

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

**FACULTAD DE BIOLOGÍA,
CIENCIAS AMBIENTALES Y QUÍMICA**

Departamento de Química II

Unidad Docente de Química Inorgánica



Tesis Doctoral

**SÍNTESIS DE COMPLEJOS METÁLICOS BASADOS EN
LIGANDOS NITROGENADOS POLIANIÓNICOS.
APLICACIONES COMO AGENTES ANTIVIRALES.**

Memoria presentada en la Universidad de Alcalá
para optar al grado de Doctor en Química por la
licenciada Sandra García Gallego.

D. ANTONIO LORENTE PÉREZ, Profesor Titular de Universidad y Director en funciones del Departamento de Química II de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada **“Síntesis de complejos metálicos basados en ligandos nitrogenados polianiónicos. Aplicaciones como agentes antivirales.”** ha sido realizada por la licenciada Sandra García Gallego en el Departamento de Química II (Unidad Docente de Química Inorgánica) de la Universidad de Alcalá, y dirigida por el Dr. D. Fco. Javier de la Mata de la Mata y la Dra. Dña. M^a Ángeles Muñoz-Fernández, y da su conformidad para la presentación de la misma como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, 8 de Febrero de 2013

A handwritten signature in blue ink that reads "A. Lorente". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath the name.

Fdo. Dr. D. Antonio Lorente Pérez

D. FRANCISCO JAVIER DE LA MATA DE LA MATA, Profesor Titular del Departamento de Química II (Unidad Docente de Química Inorgánica) de la Universidad de Alcalá, y

Dña. **M^a ÁNGELES MUÑOZ-FERNÁNDEZ**, Jefa de Sección Médica del Servicio de Inmunología y Coordinadora del Laboratorio de Inmunobiología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada “**Síntesis de complejos metálicos basados en ligandos nitrogenados polianiónicos. Aplicaciones como agentes antivirales.**” ha sido realizada por la licenciada Sandra García Gallego en el Departamento de Química II (Unidad Docente de Química Inorgánica) de la Universidad de Alcalá con nuestra inmediata dirección e informamos favorablemente y autorizamos su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, 8 de Febrero de 2013



Fdo. Dr. D. Fco. Javier
de la Mata de la Mata



Fdo. Dra. Dña. M^a Ángeles
Muñoz-Fernández

AGRADECIMIENTOS

Durante esta Tesis Doctoral, se podría decir que he cumplido con el célebre refrán “*Tres cosas hay que hacer en la vida: plantar un árbol, tener un hijo y escribir un libro*”. La semilla sembrada hace tiempo ha dado fruto, un fruto cultivado con esfuerzo, tiempo, dedicación y cariño, que está plasmado a lo largo de toda esta Memoria.

Los orígenes de esta Tesis se remontan al año 2003, cuando Javi me ofreció la posibilidad de conocer su laboratorio. Hilando beca con beca y beca con contrato, la estancia en su laboratorio se alargó hasta este año 2013. Nada más y nada menos que una década, llena de éxitos, fracasos y retos tanto profesionales como personales. 10 años son mucho tiempo, y sobre todo mucha gente a la que agradecer todos y cada uno de los detalles que han permitido esta evolución.

Gente que vino para quedarse (Elena, Marta, Silvia, Tania: chicas, ¡somos la envidia de Toledo!); gente que nos visitó (Romana, Michael); gente que vino y se fue (Edu); gente que vino, se fue y volvió porque nos echaba mucho de menos (¡yo habría hecho lo mismo Bea, gracias por volver!); y gente que estuvo, está y estará, con la que podrás contar en cualquier momento: gracias Paula por iniciarme en este mundo y gracias Javi SNF por arrojar luz sobre el mundo espectral, pero sobre todo por vuestra amistad.

No quiero olvidar tampoco a todos los compañeros becarios y doctores de Inorgánica con los que he compartido laboratorio, comidas o congresos a lo largo de este tiempo, ¡muchas gracias por todos los buenos ratos! Y a todos los que me habéis echado una mano en cualquier momento, una especial mención al Dr. Mikhail V. Galakhov y a la Dra. Pilar Gómez-Sal.

Pero no sólo hubo gente que vino al laboratorio, sino que durante este tiempo, he tenido la oportunidad de desarrollarme como científica y como persona en otros tantos laboratorios, y a la que no puedo olvidar en estos agradecimientos:

El Máster de Dianas Terapéuticas, gracias a todos los que me enseñasteis a dar mis primeros pasos en este complejo mundo de la bioquímica y a los que me acompañasteis este tiempo: Vero y Borja, por las horas compartidas en el laboratorio, que siempre me parecían pocas; Eva, Arantxa, Adri..., por los ratos de risas en el cuartito de Eva; Luis y “las Lolos” por toda su ayuda y el inestimable interés por los dendrímeros.

La estancia STSM en Urbino, en la que aprendí que la lejanía de los lugares solo está limitada por el número de medios de transporte que debes tomar para llegar: *Grazie mille Francesca, per ospitare nel vostro laboratorio di Urbino e en ella vostra casa a Firenze, e grazie mille Miki e Luigi, di fatto sentire a casa.*

La estancia en Copenhague, que necesitaría escribir otro anexo para describir todo lo que aprendí de la química, de la vida y de la amistad: *Mange tak Ulrik, Ulrich og Aneesh! Altid være i min hukommelse. Tak og se dig snart!*

La estancia en el Hospital, con toda esa maravillosa gente del “Gregorio”: Gracias Raquel por enseñarme a dar mis primeros pasos en vuestro laboratorio; gracias Javi por tu paciencia y tu ayuda, ¡lo hemos conseguido!; gracias Jose por hacer del laboratorio un lugar más divertido; gracias Almu, Judith, Laura, Quique, Susana, Chusa, Marjorie... en fin, gracias tod@s los chic@s de Biobanco y de Inmuno I y II, no quiero olvidar a nadie... *Mil gracias y hasta siempre!!*

Y las GRACIAS en mayúscula a los tres pilares sobre los que se ha construido esta Tesis Doctoral: GRACIAS Javi, GRACIAS Rafa y GRACIAS M^a Ángeles. Gracias por darme la oportunidad de trabajar con vosotros y de conocerlos, sois unos excelentes profesionales y unas personas excepcionales.

Por último, no sólo infinito agradecimiento sino la expresa dedicatoria de esta Tesis, cada uno de los caracteres aquí incluidos, *¡va por ustedes!*:

A mis amigas Sonia, Vero, Rosa y Alma, por ser mucho más que eso. Salimos juntas del cascarón en esto que le llaman “química”, y con vosotras aprendí que algunos enlaces son imposibles de romper.

A mi familia, porque os quiero... Especialmente, a mis abuelos por enseñarme el valor del esfuerzo y la alegría de la recompensa.

A mis padres, simplemente por todo, no hay espacio en esta Memoria para enumerarlo, necesitaríamos varios tomos...

A mi hermana Patricia, porque quiero ser siempre el modelo al que admires, igual que tú lo eres para mí. ¡Gracias monina!

Y a ti, Miguel, por ser mi pasado, mi presente y mi futuro. Ahora nos toca escribir juntos un libro mucho más complejo...

Un experto es una persona que ha cometido todos los errores que se pueden cometer en un determinado campo.

Niels Bohr

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

	Página

ÍNDICE	i

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	ix
ÍNDICE DE COMPUESTOS	xiii
PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS	xvii
INTRODUCCIÓN	xix
OBJETIVOS Y DISTRIBUCIÓN DE LA MEMORIA	xx

INTRODUCCIÓN “COMPLEJOS METÁLICOS, DENDRÍMEROS Y METALODENDRÍMEROS CON APLICACIONES BIOMÉDICAS”	1

I.1. COMPLEJOS METÁLICOS EN BIOMEDICINA	3
I.1.1. Complejos metálicos en terapia frente al VIH	6
I.2. DENDRÍMEROS EN NANOMEDICINA	14
I.2.1. Nanomedicina y nanosistemas	14
<i>I.2.1.a. Propiedades de las nanopartículas</i>	14
<i>I.2.1.b. Nanotecnología en el tratamiento de la infección por VIH</i>	15
I.2.2. Dendrimeros para aplicaciones biomédicas	16
<i>I.2.2.a. Diseño y síntesis de dendrimeros</i>	16
<i>I.2.2.b. Caracterización de dendrimeros</i>	18
<i>I.2.2.c. Aplicaciones de dendrimeros en biomedicina</i>	19
I.3. METALODENDRÍMEROS EN NANOMEDICINA	24
I.3.1. Metalodendrimeros para aplicaciones biomédicas	24
<i>I.3.1.a. Diseño y síntesis de metalodendrimeros</i>	24
<i>I.3.1.b. Aplicaciones de metalodendrimeros en biomedicina</i>	25
I.4. BIBLIOGRAFÍA	29

CAPÍTULO 1 “COMPLEJOS METÁLICOS BASADOS EN LIGANDOS NITROGENADOS POLIANIÓNICOS”	39
<hr/>	
1.1. INTRODUCCIÓN	41
1.1.1. Objetivos del capítulo	41
1.1.2. Antecedentes bibliográficos	42
1.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	44
1.2.1. Estudio preparativo	44
1.2.1.a. Complejos metálicos con ligandos aminosulfonato	44
1.2.1.b. Complejos metálicos con ligandos aminocarboxilato	48
1.2.2. Estudio estructural	51
1.2.2.a. Estudio mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	51
1.2.2.b. Estudio mediante Difracción de Rayos X	56
1.2.2.c. Estudio comparativo mediante Espectrofotometría UV-Vis	60
1.2.2.d. Estudio mediante Resonancia de Spin Electrónico (RSE)	67
1.2.2.e. Estudio comparativo por Espectroscopía Infrarroja (FT-IR)	72
1.2.2.f. Estudio potenciométrico	74
1.3. APLICACIONES BIOMÉDICAS	77
1.3.1. Ensayos de biocompatibilidad	78
1.3.1.a. Compuestos sulfonato 1-6	78
1.3.1.b. Compuestos sulfonato 12-16 y carboxilato 8-11 y 18-21	79
1.3.2. Ensayos de inhibición de la infección por el VIH	80
1.3.2.a. Compuestos sulfonato 1-6	80
1.3.2.b. Compuestos sulfonato 12-16 y carboxilato 8-11 y 18-21	81
1.3.3. Conclusiones del apartado	86
1.4. BIBLIOGRAFÍA	87

CAPÍTULO 2 “SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRÍMEROS Y METALODENDRÍMEROS POLIANIÓNICOS PARA TERAPIA FRENTE AL VIH”		91
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
2.1. INTRODUCCIÓN		93
2.1.1. Objetivos del capítulo		95
2.1.2. Antecedentes bibliográficos		95
2.2. DENDRONES DE NATURALEZA CARBOSILANO CON NÚCLEO DE ETILENDIAMINA		99
2.2.1. Estudio preparativo		99
2.2.2. Estudio estructural de los dendrones iónicos y sus precursores		107
2.2.2.a. Estudio potenciométrico de los dendrones 29 y 30		111
2.2.3. Propiedades coordinantes frente a metales del dendrón aniónico 29		113
2.3. DENDRÍMEROS DE NATURALEZA POLIPROPILENIMINA CON NÚCLEO DE ETILENDIAMINA		119
2.3.1. Estudio preparativo		120
2.3.2. Estudio estructural		124
2.3.2.a. Estudio mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)		124
2.3.2.b. Estudio potenciométrico de los dendrímeros aniónicos		131
2.3.3. Propiedades coordinantes frente a metales de los dendrímeros aniónicos		134
2.3.3.a. Metalodendrímeros homometálicos		136
2.3.3.b. Metalodendrímeros heterometálicos		154
2.3.3.c. Conclusiones del apartado		155
2.4. DENDRÍMEROS ANIÓNICOS DE NATURALEZA POLIPROPILENIMINA PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATORIOS		157
2.4.1. Conjugación mediante interacción electrostática		157
2.4.2. Conjugación mediante enlace covalente amido		161
2.4.3. Conjugación mediante espaciador disulfuro		163
2.4.3.a. Paso 1: Modificación química del fármaco		164
2.4.3.b. Paso 2: Síntesis de los espaciadores		165
2.4.3.c. Paso 3: Introducción del espaciador en el dendrímero y modificación de la periferia		166

2.4.3.d. Paso 4: Conjugación del fármaco	171
2.4.4. Conclusiones del apartado	172
2.5. DENDRONES POLILISINA COMO PLATAFORMAS PARA EL ANCLAJE DE PÉPTIDOS	
ANTIGÉNICOS.....	173
2.5.1. Introducción	173
2.5.2. Estudio preparativo y estructural	174
2.6. BIBLIOGRAFÍA.....	181

CAPÍTULO 3 “ESTRATEGIAS PARA LA TERAPIA FRENTE AL VIH MEDIANTE DENDRÍMEROS Y METALODENDRÍMEROS”	187

3.1. INTRODUCCIÓN	189
3.1.1. Objetivos del capítulo	189
3.1.2. Antecedentes bibliográficos	190
3.1.2.a. Dendrimeros y metalodendrimeros como agentes antivirales en terapia frente al VIH	190
3.1.2.b. Dendrimeros como transportadores de moléculas biológicamente activas en terapia frente al VIH	192
3.1.2.c. Dendrimeros como coadyuvantes en nanovacunas en terapia frente al VIH	195
3.2.1.d. Metalodendrimeros para el seguimiento de la terapia frente al VIH mediante técnicas de imagen	197
3.2. PROPIEDADES ANTIVIRALES FRENTE AL VIH.....	198
3.2.1. Introducción	198
3.2.2. Metalodendrimeros PPI con núcleo EDA funcionalizados con grupos sulfonato y carboxilato	199
3.2.2.a. Ensayos de biocompatibilidad	199
3.2.2.b. Ensayos de inhibición de la infección por VIH	204
3.2.2.c. Conclusiones y propuesta de mecanismo de acción	215
3.3. PERSPECTIVAS FUTURAS Y PROPUESTAS DE ACCIÓN DE DISTINTAS TERAPIAS FRENTE AL VIH.....	218

3.3.1. Propiedades antivirales de metalodendrimeros carbosilano funcionalizados con grupos sulfonato	218
3.3.2. Actividad antiviral mejorada de dendrimeros PPI con grupos aniónicos e ibuprofeno conjugado	220
3.3.3. Nanovacunas basadas en dendrimeros polilisina	222
3.3.4. Utilización de dendrones catiónicos para terapia génica	224
3.4. BIBLIOGRAFÍA	225

CAPÍTULO 4 “PARTE EXPERIMENTAL”	231

4.1. MÉTODOS Y TÉCNICAS INSTRUMENTALES	233
4.1.1. Condiciones generales de trabajo	233
4.1.2. Técnicas instrumentales	233
4.2. MATERIALES UTILIZADOS	238
4.2.1. Reactivos	238
4.2.2. Cultivos celulares primarios y líneas celulares	238
4.3. ENSAYOS BIOMÉDICOS	240
4.3.1. Viabilidad celular	240
4.3.2. Tratamiento de las células con los compuestos	241
4.3.3. Infección con aislados virales	242
4.3.4. Cuantificación del antígeno p24 ^{gag} mediante ELISA	242
4.3.5. Ensayos de inhibición de la infección por el VIH	243
4.3.6. Ensayos de internalización del virus	244
4.3.7. Estudio combinado con un fármaco retroviral comercial	244
4.4. DESCRIPCIÓN DE LAS PREPARACIONES	245
4.4.1. Compuestos derivados del ligando <i>N,N'</i> -dimetiletilendiamino- <i>N,N'</i> -dietano sulfonato “ <i>dmedds</i> ” (1-6)	245
4.4.2. Compuestos derivados del ligando <i>N,N'</i> -dimetiletilendiamino- <i>N,N'</i> -di-3-propionato “ <i>dmeddp</i> ” (7-11)	248
4.4.3. Compuestos derivados del ligando etilendiamino-tetraetanosulfonato “ <i>edts</i> ” (12-16)	250

4.4.4. Compuestos derivados del ligando etilendiamino-tetra-3-propionato “edtp” (17-21)	252
4.4.5. Estrategias de crecimiento con esqueleto carbosilano (22-30)	254
4.4.6. Estrategia de crecimiento con esqueleto polipropilenimina (31-45)	259
4.4.7. Estrategias de conjugación de ibuprofeno (46-58)	264
4.4.8. Dendrones polilisina tipo MAP (61-71)	271
4.5. BIBLIOGRAFÍA	277

CAPÍTULO 5 “CONCLUSIONES”	279

CAPÍTULO 6 “SUMMARY AND CONCLUSIONS”	287

6.1. INTRODUCTION	289
6.2. RESULTS AND DISCUSSION	290
6.2.1. “Zero generation” metal complexes: dual antiviral agents which model higher generation dendrimers behavior	290
6.2.2. Dendrimers and metallodendrimers as dual antiviral agents	293
6.2.3. Ibuprofen containing anionic dendrimers as improved antiviral agents	298
6.2.4. Polylysine dendrons as scaffolds for HIV immunogenic peptides	299
6.3. CONCLUSIONS	301
6.4. BIBLIOGRAPHY	305

ANEXO “PUBLICACIONES”	309

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A continuación se muestra una ordenación alfabética de las abreviaturas que aparecerán a lo largo de esta Memoria, con el fin de facilitar el seguimiento de los capítulos, tablas, esquemas y figuras incluidas en ella.

<i>Abreviatura</i>	<i>Nombre completo</i>
° / °C	Grado, Grado Celsius
β	Magnetón de Bohr
δ	Desplazamiento químico
Δ	Incremento
ε	Coefficiente de extinción
λ	Longitud de onda
ν	Número de onda
π / σ	Orbital tipo pi / tipo sigma
τ	Tiempo de relajación (RSE)
<>	Promedio
[]	Concentración
Å	Angstrom
A	Absorbancia, Factor de acoplamiento (RSE)
Ac	Acetilo
Ab / Ag	Anticuerpo / Antígeno
AcOH	Ácido acético
Ad.	Adición
Ag p24	Antígeno de la proteína p24 del VIH
AIBN	Azobisisobutironitrilo
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
Anal.	Análisis
anh.	Anhidro
APCI	<i>Atmospheric-pressure chemical ionization</i>
Ar	Arilo
ARN / ADN	Ácido ribonucleico / Ácido desoxirribonucleico
AZT	Azidotimidina o Zidovudina
benzof.	Benzofenona
BNCT	<i>Boron Neutron Capture Therapy</i>
BOC	<i>Tert</i> -butiloxicarbonil
bpt	Bipirámide trigonal
c	Cuadruplete (RMN)
calc. / exp.	Calculado / Experimental
Cap.	Capítulo
cat.	Catalizador
CBS	Carbosilano
CXCR4 / CCR5	Receptor de quimiocina de tipo 4 / de tipo 5
col.	Colaboradores
cél.	Célula

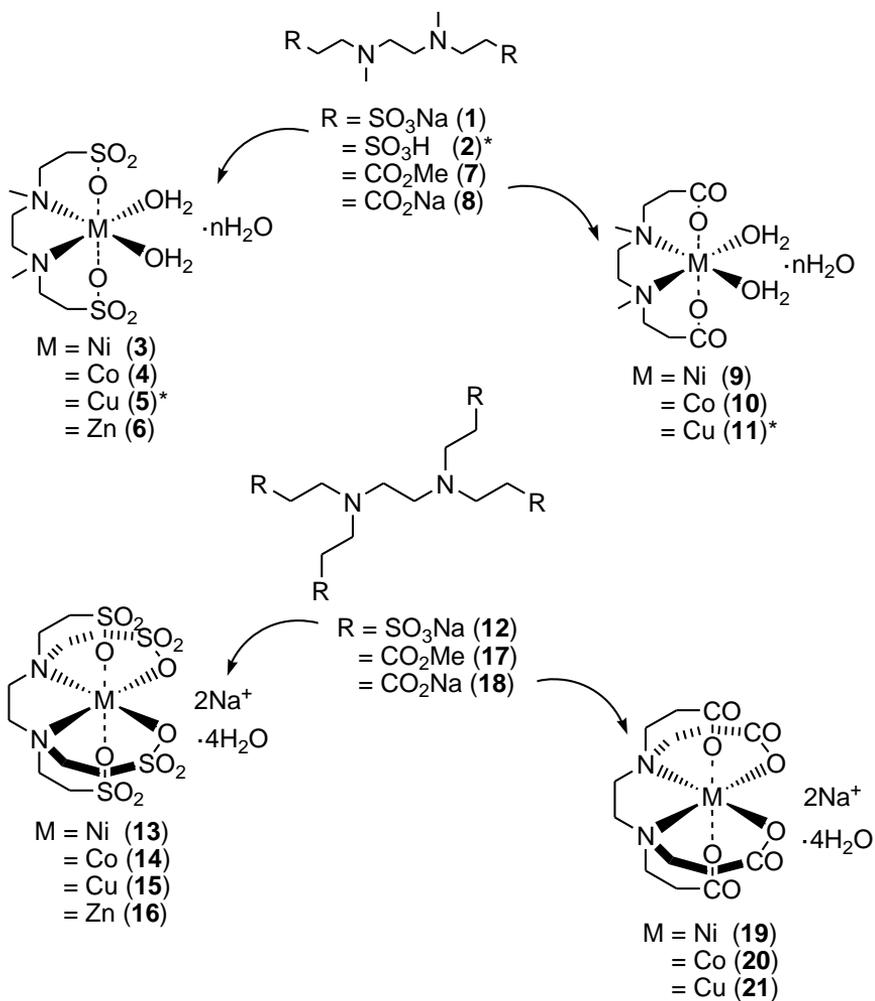
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
COX	Ciclooxigenasa
ct	Control
CuAAC	Cicloadición Huisgen azida-alquino terminal catalizada por cobre
d	Derivada, Doblete (RMN)
D, dend	Dendrímero
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DAB	Dendrímeros PPI con núcleo diaminobutano
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
dext.	Dextrano
dil	Diluido
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dmeddp	<i>N,N'</i> -dimetiletilendiamino- <i>N,N'</i> -di-3-propionato
dmedds	<i>N,N'</i> -dimetiletilendiamino- <i>N,N'</i> -dietanosulfonato
diox.	Dioxano
DIPCDI	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DOSY	<i>Diffusion-ordered spectroscopy</i>
DOTA	Ácido tetraazaciclododecano-1,4,7,10-triacético
DTPA	Ácido dietilentriamino pentaacético
DTT	Ditiotreitol
E	Energía
EDA	Etilendiamina
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
edtp	Etilendiamino-tetra-3-propionato
edts	Etilenodiamin-tetraetanosulfonato
ej.	Ejemplo
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention effect</i>
eq.	Equivalente
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i>
esq.	Esquema
Et	Etilo
Et ₂ O	Éter dietílico
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
SFB	Suero fetal bovino
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
Fig.	Figura
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
g, mg, µg, ng	Gramo, Miligramo, Microgramo, Nanogramo
g	Gas, Factor de desdoblamiento (RSE)
G	Campo magnético, Gauss, Grupo

G _n	Generación
Gly	Glicina
GMP	Guanidín monofosfato
gp	Glicoproteína
Hec-1A	Línea celular endometrial, derivada de adenocarcinoma humano
Hg	Mínimo de campo alto
hid.	Hidratado
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
h	Hora
H	Campo magnético
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
I	Momento del núcleo
Ibu	Ibuprofeno
i-Pr	Isopropil
IR-FT	Espectroscopía infrarroja mediante transformada de Fourier
K	Grados Kelvin
L, mL, µL	Litro, Mililitro, Microlitro
L	Ligando
LMCT / MLCT	<i>Ligand to Metal Charge Transfer / Metal to Ligand Charge Transfer</i>
Lys	Lisina
m, cm, mm, nm	Metro, Centímetro, Milímetro, Nanometro
m	Multiplete (RMN), Masa, Meta (localizador sustituyente)
M, mM, µM	Molar, Milimolar, Micromolar
M	Metal
M _r	Masa molecular
m/z	Relación masa carga
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MAP	<i>Multiple-Antigenic Peptide</i>
máx. / mín.	Máximo / Mínimo
MCC	Medio de cultivo completo
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
min	Minuto
mol, mmol	Mol, Milimol
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
MRP	<i>Multidrug Resistance Protein</i>
MS	Espectroscopía de Masas
MT-2	Línea celular linfóide del linaje T CD4+
MTS / MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio / Bromuro 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
N	Nuclear
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NRTI / NNRTI	Inhibidor de Transcriptasa Reversa tipo Nucleósido / No Nucleósido
NMM	<i>N</i> -metilmorfolina

ORTEP	<i>Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot</i>
p	p-Valor
pág.	Página
PAMAM	Dendrímeros Poliamidoamino
pbC	Pirámide de base cuadrada
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
PEG	Polietilenglicol
PEI / PPI	Dendrímeros Polietilenimina / Polipropilenimina
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PF	Punto focal
pH	Logaritmo negativo de la concentración de H ⁺
pK _a	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
PL	Dendrímeros Polilisina
pos.	Posición
POSS	<i>Polyhedral oligosilsesquioxanes dendrimers</i>
ppm	Partes por millón
q	Quintuplete (RMN)
R	Radical alquilo
R _T	Tiempo de retención (HPLC)
ref.	Referencia
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
RSE	Resonancia de spin electrónico
s	Segundo, Sólido, Singlete (RMN), Spin
S	Momento angular del electrón
SBD	<i>Starburst Dendrimers</i>
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
siRNA	<i>Short interfering RiboNucleic Acid</i>
SPDP	<i>N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato</i>
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
Sur.	Suramin
su	Succinimida
t	Tiempo, Triplete (RMN)
T, t.a.	Temperatura, Temperatura ambiente
TARGA	Terapia Antirretroviral de Gran Actividad
T-20	Enfuvirtide o Fuzeon
teo.	Teórico
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i> (RMN)
TOF	<i>Time Of Flight</i> (MS)
u.a.	Unidades de absorbancia (UV-Vis), Unidades arbitrarias (RSE)
uma.	Unidad de masa atómica
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V	Volumen
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VK-2/E6E7	Línea celular de mucosa vaginal humana
W _{ex}	Frecuencia de intercambio

ÍNDICE DE COMPUESTOS

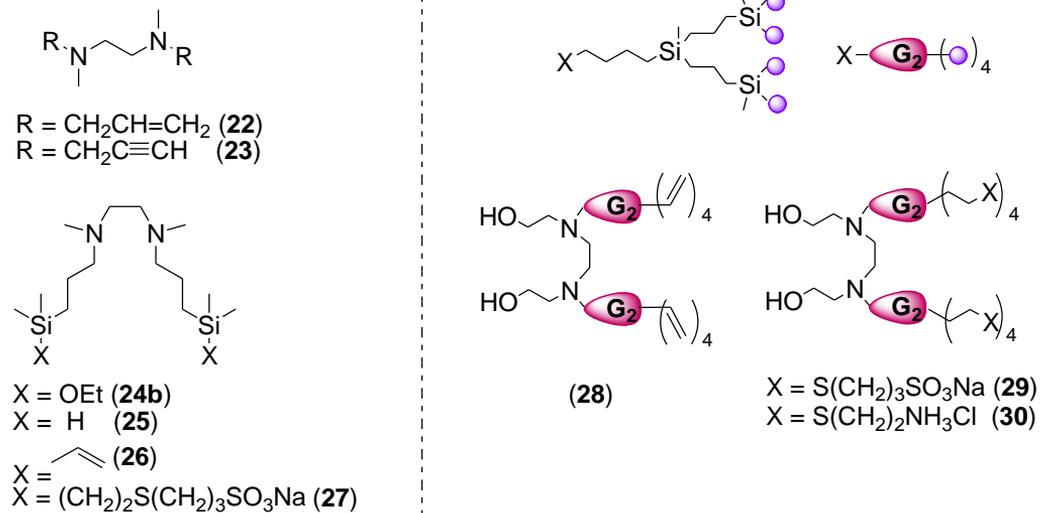
✓ Capítulo 1



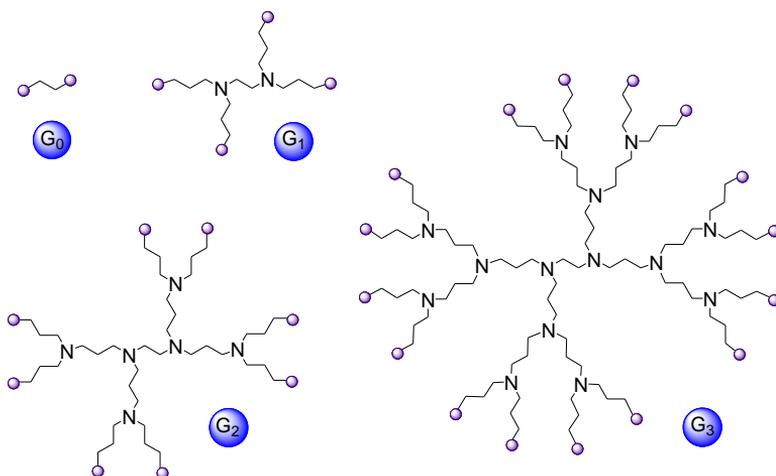
*Compuestos con una estructura particular.

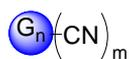
✓ **Capítulos 2 y 3**

➤ **Dendrones con esqueleto carbosilano**



➤ **Dendrímeros con esqueleto polipropilenimina**

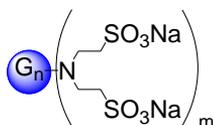




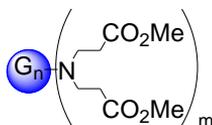
n = 1, m = 4 (31)
n = 2, m = 8 (33)
n = 3, m = 16 (35)



n = 1, m = 4 (32)
n = 2, m = 8 (34)
n = 3, m = 16 (36)



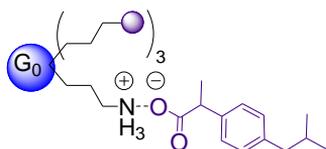
n = 1, m = 4 (37)
n = 2, m = 8 (38)
n = 3, m = 16 (39)



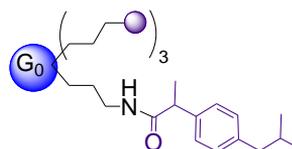
n = 1, m = 4 (40)
n = 2, m = 8 (42)
n = 3, m = 16 (44)



n = 1, m = 4 (41)
n = 2, m = 8 (43)
n = 3, m = 16 (45)



● = NH₂ (46)
= N(CH₂CH₂SO₃Na)₂ (47)
= N(CH₂CH₂CO₂Me)₂ (48)



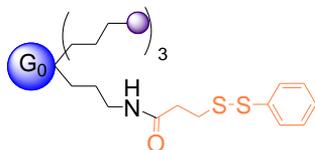
● = NH₂ (49)



X = OSu (50*)
= NH(CH₂)₂SH (51)

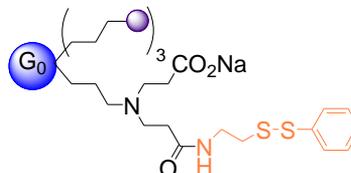


X = CO₂H (52)
= CO₂Su (52*)
= NH₃Cl (53)



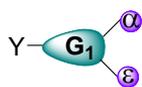
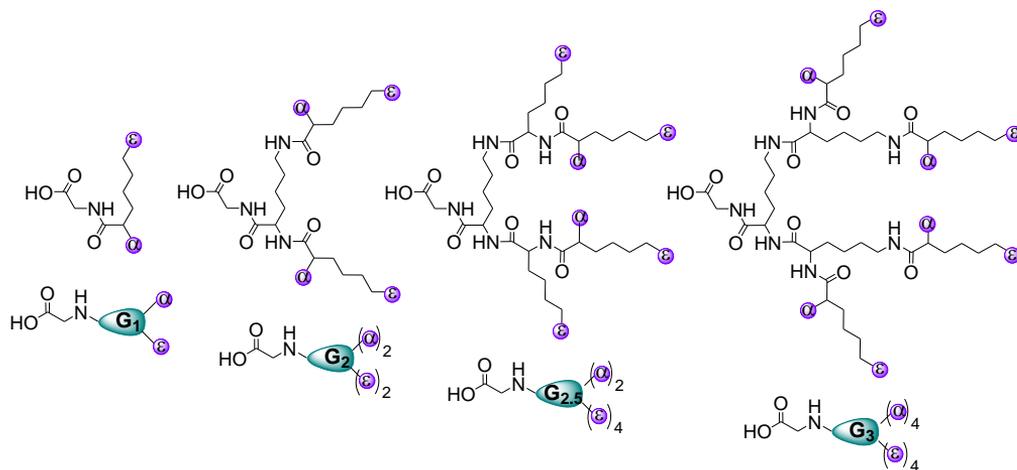
● = NH₂ (54)
= N(CH₂CH₂SO₃Na)₂ (55)
= N(CH₂CH₂CO₂Me)₂ (56)
= N(CH₂CH₂CO₂Na)₂ (57)*

*El compuesto pierde el espaciador

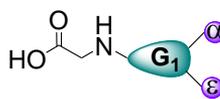


● = N(CH₂CH₂CO₂Na)₂ (58)

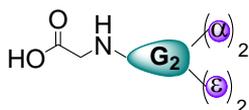
➤ *Dendrones con esqueleto polilisina*



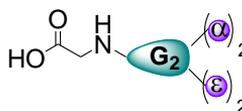
Y α ϵ
 OH, NHBoc, NHBoc (**61**)
 OSu, NHBoc, NHBoc (**61***)
 OSu, NHBoc, NHTFA (**64***)



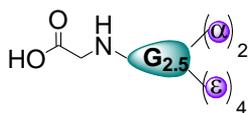
α ϵ
 NHBoc, NHBoc (**62**)
 NH₃Cl, NH₃Cl (**63**)



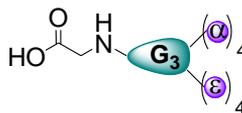
α ϵ
 NHBoc, NHBoc (**65**)
 NHBoc, NHTFA (**67**)



α ϵ
 NH₃TFA, NH₃TFA (**66a**)
 NH₃Cl, NH₃Cl (**66b**)
 NH₃TFA, NHTFA (**68a**)
 NH₃Cl, NHTFA (**68b**)



α ϵ
 NHBoc, NHTFA (**69**)



α ϵ
 NHBoc, NHBoc (**70**)
 NHBoc, NHTFA (**71**)

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años, nuestro grupo de investigación viene desarrollando trabajos de investigación relacionados con la síntesis y las aplicaciones de macromoléculas dendríticas en catálisis y biomedicina, convirtiéndose en un grupo pionero en la síntesis de dendrímeros de naturaleza carbosilano. Sin embargo, una amplia experiencia previa en el mundo de la Química de la Coordinación y la Química Organometálica ha permitido aunar ambas ramas, dando lugar a esta Tesis Doctoral. En ella, se ha desarrollado un trabajo de investigación basado en la generación de diversos sistemas dendríticos y la incorporación en ellos de metales de transición, comparando su comportamiento químico y biológico con los compuestos de coordinación análogos que se usarán como modelos, también preparados durante este proyecto. El diseño de estos sistemas va encaminado a su utilización en distintas terapias frente a la infección por VIH, enfermedad a la que se orienta este trabajo como resultado de la intensa colaboración entre el grupo BioInDen y el Laboratorio de Inmunobiología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Este trabajo es el fruto de un proyecto de investigación del grupo BioInDen de la Universidad de Alcalá, en el que han colaborado los grupos de Inmunobiología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón dirigido por la Doctora M^a Ángeles Muñoz-Fernández, co-directora de esta Tesis Doctoral; el Laboratorio de Resonancia de Spin Electrónico, dirigido por la Doctora M^a Francesca Ottaviani de la Universidad de Urbino (Italia); y el grupo de investigación del Doctor Ulrik Boas de la Universidad Técnica de Copenhague (Dinamarca). Está basado en la síntesis y caracterización química de complejos metálicos basados en ligandos nitrogenados polianiónicos, tanto de naturaleza sencilla como dendrítica, y su utilización en diversas terapias como agentes para el tratamiento de la infección por VIH.

OBJETIVOS Y DISTRIBUCIÓN DE LA MEMORIA

La demostrada experiencia de nuestro grupo de investigación en la síntesis de macromoléculas dendríticas y en la preparación de complejos metálicos, junto con el interés en la búsqueda de nuevas terapias y tratamientos para combatir la infección por el VIH, nos ha llevado a plantearnos para este proyecto los siguientes objetivos:

➤ **Objetivo general**

Sintetizar y caracterizar químicamente complejos metálicos basados en ligandos nitrogenados polianiónicos, tanto de naturaleza sencilla como dendrítica, y evaluar su utilización en diversas terapias como agentes para el tratamiento de la infección por VIH.

➤ **Objetivos particulares**

- ✓ Sintetizar, caracterizar y estudiar químicamente compuestos polianiónicos sencillos que presenten un núcleo de etilendiamina, y los complejos metálicos derivados de ellos, que permitan modelar el comportamiento de sistemas dendríticos análogos de generaciones mayores.
- ✓ Evaluar la biocompatibilidad y la capacidad antiviral frente a la infección por el VIH de dichos compuestos y complejos metálicos, con el fin de predecir el comportamiento de los dendrímeros de siguientes generaciones.
- ✓ Analizar la idoneidad de distintas metodologías para la preparación de sistemas de naturaleza dendrítica polianiónicos a partir de un núcleo de etilendiamina, y estudiar sus propiedades coordinantes frente a distintos metales de transición.

- ✓ Preparar sistemas heterofuncionales aniónicos que permitan el transporte de ibuprofeno, como modelo de fármaco que mejore la actividad antiviral.
- ✓ Generar macromoléculas dendríticas de tipo MAP que actúen como plataforma para anclar selectivamente péptidos inmunogénicos para terapia frente a VIH.
- ✓ Evaluar la biocompatibilidad y capacidad inhibitoria frente a la infección por el VIH de los dendrímeros y metalodendrímeros descritos.

El trabajo realizado en cada una de estas etapas se describirá en esta Memoria de acuerdo con la siguiente distribución:

En la **Introducción** se hace una breve revisión general de los trabajos más representativos relacionados con complejos metálicos, dendrímeros y metalodendrímeros utilizados en aplicaciones biomédicas.

En el **Capítulo 1** se aborda la síntesis y caracterización de cuatro familias de compuestos nitrogenados polianiónicos y sus complejos metálicos de níquel, cobalto, cobre y zinc, junto con los ensayos de biocompatibilidad y capacidad inhibitoria frente a la infección por VIH.

En el **Capítulo 2** se recogen diversas estrategias para la preparación de sistemas dendríticos y sus complejos metálicos derivados, con potenciales aplicaciones en diversas terapias para tratar la infección por VIH.

En el **Capítulo 3** se evalúa la capacidad de estos sistemas para actuar como agentes antivirales frente a la infección por VIH, y se realiza una propuesta de actuación de aquéllos sistemas para los que no se han realizado estudio experimental.

La descripción de las preparaciones, así como las condiciones generales del trabajo experimental y las técnicas de identificación estructural y análisis se recogen en el **Capítulo 4**.

En el **Capítulo 5** se destacan a modo de conclusiones los resultados más relevantes de este trabajo.

El **Capítulo 6 (Summary and conclusions)** recoge, de acuerdo con la normativa vigente que rige los estudios para la obtención del Doctorado Europeo, un resumen en inglés del trabajo presentado en esta Memoria.

Finalmente, se incluye un **Anexo** donde se enumeran las publicaciones surgidas durante el período de realización de esta Tesis Doctoral, relacionadas con el trabajo de investigación que recoge esta Memoria o con otras colaboraciones realizadas.

INTRODUCCIÓN

**“COMPLEJOS METÁLICOS,
DENDRÍMEROS Y METALODENDRÍMEROS
CON APLICACIONES BIOMÉDICAS”**

I.1. COMPLEJOS METÁLICOS EN BIOMEDICINA

Desde la Antigüedad, numerosas clases de compuestos inorgánicos se han utilizado para tratar enfermedades diversas.² El concepto de “quimioterapia” se desarrolló en 1910 a partir de la síntesis del complejo *Arsfenamina*, un derivado de arsénico utilizado para tratar la sífilis. Desde entonces, numerosos metalofármacos se han propuesto y utilizado clínicamente en el mundo (*Tabla I.1*).

<i>Metal</i>	<i>Compuesto y tratamiento</i>
Ag	Sulfadiazinas: Apósitos de quemaduras y heridas
Al	Sucralfato: Úlcera estómago
Au	Aurothiolamt, Aurotioglucosa, Auranofin: Artritis reumatoide
As	Arsfenamina: Sífilis Trisenol (As_2O_3): Leucemia promielocítica aguda
Bi	Sulfosalicilato: Enfermedades por <i>Helicobacter pylori</i>
Co	Cianocobalamina: Retraso crecimiento, Anemia
Cu	Aspirinato: Antioxidante, Dermatitis inducida por UV
Ge	Ge-132: Enfermedades bacterianas, Cáncer
Li	Carbonato: Psicosis maniaco-depresiva
Mo	Tetratiomolibdato: Enfermedad de Wilson
Pt	Cisplatino: Cáncer
Ru	Cloroamina: Cáncer
Se	Ebselen: Accidente cerebrovascular isquémico agudo
V	Complejos: Diabetes mellitus
Zn	Polaprezinc: Úlcera estómago Complejos: Diabetes mellitus, Dermatitis inducida por UV Ditiocarbamato: Diabetes Acetato: Enfermedad de Wilson

Tabla I.1. Ejemplos de metales y compuestos derivados utilizados como fármacos.

Aunque en algunos casos el tratamiento se realiza con sales inorgánicas del metal correspondiente, en la mayoría se utilizan complejos de coordinación y derivados organometálicos.^{3, 4} Estos complejos son vías prometedoras de actuación frente a distintas enfermedades, ya que presentan la posibilidad de formar fuertes uniones con la molécula diana, gracias a la combinación de la habilidad de coordinación de los metales (enlace covalente o iónico) con las propiedades estereoelectrónicas únicas del ligando (enlace por puente de hidrógeno, interacción de Van der Waals). Por otro lado, la complejación de iones metálicos a ligandos orgánicos es un método útil para reducir la toxicidad y mejorar tanto la biodisponibilidad como la absorción de los iones en los tejidos.

Los complejos metálicos presentan una serie de rasgos notables, que se enumeran a continuación:

- ✓ Presentan una gran variedad de números de coordinación y geometrías, que da lugar a una amplia diversidad estructural. Este hecho es importante para el diseño de farmacóforos (rasgos estructurales de una molécula que son reconocidos por el receptor y responsables de su actividad biológica) que no son accesibles con elementos orgánicos puros, y puede presentarse como una posible solución ante las resistencias halladas.⁵
- ✓ Son susceptibles de química combinatoria, ya que se construyen desde un centro común y las reacciones de intercambio de ligandos habitualmente ocurren con una tendencia predecible. Esto permite descubrir complejos con propiedades deseadas mediante síntesis combinatoria y cribado de alto rendimiento.
- ✓ Exhiben propiedades únicas y adaptables, como las cinéticas de intercambio de ligandos, propiedades catalíticas, actividades redox, acidez de Lewis, acceso a especies radicalarias, propiedades magnéticas y espectroscópicas, radioactividad, etc., que pueden ser explotadas para la generación de funciones a medida.

Los complejos metálicos pueden modificar la actividad enzimática de ciertas proteínas a través de la perturbación de un metal endógeno vital para dicha acción (por coordinación de ligandos exógenos al metal, sustitución del metal o eliminación del mismo), pero también la de aquellas proteínas no metaloenzimas (mediante la coordinación en residuos del sitio activo y bloqueo de la interacción con el sustrato, o la coordinación a residuos fuera del sitio activo y modificación de la integridad estructural).

Por otro lado, algunos fármacos presentan propiedades farmacológicas y toxicológicas modificadas al administrarlos en forma de complejos metálicos. Probablemente, el catión más ampliamente estudiado en este aspecto es Cu^{2+} , ya que sus compuestos de coordinación de bajo peso molecular han mostrado ser efectivos frente a algunas enfermedades, como tuberculosis, reuma, úlceras gástricas y cáncer.⁶⁻⁸

No obstante, la utilización de compuestos de coordinación y organometálicos con aplicaciones clínicas o farmacéuticas necesita cumplir con ciertos requisitos, como son gran actividad farmacológica, toxicidad y efectos secundarios mínimos, buena farmacocinética y farmacodinámica en materia de concentración efectiva en sangre, y evidencia de un mecanismo de acción farmacológico.

I.1.1. Complejos metálicos en terapia frente al VIH

Este año 2013, se cumplen 30 años de la aparición de la infección por VIH. Hasta el momento, el VIH/SIDA continúa siendo uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, con 33 millones de personas infectadas y con nuevas infecciones en aumento. En general, el proceso de infección se inicia cuando el virus entra en el organismo vía mucosas, y es transportado mediante células dendríticas a órganos linfoides, donde se encuentran las células T CD4+ activadas, dianas específicas del virus. Una infección eficaz de dichas células conduce al paso del virus al torrente sanguíneo y su diseminación a otras partes del organismo.

En la actualidad, no existe una vacuna profiláctica frente a la infección por este virus debido a múltiples motivos, como la necesidad de una respuesta humoral y celular amplia, o la capacidad intrínseca del virus para mutar, que le permite evadir el sistema inmune humoral. Sin embargo, en la actualidad, existen más de 25 fármacos antirretrovirales aprobados por la FDA para el tratamiento de pacientes infectados por VIH⁹ (*Fig. I.1*).

El ciclo replicativo del VIH consta de una serie de etapas que pueden ser consideradas como potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad (*Fig. I.1*) y que se dividen en:

- ✓ *Pasos de entrada:*¹⁰⁻¹² adsorción (i) y fusión (ii) del virus a la célula.
- ✓ *Pasos post-entrada:* descapsidación del virus (iii); transcripción reversa (iv); integración (v), replicación (vi) y transcripción (vii) del ADN proviral a ARNm viral; traducción del ARNm viral a proteínas virales precursoras (viii); ensamblaje (ix) y liberación (x).¹³

Inhibidores transcriptasa reversa

NRTIs – abacavir, didanosine, emtricitabine, lamivudine, tenofovir, zalcitabine, zidovudine

NNRTIs – atevirdine, delavirdine, efavirenz, nevirapine, piridinonas

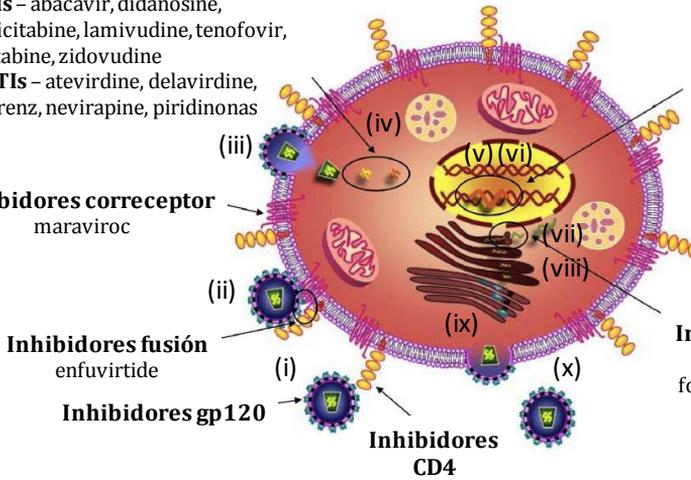
Inhibidores correceptor
maraviroc**Inhibidores fusión**
enfuvirtide**Inhibidores gp120****Inhibidores CD4****Inhibidores integrasa**
raltegravir**Inhibidores proteasa**
atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir

Figura I.1 Etapas del ciclo replicativo del VIH e inhibidores (modificado de Pirrone¹⁴).

En la actualidad, los pacientes son tratados mediante la Terapia Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA), que consiste en una combinación de, como mínimo, tres fármacos de al menos dos clases distintas de agentes antirretrovirales. Este tratamiento suprime la carga viral en plasma hasta niveles indetectables por los métodos habituales utilizados en la clínica y produce una recuperación de las células T CD4+. Sin embargo, este tratamiento no es capaz de erradicar el VIH. Tras la infección aguda, el virus es capaz de establecer reservorios en los tejidos que son inaccesibles a niveles óptimos de fármacos antivirales (reservorios anatómicos) o dentro de las células donde el virus permanece latente (reservorios celulares).¹⁵

La incapacidad de las terapias actuales para erradicar los reservorios virales supone tratamientos de por vida, lo que conlleva serios problemas como toxicidad de los fármacos a largo plazo, interacciones entre ellos y la aparición de resistencias.¹⁶ Todas ellas son razones para desarrollar nuevas terapias, que permitan tanto el tratamiento como la prevención de la infección por el VIH. La investigación actual se orienta a diseñar compuestos capaces de interaccionar

con más de una diana,^{17, 18} a combinar fármacos para crear potentes sinergias¹¹ o a inhibir dianas menos exploradas del ciclo,¹² como los pasos de ensamblaje y liberación, o los dedos de zinc, pequeños motivos proteicos capaces de unir este metal y que mantienen unida la nucleocápside del virus.

Los tratamientos enfocados al “ataque” en los pasos de entrada presentan una relevancia destacada, ya que impedirían la infección de las células y por lo tanto la transmisión viral (*Fig. I.2.A*). El proceso de inhibición de la entrada viral se inicia cuando el complejo proteico gp120-gp41 de la superficie del virus se une al receptor celular CD4. Este contacto induce un cambio conformacional en la proteína gp120, permitiéndole unirse a un correceptor celular (CCR5 o CXCR4, *Fig. I.2.B*). La unión de gp120 a CD4 y al correceptor induce un cambio conformacional en la proteína gp41, presentando el dominio N-terminal del péptido de fusión y permitiendo su inserción en la membrana de la célula diana. La formación de una estructura de horquilla que aproxima las membranas viral y celular, permite su fusión y finalmente la entrada del virus en la célula.

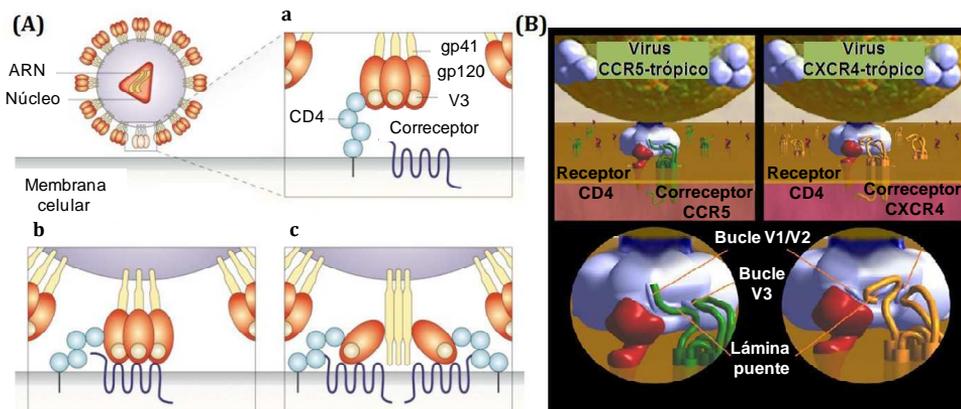


Figura I.2 A) Entrada del VIH en la célula (modificado de De Clercq y col.¹⁹). B) Proceso de reconocimiento de los correceptores CXCR4 y CCR5 por gp120 (modificado de McGowan y col.²⁰).

A pesar de todo, la única aproximación efectiva que puede finalmente conducir a la erradicación de la enfermedad es la prevención.⁹ Dada la dificultad para la obtención de *vacunas profilácticas* efectivas, se está investigando en métodos alternativos de profilaxis que eviten la infección por contacto sexual²¹ mediante barreras físicas (*preservativos*), químicas (*microbicidas tópicos*)¹⁴ o inmunológicas (*vacunas preventivas*, donde se incluye la *profilaxis pre-exposición* con antirretrovirales, como el caso del TRUVADA,²² primer fármaco aprobado para prevenir la infección por VIH).

La evolución en el desarrollo de los microbicidas ha dado lugar a su clasificación en tres grupos:²³⁻²⁵

- 1) *Microbicidas inespecíficos*, que incluyen surfactantes y detergentes, y agentes que aumentan los mecanismos de defensa normales de la vagina (ej. *lactobacilli*, tampones ácidos, peroxidasas).
- 2) *Microbicidas moderadamente específicos*, como péptidos y anticuerpos que aumentan los mecanismos de defensa, o polímeros (sulfato de celulosa, PRO 2000 y *carrageenan*) y dendrímeros polianiónicos (Fig. I.3), que bloquean la entrada mediante interacciones electrostáticas con las proteínas del virus, y en algunos casos, con los receptores celulares.
- 3) *Microbicidas específicos*, cualquier agente que inhibe un paso crítico en el ciclo del virus (especialmente las etapas iniciales).

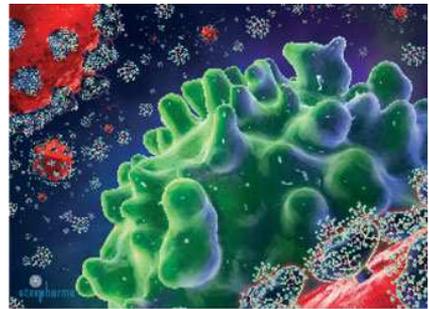


Figura I.3 Acción microbicida de los dendrímeros con grupos aniónicos (imagen de Starpharma Pty Ltd).

Los resultados más prometedores se han obtenido con los *microbicidas específicos* (fuzeon, maraviroc) o *moderadamente específicos* (dendrimeros polilisina SPL7013²⁵ (VivaGel, fase clínica III) o carbosilano G2-S16,²⁶⁻²⁸ Fig. I.4).

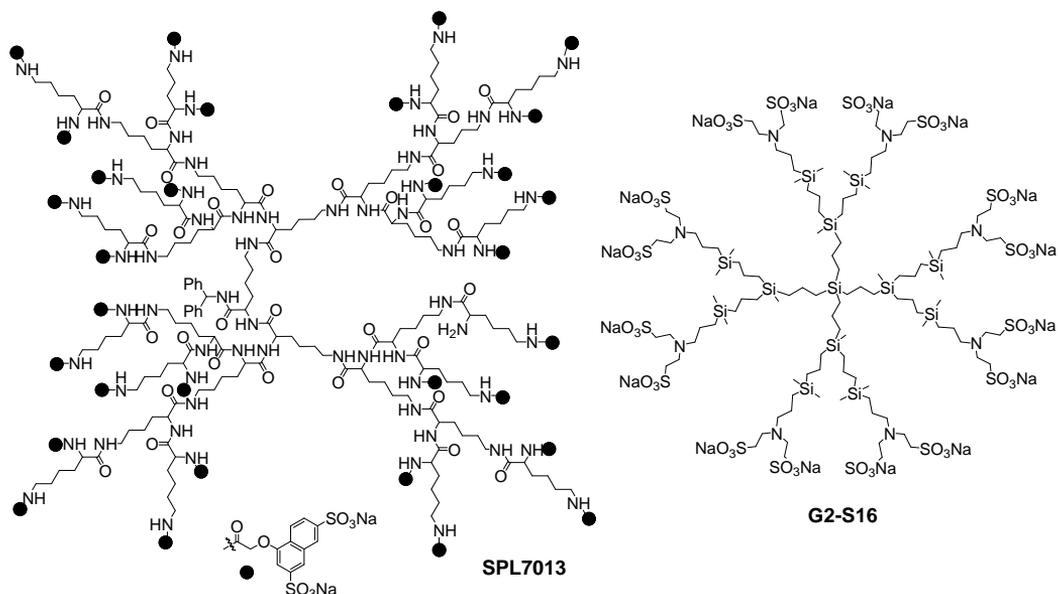


Figura I.4 Estructura química de los dendrimeros polianiónicos SPL7013 y G2-S16.

Muchos de los microbicidas se basan en *ligandos polianiónicos o sus derivados metalados*,²⁹ como polisulfonatos (ej. Suramin), policarboxilatos (ej. polímero aurintricarboxílico), polisulfatos (ej. dextrano sulfato), polioxometalatos (ej. JM1590) y metaloporfirinas aniónicas, destacando la actividad de los dos primeros grupos. Los dendrimeros G₄-PAMAM fenildicarboxilato BRI6195 y naftildisulfonato BRI2923,¹⁸ inhiben los pasos iniciales del ciclo del VIH y, en el caso del sulfonato, también inhiben la transcriptasa reversa y la integrasa, debido a su capacidad para entrar en las células. Otros polímeros fenil carboxilato³⁰ también inhiben la infección por este virus, con el requisito del control del pK_a de dichos grupos carboxilato.

La potencia antiviral del compuesto está determinada tanto por el número de grupos aniónicos³¹ como por el material sobre el que se soportan (surfactantes polimerizados, micelas, ciclodextrinas, dendrímeros...).³²⁻³⁶ En general, estos sistemas presentan un amplio espectro de actividad antiviral (inhiben tanto ARN como ADN virus) y pueden actuar de manera sinérgica con otros fármacos anti-VIH; además, algunos compuestos también son inhibidores de la transcriptasa reversa y de la proteasa,³⁷ o participan en otras actividades biológicas, como anticoagulantes o inhibidores de angiogénesis (ej. Suramin y otros polisulfonatos), siempre que su eficacia no disminuya por afinidad a proteínas plasmáticas. Sin embargo, el VIH ha desarrollado resistencias a algunos compuestos aniónicos mediante mutaciones en el bucle V3 de la proteína gp120, conduciendo a una carga general menos positiva y una disminución de la interacción electrostática con los compuestos polianiónicos.³⁸

La combinación de grupos aniónicos con centros metálicos en una misma molécula potencia la actividad antiviral, especialmente en aquéllos donde los grupos aniónicos no están directamente unidos al metal. Ejemplos de este comportamiento son los complejos de platino o paladio basados en 2-mercaptoetanosulfonato;³⁹ porfirinas y ftalocianinas sulfonatadas y carboxiladas, y sus complejos metálicos;²³ naftil porfirinas sulfonatadas y sus quelatos de cobre y hierro;⁴⁰ o triazinas sulfonatadas de platino (*Fig. I.5*).²⁴

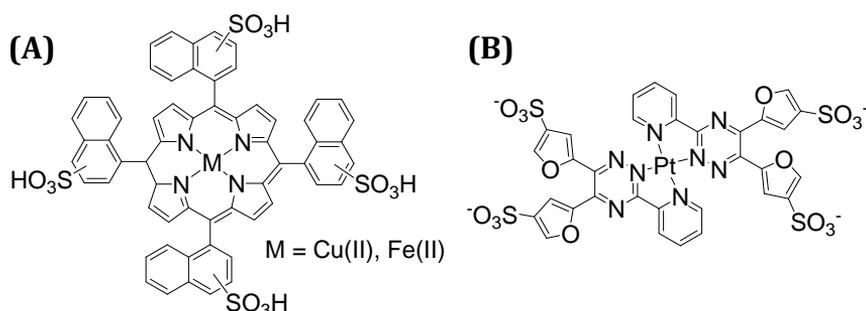


Figura I.5. Estructura de complejos metálicos polisulfonato: A) Naftil porfirinas. B) Triazinas sulfonatadas.

Aparte de los compuestos polianiónicos, otra aproximación consiste en el uso de sistemas biciclám¹³ como AMD3100, compuesto muy específico en su afinidad por el correceptor CXCR4. Su actividad aumenta al unir Cu^{2+} , Zn^{2+} o Ni^{2+} ,⁴¹⁻⁴³ ya que estos centros metálicos interactúan con los grupos carboxilato de CXCR4 (Fig. I.6). Además, las distintas configuraciones posibles de estos complejos metálicos influyen en la interacción receptor - macrociclo metálico.

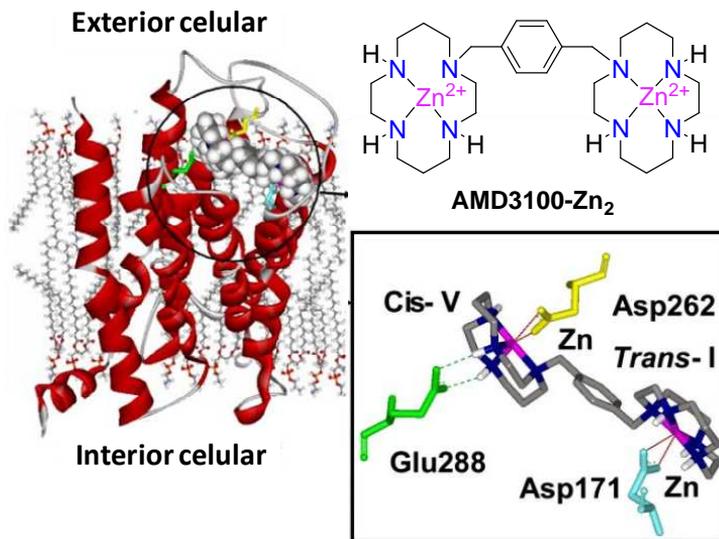


Figura I.6 Actividad anti-VIH del complejo biciclám AMD3100- Zn_2 , mediante unión específica al correceptor CXCR4 (modificado de Liang y col.⁴¹).

Los complejos metálicos también actúan en otras partes del ciclo viral³ sobre dianas sensibles a metales, como la transcriptasa reversa,⁴⁴ la integrasa⁴⁵,⁴⁶ la proteasa,⁴⁷,⁴⁸ la proteína transactivadora⁴⁹ o los dedos de zinc de la nucleocápside.⁵⁰⁻⁵² Aunque ciertos cationes metálicos libres (Zn^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^+ y Cu^{2+}) han mostrado su actividad inhibitoria frente a enzimas como la proteasa,⁵³,⁵⁴ no son agentes antivirales útiles dada la dificultad para entrar en las células y ejercer su actividad. La coordinación de los mismos con ciertos ligandos facilita su transporte hasta la molécula diana, pudiendo ser liberados para su acción o actuar en forma de complejo, como en el caso del complejo batocuproína disulfónico.⁵⁵

La proteasa presenta dos sitios principales donde se puede inhibir: el sitio activo, posición donde se produce la catálisis, y la interfaz, responsable de la estabilización de la estructura dimérica de la enzima; así, se pueden diseñar inhibidores que actúen en estos dos lugares, como por ejemplo derivados de Setcez.⁴⁸ La integrasa requiere cationes metálicos divalentes para alcanzar la ruptura del enlace fosfodiéster en la molécula de ADN. Los inhibidores diseñados contienen fragmentos químicos con gran habilidad para quelar cationes metálicos, como por ejemplo complejos derivados de β -dicetoácido.⁴⁵ La transcriptasa inversa es inhibida por complejos de oxovanadio(V), que además presentan actividad espermicida.⁴⁴ Algunos de estos complejos metálicos se muestran en la Figura I.7.

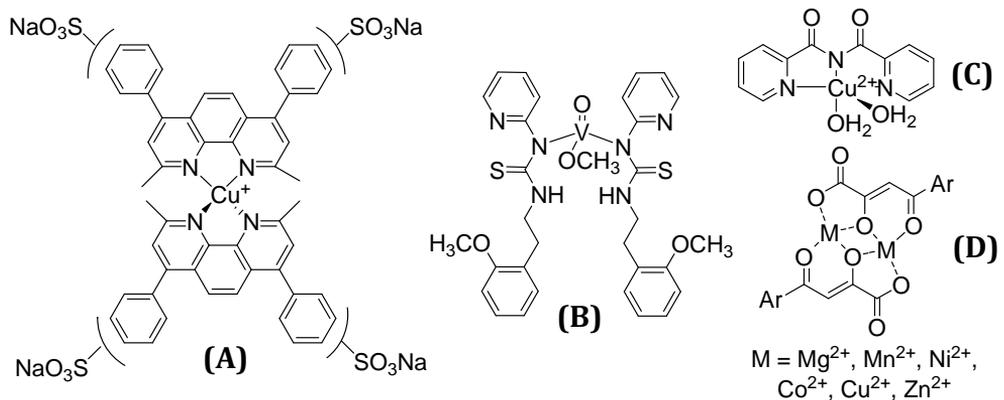


Figura I.7 Ejemplos de complejos metálicos que inhiben diferentes enzimas del ciclo viral, como la proteasa (A, C),⁴⁸ la transcriptasa reversa (B),⁴⁴ y la integrasa (D).⁴⁵

I.2. DENDRÍMEROS EN NANOMEDICINA

I.2.1. Nanomedicina y nanosistemas

La nanomedicina⁵⁶ se define como la monitorización, control, reparación y construcción de sistemas biológicos a nivel celular mediante el uso de materiales y estructuras organizados a nivel molecular. Persigue la síntesis de nanodispositivos para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento, cuyo único requisito es que presenten al menos una dimensión en la escala nanométrica, lo que les confiere propiedades físico-químicas únicas.

I.2.1.a. Propiedades de las nanopartículas

Las propiedades físico-químicas de las nanopartículas determinan su comportamiento en un sistema biológico¹ y les confieren ciertas ventajas farmacológicas, en comparación con agentes convencionales. Además, muchos fenómenos biológicos, como el reconocimiento inmune o el paso a través de barreras biológicas, están gobernados por consideraciones de tamaño. Entre las propiedades que más influyen se encuentran:

- ✓ El *tamaño de partícula*, que afecta a la biodisponibilidad, al tiempo de circulación y determina el mecanismo de internalización.
- ✓ La *proporción superficie/volumen*, que afecta a la solubilidad del compuesto.
- ✓ La *carga superficial*, que influye en el proceso de entrada en la célula.
- ✓ La *multifuncionalidad*, para combinar en una sola molécula varios rasgos beneficiosos que mejoren las propiedades globales del sistema (Fig. I.8).
- ✓ La *multivalencia*, que aumenta la afinidad entre elementos, imitando a las moléculas naturales.

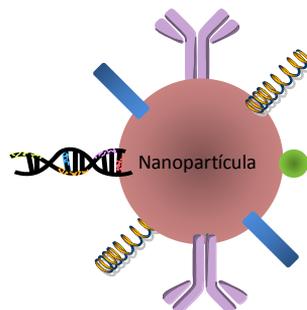


Figura I.8 Esquema de una nanopartícula multifuncionalizada.

1.2.1.b. Nanotecnología en el tratamiento de la infección por VIH

La nanotecnología⁵⁷ converge con la farmacología a través de sistemas como liposomas, micelas, dendrímeros, *quantum dots* y *quantum rods*, nanopartículas sólidas, sistemas de autoensamblaje, nanoemulsiones, etc., con el fin de prevenir y tratar enfermedades humanas.

En el tratamiento de la infección por el VIH, la nanotecnología actúa principalmente en dos direcciones.¹ Por un lado, en la obtención de *sistemas de liberación de fármacos* orientados a optimizar la distribución tisular y la biodisponibilidad de fármacos antirretrovirales, a disminuir los efectos secundarios, a reducir las interacciones fármaco-fármaco, al cotransporte de agentes antirretrovirales, a la solubilización de fármacos, al transporte de agentes anti-VIH complejos (por ejemplo ADN o ARN pequeño interferente (siRNA, de sus siglas en inglés *short interfering RNA*)). Por otro lado, en el diseño de *nuevos fármacos*, con mayor tiempo de vida media, con nuevos mecanismos de acción o dirigidos a erradicar los reservorios virales.

Entre los nanosistemas utilizados frente a la infección por el VIH, se encuentran los liposomas,⁵⁸⁻⁶⁰ las nanopartículas de oro,⁶¹ los dendrímeros,⁶²⁻⁶⁴ las micelas⁶⁵⁻⁶⁹ y las nanocápsulas,⁷⁰ cuyas estructuras esquemáticas se pueden observar en la Figura I.9.

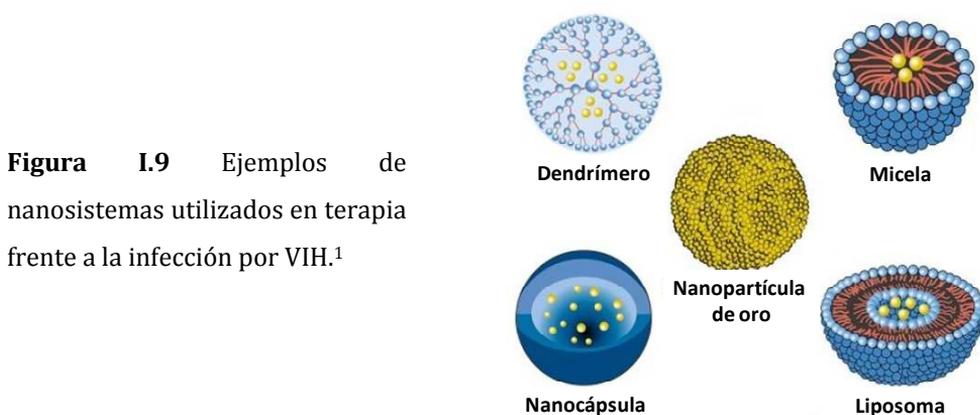


Figura I.9 Ejemplos de nanosistemas utilizados en terapia frente a la infección por VIH.¹

La evolución de la nanomedicina ha destacado la necesidad de preparar nanodispositivos estables, sofisticados pero perfectamente definidos. Los dendrímeros cumplen estas premisas y surgen como agentes terapéuticos versátiles. Debido a su tamaño y naturaleza polivalente, los dendrímeros pueden actuar sobre varios receptores simultáneamente, lo que puede conducir a efectos biológicos nuevos o potenciados. La posibilidad de controlar su síntesis permite dirigir su diseño a atacar la infección desde diferentes puntos: la modificación con azúcares, péptidos o grupos aniónicos les permite inhibir la infección; o pueden diseñarse para unirse a sitios específicos de ciertos virus.

I.2.2. Dendrímeros para aplicaciones biomédicas

I.2.2.a. Diseño y síntesis de dendrímeros

Los dendrímeros y dendrones pertenecen a un grupo muy especial de polímeros, caracterizado por su naturaleza ramificada y monodispersa (Fig. I.10). Su estructura se compone de un *núcleo* (dendrímero) o *punto focal* (dendrón) desde el que parten las ramificaciones; varias *unidades de ramificación* y *puntos de divergencia*, que determinan las diferentes *generaciones*, y diversos *grupos terminales*, que generalmente dictaminan las propiedades químicas del sistema.

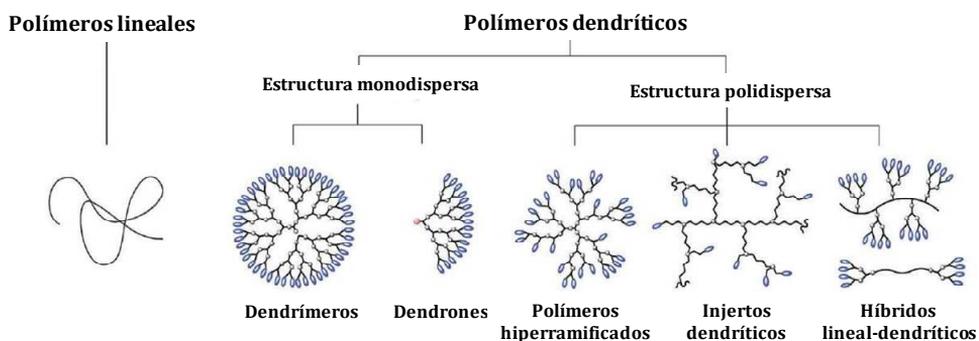


Figura I.10. Clasificación de los polímeros dendríticos (modificado de Walter y col.⁷¹).

El principal requisito en el diseño de dicha estructura para un sistema con futuras aplicaciones en biomedicina es su biocompatibilidad. Un candidato viable no puede ser tóxico,⁷² y debe ser biopermeable, capaz de circular en el torrente sanguíneo y sería adecuado que fuera capaz de dirigirse a su diana.

Además, su proceso de síntesis debe estar optimizado. La síntesis tradicional de dendrímeros, mediante una estrategia divergente o convergente, ha dado paso a las “estrategias sintéticas aceleradas” (Fig. I.11),^{71, 73} que reducen significativamente el tiempo de preparación. Estas estrategias pueden derivar de una revisión de las tradicionales, como la *estrategia del hipermonómero*, donde se emplean monómeros con un mayor número de grupos funcionales que el convencional AB₂; la *aproximación sintética de doble etapa*, donde se desarrollan de forma divergente un “hipernúcleo” y un “hipermonómero” y después se ensamblan mediante estrategia convergente, y la *aproximación sintética exponencial doble*, donde el dendrímero se crece de manera bidireccional a partir de un monómero protegido ortogonalmente.

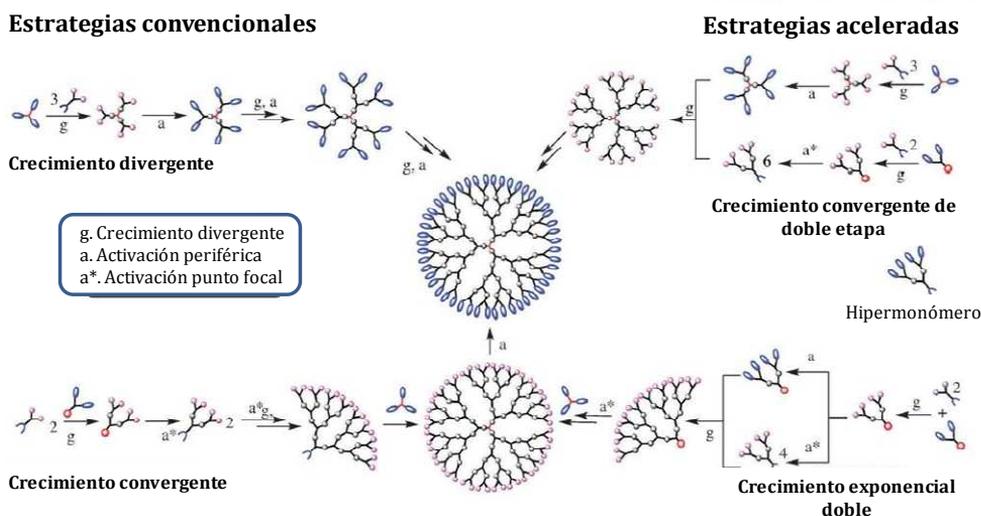


Figura I.11 Estrategias convencionales y aceleradas de síntesis de dendrímeros (modificado de Walter y col.⁷¹).

Las limitaciones de estas estrategias se superan al eliminar los pasos de activación iterativos, mediante *reacciones quimioselectivas* (ej. *Click-Chemistry*), la *estrategia de acoplamiento ortogonal*,⁷⁴ la *estrategia one-pot de cascada multi-click*,⁷⁵ la *estrategia de autoensamblaje*,... etc.

1.2.2.b. Caracterización de dendrímeros

Existe un amplio abanico de técnicas que permiten caracterizar la estructura dendrítica y determinar así sus propiedades físico-químicas. Por ejemplo, técnicas cromatográficas, como la *cromatografía de exclusión por tamaño* (SEC, del inglés *Size Exclusion Chromatography*), la cual permite determinar el volumen hidrodinámico, y el peso molecular si se acopla a un detector de difusión de luz de ángulo múltiple (MALS, del inglés *Multi-Angle Light Scattering*). También técnicas espectroscópicas como *Infrarrojo* y *Raman*, y la *espectrofotometría UV-Vis*. Esta última presenta un gran potencial, ya que permite determinar la pureza de dendrímeros con cromóforos, la influencia de la arquitectura dendrítica en el espectro electrónico, etc. La *espectrofotometría de fluorescencia* se utiliza para investigar procesos de dinámica molecular y la capacidad de encapsulación de dendrímeros. La *espectrometría de masas (MS)* y la *Resonancia Magnética Nuclear (RMN)* son técnicas muy habituales que aportan una gran cantidad de información. Además, existen otras técnicas menos frecuentes, como la *difracción de rayos X*, ya que en estado sólido los dendrímeros son habitualmente amorfos, la *difusión de luz*, o la *viscosimetría*. Por último, hay que destacar la *Resonancia de Spin Electrónico (RSE)*, que hace uso de determinadas sondas para caracterizar de manera amplia y precisa no sólo la estructura de los dendrímeros, sino también la interacción de éstos con moléculas como proteínas o fármacos.

1.2.2.c. Aplicaciones de dendrímeros en biomedicina

El desarrollo de dendrímeros con aplicaciones en el campo de la nanomedicina ha mostrado un aumento exponencial en los últimos años. Las aplicaciones^{56, 76-79} son innumerables y se pueden clasificar en 4 grandes grupos:

1) Transporte de moléculas con interés farmacológico

Se han diseñado numerosos nanovectores dendríticos para transportar moléculas con interés farmacológico. El transporte puede realizarse de diversas formas, encapsulando la molécula en el interior del dendrímero o interactuando con ella de forma electrostática o covalente (*Fig. I.12*).⁸⁰⁻⁸³

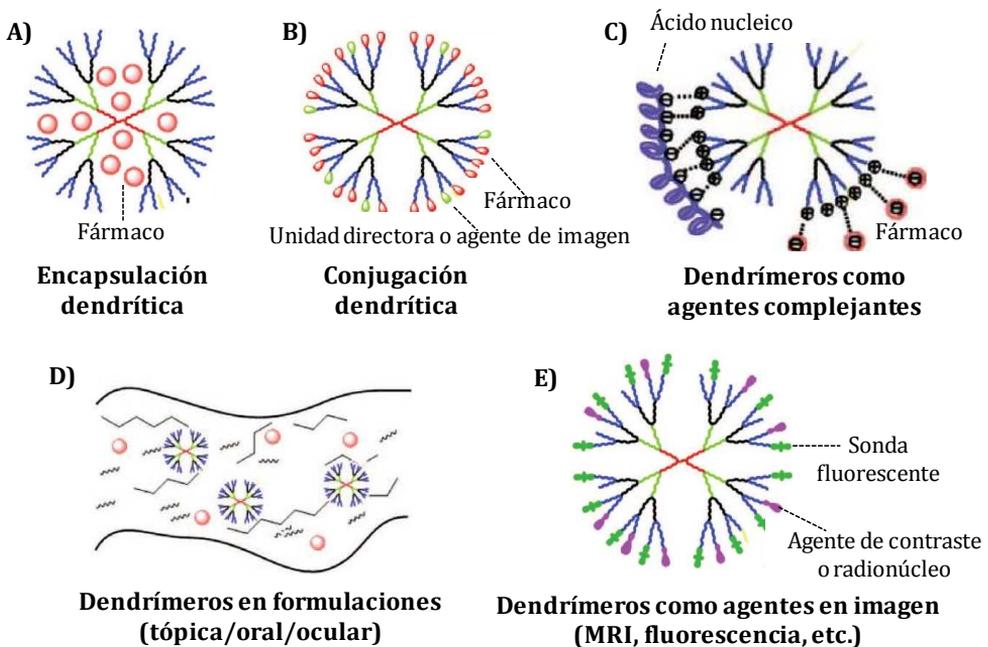


Figura I.12 Aplicaciones de los dendrímeros como agentes de transporte de fármacos (modificado de Menjoge y col.⁷⁸).

La *encapsulación de fármacos en el interior del dendrímero* o química “*host-guest*”, es posible debido al espacio interno relativamente flexible alrededor del núcleo y el denso empaquetado de los grupos funcionales periféricos. La internalización de la molécula implica encapsulación física, interacciones hidrofóbicas o enlace de hidrógeno. Esta estrategia, utilizada para transportar fármacos de naturaleza hidrofóbica, permite una carga de fármaco limitada y un control pequeño sobre su liberación, y puede ser mejorada mediante la inclusión del fármaco durante los pasos sintéticos (*encapsulación en “dendritic box”*). Meijer y col. mostraron la encapsulación de moléculas hidrofóbicas en dendrímeros PPI con grupos protectores terminales, cuya desprotección supone la apertura de la superficie y la liberación de las moléculas del interior.⁸⁴ Otras estrategias *host-guest* implican la preparación de hospedadores dinámicos⁸⁵ que liberen la molécula transportada bajo determinadas condiciones, siendo una prometedora estrategia para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos.

El *transporte de fármacos catiónicos o aniónicos mediante interacciones electrostáticas* a través de dendrímeros iónicos⁸⁶ permite una liberación eficaz pero poco controlada del fármaco. Mientras que fármacos cargados positivamente se localizan exclusivamente en la superficie de dendrímeros aniónicos, fármacos cargados negativamente se localizan tanto en la superficie como en cavidades interiores de dendrímeros catiónicos. Este es el caso de dendrímeros PPI y PAMAM con grupos amino terminales, con excelentes propiedades para el transporte de moléculas ácidas como las vitaminas B₃, C y B₆.⁸⁷ Numerosos fármacos han sido transportados mediante este sistema, como antiinflamatorios no esteroideos (AINES),^{88, 89} anti-cancerígenos,⁹⁰ antibacterianos,⁹¹ etc. Una de las aplicaciones más estudiadas de este tipo de transporte es la de dendrímeros catiónicos como *transportadores de material génico*⁹²⁻⁹⁵ y *péptidos*.⁹⁶ La interacción electrostática creada entre dendrímeros catiónicos y la carga negativa de plásmidos de ADN, siRNA u oligonucleótidos

antisentido, ha permitido generar un amplio campo de agentes de transfección no virales, seguros y eficientes. El *dendriplex* formado presenta carga resultante positiva, y puede interactuar con las membranas celulares cargadas negativamente, permitiendo la entrada endosomal del *dendriplex*. Una vez en el citoplasma, el material genético es liberado y ejerce su acción. El resultado del transporte de ADN plasmídico será la expresión de un gen de interés, que incrementará la producción de una proteína terapéutica, y el del transporte de siRNA será la disminución de la actividad de la molécula diana. SuperFect™ (Qiagen) es un famoso agente de transfección génica basado en dendrímeros.⁹⁷

El *anclaje mediante enlace covalente* a la estructura del dendrímero permite una carga de fármaco elevada y un gran control en su liberación, que ocurre de forma química o enzimática en función del tipo de enlace utilizado (éster, acil hidrazona, disulfuro...). Además, habitualmente conduce a una biodistribución optimizada del fármaco y una concentración en la región diana, aumentando así su efecto farmacológico mientras que se reduce la toxicidad asociada al fármaco libre. Por otro lado, este tipo de anclaje permite la introducción de otras moléculas que mejoran las propiedades generales del sistema, como pueden ser anticuerpos, azúcares, sondas fluorescentes, etc. Esta estrategia se ha utilizado para el tratamiento de numerosas enfermedades (ej. inflamación,⁹⁸ cáncer,^{99, 100} etc.).

2) Dendrímeros como agentes terapéuticos

Algunas estructuras dendríticas presentan actividad terapéutica *per se*, debido a las propiedades químicas de sus grupos funcionales. Dendrímeros con esqueleto de diversa naturaleza y grupos catiónicos o azúcares en su periferia presentan importante *actividad bactericida*,^{86, 101, 102} al destruir la pared bacteriana por interacciones electrostáticas; dendrímeros PAMAM y fosfodendrímeros cargados positivamente, y diferentes glicodendrímeros han

mostrando una interesante actividad como *agentes anti-amiloidogénicos* para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas;¹⁰³ dendrímeros funcionalizados con grupos aniónicos, azúcares o péptidos son eficaces *agentes antivirales*¹⁰⁴ y *microbicidas*.¹⁰⁵

3) Dendrímeros en imagen

La arquitectura controlada de los dendrímeros permite un anclaje multivalente de quelantes de radionúcleos, para su utilización como agentes de contraste en Imagen por Resonancia Magnética (MRI, del inglés *Magnetic Resonance Imaging*) o Rayos X (*ver apartado I.3.1.b*). Además, otros dendrímeros actúan por sí mismos como trazadores de doble fotón para imagen *in vivo*,¹⁰⁶ siendo esta técnica TPEF (del inglés *Two-Photon Excitation Fluorescence*) muy útil por su gran resolución espacial y profundidad.

4) Otras aplicaciones

La gran versatilidad de las estructuras dendríticas ha dado lugar a otra serie de aplicaciones en biomedicina, como las que se describen a continuación:

- ✓ Los dendrímeros son plataformas multivalentes molecularmente definidas y no inmunogénicas que pueden actuar como *coadyuvantes en vacunas*.^{107, 108} El anclaje de pequeñas moléculas inmunoestimuladoras o antígenos da lugar a conjugados perfectamente definidos, que aumentan la eficacia de las vacunas. Los dendrímeros polilisina de tipo “péptido antigénico múltiple” (MAP, del inglés *Multiple Antigen Peptide*), iniciada por Tam y col.,¹⁰⁹ son la familia más estudiada con este propósito y en la actualidad se están evaluando para el transporte de antígenos no peptídicos, como carbohidratos, haptenos, etc.¹¹⁰

- ✓ La capacidad de los dendrímeros para unir proteínas y anticuerpos ha permitido su aplicación en *inmunoensayos* y *diagnóstico clínico*,¹¹¹ e incluso ha dado lugar al test para diagnóstico cardiaco aprobado por la FDA Stratus® CS Acute Care™ (Dade Behring). Además, su capacidad para unir ADN puede utilizarse para la preparación de biochips de ADN de gran sensibilidad.⁹³

- ✓ La *terapia fotodinámica* (PDT, del inglés *Photodynamic Therapy*) es una prometedora tecnología para el tratamiento menos invasivo del cáncer, basada en la administración sistémica de un fotosensibilizador y la irradiación láser en el tejido diana, originando especies reactivas de oxígeno tóxicas que destruyen dicho tejido. El primer dendrímero utilizado con este objetivo fue un dendrímero PAMAM con unidades de ácido 5-aminolevulínico¹¹² y diversos sistemas se han desarrollado posteriormente.

- ✓ La *terapia de captura de neutrones de boro* (BNCT, del inglés *Boron Neutron Capture Therapy*) utiliza la energía radiante desprendida en dicho proceso para la destrucción selectiva de tejidos tumorales. Los dendrímeros son transportadores útiles de boro debido a su estructura definida y su multivalencia, que permiten alcanzar la adecuada concentración de boro en un punto determinado para una terapia efectiva. El primer ejemplo se desarrolló a partir de la conjugación de un borano a un dendrímero tipo PAMAM¹¹³ y otros sistemas se han desarrollado posteriormente mejorados con sondas fluorescentes, polietilenglicol (PEG), etc.¹¹⁴

I.3. METALODENDRÍMEROS EN NANOMEDICINA

Las aplicaciones de los dendrímeros se multiplican exponencialmente cuando su química se combina con las propiedades de los metales, abarcando campos como catálisis, sensores, diagnosis médica, etc.^{115, 116} En esta Memoria, los antecedentes se limitan a los de aquéllos utilizados en biomedicina.

I.3.1. Metalodendrimeros para aplicaciones biomédicas

1.3.1.a. Diseño y síntesis de metalodendrimeros

El diseño y la síntesis de metalodendrimeros están condicionados por su posterior aplicación, pudiendo hallar el metal en distintas posiciones (*Fig. 1.13*)

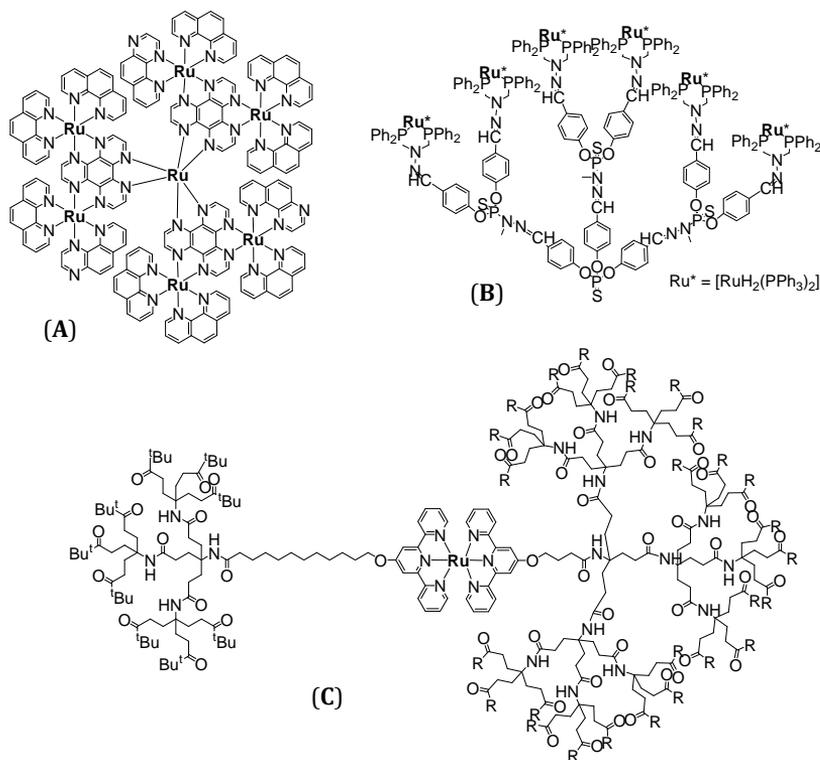


Figura I.13 Ejemplos de metalodendrimeros de rutenio donde los iones metálicos presentan distintas funciones estructurales.¹¹⁷ A) Rutenio como núcleo y centro de ramificación. B) Rutenio como grupo terminal. C) Rutenio como conector de bloques.

En general, las estrategias sintéticas difieren en función de la posición del ión metálico en la estructura dendrítica, pudiendo incluirse en dicha estructura (actuando como punto de ramificación, conector de bloques, núcleo o grupo terminal) o coordinándose de manera posterior (Fig. I.13). Excelentes revisiones se han publicado en relación con esta materia.^{115, 117-119}

1.3.1.b. Aplicaciones de metalodendrimeros en biomedicina

1) Metalodendrimeros como agentes terapéuticos

Al igual que los dendrimeros, sus complejos metálicos se utilizan para el tratamiento de diversas enfermedades, como se detalla a continuación:

- ✓ En el *tratamiento de cáncer*, se emplean principalmente metalodendrimeros basados en platino. Complejos de Pt(II) con dendrimeros aniónicos (PAMAM-CO₂Na)⁹⁹ o catiónicos (DAB-PPI¹²⁰ o PPI-{1,2-bis(4-fluorofenil)-etilenodiamino}platino(II))¹²¹ muestran actividad citotóxica en líneas tumorales de ratón y humanas. Dendrimeros G₁-PAMAM con complejos multinucleares de platino o cobre¹²² presentan una actividad citotóxica mejorada, al igual que otros sistemas de Pd(II), Au(I), Ru(II) o Ru(III).¹¹⁶
- ✓ La actividad antiplasmodial frente a *P. falciparum*¹²³ de dendrimeros PPI con unidades de ferroceniltiosemicarbazona conjugadas en la periferia les configura como agentes para el tratamiento de la malaria.
- ✓ Otros sistemas han mostrado buena *actividad antimicrobiana* frente a varias bacterias Gram positivas, como es el caso de dendrimeros PAMAM que encapsulan sales de plata con liberación lenta.¹²⁴
- ✓ Los metalodendrimeros también se aplican en *terapia fotodinámica* (PDT) de cáncer. Los ensayos *in vitro* e *in vivo* de porfirinas dendríticas basadas en zinc muestran su potencial como fotosensibilizadores y diversos sistemas se han desarrollado con este objetivo.^{125, 126}

2) Metalodendrimeros en imagen médica

Los progresos en medicina nuclear han permitido el diseño de *agentes de transporte de radionúcleos* dirigidos selectivamente al tumor, para mejorar el resultado del diagnóstico y la terapia del cáncer. En este campo, los dendrimeros juegan un papel importante, debido a su arquitectura controlada que posibilita un anclaje multivalente de quelantes de radionúcleos y unidades directoras.¹²⁷ Dendrimeros basados en ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I y ^{68}Ga se utilizan en imagen médica nuclear, para Tomografía Computerizada de Emisión de Fotones (SPECT, del inglés *Single Photon Emission Computed Tomography*) y Tomografía de Emisión de Positrones (PET, del inglés *Positron Emission Tomography*). Sistemas dendríticos que transportan radiomarcadores (^{64}Cu , ^{18}F , ^{76}Br , ^{68}Ga , ^{111}In) también se han utilizado.

Otros sistemas son diseñados como *agentes de contraste para MRI*. Esta técnica es una herramienta para el diagnóstico no invasivo, y se basa en el tiempo de relajación no homogéneo de los protones en diferentes tejidos. En presencia de iones paramagnéticos (especialmente Gd(III)), el tiempo de relajación de los protones del agua puede reducirse y generar una buena relación señal/ruido. La conjugación de estos iones a la estructura dendrítica supone la disminución de su toxicidad y de la tasa de aclaramiento, y el aumento de la permeabilidad y la retención (efecto EPR, *Enhanced Permeability and Retention Effect*). Dendrimeros tipo PAMAM¹²⁸ o PPI¹²⁹ con unidades Gd(III)-DTPA (dietilentriamino pentacetato) actúan como eficaces agentes de contraste. La sustitución de las unidades DTPA por tetraazaciclododecano-1,4,7,10-triacetato (DOTA), aumenta la estabilidad de los complejos y mejora las propiedades del agente de contraste; de hecho, un dendrimer polilisina con 24 unidades Gd(III)-DOTA, Gadomer-17® (Bayer/Schering Pharma AG, Alemania), se encuentra en fases clínicas para imagen vascular.^{78, 130, 131}

De forma similar a los agentes de contraste para MRI, se han desarrollado sistemas dendríticos para su utilización como *agentes de contraste mediante Rayos X*. Es el caso de sistemas basados en varios complejos organometálicos de bismuto y estaño.^{132, 133}

Algunos metalodendrimeros se han estudiado como *sensores de oxígeno in vivo* para imagen de tejidos. Jaulas dendríticas basadas en aminoácidos, con PEG terminal y complejos de paladio de tetrabenzoporfirinas,¹³⁴ exhiben fuerte emisión fosforescente dependiente de oxígeno.

3) Metalodendrimeros con propiedades biomiméticas

La estructura tridimensional de los dendrimeros, similar a la conformación natural de las proteínas, les confiere *propiedades biomiméticas*,^{135, 136} es decir, la habilidad para imitar a materiales naturales. Estas propiedades se manifiestan en los metalodendrimeros con comportamientos como:

- ✓ El *autoensamblaje*, basado en interacciones no covalentes metal-ligando o metal-metal. Dendrones basados en pirazol forman metalaciclos triméricos capaces de autoensamblarse mediante interacciones metal-metal y dar lugar a materiales nanofibrosos superhelicoidales fosforescentes¹³⁷ (*Fig. I.14.A*).
- ✓ La *catálisis selectiva de sitio*, que permite dar lugar a reacciones regioselectivas. Dendrimeros poliéster con núcleo de Mn-porfirina muestran catálisis selectiva en epoxidación de alquenos.¹³⁸
- ✓ La *recogida artificial de luz*, para imitar la fotosíntesis natural mediante sistemas supramoleculares sintéticos, como el caso de metaloporfirinas de zinc dendronizadas (*Fig. I.14.B*).¹³⁹
- ✓ *Propiedades redox* que imitan el comportamiento de metaloproteínas naturales, como los sistemas dendríticos con núcleo bimetálico con puente de oxígeno de Cu(I) o Fe(II)¹⁴⁰ (*Fig. I.14.C*).

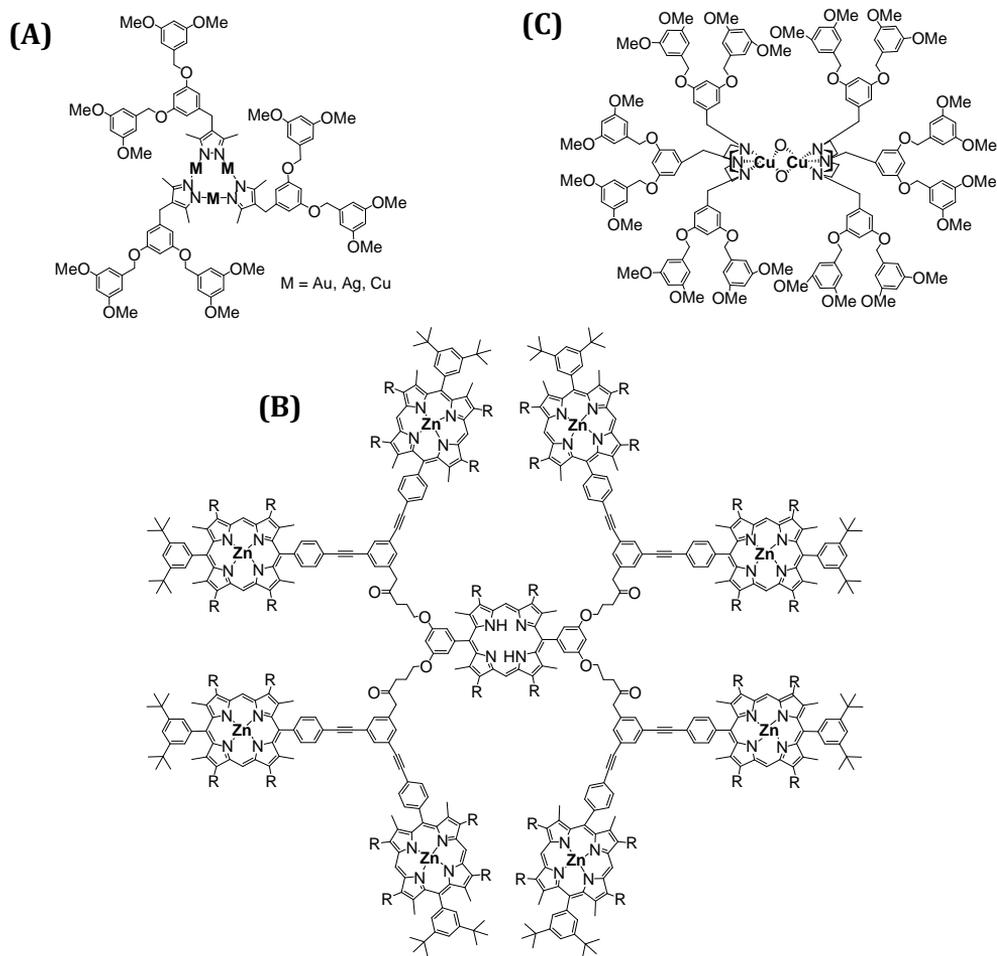


Figura I.14. Ejemplos de metalodendrimeros con propiedades biomiméticas:¹³⁵ A) Metalociclos capaces de autoensamblarse. B) Metaloporfirinas dendronizadas de zinc útiles para la recogida artificial de luz. C) Dendrimeros de cobre capaces de mimetizar metaloproteínas naturales.

I.4. BIBLIOGRAFÍA

1. R. Parboosing, G. E. M. Maguire, P. Govender, H. G. Kruger. *Viruses*, **2012**, *4*, 488-520.
2. H. Sakurai. *J. Health Sci.*, **2010**, *56*, 129-143.
3. A. Y. Louie, T. J. Meade. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2711-2734.
4. E. Meggers. *Chem. Commun.*, **2009**, 1001-1010.
5. U. Dietrich. *AIDS Rev.*, **2001**, *3*, 89-97.
6. J. R. J. Sorenson. *J. Med. Chem.*, **1976**, *19*, 135-148.
7. D. H. Brown, W. E. Smith, J. W. Teape, A. J. Lewis. *J. Med. Chem.*, **1980**, *23*, 729-734.
8. M. Ruiz, L. Perelló, R. Ortiz, A. Castiñeiras, C. Maichle-Mössmer, E. Cantón. *J. Inorg. Biochem.*, **1995**, *59*, 801-810.
9. J. A. Esté, T. Cihlar. *Antiviral Res.*, **2010**, *85*, 25-33.
10. J. A. Esté, A. Telenti. *Lancet*, **2007**, *370*, 81-88.
11. B. M. O'Hara, W. C. Olson. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2002**, *2*, 523-528.
12. M. Desai, G. Iyer, R. K. Dikshit. *Indian J. Pharmacol.*, **2012**, *44*, 288-298.
13. E. De Clercq. *Metal-based Drugs*, **1997**, *4*, 173-192.
14. V. Pirrone, B. Wigdahl, F. C. Krebs. *Antiviral Res.*, **2011**, *90*, 168-182.
15. J. R. Clarke, N. C. White, J. N. Weber. *AIDS Rev.*, **2000**, *2*, 15-22.
16. M. D. Marsden, J. A. Zack. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2009**, *63*, 7-10.
17. E. De Clercq. *Med. Res. Rev.*, **2002**, *22*, 531-565.
18. M. Witvrouw, V. Fikkert, W. Pluymers, B. Matthews, K. Mardel, D. Schols, J. Raff, Z. Debyser, E. De Clercq, G. Holan, C. Pannecouque. *Mol. Pharmacol.*, **2000**, *58*, 1100-1108.
19. E. De Clercq. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2003**, *2*, 581.

20. J. P. McGowan, S. Shah. *The PRN Notebook*, **2010**, 15.
21. C. J. Elias, L. L. Heise. *Aids*, **1994**, 8, 1-9.
22. B. Roehr. *Br. Med. J.*, **2012**, 345, e4879.
23. A. N. Vzorov, L. G. Marzilli, R. W. Compans, D. W. Dixon. *Antiviral Res.*, **2003**, 59, 99-109.
24. A. N. Vzorov, D. Bhattacharyya, L. G. Marzilli, R. W. Compans. *Antiviral Res.*, **2005**, 65, 57-67.
25. G. Tachedjian. *Microbiology Australia*, **2010**, 188-191.
26. L. Chonco, M. Pion, E. Vacas, B. Rasines, M. Maly, M. J. Serramía, L. López-Fernández, F. J. de la Mata, S. Álvarez, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández. *J. Control. Release*, **2012**, 161, 949-958.
27. B. Rasines, J. Sánchez-Nieves, M. Maiolo, M. Maly, L. Chonco, J. L. Jiménez, M. Á. Muñoz-Fernández, F. J. de la Mata, R. Gómez. *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 12733-12748.
28. F. J. de la Mata, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández, J. Sánchez-Nieves, P. Ortega, L. Chonco, B. Rasines, E. Arnaiz, M. J. Serramía. *International Pat.*, WO2011101520, **2011**.
29. E. De Clercq. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1995**, 8, 200-239.
30. R. F. Rando, S. Obara, M. C. Osterling, M. Mankowski, S. R. Miller, M. L. Ferguson, F. C. Krebs, B. Wigdahl, M. Labib, H. Kokubo. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2006**, 50, 3081-3089.
31. M. Cushman, P. L. Wang, S. H. Chang, C. Wild, E. De Clercq, D. Schols, M. E. Goldman, J. A. Bowen. *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 329-337.
32. A. Leydet, P. Barthelemy, B. Boyer, G. Lamaty, J. P. Roque, A. Bousseau, M. Evers, Y. Henin, R. Snoeck, G. Andrei. *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 2433-2440.
33. A. Leydet, H. El Hachemi, B. Boyer, G. Lamaty, J. P. Roque, D. Schols, R. Snoeck, G. Andrei, S. Ikeda, J. Neyts, D. Reymen, J. Esté, M. Witvrouw, E. De Clercq. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 1626-1634.
34. A. Leydet, V. Barragán, B. Boyer, J. L. Montero, J. P. Roque, M. Witvrouw, J. Esté, R. Snoeck, G. Andrei, E. De Clercq. *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 342-349.

35. A. Leydet, C. Jeantet-Segonds, C. Bouchitte, C. Moullet, B. Boyer, J. P. Roque, M. Witvrouw, J. Esté, R. Snoeck, G. Andrei, E. De Clercq. *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 350-356.
36. A. Leydet, C. Moullet, J. P. Roque, M. Witvrouw, C. Pannecouque, G. Andrei, R. Snoeck, J. Neyts, D. Schols, E. De Clercq. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4927-4932.
37. J. T. Rhule, C. L. Hill, D. A. Judd, R. F. Schinazi. *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 327-358.
38. J. A. Esté, D. Schols, K. De Vreese, K. Van Laethem, A. M. Vandamme, J. Desmyter, E. De Clercq. *Mol. Pharmacol.*, **1997**, *52*, 98-104.
39. D. E. Bergstrom, L. Xiaoping, T. D. Wood, M. Witvrouw, S. Ikeda, G. Andrei, R. Snoeck, D. Scjols, E. De Clercq. *Antiviral Chem. Chemother.*, **2002**, *13*, 185-195.
40. D. W. Dixon, A. F. Gill, L. Giribabu, A. N. Vzorov, A. B. Alam, R. W. Compans. *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, *99*, 813-821.
41. X. Liang, P. J. Sadler. *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, *33*, 246-266.
42. A. Khan, J. Greenman, S. J. Archibald. *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*, 2257-2277.
43. A. Khan, G. Nicholson, J. Greenman, L. Madden, G. McRobbie, C. Pannecouque, E. De Clercq, R. Ullom, D. L. Maples, R. D. Maples, J. D. Silversides, T. J. Hubin, S. J. Archibald. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 3416-3417.
44. O. J. D'Cruz, Y. Dong, F. M. Uckun. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, *302*, 253-264.
45. M. Sechi, A. Bacchi, M. Carcelli, C. Compari, E. Duce, E. Fisicaro, D. Rongolino, P. Gates, M. Derudas, L. D. Al-Mawsawi, N. Neamati. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 4248-4260.
46. B. Courcot, D. Firley, P. Becker, J. M. Gillet, P. Pattison, D. Chernyshov, M. Sghaier, F. Zouhiri, D. Desmaele, J. d'Angelo, F. Bonhomme, S. Geiger, N. E. Ghermani. *J. Phys. Chem. B.*, **2007**, *111*, 6042-6050.
47. M. Kozisek, P. Cígler, M. Lepsík, J. Fanfrlík, P. Rezácová, J. Brynda, J. Pokorná, J. Plesek, B. Grüner, K. G. Sasková, J. Václavíková, V. Král, J. Konvalinka. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 4839-4843.

48. F. Lebon, N. Boggetto, M. Ledecq, F. Durant, Z. Benatallah, S. Sicsis, R. Lapouyade, O. Kahn, A. Mouithys-Mickalad, G. Deby-Dupont, M. Reboud-Ravaux. *Biochem. Pharm.*, **2002**, *63*, 1863-1873.
49. H. C. Schroder, D. Ugarkovic, R. Wenger, P. Reuter, T. Okamoto, W. E. Muller. *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, **1990**, *6*, 659-672.
50. R. J. Gorelick, S. M. Nigida Jr., J. W. Bess Jr., L. O. Arthur, L. E. Henderson, A. Rein. *J. Virol.*, **1990**, *64*, 3207-3211.
51. J. A. Loo, T. P. Holler, J. Sánchez, R. Gogliotti, L. Maloney, M. D. Reily. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4313-4320.
52. X. Yu, Y. Hathout, C. Fenselau, R. C. Sowder, L. E. Henderson, W. G. Rice, J. Mendeleyev, E. Kun. *Chem. Res. Toxicol.*, **1995**, *8*, 586-590.
53. Z. Y. Zhang, I. M. Reardon, J. O. Hui, K. L. O'Connell, R. A. Poorman, A. G. Tomasselli, R. L. Heinrikson. *Biochemistry*, **1991**, *30*, 8717-8721.
54. A. R. Karlstrom, R. L. Levine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, 5552-5556.
55. D. A. Davis, A. A. Branca, A. J. Pallenberg, T. M. Marschner, L. M. Patt, L. G. Chatlynne, R. W. Humphrey, R. Yarchoan, R. L. Levine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1995**, *322*, 127-134.
56. R. Duncan, R. Gaspar. *Mol. Pharm.*, **2011**, *8*, 2101-2141.
57. W. E. Bawarski, E. Chidlowsky, D. J. Bharali, S. A. Mousa. *Nanomedicine*, **2008**, *4*, 273-282.
58. N. C. Phillips, C. Tsoukas. *Blood*, **1992**, *79*, 1137-1143.
59. A. Desormeaux, P. Harvie, S. Perron, B. Makabi-Panzu, D. Beauchamp, M. Tremblay, L. Poulin, M. G. Bergeron. *AIDS* **1994**, *8*, 1545-1553.
60. P. Harvie, A. Desormeaux, N. Gagne, M. Tremblay, L. Poulin, D. Beauchamp, M. G. Bergeron. *AIDS*, **1995**, *9*, 701-707.
61. M. C. Bowman, T. E. Ballard, C. J. Ackerson, D. L. Feldheim, D. M. Margolis, C. Melander. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 6896-6897.
62. T. Dutta, N. K. Jain. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1770*, 681-686.

-
63. T. Dutta, H. B. Agashe, M. Garg, P. Balakrishnan, M. Kabra, N. K. Jain. *J. Drug Target.*, **2007**, *15*, 89-98.
 64. T. Dutta, M. Garg, N. K. Jain. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2008**, *34*, 181-189.
 65. D. A. Chiappetta, G. Facorro, E. R. de Celis, A. Sosnik. *Nanomedicine*, **2011**, *7*, 624-637.
 66. D. A. Chiappetta, C. Hocht, A. Sosnik. *Curr. HIV Res.*, **2010**, *8*, 223-231.
 67. D. A. Chiappetta, C. Hocht, C. Taira, A. Sosnik. *Nanomedicine*, **2010**, *5*, 11-23.
 68. D. A. Chiappetta, C. Hocht, C. Taira, A. Sosnik. *Biomaterials*, **2011**, *32*, 2379-2387.
 69. D. A. Chiappetta, A. Sosnik. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2007**, *66*, 303-317.
 70. M. Pereira de Oliveira, E. Garcion, N. Venisse, J. P. Benoît, W. Couet, J. C. Olivier. *Pharm. Res.*, **2005**, *22*, 1898-1905.
 71. M. V. Walter, M. Malkoch. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 4593-4609.
 72. A. Janaszewska, K. Maczynska, G. Matuszko, D. Appelhans, B. Voit, B. Klajnert, M. Bryszewska. *New J. Chem.*, **2012**, *36*, 428-437.
 73. P. Antoni, Y. Hed, A. Nordberg, D. Nystrom, H. von Holst, A. Hult, M. Malkoch. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2009**, *48*, 2126-2130.
 74. P. Antoni, M. J. Robb, L. Campos, M. Montanez, A. Hult, E. Malmström, M. Malkoch, C. J. Hawker. *Macromolecules*, **2010**, *43*, 6625-6631.
 75. X.-Q. Xiong. *Aust. J. Chem.*, **2009**, *62*, 1371-1377.
 76. O. Rolland, C.-O. Turrin, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral. *New J. Chem.*, **2009**, *33*, 1809-1824.
 77. C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. Frechet, F. C. Szoka. *Nat. Biotechnol.*, **2005**, *23*, 1517-1526.
 78. A. R. Menjoge, R. M. Kannan, D. A. Tomalia. *Drug Discov. Today*, **2010**, *15*, 171-185.
 79. H. Yang, W. J. Kao. *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.*, **2006**, *17*, 3-19.
 80. Y. Cheng, Z. Xu, M. Ma, T. Xu. *J. Pharm. Sci.*, **2008**, *97*, 123-143.

81. A. D'Emanuele, D. Attwood. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, *57*, 2147-2162.
82. S. Drabu, S. Khatri, S. Babu. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.*, **2010**, *1*, 464-471.
83. A. Samad, M. I. Alam, K. Saxena. *Curr. Pharm. Design*, **2009**, *15*, 2958-2969.
84. J. F. G. A. Jansen, E. M. M. de Brabander van den Berg, E. W. Meijer. *Science*, **1994**, *266*, 1226-1229.
85. U. Boas, S. H. M. Sontjens, K. J. Jensen, J. B. Christensen, E. W. Meijer. *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 433-439.
86. B. Rasines, J. Sánchez-Nieves, I. T. Molina, M. Guzmán, M. Á. Muñoz-Fernández, R. Gómez, F. J. de la Mata. *New J. Chem.*, **2012**, *36*, 360-370.
87. E. Boisselier, L. Liang, M. Dalko-Csiba, J. Ruiz, D. Astruc. *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 6056-6068.
88. O. M. Milhem, C. Myles, N. B. McKeown, D. Attwood, A. D'Emanuele. *Int. J. Pharm.*, **2000**, *197*, 239-241.
89. P. Kolhe, E. Misra, R. M. Kannan, S. Kannan, M. Lieh-Lai. *Int. J. Pharm.*, **2003**, *259*, 143-160.
90. E. R. Gillies, J. M. J. Fréchet. *Drug Discov. Today*, **2005**, *10*, 35-43.
91. M. Ma, Y. Cheng, Z. Xu, P. Xu, H. Qu, Y. Fang, T. Xu, L. Wen. *Eur. J. Med. Chem.*, **2007**, *42*, 93-98.
92. X. Liu, P. Rocchi, L. Peng. *New J. Chem.*, **2011**, *36*, 256-263.
93. A.-M. Caminade, C.-O. Turrin, J.-P. Majoral. *Chem.-Eur. J.*, **2008**, *14*, 7422-7432.
94. J. L. Jiménez, R. Gómez, V. Briz, R. Madrid, M. Bryszewska, F. J. de la Mata, M. Á. Muñoz-Fernández. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2012**, *22*, 75-82.
95. N. de las Cuevas, S. García-Gallego, B. Rasines, L. González Guijarro, F. J. de la Mata, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez. *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*, 5052-5061.
96. M. Ionov, K. Ciepluch, B. Klajnert, S. Glinska, R. Gómez, F. J. de la Mata, M. Á. Muñoz-Fernández, M. Bryszewska. *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, **2013**, *101*, 236-242.

97. M. Tang, C. T. Redemann, F. C. Szoka Jr. *Bioconjugate Chem.*, **1996**, *7*, 703-714.
98. B. Clares, M. A. Ruiz, V. Gallardo, J. L. Arias. *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*, 3203-3211.
99. N. Malik, E. G. Evagorou, R. Duncan. *Anti-Cancer Drugs*, **1999**, *10*, 767-776.
100. A. K. Patri, J. F. Kukowska-Latallo, J. R. Baker. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, *57*, 2203-2214.
101. A. Castonguay, E. Ladd, T. G. M. van de Ven, A. Kakkar. *New J. Chem.*, **2012**, *36*, 199-204.
102. F. J. de la Mata, R. Gómez, M. Á. Muñoz-Fernández, B. Rasines. *International Pat.*, WO2011121161, **2011**.
103. N. Benseny-Cases, O. Klementieva, J. Cladera. *New J. Chem.*, **2012**, *36*, 211-216.
104. A. Rosa Borges, C. L. Schengrund. *Curr. Drug Targets*, **2005**, *5*, 247-254.
105. J. L. Jiménez, M. Pion, F. J. de la Mata, R. Gómez, E. Muñoz, M. Leal, M. A. Muñoz-Fernández. *New J. Chem.*, **2012**, *36*, 299-309.
106. O. Rolland, C.-O. Turrin, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral. *New J. Chem.*, **2009**, *33*, 1809-1824.
107. P. M. H. Heegaard, U. Boas, N. S. Sorensen. *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 405-418.
108. T. C. Shiao, R. Roy. *New J. Chem.*, **2012**, *36*, 324-339.
109. J. P. Tam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 5409-5413.
110. S. Bay, R. Lo-Man, E. Osinaga, H. Nakada, C. Leclerc, D. Cantacuzene. *J. Pept. Res. Ther.*, **1997**, *49*, 620-625.
111. P. Singh. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2007**, *48*, 1-9.
112. S. H. Battah, C.-E. Chee, H. Nakanishi, S. Gerscher, A. J. MacRobert, C. Edwards. *Bioconjugate Chem.*, **2001**, *12*, 980-988.
113. R. F. Barth, D. M. Adams, A. H. Soloway, F. Alam, M. V. Darby. *Bioconjugate Chem.*, **1994**, *5*, 58-66.

114. B. Qualmann, M. M. Kessels, H.-J. Musiol, W. D. Sierralta, P. W. Jungblut, L. Moroder. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, *35*, 909-911.
115. Y.-H. Tang, A. Y.-T. Huang, P.-Y. Chen, H.-T. Chen, C.-L. Kao. *Curr. Pharm. Des.*, **2011**, *17*, 2308-2330.
116. P. Govender, B. Therrien, G. S. Smith. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, *17*, 2853-2862.
117. G. R. Newkome, E. He, C. N. Moorefield. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 1689-1746.
118. H.-J. Van Manen, F. C. J. M. Van Veggel, D. N. Reinhoudt. *Top. Curr. Chem.*, **2001**, *217*, 121-162.
119. C. Gorman. *Adv. Mater.*, **1998**, *10*, 295-309.
120. B. A. J. Jansen, J. van der Zwan, J. Reedijk, H. den Dulk, J. Brouwer. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1999**, 1429-1433.
121. T. Kapp, A. Dullin, R. Gust. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 1182-1190.
122. X.-X. Zhao, S.-C. J. Loo, P. P.-F. Lee, T. T.-Y. Tan, C.-K. Chu. *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, *104*, 105-110.
123. S. D. Khanye, J. Gut, P. J. Rosenthal, K. Chibale, G. S. Smith. *J. Organomet. Chem.*, **2011**, *696*, 3296-3300.
124. L. Balogh, D. R. Swanson, D. A. Tomalia, G. L. Hagnauer, A. T. McManus. *Nano Lett.*, **2001**, *1*, 18-21.
125. G.-D. Zhang, A. Harada, N. Nishiyama, D.-L. Jiang, H. Koyama, T. Aida, K. Kataoka. *J. Control. Release*, **2003**, *93*, 141-150.
126. W.-D. Jang, Y. Nakagishi, N. Nishiyama, S. Kawauchi, Y. Morimoto, M. Kikuchi, K. Kataoka. *J. Control. Release*, **2006**, *113*, 73-79.
127. C. Ghobril, G. Lamanna, M. Kueny-Stotz, A. Garofalo, C. Bilotey, D. Felder-Flesch. *New J. Chem.*, **2012**, *36*, 310-323.
128. E. C. Wiener, M. W. Brechbiel, H. Brothers, R. L. Magin, O. A. Gansow, D. A. Tomalia, P. C. Lauterbur. *Magn. Reson. Med.*, **1994**, *31*, 1-8.
129. H. Kobayashi, S. Kawamoto, T. Saga, N. Sato, A. Hiraga, T. Ishimori, Y. Akita, M. H. Mamede, J. Konishi, K. Togashi, M. W. Brechbiel. *Magn. Reson. Med.*, **2001**, *46*, 795-802.

-
130. Q. Dong, D. R. Hurst, H. J. Weinmann, T. L. Chenevert, F. J. Londy, M. R. Prince. *Invest. Radiol.*, **1998**, *33*, 699-708.
 131. B. Tombach, J. Schneider, P. Reimer, M. Mahler, W. Ebert, K. Shamsi, W. Heindel. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, **2002**, *10*.
 132. H. Schumann, B. C. Wassermann, S. Schutte, J. Velder, Y. Aksu, W. Krause, B. Raduechel. *Organometallics*, **2003**, *22*, 2034-2041.
 133. W. Krause, N. Hackmann-Schlichter, F. K. Maier, R. Muller. *Top. Curr. Chem.*, **2000**, *210*, 261-308.
 134. I. B. Rietveld, E. Kim, S. A. Vinogradov. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 3821-3831.
 135. W.-D. Jang, K. M. Kamruzzaman Selim, C.-H. Lee, I.-K. Kang. *Prog. Polym. Sci.*, **2009**, *34*, 1-23.
 136. D.-L. Jiang, T. Aida. *Prog. Polym. Sci.*, **2005**, *30*, 403-422.
 137. M. Enomoto, A. Kishimura, T. Aida. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5608-5609.
 138. P. Bhyrappa, J. K. Young, J. S. Moore, K. S. Suslick. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 5708-5711.
 139. C. C. Mak, N. Bampos, J. K. M. Sanders. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 3020-3023.
 140. M. Enomoto, T. Aida. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 874-875.

CAPÍTULO 1

“COMPLEJOS METÁLICOS BASADOS EN LIGANDOS NITROGENADOS POLIANIÓNICOS”

1.1. INTRODUCCIÓN

En este primer Capítulo, se presenta la síntesis y caracterización química de cuatro familias de ligandos polianiónicos con un núcleo de etilendiamina, y los complejos metálicos de Ni, Co, Cu y Zn obtenidos a partir de ellos. Estos compuestos podrían considerarse, en terminología de dendrímeros, como compuestos de “generación 0”, que permiten modelar el comportamiento de dendrímeros y metalodendrímeros de generaciones mayores.

Con el fin de facilitar la lectura del Capítulo, se simplifican los nombres de los compuestos de acuerdo con la siguiente nomenclatura: ligandos dianiónicos *N,N'*-dimetiletilendiamino-*N,N'*-dietanosulfonato (*dmedds*, Esq. 1.3 y 1.5) y *N,N'*-dimetiletilendiamino-*N,N'*-di-3-propionato (*dmeddp*, Esq. 1.7 y 1.8), y ligandos tetraaniónicos etilendiamino-tetraetanosulfonato (*edts*, Esq. 1.4 y 1.6) y etilendiamino-tetra-3-propionato (*edtp*, Esq. 1.8 y 1.9).

1.1.1. Objetivos del capítulo

Los objetivos de este Capítulo 1 son los que se enumeran a continuación:

- ✓ Sintetizar, caracterizar y estudiar químicamente los compuestos denominados de “generación cero” (G_0).
- ✓ Preparar y caracterizar estructuralmente los complejos metálicos derivados de estos ligandos.
- ✓ Evaluar la toxicidad y la capacidad antiviral frente a la infección por el VIH de todas las sustancias presentadas.

Esta investigación ha dado lugar a dos publicaciones en revistas internacionales de reconocido prestigio.^{1,2}

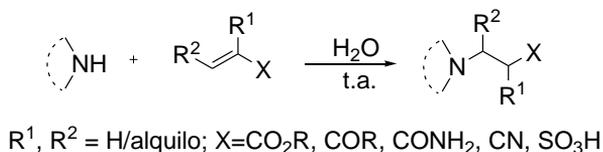
1.1.2. Antecedentes bibliográficos

Existe una extensa bibliografía acerca de complejos metálicos con ligandos aminocarboxilato “tipo EDTA” (etilendiaminotetraacetato),³ dada la capacidad efectiva de actuación de estos ligandos como agentes quelantes. Esta propiedad posibilita su aplicación en diversos campos, dando lugar incluso a la “terapia por quelación con EDTA”.⁴ Habitualmente, estos compuestos se preparan mediante procesos de condensación de la diamina de interés con ácido acrílico o ácido α - o β -monohalocarboxílico a pH neutro, o de derivados dihalógeno de diamina con diversos aminoácidos.⁵ Por otra parte, la obtención de los complejos metálicos suele realizarse mediante la adición de la sal metálica al ligando en su forma ácida, con control de pH, y un posterior paso por columna de intercambio iónico.⁶

A diferencia de los anteriores, los complejos con ligandos aminosulfonato no han recibido una atención tan exhaustiva, posiblemente debido a la dificultad de su preparación. La metodología sintética más habitual es aquella que transcurre a través de la oxidación de los correspondientes complejos tiolato, utilizando condiciones de reacción agresivas, con oxidantes como H_2O_2 o Cl_2 ,⁷⁻¹⁰ que pueden dar lugar a mezclas de productos y no siempre conducen al complejo de interés. Este es el caso de zinc, donde el metal se descoordina en el proceso de oxidación.⁸ Las propiedades electrónicas de cada metal (y especialmente la presencia o ausencia de interacciones metal-azufre π -antienlazantes) influyen en la reactividad del tiolato, y son las responsables de los distintos resultados.

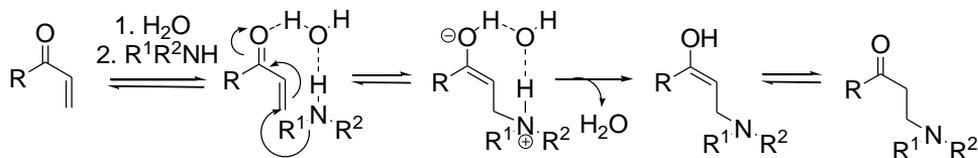
La necesidad de una alternativa sintética, con condiciones suaves y reacciones sencillas, nos llevó a emplear reacciones tipo adición “aza-Michael”, pero utilizando una nueva ruta sintética desarrollada por Liang y col.¹¹ (*Esq. 1.1*). Este método aprovecha la selectividad y sencillez de las adiciones conjugadas,

pero en disolución acuosa, a diferencia de las adiciones de Michael tradicionales que se llevan a cabo en disolventes orgánicos en presencia de ácidos o bases. Este método permite que numerosas aminas primarias y secundarias se adicionen de manera suave a compuestos α,β -insaturados (ésteres carboxílicos, cetonas, nitrilos y amidas) en agua a temperatura ambiente.¹²



Esquema 1.1 Esquema general de la reacción de tipo “adición aza-Michael” en agua.

Mientras que las aminas aromáticas, las aminas terciarias y los aldehídos α,β -insaturados no reaccionan en estas condiciones, las aminas primarias conducen selectivamente a productos de monoaddición. Las reacciones son limpias, rápidas y con elevados rendimientos, en comparación con aquéllas realizadas en disolventes orgánicos. Es probable que el agua favorezca la reacción (*Esq. 1.2*) mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del carbonilo insaturado, aumentando el carácter electrofílico del C_β , que es atacado por la amina nucleofílica. Por otro lado, la formación del enlace de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del agua y el átomo de hidrógeno de la amina aumenta la nucleofilia del átomo de nitrógeno de la amina. De esta manera, el agua activa la amina así como el alqueno conjugado, y facilita la adición.



Esquema 1.2 Acción dual del agua durante la reacción aza-Michael, facilitando la adición.

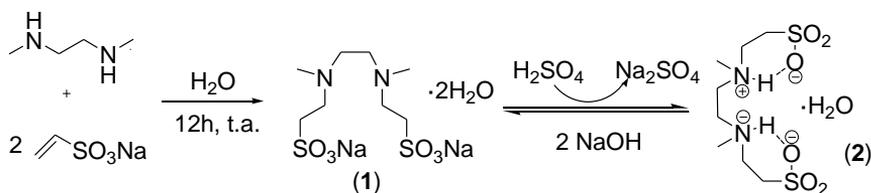
1.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Se prepararon cuatro familias de compuestos polianiónicos con un núcleo de etilendiamina, en los que cada átomo de nitrógeno se encuentra monosustituido (dmedds y dmeddp, **1** y **8** en sus formas de sal sódica respectivamente) o disustituido (edts y edtp, **12** y **18** en sus formas de sal sódica, respectivamente). Las condiciones para la preparación y caracterización estructural de los ligandos y complejos metálicos se detallan a continuación.

1.2.1. Estudio preparativo

1.2.1.a. Complejos metálicos con ligandos aminosulfonato

La síntesis del ligando disulfonato {[Na₂(dmedds)]·2H₂O} (**1**) transcurre a través de una adición de tipo aza-Michael (*Esq. 1.3*). La adición conjugada de dos equivalentes de vinilsulfonato de sodio a la amina secundaria *N,N'*-dimetiletildiamina en disolución acuosa, durante 12 h a t. a., y posterior evaporación, conduce a la formación del compuesto **1** como un sólido blanco con un rendimiento del 88%. Este compuesto es muy soluble en agua, ligeramente soluble en alcoholes e insoluble en otros disolventes orgánicos.

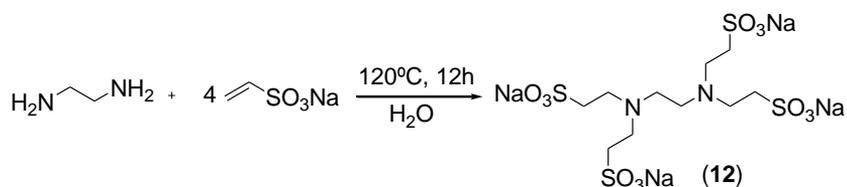


Esquema 1.3 Ruta sintética para la preparación de los compuestos **1** y **2**.

La adición de un equivalente de H₂SO₄ o dos de HCl a una disolución acuosa de la sal disódica **1** conduce a la precipitación del derivado zwitteriónico {[H₂(dmedds)]·H₂O} (**2**), como un sólido blanco cristalino, con rendimiento cuantitativo. El compuesto **2** es soluble en agua caliente, pero insoluble en

disolventes orgánicos. La reacción es reversible al adicionar dos equivalentes de NaOH (*Esq. 1.3*). La preparación de esta forma alternativa al compuesto **1** permite establecer una ruta distinta de síntesis de complejos metálicos que no dé lugar a subproductos durante la reacción (*Esq. 1.5*).

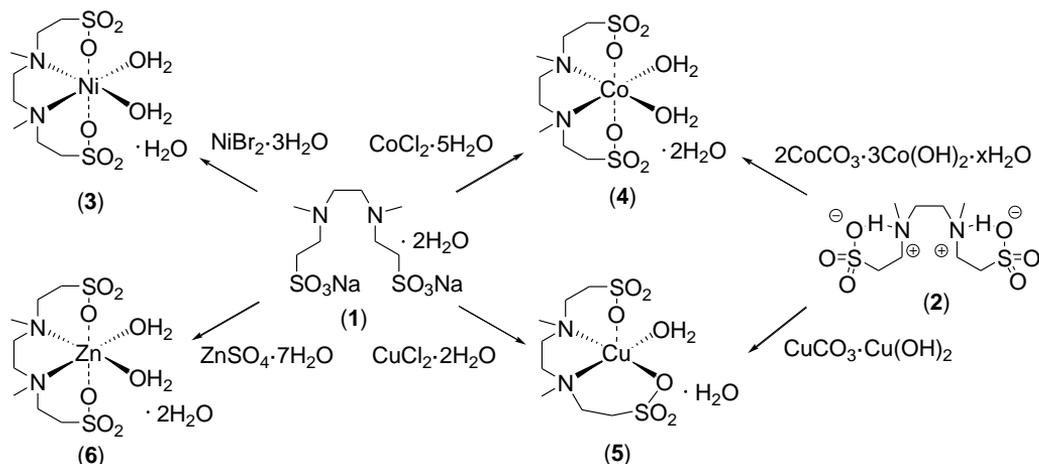
El protocolo de síntesis del derivado tetrasulfonato $\{[\text{Na}_4(\text{edts})]\cdot 4\text{H}_2\text{O}\}$ (**12**) es análogo al de **1**, partiendo de la amina primaria etilendiamina y cuatro equivalentes de vinilsulfonato de sodio (*Esq. 1.4*). En este caso, la introducción de dos ramas por nitrógeno requiere el calentamiento a 120°C para completar la reacción, y un posterior paso de purificación por lavados repetidos en MeOH. En este caso, no se creyó necesaria la preparación del compuesto neutralizado, dada la facilidad de purificación de los complejos metálicos obtenidos a partir de **12**.



Esquema 1.4 Síntesis del compuesto **12**, mediante reacción de adición tipo “aza-Michael”.

Los compuestos aminosulfonato **1**, **2** y **12** se utilizaron para generar complejos de níquel, cobalto, cobre y zinc, y su preparación se describe en los Esquemas 1.5 y 1.6, según las características particulares de cada ión metálico.

El tratamiento de **1** con un equivalente de $\text{NiBr}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en agua produce la precipitación de un sólido verde turquesa que corresponde a $[\text{Ni}(\text{dmedds})(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) con un 90% de rendimiento. Este mismo producto, ha sido obtenido por Reedijk y *col.*,⁷ mediante la oxidación con H_2O_2 de un complejo mononuclear ditiolato de níquel.



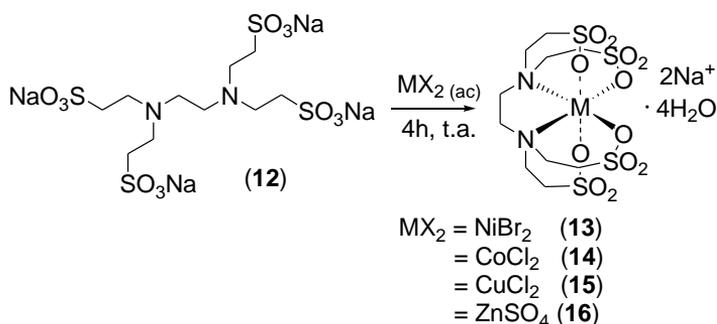
Esquema 1.5 Ruta sintética para la obtención de los complejos 3-6, partiendo de 1 ó 2.

La reacción análoga con $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ o $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ conduce a la obtención de los complejos de cobalto $[\text{Co}(\text{dmedds})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4) (80%, microcristales rosas por concentración de la disolución) y cobre $[\text{Cu}(\text{dmedds})(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5) (78%, microcristales azul oscuro por precipitación en doble capa agua/metanol). Además, estos dos compuestos 4 y 5 pueden obtenerse a partir del sistema zwitteriónico 2, por reacción de una disolución acuosa del mismo con hidroxicarbonato de cobalto $2\text{CoCO}_3 \cdot 3\text{Co(OH)}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ o de cobre $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu(OH)}_2$. De esta manera, tras 12 h en agitación a temperatura ambiente, precipitan los complejos metálicos con un rendimiento cuantitativo y sin formación de subproductos. Los complejos 3 y 4 son estables al aire, ligeramente solubles en agua y alcoholes, y solubles en DMSO. En ambos complejos, la separación de los haluros alcalinos, NaBr o NaCl respectivamente, se consigue en base a sus diferentes solubilidades en agua. El complejo 5 es estable al aire, muy soluble en agua y DMSO, y ligeramente soluble en alcoholes.

Finalmente, el tratamiento de 1 con un equivalente de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua conduce a la formación de un sólido blanco identificado como $[\text{Zn}(\text{dmedds})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6), con un rendimiento del 45%. Este complejo es estable al aire, y parcialmente soluble en agua.

El tratamiento del derivado tetrasulfonato **12** con un equivalente de $\text{NiBr}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en agua conduce a una disolución verde, cuya filtración y adición de etanol produce la formación de un precipitado verde que corresponde a $\{\text{Na}_2[\text{Ni}(\text{edts})]\} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**13**), con un 78% de rendimiento. De igual manera, partiendo de $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se obtienen $\{\text{Na}_2[\text{Co}(\text{edts})]\} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**14**) y $\{\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{edts})]\} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**15**), como sólidos pulverulentos de color violeta (84%) o azul (80%), respectivamente. Los complejos **13**, **14** y **15** son estables al aire, solubles en agua y alcoholes, y su separación de los haluros alcalinos se alcanza por su diferente solubilidad en etanol.

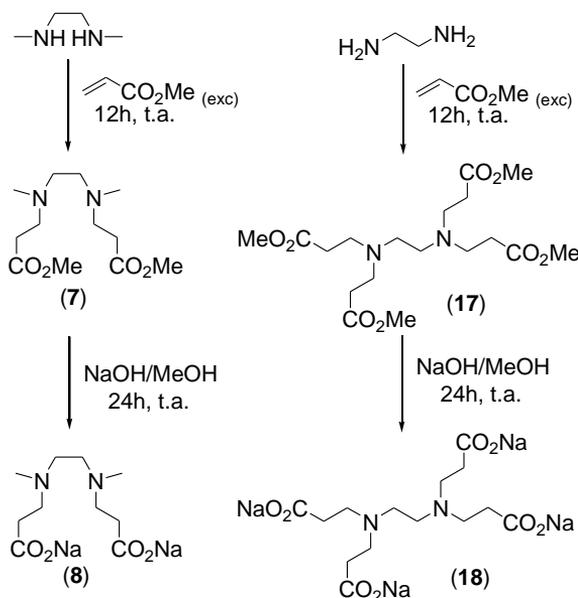
La síntesis del complejo $\text{Na}_2[\text{Zn}(\text{edts})] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**16**) requiere una adición lenta de la sal sódica sobre una disolución acuosa de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ya que la adición a la inversa conduce a la formación de mezclas de productos difíciles de caracterizar. Tras su filtración, la disolución se lleva a sequedad y se obtiene el complejo de zinc. La parecida solubilidad de este complejo **16** y de Na_2SO_4 impide su separación.



Esquema 1.6 Ruta sintética para la obtención de los compuestos metálicos **13-16**.

1.2.1.b. Complejos metálicos con ligandos aminocarboxilato

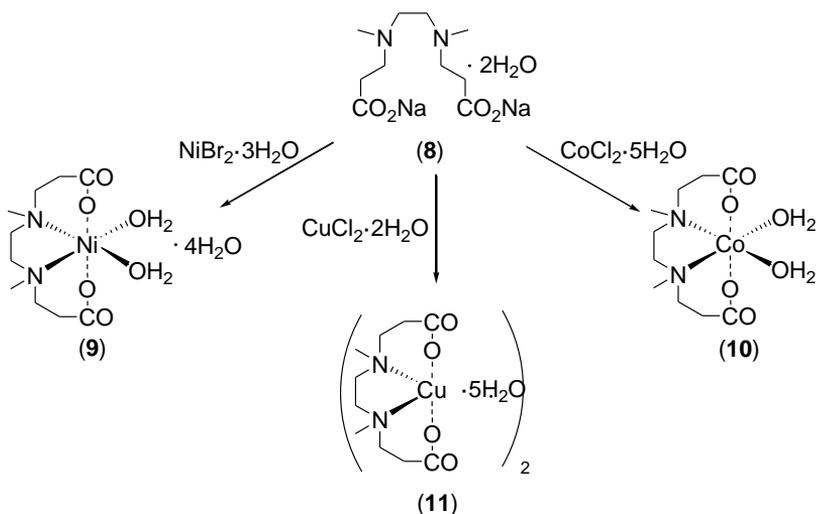
La síntesis de los compuestos aminocarboxilato **8** y **18**, similares a **1** y **12** pero con grupos carboxilato terminales, se consigue mediante un proceso de dos pasos (Esq. 1.7). En el primero de ellos, se realiza la adición conjugada de acrilato de metilo a la amina secundaria *N,N'*-dimetiletilendiamina o a la amina primaria etilendiamina, durante 12 h a t. a. La evaporación completa de la disolución conduce a la obtención de los derivados éster [Me₂(dmeddp)] (**7**) y [Me₄(edtp)] (**17**) respectivamente,^{13, 14} como aceites incoloros con rendimiento cuantitativo. El segundo paso consiste en la transformación de los grupos éster en medio básico, obteniendo las sales sódicas correspondientes [Na₂(dmeddp)]·2H₂O (**8**) y [Na₄(edtp)]·H₂O (**18**),¹⁵ como sólidos blancos solubles en agua. De nuevo, en este caso, no se creyó necesaria la preparación de los derivados neutralizados, dada la facilidad de purificación de los complejos metálicos obtenidos a partir de **8** y **18**, y la presumible complejidad de las mezclas de compuestos durante dicha neutralización.



Esquema 1.7 Ruta sintética para la obtención de los compuestos **7**, **8**, **17** y **18**.

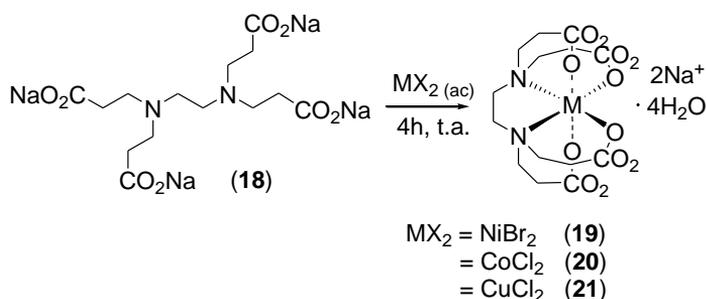
La formación de complejos metálicos a partir de los sistemas **8** y **18** se muestra en los Esquemas 1.8 y 1.9. La síntesis es similar a lo descrito para **1** y **12**, aunque existen algunas diferencias que conviene mencionar.

La reacción de **8** con un equivalente de $\text{NiBr}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en agua produce una disolución verde, que tras su evaporación y posterior extracción con etanol, da lugar a un sólido verde turquesa que corresponde a $[\text{Ni}(\text{dmeddp})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**9**) con un 94% de rendimiento. La reacción análoga con $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ conduce a la formación de $[\text{Co}(\text{dmeddp})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**10**, 92%, rosa) o $[\text{Cu}(\text{dmeddp})] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**11**, 95%, azul). Los datos de espectrometría de masas y RSE apuntan hacia una estructura dímica en el caso del complejo **11**, a diferencia de **9** y **10**, que son monómeros (*ver Apartado 1.2.2*). Los complejos **9**, **10** y **11** son estables al aire, solubles en agua y alcoholes, y su separación de los haluros alcalinos formados como subproductos en la reacción se consigue por su diferente solubilidad en etanol.



Esquema 1.8 Ruta de síntesis y estructura propuesta de los derivados metálicos **9-11**.

La adición de un equivalente de $\text{NiBr}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en agua al compuesto **18** produce una disolución azul, cuya evaporación y posterior extracción con EtOH permite aislar el complejo $\{\text{Na}_2[\text{Ni}(\text{edtp})]\} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**19**), como un sólido azul celeste con un rendimiento del 96%. La reacción análoga con $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ conduce a la obtención de $\{\text{Na}_2[\text{Co}(\text{edtp})]\} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**20**, 93%, rosa) o $\{\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{edtp})]\} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**21**, 96%, azul intenso). Los compuestos **19-21** son estables al aire, solubles en agua, alcoholes y DMSO, y la separación de sus correspondientes haluros alcalinos se lleva a cabo por su diferente solubilidad en EtOH. Los datos de espectrometría de masas y RSE apuntan hacia una estructura monómera en estos compuestos.



Esquema 1.9 Ruta sintética para la obtención de los compuestos metálicos **19-21**.

El complejo **19** fue descrito previamente por Radanovic *y col.*,⁶ en forma de sal de bario $\{\text{Ba}[\text{Ni}(\text{edtp})]\} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, con menor rendimiento (42%) a través de una ruta bastante más compleja, que supone control de pH, calentamiento e intercambio iónico.

La reacción análoga de los compuestos aminocarboxilato **8** y **18** con $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ conduce a una mezcla de especies solubles e insolubles difíciles de caracterizar. De acuerdo con la bibliografía,¹⁶ el complejo de zinc derivado de **18** se presenta en un rango de pH de 5.3 a 6.2, precipitando a pH superiores, lo que dificulta su preparación y caracterización.

1.2.2. Estudio estructural

El estudio estructural de los compuestos preparados se llevó a cabo a través de diferentes técnicas, como Resonancia Magnética Nuclear, Difracción de Rayos X, Espectrofotometría UV-Vis, Resonancia de Spin Electrónico, Espectroscopía Infrarroja, Espectrometría de Masas y Análisis Elemental.

1.2.2.a. Estudio mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Esta técnica se utilizó para caracterizar los ligandos sintetizados y los complejos metálicos derivados de zinc, al presentar carácter diamagnético. Las resonancias halladas mediante experimentos de RMN-¹H y ¹³C fueron asignadas en base a estudios DEPT, HSQC, HMBC y NOESY (*ver Cap. 4*).

Los valores de δ (ppm) de los compuestos aminosulfonato **1**, **2** y **12**, y los complejos derivados de zinc **6** y **16** se muestran en la Figura 1.1, mientras que en la Figura 1.2 aparecen algunos espectros representativos del compuesto **1**. El espectro de RMN-¹H en D₂O de **1** muestra un singlete a 2.42 ppm que corresponde a los grupos metileno -NCH₂CH₂N-, mientras que aquéllos de los fragmentos 2-sulfoetilo aparecen como dos multipletes a 2.70 y 2.87 ppm, correspondientes al metileno unido a N y a S respectivamente. Cada una de estas dos señales aparecen como dos multipletes parcialmente superpuestos debido a su naturaleza de protones diastereotópicos. Finalmente los grupos MeN- muestran un singlete a 2.07 ppm. Para el caso de RMN-¹³C, se observan 4 resonancias, mientras que el espectro RMN-^{1H-15N} muestra una única señal a -348.6 ppm. Las resonancias halladas para el compuesto **12** son similares a las de **1**, con la ausencia de las señales debidas a los grupos metilo (*Fig. 1.1*).

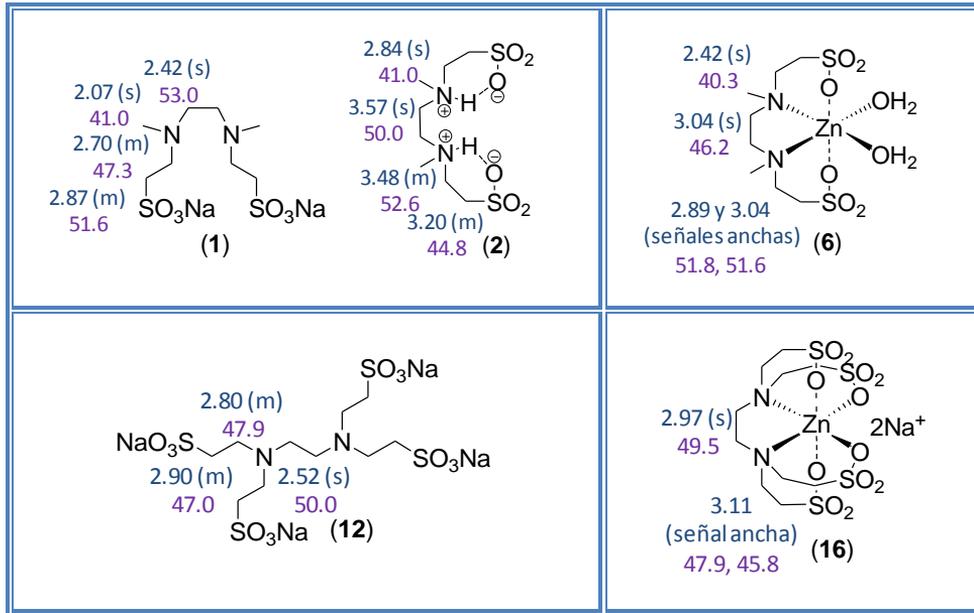


Figura 1.1 Datos de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de los compuestos aminosulfonato **1**, **2**, **6**, **12** y **16** (D_2O , δ ppm).

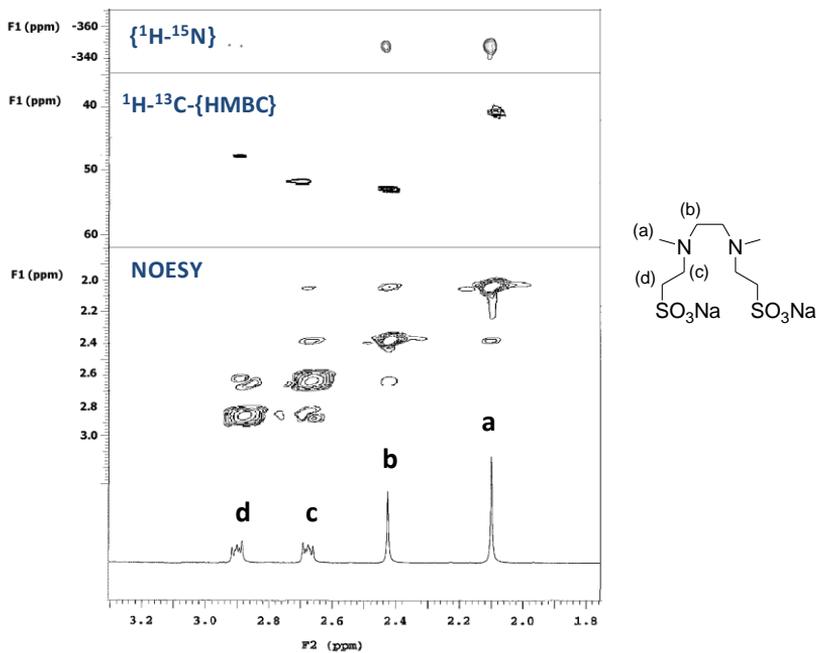


Figura 1.2 Espectros de RMN- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}-\{\text{HMBC}\}$ y NOESY del compuesto **1**.

La comparación del espectro RMN- ^1H del compuesto **2** respecto al de **1** muestra, como resultado de la protonación, un desplazamiento a campo bajo de 0.8-1.1 ppm para las señales correspondientes a $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}^+$ y $-\text{NH}(\text{CH}_3)$, y de 0.5-0.8 ppm, para las señales de los grupos 2-sulfoetilo. Un comportamiento similar es detectado en el espectro de RMN- ^{13}C . Grapperhaus *y col.*⁸ describen la formación de un compuesto muy similar (*Fig. 1.3*), que se obtiene a través de la oxidación con H_2O_2 de un tiolato de zinc, que a diferencia del análogo de níquel, pierde el átomo metálico en el proceso. Este compuesto se presenta, en estado sólido, como un di-zwitterión con los átomos de nitrógeno protonados y las unidades de ácido sulfónico desprotonadas. Aunque formalmente es zwitteriónico, la separación de carga está disipada por la presencia de dos enlaces por puentes de hidrógeno intramoleculares. Una situación análoga en el sistema **2** explicaría los valores de δ (ppm) en RMN- ^1H y ^{13}C .

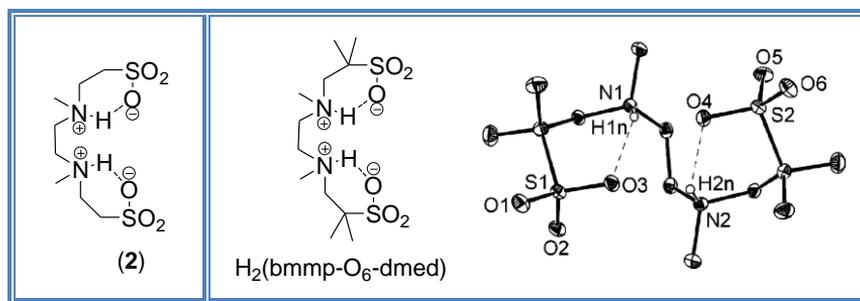


Figura 1.3 Estructuras comparativas del compuesto zwitter-iónico **2** y su análogo $\text{H}_2(\text{bmmp-O}_6\text{-dmed})$,⁸ y estructura cristalina ORTEP de este último.

Para el complejo de zinc **6**, el espectro de RMN- ^1H muestra una señal ancha a 3.04 ppm, debido al solapamiento de las señales de los grupos metileno $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ y la del grupo metileno $-\text{NCH}_2$ de la cadena 2-sulfoetilo, mientras que la otra señal de la cadena $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ aparece también como una señal ancha a 2.89 ppm. Los grupos $\text{MeN}-$ se corresponden con un singlete a 2.42 ppm. En el espectro de RMN- ^{13}C se observan cuatro resonancias (*Fig. 1.2*). Los espectros de

RMN-¹H y ¹³C del complejo **16** presentan unas señales similares, pero aquéllas del fragmento 2-sulfoetilo aparecen como una única señal ancha.

En las Figuras 1.4 y 1.5, se muestran los valores de δ (ppm) y algún espectro representativo de los sistemas aminocarboxilato **7**, **8**, **17** y **18**.

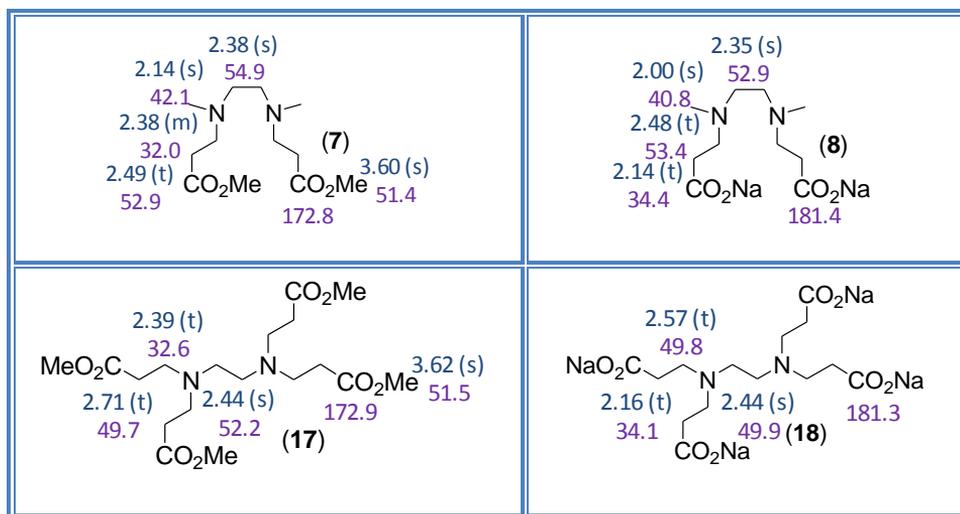


Figura 1.4 Valores de RMN-¹H y ¹³C de los ligandos aminocarboxilato (δ ppm, CDCl₃ (**7** y **17**), D₂O (**8** y **18**)).

El espectro de RMN-¹H en CDCl₃ del compuesto **7** presenta 5 señales. El metilo del grupo CO₂Me aparece como un singlete a 3.60 ppm, mientras que los grupos metileno del fragmento 2-carboxietilo surgen como dos multipletes, a 2.49 ppm para la unidad -CH₂- y 2.38 ppm para la unidad -NCH₂-, éste último superpuesto con un singlete para los grupos metileno equivalentes -NCH₂CH₂N-. Finalmente, el grupo metilo -NCH₃ aparece como un singlete a 2.14 ppm. En el espectro de RMN-¹³C, las señales fueron asignadas con ayuda de un experimento HSQC, obteniendo los valores indicados en la Figura 1.4. El precursor **17** fue caracterizado por RMN-¹H y ¹³C, y el espectro presenta una distribución muy similar a la encontrada para el compuesto **7** (Fig. 1.4).

En el espectro de RMN- ^1H de **8**, las unidades metilénicas del fragmento 2-carboxietilo aparecen como dos multipletes, a 2.48 ppm para la unidad $-\text{NCH}_2-$ y 2.14 ppm para la unidad $-\text{CH}_2\text{C}-$. Además, se observan dos singletes para los grupos metileno equivalentes $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$, a 2.35 ppm, y a 2.00 ppm para el grupo $-\text{NCH}_3$. En el espectro de RMN- ^{13}C , se observan 5 resonancias. Para el fragmento CO_2Na , el grupo carbonilo muestra una resonancia a 181.4 ppm. Los carbonos equivalentes del fragmento $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ aparecen a 53.4 ppm, mientras que las señales a 52.9 y 34.4 ppm se atribuyen a los fragmentos $-\text{CH}_2\text{C}-$ y $-\text{NCH}_2-$ del grupo etilcarboxilato, respectivamente. Finalmente, el grupo metilo $-\text{NCH}_3$ aparece como a 40.8 ppm. De forma análoga, el compuesto **18** fue caracterizado por RMN- ^1H y ^{13}C en D_2O , hallando un patrón de resonancia similar al del sistema **8**.

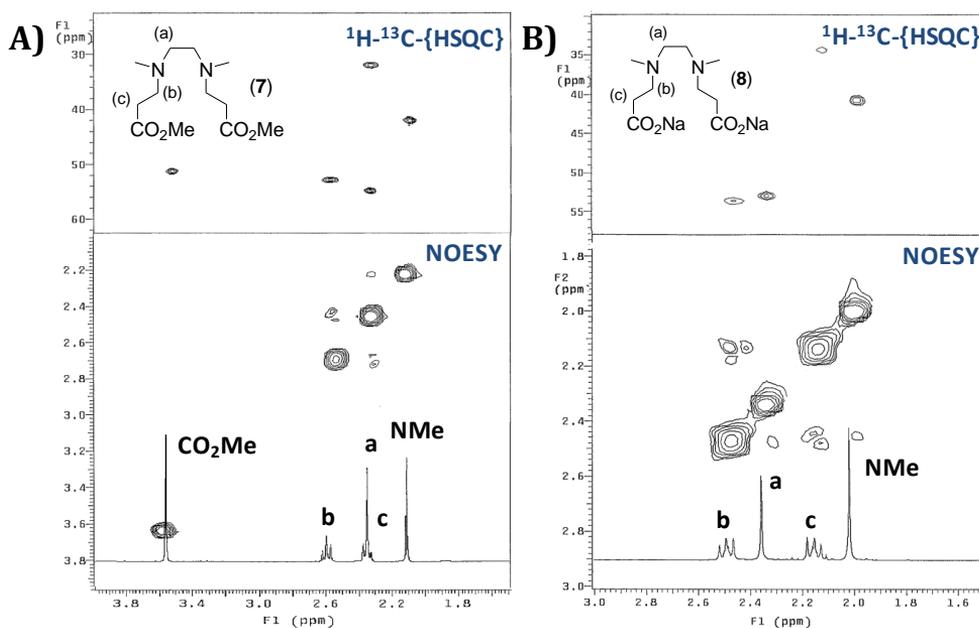


Figura 1.5 Espectros de ^1H - ^{13}C -{HSQC} y NOESY de los compuestos aminocarboxilato.

A) Espectros de **7** (en CDCl_3). B) Espectros de **8** (en D_2O). Valores en ppm.

1.2.2.b. Estudio mediante Difracción de Rayos X

La Difracción de Rayos X de monocristal permite determinar la estructura de los compuestos en estado sólido. La dificultad para generar monocristales aptos para difracción solo permitió establecer la estructura cristalina de los compuestos metálicos aminosulfonato **3-6**. Los diagramas ORTEP de estos compuestos se muestran en la Figura 1.6, mientras que en la Tabla 1.1 se recogen algunas longitudes y ángulos de enlace representativos. El resto de distancias y ángulos, y los datos cristalográficos de estos compuestos se muestran en el Capítulo 4 de esta Memoria.

La recristalización en etanol o metanol del compuesto **3** produjo microcristales verdes aptos para difracción de rayos X, que confirmaron la estequiometría del compuesto y la obtención del mismo sistema descrito por Reedijk *et al.*⁷ Las distancias Ni-O de 2.044(1) (RSO₂-O-Ni) y 2.084(1) (H₂O-Ni) se encuentran en el rango esperado de 2.03-2.13 Å para complejos similares.¹⁷⁻¹⁹

Los monocristales rosas del compuesto **4**, obtenidos mediante concentración de una disolución acuosa del compuesto, y aquéllos incoloros de **6**, conseguidos por evaporación lenta de una disolución acuosa del mismo, también fueron aptos para caracterización por difracción de rayos X, y presentan una estructura análoga a la del compuesto **3**. En ellos, la coordinación alrededor del centro metálico es octaédrica, con el metal situado en un eje doble cristalográfico, por lo que la unidad asimétrica en la celdilla unidad corresponde a media molécula. El ligando aminosulfonato ocupa 4 sitios de coordinación, con los nitrógenos de la amina situados en posición *cis* y los dos oxígenos de los grupos sulfonato en posición *trans*. El entorno octaédrico se completa con dos moléculas de agua en posición *cis* entre ellas. Además, existen otras dos moléculas de agua de hidratación por cada molécula de complejo.

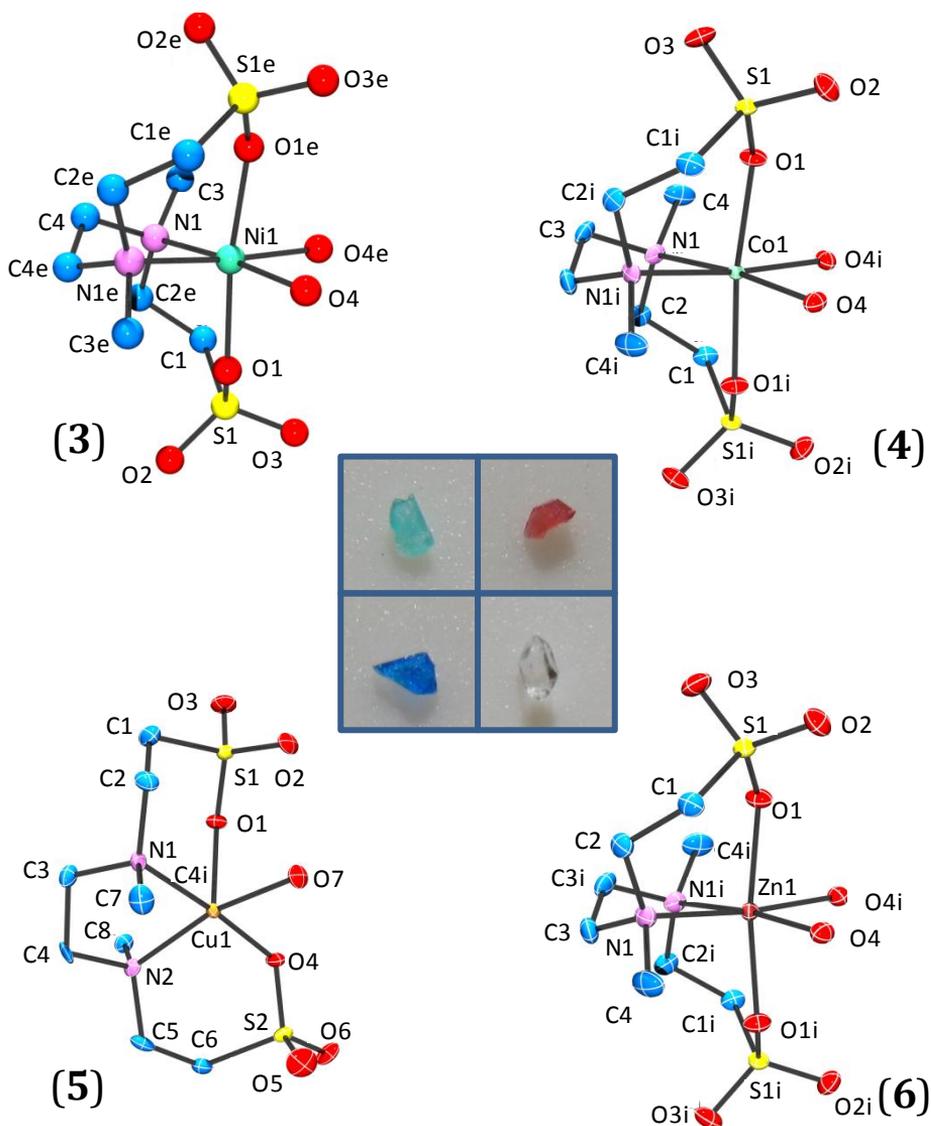


Figura 1.6 Estructuras ORTEP (elipsoides con 50% probabilidad) de rayos X de monocristal de los compuestos 3-6, junto con la foto de un cristal de cada uno de los complejos metálicos.

En el complejo **4**, las distancias Co-N de 2.223(3) Å se encuentran en el rango esperado para cobalto octaédricamente coordinado,²⁰⁻²² de tipo “N₂O₄”, y son más largas que los enlaces Co-O. En este caso, los enlaces Co-O correspondientes a los oxígenos de los grupos sulfonato en *trans* son de 2.085(2) Å, más cortos que los de las moléculas de agua coordinadas, de 2.147(2). Los ángulos O(1)-Co-O(4i) de 172.66(13)° y N(1)-Co-N(1i) de 83.24(15)°, son menores que los ideales de 180° y 90° respectivamente, debido al efecto quelato, mientras que los demás ángulos en el plano ecuatorial N(1)-Co-O(4i), O(4i)-Co-O(4) y O(4)-Co-N(1i) son obtusos.

	M = Co (4)	M=Zn (6)		M=Cu (5)
<i>M-O(1)</i>	2.085(2)	2.098(2)	<i>Cu(1)-O(1)</i>	2.235(4)
<i>M-O(1i)</i>	2.085(2)	2.098(2)	<i>Cu(1)-O(4)</i>	1.985(4)
<i>M-O(4)</i>	2.147(2)	2.120(2)	<i>Cu(1)-O(7)</i>	2.028(4)
<i>M-N(1)</i>	2.223(3)	2.206(2)	<i>Cu(1)-N(2)</i>	2.054(5)
			<i>Cu(1)-N(1)</i>	2.055(5)
<i>O(1i)-M-O(1)</i>	172.66(13)	171.66(10)	<i>O(4)-Cu(1)-O(1)</i>	90.49(17)
<i>O(1)-M-O(4i)</i>	85.01(9)	84.65(7)	<i>O(4)-Cu(1)-N(1)</i>	175.89(19)
<i>O(1)-M-O(4)</i>	89.88(9)	89.56(7)	<i>O(4)-Cu(1)-N(2)</i>	89.62(18)
<i>O(4i)-M-O(4)</i>	91.70(13)	92.16(11)	<i>O(7)-Cu(1)-N(2)</i>	161.27(19)
<i>O(1i)-M-N(1i)</i>	95.11(10)	95.73(8)	<i>O(4)-Cu(1)-O(7)</i>	91.83(19)
<i>O(1)-M-N(1i)</i>	90.38(9)	90.47(7)	<i>N(2)-Cu(1)-N(1)</i>	86.44(19)
<i>O(4)-M-N(1i)</i>	92.73(10)	92.16(8)	<i>O(7)-Cu(1)-O(1)</i>	94.08(17)
<i>O(1)-M-N(1)</i>	95.11(10)	95.73(8)	<i>N(1)-Cu(1)-O(1)</i>	91.65(18)
<i>O(4)-M-N(1)</i>	173.60(10)	173.46(8)	<i>O(7)-Cu(1)-N(1)</i>	91.52(19)
<i>N(1i)-M-N(1)</i>	83.24(15)	83.98(12)	<i>N(2)-Cu(1)-O(1)</i>	104.58(18)

Tabla 1.1 Selección de longitudes [Å] y ángulos [°] de enlace en los compuestos **4-6**.

El complejo de zinc **6** muestra la misma geometría que la hallada en los cristales de níquel y cobalto, con las variaciones normales en las distancias y ángulos de enlace debidas a la presencia de diferentes átomos metálicos. La distancia Zn-N es de 2.206(2) Å, también en el rango esperado para zinc octaédricamente coordinado²⁰⁻²⁵ y de nuevo es mayor que la distancia Zn-O. Respecto a los ángulos, son muy similares a los del derivado de cobalto.

A través de una difusión lenta de metanol en agua, se obtuvieron monocristales azules del complejo $[\text{Cu}(\text{dmedds})(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**5**), aptos para difracción de rayos X. El complejo puede describirse de dos maneras. Por un lado, como una bipirámide trigonal (bpt) distorsionada, donde los átomos N(2), O(1) de un grupo sulfonato y O(7) de una molécula de agua definen el plano ecuatorial, y los átomos N(1) y O(4) de otro sulfonato ocupan los sitios apicales. Por otro lado, como una pirámide de base cuadrada (pbc), donde el átomo O(1) está en posición apical y los otros átomos dadores en el plano cuadrado. Los ángulos entre átomos en *cis* se encuentran entre $86\text{--}92^\circ$ en el plano cuadrado y $92\text{--}104^\circ$ con el átomo apical. Las distancias Cu-N son prácticamente idénticas (2.055(5) y 2.054(5) Å) para ambos nitrógenos. Las distancias Cu-O son similares para los oxígenos ecuatoriales (Cu-O(4) del sulfonato, 1.984 (4) Å, y Cu-O(7) de agua, 2.028 (4)). Sin embargo, el enlace con el otro oxígeno del sulfonato apical Cu-O(1) muestra una distancia mayor 2.235(4) Å, apoyando la descripción de la molécula como pbc en estado sólido, de acuerdo con la preferencia de los complejos pentacoordinados de Cu(II) de una geometría pbc sobre bpt.²⁶ Las distancias Cu-N y Cu-O se encuentran en el rango esperado para complejos de cobre pentacoordinados.²⁷⁻²⁹ El efecto Jahn-Teller, originado por la configuración d^9 del ión Cu(II), se aprecia en la elongación de la distancia Cu-O apical, a pesar de que el efecto es menos pronunciado que en complejos hexacoordinados de Cu(II), como $[\text{Cu}(\text{edta})]^{2-}$ y *trans*(O_6)- $[\text{Cu}(1,3\text{-pddadp})]^{2-}$.³⁰

Otros complejos pentacoordinados de Cu(II) con ligandos N,O dadores muestran estructuras bpt NO_4 ,³¹ o pbc N_2O_3 ,^{5, 32, 33} afectadas por pseudo-distorsión Jahn-Teller. Sin embargo, la formación de una geometría particular, aparte de atribuirse a la configuración d^9 de Cu(II), y por tanto al efecto Jahn-Teller, depende de otros factores como la fuerza del campo de ligandos en el plano, la estructura del ligando y el tamaño de los anillos quelato.

1.2.2.c. Estudio comparativo mediante Espectrofotometría UV-Vis

Los compuestos de metales de transición que tienen capas de orbitales *d* incompletas absorben determinadas longitudes de onda en la región visible e infrarroja próxima del espectro. Estas absorciones dependen de la energía de los orbitales *d*, de su degeneración y del número de electrones distribuidos en ellos, que vienen condicionados por el estado de oxidación del metal, el número y clase de ligandos, y la geometría de los complejos.

En la *región ultravioleta (UV)* se observan bandas de transferencia de carga (LMCT, del inglés *Ligand to Metal Charge Transfer*) muy intensas debidas a las transiciones de átomos dadores como N y O hacia el metal, y también se pueden observar bandas de algunos grupos o iones inorgánicos como resultado de transiciones internas. Por otra parte, las absorciones debidas a la transferencia de carga desde el metal hacia los ligandos (MLCT, del inglés *Metal to Ligand Charge Transfer*), que son de baja intensidad, a veces no se distinguen. En la *región del visible e infrarrojo próximo*, se observan las bandas (intensas o débiles) debidas a transiciones d-d correspondientes al ión metálico. Todas estas bandas se caracterizan por su coeficiente de extinción molar (ϵ) y la longitud de onda ($\lambda_{\text{máx}}$).

En las siguientes tablas, se muestran los valores comparativos de los complejos metálicos en estudio, en relación con los establecidos para complejos octaédricos conocidos con ligandos N y O.³⁴⁻³⁶ En base a la teoría del campo cristalino, los sistemas dadores octaédricos N_2O_4 deberían absorber a longitudes de onda intermedias entre el campo fuerte N_6 y el campo moderado O_6 .

Los complejos de níquel 3, 9, 13 y 19 (Tabla 1.2) son de color verde y presentan una banda de transferencia de carga a 370-390 nm, que enmascara la transición ${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(P)$. En la región del visible, se observa una banda a 620-660 nm debida a la transición ${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(F)$. Ambas presentan pequeños coeficientes de extinción ($1-30 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y aparecen en el rango esperado. La última transición, (${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{2g}(F)$), que debería aparecer en el rango 900-1200 nm, no pudo ser evaluada ya que se encuentra fuera del rango de medida del instrumento. Estos resultados de UV-Vis, junto con el estudio de espectroscopía de masas, apuntan a una estructura monomérica con un entorno octaédrico N_2O_4 alrededor del átomo de níquel.^{6,37}

El espectro de **3** en disolución acuosa presenta unos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ muy cercanos a los observados por Reedijk y col.⁷ de 653 y 386 nm en estado sólido. Además, el complejo análogo al compuesto **19**, $\{\text{Ba}[\text{Ni}(\text{edtp})]\} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, descrito previamente,⁶ muestra una estructura hexadentada N_2O_4 en disolución acuosa, con bandas a 370, 612, 768 y 998 nm. Se confirma así la gran tendencia de este ligando a formar complejos hexadentados, atribuida a la presencia de 4 anillos quelato de 6 miembros, a diferencia del EDTA que forma anillos de 5 miembros

Tabla 1.2 Valores de $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) y ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) de los complejos de níquel.

LMCT	330-500 nm
${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(P)$	330-500 nm
${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(F)$	540-720 nm
${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{2g}(F)$	900-1200 nm*
"NiO ₆ "	395
$[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$	658
"NiN ₆ "	354
$[\text{Ni}(1\text{-alilimidazol})_6](\text{NO}_3)_2$	571
3	390 (18,01) 670 (8,58)
13	388 (23,26) 660 (8,51)
9	376 (8,20) 628 (5,89)
19	377 (63,02) 622 (31,79)

Los complejos de cobalto 4, 10, 14 y 20 (Tabla 1.3) son de color rosa y, en algún caso, presentan una banda de transferencia de carga a 278 nm. La transición ${}^4T_{1g}(F) \rightarrow {}^4T_{1g}(P)$ aparece alrededor de 480-510 nm, y la transición ${}^4T_{1g}(F) \rightarrow {}^4A_{2g}(F)$ en el rango 510-590 nm. Ambas son bandas anchas de pequeña intensidad ($\epsilon = 1\text{-}20 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), y aparecen en el rango esperado. Los coeficientes de extinción por debajo de $80 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ son característicos de complejos hexa-coordinados.³⁸ De nuevo, la transición ${}^4T_{1g}(F) \rightarrow {}^4T_{2g}(F)$, en el rango 1000-1250 nm, no pudo ser evaluada. Estos valores de UV-Vis también apuntan a un entorno octaédrico alrededor del átomo de cobalto, y se encuentran de acuerdo con las estructuras monoméricas observadas en el estudio por espectrometría de masas.

Tabla 1.3 Valores de λ_{max} (nm) y ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) de los complejos de cobalto. “h” indica la aparición de un hombro en el espectro UV-Vis.

LMCT	250-350 nm
${}^4T_{1g}(F) \rightarrow {}^4T_{1g}(P)$	450-600 nm
${}^4T_{1g}(F) \rightarrow {}^4A_{2g}(F)$	500-800 nm
${}^4T_{1g}(F) \rightarrow {}^4T_{2g}(F)$	1000-1250 nm*
“CoO ₆ ”	-
[Co(H ₂ O) ₆] ²⁺	515 625
“CoN ₆ ”	-
[Co(1-alilimidazol) ₆](NO ₃) ₂	484-487 530-611
4	- 500 (20,28) 705 (13,93)
14	278 (90,97) 480h 513 (8,69)
10	- 508 (7,94) -
20	- 508 (94,65) 586h (51,61)

Los complejos de cobre 5, 11, 15 y 21 (Tabla 1.4) son de color azul y presentan una banda de transferencia de carga a 275-290 nm, asignada a $N \rightarrow Cu$, y solo en el caso de los carboxilatos, también un hombro alrededor de 244 nm, asignado a $COO \rightarrow Cu$. Una única transición d-d de gran intensidad es permitida por las reglas de espín, y aparece alrededor de 695 nm para los complejos dianiónicos **15** y **21**, ambos probablemente con coordinación pseudo-octaédrica CuN_2O_4 en disolución.⁶ Para el complejo neutro **5**, los estudios de difracción de rayos X muestran una estructura pbc en estado sólido,¹ y la banda se desplaza a menor longitud de onda, a 684 nm, mostrando una pequeña diferencia respecto a su análogo dianiónico **15**. Estos valores indican que la geometría alrededor del átomo de cobre en disolución es intermedia entre pbc ($\lambda_{m\acute{a}x} = 526-625$ nm) y bpt ($\lambda_{m\acute{a}x} = 666-1000$ nm);³⁹⁻⁴¹ sin embargo, tampoco puede descartarse una estructura pseudo-octaédrica en disolución ($\lambda_{m\acute{a}x} = 578-794$ nm). En el complejo neutro **11**, la banda se desplaza a 663 nm, probablemente debido a la distorsión en el entorno octaédrico⁴²⁻⁴⁴ procedente de una estructura dimérica (*Cap.4*). Todos estos resultados están de acuerdo con los estudios por RSE (*Apartado 1.2.2.d*).

Tabla 1.4 Valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) y ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) de los complejos de cobre. “h” indica la aparición de un hombro en el espectro UV-Vis.

LMCT ${}^2E_g \rightarrow {}^2T_{2g}$	200-300 nm 600-900 nm
“CuO ₆ ” [Cu(H ₂ O) ₆] ²⁺	- 794
“CuN ₆ ” [Cu(1-alilimidazol) ₆](NO ₃) ₂	- 578
5	278 (3770) 684 (73,05)
15	286 (2235) 693 (65,09)
11	250h, 276 (3485) 663 (113)
21	250h, 282 (3978) 698 (154,4)

El compuesto **21** se encuentra descrito en la bibliografía como $\text{Ba}_2[\text{Cu}(\text{edtp})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,^{45, 46} y $\text{Mg}[\text{Cu}(\text{edtp})] \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.⁴⁷ La estructura cristalina del anión se presenta como una pbc con distorsión hacia bpt, donde el ligando actúa como pentadentado con un grupo 3-propionato sin coordinar. Los intentos de estos autores por preparar el complejo octaédrico de Cu(II) variando el contraión (Ba^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y Li^+) no alcanzaron su objetivo, pero sí influyeron significativamente en la estructura y la geometría de los complejos.

Además, existen diferencias notables entre este compuesto y su análogo hexadentado con EDTA. Mientras que el EDTA forma complejos con cobre tanto hexa como pentadentados, el ligando edtp forma complejos con Cu(II) con geometría pbc, tal y como se estableció en el cristal de Ba. Con otros iones metálicos, sin embargo, la tendencia es dar complejos $[\text{M}(\text{edtp})]^{n-}$ con entorno octaédrico,^{3, 6, 48-51} aunque existe algún ejemplo de complejo pentadentado como $[\text{Cr}(\text{Hedtp})(\text{H}_2\text{O})]^{52}$ inestable en disolución acuosa.

Debido a la influencia del efecto Jahn-Teller, los ligandos “tipo-EDTA” se coordinan preferentemente en un plano ecuatorial, que puede conducir a un octaedro elongado tetragonalmente, a una pirámide de base cuadrada o a un complejo plano cuadrado. El tipo final de geometría depende de la fuerza del campo de los ligandos en el plano, la estructura del ligando y el tamaño de los anillos quelatos. La presencia de anillos de 6 miembros hace que el quelato en el plano sea más flexible, permitiendo al ión Cu(II) elevarse del plano ecuatorial más fácilmente y formar el quinto enlace (axial) para dar disposición pbc.

A pesar de todas estas evidencias, los datos obtenidos en nuestro estudio apuntan hacia una coordinación de todos los grupos carboxilato, como puede apreciarse especialmente en el estudio mediante Espectroscopía Infrarroja (*ver sección 1.2.2.e*). Es probable que el método sintético directo entre el compuesto aniónico y el metal sea el responsable de la obtención del compuesto de interés.

El estudio comparativo de los espectros de los cuatro compuestos de cobre (**5**, **11**, **15** y **21**) a la misma concentración se muestra en la Figura 1.7. La banda LMCT alrededor de 280 nm es indicativa de la coordinación del metal a través del grupo etilendiamina. En el caso de los sistemas con grupos sulfonato, esta banda es de menor intensidad en **15** respecto a **5**, indicando una interacción más débil con los nitrógenos, a favor de una coordinación más fuerte a los oxígenos de los grupos sulfonato. Sin embargo, en los complejos carboxilato esta banda LMCT es más intensa, demostrando una coordinación preferente a los nitrógenos respecto a los oxígenos de los carboxilatos. Además aparece un hombro alrededor de 250 nm, que corrobora la coordinación del grupo carboxilato al cobre. El complejo **21** presenta un hombro más intenso que **11**, debido al mayor número de grupos carboxilato coordinados. Todas estas evidencias concuerdan con los resultados obtenidos mediante RSE (ver sección 1.2.2.d.).

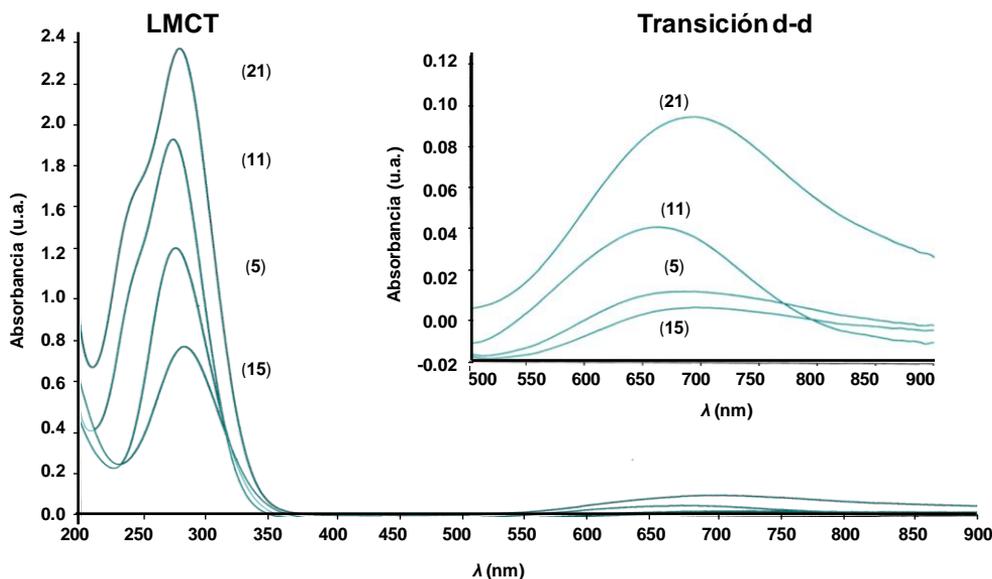


Figura 1.7 Espectro UV-Vis comparativo de los complejos de cobre **5**, **11**, **15** y **21**, a una misma concentración (0.5 mM).

La estabilidad de los complejos al variar el pH se evaluó mediante espectrofotometría UV-Vis (Fig. 1.8) tomando como compuesto modelo a **5**, al ser aquél donde el átomo metálico se encuentra más débilmente coordinado por el ligando. Este compuesto es estable en un rango de pH 4-9, que incluye todos los valores fisiológicos posibles. Por encima y por debajo de este rango, la LMCT desaparece y se observa un efecto batocrómico de la banda d-d, mostrando descomplejación, posiblemente debida a la formación de especies $\text{Cu}(\text{OH})_2$ o $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, respectivamente. Además, se observa un efecto tampón del pH como resultado del equilibrio de las formas acuo e hidroxido del complejo **5**.

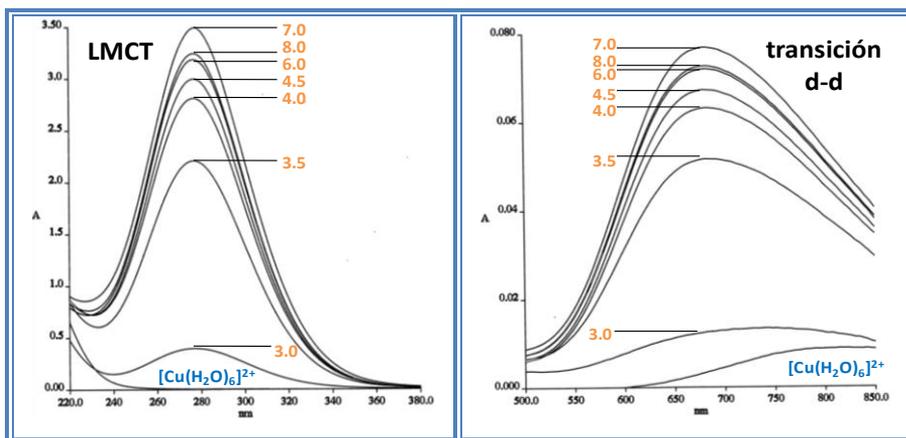


Figura 1.8 Espectro UV-Vis del compuesto **5**, registrado a diferentes valores de pH.

Asimismo, se registró la variación del espectro UV-Vis de una disolución de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, al aumentar la concentración del ligando **1** (proporción Cu:**1** = 1:0, 1:1, 1:2, 1:5). Al aumentar la cantidad de **1**, se observa un desplazamiento de la banda de transición d-d a valores menores de $\lambda_{\text{máx}}$, consistente con la menor presencia de átomos de O en la esfera de coordinación, y por tanto, con un único ligando por átomo metálico en una proporción 1:1. Así, la posibilidad de un intercambio de ligandos para dar un complejo 1:1 (Cu:ligando) queda excluida. Además, la banda debida al catión de cobre libre nunca se observa.

1.2.2.d. Estudio mediante Resonancia de Spin Electrónico (RSE)

Los estudios mediante RSE se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Resonancia de Spin Electrónico de la Universidad de Urbino (Italia), que dirige la profesora M^a Francesca Ottaviani, debido a la concesión de una beca para estancia corta de la acción COST “*Dendrimers for biomedical applications*” (Ref. TD0802).

La RSE de sistemas moleculares inorgánicos⁵³ constituye una de las herramientas más potentes para la determinación de la estructura electrónica de muchas moléculas inorgánicas, así como de un gran número de complejos de metales de transición. En RSE, los diferentes estados energéticos aparecen por interacción del campo magnético (H) con el momento de espín de los electrones desapareados, en lo que se denomina el “efecto Zeeman”.

Las señales se caracterizan por sus *factores de desdoblamiento* (g , con valor 2.0023 para el electrón libre) y *de acoplamiento* (A), que serán tensores en sistemas anisotrópicos (designados \mathbf{g} y \mathbf{A}) con el fin de considerar la variación de ambos en las distintas direcciones del espacio por la presencia tanto del momento angular orbital como de espín. La anisotropía es especialmente importante en sistemas inorgánicos con metales de transición, que en función de su simetría darán lugar al desdoblamiento en g_{\parallel} y g_{\perp} (simetría axial) o incluso g_{xx} , g_{yy} y g_{zz} (simetría menor a la axial), y lo mismo para A .

La condición de resonancia, por tanto, viene determinada por:

$$\Delta E = \beta \mathbf{g} \mathbf{H} - g_N \beta_N \mathbf{H} \hat{I}_z + h \mathbf{A} \hat{I}$$

Donde el primer término engloba el *efecto Zeeman electrónico* (interacción del momento del electrón S con el campo magnético externo H), el segundo es el *efecto Zeeman nuclear* (interacción del momento del núcleo I con el campo magnético externo H) y el tercero mide el *acoplamiento hiperfino electrón-núcleo*

(interacción entre el electrón desapareado y los núcleos de los átomos a los que pertenece). El valor β hace referencia al magnetón de Bohr.

Por otro lado, en los sistemas moleculares inorgánicos existen diversos factores que afectan a la anchura de la señal de RSE:

- ✓ *Relajación espín-red*, debida a la interacción de los iones paramagnéticos con las vibraciones térmicas de la red. Este fenómeno produce un ensanchamiento de la señal, que hace que en algunos sistemas moleculares sea necesario realizar el estudio a baja temperatura.
- ✓ *Interacciones espín-espín con las moléculas paramagnéticas vecinas*, que producen una redistribución de los estados electrónicos y un ensanchamiento de la señal, dependiente de la distancia entre centros paramagnéticos y del ángulo del campo magnético con la muestra.
- ✓ *Interacciones de intercambio electrónico*, que si son muy rápidas estrechan las señales.

El estudio de los tensores \mathbf{g} y \mathbf{A} proporciona información valiosa acerca de los grupos puntuales y las estereoquímicas, como se describe en la Tabla 1.5.

\mathbf{g}, \mathbf{A}	Geometría molécula
$g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$ $A_{xx} = A_{yy} = A_{zz}$	O_h (octaédrica), T_d (tetraédrica)
$g_{zz} \neq g_{xx} = g_{yy}$ $A_{zz} \neq A_{xx} = A_{yy}$	C_{4v} (piramidal cuadrada), C_{3v} (piramidal trigonal), D_{2d} (tetraedro comprimido o elongado), D_{4h} (plano-cuadrada)
$g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$ $A_{xx} \neq A_{yy} \neq A_{zz}$	C_{2h} , C_{2v} , D_{2h} , C_2 , C_s , C_i , C_1

Tabla 1.5 Valores de los tensores \mathbf{g} y \mathbf{A} en RSE, y geometrías moleculares relacionadas.

Mediante esta técnica, se ha evaluado la geometría en la coordinación de los compuestos **1**, **8**, **12** y **18** en disolución acuosa utilizando Cu(II) como sonda. La Figura 1.9 muestra los espectros RSE tanto experimentales como simulados a 298 y 150 K, junto con los parámetros magnéticos, partiendo de una concentración de compuesto (**1**, **8**, **12** y **18**) de 0.05 M y 0.2 equivalentes de Cu(II), puesto que a mayores concentraciones de cobre la aparición de una señal ancha dificulta su análisis.

La interpretación de estos parámetros se realiza por comparación con los datos existentes en bibliografía,⁵⁴⁻⁵⁷ para sistemas donde el estudio de RSE fue llevado a cabo mediante una aproximación similar. Como principio general, se consideró que un aumento de A_{zz} y el correspondiente descenso en g_{zz} indican un incremento en la densidad electrónica del átomo de cobre, debido a dos factores:

- (i) Una mayor interacción con los átomos que ceden densidad al centro metálico (átomos de nitrógeno u oxígeno cargados negativamente, por separado).⁵⁴
- (ii) Un incremento en el número de átomos de nitrógeno respecto a los de oxígeno que coordinan Cu(II) (el átomo de nitrógeno transfiere la densidad electrónica al átomo de cobre de manera más eficiente que los oxígenos cargados negativamente).⁵⁴ Si tanto g como A disminuyen, estos resultados se interpretan como una distorsión en la coordinación plano cuadrada.

Para una proporción $L:Cu^{2+} = 1:0.2$, los parámetros magnéticos del sistema cuando $L =$ disulfonato **1** (Fig. 1.9) apuntan a una coordinación CuN_2O_2 .⁵⁴ Para el sistema tetrasulfonato **12**, tan solo el 20% de los iones presentan esta coordinación, mientras que el 80% de los iones muestran parámetros que sugieren una coordinación CuO_4 ,⁵⁴ en línea con la presencia de un mayor número de grupos sulfonato que unen cobre, en lugar de átomos de nitrógeno. Este hecho está de acuerdo con los resultados observados en el espectro UV-Vis.

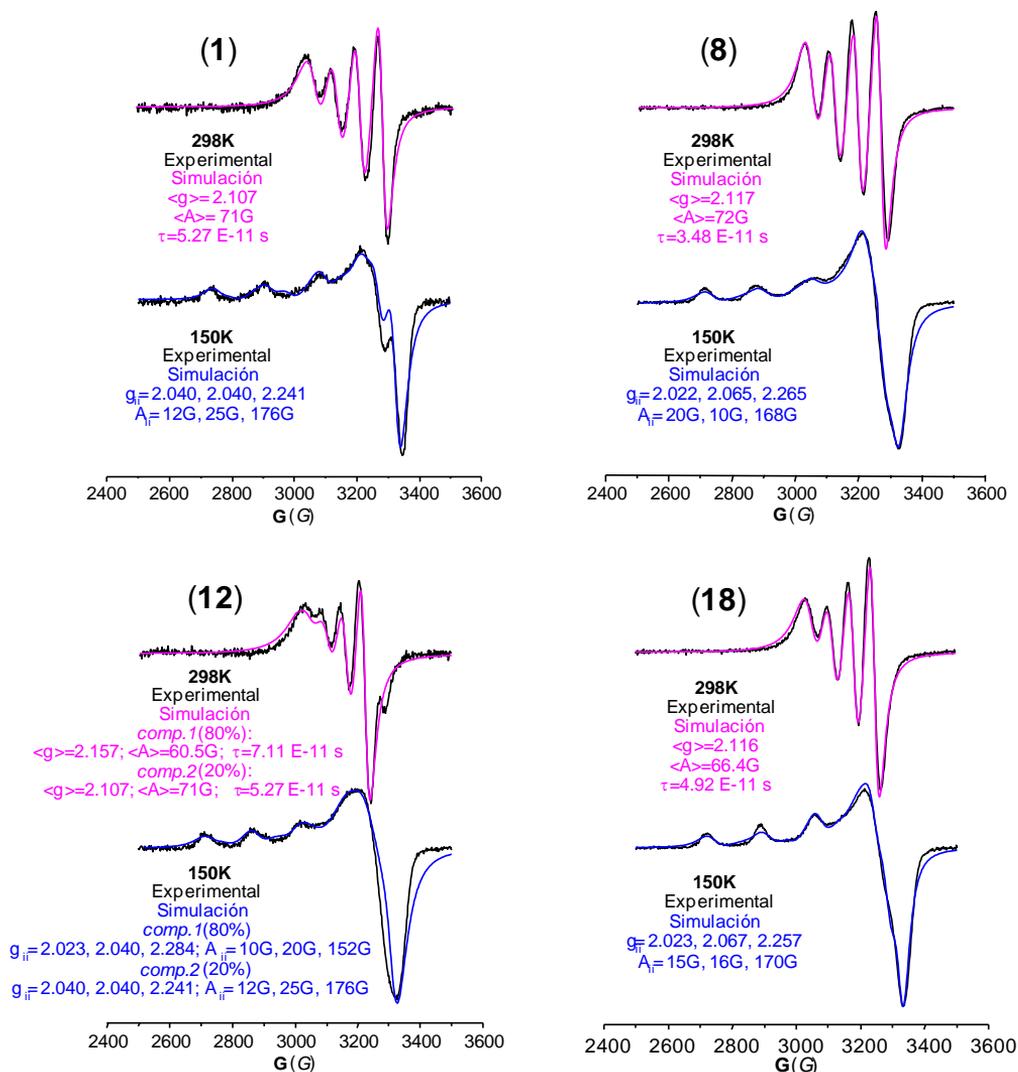


Figura 1.9 Espectros RSE de los compuestos **1**, **8**, **12** y **18**, a una proporción L:Cu de 1:0.2, a 298 y 150 K. Se muestran en negro (espectro experimental) y en color (simulado).

En relación a los derivados carboxilato, de la comparación con su análogo sulfonato **12** se concluye que el compuesto **18** muestra una interacción preferente del Cu(II) por los nitrógenos respecto a los oxígenos de los grupos carboxilato, tal y como muestran los parámetros magnéticos (menor g_{zz} , mayor

A_{zz}). Sin embargo, este hecho no se cumple al comparar **8** con **1**, debido a que los parámetros magnéticos y de movilidad indican una coordinación CuO_4 distorsionada, o CuN_1O_3 ,⁵⁴ que probablemente surge de la formación de una estructura dímica, tal y como apunta el espectro de masas, donde ambos iones de cobre interactúan débilmente con dos ligandos. De hecho, la mayor movilidad (menor tiempo de correlación τ) en **8** a t.a. está de acuerdo con esta interpretación, con un continuo intercambio entre los átomos de cobre.

Al aumentar la concentración de cobre, se produce una progresiva saturación, primero de los nitrógenos y luego de los oxígenos, que fuerza a los iones de cobre a ocupar posiciones muy próximas. Esto conduce a un aumento gradual del porcentaje relativo de una señal ancha de línea única superpuesta a la señal resuelta. La gráfica en la Figura 1.10 muestra el incremento en el porcentaje relativo de esta señal ancha en función de la concentración de cobre. El compuesto **8** muestra una saturación retrasada, probablemente debido a la formación de unidades dímicas que presenten el ión cobre en un entorno distorsionado, lo que desfavorece la aparición de la señal ancha.

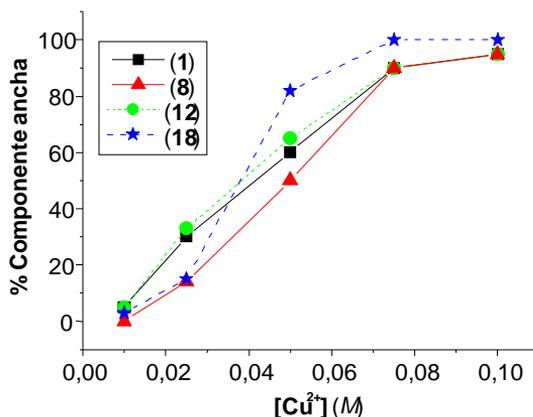


Figura 1.10 Incremento en el porcentaje de la componente ancha en el espectro de RSE al aumentar la concentración de cobre, que surge de la progresiva saturación de los oxígenos del ligando ([ligando] = 0,05M).

1.2.2.e. Estudio comparativo por Espectroscopía Infrarroja (FT-IR)

El estudio por Espectroscopía Infrarroja permite determinar el modo de coordinación de las distintas ramas al ión metálico, a través del estudio de las bandas de vibración de los diferentes grupos funcionales. En este caso, los grupos funcionales que aportan mayor información son CO_2^- (en compuestos aminocarboxilato) y SO_3^- (en compuestos aminosulfonato) (Tabla 1.6).

	Carboxilato (cm^{-1})	Sulfonato (cm^{-1})
Protonado	1700-1750	1355-1340, 1165-1150
Coordinado	1650-1600	-
Iónico	< 1600	1250-1140, 1070-1030

Tabla 1.6 Rangos de valores de las bandas de tensión en FT-IR⁵⁸ para los grupos carboxilato y sulfonato. “-“ indica la ausencia de esta información en la bibliografía.

En el caso de los compuestos aminocarboxilato, las bandas de vibración de tensión asimétrica de los grupos carbonilo se han utilizado para determinar el entorno de este grupo funcional.⁵⁹ El espectro IR en estado sólido de los complejos estudiados apunta hacia una coordinación de todos los grupos carboxilato al centro metálico, donde los compuestos exhiben una única banda intensa a 1600 cm^{-1} , que corresponde a los carboxilatos coordinados (Fig. 1.11).^{14, 48, 52} Además, en disolución acuosa otros autores han observado la permanencia de dichos grupos unidos al ión metálico.⁶

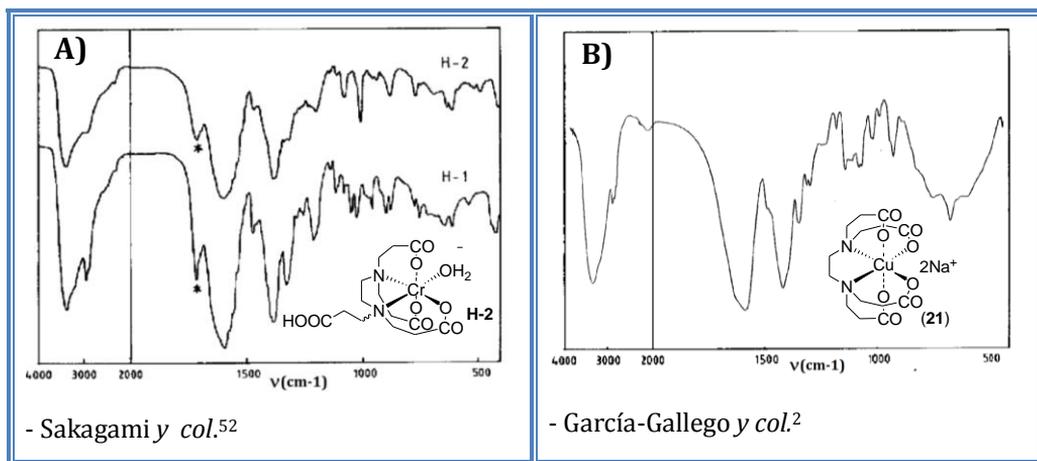


Figura 1.11 Espectros IR-FT de: A) Estereoisómeros H-1 y H-2 de $[\text{Cr}(\text{Hedtp})(\text{H}_2\text{O})]^-$,⁵² ejemplo de complejo con un grupo COOH sin coordinar, marcado como *. B) Complejo $\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{edtp})]$ (**21**).

Para los compuestos aminosulfonato se sigue un razonamiento similar con los modos de vibración de los grupos R-SO_3^- . El espectro IR del compuesto **3** está de acuerdo a lo observado en bibliografía,⁸ con cuatro bandas fuertes en el rango $1157\text{-}1233\text{ cm}^{-1}$, que pueden asignarse a las vibraciones de tensión $\nu(\text{SO})$. El resto de complejos presentan espectros similares, algunos de ellos con las bandas englobadas en una sola banda ancha. Estos resultados apuntan a una coordinación de todos los grupos aniónicos sobre el centro metálico.

1.2.2.f. Estudio potenciométrico

La evaluación del comportamiento ácido-base de los sistemas **1**, **8**, **12** y **18** aporta información relacionada con la capacidad de los mismos para coordinar iones metálicos o su disponibilidad para interactuar con ciertas estructuras celulares a través de sus grupos aniónicos, a valores de pH fisiológicos.

La valoración potenciométrica de estos compuestos se realizó en agua destilada sin fuerza iónica. Los pK_a se calcularon mediante el método de la segunda derivada⁶⁰ y se muestran en la Tabla 1.7 y la Figura 1.12. Este método representa $\Delta^2pH/\Delta V^2$ vs. V , siendo V el volumen de valorante añadido (HCl, en este caso) y ΔV el incremento de volumen constante. En la curva de valoración (pH vs V), la inflexión ocurre en los puntos de equivalencia, y los valores precisos de pK_a se determinan al observar los máximos de la primera derivada o los valores donde la segunda derivada es cero.

Compuesto	pK_{a1}	asignación	pK_{a2}	asignación
1	4.67	1 ^{er} (NH ⁺)	9.71	2 ^o (NH ⁺)
12	4.63	1 ^{er} (NH ⁺)	9.12	2 ^o (NH ⁺)
8	4.79	1 ^{er} (NH ⁺) y COOH	8.00	2 ^o (NH ⁺)
18	5.01	1 ^{er} (NH ⁺) y COOH	8.09	2 ^o (NH ⁺)

Tabla 1.7 Valores de pK_a para los ligandos **1**, **12**, **8** y **18**

En su estructura, los sistemas presentan dos aminas terciarias equivalentes y dos o cuatro grupos aniónicos, que muestran una pronunciada diferencia en sus procesos de protonación. En el caso de los compuestos con grupos sulfonato **1** y **12**, la curva de valoración muestra dos valores de pK_a (Tabla 1.7), que se asignan a las dos constantes de disociación ácida de los grupos amonio, ya que los grupos sulfonato son bases tan débiles que los

valores de pK_a no pueden ser determinados por esta técnica. Estos valores de pK_a son similares a los de sistemas análogos, como los denominados *tampones de Good*, compuestos aminosulfonato N-sustituídos zwitter-iónicos.⁶¹⁻⁶³ Sin embargo, el comportamiento de coordinación para **1** y **12** es completamente diferente al de estos compuestos, los cuales muestran propiedades complejantes débiles o inexistentes.

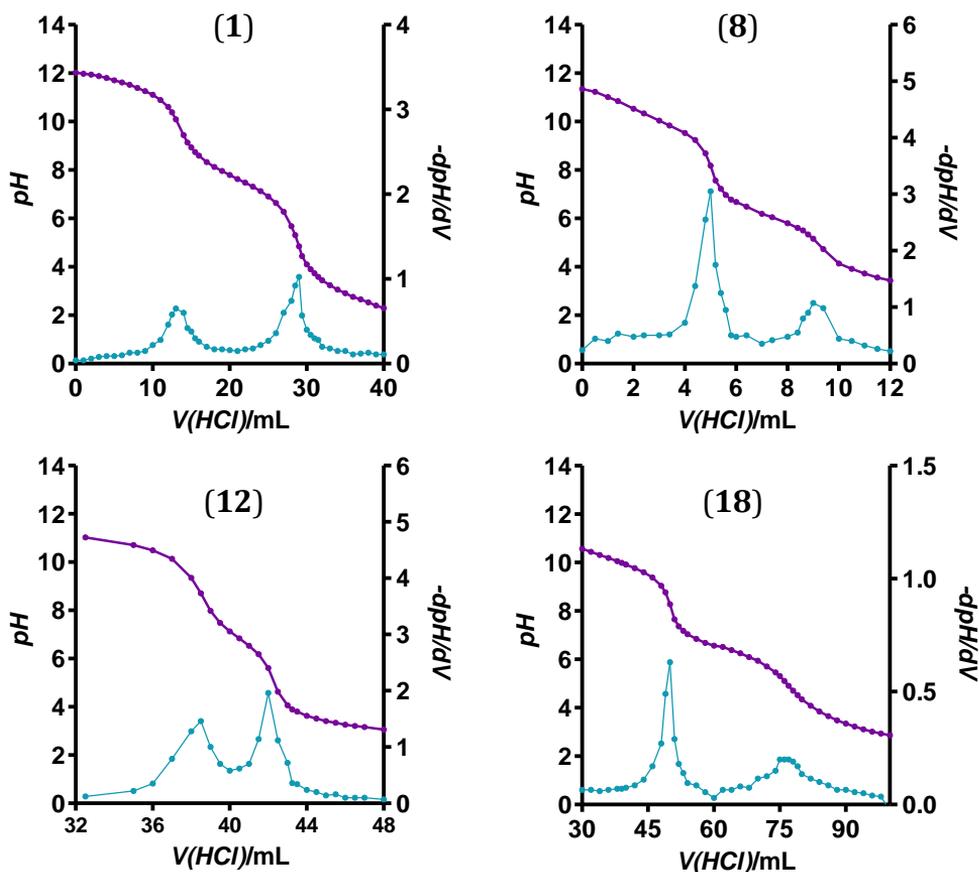


Figura 1.12 Curvas de valoración pH/V y dpH/dV para los sistemas **1**, **8**, **12** y **18**.

El proceso de transformación del compuesto **1** en el derivado zwitter-iónico **2** durante el proceso de valoración potenciométrica se siguió por RMN- 1H y se muestra en la Figura 1.13.

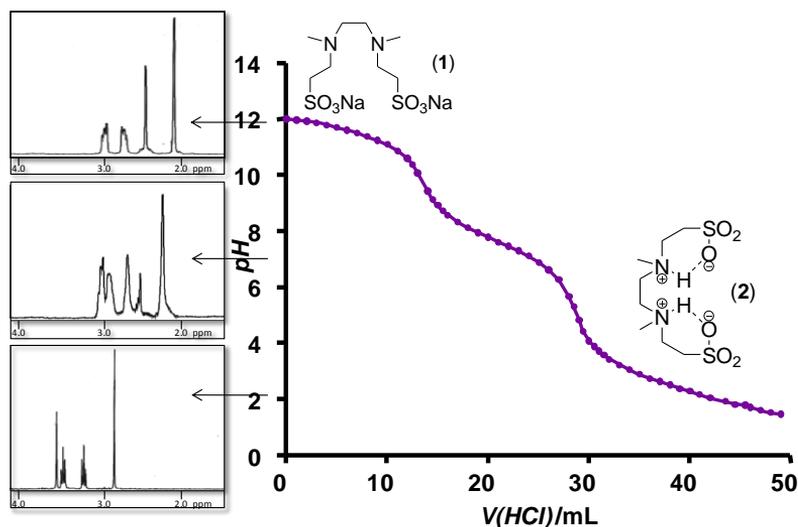


Figura 1.13 Transformación del compuesto **1** en **2** seguida por RMN-¹H durante su valoración potenciométrica.

Para los derivados carboxilato **8** y **18**, la curva de valoración también muestra dos valores de pK_a (Tabla 1.7); sin embargo, en este caso el primer punto de protonación aparece como un pico ancho, ya que engloba también a las constantes de disociación de los grupos -COOH.

Las diferencias entre los valores de pK_a de estos sistemas se deben a su distinta estructura⁶⁴ y pueden atribuirse a un compromiso entre dos factores:

- (i) El distinto efecto electro-donador de los grupos SO_3^- respecto a los CO_2^- .
- (ii) El efecto electrostático resultante por la presencia de 2 o 4 grupos cargados negativamente en la cadena que une al nitrógeno.

De estos resultados se deduce que, a pH fisiológico, los grupos sulfonato y carboxilato se encuentran en su forma aniónica, estando así disponibles para la coordinación cuando se enfrenten a metales o para inhibir la infección viral mediante la interacción electrostática con proteínas virales y celulares, como se comentará en la siguiente sección.

1.3. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Los compuestos sintetizados en este capítulo son potenciales agentes antivirales frente al VIH. Por un lado, presentan grupos aniónicos aptos para su unión a dominios catiónicos del receptor CD4 y/o de los correceptores CXCR4 o CCR5 de la célula, o a las proteínas de la envuelta del virus, como gp120, impidiendo su unión y fusión. Además, la coordinación de iones metálicos podría modular esta acción.

Para evaluar este comportamiento, se realizaron los siguientes ensayos:

- 1) Estudio de *biocompatibilidad* de los diversos compuestos mediante un ensayo MTT (*Cap. 4*), para establecer la concentración idónea de trabajo.
- 2) Estudio de la *actividad inhibitoria* frente al VIH, en diferentes condiciones:
 - a) "*Ensayo de pre-tratamiento*", que permite determinar la actividad preventiva de los compuestos, en el cual se mide la infección viral en células tratadas antes de la infección.
 - b) "*Ensayo de post-tratamiento*", que permite determinar la actividad terapéutica de los compuestos, a través de la cuantificación de la infección viral en células tratadas después la infección.
 - c) "*Ensayo de especificidad por correceptores*", para analizar la preferencia de los compuestos por virus con tropismo X4, R5 o X4/R5.
 - d) "*Ensayo combinado de los compuestos con zidovudina (AZT)*", para evaluar un posible efecto sumatorio o incluso sinérgico entre ambos.

Los compuestos con el ligando dmedds se evaluaron en la línea celular MT-2 (línea celular linfoide del linaje T CD4+). Los compuestos derivados de los ligandos **8**, **12** y **18**, sin embargo, fueron evaluados en cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), puesto que son más fisiológicos y la acción de los compuestos es evaluada en una situación más real. Ambas tipos celulares permiten recrear fielmente las dianas celulares del VIH-1.

1.3.1. Ensayos de biocompatibilidad

La citotoxicidad de los compuestos se evaluó mediante un ensayo MTT, que valora la actividad metabólica de la célula. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción mitocondrial de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a sales de formazán por parte de las células vivas. Valores de reducción mitocondrial menores del 80% se consideran indicios de toxicidad.

1.3.1.a. Compuestos sulfonato 1-6

Las células MT-2, en medio de cultivo OPTIMEM® I, se trataron con los compuestos **1-6** en un rango de concentraciones finales de 0.5-5 μM , procedentes de disoluciones madre en agua con 2.5% de DMSO para asegurar la total disolución de los compuestos. Tras 24 h, se realizó el ensayo MTT (*ver Cap.4*), y los resultados se muestran en la Figura 1.14, donde se observa que todos los compuestos son biocompatibles a una concentración de 5 μM , excepto en el caso del complejo de zinc **6**, con el que la actividad mitocondrial se reduce a un 60%.

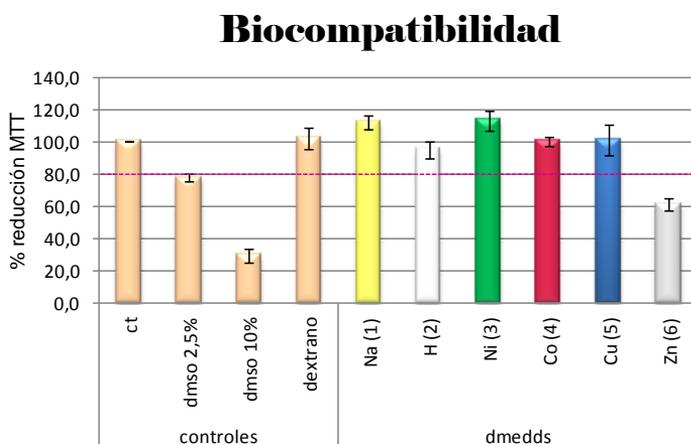


Figura 1.14 Ensayo MTT en células MT-2 tratadas durante 24 h con los compuestos **1-6** a concentraciones de 5 μM . La figura representa la media de 3 experimentos independientes. Controles: ct (células sin tratar), DMSO (control de muerte celular) y dextrano (control macromolecular de viabilidad).

1.3.1.b. Compuestos sulfonato 12-16 y carboxilato 8-11 y 18-21

El mismo ensayo MTT se llevó a cabo con los compuestos derivados de los ligandos **8**, **12** y **18**, esta vez en CMSP, a un rango de concentraciones 0.5-5 μM y a 24 h (Fig. 1.15). En este caso, las disoluciones madre se prepararon solo en agua, por la mayor solubilidad de estos compuestos.

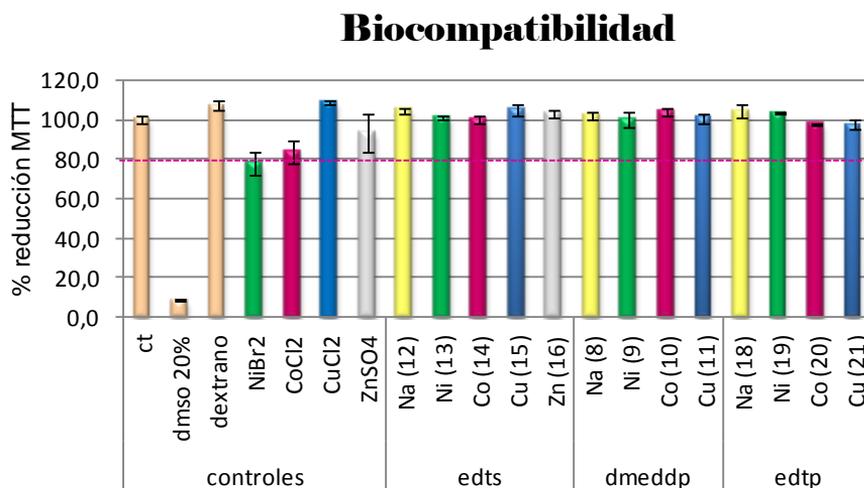


Figura 1.15 Ensayo MTT en CMSP tratadas con concentraciones de 5 μM de los compuestos sulfonato **12-16** y carboxilato **8-11** y **18-21**, durante 24 h. La figura representa la media de 3 experimentos independientes. Controles: ct (células sin tratar), DMSO 20% (control de muerte celular), dextrano (control macromolecular de viabilidad) y controles metálicos 5 μM (NiBr₂, CoCl₂, CuCl₂ y ZnSO₄).

La gráfica muestra la ausencia de toxicidad de estos compuestos en el rango de concentraciones evaluado, en este cultivo primario. En relación con las sales metálicas de partida a la misma concentración, los complejos muestran un aumento claro de la biocompatibilidad, especialmente en el caso de Ni y Co, cuyas controles metálicos se encuentran en el límite establecido de biocompatibilidad (80% de actividad mitocondrial). Por otro lado, no se observan diferencias entre los sistemas con dos y con cuatro grupos aniónicos.

1.3.2. Ensayos de inhibición de la infección por el VIH

Tras evaluar las concentraciones a las que los compuestos son biocompatibles, se procedió a analizar su capacidad para inhibir la infección por el VIH. En el “*ensayo de pre-tratamiento*”, las células se incubaron con los compuestos durante 2 h, y posteriormente se infectaron durante 2 h con $10 \text{ ng}/10^6$ células del aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3}, con preferencia por el correceptor CXCR4. Tras 48 h, se recogió el sobrenadante y se midió la producción de antígeno de la proteína p24 del VIH (Ag p24) mediante enzimoimmunoensayo (ELISA, kit comercial), que permite cuantificar la infección de las células tras los distintos tratamientos. En el “*ensayo de post-tratamiento*”, el experimento se realiza a la inversa, tratando las células después de haber sido infectadas.

1.3.2.a. Compuestos sulfonato 1-6

En el caso de los compuestos **1-6**, se evaluó su capacidad inhibitoria de la infección por el VIH en células MT-2, tanto en pre como en post-tratamiento (*Fig. 1.16.A*). Los compuestos **1** y **2** no presentan ningún tipo de inhibición, ni en pre ni en post-tratamiento, al igual que ocurre con el derivado de zinc **6**. En el caso de células pre-tratadas, los complejos **3-5** inhiben en torno a un 40-70% la infección por el virus, comparado con las células control o con las células tratadas con el compuesto **1**. En células MT-2 previamente infectadas por el VIH y posteriormente tratadas con los compuestos, la inhibición se encuentra alrededor de un 50% para los compuestos **3-5**. Estos resultados apuntan a un comportamiento dual de estos compuestos, que actúan tanto en los pasos iniciales como en los posteriores del ciclo replicativo del VIH.

Además, se evaluó la inhibición comparativa entre los complejos y sus controles metálicos respectivos, en pre-tratamiento. Como se observa en la *Figura 1.16.B*, la coordinación del ión metálico al ligando aniónico aumenta de manera significativa su actividad inhibitoria.

Inhibición pre/post-tratamiento

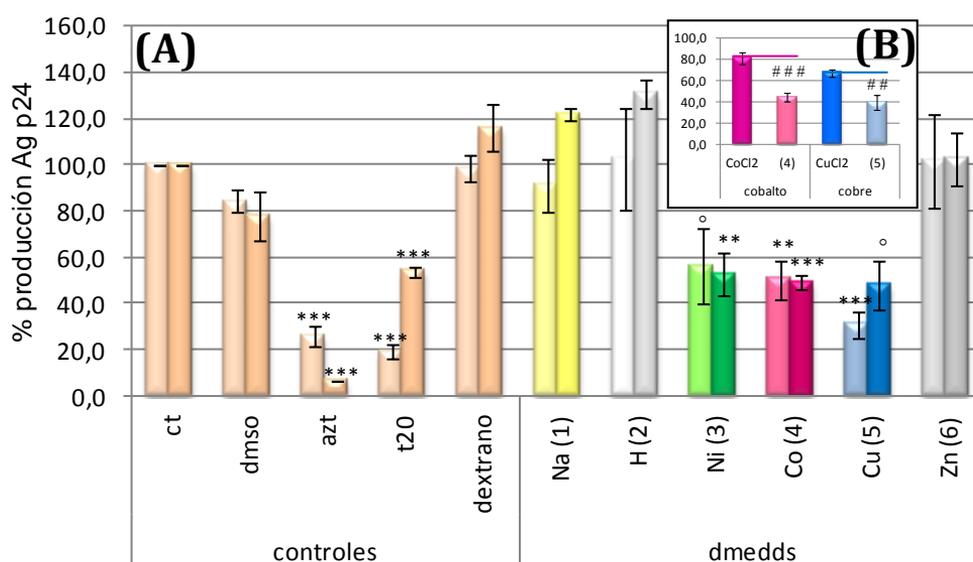


Figura 1.16 A) Ensayo ELISA del antígeno de la proteína viral p24 a 48 h pre- (barras claras) y post-tratamiento (barras oscuras). Las diferencias respecto al grupo control se analizaron estadísticamente ($^{\circ}p < 0.2$, $^{**}p < 0.05$, $^{***}p < 0.01$). Los compuestos 1-6 se utilizaron a una concentración de 5 μM , y la infección se realizó con el aislado viral X4-VIH-1_{NL4.3}, específico del correceptor CXCR4. Los resultados son la media de tres experimentos diferentes. Como controles: AZT 0.5 μM (inhibidor de la retrotranscripción), T-20 (inhibidor de la fusión) y dextrano 15 μM (control macromolecular). B) Comparativa de la inhibición de los compuestos 4 y 5, respecto a las sales metálicas solas CoCl₂ y CuCl₂. Las diferencias respecto a cada control metálico se analizaron estadísticamente ($^{\#\#}p < 0.05$, $^{\#\#\#}p < 0.01$).

1.3.2.b. Compuestos sulfonato 12-16 y carboxilato 8-11 y 18-21

La actividad antiviral frente al VIH de los derivados de los compuestos **8**, **12** y **18** se evaluó en CMSP. Para discriminar entre un efecto atribuido al ión metálico libre y el del complejo por sí mismo, la eficacia inhibitoria de los complejos se comparó con la de las sales metálicas NiBr₂, CoCl₂, CuCl₂ y ZnSO₄, bajo las mismas condiciones experimentales.

Los resultados del ensayo en pre-tratamiento se muestran en la Fig. 1.17. Ninguno de los controles metálicos presentó una inhibición significativa en comparación con el control de células sin tratar. A 5 μM , la mayor eficacia se alcanzó con los complejos de níquel (20-40%), el de cobalto **10** (37%) y el de zinc **16** (46%), todos en el rango de T-20 15 μM (56%). Además, todos ellos son estadísticamente significativos respecto al control de células sin tratar y respecto a sus correspondientes controles metálicos. Estas evidencias indican que estos compuestos están actuando como inhibidores del primer paso del ciclo viral. De nuevo, los ligandos en su forma de sal sódica **8**, **12** y **18** no presentan una acción significativa, de ahí la importancia de la coordinación con el centro metálico para obtener un efecto inhibitorio.

Inhibición pre-tratamiento

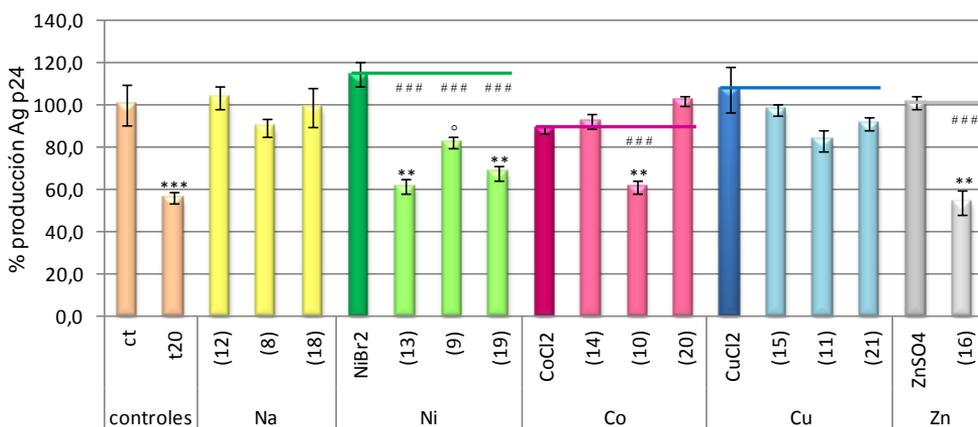


Figura 1.17 Ensayo ELISA de la producción de Ag p24 48 h después del pre-tratamiento. Los compuestos se evaluaron a una concentración de 5 μM y la infección se realizó con aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3}, específico del corresponsor CXCR4. Como controles: ct (células sin tratar), T-20 15 μM (inhibidor de la fusión) y controles metálicos 5 μM (NiBr₂, CoCl₂, CuCl₂ y ZnSO₄). Las diferencias se analizaron estadísticamente respecto al grupo control ($^{\circ}p < 0.2$, $^{**}p < 0.05$, $^{***}p < 0.01$) y respecto a los correspondientes controles metálicos ($^{###}p < 0.01$). Los resultados son la media de tres experimentos diferentes.

Para evaluar una posible especificidad de los compuestos sobre los correceptores celulares CXCR4 o CCR5 (ver Fig. 0.2), se repitió este experimento con el aislado viral R5 VIH-1_{Bal-1}, específico de CCR5. Los resultados se muestran en la Figura 1.18, junto con los obtenidos en el ensayo con el aislado X4 VIH-1_{NL4.3}, de los que se deduce que no existe ningún patrón claro, habiendo complejos específicos para CXCR4 (**13** (Ni), **9** (Ni) y **10** (Co)), para CCR5 (**15** (Cu) y **18** (Na)) o para ambos (**16** (Zn) y **19** (Ni)). Una combinación de compuestos que actúen sobre distintos correceptores podría conducir a una mayor efectividad del tratamiento.

Inhibición pre-tratamiento CXCR4 vs CCR5

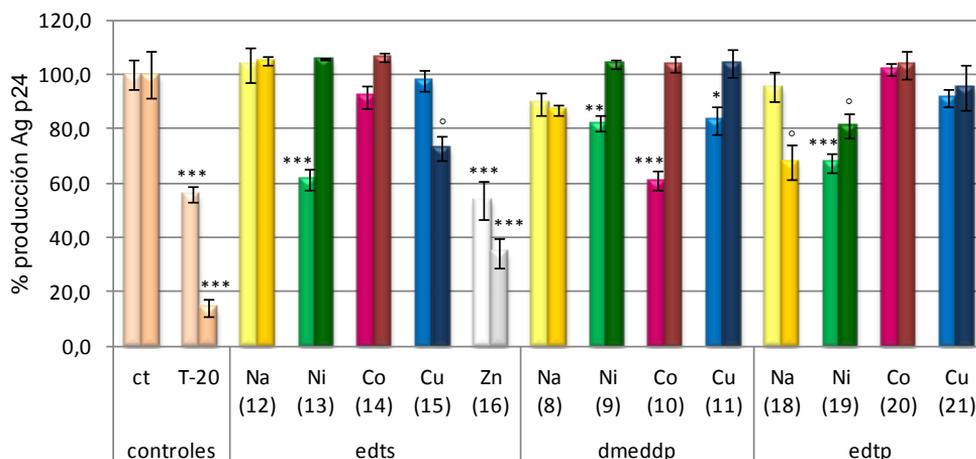


Figura 1.18 Estudio de la especificidad por los correceptores CXCR4 (color claro) y CCR5 (color oscuro), mediante ensayo ELISA del Ag p24, tras 48 h del pre-tratamiento con los compuestos a una concentración de 5 μ M. La infección se realizó con aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3}, específico del correceptor CXCR4, o el R5 VIH-1_{Bal-1}, específico del correceptor CCR5. Como controles: ct (células sin tratar) y T-20 15 μ M (inhibidor de fusión). Las diferencias respecto a cada grupo control se analizaron estadísticamente ($^{\circ}p < 0.2$, $*p < 0.1$, $**p < 0.05$, $***p < 0.01$). Los resultados son la media de 3 experimentos.

Respecto al ensayo en post-tratamiento, se evaluó la capacidad inhibitoria de los compuestos a una concentración de 5 μ M, durante 24, 48 y 72 h. Los resultados se muestran en la Figura 1.19, agrupados según el metal.

Inhibición post-tratamiento

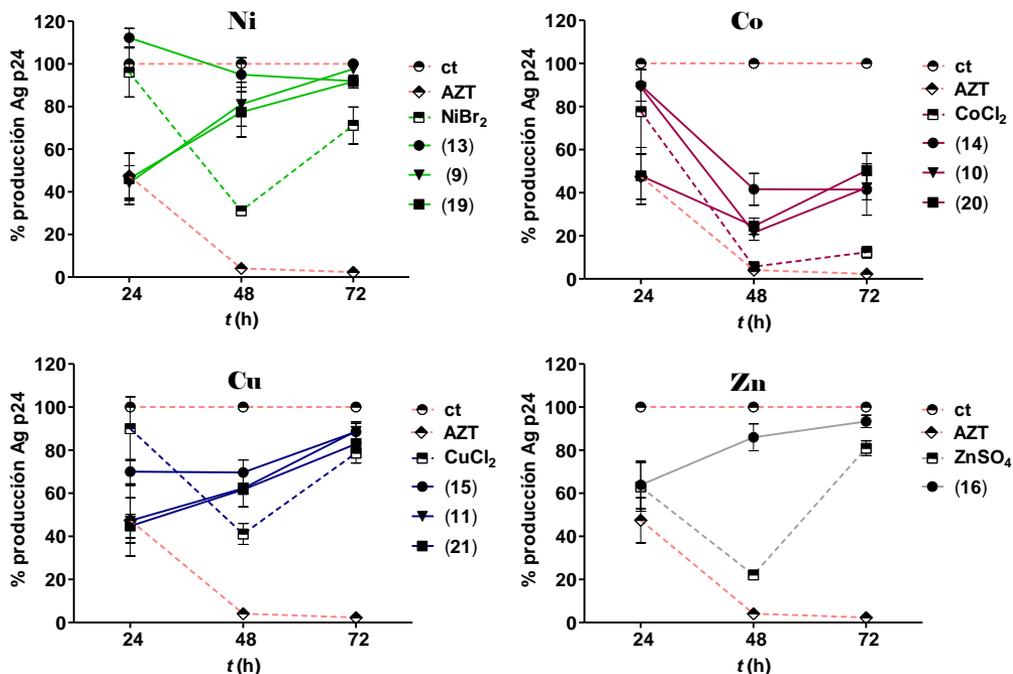


Figura 1.19 Ensayo ELISA del Ag p24 tras post-tratamiento durante 24, 48 y 72 h. Como controles: ct (células sin tratar), AZT (inhibidor de la retrotranscripción) a 0.5 μM (24h) y 1 μM (48 y 72h), y controles metálicos 5 μM (NiBr₂, CoCl₂, CuCl₂ y ZnSO₄). La infección se realizó con aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3}, específico del correceptor CXCR4. Los resultados son la media de 4 experimentos diferentes. Los derivados en su forma de sal sódica no produjeron ninguna inhibición, por lo que no se muestran en las gráficas.

A 24 h, la mayoría de los complejos presentan un efecto significativo, mayor que el de sus respectivos controles metálicos y en el rango de AZT 0.5 μM (50%). La coordinación del metal al ligando es imprescindible, puesto que los derivados en su forma de sal sódica no muestran inhibición. A 48 h, los complejos de Co(II) y Cu(II) continúan manifestando una actuación significativa (60-80% y 30-40% respectivamente), aunque menor que el metal libre. Finalmente, a 72 h, la mayoría de los compuestos muestran un efecto pobre, solo CoCl₂ (88%) y sus complejos (50-60%) revelan una inhibición destacable.

Por último, se realizó un estudio en post-tratamiento para evaluar el posible efecto sumatorio de la utilización de los compuestos junto con zidovudina (AZT, fármaco antirretroviral comercial) en la inhibición de la infección por el VIH. En el experimento, se infectaron CMSP durante 2 h con 10 ng/10⁶ células con el aislado X4 VIH-1_{NL4.3}, y posteriormente se trataron con las mezclas de cada compuesto (5 μM) con AZT (1 μM). Tras 24 y 48 h, se cuantificó la producción de Ag p24 en el sobrenadante del cultivo mediante ensayo ELISA. Los resultados se muestran en la Fig. 1.20.

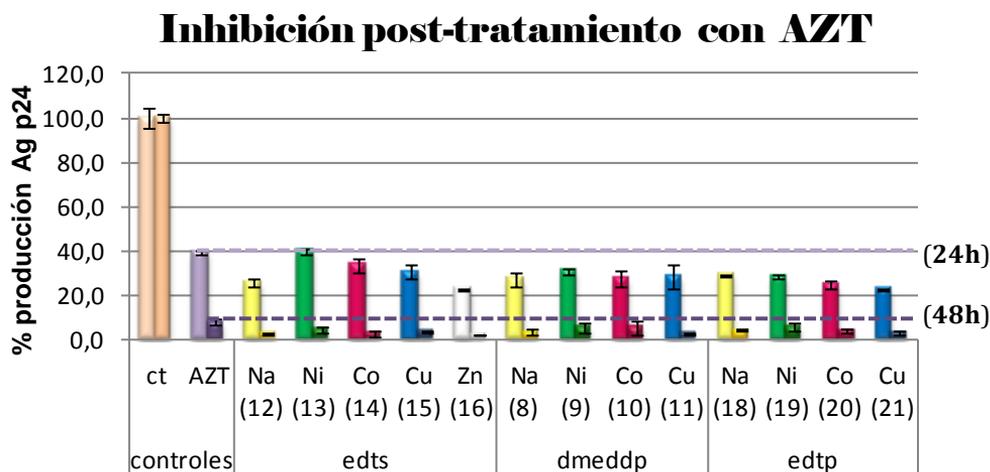


Figura 1.20 Efecto inhibitorio combinado entre los compuestos (5 μM) y el fármaco comercial AZT (1 μM), evaluado mediante ensayo de ELISA del Ag p24 tras post-tratamiento a 24 h (barras claras) y 48 h (barras oscuras). Los resultados son la media de dos experimentos diferentes.

La combinación de los compuestos estudiados con AZT produce una inhibición superior a la del fármaco solo, ya patente a 24 h, y alcanzando una inhibición cercana al 100% a 48 h. Este efecto es especialmente importante para los ligandos en forma de sal sódica, que no producen inhibición por ellos mismos, pero que mejoran claramente la actividad antiviral del AZT, observándose una posible sinergia entre ambos.

1.3.3. Conclusiones del apartado

A la vista de todos los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- 1) Los ligandos, en su forma de sal sódica, no presentan toxicidad ni capacidad inhibitoria frente a la infección por el VIH, tanto en células pre-tratadas como post-tratadas.
- 2) La coordinación de iones metálicos al ligando supone una disminución significativa de la toxicidad de los iones libres y un aumento significativo de la capacidad inhibitoria.
- 3) En MT-2, los compuestos de níquel, cobalto y cobre **3-5** presentan altas tasas de inhibición (40-70%) tanto en pre como en post-tratamiento. En CMSP, destaca la inhibición de los complejos de Ni(II) **9, 13 y 19**, de Co(II) **10** y de Zn(II) **16**, en pre-tratamiento; respecto al post-tratamiento, a 24 h la mayoría de complejos presentan una inhibición similar a la del AZT, cuya actividad se extiende hasta las 48 h en el caso de Cu(II) ó 72 h para Co(II).
- 4) La especificidad frente a los correceptores CXCR4 y CCR5 no sigue un patrón concreto, observando compuestos con cierta preferencia por uno, por el otro o por ambos. Una combinación de compuestos que actúen sobre distintos correceptores podría conducir a una mayor efectividad del tratamiento.
- 5) Finalmente, el estudio inhibitorio combinado con AZT demuestra que la administración conjunta es más eficaz en el tratamiento de la infección por el VIH, alcanzando valores de 100% de inhibición a 48 h para la mayoría de los compuestos.

Los resultados apuntan a un comportamiento dual de los compuestos. Primero, impiden la unión del virus a la célula, a través del bloqueo de las proteínas en la superficie de ambos mediante los grupos aniónicos, interacción que es modulada por el centro metálico. Segundo, actúan en pasos posteriores del ciclo replicativo, una vez que las células están infectadas. Por lo tanto, se trata de agentes preventivo-terapéuticos frente al VIH.

1.4. BIBLIOGRAFÍA

1. S. García-Gallego, M. J. Serramía, E. Arnaiz, L. Díaz, M. A. Muñoz-Fernández, P. Gómez-Sal, M. F. Ottaviani, R. Gómez, F. J. de la Mata. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2011**, 1657-1665.
2. S. García-Gallego, J. Sánchez Rodríguez, J. L. Jiménez, M. Cangiotti, M. F. Ottaviani, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez, F. J. de la Mata. *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 6488-6499.
3. B. E. Douglas, D. J. Radanovic. *Coord. Chem. Rev.*, **1993**, 128, 139-165.
4. D. M. Seely, P. Wu, E. J. Mills. *BMC Cardiovasc. Disord.*, **2005**, 5, 32.
5. Z. D. Matovic, A. Meetsma, V. D. Miletic, P. J. van Koningsbruggen. *Inorg. Chim. Acta*, **2007**, 360, 2420-2431.
6. D. J. Radanovic, S. Ianelli, G. Pelosi, Z. D. Matovic, S. Tasic-Stojanovic, B. E. Douglas. *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, 278, 66-75.
7. R. K. Henderson, E. Bouwman, A. L. Spek, J. Reedijk. *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 4616-4617.
8. C. A. Grapperhaus, C. S. Mullins, P. M. Kozlowski, M. S. Mashuta. *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 2859-2866.
9. Y. Lee, D. H. Lee, A. A. Narducci Sarjeant, K. D. Karlin. *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, 101, 1845-1858.
10. W. Jackson, A. M. Sargeson. *Inorg. Chem.*, **1988**, 27, 1068-1073.
11. H.-C. Liang, S. K. Das, J. R. Galván, S. M. Sato, Y. Zhang, L. N. Zakharov, A. L. Rheingold. *Green Chem.*, **2005**, 7, 410-412.
12. B. C. Ranu, S. Banerjee. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 141-143.
13. H. J. Kim, M. S. Kwon, J. S. Choi, B. H. Kim, J. K. Yoon, K. Kim, J.-s. Park. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 1708-1715.
14. X.-J. Tan, L.-Q. Jin, D.-X. Xing. *Acta Crystallogr. Sect. E-Struct Rep. Online*, **2006**, E62, m2502-m2504.
15. J. Liqiang, L. Yanchun. *Zhoungguo Pige*, **2005**, 34, 19-21.

16. L. H. J. Lajunen, P. Kokkonen, H. Knuutti, J. Jokisaari. *Acta Chem. Scand.*, **1989**, 43, 2-5.
17. K. Wiegardt, U. Bossek, M. Guttmann, J. Z. Weiss. *Z. Naturforsch. (B)*, **1983**, 38B, 81-89.
18. J. Smieja, H. Place, K. J. Brewer. *Acta Crystallogr. Sect. C-Cryst. Struct. Commun.*, **1991**, C47, 2455.
19. H. Endres. *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **1984**, 513, 78.
20. E. T. Papish, M. T. Taylor, F. E. Jernigan, M. J. Rodig, R. R. Shawhan, G. P. A. Yap, F. A. Jové. *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 2242-2250.
21. B.-L. Wu, P. Zhang, Y.-Y. Niu, H.-Y. Zhang, Z.-J. Li, H.-W. Hou. *Inorg. Chim. Acta*, **2008**, 361, 2203-2209.
22. T. S. Lobana, I. Kinoshita, K. Kimura, T. Nishioka, D. Shiomi, K. Isobe. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2004**, 356-367.
23. R. Fu, S. Hu, X. Wu. *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 9630-9640.
24. K. Kimura, T. Kimura, I. Konoshita, N. Nakashima, K. Kitano, T. Nishioka, K. Isobe. *Chem. Commun.*, **1999**, 497-498.
25. J. M. Plummer, J. A. Wietgenant, B. C. Noll, J. W. Lauher, O. Wiest, P. Helquist. *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 3911-3914.
26. R. J. Deeth, L. J. A. Hearnshaw. *Dalton Trans.*, **2005**, 3638-3645.
27. H. Endres, D. Nothe, E. Rossato, W. E. Hatfield. *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 3467-3473.
28. C. Fernandes, A. J. Bortolozzi, B. Spoganicz, E. Schwingel, A. Neves. *Inorg. Chim. Acta*, **2005**, 358, 997-1004.
29. G. A. Santillan, C. J. Carrano. *Dalton Trans.*, **2008**, 3995-4005.
30. D. J. Radanovic, B. V. Prelesnik, D. D. Radanovic, Z. D. Matovic, B. E. Douglas. *Inorg. Chim. Acta*, **1997**, 262, 203-211.
31. M. J. Borah, R. K. B. Singh, U. B. Sinha, T. Gurung, P. J. Borah. *J. Appl. Chem.*, **2012**, 1, 59-69.

32. S. M. Mobin, B. J. Sanghavi, A. K. Srivastava, P. Mathur, G. K. Lahiri. *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 5983-5992.
33. E. A. Ededet, G. A. Ayimele, Z.-X. Wang, P. T. Chongwain, G. E. Iniama, O. E. Offiong, E. N. Nfor. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, **2011**, *25*, 53-60.
34. K. Kurdziel, T. Glowiak. *Polyhedron*, **2000**, *19*, 2183-2188.
35. A. B. Lever, *Inorganic Electronic Spectroscopy*, 1st edn., Elsevier, Amsterdam, **1968**.
36. W. J. Eilbeck, F. Holmes, A. E. Underhill. *J. Chem. Soc. A*, **1967**, 757-761.
37. F. A. Cotton, G. Wilkinson, *Química Inorgánica Avanzada*, 4 edn., **1986**.
38. R. C. Rosenberg, C. A. Root, R.-H. Wang, M. Cerdonio, H. B. Gray. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1973**, *70*, 161-163.
39. B. J. Hathaway, R. J. Dudley, P. Nicholls. *J. Chem. Soc. A*, **1965**, 1845-1848.
40. B. J. Hathaway, I. M. Procter, R. C. Slade, A. A. D. Tomlinson. *J. Chem. Soc. A*, **1965**, 2219-2223.
41. H. Kurosaki, H. Koike, S. Omori, Y. Ogata, Y. Yamaguchi, M. Goto. *Inorg. Chem. Commun.*, **2004**, *7*, 1229-1232.
42. B. Hathaway, M. Duggan, A. Murphy, J. Mullane, C. Power, A. Walsh, B. Walsh. *Coord. Chem. Rev.*, **1981**, *36*, 267-324.
43. M. A. Hitchman, T. D. Waite. *Inorg. Chem.*, **1976**, *15*, 2150-2154.
44. F. Cariati, L. Erre, G. Micera, A. Panzanelli, G. Ciani, A. Sironi. *Inorg. Chim. Acta*, **1983**, *80*, 57-65.
45. I. F. Burshtein, A. L. Poznyak. *Zh. Neorg. Khim.*, **1998**, *43*, 1148-1151.
46. M. Zabel, V. I. Pavlovskii, A. L. Poznyak. *Russ. J. Coord. Chem.*, **2008**, *34*, 53-58.
47. U. Rychlewska, D. D. Radanovic, M. D. Dimitrijevic, D. M. Ristanovic, M. M. Vasojevic, D. J. Radanovic. *Polyhedron*, **2001**, *20*, 2523-2530.
48. M. Parvez, C. Maricondi, D. J. Radanovic, M. I. Djuran, B. E. Douglas. *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, *182*, 177-186.
49. D. J. Radanovic. *Coord. Chem. Rev.*, **1984**, *54*, 159-261.

50. I. M. Bezrukavnikova, T. N. Polynova, A. L. Poznyak, M. A. Porai-Koshits. *Koord. Khim.*, **1991**, *17*, 1523-1528.
51. D. J. Radanovic, M. I. Djuran, B. E. Douglas. *Inorg. Chem.*, **1985**, *24*, 4239-4241.
52. N. Sakagami, S. Kaizaki. *Inorg. Chim. Acta*, **1992**, *195*, 187-191.
53. J. Weil, J. Bolton, J. Wertz, *Electron Paramagnetic Resonance: Elemental theory and practical applications*, John Wiley and Sons, New York, **1994**.
54. M. F. Ottaviani, S. Bossmann, N. J. Turro, D. A. Tomalia. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 661-671.
55. M. F. Ottaviani, F. Montalti, N. J. Turro, D. A. Tomalia. *J. Phys. Chem. B*, **1997**, *101*, 158-166.
56. M. F. Ottaviani, R. Valluzzi, L. Balogh. *Macromolecules*, **2002**, *35*, 5105-5115.
57. D. Appelhans, U. Oertel, R. Mazzeo, H. Komber, J. Hoffmann, S. Weidner, B. Brutschy, B. Voit, M. F. Ottaviani. *Proc. R. Soc. A-Math. Phys. Eng. Sci.*, **2010**, *466*, 1489-1513.
58. K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, John Wiley & Sons, New Jersey, **2009**.
59. R. E. Sievers, J. C. Bailar Jr. *Inorg. Chem.*, **1962**, *1*, 174-182.
60. Z. Qiang, C. Adamas. *Water Res.*, **2004**, *38*, 2874-2890.
61. Q. Yu, A. Kandegedara, Y. Xu, D. B. Rorabacher. *Anal. Biochem.*, **1997**, *253*, 50-56.
62. A. Kandegedara, D. B. Rorabacher. *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 3140-3144.
63. H. E. Mash, Y.-P. Chin. *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 671-677.
64. A. F. Danil de Namor, D. A. Pacheco Tanaka. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1998**, *94*, 3105-3110.

CAPÍTULO 2

“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRÍMEROS Y METALODENDRÍMEROS POLIANIÓNICOS PARA TERAPIA FRENTE AL VIH”

2.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior, se han presentado cuatro familias de compuestos polianiónicos con núcleo de etilendiamina y sus complejos metálicos de Ni, Co, Cu y Zn. Dado el carácter antiviral de estos compuestos, que hemos denominado de “generación 0”, es interesante la preparación de sistemas análogos con carácter multivalente (dendrimeros y metalodendrimeros), con el fin de determinar si esta modificación se traduce en una mejora de la actividad biológica. Los efectos conjuntos del centro metálico y los grupos aniónicos libres podrían potenciar la actividad antiviral e incluso dar lugar a una sinergia entre ambos (Fig. 2.1).

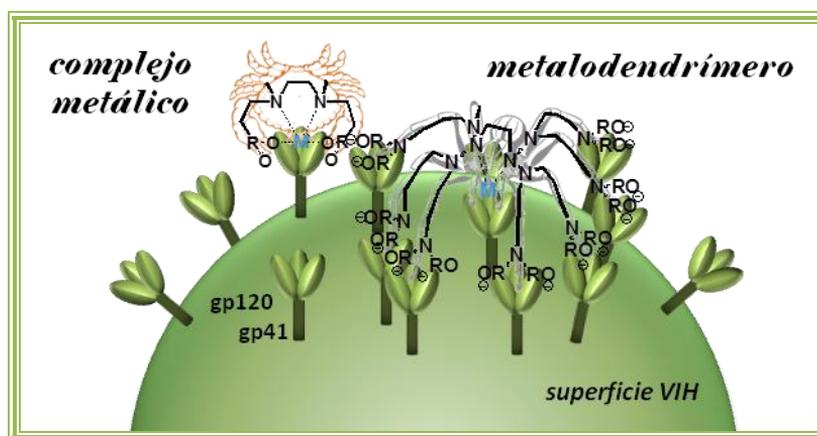


Figura 2.1. Propuesta de actuación de los complejos metálicos estudiados en el Capítulo 1 (interacción de tipo “cangrejo”) y de algunos metalodendrimeros preparados en este Capítulo 2 (interacción multivalente de tipo “araña”).

Con esta idea, y partiendo del núcleo de etilendiamina (EDA), que permite coordinar iones metálicos en el punto focal o núcleo del sistema dendrítico, se estudió la idoneidad de diversas metodologías sintéticas para “crecer” el punto focal, que posibiliten la posterior incorporación de grupos aniónicos en su periferia. Un estudio en paralelo entre “crecimiento” con esqueleto carbosilano (CBS) y con esqueleto polipropilenimina (PPI), nos

permitió determinar las metodologías más adecuadas en cada caso. Además, para los sistemas dendríticos obtenidos, se realizó un estudio de coordinación de metales de transición, que permitió generar un amplio abanico de metalodendrimeros, cuya actividad antiviral frente al VIH ha sido evaluada y se presenta en el Capítulo 3 de esta Memoria.

La estrategia descrita permitiría una mejora de la actividad antiviral frente al VIH, al modular la actuación terapéutica del sistema dendrítico *per se* a través del aumento del número de grupos funcionales que interaccionen con las moléculas diana y donde es posible coordinar múltiples átomos metálicos. Sin embargo, existen otras estrategias a tener en cuenta en la terapia frente al VIH, como es la utilización de nanosistemas como transportadores de fármacos u otras moléculas con propiedades farmacológicas (péptidos, azúcares, anticuerpos, material génico...). En esta Memoria, se describen los primeros pasos para la preparación de sistemas dendríticos heterofuncionales con un valor añadido en la terapia frente al VIH, realizados en dos líneas de actuación diferentes:

- ✓ Evaluación de la idoneidad de distintos sistemas de anclaje de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos a dendrimeros PPI funcionalizados con grupos aniónicos. Mediante esta vía, la actividad antiviral podría mejorarse mediante la disminución de la inflamación, que habitualmente favorece la infección, y la inhibición de las bombas de eflujo que expulsan los fármacos del interior celular.¹

- ✓ Preparación de dendrones polilisina que actúen como plataformas de tipo Péptido Antigénico Múltiple (MAP),² para el anclaje selectivo de distintas moléculas de interés, como dichos péptidos antigénicos. Estos sistemas serían candidatos para su utilización como coadyuvantes en nanovacunas.²

2.1.1. Objetivos del capítulo

Los objetivos de este Capítulo 2 son los que se enumeran a continuación:

- ✓ Evaluar distintas metodologías para la preparación de sistemas de naturaleza dendrítica con grupos aniónicos terminales a partir de etilendiamina (EDA), y estudiar sus propiedades coordinantes frente a distintos metales de transición.
- ✓ Preparar sistemas heterofuncionales aniónicos que permitan el transporte de ibuprofeno, como modelo de fármaco que mejore la actividad antiviral.
- ✓ Generar macromoléculas dendríticas de tipo MAP que actúen como plataforma para anclar selectivamente péptidos inmunogénicos en terapia frente a VIH-1.³ Este objetivo se desarrolló como trabajo de una estancia predoctoral en la Universidad Técnica de Copenhague, bajo la supervisión del doctor Ulrik Boas.

Parte de esta investigación, relacionada con el primer objetivo, ha dado lugar a una publicación en una revista internacional de reconocido prestigio.⁴

2.1.2. Antecedentes bibliográficos

Las estrategias para la preparación de dendrímeros, conocidas como “métodos iterativos de síntesis”, han evolucionado a lo largo del tiempo.^{5, 6} En 1978, Vögtle⁷ describió la primera “síntesis en cascada” de una molécula dendrítica, de tipo *polipropilenimina (PPI)*, basada en la adición de Michael de una amina a acrilonitrilo y posterior reducción de los grupos nitrilo para generar grupos amino. Ese mismo año, Fetters⁸ inauguró la síntesis de *dendrímeros basados en silicio (CBS)*, mediante reacciones consecutivas de hidrosililación y posterior adición de un haluro de alquilmagnesio, que más tarde continuaron Made, Muzafarov, Zhou y Morán.⁹⁻¹³

A principios de los años 80, surgió la familia de dendrímeros peptídicos¹⁴ con la estrategia sintética desarrollada por Denkewalter^{15, 16} para generar *dendrímeros polilisina (PL)*, y que en 1988 Tam utilizó para generar la familia de dendrones derivada del *sistema péptido antigénico múltiple² (MAP)*. La metodología sintética era la habitual de péptidos, con aproximaciones en fase sólida y estrategias tanto divergentes como convergentes, así como métodos ortogonales de protección y/o de acoplamiento quimioselectivo que permitían la heterofuncionalización del núcleo MAP. También a mediados de los años 80, se desarrolló la estrategia sintética que conducía a los *dendrímeros tipo Newkome o arboroles*,¹⁷ mediante la sustitución nucleofílica de 1-bromopentano por trietilmetanotricarboxilato de sodio y posterior reducción de los grupos éster a un triol activado como tosilato. En esta misma época, Tomalia¹⁸ desarrolló los *dendrímeros poliamidoamina (PAMAM)*, mediante adición tipo Michael a aminas de acrilato de metilo y posterior ataque con etilendiamina.

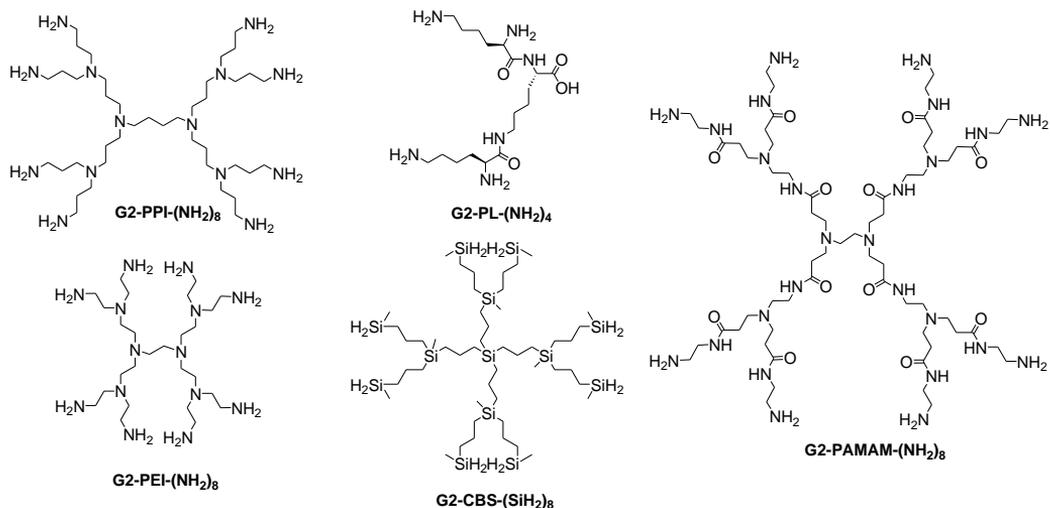


Figura 2.2. Ejemplos de dendrímeros y dendrones de segunda generación de distinta naturaleza: polipropilenimina (PPI), polilisina (PL), polietilenimina (PEI), carbosilano (CBS) y poliamidoamina (PAMAM).

Ya en los años 90, Rengan y Engel¹⁹ iniciaron la síntesis de *fosfodendrímeros*, preparados mediante la ruptura de enlaces tipo éter por yoduro de trimetilsililo y posterior ataque de una fosfina con tres grupos éter, siendo Majoral²⁰⁻²³ quien ha dado continuidad a estos trabajos generando una gran diversidad de familias. En esta misma época, comenzaron a aparecer las primeras rutas convergentes, con los *dendrímeros de tipo-Fréchet*^{24, 25} basados en un esqueleto hiperramificado polibenciléter, y los dendrímeros poliaromáticos de Miller,²⁶ rutas que posteriormente han dado lugar a una gran familia denominada *dendrímeros tipo Janus*,²⁷ de múltiples topologías. Quizás entre los dendrímeros de aparición más reciente se encuentren los dendrímeros triazina de Simanek.²⁸ Su síntesis se basa en la sustitución secuencial de triclorotriazina con aminas nucleofílicas, obteniendo dendrímeros con alta pureza y rendimiento tanto por estrategia divergente como convergente.²⁹

Entre las estrategias de síntesis acelerada de dendrímeros³⁰ cabe destacar la *click-chemistry*,³¹ donde se engloban reacciones como la Diels-Alder, la cicloadición Huisgen azida-alquino terminal utilizando un catalizador de cobre a temperatura ambiente (CuAAC), y la reacción tiol-eno. Todas ellas se caracterizan por ser sencillas, cuantitativas, de fácil iniciación y compatibles con numerosos disolventes y grupos funcionales.

La preparación de metalodendrímeros también se inició al comienzo de los años 90, con los grupos de Balzani³² y Newkome.³³ Las estrategias sintéticas difieren dependiendo de si el ión metálico está incluido en la estructura dendrítica (actuando como punto de ramificación, conector de bloques, núcleo o grupo terminal, *Fig. 2.3*), o si se coordina de manera posterior, de manera específica o aleatoria. Existen excelentes revisiones bibliográficas en relación con esta materia.³⁴⁻³⁶

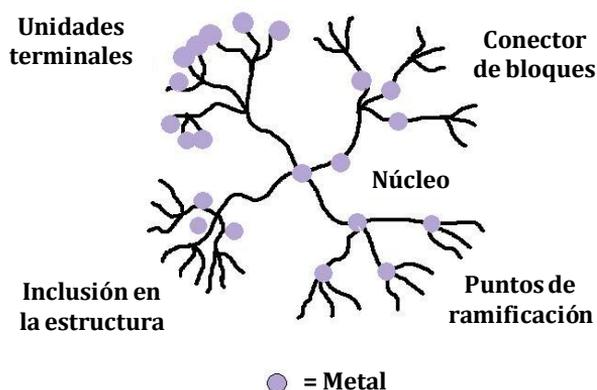


Figura 2.3. Distintas posiciones de iones metálicos en la estructura dendrítica.

En el campo de la biomedicina, los metalodendrimeros presentan numerosa aplicaciones, como transportadores de fármacos, agentes terapéuticos, biosensores, en imagen médica, etc.³⁷ Sistemas dendríticos basados en Pt(II), Pd(II), Cu(II), Au(I), Ru(II) o Ru(III) han exhibido una actividad anti-cancerígena importante,³⁸ mientras que derivados de Fe(II) han sido utilizados como agentes anti-malaria. Como biosensores, se han aplicado diversos sistemas dendríticos de Ru(II), Ir(III) o Co(II), mientras que en Imagen,³⁹ por ejemplo para Tomografía Computerizada de Emisión de Fotones (SPECT) o Tomografía de Emisión de Positrones (PET), se han utilizado para el transporte de radiomarcadores como ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{68}Ga o ^{64}Cu .

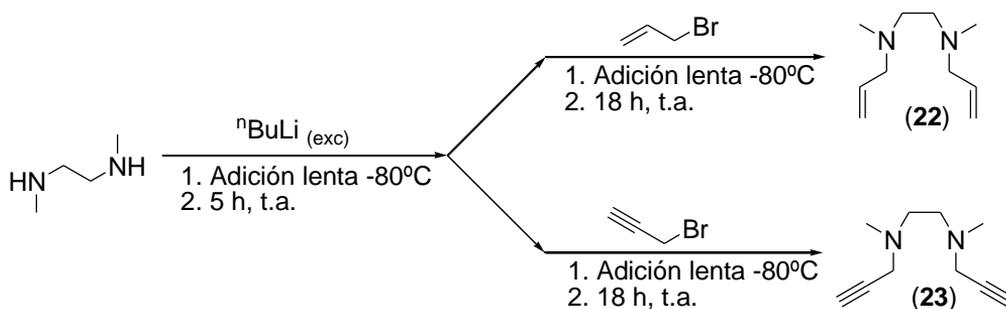
La utilización de dendrimeros y metalodendrimeros como transportadores de moléculas bioactivas^{40, 41} abarca un amplio campo de investigación. Los distintos tipos de unión de la molécula a la estructura dendrítica (interacción electrostática, unión covalente, encapsulación, sistemas de liberación controlada...) condicionará sus posteriores aplicaciones,⁴² tanto como el tipo de agente terapéutico transportado (fármaco, péptido, material génico...).

2.2. DENDRONES DE NATURALEZA CARBOSILANO CON NÚCLEO DE ETILENDIAMINA

2.2.1. Estudio preparativo

En el apartado anterior, se ha explicado el interés de preparar sistemas dendríticos a partir de un núcleo de etilendiamina. En este apartado, se analiza la idoneidad de varias metodologías seguidas para la síntesis de estos sistemas basados en un esqueleto de naturaleza carbosilano.

En estos estudios se partió de derivados de etilendiamina, tanto comerciales (*N,N'*-dimetiletilendiamina, *N,N'*-bis(hidroxietyl)etilendiamina) como preparados en el laboratorio, como el derivado alílico **22** y el propargílico **23**, según la ruta mostrada en el Esquema 2.1.



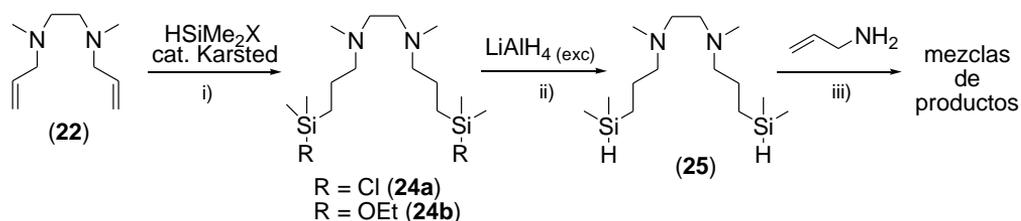
Esquema 2.1 Ruta sintética de obtención de los derivados alílico **22** y propargílico **23**.

La reacción de *N,N'*-dimetiletilendiamina con $n\text{BuLi}$ en hexano produce el derivado dilitiado, cuya posterior reacción con bromuro de alilo o bromuro de propargilo, da lugar a *N,N'*-dialil-*N,N'*-dimetiletilendiamina (**22**) o *N,N'*-dimetil-*N,N'*-dipropargiletildiamina (**23**), respectivamente. Mediante una extracción agua/hexano, los productos se aíslan como aceites amarillos estables al aire, con rendimientos alrededor del 80%. El compuesto **23** aparece descrito en la bibliografía mediante una ruta sintética similar, utilizando como base K_2CO_3 en DMF,⁴³ en lugar de la ruta mediante compuestos litiados.

La caracterización de estos compuestos se llevó a cabo mediante RMN- ^1H y ^{13}C . En el espectro de RMN- ^1H de **22** (Fig. 2.4) se observan dos singletes a 2.20 y 2.45 ppm, correspondientes al grupo metilo $-\text{NCH}_3$ y al fragmento $-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}-$, respectivamente. El grupo alilo aparece en el espectro a 2.98 (b), 5.83 (c) y 5.11 (d) ppm. En el espectro de RMN- ^{13}C , aparecen 5 señales a valores de 42.4 ($-\text{NCH}_3$), 54.6 (a), 61.4 (b), 117.5 (c) y 135.6 (d) ppm. Los valores de RMN- ^1H y ^{13}C de **23** están de acuerdo con los hallados en la bibliografía.⁴³

A partir de estos derivados, se realizaron intentos para crecer un sistema dendrítico con un esqueleto carbosilano a partir de reacciones de hidrosililación en el caso del derivado **22** y mediante la utilización de *click-chemistry* tipo CuAAC en el caso del compuesto **23**. Ambas aproximaciones presentaron problemas y no permitieron la obtención de los sistemas deseados, tal y como se comenta a continuación.

La primera ruta estudiada para el crecimiento de una cuña carbosilano a partir del núcleo de *N,N'*-dimetiletilendiamina sigue la secuencia hidrosililación/alquenilación, como se muestra en el Esquema 2.2.



Esquema 2.2 Ruta sintética de crecimiento de cuñas dendríticas mediante reacciones de hidrosililación/alquenilación. Condiciones de reacción: i) $\text{X}=\text{Cl}$, 18 h t.a.; $\text{X}=\text{OEt}$, 24 h, 90°C . ii) Et_2O , 18 h, t.a. iii) Distintas condiciones.

La hidrosililación del compuesto **22** con HSiMe_2Cl da lugar al compuesto con enlaces terminales Si-Cl **24a**, bastante inestable y difícil de manejar y caracterizar. Sin embargo, si la reacción se realiza con HSiMe_2OEt se obtiene **24b**, que presenta enlaces Si-OEt en la periferia y es más estable que el anterior. La reacción del compuesto **24b** con LiAlH_4 , y posterior extracción en éter/agua saturada de NH_4Cl y NaCl , conduce al aislamiento del compuesto **25** como un aceite amarillo. Este proceso se siguió mediante RMN- ^1H (Fig. 2.4) y RMN- ^{13}C .

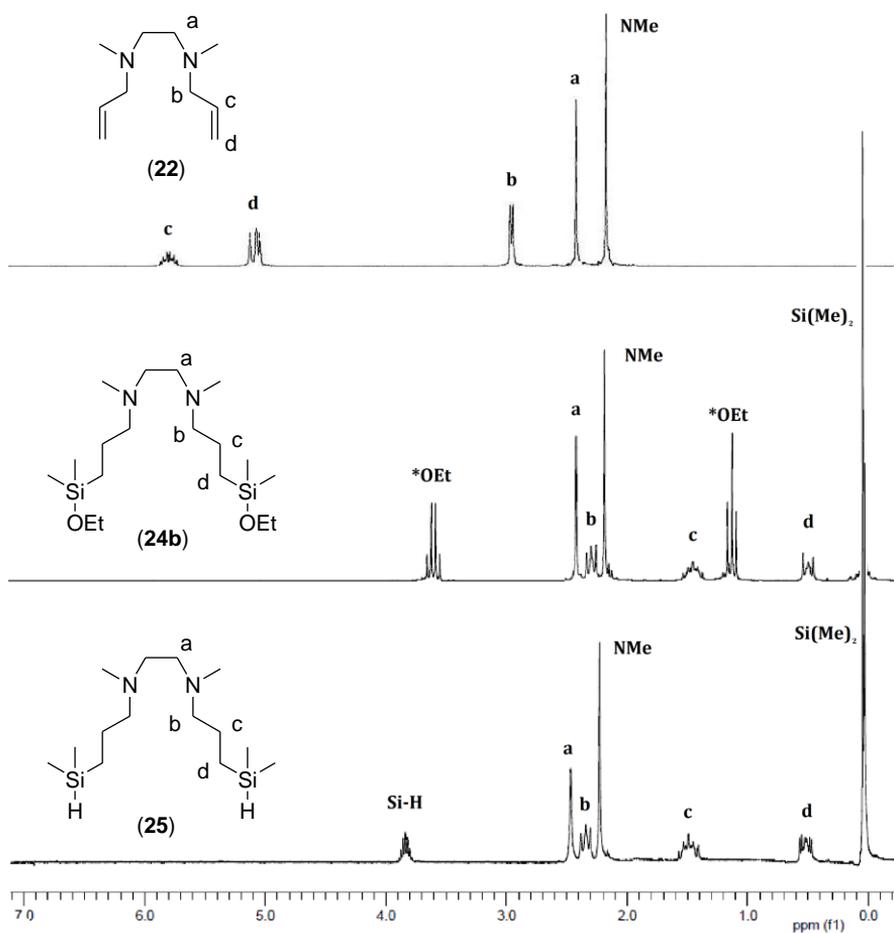
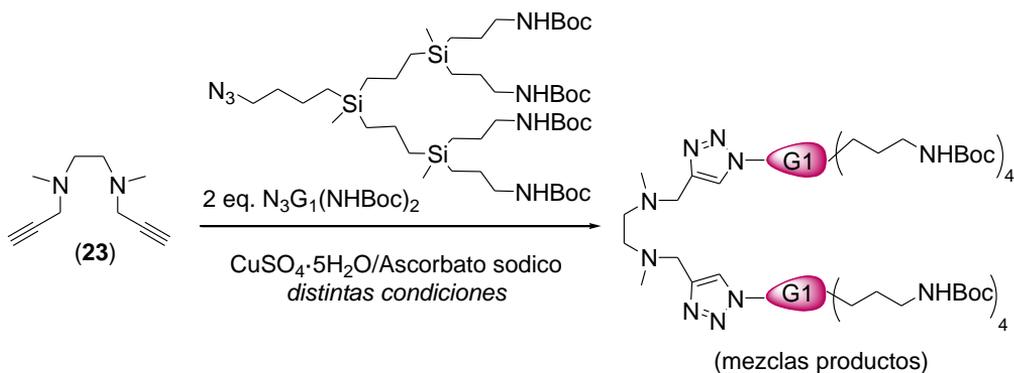


Figura 2.4. Espectros de RMN- ^1H (CDCl_3 , δ ppm) de los derivados de **22**, **24b** y **25**.

El espectro de RMN-¹H en CDCl₃ del compuesto **24b** muestra dos singletes a 2.21 y 2.45 ppm debido a los grupos -NCH₃ y -N(CH₂)₂N-. Los grupos metileno de la cadena -NCH₂CH₂CH₂Si- aparecen a 2.30 (*b*), 1.48 (*c*) y 0.50 (*d*). Las señales del grupo -OCH₂CH₃ surgen a 3.63 y 1.16 ppm, mientras que los grupos -Si(CH₃)₂ a 0.07 ppm. La sustitución del grupo -OEt por -H para dar el compuesto **25** viene marcada en el espectro de RMN-¹H por la desaparición de las señales del grupo etoxo, y la aparición de un multiplete a 3.83 ppm debido a -Si-H y un doblete a 0.05 ppm debido a -Si(CH₃)₂. El resto de señales apenas sufre modificación. En el espectro de RMN-¹³C del compuesto **24b** aparecen 8 señales: los grupos -NCH₃ y -N(CH₂)₂N-, a 42.7 y 55.6 ppm, respectivamente. Los grupos metilenos de la cadena -NCH₂CH₂CH₂Si- aparecen a 61.8 (*b*), 21.0 (*c*) y 14.0 (*d*) ppm. Las señales del grupo -OCH₂CH₃ surgen a 58.2 y 18.5 ppm, mientras que los grupos -Si(CH₃)₂ a -2.1 ppm. La sustitución del grupo -OEt por -H para dar el compuesto **25** viene marcada en el espectro de RMN-¹³C por la desaparición de dichas señales del grupo etoxo, y el desplazamiento de la señal -Si(CH₃)₂ a menor δ(ppm). De nuevo, el resto de señales apenas sufre modificación.

En la búsqueda de sistemas derivados de **25**, con grupos -NH₂ terminales que sirvieran como precursores de compuestos con grupos aniónicos periféricos a través de reacciones análogas a las utilizadas en el Capítulo 1, se llevó a cabo la reacción de hidrosililación de alilamina con **25**, utilizando Pt como catalizador, bajo distintas condiciones. Este paso condujo a mezclas de productos difíciles de caracterizar por RMN, probablemente debido a la incapacidad del catalizador de platino de unirse y activar al enlace Si-H por la presencia en el medio de ligandos muy coordinantes (aminas),^{44 45} que impiden que la reacción se complete. Además, el uso de catalizadores metálicos propicia la saturación del grupo etilendiamina, e impide la posterior coordinación de otros iones metálicos de interés. Por estos motivos, esta ruta sintética fue descartada.

La segunda ruta ensayada para la obtención de dendrones de naturaleza carbosilano fue la utilización de acoplamiento convergente sobre el núcleo de *N,N'*-dimetiletilendiamina, mediante reacciones tipo *click* de cicloadición Huisgen azida-alquino terminal catalizada por cobre (CuAAC) (Esq. 2.3.).

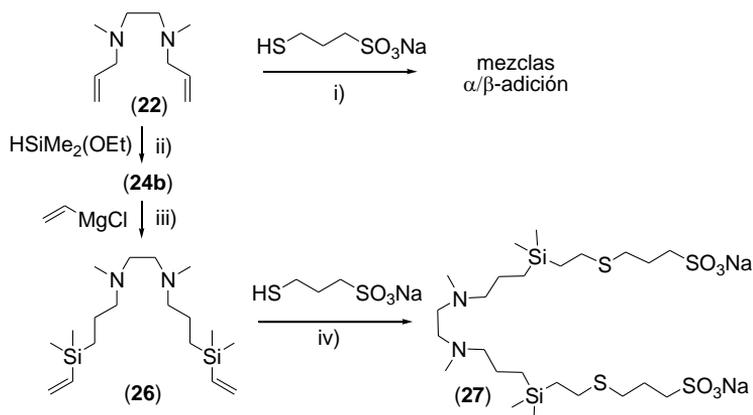


Esquema 2.3 Ruta sintética para la dendronización de **23** mediante reacción *CuAAC*.

La reacción *CuAAC* del derivado propargílico **23** con 2 eq. de la cuña carbosilano $N_3G_1(NHBoc)_2$ preparada en nuestro grupo de investigación,⁴⁶ se llevó a cabo utilizando como catalizador Cu(I) formado *in situ*, bajo distintas condiciones de reacción. El seguimiento de la reacción se realizó mediante RMN-¹H, prestando especial atención a la desaparición de las señales del grupo propargilo a 3.38 y 2.20 ppm, y al desplazamiento de la señal debida al grupo N_3CH_2 - debido a su transformación en un grupo triazol. Los intentos de purificación del crudo mediante cromatografía en columna muestran la formación de mezclas de productos de mono y disustitución (las señales del grupo propargilo no llegan a desaparecer) inseparables por esta técnica, probablemente debidas a la complejación del catalizador en el punto focal EDA tanto del reactivo como del producto (presentan coloración azulada). Por esta razón, esta estrategia tampoco resultó adecuada por la dificultad para completar la reacción y la contaminación del producto con el catalizador.

Hasta ahora, las rutas sintéticas utilizadas no permitieron la obtención de un sistema dendrítico de naturaleza carbosilano a partir del núcleo de EDA, por lo que nos llevaron a plantearnos la utilización de otro tipo de reacción incluida en la metodología *click-chemistry*, la reacción tiol-eno. Esta reacción, aparte de ser sencilla y cuantitativa, no precisa catalizadores metálicos, evitando así los problemas de desactivación del catalizador mediante el núcleo de EDA.

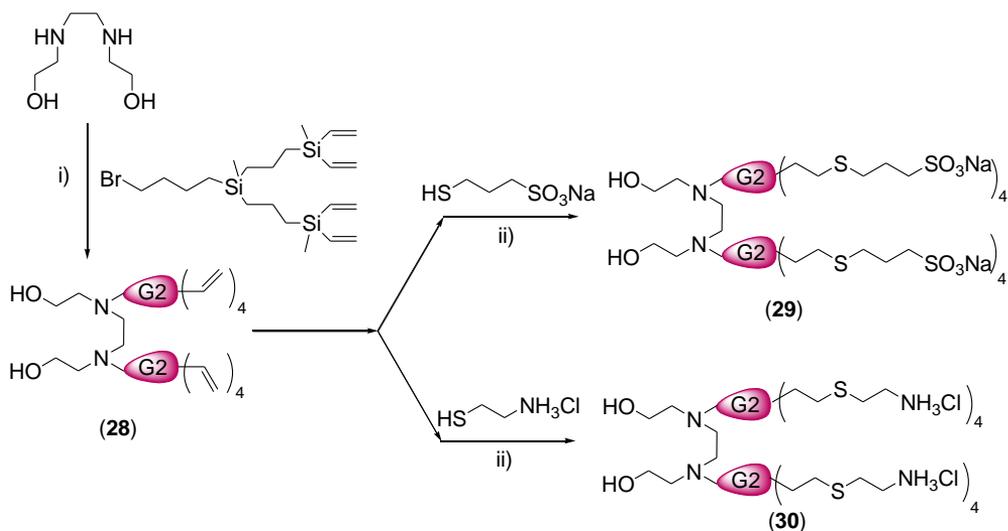
La estrategia mediante reacción tiol-eno se muestra en el Esquema 2.4. La reacción del compuesto **22** con $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$ se llevó a cabo en distintas condiciones (luz UV, iniciadores radicalarios), observando que los elevados tiempos de reacción (16 h) conducen a mezclas de productos de α - y β -adición. La reacción tiol-eno se favorece al transformar el derivado alílico **22**, mediante una ruta en dos pasos a través de **24b**, en el derivado vinílico **26**. La reacción de **24b** con cloruro de vinilmagnesio a reflujo, conduce a la formación de **26**, que tras ser aislado reacciona eficazmente con un ligero exceso de $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$ para dar **27** tras una purificación mediante cromatografía en Sephadex. En este caso, la α -adición está restringida por el mayor impedimento en esta posición.



Esquema 2.4 Esquema de las distintas rutas de síntesis tiol-eno probadas a partir de **22**. Condiciones de reacción: i) AIBN/70°C o benzofenona/UV, 16 h. ii) Cat. Karstedt 90°C, 24 h. iii) Adición lenta a 0°C y posterior reflujo 24 h. iv) Benzofenona/UV, 6 h.

Esta ruta sintética conduce a la incorporación de sólo 2 grupos aniónicos, al no presentar ningún punto de ramificación en la estructura. El interés por obtener sistemas con propiedades multivalentes nos condujo a utilizar esta misma reacción tiol-eno sobre una cuña dendrítica con múltiples grupos vinilo, preparada mediante estrategia convergente. Además, el núcleo de *N,N'*-dimetiletilendiamina se sustituyó por *N,N'*-bis(hidroxietyl)etilendiamina, que permitiera anclar iones metálicos con un mayor índice de coordinación.

La reacción de *N,N'*-bis(hidroxietyl)etilendiamina con dos equivalentes de la cuña Br-G2-vinilo preparada en nuestro grupo de investigación⁴⁶ (Esq. 2.5) se lleva a cabo en acetona en presencia de K_2CO_3 , NaI y éter corona 18C6, durante 5 h a 80°C. La disolución se filtra, se lleva a sequedad y se purifica mediante cromatografía de exclusión de tamaños en tolueno, obteniendo el dendrón carbosilano **28** como un aceite amarillo con un 50% de rendimiento.



Esquema 2.5 Ruta sintética de obtención de la cuña dendrítica **28** y reacciones tiol-eno para generar los sistemas iónicos **29** y **30**. Condiciones: i) K_2CO_3 (3 eq.), NaI (2 eq.), 18C6 (0.2 eq.), acetona 24 h 80°C. ii) UV/benzofenona, 4 h, THF:MeOH:H₂O.

La cuña dendrítica **28** se utilizó como punto de partida para generar los dendrones iónicos de interés. La reacción de **28** con un pequeño exceso de $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$ se llevó a cabo en una mezcla THF:MeOH:H₂O en presencia de fotoiniciador (benzofenona, 1 eq.), en condiciones de desoxigenación, y luz UV durante 4 h. Tras llevar a sequedad la disolución, y purificarla por nanofiltración en agua (en membrana de 1000 kDa), se obtuvo el dendrón **29**, como un sólido pulverulento amarillo con rendimiento cuantitativo. Este sistema presenta puntos de coordinación de metales en su estructura, que permitirán la generación de distintos metalodendrimeros. Un extenso estudio de dichas propiedades coordinantes se detalla en el Apartado 2.2.3 de este Capítulo.

La reacción tiol-eno análoga de **28** con $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3\text{Cl}$ da lugar al dendrón catiónico **30**, también aislado como un sólido pulverulento amarillo, con rendimiento cuantitativo. A continuación se incluye un estudio comparativo de las propiedades estructurales y ácido-base de ambos sistemas **29** y **30**. Este sistema catiónico presenta interés como transportador de material génico, y sus propiedades coordinantes frente a diversos metales (por ejemplo, radiomarcadores) le permiten aunar ambas ventajas en un solo sistema. En este caso, la coordinación se realizará preferentemente sobre el punto focal, ya que los grupos periféricos se encuentran cuaternizados y por tanto no disponibles para la coordinación. A pesar de todo, la naturaleza catiónica de **29** le aleja ligeramente del tema principal de esta Tesis Doctoral, y aunque se han realizado estudios preliminares en relación con la coordinación de Ga(III) y Gd(III), no se han recogido en esta Memoria por no ser aún concluyentes.

2.2.2. Estudio estructural de los dendrones iónicos y sus precursores

Para facilitar la lectura de los resultados de RMN, en la estructura de los distintos sistemas dendríticos se numeran los grupos metilénicos como *a* (núcleo), *b*, *c*, etc., hasta el grupo terminal.

El crecimiento del compuesto **22** mediante reacción tiol-eno se siguió mediante RMN-¹H y ¹³C. La reacción directa con HS(CH₂)₃SO₃Na conduce a mezclas de α -y β -adición (Fig. 2.5), y la reacción no se completa. Sin embargo, la transformación del derivado alílico **22** en uno vinílico **26**, mediante de dos pasos de reacción a través del compuesto **24b**, favorece la β -adición y conduce a **27** selectivamente. En este caso, la adición α queda restringida por el mayor impedimento en esta posición y la reacción se completa satisfactoriamente.

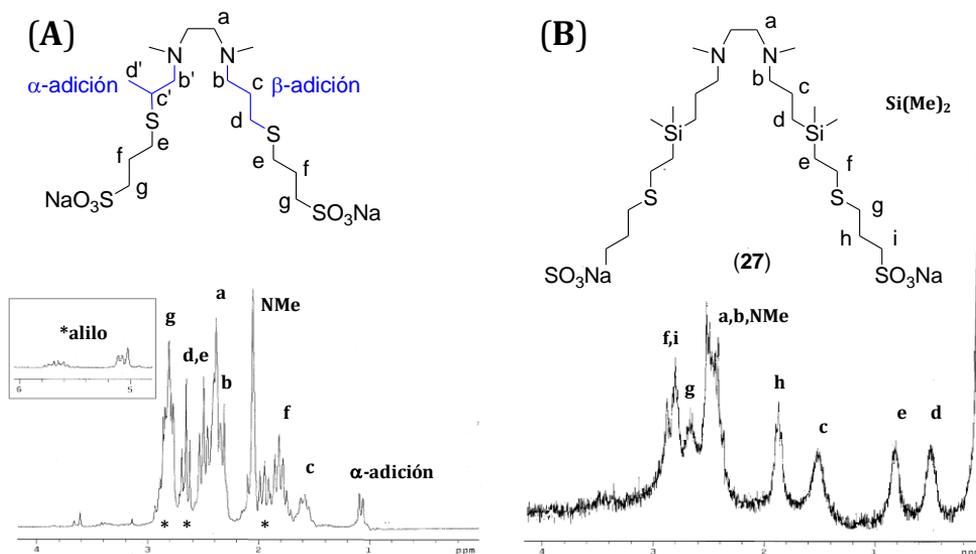


Figura 2.5. Espectros de RMN-¹H (D₂O, δ ppm) de los productos de reacción tiol-eno. A) Partiendo del derivado alílico **22**, la reacción no llega a completarse (exceso reactivos marcado como *) y conduce a mezclas de α - y β -adición. (B) Partiendo del derivado vinílico **26**, la reacción se completa con altos rendimientos para dar selectivamente el compuesto aniónico **27**, producto de β -adición.

En los espectros de RMN-¹H en CDCl₃, la transformación de **24b** en **26** se manifiesta por la desaparición de las señales del grupo -OEt a 3.63 y 1.16 ppm, y la aparición de las señales del grupo vinilo a 5.6-6.2 ppm, permaneciendo el resto de señales prácticamente invariables. El mismo comportamiento se observa en el espectro RMN-¹³C. Para el producto final **27**, en el espectro de RMN-¹H en D₂O desaparecen las señales correspondientes al grupo vinilo en torno a 5.0-6.0 ppm y aparecen las señales debidas al nuevo fragmento, tal y como se describen a continuación. Los grupos metileno de la cadena -SiCH₂CH₂S- dan lugar a dos multipletes a 0.72 (*e*) y 2.81 (*f*) ppm, mientras que aquéllos del fragmento terminal -SCH₂CH₂CH₂SO₃Na aparecen también como multipletes a 2.66 (*g*), 1.82 (*h*) y 2.81 (*i*) ppm. Todas las señales aparecen poco definidas y ensanchadas, debido a la realización del espectro en D₂O.

La caracterización de las cuñas carbosilano **28-30** también se realizó mediante RMN-¹H y ¹³C en CDCl₃ (**28**) o D₂O (**29-30**) y se muestra en las Figuras 2.6 y 2.7, respectivamente. En el caso de **28** (Fig. 2.6), el punto focal aparece en RMN-¹H representado por cuatro señales. El fragmento -NCH₂CH₂OH muestra dos tripletes a 2.67 y 3.65 ppm, para el grupo metileno unido al átomo de N y al de O, respectivamente, y un singlete ancho alrededor de 4.44 ppm, debido al grupo -OH. El puente etilendiamina se corresponde con un singlete a 2.65 ppm. Respecto a las señales procedentes de la cuña inicial, el grupo metileno *a*, unido al átomo de N, es el que sufre mayor desplazamiento, puesto que pasa de estar unido al átomo de Br (3.40 ppm) al nuevo átomo de N del punto focal (2.45 ppm). El resto de señales de la cuña presentan un menor desplazamiento según se alejan del punto focal, hasta el grupo metileno *d* unido al primer átomo de silicio, a partir del cual las señales aparecen invariables.

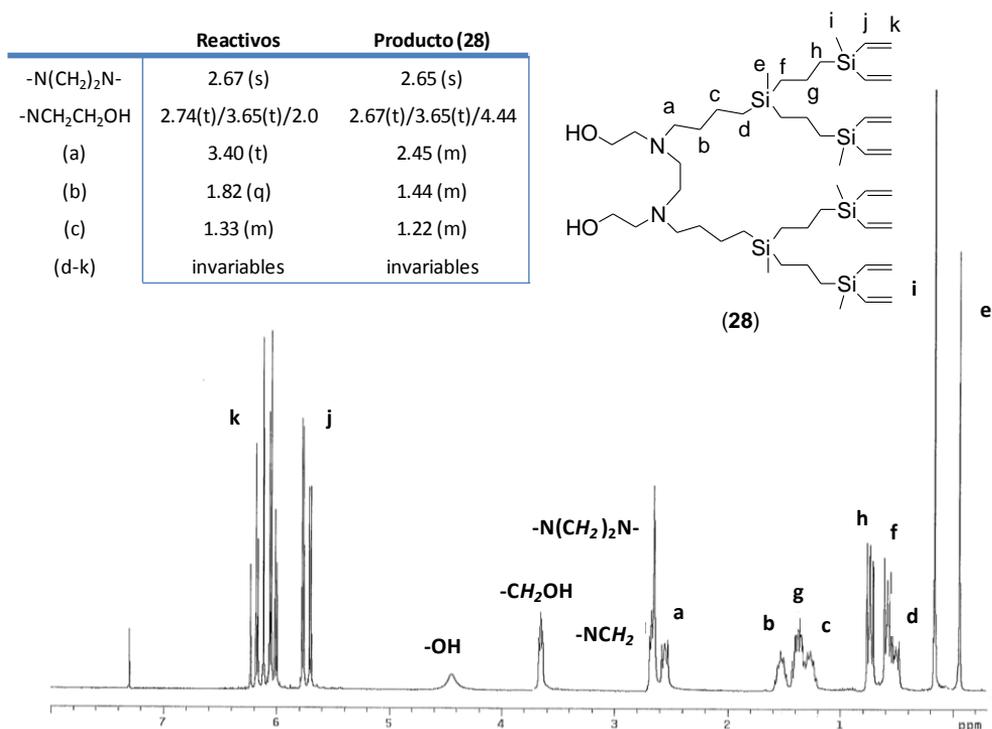


Figura 2.6 Espectro de RMN-¹H de la cuña dendrítica de naturaleza carbosilano **28**, y tabla comparativa de las señales que más cambian al pasar del reactivo al producto.

El espectro de RMN-¹³C del dendrón **28** también refleja la unión del punto focal *N,N'*-bis(2-hidroxietil)etilendiamina a la cuña de partida. De nuevo, las señales más cercanas al punto focal son las que más cambio experimentan. El fragmento -NCH₂CH₂OH muestra dos señales a 55.9 y 60.2 ppm, para los grupos metileno unidos a los átomos de N y O, respectivamente. El puente etilendiamina se corresponde con una señal a 52.6 ppm. Respecto a las señales procedentes de la cuña inicial, de nuevo es el grupo metileno *a* el que soporta un mayor desplazamiento (de 36.4 a 55.5 ppm), mientras que el resto de señales las diferencias son menores según se alejan del punto focal, hasta el grupo metileno *d*, a partir del cual las señales aparecen de nuevo invariables.

La incorporación del nuevo fragmento iónico en la cuña dendrítica **28** mediante reacción tiol-eno se sigue mediante RMN. En el espectro de RMN-¹H de los sistemas **29** y **30** (Fig. 2.7), se observa la total desaparición de las señales correspondientes a los grupos vinilo, y la aparición de las debidas a los grupos metileno del fragmento Si(CH₂)₂X siendo X = S(CH₂)₃SO₃Na (**29**) o S(CH₂)₂NH₃Cl (**30**). En ambos sistemas, la cadena -SiCH₂CH₂S- aparece como dos multipletes a 0.75 (j) y 2.47 (k) ppm, indicativos del éxito de la reacción tiol-eno. Los grupos metileno del fragmento terminal -S(CH₂)₃SO₃Na (**29**) aparecen como multipletes a 2.50 (l), 1.82 (m) y 2.79 (n), y los de -S(CH₂)₂NH₃Cl (**30**), a 2.67 (l) y 3.00 (m). El resto de señales apenas varían, aunque sí están ensanchadas por el cambio de disolvente, y el mismo comportamiento se observa en RMN-¹³C (Cap. 4).

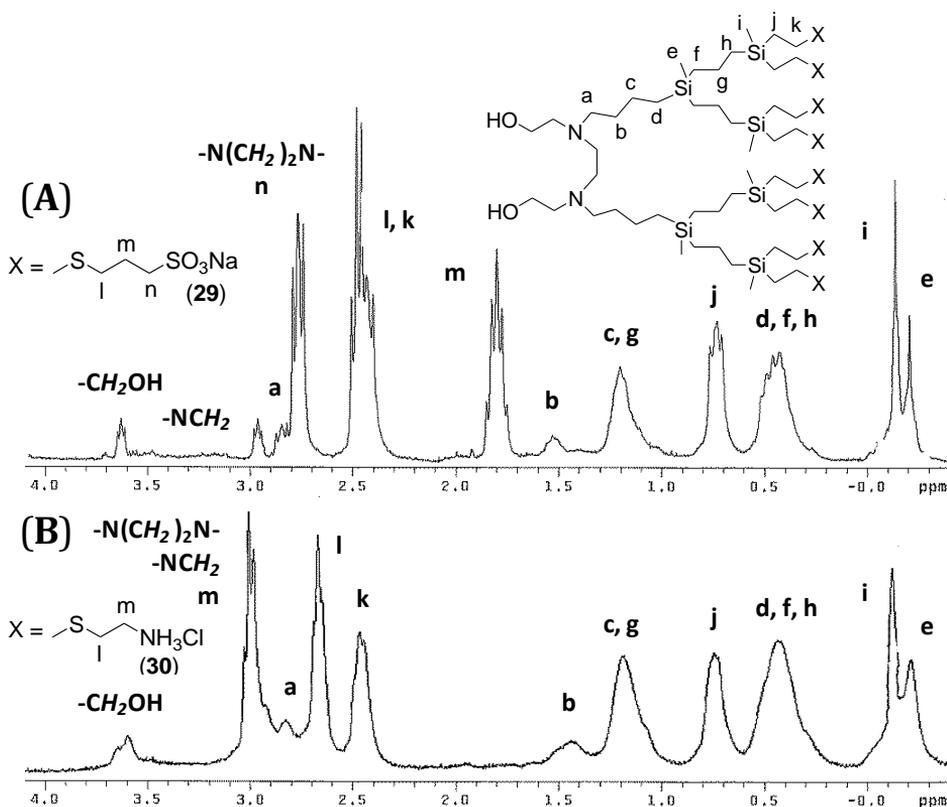


Figura 2.7 Espectro de RMN-¹H en D₂O de los sistemas dendríticos de naturaleza carbosilano **29** y **30** obtenidos mediante reacción tiol-eno.

2.2.2.a. Estudio potenciométrico de los dendrones 29 y 30

El comportamiento ácido-base de las cuñas iónicas **29** y **30** se estudió mediante valoración potenciométrica en agua destilada sin fuerza iónica, y el cálculo experimental de los valores de pK_a se realizó mediante el método de la segunda derivada, de acuerdo con lo expuesto en el Capítulo 1. Las curvas de valoración experimentales se muestran en la Figura 2.8 (gráficas a la izquierda), junto a los valores calculados teóricamente y la distribución teórica de macroespecies (gráficas a la derecha), determinados mediante el programa *Marvin, Calculator Plugin and Chemical Terms Demo*.⁴⁷ Este programa calcula los valores teóricos de pK_a para cada grupo químico del sistema, y diseña un diagrama de distribución de macroespecies donde se indica el porcentaje de cada uno de los sistemas obtenidos al ir protonando cada grupo químico en función de dichos pK_a (eje y) a un pH determinado (eje x).

La valoración potenciométrica de la cuña **29** muestra dos valores de pK_a con diferencia pronunciada entre ambos (8.49 y 5.26), que se asignan a la protonación de los dos nitrógenos del punto focal. En el rango de pH en el que se ha realizado la valoración, no es posible detectar el pK_a de los grupos -OH y -S- (ácidos muy débiles) ni de los grupos -SO₃⁻ (base muy débil). Los valores se encuentran de acuerdo con los determinados teóricamente. Según estos resultados, a pH fisiológico la macroespecie predominante es la que presenta un nitrógeno y los dos oxígenos del punto focal protonados, mientras que los grupos sulfonato se encontrarían desprotonados, disponibles para ejercer su efecto inhibitorio frente al VIH o para coordinar diversos metales.

La curva de valoración del dendrón **30** presenta un patrón bastante más complejo debido al gran número de grupos -NH₂. Los valores experimentales de pK_a (un conjunto en el intervalo 10.2-7.5 y uno más claro a 5.09) se encuentran de acuerdo con los determinados teóricamente, asignando el nitrógeno más

ácido a uno del punto focal. De nuevo, el carácter de ácido muy débil que presentan los grupos -OH y -S- no permite detectar su pK_a en el rango de pH estudiado. Los resultados muestran que a pH fisiológico, la macroespecie predominante es la que presenta todos sus nitrógenos protonados, excepto uno del punto focal, de modo que se encuentran disponibles para ejercer su actividad como transportador de ácidos nucleicos.

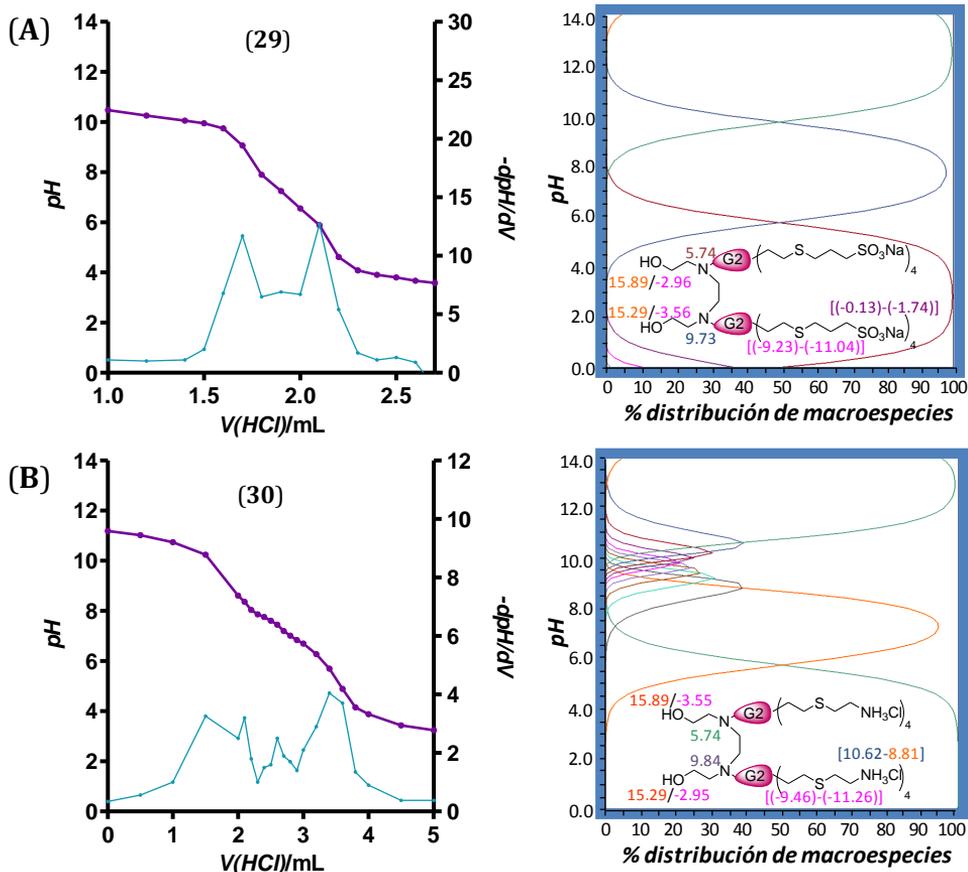


Figura 2.8 Valoración potenciométrica de las cuñas carboxilano **29** (A) y **30** (B). Los valores experimentales se muestran en las gráficas de la izquierda, mientras que en las de la derecha se indican los valores teóricos de pK_a y la distribución de macroespecies. La curva de cada macroespecie viene marcada por un determinado color, que coincide con el del pK_a del grupo que se está protonando cuando predomina dicha macroespecie.

2.2.3. Propiedades coordinantes frente a metales del dendrón aniónico **29**

Debido a sus características estructurales, el sistema **29** es un potencial agente coordinante de metales. Para analizar esta situación, se realizó un estudio combinado mediante espectrofotometría UV-Vis y RMN, con el fin de elucidar las propiedades coordinantes frente a distintos iones metálicos, como Cu(II), Pt(II) y Zn(II). Los metalodendrimeros derivados se aíslan como sólidos pulverulentos, tras su purificación mediante nanofiltración.

- Coordinación de Cu(II)

La valoración de la cuña **29** con cantidades crecientes de Cu(II) se siguió por espectrofotometría UV-Vis, a dos pH diferentes (*Fig. 2.9*).

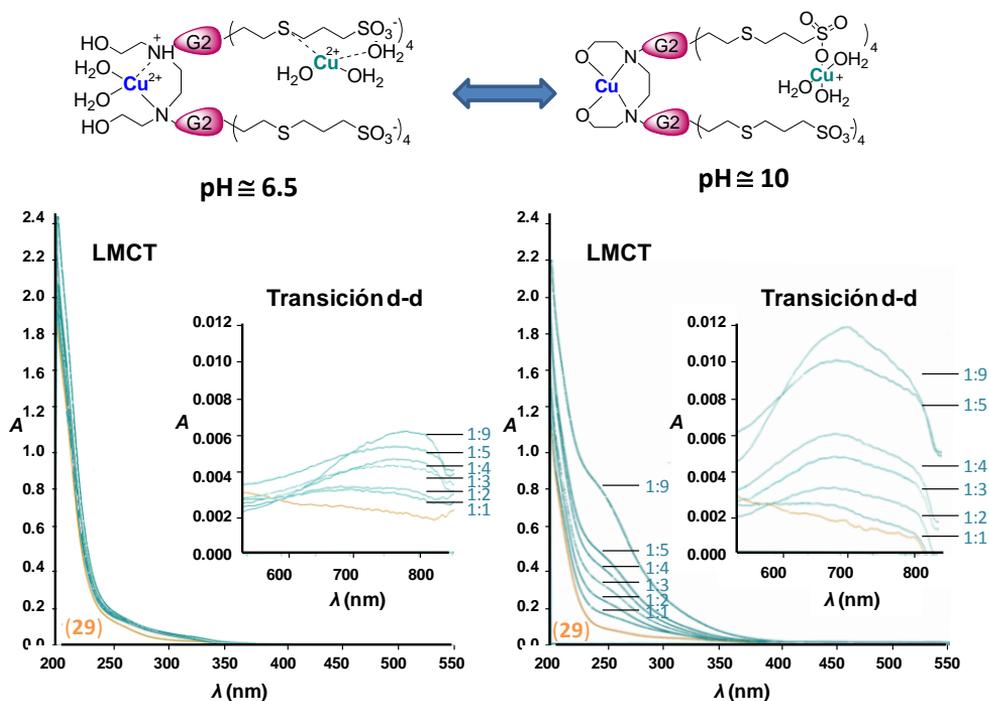


Figura 2.9 Espectro UV-Vis de la valoración con Cu(II) de la cuña dendrítica aniónica **29** y propuesta de coordinación, a pH 6.5 y 10.

A pH ligeramente ácido (alrededor de 6.50), la cuña presenta un nitrógeno y los dos oxígenos del punto focal protonados, de acuerdo con su estudio potenciométrico. Al añadir el primer equivalente de Cu(II), aparecen tres bandas, a 256 y 320 nm (bandas LMCT, de baja intensidad, determinadas mediante resta de espectros, probablemente debidas a las transferencias del punto focal $N(\sigma) \rightarrow Cu$ y de la periferia $S(\sigma) \rightarrow Cu$, respectivamente)^{48, 49} y 690 nm (transición d-d). Tomando como modelo de coordinación del punto focal el compuesto comercial *N,N'*-bis(2-hidroxietil)etilendiamina, a un pH similar, la coordinación de 1 eq. de Cu(II) produce dos bandas a 254 y 690 nm, y por lo tanto se intuye una coordinación similar en ambas moléculas (CuN_2O_2). Sin embargo, el mayor impedimento de acceso al punto focal de la cuña dendrítica, junto con la competencia del ión metálico con el protón del nitrógeno, dificulta la interacción Cu-N y determina un pequeño equilibrio entre la coordinación en el punto focal y la periferia. Durante la adición de los siguientes 8 equivalentes, la banda a 690 nm se mantiene y una nueva banda a 763 nm aparece y aumenta proporcionalmente, como consecuencia de una coordinación periférica con los grupos sulfonato hidratados. Lo mismo ocurre con las bandas LMCT, permaneciendo la banda a 256 nm sin modificar mientras que el hombro a 320 nm aumenta ligeramente.

Por lo tanto, a este pH, se puede postular que el dendrón **29** presenta una interacción preferente en el punto focal con el primer equivalente de cobre; el resto de equivalentes se distribuyen en la periferia, con una interacción principal a través de los grupos sulfonato hidratados y una débil contribución de los grupos tioéter. Este hecho está de acuerdo con la bibliografía, ya que la interacción del grupo tioéter depende de distintos factores como el pH del medio o el tipo de metal (despreciable para Zn(II), Co(II) y Cd(II), pequeña para Cu(II) y Ni(II), y muy efectiva para metales blandos como Pd(II) y Ag(I)).⁵⁰

A pH básico (alrededor de 10), la adición de un equivalente de cobre a la cuña dendrítica **29** supone la aparición de una banda a 660 nm y un hombro alrededor de 250 nm, mientras que la adición a su modelo *N,N'*-bis(2-hidroxiethyl)etilendiamina origina valores de 262 y 640 nm. De acuerdo con la bibliografía,⁵¹⁻⁵³ donde establecen que los valores de pK_a de los grupos -OH son 7.28 y 9.33 para los complejos de cobre 1:1 de *N,N'*-bis(2-hidroxiethyl)etilendiamina, a este pH tanto los nitrógenos como los oxígenos del punto focal se encuentran desprotonados y disponibles para una coordinación efectiva del ión metálico. Así, se confirma la coordinación del primer equivalente de Cu(II) en el punto focal de la cuña aniónica.

La adición de los siguientes equivalentes de cobre sobre la cuña **29** provoca el desplazamiento del máximo de la banda d-d hasta 690 nm, mientras que el hombro a 250 nm (superposición de las bandas LMCT $O \rightarrow Cu$ y $N \rightarrow Cu$ en el rango 250-350) continúa creciendo, como consecuencia de la continua y efectiva coordinación a través de los grupos sulfonato. La influencia del pH determina estos cambios, y también la desaparición de la banda relacionada con la interacción con el grupo tioéter. En ningún caso se observa la precipitación de $Cu(OH)_2$, por lo que el ión Cu(II) debe encontrarse siempre coordinado a algún punto de la cuña.

Por lo tanto, se puede postular que a pH básico, la coordinación de cobre se produce de forma mucho más eficaz, con una disposición CuN_2O_2 para el primer equivalente en el punto focal, y una unión a través de los grupos sulfonato periférica para el resto de equivalentes.

- Coordinación de Pt(II)

La coordinación de Pt(II) a la estructura de la cuña dendrítica fue estudiada mediante espectrofotometría UV-Vis, mediante valoración del sistema con cantidades crecientes de Pt²⁺, y RMN de ¹H y ¹⁹⁵Pt (*Fig. 2.10*).

El espectro UV-Vis de K₂PtCl₄ en agua muestra las siguientes bandas, asignadas de acuerdo con la bibliografía:⁵⁴ una banda LMCT intensa a 215 nm; tres transiciones d-d permitidas por espín a 230 (hombro intenso, ¹A_{1g}→¹B_{1g}), 320 (¹A_{1g}→¹E_g) y 390 (¹A_{1g}→¹A_{2g}) nm; y dos transiciones d-d no permitidas de muy baja intensidad a 463 (¹A_{1g}→³A_{2g}) y 535 (¹A_{1g}→³E_g) nm. La valoración del sistema dendrítico se realizó previa hidrólisis del K₂PtCl₄ para acelerar la coordinación del platino al dendrímero.⁵⁵

El estudio de la coordinación del primer equivalente de Pt(II) a la cuña aniónica se realizó por comparación con modelos de coordinación en el punto focal (*N,N'*-bis(2-hidroxietil)etilendiamina)^{56, 57} y en la periferia (G₁-Si-S(CH₂)₃SO₃Na, dendrímero esférico preparado en nuestro grupo de investigación)⁵⁸ (*Fig. 2.10.A*). Se observa que el comportamiento de **29** frente a Pt(II) es más parecido al del dendrímero, con bandas similares a 215, 230, 252 y 320 nm, intuyendo por tanto una coordinación periférica del primer equivalente. La valoración con cantidades crecientes de Pt(II) (*Fig. 2.10.B*) aporta información acerca de la coordinación del resto de equivalentes del metal, especialmente la banda LMCT a 252 nm. Estudios previos en dendrímeros G₄OH PAMAM establecen que la altura de esta banda es proporcional al número de equivalentes de Pt(II) unidos por el dendrímero⁵⁹ y que la altura es dependiente del tiempo, observándose a partir de 24 h. En nuestro caso, esta banda aparece en el momento de la adición como consecuencia de la mayor accesibilidad del metal a los grupos coordinantes, y aumenta proporcionalmente durante los 4 primeros equivalentes, por lo que podría asignarse a una coordinación PtS₂O₂ periférica. En este caso, la

interacción del grupo tioéter con Pt^{2+} es más eficaz que con Cu^{2+} , de acuerdo con el principio de simbiosis, y además está reforzada por la interacción con el grupo sulfonato.⁶⁰ La adición del quinto equivalente supone un ligero aumento de la banda a 252 nm, probablemente debido a la unión del Pt(II) en el punto focal que da lugar a una banda $\text{N} \rightarrow \text{Pt}$ alrededor de 250 nm.⁵⁵ Además, en este punto cambia la forma de las bandas en el intervalo 200-250 nm, que continúan creciendo, a diferencia de la banda a 252 nm, que no aumenta más. La saturación se alcanza con el noveno mol, transformándose el color amarillo en dorado-marrón y comenzando a precipitar.

Los datos sugieren una coordinación periférica de los cuatro primeros equivalentes a través de los grupos tioéter y sulfonato de dos ramas. El quinto equivalente parece desplazarse hacia el punto focal, mientras que los cuatro siguientes parecen redistribuirse en la periferia de manera menos definida, alcanzándose la saturación con este último equivalente.

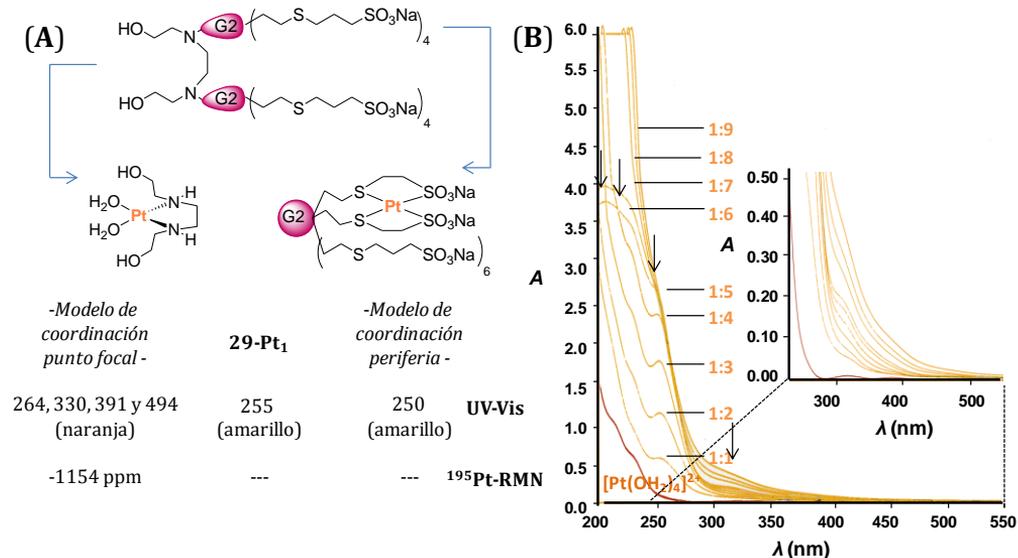


Figura 2.10 A) Coordinación del primer equivalente de Pt(II) en la cuña **29**, por comparación con los modelos de puntos focal y periferia. B) Seguimiento por espectrofotometría UV-Vis de la valoración de **29** con Pt(II).

Los estudios de RMN de ^{195}Pt y ^1H permiten corroborar los resultados observados por UV-Vis. Para los espectros RMN- ^{195}Pt en D_2O ,⁶¹ se tomó como referencia una disolución de K_2PtCl_4 ($\delta = -1616$ ppm). La adición de 1 eq. del modelo de punto focal *N,N'*-bis(hidroxiethyl)etilendiamina desplaza la señal a -1154 ppm, debido a la interacción con los átomos de nitrógeno; sin embargo, si la adición es de 1 eq. de la cuña dendrítica **29**, se produce la desaparición de la señal de Pt. Este hecho puede deberse al aumento de la movilidad del átomo de platino, que esté continuamente intercambiando su coordinación entre distintas ramas y sea difícil de establecer una señal concreta en el espectro,⁶² lo que es indicativo de la coordinación periférica del metal. Además, el espectro RMN- ^1H de **29** tras añadir 1 eq. de Pt(II) no sufre apenas variación, mientras que la adición de 9 eq. produce un gran ensanchamiento de todas las señales, y un desplazamiento de aquéllas próximas a los puntos de coordinación, incluidas las del punto focal. De nuevo, se corrobora la coordinación inicial periférica para posteriormente saturar también el punto focal.

- Coordinación de Zn(II)

El estudio de la coordinación del primer equivalente de Zn^{2+} se llevó a cabo mediante RMN- ^1H , observándose que no existe modificación de ninguna señal respecto al dendrón original. La adición de 1 eq. de Zn(II) a una disolución de **29** da lugar a un pH 7.20. A este pH, tan sólo hay un nitrógeno disponible para la coordinación metálica en el punto focal, y el ión metálico tiende a coordinarse a través de los oxígenos de los grupos sulfonato, por lo que las señales metilénicas no se ven afectadas. Los intentos por favorecer la coordinación en el punto focal mediante el aumento del pH provocan la formación de especies hidroxido de zinc insolubles, junto con el desplazamiento de las señales del núcleo en el espectro, análogo al que ocurre en la cuña sola a pH entorno a 10. Por lo tanto, se deduce que la coordinación de Zn(II) en **29** es preferente en la periferia, a través de los grupos sulfonato, y que los grupos tioéter no presentarán apenas interacción con el centro metálico.

2.3. DENDRIMEROS DE NATURALEZA POLIPROPILENIMINA CON NÚCLEO DE ETILENDIAMINA

En este apartado, se describe la síntesis, caracterización y estudio coordinativo de una serie de dendrímeros con esqueleto polipropilenimina (PPI) obtenidos mediante el crecimiento del núcleo de etilendiamina (EDA).

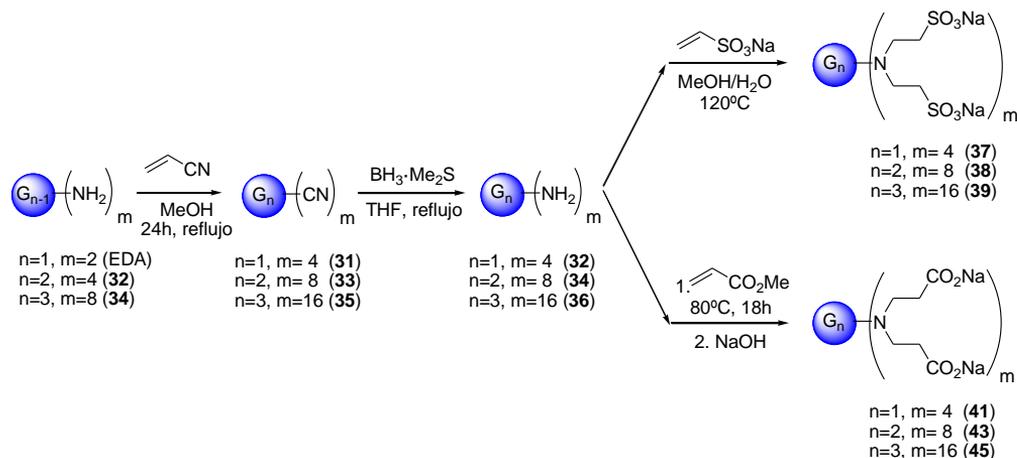
La nomenclatura utilizada para estos sistemas es G_n -eda- R_m , donde G_n describe la generación del dendrímero, *eda* su núcleo etilendiamina y R_m el tipo y número de grupos terminales. Además, esta nomenclatura puede encontrarse abreviada como G_1C , G_2C y G_3C , para dendrímeros carboxilato, o G_1S , G_2S y G_3S para los dendrímeros sulfonato. Los dendrímeros polianiónicos sintetizados presentan diversos puntos de coordinación de metales en su estructura, que permitirán la generación de distintos metalodendrímeros. Un extenso estudio de las propiedades coordinantes de estos sistemas se detalla en el Apartado 2.3.3 de este Capítulo. Los metalodendrímeros derivados se nombran como **XX- M_n** , donde *XX* indica el número del dendrímero de partida y M_n el tipo y número de átomos metálicos incorporados.

Estos sistemas se pueden considerar como las generaciones mayores de los compuestos estudiados en el Capítulo 1, que en la terminología anteriormente expuesta se pueden describir como G_0 -dmeda- $(SO_3Na)_2$ (**1**), G_0 -dmeda- $(CO_2Na)_2$ (**8**), G_0 -eda- $(SO_3Na)_4$ (**12**) y G_0 -eda- $(CO_2Na)_4$ (**18**). Estos compuestos, y sus complejos metálicos, sirven para modelar el comportamiento, tanto químico como biológico, de los dendrímeros y metalodendrímeros de generaciones mayores, que se expondrán a continuación.

2.3.1. Estudio preparativo

La estrategia utilizada para el crecimiento del núcleo EDA mediante esqueleto PPI se caracteriza por ser sencilla, no utilizar catalizadores metálicos y, al ser divergente, evitar los problemas de impedimento estérico.

El procedimiento (*Esq. 2.6.*) se inicia con la preparación de los dendrímeros poliamina precursores, mediante la ruta general establecida por Moors y Voegtle,⁶³ donde en un primer paso se realiza la adición de Michael de acrilonitrilo a la amina, y posteriormente se reducen los grupos nitrilo. Los dendrímeros polinitrilo se prepararon mediante una modificación del protocolo descrito por Tack,⁶⁴ sin utilizar ácido acético como catalizador, lo que evita los pasos de purificación. El paso de reducción se llevó a cabo con $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$, de forma análoga a lo realizado para otros dendrímeros polinitrilo,⁶⁵ ya que la reacción con reductores habituales (NaBH_4 , LiAlH_4 , DIBAL) era incompleta y propiciaba la aparición de subproductos indeseables por la coordinación de sales litiadas al núcleo de etilendiamina. El siguiente paso es la incorporación de los grupos aniónicos en la periferia del dendrímero mediante reacciones de adición tipo Michael. El estudio preparativo se detalla a continuación.



Esquema 2.6 Procedimiento general de preparación de dendrímeros PPI con núcleo EDA y grupos terminales sulfonato y carboxilato.

La síntesis de los dendrimeros con grupos nitrilo y amino en la periferia **31-36** se muestra en el Esquema 2.6 y se detalla en el Capítulo 4 de esta Memoria. El dendrimer G₁-eda-(CN)₄ (**31**) se sintetizó mediante reacción de un exceso de acrilonitrilo con etilendiamina, a reflujo durante 24 h. Tras su evaporación, se obtiene **31** como un aceite denso que solidifica en contacto con el aire para dar un sólido pulverulento de color crema, con rendimiento cuantitativo. La reducción de **31** con un gran exceso de BH₃·Me₂S, en THF a 60°C, y posterior tratamiento con MeOH, conduce al dendrimer G₁-eda-(NH₂)₄ (**32**), como un sólido blanco muy higroscópico. De forma análoga se sintetizaron los dendrimeros de segunda generación G₂-eda-(CN)₈ (**33**) y G₂-eda-(NH₂)₈ (**34**) y tercera generación G₃-eda-(CN)₁₆ (**35**) y G₃-eda-(NH₂)₁₆ (**36**), aumentando los tiempos de reacción. Las estructuras propuestas se muestran en la Figura 2.11.

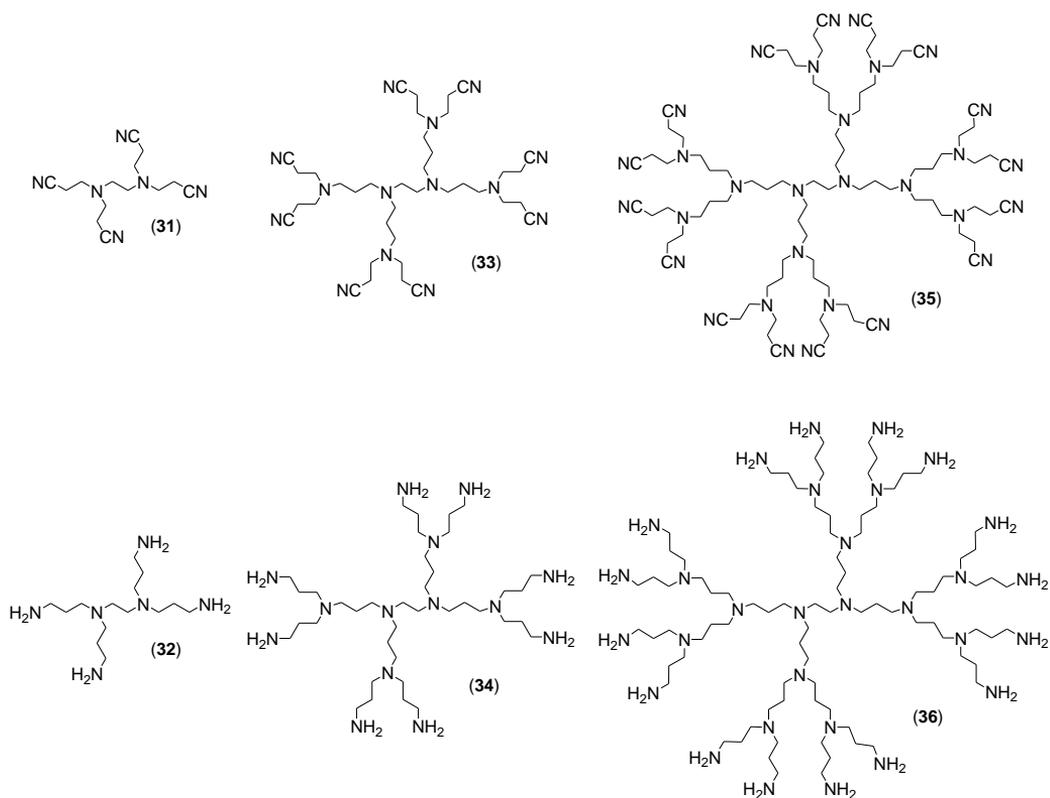


Figura 2.11 Estructuras propuestas para los dendrimeros polinitrilo y poliamino **31-36**.

Los dendrímeros con grupos amino terminales se funcionalizaron con grupos sulfonato mediante adición “aza-Michael” de vinilsulfonato de sodio (*Cap. 1*), dando lugar a sistemas de generación 1 (**37**, 8 grupos terminales), 2 (**38**, 16 grupos terminales) y 3 (**39**, 32 grupo terminales). Las estructuras propuestas para estos dendrímeros se muestran en la Figura 2.12. El dendrímero G_1 -eda- $(SO_3Na)_8$ (**37**) se sintetizó mediante la reacción de **32** con vinilsulfonato de sodio en una mezcla $H_2O/MeOH$, durante 48 h a $120^\circ C$. Tras su evaporación, el producto se purificó por nanofiltración en agua con membrana de 500 kDa, obteniéndose como un sólido pulverulento blanco. Los dendrímeros G_2 (**38**) y G_3 (**39**) se sintetizaron mediante un protocolo análogo, y se purificaron por nanofiltración en membrana de 1000 kDa.

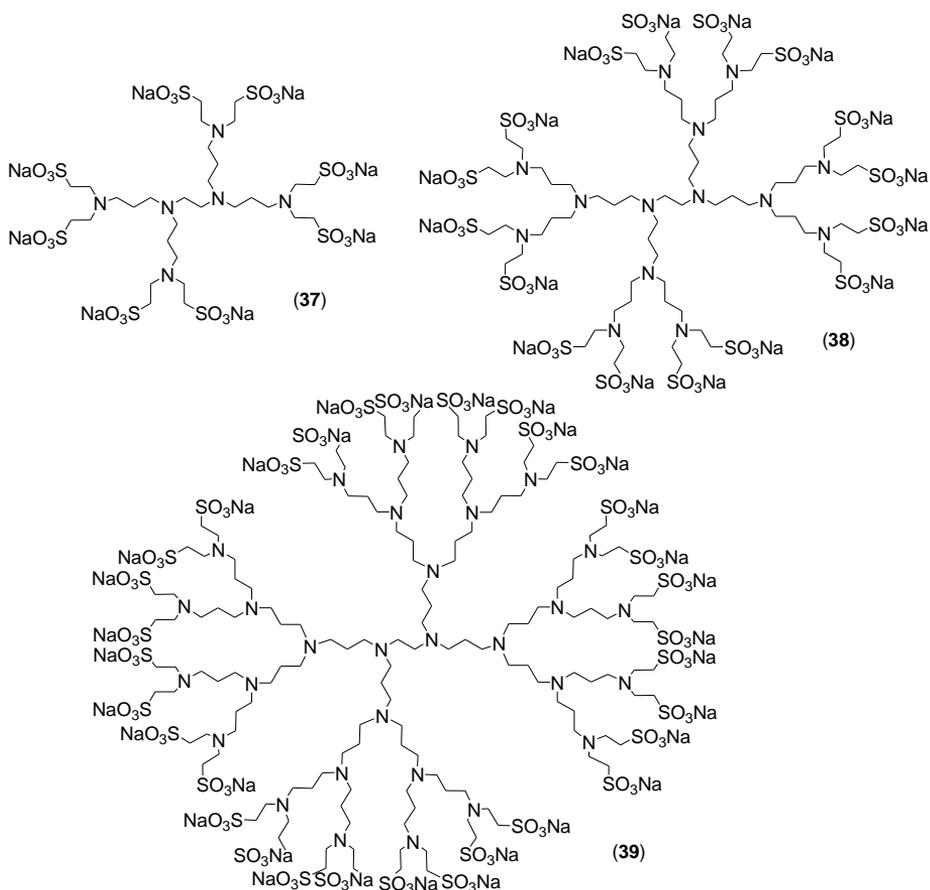


Figura 2.12. Estructuras propuestas para los dendrímeros con grupos sulfonato **37-39**.

La periferia de los dendrimeros con grupos amino terminales también se funcionalizó con grupos carboxilato, de forma análoga a lo realizado para los ligandos **8** y **18** (Cap. 1). En un primer paso, se realiza la adición de Michael de un exceso de acrilato de metilo al dendrimer con grupos amino terminales, obteniéndose los dendrimeros $G_n\text{-eda}-(\text{CO}_2\text{Me})_m$ (**40** ($n=1, m=8$), **42** ($n=2, m=16$) y **44** ($n=3, m=32$)). La reacción transcurre a 80°C durante 48 h; al evaporar, obtenemos el dendrimer como un aceite amarillo, el cual es soluble en cloroformo. En un segundo paso, se obtienen las sales sódicas tras la reacción con un ligero exceso de NaOH en MeOH. Este proceso en dos pasos sobre los dendrimeros con grupos amino libres proporciona sistemas de generación 1 (**41**, 8 grupos terminales), 2 (**43**, 16 grupos terminales) y 3 (**45**, 32 grupos terminales). Las estructuras propuestas se muestran en la Figura 2.13.

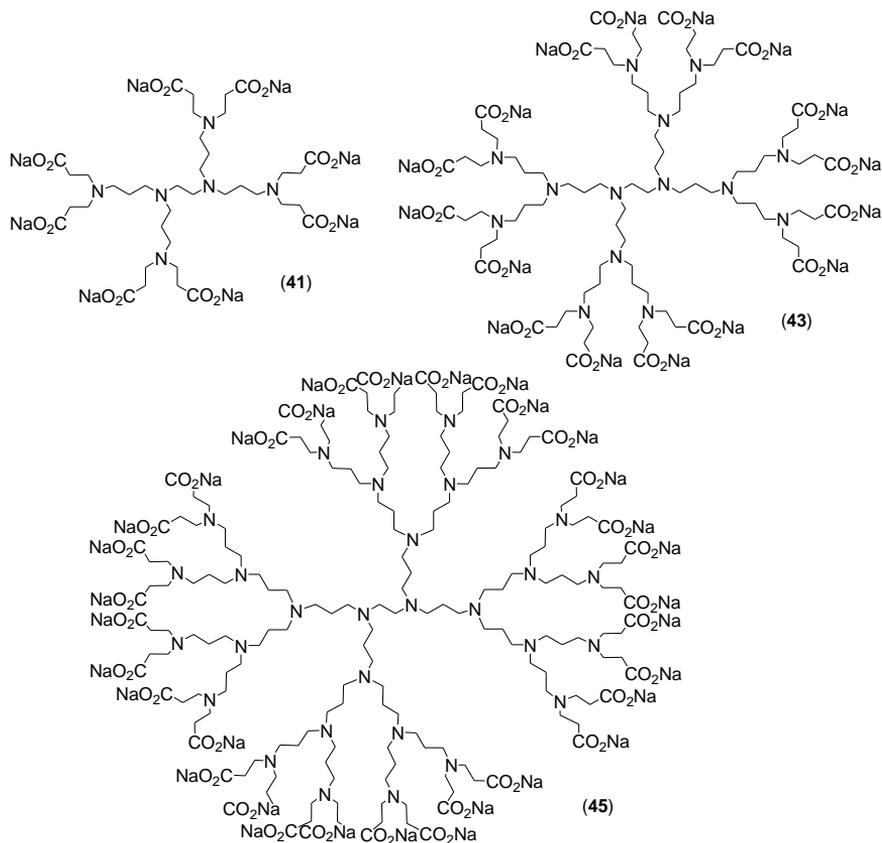


Figura 2.13. Estructuras propuestas para los dendrimeros policarboxilato **41**, **43** y **45**.

2.3.2. Estudio estructural

Los dendrímeros descritos en este apartado han sido caracterizados por técnicas de espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C , y estudios ^1H - ^{13}C -{HSQC}, ^1H - ^{13}C -{HMBC}, TOCSY-2D y NOESY-2D. Los estudios de análisis elemental de C, H y N muestran el gran carácter higroscópico de dichos compuestos. Los datos completos de RMN se encuentran en el apartado experimental de esta Memoria (*Cap. 4*), tras la descripción detallada de la síntesis de cada producto.

2.3.2. a. Estudio mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Para facilitar la lectura de los resultados de Resonancia Magnética Nuclear, en la estructura del dendrímero, se enumeran los grupos metilénicos del esqueleto poliamina como *a* (núcleo), *b*, *c*, etc., y los de los grupos terminales como *x* e *y*, siendo éste último el unido al grupo funcional.

Para los dendrímeros con grupos terminales nitrilo y amino **31-36**, los datos de RMN de ^1H y ^{13}C obtenidos son concordantes con los hallados en bibliografía para rutas alternativas de síntesis,^{64, 66} y en esta Memoria se recogen con el fin de que el lector pueda seguir sin problema la explicación para el resto de sistemas preparados.

Para los dendrimeros con grupos terminales nitrilo y amino, los datos de RMN de ^1H y ^{13}C son concordantes con la estructura propuesta para los compuestos **31-36** en la Figura 2.11, y se encuentran recogidos en el Capítulo 4 de esta memoria. Algunos datos de δ (ppm) y espectros de RMN representativos se muestran en las Figuras 2.14 y 2.15.

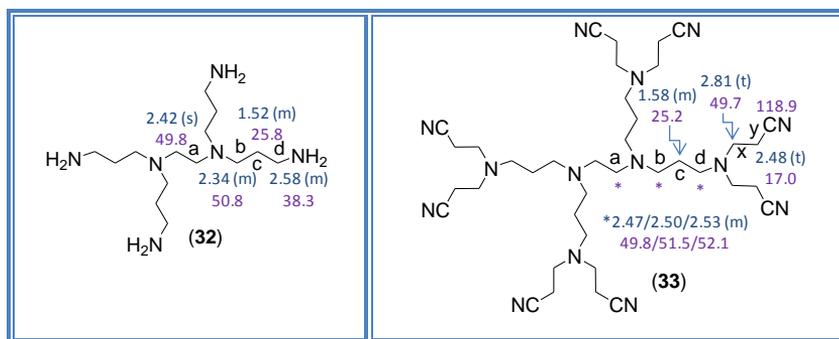


Figura 2.14 Datos de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de los dendrimeros precursores **32** (D_2O , δ ppm) y **33** (CDCl_3 , δ ppm).

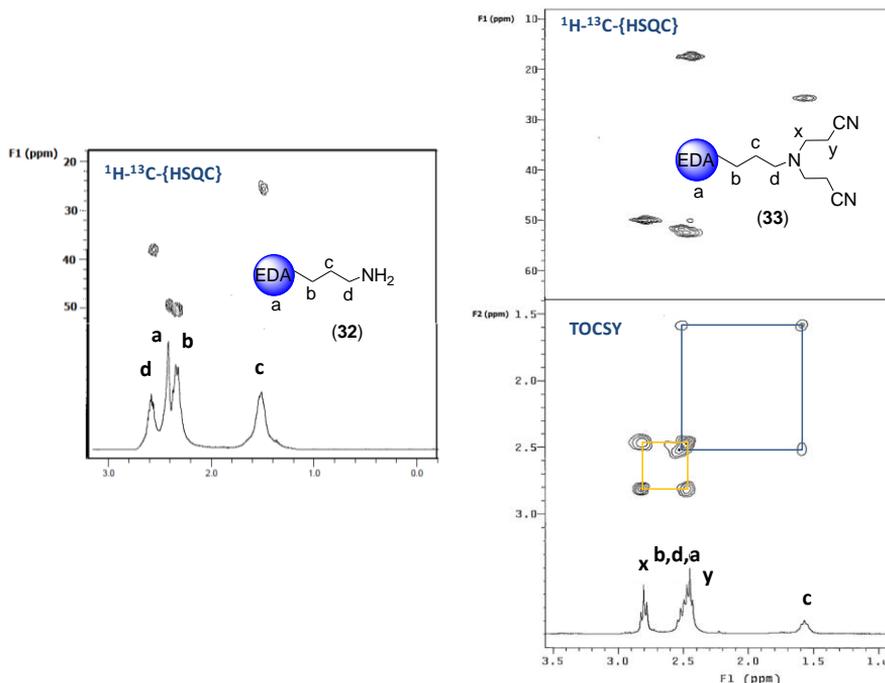


Figura 2.15 Espectros ^1H - ^{13}C -{HSQC} y TOCSY de los dendrimeros precursores **32** y **33**.

El dendrímero poliamina de primera generación **32** muestra, en ambos espectros de RMN- ^1H y ^{13}C , 4 resonancias asignadas mediante experimentos de ^1H - ^{13}C -{HSQC}. Los grupos metileno equivalentes del núcleo aparecen como un singlete ancho a 2.42 ppm, mientras que los pertenecientes a la cadena aparecen a 2.34 (*b*), 1.52 (*c*) y 2.58 (*d*) ppm. Respecto al espectro de RMN- ^{13}C , las señales del núcleo aparecen a 49.8 ppm, mientras que las de la cadena a 50.8 (*b*), 25.8 (*c*) y 38.3 (*d*) ppm.

Los dendrímeros poliamina de generaciones 2 (**34**) y 3 (**36**) presentan señales análogas en sus espectros, pero muy ensanchadas debido al descenso acusado de solubilidad en agua de dichos compuestos (*Cap. 4*).

Para los dendrímeros polinitrilo, a modo de ejemplo se comentará el espectro de RMN obtenido para el sistema de segunda generación (**33**). En el espectro de RMN- ^1H , las señales correspondientes al fragmento 2-cianoetilo aparecen como dos tripletes a 2.81 (*x*) y 2.48 (*y*) ppm. El resto de grupos - NCH_2 - aparecen como un conjunto de multipletes centrado en 2.50 ppm. Por último, el grupo metileno central de la cadena (*c*), aparece como un multiplete a 1.58 ppm. En el espectro de RMN- ^{13}C , las resonancias se asignaron de la siguiente manera: el grupo -CN aparece a 118.9 ppm, mientras que las señales correspondientes al fragmento 2-cianoetilo se localizan a 49.7 (*x*) y 17.0 (*y*) ppm. Los demás grupos - NCH_2 - aparecen a 49.8, 51.5 y 52.1 ppm, y el metileno central de la cadena (*c*), a 25.2 ppm. Los dendrímeros polinitrilo de generaciones 1 (**31**) y 3 (**35**) presentan señales análogas en sus espectros (*Cap.4*).

Para los *dendrímeros con grupos sulfonato terminales 37-39*, los datos analíticos y espectroscópicos concuerdan con la estructura propuesta en la Figura 2.12, y los valores de δ (ppm, en D_2O a temperatura ambiente) se recogen en el Capítulo 4. La Figura 2.16 muestra los valores δ (ppm) del dendrímero de primera generación **37**, en comparación con los del compuesto análogo de generación 0 **12**, y la Figura 2.17 presenta los espectros 1H - ^{13}C -{HSQC} y TOCSY de este mismo dendrímero.

Para el dendrímero **37**, el espectro RMN- 1H muestra, para el fragmento 2-sulfoetilo, dos multipletes a 2.95 (*y*) y 2.81 (*x*) ppm. Éste último se encuentra solapado con el singlete asignado a los grupos metileno equivalentes del núcleo. Los grupos metilénicos de la cadena aparecen como multipletes a 2.40 (*b*), 1.60 (*c*) y 2.60 (*d*) ppm. Respecto al espectro de RMN- ^{13}C , se observan 6 resonancias. Las señales a 47.6 (*x*) y 47.0 (*y*) ppm son debidas al fragmento 2-sulfoetilo. Los grupos metileno del núcleo (*a*) aparecen a 50.3 ppm, mientras que los de la cadena alquílica aparecen a 51.0 (*b*), 22.0 (*c*) y 52.8 (*d*) ppm. Como puede observarse, las diferencias con las señales del sistema G_0 **12** son mínimas.

Los dendrímeros de generaciones 2 (**38**) y 3 (**39**) presentan patrones análogos en los espectros, pero las señales aparecen menos resueltas según aumenta la generación (*Cap. 4*).

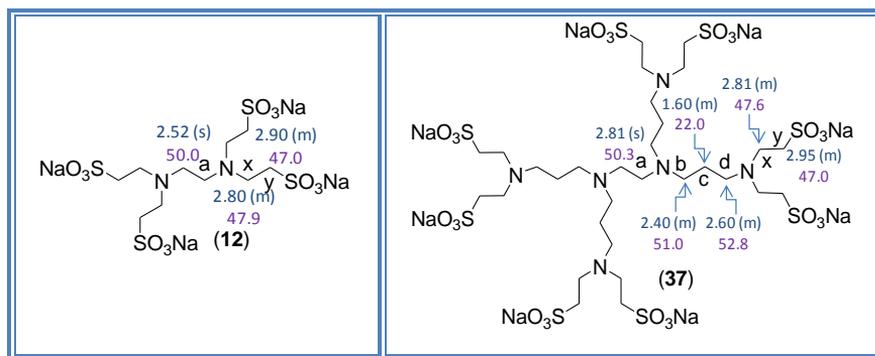


Figura 2.16 Datos de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de los dendrímeros polisulfonato de generación 0 (**12**) y 1 (**37**) (D_2O , δ ppm).

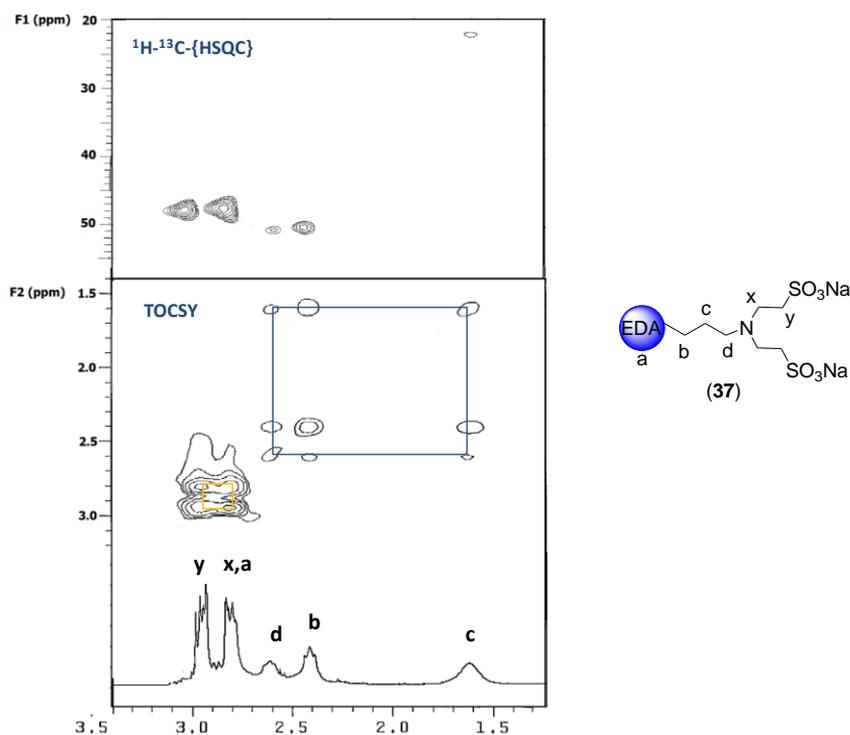


Figura 2.17 Espectros de ^1H - ^{13}C -{HSQC} y TOCSY del dendrímero G_1 con 8 grupos sulfonato terminales, **37**.

Los datos analíticos y espectroscópicos obtenidos para los *dendrímeros con grupos carboxilato en la periferia* **40-45**, son concordantes con la estructura propuesta en la Figura 2.13. Los espectros de RMN han sido registrados en CDCl₃ (dendrímeros poliéster) y en D₂O (dendrímeros policarboxilato) a temperatura ambiente. Los valores de δ (ppm) de todos ellos se muestran en el Capítulo 4, mientras que la Figura 2.18 recoge dichos datos para los dendrímeros de generación 1 **40** y **41**, en comparación con los valores de los ligandos de generación 0 **17** y **18**. Además, la Figura 2.19 presenta los espectros ¹H-¹³C-{HSQC} y TOCSY de los dendrímeros de primera generación **40** y **41**.

El espectro RMN-¹H del dendrímero G₁-eda-(CO₂Me)₈ (**40**) presenta un singlete a 3.63 ppm debido al grupo metilo -CO₂Me, mientras que el fragmento 2-metoxicarboniletilo aparece como dos multipletes a 2.73 (*x*) y 2.41 (*y*) ppm, el último solapado con todas las señales de los grupos -NCH₂-, del núcleo y de la cadena. El grupo metileno intermedio (*c*) de la cadena se observa a 1.52 ppm como un multiplete. En el espectro RMN-¹³C, el fragmento -CO₂Me da lugar a dos señales a 173.0 (CO) y 51.5 (Me) ppm. Las señales a 49.1 (*x*) y 32.4 (*y*) ppm se atribuyen al fragmento 2-metoxicarboniletilo, y los grupos metileno -NCH₂- aparecen en el rango 52.5-51.8 ppm. Finalmente, el grupo metileno central (*c*) da lugar a una señal a 24.7 ppm. Los dendrímeros G₂ (**42**) y G₃ (**44**) presentan datos similares de RMN (*Cap. 4*).

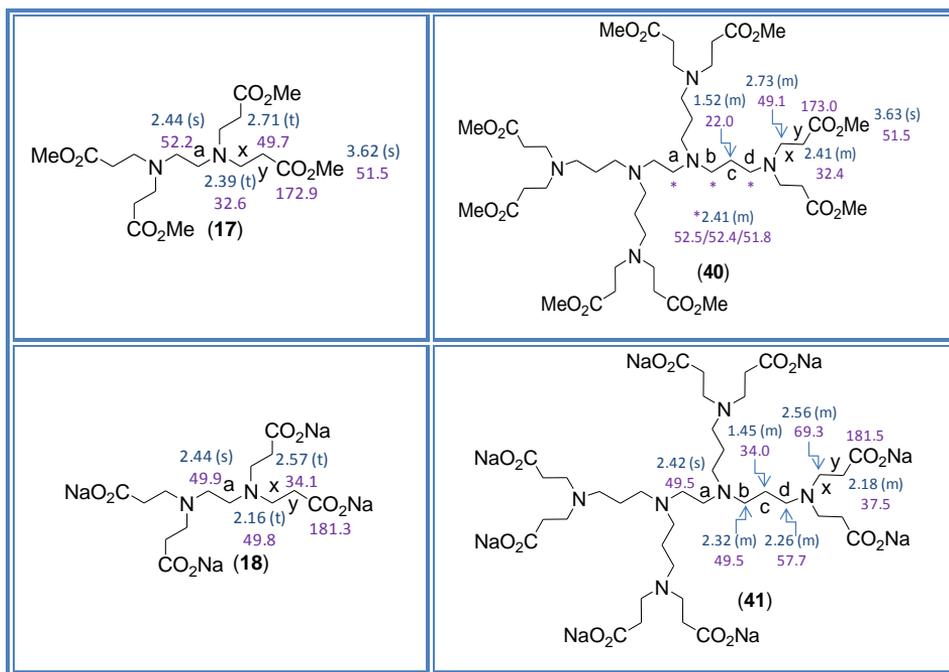


Figura 2.18 Datos de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de los dendrímeros policarboxilato de generaciones 0 y 1 (δ ppm, CDCl_3 (17 y 40), D_2O (18 y 41)).

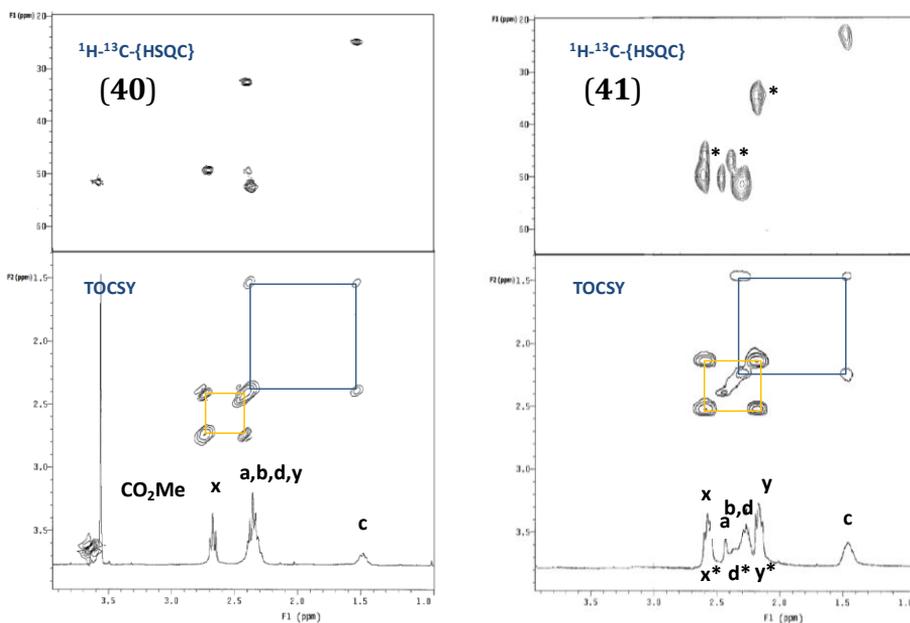


Figura 2.19 Espectros de ^1H - ^{13}C -{HSQC} y TOCSY-2D de los dendrímeros 40 y 41.

Para el dendrímico G_1 -eda- $(CO_2Na)_8$ (**41**), el espectro RMN- 1H muestra, para el fragmento 2-carboxietilo, dos multipletes a 2.18 (y) y 2.56 (x) ppm. Además, a 2.42 ppm se observa un singlete asignado a los grupos metileno equivalentes del núcleo. Los grupos metilénicos de la cadena aparecen como multipletes a 2.32 (b), 1.45 (c) y 2.26 (d) ppm. Es posible observar dos pequeños multipletes a 2.55 (x^*) y 2.35 (y^*), que son indicativos de una protonación parcial de los grupos amino periféricos al pH de la medida y que provoca un ligero desplazamiento de los grupos metileno unidos a este nitrógeno. Respecto al espectro de RMN- ^{13}C , se observan 5 resonancias. El grupo carbonilo en $-CO_2Na$ da lugar a una señal a 181.5 ppm, mientras que las señales a 49.8 (x) y 37.5 (y) ppm se atribuyen al fragmento 2-carboxietilo. Los metilenos del núcleo (a) aparecen a 49.9 ppm, y los de la cadena se localizan a 53.7 (b), 24.0 (c) y 53.7 (d) ppm. De nuevo, la protonación parcial del nitrógeno periférico origina unas señales de menor intensidad situadas a 36.4 (y^*), 46.0 (x^*) y 46.5 (d^*) ppm, e implica una estructura zwitteriónica parcial del grupo carboxilato al aparecer una señal de baja intensidad a 180.3 ppm ($COOH^*$).

Los dendrimeros de generaciones 2 (**43**) y 3 (**45**) muestran patrones similares de RMN- 1H y ^{13}C , aunque de nuevo las señales se vuelven menos resueltas según aumenta la generación (*Cap. 4*).

2.3.2. b. Estudio potenciométrico de los dendrimeros aniónicos

Los dendrimeros con esqueleto PPI presentan interesantes propiedades ácido-base, debido a su estructura nitrogenada.⁶⁷ En nuestro caso, su funcionalización con grupos aniónicos terminales modifica dichas propiedades ácido-base, al incluir nuevos grupos aptos de protonación. El estudio de dichas propiedades permite predecir el comportamiento de los mismos en diversas condiciones, como por ejemplo al enfrentarse a iones metálicos o a ciertas dianas celulares para ejercer un determinado efecto biológico.

En general, el denominado “Modelo de Ising”⁶⁷ estudia el comportamiento de polielectrolitos lineales o ramificados a través de los valores de pK_a microscópicos de cada grupo individual y los parámetros de interacción entre pares o tríos de grupos. Para el caso de dendrímeros PPI modificados, por ejemplo con grupos carboxilato en la periferia, hay que recurrir a una extensión del modelo que considere una combinación de dos tipos de grupos ionizables. Por sencillez, en este trabajo se evaluó el comportamiento ácido-base de estos dendrímeros en función del pH mediante valoración potenciométrica en agua destilada sin fuerza iónica, y los valores de pK_a se calcularon mediante el método de la segunda derivada (*ver Cap. 1*). Los resultados para los dendrímeros de primera generación se muestran en la Fig. 2.20, comparándolos con los valores teóricos y la distribución simulada de macroespecies.

En el Capítulo 1, se mostró que la curva de valoración del compuesto G_0 con grupos sulfonato **12** presentaba dos valores de pK_a (4.63 y 9.12), asignados a las dos constantes de disociación ácida de los grupos amonio, mientras que la del ligando carboxilato análogo **18** también presentaba dos valores de pK_a (5.01 y 8.09), siendo el primero de ellos un pico ancho donde se engloban además otros procesos ácido-base asociados a los grupos carboxilato.

Este mismo comportamiento se repite para los dendrímeros de primera generación y probablemente pueda extenderse al resto de generaciones, aunque aumente la complejidad de los picos. Para el dendrímero G_1S (**37**), la curva de valoración muestra dos valores de pK_a (4.57 y 8.40), que marcan los extremos del intervalo en el que se encuentran los pK_a del conjunto de nitrógenos. Este resultado está de acuerdo con el cálculo teórico, donde se observa que a pH fisiológico la macroespecie predominante es aquella que presenta 4 nitrógenos protonados, tanto del núcleo como de la primera capa, y todos los grupos sulfonato desprotonados, disponibles para su acción inhibitoria frente al VIH.

Para el dendrímico G_1C (**41**), de nuevo se aprecian dos valores de pK_a (5.72 y 8.37). El primero incluye los procesos ácido-base tanto de los átomos de N del núcleo como de los grupos carboxilato, mientras que el segundo engloba la protonación de los átomos de N de la primera capa. A pH fisiológico la macroespecie predominante es aquella que presenta todos los nitrógenos de la primera capa protonados, mientras que los del núcleo y los grupos carboxilato estarían desprotonados y, por lo tanto, disponibles para inhibir el virus.

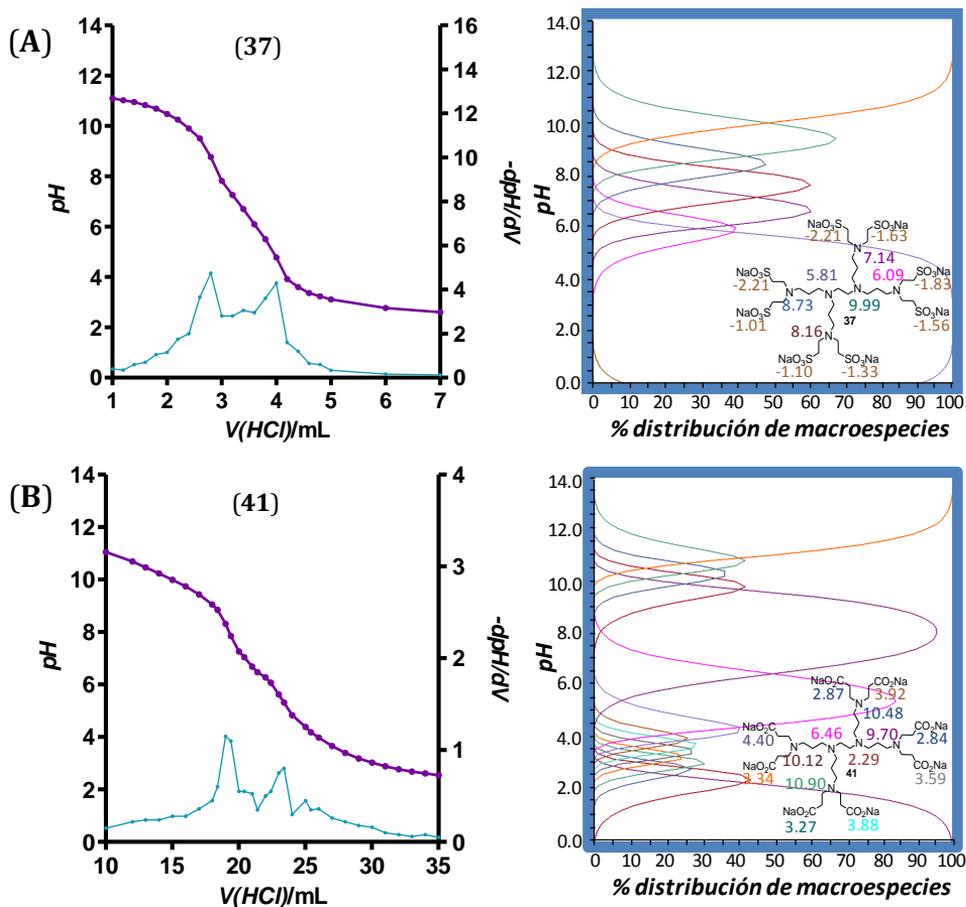


Figura 2.20 Valoración potenciométrica de G_1S (**37**, A) y G_1C (**41**, B). Los valores experimentales se muestran en las gráficas de la izquierda, mientras que en las de la derecha se indican los valores teóricos de pK_a y la distribución de macroespecies. La curva de cada macroespecie viene marcada por un determinado color, que coincide con el del pK_a del grupo que se está protonando cuando predomina dicha macroespecie.

2.3.3. Propiedades coordinantes frente a metales de los dendrímeros aniónicos

Los dendrímeros PPI con núcleo EDA y grupos aniónicos en la periferia presentan en su estructura diversos puntos de coordinación que pueden ser ocupados por iones metálicos. Por ejemplo, un dendrímero de primera generación presenta las posiciones de coordinación indicadas en la Fig. 2.21.

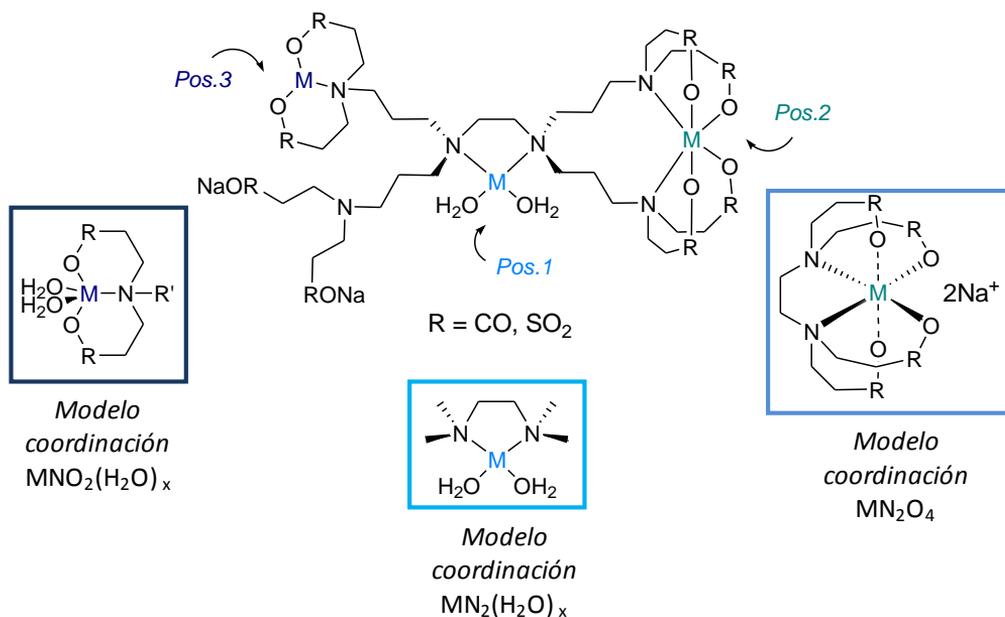


Figura 2.21 Posiciones de coordinación de metales para un dendrímero PPI polianiónico con núcleo EDA de primera generación.

Los dendrímeros de generaciones 2 y 3 presentan las mismas posiciones de coordinación, y además múltiples nitrógenos en su estructura que puedan interactuar inespecíficamente con átomos metálicos. Por sencillez, se realizará un estudio del comportamiento coordinativo para los sistemas de generación 1, y posteriormente se destacarán las diferencias respecto a las generaciones mayores.

Por lo tanto, las posiciones de coordinación de iones metálicos en los dendrímeros aniónicos serían las siguientes (*Fig. 2.21*):

- La posición de coordinación 1 sería muy favorable, dada la tendencia del núcleo de etilendiamina a formar situaciones quelato con metales. El metal se coordinaría a través de 2 puntos, formando un ciclo de 5 eslabones, y completaría su esfera de coordinación con moléculas de agua. En estos dendrímeros, la estructura es bastante abierta y el acceso del metal sería favorable hasta esta posición, aunque el aumento de la generación dificultaría el acceso por impedimento estérico de las ramas. El modelo de coordinación serían los derivados metálicos de *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina.⁶⁸
- La posición de coordinación 2 sería también posible, con una situación de tipo MN_2O_4 , formando 5 anillos quelato. Esta coordinación dependería de la flexibilidad de las ramas del dendrímero, y su modelo de coordinación serían los complejos metálicos de generación 0 del Capítulo 1.^{69, 70}
- Finalmente, la posición de coordinación 3 también sería favorable, el metal se coordinaría al dendrímero a través de 3 puntos (MNO_2), formando 2 ciclos de 6 eslabones, y su esfera se completaría con moléculas de agua. Mientras que para compuestos sulfonato no existe ningún modelo con estructura cristalina para la coordinación O-N-O, en el caso de los derivados carboxilato hay dos ejemplos de complejos metálicos de cobre con esta coordinación.^{71, 72} En ellos, el átomo metálico presenta un entorno pbc, con una pequeña distorsión de bpt. El plano basal está formado por los átomos donadores del ligando tridentado y una molécula de agua, y el apical por otra molécula de agua. Presumiblemente, ésta es la disposición que adquirirían en la periferia del dendrímero, donde la posición del sustituyente R' es ocupada por la rama del dendrímero.

2.3.3.a. Metalodendrimeros homometálicos

La capacidad para coordinar iones metálicos en la estructura dendrítica se estudió utilizando Cu^{2+} como sonda, a través de una valoración de los distintos dendrimeros con cantidades crecientes del metal. La valoración se siguió a través de Espectrofotometría UV-Vis y RSE. Es posible aislar los metalodendrimeros derivados, tras purificar mediante nanofiltración, como sólidos pulverulentos que se aceitan con facilidad en contacto con el aire.

▪ Espectrofotometría UV-Vis

Se realizaron valoraciones en agua destilada de muestras de los distintos dendrimeros a una concentración de 0.1 mM y cantidades crecientes de Cu(II) , correspondientes a distintas proporciones dendrimerometal (G_1 , D:M = 1:1, 1:3 y 1:5; G_2 , D:M = 1:1, 1:5 y 1:9; G_3 , D:M = 1:1, 1:9 y 1:17). Estas proporciones se corresponden con los equivalentes necesarios para saturar cada una de las distintas posiciones de coordinación mostradas en la Figura 2.21, para cada dendrimer. Los resultados se muestran en la Tabla 2.1.

	Pos. 1		Pos. 2		Pos. 3	
G₁S (37)	1:1	295/663	1:3	295/709	1:5	295/741
G₂S (38)	1:1	295/657	1:5	295/678	1:9	295/753
G₃S (39)	1:1	298/652	1:9	298h/694	1:17	298h/759
G₁C (41)	1:1	298/658	1:3	258h/298/674	1:5	250/298h/701
G₂C (43)	1:1	288/666	1:5	254h/286/684	1:9	246/298h/690
G₃C (45)	1:1	279/655	1:9	257/280h/675	1:17	252/280h/688

Tabla 2.1. Comparativa de los valores máximos de absorción UV-Vis ($\lambda_{\text{máx}}$, nm) para las distintas posiciones de coordinación de Cu^{2+} en dendrimeros $G_n\text{-eda}-(\text{SO}_3\text{Na})_m$ y $G_n\text{-eda}-(\text{CO}_2\text{Na})_m$. “h” hace referencia a un hombro en el espectro.

Los espectros UV-Vis de las valoraciones de los dendrimeros policarboxilato **41**, **43** y **45** se muestran en la Figura 2.22. Para el dendrimerio G_1C **41**, el espectro muestra una banda LMCT a 298 nm y una de transición d-d a 660 nm. De acuerdo con los resultados previos con los sistemas G_0 (*Cap. 1*), estas bandas son indicativas de una coordinación mediante el grupo etilendiamina del núcleo del dendrimerio (*Pos. 1, Fig. 2.21*).^{69, 70} Los siguientes dos equivalentes dan lugar a un hombro alrededor de 260 nm, relacionado con la coordinación de los grupos carboxilato al ión metálico,^{70, 72, 73} y un aumento de la banda a 298 nm, de acuerdo con un mayor número de átomos de nitrógeno coordinados. La banda d-d se desplaza a mayor $\lambda_{m\acute{a}x}$, debido al aumento del número de oxígenos coordinados al metal, con una posible coordinación CuN_2O_4 octaédrica (*Pos. 2, Fig. 2.21*).^{69, 70} Finalmente, con los dos últimos equivalentes, la banda a 298 nm permanece invariable, indicando la saturación de los nitrógenos, mientras que la banda a 260 nm continúa creciendo y la banda d-d desplazándose, presumiblemente hacia una coordinación $CuNO_x$, que incluye moléculas de agua (*Pos. 3, Fig. 2.21*). A mayor concentración de Cu(II), la banda LMCT permanece invariable, mientras que el máximo de la banda d-d se desplaza a mayor λ debido a la presencia de $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$.

Los dendrimeros de mayores generaciones (**43** y **45**) muestran un patrón similar en sus respectivas posiciones de coordinación. Sin embargo, a las máximas concentraciones probadas de cobre, se observa un comportamiento distinto respecto a G_1C . Al aumentar la concentración de Cu(II), se observa un continuo aumento de la banda LMCT, hasta alcanzar los 11 (**43**) o los 25 (**45**) equivalentes. Además, el máximo de la banda d-d sufre un desplazamiento a menor λ , especialmente claro para **45**. Todas estas evidencias apuntan a una reubicación de los iones de cobre entre la periferia y el interior del dendrimerio, aumentando el número de nitrógenos internos coordinados, que además se corresponden con la aparición de cierta turbidez en el medio indicativa de una disminución progresiva de la solubilidad del compuesto en agua.

Se puede concluir, por tanto, que los dendrímeros policarboxilato siguen un patrón de coordinación específico, que comienza en el núcleo y continúa con la periferia (probablemente, primero con una coordinación CuN_2O_4 y después pasando a CuNO_x) y reubicación posterior entre periferia y el esqueleto interno.

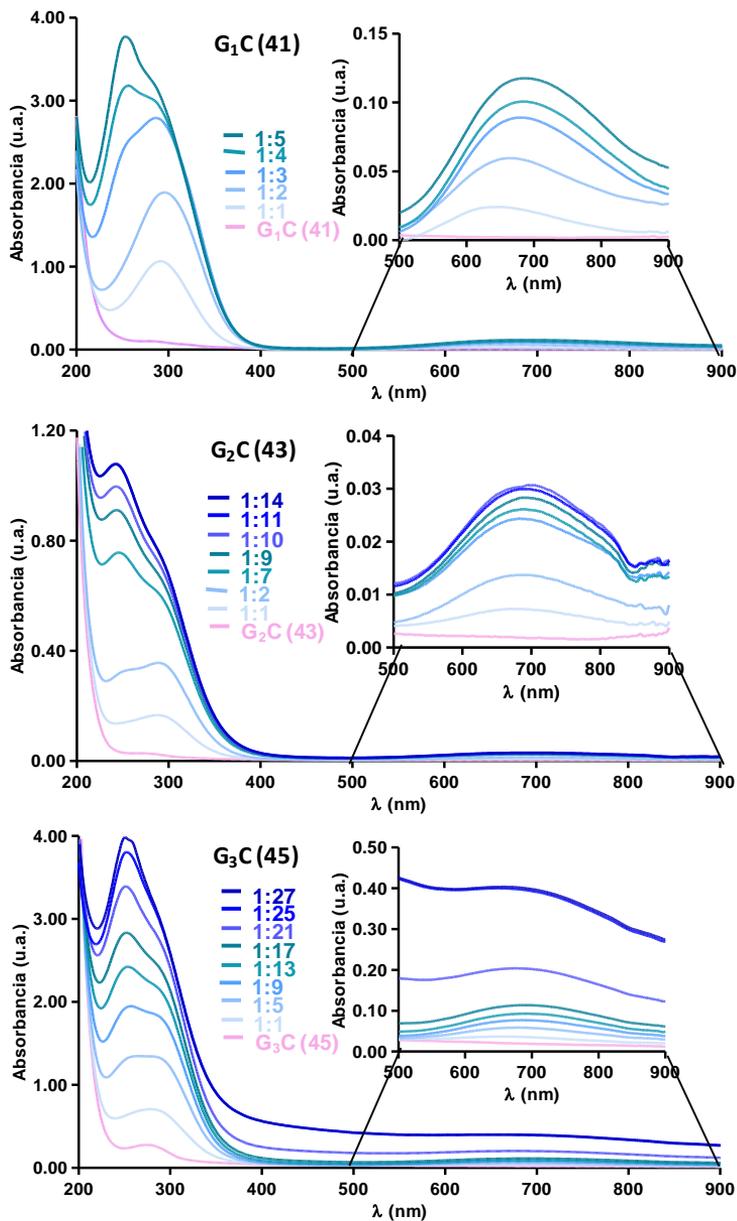


Figura 2.22 Seguimiento, mediante espectrofotometría UV-Vis, de la valoración con cantidades crecientes de Cu^{2+} de los dendrímeros policarboxilato **41**, **43** y **45**.

Los espectros UV-Vis de las valoraciones de los dendrimeros polisulfonato **37-39** se muestran en la Figura 2.23. De acuerdo con los resultados descritos para los ligandos G_0 (*Cap. 1*), la banda LMCT correspondiente a dendrimeros sulfonato es de menor intensidad a aquélla de dendrimeros carboxilato, indicando así una interacción más débil del átomo metálico con los nitrógenos, a favor de una coordinación más fuerte con los oxígenos de los grupos sulfonato. Inversamente, la banda LMCT de complejos carboxilato es más intensa, demostrando una coordinación a N preferente sobre los O de los grupos carboxilato.

En el caso del dendrimer G_1S (**37**), tras la adición del primer equivalente de cobre, aparece una banda LMCT alrededor de 295 nm y una de transición d-d sobre 660 nm, debido a la coordinación en el núcleo del dendrimer (*Pos. 1, Fig. 2.21*). Los siguientes equivalentes dan lugar a un aumento en la intensidad de la banda LMCT, ligero a partir del segundo equivalente por la coordinación preferente con los sulfonato en lugar de los nitrógenos. Además, se observa un progresivo desplazamiento de la banda d-d a mayor longitud de onda, debido al aumento del número de átomos de oxígeno coordinados al cobre (*Pos. 2-3, Fig. 2.21*). A mayor concentración de cobre, la banda LMCT permanece invariable, mientras que el máximo de la banda d-d se desplaza significativamente a mayor λ debido a la presencia de $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$.

De nuevo, los dendrimeros sulfonato G_2S (**38**) y G_3S (**39**) siguen un patrón similar en sus correspondientes puntos de coordinación.

En este caso, se puede concluir que los dendrimeros polisulfonato también parecen seguir un patrón de coordinación específico, que comienza en el núcleo y continua con la periferia, pero que existe una interacción preferente por los oxígenos de los grupos $-SO_3^-$ respecto a los nitrógenos del sistema dendrítico.

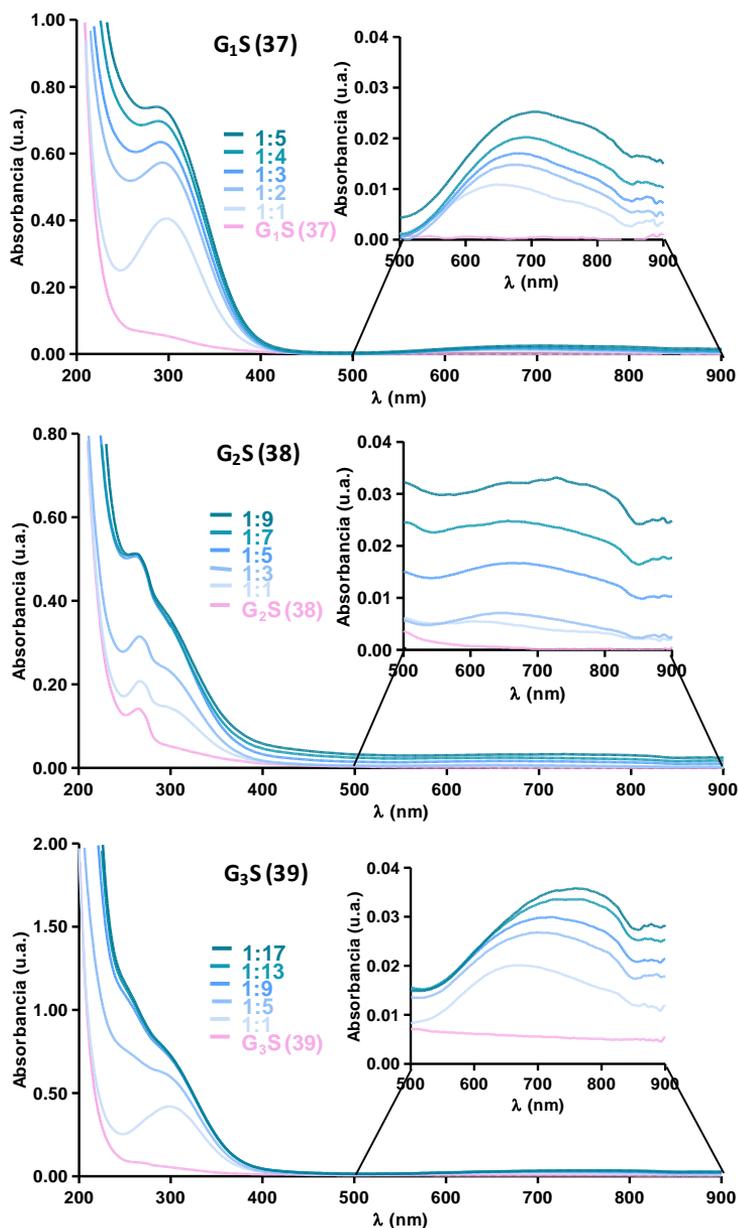


Figura 2.23 Seguimiento, mediante espectrofotometría UV-Vis, de la valoración con cantidades crecientes de Cu²⁺ de los dendrímeros polisulfonato 37-39.

Todas estas evidencias concuerdan bastante con los resultados obtenidos del estudio mediante RSE, como se detalla a continuación.

▪ **Resonancia de Spin Electrónico**

Estos estudios RSE se realizaron en colaboración con el Laboratorio de RSE de la Universidad de Urbino (Italia), que dirige la profesora M^a Francesca Ottaviani. Esta técnica aporta información muy valiosa respecto a la caracterización de dendrimeros,⁷⁴ en relación con su estructura, propiedades y comportamiento. Su principal ventaja reside en la habilidad para elegir una sonda de espín apropiada que sea capaz de monitorizar un área seleccionada del interior o exterior del dendrímtero, obteniendo diferentes parámetros:

- ✓ La **intensidad** de la señal, que en valor absoluto da una medida de la concentración de la sonda (Cu(II) en nuestro caso), y la variación de la intensidad relativa de una componente espectral informa sobre la distribución de la sonda en distintas localizaciones y entornos de la superficie externa y/o interna del dendrímtero.
- ✓ Los **parámetros magnéticos**, como las componentes de los tensores g y A o sus valores isotrópicos, se calculan para complejos de cobre en localizaciones de la superficie del dendrímtero para identificar su coordinación (*Cap. 1*).
- ✓ El **tiempo de correlación** (τ) para el movimiento de rotación, obtenido mediante análisis espectral en un régimen de movimiento rápido-lento, se obtiene para casos en los que el mecanismo de relajación se debe a la difusión rotacional de la sonda. En general, el análisis de τ (un aumento se corresponde con un descenso en la movilidad de la sonda) informa sobre la interacción de la sonda con las superficies dendríticas, o las interacciones de los dendrimeros con otras especies (ej. biomoléculas, surfactantes, etc.).
- ✓ Los parámetros relacionados con el **acoplamiento espín-espín y/o interacciones de intercambio** (p. ej., la frecuencia de intercambio) son relevantes cuando las especies paramagnéticas se aproximan entre sí debido a una gran densidad en una posición determinada del dendrímtero.

El estudio mediante RSE de los dendrímeros sulfonato **37-39** y carboxilato **41, 43** y **45** permitió caracterizar su capacidad de coordinación, su dinámica y su estructura. Se realizó un análisis experimental-simulado a 298 y 150 K, utilizando cantidades crecientes de Cu^{2+} como sonda. Los espectros se analizaron utilizando los programas NLSL, SimFonia y CU3XP (*Cap. 4*), y los parámetros se interpretaron por comparación con estudios donde los análisis RSE se llevaron a cabo por una aproximación similar.⁷⁵⁻⁷⁸

Los dendrímeros se disolvieron en agua a una concentración de 0.1 M en grupos terminales, obteniendo disoluciones de concentración 12.5 mM (G_1 , 8 grupos superficiales), 6.25 mM (G_2 , 16 grupos) and 3.12 mM (G_3 , 32 grupos), mientras que la concentración de Cu^{2+} se varió en dos rangos diferentes:

- 1) *Análisis a baja concentración de Cu(II)* (2.5-30 mM), que permite corroborar la especificidad del primer equivalente de cobre en el núcleo del dendrímero observada previamente mediante espectrofotometría UV-Vis.
- 2) *Análisis a alta concentración de Cu(II)* (25–250 mM), que permite comprobar si existe un patrón de coordinación concreto en los dendrímeros en un amplio rango de concentraciones de cobre.

1) Análisis RSE a baja concentración de Cu(II) (2.5-30 mM)

Para dendrímeros carboxilato, cuando $[\text{Cu}^{2+}]$ es 2.5 mM, los espectros a 298 K están constituidos por dos componentes: *Señal I* y *Señal II* (*Fig. 2.24.A*). La ***Señal I***, cuyos parámetros están de acuerdo con una fuerte coordinación con átomos de nitrógeno (CuN_2O_2 o CuN_3O),^{68, 77} es la única componente tanto a 298 K como a 150 K para $G_1\text{C}$ (**41**) a una proporción 1:0.2 (*Fig. 2.25.A*). Esta componente desciende en intensidad relativa especialmente al pasar de G_1 a G_2 , pero también de G_2 a G_3 , debido a las propiedades estructurales de cada dendrímero. Para $G_1\text{C}$ (**41**), el espectro muestra la misma forma de línea a las distintas concentraciones de cobre (*Fig. 2.24.B*), pero la intensidad aumenta

proporcionalmente hasta alcanzar 0.8 eq. de cobre. A partir de 15 mM (1.2 eq.), esta componente deja de aumentar, al contrario que la segunda componente (*Señal II*). Este resultado se encuentra de acuerdo con la interacción del primer equivalente (alcanzado a 12.5 mM) de Cu^{2+} en el núcleo (*Pos. 1, Fig. 2.21*), y la coordinación de los siguientes equivalentes en la periferia del dendrímtero.

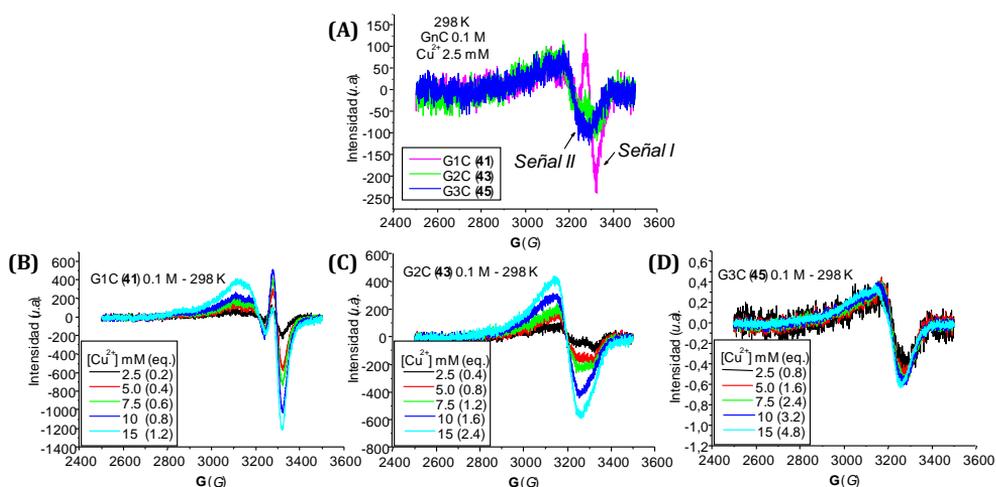


Figura 2.24 Espectros RSE experimentales a 298 K. (A) Componentes I y II de los dendrimeros carboxilato a $[\text{Cu}^{2+}] = 2.5 \text{ mM}$. (B-D) Valoración con cantidades crecientes de cobre de G_nC .

La *Señal II*, cuyos parámetros indican una coordinación de tipo CuNO_3 ,⁷⁷ (relacionada con la *Posición 3*, Fig. 2.21) aparece en una alta concentración relativa. Al pasar de G_1C a G_2C , la *Señal I* desaparece parcialmente mientras que la *Señal II* permanece invariable (Fig. 2.25.B). Este efecto puede deberse a la localización de más de un ión Cu^{2+} en cavidades próximas al núcleo de G_2C (43), de modo que sin hallar repulsión, se den fuertes interacciones de intercambio espín-espín y una consecuente disminución en la intensidad de la *Señal I*. De acuerdo con esta hipótesis, se observa un incremento no lineal de la intensidad de dicha *Señal I* al aumentar la concentración de cobre (Fig. 2.24.C), que se detiene alrededor 7.5 mM (1.2 eq.) y deja de ser distinguible a 10 mM (1.6 eq.), en línea con la saturación del núcleo del dendrímtero (*Pos. 1, Fig. 2.21*).

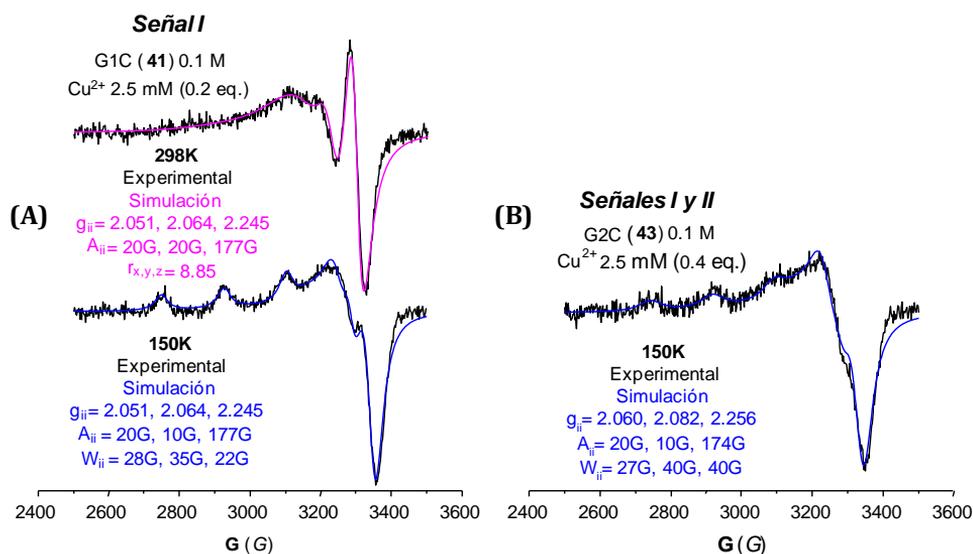


Figura 2.25 Espectros RSE experimentales y simulados, (a) *Señal I* en G₁C (41), a 298 y 150 K, (b) *Señales I y II* en G₂C (43) a 150 K.

G₁C (41) presenta una estructura abierta y ramas móviles, lo que favorece una coordinación plano cuadrada menos distorsionada de los iones. El aumento de la generación en G₂C (43) supone una disminución en la movilidad de la *Señal I* a t.a. y una variación en los parámetros del espectro a baja temperatura (única componente con menor A_{zz} y mayor g_{zz}), lo que indica una coordinación más débil (o simplemente más distorsionada) con los átomos de nitrógeno. La primera componente se ensancha como consecuencia de interacciones espín-espín y llega a enmascarar a la segunda. La situación para G₃C (45) se encuentra en esta misma línea: A pesar de presentar mayor espacio interno, el núcleo es menos accesible, y se ve un porcentaje aún mayor de la *Señal II*. La primera componente ha desaparecido ampliamente por interacciones espín-espín, y la forma de la línea apenas varía al aumentar la concentración de cobre. La intensidad aumenta linealmente hasta un proporción 1:2.4, y a partir de este punto permanece invariable.

Debido a que, en general, un incremento en g_{xx} refleja una coordinación más débil con los nitrógenos,⁷⁷ es interesante monitorizar la variación del parámetro Hg_{xx} (mínimo de campo alto del espectro a baja temperatura), que sigue la tendencia inversa del valor g_{xx} de la componente principal (Fig. 2.26.A).

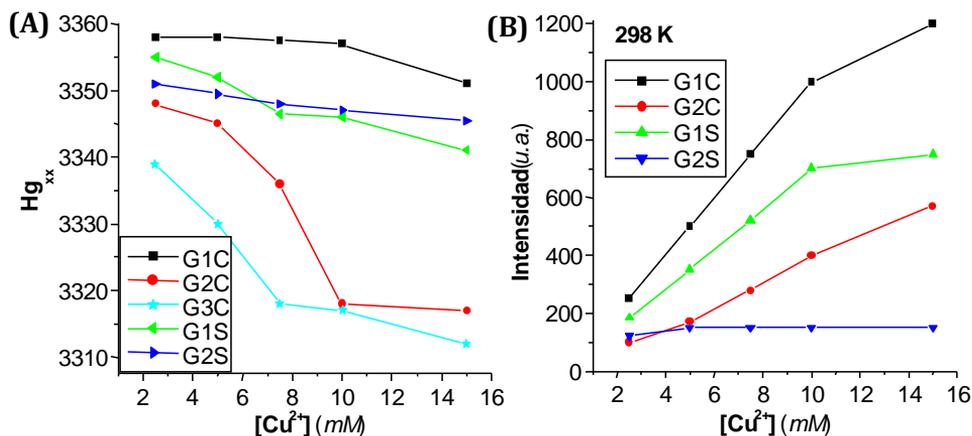


Figura 2.26 Comparativa de la variación, al aumentar la concentración de cobre: (A) Del parámetro Hg_{xx} . (B) De la intensidad de señal, para los distintos dendrimeros.

Para una misma concentración de Cu(II), Hg_{xx} varía según $G_1C > G_2C > G_3C$, y al aumentar dicha concentración, existe un punto de inflexión en dicha tendencia, a partir del cual existe un descenso acusado. Dicho punto de inflexión se alcanza en el rango 10-15 mM (0.8-1.2 eq.) para G_1C , 5-7.5 mM (0.8-1.2 eq.) para G_2C y 2.5-5 mM (0.8-1.6 eq.) para G_3C , de acuerdo con la saturación del núcleo, alrededor del primer equivalente de cobre (Pos. 1, Fig. 2.21). Estos valores de Hg_{xx} , junto con los parámetros magnéticos, reflejan las distintas habilidades de interacción de los dendrimeros de distintas generaciones, debido a su diferente espacio interno, flexibilidad de las ramas y disponibilidad de los nitrógenos en el núcleo. Estas interacciones son posibles debido a la interacción relativamente débil del Cu(II) con los grupos carboxilato. De hecho, sólo cuando los nitrógenos son ocupados casi en su totalidad, los grupos carboxilato participan en la complejación junto a moléculas de disolvente.

En el caso de los dendrímeros sulfonato, a temperatura ambiente el espectro de G₁S (**37**) está formado por dos componentes, una de baja movilidad (*Señal I*, con coordinación de tipo CuN₂O₂, relacionada con la *Posición 1* de la Figura 2.21) y otra ancha sin resolver (*Señal II*, con coordinación de tipo CuNO₃, relacionada con la *Posición 3*). De sus porcentajes relativos a 298 K (Fig. 2.27.A) y su simulación a 150 K (Fig. 2.27.B), se deduce que a t.a. la *Señal I* disminuye en intensidad relativa, alcanzando una meseta alrededor de 12.5 mM (primer equivalente de Cu(II)). Este comportamiento concuerda de nuevo con la saturación del núcleo dendrítico a una proporción 1:1, y la posterior coordinación periférica de los siguientes equivalentes de cobre.

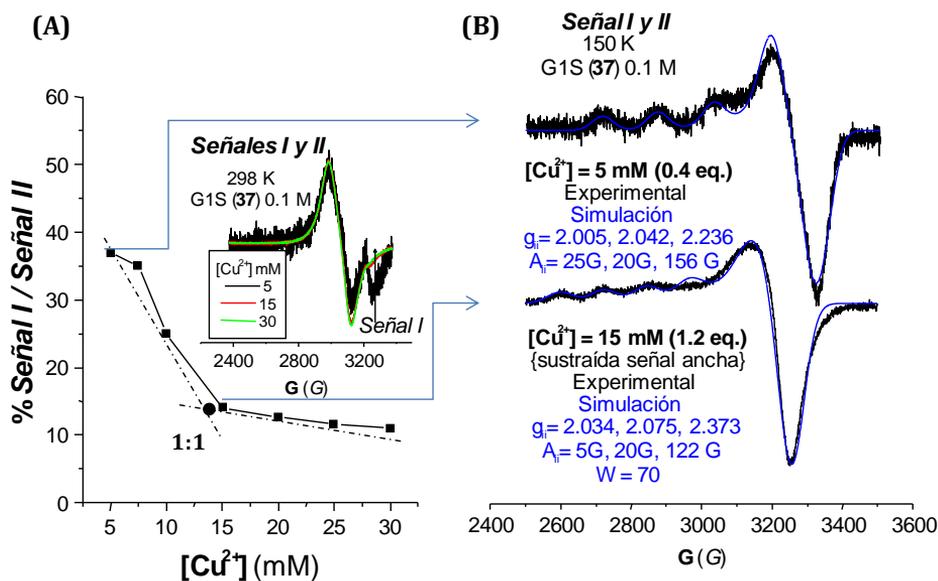


Figura 2.27 *Señales I y II* en G₁S (**37**). (A) 298 K, % *Señal I/Señal II* al aumentar [Cu²⁺] y espectros experimentales. (B) 150 K, espectros experimentales y simulados.

El estudio a distintas concentraciones de cobre para los dendrímeros sulfonato se realizó principalmente por comparación con sus análogos carboxilato (Fig. 2.28). La mayor interacción de Cu(II) con -SO₃⁻ en comparación con -CO₂⁻, se observa por ejemplo a 10 mM, donde la interacción Cu-N es más débil en G₁S que en G₁C (la última línea hiperfina se desplaza a la izquierda (Fig.

2.28.D), y los valores de $H_{g_{xx}}$ son menores (Fig. 2.26.A)). De G_1S a G_2S la variación es similar pero menor a la descrita de G_1C a G_2C . En cuanto a la variación de la intensidad al aumentar $[Cu^{2+}]$ (Fig. 2.26.B), en dendrimeros sulfonato ocurre lo contrario de lo esperado, ya que al aumentar la generación aparece un descenso de la intensidad correlacionado con la formación de complejos de cobre diméricos al interaccionar con grupos sulfonato próximos.⁷³

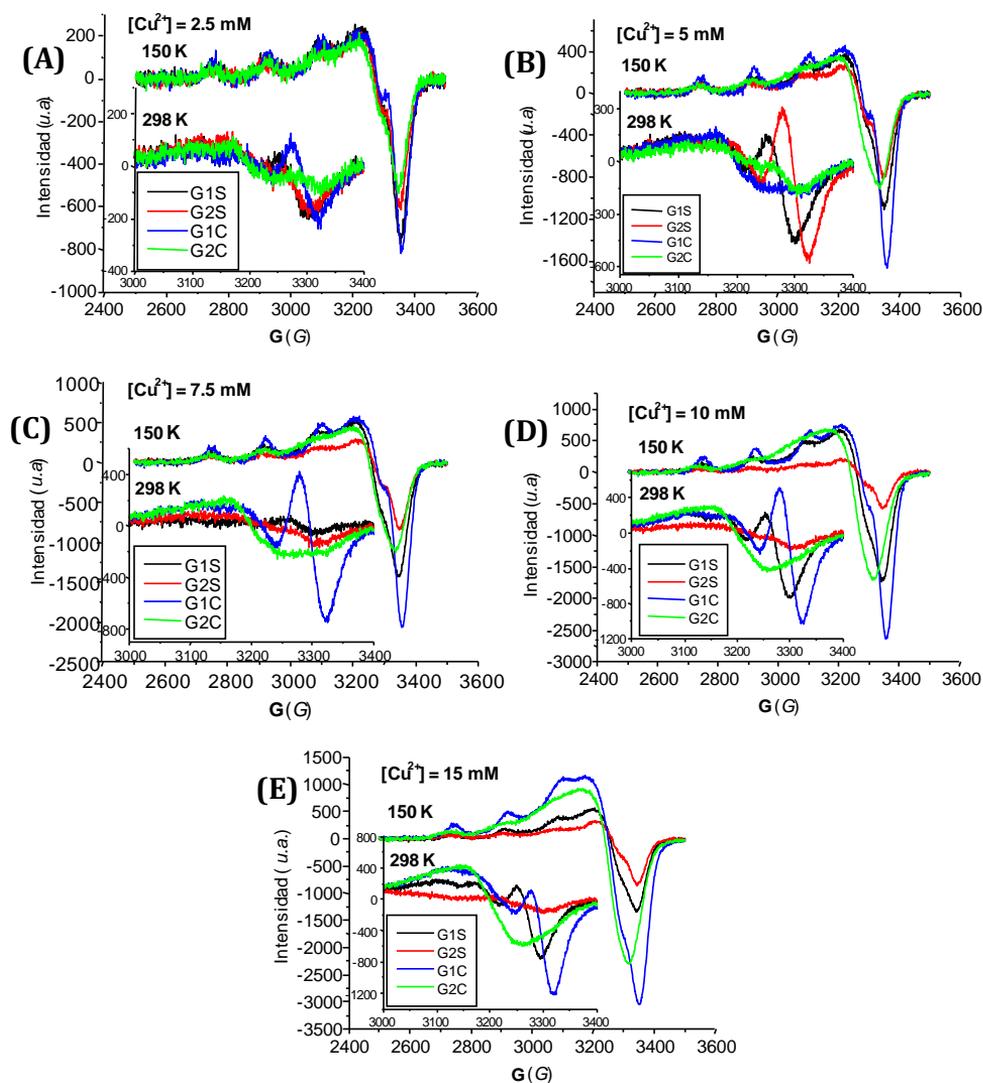


Figura 2.28 Comparativa de los espectros RSE experimentales a 298 K y 150 K, a las distintas concentraciones de cobre analizadas, para los dendrimeros G_1S , G_2S , G_1C y G_2C .

2) Análisis RSE a alta concentración de Cu(II) (25-250 mM)

Para los dendrímeros carboxilato **41**, **43** y **45**, los espectros experimentales (normalizados en altura) a 298 y 150 K, con cantidades crecientes de Cu(II), se muestran en la Figura 2.29, mientras que las simulaciones de ciertos espectros significativos se presentan en la Figura 2.30.

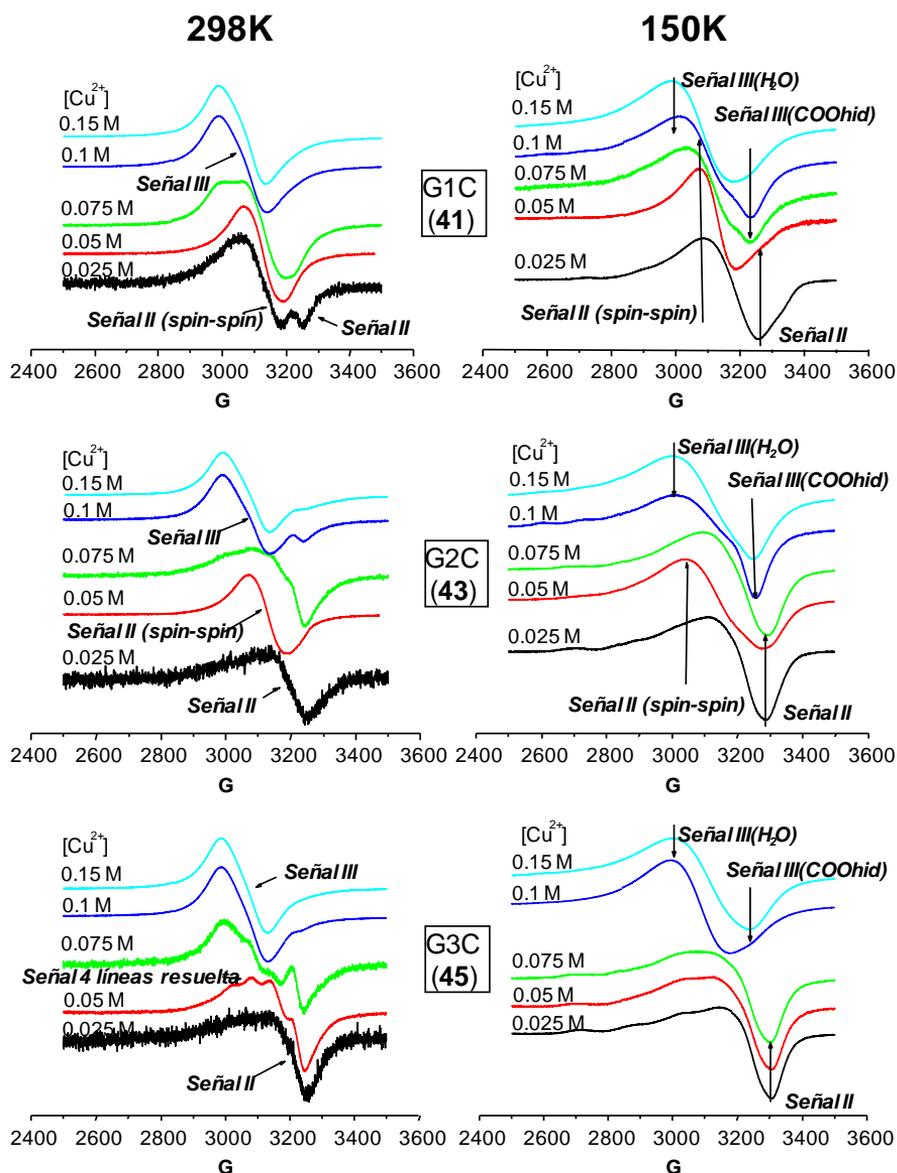


Figura 2.29 Espectros RSE experimentales de dendrímeros GnC, a 298 K (izquierda) y 150 K (derecha), con cantidades crecientes de cobre.

La **Señal II** indica de nuevo una coordinación CuNO_3 y condiciones de baja movilidad a t.a. ($\tau=3$ ns) debido a su unión a ligandos externos.⁷³ Esta señal es la única componente a 298 y 150 K en G_3C (**45**) a una proporción 1:8 (Fig. 2.29.A) y en G_2C (**43**) a 1:4, mientras que para G_1C (**41**) a una proporción 1:2, se superpone además otra señal estrecha de línea única (*Señal II (espín-espín)*).

Esta **Señal II (espín-espín)**, que es la única que permanece en G_1C (**41**) a una proporción 1:4 (Fig. 2.30.B) y en G_2C (**43**) a 1:8, surge de las fuertes interacciones espín-espín que se dan durante la progresiva ocupación con Cu^{2+} de los grupos vecinos de la superficie. Estas interacciones conducen primero a un ensanchamiento de la línea, después a un intercambio del estrechamiento (medido por la frecuencia de intercambio W_{ex}), y finalmente, a la desaparición del espectro. Este razonamiento está de acuerdo con el inesperado descenso en la intensidad absoluta de los espectros entre 50-75 mM (8-12 eq.) y el gran ruido presente en los espectros a t.a. a $[\text{Cu}^{2+}] = 75$ mM (Fig. 2.29).

La **Señal resuelta de 4 líneas** (Fig. 2.30.B), con los mismos parámetros g_{ii} y A_{ii} que la *Señal II* pero menor tiempo τ , muestra cómo los iones forman complejos CuNO_3 más móviles a t.a. al aumentar $[\text{Cu(II)}]$ (a 150 K los espectros son iguales). Esta señal aparece, en G_1C (**41**), de la resta de los espectros a t.a. a 50 y 25 mM, y en generaciones mayores mediante la resta de la *Señal II*.

La **Señal III** (Fig. 2.30.C), que surge de una coordinación CuO_4 (menor A_{zz} y mayor g_{zz} respecto a *Señal II*),⁷⁷ aparece a las mayores concentraciones de cobre, donde los grupos externos están ya ocupados por iones, y es idéntica para todas las generaciones. A 150 K, esta señal se desdobra en **Señal III (H_2O)** (línea ancha sin resolver) y **Señal III (COO_{hid})**, diferencia sólo apreciable a 150 K (a t.a. las anisotropías son promediadas) ya que la coordinación con moléculas de agua situadas en los grupos periféricos COO^- fuerza la estructura del complejo Cu-agua a ser más homogéneo y definido como una geometría plano cuadrada.

A estas concentraciones, las señales dependen de la estructura del dendrímero, que determina un compromiso entre dos tendencias opuestas: al aumentar la generación, el espacio interno y el número de ramas por macromolécula se incrementan (favoreciendo la coordinación CuNO_3), mientras que la flexibilidad de las ramas disminuye y aumenta la constricción (favoreciendo la coordinación CuO_4).

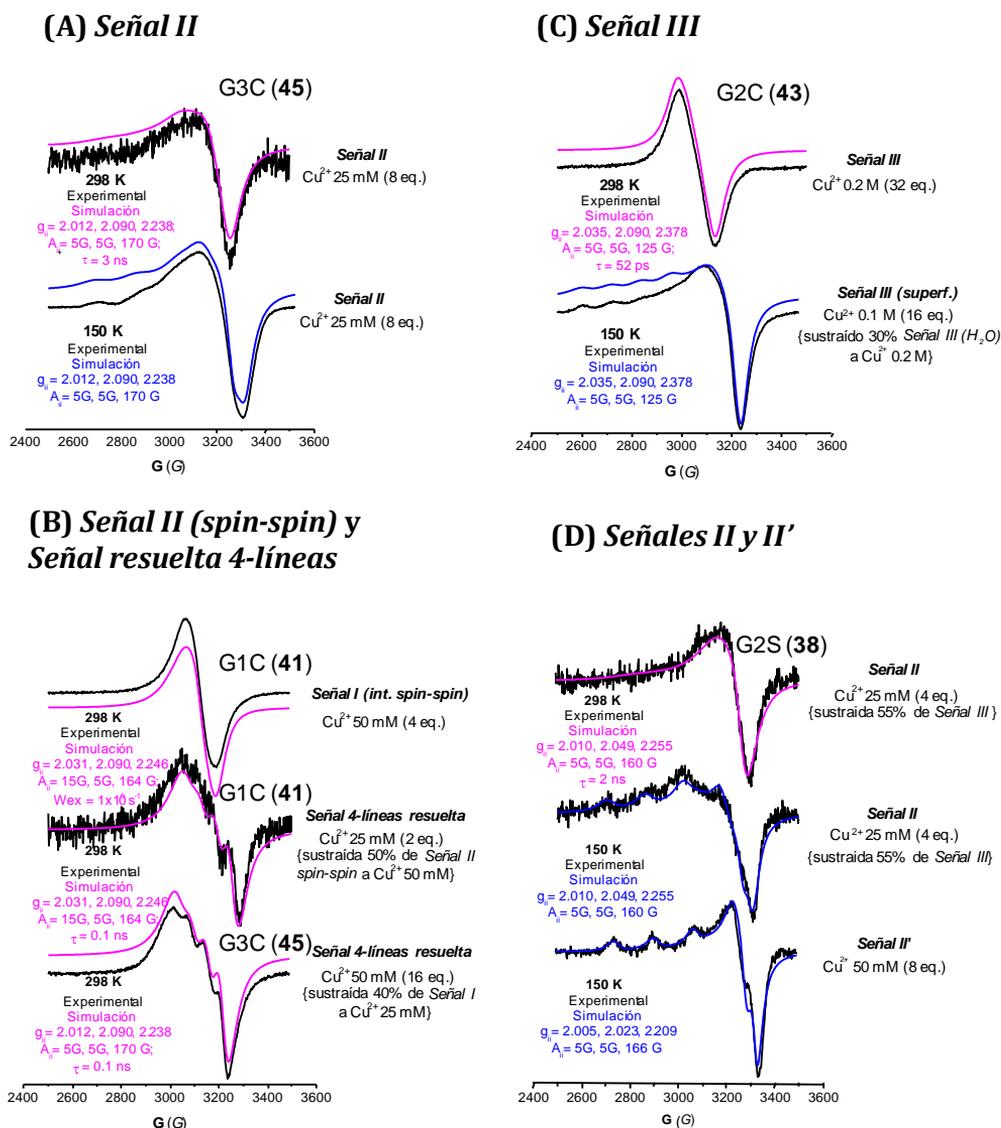


Figura 2.30 Espectros RSE experimentales y simulados para calcular: (A) Señal II. (B) Señal II (espín-espín) vs Señal 4 líneas resuelta. (C) Señal III. (D) Señal II vs Señal II'.

El análisis de los espectros RSE de los dendrimeros sulfonato se realiza tomando como base el expuesto para los sistemas carboxilato. Los espectros experimentales (normalizados en altura) a 298 y 150 K se muestran en la Figura 2.31 con cantidades crecientes de Cu(II).

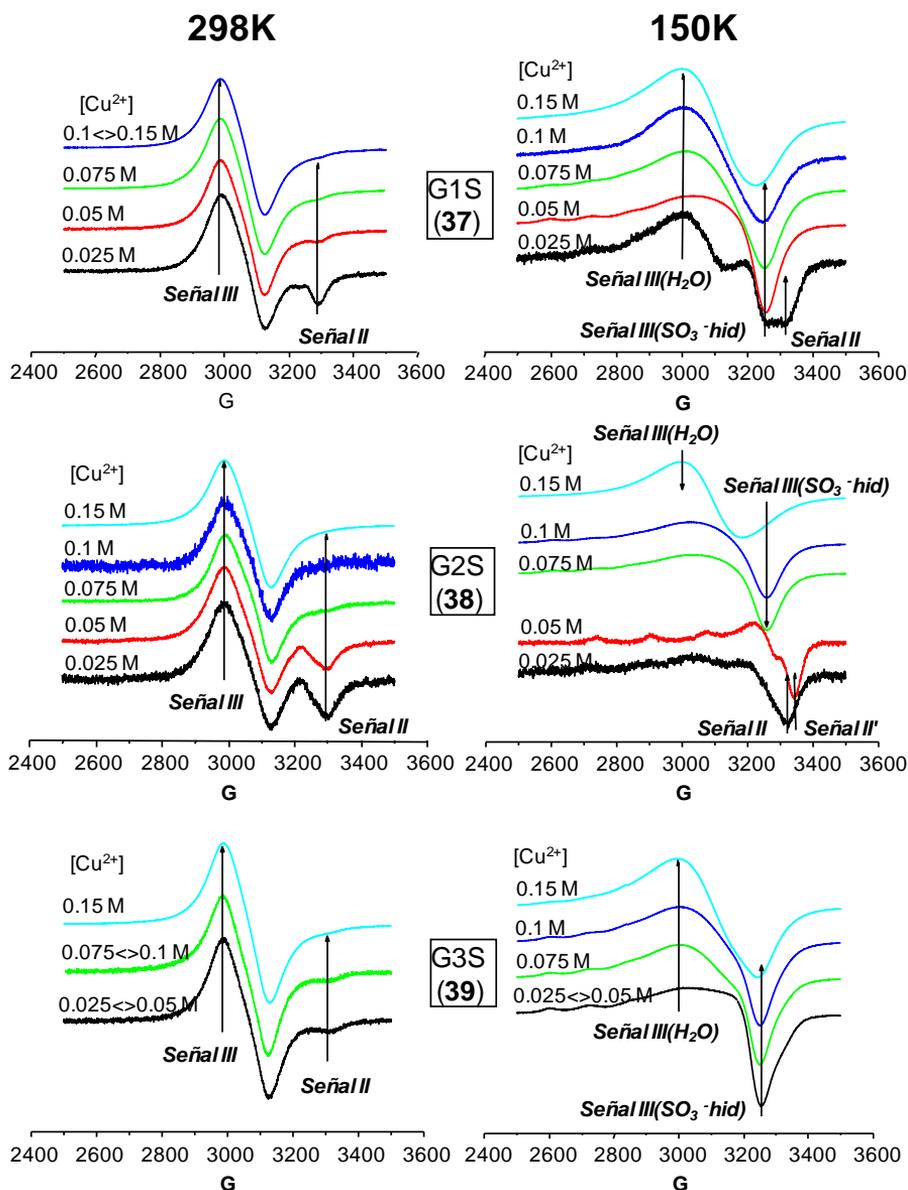


Figura 2.31 Espectros RSE de dendrimeros sulfonato, a 298 K y 150 K, con cantidades crecientes de cobre.

A temperatura ambiente, los espectros solo muestran dos componentes: “*Señal II*” y “*Señal III*” (Fig. 2.31). En comparación con los sistemas carboxilato, se observa una mayor prevalencia de la *Señal III* respecto a la *Señal II*, y la ausencia de la *Señal II (espín-espín)* y la *Señal resuelta de 4 líneas*. Además, mientras que la *Señal III* es la misma para ambos sistemas, la *Señal II* revela rasgos similares pero parámetros magnéticos y de movilidad distintos (Fig. 2.30.A,D). Estos resultados se encuentran de acuerdo con la interacción más débil de Cu(II) con el nitrógeno y más fuerte con los oxígenos de los grupos SO_3^- .

En la línea de los resultados descritos para dendrímeros carboxilato, también en el caso de los derivados sulfonato el dendrímero de segunda generación **38** muestra un cantidad relativa *Señal II / Señal III* incrementada, debido al aumento del espacio interno y el número de ramas, que prevalece sobre la constricción, mientras que para el de tercera generación **39** ocurre lo contrario y los iones están casi impedidos para alcanzar los nitrógenos.

A baja temperatura, la *Señal II* fue simulada con los mismos parámetros magnéticos hallados a t.a. (Fig. 2.30.D). Sin embargo, todos los espectros a menores concentraciones (25 y 50 mM) muestran una contribución pequeña pero cuantificable de una señal que es la única que contribuye al espectro de G_2S (**38**) a 50 mM (8 eq.). Los parámetros magnéticos de esta *Señal II'*, con mayor A_{zz} y menor g_{zz} , indican una interacción más fuerte con el nitrógeno periférico en una estructura más plano cuadrada.

También de acuerdo con la interacción más fuerte de Cu(II) con los grupos SO_3^- respecto a los CO_2^- , a 150 K prevalece la *Señal III (SO_3^- hid)*, apareciendo la *Señal III (H_2O)* sólo a las concentraciones de cobre más altas. Sin embargo, de nuevo en línea con lo discutido previamente, para G_2S (**38**) la *Señal III (H_2O)* solo aparece a concentraciones de Cu^{2+} mayores de 0.1 M (16 eq.), mientras que para G_1S y G_3S empieza a aparecer a concentraciones menores.

Para resumir las contribuciones relativas de las *Señales II* y *III* comentadas anteriormente, la gráfica en la Figura 2.32 indica la variación de sus porcentajes relativos, obtenidos del análisis de los espectros a t.a.

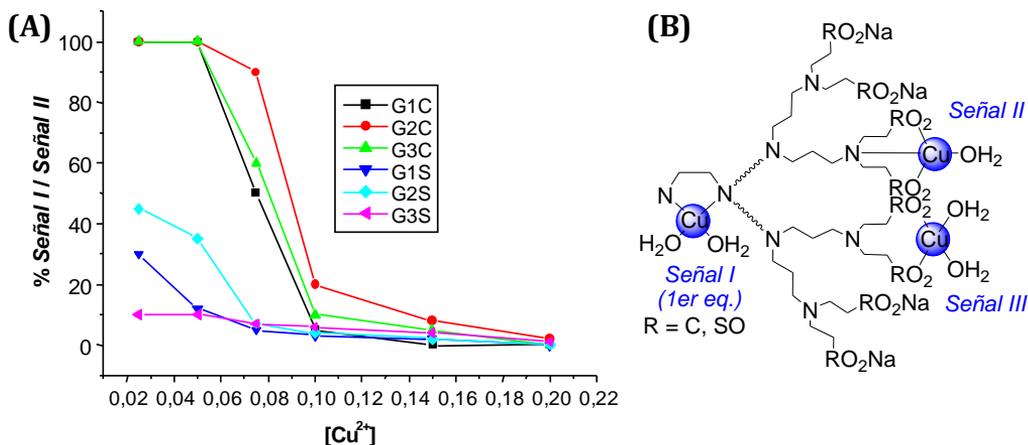


Figura 2.32 A) % Señal II/Señal III para los distintos dendrimeros a cantidades crecientes de cobre; B) Modelo de coordinación de los iones metálicos en la estructura dendrítica, correspondiente a las *Señales I, II y III*.

El estudio conjunto mediante espectrofotometría UV-Vis y RSE nos permite concluir que estos dendrimeros presentan un patrón específico en la coordinación de iones metálicos. A las concentraciones más pequeñas de $Cu(II)$, hasta una proporción 1:1, los espectros son dominados por una señal que surge de la coordinación CuN_2O_2 en el núcleo del dendrímero (*Posición 1*). A mayores concentraciones, los espectros sugieren una localización periférica de los iones, con coordinación plano-cuadrada $CuNO_3$ (*Posición 3*, descartando la *Posición 2*) y luego CuO_4 a las concentraciones más altas probadas. Además, y tal y como se esperaba, existen diferencias notables entre los sistemas con grupos terminales carboxilato o sulfonato, observándose una interacción más débil por el nitrógeno y más fuerte por los oxígenos terminales, en el caso de los dendrimeros con grupos sulfonato, y a la inversa en el caso de los sistemas con grupos carboxilato.

2.3.3.b. Metalodendrimeros heterometálicos

La especificidad observada en el proceso de coordinación de iones metálicos en la estructura dendrítica permite generar derivados con distintos metales en posiciones controladas. A modo de ejemplo, y dada la facilidad de distinción entre los diferentes puntos de coordinación del dendrímero G_1 -eda- $(CO_2Na)_8$ (**41**), se estudió la posibilidad de coordinar distintos metales (Cu(II) y Co(II)) mediante adiciones seriadas a través de espectrofotometría UV-Vis.

La coordinación de 1 eq. de Cu^{2+} al dendrímero **41** produce sus bandas características alrededor de 298 y 660 nm debido a la coordinación en el núcleo (Fig. 2.33). Posteriormente, se adicionaron 4 eq. de Co^{2+} . El espectro UV-Vis reveló el mantenimiento del Cu(II) en el núcleo (el desplazamiento a la periferia supondría la aparición de la banda característica a 258 nm debida a la coordinación de los grupos carboxilato al cobre) y la coordinación de los iones Co(II) en la periferia del dendrímero, al observarse la aparición de hombros con coeficiente de extinción pequeño, a 250 y 325 nm (LMCT), 503 (${}^4T_{1g}(F) \rightarrow {}^4T_{1g}(P)$) y 715 (${}^4T_{1g}(F) \rightarrow {}^4A_{2g}(F)$), máximos calculados mediante la resta de espectros, y que están de acuerdo con los complejos análogos G_0 .⁷⁰

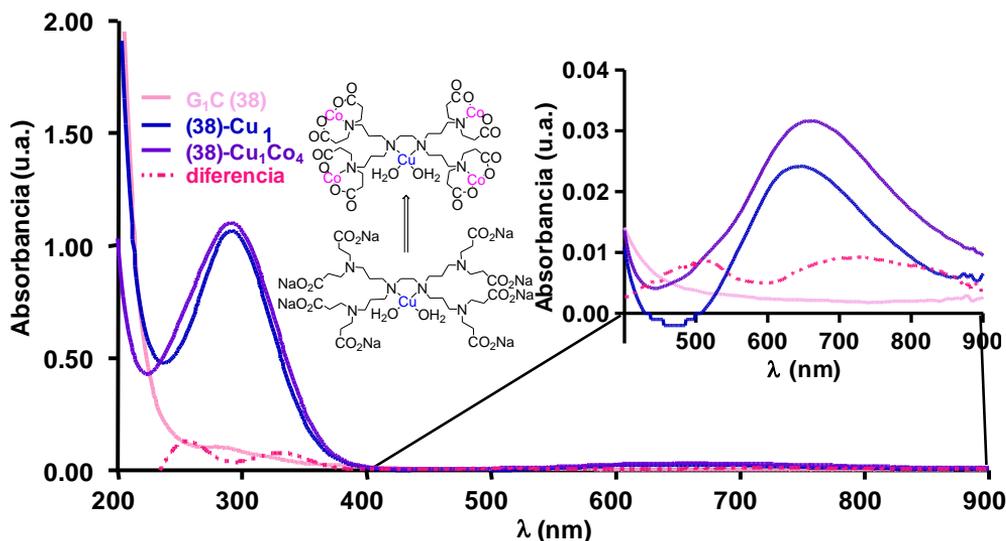


Figura 2.33 Espectro UV-Vis del metalodendrimer heterometálico (**41**)- Cu_1Co_4 .

2.3.3.c. Conclusiones del apartado

De acuerdo con los estudios mediante espectrofotometría UV-Vis y RSE de los sistemas homo y heterometálicos, hemos demostrado que tanto el esqueleto dendrítico como los grupos terminales juegan un importante papel en la habilidad coordinativa de los dendrimeros, exhibiendo nuestros dendrimeros PPI aniónicos interesantes diferencias en comparación con estructuras dendríticas similares.

En relación al esqueleto dendrítico, el comportamiento de nuestros dendrimeros es más cercano al de PAMAM G_{1.5}-CO₂Na⁷⁶ que al del dendrímoro POSS-CO₂Na sintetizado por Naka.⁷⁹ De acuerdo con estudios espectrofotométricos y calorimétricos, los posibles modos de coordinación en el dendrímoro PAMAM son CuN₄ y CuN₂O₂ dependiendo de la proporción Cu²⁺-dendrímoro, mientras que solo los complejos CuN₂O₂ pueden formarse para el dendrímoro POSS, cuya disposición nuclear provoca la disminución en la movilidad de las ramas. Otros estudios con generaciones pequeñas de dendrimeros PAMAM-CO₂Na⁷⁹ tipo *starburst* (con núcleo de nitrógeno trivalente) mostraron la prevalencia de la señal RSE debido a coordinación CuN₂O₂ a pH intermedio. Sin embargo, nosotros hemos observado que nuestros dendrimeros PPI presentan una preferencia por CuNO₃ (*Posición 3*) probablemente debido a una estructura más abierta que desfavorece la coordinación del mismo ión metálico entre dos ramas (descartando por tanto la *Posición 2*).

El esqueleto poliamino amplifica la habilidad coordinativa de nuestros dendrimeros, en comparación con los análogos con esqueleto carbosilano previamente sintetizados en nuestro grupo.⁷³ Además, los iones Cu(II) pueden incluirse en las cavidades del dendrímoro y en la superficie de una manera controlada, y los productos finales son solubles hasta concentraciones muy elevadas de cobre.

El papel de los grupos periféricos es tan importante como el del esqueleto dendrítico. Existen estudios sobre la coordinación de Cu(II) en dendrímeros PAMAM⁸⁰ con núcleo EDA y diferentes grupos terminales (aminas primarias, ácido succinámico, glicidol y acetamida). Los resultados conjuntos de la unión de protones y metales ponen de manifiesto que la coordinación de Cu(II) en estos dendrímeros implica tanto a las aminas terciarias como a los grupos terminales, pero que el grado de protonación controla la habilidad de los dendrímeros para unir Cu(II). Ottaviani *y col.* han realizado estudios de RSE^{76,77} en dendrímeros PAMAM tipo *starburst* nSBD-NH₂ (n = 3, 5 y 7), demostrando que las mezclas 1:1 con Cu(II) por encima de pH = 6 se unen exclusivamente al exterior de la estructura dendrítica, aparentemente debido a la gran basicidad y accesibilidad de las aminas terminales; además, demostró que los núcleos dendríticos de las generaciones menores pueden atrapar una cantidad significativa de agua, que pueden también coordinar alrededor de un 20% de Cu(II) inespecíficamente. Por el contrario, nosotros hemos establecido que el primer equivalente de Cu(II) se coordina en el núcleo de nuestros dendrímeros PPI aniónicos, quelados de manera específica por el puente etilendiamina (*Posición 1*); la contribución de las moléculas de agua unidas a la estructura dendrítica es más importante al aumentar la concentración de cobre, y de acuerdo con los resultados de dendrímeros PAMAM,^{77, 81} sirven como agentes quelantes de alta capacidad para iones metálicos.

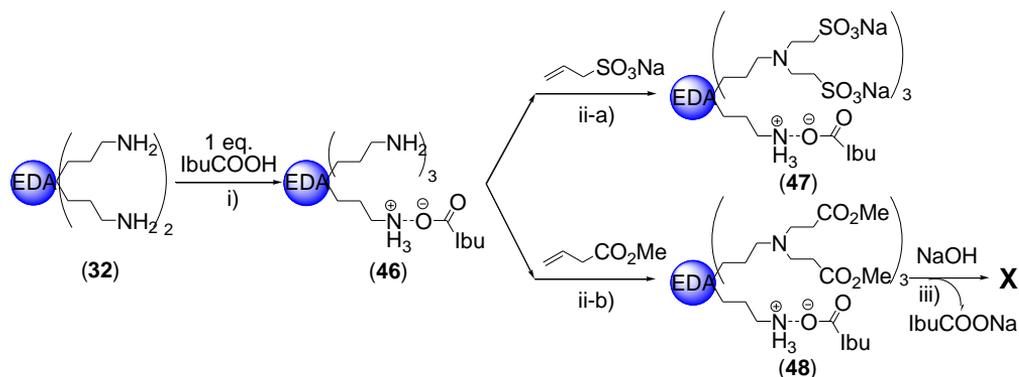
2.4. DENDRÍMEROS ANIÓNICOS DE NATURALEZA POLIPROPILENIMINA PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATORIOS

Los dendrimeros G_n -eda-(NH₂)_m (**32**, **34** y **36**) podrían considerarse como potenciales transportadores de fármacos, debido a la capacidad de unión de los mismos a través de sus grupos terminales. Para corroborar esta hipótesis, se realizó un estudio tomando como modelos el dendrimer G_1 -eda-(NH₂)₄ (**32**) y el fármaco ibuprofeno (Ibu-COOH), debido a su sencillo seguimiento mediante RMN. El anclaje del ibuprofeno al sistema **32** se realizó mediante (a) interacción electrostática, (b) enlace covalente amido y (c) espaciador disulfuro, y se evaluó la estabilidad de los conjugados al incorporar grupos aniónicos en la periferia del sistema, que le den propiedades inhibitorias frente a la infección por VIH.

El proceso de conjugación de ibuprofeno a los dendrimeros se siguió mediante RMN, especialmente a través de estudios de difusión DOSY-2D que permitieron determinar la unión de los espaciadores o el fármaco al dendrimer, mediante la separación de los distintos componentes de la mezcla en función de sus diferentes coeficientes de difusión traslacional. La formación del conjugado implica la existencia de un único valor de coeficiente de difusión.

2.4.1. Conjugación mediante interacción electrostática

El dendrimer de primera generación **32** cumple los requisitos estructurales para transportar fármacos aniónicos mediante interacción electrostática, como es el caso del ibuprofeno. La reacción de G_1 -eda-(NH₂)₄ (**32**) con un equivalente de IbuCOOH (*Esq. 2.7*), en MeOH durante 24 h a t.a., da lugar al conjugado **46**. La interacción electrostática en **46** es la responsable de la solubilización del fármaco en medio acuoso (inicialmente insoluble en este disolvente), prueba evidente de la interacción del dendrimer con el fármaco.



Esquema 2.7 Reacción de conjugación de ibuprofeno al dendrímero **32** por interacciones electrostáticas y modificación química de la periferia. Condiciones de reacción: i) MeOH, 24 h, t.a. ii-a) H₂O:MeOH, 48 h, 120°C. ii-b) MeOH, 18 h, 60°C. iii) NaOH, MeOH, 18 h, t.a.

El estudio de la interacción fármaco-dendrímero se llevó a cabo mediante RMN-¹H en D₂O ya que, como se comentó anteriormente, el conjugado **46** es soluble en agua a diferencia del reactivo de partida IbuCOOH. En este disolvente, la protonación estadística de los grupos -NH₂ en el dendrímero **32** impide detectar un desplazamiento significativo de las señales terminales como consecuencia de la interacción electrostática del ibuprofeno en **46** (Fig. 2.34).

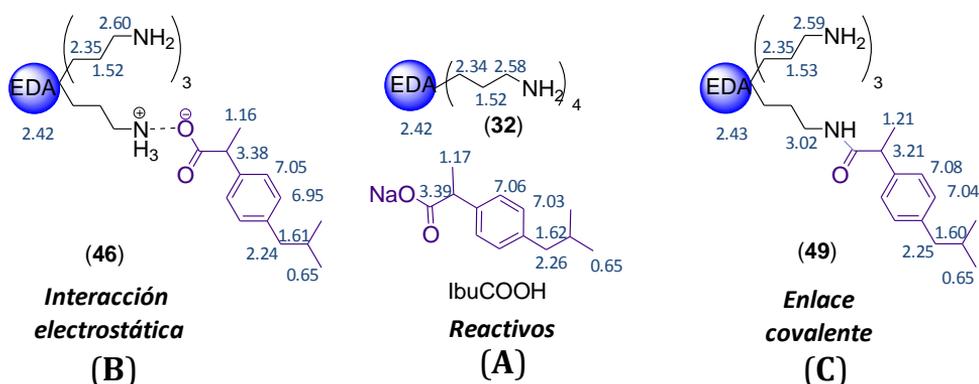


Figura 2.34 Valores de δ (ppm) en D₂O para los distintos conjugados con ibuprofeno. A) Reactivos: dendrímero G₁-eda-(NH₂)₄ (**32**) e ibuprofeno. B) Conjugado por interacción electrostática **46**. C) Conjugado mediante enlace amido **49**.

La estabilidad de este conjugado se puso de manifiesto al intentar incorporar grupos aniónicos sulfonato y carboxilato en su periferia, proceso evaluado mediante RMN-¹H (*Fig. 2.35*). La reacción de **46** con vinilsulfonato de sodio durante 48 h a 120°C conduce a la obtención del compuesto **47** (*Esq. 2.7*). La integración de las señales muestra la incorporación de 6 grupos sulfonato, lo que es indicativo de la existencia de un enlace -NH₃⁺---OOC-Ibu que impide la adición de Michael en esa rama. Las señales del espectro son muy similares a las del dendrímero G₁-eda-(SO₃Na)₈ (**37**), excepto la del grupo metileno -CH₂N(CH₂)₂SO₃Na (*d*) que se encuentra ligeramente desplazada a campo bajo y desdoblada en *d'*, señal que aparece englobada con el multiplete a 2.79 ppm y que se atribuye al grupo metileno -CH₂NH₃⁺.

De modo similar, la reacción del conjugado **46** con acrilato de metilo durante 18 h a 60°C produce el derivado **48**, observando la presencia del ibuprofeno y la incorporación de 6 grupos éster en el espectro (*Fig. 2.35*), y confirmando así la permanencia de un grupo amino como grupo amonio que impide la adición de Michael en todos los grupos -NH₂ terminales. De nuevo, las señales son similares a las de G₁-eda-(CO₂Me)₈ (**40**), aunque los grupos *c* y *d* se desdoblan en 1.55 (*c*) y 1.64 (*c'*), y 2.40 (*d*) y 2.46 (*d'*) ppm, como consecuencia de la interacción electrostática en una rama. El grupo CHCOO⁻ del ibuprofeno se desplaza además de 3.38 a 2.95 ppm. El espectro de RMN-¹³C confirma estos resultados. La posterior adición de NaOH en MeOH al derivado **48** forma la correspondiente sal sódica -CO₂Na, tal y como muestra el espectro RMN-¹H, pero además el cambio en el pH produce la ruptura de la interacción electrostática, liberando el fármaco. Se concluye que el conjugado con interacción electrostática es estable a altas temperaturas pero libera fácilmente el fármaco a determinados valores de pH, impidiendo la generación del conjugado carboxilato de interés.

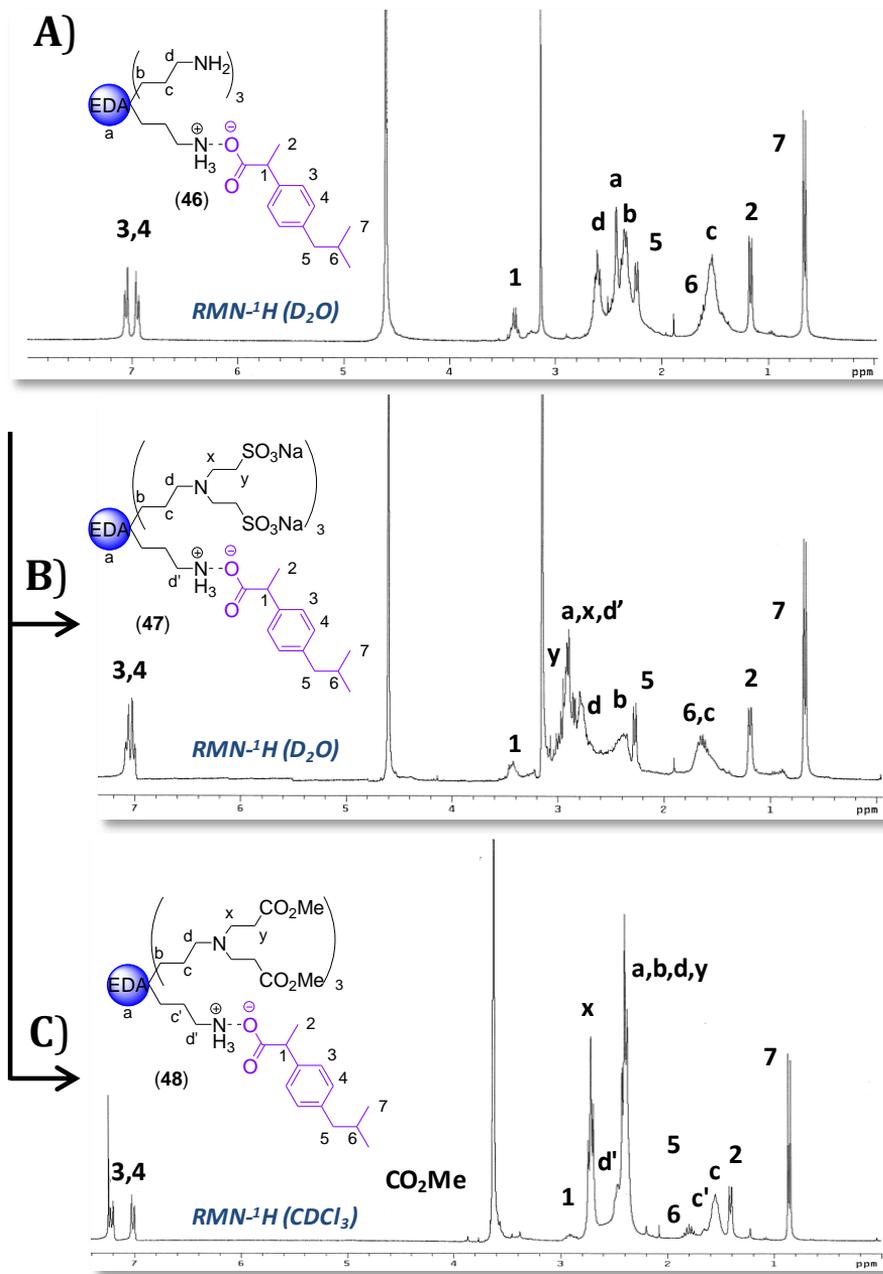
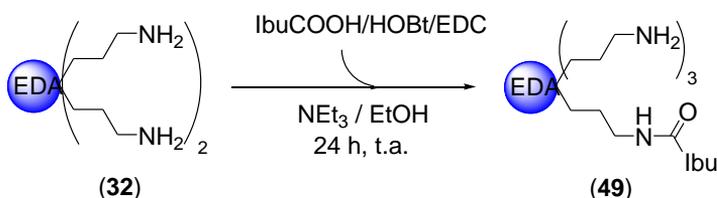


Figura 2.35 Seguimiento mediante RMN-¹H de la incorporación de grupos aniónicos en la periferia de **46**. A) Espectro del conjugado **46**. B) Espectro del dendrímero sulfonato **47**. C) Espectro del dendrímero metiléster **48**.

2.4.2. Conjugación mediante enlace covalente amido

Otra ruta para generar los compuestos de interés procede a través de la sustitución del enlace electrostático por uno covalente. El ibuprofeno presenta un grupo -COOH a través del cual puede anclarse a los grupos -NH₂ del dendrímero **32** por enlace amido. Para la generación de este enlace, se utilizan distintos agentes acoplantes como *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC/NHS, con *N*-hidroxisuccinimida) o hidrocloreuro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC/HOBt/NEt₃, con 1-hidroxibenzotriazol y trietilamina).⁸² La facilidad de purificación del producto mediante lavados sencillos a través del segundo método hace que sea el elegido.

La reacción de G₁-eda-(NH₂)₄ (**32**), en presencia de NEt₃, con el derivado activado IbuCOOH-EDC y utilizando como agente de transferencia HOBt (*Esq.* 2.8.), permite la incorporación del ibuprofeno al dendrímero. Un simple lavado con CHCl₃ conduce a la eliminación de los subproductos de la reacción.



Esquema 2.8 Acoplamiento de ibuprofeno al dendrímero **32** mediante enlace amido.

En este caso, los valores de δ (ppm, D₂O) en el espectro de RMN-¹H del conjugado **49** (*Fig.* 2.34) permanecen invariables respecto a los reactivos de partida, excepto los de los grupos metileno más próximos al enlace amido. Las señales correspondientes al fragmento -CH₂NHCOCH- se desplazan de 2.58 a 3.02 ppm (-CH₂NH) y de 3.39 a 3.21 ppm (COCH-) como consecuencia de esta unión. Además, un experimento DOSY-2D en D₂O (*Fig.* 2.36) confirma la unión del fármaco a la estructura dendrítica, al obtener un mismo coeficiente de difusión para las señales correspondientes al ibuprofeno y del dendrímero.

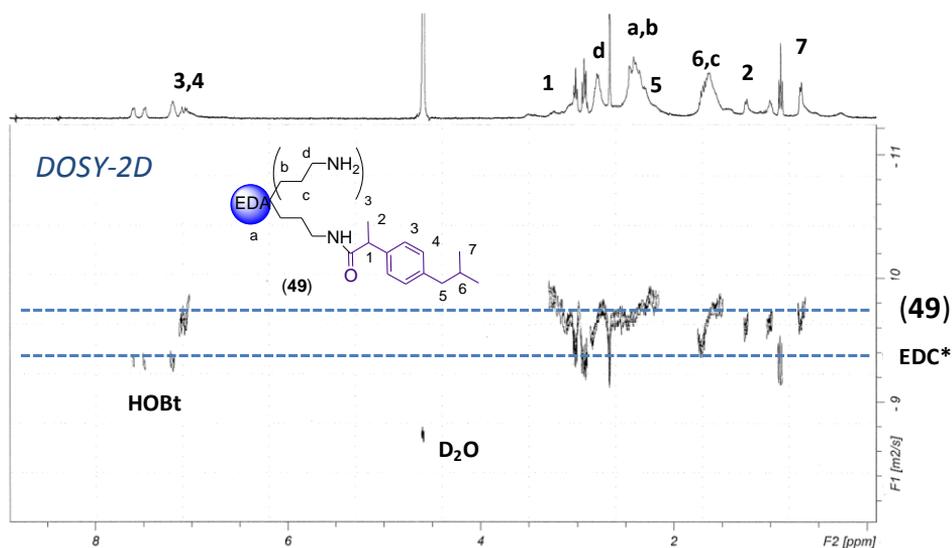
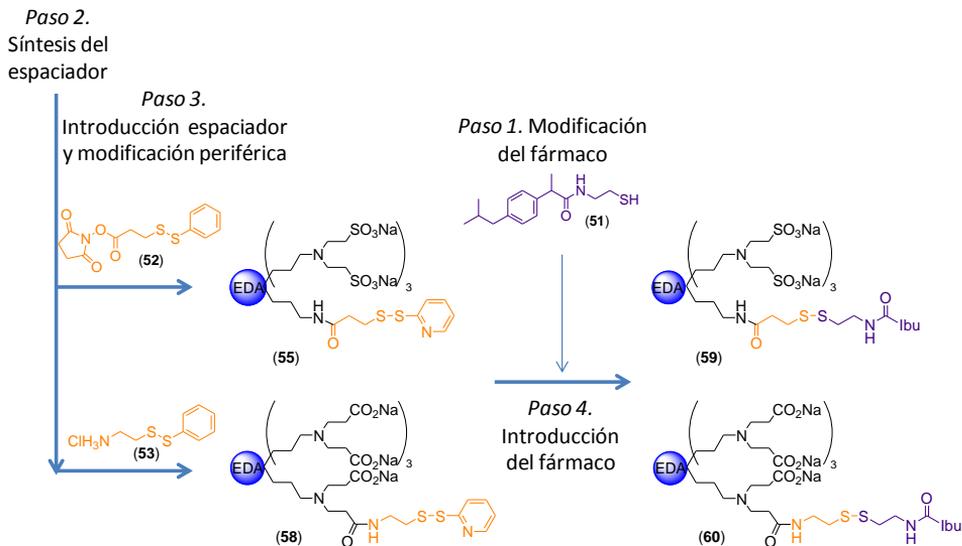


Figura 2.36 DOSY-2D en D₂O del conjugado **49**, registrado antes de su purificación. Las señales correspondientes al esqueleto dendrítico y al ibuprofeno presentan el mismo coeficiente de difusión, a diferencia del resto de productos en el medio (el agente acoplante transformado EDC* o el agente de transferencia HOBt).

La presencia del enlace amido permite por un lado la generación de los derivados aniónicos mediante las reacciones habituales, pero la liberación del fármaco debe realizarse mediante reacción de hidrólisis del mismo en función del pH de cada compartimento corporal, y por tanto, se trata de un proceso poco controlado. Este es el motivo por el que se decidió no proseguir con las reacciones de formación de los derivados aniónicos, y se recondujo la investigación hacia la posibilidad de anclaje del fármaco mediante un enlace covalente que permitiera una liberación más controlada, como se describirá en el apartado siguiente.

2.4.3. Conjugación mediante espaciador disulfuro

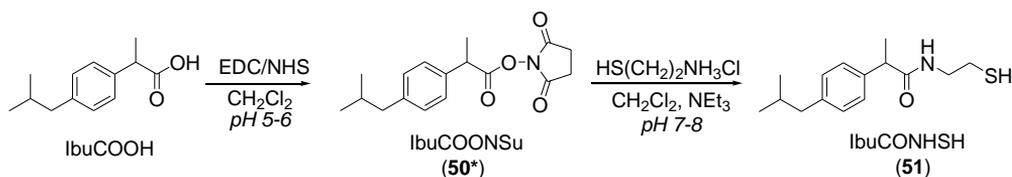
La búsqueda de una estrategia de anclaje del fármaco suficientemente fuerte como para transportar el fármaco hasta su punto de acción, pero suficientemente lábil como para liberarse en el momento adecuado, nos condujo hasta la formación de un enlace disulfuro, que permita la liberación controlada en ambientes reductores, como son ciertos entornos celulares. Algunos autores⁸³ han utilizado este método para anclar el fármaco al dendrímero a través del espaciador lábil *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP, *Esq. 2.9*). Este espaciador se ha utilizado para conjugar fármacos con grupos COOH a sistemas PAMAM-NH₂, o fármacos modificados con glutatión a dendrímeros PAMAM-COOH, procedimiento limitado al transporte de fármacos que presenten grupos -SH en su estructura. El interés por obtener un sistema dendrítico que permita transportar una gran variedad de fármacos, previa modificación química, nos condujo a la estrategia detallada en el Esquema 2.9.



Esquema 2.9 Procedimiento para la obtención de dendrímeros con grupos terminales sulfonato y carboxilato e ibuprofeno conjugado mediante espaciador disulfuro.

2.4.3.a. Paso 1: Modificación química del fármaco

La introducción de un grupo -SH en aquéllos fármacos que presenten un grupo carboxílico libre en su estructura (como es el caso de ibuprofeno) puede realizarse mediante la generación de un enlace amido con hidrocloreuro de cisteamina (Esq. 2.10):



Esquema 2.10 Procedimiento sintético del “Paso 1”: Modificación química del fármaco.

La activación de IbuCOOH como éster de succinimida (**50***) se lleva a cabo mediante una pequeña modificación del protocolo propuesto por Marega y col.⁸⁴ (Cap. 3), y el compuesto se utiliza sin aislar para la obtención de **51**. Lo mismo ocurre para la preparación de **51**, que se realiza mediante un protocolo similar al de Kourounakis y col.⁸⁵ (Cap. 3), mediante la conjugación de hidrocloreuro de cisteamina al compuesto **50*** sin aislar, a un pH a 7-8.

Los valores de RMN ¹H y ¹³C obtenidos para ambos compuestos están de acuerdo con los hallados en bibliografía. Sin embargo, la obtención de **51** como una mezcla de sus formas reducida (-SH) y oxidada (S-S) se muestra en la Figura 2.37, mediante su espectro TOCSY-2D. Las señales que permiten distinguir ambas formas son aquéllas de la cadena -NHCH₂CH₂S-, a 3.39 (*h*) y 2.65 (*i*) ppm (compuesto reducido), ó 3.55 (*h'*) y 3.30 (*i'*) ppm (compuesto oxidado). En el espectro de RMN-¹³C, también se detecta la presencia de ambas formas, con señales a 42.2 (*h*) y 24.3 (*i*) ppm ó 38.4 (*h'*) y 37.4 (*i'*) ppm. Además, el grupo carbonilo se desplaza de 169.1 ppm a 174.9 ó 174.6 ppm, en función de la forma del tiol.

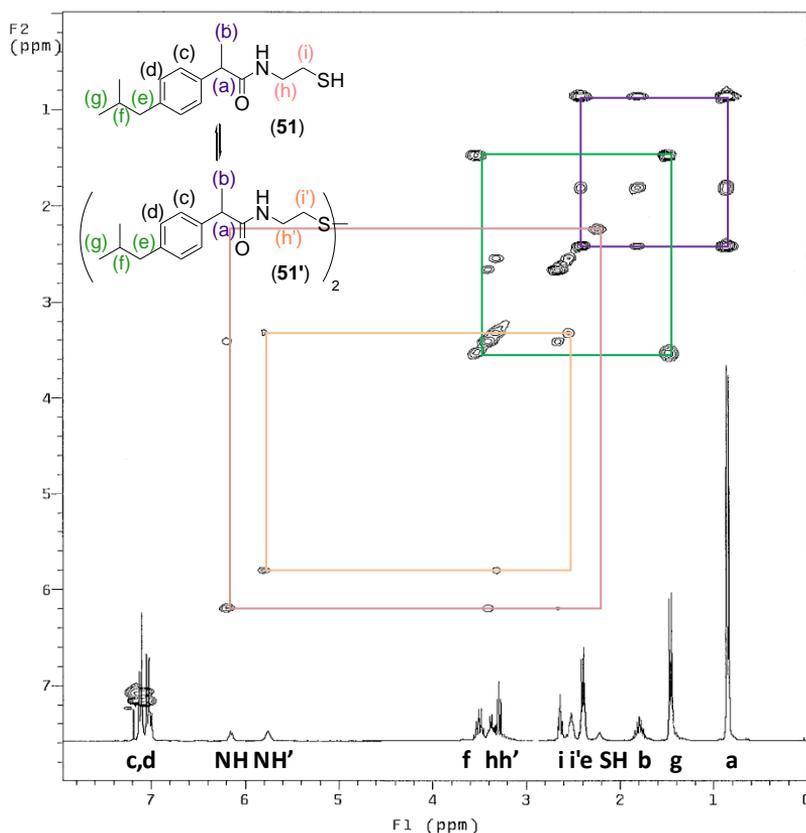
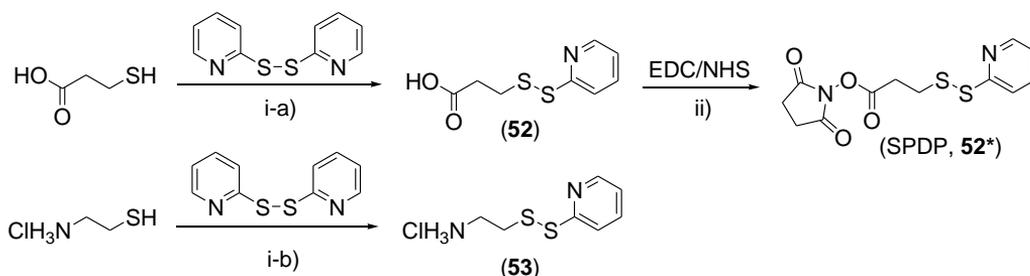


Figura 2.37 Espectro TOCSY-2D de la molécula de ibuprofeno modificado, mostrando las señales correspondientes a sus formas reducida (**51**) y oxidada (**51'**).

2.4.3.b. Paso 2: Síntesis de los espaciadores

El acoplamiento de los fármacos a dendrímeros con grupos terminales de diversa naturaleza exige la preparación de distintos espaciadores: el espaciador aniónico SPDP (en su forma de ácido libre **52** o activado como éster de succinimida **52***), que reacciona con dendrímeros con grupos terminales -NH₂, y el espaciador catiónico **53**, que lo hará con dendrímeros con grupos -COOH en su superficie (*Esq. 2.11*).

La síntesis del compuesto **52*** se realiza siguiendo el protocolo establecido por Navath y col.,⁸³ pero sustituyendo el agente acoplante DCC/DMAP (4-dimetilaminopiridina) por EDC/NHS, que permite una purificación mucho más sencilla, ya que un simple lavado con agua elimina todos los subproductos y reactivos. De forma análoga, la preparación de **53** procede según lo publicado por Van der Vlies y col.⁸⁶ Los valores de RMN-¹H y ¹³C experimentales para ambos compuestos concuerdan con los indicados por los autores en la bibliografía.

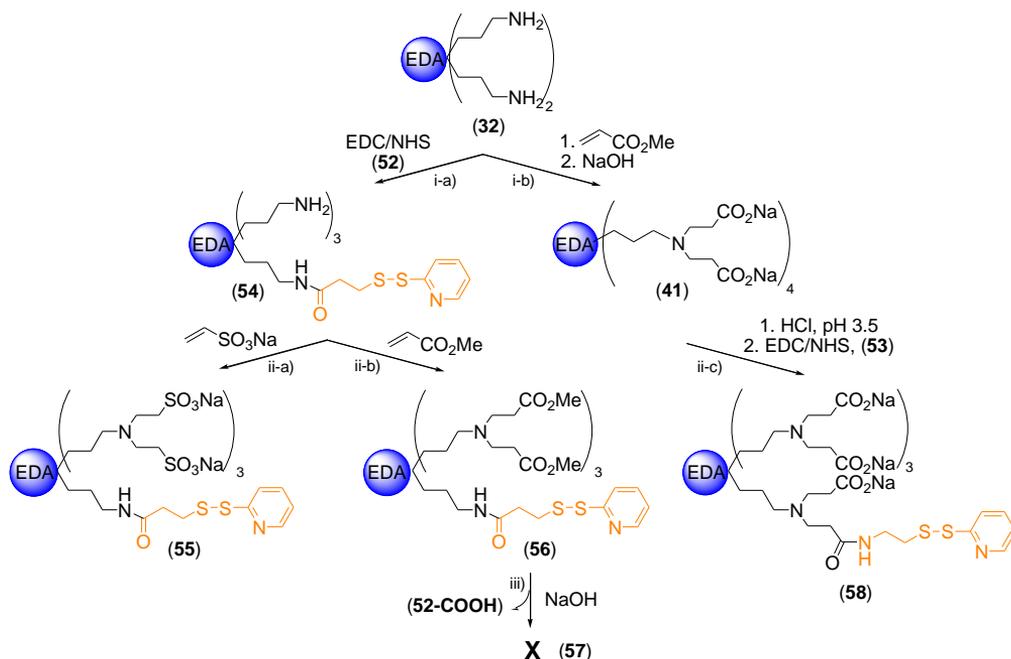


Esquema 2.11 Esquemas de reacción para la obtención de los espaciadores **52** y **53**. Condiciones: i-a) EtOH/AcOH_{cat}, 2 h t.a. y purificación en columna de Al₂O₃ básica; i-b) EtOH/MeOH, 2 h t.a. y precipitación en Et₂O; ii) CH₂Cl₂, adición de los reactivos a 0°C y posteriormente agitación 4 h a t.a.

2.4.3.c. Paso 3: Introducción del espaciador en el dendrímero y modificación de la periferia

Las reacciones que componen este tercer paso persiguen la obtención de sistemas dendríticos con un espaciador conjugado y grupos terminales sulfonato o carboxilato, y se detallan en el Esquema 2.12.

La conjugación en relación 1:1 del espaciador aniónico **52*** disuelto en EtOH al dendrímero **32** en PBS:MeOH transcurre durante 18 h a t.a. Tras filtrar la disolución amarilla, se evaporó para aislar el conjugado **54**, como un sólido amarillo higroscópico.



Esquema 2.12 Acoplamiento de los espaciadores a los correspondientes dendrimeros y modificación de la periferia para generar los derivados polianiónicos. Condiciones de reacción: i-a) PBS:MeOH:EtOH, 18 h, t.a. i-b) MeOH, 18 h, 80°C; MeOH, 24 h, t.a. ii-a) MeOH:H₂O, 18 h, 120°C. ii-b) MeOH, 18 h, 80°C. ii-c) EtOH:H₂O, HCl pH=3.5; EDC/NHS adición en frío, 1 h t.a. a pH 5.50; **53**, pH=7.3, 48 h, t.a. iii) MeOH, 18 h, t.a.

Este compuesto **54** se caracterizó mediante RMN-¹H en D₂O y DOSY-2D en CD₃OD, como muestra la Figura 2.38. La incorporación del espaciador viene reflejada por la aparición de las señales debidas a los grupos aromáticos entre 8.31-7.14 ppm (marcadas en la figura como *) y a los grupos metileno -COCH₂CH₂S- a 2.50 (*e*) y 2.82 (*f*) ppm. Además, los grupos metileno de la rama dendrítica próximos al enlace amido sufren un desplazamiento, de 1.66 a 1.53 (*c'*) y de 2.72 a 3.10 (*d'*) ppm, respectivamente, como consecuencia de esta unión. El espectro DOSY-2D de este conjugado corrobora la unión del espaciador al dendrimer, al presentar un mismo coeficiente de difusión las señales del dendrimer y las del espaciador.

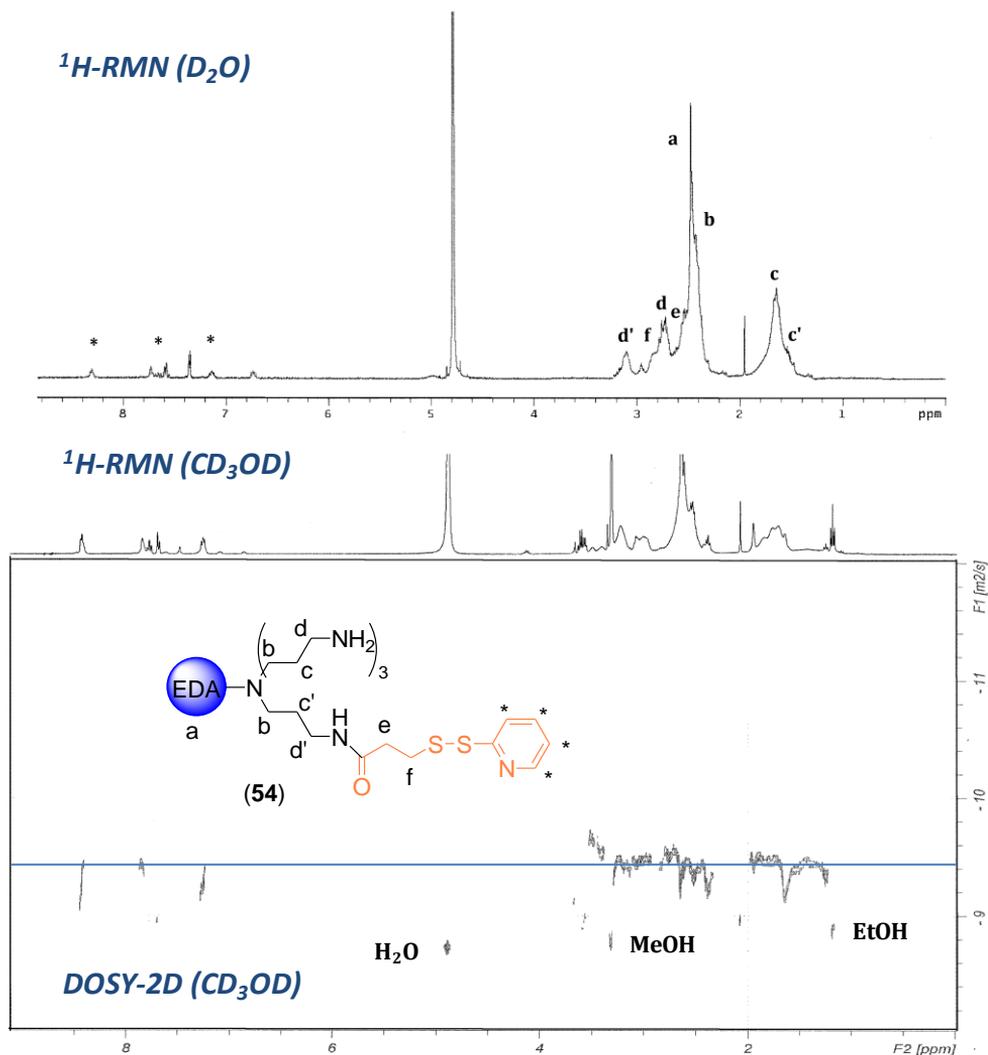


Figura 2.38 Espectro RMN- ^1H (D_2O y CD_3OD) y DOSY-2D en CD_3OD del conjugado **54**, mostrando la unión del espaciador al dendrímero.

La estabilidad del conjugado **54** se puso de manifiesto en el momento de la introducción de los grupos aniónicos en la periferia. La reacción de **54** con vinilsulfonato de sodio durante 18 h a 120°C o un exceso de acrilato de metilo durante 18 h a 80°C conduce a la incorporación de grupos $-\text{SO}_3\text{Na}$ o $-\text{CO}_2\text{Me}$, respectivamente, en todas los grupos amino libres del dendrímero para dar **55** y **56**. La integración de las señales de los espectros RMN- ^1H (D_2O para **55**, CDCl_3

para **56**) revela la introducción de 6 grupos aniónicos, corroborando la presencia del espaciador anclado que impide la adición conjugada en una rama. Este hecho se comprobó también mediante la realización de un experimento DOSY para el compuesto **55**, puesto que soporta condiciones de reacción más extremas, observándose un mismo coeficiente de difusión para el dendrímero y para el fármaco, y confirmando la estabilidad del conjugado a altas temperaturas. En el espectro de RMN-¹H, se observa un desdoblamiento de los grupos metileno más externos, como consecuencia de la presencia del enlace amido en una de las ramas: 1.70/1.62 (*c/c'*) y 2.88/3.10 (*d/d'*) ppm (**55**), y 1.51/1.68 (*c/c'*) y 2.41/2.98 (*d/d'*) ppm (**56**). Además, las señales del espaciador aparecen a 2.40 (*e*) y 3.10 (*f*) ppm (**55**), y 2.52 (*e*) y 2.73 (*f*) ppm (**56**), y las de los grupos aromáticos en el rango 6.95-8.40 ppm. Los espectros de RMN-¹H de **55** y **56** se muestran en la Figura 2.39.

Los grupos éster terminales del conjugado **56** se hidrolizaron en un paso posterior con NaOH dando lugar al dendrímero con grupos terminales -CO₂Na (**57**); sin embargo, la desaparición de las señales correspondientes al ibuprofeno tras su nanofiltración en agua confirma la ruptura del enlace amido al variar el pH del medio y la inestabilidad del conjugado en estas condiciones, de forma que esta estrategia es inadecuada para el propósito del estudio.

La reacción alternativa es la introducción directa del espaciador catiónico **53** al dendrímero G₁-eda-(CO₂Na)₈ (**41**), previa conversión de algunos grupos CO₂Na en CO₂H por reacción con HCl_{ac} (pH = 3.5-4). La conjugación se realiza con EDC/NHS mediante el protocolo habitual y, tras su nanofiltración, el conjugado formado **58** (*Fig. 2.39.C*) muestra en su espectro RMN-¹H la introducción del espaciador por la aparición de las señales de los protones del anillo aromático a 8.20-7.10 ppm, a 2.75 (*e*) y 3.12 (*f*) ppm las del fragmento -NHCH₂CH₂S-, y el desplazamiento a campo más alto de CH₂CONH (*γ'*).

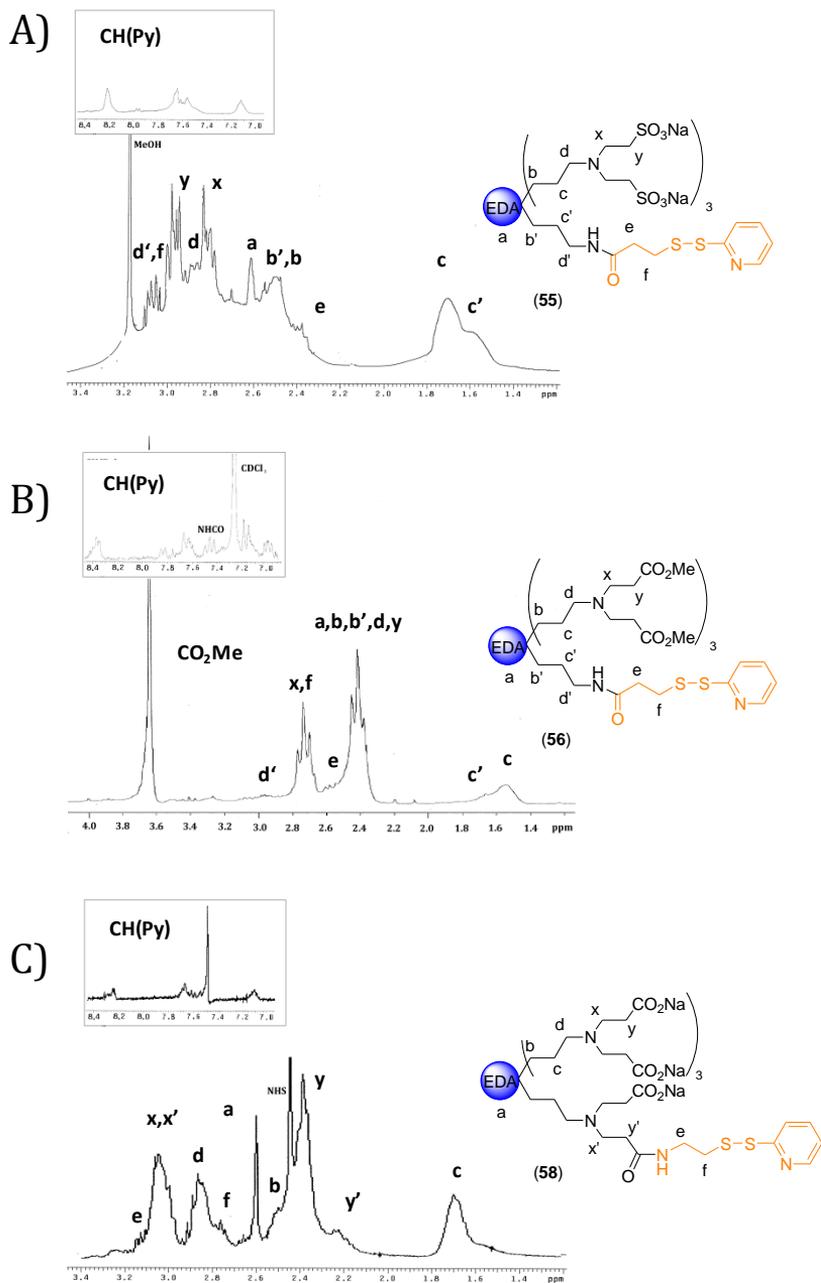
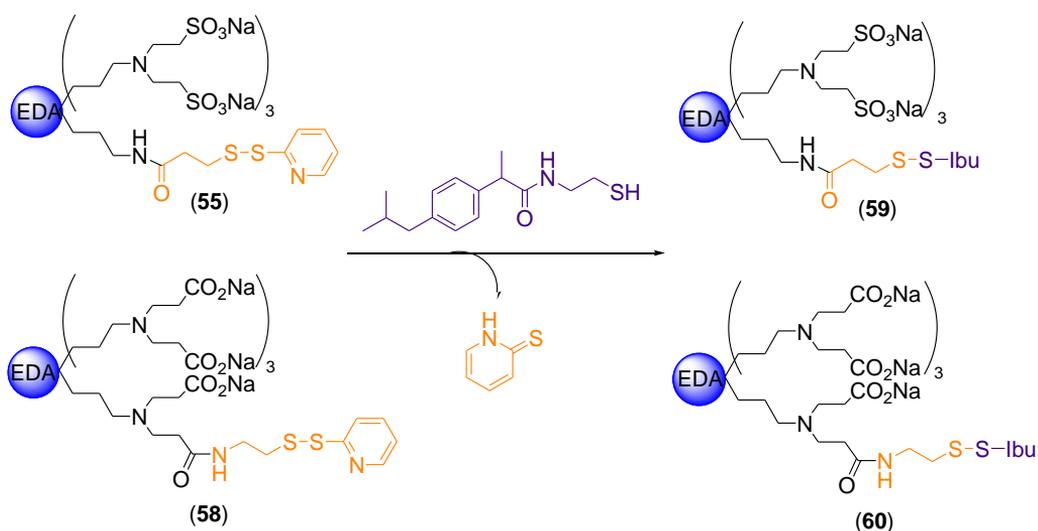


Figura 2.39 Espectros RMN-¹H (δ D₂O (**55** y **58**), CDCl₃ (**56**)), mostrando la unión del espaciador al dendrímtero. A) Espectro de **55**. B) Espectro de **56**. C) Espectro de **58**.

2.4.3.d. Paso 4: Conjugación del fármaco

En el último paso, el grupo tiopiridina en los dendrimeros polianiónicos **55** y **58** se desplazaría por el fármaco modificado a través del grupo -SH, en mezcla PBS/EtOH (Esq. 2.13), de forma análoga a lo descrito para dendrimeros PAMAM.⁸³ Los estudios realizados hasta el momento, utilizando estas mismas condiciones, no permiten detectar un anclaje eficaz del fármaco modificado, por lo se hace necesario una futura optimización de estas condiciones.



Esquema 2.13 Reacción de conjugación del fármaco. Las condiciones ensayadas (PBS/EtOH, pH=6.5) deben ser optimizadas para un anclaje efectivo en estos dendrimeros.

2.4.4. Conclusiones del apartado

En la búsqueda de sistemas polianiónicos con ibuprofeno conjugado, se han presentado diversas estrategias para su unión a dendrímeros con grupos -NH₂. La distinta fortaleza de los conjugados electrostáticos y covalentes determina la posibilidad de introducción de grupos aniónicos en la periferia del dendrímero, y las condiciones en las que se podrá liberar el fármaco. Estos sistemas heterofuncionales polianiónicos son potenciales agentes antivirales, con actividad mejorada respecto a los sistemas presentados en el apartado 3.2, ya que el ibuprofeno podría disminuir la inflamación que favorece la infección e inhibir las bombas de eflujo que reducen la concentración efectiva de fármacos antirretrovirales en el interior celular (*Cap. 3*). Del estudio se concluye que:

- ✓ La estrategia mediante *interacción electrostática* permite la solubilización de ibuprofeno en agua de forma sencilla y su liberación al variar el pH. El conjugado **46** presenta una alta estabilidad térmica, permitiendo su funcionalización con grupos -SO₃Na (**47**) y -CO₂Me (**48**), pero es inestable frente a la variación del pH necesaria para generar el derivado con grupos -CO₂Na, que provoca la liberación del fármaco.
- ✓ En la estrategia mediante *enlace covalente amido*, similar a la anterior, la liberación del fármaco se realizaría por hidrólisis pH-dependiente, de forma más controlada al tratarse de un enlace más fuerte. Esta mayor fortaleza en el conjugado **48** permitiría la funcionalización con grupos -SO₃Na y -CO₂Na mediante las reacciones habituales. Sin embargo, estos estudios no se han realizado, interesados en otros sistemas de liberación controlada.
- ✓ La estrategia mediante *espaciador disulfuro* posibilita la obtención de sistemas con un espaciador conjugado, y grupos -SO₃Na (**55**) y -CO₂Na (**58**), a partir de los cuales preparar los conjugados aniónicos con ibuprofeno **59** y **60** mediante de unas condiciones que deben ser optimizadas. Estos sistemas permitirían la liberación controlada del fármaco en ambientes reductores.

2.5. DENDRONES POLILISINA COMO PLATAFORMAS PARA EL ANCLAJE DE PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS

2.5.1. Introducción

En este último apartado, se presenta otra estrategia para la generación de sistemas dendríticos útiles para la terapia frente a la infección por el VIH. Consiste en la generación de dendrones polilisina con grupos amino ortogonalmente protegidos, que permitan la posterior desprotección selectiva para el anclaje de diversas moléculas de interés. La terminología utilizada es la habitual para sistemas de tipo Péptido Antigénico Múltiple (MAP), considerando como dendrones G_1 aquéllos que presentan 2 grupos amino terminales, G_2 los que tienen 4, G_3 los que presentan 8, etc. Además, la desprotección selectiva permite la preparación de dendrones de generación $n.5$, mediante el crecimiento de ramas desde solo la mitad de grupos posibles ($G_{1.5}$, 3 grupos amino; $G_{2.5}$, 6 grupos amino, etc.). Estos sistemas se denotarán como G_n -(GT)-PF, donde G_n indica la generación, (GT) el tipo y número de grupos terminales, y PF el punto focal, siendo éste -OH (en G_1 , por el grupo -COOH) ó -G-OH (en $G>1$, por el grupo glicina-COOH)).

La estrategia sintética seguida, análoga a la presentada por Dykes y *col.*,⁸⁷ consiste en un proceso convergente de unión de bloques a un punto focal para formar las distintas generaciones del dendrímero, pero con ciertas particularidades en nuestro caso. Por un lado, en el protocolo de la bibliografía, la lisina del punto focal presenta su grupo -COOH protegido en forma de éster, y en cada paso de acoplamiento ha de ser previamente desprotegido. En nuestro caso, el punto focal se trata del fragmento Lys-Gly-COOH, donde este grupo se encuentra desprotegido durante todo el proceso y no interfiere en ninguna de las reacciones. Aparte de las ventajas sintéticas al evitar los pasos de protección/desprotección, este grupo concede cierta solubilidad al producto,

que puede resultar de interés. Por otro lado, en esta Memoria se presentan dos familias diferentes de dendrímeros: aquella donde todos los grupos amino se encuentran protegidos como -NHBoc, y aquella en la que la protección es ortogonal como -NHBoc y -NHTFA. Ésta última familia permite la desprotección selectiva y el anclaje de diversas moléculas de interés de forma controlada.

La caracterización de los dendrones polilisina se llevó a cabo mediante HPLC-MS(ESI) y RMN de ^1H y ^{13}C (Cap. 4). Para facilitar el seguimiento de su estudio estructural, se denominó como C_a el carbono contiguo al grupo -COOH del correspondiente aminoácido (glicina o lisina), y los carbonos consecutivos de la lisina como b, c, d, e , etc.

2.5.2. Estudio preparativo y estructural

El procedimiento global se basa en la combinación de dos aminoácidos (glicina (Gly) y lisina (Lys)) y tres tipos de reacciones principales (*Activación*, *Protección/Desprotección* y *Acoplamiento*), detalladas en la Tabla 2.2.

Esquema de la reacción

<p><i>I-Activación</i></p> <p>(preparación de 61*, 64*, 65*, 67*)</p>	
<p><i>II-Protección/desprotección</i></p> <p>(preparación de 61, 63, 66 y 68)</p>	
<p><i>III-Acoplamiento</i></p> <p>(preparación de 62, 65, 67, 69, 70, 71)</p>	

Tabla 2.2 Reacciones generales para la preparación de los dendrones polilisina.

I. Reacciones de activación de R-COOH como éster de succinimida.

La adición de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) a un compuesto con grupos R-COOH en presencia del agente acoplante *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), se realiza a 0°C. Tras la adición, la mezcla de reacción se mantiene 18 h a t.a. Posteriormente, la disolución se filtra, se lava con NaHCO₃ y NaCl, se seca con Na₂SO₄ y se evapora, obteniendo el compuesto de interés en forma activada, que se denotará como **XX***, siendo XX la numeración del compuesto de partida. Este tipo de reacción se utilizó para obtener los compuestos **61***, **64***, **65*** y **67***.

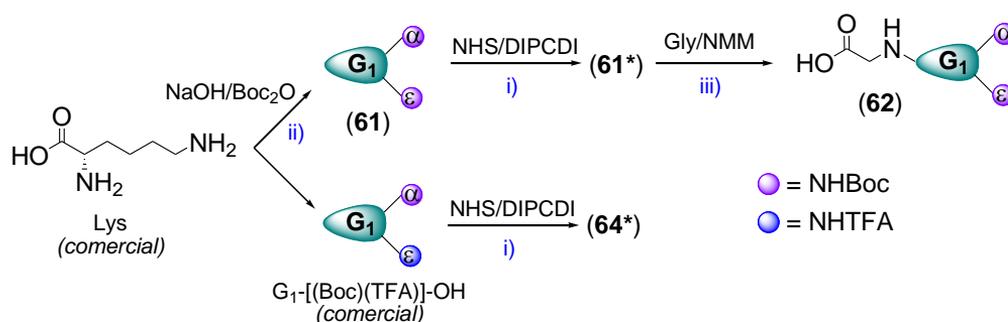
II. Reacciones de protección/desprotección de R'-NH₂ como R'-NHBoc.

- ✓ La *protección* de grupos amino se realiza de acuerdo con el protocolo establecido en bibliografía.^{88, 89} El reactivo se disuelve en NaOH_{ac} y se adiciona en frío di-*tert*-butildicarbonato (Boc₂O) en THF. Tras 2 h a t.a, se adiciona KHSO₄, se extrae con EtOAc, se lava con NaCl, se seca con Na₂SO₄ y se lleva a sequedad para obtener el producto final. Esta fue la metodología utilizada para obtener el compuesto **61**.
- ✓ La *desprotección* también se realiza según una modificación del protocolo establecido en la bibliografía,⁸⁹ en THF por reacción con HCl/dioxano a reflujo durante 1 h, precipitando el compuesto en el medio de reacción, o con ácido trifluoroacético (TFA) en CH₂Cl₂ durante 2 h a t.a., con el inconveniente de que el producto final retiene TFA. Este tipo de reacción se utilizó para obtener los compuestos **63**, **66** y **68**.

III. Reacciones de acoplamiento mediante enlace amido.

El acoplamiento del compuesto activado **XX*** con los grupos R'-NH₂ se lleva a cabo en EtOH:H₂O, en presencia de *N*-metilmorfolina (NMM), durante 18 h a t.a. El posterior tratamiento con KHSO₄ asegura la protonación del -COOH del punto focal, y tras la extracción con EtOAc, lavado con NaCl, secado con Na₂SO₄ y evaporación a vacío se obtiene el compuesto conjugado. Esta reacción de acoplamiento permitió generar los compuestos **62**, **65**, **67**, **69**, **70** y **71**.

La síntesis de los *dendrones de generación 1* (Esq. 2.14) se inicia con la reacción de *L*-Lisina con Boc_2O , que conduce a la obtención de la lisina con grupos amino protegidos $\text{G}_1\text{-}[(\text{Boc})_2]\text{-OH}$ (**61**),^{88, 89} cuyo ácido carboxílico libre fue activado en el paso posterior como éster de succinimida, $\text{G}_1\text{-}[(\text{Boc})_2]\text{-OSu}$ (**61***),⁹⁰ sustituyendo el agente acoplante DCC de la bibliografía por DIPCDI para facilitar la separación de los subproductos. La reacción análoga con el compuesto comercial $\text{G}_1\text{-}[(\text{Boc})(\text{TFA})]\text{-OH}$ da lugar al dendrón $\text{G}_1\text{-}[(\text{Boc})(\text{TFA})]\text{-OSu}$ (**64***), que permitirá una desprotección selectiva de los grupos amino. Ambos dendrones G_1 **61*** y **64*** serán utilizados como los bloques para el crecimiento del resto de generaciones de los dendrímeros.



Esquema 2.14 Estrategia sintética de preparación de los dendrones de generación 1.

Los espectros $\text{RMN-}^1\text{H}$, HSQC y HPLC-MS(ESI) de los dendrones G_1 **61*** y **64*** se muestran en la Figura 2.40 para facilitar su comparación con las generaciones mayores. El espectro $\text{RMN-}^1\text{H}$ de **61*** muestra dos singletes característicos a 1.40 y 2.80 ppm, asignados a los grupos protector (Boc) y activante (NHS), respectivamente. El resto de señales del esqueleto lisina aparecen como pequeños multipletes a 4.61 (*a*), 1.86 (*b*), 1.40 (*c*), 1.48 (*d*) y 3.06 (*e*). Las señales del dendrón **64*** son similares, observando diferencias en los grupos metileno *d* (1.56) y *e* (3.29) debido a la sustitución del un grupo protector Boc por TFA, y en la integración de dicha señal de los grupos Boc.

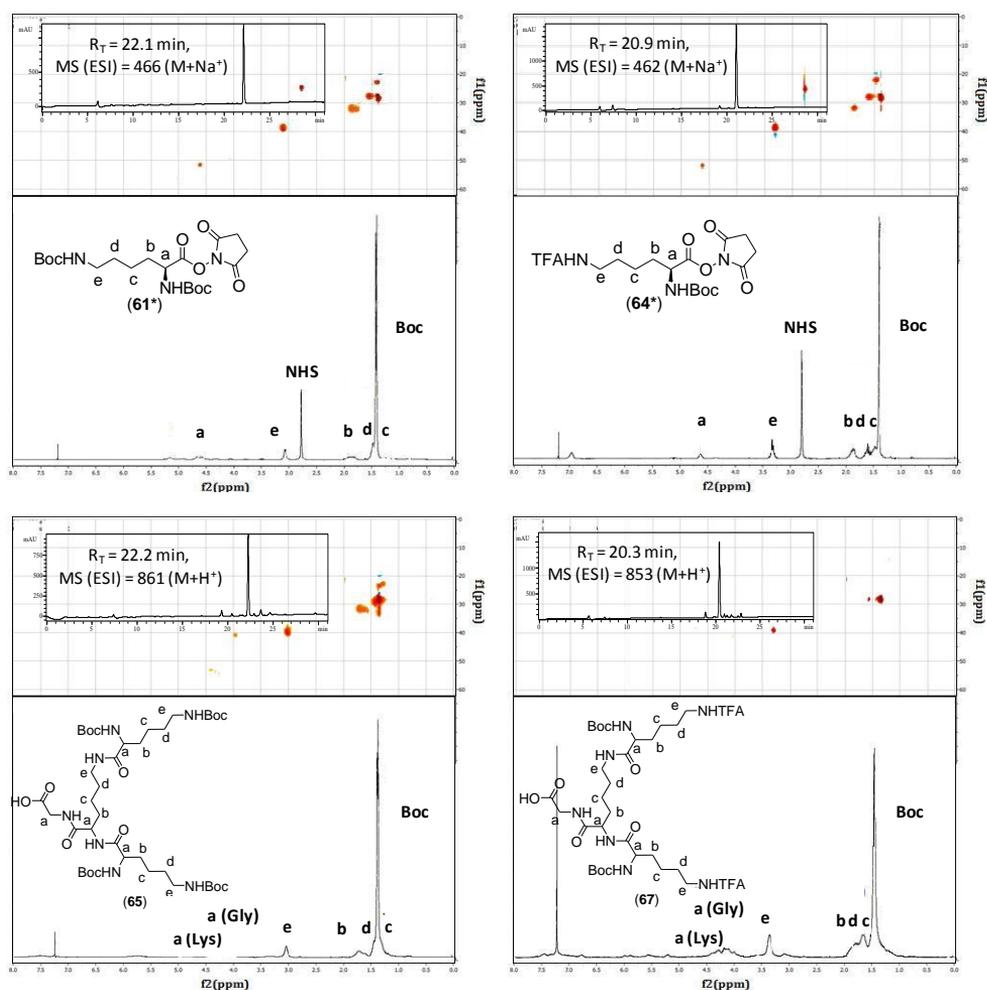
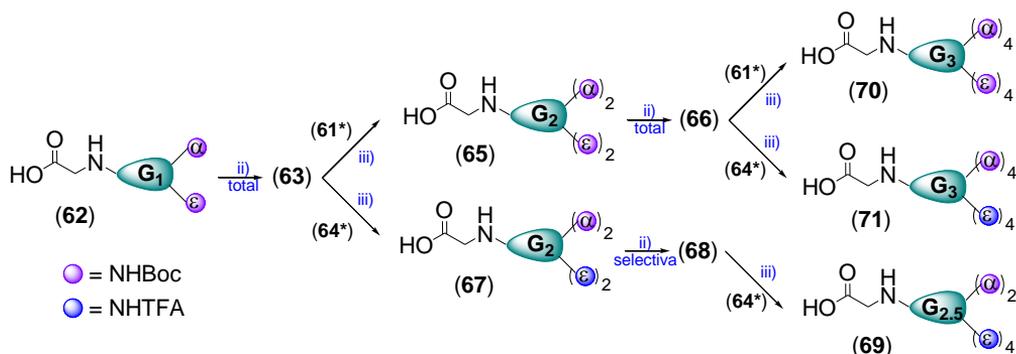


Figura 2.40 Espectros RMN- ^1H y ^1H - ^{13}C -{HSQC} en CDCl_3 , y HPLC-MS(ESI) en MeCN, de los dendrones G1 **61*** y **64*** y sus respectivos dendrones G2 **65** y **67**.

El compuesto **61*** se conjugó con glicina (Esq. 2.14) mediante un pequeño cambio en el protocolo habitual⁹¹ que facilita su aislamiento (Cap. 4), dando lugar a G_1 -[(Boc) $_2$]-G-OH (**62**), y posteriormente se desprotegió para dar G_1 -[(NH $_3$ Cl) $_2$]-G-OH (**63**). El espectro RMN- ^1H de **62** (Cap. 4) corrobora este acoplamiento al desaparecer la señal a 2.80 ppm (singlete, NHS) y aparecer las señales correspondientes al nuevo aminoácido a 4.24 ppm (singlete ancho, $\alpha(\text{Gly})$). Las señales del esqueleto lisina apenas se ven modificadas, excepto

aquellas más próximas al nuevo enlace amido, como *a* (de 4.61 a 4.08 ppm) y *b* (de 1.86 a 1.78 ppm). La desprotección de los grupos amino se ve en el espectro RMN-¹H de **63** al desaparecer las señales de los grupos Boc, y modificarse el resto de señales como consecuencia de la formación de los grupos amonio: 3.91 (*a*(Gly y Lys)), 1.79 (*b*), 1.34 (*c*), 1.56 (*d*) y 2.85 (*e*). Además, el aumento de la polaridad al pasar de **62** y **63** se refleja en HPLC, pasando de un tiempo de retención (*R_T*) de 19.1 (en MeCN) a 6.8 min (en MeCN:H₂O).

La ruta convergente para la preparación de los *dendrones de segunda generación* se muestra en el Esquema 2.15. El compuesto **63** se hizo reaccionar con los dendrones activados **61*** o **64*** para dar G₂-[(Boc)₄]-G-OH (**65**) y G₂-[(Boc)₂(TFA)₂]-G-OH (**67**), respectivamente. Ambos son sistemas MAP tetraméricos con el fragmento Lys-Gly-COOH en su punto focal, con la diferencia de que la protección ortogonal en **67** permite la desprotección selectiva de las aminas. Los espectros RMN-¹H, ¹H-¹³C-{HSQC} y HPLC-MS(ESI) de **65** y **67** se muestran en la Figura 2.40, en comparación con sus análogos de generación 1, **61*** y **64***. La formación de **65** se observa en el espectro por la desaparición de las señales debidas al grupo activante NHS y la aparición de la señal debida al grupo metileno *a*(Gly) a 4.00 ppm. Respecto a su análogo G₁ (**61***), las señales de los grupos metileno de las unidades de lisina aumentan su proporción respecto a la señal del Boc, pasando de 1 a 1.5 protones metilénicos por grupo Boc, pero los desplazamiento son similares, encontrando las desviaciones más acusadas en los grupos más cercanos al punto focal, de acuerdo con la unión a la glicina. Los valores de ESI están de acuerdo con los hallados en la bibliografía para la preparación de **65** mediante una ruta alternativa,⁹² donde el grupo -COOH se encuentra protegido hasta el último paso. Para el caso del dendrón **67**, el espectro varía de forma análoga respecto a **64***. En relación con los espectros de HPLC, la mayor polaridad del dendrón **67** respecto al **65** debido a los grupos TFA se avala por la aparición del pico a menor tiempo de retención (*Cap. 4*), al igual que ocurría con **64*** respecto a **61***.



Esquema 2.15 Ruta convergente de síntesis de los dendrones polilisina G_1 - G_3 , mediante reacciones de (i) activación, (ii) protección/desprotección y (iii) acoplamiento.

La desprotección total del dendrón **65** conduce a G_2 - $[(NH_3X)_4]$ -G-OH (**66**), mientras que la desprotección selectiva de **67** conduce a G_2 - $[(NH_3X)_2(TFA)_2]$ -G-OH (**68**) (Esq. 2.15), ambos utilizados para la preparación de la siguiente generación de dendrones mediante acoplamiento convergente. En ambos casos, la desprotección puede realizarse con ácido trifluoroacético ($X=TFA$) o ácido clorhídrico ($X=Cl$), aunque en el primer caso siempre queda TFA retenido en el producto final. Los valores de tiempo de retención en HPLC ($R_T = 6.5$ min (**66**) y 12.4 min (**68**)) exponen un claro aumento de la polaridad de los compuestos. Además, sus espectros RMN- 1H muestran la desaparición de las señales correspondientes a los grupos -NHBoc, y un desplazamiento del resto de señales debido a la formación de los grupos - NH_3^+ .

La desprotección selectiva en **68** permite preparar *dendrones de generación 2.5*, como $G_{2.5}$ - $[(Boc)_2(TFA)_4]$ -G-OH (**69**). Sin embargo, la desprotección total en **66** conduce a la síntesis los *dendrones de generación 3* G_3 - $[(Boc)_8]$ -G-OH (**70**) y G_3 - $[(Boc)_4(TFA)_4]$ -G-OH (**71**) (Fig. 2.41), mediante la reacción con 4 eq. de **61*** o **64***, respectivamente. La caracterización de **69-71** se llevó a cabo mediante HPLC-MS(ESI), obteniendo valores de R_T de 22.1 (**69**), 23.1 (**71**) y 25.8 (**70**) min, que aumentan claramente al crecer la apolaridad de la molécula debido al distinto número de los grupos protectores en cada una.

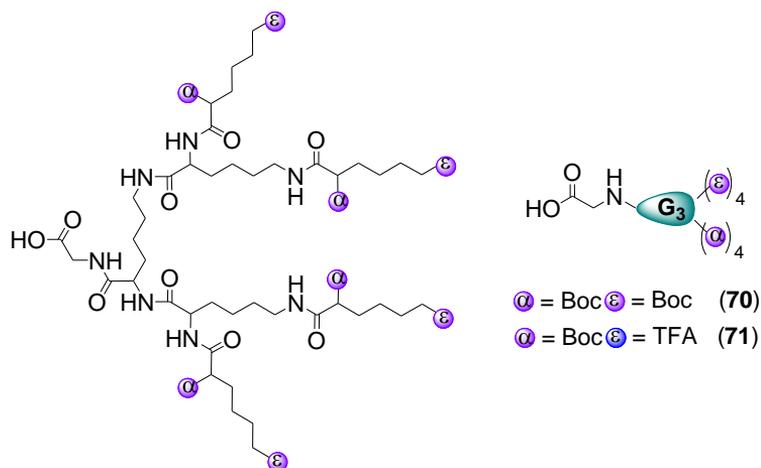


Figura 2.41. Estructura química de los dendrones polilisina de tercera generación, con protección total (70) u ortogonal (71).

Los dendrones presentados permiten la preparación de grandes generaciones mediante una estrategia de crecimiento exponencial doble.⁸⁷ La reacción de **66**, previa desprotección total, con 4 eq. de **65*** o **67*** permitiría pasar de G2 a G4 ($G_4\text{-}[(\text{Boc})_{16}]\text{-G-OH}$ o $G_4\text{-}[(\text{Boc})_8(\text{TFA})_8]\text{-G-OH}$) en un solo paso. Esta estrategia está siendo desarrollada en la actualidad en el grupo de investigación donde se realizó este trabajo.

La estrategia mostrada se presenta como un método sencillo y rápido para generar, de forma convergente, sistemas dendronizados tipo MAP que actúen como plataforma para el posterior anclaje selectivo de péptidos inmunogénicos y otras moléculas de interés. Estos resultados han sido ampliados en el Laboratorio del doctor Ulrik Boas, y serán plasmados en una publicación que llevará por título *“Convergent synthesis of polyfunctional polylysine dendrons by a novel strategy”*. El potencial de estas plataformas en nanovacunas se describirá en el Capítulo 3 en relación con la terapia frente al VIH-1, iniciando una interesante línea de trabajo que implique la colaboración multidisciplinar de los distintos grupos de investigación.

2.6. BIBLIOGRAFÍA

1. M. I. Clemente, S. Álvarez, M. J. Serramía, O. Turriziani, M. Genebat, M. Leal, M. Fresno, M. Á. Muñoz-Fernández. *Antivir. Ther.*, **2009**, *14*, 1101-1111.
2. P. M. H. Heegaard, U. Boas, N. S. Sorensen. *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 405-418.
3. L. J. Cruz, E. Iglesias, J. C. Aguilar, L. J. González, O. Reyes, F. Albericio, D. Andreu. *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *15*, 112-120.
4. S. García-Gallego, M. Cangiotti, L. Fiorani, A. Fattori, M. Á. Muñoz-Fernández, R. Gómez, M. F. Ottaviani, F. J. de la Mata. *Dalton Trans.*, **2013**.
5. U. Boas, J. B. Christensen, P. M. H. Heegaard, *Dendrimers in Medicine and Biotechnology: New Molecular Tools*, Royal Society of Chemistry, **2006**.
6. U. Boas, P. M. H. Heegaard. *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, *33*, 43-63.
7. E. Buhleier, W. Wehner, F. Vöegtle. *Synthesis*, **1978**, 155-158.
8. N. Hadjichristidis, A. Guyot, L. J. Fetters. *Macromolecules*, **1978**, *11*, 668-672.
9. A. W. van der Made, P. W. N. M. van Leeuwen. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 1400-1401.
10. A. M. Muzafarov, E. A. Rebrov. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2008**, *46*, 4935-4948.
11. L. L. Zhou, J. Roovers. *Macromolecules*, **1993**, *26*, 963-968.
12. B. Alonso, I. Cuadrado, M. Morán, J. Losada. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 2575-2576.
13. F. Lobete, I. Cuadrado, C. M. Casado, B. Alonso, M. Morán, J. Losada. *J. Organomet. Chem.*, **1996**, *509*, 109-113.
14. L. Crespo, G. Sanclimens, M. Pons, E. Giralt, M. Royo, F. Albericio. *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 1663-1681.
15. R. G. Denkewalter, J. Kolc, W. J. Lukasavage, US4289872A, **1981**.
16. R. G. Denkewalter, J. F. Kolc, W. J. Lukasavage, US4410688A, **1983**.

17. G. R. Newkome, Z. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta. *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 2003-2004.
18. D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith. *Polym. J. (Tokyo)*, **1985**, *17*, 117-132.
19. K. Rengan, R. Engel. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 1084-1085.
20. A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, en *Designing dendrimers*, ed. Campagna-Ceroni-Puntoriero, John Wiley & Sons, Inc., **2012**, pp. 529-562.
21. A.-M. Caminade, J.-P. Majoral. *Catal. Met. Complexes*, **2011**, *37*, 265-303.
22. A.-M. Caminade, C.-O. Turrin, R. Laurent, A. Maraval, J.-P. Majoral. *Curr. Org. Chem.*, **2006**, *10*, 2333-2355.
23. A.-M. Caminade, V. Maraval, R. Laurent, C.-O. Turrin, P. Sutra, J. Leclaire, L. Griffe, P. Marchand, C. Baudoin-Dehoux, C. Rebout, J.-P. Majoral. *C. R. Chim.*, **2003**, *6*, 791-801.
24. C. J. Hawker, J. M. J. Frechet. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 7638-7647.
25. C. Hawker, M. J. Frechet. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 1010-1013.
26. T. M. Miller, T. X. Neenan. *Chem. Mater.*, **1990**, *2*, 346-349.
27. A.-M. Caminade, R. Laurent, B. Delavaux-Nicot, J.-P. Majoral. *New J. Chem.*, **2012**, *36*, 217-226.
28. J. Lim, E. E. Simanek. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, *64*, 826-835.
29. W. Zhang, E. E. Simanek. *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 843-845.
30. M. V. Walter, M. Malkoch. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 4593-4609.
31. G. K. Such, A. P. R. Johnston, K. Liang, F. Caruso. *Prog. Polym. Sci.*, **2012**, *37*, 985-1003.
32. S. Campagna, G. Denti, S. Serroni, M. Ciano, A. Juris, V. Balzani. *Inorg. Chem.*, **1992**, *31*, 2982-2984.
33. G. R. Newkome, C. N. Moorefield, G. R. Baker, A. L. Johnson, R. K. Behera. *Angew. Chem.*, **1991**, *103*, 1205-1207.
34. G. R. Newkome, E. He, C. N. Moorefield. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 1689-1746.

35. H.-J. Van Manen, F. C. J. M. Van Veggel, D. N. Reinhoudt. *Top. Curr. Chem.*, **2001**, *217*, 121-162.
36. C. Gorman. *Adv. Mater.*, **1998**, *10*, 295-309.
37. P. Govender, B. Therrien, G. S. Smith. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, *17*, 2853-2862.
38. S. El Kazzouli, N. El Brahmi, S. Mignani, M. Bousmina, J.-P. Majoral. *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*, 4995-5010.
39. C. Ghobril, G. Lamanna, M. Kueny-Stotz, A. Garofalo, C. Bilotey, D. Felder-Flesch. *New J. Chem.*, **2012**, *36*, 310-323.
40. S. Drabu, S. Khatri, S. Babu. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, **2010**, *1*, 464-471.
41. A. Samad, M. I. Alam, K. Saxena. *Curr. Pharm. Design*, **2009**, *15*, 2958-2969.
42. S. El Kazzouli, S. Mignani, M. Bousmina, J.-P. Majoral. *New J. Chem.*, **2011**, *36*, 227-240.
43. E. Hao, Z. Wang, L. Jiao, S. Wang. *Dalton Trans.*, **2010**, *39*, 2660-2666.
44. C. Zhang, R. L. Laine. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 6979-6988.
45. K. D. Safa, S. Tofangdarzadeh, A. Hassanpour. *J. Organomet. Chem.*, **2009**, *694*, 4107-4115.
46. E. Fuentes-Paniagua, Tesis Doctoral en preparación, Universidad de Alcalá.
47. K. Kimura, T. Kimura, I. Konoshita, N. Nakashima, K. Kitano, T. Nishioka, K. Isobe. *Chem. Comm.*, **1999**, 497-498.
48. K. B. Yatsimirskii, V. V. Pavlishchuk. *J. Coord. Chem.*, **1996**, *37*, 341-348.
49. M. J. Prushan, A. W. Addison, R. J. Butcher, L. K. Thompson. *Inorg. Chim. Acta*, **2005**, *358*, 3449-3456.
50. K. Varnagy, B. Boka, I. Sovago, D. Sanna, P. Marras, G. Micera. *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, *275-276*, 440-446.
51. J. L. Hall, W. E. Dean. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 3300-3303.
52. J. L. Hall, W. E. Dean, E. A. Pacofsky. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 3303-3308.

53. Y.-S. Xie, F.-P. Kou, R.-S. Lin, H.-X. Zong. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*, **1998**, *19*, 676-680.
54. W. R. Mason, III, H. B. Gray. *J. Amer. Chem. Soc.*, **1968**, *90*, 5721-5729.
55. M. R. Knecht, M. G. Weir, V. S. Myers, W. D. Pyrz, H. Ye, V. Petkov, D. J. Buttrey, A. I. Frenkel, R. M. Crooks. *Chem. Mater.*, **2008**, *20*, 5218-5228.
56. S. C. F. Au-Yeung, Y. P. Ho, G. Lin, X. Han, X. Wang, S. Lu, T. Jiang, WO9849174A1, **1998**.
57. K.-I. Lee, T. Tashiro, M. Noji. *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, *42*, 702-703.
58. M. Galán Herranz, Tesis doctoral en preparación, Universidad de Alcalá.
59. Y. Gu, P. Sanders, H. J. Ploehn. *Colloids Surf., A*, **2010**, *356*, 10-15.
60. S. Banerjee, A. K. Mukherjee. *Comp. Theor. Chem.*, **2012**, *991*, 116-123.
61. B. M. Still, P. G. A. Kumar, J. R. Aldrich-Wright, W. S. Price. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 665-686.
62. P. J. Pellechia, J. Gao, Y. Gu, H. J. Ploehn, C. J. Murphy. *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 1421-1428.
63. R. Moors, F. Vögtle. *Chem. Ber.*, **1993**, *126*, 2133-2135.
64. R. D. Tack, WO9612755A1, **1996**.
65. C. Valério, J. Ruiz, E. Alonso, P. Boussaguet, J. Guittard, J.-C. Blais, D. Astruc. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1997**, *134*, 907-914.
66. Y. Lu, B. Sun, C. Li, M. H. Schoenfish. *Chem. Mater.*, **2011**, *23*, 4227-4233.
67. G. J. M. Koper, M. H. P. van Genderen, C. Elissen-Román, M. W. P. L. Baars, E. W. Meijer, M. Borkovec. *J. Amer. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 6512-6521.
68. H. Wan, S. Li, T. A. Konovalova, S. F. Shuler, D. A. Dixon, S. C. Street. *J. Phys. Chem. C*, **2008**, *112*, 1335-1344.
69. S. García-Gallego, M. J. Serramía, E. Arnaiz, L. Díaz, M. A. Muñoz-Fernández, P. Gómez-Sal, M. F. Ottaviani, R. Gómez, F. J. de la Mata. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2011**, 1657-1665.

70. S. García-Gallego, J. Sánchez Rodríguez, J. L. Jiménez, M. Cangiotti, M. F. Ottaviani, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez, F. J. de la Mata. *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 6488-6499.
71. Y. A. Skorik, N. V. Podberezskaya, G. V. Romanenko, E. V. Osintseva, L. K. Neudachina, A. A. Vshivkov. *Russ. J. Inorg. Chem.*, **2003**, 48, 250.
72. Y. A. Skorik, G. V. Romanenko, C. A. R. Gomes, L. K. Neudachina, A. A. Vshivkov. *Polyhedron*, **2002**, 21, 2719.
73. M. Galán, J. Sánchez Rodríguez, M. Cangiotti, S. García-Gallego, J. L. Jiménez, R. Gómez, M. F. Ottaviani, M. A. Muñoz-Fernández, F. J. de la Mata. *Cur. Med. Chem.*, **2012**, 19, 4984-4994.
74. C. Ornelas, V. Vertlib, J. Rodrigues, K. Rissanen. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 47-50.
75. D. Appelhans, U. Oertel, R. Mazzeo, H. Komber, J. Hoffmann, S. Weidner, B. Brutschy, B. Voit, M. F. Ottaviani. *Proc. R. Soc. A.*, **2010**, 466, 1489-1513.
76. M. F. Ottaviani, S. Bossmann, N. J. Turro, D. A. Tomalia. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 661-671.
77. M. F. Ottaviani, F. Montalti, N. J. Turro, D. A. Tomalia. *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 101, 158-166.
78. M. F. Ottaviani, R. Valluzzi, L. Balogh. *Macromolecules*, **2002**, 35, 5105-5115.
79. K. Naka, M. Fujita, K. Tanaka, Y. Chujo. *Langmuir*, **2007**, 23, 9057-9063.
80. M. S. Diallo, S. Christie, P. Swaminathan, L. Balogh, X. Shi, W. Um, C. Papelis, W. A. r. Goddard, J. H. J. Johnson. *Langmuir*, **2004**, 20, 2640-2651.
81. S.-T. Lin, P. K. Maiti, W. A. Goddard. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 8663-8672.
82. K. Kono, M. Liu, J. M. J. Fréchet. *Bioconjugate Chem.*, **1999**, 10, 1115-1121.
83. R. S. Navath, Y. E. Kurtoglu, B. Wang, S. Kannan, R. Romero, R. M. Kannan. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 2446-2455.
84. A. R. Marega, M. Bergamin, V. Aroulmoji, F. Dinon, M. Prato, E. Murano. *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 2011, 5617-5625.

85. A. P. Kourounakis, D. Galanakis, K. Tsiakitzis, E. A. Rekka, P. N. Kourounakis. *Drug Dev. Res.*, **1999**, *47*, 9-16.
86. A. J. Van der Vlies, C. P. O'Neil, U. Hasegawa, N. Hammond, J. A. Hubbell. *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 653-662.
87. G. M. Dykes, L. J. Brierley, D. K. Smith, P. T. McGrail, G. J. Seeley. *Chem.-Eur. J.*, **2001**, *7*, 4730-4739.
88. O. Keller, W. E. Keller, L. G. Van, G. Wersin. *Org. Synth.*, **1985**, *63*, 160-170.
89. M. Driffield, D. M. Goodall, D. K. Smith. *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 2612-2620.
90. M. E. Sergeev, T. L. Voyushina. *Lett. Org. Chem.*, **2006**, *3*, 857-860.
91. T. L. Nagabhushan, M. F. Haslanger, M. F. Czarniecki, WO8900165A1, **1989**.
92. G. Y. Krippner, G. Lichti, P. Razzino, B. D. Kelly, S. Pallich, S. A. Henderson, A. M. Scheppokat, C. C. Williams, C. J. H. Porter, B. J. Boyd, L. M. Kaminskas, P. M. Rendle, B. W. Greatrex, WO2007048190A1, **2007**.

CAPÍTULO 3

“ESTRATEGIAS PARA LA TERAPIA FRENTE AL VIH MEDIANTE DENDRÍMEROS Y METALODENDRÍMEROS”

3.1. INTRODUCCIÓN

En el Capítulo 1 se presentaron una serie de complejos metálicos con ligandos *N*-polianiónicos, que actuaban como agentes duales frente a la infección por el VIH, al prevenir y también tratar dicha infección. Como continuación a ese trabajo, los dendrímeros y metalodendrímeros expuestos en el Capítulo 2 se prepararon con el objeto de actuar en la terapia frente a este virus, a través de la mejora de la actividad antiviral (mediante moléculas multivalentes) o de la utilización de otras estrategias diferentes (nanovacunas, transporte de fármacos, etc.). En este capítulo se describen todas esas diferentes aplicaciones, exponiendo en unos casos, los resultados experimentales alcanzados y, en otros, las aplicaciones potenciales que podrían tener y que serán abordadas por el grupo de investigación donde se ha realizado este trabajo en un futuro próximo. Asimismo, se muestra un estudio de modelaje de los sistemas dendríticos más importantes, que determina su configuración más estable mediante la situación de mínima energía y que permite relacionarla con su potencial aplicación biológica.

3.1.1. Objetivos del capítulo

Los objetivos de este Capítulo 3 son los que se enumeran a continuación:

- ✓ Evaluar la biocompatibilidad y capacidad inhibitoria frente a la infección por el VIH de los dendrímeros y metalodendrímeros PPI polianiónicos descritos en el Capítulo 2. Este objetivo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunobiología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, que dirige la codirectora de esta Tesis Doctoral, la Dra. M^a Ángeles Muñoz-Fernández.
- ✓ Proponer un posible mecanismo de acción del resto de sistemas dendríticos más importantes descritos en el Capítulo 2.

3.1.2. Antecedentes bibliográficos

Tal y como se expuso en el capítulo introductorio de esta Memoria, los dendrímeros poseen un amplio abanico de propiedades químicas interesantes. Por un lado, presentan múltiples grupos funcionales accesibles en su superficie, que pueden utilizarse para conjugar moléculas biológicamente interesantes. Por otro lado, se conocen métodos que permiten la precisa heterofuncionalización de los grupos superficiales. Asimismo, los dendrímeros son altamente biocompatibles y las características de interacción con la membrana celular vienen determinadas por su tamaño y carga superficial.

También se comentaron con detalle las diferentes aplicaciones de sistemas dendríticos en relación con el campo de la biomedicina. Dada la amplitud de esta materia, a continuación se concretarán los antecedentes bibliográficos de dendrímeros y metalodendrímeros en terapia frente a la infección por el VIH.

3.1.2.a. Dendrímeros y metalodendrímeros como agentes antivirales en terapia frente al VIH

El proceso de infección por el VIH se desencadena por la interacción de las proteínas de la envuelta viral con los receptores, correceptores y otras moléculas de la superficie celular, como lípidos complejos (galactosilceramida, esfingolípidos), que se utilizan para una unión y/o entrada viral eficientes.¹ Los dendrímeros que actúan impidiendo este paso presentan esqueletos de distinta naturaleza, pero están funcionalizados principalmente con tres tipos de moléculas: azúcares, grupos aniónicos o péptidos,² como se detalla a continuación.

Los *glicodendrímeros* son el grupo más común de dendrímeros probados como antivirales. En general, se encuentran decorados con residuos azucarados análogos a los hallados en la superficie de células diana y que funcionan como receptores virales.³ Fosfodendrímeros catiónicos que unen análogos de galactosilceramida mediante pares iónicos⁴⁻⁶ y dendrímeros PPI funcionalizados con esfingolípidos⁷ han mostrado importante actividad antirretroviral. Además, glicodendrímeros decorados con grupos aniónicos se han presentado como eficientes antagonistas en ensayos *in vitro*, donde se ha demostrado que la unión del VIH-1 depende de los carbohidratos, no sólo de los grupos aniónicos. Es el caso de dendrímeros PPI con grupos galactosa sulfatados de manera aleatoria⁸ u otros trisacáridos aniónicos,⁷ o dendrímeros polilisina con celobiosa sulfatada.⁹ Otra estrategia es la generación de glicodendrímeros funcionalizados con manosa, que compitan con el VIH por el uso de DC-SIGN, un tipo de lectinas que une carbohidratos expresados por el patógeno y ayudan a su infección.

Dendrímeros aniónicos de diversa naturaleza interfieren en los primeros pasos de la infección viral al interactuar con el bucle V3 de la proteína gp120. Se ha demostrado que dendrímeros PAMAM polianiónicos¹⁰ disminuyen la infección de las células. Igualmente, dendrímeros polilisina decorados con grupos carboxilato y sulfonato, inhibieron la entrada del virus en las células *in vitro*, y en el caso del sulfonato, actuaron también sobre enzimas como la transcriptasa reversa y la integrasa,^{11, 12} al igual que porfirinas sulfonatadas.¹² Asimismo, un dendrímero polilisina, funcionalizado con grupos naftaleno disulfonato, el SPL7013, ha mostrado actividad microbicida en uso tópico vaginal y actualmente se encuentra en ensayos clínicos en fase III (VivaGel).¹³ Dendrímeros carbosilano funcionalizados con grupos aniónicos han probado también su eficacia, como el prometedor G2-S16 preparado en nuestro grupo de investigación,^{14, 15} que presenta 16 grupos sulfonato en su periferia y actúa inhibiendo la infección por el VIH en diversas líneas celulares.

Los *dendrimeros funcionalizados con péptidos* como agentes antivirales es el grupo que menos atención ha recibido. La unión a un dendrímero polilisina de un péptido sintético conteniendo una secuencia del bucle V3 de la proteína viral gp120 permite la inhibición de la infección viral *in vitro*, a diferencia del péptido libre,¹⁶ mediante la interferencia en la interacción del virus tanto con glicosfingolípidos como con los correceptores en la superficie celular.^{17, 18} Dendrimeros derivatizados con péptidos similares del bucle V3 han sido evaluados como candidatos para el desarrollo de vacunas,¹⁹ demostrando que los dendrimeros son mejores inmunógenos que otros transportadores macromoleculares.

En el caso de los metalodendrimeros, el espectro de aplicación se amplía debido a las diferentes propiedades de los metales,²⁰ que modulan la actividad de las macromoléculas dendríticas donde se hallan anclados. Es el caso de los complejos de cobre derivados de dendrimeros carbosilano aniónicos, previamente sintetizados en nuestro grupo de investigación, donde demostramos que el anclaje del metal mejora la actividad antiviral frente al VIH del dendrímero por sí solo.²¹ Otros metalodendrimeros con posibles aplicaciones antivirales son los de naturaleza aniónica basados en cobaltabisdicarbolido.²²⁻²⁴

3.1.2.b. Dendrimeros como transportadores de moléculas biológicamente activas en terapia frente al VIH

En la terapia frente al VIH,²⁵ el transporte dendrítico de moléculas también se realiza mediante distintos tipos de unión. Por un lado, la asociación no covalente se basa en una gran variedad de interacciones como enlaces de hidrógeno, uniones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Por otro lado, la unión covalente utiliza enlaces biodegradables, principalmente para la unión de fármacos hidrofóbicos, evitando así la baja carga de fármaco que resultaría de una estrategia no covalente.

La *encapsulación en el interior* del dendrímero ha sido la estrategia seguida para aumentar la absorción de los inhibidores de transcriptasa inversa lamivudina o efavirenz, mediante dendrímeros G₅-PPI funcionalizados con grupos manosa en la periferia, al dirigirlos a receptores de lectina en la superficie de macrófagos.^{26, 27}

La *interacción electrostática en la periferia* permite el transporte de moléculas biológicamente activas con carga positiva o negativa mediante dendrímeros iónicos. En la terapia frente al VIH, esta estrategia se utiliza principalmente para el transporte de material génico mediante dendrímeros catiónicos. La terapia génica antisentido incluye ribozimas, oligonucleótidos y siRNA, cuyo objetivo es conseguir células resistentes al VIH mediante la introducción de material genético recombinante que interfiera con la infección y/o replicación del VIH. Sistemas dendríticos de naturaleza PAMAM,²⁸ PPI,^{29, 30} fosforada³¹ y carbosilano³²⁻³⁶ transportan oligonucleótidos y siRNA anti-VIH mediante interacciones electrostáticas, protegiéndolos de la degradación enzimática.

La conjugación de fármacos mediante *enlace covalente en la periferia* del dendrímero persigue el transporte de los agentes terapéuticos a tejidos específicos, con el fin de reducir efectos sistémicos y aumentar la eficacia en el lugar de acción. La funcionalización puede ser completa o parcial, con el fin de unir otras moléculas de interés (unidades directoras, sondas fluorescentes). Por ejemplo, dendrímeros PPI con tuftusina (tetrapéptido natural activador de macrófagos) conjugada,³⁷ aumentan la absorción de efavirenz hasta 34.5 veces.

La eficacia de la estrategia de unión covalente recae en la estabilidad de los conjugados hasta alcanzar su diana. Una liberación prematura o una excesiva estabilidad del conjugado conducirán a una ineffectividad del sistema de transporte. Por lo tanto, el fármaco debe unirse al dendrímero (directamente o

mediante un espaciador) mediante enlaces química o enzimáticamente lábiles. Entre los enlaces utilizados, destacan los grupos amido o éster,³⁸⁻⁴¹ disulfuro^{42, 43} u otros (hidrazona, ácido láctico, dietilenglicol, etc.),⁴⁴ para el transporte de una gran diversidad de fármacos. Los conjugados formados directamente mediante enlace amido no son adecuados para el desarrollo de pro-fármacos, debido a su alta estabilidad química y enzimática,⁴⁰ mientras que los conjugados tipo éster muestran liberación dependiente del pH.⁴⁵

Uno de los fármacos más habituales para su estudio de transporte mediante plataformas dendríticas ha sido el ibuprofeno. El transporte mediante dendrímeros PAMAM ha sido estudiado por diversos autores como Kolhe^{46, 47} y Kurtoglu⁴⁵ analizando las diferencias entre la encapsulación física, el transporte mediante interacción electrostática y la conjugación mediante distintos enlaces (amido, éster o espaciador). Así, han demostrado que la encapsulación produce una baja carga de fármaco y una liberación no controlada; que los complejos electrostáticos presentan una alta carga de fármaco, estabilidad en agua y metanol, liberación ralentizada y actividad antiinflamatoria en ensayos *in vitro*; y que los conjugados covalentes son más estables *in vivo*, prolongando así la circulación del fármaco y la liberación en tejido, más eficaces al aumentar el transporte celular y producen una rápida respuesta farmacológica. En cuanto al enlace covalente, demostraron que los conjugados tipo éster muestran liberación dependiente de pH, mientras que los amido son muy estables a todos los valores de pH ensayados; además, los conjugados dendrímero-ibuprofeno sin espaciadores son estables frente a la hidrólisis enzimática debido a efectos estéricos.

3.1.2.c. Dendrimeros como coadyuvantes en nanovacunas en terapia frente al VIH

Las vacunas son la solución ideal para el control de enfermedades infecciosas. En el caso del VIH-1, su desarrollo es un gran desafío, debido a su extraordinaria diversidad, su capacidad para evadir respuestas inmunes adaptativas o el establecimiento temprano de reservorios virales latentes. Distintas estrategias han sido utilizadas en vacunas frente al VIH-1⁴⁸⁻⁵⁰ (Fig. 3.1).

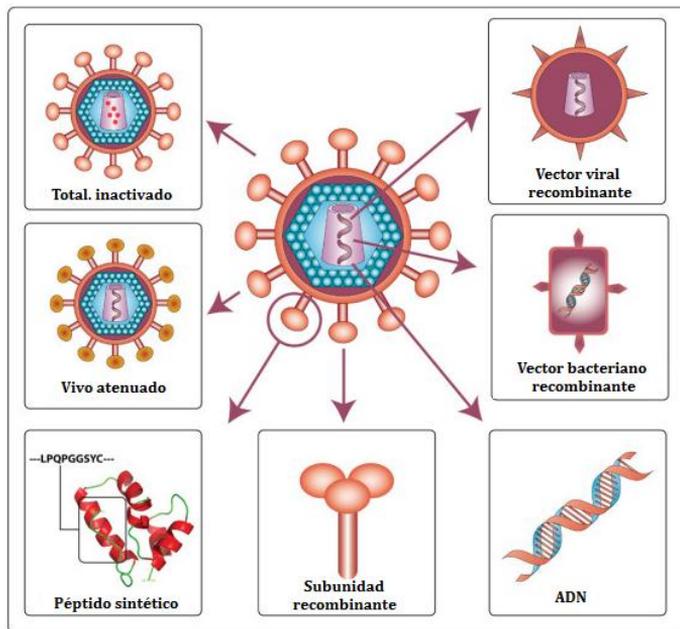


Figura 3.1. Diferentes estrategias en el desarrollo de vacunas frente al VIH-1 (modificado de Gorry y col.).⁵¹

Entre las *estrategias tradicionales*, se encuentran los virus vivos atenuados, los virus muertos y las subunidades proteicas, limitados por motivos de seguridad o eficacia. Entre las *estrategias novedosas* se incluyen los péptidos sintéticos y las vacunas de ADN plasmídico (ambos dependientes de adyuvantes o sistemas de transporte que mejoren su eficacia), y los vectores recombinantes vivos (especialmente virales) que expresen antígenos del VIH-1. El único

candidato que ha conseguido completar un ensayo clínico de fase III (*RV144*)⁵⁰ combina estas estrategias: vacuna ALVAC HIV (vector viral que contiene versiones genéticamente modificadas de tres genes virales ENV, GAG y POL) y AIDSVAX B/E (proteína gp120 modificada genéticamente).

Actualmente, se está prestando una gran atención al desarrollo de vacunas basadas en péptidos sintéticos, ya que presentan ventajas obvias como su gran seguridad, bajo coste, facilidad de manejo y almacenamiento, y especialmente, su diseño exclusivo frente a dianas específicas difícilmente accesibles al sistema inmune. Estos péptidos permiten la producción de anticuerpos capaces de neutralizar el virus antes de que infecte a las células, mediante la unión específica a las proteínas de la envuelta gp120 y gp41. Sin embargo, la envuelta del VIH es poco inmunogénica y genéticamente diversa, y la producción de anticuerpos hacia epítomos específicos a través de la vacunación no es sencilla. Aunque sí se han observado sitios vulnerables en la envuelta del VIH que se conservan en múltiples cepas, como el sitio de unión gp120-CD4 o regiones concretas en gp41 y gp120,⁵² los inmunógenos de las vacunas deben ser adaptados según la diversidad del VIH o deben presentar múltiples antígenos para provocar una respuesta más amplia.

Tradicionalmente, esta respuesta amplia se conseguía mediante la conjugación del antígeno a una proteína transportadora, como albúmina u ovoalbúmina. En la actualidad, se consigue mediante la utilización de formas mejoradas de presentación al sistema inmune de epítomos sintéticos,¹⁹ que incluyen dendrones MAP,⁵³ dendrímeros,⁵⁴ lipopéptidos,^{55, 56} polímeros,^{57, 58} conjugación a transportadores como proteínas o polímeros sintéticos,^{59, 60} o asociación a liposomas.⁶¹

Los dendrímeros proporcionan plataformas multivalentes molecularmente definidas para producir conjugados con pequeños

inmunoestimuladores y/o antígenos. La unión covalente permite una exposición multivalente de los antígenos, sin inducir respuestas adversas en el hospedador, como reacciones inmunes o inflamatorias. Además, como transportadores, las macromoléculas dendriméricas se consideran soportes inmunológicamente inertes. Entre los sistemas dendríticos, el sistema Péptido Antigénico Múltiple (MAP) es el más investigado con propósitos de inmunización y vacunas hasta el momento, y su estructura fue descrita en el Capítulo 2. Las múltiples posibilidades en su preparación permiten el anclaje de diversos epítomos de interés en una misma estructura. En terapia frente al VIH, se han utilizado dendrímeros polilisina con celobiosa que unen oligopéptidos acíclicos del VIH y actúan como nanovacunas.⁶²

3.1.2.d. Metalodendrímeros para el seguimiento de la terapia frente al VIH mediante técnicas de imagen

Aunque existen numerosos ejemplos de metalodendrímeros utilizados en técnicas de imagen para el tratamiento de diversas enfermedades (*ver Introducción*), no existen ejemplos concretos en la terapia frente al VIH. Algunos sistemas que podrían utilizarse frente a este virus podrían ser glicodendrímeros capaces de unir diferentes metales (Ru, Zn, Al, Gd), utilizados como biosensores de lectina^{63, 64} aptos para su seguimiento mediante fluorescencia o transferencia electrónica fotoinducida (PET) durante el tratamiento antiviral; o nanopartículas metálicas⁶⁵ decoradas con azúcares u otros polímeros donde el siRNA puede ser externamente conjugado, que además permiten el seguimiento de la biodistribución mediante resonancia magnética.

3.2. PROPIEDADES ANTIVIRALES FRENTE AL VIH

3.2.1. Introducción

En la infección por el VIH, el virus debe atravesar dos barreras antes de llegar a las células diana en el nódulo linfático (*Fig. 3.2*). La primera es el epitelio cervicovaginal, modelada mediante las líneas celulares adherentes de útero y vagina, Hec-1A y VK-2/E6E7, respectivamente. La segunda son las células sanguíneas, modeladas mediante cultivo primario de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP), células aisladas de sangre de donante sano a través de un procedimiento de gradiente de Ficoll. Sus características de cultivo primario permiten el estudio en condiciones más fisiológicas, a diferencia de otras líneas celulares, como por ejemplo MT-2, utilizadas en el Capítulo 1 de esta Memoria.

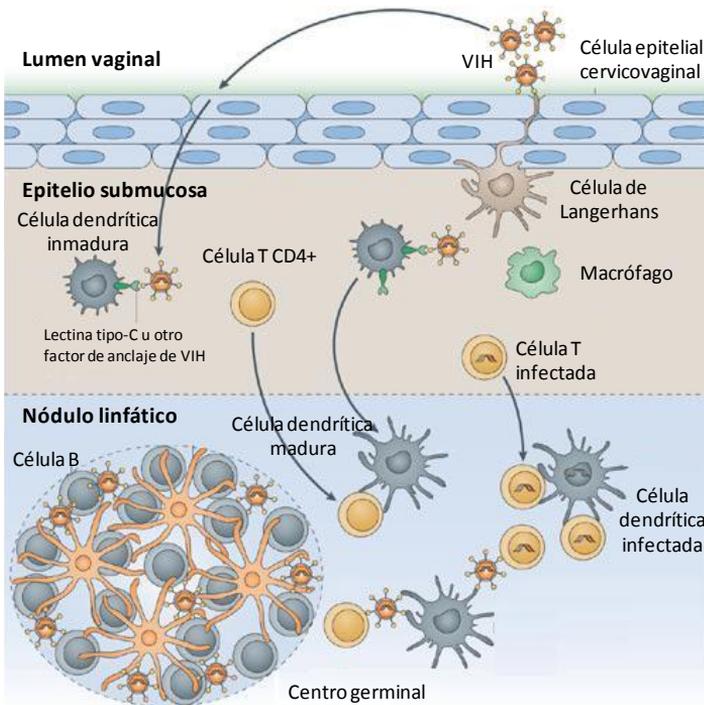


Figura 3.2. Proceso de infección del VIH, desde su entrada vía vaginal hasta alcanzar el nódulo linfático (modificado de Wu y col.⁶⁶).

Los dendrímeros con esqueleto PPI preparados en el Capítulo 2 presentan grupos aniónicos terminales que les hacen posibles candidatos como inhibidores de la entrada del virus en la célula. Además, su capacidad para coordinar metales en su estructura podría modular esta actividad inhibitoria.

3.2.2. Metalodendrímeros PPI con núcleo EDA funcionalizados con grupos sulfonato y carboxilato

Los compuestos utilizados en este estudio fueron los dendrímeros PPI con grupos sulfonato terminales **37** (G₁S), **38** (G₂S) y **39** (G₃S), y con grupos carboxilato terminales **41** (G₁C), **43** (G₂C) y **45** (G₃C). Además, se generaron sus metalodendrímeros derivados de níquel, cobalto, cobre y zinc, a distintas proporciones dendrímero:metal (D:M), de acuerdo con la saturación de las distintas posiciones de coordinación de su estructura (*Cap. 2*): G1, proporciones 1:1, 1:3 y 1:5; G2, proporciones 1:1, 1:5 y 1:9; y G3, proporciones 1:1, 1:9 y 1:17.

Inicialmente, se evaluó la biocompatibilidad de todos los compuestos y posteriormente se realizaron diversos ensayos relacionados con su capacidad para inhibir la infección del VIH en distintas condiciones.

3.2.2.a. Ensayos de biocompatibilidad

La evaluación de la toxicidad de los compuestos en células Hec-1A y VK-2 se realizó mediante ensayo MTS (similar al ensayo MTT, *ver Cap. 4*). Se sembraron las células a una densidad de 30.000 células/pocillo y 24 h después, se trataron con los compuestos durante otras 24 h adicionales. Tras eliminar el sobrenadante del cultivo, se incubaron con la disolución de MTS durante 2 h y se midió la absorbancia de cada pocillo. En el caso del tratamiento con metalodendrímeros, es necesario retirar todo el sobrenadante y añadir la disolución MTS sobre medio nuevo, debido a la interferencia de los iones metálicos sobre el compuesto reducido de MTS.

En CMSP, sin embargo, se realizó a través de un ensayo MTT (*Cap. 4*). Las células se sembraron a una densidad 200.000 células/pocillo, y se trataron con los dendrímeros durante 24 h. Tras centrifugar y eliminar el sobrenadante del cultivo, las células se incubaron con la disolución de MTT durante 4 h. De nuevo se centrifugaron y al *pellet* celular (sedimento) se añadió DMSO para disolver los cristales de formazán y medir la absorbancia de cada pocillo.

▪ **Dendrímeros**

La toxicidad de los dendrímeros se evaluó a concentraciones crecientes de 1, 5, 10 y 20 μM , en las distintas células (*Fig. 3.3*).

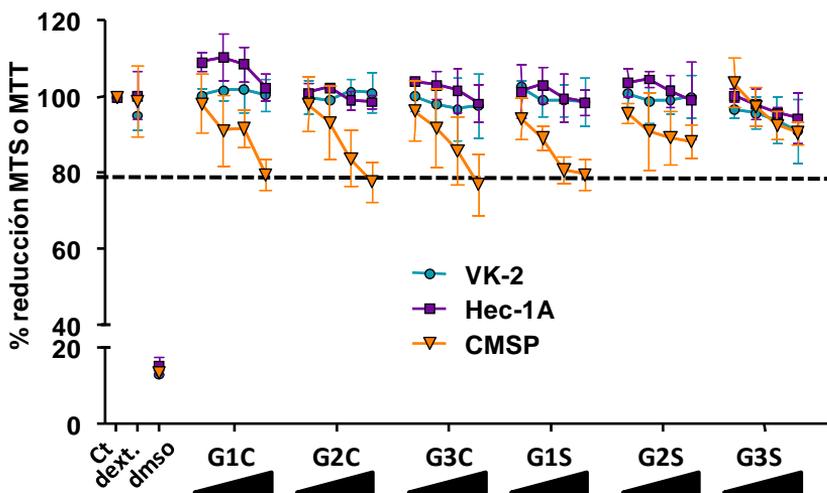


Figura 3.3 Evaluación de la toxicidad de los dendrímeros en VK-2 y Hec-1A (ensayo MTS) y CMSP (ensayo MTT), a concentraciones de 1, 5, 10 y 20 μM . Controles: sólo células, dextrano 10 μM y DMSO 10%.

En las líneas epiteliales (VK-2 y Hec-1A) no existen indicios de toxicidad para ningún compuesto. Tan sólo aparecen con una viabilidad del 80% algunos dendrímeros carboxilato a concentración de 20 μM en CMSP, de modo que para asegurar la total biocompatibilidad, la concentración de trabajo se estableció en 10 μM . En el caso de dendrímeros sulfonato, la biocompatibilidad es aún mayor, pero se toma el mismo límite para facilitar la comparación entre ambas familias.

▪ Metalodendrimeros

Una vez establecido el límite de seguridad de 10 μM , se evaluó la biocompatibilidad de los derivados metálicos de Ni, Co, Cu y Zn de los dendrimeros precursores, a las distintas proporciones dendrimerometal. Además, los valores se compararon con las sales metálicas: NiBr_2 , CoCl_2 , CuCl_2 y ZnSO_4 , a la máxima concentración utilizada en cada ensayo, para analizar el efecto de la coordinación del ión metálico en la estructura dendrítica. El estudio se llevó a cabo en Hec-1A (Fig. 3.4), VK-2 (Fig. 3.5) y CMSP (Fig. 3.6).

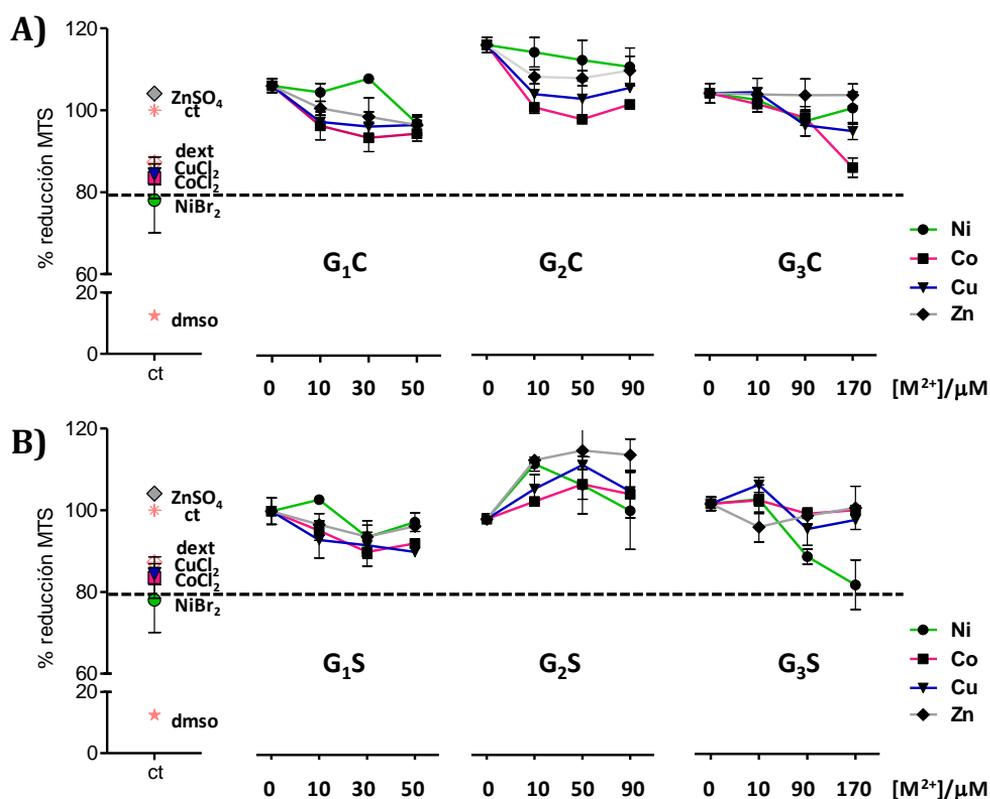


Figura 3.4 Ensayo MTS en células Hec-1A de los dendrimeros con grupos carboxilato y sulfonato con metales a las distintas proporciones D:M. Controles: sólo células, dextrano 10 μM , DMSO 10% y los correspondientes controles metálicos a 170 μM .

En Hec-1A (Fig. 3.4), todos los compuestos probados, tanto dendrímeros como metalodendrímeros son biocompatibles. En la mayoría de los casos, la coordinación de los iones metálicos al dendrímero supone aumentar su biocompatibilidad de manera destacada en relación con los iones metálicos libres. Se observa, además, que los derivados de segunda generación presentan una biocompatibilidad por encima de sus análogos de primera y tercera generación, lo que les conforma como candidatos ideales para los siguientes experimentos.

Para corroborar los resultados obtenidos en Hec-1A, se repitió el experimento en células VK-2 (Fig. 3.5), tan sólo para los derivados de segunda generación. De nuevo, todos los compuestos probados son biocompatibles, a excepción del control ZnSO_4 y el complejo **38-Zn₉**, ambos con una concentración de Zn^{2+} de $90 \mu\text{M}$. Además, la coordinación de los iones metálicos al dendrímero supone aumentar su biocompatibilidad de manera destacada en relación con los iones metálicos libres, incluso para el caso del compuesto tóxico.

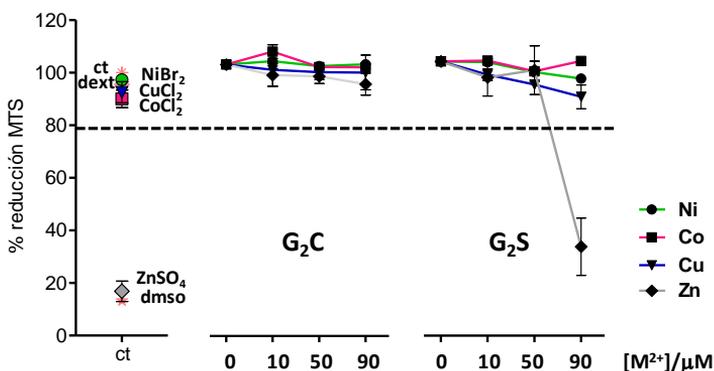


Figura 3.5. Ensayo MTS en células VK-2 de los dendrímeros G₂ carboxilato y sulfonato con metales a las distintas proporciones D:M. Controles: sólo células, dextrano 10 µM, DMSO 10% y los correspondientes controles metálicos a 90 µM.

Finalmente, la toxicidad de los metalodendrimeros se evaluó en CMSP, mediante ensayo MTT, y los resultados se muestran en la Figura 3.6. La mayoría de los compuestos probados no presenta indicios de toxicidad a excepción de algún caso, que se encuentra en el límite, y los compuestos carboxilato **45-Co₁₇** y sulfonato **39-Co₁₇**. De nuevo, los derivados sulfonato son ligeramente menos tóxicos que los carboxilato, y la coordinación del metal al dendrímtero aumenta la biocompatibilidad del producto final.

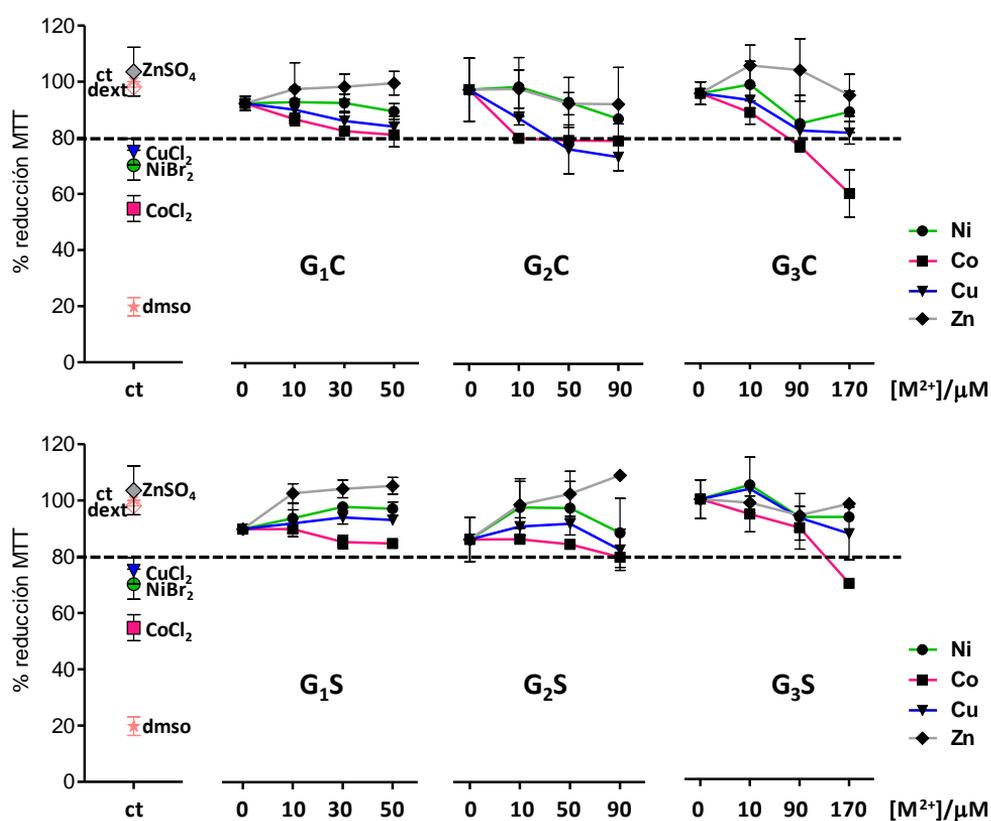


Figura 3.6. Ensayo MTT en CMSP de los dendrimeros carboxilato y sulfonato con metales a las distintas proporciones D:M. Controles: sólo células, dextrano 10 μM , DMSO 10% y los correspondientes controles metálicos a 170 μM .

3.2.2.b. Ensayos de inhibición de la infección por el VIH

1) Modelo de la primera barrera: Hec-1A y VK-2

A pesar de que las células epiteliales apenas son infectadas por el VIH, son la primera línea de defensa frente a esta infección, por lo que es importante realizar un estudio completo de la actividad inhibitoria de los compuestos en un modelo de esta primera barrera, como son las líneas celulares Hec-1A y VK-2. Una capacidad antiviral efectiva en esta barrera supone una disminución de las probabilidades de infección de las células diana del virus en pasos posteriores.

a. Inhibición en Hec-1A: tiempo total a 24 y 72 h

La capacidad inhibitoria de los dendrímeros se ensayó a un tiempo de pre-tratamiento de 1 h (*Fig. 3.7*). El protocolo estándar seguido fue el siguiente: las células Hec-1A se sembraron a una densidad de 30.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con medio completo y 24 h después se pre-trataron con los compuestos durante el tiempo seleccionado. Posteriormente, se infectaron con el aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3} (100 ng/10⁶ céls.) durante 2 h 30 min, se lavaron con PBS y tras añadir medio nuevo, se incubaron a 37°C y 5% CO₂. 24 y 72 h después de la infección, se recogió el sobrenadante de cultivo y se evaluó la producción de Ag p24 mediante ELISA (INNOTEST® HIV antigen mAb, kit comercial). El valor obtenido es proporcional a la cantidad de partículas virales y permite cuantificar la infección en cada muestra. Como controles, se utilizaron células infectadas sin tratar (control positivo de la infección, utilizado como referencia del 100%), Suramin y T-20 (fármacos comerciales que actúan en las primeras etapas del ciclo viral, los pasos de entrada, utilizados como controles positivos de inhibición de la infección), y los controles metálicos (NiBr₂, CoCl₂, CuCl₂ y ZnSO₄, que permiten detectar las diferencias en la inhibición entre el ión metálico libre y coordinado en la estructura dendrítica).

Inhibición Hec-1A pre-tratamiento a 24 y 72 h

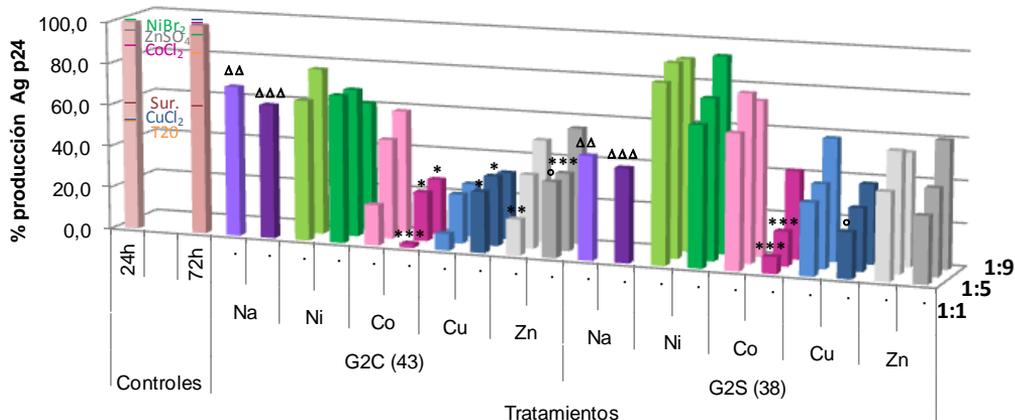


Figura 3.7. Producción de Ag p24 en Hec-1A a 24 h (claro) y 72 h (oscuro) tras pre-tratar durante 1 h las células con los compuestos (10 μ M). Controles: células sin tratar, Suramin 10 μ M, T-20 20 μ M y controles metálicos a 90 μ M. La infección se realizó con el aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3}. Los resultados son la media de 2 experimentos. La comparación estadística se realizó respecto al dendrímero solo [$p < 0.01$ (***)], [$p < 0.05$ (**)], [$p < 0.1$ (*)] y [$p < 0.2$ (°)], y éste se comparó con las células sin tratar [$p < 0.01$ ($\Delta\Delta\Delta$), $p < 0.05$ ($\Delta\Delta$)].

A 24 h, los dendrímeros G₂S (**38**) y G₂C (**43**) en su forma de sal sódica presentan una inhibición del 50% y 30%, respectivamente, aumentando su eficacia un 10% a 72 h. En los complejos metálicos, el efecto inhibitorio disminuye al aumentar la proporción de metal, probablemente debido a que los grupos aniónicos se van encontrando menos disponibles para su acción. A 24 h, los complejos carboxilato 1:1 presentan una inhibición de 80% (Co y Zn) y 90% (Cu), mientras que los sulfonato muestran actividades del 40% (Co) y 60% (Cu y Zn). Los derivados de Ni disminuyen la capacidad inhibitoria del dendrímero por sí solo, por lo que se descartan para los siguientes estudios. Tras 72 h, los complejos de Ni y Co aumentan su capacidad inhibitoria, alcanzando un nivel del 95-100% para los derivados de Co. Esta tendencia se mantiene para los complejos sulfonato de Cu y Zn, mientras que en los análogos carboxilato disminuye ligeramente su actividad. En todos los casos, la inhibición de los metalodendrimeros es mayor que la de los controles metálicos y comerciales.

b. Inhibición en Hec-1A: optimización del tiempo de pre-tratamiento

El tiempo de pre-tratamiento se optimizó mediante un estudio comparativo a 30 min y 1 h, a través del protocolo estándar, con un tiempo final de tratamiento de 24 h. Los resultados se muestran en la Figura 3.8.

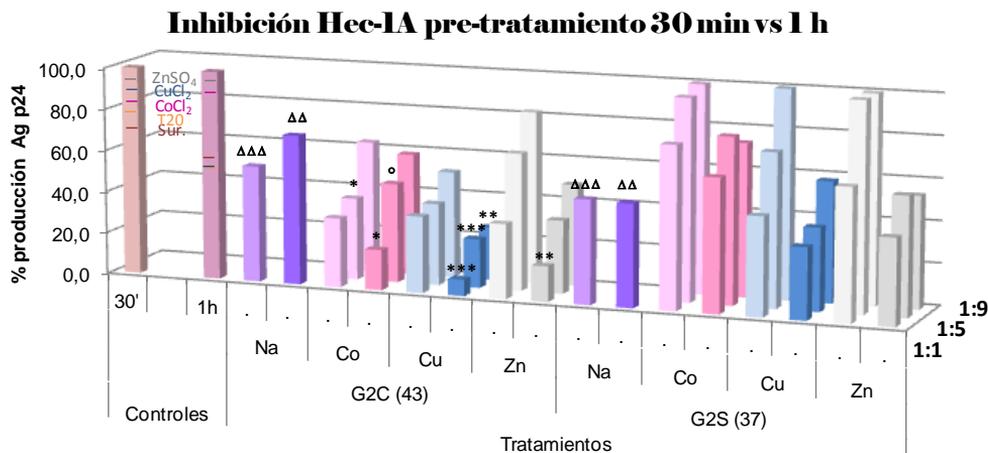


Figura 3.8 Producción de Ag p24 en Hec-1A a 24 h, con tiempos de pre-tratamiento con los compuestos (10 μM) de 30 min (claro) y 1 h (oscuro). Controles: células sin tratar, Suramin 10 μM, T-20 20 μM y controles metálicos a 90 μM. La infección se realizó con el aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3}, específico del correceptor CXCR4. Los resultados son la media de dos experimentos independientes. La comparación estadística se ha realizado respecto al dendrímero solo [p <0.01 (***), <0.05 (**), <0.1 (*) y <0.2 (°)], y éste se comparó con las células sin tratar [p<0.01 (ΔΔΔ), p<0.05 (ΔΔ)].

La eficacia de los dendrímeros por sí mismos es elevada con un pre-tratamiento de 30 min (45% en G₂C y 50% en G₂S), y ésta se mantiene o disminuye ligeramente al aumentar el tiempo de pre-tratamiento. Sin embargo, para el caso de los metalodendrímeros, la inhibición es bastante mayor al pre-tratar durante 1 h. Se concluye, por tanto, que un pre-tratamiento de 30 min es suficiente para que los dendrímeros ejerzan su máxima actividad inhibitoria, pero es necesario aumentar este tiempo para alcanzar las mejores cotas en los derivados metálicos. El tiempo óptimo de pre-tratamiento se estableció en 1 h.

c. Estudio de la especificidad por los correceptores

Los anteriores ensayos de inhibición se han llevado a cabo con aislados virales X4 VIH-1_{NL4.3}, los cuales dan una idea de la actividad de los distintos compuestos en virus que actúan preferentemente a través del correceptor CXCR4. Sin embargo, es interesante evaluar también la actividad de los mismos sobre virus que actúen a través del correceptor CCR5, para poder determinar la especificidad de los compuestos por uno, otro o ambos correceptores.

Para ello, se realizó un ensayo análogo mediante el protocolo estándar con pre-tratamiento de 1 h y tiempo total de 24 h, con la diferencia de que la infección se realizó con el aislado viral R5 VIH-1_{BAL}. Los resultados se muestran, de forma comparativa, en la Figura 3.9.

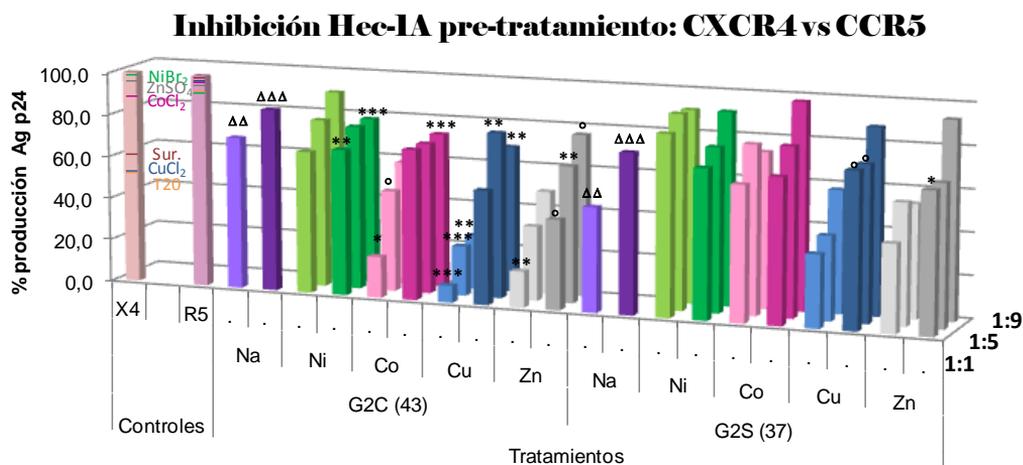


Figura 3.9 Producción de Ag p24 en Hec-1A a 24 h tras pre-tratar las células con los compuestos (10 μ M) durante 1 h, e infectarlas con el aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3} (claro) o R5 VIH-1_{BAL} (oscuro). Controles: células sin tratar, Suramin 10 μ M, T-20 20 μ M y controles metálicos a 90 μ M. Los resultados son la media de dos experimentos independientes. La comparación estadística se ha realizado respecto al dendrímero solo [$p < 0.01$ (***), < 0.05 (**), < 0.1 (*) y < 0.2 (Δ)], mientras que el dendrímero se comparó con las células sin tratar [$p < 0.01$ ($\Delta\Delta\Delta$), $p < 0.05$ ($\Delta\Delta$)].

En la gráfica se aprecia que, en general, el efecto inhibitorio de los compuestos es mayor si el virus actúa a través del correceptor CXCR4, excepto en el caso de los compuestos de níquel. Este dato es llamativo, ya que los compuestos de níquel no presentan ninguna inhibición del VIH a través de CXCR4. Además, cuando el correceptor es CCR5 se mantiene la tendencia observada en CXCR4, disminuyendo la inhibición al aumentar la cantidad de metal en la estructura dendrítica. En relación con el metal utilizado, se puede decir que derivados de Co son más activos frente al correceptor CXCR4, los de Ni por el correceptor CCR5, y que los de Cu y Zn actúan en ambos. Esta tendencia no se había observado en los ensayos realizados con complejos metálicos de generación cero, y puede estar relacionada con la estructura dendrítica.

d. Estudio de la internalización del virus en Hec-1A

El proceso de internalización viral en células epiteliales permite, por un lado, desencadenar la infección, y por el otro, permitir la transmisión a otras células. Los compuestos que actúan impidiendo este proceso paralizan la infección a nivel de la primera barrera, con el gran interés que ello supone. En el estudio de internalización del virus en células Hec-1A, se cuantificó la cantidad de Ag p24 dentro de las células mediante dos técnicas distintas (lisis celular-ELISA y citometría de flujo) que nos permitieron corroborar la actuación inhibitoria de los dendrímeros en el primer paso del ciclo del VIH (*Fig. 3.10*).

Ambos ensayos se inician mediante el protocolo de inhibición estándar, sembrando las células Hec-1A en placas de 24 pocillos a una densidad de 120.000 (lisados) o 500.000 (citometría) céls/pocillo. Tras el pre-tratamiento de 1 h y la infección con aislado X4 VIH-1_{NL4.3} durante 2 h 30 min, las células se lavaron repetidamente con PBS, se despegaron con tripsina y se centrifugaron para obtener los distintos pellet celulares.

- ✓ Estudio mediante lisis celular y ELISA. Los pellet celulares se lisaron con Tritón X-100 (0.2% en PBS), se centrifugaron, y el sobrenadante se separó para cuantificar la cantidad de Ag p24 mediante ensayo ELISA.
- ✓ Estudio mediante citometría de flujo (FACS). Las células se permeabilizaron por incubación con *Cytofix-Cytoperm* durante 1 h a 4°C, y tras el lavado con *Wash Perm*, las muestras se incubaron con el anticuerpo anti-p24 KC57-FITC durante 1 h, a 4°C en oscuridad. De nuevo, las células se lavaron con *Wash Perm* repetidamente, para eliminar todo el anticuerpo que haya quedado unido de manera inespecífica, y se fijaron con *p*-formaldehído al 2%. Tras su lavado, y resuspensión en PBS (con 2% SFB), se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo de tipo FACS.

Los resultados de ambos ensayos de internalización (ELISA líneas continuas, FACS líneas discontinuas) se exponen en la Figura 3.11 de forma comparativa. Los datos obtenidos corroboran los resultados encontrados en los anteriores ensayos de inhibición, demostrando que los compuestos además impiden la internalización del virus en las células. El ensayo ELISA muestra que los dendrímeros G2S y G2C, en sus formas de sal sódica, presentan cotas de inhibición entre el 20-30%, que aumentan hasta niveles de 55% en algunos derivados metálicos. De nuevo, la inclusión del ión metálico en la estructura dendrítica aumenta su eficacia notablemente, como puede deducirse de la comparación con los controles metálicos para cada una de las técnicas. Además, ciertos compuestos producen una inhibición de la internalización del VIH en un mayor grado que los antirretrovirales comerciales Suramin y T-20. Del conjunto de ambas técnicas parece intuirse de nuevo una tendencia donde al aumentar la proporción de metal, la inhibición de la internalización del virus disminuye.

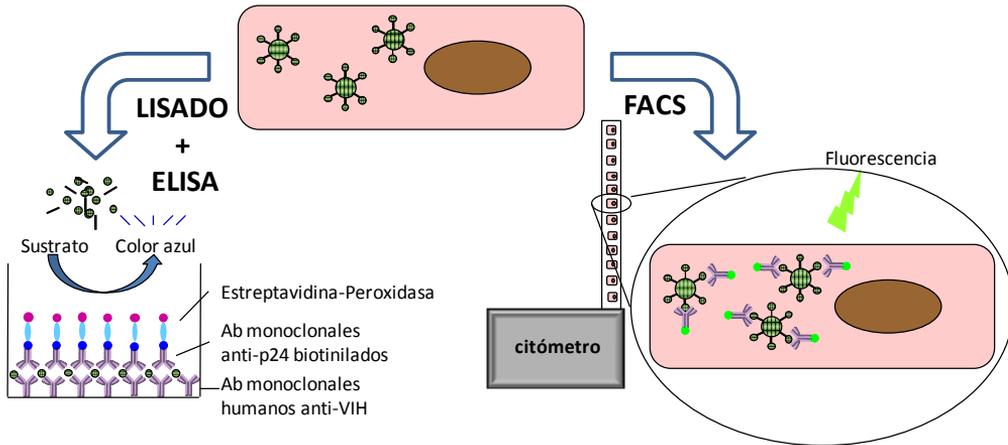


Figura 3.10 Representación de las técnicas utilizadas para la evaluación de la internalización del virus (medida Ag p24) en Hec-1A tras pre-tratar las células con los compuestos.

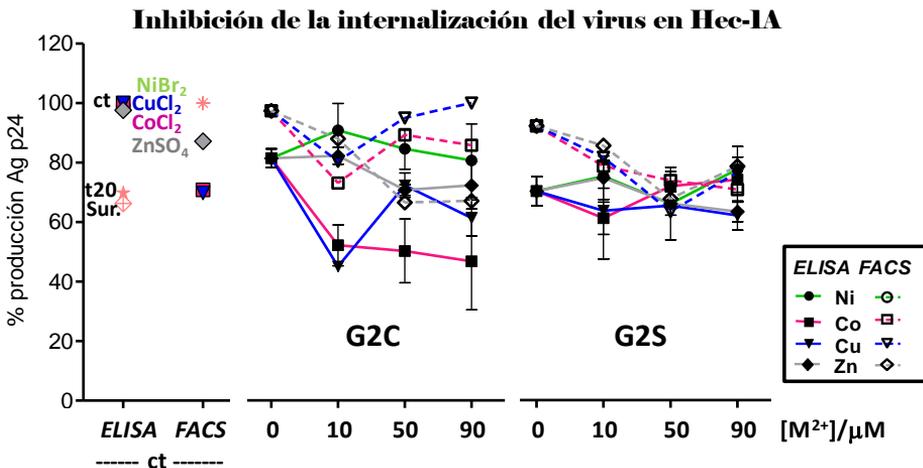


Figura 3.11 Inhibición de la internalización del virus (medida Ag p24) en Hec-1A tras pre-tratar las células con los compuestos (10 μM) durante 1 h, comparativa de resultados obtenidos mediante ELISA y FACS. Controles: células solas, Suramin 10 μM, T-20 20 μM y controles metálicos a 90 μM. La infección se realizó con el aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3}, específico del correceptor CXCR4. Los resultados son la media de uno (FACS) o dos experimentos independientes (ELISA).

En el análisis mediante citometría de flujo, se evaluó la fluorescencia de las células permeabilizadas y marcadas con el anticuerpo fluorescente anti-p24 KC57-FITC. Los histogramas obtenidos se muestran en la Figura 3.12, tomando como controles células no infectadas marcadas (en rojo) y células infectadas por el VIH marcadas (en naranja y negro). La disminución en la fluorescencia en el interior de las células tratadas con los compuestos es indicativa de una inhibición de la internalización del virus. Los valores de los histogramas cuantificados se muestran en la Figura 3.11, y parecen presentar una tendencia similar a la hallada mediante lisado y ELISA. A pesar de que los resultados obtenidos mediante citometría de flujo (*Fig. 3.12*) aportan valores menores de inhibición debido a la distinta naturaleza de la técnica de medida, en general se observa una tendencia similar mediante las dos técnicas.

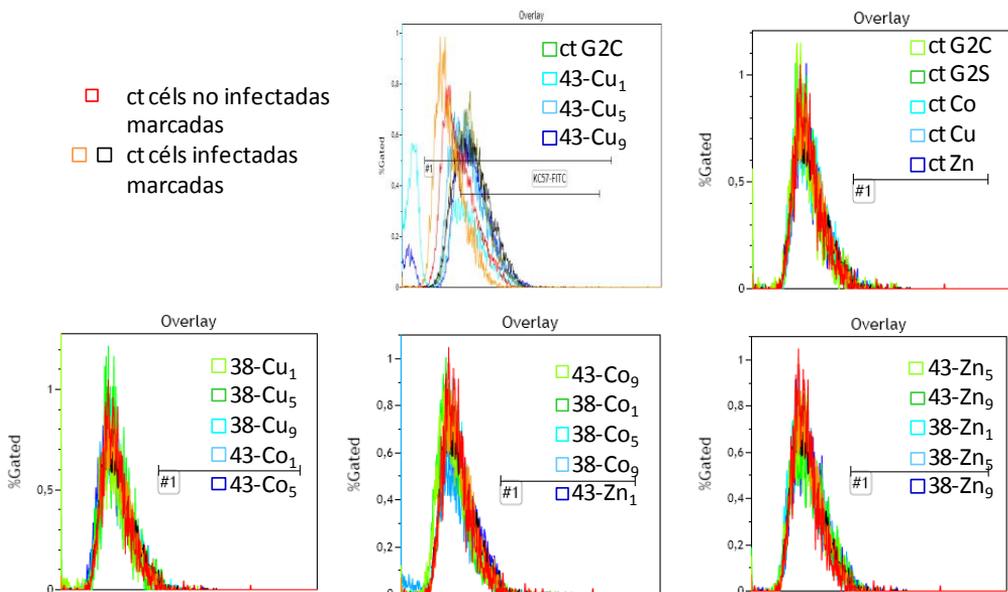


Figura 3.12 Histogramas obtenidos mediante FACS donde se representa la fluorescencia interna de las células marcadas con el anticuerpo específico para la proteína viral p24, KC57-FITC.

e. Ensayo de inhibición en VK-2

Los anteriores ensayos se realizaron en células Hec-1A como modelo de la primera barrera de infección del virus. Para comprobar cuál es el comportamiento de los compuestos en otro tipo de células epiteliales, las VK-2, se realizó un ensayo de inhibición mediante el protocolo estándar, con pre-tratamiento de 1 h y tiempo total de 24 h. El ensayo se realizó con un conjunto de compuestos seleccionados que presentaban cierta inhibición en células Hec-1A, y los resultados se muestran en la Figura 3.13. Tras el análisis, se concluyó que el comportamiento es parecido en ambos tipos celulares; los dendrímeros presentan niveles de inhibición similares o incluso mayores en esta línea celular, mientras que los derivados metálicos la inhibición es menor en la línea celular VK-2 pero se mantiene la tendencia observada en la línea celular Hec-1A.

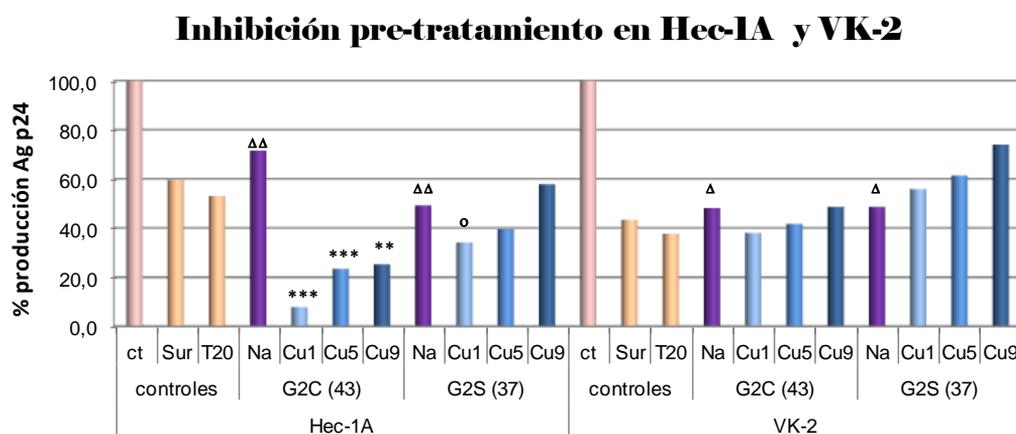


Figura 3.13 Producción de Ag p24 en Hec-1A y VK-2 a 24 h tras pre-tratar las células con los compuestos (10 μ M) durante 1 h. Controles: células sin tratar, Suramin 10 μ M y T-20 20 μ M. La infección se realizó con el aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3}, específico del correceptor CXCR4. Los resultados son la media de dos experimentos independientes. La comparación estadística se ha realizado respecto al dendrímero solo [$p < 0.01$ (***)], < 0.05 (**), < 0.2 (°)], mientras que el dendrímero se comparó con las células sin tratar [$p < 0.05$ ($\Delta\Delta$), $p < 0.01$ ($\Delta\Delta\Delta$)].

2) Modelo de la segunda barrera: CMSP

Tras demostrar la capacidad de los compuestos para inhibir la entrada del VIH-1 en las líneas celulares VK-2 y Hec-1A, como modelo de la primera barrera frente a la infección viral, se evaluó su acción en CMSP, como modelo de la segunda barrera. Para ello, se realizaron dos estudios diferentes para evaluar la capacidad preventiva (*ensayo en pre-tratamiento*) y terapéutica (*ensayo en post-tratamiento*) de los compuestos. Las CMSP se extrajeron de sangre de donantes sanos mediante un gradiente en Ficoll (*Cap. 4*). Tras su activación, se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 200.000 células/pocillo en medio RPMI-1640 completo con 10% de SFB. En el ensayo de pre-tratamiento, las CMSP se sometieron al tratamiento con los compuestos durante 1 h. Posteriormente, las células se infectaron durante 2 h 30 min con el aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3} (100 ng/10⁶ células), se lavaron con PBS y se añadió medio nuevo. Tras 24 h, se recogió el sobrenadante y se midió la producción de Ag p24 mediante ELISA. En el ensayo en post-tratamiento, las CMSP se infectaron primero durante 2 h 30 min con el aislado viral X4, y posteriormente se trataron con los compuestos durante 24 h. Tras este tiempo, se recogió el sobrenadante del cultivo y se cuantificó la producción de Ag p24.

Los resultados de ambos ensayos se presentan de manera comparativa en la Figura 3.14. Los dendrímeros G2S y G2C, en sus formas de sal sódica, producen una inhibición de 20-30%, tanto en pre como en post-tratamiento. El pre-tratamiento con los derivados metálicos del dendrímero carboxilato supone un aumento de la inhibición, especialmente para los compuestos de cobre (50%) y zinc (35%), mientras que para los derivados del dendrímero con grupos sulfonato las diferencias halladas no son significativas. De nuevo, se encuentra una tendencia análoga a la hallada en la línea celular Hec-1A, donde la inhibición disminuye al aumentar la concentración de metal, debido a la menor disponibilidad de los grupos aniónicos para ejercer su acción. Las tasas de

inhibición en pre-tratamiento son del orden o incluso mejores que los controles comerciales (Suramin y T-20, con una inhibición alrededor del 25%, marcado en la figura con una línea naranja discontinua). Para el post-tratamiento, la tendencia se invierte en el caso de los compuestos carboxilato, presentando una mayor inhibición los dendrímeros a la máxima concentración de metal. Este resultado está en concordancia con una mayor fortaleza del enlace, que permita mantener unidos los iones metálicos hasta la internalización en la célula, y su posterior liberación para ejercer un efecto terapéutico. En todos los casos, se observa un efecto sumatorio entre la actividad del dendrímero y la del ión metálico solo, y una actuación inhibitoria del orden del AZT utilizado como control (alrededor del 20%, línea verde discontinua en la Figura 3.14).

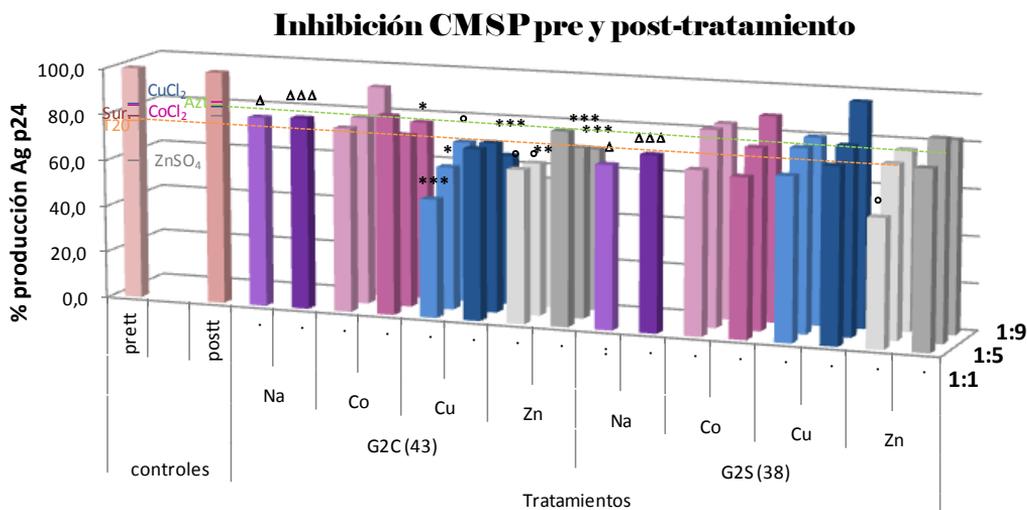


Figura 3.14 Producción de Ag p24 a 24 h en CMSP tratadas con los compuestos (10 μ M), mediante pre-tratamiento 1 h (claro) y post-tratamiento 24 h (oscuro). Controles: células solas, Suramin 10 μ M, T-20 20 μ M, AZT 1 μ M y controles metálicos a 90 μ M. La infección se realizó con el aislado X4 VIH-1_{NL4.3}, específico del correceptor CXCR4. Los resultados son la media de dos experimentos independientes. La comparación estadística se realizó respecto al dendrímero solo [p <0.01 (***), <0.05 (**), <0.1 (*) y <0.2 (°)], mientras que el dendrímero se comparó con las células sin tratar [p<0.01 ($\Delta\Delta\Delta$), p<0.1 (Δ)].

3.2.2.c. Conclusiones y propuesta de mecanismo de acción

Según los resultados de los anteriores experimentos, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- ✓ Los dendrímeros PPI con núcleo EDA y grupos sulfonato y carboxilato en la periferia son biocompatibles hasta una concentración de 20 μM , en las líneas celulares (Hec-1A y VK-2) y en los cultivos primarios (CMSP) estudiados.
- ✓ Los complejos metálicos de Ni, Co, Cu y Zn, preparados a partir de estos dendrímeros a distintas proporciones dendrímero:metal también son biocompatibles. La coordinación del ión metálico al dendrímero disminuye significativamente su toxicidad, respecto al ión libre.
- ✓ En la línea celular Hec-1A, como modelo de la primera barrera frente a la infección por el VIH, el pre-tratamiento con algunos derivados de segunda generación durante 1 h produce tasas de inhibición de hasta un 90% a 24 h, que aumentan hasta alrededor del 100% a las 72 h. Para todos los metales, la inhibición disminuye al aumentar la proporción de ión metálico, debido a la saturación de los grupos aniónicos periféricos. Las mayores inhibiciones se producen con los compuestos **38-M₁** y **43-M₁**, donde existe una cooperatividad entre los grupos aniónicos libres y el centro metálico por la interacción con las proteínas virales y celulares (*Fig. 3.15*).
- ✓ En aislados virales X4 VIH-1_{NL4.3}, específicos del correceptor CXCR4, los complejos más efectivos son los de cobalto y cobre, mientras que los derivados de níquel no producen ninguna inhibición. Sin embargo, para aislados R5 VIH-1_{Bal}, específicos del correceptor CCR5, los complejos de níquel presentan cierta inhibición.
- ✓ Los metalodendrímeros además previenen la internalización del virus dentro de las células, y la interacción del ión metálico en la estructura dendrítica potencia su actividad inhibitoria de manera destacada.

- ✓ En la línea celular VK-2, los ensayos realizados apuntan hacia una tendencia similar a la observada en la línea Hec-1A, aunque los valores de inhibición para los metalodendrimeros son menores en la línea celular vaginal.

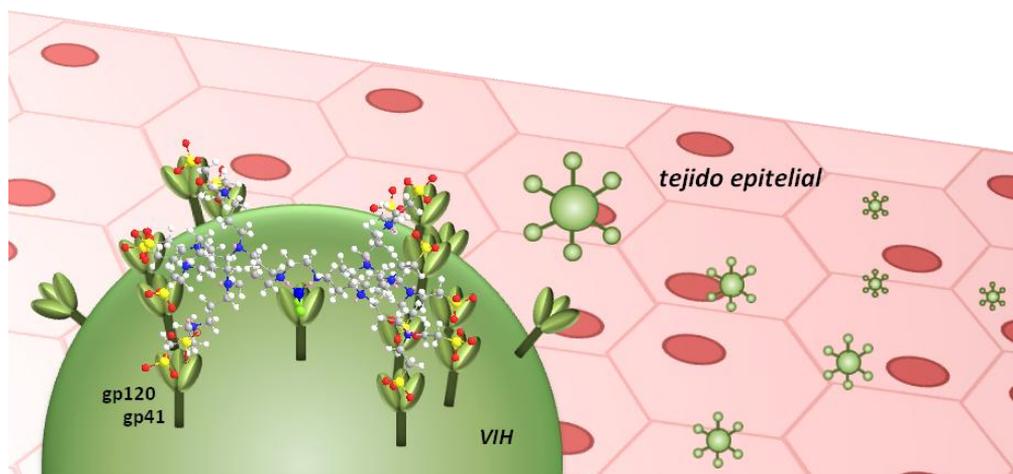


Figura 3.15 Propuesta de la interacción de los metalodendrimeros **38-M₁** y **43-M₁** con las proteínas de la superficie del VIH y, posiblemente también con los receptores y correceptores celulares, que impide la infección por el VIH de las células del epitelio vaginal y uterino. La estructura del compuesto **38-Cu₁** se modeló según la situación de mínima energía mediante el comando MM2 del programa Chem3D Ultra.

- ✓ En CMSP, el pre-tratamiento con los dendrimeros y sus complejos metálicos produce tasas de inhibición del orden de los inhibidores comerciales (Suramin y T-20), o incluso mayores en el caso de proporción 1:1 de Cu y Zn. De nuevo se observa una disminución de la inhibición al aumentar la cantidad de metal. El post-tratamiento con estos mismos compuestos también produce tasas de inhibición similares a la del AZT, o mayores (dendrimeros carboxilato de cobalto, cobre y zinc), observándose en éstos la inversión de la tendencia vista hasta el momento, probablemente por la mayor interacción con los átomos metálicos que permite una mejor internalización dentro de las células.

Las conclusiones anteriores nos llevan a proponer un mecanismo de acción de estos compuestos como el que se muestra en la Figura 3.16. La aplicación tópica de estos compuestos permitiría inhibir la infección por el VIH a nivel epitelial (primeramente en células vaginales y después en uterinas), reduciendo además la internalización del virus en estos tipos celulares, de acuerdo con los experimentos de pre-tratamiento realizados en las líneas celulares VK-2 y Hec-1A. En el caso de que las partículas virales o las células infectadas llegaran al sub-epitelio, los metalodendrimeros serían capaces de inhibir la infección de los linfocitos T, así como reducir la infección de células ya infectadas, como se observó en los ensayos en pre y post-tratamiento en CMSP.

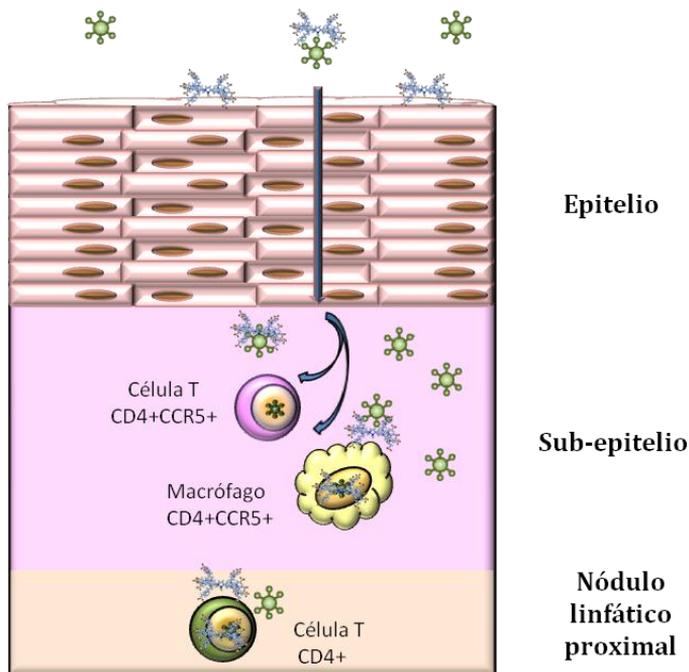


Figura 3.16 Propuesta de mecanismo de acción de los metalodendrimeros estudiados en los distintos puntos de la infección por el VIH.

3.3. PERSPECTIVAS FUTURAS Y PROPUESTAS DE ACCIÓN DE DISTINTAS TERAPIAS FRENTE AL VIH

3.3.1. Propiedades antivirales de metalodendrimeros carbosilano funcionalizados con grupos sulfonato

La cuña dendrítica **29** presenta analogías con el dendrímico **37**, como son la presencia de un núcleo coordinante de EDA y 8 grupos sulfonato periféricos (Fig. 3.17). Sin embargo, su diferente esqueleto dendrítico y la presencia de grupos hidroxietilo que potencian la coordinación en el núcleo, son importantes a la hora de obtener distintas actividades terapéuticas.

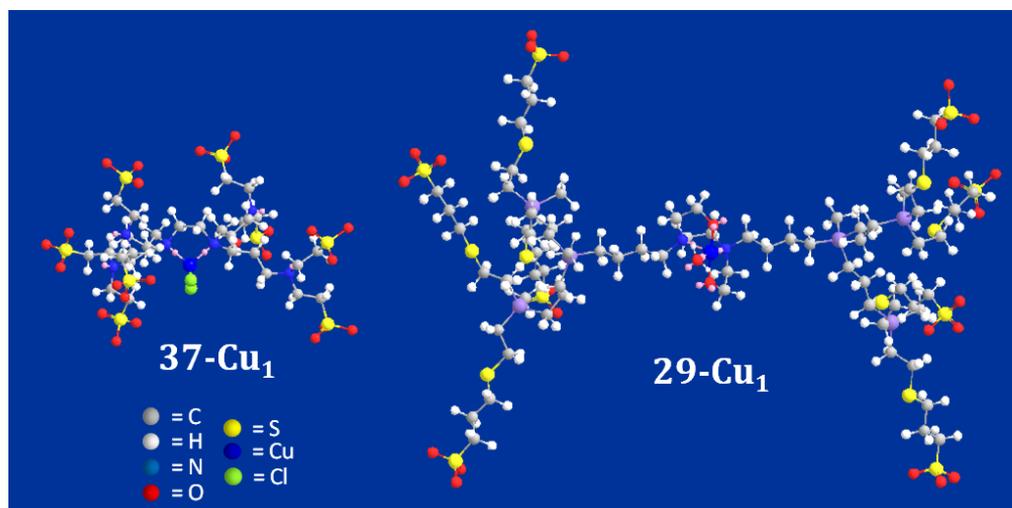


Figura 3.17 Comparativa de las estructuras de los compuestos **29-Cu₁** y **37-Cu₁**, ambas modeladas según la situación de mínima energía mediante el comando MM2 del programa Chem3D Ultra.

En el apartado anterior, se mostró que los dendrimeros funcionalizados con grupos sulfonato **37-39**, presentan importante actividad antiviral frente al VIH que puede verse modulada mediante la coordinación de diversos metales. En el caso de **29**, la coordinación puede controlarse no solo en función del punto

de coordinación sino también en función del tipo de ion metálico, debido a la presencia de átomos duros y blandos que pueden discernir en la coordinación de distintos metales. Además, la presencia de un esqueleto carbosilano aumenta la lipofilia del sistema y puede favorecer la inhibición en post-tratamiento. Por todo ello, se propone este sistema como posible agente antiviral frente al VIH, a falta de un estudio experimental que demuestre esta conjetura.

Por otro lado, los metalodendrimeros derivados del sistema **29** podrían ser utilizados en otras terapias (ej. cáncer). El complejo de Pt(II) con *N,N'*-bis(hidroxietyl)etilendiamina interacciona de manera eficaz con guanósín monofosfato (5'-GMP) y en su unión al ADN a pH 7.2, con un tiempo de vida media de 1 h.^{67, 68} Este complejo constituye el punto focal del dendrímico **29-Pt₅**, por lo que podría esperarse un comportamiento similar de ambos, aunque reforzado por la presencia de otros iones Pt(II) coordinados en su periferia. Este sistema podría interactuar simultáneamente con distintas bases nitrogenadas del ADN (*Fig. 3.18*) e interferir en la replicación de las células cancerígenas. El estudio del comportamiento de estos sistemas será abordado por el grupo de investigación donde se ha realizado este trabajo en un futuro próximo.

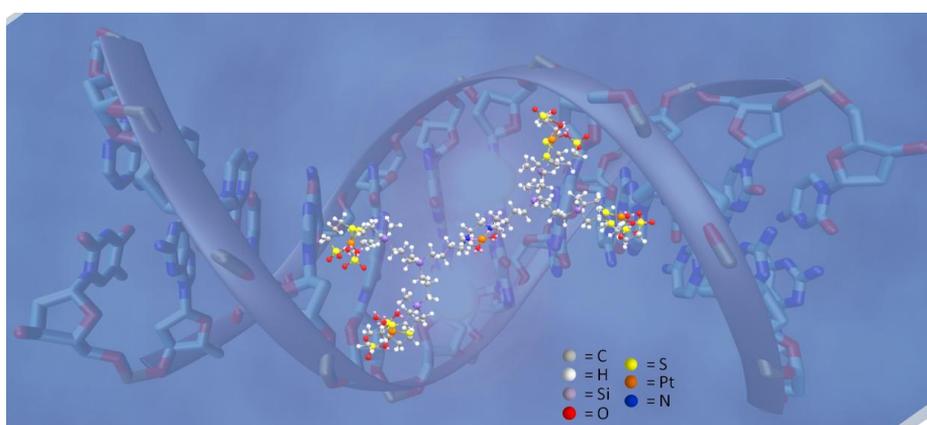


Figura 3.18 Propuesta de mecanismo de acción del complejo de platino **29-Pt₅** en la unión a ADN, cuya estructura ha sido modelada según la situación de mínima energía mediante el comando MM2 del programa Chem3D Ultra.

3.3.2. Actividad antiviral mejorada de dendrímeros PPI con grupos aniónicos e ibuprofeno conjugado

El tratamiento prolongado con terapia antirretroviral de alta eficacia (TARGA) conduce a la aparición de resistencias y, en último término, al fallo de la terapia. Este fallo es principalmente resultado de mutaciones virales, pero en otras ocasiones son ciertos mecanismos celulares los que lo generan.⁶⁹ Una terapia efectiva requiere alcanzar una concentración intracelular adecuada de fármacos antirretrovirales, la cual es controlada por procesos de influjo y eflujo a través de la membrana celular.⁷⁰ Entre las proteínas implicadas en estos procesos de forma activa, se encuentra la subfamilia de proteínas de multiresistencia a fármacos (MRP),^{71, 72} y en especial sus miembros MRP-1, 4 y 5 que transportan fármacos antirretrovirales fuera de las células mediante procesos activos.⁷³ Estudios previos han demostrado que ciertos fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs, ej. ibuprofeno o indometacina) inhiben la actividad transportadora de MRP4,^{73, 74} y que el pre-tratamiento con estos fármacos aumenta la efectividad de fármacos anti-VIH como zidovudine, lamivudine, abacavir o tenofovir.⁷⁵ Además, la actividad anti-inflamatoria del ibuprofeno se debe a la inhibición de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), una enzima crucial para la producción de mediadores inflamatorios que favorecen la infección por el VIH.

Los dendrímeros PPI aniónicos con ibuprofeno en su estructura **59** y **60** son candidatos para producir un efecto doble en el tratamiento frente al VIH. Por un lado, su actividad antiviral preventiva y terapéutica debido a los grupos aniónicos (ver Apartado 3.1), ha sido previamente demostrada en los ensayos de inhibición frente al VIH. La inclusión de iones metálicos en su estructura podría además modular y potenciar esta actividad. Por otro lado, la presencia de una molécula de ibuprofeno anclada a la periferia del dendrímero mediante un enlace que permite su liberación controlada, permite su transporte y liberación

eficaces, pudiendo contribuir no solo a la inhibición de la proteína MRP-4, sino también a prevenir la infección por su efecto anti-inflamatorio. Además, tal y como se mostró en el Capítulo 1, la eficacia de fármacos antirretrovirales comerciales, como el AZT, se ve aumentada hasta un 100% de inhibición al ser combinada con la utilización de los ligandos y complejos metálicos de generación 0.

Con todo ello, se proponen los sistemas dendríticos multifuncionales **59** y **60** como agentes antivirales en el tratamiento de la infección por el VIH, a la espera de confirmar experimentalmente esta conjetura. Un posible mecanismo de acción se muestra en la Figura 3.19. Los grupos aniónicos periféricos y los iones metálicos producirían una unión eficaz a los receptores celulares, y la nanopartícula sería internalizada, para liberar el fármaco anti-VIH. Al mismo tiempo, la molécula de ibuprofeno se liberaría en un entorno reductor y bloquearía las bombas de eflujo, lo que aumentaría la concentración intracelular del fármaco antiviral. Además, la acción anti-inflamatoria del ibuprofeno actuaría de forma preventiva frente a la infección por el VIH. En conjunto, se daría lugar a un efecto inhibitorio mejorado.

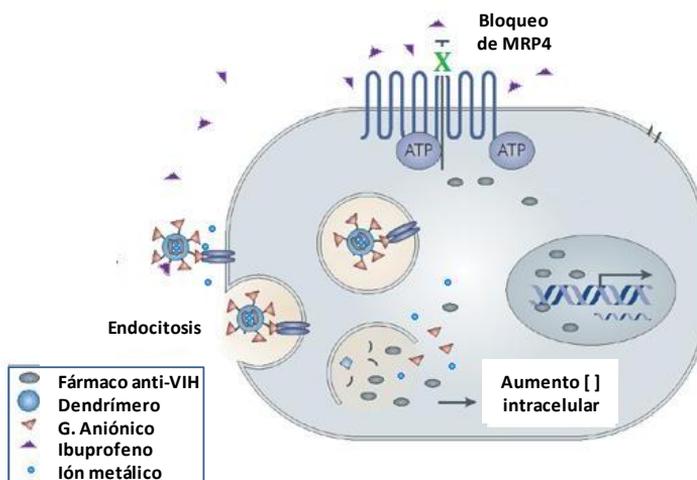


Figura 3.19 Propuesta de mecanismo de acción de los dendrimeros **59** y **60** con metales coordinados y AZT en el medio (modificado de Davis *y col.*).

3.3.3. Nanovacunas basadas en dendrímeros polilisina

Como ya se ha comentado, el sistema Péptido Antigénico Múltiple (MAP) es el transportador más investigado con propósitos de inmunización, actuando como agente coadyuvante en nanovacunas. La posibilidad de preparar un sistema de gran generación mediante síntesis convergente permite obtener moléculas con mayor grado de pureza mediante un menor número de pasos sintéticos. Además, la protección ortogonal de los grupos amino en la estructura (*Fig. 3.20*) permite una desprotección selectiva, que conduzca a la incorporación de distintas moléculas de interés en la estructura.

Los dendrones MAP descritos en el Capítulo 2 son estructuras que sirven como plataformas para posterior incorporación de distintas moléculas con interés farmacológico. La desprotección selectiva del dendrón **71** proporciona una estructura apta para la incorporación de distintos péptidos inmunogénicos (*Fig. 3.21*), u otras moléculas de interés. Por ejemplo, el anclaje de distintos epítopos específicos permitiría la producción de una respuesta inmunológica amplia frente al VIH; o derivados de estos dendrones con un péptido frente al VIH en el punto focal y diferentes grupos aniónicos en la periferia serían candidatos para una inhibición dirigida de la infección por el VIH, uniendo en una sola molécula las ventajas de los grupos inhibitorios de naturaleza aniónica y de naturaleza peptídica. Todas estas conjeturas se evaluarán experimentalmente en un futuro próximo, mediante una colaboración entre los diversos grupos de investigación donde se ha realizado esta Tesis Doctoral.

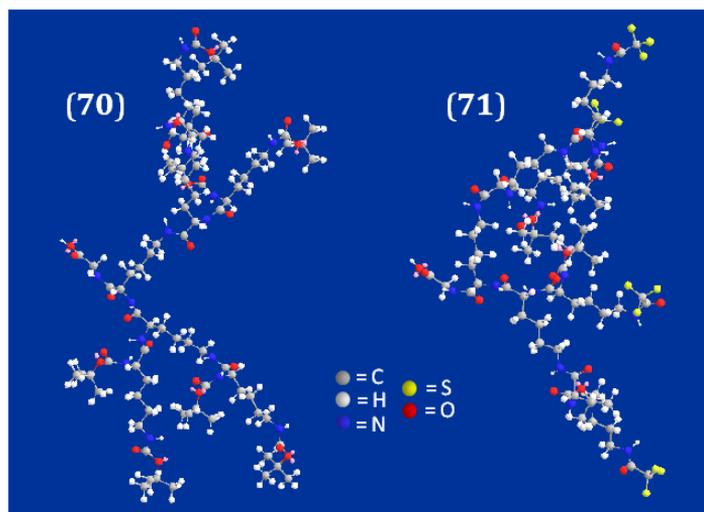


Figura 3.20 Estructuras de los dendrones polilisina de generación 3, **70** y **71**, modeladas según la situación mínima energía mediante el comando MM2 del programa Chem3D Ultra. La diferencia protección de sus grupos amino terminales les confiere distinta disposición espacial.

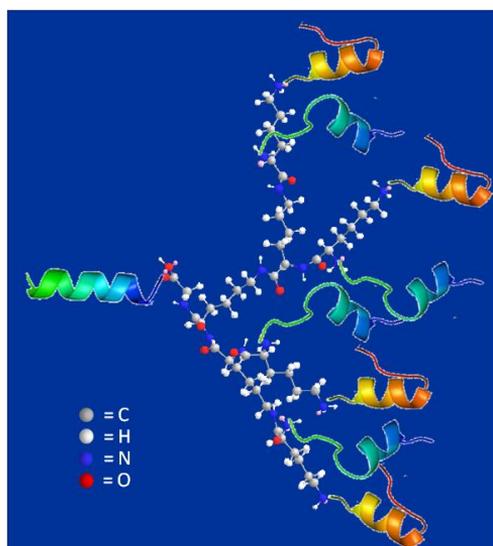


Figura 3.21 Incorporación de distintos péptidos inmunogénicos en el dendrón MAP generado tras la desprotección selectiva de **71**. La estructura del dendrón ha sido modelada según la situación mínima energía mediante el comando MM2 del programa Chem3D Ultra.

3.3.4. Utilización de dendrones catiónicos para terapia génica

Los dendrímeros con grupos terminales catiónicos se han utilizado para el transporte de material génico en terapia frente al VIH. La cuña dendrítica **30** presenta los requisitos para su utilización como transportador en terapia génica, mediante interacciones electrostáticas. Además, esta cuña presenta una mejora interesante, como es la posibilidad de anclaje selectivo de iones metálicos en el punto focal, puesto que la presencia de grupos amonio en la periferia evita la coordinación exterior. Estudios futuros evaluarán la posibilidad de anclaje de radionúcleos que permitan el seguimiento de dicho proceso de transporte hasta la célula (*Fig. 3.22*).

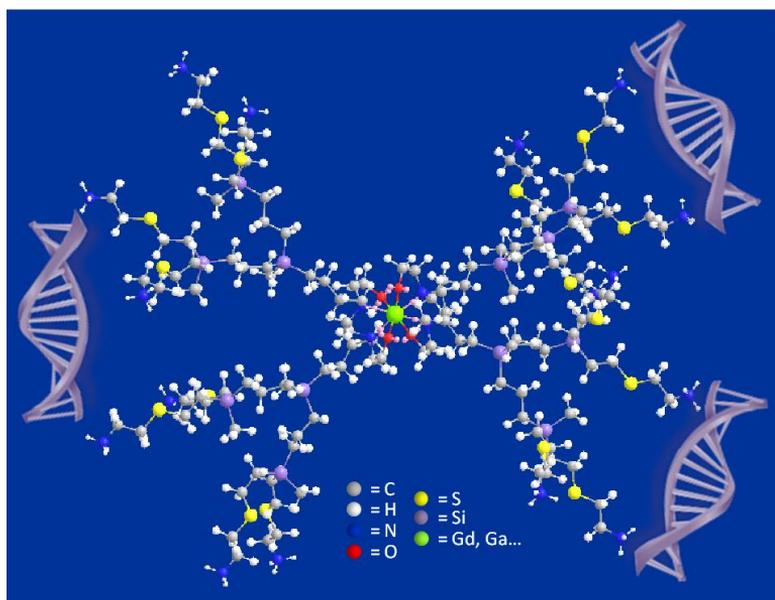


Figura 3.22 Propuesta de mecanismo de acción de los posibles metalodendrímeros con radionúcleos derivados de **30**. La estructura más estable fue determinada mediante cálculo de la mínima energía mediante el comando MM2 del programa Chem3D Ultra.

3.4. BIBLIOGRAFÍA

1. B. F. Haynes, D. C. Montefiori. *Expert Rev. Vaccines*, **2006**, *5*, 579-595.
2. A. Rosa Borges, C. L. Schengrund. *Curr. Drug Targets*, **2005**, *5*, 247-254.
3. G. R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vögtle, *Dendrimers and dendrons*, Weinheim: Wiley-VCH, **2001**.
4. M. Blanzat, C.-O. Turrin, E. Perez, I. Rico-Lattes, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral. *Chem. Commun.*, **2002**, 1864-1865.
5. M. Blanzat, C.-O. Turrin, A.-M. Aubertin, C. Couturier-Vidal, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, I. Rico-Lattes, A. Lattes. *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 2207-2213.
6. A. Pérez-Anes, C. Stefaniu, C. Moog, J.-P. Majoral, M. Blanzat, C.-O. Turrin, A.-M. Caminade, I. Rico-Lattes. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 242-248.
7. A. Rosa Borges, L. Wieczorek, B. Johnson, A. J. Benesi, B. K. Brown, R. D. Kensinger, F. C. Krebs, B. Wigdahl, R. Blumenthal, A. Puri, F. E. McCutchan, D. L. Birx, V. R. Polonis, C.-L. Schengrund. *Virology*, **2010**, *408*, 80-88.
8. R. D. Kensinger, B. J. Catalone, F. C. Krebs, B. Wigdahl, C.-L. Schengrund. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, *48*, 1614-1623.
9. S. Han, Y. Dai, T. Kanamoto, H. Nakashima, T. Uryu, T. Yoshida. *Carbohydr. Polym.*, **2010**, *80*, 1111-1115.
10. B. R. Matthews, G. Holan. *International Pat.*, WO9534595A1, **1995**.
11. M. Witvrouw, V. Fikkert, W. Pluymers, B. Matthews, K. Mardel, D. Schols, J. Raff, Z. Debyser, E. De Clercq, G. Holan, C. Pannecouque. *Mol. Pharmacol.*, **2000**, *58*, 1100-1108.
12. D. W. Dixon, A. F. Gill, L. Giribabu, A. N. Vzorov, A. B. Alam, R. W. Compans. *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, *99*, 813-821.
13. R. Rupp, S. L. Rosenthal, L. R. Stanberry. *Int. J. Nanomed.*, **2007**, *2*, 561-566.
14. B. Rasines, J. Sánchez-Nieves, M. Maiolo, M. Maly, L. Chonco, J. L. Jiménez, M. Á. Muñoz-Fernández, F. J. de la Mata, R. Gómez. *Dalton Trans.*, **2012**, *41*, 12733-12748.

15. F. J. de la Mata, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández, J. Sánchez-Nieves, P. Ortega, L. Chonco, B. Rasines, E. Arnaiz, M. J. Serramía. *International Pat.*, WO2011101520, **2011**.
16. J. Fantini, N. Yahy, K. Mabrouk, R. J. Van, H. Rochat, J. M. Sabatier. *C. R. Acad. Sci., Ser. III*, **1993**, 316, 1381-1387.
17. O. Delezay, D. Hammache, J. Fantini, N. Yahy. *Biochemistry*, **1996**, 35, 15663-15671.
18. N. Yahy, J. Fantini, S. Baghidiguan, K. Mabrouk, C. Tamalet, H. Rochat, J. van Rietschoten, J.-M. Sabatier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1995**, 92, 4867-4871.
19. L. J. Cruz, E. Iglesias, J. C. Aguilar, L. J. González, O. Reyes, F. Albericio, D. Andreu. *Bioconjugate Chem.*, **2003**, 15, 112-120.
20. P. Govender, B. Therrien, G. S. Smith. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 17, 2853-2862.
21. M. Galán, J. Sánchez Rodríguez, M. Cangioti, S. García-Gallego, J. L. Jiménez, R. Gómez, M. F. Ottaviani, M. A. Muñoz-Fernández, F. J. de la Mata. *Cur. Med. Chem.*, **2012**, 19, 4984-4994.
22. E. J. Juárez-Pérez, C. Viñas, F. Teixidor, R. Santillán, N. Farfán, A. Abreu, R. Yépez, R. Núñez. *Macromolecules*, **2010**, 43, 150-159.
23. E. J. Juárez-Pérez, C. Viñas, F. Teixidor, R. Núñez. *Organometallics*, **2009**, 28, 5550-5559.
24. P. Cigler, M. Kozisek, P. Rezacova, J. Brynda, Z. Otwinowski, J. Pokorna, J. Plesek, B. Gruner, L. Doleckova-Maresova, M. Masa, J. Sedlacek, J. Bodem, H.-G. Krausslich, V. Kral, J. Konvalinka. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2005**, 102, 15394-15399.
25. R. Mallipeddi, L. C. Rohan. *Int. J. Nanomed.*, **2010**, 5, 533-547.
26. T. Dutta, N. K. Jain. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1770, 681-686.
27. T. Dutta, H. B. Agashe, M. Garg, P. Balakrishnan, M. Kabra, N. K. Jain. *J. Drug Target.*, **2007**, 15, 89-98.
28. Y. Tang, Y. B. Li, B. Wang, R. Y. Lin, M. van Dongen, D. M. Zurcher, X. Y. Gu, M. M. Banaszak Holl, G. Liu, R. Qi. *Mol. Pharm.*, **2012**, 9, 1812-1821.

29. E. Pedziwiatr-Werbicka, M. Ferenc, M. Zaborski, B. Gabara, B. Klajnert, M. Bryszewska. *Colloid Surf., B-Biointerfaces*, **2011**, *83*, 360-366.
30. J. Maly, E. Pedziwiatr-Werbicka, M. Maly, A. Semeradtova, D. Appelhans, A. Danani, M. Zaborski, B. Klajnert, M. Bryszewska. *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*, 4708-4719.
31. D. Shcharbin, V. Dzmitruk, A. Shakhbazau, N. Goncharova, I. Seviaryn, S. Kosmacheva, M. Potapnev, E. Pedziwiatr-Werbicka, M. Bryszewska, M. Talabaev, A. Chernov, V. Kulchitsky, A. M. Caminade, J. P. Majoral. *Pharmaceutics*, **2011**, *3*, 458-473.
32. T. Gonzalo, M. I. Clemente, L. Chonco, N. D. Weber, L. Díaz, M. J. Serramía, R. Gras, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Gómez, L. A. López-Fernández, M. A. Muñoz-Fernández, J. L. Jiménez. *ChemMedChem*, **2010**, *5*, 921-929.
33. J. L. Jiménez, M. I. Clemente, N. D. Weber, J. Sánchez, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Gómez, D. García, L. A. López-Fernández, M. A. Muñoz-Fernández. *BioDrugs*, **2010**, *24*, 331-343.
34. E. Pedziwiatr-Werbicka, D. Shcharbin, J. Maly, M. Maly, M. Zaborski, B. Gabara, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández, B. Klajnert, M. Bryszewska. *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2012**, *8*, 57-73.
35. I. Posadas, B. López-Hernández, M. I. Clemente, J. L. Jiménez, P. Ortega, J. de la Mata, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández, V. Ceña. *Pharm. Res.*, **2009**, *26*, 1181-1191.
36. N. Weber, P. Ortega, M. I. Clemente, D. Shcharbin, M. Bryszewska, F. J. de la Mata, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández. *J. Control. Release*, **2008**, *132*, 55-64.
37. T. Dutta, M. Garg, N. K. Jain. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2008**, *34*, 181-189.
38. M. Najlah, S. Freeman, D. Attwood, A. D'Emanuele. *Int. J. Pharm.*, **2007**, *336*, 183-190.
39. S. Gurdag, J. Khandare, S. Stapels, L. H. Matherly, R. M. Kannan. *Bioconjugate Chem.*, **2006**, *17*, 275-283.
40. M. Najlah, S. Freeman, D. Attwood, A. D'Emanuele. *Int. J. Pharm.*, **2006**, *308*, 175-182.
41. J. Khandare, P. Kolhe, O. Pillai, S. Kannan, M. Lieh-Lai, R. M. Kannan. *Bioconjugate Chem.*, **2005**, *16*, 330-337.

42. Y. E. Kurtoglu, R. S. Navath, B. Wang, S. Kannan, R. Romero, R. M. Kannan. *Biomaterials*, **2009**, *30*, 2112-2121.
43. R. S. Navath, Y. E. Kurtoglu, B. Wang, S. Kannan, R. Romero, R. M. Kannan. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 2446-2455.
44. T. Etrych, P. Chytil, M. Jelinkova, B. Rihova, K. Ulbrich. *Macromol. Biosci.*, **2002**, *2*, 43-52.
45. Y. E. Kurtoglu, M. K. Mishra, S. Kannan, M. K. Rangaramanujam. *Int. J. Pharm.*, **2010**, *384*, 189-194.
46. P. Kolhe, E. Misra, R. M. Kannan, S. Kannan, M. Lieh-Lai. *Int. J. Pharm.*, **2003**, *259*, 143-160.
47. P. Kolhe, J. Khandare, O. Pillai, S. Kannan, M. Lieh-Lai, R. M. Kannan. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 660-669.
48. D. H. Barouch. *Nature*, **2008**, *455*, 613-619.
49. L. Reynell, A. Trkola. *Swiss Med. Wkly.*, **2012**, *142*, w13535.
50. P. D. Kwong, J. R. Mascola, G. J. Nabel. *J. Int. AIDS Soc.*, **2012**, *15*, 17407.
51. P. R. Gorry, D. A. McPhee, E. Verity, W. B. Dyer, S. L. Wesselingh, J. Learmont, J. S. Sullivan, M. Roche, J. J. Zaunders, D. Gabuzda, S. M. Crowe, J. Mills, S. R. Lewin, B. J. Brew, A. L. Cunningham, M. J. Churchill. *Retrovirology*, **2007**, *4*.
52. J. Esparza, S. Osmanov, W. L. Heyward. *Drugs*, **1995**, *50*, 792-804.
53. J. P. Tam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1988**, *85*, 5409-5413.
54. D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith. *Polym. J.*, **1985**, *17*, 117-132.
55. O. M. Volpina, A. V. Yarov, M. N. Zhmak, M. A. Kuprianova, A. V. Chepurkin, A. V. Toloknov, V. T. Ivanov. *Vaccine*, **1996**, *14*, 1375-1380.
56. L. BenMohamed, S. L. Wechsler, A. B. Nesburn. *Lancet Infect. Dis.*, **2002**, *2*, 425-431.
57. W. Lindner, F. A. Robey. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1987**, *30*, 794-800.

58. F. Borrás-Cuesta, Y. Fedon, A. Petit-Camurdan. *Eur. J. Immunol.*, **1988**, *18*, 199-202.
59. J. P. Defoort, B. Nardelli, W. Huang, J. P. Tam. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1992**, *40*, 214-221.
60. M. Singh, X. M. Li, H. Wang, J. P. McGee, T. Zamb, W. Koff, C. Y. Wang, D. T. O'Hagan. *Vaccine*, **1998**, *16*, 346-352.
61. G. Gregoriadis. *Immunomethods*, **1994**, *4*, 210-216.
62. H. Baigude, K. Katsuraya, S. Tokunaga, N. Fujiwara, M. Satoyama, T. Magome, K. Okuyama, G. Borjihan, T. Uryu. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2005**, *43*, 2195-2206.
63. R. Kikkeri, L. H. Hossain, P. H. Seeberger. *Chem. Commun.*, **2008**, 2127-2129.
64. R. Kikkeri, I. Garcia-Rubio, P. H. Seeberger. *Chem. Commun.*, **2009**, 235-237.
65. K. Gavrilov, W. M. Saltzman. *Yale J. Biol. Med.*, **2012**, *85*, 187-200.
66. L. Wu, V. N. Kewel Ramani. *Nat. Rev. Immunol.*, **2006**, *6*, 859-868.
67. M. S. Robillard, M. Galanski, W. Zimmermann, B. K. Keppler, J. Reedijk. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *88*, 254-259.
68. K.-I. Lee, T. Tashiro, M. Noji. *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, *42*, 702-703.
69. B. Groschel, J. Cinatl, J. Cinatl Jr. *Intervirology*, **1997**, *40*, 400-407.
70. P. G. Hoggard, A. Owen. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2003**, *51*, 493-496.
71. A. Haimeur, G. Conseil, R. G. Deeley, S. P. C. Cole. *Curr. Drug Metab.*, **2004**, *5*, 21-53.
72. G. D. Kruh, M. G. Belinsky. *Oncogene*, **2003**, *22*, 7537-7552.
73. F. G. M. Russel, J. B. Koenderink, R. Masereeuw. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2008**, *29*, 200-207.
74. G. Reid, P. Wielinga, N. Zelcer, I. van der Heijden, A. Kuil, M. de Haas, J. Wijnholds, P. Borst. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2003**, *100*, 9244-9249.
75. M. I. Clemente, S. Álvarez, M. J. Serramía, O. Turriziani, M. Genebat, M. Leal, M. Fresno, M. A. Muñoz-Fernández. *Antiviral Ther.*, **2009**, *14*, 1101-1111.

CAPÍTULO 4

“PARTE EXPERIMENTAL”

4.1. MÉTODOS Y TÉCNICAS INSTRUMENTALES

4.1.1. Condiciones generales de trabajo

La mayoría de preparaciones sintéticas se realizaron bajo las condiciones de manipulación comunes. Sin embargo, dada la sensibilidad a humedad de algunos de los productos utilizados en este trabajo, las reacciones que conducen a su preparación fueron realizadas en condiciones de atmósfera inerte utilizando para ello técnicas de Schlenk en líneas de vacío/argón (argón de tipo UN-45 de Air-Liquide con cantidades de O₂ y H₂O menores de 3 ppm).

Debido a que el VIH está clasificado como agente biológico del grupo 3 (riesgo individual elevado y poblacional bajo), los ensayos biomédicos con este agente se realizaron en un laboratorio con nivel de seguridad 3 y en cabinas de flujo laminar y con seguridad biológica de clase 3.

4.1.2. Técnicas instrumentales

Análisis Elemental. Los análisis cuantitativos de C, H, N y S se llevaron a cabo con microanalizadores LECO CHNS-932, en el Centro de Apoyo a la Investigación Química de la Universidad de Alcalá (CAIQ-UAH).

Citometría de flujo (FACS). Esta técnica se utilizó tanto para evaluar la viabilidad celular mediante tinción con yoduro de propidio (Sigma), como para cuantificar el nivel intracelular de antígeno p24 del VIH, mediante tinción con el anticuerpo monoclonal KC57-FITC (Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, USA). La medida de fluorescencia y el análisis se realizó en la unidad de Citometría y Sorter del Hospital General Universitario Gregorio Marañón utilizando el citómetro de flujo Coulter Epics XL (Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, USA), con el asesoramiento de la Dra. Laura Díaz.

Difracción de Rayos X. La resolución de la estructura cristalina de los compuestos **3-6** la llevó a cabo la Dra. M^a Pilar Gómez-Sal del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá, usando el difractómetro modelo Bruker-Nonius Kappa CCD con dispositivo de baja temperatura. Los datos cristalográficos se encuentran recogidos en las Tablas 4.1 y 4.2. Las transformaciones de simetría para generar átomos equivalentes son: M = Co (i) $-x,y,-z+3/2$, y M = Zn (i) $-x,y,-z+1/2$.

	4	5	6
Fórmula	C ₈ H ₂₆ N ₂ CoO ₁₀ S ₂	C ₈ H ₂₂ N ₂ CuO ₈ S ₂	C ₈ H ₂₆ N ₂ O ₁₀ S ₂ Zn
M _r (g/mol)	433.36	401.94	439,80
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	C2/c	P2 ₁ /n	C2/c
a (Å)	14.636(3)	6.7947(3)	14.595(3)
b (Å)	9.6560(10)	23.313(5)	9.5169(18)
c (Å)	12.639(2)	10.547(2)	12.6644(9)
α (°)	90.0	90	90
β (°)	101.31(2)	106.340(7)	101.40(1)
γ (°)	90.0	90	90.0
Volumen (Å ³)	1751.5(5)	1603.2(5)	1724.4(5)
Z	4	4	4
Densidad calc. (Mg/m ³)	1.643	1.665	1.694
μ _{MoKα} (mm ⁻¹)	1.267	1.659	1.716
T (K)	200(2)	200(2)	200(2)
Tamaño cristal (mm ³)	0.5x0.4x0.4.	0.4x0.3x0.2	0.4x0.4x0.25
Rango θ (°)	3.18-27.53	3.21-27.51	3.20-27.51
Reflexiones medidas	13814	31914	18795
Reflexiones únicas [R _{int}]	3854 [0.0837]	3676 [0.1349]	1988 [0.1282]
Completitud θ (°)	27.53, 97.0%	27.51, 99.7%	27.51,99.7%
Bondad del ajuste en F ²	1.284	1.178	1.235
R1, wR2 (I > 2σ(I))	0.0430, 0.1128	0.0719, 0.1736	0.0381, 0.0945
R1, wR2 (todos los datos)	0.0534, 0.1383	0.0933, 0.1873	0.0480, 0.1131
Coef. absorción (mm ⁻¹)	1.267	1.659	1.716
Dif. máx. pico y agujero (e Å ⁻³)	0.774 y -1.609	2.806 y -1.523	0.773 y -1.532

Tabla 4.1 Datos cristalográficos de las estructuras de monocristal obtenidas por difracción de rayos X de los compuestos **4-6**.

	M = Co (4)	M=Zn (6)		M=Cu (5)
<i>M-O(1)</i>	2.085(2)	2.098(2)	<i>Cu(1)-O(1)</i>	2.235(4)
<i>M-O(1i)</i>	2.085(2)	2.098(2)	<i>Cu(1)-O(4)</i>	1.985(4)
<i>M-O(4)</i>	2.147(2)	2.120(2)	<i>Cu(1)-O(7)</i>	2.028(4)
<i>M-N(1)</i>	2.223(3)	2.206(2)	<i>Cu(1)-N(2)</i>	2.054(5)
			<i>Cu(1)-N(1)</i>	2.055(5)
<i>S(1)-O(3)</i>	1.466(2)	1.458(2)	<i>S(1)-O(3)</i>	1.475(5)
<i>S(1)-O(2)</i>	1.481(2)	1.462(2)	<i>S(1)-O(2)</i>	1.470(4)
<i>S(1)-O(1)</i>	1.485(2)	1.479(2)	<i>S(1)-O(1)</i>	1.477(4)
<i>S(1)-C(1)</i>	1.789(3)	1.781(3)	<i>S(1)-C(1)</i>	1.791(7)
			<i>S(2)-O(5)</i>	1.452(5)
			<i>S(2)-O(6)</i>	1.458(5)
			<i>S(2)-O(4)</i>	1.497(4)
			<i>S(2)-C(6)</i>	1.783(6)
<i>N(1)-C(4)</i>	1.500(5)	1.496(4)	<i>N(1)-C(2)</i>	1.501(8)
<i>N(1)-C(3)</i>	1.502(4)	1.484(3)	<i>N(1)-C(3)</i>	1.500(7)
			<i>N(1)-C(7)</i>	1.509(8)
<i>N(1)-C(2)</i>	1.502(4)	1.501(3)	<i>N(2)-C(4)</i>	1.502(7)
<i>C(2)-C(1)</i>	1.543(5)	1.532(4)	<i>N(2)-C(5)</i>	1.499(7)
<i>C(3)-C(3i)</i>	1.530(7)	1.524(6)	<i>N(2)-C(8)</i>	1.505(7)
			<i>C(1)-C(2)</i>	1.535(9)
			<i>C(4)-C(3)</i>	1.530(8)
			<i>C(6)-C(5)</i>	1.544(9)
<i>O(1i)-M-O(1)</i>	172.66(13)	171.66(10)	<i>O(4)-Cu(1)-O(1)</i>	90.49(17)
<i>O(1)-M-O(4i)</i>	85.01(9)	84.65(7)	<i>O(4)-Cu(1)-N(1)</i>	175.89(19)
<i>O(1)-M-O(4)</i>	89.88(9)	89.56(7)	<i>O(4)-Cu(1)-N(2)</i>	89.62(18)
<i>O(4i)-M-O(4)</i>	91.70(13)	92.16(11)	<i>O(7)-Cu(1)-N(2)</i>	161.27(19)
<i>O(1i)-M-N(1i)</i>	95.11(10)	95.73(8)	<i>O(4)-Cu(1)-O(7)</i>	91.83(19)
<i>O(1)-M-N(1i)</i>	90.38(9)	90.47(7)	<i>N(2)-Cu(1)-N(1)</i>	86.44(19)
<i>O(4)-M-N(1i)</i>	92.73(10)	92.16(8)	<i>O(7)-Cu(1)-O(1)</i>	94.08(17)
<i>O(1)-M-N(1)</i>	95.11(10)	95.73(8)	<i>N(1)-Cu(1)-O(1)</i>	91.65(18)
<i>O(4)-M-N(1)</i>	173.60(10)	173.46(8)	<i>O(7)-Cu(1)-N(1)</i>	91.52(19)
<i>N(1i)1-M-N(1)</i>	83.24(15)	83.98(12)	<i>N(2)-Cu(1)-O(1)</i>	104.58(18)

Tabla 4.2 Longitudes (Å) y ángulos (°) de enlace en los compuestos cristalinos 4-6.

Espectrofotometría UV-Vis. Los análisis UV-Vis se registraron mediante un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 18 UV-Vis en el CAIQ-UAH.

Espectrofotometría IR-FT. Los análisis IR-FT se registraron mediante un espectrómetro Perkin-Elmer SPECTRUM 2000 en el CAIQ-UAH, en el rango 4000-370 cm⁻¹, utilizando pastillas de KBr.

Espectrometría de Masas. Los espectros de masas obtenidos por la técnica ESI-TOF o APCI-TOF se registraron mediante un Espectrómetro Agilent 6210 TOF LC/MS en el CAIQ-UAH. El análisis HPLC-MS HPLC/MS se realizó en un Shimadzu LCMS 2010 acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar en modo ESI+ perteneciente al grupo de investigación del Doctor Ulrik Boas en la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU).

Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear. Los espectros RMN- ^1H , ^{13}C y ^{15}N se registraron en espectrómetros Varian Unity-500+, Unity-300, Mercury-300 y Gemini-200 del CAIQ-UAH, y Bruker Avance 300 de la DTU, mientras que los espectros DOSY-2D y RMN- ^{195}Pt se registraron en un espectrómetro Bruker AV400 de la UAH. Todos ellos se realizaron a 25°C y los desplazamientos químicos (δ , ppm) se midieron relativos a la señal residual de ^1H y ^{13}C de los disolventes deuterados. Para ^{13}C , ^{15}N y ^{195}Pt , se utilizaron referencias externas ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, CH_3NO_2 y K_2PtCl_4 , respectivamente). Se realizaron experimentos DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*, para determinar la multiplicidad de los átomos de carbono); TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*, que permite determinar los acoplamientos escalares entre protones de un mismo sistema de espín); NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*, que mide dicho efecto NOE dependiente de la distancia entre protones separados menos de 5 \AA); ^1H - $^{13}\text{C}\{\text{HMBC}\}$ y ^1H - $^{13}\text{C}\{\text{HSQC}\}$ (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation y Heteronuclear Single Quantum Correlation*, para correlacionar el desplazamiento químico de los protones con los de los carbonos, a través de las interacciones de acoplamiento entre dichos núcleos) y DOSY-2D (*Difussion Ordered Spectroscopy*, que permite determinar los componentes de una mezcla en función de sus distintos coeficientes de traslación).

Espectrometría de Resonancia de Spin Electrónico. Los espectros de RSE fueron registrados en colaboración con la Dra. M^a Francesca Ottaviani en la Universidad de Urbino (Italia), utilizando un espectrómetro EMX-Bruker operativo en la banda X (9.5 GHz), midiendo los parámetros magnéticos en referencia al estándar 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH, $\langle g \rangle = 2.0036$). La temperatura se controló con un Bruker ST3000 assembly de temperatura variable. Las simulaciones de los espectros para evaluar los parámetros magnéticos se llevaron a cabo con el programa WINEPR SimFonia (versión 1.25, Bruker) y con el programa CU23G (Dr. Romanelli, Universidad de Florencia), para espectros a baja temperatura de complejos Cu(II) plano-cuadrado (o elongado octaédricamente). Los espectros a temperatura ambiente se simularon mediante el programa de Budil, Freed y colaboradores,¹ que considera el mecanismo de relajación de sistemas paramagnéticos $S=1/2$ (principalmente radicales nitróxido) y permite calcular el tiempo de correlación para la difusión rotacional de las especies paramagnéticas en las llamadas “condiciones de movimiento rápido-lento” ($\tau < 5 \times 10^{-8}$ s). Los parámetros magnéticos utilizados para las simulaciones a 298 K fueron los mismos que los de 150 K. La precisión en los parámetros magnéticos y de movilidad, así como los porcentajes relativos de los componentes espectrales fue 5%, tal y como se obtuvo del ajuste entre las señales experimentales y simuladas.

Modelaje molecular. El modelaje mediante la situación de mínima energía se realizó mediante el comando MM2 del programa Chem3D Ultra.

Valoración Potenciométrica. Las valoraciones potenciométricas se realizaron utilizando un sistema CRISON, consistente en un potenciómetro digital (pH-Meter BASIC 20+) y un electrodo de pH, que presenta un sistema de referencia encapsulado (*cartridge*) con una barrera de iones Ag^+ , dos diafragmas y electrolito CRISOLYT. El pH-metro se estandarizó a pH = 4.01, 7.00 y 9.21 mediante las disoluciones tampón apropiadas.

4.2. MATERIALES UTILIZADOS

4.2.1. Reactivos

Los reactivos y disolventes se utilizaron tal y como se recibieron de la casa comercial.

4.2.2. Cultivos celulares primarios y líneas celulares

Medios de cultivo. El medio de cultivo completo (MCC) utilizado para cada cultivo celular se clasificó en 4 tipos: *MCC1* (RPMI 1640, Biochrom KG Seromed) y *MCC2* (McCoy's 5A, Biochrom AG[®]), suplementados con 10% de SFB (suero fetal bovino, inactivado por calor), 2 mM de L-glutamina (ICN Pharmaceuticals, CostaMesa, CA, USA) y 1% de penicilina/estreptomicina. *MCC3* (Keratinocyte-SFM, GIBCO[®]) medio de cultivo sin suero suplementado con factor de crecimiento epitelial (EGF, 0.1 ng/mL), extracto de pituitaria bovina (0.05 mg/mL, Sigma-Aldrich) y CaCl₂ (0.4 mM). *MCC4* (OPTIMEM[®] I Gibco-BRL) con 5% SFB.

Línea celular MT-2. Línea celular linfóide del linaje T CD4+, procedente de linfocitos de sangre periférica de pacientes infectados por el virus de la leucemia de células T humana tipo 1 (HTLV-1). Se obtuvieron a través de *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*. Se crecieron de forma rutinaria en medio de cultivo *MCC1*, a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Línea celular Hec-1A. (ATCC HTB-112) Línea celular endometrial humana, derivada de un adenocarcinoma humano de endometrio, adquiridas a través del *American Type Culture Collection* (ATCC) y cultivadas en *MCC2* en placas de 24 o 96 pocillos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Línea celular VK-2/E6E7. (ATCC CRL-2616) Línea celular de mucosa vaginal humana, transducida con el vector viral LXSN-16E6E7. Se obtuvieron del ATCC y se cultivaron en MCC3 en placas de 96 pocillos a 37°C con 5% de CO₂.

Células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Se obtuvieron a partir de *buffy coat* de sangre de donantes sanos, procedentes de los Centros de Transfusiones de la Comunidad de Madrid y de Albacete. La sangre se diluyó 1:1 en PBS estéril (Lonza, BioWhittaker) y posteriormente se centrifugó en un gradiente de densidad Ficoll Hypaque® (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) a 1800 rpm durante 30 min, recuperando el halo que contenía las CMSP. Una vez recogido el halo de células se procedió a dos ciclos de centrifugación-lavado con PBS estéril. Las CMSP resultantes se cultivaron a una densidad de 4x10⁶ células/ml en medio de cultivo MCC1, a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. La activación de las CMSP se realizó con 1 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA, Remel), durante 48 h, y para mantener la viabilidad de los linfocitos T en cultivo, se trataron con 60 U/ml de interleuquina-2 (IL-2, Bachem).

4.3. ENSAYOS BIOMÉDICOS

4.3.1. Viabilidad celular

Los métodos utilizados en esta Memoria para estudiar la viabilidad celular se basan en la capacidad que tienen las células viables, por un lado, de impedir la permeabilización de yoduro de propidio (*ensayo por citometría de flujo*), y por otro, de reducir una sal de tetrazolio a cristales de formazán por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (*ensayos MTT y MTS*).

Citometría de flujo (MT-2). Para evaluar la viabilidad celular de la línea MT-2, las células se pre-trataron 48 h con los compuestos **1-6** y se tiñeron con 5 μ L de yoduro de propidio (disolución stock 1 mg/mL, Sigma). La viabilidad celular se calculó directamente tras la selección adecuada para excluir los restos del cultivo mediante el instrumento utilizando la posterior señal de dispersión de luz a 48 h.

Ensayo MTT (MT-2 y CMSP). Se sembraron las células en una placa de 96 pocillos a una densidad 10^7 (MT-2) o $2 \cdot 10^5$ (CMSP) células/pocillo, en medio completo (MCC4 para MT-2 o MCC1 para CMSP). Tras añadir las cantidades necesarias de los distintos compuestos, las células se incubaron 24 h a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, se centrifugaron, se eliminaron los sobrenadantes y se adicionó 220 μ l de la disolución de MTT (20 μ l de una disolución 5 mg/ml MTT en agua (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio, Sigma-Aldrich) por cada 200 μ l de Opti-MEM). Tras 4 h de incubación a 37°C en oscuridad, el sobrenadante se decantó y se añadieron 200 μ l de DMSO, para disolver los cristales de formazán formados. La absorbancia se midió a 570 nm con referencia 690 nm, en un lector de placas.

Ensayo MTS (Hec-1A y VK-2). Se sembraron las células en una placa de 96 pocillos a una densidad de 30.000 células/pocillo y se incubaron 24 h a 37°C con 5% CO₂. Las células se trataron con los compuestos a las concentraciones adecuadas durante 24 h a 37°C, y entonces se retiró 100 μ l del sobrenadante y

se adicionó 20 μL de la disolución MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, Promega). Para el tratamiento con compuestos metálicos, fue necesario eliminar todo el sobrenadante para evitar interferencias con el sustrato, e incubar en medio nuevo durante 2 h a 37°C en oscuridad. La absorbancia se midió en cada pocillo a 490 nm, en un lector de placas.

En ambos ensayos MTT y MTS, se considera como no tóxico una viabilidad $\geq 80\%$. Como controles, se utilizaron células no tratadas (100% viabilidad), DMSO 10% (0% viabilidad) y dextrano 5 ó 10 μM (polímero ramificado complejo de glucosa utilizado como control macromolecular de viabilidad, Sigma-Aldrich).

4.3.2. Tratamiento de las células con los compuestos

Compuestos 1-6. Las disoluciones *stock* se prepararon en agua:DMSO, con una cantidad final de DMSO menor de 0.5 μM . Los tratamientos se hicieron con 5 μL de cada compuesto, a concentraciones finales de 0.5, 1, 2, 5, 10 y 15 μM (*ensayo viabilidad*) y 5 μM (*ensayo inhibición*).

Compuestos 8-21. Las disoluciones *stock* se prepararon en agua. Los tratamientos se hicieron con 5 μL de cada compuesto, a concentraciones finales de 0.5-5 μM (*ensayo viabilidad*) y 5 μM (*ensayo inhibición*).

Dendrímeros 37-45 y metalodendrímeros derivados. Las disoluciones *stock* de los dendrímeros (*stock D*: 800, 400, 200 y 40 μM) y de las distintas sales metálicas (*stock M*: 4 mM) se prepararon en agua. Las disoluciones *stock* de los metalodendrímeros (*stock MD*) se prepararon mezclando las cantidades adecuadas de *stock D* (800 μM) y *stock M* (Tabla 4.3), y agitando la mezcla a t.a. durante 4 h. Las disoluciones control de los dendrímeros (*control D*) y de las sales metálicas (*control M*) se prepararon a 182 μM y 3.1 mM, respectivamente, y se adicionaron en diferentes volúmenes dependiendo de cada experimento. Para los ensayos de biocompatibilidad, los tratamientos se hicieron con 5 μL de

cada dendrímero, a concentraciones finales de 1, 5, 10 y 20 μM . En el caso de los metalodendrímeros, todos los experimentos se realizaron con las cantidades indicadas en la Tabla 4.3, a concentraciones finales de 10 μM .

	Ratio D:M	$V(\text{Stock } D^{800\mu\text{M}}) + V(\text{Stock } M)$	$[\text{Stock } MD]$	V_{en} p96	V_{en} p24
G₁S (37)	(1:1)	50 μL + 10 μL	666 μM	3 μL	7.5 μL
	(1:3)	50 μL + 30 μL	500 μM	4 μL	10 μL
G₁C (41)	(1:5)	50 μL + 50 μL	400 μM	5 μL	12.5 μL
	(1:1)	50 μL + 10 μL	666 μM	3 μL	7.5 μL
G₂S (38)	(1:5)	50 μL + 50 μL	400 μM	5 μL	12.5 μL
	(1:9)	50 μL + 90 μL	285 μM	7 μL	17.5 μL
G₂C (43)	(1:1)	50 μL + 10 μL	666 μM	3 μL	7.5 μL
	(1:9)	50 μL + 90 μL	285 μM	7 μL	17.5 μL
G₃S (39)	(1:1)	50 μL + 10 μL	666 μM	3 μL	7.5 μL
	(1:9)	50 μL + 90 μL	285 μM	7 μL	17.5 μL
G₃C (45)	(1:17)	50 μL + 170 μL	182 μM	11 μL	27.5 μL

Tabla 4.3. Volúmenes y concentraciones para preparar y utilizar las disoluciones *stock* de los diferentes metalodendrímeros.

4.3.3. Infección con aislados virales

Para la realización de los experimentos de infección, se utilizaron dos tipos de aislados virales: X4 VIH-1_{NL4.3} (aislado de laboratorio con tropismo X4, específico del correceptor CXCR4) y R5 VIH-1_{Bal-1} (aislado de laboratorio con tropismo R5, específico del correceptor CCR5). La cantidad de virus añadido a las células fue de 100 ng (Hec-1A, VK-2) o 10 ng (MT-2 y CMSP) por millón de células, y la infección se realizó durante 2 h 30 min a 37°C.

4.3.4. Cuantificación del antígeno p24^{gag} mediante ELISA

La cantidad de virus en los distintos aislados virales se cuantificó mediante un inmunoensayo (o ELISA) comercial (INNOTEST® HIV antigen mAb, Innogenetics N.V., Zwijndrecht, Belgium), según las instrucciones del fabricante.

4.3.5. Ensayos de inhibición de la infección por el VIH

Los ensayos de inhibición se realizaron en células MT-2, Hec-1A, VK-2 y CMSP, previamente sembradas a una densidad de 80.000 (MT-2), 30.000 (VK-2, Hec-1A) o 300.000 (CMSP) células/pocillo con medio completo.

Ensayo de pre-tratamiento. Las células se pre-trataron, inmediatamente después de la siembra (CMSP, MT-2) o tras 24 h de incubación a 37°C (VK-2, Hec-1A), durante el tiempo seleccionado (30 min, 1 h, 2 h) en función del experimento. Posteriormente, se infectaron con el aislado viral elegido durante 2 h 30 min, se lavaron 3 veces y se incubaron a 37°C y 5% CO₂. El sobrenadante se recogió a 24, 48 o 72 h post-infección, y la producción de Ag p24 se determinó mediante ELISA. Como controles se utilizaron células infectadas sin tratar (100% infección), Suramin 10 µM (fármaco con capacidad de unión a la región de V3 de gp120 del VIH-1 utilizado como control positivo de inhibición, Sigma-Aldrich), T-20 a concentraciones de 15 o 20 µM (*Fuzeon*, inhibidor de la fusión del VIH-1 a células por unión a gp41 utilizado como control positivo de inhibición, Genetech USA, Inc. And Trimeris Inc.), dendrímeros G₂C (**43**) y G₂S (**38**) 10 µM (controles de dendrímeros solos), y NiBr₂, CoCl₂, CuCl₂ y ZnSO₄ 90 µM (controles de sales metálicas solas).

Ensayo de post-tratamiento. Inmediatamente después de la siembra, las células (MT-2 y CMSP) se infectaron con el aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3} durante 2 h 30 min. Posteriormente, se lavaron 3 veces y se trataron con los distintos compuestos a las concentraciones adecuadas. El sobrenadante de los cultivos celulares se recogió a 24, 48 o 72 h en función del experimento, y la producción de Ag p24 fue determinada mediante ELISA. Como controles se utilizaron células infectadas sin tratar (100% infección), AZT 0.5 ó 1 µM (*Zidovudina*, inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido utilizado como control positivo de inhibición, Retrovir, GSK), dendrímeros G₂C (**43**) y G₂S (**38**) 10 µM (controles de dendrímeros solos), y NiBr₂, CoCl₂, CuCl₂ y ZnSO₄ 90 µM (controles de sales metálicas).

4.3.6. Ensayos de internalización del virus

Se sembraron células Hec-1A en placas de 24 pocillos a una densidad de 120.000 (lisados) o 500.000 (citometría) células/pocillo. Tras el pretratamiento de 1 h con los compuestos adecuados en función del estudio, y la infección con aislado X4 VIH-1_{NL4.3} durante 2 h 30 min, las células se lavaron repetidamente con PBS, se despegaron con tripsina y se centrifugaron para obtener los distintos *pellet* celulares (sedimentos de células).

Estudio mediante lisis celular y ELISA. Los *pellet* celulares se lisaron con Tritón™ X-100 (0.2% en PBS) durante 30 min a 4°C, se centrifugaron, y el sobrenadante se separó para cuantificar la producción de Ag p24 mediante ensayo ELISA.

Estudio mediante citometría de flujo (FACS). Las células se permeabilizaron mediante el protocolo establecido en *BD Cytofix-Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences)*. Las células se incubaron con la solución de fijación/permeabilización (1 h a 4°C), se lavaron con la solución de lavado y se incubaron con anti-p24 KC57-FITC (1 h a 4°C y en oscuridad). De nuevo, las células se lavaron con la solución de lavado repetidamente, para eliminar todo el anticuerpo que hubiera quedado unido de manera inespecífica, y se fijaron con *p*-formaldehído al 2%. Tras su lavado, y resuspensión en PBS (con 2% FBS), se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo tipo FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*), técnica que permite la clasificación y selección de células provenientes de una mezcla, en base a las características particulares de dispersión y fluorescencia de cada célula.

4.3.7. Estudio combinado con un fármaco retroviral comercial

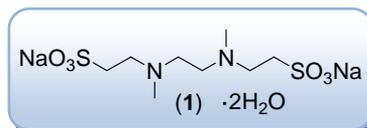
La influencia en la tasa de inhibición viral al combinar los compuestos **8-21** (5 µM) con AZT (1 µM) se llevó a cabo mediante un ensayo de posttratamiento en CMSP, de acuerdo con lo descrito en el apartado 4.3.5.

4.4. DESCRIPCIÓN DE LAS PREPARACIONES

4.4.1. Compuestos derivados del ligando *N,N'*-dimetiletilendiamino-*N,N'*-dietanosulfonato “*dmedds*” (1-6)

➤ $\{[Na_2(dmedds)] \cdot 2H_2O\}$ (1)

Se hace reaccionar una disolución acuosa de vinilsulfonato de sodio (10.4 mL, 28.4 mmol) con *N,N'*-dimetiletilendiamina (1.5 mL, 14.2



mmol) durante 12 h a 120°C. Tras la evaporación del disolvente, el producto se lava con Et₂O (3 x 5 mL) y se seca a vacío para aislar el compuesto **1**.

(1) C₈H₁₈N₂Na₂O₆S₂·2H₂O (384.4). Sólido microcristalino blanco (10.7 g, 98%).

RMN-¹H/¹³C (D₂O): δ 2.87/51.6 (4 H, m, NCH₂CH₂SO₃Na), 2.70/47.3 (4 H, m, NCH₂CH₂SO₃Na), 2.42/53.0 (4 H, s, N(CH₂)₂N), 2.07/41.0 (6 H, s, NCH₃).

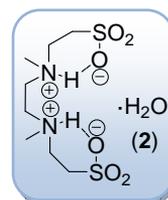
RMN-¹⁵N (D₂O): δ -349.

A. Elemental

%Calc.: C, 25.00; H, 5.77; N, 7.29; S, 16.68. Exp.: C, 24.84; H, 5.27; N, 6.83; S, 16.91.

➤ $\{[H_2(dmedds)] \cdot H_2O\}$ (2)

La reacción a t.a. durante 1 h de una disolución acuosa de **1** (1g, 2.6 mmol) con 1 eq. de H₂SO₄ (0.14 mL, 2.6 mmol) conduce a la precipitación de un sólido blanco, que se aísla por filtración y se purifica por recristalización en agua caliente, dando lugar a **2**.



(2) C₈H₂₀N₂O₆S₂·H₂O (322.4). Sólido blanco microcristalino (0.84 g, 100%).

RMN-¹H/¹³C (D₂O): δ 3.57/50.0 (4 H, s, N(CH₂)₂N), 3.48/52.6 (4 H, m, NCH₂CH₂SO₃Na), 3.20/44.8 (4 H, m, NCH₂CH₂SO₃Na), 2.84/41.0 (6 H, s, NCH₃).

RMN-¹⁵N (D₂O): δ -337.

A. Elemental

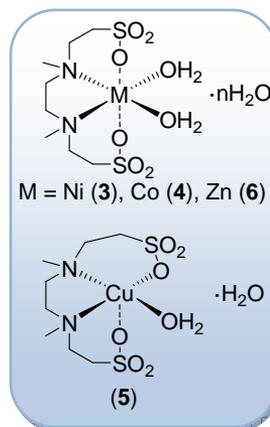
%Calc.: C, 29.80; H, 6.88; N, 8.69; S, 19.89. Exp.: C, 29.42; H, 6.36; N, 8.61; S, 20.31.

➤ $[M(\text{dmedds})(\text{H}_2\text{O})_m] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (3-6)

Protocolo general.

- *Método 1* (3-6): A una disolución acuosa de **1** en 5 mL de agua, se le adiciona la sal metálica correspondiente disuelta en 2 mL de agua. La disolución se agita 2 h a t.a., y el compuesto se aísla de distinta manera en función de su solubilidad. Tras secado a vacío, se obtienen los compuestos **3-6** como sólidos microcristalinos con elevados rendimientos.

- *Método 2* (4, 5): Partiendo de una disolución acuosa (10 mL) de **2** y otra (5 mL) de la sal metálica básica, la mezcla se agita durante 18 h, y el precipitado resultante se filtra, se lava con EtOH y se seca a vacío, obteniendo **4** y **5** con rendimiento cuantitativo y sin subproductos.



$[\text{Ni}(\text{dmedds})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**3**) $\text{C}_8\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NiO}_8\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (414.0). Sólido microcristalino verde turquesa (0.61 g, 94%), ligeramente soluble en agua.

Reactivos: **1** (0.6 g, 1.56 mmol), $\text{NiBr}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.42 g, 1.56 mmol). Aislamiento: filtración del precipitado verde, lavado con H_2O (1x4 mL) y secado.

A. Elemental

%*Calc.*: C, 22.18; H, 6.05; N, 6.47; S, 14.81. *Exp.*: C, 22.17; H, 5.71; N, 6.34; S, 14.51.

Espect. UV-Vis $\lambda_{\text{máx}}$ (H_2O)/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 390 (18,01) y 670 (8,58).

$[\text{Co}(\text{dmedds})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**4**) $\text{C}_8\text{H}_{22}\text{N}_2\text{CoO}_8\text{S}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (433.4). Sólido cristalino rosa parcialmente soluble en agua {0.54 g, 80% (mét.1); 143 mg, 100% (mét.2)}.

Reactivos:

- *Método 1:* **1** (0.6 g, 1.56 mmol), $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.34 g, 1.56 mmol). Aislamiento: filtración de la disolución y concentración a presión reducida hasta aparición del precipitado rosa, que se lava con etanol y se seca a vacío.

- *Método 2: 2* (100 mg, 0.33 mmol), $2\text{CoCO}_3 \cdot 3\text{Co}(\text{OH})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (39 mg, 0.33 mmol).

A. Elemental

%*Calc.*: C, 22.17; H, 6.05; N, 6.46; S, 14.80. *Exp.*: C, 21.77; H, 6.04; N, 6.42; S, 14.77.

Espect. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 500 (20,28) y 705 (13,93).

$[\text{Cu}(\text{dmedds})(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**5**) $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{N}_2\text{CuO}_7\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (401.9). Sólido microcristalino azul soluble en agua {0.49 g, 78% (mét.1); 133 mg, 100% (mét.2)}.

Reactivos:

- *Método 1: 1* (0.6 g, 1.56 mmol), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.26 g, 1.56 mmol). Aislamiento: filtración de la disolución y concentración a presión reducida, difusión lenta de metanol en agua hasta la precipitación del compuesto azul oscuro, filtración y secado a vacío.

- *Método 2: 2* (100 mg, 0.33 mmol), $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ (36 mg, 0.16 mmol).

A. Elemental

%*Calc.*: C, 23.91; H, 5.52; N, 6.97; S, 15.95. *Exp.*: C, 23.67; H, 5.47; N, 7.11; S, 15.98.

Espect. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 278 (3770) y 684 (73).

$[\text{Zn}(\text{dmedds})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**6**) $\text{C}_8\text{H}_{22}\text{N}_2\text{ZnO}_8\text{S}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (439.8). Sólido blanco microcristalino (129 mg, 45%), parcialmente soluble en agua.

Reactivos: 1 (250 mg, 0.65 mmol), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (187 mg, 0.65 mmol). Aislamiento: filtración del precipitado blanco y secado a vacío.

RMN-¹H (D_2O): δ 3.04 (8 H, s ancho, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}$ y $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$), 2.89 (4 H, señal ancha, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$), 2.42 (6 H, s, NCH_3). **RMN-¹³C** (D_2O): δ 51.8 y 51.6 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$), 46.2 ($\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}$), 40.3 (NCH_3).

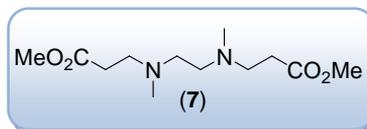
A. Elemental

%*Calc.*: C, 21.85; H, 5.96; N, 6.37; S, 14.58. *Exp.*: C, 21.69; H, 5.22; N, 6.39; S, 15.03.

4.4.2. Compuestos derivados del ligando *N,N'*-dimetiletilendiamino-*N,N'*-di-3-propionato “*dmeddp*” (7-11)

➤ [*Me*₂(*dmeddp*)] (7)

La reacción de *N,N'*-dimetiletilendiamina (4.0 mL, 37.5 mmol) con acrilato de metilo (6.9 mL, 75 mmol) durante 24 h a t.a., da lugar al compuesto **7**, que se aísla mediante la evaporación del exceso de acrilato.



(7) C₁₂H₂₄N₂O₄ (260.3). Aceite amarillo soluble en CHCl₃ (9.8 g, 100%).

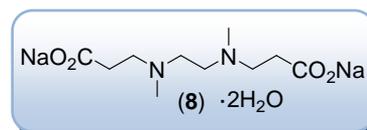
RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.60 (6 H, s, CO₂Me), 2.49 (4 H, t, NCH₂CH₂CO₂Me), 2.38 (8 H, m, N(CH₂)₂N y NCH₂CH₂CO₂Me), 2.14 (6 H, s, NCH₃). **RMN-¹³C** (CDCl₃): δ 172.8 (CO₂Me), 54.9 (N(CH₂)N), 52.9 (NCH₂CH₂CO₂Me), 51.4 (CO₂Me), 42.1 (NCH₃), 32.0 (NCH₂CH₂CO₂Me).

A. Elemental % *Calc.*: C, 55.36; H, 9.29; N, 10.76. *Exp.*: C, 55.44; H, 8.71; N, 11.02.

MS-ESI(+): *m/z* (uma). Para C₁₂H₂₅N₂O₄⁺ [M+H]⁺: *Calc.* 261.18. *Exp.* 261.18.

➤ [*Na*₂(*dmeddp*)]·2H₂O (8)

La reacción del compuesto **7** (9.8 g, 37.5 mmol) con NaOH (3.0 g, 75 mmol) en MeOH, durante 24 h a t.a., y posterior evaporación,



conduce a la obtención del compuesto **8**, como un sólido blanco microcristalino.

(8) C₁₀H₁₈N₂Na₂O₄·2H₂O (312.3). Sólido blanco microcristalino soluble en agua (11.2 g, 96%).

RMN-¹H (D₂O): δ 2.48 (4 H, t, NCH₂CH₂CO₂Na), 2.35 (4 H, s, N(CH₂)₂N), 2.14 (4 H, t, NCH₂CH₂CO₂Na), 2.00 (6 H, s, NCH₃). **RMN-¹³C** (D₂O): δ 181.4 (CO₂Na), 53.4 (NCH₂CH₂CO₂Na), 52.9 (N(CH₂)N), 40.8 (NCH₃), 34.4 (NCH₂CH₂CO₂Na).

A. Elemental % *Calc.*: C, 38.46; H, 7.10; N, 8.97. *Exp.*: C, 38.07; H, 7.27; N, 8.60.

MS-ESI(+): *m/z* (uma). Para C₂₀H₃₆N₄Na₄O₈ [2M+H]⁺: *Calc.* 553.22. *Exp.* 553.22. Para C₁₀H₁₈N₂Na₂O₄ [M+H]⁺: *Calc.* 277.11. *Exp.* 277.11.

➤ $[M(\text{dmeddp})]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**9-11**)

Protocolo general. Se mezclan dos disoluciones en agua de la sal sódica **8** (5 mL) y la sal metálica correspondiente (2 mL). La disolución se agita 2 h a t.a., se evapora y el producto se extrae con EtOH (3 mL), para aislar los productos **9-11** como sólidos microcristalinos.

$[\text{Ni}(\text{dmeddp})(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**9**) $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NiO}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (397.0). Sólido microcristalino verde soluble en agua y alcoholes (597 mg, 94%).

Reactivos: **8** (500 mg, 1.60 mmol), $\text{NiBr}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (436 mg, 1.60 mmol).

A. Elemental % *Calc.*: C, 30.25; H, 7.62; N, 7.06. *Exp.*: C, 29.94; H, 7.34; N, 7.17.

MS-ESI(+): *m/z* (uma). Para $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{NiO}_4^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: *Calc.* 289.07. *Exp.* 289.07.

Espect. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$): 376 (8,20) y 628 (5,89).

$[\text{Co}(\text{dmeddp})(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**10**) $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{CoO}_6$ (325.2). Sólido microcristalino rosa soluble en agua y alcoholes (479 mg, 92%).

Reactivos: **8** (500 mg, 1.60 mmol), $\text{CoCl}_2\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (379 mg, 1.60 mmol).

A. Elemental % *Calc.*: C, 36.93; H, 6.82; N, 8.61. *Exp.*: C, 37.25; H, 6.66; N, 8.36.

MS-ESI(+): *m/z* (uma). Para $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{CoO}_4^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: *Calc.* 290.07. *Exp.* 290.06.

Espect. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$): 508 (7,94).

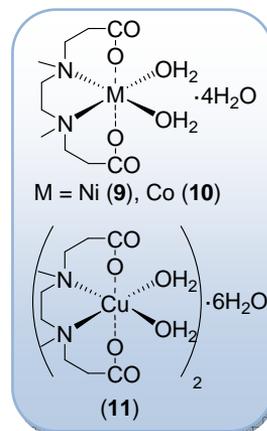
$[\text{Cu}(\text{dmeddp})(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**11**) $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{CuO}_6\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (383.9). Sólido microcristalino azul soluble en agua y alcoholes (614 mg, 95%).

Reactivos: **8** (500 mg, 1.60 mmol), $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (273 mg, 1.60 mmol).

A. Elemental % *Calc.*: C, 31.29; H, 7.35; N, 7.30. *Exp.*: C, 31.88; H, 6.86; N, 7.58.

MS-APCI(+): *m/z* (uma). Para $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{Cu}_2\text{O}_8^+$ $[2\text{M}+\text{H}]^+$: *Calc.* 587.12. *Exp.* 587.38.

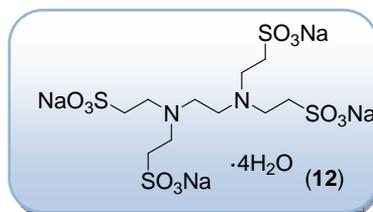
Espect. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$): 250 (h), 276 (3485) y 663 (113).



4.4.3. Compuestos derivados del ligando etilendiamino-tetraetano sulfonato "edts" (12-16)

➤ $[Na_4(edts)] \cdot 4H_2O$ (**12**)

En una ampolla de vidrio, se hace reaccionar etilendiamina (2.0 mL, 29.6 mmol) y vinilsulfonato de sodio (43.5 mL, 118.5 mmol) en agua, durante 24 h a 120°C. Tras evaporar a



sequedad, el producto se purifica por lavado con MeOH (3x5 mL) y Et₂O (3x5 mL), y se seca a vacío, aislando el compuesto **12**, soluble en agua.

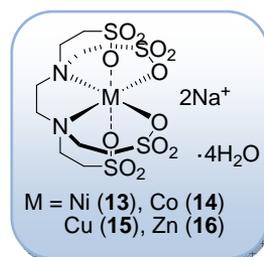
(**12**) C₁₀H₂₀N₂Na₄O₁₂S₄·4H₂O (652.5). Sólido cristalino blanco (19.3 g, 100%).

RMN-¹H (D₂O): δ 2.90 (8 H, t, NCH₂CH₂SO₃Na), 2.80 (8 H, t, NCH₂CH₂SO₃Na), 2.52 (4 H, s, N(CH₂)₂N). **RMN-¹³C** (D₂O): δ 50.0 (N(CH₂)₂N), 47.9 (NCH₂CH₂SO₃Na), 47.0 (NCH₂CH₂SO₃Na).

A. Elemental % Calc.: C, 18.41; H, 4.32; N, 4.29. Exp.: C, 18.45; H, 3.47; N, 4.23.

➤ $\{Na_2[M(edts)]\} \cdot 4H_2O$ (**13-16**)

Protocolo general. Se disuelve **12** en 5 mL de agua, y se le adiciona la sal metálica correspondiente disuelta en 2 mL de agua. La disolución se agita 4 h a t.a., se filtra, se concentra y se precipita con EtOH. Tras evaporación a sequedad, se aíslan los sólidos microcristalinos **13-16**.



$\{Na_2[Ni(edts)]\} \cdot 4H_2O$ (**13**) C₁₀H₂₀N₂Na₂NiO₁₂S₄·4H₂O (665.3). Sólido verde microcristalino soluble en agua (794 mg, 78%).

Reactivos: **12** (1 g, 1.53 mmol), NiBr₂·3H₂O (418 mg, 1.53 mmol).

A. Elemental

%Calc.: C, 18.05; H, 4.24; N, 4.21; S, 19.28. Exp.: C, 17.66; H, 4.36; N, 4.07; S, 19.63.

MS-ESI(-) m/z (uma). Para C₁₀H₂₁N₂NiO₁₂S₄⁻ [M+H]⁻: Calc. 546.93. Exp. 546.93.

Espect. UV-Vis (H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ /nm (ϵ /M⁻¹ cm⁻¹): 388 nm (23,26) y 660 nm (8,51).

{Na₂[Co(edts)]}·4H₂O (**14**) C₁₀H₂₀N₂Na₂CoO₁₂S₄·4H₂O (665.5). Sólido rosa microcristalino soluble en agua (855 mg, 84%).

Reactivos: 12 (1 g, 1.53 mmol), CoCl₂·5H₂O (364 mg, 1.53 mmol).

A. Elemental

%*Calc.*: C, 18.05; H, 4.24; N, 4.21; S, 19.27. *Exp.*: C, 17.50; H, 4.15; N, 4.28; S, 19.28

MS-ESI(-) *m/z* (uma). Para C₁₀H₂₁N₂CoO₁₂S₄⁻ [M+H]⁻: *Calc.* 547.93. *Exp.* 547.93.

Espect. UV-Vis (H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ /nm (ϵ /M⁻¹ cm⁻¹): 278 (90,97), 480 (h) y 513 (8,69).

{Na₂[Cu(edts)]}·4H₂O (**15**) C₁₀H₂₀N₂Na₂CuO₁₂S₄·4H₂O (670.1). Sólido azul microcristalino soluble en agua (820 mg, 80%).

Reactivos: 12 (1 g, 1.53 mmol), CuCl₂·2H₂O (262 g, 1.53 mmol).

A. Elemental

%*Calc.*: C, 17.92; H, 4.21; N, 4.18; S, 19.14. *Exp.*: C, 17.73; H, 4.13; N, 4.13; S, 19.44.

MS-ESI(-) *m/z* (uma). Para C₁₀H₂₁N₂CuO₁₂S₄⁻ [M+H]⁻: *Calc.* 551.93. *Exp.* 551.93.

Espect. UV-Vis (H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ /nm (ϵ /M⁻¹ cm⁻¹): 286 (2235) y 693 (65,09).

{Na₂[Zn(edts)]}·nH₂O (**16**) C₁₀H₂₀N₂Na₂ZnO₁₂S₄ (599.9). Sólido blanco microcristalino soluble en agua.

Reactivos: 12 (400 mg, 0.61 mmol), ZnSO₄·7H₂O (176 mg, 0.61 mmol). En este caso, la adición debe ser lenta de **12** sobre la sal metálica, y el tratamiento se realiza mediante filtración y evaporación de la disolución. La similar solubilidad del compuesto y el subproducto Na₂SO₄ impide su separación.

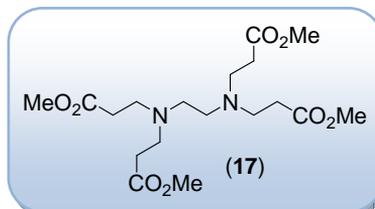
RMN-¹H (D₂O): δ 3.11 (16 H, señal ancha, NCH₂CH₂SO₃Na), 2.97 (4 H, s ancho, N(CH₂)₂N). **RMN-¹³C** (D₂O): δ 49.5 (N(CH₂)₂N), 47.9 y 45.8 (NCH₂CH₂SO₃Na).

MS-ESI(-) *m/z* (uma). Para C₁₀H₂₁N₂O₁₂S₄Zn⁻ [M+H]⁻: *Calc.* 552.93. *Exp.* 552.99.

4.4.4. Compuestos derivados del ligando etilendiamino-tetra-3-propionato "edtp" (17-21)

➤ $[Me_4(edtp)]$ (17)

En un schlenk, se agitan etilendiamina (2.22 mL, 33 mmol) y acrilato de metilo (12.0 mL, 132.0 mmol), en 5 mL de MeOH, 12 h a t.a. Tras la evaporación del exceso de acrilato, se aísla el producto **17**, como un aceite incoloro soluble en disolventes orgánicos, con rendimiento cuantitativo.



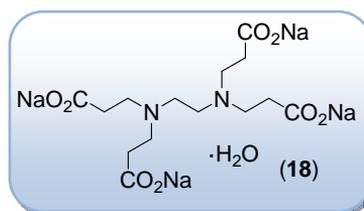
(17) $C_{18}H_{32}N_2O_8$ (404.5). Aceite incoloro soluble en $CHCl_3$ (13.3 g, 100%).

RMN-¹H ($CDCl_3$): δ 3.62 (12H, s, CO_2Me), 2.71 (8 H, t, $CH_2CH_2CO_2Me$), 2.44 (4 H, s, $N(CH_2)_2N$), 2.39 (8 H, t, $CH_2CH_2CO_2Me$). **RMN-¹³C** ($CDCl_3$): δ 172.9 (CO_2Me), 52.2 ($N(CH_2)_2N$), 51.5 (CO_2Me), 49.7 ($CH_2CH_2CO_2Me$), 32.6 ($CH_2CH_2CO_2Me$).

A. Elemental % *Calc.*: C, 53.45; H, 7.97; N, 6.93. *Exp.*: C, 53.60; H, 7.79; N, 7.44.

➤ $[Na_4(edtp)] \cdot H_2O$ (18)

Al compuesto **17** (13.4 g, 33.0 mmol), se añade NaOH (5.3 g, 132 mmol) en 15 mL de MeOH. Tras 24 h de agitación a t.a. y evaporación del disolvente, se obtiene el producto **18** con rendimiento cuantitativo.



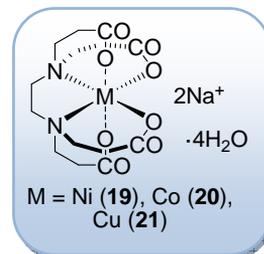
(18) $C_{14}H_{20}N_2Na_4O_8 \cdot H_2O$ (454.3). Sólido microcristalino blanco soluble en agua (15.0 g, 100%).

RMN-¹H (D_2O): δ 2.57 (8 H, t, $NCH_2CH_2CO_2Na$), 2.44 (4 H, s, $N(CH_2)_2N$), 2.16 (8 H, t, $CH_2CH_2CO_2Na$). **RMN-¹³C** (D_2O): δ 181.3 (CO_2Na), 49.89 y 49.81 ($N(CH_2)_2N$ y $CH_2CH_2CO_2Na$) y 34.06 ($CH_2CH_2CO_2Na$).

A. Elemental % *Calc.*: C, 37.01; H, 4.88; N, 6.17. *Exp.*: C, 37.01; H, 4.48; N, 6.12.

➤ $\{Na_2[M(edtp)]\} \cdot 4H_2O$ (**19-21**)

Protocolo general. Se disuelve la sal sódica **18** en 5 mL de agua, y se le adiciona la sal metálica correspondiente disuelta en 2 mL de agua. La disolución se agita 4 h a t.a., se filtra y se lleva a sequedad. El compuesto se extrae en EtOH, y se evapora, aislando los compuestos **19-21** como sólidos microcristalinos con elevados rendimientos.



$\{Na_2[Ni(edtp)]\} \cdot 4H_2O$ (**19**) $C_{14}H_{20}NiN_2Na_2O_8 \cdot 4H_2O$ (521.0). Sólido azul microcristalino soluble en agua y alcoholes (550 mg, 96%).

Reactivos: **8** (500 mg, 1.10 mmol), $NiBr_2 \cdot 3H_2O$ (300 mg, 1.10 mmol).

A. Elemental % *Calc.*: C, 32.27; H, 6.24; N, 6.67. *Exp.*: C, 32.54; H, 6.15; N, 6.38.

MS-ESI(+) *m/z* (uma). Para $C_{14}H_{23}NiN_2O_8^+$ $[M+H]^+$: *Calc.* 405.08. *Exp.* 405.08.

Espect. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{m\acute{a}x}/nm$ ($\epsilon/M^{-1} cm^{-1}$): 377 (63,02) y 622 (31,79).

$\{Na_2[Co(edtp)]\} \cdot 4H_2O$ (**20**) $C_{14}H_{20}CoN_2Na_2O_8 \cdot 4H_2O$ (521.3). Sólido púrpura microcristalino soluble en agua y alcoholes (533 mg, 93%).

Reactivos: **8** (500 mg, 1.10 mmol), $CoCl_2 \cdot 5H_2O$ (261 mg, 1.10 mmol).

A. Elemental % *Calc.*: C, 32.26; H, 5.41; N, 5.37. *Exp.*: C, 31.74; H, 5.59; N, 5.37.

MS-ESI(+) *m/z* (uma). Para $C_{14}H_{23}CoN_2O_8^+$ $[M+H]^+$: *Calc.* 406.08. *Exp.* 406.08.

Espect. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{m\acute{a}x}/nm$ ($\epsilon/M^{-1} cm^{-1}$): 508 (94.65) y 586 (h, 51.61).

$\{Na_2[Cu(edtp)]\} \cdot 4H_2O$ (**21**) $C_{14}H_{20}CuN_2Na_2O_8 \cdot 4H_2O$ (525.9). Sólido azul intenso microcristalino soluble en agua y alcoholes (555 mg, 96%).

Reactivos: **8** (500 mg, 1.10 mmol), $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (188 mg, 1.10 mmol).

A. Elemental % *Calc.*: C, 31.97; H, 5.37; N, 5.33. *Exp.*: C, 31.76; H, 5.99; N, 5.17.

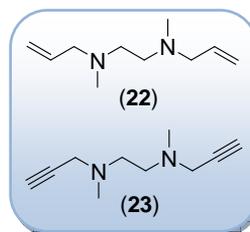
MS-ESI(+) *m/z* (uma). Para $C_{14}H_{22}CuN_2NaO_8^+$ $[M+H]^+$: *Calc.* 432.06. *Exp.* 432.06.

Espect. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{m\acute{a}x}/nm$ ($\epsilon/M^{-1} cm^{-1}$): 250 (h), 282 (3978) y 698 (154.4).

4.4.5. Estrategias de crecimiento con esqueleto carbosilano (22-30)

- *N,N'*-dialil-*N,N'*-dimetiletilendiamina (**22**) y *N,N'*-dimetil-*N,N'*-dipropargiletilendiamina (**23**)

Protocolo general: Bajo atmósfera inerte, se disuelve la amina en 100 mL de hexano, y entonces se adiciona ⁿBuLi, gota a gota, a -80°C. Con agitación, se deja alcanzar temperatura ambiente y se mantiene la reacción 5 h hasta la total precipitación del derivado dilitado. De



nuevo, se enfría la reacción a -80°C, se adiciona bromuro de alilo/propargilo, y se agita 18 h a t.a. La fase orgánica, tras el lavado con agua saturada de Na₂CO₃, se seca con MgSO₄ y se lleva a sequedad, obteniendo el producto como un aceite amarillo.

(22) C₁₀H₂₀N₂ (168.3). Aceite amarillo soluble en CHCl₃ (823 mg, 87%).

Reactivos: *N,N'*-dimetiletilendiamina (0.60 mL, 5.62 mmol), ⁿBuLi (9.4 mL, 15 mmol), bromuro de alilo (1.14 mL, 13 mmol).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 5.83 (2 H, m, CH=CH₂), 5.11 (4 H, dd, CH=CH₂), 2.98 (4 H, d, CH₂CH=CH₂), 2.45 (4H, s, N(CH₂)₂N), 2.20 (6H, s, NCH₃). **RMN-¹³C** (CDCl₃): δ 135.6 (CH=CH₂), 117.5 (CH=CH₂), 61.4 (NCH₂CH=CH₂), 54.6 (N(CH₂)₂N), 42.4 (NCH₃).

A. Elemental %Calc: C, 71.37; H, 11.98; N, 16.65. *Exp:* C, 71.05; H, 11.32; N, 16.18.

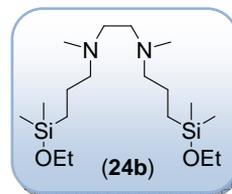
(23) C₁₀H₁₆N₂ (164,13). Aceite amarillo soluble en CHCl₃ (738 mg, 80%).

Reactivos: *N,N'*-dimetiletilendiamina (0.6 mL, 5.62 mmol), ⁿBuLi (9.4 mL, 15 mmol), bromuro de propargilo (2.0 mL 18 mmol).

RMN-¹H/¹³C: Los valores concuerdan con los descritos en bibliografía² para la obtención de este compuesto mediante una ruta sintética similar.

➤ *G-dmeda-(SiMe₂OEt)₂* (**24b**)

Bajo atmósfera inerte, se adiciona una gota de catalizador de Karstedt al compuesto **22** (342 mg, 2.03 mmol), y a 0°C se adiciona HSiMe₂OEt (1.15 mL, 8.12 mmol). Tras 24 h a 90°C, el producto **24b** se aísla por filtración con carbono activo y posterior evaporación.

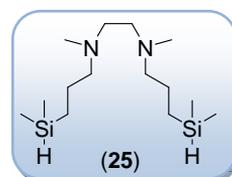


(**24b**) C₁₈H₄₄N₂O₂Si₂ (376.7). Aceite amarillo soluble en CHCl₃ (765 mg, 100%).
RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.63 (4H, c, OCH₂CH₃), 2.45 (4H, s, N(CH₂)₂N), 2.30 (4H, t, NCH₂CH₂CH₂Si), 2.21 (6H, s, NCH₃), 1.48 (4H, m, NCH₂CH₂CH₂Si), 1.16 (6 H, t, OCH₂CH₃), 0.50 (4 H, m, NCH₂CH₂CH₂Si), 0.07 (12 H, s, SiMe₂). **RMN-¹³C** (CDCl₃): δ 61.8 (NCH₂CH₂CH₂Si), 58.2 (OCH₂CH₃), 55.6 (N(CH₂)₂N), 42.7 (NCH₃), 21.0 (NCH₂CH₂CH₂Si), 18.5 (OCH₂CH₃), 14.0 (NCH₂CH₂CH₂Si), -2.1 (SiMe₂).

A. Elemental % *Calc.*: C, 57.39; H, 11.77; N, 7.44. *Exp.*: C, 56.96; H, 11.53; N, 7.79.

➤ *G-dmeda-(SiMe₂H)₂* (**25**)

Bajo atmósfera inerte, se disuelve **24b** (667 mg, 1.77 mmol) en Et₂O seco, y se adiciona lentamente a 0°C sobre LiAlH₄ (0.44 mL 2M, 0.89 mmol) en Et₂O seco. Tras 18 h a t.a., la disolución se lava con agua saturada de NH₄Cl y NaCl

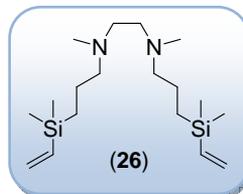


(3x10 mL), y se extrae el compuesto con Et₂O (3x10 mL). Posteriormente, se seca con MgSO₄, se filtra con celite y carbón activo, y se evapora, dando **25**.

(**25**) C₁₄H₃₆N₂Si₂ (288.6). Aceite amarillo soluble en CHCl₃ (388 mg, 76%).
RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.83 (2H, m, SiH), 2.47 (4H, s, N(CH₂)₂N), 2.34 (2H, t, NCH₂CH₂CH₂Si), 2.23 (6H, s, NCH₃), 1.49 (4 H, m, NCH₂CH₂CH₂Si), 0.56 (4 H, m, NCH₂CH₂CH₂Si), 0.05 (12 H, d, SiMe₂). **RMN-¹³C** (CDCl₃): δ 61.6 (NCH₂CH₂CH₂Si), 55.6 (N(CH₂)₂N), 42.7 (NCH₃), 22.1 (NCH₂CH₂CH₂Si), 11.8 (NCH₂CH₂CH₂Si), -4.5 (SiMe₂).

➤ *G-dmeda*-(SiMe₂(CH=CH₂))₂ (**26**)

Bajo argón, se disuelve **24b** (248 mg, 0.66 mmol) en 5 mL de THF, y con un baño de hielo se adiciona cloruro de vinilmagnesio (0.82 mL, 1.32 mmol). Tras 24 h a reflujo, el compuesto se extrae en éter/agua saturada de NH₄Cl, y la fase orgánica se seca con MgSO₄ y se lleva a sequedad para aislar **26**.

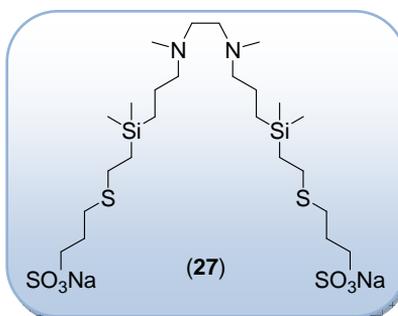


(**26**) C₁₈H₄₀N₂Si₂ (340.69). Aceite marrón soluble en CHCl₃ (225 mg, 40%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 6.20-5.90 (4 H, m, CHCH₂), 5.70-5.60 (2 H, dd, CHCH₂), 2.44 (4H, s, N(CH₂)₂N), 2.31 (4H, t, NCH₂CH₂CH₂Si), 2.20 (6H, t, NCH₃), 1.44 (4H, q, NCH₂CH₂CH₂Si), 0.50 (4H, m, NCH₂CH₂CH₂Si), 0.03 (12H, s, SiMe₂(vinilo)). **RMN-¹³C** (CDCl₃): δ 138.9 (CHCH₂), 131.6 (CHCH₂), 61.6 (NCH₂CH₂CH₂Si), 55.1 (N(CH₂)₂N), 42.4 (NCH₃), 21.4 (NCH₂CH₂CH₂Si), 20.8 (NCH₂CH₂CH₂Si), 1.0 (SiMe(vinilo)).

➤ *G-dmeda*-(SO₃Na)₂ (**27**)

Se disuelven el compuesto **26** (90 mg, 0.26 mmol) y HS(CH₂)₂SO₃Na (103 mg, 0.52 mmol) en 3 mL de MeOH, y se adiciona benzofenona (15 mg). Tras 6 h en agitación bajo luz UV (365 nm), la disolución se lava con éter y se lleva a sequedad. El residuo se purifica por cromatografía de exclusión de tamaño en Sephadex en agua, para obtener el compuesto **27**.

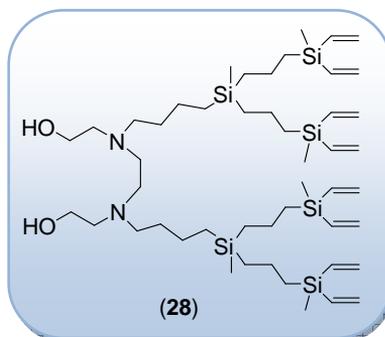


(**27**) C₂₄H₅₄N₂Na₂O₆S₄Si₂ (697.1). Sólido microcristalino blanco soluble en agua (45 mg, 24%).

RMN-¹H (D₂O): δ 2.81 (8 H, m, CH₂SO₃Na y SiCH₂CH₂S), 2.66 (4 H, m, SCH₂CH₂CH₂SO₃Na), 2.40-2.60 (14 H, m, N(CH₂) y NCH₃), 1.82 (4 H, m, SCH₂CH₂CH₂SO₃Na), 1.46 (4 H, m, NCH₂CH₂CH₂Si), 0.72 (4 H, m, SiCH₂CH₂S), 0.39 (4 H, m, NCH₂CH₂CH₂Si), -0.05 (12 H, s, Si(Me)₂).

➤ G_2 -edaOH-(Si(CH=CH₂)₂)₄ (**28**)

Se disuelve la cuña Br-G₂-vinilo (2.80 g, 6.12 mmol), previamente sintetizada en nuestro grupo de investigación,³ en 5 mL de acetona y se adiciona *N,N'*-(bis-hidroxietil)etilendiamina (453 mg, 3.06 mmol), K₂CO₃ (1.27 g, 9.18 mmol), NaI (0.92 g, 6.12 mmol) y éter corona 18C6 (162 mg, 0.61 mmol). La reacción progresa a 80°C durante 5 h. Tras filtrar la disolución, se lleva a sequedad y el producto se extrae con la mínima cantidad de tolueno y se purifica mediante cromatografía de exclusión de tamaños.



(28) C₄₈H₉₆N₂O₂Si₆ (901.8). Aceite anaranjado soluble en CHCl₃ (2.76 g, 50%).

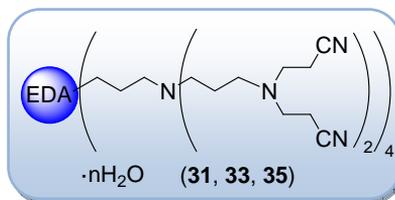
RMN-¹H (CDCl₃): δ 6.11 (16 H, m, CHCH₂), 5.74 (8 H, dd, CHCH₂), 4.42 (2 H, s ancho, OH), 3.65 (4H, t, CH₂OH), 2.67 (4H, t, NCH₂CH₂OH), 2.65 (4H, s, NCH₂CH₂N), 2.45 (4H, t, NCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 1.52 (4H, q, NCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 1.37 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂Si), 1.25 (4H, m, NCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 0.73 (8H, t, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.58 (8H, t, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.50 (4H, t, NCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 0.16 (12H, s, SiMe(vinilo)) y -0.06 (6H, s, SiMe). **RMN-¹³C** (CDCl₃): δ 137.1 (CHCH₂), 132.6 (CHCH₂), 60.2 (CH₂OH), 55.9 (NCH₂CH₂OH), 55.5 (NCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 52.6 (N(CH₂)₂N), 30.2 (NCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 21.9 (NCH₂CH₂CH₂CH₂Si), 18.7 (SiCH₂CH₂CH₂Si), 18.5 (SiCH₂CH₂CH₂Si), 18.2 (SiCH₂CH₂CH₂Si), 14.0 (NCH₂CH₂CH₂CH₂Si), -5.1 (SiMe), -5.2 (SiMe(vinilo))

A. Elemental %Calc.: C, 63.93; H, 10.73; N, 3.11. *Exp.* C, 63.25; H, 9.64; N, 3.84.

4.4.6. Estrategia de crecimiento con esqueleto polipropilenimina (31-45)

➤ $G_n\text{-eda}-(\text{CN})_m$ (31, 33, 35)

Protocolo general: Se trata de una modificación del protocolo de Tack.⁴ Se suspende el dendrímero poliamina en MeOH (5 mL) y se refluje 24 h con un exceso de acrilonitrilo (2.4 eq. por grupo amino). Tras evaporación a sequedad, los productos se aíslan analíticamente puros (determinado por RMN y Análisis Elemental) debido a la ausencia de ácido acético como catalizador, lo que permite utilizar los compuestos sin pasos de purificación. Los valores de RMN concuerdan con los proporcionados para estos compuestos obtenidos mediante otras rutas.⁵



G1 - (31) $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_6$ (272.2). Sólido microcristalino beige soluble en disolventes orgánicos (2.0 g, 100%).

Reactivos: Etilendiamina (0.5 mL, 7.40 mmol), acrilonitrilo (3 mL, 5 mmol).

G2 - (33) $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{N}_{14}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (731.0). Aceite viscoso amarillento soluble en disolventes orgánicos (2.7 g, 100%).

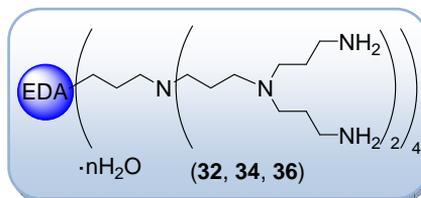
Reactivos: 32 (1.26 g, 3.67 mmol), acrilonitrilo (2.9 mL, 44 mmol).

G3 - (35) $\text{C}_{86}\text{H}_{140}\text{N}_{30}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1630.3). Aceite viscoso amarillento soluble en disolventes orgánicos (1.0 g, 100%).

Reactivos: 34 (461 mg, 0.62 mmol), acrilonitrilo (1.3 mL, 20 mmol)

➤ $G_n\text{-eda}-(\text{NH}_2)_m$ (32, 34, 36)

Protocolo general: Bajo argón, se disuelve el dendrímero polinitrilo en 5 mL de THF seco y se adiciona lentamente la cantidad necesaria de $\text{BH}_3\cdot\text{Me}_2\text{S}$. Tras el



tiempo adecuado a reflujo (en función de la generación), se adiciona MeOH con baño de hielo, y se agita a t.a. 24 h. Se lleva a sequedad para eliminar los componentes volátiles, obteniéndose un sólido blanco pegajoso, que se lava con éter a reflujo (3x5 mL). Tras decantar el sobrenadante y llevar a vacío, los productos se obtienen como sólidos blancos muy higroscópicos. Otros autores, que preparan estos compuestos mediante hidrogenación catalítica,⁵ describen su caracterización como aceites incoloros solubles en CHCl_3 , pero los valores de RMN concuerdan bastante bien con los obtenidos con nuestros compuestos.

G1 - (32) $\text{C}_{14}\text{H}_{36}\text{N}_6\cdot n\text{H}_2\text{O}$ ("288.5"). Sólido blanco aceitoso parcialmente soluble en agua.

Reactivos: 31 (1 g, 3.67 mmol), $\text{BH}_3\cdot\text{Me}_2\text{S}$ (40 mL, 5 M en éter). Reflujo 24 h.

G2 - (34) $\text{C}_{38}\text{H}_{92}\text{N}_{14}\cdot n\text{H}_2\text{O}$ ("745.2"). Sólido blanco aceitoso parcialmente soluble en agua.

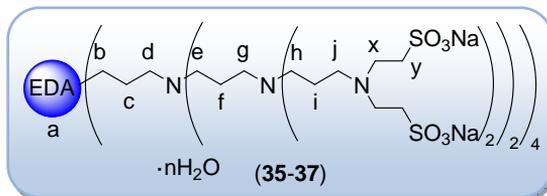
Reactivos: 33 (1 g, 1.40 mmol), $\text{BH}_3\cdot\text{Me}_2\text{S}$ (40 mL, 5 M en éter). Reflujo 32 h.

G3 - (36) $\text{C}_{86}\text{H}_{204}\text{N}_{30}\cdot n\text{H}_2\text{O}$ ("1658.7"). Sólido blanco aceitoso parcialmente soluble en agua.

Reactivos: 35 (1 g, 0.63 mmol), $\text{BH}_3\cdot\text{Me}_2\text{S}$ (40 mL, 5 M en éter). Reflujo 48 h.

➤ $G_n\text{-eda}-(\text{SO}_3\text{Na})_m$ (37-39)

Protocolo general: La mezcla del dendrímero poliamina y vinilsulfonato de sodio (2 eq. por grupo amino) en MeOH:H₂O se



refluje a 120°C 48 h en ampolla de vidrio. Tras llevar a sequedad, se purifica mediante ultrafiltración en agua (membranas 500-1000 kDa), para dar los productos como sólidos microcristalinos solubles en agua.

G1-(37) C₃₀H₆₀N₆Na₈O₂₄S₈ (1329.3). Sólido blanco higroscópico (2.1 g, 90%).

Reactivos: 29 (500 mg, 1.73 mmol), vinilsulfonato sódico (5.1 mL, 13.9 mmol).

RMN-¹H/¹³C (D₂O): δ 2.95/47.0 (16H, m, y), 2.81/47.6+50.3 (20H, m, x+a), 2.60/52.8 (8H, m, d), 2.40/51.0 (8H, m, b), 1.60/22.0 (8H, m, c).

MS (ESI-) *m/z* (uma). Para [M-3Na+2H]⁻: *Calc.* 1262.31. *Exp.* 1261.11.

G2-(38) C₇₀H₁₄₀N₁₄Na₁₆O₄₈S₁₆ (2826.8). Sólido blanco higroscópico (1.6 g, 85%).

Reactivos: 31 (500 mg, 0.67 mmol), vinilsulfonato sodio (3.93 mL, 10.7 mmol).

RMN-¹H (D₂O): δ 2.89 (32H, m, y), 2.79 (52H, m, x+a+g), 2.39 (32H, m, b+d+e), 1.65 (16H, m, f), 1.54 (8H, m, c). **RMN-¹³C** (D₂O): δ 51.0-50.0 (a+b+d+e+g), 47.5 (x), 47.0 (y), 22.6 (c), 21.1 (f).

A. Elemental

% *Calc.*: C, 29.7; H, 5.0; N, 6.9; S, 18.1. *Exp.*: C, 30.4; H, 6.1; N, 7.2; S, 18.5.

G3-(39) C₁₅₀H₃₀₀N₃₀Na₃₂O₉₆S₃₂ (5821.9). Sólido blanco higroscópico (1.4g, 78%).

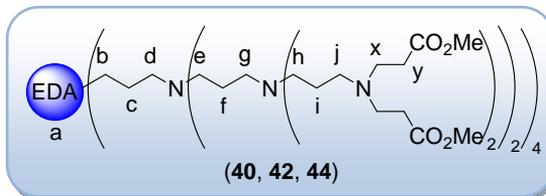
Reactivos: 33 (500 mg, 0.30 mmol), vinilsulfonato sódico (3.53 mL, 9.6 mmol).

RMN-¹H (D₂O): δ 2.96 (64H, m, y), 2.84 (64H, m, x), 2.75-2.48 (116H, m, a+b+d+e+g+h+j), 1.73 (40H, m, c+i), 1.54 (16H, m, f). **RMN-¹³C** (D₂O): δ 50.6-50.3 (a+b+d+e+g+h+j), 47.4 (x), 47.0 (y), 22.0 (c+f), 21.9 (i).

MS (ESI+) *m/z* (uma). Para [M-4Na+5H]⁺: *Calc.* 5734.96. *Exp.* 5734.86.

➤ $G_n\text{-eda}-(\text{CO}_2\text{Me})_m$ (**40**, **42** y **44**)

Protocolo general: En una ampolla de vidrio, se adiciona acrilato de metilo (2.8 eq. por grupo amino) sobre el



correspondiente dendrímero poliamina en 5 mL de MeOH. La disolución se agita a 80°C durante 18 h, y tras la evaporación completa los productos se aíslan como aceites amarillos.

G1 - (**40**) $\text{C}_{46}\text{H}_{84}\text{N}_6\text{O}_{16}$ (977.2). Aceite amarillo soluble en CHCl_3 (1.6 g, 94%).

Reactivos: **29** (500 mg, 1.73 mmol), acrilato de metilo (1.8 mL, 19.4 mmol).

RMN-¹H (CDCl_3): δ 3.63 (24H, s, CO_2Me), 2.73 (16H, t, x), 2.41 (36H, m, $a+b+d$), 1.52 (8H, m, c). **RMN-¹³C** (CDCl_3): δ 173.0 (CO_2Me), 52.5, 52.4, 51.8 ($a+b+d$), 51.5 (CO_2Me), 49.1 (x), 32.4 (y), 24.7 (c).

A. Elemental % Calc.: C, 53.45; H, 7.97; N, 6.93. *Exp.:* C, 53.60; H, 7.79; N, 7.45.

G2 - (**42**) $\text{C}_{98}\text{H}_{182}\text{N}_{14}\text{O}_{28}$ (2004.6). Aceite amarillo soluble en CHCl_3 (1.2 g, 90%).

Reactivos: **31** (500 mg, 0.67 mmol), acrilato de metilo (1.4 mL, 15.0 mmol).

RMN-¹H (CDCl_3): δ 3.64 (48H, s, CO_2Me), 2.74 (32H, t, x), 2.41 (84H, m, $a+b+d+e+g$), 1.52 (24H, m, $c+f$). **RMN-¹³C** (CDCl_3): δ 173.0 (CO_2Me), 52.0-51.5 ($a+b+d+e+g$), 51.5 (CO_2Me), 49.2 (x), 32.4 (y), 24.6 ($c+f$).

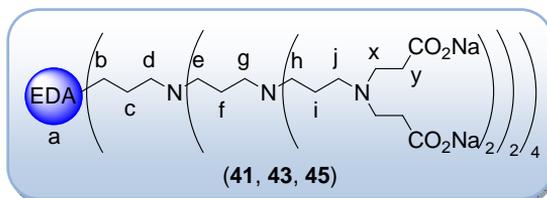
G3 - (**44**) $\text{C}_{214}\text{H}_{396}\text{N}_{30}\text{O}_{64}$ (4413.6). Aceite amarillo soluble en CHCl_3 (1.0 g, 78%).

Reactivos: **33** (500 mg, 0.30 mmol), acrilato de metilo (1.2 mL, 13.4 mmol).

RMN-¹H (CDCl_3): δ 3.63 (96H, s, CO_2Me), 2.73 (64H, m, x), 2.41 (180H, m, $a+b+d+e+g+h+j$), 1.52 (56H, m, $c+f+i$).

➤ G_n -eda-(CO₂Na)_m (**41**, **43** y **45**)

Protocolo general: Una disolución de NaOH (1.1 eq. por grupo CO₂Me) en MeOH se adiciona sobre el dendrímero



polimetiléster, y se agita a t.a. durante 24 h. El producto se aísla por evaporación a vacío y se purifica en agua mediante membranas de ultrafiltración de 500-1000 kDa. Los productos se obtienen como sólidos blancos microcristalinos solubles en agua, tras la evaporación total y el secado con Et₂O.

G1 - (**41**) C₃₈H₆₀N₆Na₈O₁₆·2H₂O (1076.9). Sólido blanco (538 mg, 98%).

Reactivos: **37** (500 mg, 0.51 mmol), NaOH (180 mg, 4.5 mmol).

RMN-¹H (D₂O): δ 2.56/2.55* (16H, m, x y x_H⁺), 2.42 (4H, s, a), 2.32 (8H, m, b), 2.26/2.35* (8H, m, d y d_H⁺), 2.18 (16H, y), 1.45 (8H, m, c). **RMN-¹³C** (D₂O): δ 181.5/180.3* (CO₂Na, CO₂H), 53.7 (b+d), 49.9 y 49.8/46.0* (a y x+x_H⁺), 37.5 (y), 24.0 (c).

A. Elemental % *Calc.*: C, 42.38; H, 5.99; N, 7.80. *Exp.*: C, 42.02; H, 6.01; N, 7.94.

G2 - (**43**) C₈₆H₁₄₀N₁₄Na₁₆O₃₂ (2249.9). Sólido blanco (540 mg, 96%).

Reactivos: **39** (500 mg, 0.25 mmol), NaOH (176 mg, 4.4 mmol).

RMN-¹H (D₂O): δ 2.55 (32H, m, x), 2.41 (4H, s, a), 2.24 (48H, m, b+d+e+g), 2.14 (32H, m, y), 1.44 (24H, m, c+f).

G3 - (**45**) C₁₈₂H₃₀₀N₃₀Na₃₂O₆₄ (4668.2). Sólido blanco (488 mg, 95%).

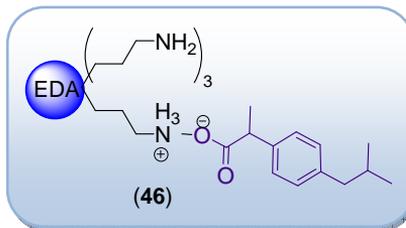
Reactivos: **41** (500 mg, 0.11 mmol), NaOH (160 mg, 4.0 mmol).

RMN-¹H (D₂O): δ 2.56 (64H, m, x), 2.41 (4H, s, a), 2.25 (112H, m, b+d+e+g+h+j), 2.15 (64H, m, y), 1.45 (56H, m, c+f+i).

4.4.7. Estrategias de conjugación de ibuprofeno (46-58)

➤ $G_1\text{-eda}-(\text{NH}_2)_3(\text{NH}_3^+\text{-OOC-Ibu})$ (**46**)

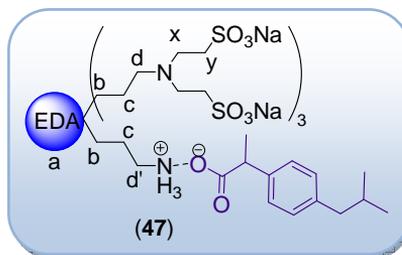
A una disolución del dendrímero **32** (80 mg, 0.28 mmol) en 2 mL de MeOH se adiciona ibuprofeno (57 mg, 0.28 mmol) también disuelto en 1 mL de MeOH. Tras agitación 24 h a t.a. en oscuridad, se obtiene el conjugado **46**, que debe mantenerse en disolución para evitar su agregación.



(**46**) $\text{C}_{27}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_2$ (494.8). Sólido blanco soluble en H_2O y MeOH (138 mg, 100%).
RMN- ^1H (D_2O): δ 7.05 y 6.95 (4H, 2d, Ar-H), 3.38 (1H, c, CHCOO), 2.80 (6H, m, CH_2NH_2), 2.42 (4H, s, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}$), 2.35 (8H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.24 (2H, d, ArCH_2), 1.61 ($\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1.52 (8H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 1.16 (3H, d, CHCH_3), 0.65 (6H, d, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).

➤ $G_1\text{-eda}-(\text{SO}_3\text{Na})_6(\text{NH}_3^+\text{-OOC-Ibu})$ (**47**)

A una disolución de **46** (138 mg, 0.28 mmol) en 4 mL de MeOH: H_2O (1:1) se adiciona vinilsulfonato de sodio (0.72 mL, 1.96 mmol) y se calienta a 120°C durante 48 h en ampolla de vidrio. La disolución



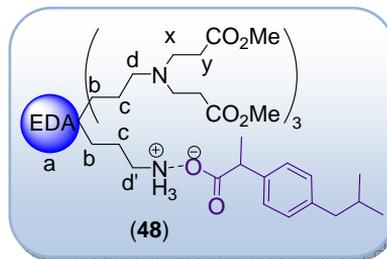
anaranjada se lleva a sequedad y se purifica por nanofiltración en agua (membrana de 1000 kDa). Tras evaporar y lavar con Et_2O , se obtiene **47** como un sólido pulverulento blanco.

(**47**) $\text{C}_{39}\text{H}_{72}\text{N}_6\text{Na}_6\text{O}_{20}\text{S}_6$ (1275.3). Sólido blanco pulverulento soluble en agua (324 mg, 91%).

RMN- ^1H (D_2O): δ 7.06 y 7.04 (2H y 2H, d y d, ArH), 3.44 (1H, m, CHCOO), 2.92 (12H, m, y), 2.79 (18H, m, $x+a+d'$), 2.70 (6H, m, d), 2.40 (8H, m, b) 2.27 (2H, d, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.63 (9H, m, c + $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.19 (3H, d, CHCH_3), 0.67 (3H, d, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

➤ $G_1\text{-eda}-(\text{CO}_2\text{Me})_6(\text{NH}_3^+\text{-OOC-Ibu})$ (**48**)

A una disolución del conjugado **46** (138 mg, 0.28 mmol) en 3 mL de MeOH se adiciona acrilato de metilo (0.21 mL, 2.35 mmol) y se calienta 18 h a 80°C. Tras la evaporación a sequedad, se obtiene el derivado **48**, como un aceite amarillento.

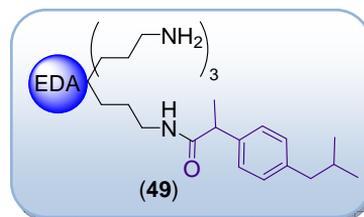


(**48**) $\text{C}_{51}\text{H}_{89}\text{N}_6\text{O}_{14}$ (1010.3). Aceite amarillo soluble en CHCl_3 (283 mg, 100%).

RMN-¹H (CDCl_3): δ 7.21 y 7.01 (2H y 2H, d y d, ArH), 3.62 (18H, s, CO_2Me), 2.95 (1H, m, CHCOO), 2.72 (12H, t, x), 2.46 (2H, m, d'), 2.40 (24H, m, $a+b+d$), 1.80 (1H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.64 (2H, m, c'), 1.55 (6H, m, c), 1.41 (3H, d, CHCH_3), 0.86 (6H, d, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$). **RMN-¹³C** (CDCl_3): δ 198.0 (COO^-), 172.9 (CO_2Me), 140.0, 142.0, 128.9 y 127.2 ($\text{C}(\text{Ar})$), 51.8-51.5 ($a+b+d+\text{CO}_2\text{Me}$), 49.0 (x), 46.1 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 45.0 (CHCH_3), 36.0 (d'), 32.3 (y), 30.2 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 23.7 ($c'+\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 22.4 (c), 19.1 (CHCH_3).

➤ $G_1\text{-eda}-(\text{NH}_2)_3(\text{NHCO-Ibu})$ (**49**)

Se disuelve el dendrímero **48** (150 mg, 0.52 mmol) en EtOH y se agita con NEt_3 durante 1 h. Por otro lado, se disuelve IbuCOOH (115 mg, 0.56 mmol) en EtOH, y se activa con HOBt (40 mg, 0.30 mmol) y EDC (128 mg, 0.67 mmol), con



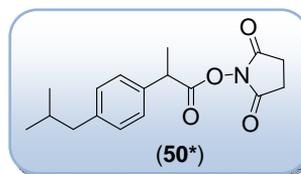
agitación durante 1 h. Entonces se adiciona el ibuprofeno activado sobre el dendrímero y se agitan 24 h a t.a. La disolución se lleva a sequedad y se lava con CHCl_3 , obteniendo el compuesto **49** como un sólido blanco pegajoso.

(**49**) $\text{C}_{27}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}$ (476.7). Sólido blanco soluble en agua (250 mg, 100%).

RMN-¹H (D_2O): δ 7.08 y 7.04 (2H y 2H, d y d, ArH), 3.02 (1H, c, CHCOO), 2.75 (8H, m, CH_2NH_2), 2.35 (14H, m, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ y ArCH_2), 1.60 (9H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1.21 (3H, d, CHCH_3), 0.65 (6H, d, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).

➤ *IbuCONHS (50*)*

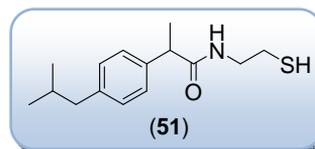
La preparación de este compuesto se realiza a través de una modificación del protocolo de Marega y col.,⁶ eliminando la utilización de DMAP, pero controlando que pH = 5-6.5. Además, la separación del



IbuCOOH sin reaccionar se realizó mediante una filtración de afinidad en alúmina básica con CH₂Cl₂ como eluyente, y el compuesto **50*** se utilizó sin mayor purificación para la siguiente reacción. Los valores de RMN-¹H y ¹³C concuerdan con los mostrados en bibliografía y confirman la obtención de **50***.

➤ *IbuCONHSH (51)*

Este compuesto, preparado previamente por otros autores,⁷ se sintetiza mediante la adición a una disolución de **50** (3.39 mmol) en CH₂Cl₂, sin aislar del



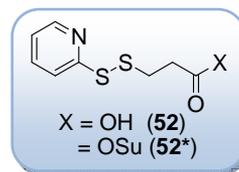
paso anterior, de hidrocloreuro de cisteamina (506 mg, 3.39 mmol) y luego se ajusta pH = 7.5 con NEt₃. Tras 18 h en agitación a t.a., la disolución se lava rápidamente (para minimizar la oxidación del tiol) con H₂O/NaCl_{sat} (4x2 mL), se seca con MgSO_{4anh} y se evapora. **51** se obtiene como un sólido blanco, mezcla de sus formas reducida (-SH) y oxidada (S-S). Aunque los valores de RMN concuerdan con los hallados en bibliografía, a continuación se detallan para facilitar la comprensión de ambas formas del compuesto.

(51) C₁₅H₂₃NOS (265.4). Sólido blanco soluble en CHCl₃ (450 mg, 50%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.16 y 7.07 (4 H, 2 d, CH₂(Ar)), 3.52 (1H, c, CHCO), 3.39 y 3.30 (2H, m y t, NHCH₂CH₂S^{H/S}), 3.65 y 3.55 (2H, t y t, NHCH₂CH₂S^{H/S}), 2.40 (2H, d, CHCH₂), 2.06 (1H, s ancho, SH) 1.80 (1H, h, (CH₃)₂CH), 1.46 (3H, d, CHCH₃), 0.85 (6H, d, (CH₃)₂CH). **RMN-¹³C** (CDCl₃): δ 174.9/174.6 (CO), 140.6/140.4 y 138.3 (C(Ar)), 129.5/129.4 y 127.1 (CH(Ar)), 46.5/46.2 (CHCH₃), 44.8 (CHCH₂), 42.2 (NHCH₂CH₂S^H), 38.4 (NHCH₂CH₂S^S), 37.4 (NHCH₂CH₂S^S), 30.0 (CH₃)₂CH, 24.3 (NHCH₂CH₂S^H), 22.2 (CH₃)₂CH, 18.4/18.2 (CH₃CH).

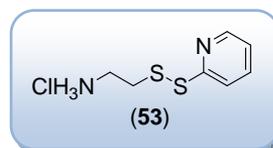
➤ *Ácido 3-(2-piridilditio)-propanoico (52) y N-succinimidil 3-(2-piridilditio)-propanoato (52*)*

El protocolo seguido para la preparación de estos compuestos es el descrito por Navath.⁸ Para el caso del compuesto **52** (o PDP, en su terminología) no se realiza ningún cambio en el protocolo, y sin embargo obtenemos rendimientos superiores (cuantitativos). Para el derivado **52***, sin embargo, se modificó el protocolo al sustituir el agente acoplante DCC por EDC, lo que supone una mejora destacada en la purificación posterior. El proceso es el que sigue: se disuelve **52** (100 mg, 0.46 mmol) en 5 mL de CH₂Cl₂ seco, y a 0°C se adicionan inicialmente EDC (125 mg, 1.30 mmol), con agitación durante 10 min en frío y 10 min a t.a., y posteriormente *N*-hidroxisuccinimida (65 mg, 1.11 mmol) con 10 min de agitación en frío. Tras este tiempo, se deja alcanzar t.a. y la reacción se mantiene durante 4 h. La disolución se lava con H₂O/NaCl_{sat} para eliminar los subproductos derivados de EDC (2x5 mL), y la fase orgánica se seca con Na₂SO_{4 anh} y se lleva a sequedad, obteniendo **52*** como un aceite anaranjado. Los valores de RMN-¹H y ¹³C obtenidos concuerdan con los proporcionados en la bibliografía y confirman la presencia de los compuestos deseados.



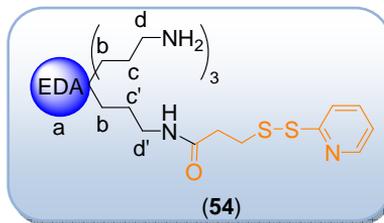
➤ *PySS(CH₂)₂NH₃Cl (53)*

El compuesto **53** se preparó según el protocolo descrito por Van der Vlies,⁹ con la reducción del tiempo de reacción de 18 a 2 h y obteniendo un rendimiento similar. Los valores de RMN-¹H y ¹³C obtenidos concuerdan con los proporcionados en la bibliografía y confirman la presencia del compuesto deseado.



➤ G_1 -eda-(NH₂)₃(NHCO(CH₂)₂SSPy) (**54**)

Sobre el dendrímero poliamina **32** (700 mg, 2.04 mmol) disuelto en 4 mL de PBS:MeOH (1:1), se adiciona el espaciador aniónico activado **52** (640 mg, 2.05 mmol) disuelto en 2 mL de EtOH. Tras 18 h a t.a., la disolución



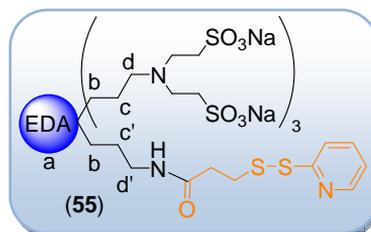
amarilla se filtra y se lleva a sequedad, obteniendo **54** como un sólido amarillo higroscópico.

(54) C₂₂H₄₃N₇OS₂ (485.8). Sólido amarillo higroscópico soluble en MeOH y parcialmente soluble en agua (990 mg, 100%).

RMN-¹H (D₂O): δ 8.31, 7.73, 7.58 y 7.14 (4 H; d, m, d y m, CH(Ar)), 3.10 (2 H, m, d'), 2.82 (2H, m, COCH₂CH₂S), 2.72 (6 H, m, d), 2.50 (2H, m, COCH₂CH₂S), 2.47 (4 H, s, a), 2.42 (8 H, m, b), 1.66 y 1.53 (6 H y 2 H, m y m, c y c').

➤ G_1 -eda-(SO₃Na)₆(NHCO(CH₂)₂SSPy) (**55**)

Sobre una disolución del conjugado **54** (1.7 g, 3.5 mmol) en MeOH se adiciona vinilsulfonato de sodio (7.7 mL, 21.0 mmol). Tras 18 h a 120°C en ampolla de vidrio, la disolución se lleva a sequedad, y el conjugado se purifica por extracción en EtOH.

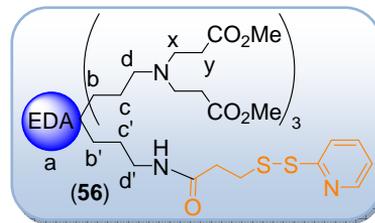


(55) C₃₄H₆₁N₇Na₆O₁₉S₈ (1266.3). Sólido amarillo microcristalino soluble en agua (4.4 g, 100%).

RMN-¹H (D₂O): δ 8.21, 7.64, 7.56 y 7.12 (4H, m, CH(Ar)), 3.10 (4H, m, d' y COCH₂CH₂S), 2.96 (12H, m, y), 2.88 (6H, m, d), 2.82 (12H, m, x), 2.61 (4 H, s, a), 2.50 (8 H, m, b), 2.40 (2H, m, COCH₂CH₂S), 1.70 y 1.62 (6H y 2H, m y m, c y c').

➤ $G_1\text{-eda}-(\text{CO}_2\text{Me})_6(\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{SSPy})$ (**56**)

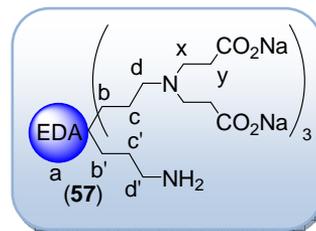
Sobre el conjugado **54** (100 mg, 0.20 mmol) disuelto en MeOH se adiciona acrilato de metilo (0.18 mL, 2.0 mmol). Tras 18 h a 80°C, la disolución amarilla se evapora para dar **56**, como un aceite amarillento con rendimiento cuantitativo.



(**56**) $\text{C}_{46}\text{H}_{79}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{S}_2$ (1002.3). Aceite amarillo soluble en CHCl_3 (200 mg, 100%).
RMN- ^1H (CDCl_3): δ 8.40, 7.64, 7.12 y 6.95 (4H, d, m, d y m, $\text{CH}(\text{Ar})$), 7.64 (1H, t, NHCO), 3.64 (18 H, s, CO_2Me), 2.98 (2H, m, d'), 2.73 (14 H, t, x y $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.52 (2H, m, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.41 (30H, m, $a+b+b'+d+y$), 1.68 y 1.51 (2H y 6H, m y m, c' y c). **RMN- ^{13}C** (CDCl_3): δ 173.0 (CO_2Me), 169.0 (CONH), 152.6, 144.7, 136.4, 128.3, 126.0 ($\text{C}(\text{Ar})$), 52.5-51.8 ($a+b+b'+d$), 50.8 (CO_2Me), 49.1 (x), 38.8 (d'), 36.0 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 34.1 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 32.4 (y), 24.7 y 24.2 (c y c').

➤ $G_1\text{-eda}-(\text{CO}_2\text{Na})_6(\text{NH}_2)$ (**57**)

Sobre el conjugado **56** (167 mg, 0.71 mmol) disuelto en MeOH se adiciona NaOH (80 mg, 15 mmol) en MeOH, y se agita a t.a. 18 h. Tras evaporar la disolución a sequedad, el residuo se lava con CHCl_3 y se purifica por nanofiltración en agua en membrana

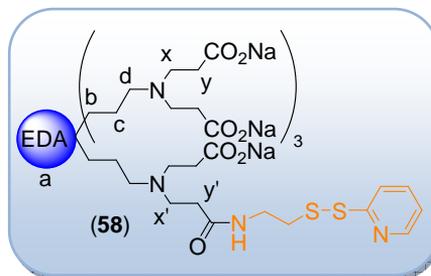


de 500 kDa, obteniendo **57** como un sólido blanco, que ha dejado de contener la molécula de ibuprofeno.

(**57**) $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{Na}_6\text{O}_{12}$ (852.7). Sólido blanco soluble en agua (605 mg, 100%).
RMN- ^1H (D_2O): δ 2.55 (12 H, m, x), 2.41 (4H, s, a), 2.32 (8H, m, b), 2.22 (6H y 2H, m, d y d'), 2.14 (12 H, m, y), 1.44 (6H + 2H, m, c y c').

➤ $G_1\text{-eda}-(\text{CO}_2\text{Na})_7(\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{SSPy})$ (**58**)

Se suspende el dendrímero carboxilato **41** (109 mg, 0.10 mmol) en EtOH y se adiciona HCl_{ac} hasta un pH 3.5-4, donde queda todo disuelto. Se lleva a sequedad y se vuelve a disolver en 4 mL EtOH:H₂O (1:1). A 0°C, se adiciona EDC (107



mg, 0.56 mmol) y se mantiene 10 min en frío y 10 min a t.a. con agitación. Entonces, a 0°C se adiciona *N*-hidroxisuccinimida (57 mg, 0.48 mmol) y tras 10 minutos en frío, se deja alcanzar t.a. El pH se ajusta a 5.50 con HCl_{ac} y se deja agitar 1 h a t.a. En el siguiente paso, se adiciona el espaciador **53** (30 mg, 0.12 mmol) y se ajusta el pH a 7.3 con NaHCO_3 . Se agita a t.a. 48 h, se lleva a sequedad y se lava con CHCl_3 , obteniendo **58** como un sólido amarillo.

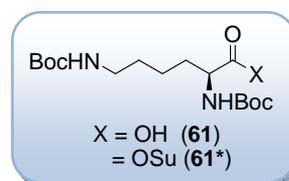
(**58**) $\text{C}_{43}\text{H}_{64}\text{N}_7\text{Na}_7\text{O}_{16}\text{S}_2$ (1160.1). Sólido amarillo soluble en agua (102 mg, 88%).
RMN-¹H (D_2O): δ 8.20, 7.65 y 7.10 (4 H, m, C(Ar)), 3.12 (2H, m, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3.00 (16 H, m, x y x'), 2.80 (8H, m, d), 2.75 (2H, m, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.61 (4 H, s, a), 2.44 (8H, m, b), 2.48 (14 H, m, y), 2.22 (2H, m, y'), 1.70 (8H, m, c).

4.4.8. Dendrones polilisina tipo MAP (61-71)

Dada la gran expansión de la química peptídica, algunos de los compuestos que a continuación se describen han sido publicados anteriormente (por ejemplo, **61**, **61***, **62** y **64**).¹⁰ En esta Memoria se recogen las condiciones optimizadas para generar grandes cantidades, y la confirmación mediante HPLC-MS de la obtención de los compuestos deseados. Para el resto, la caracterización se describe considerando como C_a el carbono contiguo al grupo COO del respectivo aminoácido y nombrando los carbonos consecutivos como *b*, *c*, *d*, *e*, etc. En ocasiones, en el espectro se discrimina entre el grupo metileno *x*¹ de la primera capa y aquéllos *x* de las siguientes.

➤ G_1 -[(Boc)₂]-OH (**61**) y G_1 -[(Boc)₂]-OSu (**61***)

La síntesis de **61** y **61*** se lleva a cabo según el protocolo establecido en bibliografía,¹¹⁻¹⁴ aunque en el caso de **61*** la reacción de acoplamiento se realiza con *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) en lugar de DCC



para facilitar la separación del subproducto. Los valores obtenidos mediante HPLC-MS confirman la naturaleza de los compuestos deseados.

(61) C₁₆H₃₀N₂O₆ (346.4). Aceite viscoso soluble en CHCl₃ (35.7 g, 100%).

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN): 20.4 min.

m/z (uma) para C₁₆H₃₀N₂O₆Na⁺ (M+Na⁺): *Calc.* 369. *Exp.* 369.

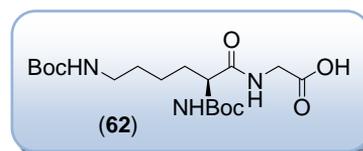
(61*) C₂₀H₃₃N₃O₈ (443,49). Sólido blanco soluble en CHCl₃ (32.0 g, 70%).

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN): 22.1 min.

m/z (uma) para C₂₀H₃₃N₃O₈Na⁺ (M+Na⁺): *Calc.* 466. *Exp.* 466.

➤ G_1 -[(Boc)₂]-G-OH (**62**)

El compuesto **62** se preparó según el protocolo de la bibliografía,¹⁴ pero sustituyendo



el disolvente de reacción DMF/H₂O por EtOH/H₂O (2:1), y utilizando como base

NMM (2 eq.) en lugar de NaHCO₃, por facilidad en la purificación. Los valores obtenidos mediante HPLC-MS confirman la naturaleza del compuesto deseado.

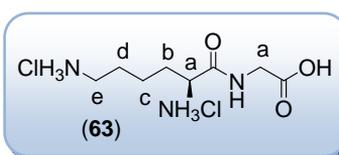
(62) C₁₈H₃₃N₃O₇ (403.5). Sólido blanco soluble en CHCl₃ (11.2 g, 81%).

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN): 19.1 min.

m/z (uma). Para C₁₈H₃₃N₃O₇H⁺ (M+H⁺): *Calc.* 404. *Exp.* 404. Para C₁₈H₃₃N₃O₇Na⁺ (M+Na⁺): *Calc.* 426. *Exp.* 426

➤ G₁-[(NH₃Cl)₂]-G-OH (**63**)

La mezcla de **62** (11.2 g, 27.8 mmol) en THF (60 mL) y HCl/dioxano (47 mL, 190 mmol) se refluje 1 h. El precipitado se agita 1 h con Et₂O a



t.a., se decanta y se agita de nuevo con Et₂O durante 18 h. **63** se aísla por decantación y evaporación, como un sólido muy higroscópico.

(63) C₈H₁₉Cl₂N₃O₃ (276.2). Sólido blanco soluble en agua (7.7 g, 100%).

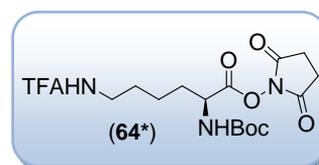
HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN:H₂O): 6.8 min.

m/z (uma) para C₈H₁₈N₃O₃⁺ (M-(2HCl)+H⁺): *Calc.* 204. *Exp.* 204.

RMN-1H (D₂O): δ 3.91 (3H, m, *a*(Gly) y *a*(Lys)), 2.85 (2H, t, *e*), 1.79 (2H, m, *b*), 1.56 (2H, m, *d*), 1.34 (2H, m, *c*).

➤ G₁-[(Boc)(TFA)]-OSu (**64***)

La síntesis de **64*** se lleva a cabo de forma análoga a **61***, según el protocolo de la bibliografía,¹³ de nuevo sustituyendo DCC por DIPCDI para facilitar la separación del subproducto. Los valores obtenidos



mediante HPLC-MS confirman la naturaleza del compuesto deseado.

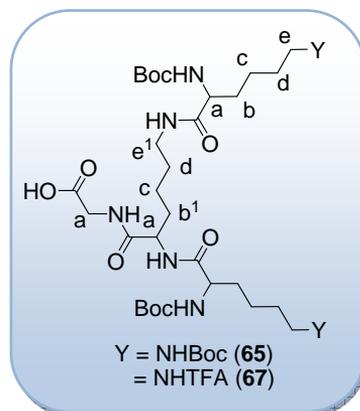
(64*) C₁₇H₂₄F₃N₃O₇ (439.4). Sólido blanco soluble en CHCl₃ (12.8 g, 67%).

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN): 20.9 min.

m/z (uma). Para C₁₇H₂₄F₃N₃O₇Na⁺ (M+Na⁺): *Calc.* 462. *Exp.* 462. Para C₁₂H₁₇F₃N₃O₅⁺ (M-Boc+H⁺): *Calc.* 340. *Exp.* 340.

➤ G_2 -[$(Boc)_4$]-G-OH (**65**) y G_2 -[$(Boc)_2(TFA)_2$]-G-OH (**67**)

Protocolo general. Una disolución del dendrón **63** en 10 mL H₂O se adiciona sobre una disolución de **61*** o **64*** en EtOH (10 mL). Tras añadir NMM, la mezcla se agita durante 18 h a t.a., y entonces se añade KHSO₄ (1M, 40 mL). La disolución se extrae con AcOEt (3x40 mL), y la fase orgánica se lava con H₂O/NaCl_{sat} (3x40 mL), se seca con Na₂SO_{4(anh)} y se lleva a sequedad. El residuo se agita con éter de petróleo (40 mL), para aislar **65** o **67** como sólidos blancos microcristalinos.



(**65**) C₄₀H₇₃N₇O₁₃ (860.0). Sólido blanco soluble en CHCl₃ (2.5 g, 81%).

Reactivos: **63** (1 g, 3.6 mmol), **61*** (3.19 g, 7.2 mmol), NMM (2 mL, 18.2 mmol).

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN): 22.2 min.

m/z (uma) para C₄₀H₇₄N₇O₁₃ (M+H⁺): *Calc.* 861. *Exp.* 861.

RMN-¹H/¹³C (CDCl₃): δ 4.48/52.5 (6H, m, *a*(Lys)), 4.00/40.8 (2H, m, *a*(Gly)), 3.06/40.2 y 38.5 (6H, m, *e* y *e*¹), 1.73/31.0 y 1.60/31.2 (4H y 2H, m, *b* y *b*¹), 1.38/32.5 (6H, m, *d*), 1.38/29.0 (36H, s, Boc), 1.38/22.5 (6H, m, *c*).

(**67**) C₃₄H₅₅F₆N₇O₁₁ (851.8). Sólido blanco soluble en CHCl₃ (4.5 g, 87%).

Reactivos: **63** (1.46 g, 5.32 mmol), **64*** (4.68 g, 10.6 mmol), NMM (3 mL, 27.3 mmol)

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN): 20.3 min.

m/z (uma) para C₃₄H₅₆F₆N₇O₁₁ (M+H⁺): *Calc.* 853. *Exp.* 853.

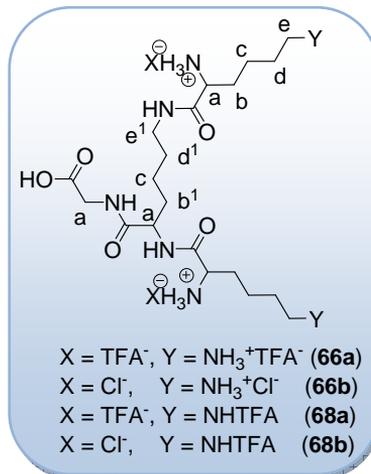
RMN-¹H/¹³C (CDCl₃): δ 4.28/53.9 (6H, m, *a*(Lys)), 4.17/43.0 (2H, m, *a*(Gly)), 3.34/39.5 (6H, m, *e*), 1.77/31.0 (6H, m, *b*), 1.61/29.0 (6H, m, *d*), 1.40/29.0 (36H, s, Boc), 1.40/22.5 (6H, m, *c*).

➤ $G_2-[(NH_3X)_4]-G-OH$ (**66**) y $G_2-[(TFA)_2(NH_3X)_2]-G-OH$ (**68**)

Protocolo general.

- *Método 1* (**66a**, **68a**): Se disuelve el dendrón en TFA:CH₂Cl₂ (1:1, 30 mL) y la disolución se agita 2 h a t.a. Tras la evaporación del disolvente, el residuo aceitoso se lava con éter de petróleo y se seca con alto vacío, para obtener el producto como un aceite incoloro que retiene TFA.

- *Método 2* (**66b**, **68b**): Se refluxe durante 2 h una disolución del dendrón en THF (15 mL) con HCl/dioxano (4 mL, 14 mmol). El precipitado se agita 1 h con Et₂O (20 mL), y el sobrenadante se elimina por decantación. Tras evaporación a sequedad, se aísla el producto final.



(**66a**) C₂₈H₄₅F₁₂N₇O₁₃ (915.7). Aceite viscoso incoloro soluble en agua.

Reactivos: **65** (500 mg, 0.58 mmol), TFA:CH₂Cl₂ (1:1, 30 mL).

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN:H₂O): 7.5 min.

m/z (uma) para C₂₀H₄₂N₇O₅ (M-4TFA+H⁺): *Calc.* 460. *Exp.* 460.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.77 (1H, t, *a*(Lys)), 3.34 (2H, s, *a*(Gly)), 2.63 y 2.40 (2H (t) y 4 H (t), *e*¹ y *e*), 1.31 y 1.21 (4H (m) y 2H (m), *b* y *b*¹), 1.11 y 0.95 (4H (m) y 2H (m), *d* y *d*¹), 0.83 (6H, m, *c*).

(**68a**) C₃₄H₅₉F₆N₇O₁₁ (855.9). Aceite viscoso amarillo soluble en agua.

Reactivos: **67** (476 mg, 0.56 mmol), TFA:CH₂Cl₂ (1:1, 30 mL).

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN:H₂O): 13.0 min.

m/z (uma) para C₂₀H₄₀F₆N₇O₇ (M-2TFA+H⁺): *Calc.* 652. *Exp.* 652.

RMN-¹H (D₂O): δ 4.08 y 3.74 (1H (t) y 2H (t), *a*(Lys¹) y *a*(Lys)), 3.70 (2H, s, *a*(Gly)), 3.63 y 3.04 (2H (t) y 4H (t), *e*¹ y *e*), 1.60 y 1.53 (4H (m) y 2H (m), *b* y *b*¹), 1.33 y 1.28 (4H (m) y 2H (m), *d* y *d*¹), 1.12 (6H, m, *c*(Lys)).

(66b) $C_{20}H_{45}Cl_4N_7O_5$ (605.4). Sólido blanco muy higroscópico soluble en agua (702 mg, 100%).

Reactivos: **65** (1.0 g, 1.16 mmol), HCl/dioxano (4 mL, 14 mmol).

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN:H₂O): 6.5 min.

m/z (uma) para $C_{20}H_{42}N_7O_5$ (M-4HCl+H⁺): *Calc.* 460. *Exp.* 460.

RMN-¹H (D₂O): δ 4.20 (1H, t, *a*(Lys)), 3.82 (2H, s, *a*(Gly)), 3.07 y 2.84 (2H (t) y 4H (t), *e*¹ y *e*), 1.74 y 1.61 (4H (m) y 2H (m), *b* y *b*¹), 1.54 y 1.34 (4H (m) y 2H (m), *d* y *d*¹), 1.26 (6H, m, *c*).

(68b) $C_{24}H_{41}F_6Cl_2N_7O_7$ (724.5). Sólido blanco muy higroscópico soluble en agua (427 mg, 100%).

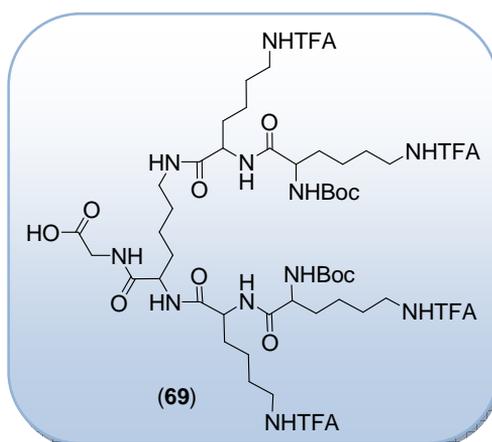
Reactivos: **65** (500 mg, 0.59 mmol), HCl/dioxano (1 mL, 3.54 mmol).

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN:H₂O): 12.4 min.

m/z (uma) para $C_{24}H_{40}F_6N_7O_7$ (M-2HCl+H⁺): *Calc.* 652. *Exp.* 652.

➤ $G_{2.5}$ -[(Boc)₂(TFA)₂]-G-OH (**69**)

Una disolución de **68a** (480 mg, 0.56 mmol) en 3 mL H₂O se adiciona sobre una disolución de **64*** (474 mg, 1.08 mmol) en 10 mL EtOH. Tras añadir NMM (0.3 mL, 2.8 mmol), la mezcla se agita durante 18 h a t.a., y entonces se añade KHSO₄ (1M, 20 mL). La disolución se extrae con AcOEt (3x20 mL), y la fase orgánica se lava



con H₂O/NaCl_{sat} (3x20 mL), se seca con Na₂SO_{4(anh)} y se lleva a sequedad. El residuo se agita con éter de petróleo, y tras decantar el sobrenadante y llevar a sequedad, se obtiene **67** como un sólido pegajoso que retiene TFA.

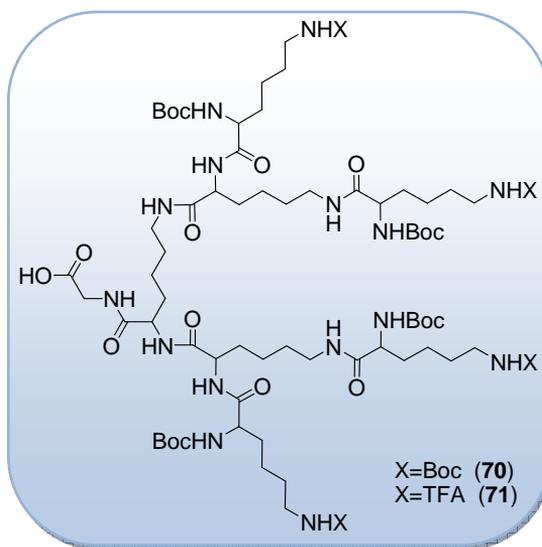
(69) $C_{50}H_{77}F_{12}N_{11}O_{15}$ (1300.2). Sólido pegajoso soluble en CHCl₃.

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN): 22.1 min.

m/z (uma) para $C_{45}H_{70}F_{12}N_{11}O_{13}^+$ (M-Boc+H⁺): *Calc.* 1202. *Exp.* 1202.

➤ G_3 -[(Boc)₈]-G-OH (**70**) y G_3 -[(Boc)₄(TFA)₄]-G-OH (**71**)

Protocolo general. Una disolución de **66b** en 3 mL H₂O se adiciona sobre una disolución de **61*** o **64*** en 5 mL EtOH. Tras añadir NMM, la mezcla se agita durante 18 h a t.a. y entonces se añade KHSO₄ (1M, 20 mL). Tras su filtración, la disolución se extrae con AcOEt (3x20 mL), y la fase orgánica se lava con H₂O/NaCl_(sat) (2x20mL), se seca con Na₂SO_{4(anh)} y



se lleva a sequedad. El residuo se agita con éter de petróleo, y tras decantar el sobrenadante y llevar a sequedad, se obtienen **70** ó **71**.

(**70**) $C_{84}H_{153}N_{15}O_{25}$ (1773.8). Sólido blanco soluble en CHCl₃ (400 mg, 39%).

Reactivos: **66b** (350 mg, 0.58 mmol), **61*** (1.02 g, 2.31 mmol), NMM (642 μ L, 5.8 mmol).

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN): 25.8 min.

m/z (uma) para $C_{84}H_{154}N_{15}O_{25}$ (M+H⁺): *Calc.* 1775. *Exp.* 1775.

(**71**) $C_{72}H_{117}F_{12}N_{15}O_{21}$ (1756.8). Sólido blanco soluble en CHCl₃ (754 mg, 74%).

Reactivos: **66b** (350 mg, 0.58 mmol), **64*** (1.01 g, 2.31 mmol), NMM (642 μ L, 5.8 mmol).

HPLC-MS(ESI) R_T (MeCN): 23.1 min.

m/z (uma) para $C_{72}H_{118}F_{12}N_{15}O_{21}$ (M+H⁺): *Calc.* 1777. *Exp.* 1777.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

1. D. E. Budil, S. Lee, S. Saxena, J. H. Freed. *J. Magn. Res. A*, **1996**, *120*, 155-189.
2. E. Hao, Z. Wang, L. Jiao, S. Wang. *Dalton Trans.*, **2010**, *39*, 2660-2666.
3. E. Fuentes Paniagua, Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá, **2014**.
4. R. D. Tack, WO9612755A1, **1996**.
5. Y. Lu, B. Sun, C. Li, M. H. Schoenfish. *Chem. Mater.*, **2011**, *23*, 4227-4233.
6. A. R. Marega, M. Bergamin, V. Aroulmoji, F. Dinon, M. Prato, E. Murano. *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, *2011*, 5617-5625.
7. A. P. Kourounakis, D. Galanakis, K. Tsiakitzis, E. A. Rekka, P. N. Kourounakis. *Drug Dev. Res.*, **1999**, *47*, 9-16.
8. R. S. Navath, Y. E. Kurtoglu, B. Wang, S. Kannan, R. Romero, R. M. Kannan. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 2446-2455.
9. A. J. Van der Vlies, C. P. O'Neil, U. Hasegawa, N. Hammond, J. A. Hubbell. *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 653-662.
10. T. L. Nagabhushan, M. F. Haslanger, M. F. Czarniecki, WO8900165A1, **1989**.
11. O. Keller, W. E. Keller, L. G. Van, G. Wersin. *Org. Synth.*, **1985**, *63*, 160-170.
12. M. Driffield, D. M. Goodall, D. K. Smith. *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 2612-2620.
13. M. E. Sergeev, T. L. Voyushina. *Lett. Org. Chem.*, **2006**, *3*, 857-860.
14. T. L. Nagabhushan, M. F. Haslanger, M. F. Czarniecki, WO8900165A1, **1989**.

CAPÍTULO 5

“CONCLUSIONES”

Del trabajo presentado en los Capítulos 1, 2 y 3 de esta Memoria se desprenden las siguientes conclusiones:

I.- Se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización química de cuatro familias de compuestos con núcleo de etilendiamina (EDA) y 2 ó 4 grupos aniónicos, a partir de los cuales se han generado complejos metálicos de Ni, Co, Cu y Zn. Estos compuestos, que denominamos de “generación 0”, sirven para modelar el comportamiento de dendrímeros y metalodendrímeros de generaciones mayores. La estrategia de síntesis se basa en reacciones de tipo Michael o aza-Michael, sencillas y con elevados rendimientos, mientras que la caracterización química mediante técnicas como RMN, RSE, espectrofotometría UV-Vis o difracción de rayos X, permitió conocer la estructura de estos compuestos tanto en estado sólido como en disolución.

II.- La valoración potenciométrica de las sales sódicas **1**, **8**, **12** y **18** permite concluir que, a pH fisiológico, los grupos sulfonato y carboxilato se encuentran en su forma aniónica, estando así disponibles para la coordinación cuando se enfrenten a metales o para inhibir la infección viral frente al VIH mediante la interacción electrostática con proteínas virales y/o celulares.

III.- Los ensayos biomédicos realizados mostraron que las sales sódicas **1**, **8**, **12** y **18** no presentan toxicidad ni capacidad inhibitoria frente a la infección por el VIH, tanto en células pre- como post-tratadas. Sin embargo, la coordinación de iones metálicos a estos ligandos supone una disminución significativa de la toxicidad de los iones libres y un aumento claro de la capacidad inhibitoria, hasta alcanzar niveles similares a los de los fármacos comerciales tanto en pre- como en post-tratamiento. Estos resultados apuntan a un comportamiento dual de los compuestos, impidiendo por un lado la unión del virus a la célula, a través del bloqueo de las proteínas de membrana del virus y la célula mediante los

grupos aniónicos, interacción que es modulada por el centro metálico, y por el otro, actuando en pasos posteriores del ciclo replicativo.

IV.- Los estudios complementarios realizados muestran que los compuestos no siguen un patrón concreto de especificidad por los correceptores CXCR4 y CCR5, y que el tratamiento combinado de los nuevos complejos metálicos con AZT es más eficaz en el tratamiento de la infección por el VIH, alcanzando valores de 100% de inhibición a 48 h para la mayoría de los compuestos.

V.- Se han ensayado distintas metodologías para la generación de sistemas dendríticos multivalentes a partir de un núcleo de etilendiamina. Las más eficaces resultaron ser la estrategia de acoplamiento convergente/reacción tiol-eno, para dendrones con esqueleto carbosilano, y la estrategia adición de Michael/reducción, para dendrímeros con esqueleto polipropilenimina (PPI), descartando las rutas de alquenilación/hidrosililación y la reacción *click* CuAAC por la contaminación del producto con los catalizadores y la dificultad para completar la reacción.

VI.- El dendrón con esqueleto carbosilano **28**, preparado mediante estrategia convergente, permite la introducción de grupos aniónicos (**29**) o catiónicos (**30**) en la periferia mediante reacciones tiol-eno sencillas, rápidas y fáciles de purificar. Estos sistemas dendríticos iónicos son particularmente interesantes porque presentan un punto focal con una gran capacidad coordinativa para poder alojar diferentes centros metálicos, a la vez que una superficie con carga negativa (**29**) o positiva (**30**) que les dota de una gran potencialidad para comprobar su actividad en diferentes aplicaciones médicas, como la inhibición de la infección viral o el transporte de ácidos nucleicos, respectivamente.

VII.- Los dendrímeros PPI de generaciones 1-3, con grupos sulfonato (**37-39**) y carboxilato (**41, 43 y 45**) terminales, se prepararon a partir de sus precursores mediante las mismas reacciones que en los sistemas de generación 0, y se caracterizaron principalmente a través de RMN. A pH fisiológico, ambas familias presentan sus grupos aniónicos disponibles para la coordinación de metales o para inhibir la infección viral, tal y como los sistemas de generación 0 habían predicho.

VIII.- El estudio conjunto mediante espectrofotometría UV-Vis y RSE nos permite concluir que estos dendrímeros PPI aniónicos presentan un patrón específico en la coordinación de iones metálicos. A las concentraciones más pequeñas de Cu(II), hasta una proporción 1:1, los espectros son dominados por una señal que surge de la coordinación quelato CuN_2O_2 en el núcleo del dendrímero. A mayores concentraciones, los espectros sugieren una localización periférica de los iones, inicialmente con una coordinación plano-cuadrada CuNO_3 , y posteriormente de tipo CuO_4 a las concentraciones más altas probadas. Además, existen diferencias notables entre los sistemas con grupos terminales carboxilato o sulfonato, observándose una interacción más débil por el nitrógeno y más fuerte por los oxígenos terminales, en el caso de los dendrímeros con grupos sulfonato, y a la inversa en el caso de los sistemas con grupos carboxilato. Esto permitiría generar sistemas homo y heterometálicos de manera controlada.

IX.- Los dendrímeros sulfonato **37-39** y carboxilato **41, 43 y 45** fueron evaluados como agentes antivirales frente a la infección por el VIH, observando que:

- a) Los dendrímeros son biocompatibles hasta una concentración de 20 μM , en las líneas celulares (Hec-1A y VK-2) y en los cultivos primarios (CMSP) estudiados, mientras que los complejos metálicos de Ni, Co, Cu y Zn, preparados a partir de ellos a distintas proporciones dendrímero:metal

también son biocompatibles. La coordinación del ión metálico al dendrímero disminuye significativamente su toxicidad, respecto al ión libre.

- b) En las líneas epiteliales Hec-1A y VK-2, como modelo de la primera barrera frente a la infección por el VIH, el pre-tratamiento con algunos derivados de segunda generación produce altas tasas de inhibición. Para todos los metales, la inhibición disminuye al aumentar la proporción de ión metálico, debido a la saturación de los grupos aniónicos periféricos. Las mayores inhibiciones se producen con los compuestos **38-M₁** y **43-M₁**, donde existe una cooperatividad entre los grupos aniónicos y el centro metálico por la interacción con las proteínas virales y celulares. Además, los metalodendrímeros previenen la internalización del virus dentro de las células, y la interacción del ión metálico en la estructura dendrítica potencia su actividad inhibitoria de manera destacada.
- c) A diferencia de los complejos mononucleares de “generación 0”, se encontró cierta especificidad por los correceptores CXCR4 en los complejos de cobalto y cobre. Sin embargo, mientras que los derivados de níquel no producen ninguna inhibición en CXCR4, sí que la muestran en el correceptor CCR5.
- d) En el cultivo primario de CMSP, como modelo de la segunda barrera frente a la infección por el VIH, tanto el pre- como el post-tratamiento con los dendrímeros y sus complejos metálicos produce tasas de inhibición similares o incluso mayores que los inhibidores comerciales.
- e) Al igual que en sus sistemas análogos de generación 0, estos resultados apuntan a un comportamiento dual de los compuestos, impidiendo por un lado la unión del virus a la célula, a través del bloqueo de las proteínas de membrana del virus y la célula mediante los grupos aniónicos, interacción que es modulada por el centro metálico, y por el otro, actuando en pasos posteriores del ciclo replicativo.

XI.- Se han realizado estudios preliminares encaminados a mejorar la actividad inhibitoria de los dendrímeros anteriormente mencionados, mediante la incorporación de fármacos como ibuprofeno, que pretenden dotar a estos sistemas de una capacidad anti-inflamatoria e inhibitoria de las bombas de eflujo celulares que reducen la concentración efectiva de los fármacos. La incorporación de ibuprofeno a los sistemas dendríticos seleccionados se llevó a cabo ensayando distintos sistemas de anclaje (interacción electrostática, enlace amido o espaciador disulfuro), que condicionarían las propiedades terapéuticas de los compuestos finales.

XI.- Finalmente, se han preparado dos familias de dendrones polilisina, con un grupo -COOH en el punto focal, donde los grupos amino se encuentran protegidos en su totalidad como -NHBoc (G_1 (**61**), G_2 (**65**) y G_3 (**70**)), u ortogonalmente como -NHBoc y -NHTFA (G_1 (**64**), G_2 (**67**), $G_{2.5}$ (**69**) y G_3 (**71**)). La estrategia sintética seguida consiste en un proceso convergente sencillo, rápido y con elevados rendimientos, que evita los pasos de protección/desprotección del grupo focal de las rutas habituales, y que permite la preparación de grandes generaciones mediante una estrategia de crecimiento exponencial doble. Estos dendrones de tipo MAP son estructuras que sirven como plataforma para la posterior incorporación de distintas moléculas con interés farmacológico. Su desprotección selectiva proporciona una estructura apta para la incorporación de distintos péptidos inmunogénicos, u otras moléculas de interés, conformándose como candidatos para una futura evaluación como coadyuvante en nanovacunas frente a distintas infecciones, como por ejemplo el VIH.

CAPÍTULO 6

“SUMMARY AND CONCLUSIONS”

6.1. INTRODUCTION

HIV/AIDS remains being one of the biggest problems in global health. The failure of present therapies to eradicate the viral reservoirs and the virus ability to mutate are two of the main reasons for the search of new solutions. In HIV replicative cycle, both entrance and post-entrance steps can be considered as potential therapeutic targets for the treatment of this disease,¹⁻³ especially the initial events, which could avoid cells infection.

In the struggle against HIV infection, several compounds have been used as therapeutic agents, mainly those based on inorganic compounds or their coordination and organometallic complexes.^{1, 4, 5} These compounds present some particularities such as a wide structural variety and catalytic, redox or spectroscopic properties. However, the only effective approach that can lead to the eradication of the disease is by means of prevention and prophylaxis.⁶ Great efforts are being invested to develop prophylactic vaccines and topical microbicides.² In this last group, some polyanionic nanosystems have found an interesting application, especially polysulfonate and polycarboxylate dendrimers.⁷⁻¹⁰ Moreover, the combination of polyanionic groups and metal centers in the same molecule usually improve their activity, through potency or specificity.¹¹⁻¹⁴ Some systems are capable of acting in different stages of the replicative cycle,⁴ by attacking different enzymes such as reverse transcriptase, integrase or protease.

Compared to conventional agents, nanoparticles present some pharmacological advantages, due to their special size, surface/volume ratio and multivalency.¹⁵ Different nanosystems have been used to treat HIV infection,¹⁶ mainly in two different directions: innovative drug delivery agents and new drugs. Among them, dendrimers are stable, perfectly defined and versatile nanostructures, with wide applications in therapies against HIV infection.¹⁷⁻¹⁹

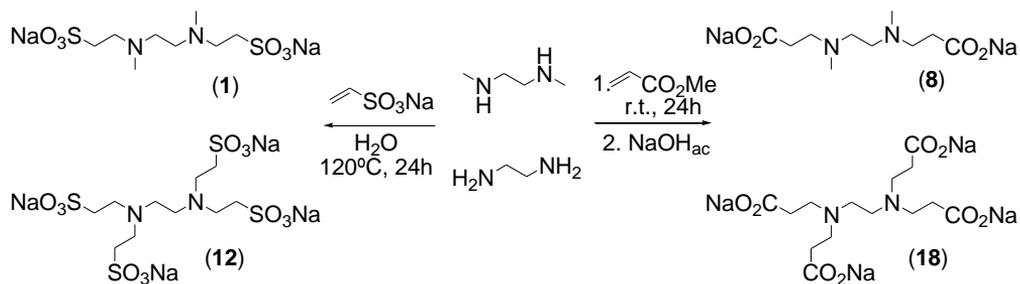
Dendrimers present a broad field of applications in nanomedicine,^{15, 20-22} such as drug delivery agents²³⁻²⁶ (host-guest chemistry, electrostatic interactions, covalent linkage), therapeutic agents (antibacterial,^{27, 28} antiviral,²⁹⁻³¹ antiprionogenic agents^{32...}), imaging agents,³³ or others.³⁴ However, these functions are exponentially multiplied when their chemistry is combined with specific properties of the different metals,^{33, 35, 36} using these metallodendrimers in catalysis, sensing, medical diagnosis, nanoparticles synthesis, etc.

6.2. RESULTS AND DISCUSSION

All the systems synthesized in this work have been characterized by different techniques such as NMR spectroscopy, elemental analysis of C, H, N and S, mass spectrometry, IR-FT, and the application of several NMR techniques such as TOCSY-2D, NOESY-2D, gHSQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$, gHMBC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ and DOSY-2D have allowed a correct structural characterization of compounds. For metal complexes, we applied some other techniques, mainly UV-Vis spectrophotometry and Electronic Paramagnetic Resonance (EPR), for a complete characterization.

6.2.1. “Zero generation” metal complexes: dual antiviral agents which model higher generation dendrimers behavior

A new family of *N*-polyanionic compounds have been described, which are based on dianionic ligands *dmedds* (*N,N'*-dimethylethylenediamine-*N,N'*-diethylenesulfonate ion) and *dmeddp* (*N,N'*-dimethyl-ethylene-diamine-*N,N'*-tetra-3-propionate ion), or tetranionic analogues *edts* (ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraethylenesulfonate ion) and *edtp* (ethylene-diamine-*N,N,N',N'*-tetra-3-propionate ion). The synthetic strategy of the correspondent sodium salts **1**, **8**, **12** and **18** is founded on Michael or aza-Michael-type reactions (*Scheme 1*), which are simple and present high yields, and their chemical characterization was mainly performed by means of different NMR experiments.

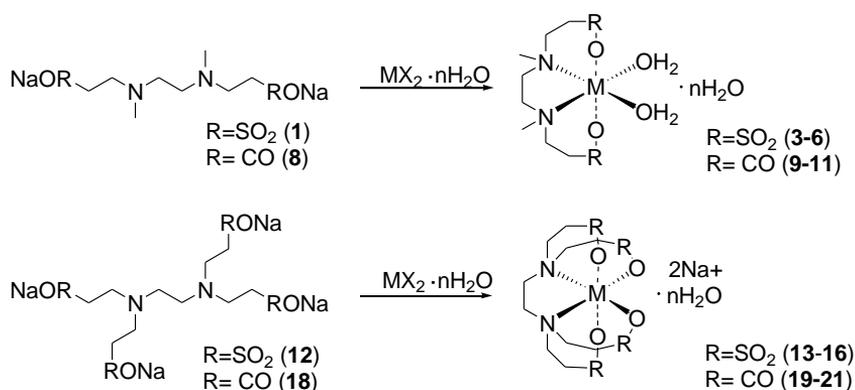


Scheme 1. Synthesis of dianionic (**1** and **8**) and tetranionic (**12** and **18**) sodium salts, through Michael or aza-Michael-type reactions.

Potentiometric titration studies of sodium salts **1**, **8**, **12** and **18** concluded that, at physiological pH, all carboxylate and sulfonate groups are found in its anionic form, thus being available for metal complexation or for inhibition of viral infection through electrostatic interaction with viral proteins.

- Metal complexation properties

Coordination of metal transition ions (Ni(II), Co(II), Cu(II), Zn(II)) to the sodium salts **1**, **8**, **12** and **18** led to the formation of different metal complexes (*Scheme 2*), which were chemically characterized, in both solution and solid state, by different analytical methods such as NMR, EPR, UV-Vis spectrophotometry and X-ray diffraction.



Scheme 2. Synthesis of metal complexes, starting from anionic sodium salts **1**, **8**, **12** and **18**. $\text{MX}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ corresponds to $\text{NiBr}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

- Biocompatibility and inhibitory properties against HIV infection

Previously described compounds were tested on MT-2 cell line and PBMC cell culture for a toxic effect using a well established metabolic activity assay (MTT assay). The study underlines the absence of toxicity of these compounds below 5 μ M concentrations. In addition, the coordination of metal ions to these ligands implies a significant reduction of the toxicity of free ions.

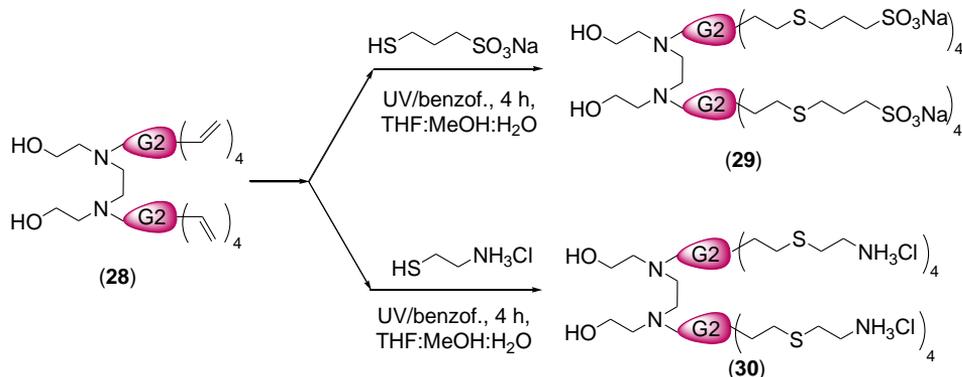
These compounds were also evaluated for HIV antiviral activity, again in MT-2 cell line and PBMC cell culture. We performed two different experiments, denoted as “*pre-treatment*” and “*post-treatment*” assays, where we could evaluate the preventive and therapeutic behavior of the different compounds. The first one quantified HIV infection (by means of ELISA assay of the viral protein p24) in treated cells before infection, while the second one quantified it in treated cells after infection. Our results point out a dual behavior of these compounds, due to their inhibitory effect in both experiments by acting in first and later steps of the replicative cycle. Moreover, we observed that sodium salts **1**, **8**, **12** and **18** do not present inhibitory capacity against HIV infection, being essential the coordination of metal ions for a relevant inhibitory effect and reaching similar levels to those of the commercial drugs in both pre- and post-treatment. In further studies, we demonstrated that these compounds do not follow a specificity pattern for CXCR4 and CCR5 co-receptors, and that their combination with AZT is more effective in the infection treatment, reaching values of 100% of inhibition at 48 h in most cases.

All these work, related to these “zero generation” compounds (which model the chemical and biological behavior of dendrimers and metallodendrimers of higher generations) led to two manuscripts published in internationally relevant journals. They can be consulted for further details.^{37, 38}

6.2.2. Dendrimers and metallodendrimers as dual antiviral agents

Different methodologies for the generation of multivalent dendritic systems from ethylenediamine core have been tested. Alkenylation-hydrosilylation and Click CuAAC routes were discarded, due to catalyst contamination of the product and the reaction incompleteness. However, we found two successful routes for different dendritic skeleton growth:

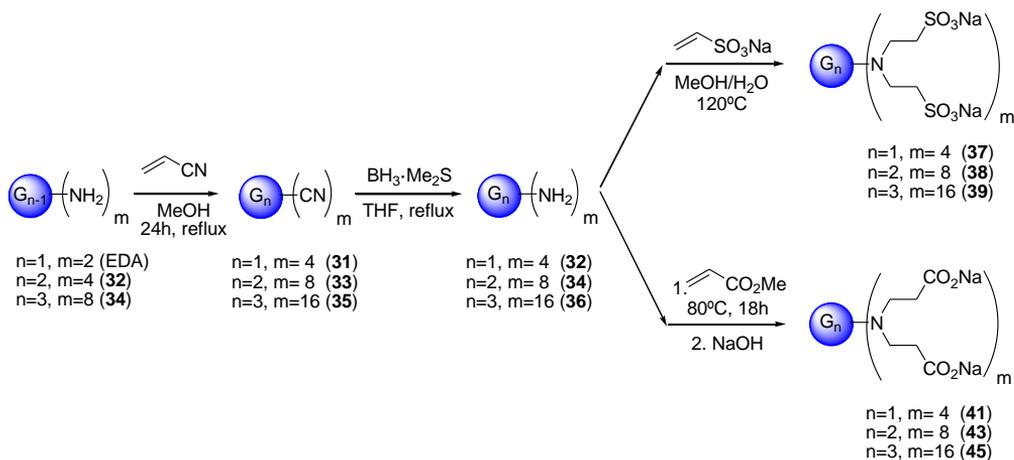
(1) Carbosilane dendrons from an EDA core were efficiently prepared through the *convergent coupling - thiol-ene reaction strategy* (Scheme 3). The precursor carbosilane dendron **28** allowed the introduction of anionic (**29**) or cationic (**30**) groups at the periphery using a simple, fast and easy to purify way. These ionic dendrons are particularly interesting because they present a focal point with a great coordinative ability to accommodate various metal centers, as well as a negatively (**29**) or positively (**30**) charged surface which provides them a great potentiality for biomedical applications, such as the inhibition of viral infection or the nucleic acid transport, respectively.



Scheme 3. Thiol-ene reaction for the synthesis of ionic carbosilane dendrons **29** and **30**.

(2) Polypropyleneimine (PPI) dendrimers with an EDA core were efficiently synthesized through the *Michael addition - reduction strategy*. Unmodified PPI dendrimers with EDA core allowed the synthesis of sulfonate (**37-39**) and

carboxylate (**41**, **43** and **45**) decorated dendrimers, by means of the same reactions as zero generation systems (*Scheme 4*).



Scheme 4. General synthetic proceeding for the preparation of anionic PPI dendrimers with EDA core.

These dendrimers were mainly characterized by different NMR experiments (*Figure 1*). According to zero generation compounds prediction, their potentiometric study concluded that, at physiological pH, both families presented their anionic groups available for metal complexation or viral infection inhibition.

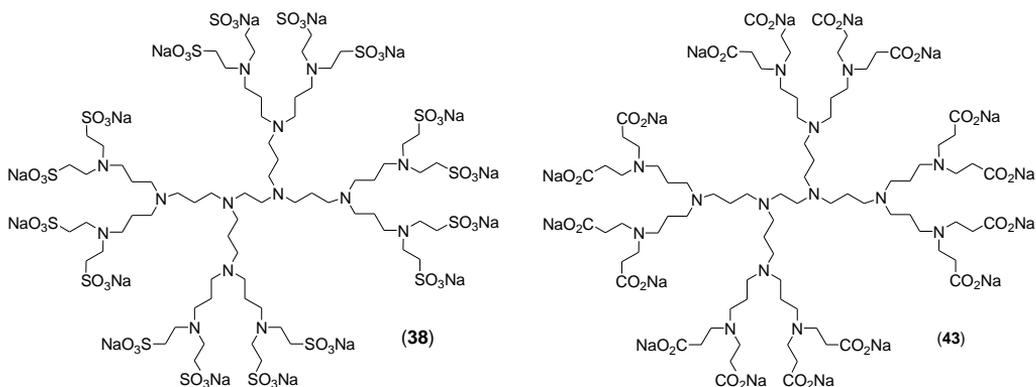


Figure 1. Proposed structures for G_2 anionic PPI dendrimers **38** and **43**.

- Metal complexation properties

By means of a combined study between UV-Vis spectrophotometry and EPR, we found a specific pattern towards metal ions coordination in these anionic PPI dendrimers (*Figure 2*).

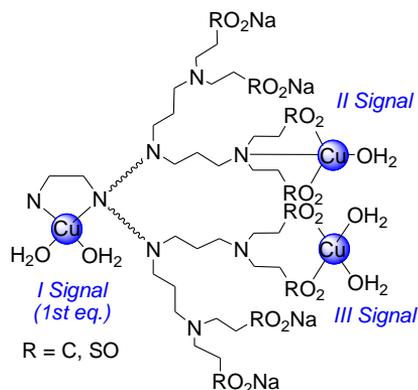


Figure 2. Metal coordination modes in anionic PPI dendrimers when increasing Cu(II) concentration, discovered by means of UV-Vis spectrophotometry and EPR study.

For Cu(II) concentrations up to 1:1 dendrimer:metal ratio, the spectra are dominated by a signal that arises from a chelate coordination CuN_2O_2 at the core of the dendrimer (*Signal I*). At higher concentrations, spectra suggest a peripheral location of ions, initially with a square-planar coordination CuNO_3 (*Signal II*) and then a CuO_4 one (*Signal III*) at the highest concentrations tested. In addition, remarkable differences are observed between systems with carboxylate or sulfonate terminal groups, noting a weaker Cu-N and stronger Cu-O interactions in sulfonate dendrimers, and the opposite behavior in carboxylate systems. These features would allow generating homo and heterometallic systems in a controlled manner.

This work has been recently accepted for publication in an internationally relevant journal, and it could be consulted for further details in a near future.³⁹

- Biocompatibility and inhibitory properties against HIV infection

According to the dual antiviral behavior observed for G_0 compounds, sulfonate (**37-39**) and carboxylate (**41**, **43** and **45**) dendrimers, and their metal complexes in different dendrimer:metal ratios, were evaluated as antiviral agents. They were tested on Hec-1A and VK-2 cell lines, as model of the first barrier against HIV infection, and on PBMC culture, as model of the second one.

Their biocompatibility in these cells was assayed using the metabolic activity assays MTT and MTS, depending on the experiment. Dendrimers are biocompatible up to a concentration of 20 μM , in both cell lines (Hec-1A and VK-2) and primary cultures (PBMC) tested, as well as the derived metal complexes of Ni, Co, Cu, and Zn, at different dendrimer:metal ratios. Again, the coordination of the metal ion to the dendrimer significantly decreases its toxicity, compared to the free metal ion.

Second generation dendritic systems were chosen for their evaluation as antiviral agents. Their inhibition against HIV infection in epithelial cell lines Hec-1A and VK-2 was evaluated through pre-treatment assay. We observed that, contrary to G_0 analogue systems, dendrimers alone were capable of inhibiting HIV infection. Furthermore, metal coordination to the dendritic skeleton powers their inhibitory effect, especially at the lowest metal concentrations where the anionic groups are still available for interaction. Compounds **38-M₁** and **43-M₁** appeared to be the best inhibitors, according to the cooperativity between the anionic groups and the metal center for the interaction with the viral and cellular proteins (*Figure 3*). In addition, we observed that metallodendrimers may prevent from the virus internalization inside cells. Unlike zero generation complexes, we found certain preference towards CXCR4 co-receptor in cobalt and copper complexes, and a more clear specificity towards CCR5 co-receptor in nickel derivatives, as their inhibition in CXCR4 seems to be void.

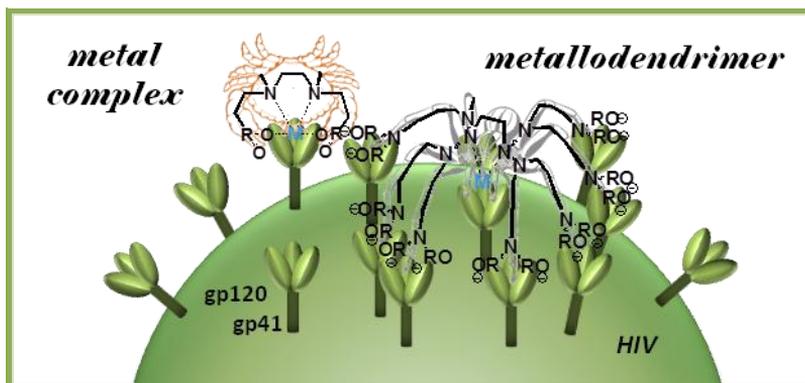


Figure 3. Proposed metal derivatives interaction towards gp120 viral protein, showing the differences between metal complexes (“crab-type” interaction, less effective) and metallodendrimers (“spider-type” interaction, multivalent effect).

Both pre- and post-treatment assays were performed in PBMC primary culture, with second generation dendritic systems, and the results showed similar inhibition rates or even higher than commercial inhibitors. As well as their G_0 analogue systems, all these data point to a dual behavior against HIV infection, first by preventing the union of the virus to the cell through the blockage of cell and viral membrane proteins through electrostatic interactions, interaction modulated by the metal center, and second by acting in later steps of the replicative cycle.

This work is being reflected in a manuscript, titled “*Antiviral behavior against HIV of anionic PPI metallodendrimers*”, which will be soon sent for publication in an internationally relevant journal.

6.2.3. Ibuprofen containing anionic dendrimers as improved antiviral agents

In order to improve the inhibitory activity of aforementioned anionic dendrimers, we performed some preliminary studies for the incorporation of drugs like ibuprofen. We were focused in providing these systems of anti-inflammatory and inhibitory capacity of cellular efflux pumps which reduce the effective concentration of the drugs.

We tested different linking systems (electrostatic interaction, amido linker or disulfide bond spacer, *Figure 4*), which determine the therapeutic properties of the final compounds, and evaluated their stability in the reaction conditions for polyanionic functionalization.

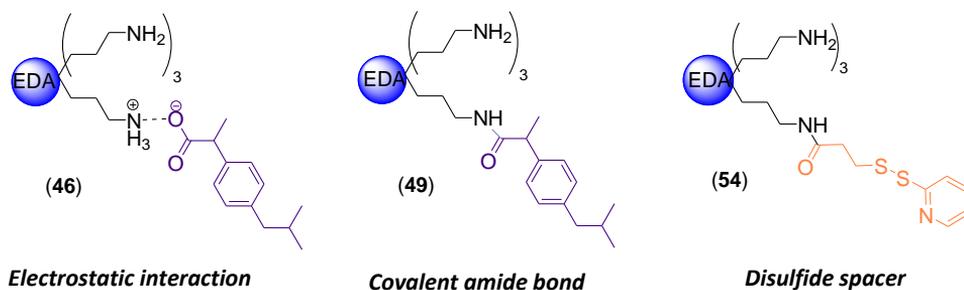
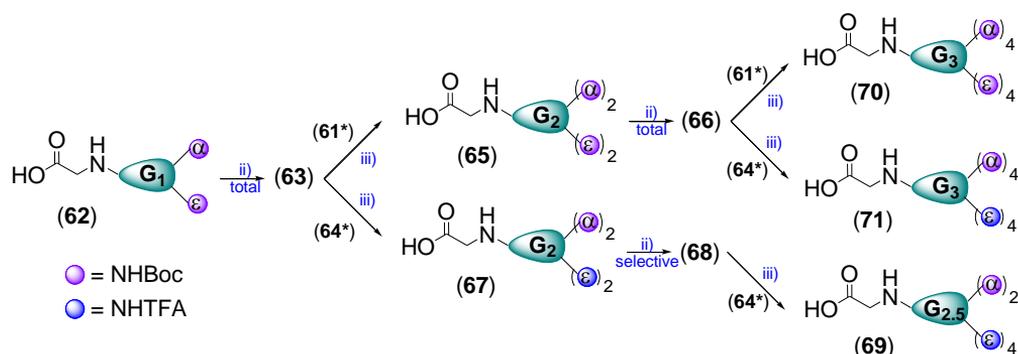


Figure 4. Conjugated precursors **46**, **49** and **54**, with different linkers, employed as starting point for the synthesis of ibuprofen-conjugated polyanionic dendrimers.

Our studies showed that electrostatic conjugate **46** allows its functionalization with sulfonate groups, while the reaction conditions for the synthesis of the carboxylate derivative releases the ibuprofen. However, covalent conjugate **49** is more stable, and could allow the preparation of both anionic systems. Finally, the linking strategy through disulfide spacer allows to obtain both sulfonate and carboxylate linker-containing systems, where the drug can be connected under the adequate conditions.

6.2.4. Polylysine dendrons as scaffolds for HIV immunogenic peptides

A novel convergent strategy was developed for the synthesis of polyfunctional poly-lysine dendrons, with a -COOH group in the focal point. By using a simple and high yielded process, which avoids focal group protection /deprotection steps, high generation dendrimers can be easily obtained.



Scheme 5. Convergent route for the synthesis of generations 1-3 poly-lysine dendrons, through reactions of (i) activation, (ii) protection/deprotection and (iii) coupling.

By combining two different aminoacids (Glycine and Lysine) and three kinds of reactions ((i) R-COOH activation, (ii) R'-NH₂ protection/deprotection and (iii) R-CO-NH-R' coupling), we prepared two different families (Scheme 5), one of them with the amino groups completely protected as NHBoc (G₁ (61), G₂ (65) and G₃ (70)), and the other with these amino groups orthogonally protected as -NHBoc and -NHTFA (G₁ (64), G₂ (67), G_{2.5} (69) and G₃ (71))

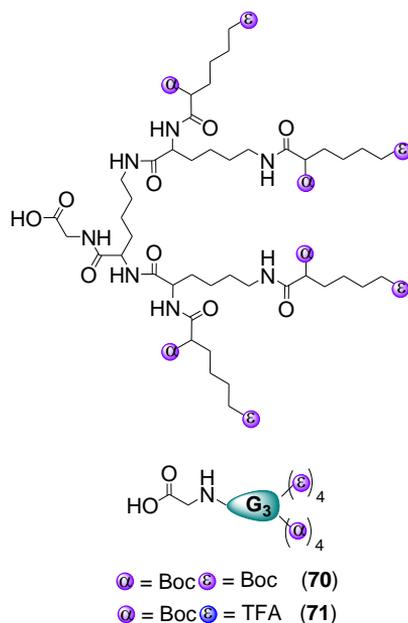


Figure 5. Chemical structure of generation 3 poly-lysine dendrons 70 and 71.

These Multiple Antigenic Peptide (MAP) type dendrons (*Figure 5*) could be used as scaffolds for the subsequent incorporation of different molecules with pharmacological interest. Their selective deprotection provides with a suitable structure for the incorporation of different immunogenic peptides, and other molecules of interest. They are thus proposed as candidates for future evaluation as nanovaccine adjuvants against different infections, such as HIV.

This work is being reflected in a manuscript, titled "*Convergent synthesis of polyfunctional poly-lysine dendrons by a novel strategy*", which will be soon sent for publication in an internationally relevant journal.

6.3. CONCLUSIONS

The following conclusions emerge from the work presented in Chapters 1, 2 and 3 of this report:

I.- We performed the synthesis and chemical characterization of four families of compounds containing an ethylenediamine (EDA) core and 2 or 4 anionic groups, and their derived metal complexes of Ni, Co, Cu, and Zn. These compounds, which we called "generation 0", model the behavior of dendrimers and metalodendrimers of higher generations. The synthetic strategy is based on Michael or aza-Michael-type reactions, which are simple and present high yields, while the chemical characterization, by means of techniques such as NMR, EPR, UV-Vis spectrophotometry or X-ray diffraction, allowed us to know the structure of these compounds both in solid state and in solution.

II.- Potentiometric titration studies of sodium salts **1**, **8**, **12** and **18** concluded that, at physiological pH, all carboxylate and sulfonate groups are found in their anionic form, thus being available for metal complexation or for inhibition of HIV infection through electrostatic interactions with viral and cellular proteins.

III.- We also performed some biomedical assays, which showed that sodium salts **1**, **8**, **12** and **18** do not present toxicity or inhibitory capacity against HIV infection, both in pre- and post-treated cells. However, metal coordination to these ligands implies a significant reduction of free ions toxicity and a significant increase of the inhibitory capacity, reaching similar levels to that of the commercial drugs in both pre- and post-treatment. These results point to a dual behavior of these compounds, first by preventing the union of the virus to the cell through the blockage of membrane proteins of the virus and the cell through the anionic groups, interaction which is modulated by the metal center, and second, by acting in later steps of the replicative cycle.

IV.- We also carried out some complementary studies, which demonstrated that these compounds do not follow a particular specificity pattern for CXCR4 and CCR5 co-receptors, and that the combined treatment of new metal complexes with AZT is more effective in the treatment of the HIV infection, reaching values of 100% of inhibition at 48 h for most of the compounds.

V.- A variety of methodologies for the generation of multivalent dendritic systems from ethylenediamine core have been tested. The most effective ones proved to be the strategy of convergent coupling - thiol-ene reaction for carbosilane dendrons, and the strategy of Michael addition - reduction for polypropyleneimine (PPI) dendrimers. Alkenylation-hydrosilylation and click CuAAC routes were discarded, due to catalyst contamination of the product and reaction incompleteness.

VI.- Carbosilane dendron **28**, synthesized by convergent strategy, allows the introduction of anionic (**29**) or cationic (**30**) groups at the periphery using simple, fast and easy to purify thiol-ene reactions. These ionic dendrons are particularly interesting because they present a focal point with a great coordinative ability to accommodate various metal centers, as well as a negatively (**29**) or positively (**30**) charged surface which provides them a great potentiality for biomedical applications, such as the inhibition of viral infection or the nucleic acid transport, respectively.

VII.- Generations 1-3 PPI dendrimers, with peripheral sulfonate (**37-39**) and carboxylate (**41**, **43** and **45**) groups, were prepared from their precursors through the same reactions as zero generation systems, and they were mainly characterized by NMR. At physiological pH, both families presented their anionic groups available for metal complexation or viral infection inhibition, according to G₀ compounds prediction.

VIII.- The combined study by UV-Vis spectrophotometry and EPR concluded that these anionic PPI dendrimers presented a specific pattern in metal ion coordination. For Cu(II) concentrations up to 1:1 (D:M) ratio, spectra were dominated by a signal that arises from a chelate coordination CuN_2O_2 at the core of the dendrimer. At higher concentrations, spectra suggested a peripheral location of ions, initially with a square-planar coordination CuNO_3 , and then a CuO_4 one at the highest concentrations tested. In addition, remarkable differences were observed between systems with carboxylate or sulfonate groups, noting a weaker Cu-N and stronger Cu-O interactions in sulfonate dendrimers, and the opposite behavior in carboxylate systems. These features would allow to prepare homo and heterometallic systems in a controlled way.

IX.- Sulfonate (**37-39**) and carboxylate (**41, 43** and **45**) decorated dendrimers were evaluated as antiviral agents against HIV infection, noting that:

(a) Dendrimers are biocompatible up to a concentration of 20 μM , in both cell lines (Hec-1A and VK-2) and primary cultures (PBMC) tested, as well as their metal complexes of Ni, Co, Cu, and Zn, at different D:M ratios. Metal coordination to the dendrimer significantly decreases its toxicity, compared to free metal ion.

(b) In epithelial cell lines Hec-1A and VK-2, as model of the first barrier against HIV infection, pre-treatment with some G_2 metallodendrimers produces high rates of inhibition. For all metals, inhibition decreases by increasing metal concentration, due to the subsequent saturation of the anionic groups. Compounds **38-M₁** and **43-M₁** produce the highest inhibitions, according to the cooperativity between the anionic groups and the metal center for the interaction with the viral and cellular proteins. In addition, metallodendrimers may prevent from virus internalization inside cells, and metal coordination into the dendritic structure power its inhibitory activity prominently.

(c) Unlike G_0 metal complexes, some preference for CXCR4 co-receptor was found for Co and Cu complexes. However, while Ni derivatives do not produce any inhibition in CXCR4, they show certain specificity for CCR5 co-receptor.

(d) In PBMC culture, as model of the second barrier against HIV infection, both pre- and post-treatment with dendrimers and their metal complexes produce similar or even higher inhibition rates than commercial inhibitors.

d) As G_0 compounds, these results point to a dual behavior against HIV infection, first by preventing the union of the virus to the cell through the blockage of cell and viral membrane proteins through anionic groups, interaction modulated by the metal center, and second by acting in later steps of the replicative cycle.

XI.- Preliminary studies were performed, aimed at improving the inhibitory activity of aforementioned dendrimers, through the incorporation of drugs like ibuprofen. We were focused in providing these systems of anti-inflammatory and inhibitory capacity of cellular efflux pumps which reduce the effective concentration of the drugs. The incorporation of ibuprofen to selected dendritic systems was carried out testing different systems of anchorage (electrostatic interaction, amido linker or disulfide bond spacer), which determine the therapeutic properties of the final compounds.

XI.- Finally, two families of polylysine dendrons have been prepared, with a -COOH group in the focal point, where amino groups were completely protected as -NHBoc (G_1 (**61**), G_2 (**65**) and G_3 (**70**)), or orthogonally protected as -NHBoc and -NHTFA (G_1 (**64**), G_2 (**67**), $G_{2.5}$ (**69**) and G_3 (**71**)). The synthetic strategy consists of a simple, fast and high yielded convergent process, which avoids the focal group protection/deprotection steps of the normal routes, and allows the preparation of high generations through a strategy of double exponential growth. These MAP-type dendrons could be used as scaffolds for the subsequent incorporation of different molecules with pharmacological interest. Their selective deprotection provides with a suitable structure for the incorporation of different immunogenic peptides, and other molecules of interest. They are thus proposed as candidates for future evaluation as nanovaccine adjuvants against different infections, such as HIV.

6.4. BIBLIOGRAPHY

1. E. De Clercq. *Metal-based Drugs*, **1997**, *4*, 173-192.
2. V. Pirrone, B. Wigdahl, F. C. Krebs. *Antiviral Res.*, **2011**, *90*, 168-182.
3. M. Desai, G. Iyer, R. K. Dikshit. *Indian J. Pharmacol.*, **2012**, *44*, 288-298.
4. A. Y. Louie, T. J. Meade. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2711-2734.
5. E. De Clercq. *Med. Res. Rev.*, **2002**, *22*, 531-565.
6. J. A. Esté, T. Cihlar. *Antiviral Res.*, **2010**, *85*, 25-33.
7. G. Tachedjian. *Microbiology Australia*, **2010**, 188-191.
8. L. Chonco, M. Pion, E. Vacas, B. Rasines, M. Maly, M. J. Serramía, L. López-Fernández, J. de la Mata, S. Álvarez, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández. *J. Control. Release*, **2012**, *161*, 949-958.
9. B. Rasines, J. Sánchez-Nieves, M. Maiolo, M. Maly, L. Chonco, J. L. Jiménez, M. Á. Muñoz-Fernández, F. J. de la Mata, R. Gómez. *Dalton Trans.*, **2012**, *41*, 12733-12748.
10. E. De Clercq. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1995**, *8*, 200-239.
11. D. E. Bergstrom, L. Xiaoping, T. D. Wood, M. Witvrouw, I. S., G. Andrei, R. Snoeck, S. D., E. De Clercq. *Antiviral Chem. Chemother.*, **2002**, *13*, 185-195.
12. A. N. Vzorov, L. G. Marzilli, R. W. Compans, D. W. Dixon. *Antiviral Res.*, **2003**, *59*, 99-109.
13. A. N. Vzorov, D. Bhattacharyya, L. G. Marzilli, R. W. Compans. *Antiviral Res.*, **2005**, *65*, 57-67.
14. D. W. Dixon, A. F. Gill, L. Giribabu, A. N. Vzorov, A. B. Alam, R. W. Compans. *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, *99*, 813-821.
15. R. Duncan, R. Gaspar. *Mol. Pharm.*, **2011**, *8*, 2101-2141.
16. R. Parboosing, G. E. M. Maguire, P. Govender, H. G. Kruger. *Viruses*, **2012**, *4*, 488-520.
17. T. Dutta, H. B. Agashe, M. Garg, P. Balakrishnan, M. Kabra, N. K. Jain. *J. Drug Target.*, **2007**, *15*, 89-98.

18. T. Dutta, N. K. Jain. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1770, 681-686.
19. T. Dutta, M. Garg, N. K. Jain. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2008**, 34, 181-189.
20. O. Rolland, C.-O. Turrin, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral. *New J. Chem.*, **2009**, 33, 1809-1824.
21. C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. Frechet, F. C. Szoka. *Nat. Biotechnol.*, **2005**, 23, 1517-1526.
22. A. R. Menjoge, R. M. Kannan, D. A. Tomalia. *Drug Discov. Today*, **2010**, 15, 171-185.
23. Y. Cheng, Z. Xu, M. Ma, T. Xu. *J. Pharm. Sci.*, **2008**, 97, 123-143.
24. A. D'Emanuele, D. Attwood. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, 57, 2147-2162.
25. S. Drabu, S. Khatri, S. Babu. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.*, **2010**, 1, 464-471.
26. A. Samad, M. I. Alam, K. Saxena. *Curr. Pharm. Design*, **2009**, 15, 2958-2969.
27. B. Rasines, J. Sánchez-Nieves, I. T. Molina, M. Guzmán, M. Á. Muñoz-Fernández, R. Gómez, F. J. de la Mata. *New J. Chem.*, **2012**, 36, 360-370.
28. F. J. de la Mata, R. Gómez, M. Á. Muñoz-Fernández, B. Rasines. *International Pat.*, WO2011121161, **2011**.
29. A. Rosa Borges, C. L. Schengrund. *Curr. Drug Targets*, **2005**, 5, 247-254.
30. F. J. de la Mata, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández, J. Sánchez-Nieves, P. Ortega, L. Chonco, B. Rasines, E. Arnaiz, M. J. Serramía. *International Pat.*, WO2011101520, **2011**.
31. J. L. Jiménez, M. Pion, F. J. de la Mata, R. Gómez, E. Muñoz, M. Leal, M. A. Muñoz-Fernández. *New J. Chem.*, **2012**, 36, 299-309.
32. N. Benseny-Cases, O. Klementieva, J. Cladera. *New J. Chem.*, **2012**, 36, 211-216.
33. C. Ghobril, G. Lamanna, M. Kueny-Stotz, A. Garofalo, C. Billotey, D. Felder-Flesch. *New J. Chem.*, **2012**, 36, 310-323.
34. P. M. H. Heegaard, U. Boas, N. S. Sorensen. *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 405-418.

35. P. Govender, B. Therrien, G. S. Smith. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 17, 2853-2862.
36. W.-D. Jang, K. M. Kamruzzaman Selim, C.-H. Lee, I.-K. Kang. *Prog. Polym. Sci.*, **2009**, 34, 1-23.
37. S. García-Gallego, M. J. Serramía, E. Arnaiz, L. Díaz, M. A. Muñoz-Fernández, P. Gómez-Sal, M. F. Ottaviani, R. Gómez, F. J. de la Mata. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2011**, 1657-1665.
38. S. García-Gallego, J. Sánchez Rodríguez, J. L. Jiménez, M. Cangiotti, M. F. Ottaviani, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez, F. J. de la Mata. *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 6488-6499.
39. S. García-Gallego, M. Cangiotti, L. Fiorani, A. Fattori, M. Á. Muñoz-Fernández, R. Gómez, M. F. Ottaviani, F. J. de la Mata. *Dalton Trans.*, **2013**.

ANEXO

“PUBLICACIONES”

Una de las formas de demostrar la calidad de una Tesis Doctoral consiste en publicar el trabajo desarrollado en revistas de reconocido prestigio internacional. Durante el período de realización de esta Tesis, se han generado una serie de publicaciones derivadas del trabajo incluido en esta Memoria, y otras debidas a colaboraciones no incluidas en la misma (*Tabla A.1*).

Capítulo	Publicaciones incluidas en esta Tesis Doctoral
1	<i>"Transition-metal complexes based on a sulfonate-containing N-donor ligand and their use as HIV antiviral agents."</i> * Eur. J. Inorg. Chem, 2011 , 10, 1657-1665
1	<i>"Polyanionic N-donor ligands as chelating agents in transition metal complexes: synthesis, structural characterization and antiviral properties against HIV."</i> * Dalton Trans. 2012 , 41, 6488-6499
2	<i>"Anionic sulfonate and carboxylate PPI dendrimers with EDA core: synthesis and characterization as selective metal complexing agents."</i> * Dalton Trans. 2013 . - Manuscrito aceptado para su publicación -
2	<i>"Convergent synthesis of polyfunctional poly-lysine dendrons by a novel strategy."</i> * - En preparación del manuscrito -
3	<i>"Antiviral behavior against HIV of anionic PPI metallodendrimers."</i> * - En preparación del manuscrito -
Publicaciones derivadas de otras colaboraciones	
-	<i>"Dendrímeros carbosilanos catiónicos obtenidos mediante "Click-Chemistry", su preparación y sus usos".</i> P201130804, 2012 .
-	<i>"Synthesis of cationic carbosilane dendrimers via Click-Chemistry and their use as effective carriers for DNA transfection into cancerous cells".</i> Mol. Pharm., 2012 , 9, 433-447.
-	<i>"Water-stable cationic carbosilane dendrimers as delivery vehicles for gene therapy against HIV and hepatocarcinoma."</i> * Curr. Med. Chem., 2012 , 19, 29, 5052-5061.
-	<i>"Antiviral properties against HIV of water soluble copper carbosilane dendrimers and their EPR characterization."</i> Curr. Med. Chem., 2012 , 19, 29, 4984-4994.
-	<i>"In vitro evaluation of the effectiveness of water-stable cationic carbosilane dendrimers against Acanthamoeba castellanii UAH-T17c3 trophozoites."</i> Parasitol. Res., 2012 , DOI 10.1007/s00436-012-3216-z

Tabla A.1. Publicaciones surgidas durante el periodo de realización de esta Tesis Doctoral, debido al trabajo incluido en esta Memoria o derivadas de otras colaboraciones. La participación como autor principal se indica como *.

La cabecera de estas publicaciones, donde está incluido el *abstract*, se muestra en las siguientes Figuras:

FULL PAPER

DOI: 10.1002/ejic.201001121

Transition-Metal Complexes Based on a Sulfonate-Containing N-Donor Ligand and Their Use as HIV Antiviral Agents

**Sandra García-Gallego,^{[a][*]} M. Jesús Serramía,^{[b][*]} Eduardo Arnaiz,^[a] Laura Díaz,^[b]
 M. Angeles Muñoz-Fernández,^{*,[b]} Pilar Gómez-Sal,^[c] M. Francesca Ottaviani,^[d]
 Rafael Gómez,^{*,[a]} and F. Javier de la Mata^{*,[a]}**

Keywords: Inhibitors / Antiviral agents / Transition metals / N,O ligands / HIV

Herein, we describe the synthesis and characterization of a sulfonate-containing N-donor ligand in its sodium salt and acid forms, Na₂[(DES)MeN(CH₂)₂NMe(DES)]·2H₂O (1) and [(DES)MeN⁺H(CH₂)₂N⁺HMe(DES)]·H₂O (2), and its corresponding metal complexes, [(DES)MeN(CH₂)₂NMe(DES)]-

M(H₂O)₂·nH₂O [M = Ni (3), Co (4), Cu (5) and Zn (6)]. Treatment of HIV-infected MT-2 cells with Ni, Co and Cu complexes inhibit virus replication up to 50–70% both in pre- and post-infected cells as a result of dual preventive and therapeutic behaviour.

Dalton Transactions

Cite this: *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 6488

www.rsc.org/dalton

This paper is published as part of a *Dalton Transactions* themed issue entitled:

Application of inorganic chemistry for non-cancer therapeutics

PAPER

Polyanionic N-donor ligands as chelating agents in transition metal complexes: synthesis, structural characterization and antiviral properties against HIV

Sandra García-Gallego,^{†a} Javier Sánchez Rodríguez,^{‡b} José Luis Jiménez,^b Michela Cangiotti,^c Maria Francesca Ottaviani,^{*,c} M. Angeles Muñoz-Fernández,^{*,d} Rafael Gómez^{*,a} and F. Javier de la Mata^{*,a}

Received 21st September 2011, Accepted 21st December 2011
 DOI: 10.1039/c2dt11793b

We describe here the synthesis and characterization of new sulfonated and carboxylated-containing N-donor ligands [Na₄(edts)]·4H₂O (2), [Na₂(dmeddp)]·2H₂O (3) and [Na₄(edtp)]·H₂O (4) (edts = ethylene-diamine-*N,N,N',N'*-tetraethylenesulfonate ion; dmeddp = dimethyl-ethylene-diamine-*N,N,N',N'*-tetra-3-propionate ion; edtp = ethylene-diamine-*N,N,N',N'*-tetra-3-propionate ion) and their corresponding metal (Ni, Co, Cu and Zn) complexes. Mainly, UV-Vis and a computer aided analysis of the EPR spectra provided information on the geometry and structure of the complexes in solution. Some of the metal complexes inhibit HIV replication when treating both pre- and post-infected PBMC cells, and hustle the inhibitory effect compared to the metal salts alone.

ES 2 392 994 A1

54) **Título:** DENDRIMEROS CARBOSILANOS CATIÓNICOS OBTENIDOS MEDIANTE "CLICK CHEMISTRY", SU PREPARACIÓN Y SUS USOS

57) **Resumen:**
Dendrimeros carbosilanos catiónicos obtenidos mediante click chemistry, su preparación y sus usos.
La presente invención se refiere a macromoléculas altamente ramificadas sintetizadas a partir de un núcleo polifuncional, denominadas dendrimeros, de estructura carbosilano y funcionalizados en su periferia con grupos catiónicos que dan a la macromolécula una carga neta positiva. Estos dendrimeros contienen en su estructura grupos 1,2,3 triazoles resultantes al aplicar una reacción de cicloadición de Huisgen 1,3-dipolar entre alquinos y azidas. Además la invención se refiere a su procedimiento de obtención y sus usos en biomedicina, tanto como vector no viral de ácidos nucleicos para procesos de terapia génica como su uso como agentes terapéuticos per se.

72) **Inventor/es:**

DE LA MATA DE LA MATA, Francisco Javier;
GOMEZ RAMIREZ, Rafael;
ARNAIZ GARRIDO, Eduardo;
GARCIA GALLEGO, Sandra;
COPA PATIÑO, José Luis;
SOLIVERI DE CARRANZA, Juan;
HERNANDEZ ROS, Jose Manuel;
MUÑOZ-FERNANDEZ, M^a Angeles;
BRIZ SEBASTIAN, Veronica;
SERRAMIA LOBERA, M^a Jesus y
TROS DE ILARDUYA, Conchita

molecular
pharmaceutics

Article

pubs.acs.org/molecularpharmaceutics

Synthesis of Cationic Carbosilane Dendrimers via Click Chemistry and Their Use as Effective Carriers for DNA Transfection into Cancerous Cells

Eduardo Arnáiz,^{†,‡} Lorena I. Doucede,[§] Sandra García-Gallego,^{†,‡} Koldo Urbiola,[§] Rafael Gómez,^{*,†,‡} Conchita Tros de Ilarduya,^{*,§} and F. Javier de la Mata^{*,†,‡}

[†]Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, E-28871 Alcalá de Henares, Spain

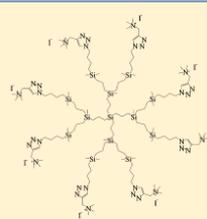
[‡]Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain

[§]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Navarra, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: New amine-terminated carbosilane dendrimers have been prepared by a Huisgen cycloaddition ("click chemistry" reaction) of azide-terminated carbosilane dendrimers with two different propargyl amines. The corresponding cationic derivatives with peripheral ammonium groups were obtained by subsequent addition of MeI. Quaternized dendrimers are soluble and stable in water or other protic solvents for long time periods, and have been studied as nonviral vectors for the transfection of DNA to cancer cells. In this study DNA-dendrimeric nanoparticles (dendriplexes) formulated with two different families of cationic carbosilane dendrimers (family 1 (G1, G2 and G3) and family 2 (G1, G2)) were characterized and evaluated for their ability to transfect cells *in vitro* and *in vivo*. Dendriplex derived from second generation dendrimer of family 1 (F1G2 S/1 (+/-)) increased the efficiency of plasmid-mediated gene transfer in HepG2 cells as compared to naked DNA and the commercial control dendrimer. Also, intravenously administered dendriplex F1G3 20/1 (+/-) is superior in terms of gene transfer efficiency *in vivo*.

KEYWORDS: dendrimer, carbosilane, cationic, click chemistry, gene therapy, cancer



4984

Current Medicinal Chemistry, 2012, 19, 4984-4994

Antiviral Properties Against HIV of Water Soluble Copper Carbosilane Dendrimers and their EPR Characterization

M. Galán^{*,†}, J. Sánchez-Rodríguez^{*,§}, M. Cangiotti[‡], S. García-Gallego[†], J.L. Jiménez[†], R. Gómez[†], M.F. Ottaviani^{*,c}, M.Á. Muñoz-Fernández^{*,b,d} and F.J. de la Mata^{*,a}

^aDepartamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, E-28871 Alcalá de Henares Spain, Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain; ^bPlataforma de laboratorio, Lab. Immunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ^c(LJ) Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain; ^dDepartment of Earth, Life and Environment Sciences, 61029 Urbino Italy; ^eLaboratorio de Immunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid Spain, Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain

Abstract: We describe here the use of anionic carbosilane dendrimers to obtain new copper complexes. UV-Vis and a computer aided analysis of the EPR spectra provided information about the coordination modes of copper depending on the nature of the dendrimer and about the geometry and structure of the complexes in solution. Some of these metallo-dendrimers have been tested "in vitro" as antiviral compounds in the inhibition of HIV infection in pre and post-infection treatment.

Keywords: Anionic, antiviral properties, carboxylate, copper, dendrimers, EPR, HIV, microbicide, sulfonate, transition-metal ions.

In Vitro Studies of Water-Stable Cationic Carbosilane Dendrimers As Delivery Vehicles for Gene Therapy Against HIV and Hepatocarcinoma

N. de las Cuevas^{a,d}, S. García-Gallego^{a,b}, B. Rasines^b, F.J. de la Mata^b, L.G. Guijarro^{a,c}, M.Á. Muñoz-Fernández^{a,d} and R. Gómez^{a,b}

^aLaboratorio de Inmunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid Spain, Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain; ^bDepartamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, E-28871 Alcalá de Henares (Spain), Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain; ^cDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, E-28871 Alcalá de Henares (Spain), Networking Biomedical Research Center in Liver and Digestive Diseases (CIBER-EHD), Spain

Abstract: Here we present a synthetic procedure for water-stable carbosilane dendrimers containing ammonium groups at the periphery of type G_n-[Si(CH₃)₂N⁺(Me)(Et)(C(CH₃)₂CH₂N⁺Me₂), (CF₃SO₂)₂], which have been used as non-viral vectors for transfecting different types of nucleic acids against two different medical problems, HIV and hepatocarcinoma. These systems have shown to be non-toxic in both PBMC and HepG2 cell lines under the experimental conditions and are able to form nanoconjugates with nucleic acids perfectly stable over time and in a wide range of pH values, which leads to the conclusion that the interaction between dendrimer and nucleic acid is very strong. In addition, a high degree of transfection using these nanoconjugates has been observed, ranging from 70-90% depending on the generation and in the particular case of PBMC transfection with anti-HIV oligonucleotides. However, besides of the good properties shown by the dendrimers here prepared as transfecting agents, only moderate effect was observed in functional experiments for hepatocarcinoma, as a result of the strong interaction between dendrimer and nucleic acid. Nevertheless, it is important to mention that an IRS-4 knock-down of 40% in HepG2 achieves an analogous degree of cell sensitization to cancer treatment, which may represent a major advance in the hepatocarcinoma treatment when appropriate dendrimers as transfection agents are used.

Keywords: Dendrimer, carbosilane, oligonucleotides, siRNA, drug delivery, gene therapy, transfection agent, HIV, cancer.

Parasitol Res
DOI 10.1007/s00436-012-3216-z

ORIGINAL PAPER

In vitro evaluation of the effectiveness of new water-stable cationic carbosilane dendrimers against *Acanthamoeba castellanii* UAH-T17c3 trophozoites

I. Heredero-Bermejo · J. L. Copa-Patiño · J. Soliveri · S. García-Gallego · B. Rasines · R. Gómez · F. J. de la Mata · J. Pérez-Serrano

Received: 6 September 2012 / Accepted: 22 November 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract *Acanthamoeba* is one of the most common free-living amoebas which is widespread in the environment and can infect humans, causing diseases such as keratitis and encephalitis. In this paper we examine for the first time the amebicidal activity of the family of cationic dendrimers nG -[Si{(CH₂)₂N⁺(Me)(Et)(CH₂)₂NMe₃⁺}2] (where n denotes the generations: zero ($n=0$, $x=1$), first ($n=1$, $x=4$), and second ($n=2$, $x=8$); for simplicity, they were named as 0G-CNN2, 1G-CNN8, and 2G-CNN16, respectively) against *Acanthamoeba castellanii* UAH-T17c3 trophozoites. In order to test the amebicidal activity, we cultured the strain *A. castellanii* UAH-T17c3 in PYG-Bactocastone medium and later, we treated it with different concentrations of these dendrimers and monitored the effects and damage by optical count, flow cytometry, and scanning electron microscopy. The results showed that all the nanosystems assayed had a strong amebicidal activity. The dendrimer 1G-CNN8 was the most effective against the amoeba. In the morphology of treated trophozoites of *A. castellanii* UAH-T17c3 analyzed by light and scanning electron microscopy techniques, morphological changes were evident

in amoeba cells, such as loss of pseudopodia, ectoplasm increase, roundness, and cellular lysis. Furthermore, flow cytometry results showed alterations in cell granularity, which was dose-time dependent. In conclusion, this family of cationic carbosilane dendrimers has a strong amebicidal activity against the trophozoites of *A. castellanii* UAH-T17c3 in vitro. They could potentially become new agents significant to the development of new amebicidal compounds for prevention and therapy of *Acanthamoeba* infections.

Introduction

Free-living amoebae from the genus *Acanthamoeba* sp. may be found in air, soil, tap water, mineral water, sanitary equipment, swimming pools, air-conditioning units, and dialyzers (Astorga et al. 2011; Booton et al. 2004; De Jonckheere 1991; Kilvington and White 1994; Martinez and Visvesvara 1997; Visvesvara and Sterh-Green 1990; Winck et al. 2011). Their life cycle takes place in the

