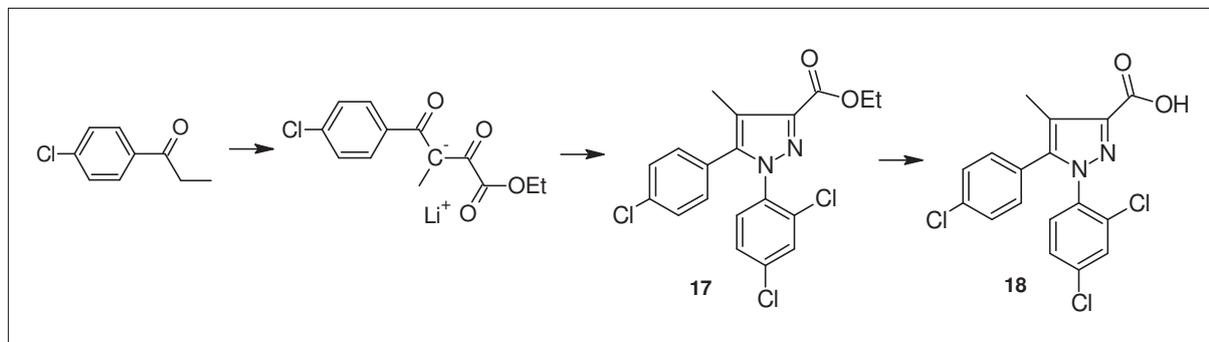
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.69-1.76 (m, 1H, CH₂-CHNH), 2.05-2.09 (m, 2H, CH₂-CH₂NH), 2.06 (s, 3H, CH₃-carborano), 2.14-2.47 (m, 10H, BH), 2.18-2.25 (m, 1H, CH₂-CHNH), 3.30-3.39 (m, 2H, CH₂-NH), 3.54-3.62 (m, 1H, CH₂-NHCO), 3.69-3.72 (m, 1H, CH₂-NHCO), 3.92 (s, 1H, CH-CH₂NHCO), 7.65 (s, 1H, NH-CO), 8.61 (s, 1H, NH(TFA)), 9.34 (s, 1H, NH(TFA)).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 24.37, 27.80, 27.96, 42.32, 46.33, 60.40, 74.51, 76.39, 114.45, 116.75, 160.99, 161.42, 161.73, 162.04.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -12.69, -11.30, -10.51, -9.76, -6.69, -5.45, -1.63.

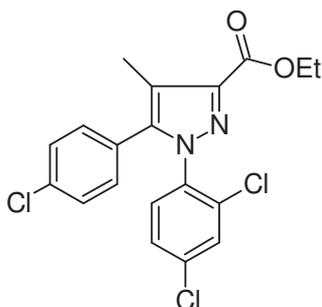
HRMS (ESI): *m/z* calculada para C₉H₂₄B₁₀N₂OH: 285.297 [M+H]⁺; encontrada 285.265.

3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE LIGANDOS DE RECEPTORES CB₁



Éster etílico de 1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-ácido carboxílico

17:



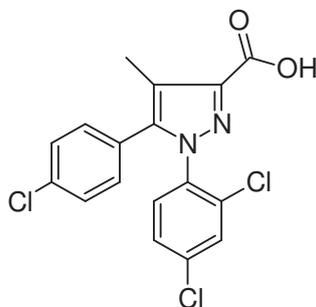
17

Sobre una disolución de LiHMDS (5.9mL, 5.9mmol) en Et₂O anhidro (30mL) a -78°C, bajo atmósfera inerte, se adiciona una segunda disolución de 4-cloropropiofenona (1g, 5.9mmol) en Et₂O anhidro (10mL). La mezcla se agita durante 45 minutos a -78°C y a continuación se adiciona dietil oxalato (0.9mL, 6.5mmol). La disolución final se agita a temperatura ambiente durante 14 horas. Finalmente se evapora a sequedad, obteniendo la sal intermedia (0.75g), que se disuelve en EtOH (20mL). Sobre esta disolución se adiciona, lentamente la hidracina (0.73g, 3.41mmol) y la mezcla final se agita a temperatura ambiente durante 20 horas. A continuación el sólido obtenido se centrifuga, se lava con EtOH y se seca a vacío. Posteriormente se suspende en HAc (10mL) y se calienta a reflujo durante 24 horas. La disolución se deja atemperar, se vierte sobre agua fría (40mL) y se extrae con AcOEt (3x40mL). La combinación de los extractos orgánicos se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de Hexano/AcOEt : 9/1, para obtener el compuesto deseado **17** (0.31g, 20% dos pasos).

¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.41 (t, J = 10 Hz, 3H, CH₃-CH₂OCO), 2.31 (s, 3H, CH₃-pirazol), 4.43 (q, J = 10 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 7.04-7.36 (m, 7H, Aromaticos).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 9.90, 14.68, 61.22, 119.39, 127.30, 128.00, 129.13, 131.12, 133.29, 135.25, 136.28, 143.12, 143.22, 163.0.

1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-ácido carboxílico **18**:



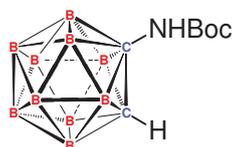
18

Se disuelve el compuesto **17** (0.31g, 0.76mmol) en THF (9mL), se enfría a 0°C y se adiciona, lentamente, una disolución de LiOH (0.04g, 1.5mmol) en H₂O (2mL). La mezcla final se agita a temperatura ambiente durante 14 horas. Entonces se vierte sobre H₂O (20mL), se acidifica con HCl 1M y se extrae con AcOEt (3x20mL). La combinación de los extractos orgánicos se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y concentra, obteniéndose el compuesto deseado **18** (0.28g, 98%).

¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 2.33 (s, 3H, CH₃), 7.05 (d, J = 5 Hz, 2H, Aromáticos), 7.28-7.31 (m, 4H, Aromáticos), 7.40 (s, 1H, Aromático).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 9.78, 119.83, 126.98, 128.09, 129.21, 130.47, 131.08, 135.46, 136.50, 142.28, 143.65, 165.53.

1-[[*tert*-butioxi]carbonil)amino]-1,2-dicarba-closo-dodecaborano **19**:



19

Bajo atmósfera inerte se disuelve el cloruro de ácido **3** (0.14g, 0.68mmol) en Tolueno anhidro (2mL) y se adiciona TMSN₃ (0.14mL, 1.08mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 2 horas y posteriormente se deja atemperar. Se adiciona ^tBuOH (1mL) y la mezcla se vuelve a calentar a reflujo durante 1 hora. A continuación se deja atemperar y se evapora a sequedad. El residuo obtenido se redissuelve en AcOEt (20mL) y se lava con H₂O (3x15mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de Hexano/AcOEt : 10/1 para obtener el compuesto deseado **19** (0.06g, 34%).

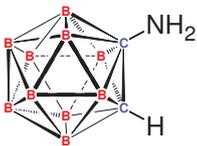
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.42 (m, 9H, C(CH₃)₃), 2.02-2.71 (m, 10H, BH), 4.60 (s, 1H, CH-carborano).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 28.37, 61.35, 79.97, 83.28, 151.84.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -13.99, -11.82, -11.02, -7.72, -3.78.

Parte Experimental

1-amino-1,2-dicarba-closo-dodecaborano **20**:



20

Se disuelve el compuesto **19** (0.1g, 0.39mmol) en DCM (5mL), se enfría a 0°C y se adiciona TFA (0.6mL, 7.7mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 14 horas y a continuación se evapora a sequedad, obteniendo el compuesto deseado **20** (0.06g, 93%).

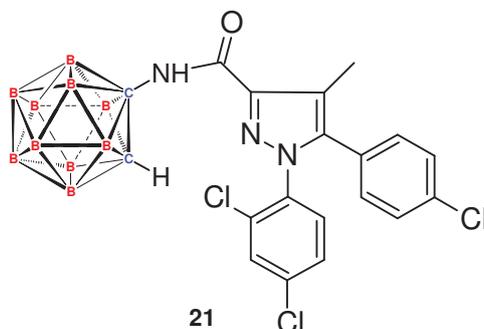
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.92-2.41 (m, 10H, BH), 2.94 (s, 2H, NH₂), 3.77 (s, 1H, CH-carborano).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -13.62, -12.51, -11.18, -10.27, -2.16.

Parte Experimental

1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-4-metil-N-(1,2-dicarba-closo-dodecaboranil)-1H-pirazol-3-carboxamida **21**:



Bajo atmósfera inerte se disuelve el ácido carboxílico **18** (0.13g, 0.35mmol) en Tolueno anhidro (9mL) y se adiciona SOCl_2 (1mL). La mezcla se calienta a reflujo durante 3 horas. A continuación se deja atemperar y se evapora a sequedad.

Por otro lado, en un vial de microondas, bajo atmósfera inerte, se disuelve la amina **20** (0.06g, 0.35mmol) en Tolueno anhidro (1mL). Sobre esta disolución, se adiciona la disolución del cloruro de ácido recién sintetizado en Tolueno anhidro (1mL). La mezcla final se calienta en el microondas a 150°C durante 50 minutos. Finalmente se evapora a sequedad y el crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de Hexano/AcOEt : 6/1, para obtener el compuesto final **21** (0.08g, 43%).

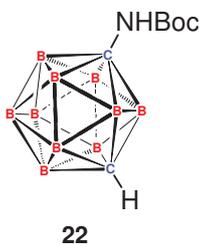
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500MHz): δ 2.12-2.70 (m, 10H, BH), 2.26 (s, 3H, CH₃), 5.01 (s, 1H, CH-carborano), 6.97-7.02 (d, $J = 10$ Hz, 2H, Aromáticos), 7.21-7.38 (m, 5H, Aromáticos), 7.83 (s, 1H, CONH).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125.77MHz): δ 9.47, 60.59, 78.91, 118.85, 126.67, 128.21, 129.25, 129.31, 130.97, 135.58, 136.69, 142.81, 144.14, 160.63.

$^{11}\text{B NMR}$ (CDCl_3 , 160.46MHz, desacoplado): δ -13.79, -10.88, -7.08, -3.90.

HRMS (ESI): m/z calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{B}_{10}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{ONa}$: 545.1722 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺; encontrada 545.1721.

1-(((tert-butoxi)carbonil)amino)-1,7-dicarba-closo-dodecaborano **22**:



Bajo atmósfera inerte se disuelve el cloruro de ácido **8** (0.31g, 1.70mmol) en Tolueno anhidro (6mL), se adiciona TMSN₃ (0.33mL, 2.44mmol) y se calienta la mezcla a reflujo durante 3 horas. A continuación se deja atemperar, se adiciona ^tBuOH (4mL) y se calienta de nuevo a reflujo durante 14 horas. Finalmente se deja atemperar, se evapora a sequedad y el crudo se redisuelve en AcOEt (40mL). Se lava con H₂O (3x20mL) y la fase orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y concentra. El crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de Hexano/AcOEt : 4/1, para obtener el compuesto final **22** (0.03g, 11%).

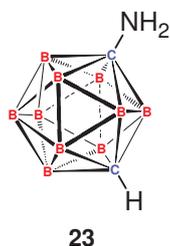
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.00-2.51 (m, 9H, BH), 2.88 (s, 1H, CH-carborano), 3.11 (s, 1H, BH).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 28.35, 53.09, 68.38, 81.93, 152.10.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -15.47, -15.12, -12.45, -10.71, -3.83.

Parte Experimental

1-amino-1,7-dicarba-closo-dodecaborano **23**:



Se disuelve el compuesto **22** (0.03g, 0.11mmol) en DCM (2mL), se enfría a 0°C y se adiciona, lentamente TFA (0.17mL, 2.24mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 14 horas. A continuación se concentra a sequedad, obteniendo el compuesto deseado **23** (0.023g, rendimiento cuantitativo).

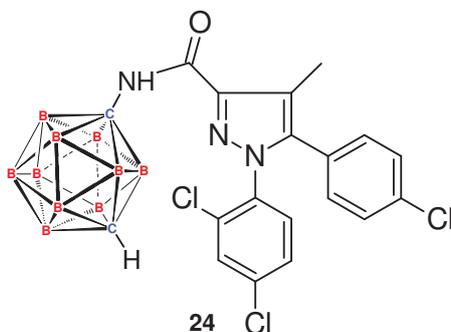
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 2.01-2.56 (m, 9H, BH); 2.89 (s, 1H, BH), 2.92 (s, 1H, CH-carborano).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 53.68, 68.83.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -15.11, -14.64, -13.66, -11.62, -10.42, -3.54.

Parte Experimental

1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-4-metil-N-(1,7-dicarba-closo-dodecaboranil)-1H-pirazol-3-carboxamida **24**:



Bajo atmósfera inerte se disuelve el ácido carboxílico **18** (0.06g, 0.15mmol) en Tolueno anhidro (5mL) y se adiciona SOCl_2 (1mL). La mezcla se calienta a reflujo durante 3 horas. A continuación se deja atemperar y se evapora a sequedad.

Por otro lado, en un vial de microondas, bajo atmósfera inerte, se disuelve la amina **23** (0.02g, 0.13mmol) en Tolueno anhidro (1mL). Sobre esta disolución, se adiciona la disolución del cloruro de ácido recién sintetizado en Tolueno anhidro (1mL). La mezcla final se calienta en el microondas a 150°C durante 50 minutos. Finalmente se evapora a sequedad y el crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de Hexano/AcOEt : 10/1, para obtener el compuesto final **24** (0.02g, 32%).

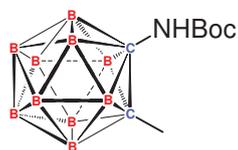
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500MHz): δ 2.02-2.62 (m, 10H, BH), 2.32 (s, 3H, CH_3), 2.94 (s, 1H, CH-carborano), 7.00-8.13 (m, 7H, Aromáticos).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125.77MHz): δ 9.58, 53.35, 80.00, 118.64, 119.75, 127.01, 127.41, 128.14, 129.18, 130.56, 131.01, 131.11, 143.51, 143.77, 149.57, 160.20, 189.50.

$^{11}\text{B NMR}$ (CDCl_3 , 160.46MHz, desacoplado): δ -15.04, -12.40, -10.67, -3.79.

HRMS (ESI): m/z calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{B}_{10}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}$: 521.1746 $[\text{M-H}]^-$; encontrada 521.1744.

1-metil-2-[(*tert*-butioxi)carbonil)amino]-1,2-dicarba-closo-dodecaborano **25**:



25

Bajo atmósfera inerte se disuelve el cloruro de ácido **13** (0.21g, 0.95mmol) en Tolueno anhidro (3mL), se adiciona TMSN₃ (0.2mL, 1.52mmol) y se calienta a reflujo durante 2 horas. A continuación se deja atemperar, se adiciona ^tBuOH (2mL) y se vuelve a calentar a reflujo la mezcla durante 3 horas. Finalmente se deja atemperar, se evapora a sequedad y el crudo se redisuelve en AcOEt (40mL). Se lava con H₂O (3x15mL) y la fase orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de Hexano/AcOEt : 4/1, para obtener el compuesto deseado **25** (0.093g, 36%).

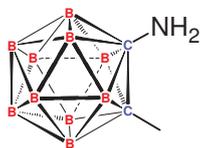
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.96 (s, 3H, CH₃), 2.02-2.47 (m, 10H, BH).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 22.31, 28.25, 79.10, 83.34, 84.23, 151.69.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -11.95, -11.01, -10.29, -6.04.

Parte Experimental

1-metil-2-amino-1,2-dicarba-closo-dodecaborano **26**:



26

Se disuelve el compuesto **25** (0.09g, 0.33mmol) en DCM (4mL) y se enfría a 0°C. A continuación se adiciona TFA (0.5mL, 6.59mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 14 horas. Finalmente se evapora a sequedad para obtener el compuesto deseado **26** (0.05g, 90%).

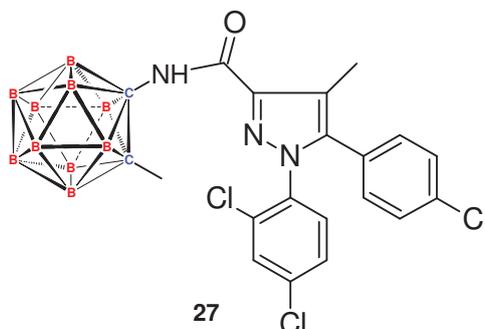
¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 1.56-2.39 (m, 10H, BH), 2.02 (s, 3H, CH₃), 2.97 (s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77MHz): δ 21.44, 79.15, 91.35.

¹¹B NMR (CDCl₃, 160.46MHz, desacoplado): δ -12.35, -10.51, -9.63, -5.32.

Parte Experimental

1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-4-metil-N-(1-metil-1,2-dicarba-closo-dodecaboranil)-1H-pirazol-3-carboxamida **27**:



Bajo atmósfera inerte se disuelve el ácido carboxílico **18** (0.07g, 0.17mmol) en Tolueno anhidro (4mL) y se adiciona SOCl_2 (1mL). La mezcla se calienta a reflujo durante 3 horas. A continuación se deja atemperar y se evapora a sequedad.

Por otro lado, en un vial de microondas, bajo atmósfera inerte, se disuelve la amina **26** (0.03g, 0.17mmol) en Tolueno anhidro (1mL). Sobre esta disolución, se adiciona la disolución del cloruro de ácido recién sintetizado en Tolueno anhidro (1mL). La mezcla final se calienta en el microondas a 150°C durante 50 minutos. Finalmente se evapora a sequedad y el crudo resultante se purifica en columna cromatográfica manual, eluyendo con una mezcla de Hexano/AcOEt : 4/1, para obtener el compuesto final **27** (0.009g, 10%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500MHz): δ 2.02-2.59 (m, 10H, BH), 2.00 (s, 3H, CH_3 -C(carborano)), 2.33 (s, 3H, CH_3), 7.02-7.43 (m, 7H, Aromáticos), 8.02 (s, 1H, CONH).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125.77MHz): δ 9.56, 22.55, 79.01, 82.48, 119.10, 126.74, 128.20, 129.29, 130.61, 131.01, 135.63, 136.68, 143.04, 144.21, 160.47.

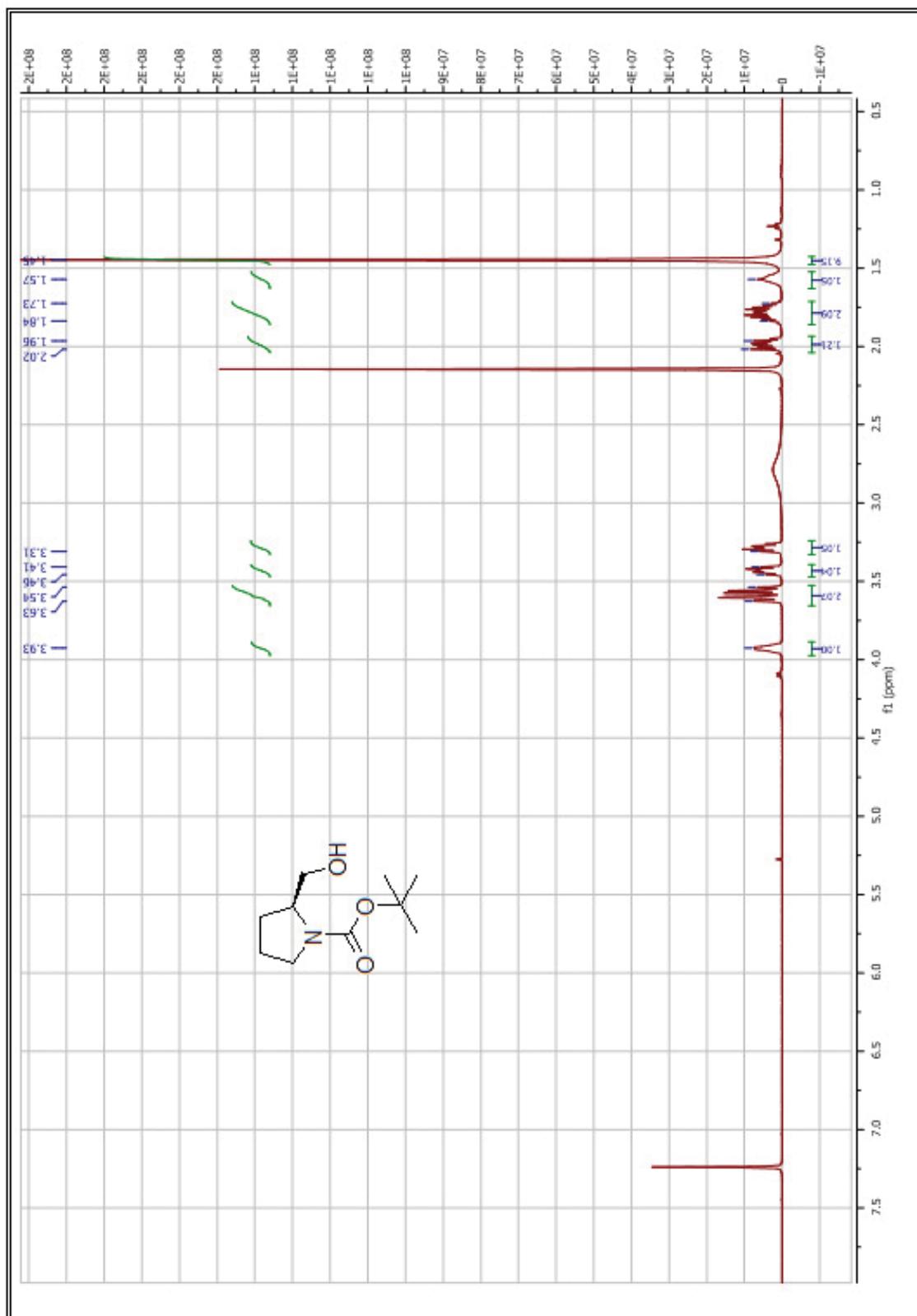
$^{11}\text{B NMR}$ (CDCl_3 , 160.46MHz, desacoplado): δ -11.75, -10.16, -6.12.

HRMS (ESI): m/z calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{B}_{10}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{ONa}$: 559.1879 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; encontrada 559.1916.

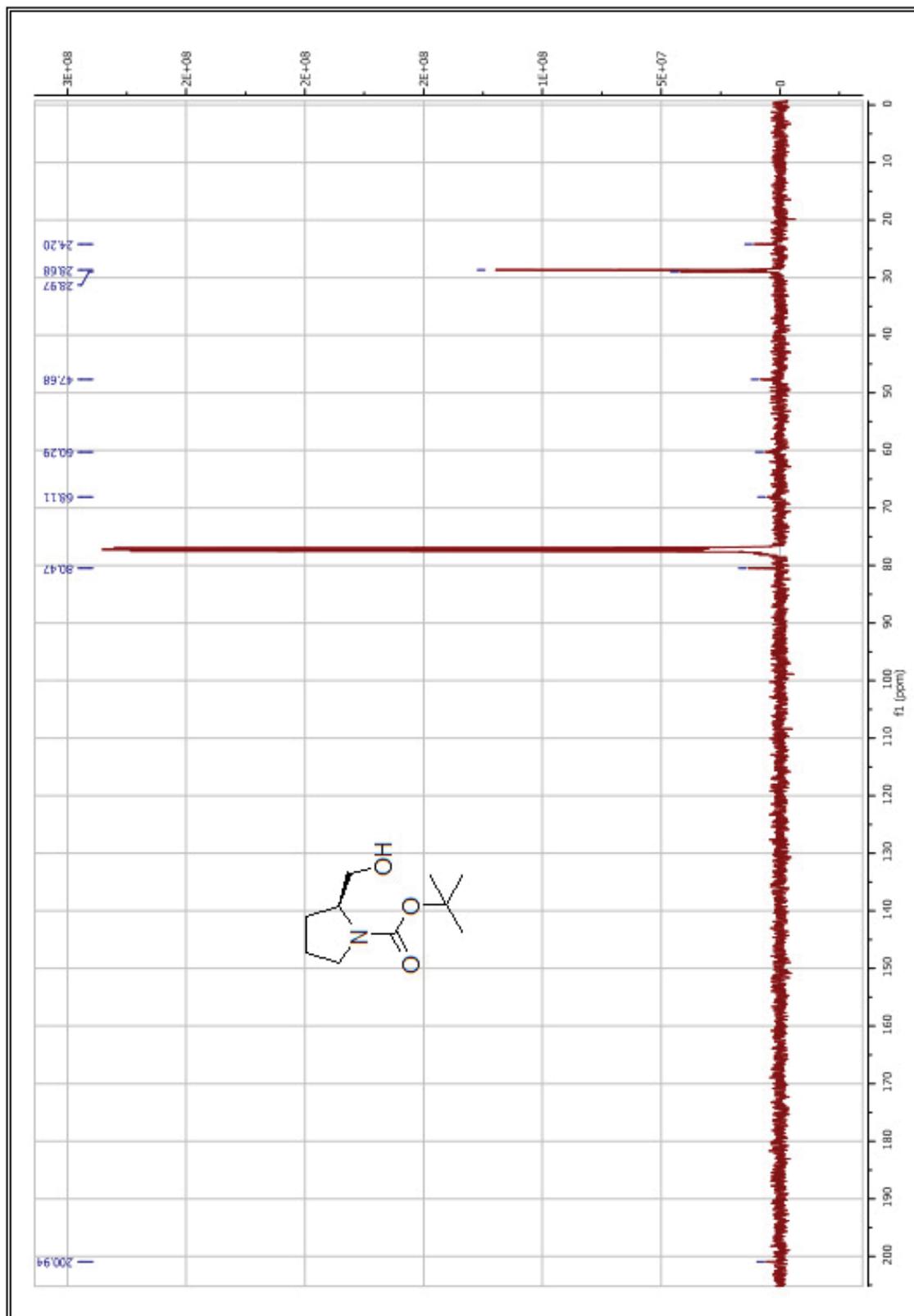
ANEXO I

SELECCIÓN DE ESPECTROS DE RMN

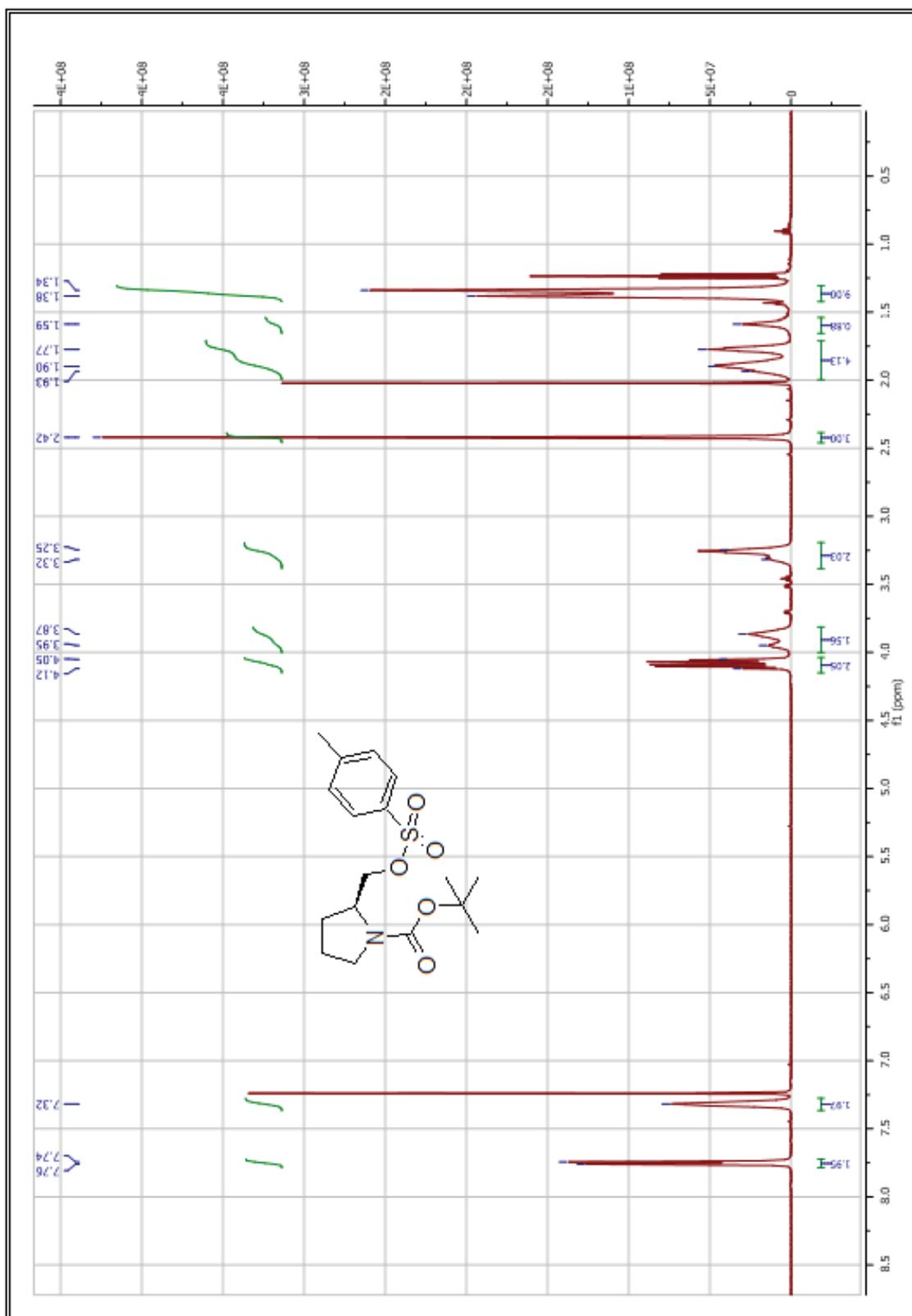
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



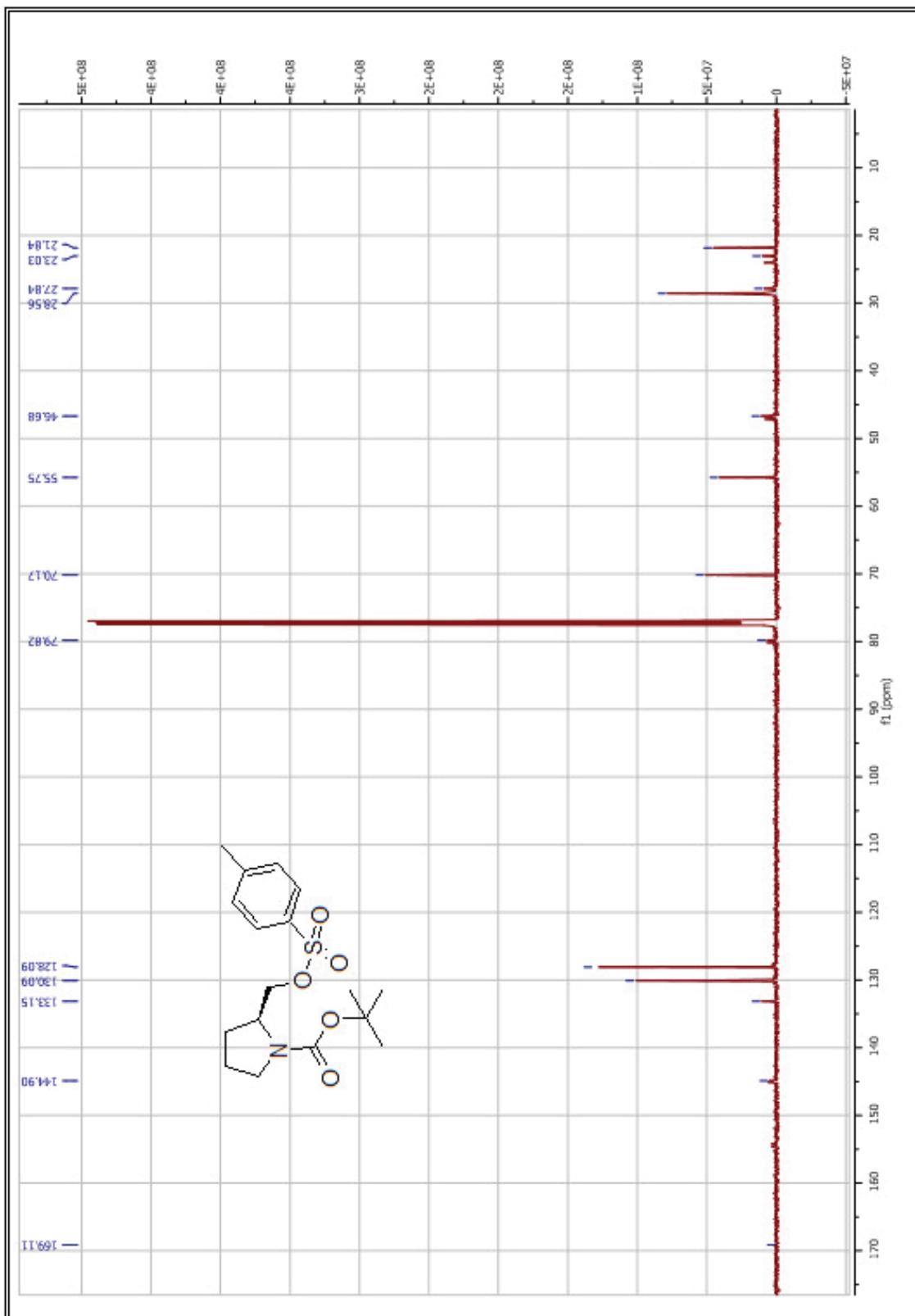
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



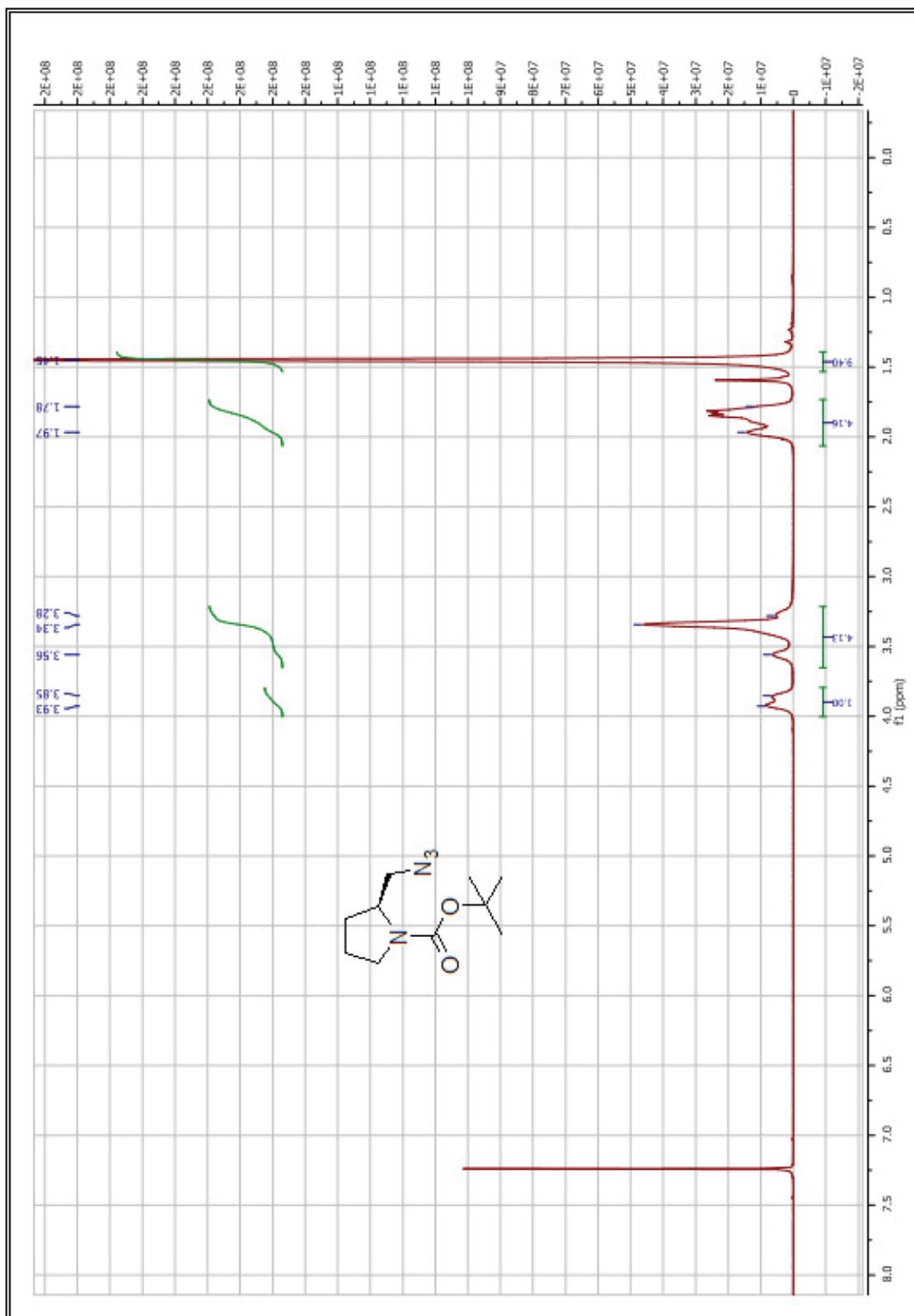
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



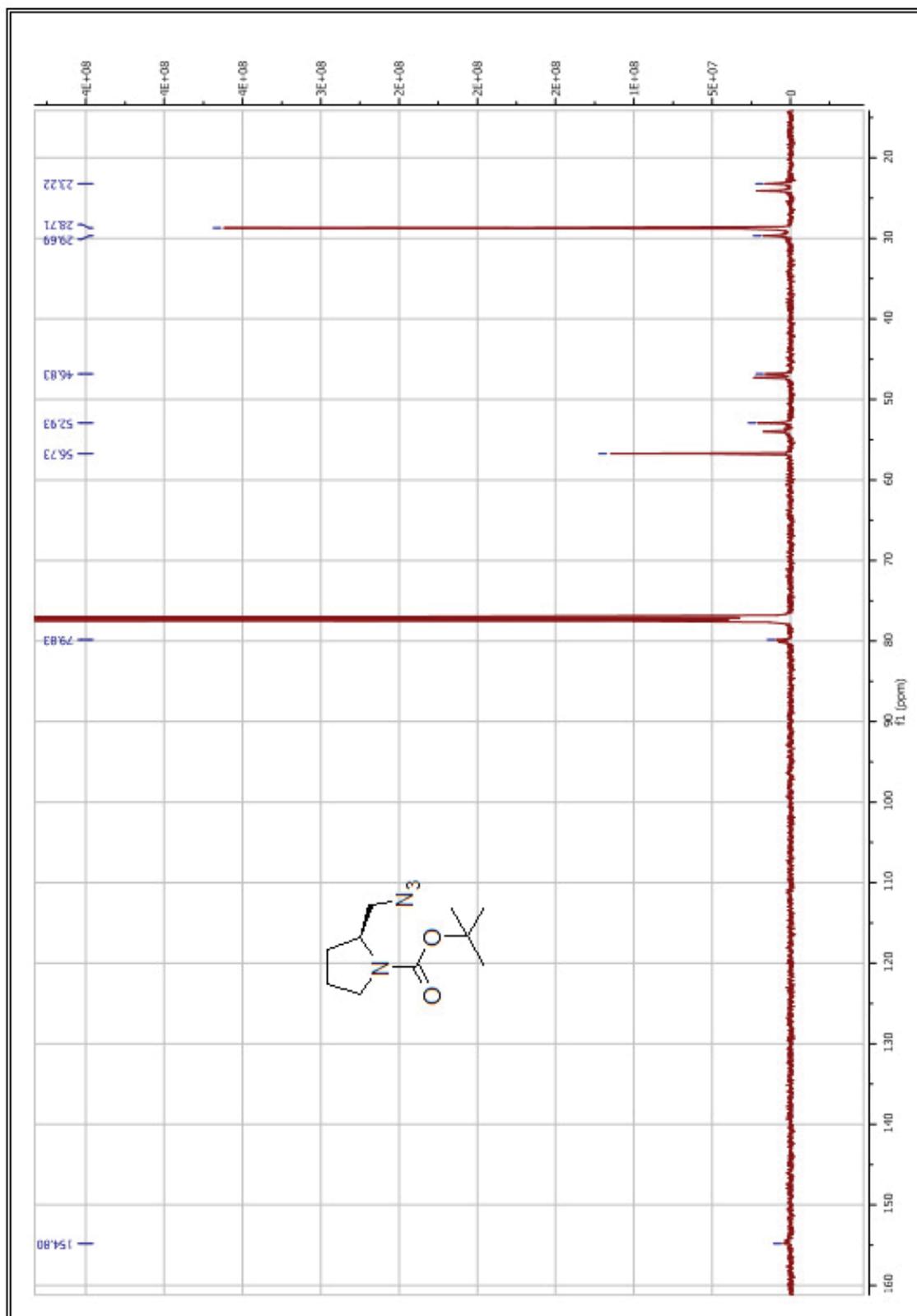
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



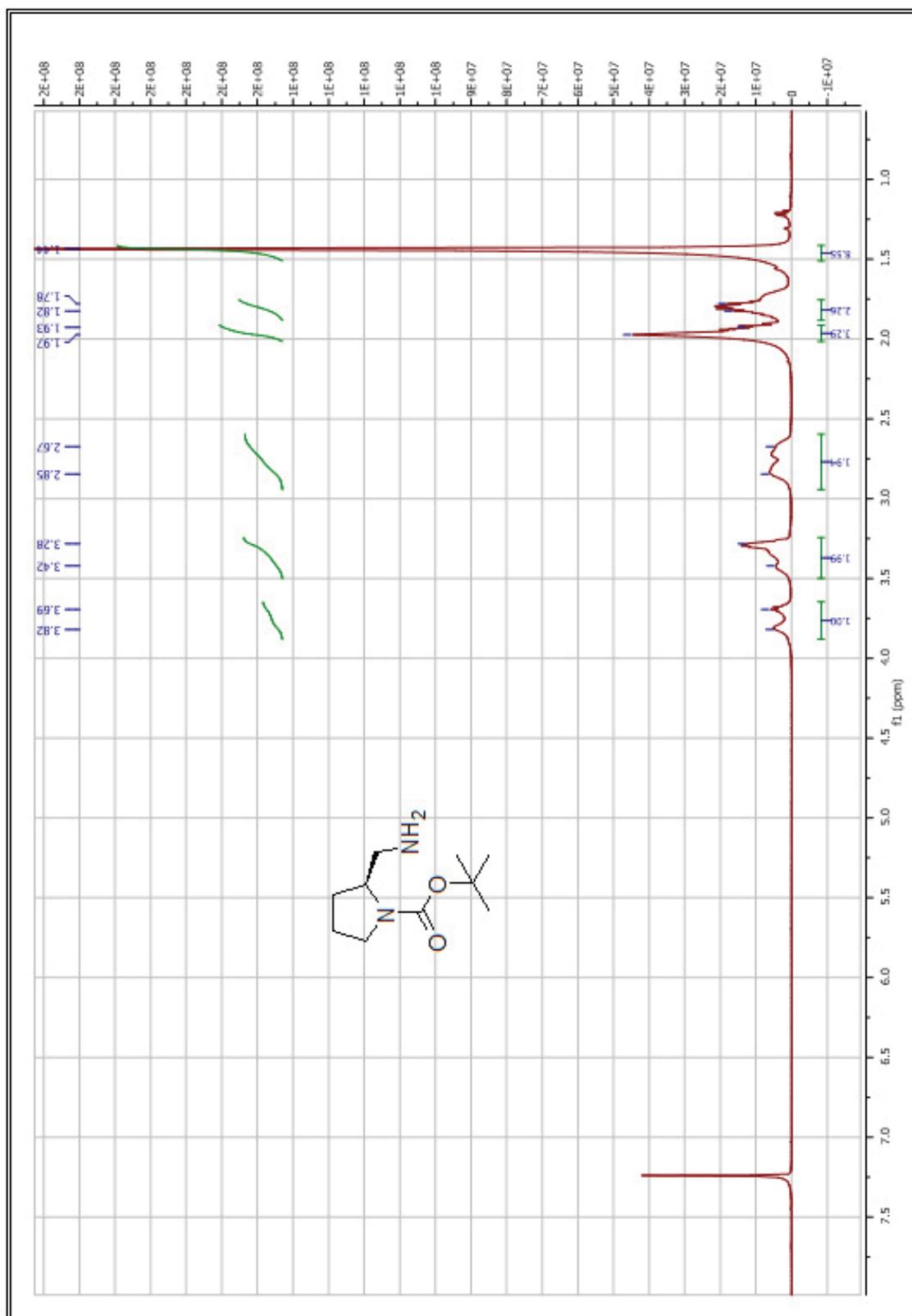
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



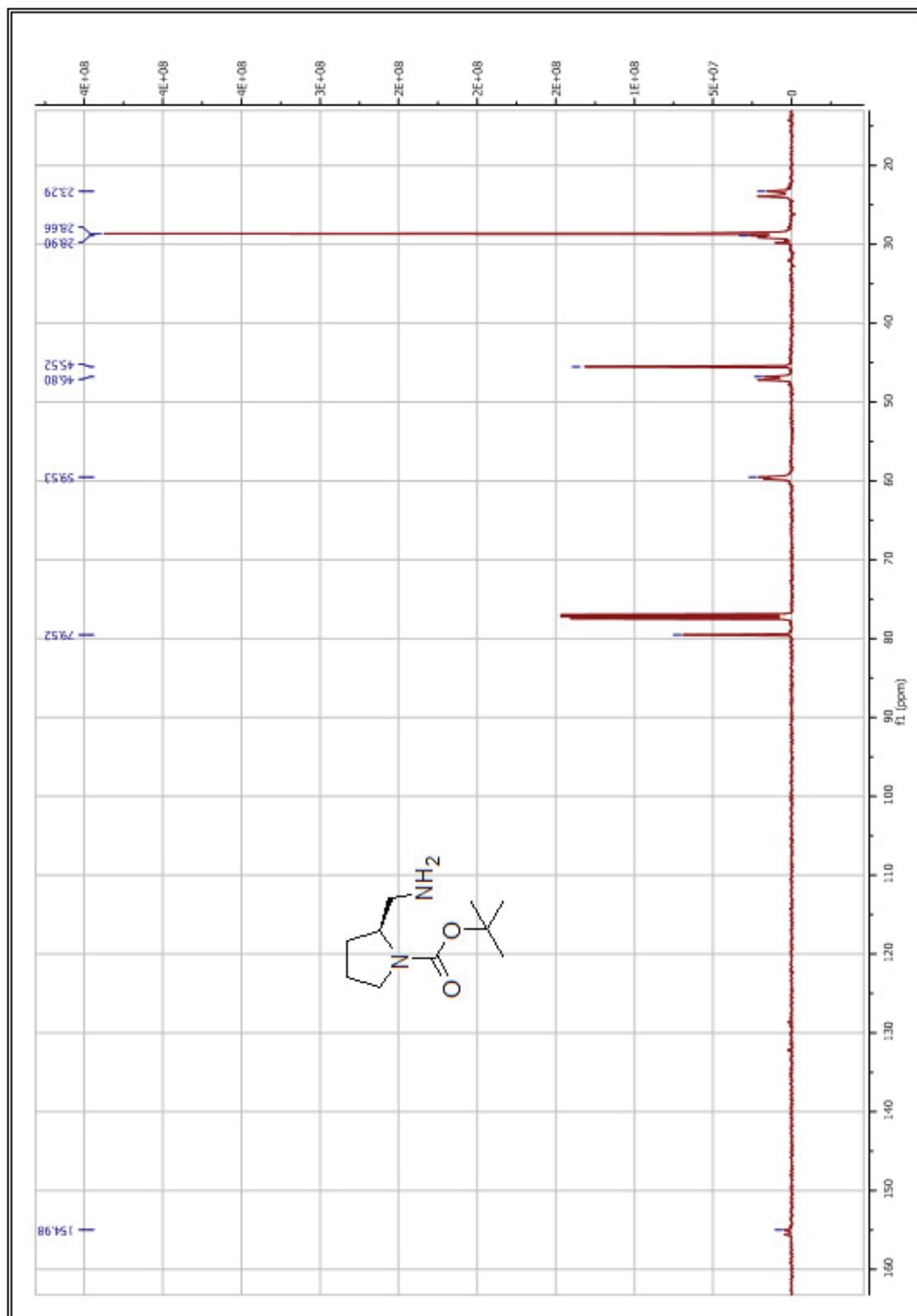
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



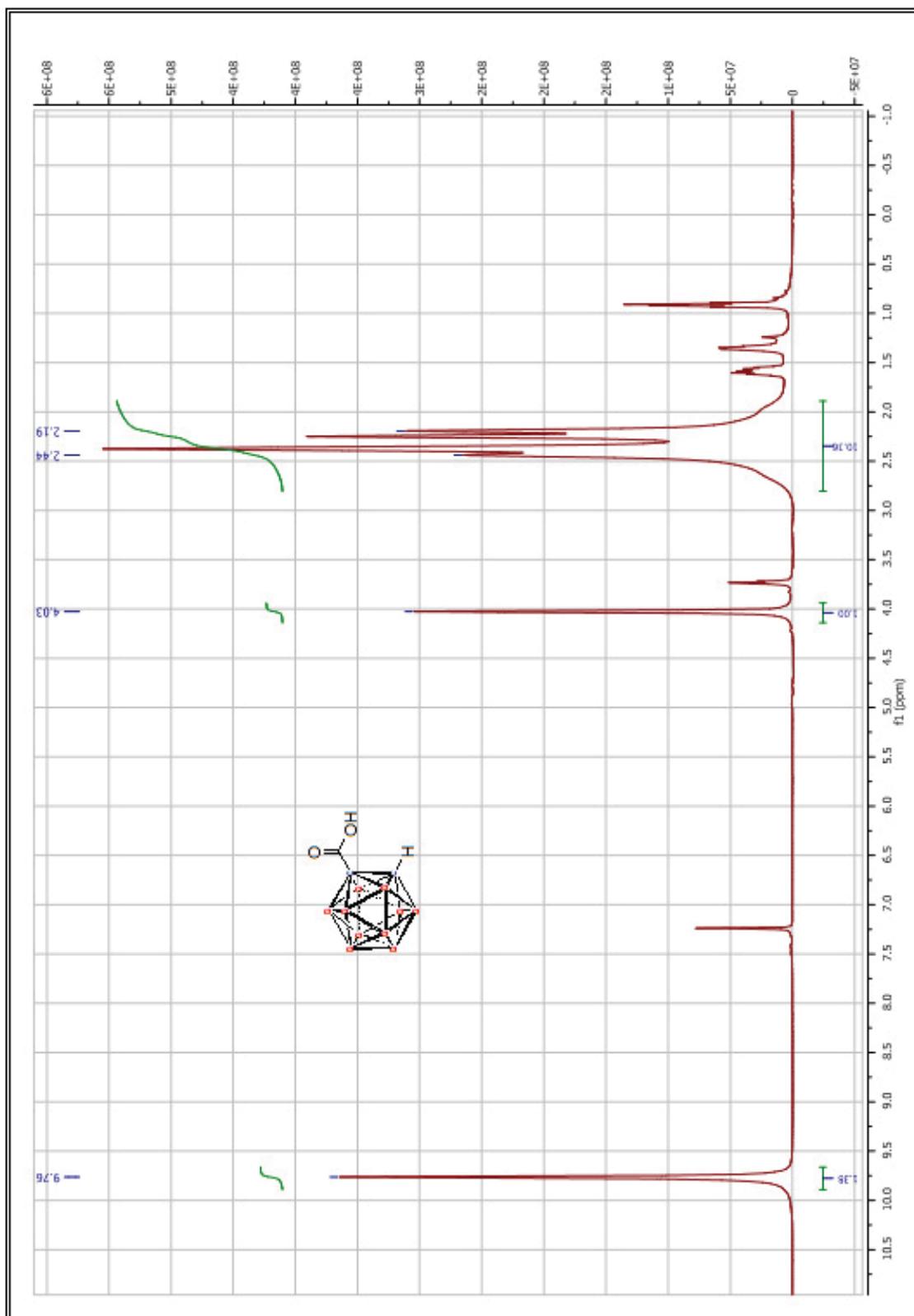
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



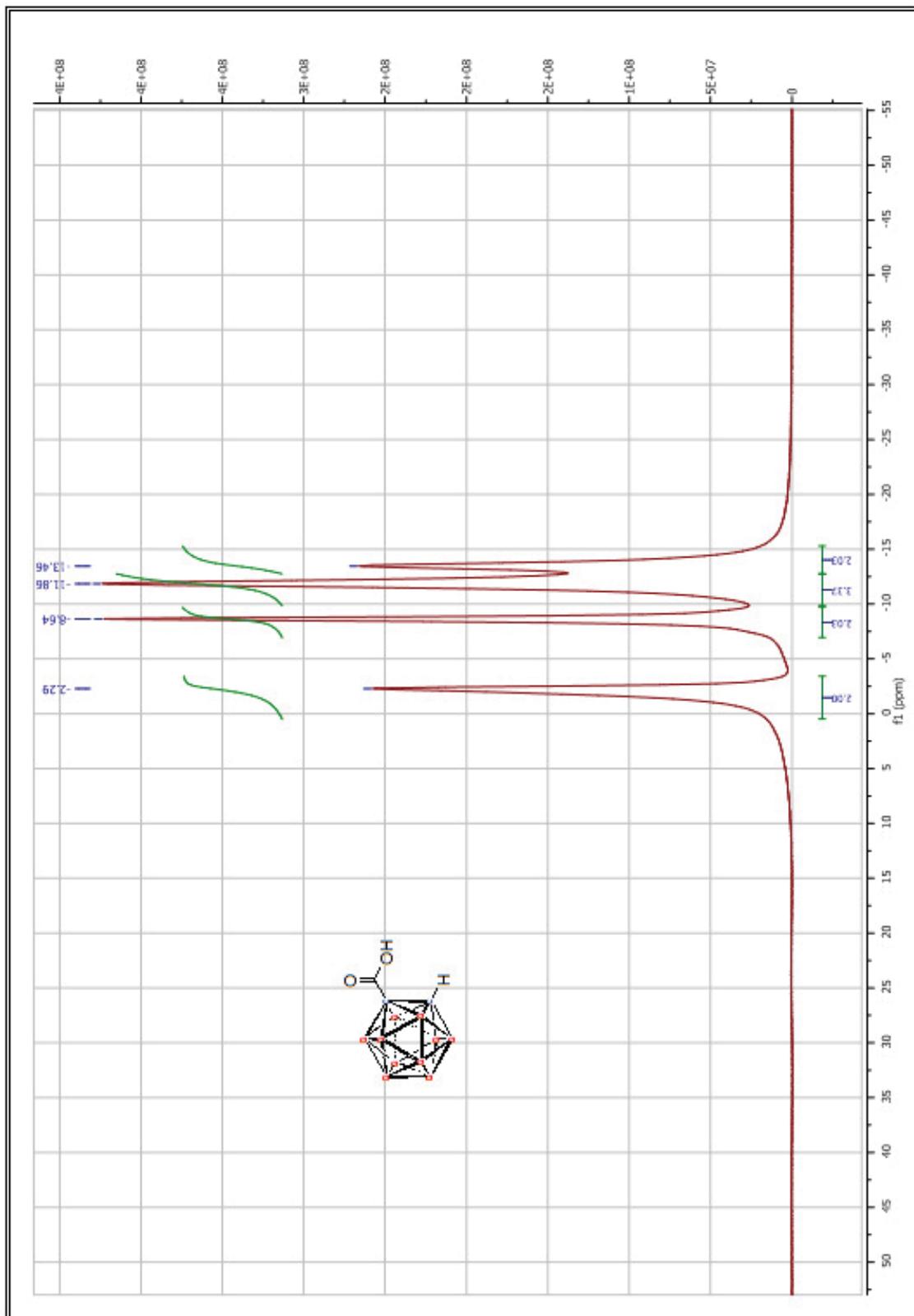
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



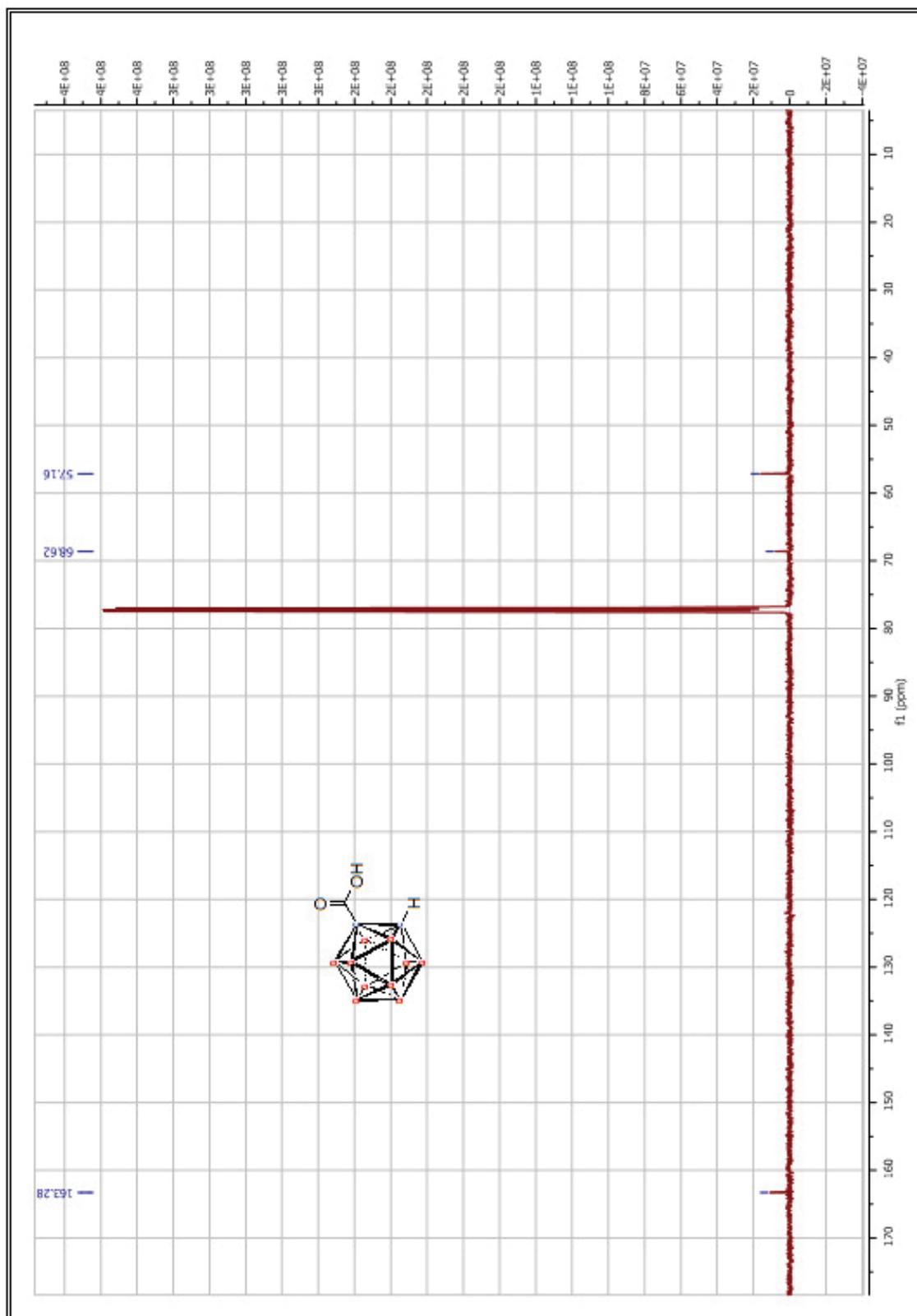
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



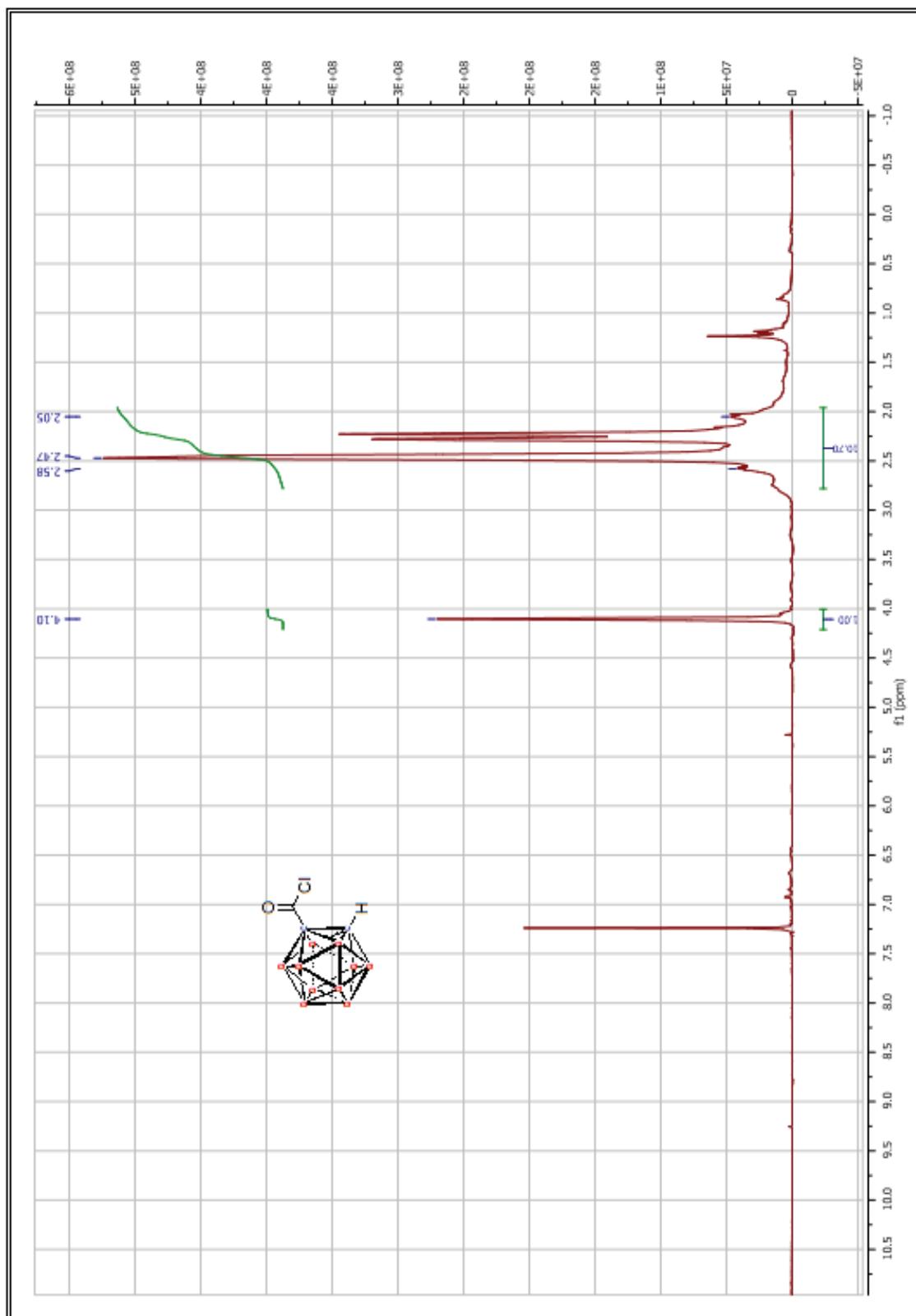
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



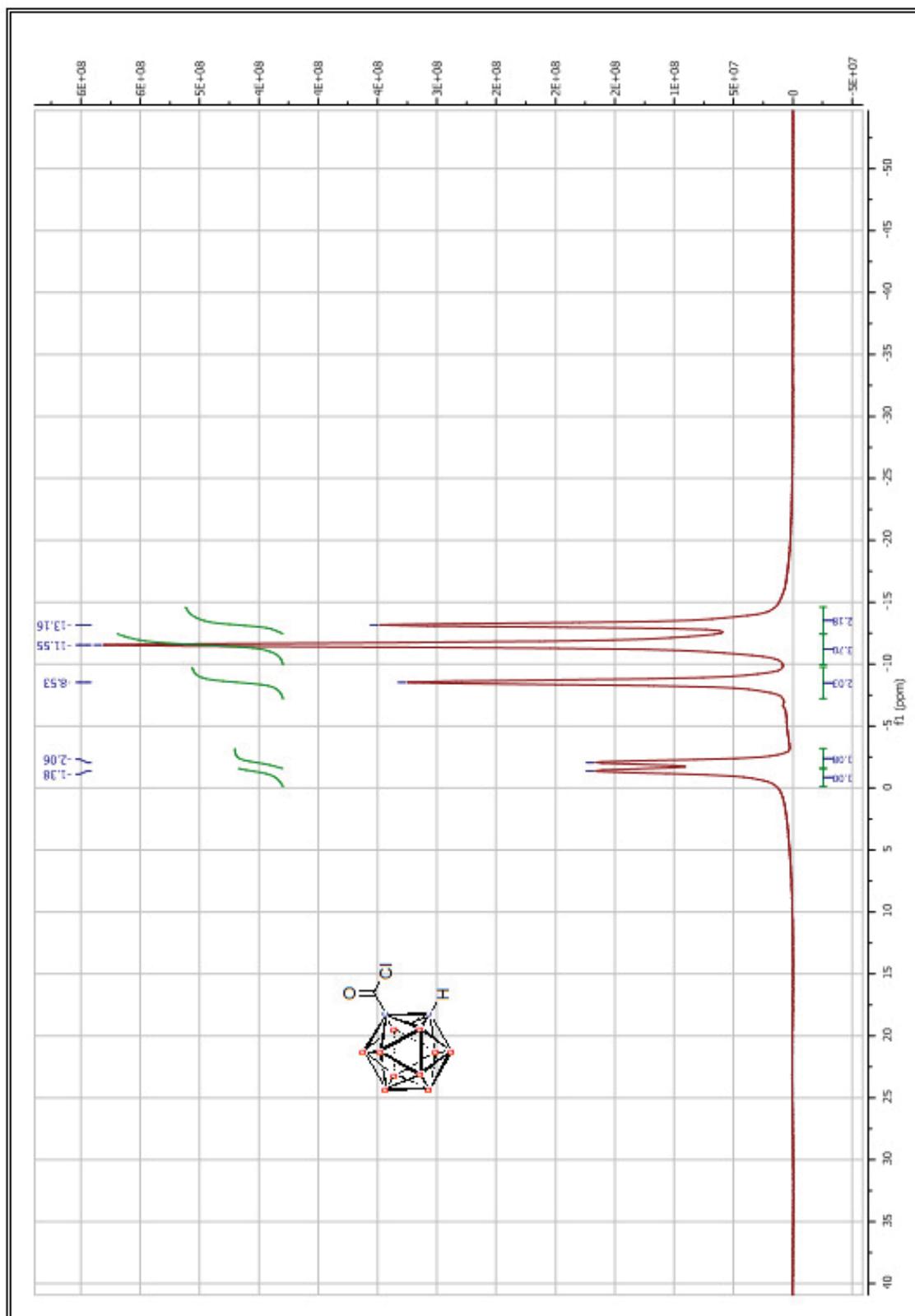
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



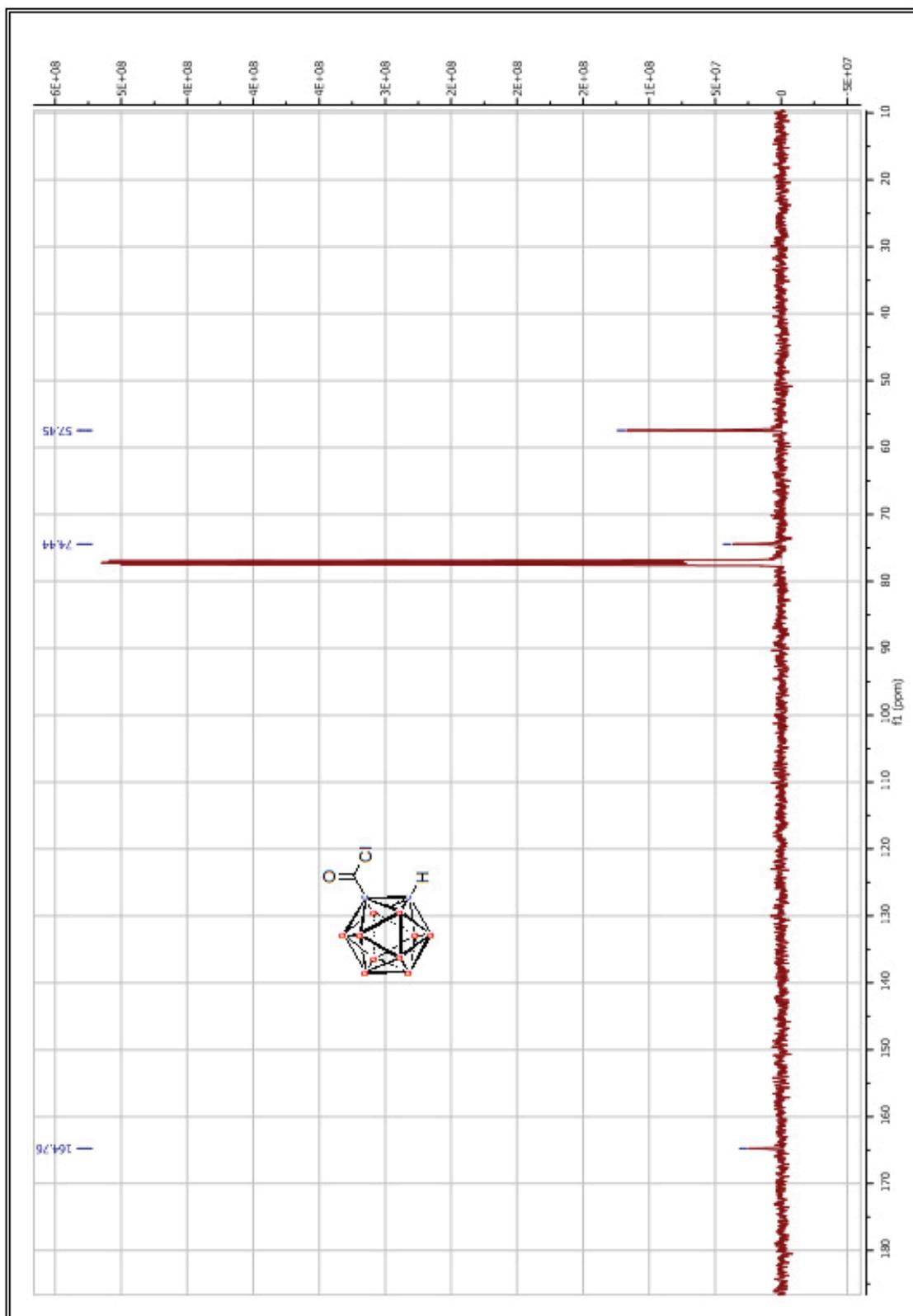
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



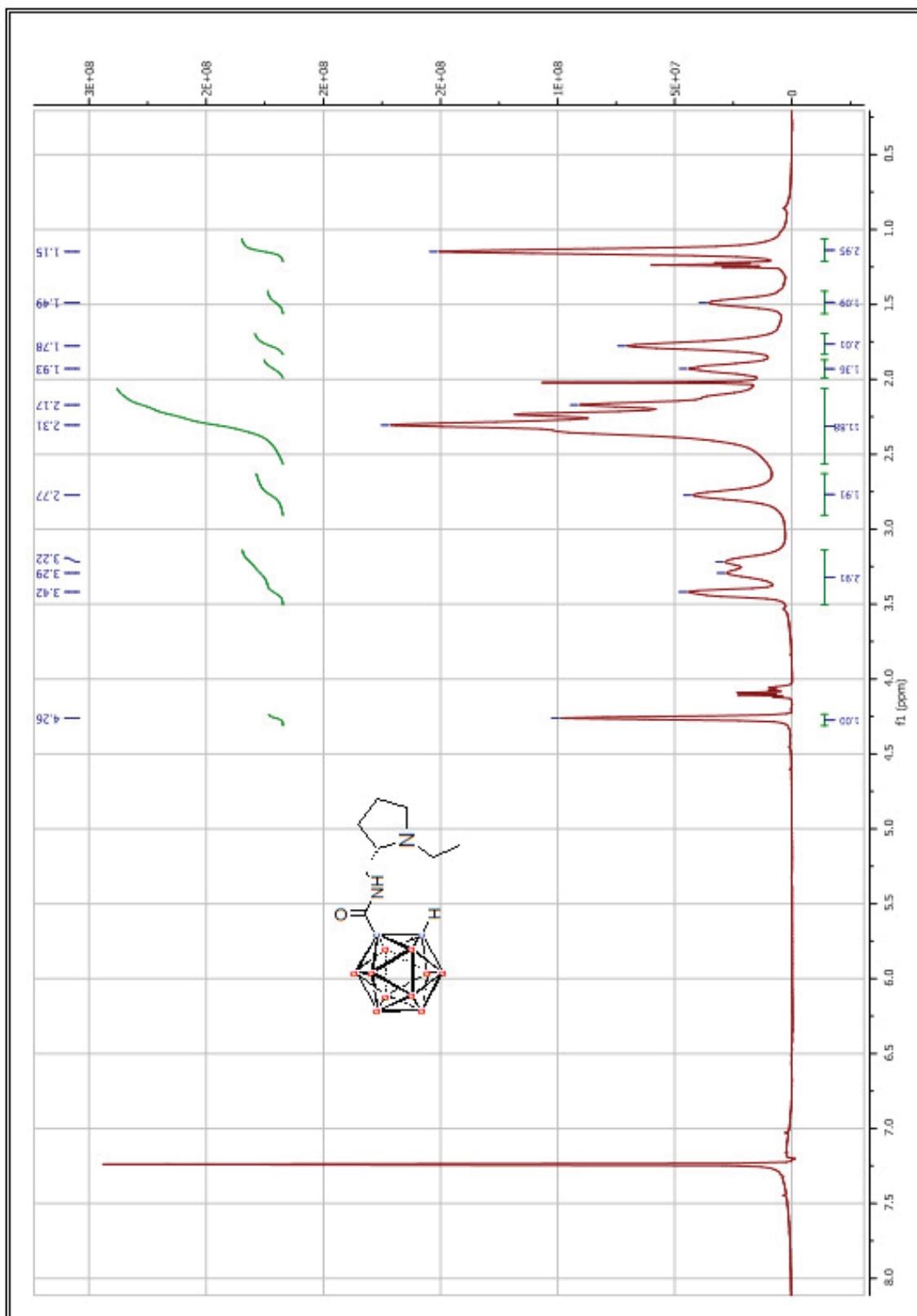
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



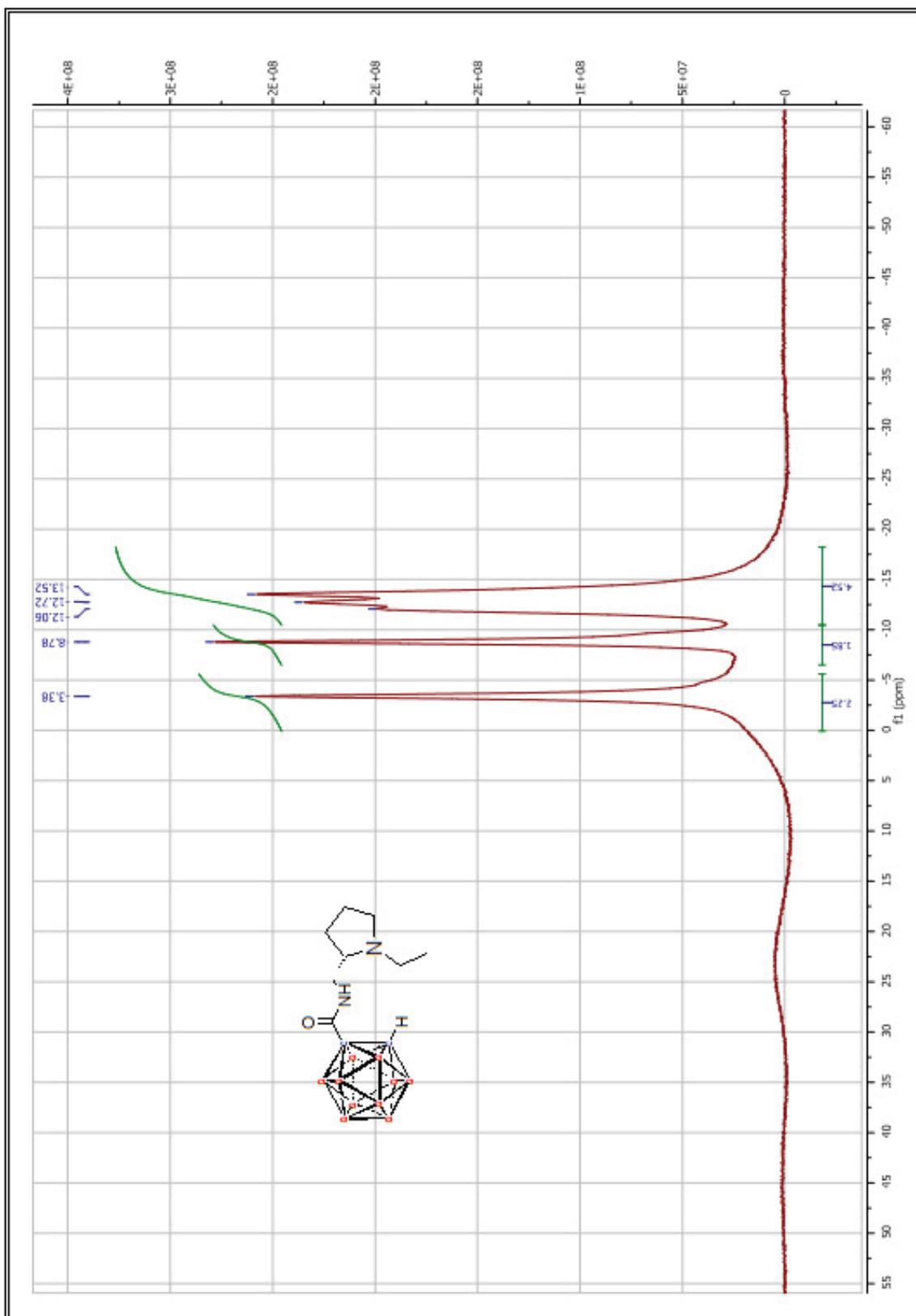
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



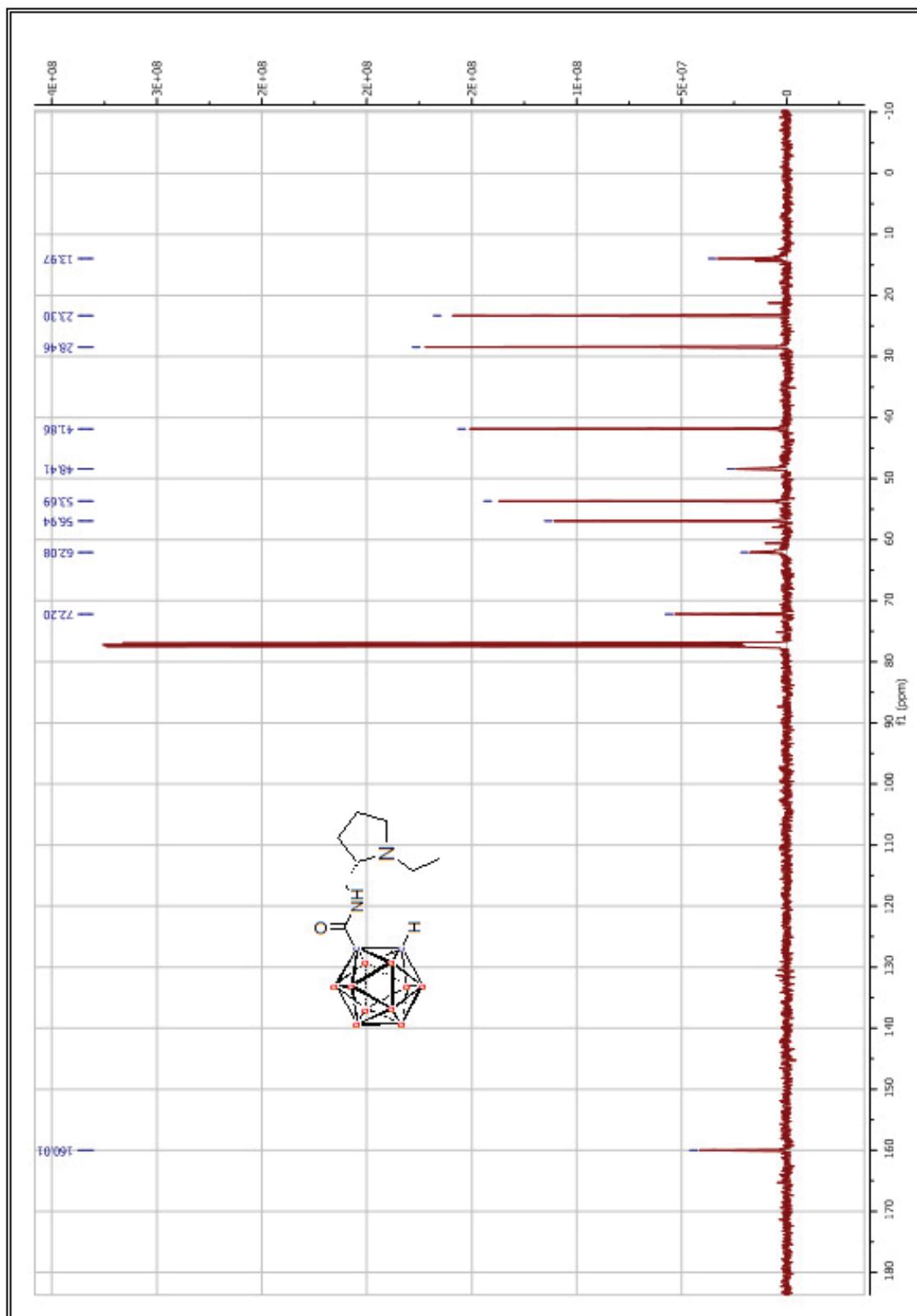
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



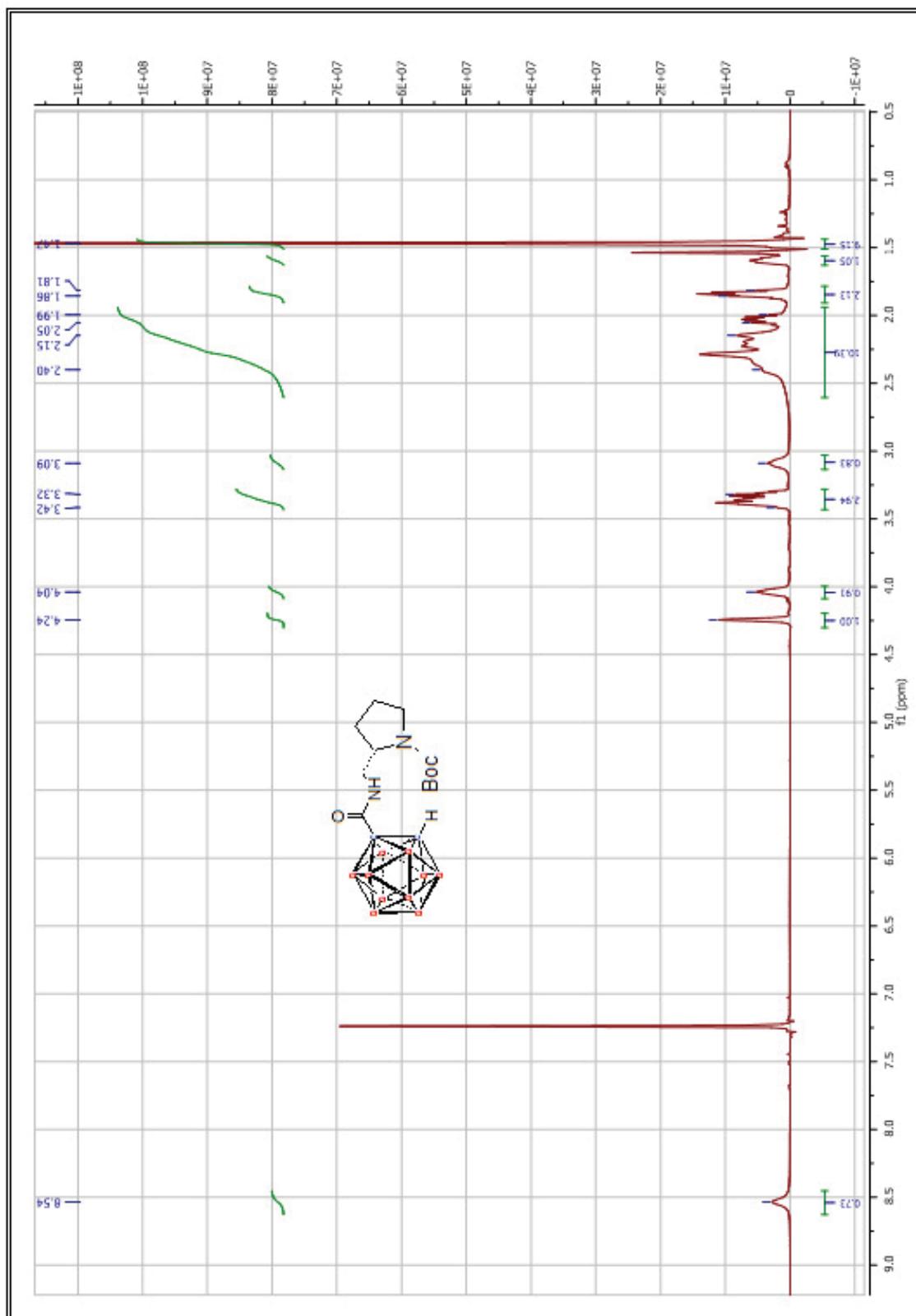
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



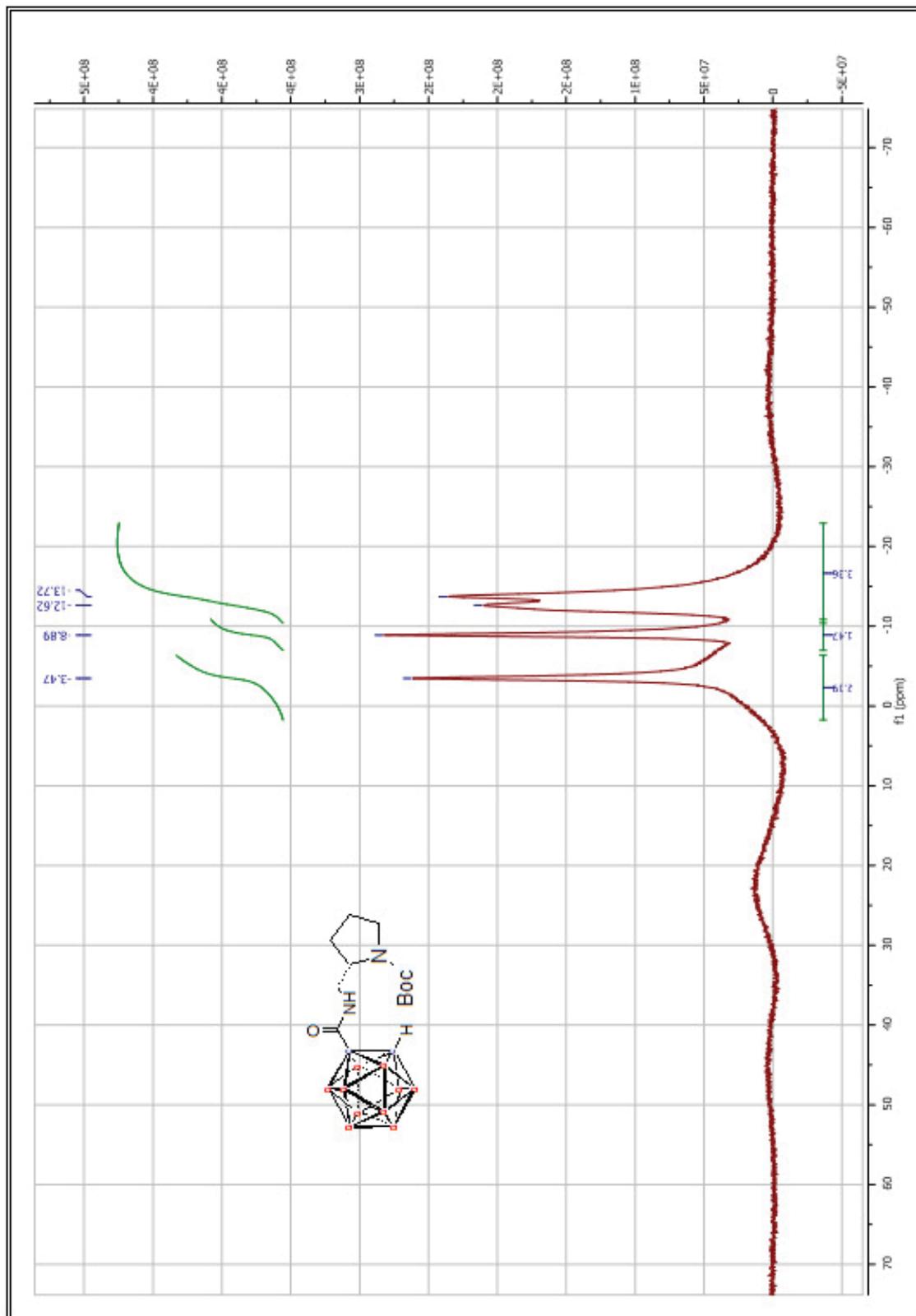
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



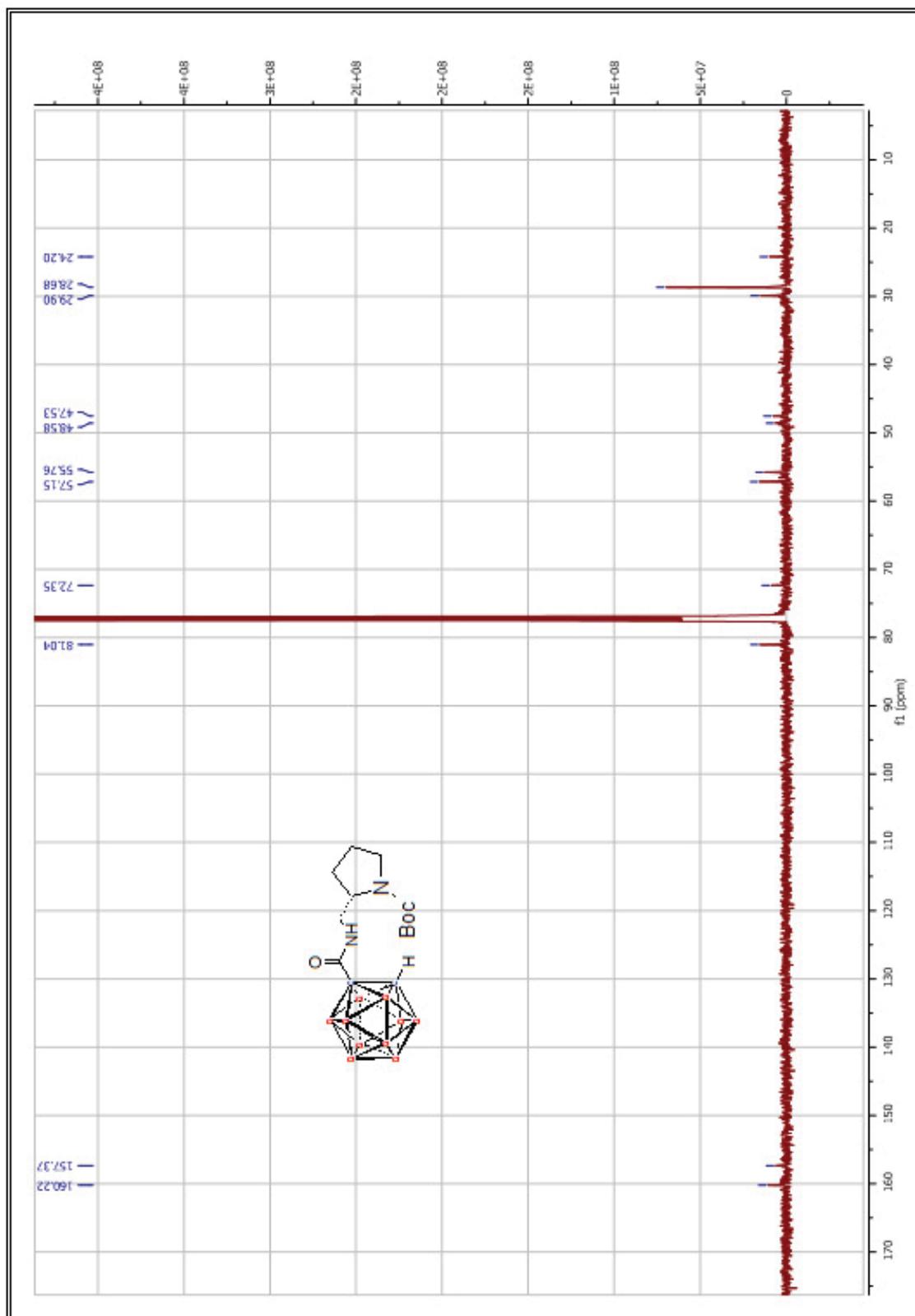
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



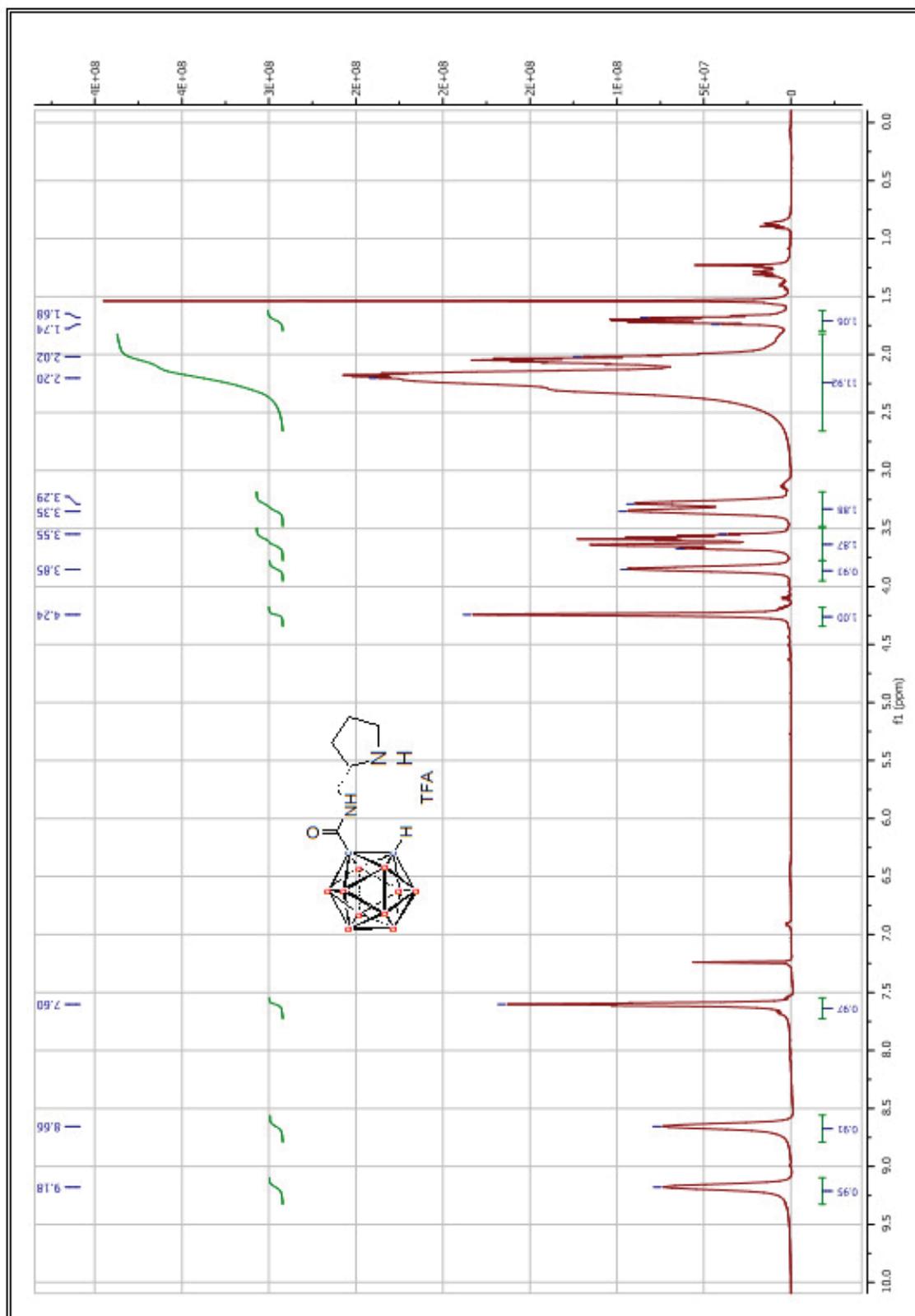
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



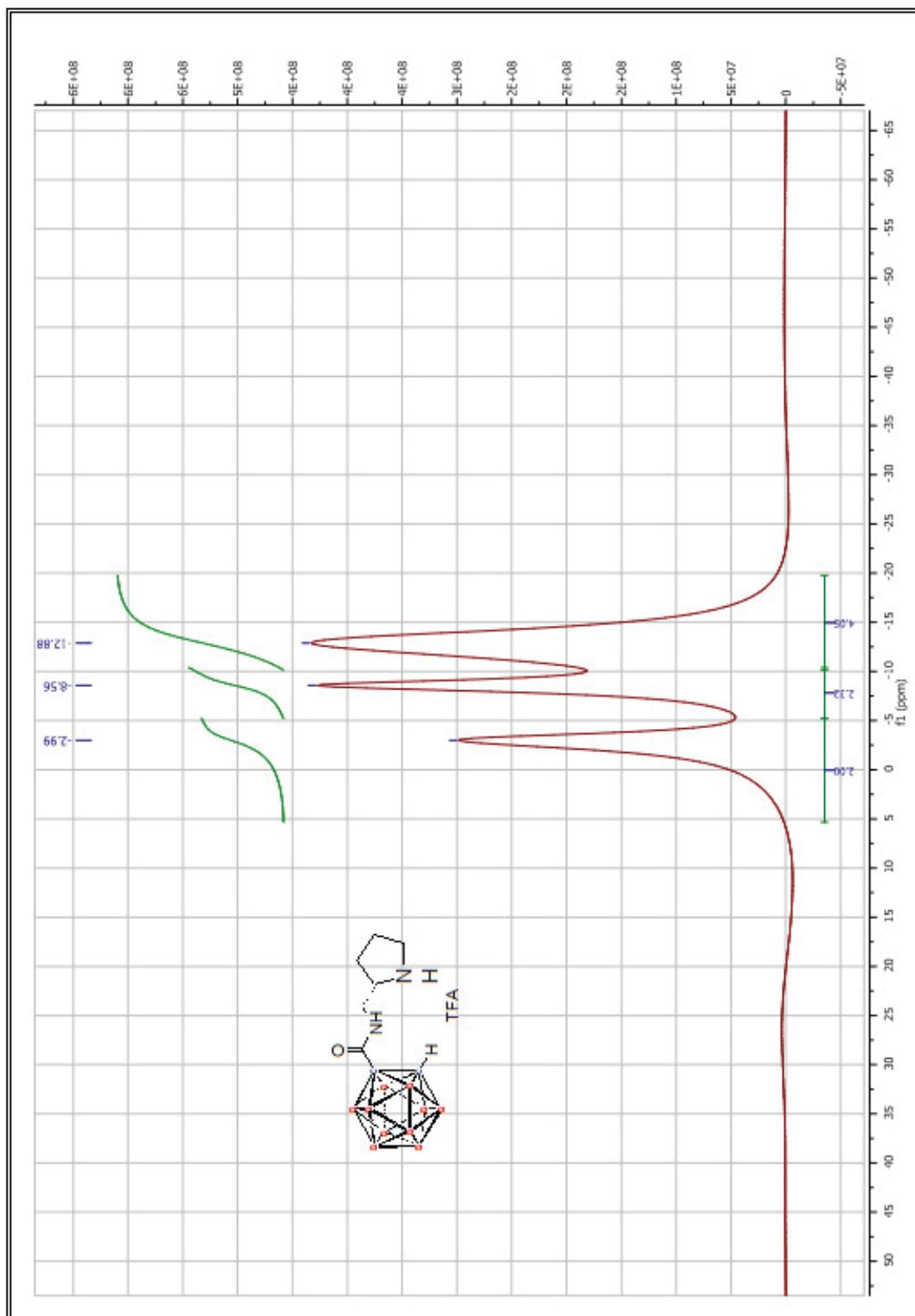
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



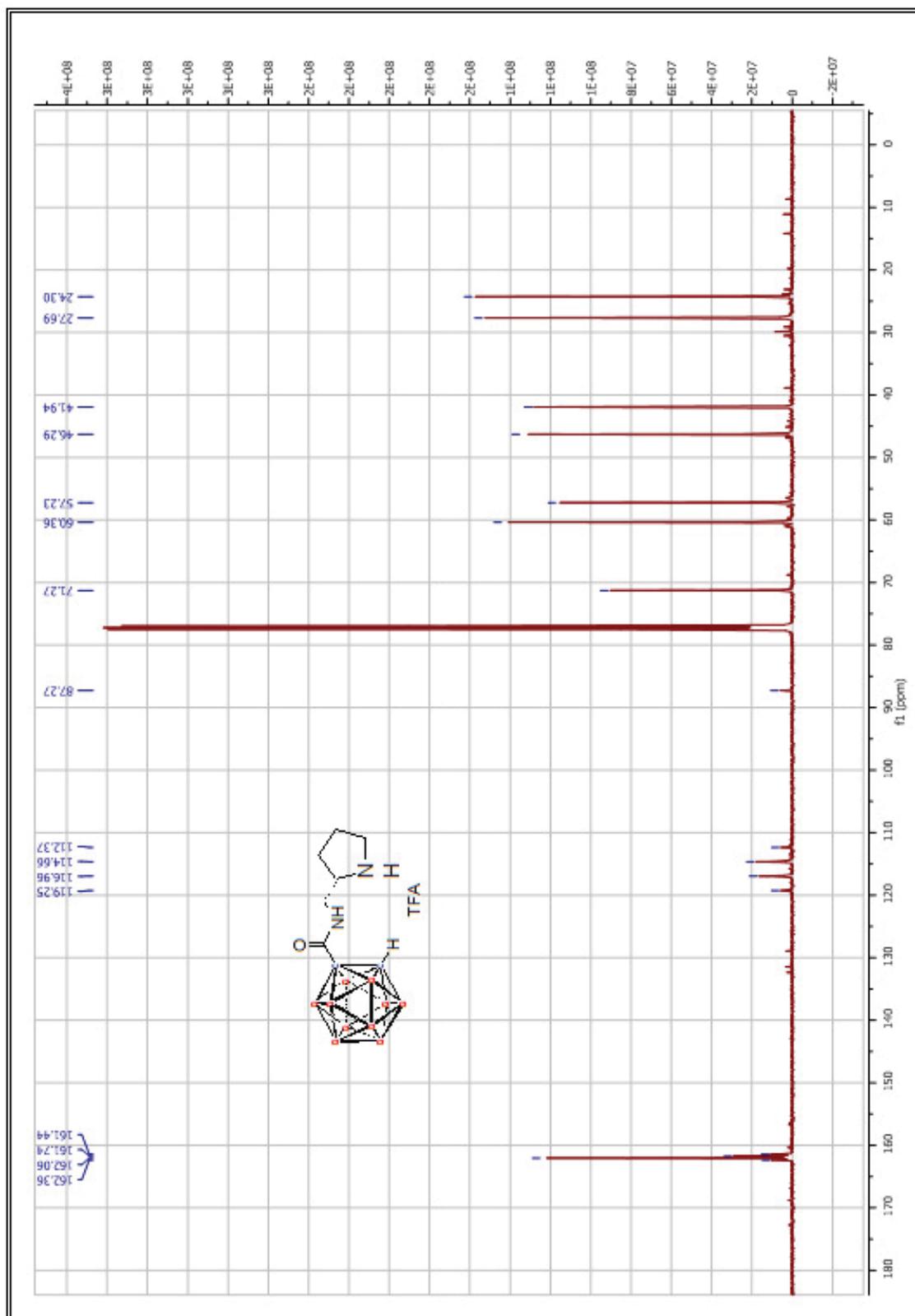
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



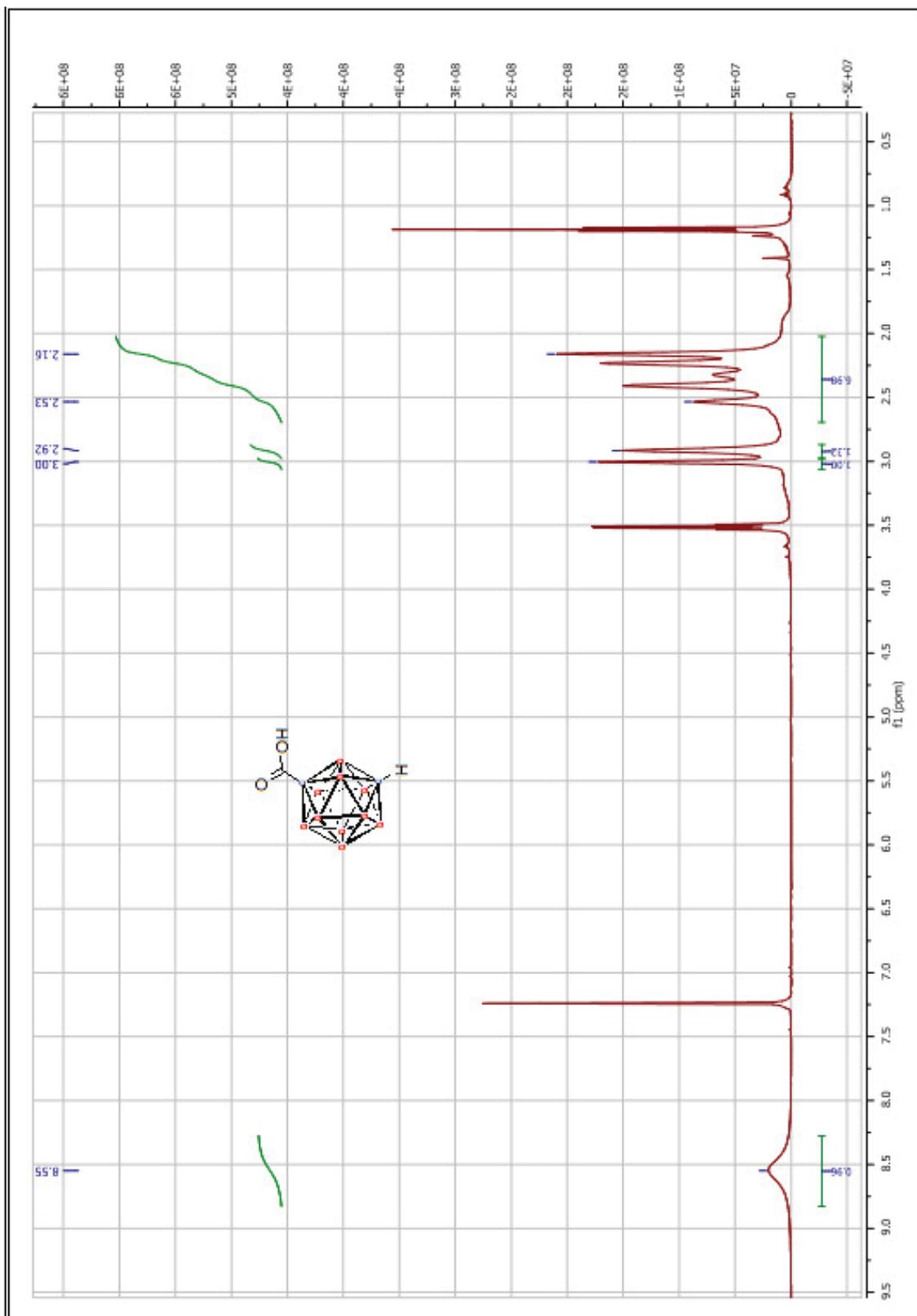
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



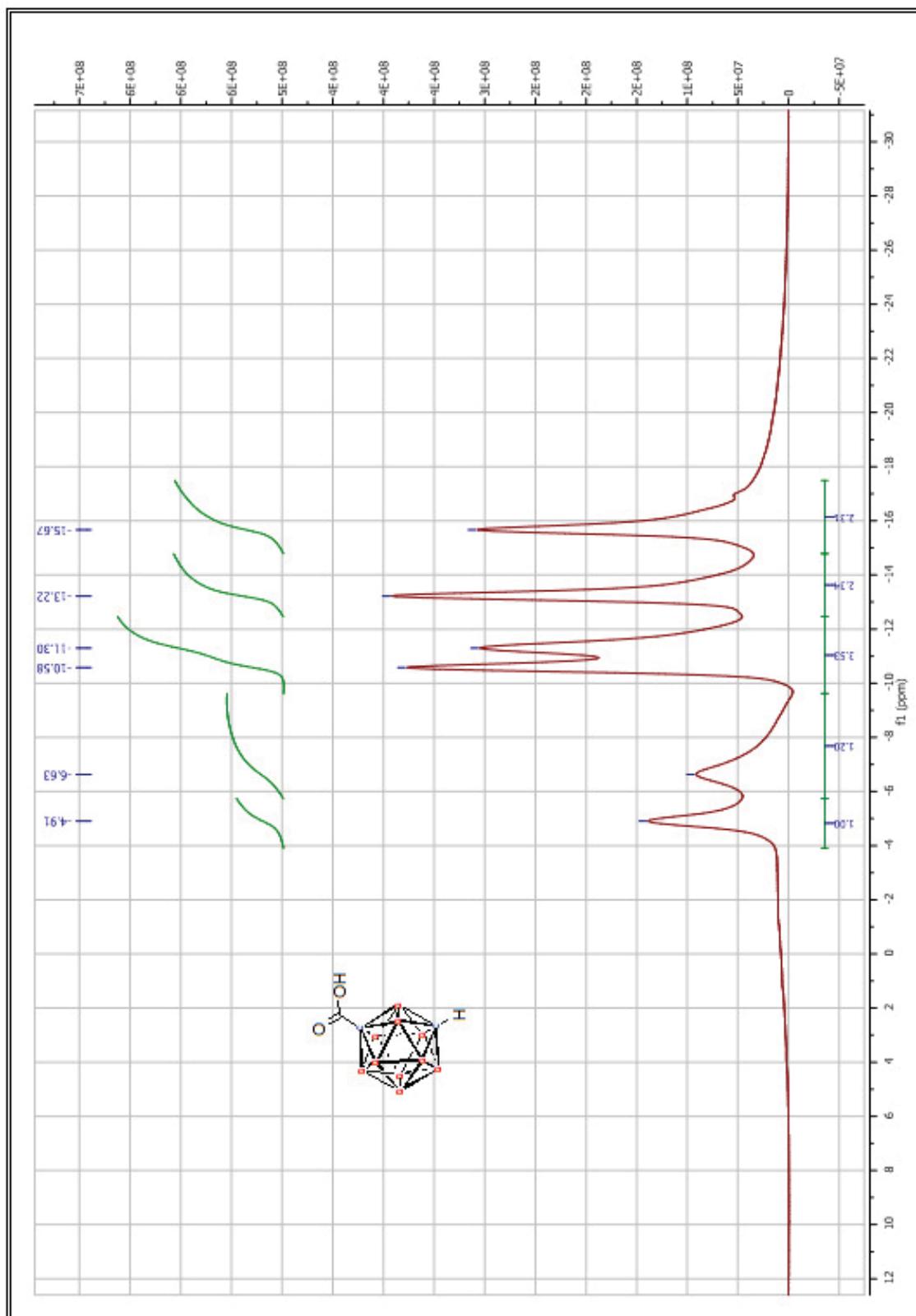
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



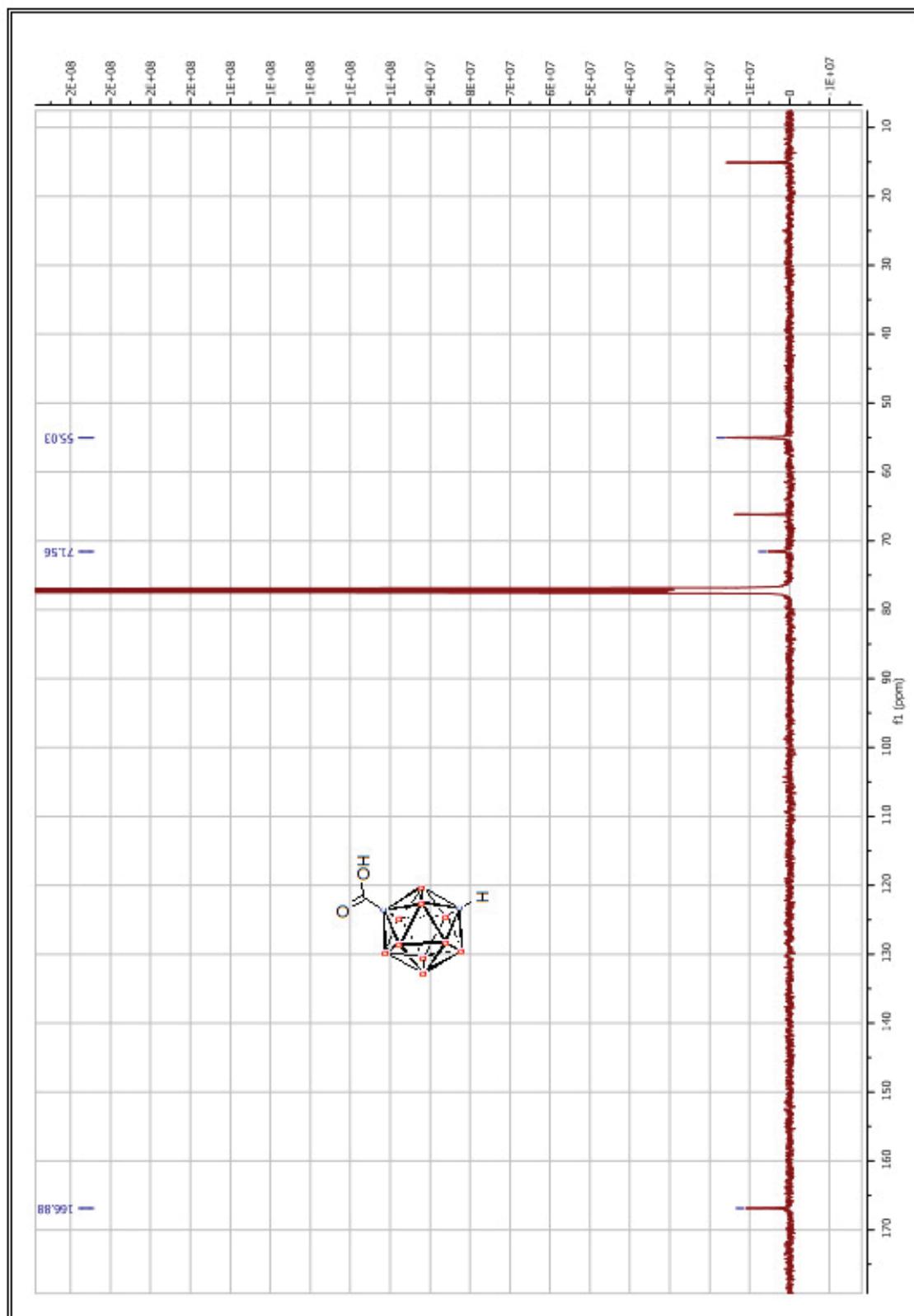
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



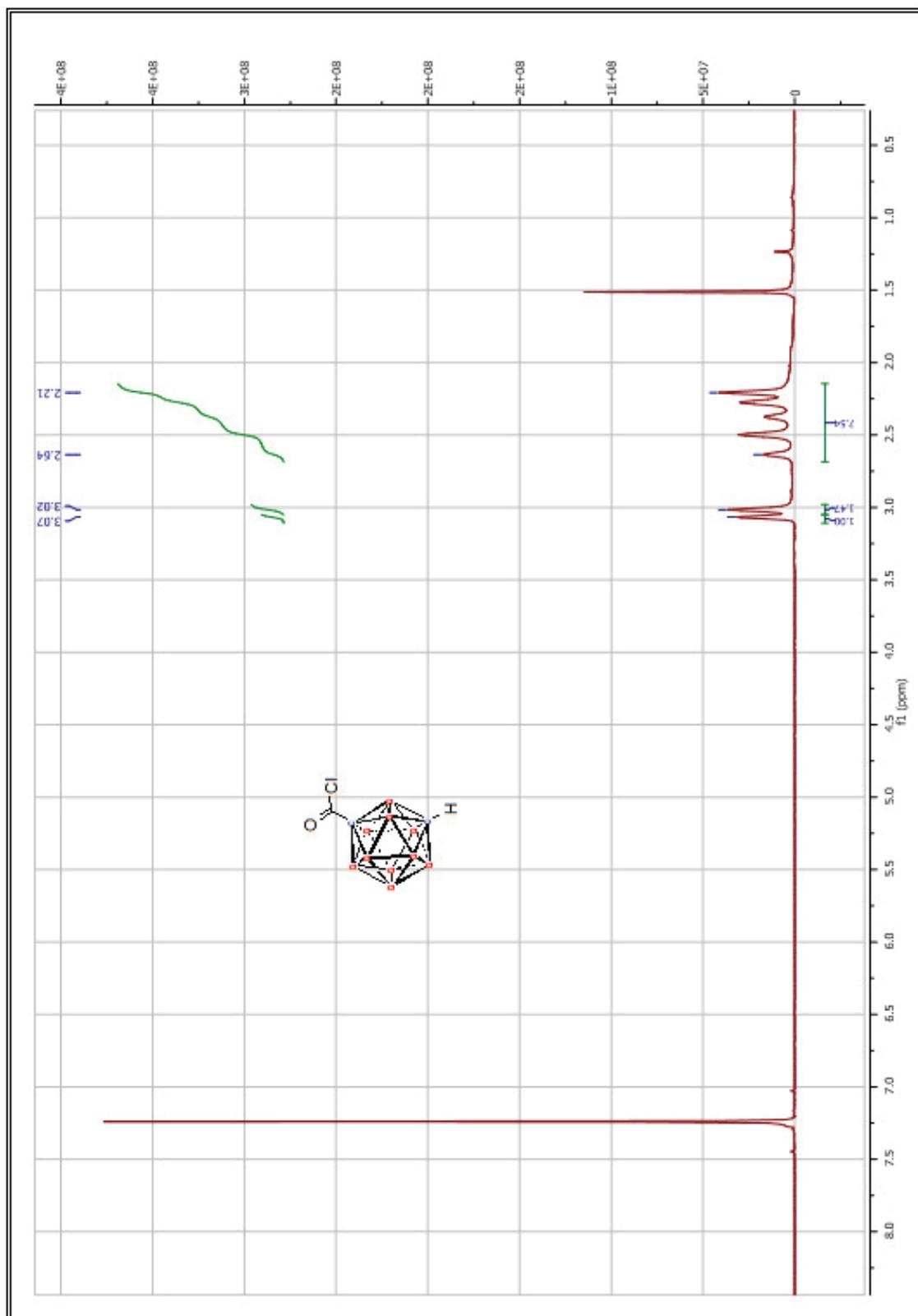
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



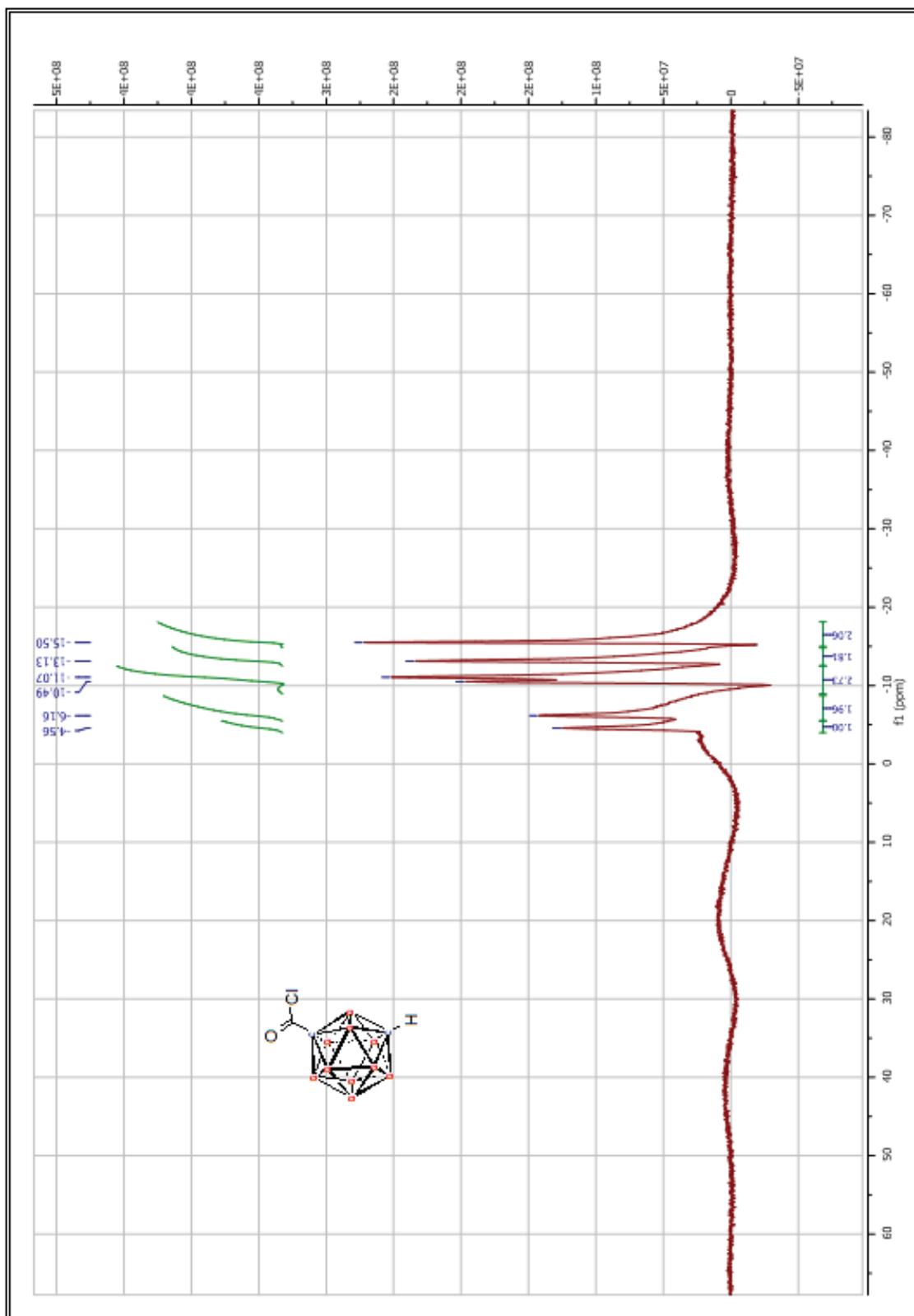
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



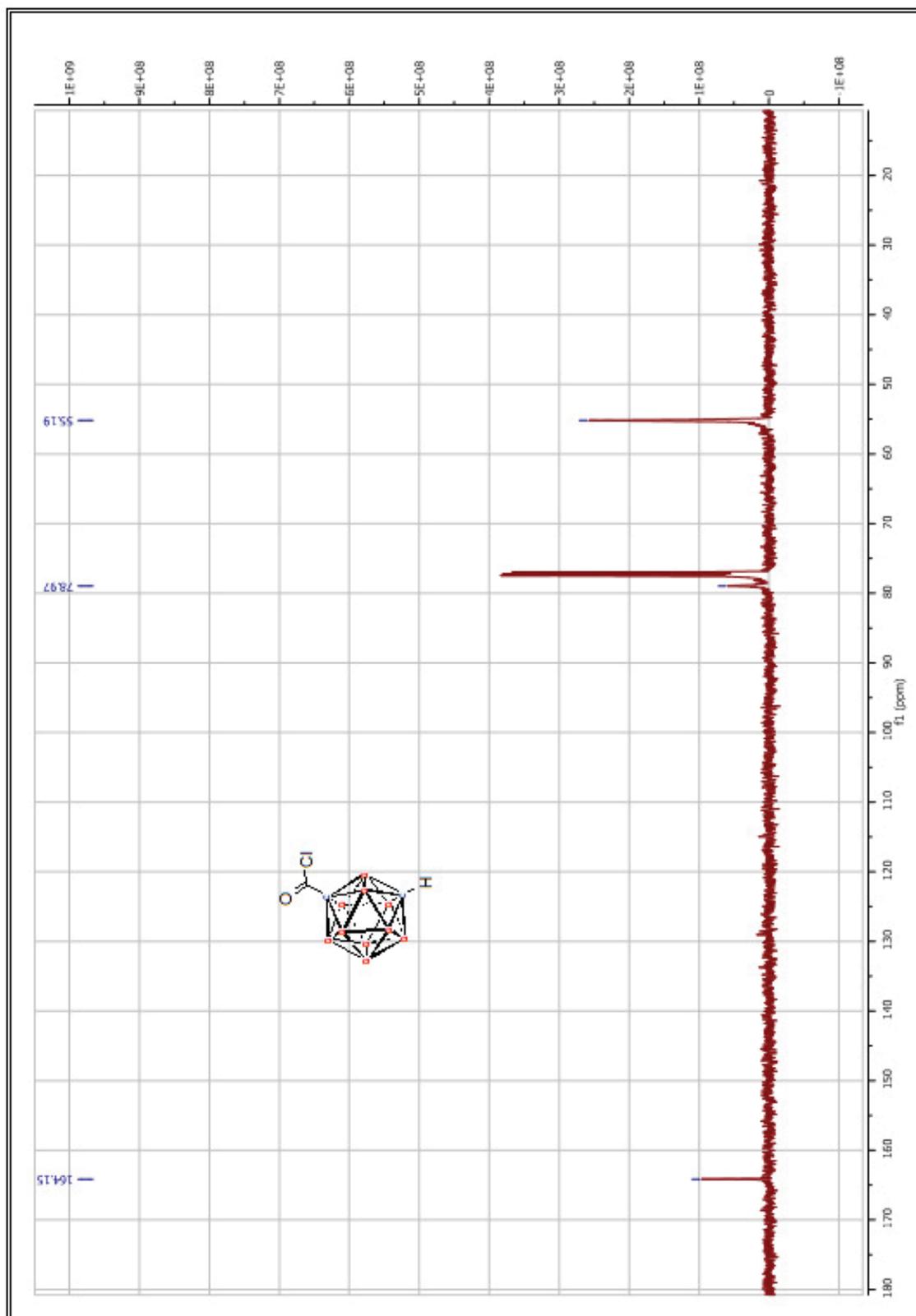
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



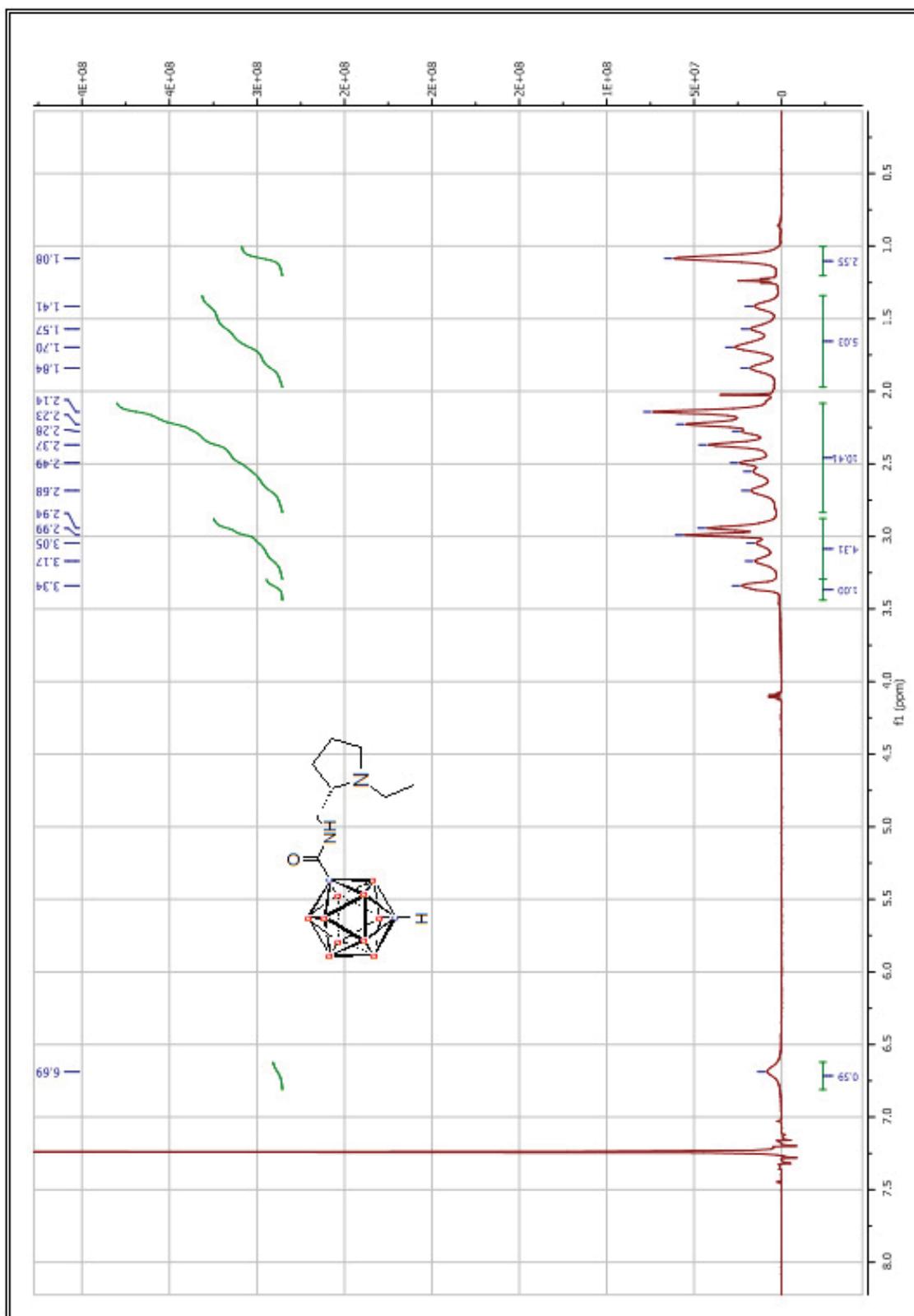
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



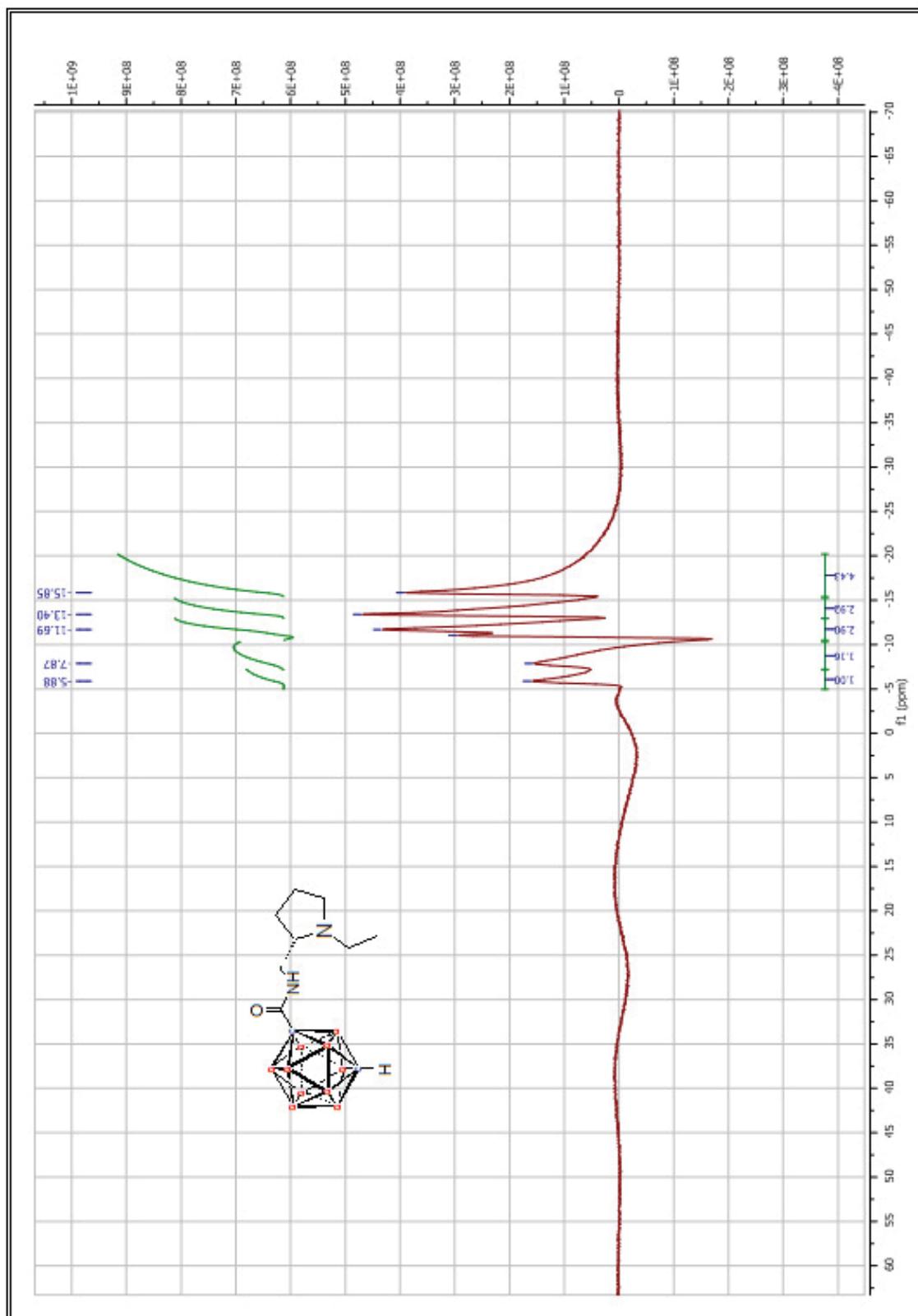
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



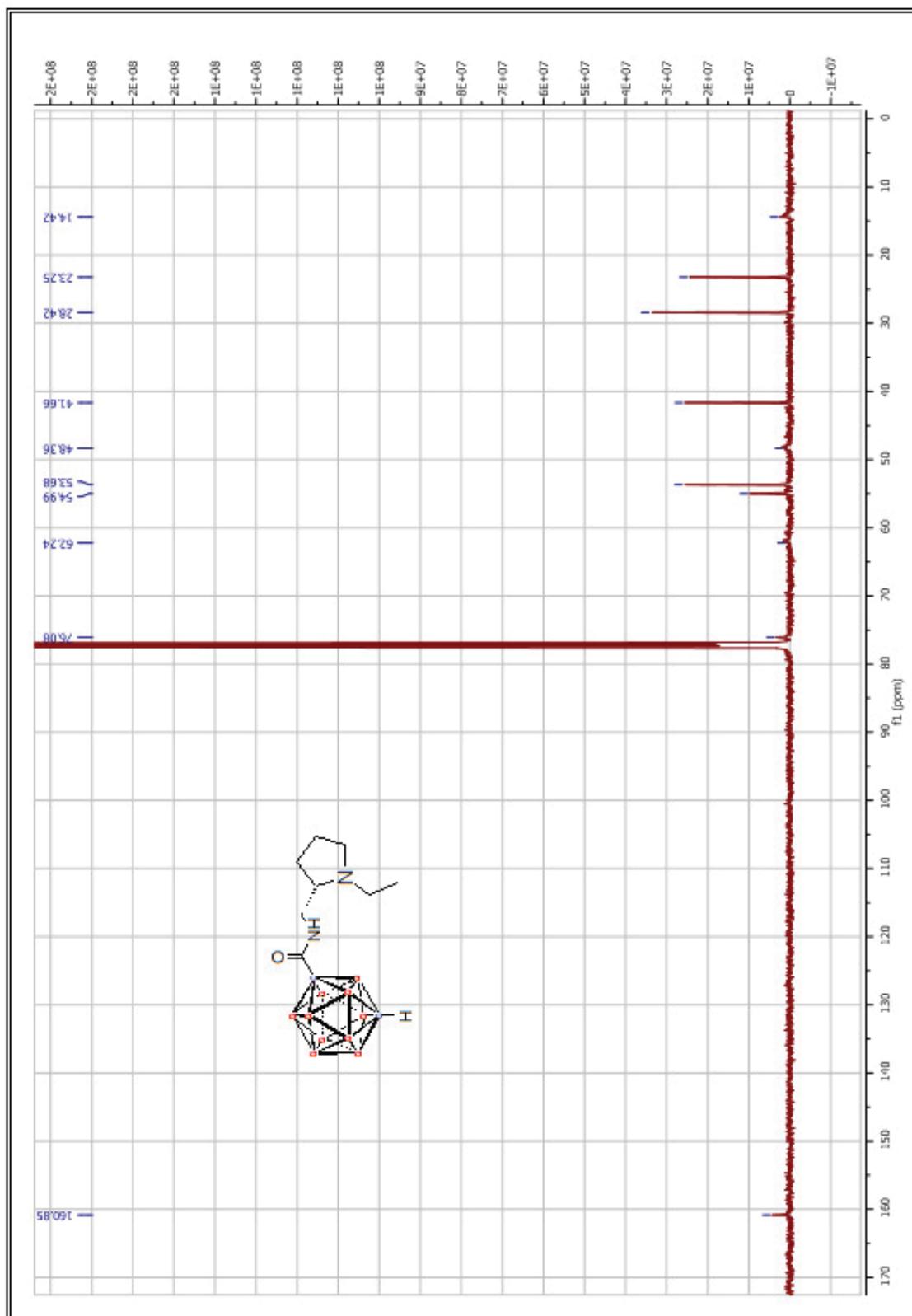
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



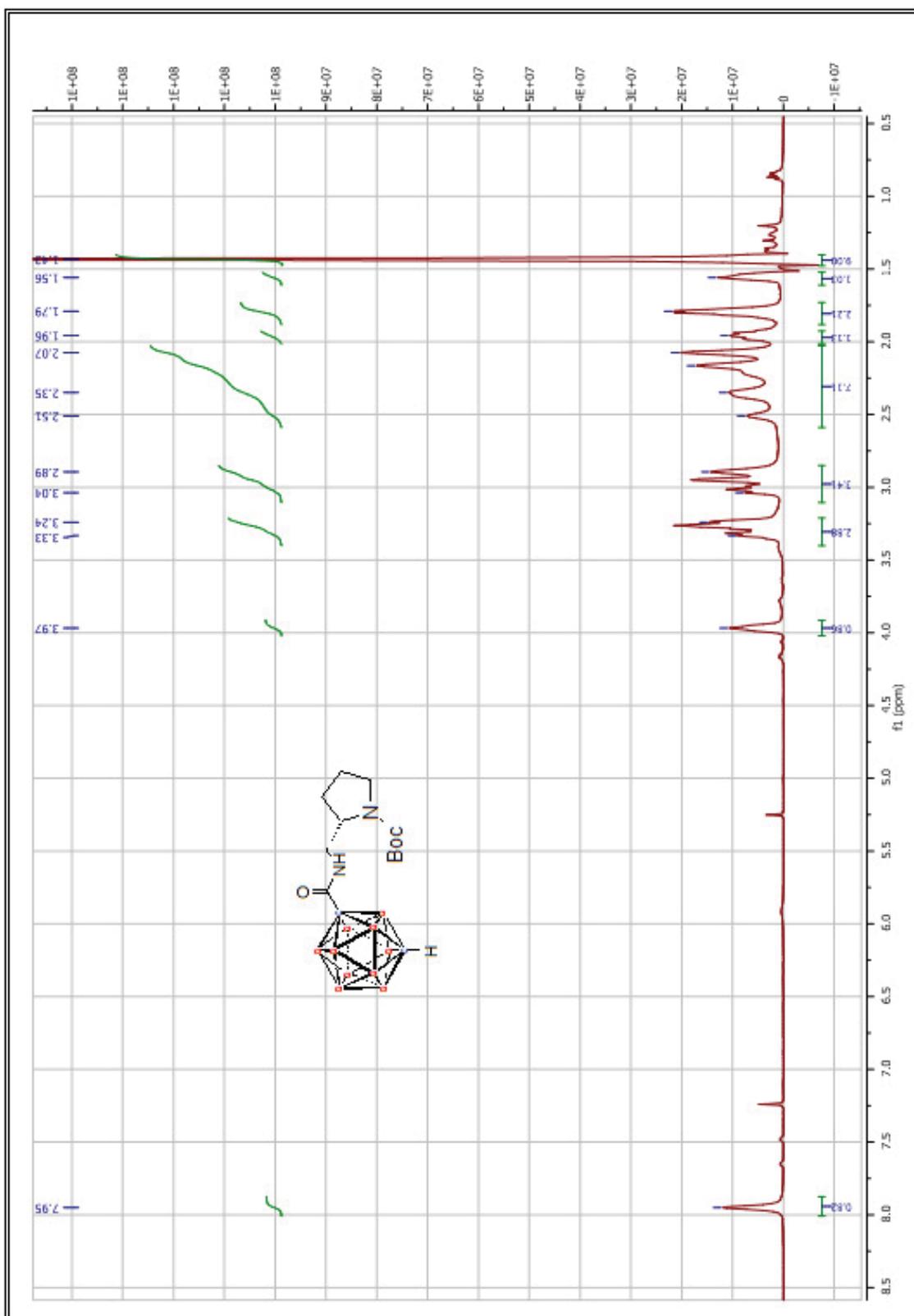
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



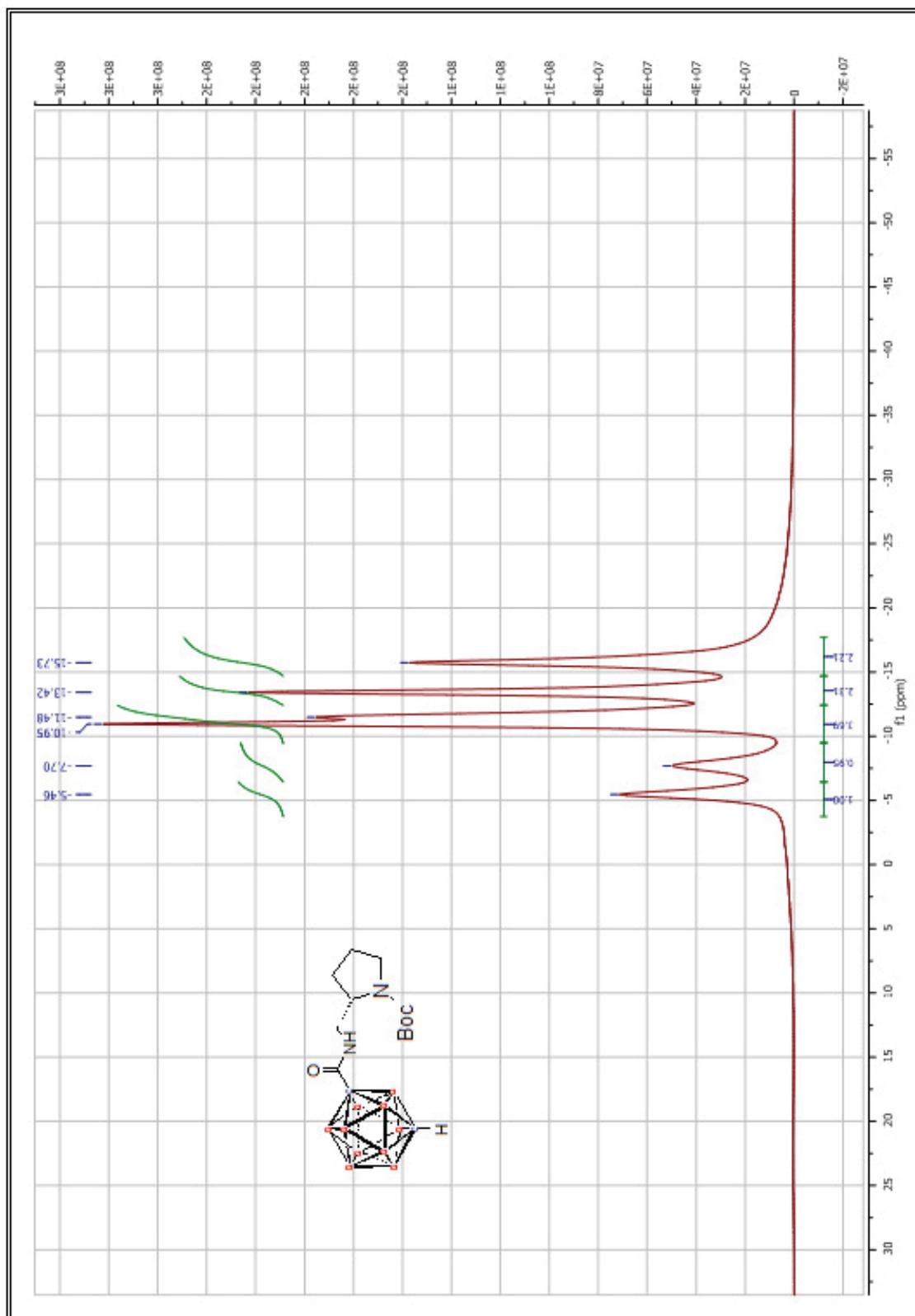
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



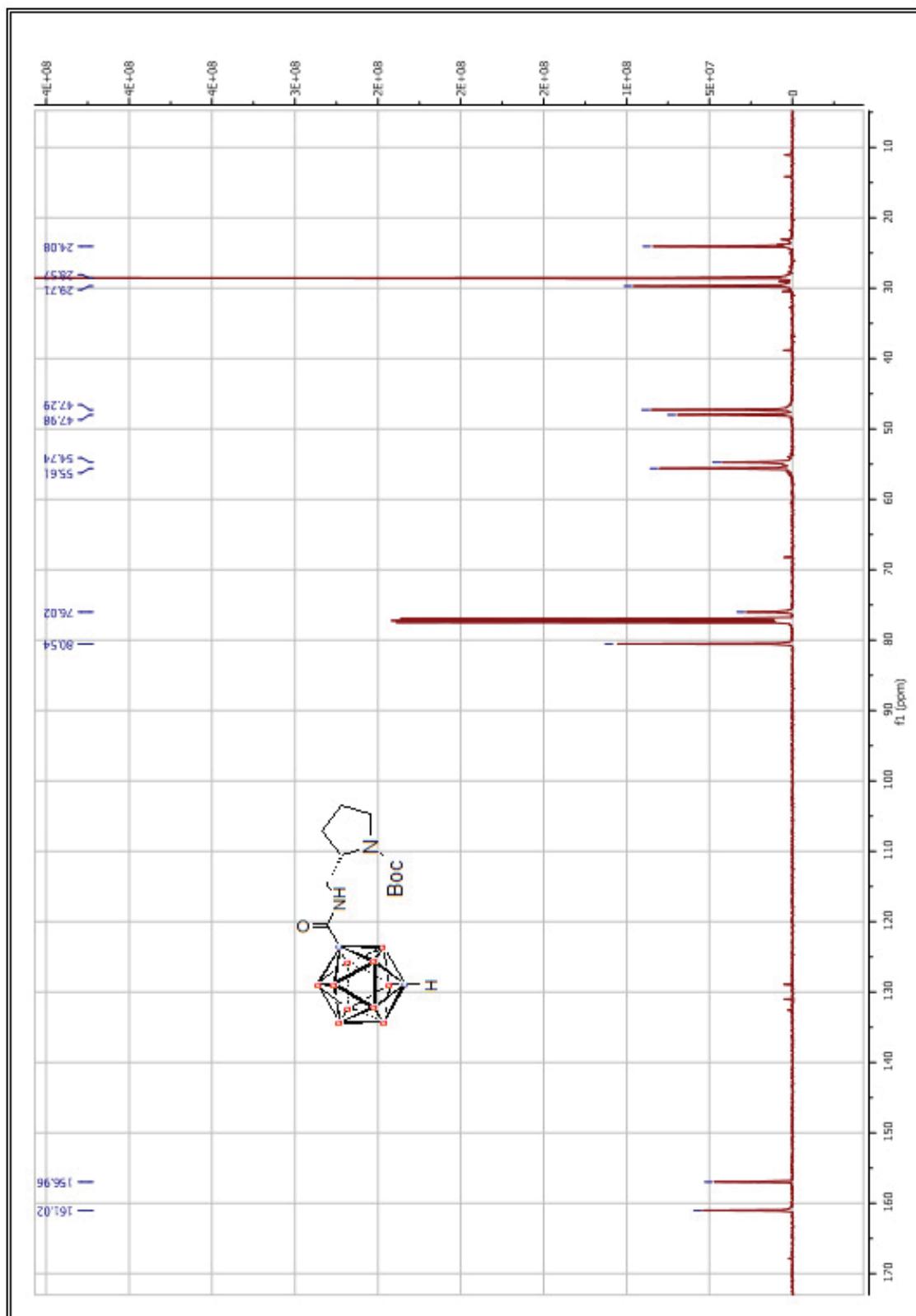
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



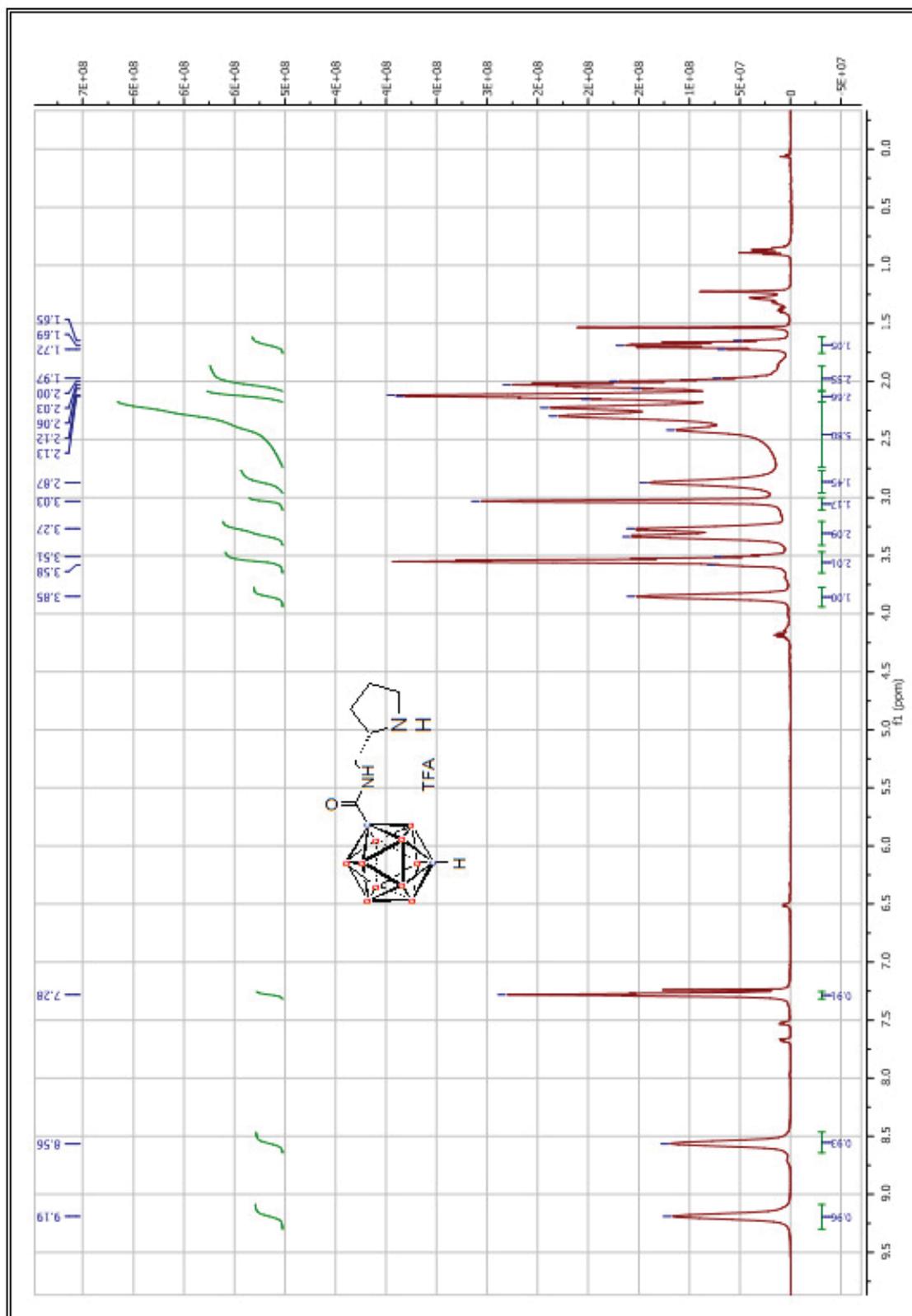
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



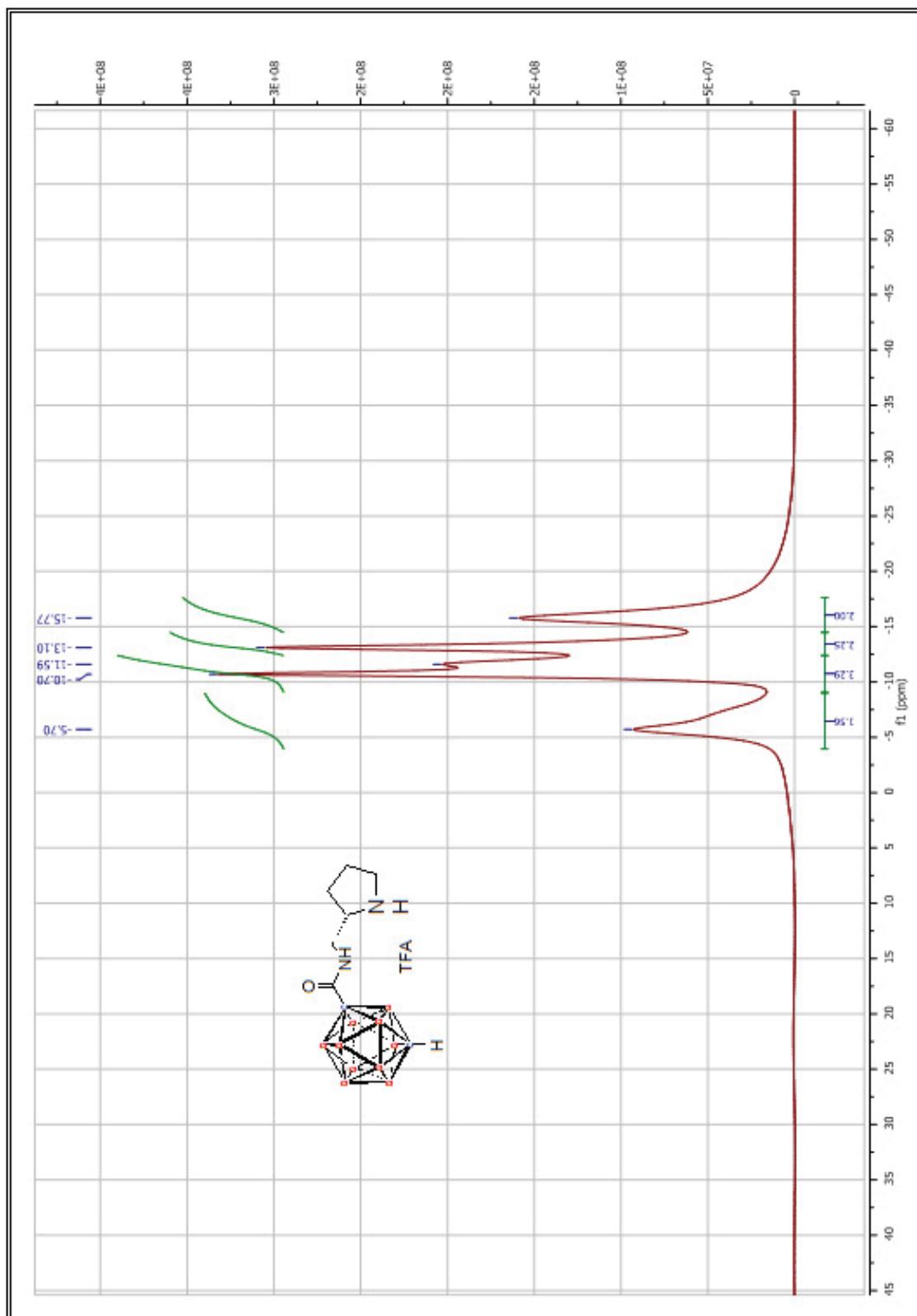
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



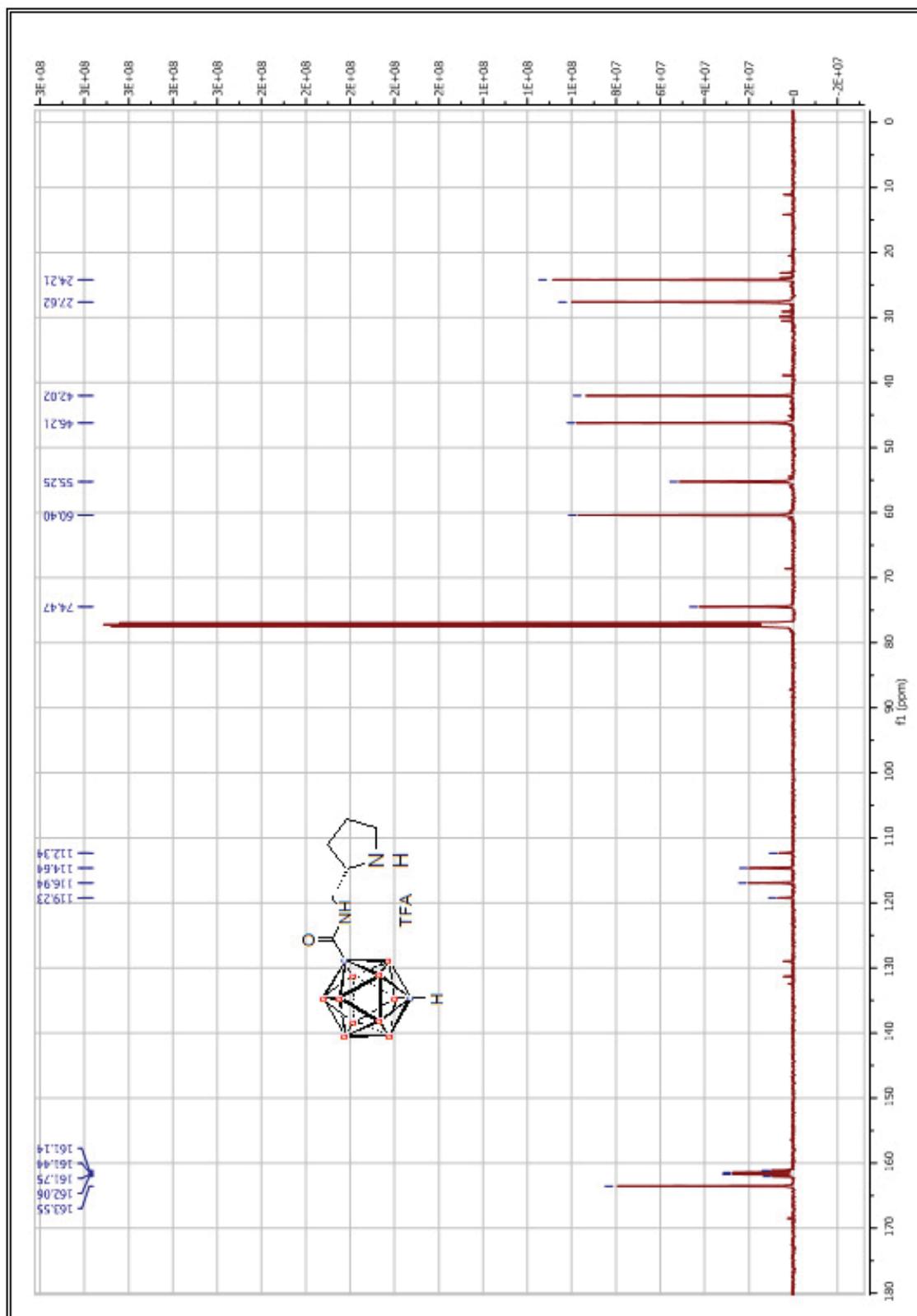
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



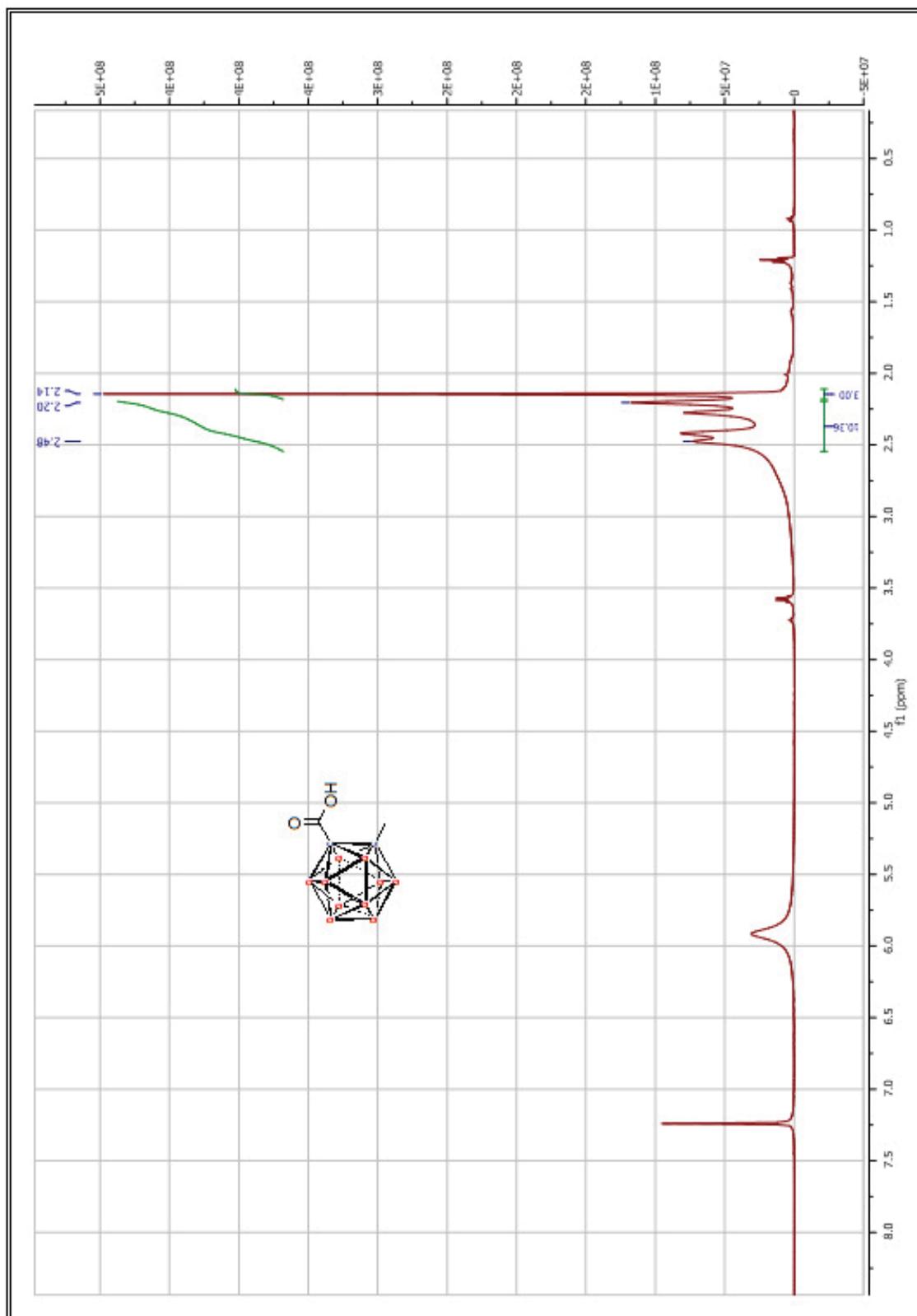
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



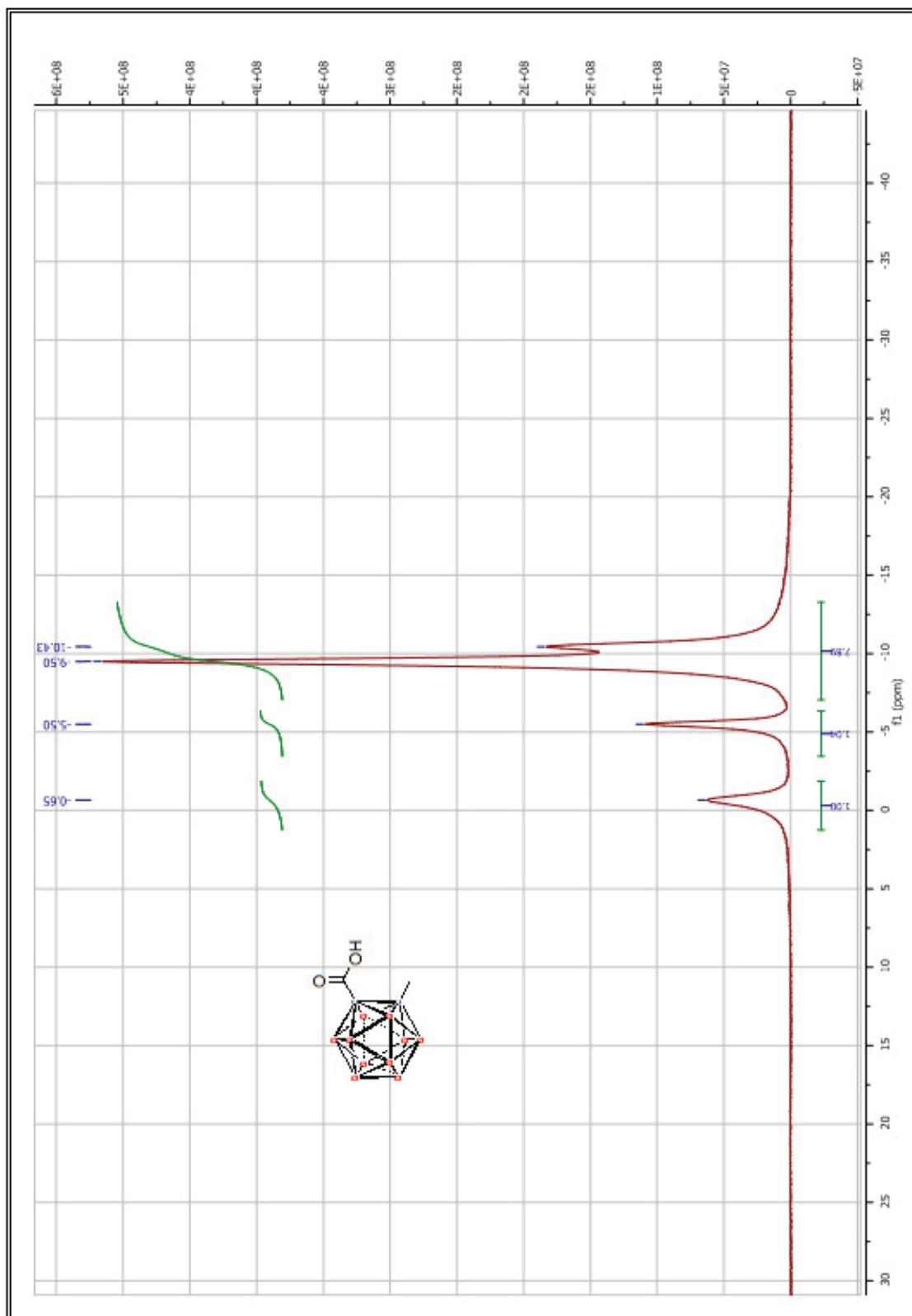
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



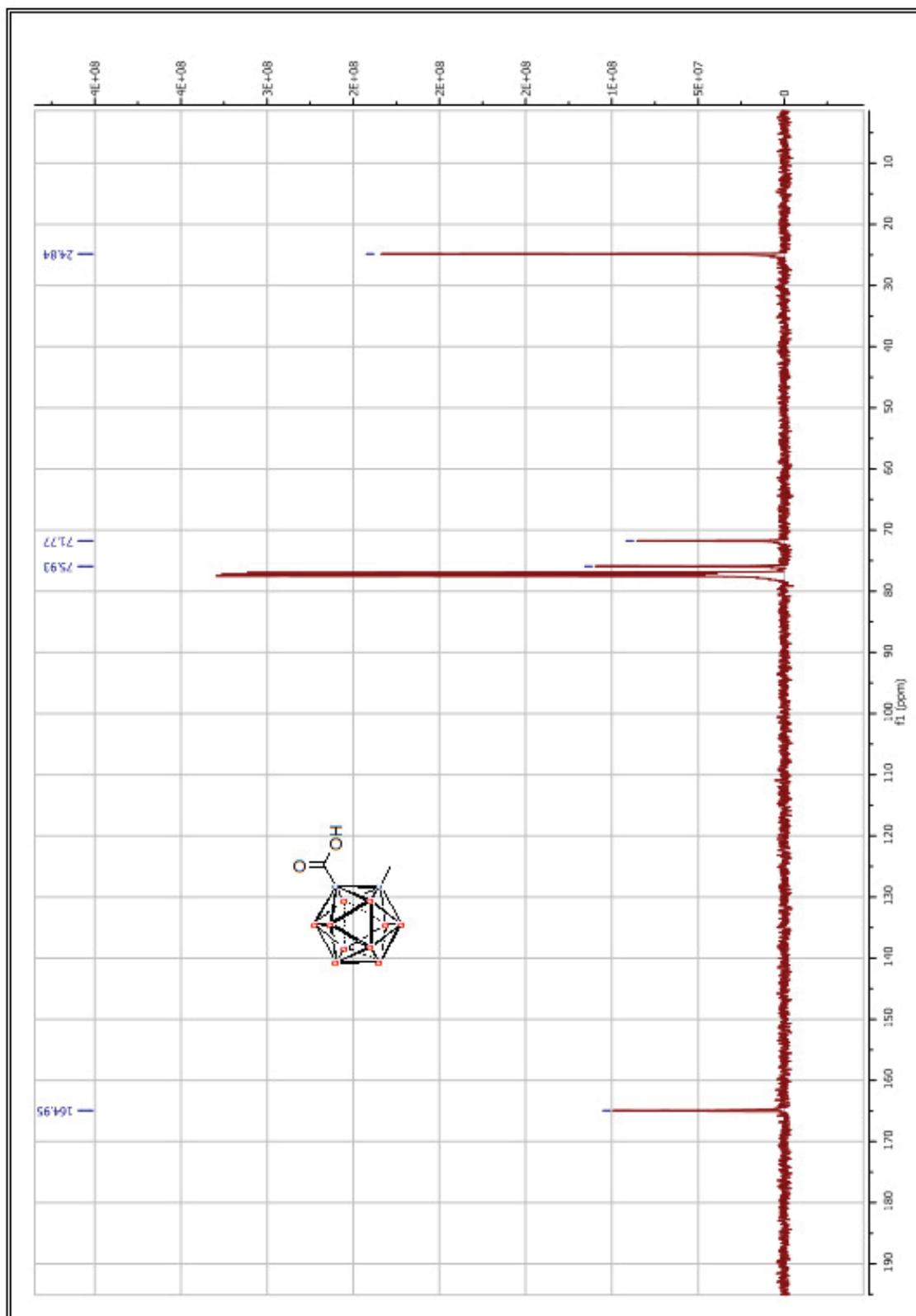
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



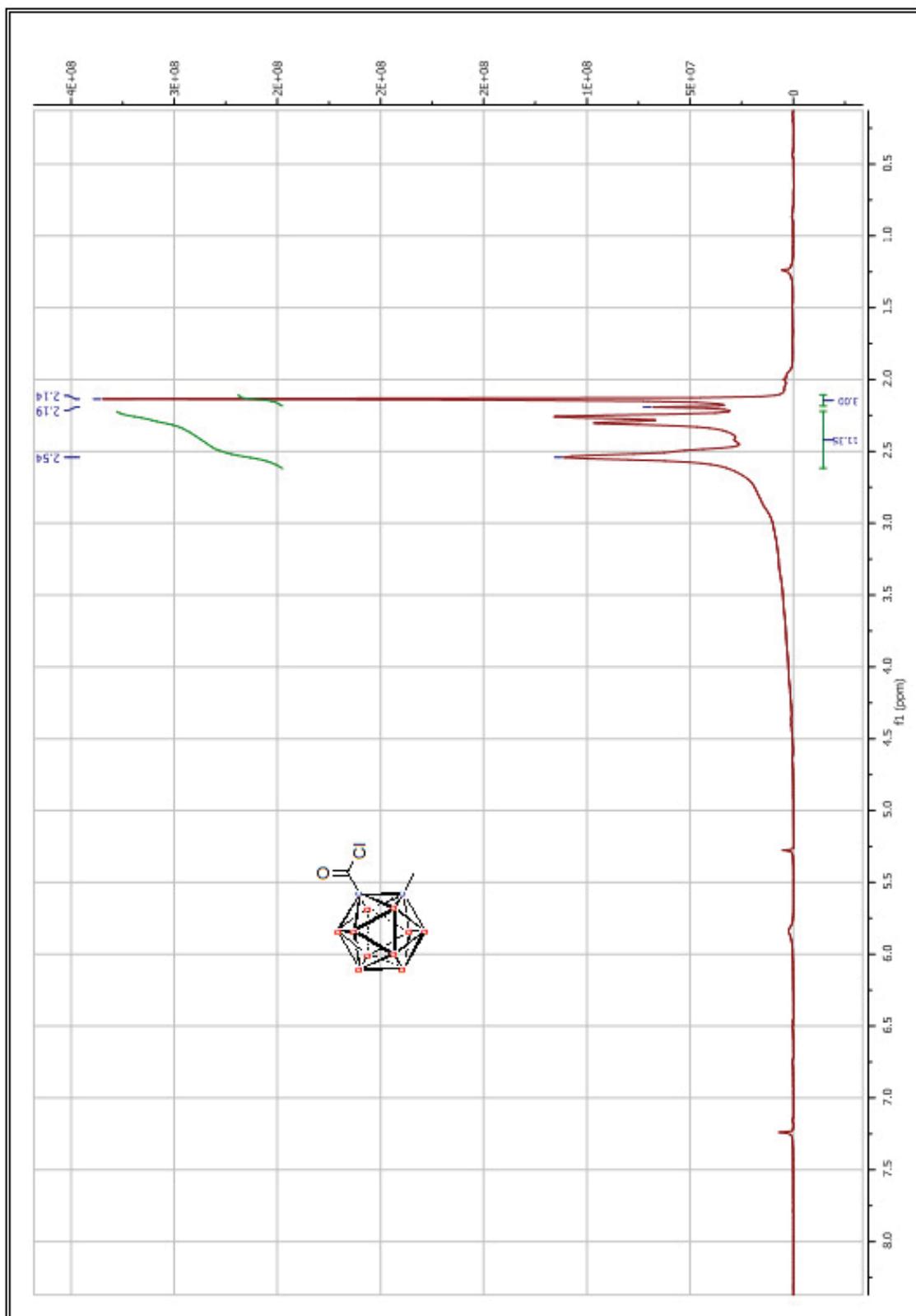
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



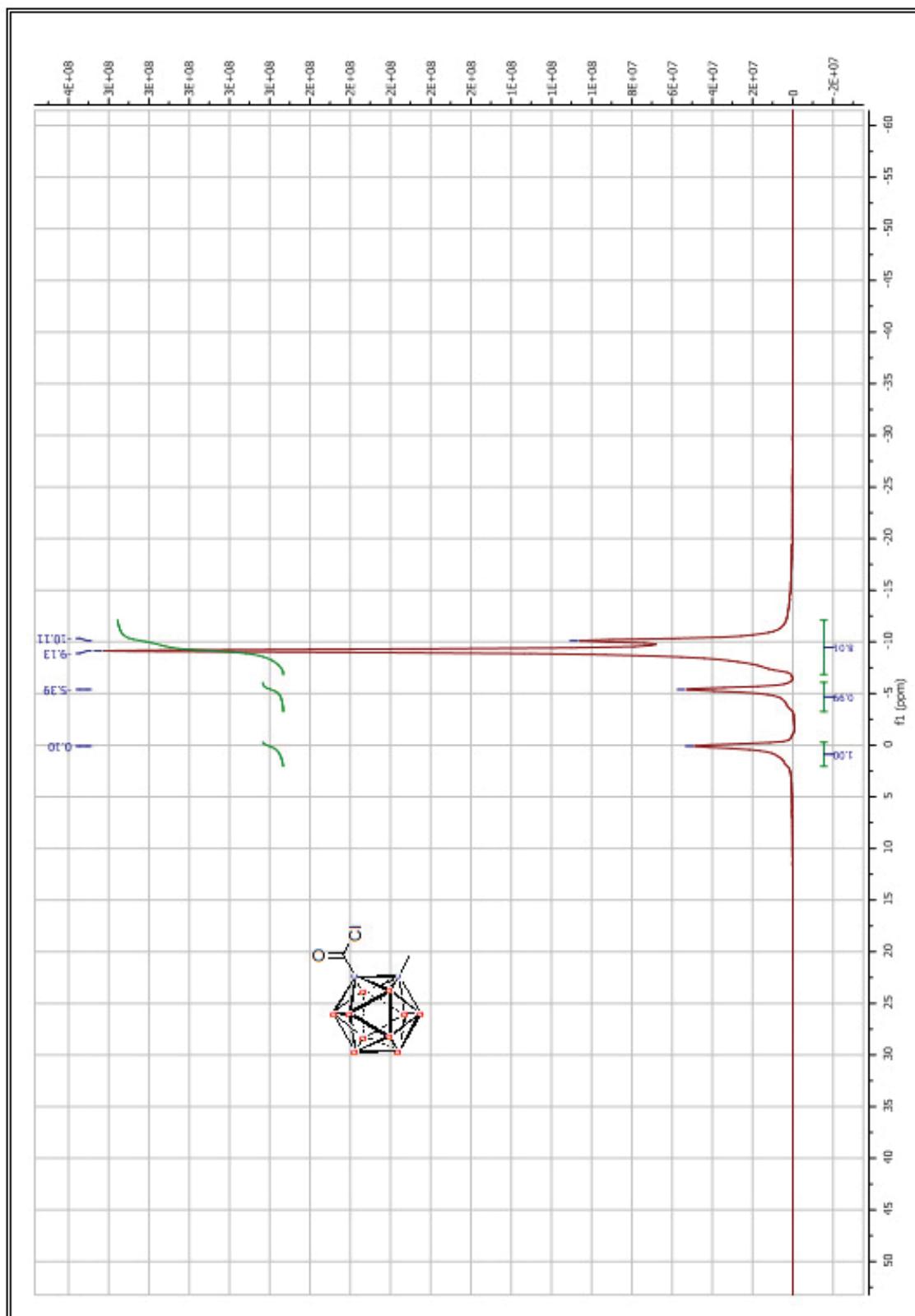
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



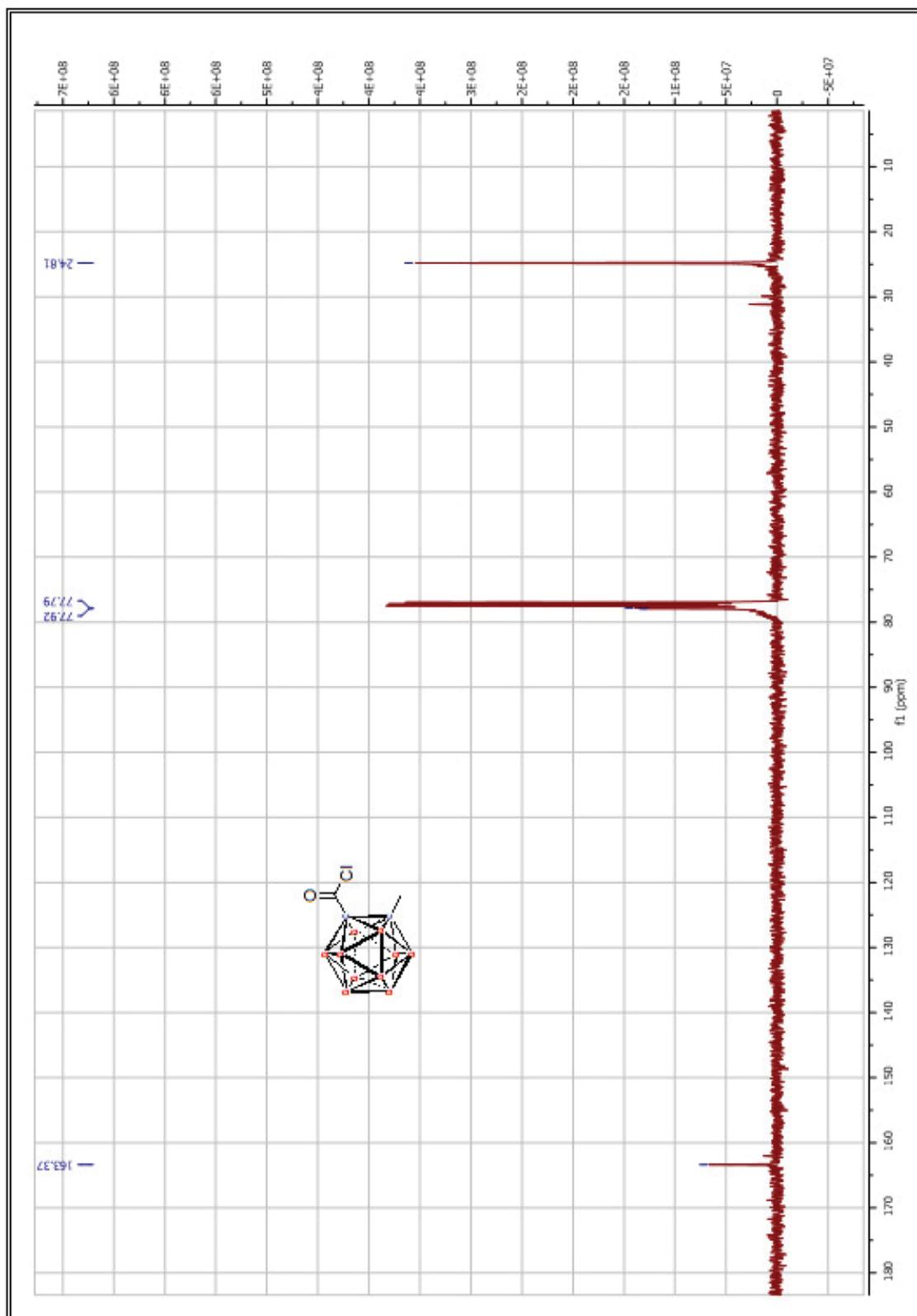
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



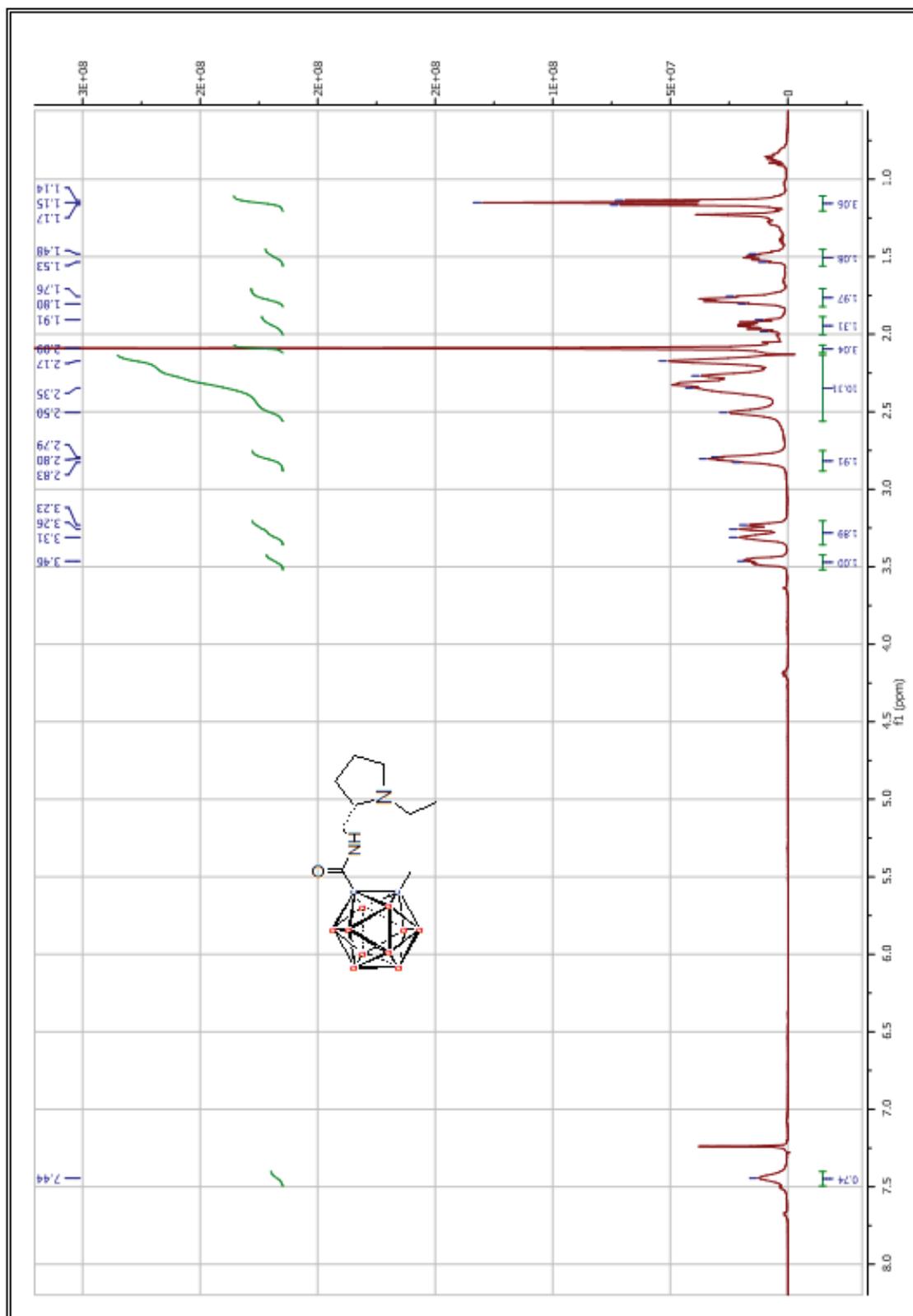
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



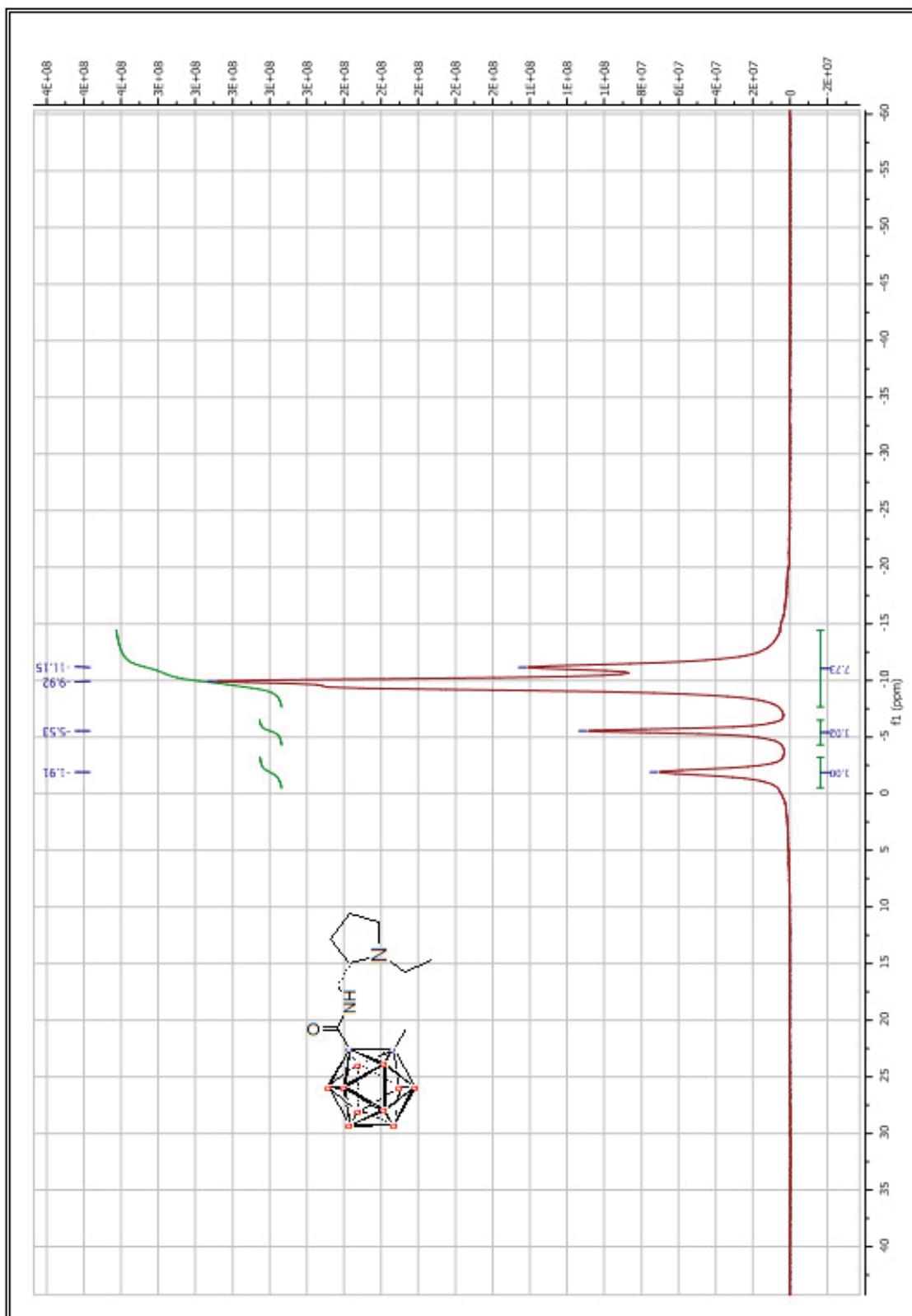
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



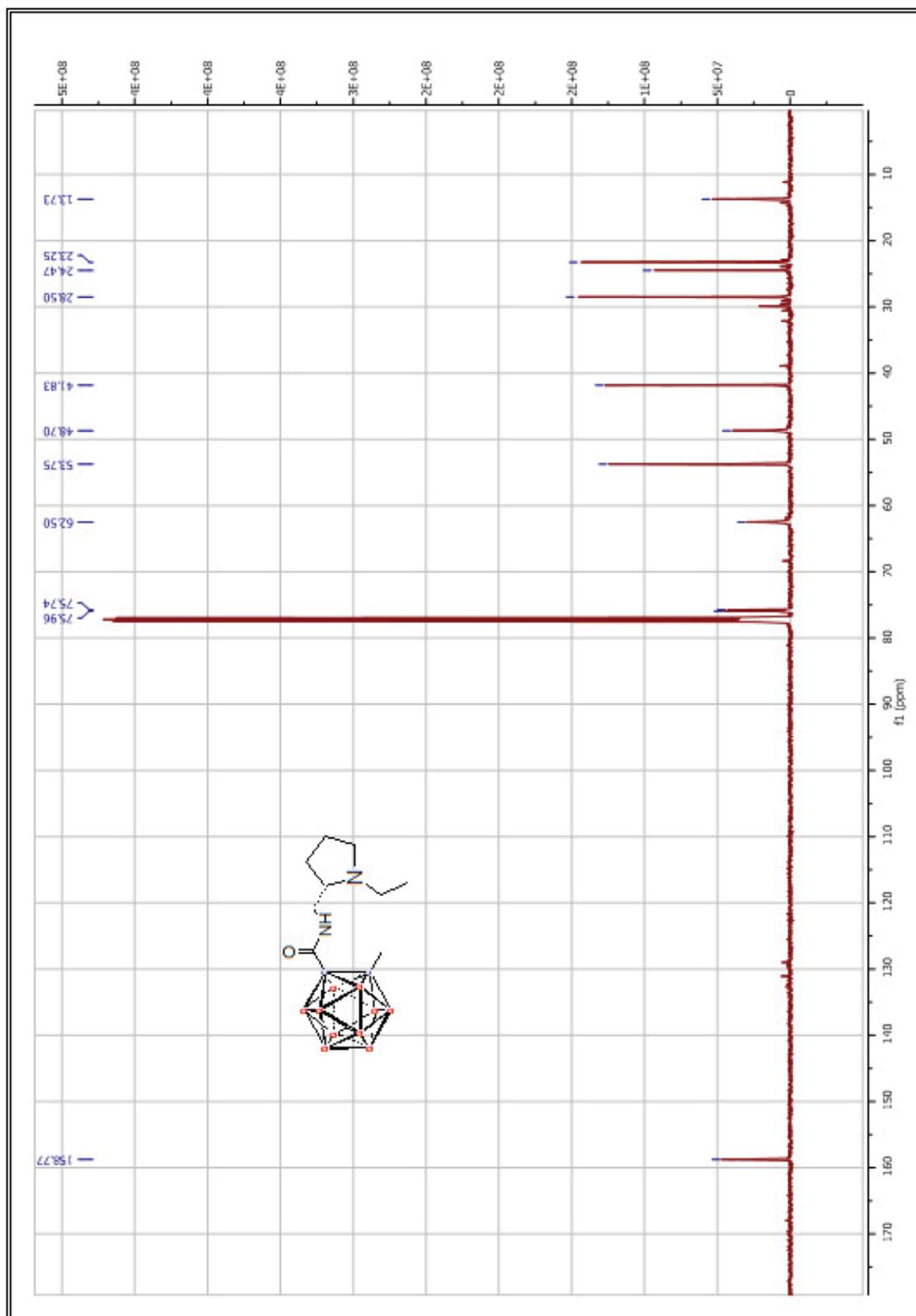
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



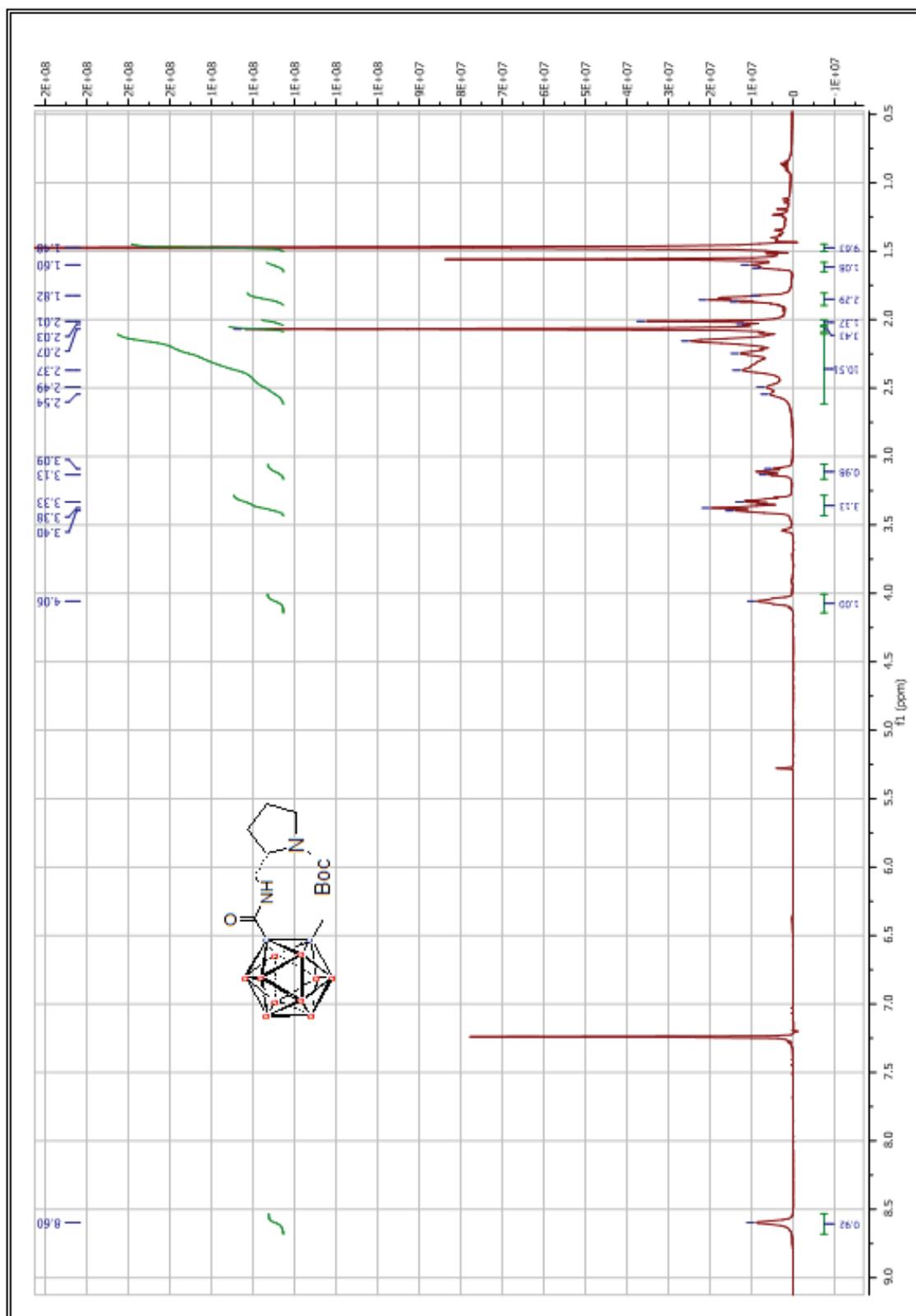
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



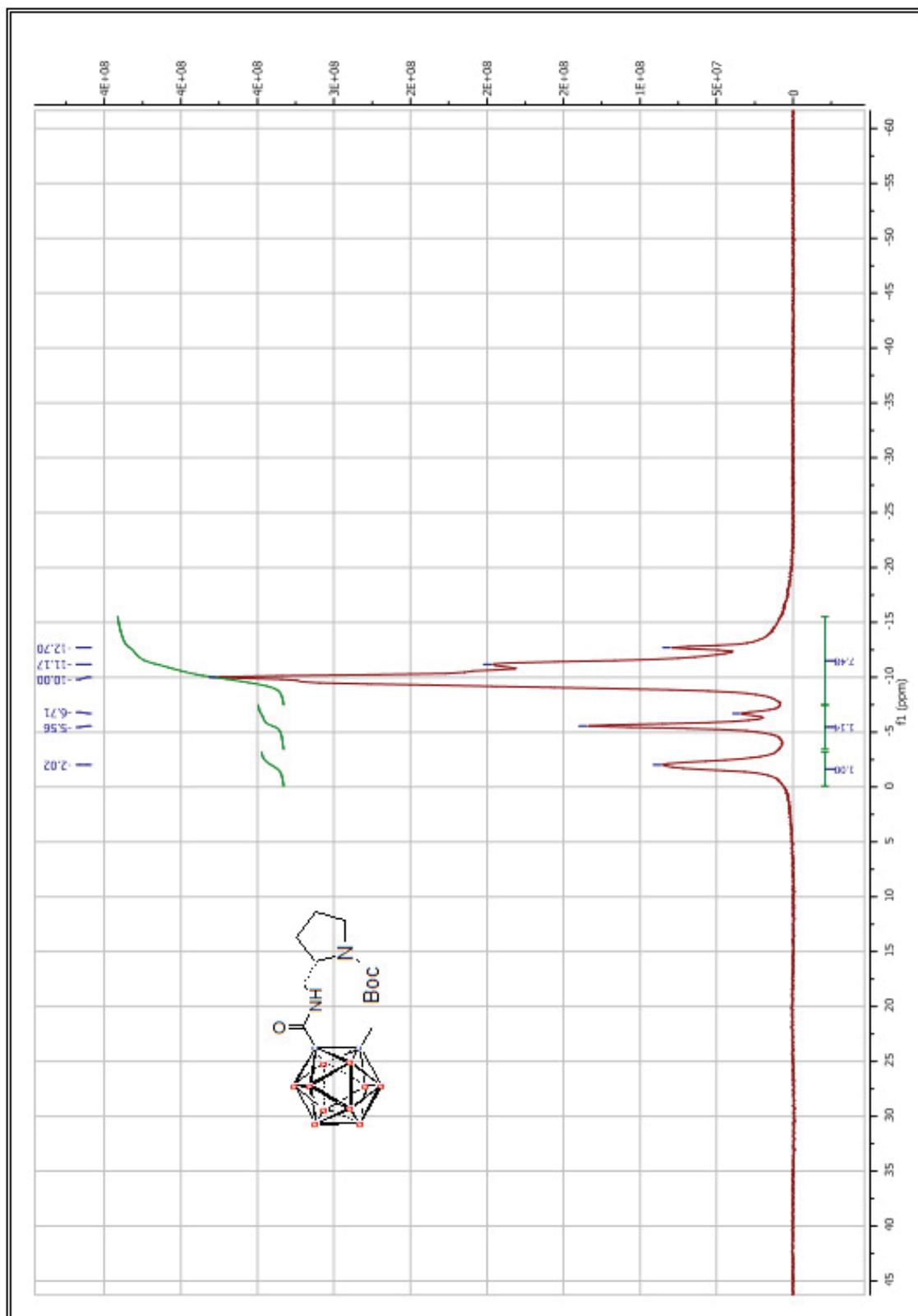
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



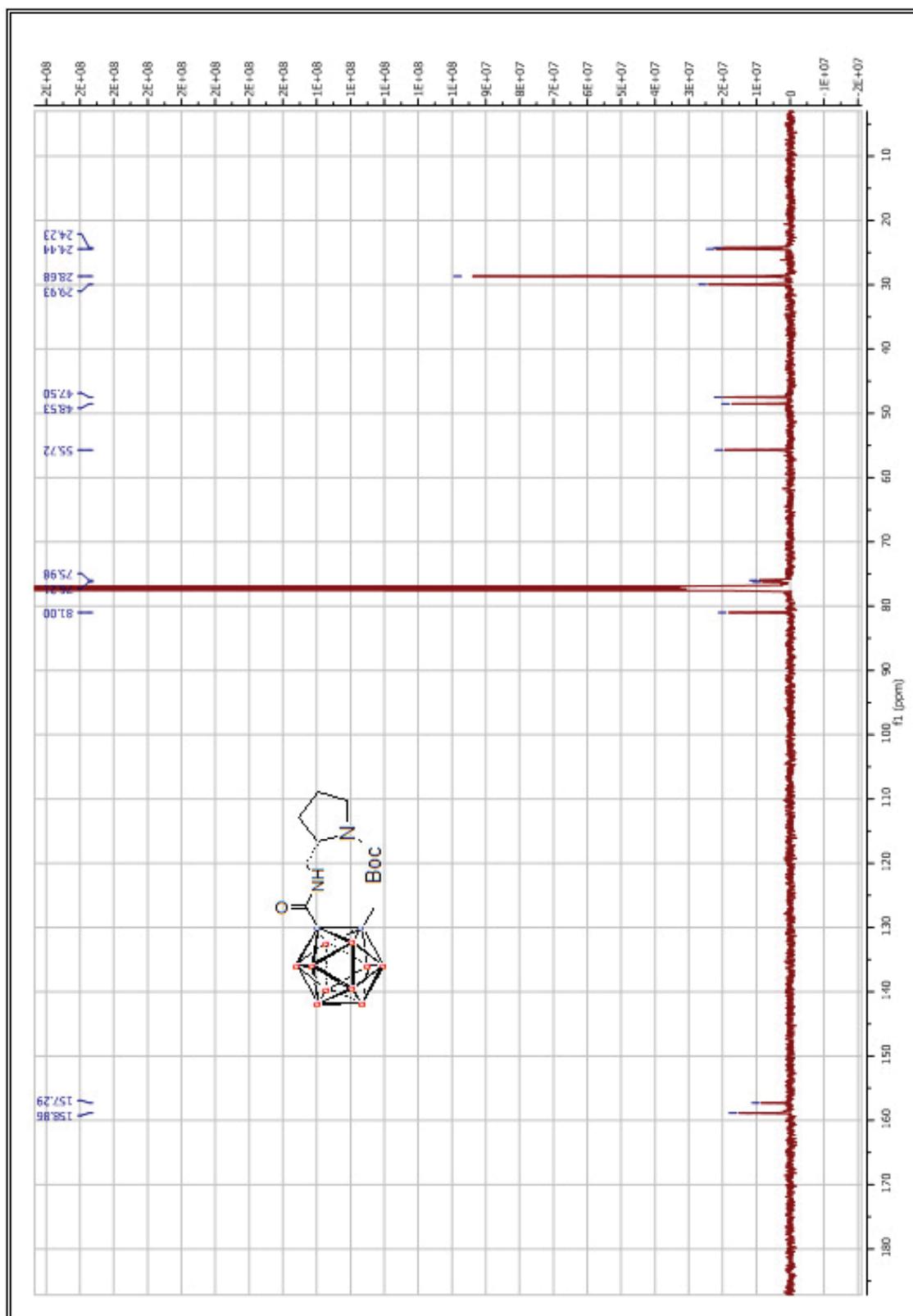
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



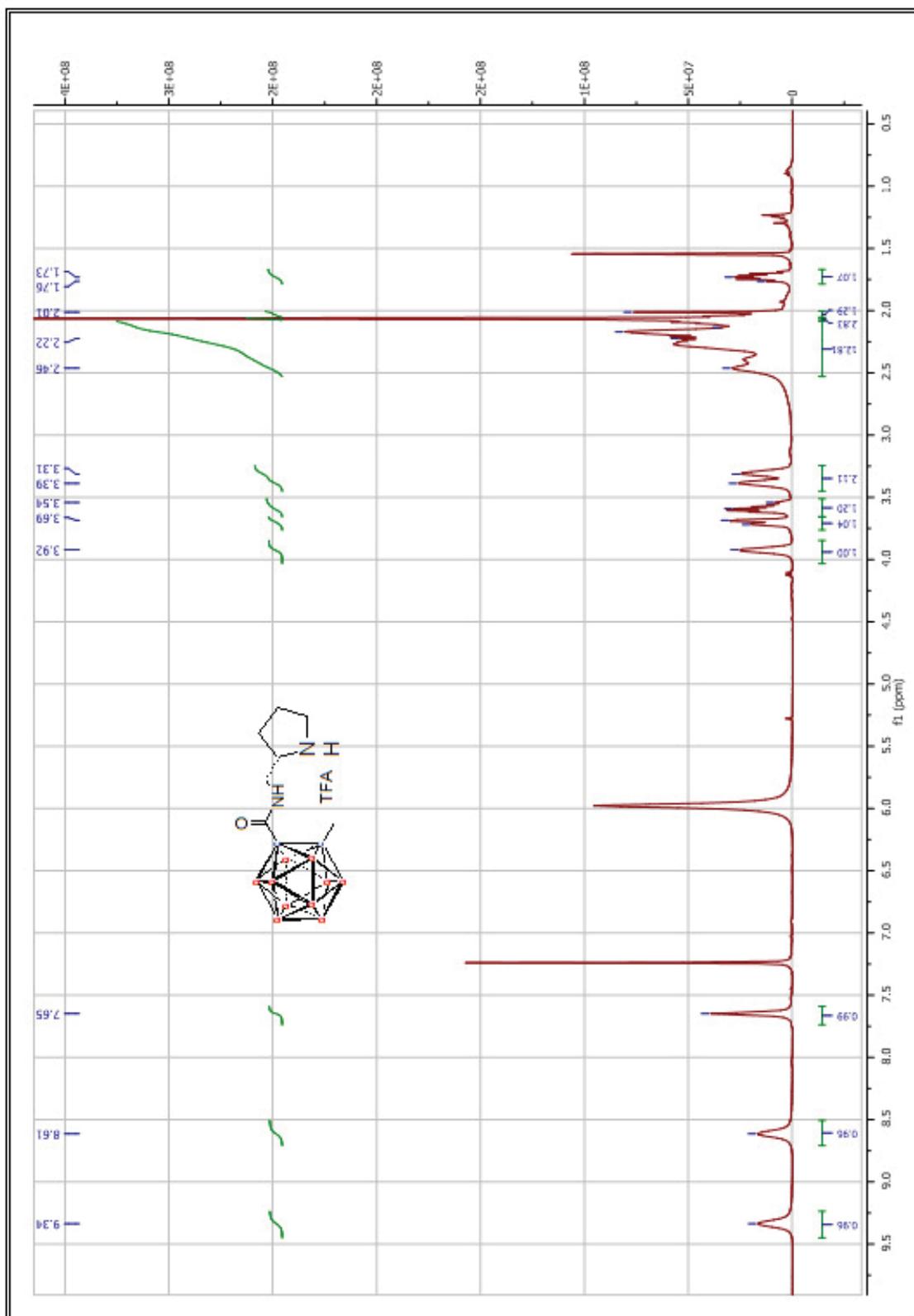
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



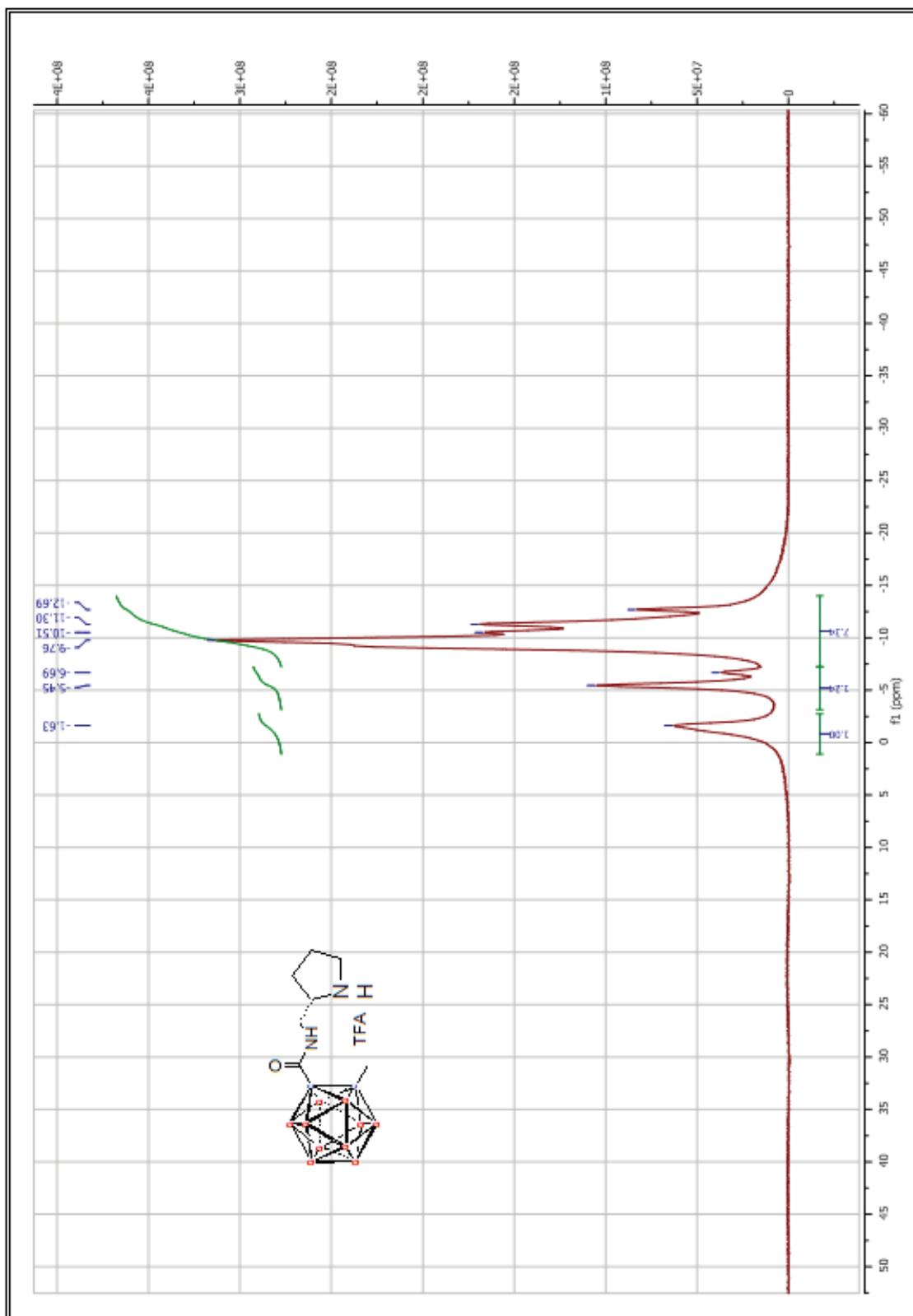
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



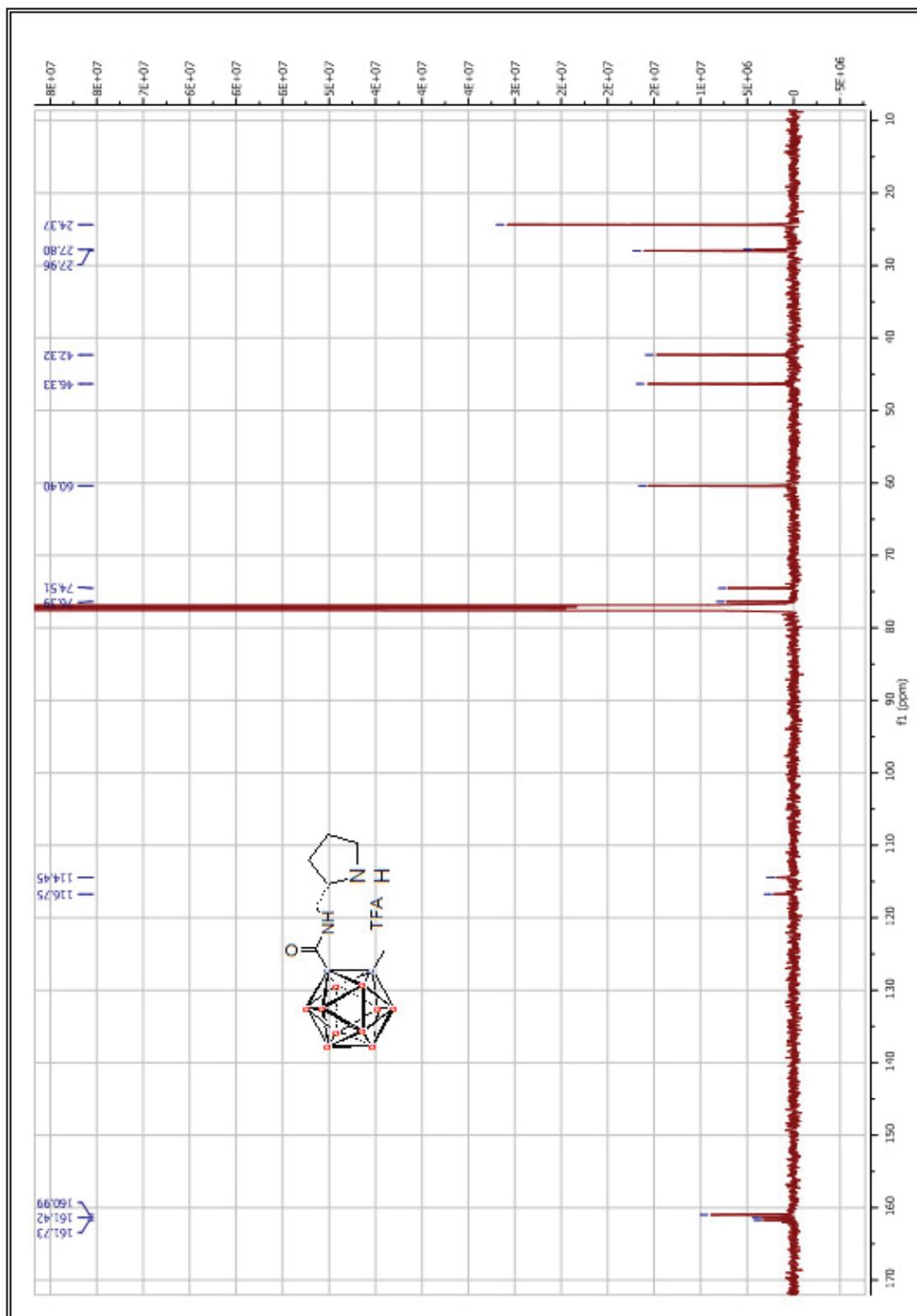
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



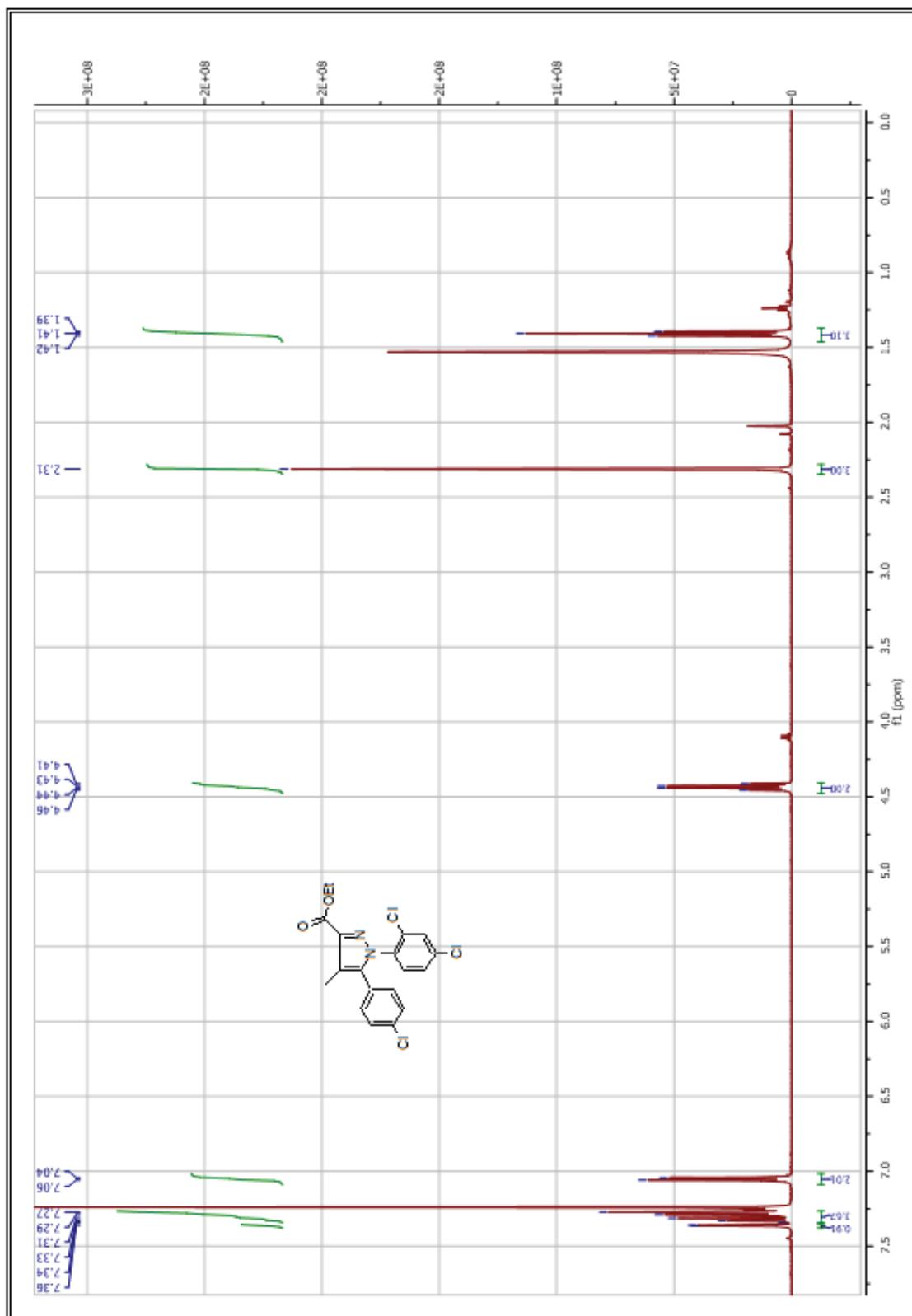
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



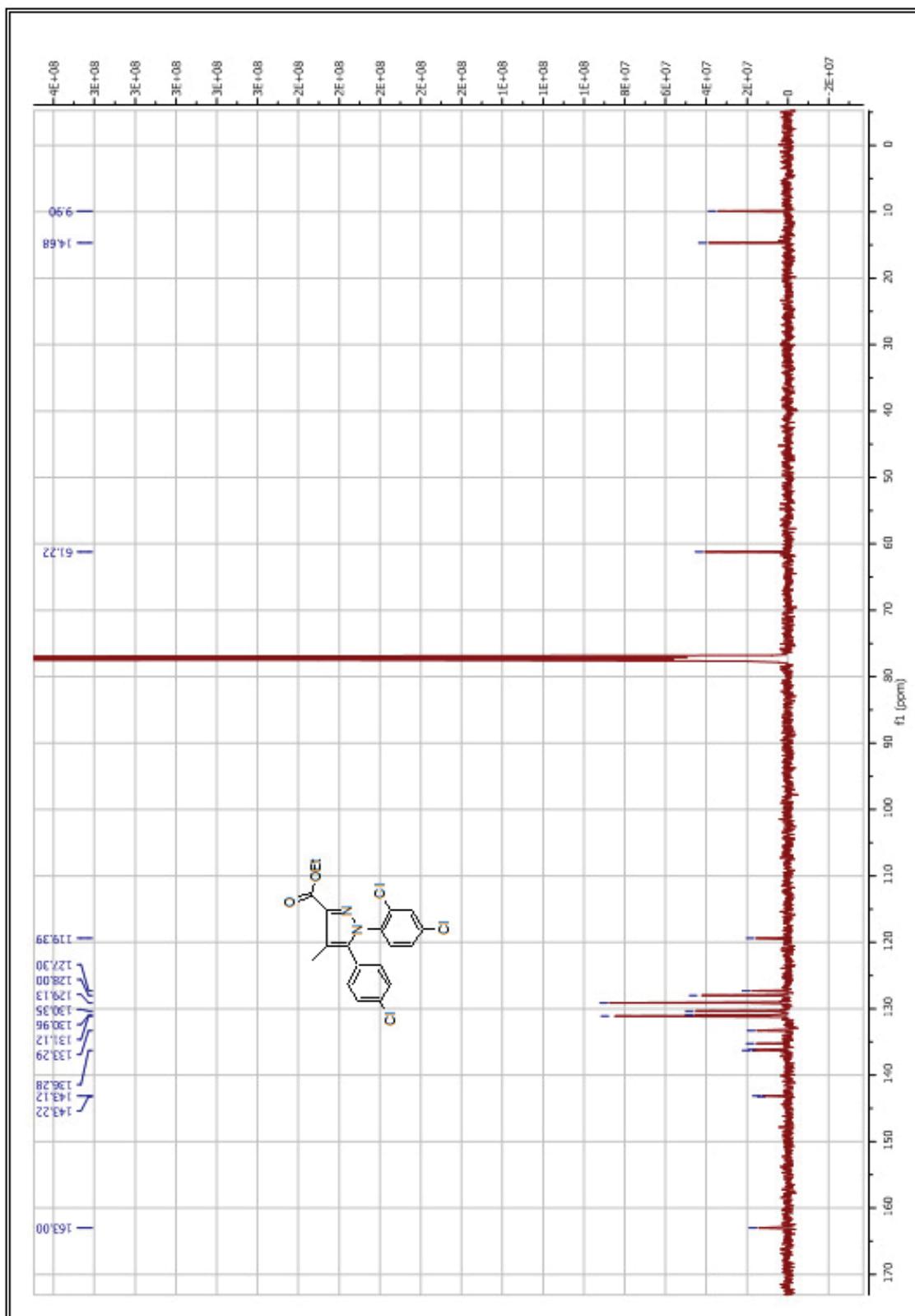
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



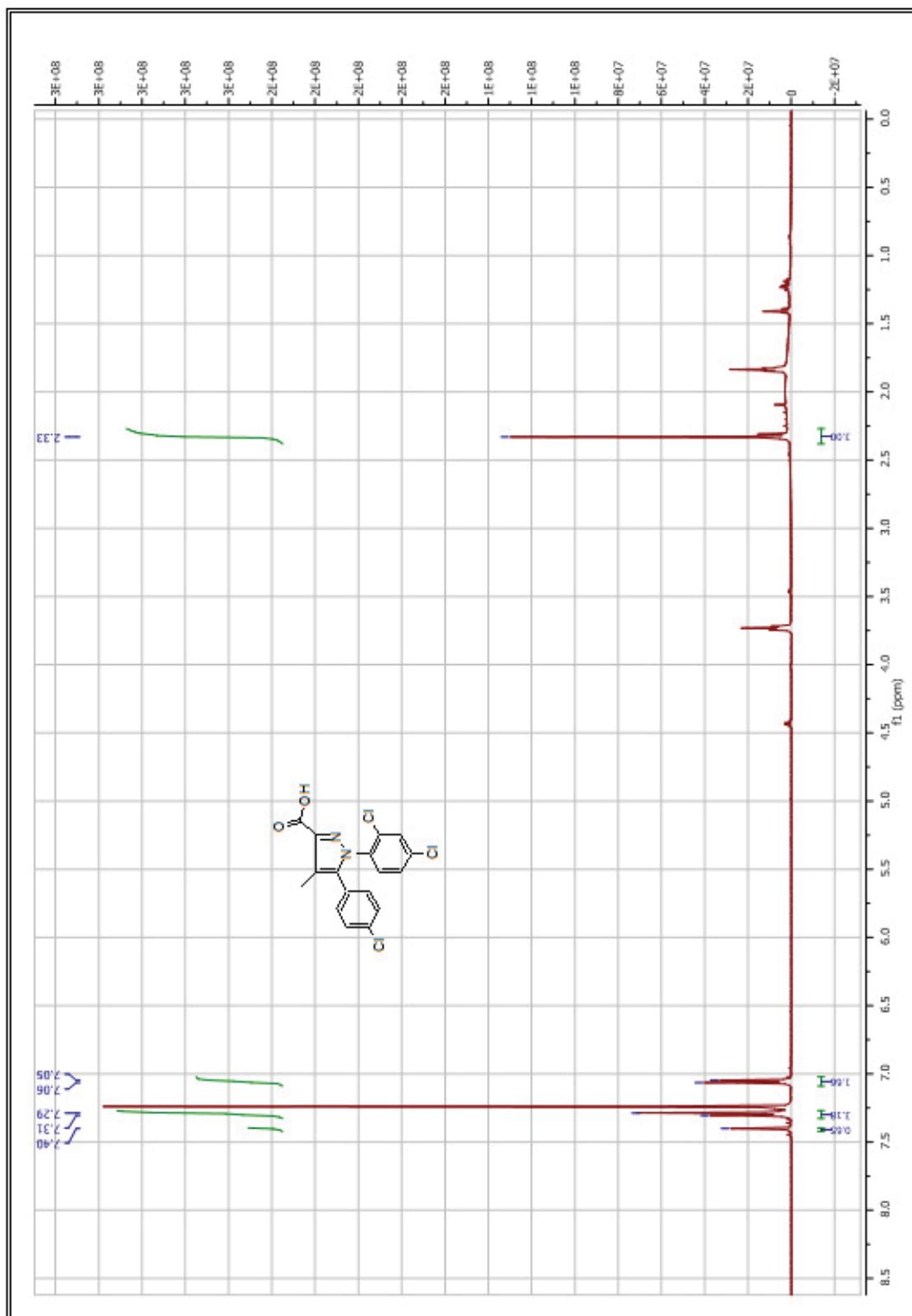
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



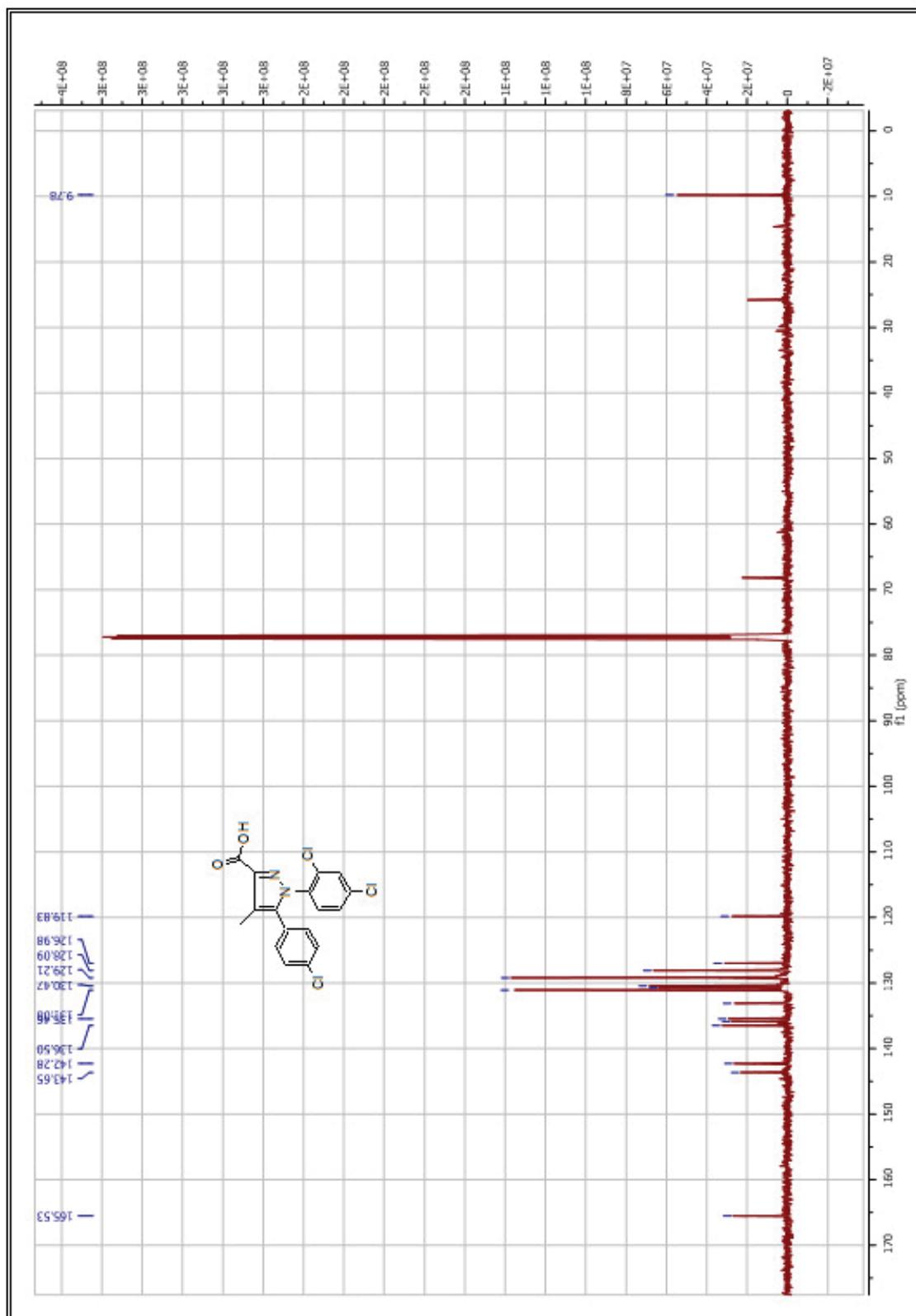
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



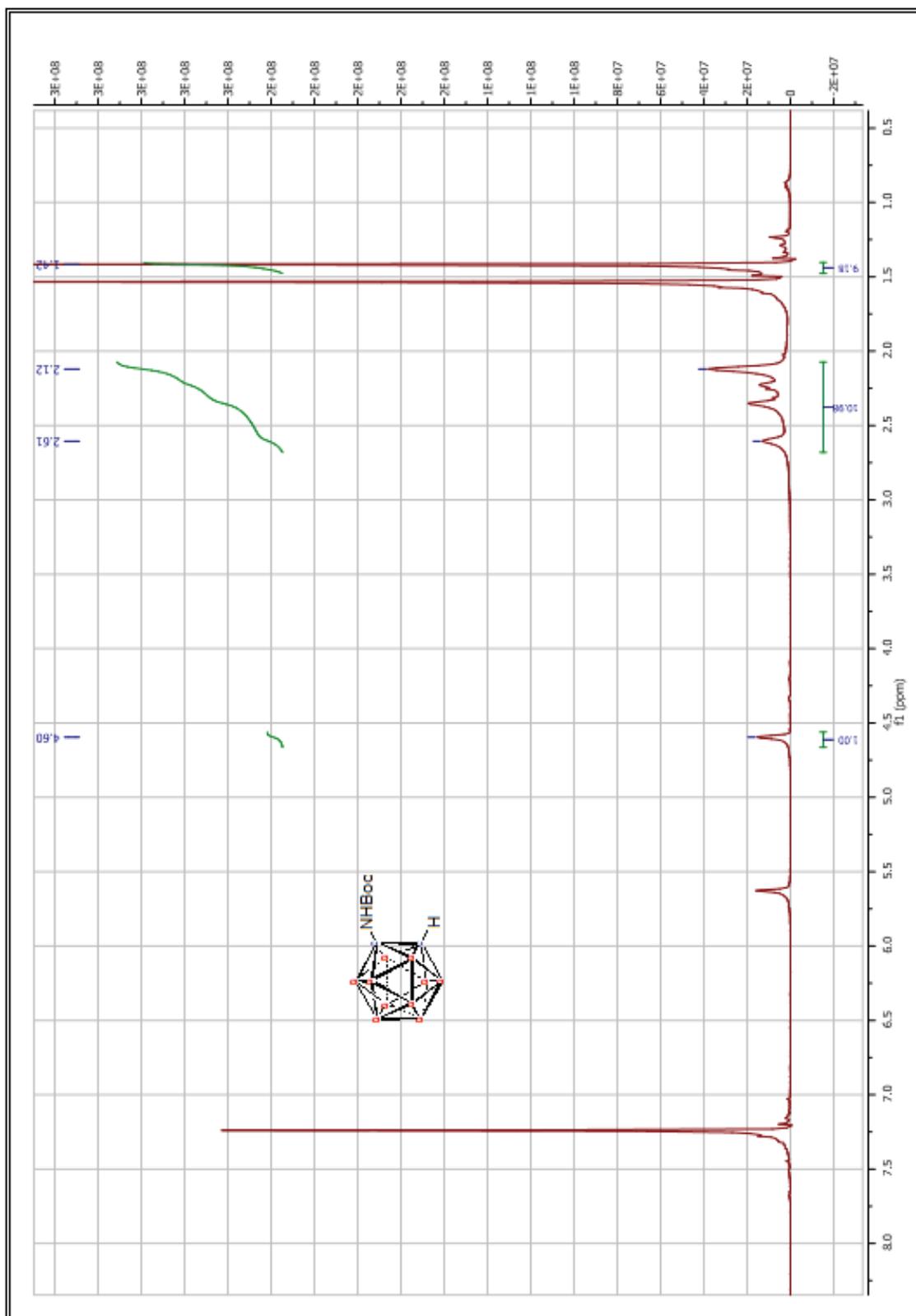
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



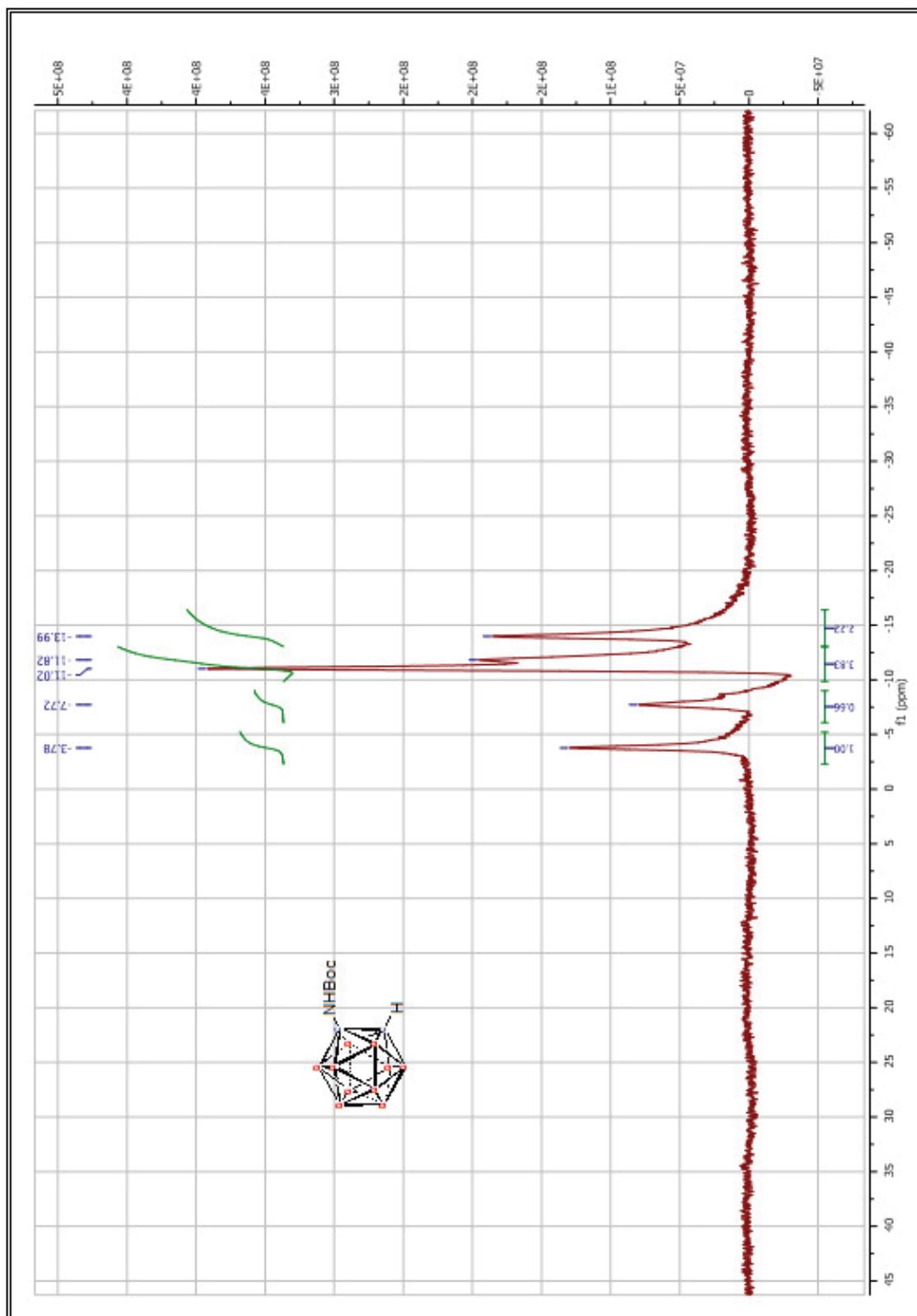
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



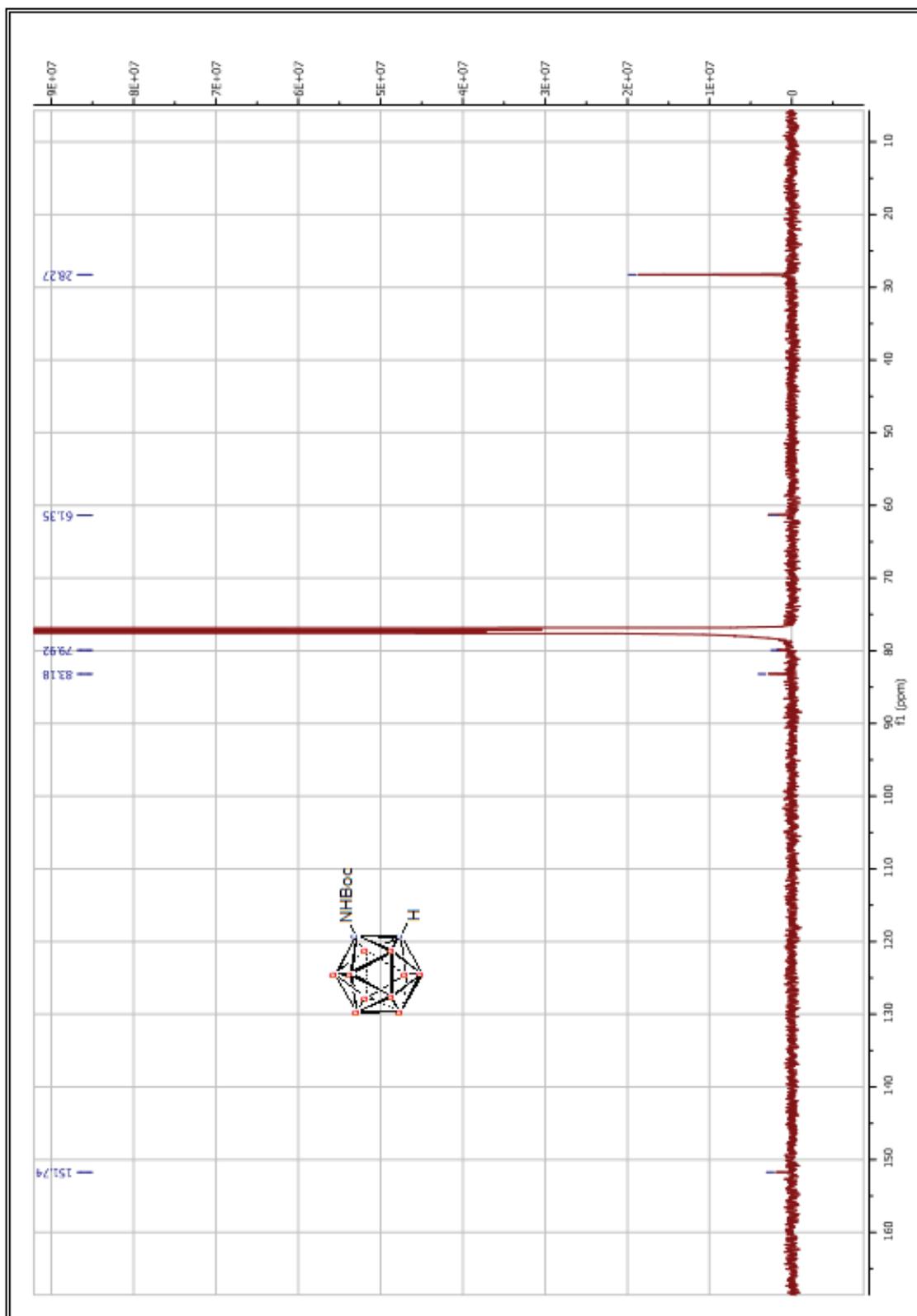
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



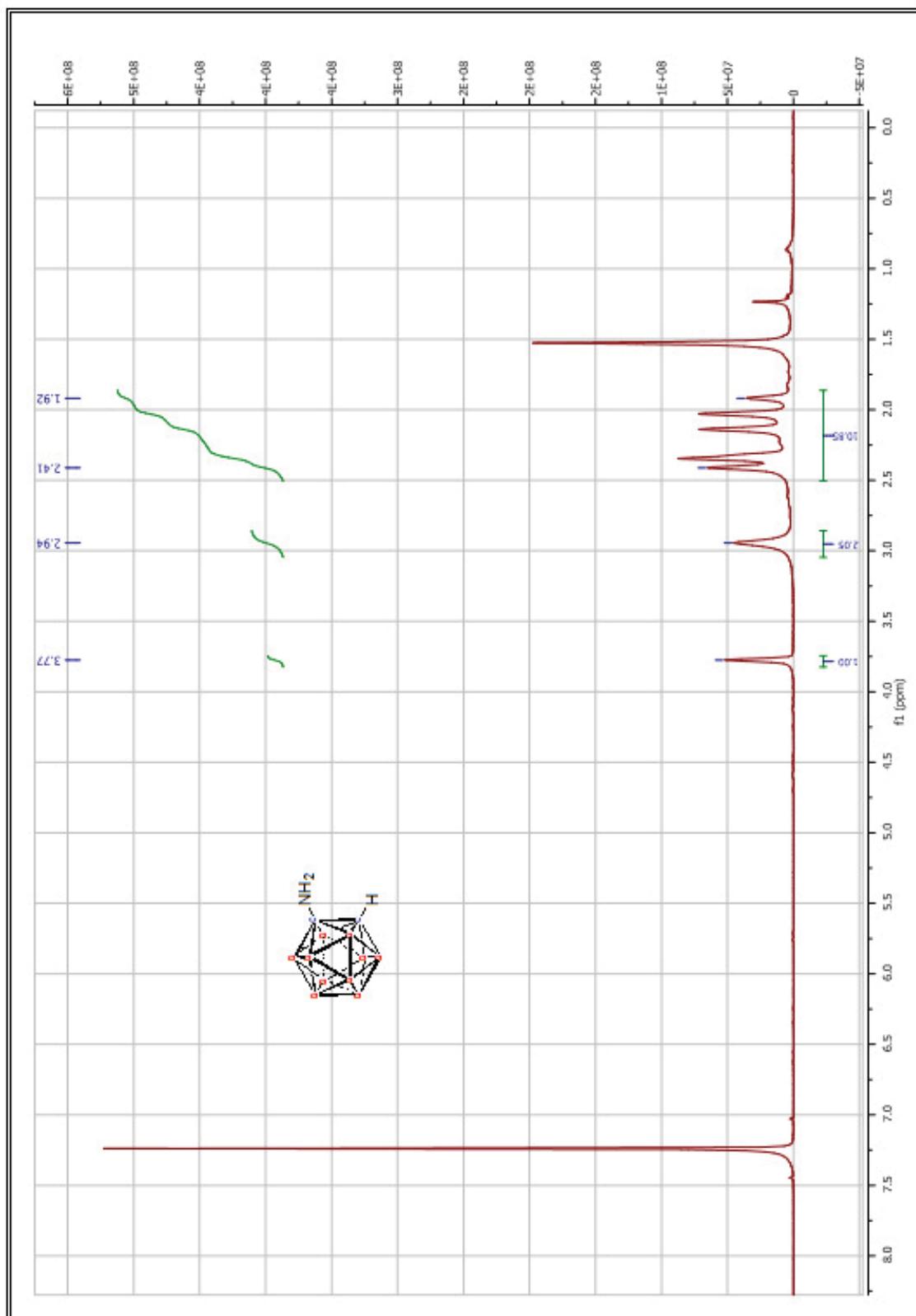
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



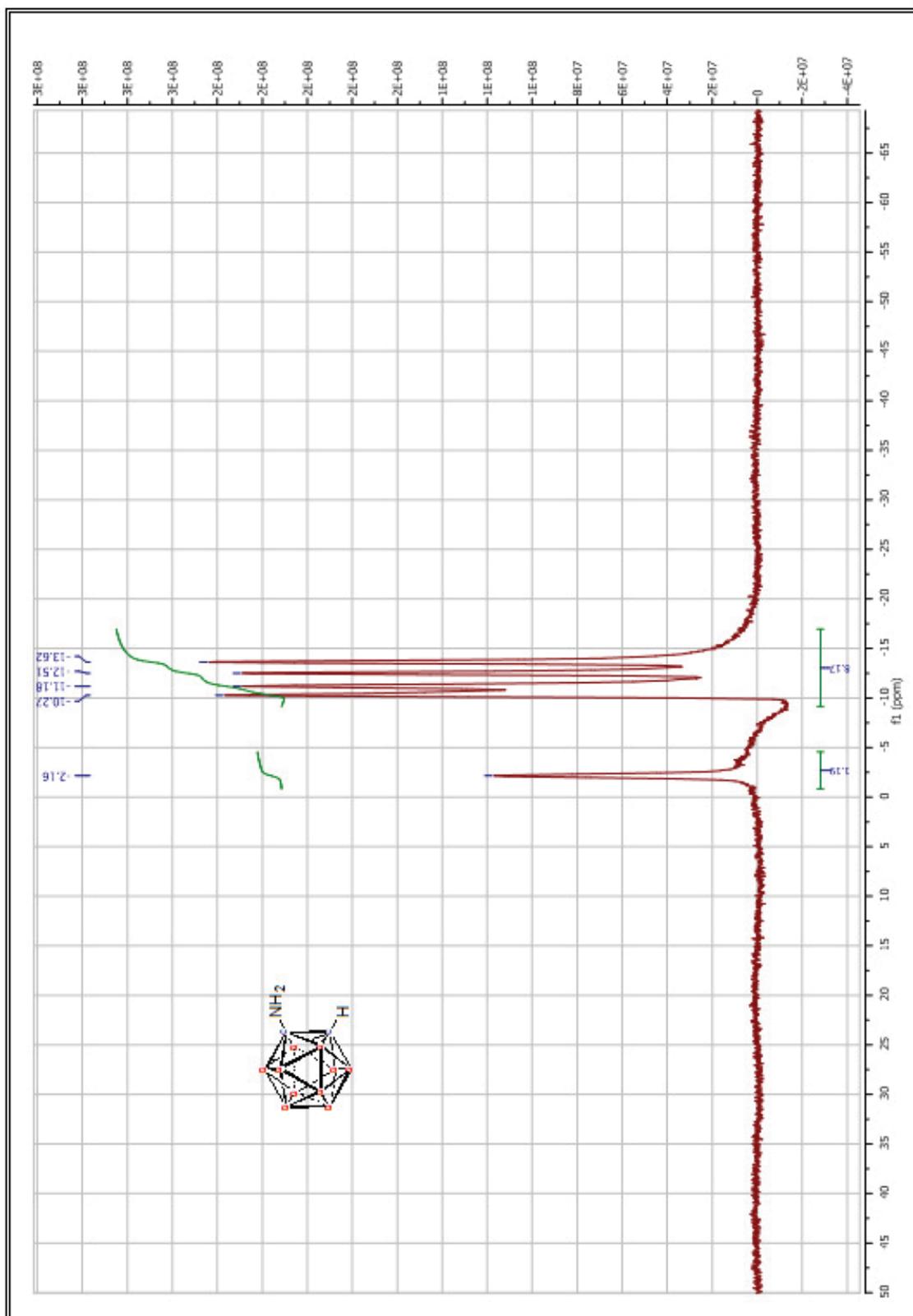
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



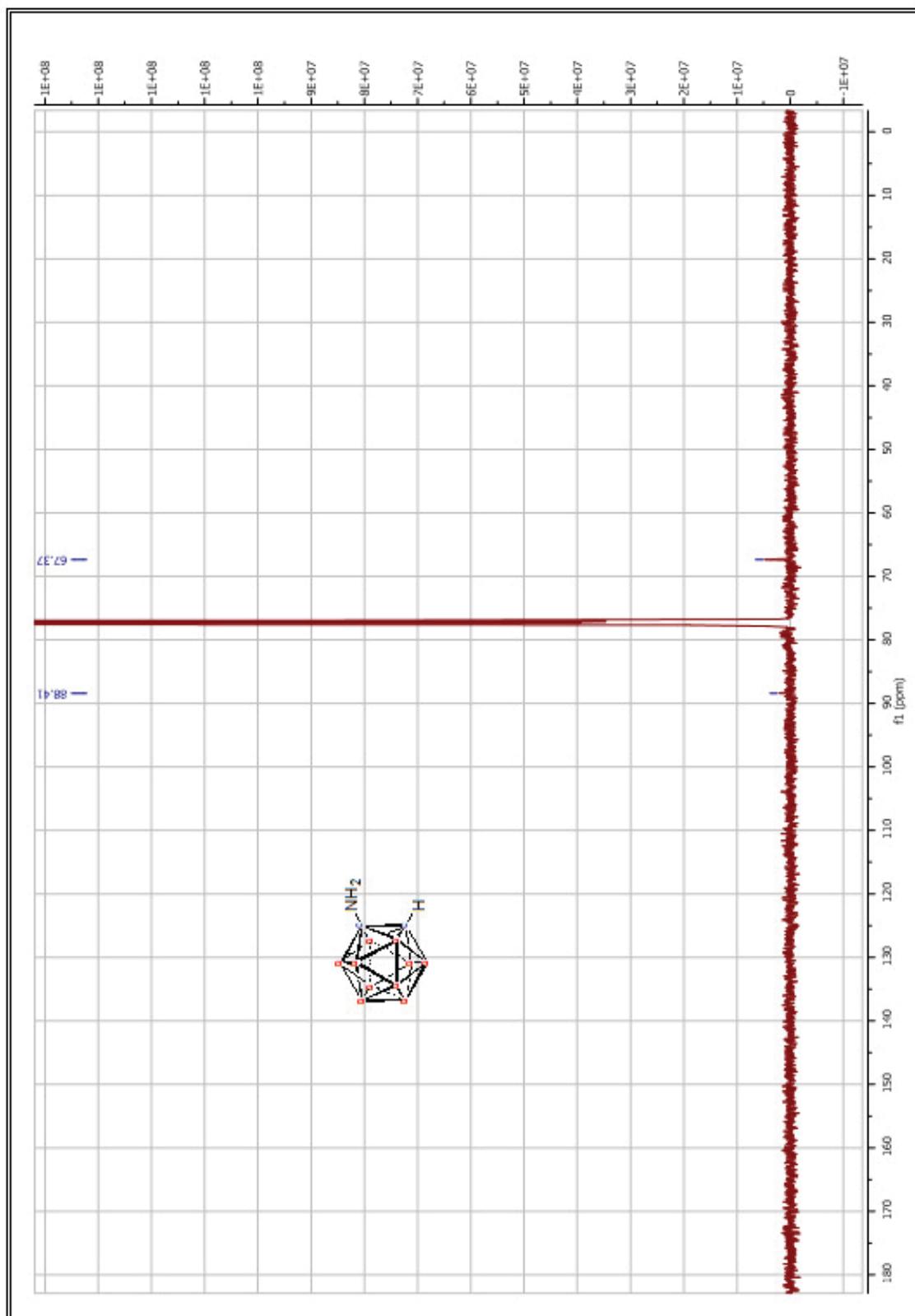
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



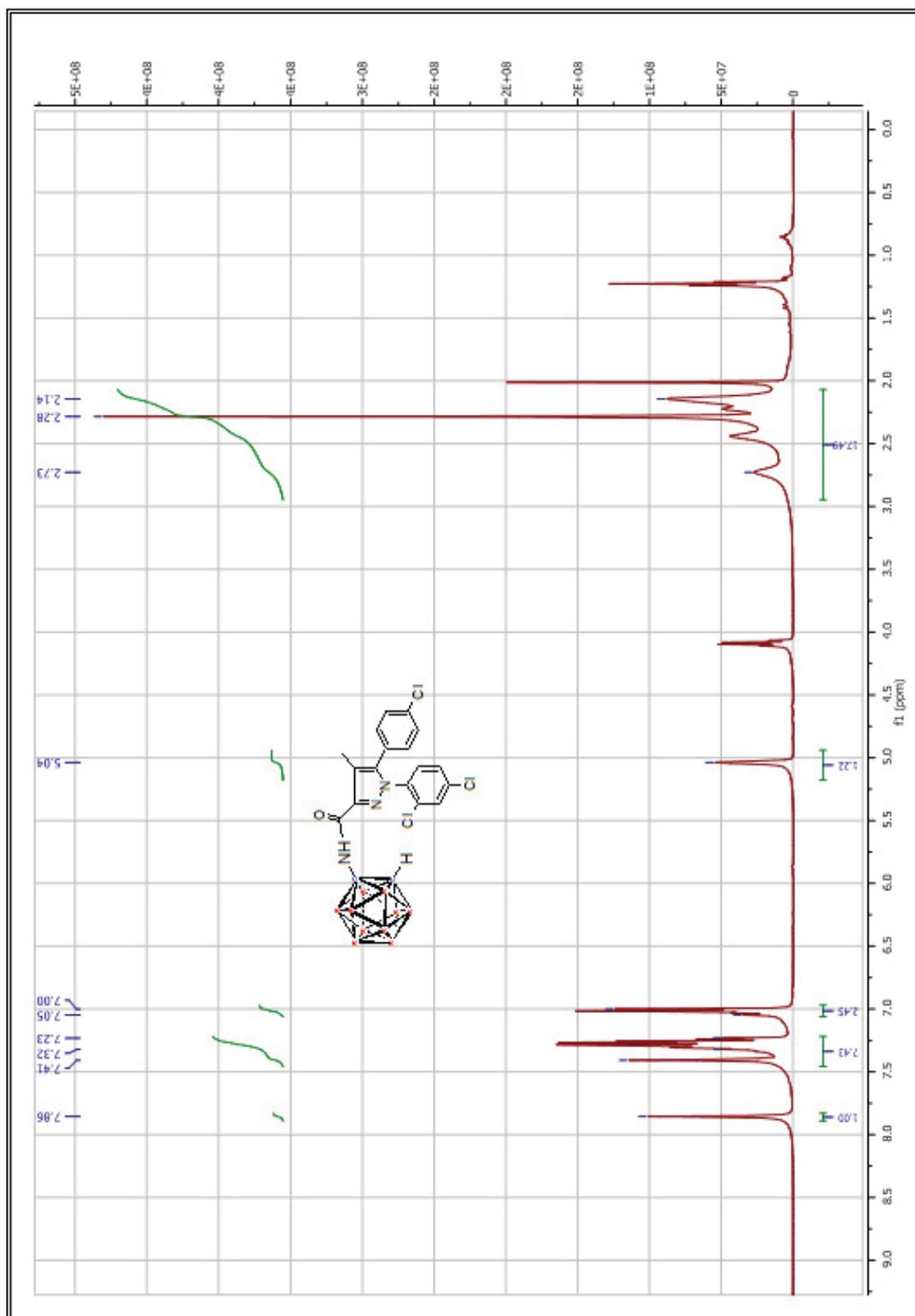
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



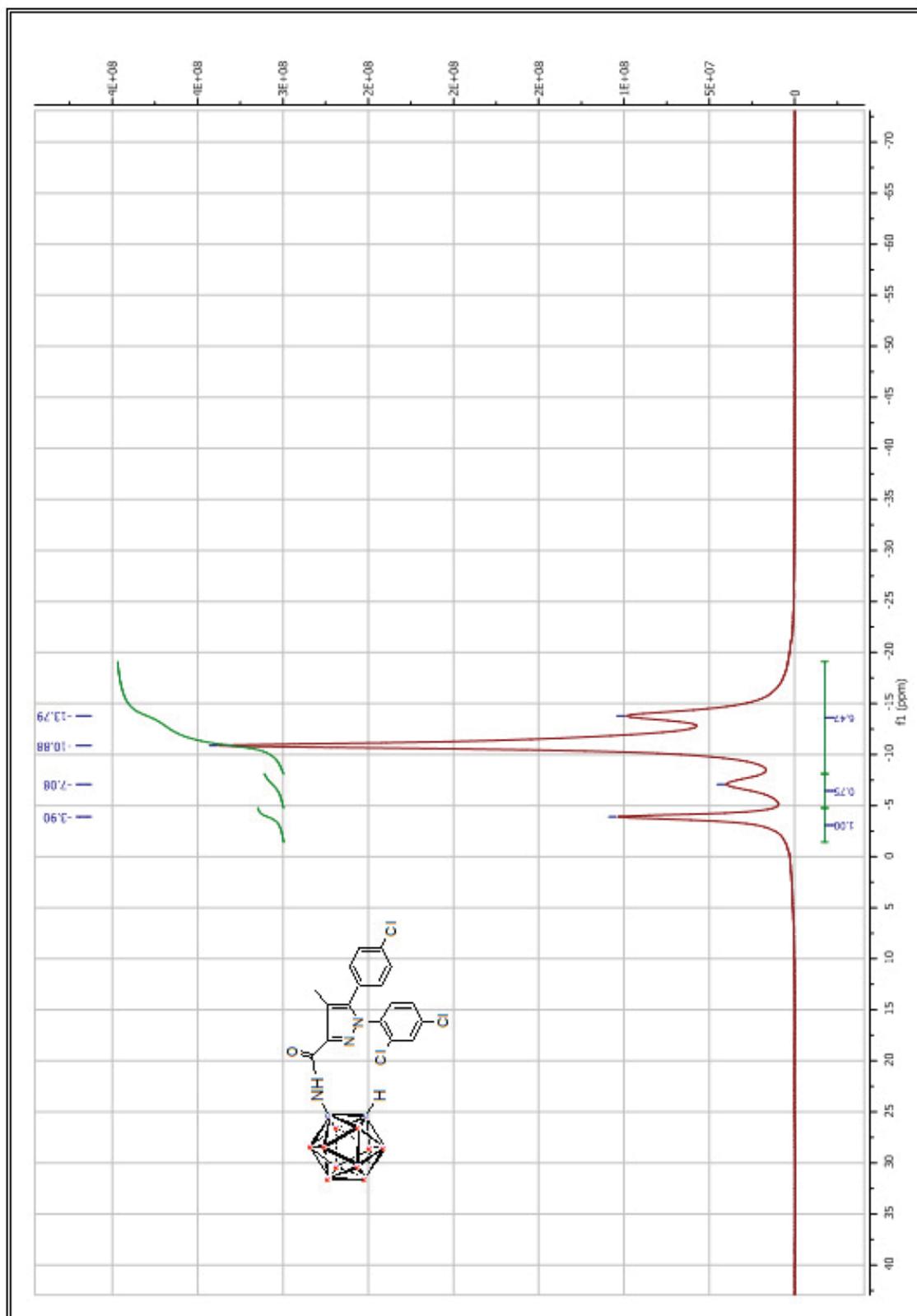
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



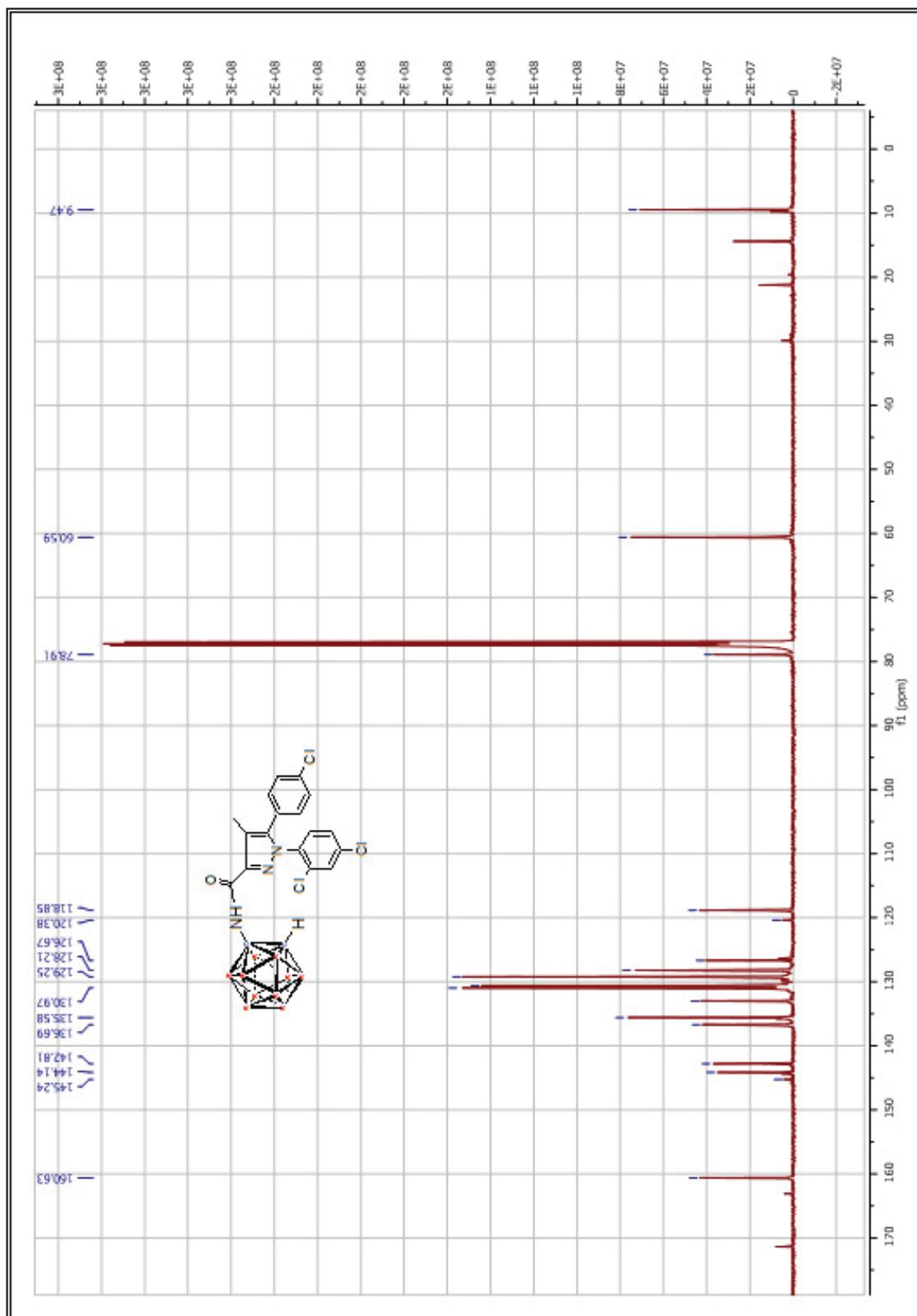
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



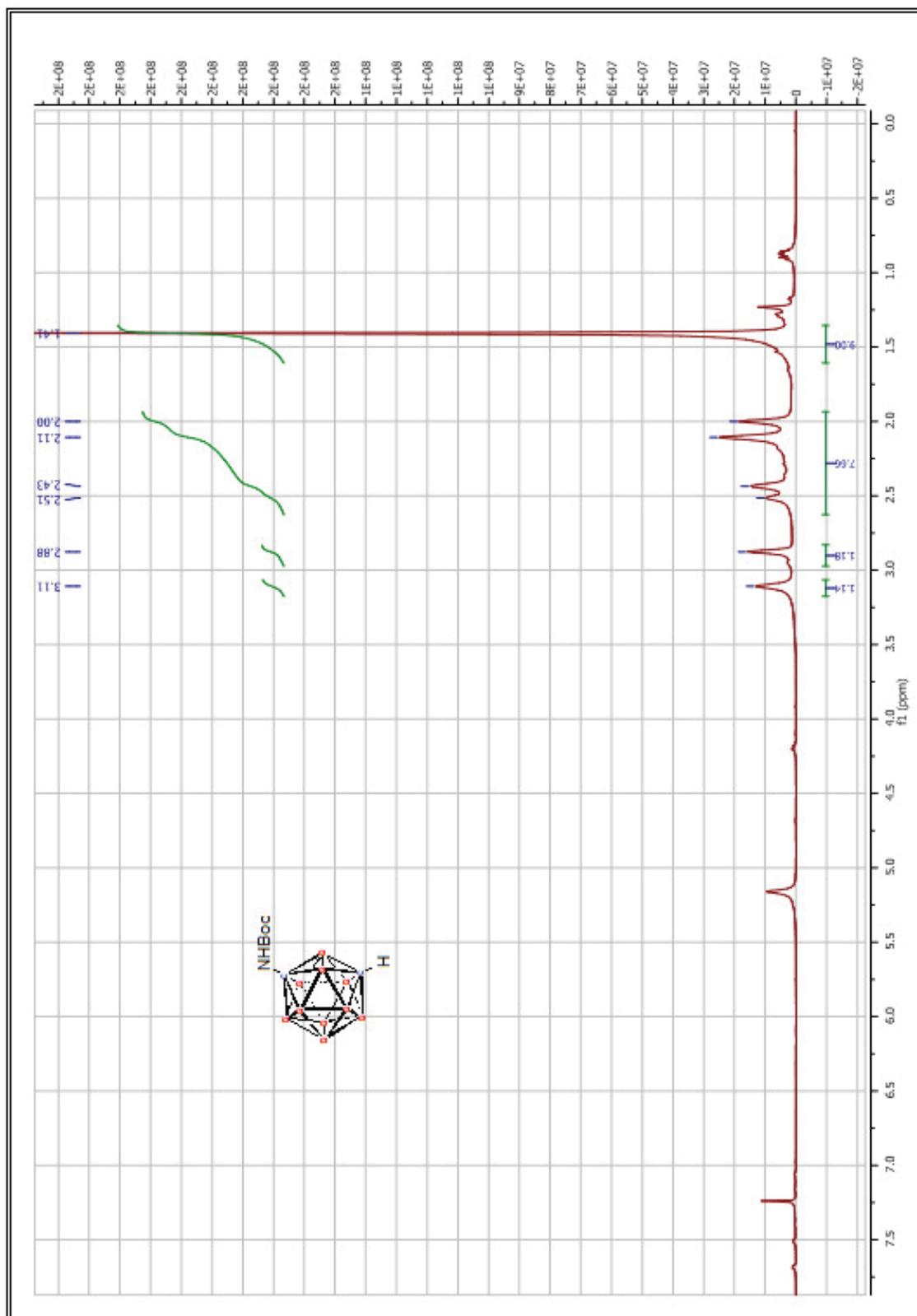
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



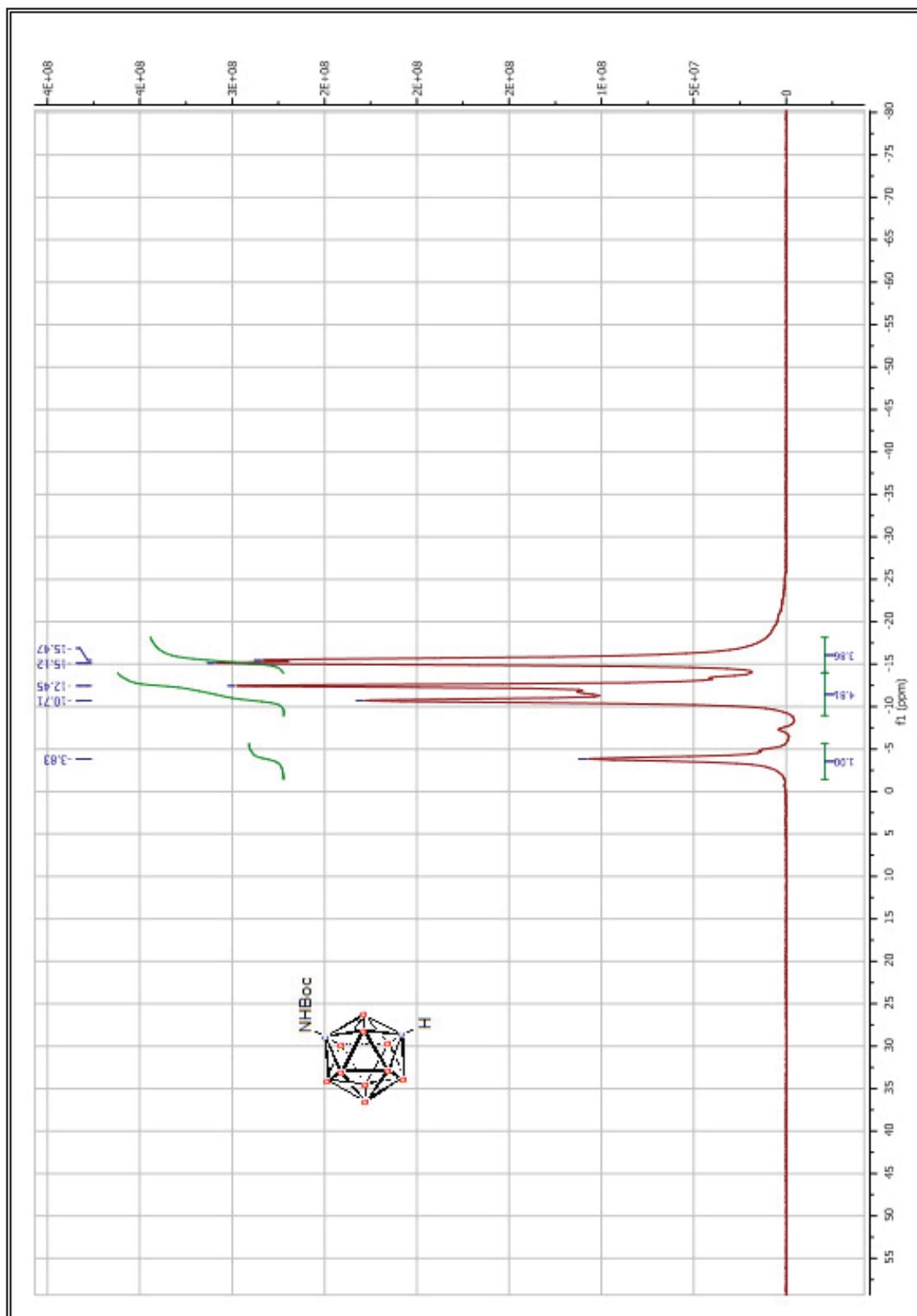
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



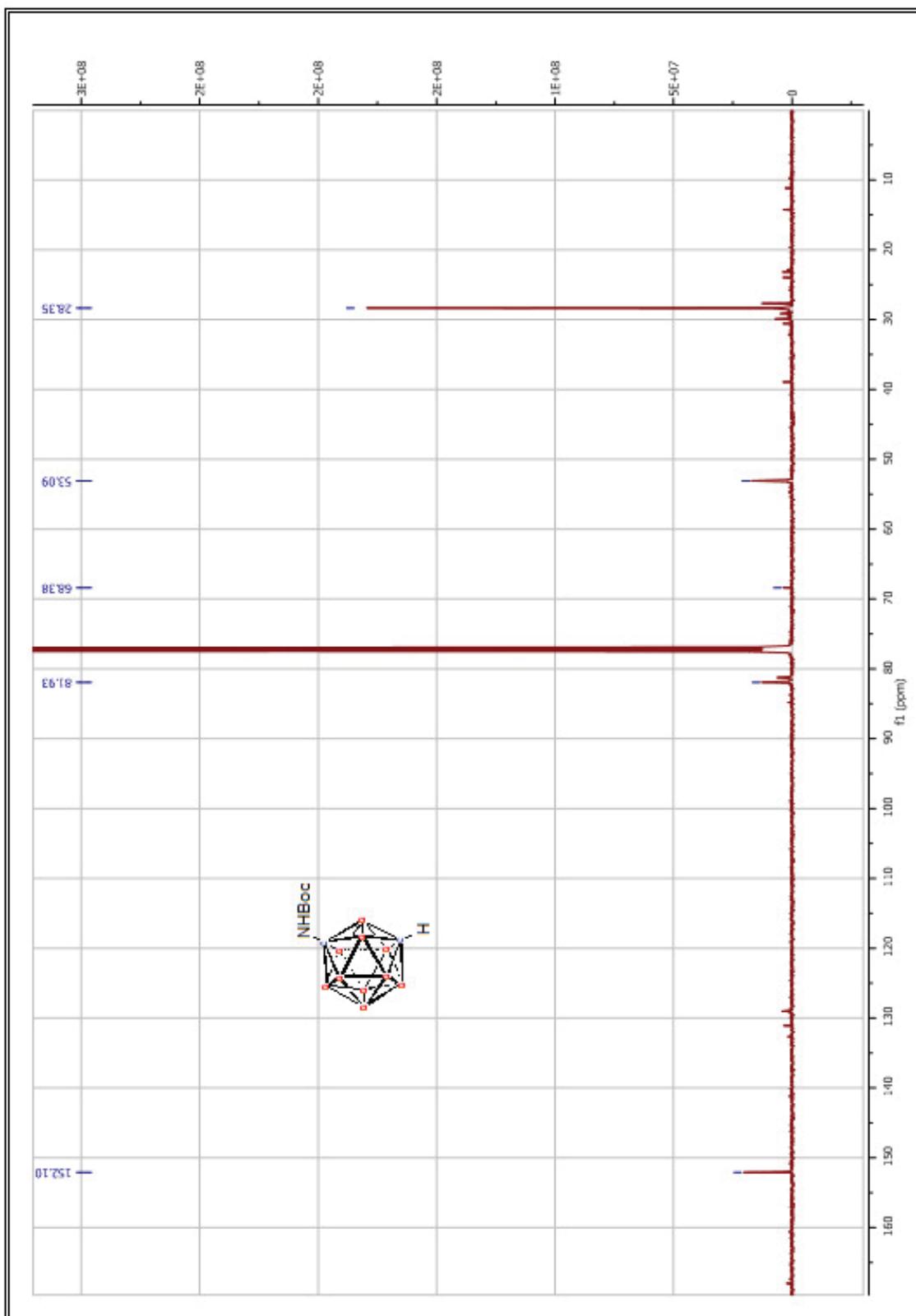
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



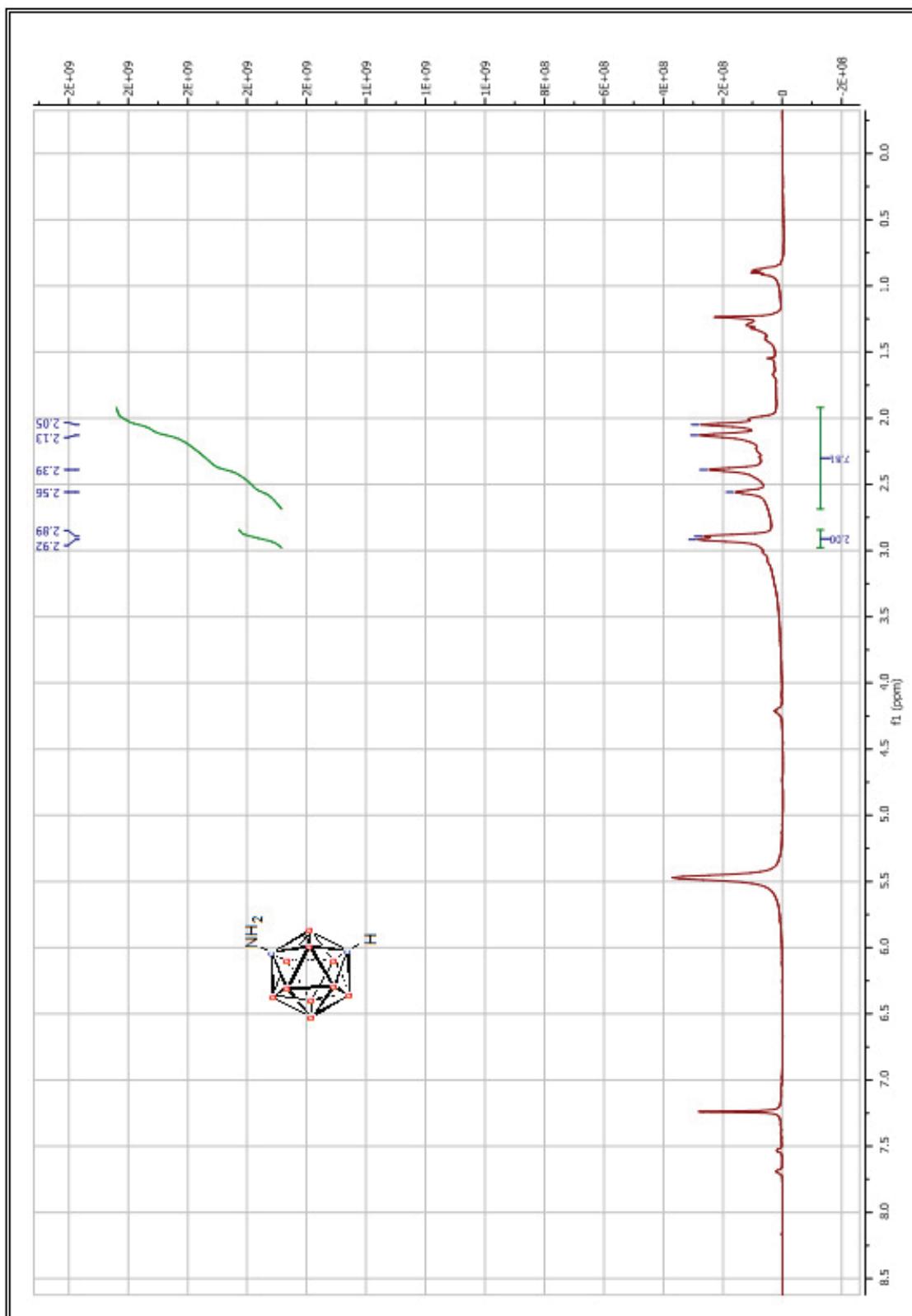
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



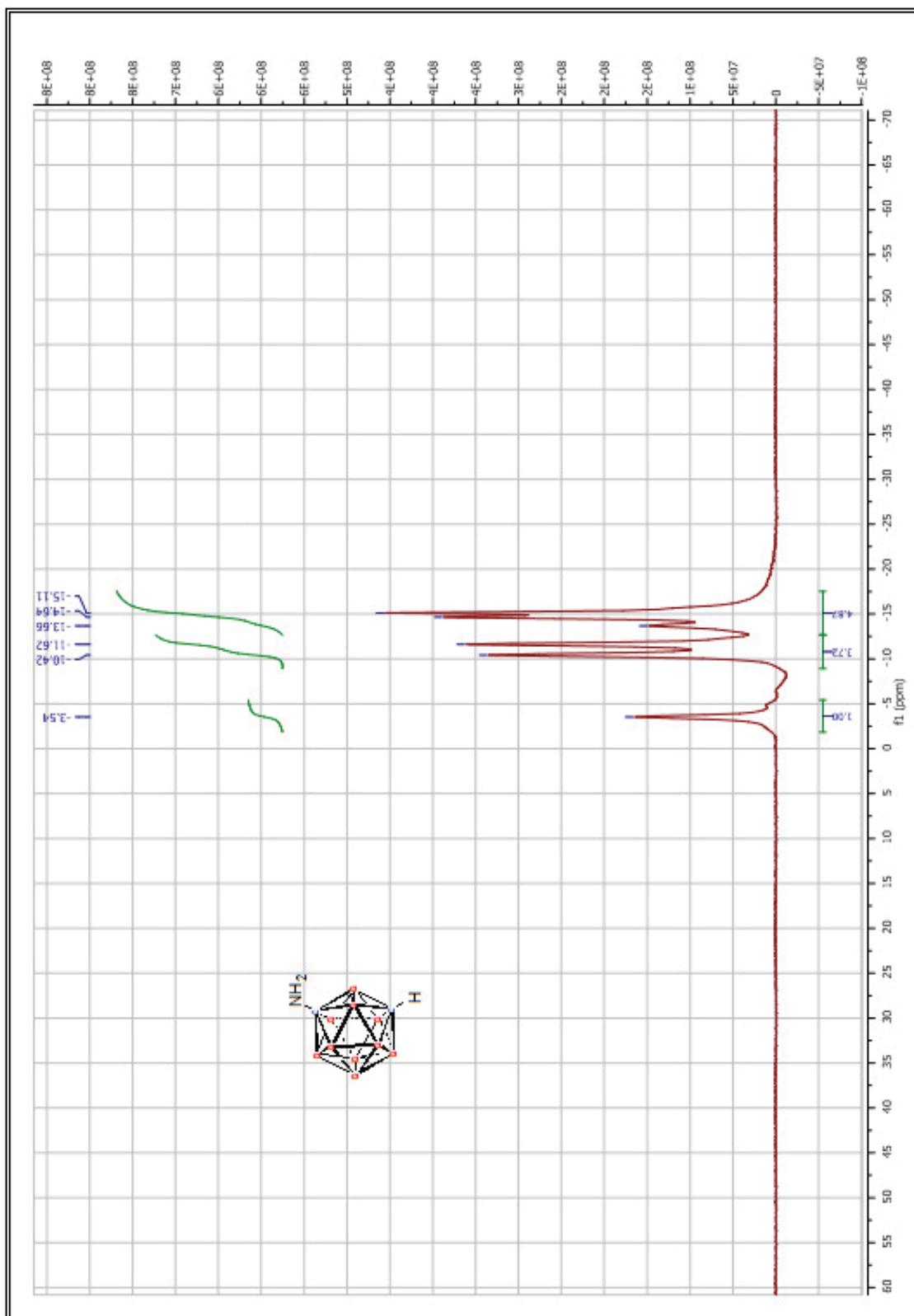
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



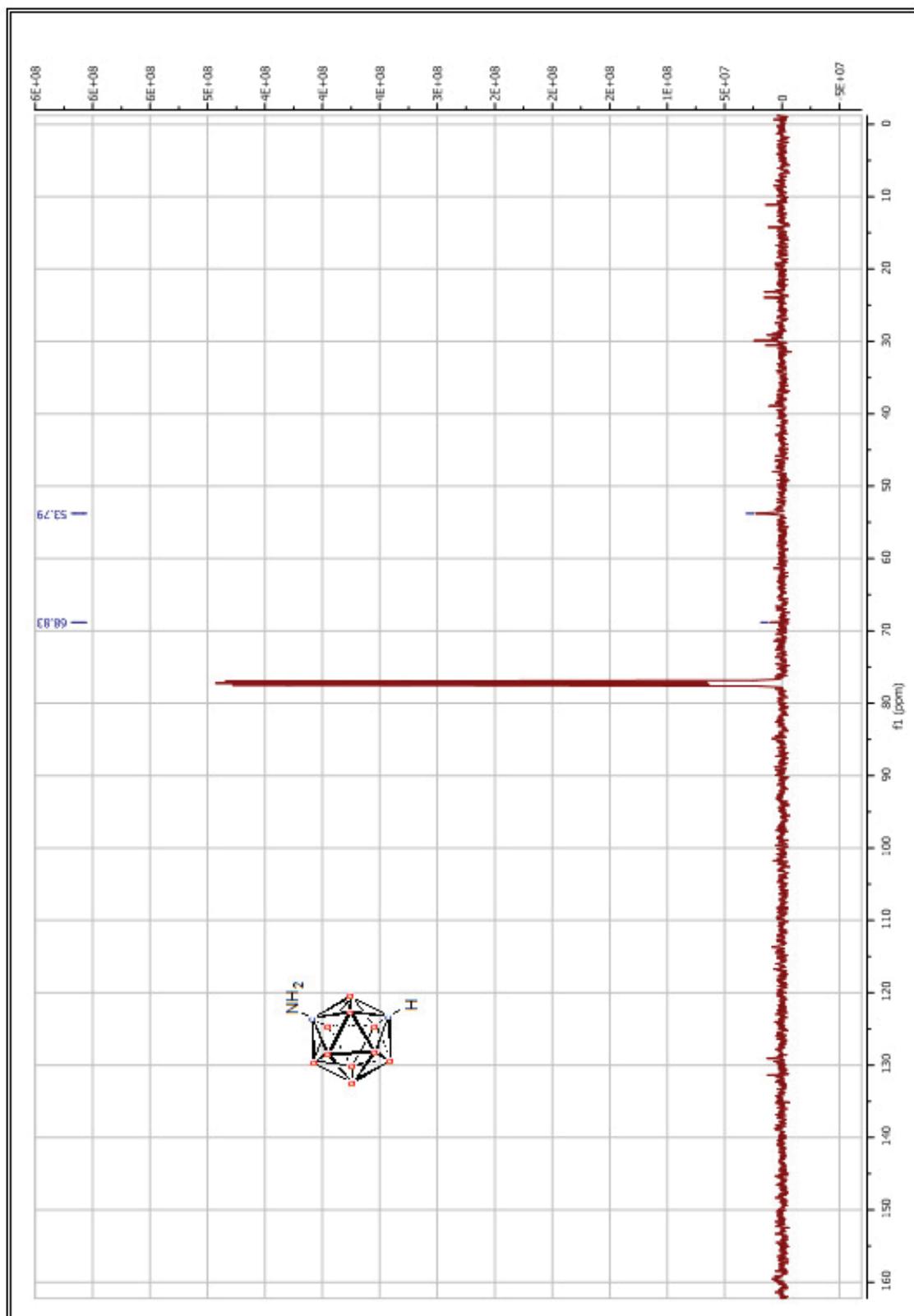
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



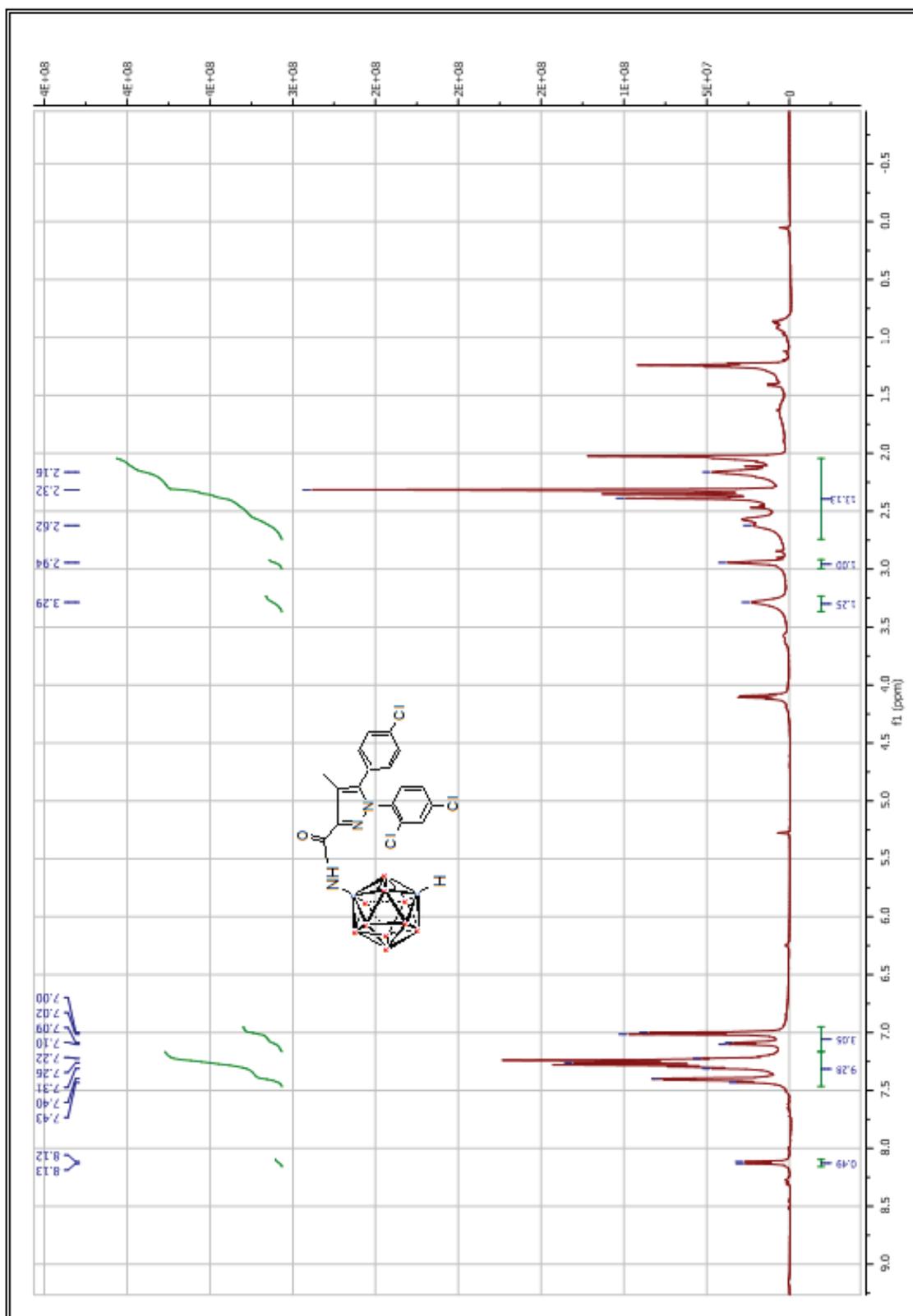
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



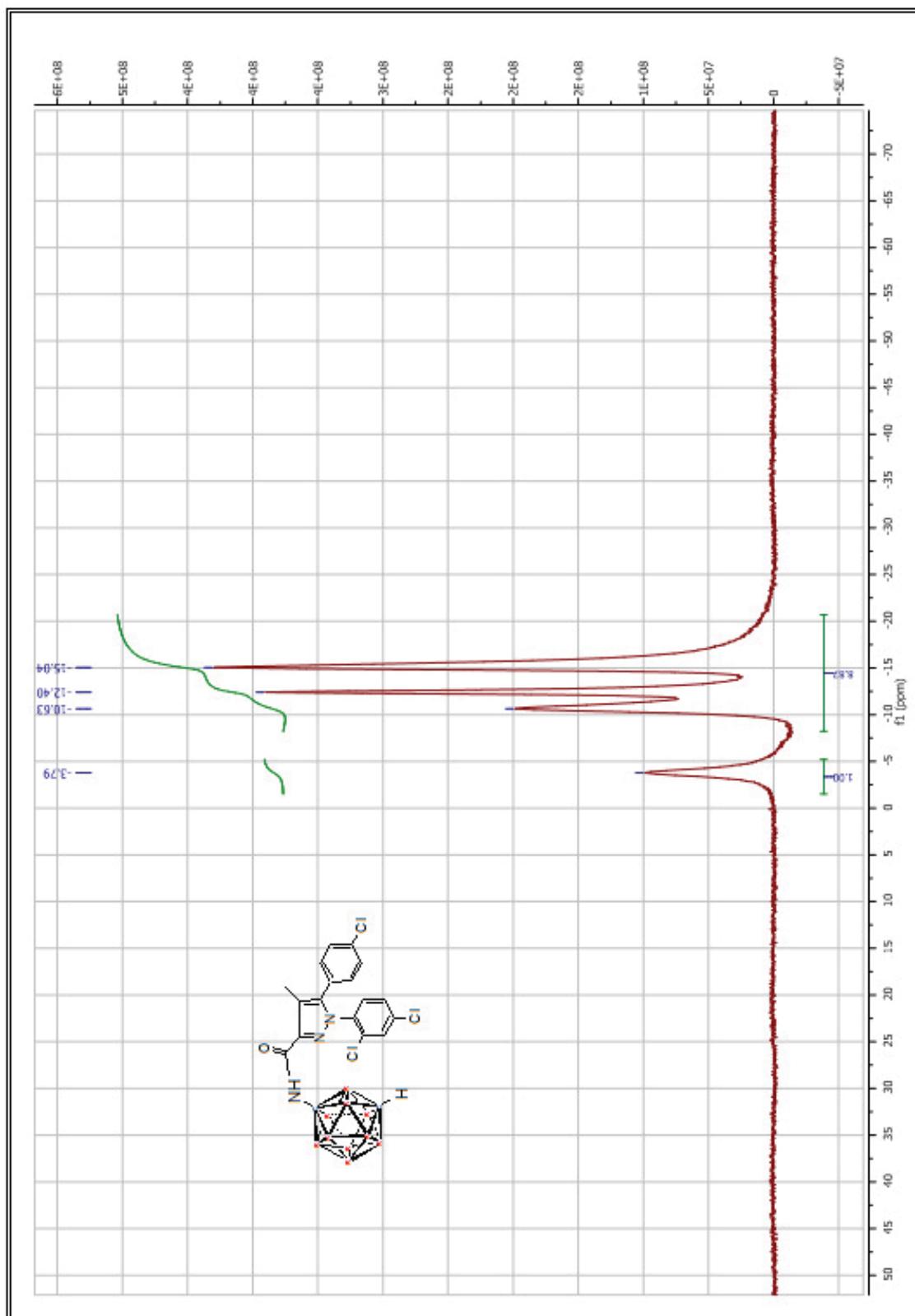
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



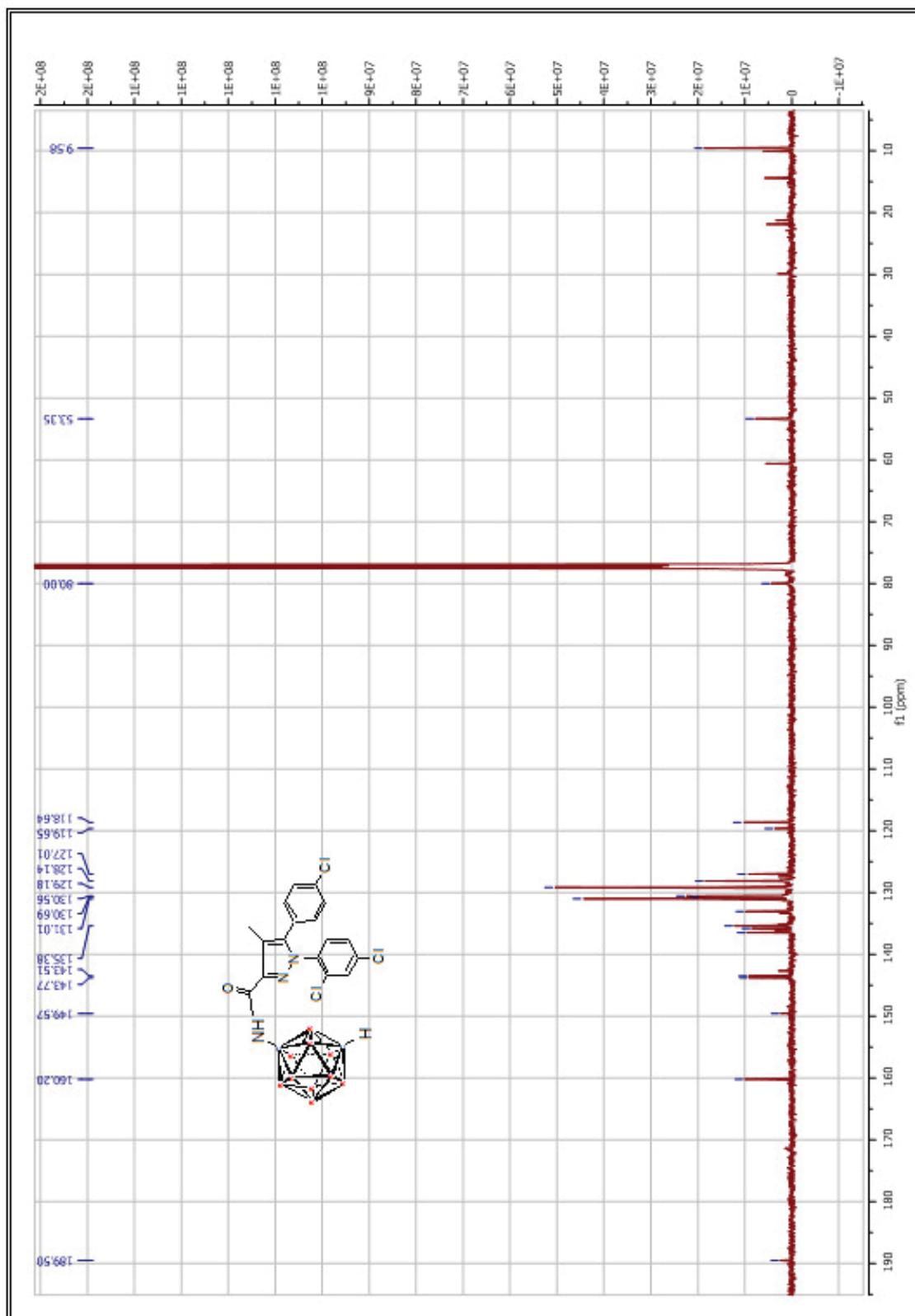
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



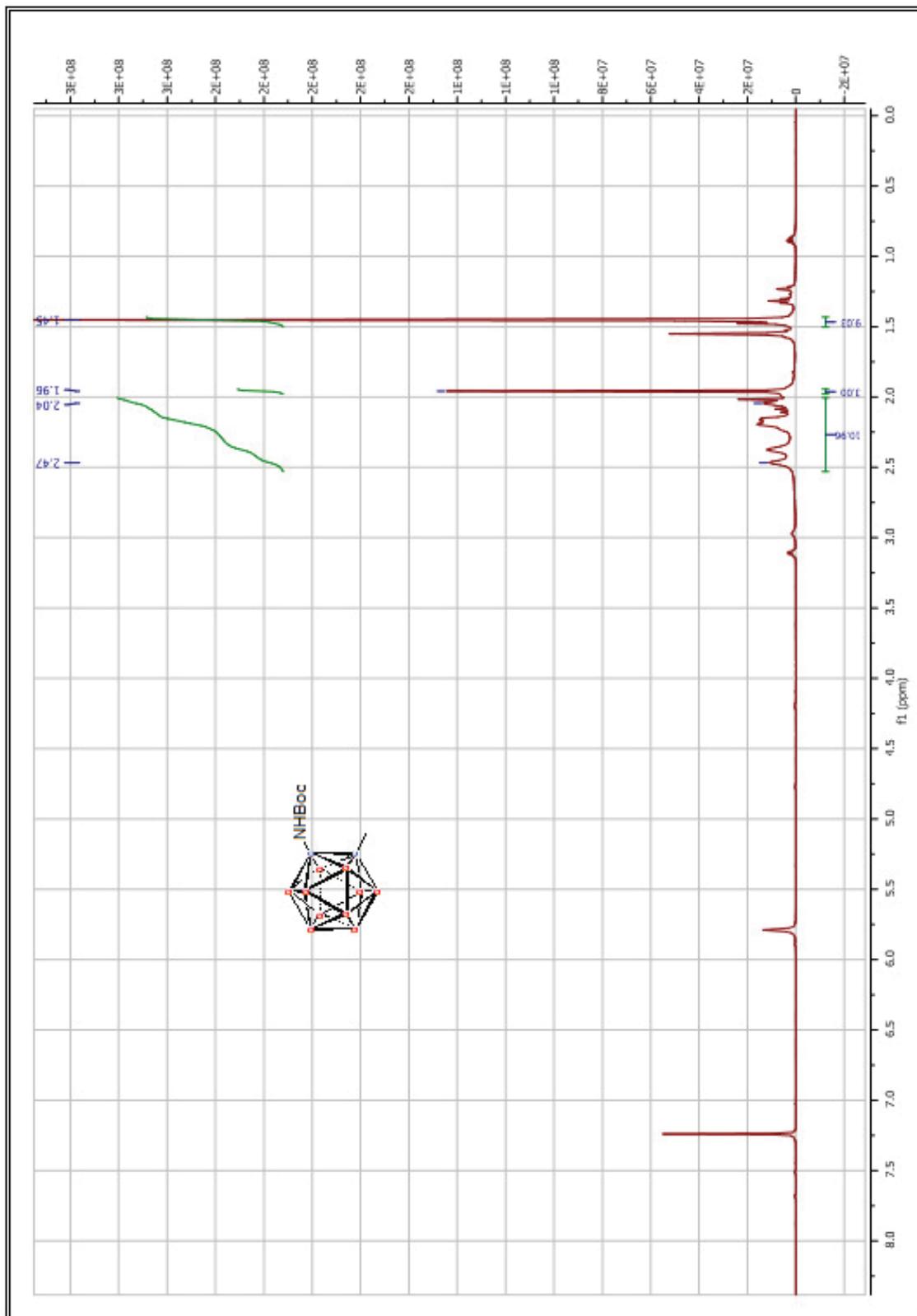
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



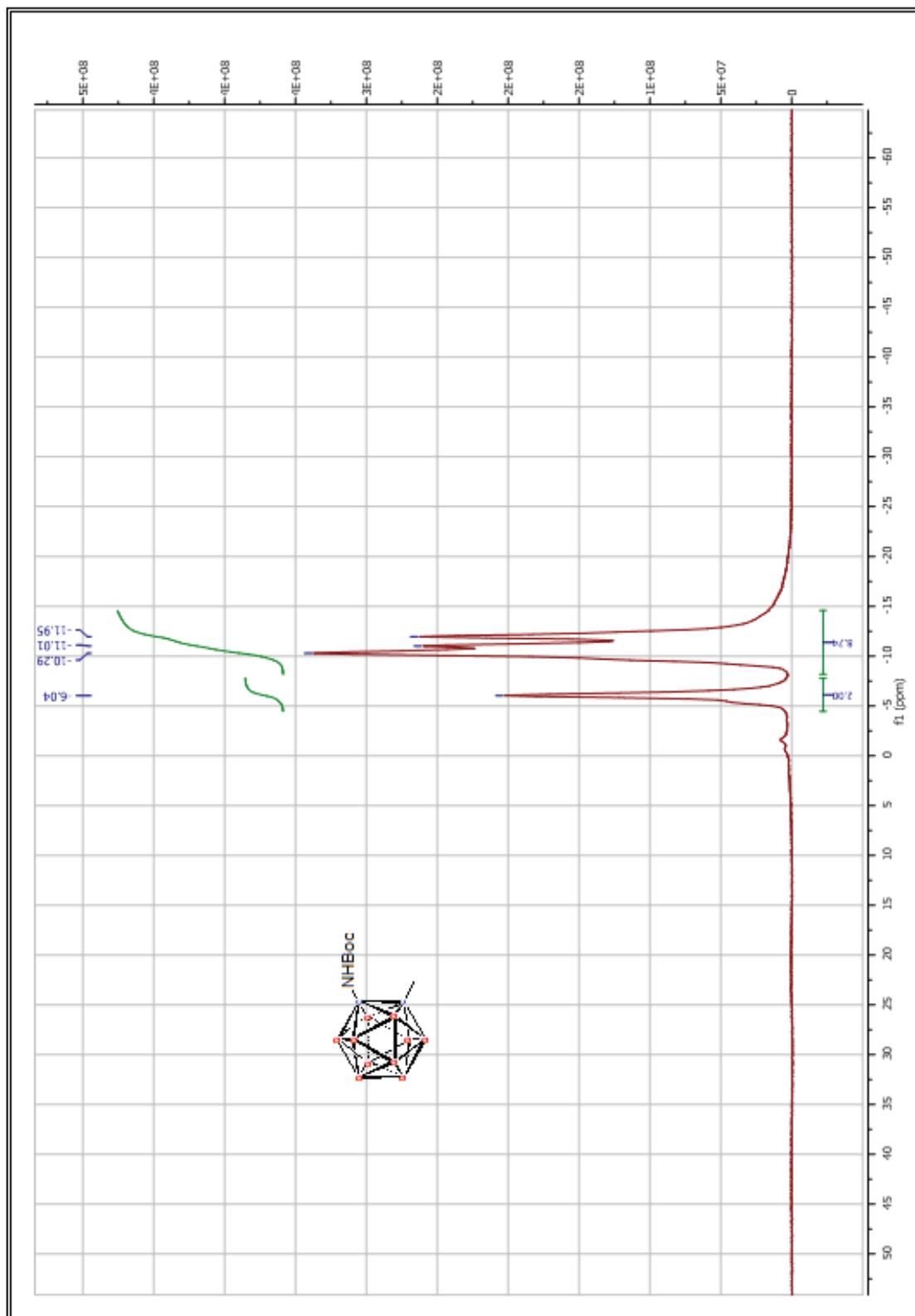
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



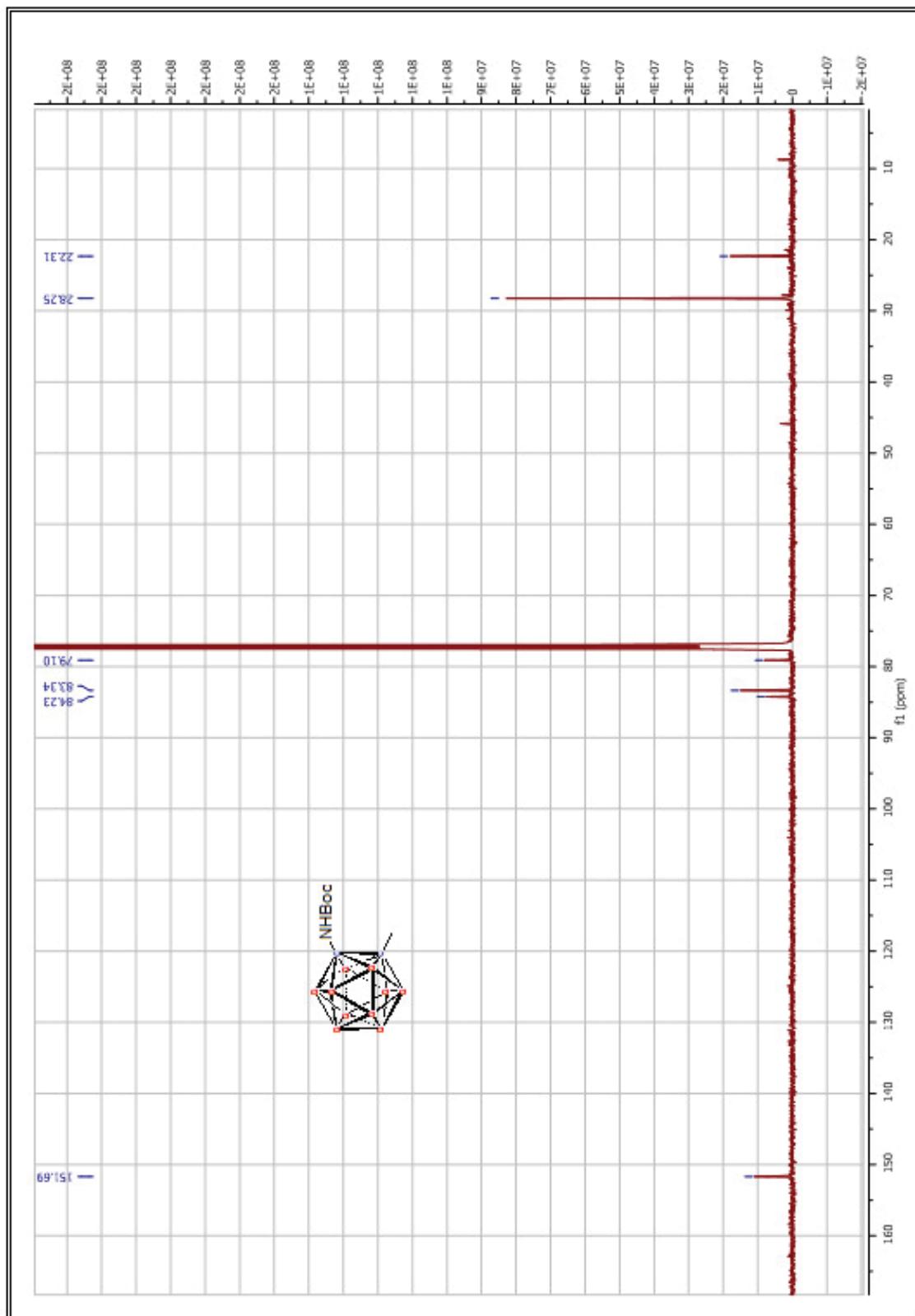
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



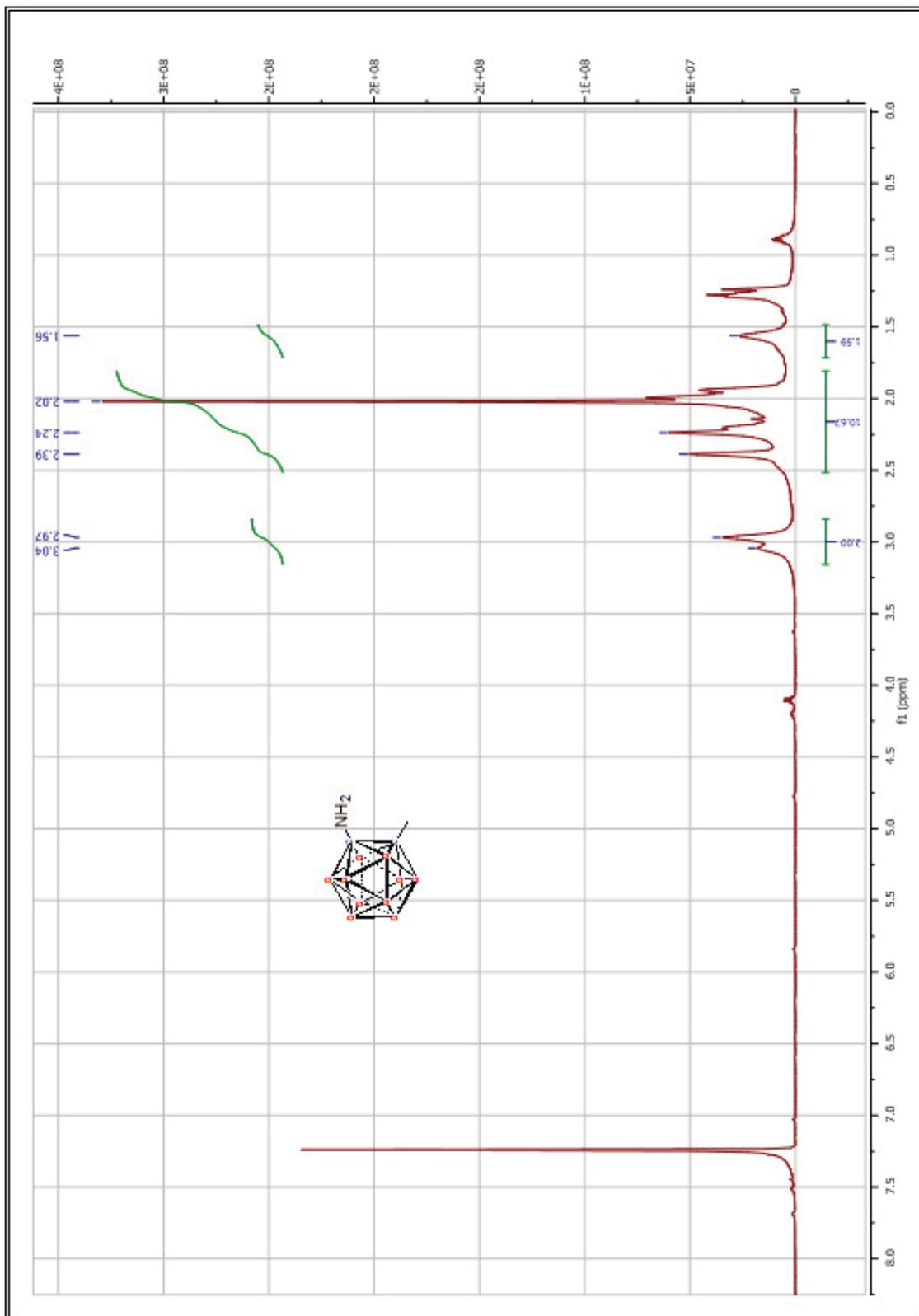
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



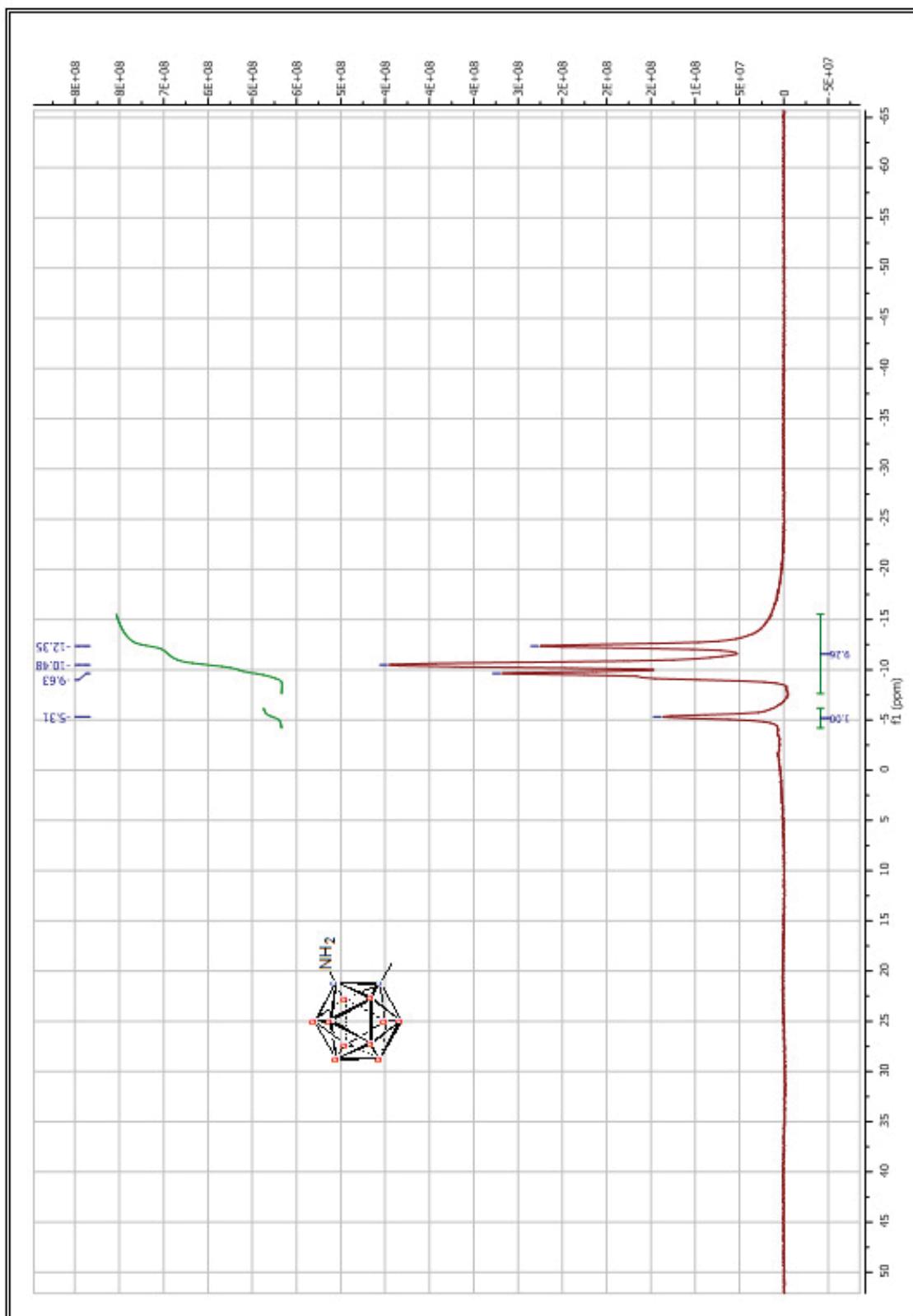
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



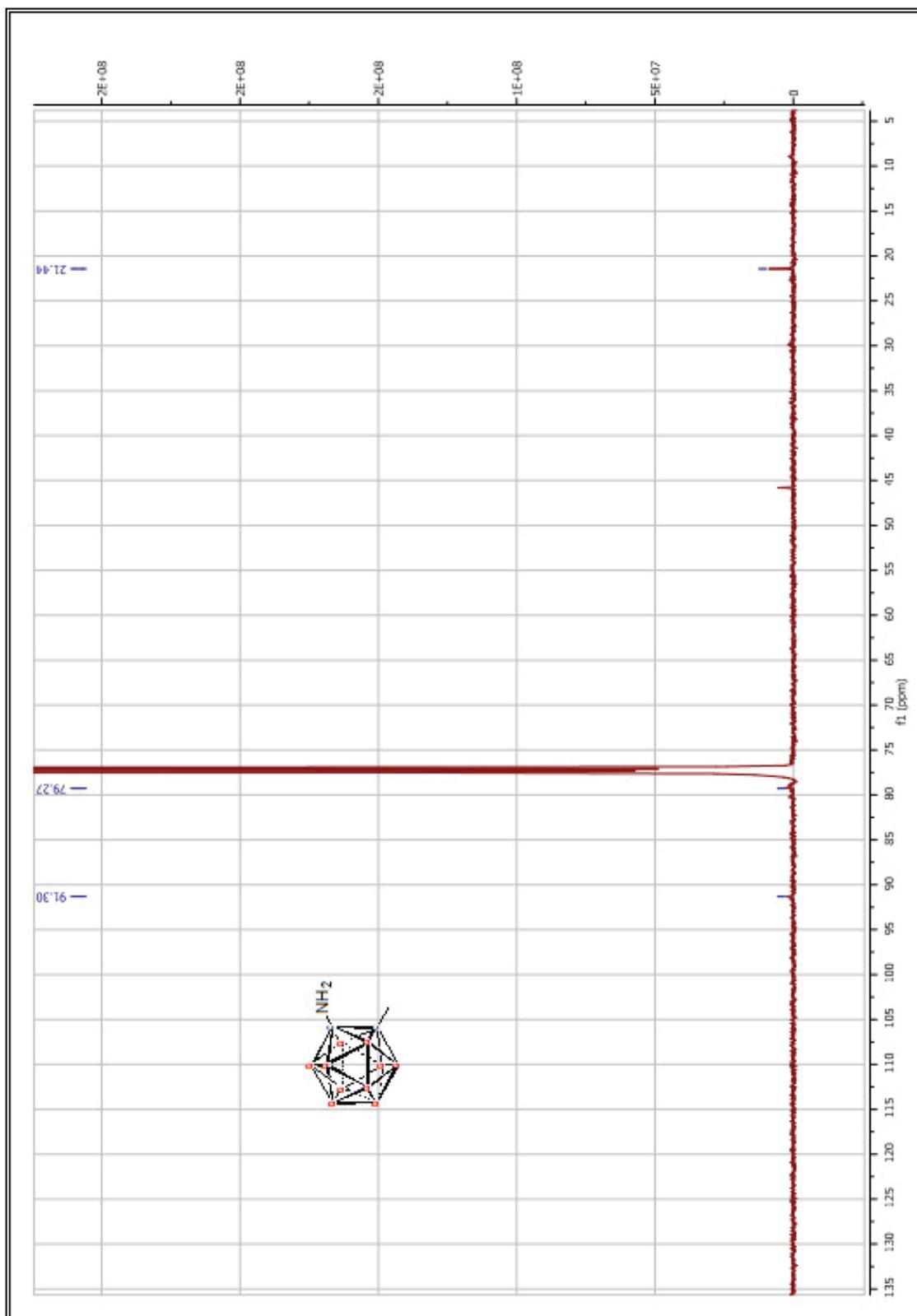
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



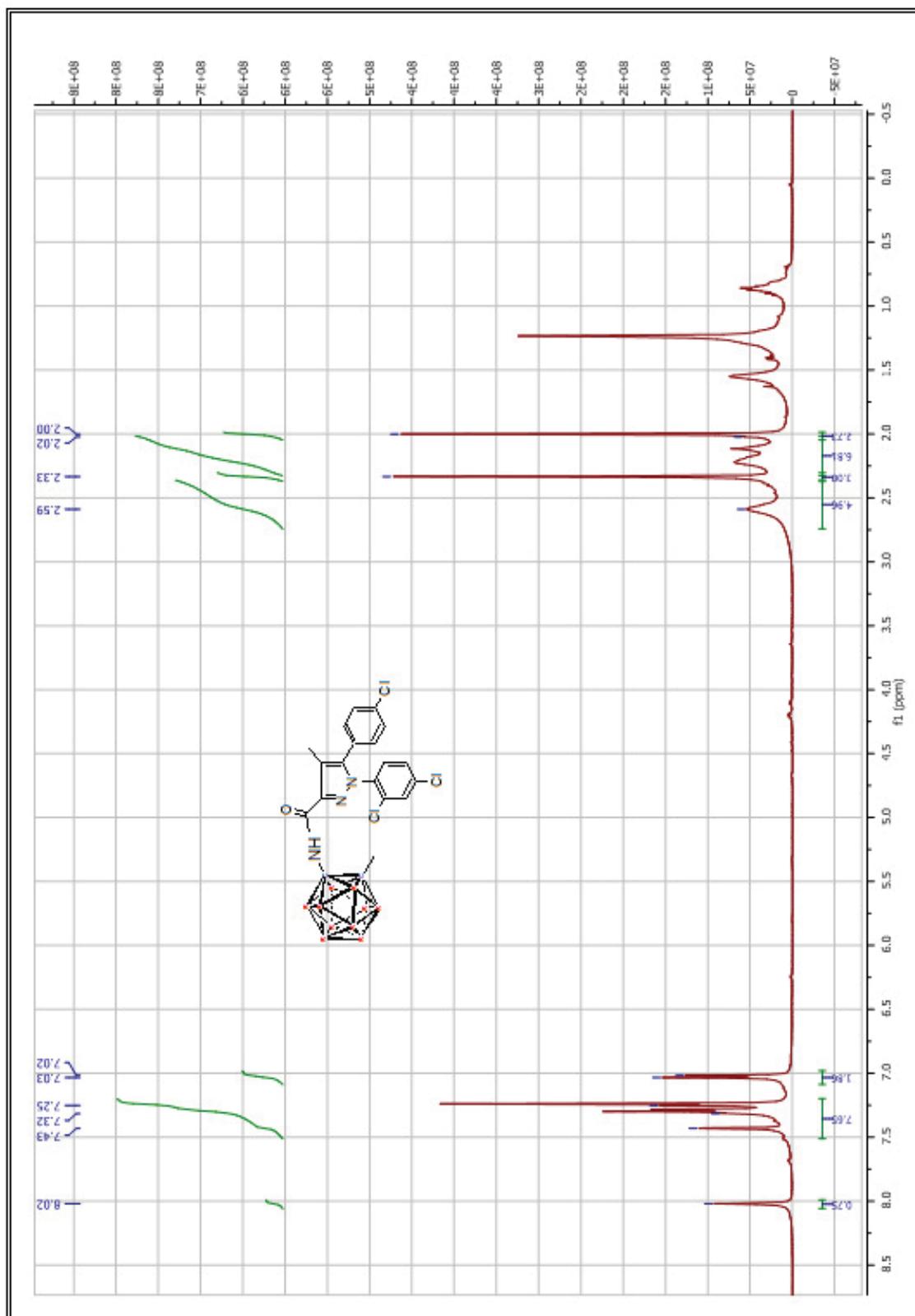
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



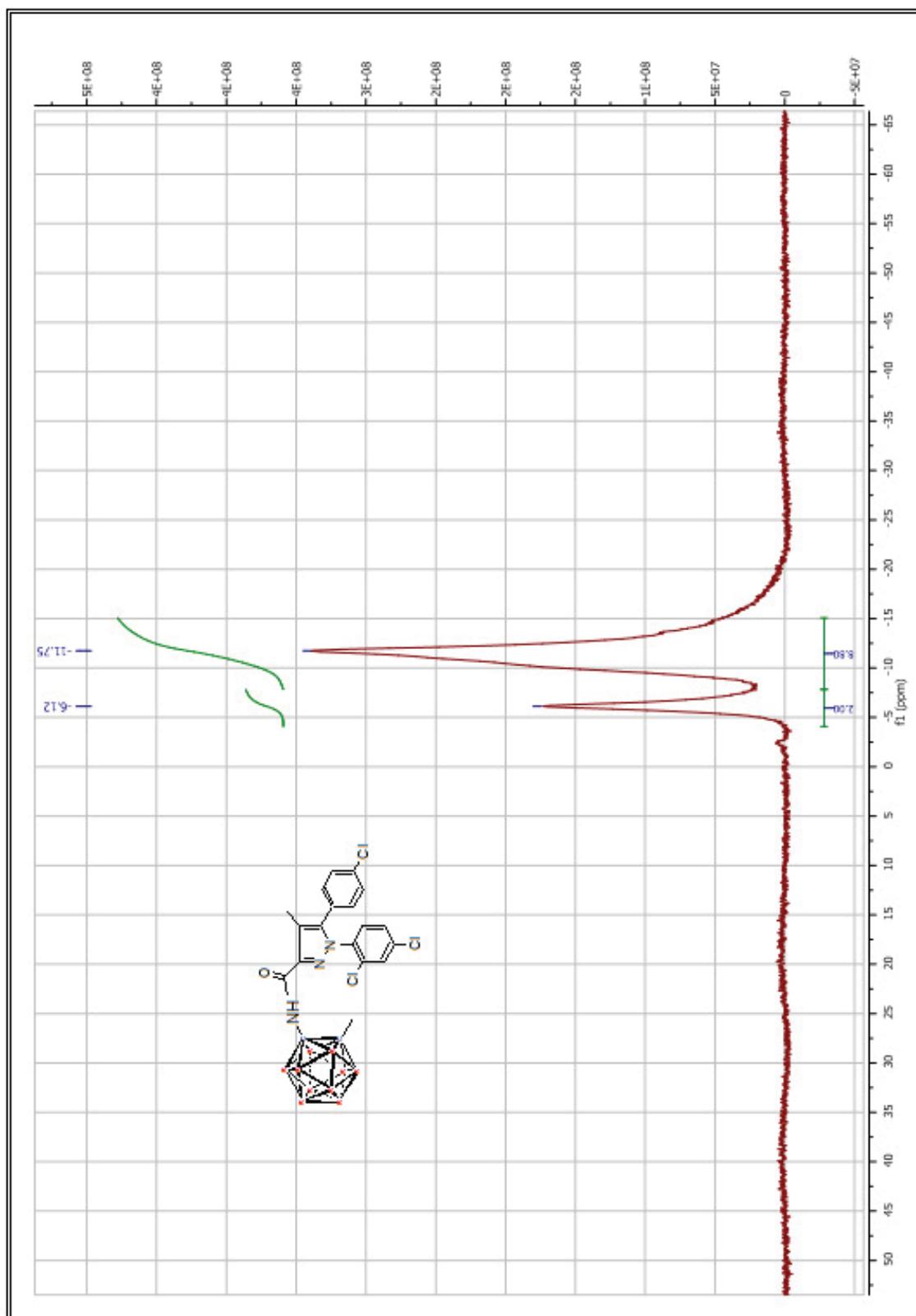
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



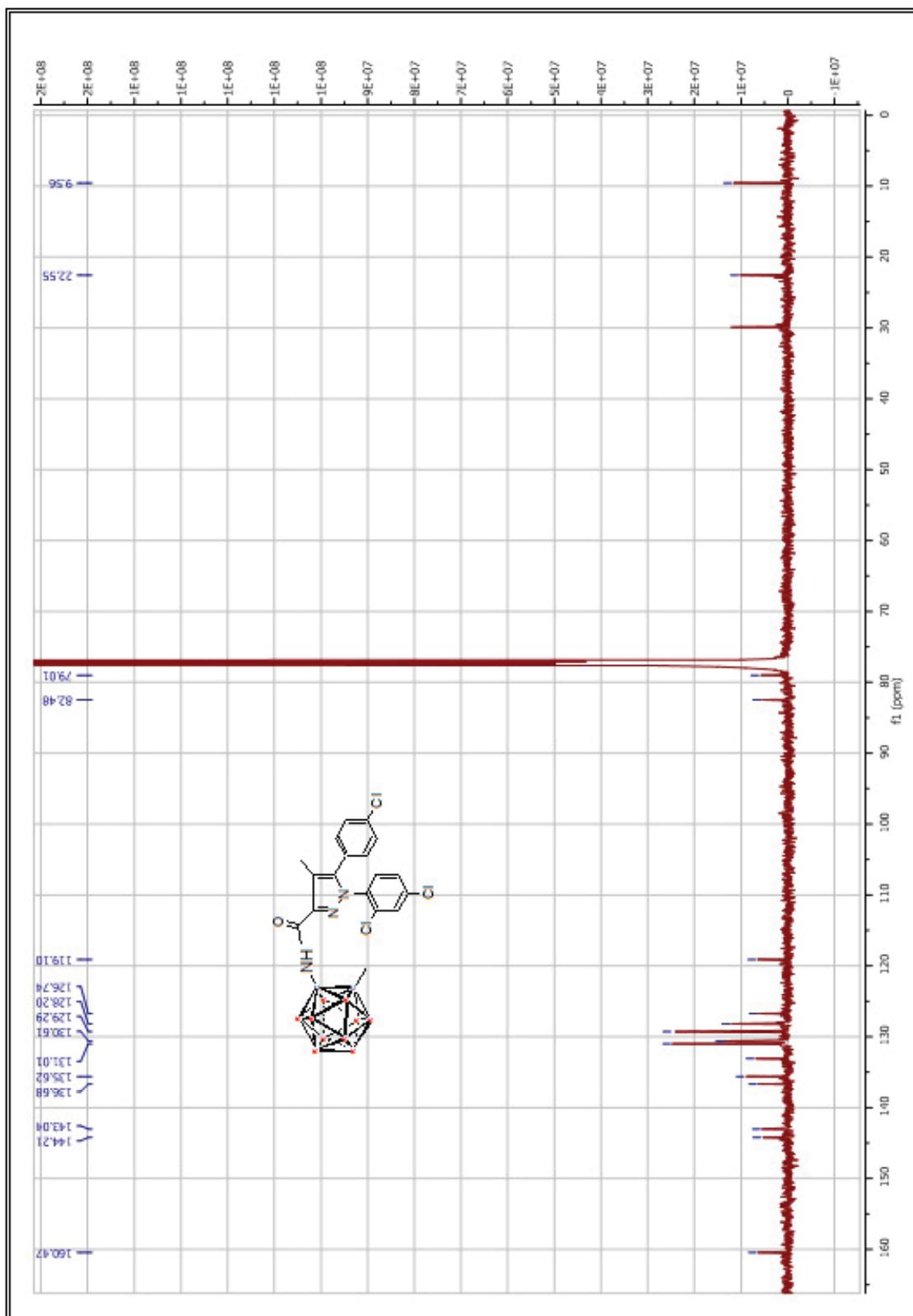
ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



ANEXO I: ESPECTROS DE RMN



ANEXO II
ABREVIATURAS

ANEXO II: ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ADME	Administración, distribución, metabolismo y eliminación
ARG	Autorradiografía
BHE	Barrera hematoencefálica
BNCT	Boron neutron capture therapy
Boc	<i>tert</i> -Butoxi carbonilo (grupo)
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butillitio
°C	Grado centígrado
CT	Tomografía computerizada
CB ₁	Receptor cannabinoide tipo 1
CB ₂	Receptor cannabinoide tipo 2
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigerol
CBN	Cannabinol
cpm	Cuentas por minuto
cpm/mm ²	Cuentas por minuto/mm ²
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble doblete
D ₁	Receptor dopaminérgico tipo 1
D ₂	Receptor dopaminérgico tipo 2
D ₃	Receptor dopaminérgico tipo 3
D ₄	Receptor dopaminérgico tipo 4
D ₅	Receptor dopaminérgico tipo 5

ANEXO II: ABREVIATURAS

DA	Dopamina
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropil carbodiimida
DIPEA	Diisopropiletil amina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
Eq	Equivalente
eV	Electronvoltio
[¹⁸ F]FDG	2-[¹⁸ F]fluoro-2-deoxy-D-glucose
[¹⁸ F]FDOPA	(2S)-2-amino-3-(2-([¹⁸ F]fluoro)-4,5-dihydroxyphenyl)propanoic acid
g	Gramo
h	Hora
HOAT	7-azo-1-hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Hz	Hercio
IC ₅₀	Concentración de inhibición al 50%
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K ₂₂₂	Kryptofix-222
K _D	Constante de desplazamiento
K _i	Constante de afinidad
LiHMDS	Bis (trimetilsilil) amiduro de litio
m	Multiplete
mm	Milímetro

ANEXO II: ABREVIATURAS

mmol	Milimol
MRI	Imagen por resonancia magnética
m/z	Relación masa/carga
MW	Microondas
NHS	N-hidroxisuccinimida
nM	nano Molar
PET	Tomografía por emisión de positrones
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singlete
SA	Specific Activity (Actividad específica)
SAR	Structure-activity relationship
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SPECT	Tomografía computerizada por emisión de fotón único
t	Triplete
TDAH	Trastorno por déficit de atención con hiperactividad
TEA	Trietil amina
TLC	Cromatografía de capa fina
TFA	Ácido trifluoroacético
THC	Tetrahidrocannabinol
THF	Tetrahidrofurano
TMSN3	Trimetilsilil azida

