



UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
Facultad de Farmacia
Departamento de Química Orgánica



**POLIFENOLES COMO MIMÉTICOS DE
LECTINAS: UNA NUEVA APROXIMACIÓN
EN LA TERAPIA DEL SIDA**

Paula Carrero Berzal

2010



UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
Facultad de Farmacia
Departamento de Química Orgánica



**POLIFENOLES COMO MIMÉTICOS DE
LECTINAS: UNA NUEVA APROXIMACIÓN
EN LA TERAPIA DEL SIDA**

Memoria que para obtener el grado de Doctor en Química presenta

Paula Carrero Berzal

2010

Agradecimientos

Este proyecto empezó siendo una beca de un año para desarrollar una novedosa y atrayente aproximación para enfrentarse al VIH. Muy a nuestro pesar, los investigadores sabemos que en ciencia, y además en un proyecto que empieza, un año no basta para obtener suficientes resultados para tan alto objetivo, por lo que tuve la gran oportunidad de seguir indagando durante 3 años más. Y aquí estoy, presentando una tesis doctoral, lo cual no significa que la investigación haya terminado, ni mucho menos, esta tesis sólo hace ver la punta del iceberg de una apasionante investigación que tiene un gran futuro por delante. Evidentemente también sabemos que uno no puede, ni debe, hacer todo el trabajo solo. Es por ello que en estas líneas quiero agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado durante estos 4 años, tanto profesional como personalmente.

El trabajo que presento en esta memoria ha sido realizado en el Instituto de Química Médica bajo la dirección de la Dra. Ana San-Félix. A ella quiero agradecer, en primer lugar, su acogida, su apoyo y dedicación al proyecto. Ha sido un verdadero placer para mí trabajar al lado de una investigadora tan constante, concienzuda, detallista, trabajadora y sobretodo humana, todo un ejemplo a seguir en cualquier ámbito de la vida.

Quiero agradecer también a M^a Jesús Pérez Pérez por hacerme parte de este proyecto, por su importantísima aportación científica y por su “ojo crítico” de los resultados que me ha servido de vez en cuando para poner los pies en la tierra.

I am grateful to Dr. Jan Balzarini, for allowing me the privilege of starting this new line of research, for the economic support, for the biological evaluation as well as for the SPR experiments and overall for his enthusiasm with this project which he has passed it on to me.

A M^a José Camarasa agradecerle la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, un gran equipo el cual ha formado con valiosísimos investigadores. A ellos, Dra. Sonsoles Velázquez, Dra. Eva María Priego y Dr. Ernesto Quesada (y a Ana y M^a Jesús) también agradecerles su enorme apoyo y discusiones científicas con las que he aprendido a valorar, defender y discutir cada resultado.

Al Dr. Jesús Jiménez-Barbero y a la Dra. Ana Arda por compartir su conocimiento científico y por la colaboración en los experimentos de RMN, así como a todo su grupo que me han hecho sentirme como una más los días que he compartido con ellos.

A la Dra. Dolores Solís y a la Dra. Alejandra García por su trabajo y dedicación en el proyecto, ¡seguro que pronto empezamos a tener resultados!

A los que han trabajado conmigo día a día, compartiendo vitrina y manías, días buenos y malos, filosofadas para arreglar el mundo, risquetos, palomitas, etc. es decir, mis “compis” de laboratorio. A los Drs. Alessandra Cordeiro, M^a Cruz Bonache y Ernesto Quesada, y cómo no a... ¡¡Susuuuu!! Esto ha sido mucho más fácil gracias a vosotros, a vuestra amistad, apoyo, comprensión y a que escuchabais con paciencia mis chistes malos.

A mis compañeros del grupo de investigación, Alberto, Pedro, Silvia, Gloria, Gwenn, Maite P., Elena, Leire, Virginia, María, Olga, Aoife y Sonia, una gran plantilla de la que tengo el orgullo de decir que me llevo muchos amigos. Gracias por vuestra ayuda y consejos que me han sido realmente valiosos a lo largo del desarrollo de este proyecto, y a los desayunos de los viernes en el central! En especial quiero agradecer a la Dra. Elena Casanova, por esa mano que me ha echado a última hora a pie de vitrina y a Virginia (junto a Marleen Renders) que me han resuelto todas mis dudas sobre SPR tan pronto como les he preguntado.

A todo el Instituto de Química Médica, empezando por la directora, la Dra. Pilar Goya, a M^a Luisa, M^a Ángeles, Juan Carlos, Javier, Guadalupe y Felipe, por hacer que todo fuese siempre fácil, rápido y sencillo. Así como el resto del personal en plantilla, en especial a M^a Jesús Pérez de Vega, por su constancia y a Mercedes por su ayuda con el hidrogenador.

No puedo dejar de nombrar al resto de compañeros que me han acompañado durante este largo camino en el IQM y “alrededores”, todos y cada uno me han dado razones para estarles agradecida y me quedan en el recuerdo (y en las fotos) grandes momentos. Así que allá van: Iria, Sandra, Eulogio, Valle, Miriam, Gema, Mariana, Dani, Felicia, Vicente, Pedro, Ángela, Cumella, Cristina, Laura H, Laura M., Jose, Quique, Maite M., Elena G., Felipe, Sergio, Maribel, Susana G., Tati, Pili (al final me pilló!), Marta, Ángel, Ainhoa, Fernando, Baeza, Paula, Diego, Maite A., M^a Ángeles, Mario, Paco y Ruth (espero no haberme dejado a nadie), a todos, ¡Muchas Gracias! (y en especial al club del tupper!)

Me gustaría dar las gracias a todo el personal del Centro de Química “Manuel Lora Tamayo” sin cuya ayuda no podría haber llevado a cabo esta Tesis Doctoral, al Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, al Laboratorio de Espectrometría de Masas y al Laboratorio de Microanálisis. Y a todas las personas que trabajan por el buen funcionamiento del Centro.

Quiero también agradecerles a aquellos que me formaron. A mis profesores, a mis “jefes” el Dr. Alex Weymouth-Wilson (Dextra Labs) y el Dr. Pedro Nieto (IIQ) y muy especialmente a los Drs. Guillem Aromí, Olivier Robeau y Patrick Gámez (CBAC, Leiden) porque hicieron que me picara el gusanillo de la investigación.

Cómo no, y ya en el terreno personal, quiero agradecer a mis amigos su apoyo, interés y amistad que perduran en la distancia y el tiempo. ¡Sois mi mejor tesoro! Necesitaría otras 200 páginas para agradecer a cada uno lo vuestro.

A mi familia, a los Carrero, a los Berzales y a los López-Chimeno. En especial quiero agradecer a mis padres, Juan y Amparo, que estén siempre ahí, para lo que sea, anticipándose a mis necesidades, dispuestos a todo, apoyándome en todas mis decisiones, poniéndomelo fácil y por su interés e ilusión en este proyecto, que nunca tengo la suficiente paciencia de explicarles. A mis hermanos Juan Pablo, Elena y Vivi (& company: Kata, Martin & Owen) porque somos la mejor familia que quisiera tener.

Finalmente, quiero agradecer enormemente a Julián, el que tengo la gran suerte que sea mi compañero, mi amigo, mi apoyo y mi confidente. Muchas gracias por todo, porque esta tesis también la has vivido día a día, entendiéndome y compartiendo mis locuras, cuidándome en estos últimos meses de escritura para que no me tuviera que preocupar por nada más, estando siempre a mi lado. Gracias por tu infinita paciencia, tu inestimable ayuda y por ser tan bueno.

¡Muchísimas gracias a todos!

Paula

A mis padres

A Julián

Abstract

Human Immunodeficiency Virus (HIV) entry into host cells is mediated by the viral envelope glycoproteins gp120 and gp41, which interact with the CD4 receptors on the T cell surface. Glycoprotein gp120 is of particular importance during viral fusion and entry, as it serves as the first point of contact with the host cell. This envelope glycoprotein is the main target for neutralizing antibodies that appear during natural infection. The HIV gp120 protein is extensively glycosylated, so that approximately 50% of its molecular weight is due to a dense carbohydrate (glycan) array that partially hides the viral envelope antigens. Therefore, agents that interact with the glycans on the viral envelope may disturb the efficient interaction between gp120 and its (co)receptors.

There exist several types of glycan-interacting agents for which anti-HIV activity has been reported. Amongst them, different lectins, i.e. proteins of natural origin that bind carbohydrates, show a potent inhibitory activity against HIV. These lectins predominantly target the glycans of the gp120 glycoprotein. Such interactions affect the conformation and/or efficient functioning of the envelope molecules thus preventing HIV entry. Furthermore, resistance studies indicate that, under the pressure of the lectins, viral mutations result in the deletion/modification of the *N*-glycosylation sites of its envelope. Appearance of mutations affecting the viral envelope should, in contrast with currently existing antiviral therapies, not necessarily be detrimental for antiviral activity, but, instead, might trigger an efficient immune response directed against the mutated virus, since the previously hidden immunogenic epitopes of gp120 become exposed and then the host immune system may produce neutralizing antibodies against them. Interestingly, Reitter and colleagues have demonstrated that Rhesus monkeys infected with mutant simian immunodeficiency virus (SIV) strains lacking only two *N*-glycosylation sites in their external envelope protein show a marked increase in antibody formation and a considerable decrease in viral load. However, due to their protein nature, lectins are endowed with unfavourable and non-appropriate pharmacokinetic properties that prevent their development as suitable drugs. Therefore, it would be desirable to have small synthetic molecules, i.e. "lectin mimetics", capable of acting through a similar mechanism to that of the natural lectins. Interestingly, it has been recently reported that Pradimicin-A (PRM-A), an

antifungal antibiotic, shows anti-HIV activity. Moreover, PRM-A behaves similarly to natural lectins and PRM-A-resistant virus strains indeed have deletions in the *N*-glycosylation sites of the viral envelope. Therefore PRM-A can be considered as a “proof-of-concept” that small low-molecular-weight molecules can behave as “lectin mimetics”, and this fuels our interest in the development of other synthetic “lectin mimetics”.

Glycosylation of proteins is not unique for viruses since glycans are also present on vertebrate host cell glycoproteins. However, still striking differences in the nature of the glycans can be found between HIV envelope glycoproteins and host cellular glycoproteins. HIV contains a high amount of high-mannose-type glycans that are much less abundantly present in most mammalian cells.

A novel therapeutic concept to fight against HIV infection is then proposed based on mimicking the natural lectins. Such “lectin mimetics” may act through a dual mechanism against HIV: (i) a “direct” antiviral effect by preventing HIV entry and transmission to the target cells, and (ii) an “indirect” antiviral activity by forcing HIV to remove glycans from its envelope gp120 glycoprotein. The latter phenomenon will result in creating “holes” in the protective glycan shield of the HIV envelope, thereby allowing the immune system to become triggered to produce neutralizing antibodies against previously hidden immunogenic epitopes of gp120. This may in turn result in a more efficient elimination of infectious HIV from the body. This approach has been designated as “Targeting the Achilles heel of HIV”.

Our research efforts are focused on the synthesis of small molecules, “lectin mimetics” able to interact with the glycans of the glycoprotein gp120 of HIV. In the design of these molecules, the following should be considered: first, the binding between lectins and carbohydrates is weak in nature, as lectins generally possess shallow binding pockets that are solvent exposed. Secondly, high affinity binding is achieved through multivalency, where the high number of simultaneous binding events compensates the lack of strength of an individual interaction. And, finally, the protein-carbohydrate interactions are non-covalent and involve hydrogen bonding (including bidentate, cooperative, and water-mediated), van der Waals forces, interactions of sugars CHs with aromatic residues of the protein and/or metal coordination.

The interaction between the synthetic “lectin mimetics” and the carbohydrates of the viral gp120 should occur at virus entry, outside the cell, in a water environment. Therefore, water soluble “lectin mimetics” would be desirable. Moreover, since the glycans of the HIV gp120 are particularly rich in mannoses, but other

monosaccharides are also present, in particular fucose, sialic acid, galactose and *N*-acetylglucosamine, the interaction with any of these residues is also of interest.

Having all of this in mind, we have prepared three series of multivalent compounds containing a central scaffold of different architecture, substituted with several carbohydrate binding ligands. Both entities were connected by amide or ester bonds.

As carbohydrate binding ligands there have been employed phenols with 1, 2 or 3 OHs attached to the aromatic ring. These entities have the potential to interact with carbohydrates through, both, CH/ π interactions and hydrogen bonds. Galloyl (3,4,5-trihydroxybenzoyl) and 2,3,4-trihydroxybenzoyl moieties together with other mono-, and didroxybenzoyl residues have been used.

The following three series of compounds have been prepared:

- Series 1 (Figure 1).** In this series linear or branched polyamines and polyalcohols of different length and architecture have been used as scaffolds. These scaffolds allowed us to introduce, on the same molecule, a variable number of carbohydrate binding ligands (from one to five) and to modify the distance between them. This work is described in chapter 1.

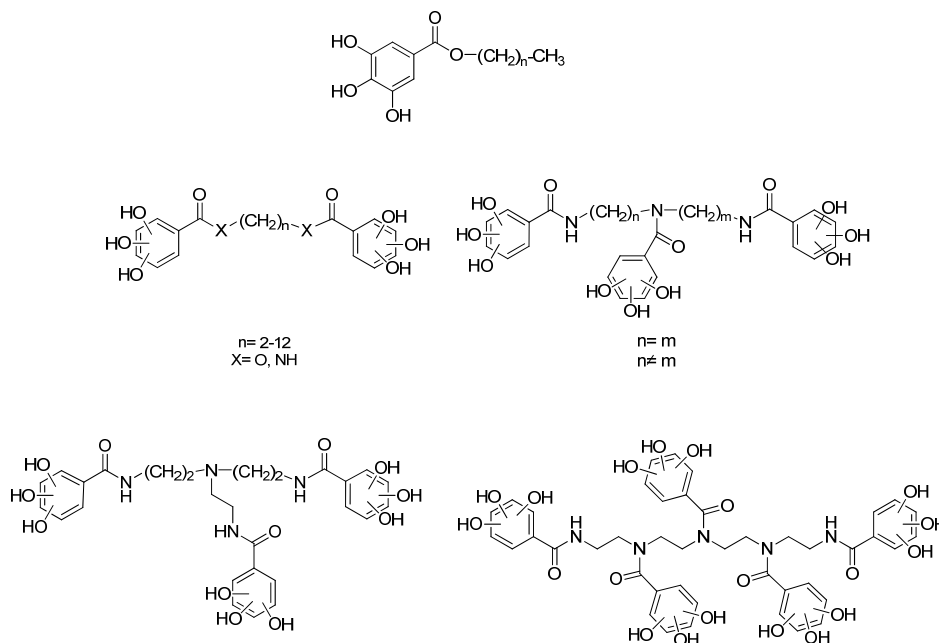


Figure 1.

- Series 2 (Figure 2).** Carbohydrates with their different stereochemistry, offer a unique opportunity to differently distribute and to increase the number of carbohydrate binding ligands attached to the central scaffold. Based on that, in this series mono- and disaccharides have been used as central scaffolds. This work is described in chapter 2.

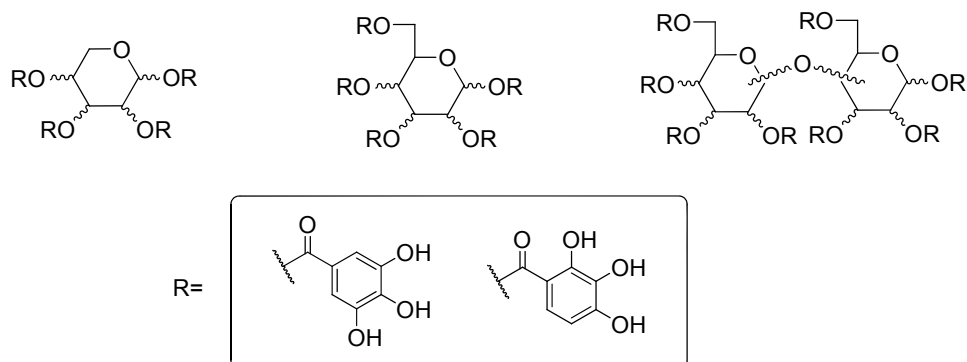


Figure 2.

- Series 3 (Figure 3).** Tripodal compounds based on the 2,4,6-triethyl(methyl)benzene scaffold were prepared since the central aromatic ring is expected to participate in CH/π interactions with the viral carbohydrates thus providing an additional stabilization. In addition, the architecture of this scaffold has been proposed to effectively orient the three groups attached to the aromatic ring to create a cavity in which different carbohydrates can be accommodated. This work is described in chapter 3.

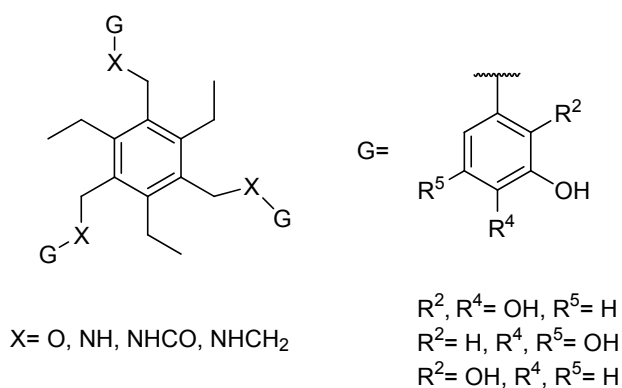


Figure 3.

Finally, the anti-HIV activity of all the synthesized compounds is presented. In addition, NMR and SPR experiments have been used to evaluate the interaction between these compounds and different carbohydrates present on gp120.

From the antiviral activity results we can conclude that the presence of three phenolic OHs, is very important for the activity since the protected compounds such as aryl methyl or aryl phenyl ethers, or with only one or two OHs, were inactive. The number of residues of polyphenol linked to a certain scaffold does not seem to be very important for the activity. Thus, compounds with more residues of polyphenol were as active as those that possess less. The central scaffold is important to modulate both the activity and the toxicity. The best results have been obtained with the triethylbenzene and α,α -trehalose scaffolds. Thus, the α,α -trehalose derivative **2.27** (TI, Therapeutic Index = 12.2) and the triethyl benzene derivatives **3.20** (TI = 12) and **3.22** (TI = 29) were the most active and simultaneously the less toxic. These three compounds presented the best therapeutic indices.

The interaction of the compounds synthesized with the gp120 of HIV has been studied using SPR. A moderated response has been observed for compounds **1.35**, **1.37** and **3.30**. In addition, a very intense response has been observed with the compounds **3.22** and **3.27** that it is comparable to that for the reference compound, Pradimicin-A (PRM-A).

As shown by NMR and Molecular Modelling studies, compound **3.22** exhibited a conformational restriction of the polyphenols linked to the central skeleton (triethylbenzene), and therefore this compound has a preorganized structure, whereas for compound **3.20** such a conformational restriction was not observed. On the other hand, interaction between **3.22** and a polysaccharide of mannose, consisting on a linear mannose chain (1 \rightarrow 6) with mannoses consecutively bonded in (1 \rightarrow 2) direction, has been observed.

On the basis of the biological activity, affinity, Molecular Modelling and NMR studies we can conclude that the compound **3.22** can be considered as an interesting hit to be further studied in order to find more active and less toxic compounds able to interact with the carbohydrates of the viral gp120 and to validate the novel therapeutic approach proposed in this doctoral Thesis.

Abreviaturas

| | |
|------------------|---|
| AMBER | Assisted Model Building and Energy Refinement |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| BOP | hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris-(dimetilamino)fosfonio |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| CAM | Mezcla: ácido molíbdico, cerio sulfato amónico y ácido sulfúrico |
| CCTLC | Cromatografía circular centrífuga en capa fina |
| CE ₅₀ | Concentración efectiva 50 |
| CC ₅₀ | Concentración citotóxica 50 |
| DC | Célula dendrítica |
| DCC | Diciclohexilcarbodiimida |
| DC-SIGN | Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin |
| DMAP | 4-Dimetil aminopiridina |
| DMF | <i>N,N'</i> -Dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| E | Energía |
| EDC | Hidrocloreuro de 1-etil-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida |
| eq | equivalentes |
| EM-ES | Espectrometría de masas con ionización por electrospray |
| FDA | Food and Drug Administration |
| Gal | Galactosa |
| GNA | <i>Galanthus nivalis agglutinin</i> , |
| Glc | Glucosa |
| GlcNAc | <i>N</i> -Acetil glucosamina |
| gp | glicoproteína |
| HHA | <i>Hippeastrum hybrid agglutinin</i> |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento |
| IT | Índice terapéutico |

Abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| <i>J</i> | Constante de acoplamiento |
| K | Grados Kelvin |
| MALDI-TOF | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight |
| Man | Manosa |
| MCMM | Montecarlo Multiple Minimum |
| MMFF | Merck Molecular Force Field |
| min | Minutos |
| NIH | Instituto Nacional de Salud |
| NHS | <i>N</i> -hidroxisuccinimida |
| NOE | Efecto Nuclear Overhauser |
| OPLS | Optimized Potential for Liquid Simulations |
| Pd (C) | Paladio soportado sobre carbón |
| PDEA | piridinilditioetanamina |
| <i>p</i> -TSA | Ácido <i>p</i> -toluensulfónico |
| PRM | Pradimicina |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| RU | Unidades arbitrarias de resonancia |
| SIDA | Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido |
| SPR | Resonancia de Plasmón de Superficie |
| t.a. | Temperatura ambiente |
| TEA | Trietilamina |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| TI | Transcriptasa Inversa |
| VHS | Virus Herpes Simple |
| VIH | Virus de Inmunodeficiencia Humana |

Índice

| | |
|---|-----|
| Abstract | i |
| Abreviaturas | vii |
| Índice | ix |
| Introducción | 1 |
| Entrada/fusión del Virus | 8 |
| La glicoproteína gp120 como diana terapéutica | 12 |
| Lectinas, inhibidores del proceso de entrada | 13 |
| Multivalencia e importancia de las interacciones CH- π | 17 |
| El problema del reconocimiento de carbohidratos | 20 |
| Hipótesis y Objetivos Generales | 23 |
| Capítulo 1. Derivados lineales de polifenoles | 27 |
| ➤ Antecedentes y objetivos | 29 |
| ➤ Resultados y discusión | |
| Síntesis | 32 |
| Actividad Antiviral | 44 |
| Capítulo 2. Compuestos polifenólicos con mono y disacáridos como esqueleto central | 49 |
| ➤ Antecedentes y objetivos | 51 |
| ➤ Resultados y discusión | |
| Síntesis | 57 |
| Actividad Antiviral | 62 |
| Estudio mediante RMN de la interacción de penta-O-galoil-D-gluco (2.8) y D-manopiranososa (2.14, 2.17 y 2.18) con carbohidratos | 65 |
| Capítulo 3. Compuestos polifenólicos basados en una estructura central de benceno | 73 |
| ➤ Antecedentes y objetivos | 75 |
| ➤ Resultados y discusión | |
| Síntesis | 81 |

| | |
|---|-----|
| Actividad Antiviral | 86 |
| Capítulo 4. Evaluación de la capacidad de los compuestos sintetizados para reconocer los carbohidratos presentes en la glicoproteína gp120 | 91 |
| ➤ Antecedentes y objetivos | 93 |
| ➤ Resultados y discusión | 98 |
| Estudio conformacional de los compuestos 3.20 y 3.22 por RMN | 106 |
| Estudio de interacción de 3.20 y 3.22 con carbohidratos por RMN | 117 |
| Conclusiones | 123 |
| Parte experimental | 126 |
| ➤ Generalidades | 129 |
| ➤ Capítulo 1 | 132 |
| ➤ Capítulo 2 | 155 |
| ➤ Capítulo 3 | 166 |
| ➤ Métodos biológicos | 180 |
| ➤ Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) | 181 |
| ➤ Modelización Molecular | 181 |

Introducción

Desde que en el verano de 1981 fueron descritos en EE.UU. los primeros casos de una, entonces, rara enfermedad hasta la actualidad, han pasado casi tres décadas y el impacto producido, por lo que en 1982 se definiría como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), ha sido excepcional, no sólo a nivel científico, sino por sus altos costes humanos, sociales y económicos.

El concepto SIDA designa el estadio final de un cuadro de inmunodeficiencia profunda debida a la pérdida de una subpoblación de linfocitos T, los T-4, que deja al paciente a merced de numerosas infecciones oportunistas de origen bacteriano, protozoario, fúngico o viral. El agente etiológico de la enfermedad es el denominado virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) perteneciente a la familia de los retrovirus.^{1,2}

La infección por el VIH es una enfermedad transmisible que afecta directa y fundamentalmente al sistema inmunológico, produciendo su destrucción y dando lugar a un amplio espectro de manifestaciones clínicas tales como infecciones oportunistas y/o neoplasias que definen el estadio más avanzado y mortal de la enfermedad denominado SIDA.

Los datos ofrecidos en 2009 por el programa de las Naciones Unidas (ONUSIDA)³ para luchar contra la epidemia de VIH/SIDA son desoladores ya que a finales de 2008, 33.4 millones de personas en el mundo vivían con el virus. Durante ese año se registraron en torno a 2 millones de fallecimientos y 2.7 millones de nuevas infecciones.

El descubrimiento del virus VIH ha estado siempre acompañado de gran controversia. Así, en 1983, un grupo de especialistas del Instituto Pasteur de París, encabezado por el profesor Montagnier y la también francesa Françoise Barré-Sinoussi, examinaron el ganglio de un enfermo que se sospechaba que tenía SIDA y determinaron que existían rastros de actividad bioquímica de un retrovirus. Era la

¹ Faucy, A.S. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat. Med.* **2003**, 9 (7), 839-843.

² Pomerantz, R.J. and Horn, D.L. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2003**, 9 (7), 867-873.

³ *AIDS epidemic update: November 2009*; UNAIDS: 2009.

primera evidencia de que la enfermedad estaba causada por un agente externo, y que este agente era un virus, en concreto un retrovirus.⁴

Durante los años previos, el equipo del investigador estadounidense Robert Gallo (Instituto Nacional de Salud, NIH) había sido el primero en describir los retrovirus humanos, unos virus que eran responsables de algunas leucemias. Parece que los investigadores franceses enviaron una muestra del virus a los americanos quienes en 1984 se adjudicaron la paternidad del descubrimiento; sin embargo en 1993 varios tribunales fallaron en favor de Montagnier y Barré-Sinoussi.

En la actualidad se considera que Montagnier y Barré-Sinoussi fueron los descubridores de los virus VIH-1 y VIH-2 y que Gallo (NIH, EEUU) aportó la metodología necesaria para descubrir los primeros retrovirus humanos. Sin los conocimientos que había aportado Gallo, al identificar por primera vez los retrovirus humanos, Montagnier y Barré-Sinoussi nunca hubieran podido descubrir el VIH. Finalmente en 2008 los científicos franceses serían los que recibirían el Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento del VIH.⁵

El material genético del VIH está constituido por ARN que debe ser copiado en ADN bicatenario para integrarse en el núcleo celular. Este proceso de conversión del ARN en ADN es la característica que define a los retrovirus. Se trata del proceso inverso al de la transcripción habitual y es llevado a cabo por la enzima viral Transcriptasa Inversa (TI).

El VIH se compone de una envoltura lipídica y una nucleocápsida central en cuyo interior se localiza el material genético y las enzimas necesarias para el ciclo viral (Figura 1). La envoltura consiste en una bicapa lipídica procedente de la célula infectada que contiene varias proteínas virales: la gp120 que sobresale hacia el exterior permaneciendo anclada en la membrana mediante otra proteína, la gp41. La nucleocápsida está formada por la proteína p24 y envuelve dos cadenas idénticas de RNA y las enzimas necesarias para la integración en el genoma del huésped: transcriptasa inversa (TI), proteasa e integrasa.

⁴ Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. Isolation of a T Lymphotropic Retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220 (4599), 868-871.

⁵ <http://nobelprize.org/>

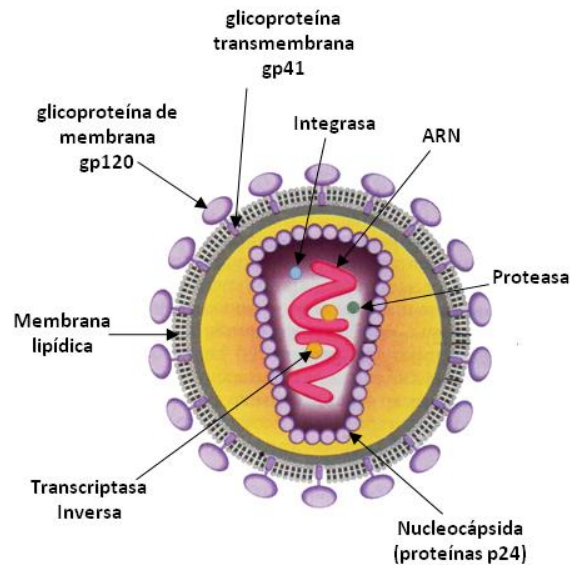


Figura 1. Estructura del virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Por alguno de los mecanismos de transmisión conocidos (hetero- y homosexual, intercambio de material entre la población drogadicta, transfusión de sangre y hemoderivados y transmisión vertical de madre a hijo) el VIH penetra en el organismo. Existen dos tipos de células humanas que son blanco principal de la infección por VIH, los linfocitos T y los macrófagos. La entrada del VIH en la célula se produce por la interacción del virus con un receptor específico situado en la superficie celular que es la molécula CD4 (proteína de transmembrana constituida por 433 aminoácidos). Esta molécula se expresa fundamentalmente en un subtipo de linfocitos T, los T colaboradores (helper). Posteriormente la proteína gp120 interacciona con los co-receptores de quimiocinas CXCR4 o CCR5 permitiendo que la proteína viral gp41 se introduzca en la membrana celular favoreciendo así el proceso de fusión y la entrada del virus en la célula. A continuación, el virus se descapsida y se libera el genoma viral (en forma de ARN), el cual es transcrito (convertido en ADN de doble cadena) por la enzima viral Transcriptasa Inversa (TI). Este ADN vírico penetra en el núcleo de la célula y se integra en el ADN celular en un proceso catalizado por la enzima viral integrasa. De este modo, la célula queda “programada” para crear nuevas copias del VIH. Los mecanismos celulares normales transcriben el ADN viral integrado en el material genético de la célula huésped, en nuevas moléculas de ARN vírico y ARN mensajero vírico, que a su vez dirige la síntesis de nuevas proteínas víricas. Dichas proteínas virales una vez sintetizadas deben

procesarse antes de ensamblarse en una partícula viral madura. Este proceso consiste en una ruptura proteolítica catalizada por la proteasa viral. Estas nuevas proteínas y el ARN vírico se organizan en un nuevo virión que abandona el linfocito T, tomando un fragmento de membrana para utilizarlo como envuelta (Figura 2).

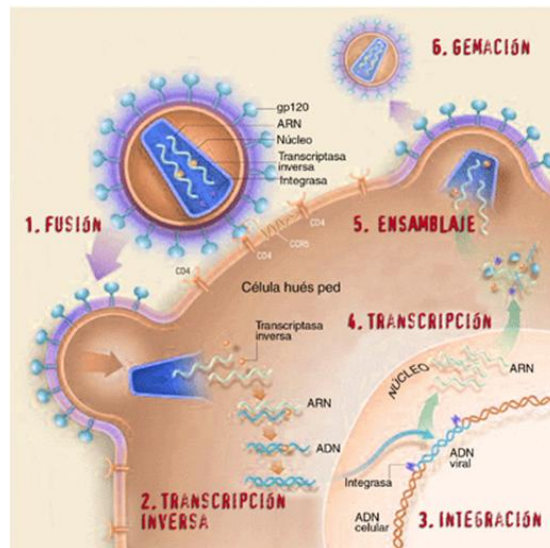


Figura 2. Ciclo replicativo del VIH

En la actualidad existen 25 medicamentos y varias combinaciones de éstos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento del SIDA.⁶ Dichos compuestos pueden clasificarse en cinco grandes grupos: i) Nucleósidos inhibidores de la enzima viral transcriptasa inversa (TI), ii) Nucleótidos inhibidores de la TI, iii) Inhibidores alostéricos de la TI, iv) inhibidores de la enzima viral proteasa, v) inhibidores de la enzima viral integrasa, y finalmente vi) inhibidores del proceso de entrada/fusión (Tabla 1).⁷

Estos fármacos se prescriben en combinación, en lo que se ha denominado Terapias Antirretrovirales de Gran Actividad (TARGA, HAART en inglés). A pesar del éxito de estas terapias, con las cuales se ha conseguido disminuir drásticamente la mortalidad de los pacientes en países desarrollados y hacer desaparecer por un tiempo prolongado el ARN viral en el plasma, no se ha conseguido erradicar el virus. Además ya han aparecido virus resistentes a la mayoría de los agentes retrovirales

⁶ de Clercq, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, 33 (4), 307-320.

⁷ www.fda.gov

de los que se dispone, lo que lleva a una menor efectividad de los mismos. Estos virus “multirresistentes” pueden ser transmitidos a otros individuos haciendo más complejo su tratamiento.⁸

Tabla 1. Fármacos anti-VIH aprobados para el tratamiento del SIDA hasta Octubre 2009

| Familia farmacológica | | Fármacos | |
|--------------------------------------|-------------|--|---|
| Inhibidores de Transcriptasa Inversa | Nucleósidos | Zidovudina (AZT) Didanosina (ddI) Zalcitabina (ddC) Lamivudina (3TC) | Estavudina (d4T) Abacavir (ABC) Emtricitabina (FTC) |
| | Nucleótidos | Tenofovir (TNV) | |
| | Alostéricos | Nevirapina (NVP) Delavirdina (DLV) Efavirenz (EFV) Etravirina | |
| Inhibidores de Proteasa | | Saquinavir (SQV) Indinavir (IDV) Ritonavir (RTV) Nelfinavir (NFV) Amprenavir (APV) | Lopinavir (LPV) Atazanavir (AZV) Tipranavir (TPV) Fosamprenavir Darunavir |
| Inhibidores de Integrasa | | Raltegravir | |
| Inhibidores de entrada / fusión | | Fuzeón (ENV; T-20) Maraviroc | |

Por último, la toxicidad asociada a todos estos fármacos conduce a graves problemas secundarios como lipodistrofia, intolerancia a la glucosa, altos niveles de colesterol y problemas cardiovasculares, entre otros. Por todo ello, existe la urgente necesidad de descubrir nuevos fármacos con menos efectos secundarios, y que actúen bien frente a nuevas dianas virales o frente a las ya disponibles pero mediante diferentes mecanismos. Al igual que existe la necesidad de seguir investigando en

⁸ Yerly, S., Kaiser, L., Race, E., Bru, J.P., Clavel, F. and Perrin, L. Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet* **1999**, 354 (9180), 729-733.

vacunas para prevenir la enfermedad, que están empezando, después de 20 años, a tener pequeños, pero importantes éxitos.⁹

En la presente memoria nos hemos centrado en el proceso de entrada/fusión como diana terapéutica para conseguir fármacos anti-VIH eficaces. Prueba del interés que existe en la actualidad en la inhibición del proceso de entrada/fusión es la reciente aprobación de Maraviroc y Fuzeón,¹⁰ dos de los últimos fármacos incorporados al arsenal terapéutico para el tratamiento del SIDA.

A continuación comentaremos las características más importantes de dicho proceso.

Entrada/fusión del virus

Tal y como se ha comentado, la envoltura del VIH consiste en una bicapa lipídica que contiene varias glicoproteínas virales: la gp120 que sobresale hacia el exterior permaneciendo anclada en la membrana mediante otra proteína, la gp41.

La fase inicial del proceso de infección comienza en las mucosas externas, recto, cuello del útero, placenta, pulmones o intestino, donde se expresan las células dendríticas intersticiales. Los carbohidratos presentes en la superficie de la glicoproteína viral gp120 son reconocidos a través de la proteína DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-Grabbing Nonintegrin) presente en las células dendríticas y macrófagos.¹¹ DC-SIGN ayuda a la internalización del VIH en los órganos linfoides y a su presentación a las células T CD4+.¹² (Figura 3)

⁹ Cohen, J. HIV/AIDS Research. Surprising AIDS Vaccine Success Praised and Pondered. *Science* **2009**, 326 (5949), 26-27.

¹⁰ Opar, A. New HIV drug classes on the horizon. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 258-259.

¹¹ Geijtenbeek, T.B.H., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C.F., Middel, J., Cornelissen, I.L.M.H.A., Nottet, H.S.L.M., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G. and van Kooyk, Y. DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells. *Cell* **2000**, 100, 587-597.

¹² a) Kooyk, Y.v. and Geijtenbeek, T.B.H. DC-SIGN: Escape Mechanism For Pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, 3 (9), 697-709, b) Wu, L. and KewalRamani, V.N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 859-868.

Introducción

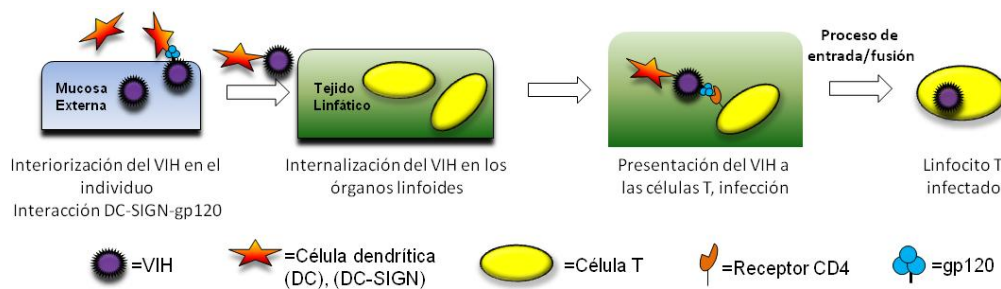


Figura 3. Proceso de llegada del VIH a los linfocitos T

A continuación tiene lugar la entrada del virus en la célula-T mediante un proceso complejo que puede dividirse en tres etapas: a) reconocimiento, b) unión a los co-receptores celulares, y c) fusión (Figura 4).

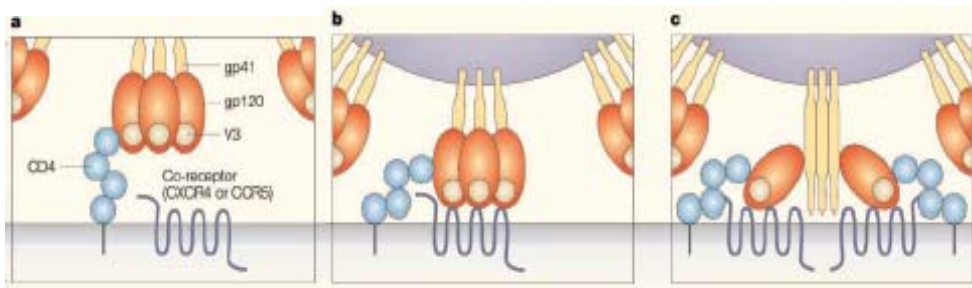


Figura 4. Proceso de entrada/fusión

En la etapa de reconocimiento tiene lugar la interacción de la glicoproteína viral gp120 y el receptor CD4 celular (Figura 4a). En este momento se da un cambio conformacional en el complejo glicoprotéico gp120/gp41 permitiendo que la glicoproteína viral gp120 interactúe con los co-receptores celulares (CCR5 ó CXCR4, receptores transmembrana acoplados a proteína G) (Figura 4b). Esto da lugar a nuevos cambios conformacionales que dejan expuesto el dominio hidrofóbico de fusión de gp41 el cual se inserta en la membrana celular (Figura 4c) permitiendo la creación de poros en ella (fusión) y posibilitando la descarga del contenido viral en el citoplasma.

Los inhibidores del proceso de entrada/fusión se clasifican en función de la diana terapéutica hacia la que van dirigidos.¹³ Entre dichos inhibidores se encuentran:

¹³ Qian, K., Morris-Natschke, S.L. and Kuo-Hsiung, L. HIV entry inhibitors and their potential in HIV therapy. *Med. Res. Rev.* **2009**, 29 (2), 369-393.

1. Inhibidores de la unión virus-DC-SIGN
2. Inhibidores de la unión virus-célula T
 - a. Inhibidores de uniones inespecíficas
 - b. Inhibidores de la unión gp120-CD4
 - c. Reguladores de la expresión del receptor celular CD4
3. Inhibidores de la unión a los co-receptores celulares
 - a. Inhibidores de CCR5
 - b. Inhibidores de CXCR4
4. Inhibidores de la fusión (Inhibidores de la glicoproteína viral gp41)

Dentro del grupo de los inhibidores del proceso de entrada / fusión el primer fármaco aprobado fue el Enfurtivide (Fuzeón, ENV, T-20) (Trimeris, Inc.) que es un péptido de 36 aminoácidos capaz de interactuar con la glicoproteína viral gp41 bloqueando el proceso de fusión de las membranas vírica y celular. Debido a su naturaleza peptídica el Enfurtivide debe ser inyectado subcutáneamente dos veces al día.¹⁴ El segundo fármaco aprobado fue el Maraviroc (Pfizer, Inc.), que actúa bloqueando el co-receptor celular CCR5, presente en macrófagos, impidiendo así la unión con el complejo gp120-CD4.¹⁵ La mayor ventaja de este tipo de compuestos respecto al resto de medicamentos antirretrovirales es que actúan fuera de los linfocitos T, antes de que el VIH entre en la célula.

Además del complejo proceso de reconocimiento entre el VIH y la célula T anteriormente comentado, se producen otros procesos menos específicos de adsorción y unión entre el VIH y la membrana celular. Dichos procesos tienen lugar a través de interacciones iónicas (carga-carga) entre regiones de la gp120 que poseen múltiples aminoácidos de carácter básico (cargadas positivamente) y regiones polianiónicas (cargadas negativamente) de la célula huésped. Por tanto, no resulta sorprendente el hecho de que existan un gran número de polisacáridos de naturaleza aniónica de origen natural y sintético que muestran actividad anti-HIV al interactuar con las regiones básicas de la gp120 impidiendo su interacción con las células CD4.

¹⁴ Matthews, T., Salgo, M., Greenberg, M., Chung, J., DeMasi, R. and Bolognesi, D. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3 (3), 215-225.

¹⁵ Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., Webster, R., Armour, D., Price, D., Stammen, B., Wood, A. and Perros, M. Maraviroc (UK-427,857), a Potent, Orally Bioavailable, and Selective Small-Molecule Inhibitor of Chemokine Receptor CCR5 with Broad-Spectrum Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49 (11), 4721-4732.

Entre ellos se encuentran polianiones solubles como el sulfato de dextrano, la sulfato ciclodextrina o la heparina.^{16,17} Otro grupo de compuestos con uniones inespecíficas lo constituyen los sulfonatos poliméricos de naftaleno que actúan uniéndose de manera no específica a las células dendríticas. Debido a su naturaleza polimérica y mecanismo de acción uno de dichos compuestos, PRO2000, se encuentra actualmente en fase clínica III como microbicida de uso tópico.¹⁸ Desafortunadamente en Diciembre de 2009 y tras un estudio en el que participaron 9385 mujeres africanas, ha aparecido la noticia del fracaso de dicho compuesto.¹⁹

En la presente Tesis doctoral nos hemos centrado en la glicoproteína viral gp120, y más concretamente en los carbohidratos presentes en ella, para el desarrollo de compuestos con actividad frente al VIH. Esta aproximación es bastante novedosa ya que, únicamente, la empresa Cellegy Pharmaceuticals está realizando ensayos clínicos con la lectina cianovirina-N que tiene como diana terapéutica los carbohidratos presentes en la glicoproteína viral gp120. Debido a su naturaleza proteica, la cianovirina-N se está ensayando como microbicida de uso tópico en forma de gel vaginal para prevenir la transmisión del VIH.²⁰

¹⁶ a) Callahan, L.N., Phelan, M., Mallinson, M. and Norcross, M.A. Dextran Sulfate Blocks Antibody Binding to the Principal Neutralizing Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 without Interfering with gp120-CD4 Interactions. *J. Virol.* **1991**, 65 (3), 1543-1550, b) Mondor, I., Ugolini, S. and Sattentau, Q.J. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Attachment to HeLa CD4 Cells Is CD4 Independent and gp120 Dependent and Requires Cell Surface Heparans. *J. Virol.* **1998**, 72 (5), 3623-3634, c) Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P.D. and Sattentau, Q.J. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* **2000**, 74 (4).

¹⁷ McReynolds, K. and Gervay-Hague, J. Chemotherapeutic interventions targeting HIV interactions with host-associated carbohydrates. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (5), 1533-1552.

¹⁸ a) Teleshova, N., Chang, T., Profy, A. and Klotman, M.E. Inhibitory effect of PRO 2000, a candidate microbicide, on dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus transfer. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52 (5), 1751-1758, b) Dhawan, D. and Mayer, K.H. Microbicides to Prevent HIV Transmission: Overcoming Obstacles to Chemical Barrier Protection. *JID* **2006**, 193, 36-44, c) <http://www.aidsinfo.nih.gov/>, 2009

¹⁹ Microbicides Development Programme (<http://www.mdp.mrc.ac.uk/>)

²⁰ a) Botos, I., O'Keefe, B., Shenoy, S., Cartner, L., Ratner, D. and Seeberger, P. Structures of the complexes of a potent anti-HIV protein cyanovirin-N and high mannose oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (37), 34336-34342, b) Barrientos, L.G. and Gronenborn, A.M. The highly specific carbohydrate-binding protein cyanovirin-N: Structure, anti-HIV/Ebola activity and possibilities for therapy. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, 5 (1), 21-31, c) <http://www.aidsinfo.nih.gov/>, 2009

La glicoproteína gp120 como diana terapéutica

Aproximadamente el 50% de los 120KDa del peso molecular de la glicoproteína gp120 de la cubierta del VIH se debe a los carbohidratos presentes en ella. Es importante señalar que los carbohidratos de la cubierta viral son sintetizados por el huésped ya que el VIH no posee la maquinaria capaz de producir sus propios carbohidratos.²¹ La presencia de carbohidratos en la superficie viral afecta a numerosos eventos que tienen lugar durante el ciclo replicativo del VIH, entre ellos el ensamblaje y la transmisión viral.²² Estos oligosacáridos siempre se unen a la proteína a través de residuos de Asparagina (*N*-glicosidación) no observándose en ningún caso *O*-glicosidación.²³

Las 24 posibles posiciones de *N*-glicosilación están ocupadas por oligosacáridos en los que está presente una estructura común de pentasacárido, **A** (Figura 5). Dicho pentasacárido posee dos residuos de *N*-acetilglucosamina (en azul) unidos por un extremo al grupo amida de un residuo de asparagina de la proteína y por otro a tres manosas (en rojo). A esta estructura básica pueden estar unidos distintos tipos de azúcares para dar lugar a tres tipos de oligosacáridos: a) alto contenido en manosa (*high mannose*), b) complejo y c) híbrido.

Los oligosacáridos de alto contenido en manosa, tienen hasta otros 6 residuos de manosa unidos a las distintas ramas de la estructura básica tal y como se observa en la Figura 5. En las estructuras complejas podemos encontrar otros azúcares diferentes de manosa, entre ellos: galactosa, *N*-acetilglucosamina, *N*-acetilgalactosamina y L-fucosa. En las estructuras híbridas se encuentran elementos estructurales comunes a los dos tipos de oligosacáridos anteriores.

²¹ Helenius, A. and Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **2001**, *291*, 2364-2369.

²² Scanlan, C.N., Offer, J., Zitzmann, N. and Dwek, R.A. Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature* **2007**, *446*, 1038-1045.

²³ Botos, I. and Wlodawer, A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2005**, *88*, 233-282.

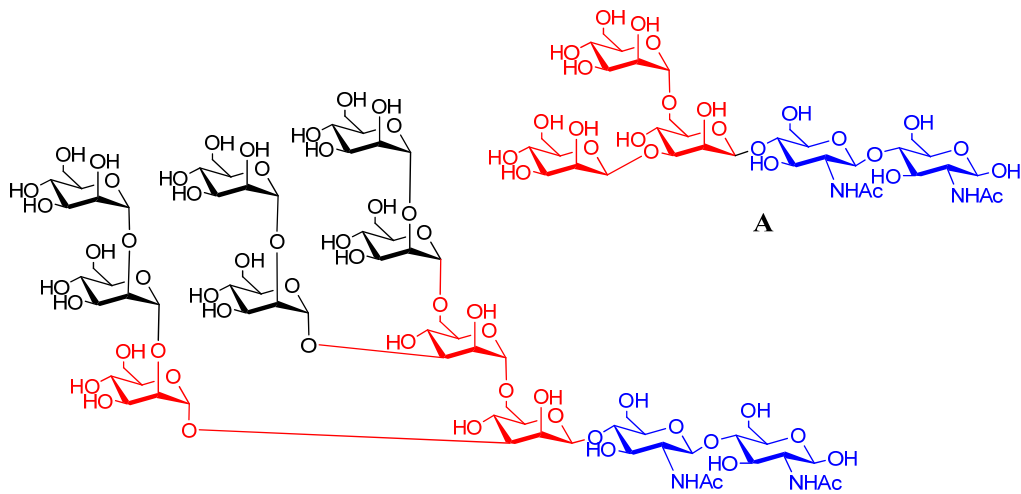


Figura 5. Estructura química del fragmento básico de pentasacárido (A) y un oligosacárido con alto contenido en manosa.

Los azúcares de la glicoproteína gp120 actúan como un “escudo protector” enmascarando los epítomos inmunogénicos, únicas dianas posibles para el ataque de los anticuerpos. Este hecho permite al virus burlar la respuesta inmune de los organismos a los que infecta.²⁴

Lectinas, inhibidores del proceso de entrada.

En la naturaleza existe un gran número de proteínas que interaccionan con carbohidratos de forma no covalente. Ejemplos significativos de este tipo de proteínas son las enzimas específicas de carbohidratos (glicosiltransferasas, glicosidasas, etc.)²⁵ y los anticuerpos anticarbohidrato.²⁶ Un tercer grupo de proteínas que se comporta de este modo son las lectinas. Las lectinas tienen la capacidad de unirse a mono- y oligosacáridos de forma reversible y con gran especificidad pero ni poseen actividad catalítica ni son producto de la respuesta inmune. Cada molécula de lectina

²⁴ Reitter, J.N., Means, R.E. and Desroiers, R.C. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat. Med.* **1998**, 4 (6), 679-684.

²⁵ Bojarova, P. and Kren, V. Glycosidasas: a key to tailored carbohydrates. *Trends Biotechnol.* **2009**, 27 (4), 199-209.

²⁶ Weintraub, A. Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydr. Res.* **2003**, 338 (23), 2539-2547.

posee dos o más sitios de reconocimiento de carbohidratos, es decir son di- o polivalentes. Por tanto, cuando las lectinas interactúan con los carbohidratos de una determinada célula, por ejemplo un eritrocito, no solo se combinan con los azúcares presentes en su membrana celular sino que además causan entrecruzamiento (cross-linking) entre los carbohidratos presentes en otras membranas celulares lo que provoca la precipitación de las células. Este fenómeno conocido como aglutinación es una de las características más importantes de las lectinas, dándose también para polisacáridos y para glicoproteínas, empleándose de manera rutinaria para su detección y caracterización.²⁷

Las lectinas se encuentran en la mayoría de los seres vivos, desde virus o bacterias hasta plantas y animales. Algunas lectinas, y más concretamente las que poseen especificidad por manosa o *N*-acetilglucosamina como concavalina A y cianovirina, poseen actividad antiviral y en particular actividad frente al VIH.²⁸ Dicha acción antiviral se debe a su unión a los azúcares (manosa, *N*-acetilglucosamina, galactosa y fucosa) que forman parte de la glicoproteína gp120. Aunque el mecanismo exacto no se conoce todavía, parece probable que la unión de dichas lectinas a los oligosacáridos de gp120 afecte a la movilidad de éstos, impidiendo de algún modo los cambios conformacionales que son necesarios para que la glicoproteína gp120 interactúe con los co-receptores celulares y el virus pueda entrar en la célula a la que pretende infectar.

Una observación muy interesante es que, ante la presión de determinadas lectinas, el virus desarrolla mutaciones cuyo resultado es la eliminación/modificación de los sitios de *N*-glicosilación situados en la glicoproteína gp120 pero no en los de la glicoproteína gp41.²⁹ En este caso, la aparición de cepas virales mutadas, contrariamente a lo que ocurre en las terapias antivirales convencionales, lejos de suponer un hecho perjudicial podría suponer un beneficio, ya que los epítomos

²⁷ Lis, H. and Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674.

²⁸ Balzarini, J., Hatse, S., Vermeire, K., Princen, K., Aquaro, S. and Perno, C. Mannose-specific plant lectins from the Amaryllidaceae family qualify as efficient microbicides for prevention of human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (10), 3858-3870.

²⁹ Balzarini, J., Laethem, K.V., Hatse, S., Froeyen, M., Damme, E.V., Bolmstedt, A., Peumans, W., de Clercq, E. and Schols, D. Marked Depletion of Glycosylation Sites in HIV-1 gp120 under Selection Pressure by the Mannose-Specific Plant Lectins of *Hippeastrum Hybrid* and *Galanthus nivalis*. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1556-1565.

inmunogénicos del virus quedan expuestos.³⁰ De este modo, el sistema inmunitario del huésped podría reconocerlos y atacar al virus.³¹ Las cepas virales resistentes que aparecen bajo la presión de las lectinas son, además, sensibles a la acción de otros fármacos que inhiben el proceso de entrada del VIH. Un aspecto interesante es que las lectinas ensayadas hasta el momento no han mostrado toxicidad significativa. Esta falta de toxicidad podría ser quizá debida a una interacción preferente con las manosas de la cubierta viral.

La especificidad de determinadas lectinas por el VIH parece residir en la inusual densidad de azúcares de la glicoproteína gp120 y en la capacidad de dichas lectinas para interactuar con residuos terminales de manosa que no son habituales en las células de mamíferos.³²

En la Figura 6 se representan en forma de esferas rojas y amarillas todos los puntos de glicosidación, 24 en total, en la glicoproteína gp120. Las esferas rojas en particular representan los sitios en los que desapareció la glicosidación después de someter al virus a la presión de diferentes tipos de lectinas (GNA, *Galanthus nivalis* agglutinin, HHA, *Hippeastrum hybrid* agglutinin y cianovirina).³²

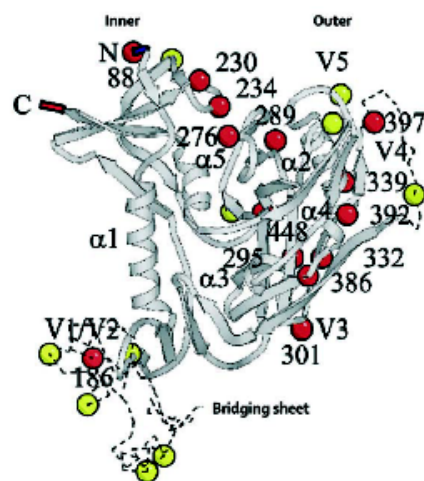


Figura 6. Sitios de glicosidación en la gp120

³⁰ Balzarini, J., Van Laethem, K., Hatse, S., Froeyen, M., Peumans, W., Van Damme, E. and Schols, D. Carbohydrate-binding Agents Cause Deletions of Highly Conserved Glycosylation Sites in HIV gp120: A New Therapeutic Concept to hit the Achilles Heel of HIV. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (49), 41005-41014.

³¹ Balzarini, J. Targeting the glycans of gp120: a novel approach aimed at the Achilles heel of HIV. *The Lancet* **2005**, 5, 726-731.

³² Balzarini, J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. *Antiviral Res.* **2006**, 71, 237-247.

Debido a su naturaleza proteica las lectinas naturales no presentan las propiedades farmacocinéticas adecuadas para su posible consideración como fármacos y es por ello por lo que resultaría deseable disponer de moléculas sintéticas pequeñas capaces de actuar mediante un mecanismo similar al de las lectinas naturales.

Muy recientemente se ha descubierto que la pradimicina A (Figura 7), un antibiótico antifúngico no peptídico y estructura compleja producido por el actinomiceto *Actinomadura hibisca*, es capaz de inhibir la replicación del VIH mediante un mecanismo de acción similar al de las lectinas naturales. Se ha sugerido que la actividad anti-VIH mostrada por dicho compuesto podría ser debida a la unión con el disacárido terminal de α -(1-2)-manosa muy abundante en los oligosacáridos presentes en la cubierta del VIH. Por tanto, la pradimicina A constituye la primera molécula pequeña de naturaleza no peptídica capaz de actuar de este modo y desde este punto de vista se puede considerar como una nueva clase de "lectina artificial" que posee actividad anti-VIH y que fuerza al virus a seguir un patrón único de mutación que tiene como resultado alteraciones en la glicoproteína gp120 de la cubierta viral.³³

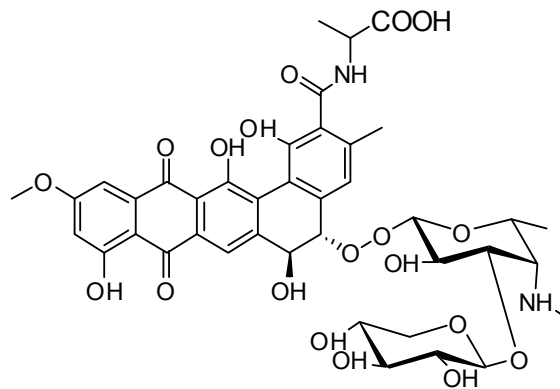


Figura 7. Estructura de pradimicina A

La unión de la pradimicina A a manosa es dependiente de Ca^{2+} dando lugar a complejos formados por dos moléculas de pradimicina, cuatro de manosa y un átomo

³³ Balzarini, J., Van Laethem, K., Daelemans, D., Hatse, S., Bugatti, A., Rusnati, M., Igarashi, Y., Oki, T. and Schols, D. Pradimicin A, a Carbohydrate-Binding Nonpeptidic Lead Compound for Treatment of Infections with Viruses with Highly Glycosylated Envelopes, Such as Human Immunodeficiency Virus. *J. Virol.* **2007**, *81* (1), 362-373.

de calcio.³⁴ Su bajo peso molecular, 838 Da, (P_M de las lectinas ~ 8.5 a 50 KDa) y su naturaleza no peptídica constituyen ventajas a la hora de su desarrollo como fármaco. De este modo, la pradimicina A es un compuesto que avala la posibilidad de que otras moléculas pequeñas capaces de interactuar con los oligosacáridos de gp120 puedan inhibir la replicación del VIH.

Multivalencia e importancia de las interacciones CH- π

Las interacciones lectina-monosacárido son generalmente débiles y de baja afinidad, con constantes de afinidad en el rango milimolar. Además muestran una especificidad no demasiado alta si se compara con la estricta especificidad que poseen las interacciones enzima-sustrato. La razón de la baja afinidad es que el sitio de reconocimiento de carbohidratos de las lectinas es un bolsillo poco profundo muy expuesto al disolvente. Sin embargo, las lectinas muestran alta afinidad y una exquisita especificidad por los oligosacáridos de glicoproteínas y glicolípidos presentes en la superficie celular, un requisito ineludible para la función (reconocimiento molecular) que desempeñan a nivel biológico. El mecanismo empleado por las lectinas para aumentar la afinidad y especificidad en el reconocimiento consiste en establecer múltiples interacciones con el oligosacárido con el que interactúan (teoría de multivalencia).^{35,36} Este tipo de asociación polivalente, empleado por los sistemas biológicos para el reconocimiento molecular, posee unas características muy diferentes a las de las asociaciones monovalentes, implicando muchas interacciones poco intensas en lugar de una única interacción de gran intensidad.

Por otra parte, y gracias a la resolución de las estructuras cristalinas de los complejos lectina-carbohidrato se ha podido topografiar en detalle los sitios de

³⁴ Ueki, T., Oka, M., Fukagawa, Y. and Oki, T. Studies on the mode of antifungal action of pradimicin antibiotics. III. Spectrophotometric sequence analysis of the ternary complex formation of BMY-28864 with D-mannopyranoside and calcium. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 465-477.

³⁵ a) Mammen, M., Choi, S.-K. and Whitesides, G.M. Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37* (20), 2755-2794. , b) Kiessling, L.L., Gestwicki, J.E., Cairo, C.W., Strong, L.E. and Oetjen, K.A. Influencing Receptor-Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (50), 14922-14933.

³⁶ Liu, Y.A., Carroll, J.R., Holt, L.A., McMahon, J., Giomarelli, B. and Ghirlanda, G. Multivalent Interactions with gp120 Are Required for the Anti-HIV Activity of Cyanovirin. *Biopolymers* **2009**, *92* (3), 194-200.

reconocimiento de carbohidratos de numerosas lectinas.^{37,38} De este modo, se ha podido determinar que las interacciones lectina-carbohidrato son de tipo no covalente y se establecen fundamentalmente a través de enlaces de hidrógeno (bidentado o cooperativo), fuerzas de van der Waals, interacciones CH- π y/o coordinación con metales.³⁹ A modo de ejemplo en la Figura 8a se muestra, de forma esquemática, el sitio de reconocimiento de carbohidratos de la lectina *Narcissus pseudonarcissus* 7 (NPL7). Tal y como se puede observar se establecen numerosos enlaces de hidrógeno (líneas de puntos) e interacciones de Van der Waals (en verde) con el fragmento Man(1–3)Man.⁴⁰ En la Figura 8b se muestra la unión de una lectina de tipo C a manosa (en azul) con la ayuda de un átomo de Calcio (en morado), las interacciones con el Calcio y los enlaces de hidrógeno se representan con pequeñas esferas verdes, el residuo de Valina194 (en naranja) aporta interacciones de Van der Waals.²³

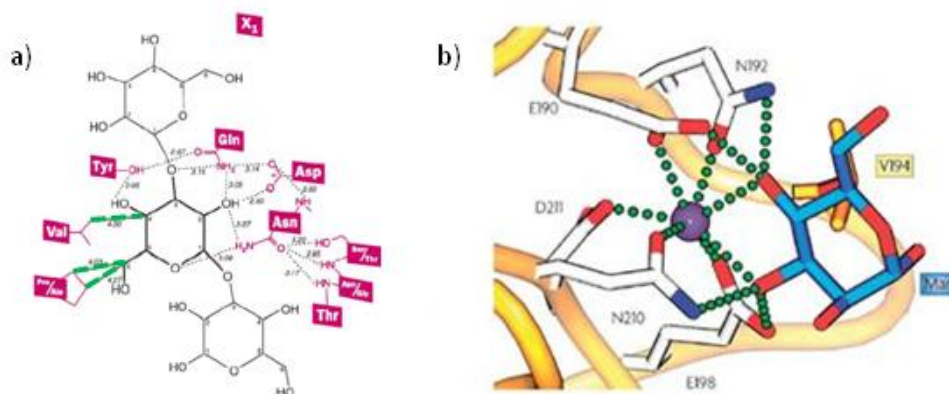


Figura 8. Ejemplos de asociación lectina-manosa: a) lectina *Narcissus pseudonarcissus*, b) lectinas de tipo C con manosa (en morado el Calcio)

³⁷ Sharon, N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 527-537.

³⁸ Williams, D.C., Jr., Lee, J.Y., Cai, M., Bewley, C.A. and Clore, G.M. Crystal Structures of the HIV-1 Inhibitory Cyanobacterial Protein MVL Free and Bound to Man3GlcNAc2: Structural Basis For Specificity and High-Affinity Binding to the Core Pentasaccharide from N-Linked Oligomannoside. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (32), 29269-29276.

³⁹ Lee, Y.C. and Lee, R.T. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28* (8), 321-327.

⁴⁰ Sauerborn, M.K., Wright, L. M., Reynolds, C. D., Grossmann, J. G. & Rizkallah, P. J. Insights into carbohydrate recognition by *Narcissus pseudonarcissus* lectin: the crystal structure at 2 Å resolution in complex with α 1–3 mannoibiose. *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 185-199.

Una observación muy interesante es que resulta relativamente frecuente encontrar aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) en el sitio de reconocimiento de carbohidratos.^{41,42} Estudios de difracción de Rayos X han puesto de manifiesto que en estos casos se establecen interacciones clave entre la región hidrofóbica del azúcar (hidrógenos unidos al anillo de piranosa) y los anillos aromáticos de las cadenas laterales de los aminoácidos situados en su proximidad.

Por otra parte, estudios recientes han demostrado a nivel teórico la existencia de interacciones estabilizadoras entre la fucosa (tomada como modelo de galactosa) y el benceno (Figura 9). En el mismo trabajo los autores han demostrado a nivel experimental la existencia de interacciones CH/ π entre el benceno (o fenol) y los átomos de hidrógeno de la cara α del metil- β -galactósido.⁴³ Un aspecto a destacar es que para que tenga lugar la interacción no se requiere la rigidez que proporciona la estructura tridimensional de una proteína.

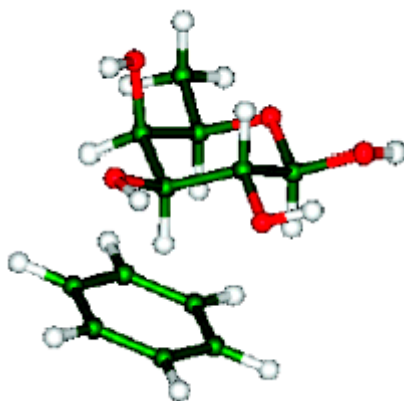


Figura 9. Modelo fucosa-benceno

⁴¹ a) Sauter, N., Hanson, J., Glick, G., Brown, J., Crowther, R. and Park, S. Binding of Influenza-Virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid- Analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-Ray crystallography. *Biochemistry* **1992**, *31* (40), 9609-9621, b) Pascal, J., Day, P., Monzingo, A., Ernst, S., Robertus, J. and Iglesias, R. 2.8-angstrom crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin 1. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* **2001**, *43* (3), 319-326.

⁴² Fernández-Alonso, M.C. Interacciones proteína-carbohidrato: Estudio Teórico de los requisitos energéticos para la distorsión de anillos de piranosa y origen de las interacciones carbohidrato-anillo aromático. Universidad de Vigo-Centro de Investigaciones Biológicas, Vigo, 2006.

⁴³ Fernández-Alonso, M.C., Cañada, F., Jiménez-Barbero, J. and Cuevas, G. Molecular recognition of saccharides by proteins. Insights on the origin of the carbohydrate-aromatic interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (20), 7379-7386.

El problema del reconocimiento de carbohidratos en agua

Tal y como veremos a continuación, el objetivo prioritario de esta Tesis Doctoral es la obtención de moléculas pequeñas con potencial actividad antiviral frente al VIH mediante un mecanismo similar al descrito para diferentes lectinas y para la pradimicina A. Para ello, dichas moléculas deben ser capaces de unirse eficientemente a los carbohidratos de la glicoproteína gp120 presente en la cubierta del virus.

Para el diseño de estas moléculas además de las características de la interacción carbohidrato-lectina comentadas hasta el momento (multivalencia, interacciones no covalentes) hay dos aspectos básicos que hay que tener en cuenta. En primer lugar, la interacción debe tener lugar en el medio donde se encuentran los carbohidratos en la naturaleza: el agua, a la que se parecen enormemente debido al gran número de grupos hidroxilo presentes en ellos. En segundo lugar, nuestros compuestos deben ser capaces de discriminar entre los carbohidratos presentes en la cubierta del VIH (preferentemente manosa) y los que están presentes en la célula huésped. Por lo tanto, el primer reto de nuestro trabajo y en general en el reconocimiento de carbohidratos consiste en discriminar entre un azúcar concreto y el agua, y el segundo, consiste en la selectividad, es decir en la capacidad de discriminar entre distintos azúcares (Figura 10).

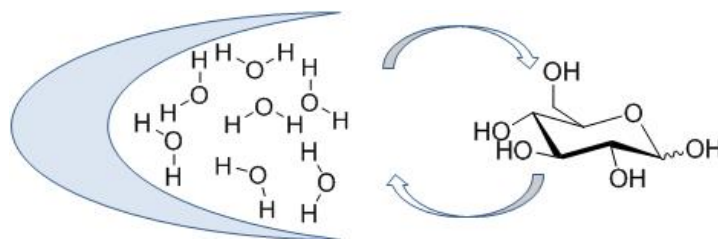


Figura 10. El reto de los receptores de carbohidratos

Se han descrito numerosos receptores sintéticos capaces de reconocer carbohidratos en disolventes orgánicos,⁴⁴ sin embargo son escasos los que lo hacen

⁴⁴ a) Nativi, C., Cacciarini, M., Francesconi, O., Vacca, A., Moneti, G., Ienco, A. and Roelens, S. Pyrrolic Tripodal Receptors Effectively Recognizing Monosaccharides. Affinity Assessment through a Generalized Binding Descriptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4377-4385, b)

en agua. Entre los receptores sintéticos capaces de reconocer carbohidratos en agua se encuentran: derivados solubles de calixarenos,⁴⁵ ciclodextrinas,⁴⁶ porfirinas,⁴⁷ compuestos que forman complejos a través de iones metálicos⁴⁸ y determinados compuestos tripodales basados en el esqueleto de benceno (que serán revisados en el capítulo 3 de la presente memoria).

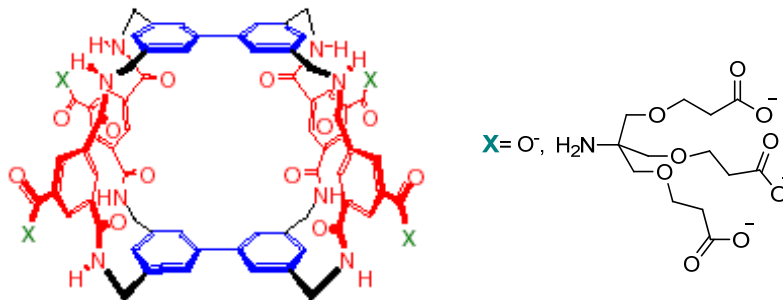


Figura 11. Receptor sintético de monosacáridos. En azul superficies apolares, en rojo grupos polares y en verde grupos necesarios para la solubilidad en agua

Por último, se encuentra la familia de los receptores “templo” (Figura 11), tal y como los denomina su autor, Anthony P. Davis, que consiguen rodear por completo el azúcar. Dichos compuestos poseen dos superficies aromáticas paralelas (grupos bifenilos) separadas por espaciadores rígidos polares. Las superficies aromáticas se unen a los grupos CH del carbohidrato mediante interacciones hidrofóbicas y CH- π , mientras que los espaciadores polares forman enlaces de hidrógeno con los OH del azúcar. Hasta el momento, estos receptores “templo”, han mostrado gran afinidad (1000 M^{-1}) y selectividad por carbohidratos que tienen todos sus grupos hidroxilos en

Kuschel, M. and Mazik, M. Highly effective acyclic carbohydrate receptors consisting of aminopyridine, imidazole, and indole recognition units. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (8), 2405-2419.

⁴⁵ Kobayashi, K., Asakawa, Y., Kato, Y. and Aoyama, Y. Complexation of hydrophobic sugars and nucleosides in water with tetrasulfonate derivatives of resorcinol cyclic tetramer having a polyhydroxy aromatic cavity- Importance of guest-host CH-P interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (26), 10307-10313.

⁴⁶ Aoyama, Y., Nagai, Y., Otsuki, J., Kobayashi, K. and Toi, H. Selective binding of sugar to beta cyclodextrin- a prototype for sugar-sugar interactions in water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31* (6), 745-747.

⁴⁷ Kral, V., Rusin, O. and Schmidtchen, F. Novel porphyrin-cryptand cyclic systems: Receptors for saccharide recognition in water. *Org. Lett.* **2001**, *3* (6), 873-876.

⁴⁸ Striegler, S. and Dittel, M. A sugar discriminating binuclear copper(II) complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (38), 11518-11524.

posición ecuatorial, especialmente por *N*-acetil glucosamina y por un disacárido, la celobiosa.^{49,50,51,52,53}

⁴⁹ Ferrand, Y., Crump, M.P. and Davis, A.P. A Synthetic Lectin Analog for Biomimetic Disaccharide Recognition. *Science* **2007**, *318* (5850), 619-622.

⁵⁰ Ferrand, Y., Klein, E., Barwell, N., Crump, M., Jimenez-Barbero, J. and Vicent, C. A Synthetic Lectin for O-Linked beta-N-Acetylglucosamine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (10), 1775-1779.

⁵¹ Walker, D., Joshi, G. and Davis, A. Progress in biomimetic carbohydrate recognition. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66* (19), 3177-3191.

⁵² Davis, A. Synthetic lectins. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (18), 3629-3638.

⁵³ Kubik, S. Synthetic Lectins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (10), 1722-1725.

Hipótesis y Objetivos generales

De todo lo expuesto en la introducción se podría concluir que la interacción con los carbohidratos presentes en la glicoproteína gp120 podría constituir una aproximación terapéutica eficaz y novedosa para inhibir la replicación del VIH.²² Dicha aproximación es conceptualmente diferente a las aproximaciones terapéuticas existentes hasta el momento ya que si dicha hipótesis es correcta se podría pensar en un efecto antiviral dual, que consistiría en una acción directa, por la que el compuesto inhibiría el proceso de fusión/entrada del virus a la célula huésped, y en otra indirecta, por la que se facilitaría la respuesta del sistema inmune del organismo al que infecta el virus.

Existen estudios “in vivo” que evidencian que esta aproximación terapéutica es realista y viable. Así por ejemplo, Reitter y colaboradores demostraron que en monos infectados con una variante del Virus de la Inmunodeficiencia de Simios (VIS) que contiene dos mutaciones en el gen *env* que codifica para las glicoproteínas de la cubierta, tiene lugar un aumento en el nivel de anticuerpos y una caída considerable en la carga viral.²⁴

Además, la aproximación de usar agentes que se unen a carbohidratos podría no sólo ser efectiva contra el VIH, sino también frente a otras enfermedades crónicas causadas por virus con cubierta tales como la hepatitis C, Influenza, Corona, etc., ya que se podría dar el caso de que un mismo compuesto presentase simultáneamente actividad frente a dos o más virus con cubierta.

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es el diseño y síntesis de moléculas orgánicas pequeñas de fácil accesibilidad sintética, capaces de unirse a los carbohidratos presentes en la cubierta de determinados virus, y de manera especial, en la del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

En base a la teoría de la multivalencia y al tipo de interacción no covalente que establecen las lectinas con los oligosacáridos, nos hemos centrado en el diseño y la síntesis de compuestos capaces de establecer interacciones múltiples con carbohidratos a través de enlaces de hidrógeno, interacciones CH- π , fuerzas de Van der Waals, etc. Para ello se ha empleado un núcleo central o “scaffold” al que se le han unido varios grupos con capacidad para interactuar con carbohidratos (ligantes de carbohidratos). Las modificaciones estructurales realizadas han consistido en variar tanto la naturaleza como el número de unidades ligantes de carbohidrato que

se unen a un determinado núcleo central. Asimismo se ha modificado la arquitectura del “scaffold” y el tipo de unión entre el núcleo central y el ligante de carbohidrato.

Como agente ligante de carbohidrato se han empleado fenoles con 1, 2 y 3 OHs unidos al anillo aromático para determinar cómo afecta el número de OHs en la actividad. Tal y como hemos visto en la introducción, este tipo de estructuras ofrecen la posibilidad de interactuar con azúcares mediante interacciones CH- π . Además, la presencia de hidroxilos en el anillo aromático podría favorecer la formación de enlaces mediante puente de hidrógeno. Con el fin de determinar el efecto en la actividad de la posición de los OH del anillo aromático se han sintetizado derivados sustituidos con grupos galoilo (3,4,5-trihidroxibenzoilo) y (2,3,4-trihidroxibenzoilo).

Se han empleado tres tipos de núcleos centrales o “scaffolds”:

Lineal: se han preparado compuestos lineales y flexibles empleando poliaminas y polialcoholes como esqueleto central en cuyos grupos amino e hidroxilo se han incorporado las funciones ligantes de carbohidrato mediante enlaces amida o éster. En esta serie de compuestos se han anclado un número variable de ligantes de carbohidrato (desde 1 hasta 5) y se ha modificado la distancia entre ellos. Este trabajo se describe en el capítulo 1 (Figura 12).

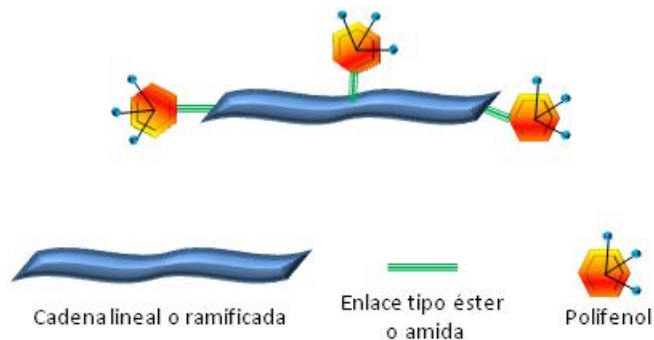


Figura 12. Esquema general de los compuestos descritos en el Capítulo 1

Carbohidratos: los monosacáridos con sus muy diferentes estereoquímicas ofrecen una oportunidad única como “scaffold” para orientar de manera diferente los grupos que se unen a ellos. Dentro de esta serie se han empleado mono- y disacáridos como núcleo central ya que con estos últimos aumenta

considerablemente el número de ligantes de carbohidrato en una misma molécula. Este trabajo se describe en el capítulo 2 (Figura 13).

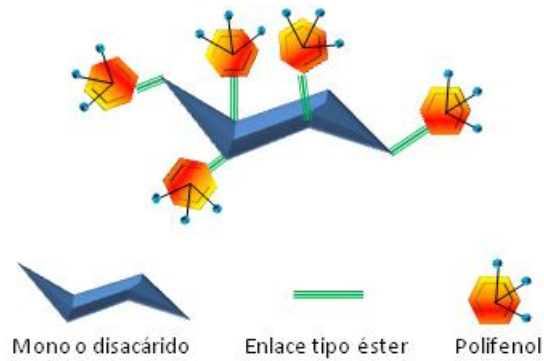


Figura 13. Esquema general de los compuestos descritos en el Capítulo 2

Benceno: el anillo central aromático que se ha empleado en esta serie de compuestos podría aumentar las interacciones CH- π con los protones unidos al anillo de piranosa de los azúcares de la cubierta viral. Además, según se describe en la bibliografía estos compuestos son capaces de orientar eficazmente los tres grupos unidos al anillo aromático de forma tal que se origina una cavidad en la que podrían acomodarse diferentes tipos de carbohidratos. Este trabajo se describe en el capítulo 3 (Figura 14).

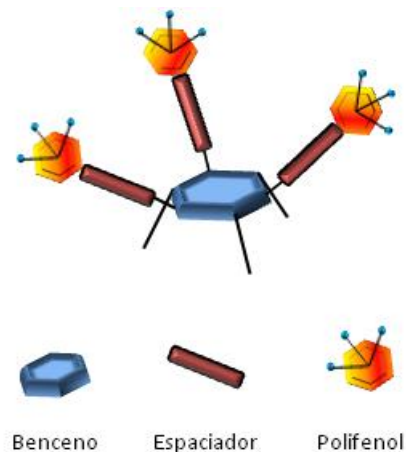


Figura 14. Esquema general de los compuestos descritos en el Capítulo 3

En el capítulo 4 se describe el empleo de la técnica de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) para determinar si existe interacción entre los compuestos sintetizados y la glicoproteína viral gp120 presente en la cubierta del VIH.

Estos estudios han sido realizados en el grupo del Dr. Balzarini de la Universidad Católica de Lovaina. Además, se ha empleado la RMN para determinar si existe interacción entre los compuestos sintetizados y determinados carbohidratos presentes en la cubierta del VIH. En concreto al finalizar el capítulo 2 y en el capítulo 4 se describen distintos experimentos de RMN, llevados a cabo en disolventes polares, agua y dimetilsulfóxido, para la detección cualitativa de interacciones intermoleculares, así como para el estudio de la estructura tridimensional de alguno de los compuestos que mejores resultados de afinidad presentaron en SPR. Este estudio se ha realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), del CSIC, en colaboración con el grupo del Dr. Jiménez Barbero.

La evaluación biológica de los compuestos descritos en la presente Tesis Doctoral frente a VIH-1 y VIH-2 fue realizada empleando cultivos celulares, por el equipo del Dr. Jan Balzarini, de la Universidad Católica de Lovaina.

Capítulo 1 . Derivados lineales de polifenoles

Antecedentes y objetivos

El ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) **1.1** (Figura 1.1), compuesto que forma parte de la estructura de muchos productos naturales que se encuentran ampliamente distribuidos en frutas y plantas,⁵⁴ posee en su estructura un anillo aromático sustituido con tres grupos hidroxilo, y por tanto, tal y como se ha comentado en la introducción, podría establecer interacciones no covalentes de tipo enlace de hidrógeno y π -aromático con los carbohidratos presentes en la cubierta viral del VIH y de este modo tener un efecto antiviral. En base a ello, decidimos emplear dicho compuesto para preparar gran parte de los compuestos lineales y flexibles descritos en el presente capítulo.

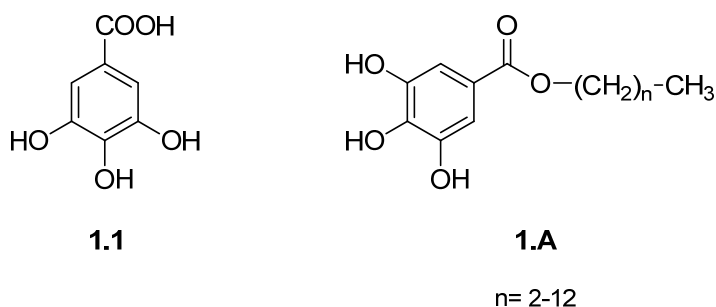


Figura 1.1. Estructura general del ácido gálico (1.1) y de alquil galatos (1.A)

Por otra parte, los n-alkil ésteres de ácido gálico, o alquil galatos, de fórmula general **1.A** (Figura 1.1), entre los que se encuentran los propil (E-310), octil (E-311) o lauril galatos (E-312) son muy usados en la industria alimentaria y cosmética por sus propiedades antioxidantes.⁵⁵ Además, existen estudios que ponen de manifiesto la actividad anticancerosa,^{56,57} antimalárica,⁵⁸ antiviral^{59,60} y antibacteriana⁶¹ de dichos

⁵⁴ Haddock, E., Gupta, R., Alshafi, S., Haslam, E. and Magnolato, D. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants.1.Introduction- Naturally-occurring galloyl esters. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, (11), 2515-2524.

⁵⁵ Aruoma, O., Murcia, A., Butler, J. and Halliwell, B. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41* (11), 1880-1885.

⁵⁶ Ow, Y.Y. and Stupans, I. Gallic acid and gallic acid derivatives: Effects on drug metabolizing enzymes. *Curr. Drug Metab.* **2003**, *4* (3), 241-248.

compuestos. En particular, en el estudio hecho por Uozaki⁵⁹ se describe que los alquil galatos poseen actividad, aunque muy moderada, frente al virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1). Dicha actividad aumenta a medida que también lo hace la longitud de la cadena metilénica, siendo el octil galato el que mejor relación actividad-toxicidad presentó. Los estudios realizados con el fin de determinar el mecanismo de acción de dichos compuestos ponen de manifiesto que el octil galato posee la capacidad de inactivar el virus antes de que éste infecte a la célula.⁵⁹

De manera análoga existen otros trabajos en la literatura, en los que se estudia la actividad antiviral de los alquil galatos frente a los virus herpes simplex tipos 1 y 2,⁶⁰ concluyendo que la actividad que presentan dichos compuestos puede ser atribuida a la inhibición del proceso de fusión y entrada del virus a la célula huésped aunque no se dan detalles sobre su mecanismo de acción.

La actividad antiviral y el mecanismo de acción propuesto para los alquil galatos llamó nuestra atención ya que pensamos que tal vez dichos compuestos estuvieran interaccionando con los carbohidratos de la cubierta del virus herpes y que podría darse el caso de que también lo hicieran con la cubierta del VIH. Para comprobar este hecho en el presente capítulo decidimos en primer lugar llevar a cabo la síntesis y evaluación biológica de los n-alquil ésteres de ácido gálico de fórmula general **1.A**, donde una unidad de ácido gálico se une a cadenas alquílicas de diferente longitud mediante enlaces de tipo éster.

⁵⁷ a) Pavani, M., Cordano, G., Muñoz, S., Rivera, E., Medina, J. and Frey, C. Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **2007**, *146* (4), 520-527, b) Locatelli, C., Rosso, R., Santos-Silva, M.C., Souza, C.A.d., Licinio, M.A., Leal, P., Bazzo, M.L., Yunesd, R.A. and Creczynski-Pasa, T.B. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3791-3799.

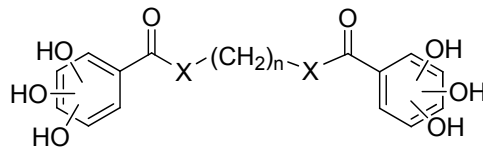
⁵⁸ Bilia, A.R. Non-nitrogenous plant-derived constituents with antiplasmodial activity. *Nat. Prod. Commun.* **2006**, *1* (12), 1181-1204.

⁵⁹ Uozaki, M., Yamasaki, H., Katsuyama, Y., Higuchi, M., Higuti, T. and Koyama, A. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. *Antiviral Res.* **2007**, *73* (2), 85-91.

⁶⁰ a) Savi, L.A., Leal, P.C., Vieira, T.O., Rosso, R., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Creczynski-Pasa, T.B., Barardi, C.R.M. and Simoes, C.M.O. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. *Arzneim.-Forsch.-Drug Res.* **2005**, *55* (1), 66-75, b) Andrighetti-Frohner, C., Leal, P., Nunes, R., Yunes, R., Trybala, E. and Kratz, J. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31* (5), 903-907.

⁶¹ a) Beveridge, E. and Boyd, I. Anti-microbial activity of some alkyl esters of gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) against *Escherichia Coli* NCTC-5993 with particular reference to normal propyl gallate. *Microbios* **1981**, *30* (120), 73-85, b) Fujita, K., Nihei, K., Nihei, A. and Kubo, I. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (5), 1072-1076.

Además, se sintetizaron los compuestos de fórmula general **1.B** (Figura 1.2) en los que, dos residuos de polifenol se unieron a cadenas alquílicas de diferente longitud. La unión entre el núcleo central y el residuo de polifenol se llevó a cabo en primer lugar mediante enlaces éster ($X = O$). También se emplearon enlaces amida ($X = NH$) con el fin de aumentar la estabilidad metabólica de los compuestos.

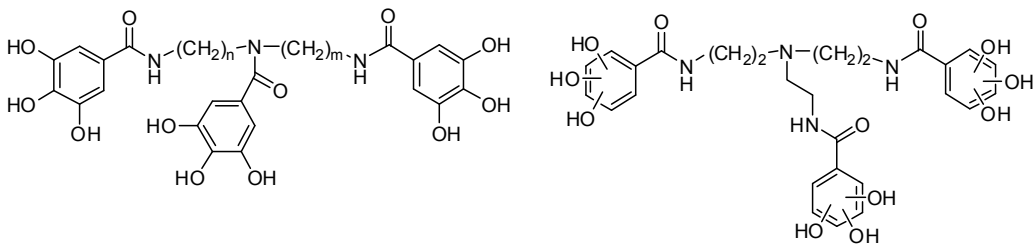


1.B

$n = 2-12$
 $X = O, NH$

Figura 1.2. Fórmula general 1.B

Con el propósito de aumentar el número de unidades de polifenol en una misma molécula se prepararon los compuestos de fórmulas generales **1.C** y **1.D** (Figura 1.3) con tres residuos de polifenol. En los compuestos de fórmula general **1.D** decidimos separar el anillo de polifenol unido al nitrógeno central mediante una cadena etilénica así como averiguar el efecto de la posición de los OH fenólicos en la actividad. Para ello, empleamos tanto residuos de ácido gálico (3,4,5-trihidroxibenzoilo) como de 2,3,4-trihidroxibenzoilo.



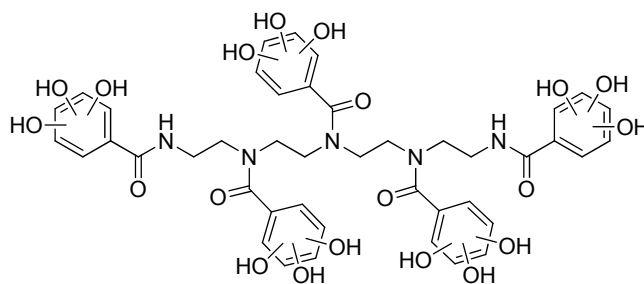
1.C

$n = m$
 $n \neq m$

1.D

Figura 1.3. Fórmulas generales 1.C y 1.D de los compuestos lineales

Finalmente preparamos el compuesto de fórmula general **1.E** con cinco residuos fenólicos en una misma molécula (Figura 1.4).



1.E

Figura 1.4. Fórmula general 1.E

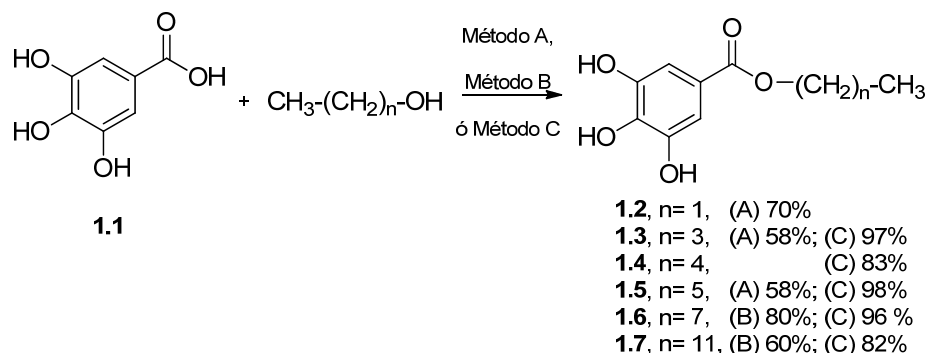
Resultados y discusión

Síntesis

En primer lugar, se llevó a cabo la preparación de los *n*-alquil ésteres de ácido gálico **1.2-1.7** (Esquema 1.1). En ellos se modificó la longitud de la cadena alquílica para averiguar si este aspecto estructural desempeñaba algún papel en la actividad antiviral frente al VIH.

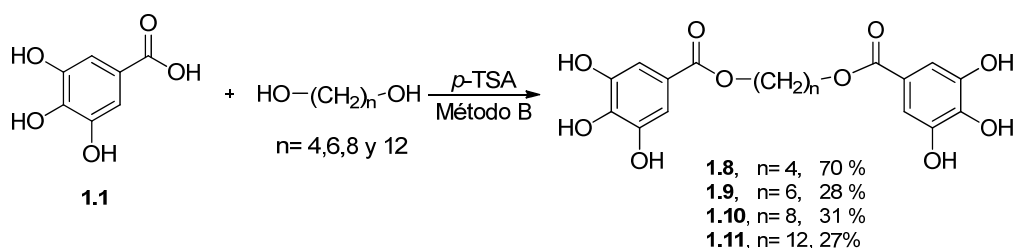
La síntesis de dichos compuestos se llevó a cabo en un solo paso empleando procedimientos descritos^{60a} que consistieron en la esterificación de ácido gálico con los correspondientes alcoholes en presencia de cantidades catalíticas de ácido sulfúrico (**método A**) o ácido *p*-toluensulfónico (**método B**) (Esquema 1.1).

Debido a que en ambos métodos se requieren elevadas temperaturas (110-160 °C), largos tiempos de reacción (hasta 12 horas), y un montaje Dean-Stark o de destilación a vacío, nos planteamos la puesta a punto de un método más sencillo mediante la utilización del microondas (**método C**). En dicho método se emplea el alcohol correspondiente como disolvente y ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TSA) en cantidades catalíticas. De esta manera acortamos los tiempos de reacción, que en este caso fueron de 50 minutos, y aumentamos el rendimiento de los compuestos deseados (ver Esquema 1.1).



Esquema 1.1. Síntesis de alquil galatos 1.2-1.7

Con el fin de determinar si el número de residuos de polifenol por molécula era un factor importante en la actividad se prepararon además los compuestos **1.8-1.11** con dos residuos de ácido gálico en sus estructuras (Esquema 1.2). La síntesis de dichos compuestos se llevó a cabo empleando el método **B**. Así, la esterificación de los correspondientes dioles: 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol, 1,8-octanodiol y 1,12-dodecanodiol, con dos equivalentes de ácido gálico en presencia de cantidades catalíticas de ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TSA) condujo a los compuestos deseados aunque con rendimientos inferiores a los obtenidos con los monoalcoholes.

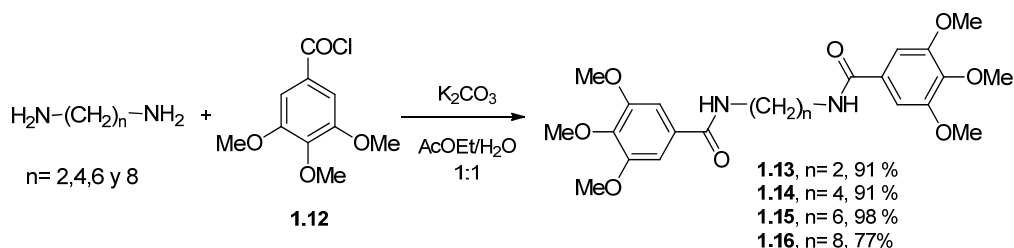


Esquema 1.2. Síntesis de alquil galatos 1.8-1.11

Además de los ésteres se consideró de interés la síntesis de las amidas análogas que además de introducir un átomo dador para la formación de enlaces de hidrógeno podrían tener mayor estabilidad metabólica.

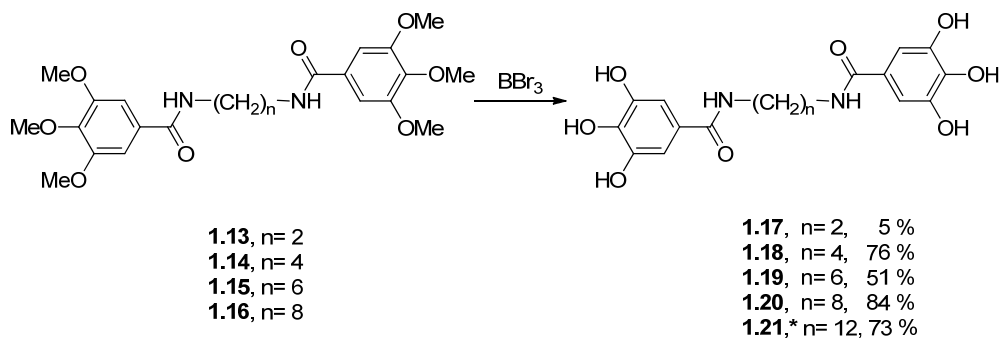
En primer lugar preparamos los compuestos **1.13-1.16** con dos unidades de polifenol en una misma molécula (Esquema 1.3). La síntesis de dichos compuestos se intentó, sin éxito, por reacción de acoplamiento entre la correspondiente diamina y el ácido gálico o su correspondiente éster metílico. En vista de que de este modo no era posible obtener los compuestos deseados, la síntesis se llevó a cabo a partir de

cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo (**1.12**), un derivado de ácido gálico comercial con los grupos hidroxilo protegidos en forma de éter metílico. El acoplamiento del cloruro de ácido **1.12** con las diaminas etilendiamina, 1,4-butanodiamina, 1,6-hexanodiamina, 1,8-octanodiamina y 1,12-dodecanodiamina, disponibles comercialmente, se llevó a cabo en presencia de carbonato potásico en un sistema bifásico acetato de etilo/agua.⁶² Esta reacción condujo respectivamente a los compuestos **1.13-1.16** (Esquema 1.3) con buenos rendimientos.



Esquema 1.3. Síntesis de Alquil Amidas 1.13-1.16

Una vez obtenidos los correspondientes aril metil éteres llevamos a cabo su desprotección utilizando tribromuro de boro en diclorometano seco y en atmósfera inerte, ya que la presencia de agua descompone el reactivo formando ácido bromhídrico gas (HBr), muy tóxico, que puede además descomponer nuestro producto.⁶² Con esta metodología obtuvimos los compuestos desprotegidos **1.17-1.20** (Esquema 1.4).



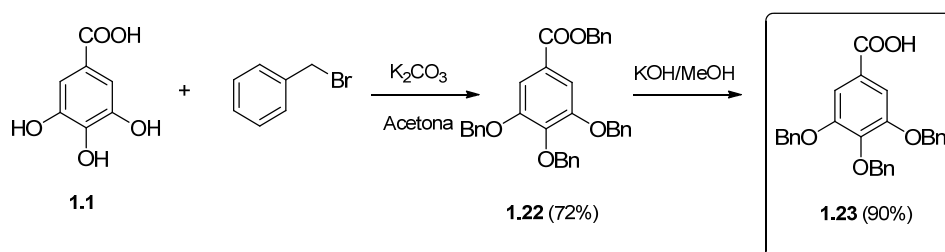
*. La síntesis de este compuesto se llevó a cabo por hidrogenación en presencia de Pd/C a partir del aril bencil éter **1.28** descrito a continuación

Esquema 1.4. Síntesis de Alquil Amidas 1.17-1.21

⁶² Brevitt, S.E. and Tan, E.W. Synthesis and in Vitro Evaluation of Two Progressive Series of Bifunctional Polyhydroxybenzamide Catechol-O-methyltransferase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (13), 2035-2039.

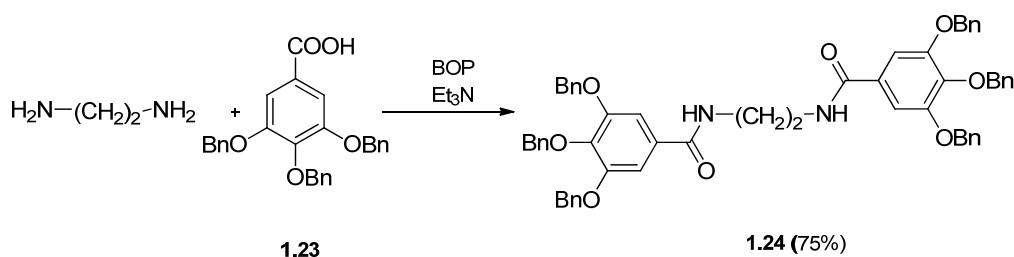
El derivado de etilendiamina **1.17** resultó muy inestable en las condiciones de reacción empleadas, obteniéndose tan solo con un 5% de rendimiento, por lo que decidimos emplear para su síntesis un método alternativo en el que se utilizó el derivado de ácido gálico **1.23**⁶³ (Esquema 1.5) con los hidroxilos protegidos con grupos bencilo. En este caso, la desprotección se llevó a cabo en condiciones suaves de hidrogenación.

La síntesis del ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23**⁶³ se llevó a cabo a partir de ácido gálico perbencilado **1.22**, intermedio clave de la síntesis, que se obtuvo a partir del ácido gálico **1.1** por tratamiento con bromuro de bencilo. La saponificación del éster bencilico condujo al compuesto deseado, **1.23**, con excelente rendimiento (Esquema 1.5).



Esquema 1.5. Síntesis del Ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23**

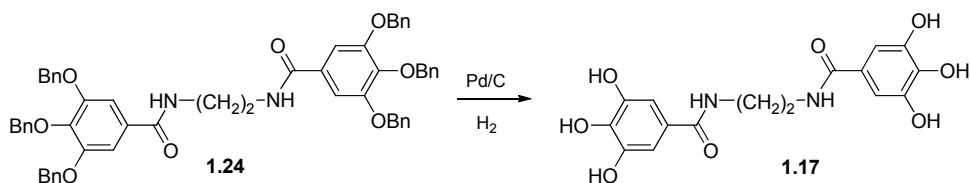
Una vez obtenido el intermedio bencilado **1.23** se procedió a su acoplamiento con etilendiamina empleando BOP como agente de acoplamiento y trietilamina como base obteniéndose el compuesto **1.24** con un 75% de rendimiento (Esquema 1.6).



Esquema 1.6. Síntesis de **1.24**

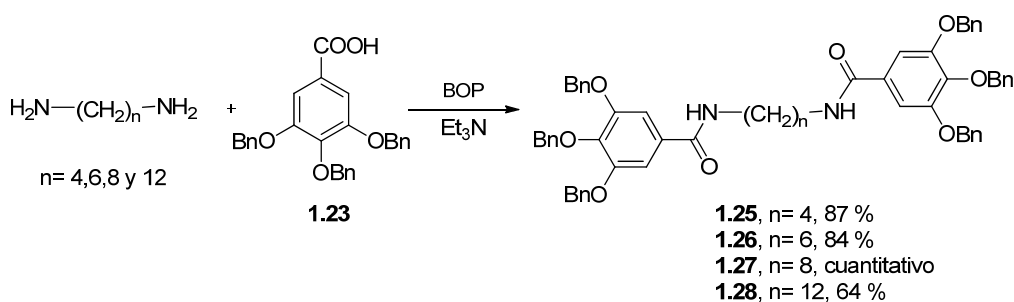
⁶³ Belin, F., Barthélémy, P., Ruiz, K., Lacombe, J.M. and Pucci, B. Synthetic Gallic Acid Derivatives as Models for a Comprehensive Study of Antioxidant Activity. *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86 (2), 247-265.

La desprotección de los grupos bencilo presentes en **1.24** se llevó a cabo por hidrogenolisis empleando Pd/C como catalizador (Esquema 1.7). El producto **1.17** se formó en dichas condiciones como se comprobó por HPLC-Masas, pero no pudo ser aislado con pureza suficiente debido a la presencia de Pd que no pudo ser eliminado a pesar de las sucesivas purificaciones a las que se sometió el bruto de reacción.



Esquema 1.7. Síntesis de **1.17** por hidrogenación a partir de **1.24**

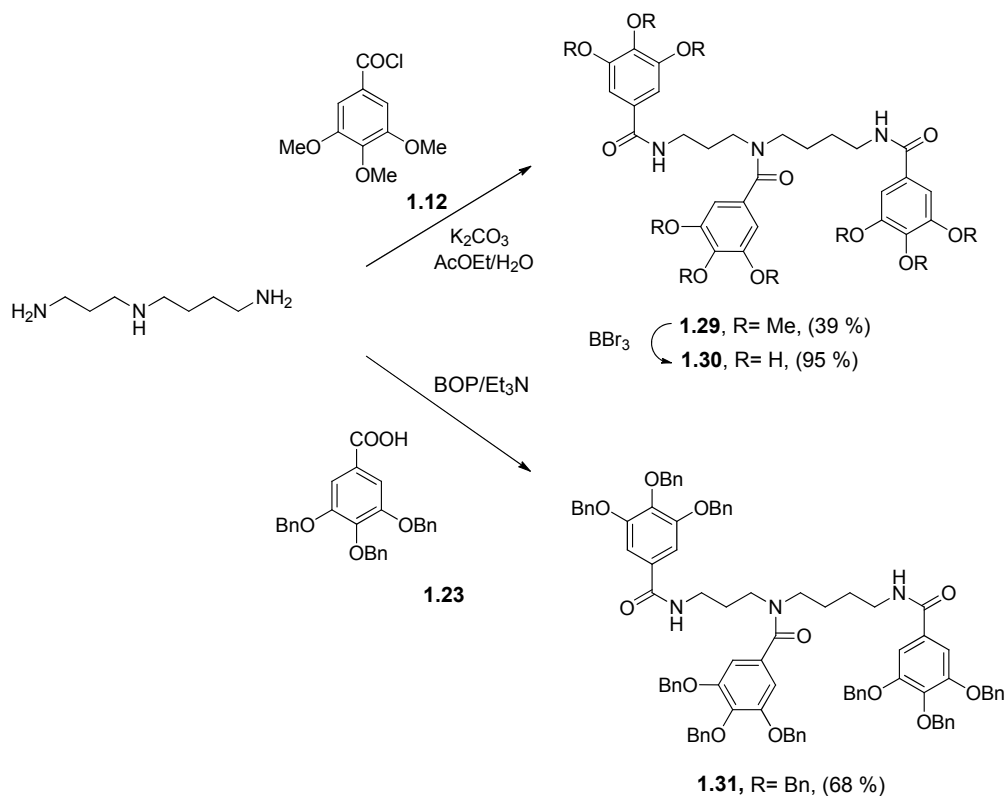
Con el fin de averiguar si la naturaleza del grupo protector de los OH fenólicos desempeñaba algún papel en la actividad de los compuestos, se sintetizaron los compuestos **1.25-1.28** (Esquema 1.8) en los que los OH estaban protegidos en forma de bencil éter en lugar de metil éter. La síntesis de dichos compuestos se llevó a cabo siguiendo el método puesto a punto para la síntesis de **1.24** mediante el acoplamiento de la correspondiente amina con el intermedio bencilado **1.23** empleando BOP como agente de acoplamiento y trietilamina como base.⁶⁴



Esquema 1.8. Síntesis de alquil amidas **1.25-1.28**

⁶⁴ Dodo, K., Minato, T. and Hashimoto, Y. Structure-activity relationship of bis-galloyl derivatives related to (-)-epigallocatechin gallate. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2009**, 57 (2), 190-194.

Para determinar si el número de grupos galoilo presentes en una molécula era un factor importante para la actividad, decidimos preparar el compuesto **1.30** (Esquema 1.9) con 3 grupos galoilo en una misma molécula y en el que los nitrógenos distales están separados por 8 átomos. La síntesis de **1.30** se llevó a cabo con un 37 % de rendimiento global por reacción de espermidina (1,8-diamino-4-azaoctano) con el cloruro del ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (**1.12**) seguido de desprotección del compuesto formado (**1.29**) en presencia de BBr₃.

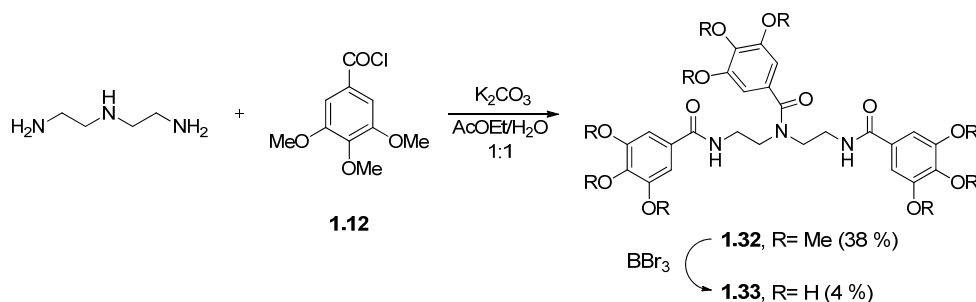


Esquema 1.9. Síntesis de los derivados de espermidina **1.29-1.31**

Con el fin de determinar el papel de los grupos protectores de los hidroxilos fenólicos en la actividad decidimos preparar el compuesto **1.31**, con los grupos hidroxilo en forma de bencil éteres. Dicho compuesto se obtuvo con un rendimiento del 68% mediante acoplamiento de espermidina con el ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23** (Esquema 1.9).

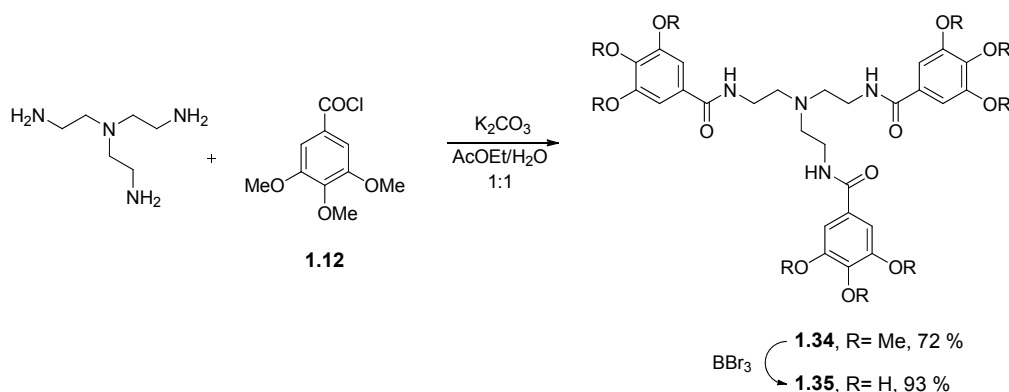
A continuación preparamos el compuesto **1.33** en el que los nitrógenos distales están separados por cinco átomos (Esquema 1.10). La síntesis de **1.33** se

llevó a cabo por reacción de la dietilentriamina con el cloruro del ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (**1.12**) seguido de desprotección del compuesto formado (**1.32**) en presencia de BBr_3 .



Esquema 1.10. Síntesis del compuesto **1.33**

Tomando como referencia el compuesto **1.33** decidimos separar el grupo galilo del nitrógeno central para lo cual preparamos el compuesto **1.35** (Esquema 1.11). La síntesis de dicho compuesto se llevó a cabo por reacción de la tris(2-aminometil)amina con el cloruro del ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (**1.12**) seguido de desprotección con BBr_3 .^{63,65,66}



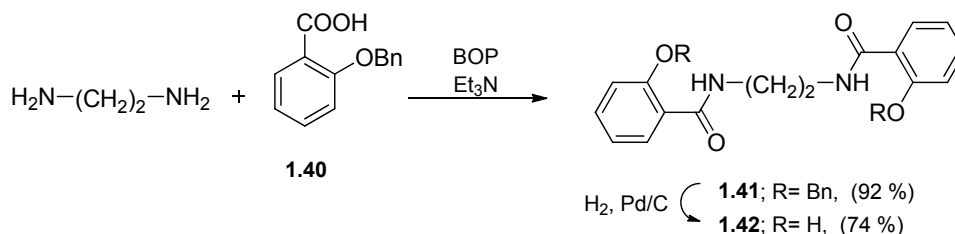
Esquema 1.11. Síntesis de **1.35**

Por último decidimos preparar el compuesto **1.37** (Esquema 1.12) con 5 grupos galilo presentes en la molécula. Para ello se hizo reaccionar la

⁶⁵ Bulls, A.R., Pippin, C.G., Hahn, F.E. and Raymond, K.N. Synthesis and characterization of a series of vanadium-tungstochromate B 1 analogs. Crystal structure of a tris(catecholamide) complex of vanadium. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (7), 2627-2632.

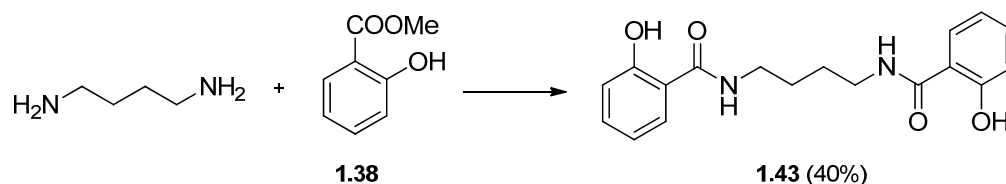
⁶⁶ a) Westra, A., Warr, R., Chartres, J., Ellis, R., Tong, C. and Bell, K. Outer-sphere coordination chemistry: Selective extraction and transport of the $[\text{PtCl}_6](2-)$ anion. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (9), 1745-1748, b) Westra, A., Bell, K., Chartres, J., Ellis, R., Tong, C. and Warr, R. Selective Extraction and Transport of the $[\text{PtCl}_6](2-)$ Anion through Outer-Sphere Coordination Chemistry. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (19), 4836-4850.

dicho compuesto mediante hidrogenación en presencia de Pd/C condujo al correspondiente derivado desprotegido **1.42** con buen rendimiento.^{67,68,69}



Esquema 1.14. Síntesis de 1.42

El compuesto **1.43**, con una cadena de 4 metilenos entre los nitrógenos distales, se obtuvo con un rendimiento del 40%, mediante un método alternativo que supuso la fusión a 130 °C de la 1,4-butilendiamina con el salicilato de metilo **1.38** (Esquema 1.15).^{68,69}



Esquema 1.15. Síntesis de 1.43

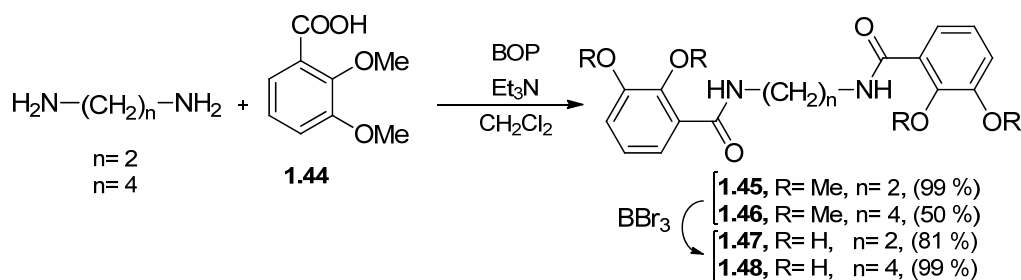
La síntesis de los derivados fenólicos con dos OH se llevó a cabo mediante reacción del ácido 2,3-dimetoxibenzoico, **1.44**, disponible comercialmente, con etilen y tetrametilen diaminas para dar los compuestos **1.45** y **1.46** respectivamente, cuyo tratamiento con tribromuro de boro condujo a los correspondientes compuestos desprotegidos **1.47** y **1.48** (Esquema 1.16). Estos compuestos fueron sintetizados

⁶⁷ Brennan, D.J., Haag, A.P., White, J.E. and Brown, C.N. High-Barrier Poly(hydroxy amide ethers): Effect of Polymer Structure on Oxygen Transmission Rates. 21. *Macromolecules* **1998**, 31 (8), 2622-2630.

⁶⁸ Daidone, G., Raffa, D., Maggio, B., Plescia, S., Matera, M. and Caruso, A. Synthesis and evaluation of the analgesic and antiinflammatory activities of N,N'-bis(2-hydroxybenzoyl)-diaminoalcanos. *Il farmaco* **1990**, 45 (3), 285-292.

⁶⁹ Bhargava, K. New Compounds-N¹,N⁸-bis(2,3-dihydroxybenzoyl)spermidine and analogs as potencial iron-chelating drugs. *J. Pharm. Sci.* **1980**, 69 (8), 986-989.

previamente por diferentes autores por su capacidad de reconocer iones cloruro,⁷⁰ hierro (III)^{69,71} y actinidos,⁷² o por su posibilidad de interactuar con los iones Mg²⁺ presentes en el centro activo de la integrasa de VIH y de este modo actuar como inhibidores de dicha enzima.⁷³



Esquema 1.16. Síntesis de alquil amidas 1.45-1.48

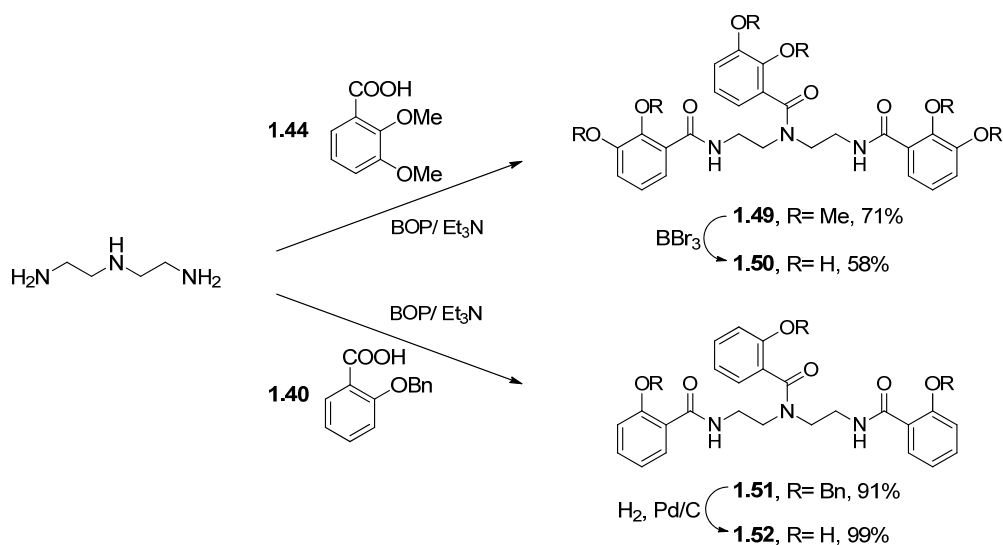
A continuación, se sintetizaron los compuestos **1.50** y **1.52** con tres residuos de dihidroxi y monohidroxibenzoilo respectivamente (Esquema 1.17). La síntesis de dichos compuestos se llevó a cabo por reacción de la dietilentriamina con tres equivalentes de los ácidos 2,3-dimetoxibenzoico (**1.44**) y 2-bencilbenzoico (**1.40**) respectivamente, seguido de desprotección con BBr₃, en el caso de **1.49**, para dar **1.50** (58%) o mediante hidrogenación catalítica, en el caso de **1.51**, para dar **1.52** (99%).

⁷⁰ Winstanley, K.J. and Smith, D.K. Ortho-Substituted Catechol Derivatives: The Effect of Intramolecular Hydrogen-Bonding Pathways on Chloride Anion Recognition. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2803-2815.

⁷¹ Stack, T. and Enemark, E. Spectral and structural characterization of two ferric coordination modes of a simple bis(catecholamide) ligand: Metal-assisted self-assembly in a siderophore analog. *Inorg. Chem.* **1996**, *35* (10), 2719-2720.

⁷² Raymond, K. and Weill, F. Specific sequestering agents for the actinides.3. Polycatecholate ligands derived from 2,3-dihydroxy-5-sulfobenzoyl conjugates of diazaalkanes and tetraazaalkanes. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (7), 2289-2293.

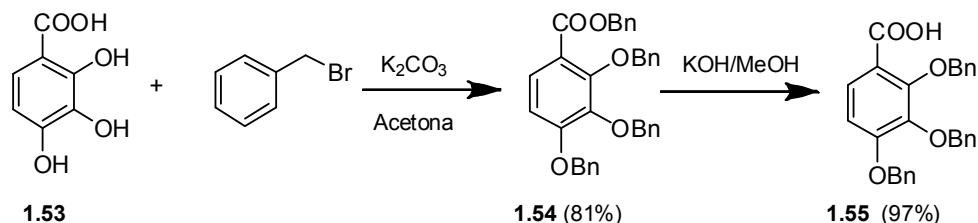
⁷³ Zhao, X.Z., Semenova, E.A., Vu, B.C., Maddali, K., Marchand, C., Hughes, S.H., Pommier, Y. and Burke, T.R. 2,3-Dihydro-6,7-dihydroxy-1H-isoindol-1-one-Based HIV-1 Integrase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 251-259.



Esquema 1.17. Síntesis de 1.49-1.52

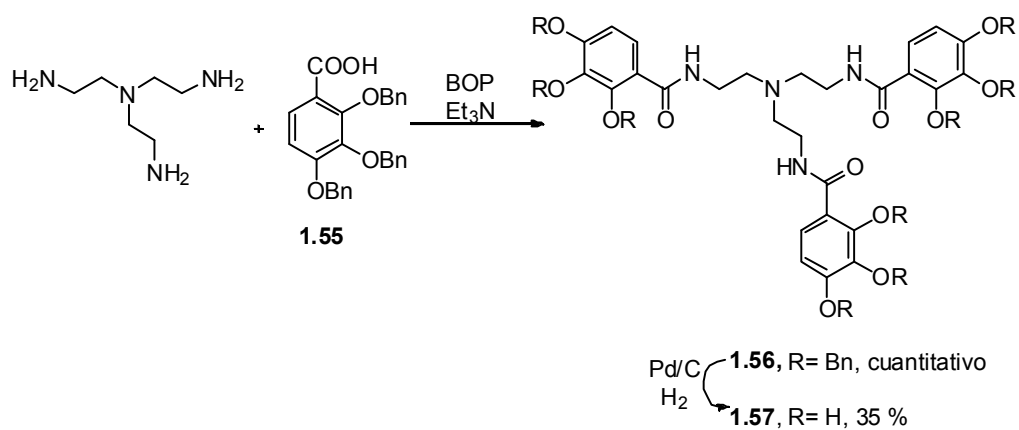
Por último, con el fin de averiguar si la posición de los grupos hidroxilo en el anillo aromático era importante para la actividad, decidimos preparar el compuesto **1.57** (Esquema 1.19) en el que tres unidades de 2,3,4-trihidroxibenzoilo están presentes y comparar su actividad con la alquilamida **1.35** (Esquema 1.11, página 38) que posee tres unidades de ácido gálico (3,4,5-trihidroxibenzoilo) en su estructura.

Para la síntesis de **1.57** fue necesario en primer lugar preparar el ácido 2,3,4-tribenciloxibenzoico **1.55** (Esquema 1.18) mediante un método similar al empleado para el ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23** (Esquema 1.5, página 35) consistente en hacer reaccionar el ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico **1.53** con bromuro de bencilo para dar el éster bencilo **1.54** cuya posterior saponificación conduce al compuesto deseado **1.55** con excelente rendimiento.



Esquema 1.18. Síntesis del ácido 2,3,4-tribenciloxibenzoico 1.55

El acoplamiento de **1.55** con tris(2-aminoetil)amina en presencia de BOP y trietilamina condujo al compuesto **1.56** cuya hidrogenación dio lugar al compuesto **1.57** con un rendimiento del 35 % (Esquema 1.19).



Esquema 1.19. Síntesis de 1.57

Actividad Antiviral

Paralelamente a la síntesis, todos los compuestos preparados dentro del presente capítulo fueron evaluados como agentes antivirales frente a la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2), en cultivo celular empleando la línea celular CEM/0, por el equipo del doctor Jan Balzarini del “Rega Institute for Medical Research” de la Universidad Católica de Lovaina.

La determinación de la actividad antiviral ha estado basada en la inhibición de la formación de sincitios o células gigantes siguiendo procedimientos descritos.⁷⁴ La actividad antiviral se expresa como CE_{50} , o concentración efectiva 50, que es la concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la formación de sincitios. Paralelamente, se ha evaluado la toxicidad de los compuestos que se expresa como CC_{50} , o concentración citotóxica 50, que es la concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la proliferación celular. El cociente entre ambos factores (CC_{50}/CE_{50}) se denomina índice de selectividad o terapéutico (IT), y da idea de la seguridad de un compuesto.

El primer dato que merece la pena destacar es que los compuestos con los OH fenólicos protegidos como éteres metílicos o bencílicos **1.13-1.16**, **1.25-1.29**, **1.31**, **1.32**, **1.36**, **1.41**, **1.45**, **1.46**, **1.49**, **1.51** y **1.56** resultaron inactivos.

Los resultados obtenidos de la evaluación de los compuestos con los OH fenólicos desprotegidos quedan recogidos en la Tabla 1.1, en la que se ha incluido la pradimicina-A (PRM-A) como compuesto de referencia.

⁷⁴ Balzarini, J., Naesens, L., Slachmuylders, J., Niphuis, H., Rosenberg, I., Holy, A., Schellenkens, H. and De Clercq, E. 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) effectively inhibits retrovirus replication in vitro and simian immunodeficiency virus-infection in rhesus-monkeys. *AIDS* **1991**, 5 (1), 21-28.

Tabla 1.1 Actividad antiviral frente a VIH-1 y VIH-2 en células CEM/0

| | CE ₅₀ (μM) | | CC ₅₀ (μM) | IT [*] |
|--------------------------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------------|
| | VIH-1 | VIH-2 | | |
| Ácido gálico, 1.1 | >50 | >50 | >250 | --- |
| 1.2 | >10 | >10 | 23 ± 0.0 | --- |
| 1.3 | >10 | >10 | 55 ± 43 | --- |
| 1.4 | 14 ± 4.9 | ≥10 | 47 ± 38 | 3.3 |
| 1.5 | 5.4 ± 0.6 | 6.6 ± 1.1 | 14.3 ± 2.6 | 2.6 |
| 1.6 | >2 | >2 | 10.6 ± 8.5 | --- |
| 1.7 | ≥ 1 | ≥ 1 | 2.8 ± 0.4 | --- |
| 1.8 | >10 | >10 | 21 ± 3.5 | --- |
| 1.9 | ≥ 10 | ≥ 10 | 22.5 ± 0.4 | --- |
| 1.10 | >10 | >10 | 12.6 ± 7.1 | --- |
| 1.11 | 4.6 ± 0.1 | > 10 | 4.7 ± 0.3 | 1.0 |
| 1.18 | 5.2 ± 0.9 | > 10 | 23 ± 1.4 | 4.4 |
| 1.19 | > 10 | > 10 | 71.8 ± 38.7 | --- |
| 1.20 | > 10 | | 51 ± 28 | --- |
| 1.21 | 19 ± 12 | 26 ± 2.1 | 58 ± 7.8 | 3.0 |
| 1.30 | 18 ± 16 | | 107 ± 0.7 | 5.9 |
| 1.33 | > 10 | > 10 | 33.9 ± 14.3 | --- |
| 1.35 | 10.0 ± 0.0 | | 54 ± 33 | 5.4 |
| 1.37 | 4.9 ± 0.6 | > 10 | 21 ± 1.4 | 4.3 |
| 1.42 | >10 | >10 | 25.0 ± 2.8 | --- |
| 1.43 | > 10 | | 35 ± 3.5 | --- |
| 1.47 | >10 | >10 | 18.6 ± 5.5 | --- |
| 1.48 | > 2 | | 5.2 ± 0.8 | --- |
| 1.50 | > 10 | > 10 | 24.3 ± 2.0 | --- |
| 1.57 | 2.5 ± 1.9 | >10 | 18 ± 9.3 | 7.2 |
| PRM-A[*] | 3.4 ± 1.3 | | > 50 | 14 |

CE₅₀: concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la formación de sincitios

CC₅₀: concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la proliferación celular

IT: relación CC₅₀/CE₅₀

Dentro del grupo de los alquil ésteres de ácido gálico, compuestos **1.2** a **1.7**, tan solo mostraron actividad el pentil (**1.4**) y el hexil (**1.5**) galato, si bien en ambos compuestos la actividad resultó próxima a la toxicidad. Los alquil diésteres, **1.8** a **1.11**, no mejoran los resultados obtenidos para los monoésteres.

Dentro del grupo de las alquil diamidas, compuestos **1.18** a **1.21**, los más activos fueron **1.18**, con un espaciador de 4 metilenos y **1.21**, con una cadena de 12 metilenos como espaciador. Sin embargo, en ellos la actividad está próxima a la toxicidad.

Dentro del grupo de compuestos con 3 ó 5 unidades de ácido gálico el más activo resultó **1.37** con 5 unidades de ácido gálico y el menos tóxico el derivado de espermidina **1.30**, con tres residuos de gálico, siendo este último compuesto el que presentó menor toxicidad de los descritos en el presente capítulo.

Los compuestos, **1.42**, **1.43**, **1.47**, **1.48** y **1.50** en los que se ha sustituido el ácido gálico por anillos aromáticos con 1 o 2 grupos hidroxilo, resultaron inactivos lo que parece indicar que es necesaria la presencia de al menos 3 OH fenólicos para la actividad.

El compuesto **1.57**, con un esqueleto de tris(2-aminoetil)amina, que presenta los grupos hidroxilo en las posiciones 2,3,4 del anillo aromático a diferencia de **1.35** que los presenta en las posiciones 3,4,5, resultó cuatro veces más activo que éste aunque algo más tóxico. El compuesto **1.57**, es el más activo de los compuestos lineales sintetizados hasta el momento mejorando incluso la actividad del compuesto de referencia, PRM-A, y el que mejor relación actividad/toxicidad presenta (IT= 7.2).

Los datos obtenidos con los compuestos incluidos en el presente capítulo indican que es necesaria la presencia de los anillos fenólicos con los OH desprotegidos para que un compuesto muestre actividad antiviral. La actividad mostrada por varios de los compuestos (**1.5**, **1.11**, **1.18**, **1.37** y **1.57**) descritos en el presente capítulo resultó similar a la de la Pradimicina A, si bien nuestros compuestos resultaron más tóxicos. Por otra parte, el ácido gálico resultó inactivo ($EC_{50} > 50 \mu M$) y poco tóxico ($CC_{50} > 250 \mu M$). Del conjunto de datos recogidos en la tabla se observa la importancia que tiene la unión de dicho residuo a un determinado esqueleto cuya arquitectura, parece contribuir a modular tanto la actividad como la toxicidad.

Para determinar si la actividad mostrada por los compuestos descritos en el presente capítulo es debida a su interacción con los carbohidratos de la glicoproteína gp120 del VIH se ensayó su afinidad por dicha glicoproteína viral mediante la técnica

Capítulo 1

de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Los resultados obtenidos serán descritos en el capítulo 4 de esta memoria.

**Capítulo 2. Compuestos polifenólicos con
mono- y disacáridos como esqueleto
central**

Antecedentes y objetivos

Los polifenoles constituyen uno de los grupos de productos naturales más numerosos y abundantes en el reino vegetal, con más de ocho mil estructuras conocidas.⁷⁵ Proviene del metabolismo secundario de las plantas y su estructura puede variar desde moléculas sencillas, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos con alto grado de polimerización.

Tradicionalmente los polifenoles se han empleado para el proceso de curtido o conversión de las pieles de animales en cuero, proceso que data de al menos 2000 años atrás. De ahí deriva precisamente el término tanino (“tanning” del inglés) con el que también se denomina a este grupo de moléculas.⁷⁶ Esta propiedad se debe a la capacidad de los taninos para establecer enlaces entre las fibras de colágeno de la piel, lo que le confiere resistencia al agua, al calor y a la abrasión. La capacidad de formar complejos con macromoléculas explica otra de las propiedades de los taninos como es la astringencia, al precipitar las glicoproteínas ricas en prolina que contiene la saliva.⁷⁷

Los taninos o polifenoles además de para el curtido de pieles se han empleado en la industria del vino, del té y del cacao. Más recientemente dichos compuestos se han identificado como el principio activo responsable de la acción curativa de muchas de las hierbas tradicionales que forman parte de la medicina popular ya que poseen numerosos efectos biológicos.⁷⁸ Entre ellos destaca su gran

⁷⁵ Harbone, J., 1980. Plant polyphenolics. Bell, E., Charlwood, B. Encyclopedia of Plant Physiology. Berlin Heidelberg New York. 329-395

⁷⁶ Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A.-M. and Saura-Calixto, F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53 Suppl 2*, S310-329.

⁷⁷ Sarni-Manchado, P., Canals-Bosch, J.-M., Mazerolles, G. and Cheyrier, V. Influence of the Glycosylation of Human Salivary Proline-Rich Proteins on Their Interactions with Condensed Tannins. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9563-9569.

⁷⁸ a) Haslam, E., *Plant polyphenols: vegetable tannins revisited*. London, 1989, b) Haslam, E., Lilley, T., Cai, Y., Martin, R. and Magnolato, D. Traditional herbal medicines- The role of polyphenols. *Planta Med.* **1989**, (1), 1-8, c) Haslam, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59* (2), 205-215, d) Haslam, E., *Practical*

capacidad anti-oxidante, propiedad de la que se derivan sus efectos beneficiosos para el corazón⁷⁹ y su capacidad de prevenir el envejecimiento y el cáncer de piel.⁸⁰

Asimismo, los polifenoles previenen el crecimiento de tumores⁸¹ y la angiogénesis, y además, actúan como antivirales,⁸² antidiabéticos,⁸³ antifúngicos y antibacterianos.⁸⁴ Además actúan como inhibidores de distintos tipos de enzimas⁸⁵ y de agentes hepatoprotectores.⁸⁶

En la mayoría de los casos los mecanismos por los cuales dichos compuestos ejercen su acción antiviral o antibacteriana no han sido determinados, aunque sí parece claro que inhiben el proceso de entrada interaccionando con las

polyphenols: From structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press: 1998.

⁷⁹ a) Velayutham, P., Babu, A. and Liu, D. Green tea catechins and cardiovascular health: An update. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15* (18), 1840-1850, b) Rasmussen, S., Frederiksen, H., Krogholm, K. and Poulsen, L. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49* (2), 159-174.

⁸⁰ Siddiqui, I., Tarapore, R. and Mukhtar, H. Prevention of skin cancer by green tea Past, present and future. *Cancer Biol. Ther.* **2009**, *8* (13), 1288-1291.

⁸¹ Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C., Reed, J. and Mukhtar, H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int. J. Cancer* **2005**, *113* (3), 423-433.

⁸² Ehrhardt, C.C., Hrinčius, E.R.E.R., Korte, V.V., Mazur, I.I., Droebner, K.K., Poetter, A.A., Dreschers, S.S., Schmolke, M.M. and Planz, O. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res.* **2007**, *76* (1), 38.

⁸³ Broadhurst, C., Polansky, M. and Anderson, R. Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (3), 849-852.

⁸⁴ a) Scalbert, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **1991**, *30* (12), 3875-3883, b) Chung, K., Stevens, S., Lin, W. and Wei, C. Growth-inhibition of selected food-borne bacteria by tannic-acid, propyl gallate and related-compounds. *Lett. Appl. Microbiol.* **1993**, *17* (1), 29-32, c) Nohynek, L., Alakomi, H., Kahkonen, M., Heinonen, M., Helander, K. and Oksman-Caldentey, K. Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutr. Cancer* **2006**, *54* (1), 18-32, d) Buzzini, P., Arapitsas, P., Goretti, M., Branda, E., Turchetti, B., Pinelli, P., Ieri, F. and Romani, A. Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2008**, *8* (12), 1179-1187, e) Engels, C., Knodler, M., Zhao, Y., Carle, R., Ganzle, M. and Schieber, A. Antimicrobial Activity of Gallotannins Isolated from Mango (*Mangifera indica* L.) Kernels. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (17), 7712-7718.

⁸⁵ a) Kakiuchi, N., Kusumoto, I., Hattori, M., Namba, T., Hatano, T. and Okuda, T. Effect of condensed tannins and related-compounds on reverse-transcriptase. *Phytother. Res.* **1991**, *5* (6), 270-272, b) Kilkuskie, R., Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Bodner, A. and Cheng, Y. Anti-AIDS agents.8. HIV and reverse-transcriptase inhibition by tannins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2* (12), 1529-1534, c) Notka, F., Meier, G.R. and Wagner, R. Inhibition of wild-type human immunodeficiency virus and reverse transcriptase inhibitor-resistant variants by *Phyllanthus amarus*. *Antiviral Res.* **2003**, *58* (2), 175-186.

⁸⁶ Kim, Y., An, R., Yoon, N., Nam, T. and Choi, J. Hepatoprotective constituents of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Arch. Pharmacol. Res.* **2005**, *28* (12), 1376-1380.

paredes de virus o bacterias y sobre todo con proteínas específicas situadas en su membrana.^{85c}

Los polifenoles naturales se pueden clasificar en tres grandes grupos atendiendo a su estructura: 1) taninos hidrolizables o pirogálicos, 2) taninos condensados o proantocianidinas y 3) florotaninos.^{87,88}

Los taninos hidrolizables poseen como unidad monomérica fundamental el ácido gálico que se une a un azúcar (generalmente glucosa) o a un polialcohol. Un representante de este tipo de compuestos es el ácido tánico (Figura 2.1).

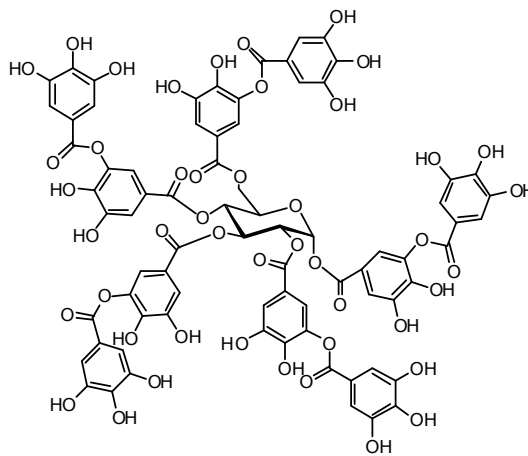


Figura 2.1. Estructura del Ácido Tánico

Los taninos condensados se basan en el esqueleto de flavan-3-ol **2.A** (Figura 2.2) mientras que los florotaninos están constituidos por unidades de floriglucinol **2.B** (Figura 2.2) ligadas por enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno.

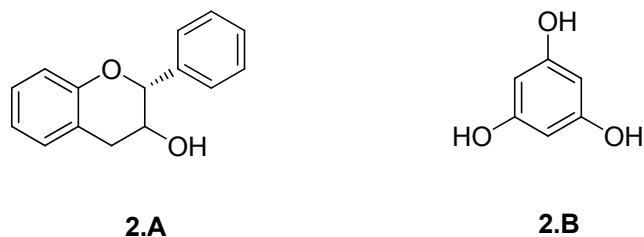


Figura 2.2. Estructura de flavan-3-ol (2.A), y floriglucinol (2.B)

⁸⁷ Quideau, S. and Feldman, K.S. Ellagitannin Chemistry. *Chem. Rev.* **1996**, 96 (1), 475-504.

⁸⁸ Tannin Handbook; <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>

En lo que se refiere a sus propiedades antivirales se ha observado actividad antiherpética en los taninos hidrolizables, siendo ésta dependiente del número de grupos galilo, mientras que la de los taninos condensados parece depender de su grado de condensación.⁸⁹ Diversos autores han sugerido que la actividad antiherpética de los taninos es debida a su interferencia con la adsorción del virus a la célula, lo que ha sido demostrado utilizando partículas virales marcadas.⁹⁰

Por otra parte, en un estudio llevado a cabo en 1979, se demostró que el ácido tánico (Figura 2.1) inhibe la replicación del virus RNA Chikungunya, debido a su interacción con algunas de las proteínas de su cubierta.⁹¹

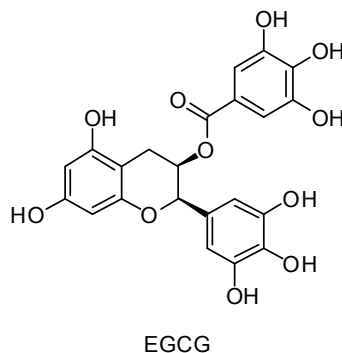


Figura 2.3. Estructura de galato de epigalocatequina (EGCC)

Finalmente, se ha descrito que el tanino condensado galato de epigalocatequina (EGCG) (Figura 2.3), el mayor componente del té verde, inhibe de manera significativa la replicación del VIH-1. Se han sugerido varios mecanismos para explicar la actividad antiviral de dicho compuesto, entre ellos, la destrucción de la partícula viral, la inhibición de la enzima viral transcriptasa inversa o el bloqueo de la unión de la glicoproteína viral gp120 al receptor celular CD4. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que actúa dicho polifenol está aún por determinar.^{92,93,94}

⁸⁹ Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, M., Nonaka, G. and Nishioka, I. Structure and antiherpetic activity among the Tannins. *Phytochemistry* **1985**, *24* (10), 2245-2250.

⁹⁰ Fukuchi, K., Sakagami, H., Okuda, T., Hatano, T., Tanuma, S. and Kitajima, K. Inhibition of herpes-simplex virus-infection by tannins and related-compounds. *Antiviral Res.* **1989**, *11* (5-6), 285-297.

⁹¹ Konishi, E. and Hotta, S. Effects of tannic-acid and its related compounds upon Chikungunya virus. *Microbiol. Immunol.* **1979**, *23* (7), 659-667.

⁹² Yamaguchi, K., Honda, M., Ikigai, H., Hara, Y. and Shimamura, T. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Res.* **2002**, *53* (1), 19-34.

Una observación común a todos los trabajos publicados hasta el momento sobre la actividad biológica de los polifenoles es que los anillos fenólicos presentes en ellos son los responsables, en la mayoría de los casos, de su actividad biológica y de algunas de las propiedades más importantes de dichos compuestos como es su capacidad para formar complejos con iones metálicos, atrapar radicales libres y formar complejos con algunas macromoléculas especialmente proteínas y en menor medida polisacáridos.^{78c,95}

En el presente capítulo nos proponemos en primer lugar la preparación de compuestos de fórmulas generales **2.C** y **2.D** (Figura 2.4), en los que a un monosacárido, que actúa como núcleo central se le unirán 4 o 5 residuos de galoilo (3,4,5-trihidroxibenzoilo).

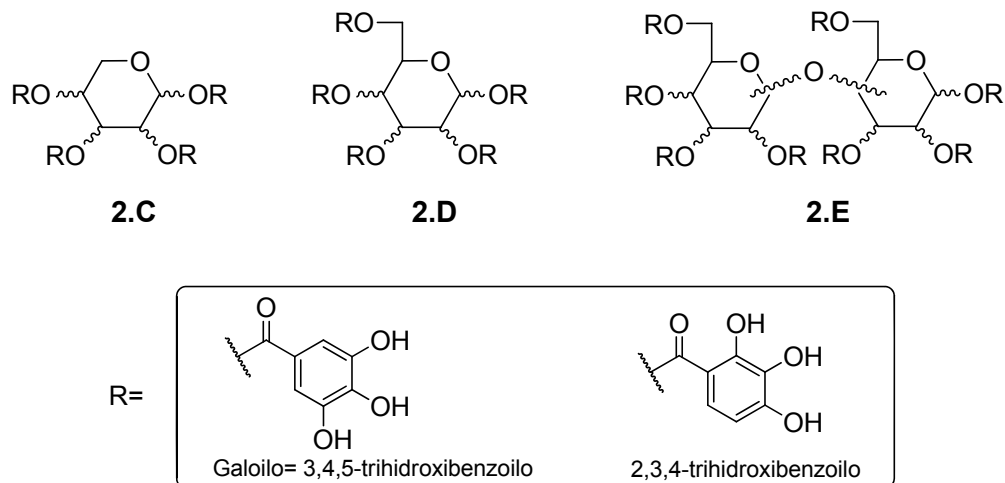


Figura 2.4. Estructuras generales de los compuestos descritos en el Capítulo 2

Con el fin de estudiar la dependencia en la actividad de la orientación espacial de los grupos galoilo preparamos compuestos en los que el anillo central es un residuo de glucosa, manosa, ribosa o galactosa. Con el fin de aumentar el número de residuos de polifenol en una misma molécula decidimos también sintetizar

⁹³ Kawai, K., Tsuno, N., Kitayama, J., Okaji, Y., Yazawa, K. and Asakage, M. Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, 112 (5), 951-957.

⁹⁴ Fassina, G., Buffa, A., Benelli, R., Varnier, O., Noonan, D. and Albini, A. Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea as a candidate anti-HIV agent. *AIDS* **2002**, 16 (6), 939-941.

⁹⁵ De Bruyne, T., Pieters, L., Deelstra, H. and Vlietinck, A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, 27 (4), 445-459.

compuestos de fórmula general **2.E** en los que el núcleo central es un disacárido (maltosa o trehalosa) al que se le unirán 8 residuos de galoilo. Por último, con el fin de determinar la dependencia en la actividad de la posición de los OH fenólicos preparamos también compuestos en los que al azúcar central se le unieron residuos de 2,3,4-trihidroxibenzoilo en lugar de galoilo (3,4,5-trihidroxibenzoilo).

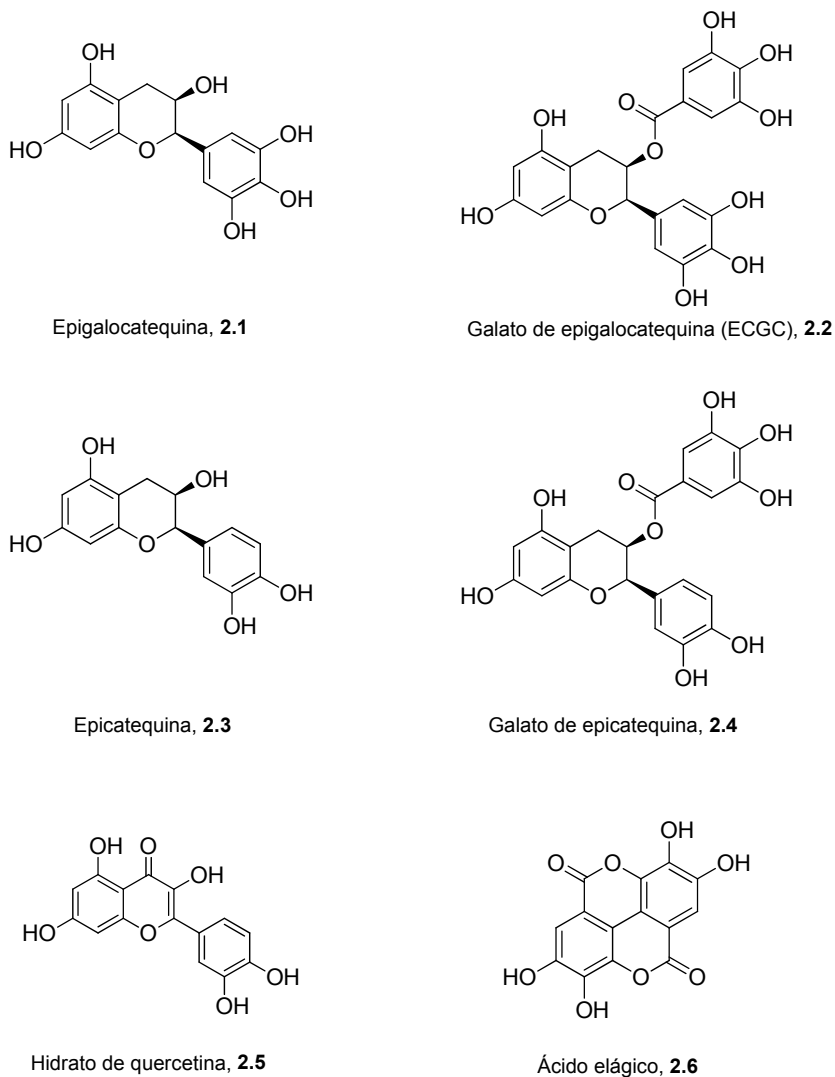


Figura 2.5. Estructura de los taninos condensados comerciales ensayados frente a VIH

Además, con fines comparativos, se ha evaluado la actividad antiviral de un tanino hidrolizable comercial como es el ácido tánico (Figura 2.1) y la de los taninos condensados comerciales representados en la Figura 2.5: epigallocatequina (**2.1**),

galato de epigalocatequina (ECGC, **2.2**), epicatequina (**2.3**), galato de epicatequina (**2.4**), hidrato de quercetina (**2.5**) y ácido elágico (**2.6**)

Resultados y discusión

Síntesis

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo los taninos o polifenoles, y entre ellos los taninos hidrolizables, poseen una gran variedad de efectos beneficiosos para la salud y se han identificado como el principio activo responsable de la acción curativa de muchos de los remedios tradicionales que forman parte de la medicina popular.^{78b,96} Uno de los taninos hidrolizables más representativos es la penta-O-galoil-D-glucopiranososa de ahí que la síntesis de dicho compuesto se pusiese a punto hace ya algunos años.⁹⁷ En el año 2006, durante el transcurso de esta Tesis doctoral, apareció publicado un trabajo⁹⁸ en el que se estudiaba la actividad antidiabética de dicho compuesto así como la de los galoil derivados de manosa, ribosa y galactosa.

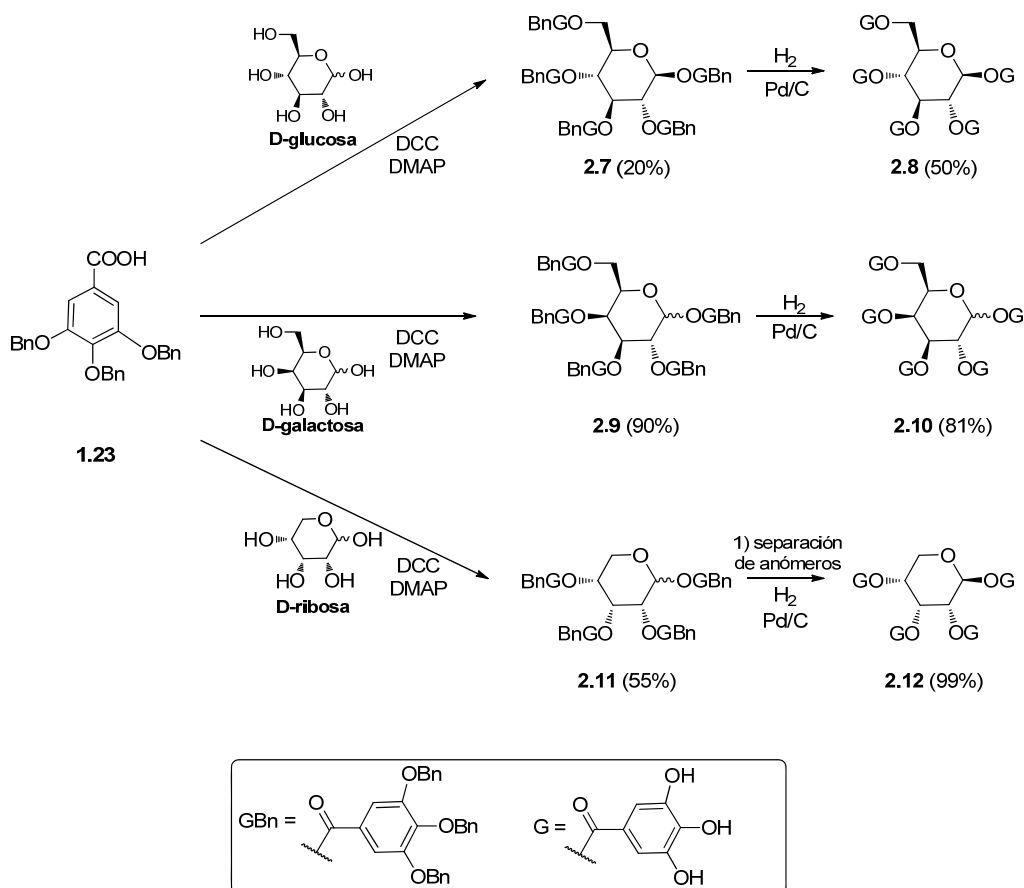
En el presente capítulo hemos llevado a cabo la síntesis de la penta-O-galoil-D-glucopiranososa así como la de análogos de dicho compuesto en los que la glucosa se sustituyó por otros mono- y disacáridos sustituidos con grupos galoilo y 2,3,4-trihidroxibenzoilo con el fin de determinar los requisitos estructurales necesarios para la actividad antiviral. Para la síntesis de dichos compuestos no es posible utilizar fenoles con los OH en forma de metil éteres ya que el tratamiento con BBr₃ conduciría a la ruptura de los enlaces de tipo éster que unen el esqueleto central (azúcar) a los polifenoles.⁹⁷

⁹⁶ a) Okuda, T., Yoshida, T. and Hatano, T. Ellagitannins as active constituents of medicinal-plants. *Planta Med.* **1989**, (2), 117-122, b) Hattori, M., Hada, S., Watahiki, A., Ihara, H., Shu, Y. and Kakiuchi, N. Studies on dental-caries prevention by traditional medicines. 10. Antibacterial action of polyphenolic components from mace against streptococcus-mutants. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1986**, 34 (9), 3885-3893.

⁹⁷ Khanbabaee, K. and Lötzerich, K. Efficient Total Synthesis of the Natural Products 2,3,4,6-Tetra-O-galloyl-D-glucopyranose, 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-b-D-glucopyranose and the Unnatural 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-a-D-glucopyranose. *Tetrahedron* **1997**, 53 (31), 10725-10732.

⁹⁸ Ren, Y., Himmeldirk, K. and Chen, X. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Antidiabetic Penta-O-galloyl-D-glucopyranose and Its Analogues. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (9), 2829-2837.

En primer lugar, llevamos a cabo la síntesis de los galoil monosacáridos mediante acoplamiento del correspondiente azúcar con el derivado de ácido gálico (**1.23**)⁶³ con los OHs en forma de bencil éter y posterior hidrogenación (Esquema 2.1).



Esquema 2.1. Síntesis de 2.7-2.12

Los monosacáridos comerciales (D-glucosa, D-galactosa y D-ribosa) se hicieron reaccionar con el ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico (**1.23**)⁶³ en presencia de dicitohexilcarbodiimida (DCC) como agente de acoplamiento y *N,N*-(dimetilamino)piridina (DMAP) para obtener los correspondientes derivados protegidos **2.7**,^{97,98} **2.9**⁹⁸ y **2.11**⁹⁸ como mezcla de anómeros α y β (Esquema 2.1). Las condiciones básicas empleadas en la reacción conducen inevitablemente a epimerización en la posición C-1 del anillo de azúcar, siendo el grado de epimerización dependiente de las condiciones de reacción y la composición anomérica del azúcar de partida. Para la glucosa y la ribosa la proporción del

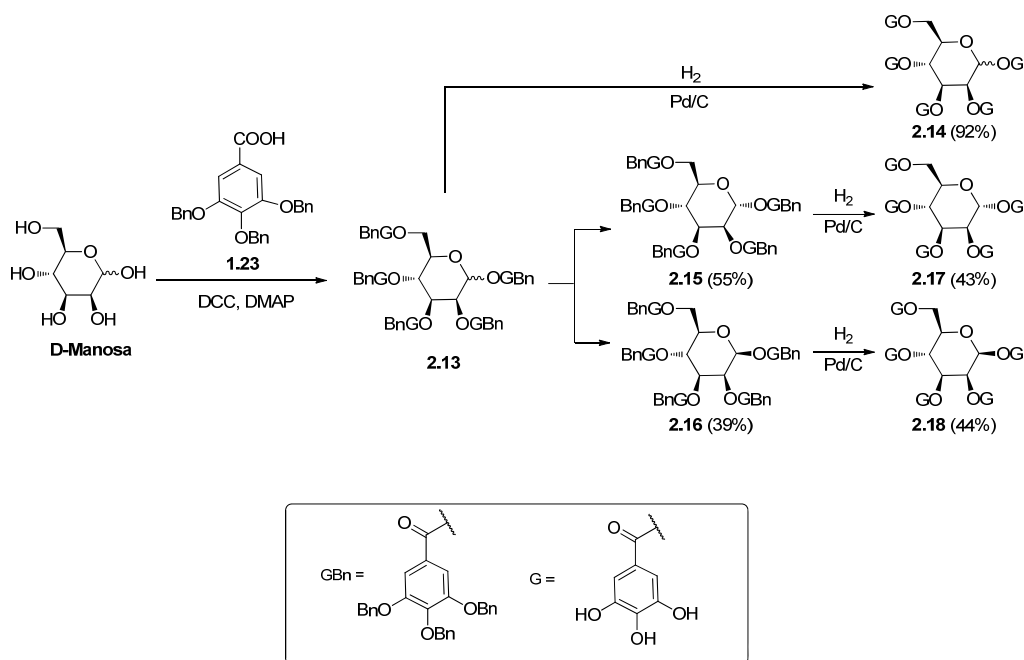
anómero β fue mucho mayor que la del anómero α , obtenido en cantidad prácticamente inapreciable. La separación de los anómeros α y β se llevó a cabo mediante cromatografía en columna empleando como eluyente diclorometano/tolueno/acetato de etilo para el derivado de glucosa **2.7** y diclorometano/metanol para el de ribosa **2.11**.

La configuración anomérica de los compuestos obtenidos se asignó mediante $^1\text{H-RMN}$ en base al desplazamiento químico del protón H-1 y la constante de acoplamiento, $J_{1,2}$. Así, la señal del H-1 del anómero α aparece en todos los casos ligeramente desapantallada (6.6-6.8 ppm) con respecto a la del anómero β (6.3-6.4 ppm). El valor de la constante de acoplamiento $J_{1,2} < 4$ Hz para el anómero α indica una relación ecuatorial-axial entre los protones H-1 y H-2, mientras que para el anómero β el valor de la constante de acoplamiento es $J_{1,2} \approx 8$ Hz lo que demuestra una disposición trans-diaxial para H-1 y H-2. Los derivados bencilados **2.7** β , **2.9** y **2.11** β se desprotegeron en condiciones de hidrogenación obteniéndose los correspondientes derivados desprotegidos de glucosa **2.8**,^{97,98} galactosa **2.10**⁹⁸ y ribosa **2.12**⁹⁸ (Esquema 2.1) con 5 unidades galoilo en los dos primeros y 4 en el tercero.

Quando las reacciones de hidrogenación se realizaron en THF como único disolvente, tal y como se describe en la literatura,⁹⁸ precipitaron compuestos parcialmente protegidos que ya no evolucionan hacia los compuestos totalmente desprotegidos, por lo que se obtuvieron mezclas complejas de difícil separación. Para mejorar el método descrito decidimos emplear como disolvente una mezcla de THF/metanol (1:1). De esta manera fue posible tener siempre en disolución los compuestos de partida, los intermedios y los productos finales, obteniéndose los compuestos deseados puros después de una simple filtración y sin necesidad de posteriores purificaciones cromatográficas.

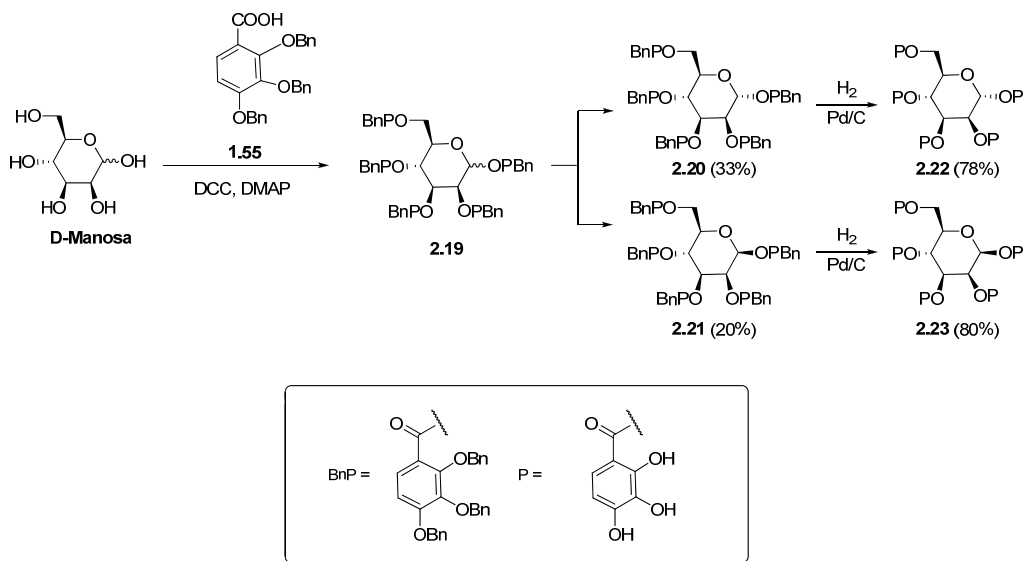
Siguiendo el mismo procedimiento de acoplamiento descrito, se hizo reaccionar la D-manosa con el derivado de gálico **1.23**⁶³ en presencia de DCC y DMAP obteniéndose la mezcla anomérica **2.13**⁹⁸ que tras desprotección en condiciones de hidrogenación condujo a la mezcla anomérica **2.14** con un 92 % de rendimiento (Esquema 2.2). Con el fin de ensayar los anómeros α y β individualmente, se llevó a cabo la separación de la mezcla anomérica **2.13** mediante cromatografía en columna de gel de sílice, usando como eluyente diclorometano/tolueno/acetato de etilo, obteniéndose los anómeros α (**2.15**)⁹⁸ y β

(**2.16**)⁹⁸ con un 55% y 39% de rendimiento, respectivamente. La hidrogenolisis de **2.15** y **2.16** condujo a los anómeros α (**2.17**)⁹⁸ y β (**2.18**)⁹⁸, respectivamente.



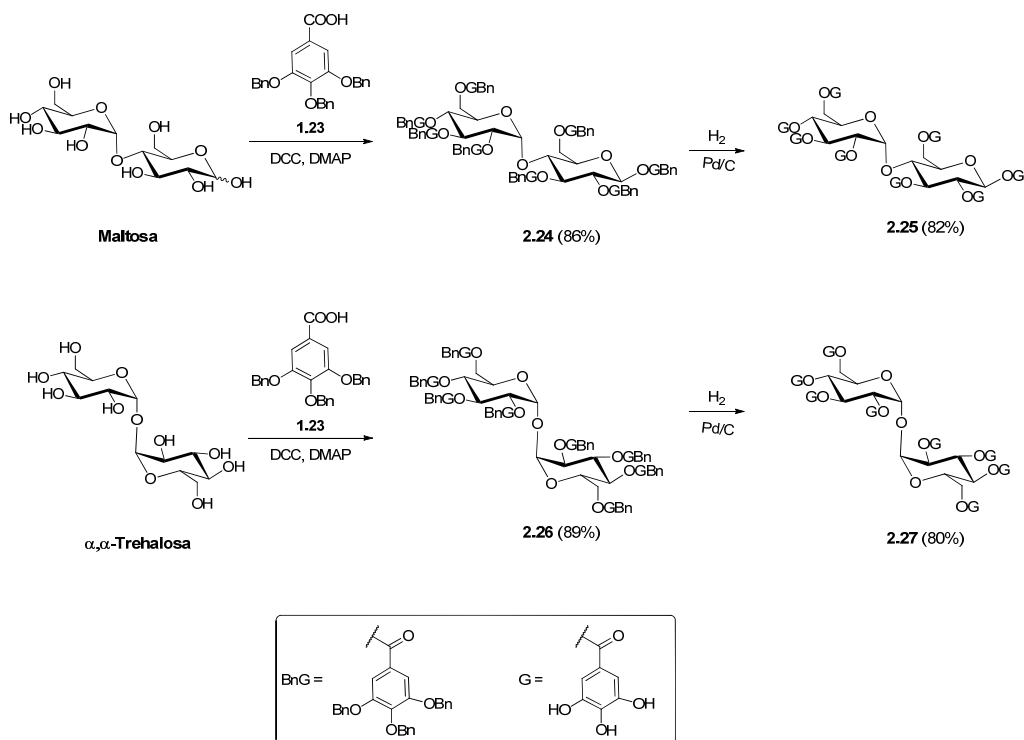
Esquema 2.2. Síntesis de derivados de manosa **2.14-2.18**

Con el fin de averiguar si la posición de los grupos hidroxilo en el anillo aromático era importante para la actividad, decidimos preparar los análogos **2.22** y **2.23** (Esquema 2.3) de los derivados de manosa **2.17** y **2.18** donde los cinco residuos galilo han sido sustituidos por cinco unidades de 2,3,4-trihidroxibenzoilo. Para ello se hizo reaccionar D-manosa con el ácido 2,3,4-tribenciloxibenzoico **1.55**, obteniéndose la mezcla de anómeros **2.19** que fue separada por cromatografía en columna de gel de sílice para dar los anómeros α (**2.20**) y β (**2.21**) cuya hidrogenación condujo a los compuestos desprotegidos **2.22** (26%) y **2.23** (16%) respectivamente.



Esquema 2.3. Síntesis de derivados de manosa 2.20-2.23

Por último, con el fin de aumentar el número de residuos de polifenol en una misma molécula decidimos preparar los derivados de maltosa **2.25** y trehalosa **2.27** con 8 unidades de galilo (Esquema 2.4). Ambos compuestos se obtuvieron por reacción de los disacáridos comerciales maltosa (α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranososa) y α,α -trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido) con el ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23**,⁶³ en las mismas condiciones de acoplamiento empleadas para los monosacáridos, obteniéndose el anómero β de maltosa **2.24** y el compuesto derivado de α,α -trehalosa **2.26**, respectivamente, cuya hidrogenolisis condujo a los compuestos desprotegidos **2.25** y **2.27** con un rendimiento de 82% y 80%, respectivamente.



Esquema 2.4. Síntesis de derivados de maltosa y trehalosa 2.24-2.27

Actividad antiviral

Los compuestos cuya síntesis se describe en el presente capítulo, así como el ácido tánico y los taninos condensados adquiridos comercialmente, fueron evaluados como agentes antivirales frente a la replicación del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH-1 y VIH-2) en cultivo celular empleando las líneas celulares CEM/0 y MT-4 de forma análoga a la mencionada en el correspondiente apartado de actividad antiviral del capítulo 1 de esta Memoria.⁷⁴

Los compuestos con los OH fenólicos protegidos como éteres bencílicos **2.7**, **2.9**, **2.11**, **2.14**, **2.15**, **2.19**, **2.20**, **2.23** y **2.24** resultaron inactivos. Este dato pone nuevamente de manifiesto que la presencia de OH fenólicos es crítica para la actividad.

Los resultados de la evaluación biológica de los compuestos con los OH fenólicos desprotegidos quedan recogidos en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Actividad antiviral frente a VIH-1 y VIH-2 en células CEM/0

| | Esqueleto | CE ₅₀ (μM) | | CC ₅₀ (μM) | IT |
|-------------------------|------------------------|-----------------------|-------------|-----------------------|------|
| | | VIH-1 | VIH-2 | | |
| 2.1 | Flavanol | > 50 | > 50 | --- | --- |
| 2.2 | Flavanol | > 10 | > 10 | --- | --- |
| 2.3 | Flavanol | > 250 | > 250 | > 250 | --- |
| 2.4 | Flavanol | > 50 | > 50 | 104 ± 12.3 | --- |
| 2.5 | --- | > 50 | > 50 | 120 ± 55.1 | --- |
| 2.6 | --- | > 250 | > 250 | > 250 | --- |
| Ácido tánico | α y β- Glucosa | 4.8 ± 1.3 | ≥ 10 | 19.9 ± 4.9 | 4.1 |
| 2.8 | β-Glucosa | 7.67 ± 4.04 | > 10 | 22.9 ± 0.35 | 3.0 |
| 2.10 | α y β-Galactosa | > 10 | > 10 | 10.8 ± 2.0 | --- |
| 2.12 | β-Ribosa | 50.0 ± 0.0 | 37.5 ± 17.7 | 92.5 ± 9.8 | 1.8 |
| 2.14 | α y β-Manosa | 20.0 ± 7.1 | 32.5 ± 24.7 | 73.8 ± 15.3 | 3.6 |
| 2.17 | α-Manosa | 7.7 ± 3.3 | ≥ 10 | 25 ± 1.4 | 3.2 |
| 2.18 | β-Manosa | > 10 | > 10 | 27 ± 2.8 | --- |
| 2.22^a | α-Manosa | 7.3 ± 3.9 | ≥ 10 | 22 ± 2.1 | 3.0 |
| 2.23^a | β-Manosa | > 10 | > 10 | 22 ± 0.71 | --- |
| 2.25 | β-Maltosa | 3.1 ± 1.6 | 7.9 ± 3.0 | 27 ± 0.0 | 8.7 |
| 2.27 | Trehalosa | 5.9 ± 3.6 | > 10 | 72 ± 3.5 | 12.2 |
| PRM-A | | 3.4 ± 1.3 | | > 50 | 14.7 |

CE₅₀: concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la formación de sincitios

CC₅₀: concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la proliferación celular

IT: relación CC₅₀/CE₅₀

^a manosa sustituida con 2,3,4-trihidroxibenzoilo

Los taninos condensados comerciales **2.1** a **2.6** (Figura 2.5, página 56) que poseen una estructura en la que los residuos de polifenol están unidos a un núcleo central de flavan-3-ol, o similar, y no a un esqueleto de azúcar, no mostraron actividad y tampoco resultaron tóxicos. Sin embargo, el ácido tánico comercial en el que varios residuos polifenólicos se unen a una glucosa central resultó moderadamente activo aunque tóxico. Este dato parece indicar que es necesaria la presencia de un azúcar

como esqueleto central para distribuir los grupos polifenólicos adecuadamente en el espacio.

Con el fin de determinar el papel que desempeña la orientación espacial de los grupos galoilo en la actividad se ensayaron los derivados **2.8**, **2.10**, **2.12**, **2.14**, **2.17**, **2.18**, **2.22** y **2.23** con diferentes monosacáridos como núcleo central. El hecho de que el derivado de β -glucosa (**2.8**) fuese activo y el de β -manosa (**2.18**) resultase inactivo parece indicar que la disposición ecuatorial del C-2 es la más adecuada para la actividad.

En cuanto al efecto de la configuración anomérica en la actividad se observa que en el caso de manosa el anómero α es activo mientras que el β es inactivo. Estos resultados parecen indicar que pequeñas diferencias estructurales en la distribución espacial de los grupos fenólicos tienen repercusión en la actividad.

Los anómeros β de manosa **2.18** y **2.23** sustituidos con residuos de 3,4,5 y 2,3,4-trihidroxibenzoilo resultaron inactivos. Sin embargo los derivados de α -manosa **2.17** y **2.22** que presentan en su estructura residuos de 3,4,5 y 2,3,4-trihidroxibenzoilo respectivamente presentaron similar actividad y toxicidad. De estos datos se podría concluir que la posición de los OH fenólicos no parece ser importante para la actividad.

Los derivados **2.25** y **2.27** con un disacárido, β -maltosa y α,α -trehalosa respectivamente, como esqueleto central resultaron ligeramente más activos que los derivados con un monosacárido como esqueleto central. Este hecho podría deberse a la presencia de un mayor número de grupos polifenólicos o a que el disacárido es capaz de orientar en el espacio los grupos polifenólicos de manera más eficaz que el monosacárido.

El derivado de α,α -trehalosa **2.27**, con un índice terapéutico de 12.2, resultó ser el compuesto con mejor perfil actividad antiviral/toxicidad de los descritos en el presente capítulo. Además, y teniendo en cuenta que el índice terapéutico de **2.27** es mayor de 10, consideramos que dicho compuesto es el primero de los descritos hasta el momento con actividad antiviral significativa.

Estudio mediante RMN de la interacción de penta-O-galoi-D-gluco- (2.8) y D-manopiranososa (2.14, 2.17 y 2.18) con carbohidratos

La Resonancia Magnética Nuclear resulta una técnica idónea para analizar interacciones intermoleculares, ya que diversos parámetros de la RMN se modifican sustancialmente cuando una molécula dada (un ligando) interacciona con otra (un receptor). En particular la RMN ha sido una de las técnicas más utilizadas para el estudio de las interacciones de receptores sintéticos con carbohidratos y en la literatura hay abundantes ejemplos de ello.^{44,49-51,99}

Para detectar la existencia de interacción molecular, en el trabajo descrito en el presente apartado nos hemos basado en la observación de la perturbación de desplazamientos químicos (δ). Brevemente, este método consiste en monitorizar el desplazamiento químico que experimentan las señales de un determinado compuesto frente a la presencia de potenciales ligandos. La mera existencia de variaciones de δ es ya un indicio de la existencia de interacción y además si las señales han sido asignadas será posible conocer los residuos implicados en ella.¹⁰⁰

En concreto se pretende determinar mediante RMN si existe interacción entre los compuestos sintetizados y los oligosacáridos de la cubierta del VIH. Dada la dificultad que supone esta tarea por la complejidad estructural de dichos oligosacáridos, decidimos emplear una primera aproximación que consistió en averiguar si los compuestos sintetizados eran capaces de interactuar con carbohidratos sencillos algunos de los cuales forman parte de los oligosacáridos presentes en la cubierta del VIH.

El estudio de RMN se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Jesús Jiménez Barbero del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC.

El estudio de la interacción de los compuestos **2.8**, **2.10**, **2.14**, **2.17** y **2.18** (Figura 2.6) con carbohidratos se abordó mediante la observación de la perturbación del desplazamiento químico que experimentaban las señales de dichos compuestos en presencia de una colección de potenciales ligandos.

⁹⁹ Kogelberg, H., Solis, D. and Jimenez-Barbero, J. New structural insights into carbohydrate-protein interactions from NMR spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13 (5), 646-653.

¹⁰⁰ Jimenez-Barbero, J. Aplicaciones de la RMN al estudio de interacciones entre moléculas. *An. Quim.* **2003**, 99 (2), 115-125.

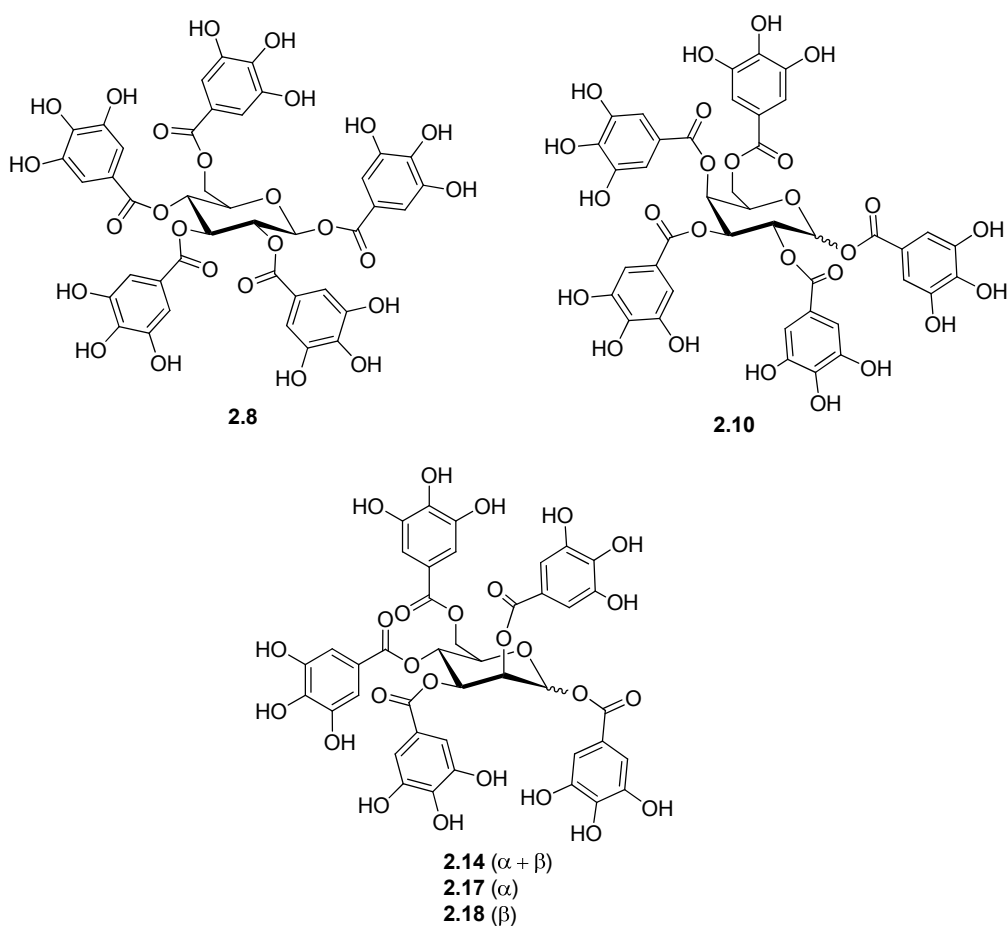


Figura 2.6. Estructuras de los compuestos 2.8, 2.10, 2.14, 2.17 y 2.18

En el estudio se empleó agua deuterada como disolvente, para poder simular en la medida de lo posible las condiciones del medio fisiológico. Es preciso recordar que hasta el momento se han descrito numerosos receptores sintéticos capaces de reconocer carbohidratos en disolventes orgánicos⁴⁴ sin embargo son escasos los que lo hacen en agua.

El experimento se puso a punto en primer lugar para el derivado de glucosa **2.8** y seguidamente se extendió a los derivados de galactosa **2.10** y manosa **2.14**. Desde el punto de vista experimental, se realizan varios experimentos. Primero uno de control en el que el tubo de RMN solamente contiene el compuesto **2.8** disuelto en agua en una concentración 0.5 mM y se registra su espectro de ¹H-RMN. A continuación, se van añadiendo los azúcares en estudio de tal manera que la

disolución final siempre tiene un exceso de azúcar (relación molar final **2.8**/azúcar, 1:20). En el caso de que alguno de los azúcares añadidos mostrase afinidad por **2.8** se producirá el consiguiente desplazamiento de las señales de **2.8**.

Los azúcares empleados en el estudio fueron los siguientes: metil- α -D-glucopiranosido (Me- α -Glc), metil- β -D-glucopiranosido (Me- β -Glc), metil- α -D-galactopiranosido (Me- α -Gal), metil- β -D-galactopiranosido (Me- β -Gal), metil- α -D-manosido (Me- α -Man), *N*-acetil-glucosamina (NAcGlc) y α,α -trehalosa (Figura 2.7).

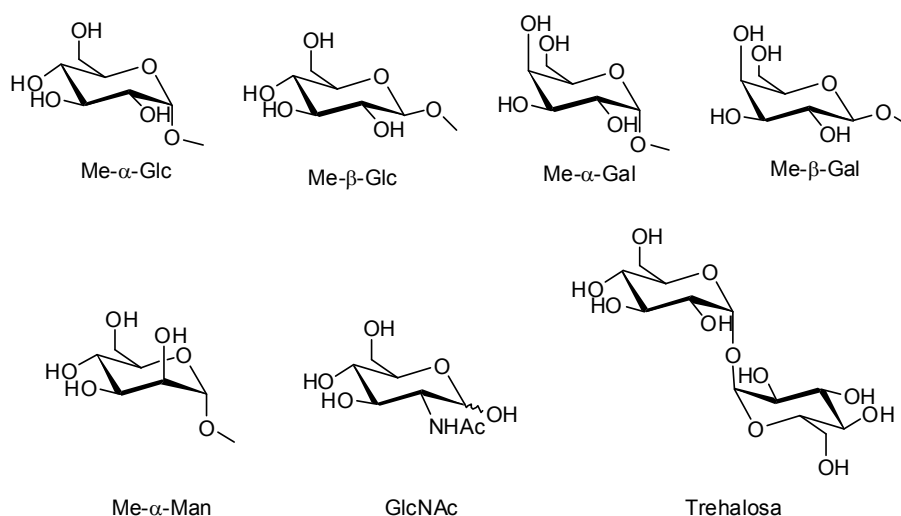


Figura 2.7. Estructura de los azúcares utilizados en el estudio de RMN

No se observó variación en los desplazamientos químicos de las señales de **2.8** con ninguno de los azúcares añadidos. Tampoco se observó ningún cambio en las señales cuando los experimentos se realizaron con el compuesto derivado de galactosa **2.10**.

Con el compuesto **2.14**, seguimos el mismo procedimiento que el indicado para **2.8**. En la Figura 2.8, letra a, se muestran las señales que aparecen en la zona comprendida entre δ 6.7 y 7.2 ppm correspondientes a los protones aromáticos de **2.14** disuelto en agua. Encima y numerados de abajo a arriba con las letras b-h se representan los espectros de **2.14** en presencia de un determinado azúcar.

Como puede observarse, en este caso se observa una variación significativa en el desplazamiento químico de las señales correspondientes a los protones aromáticos de **2.14** en función del azúcar añadido.

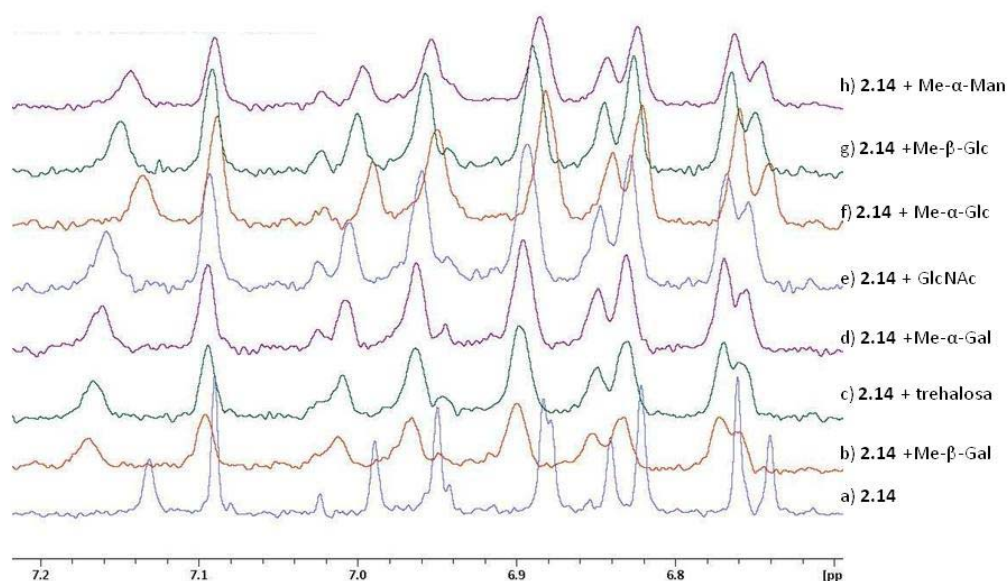


Figura 2.8. Espectro de ^1H -RMN de **2.14** en D_2O , zona de protones aromáticos (δ 6.5-7.2)

En la Figura 2.9, se observa lo que ocurre en las zonas comprendidas entre δ 6.3-6.5 ppm (Figura 2.9a), y δ 5.6-5.9 ppm (Figura 2.9b) correspondientes a los protones anoméricos y a los H-2, H-3 y H-4 respectivamente. Para estos protones se observa una menor variación en el desplazamiento químico de las señales que en la zona aromática. Este hecho sugiere que son los protones aromáticos los que presentan una mayor interacción con los carbohidratos en estudio.

De los resultados experimentales obtenidos con el derivado de manosa **2.14**, se puede concluir que parece existir interacción en agua de dicho compuesto con distintos monosacáridos y que ésta es especialmente importante en la zona de los protones aromáticos.

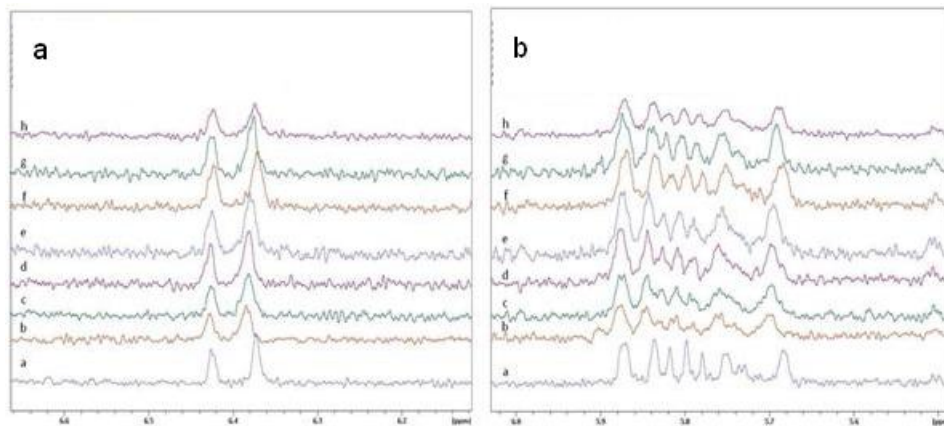


Figura 2.9. Espectros de ^1H -RMN de 2.14 en D_2O . (a) Zona de protones anoméricos (6.3-6.5 ppm) y (b) zona de H2, H3 y H4 (5.6-5.9 ppm)

Para estudiar si existe selectividad en cuanto a la interacción decidimos representar en forma de diagrama de barras (Figura 2.10) la variación de desplazamiento químico que experimentan las señales de los protones aromáticos en función del azúcar añadido. Tal y como se observa en la Figura 2.10 en general la afinidad es mayor por el metil- β -D-galactopiranosido (Me- β -Gal) (barra púrpura) y menor por el metil- α -D-manopiranosido (Me- α -Man) (barra azul celeste).

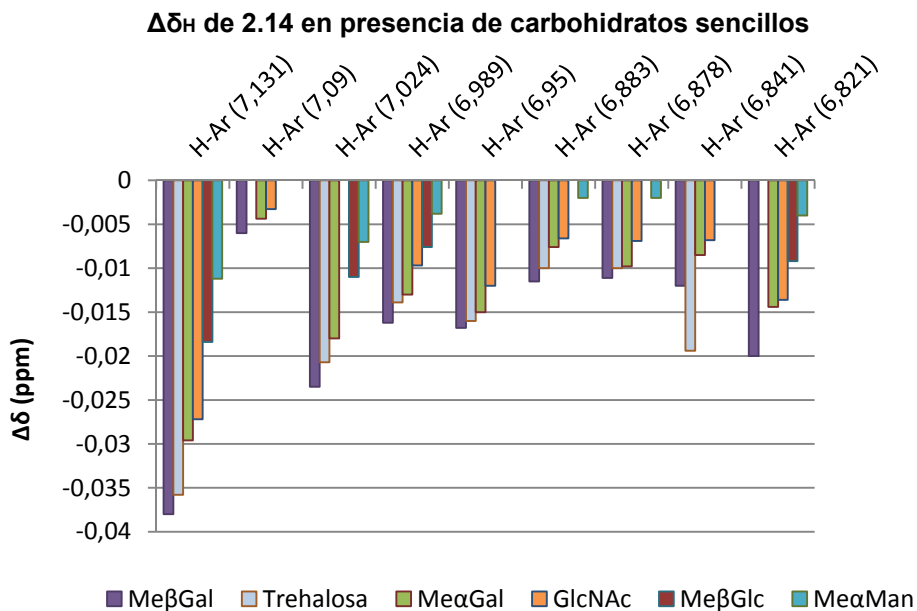


Figura 2.10. Variación del desplazamiento químico de las señales de los protones aromáticos en presencia de distintos carbohidratos

Como el compuesto **2.14** es una mezcla anomérica decidimos averiguar cómo se comportaban los anómeros α (**2.17**) y β (**2.18**) por separado. Los resultados para el anómero α (**2.17**), se muestran en la Figura 2.11 y para el anómero β (**2.18**) en la Figura 2.12.

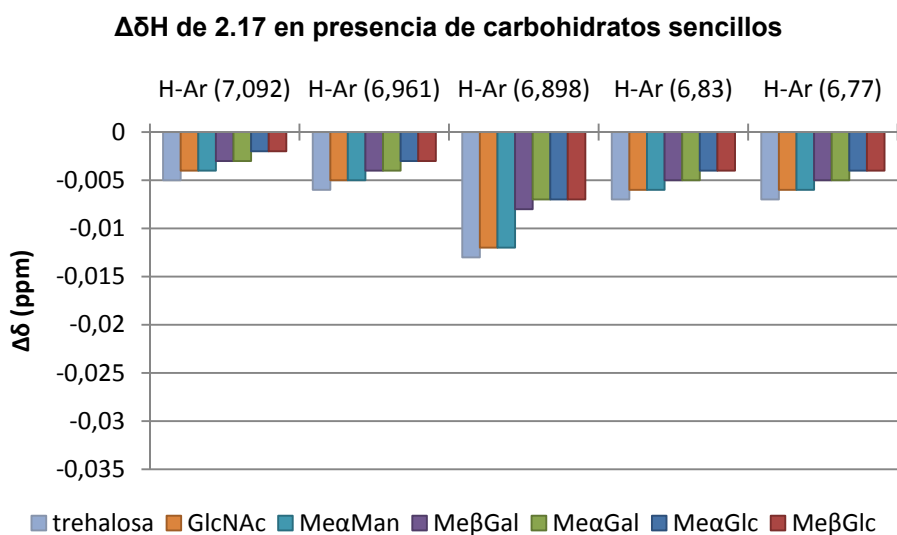


Figura 2.11. Variación del desplazamiento químico de las señales de los protones aromáticos del anómero α 2.17 en D_2O en presencia de distintos carbohidratos

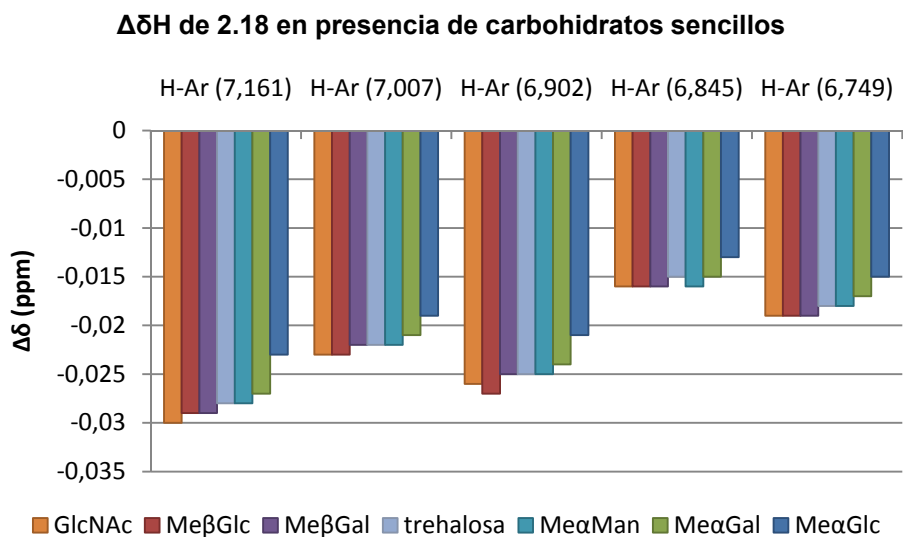


Figura 2.12. Variación del desplazamiento químico de las señales de los protones aromáticos del anómero β 2.18 en D_2O en presencia de distintos carbohidratos

Como puede observarse el desplazamiento de las señales correspondientes a los protones aromáticos en el anómero β (**2.18**), en presencia de los carbohidratos, es aproximadamente tres veces mayor que el de las señales del anómero α (**2.17**) si bien no se observan diferencias significativas entre los distintos azúcares. Este hecho sugiere que los anillos aromáticos del anómero β (**2.18**) tienen una disposición espacial más adecuada para la interacción con los carbohidratos en estudio que los del anómero α **2.17**. En la actualidad se están llevando a cabo éstos y otros experimentos de RMN con los compuestos que presentan β -maltosa (**2.25**) y trehalosa (**2.27**) como esqueleto central.

Como veremos más adelante, en los ensayos SPR no se observó una especial interacción de los compuestos **2.14**, **2.17** y **2.18** con los carbohidratos de la glicoproteína gp120, sin embargo los estudios de RMN ponen de manifiesto que estos compuestos interaccionan con distintos tipos de monosacáridos en agua.

Es necesario señalar que la búsqueda de compuestos capaces de interaccionar con carbohidratos en agua es un tema altamente competitivo que está lejos de ser resuelto. De hecho, y tal y como se ha comentado en la introducción son muy escasos los compuestos capaces de reconocer carbohidratos en agua,⁴⁹ por lo que cualquier avance que se lograse en esta área repercutiría de modo notable en un tema de gran actualidad como es el reconocimiento molecular de carbohidratos.

Capítulo 3. Compuestos polifenólicos basados en una estructura central de benceno

Antecedentes y objetivos

Los receptores tripodales son aquellos que tienen 3 funcionalidades adecuadas para el reconocimiento molecular ancladas a un soporte o esqueleto central cíclico o acíclico. Este tipo de receptor está siendo últimamente muy utilizado para la catálisis asimétrica,^{101,102} la nanoarquitectura,¹⁰³ y el reconocimiento molecular.¹⁰⁴ Dentro del área del reconocimiento molecular, los receptores tripodales se han empleado como agentes coordinantes de cationes y aniones.¹⁰⁵ Así, y gracias a dicha propiedad se han empleado, por ejemplo, en química médica, para secuestrar iones Fe (III) impidiendo el crecimiento bacteriano, o en química analítica, para reconocer selectivamente iones NH_4^+ y de esta forma determinar la concentración de dicho catión en el agua potable o en el aire.¹⁰⁶

A principios de los años 90 se descubrieron receptores tripodales capaces de reconocer moléculas neutras y entre ellas carbohidratos. Desde entonces el número de receptores de este tipo ha ido en aumento y hoy en día ya se cuenta con una cantidad importante de ellos.¹⁰⁷ En la Figura 3.1 se representan algunos de los

¹⁰¹ Harlow, R. and Burk, M. New chiral C3-symmetrical tripodal phosphanes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29 (12), 1462-1464.

¹⁰² Moberg, C. C-3 symmetry in asymmetric catalysis and chiral recognition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37 (3), 248-268.

¹⁰³ a) Folmer, B., Meijer, E., Sijbesma, R. and Brunsveld, L. Supramolecular polymers. *Chem. Rev.* **2001**, 101 (12), 4071-4097, b) Mio, M., Prince, R., Hughes, T., Moore, J. and Hill, D. A field guide to foldamers. *Chem. Rev.* **2001**, 101 (12), 3893-4011, c) Reinhoudt, D., Timmerman, P. and Prins, L. Noncovalent synthesis using hydrogen bonding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40 (13), 2382-2426.

¹⁰⁴ Castaldi, M. and Gibson, S. Applications of chiral C-3-symmetric molecules. *Chem. Commun.* **2006**, (29), 3045-3062.

¹⁰⁵ Kuswandi, B., Verboom, W. and Reinhoudt, D. Tripodal receptors for cation and anion sensors. *Sensors* **2006**, 6 (8), 978-1017.

¹⁰⁶ Bühlmann, P., Pretsch, E. and Bakker, E. Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 2. Ionophores for potentiometric and optical sensors. *Chem. Rev.* **1998**, 98 (4), 1593-1687.

¹⁰⁷ a) Lemieux, R. The origin of the specificity in the recognition of oligosaccharides by proteins. *Chem. Soc. Rev.* **1989**, 18 (3), 347-374, b) Drickamer, K. and Weis, W. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 441-473, c) Wareham, R. and Davis, A. Carbohydrate recognition through noncovalent interactions: A challenge for biomimetic and supramolecular chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38 (20), 2978-2996, d) Bandmann, H., Sicking, W. and Mazik, M. Molecular recognition of carbohydrates by artificial polypyridine and polypyrimidine receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39 (3), 551.

esqueletos que con más frecuencia forman parte de los receptores tripodales. En particular, los receptores que presentan los esqueletos **I**¹⁰⁸, **II**¹⁰⁹, **III**¹¹⁰, **IV**¹¹¹ y **V**¹¹² en su estructura son los más utilizados para el reconocimiento de carbohidratos. En el presente capítulo centramos nuestra atención en los receptores basados en el esqueleto **III** con un anillo de benceno hexasustituido.

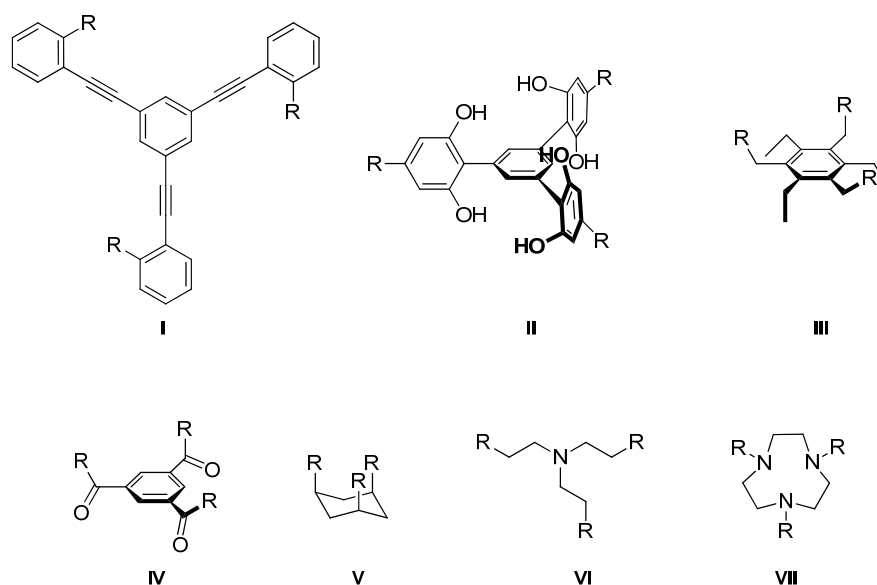


Figura 3.1. Ejemplos de esqueletos para el diseño de receptores tripodales

El anillo de benceno es una plataforma pequeña y rígida útil para el diseño de receptores. Sin embargo, en el benceno 1,3,5-trisustituido de fórmula general **3.A**, fácilmente accesible desde un punto de vista sintético, o en el receptor de fórmula general **3.B**, basado en el anillo de mesitileno (1,3,5-trimetilbenceno) no existe un

¹⁰⁸ Zhong, Z., Anslyn, E. and Wright, A. A functional assay for heparin in serum using a designed synthetic receptor. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (35), 5679-5682.

¹⁰⁹ Horii, A., Matsumoto, S., Shiro, M., Inouye, M. and Abe, H. D-3h-symmetrical hydrogen-bonding unit as a saccharide recognition and self-assembling module. *Org. Lett.* **2008**, *10* (13), 2685-2688.

¹¹⁰ a) Cacciarini, M., Francesconi, O., Moneti, G., Roelens, S. and Nativi, C. A b-mannoside-selective pyrrolic tripodal receptor. *Org. Lett.* **2007**, *9* (23), 4685-4688, b) Kuschel, M. and Mazik, M. Amide, amino, hydroxy and aminopyridine groups as building blocks for carbohydrate receptors. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, (9), 1517-1526.

¹¹¹ Sicking, W. and Mazik, M. Molecular recognition of carbohydrates by artificial receptors: Systematic studies towards recognition motifs for carbohydrates. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7* (3), 664-670.

¹¹² Palde, P., Gareiss, P. and Miller, B. Selective recognition of alkyl pyranosides in protic and aprotic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (29), 9566-9573.

control conformacional de los sustituyentes unidos al benceno (Figura 3.2) y por tanto no existe la preorganización necesaria para llevar a cabo el reconocimiento molecular.

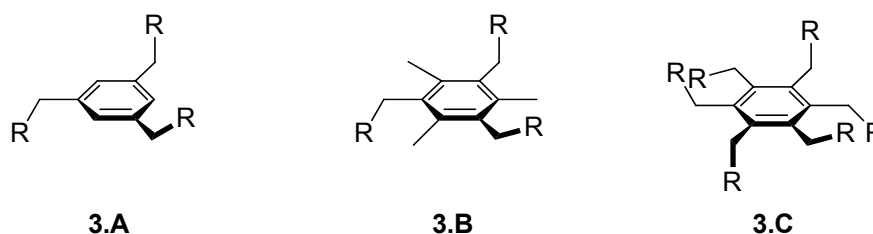


Figura 3.2. Benceno (3.A), mesitileno (3.B) y benceno hexasustituído (3.C)

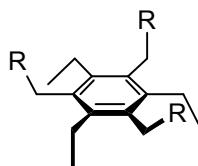
En 1976 MacNicol¹¹³ descubrió la preorganización que sin embargo adoptan los grupos funcionales en derivados de benceno sustituidos con seis grupos idénticos de fórmula general **3.C** (Figura 3.2). Dichos sistemas adoptan una conformación termodinámicamente favorable en la que los seis sustituyentes del anillo aromático se disponen en forma alternada por encima y por debajo del anillo de benceno. Es decir, adoptan un patrón alternante de tipo *ababab* (del inglés “a”, *above*, “b”, *below*), y por tanto, muestran una segregación facial entre los sustituyentes 1,3,5 y los 2,4,6, mostrando simetría C_3 .¹¹⁴ Dicha característica estereoquímica, totalmente excepcional, hace del anillo de benceno persustituído una plataforma ideal para preparar receptores sintéticos tripodales. Sin embargo, una limitación importante para el desarrollo de este tipo de receptores fue la dificultad de sintetizar compuestos con diferentes grupos funcionales unidos al anillo aromático por lo que en un principio los seis sustituyentes debían ser iguales.

Más adelante, se descubrió que el esqueleto de 2,4,6-trietilbenceno-1,3,5-sustituído **3.D** (Figura 3.3) también adopta un patrón alternante de tipo *ababab* y aporta unas excelentes características para el diseño de receptores sintéticos. A pesar de ello, la baja accesibilidad sintética del anillo bencénico precursor de este tipo de receptores suponía una gran limitación para su uso. Así, los derivados de trietil benceno 1,3,5 sustituidos se preparaban con muy bajo rendimiento mediante la introducción de grupos CN en el anillo de trietilbenceno empleando unas condiciones

¹¹³ Hardy, A., Wilson, D. and MacNicol, D. Crystal and molecular-structure of a hexa-host inclusion compound. *Nature* **1977**, 266 (5603), 611-612.

¹¹⁴ Anslyn, E. and Hennrich, G. 1,3,5-2,4,6-functionalized, facially segregated benzenes - Exploitation of sterically predisposed systems in supramolecular chemistry. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8 (10), 2219-2224.

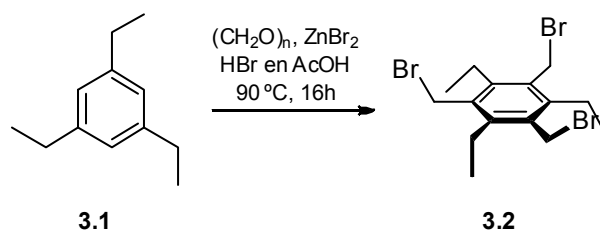
drásticas de reacción en las que se utilizaba Cu(I) y se requería un elaborado procesado.¹¹⁵



3.D

Figura 3.3. Esqueleto de 2,4,6-trietilbenceno sustituido en 1,3 y 5 con disposición *ababab*

Esta situación cambió cuando a mitad de los años 90 se publicó, de manera independiente, por Walsdorff¹¹⁶ y Anslyn¹¹⁷ una ruta sintética sencilla para obtener el 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno (**3.2**) (Esquema 3.1). Dicha ruta se basaba en un método sintético anteriormente descrito por van der Made¹¹⁸ para bromometilar en una, dos o tres posiciones el mesitileno (1,3,5-trimetilbenceno). Según la ruta descrita por Walsdorff¹¹⁶ y Anslyn¹¹⁷ el trietilbenceno comercial **3.1** se transforma con rendimientos superiores al 95 % en el tribromo derivado **3.2**, compuesto clave a partir del cual se pueden introducir los ligandos adecuados para el reconocimiento molecular (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Síntesis del 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno (**3.2**)

¹¹⁵ Weis, C.D. Symmetrical Tricyanobenzenes. *J. Org. Chem.* **1962**, 27 (8), 2964-2965.

¹¹⁶ Saak, W., Pohl, S. and Walsdorff, C. Synthesis of 1,3,5-tris(bromomethyl)-2,4,6-triethylbenzene - A versatile precursor to predisposed ligands. *J. Chem. Res., Synop.* **1996**, (6), 282-283.

¹¹⁷ Lynch, V., Anslyn, E. and Metzger, A. A synthetic receptor selective for citrate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36 (8), 862-865.

¹¹⁸ Van der Made, R. and Van der Made, A. A convenient procedure for bromomethylation of aromatic compounds. selective monobromomethylation, bisbromomethylation, or trisbromomethylation. *J. Org. Chem.* **1993**, 58 (5), 1262-1263.

Una vez que se dispuso de un método eficaz para la síntesis del 1,3,5-tris(bromometil) derivado **3.2**, la preparación de receptores sintéticos basados en el esqueleto de benceno experimentó un avance espectacular.

La síntesis de este tipo de receptores ha sido explorada exhaustivamente, con el objetivo de reconocer carbohidratos, por el grupo de Mazik¹¹⁹ demostrando que en medios apolares (cloroformo) el anillo de trietilbenceno que incorpora tres aminopiridinas es capaz de unirse a alquil piranosidos con una considerable afinidad y selectividad formando complejos de estequiometría 1:1 y 1:2. Otros ejemplos interesantes de receptores tripodales basados en el anillo de benceno hexasustituido han sido descritos por los grupos de Roelens¹²⁰, Abe¹²¹ y Schmuck¹²² quienes han preparado compuestos derivados de trietilbenceno que incorporan grupos urea, fenol y guanidinio como ligantes de carbohidrato con capacidad para interactuar con mono- y disacáridos en disolventes apolares (cloroformo). Entre ellos, Roelens y colaboradores, en 2007, sintetizaron el derivado de tricatecol **3.6**¹²³ (Figura 3.4) en el que tres unidades de ácido pirogálico están unidas a un núcleo central de 2,4,6-trietilbenceno mediante un enlace éter. Una vez sintetizado el compuesto **3.6** se determinó su afinidad por octilglicósidos derivados de glucosa, galactosa y manosa mediante ¹H-RMN. Dichos experimentos, llevados a cabo en CDCl₃, pusieron de manifiesto que la afinidad de **3.6** por dichos carbohidratos era entre 0.87 y 5.2 mM. Además, el receptor **3.6** mostraba una selectividad por el α-manósido 6 veces superior a la mostrada por el resto de azúcares. Este dato nos llevó a centrar nuestra

¹¹⁹ Algunas de sus publicaciones más recientes: a) Cavga, H. and Mazik, M. Molecular recognition of N-acetylneuraminic acid with acyclic benzimidazolium- and aminopyridine/guanidinium-based receptors. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (3), 831-838, b) Buthe, A. and Mazik, M. Highly effective receptors showing di- vs. monosaccharide preference. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (9), 1558-1568, c) Kuschel, M. and Mazik, M. Amide, amino, hydroxy and aminopyridine groups as building blocks for carbohydrate receptors. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, (9), 1517-1526, d) Kuschel, M. and Mazik, M. Highly effective acyclic carbohydrate receptors consisting of aminopyridine, imidazole, and indole recognition units. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (8), 2405-2419, e) Buthe, A. and Mazik, M. Recognition properties of receptors based on dimesitylmethane-derived core: Di- vs. monosaccharide preference. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (10), 2063-2071.

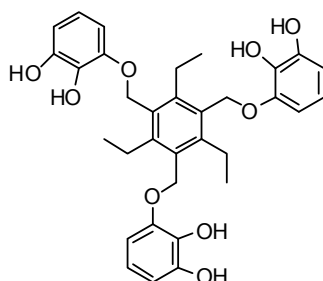
¹²⁰ Nativi, C., Cacciarini, M., Pergoli, R., Roelens, S. and Vacca, A. A new tripodal receptor for molecular recognition of monosaccharides. A paradigm for assessing glycoside binding affinities and selectivities by H-1 NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (50), 16456-16465.

¹²¹ Abe, H., Aoyagi, Y. and Inouye, M. A rigid C-3v-symmetrical host for saccharide recognition: 1,3,5-tris(2-hydroxyaryl)-2,4,6-trimethylbenzenes. *Org. Lett.* **2005**, *7* (1), 59-61.

¹²² Schmuck, C. and Schwegmann, M. Recognition of anionic carbohydrates by an artificial receptor in water. *Org. Lett.* **2005**, *7* (16), 3517-3520.

¹²³ Cacciarini, M., Cordiano, E., Nativi, C. and Roelens, S. A tricatecholic receptor for carbohydrate recognition: Synthesis and binding studies. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (10), 3933-3936.

atención en dicho compuesto ya que precisamente el α -manosido es uno de los azúcares más abundantes en la cubierta del VIH.



3.6

Figura 3.4. Derivado de triccatecol 3.6

El objetivo del trabajo descrito en el presente capítulo es el diseño y síntesis de receptores tripodales basados en el esqueleto de 2,4,6-trietilbenceno sustituido en las posiciones 1,3,5 con anillos fenólicos con 2 o 3 grupos hidroxilo. La unión entre ambos fragmentos se realizará a través de grupos amino, amida o éter (Figura 3.5). El anillo de benceno presente en dichos compuestos podría dar lugar a interacciones estabilizadoras mediante enlaces CH- π con los carbohidratos de la glicoproteína viral gp120.

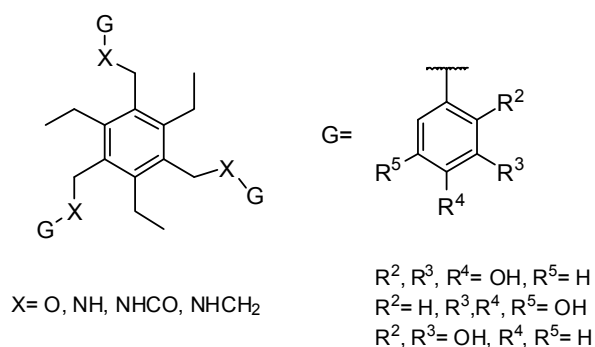


Figura 3.5. Fórmula general de los compuestos sintetizados en el capítulo 3

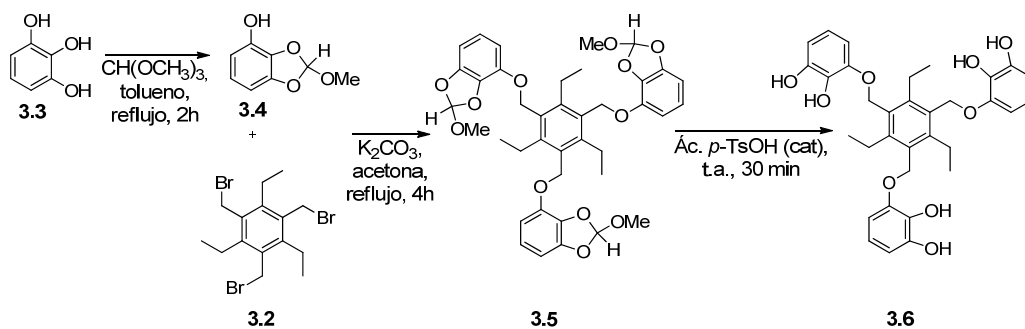
Además, se llevará a cabo la evaluación biológica frente al VIH de los compuestos sintetizados y un estudio mediante RMN para determinar si dichos compuestos son capaces de interactuar con distintos carbohidratos. Este tipo de estudios se llevará a cabo utilizando agua como disolvente ya que ésta se considera

el disolvente biológico por excelencia. Asimismo, se determinará la interacción de dichos compuestos con la glicoproteína gp120 del VIH. Estos resultados se recogen en el capítulo 4 de la presente memoria.

Resultados y discusión

Síntesis

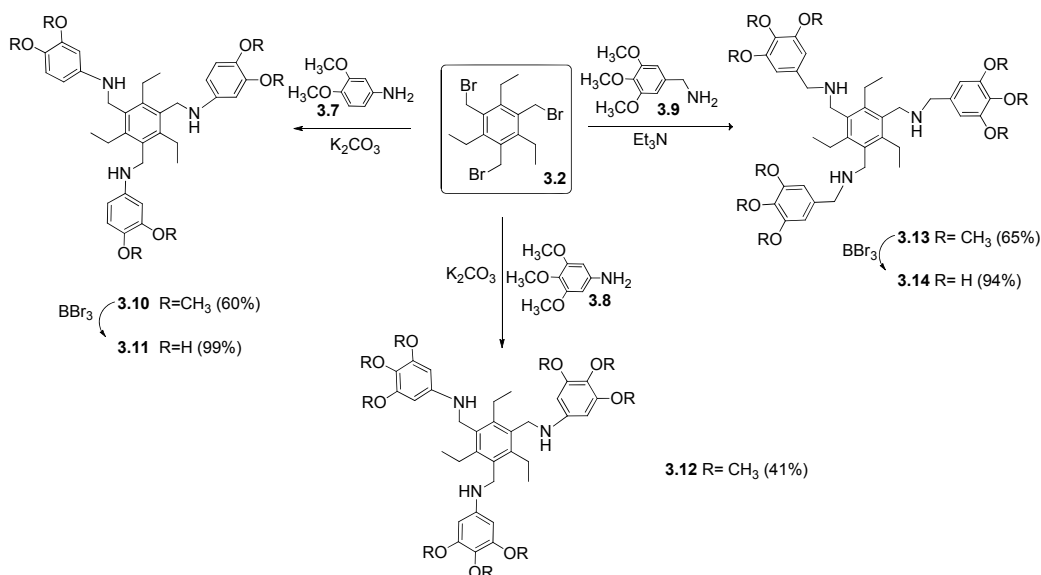
En primer lugar llevamos a cabo la síntesis del compuesto **3.6** empleando el método descrito¹²³ en la bibliografía (Esquema 3.2) según el cual se hace reaccionar el ácido pirogálico **3.3** protegido como ortoéster **3.4** con el 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno **3.2** obteniéndose el compuesto **3.5** que tras desprotección con ácido *p*-toluensulfónico conduce al compuesto deseado **3.6**.



Esquema 3.2. Síntesis del receptor de triccatecol **3.6**

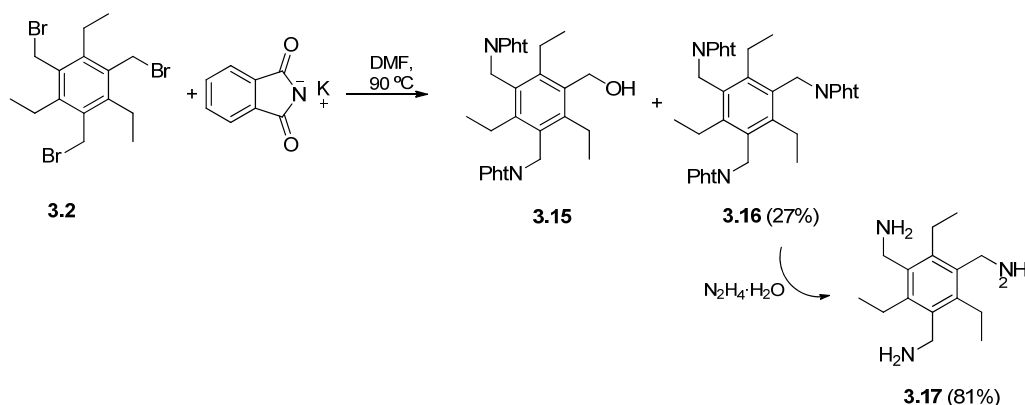
A continuación llevamos a cabo la síntesis de los compuestos en los que las unidades de polifenol se unieron al esqueleto central a través de un grupo amino o metilnamino (Esquema 3.3). Para ello se utilizaron las aminas comerciales: 3,4-dimetoxianilina (**3.7**), 3,4,5-trimetoxianilina (**3.8**) y 3,4,5-trimetoxibencilamina (**3.9**) que se hicieron reaccionar con el 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno **3.2**¹¹⁶⁻¹¹⁸ en condiciones básicas obteniéndose los compuestos **3.10**, **3.12** y **3.13** respectivamente. La desprotección de los grupos metil éter de los compuestos **3.10** y **3.13** se llevó a cabo con el ácido de Lewis tribromuro de boro para obtener los compuestos **3.11** y **3.14** con sus OH libres. Cuando el compuesto **3.12** se desprotegió en estas mismas condiciones se obtuvo, tal y como se comprobó por HPLC-Masas, el compuesto deseado con todos sus OH libres, sin embargo dicho compuesto resultó inestable y

no pudo ser aislado. A pesar de que se intentaron otras condiciones de reacción en ningún caso fue posible aislar el compuesto desprotegido puro.



Esquema 3.3. Síntesis de los compuestos 3.10-3.14

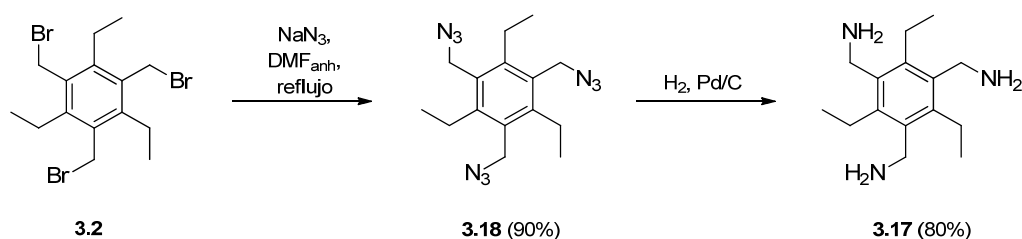
Seguidamente nos propusimos la síntesis de compuestos en los que los anillos fenólicos se unieron al esqueleto central a través de enlaces amida. Para ello se empleó la amina **3.17** cuya preparación se abordó en primer lugar mediante síntesis de Gabriel a partir del tribromo derivado **3.2**. (Esquema 3.4).



Esquema 3.4. Síntesis de Gabriel para la obtención de la triamina 3.17

Así, la reacción de **3.2** con ftalimida potásica condujo a una mezcla de los compuestos di (**3.15**) y trisustituidos (**3.16**). Tras separación cromatográfica de la mezcla, el compuesto **3.16** se trató con hidracina para dar el compuesto deseado (**3.17**) con un rendimiento global del 22%.

Debido al bajo rendimiento con el que se obtuvo el compuesto **3.17** siguiendo la síntesis de Gabriel, buscamos un método alternativo que nos permitiese acceder a dicho compuesto de manera más eficiente. Para ello se trató el compuesto **3.2**¹¹⁶⁻¹¹⁸ (Esquema 3.5) con azida sódica obteniéndose la triazida **3.18**¹¹⁷ con un rendimiento del 90%. En la bibliografía la reducción del grupo azida, presente en **3.18**¹¹⁷, se lleva a cabo mediante el método de Staudinger empleando PPh₃¹¹⁴, o BH₃ en THF¹²⁴. En nuestro caso, decidimos llevar a cabo la reducción en presencia de H₂ empleando Pd/C (30%)¹²⁵ como catalizador. De este modo se obtuvo la triamina **3.17** con un rendimiento global del 71 % que sin necesidad de ser purificada se utilizó directamente en el paso siguiente de reacción.



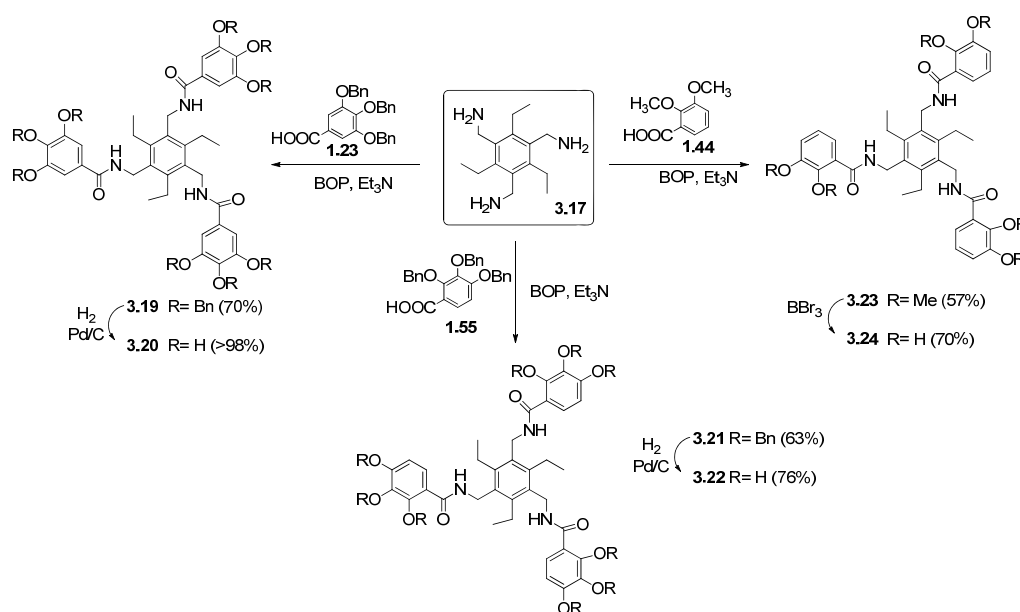
Esquema 3.5. Síntesis de la triamina 3.17

El compuesto **3.17** se hizo reaccionar con los ácidos carboxílicos 3,4,5-tribenciloxibenzoico (**1.23**)⁶³ y 2,3,4-tribenciloxibenzoico (**1.55**), cuya síntesis se describió con anterioridad, y con el ácido comercial 2,3-dimetoxibenzoico (**1.44**) utilizando BOP como agente de acoplamiento y trietilamina como base para obtener los compuestos **3.19** (70%), **3.21** (63%) y **3.23** (57%) (Esquema 3.6). La desprotección de los grupos bencilo de los compuestos **3.19** y **3.21** se realizó por hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C (10%) para obtener los compuestos

¹²⁴ Stehouwer, J., Hao, J. and Tam-Chang, S. Formation of a macrobicyclic tris(disulfide) by molecular self-assembly. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (2), 334-335.

¹²⁵ Hanes, R., Anslyn, E., Morey, J., Kilway, K., Siegel, J. and Wallace, K. Preparation of 1,3,5-tris(aminomethyl)-2,4,6-triethylbenzene from two versatile 1,3,5-tri(halosubstituted) 2,4,6-triethylbenzene derivatives. *Synthesis* **2005**, (12), 2080-2083.

desprotegidos **3.20** (99%) y **3.22** (76%) respectivamente. En el caso del compuesto **3.23** la desprotección de los grupos metil éter se llevó a cabo empleando tribromuro de boro obteniéndose el compuesto desprotegido **3.24**¹²⁶ con un 70% de rendimiento (Esquema 3.6). En el compuesto **3.20** los OH fenólicos ocupan una disposición 3,4,5 en el anillo aromático mientras que en **3.22** los OH ocupan las posiciones 2,3,4. El compuesto **3.24** es un análogo de **3.22** en el que se ha eliminado el OH en posición 4. Todos estos compuestos servirán para estudiar cómo afecta el número de OH fenólicos y su posición en la actividad.

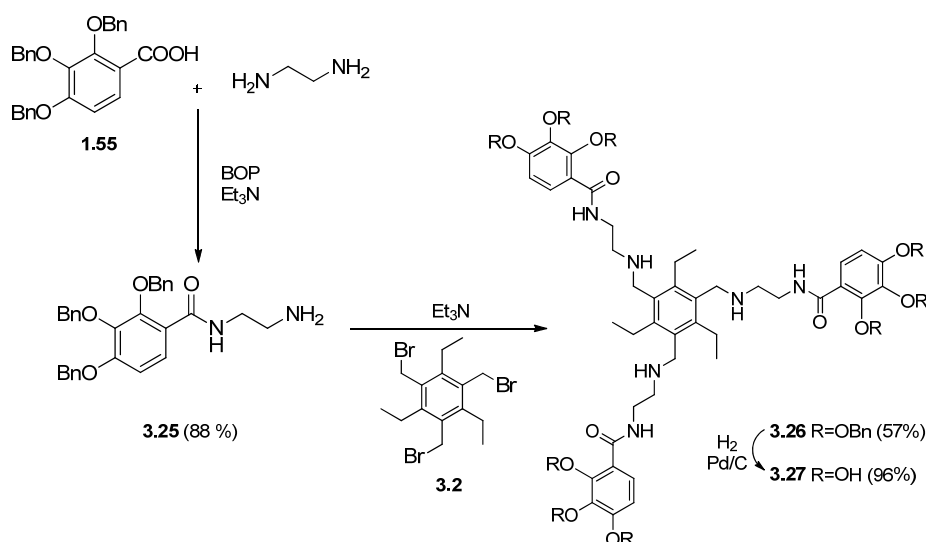


Esquema 3.6. Síntesis de 3.19-3.24

Por otra parte, la actividad del compuesto **3.20**, en el que existe un enlace amida entre el esqueleto central y los anillos fenólicos, se comparará con la del compuesto **3.14** (Esquema 3.3) en el que la unión se lleva a cabo a través de un grupo metilnamino, con objeto de averiguar cómo afecta la presencia del grupo carbonilo en la actividad.

¹²⁶ a) Stack, T., Hou, Z. and Raymond, K.N. Rational reduction of the conformational space of a siderophore analog through nonbonded interactions: the role of entropy in enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (14), 6466-6467, b) Hou, Z., Stack, T.D.P., Sunderland, C.J. and Raymond, K.N. Enhanced iron(III) chelation through ligand predisposition: syntheses, structures and stability of tris-catecholate enterobactin analogs. *Inorg. Chim. Acta* **1997**, *263*, 341-355.

Con el fin de determinar si la distancia entre el esqueleto central y el anillo fenólico es un factor importante para la actividad, decidimos preparar el compuesto **3.27** (Esquema 3.7), análogo de **3.22** (Esquema 3.6), en el que la distancia entre las dos partes de la molécula se alarga mediante el empleo de una unidad de etilendiamina, entre el anillo central y el benzoilo. Para la síntesis de **3.27** fue necesario, primero, preparar la amina **3.25** por acoplamiento del ácido 2,3,4-tribenciloxibenzoico (**1.55**) con etilendiamina en presencia de BOP y trietilamina. La reacción de la amina **3.25** con el tribromo derivado **3.2** condujo al compuesto **3.26** cuya desprotección con hidrógeno en presencia de Pd/C condujo al compuesto desprotegido **3.27** con buen rendimiento global (48%).

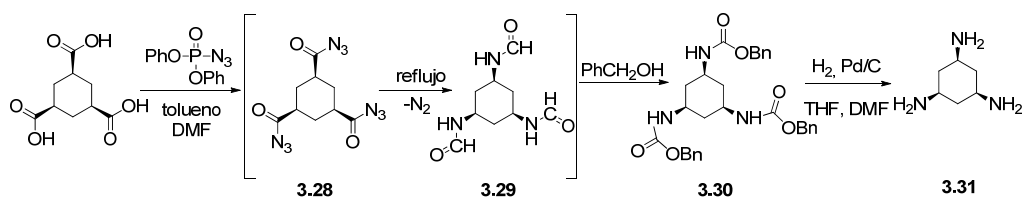


Esquema 3.7. Ruta de síntesis del compuesto 3.27

Por último, con el fin de conocer la influencia de la aromaticidad del esqueleto central en la actividad de los compuestos se sintetizó el compuesto **3.33** (ver Esquema 3.9) que presenta un anillo de ciclohexano como esqueleto central (esqueleto V de la Figura 3.1, página 76) unido a tres anillos fenólicos a través de enlaces amida. Para la obtención de dicho compuesto fue necesario preparar en primer lugar la triamina derivada de ciclohexano **3.31**¹²⁷ (Esquema 3.8). Para ello, el ácido comercial cis,cis-1,3,5-ciclohexano tricarbóxico se hizo reaccionar con la difenil

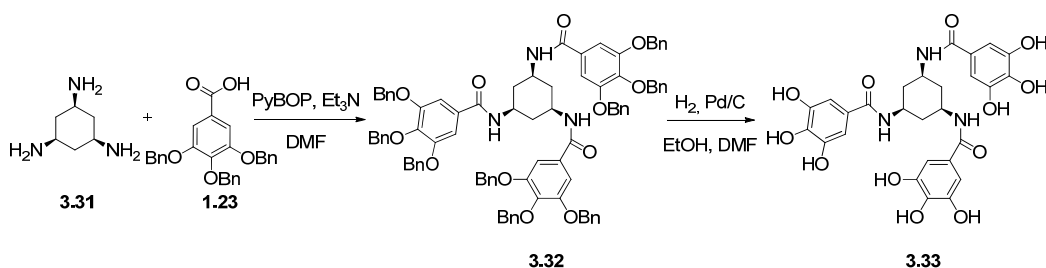
¹²⁷ de Loos, M., van Esch, J., Kellogg, R. and Feringa, B. C-3-symmetric, amino acid based organogelators and thickeners: a systematic study of structure-property relations. *Tetrahedron* **2007**, 63 (31), 7285-7301.

fosforil azida (DPPA) obteniéndose la tris-acilazida **3.28**. Una reorganización de Curtius, con la correspondiente eliminación de nitrógeno gas, que tiene lugar “in situ” cuando la mezcla de reacción se calienta a reflujo, dió lugar al tris-isocianato **3.29** que se atrapa con alcohol bencílico para dar el tris-bencilcarbamato **3.30** con un 26% de rendimiento. El compuesto **3.30** se hidrogena en presencia de Pd/C utilizando una mezcla de THF y DMF, en relación 5:1, para obtener la tris-amina **3.31**.



Esquema 3.8. Síntesis de 3.31

Por último, la tris-amina **3.31** se hace reaccionar con el ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23** empleando PyBOP como agente de acoplamiento para dar el compuesto **3.32** cuya hidrogenación en presencia de Pd/C condujo al compuesto **3.33** (Esquema 3.9).



Esquema 3.9. Síntesis de 3.33

Actividad antiviral

Los compuestos preparados dentro del presente capítulo fueron evaluados como agentes antivirales frente a la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2), en cultivo celular empleando las líneas celulares CEM/0 y

MT-4 de forma análoga a la mencionada en el correspondiente apartado de actividad antiviral de los capítulos 1 y 2 de esta Memoria.⁷⁴

Los compuestos **3.5**, **3.10**, **3.12**, **3.13**, **3.19**, **3.21**, **3.23**, **3.26** y **3.32**, sintetizados dentro de este capítulo con los OH fenólicos en forma de bencil o metil éter resultaron inactivos. Este dato biológico está de acuerdo con el obtenido en capítulos anteriores y confirma que es necesaria la presencia de OH fenólicos para la actividad.

Los resultados obtenidos de la evaluación biológica frente al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH-1 y VIH-2) de los compuestos con los OH fenólicos desprotegidos quedan recogidos en la Tabla 3.1 en la que se definen los parámetros utilizados para determinar actividades (EC_{50}) y toxicidades (CC_{50}).

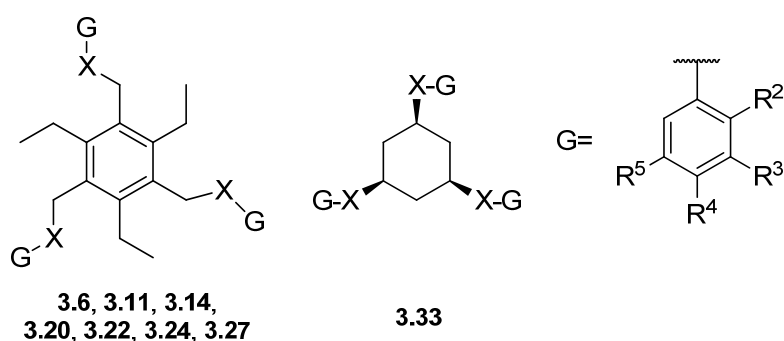
Un análisis detallado de la actividad mostrada por los compuestos desprotegidos que aparecen en la Tabla 3.1 nos permite establecer una serie de conclusiones sobre la relación entre la estructura química y la actividad biológica.

En primer lugar, el derivado de triccatecol **3.6** que tal y como se había descrito¹²³ presenta afinidad por los monosacáridos glucosa, galactosa y manosa, siendo ésta mayor para la manosa, no mostró actividad frente a la replicación del VIH-1 y VIH-2. Asimismo, el compuesto **3.11** en el que tres unidades de dihidroxifenol están unidas al esqueleto central a través de una amina, resultó inactivo.

El primer dato que merece la pena destacar es la actividad frente a VIH-1 mostrada por el compuesto **3.20** en el que un enlace amida está presente entre el esqueleto central y los anillos fenólicos. Esta actividad contrasta con la del compuesto **3.14** en el que la unión entre los dos fragmentos de la molécula se lleva a cabo a través de un grupo metilnamino, lo que pone de manifiesto que la presencia del grupo carbonilo en el nexo de unión es importante para la actividad.

El compuesto **3.22** resultó el más activo y el menos tóxico de la serie, siendo dicho compuesto el más seguro de los descritos en la presente Tesis Doctoral (IT = 29). La estructura de **3.22** difiere de la de **3.20** en que los OH fenólicos ocupan las posiciones 2,3,4 del anillo aromático mientras que en **3.20** los OH fenólicos ocupan las posiciones 3,4,5.

Tabla 3.1. Actividad antiviral frente a VIH-1 y VIH-2 en células CEM/O



| | X | R ² | R ³ | R ⁴ | R ⁵ | CE ₅₀ (μM) | | CC ₅₀ (μM) | IT |
|--------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|---------|-----------------------|-----|
| | | | | | | VIH-1 | VIH-2 | | |
| 3.6 | O | OH | OH | H | H | >10 | >10 | 16 ± 9.5 | --- |
| 3.11 | NH | H | OH | OH | H | >10 | >10 | 23 ± 4.2 | --- |
| 3.14 | NH-CH ₂ | H | OH | OH | OH | >10 | >10 | 173 ± 7 | --- |
| 3.20 | NH-CO | H | OH | OH | OH | 7.0 ± 4.3 | --- | 84 ± 23 | 12 |
| 3.22 | NH-CO | OH | OH | OH | H | 6.3 ± 0.7 | 41 ± 13 | 184 ± 14 | 29 |
| 3.24 | NH-CO | OH | OH | H | H | >2 | >2 | 5.0 ± 0.1 | --- |
| 3.27 | NH-(CH ₂) ₂ - NH-CO | OH | OH | OH | H | >10 | >10 | 117 ± 3 | --- |
| 3.33 | NH-CO | H | OH | OH | OH | >10 | >10 | 107 ± 1 | |
| PRM-A | | | | | | 3.4 ± 1.3 | | > 50 | 14 |

CE₅₀: concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la formación de sincitios

CC₅₀: concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la proliferación celular

IT: relación CC₅₀/CE₅₀

El compuesto **3.24**, cuya estructura tan solo se diferencia de **3.22** en que presenta 2 OH fenólicos en lugar de tres, resultó inactivo lo que de nuevo pone de manifiesto que la presencia de tres OH en el anillo aromático es un factor importante para la actividad. El compuesto **3.27** en el que la distancia entre los anillos fenólicos y el esqueleto central se ha alargado con respecto a **3.22** resultó inactivo.

Por otra parte, el compuesto **3.33** que presenta un esqueleto central de ciclohexano tampoco resultó activo.

Finalmente podemos concluir que **3.22** es el mejor compuesto de los descritos en la presente Tesis Doctoral. Su actividad, similar a la de la Pradimicina, y su falta de toxicidad hacen de él un candidato idóneo sobre el que seguir trabajando. En el capítulo 4 de esta memoria se describen estudios de RMN y modelización para determinar la conformación que dicho compuesto presenta en disolución. Asimismo, en dicho capítulo se estudiará su capacidad de unión a polisacáridos.

**Capítulo 4. Evaluación de la capacidad de los
compuestos sintetizados para reconocer los
carbohidratos presentes en la glicoproteína gp120**

Antecedentes y objetivos

El objetivo del trabajo descrito en el presente capítulo es evaluar la capacidad de los compuestos sintetizados para interaccionar con carbohidratos y de forma especial con los carbohidratos presentes en la cubierta del VIH. Para ello hemos utilizado una técnica basada en un biosensor con detección por Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR). Estos experimentos han sido realizados en la Universidad Católica de Lovaina por el grupo del Dr. Jan Balzarini en un instrumento BIAcore® T100.¹²⁸ Asimismo se ha llevado a cabo un estudio conformacional de los compuestos **3.20** y **3.22** y se ha estudiado la capacidad de interacción de dichos compuestos con carbohidratos y de forma especial con alguno de los carbohidratos presentes en la cubierta viral mediante experimentos de RMN.

Nociones básicas sobre biosensores y la técnica de SPR

Los recientes avances en el campo de la biotecnología y la microelectrónica han acelerado el desarrollo de los biosensores, una alternativa a las técnicas analíticas convencionales que implica sistemas de diagnóstico de alta especificidad y rapidez de respuesta.

Un biosensor se define como un dispositivo analítico que transforma procesos biológicos en señales eléctricas u ópticas y permite su cuantificación. Por tanto, los biosensores consisten en un elemento de reconocimiento biológico y un transductor físico. El primero es el responsable del reconocimiento específico del analito de interés mientras que el segundo elemento convierte este hecho en una señal óptica o eléctrica medible. Según la naturaleza del elemento de reconocimiento utilizado, los biosensores se clasifican de forma general en biosensores enzimáticos, biosensores celulares, inmunosensores, etc.¹²⁹

¹²⁸ www.biacore.com

¹²⁹ Borisov, S.M. and Wolfbeis, O.S. Optical biosensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (2), 423-461.

Los transductores ópticos se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de la luz como consecuencia de la interacción física o química entre el analito a detectar y el elemento biológico de reconocimiento del biosensor. Las bases físicas de este tipo de sensores son los cambios que ocurren en absorción, fluorescencia, luminiscencia, dispersión o índice de refracción, cuando la luz se refleja en las superficies de reconocimiento. El sistema básico de medida consiste en una fuente de luz, el elemento sensor (donde se encontrarían las moléculas receptoras) y el detector. Los transductores ópticos son muy variados en función de sus propiedades e incluyen sensores de fibra óptica o sensores de resonancia de plasmón superficial, entre otros.

Los biosensores de resonancia de plasmón de superficie (SPR) son sensores ópticos con aplicaciones en las se requiere una detección sensible, rápida y sin marcaje de sustancias biológicas y químicas. Los biosensores de SPR son relativamente nuevos, con el primer dispositivo comercial introducido en 1990, sin embargo, tal y como se observa en la Figura 4.1 el interés en el desarrollo y las aplicaciones de este tipo de biosensores está creciendo rápidamente por diversas razones entre las que se encuentran la sensibilidad, selectividad, velocidad y fiabilidad en los análisis, además de los beneficios de portabilidad, reutilización, miniaturización y el análisis *on-site*.¹³⁰



Figura 4.1. Documentos publicados sobre SPR por año hasta 2008

La instrumentación que requiere este tipo de análisis es: un sensor, un detector de SPR, software para el control y tratamiento de datos, y un sistema para introducir los reactivos y analitos en la superficie del sensor.

¹³⁰ Web of Knowledge; <http://isiwebofknowledge.com/>

En comparación con los métodos analíticos convencionales (cromatografía gaseosa, cromatografía líquida, espectrofotometría de masas) los biosensores de SPR ofrecen numerosas ventajas: son fáciles de utilizar, permiten detecciones directas y en tiempo real, poseen una elevada sensibilidad, ofrecen gran versatilidad y son fácilmente automatizables por lo que son una herramienta prometedora para la detección rápida de compuestos.

Los biosensores de SPR emplean la superficie de determinados metales tales como oro y plata para generar plasmones de superficie que son oscilaciones colectivas de un gas de electrones (o plasma) que rodea el entramado atómico de un metal. La resonancia de plasmón de superficie es un fenómeno óptico que ocurre cuando una luz polarizada se dirige desde una capa de mayor índice de refracción (un prisma) hacia una de menor índice de refracción, que en este caso es una capa metálica, que se sitúa entre el prisma y la disolución en la que se encuentra la muestra a analizar (Figura 4.2).

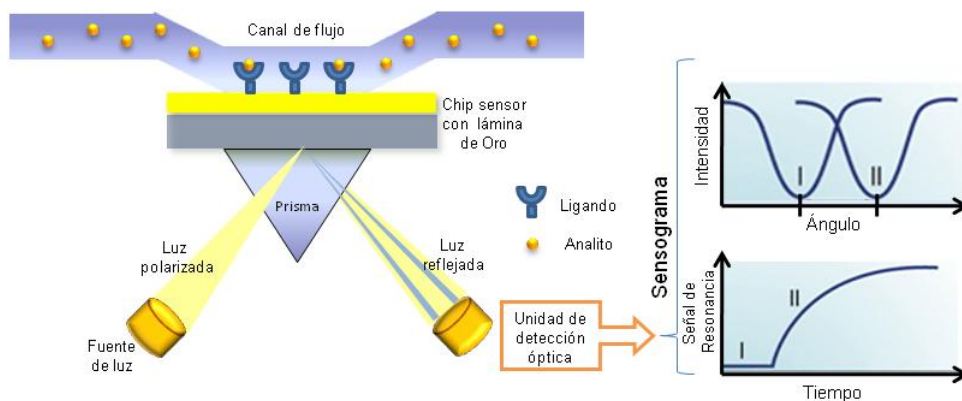


Figura 4.2. Esquema de funcionamiento de un biosensor de SPR

La luz que incide en dicha interfase, entre el metal y el prisma, provoca la excitación del plasmón superficial para un determinado ángulo de incidencia de dicha luz, llamado ángulo de resonancia. El ángulo de resonancia depende fuertemente del índice de refracción del medio colindante a la lámina metálica, por lo que las variaciones que se produzcan en el mismo van a ser detectadas como cambios del ángulo de resonancia. La unión de los analitos al elemento de reconocimiento supone un cambio de índice de refracción sobre la superficie del metal y, como consecuencia, un desplazamiento del ángulo de resonancia (de I a II en la gráfica superior derecha de la Figura 4.2). Estos cambios son proporcionales a la cantidad de sustrato unida a

la superficie, mientras que la velocidad a la que se producen dichos cambios depende de la cinética de interacción. Esto permite realizar medidas directas en tiempo real, sin marcaje, así como el análisis de muestras complejas sin purificación previa.^{131,132}

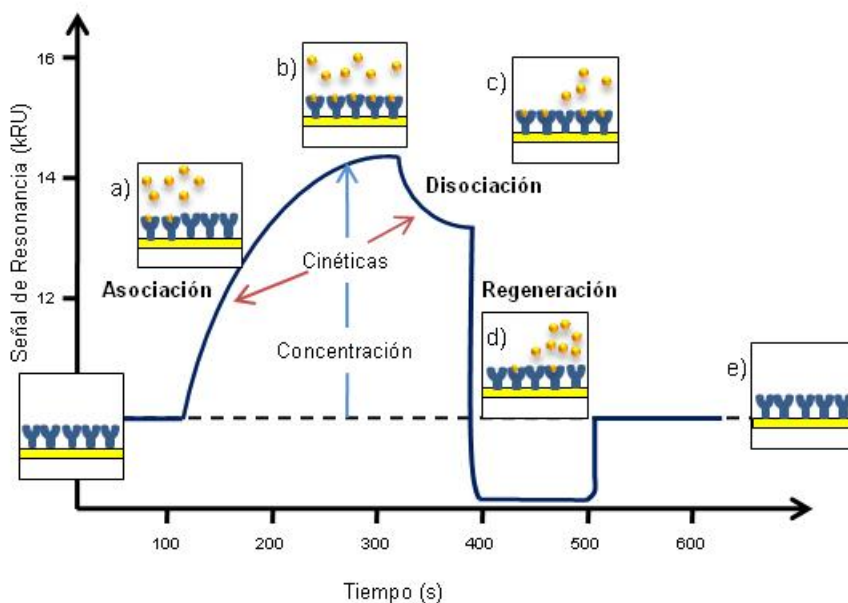


Figura 4.3. Modelo de sensograma

La relación entre la respuesta (en unidades de resonancia, RU) y el tiempo, en segundos, da lugar a lo que se denomina sensograma (Figura 4.3). La forma de la curva de un sensograma se debe a la aplicación del protocolo experimental siguiente: en primer lugar se inmoviliza un ligando (en nuestro caso gp120) al chip, a continuación se hace pasar una disolución tampón. A un tiempo determinado se hace pasar el analito (compuesto sintetizado), disuelto en la disolución tampón. Si existe una interacción entre el ligando anclado al chip y el analito, se dará un cambio en el índice de refracción lo que produce un incremento de la señal de resonancia (Figura 4.3.a) hasta que se llega al equilibrio (Figura 4.3.b). Del análisis de esta parte de la curva obtenemos la constante de asociación observada (k_{obs}) y si se conoce la concentración de analito en la disolución, podemos calcular la constante de asociación (k_a). Una vez llegado al equilibrio, se empieza a pasar de nuevo disolución

¹³¹ McDonnell, J. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5 (5), 572-577.

¹³² Cooper, M.A. Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1 (7), 515-528.

tampón libre de analito, para favorecer la disociación ligando-analito, pudiéndose obtener del análisis de esta parte de la curva la constante de disociación (k_d) (Figura 4.3.c). Por último, se lleva a cabo la regeneración de la superficie del chip (Figura 4.3.d) eliminando todo el analito, con lo cual la superficie queda lista para una nueva medida (Figura 4.3.e). Este ciclo se suele repetir a diferentes concentraciones para tener un mejor análisis cinético. Si se desea hacer un análisis termodinámico, se repite a diferentes temperaturas.^{132,133}

Existen muchas estrategias para funcionalizar el chip, pudiéndose inmovilizar los ligandos de forma covalente o no covalente, generalmente a una cubierta polimérica. El polímero más habitual es el carboximetil dextrano lo que proporciona al chip una gran resistencia frente a la adsorción no específica.¹³⁴ La selección del método de inmovilización correcto requiere que se tengan en cuenta diferentes aspectos: i) la orientación resultante del ligando tras el acoplamiento, ii) el medio del que va a estar rodeado el ligando una vez anclado, y iii) la estabilidad del anclaje en las condiciones de regeneración del chip. Por lo tanto, el método escogido debe ser eficiente, debe dar lugar a un anclaje estable y debe permitir el control de la cantidad de ligando inmovilizado.

La estrategia más común de acoplamiento del ligando para los chips de oro que presentan el polímero de dextrano funcionalizado con ácidos carboxílicos es la activación *in situ* de dichos grupos con hidrocioruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopiridil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida. El éster activado resultante puede: (Figura 4.4)

- a) Acoplarse directamente con grupos amina del ligando (residuos de lisina si se trata de una proteína) para formar enlaces amida.
- b) Derivatizarse con reactivos como la piridinilditioetanamina (PDEA) permitiendo el posterior acoplamiento con grupos tioles del ligando (residuos de cisteína y metionina si se trata de proteínas) formando puentes disulfuro.
- c) Tratarse con hidracina y acoplarse con grupos aldehídos del ligando seguido de una posterior aminación reductiva.

¹³³ Szabo, A., Stolz, L. and Granzow, R. Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5 (5), 699-705.

¹³⁴ Lofas, S. and Johnsson, B. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface-plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, (21), 1526-1528.

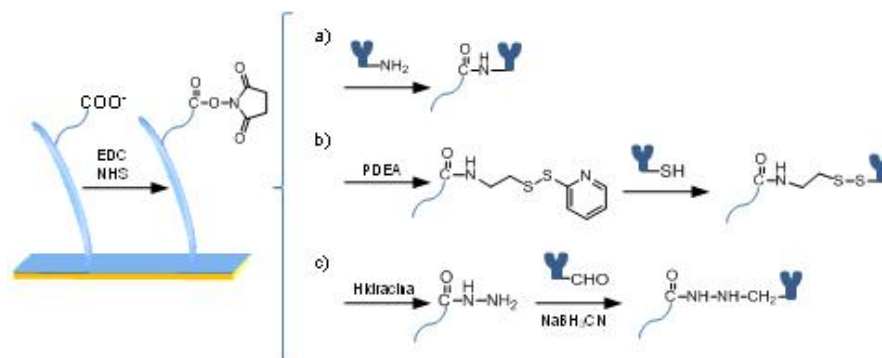


Figura 4.4. Métodos de inmovilización del ligando

Resultados y discusión

Tal y como se comentó en la introducción de esta Tesis Doctoral la Pradimicina A (PRM-A), un antibiótico antifúngico de origen natural y estructura compleja, es capaz de inhibir la replicación del VIH¹³⁵ mediante un mecanismo similar al de las lectinas.³³ Se ha sugerido que la actividad anti-VIH mostrada por dicho compuesto podría ser debida a la unión con el disacárido de α -(1-2)-manosa muy abundante en los oligosacáridos presentes en la cubierta del VIH.^{32,33,136} Por tanto, y a modo de control positivo, decidimos averiguar si mediante la técnica SPR éramos capaces de detectar la interacción de PRM-A con la gp120 anclada al chip. Además, estudiamos la interacción de dos derivados de PRM-A con actividad similar tales como, PRM-S,¹³⁷ que es un derivado de PRM-A, más soluble en agua, en el que la unidad de xilosa terminal ha sido sustituida por una glucosa sulfatada en la posición 3, y PRM-A FITC (fluorescein-5-isotiocianato) que se diferencia de la PRM-A por tener un resto fluorescente. Los compuestos PRM-A, PRM-S y PRM-FITC se ensayaron a diferentes concentraciones, en presencia de Ca²⁺, y sus

¹³⁵ Tanabe, A., Nakashima, H., Yoshida, O., Yamamoto, N., Tenmyo, O. and Oki, T. Inhibitory effect of new antibiotic, Pradimicin-A on infectivity, cytopathic effect and replication of human immunodeficiency virus invitro. *J. Antibiot.* **1988**, *41* (11), 1708-1710.

¹³⁶ Tanabe, A., Tochikura, T., Yoshida, O., Oki, T. and Yamamoto, N. Pradimicin-A inhibition of human-immunodeficiency virus-attenuation by mannan *Virology* **1990**, *176* (2), 467-473.

¹³⁷ Balzarini, J., Francois, K., Van Laethem, K., Hoorelbeke, B., Auwerx, J. and Liekens, S. Pradimicin-Sis a Highly Soluble Non-peptidic Small-size Carbohydrate-binding Antibiotic that may Qualify as a Potential Drug Lead for HIV Treatment. *Antiviral Res.* **2009**, *82* (2), A44.

correspondientes sensogramas se recogen en la figura 4.5. Estos ensayos prueban que los tres compuestos (PRM-A, PRM-S y PRM-FITC) tienen afinidad por la gp120 y que ésta depende de la concentración, y de la presencia de calcio. En concreto se observó que la PRM-A interactúa con la gp120 con una relación molar 1:33, lo que significa que 33 moléculas de PRM-A se unen a una sola molécula de gp120.

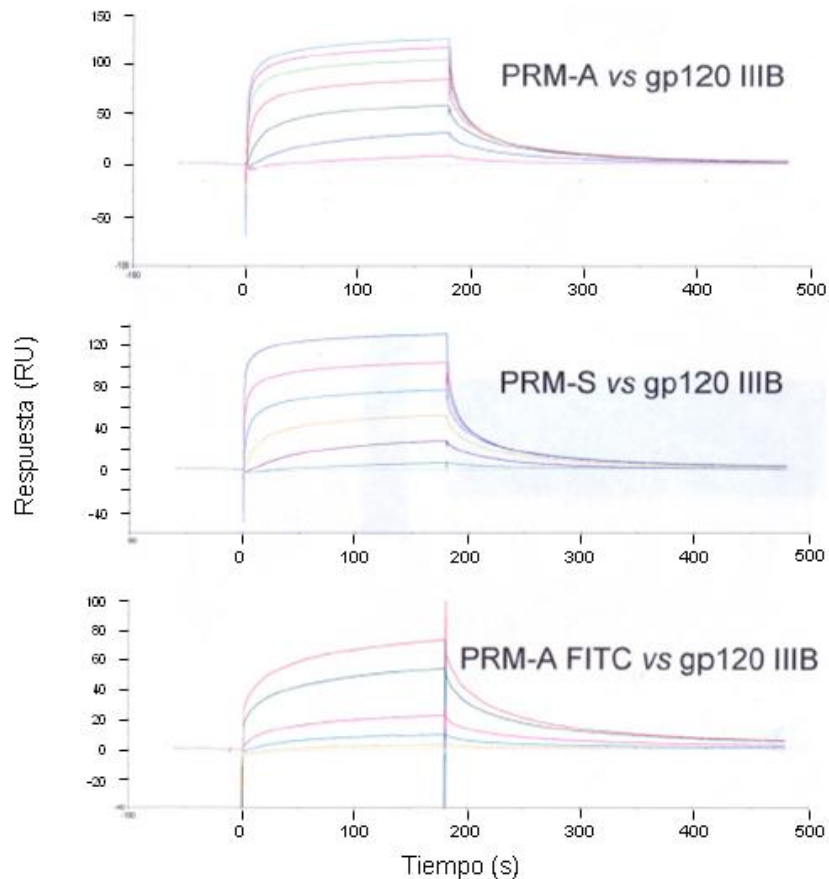


Figura 4.5. Ensayos de SPR de PRM-A, PRM-S y PRM-A FITC a diferentes concentraciones

Sin embargo, la relación molar para dos lectinas específicas de manosa, cianovirina y *Hippeastrum hybrid* agglutinin (HHA), oscila entre 1:5 para la primera y 1:1.5 para la segunda. La diferencia estequiométrica encontrada entre la PRM-A y las lectinas podría ser debida al gran impedimento estérico que se produciría en el caso de que más de una molécula de lectina se uniese a la gp120 como consecuencia de

su gran tamaño: 50000 Da (para HHA) y 11000 Da (para cianovirina) mientras que el impedimento es menor para una molécula pequeña como la PRM-A (838 Da).

A continuación ensayamos la afinidad de los compuestos sintetizados en la presente Tesis Doctoral por la glicoproteína viral gp120 mediante SPR. En los ensayos siempre se empleó una concentración de compuesto 50 μ M. Es importante señalar que cada chip biosensor es independiente, ya que el grado de inmovilización de la gp120 es diferente, por lo que los resultados obtenidos a partir de diferentes chips no pueden ser comparados.

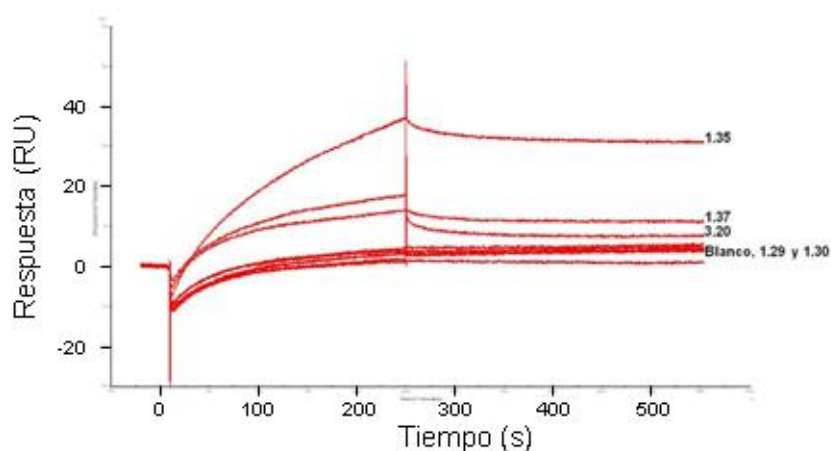


Figura 4.6. Sensograma correspondiente a los compuestos 1.29, 1.30, 1.35, 1.37 y 3.20

En primer lugar se ensayaron los compuestos con un esqueleto central lineal y con los OH fenólicos protegidos (**1.29**) y desprotegidos (**1.30**, **1.35**, **1.37**) así como el compuesto **3.20** con un esqueleto central aromático obteniéndose los sensogramas de la Figura 4.6 (compuestos Figura 4.7). El sensograma de los compuestos **1.29** y **1.30**, con un esqueleto de espermidina, indica que dichos compuestos no se unen específicamente a la glicoproteína gp120 ya que su señal es comparable a la del blanco. Sin embargo, los compuestos **1.35**, **1.37** y **3.20** con esqueletos de trietilentetramina, tetrametilenpentamina y trietilbenceno, respectivamente, presentaron sensogramas que indican que existe interacción con la glicoproteína gp120, siendo ésta mayor para el compuesto **1.35**.

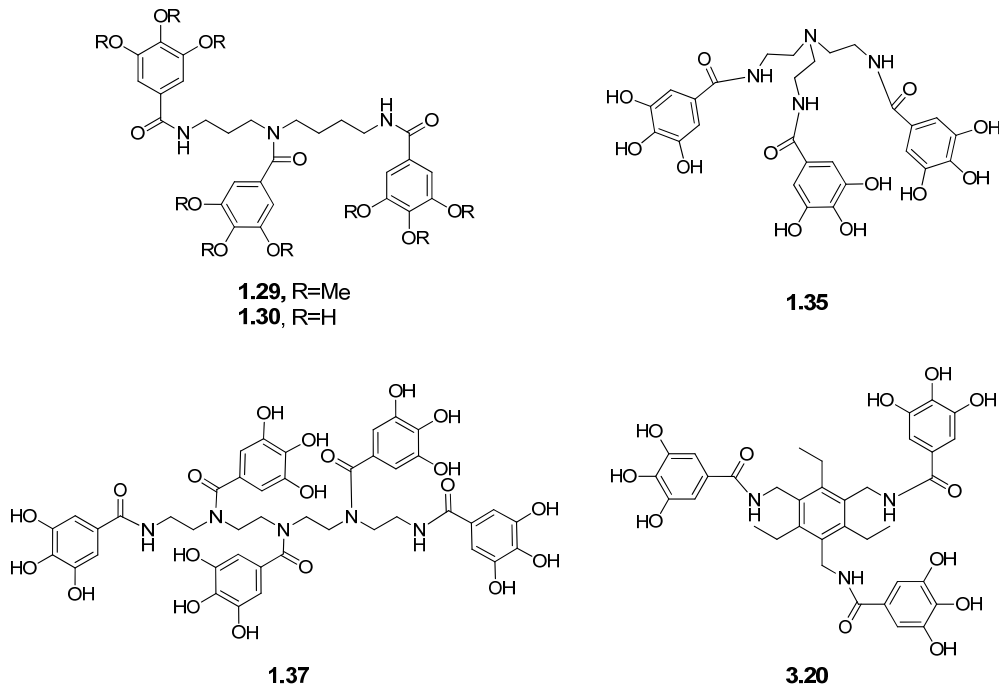


Figura 4.7. Estructuras de los compuestos 1.29, 1.30, 1.35, 1.37 y 3.20

Los derivados de manosa **2.17** y **2.18**, así como el compuesto **3.11** con un esqueleto de benceno central unido a 3 grupos dihidroxianilina, no mostraron interacción significativa con la glicoproteína gp120.

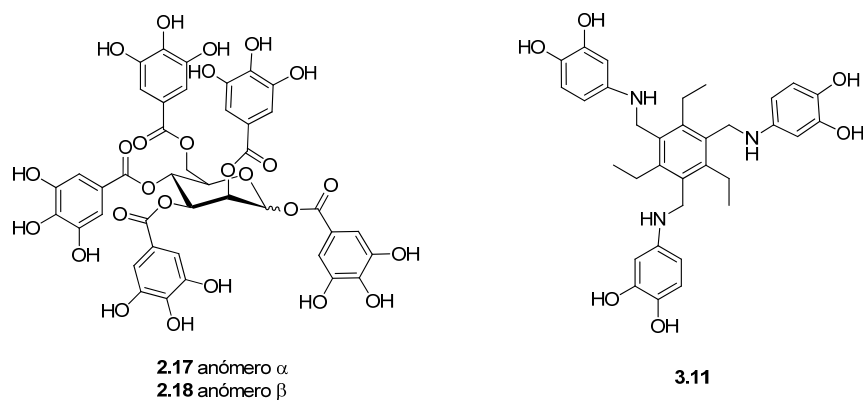


Figura 4.8. Estructura de los compuestos 2.17, 2.18, 3.11

Cuando en el ensayo se emplearon los compuestos **1.57** y **3.22** (Figura 4.9) en los que tres unidades de 2,3,4-trihidroxibenzoilo, en lugar de 3,4,5-

trihidroxibenzoilo, se unen al esqueleto centra, se observó un resultado muy dispar entre ellos.

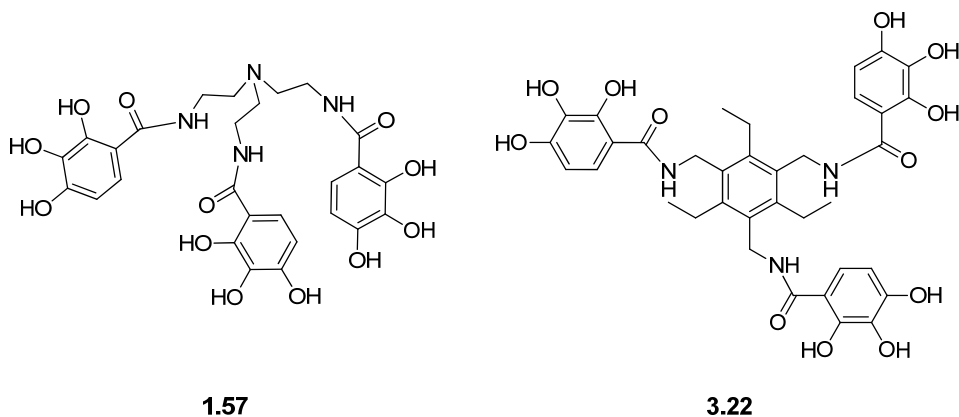


Figura 4.9. Estructura de los compuestos 1.57 y 3.22

Así, tal y como indica el sensograma de la Figura 4.10 el compuesto **1.57** no interacciona con la gp120 mientras que **3.22** se une muy fuertemente a ella. Dicha unión es incluso mayor que la observada para la propia PRM-A (ensayada a una concentración 12.5 μM), que utilizamos como control.

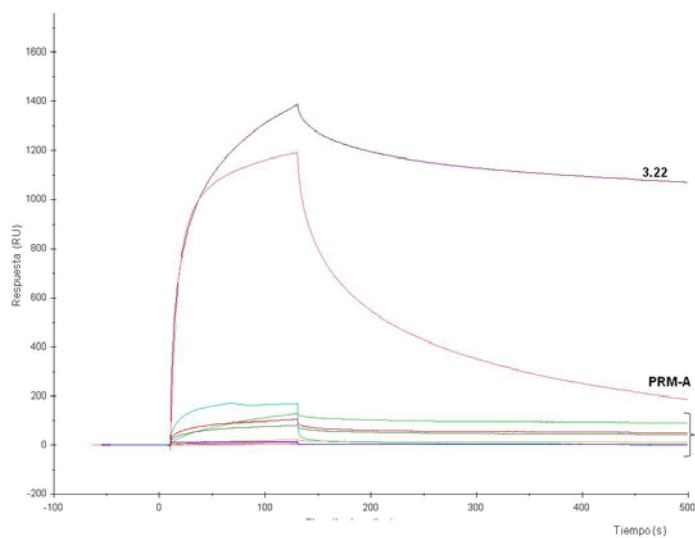


Figura 4.10. Sensograma correspondiente a los compuestos 1.57, 2.17, 2.18, 3.11 y 3.22

Un hecho muy destacable es la fuerte interacción observada entre el compuesto **3.22** y la glicoproteína gp120 dándose el caso de que el chip no pudo

regenerarse por completo tras el empleo de las condiciones habituales usadas para la regeneración (NaOH, 50 mM) quedando un 30% de compuesto **3.22** anclado a él. Debido a que no se conoce el tipo de interacciones que se establecen entre el compuesto **3.22** y la gp120 decidimos emplear, aunque sin éxito, diferentes condiciones para la regeneración del chip que son las que se reflejan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Condiciones de regeneración del chip

| Tipo de enlace | Ácido | Básico | Hidrofóbico | Iónico |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------|----------------------|
| pH | > 2.5 | < 9 | < 9 | |
| Condiciones | Glicina·HCl 10 mM | NaOH (50 mM-1M) | 75% etilén glicol | MgCl ₂ 4M |
| | 0.1% H ₃ PO ₄ | | | |
| | 0.1 % HCOOH | Cloruro de guanidinio 6M | | |

Por otra parte también se hizo uso de disolventes tales como etanol (10%) y DMSO (50%) y de detergentes: 0.1% Tween 20 y 0.1% Triton-X sin que se observase la regeneración del chip. Una interpretación de este resultado sería que el compuesto **3.22** además de establecer interacciones con la glicoproteína gp120 lo hiciera también con la superficie del chip. Para comprobar este hecho se hizo pasar el compuesto por un canal de referencia donde se encuentra el chip libre de glicoproteína gp120 observándose que no existe interacción. Cabría también la posibilidad de que el compuesto **3.22** estableciese interacciones con los carbohidratos y con la parte proteica de la glicoproteína gp120. Para corroborar esta hipótesis decidimos estudiar la interacción de **3.22** y PRM-A, con una proteína que no estuviera glicosilada. La proteína elegida fue albúmina de suero bovino (BSA) que se ancló al chip sensor en lugar de la glicoproteína gp120. Así se observó que mientras que la PRM-A no establece ninguna interacción con la proteína BSA, el compuesto **3.22** si interacciona con ella (aunque en menor medida que con la gp120) y que de igual manera que cuando estaba anclada la glicoproteína gp120, es imposible la total regeneración del chip. Este resultado parece apoyar que el compuesto **3.22** podría unirse tanto a la parte proteica como a la parte glicosilada de gp120. Otra posibilidad,

dada la estructura del compuesto **3.22**, es que se formasen agregados intermoleculares que se unirían a la parte proteica de gp120.¹³⁸

De momento no se han encontrado las condiciones adecuadas para la regeneración del chip y por ello ha sido imposible determinar las constantes de asociación que rigen la interacción de **3.22** con la glicoproteína gp120.

Por otra parte, aunque no puede hacerse un estudio cinético completo de la interacción, si se puede hacer un cálculo orientativo de su estequiometría (cantidad de moléculas de **3.22** que están unidas a cada molécula de gp120) a partir de los pesos moleculares de los compuestos que interaccionan y la cantidad de ligando que cubre la superficie del chip. Para ello es preciso comparar los valores de la respuesta máxima esperada (R_{max}) y la respuesta observada (R_{obs}) en unidades de resonancia (RU).¹³⁹ Para calcular la respuesta máxima esperada se hace uso de la Ecuación 4.1

$$R_{max} = \frac{PM_a}{PM_L} \times R_L \times S_m$$

Ecuación 4.1. Respuesta máxima esperada

donde R_{max} es la capacidad de unión de la superficie del chip; PM_a es el peso molecular del analito, que en este caso es el compuesto **3.22**; PM_L es el peso molecular del ligando, que en este caso es la gp120; R_L es el grado de inmovilización del ligando (en RU) que se calcula *in situ* para cada chip empleando el software de Biacore y S_m es la relación estequiométrica con la que se une el analito al ligando.

Sabiendo que $PM_a = 705.71$, $PM_L = 120000$ y que $R_L = 3021$ en este experimento, y suponiendo que la relación estequiométrica gp120/**3.22** es 1:1 ($S_m = 1$) se sustituyen estos valores en la Ecuación 4.1 y se obtiene un valor para R_{max} de 17.76 RU. Lo que quiere decir que si sólo una molécula de **3.22** se uniera a cada una de las moléculas de gp120 inmovilizadas sobre el chip, como máximo podríamos ver una señal de 17.76 RU. Sin embargo, en el sensograma la señal máxima observada para **3.22** es de 1375 RU (R_{obs}) y por tanto la relación estequiométrica (gp120/**3.22**) es 1:77 ($S_{obs} = 77$). Es decir, hay aproximadamente 77 moléculas de **3.22** unidas a cada molécula de gp120. Este valor es más del doble del observado para PRM-A (1:33).³³

¹³⁸ Giannetti, A., Koch, B. and Browner, M. Surface plasmon resonance based assay for the detection and characterization of promiscuous inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (3), 574-580.

¹³⁹ Di Primo, C. and Lebars, I. Determination of refractive index increment ratios for protein-nucleic acid complexes by surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* **2007**, 368 (2), 148-155.

A continuación se ensayaron los compuestos con un esqueleto central de trietilbenceno: **3.13**, **3.14**, **3.23**, **3.24**, **3.27** y el compuesto **3.33** con un esqueleto central no aromático (Figura 4.11) junto con el compuesto **3.22** ensayado anteriormente y la PRM-A ensayada a una concentración 12.5 μM .

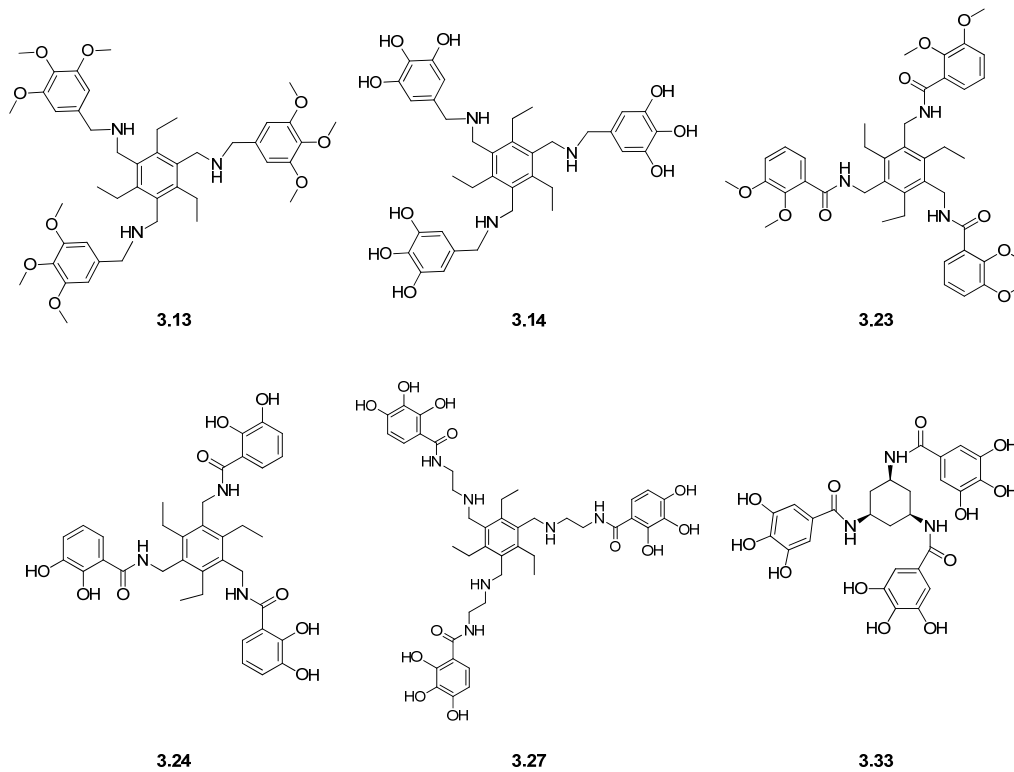


Figura 4.11. Estructura de los compuestos 3.13, 3.14, 3.23, 3.24, 3.27, 3.33

En este experimento se observa que el compuesto **3.27**, que se diferencia de **3.22** en que tiene los grupos fenólicos separados del esqueleto de benceno central, con una cadena aminoetilénica tiene una respuesta en el experimento SPR muy intensa, siendo incluso superior a la observada para **3.22** y PRM-A (a 12.5 μM). Una diferencia notable con respecto a **3.22** es que en el caso de **3.27** sí fue posible regenerar el chip con cuatro ciclos de NaOH, lo cual no se consigue con **3.22**. Con el resto de compuestos ensayados, **3.13**, **3.14**, **3.23**, **3.24** y **3.33** no se observaron afinidades significativas. Llama la atención la falta de interacción observada entre gp120 y el compuesto **3.24**, análogo de **3.22** en el que falta el OH en posición 4 del anillo fenólico (Figura 4.11).

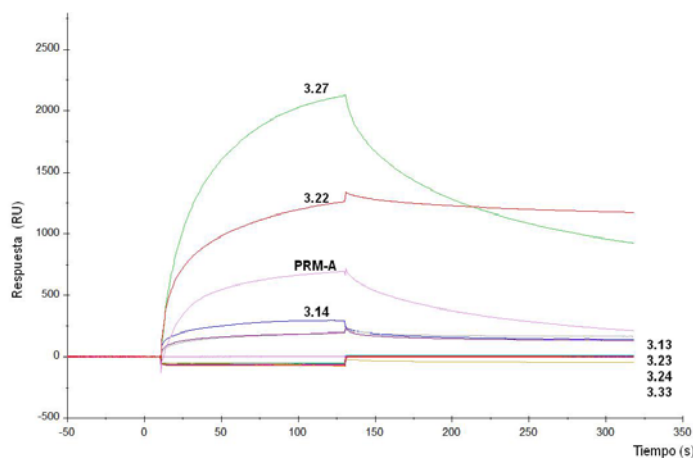


Figura 4.12. Sensograma de los compuestos 3.13, 3.14, 3.22, 3.23, 3.24, 3.27 y 3.33

De este apartado concluimos que mediante experimentos SPR, donde la glicoproteína gp120 está inmovilizada sobre el chip sensor, hemos observado una respuesta significativa con los compuestos **1.35**, **1.37** y **3.20** lo que podría indicar que dichos compuestos son capaces de interactuar con dicha glicoproteína. Además se ha observado una respuesta muy intensa con los compuestos **3.22** y **3.27** (ensayados a concentración 50 μM), que es incluso superior a la observada para la PRM-A (ensayada a concentración 12.5 μM).

Todos estos compuestos a excepción de **3.27** mostraron actividad antiviral significativa, que en base a los resultados observados en SPR podría ser debida a la interacción con la glicoproteína gp120.

Estudio conformacional de los compuestos 3.20 y 3.22 por RMN

Los compuestos **3.20** y **3.22** (Figura 4.13) tan sólo se diferencian a nivel estructural en la disposición de los OH fenólicos que en el caso de **3.20** ocupan las posiciones 3, 4 y 5 del anillo de benceno, y en **3.22** las posiciones 2, 3 y 4. Con respecto a su actividad anti-VIH, tal y como se ha comentado en el capítulo 3 de la presente tesis doctoral, ambos compuestos poseen valores de CE_{50} similares, $CE_{50} = 7.0 \pm 4.3 \mu\text{M}$ para el compuesto **3.20** y $CE_{50} = 6.7 \pm 0.7 \mu\text{M}$ para **3.22**, aunque **3.20** es 2.2 veces más tóxico que **3.22**. Sin embargo hemos observado grandes diferencias de comportamiento en el experimento SPR para ambos. Así el compuesto **3.20** presenta una respuesta débil mientras que la de **3.22** es muy intensa. Con el fin de explicar esta gran diferencia de comportamiento en el experimento SPR decidimos

llevar a cabo un estudio de RMN para determinar si existían diferencias conformacionales significativas entre ellos

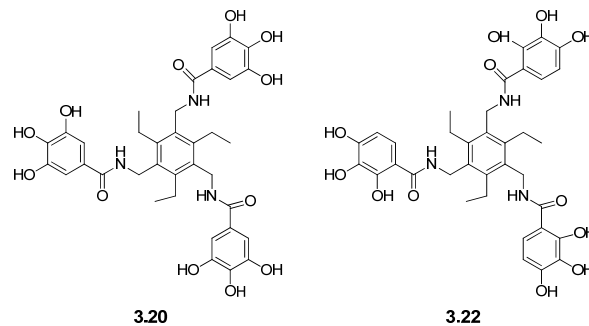


Figura 4.13. Estructuras de los compuestos 3.20 y 3.22

En primer lugar se registraron los espectros de protón en DMSO- d_6 de los dos compuestos, **3.20** y **3.22**, a diferentes temperaturas (21-55 °C). En la Figura 4.14 se muestran los espectros de protón registrados para el compuesto **3.22**.

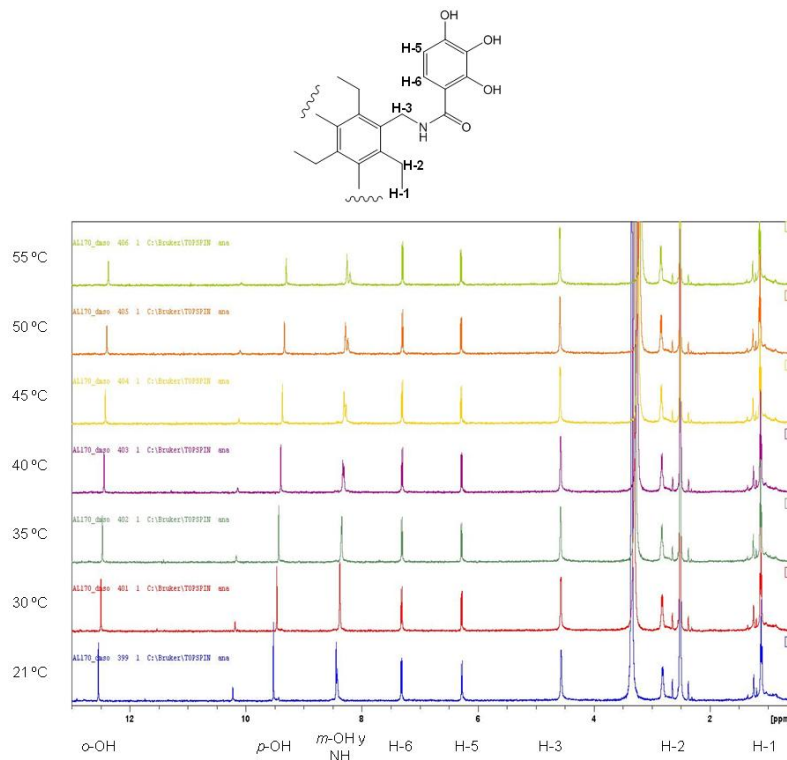


Figura 4.14. Espectros de ^1H -RMN de 3.22 en DMSO- d_6 a diferentes temperaturas. Las asignaciones están indicadas en la parte inferior de la figura.

La elección del disolvente no es casual ya que la detección de las señales de los protones de los grupos hidroxilo en disolventes próticos, especialmente en agua, por RMN está dificultada por el rápido intercambio con el deuterio del disolvente empleado. Así, la observación de dichas señales en agua tan solo es posible empleando técnicas muy especiales de RMN con ayuda de co-disolventes y a bajas temperaturas.¹⁴⁰ Sin embargo, en DMSO-*d*₆ sí se observan las señales de dichos protones debido a que existe un intercambio más lento con el disolvente.^{141,142}

En la Tabla 4.2 se detallan los desplazamientos químicos de los protones intercambiables (OH y NH) presentes en **3.20** y **3.22** registrados a distintas temperaturas (21-55 °C). Así mismo se incluyen los coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) para cada uno de dichos protones.

El coeficiente de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$), está relacionado con la “rapidez” con la que un protón puede intercambiar con el medio. Cuando un protón forma parte de un enlace de hidrógeno el intercambio con el medio es más lento y se refleja en un coeficiente de temperatura, en valor absoluto, menor. Por tanto, el coeficiente de temperatura indica la tendencia de un protón a formar enlaces de hidrógeno.^{143,144}

Por otra parte se conoce también el efecto en el desplazamiento químico de los protones de los grupos hidroxilo que forman enlaces de hidrógeno. Así, cuando un OH participa como dador de H en enlaces de hidrógeno intramoleculares aumenta su

¹⁴⁰ a) Symons, M., Naftalin, R. and Harvey, J. Proton magnetic-resonance study of hydration of glucose. *Nature* **1976**, 261 (5559), 435-436, b) Vanhalbeek, H. and Poppe, L. Nuclear-Magnetic-Resonance of hydroxyl and amido protons of oligosaccharides in aqueous-solution-Evidence for a strong intramolecular hydrogen-bond in sialic-acid residues. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113 (1), 363-365, c) Vanhalbeek, H. and Poppe, L. NMR-spectroscopy of hydroxyl protons in supercooled carbohydrates. *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1 (4), 215-216, d) Vanhalbeek, H. and Sheng, S. Evidence for a transient interresidue hydrogen-bond in sucrose in aqueous-solution obtained by rotating-frame exchange NMR-spectroscopy under supercooled conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 215 (2), 504-510.

¹⁴¹ King, R. and Chapman, O. Classification of alcohols by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86 (6), 1256.

¹⁴² Bernet, B. and Vasella, A. ¹H-NMR analysis of intra- and intermolecular H-bonds of alcohols in DMSO: Chemical shift of hydroxy groups and aspects of conformational analysis of selected monosaccharides, inositols, and ginkgolides. *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83 (5), 995-1021.

¹⁴³ a) Pardi, A., Wagner, G. and Wuthrich, K. Protein conformation and proton NMR chemical-shifts. *Eur. J. Biochem.* **1983**, 137 (3), 445-454, b) Wagner, G., Pardi, A. and Wuthrich, K. Hydrogen-bond length and ¹H-NMR chemical-shifts in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105 (18), 5948-5949, c) Wishart, D.S., Sykes, B.D. and Richards, F.M. The chemical-shift index- A fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR-spectroscopy. *Biochemistry* **1992**, 31 (6), 1647-1651.

¹⁴⁴ Andersen, N.H., Neidigh, J.W., Harris, S.M., Lee, G.M., Liu, Z. and Tong, H. Extracting Information from the Temperature Gradients of Polypeptide NH Chemical Shifts. 1. The Importance of Conformational Averaging. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8547-8561.

desplazamiento químico¹⁴², siendo mayor su desplazamiento cuanto mayor sea la fuerza del enlace.¹⁴⁵

Tabla 4.2. Desplazamientos químicos y coeficientes de temperatura de los protones intercambiables de 3.22 y 3.20

| T (°C) | δ (ppm) | | | | | | |
|---------------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|--------------|
| | 3.22 | | | | 3.20 | | |
| | <i>o</i> -OH | <i>m</i> -OH | <i>p</i> -OH | NH | <i>p</i> -OH | 2 <i>m</i> -OH | NH |
| 21 | 12.541 | 8.442 | 9.523 | 8.422 | 8.648 | 8.999 | 7.715 |
| 25 | 12.521 | 8.414 | 9.497 | 8.403 | 8.619 | 8.973 | 7.691 |
| 30 | 12.496 | 8.379 | 9.465 | 8.397 | 8.583 | 8.943 | 7.662 |
| 35 | 12.471 | 8.344 | 9.432 | 8.355 | 8.547 | 8.911 | 7.632 |
| 40 | 12.447 | 8.309 | 9.400 | 8.331 | 8.511 | 8.879 | 7.602 |
| 45 | 12.421 | 8.273 | 9.368 | 8.306 | 8.476 | 8.848 | 7.572 |
| 50 | 12.395 | 8.238 | 9.335 | 8.282 | 8.440 | 8.816 | 7.541 |
| 55 | 12.368 | 8.202 | 9.302 | 8.256 | 8.405 | 8.785 | 7.511 |
| $ \Delta\delta/\Delta T $ | 5.100 | 6.500 | 7.100 | 5.000 | 7.200 | 6.300 | 6.000 |

Los datos experimentales indican que el hidroxilo en posición *orto* (*o*-OH) del compuesto **3.22** se encuentra muy desplazado a campo bajo, con diferencias de 3 y 4 ppm con respecto a los otros dos grupos hidroxilo (*m*-OH y *p*-OH). Además, el coeficiente de temperatura para este hidroxilo es más bajo que los correspondientes a los hidroxilos *m*-OH y *p*-OH, por lo que podemos concluir que el *o*-OH debe estar implicado en un enlace de hidrógeno intramolecular.

Para los protones intercambiables de **3.20** no se observan comportamientos especiales en el desplazamiento químico ni en el coeficiente de temperatura lo cual indica que no existen enlaces de hidrógeno intramoleculares.

Por otra parte se obtuvo el espectro NOESY (Figura 4.15) del compuesto **3.22** a 21 °C observándose algunos NOEs de interés como son: NH/H-6, H-6/H-5 y H-5/NH.

¹⁴⁵ Szatmari, I., Fulop, F., Kleinpeter, E. and Lammermann, A. Inter- or Intramolecular N···H-O or N-H···O Hydrogen Bonding in 1,3-Amino-alpha/beta-naphthols: An Experimental NMR and Computational Study. *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113 (21), 6197-6205.

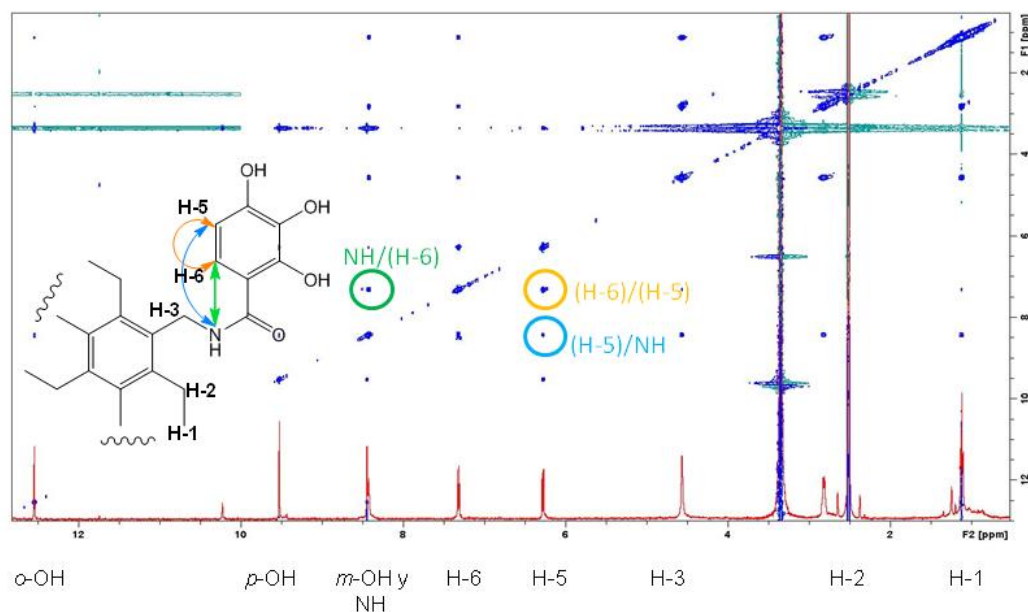


Figura 4.15. Espectro NOESY 500ms, 21 °C de 3.22 en DMSO- d_6 . Los círculos indican los NOEs representados en la estructura en clave de colores.

En la Tabla 4.3 se recogen tanto las intensidades cualitativas como las cuantitativas, determinadas a partir del experimento NOESY. Para la determinación cuantitativa, se ha dado el valor 1 a la integral de mayor intensidad, recalculándose el resto con respecto a ella. Para la determinación cualitativa se ha considerado la integral con valor 1 “muy fuerte”, con valores de 0.5 a 0.99 “fuerte”, de 0.2 a 0.49 “medio”, de 0.1 a 0.19 “débil” e inferiores a 0.1 “muy débil”. La columna “número de protones implicados” da idea de cuántos protones participan en cada señal NOE.

Del espectro NOESY de la Figura 4.15 y los datos de la Tabla 4.3 cabe destacar el NOE observado entre el NH del enlace amida y el H-6. De hecho, este NOE es más intenso que el observado entre los protones contiguos del anillo aromático H-6/H-5, que están a una distancia conocida de 2.4 Å, por lo que la distancia entre el NH y el H-6 debe ser más pequeña. Además se observa un NOE entre el NH y el H-5 que, aunque débil, es visible.

Tabla 4.3. Información cualitativa y cuantitativa de los NOEs obtenidos para 3.22

| | Intensidad Cuantitativa | Intensidad Cualitativa | Número de Protones Implicados |
|----------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------|
| <i>o</i> -OH/ <i>m</i> -OH | 0.05 | Muy débil | 3 / 3 |
| <i>m</i> -OH/ <i>p</i> -OH | 0.04 | Muy débil | 3 / 3 |
| <i>p</i> -OH/H-5 | 0.07 | Muy débil | 3 / 3 |
| NH/H-6 | 0.36 | Medio | 3 / 3 |
| NH/H-3 | 0.18 | Débil | 3 / 6 |
| NH/H-2 | 0.16 | Débil | 3 / 6 |
| NH/H-1 | 0.10 | Débil | 3 / 9 |
| NH/H-5 | 0.02 | Muy débil | 3/3 |
| H-6/H-5 | 0.21 | Medio | 3 / 3 |
| H-6/H-2 | 0.04 | Muy débil | 3 / 6 |
| H-6/H-1 | 0.05 | Muy débil | 3 / 9 |
| H-3/H-2 | 1.00 | Muy fuerte | 6 / 6 |
| H-3/H-1 | 0.5 | Fuerte | 6 / 9 |
| H-2/H-1 | 0.56 | Fuerte | 6 / 9 |

De los datos experimentales podemos concluir:

1.- Los protones NH y H-6 están muy próximos, más de lo que lo están los dos H aromáticos (H-5 y H-6) entre sí.

2.- El hidroxilo en posición *orto* (*o*-OH) forma un enlace de hidrógeno intramolecular. La existencia del NOE NH/H-6 indica claramente que el NH está orientado hacia el H-6 y por tanto, el *o*-OH debe estar orientado hacia el carbonilo formando un enlace de hidrógeno con el oxígeno de dicho grupo.

3.- Por último, los datos de RMN apoyan una disposición en “el mismo plano” del anillo fenólico y el enlace amida, permitiendo así que las distancias sean las adecuadas para la formación del enlace de hidrógeno intramolecular observado (Figura 4.16).

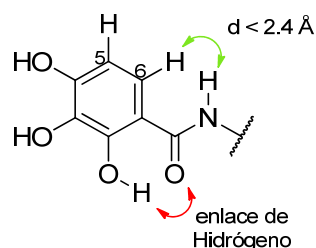


Figura 4.16. Disposición del anillo fenólico en 3.22

Para corroborar los resultados de RMN decidimos realizar estudios de modelización molecular. Para ello se ha empleado el procedimiento de búsqueda conformacional de mínimos de energía MCMM (*Montecarlo Multiple Minimum*). Se han utilizado tres campos de fuerza: AMBER, MM3 y OPLS05.¹⁴⁶ Los cálculos se han llevado a cabo en disolvente implícito y considerando la constante dieléctrica del DMSO ($\epsilon = 47.5$). Con los tres campos de fuerza empleados, se obtuvieron conformeros de mínima energía muy similares en los que prevalecen los enlaces de hidrógeno entre el NH y el OH fenólico en posición *orto*. En la Figura 4.17 se muestra en concreto el conformero obtenido con el campo de fuerzas MM3. Este dato no está de acuerdo con el resultado experimental obtenido según el cual los enlaces de hidrogeno se establecen entre el OH y el oxígeno del carbonilo.

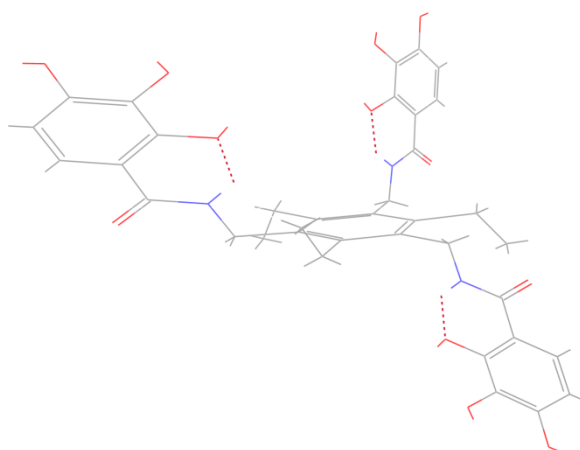


Figura 4.17. Mínimo de Energía ($E = 49.54 \text{ kcal/mol}$) encontrado para el compuesto 3.22 de la búsqueda conformacional MCMM empleando el campo de fuerzas MM3

¹⁴⁶ AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement); OPLS (Optimized Potential for Liquid Simulations); MMFF (Merck Molecular Force Field).

Con el fin de averiguar el campo de fuerzas que mejor reprodujese los datos experimentales se realizó una búsqueda bibliográfica, encontrándose que el campo de fuerzas MMFF es el más indicado para describir este tipo de interacciones intramoleculares.¹⁴⁷ Este campo de fuerzas se aplicó a la búsqueda conformacional de **3.22**. De este modo, se encontró un mínimo de energía ($E = 137.53$ kcal/mol) empleando el procedimiento de búsqueda de mínimos de energía MCMM (Figura 4.18), que explica los datos experimentales (coeficientes de temperatura, desplazamientos químicos, y gran parte de los NOEs observados). El mínimo de energía encontrado presenta una segregación facial tipo *ababab*, donde los anillos fenólicos están orientados con los grupos OH hacia fuera de la molécula y los tres protones de los NH del enlace amida hacia dentro creando un “interior” polar sobre la superficie apolar del benceno. Esta estructura está de acuerdo con la de compuestos similares descritos en la bibliografía.^{126a} En dicha estructura la distancia entre el OH fenólico en posición *orto* y el oxígeno carbonílico es de 2.056 Å y entre el NH y el H-6 es 2.23 Å lo que está de acuerdo con los dos NOEs observados.

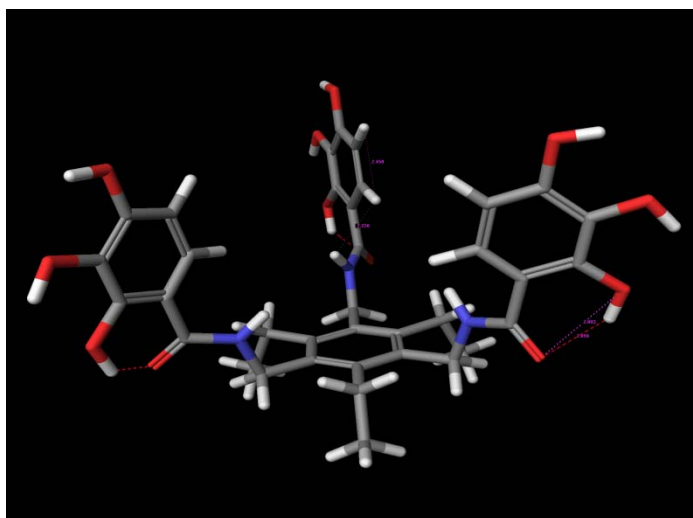


Figura 4.18. Estructura de mínima energía ($E = 137.53$ kcal/mol) de **3.22** empleando el campo de fuerzas MMFFs.

Sin embargo, existen algunos NOEs que difícilmente encuentran explicación si se tiene en cuenta como única conformación la representada en la Figura 4.18.

¹⁴⁷ Halgren, T. MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *J. Comput. Chem.* **1999**, 20 (7), 730-748.

Tabla 4.4. NOEs sin explicación en la conformación representada en la Figura 4.18

| | Intensidad Cuantitativa | Intensidad Cualitativa | d (Å) |
|---------|-------------------------|------------------------|-------|
| NH/H-1 | 0.10 | Débil | 4.58 |
| H-6/H-1 | 0.05 | Muy débil | 5.89 |

Estos NOEs, NH/H-1 y H-6/H-1 (Tabla 4.4), podrían explicarse por la participación de conformaciones como la representada en la Figura 4.19 ($E = 139.83$ kcal/mol) que es la segunda estructura en el ranking de energías encontrado en la búsqueda conformacional, que presenta una diferencia de 2.30 kcal/mol respecto a la estructura de mínima energía ($E = 137.53$ kcal/mol). En esta segunda estructura encontramos uno de los brazos “polifenólicos” orientado de manera opuesta a los otros dos no adoptándose el patrón alternante de tipo *ababab* alrededor de la plataforma de benceno. En esta segunda estructura las distancias NH/H1 y H-6/H1 son respectivamente 2.71 Å y 2.56 Å lo que justifica dos de los NOEs encontrados experimentalmente. Dichos NOES también podrían justificarse por la posible rotación de los etilos unidos al anillo de benceno tal y como se ha observado en trabajos publicados.^{126a}

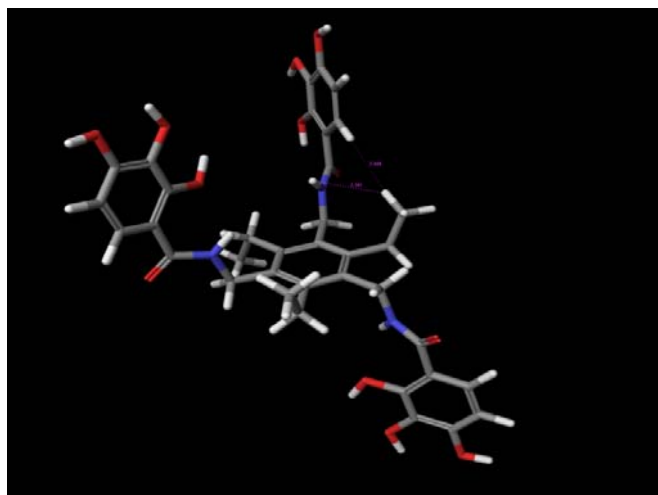


Figura 4.19. Segunda estructura en el ranking de Energía ($E = 139.83$ kcal/mol) de la búsqueda conformacional realizada para 3.22 con el campo de fuerzas MMFFs.

Con respecto al compuesto **3.20**, que posee una estructura similar a la de **3.22** en la que los OH ocupan las posiciones 3, 4, y 5 del anillo aromático, los datos de RMN indican que ninguno de los OH fenólicos participa en enlaces de hidrógeno y

tampoco el NH se ve afectado por ninguna interacción. Los NOEs observados para este compuesto concuerdan con la estructura de mínima energía obtenida de la búsqueda conformacional empleando el campo de fuerzas MMFFs ($E = 132.56$ kcal/mol) representada en la Figura 4.20 en la que se aprecia un patrón alternante de tipo *ababab* y donde las distancias son: $\text{CH}_3\text{-NH}$, 4.62 Å; $(\text{CH}_2)_{\text{NH}}\text{-NH}$, 2.77 Å; CH-NH , 2.16 Å y NH-CH_3 , 4.62 Å.

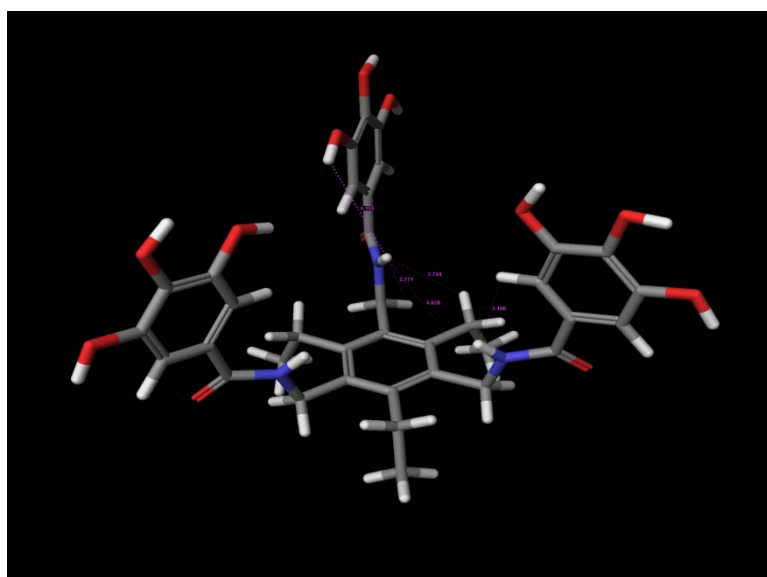


Figura 4.20. Conformación de mínima energía ($E = 132.56$ kcal/mol) obtenida para 3.20 empleando el campo de fuerzas MMFFs

Además, se observan diferentes conformaciones con energía muy similar a la del mínimo (tan solo 0.19 kcal/mol de diferencia), y de estructura también muy similar, en las que el ángulo diedro correspondiente al enlace CO-anillo fenólico presenta diferentes valores (Figura 4.21). Este resultado indica que no existe un control conformacional de los sustituyentes unidos al benceno y por tanto el compuesto **3.20** no posee una estructura preorganizada como ocurre con el compuesto **3.22**.

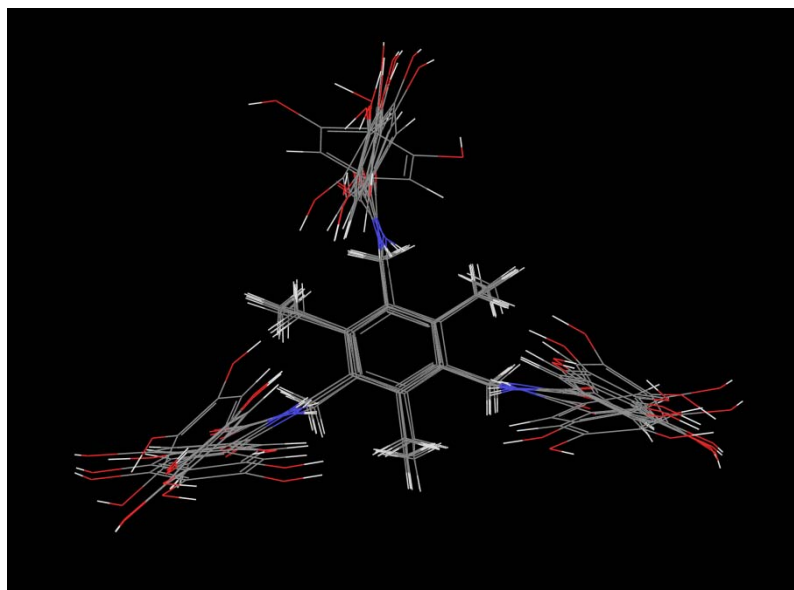


Figura 4.21. Superposición de estructuras de más baja energía, comprendidas en una ventana de 0.19 kcal/mol de la búsqueda conformacional realizada para el compuesto 3.20

Como se había observado para el compuesto **3.22**, en el compuesto **3.20** también se observa un NOE entre los protones H-5 y H-6 aromáticos y los CH₃ del etilo unido al benceno central que no tiene respuesta si se tiene en cuenta la conformación de la Figura 4.20 ya que estos protones en dicha estructura se encuentran a una distancia de 6.5 Å. Este NOE se explicaría con la séptima estructura en ranking de energía ($E = 134.06$ kcal/mol) (Figura 4.22), con una diferencia de 1.51 kcal/mol respecto a la estructura de mínima energía. En ella, uno de los brazos “polifenólicos” está hacia abajo, quedando una estructura de tipo *abbaab*. En tal disposición encontramos que la distancia entre el CH aromático y el CH₃ es de 2.69 Å lo que explicaría el NOE observado.

Por tanto, se podría concluir que en el compuesto **3.22** existe un control conformacional de los sustituyentes (anillos de polifenol) unidos al esqueleto central (trietilbenceno), y por tanto dicho compuesto posee una estructura preorganizada muy favorecida energéticamente, mientras que en el compuesto **3.20** la estructura preorganizada no está energéticamente tan favorecida.

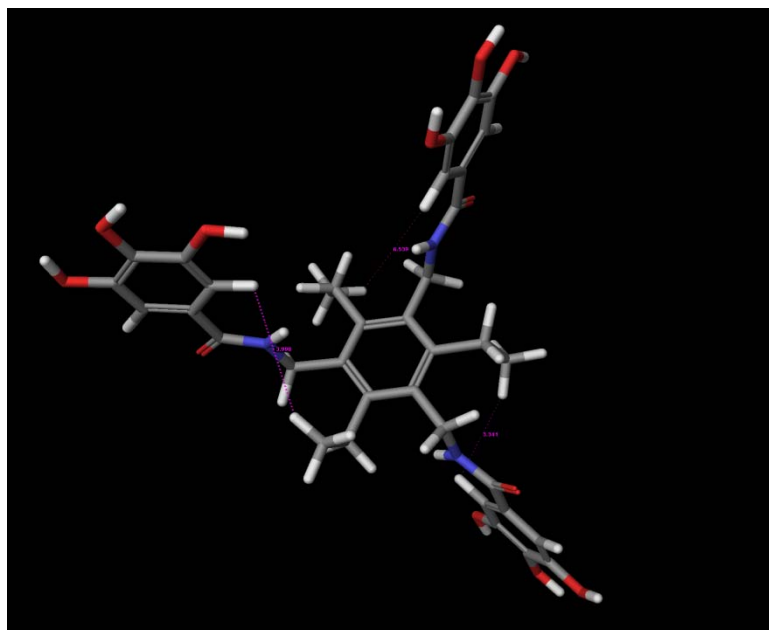


Figura 4.22. Séptima estructura en el ranking de Energía ($E= 134.06$ Kcal/mol) de la búsqueda conformacional realizada para **3.20** con el campo de fuerzas MMFFs.

*Estudio de interacción de **3.20** y **3.22** con carbohidratos por RMN*

El objetivo del trabajo descrito en este apartado es evaluar la capacidad de los compuestos **3.20** y **3.22** para interactuar con carbohidratos y de forma especial con los carbohidratos presentes en la cubierta viral mediante experimentos de RMN. Para ello nos hemos basado en la observación de la perturbación de desplazamientos químicos, comentado en el capítulo 2, así como en el cambio del ensanchamiento de las señales de ambos compuestos en presencia de potenciales ligandos.

La anchura de línea de las señales de resonancia es directamente proporcional a la velocidad de relajación transversal y, de hecho, la existencia de velocidades muy grandes, y por tanto de señales muy anchas, ha supuesto una gran limitación para determinar la estructura de macromoléculas mediante RMN. En cambio, las señales de RMN de las moléculas pequeñas son generalmente estrechas. Esta diferencia de anchura puede explotarse para detectar la existencia de unión de uno o varios ligandos a un receptor. La existencia de ensanchamiento de las

líneas de las moléculas pequeñas al añadir el receptor potencial demuestra inequívocamente la existencia de interacción.¹⁰⁰

En primer lugar se estudió la interacción del compuesto **3.20** con mono- y disacáridos, algunos de los cuales están presentes en la cubierta viral, empleando DMSO-*d*₆. Los carbohidratos utilizados para el estudio fueron: metil- α -D-glucopiranosido (Me- α -Glc), metil- β -D-glucopiranosido (Me- β -Glc), metil- α -D-galactopiranosido (Me- α -Gal), metil- β -D-galactopiranosido (Me- β -Gal), metil- α -D-manosido (Me- α -Man), N-acetil-glucosamina (NAcGlc) y α,α -trehalosa. En caso de que hubiese interacción con alguno de estos azúcares se observarían variaciones tanto en el desplazamiento químico como en la anchura de las señales. Las señales de **3.20** y **3.22** no mostraron cambio alguno al añadir los monosacáridos comentados lo que parece indicar que dichos compuesto no interaccionan con ellos.

Por otra parte, se realizó el experimento contrario en el que nos fijamos en la variación de desplazamiento químico y ensanchamiento que experimentan las señales de un determinado glicósido en presencia de **3.20** o **3.22**. En concreto, en la Figura 4.23 se muestran los espectros de ¹H-RMN de metil α -manósido, tanto libre como en presencia de los compuestos **3.20** y **3.22**. Tal y como se observa en la figura, las señales del α -manósido se ensanchan, pero no sufren ningún cambio en el desplazamiento químico. Este cambio no se considera razón suficiente para indicar que exista interacción entre dicho carbohidrato y los compuestos **3.20** y **3.22**.

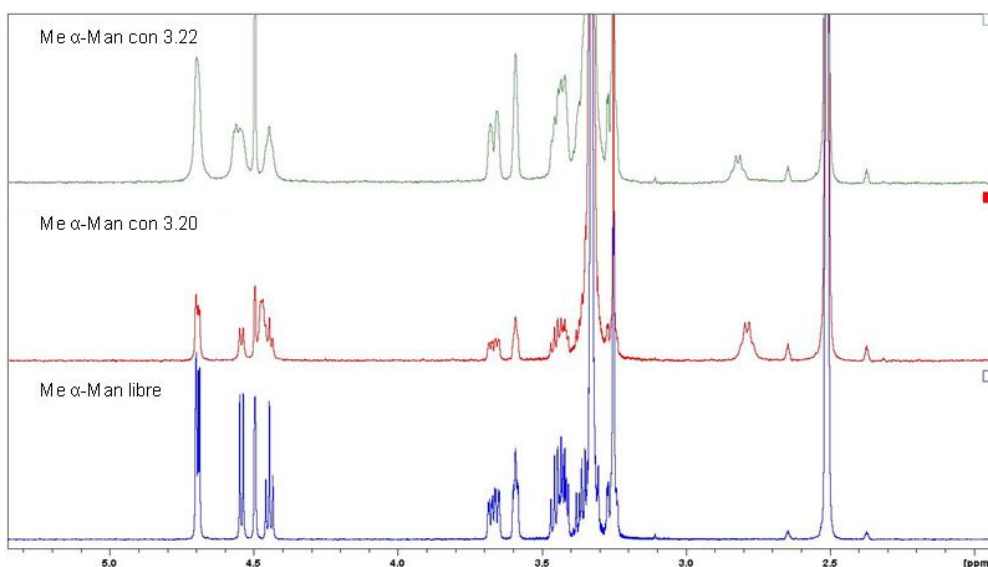


Figura 4.23. Espectros de ¹H-RMN de Me- α -Man libre y en presencia de **3.20** y **3.22**

A continuación se estudió la interacción de los compuestos **3.20** y **3.22** con tres polisacáridos de alto contenido en manosa de estructura general **A**, **B** y **C** (Figura 4.24). Los tres polisacáridos constan de una cadena lineal formada por α -manosas unidas entre las posiciones 1 y 6. A su vez estos residuos de manosa llevan unidos en posición C-2: glucosa (**A**) o manosa (**B** y **C**). En el caso de la estructura **B**, la manosa lateral se encuentra situada cada 3 manosas de la cadena central mientras que en la estructura **C** la manosa lateral está unida consecutivamente a cada una de las manosas de la cadena principal, en ambos casos en dirección (1 \rightarrow 2).

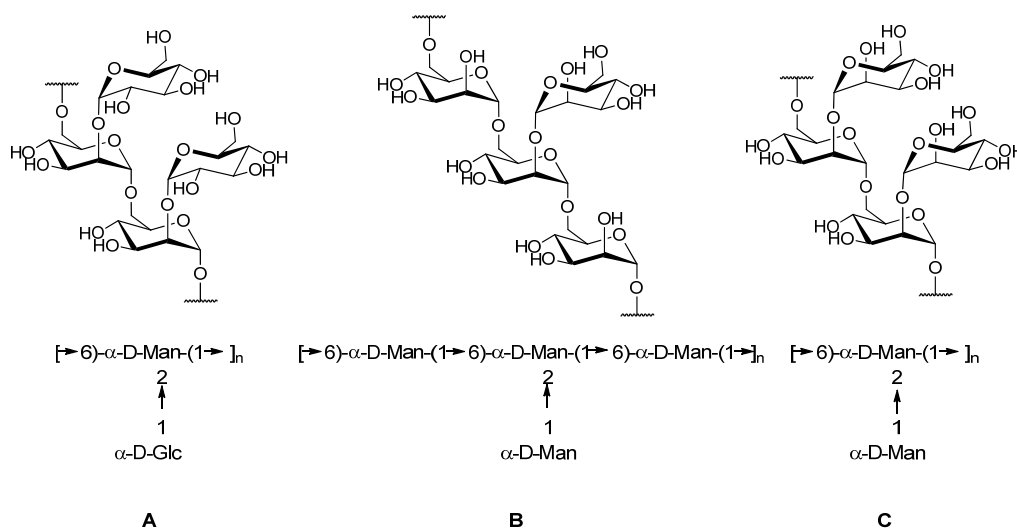


Figura 4.24. Estructuras de los polisacáridos **A**, **B** y **C**

Desde el punto de vista experimental, se realizan varios experimentos. Primero uno de control en el que el tubo de RMN solamente contiene el compuesto en estudio disuelto en $\text{DMSO-}d_6$ con una concentración aproximada 0.7 mM y se registra su espectro de $^1\text{H-RMN}$. A continuación, se preparan disoluciones de los polisacáridos **A**, **B** y **C** de concentración 23 mg/mL (la concentración molar no se conoce porque los polímeros son compuestos heterogéneos) y se van añadiendo a la disolución del compuesto en estudio. En el caso de que alguno de los polisacáridos añadidos mostrase afinidad por el compuesto en estudio se producirá el consiguiente desplazamiento y ensanchamiento de sus señales.

Cuando estos experimentos se realizaron con el compuesto **3.20** no fue observado ningún cambio en el espectro lo que indica que no existe interacción entre dicho compuesto y los polisacáridos **A**, **B** y **C**.

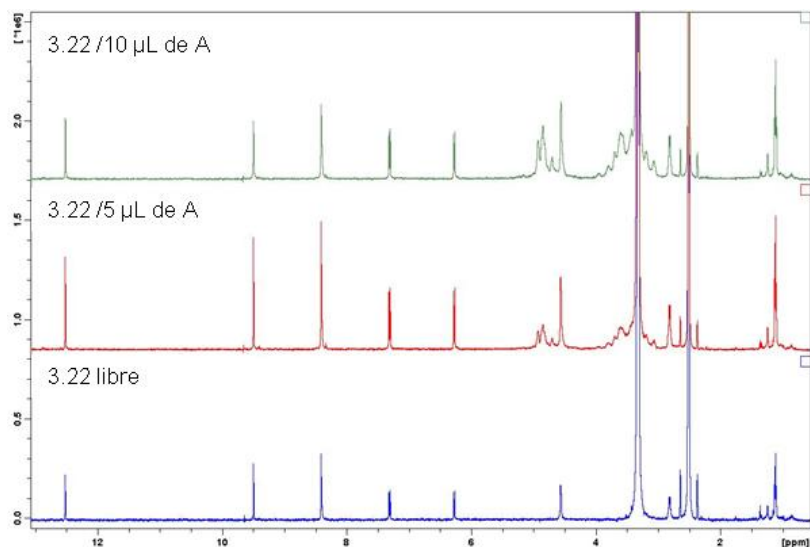


Figura 4.25. Estudio de interacción entre el compuesto 3.22 y el polisacárido A

Cuando el experimento de interacción se realizó con el compuesto **3.22** y los polisacáridos **A** y **B**, no se observaron cambios ni en el aspecto ni en el desplazamiento químico de las señales de **3.22** tal y como se ve en la Figura 4.25 para el caso del polisacárido **A**.

Sin embargo, en presencia del polisacárido **C** se observó una variación significativa en el desplazamiento químico de las señales de los H aromáticos, H-5 y H-6, de **3.22** así como el ensanchamiento de éstas (Figura 4.26).

Estos resultados indican la existencia de interacción entre el polisacárido **C** y el compuesto **3.22**, siendo los protones aromáticos los que están implicados en dicha interacción.

Por lo que concluimos que, los resultados obtenidos en el presente capítulo parecen indicar que el compuesto **3.22**, en el que existe un control conformacional de los sustituyentes unidos al benceno, posee la preorganización necesaria para llevar a cabo el reconocimiento molecular de los oligosacáridos de la glicoproteína viral gp120, siendo los protones aromáticos de los tres brazos polifenólicos orientados por encima del esqueleto central de 2,4,6-trietilbenceno, los responsables de la interacción con los oligosacáridos.

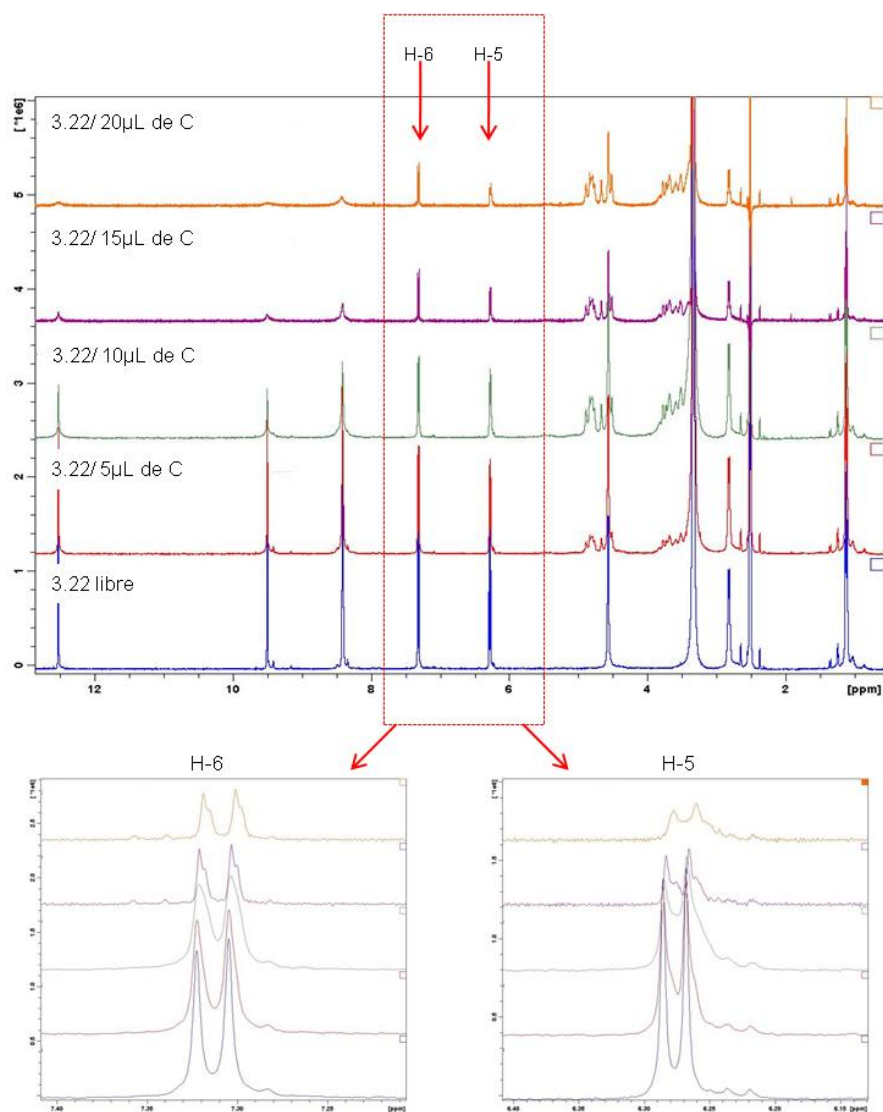


Figura 4.26. Espectro de 3.22 al añadir el polisacárido C

Conclusiones

El objetivo de la presente Tesis doctoral ha sido la obtención de compuestos con potencial utilidad para el tratamiento del SIDA mediante una aproximación terapéutica novedosa que consiste en la búsqueda de moléculas pequeñas capaces de actuar sobre el VIH, agente causante del SIDA mediante un mecanismo similar al de las lectinas o la pradimicina A.

Con este objetivo se ha llevado a cabo el diseño y síntesis de moléculas pequeñas capaces de unirse a los carbohidratos presentes en la glicoproteína gp120 del VIH. Para el diseño de estas moléculas se ha tenido en cuenta el tipo de interacciones que establecen las lectinas con los carbohidratos de la cubierta viral que son: múltiples, de baja afinidad y de tipo no covalente. En base a ello se han sintetizado compuestos con un núcleo central de diferente naturaleza al que se le han unido varios residuos fenólicos con 1, 2 y 3 hidroxilos. La elección de residuos fenólicos para interactuar con los carbohidratos de la cubierta viral se ha basado en la posibilidad que ofrece este tipo de anillo para establecer interacciones de tipo CH/ π y enlaces de hidrógeno con los carbohidratos de la cubierta viral. Las modificaciones estructurales llevadas a cabo han consistido en variar tanto el número de residuos de polifenol que se unen a un determinado núcleo central o "scaffold" como en modificar la arquitectura de éste con el fin de distribuir los anillos fenólicos de manera diferente en el espacio y por último en modificar el tipo de unión entre ambos.

Se han preparado tres series de compuestos. En la primera, se han sintetizado compuestos lineales y flexibles con un polialcohol o poliamina como esqueleto central, en los que se ha modificado la longitud y la ramificación del esqueleto central y el número de anillos fenólicos unidos a él. En la segunda serie, se han utilizado mono- y disacáridos como esqueleto central, lo que ha permitido obtener compuestos de tipo globular con pequeñas diferencias en cuanto a la orientación espacial de los polifenoles. Por último, se ha empleado un esqueleto de trietilbenceno con el fin de establecer interacciones adicionales de tipo CH/ π con los carbohidratos de la cubierta viral.

Las conclusiones más importantes de la presente Tesis Doctoral son las siguientes:

- 1) En las tres series de compuestos se observa que la presencia de los OH fenólicos es imprescindible para la actividad ya que los compuestos protegidos como aril metil o aril fenil éteres resultaron inactivos.
- 2) El número de OH presentes en el anillo aromático es importante para la actividad resultando activos tan solo los compuestos con 3 OH en el anillo.
- 3) El número de residuos de polifenol unidos a un determinado esqueleto no parece influir de manera importante en la actividad. Así, compuestos con mayor número de residuos de polifenol presentaron una actividad similar a la de los que poseen menos.
- 4) El esqueleto central es importante para modular tanto la actividad como la toxicidad. Los mejores resultados se han conseguido con el esqueleto de trietilbenceno y α,α -trehalosa. Así el derivado de trehalosa **2.27** (IT = 12.2) y los derivados de trietil benceno **3.20** (IT = 12) y **3.22** (IT = 29) fueron los más activos y a la vez los menos tóxicos, por lo que fueron los que mejor índice terapéutico presentaron.
- 5) Mediante técnicas de RMN se ha estudiado la interacción de alguno de los compuestos sintetizados con carbohidratos que forman parte de la cubierta del VIH. De los resultados obtenidos se puede concluir que parece existir interacción en agua entre los anómeros α y β de manosa **2.17** y **2.18** y distintos carbohidratos, siendo dicha interacción especialmente importante en la zona de los protones aromáticos. La interacción del anómero β (**2.18**) con los carbohidratos estudiados es aproximadamente tres veces superior a la del anómero α (**2.17**), si bien no se observan diferencias de selectividad en cuanto a los carbohidratos ensayados.
- 6) Mediante experimentos de resonancia de plasmón de superficie (SPR) se ha estudiado la interacción de los compuestos sintetizados con la glicoproteína gp120 del VIH observándose una respuesta significativa con los compuestos **1.35**, **1.37** y **3.20**. Además, se ha observado una respuesta muy intensa con los compuestos **3.22** y **3.27** que es incluso superior a la observada para el compuesto de referencia, Pradimicina-A (PRM-A).
- 7) Llama la atención la diferencia de comportamiento en el ensayo SPR de los compuestos **3.20** y **3.22**, ya que el compuesto **3.20** presenta una respuesta débil mientras que la de **3.22** es muy intensa. A nivel estructural ambos compuestos poseen como esqueleto central un anillo de trietilbenceno sustituido con tres anillos fenólicos. En el caso de **3.20** los OH fenólicos

ocupan las posiciones 3, 4 y 5 mientras que en **3.22** ocupan las posiciones 2, 3 y 4. Para tratar de explicar estos resultados se han llevado a cabo estudios de RMN y Modelización Molecular. Así, se ha determinado que en el compuesto **3.22** existe un control conformacional de los sustituyentes (anillos de polifenol) unidos al esqueleto central (trietilbenceno), y por tanto dicho compuesto posee una estructura preorganizada muy favorecida energéticamente, mientras que en el compuesto **3.20** la estructura preorganizada no está energéticamente tan favorecida.

- 8) Por último, se ha estudiado mediante RMN la interacción de los compuestos **3.20** y **3.22** con tres polisacáridos de alto contenido en manosa observándose que tan solo el compuesto **3.22** interacciona con uno de los polisacáridos ensayados. Dicho polisacárido posee cierta analogía estructural con el oligosacárido terminal de la glicoproteína gp120 y consta de una cadena central formada por α -manosas, unidas entre las posiciones 1 y 6, a la que se anclan consecutivamente manosas laterales en dirección (1 \rightarrow 2).

De todo lo expuesto consideramos que la hipótesis de partida propuesta en la presente Tesis Doctoral según la cual los polifenoles podrían ser compuestos útiles para interactuar con los carbohidratos de la glicoproteína gp120 parece ser adecuada.

En base a los resultados de actividad, afinidad, estudios de RMN y de Modelización Molecular, podemos concluir que el compuesto **3.22**, en el que existe un control conformacional de los sustituyentes unidos al benceno, posee la preorganización necesaria para llevar a cabo el reconocimiento molecular de los oligosacáridos de la glicoproteína viral gp120. Los protones aromáticos de los tres brazos polifenólicos orientados por encima del esqueleto central de 2,4,6-trietilbenceno parecen ser los responsables de la interacción con los oligosacáridos. Por tanto, el compuesto **3.22** es un buen cabeza de serie con el que seguir trabajando, a fin de encontrar compuestos más activos y menos tóxicos capaces de interactuar con los carbohidratos de la glicoproteína viral gp120 y de validar la aproximación terapéutica que constituye el objetivo principal de la presente Tesis doctoral.

Parte Experimental

Generalidades

Procedimientos cromatográficos

El seguimiento de las reacciones se ha realizado por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando cromatofolios de 0.2 mm de espesor, con gel de sílice de tipo 60, Merck F₂₅₄. Los compuestos se detectaron con luz UV a 254 nm y/o mediante la utilización de reveladores químicos como ácido sulfúrico en etanol, Ninhidrina, Vainillina, ácido fosfomolibdico, el revelador de Hanessian (molibdato amónico y sulfato de cerio), permanganato potásico, y/o posterior calefacción.

Las cromatografías preparativas se realizaron en columna flash, utilizando gel de sílice Merck tipo 60 (230-400 mesh), o mediante cromatografía circular centrífuga en capa fina (CCTLC) en un cromatotrón Harrison Research modelo 8924, en placas circulares de vidrio, con capas de gel de sílice 60 PF₂₅₄ con yeso de 1 mm de espesor y flujo (2-4 mL/min) o cromatografía flash (HPFC) en un instrumento Biotage Horizon. Los eluyentes empleados se indican en cada caso y las proporciones indican la relación volumen: volumen. Para cromatografía en fase reversa se han utilizado cartuchos SPE (extracción en fase sólida) DSC-18Lt.

La cromatografía de alta resolución utilizada para la caracterización de los productos se ha realizado en un módulo de separación Alliance 2695 (Waters) y detector PDA (Photo Diode Array) Waters 2996, acoplado a un espectrómetro de masas Micromass ZQ. Como disolvente A se ha utilizado acetonitrilo con un 0.08% de ácido fórmico y como disolvente B se ha utilizado agua con un 0.1% de ácido fórmico y flujo de 1ml/min.

Puntos de fusión

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Reichert-Jung Kofler y no están corregidos.

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se han realizado en su mayoría a temperatura ambiente; los experimentos a distintas temperaturas se

llevaron a cabo en algunos de los experimentos descritos en el capítulo 4. El disolvente deuterado usado se indica en cada caso. Los desplazamientos químicos (en ppm) se han referido al tetrametilsilano (TMS), en aquellas muestras disueltas en CDCl_3 , y en el resto de los casos se empleó la señal correspondiente al disolvente utilizado [$(\text{CD})_3\text{CO}$, DMSO-d_6 , CD_3OD].

Los espectros de ^1H -RMN se registraron en espectrómetros Varian Inova-300 (300 MHz), Varian Inova-400 (400 MHz), Bruker-300 (300 MHz) y Bruker-500 (500 MHz). En cada caso, junto al disolvente en el que se ha realizado el espectro, está indicada la frecuencia en la que se ha registrado el mismo. Se indican en cada caso los desplazamientos químicos en la escala δ (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuarteto; dd, doblete de doblete; m, multipleto), el número de protones (deducidos por la integral), el valor de las constantes de acoplamiento J (Hz) y la asignación estructural.

Los espectros de ^{13}C -RMN se registraron en espectrómetros Bruker-300 (75 MHz), Varian-INOVA-300 (75 MHz) o Varian-INOVA-400 (100 MHz), utilizando las mismas referencias internas que en los espectros de ^1H -RMN. Se indican los desplazamientos químicos de las señales en la escala δ (ppm).

Espectrometría de masas (EM)

La determinación del Ión Molecular se llevó a cabo mediante las técnicas de electroespray positivo (ES+) registrándose dichos experimentos en un Hewlett Packard 1100 MSD, como portador metanol o bien mezcla metanol-acetonitrilo-ácido fórmico (1%). El flujo utilizado fue 0.5 mL/min, presión de nebulizador 40 psi, y la temperatura y flujo de gas de secado fue 300°C y 10 mL/min. En esta técnica los picos $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$ y $[\text{M}+\text{Na}]^+$ suelen ser las señales más significativas. Como ha sido comentado en la sección de cromatografía, también se determinó el ión molecular en un espectrómetro de masas Micromass ZQ. Cuando fue requerida la masa exacta se registraron los experimentos en un Agilent Technologies 6520 Accurate-Mass QTOF LC/MS.

MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight)

La determinación de la masa molecular fue llevada a cabo en un Voyager-DETM STR Biospectrometry (Applied Biosystems), equipado con un láser de nitrógeno (337 nm). Los datos recogidos fueron procesados con el Software Data ExplorerTM (Applied Biosystems) y se han realizado en el laboratorio de microanálisis del

Departamento de Ciencias Experimentales de la Salud en la Universidad Pompeu Fabra (UPF).

Análisis elemental

Los análisis elementales de los compuestos no descritos en la bibliografía se hallan en el rango de ± 0.4 respecto a los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares y se han realizado en el laboratorio de microanálisis del C.N.Q.O. “Lora Tamayo” con un analizador Heareus CHN-O-Rapid y se expresan en tanto por ciento.

Microondas

Los experimentos fueron realizados en un Biotage Initiator™ 2.0.

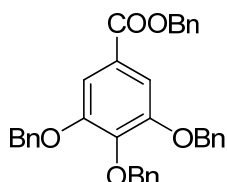
Rotación Óptica

Los medidas fueron tomadas en un polarímetro Perkin-Elmer 241MC.

Capítulo 1

Síntesis de polifenoles de partida con grupos hidroxilo protegidos

3,4,5-Tribenciloxibenzoato de bencilo (**1.22**)⁶³ (Esquema 1.5)

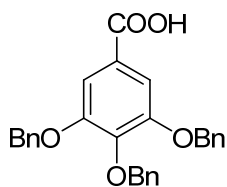


El ácido gálico (3,4,5-trihidroxibenzoico) **1.1** (5 g, 29.39 mmol, 1 eq) se disuelve en acetona anhidra (300 mL) y se añade K_2CO_3 (20.30 g, 5 eq), bromuro de bencilo (16 mL, 5 eq) y NaI (4.4 g, 1 eq). La mezcla se calienta a reflujo mientras se agita durante 16 horas. Se añade agua (1 L) y la mezcla se extrae con acetato de etilo (3 x 150 mL). El disolvente se evapora, y el residuo se cristaliza en etanol obteniéndose 11.16 g (72%) de 3,4,5-tribenciloxibenzoato de bencilo **1.22** como un sólido blanco; p.f. 91-93 °C (*lit.* 93.5-93.4 °C).⁶³

¹H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 5.16 (s, 6H, CH_2 -Ph), 5.36 (s, 2H, COO- CH_2 -Ph), 7.26-7.47 (m, 22H, ArH).

¹³C-RMN ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 66.70 (CH_2), 71.12 (2 CH_2), 75.05 (CH_2), 109.09 (2 CH), 125.05 (C), 127.46-128.47 (CH), 135.982 (C), 136.56 (2 C), 137.33 (C), 152.44 (2 C), 165.88 (CO).

Ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico (**1.23**)⁶³ (Esquema 1.5)



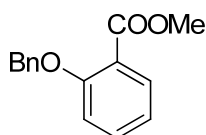
El compuesto anterior, **1.22** (2g, 3.77 mmol), se disuelve en una disolución de KOH (3 N) en metanol (100 mL). La disolución se calienta a reflujo durante 12 horas y se acidifica a temperatura ambiente hasta pH~3-4 con una disolución 3N de HCl. El precipitado blanco resultante se filtra y se redissuelve en acetato de etilo (80 mL) lavándose con agua (3 x 60 ml). La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), filtra y evapora a sequedad. El residuo se cristaliza en metanol, aislándose 1.49 g (90%) de **1.23** en forma de cristales blancos; p.f. 195-197 °C (*lit.* 193.5-193.7 °C).⁶³

¹H-RMN [$(CD_3)_2SO$, 300 MHz] δ 5.05 (s, 2H, CH_2 -Ph), 5.18 (s, 4H, CH_2 -Ph), 7.25-7.48 (m, 17H, ArH).

¹³C-RMN [$(CD_3)_2SO$, 75 MHz] δ 70.10 (CH_2), 74.15 (CH_2), 108.09 (CH_2), 125.92 (C), 127.50-128.36 (CH), 136.77 (C), 137.31 (2 C), 137.33 (C), 151.93 (2 C), 166.79 (COOH).

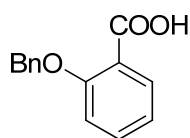
Análisis elemental (%) calculado para $C_{28}H_{24}O_5$: C, 76.35; H, 5.49. Hallado: C, 76.44; H, 5.37.

Bencilsalicilato de metilo (1.39) (Esquema 1.13)



A una mezcla de K_2CO_3 (2.71 g, 19.6 mmol) y NaI (1.33 g, 19.6 mmol) en acetona (120 mL) se le añade salicilato de metilo **1.38** (2 g, 13.1 mmol). La mezcla se agita durante 20 minutos, a continuación se añade cloruro de bencilo (2.26 mL) y se calienta a reflujo durante la noche. El crudo de reacción se concentra y purifica por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo, 100:1, 9:1, 7:3) obteniéndose **1.39** (2.5 g, 10.33 mmol, 79%) en forma de aceite amarillo.

Ácido bencilsalicílico (1.40) (Esquema 1.13)

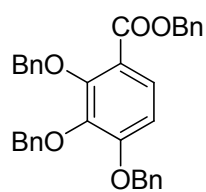


El compuesto anterior, **1.39** (2.5 g, 10.33 mmol) se disuelve en una disolución 3N de KOH en metanol (100 mL). Al cabo de 5 horas se acidifica con una disolución 3N de HCl. La mezcla se extrae con diclorometano, y la fase orgánica se seca ($MgSO_4$), filtra y evapora a sequedad para dar 1.55 g (66 %) del compuesto **1.40** en forma de sólido blanco; p.f. 73-75 °C (*lit.* 73-77 °C)¹⁴⁸.

¹H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 5.28 (s, 2H, CH_2 -Ph), 7.11-7.58 (m, 9H, H-Ar).

Análisis elemental (%) calculado para $C_{14}H_{12}O_3$: C, 73.67; H, 5.30. Hallado: C, 73.61; H, 5.43.

2,3,4-Tribenciloxibenzoato de bencilo (1.54) (Esquema 1.18)



Partiendo del ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico **1.53** (5g, 29.4 mmol) se sigue el mismo procedimiento que el establecido para el compuesto **1.22** para obtener el compuesto **1.54** en forma de cristales blancos con un rendimiento del 81%; p.f. 59-61 °C.

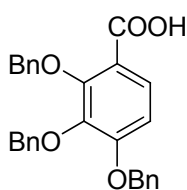
¹H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 4.94 (s, 2H, CH_2 -Ph), 5.01 (s, 2H, CH_2 -Ph), 5.06 (s, 2H, CH_2 -Ph), 5.23 (s, 2H, COO- CH_2 -Ph), 6.71 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-5 Ar), 7.18-7.35 (m, 20H, Ph), 7.58 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-6 Ar).

¹⁴⁸ www.sigmaaldrich.com

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 66.62 (CH₂), 70.82 (CH₂), 75.56 (CH₂), 76.25 (CH₂), 108.69 (CH), 118.71 (C), 127.25-128.76 (CH), 136.11 (CH), 136.14 (CH), 137.19 (CH), 142.55 (C), 153.85 (C), 156.60 (C), 165.35 (COO).

Análisis elemental (%) calculado para C₃₅H₃₀O₅: C, 79.22; H, 5.70. Hallado: C, 78.98; H, 5.90.

Ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico (1.55) (Esquema 1.18)



El compuesto **1.54** (7.2 g, 13.56 mmol) se hace reaccionar de manera análoga a como se describe para el compuesto **1.23** cristalizando 5.8 g (97 %) del compuesto **1.55**; p.f. 148-150 °C.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.11 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.21 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.31 (s, 2H, CH₂-Ph), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, *m*-CH), 7.34-7.49 (m, 15H, Ph), 7.91 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, *o*-CH).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 70.96 (CH₂), 75.79 (CH₂), 77.65 (CH₂), 109.48 (CH), 115.37 (C), 127.51-129.24 (CH), 134.71 (CH), 135.65 (CH), 136.56 (CH), 140.75 (C), 152.02 (C), 157.38 (C), 165.49 (COO).

EM (ES+): *m/z* 441 (M+H)⁺, 463 (M+Na)⁺.

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 20-100% de A en 15 min]: 15.10 min.

Análisis elemental (%) calculado para C₂₈H₂₄O₅: C, 76.35; H, 5.49. Hallado: C, 76.43; H, 5.51.

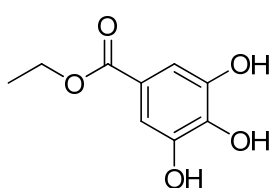
Síntesis de alquil ésteres de ácido gálico (alquil galatos)

Método General A.^{60a} El ácido gálico **1.1** (2.5 mmol) y el alcohol correspondiente (3 eq) se disuelven en tolueno (30 mL) en presencia de cantidades catalíticas de H₂SO₄. La reacción se calienta a reflujo durante 6 horas usando un Dean-Stark para ir eliminando el agua. El crudo resultante se concentra y se lava sucesivamente con disoluciones saturadas de NaHCO₃ y NaCl. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄. Después de filtrar, la disolución se calienta y se añade carbón activo para filtrar y concentrar posteriormente. El residuo se purifica por columna cromatográfica usando como eluyente acetato de etilo /hexano, 55:45.

Método general B.^{60a} El ácido gálico **1.1** (2.5 mmol) junto con el alcohol correspondiente (3 eq) y ácido *p*-toluensulfónico en cantidades catalíticas se disuelven en dioxano en un equipo de destilación. La reacción se calienta hasta 160 °C destilando el disolvente que se repone hasta que se completa la reacción. En el caso de los *n*-alquil galatos el crudo resultante se redissuelve en acetato de etilo y se lava sucesivamente con disoluciones saturadas de NaHCO₃ y NaCl. La fase orgánica se seca con MgSO₄ y tras evaporar el disolvente a sequedad el residuo se purifica por cromatografía en columna usando como eluyente, diclorometano/metanol (9:1).

Método general C. Ácido gálico **1.1** (0.3 mmol, 50 mg), el alcohol correspondiente (0.9 mmol) y H₂SO₄ concentrado (0.07 mL) se hacen reaccionar a 100°C durante 50 minutos en un microondas. El crudo resultante se disuelve en acetato de etilo y se lava sucesivamente con disoluciones saturadas de NaHCO₃ y NaCl. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄. El residuo se purifica en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo, 3:7.

3,4,5-Trihidroxibenzoato de etilo (1.2)^{60a} (Esquema 1.1)



Ácido gálico **1.1** (0.5 mmol, 100 mg) y etanol se hacen reaccionar según el método general A obteniéndose 69 mg (70%) de **1.2** en forma de sólido blanco; p.f. 148-150 °C (*lit.* 118-120 °C).^{60a}

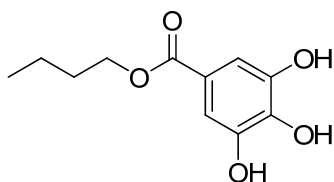
¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 4.25 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 7.12 (s, 2H, H-Ar), 8.13 (s ancho, 3H, OH).

¹³C-RMN [(CD₃)₂CO, 75 MHz] δ 15.60 (CH₃), 61.89 (CH₂), 110.73 (CH), 123.07 (C), 139.60 (C), 146.98 (C), 167.65 (CO).

EM (ES+): *m/z* 199 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₉H₁₀O₅: C, 54.55; H, 5.09. Hallado: C, 54.51; H, 5.14.

3,4,5-Trihidroxibenzoato de butilo (1.3)^{60a} (Esquema 1.1)



Ácido gálico **1.1** (3 mmol, 500 mg) y 1-butanol se hacen reaccionar según el método general A obteniéndose 294 mg (58%) de **1.3** en forma de sólido blanco; p.f. 114-116 °C (*lit.* 126-127 °C).^{60a} Según el método C se obtuvo un 97 % de rendimiento.

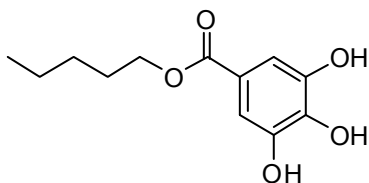
¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.45 (qd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 14.4 Hz, 2H, CH₃-CH₂), 1.68 (dd, *J* = 6.5 Hz, *J* = 14.6 Hz, 2H, CH₃-CH₂-CH₂), 4.21 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂-O), 7.13 (s, 2H, H-Ar), 8.13 (s ancho, 3H, OH).

¹³C-RMN [(CD₃)₂CO, 75 MHz] δ 15.01 (CH₃), 20.93 (CH₂), 32.58 (CH₂), 65.70 (CH₂), 110.77 (CH), 123.12 (C), 139.62 (C), 147.01 (C), 167.70 (CO).

EM (ES+): m/z 227 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₁₁H₁₄O₅: C, 58.40; H, 6.24. Hallado: C, 58.33; H, 6.17.

3,4,5-Trihidroxibenzoato de pentilo (1.4) (Esquema 1.1)



Ácido gálico **1.1** (0.3 mmol, 50 mg) y 1-pentanol (0.9 mmol, 0.1 mL) y H₂SO₄ concentrado (0.07 mL) se hacen reaccionar según el método general C obteniéndose 60 mg (83%) de **1.4** en forma de sólido blanco; p.f. 90-92 °C (*lit.* 93-94

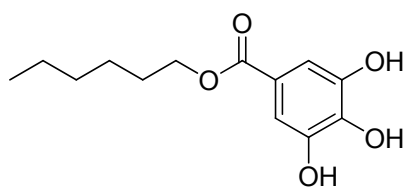
°C).^{60a}

¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 0.91 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.40 (m, 4H, (CH₂)₂), 1.72 (m, 2H, CH₂-CH₂-O), 4.20 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂-O), 7.12 (s, 2H, H-Ar), 8.07 (s ancho, 1H, OH), 8.22 (s ancho, 2H, OH).

EM (ES+): m/z 241 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₁₁H₁₄O₅: C, 59.99; H, 6.71. Hallado: C, 60.35; H, 6.90.

3,4,5-Trihidroxibenzoato de hexilo (1.5)^{60a} (Esquema 1.1)



Ácido gálico **1.1** (2 mmol, 340 mg) y 1-hexanol se hacen reaccionar según el método general A obteniéndose 294 mg (58%) de **1.5** en forma de sólido blanco; p.f. 89-91 °C (*lit.* 92-93 °C).^{60a} Según el método C se obtuvo un 98 % de

rendimiento.

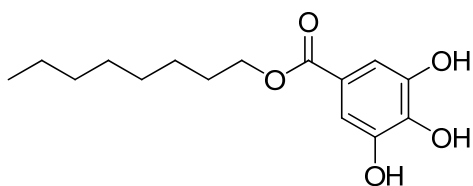
¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃), 1.35 (m, 6H, (CH₂)₃), 1.71 (m, 2H, CH₂-CH₂-O), 4.20 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂-O), 7.13 (s, 2H, H-Ar), 8.1 (s ancho, 3H, OH).

$^{13}\text{C-RMN}$ $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 75 \text{ MHz}] \delta$ 15.27 (CH₃), 24.22 (CH₂), 27.46 (CH₂), 30.48 (CH₂), 33.20 (CH₂), 66.0 (CH₂), 110.77 (CH), 123.14 (C), 139,62 (C), 147.02 (C), 167.69 (CO).

EM (ES+): m/z 255 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₁₃H₁₈O₅: C, 61.40; H, 7.14. Hallado: C, 61.45; H, 7.20.

3,4,5-Trihidroxibenzoato de octilo (1.6)^{60a} (Esquema 1.1)



Ácido gálico **1.1** (1.6 mmol, 283.5 mg) y 1-octanol se hacen reaccionar según el método general B obteniéndose 361 mg (80%) de **1.6** en forma de sólido blanco; p.f. 94-96 °C (*lit.* 91-92 °C).^{60a} Según el

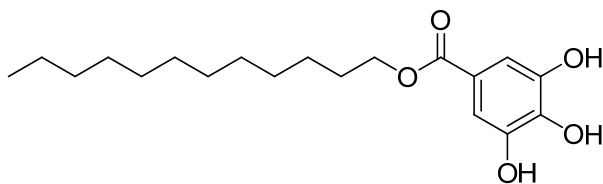
método C se obtuvo un 96 % de rendimiento.

$^1\text{H-RMN}$ $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 300 \text{ MHz}] \delta$ 0.87 (t, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, CH₃), 1.40 (m, 10H, (CH₂)₅), 1.71 (m, 2H, CH₂-CH₂-O), 4.20 (t, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 2H, CH₂-O), 7.27 (s, 2H, H-Ar), 8.1 (s ancho, 3H, OH).

EM (ES+): m/z 283 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₁₅H₂₂O₅: C, 63.81; H, 7.85. Hallado: C, 63.98; H, 7.72.

3,4,5-Trihidroxibenzoato de dodecilo (1.7)^{60a} (Esquema 1.1)



Ácido gálico **1.1** (2 mmol, 340 mg) y 1-dodecanol se hacen reaccionar según el método general B obteniéndose 406 mg (60%) de **1.7** en forma

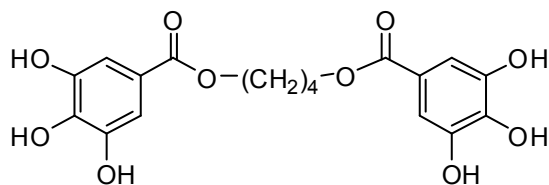
de sólido blanco; p.f. 95-96 °C (*lit.* 94-96 °C).^{60a} Según el método C se obtuvo un 82 % de rendimiento.

$^1\text{H-RMN}$ $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 300 \text{ MHz}] \delta$ 0.87 (t, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, CH₃), 1.40 (m, 18H, (CH₂)₉), 1.71 (m, 2H, CH₂-CH₂-O), 4.20 (t, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 2H, CH₂-O), 7.12 (s, 2H, H-Ar), 8.1 (s ancho, 3H, OH).

EM (ES+): m/z 339 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₁₉H₃₀O₅: C, 67.43; H, 8.93. Hallado: C, 67.35; H, 8.82.

Bis(3,4,5-trihidroxibenzoato) de tetrametilen-1,4-diilo (1.8) (Esquema 1.2)



Ácido gálico **1.1** (566 mg, 3.3 mmol.) y 1,4-butanodiol (100 mg, 1.1 mmol) se hacen reaccionar según el método general B obteniéndose 305 mg (70%) de **1.8**

en forma de sólido blanco; p.f. 221-222 °C.

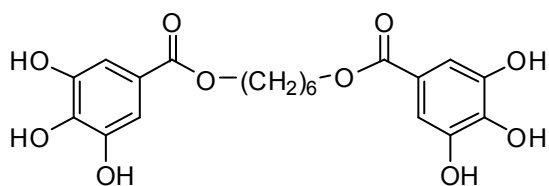
¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 1.89 (m, 4H, CH₂), 4.30 (m, 4H, O-CH₂), 7.14 (s, 4H, H-Ar), 8.07 (s, 2H, OH), 8.27 (s, 4H, OH).

¹³C-RMN [(CD₃)₂CO, 75 MHz] δ: 27.2 (CH₂), 65.7 (CH₂), 110.6 (CH), 122.6 (C), 139.7 (C), 147.0 (C), 168.0 (CO).

EM (ES⁺): m/z 395.3 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₁₈H₁₈O₁₀: C, 54.83; H, 4.60. Hallado: C, 55.15; H, 4.40.

Bis(3,4,5-trihidroxibenzoato) de hexametilen-1,6-diilo (1.9)^{64,149} (Esquema 1.2)



Ácido gálico **1.1** (510 mg, 3 mmol) y 1,6-hexanodiol (118 mg, 1 mmol) se hacen reaccionar según el método general B obteniéndose 83 mg (28%) de **1.9** en forma de sólido

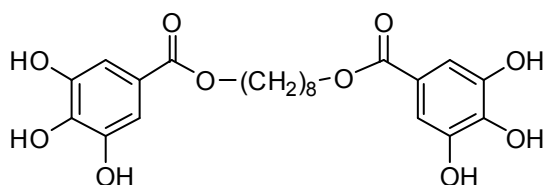
blanco; p.f. 212-215 °C.

¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 1.50 (m, 4H, CH₂), 1.74 (m, 4H, CH₂-CH₂-O), 4.23 (t, J = 6.5 Hz, 4H, O-CH₂), 7.14 (s, 4H, H-Ar), 8.22 (s ancho, OH).

EM (ES⁺): m/z 423 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₂₀H₂₂O₁₀: C, 56.87; H, 5.25. Hallado: C, 56.98; H, 5.23.

Bis(3,4,5-trihidroxibenzoato) de octametilen-1,8-diilo (1.10)¹⁴⁹ (Esquema 1.2)



Ácido gálico **1.1** (510 mg, 3 mmol) y 1,8-octanodiol (146 mg, 1 mmol) se hacen reaccionar según el

¹⁴⁹ Nakazono, M., Nanbu, S., Zaitu, K. and Agawa, H. Chemiluminescence Change of Polyphenol Dendrimers with Different Core Molecules. *Org. Lett.* **2008**, *10* (22), 5171-5174.

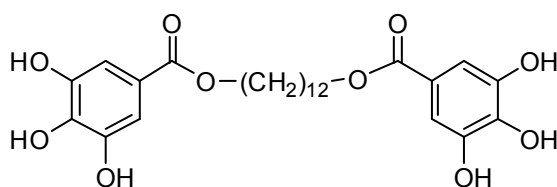
método general B obteniéndose 137 mg (31%) de **1.10** en forma de un sólido blanco cristalino; p.f. 98-101 °C.

¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 1.50 (m, 8H, CH₂), 1.74 (m, 4H, CH₂-CH₂-O), 4.21 (t, J = 6.5 Hz, 4H, O-CH₂), 7.12 (s, 4H, H-Ar), 8.22 (s ancho, OH).

EM (ES+): m/z 451 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₂₂H₂₆O₁₀: C, 58.66; H, 5.82. Hallado: C, 58.54; H, 5.68.

Bis(3,4,5-trihidroxibenzoato) de dodecametilen-1,12-diilo (1.11)^{64,150} (Esquema 1.2)



Ácido gálico **1.1** (510 mg, 3 mmol) y 1,12-dodecanodiol (202.3 mg, 1 mmol) se hacen reaccionar según el método general B obteniéndose 137 mg (27%) de **1.11**

en forma de un sólido blanco cristalino; p.f. 190-192 °C.

¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 1.40 (m, 16H, CH₂), 1.74 (m, 4H, CH₂-CH₂-O), 4.21 (t, J = 6.5 Hz, 4H, O-CH₂), 7.12 (s, 4H, H-Ar), 8.21 (s ancho, OH).

EM (ES+): m/z 507 (M+H)⁺, 529 (M+Na)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₂₆H₃₄O₁₀: C, 61.65; H, 6.77. Hallado: C, 61.59; H, 6.90.

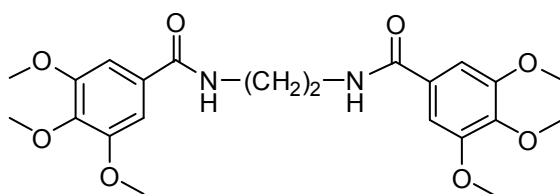
Síntesis de alquil amidas derivadas de mono, di y tri-polifenoles

Método general D. El cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoílo **1.12** (3 eq) y K₂CO₃ (3 eq) se disuelven en una mezcla de acetato de etilo/agua (1:1). A esta disolución se le añade la amina correspondiente (1 eq) apareciendo con el tiempo un precipitado blanco. La mezcla se deja reaccionar durante la noche. El crudo de reacción se separa en sus 2 fases. El precipitado de la fase orgánica se filtra para obtener un sólido blanco, normalmente puro, que si es necesario se purifica por cromatografía en columna usando como eluyente diclorometano/metanol, 9:1.

¹⁵⁰ Minato, T., Noguchi-Yachide, T., Suganuma, M., Hashimoto, Y. and Dodo, K. Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of alkyl gallate and gallamide derivatives related to (-)-epigallocatechin gallate. *Biorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (17), 7975-7982.

Método general E. A una disolución en diclorometano anhidro (20 mL) del correspondiente ácido: 3,4,5-tribenciloxibenzoico (**1.23**)⁶³, 2-benciloxibenzoico (**1.40**), 2,3-dimetoxibenzoico (**1.44**), 2,3,4-tribenciloxibenzoico (**1.55**), ó (2.2 eq) se le añade BOP (2.2 eq) y al cabo de 5 minutos 1 equivalente de la correspondiente amina junto con trietilamina (2 eq). La mezcla se deja reaccionar toda la noche a temperatura ambiente y el crudo de reacción se lava sucesivamente con disoluciones saturadas de ácido cítrico (3 x 20 mL), NaHCO₃ (3 x 20 mL) y NaCl (1 x 20 mL). El residuo se concentra y se purifica por CCTLC usando como eluyente diclorometano/metanol, 9:1.

***N,N'*-etilénbis(3,4,5-trimetoxibenzamida) (1.13)** (Esquema 1.3)



Etilendiamina (50 mg, 0.84 mmol) y cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo **1.12** (553 mg, 2.4 mmol) se hacen reaccionar según el método general D obteniéndose 261

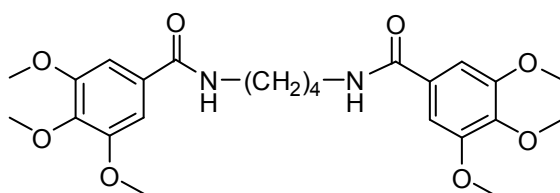
mg (91%) de **1.13** en forma de sólido blanco; p.f. 246-249 °C.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.65 (t, *J* = 2.2 Hz, 4H, CH₂-NH), 3.80 (s, 6H, OCH₃), 3.83 (s, 12H, OCH₃), 6.99 (s, 4H, H-Ar), 7.1 (s ancho, 2H, NH).

EM (ES+): m/z 449.0 (M+H)⁺, 471.0 (M+Na)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₂₂H₂₈N₂O₈: C, 58.92; H, 6.29; N, 6.25. Hallado: C, 59.14; H, 6.16; N, 6.25.

***N,N'*-tetrametilénbis(3,4,5-trimetoxibenzamida) (1.14)** (Esquema 1.3)



1,4-Tetrametilendiamina (75 mg, 0.88 mmol) y cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo **1.12** (609 mg, 2.64 mmol) se hacen reaccionar según el método general D obteniéndose 380

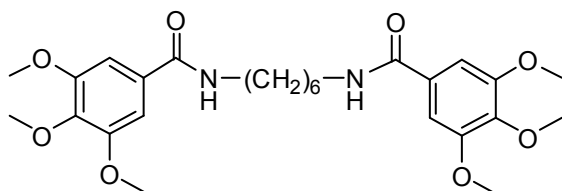
mg (91%) de **1.14** en forma de sólido blanco; p.f. 243-244 °C.

¹H-RMN [(CD₃)₂SO, 300 MHz] δ 1.55 (m, 4H, CH₂), 3.67 (m, 4H, CH₂-NH), 3.80 (s, 12H, OCH₃), 7.1 (s, 4H, H-Ar), 8.42 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, NH).

EM (ES+): m/z 477.0 (M+H)⁺, 499 (M+Na)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₂₄H₃₂N₂O₈: C, 60.49; H, 6.77; N, 5.88. Hallado: C, 60.33; H, 6.68; N, 5.88.

***N,N'*-hexametilenbis(3,4,5-trimetoxibenzamida) (1.15)** (Esquema 1.3)



1,6-hexametilendiamina (75 mg, 0.64 mmol) y el cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoílo **1.12** (445 mg, 1.93 mmol) se hacen reaccionar según el método general D

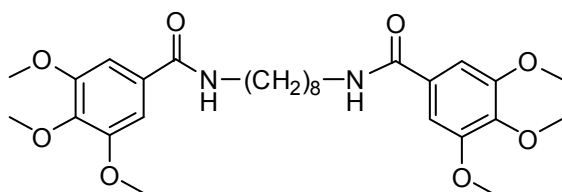
obteniéndose 314 mg (98%) de **1.15** en forma de sólido blanco; p.f. 219-221 °C.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.45 (m, 4H, CH₂), 1.64 (m, 4H, CH₂), 3.45 (c, *J* = 6.7 Hz, *J* = 6.2 Hz, 4H, CH₂-NH), 3.87 (s, 6H, OCH₃), 3.90 (s, 12H, OCH₃), 6.13 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, NH), 6.99 (s, 4H, H-Ar).

EM (ES+): *m/z* 505.3 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₂₆H₃₆N₂O₈: C, 61.89; H, 7.19; N, 5.55. Hallado: C, 62.19; H, 7.01; N, 5.55.

***N,N'*-octametilenbis(3,4,5-trimetoxibenzamida) (1.16)** (Esquema 1.3)



1,8-octametilendiamina (100 mg, 1.13 mmol) y cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoílo **1.12** (1.04 g, 4.52 mmol) se hacen reaccionar según el método general D obteniéndose 464

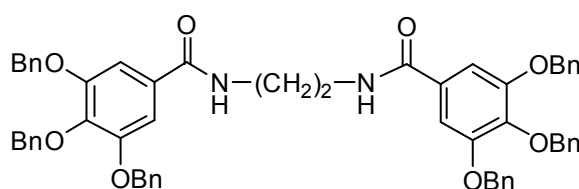
mg (77%) de **1.16** en forma de sólido blanco; p.f. 201-202 °C.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.37 (m, 8H, CH₂), 1.63 (m, 4H, CH₂), 3.43 (c, *J* = 6.9 Hz, *J* = 6.5 Hz, 4H, CH₂-NH), 3.87 (s, 18H, OCH₃), 6.43 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, NH), 7.06 (s, 4H, H-Ar).

EM (ES+): *m/z* 533 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₂₈H₄₀N₂O₈: C, 63.14; H, 7.57; N, 5.26. Hallado: C, 63.01; H, 7.90; N, 5.15.

***N,N'*-etilenbis(3,4,5-tribenciloxibenzamida) (1.24)**⁶⁴ (Esquema 1.6)



Etilendiamina (50 mg, 0.80 mmol) y ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23**⁶³ (774 mg, 1.76 mmol) se hacen reaccionar según el método

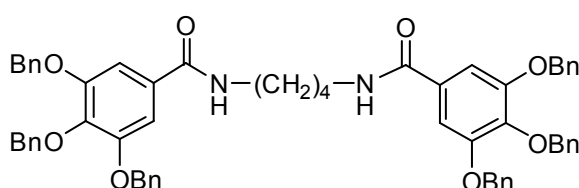
general E obteniéndose 532 mg (75%) de **1.24** en forma de sólido blanco; p.f. 198-200 °C.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.5 (s, 4H, CH₂-NH), 5.09 (s, 12H, CH₂-Ph), 7.1-7.4 (m, 34H, H-Ar).

EM (ES⁺): m/z (%) 905 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₅₈H₅₂N₂O₈: C, 76.97; H, 5.79; N, 3.10. Hallado: C, 77.01; H, 5.88; N, 3.14.

N,N'-tetrametilenbis(3,4,5-tribenciloxibenzamida) (1.25) (Esquema 1.8)



1,4-tetrametilendiamina (50 mg, 0.56 mmol) y ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23**⁶³ (546 mg, 1.24 mmol) se hacen reaccionar según el método

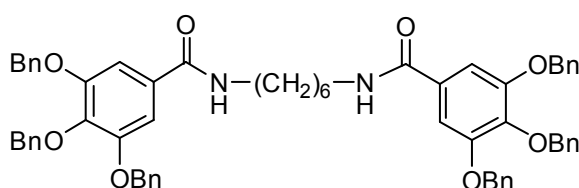
general E obteniéndose 455 mg (87%) de **1.25** en forma de sólido blanco; p.f. 223-225 °C.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.54 (m, 4H, CH₂), 3.5 (c, J = 6.2 Hz, 4H, CH₂-NH), 5.09 (s, 12H, CH₂-Ph), 6.63 (s ancho, 2H, NH), 7.1-7.4 (m, 34H, H-Ar).

EM (ES⁺): m/z 934 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₆₀H₅₆N₂O₈: C, 77.23; H, 6.05; N, 3.00. Hallado: C, 77.15; H, 6.11; N, 3.10.

N,N'-hexametilenbis(3,4,5-tribenciloxibenzamida) (1.26)⁶⁴ (Esquema 1.8)



1,6-hexametilendiamina (50 mg, 0.43 mmol) y ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23**⁶³ (416 mg, 0.95 mmol) se hacen reaccionar según el método

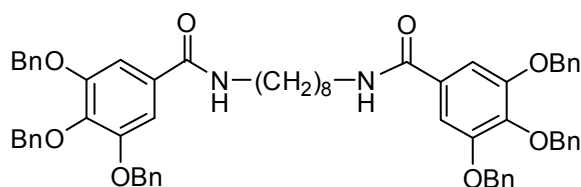
general E obteniéndose 347 mg (84%) de **1.26** en forma de sólido blanco; p.f. 230-232 °C.

¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 1.36 (m, 4H, CH₂), 1.54 (m, 4H, CH₂), 3.36 (c, J = 6.2 Hz, 4H, CH₂-NH), 5.00 (s, 12H, CH₂-Ph), 7.02-7.32 (m, 34H, H-Ar).

EM (ES⁺): m/z 961 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₆₂H₆₀N₂O₈: C, 77.48; H, 6.29; N, 2.91. Hallado: C, 77.57; H, 6.21; N, 2.85.

***N,N'*-octametilénbis(3,4,5-tribenciloxibenzamida) (1.27)** (Esquema 1.8)



1,8-octametilendiamina (58 mg, 0.4 mmol) y ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23**⁶³ (440 mg, 1 mmol) se hacen reaccionar según el método general E

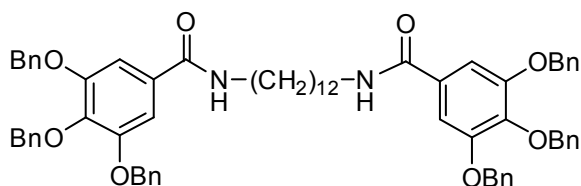
obteniéndose 395 mg de **1.27**, con rendimiento cuantitativo, en forma de sólido blanco; p.f. 210-212 °C.

¹H-RMN [(CD₃)₂SO, 300 MHz] δ 1.30 (s, 8H, CH₂), 1.51 (m, 4H, CH₂), 3.24 (c, *J* = 6.4 Hz, 4H, CH₂-NH), 4.97 (s, 4H, CH₂-Ph), 5.14 (s, 8H, CH₂-Ph), 7.22-7.46 (m, 34H, H-Ar), 8.39 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, NH).

EM (ES+): *m/z* 1012 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₆₄H₆₄N₂O₈: C, 77.71; H, 6.52; N, 2.83. Hallado: C, 77.62; H, 6.47; N, 2.92.

***N,N'*-dodecametilénbis(3,4,5-tribenciloxibenzamida) (1.28)**⁶⁴ (Esquema 1.8)



1,12-dodecametilendiamina (80.14 mg, 0.40 mmol) y ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23**⁶³ (440 mg, 1 mmol) se hacen reaccionar según el método general E obteniéndose 266.2 mg (64%) de **1.28** en forma de sólido blanco,

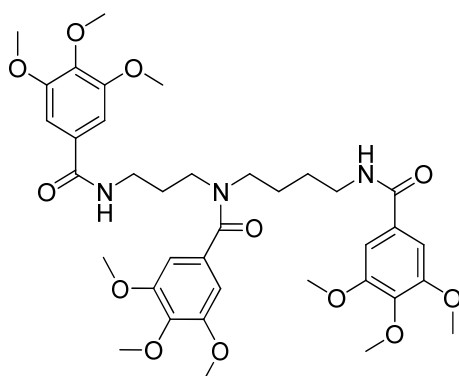
p.f. 188-190 °C.

¹H-RMN [(CD₃)₂SO, 300 MHz] δ 1.24 (s, 16H, CH₂), 1.49 (m, 4H, CH₂), 3.24 (c, *J* = 6.4 Hz, 4H, CH₂-NH), 4.97 (s, 4H, CH₂-Ph), 5.14 (s, 8H, CH₂-Ph), 7.24-7.46 (m, 34H, H-Ar), 8.39 (t, *J* = 5 Hz, 2H, NH).

EM (ES+): *m/z* 1045 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₆₈H₇₂N₂O₈: C, 78.13; H, 6.94; N, 2.68. Hallado: C, 78.24; H, 6.88; N, 2.63.

***N,N',N''*-tris(3,4,5-trimetoxibenzoil)espermidina (1.29)**¹⁵¹ (Esquema 1.9)



Espermidina (50 mg, 0.34 mmol) y cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoílo **1.12** (353 mg, 1.53 mmol) se hacen reaccionar según el método general D obteniéndose 96.3 mg (39%) de **1.29** en forma de sólido blanco; p.f. 78-80 °C.

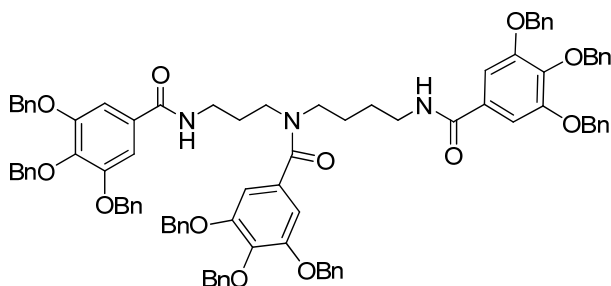
¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300MHz] δ 1.52 (m, 4H, CH₂), 1.73 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH), 3.43 (m, 8H, CH₂-NH), 3.82 (s, 9H, CH₃-O), 3.83 (s,

9H, CH₃-O), 3.84 (s, 9H, CH₃-O), 7.23 (s ancho, 6H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 728 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₃₇H₄₉N₃O₁₂: C, 61,06; H, 6,79; N, 5,77. Hallado: C, 61,19; H, 6,84; N, 5,60.

***N,N',N''*-tris(3,4,5-tribenciloxibenzoil)espermidina (1.31)** (Esquema 1.9)



Espermidina (50 mg, 0.34 mmol) y ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23**⁶³ (500 mg, 1.13 mmol) se hacen reaccionar según el método general E obteniéndose 228 mg (68%) de **1.31** en forma de sólido

blanco, p.f. 96-98 °C.

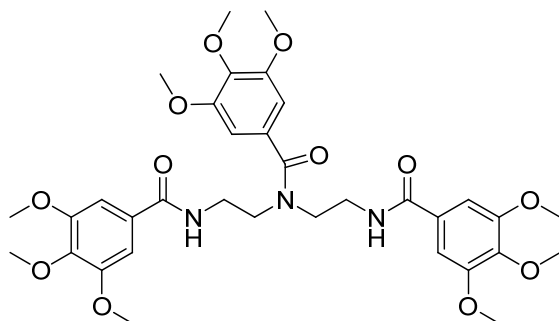
¹H-RMN [(CD₃)₂SO, 300 MHz] δ 1.84 (m, 6H, CH₂), 3.01 (m, 8H, CH₂-NH), 7.1 (s ancho, 6H, H-Ar), 7.37 (m, 45 H).

EM (ES+): m/z 1412 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₉₂H₈₇N₃O₁₂: C, 77,45; H, 6,15; N, 2,95. Hallado: C, 77,53; H, 6,06; N, 2,83.

¹⁵¹ Kime-Hunt, E., Spartalian, K., Holmes, S., Mohan, M. and Carrano, C.J. Vanadium Metabolism in Tunicates: The Coordination Chemistry of V(III) , V(IV), and V(V) With Models for the Tunichromes. *J. Inorg. Biochem.* **1991**, 41, 125-141.

***N,N',N''*-tris(3,4,5-trimetoxibenzoil)diethylentriamina (1.32)** (Esquema 1.10)



Diethylentriamina (100 mg, 0.96 mmol) y cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoílo **1.12** (708 mg, 3.07 mmol) se hacen reaccionar según el método general D obteniéndose 241 mg (38%) de **1.32** en forma de sólido blanco; p.f. 96-99 °C.

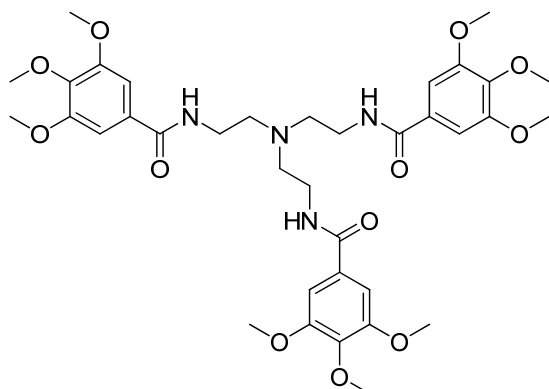
¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300MHz] δ 3.21

(m, 8H, CH₂-NH), 3.57-3.81 (m, 27H, O-CH₃), 6.5 (s ancho, 2H, H-Ar), 7.20 (s ancho, 4H, H-Ar), 8.21 (s ancho, 2H, NH).

EM (ES+): m/z 686 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₃₄H₄₃N₃O₁₂: C, 59,55; H, 6,32; N, 6,13. Hallado: C, 59,79; H, 6,26; N, 6,07.

Tris[2-(3',4',5'-trimetoxibenzamido)etil]amina (1.34)⁶⁵ (Esquema 1.11)



Tris(2-aminoetil)amina (50 mg, 0.34 mmol) y cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoílo **1.12** (355 mg, 1.5 mmol) se hacen reaccionar según el método general D obteniéndose 171.8 mg (72%) de **1.34** en forma de sólido blanco; p.f. 150-152 °C.

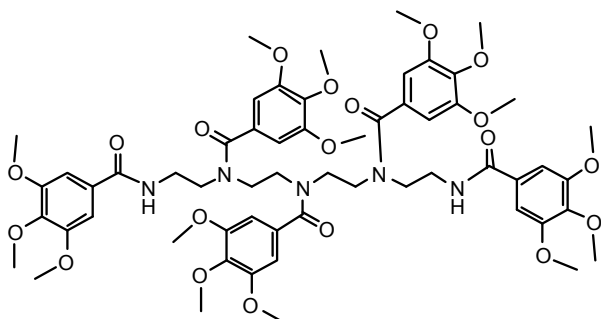
¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300MHz] δ 2.77

(t, J = 5.6 Hz, 6H, CH₂-N), 3.52 (m, 6H, CH₂-NH), 3.72 (s, 9H, O-CH₃), 3.76 (s, 18H, O-CH₃), 7.17 (s, 6H, H-Ar), 7.98 (t, J = 5.1 Hz, 3H, NH).

EM (ES+): m/z 729 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₃₆H₄₈N₄O₁₂: C, 59,33; H, 6,64; N, 7,69. Hallado: C, 59,46; H, 6,51; N, 7,74.

***N,N',N'',N''',N''''*-pentaquis(3,4,5-trimetoxibenzoil)tetraetilenpentamina (1.36)** (Esquema 1.12)



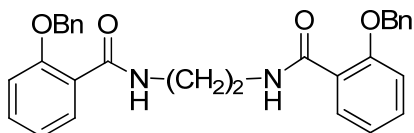
Tetraetilenpentamina (50 mg, 0.26 mmol) y cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo **1.12** (486 mg, 2.11 mmol) se hacen reaccionar según el método general D obteniéndose 153.3 mg (85%) de **1.36** en forma de sólido blanco; p.f. 102-105 °C.

¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300MHz] δ 3.4-3.9 (m, 61H, CH₂ y O-CH₃), 6.33-7.09 (m, 10H, H-Ar).

EM (ES⁺): m/z 1161 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₅₈H₇₃N₅O₂₀: C, 60,04; H, 6,34; N, 6,04. Hallado: C, 60,12; H, 6,27; N, 6,13.

***N,N'*-etilenbis(2-benciloxibenzamida) (1.41)** (Esquema 1.14)



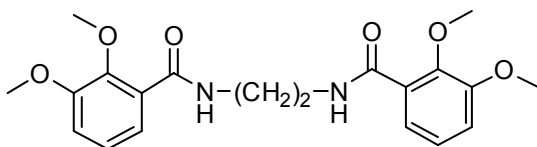
Etilendiamina (50 mg, 0.8 mmol) y ácido 2-bencilbenzoico **1.40** (547 mg, 2.4 mmol) se hacen reaccionar según el método general E obteniéndose 352 mg (92 %) de **1.41** en forma de sólido blanco; p.f. 142-143 °C.

¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300MHz] δ 3.54 (m, 4H, CH₂-NH), 5.31 (s, 4H, CH₂-Ph), 7.06-8.07 (m, 18H, H-Ar).

EM (ES⁺): m/z 481 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₃₀H₂₈N₂O₄: C, 74,98; H, 5,87; N, 5,83. Hallado: C, 75,06; H, 5,83; N, 5,79.

***N,N'*-etilenbis(2,3-dimetoxibenzamida) (1.45)** (Esquema 1.16)



Etilendiamina (50 mg, 0.80 mmol) y ácido 2,3-dimetoxibenzoico **1.44** (440 mg, 2.4 mmol) se hacen reaccionar según el método general E

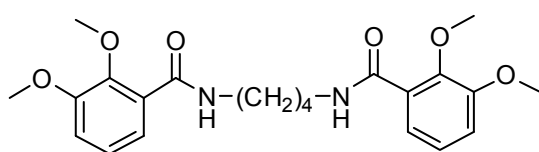
obteniéndose 310 mg de **1.45** con un rendimiento cuantitativo en forma de sólido blanco; p.f. 144-145 °C.

¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300MHz] δ 3.67 (m, 4H, CH₂-NH), 3.86 (s, 6H, O-CH₃), 3.88 (s, 6H, O-CH₃), 7.09-7.18 (m, 4H, H-Ar), 7.52 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 2H, H-Ar), 8.35 (s ancho, 2H, NH).

EM (ES+): m/z 389 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₂₀H₂₄N₂O₆: C, 61.84; H, 6.23; N, 7.21. Hallado: C, 61.79; H, 6.27; N, 7.24.

***N,N'*-1,4-tetrametilenbis(2,3-dimetoxibenzamida) (1.46)** (Esquema 1.16)



1,4-tetrametilendiamina (100 mg, 1.13 mmol) y ácido 2,3-dimetoxibenzoico **1.44** (412 mg, 2.26 mmol) se hacen reaccionar según el

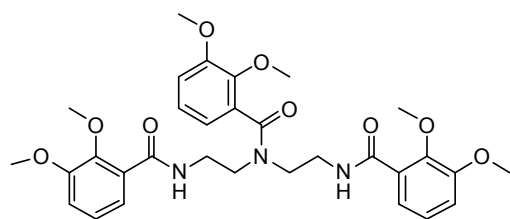
método general E obteniéndose 211.5 mg (50%) de **1.46** en forma de sólido blanco; p.f. 148-150 °C.

¹H-RMN (CDCl₃, 300MHz) δ 1.73 (q, *J* = 3.1 Hz, *J* = 6.62 Hz, 4H, CH₂), 3.52 (m, 4H, CH₂-NH), 3.89 (s, 6H, O-CH₃), 3.90 (s, 6H, O-CH₃), 7.03 (dd, *J* = 8.14 Hz, *J* = 1.6 Hz, 2H, H-Ar), 7.15 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-Ar), 7.68 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.6 Hz, 2H, H-Ar), 8.03 (s ancho, 2H, NH).

EM (ES+): m/z 417 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₂₂H₂₈N₂O₆: C, 63.45; H, 6.78; N, 6.73. Hallado: C, 63.50; H, 6.73; N, 6.69.

***N,N',N''*-tris(2,3-dimetoxibenzoil)dietilentriamina (1.49)** (Esquema 1.17)

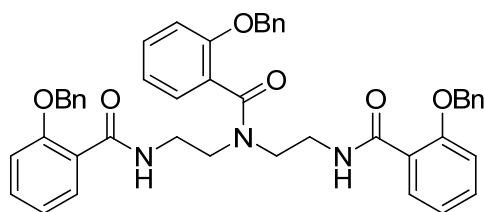


Dietilentriamina (100 mg, 0.96 mmol) y ácido 2,3-dimetoxibenzoico **1.44** (787 mg, 4.32 mmol) se hacen reaccionar según el método general E obteniéndose 402.8 mg (71 %) de **1.49** en forma de aceite amarillo.

¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300MHz] δ 3.51 (m, 4H, CH₂-N), 3.71 (s, 3H, O-CH₃), 3.76 (m, 4H, CH₂-NH), 3.82 (s, 3H, O-CH₃), 3.85 (s, 3H, O-CH₃), 3.88 (s, 6H, O-CH₃), 3.93 (s, 3H, O-CH₃), 6.73-7.57 (m, 9H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 596 (M+H)⁺.

***N,N',N''*-tris(2-benciloxibenzoil)dietilentriamina (1.51)** (Esquema 1.17)



Dietilentriamina (50 mg, 0.48 mmol) y ácido 2-bencilbenzoico **1.40** (438 mg, 1.92mmol) se hacen reaccionar según el método general E obteniéndose 318.7 mg (91 %) de **1.51** en forma de sólido

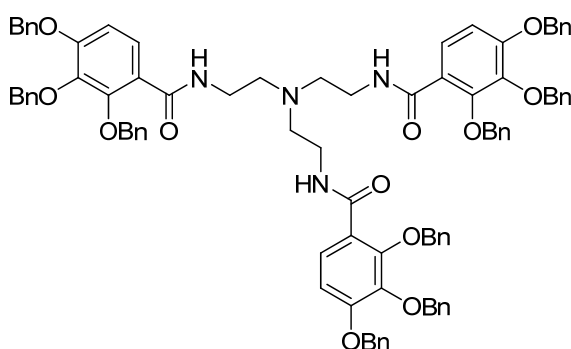
blanco; p.f. 57-59 °C.

¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300MHz] δ 3.30-3.60 (m, 8H, CH₂-NH), 5.04 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.24 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.35 (s, 2H, CH₂-Ph), 6.70-7.06 (m, 27H, H-Ar).

EM (ES⁺): m/z 734 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₄₆H₄₃N₃O₆: C, 75,29; H, 5,91; N, 5,73. Hallado: C, 75,33; H, 5,95; N, 5,67.

Tris[2-(2',3',4'-tribenciloxibenzamido)etil]amina (1.56) (Esquema 1.19)



Tris(2-aminoetil)amina (0.052 mL, 0.34 mmol) y ácido 2,3,4-tribenciloxibenzoico **1.55** (494 mg, 1.12 mmol) se hacen reaccionar según el método general E obteniéndose 478 mg (100%) de **1.56** en forma de aceite.

¹H-RMN (CDCl₃, 300MHz) δ 2.65 (dd, *J* = 0.48 Hz, *J* = 9.31 Hz, 12 H, CH₂-NH), 5.03 (s, 6H, CH₂-O), 5.10 (s, 12H, CH₂-O), 7.36 (m, 51H, H-Ar).

EM (ES⁺): m/z 1413 (M+H)⁺.

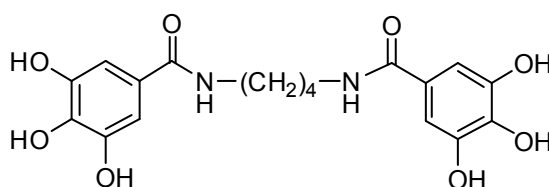
Desprotección de fenoles con grupos hidroxilo en forma de metil y bencil éteres

Método general F para la desprotección de fenoles con grupos hidroxilo en forma de éteres bencilicos. El correspondiente derivado bencilado se disuelve en THF/metanol (1:1) en presencia de Pd/C (10 %) (30% en peso) y se hidrogena a 30 °C y 2.85 atm (42 psi) durante la noche. Al cabo de este tiempo la reacción se filtra sobre filtro Whatman 42, se lava con metanol y el filtrado se evapora a sequedad para dar los correspondientes derivados desprotegidos como únicos productos. En

aquellos casos en los que el producto no está puro se purifica con un cartucho DSC-18Lt en gradiente (agua/metanol, 20:1 →1:1).

Método general G para la desprotección de fenoles con grupos hidroxilo en forma de éteres metílicos. El correspondiente derivado protegido se disuelve en diclorometano recién destilado. Se añade BBr₃ (1.5 eq por cada grupo OMe) en atmósfera de Argon y en frío, y se deja que la reacción evolucione a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado que aparece en la disolución amarillenta se filtra y tritura con diclorometano y éter fríos. En aquellos casos en los que el producto no está puro se purifica con un cartucho DSC-18Lt en gradiente (agua/metanol, 20:1 →1:1).

***N,N'*-tetrametilenbis(3,4,5-trihidroxibenzamida) (1.18)** (Esquema 1.4)



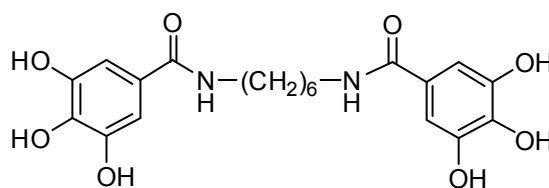
El compuesto **1.14** (200 mg, 0.21 mmol) se desprotege según el método general G obteniéndose 62.3 mg (76%) de **1.18** en forma de sólido blanco; p.f. 238-240 °C.

¹H-RMN [(CD₃)₂SO, 300 MHz] δ 1.46 (s ancho, 4H, CH₂), 3.16 (s ancho, 4H, CH₂-NH), 6.80 (s, 4H, H-Ar), 8.05 (s ancho, 2H, NH); 8.83 (s ancho, 6H, OH).

EM (ES+): m/z 393 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₁₈H₂₀N₂O₈: C, 55.10; H, 5.14; N, 7.14. Hallado: C, 55.20; H, 5.05; N, 7.11.

***N,N'*-hexametilenbis(3,4,5-trihidroxibenzamida) (1.19)**^{62,64} (Esquema 1.4)



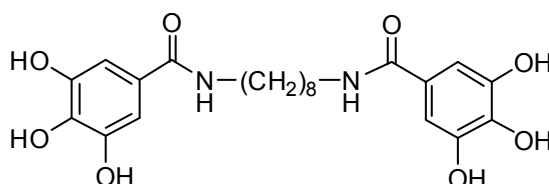
El compuesto **1.15** (200 mg, 2.1 mmol) se desprotege según el método general G obteniéndose 45.2 mg (51%) de **1.19** en forma de sólido blanco; p.f. 214-216 °C (*lit.* 210-211 °C).⁶²

¹H-RMN [(CD₃)₂SO, 300 MHz] δ 1.28 (s ancho, 4H, CH₂), 1.46 (s ancho, 4H, CH₂), 3.16 (c, *J* = 5.9 Hz, *J* = 5.7 Hz, 4H, CH₂-NH), 6.80 (s, 4H, H-Ar), 8.03 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, NH), 8.90 (s ancho, OH).

EM (ES+): m/z 421 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para $C_{20}H_{24}N_2O_8$: C, 57.14; H, 5.75; N, 6.66.
Hallado: C, 57.23; H, 5.69; N, 6.62.

***N,N'*-octametenbis(3,4,5-trihidroxibenzamida) (1.20)** (Esquema 1.4)



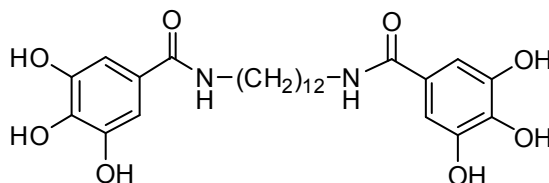
El compuesto **1.16** (77 mg, 0.14 mmol) se desprotege según el método general G obteniéndose 54.3 mg (84%) de **1.20** en forma de sólido blanco; p.f. 155-157 °C.

¹H-RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 1.38 (s ancho, 8H, CH_2), 1.58 (m, 4H, CH_2-CH_2-NH), 3.34 (m, 4H, CH_2-NH), 6.82 (s, 4H, H-Ar),

EM (ES+): m/z 449 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para $C_{22}H_{28}N_2O_8$: C, 58.92; H, 6.29; N, 6.25.
Hallado: C, 58.83; H, 6.27; N, 6.21.

***N,N'*-dodecametenbis(3,4,5-trihidroxibenzamida) (1.21)**⁶⁴ (Esquema 1.4)



El compuesto **1.28** (200 mg, 0.19 mmol) se desprotege según el método general F obteniéndose 70 mg (73 %) de **1.21** en forma de sólido blanco; p.f. 135-137 °C.

¹H-RMN [$(CD_3)_2SO$, 300 MHz] δ 1.24 (m, 16H, CH_2), 1.45 (m, 4H, CH_2), 3.16 (m, 4H, CH_2-NH), 6.80 (s, 4H, H-Ar), 8.00 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, NH), 8.25 (s ancho, OH).

EM (ES+): m/z 505 (M+H)⁺.

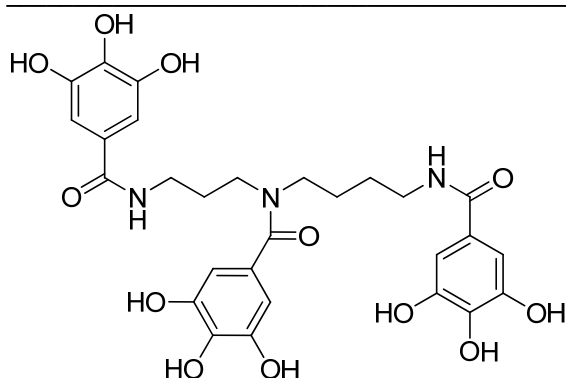
Análisis elemental (%) calculado para $C_{26}H_{36}N_2O_8$: C, 61.89; H, 7.19; N, 5.55.
Hallado: C, 61.84; H, 7.24; N, 5.58.

***N,N',N''*-tris(3,4,5-trihidroxibenzoil)espermidina (1.30)**¹⁵¹ (Esquema 1.9)

El compuesto **1.29** (72.7 mg, 0.1 mmol) se desprotege según el método general G obteniéndose 56.7 mg (95%) de **1.30** en forma de sólido blanco.

¹H-RMN (CD_3OD , 300MHz) δ 1.76 (m, 6H, CH_2), 2.99 (m, 8H, CH_2-NH), 6.41(s ancho, 3H, H-Ar), 6.85 (s ancho, 3H, H-Ar).

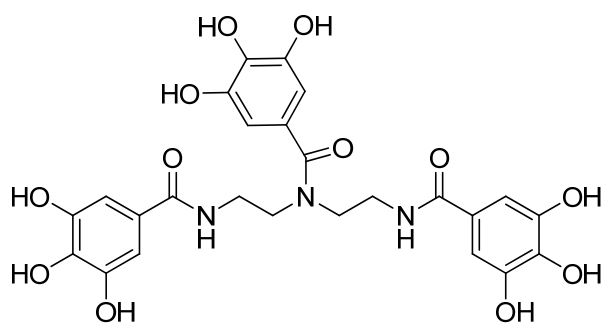
EM (ES+): m/z 602 (M+H)⁺.



Análisis elemental (%) calculado para $C_{28}H_{31}N_3O_{12}$: C, 55,90; H, 5,19; N, 6,99. Hallado: C, 56,06; H, 5,11; N, 7,08.

***N,N',N''*-tris(3,4,5-trihidroxi-benzoil)di-etil-tri-amina (1.33)** (Esquema 1.10)

El compuesto **1.32** (548 mg, 0.8 mmol) se desprotege según el método general G obteniéndose 17.4 mg (4%) de **1.33** en forma de sólido blanco.



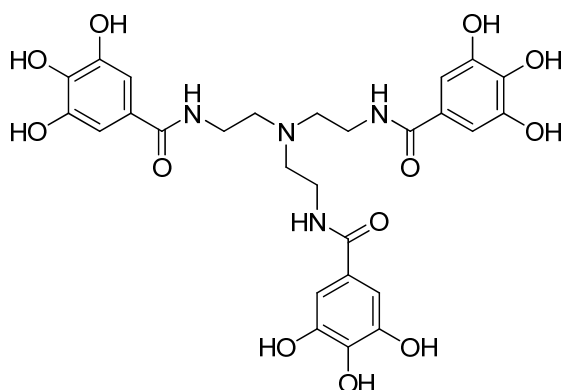
¹H-RMN [(CD₃)₂CO + D₂O, 300MHz] δ 3.58-3.67 (m, 8H), CH₂-NH), 6.15 (s ancho, 2H,

NH), 6.66 (s ancho, 3H, H-Ar), 6.76 (s ancho, 3H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 560 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para $C_{25}H_{25}N_3O_{12}$: C, 53,67; H, 4,50; N, 7,51; Hallado: C, 53,81; H, 4,67; N, 7,41.

Tris[2-(3',4',5'-trihidroxi-benzamido)etil]amina (1.35)^{63,65} (Esquema 1.11)



El compuesto **1.34** (107 mg, 0.15 mmol) se desprotege según el método general G obteniéndose 82 mg (93%) de **1.35** en forma de sólido blanco; p.f.188-190 °C.

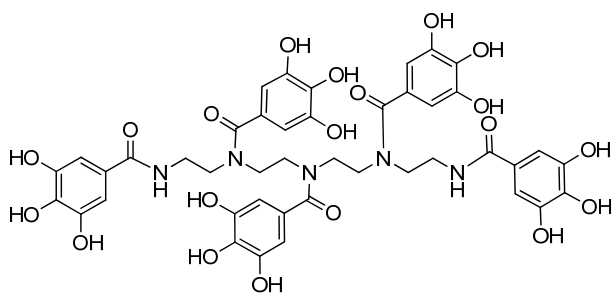
¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300MHz] δ 3.42 (s ancho, 6H, CH₂-N), 3.60 (s ancho, 6H, CH₂-N), 6.85 (s ancho, 6H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 603 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para $C_{27}H_{30}N_4O_{12}$: C, 53.82; H, 5.02; N, 9.30. Hallado: C, 54.01; H, 4.92; N, 9.42.

***N,N',N'',N''',N''''*-pentaquis(3,4,5-trihidroxibenzoil)tetraetilenpentamina (1.37)** (Esquema 1.12)

El compuesto **1.36** (105 mg, 0.09 mmol) se desprotege según el método general G obteniéndose cuantitativamente **1.37** en forma de sólido blanco, p.f. 175-177 °C.



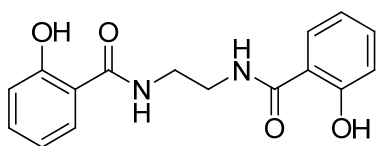
¹H-RMN (CD_3OD , 300MHz) δ 3.21-3.76 (m, 16H, CH_2), 7.02-7.33 (m, 10H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 950 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para $C_{43}H_{43}N_5O_{20}$: C, 54.37; H, 4.56; N, 7.37. Hallado:

C, 54.45; H, 4.68; N, 7.42.

***N,N'*-1,2-etilenbis(2-hidroxibenzamida) (1.42)**⁶⁷⁻⁶⁹ (Esquema 1.14)



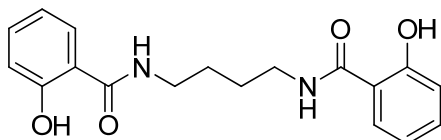
El compuesto **1.41** (350 mg, 0.68 mmol) se desprotege según el método general F obteniéndose 151 mg (74%) de **1.42** en forma de sólido blanco cristalino; p.f. 187-189 °C (*lit.* 187-189 °C).⁶⁹

¹H-RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 3.51(s, 4H, CH_2), 6.75 (td, $J = 0.9$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 4H, H-Ar), 7.24 (m, 2H, H-Ar), 7.61 (m, 2H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 301 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para $C_{16}H_{16}N_2O_4$: C, 63.99; H, 5.37; N, 9.33. Hallado: C, 64.04; H, 5.41; N, 9.28.

***N,N'*-tetrametilenbis(2-hidroxibenzamida) (1.43)**^{68,69} (Esquema 1.15)



Una mezcla de tetrametilendiamina (100 mg, 1.13 mmol) y salicilato de metilo **1.38** (378 mg, 2.5 mmol) se agita mientras se calienta a 130 °C bajo atmósfera de Argon

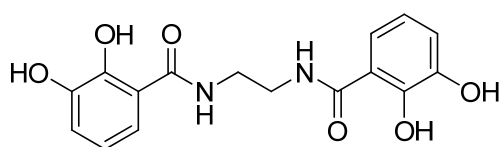
durante 3 horas. Una vez enfriado el residuo, el compuesto **1.43** se cristaliza en EtOH; p.f. 177-180 °C (*lit.* 180 -181 °C).⁶⁹

¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 1.71 (s, 4H, CH₂), 3.44 (s, 4H, CH₂-NH), 6.84-6.90 (m, 4H, H-Ar), 7.33-7.39 (m, 2H, H-Ar), 7.72-7.75 (m, 2H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 329 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₁₈H₂₀N₂O₄: C, 65.84; H, 6.14; N, 8.53. Hallado: C, 65.88; H, 6.10; N, 8.47.

N,N'-etilenbis(2,3-dihidroxibenzamida) (1.47)⁶⁹ (Esquema 1.16)



El compuesto **1.45** (322 mg, 0.82 mmol) se desprotege según el método general G obteniéndose 220.5 mg (81%) de **1.47** en forma de sólido blanco

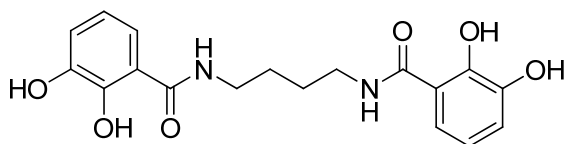
cristalino; p.f. 220-221 °C (*lit.* 220-221 °C).⁶⁹

¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 3.53(s, 2H, CH₂), 3.79 (s, 2H, CH₂), 6.45-7.22 (m, 6H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 333 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₁₆H₁₆N₂O₆: C, 57.83; H, 4.85; N, 8.43. Hallado: C, 57.90; H, 4.95; N, 8.36.

N,N'-tetrametilenbis(2,3-dihidroxibenzamida) (1.48)⁶⁹ (Esquema 1.16)



El compuesto **1.46** (85 mg, 0.2 mmol) se desprotege según el método general G obteniéndose 73 mg de **1.48**, con rendimiento

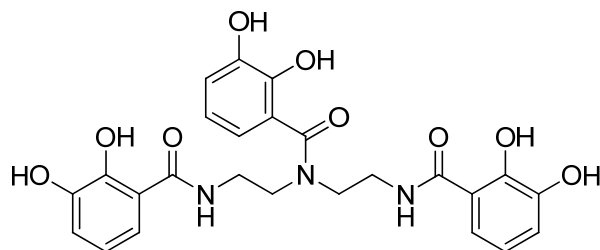
cuantitativo, en forma de sólido blanco cristalino, p.f. 210-212 °C (*lit.* 210-212 °C).⁶⁹

¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 1.54 (s ancho, 4H, CH₂-CH₂), 3.28 (s ancho, 4H, CH₂-NH), 6.67 (H-Ar), 6.90 (H-Ar), 7.21 (H-Ar).

EM (ES+): m/z 361 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₁₈H₂₀N₂O₆: C, 59.99; H, 5.59; N, 7.77. Hallado: C, 60.06; H, 5.55; N, 7.74.

***N,N',N''*-tris(2,3-dihidroxi benzoil) dietil triamina (1.50)** (Esquema 1.17)



El compuesto **1.49** (342 mg, 0.6 mmol) se desprotege según el método general G obteniéndose 170.3 mg (58%) de **1.50** en forma de sólido blanco cristalino.

¹H-RMN (CD₃OD, 300MHz) δ

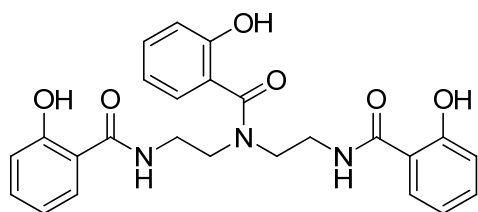
3.61 (s ancho, 8H, CH₂), 6.71 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H, H-Ar), 6.92 (dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.8 Hz, 3H, H-Ar), 7.19 (dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.0 Hz, 3H, H-Ar).

EM (ES+): *m/z* 512 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₂₅H₂₅N₃O₉: C, 58,71; H, 4,93; N, 8,22.

Hallado: C, 58,73; H, 4,97; N, 8,19.

***N,N',N''*-tris(2-hidroxi benzoil) dietil triamina (1.52)** (Esquema 1.17)



El compuesto **1.51** (150 mg, 0.2 mmol) se desprotege según el método general F obteniéndose 93 mg de **1.52** en forma de sólido blanco con rendimiento cuantitativo; p.f. 101-103 °C.

¹H-RMN (CD₃OD, 300MHz) δ

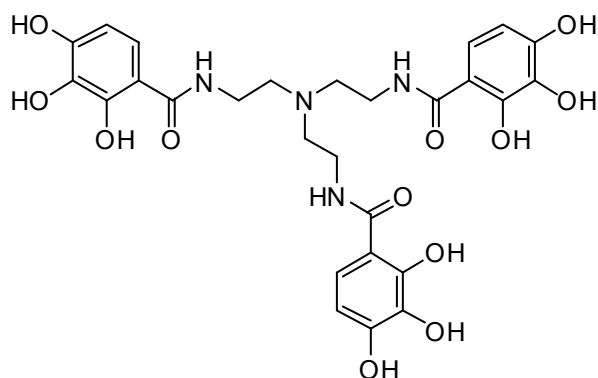
3.45 (s ancho, 4H, CH₂-N), 3.71 (s ancho, 4H, CH₂-NH₂), 6.49 (td, *J* = 0.94 Hz, *J* = 7.48 Hz, 1H, H-Ar), 6.68-6.86 (m, 6H, H-Ar), 6.98-7.3 (m, 6H, H-Ar), 7.24-7.30 (m, 1H, H-Ar), 7.59 (m, 2H, H-Ar).

EM (ES+): *m/z* 464 (M+H)⁺.

Análisis elemental (%) calculado para C₂₅H₂₅N₃O₆: C, 64,79; H, 5,44; N, 9,07.

Hallado: C, 64,88; H, 5,39; N, 9,09.

Tris[2-(2',3',4'-trihidroxibenzamido)etil]amina (1.57)⁶⁵ (Esquema 1.19)



El compuesto **1.56** (220 mg, 0.15 mmol) se desprotege según el método general F obteniéndose 32 mg (35 %) de **1.57** en forma de sólido blanco, p.f. 154-156 °C.

¹H-RMN (CD₃OD, 300MHz) δ 2.83 (t, J = 6.20 Hz, 6H, CH₂-NH), 3.49 (t, J = 6.12 Hz, 6H,

CH₂-NH), 6.26 (d, J = 8.80 Hz, 3H, H-Ar), 7.03 (d, J = 8.81 Hz, 3H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 603 (M+H)⁺.

Capítulo 2

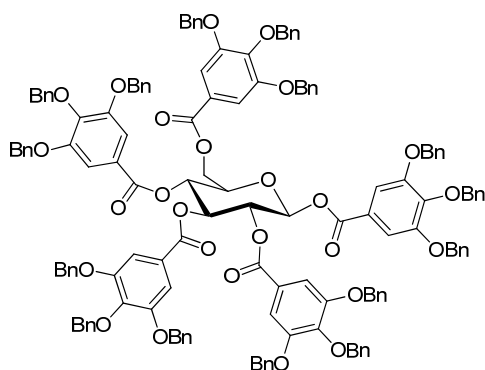
Método general para la esterificación de mono- y disacáridos con los ácidos 2,3,4- y/o 3,4,5-tribenciloxibenzoico.

Una suspensión del mono- o disacárido correspondiente (1 eq), el ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico (**1.23**)⁶³ o 2,3,4-tribenciloxibenzoico (**1.55**) (1.4 eq por OH de azúcar), diciclohexilcarbodiimida (DCC) (1.6 eq por OH de azúcar) y *N,N*-(dimetilamino)piridina (DMAP) (1.6 eq por OH de azúcar) en diclorometano seco (70 mL) se calienta a reflujo bajo atmósfera de Argon durante la noche (16-18h). Tras enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente se filtra el precipitado que aparece como subproducto de la reacción (ureas) a través de Celita. La solución se concentra y el residuo se purifica por cromatografía en columna empleando la mezcla de disolventes indicada en cada caso.

Método general para la desprotección de los éteres bencilicos.

A una disolución del correspondiente azúcar (0.087 mmol) en THF/metanol (1:1) (18 ml) se le añade Pd/C (10%) (30% en peso). La disolución se hidrogena a 2.85 atm (42 psi) a 30 °C durante la noche (16-18 h). Se filtra el catalizador sobre un filtro Whatman 42, se lava con metanol y el filtrado se evapora a sequedad para dar los correspondientes derivados desprotegidos. En caso de ser necesario se puede hacer una purificación por fase reversa en cartuchos DSC-Lt18 utilizando H₂O/metanol como eluyente.

β -D-glucopiranososa pentaquis[3,4,5-tris(fenilmetoxi)benzoato] (**2.7**)^{97,98} (Esquema 2.1)



Según el método general de esterificación de azúcares se hace reaccionar D-Glucosa (50 mg, 0.28 mmol), ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico (**1.23**)⁶³ (915 mg, 2.08 mmoles, 7.5 eq), DCC (454 mg, 2.22 mmol, 8 eq) y DMAP (270 mg, 2.22 mmol, 8 eq) en diclorometano seco (70 mL). El residuo obtenido se purifica en columna

empleando como eluyente diclorometano/tolueno/acetato de etilo (75:25:1) obteniéndose el anómero **2.7** en forma de sólido blanco con un rendimiento del 20%. Según se observa mediante $^1\text{H-NMR}$ dicho compuesto es el anómero β puro.

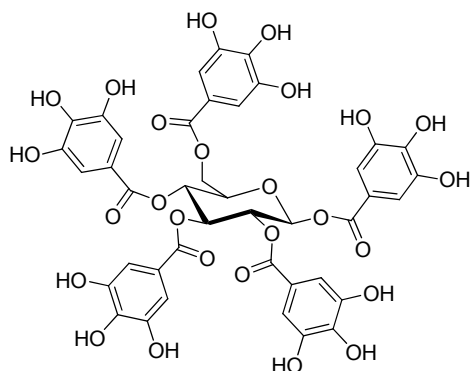
P.f. 57-59 °C (*lit.* 72-73 °C)⁹⁷

$[\alpha]^{24}_{\text{D}} -2.3$ (c 0.16, CH_2Cl_2). [*lit* $[\alpha]^{24}_{\text{D}} -1.0$ (c 0.4, CH_2Cl_2)]⁹⁷ [*lit* $[\alpha]^{24}_{\text{D}} -0.59$ (c 0.17, CH_2Cl_2)]⁹⁸

$^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 300 MHz] δ 4.51 (dd, $J = 4.5$ Hz, $J = 11.9$ Hz, 1H, H-5), 4.84 (m, 2H, H-6), 4.94-5.24 (m, 30H, O- CH_2 -Ph), 5.88 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-2), 5.98 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-4), 6.32 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-3), 6.52 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1), 7.15-7.54 (m, 85H, H-Ar).

EM-MALDI-TOF(ES+): m/z 2314 (M+Na⁺).

β -D-glucopiranososa pentaquis(3,4,5-trihidroxibenzoato) (2.8)^{97,98} (Esquema 2.1)



Siguiendo el procedimiento general de desprotección de éteres bencílicos el derivado bencilado **2.7** (100 mg, 0.04 mmol) conduce a un residuo que cristaliza en H_2O obteniéndose 19.3 mg (50%) de **2.8** en forma de cristales blancos, p.f. > 250 °C. (*lit.* >250 °C).⁹⁸

$[\alpha]^{24}_{\text{D}} +11.5$ (c 0.15, CH_3COCH_3). [*lit* $[\alpha]^{24}_{\text{D}} +18.5$ (c 0.4, CH_3COCH_3)]⁹⁷ [*lit* $[\alpha]^{24}_{\text{D}} +17.14$

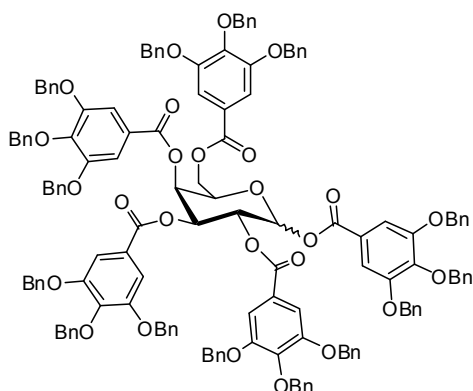
(c 0.14, CH_3COCH_3)]⁹⁸

$^1\text{H-RMN}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 300 MHz] δ 4.28 (m, 2H, H-6), 4.57 (m, 1H, H-5), 5.41 (m, 2H, H-2 y H-4), 5.95 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-3), 6.30 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-1), 6.75 (s, 2H, H-Ar), 6.80 (s, 2H, H-Ar), 6.83 (s, 2H, H-Ar), 6.89 (s, 2H, H-Ar), 6.96 (s, 2H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 941 (M+H)⁺.

α y β -D-galactopiranososa pentaquis[3,4,5-tris(fenilmetoxi)benzoato] (2.9)⁹⁸ (Esquema 2.1)

Siguiendo el método general de esterificación de azúcares se hace reaccionar D-galactosa (50 mg, 0.28 mmol), ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico (**1.23**)⁶³ (915 mg, 2.08 mmoles, 7.5 eq), DCC (454 mg, 2.22 mmol, 8 eq) y DMAP (270 mg, 2.22 mmol, 8 eq) en diclorometano seco (70 mL) obteniéndose 575 mg (90 %) de una mezcla anomérica. Con el fin de llevar a cabo su caracterización, 200 mg de dicha mezcla



anomérica se separan mediante cromatografía en columna empleando como eluyente tolueno/acetato de etilo (94:6). De las fracciones de menor movilidad cromatográfica se obtuvieron 71 mg (35 %) del anómero α , p.f. 54-56 °C.

(α) $^1\text{H-RMN}$ [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 4.30 (dd, $J = 7.0$ Hz, $J = 11.0$ Hz, 2H, H-6), 4.74-

5.22 (m, 31H, CH₂-Ph y H-5), 6.15 (m, 1H, H-4), 6.32- 6.48 (m, 2H, H-2 y H-3), 7.04 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-1), 7.18-7.68 (m, 85H, H-Ar).

EM-MALDI-TOF (ES+): m/z 2314 (M+Na)⁺

$[\alpha]_D^{24} +70.6$ (c 0.16, CH₂Cl₂). [lit $[\alpha]_D^{24} +94.67$ (c 0.15, CH₂Cl₂)]⁹⁸

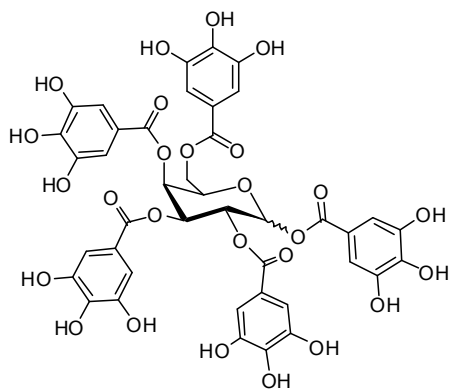
De las fracciones de mayor movilidad cromatográfica se obtuvieron 128 mg (65 %) del anómero β , p.f. 62-64 °C.

(β) $^1\text{H-RMN}$ [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 4.41 (dd, $J = 6.1$ Hz, $J = 11.1$ Hz, 2H, H-6), 4.78-5.26 (m, 31H, CH₂-Ph y H-5), 6.19 (dd, $J = 3.1$ Hz, $J = 10.5$ Hz, 1H, H-3), 6.25-6.31 (m, 2H, H-2 y H-4), 6.57 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1), 7.10-7.62 (m, 85H, H-Ar).

EM-MALDI-TOF (ES+): m/z 2314 (M+Na)⁺

$[\alpha]_D^{24} +41.0$ (c 0.16, CH₂Cl₂). [lit $[\alpha]_D^{24} +60.00$ (c 0.15, CH₂Cl₂)]⁹⁸

α y β -D-galactopiranosas pentaquis(3,4,5-trihidroxibenzoato) (2.10)⁹⁸ (Esquema 2.1)

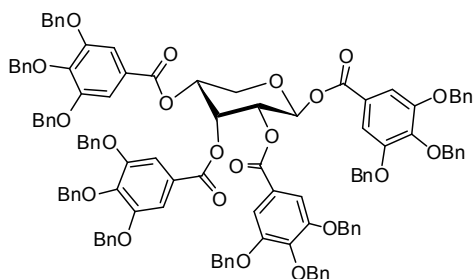


Siguiendo el procedimiento general de desprotección de éteres bencílicos la mezcla de anómeros α y β **2.9** (200 mg, 0.08 mmol) se hidrogena para dar 61 mg (0.065 mmol, 81 %) de la mezcla anomérica **2.10** en forma de sirupe.

$^1\text{H-RMN}$ [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 4.14 (m, H-6), 4.38 (m, H-6), 4.64 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-5 de β), 4.85 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz, H-5 de α), 5.60-5.95 (m, H-2, H-3, H-4 de α y β), 6.21 (d, $J =$

7.8 Hz, 1H, H-1 β), 6.69 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-1 α), 6.82-7.15 (m, H-Ar)

β -D-ribopiranosita tetraquis[3,4,5-tris(fenilmetoxi)benzoato] (2.11)⁹⁸ (Esquema 2.1)



Siguiendo el método general de esterificación de azúcares se hace reaccionar D-ribosa (75 mg, 0.5 mmol), ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico (**1.23**)⁶³ (1.23 g, 2.8 mmoles, 5.6 eq), DCC (660 mg, 3.2 mmol, 6.4 eq) y DMAP (391 mg, 3.2 mmol, 6.4 eq) en diclorometano seco (70

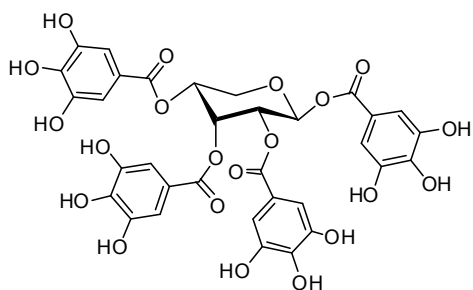
mL) obteniéndose una mezcla anomérica que se separa en columna cromatográfica empleando como eluyente diclorometano/metanol (999:1) para dar 508 mg (55%) del anómero β , p.f. 58-60 °C El anómero α es prácticamente inapreciable.

$[\alpha]_D^{24} -29.9$ (c 0.15, CH_2Cl_2) [lit $[\alpha]_D^{24} -29.09$ (c 0.11, CH_2Cl_2)].⁹⁸

¹H-RMN [(CD_3)₂CO, 300 MHz] δ 4.40 (m, 3H, H-4, H-5), 4.60-5.30 (m, 24H, CH_2 -Ph), 5.70 (m, 2H), 6.08 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-1), 7.12-7.60 (m, 68H, H-Ar).

EM-MALDI-TOF (ES+): m/z 1862 (M+Na)⁺.

β -D-ribopiranosita tetraquis(3,4,5-trihidroxibenzoato) (2.12)⁹⁸ (Esquema 2.1)



Siguiendo el procedimiento general de desprotección de éteres bencilicos el anómero β **2.11** (130 mg, 0.07 mmol) se hidrogena obteniéndose 53 mg (99%) de **2.12** en forma de sirupe.

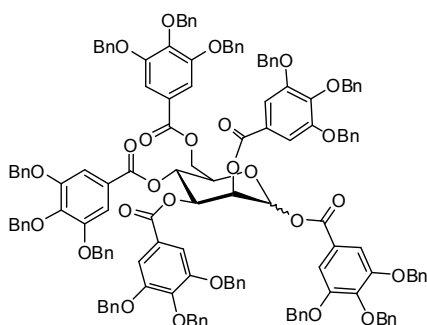
$[\alpha]_D^{24} -36.92^\circ$ (c 0.13, CH_3COCH_3).⁹⁸

¹H-RMN [(CD_3)₂SO, 300 MHz] δ 4.07 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H, H-5), 4.22 (m, 1H), 5.40 (m, 2H), 5.98 (m, 1H), 6.24 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-1), 6.78 (s, 2H, H-Ar), 6.81 (s, 2H, H-Ar), 6.95 (s, 2H, H-Ar), 7.02 (s, 2H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 781 (M+Na)⁺, 589.

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 5-80% de A en 15 min]: 10.0 min.

α y β -D-manopiranosas pentaquis[3,4,5-tris(fenilmetoxi)benzoato] (2.13, 2.15 y 2.16)⁹⁸ (Esquema 2.2)



Según el método general de esterificación de azúcares se hace reaccionar D-manosa (50 mg, 0.28 mmol), ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico (**1.23**)⁶³ (915 mg, 2.08 mmoles, 7.5 eq), DCC (454 mg, 2.22 mmol, 8 eq) y DMAP (270 mg, 2.22 mmol, 8 eq) en diclorometano seco (70 mL) obteniéndose una mezcla anomérica (**2.13**) que se purifica por

cromatografía en columna empleando como eluyente tolueno/acetato de etilo 94:6. De las fracciones de menor movilidad cromatográfica se obtienen 352 mg (55%) del anómero α (**2.15**) en forma de espuma blanca.

2.15: ¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 4.63-5.08 (m, 33H), 6.12 (dd, $J = 3.11$ Hz, $J = 9.89$ Hz, 1H, H-3), 6.26 (d ancho, $J = 3.03$ Hz, 1H, H-2), 6.42 (t, $J = 9.61$ Hz, 1H, H-4), 6.78 (s ancho, 1H, H-1), 7.09-7.43 (85H, m, H-Ar).

$[\alpha]_D^{24} +30.4$ (c 0.14, CH₂Cl₂). [lit. $[\alpha]_D^{24} +28.00^\circ$ (c 0.15, CH₂Cl₂)]⁹⁸

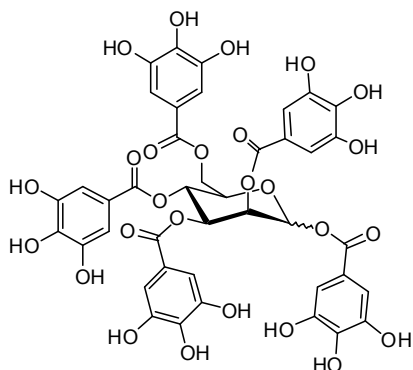
De las fracciones de mayor movilidad cromatográfica se obtienen 250 mg (39%) del anómero β **2.16** en forma de sólido blanco, p.f. 103-105 °C (lit. 69.5-71.8 °C)⁹⁸.

2.16: ¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 300 MHz] δ 4.68 (dd, $J = 2.69$ Hz, $J = 12.19$ Hz, 2H), 4.78-5.07 (m, 31H), 6.10 (m, 1H), 6.26 (dd, $J = 2.76$ Hz, $J = 10.33$ Hz, 1H), 6.53 (t, $J = 10.21$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 1.67$ Hz, 1H), 7.11-7.54 (m, 85H, H-Ar).

EM-MALDI-TOF (ES+): m/z 2314 (M+Na)⁺.

$[\alpha]_D^{24} -36.0$ (c 0.15, CH₂Cl₂) [lit. $[\alpha]_D^{24} -30.83$ (c 0.24, CH₂Cl₂)]⁹⁸

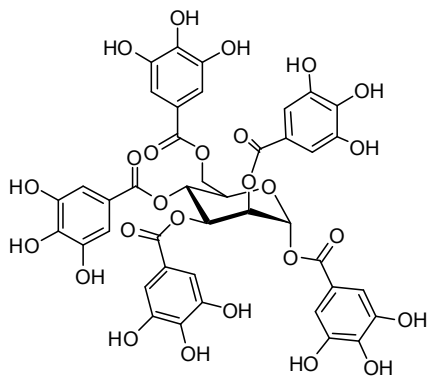
α y β -D-manopiranosas pentaquis[3,4,5-trihidroxibenzoato] (2.14)⁹⁸ (Esquema 2.2)



Siguiendo el procedimiento general de desprotección de éteres bencilicos la mezcla anomérica **2.13** (200 mg, 0.087 mmol) se hidrogena para dar 35 mg (0.04 mmol, 45 %) de la mezcla anomérica **2.14** en forma de sólido blanco.

2.14: $^1\text{H-RMN}$ $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 300 MHz] δ 4.11-4.47 (m, H-5s, H-6s), 5.45-5.80 (m, H-2, H-3 y H4 de α y β), 6.29 (H1- β), 6.47 (H1- α), 6.72-7.11 (m, H-Ar).

α -D-manopiranososa pentaquis(3,4,5-trihidroxibenzoato) (2.17)⁹⁸ (Esquema 2.2)



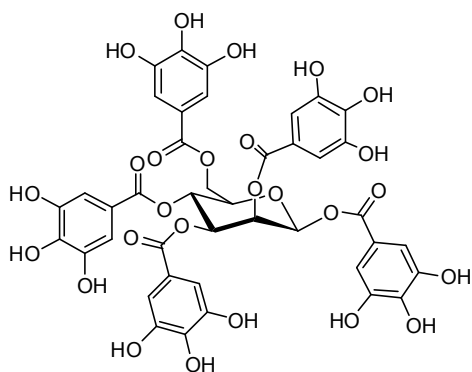
Seguindo el procedimiento general de desprotección de éteres bencílicos el anómero α **2.15** (200 mg, 0.087 mmol) se hidrogena para dar 35 mg (0.037 mmol, 43 %) del anómero α **2.17** en forma de sólido blanco, p.f. > 250 °C dec.

$[\alpha]^{24}_D$ -84.3 (c 0.16, CH_3COCH_3) [lit. $[\alpha]^{24}_D$ -6.19 (c 0.16, CH_3COCH_3)]⁹⁸

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 300 MHz) δ 4.37-4.61 (m, 3H, H-5, H-6), 5.71-5.80 (m, 2H, H-2, H-3), 5.95 (dd ancho, 1H, H-4), 6.40 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H-1), 6.90 (s, 2H, H-Ar), 7.00 (s, 2H, H-Ar), 7.01 (s, 2H, H-Ar), 7.09 (s, 2H, H-Ar), 7.21 (s, 2H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 941 (M+H)⁺, 771.

β -D-manopiranososa pentaquis(3,4,5-trihidroxibenzoato) (2.18)⁹⁸ (Esquema 2.2)



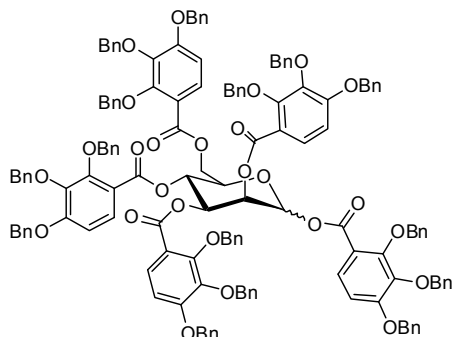
Seguindo el procedimiento general de desprotección de éteres bencílicos el anómero β **2.16** (200 mg, 0.087 mmol) se hidrogena para dar 36 mg (0.038 mmol, 44 %) del anómero β **2.18** en forma de sólido blanco, p.f. > 250 °C dec

$[\alpha]^{24}_D$ -73.33° (c 0.15, CH_3COCH_3).⁹⁸

$^1\text{H-RMN}$ $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 500 MHz] δ 4.03 (dd, J = 4.6 Hz, J = 11.5 Hz, 1H, H-5), 4.21 (c, J = 6.7 Hz, J = 14.0 Hz, 1H, H-6), 4.36 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-6), 5.70 (m, 2H, H-3, H-4), 5.85 (d, J = 1.0 Hz, 1H, H-2), 6.43 (d, J = 1.0 Hz, 1H, H-1), 6.75 (s, 2H, H-Ar), 6.85 (s, 2H, H-Ar), 6.90 (s, 2H, H-Ar), 7.01 (s, 2H, H-Ar), 7.16 (s, 2H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 941 (M+H)⁺, 771.

α y β -D-manopiranosas pentaquis[2,3,4-tris(fenilmetoxi)benzoato] (2.19, 2.20 y 2.21) (Esquema 2.3)



Siguiendo el método general de esterificación de azúcares se hace reaccionar D-manosa (50 mg, 0.28 mmol), ácido 2,3,4-tribenciloxibenzoico (**1.55**) (915 mg, 2.08 mmoles, 7.5 eq), DCC (454 mg, 2.22 mmol, 8 eq) y DMAP (270 mg, 2.22 mmol, 8 eq) en diclorometano seco (70 mL) obteniéndose

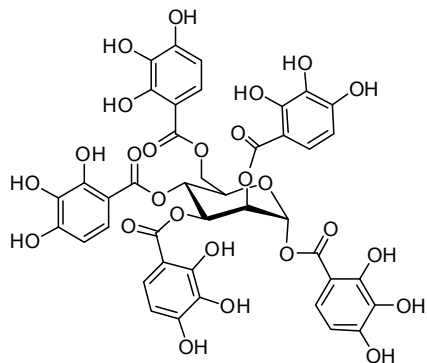
una mezcla anomérica (**2.19**) que se purifica en columna empleando como eluyente tolueno/acetato de etilo (96:4). De la fracción de mayor movilidad cromatográfica se obtienen 203 mg (33%) del anómero α **2.20** como un sólido blanco.

2.20: $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4.41-4.50 (m, 2H, H-6), 4.65 (d ancho, 1H, H-5), 4.85-5.29 (m, 30H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.91 (m, 1H, H-2), 6.09 (dd, $J = 3.0$ Hz, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-3), 6.12 (m, 1H, H-4), 6.40 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-Ar), 6.55-6.61 (m, 4H, H-Ar y H-1), 6.84 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-Ar), 6.90 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-Ar), 7.19-7.70 (m, 77H, H-Ar), 7.80 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-Ar), 7.87 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-Ar).

De las fracciones con menor movilidad cromatográfica se aíslan 124.2 mg (20%) del anómero β **2.21** como un sólido blanco, p.f. 188-190 °C.

2.21: $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4.49-4.68 (m, 3H, H-5, H-6), 4.82-5.17 (m, 30H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.71 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-3), 6.03 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-4), 6.09 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-2), 6.23 (s, 1H, H-1), 6.40 (dd, $J = 2.3$ Hz, $J = 9.0$ Hz, H-Ar), 6.55 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-Ar), 6.62 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-Ar), 7.20-7.68 (m, 78H, H-Ar), 7.80 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-Ar), 7.86 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-Ar).

α -D-manopiranosas pentaquis(2,3,4-trihidroxibenzoato) (2.22) (Esquema 2.3)



Siguiendo el procedimiento general de desprotección de éteres bencilicos el anómero α **2.20** (200 mg, 0.08 mmol) se hidrogena obteniéndose 63.6 mg (78 %) de **2.22** en forma de sólido blanco; p.f. 158-160 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} + 4.0$ (c 0.15, CH_3COCH_3).

2.22: $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 4.52-4.68 (m, 3H, H-5 y H-6), 5.93 (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 3.2$ Hz, H-

2), 5.98 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-3), 6.15 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-4), 6.20 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-Ar), 6.35 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-Ar), 6.38 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-Ar), 6.45 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-Ar), 6.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-Ar), 6.57 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-1), 6.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-Ar), 7.32 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-Ar), 7.39 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-Ar), 7.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-Ar), 7.57 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-Ar).

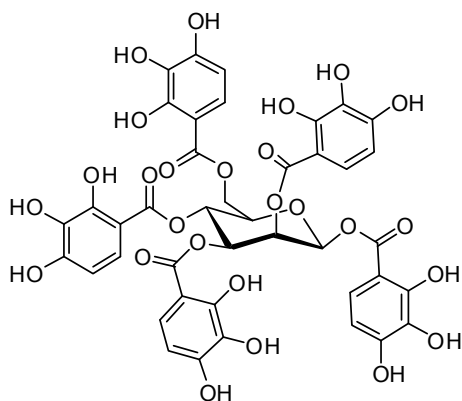
$^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ 62.69 (CH_2), 66.60 (CH), 70.27 (CH), 71.35 (CH), 72.44 (CH), 92.65 (CH), 105.00-105.84 (C), 108.88-109.31 (CH), 122.39-122.85 (CH), 133.51-133.95 (C) 152.25-153.84 (CH y C), 168.91-170.88 (C=O).

EM (ES+): m/z 941 (M+H) $^+$, 771.

HPLC [SunFire C_{18} (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 0-100% de A en 5 min]: 3.58 min.

Análisis elemental (%) calculado para $\text{C}_{68}\text{H}_{54}\text{O}_{43}$ (β): C, 52.35; H, 3.43. Hallado: C, 52.08; H, 3.71.

β -D-manopiranososa pentaquis(2,3,4-trihidroxibenzoato) (2.23) (Esquema 2.3)



Siguiendo el procedimiento general de desprotección de éteres bencílicos el anómero β **2.21** (100 mg, 0.044 mmol) se hidrogena obteniéndose 33.2 mg (0.035 mmol, 80 %) del anómero β **2.23** en forma de sólido blanco; p.f. 160-162 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} +79.9$ (c 0.154, CH_3COCH_3).

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 4.49 (dt, $J = 3.0$ Hz, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-5), 4.65 (dd, $J = 3.0$ Hz, $J = 12.5$ Hz, 2H, H-6), 5.92 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-3), 6.05 (t, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-4), 6.08 (dd, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 3.2$ Hz, H-2), 6.22 (d, $J = 8.9$ Hz, H-Ar), 6.25 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-Ar), 6.37 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-Ar), 6.41 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-Ar), 6.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-Ar), 6.53 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H, H-1), 6.99 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-Ar), 7.01 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-Ar), 7.31 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-Ar), 7.48 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-Ar), 7.49 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-Ar).

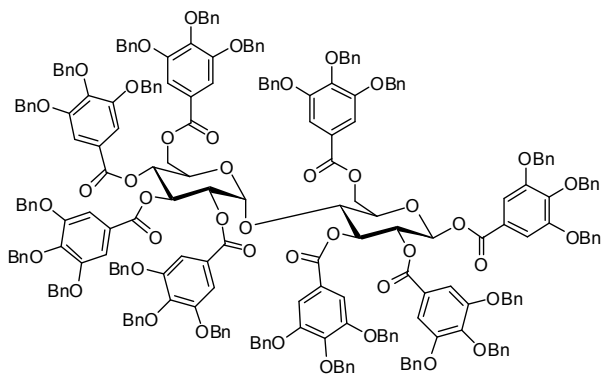
$^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ 61.81 (CH_2), 66.08 (CH), 69.55 (CH), 71.30 (CH), 72.72 (CH), 90.96 (CH), 103.63-104.67 (C), 107.68-108.09 (CH), 121.26-121.47 (CH), 132.34-132.65 (C), 151.10-152.43 (CH y C), 167.77-169.72 (C=O).

EM (ES+): m/z 941 (M+H) $^+$, 771.

HPLC [SunFire C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 0-100% de A en 5 min]: 3.50 min.

Análisis elemental (%) calculado para C₆₈H₅₄O₄₃ (β): C, 52.35; H, 3.43. Hallado: C, 52.07; H, 3.71.

β-D-Maltosa octaquis[3,4,5-tris(fenilmetoxi)benzoato] (2.24) (Esquema 2.4)



Siguiendo el método general de esterificación de azúcares se hace reaccionar maltosa (50 mg, 0.14 mmol), ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico (**1.23**)⁶³ (690 mg, 1.57 mmoles, 11.2 eq), DCC (369 mg, 1.8 mmol, 12.8 eq) y DMAP (219 mg,

1.8 mmol, 12.8 eq) en diclorometano seco (70 mL). El residuo se purifica en columna empleando como eluyente diclorometano/tolueno/acetato de etilo (75:25:1) obteniéndose 440 mg (86%) de **2.24** como un sólido blanco, p.f. 59-61 °C.

$[\alpha]_D^{24}$ -12.3 (c 0.153, CH₂Cl₂).

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 4.20-4.57 (m, 7H, H-4, H-5, H-6 y H-6'), 4.62-5.08 (m, 48H, CH₂-Ph), 5.36 (dd, *J* = 3.7 Hz, *J* = 10.7 Hz, 1H, H-2'), 5.50-5.60 (m, 2H, H-1' y H-2), 5.69 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-4'), 6.00 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H-3), 6.09-6.17 (m, 2H, H-1 y H-3'), 6.82-7.38 (m, 136H, H-Ar).

EM-MALDI-TOF (ES+): m/z 3744 (M+Na)⁺

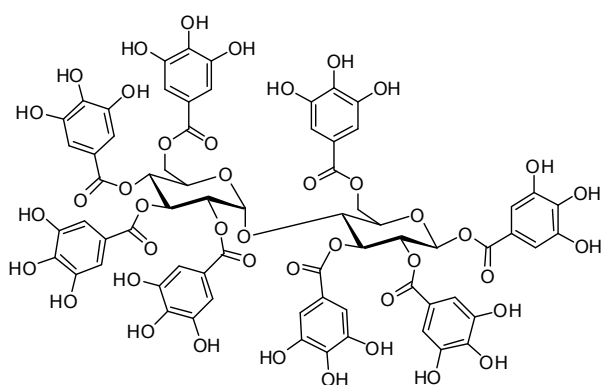
HPLC [SunFire C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 10-100% de A en 5 min]: 3.78 min.

β-D-Maltosa octaquis(3,4,5-trihidroxibenzoato) (2.25) (Esquema 2.4)

Siguiendo el procedimiento general de desprotección de éteres bencílicos el compuesto **2.24** (125 mg, 0.034 mmol) se hidrogena obteniéndose 44.3 mg (82%) de **2.25** en forma sólido blanco, p.f. >190 °C (dec).

$[\alpha]_D^{24}$ +38.3 (c 0.15, CH₃COCH₃).

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ 4.12 (s ancho, 2H, H-6'), 4.21 (dt, *J* = 2.0 Hz, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-5'), 4.38 (dt, *J* = 2.7 Hz, *J* = 9.7 Hz, 1H, H-5), 4.59 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-4), 4.74 (s ancho, 2H, H-6), 5.13 (dd, *J* = 3.9 Hz, *J* = 10.5 Hz, 1H, H-2'), 5.43 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 9.8 Hz, 1H, H-2), 5.55 (t, *J* = 9.8 Hz, 1H, H-4'), 5.78 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-1'),



5.82-5.91 (m, 2H, H-3 y H-3'),
6.17 (d, $J = 8.3$, 1H, H-1), 6.80
(s, 2H, H-Ar), 6.84 (s, 2H, H-Ar),
6.87 (s, 2H, H-Ar), 6.89 (s, 2H,
H-Ar), 6.95 (s, 2H, H-Ar), 7.02 (s,
2H, H-Ar), 7.07 (s, 2H, H-Ar),
7.20 (s, 2H, H-Ar).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ
62.56 (CH_2), 63.40 (CH_2), 64.00

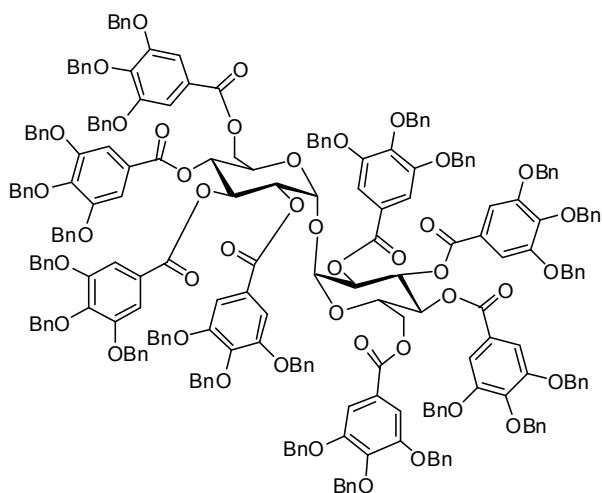
(CH), 69.49(CH), 70.64 (CH), 71.14 (CH), 71.78 (CH), 72.71 (CH), 72.77 (CH), 74.75
(CH), 76.30 (CH), 93.60 (CH), 97.63 (CH), 110.29-110.98 (CH y C), 119.77-121.04
(C), 139.96-140.752 (C), 146.03-146.75 (CH y C), 166.26-168.24 (C=O).

EM (ES+): m/z 1559 ($\text{M}+\text{H}^+$)

HPLC [SunFire C_{18} (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 0-100% de A en 5 min]:
2.84 min.

Análisis elemental (%) calculado para $\text{C}_{68}\text{H}_{54}\text{O}_{43}$: C, 52.38; H, 3.49. Hallado: C,
52.02; H, 4.65.

α,α -Trehalosa octaquis[3,4,5-tris(fenilmetoxi)benzoato] (2.26) (Esquema 2.4)



Siguiendo el método
general de esterificación de
azúcares se hace reaccionar α,α -
trehalosa (50 mg, 0.14 mmol),
ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico
(**1.23**)⁶³ (690 mg, 1.57 mmoles,
11.2 eq), DCC (369 mg, 1.8
mmol, 12.8 eq) y DMAP (219 mg,
1.8 mmol, 12.8 eq) en
diclorometano seco (70 mL). El
residuo obtenido se purifica en

columna empleando como eluyente diclorometano/tolueno/acetato de etilo (75:25:1)
obteniéndose 398 mg (81%) de **2.26**, p.f. 83-85 °C.

$[\alpha]_D^{24} +79.6$ (c 0.156, CH_2Cl_2).

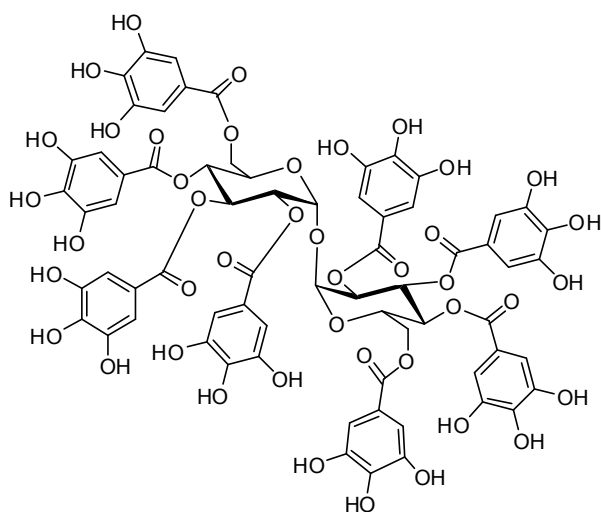
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4.27-4.32 (m, 4H, H-6), 4.41-4.47 (m, 2H, H-5), 4.55-
5.15 (m, 48H, CH_2 -Ph), 5.21 (dd, $J = 3.8$ Hz, $J = 10.1$, 2H, H-2), 5.62 (t, $J = 9.9$ Hz,

2H, H-4), 3.97 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H, H-1), 6.38 (t, $J = 10.0$ Hz, 2H, H-3), 6.89-7.40 (m, 136H, H-Ar).

EM-MALDI-TOF (ES+): m/z 3744 ($M+Na$)⁺

HPLC [SunFire C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 10-100% de A en 5 min]: 3.75 min.

α,α-D-Trehalosa octaquis(3,4,5-trihidroxibenzoato) (2.27) (Esquema 2.4)



Siguiendo el procedimiento general de desprotección de éteres bencílicos el compuesto **2.26** (200 mg, 0.053 mmol) se hidrogena, obteniéndose 66 mg (80%) de **2.27** en forma sólido blanco, p.f. >200 °C (dec.).

$[\alpha]_D^{24} +19.7$ (c 0.155, CH₃COCH₃).

¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 3.63 (d, $J = 11.7$ Hz, 2H, 2H-6),

3.93 (d, $J = 12.4$ Hz, 2H, 2H-6), 4.22 (d, $J = 10.3$ Hz, 2H, 2H-5), 5.26 (dd, $J = 4.0$ Hz, $J = 10.3$ Hz, 2H, 2H-2), 5.60 (t, $J = 10.1$ Hz, 2H, 2H-4), 5.70 (d, $J = 3.7$ Hz, 2H, 2H-1), 6.02 (t, $J = 10.1$ Hz, 2H, 2H-3), 6.90 (s, 4H, H-Ar), 6.98 (s, 4H, H-Ar), 7.05 (s, 4H, H-Ar), 7.20 (s, 4H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 1559 ($M+H$)⁺

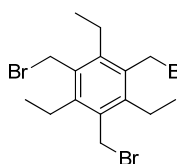
HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 5-80% de A en 15 min]: 9.18 min.

Análisis elemental (%) calculado para C₆₈H₅₄O₄₃: C, 52.38; H, 3.49. Hallado C, 52.61; H, 3.64.

Capítulo 3

Síntesis de los compuestos de partida

1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno (**3.2**)^{116-118, 120, 125} (Esquema 3.1)



A una mezcla de trietilbenceno (**3.1**) (1 mL, 5.3 mmol) (comercialmente asequible) y paraformaldehído (1.6 g, 55.6 mmol) en HBr/AcOH (30% en peso, 10 mL) se le añade lentamente y a temperatura ambiente bromuro de zinc (2 g, 8.7 mmol). La disolución naranja se deja reaccionar a 90° C durante 16 horas apareciendo un precipitado blanco en suspensión. La reacción se enfría a temperatura ambiente, el precipitado blanco se filtra, se lava con agua y se seca a vacío durante la noche, para obtener 2.2 g (94 %) de **3.2** como un sólido blanco; p.f. 144-146 °C (*lit.* >150 °C dec)¹²⁵ (*lit.* 169-170 °C).¹²⁰

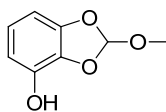
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.26 (t, *J* = 7.6 Hz, 9H, CH₃), 2.89 (c, *J* = 7.5 Hz, 6H, CH₂-CH₃), 4.50 (s, 6H, CH₂-Br).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 15.60 (CH₃), 22.71 (CH₂), 28.54 (CH₂), 132.60 (C), 144.95 (C).

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 5-80% de A en 15 min]: 20.19 min.

Análisis elemental (%) calculado para C₄₂H₅₁N₃O₉: C, 40.85; H, 4.80; Br, 54.35. Hallado: C, 40.79; H, 4.91; Br, 53.88.

2-metoxi-1,3-benzodioxol-4-ol (**3.4**)^{120,152} (Esquema 3.2)



A una suspensión de 1,2,3-trihidroxibenceno (ácido pirogálico) (**3.3**) (1 g, 7.9 mmol) en tolueno se le añade trimetilortoformiato (1g, 9.5 mmol) y resina amberlite 15H en cantidad catalítica. La reacción se calienta a 120 °C en un sistema de destilación con la eliminación azeotrópica de tolueno/metanol durante 6 horas. La disolución rosácea se enfría a temperatura ambiente, se filtra sobre celita, se lava con tolueno y a continuación se elimina el disolvente a vacío. El residuo obtenido se purifica en columna usando como eluyente hexano/acetato de etilo, 6:4, obteniéndose 0.46 g (34 %) de **3.4** como un aceite.

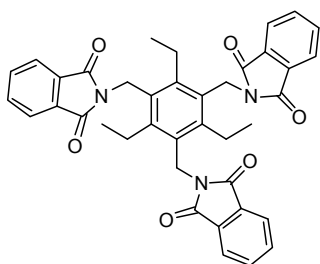
¹⁵² Lee, J. and Danishefsky, S. Total synthesis of (+/-)-Pancratistatin. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (13), 4829-4837.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.43 (s, 3H, CH₃-O), 6.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-Ar), 6.75 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-Ar), 6.87 (s, 1H, CH(O)₃).

EM (ES+): *m/z* 169 (M+H)⁺.

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 5-80% de A en 15 min]: 10.26 min.

1,3,5-tris(ftalimidometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.16)¹²⁰ (Esquema 3.4)



A una suspensión de ftalimida potásica (1.68 g, 9.08 mmol) en DMF se le añade a temperatura ambiente **3.2**¹¹⁶⁻¹¹⁸ (1g, 2.27 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 90° C durante 6 horas, tras lo cual se enfría en un baño de hielo apareciendo un precipitado blanco, el exceso de ftalimida potásica, que se elimina por filtración. Se elimina el disolvente y el residuo se

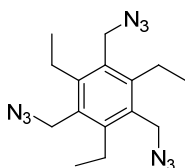
cromatografía en columna usando como eluyente hexano/acetato de etilo, 1:1, para obtener 396 mg (27 %) de **3.16**.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 0.89 (t, *J* = 7.4 Hz, 9H, CH₃), 3.03 (c, *J* = 7.3 Hz, 6H, CH₂-CH₃), 4.87 (s, 6H, CH₂-N), 7.67 (m, 12H, H-Ar).

EM (ES+): *m/z* 640 (M+H)⁺, 662 (M+Na)⁺.

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 50-1000% de A en 15 min]: 9.01 min.

1,3,5-Tris(azidometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.18)^{117,125} (Esquema 3.5)



En un matraz previamente secado en horno se disuelve **3.2**¹¹⁶⁻¹¹⁸ (462 mg, 1.05 mmol) en DMF (15 mL). A esta disolución se le añade NaN₃ (612.8 mg, 9.04 mmol) en pequeñas porciones durante 30 minutos y la reacción se deja a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de este tiempo aparece un precipitado

(NaBr) que se elimina por filtración a través de celita. Se añade diclorometano a la disolución precipitando más cantidad de NaBr que se vuelve a eliminar por filtración. Esta operación se repite hasta que no se observa la aparición de precipitado y a continuación el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se disuelve en acetato de etilo (5 mL), se lava con H₂O (3 x 10 mL) y a continuación con una disolución saturada de NaCl. Las fases orgánicas se evaporan a vacío y el residuo

obtenido se recristaliza de acetato de etilo:hexano (25:75) para obtener 310.1 mg (90 %) de **3.18** como un sólido blanco; p.f. 61-63 °C (*lit.* 61 °C).

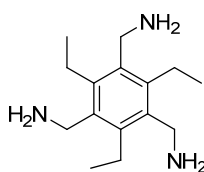
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.24 (t, *J* = 7.6 Hz, 9H, CH₃), 2.85 (c, *J* = 7.6 Hz, 6H, CH₂-CH₃), 4.49 (s, 6H).

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 20-100% de A en 15 min]: 15.59 min.

IR (CDCl₃ en NaCl): 2084 cm⁻¹ (N=N=N).

¡PRECAUCION!: La azida sódica (NaN₃) es explosiva en determinadas condiciones y por eso debe manejarse con cautela.¹²⁵

1,3,5-Tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno (**3.17**)¹²⁵ (Esquema 3.5)



En un vaso de hidrogenación previamente secado en el horno se disuelve la triazida **3.18**^{117,125} (270 mg, 0.82 mmol) en metanol (16 mL) y a continuación se añaden 27 mg de Pd/C (10%). La disolución se hidrogena a 2.03 atm (30 psi) a temperatura ambiente durante 6 horas. Se filtra el catalizador sobre un filtro Whatman 42, se lava con metanol y el filtrado se evapora a sequedad para obtener 164 mg (80 %) de **3.17** como un sólido de color amarillo pálido; p.f. 130-131 °C (*lit.* 130- 132 °C).¹²⁵

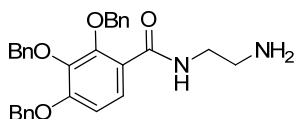
¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 1.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 9H, CH₃), 2.81 (c, *J* = 7.5 Hz, 6H, CH₂-CH₃), 3.83 (s, 6H).

EM (ES⁺): m/z 500 (2M+H)⁺

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 5-80% de A en 15 min]: 1.27 min.

Análisis elemental (%) calculado para C₄₂H₅₁N₃O₉: C, 72.24; H, 10.91; N, 16.85. Hallado: C, 71.99; H, 11.04; N, 17.02.

N-(2-aminoetil)-2,3,4-tris(benciloxi)benzamida (**3.25**) (Esquema 3.7)



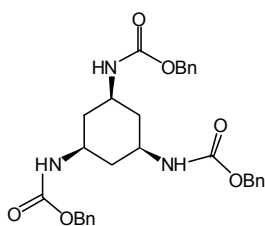
A una disolución del ácido 2,3,4-tribenciloxibenzoico (**1.55**) (485 mg, 0.87 mmol) en diclorometano seco (30 mL) se le añade BOP (442 mg, 1mmol). Pasados cinco minutos a la mezcla de reacción se le añade trietilamina (0.138 ml, 1 mmol), y se deja reaccionar durante 3 horas. La disolución blanquecina se lava con una disolución saturada de ácido cítrico (3 x

30mL), NaHCO₃ (3 x 30mL) y NaCl (3 x 30mL). Se evapora el disolvente y se precipita el ácido activado con éter como un sólido blanco que se filtra. A una suspensión del sólido anterior en diclorometano se le añade etilendiamina en exceso (10 mL). La mezcla se deja reaccionar toda la noche a temperatura ambiente y el crudo de reacción se lava sucesivamente con H₂O (3 x 30 mL) y NaCl (1 x 30 mL). El residuo se concentra y se purifica por CCTLC en el cromatotrón usando como eluyente diclorometano/metanol/amoniaco, 9:1: 0.2 para obtener 368 mg (88 %) de **3.25**.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 2.85 (s ancho, 2H, CH₂-NH₂), 3.35 (m, 2H, CH₂-NH), 5.06 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.15 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.16 (s, 2H, CH₂-Ph), 6.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-Ar), 7.28-7.46 (m, 15H, H-Ar), 7.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-Ar), 8.22 (t, *J* = 5.36 Hz, 1H, NH).

EM (ES⁺): m/z 483 (M+H)⁺.

Cis,cis-1,3,5-Tris{[(benciloxi)carbonil]amino}ciclohexano (3.30)¹²⁷ (Esquema 3.8)

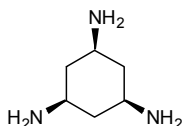


Una solución de ácido cis,cis-1,3,5-ciclohexano tricarbóxico (200 mg, 0.9 mmol), difenil fosforil azida (DPPA) (618 µl, 2.85 mmol) y trietilamina (400 µl, 0.92 mmol) en tolueno/DMF (9:1, 8 ml), se agita durante 30 min a temperatura ambiente para obtener tricarbóil triazida cis,cis-1,3,5-ciclohexano **3.28** en solución. A continuación, la solución se deja a reflujo durante 30 min hasta que deje de burbujear N₂, y se le añade alcohol bencílico (162 µl, 1.57 mmol). La mezcla se deja agitando a reflujo durante la noche. La mezcla de reacción se concentra hasta sequedad a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotron usando como eluyente un gradiente de diclorometano/metanol (30:1 a 10:1). Se obtienen 126 mg (26%) de **3.30** como un sólido blanco.

EM (ES, modo positivo): m/z 532 (M + 1)⁺.

¹H-RMN [(CD₃)₂SO, 300 MHz]: δ 1.02-1.08 (m, 3H, CH₂-ciclohexano), 1.86 (d ancho, *J* = 8.9 Hz, 3H, CH₂-ciclohexano), 3.36-3.44 (m, 3H, CH), 4.99 (s, 6H, CH₂Ph), 7.29-7.35 (m, 15H, H-Ar).

Cis,cis-1,3,5-triaminociclohexano (3.31)¹²⁷ (Esquema 3.8)



A una disolución de **3.30** (99 mg, 0.19 mmol) en THF/DMF (5:1, 12 ml), se le añade una punta de espátula de Pd/C al 10%. La mezcla de reacción se hidrogena a 2.85 atm (42 psi) a 27 °C durante 3 días. La mezcla de reacción se filtra sobre un filtro Whatman 42, se lava con metanol y el filtrado se evapora a sequedad para obtener 22 mg (92%) de **3.31** como un aceite amarillo.

¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz): δ 1.31-1.43 (m, 3H, CH₂-ciclohexano), 2.29 (d ancho, J = 11.5 Hz, 3H, CH₂-ciclohexano), 3.18-3.26 (m, 3H, CH)

Síntesis de compuestos basados en el esqueleto de benceno

Método general H para la reacción de la trisamina 3.17 con ácidos benzoicos.

A una disolución del correspondiente ácido benzoico (3.3 eq) en diclorometano seco (5 mL) se le añade BOP (3.3 eq). Pasados cinco minutos a la mezcla de reacción se le añade la trisamina **3.17**¹²⁵ (50 mg, 1 eq) y trietilamina (3.3 eq). La mezcla se deja reaccionar toda la noche a temperatura ambiente y el crudo de reacción se lava sucesivamente con disoluciones saturadas de ácido cítrico (3 x 30 mL), NaHCO₃ (3 x 30 mL) y NaCl (1 x 30 mL). El residuo se concentra y se purifica por CCTLC en el cromatotrón empleando como eluyente diclorometano/metanol, 9:1.

Método general I para la reacción del trisbromometil derivado 3.2 con anilinas.

A una disolución de **3.2**¹¹⁶⁻¹¹⁸ (1 eq) y la correspondiente amina (4 eq) en CH₃CN (5 mL) se le añade K₂CO₃ (4 eq). La reacción se deja reaccionar a reflujo durante la noche (16-18h) y el disolvente se evapora a presión reducida. El residuo se disuelve en acetato de etilo (15 mL), y se lava con H₂O (3x15 mL). La fase orgánica se seca (Na₂SO₄), filtra y evapora a sequedad. El residuo se purifica por CCTLC (gradiente de acetato de etilo/hexano, 3:7 a 100% de acetato de etilo) para obtener una espuma anaranjada que se trata con acetato de etilo y hexano para precipitar el compuesto deseado.

Método general J para la desprotección de los éteres bencilicos.

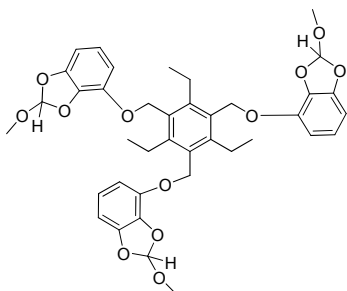
A una disolución del correspondiente derivado bencilado (1mmol) en THF/metanol (1:1) (100 ml) se le añade Pd/C (10%) (30% en peso). La disolución se hidrogena a 2.85 atm (42 psi) a 30 °C durante la noche (16-18 h). Se filtra el

catalizador sobre un filtro Whatman 42, se lava con metanol y el filtrado se evapora a sequedad para dar los correspondientes derivados desprotegidos como únicos productos. En aquellos casos en los que el producto no está puro se purifica con un cartucho DSC-18Lt empleando un gradiente (agua/metanol, 20:1 → 1:1).

Método general K para la desprotección de los éteres metílicos.

El correspondiente derivado protegido se disuelve en diclorometano recién destilado (10 mL). La disolución se enfría a 0 °C, se añade BBr₃ (1.5 eq por cada grupo OMe) bajo atmósfera de Argon y se deja evolucionar a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (16-18 h) aparece un precipitado blanco que se filtra y tritura con diclorometano y éter fríos para dar el derivado desprotegido puro. En aquellos casos en los que el producto no está puro se purifica con un cartucho DSC-18Lt en gradiente (agua/metanol, 20:1 → 1:1).

1,3,5-Tris(2'-metoxi-1',3'-benzodioxol-4'-oximetil)-2,4,6-trietilbenceno (3.5)¹²³ (Esquema 3.2)



A una disolución del trisbromometil derivado **3.2**¹¹⁶⁻¹¹⁸ (100 mg, 0.2 mmol) y **3.4**¹⁵² (114.4 mg, 0.68 mmol) en acetona (10 mL) se le añade K₂CO₃ (258.4 mg, 1.87 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 4 horas y posteriormente se enfría a temperatura ambiente. Tras filtrar la mezcla de reacción el disolvente se evapora a presión reducida

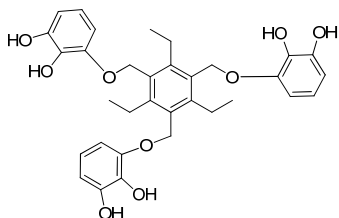
para obtener un residuo que se cristaliza en metanol obteniéndose 83 mg (59 %) de **3.5** en forma de sólido blanco; p.f. 92-95 °C (*lit.* 92-94 °C).¹²³

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 9H, CH₃), 2.98 (c, *J* = 7.4 Hz, 6H, CH₂-CH₃), 3.42 (s, 9H, CH₃-O), 5.26 (s, 6H, CH₂-O), 6.63-6.86 (m, 12H, H-Ar).

EM (ES+): *m/z* 702 (M+H)⁺, 725 (M+Na)⁺.

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 5-80% de A en 15 min]: 13.57 min.

1,3,5-Tris(2',3'-dihidroxifenoximetil)-2,4,6-trietilbenceno (3.6)¹²³ (Esquema 3.2)



A una disolución de **3.5** (0.150 g, 0.213 mmol) en diclorometano (2.5 mL) se le añade ácido *p*-toluensulfónico en cantidades catalíticas. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se lava con una disolución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se seca sobre

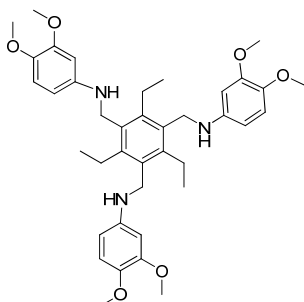
Na₂SO₄, se filtra y evapora a sequedad obteniéndose un residuo que se purifica en columna usando como eluyente diclorometano/metanol, 9:1, para obtener 44 mg (36 %) de **3.6** como un sólido blanco; p.f. 178-180 °C (*lit.* 178- 180 °C).¹²³

¹H-RMN (CDCl₃+D₂O, 300 MHz) δ 1.23 (t, *J* = 7.4 Hz, 9H, CH₃), 2.84 (c, *J* = 7.3 Hz, 6H, CH₂-CH₃), 5.13 (s, 6H, CH₂-O), 6.63-6.84 (m, 9H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 577 (M+H)⁺.

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 20-100% de A en 15 min]: 8.44 min.

1,3,5-Tris(3,4-dimetoxifenilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.10) (Esquema 3.3)



A una disolución de **3.2**¹¹⁶⁻¹¹⁸ (100 mg, 0.22 mmol) y la amina comercial, 3,4-dimetoxianilina **3.7** (139.4 mg, 0.91 mmoles) en CH₃CN (6 mL) se le añade K₂CO₃ (125.8 mg, 0.91 mmol) y se trata según el método general I obteniendo 93 mg (66%) del compuesto **3.10** en forma de sólido blanco; p.f. 77-79 °C.

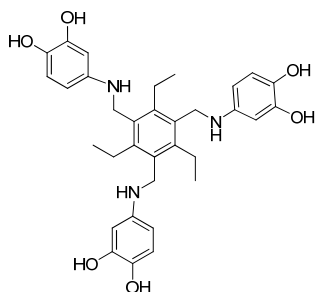
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 9H, CH₃), 2.79 (c, *J* = 7.2 Hz, 6H, CH₃-CH₂), 3.83 (s, 9H, CH₃-O), 3.86 (s, 9H, CH₃-O), 4.20 (s, 6H, CH₂-NH), 6.26 (m, 6H, H-Ar), 6.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 3H, H-Ar).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 17.45 (CH₃), 23.24 (CH₂), 43.35 (CH₂), 56.22 (CH₃), 57.21 (CH₃), 99.14 (CH), 103.35 (CH), 113.76 (CH), 133.77 (C), 142.23 (C), 143.62 (C), 144.02 (C), 150.56 (C).

EM (ES+): m/z 658 (M+H)⁺.

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 20-80% de A en 15 min]: 11.57 min.

1,3,5-Tris(3,4-dihidroxiifenilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.11) (Esquema 3.3)



El compuesto **3.10** (50 mg, 0.07 mmol) se desprotege según el método general K obteniéndose 40 mg (99 %) de **3.11** como un sólido blanco, p.f. >150 °C dec.

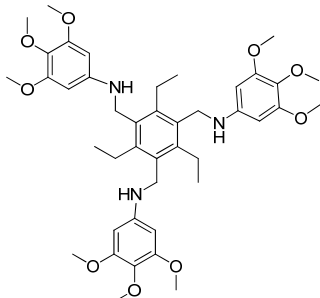
¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 1.17 (t, 9H, *J* = 7.3 Hz, CH₃), 2.82 (c, 6H, *J* = 7.3 Hz, CH₃-CH₂), 4.66 (s, 6H, CH₂-NH), 6.93-7.03 (m, 6H, H-Ar), 6.82 (m, 3H, H-Ar).

¹³C-RMN (CD₃OD, 100 MHz) δ 15.95 (CH₃), 26.18 (CH₂), 52.00 (CH₂), 110.82 (CH), 111.10 (CH), 116.96 (CH), 128.44 (C), 128.70 (C) 147.80 (C), 148.35 (C), 149.90 (C).

EM (ES+): *m/z* 574 (M+H)⁺.

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 5-80% de A en 15 min]: 10.30 min.

1,3,5-Tris(3,4,5-trimetoxifenilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.12) (Esquema 3.3)



Se disuelve el trisbromometil derivado **3.2**¹¹⁶⁻¹¹⁸ (150 mg, 0.34 mmol), 3,4,5-trimetoxianilina **3.8** (249.2 mg, 1.3 mmoles, 4 eq) y K₂CO₃ (188 mg, 1.3 mmol, 4 eq) en CH₃CN (9 mL). La reacción se trata según el método general I obteniendo 91 mg (41 %) del compuesto **3.12** en forma de sólido blanco; p.f. 94-96 °C.

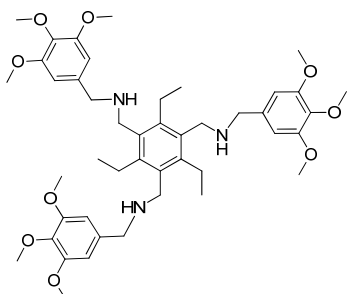
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 9H, CH₃-CH₂), 2.80 (c, *J* = 7.2 Hz, 6H, CH₃-CH₂), 3.79 (s, 9H, *m*-CH₃-O), 3.86 (s, 18H, *p*-CH₃-O), 4.21 (s, 6H, CH₂-NH), 5.92 (s, 6H, H-Ar).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 17.45 (CH₃), 23.27 (CH₂), 43.00 (CH₂), 56.48 (CH₃), 61.54 (CH₃), 90.53 (CH), 130.83 (C), 133.51 (C), 144.16 (C), 145.25 (C), 154.52 (C).

EM (ES+): *m/z* 748 (M+H)⁺.

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 20-80% de A en 15 min]: 11.49 min

1,3,5-Tris(3,4,5-trimetoxibencilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.13) (Esquema 3.3)



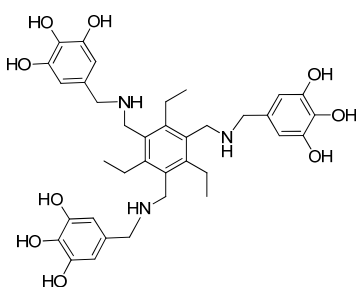
A una disolución del trisbromometil derivado **3.2**¹¹⁶⁻¹¹⁸ (167 mg, 0.37 mmol) y la amina comercial, 3,4,5-trimetoxibencilamina **3.9** (262 mg, 1.3 mmoles) en diclorometano (5 mL) se le añade trietilamina (0.180 ml, 1.3 mmol). La reacción se deja reaccionar a temperatura ambiente durante la noche (16-18 h). Se añade diclorometano (15 mL) y la disolución se lava con solución saturada de cloruro amónico (3 x 15 mL).

La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), filtra y evapora a vacío. El residuo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (diclorometano/metanol/amoniaco, 9:1:0.2) para obtener 188 mg (0.23 mmol, 65 %) del compuesto **3.13** en forma de sólido blanco; p.f. 100-102 °C.

¹H-RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.11 (t, $J = 7.4$ Hz, 9H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 2.71 (c, $J = 7.4$ Hz, 6H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 3.83 (s, 6H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.87 (s ancho, 6H, $\text{CH}_3\text{-O}$ y $\text{CH}_2\text{-NH}$), 6.64 (s, 6H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 791 (M+H)⁺.

1,3,5-Tris(3,4,5-trihidroxibencilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.14) (Esquema 3.3)



El compuesto **3.13** (170 mg, 0.21 mmol) se desprotege según el método general K obteniéndose 135 mg (94 %) de **3.14** en forma de sólido blanco; p.f. >200 °C (dec).

¹H-RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 0.89 (t, $J = 7.3$ Hz, 9H, CH_3), 2.38 (c, $J = 7.0$ Hz, 6H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 4.12 (s, 6H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 4.16 (s, 6H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 6.64 (s, 6H, H-Ar)

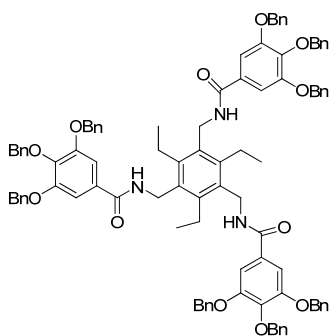
¹³C-RMN (CD_3OD , 75 MHz) δ 16.1 (CH_3), 24.9 (CH_2), 43.5 (CH_2), 52.6 (CH_2), 111.1 (CH), 121.6 (C), 128.4 (C), 135.9 (C), 147.4 (C), 149.2 (C).

EM (ES+): m/z 664 (M+H)⁺.

HPLC [SunFire C_{18} (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 0-100% de A en 5 min]: 2.38 min.

Análisis elemental (%) calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_9$: C, 65.14; H, 6.83; N, 6.33. Hallado C, 65.00; H, 6.63; N, 6.23.

1,3,5-Tris(3,4,5-tribenciloxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.19) (Esquema 3.6)



La trisamina **3.17**¹²⁵ (50 mg, 0.2 mmol) y el ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico **1.23**⁶³ (317 mg, 0.72 mmol, 3.6 eq) se hacen reaccionar según el método general H obteniéndose 212 mg (70%) de **3.19** en forma de sólido blanco; p.f. 178-180 °C.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.18 (t, *J* = 6.9 Hz, 9H, CH₃), 2.73 (c, *J* = 6.7 Hz, 6H, CH₃-CH₂), 4.62 (s, 6H, CH₂-NH), 4.99 (s, 18H, CH₂-Ph), 5.69 (s, 3H, NH), 6.93

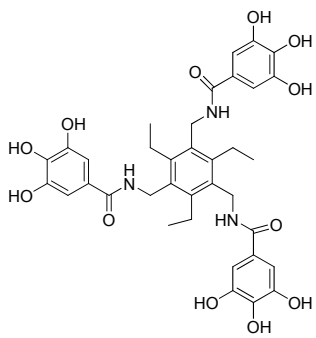
(s, 6H, H-Ar), 7.14-7.30 (m, 45H, H-Ar).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 17.15 (CH₃), 23.76 (CH₂), 39.17 (CH₂), 72.09 (CH₂), 75.63 (CH₂), 107.76 (CH), 127.96-128.99 (CH), 132.78 (C), 136.95 (C), 137.67 (C), 142.11 (C), 145.21 (C), 153.25 (C), 167.20 (C=O).

HPLC [XBridge C₁₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 5-80% de A en 15 min]: 20.44 min.

EM-QTOF (ES+): m/z 1517 (M+H)⁺, 1539 (M+Na)⁺.

1,3,5-Tris(3,4,5-trihidroxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.20) (Esquema 3.6)



3.6)

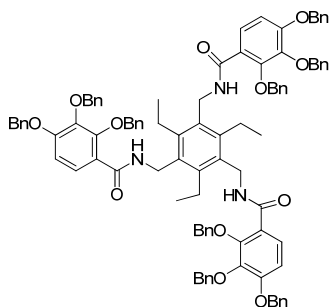
El compuesto **3.19** (100 mg, 0.066 mmol) se desprotege según el método general J obteniéndose **3.20** cuantitativamente en forma de sólido blanco; p.f. 178-180 °C.

¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 1.21 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, CH₃), 2.90 (c, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃-CH₂), 4.61 (s, 6H, CH₂-NH), 6.81 (s, 6H, H-Ar).

EM (ES+): m/z 706 (M+H)⁺, 728 (M+Na)⁺.

HPLC [SunFire C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 10-100% de A en 5 min]: 3.04 min.

1,3,5-Tris(2,3,4-tribenciloxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.21) (Esquema 3.6)



La trisamina **3.17**¹²⁵ (50 mg, 0.2 mmol) y el ácido 2,3,4-tribenciloxibenzoico **1.55** (290 mg, 0.66 mmol, 3.3 eq) se hacen reaccionar según el método general H obteniéndose 190 mg (63 %) de **3.21** en forma de aceite amarillo.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.03 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, CH₃-CH₂), 2.47 (c, *J* = 7.3 Hz, 6H, CH₃-CH₂), 4.53 (s, 6H, CH₂-NH), 4.82 (s, 6H, CH₂-Ph), 4.83 (s, 6H, CH₂-

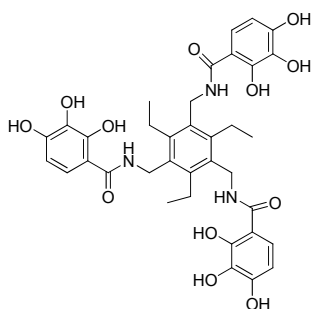
Ph), 5.12 (s, 6H, CH₂-Ph), 6.8-7.4 (m, 48H, H-Ar), 7.74 (t, *J* = 4.4 Hz, 3H, NH), 7.90 (d, *J* = 8.9 Hz, 3H, H-Ar).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 16.27 (CH₃), 22.83 (CH₂), 37.88 (CH₂), 70.87 (CH₂), 75.52 (CH₂), 76.48 (CH₂), 109.25 (C), 119.68 (C), 126.77 (CH), 127.54-128.06 (CH), 132.34 (C), 135.73 (C), 136.14 (C), 136.88 (C), 141.05 (C), 143.90 (C), 151.42 (C), 155.72 (C), 164.42 (C=O).

EM (ES⁺): m/z 1517 (M+H)⁺, 1539 (M+Na)⁺.

HPLC [SunFire C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 10-100% de A en 5 min]: 5.74 min.

1,3,5-Tris(2,3,4-trihidroxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.22) (Esquema 3.6)



El compuesto **3.21** (190 mg, 0.12 mmol) se desprotege según el método general J obteniéndose 67 mg (76 %) de **3.22** en forma de sólido blanco; p.f. 154-156 °C.

¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 1.21 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, CH₃-CH₂), 2.88 (c, *J* = 7.0 Hz, 6H, CH₃-CH₂), 4.67 (s, 6H, CH₂-NH), 6.33 (d, *J* = 8.8 Hz, 3H, H-Ar), 7.19 (d, *J* =

8.8 Hz, 3H, H-Ar).

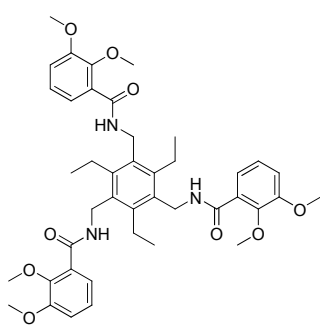
¹³C-RMN (CD₃OD, 75 MHz) δ 16.64 (CH₃), 24.04 (CH₂), 39.15 (CH₂), 108.10 (C), 109.48 (CH), 120.37 (CH), 132.87 (C), 133.75 (C), 145.84 (C), 150.45 (C), 150.67 (C), 170.74 (C=O).

EM (ES⁺): m/z 706 (M+H)⁺, 728 (M+Na)⁺.

HPLC [SunFire C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 10-100% de A en 5 min]: 3.62 min.

Análisis elemental (%) calculado para C₃₆H₃₉N₃O₁₂: C, 61.27; H, 5.57; N, 5.95. Hallado: C, 60.98; H, 5.63; N, 6.12.

1,3,5-Tris(2,3-dimetoxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.23)¹²⁶ (Esquema 3.6)



La trisamina **3.17**¹²⁵ (50 mg, 0.2 mmol) y el producto comercial, ácido 2,3-dimetoxibenzoico **1.44** (120.2 mg, 0.66 mmol, 3.3 eq) se hacen reaccionar según el método general H obteniéndose 84 mg (57 %) de **3.23** en forma sólido blanco; p.f. 88-90 °C.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 9H, CH₃-CH₂), 2.83 (c, *J* = 7.2 Hz, 6H, CH₃-CH₂), 3.69 (s, 9H, CH₃-O), 3.84 (s, 9H, CH₃-O), 4.70 (d, *J* = 4.1 Hz, 6H,

CH₂-NH), 7.00 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.1 Hz, 3H, CH-Ar), 7.14 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H, CH-Ar), 7.69 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.0 Hz, 3H, CH-Ar).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 16.44 (CH₃), 22.93 (CH₂), 38.34 (CH₂), 56.03 (CH₃), 61.17 (CH₃), 115.42 (CH), 122.72 (CH), 124.43 (CH), 126.65 (C), 132.40 (C), 143.87 (C), 147.41 (C), 152.54 (C), 164.756 (CO).

EM (ES⁺): 742 (M+H)⁺.

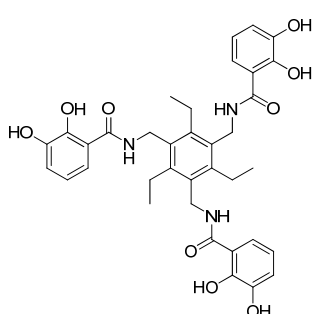
HPLC [SunFire C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 10-100% de A en 5 min]: 5.05 min.

Análisis elemental (%) calculado para C₄₂H₅₁N₃O₉: C, 68.00; H, 6.93; N, 5.66. Hallado: C, 67.57; H, 7.12; N, 6.21.

1,3,5-Tris(2,3-dihidroxi-benzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.24)¹²⁶ (Esquema 3.6)

El compuesto **3.23** (72.5 mg, 0.097 mmol) se desprotege según el método general K obteniéndose 45 mg (70%) de **3.24** en forma de sólido blanco; p.f. 238-240 °C.

¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 1.2 (t, *J* = 7.4 Hz, 9H, CH₃-CH₂), 2.90 (c, *J* = 7.4 Hz, 6H, CH₃-CH₂), 4.71 (s, 6H, CH₂-NH), 6.69 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H, CH-Ar), 6.91 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.8 Hz, 3H, CH-Ar), 7.29 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.1 Hz, 3H, CH-Ar).



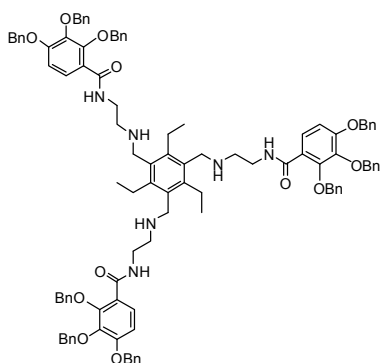
^{13}C -RMN (CD_3OD , 75 MHz) δ 16.68 (CH_3), 24.13 (CH_2), 39.29 (CH_2), 117.57 (CH), 119.60 (CH), 119.87 (CH), 133.05 (C), 145.99 (C), 147.16 (C), 149.23 (C), 170.37 (CO).

EM (ES $^+$): 658 (M+H) $^+$.

HPLC [SunFire C_{18} (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 10-100% de A en 5 min]: 4.33 min.

Análisis elemental (%) calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_9$: C, 65.74; H, 5.98; N, 6.39. Hallado: C, 65.30; H, 5.98; N, 6.74.

1,3,5-Tris(2,3,4-tribenciloxibenzamidoetilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.26)
(Esquema 3.7)



A una disolución del trisbromo derivado **3.2**¹¹⁶⁻¹¹⁸ (50 mg, 0.11 mmol) y *N*-(2-aminoetil)-2,3,4-tris(benciloxi)benzamida **3.25** (231 mg, 0.47 mmol) se le añade trietilamina (0.065 ml, 0.47 mmol). La reacción se deja reaccionar a temperatura ambiente durante la noche (16-18 h). Se añade diclorometano (15 mL) y la disolución se lava con solución saturada de cloruro amónico (3 x 15 mL). La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), filtra y

evapora a vacío. El residuo obtenido se purifica por CCTLC usando como eluyente diclorometano/metanol/amoniaco, 15:1:0.4, para dar 106 mg (57%) de **3.26** como un aceite transparente.

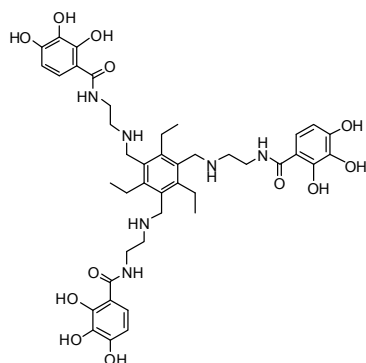
^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_3), 2.65-2.70 (m, 12 H, CH_2 - CH_3 , NH- CH_2), 3.39 (c, $J = 5.8$ Hz, 6H, CH_2 -NHCO), 3.63 (s, 6H, Ar- CH_2 -NH), 5.06 (s, 6H, CH_2 -Ph), 5.11 (s, 6H, CH_2 -Ph), 5.16 (s, 6H, CH_2 -Ph), 6.88 (dd, $J = 0.5$, $J = 9.2$ Hz, 3H, H-Ar), 7.22-7.46 (m, 45H, H-Ar), 7.90 (dd, $J = 0.7$, $J = 8.9$ Hz, 3H, H-Ar), 8.03 (t, $J = 5.2$ Hz, 3H, NHCO).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ 17.14 (CH_3), 22.78 (CH_2), 39.69 (CH_2), 47.68 (CH_2), 49.52 (CH_2), 70.97 (CH_2), 75.77 (CH_2), 109.27 (C), 120.07 (C), 126.89 (CH), 127.67 (CH), 128.29-128.96 (CH), 134.18 (C), 136.38 (C), 136.41 (C), 137.27 (C), 141.24 (C), 142.25 (C), 151.90 (C), 155.75 (C), 165.09 (C=O).

EM (ES $^+$): m/z 1647 (M + H) $^+$; 824 (M) $^{2+}$.

HPLC [SunFire C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) gradiente: A:B, 10-90% de A en 5 min]: 3.71 min.

1,3,5-Tris(2,3,4-trihidroxibenzamidoetilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (3.27)
(Esquema 3.7)



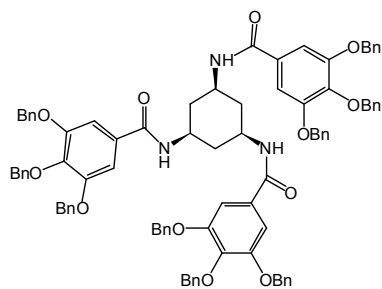
El compuesto **3.26** (92 mg, 0.06 mmol) se desprotege según el método general J para dar 45 mg (96%) de **3.27** como un sólido blanco; p.f. 164-166 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 835 (M + H)⁺

¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 1.19 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, CH₃), 2.91 (c, *J* = 7.3 Hz, 6H, CH₂-CH₃), 3.50 (m, 6H, NH-CH₂-CH₂-NHCO), 3.81 (m, 6H, NH-CH₂-CH₂-NHCO), 4.22 (s, 6H, Ar-CH₂-NH), 6.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 3H, H-Ar), 7.22 (d, *J* = 8.8 Hz, 3H, H-Ar).

¹³C-RMN (CD₃OD, 75 MHz) δ 16.61 (CH₃), 25.71 (CH₂), 37.52 (CH₂), 43.27 (CH₂), 50.21 (CH₂), 108.24 (C), 108.42 (CH), 119.95 (CH), 128.89 (C), 134.05 (C), 149.37 (C), 151.41 (C), 150.67 (C), 173.19 (C=O).

Cis,cis-[1,3,5-tris(3,4,5-tribenciloxibenzoamida)]ciclohexano (3.32) (Esquema 3.9)



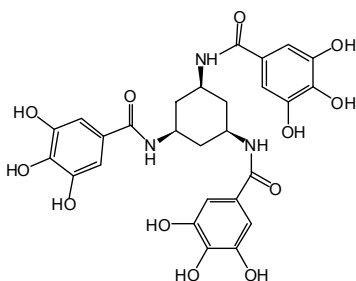
A una disolución que contiene **3.31** (22 mg, 0.17 mmol), ácido 3,4,5-tris(benciloxi)benzoico **1.23**⁶³ (248 mg, 0.56 mmol) y PyBOP (292, 0.56 mmol) en DMF (1.5 ml) se le añade Et₃N. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se evapora a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CCTLC

usando como eluyente diclorometano/metanol, 10:1, obteniéndose 82 mg (35%) de **3.32** como un sólido blanco.

EM (ES, modo positivo): m/z 1397 (M+H)⁺.

¹H-RMN [(CD₃)₂SO, 300 MHz] δ 1.52-1.63 (m, 3H, CH₂-ciclohexano), 2.12 (d ancho, *J* = 8.9 Hz, 3H, CH₂-ciclohexano), 3.96-3.99 (m, 3H, CH), 4.98, 5.16 (s, 18H, CH₂Ph), 7.24-7.48 (m, 51H, Ar), 8.35 (d, *J* = 8.3 Hz, 3H, NH).

Cis,cis-(1,3,5-tris(3,4,5-tribenciloxibenzamida)-ciclohexano (3.33) (Esquema 3.9)



El compuesto **3.32** (74 mg, 0.05 mmol) se desprotege según el método general J para dar 30 mg (92%) de **3.33** como un aceite marrón.

EM (ES, modo positivo): m/z 586 (M+H)⁺.

¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ 1.44-1.56 (m, 3H, CH₂-ciclohexano), 2.23 (d ancho, J = 10.2 Hz, 3H, CH₂-ciclohexano), 4.03-4.10 (m, 3H, CH), 6.84 (s, 6H, Ar).

Métodos Biológicos

Todos los ensayos biológicos han sido realizados por el equipo del Dr. Jan Balzarini en el Instituto Rega de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica).

El virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 VIH-1(III_B) fue proporcionado por el Dr. R. C. Gallo y el Dr. M. Popovic (Institute of Human Virology, University of Maryland, Baltimore, MD).

Las células humanas linfocitos T, CEM, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se cultivan en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) (Cambrex Bio Science Verviers S.p.r.l., Verviers, Belgium), 2 mM L-glutamina y 0.075 M NaHCO₃.

Las células CEM se infectan con VIH como se describe a continuación. Se suspenden células CEM (4.5 x 10⁵ células/mL) y se infectan con VIH-1 o VIH-2 a una concentración 100 veces superior a la dosis infectiva 50% (CCDI₅₀). La formación de células gigantes en células CEM inducida por VIH-1 se determina microscópicamente tras incubación a 37 °C durante 4 días.

La concentración efectiva 50% (CE₅₀) se define como la concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la formación de sincitios y la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) se define como la concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la proliferación celular.

Resonancia de Plasmón de Superficie

La proteína recombinante gp120 de VIH-1 III B (ImmunoDiagnostics Inc., Woburn, MA) (producida en cultivo celular de ovarios de hámster chino) fue inmovilizada de manera covalente en la matriz de dextrano funcionalizada con ácidos carboxílicos de un chip sensor CM5 en acetato de sodio 10mM, y pH 4 usando un método estandar de acoplamiento de aminas (Figura 4.4a) hasta obtener una densidad final de 1770 RUs (15fmol de gp120).¹⁵³ Se usó una celda de referencia como control para interacciones no específicas y cambios en el índice de refracción. Todos los estudios de interacción fueron realizados a 25 °C en un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Los compuestos fueron disueltos en HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% surfactante P20; pH 7.4), un 5% de dimetil sulfóxido (DMSO, Merck) y Ca²⁺ (10 mM) a una concentración de 50 µM. Las muestras fueron inyectadas durante 3 minutos con un flujo 30 µl/min seguido de una fase de disociación de 5 minutos. Con el fin de eliminar la contribución del DMSO en la medida de la respuesta se incluyeron series concentradas de DMSO. La superficie del chip CM5 fue regenerada con una inyección de NaOH (50 mM) durante 5 segundos con un flujo de 100 µl/min.

Modelización Molecular

Los confórmeros de baja energía fueron obtenidos usando el método de búsqueda conformacional MCMM (Monte Carlo Multiple Minimum), con configuración automática, ventana energética de 12 kcal/mol, número de pasos máximo 10000, y 100 pasos por torsión rotada. Para describir la energía en esa búsqueda conformacional se emplearon los siguientes parámetros: Como potencial para describir la Energía se compararon diferentes campos de fuerzas (MM3, AMBER, MMFFs y OPLS), con tratamiento electrostático de la constante dieléctrica de 47.2 Debyes, y como método de minimización energética se empleó el esquema 'Polar-Ribier Conjugate Gradient' (PCRG) con un número máximo de 5000 iteraciones, hasta un umbral de 0.05.

¹⁵³ Johnsson, B., Lofas, S. and Lindquist, G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface-plasmon resonance sensors. *Anal. Biochem.* **1991**, *198* (2), 268-277.