

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica



**COMPUESTOS POLIFUNCIONALES BASADOS EN
EL ANILLO DE 1,3,5-TRIAZINA: SÍNTESIS Y
ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES ANTI-VIH.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Virginia Lozano Rosas

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-5115-1

© Virginia Lozano Rosas, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas



Departamento de Química Orgánica

COMPUESTOS POLIFUNCIONALES BASADOS EN EL ANILLO DE 1,3,5-TRIAZINA. SÍNTESIS Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES ANTI-VIH

Memoria que para obtener el grado de Doctor en Química presenta

Virginia Lozano Rosas

2010

INDICE

ABREVIATURAS	5
BREVE INTRODUCCIÓN GENERAL Y ESTRUCTURA DE LA TESIS	7
CAPÍTULO 1: Derivados de 1,3,5-triazina: síntesis y evaluación frente a VIH-1 y VIH-2	9
INTRODUCCIÓN	11
El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	12
Ciclo vírico del VIH. Tratamientos anti-VIH actuales	13
La entrada viral: una diana prometedora en el tratamiento anti-VIH	15
La glicoproteína gp120 y el papel de sus carbohidratos en el reconocimiento molecular	17
Neutralización del VIH mediada por lectinas	20
Reconocimiento de carbohidratos por lectinas	23
Otros compuestos con un mecanismo de inhibición del VIH similar al de las lectinas	25
Miméticos sintéticos de lectinas	26
OBJETIVOS	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
Breve introducción a la síntesis y aplicaciones de los derivados de 1,3,5-triazina	35
Estrategia de síntesis de las estructuras propuestas	37
Síntesis de los derivados de 1,3,5-triazina de las Series I y II	40
Síntesis de los derivados de 1,3,5-triazina de la Serie III	56
Evaluación de los compuestos frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2	64
Estudios de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)	68
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFÍA	87
CAPÍTULO 2: Estudio de las propiedades gelificantes del dímero 65 y síntesis de derivados	95
INTRODUCCIÓN	99
Proceso de formación de un gel	101
Caracterización de los geles	102
Diversidad estructural en la obtención de geles de bajo peso molecular	103

Aminoácidos en la formación de geles	105
OBJETIVOS	107
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
Estudio del comportamiento del gel formado por el compuesto 65 en 1,4-dioxano	109
Análogos estructurales del compuesto 65 . Síntesis y estudio de sus propiedades	117
CONCLUSIONES	135
BIBLIOGRAFÍA	139
CONCLUSIONES GENERALES	143
PARTE EXPERIMENTAL	151
Métodos generales de síntesis y caracterización	153
Procedimientos generales de síntesis	155
Síntesis de los compuestos de las Series I y II	157
Síntesis de compuestos de la Serie III	179
Síntesis de compuestos del Capítulo 2	193
Ensayos biológicos en cultivo	199
Resonancia de Plasmón Superficial	199
Caracterización de los geles	201

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
Boc	<i>t</i> -Butoxicarbonilo
CADA	Ciclotriazadisulfonamida
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50
CCTLC	Cromatografía circular centrífuga en capa fina (Centrifugal circular thin layer chromatography)
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDC	Hidrocloreuro de 1-etil-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EM	Espectrometría de masas
ES	Electrospray
FDA	Administración de alimentos y fármacos de Estados Unidos (Food and Drug Administration)
Gal	Galactosa
Glc	Glucosa
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
gp	glicoproteína
HAART	Terapia antirretroviral de alta eficacia. (Highly Active AntiRetroviral Treatment)
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (High performance liquid chromatography)
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (High performance liquid chromatography-mass spectrometry)

HSA	Albúmina de suero humano (Human Serum Albumin)
MAOS	Síntesis orgánica asistida por microondas (Microwave-assisted organic synthesis)
Man	Manosa
MCMM	Montecarlo Multiple Minimum
NIH	Instituto Nacional de Salud (en EEUU). National Institutes of Health
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
MW	Microondas
Pf	Punto de fusión
Phe	Fenilalanina
PRM	Pradimicina
RMN	Resonancia magnética nuclear
RU	Unidades de resonancia (Resonance Units)
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
SPR	Resonancia de plasmón superficial (Surface Plasmon Resonance)
ta	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
TFA	Ácido trifluoroacético (Trifluoroacetic acid)
TREN	Tris(2-aminoetil)amina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIS	Virus de la inmunodeficiencia en simios

**BREVE INTRODUCCIÓN GENERAL Y
ESTRUCTURA DE LA TESIS**

BREVE INTRODUCCIÓN GENERAL Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

En 2010 se cumplieron veinticinco años desde que se iniciara la investigación en la búsqueda de compuestos activos frente a la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), agente etiológico del SIDA. Los avances en la investigación farmacéutica han sido espectaculares y posiblemente no exista ningún otro campo terapéutico donde se hayan conseguido tantos resultados en un periodo de tiempo tan reducido. Aún así, el SIDA continúa siendo un problema muy grave, que afecta especialmente a las regiones más desfavorecidas del mundo, donde el acceso a las terapias actuales se encuentra limitado por problemas económicos y culturales. Por ello es necesario seguir investigando en nuevas aproximaciones y en nuevos compuestos que, unidos al actual arsenal de fármacos, permitan tratar a los pacientes infectados y/o ayuden a prevenir nuevas infecciones (microbicidas).

Como se ilustrará en el Capítulo 1, en los últimos años se ha propuesto una nueva aproximación para luchar contra la replicación del VIH que consiste en utilizar lectinas, o proteínas de distinto origen capaces de reconocer carbohidratos, para impedir la transmisión del virus mediante la interacción de estas lectinas con las glicoproteínas gp120 presentes en la cubierta viral. A pesar del interés de los datos experimentales obtenidos, las lectinas presentan numerosos inconvenientes que impiden su desarrollo como fármacos. El análisis de las interacciones más habituales entre las lectinas y los carbohidratos permite concluir que son abundantes los enlaces de hidrógeno (sencillos, cooperativos, bidentados, etc...), las interacciones de tipo CH- π , las interacciones de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas, así como las interacciones mediadas por coordinación con cationes divalentes (Ca^{2+} , Mn^{2+}). Por otro lado, una de las características de la interacción carbohidrato-lectina es la debilidad de las interacciones individuales, limitación que la naturaleza solventa mediante el establecimiento de interacciones múltiples (teoría de la multivalencia).

Con el objetivo de disponer de un compuesto sintético que pudiera mimetizar a las lectinas en su interacción con la gp120 viral, se han sintetizado en el Capítulo 1 tres series de compuestos con un motivo estructural común: un anillo de 1,3,5-triazina funcionalizado con dos aminoácidos de naturaleza aromática unidos a la triazina a través de sus grupos amino. El número de residuos de aminoácidos varía de 2 unidades en los monómeros de la Serie I, a 4 unidades en los dímeros de la Serie II y se incrementa hasta 6 unidades en los trímeros de la Serie III. El motivo estructural presente en las tres series, como se ilustrará, es rico en elementos de reconocimiento que podrían ayudar a mimetizar las interacciones lectina-carbohidrato. Además, al pasar de monómeros a dímeros y posteriormente a trímeros se pretendía incrementar el número de interacciones conforme a la teoría de la multivalencia. Así, en el Capítulo 1, se abordará la síntesis de las tres series de compuestos mencionados, su evaluación frente a la replicación del VIH en cultivos "in vitro" y su capacidad de interacción con la gp120 viral mediante experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR).

Durante la síntesis de un dímero de triazinas funcionalizadas con asparraginas, se observó la formación un compuesto con aspecto de gel, que no fluía al invertir el vial que lo contenía. El aislamiento y caracterización de este compuesto nos permitió identificarlo como un compuesto de bajo peso molecular capaz de formar gel en disolventes orgánicos, sustancias también denominadas organogeladores. La identificación y caracterización de sustancias que puedan formar geles en disolventes orgánicos así como en medio acuoso es un campo de investigación muy activo en los últimos años ya que estos geles físicos o supramoleculares presentan características y aplicaciones muy atractivas con respecto a los geles poliméricos, hoy ampliamente extendidos. Por ello, en el Capítulo 2, se ha estudiado el comportamiento de gel de este dímero de asparraginas, así como sus características reológicas y morfológicas. Igualmente se han sintetizado compuestos estructuralmente relacionados con nuestro primer organogelador y se ha estudiado su capacidad de formar geles en distintos disolventes.

Esta diversidad de temas nos ha llevado a estructurar la tesis de modo que cada capítulo tenga entidad propia con su introducción, objetivos, resultados y discusión, y conclusiones, junto a la bibliografía empleada. Tras los dos capítulos se han incluido unas conclusiones generales de la tesis para finalizar con la parte experimental.

CAPÍTULO 1

**Derivados de 1,3,5-triazina: síntesis y
evaluación frente a VIH-1 y VIH-2**

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con los datos publicados en Diciembre de 2009, el número de personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se estimaba en alrededor de 33.4 millones¹. En 2008 se produjeron 2.7 millones de nuevas infecciones, de las cuales 1.9 millones correspondieron al África subsahariana. La infección producida por el VIH conduce al desarrollo del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El VIH ataca preferentemente a un tipo de linfocitos T, los CD4⁺, de forma que el sistema inmunitario no puede hacer frente a las infecciones oportunistas producidas por otros virus, bacterias u hongos. En 2008, 2 millones de personas fallecieron como consecuencia de enfermedades relacionadas con el SIDA, haciendo de esta pandemia la cuarta causa de mortalidad a nivel mundial¹.

En la actualidad existen numerosas evidencias de que el SIDA es una zoonosis, y de que su agente etiológico, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2), saltó la barrera entre especies en la primera mitad del siglo XX en el África Ecuatorial, debido a la caza de simios infectados por el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS)². Puesto que la mayoría de especies de primates infectados con VIS no enferman, se consideraba que el virus había coevolucionado con los primates durante millones de años, permitiendo al huésped y al patógeno coexistir sin problemas. No obstante, estudios recientes sugieren que el virus es mucho más nuevo, y de hecho se piensa que el *Mangabeye gris* se infectó por primera vez en 1808 con VIS. Este virus saltó a humanos 125 años después, convirtiéndose en el VIH-2, mientras que el VIH-1 procedente de simios, saltó a humanos en torno a 1908³. Mientras que el VIH-1 es responsable de la epidemia a nivel mundial, el VIH-2 es endémico del África Oriental y es poco habitual fuera de esta región. Los genomas del VIH-1 y VIH-2 tienen una similitud de sólo el 40-50%. Desde un punto de vista clínico, el VIH-2 se diferencia del VIH-1 en que la enfermedad que produce es menos agresiva, evoluciona más lentamente hacia la destrucción del sistema inmunitario y su transmisión vertical (madre-hijo) parece ser más difícil⁴. Una de las características del VIH, que dificulta en gran medida la cura de esta enfermedad, es su gran variabilidad genética. Dentro de los infectados por VIH-1 se conocen tres grupos: M (Main), O (Outlier) y N (no M, no O). El VIH-1 del grupo M se ha diversificado enormemente en humanos, generando al menos 10 subtipos designados por letras que van de la A hasta la K⁵⁻⁶.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

El descubrimiento del VIH estuvo acompañado de polémica durante un buen número de años e incluso ha sido objeto de demandas judiciales entre el grupo de Luc Montagner y Françoise Barré-Sinoussi, del Instituto Pasteur de Paris, y el grupo liderado por Robert Gallo, en el NIH de Bethesda en EEUU. Hoy se considera que los descubridores del virus en el año 1983 fueron los integrantes del equipo francés⁷ y así se reconoció con la concesión del premio Nobel de medicina a Montaigner y Barré-Sinoussi en el año 2008. Ahora bien, la metodología en la que había estado trabajando el grupo de Gallo en los años previos para la identificación de retrovirus humanos fue determinante para identificar el retrovirus HTLV-III⁸, bautizado posteriormente como VIH, en la muestra enviada a Bethesda por Montagner y Barré-Sinoussi.

El VIH es un retrovirus y pertenece al género de los *Lentivirus*, los cuales se caracterizan por producir una infección muy lenta y progresiva. El VIH se transmite principalmente por vía sexual, por vía sanguínea y por vía vertical (de madre a hijo). En la Figura 1 se representa un modelo esquemático del VIH. Estructuralmente el VIH está formado por una envoltura lipídica y una nucleocápsida central donde se aloja el material genético en forma de ARN y las enzimas virales. En la envoltura del virus se encuentran las glicoproteínas gp41 y gp120, responsables de la interacción y fusión del virus con la célula huésped.

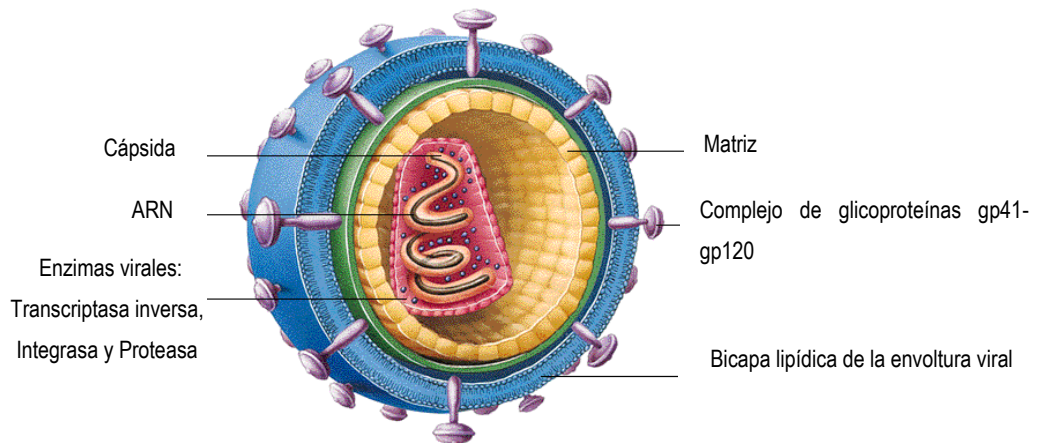


Figura 1. Modelo esquemático del VIH-1

El material genético del virus está constituido por dos hebras simples de ARN, con aproximadamente 9.5 Kb de longitud. Este ARN posee, entre otros, los genes Gag, Pol y Env, que conducirán a las proteínas estructurales y funcionales del virus. Así, el gen Gag codifica a las proteínas estructurales de la matriz y de la cápsida, la traducción de Pol y posterior procesamiento conduce a las enzimas proteasa, integrasa y transcriptasa inversa, mientras que el gen Env codifica a gp160, precursora de las glicoproteínas de la envoltura viral, gp120 y gp41.

Ciclo vírico del VIH. Tratamientos anti-VIH actuales

En la Figura 2 se muestra el ciclo vírico del VIH-1 y se señalan aquellas etapas que han sido exploradas con mayor profundidad para el desarrollo de fármacos. En primer lugar se produce la adsorción del virus a la célula huésped mediante la interacción del complejo gp120-gp41, presente en la envoltura del VIH-1, con el receptor CD4 y los correceptores de quimiocinas CCR5 y/o CXCR4 de la célula huésped. La interacción de gp120 con el correceptor CCR5 puede inhibirse mediante *maraviroc*, un antagonista de CCR5⁹.

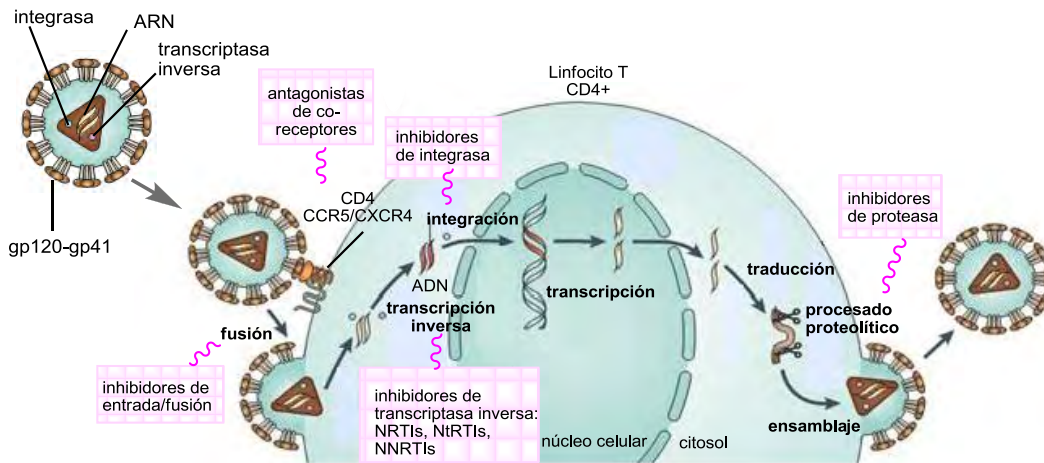


Figura 2. Ciclo vírico del VIH-1

Tras la adsorción del virus, se producen una serie de cambios conformacionales en gp41 que conducen a la fusión de la envoltura del VIH-1 con la membrana de la célula huésped. Esta fusión puede ser inhibida mediante enfuvirtida (T-20), el primer inhibidor de entrada aprobado por la FDA¹⁰.

Cuando el virus penetra en la célula huésped, la transcriptasa inversa viral sintetiza una doble cadena de ADN circular a partir del ARN. Puesto que el paso de ARN a ADN catalizado por la enzima transcriptasa inversa es un proceso exclusivo de retrovirus como el VIH, esta enzima viral ha sido ampliamente estudiada como diana selectiva de la replicación del virus. Esta enzima ofrece dos sitios de interacción: el centro catalítico donde se unen los sustratos (desoxirribonucleótidos trifosfato) y un sitio alostérico próximo. Existen tres familias de inhibidores frente a la transcriptasa inversa¹¹:

- Los inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, como zidovudina y emtricitabina entre otros, que actúan como inhibidores competitivos del sustrato natural.
- Los inhibidores nucleotídicos de la transcriptasa inversa, cuyo modo de actuación es similar a los anteriores, pero poseen un grupo fosfonato no hidrolizable en sustitución del monofosfato. Hasta la fecha sólo ha sido aprobado el tenofovir.

- Los inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa, los cuales interaccionan con el sitio alostérico. Como ejemplos de esta familia se encuentran nevirapina, delavirdina, efavirenz y etravirina.

A continuación tiene lugar el transporte del ADN vírico al núcleo de la célula huésped. La cadena de ADN circular se recombina con un lugar específico del ADN cromosómico y se inserta linealmente. En estas condiciones, el genoma provírico integrado puede persistir en un estado no infeccioso durante mucho tiempo, con la mayoría de sus genes desactivados (lisogenia). Ciertos factores de tensión ambiental, todavía no determinados, pueden desencadenar la escisión del genoma vírico integrado y la vuelta del virus a un estado infeccioso (ciclo lítico). La inserción del ADN vírico en el ADN cromosómico de la célula huésped está catalizada por una enzima viral, la integrasa, frente a la cual existe un único fármaco aprobado, el raltegravir¹².

Durante la transcripción del ADN se genera una cadena de ARN vírica que se exporta al citoplasma para su traducción. Tras este proceso se obtiene una cadena polipeptídica que es digerida por la proteasa del VIH-1 en proteínas funcionales y estructurales que formarán parte de la cápsida del VIH-1. Existen comercializados diversos inhibidores de proteasa como atazanavir, tripanavir o darunavir¹¹.

Debido a la complejidad que entraña la selección de un determinado tratamiento, la severidad de los efectos secundarios asociados y la necesidad de evitar la aparición de cepas virales resistentes, el tratamiento actual frente al VIH-1 se basa en el empleo de una combinación de fármacos. Esta terapia, que se conoce como *“terapia antirretroviral de alta eficacia”* (también conocida por sus siglas en inglés como HAART), ha ido evolucionando a lo largo de los años desde un régimen de más de 20 píldoras al día, a una única píldora diaria comercialmente conocida como Atripla, una combinación de emtricitabina, tenofovir y efavirenz. También existen otras formulaciones triples como Triomune, así como distintas combinaciones de fármacos en función de la evolución de la enfermedad¹³. En el año 2010 se han cumplido 25 años desde que se dieron los primeros pasos en la terapia anti-VIH, la cual comenzó con el empleo de zidovudina (AZT), el primer fármaco aprobado en 1987 para el tratamiento del SIDA. Es evidente que la situación ha cambiado drásticamente en estos 25 años, desde la impotencia inicial de los primeros años donde las muertes se producían rápidamente sin que los médicos pudieran ofrecer ningún tratamiento, a la situación actual donde existen hasta 30 especialidades farmacéuticas disponibles; por ello la terapia antirretroviral se considera un ejemplo extraordinario de medicina traslacional¹⁴⁻¹⁵.

En los países desarrollados las muertes debidas a la infección por VIH-1 han disminuido considerablemente gracias al desarrollo de los fármacos antes enumerados, que aunque no permiten erradicar la infección, mantienen los niveles del virus en plasma por debajo de los límites de detección. No obstante, en torno a un 20% de los pacientes no puede tolerar los cócteles antivirales a corto plazo, y se han observado a largo plazo importantes efectos secundarios sobre el sistema cardiovascular y el metabolismo.

En los países subdesarrollados, el acceso a este arsenal de fármacos se ve limitado en algunos de ellos por su alto coste, mientras que en otros países donde el tratamiento es gratuito, las trabas burocráticas hacen que los pacientes tengan que esperar un año o más para recibir tratamiento. Ésto ha llevado a la búsqueda de alternativas más económicas como son el desarrollo de geles o cremas microbicidas, los cuales persiguen inactivar a los viriones en el lumen vaginal antes de que puedan entrar en contacto con los linfocitos T CD4⁺. Así, los geles microbicidas podrían ser aplicados tópicamente por las mujeres, con anterioridad al contacto sexual, para prevenir la infección por VIH. Con esta finalidad, los primeros microbicidas que se desarrollaron llevaban en su composición un inhibidor de entrada viral; no obstante, los ensayos realizados muestran que la presencia de un inhibidor de entrada no es suficiente para prevenir la infección. Por ello, los geles microbicidas actuales no sólo están siendo desarrollados con el objetivo de impedir la entrada viral en la célula huésped, sino que también se persigue inhibir la extensión de la infección en el caso de que el virus consiga penetrar en alguna célula. De esta forma, algunas formulaciones que se encuentran en fase III, consisten en una combinación de fármacos donde se encuentra un inhibidor de la entrada viral y un inhibidor de la transcriptasa inversa o integrasa¹⁶.

La entrada viral: una diana prometedora en el tratamiento anti-VIH

Bloquear la entrada del virus a la célula e impedir así la infección ha sido, desde la identificación del virus, una de las estrategias más atractivas. Sin embargo, la complejidad del proceso como se ilustra a continuación, ayuda a explicar porqué los éxitos en este área han sido menores que los alcanzados frente a las enzimas virales (transcriptasa, integrasa y proteasa). En todo caso, la rápida expansión de la pandemia y los fracasos cosechados en los ensayos clínicos con vacunas y microbicidas, han motivado que la comunidad científica reinvestigue, desde la ciencia básica a modelos animales, las etapas iniciales de la infección como la vía más prometedora para impedir que la pandemia siga extendiéndose¹⁷.

El proceso de infección de las células es un proceso complejo y con varias etapas que incluye la adsorción del virus a la célula huésped a través de los receptores CD4, unión a los correceptores y fusión de las membranas celular y viral¹⁸. En estas etapas múltiples intervienen las glicoproteínas gp120 y gp41 que se encuentran formando un complejo trimérico en la envoltura del virus. Las proteínas virales gp120 y gp41 son sintetizadas a partir de un único precursor, gp160. La subunidad gp120 participa en la adsorción a la célula huésped, unión a CD4 y posterior interacción con los correceptores. Esta glicoproteína está formada por cinco dominios conservados (C1-C5) y cinco dominios variables (V1-V5) anclados en su base por puentes disulfuro altamente conservados. Las regiones variables, junto a los numerosos sitios de *N*-glicosilación, permiten al virus evadir constantemente la respuesta humoral. Por su parte, la subunidad gp41 interviene en el proceso de fusión de ambas membranas. Este proceso multietapa se comenta con más detalle a continuación¹⁸.

En primer lugar se produce la adsorción del VIH a la célula huésped, favorecida por interacciones inespecíficas entre regiones cargadas positivamente en gp120 y los proteoglicanos de carga opuesta

presentes en la membrana celular. También se puede dar una interacción específica entre la proteína viral gp120 y lectinas de superficie como DC-SIGN, expresadas en la superficie de macrófagos y células dendríticas. Se han descrito distintos polianiones solubles que son capaces de bloquear esta unión inespecífica de los viriones a la célula huésped¹⁹. En la Figura 3 se muestran las estructuras de PRO2000 y suramina, dos ejemplos de polianiones con actividad anti-VIH.

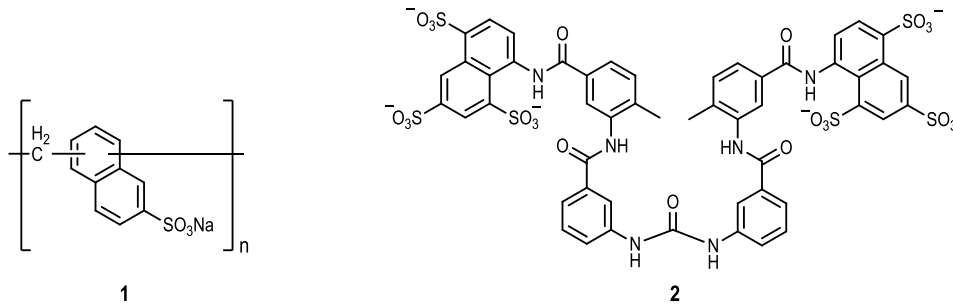


Figura 3. PRO2000 y suramina, dos polianiones con actividad anti-VIH in vitro

PRO2000 (Indevus Pharmaceuticals), un compuesto polimérico de naftalenos sulfonados, constituía un prometedor microbicida vaginal²⁰ y había superado con éxito las fases clínicas I y II, pero en diciembre de 2009, un extenso estudio realizado con 9400 mujeres africanas reveló que aunque PRO2000 cumplía con los requisitos de seguridad, no ofrecía protección estadísticamente significativa frente al virus en comparación con un placebo²¹.

Tras la adsorción se produce la interacción de gp120 con el receptor CD4 (Figura 4), un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que es expresado en monocitos, macrófagos, linfocitos T y células dendríticas. Para bloquear esta interacción, se han seguido distintas aproximaciones. Un grupo importante de estas estrategias se han centrado en el componente celular, es decir, el CD4, y para ello se han desarrollado anticuerpos monoclonales antiCD4, CD4 recombinante soluble, así como miméticos y derivados del receptor CD4. También se han descrito compuestos que disminuyen la expresión del receptor CD4, como los CADA¹⁹, haciendo así que las células se vuelvan temporalmente resistentes a la infección. Un segundo grupo de estrategias tienen como objetivo la interacción con la gp120 viral. Así, se han desarrollado anticuerpos monoclonales (por ejemplo 2G12), o moléculas capaces de interactuar con los carbohidratos de gp120, apartado que será comentado con más detalle posteriormente.

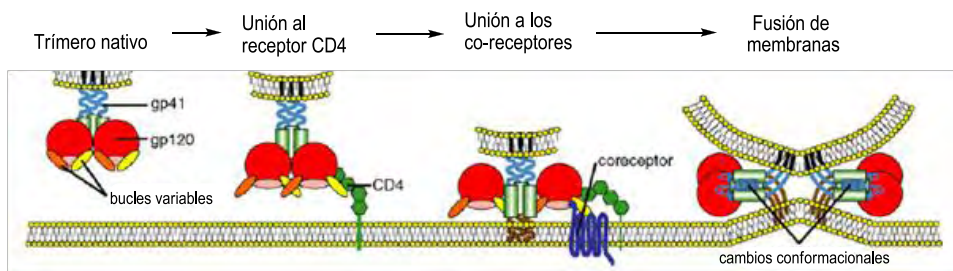


Figura 4. Etapas de la entrada viral

Tras la interacción con el receptor CD4, la glicoproteína gp120 experimenta una serie de cambios conformacionales quedando expuestas las regiones variables V1, V2 y V3, estando la región V3 especialmente implicada en la posterior interacción con los correceptores celulares CCR5 y/o CXCR4. Esta región V3 de 35 residuos de longitud es muy variable, se encuentra altamente glicosilada y su secuencia de aminoácidos determina si se une a los correceptores CCR5 o CXCR4 (Figura 4).

La interacción de gp120 con los correceptores celulares CCR5 y/o CXCR4 constituye otra diana terapéutica de gran interés. Las cepas de VIH predominantes son las que reconocen al correceptor CCR5 (virus R5), no obstante estas cepas pueden mutar y pasar a reconocer los correceptores CXCR4 (virus X4), lo que ocurre aproximadamente en el 50% de pacientes infectados con VIH-1. Este cambio de tropismo conduce a un incremento en la velocidad de replicación viral que origina una progresión más rápida de la enfermedad. Los datos epidemiológicos muestran que aquellos individuos homocigóticos para el alelo $\delta 32\text{ccr}5$, los cuales no expresan CCR5 en la superficie celular, son altamente resistentes a la infección por VIH, lo que refleja la importancia de estos correceptores como diana terapéutica¹⁸. Hasta la fecha, sólo el fármaco maraviroc ha sido aprobado por la FDA como antagonista de CCR5. Para el correceptor CXCR4 todavía no están disponibles antagonistas no tóxicos, lo que en parte es debido a que, a diferencia de CCR5, el CXCR4 interviene en numerosas funciones fisiológicas. No obstante, el tratamiento con maraviroc ha sido cuestionado por algunos autores, ya que ante la presión del fármaco, se ha observado en algunos pacientes la emergencia de virus con preferencia por el correceptor CXCR4¹⁸.

La unión de gp120 a los correceptores provoca cambios conformacionales en el complejo trimérico gp120-gp41 los cuales originan la exposición del péptido de fusión *N*-terminal de gp41 altamente hidrofóbico. Éste se inserta en la membrana celular, lo que conduce a la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped (Figura 4). Como se comentó anteriormente, esta fusión puede ser inhibida mediante enfuvirtida (T-20), un péptido sintético de 36 aminoácidos de secuencia idéntica a una región de gp41. No obstante, su naturaleza peptídica no permite su administración oral y debe ser inyectado dos veces al día, lo que limita su aplicación.

A modo de resumen podemos concluir que se han hecho considerables avances en el campo de los inhibidores de entrada, pero siguen siendo necesarios nuevos compuestos que solventen los problemas presentados por los dos inhibidores aprobados por la FDA, maraviroc y enfuvirtida.

La glicoproteína gp120 y el papel de sus carbohidratos en el reconocimiento molecular

La glicoproteína viral gp120 está densamente glicosilada, siendo el 50% de su peso molecular debido a carbohidratos. Las posiciones de *N*-glicosilación se encuentran en los residuos de Asn contenidos en la secuencia Asn-X-Ser/Thr (donde X es diferente de Pro) y están altamente conservadas²². No obstante, el genoma del VIH no codifica ninguna enzima capaz de sintetizar estos carbohidratos, es decir, la gp120 es glicosilada en su totalidad por las enzimas de la célula huésped.

Durante la traducción del ARN que genera gp160, el polipéptido naciente es transportado al retículo endoplasmático de la célula huésped por la proteína Sec61, donde se transfieren bloques de 14 azúcares ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) a los grupos amida de los residuos de asparragina del polipéptido. A continuación, el primer y segundo residuo de glucosa del polisacárido transferido son eliminados por las glucosidasas I y II, de forma que se obtiene $(\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2)\text{-gp160}$, con una glucosa terminal. Este polipéptido glicosilado es reconocido por las chaperonas calnexina y calreticulina, las cuales colaboran en el correcto plegamiento de gp160 junto con isomerasas de puentes disulfuro, encargadas de la correcta formación de los mismos. En este punto, gp160 se ensambla en oligómeros, preferentemente trímeros²². La hidrólisis del enlace terminal ($\text{Glc}\alpha\text{1-2Man}$) libera a gp160 de las chaperonas y permite que la proteína glicosilada ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-gp160}$) sea transportada al aparato de Golgi, donde las manosidasas recortan el polisacárido para dar lugar a $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, unidad pentasacárida a partir de la cual se generarán otros glicanos más complejos. En la Figura 5 se representan los tres tipos de glicanos que podemos encontrar en gp120. Como se puede observar, todos ellos comparten la misma unidad pentasacárida ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) representada en naranja en la unión a los residuos de Asn del polipéptido²³.

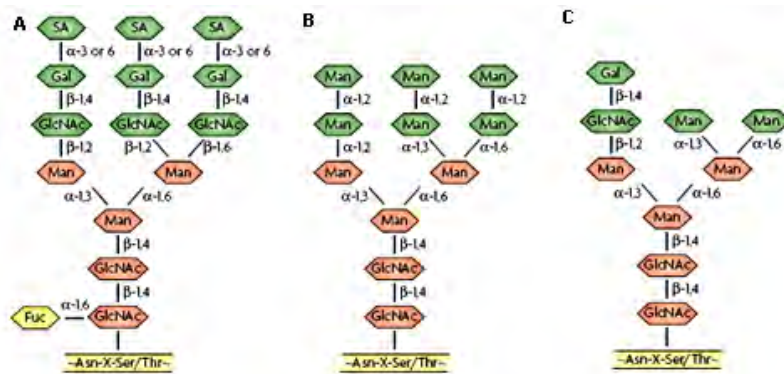


Figura 5. Estructura de los diferentes tipos de *N*-glicanos. **A:** glicano de naturaleza compleja; **B:** glicano de alto contenido en manosa; **C:** glicano híbrido. Man= manosa, GlcNAc= *N*-acetilglucosamina, Gal= galactosa, Fuc= fucosa, SA= ácido siálico.

De estos glicanos, un 63% son de naturaleza compleja (Figura 5A), un 33% son de alto contenido en manosa (Figura 5B), y un 4% son un híbrido de los dos anteriores (Figura 5C). En los glicanos de naturaleza compleja abundan los residuos de fucosa y ácido siálico y en menor medida los residuos de galactosa, *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilgalactosamina. En los glicanos de alto contenido en manosa, existen entre dos y seis residuos de manosa unidos a la unidad pentasacárida.

Durante el transcurso de este proceso de glicosilación, una proteasa presente en el aparato de Golgi procesa a gp160, obteniéndose las glicoproteínas maduras gp120 y gp41.

Los carbohidratos de gp120, así como los de otras glicoproteínas, son pobremente inmunogénicos por varias razones²². Por un lado exhiben microheterogeneidad, es decir, la misma secuencia de aminoácidos en la proteína puede presentar un amplio rango de glicofomas, lo que causa

una respuesta inmunogénica pobre²⁴. Por otra parte, los carbohidratos forman un entramado flexible y denso sobre la estructura proteica, cubriendo cualquier epítipo potencial. Por último, los carbohidratos de gp120 son producidos por la maquinaria de la célula huésped, por lo que suelen ser reconocidos como propios. Aún así, a partir de pacientes seropositivos, se han aislado un reducido panel de anticuerpos con capacidad neutralizante frente al virus. De ellos, el anticuerpo monoclonal 2G12 es uno de los pocos conocidos que reconoce un epítipo formado por los carbohidratos de gp120. Este epítipo, que se encuentra entre la región conservada C4 y la región variable V4, posee glicanos de alto contenido en manosa. En concreto, el anticuerpo monoclonal 2G12 es capaz de reconocer los oligómeros terminales de manosa unidas por enlaces α -1,2²⁵⁻²⁶. Muy recientemente, en 2009, Walker y colaboradores descubrieron dos nuevos potentes anticuerpos frente a VIH-1, el PG9 y PG16²⁷.

Cabe destacar que, aunque la cubierta del virus está constituida por glicanos de la célula huésped, existe una diferencia fundamental con respecto a las glicoproteínas de mamíferos, y es que en las glicoproteínas de la envoltura del VIH-1 abundan los residuos terminales de manosa²³. Se considera que esta diferencia es debida al denso entramado de carbohidratos en gp120 que impide a las manosidasas actuar correctamente sobre ellos durante el procesado glicídico que tiene lugar en el aparato de Golgi. Así, el hecho de que en gp120 abunden los residuos terminales de manosa supone una diferencia notable con respecto a las glicoproteínas de mamíferos, diferencia que puede ser empleada para la búsqueda de compuestos que interaccionen selectivamente con las glicoproteínas del virus.

No obstante, el virus también saca ventaja de su riqueza en residuos de manosa terminales para extender la infección, puesto que estas manosas pueden interaccionar con una lectina específica (DC-SIGN), presente en la superficie de células dendríticas, macrófagos, linfocitos B y en ciertos tejidos (Figura 6).

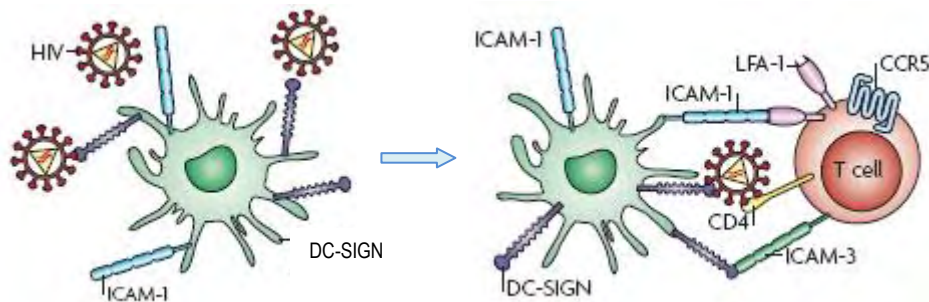


Figura 6. Captura de partículas virales por DC-SIGN y posterior presentación a los linfocitos T CD4

Las células dendríticas se encuentran presentes en los sitios de entrada de los patógenos (por ejemplo, en la mucosa que se encuentra bajo el epitelio vaginal), donde los reconocen y capturan. Es entonces cuando inician su migración a los nódulos linfáticos, donde se multiplican los linfocitos T para erradicar al patógeno. Una de las funciones de DC-SIGN es la de interaccionar con la molécula de adhesión intercelular ICAM-3 presente en los linfocitos T para facilitar la presentación del antígeno al

linfocito (Figura 6). De esta forma, las células dendríticas pueden capturar de un modo eficiente las partículas virales a través de las lectinas DC-SIGN. Cuando estas células dendríticas establecen contacto con los linfocitos T, el virus pasa de una célula a otra, a través de una “sinapsis infecciosa” cuyo resultado es una infección muy rápida de un gran número de linfocitos T²⁶.

Neutralización del VIH mediada por lectinas

Las lectinas son proteínas que se unen reversiblemente a carbohidratos, y están presentes en la mayoría de los organismos: desde virus y bacterias, hasta plantas y mamíferos. Estas proteínas despertaron un gran interés cuando fueron descubiertas en la primera mitad del siglo XX, pues poseen un sitio de reconocimiento similar al de los anticuerpos, en este caso para carbohidratos. No obstante estas proteínas no son producto de una respuesta inmunogénica²⁸.

Actualmente se conocen varios cientos de lectinas con especificidad para distintos tipos de carbohidratos (por ejemplo, manosa, *N*-acetilglucosamina u oligómeros de galactosa) de las cuales unas 60 son comerciales. Las lectinas poseen funciones muy diversas que, en mamíferos, suelen estar relacionadas con procesos de reconocimiento celular y transmisión de señales a través de la membrana celular²⁹. Así, un gran número de lectinas actúan como mitógenos de los linfocitos, es decir, poseen la capacidad de estimular a estas células para que crezcan y se dividan. Esta actividad mitogénica es el resultado del reconocimiento e interacción de estas lectinas con determinados carbohidratos de la superficie celular²⁹. En plantas, no se conoce bien la función de estas lectinas, pero algunas poseen actividad protectora frente a microorganismos patógenos, mientras que otras podrían estar involucradas en la simbiosis que se establece entre plantas y las bacterias que fijan nitrógeno²⁸. Es muy habitual que las lectinas posean dos o más sitios de reconocimiento de carbohidratos. Así, cuando interaccionan con los azúcares de la superficie de células como los eritrocitos, varias de estas células pueden unirse a una misma lectina, lo que da lugar a un proceso de aglutinación que origina la precipitación de las células entrelazadas a través de las lectinas. Este fenómeno ha sido empleado para la detección y caracterización de lectinas, pues tanto la aglutinación como la precipitación pueden ser inhibidas con el azúcar por el cual la lectina tiene especificidad²⁸. El hecho de que las lectinas sean capaces de reconocer y unirse de forma específica a los oligosacáridos de los glóbulos rojos ha sido empleado para la detección del grupo sanguíneo, ya que éste depende entre otros factores, del tipo de carbohidrato presente en la superficie de los eritrocitos³⁰.

Se han descrito distintas lectinas para las que se ha demostrado su capacidad para reconocer los carbohidratos de la gp120 viral, interfiriendo en la adsorción del VIH-1 a la célula huésped e impidiendo la infección³⁰. Así, se conocen lectinas procedentes de plantas como la aglutinina del híbrido de *Hippeastrum*, la aglutinina de *Galanthus nivalis* o la aglutinina de *Urtica dioica*, con actividad anti VIH-1

(CE₅₀) en el rango nanomolar³¹⁻³². Las dos primeras presentan especificidad por residuos de manosa, mientras que la aglutinina de *Urtica dioica* reconoce unidades de *N*-acetilglucosamina. También se han realizado ensayos con lectinas procedentes de organismos procariotas, entre las que destaca la cianovirina, una proteína de 11 KDa aislada de cianobacterias que reconoce glicanos ricos en manosa, y que ha sido propuesta como un potencial microbicida³³.

Las lectinas con actividad anti-VIH también previenen la infección de las células dendríticas, impidiendo de esta forma la presentación del virus a los linfocitos T. Esta actuación temprana frente al VIH convierte a las lectinas en interesantes candidatos como microbicidas, puesto que se considera que la captura del virus mediada por DC-SIGN y posterior transmisión a los linfocitos T, es uno de los primeros eventos que ocurren durante el proceso de infección viral a través de contacto sexual.

Además de inhibir la infección por VIH a concentraciones 5 ó 10 veces superiores a su CE₅₀, las lectinas previenen la formación de sincitios cuando se ponen en contacto células permanentemente infectadas con células sanas³⁴. Un sincitio es una célula gigante multinucleada que se forma cuando el complejo gp120-gp41 presente en la superficie de células infectadas por VIH interacciona con el receptor CD4 de células sanas, originando la fusión de las células. Esta célula gigante acaba experimentando apoptosis.

Ahora bien, el mecanismo exacto por el que las lectinas ejercen su actividad anti-VIH sigue siendo objeto de estudio. Se sabe que la unión de lectinas a gp120 no impide la interacción inicial del virus con las células T CD4+; no obstante, la interacción con los correceptores y/o la exposición del péptido de fusión de gp41 se bloquea en presencia de estas lectinas. Por ello, se considera que la unión lectina-gp120 impide o dificulta los cambios conformacionales requeridos para que la gp120 pueda interactuar correctamente con los correceptores, antes o durante el proceso de fusión de las membranas.

Como con cualquier otro agente anti-VIH, la exposición prolongada del virus al agente antiviral se traduce en la aparición de fenotipos resistentes. Balzarini y colaboradores han estudiado la aparición de cepas resistentes tras la exposición prolongada a distintas lectinas³⁵⁻³⁶. La secuenciación de estas cepas indicó que se producía una acumulación de mutaciones que afectan a residuos de Asn, Ser o Thr de la gp120, lo que conduce a la pérdida de hasta 9 sitios de *N*-glicosilación y por tanto a una gp120 menos glicosilada.

resistentes que han perdido sitios de *N*-glicosilación y que por tanto podrían ser más eficazmente reconocidos por el sistema inmune del huésped³⁸.

Reconocimiento de carbohidratos por lectinas

El sitio de unión de los carbohidratos en las lectinas es, en general, una depresión poco profunda en la superficie de la misma²⁸. Las bases estructurales para el reconocimiento de los carbohidratos por las lectinas han sido estudiadas fundamentalmente a partir de la determinación de complejos por cristalografía de rayos X. Lo más llamativo es la extensa red de enlaces de hidrógeno, pero a ello hay que añadir interacciones de tipo CH- π , interacciones de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas, así como interacciones mediadas por coordinación con cationes divalentes (Ca^{2+} , Mn^{2+})³⁹. En la Figura 8 se reflejan los múltiples tipos de enlaces de hidrógeno que pueden establecerse cuando las lectinas interactúan con los carbohidratos²⁸. Los puentes de hidrógeno se pueden formar entre los grupos -OH de los carbohidratos y los grupos -NH, -OH y átomos de oxígeno de la lectina, siendo habituales los puentes de hidrógeno bidentados (por ejemplo, con las cadenas laterales de aminoácidos de carácter ácido) y cooperativos, donde el grupo -OH actúa simultáneamente como donador y aceptor. En muchas ocasiones, se establecen enlaces de hidrógeno mediados por moléculas de agua, las cuales juegan un papel fundamental en el reconocimiento de carbohidratos, confiriendo en algunos casos una elevada especificidad en el reconocimiento³⁹. Por otro lado, el carboxilato de la cadena lateral de los residuos de aspártico juega un papel fundamental en la discriminación de azúcares anómeros o epiméricos³⁹.

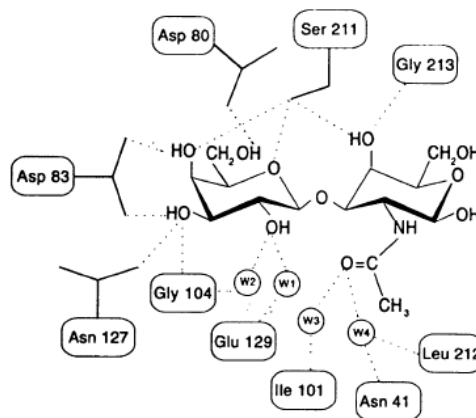


Figura 8. Representación esquemática de los tipos de enlaces de hidrógeno que se dan en la interacción lectina-carbohidrato

Un segundo grupo de interacciones muy habituales en los complejos lectina-carbohidrato son las interacciones CH- π entre los hidrógenos axiales de los carbohidratos y la nube de electrones de los anillos aromáticos de la proteína. La contribución de estas interacciones en el reconocimiento lectina-carbohidrato, a las que se da una importancia creciente, está siendo estudiada con distintos sistemas modelo⁴⁰⁻⁴². Por otro lado, la disposición estérica de los grupos hidroxilo en los carbohidratos crea bolsillos hidrofóbicos en la superficie de los mismos que pueden interactuar con regiones apolares de la

proteína²⁸. A su vez, las interacciones de Van der Waals, aunque suelen ser débiles, son muy numerosas, contribuyendo de forma significativa a la unión.

En numerosos casos, los cationes divalentes como Ca^{2+} y Mn^{2+} están involucrados en el reconocimiento de carbohidratos, tanto de forma indirecta, posicionando las cadenas laterales en el sitio de unión, como a través de la unión directa con el carbohidrato, como en el caso de las lectinas de tipo C que requieren Ca^{2+} para su actividad³⁹.

En la Figura 9 se representan las interacciones que se establecen entre el trisacárido *N*-acetilglucotriosa y la lectina procedente de *Urtica dioica*⁴³ que reconoce específicamente *N*-acetilglucosamina y que ha mostrado actividad anti-VIH. En esta Figura se pone de manifiesto la importancia en el reconocimiento molecular de los enlaces de hidrógeno, las interacciones de van der Waals e interacciones de tipo CH- π . Como vemos, intervienen al menos cinco enlaces de hidrógeno en el complejo carbohidrato-lectina y se dan varias interacciones de tipo CH- π entre las unidades de GlcNAc y los residuos Trp21, Trp23, Trp69 e His67 de la cadena polipeptídica de la aglutinina de *Urtica dioica*.

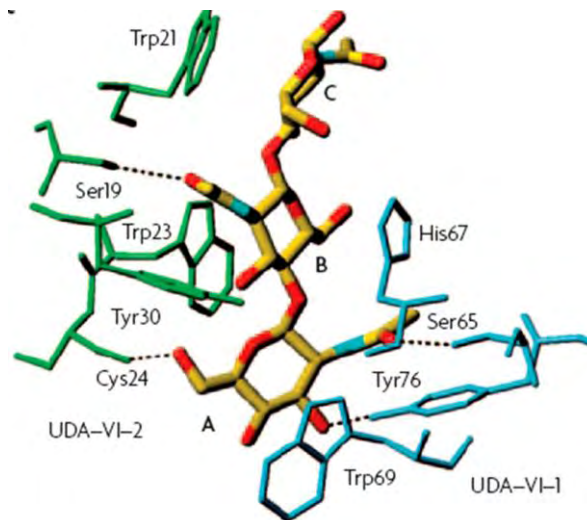


Figura 9. Red de enlaces de hidrógenos, interacciones de van del Waals e interacciones CH- π , entre el trisacárido GlcNAc₃ y la aglutinina de *Urtica dioica* (PDB ID 1ehh)

Como habíamos comentado anteriormente, el sitio de reconocimiento de carbohidratos en lectinas es una depresión poco profunda, muy expuesta al medio acuoso. Según esto, cabría esperar que la interacción de las lectinas con los carbohidratos tuviese una baja afinidad y una relajada especificidad. No obstante, las lectinas exhiben una elevada afinidad y una exquisita especificidad por determinados oligosacáridos de glicoproteínas, lo que consiguen mediante el establecimiento de numerosas interacciones de poca intensidad, según se recoge en la teoría de la multivalencia. El establecimiento de interacciones multivalentes por parte de sistemas biológicos como las lectinas, confiere una elevada especificidad a la interacción, necesaria para llevar a cabo procesos de reconocimiento molecular⁴⁴. Sin estas interacciones múltiples, la afinidad de unión estaría en el rango milimolar, como sucede cuando las lectinas establecen interacciones con monosacáridos.

Otros compuestos de naturaleza no proteica con un mecanismo de inhibición del VIH similar al de las lectinas

Los resultados que se acaban de comentar con la utilización de lectinas como agentes anti-VIH son realmente prometedores. No obstante, las lectinas presentan diversos problemas a la hora de ser empleadas como fármacos. Debido a su elevado peso molecular y a su naturaleza peptídica, su biodisponibilidad oral es muy baja, lo que complica la farmacocinética y farmacodinamia, particularmente en el caso de necesitarse una administración frecuente. Por otro lado, muchas lectinas poseen propiedades mitogénicas, aglutinantes de glóbulos rojos y algunas de ellas pueden originar procesos inflamatorios, toxicidad celular y desencadenar una respuesta inmunitaria, lo que comprometería su eventual eficacia antiviral. Las lectinas son también relativamente costosas de producir y purificar a gran escala, pudiendo presentar problemas de estabilidad y almacenaje⁴⁵.

Por todo ello se está investigando activamente en compuestos no proteicos de bajo peso molecular, de origen natural, con capacidad para el reconocimiento de carbohidratos. Hace aproximadamente veinte años, se descubrió la pradimicina A (PRM-A), un antibiótico no peptídico procedente de *Actinomadura hibisca*, que inhibía el crecimiento de hongos (Figura 10)⁴⁶. Posteriormente se descubrió que PRM-A presentaba actividad anti-VIH y prevenía la formación de sincitios entre células infectadas con VIH y células sanas⁴⁷. Además, la actividad anti-VIH requería de la presencia de Ca^{2+} y podía revertirse añadiendo al cultivo manano, un polisacárido de manosas, lo que sugería que la PRM-A actuaba uniéndose a las manosas de gp120 viral⁴⁸. Mediante la exposición prolongada a PRM-A, Balzarini y colaboradores demostraron que, al igual que con las lectinas, las cepas resistentes se caracterizaban por la pérdida de varios sitios de *N*-glicosilación de gp120⁴⁵ y que por tanto la PRM-A era la primera molécula pequeña no peptídica capaz de mimetizar la acción de las lectinas. PRM-A presenta una solubilidad limitada ($< 50 \mu\text{M}$) lo que dificulta su desarrollo. Muy recientemente se ha publicado que un análogo de PRM-A procedente de *Actinomadura spinosa*, denominado PRM-S (Figura 10), con un grupo sulfato en la posición 3' del residuo de glucosa terminal y mayor solubilidad en agua, presenta un comportamiento frente a VIH muy similar al de PRM-A⁴⁹.

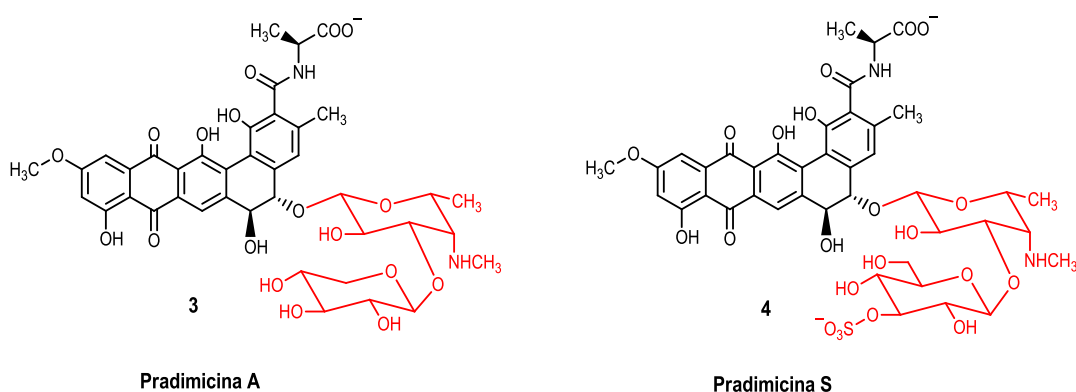


Figura 10. Estructuras de pradimicina A y pradimicina S

Otro ejemplo notable de compuesto no peptídico lo constituye el Alcian Blue, una ftalocianina catiónica (Figura 11). El Alcian Blue se emplea tradicionalmente para cuantificar glucosaminoglicanos por su capacidad para formar complejos con carbohidratos, y su actividad anti-VIH había sido descrita por Vzorov⁵⁰. Estudios sobre el mecanismo de acción realizados muy recientemente⁵¹, mostraron que este compuesto no sólo inhibía la infección por VIH de células sanas, sino que prevenía la formación de sincitios y la captura de partículas virales por DC-SIGN. Todo ello, junto con la capacidad de producir pérdidas de sitios de *N*-glicosilación en gp120 tras una exposición prolongada del virus a esta ftalocianina, proporcionaba evidencias de que este compuesto bloqueaba la infección viral mediante la interacción con los glicanos de las glicoproteínas presentes en la envoltura viral.

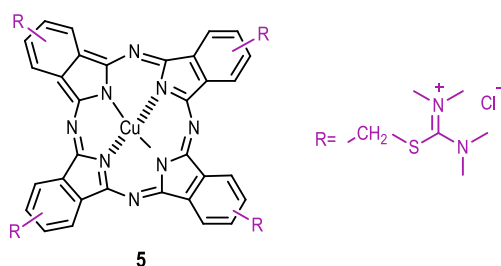


Figura 11. Estructura molecular del Alcian Blue

De esta forma se pone de manifiesto que es posible encontrar compuestos no peptídicos, de bajo peso molecular que presenten actividad anti-VIH y se comporten de forma análoga a las lectinas.

Miméticos sintéticos de lectinas

El diseño y síntesis de compuestos con capacidad para el reconocimiento de carbohidratos, también llamados receptores sintéticos o miméticos sintéticos de lectinas, es un área de gran interés, tanto para la búsqueda de fármacos que actúen a nivel de los glicanos presentes en la envoltura de patógenos, como en el desarrollo de sensores de carbohidratos con aplicaciones biomédicas^{39, 52}. Se han hecho considerables avances en la obtención de receptores sintéticos capaces de reconocer carbohidratos, de forma que se han descrito diversos receptores capaces de unir mono- y disacáridos con relativa afinidad y especificidad en disolventes orgánicos. A continuación se citan algunos ejemplos con fines ilustrativos, habiéndose publicado interesantes revisiones en los últimos años⁵³⁻⁵⁵.

Roelens y colaboradores publicaron un receptor tipo jaula con capacidad para reconocer β -D-glucosa con gran afinidad y selectividad en disolventes orgánicos⁵⁶. Este receptor está formado por tres unidades de pirrol en las “paredes” de la jaula, mientras que el “suelo” y el “techo” lo constituyen dos unidades de trietilbenceno (Figura 12). Los pirroles establecen enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo de los carbohidratos y las dos unidades de trietilbenceno estarían involucradas en el establecimiento de interacciones de tipo CH- π con los hidrógenos axiales de la glucosa.

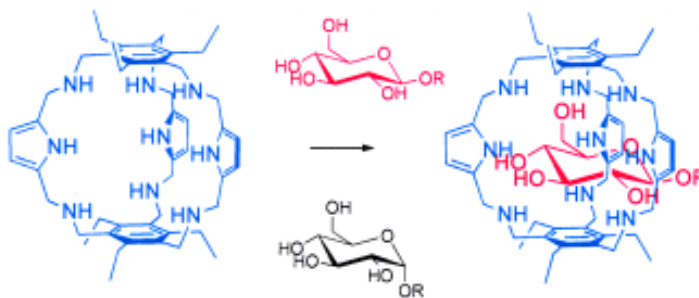


Figura 12. Receptor de β -D-glucosa diseñado por Roelens y colaboradores

Por otro lado, Mazik y colaboradores han sintetizado distintos tipos de receptores ricos en unidades de aminopiridinas y/o aminopirimidinas. Así, han descrito el receptor acíclico representado en la Figura 13, capaz de reconocer el disacárido dodecil β -D-maltósido en cloroformo⁵⁷.

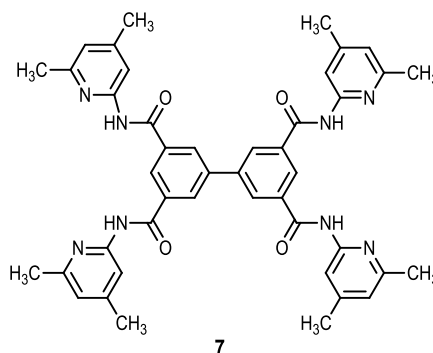


Figura 13. Receptor de disacáridos desarrollado por Mazik y colaboradores

El núcleo central de bifenilos tetrasustituidos forma una cavidad de tamaño y forma adecuada que permite la encapsulación del disacárido, mientras que los agrupamientos N=C-NH de las unidades de aminopiridinas se encuentran involucrados en el establecimiento de enlaces de hidrógeno con el disacárido. En la Figura 14 se representan los enlaces de hidrógeno que se pueden establecer entre el agrupamiento N=C-NH y el disacárido.

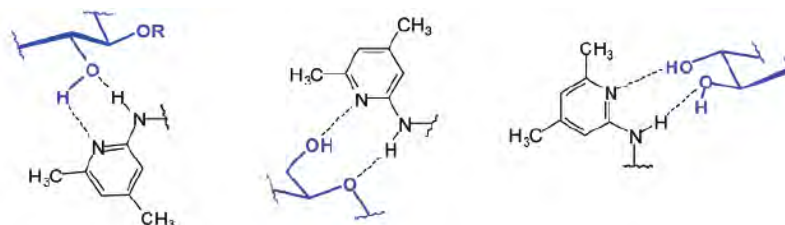


Figura 14. Enlaces de hidrógeno entre las unidades de aminopiridina del receptor y el disacárido propuestos a partir de estudios de modelado molecular

El proceso de reconocimiento de carbohidratos en sistemas biológicos tiene lugar en condiciones fisiológicas, es decir, en agua y a pH neutro. Aunque se han hecho importantes avances en la obtención de receptores que reconocen carbohidratos en medios orgánicos, es notoria la dificultad que entraña el reconocimiento de carbohidratos en medio acuoso, debido a la fuerte competencia de las moléculas de agua por los enlaces de hidrógeno entre el receptor y el carbohidrato. Por ello, la búsqueda de receptores que reconozcan carbohidratos en medio acuoso supone un área de gran interés.

La capacidad de los ácidos borónicos para reaccionar con dioles ha sido muy empleada para la obtención de compuestos con capacidad de unión a carbohidratos⁵⁵. Recientemente, Jay y colaboradores describieron un polímero funcionalizado con benzoboroxoles⁵⁸ con actividad anti VIH-1. Este polímero de benzoboroxoles posee una elevada afinidad por los carbohidratos de gp120 y está siendo desarrollado como microbicida.

Por otro lado, cabe destacar el receptor polianiónico tipo jaula, diseñado y sintetizado por Davis y colaboradores (Figura 15). Este receptor sintético posee una cavidad central que es capaz de unir el disacárido celobiosa en agua con afinidad moderada, pero con elevada selectividad.

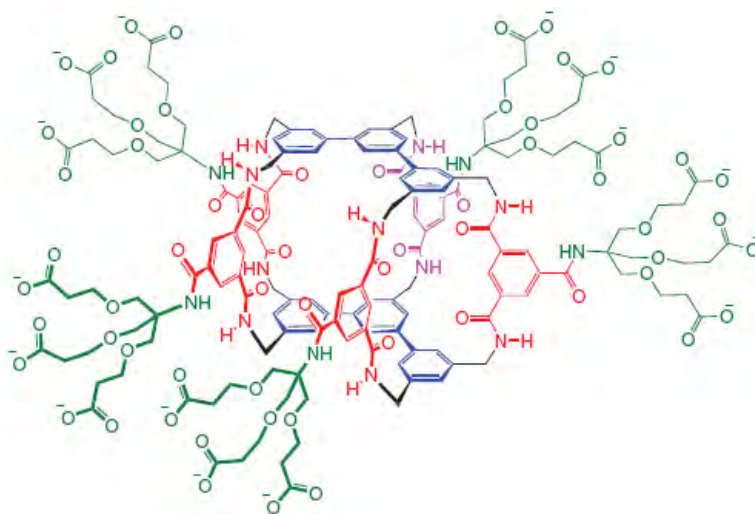


Figura 15. Receptor del disacárido celobiosa diseñado y sintetizado por Davis y colaboradores

El “techo” y “suelo” del receptor están constituidos por *m*-terfenilos (en azul) los cuales intervienen en las interacciones CH- π con los H axiales del carbohidrato. Los “pilares” de la estructura lo constituyen cinco unidades de isoftalimida (en rojo y morado), donde los enlaces de tipo amida establecen enlaces por puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo del disacárido. Por último, las unidades de tricarboxilato (en verde) confieren solubilidad en agua e impiden la agregación del receptor⁵⁹.

Los receptores tipo jaula son los que poseen mayores constantes de afinidad para la unión con mono- y disacáridos. No obstante, para el reconocimiento de carbohidratos más complejos como los

presentes en gp120 (Figura 16), a priori, serían necesarias estructuras abiertas que puedan interactuar de forma multivalente con una región extensa de los carbohidratos de la glicoproteína.

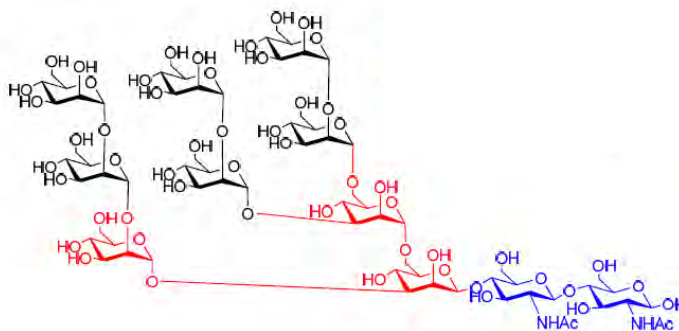


Figura 16. Estructura de un oligosacárido de gp120 rico en manosa. El fragmento pentasacárido básico está constituido por residuos de *N*-acetilglucosamina (azul) y manosa (rojo). Otros seis residuos de manosa (negro) se encuentran unidos al pentasacárido.

OBJETIVOS

Como se acaba de ilustrar en la introducción, la interacción con los carbohidratos de la glicoproteína gp120 presente en la cubierta del VIH constituye una aproximación muy atractiva para inhibir la replicación viral. Los resultados obtenidos con distintas lectinas en cultivo y con la generación de cepas virales resistentes indican que esta aproximación es conceptualmente diferente respecto a otras aproximaciones que han dado lugar a los agentes antivirales hoy disponibles⁴⁵. Entre los hechos diferenciales de esta aproximación cabe destacar los siguientes:

- La interacción con la diana objetivo, la gp120 viral, se produce en el medio extracelular.
- La interacción lectina-gp120 impide la transmisión de la infección así como la formación de células gigantes o sincitios. Igualmente las lectinas impiden la infección de células dendríticas convirtiéndose en potenciales agentes microbicidas
- No hay fenómenos de resistencia cruzada con otros antivirales ya en explotación, con lo que son excelentes candidatos para ser incluidos en terapias combinadas.
- La aparición de cepas resistentes sólo se produce cuando se acumulan varias mutaciones, por tanto tiene una barrera genética alta.
- Las cepas resistentes a las lectinas se caracterizan por la pérdida de distintos sitios de *N*-glicosilación de modo que en la cubierta viral quedan expuestos epítomos que antes estaban enmascarados por el denso entramado de carbohidratos. Conforme a ensayos precedentes realizados en monos, estas cepas pueden desencadenar un aumento en el nivel de anticuerpos y una caída considerable de la carga viral.
- Por tanto, y a diferencia de cualquier otro agente anti-VIH disponible, la generación de cepas resistentes frente a las lectinas, lejos de ser un problema, podría ayudar al organismo huésped a desencadenar una respuesta humoral más eficaz frente al VIH.

A pesar de estos rasgos tan atractivos, las lectinas no son buenos candidatos para su desarrollo como fármacos, como ya se ha comentado en la introducción.

Dadas las múltiples aplicaciones de las lectinas, el reconocimiento lectina-carbohidrato es un campo de gran interés. En la interacción carbohidrato-lectina se combinan enlaces de hidrógeno, interacciones de tipo CH- π , fuerzas de Van der Waals, etc... Estas interacciones, aunque de naturaleza débil, son muy numerosas, lo que permite aumentar significativamente la afinidad de la unión conforme a la teoría de la multivalencia, la cual postula un incremento significativo de la afinidad de unión con el aumento en el número de los elementos de reconocimiento.

El objetivo de esta tesis se centra en el diseño, síntesis y evaluación frente al VIH-1 de compuestos que incorporan los elementos de reconocimiento observados en las lectinas, con el fin de mimetizar las interacciones lectina-gp120 viral. En función del número de elementos de reconocimiento presentes, las estructuras sintetizadas se han agrupado en tres series (Figura 17).

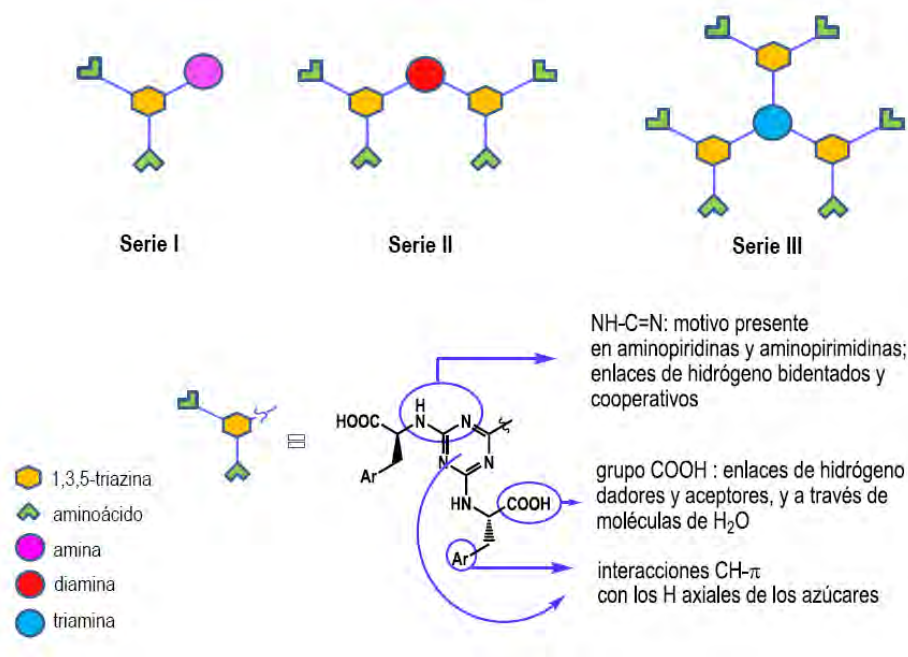


Figura 17. Representación esquemática de las series de triazinas sintetizadas

Las tres series tienen como motivo común la presencia del anillo de 1,3,5-triazina disustituido con residuos de aminoácidos a través de sus grupos amino. Así, a los compuestos de la Serie I les hemos denominado monómeros, ya que incorporan un único núcleo de triazina sustituido con dos residuos de aminoácidos; los compuestos de la Serie II son dímeros de anillos de triazina separados por un espaciador e incorporan 4 residuos de aminoácidos; y por último, la Serie III está formada por trímeros, compuestos con tres anillos de triazina conectados a un núcleo central y presentan 6 residuos de aminoácidos en la periferia.

Las estructuras propuestas son ricas en elementos de reconocimiento presentes en los sitios de unión de carbohidratos en lectinas; estos elementos de reconocimiento, muy empleados en la búsqueda de miméticos de lectinas, se describen a continuación:

- La presencia del agrupamiento NH-C=N en los anillos de 1,3,5-triazina-2,4,6-triamina podría favorecer la formación de puentes de hidrógeno cooperativos y/o bidentados de un modo similar a las aminopiridinas y aminopirimidinas ampliamente utilizadas en la bibliografía como miméticos de lectinas.

- El grupo carboxilato de los aminoácidos podría también participar en enlaces de hidrógeno además de facilitar la solubilidad de los compuestos en agua. Recordemos que se pretende la interacción con los carbohidratos presentes en la gp120 de la cubierta viral y que por tanto esa interacción se producirá en un medio eminentemente acuoso.

- Las interacciones CH- π cobran cada vez más importancia en las interacciones lectina-carbohidrato. Por ello, con el fin de favorecer este tipo de interacciones, se han elegido como sustituyentes de las triazinas preferentemente aminoácidos de naturaleza aromática: fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) y tirosina (Tyr).

- Dada la naturaleza quiral de los aminoácidos, las estructuras propuestas son ricas en centros quirales lo que les confiere un valor adicional en reconocimiento molecular.

- Al incrementar el número de elementos de reconocimiento pasando de monómeros a dímeros y de dímeros a trímeros, se pretende aumentar el número de interacciones posibles conforme a la teoría de la multivalencia.

Las tres series de productos han sido evaluados frente a la replicación del VIH en cultivo celular. Además, se han realizado medidas de la interacción de los compuestos sintetizados con la glicoproteína viral gp120 mediante experimentos de resonancia de plasmón superficial o SPR. Ambas evaluaciones serán comentadas en detalle al final de este capítulo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Breve introducción a la síntesis y aplicaciones de los derivados de 1,3,5-triazina

El anillo de 1,3,5-triazina ha sido ampliamente utilizado en química supramolecular dada su capacidad para participar en interacciones π , y en la formación de redes de enlaces de hidrógeno⁶⁰⁻⁶¹. Además, son muy numerosos los compuestos que presentan como núcleo central el anillo de 1,3,5-triazina y para los que se han descrito distintas propiedades farmacológicas. Como ejemplos ilustrativos publicados en los últimos cinco años, se pueden citar inhibidores de la fosfatidilinositol-3-quinasa **9**⁶² (Figura 18), compuestos con actividad antibacteriana como **10**⁶³ y **11**⁶⁴, o compuestos con dos núcleos de triazina como miméticos de la proteína A para el tratamiento de enfermedades autoinmunes **12**⁶⁵. La versatilidad sintética de las 1,3,5-triazinas les ha llevado también a ser utilizadas en química combinatoria⁶⁶ tanto en disolución⁶⁷ como en fase sólida⁶⁸⁻⁶⁹.

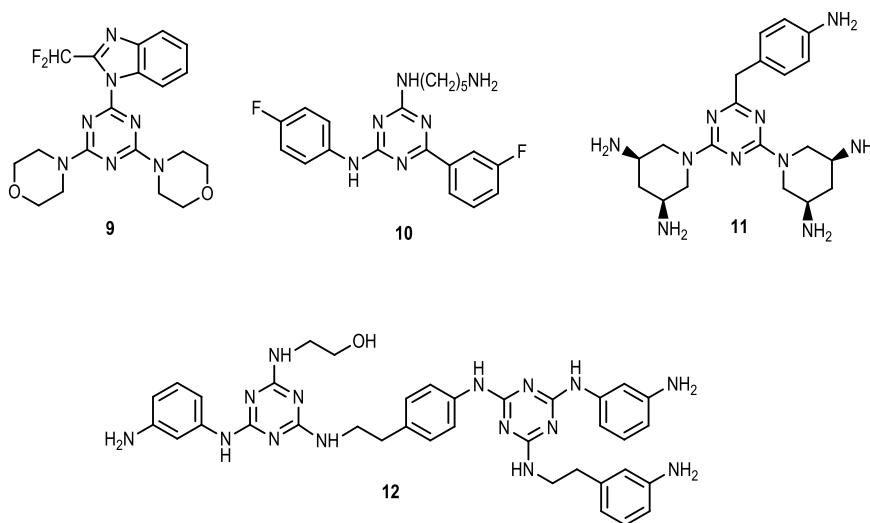


Figura 18. Ejemplos de derivados de 1,3,5-triazina con actividad biológica

A pesar de la amplia utilización de derivados de 1,3,5-triazina con distintos fines como se acaba de ilustrar, llama la atención los relativamente escasos precedentes bibliográficos de triazinas funcionalizadas con aminoácidos. Dentro de este apartado cabe mencionar un trabajo del grupo de J.M. Lehn⁷⁰ donde se estudia el reconocimiento molecular entre barbituratos y aminotriazinas que incorporaban triptófanos y α -metilbencilaminas en sus dos formas enantioméricas.

Por otra parte, con el fin de obtener nuevos ligandos biomiméticos como adsorbentes para la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad, Platis y colaboradores sintetizaron una librería de derivados de 1,3,5-triazina sustituidos con fenilalanina (Figura 19) donde R representa la cadena lateral

de distintos aminoácidos⁷¹. El mismo grupo describió en 2009 un ligando derivado de 1,3,5-triazina funcionalizada con β -Ala y Phe, el cual permite la purificación eficaz y con buenos rendimientos del anticuerpo monoclonal 4E10, uno de los que posee mayor capacidad neutralizante frente al VIH, tras ser expresado en tabaco transgénico⁷².

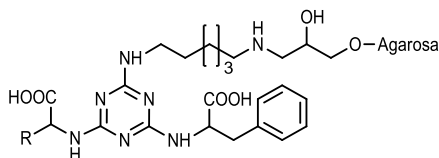


Figura 19. Estructura general de ligandos biomiméticos empleados para la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad

El amplio abanico de aplicaciones de las 1,3,5-triazinas se ve favorecido en gran medida por la síntesis sencilla y asequible de estructuras complejas a partir de cloruro cianúrico (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina), un sintón barato y muy versátil, pues cada átomo de cloro del cloruro cianúrico puede ser sustituido secuencialmente por diferentes nucleófilos controlando la temperatura (Figura 20).

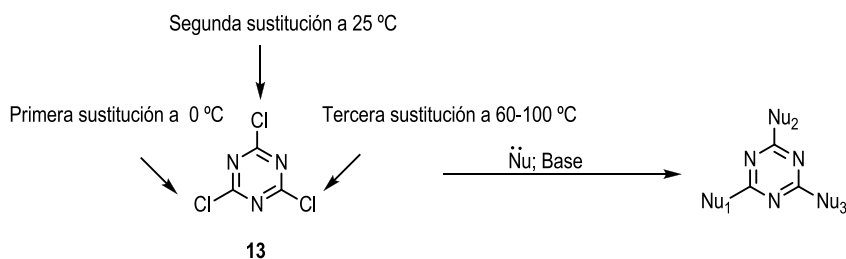


Figura 20. Temperaturas necesarias para las diferentes sustituciones nucleófilas en el anillo de triazina

La primera sustitución es exotérmica y se realiza a 0 °C; en estas condiciones no se observan productos de disustitución, pues el anillo de triazina queda desactivado por la introducción del primer nucleófilo. La incorporación del segundo nucleófilo, o la sustitución simultánea de dos átomos de cloro con el mismo nucleófilo, se realiza a temperatura ambiente. El anillo de triazina con dos sustituyentes se encuentra altamente desactivado, por lo que la tercera sustitución sólo tiene lugar con calor, aplicando temperaturas entre 60 y 100 °C, dependiendo de la reactividad del nucleófilo, y requiere además tiempos prolongados de reacción, entre 24 y 48 horas. Por ello, la síntesis asistida por microondas ha sido recientemente empleada para realizar la sustitución nucleófila del tercer cloro del anillo de triazina⁷³⁻⁷⁴.

Estrategia de síntesis de las estructuras propuestas

Tal y como se ha comentado en los objetivos, en este capítulo se pretende llevar a cabo la síntesis de tres series de compuestos representados esquemáticamente en la Figura 21. Estos compuestos los hemos agrupado en monómeros, dímeros y trímeros, según incorporen uno, dos o tres anillos de 1,3,5-triazina disustituido con aminoácidos de carácter aromático. Los aminoácidos aromáticos empleados han sido L-fenilalanina (Phe), L-triptófano (Trp) y L-tirosina (Tyr). Aunque los tres aminoácidos tienen una cadena lateral con un anillo aromático, sus índices hidropáticos⁷⁵, es decir, el balance entre las propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas de la cadena lateral, son bien distintos. Así, la fenilalanina posee un valor de índice hidropático positivo de 2.9, que indica su marcada hidrofobicidad, mientras que la presencia de un anillo indólico que contiene un grupo -NH hidrofílico en el caso de triptófano, y la inclusión de un grupo OH fenólico en el caso de tirosina, confiere a estos dos aminoácidos índices hidropáticos negativos, de -0.9 y -1.3 respectivamente. Este balance hidrofobia/hidrofilia, junto con los grupos funcionales presentes en cada aminoácido, puede repercutir en la capacidad de reconocimiento de los compuestos frente a los sacáridos de la envoltura viral.

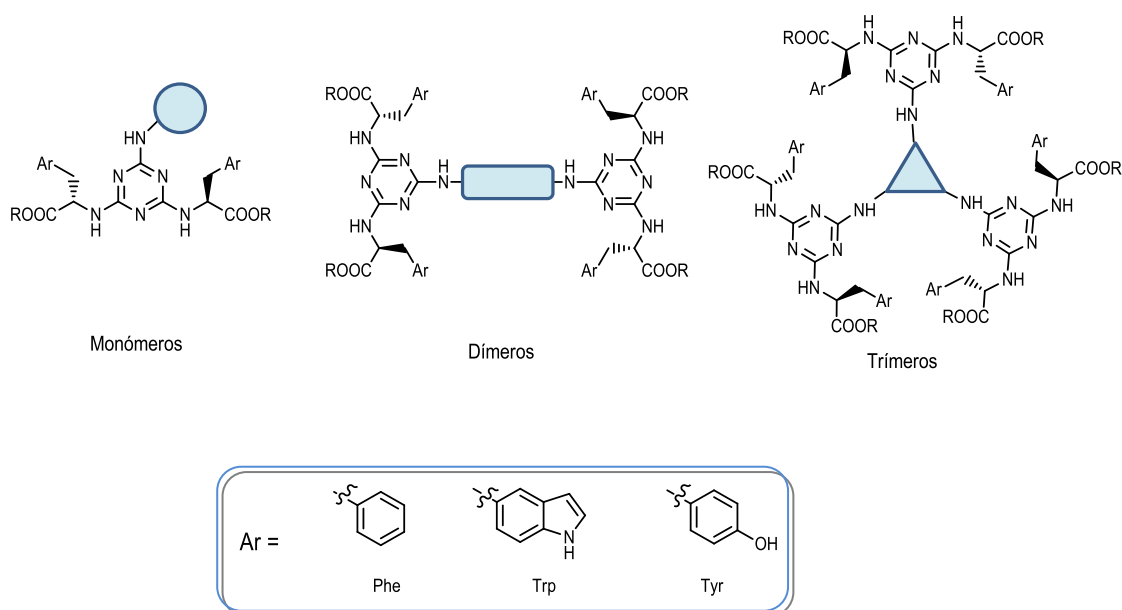


Figura 21. Arquitecturas obtenidas en función del número de anillos de triazina

Para la obtención de dímeros y trímeros, es posible emplear una estrategia divergente o convergente, como se representa esquemáticamente en la Figura 22 para la síntesis de trímeros.

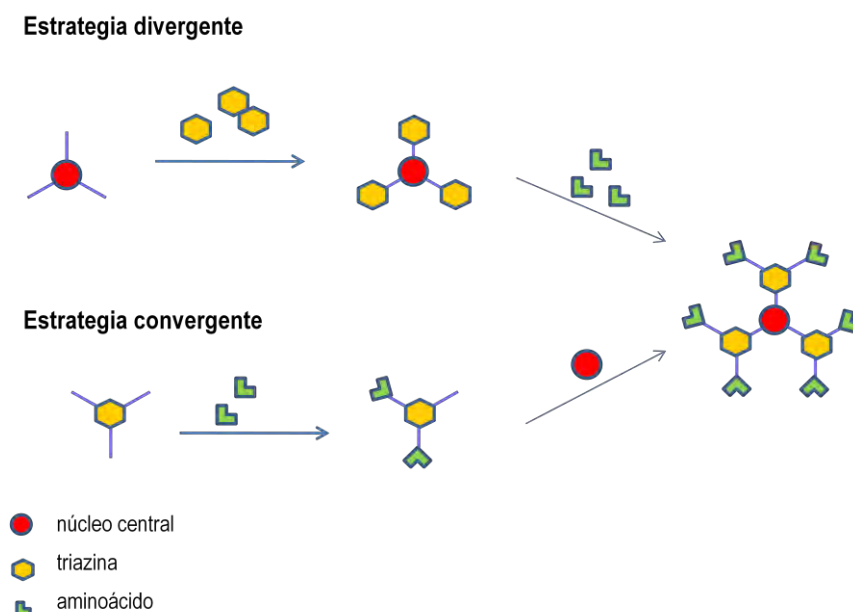


Figura 22. Estrategia convergente y divergente para la obtención de trímeros

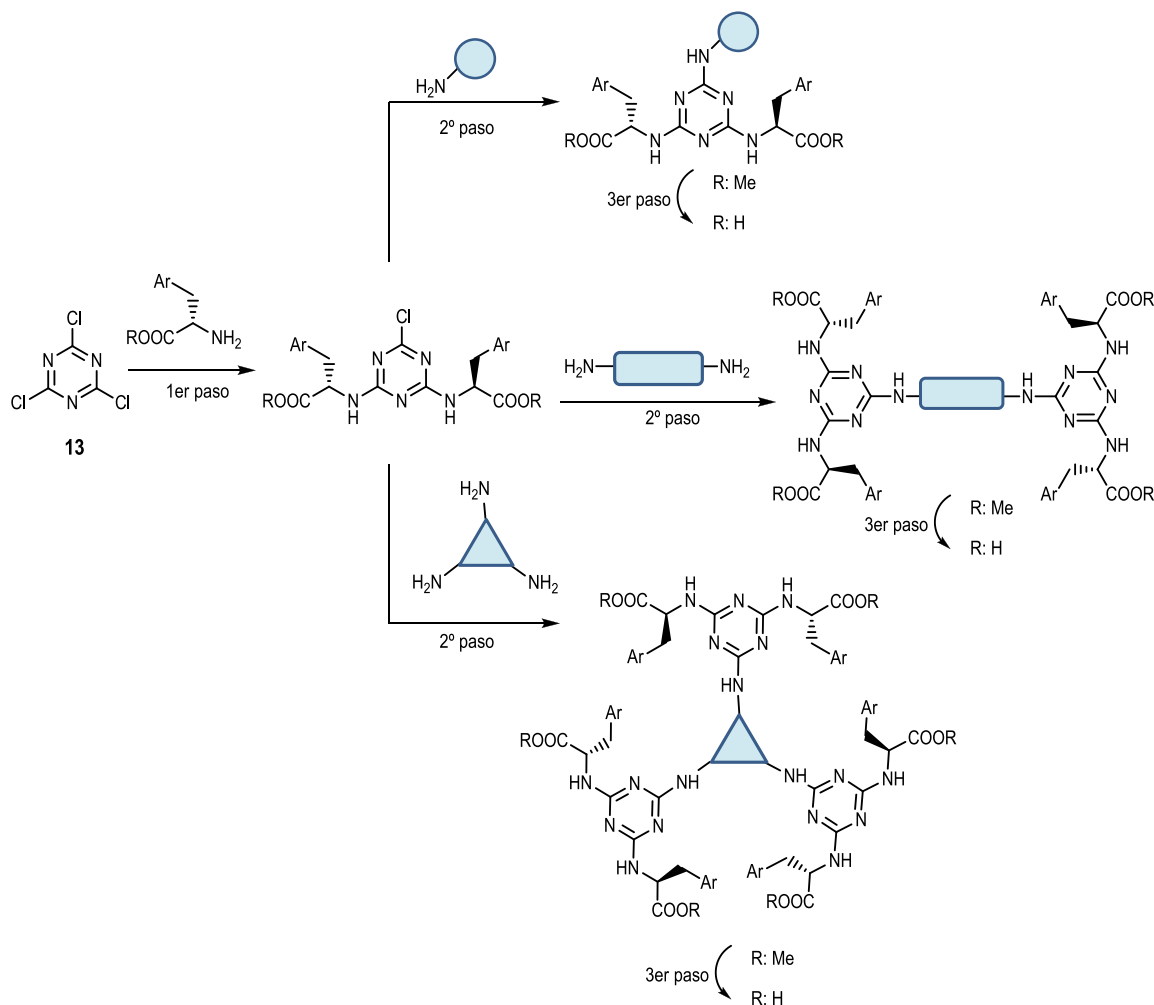
En la estrategia divergente empleada por algunos autores⁷⁶⁻⁷⁷, se hace reaccionar en primer lugar el núcleo central con la 1,3,5-triazina y posteriormente se incorporan los sustituyentes de la periferia. Siguiendo esta estrategia a menudo se observan dificultades para llevar a cabo la tercera sustitución sobre el anillo de triazina y se obtienen mezclas de productos parcialmente sustituidos. Por el contrario, en la estrategia convergente, que es la que hemos empleado nosotros y también utilizada por otros autores⁷⁸, primero se funcionaliza la triazina con los grupos periféricos y posteriormente se hace reaccionar con el núcleo central.

Así, la ruta de síntesis elegida es prácticamente común para las distintas series y consta de tres pasos (Esquema 1):

1º incorporación de dos restos de aminoácidos a través de sus grupos amino sobre la 1,3,5-triazina;

2º sustitución del tercer cloro de la triazina por una amina, diamina o triamina, según se trate de monómeros, dímeros o trímeros;

3º saponificación de los grupos ésteres metílicos de los aminoácidos para la obtención de los correspondientes ácidos.



Esquema 1. Metodología seguida para la obtención de las estructuras propuestas

Las aminas introducidas en los monómeros están estructuralmente relacionadas con las diaminas empleadas en los dímeros con el fin de facilitar la comparación de los datos biológicos tras su evaluación. Las aminas elegidas para la síntesis de dímeros y trímeros conducirán a distintas arquitecturas en los compuestos finales y con ello la posibilidad de abarcar distintos espacios conformacionales. Las diaminas elegidas para la síntesis de dímeros han sido piperazina, 1,3-xilidendiamina y 2,2'-(etilenodioxi)dietilamina. Las aminas utilizadas en los trímeros han sido la tris(2-aminoetil)amina y 1,3,5-triaminometil-2,4,6-trietilbenceno.

Como se ha comentado anteriormente, es posible controlar el grado de sustitución del cloruro cianúrico y las clorotriazinas resultantes en función de la temperatura. Así, la primera y segunda sustitución del cloruro cianúrico con los grupos amino de los aminoácidos (1er paso en el Esquema 1) se pueden realizar a temperatura ambiente. Para la tercera sustitución (2º paso), donde se incorporan aminas, diaminas o triaminas, es necesario aplicar calor. Este paso se puede realizar con calentamiento tradicional y tiempos prolongados de reacción o en tiempos más cortos si se aplica síntesis asistida por microondas. Durante el transcurso de esta tesis, nuestro grupo de investigación adquirió un equipo

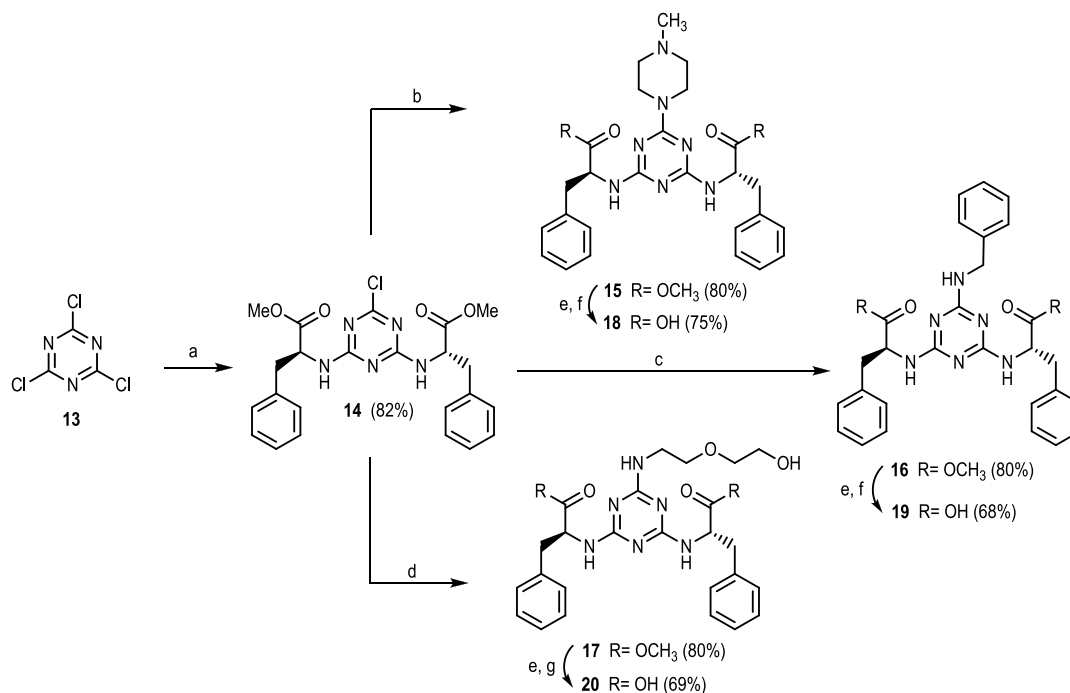
microondas por lo que, a lo largo de esta memoria, se describen reacciones tanto con calentamiento tradicional realizadas antes de la adquisición del equipo, como con calentamiento asistido por microondas. La principal ventaja de este último procedimiento es acortar muy notablemente los tiempos de reacción, que pasan de 24 ó 48 horas, a 1 ó 2 horas, respectivamente. Sin embargo, los rendimientos obtenidos fueron en general similares a los obtenidos por calentamiento tradicional.

Síntesis de los derivados de 1,3,5-triazina de las Series I y II

A continuación se pasa a describir la síntesis de los monómeros y los dímeros, los cuales han sido clasificados en función del aminoácido empleado como nucleófilo.

Derivados de fenilalanina

En primer lugar se sintetizaron los monómeros portadores de dos unidades de fenilalanina en los que se ha introducido en la tercera posición las siguientes aminas: *N*-metilpiperazina, bencilamina y 2-(2-aminoetoxi)etanol, cuya síntesis se recoge en el Esquema 2.



Esquema 2. Condiciones de reacción: a) H-Phe(OMe)·HCl, THF, DIPEA, 25 °C, 24 h; b) *N*-metilpiperazina, 1,4-dioxano, DIPEA, 70 °C, 24 h; c) bencilamina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 2 h; d) 2-(2-aminoetoxi)etanol, 1,4-dioxano, DIPEA, 100 °C, 24 h; e) LiOH·H₂O, THF:H₂O (1:1), 10 h; f) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Amberlite IRA400 (forma HCOO⁻); g) neutralización con HCl.

La reacción del cloruro cianúrico con 2 equivalentes de H-Phe-OMe-HCl en presencia de DIPEA a 25 °C, condujo a un único producto de masa m/z=470 con distribución isotópica de un átomo de cloro, que se identificó como el producto disustituido **14** (82% de rendimiento). Cabe indicar que la

espectrometría de masas, junto con el análisis cromatográfico (TLC o HPLC) constituye la mejor herramienta para el seguimiento de las reacciones de mono- y disustitución del anillo de triazina. La introducción de las diferentes aminas en la tercera posición del anillo de triazina se realizó a temperaturas comprendidas entre 70 ° y 100 °C en función de la reactividad de la amina. Así, el compuesto **15** se obtuvo por reacción del derivado **14** con *N*-metilpiperazina a 70 °C durante 24 h, empleando DIPEA como base y 1,4-dioxano como disolvente, con un rendimiento del 80%. De forma análoga, la reacción del derivado **14** con bencilamina y 2-(2-aminoetoxi)etanol a 100 °C, condujo respectivamente a las monotriazinas **16** y **17** con rendimientos del 65% y 69%, respectivamente.

A continuación, los grupos éster metílico de las monotriazinas **15**, **16** y **17** fueron desprotegidos mediante tratamiento básico con LiOH-H₂O durante 10 horas. Posteriormente se adicionó al medio de reacción ácido fórmico hasta pH 2. Puesto que los ácidos constituían nuestros compuestos objetivo, era necesario disponer de un método versátil que permitiera el correcto aislamiento de dichos compuestos y que fuese aplicable a los dímeros y trímeros propuestos. En este sentido, Bookser y Zhu⁷⁹ habían realizado un estudio exhaustivo empleando distintas resinas de intercambio aniónico en forma formiato y una amplia variedad de disolventes para la captura y/o aislamiento de ácidos carboxílicos aromáticos y alifáticos. El procedimiento empleado se representa esquemáticamente en la Figura 23.

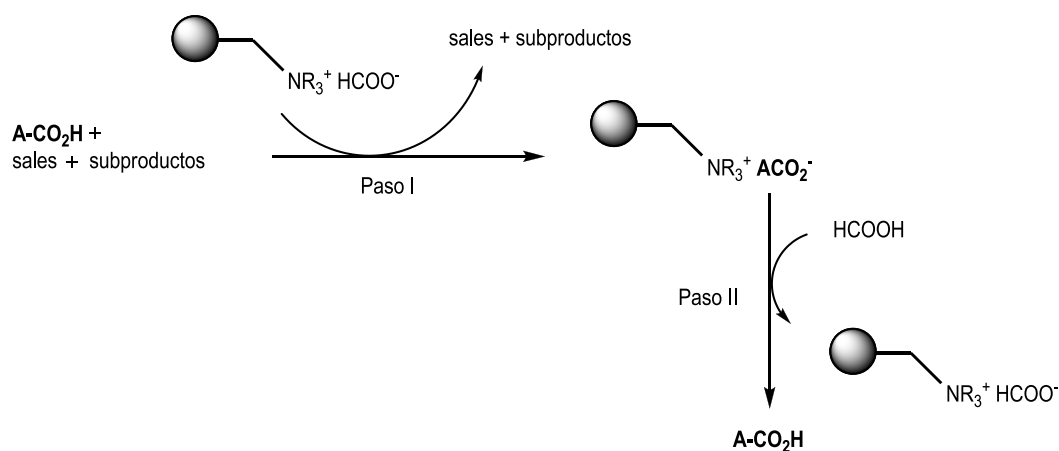
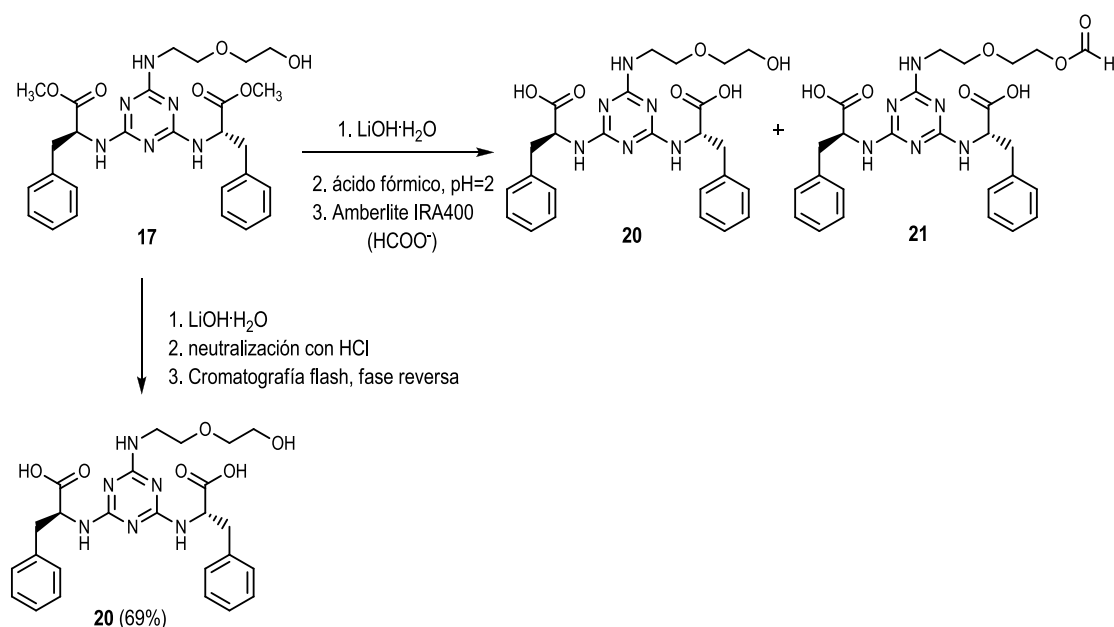


Figura 23. Representación esquemática de los pasos seguidos en la purificación de ácidos carboxílicos empleando Amberlite IRA400 (forma HCOO⁻)

Así, al aplicar la mezcla de reacción que contiene el ácido deseado junto con sales y otros subproductos a la resina Amberlite IRA400 en forma HCOO⁻, se consigue que sólo el ácido quede anclado a la resina como se observa en el paso I. El lavado de la resina permite arrastrar sales y otros subproductos generados en la reacción. En el paso II se procede al desanclaje del ácido mediante tratamiento con ácido fórmico. Aplicando esta secuencia al bruto de reacción obtenido tras la saponificación de los ésteres **15**, **16** y **17**, se pudieron aislar los productos **18** y **19** (Esquema 2) como diácidos con rendimientos del 75% y 68% respectivamente. Sus estructuras y grado de pureza fueron

confirmadas mediante técnicas analíticas y espectroscópicas, incluyendo espectrometría de masas, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, y en base a experimentos de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMBC). No obstante, al aplicar este procedimiento al diácido **20**, se observó que el cromatograma de HPLC-MS del producto aislado tras el desanclaje de la resina mostraba dos picos en una relación de área 1:1, con masas de $m/z=511$ correspondiente al diácido esperado **20**, y $m/z=539$. Estas masas diferían en 28 umas, lo que podría corresponder a un resto formiato. Por otro lado, en el espectro de ^1H -RMN (DMSO- d_6) de la mezcla aparecía una señal a $\delta=8.09$ ppm que podría corresponder al protón del grupo OCHO del derivado en forma de éster formiato. Asimismo, el espectro de ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) mostró una señal a $\delta=162.9$ ppm, que fue asignada al carbono del grupo OCHO. Estos datos parecían indicar que el producto de desanclaje de la resina correspondía a una mezcla 1:1 del producto esperado **20** y de su derivado en forma de éster formiato **21** (Esquema 3).

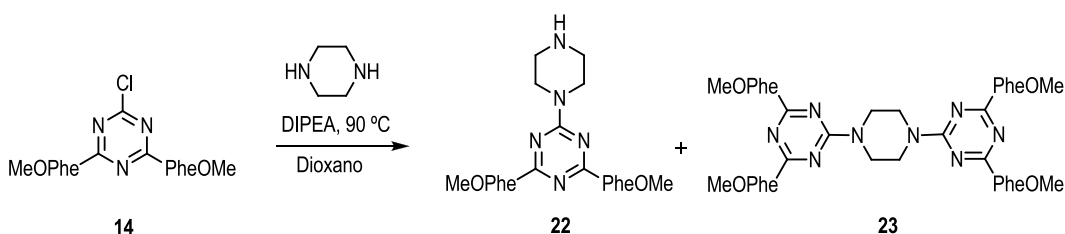


Esquema 3. Desprotección del compuesto **17** en medio básico y aislamiento del diácido **20**

Así concluimos que en las condiciones empleadas para la neutralización y purificación del derivado **20**, tiene lugar la formación de un éster formiato sobre el hidroxilo. Existe al menos un precedente de una reacción similar. En concreto, cuando se emplean alcoholes de tipo glicol para la síntesis de triazinas en fase sólida y se realiza el desanclaje del producto de la resina con ácido trifluoroacético, se observa la formación del éster de trifluoroacetato sobre el hidroxilo⁶⁸.

Para evitar la formación del éster formiato, se modificó el procesado tras la saponificación del compuesto **17** con $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$. Para ello, se neutralizó la reacción con HCl y se aisló el diácido **20** mediante purificación en cromatografía flash en fase reversa. Así se obtuvo **20** con un 69% de rendimiento.

A continuación se pasará a describir la síntesis de dímeros de triazinas funcionalizadas con restos de fenilalanina. Como se ha comentado, para la síntesis de dímeros se eligió una estrategia convergente. En una estrategia convergente es muy importante controlar el número de equivalentes del núcleo central, una diamina simétrica en el caso de los dímeros, pues un exceso de ésta puede conducir a la obtención de mezclas del dímero y de la monotriazina, con la consiguiente disminución en el rendimiento del dímero. Con el fin de determinar el número de equivalentes óptimo de diamina para la obtención del dímero, se hizo reaccionar el derivado disustituido **14** (Esquema 4) con diferentes cantidades de piperazina y las proporciones de producto de partida, monotriazina y dímero fueron cuantificadas por HPLC-MS a diferentes tiempos de reacción. Esta reacción se realizó en tubo de presión mediante calentamiento tradicional a 90 °C. Los porcentajes del producto de partida **14**, de la monotriazina **22** y del dímero **23**, obtenidos a las 24 y 48 horas para los diferentes equivalentes de piperazina, se recogen en la Tabla 1.



Esquema 4. Síntesis del dímero de triazina disustituida con fenilalanina y piperazina como espaciador

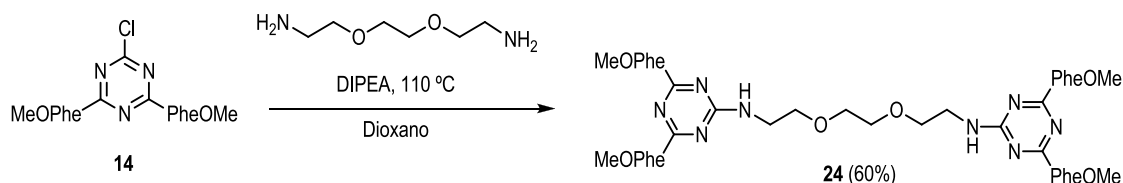
Tabla 1. Seguimiento de la reacción de la monoclorotriazina **14** con piperazina en función del tiempo de reacción y número de equivalentes de diamina

eq piperazina	0.3 eq		0.6 eq		0.8 eq		1.0 eq	
tiempo de reacción	24 h	48 h	24 h	48 h	24h	48 h	24 h	48 h
14 : 22 : 23^a	59:0:41	53:0:47	17:4:79	9:1:90	4:12:84	2:13:85	0:14:86	0:12:88

^a: Porcentajes obtenidos de la integración de los picos en el cromatograma de HPLC

Como se puede observar, empleando 0.3 equivalentes de piperazina, el porcentaje de producto de partida es superior al 50% tras 48 horas de reacción, siendo el porcentaje restante dímero (**23**), sin que se detecte la monotriazina (**22**). Al aumentar la cantidad de piperazina hasta 0.6 equivalentes, la proporción de dímero se incrementa hasta casi el 80% a las 24 horas y al 90% a las 48 horas. El empleo de cantidades superiores de piperazina (0.8 eq ó 1.0 eq) conduce a rendimientos algo inferiores del dímero y a un aumento de la proporción de la monotriazina **22**. Teniendo en cuenta estos resultados, la síntesis del dímero **23** se llevó a cabo por reacción de **14** con 0.6 eq de piperazina en dioxano y en presencia de DIPEA calentando a 90 °C durante 48h, y el rendimiento del producto aislado fue del 85%.

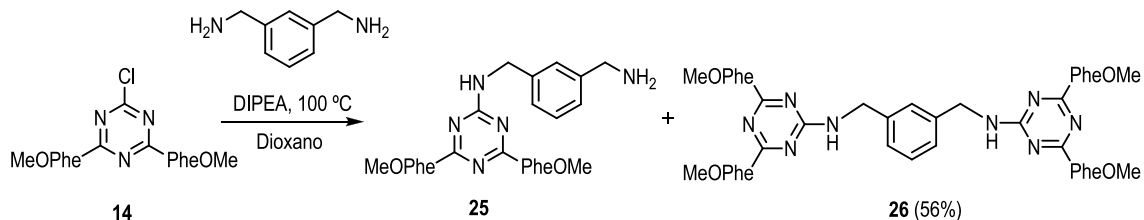
De forma análoga, el dímero **24** se obtuvo por reacción del derivado **14** con 0.6 equivalentes de 2,2'-(etilenodioxo)diethylamina, en presencia de DIPEA y a 110 °C durante 48 horas en tubo de presión, obteniéndose con un rendimiento del 60% (Esquema 5).



Esquema 5. Síntesis del dímero de triazina disustituida con fenilalanina y 2,2'-(etilenodioxo)diethylamina como espaciador

Cabe señalar que estos resultados concuerdan con las condiciones experimentales empleadas en la síntesis de dímeros recientemente descritos en la bibliografía⁸⁰ donde el empleo de 0.5 eq de piperazina conduce a rendimientos entre el 50% y 70% tras 24 horas de reacción.

De un modo similar, la reacción del derivado **14** con 0.6 equivalentes de *m*-xililendiamina, en presencia de DIPEA y a 100 °C durante 48 horas en tubo de presión, condujo al dímero **26**, pero con un rendimiento del 56% (Esquema 6).



Esquema 6. Síntesis del dímero de triazina disustituida con fenilalanina y 1,3-xilidendiamina como espaciador

Este bajo rendimiento en comparación al obtenido empleando piperazina como espaciador (Esquema 4), se puede atribuir al empleo de una amina de naturaleza bencílica, menos reactiva en las reacciones de sustitución nucleófila. No obstante, cuando se adquirió el equipo microondas, se repitió esta reacción con el objetivo de estudiar si el rendimiento aumentaba al emplear calentamiento por microondas. Así, se hizo reaccionar en un vial de microondas la clorotriazina **14** con un número variable de equivalentes de *m*-xililendiamina en dioxano en presencia de DIPEA a 100 °C y se evaluaron los porcentajes de producto de partida **14**, de la monotriazina **25** y del dímero **26** tras 1 y 2 horas de irradiación, ya que tiempos mayores no se traducían en modificaciones significativas de los porcentajes. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Seguimiento de la reacción de la monoclorotriazina **14** con 1,3-xililendiamina en función del tiempo de reacción y número de equivalentes de diamina

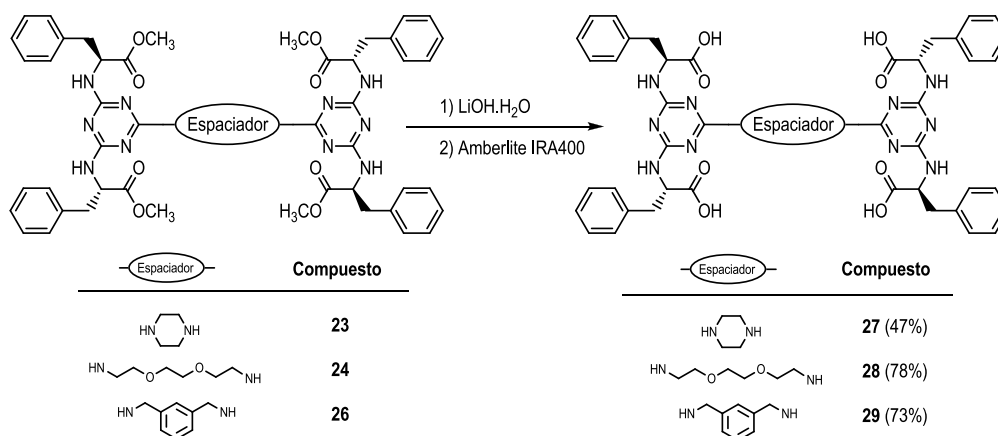
eq xililendiamina	0.3 eq		0.6 eq		0.8 eq		1.0 eq	
tiempo de reacción	1 h	2 h	1 h	2 h	1 h	2 h	1 h	2 h
14 : 25 : 26^a	62:8:30	63:4:33	34:18:48	33:7:60	19:30:51	15:25:60	13:39:48	7:35:58

^a Porcentajes obtenidos de la integración de los picos en el cromatograma de HPLC

Los resultados recogidos en la Tabla 2 indican que tras 2 horas de reacción, y con 0.3 eq de *m*-xililendiamina, la proporción de dímero **26** es del 33%. Al pasar a 0.6 eq de *m*-xililendiamina, el rendimiento de dímero aumenta pero sólo hasta un 60%, porcentaje muy similar al obtenido cuando se empleó calentamiento tradicional en la síntesis de este dímero (56%). Cuando se emplea mayor número de equivalentes de *m*-xililendiamina (0.8 y 1.0), el rendimiento del dímero se mantiene prácticamente constante, aumentando la proporción de monotriazina **25**. Por ello, se optó por el empleo de 0.6 equivalentes de diamina, ya que permitía recuperar una mayor cantidad de producto de partida en la purificación. Así, aunque se obtuvieron rendimientos similares a los obtenidos mediante calentamiento tradicional, el empleo de calentamiento por microondas permitió acortar sensiblemente los tiempos de reacción, obteniéndose el dímero en 2 horas, frente a las 48 horas necesarias por calentamiento tradicional.

Conviene comentar que el empleo de otras combinaciones disolvente/base como CHCl₃ /K₂CO₃ no condujo a mejores rendimientos.

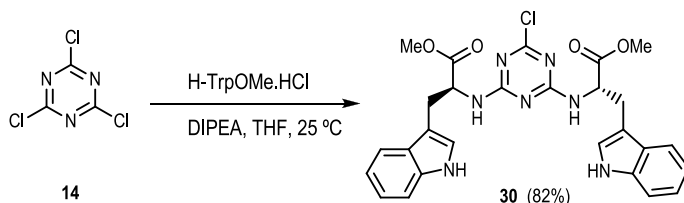
Los dímeros protegidos **23**, **24** y **26** fueron tratados con LiOH·H₂O para la saponificación de los grupos éster metílico. Tras la adición al medio de reacción de ácido fórmico hasta pH 2, posterior aislamiento mediante tratamiento con resina Amberlite IRA-400 (forma HCOO⁻) y elución con H₂CO₂:H₂O (9:1), se obtuvieron los dímeros desprotegidos **27**, **28** y **29** con rendimientos del 47%, 73% y 78% respectivamente (Esquema 7).



Esquema 7. Desprotección de los dímeros de fenilalanina

Derivados de triptófano

Para la síntesis de monómeros y dímeros de triazinas sustituidas con triptófano, el primer paso consistió en la obtención de la clorotriazina **30** (Esquema 8).



Esquema 8. Obtención de la monoclorotriazina **30**

Ésta se obtuvo mediante reacción del cloruro cianúrico con H-TrpOMe-HCl en presencia de DIPEA, empleando THF como disolvente y a temperatura ambiente. El producto aislado presentaba por espectrometría de masas la relación $m/z=548$ con distribución isotópica de un cloro y fue obtenido con un 82% de rendimiento. El espectro de $^1\text{H-RMN}$ de la clorotriazina **30** a 20 °C indicaba la presencia de agrupaciones de señales de alta intensidad junto a otras de menor intensidad que debían corresponder a un único protón. Dentro de cada agrupación, todas las señales tenían la misma multiplicidad, lo que sugería la existencia de distintos conformeros (Figura 24).

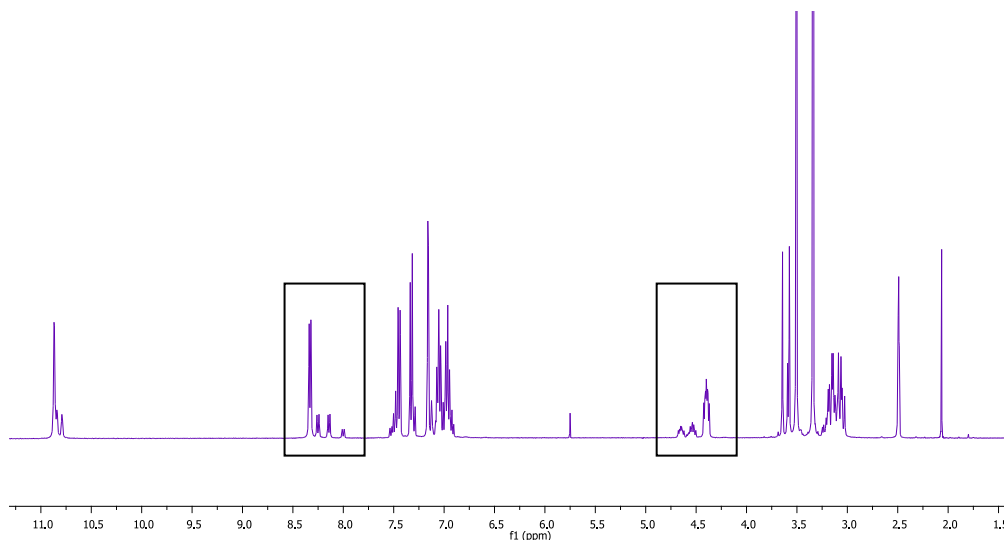


Figura 24. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6) a 20 °C de la clorotriazina **30**

Es bien conocido que en aminotriazinas el enlace $\text{C}_{\text{Trz}}\text{-NH}$ presenta rotación restringida, lo que da lugar a la existencia de distintos rotámeros⁸⁰⁻⁸². Así, para la monoclorotriazina **30** pueden postularse los rotámeros representados en la Figura 25, que conforme a la nomenclatura más habitual se podrían denominar *anti-anti*, *anti-syn* y *syn-syn*⁸².

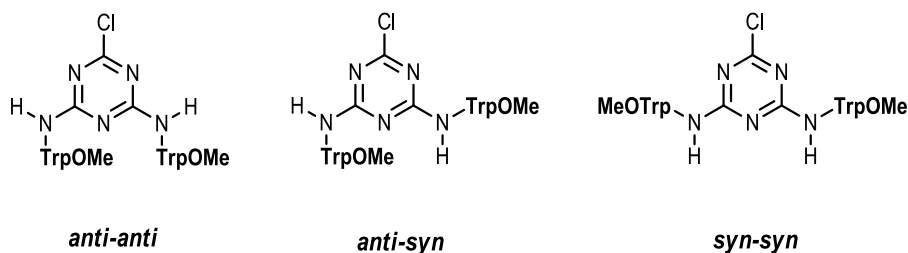


Figura 25. Posibles rotámeros de la clorotriazina **30**

Las poblaciones relativas de los rotámeros dependen en gran medida de la naturaleza de los sustituyentes sobre el anillo de triazina⁸⁰, del disolvente empleado⁸² y de la temperatura. Con el objeto de corroborar que la complejidad del espectro de ¹H-RMN de **30** era debida a la existencia de distintos rotámeros, se registraron espectros de ¹H-RMN de la monoclorotriazina **30** a diferentes temperaturas, en DMSO-d₆ (Figura 26).

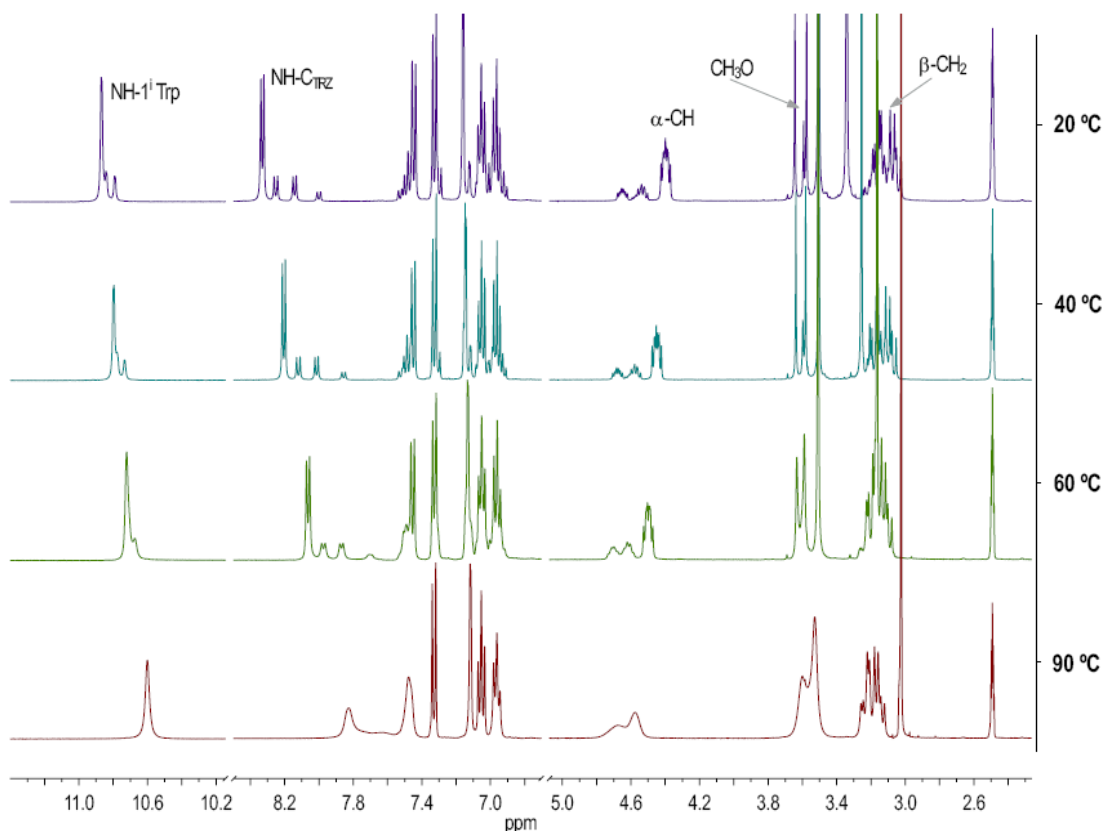


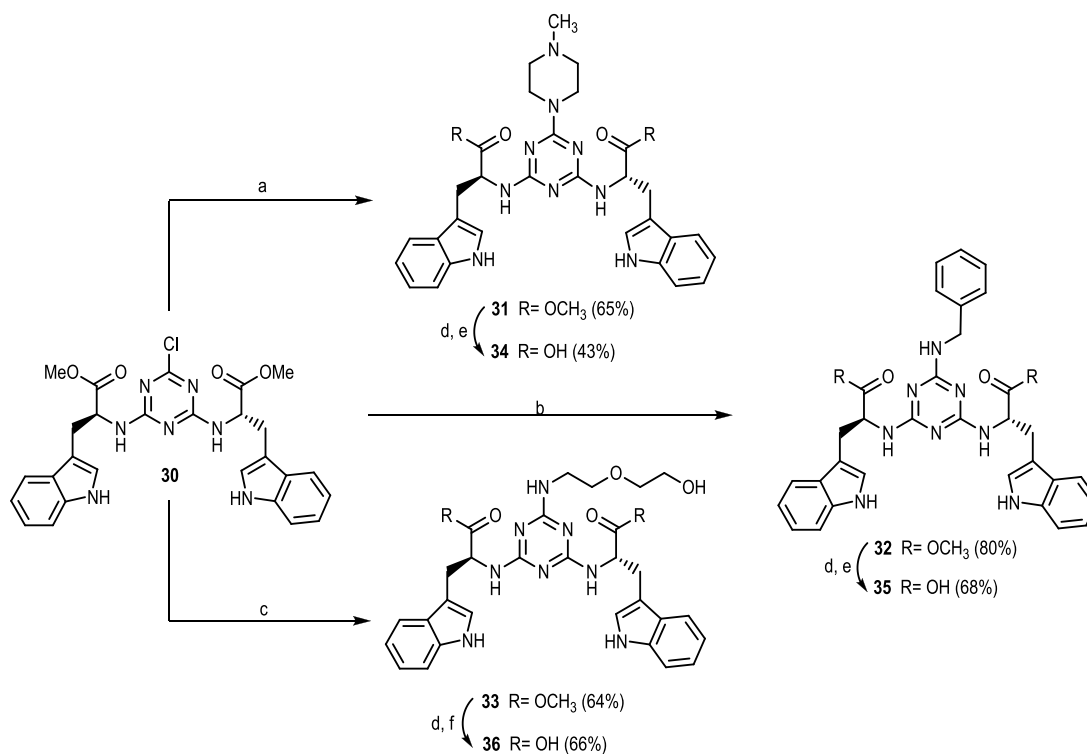
Figura 26. Espectros de ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) de la clorotriazina **30** a diferentes temperaturas

En el espectro a 20 °C (espectro superior en la Figura 26), se observa que la señal correspondiente al protón del grupo amino unido a la triazina (NH-C_{TRZ}) está compuesta por cuatro dobletes de diferente intensidad. El doblete de mayor intensidad podría ser atribuido al rotámero *syn-syn*, menos impedido estéricamente y que suele estar favorecido en disolventes polares. Por otro lado, éste es

el doblete más desapantallado, lo que concuerda con el desplazamiento observado para el NH-C_{Trz} de otros rotámeros *syn-syn* en compuestos similares de serinol descritos en la bibliografía⁸⁰. Dentro de este mismo grupo de señales, se observan dos dobletes de igual intensidad, atribuibles al rotámero *anti-syn*, el cual posee dos protones no equivalentes. Por último, se observa un doblete de muy pequeña intensidad que podría deberse al rotámero *anti-anti*, muy impedido estéricamente. Esta relación de rotámeros también se observa para otros protones como el α-CHTrp. Cuando se registraron los espectros a temperaturas más elevadas, se observa que las señales se van ensanchando y coalesciendo. Ésto es especialmente notable en el espectro registrado a 90 °C lo que podría ser indicativo de la rápida interconversión entre rotámeros a esta temperatura.

Este fenómeno lo hemos comentado aquí para el derivado **30**, pero ha sido observado en mayor o menor medida en los espectros de ¹H-RMN de la casi totalidad de compuestos sintetizados, siendo estas agrupaciones especialmente complejas en las estructuras con mayor número de sustituyentes como dímeros y trímeros.

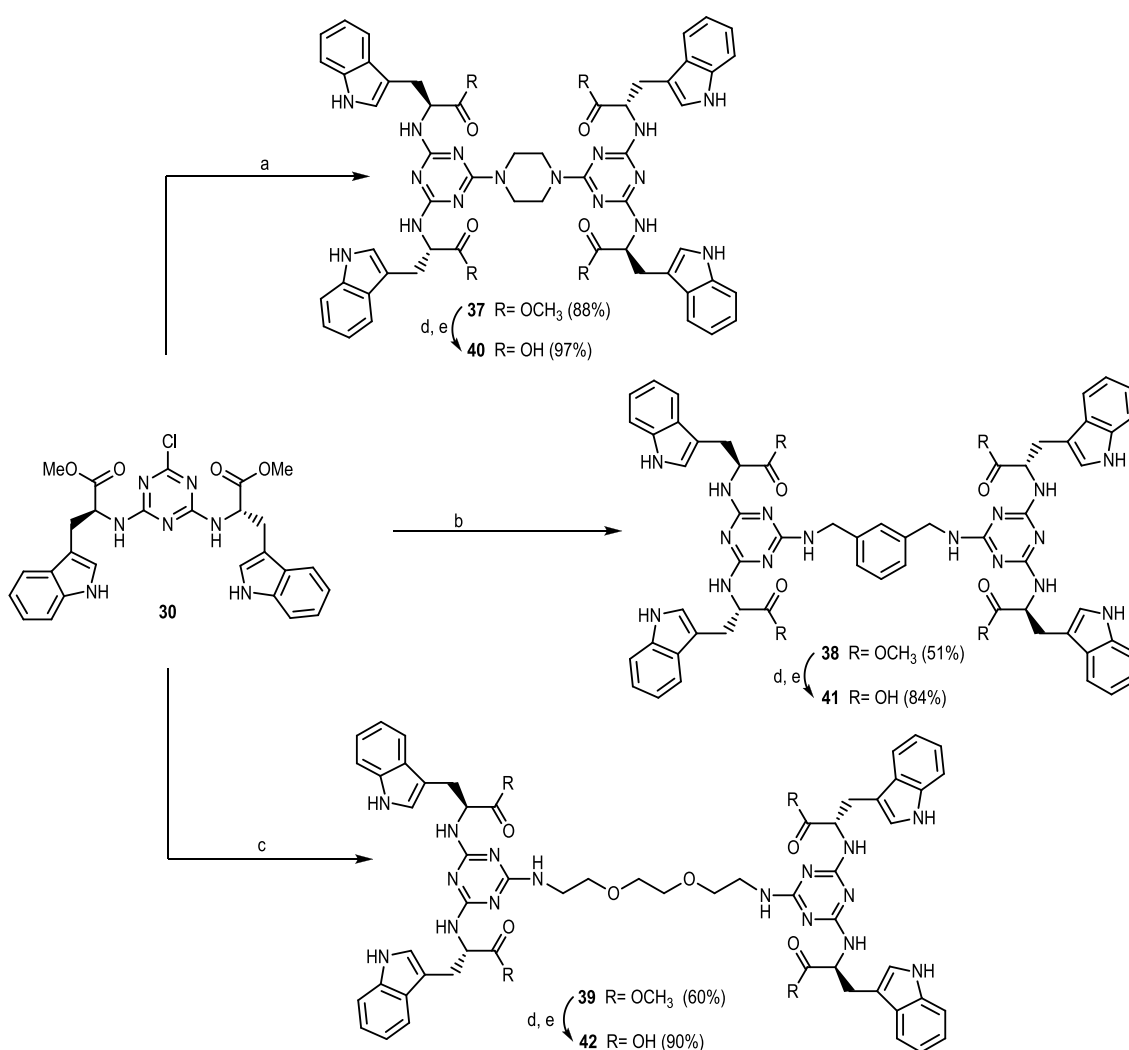
La monoclorotriazina **30** se hizo reaccionar con *N*-metilpiperazina en presencia de DIPEA, en 1,4-dioxano y a 70 °C durante 24 horas, obteniéndose el derivado **31** con un rendimiento del 65%. De forma análoga, la reacción del derivado **30** con bencilamina y 2-(2-aminoetoxi)etanol a 100 °C, condujo respectivamente a las monotriazinas **32** y **33** con rendimientos respectivos del 80% y 64% (Esquema 9).



Esquema 9. Condiciones de reacción: a) *N*-metilpiperazina, 1,4-dioxano, DIPEA, 70 °C, 24 h; b) bencilamina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 2 h; c) 2-(2-aminoetoxi)etanol, 1,4-dioxano, DIPEA, 100 °C, 24 h; d) LiOH·H₂O, THF:H₂O (1:1), 10 h; e) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Amberlite IRA400 (forma HCOO⁻); f) neutralización con HCl.

Para la obtención de los diácidos **34**, **35** y **36** se realizó la desprotección de los grupos éster metílico de sus correspondientes derivados protegidos, mediante tratamiento básico con LiOH·H₂O, durante 10 horas. Los diácidos **34** y **35** fueron aislados tras neutralización del medio de reacción con ácido fórmico, tratamiento con resina Amberlite IRA-400 (HCOO⁻) y elución con H₂CO₂:H₂O (9:1). Puesto que el tratamiento del derivado **33** con ácido fórmico podía conducir a la incorporación parcial de un resto formilo, como se había observado para el derivado análogo de fenilalanina tras su saponificación con LiOH·H₂O, el medio de reacción se neutralizó con HCl 1M y el diácido **36** se aisló por cromatografía flash en fase reversa, con un 66% de rendimiento.

En el siguiente Esquema se recoge la síntesis de los dímeros derivados de triptófano **37**, **38** y **39** así como la obtención de sus correspondientes productos desprotegidos **40**, **41** y **42**.

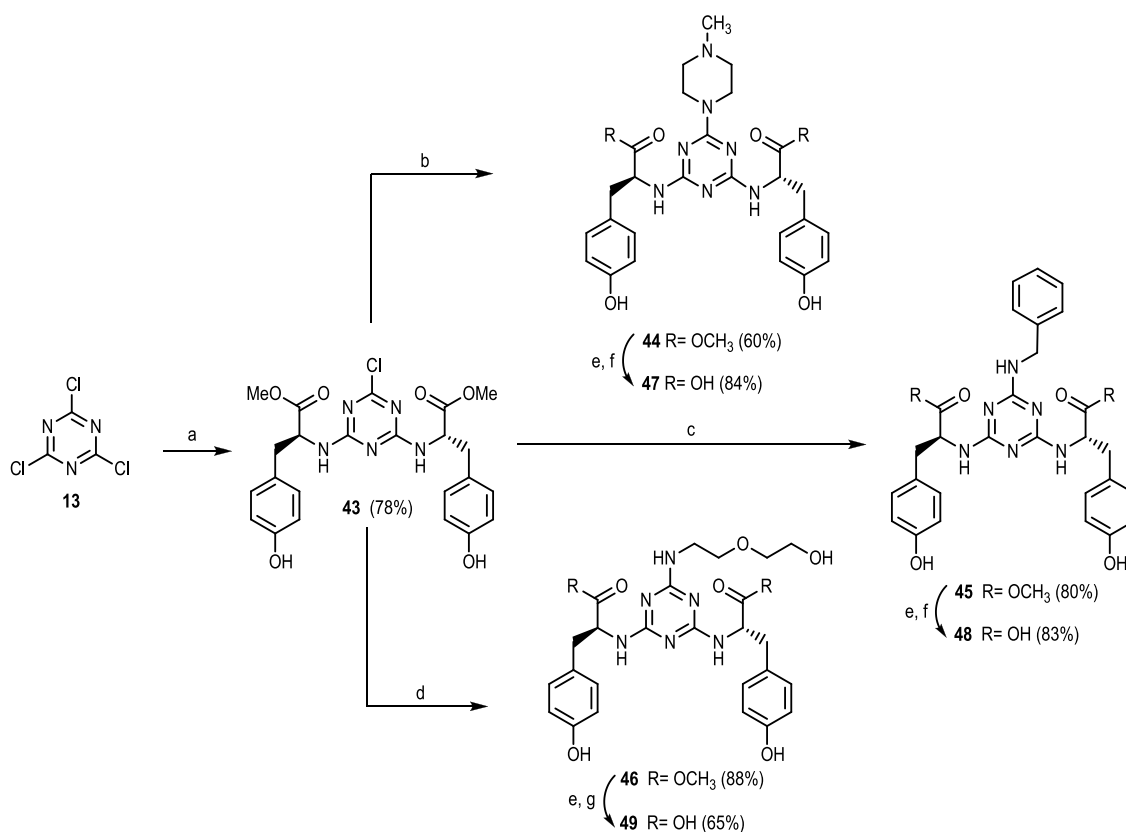


Esquema 10. Condiciones de reacción: a) piperazina, 1,4-dioxano, DIPEA, 90 °C, 48 h; b) 2,2'-(etilendioxo)diethylamina, 1,4-dioxano, DIPEA, 100 °C, 48 h; c) 1,3-xililendiamina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 2 h; d) LiOH·H₂O, THF:H₂O (1:1), 10 h; e) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Amberlite IRA400 (forma HCOO⁻).

Para la obtención de los dímeros anteriormente citados, se partió de la clorotriazina **30**. Así, la reacción de **30** con 0.6 equivalentes de piperazina, en presencia de DIPEA como base a 90 °C durante 48 horas condujo al dímero **37** con un 88% de rendimiento. El dímero **38** se obtuvo por reacción de la monoclorotriazina **30** con 0.6 equivalentes de 1,3-xilendiamina, en presencia de DIPEA y a 100 °C durante 2 horas en el microondas. De forma análoga, el dímero **39** fue obtenido mediante reacción del derivado **30** con 0.6 equivalentes de 2,2'-(etilenodioxo)diethylamina, en presencia de DIPEA y a 100 °C durante 48 horas, con un 60% de rendimiento. Los dímeros **37**, **38** y **39** fueron tratados con LiOH·H₂O durante 10 horas para su desprotección. Tras adición de ácido fórmico y posterior tratamiento con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻), se obtuvieron los respectivos dímeros desprotegidos **40**, **41** y **42** con rendimientos del 97%, 84% y 90% respectivamente.

Derivados de tirosina

Siguiendo una metodología similar a la empleada para la síntesis de monotriazinas de Phe y Trp, se sintetizaron diferentes monotriazinas de Tyr. En el Esquema 11 se recoge la síntesis de las monotriazinas protegidas **44**, **45** y **46**, a partir de las cuales se obtuvieron los respectivos diácidos **47**, **48** y **49**.



Esquema 11. Condiciones de reacción: a) H-Tyr(OMe).HCl, THF, DIPEA, 25 °C, 24 h; b) *N*-metilpiperazina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 70 °C, 1 h; c) benzilamina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 2 h; d) 2-(2-aminoeto)etanol, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 1 h; e) LiOH·H₂O, THF:H₂O (1:1), 10 h; f) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Amberlite IRA400 (forma HCOO⁻); g) neutralización con HCl.

La reacción del cloruro cianúrico con dos equivalentes de H-TyrOMe-HCl en presencia de DIPEA, empleando THF como disolvente y a temperatura ambiente, condujo al derivado disustituido **43** con un 78% de rendimiento. Las monotriazinas **44**, **45** y **46** se obtuvieron haciendo reaccionar el derivado **43** con un exceso de *N*-metilpiperazina, bencilamina y 2(2-aminoetoxi)etanol respectivamente, en presencia de DIPEA y en 1,4-dioxano, con rendimientos respectivos del 60%, 80% y 88%. Estas monotriazinas protegidas fueron tratadas con LiOH·H₂O para la saponificación de los grupos éster metílico. Los diácidos **47** y **48** fueron obtenidos tras neutralización del medio de reacción con ácido fórmico y posterior tratamiento con Amberlite IRA400 (HCOO⁻), con rendimientos del 84% y 83% respectivamente. El diácido **49** fue aislado de forma análoga a la empleada para los diácidos **20** (Esquema 1) y **36** (Esquema 9), mediante neutralización del medio de reacción con una disolución de HCl 1 M y posterior purificación por cromatografía flash en fase reversa, obteniéndose con un rendimiento del 65%.

Lowe y colaboradores⁸³ habían descrito que el ligando representado en la Figura 27, el cual posee dos unidades de 5-aminoindano sobre un esqueleto central de 1,3,5-triazina, podía ser empleado como ligando en cromatografía de afinidad para manosa. Conviene recordar, tal y como se comentó en la introducción, que la manosa es un sacárido muy abundante en la glicoproteína gp120 del VIH-1.

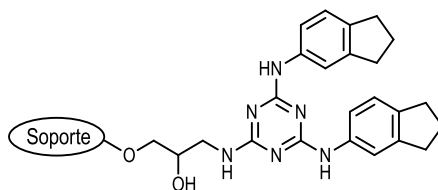


Figura 27. Triazina disustituida con 5-aminoindano: ligando con afinidad por manosa

Mediante experimentos de ¹H-RMN del ligando en disolución en presencia de α-D-metilmanósido y posteriores estudios de modelado molecular, Lowe proponía la formación de complejos ligando:manosa en una relación 2:1, estabilizados por la formación de enlaces de hidrógeno entre los hidroxilos de las posiciones 2, 3 y 4 de la manosa y el agrupamiento NH-C=N (Figura 28) del anillo de la triazina.

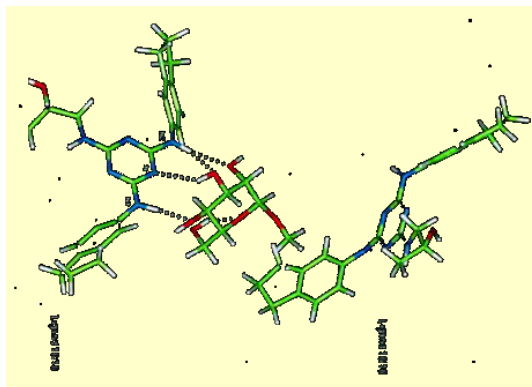
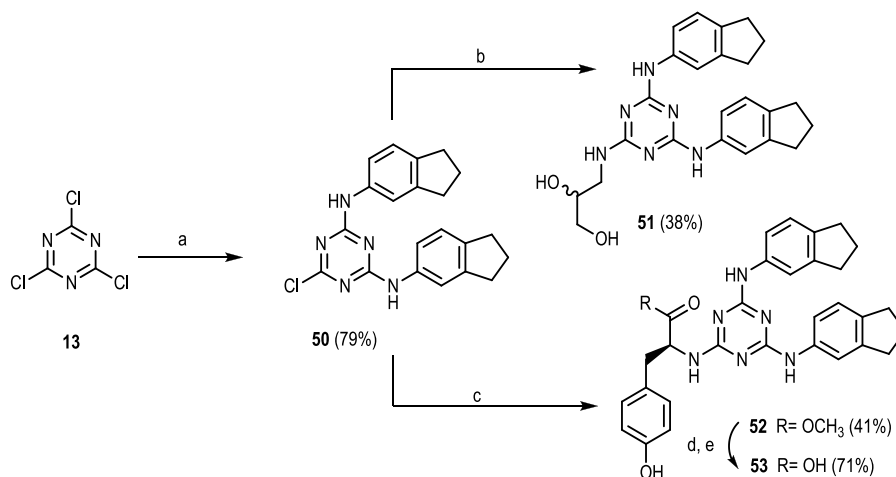


Figura 28. Modelo de interacción entre α-D-metilmanosa y dos triazinas portadoras de 5-aminoindano (Lowe y colaboradores⁸³)

Además, la segunda molécula de ligando disponía uno de sus anillos de aminoindano sobre la cara β del azúcar y participaba en interacciones de apilamiento o “stacking”.

Basándonos en estos precedentes, consideramos de interés sintetizar el ligando **51** (Esquema 12), que correspondería al análogo no anclado a soporte del ligando recogido en la Figura 7. Además, se sintetizaron los compuestos **52** y **53** donde se combinó la presencia de 5-aminoindano con un residuo de tirosina.

Para la síntesis de las triazinas **51** y **52** (Esquema 12) se partió del derivado disustituido **50**.

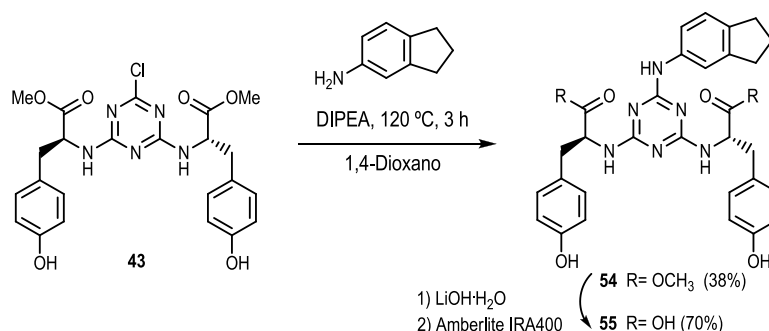


Esquema 12. Condiciones de reacción: a) 5-aminoindano, acetona:agua, Na₂CO₃, 25 °C, 10 h; b) 3-amino-1,2-propanodiol, 1,4-dioxano, NaHCO₃, 100 °C, 36 h; c) H-Tyr(OMe).HCl, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 120 °C, 3 h; d) LiOH.H₂O, THF:H₂O (1:1), 10 h; e) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Amberlite IRA400 (forma HCOO⁻).

El derivado **50** se obtuvo mediante reacción del cloruro cianúrico con 5-aminoindano en presencia de Na₂CO₃, empleando una mezcla de acetona:agua (1:1) como disolvente, conforme al procedimiento descrito por Lowe⁸³ y se aisló con un 79% de rendimiento. El compuesto **51** fue obtenido mediante reacción del derivado **50** con 3-amino-1,2-propanodiol en 1,4-dioxano y en presencia de NaHCO₃ como base a 100 °C durante 36 h, con un rendimiento del 38%. El compuesto **52** se obtuvo por reacción del derivado **50** con H-Tyr-OMe-HCl a 120 °C durante 3 h en microondas, en presencia de DIPEA y empleando 1,4-dioxano como disolvente, y se aisló con un 41% de rendimiento. Este rendimiento moderado a pesar de la alta temperatura y tiempo de reacción prolongado ilustra la dificultad de emplear aminoácidos para llevar a cabo la tercera sustitución sobre la clorotriazina. La desprotección de **52** mediante tratamiento con LiOH.H₂O y posterior aislamiento mediante resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻), condujo al derivado **53** con un rendimiento del 71%.

Por otra parte, se sintetizó un derivado con dos restos de Tyr y una unidad de 5-aminoindano. Para ello se hizo reaccionar la clorotriazina **43** con 5-aminoindano, en presencia de DIPEA, en 1,4-dioxano y calentando en microondas durante 3 horas a 120 °C, obteniéndose el compuesto **54** con un 38% de rendimiento (Esquema 13). También en este caso el rendimiento obtenido en esta tercera

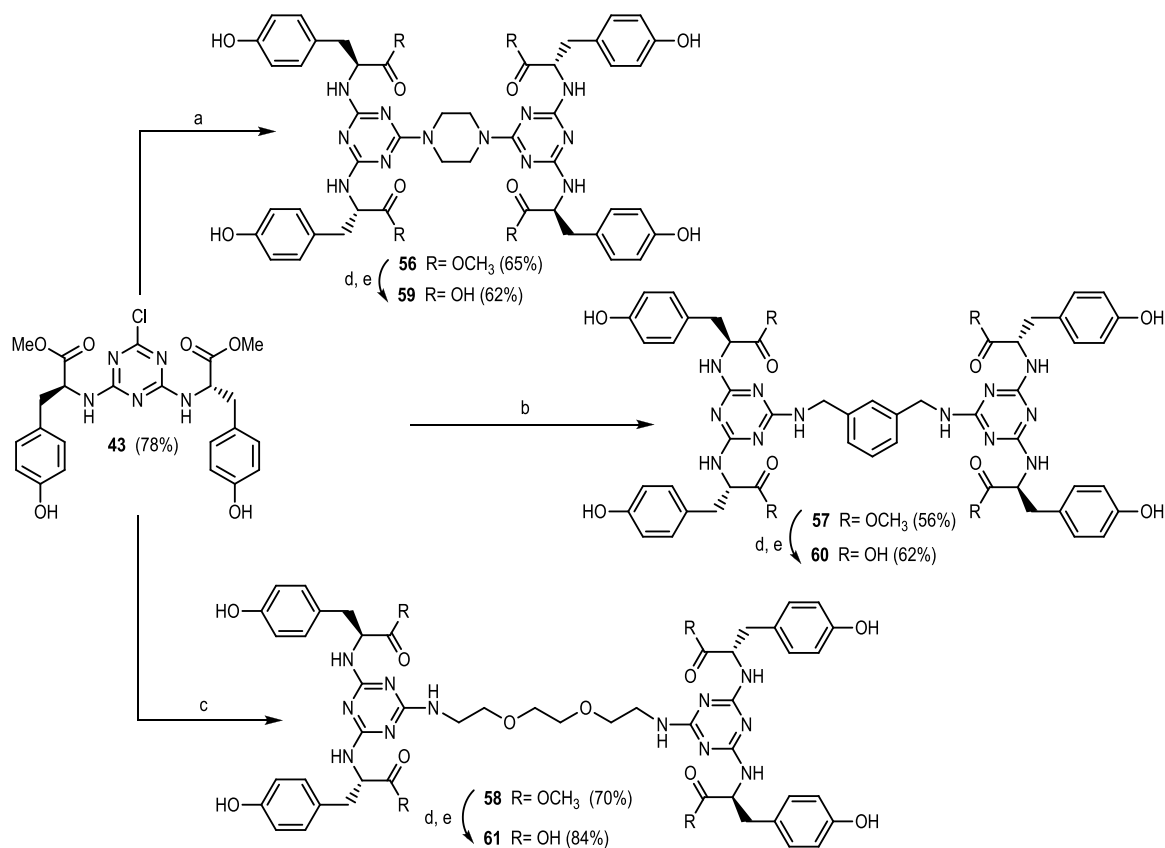
sustitución es moderado, a pesar del empleo de condiciones más energéticas en comparación a las empleadas en el caso de otras aminas como piperazina y bencilamina, y se puede atribuir a la baja reactividad de la amina de naturaleza aromática del 5-aminoindano.



Esquema 13. Síntesis de derivados de tirosina y 5-aminoindano

El derivado **54** se trató con $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ para la desprotección de los grupos éster metílico y tras purificación con resina de intercambio iónico Amberlite IRA400 (forma HCOO^-), se obtuvo el derivado **55** con un 70% de rendimiento.

En el Esquema 14 se recoge la síntesis de los dímeros de tirosina protegidos **56**, **57** y **58**, y de sus correspondientes derivados desprotegidos **59**, **60** y **61**



Esquema 14. Condiciones de reacción: a) piperazina, 1,4-dioxano, DIPEA, 100 °C, 48 h; b) 1,3-xilendiamina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 2 h; c) 2,2'-(etilendioxi)diethylamina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 2h; d) $\text{LiOH}\cdot\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1), 10 h; e) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Amberlite IRA400 (forma HCOO^-).

Para la obtención de los dímeros anteriormente citados, se partió de la clorotriazina **43**, la cual se hizo reaccionar con las mismas diaminas empleadas en la síntesis de los dímeros de fenilalanina y tirosina. De esta forma, la reacción del derivado **43** con 0.6 equivalentes de piperazina, en presencia de DIPEA como base, a 100 °C durante 48 horas, condujo al dímero **56** con un 65% de rendimiento. Los dímeros **57** y **58** fueron obtenidos por reacción de la monoclorotriazina **43** con 0.6 equivalentes de 1,3-xililendiamina y 2,2'-(etilenodioxi)dietilamina respectivamente, en presencia de DIPEA y a 100 °C durante 2 horas en el microondas y fueron obtenidos con rendimientos respectivos del 56% y 70%.

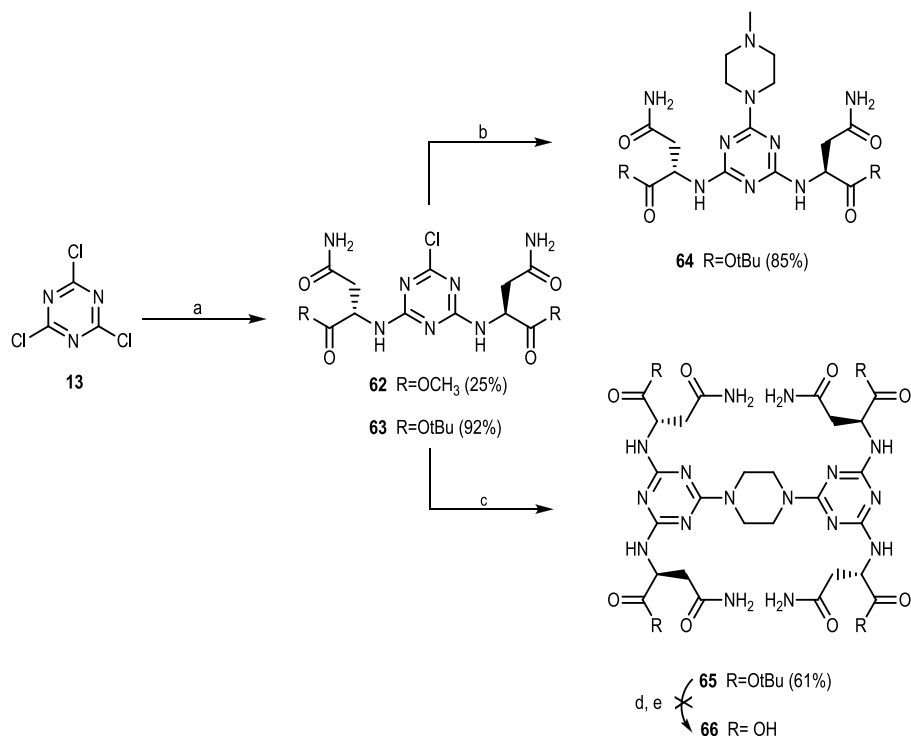
Los dímeros **56**, **57** y **58** fueron tratados con LiOH·H₂O durante 10 horas para la saponificación de los grupos éster metílico. Tras adición al medio de reacción de ácido fórmico hasta pH 2 y posterior tratamiento con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻), se obtuvieron los dímeros desprotegidos **59**, **60** y **61** respectivamente, con rendimientos del 62% para **59** y **60**, y del 84% para **61**.

Derivados de asparragina

En el sitio de reconocimiento de los carbohidratos en lectinas, además de residuos de tipo aromático, es muy habitual la presencia de asparraginas⁵⁵. En algunos casos, y mediante estudios de mutagénesis dirigida, se ha comprobado que este residuo es crítico para la capacidad de unión a los carbohidratos⁸⁴. Además, y retomando el índice hidropático del que se ha hablado al inicio de este apartado de resultados y discusión, la asparragina es uno de los aminoácidos con un índice hidropático más negativo (-3.5)⁷⁵, lo que a priori conduciría a productos con una mayor solubilidad en agua.

Por ello se planteó la síntesis de monómeros y dímeros de triazinas funcionalizadas con restos de asparragina, comenzando con los derivados de piperazina dada la alta reactividad de esta amina. Así, se hizo reaccionar el cloruro cianúrico con 2 equivalentes de H-Asn-OMe·HCl a 25 °C, en presencia de DIPEA y empleando THF como disolvente, lo que condujo a la formación de la clorotriazina **62** (Esquema 15). Sin embargo, la alta polaridad de **62** dificultó su aislamiento obteniéndose con un rendimiento del 25%. Con el fin de disminuir la polaridad y facilitar el aislamiento y purificación, se decidió emplear como aminoácido de partida la asparragina protegida en forma de éster *terc*-butílico. De esta forma, la reacción de cloruro cianúrico con 2 equivalentes de H-Asn-O^tBu·HCl a 25 °C, en presencia de DIPEA y empleando THF como disolvente, condujo a la clorotriazina **63** que se aisló con un 92% de rendimiento. La reacción del derivado **63** con *N*-metilpiperazina a 70 °C durante 24 horas, en presencia de DIPEA y empleando 1,4-dioxano como disolvente, permitió obtener la monotriazina **64** con un 85% de rendimiento. Asimismo, se hizo reaccionar el derivado **63** con 0.6 equivalentes de piperazina a 100 °C durante 2 horas en microondas, obteniéndose el dímero **65** con un 61% de rendimiento. Cuando se procedió al tratamiento ácido con TFA del compuesto **65** para la eliminación de los grupos éster *terc*-butílico, se observó por HPLC-MS la formación de distintos productos con espectros de masas complejos junto con el producto deseado **66**. En particular se observó la formación de especies de menor masa que la del producto esperado, con diferencias entre ellos de 17, 18 ó 19 umas. Está descrito que el tratamiento con ácidos de

péptidos que contienen restos de Asn puede conducir a mezclas complejas al producirse la formación de imidas cíclicas por ataque nucleófilo del grupo amido de la cadena lateral de Asn a un grupo carbonilo⁸⁵. Esto explicaría la multitud de picos observados en el cromatograma de HPLC-MS al tratar el compuesto **65**, portador de cuatro restos de Asn, con ácido trifluoroacético ya que se podrían formar mezclas complejas de compuestos con diferente número de imidas de cinco miembros muy favorecidas termodinámicamente.



Esquema 15. Condiciones de reacción: a) H-Asn-R.HCl, THF, DIPEA, 25 °C, 24 h; b) N-metilpiperazina, 1,4-dioxano, DIPEA, 70 °C, 24 h; c) piperazina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 2 h; d) LiOH.H₂O, THF:H₂O (1:1), 10h; e) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Amberlite IRA400 (forma HCOO⁻).

Cabe destacar que durante la reacción de obtención del dímero **65** en 1,4-dioxano, se observó la formación de una sustancia con aspecto de gel en el vial de microondas. Tras el aislamiento y purificación del dímero **65**, se comprobó que cuando éste se ponía en contacto con dioxano, que era el disolvente empleado en la reacción, se calentaba y se dejaba enfriar, se producía la formación de un gel, es decir, que cuando el vial que contenía la disolución con el compuesto se invertía, ésta no fluía. Este comportamiento fue estudiado con más detalle y los resultados se recogen en el Capítulo 2 de esta Memoria.

Síntesis de los derivados de 1,3,5-triazina de la Serie III

La tercera de las series propuestas son trímeros, es decir, compuestos que incorporan tres núcleos de 1,3,5-triazina. Las triaminas elegidas como núcleos centrales han sido la tris(2-aminoetil)amina, **67**, y el 1,3,5-triaminometil-2,4,6-trietilbenceno, **68** (Figura 29).

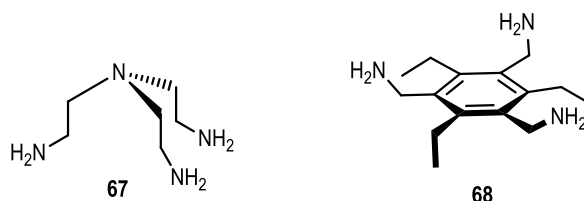


Figura 29. Triaminas empleadas en la síntesis de los trímeros

Estas triaminas han sido ampliamente empleadas en la síntesis de receptores tripodales. La tris(2-aminoetil)amina, también conocida por sus siglas en inglés TREN (**67**), se ha utilizado, entre otros fines, para la síntesis de receptores para el reconocimiento de aniones y cationes⁸⁶. Recientemente se ha empleado para la síntesis de poliaminas que reconocen nucleótidos y ácidos nucleicos⁸⁷. Por su parte, los derivados de trietilbenceno, familia a la que pertenece la triamina **68**, son comúnmente empleados como núcleos centrales en reconocimiento molecular. Muy recientemente se han descrito en la literatura receptores con este esqueleto para el reconocimiento de carbohidratos, particularmente para derivados de manosa (compuestos **69**⁸⁸ y **70**⁸⁹, Figura 30). También en nuestro grupo de investigación hemos descrito recientemente un compuesto polifenólico con un esqueleto de trietilbenceno con capacidad de reconocimiento de polisacáridos ricos en manosa (compuesto **71**)⁹⁰.

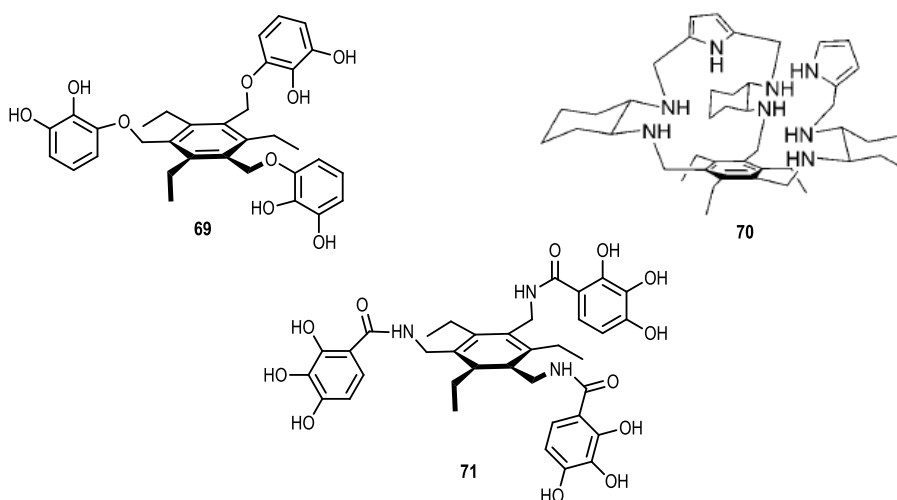


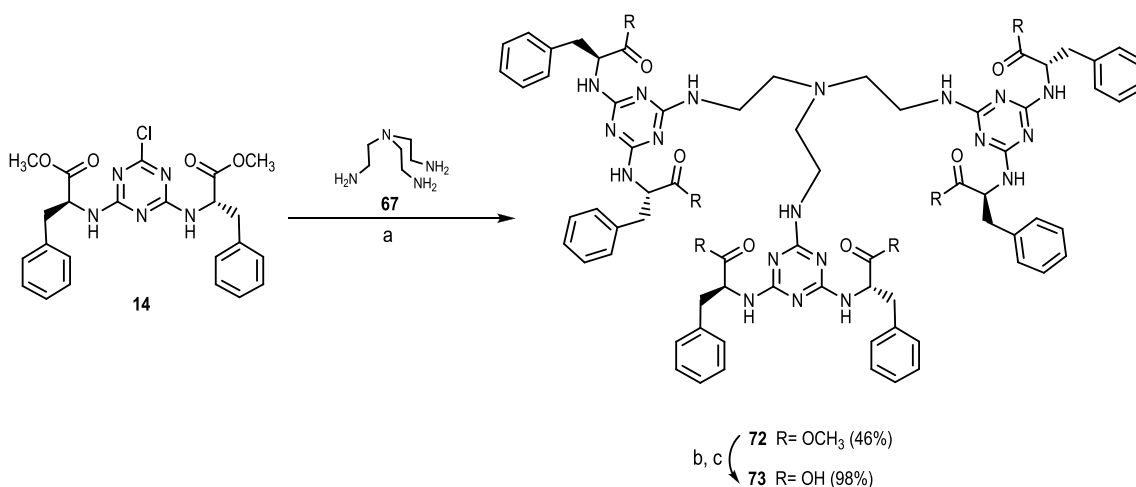
Figura 30. Receptores basados en el esqueleto de trietilbenceno con afinidad por carbohidratos

Como ya se ha comentado, la estrategia empleada para la síntesis de los trímeros es una estrategia convergente y al igual que en apartados anteriores, los compuestos se han agrupado según el aminoácido empleado como sustituyente de la triazina.

Derivados de fenilalanina

La ruta de síntesis empleada para los trímeros es análoga a la ya descrita para los dímeros. Conviene recordar que en la síntesis de los dímeros, se empleó una relación molar clorotriazina:diamina (1:0.6). En los trímeros, la relación empleada clorotriazina:triamina ha sido (1:0.3), ya que una cantidad mayor de la triamina conduce a la formación de productos donde la triamina se encuentra mono- o disustituida, productos no deseados que además dificultan la purificación del trímero.

Así, y como se recoge en el Esquema 16, la reacción de la clorotriazina sustituida con dos unidades de fenilalanina **14** con la tris(2-aminoetil)amina se llevó a cabo en 1,4-dioxano, empleando como base DIPEA y calentamiento por microondas durante 3 horas a 100 °C, lo que condujo al trímero **72** con un 46% de rendimiento.



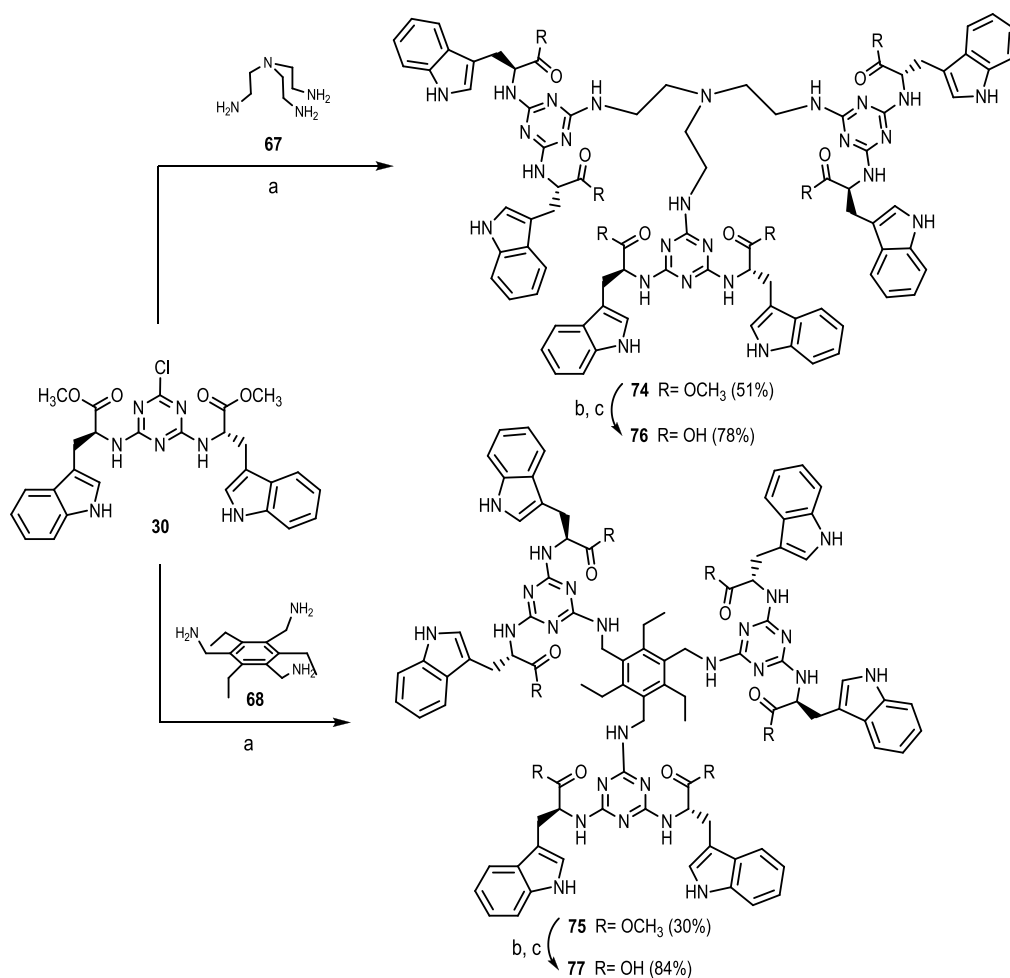
Esquema 16. Condiciones de reacción: a) 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 3 h; b) LiOH·H₂O, THF:H₂O (1:1), 10 h; c) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Dowex 1X2 (forma HCOO⁻).

A continuación se procedió a la saponificación de los grupos éster metílico de **72** por tratamiento con LiOH·H₂O y posterior neutralización con ácido fórmico. Cuando el residuo obtenido se intentó purificar mediante la resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) tal y como se había hecho en los monómeros y dímeros, el grado de anclaje del trímero a la resina fue muy bajo, quizás debido al mayor volumen del trímero respecto a los monómeros y dímeros del apartado anterior, lo que le impediría penetrar en el entramado de la resina y anclarse de forma correcta. De esta forma, para la purificación de **73** y el resto de trímeros sintetizados en este capítulo, se empleó la resina Dowex 1X2 (forma HCOO⁻), muy similar a Amberlite

IRA400, pero con menor grado de entrecruzamiento. Así, utilizando la resina Dowex 1X2 (forma HCOO⁻), y eluyendo con una mezcla dioxano:HCOOH (9:1), se obtuvo el trímero desprotegido **73** con un rendimiento del 43%.

Derivados de triptófano.

En la síntesis de trímeros de derivados de triptófano, se han utilizado como núcleos centrales la tris(2-aminoetil)amina (**67**) y la 1,3,5-triaminometil-2,4,6-trietilbenceno (**68**).



Esquema 17. Condiciones de reacción: a) 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 3 h; b) LiOH.H₂O, THF:H₂O (1:1), 10 h; c) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Dowex 1X2 (forma HCOO⁻)

La reacción de la clorotriazina **30** con tris(2-aminoetil)amina en 1,4-dioxano a 100 °C durante 3 horas en el microondas empleando DIPEA como base llevó al trímero **74** con un 51% de rendimiento. De un modo similar, la reacción de la triamina **68** sintetizada conforme a procedimientos descritos⁹¹⁻⁹³ con la clorotriazina **30** también en microondas a 100 °C durante 3 horas condujo al trímero **75**, que se aisló con un 30% de rendimiento. La utilización de tiempos de reacción más largos o el empleo de temperaturas

más elevadas no permitieron mejorar el rendimiento del trímero **75**. Si bien no se ha realizado una reacción paralela de síntesis de trímeros utilizando calentamiento tradicional, cabría esperar que fueran necesarios tiempos de reacción muy prolongados. Por tanto, el empleo de la síntesis asistida por microondas ha sido una herramienta extremadamente útil para acceder a los trímeros deseados en un corto plazo de tiempo.

Posteriormente se saponificaron los grupos éster metílico de los trímeros **74** y **75** mediante tratamiento con LiOH, y tras adición de ácido fórmico y tratamiento con la resina Dowex 1X2 (HCOO⁻), se aislaron los trímeros desprotegidos **76** y **77** con rendimientos respectivos del 78% y 84%.

Para la caracterización de los trímeros por RMN fue necesario recurrir a experimentos de correlación bidimensionales (HSQC, HMBC, COSY) puesto que el gran número de residuos de aminoácidos (6 unidades frente a los 4 restos de aminoácidos presentes en los dímeros) y el alto número de rotámeros existentes para cada conformación conducían a espectros donde las señales de los protones estaban muy ensanchadas y solapaban unas con otras dificultando su asignación (Figura 31).

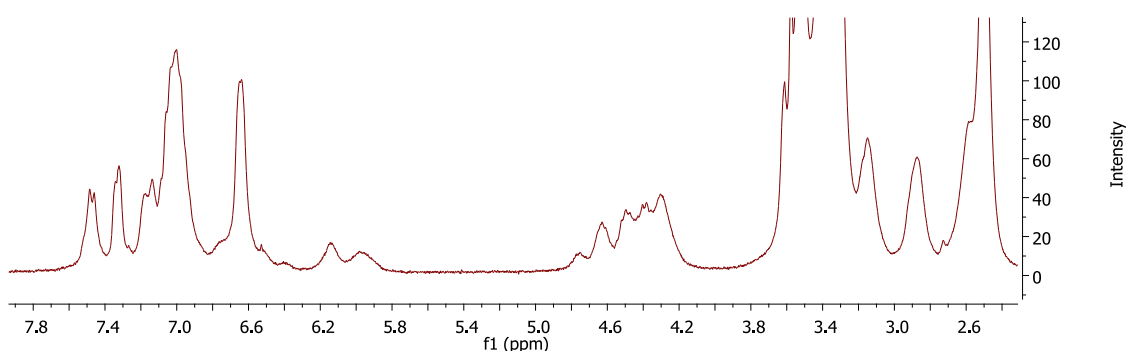
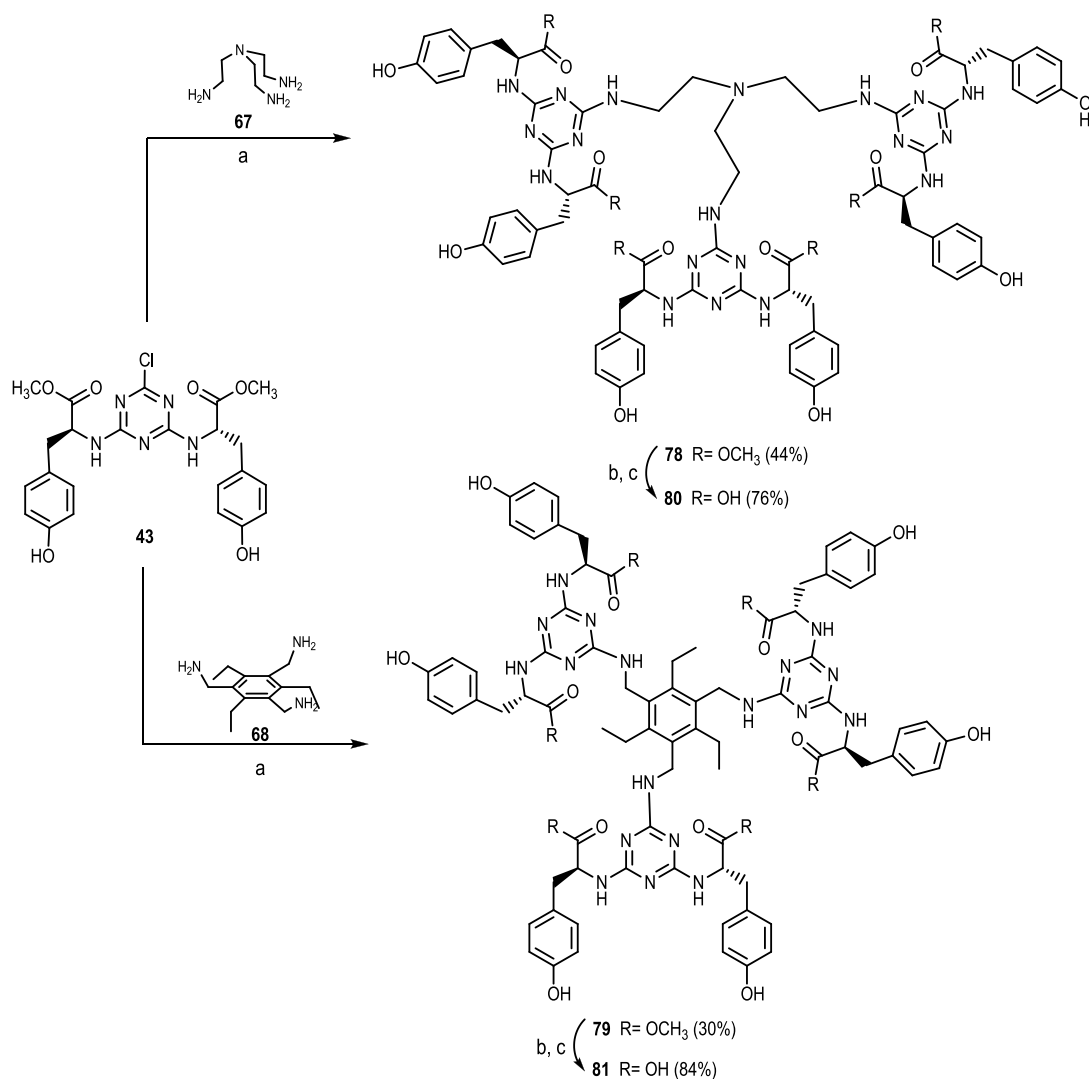


Figura 31. Espectro monodimensional de ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆), a T=60 °C, del trímero derivado de triptófano **74**

Derivados de tirosina

A partir de la clorotriazina **43** se han sintetizado los trímeros protegidos **78** y **79** (Esquema 18). La reacción de **43** con las triaminas **67** y **68** a 100 °C durante 3 horas en el microondas condujo a los trímeros **78** y **79** que se aislaron con rendimientos del 44% y 30% respectivamente. De forma análoga a lo que ocurría con los trímeros derivados de triptófano, se observa que el empleo de la triamina **68**, de naturaleza bencílica, conduce a rendimientos más bajos que cuando se emplea la tris(2-aminoetil)amina de naturaleza alquímica. Tras tratamiento de los trímeros protegidos **78** y **79** con LiOH·H₂O, adición de ácido fórmico y posterior purificación con resina de intercambio iónico Dowex 1X2 (HCOO⁻), se obtuvieron los trímeros desprotegidos **80** y **81** con rendimientos del 76% y 84% respectivamente.



Esquema 18. Condiciones de reacción: a) 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 3 h; b) LiOH.H₂O, THF:H₂O (1:1), 10 h; c) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Dowex 1X2 (forma HCOO⁻)

La evaluación frente a la replicación de VIH de los trímeros de Phe, Trp y Tyr en forma de ácidos carboxílicos reveló que el derivado de tris(2-aminoetil)amina con Trp, compuesto **76** (Figura 32) mostró actividad significativa frente a la replicación del virus. Igualmente mostraron actividad anti-VIH los compuestos cuyo núcleo central es la triamina bencílica y que están funcionalizados ya sea con Trp o Tyr (compuestos **77** y **81**, respectivamente; Figura 32). Estos datos serán comentados en detalle en la sección de evaluación biológica. Además, el derivado de Trp con la triamina bencílica como núcleo central (**77**), mostró en ensayos de resonancia de plasmón superficial (SPR), capacidad de unión a la glicoproteína viral gp120. Por ello la siguiente serie de modificaciones se realizó teniendo en cuenta estos datos.

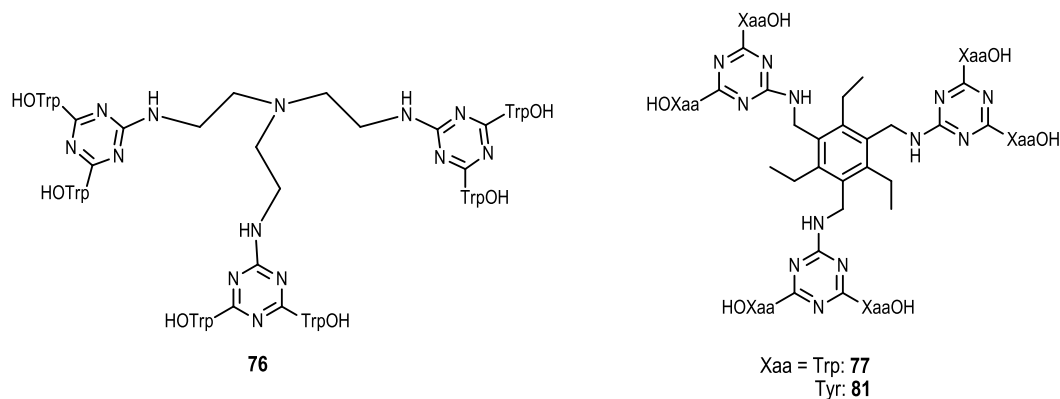
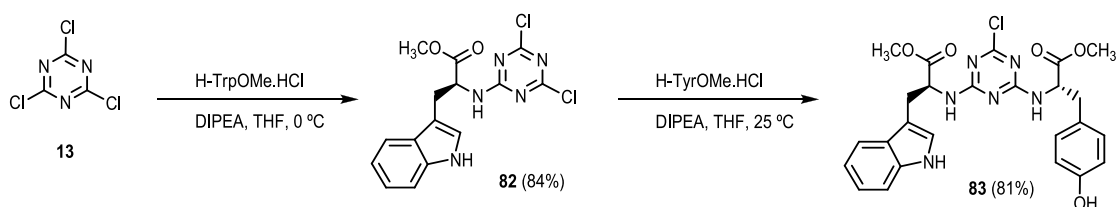


Figura 32. Trímeros con actividad anti-HIV

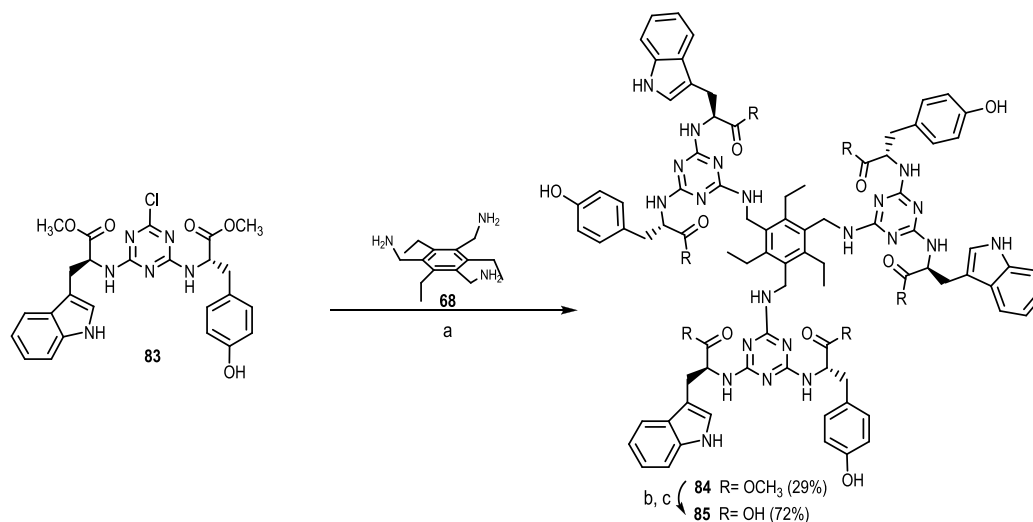
Trímeros de triazinas mixtas que combinan la presencia de L-Trp con otro aminoácido

A partir de los datos de actividad frente a VIH de los trímeros de Trp y de Tyr con esqueleto central de 1,3,5-triaminometil-2,4,6-trietilbenceno (**77** y **81**), consideramos de interés sintetizar un trímero análogo donde se alternaran residuos de Trp y de Tyr. Como se comentó al inicio de este capítulo, el control de la temperatura permite dirigir el grado de sustitución sobre la triazina. Así, la reacción del cloruro cianúrico con H-TrpOMe·HCl a 0 °C durante 4 horas, en presencia de DIPEA y empleando THF como disolvente, condujo al derivado monosustituido **82** con un rendimiento del 84%. La reacción de la monotriazina **82** con H-Tyr-OMe·HCl a 25 °C permitió obtener la clortriazina mixta **83** con un rendimiento del 81% (Esquema 19).



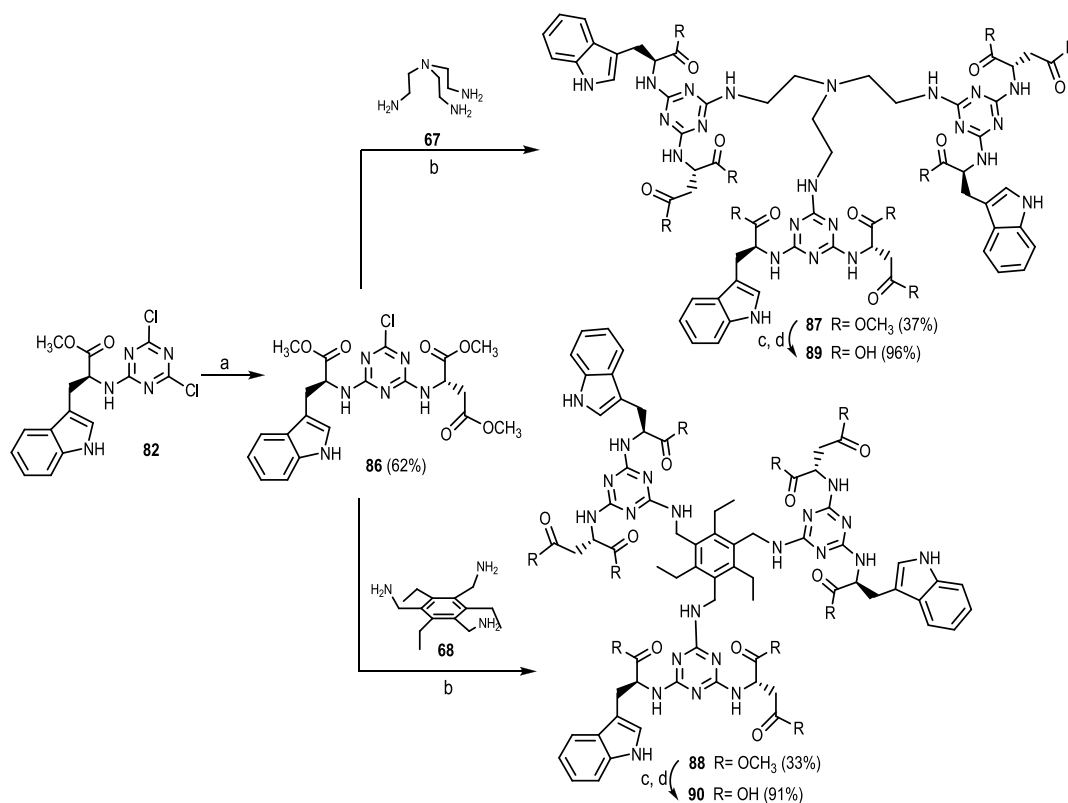
Esquema 19. Síntesis de las triazinas **82** y **83**

La clortriazina **83** se hizo reaccionar con la triamina **68** a 100 °C durante 3 horas en el microondas obteniéndose el trímero protegido **84** con un rendimiento del 29% (Esquema 20). La saponificación de los grupos éster metílico del trímero **84** mediante tratamiento básico con LiOH·H₂O, adición de ácido fórmico y posterior purificación con resina Dowex 1X2 (HCOO⁻) condujo al trímero **85** con un rendimiento del 72%.



Esquema 20. Condiciones de reacción: a) H-Tyr(OMe).HCl, THF, DIPEA, 25 °C, 10 h; b) 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 3 h c) LiOH.H₂O, THF:H₂O (1:1), 10 h; d) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Dowex 1X2 (forma HCOO⁻)

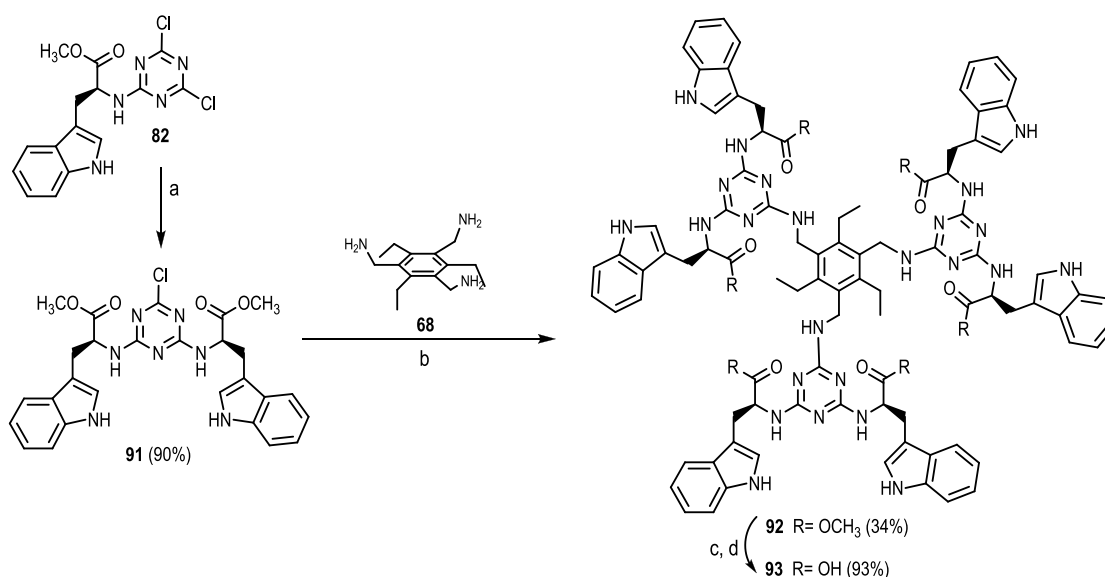
Además de aminoácidos de naturaleza aromática, en el sitio de unión de carbohidratos en lectinas es habitual la presencia de aminoácidos de carácter ácido⁵⁵. Por ello consideramos de interés combinar la presencia de Trp, en base a los datos de actividad antes mencionados, con residuos de ácido aspártico (Esquema 21).



Esquema 21. Condiciones de reacción: a) H-Asp(OMe)OMe.HCl, THF, DIPEA, 25 °C, 10 h; b) 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 3 h; c) LiOH.H₂O, THF:H₂O (1:1), 10 h; d) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Dowex 1X2 (forma HCOO⁻)

El derivado monosustituido con triptófano **82** se hizo reaccionar con H-Asp(OMe)OMe-HCl a 25 °C en THF y en presencia de DIPEA, obteniéndose la clorotriazina mixta **86**, con un 62% de rendimiento. La reacción del derivado **86** con las triaminas **67** y **68** a 100 °C durante 3 horas en el microondas condujo a los trímeros **87** y **88** con rendimientos del 37% y 33% respectivamente. La saponificación de los ésteres metílicos de la posición α de Trp y Asp, y de la cadena lateral de Asp, se realizó mediante tratamiento básico con LiOH·H₂O, neutralización con ácido fórmico y posterior purificación con resina de intercambio iónico Dowex 1X2 (HCOO⁻), obteniéndose los trímeros desprotegidos **89** y **90** con rendimientos del 96% y 91% respectivamente que presentan 9 grupos carboxilato en su estructura.

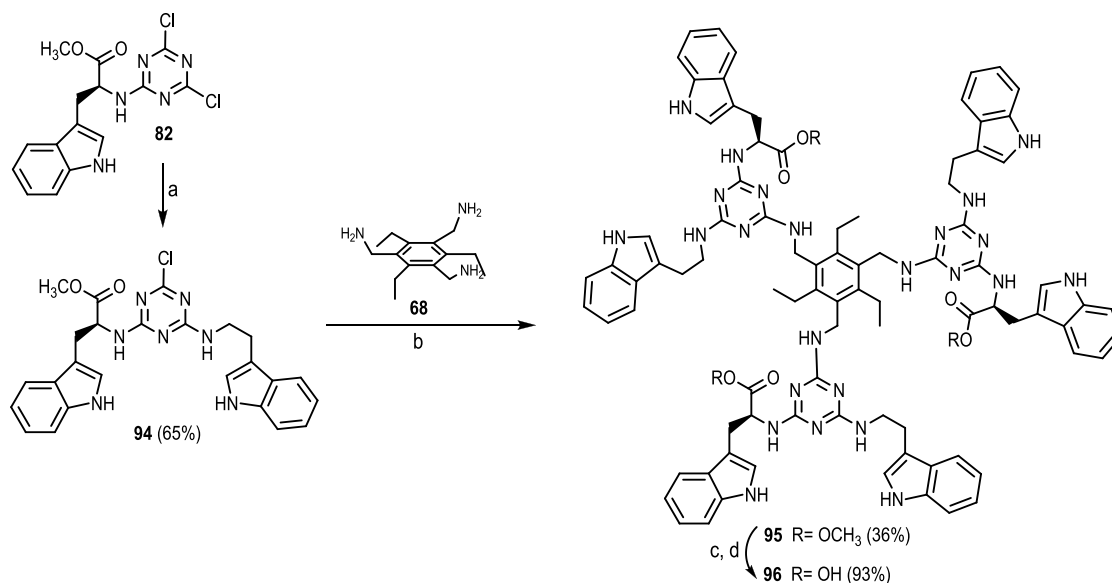
El trímero de L-Trp **77** con un esqueleto central de trietilbenceno era el compuesto que presentaba un mejor perfil tanto en actividad en cultivo frente a la replicación de VIH como en su capacidad de unión a la glicoproteína gp120 viral de acuerdo con los resultados de SPR. Con el objetivo de estudiar si la disposición relativa en el espacio de las unidades de triptófano en **77** afectaba a la actividad en cultivo y/o a la capacidad de unirse a la gp120, se sintetizó el trímero **92** (Esquema 22), donde se alternan unidades de L-triptófano con unidades de D-triptófano.



Esquema 22. Condiciones de reacción: a) H-D-Trp-OMe.HCl, THF, DIPEA, 25 °C, 10 h; b) 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 3 h; c) LiOH·H₂O, THF:H₂O (1:1), 10 h; d) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Dowex 1X2 (forma HCOO⁻)

Para ello se hizo reaccionar el derivado de L-Trp **82** con H-D-TrpOMe-HCl a 25 °C, en presencia de DIPEA, obteniéndose la clorotriazina **91** con un rendimiento del 90%. La reacción del derivado **91** con la triamina **68** a 100 °C durante 3 horas en microondas condujo al trímero **92** con un 34% de rendimiento. La saponificación de los grupos éster metílico de **92** seguido de acidificación y purificación con resina de intercambio Dowex 1X2 (HCOO⁻) permitió obtener el trímero desprotegido **93** con un 93% de rendimiento.

Como se ilustrará en el apartado de estudios de SPR, el trímero **77** era el que presentaba mayor afinidad por la gp120 viral seguido del derivado mixto Trp/Tyr **85** y en menor medida del derivado de Tyr **81**. Puesto que la naturaleza y número de grupos ácidos es idéntico en los tres trímeros mencionados, los datos obtenidos parecían indicar la importancia de la cadena lateral del triptófano en la interacción. Para estudiar esto punto con más detalle, se llevó a cabo la síntesis de un trímero análogo donde las triazinas combinaran residuos de L-Trp con residuos de triptamina, es decir unidades de triptófano “descarboxilado” (Esquema 23).



Esquema 23. Condiciones de reacción: a) triptamina, THF, DIPEA, 25 °C, 10 h; b) 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 3 h; c) LiOH·H₂O, THF:H₂O (1:1), 10 h; d) adición de ácido fórmico hasta pH 2, Dowex 1X2 (forma HCOO⁻)

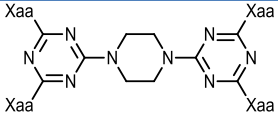
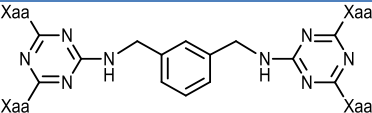
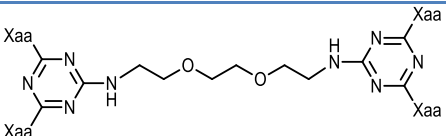
Para la obtención de este trímero, se hizo reaccionar el derivado de L-Trp **82** con triptamina a 25 °C, en presencia de DIPEA y empleando THF como disolvente, obteniéndose el compuesto disustituido **94** con un 65% de rendimiento. La reacción de la clorotriazina mixta **94** con 1,3,5-triaminometil-2,4,6-trietilbenceno (**68**) a 100 °C durante 3 horas, condujo al trímero **95** con un 36% de rendimiento. La desprotección del trímero **95** con LiOH·H₂O y posterior tratamiento con resina de intercambio Dowex 1X2 dio lugar al trímero **96** con un 93% de rendimiento.

Evaluación de los compuestos sintetizados frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2 en cultivo celular

Los compuestos sintetizados fueron evaluados frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2 en líneas celulares CEM por el grupo del Prof. Jan Balzarini del Instituto Rega de la Universidad de Lovaina (Bélgica), conforme a procedimientos descritos⁹⁴. Los monómeros con aminoácidos en forma de éster metílico, así como sus correspondientes ácidos carboxílicos, no mostraron actividad antiviral significativa. También resultaron inactivos los derivados de 5-aminoindano. Asimismo, los dímeros en forma de éster metílico tampoco fueron activos frente a VIH. No obstante, algunos de los dímeros en

forma de ácido carboxílico mostraron una ligera actividad frente a VIH-1 y VIH-2. Los resultados obtenidos para estos compuestos se recogen en la Tabla 3, donde los compuestos se han ordenado en función de la diamina empleada como núcleo central. La actividad antiviral se expresa como concentración efectiva 50 o CE_{50} , ésto es, la concentración de compuesto que permite proteger al 50% de las células del efecto citopático del virus. En paralelo se ha determinado la CC_{50} o concentración citotóxica 50, que corresponde a la concentración de compuesto citotóxica para las células no infectadas. En las tablas se ha introducido como compuesto patrón la pradimicina-A (PRM-A), una molécula pequeña para la que se ha postulado un mecanismo de inhibición frente al VIH similar al de las lectinas.

Tabla 3. Actividad antiviral frente a VIH-1 y VIH-2 en células CEM y efecto citotóxico de los dímeros de triazina portadoras de aminoácidos^a

Estructura	Xaa	n°	CE_{50} (μ M) ^b		CC_{50} (μ M) ^c
			VIH-1	VIH-2	
	Phe-OH	27	106 ± 8	121 ± 36	> 250
	Trp-OH	40	65 ± 10	63 ± 13	> 250
	Tyr-OH	59	≥ 250	≥ 250	≥ 250
	Phe-OH	29	> 10 ^d	> 10 ^d	> 10 ^d
	Trp-OH	41	56 ± 24	81 ± 6	> 250
	Tyr-OH	60	148 ± 28	80 ± 72	> 250
	Phe-OH	28	> 250	> 250	> 250
	Trp-OH	42	112 ± 0	120 ± 9	> 250
	Tyr-OH	61	≥ 250	> 250	> 250
PRM-A		3	5.2	5.9	> 50

^a: Los valores representados son la media de dos o tres experimentos independientes.

^b: CE_{50} , concentración efectiva 50, es decir, concentración efectiva de compuesto que consigue proteger al 50% de las células del efecto citopático del virus.

^c: CC_{50} , concentración citotóxica 50 o concentración de compuesto que es citotóxica para el 50% de las células no infectadas.

^d: Concentración máxima ensayada a la que fue soluble el compuesto.

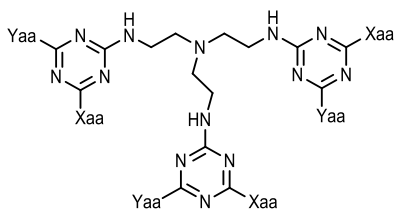
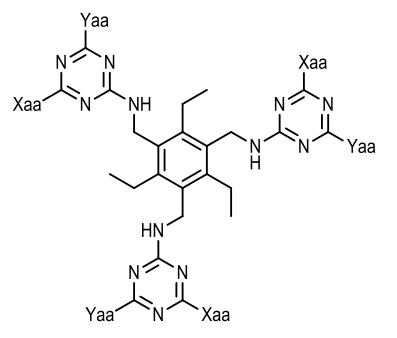
Cuando el núcleo central es piperazina, sólo los dímeros de fenilalanina (**27**) y de triptófano (**40**) mostraron una ligera actividad antiviral, con valores de CE_{50} frente a VIH-1 de 106 y 65 μ M, respectivamente. Los dímeros con *m*-xililendiamina como núcleo central también exhibieron una cierta actividad anti-VIH, especialmente el dímero de triptófano (**41**), con una CE_{50} frente a VIH-1 de 56 μ M. El dímero de fenilalanina **29** no pudo ser ensayado a concentraciones mayores de 10 μ M y a esa concentración no se detectó actividad antiviral. Por otra parte, el dímero de tirosina **60** mostró una ligera actividad frente a VIH-2, con una CE_{50} de 80 μ M. Cuando el espaciador empleado fue 2,2'-(etilenodioxi)diethylamina, sólo se observó cierta actividad para el dímero de triptófano **42**, con una CE_{50} de

112 μM . Cabe destacar que ninguno de los productos ensayados mostró toxicidad a la máxima concentración ensayada (250 μM) frente a células no infectadas como se refleja en los valores de CC_{50} .

A modo de resumen, se podría concluir que los dímeros de triptófano **40**, **41** y **42** fueron los que mostraron mejor actividad frente a VIH-1 y VIH-2 para los tres espaciadores empleados, con valores de CE_{50} entre 56 y 120 μM . Igualmente los datos parecen indicar que los espaciadores piperazina y *m*-xililendiamina conducen a compuestos algo más activos que cuando el espaciador es 2,2'-(etilenodioxo)dietilamina. En todos los casos, es conveniente resaltar que se tratan de actividades antivirales muy moderadas pero significativas ya que el examen microscópico del cultivo y la ausencia de cambios de morfología apreciables en las células apuntan a un claro efecto antiviral.

Los datos de actividad y citotoxicidad de los trímeros en forma de ácidos carboxílicos se recogen en la Tabla 4. Los trímeros han sido clasificados en función de la triamina empleada como núcleo central.

Tabla 4. Actividad antiviral frente a VIH-1 y VIH-2 en células CEM y efecto citotóxico de los trímeros y de PRM-A^a

Estructura	Xaa	Yaa	n°	CE_{50} (μM) ^b		CC_{50} (μM) ^c
				VIH-1	VIH-2	
	Phe-OH	Phe-OH	73	65 ± 21	216 ± 49	> 250
	Trp-OH	Trp-OH	76	20 ± 3	65 ± 21	> 250
	Tyr-OH	Tyr-OH	80	≥ 250	≥ 250	> 250
	Trp-OH	Asp-OH	89	216 ± 49	> 250	> 250
	Trp-OH	Trp-OH	77	16 ± 1	22 ± 3	> 250
	Tyr-OH	Tyr-OH	81	22 ± 0	22 ± 3	> 250
	Trp-OH	Tyr-OH	85	26 ± 4	24 ± 0	> 250
	Trp-OH	Asp-OH	90	18 ± 1	33 ± 2	> 250
	L-Trp-OH	D-Trp-OH	93	19 ± 3	22 ± 3	> 250
	Trp-OH	Triptamina	96	> 10 ^d	> 10 ^d	> 10 ^d
PRM-A			3	5.2	5.9	> 50

^a: Los valores representados son la media de dos o tres experimentos independientes.

^b: CE_{50} , concentración efectiva 50, es decir, concentración efectiva de compuesto que consigue proteger al 50% de las células del efecto citopático del virus.

^c: CC_{50} , concentración citotóxica 50 o concentración de compuesto que es citotóxica para el 50% de las células no infectadas.

^d: Concentración máxima ensayada a la que fue soluble el compuesto.

Así, entre los trímeros en donde se empleó TREN como núcleo central, el derivado de fenilalanina **73**, presentó un valor de CE_{50} de 65 μM frente a VIH-1. Sin embargo cuando el aminoácido es

Trp (**76**), el trímero resultante es tres veces más potente con un valor de CE_{50} de 20 μM . Curiosamente, el correspondiente trímero de tirosina **80** y el trímero mixto de triptófano/aspártico **89** resultaron prácticamente inactivos frente a la replicación viral. Los trímeros sintetizados empleando trietilbenceno como núcleo central mostraron todos ellos una actividad anti-VIH significativa. Nuevamente el mejor compuesto en esta serie fue el derivado de triptófano **77**, con una CE_{50} de 16 μM frente a VIH-1 y de 22 μM frente a VIH-2. El trímero de tirosina **81** y el trímero mixto de triptófano/tirosina **85** exhibieron actividad anti-VIH similares, con valores de CE_{50} de 22 y 26 μM frente a VIH-1, respectivamente. Cabe señalar que el trímero mixto de triptófano/aspártico **90** también muestra actividad anti-VIH significativa con una CE_{50} de 19 μM , a diferencia de lo que ocurría en el caso del trímero mixto de triptófano/aspártico **89**, cuando el núcleo central era TREN. Por otro lado, el trímero mixto de L- y D- triptófano **93**, mostró una CE_{50} frente a VIH-1 de 19 μM , muy similar a la de su análogo **77**, donde todos los triptófanos son los naturales (L-). El trímero **96**, que incorpora en las triazinas unidades de L-triptófano y de triptamina, sólo pudo ser ensayado a una concentración de 10 μM , no detectándose efecto antiviral a dicha concentración. En consonancia con los dímeros, para todos los trímeros recogidos en la Tabla 4 no se observó signos de citotoxicidad a la máxima concentración ensayada, de ahí que los valores de CC_{50} sean superiores a 250 μM , con la única excepción del ya comentado derivado de triptamina

A modo de resumen de este apartado se puede concluir que en todas las series los compuestos con los aminoácidos en forma de ésteres metílicos resultaron inactivos. Cuando los aminoácidos están en forma de ácidos carboxílicos, se observan notables diferencias entre monómeros, dímeros y trímeros. Los monómeros fueron todos inactivos, mientras que los dímeros mostraron una ligera actividad antiviral preferentemente cuando los aminoácidos empleados son triptófanos. Esta actividad es más significativa para los trímeros donde a su vez la naturaleza del núcleo central parece ejercer un marcado efecto en la actividad antiviral. Así, los compuestos con un núcleo central de trietilbenceno fueron los que mostraron las actividades antivirales más significativas. Dentro de los derivados con este núcleo central, las diferencias entre compuestos no parecen demasiado notables si bien los derivados de triptófano fueron los que mostraron una mejor actividad antiviral. Además, se puede concluir que es necesario que los aminoácidos tengan sus ácidos carboxílicos libres para que puedan ejercer actividad antiviral, ya que los correspondientes ésteres metílicos resultaron inactivos. Igualmente los datos apuntan a que un mayor número de aminoácidos en la periferia conduce a compuestos con mejores valores de CE_{50} , lo que podría tener su explicación en la teoría de la multivalencia. Así, comparando los valores de CE_{50} de los derivados de Trp donde el núcleo central es un compuesto bencílico, el dímero con *m*-xilidendiamina **41** es 5 veces menos activo que el trímero de trietilbenceno **77**. En todo caso, no sólo influyen en la actividad el número de residuos en la periferia sino la arquitectura que confiere a la molécula la naturaleza del núcleo central. Esto queda patente al comparar el trímero de Tyr con TREN como núcleo central (**80**) que es inactivo, frente al trímero de Tyr con un esqueleto de trietilbenceno (**81**), con un valor de CE_{50} de 22 μM .

Por otro lado, con tres de los trímeros con esqueleto de trietilbenceno (compuestos **77**, **81** y **90**), el grupo del Prof. Jan Balzarini está llevando a cabo experimentos para la obtención de cepas de VIH resistentes a la presión de estos compuestos, y así poder determinar si existe pérdida de sitios de *N*-glicosilación en la gp120 de estas cepas resistentes.

Estudios de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

Uno de los objetivos principales de este trabajo era obtener compuestos capaces de interactuar con la glicoproteína gp120 presente en la envoltura del VIH. Para medir esta interacción se ha utilizado la técnica de resonancia de plasmón superficial o SPR. Este trabajo se realizó en el Instituto Rega de la Universidad Católica de Lovaina bajo la supervisión del Dr. Jan Balzarini durante una estancia predoctoral de tres meses en ese centro.

Introducción a la resonancia de plasmón superficial (SPR)

Desde el desarrollo en 1990 del primer biosensor basado en resonancia de plasmón superficial (SPR), el uso de esta técnica se ha incrementado notablemente y su empleo se ha extendido a campos muy diversos. Así, se utiliza en control de calidad de alimentos para la detección de patógenos, toxinas y/o sustancias perniciosas para la salud⁹⁵. También está siendo ampliamente utilizada en diagnósticos clínicos para la detección de marcadores cancerígenos o de otras patologías, o en la detección de anticuerpos frente a diversos virus. Por otro lado, en los últimos años se ha incrementado considerablemente su utilización en el descubrimiento de fármacos, ya que los equipos más modernos permiten detectar interacciones con compuestos de bajo peso molecular.

La resonancia de plasmón superficial destaca por su gran versatilidad, puesto que permite el análisis de interacciones entre moléculas de muy diferente naturaleza y tamaño, en tiempo real y sin necesidad de ningún tipo de marcaje enzimático, fluorescente o radioactivo. Así, se pueden estudiar interacciones donde intervienen células, proteínas, ácidos nucleicos, glicanos e incluso compuestos de bajo peso molecular. Por otro lado, además de poder determinar constantes de afinidad a partir de estudios basados en el equilibrio, se pueden realizar estudios cinéticos, los cuales proporcionan información detallada acerca de la velocidad de formación y disociación del complejo⁹⁶.

La primera observación de un plasmón superficial fue hecha por Wood en 1902, al observar anomalías en el espectro de la luz difractada en una rejilla metálica de difracción. La resonancia de plasmón superficial es un fenómeno óptico que ocurre bajo condiciones de reflexión total interna de una luz polarizada plana, en la interfaz de dos medios con diferente índice de refracción, como puede ser un prisma y la disolución que contiene el analito (Figura 33A). El prisma se encuentra en contacto con una capa de un metal conductor de electrones que suele ser oro. La luz incidente interactúa con la nube de electrones libres de la superficie del metal (plasmones superficiales), generando una onda de energía

superficial que origina una caída en la intensidad de la luz reflejada. La intensidad de la luz reflejada es monitorizada en continuo en función del ángulo al que incide la luz (Figura 33B superior), con el objetivo de determinar a qué ángulo de incidencia la intensidad de la luz reflejada es mínima. Este ángulo, denominado ángulo de resonancia θ_{SPR} , es el que se determina con mayor sensibilidad puesto que corresponde al mínimo de la curva obtenida, y varía con el cambio en el índice de refracción en las proximidades de la superficie metálica⁹⁵. El ángulo de resonancia señalado como 1 en la Figura 33B superior es el que se obtendría si sólo pasase disolución tampón sin analito. Cuando se hace pasar el analito y éste se une a la superficie, el índice de refracción aumenta y el ángulo de resonancia pasa a la posición 2. Una variación de 10^{-6} en el índice de refracción origina un cambio de 10^{-4} grados en el ángulo de resonancia, lo cual se define como 1 RU (Unidades de Resonancia). La diferencia entre los ángulos a los cuales esta resonancia se produce es proporcional a la cantidad de sustrato unido a la superficie, mientras que la velocidad a la que se produce el cambio del ángulo depende de la cinética de la interacción. Cuando se representa la respuesta en RU en función del tiempo, se obtiene un sensograma como el representado en la gráfica inferior de la Figura 33B. El sensograma refleja la variación de la masa unida al biosensor durante el experimento.

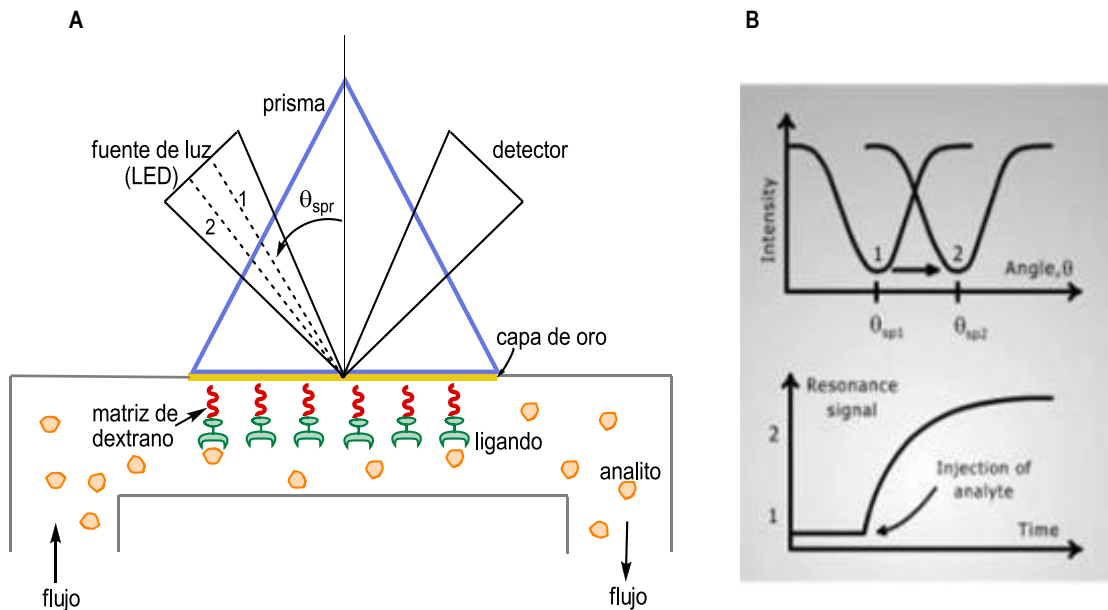


Figura 33. A: Diagrama esquemático de un biosensor basado en SPR; B: Sensograma obtenido

En la Figura 34 se representan en un sensograma las etapas de un experimento de SPR que se comentan a continuación.

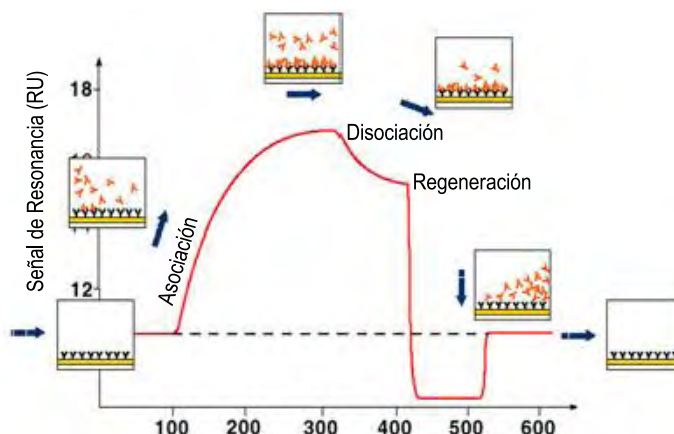


Figura 34. Sensograma donde se ilustran las etapas de un experimento de SPR

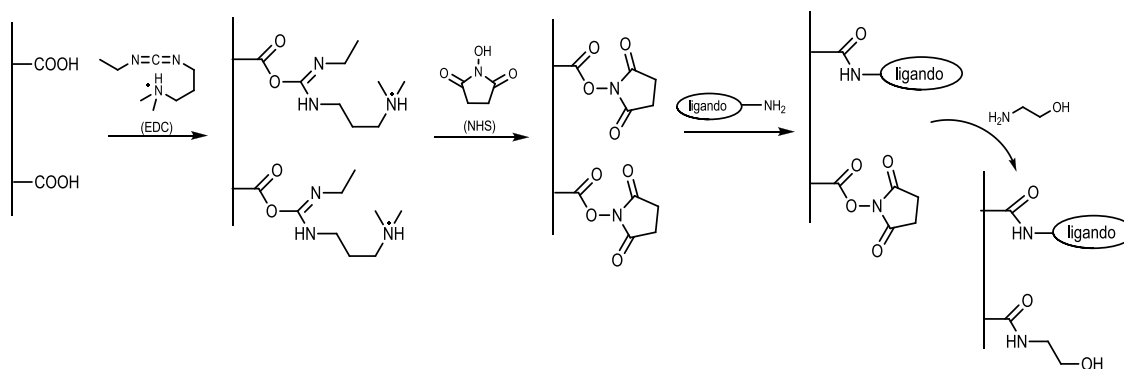
Sobre la superficie del chip biosensor, se inmoviliza el ligando como comentaremos posteriormente. Durante unos segundos, se hace pasar disolución tampón y se obtiene una línea base. A continuación se inyecta la muestra. Si el analito contenido en la muestra se une al ligando, se produce un incremento de la señal de resonancia. En esta etapa, llamada fase de asociación, el flujo y la concentración de analito se mantienen constantes durante unos minutos que dependerán de la cinética de la interacción. Del estudio de la fase de asociación a diferentes concentraciones de analito, se puede obtener la constante de velocidad de asociación. Si el tiempo que dura la fase de asociación es lo suficientemente largo, se puede llegar a alcanzar un estado de equilibrio en el que la velocidad de asociación del analito iguala a la velocidad de disociación. En este punto, la curva alcanza un *plateau* y la intensidad máxima alcanzada (R_{max}) permanece constante en el tiempo. El estudio de la intensidad máxima en el equilibrio para diferentes concentraciones de analito permite determinar la constante de afinidad (K_A) del complejo formado. Posteriormente, se procede a la inyección de una disolución tampón y comienza la fase de disociación, donde el analito es desplazado por las moléculas de disolución tampón, a una velocidad que dependerá de la cinética de disociación. Del análisis de las curvas de disociación a diferentes concentraciones de analito puede determinarse la constante de velocidad de disociación⁹⁷. A continuación se realiza la etapa de regeneración durante la cual se pretende eliminar las moléculas de analito que hayan podido quedar unidas al ligando tras la fase de disociación, de forma que la superficie del chip biosensor con el ligando queda lista para un nuevo ciclo experimental. Esto se refleja en el sensograma cuando la señal vuelve a la línea base inicial. Una regeneración eficiente que elimine cualquier molécula de analito sin dañar al ligando anclado es crucial para obtener reproducibilidad en los experimentos.

Actualmente existen diversos equipos que emplean el fenómeno de la SPR para la detección de interacciones. Para nuestro estudio se empleó un equipo Biacore T100 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia).

Preparación de la superficie del chip biosensor y condiciones experimentales

Los chips biosensores típicos poseen cuatro canales conectados, y están recubiertos con un hidrogel de carboximetildextrano (CM-dextrano), muy hidrofílico, lo que incrementa la capacidad de unión de la superficie a la vez que minimiza las interacciones inespecíficas. La matriz de dextrano es flexible, de forma que los ligandos anclados poseen cierta capacidad de movimiento en la superficie, mientras que los grupos carboxilos son empleados para la inmovilización covalente de ligandos. El chip más comúnmente empleado es el CM5, pero existen otros como el CM4 y el CM3 con una menor densidad de grupos carboxilo. De los cuatro canales del chip biosensor, al menos uno se deja libre, sin ligando, para emplearlo como canal de referencia. En los tres canales restantes se pueden inmovilizar uno o varios ligandos de interés.

En este trabajo se inmovilizaron como ligandos las glicoproteínas recombinantes gp120 y gp41 de la cubierta viral procedentes de la cepa IIB del VIH-1 (ImmunoDiagnostics Inc., Woburn, MA), producidas en cultivo de células de ovarios de hámster chino, y la albúmina de suero humano (HSA) muy abundante en el plasma sanguíneo. Esta proteína fue inmovilizada con el objetivo de determinar si los compuestos estudiados podían unirse de forma inespecífica a otras proteínas que no fuesen las de interés, gp120 y gp41. Así, las tres proteínas HSA, gp120 y gp41 fueron ancladas de forma covalente a la matriz de carboxidextrano de un chip sensor CM5, mediante reacción de los grupos amino primario de residuos de lisina con los carboxilos de la matriz de dextrano. Para ello se empleó el protocolo estándar basado en la activación de los grupos carboxilo mediante tratamiento con EDC/NHS⁹⁸ (Esquema 24). Así, a los cuatro canales del chip se les inyectó una mezcla 1:1 de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0.4 M y de N-hidroxisuccinimida (NHS) 0.1 M. A continuación se inyectó HSA en el canal 2, gp120 en el canal 3 y gp41 en el canal 4, todas ellas a una concentración de 10 mM y en disolución tampón de acetato sódico a pH 4, hasta alcanzar una densidad de 3300 RU para HSA, 3000 RU para gp120 y 2000 RU para gp41. El canal 1 se dejó libre de proteína para emplearlo como superficie de referencia. Para bloquear los grupos carboxilo del carboxidextrano activados que no hubieran reaccionado con las proteínas, a todos los canales se les inyectó una disolución de etanolamina 1M, siguiendo el procedimiento estándar.



Esquema 24. Inmovilización de ligando a través de su grupo amino

Todos los estudios de interacción fueron realizados a 25 °C en un Biacore T100 y los resultados han sido analizados con el software Biacore T100 Evaluation version 2.0.2.

Los compuestos o analitos fueron diluidos en disolución tampón HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl y 0,05% surfactante P20; pH 7.4), con un 5% de DMSO y en presencia de Ca²⁺ 10 mM. Las muestras fueron inyectadas durante tres minutos a una velocidad de flujo de 30 µl/min, seguido de una fase de disociación de 5 minutos. Para eliminar la contribución del DMSO a la respuesta obtenida, se introdujo una corrección basada en la respuesta observada para una serie de disoluciones con concentraciones de DMSO variables entre 4.5% y 5.8%. La superficie del chip sensor CM5 se regeneró mediante una inyección de NaOH 50 mM durante 5 segundos, a una velocidad de flujo de 100 µl/min. En nuestros estudios empleamos pradimicina-A (PRM-A) como compuesto de referencia, pues como se comentó en la introducción, este antibiótico no peptídico se une a la gp120 del VIH, probablemente mediante interacción con los residuos de manosa. De esta forma, PRM-A fue empleada en todos los experimentos como control positivo de interacción y al mismo tiempo como control del estado del chip. De forma sistemática la concentración de PRM-A en los experimentos fue de 8 µM mientras que la concentración de los compuestos en estudio fue de 50 µM.

Estudios de la interacción de los compuestos con las proteínas gp120, gp41 y HSA

Los monómeros, dímeros y trímeros en forma de ácidos carboxílicos fueron ensayados frente a la proteína viral gp120 empleando SPR. Para los monómeros y dímeros las señales obtenidas fueron casi inexistentes o muy débiles. Con los trímeros se obtuvieron resultados interesantes que se comentan a continuación.

Cuando los trímeros de trietilbenceno en forma de éster metílico **75**, **79** y **80** (Figura 35A) fueron evaluados frente a las proteínas gp120, gp41 y HSA mediante experimentos de SPR, no se obtuvo señal significativa, como se muestra en el sensograma de la Figura 35B. En ese sensograma se puede observar como la PRM-A, utilizado como compuesto de referencia, se une con gran afinidad a gp120 y gp41. Además, esta unión es específica, pues no se detecta interacción con la proteína HSA.

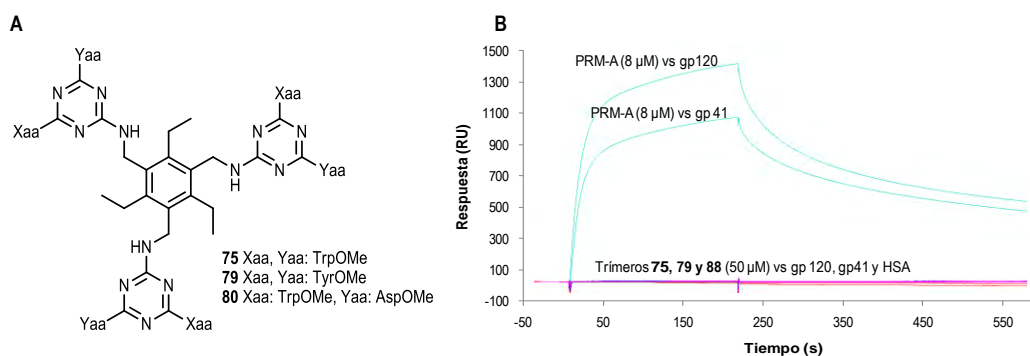


Figura 35. A: Estructura de los trímeros ensayados. **B:** Sensograma obtenido con dichos trímeros y PRM-A como referencia

Sin embargo, los ensayos realizados en SPR con los trímeros análogos en forma de ácidos carboxílicos **77**, **81** y **90** (Figura 36A), indicaron cierta afinidad por la glicoproteína viral gp120 y los sensogramas obtenidos se representan en la Figura 36B.

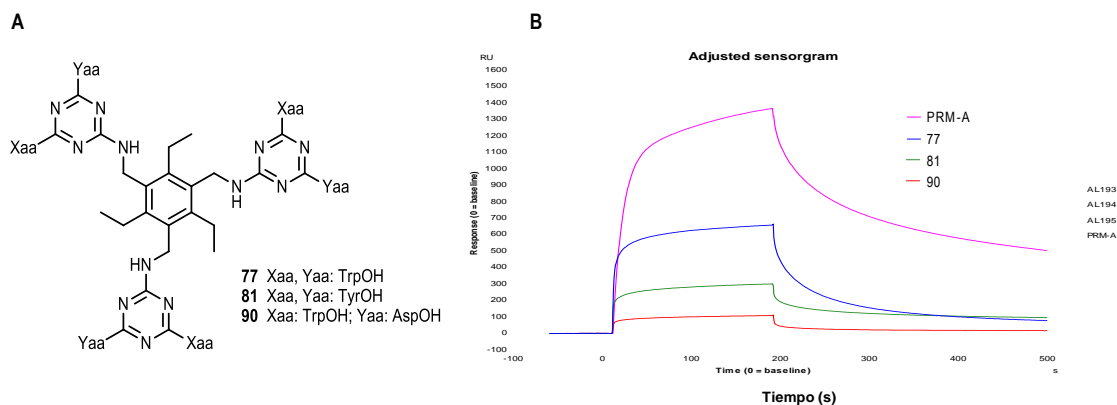


Figura 36. A: Estructura de los trímeros desprotegidos ensayados. **B:** Sensograma obtenido con los trímeros de la Figura 34A y PRM-A como referencia

El compuesto que dio lugar a una interacción mayor fue el derivado de Trp **77** (curva en azul), con una R_{max}=658 RUs. El trímero derivado de tirosina **81** (curva en verde) también se unió a gp120 con una respuesta máxima de 299 RU, mientras que el trímero mixto de triptófano y aspártico **90** (curva en rojo) fue el que dio lugar a una señal menor con una R_{max}=109 RU. En todos los casos, la interacción es menor que la observada con el compuesto patrón PRM-A (curva en rosa).

El sensograma representado en la Figura 37 indica que los tres compuestos también interactúan con la albúmina de suero humano (HSA) aunque en menor medida que con la proteína viral gp120.

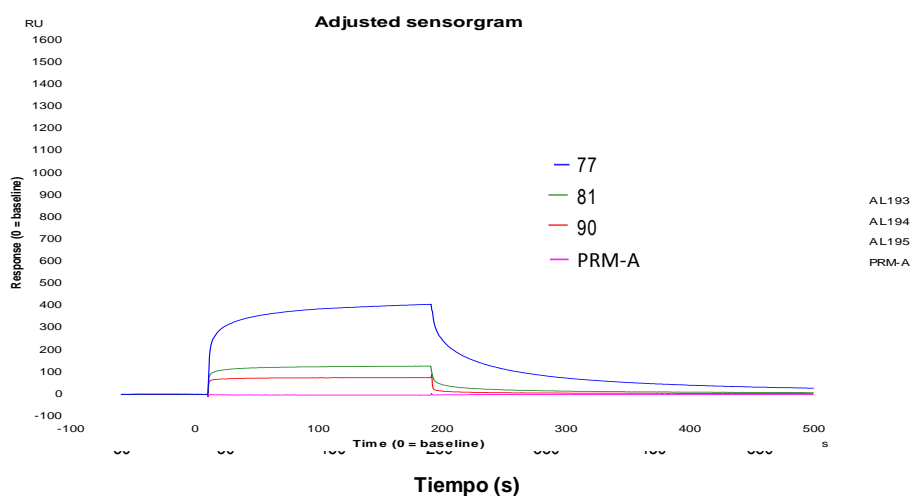


Figura 37. Sensogramas de la interacción de los trímeros de trietilbenceno **77**, **81** y **90** con HSA

Puesto que la densidad de proteína inmovilizada en el chip es muy similar en los ensayos con gp120 y HSA (3000 y 3300 RU respectivamente), se puede concluir que la interacción de los tres compuestos con HSA es menor que con la proteína viral gp120, especialmente en el caso del derivado de Trp. Los tres trímeros también mostraron interacción con la glicoproteína viral gp41, si bien en este caso los valores no son comparables ya que la densidad del chip fue notablemente inferior (1900 RUs) (no se muestra sensograma).

El carácter polianiónico de estos compuestos podría favorecer la interacción con la albúmina de suero humano, ya que como se recoge en la bibliografía, son muy numerosos los compuestos aniónicos que pueden interaccionar con esta proteína del plasma⁹⁹⁻¹⁰⁰.

Ya que el trímero de trietilbenceno con Trp (**77**) era el que daba lugar a una mayor interacción con gp120 como se acaba de comentar, se procedió a ensayar en las mismas condiciones el trímero de Trp con TREN (**76**) para determinar la importancia del núcleo central. Recordemos que ambos compuestos presentaban valores de CE₅₀ comparables en cultivo celular. Los resultados obtenidos de la SPR se recogen en el sensograma de la Figura 38.

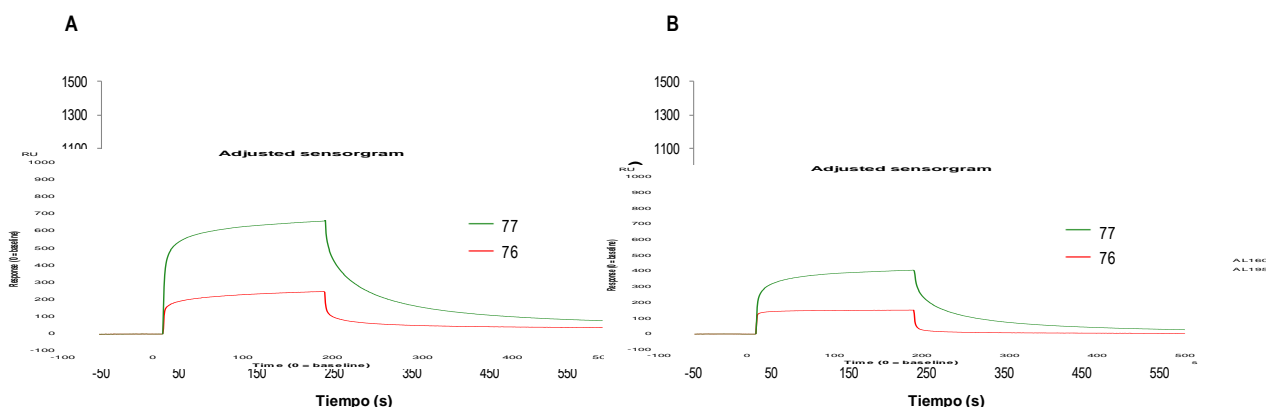


Figura 38. Sensogramas obtenidos para **77** y **76** frente a gp120 (**A**) y HSA (**B**)

El trímero de trietilbenceno con Trp **77** (curva en verde) presenta una interacción tres veces superior a la de su análogo con TREN como núcleo central **76** (curva en rojo) frente a gp120 (Figura 37A). Ambos compuestos también se unen a HSA aunque con menor afinidad que a gp120 (Figura 37B) y también en este caso la afinidad del trímero de trietilbenceno es mayor que la del derivado de TREN.

El sensograma de la Figura 39 se compara la unión a gp120 del trímero de Trp **77**, del trímero mixto derivado de Trp y Tyr **85** y del trímero de Tyr **81**, los tres compuestos a una concentración de 50 μ M. Para este experimento se empleó un chip donde la densidad de gp120 era de 1407 RUs.

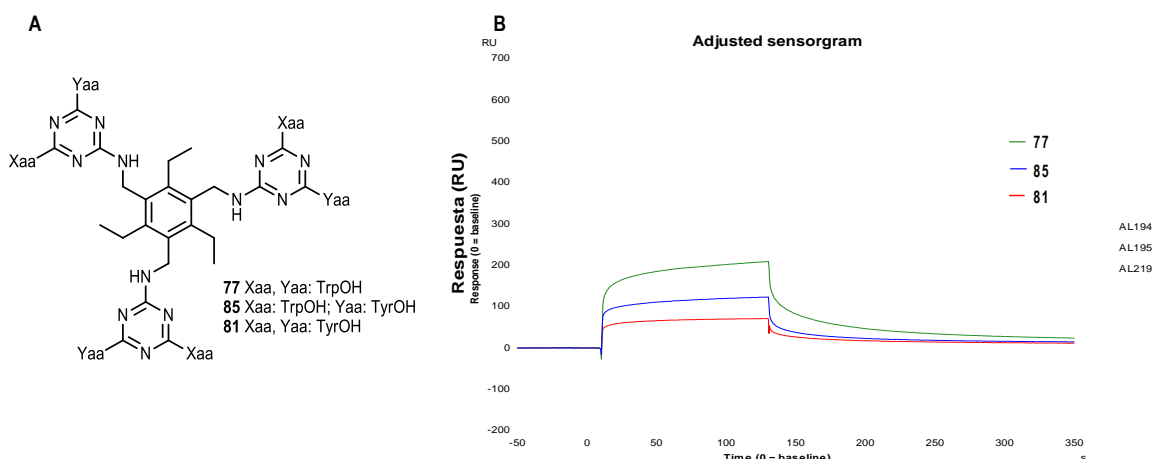


Figura 39. A: Estructura de los trímeros ensayados. B: Sensorgrama obtenido para los trímeros **77**, **85** y **81** frente a gp120

La máxima respuesta se obtiene para el trímero de Trp **77** seguido del trímero mixto de Trp y Tyr **85** y por último el trímero de Tyr **81**, ilustrando la importancia de los residuos de triptófano en la interacción con gp120.

También se realizaron estudios comparando la interacción del trímero de Trp **77** y su análogo mixto **96** donde una unidad de Trp en cada triazina había sido sustituida por una triptamina (“triptófano descarboxilado”). El sensorgrama obtenido para el compuesto **96** (curva en verde de la Figura 40) indica claramente que esta sustitución conduce a la pérdida de la capacidad de unión a gp120.

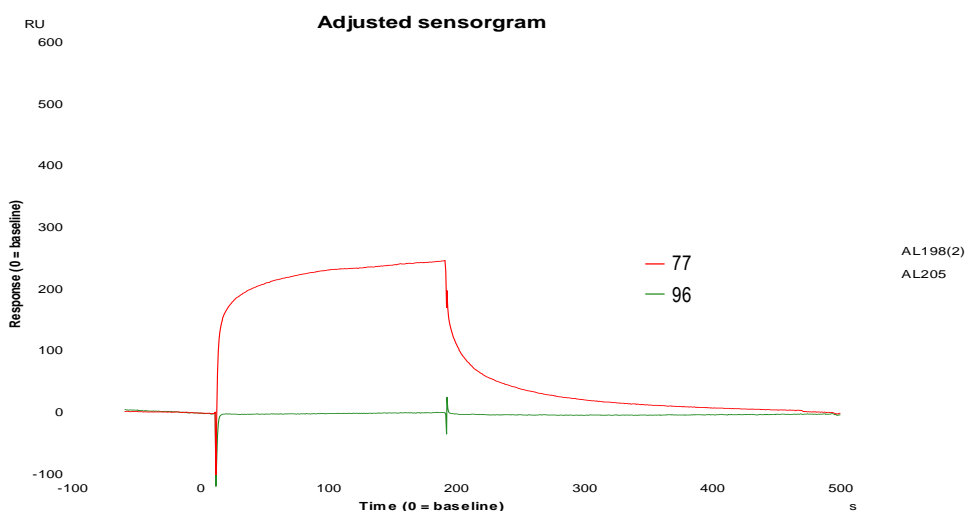


Figura 40. Trímero **77** y su análogo mixto con triptófano/triptamina **96** frente a gp120

Estudios adicionales de la interacción del compuesto **77** y gp120 por SPR

De todos los trímeros ensayados, el derivado de triptófano con trietilbenceno como espaciador (**77**) era el que presentaba mayor afinidad por la glicoproteína gp120, por lo que se decidió estudiar con más detalle la naturaleza de esta interacción mediante diversos experimentos que se describen a continuación. Con el fin de mejorar su solubilidad en agua, el compuesto **77** fue transformado en su sal sódica (**77S**) mediante tratamiento con NaHCO₃ (6 equivalentes) en una mezcla acetona:H₂O. Tras solubilizarse el compuesto, la mezcla fue liofilizada. Como cabía esperar, tanto el compuesto con los grupos ácidos libres (curva roja, Figura 41) como el compuesto en forma de sal sódica (curva verde) mostraron un comportamiento equivalente en los experimentos de SPR.

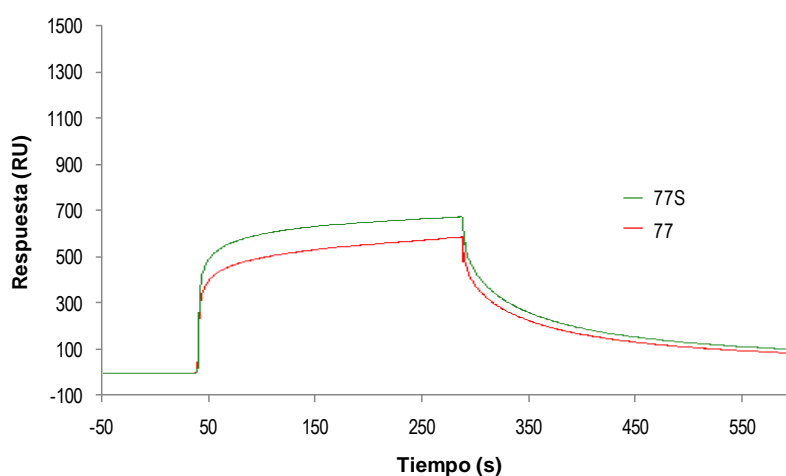


Figura 41. Comportamiento del trímero **77** y su sal sódica **77S** frente a gp120

Como se ha comentado en la introducción, la glicoproteína gp120 es rica en residuos de manosa y *N*-acetilglucosamina, y las lectinas son capaces de unirse a estos glicósidos. De un modo similar, para los miméticos de lectinas como pradimicina A o su análogo soluble pradimicina S, se ha propuesto la capacidad de interacción con estos glicósidos, en particular con glicanos ricos en manosa⁴⁸. Así, en experimentos de SPR sobre gp120 inmovilizada, la presencia de trímeros de manosa junto a pradimicina S hace que la interacción de PRM-S con gp120 disminuya⁴⁹. Por ello, con el fin de profundizar en el modo de interacción del trímero **77** y gp120, se realizaron experimentos de SPR en presencia de tres trisacáridos: (α -1,2)-manotriosa, (α -1,3)(α -1,6)-manotriosa y (β -1,4)-*N*-acetilglucotriosa, a una concentración cuatro veces mayor que la del compuesto en estudio **77** (curva roja, solapando con la rosa, Figura 42). Como puede observarse la presencia de los trisacáridos no influye en la capacidad de unión de **77** a gp120. Esto podría sugerir que la interacción entre gp120 y el compuesto **77** no se produce a nivel de los sacáridos de la gp120. Estos resultados condujeron a realizar otros estudios.

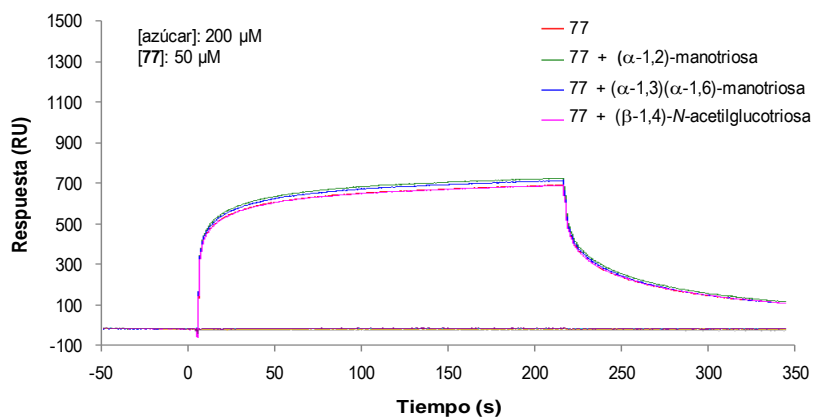


Figura 42. Experimentos de competición con trisacáridos

Como comentábamos en la introducción, en la bibliografía se encuentran descritos numerosos compuestos capaces de impedir la entrada del VIH a la célula huésped, y en algunos casos se ha propuesto que esa capacidad está vinculada a su interacción con la gp120 viral. En concreto el lazo V3 de la glicoproteína viral gp120 es muy rico en aminoácidos básicos, por lo que está cargado positivamente a pH fisiológico. Así, no es de extrañar que muchos de los compuestos que se unen a la gp120 sean compuestos de naturaleza polianiónica. Uno de los compuestos polianiónicos más estudiados es la suramina, (**2**, peso molecular: 1429) un compuesto dimérico de naftalenos sulfonados que se une al lazo V3 de la gp120 del VIH-1¹⁰¹ y posee una CE₅₀ frente a VIH-1 de 28 μg/ml.

Con el objetivo de comparar el comportamiento de la sal sódica del trímero de triptófano, **77S** (50 μM), con el de la suramina (50 μM), ambos compuestos fueron ensayados frente a gp120. En el sensorgrama de la Figura 43 se recogen los resultados obtenidos.

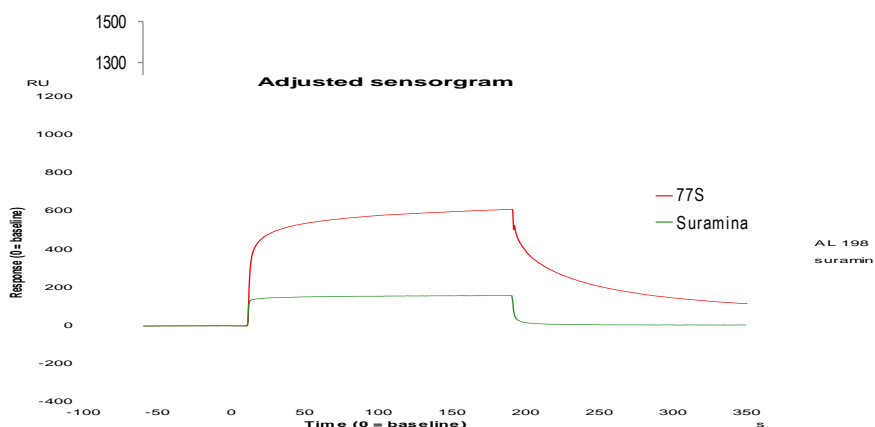


Figura 43. El compuesto **77S** y suramina frente a gp120

Como puede observarse y puesto que el peso molecular de ambos compuestos es comparable, el compuesto **77S** (curva en rojo) se une 4 veces mejor a gp120 que la suramina (curva en verde). Ahora bien, el comportamiento de los dos compuestos es bastante diferente si analizamos la forma de la curva, la cual indica que la interacción de suramina con gp120 se caracteriza por perfiles de asociación y disociación muy rápidos.

Como se comentaba en la introducción, otro compuesto polianiónico que ha recibido mucho interés en los últimos años es el PRO2000 (1), un polímero derivado de naftalenos sulfonados con actividad anti-VIH *in vitro* y del que se han realizado ensayos clínicos como microbicida. El mecanismo de acción de Pro2000 no está completamente elucidado, pero se sabe que es capaz de interactuar con la gp120 viral²⁰. Por ello se ensayaron en las mismas condiciones el PRO2000 (50 μ M) y el trímero **77S** (50 μ M) frente a gp120 (Figura 44).

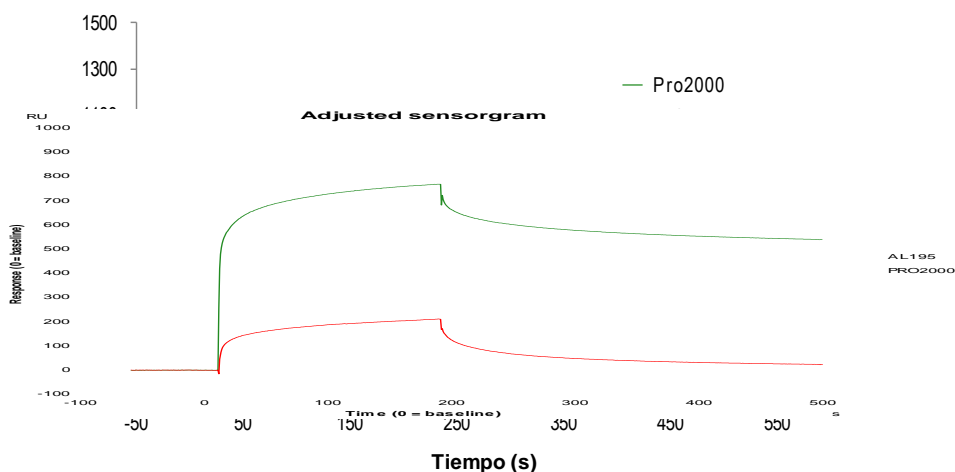


Figura 44. PRO2000 y el compuesto **77S** frente a gp120

En el sensograma de la Figura 44 se puede observar que aunque PRO2000 origina una mayor respuesta en RUs frente a gp120, los perfiles de asociación y disociación de PRO2000 y el compuesto **77S** se asemejan considerablemente. No obstante, la curva obtenida para **77S** presentaba una intensidad menor que en otros ensayos ($R_{max}=200$ RU), siendo la densidad de gp120 en el chip la misma que para los otros ensayos (3300 RUs). Tras una revisión minuciosa del sensograma y analizando la secuencia del ensayo, se pudo observar que tras el ensayo con PRO2000, la regeneración de la superficie del chip no alcanzó la línea base, como se muestra en la Figura 45 (curva en verde). Por tanto, parte del PRO2000 permanecía unido a la superficie del chip cuando se realizó la inyección del compuesto **77S**. El hecho de que la señal obtenida para **77S** fuese menor que en ensayos similares parecía indicar que la presencia de PRO2000 afectaba a la unión del compuesto **77S** a gp120.

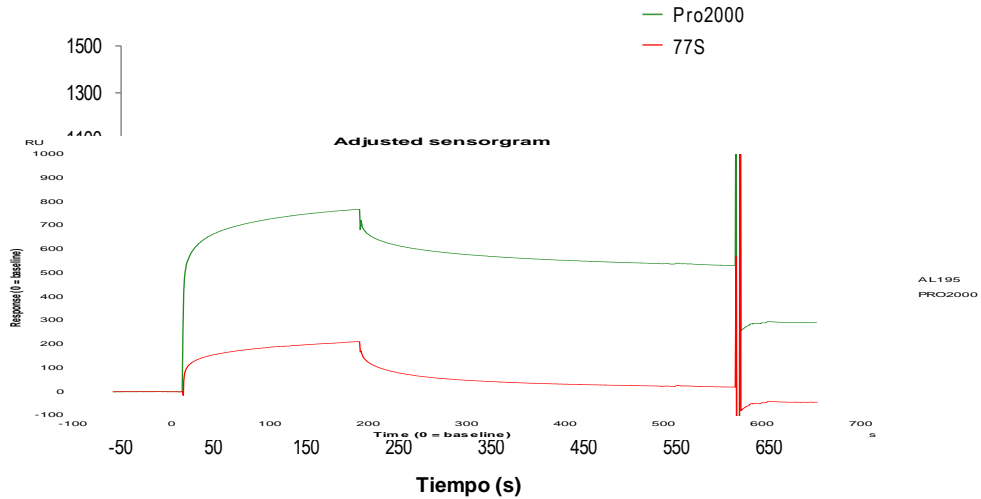


Figura 45. Regeneración ineficiente de la superficie tras la inyección de PRO2000

Por ello, se realizaron experimentos adicionales. En primer lugar se inyectó PRO2000 a una concentración de $250 \mu\text{M}$ durante 180 segundos, con el objetivo de saturar los sitios de unión en gp120. Tras este tiempo, se realizó una segunda inyección de una disolución que contenía el compuesto **77S** a $50 \mu\text{M}$ + PRO2000 $250 \mu\text{M}$, durante otros 180 segundos (Figura 46, Sensograma I). Tras el tiempo global de 360 segundos, la respuesta alcanzada en el Sensograma I es de 370 RU. Por otro lado, se realizó una inyección de PRO2000, en ausencia de **77S**, a una concentración de $250 \mu\text{M}$ y se evaluó la unión tras 360 segundos (Sensograma II). La respuesta alcanzada (376 RUs) es prácticamente idéntica a la del Sensograma I.

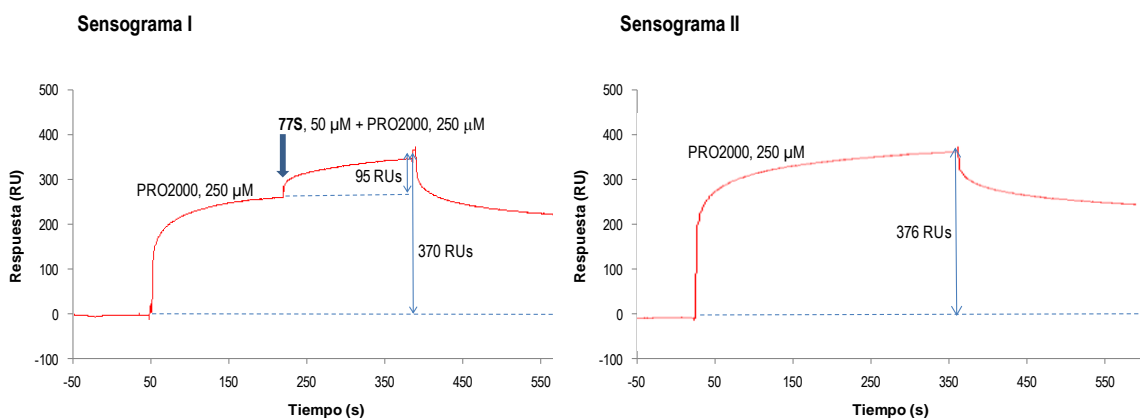


Figura 46. Experimentos de co-inyección de PRO2000 y 77S

Por tanto, la respuesta en RUs para PRO2000 tras 360 segundos es prácticamente idéntica en presencia o en ausencia de **77S**. Puesto que la unión del compuesto **77S** a gp120 ya se había determinado con experimentos previos, de los sensogramas de la Figura 45 se podría deducir que la

presencia de PRO2000 es capaz de bloquear la unión del compuesto **77S** a gp120. Esto podría ser debido a que ambos compuestos compiten por el mismo sitio de unión, y/o a que la presencia de PRO2000 dificulta el acceso de **77S** a gp120. Este segundo supuesto es posible ya que ambos compuestos son de naturaleza aniónica y por tanto podrían repelerse entre ellos.

Por otro lado, con objeto de estudiar la influencia de la naturaleza polianiónica del compuesto **77S** en la interacción con gp120, se realizaron diferentes experimentos, los cuales se describen a continuación:

Se estudió como influía la concentración de Ca^{2+} en la interacción de **77S** con gp120. Para ello se preparó la disolución tampón a diferentes concentraciones de Ca^{2+} : 3 mM, 10 mM y 100 mM. Los resultados obtenidos para la interacción de **77S** con gp120, empleando estas disoluciones tampón, se recogen en el sensograma de la Figura 47.

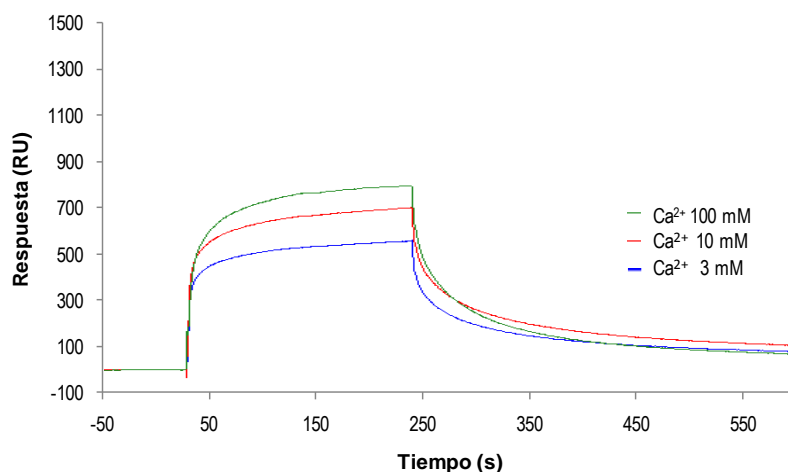


Figura 47. Interacción del compuesto **77S** con gp120, a diferentes concentraciones e Ca^{2+}

Como puede observarse, al aumentar la concentración de Ca^{2+} de 3 mM a 100 mM, aumenta progresivamente la cantidad de **77S** que se une a gp120. Ahora bien la disociación también es más rápida a 100 mM de Ca^{2+} que a 10 mM. Es difícil determinar si estos resultados con concentraciones tan elevadas de Ca^{2+} pueden tener relevancia en el medio biológico. En todo caso conviene recordar que la unión de lectinas como la DC-SIGN a los carbohidratos requiere la presencia de Ca^{2+} ¹⁰². Igualmente la unión de PRM-A a gp120 también es dependiente de Ca^{2+} ⁴⁵.

Por otro lado, también se estudió como influía la presencia de otros cationes en la interacción. La presencia de cationes monovalentes como K^+ o Na^+ a una concentración de 10 mM, no mejoraba la interacción (datos no incluidos). La presencia de cationes divalentes (Figura 48) como Mg^{2+} o Mn^{2+} a 10 mM, mejora la interacción de **77S** con gp120, siendo la interacción mayor con Ca^{2+} a 10 mM.

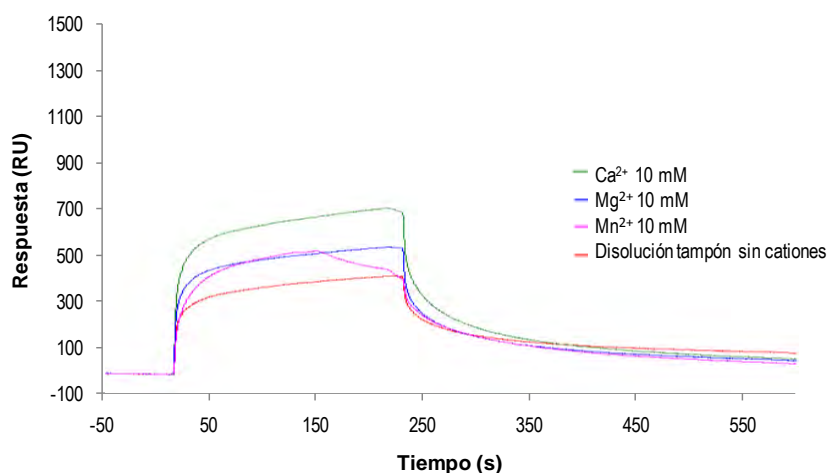


Figura 48. Interacción de 77S con gp120, en presencia de diferentes cationes divalentes

En otra serie de experimentos se evaluó la influencia del pH en la interacción del compuesto **77S** con gp120. Para ello se calculó el punto isoeléctrico de gp120 mediante una aplicación informática del Instituto Suizo de Bioinformática¹⁰³, resultando un punto isoeléctrico de 8.95. Este dato concuerda con otros valores calculados recogidos en la bibliografía¹⁰⁴. De esta forma, para el estudio se eligieron valores de pH en torno al punto isoeléctrico de gp120. En la Figura 49 se recoge el sensograma obtenido para el empleo de disoluciones tampón a pH 5.3, 7.3, 8.9 y 10.1.

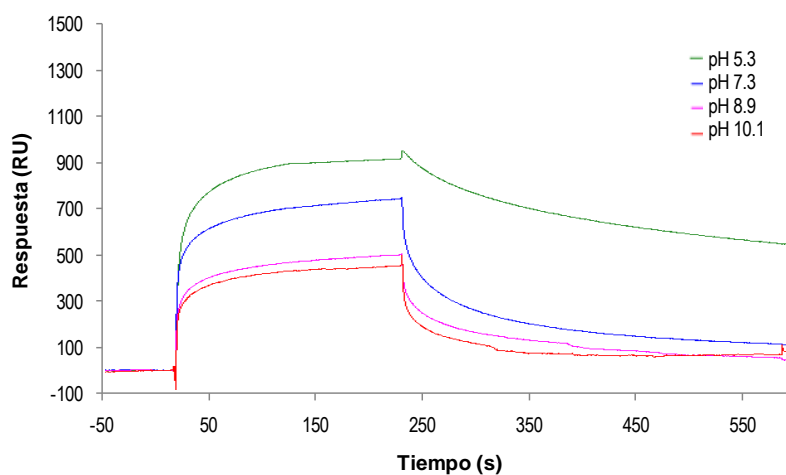


Figura 49. Interacción de 77S con gp120 a diferentes pH

Como se puede observar, cuando el pH coincide con el punto isoeléctrico, 8.9 (curva en magenta), la carga neta de gp120 es cero y **77S** interacciona con gp120 con afinidad moderada. Cuando los experimentos se realizan a pH de 10.1 (curva en rojo), pH al cual gp120 se encuentra cargada

negativamente, la respuesta obtenida es similar a la anterior. No obstante, cuando el pH disminuye hasta 7.3 y la carga neta de gp120 es positiva, se observa una respuesta de mayor intensidad (curva en azul), lo que indica que a este pH la interacción de **77S** con gp120 está más favorecida. La afinidad de **77S** por gp120 es todavía mayor a pH 5.3, donde gp120 posee una alta densidad de carga positiva, dando lugar a una disociación más lenta del complejo **77S**-gp120, que puede ser debido a unas mayores interacciones electrostáticas a este pH. Todos estos datos sugieren que la naturaleza polianiónica del compuesto **77S** podría jugar un papel importante en la interacción con gp120.

Estudios de cinética y afinidad

Con el objetivo de estudiar la cinética y afinidad de la interacción de **77S** con gp120, se realizaron una serie de experimentos de interacción con gp120 a diferentes concentraciones de **77S** (6.2, 12.5, 25.0, 50.0 y 100.0 μM), por duplicado. Los sensogramas obtenidos se recogen en la Figura 50.

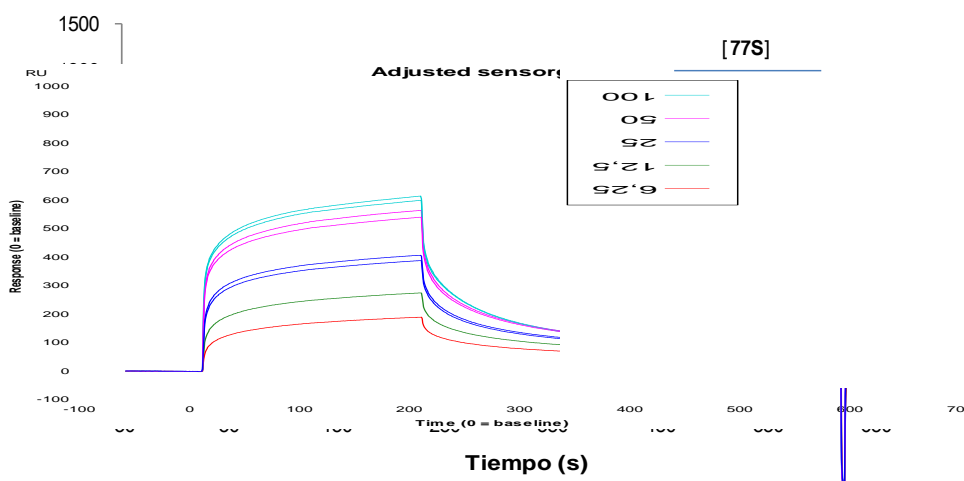


Figura 50. Sensogramas obtenidos a diferentes concentraciones de **77S**

Tras 180 segundos de asociación, se ha alcanzado prácticamente el equilibrio para todas las concentraciones, y se observa saturación para la mayor concentración empleada de 100 μM . Por otro lado, la cinética de disociación del complejo se caracteriza por una fase inicial con una elevada velocidad de disociación, seguida tras 20 segundos de una segunda fase con una velocidad de disociación mucho más lenta.

En general, las interacciones ligando-analito suelen presentar una estequiometría 1:1, ya que las proteínas normalmente presentan un único bolsillo de unión para el analito. No obstante, en el caso de la interacción con gp120, cada molécula de gp120 presenta numerosos sitios de *N*-glicosilación de donde cuelgan los glicanos a los cuales, a su vez, se puede unir más de una molécula de analito. Así, la imposibilidad de ajustar la interacción a un modelo 1:1, junto con la cinética compleja observada,

dificultaron la obtención de valores precisos de las constantes cinéticas de asociación y disociación para la interacción de **77S** con gp120.

Por otro lado, los estudios de afinidad permiten calcular la constante de disociación en el equilibrio (constante de afinidad), K_D , la cual da idea de la fortaleza del complejo formado. A su vez, la constante de asociación en el equilibrio, K_A , indica la cantidad de complejo formado en el equilibrio, donde la velocidad de asociación iguala a la velocidad de disociación. Estos estudios son independientes del tiempo, una vez alcanzado el equilibrio⁹⁷. De un modo general, el cálculo de la constante de disociación para la interacción de una molécula de analito (A) con otra de ligando (L) para dar un complejo (A-L) se realiza a partir de la siguiente ecuación:

$$A + L \rightleftharpoons A-L \quad K_A = \frac{[A-L]_{\text{formado}}}{[A]_{\text{libre}}[L]_{\text{libre}}} \quad \begin{cases} [L]_{\text{libre}} = [L]_{\text{total}} - [A-L]_{\text{formado}} \\ [A]_{\text{libre}} \sim \text{Concentración inicial de analito: } C \end{cases} \quad \begin{cases} [L]_{\text{total}} = R_{\text{max}} \\ [A-L]_{\text{formado}} = R_{\text{eq}} \end{cases}$$

$$\Downarrow$$

$$K_A = \frac{[A-L]_{\text{formado}}}{[A]_{\text{libre}}([L]_{\text{total}} - [A-L]_{\text{formado}})} = \frac{R_{\text{eq}}}{C(R_{\text{max}} - R_{\text{eq}})} \quad (1)$$

Así, cuando $R_{\text{eq}} = \frac{1}{2} R_{\text{max}}$, tras sustituir en la Ecuación 1 se obtiene que $C = 1 / K_A = K_D$

De esta forma, la constante de afinidad, K_D del complejo gp120-**77S**, fue determinada mediante representación de la respuesta obtenida en el equilibrio (R_{eq}) para cada concentración, obteniéndose la gráfica recogida en la Figura 51.

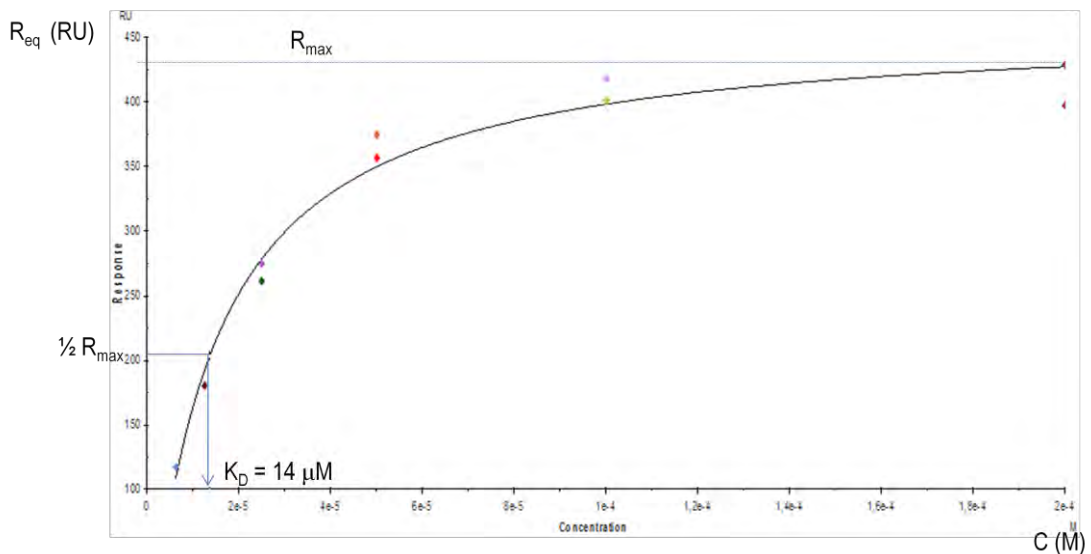


Figura 51. Cálculo de K_D mediante representación de R_{eq} frente a la concentración de **77S** empleada

Así, la K_D para el complejo **77S**-gp120 es de 14 μM . Este dato está próximo a los valores obtenidos para moléculas de adhesión celular, que suelen estar en el rango μM . El valor de K_D obtenido para PRM-A es de 2.7 μM , lo que indica la mayor fortaleza del complejo formado entre PRM-A y gp120.

En conclusión, los datos obtenidos de los experimentos de resonancia de plasmón superficial con los trímeros indican que, al igual que ocurría con los ensayos en cultivo, es necesario que los residuos de aminoácidos de los compuestos se encuentren desprotegidos para que se produzca la unión a gp120, ya que cuando los aminoácidos se encuentran protegidos en forma de éster metílico, no se observa una unión significativa. Analizando los datos sobre la capacidad de unión de los compuestos a gp120, se observa que tanto la naturaleza del núcleo central como los aminoácidos de la periferia tienen una marcada influencia en la capacidad de unión a gp120, habiéndose obtenido los mejores resultados con el trímero L-Trp/L-Trp con un núcleo central de trietilbenceno (compuesto **77**). Los estudios realizados con este compuesto o con su sal sódica (**77S**) apuntan a que la unión que se establece con gp120 se debe, al menos en parte, a su carácter polianiónico, siendo la interacción con gp120 más intensa a valores de pH más bajos, y además, se ve influenciada por la concentración de Ca^{2+} . La capacidad de unión a gp120, especialmente a pH ácido, podría ser una propiedad interesante para su potencial uso como microbicida. Conviene recordar que el reconocimiento de gp120 por las células del huésped es uno de los eventos iniciales en el ciclo replicativo del VIH, de modo que los compuestos capaces de interferir esa unión tienen interés como potenciales microbicidas, particularmente cuando se trata de transmisión sexual. Puesto que el pH vaginal es relativamente ácido, próximo a 4, los compuestos que se unen a gp120 con mayor afinidad a pH ácido, como ocurre con el compuesto **77**, tienen gran interés como potenciales microbicidas.

CONCLUSIONES

Desde un punto de vista sintético, se han preparado tres series de compuestos derivados del anillo de 1,3,5-triazina disustituido con aminoácidos, con objeto de obtener miméticos de lectinas con capacidad para reconocer a los azúcares presentes en la gp120 de la envoltura del VIH-1. En la Serie I se sintetizaron monómeros, es decir, compuestos con un anillo de triazina sustituido con dos aminoácidos aromáticos. En la Serie II se obtuvieron dímeros que poseían dos anillos de triazina separados por un espaciador, incorporando cuatro residuos de aminoácidos. En la Serie III se obtuvieron trímeros, es decir estructuras que incorporaban tres anillos de triazinas conectados a un núcleo central, con seis residuos de aminoácidos en la periferia de la estructura. De esta forma se obtuvieron estructuras con diferente número y disposición de los elementos de reconocimiento propuestos para la interacción con carbohidratos.

La síntesis de estructuras diméricas se consiguió optimizar empleando 0.6 equivalentes de la diamina elegida como espaciador por cada equivalente de triazina disustituida. Por otro lado, el empleo de calentamiento por microondas, si bien no condujo a una mejora significativa de los rendimientos, permitió acortar muy sensiblemente los tiempos de reacción a dos horas, frente a las 24 ó 48 horas de reacción que eran necesarias cuando empleábamos calentamiento tradicional. En el caso de los trímeros, se utilizaron 0.3 equivalentes de la triamina empleada como núcleo central, y el calentamiento por microondas permitió obtener el producto final tras tres horas de reacción. Tiempos mayores de reacción no condujeron a mejores rendimientos.

En la purificación de los compuestos derivados de aminoácidos desprotegidos, se empleó una metodología basada en el “*catch and release*” mediante el uso de resinas de intercambio aniónico, que permitieron el aislamiento rápido y reproducible de los compuestos finales.

Los productos sintetizados fueron ensayados frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2. Los compuestos con los aminoácidos en forma de éster metílico no mostraron actividad antiviral significativa. No obstante, cuando los aminoácidos se encontraban en forma de ácido carboxílico, se encontraron notables diferencias en la actividad anti-VIH entre monómeros, dímeros y trímeros. Los monómeros fueron todos inactivos, mientras que algunos dímeros mostraron una ligera actividad, especialmente cuando los aminoácidos eran triptófanos. Los mejores datos de actividad anti-VIH se obtuvieron con los trímeros, sobre todo con aquellos cuyo núcleo central era la triamina derivada del trietilbenceno. Esta progresión de la actividad anti-VIH, observada al pasar de monómeros a dímeros, y de dímeros a trímeros, está en concordancia con la teoría de la multivalencia, la cual postula un

incremento en la afinidad de unión al aumentar el número de elementos de reconocimiento. El compuesto más activo fue el trímero que presentaba seis unidades de L-Trp en la periferia y un núcleo central de trietilbenceno (compuesto **77**), con un valor de CE_{50} frente a VIH-1 de 16 μ M, y ausencia de citotoxicidad a la máxima concentración ensayada (250 μ M).

La capacidad de los compuestos sintetizados para interactuar con la gp120 presente en la envoltura del virus fue evaluada mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Sólo los trimeros derivados de trietilbenceno mostraron una unión significativa a gp120, siendo la interacción especialmente notable para el trímero sustituido con triptófano, compuesto **77**. Por otro lado, se realizaron estudios adicionales para intentar elucidar el modo de unión de este trímero a gp120 y los resultados preliminares indican que podría tratarse de un mecanismo de interacción similar al que se da entre los polianiones y gp120, si bien deben establecerse otro tipo de interacciones adicionales, ya que la afinidad de unión a gp120 depende de la naturaleza de la cadena lateral del aminoácido y del núcleo central del trímero.

Por tanto podemos concluir que nos hallamos ante una nueva familia de inhibidores de la replicación del VIH-1, con capacidad de unirse a la gp120 viral. La actividad antiviral del compuesto **77** puede considerarse como moderada. No obstante hay que tener en cuenta que para ejercer su acción antiviral, el compuesto no necesita entrar en las células y que además, interactúa “per se” con su diana, la gp120 viral, por lo que no necesita una metabolización o activación celular. Además de su capacidad de unión a gp120, los compuestos son capaces de inhibir la transmisión viral entre células, lo que les convierte en potenciales agentes microbicidas.

BIBLIOGRAFÍA

1. http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700_Epi_Update_2009_en.pdf.
2. Gao, F.; Bailes, E.; Robertson, D. L.; Chen, Y. L.; Rodenburg, C. M.; Michael, S. F.; Cummins, L. B.; Arthur, L. O.; Peeters, M.; Shaw, G. M.; Sharp, P. M.; Hahn, B. H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **1999**, 397, 436-441.
3. Wertheim, J. O.; Worobey, M. Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. *PLoS Comput. Biol.* **2009**, 5, 1-9.
4. Onyango, C. O.; Leligidowicz, A.; Yokoyama, M.; Sato, H.; Song, H. H.; Nakayama, E. E.; Shioda, T.; de Silva, T.; Townend, J.; Jaye, A.; Whittle, H.; Rowland-Jones, S.; Cotten, M. HIV-2 capsids distinguish high and low virus load patients in a West African community cohort. *Vaccine* **2010**, 28, B60-B67.
5. Girard, M. P.; Preziosi, M. P.; Aguado, M. T.; Kieny, M. P. A review of vaccine research and development: Meningococcal disease. *Vaccine* **2006**, 24, 4692-4700.
6. Tatt, I. D.; Barlow, K. L.; Nicoll, A.; Clewley, J. P. The public health significance of HIV-1 subtypes. *Aids* **2001**, 15, S59-S71.
7. Barré-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axlerblin, C.; Vezinetbrun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune-deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220, 868-871.
8. Popovic, M.; Sarngadharan, M. G.; Read, E.; Gallo, R. C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **1984**, 224, 497-500.
9. 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.; 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, 4721-4732.
10. Kilby, J. M.; Lalezari, J. P.; Eron, J. J.; Carlson, M.; Cohen, C.; Arduino, R. C.; Goodgame, J. C.; Gallant, J. E.; Volberding, P.; Murphy, R. L.; Valentine, F.; Saag, M. S.; Nelson, E. L.; Sista, P. R.; Dusek, A. The safety, plasma pharmacokinetics, and antiviral activity of subcutaneous enfuvirtide (T-20), a peptide inhibitor of gp41-mediated virus fusion, in HIV-infected adults. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2002**, 18, 685-693.
11. De Clercq, E. The design of drugs for HIV and HCV. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 1001-1018.
12. Markowitz, M.; Morales-Ramirez, J. O.; Nguyen, B. Y.; Kovacs, C. M.; Steigbigel, R. T.; Cooper, D. A.; Liporace, R.; Schwartz, R.; Isaacs, R.; Gilde, L. R.; Penning, L.; Zhao, J.; Teppler, H.; Protocol 004 Study, T. Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel inhibitor of HIV-1 integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naive HIV-1-infected individuals. *J. Acquired Immune Defic. Syndromes* **2006**, 43, 509-515.

13. Flexner, C. HIV drug development: the next 25 years. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 959-966.
14. Broder, S. Twenty-five years of translational medicine in antiretroviral therapy: promises to keep. *Sci. Transl. Med.* **2010**, 2, 39ps33.
15. Broder, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res.* **2010**, 85, 1-18.
16. Balzarini, J.; Van Damme, L. Microbicide drug candidates to prevent HIV infection. *Lancet* **2007**, 369, 787-797.
17. Haase, A. T. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* **2010**, 464, 217-223.
18. Tilton, J. C.; Doms, R. W. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res.* **2010**, 85, 91-100.
19. Qian, K.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K. H. HIV Entry Inhibitors and Their Potential in HIV Therapy. *Med. Res. Rev.* **2009**, 29, 369-393.
20. Huskens, D.; Vermeire, K.; Profy, A. T.; Schols, D. The candidate sulfonated microbicide, PRO 2000, has potential multiple mechanisms of action against HIV-1. *Antiviral Res.* **2009**, 84, 38-47.
21. <http://www.mdp.mrc.ac.uk/archive.html>.
22. Botos, I.; Wlodawer, A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2005**, 88, 233-282.
23. Scanlan, C. N.; Offer, J.; Zitzmann, N.; Dwek, R. A. Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature* **2007**, 446, 1038-1045.
24. Calarese, D. A.; Lee, H. K.; Huang, C. Y.; Best, M. D.; Astronomo, R. D.; Stanfield, R. L.; Katinger, H.; Burton, D. R.; Wong, C. H.; Wilson, I. A. Dissection of the carbohydrate specificity of the broadly neutralizing-anti-HIV-1 antibody 2G12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 13372-13377.
25. Calarese, D. A.; Scanlan, C. N.; Zwick, M. B.; Deechongkit, S.; Mimura, Y.; Kunert, R.; Zhu, P.; Wormald, M. R.; Stanfield, R. L.; Roux, K. H.; Kelly, J. W.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Katinger, H.; Burton, D. R.; Wilson, I. A. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* **2003**, 300, 2065-2071.
26. Wu, L.; KewalRamani, V. N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 859-868.
27. Walker, L. M. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* **2009**, 326, 285-289.
28. Lis, H.; Sharon, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637-674.
29. Sharon, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 2753-2764.
30. Balzarini, J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. *Antiviral Res.* **2006**, 71, 237-247.

31. Balzarini, J.; Neyts, J.; Schols, D.; Hosoya, M.; Vandamme, E.; Peumans, W.; De Clercq, E. The mannose-specific plant-lectins from *Cymbidium* hybrid and *Epipactis-helleborine* and the (*N*-acetylglucosamine)*N*-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human-immunodeficiency-virus and cytomegalovirus replication *in vitro*. *Antiviral Res.* **1992**, 18, 191-207.
32. Balzarini, J.; Schols, D.; Neyts, J.; Vandamme, E.; Peumans, W.; De Clercq, E. α -(1-3)-D-mannose-specific and α -(1-6)-D-mannose-specific plant-lectins are markedly inhibitory to human-immunodeficiency-virus and cytomegalovirus infections *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, 35, 410-416.
33. Tsai, C. C.; Emau, P.; Jiang, Y. H.; Agy, M. B.; Shattock, R. J.; Schmidt, A.; Morton, W. R.; Gustafson, K. R.; Boyd, M. R. Cyanovirin-N inhibits AIDS virus infections in vaginal transmission models. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2004**, 20, 11-18.
34. Balzarini, J. Targeting the glycans of glycoproteins: a novel paradigm for antiviral therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, 5, 583-597.
35. Balzarini, J.; Van Laethem, K.; Hatse, S.; Froeyen, M.; Van Damme, E.; Bolmstedt, A.; Peumans, W.; De Clercq, E.; 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.
36. Balzarini, J.; Van Laethem, K.; Hatse, S.; Vermeire, K.; De Clercq, E.; Peumans, W.; Van Damme, E.; Vandamme, A. M.; Bolmstedt, A.; Schols, D. Profile of resistance of human immunodeficiency virus to mannose-specific plant lectins. *J. Virol.* **2004**, 78, 10617-10627.
37. Reitter, J. N.; Means, R. E.; Desrosiers, R. C. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat. Med.* **1998**, 4, 679-684.
38. Balzarini, O. Targeting the glycans of gp120: a novel approach aimed at the Achilles heel of HIV. *Lancet Infect. Dis.* **2005**, 5, 726-731.
39. Mazik, M. Design of lectin mimetics. *ChemBioChem* **2008**, 9, 1015-1017.
40. Corzana, F.; Cuesta, I.; Freire, F.; Revuelta, J.; Torrado, M.; Bastida, A.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L. The pattern of distribution of amino groups modulates the structure and dynamics of natural aminoglycosides: Implications for RNA recognition. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2849-2865.
41. Fernández, M. D.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. Molecular recognition of saccharides by proteins. Insights on the origin of the carbohydrate-aromatic interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7379-7386.
42. Laughrey, Z. R.; Kiehna, S. E.; Riemen, A. J.; Waters, M. L. Carbohydrate- π interactions: what are they worth? *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14625-14633.
43. Harata, K. Crystal structures of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-*N*-acetylchitotriose. *J. Mol. Biol.* **2000**, 297, 673-681.
44. Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14922-14933.
45. Balzarini, J.; Van Laethem, K.; Daelemans, D.; Hatse, S.; Bugatti, A.; Rusnati, M.; Igarashi, Y.; Oki, T.; 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, 362-373.
46. Oki, T.; Konishi, M.; Tomatsu, K.; Tomita, K.; Saitoh, K. I.; Tsunakawa, M.; Nishio, M.; Miyaki, T.; Kawaguchi, H. Pradimicin, a novel class of potent antifungal antibiotics. *J. Antibiot.* **1988**, 41, 1701-1704.
 47. Tanabe, A.; Nakashima, H.; Yoshida, O.; Yamamoto, N.; Tenmyo, O.; Oki, T. Inhibitory effect of a new antibiotic, Pradimicin-A on infectivity, cytopathic effect and replication of human immunodeficiency virus *in vitro*. *J. Antibiot.* **1988**, 41, 1708-1710.
 48. Tanabe-Tochikura, A.; Tochikura, T. S.; Yoshida, O.; Oki, T.; Yamamoto, N. Pradimicin-A inhibition of human-immunodeficiency-virus-attenuation by mannan. *Virology* **1990**, 176, 467-473.
 49. Balzarini, J.; Francois, K. O.; Van Laethem, K.; Hoorelbeke, B.; Renders, M.; Auwerx, J.; Liekens, S.; Oki, T.; Igarashi, Y.; Schols, D. Pradimicin S, a highly soluble nonpeptidic small-size carbohydrate-binding antibiotic, is an anti-HIV drug lead for both microbicidal and systemic use. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 1425-1435.
 50. Vzorov, A. N.; Marzilli, L. G.; Compans, R. W.; Dixon, D. W. Prevention of HIV-1 infection by phthalocyanines. *Antiviral Res.* **2003**, 59, 99-109.
 51. Francois, K. O.; Pannecouque, C.; Auwerx, J.; Lozano, V.; Pérez-Pérez, M. J.; Schols, D.; Balzarini, J. The phthalocyanine prototype derivative alcian blue Is the first synthetic agent with selective anti-human immunodeficiency virus activity due to its gp120 glycan-binding potential. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 4852-4859.
 52. Davis, A. P. Synthetic lectins. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 3629-3638.
 53. Mazik, M. Molecular recognition of carbohydrates by acyclic receptors employing noncovalent interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 935-956.
 54. Walker, D. B.; Joshi, G.; Davis, A. P. Progress in biomimetic carbohydrate recognition. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 3177-3191.
 55. Jin, S.; Cheng, Y. F.; Reid, S.; Li, M. Y.; Wang, B. H. Carbohydrate recognition by boronolactins, small molecules, and lectins. *Med. Res. Rev.* **2010**, 30, 171-257.
 56. Francesconi, O.; Lenco, A.; Moneti, G.; Nativi, C.; Roelens, S. A self-assembled pyrrolic cage receptor specifically recognizes β -glucopyranosides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6693-6696.
 57. Mazik, M.; König, A. Recognition properties of an acyclic biphenyl-based receptor toward carbohydrates. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 7854-7857.
 58. Jay, J. I.; Lai, B. E.; Myszka, D. G.; Mahalingam, A.; Langheinrich, K.; Katz, D. F.; Kiser, P. F. Multivalent benzoboroxole functionalized polymers as gp120 glycan targeted microbicide entry inhibitors. *Mol. Pharmaceutics* **2010**, 7, 116-129.
 59. Ferrand, Y.; Crump, M. P.; Davis, A. P. A synthetic lectin analog for biomimetic disaccharide recognition. *Science* **2007**, 318, 619-622.
 60. Gamez, P.; Reedijk, J. 1,3,5-triazine-based synthons in supramolecular chemistry. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 29-42.
 61. Mooibroek, T. J.; Gamez, P. The s-triazine ring, a remarkable unit to generate supramolecular interactions. *Inorg. Chim. Acta* **2007**, 360, 381-404.

62. Yaguchi, S. I.; Fukui, L.; Koshimizu, K.; Yoshimi, H.; Matsuno, T.; Gouda, H.; Hirono, S.; Yamazaki, K.; Yamori, T. Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, 98, 545-556.
63. Saleh, M.; Abbott, S.; Perron, V.; Lauzon, C.; Penney, C.; Zacharie, B. Synthesis and antimicrobial activity of 2-fluorophenyl-4,6-disubstituted 1,3,5 triazines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 945-949.
64. Zhou, Y. F.; Sun, Z. X.; Froelich, J. M.; Hermann, T.; Wall, D. Structure-activity relationships of novel antibacterial translation inhibitors: 3,5-Diamino-piperidinyl triazines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 5451-5456.
65. Zacharie, B.; Abbott, S. D.; Bienvenu, J. F.; Cameron, A. D.; Cloutier, J.; Duceppe, J. S.; Ezzitouni, A.; Fortin, D.; Houde, K.; Lauzon, C.; Moreau, N.; Perron, V.; Wilb, N.; Asselin, M.; Doucet, A.; Fafard, M. E.; Gaudreau, D.; Grouix, B.; Sarra-Bournet, F.; St-Amant, N.; Gagnon, L.; Penney, C. L. 2,4,6-Trisubstituted triazines as Protein A mimetics for the treatment of autoimmune diseases. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 1138-1145.
66. Bork, J. T.; Lee, J. W.; Chang, Y. T. The combinatorial synthesis of purine, pyrimidine and triazine based libraries. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, 23, 245-260.
67. Silen, J. L.; Lu, A. T.; Solas, D. W.; Gore, M. A.; Maclean, D.; Shah, N. H.; Coffin, J. M.; Bhinderwala, N. S.; Wang, Y. W.; Tsutsui, K. T.; Look, G. C.; Campbell, D. A.; Hale, R. L.; Navre, M.; DeLuca-Flaherty, C. R. Screening for novel antimicrobials from encoded combinatorial libraries by using a two-dimensional agar format. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 1447-1453.
68. Khersonsky, S. M.; Jung, D. W.; Kang, T. W.; Walsh, D. P.; Moon, H. S.; Jo, H.; Jacobson, E. M.; Shetty, V.; Neubert, T. A.; Chang, Y. T. Facilitated forward chemical genetics using a tagged triazine library and zebrafish embryo screening. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11804-11805.
69. Moon, H. S.; Jacobson, E. M.; Khersonsky, S. M.; Luzung, M. R.; Walsh, D. P.; Xiong, W. N.; Lee, J. W.; Parikh, P. B.; Lam, J. C.; Kang, T. W.; Rosania, G. R.; Schier, A. F.; Chang, Y. T. A novel microtubule destabilizing entity from orthogonal synthesis of triazine library and zebrafish embryo screening. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11608-11609.
70. Russell, K. C.; Lehn, J. M.; Kyritsakas, N.; DeCian, A.; Fischer, J. Self-assembly of hydrogen-bonded supramolecular strands from complementary melamine and barbiturate components with chiral selection. *New J. Chem.* **1998**, 22, 123-128.
71. Platis, D.; Sottriffer, C. A.; Clonis, Y.; Labrou, N. E. Lock-and-key motif as a concept for designing affinity adsorbents for protein purification. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1128, 138-151.
72. Platis, D.; Maltezos, A.; Ma, J. K. C.; Labrou, N. E. Combinatorial de novo design and application of a biomimetic affinity ligand for the purification of human anti-HIV mAb 4E10 from transgenic tobacco. *J. Mol. Recognit.* **2009**, 22, 415-424.
73. Díaz-Ortiz, A.; Elguero, J.; de la Hoz, A.; Jiménez, A.; Moreno, A.; Moreno, S.; Sánchez-Migallón, A. Microwave-assisted synthesis and dynamic behaviour of *N*-2,*N*-4,*N*-6-tris(1*H*-pyrazolyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamines. *QSAR Comb. Sci.* **2005**, 24, 649-659.
74. Moral, M.; Ruiz, A.; Moreno, A.; Díaz-Ortiz, A.; López-Solera, I.; de la Hoz, A.; Sánchez-Migallón, A. Microwave-assisted synthesis of pyrazolyl bistriazines. *Tetrahedron* **2010**, 66, 121-127.
75. Kyte, J.; Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, 157, 105-132.

76. Hollink, E.; Simanek, E. E. A divergent route to diversity in macromolecules. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2293-2295.
77. Mason, P. V.; Champness, N. R.; Collinson, S. R.; Fisher, M. G.; Goretzki, G. Synthesis and modulation of bis(triazine) hydrogen-bonding receptors. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1444-1449.
78. Fazekas, M.; Pinteá, M.; Lameiras, P.; Lesur, A.; Berghian, C.; Silaghi-Dumitrescu, I.; Ple, N.; Darabantu, M. Serinolic amino-s-triazines: Iterative synthesis of *N*-substituted amino-1,3-dioxane derivatives from l-(p-nitrophenyl)serinols and rotational stereochemistry phenomena. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2473-2494.
79. Bookser, B. C.; Zhu, S. R. Solid phase extraction purification of carboxylic acid products from 96-well format solution phase synthesis with DOWEX 1x8-400 formate anion exchange resin. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 205-215.
80. Pinteá, M.; Fazekas, M.; Lameiras, P.; Cadis, I.; Berghian, C.; Silaghi-Dumitrescu, I.; Popa, F.; Bele, C.; Ple, N.; Darabantu, M. Serinolic amino-s-triazines: iterative synthesis and rotational stereochemistry phenomena as *N*-substituted derivatives of 2-aminopropane-1,3-diols. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8851-8870.
81. Katritzky, A. R.; Oniciu, D. C.; Ghiviriga, I.; Barcock, R. A. 4,6-Bis-(*N,N*-dialkilamino)-S-triazines and 2,4,6-tris-(*N,N*-dialkilamino)-s-triazines - synthesis, NMR-spectra and restricted rotations. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 785-792.
82. Ghiviriga, I.; Oniciu, D. C. Steric hindrance to the solvation of melamines and consequences for non-covalent synthesis. *Chem. Commun.* **2002**, 2718-2719.
83. Palanisamy, U. D.; Winzor, D. J.; Lowe, C. R. Synthesis and evaluation of affinity adsorbents for glycoproteins: an artificial lectin. *J. Chromatogr. B* **2000**, *746*, 265-281.
84. Adhikari, P.; Bachhawat-Sikder, K.; Thomas, C. J.; Ravishankar, R.; Jeyaprakash, A. A.; Sharma, V.; Vijayan, M.; Suroia, A. Mutational analysis at Asn-41 in peanut agglutinin - A residue critical for the binding of the tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 40734-40739.
85. Severs, J. C.; Froland, W. A. Dimerization of a PACAP peptide analogue in DMSO via asparagine and aspartic acid residues. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 1246-1256.
86. Kuswandi, B.; Nuriman; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. Tripodal receptors for cation and anion sensors. *Sensors* **2006**, *6*, 978-1017.
87. Sornosa-Ten, A.; Albelda, M. T.; Frías, J. C.; García-España, E.; Llinares, J. M.; Budimir, A.; Piantanida, I. Acid-base properties of functionalised tripodal polyamines and their interaction with nucleotides and nucleic acids. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2567-2574.
88. Cacciarini, M.; Cordiano, E.; Nativi, C.; Roelens, S. A tricatecholic receptor for carbohydrate recognition: synthesis and binding studies. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3933-3936.
89. Arda, A.; Venturi, C.; Nativi, C.; Francesconi, O.; Gabrielli, G.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Roelens, S. A chiral pyrrolic tripodal receptor enantioselectively recognizes β -mannose and β -mannosides. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 414-418.
90. Carrero-Berzal, P. Polifenoles como miméticos de lectinas: Una nueva aproximación en la terapia del SIDA. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. **2010**.

91. Hennrich, G.; Anslyn, E. V. 1,3,5-2,4,6-functionalized, facially segregated benzenes - Exploitation of sterically predisposed systems in supramolecular chemistry. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 2219-2224.
92. Metzger, A.; Lynch, V. M.; Anslyn, E. V. A synthetic receptor selective for citrate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 862-865.
93. Wallace, K. J.; Hanes, R.; Anslyn, E.; Morey, J.; Kilway, K. V.; Siegel, J. Preparation of 1,3,5-tris(aminomethyl)-2,4,6-triethylbenzene from two versatile 1,3,5-tri(halo-substituted) 2,4,6-triethylbenzene derivatives. *Synthesis* **2005**, 12, 2080-2083.
94. Balzarini, J.; Van Herrewege, Y.; Vermeire, K.; Vanham, G.; Schols, D. Carbohydrate-binding agents efficiently prevent dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-directed HIV-1 transmission to T lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* **2007**, 71, 3-11.
95. Homola, J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 462-493.
96. McDonnell, J. M. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 572-577.
97. Tanious, F. A.; Nguyen, B.; Wilson, W. D. Biosensor-surface plasmon resonance methods for quantitative analysis of biomolecular interactions. *Meth. Cell. Biol.* **2008**, 84, 53-77.
98. De Crescenzo, G.; Boucher, C.; Durocher, Y.; Jolicoeur, M. Kinetic characterization by surface plasmon resonance-based biosensors: principle and emerging trends. *Cell. Mol. Bioeng.* **2008**, 1, 204-215.
99. Roboz, J.; Deng, L.; Ma, L. H.; Holland, J. F. Investigation of suramin-albumin binding by electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, 12, 1319-1322.
100. Hanai, T.; Miyazaki, R.; Kinoshita, T. Quantitative analysis of human serum albumin drug interactions using reversed-phase and ion-exchange liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 378, 77-82.
101. Yahi, N.; Sabatier, J. M.; Nickel, P.; Mabrouk, K.; Gonzalezscarano, F.; Fantini, J. Suramin inhibits binding of the V3 region of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 to galactosylceramide, the receptor for HIV-1 gp120 on human collagen epithelial-cells. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 24349-24353.
102. Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* **2001**, 294, 2163-2166.
103. http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html.
104. Borchers, C.; Tomer, K. B. Characterization of the noncovalent complex of human immunodeficiency virus glycoprotein 120 with its cellular receptor CD4 by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Biochemistry* **1999**, 38, 11734-11740.

CAPÍTULO 2

**Estudio de las propiedades gelificantes de
derivados de 1,3,5-triazina con asparraginas**

NOTA SOBRE TERMINOLOGÍA

El Diccionario de la Real Academia Española de la Lengua (DRAE) define la palabra gel como “el estado que adopta una materia en dispersión coloidal cuando flocula o se coagula”. No obstante, aunque el verbo *gelificar* no se recoge en el DRAE, sí se define en otros como en el *Diccionario del español actual* de M. Seco, que lo define como tecnicismo propio de la química con el significado de “transformar (algo) en gel”. También figuran en dicho diccionario *gelificación*, para la acción de gelificar(se), y *gelificante* para lo “que gelifica”. Los términos gelificar y gelificante se emplean habitualmente en la terminología de la industria cosmética, alimentaria o en ciencia de materiales. Asimismo, es habitual el empleo del término hidrogel para denominar la formación de un gel en agua. En la literatura científica anglosajona, en los últimos años, se emplea el término “organogel” para denominar un compuesto capaz de formar gel en disolventes orgánicos, y hemos adoptado este mismo término en español, es decir, organogel, por analogía con hidrogel.

INTRODUCCIÓN

La Dra. Dorothy Jordon Lloyd comentaba en 1920 que “un gel es más fácil de reconocer que de definir”, a lo que añadía que “si posee aspecto de gel, es que debe ser un gel!”¹. Como se ha comentado en el Capítulo 1, durante la síntesis en 1,4-dioxano del dímero **65**, derivado de 1,3,5-triazinas disustituidas con asparraginas, con piperazina como espaciador (Figura 1A), observamos la formación de un sólido con aspecto de gel. Tras la purificación del compuesto, se realizó un ensayo en el que se suspendió el compuesto en dioxano y se calentó hasta obtener una disolución homogénea. A continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente y tras unos minutos se formó en la parte inferior del vial lo que parecía un gel, ya que al invertir el vial, el compuesto en 1,4-dioxano no fluía (Figura 1B). Este comportamiento estaba en concordancia con la descripción de la Dra. Lloyd.

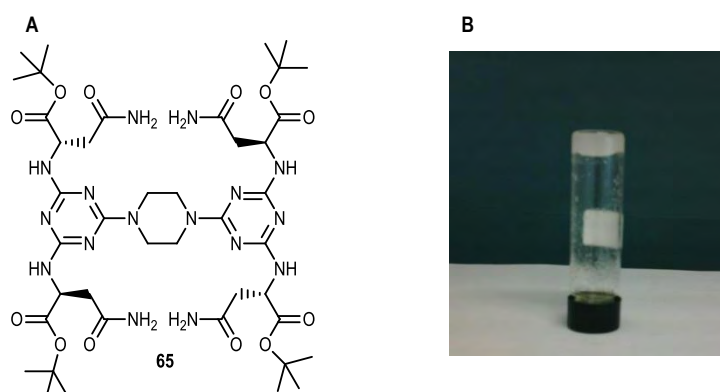


Figura 52. A: Estructura del dímero de asparragina **65**; B: Sólido con aspecto de gel formado por el dímero **65** en 1,4-dioxano, estable tras invertir el vial

El Dr. Paul John Flory (premio Nobel en 1974) completaba muchos años después el concepto de la Dra. Lloyd, afirmando que un gel posee una estructura continua, estable en una escala analítica de tiempo y cuyo comportamiento reológico es similar al de un sólido².

La definición de gel que se acepta actualmente es la de un material semi-sólido, constituido por un compuesto que a una baja concentración y en presencia de un disolvente adecuado, se autoensambla mediante interacciones físicas o químicas, originando una red tridimensional que impide el flujo de disolvente. El disolvente, aunque móvil a nivel molecular, no puede fluir a nivel macroscópico debido a

que se encuentra eficazmente sujeto en los huecos de la red tridimensional, mediante una combinación de fuerzas capilares y de interacciones con la misma red³.

En las últimas décadas los geles poliméricos han sido empleados en campos tan diversos como la alimentación, la medicina, la ciencia de materiales, los cosméticos, la farmacología, etc... Así, han ido apareciendo en forma de numerosos productos de uso cotidiano como lentes de contacto, jabones, pasta de dientes, o fijador para el cabello, entre otros muchos ejemplos. En estos geles, las unidades monoméricas se unen a través de enlaces covalentes dando lugar a la red tridimensional que impide el flujo de disolvente.

Otro tipo de geles mucho más recientes y a los que se da cada vez más importancia por sus novedosas aplicaciones, son los geles constituidos por moléculas de bajo peso molecular. En estos geles, las moléculas se autoensamblan a través de interacciones físicas, por lo que son conocidos como geles físicos o supramoleculares⁴. Entre las interacciones físicas más importantes que se dan entre moléculas, se encuentran los enlaces de hidrógeno, las interacciones de van der Waals y las interacciones solvofóbicas o hidrofóbicas si el disolvente es el agua. Estas interacciones de carácter débil confieren a los geles físicos su principal característica respecto a los geles poliméricos, y es que son reversibles. Así, se puede pasar del gel a la disolución mediante la aplicación de un estímulo externo, como puede ser un aumento de temperatura, una variación de pH, etc...

Los geles supramoleculares donde el disolvente que los constituye es el agua, se conocen como hidrogeles y poseen potenciales aplicaciones en campos muy diversos, como por ejemplo, en la liberación de fármacos. Los hidrogeles basados en moléculas de bajo peso molecular ofrecen la posibilidad de efectuar una liberación controlada del fármaco mediante la inducción de la transición gel-disolución a través de un estímulo externo, como puede ser el cambio de temperatura corporal o el cambio de pH que se produce en el estómago⁵. Además, a diferencia de los geles poliméricos, los geles supramoleculares resultan más fáciles de asimilar por el organismo, pues la naturaleza débil de sus interacciones hace que puedan ser fácilmente metabolizados. También se han descrito hidrogeles basados en péptidos, que están siendo estudiados en el campo de la ingeniería de tejidos, pues pueden actuar como nano-plataformas, dirigiendo el crecimiento de tejidos⁶. Otra aplicación propuesta para los hidrogeles está relacionada con el tratamiento de aguas, por ejemplo en la eliminación de colorantes⁷.

Por su parte, los geles supramoleculares formados en disolventes orgánicos se conocen como organogeles y también han despertado un enorme interés. A modo ilustrativo, se incluyen algunas de las aplicaciones propuestas en trabajos recientes. Así, se podrían emplear en electrónica molecular, pues las largas fibras que forman algunos organogeles pueden tener aplicación en la construcción de cables moleculares⁸. Los geles supramoleculares, a nivel nanométrico, dan lugar a una gran variedad de arquitecturas, como pueden ser fibras, hélices, micelas, vesículas, laminillas, esferulitas... La superestructura formada por un determinado compuesto formador de geles, puede ser empleada como molde para ser transcrita a una gran variedad de materiales inorgánicos, lo que genera potenciales

aplicaciones en catálisis y en procesos de separación⁹. También son numerosos los ejemplos descritos de organogeles como sensores que pueden responder ante estímulos fotoquímicos, termales, la adición de determinados iones o un cambio de pH¹⁰.

Proceso de formación de un gel

Para entender el mecanismo de formación de un gel, se ha propuesto que el gel consta de estructura primaria, secundaria y terciaria, de forma similar a las proteínas (Figura 2)¹¹.

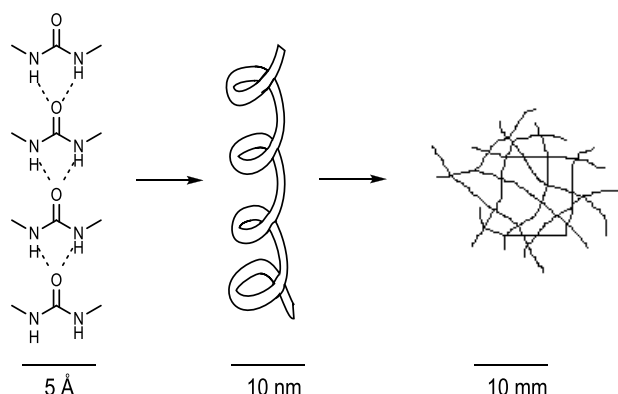


Figura 53. Estructura primaria, secundaria y terciaria de un gel que se autoensambla físicamente

La estructura primaria (en la escala de Å a nm) viene determinada por los eventos de reconocimiento a nivel molecular que promueven la agregación anisotrópica en una o dos dimensiones¹¹. En disolventes orgánicos, el reconocimiento molecular se produce principalmente a través de enlaces de hidrógeno, aunque también las interacciones de Van der Waals, interacciones por apilamiento de nubes π e interacciones solvofóbicas juegan un papel importante. En el caso de los hidrogeles, la fuerte competición de las moléculas de agua por los enlaces de hidrógeno hace que éstos pierdan su fortaleza, a menos que unos pocos se puedan combinar de forma cooperativa en una región que no esté expuesta a las moléculas de agua. De esta forma, las interacciones hidrofóbicas, que carecen de la direccionalidad de los enlaces de hidrógeno, se convierten en la fuerza más importante en medio acuoso.

En este proceso de reconocimiento molecular, si las interacciones que se dan entre moléculas son demasiado débiles y/o existe una gran interacción con las moléculas de disolvente, el compuesto permanecerá disuelto y no formará un gel. Por otro lado, si la interacción entre moléculas es tan fuerte que el disolvente queda excluido en su mayor parte, el compuesto precipitará en forma de sólido amorfo o cristalino y tampoco formará el gel. De esta forma, el proceso de formación de un gel requiere de un delicado equilibrio entre la disolución y la precipitación, por lo que es muy sensible a la naturaleza del disolvente y a la concentración de compuesto¹¹.

La estructura secundaria (en la escala de nm a μm) queda definida por la morfología de los agregados que se forman cuando unas moléculas interactúan con otras. Se han observado numerosas

morfologías como fibras, micelas, vesículas, laminillas, etc¹¹... En muchos casos, esta morfología se ve afectada por la presencia de centros quirales en las moléculas.

Finalmente, la forma en la que interaccionan unos agregados con otros determinará la estructura terciaria de un gel (en la escala de μm a mm)¹¹. Así, los geles pueden formarse bien por agregados que se ramifican dando lugar a redes tridimensionales que se interconectan, o pueden resultar del enredado de las fibras. Este tipo de entrecruzamiento a menudo determina las propiedades físicas del gel.

Caracterización de los geles

Entre las propiedades termodinámicas más importantes que se estudian de un gel, se encuentra la temperatura de transición gel-disolución (T_{gel}). Esta temperatura da idea de la fortaleza de las interacciones que se producen entre los agregados para formar la red tridimensional y por tanto depende de la concentración del compuesto. A mayor número de agregados moleculares que se forman en el gel, mayor temperatura habrá que aplicar para romper las interacciones físicas entre éstos. Existen varios métodos para determinar la T_{gel} , como por ejemplo el *método del vial invertido*, que consiste en determinar la temperatura a la cual el gel comienza a fluir en un vial que se introduce en un baño termostatizado, colocado con el tapón hacia abajo. La temperatura determinada por este método nos indica el momento en el que la estructura terciaria comienza a perderse. La T_{gel} también puede determinarse por *calorimetría diferencial de barrido* (DSC) o por *estudios reométricos*, si bien la T_{gel} determinada por estos tres métodos puede ser ligeramente diferente debido a efectos de transporte de masa y/o calor¹².

El estudio reométrico es uno de los más importantes para la caracterización y definición de un gel. La reología es la ciencia que estudia la deformación y flujo de los materiales bajo la influencia de una fuerza aplicada. La deformación se define como el cambio de forma o de volumen experimentado por un cuerpo bajo la acción de una fuerza externa, y constituye la respuesta dinámica característica de un sólido elástico. Por su parte, el flujo se entiende como una deformación continua en el tiempo bajo la acción de fuerzas externas, asociándose dicha respuesta al comportamiento dinámico característico de un fluido viscoso¹³. Los geles supramoleculares presentan propiedades que podemos calificar como intermedias, ya que combinan la elasticidad característica de los sólidos con el carácter viscoso de los líquidos. De esta forma, los geles supramoleculares se consideran materiales *viscoelásticos*¹². Las propiedades viscoelásticas de los geles derivan de la capacidad de las moléculas de difundirse en el gel, a diferencia de lo que sucede en un sólido ordenado, cuya elasticidad es el resultado del alargamiento de los enlaces entre átomos de diferentes planos cristalográficos.

Para el estudio reométrico de un gel, éste se suele colocar entre dos placas paralelas, y se aplica un esfuerzo de forma oscilatoria al mover una placa con respecto a la otra. La tensión generada en el gel se mide a través de un transductor de presión. De estas medidas se pueden determinar diversas

variables reológicas como G' o módulo de almacenamiento, que da idea de la elasticidad del material, y G'' o módulo de pérdida, el cual refleja el comportamiento viscoso de un material. Estos módulos se miden en función del esfuerzo aplicado o de la frecuencia de oscilación. Para que un material sea considerado un gel, G' debe ser mayor que G'' , y ambos módulos deben ser independientes del esfuerzo aplicado en un determinado intervalo¹².

La microscopía proporciona información acerca de la estructura secundaria de un gel. Distintas técnicas de microscopía electrónica como las de escáner (SEM) y transmisión (TEM) permiten obtener la imagen de las características estructurales mayores de 0.2 nm, por lo que proporcionan información muy valiosa acerca de la morfología de los agregados que constituyen el gel. Las imágenes obtenidas por microscopía de fuerza atómica (AFM) resultan de gran utilidad para el estudio topológico del material (Height AFM) y para la determinación de ciertas propiedades mecánicas (Phase AFM).

Para la determinación de la estructura primaria de un gel, la resonancia magnética nuclear puede resultar de utilidad para el estudio del proceso de reconocimiento molecular que se da entre las moléculas. Otra técnica empleada para el estudio de la estructura primaria es la espectroscopía de FT-IR, muy útil para la determinación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre diferentes grupos funcionales.

Diversidad estructural en la obtención de geles de bajo peso molecular

Un número muy elevado de los compuestos descritos con capacidad para la formación de geles han sido fruto de la casualidad. El análisis de estas estructuras ha permitido identificar ciertos motivos estructurales que favorecen el auto-ensamblaje de las moléculas¹⁴. Entre estos motivos estructurales son muy comunes las amidas, ureas y derivados de carbohidratos, con una elevada capacidad para el establecimiento de enlaces por puente de hidrógeno direccionales. Las largas cadenas alquílicas y fragmentos esteroideos también están presentes en muchos organogeles por su capacidad de establecer interacciones de van der Waals. Algunos autores proponen que las largas cadenas alquílicas flexibles, muy abundantes en compuestos capaces de formar geles, son necesarias para aportar un cierto grado de desorden y así evitar la cristalización¹⁵.

En la Figura 3 se representan algunos ejemplos de compuestos de bajo peso molecular con capacidad gelificante ilustrando su enorme diversidad estructural.

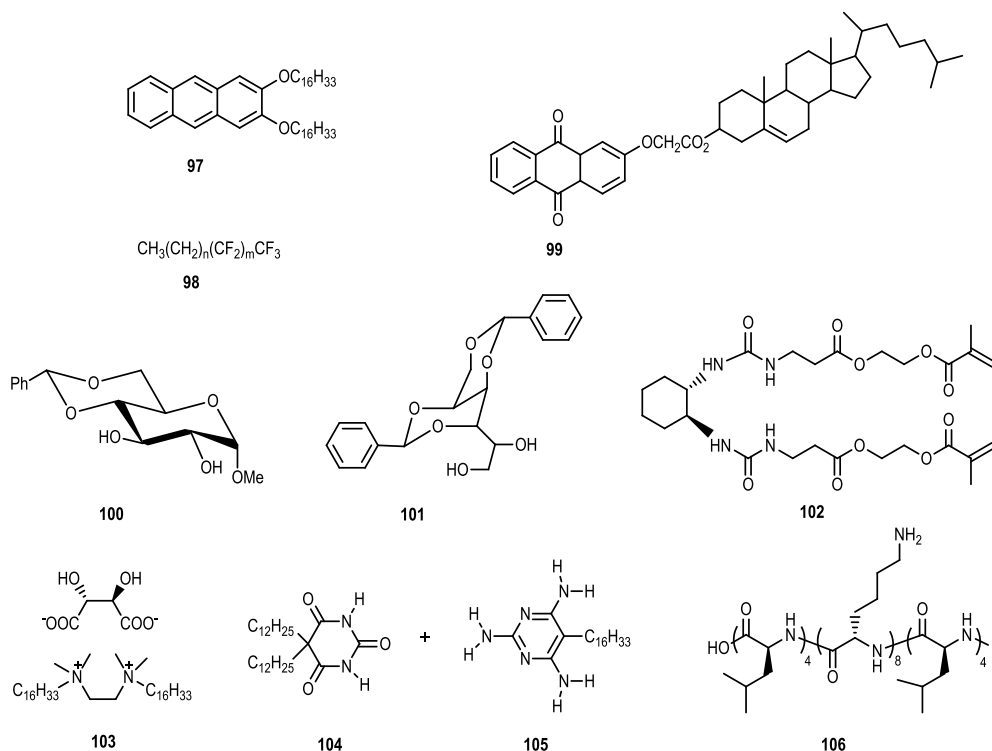


Figura 54. Ejemplos de compuestos de bajo peso molecular formadores de geles

Entre estos ejemplos, se encuentran compuestos altamente apolares como **97**, **98** y **99** que se autoensamblan predominantemente a través de interacciones de Van der Waals, formando geles en determinados disolventes orgánicos. Otros compuestos como **100**, **101** y **102** pueden interactuar a través de extensas redes de enlaces de hidrógeno. La combinación de largas cadenas hidrocarbonadas con grupos hidrófilos es una estrategia comúnmente empleada para la obtención de hidrogeles como el que forma el compuesto **103**. Por otro lado, existen sistemas multicomponente como el constituido por **104** y **105** que conducen a la obtención de un gel cuando ambos compuestos interactúan en un disolvente adecuado a través de enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waals e interacciones solvofóbicas. Los derivados de aminoácidos y péptidos como el compuesto **106** son también muy empleados en la obtención de geles pues proporcionan numerosas posibilidades de interacción.

Aminoácidos en la formación de geles

Los aminoácidos y dipéptidos constituyen motivos estructurales que se encuentran presentes en un gran número de compuestos capaces de formar geles tanto en medio acuoso como en disolventes orgánicos¹⁶, lo que se debe principalmente a los siguientes factores:

1) Un elevado número de aminoácidos son accesibles comercialmente, protegidos tanto en el extremo amino como en el grupo carboxilo. Así, en moléculas con capacidad para formar geles, es habitual la presencia del grupo Fmoc como protector del extremo *N*-terminal¹⁷⁻¹⁸ y grupos Boc en el amino de la cadena lateral de las lisinas¹⁹⁻²⁰ o del extremo *N*-terminal del aminoácido²¹.

2) Los aminoácidos y dipéptidos poseen centros quirales, una característica muy habitual en los compuestos capaces de formar geles³.

3) Algunos aminoácidos presentan cierto carácter anfipático que puede contribuir a la organización de las moléculas, favoreciendo por tanto sus propiedades para la formación de geles. De hecho el índice hidropático ha sido empleado como un factor importante para explicar el diferente comportamiento de dipéptidos anfipáticos en la formación de organogeles⁷.

4) Los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos pueden contribuir a la fortaleza del gel.

5) El estudio del ensamblaje de compuestos derivados de aminoácidos y péptidos, con capacidad para la formación de geles, podría ser de interés para el desarrollo de modelos biomiméticos que ayuden a estudiar las interacciones proteína-proteína, como por ejemplo, las que se establecen durante la formación de las fibras amiloides asociadas a la enfermedad de Alzheimer²¹.

Uno de los aminoácidos más habituales en moléculas con propiedades gelificantes es la lisina. Su cadena lateral con un grupo amino terminal puede participar en enlaces de hidrógeno, lo que favorece el reconocimiento molecular, si bien cuando se encuentra protegido puede establecer interacciones de van der Waals con otros grupos apolares²²⁻²⁴. Un segundo grupo de aminoácidos muy interesantes son los aminoácidos de carácter aromático (fenilalanina, tirosina y triptófano), ya que las interacciones por apilamiento de nubes π en las que intervienen los anillos aromáticos de estos aminoácidos pueden contribuir al fortalecimiento del gel. Así, en un ejemplo reciente, la sustitución de residuos de alanina por aminoácidos aromáticos conduce a organogeles más fuertes, que han sido estudiados para la liberación controlada de compuestos bioactivos²⁵. La asparragina, con una amida en su cadena lateral, se encuentra presente en el compuesto **65** para el que habíamos observado la formación de geles (Figura 4). Curiosamente, el residuo de asparragina no está presente en la estructura de compuestos con capacidad gelificante, y en el único ejemplo encontrado, los compuestos funcionalizados con este aminoácido no formaban geles en las condiciones ensayadas¹⁵.

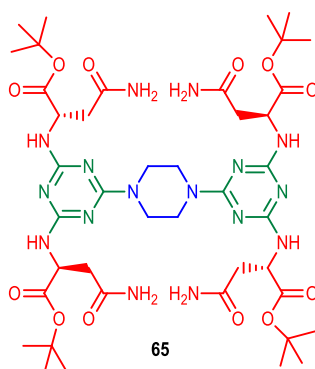


Figura 55. Estructura del compuesto **65**. En rojo: los residuos de asparragina; en verde: los anillos de 1,3,5-triazina; en azul: espaciador de piperazina

Un segundo elemento estructural característico del compuesto **65** son los dos anillos de 1,3,5-triazina. A pesar de la importancia de este anillo en procesos de reconocimiento molecular, como ya se comentó en el Capítulo 1, en el momento de iniciar este trabajo no existían ejemplos previos de compuestos con este anillo y de bajo peso molecular capaces de formar geles²⁶⁻²⁷.

OBJETIVOS

En base a todo lo expuesto, se puede concluir que, desde el punto de vista estructural, el compuesto **65** aportaba rasgos novedosos y diferenciales respecto a otros compuestos descritos con capacidad de formar geles, fundamentalmente por la presencia de residuos de asparragina y los anillos de 1,3,5-triazina, muy poco explorados previamente en este campo. No obstante, la estructura del compuesto **65** era rica en motivos estructurales que están presentes en otras moléculas con capacidad para la formación de geles (amidas, grupos amino, restos *terc*-butilo, etc...). La novedad de su estructura y el interés creciente de los organogeles nos condujeron a caracterizar las propiedades de auto-ensamblaje observadas para el compuesto **65** en 1,4-dioxano. Así, los objetivos perseguidos en este capítulo han sido:

- Estudios de gelificación en distintos disolventes y determinación de la T_{gel} .
- Caracterización reológica del gel formado.
- Estudios de microscopía que aportaran información sobre la estructura secundaria del gel.

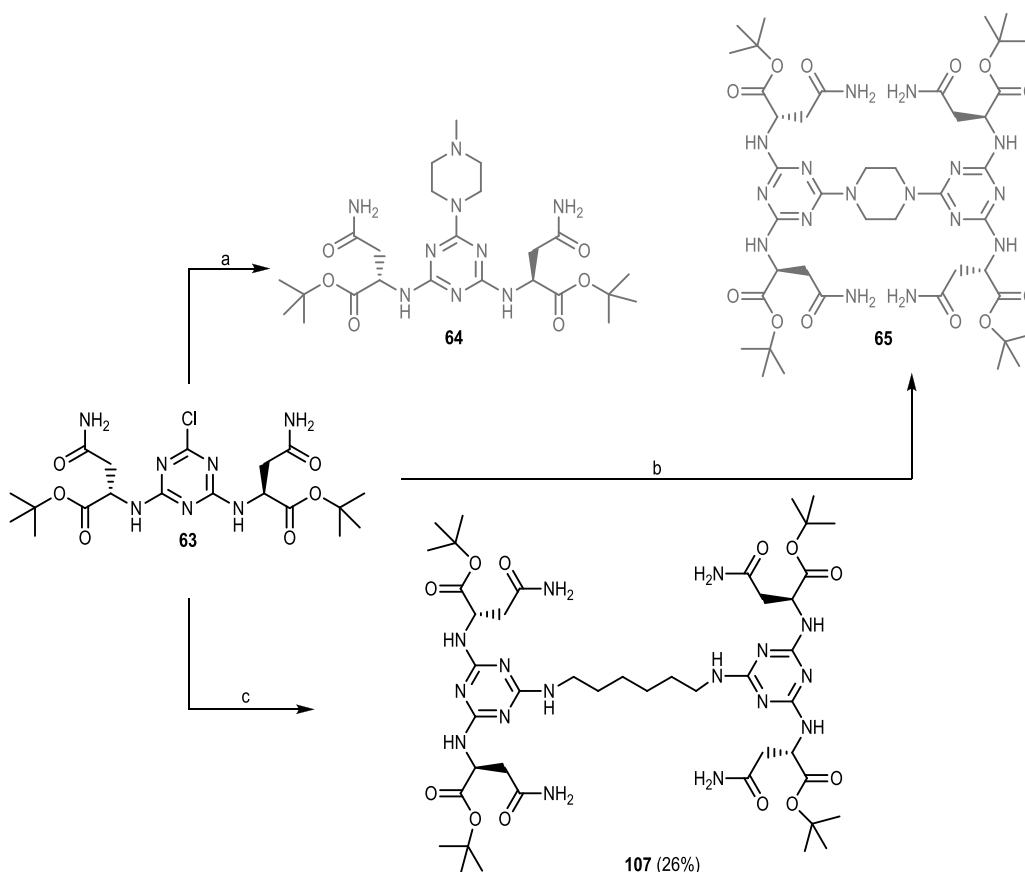
Una vez confirmado el comportamiento de gel del compuesto **65** en 1,4-dioxano, el siguiente objetivo consistió en modificar la estructura del compuesto **65** incorporando otros grupos funcionales que pudieran conducir a otros geles y/o aportaran propiedades adicionales.

Para realizar el trabajo contenido en este Capítulo, se ha mantenido una estrecha colaboración con la Dra. Rebeca Hernández y la Prof. Carmen Mijangos, del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (CSIC) quienes han llevado a cabo las distintas medidas reológicas donde también he participado. Los estudios de microscopía (SEM, AFM) se han realizado también en el mencionado Instituto. Los estudios de RMN incluidos al final de este capítulo han sido realizados por la Dra. Ana Ardá y el Prof. Jesús Jiménez-Barbero, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio del comportamiento del gel formado por el compuesto **65** en 1,4-dioxano. Caracterización reológica y morfológica

Como se ha comentado en el Capítulo 1, durante la síntesis de derivados de 1,3,5-triazina sustituidos con residuos de asparragina, se observó que el dímero con piperazina **65**, formaba gel. Este comportamiento no se observaba con el correspondiente monómero de *N*-metilpiperazina **64**. Puesto que las cadenas alquílicas son habituales en la estructura de compuestos capaces de formar geles, se procedió a la síntesis del dímero **107** donde la piperazina fue sustituida por un espaciador de 1,6-hexanodiamina. Así, y mediante el procedimiento general de obtención de dímeros, se hizo reaccionar el derivado disustituido **63** con 0.6 equivalentes de 1,6-hexanodiamina en presencia de DIPEA como base y a 100 °C durante 2 horas en el microondas, obteniéndose el dímero **107** con un rendimiento del 26% (Esquema 1).



Esquema 25. Condiciones de reacción: a) *N*-metilpiperazina, 1,4-dioxano, DIPEA, 70 °C, 24 h; b) piperazina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 2 h; c) 1,6-hexanodiamina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 3 h. Los datos analíticos y espectroscópicos de **64** y **65** se describieron en el Capítulo 1.

La capacidad de formar gel de los compuestos **64**, **65** y **107** fue estudiada para diferentes disolventes. En la Figura 5 se representa el procedimiento experimental seguido para la realización de este estudio.

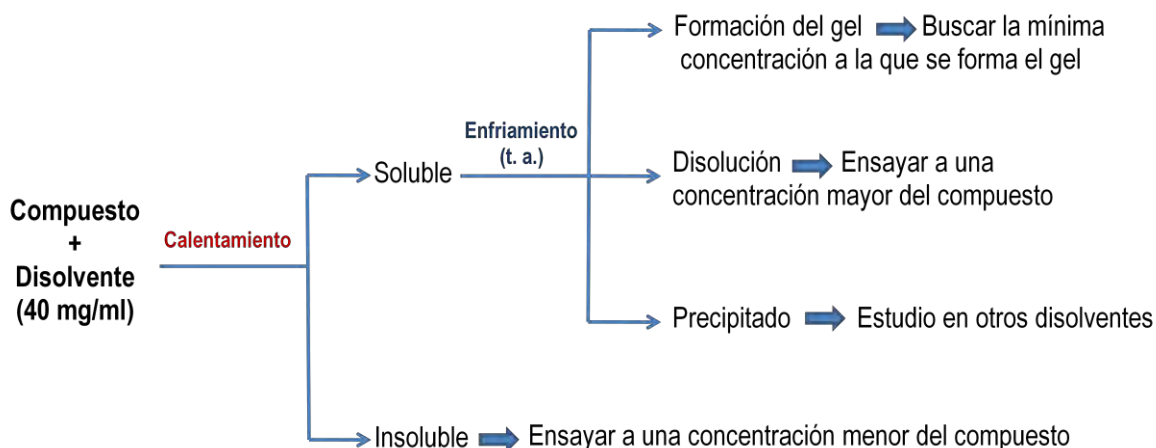


Figura 56. Procedimiento seguido para el estudio de la capacidad de formar gel de los compuestos

Siguiendo este procedimiento, el compuesto en estudio se suspende en el disolvente elegido a una concentración inicial de 40 mg/ml y a continuación se calienta a una temperatura próxima al punto de ebullición del disolvente, de forma que el compuesto queda soluble o insoluble. En este último caso, se repite el estudio empleando una concentración menor de compuesto. Si es soluble, la disolución se deja enfriar y cuando alcanza la temperatura ambiente se pueden dar tres situaciones:

- Gelificación del compuesto.* El gel formado permanece estable tras el test visual de inversión del vial. Para determinar la mínima concentración a la cual el compuesto puede formar un gel, se repite el procedimiento anterior a concentraciones menores hasta que el compuesto permanece solubilizado tras un ciclo de calentamiento-enfriamiento. A la concentración más baja a la que se forma el gel se la denomina concentración mínima de gelificación.
- El compuesto permanece solubilizado.* Si la viscosidad de la disolución aumenta o si existen indicios de que la disolución podría llegar a gelificar se repite el procedimiento empleando concentraciones mayores de compuesto.
- El compuesto precipita tras el proceso de calentamiento-enfriamiento.* En este caso, se realiza el estudio en otros disolventes.

Los resultados obtenidos para los compuestos **64**, **65** y **107** se recogen en la Tabla 1.

Tabla 5. Capacidad de formar geles para los compuestos **64**, **65** y **107** en disolventes orgánicos

Disolvente	64	65	107
Dioxano	S	G (25)	P
Diclorometano	S	G (25)	P
Cloroformo	S	P	S
Acetato de etilo	S	S	Ins
Tolueno	P	Ins	Ins
Éter dietílico	Ins	Ins	Ins
Hexano	Ins	Ins	Ins

G: gel. Los valores entre paréntesis corresponden a la mínima concentración de compuesto que forma gel en mg/ml. P: precipitación. Ins:insoluble. S: soluble.

El monómero **64** fue soluble en casi todos los disolventes ensayados, incluso a concentraciones de 100 mg/ml. En tolueno precipitaba al enfriarse la disolución caliente, mientras que no se solubilizaba ni en éter dietílico ni en hexano tras calentar. Los resultados más interesantes se observaron para el dímero **65**. Cuando se dejó enfriar la disolución caliente en diclorometano o en dioxano, se obtuvieron geles opacos que mantenían su forma tras el test de inversión del vial. El proceso de calentamiento-enfriamiento se repitió a menores concentraciones, obteniéndose que la mínima concentración a la cual el dímero **65** forma un gel en estos disolventes es de 25 mg/ml. Estos geles fueron estables a temperatura ambiente durante semanas. Por su parte, el dímero **107**, análogo estructural del dímero **65** donde el espaciador de piperazina ha sido sustituido por la 1,6-hexanodiamina, un espaciador más flexible, fue incapaz de formar gel en cualquiera de los disolventes ensayados. Por otro lado, el proceso de formación de geles del dímero **65** en dioxano y diclorometano es reversible, es decir, los geles pueden ser sometidos a ciclos repetidos de calentamiento-enfriamiento observándose una disolución al calentar, y la formación del gel al enfriar la disolución. Como se comentó en la introducción, este comportamiento es característico de los organogeles formados por compuestos de bajo peso molecular, donde las interacciones que se establecen entre moléculas son de naturaleza débil y reversible, de forma opuesta a lo que sucede en los geles químicos que están estabilizados mediante enlaces covalentes entre moléculas. La temperatura de transición gel-disolución (T_{gel}) fue determinada mediante el método de inversión del vial. La temperatura a la cual el gel a su concentración mínima (25 mg/ml) comienza a fluir en un vial invertido fue de 80 °C en 1,4-dioxano.

Como se comentó en la introducción, la espectroscopía de FT-IR puede proporcionar información relativa a la formación de enlaces de hidrógeno, una de las fuerzas dirigentes del proceso de formación de un organogel. En la Figura 6A se representan las regiones seleccionadas del espectro de FT-IR del gel del compuesto **65** en 1,4-dioxano mientras que en la Figura 6B se recoge el espectro del compuesto en disolución.

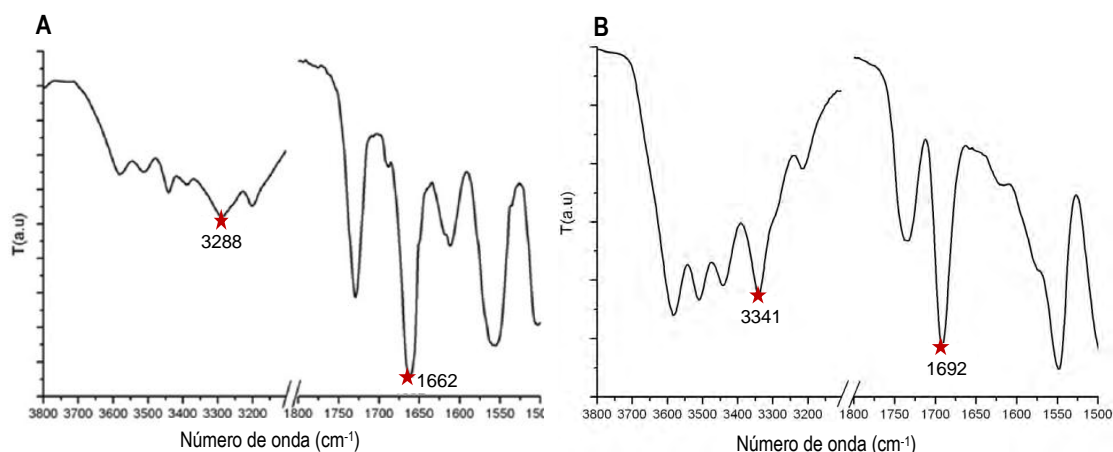


Figura 57. Espectros de FT-IR para el compuesto 65. A: formando un gel, en 1,4-dioxano; B: en disolución, en 1,4-dioxano

En el espectro obtenido para el gel (Figura 6A) una de las bandas más significativas es la que aparece a 3288 cm^{-1} , asignada a la vibración de tensión del grupo NH enlazado por puentes de hidrógeno. Cuando el compuesto está en disolución (Figura 6B), esta banda aparece a mayor número de onda (3341 cm^{-1}) debido a la vibración de tensión de los grupos NH libres. Además, en el gel la banda de amida I para el grupo carbonilo aparece a 1662 cm^{-1} , lo que sugiere la participación de los grupos amida del compuesto **65** en el establecimiento de los enlaces de hidrógeno. Nuevamente, en el espectro para el compuesto en disolución esta banda se desplaza a mayor número de onda (1692 cm^{-1}).

Caracterización reológica

Las propiedades mecánicas del gel formado por el compuesto **65** en 1,4-dioxano se caracterizaron por reología a una concentración de 40 mg/ml . El gel se sometió a un barrido de esfuerzo a una frecuencia constante $f = 1\text{ Hz}$ con el objeto de determinar *el régimen de viscoelasticidad lineal* (Figura 7). En general, cuando se estudian las propiedades reológicas que definen un gel, es importante que el esfuerzo aplicado se encuentre en el régimen de viscoelasticidad lineal, ya que de esta forma el módulo de almacenamiento, G' y el módulo de pérdida, G'' van a ser independientes de dicho esfuerzo.

En la Figura 7 se puede observar que el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') permanecen prácticamente constantes por debajo de un valor de esfuerzo en torno a 30 Pa , conocido como *esfuerzo de fluencia*. Por encima del *esfuerzo de fluencia*, tiene lugar un repentino decrecimiento de G' y G'' , que puede ser atribuido a una ruptura parcial de la red tridimensional del gel, que origina que la muestra comience a fluir. Así, la zona de viscoelasticidad lineal para el gel está comprendida entre 1 y 30 Pa , es decir, la red tridimensional del gel es mecánicamente estable por debajo de un esfuerzo menor o igual a 30 Pa .

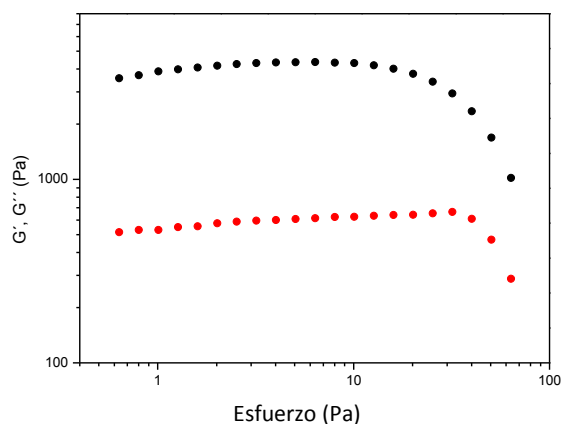


Figura 58. Evolución del módulo de almacenamiento G' (●) y módulo de pérdida G'' (●) en función del esfuerzo para el gel del compuesto **65** en dioxano (40 mg/ml), $f = 1$ Hz, Temperatura = 15 °C

Como se comentó en la introducción, para ser considerado un gel el sistema debe poseer las siguientes características reológicas: i) el módulo de almacenamiento (G') debe ser independiente de la frecuencia de deformación y ii) el módulo de almacenamiento (G') debe ser mayor que el módulo de pérdida (G'') para todas las frecuencias. Estas dos características quedan reflejadas en la Figura 8 donde G' y G'' se representan en función de la frecuencia para el gel del compuesto **65** en 1,4-dioxano, a una concentración de 40 mg/ml y para un par de fuerzas constante de 10 μ M.m, que está dentro del régimen de viscoelasticidad lineal determinado a través del barrido de esfuerzo comentado anteriormente.

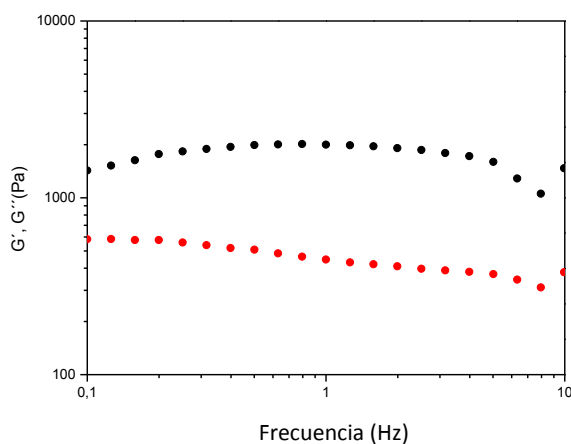


Figura 59. Módulo de almacenamiento (●) y módulo de pérdida (●) en función de la frecuencia para el gel del compuesto **65** en dioxano (40 mg/ml). Par de fuerzas = 10 μ N.m; Temperatura = 15 °C

Como puede observarse, el compuesto **65** presenta comportamiento de gel, caracterizado por la independencia de G' y G'' de la frecuencia, siendo G' mayor que G'' para todas las frecuencias

La formación del gel en 1,4-dioxano puede seguirse a través de un experimento de barrido de tiempo isoterma (Figura 9) llevado a cabo en el régimen de viscoelasticidad lineal del gel, es decir, aplicando un par de fuerzas de $10 \mu\text{M.m}$ a una frecuencia $f = 1 \text{ Hz}$. Como vemos en la Figura 9, el punto de gelificación caracterizado por el cruce entre G' y G'' , tiene lugar a los 6.5 min del comienzo del experimento. Antes de llegar al punto de gelificación, el comportamiento viscoso domina, y el sistema se comporta como un líquido, siendo el módulo de pérdida (G'') mayor que el módulo de almacenamiento (G'). Una vez que se produce la gelificación del compuesto, el comportamiento elástico domina, G' sobrepasa a G'' , y ambos alcanzan un *plateau*, indicativo de la formación del gel.

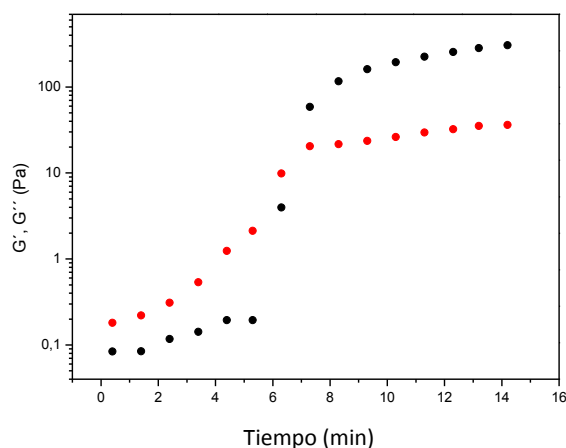


Figura 60. Evolución del módulo de almacenamiento (●) y módulo de pérdida (●) en función del tiempo para el gel del compuesto **65** en 1,4-dioxano (40 mg/ml); $f = 1 \text{ Hz}$; par de fuerzas = $10 \mu\text{N.m}$; Temperatura= $15 \text{ }^\circ\text{C}$

Morfología

Con el fin de determinar la morfología del gel formado por el compuesto **65** en 1,4-dioxano, el xerogel obtenido por liofilización del gel, fue analizado por microscopía electrónica de barrido (SEM). La Figura 10 muestra una imagen de SEM, en la cual se pueden observar agregados esféricos cuyo diámetro está comprendido entre 1 y $2 \mu\text{m}$.

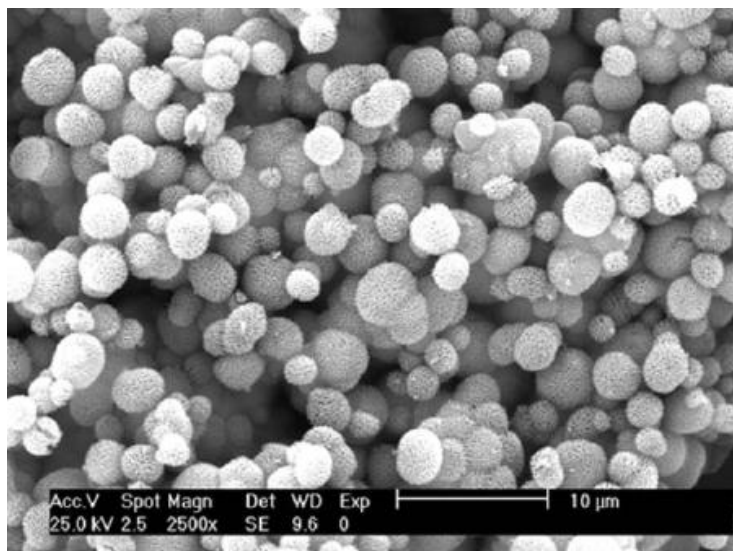


Figura 61. Imagen por microscopía electrónica de barrido (SEM) del xerogel formado por el compuesto **65** en 1,4-dioxano (40mg/ml), a temperatura ambiente

La estructura porosa podría ser atribuida al proceso de liofilizado del gel, de modo que la eliminación del 1,4-dioxano conduciría a la formación de poros en los agregados esféricos, conforme se ha descrito en otros ejemplos²⁸.

Por otro lado, las imágenes obtenidas por microscopía de fuerza atómica (AFM) del organogel, corroboran la formación de agregados esféricos (Figura 11).

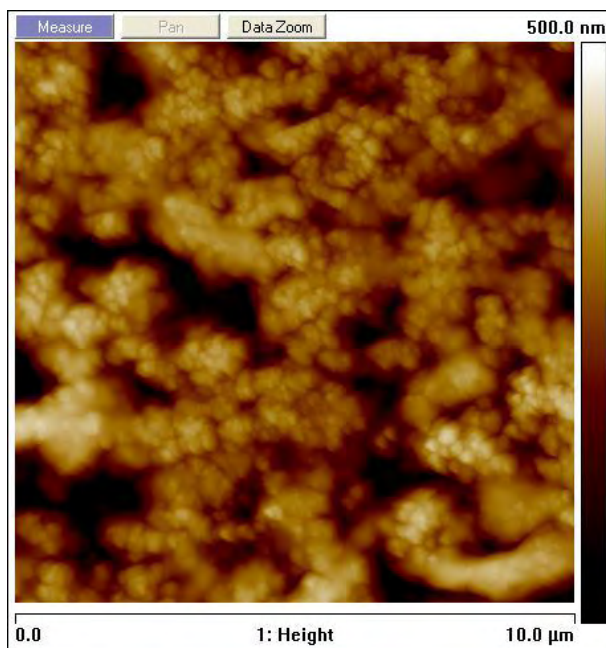


Figura 62. Imagen topográfica de AFM en modo de no-contacto (*tapping*) correspondiente al organogel del compuesto **65** en 1,4-dioxano (40 mg/ml), a temperatura ambiente

Aunque un gran número de los organogeles descritos en la bibliografía están constituidos por una red tridimensional basada en estructuras fibrosas²⁹, existen ejemplos recientes que describen la formación de geles a partir de pequeñas vesículas esféricas que son capaces de generar agregados mayores, los cuales interaccionan unos con otros para constituir el gel supramolecular³⁰. Los ejemplos de agregados esféricos descritos en la bibliografía, derivan de moléculas anfipáticas constituidas por una parte polar y una parte apolar que suele ser un fragmento esteroideo³¹⁻³² o una larga cadena hidrocarbonada³³⁻³⁴. Por otro lado, se realizó una minimización de la estructura tridimensional del compuesto **65** con el módulo semiempírico PM3 implementado en Gaussian 3.0. Como puede observarse en la Figura 12, la molécula posee una cierta curvatura que podría ser la inductora de la formación de los agregados esféricos. La influencia de la curvatura de la molécula en la formación de agregados esféricos ha sido recientemente descrito para otras moléculas no-anfipáticas³⁵.

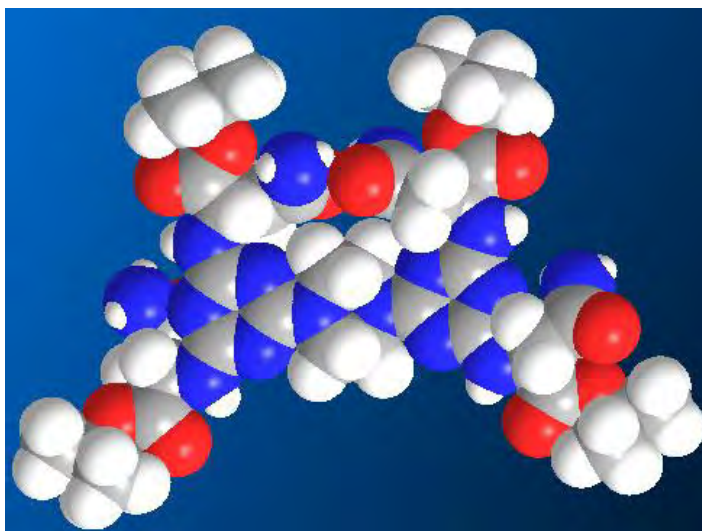


Figura 63. Modelo CPK de la estructura minimizada del compuesto **65** generado con el módulo semiempírico PM3 implementado en Gaussian 03

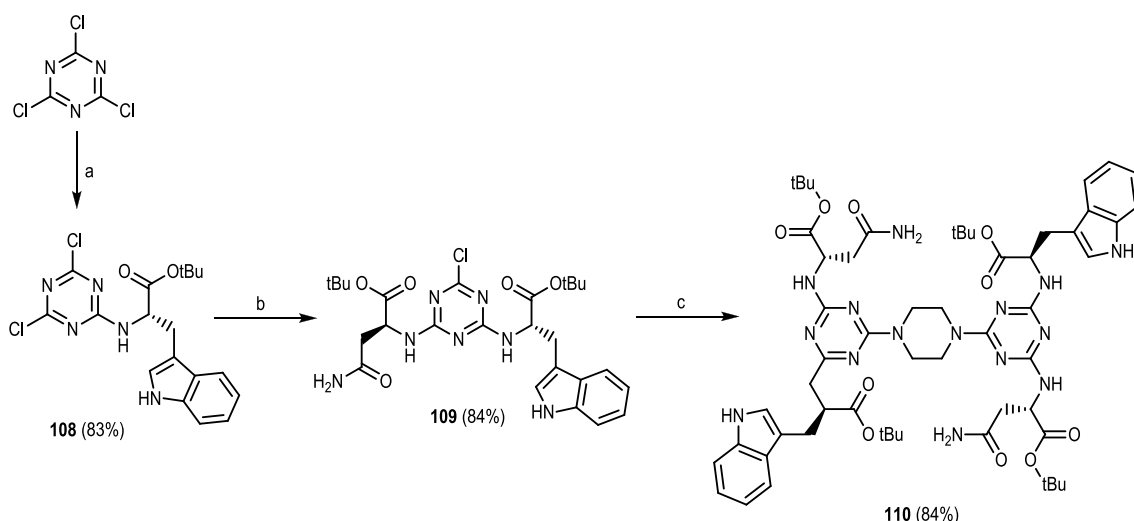
En el modelo CPK es muy visual la presencia de los grupos *terc*-butilo, que podrían participar en interacciones de van der Waals³⁶, los anillos de 1,3,5-triazina que podrían participar en interacciones por apilamiento³⁷, y los grupos amida de las cadenas laterales de las Asn que pueden participar en enlaces de hidrógeno como se ha mostrado en los experimentos de IR.

Análogos estructurales del compuesto 65. Síntesis y estudio de sus propiedades gelificantes

Como se ha comentado en la Introducción, en estudios de péptidos anfipáticos que son capaces de formar geles en medio acuoso y/o en disolventes orgánicos, se ha visto que es fundamental la presencia de un aminoácido de carácter aromático⁷. Los derivados de triptófano son particularmente atractivos a la hora de incrementar la estabilidad de un gel, no sólo por la presencia del anillo indólico que puede favorecer las interacciones por apilamiento de nubes π , sino también porque el NH indólico puede participar en la formación de enlaces de hidrógeno. Además, se han descrito moléculas anfipáticas derivadas de L-triptófano con capacidad de formar hidrogeles³⁸⁻³⁹. También se han descrito derivados de triptófano protegido en forma de éster *terc*-butílico con una diamina alifática como espaciador, que forman organogeles en tolueno. Además, las propiedades ópticas del triptófano pueden conferir a los geles aplicaciones interesantes relacionadas con la fluorescencia²¹.

Por todo ello, se pensó que la sustitución de una unidad de asparragina en cada anillo de triazina del compuesto **65** por una unidad de triptófano podría conducir a un nuevo compuesto con capacidad de formar gel, puesto que el compuesto resultante seguiría manteniendo los elementos de **65** que habíamos considerado importantes para el reconocimiento molecular (amidas, anillos de 1,3,5-triazina, restos *terc*-butilo...), mientras que la introducción de triptófano podría favorecer el establecimiento de interacciones adicionales a través del anillo aromático y/o del grupo amino indólico. Además, la fluorescencia intrínseca del triptófano podría servir para el estudio del proceso de autoensamblaje o conferir propiedades ópticas al gel resultante.

En el Esquema 2 se recoge la síntesis del dímero **110** que incorpora en cada triazina, un residuo de triptófano y otro de asparragina, protegidos en forma de éster *terc*-butílico.



Esquema 26. Condiciones de reacción: a) H-Trp OtBu.HCl, THF, DIPEA, 0 °C, 8 h; b) H-Asn OtBu.HCl, THF, DIPEA, 25 °C, 24 h; c) piperazina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 2.5 h

Así, la reacción del cloruro cianúrico con H-Trp-O^tBu.HCl, en presencia de DIPEA como base, en THF y a 0 °C durante 8 horas, condujo al derivado monosustituido **108** con un 83% de rendimiento. La reacción de **108** con H-Asn-O^tBu.HCl en presencia de DIPEA, en THF y a 25 °C durante 24 horas condujo al derivado disustituido **109** con un 84% de rendimiento. El dímero **110** se obtuvo por reacción del derivado disustituido **109** con piperazina, en presencia de DIPEA, en 1,4-dioxano y empleando calentamiento por microondas durante 2.5 horas a 100 °C. De este modo se obtuvo el dímero **110** con un 84% de rendimiento.

La clorotriazina **109** presentaba características atractivas con respecto a la clorotriazina **63**, con dos unidades de asparragina, sintetizada en el Capítulo 1 (Esquema 15, pág. 55). La presencia del anillo indólico en **109** respecto a **63** facilitaba la monitorización de las reacciones. Además, el carácter menos polar del compuesto **109** con respecto a **63** facilitaba la purificación de los productos de reacción. Por ello consideramos la clorotriazina **109** como un intermedio útil para explorar la síntesis de nuevos compuestos y su potencial capacidad para la formación de geles (Figura 13).

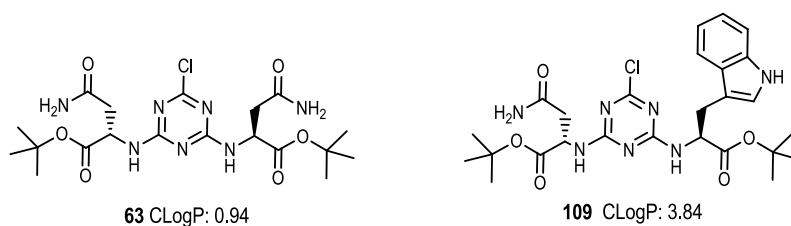
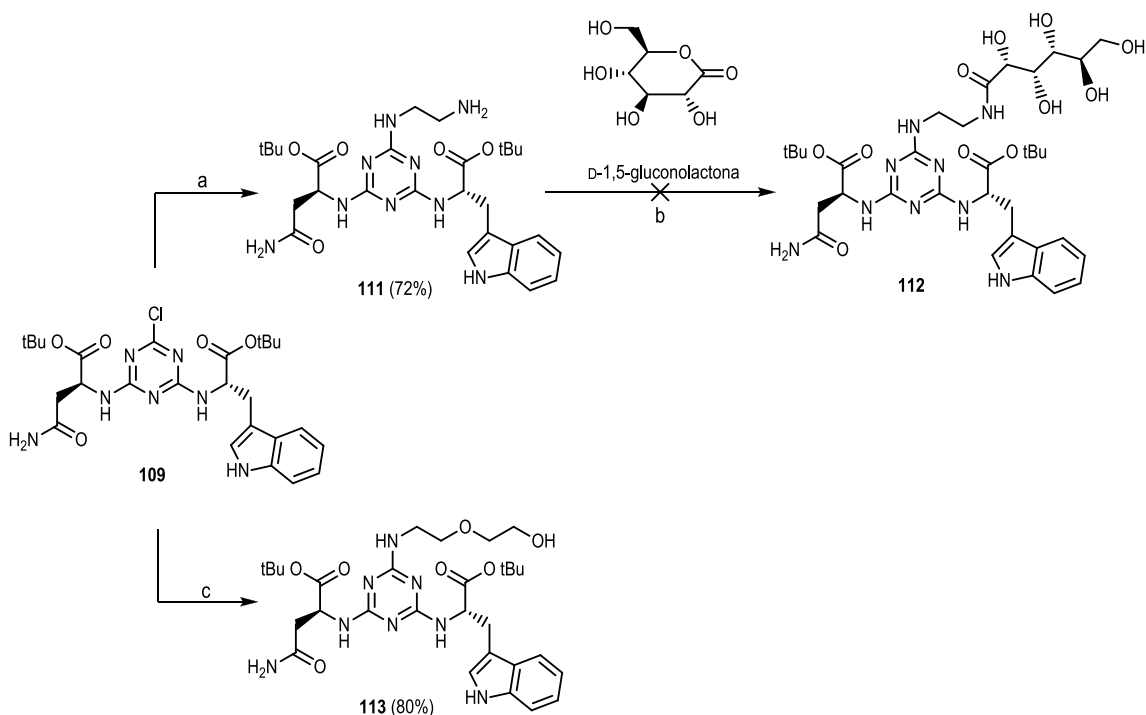


Figura 64. Estructura y ClogP (ChemDraw 12.0) de las monoclorotriazinas **63** y **109**

Dentro de la elevada variedad estructural de los compuestos con capacidad de formar geles, como se ha comentado en la introducción, centramos nuestra atención en los carbohidratos, compuestos quirales y polihidroxilados. Los azúcares lineales incorporados en moléculas apolares pueden favorecer la formación de hidrogeles⁴⁰⁻⁴¹ o la formación de organogeles tanto en disolventes próticos como apróticos⁴². Helfrich y colaboradores fueron los primeros en obtener un compuesto anfipático derivado de un azúcar lineal con capacidad de gelificación en medio acuoso y en disolventes orgánicos⁴³. Recientemente, Gao y colaboradores prepararon una serie de derivados que combinaban el carácter apolar del colesterol con azúcares lineales, obteniendo compuestos que mostraron interesantes propiedades de auto-ensamblaje tanto en disolventes próticos como apróticos⁴². La incorporación de azúcares lineales puede realizarse a partir de aldolactonas como la D-1,5-gluconolactona, la cual experimenta apertura del anillo lactónico mediante aminólisis⁴⁴. Esta gluconolactona ha sido empleada previamente en la obtención de compuestos con capacidad para la formación de geles⁴⁰. Por tanto, consideramos que podría ser de interés estudiar si la incorporación de la D-1,5-gluconolactona en la clorotriazina **109** podría conducirnos a un hidrogel y/o a un compuesto capaz de formar gel en una mayor variedad de disolventes. Para la incorporación de este agrupamiento polihidroxilado sobre la clorotriazina **109** la estrategia seguida, conforme a ejemplos

similares descritos en la bibliografía^{40, 42}, consistió en la reacción de la clorotriazina **109** con una diamina, seguida de reacción de apertura de la D-1,5-gluconolactona.

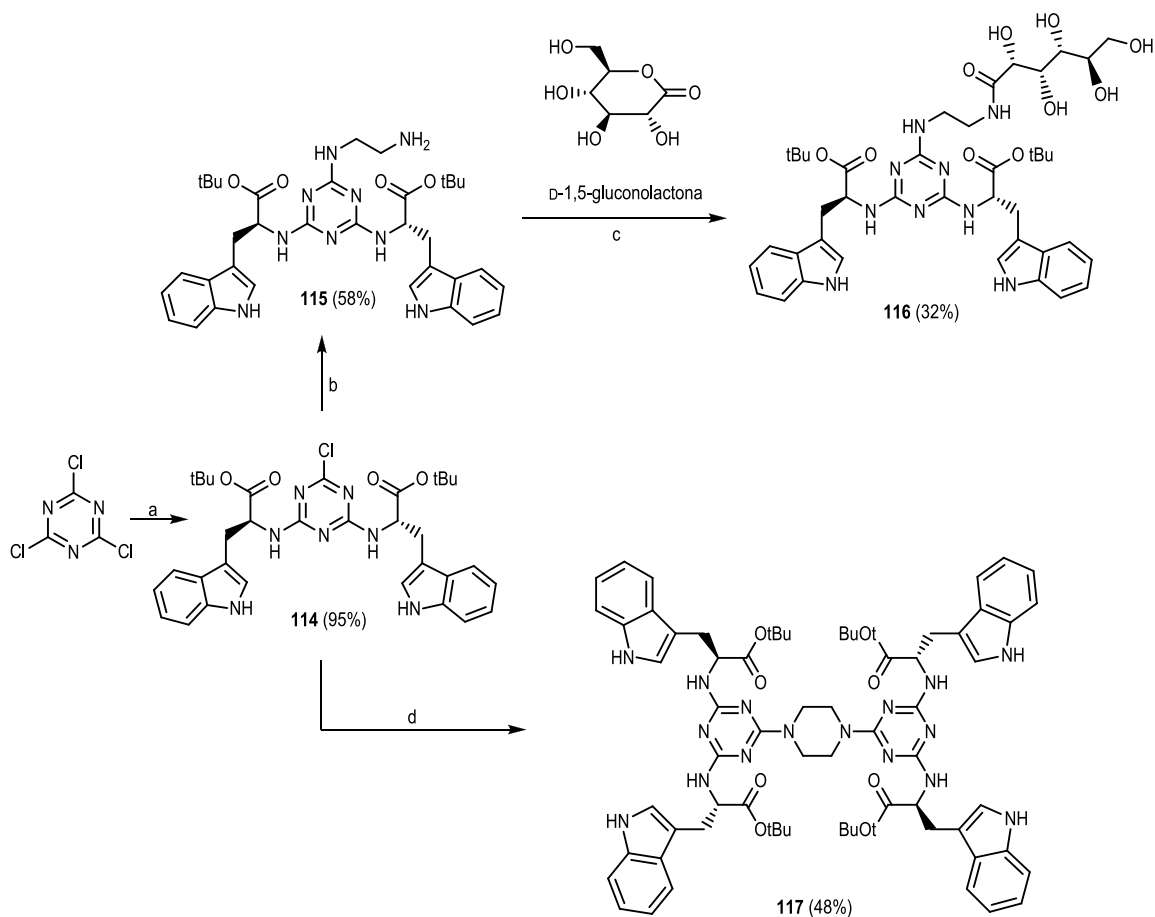
Así, se hizo reaccionar el derivado disustituido **109** con la 1,2-etanodiamina, en presencia de DIPEA como base, en 1,4-dioxano y mediante calentamiento por microondas a 70 °C durante 1 hora, lo que condujo a la obtención del compuesto **111** con un 72% de rendimiento (Esquema 3). A continuación se hizo reaccionar el compuesto **111** con la D-1,5-gluconolactona, en DMF, a 50 °C durante 24 horas. El análisis del crudo de reacción por HPLC-MS indicaba la presencia del producto esperado **112** (m/z: 732) en un porcentaje de área del 48%. Los intentos de aislamiento del compuesto **112** por cromatografía flash en fase reversa resultaron infructuosos, por lo que se intentó aislar **112** por cristalización en acetato de etilo:MeOH (10:1). No obstante, tras distintos intentos de cristalización no se consiguió aislar el compuesto **112** con la suficiente pureza, ya que siempre precipitaba con una cierta cantidad de D-1,5-gluconolactona.



Esquema 27. a) 1,2-etanodiamina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 70 °C, 1 h; b) DMF anh, 50 °C, 24 h; c) 2-(2-aminoetoxi)etanol, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 70 °C, 1 h

Estos resultados nos llevaron a considerar la síntesis de un compuesto más sencillo que incorporara un grupo hidroxilo terminal. Así, la reacción del derivado disustituido **109** con 2-(2-aminoetoxi)etanol, en presencia de DIPEA como base, en 1,4-dioxano y mediante calentamiento por microondas a 70 °C durante 1 hora permitió obtener y aislar el compuesto **113** con un 80% de rendimiento (Esquema 3).

Las dificultades encontradas en el aislamiento del compuesto **112**, derivado de D-1,5-gluco lactona, nos llevó a considerar que la sustitución del residuo de Asn-O^tBu por otro de Trp-O^tBu conduciría a un producto más apolar que podría resultar más fácil de aislar. Así, decidimos abordar la síntesis del compuesto **116** derivado de D-1,5-gluconolactona (Esquema 4).



Esquema 28. Condiciones de reacción: a) H-Trp OtBu.HCl, THF, DIPEA, 25 °C, 24 h; b) 1,2-etanodiamina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 70 °C, 1h; c) DMF anh, 50 °C, 24 h; d) piperazina, 1,4-dioxano, DIPEA, MW: 100 °C, 2 h

La clorotriazina **114** se sintetizó en un sólo paso mediante reacción del cloruro cianúrico con dos equivalentes de H-TrpO^tBu.HCl, en presencia de DIPEA como base y en THF, obteniéndose con un rendimiento del 96%. La reacción de **114** con la 1,2-etanodiamina, en presencia de DIPEA, en 1,4-dioxano, y calentando en microondas a 70 °C durante 1 hora permitió obtener el compuesto **115** con un 58% de rendimiento. A su vez, la reacción del compuesto **115** con la 1,5-gluconolactona, en DMF anh., a 50 °C durante 24 horas, condujo al compuesto **116**. En este caso el compuesto pudo ser aislado mediante cristalización en una mezcla AcOEt:MeOH (20:1) con un 32% de rendimiento.

Puesto que disponíamos de la clorotriazina **114** se procedió a la síntesis del dímero de piperazina **117**, con dos unidades de Trp-O^tBu en cada triazina. Ésto nos permitiría realizar un estudio comparativo con los dímeros previamente sintetizados **65** (derivado de Asn/Asn) y **110** (derivado de

Asn/Trp), acerca de la influencia del aminoácido en la capacidad para la formación de geles de los compuestos. El dímero **117** se sintetizó por reacción del derivado **114** con 0.6 equivalentes de piperazina, empleando DIPEA como base, en 1,4-dioxano y calentando en microondas a 100 °C durante 2 horas, obteniéndose con un rendimiento del 48% (Esquema 4).

Estudio de las propiedades gelificantes de los compuestos **110**, **113**, **116** y **117**

La capacidad para la formación de geles de los dímeros **110** (Asn/Trp) y **117** (Trp/Trp), así como las de los monómeros **113** y **116** (derivado de la D-1,5-gluconolactona) se estudió en diferentes disolventes según el procedimiento ya comentado y representado en la Figura 4. En la Tabla 2 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 2. Formación de geles de los compuestos **110**, **113**, **116** y **117** en los disolventes especificados

Disolvente	110	113	116	117
Dioxano	S	S	S	S
Tetrahidrofurano	S	S	-	S
Diclorometano	S	G (50)	Ins	S
Cloroformo	S	S	Ins	S
Acetato de etilo	G (25)	S	S	S
Acetonitrilo	G (20)	S	S	S
Tolueno	P	P	Ins	Ins
<i>N,N</i> -dimetilformamida	S	S	-	S
H ₂ O	Ins	Ins	P	Ins
isopropanol	-	-	S	-
isopropanol:H ₂ O (1:1)	-	-	S	-

G: gel. Valores en paréntesis corresponden a la mínima concentración de compuesto que forma gel en mg/ml. P: precipitación. Ins:insoluble. S: soluble.

El dímero **110** con asparragina y triptófano fue soluble en disolventes halogenados (diclorometano y cloroformo), en éteres (1,4-dioxano y tetrahidrofurano), así como en *N,N*-dimetilformamida, mientras que precipitaba en tolueno. No obstante, fue capaz de formar geles en acetato de etilo y en acetonitrilo, a una concentración mínima de 25 y 20 mg/ml respectivamente. El monómero **113** fue soluble en casi todos los disolventes salvo en diclorometano, donde formó gel a una concentración mínima de 50 mg/ml. El derivado de la D-1,5-gluconolactona **116** precipitaba en agua y en tolueno, resultó insoluble en disolventes halogenados, y permanecía soluble en acetato de etilo, en acetonitrilo, y en disolventes próticos como el isopropanol. Por último, el dímero **117** con triptófanos no fue capaz de formar geles en ningún disolvente, permaneciendo soluble en todos ellos, salvo en tolueno y en agua donde resultó ser insoluble incluso a muy baja concentración. En la Figura 14 se muestran los geles obtenidos para el dímero **110** en acetato de etilo (A) y acetonitrilo (B), y para el monómero **113** en diclorometano (C).

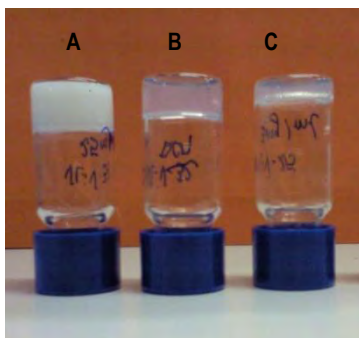


Figura 65. Geles obtenidos. A: gel del dímero 110 en acetato de etilo (25 mg/ml); B: gel del dímero 110 en acetonitrilo (20 mg/ml); C: gel del monómero 113 en diclorometano (50 mg/ml)

La temperatura de transición gel-disolución se determinó mediante el método del vial invertido para los geles del dímero **110** a su concentración mínima, resultando una T_{gel} de 39 °C, tanto en acetato de etilo como en acetonitrilo. De estos resultados se concluye que el dímero **110** y el monómero **113** podrían constituir compuestos con potenciales propiedades para la obtención de geles. Tanto **110** como **113** presentan restos de Asn y de Trp mientras que los compuestos **116** y **117**, que sólo incorporan unidades de Trp, no fueron capaces de formar geles en ninguno de los disolventes ensayados. Por tanto, comparando el comportamiento de los dímeros **110** y **117**, la presencia de las Asn parece ser determinante para la formación de geles en esta serie de compuestos, quizás debido a su capacidad de formar enlaces de hidrógeno.

La elevada concentración a la que formaba gel el monómero **113** nos hizo descartarlo como un candidato adecuado para estudios reológicos y morfológicos. Con el dímero **110** sí se ha realizado la caracterización reológica y el estudio morfológico, como se describe a continuación.

Caracterización reológica de los geles formados por el compuesto 110

Las propiedades mecánicas de los organogeles formados por el dímero **110** se caracterizaron por reología a la mínima concentración a la que se formaba gel (MGC), esto es, 25 mg/ml en acetato de etilo y 20 mg/ml en acetonitrilo. Al igual que para el organogel del compuesto **65** descrito anteriormente, los geles preparados en acetato de etilo y acetonitrilo fueron sometidos a un barrido de esfuerzo a una frecuencia constante $f = 1$ Hz con el objetivo de determinar el régimen de viscosidad lineal (Figura 15).

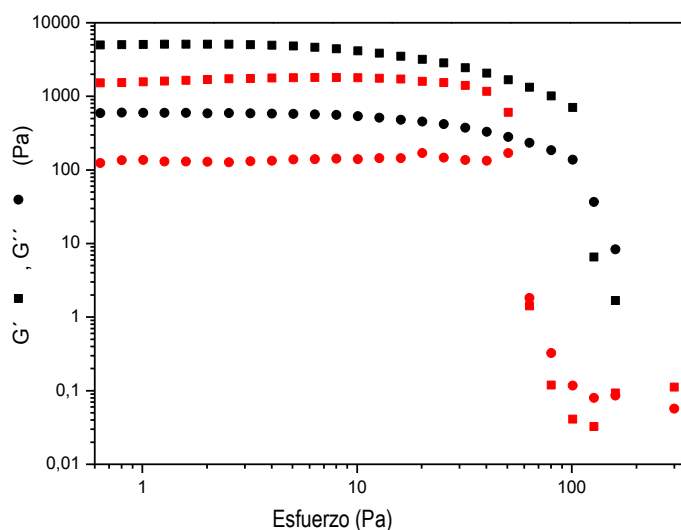


Figura 66. Evolución del módulo de almacenamiento G' (■) y módulo de pérdida G'' (●) en función del esfuerzo para el gel del compuesto **110** a una concentración de 25 mg/ml en acetato de etilo (símbolos en negro) y a una concentración de 20 mg/ml en acetonitrilo (símbolos en rojo); $f = 1$ Hz, Temperatura = 15 °C.

Para el caso del gel en acetonitrilo (Figura 15, símbolos en rojo), el módulo de almacenamiento G' , y el módulo de pérdida G'' , permanecen constantes por debajo de un valor de esfuerzo en torno a 50 Pa, que representa el límite superior del régimen de viscosidad lineal (*esfuerzo de fluencia*). Cuando tenemos el gel en acetato de etilo (Figura 15, símbolos en negro), G' y G'' permanecen aproximadamente constantes por debajo de un valor de *esfuerzo de fluencia* de 90 Pa. El mayor rango de viscosidad lineal para el gel formado en acetato de etilo indica que éste posee una mayor estabilidad mecánica que el gel en acetonitrilo, con menor rango de viscosidad lineal. Ésto puede ser debido a que el gel en acetato de etilo fue ensayado a 25 mg/ml, frente a los 20 mg/ml a los que fue ensayado el gel en acetonitrilo. A mayor concentración del compuesto, más numerosas serían las interacciones que se dan en el gel para un mismo volumen, lo que se podría traducir en una mayor estabilidad mecánica. El módulo de almacenamiento, G' , está directamente relacionado con el número de puntos de entrecruzamiento. El mayor valor de G' para el gel en acetato de etilo indica que éste posee mayor número de puntos de entrecruzamiento que el gel en acetonitrilo, lo cual puede ser también debido a la mayor concentración del compuesto **110** empleada. Para los dos geles, el módulo de almacenamiento, G' es un orden de magnitud mayor que el módulo de pérdida, G'' , lo que muestra el carácter elástico dominante de ambos geles en el rango de viscosidad lineal.

Un gel se considera tixotrópico cuando recupera su elasticidad después de haber sido sometido a un esfuerzo de cizalla. Los geles tixotrópicos vuelven a auto-ensamblarse y a recuperar su estructura tridimensional organizada. El estudio de las propiedades tixotrópicas de un gel supramolecular es interesante para ciertas aplicaciones. Por ejemplo, para la canalización de un gel hasta el lugar de

aplicación, el gel es sometido a un esfuerzo de cizalla mayor que el esfuerzo de fluencia, de forma que puede fluir como si de un líquido se tratase. Una vez que el gel se encuentra en el lugar requerido, tras un tiempo que dependerá del gel, éste se volverá a formar y recuperará sus propiedades mecánicas.

Los geles formados por el compuesto **110** en acetato de etilo y acetonitrilo fueron sometidos a una perturbación mecánica de su estructura tridimensional, mediante la agitación de los viales durante más de un minuto, observándose que las muestras volvían a formarse cuando se dejaban reposar. De esta forma, las propiedades tixotrópicas de estos geles se evaluaron mediante la aplicación de un barrido de esfuerzo aplicado en sentido inverso, es decir, de mayor a menor esfuerzo, tras haber perturbado la estructura tridimensional del gel mediante la aplicación de un esfuerzo por encima del esfuerzo de fluencia (90 Pa para el gel en acetato de etilo). En la Figura 16, se observa cómo al aplicar un esfuerzo decreciente, el gel recupera sus propiedades elásticas. No obstante, G' y G'' no retornan a sus valores originales, quizás debido a que la recuperación de la estructura tridimensional del gel después de una perturbación mecánica requiere tiempos mayores.

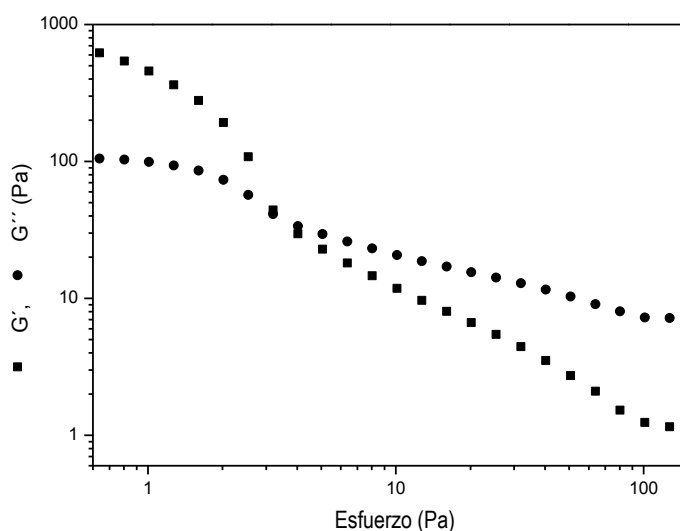


Figura 67. Recuperación de la estructura del gel del compuesto **110** en acetato de etilo (25 mg/ml) tras la aplicación de un barrido de esfuerzo decreciente después de perturbar la estructura tridimensional del gel. Módulo de almacenamiento G' representado por: (■) y módulo de pérdida G'' : (●); $f = 1$ Hz, Temperatura =15 °C.

En la Figura 17 se representa la evolución del módulo de almacenamiento, G' y el módulo de pérdida G'' en función de la frecuencia para los geles formados por el compuesto **110** en acetato de etilo y acetonitrilo.

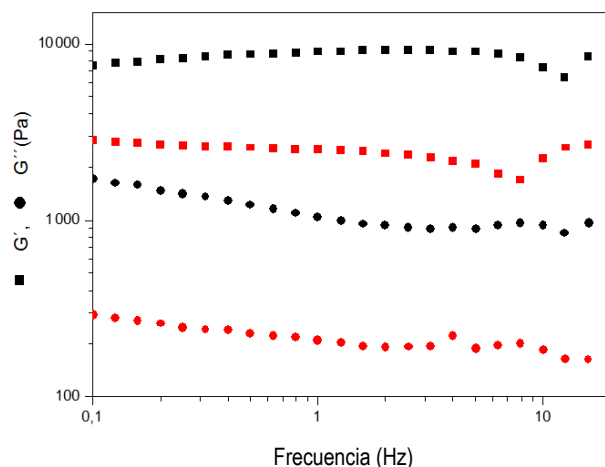


Figura 68. Evolución del módulo de almacenamiento G' (■) y módulo de pérdida G'' (●) en función de la frecuencia para el gel del compuesto **110** a una concentración de 25 mg/ml en acetato de etilo (símbolos en negro) y a una concentración de 20 mg/ml en acetonitrilo (símbolos en rojo).

Como puede observarse, ambas muestras presentan un comportamiento de gel, caracterizado por la independencia del módulo de almacenamiento, G' con respecto a la frecuencia aplicada, siendo G' mayor que G'' para todas las frecuencias.

Morfología

Con el objeto de obtener información acerca de la morfología de los geles formados por el compuesto **110** en acetato de etilo y acetonitrilo, éstos fueron analizados por microscopía de fuerza atómica (AFM). Como se puede ver en la Figura 18, la morfología exhibida por el gel en acetato de etilo consiste en gruesos haces de fibras formados por el entrelazamiento de fibras alargadas, cuyo diámetro es de ~160 nm, determinado por el análisis de la sección transversal.

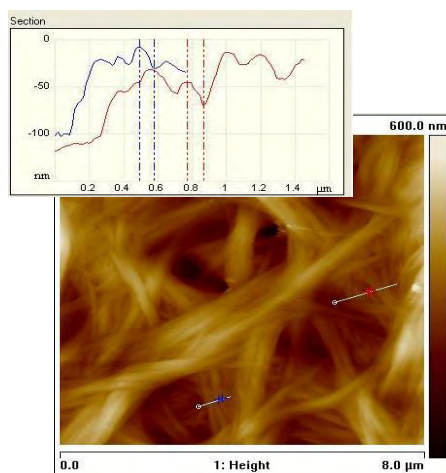


Figura 69. Imagen topográfica de AFM en modo de no-contacto (*tapping*) del gel del compuesto **110** en acetato de etilo (25 mg/ml), a temperatura ambiente. El recuadro representa el análisis de la sección transversal realizado en la región seleccionada para determinar el diámetro de las fibras.

Cuando el gel se forma en acetonitrilo, las fibras que se obtienen son mucho más cortas, como se observa en la imagen por AFM de la Figura 19A. Tomando una región aumentada y analizando la sección transversal se pudo determinar que el diámetro de las fibras era de 160 nm (Figura 19B), el mismo valor que el determinado para las fibras del gel en acetato de etilo.

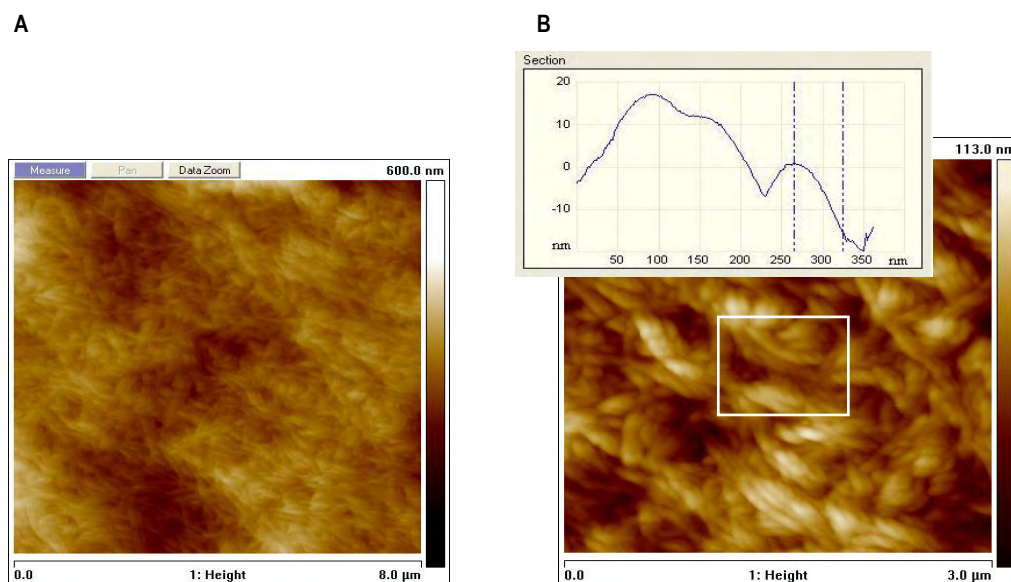


Figura 70. Imagen topográfica de AFM en modo de no-contacto (*tapping*) del gel del compuesto **110** en acetonitrilo (20 mg/ml), a temperatura ambiente, y a dos aumentos **A:** 8 μ M y **B:** 3 μ M (el recuadro representa el análisis de la sección transversal realizado para determinar el diámetro de las fibras).

De esta forma, las imágenes tomadas por AFM del gel del compuesto **110** en acetato de etilo y en acetonitrilo, muestran que aunque el diámetro de las fibras del gel es independiente del disolvente empleado siendo de ~ 160 nm en los dos casos, se produce un cambio drástico en la longitud de las fibras que puede ser debido a diferentes mecanismos de autoensamblaje de las moléculas en ambos disolventes. Esta diferencia en la morfología que presentan los geles podría estar correlacionada con el diferente comportamiento observado en los estudios reológicos de forma que los geles en acetato de etilo, con un mayor módulo de almacenamiento, presentan largas fibras entrelazadas (Figura 18), mientras que el gel en acetonitrilo, con menor módulo de almacenamiento, está constituido por fibras más cortas (Figura 19A).

Los geles liofilizados (xerogeles) del compuesto **110** en acetato de etilo y acetonitrilo fueron analizados por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes del gel en acetato de etilo no pudieron ser analizadas debido a la formación de películas o films. No obstante, la imagen SEM del gel liofilizado en acetonitrilo aportó una imagen sorprendente (Figura 20), donde se observaba la presencia de estructuras esféricas con un diámetro que oscilaba entre 0.6 y 1.4 μ m interconectadas a través de fibras de diámetro aproximado de 140 nm.

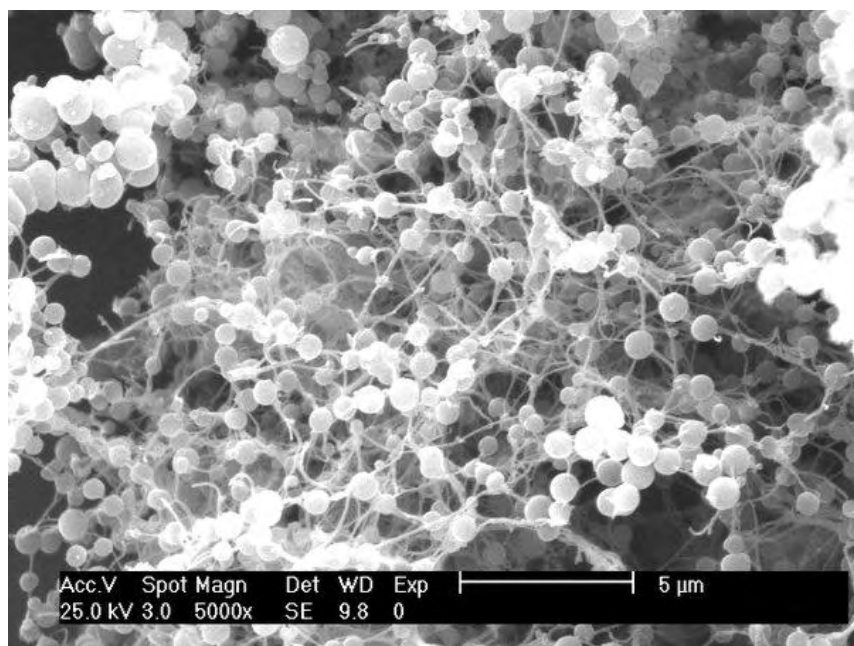


Figura 71. Imagen por microscopía electrónica de barrido (SEM) del gel formado por el compuesto **110** en acetonitrilo (20 mg/ml), a temperatura ambiente, a las 2 horas de su formación

Esta imagen peculiar nos condujo a tomar nuevas imágenes por SEM de muestras donde se variaba el lapso de tiempo entre el proceso de enfriado de la disolución a partir de la cual se forma el organogel y el proceso de liofilizado de los geles, requerido para la obtención de imágenes del gel por SEM. Cuando este periodo de tiempo era corto (< 30 min), las imágenes por SEM revelaban la formación de una gran cantidad de partículas esféricas no interconectadas entre sí a través de fibras, con diámetros que oscilaban entre 0.6 y 1.4 μm (Figura 21A). No obstante, cuando el periodo de tiempo entre la formación del gel y el proceso de liofilizado del mismo se extendía a 48 horas, las imágenes del xerogel obtenidas mostraban una morfología muy diferente consistente en una extensa red de fibras interconectadas, de un diámetro aproximado de 140 nm (Figura 21B). Cabe destacar que todavía son visibles algunas estructuras esféricas, aunque su tamaño es mucho menor que el observado para las microesferas de la Figura 20 y 21A.

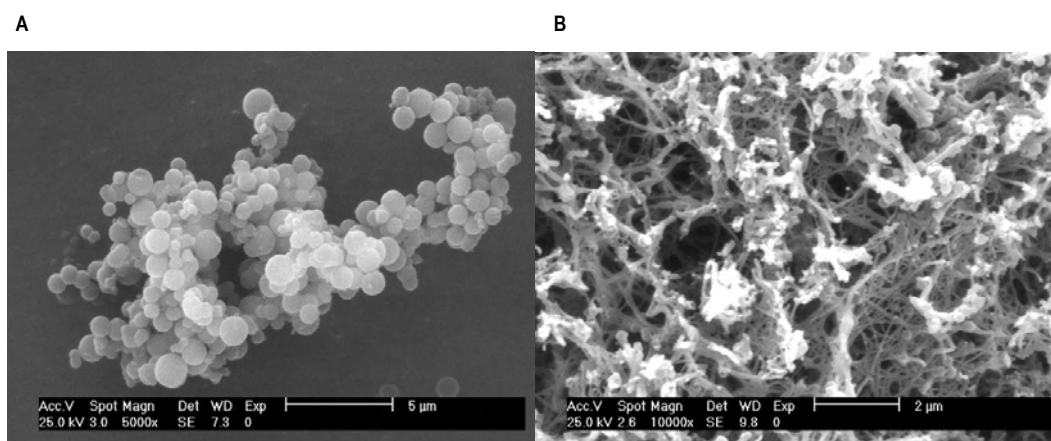


Figura 72. Imagen por microscopía electrónica de barrido del gel formado por el compuesto **110** en acetonitrilo (20 mg/ml), a temperatura ambiente, a diferentes tiempos entre la formación del gel y el proceso de liofilizado **A:** 30 minutos y **B:** 48 horas

Estas tres últimas imágenes de microscopía electrónica de barrido del gel del compuesto **110** en acetonitrilo muestran una evolución con el tiempo de la morfología de los agregados, lo que podría sugerir que el proceso de autoensamblaje es dependiente del tiempo.

El por qué y el cómo en el proceso de autoensamblaje se pueden llegar a diferentes morfologías es uno de los campos en los que se investiga en relación con los organogeles. Sin duda, además de la estructura molecular del gelificante, son varios los factores que pueden influir en el proceso de autoensamblaje, como se recoge en ejemplos recientes. Así, Xue y colaboradores han propuesto que la naturaleza del disolvente y la velocidad de gelificación puede afectar al autoensamblaje de un organogelificante de carácter lipídico⁴⁵. Igualmente, Coates y Smith han demostrado que, controlando la velocidad de enfriamiento de geles de bis-ureas, la morfología del gel puede cambiar de fibras a bolas³⁰. También Miravent y Escuder han descrito un péptido que en función de la velocidad de enfriamiento puede dar lugar a fibras más anchas o más estrechas⁴⁶. En nuestro caso, según las imágenes obtenidas por SEM para el gel del compuesto **110** en acetonitrilo, parece ser que el tiempo juega un papel fundamental en la morfología del gel, de forma que a tiempos cortos se forman principalmente esferas, pero si se incrementa el tiempo, las fibras son predominantes.

Espectroscopía de ¹H-RMN

Con el fin de obtener información acerca de la estructura tridimensional primaria que presenta el gel del compuesto **110** en acetonitrilo, se realizaron diversos experimentos mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear. En primer lugar se registraron los espectros de ¹H-RMN del compuesto **110** tanto en disolución como formando gel, en acetonitrilo (Figura 22) y a temperatura ambiente (25 °C).

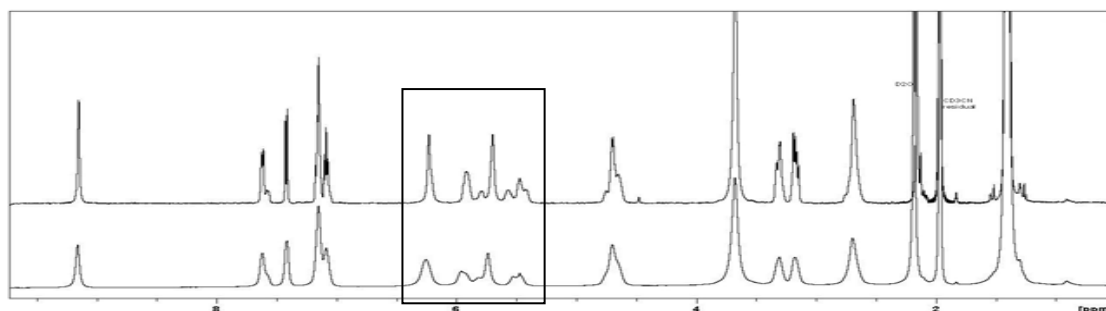


Figura 73. Espectro de ¹H-RMN a 298 K, de 0 a 9.5 ppm. Parte superior: disolución del compuesto **110** a una concentración de 1 mM en acetonitrilo. Parte inferior: gel del compuesto **110** en acetonitrilo. El recuadro engloba la región correspondiente a las señales de los NHs.

El desplazamiento químico es un parámetro muy sensible en RMN, por lo que incluso ligeras diferencias en el entorno de un núcleo determinado, puede tener un impacto significativo en su frecuencia de resonancia, lo que origina una variación en su desplazamiento químico. Curiosamente, el espectro de ¹H-RMN para el compuesto **110** tanto en disolución como formando gel, muestra básicamente los mismos

desplazamientos químicos para todos los protones, excepto para los de las aminas, que varían ligeramente (región recuadrada de la Figura 22). No obstante existe una diferencia entre los espectros de la disolución y del gel, y es que se produce un ensanchamiento significativo de las señales para la muestra del gel. Esta invariabilidad de los desplazamientos químicos, junto con el ensanchamiento de las bandas, ha sido descrita para otros organogeles⁴⁷⁻⁴⁸. En base a estas observaciones, y a medidas cualitativas del tiempo de relajación transversal T2, se ha propuesto que puede tener lugar un rápido intercambio entre moléculas que se encuentran “libres” en disolución y las que se encuentran en regiones móviles del gel. Asimismo se ha propuesto la existencia de una región rígida en el gel (silenciosa en RMN) donde las moléculas del compuesto se encuentran firmemente sujetas.

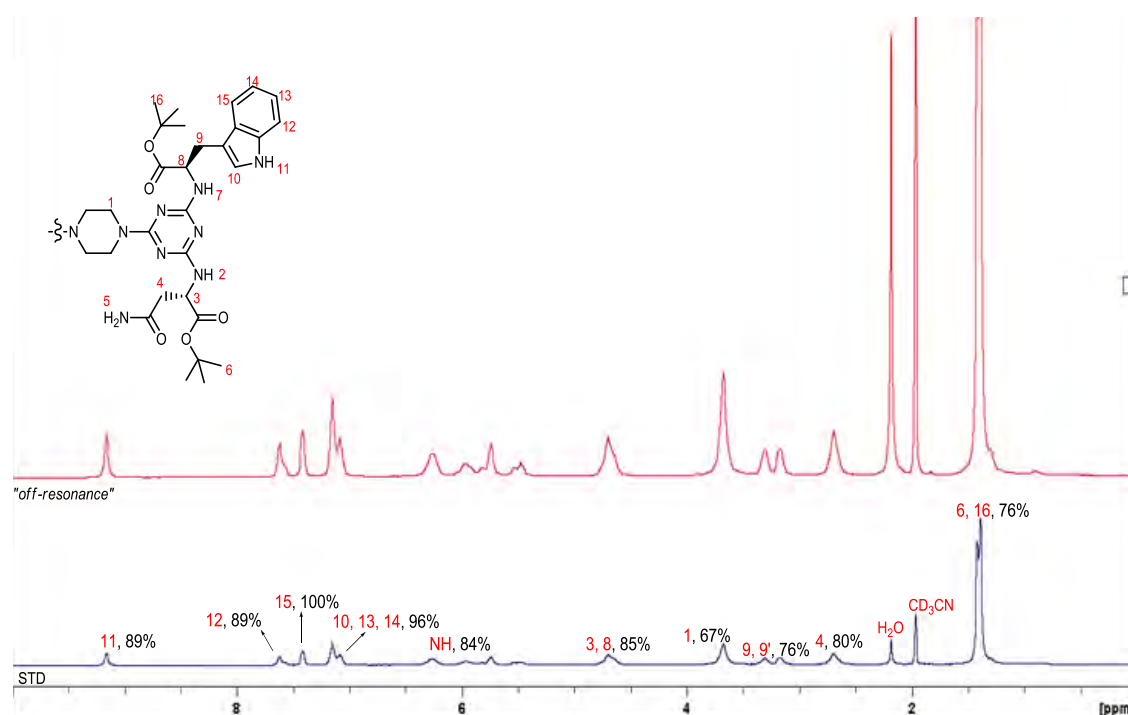


Figura 74. Parte superior: espectro *off-resonance* del compuesto **110** formando gel en acetonitrilo. Parte inferior: espectro de STD con la asignación de los protones de acuerdo a la numeración representada en la estructura, y con el correspondiente porcentaje de STD.

Además, se realizaron experimentos de diferencia de transferencia de saturación (STD) del compuesto **110** formando gel en acetonitrilo, en los cuales la frecuencia de irradiación (-1 ppm) fue fijada en una región del espectro donde no se observó resonancia alguna. El espectro de la Figura 23 muestra las señales de STD obtenidas para todos los protones, incluidos los protones residuales del agua y del acetonitrilo. La máxima respuesta de STD encontrada fue para los protones aromáticos del triptófano seguido de las señales de resonancia de los NH y H α de los residuos de triptófano y asparragina (protones 3 y 8) que aparecen solapadas. Las señales de STD más pequeñas se observaron para los protones del anillo de piperazina, lo que sugiere que el anillo de piperazina contribuye en menor medida a las interacciones intermoleculares responsables de la formación de la red tridimensional del gel,

probablemente debido a impedimentos estéricos originados por la presencia de los residuos de asparragina y triptófano.

Por otro lado, las mayores interacciones intermoleculares parecen tener lugar entre los anillos indólicos de los triptófanos y los grupos amino y amido de ambos residuos de aminoácido. Es importante señalar que el acetonitrilo y el agua también muestran transferencia de saturación en el gel, lo que indica que las moléculas de acetonitrilo y agua juegan un papel importante en la formación de la red tridimensional de gel.

Se realizaron también experimentos NOESY para el compuesto **110** en disolución (1 mM) y formando gel, en acetonitrilo. El espectro realizado con tiempo de mezcla de 500 ms (figuras no mostradas) mostró NOEs positivos, mientras que el mismo experimento realizado con un tiempo de mezcla de 5 ms para la muestra del gel, dio lugar a NOEs de signo opuesto. Esta observación está en concordancia con la existencia de agregados con largos tiempos de correlación presentes en la región móvil del gel, que se encuentran en constante intercambio con pequeños oligómeros.

Estudios de fluorescencia

Como se ha comentado anteriormente, la fluorescencia intrínseca que presentan los residuos de triptófano del compuesto **110** puede ser de utilidad para el estudio del proceso de autoensamblaje que conduce a la formación del gel. Para los estudios de fluorescencia, en primer lugar se registró el espectro de UV-VIS de una disolución del compuesto **110** en acetonitrilo, a una concentración de 10^{-4} M (Figura 24).

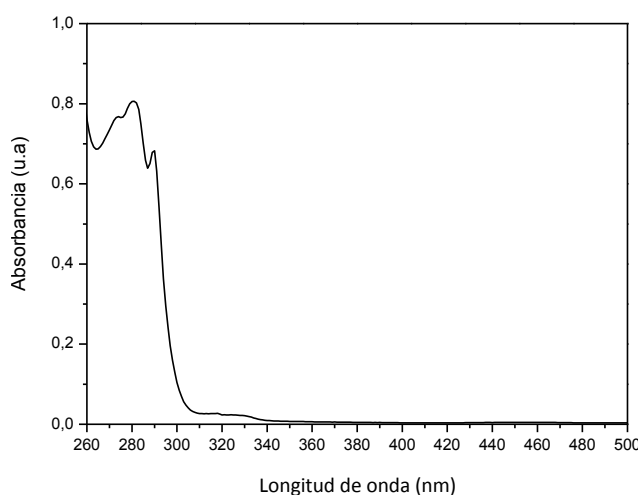


Figura 24. Espectro de UV del compuesto **110** en acetonitrilo, a una concentración de 10^{-4} M

El espectro de UV-VIS del compuesto **110** en acetonitrilo muestra una banda de absorción en torno a 280 nm, asignada a la transición $\pi-\pi^*$ típica de los residuos de triptófano. La longitud de onda a la

cual la absorción del compuesto **110** en el UV-VIS es máxima ($\lambda=280$ nm) fue empleada para la excitación del compuesto **110**, en la obtención de los espectros de fluorescencia del compuesto formando gel y en disolución (Figura 25). Para ello se empleó la mínima concentración a la cual el compuesto formaba gel en acetonitrilo, en decir, 20 mg/ml. El espectro de la disolución se obtuvo a tiempos muy cortos, cuando todavía no se había formado el gel, mientras que el espectro del gel fue obtenido a tiempos mayores (30 minutos).

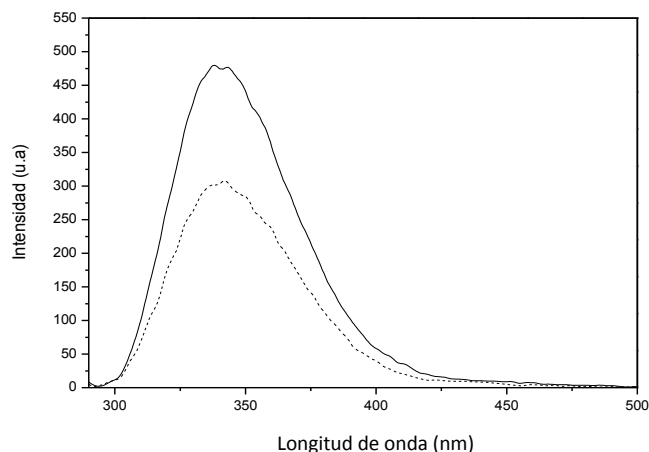


Figura 25. Espectros de fluorescencia ($\lambda_{exc}=280$ nm) del compuesto **110** en acetonitrilo en disolución (línea de puntos) y formando gel (línea continua)

Los espectros de fluorescencia del compuesto **110**, tanto en disolución como formando gel, muestran una banda de emisión a $\lambda=340$ nm, atribuida a los residuos de triptófano. El hecho de que la banda de emisión no cambie de posición ni se ensanche al pasar de la disolución al gel, podría ser indicativo de que los estados electrónicos de las moléculas del compuesto **110** no cambian en el proceso de agregación que conduce a la formación del gel.

Con el fin de analizar el incremento de fluorescencia al pasar de la disolución al gel, se registró el espectro de fluorescencia en función del tiempo de una disolución del compuesto **110** en acetonitrilo, a la mínima concentración a la que forma gel (20 mg/ml). Como se observa en la Figura 26, la intensidad de la banda de fluorescencia aumenta con el tiempo hasta alcanzar un *plateau* a los 100 minutos. Este incremento de la fluorescencia al pasar de la disolución al gel podría deberse a la disminución de la movilidad relativa que experimentan las moléculas en el proceso de agregación. Cuando las moléculas de un compuesto gelificante se encuentran en disolución pueden adoptar un gran número de conformaciones, lo que originaría una rápida desactivación de los estados excitados a través de procesos no radiativos. No obstante, durante la formación del gel, la interacción de unas moléculas con otras mediante enlaces de hidrógeno e interacciones π conduce a la formación de agregados ordenados, donde las moléculas se encuentran conformacionalmente restringidas, lo que en principio disminuiría la

desactivación de los estados excitados a través de procesos no radiativos, incrementándose así la emisión de fluorescencia⁴⁹.

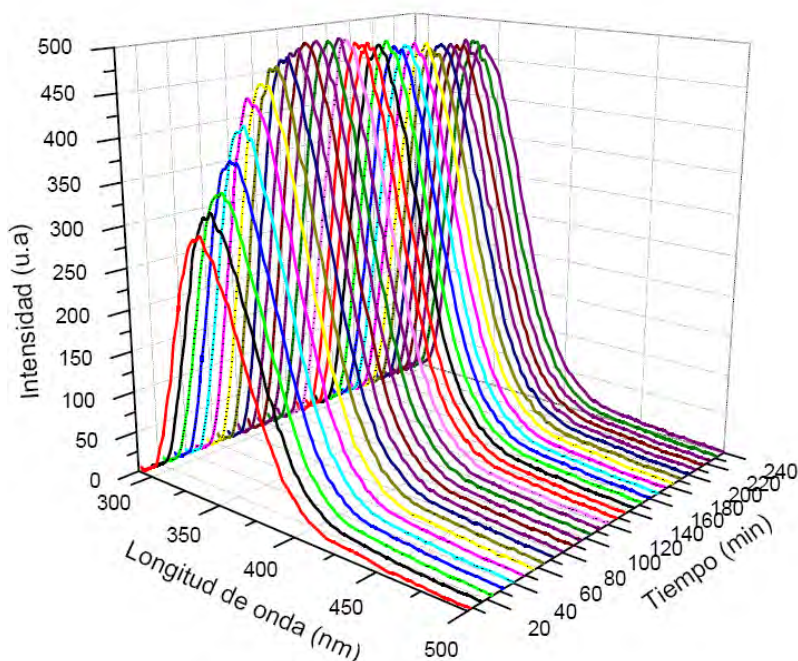


Figura 26. Espectros de fluorescencia ($\lambda_{exc}=280$ nm) a temperatura ambiente del compuesto **110** en acetonitrilo (20 mg/ml) en función del tiempo

Respuesta del gel del compuesto 110 en acetonitrilo en presencia de diferentes aniones

Como se comentó anteriormente, algunos geles formados por compuestos de bajo peso molecular poseen interesantes aplicaciones en el campo de los sensores, ya que pueden experimentar una transición gel-disolución en respuesta a diferentes estímulos externos como puede ser una variación de temperatura, o frente a la presencia de diferentes especies químicas¹⁰.

Los sensores con capacidad de reconocer aniones F^- poseen un gran interés tanto en el ámbito biológico como industrial⁵⁰, pero hasta la fecha, la mayoría de sensores de F^- desarrollados operan en disolución⁵¹. En los últimos años, se han descrito algunos organogeles con capacidad de respuesta frente al F^- ⁵²⁻⁵⁴ y sus posibles aplicaciones en el campo de los sensores están siendo objeto de estudio. Estos organogeles están constituidos por compuestos con grupos amida y que gelifican en disolventes apróticos, ya que en estos disolventes las interacciones por enlaces de hidrógeno que se dan entre moléculas juegan un papel importante en la formación del gel. Así, cuando el gel se pone en contacto con una disolución que contiene F^- , la competición del F^- por los enlaces de hidrógeno hace que el gel se rompa.

El compuesto **110**, con dos asparraginas, posee dos grupos amida, por lo que nos pareció interesante estudiar la respuesta del gel frente a diferentes aniones en acetonitrilo. Para ello, se añadió

sobre el gel previamente formado ($5.3 \mu\text{mol}/250 \mu\text{l}$), los aniones seleccionados (F^- , Cl^- , Br^- , I^- y CN^-) en forma de sales de tetrabutilamonio disueltas en acetonitrilo ($5.3 \mu\text{mol}/50 \mu\text{l}$). La adición de fluoruro de tetrabutilamonio originó una rápida transición del gel a la disolución, es decir, la presencia de F^- consiguió romper el gel previamente formado. Sin embargo, el gel permaneció estable durante días en presencia de otros aniones como Cl^- , Br^- , I^- y CN^- , como se ilustra en la Figura 27.

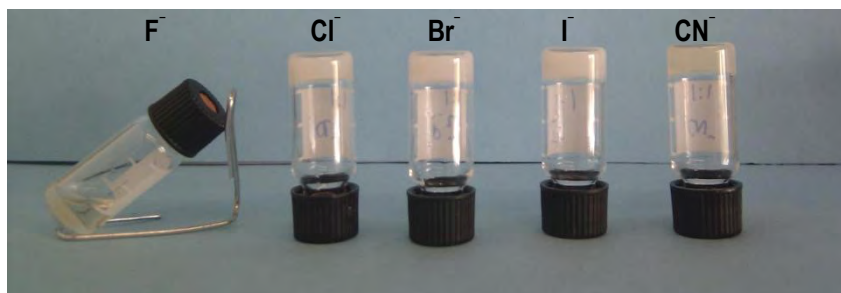


Figura 27. Diferente comportamiento del gel de **110** en acetonitrilo en presencia de diferentes sales de tetrabutilamonio

De los aniones ensayados, sólo el fluoruro es capaz de transformar el gel del compuesto **110** en acetonitrilo en disolución. Por tanto, este gel posee una capacidad de respuesta selectiva frente a la presencia de aniones F^- , siendo esta propiedad de interés en el campo de los sensores de aniones.

CONCLUSIONES

Tras los estudios llevados a cabo en este capítulo podemos concluir que dos de nuestros compuestos, los dímeros **65** y **110**, constituyen compuestos de bajo peso molecular con capacidad de formar geles supramoleculares en disolventes orgánicos. Desde el punto de vista estructural, ambos dímeros resultan novedosos, puesto que, aunque se han descrito un gran número de compuestos derivados de aminoácidos con capacidad para la formación de geles, hasta la fecha ninguno de ellos incorpora residuos de asparragina en su estructura.

El comportamiento de gel de estos dímeros se ha caracterizado mediante medidas reológicas, así como con estudios espectroscópicos y morfológicos.

Desde el punto de vista de la reología, el gel formado por el dímero **65** en 1,4-dioxano, así como los geles formados por el dímero **110** en acetato de etilo y acetonitrilo, muestran el comportamiento típico de un gel, caracterizado por un módulo elástico a frecuencia cero y la independencia del módulo de almacenamiento, G' , y del módulo de pérdida, G'' , de la frecuencia aplicada. Otra característica importante y necesaria para ser considerado un gel, es que el módulo de almacenamiento, G' , debe ser mayor que el módulo de pérdida, G'' , para todas las frecuencias, lo cual se cumple para los geles formados por los dímeros **65** y **110**. Por otro lado, se observó termorreversibilidad tanto para el gel formado por el dímero **65** en 1,4-dioxano como para los geles formados por el dímero **110** en acetato de etilo y en acetonitrilo, lo que indica la formación de geles físicos para ambos sistemas. No obstante, existen hechos diferenciales entre estos geles que se comentan a continuación:

a) La temperatura de transición gel-disolución (T_{gel}) fue 80 °C para el gel formado por el dímero **65** en 1,4-dioxano, y 39 °C para los geles formados por el dímero **110**, tanto en acetato de etilo como en acetonitrilo. Estos resultados indican que el gel formado por el compuesto **65** en 1,4-dioxano es térmicamente más estable que los geles formados por el dímero **110**.

b) El esfuerzo de fluencia (valor mínimo de esfuerzo para el cual el gel deja de comportarse como un sólido y comienza a fluir) resultó ser de 90 Pa para el gel del dímero **110** en acetato de etilo frente a los 30 Pa del gel del dímero **65** en 1,4-dioxano. Por tanto, se puede concluir que el gel del dímero **110** en acetato de etilo es mecánicamente más estable que el gel del dímero **65** en 1,4-dioxano. Cabe señalar que también existen diferencias para los geles formados por el dímero **110** en acetato de etilo y acetonitrilo. El gel formado por el compuesto **110** en acetonitrilo, con un esfuerzo de fluencia en

torno a 50 Pa, es mecánicamente más débil que cuando se forma el gel en acetato de etilo, aunque esto podría deberse en parte a la menor concentración a la que se han ensayado los geles en acetonitrilo, 20 mg/ml, frente a los 25 mg/ml en acetato de etilo.

Los espectros de FT-IR obtenidos para el gel y la disolución del dímero **65** en 1,4-dioxano revelan la importancia de los grupos amida de los residuos de asparragina en el establecimiento de enlaces de hidrógeno intermoleculares, fuerza dirigente del proceso de auto-ensamblaje en muchos organogeles.

Por otro lado, experimentos de STD y NOESYs realizados para el dímero **110** en CD₃CN, sugieren una gran proximidad entre los anillos indólicos de residuos de triptófano de moléculas vecinas, lo que indica la participación de las interacciones por apilamiento de nubes π en el proceso de auto-ensamblaje del dímero **110**. Igualmente los mayores porcentajes de STD se observan para las señales de los grupos amino y amido de ambos residuos de aminoácido. Además, los experimentos de STD muestran la participación del disolvente en el proceso de auto-ensamblaje. La importancia del disolvente está en concordancia con el diferente comportamiento observado para los geles del dímero **110** en diferentes disolventes, esto es, en acetato de etilo y acetonitrilo.

La morfología observada por imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) para el gel del dímero **65** en 1,4-dioxano muestra la formación de agregados esféricos, en concordancia con las imágenes obtenidas para este gel por microscopía de fuerza atómica (AFM). En la escala de tiempo en la que se han realizado los experimentos, siempre se observó la formación de agregados esféricos. Esta morfología, aunque inusual, ha sido descrita para otros geles formados por compuestos anfipáticos o compuestos cuya estructura tridimensional presenta cierta curvatura.

La morfología del gel del dímero **110** en acetato de etilo fue determinada mediante imágenes de AFM, y se observaron haces alargados de fibras que se entrecruzaban unos con otros. El diámetro de las fibras, determinado por el análisis de la sección transversal, era de 160 nm. No obstante, las imágenes de AFM del gel formado por este dímero en acetonitrilo mostraba la formación de fibras mucho más cortas, aunque del mismo diámetro.

Estas diferencias en las morfologías obtenidas para los diferentes geles puede correlacionarse con su diferente comportamiento mecánico. Los geles cuya estructura tridimensional está constituida por fibras suelen tener mayor estabilidad mecánica que aquellos que exhiben otras morfologías. En nuestro caso, el gel formado por el dímero **110** en acetato de etilo, con morfología fibrosa, posee mayor rango de viscosidad lineal que el gel del dímero **65** en 1,4-dioxano, con una morfología basada en agregados esféricos.

Las imágenes obtenidas por SEM para el gel del dímero **110** en acetato de etilo no fueron concluyentes debido a la formación de películas o films. Sin embargo, las imágenes por SEM del gel formado por el dímero **110** en acetonitrilo, mostraron una morfología sorprendente, donde estructuras

esféricas se interconectaban por fibras alargadas. Con objeto de estudiar la formación de esta morfología, se tomaron imágenes variando el lapso de tiempo entre la formación del gel y la liofilización del mismo. A tiempos muy cortos (< 30 min), sólo se observó la presencia de agregados esféricos, mientras que a tiempos más largos (48 h) los agregados esféricos habían desaparecido casi en su totalidad dando lugar a una extensa red fibrilar. Estos resultados sugieren una evolución en el tiempo del proceso de auto-ensamblaje de unas moléculas con otras para formar la red tridimensional del gel.

Las medidas de fluorescencia realizadas para el dímero **110** en acetonitrilo revelan un incremento de la emisión al pasar de la disolución al gel.

Los experimentos realizados para estudiar la respuesta del gel del dímero **110** en acetonitrilo frente a diferentes aniones muestran una transición del gel a la disolución en presencia de F^- , lo que sugiere que el gel formado por **110** posee una capacidad de respuesta selectiva frente a los aniones F^- .

BIBLIOGRAFÍA

1. Jordon Lloyd, D. Colloid Chemistry *The Chemical Catalog Co. New York* **1926**, 1, 767.
2. Flory, P. J. Gels and gelling process. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1974**, 57, 7-18.
3. Smith, D. K. Lost in translation? Chirality effects in the self-assembly of nanostructured gel-phase materials. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 684-694.
4. Terech, P.; Weiss, R. G. Low molecular mass gelators of organic liquids and the properties of their gels. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 3133-3159.
5. Zhao, F.; Ma, M. L.; Xu, B. Molecular hydrogels of therapeutic agents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 883-891.
6. Dastidar, P. Supramolecular gelling agents: can they be designed? *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 2699-2715.
7. Kar, T.; Debnath, S.; Das, D.; Shome, A.; Das, P. K. Organogelation and hydrogelation of low-molecular-weight amphiphilic dipeptides: pH responsiveness in phase-selective gelation and dye removal. *Langmuir* **2009**, 25, 8639-8648.
8. Puigmartí-Luis, J.; Laukhin, V.; del Pino, A. P.; Vidal-Gancedo, J.; Rovira, C.; Laukhina, E.; Amabilino, D. B. Supramolecular conducting nanowires from organogels. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 238-241.
9. Jung, J. H.; Ono, Y.; Hanabusa, K.; Shinkai, S. Creation of both right-handed and left-handed silica structures by sol-gel transcription of organogel fibers comprised of chiral diaminocyclohexane derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5008-5009.
10. Sangeetha, N. M.; Maitra, U. Supramolecular gels: functions and uses. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 821-836.
11. Estroff, L. A.; Hamilton, A. D. Water gelation by small organic molecules. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1201-1217.
12. Piepenbrock, M. O. M.; Lloyd, G. O.; Clarke, N.; Steed, J. W. Metal- and anion-binding supramolecular gels. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 1960-2004.
13. Hernández, R. Estructura y propiedades viscoelásticas de nuevos hidrogeles basados en polialcohol vinílico. *Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.* **2004**.
14. Van Esch, J. H.; Feringa, B. L. New functional materials based on self-assembling organogels: from serendipity towards design. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2263-2266.
15. Chow, H. F.; Wang, G. X. Enhanced gelation property due to intra-molecular hydrogen bonding in a new series of bis(amino acid)-functionalized pyridine-2,6-dicarboxamide organogelators. *Tetrahedron.* **2007**, 63, 7407-7418.

16. Suzuki, M.; Hanabusa, K. L-Lysine-based low-molecular-weight gelators. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 967-975.
17. Bardelang, D.; Camerel, F.; Margeson, J. C.; Leek, D. M.; Schmutz, M.; Zaman, M. B.; Yu, K.; Soldatov, D. V.; Ziessel, R.; Ratcliffe, C. I.; Ripmeester, J. A. Unusual sculpting of dipeptide particles by ultrasound induces gelation. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3313-3315.
18. Zhu, X. F.; Li, Y. G.; Duan, P. F.; Liu, M. H. Self-assembled ultralong chiral nanotubes and tuning of their chirality through the mixing of enantiomeric components. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8034-8040.
19. Hirst, A. R.; Smith, D. K.; Feiters, M. C.; Geurts, H. P. M. Two-component dendritic gel: effect of spacer chain length on the supramolecular chiral assembly. *Langmuir.* **2004**, *20*, 7070-7077.
20. Chow, H. F.; Zhang, J. Structural diversity of α -amino acid based layer-block dendrons and their layer-block sequence-dependent gelation properties. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5817-5831.
21. Coates, I. A.; Hirst, A. R.; Smith, D. K. Optimizing biomimetic gelators constructed from amino acid building blocks. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3937-3940.
22. Hirst, A. R.; Huang, B. Q.; Castelletto, V.; Hamley, I. W.; Smith, D. K. Self-organisation in the assembly of gels from mixtures of different dendritic peptide building blocks. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2180-2188.
23. Suzuki, M.; Nakajima, Y.; Yumoto, M.; Kimura, M.; Shirai, H.; Hanabusa, K. Effects of hydrogen bonding and van der Waals interactions on organogelation using designed low-molecular-weight gelators and gel formation at room temperature. *Langmuir* **2003**, *19*, 8622-8624.
24. Suzuki, M.; Nigawara, T.; Yumoto, M.; Kimura, M.; Shirai, H.; Hanabusa, K. L-Lysine based gemini organogelators: their organogelation properties and thermally stable organogels. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 4124-4131.
25. Bastiat, G.; Leroux, J. C. Pharmaceutical organogels prepared from aromatic amino acid derivatives. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 3867-3877.
26. Cicchi, S.; Ghim, G.; Fallani, S.; Brandi, A.; Berti, D.; Betti, F.; Baglioni, P. The triazine ring as a scaffold for the synthesis of new organogelators. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 1701-1705.
27. Lu, C. C.; Su, S. K. New gelators of urea-containing triazine derivatives: effects of aggregation and optical features in different organic solvents. *Supramol. Chem.* **2009**, *21*, 572-580.
28. Ghosh, S.; Verma, S. Solvent-mediated morphological transformations in peptide-based soft structures. *Tetrahedron.* **2008**, *64*, 6202-6208.
29. George, M.; Weiss, R. G. Low molecular mass organic gelators. In *Molecular Gels. Materials with self-assembled fibrillar networks*; Weiss, R.G., Terech, P., Eds; Springer, The Netherlands, 2006; pp 449-552.
30. Coates, I. A.; Smith, D. K. Controlled self-assembly-synthetic tunability and covalent capture of nanoscale gel morphologies. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6340-6344.
31. Peng, J. X.; Liu, K. Q.; Liu, J.; Zhang, Q. H.; Feng, X.; Fang, Y. New dicholesteryl-based gelators: chirality and spacer length effect. *Langmuir* **2008**, *24*, 2992-3000.
32. Jung, J. H.; Ono, Y.; Sakurai, K.; Sano, M.; Shinkai, S. Novel vesicular aggregates of crown-appended cholesterol derivatives which act as gelators of organic solvents and as templates for silica transcription. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8648-8653.

33. Ajayaghosh, A.; Varghese, R.; Praveen, V. K.; Mahesh, S. Evolution of nano- to microsized spherical assemblies of a short oligo(p-phenyleneethynylene) into superstructured organogels. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3261-3264.
34. Menger, F. M.; Peresykin, A. V. Strings of vesicles: flow behavior in an unusual type of aqueous gel. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5340-5345.
35. Rehm, T.; Stepanenko, V.; Zhang, X.; Wurthner, F.; Grohn, F.; Klein, K.; Schmuck, C. A new type of soft vesicle-forming molecule: An amino acid derived guanidiniocarbonyl pyrrole carboxylate zwitterion. *Org. Lett.* **2008**, 10, 1469-1472.
36. Yang, X. C.; Lu, R.; Xu, T. H.; Xue, P. C.; Liu, X. L.; Zhao, Y. Y. Novel carbazole-based organogels modulated by *tert*-butyl moieties. *Chem. Commun.* **2008**, 453-455.
37. Gamez, P.; Reedijk, J. 1,3,5-triazine-based synthons in supramolecular chemistry. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 29-42.
38. Das, D.; Dasgupta, A.; Roy, S.; Mitra, R. N.; Debnath, S.; Das, P. K. Water gelation of an amino acid-based amphiphile. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 5068-5074.
39. Roy, S.; Dasgupta, A.; Das, P. K. Alkyl chain length dependent hydrogelation of L-tryptophan-based amphiphile. *Langmuir* **2007**, 23, 11769-11776.
40. Sako, Y.; Takaguchi, Y. A photo-responsive hydrogelator having gluconamides at its peripheral branches. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 3843-3847.
41. Suzuki, M.; Owa, S.; Shirai, H.; Hanabusa, K. Supramolecular hydrogel formed by glucoheptonamide of L-lysine: simple preparation and excellent hydrogelation ability. *Tetrahedron.* **2007**, 63, 7302-7308.
42. Gao, D.; Xue, M.; Peng, J. X.; Liu, J.; Yan, N.; He, P. L.; Fang, Y. Preparation and gelling properties of sugar-contained low-molecular-mass gelators: Combination of cholesterol and linear glucose. *Tetrahedron.* **2010**, 66, 2961-2968.
43. Fuhrhop, J. H.; Schnieder, P.; Boekema, E.; Helfrich, W. Lipid bilayer fibers from distereomeric and enantiomeric *N*-octylaldonamides. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2861-2867.
44. Arévalo, M. J.; Avalos, M.; Babiano, R.; Cabanillas, A.; Cintas, P.; Jiménez, J. L.; Palacios, J. C. Optically active sugar thioamides from δ -gluconolactone. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 1985-1995.
45. Xue, P. C.; Lu, R.; Yang, X. C.; Zhao, L.; Xu, D. F.; Liu, Y.; Zhang, H.; Nomoto, H.; Takafuji, M.; Ihara, H. Self-assembly of a chiral lipid gelator controlled by solvent and speed of gelation. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 9824-9835.
46. Rodríguez-Llansola, F.; Miravet, J. F.; Escuder, B. Supramolecular gel formation and self-correction induced by aggregation-driven conformational changes. *Chem. Commun.* **2009**, 209-211.
47. Escuder, B.; Llusar, M.; Miravet, J. F. Insight on the NMR study of supramolecular gels and its application to monitor molecular recognition on self-assembled fibers. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 7747-7752.
48. Duncan, D. C.; Whitten, D. G. ¹H-NMR investigation of the composition, structure, and dynamics of cholesterol-stilbene tethered dyad organogels. *Langmuir* **2000**, 16, 6445-6452.

49. Shen, Y. T.; Li, C. H.; Chang, K. C.; Chin, S. Y. Synthesis, optical and mesomorphic properties of self-assembled organogels featuring phenylethynyl framework with elaborated long-chain pyridine-2,6-dicarboxamides. *Langmuir* **2009**, *25*, 8714-8722.
50. Black, C. B.; Andrioletti, B.; Try, A. C.; Ruiperez, C.; Sessler, J. L. Dipyrrolylquinoxalines: efficient sensors for fluoride anion in organic solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10438-10439.
51. Martínez-Manez, R.; Sancenon, F. Fluorogenic and chromogenic chemosensors and reagents for anions. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419-4476.
52. Dzolic, Z.; Cametti, M.; Dalla Cort, A.; Mandolini, L.; Zinic, M. Fluoride-responsive organogelator based on oxalamide-derived anthraquinone. *Chem. Commun.* **2007**, 3535-3537.
53. Maeda, H. Anion-Responsive Supramolecular Gels. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11274-11282.
54. Teng, M. J.; Kuang, G. C.; Jia, X. R.; Gao, M.; Li, Y.; Wei, Y. Glycine-glutamic-acid-based organogelators and their fluoride anion responsive properties. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 5648-5654.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo inicial de esta tesis doctoral, que constituye una línea nueva en nuestro grupo de investigación, era la obtención de compuestos que pudieran interactuar con las glicoproteínas de la cubierta del VIH mimetizando la acción de las lectinas, y de este modo obtener nuevos compuestos con actividad frente al VIH. En la interacción carbohidrato-lectina, al igual que en otros muchos eventos biológicos, tiene lugar un proceso de *reconocimiento molecular*. Con este término se hace referencia a la interacción específica entre dos o más moléculas a través de enlaces no covalentes y donde es crucial la complementariedad molecular. Desde esta perspectiva, quizás no resulte tan llamativo que, en la búsqueda de compuestos capaces de reconocer carbohidratos, surgieran compuestos capaces de “autorreconocerse” o “autoensamblarse” y formar geles. Por ello, a la vista de los resultados obtenidos, a nuestro objetivo inicial incorporamos un segundo objetivo que fue el estudio de la capacidad de formar geles de algunos de los compuestos sintetizados.

Tanto el primero como el segundo de nuestros objetivos requerían de un abordaje multidisciplinar. Así, para la consecución del primero de los objetivos, hemos mantenido una estrecha relación con nuestros colaboradores biológicos dirigidos por el Prof. Jan Balzarini en el Instituto Rega a lo largo de toda la tesis, colaboración que fue aún más estrecha durante una estancia breve de casi cuatro meses para llevar a cabo los estudios de la capacidad de la interacción de los compuestos con las glicoproteínas virales mediante resonancia de plasmón superficial. Para el segundo de los objetivos, es decir, para el estudio de la capacidad gelificante de nuestros compuestos, hemos colaborado con el grupo de investigadores de la Prof. Carmen Mijangos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros. La colaboración con ambos grupos ha sido muy enriquecedora tanto a nivel personal como formativo, ya que ha permitido el contacto con campos diferentes de la química médica, y ha facilitado el aprendizaje de nuevas metodologías y técnicas. Los resultados más relevantes de esta Memoria, agrupados por capítulos, se comentan a continuación.

En el Capítulo 1 se ha llevado a cabo la síntesis de tres series de compuestos que compartían un motivo estructural común, el anillo de 1,3,5-triazina sustituida con aminoácidos de carácter aromático, con el objetivo de obtener compuestos miméticos de lectinas que pudiesen interactuar con los azúcares de la glicoproteína gp120 presente en la envoltura de VIH, impidiendo de esta forma la adhesión del virus a la célula huésped y, por tanto, la infección. El anillo de 1,3,5-triazina destaca por su gran versatilidad sintética, y sus derivados poseen interesantes propiedades para el reconocimiento molecular. A pesar de ello, en la bibliografía existen muy pocos ejemplos de estos derivados con actividad anti-VIH. Los derivados obtenidos en este capítulo se agrupan en tres series, en función del número de anillos de triazina y de residuos de aminoácidos. Así, la Serie I la constituyen monómeros, con un único anillo de triazina disustituido con aminoácidos; en la tercera posición de los monómeros se introdujeron aminas de

diferente naturaleza como *N*-metilpiperazina, bencilamina y 2-(2-aminoetoxietanol). En la Serie II se obtuvieron dímeros, es decir, estructuras con dos núcleos de triazina separados por un espaciador y que poseen cuatro aminoácidos; como espaciadores se emplearon las diaminas piperazina, *m*-xililendiamina y 2,2'-(etilendioxo)diethylamina, estructuralmente relacionadas con las introducidas en los monómeros. Por último, en la Serie III se sintetizaron trímeros, donde tres anillos de triazina se encuentran unidos a un núcleo central, incorporando seis aminoácidos en la estructura; como núcleos centrales se emplearon la tris(2-aminoetil)amina (TREN) y la 1,3,5-triaminometil-2,4,6-trietilbenceno, triaminas muy empleadas en la obtención de receptores tripodales. Al pasar de monómeros a dímeros y de dímeros a trímeros, se perseguía aumentar el número de elementos de reconocimiento presentes en las estructuras, y aumentar así la afinidad de unión conforme a la teoría de la multivalencia. Las aportaciones más significativas son las siguientes:

- Para llevar a cabo la tercera sustitución sobre el anillo de 1,3,5-triazina disustituida, el empleo del calentamiento mediante irradiación de microondas, si bien no condujo a un incremento de los rendimientos, sí permitió acortar notablemente los tiempos de reacción respecto al calentamiento térmico convencional. Esto fue especialmente importante para la síntesis de trímeros, ya que el calentamiento por microondas permitió obtener los compuestos deseados en tan sólo 3 horas.

- El empleo de resinas de intercambio aniónico (Amberlite IRA400 para monómeros y dímeros, y Dowex 1X2 para trímeros) permitió aislar los ácidos carboxílicos de forma reproducible y con buenos rendimientos.

- En la estrategia convergente empleada para la síntesis de dímeros y trímeros se ajustó el número de equivalentes del espaciador o núcleo central, empleando 0.6 eq para dímeros y 0.3 eq para trímeros.

- Los compuestos obtenidos fueron ensayados frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2. Los monómeros protegidos, así como los desprotegidos, no mostraron actividad antiviral significativa. Los dímeros protegidos tampoco fueron activos. No obstante, alguno de los dímeros desprotegidos derivados de triptófano mostraron una ligera actividad antiviral, sobre todo cuando el espaciador fue la *m*-xililendiamina, con una CE_{50} en torno a 80 μ M. Al igual que para monómeros y dímeros, los trímeros protegidos tampoco fueron activos. Los mejores datos de actividad se obtuvieron para los trímeros desprotegidos, y en concreto para aquellos que incorporaban el anillo de trietilbenceno como núcleo central. Entre los derivados de la TREN, el trímero de triptófano **76** fue el más activo con una CE_{50} de 20 μ M. Para los derivados de trietilbenceno, las diferencias entre compuestos no parecen demasiado notables, si bien el derivado de triptófano **77** fue el que mostró la mejor actividad antiviral ($CE_{50} = 16 \mu$ M). Todos estos datos reflejan la importancia del residuo de triptófano en la actividad biológica de los compuestos, así como el aumento de la actividad con el número de elementos de reconocimiento. Por

otro lado, cabe destacar que no se observó signos de citotoxicidad a la máxima concentración ensayada, con valores de CC_{50} superiores a 250 μM en la mayoría de los casos.

- Los estudios de resonancia de plasmón superficial (SPR) permitieron obtener información complementaria sobre la capacidad y modo de unión de los compuestos frente a la gp120 del VIH. Así, y analizando los datos de SPR obtenidos con los trímeros que habían mostrado actividad frente a VIH, se pudo concluir que tanto el esqueleto central como la naturaleza de los aminoácidos en la periferia tenían un marcado efecto en la capacidad de unión frente a gp120. El compuesto que mostró una mayor capacidad de unión a gp120 fue el trímero de Trp **77** con un esqueleto central de trietilbenceno, para el que se pudo determinar una K_D de 14 μM . Además, la unión entre el compuesto **77** y la gp120 es sensible a la concentración de Ca^{2+} y al pH del medio, siendo mayor a pH ácido.

- La combinación de los datos en cultivo y los datos de interacción con gp120 permiten concluir que los compuestos aquí descritos, representados por el trímero de Trp **77**, constituyen una nueva familia de inhibidores de la replicación del VIH. Si bien su actividad antiviral es moderada ($CE_{50} = 16 \mu\text{M}$), su capacidad de unión a gp120, especialmente a pH ácido, y la ausencia de toxicidad les convierte en potenciales agentes microbicidas.

En el Capítulo 2 se realizó el estudio de las propiedades gelificantes del dímero de asparraginas **65** en 1,4 dioxano, así como la síntesis y ensayos de gelificación de compuestos estructuralmente relacionados con el dímero **65**, obteniéndose un dímero mixto de triptófano y asparragina, compuesto **110**, con capacidad de gelificar acetato de etilo y acetonitrilo. Las conclusiones extraídas del estudio reológico, espectroscópico y morfológico de estos geles, se recogen a continuación:

- El estudio reológico de los geles formados por el dímero **65** en 1,4-dioxano, y por el dímero **110** en acetato de etilo y acetonitrilo, mostró el comportamiento típico de los geles, caracterizado por la independencia del módulo de almacenamiento, G' , y del módulo de pérdida, G'' , de la frecuencia aplicada, siendo G' mayor que G'' para todas las frecuencias.

- Del estudio reológico también se determinó que el esfuerzo de fluencia era mayor para el gel formado por el dímero **110** en acetato de etilo que para el dímero **65** en 1,4-dioxano, lo que sugiere una mayor estabilidad mecánica para el dímero **110** en acetato de etilo.

- Las amidas de la cadena lateral de las asparraginas parecen cruciales para la formación de geles en esta familia de compuestos. Así, los espectros de FT-IR obtenidos para el gel del compuesto **65** en 1,4-dioxano revelan la importancia del establecimiento de enlaces de hidrógeno entre los grupos amida de los residuos de asparragina en la formación de la red tridimensional del gel. Por otro lado, experimentos de STD para el compuesto **110** en CD_3CN sugieren la participación de las amidas además de una contribución importante de las interacciones por apilamiento del anillo indólico de los residuos de triptófano en la formación del gel. Igualmente la participación del disolvente es evidente en los experimentos de STD.

- La morfología de los geles se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y por microscopía de fuerza atómica (AFM): i) las imágenes por SEM y AFM obtenidas para el dímero **65** en 1,4-dioxano, revelan la formación de agregados esféricos; ii) las imágenes de AFM de los geles del compuesto **110** muestra la formación de fibras, si bien las fibras formadas en el gel del compuesto **110** en acetato de etilo son más alargadas que en el gel del compuesto **110** en acetonitrilo, y en ambos casos el diámetro de las fibras era de 160 nm; iii) la imagen por SEM del gel formado por **110** en acetonitrilo reveló una morfología sorprendente donde estructuras esféricas se encontraban interconectadas por fibras alargadas. Esta morfología cambia con el tiempo de modo que a tiempos muy cortos (< 30 min) sólo se observó la presencia de agregados esféricos, mientras que a tiempos más largos (48 h) predominaba la morfología fibrilar.

- La respuesta selectiva del gel del dímero **110** en acetonitrilo frente a los aniones F^- , confiere a este gel propiedades que podrían ser de interés en el ámbito de los sensores de aniones.

Por último, cabría hacer una reflexión acerca de la presencia de residuos de triptófano en los compuestos más interesantes identificados en esta Memoria. En el Capítulo 1, el trímero de triptófano con un esqueleto central de trietilbenceno fue el compuesto más activo en cultivo frente a la replicación del VIH, y el que daba una mayor respuesta en su capacidad de unión a la gp120 viral en los sensogramas. En el Capítulo 2, el dímero que combina unidades de asparragina y triptófano con piperazina como espaciador forma geles de gran estabilidad mecánica lo que podría ser indicativo de un elevado número de puntos de entrecruzamiento. Estas observaciones podrían ser casuales, pero curiosamente coincide con la información contenida en un artículo del 2010 de Wei y colaboradores¹ donde se alude a la importancia de los residuos de triptófano en procesos de reconocimiento molecular. En concreto, estos autores comentan la presencia reiterada de restos de Trp en los “puntos calientes funcionales” en las interacciones proteína-proteína es decir, en los pequeños conjuntos de residuos que interaccionan en la interfaz proteína-proteína y que constituyen la contribución dominante a la energía libre de unión. Por ejemplo, en la interacción de la hormona del crecimiento con su receptor, a pesar del hecho de que más de 30 cadenas laterales de residuos de ambas proteínas establecen contacto en la interfaz del complejo, tan sólo dos residuos de triptófano del receptor dominan la interacción hormona-receptor². Por otro lado, la proteína supresora de tumores p53 y su regulador MDM2 es otro sistema de interacción proteína-proteína ampliamente estudiado, donde más de la mitad de la energía libre de unión total es debida a la contribución del Trp23 de p53, enterrado en el interior de una cavidad hidrofóbica de MDM2³⁻⁴. Cabe destacar también que el Trp672 de la glicoproteína gp41 del VIH es el residuo clave en la unión con el anticuerpo mAb 4E10⁵ y se encuentra involucrado junto con la Phe673 en numerosas interacciones cooperativas de apilamiento aromático. Estos ejemplos recogidos de la bibliografía son empleados por Wei y colaboradores para apoyar sus propias observaciones sobre la importancia del Trp26 en la funcionalidad de la α -defensina humana HNP1 y demuestran que el Trp26 es un residuo crítico para la interacción de la α -defensina con una gran variedad de toxinas y con la gp120 de VIH¹. Además,

proponen que el Trp26 es crucial para la autoasociación de la proteína, lo que puede constituir un elemento clave para la unión de las defensinas a las toxinas mediante interacciones multivalentes. A estos ejemplos, se podrían sumar quizás los resultados obtenidos en esta tesis, que muestran también la importancia del triptófano en las interacciones multivalentes y en procesos de reconocimiento molecular.

-
1. Wei, G.; Pazgier, M.; de Leeuw, E.; Rajabi, M.; Li, J.; Zou, G. Z.; Jung, G.; Yuan, W. R.; Lu, W. Y.; Lehrer, R. I. Trp-26 imparts functional versatility to human alpha-defensin HNP1. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 16275-16285.
 2. Clackson, T.; Wells, J. A. A hot-spot of binding-energy in a hormone-receptor interface. *Science* **1995**, 267, 383-386.
 3. Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **1996**, 274, 948-953.
 4. Massova, I.; Kollman, P. A. Computational alanine scanning to probe protein-protein interactions: a novel approach to evaluate binding free energies. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8133-8143.
 5. Platis, D.; Maltezos, A.; Ma, J. K. C.; Labrou, N. E. Combinatorial de novo design and application of a biomimetic affinity ligand for the purification of human anti-HIV mAb 4E10 from transgenic tobacco. *J. Mol. Recognit.* **2009**, 22, 415-424.

PARTE EXPERIMENTAL

MÉTODOS GENERALES DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

El seguimiento de las reacciones se ha realizado por cromatografía en capa fina empleando 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 ninhidrina en disolución de metanol al 2% o ácido fosfomolibdico en etanol al 5% y calefacción. El seguimiento de las reacciones también se ha realizado por HPLC-MS, mediante un cromatógrafo HPLC Waters 12695 conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ.

El aislamiento y purificación de los productos de reacción se ha realizado por: i) cromatografía en columna con gel de sílice Merck tipo 60 (230-400 mesh), ii) 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 CaSO_4 de 1 mm de espesor y flujo de 4-8 ml/min, iii) cromatografía flash (HPFC) en un instrumento Biotage Horizon. Los eluyentes empleados se indican en cada caso y las proporciones indican la relación volumen:volumen.

Las reacciones en donde se ha calentado por irradiación de microondas se realizaron en un reactor de microondas monomodo Emrys™ Synthesizer (Biotage AB).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso y fueron registrados en un espectrómetro Varian UNIT INOVA-300 (a 300 y 75 MHz), Bruker AVANCE 300 (a 300 y 75 MHz), Varian INOVA-400 (a 400 y 100 MHz), Varian MERCURY-400 (a 400 y 100 MHz) y Varian-500 (a 500 y 125 MHz). Los espectros monodimensionales de ^1H y ^{13}C se obtuvieron utilizando condiciones estándar. En cada caso se han indicado los desplazamientos químicos (δ) en la escala ppm, la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete; dd, doble doblete; m, multilplete), el número de protones (deducidos por la integral), el valor de las constantes de acoplamiento J (Hz) y la asignación estructural.

Los experimentos bidimensionales heteronucleares (HSQC y HMBC) utilizan la misma anchura espectral en el dominio de protón (6000 Hz) y en el dominio de carbono (30000 Hz), con un tiempo de espera de 1 s. Para el experimento de HSQC se procesan los datos en una matriz de 4098 x 2048 puntos y las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento heteronuclear a un enlace de 145 Hz. En el caso del experimento HMBC, los datos se procesaron en una matriz de 4096 x 4096 puntos. Las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento a larga distancia de 8 Hz.

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro Hewlett-Packard LC/MS HP 1100 con una fuente de electrospray. Cuando fue requerida la masa exacta, los espectros se registraron en un Agilent Technologies 6520 Accurate-Mass QTOF LC/MS.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Mettler Toledo M170 y no están corregidos.

Los análisis elementales de los compuestos 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. Cuando el resultado del análisis elemental no fue satisfactorio, se determinó la masa exacta y el grado de pureza mediante HPLC en dos gradientes diferentes, mediante un cromatógrafo Waters 2690 empleando un detector de diodo array (230 a 400 nm) y una columna analítica Sunfire C18 de $3.5\mu\text{m}$ (4.6×50 mm). La fase móvil empleada corresponde a mezclas de acetonitrilo con un 0.04% de TFA (disolvente A) y H₂O con un 0.05% de TFA (disolvente B), siendo la velocidad de flujo de 1ml/min. Los sistemas de gradientes empleados se describen a continuación: Sistema A: de un 10% a un 100% de disolvente A en 5 min y Sistema B: de un 10% a un 70% de disolvente A en 10 min. Para todos los compuestos analizados, la pureza fue mayor de un 95%.

Los productos finales obtenidos fueron liofilizados en un equipo Telstar 6-80.

PROCEDIMIENTOS GENERALES DE SÍNTESIS

1.-Procedimiento general para la obtención de triazinas disustituidas con aminoácidos.

Una disolución que contiene cloruro cianúrico (1.0 mmol), el correspondiente aminoácido protegido en forma de éster metílico (2.4 mmol) y DIPEA (6.0 mmol) en THF (12 ml), se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en 20 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH_4Cl (10 ml). La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica según se especifica en cada caso.

2.- Procedimiento general para la obtención de estructuras monoméricas de triazina.

Procedimiento A. Una disolución que contiene la triazina disustituida (1.0 mmol), la amina correspondiente (3.0 mmol) y DIPEA (3.0 mmol) en dioxano (10 ml) se calienta en tubo de presión durante 24 horas a temperatura entre 60 °C y 100 °C. Transcurrido este tiempo, se deja enfriar la reacción a temperatura ambiente y se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en 20 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH_4Cl (10 ml). La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica según el procedimiento descrito en cada caso.

Procedimiento B. En un vial de microondas se añade la triazina disustituida (1.0 mmol), la amina correspondiente (3.0 mmol), DIPEA (3.0 mmol) y dioxano (10 ml). El vial de reacción se sella, se agita y seguidamente se irradia durante 1-2 horas a 100 °C, en un reactor de microondas monomodo. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente, se disuelve en 20 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH_4Cl (10 ml). La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica según el procedimiento descrito en cada caso.

3.- Procedimiento general para la obtención de dímeros de triazina.

Procedimiento A. Una disolución que contiene la triazina disustituida (1.0 mmol), la diamina correspondiente (0.6 mmol) y DIPEA (3.0 mmol) en dioxano (10 ml) se calienta a 100 °C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se deja enfriar la reacción a temperatura ambiente y se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en 20 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH_4Cl (10 ml). La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica según el procedimiento descrito en cada caso.

Procedimiento B. En un vial de microondas se añade la triazina disustituida (1.0 mmol), la diamina correspondiente (0.6 mmol), DIPEA (3.0 mmol) y dioxano (10 ml). El vial de reacción se sella, se agita y seguidamente se irradia durante 2-3 horas a temperatura entre 100-120 °C, en un reactor de microondas monomodo. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente, se disuelve en 20 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH₄Cl (10 ml). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica según el procedimiento descrito en cada caso.

4.- Procedimiento general para la obtención de trímeros.

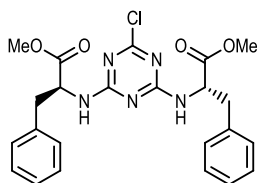
En un vial de microondas se añade la triazina disustituida (1.0 mmol), la triamina correspondiente (0.3 mmol), DIPEA (3.0 mmol) y dioxano (10 ml). El vial de reacción se sella, se agita y se irradia durante 3 horas a 100 °C en un reactor de microondas monomodo. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente, se disuelve en 20 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH₄Cl (10 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica según el procedimiento descrito en cada caso.

5.- Procedimiento general para la desprotección de los ésteres metílicos.

Una disolución que contiene el derivado protegido (1.0 mmol) en THF (10 ml) se trata con una disolución de LiOH·H₂O (2 equivalentes por grupo éster metílico) en agua (10 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 8 horas. Transcurrido ese tiempo, se adiciona ácido fórmico hasta pH 2 y se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en 2 ml de una mezcla de 1,4-dioxano:agua (9:1) y se pone en contacto con la resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) para monómeros y dímeros o Dowex 1X2 (HCOO⁻) para trímeros, durante 24 horas con agitación orbital. Transcurrido ese tiempo se lava la resina con 4 volúmenes de dioxano:agua (9:1) y se procede al desanclado del producto mediante tratamiento de la resina durante 1 hora, con un volumen de ácido fórmico:agua (9:1), seguido de lavado con 4 volúmenes de ácido fórmico:agua (9:1). El filtrado se evapora a presión reducida y se liofiliza.

SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS DE LAS SERIES I Y II

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-cloro-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-fenilpropanoato) (14)

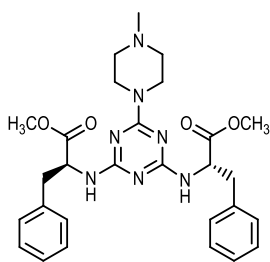


Según el procedimiento general para la obtención de triazinas disustituídas, a una disolución de cloruro cianúrico (150 mg, 0.81 mmol) en THF (20 ml), se añadió H-Phe(OMe)HCl (420 mg, 1.95 mmol) y DIPEA (2.0 ml, 11.71 mmol). El residuo se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 308 mg de un sólido blanco (82%) que se identifica como **14**. Pf 108-110 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 470 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ : 2.90-3.15 (m, 4H, β -CH₂Phe), 3.61 (s, 6H, CH₃O), 4.83-4.97 (m, 2H, α -CHPhe), 5.81 (s ancho, 2H, NH), 6.90-7.27 (m, 10H, aromáticos).

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-fenilpropanoato) (15)



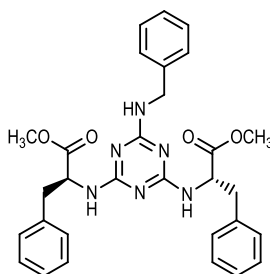
Según el procedimiento A para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del derivado **14** (160 mg, 0.27 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml), se añadió *N*-metilpiperazina (0.11 ml, 1.02 mmol) y DIPEA (0.37 ml, 2.16 mmol). La reacción se calienta a 60 °C durante 24 h en tubo de presión. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (10:1). Se obtienen 114 mg (80%) de un aceite transparente que se identifica como **15**.

EM (ES, modo positivo): m/z 534 (M+H)⁺.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ : 2.24 (s, 3H, CH₃N), 2.32-2.35 (m, 4H, CH₂N), 3.12 (m, 4H, β -CH₂Phe), 3.68 (s, 6H, CH₃O), 3.77 (m, 4H, CH₂N), 4.70-4.89 (m, 2H, α -CHPhe), 5.15 (s ancho, 1H, NH), 5.35 (s ancho, 1H, NH), 7.02-7.22 (m, 10H, aromáticos).

Anal. calculado para C₂₈H₃₅N₇O₄: C, 63.02; H, 6.61; N, 18.37. Encontrado: C, 62.97; H, 6.63; N, 18.09.

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-(bencilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-fenilpropanoato) (16)



Según el procedimiento B para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, se añadió a una disolución del derivado **14** (300 mg, 0.61 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml), bencilamina (0.2 ml, 1.85 mmol) y DIPEA (0.32 ml, 1.85 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 2 h. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash

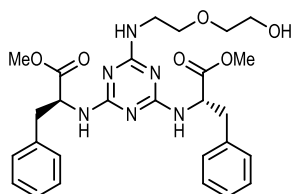
empleando como eluyente hexano:AcOEt (2:1). Se obtienen 214 mg (65%) de un sólido blanco que se identifica como **16**. Pf 54-56 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 541 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.80-3.18 (m, 4H, β-CH₂Phe), 3.62 (s ancho, 6H, CH₃O), 4.31-4.73 (m, 4H, CH₂N, α-CHPhe), 6.71-7.35 (m, 18H, NH, aromáticos).

Anal. calculado para C₃₀H₃₂N₆O₄: C, 66.65; H, 5.97; N, 15.55. Encontrado: C, 66.47; H, 6.33; N, 15.69.

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-(2-(2-hidroxi)etoxi)etilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-fenilpropanoato) (17)



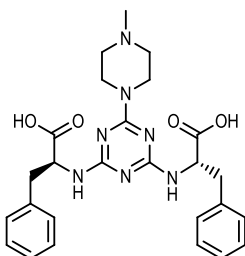
Según el procedimiento A para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del derivado **14** (511 mg, 0.93 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml), se añadió 2-(2-aminoetoxi)etanol (0.25 ml, 2.52 mmol) y DIPEA (0.15 ml, 0.84 mmol). La reacción se calienta a 100 °C durante 24 h en tubo de presión. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente AcOEt:MeOH (15:1). Se obtienen 291 mg (80%) de un sólido blanco que se identifica como **17**. Pf 46-48 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 539 (M+H)⁺.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 3.15 (m, 4H, β-CH₂Phe), 3.50 (s, 6H, CH₃O), 3.21-3.65 (m, 8H, CH₂N, CH₂O), 4.81 (m, 2H, α-CHPhe), 5.10 (s ancho, 1H, NH), 5.68-6.62 (m, 3H, NH, OH), 6.92-7.21 (m, 10H, aromáticos).

Anal. calculado para C₂₇H₃₄N₆O₆: C, 60.21; H, 6.36; N, 15.60. Encontrado: C, 60.01; H, 6.39; N, 15.41.

Ácido (2S,2'S)-2,2'-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-fenilpropanoico) (18)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **15** (40 mg, 0.08 mmol) en THF (0.8 ml) con LiOH·H₂O (13 mg, 0.31 mmol) en agua (0.8 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 28 mg (75%) de un sólido blanco que se identifica como **18**. Pf 193-194 °C.

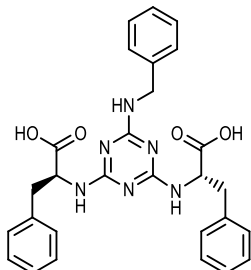
EM (ES, modo positivo): m/z 506 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.18 (s, 3H, CH₃N), 2.26 (m, 4H, CH₂N), 2.91-3.30 (m, 4H, β-CH₂Phe), 3.61 (m, 4H, CH₂N), 4.61 (m, 2H, α-CHPhe), 6.00-6.18 (m, 2H, NH), 7.05-7.20 (m, 10H, aromáticos), 12.57 (s, 2H, COOH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 75 MHz) δ: 37.5 (β-CH₂Phe), 42.7 (CH₂N), 46.2 (CH₃N), 54.8 (CH₂N), 56.4 (α-CHPhe), 126.0, 128.1, 129.8, 139.6 (C aromáticos), 164.7 (C-6), 165.8 (C-2, C-4), 174.4 (COOH).

Anal. calculado para C₂₆H₃₁N₇O₄: C, 61.77; H, 6.18; N, 19.39. Encontrado: C, 62.08; H, 6.38; N, 19.09.

Ácido (2S,2'S)-2,2'-(6-(bencilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-fenilpropanoico) (19)



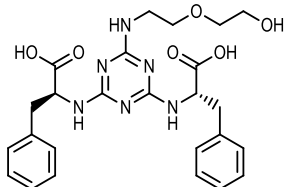
Según el procedimiento descrito para la desprotección de ésteres metílicos, se trata el compuesto **16** (60 mg, 0.11 mmol) en THF (1 ml) con LiOH·H₂O (19 mg, 0.44 mmol) en H₂O (1 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 38 mg (68%) de un sólido blanco que se identifica como **19**. Pf 109-111 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 513 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.90-3.15 (m, 4H, β-CH₂Phe), 4.31-4.70 (m, 4H, CH₂N, α-CHPhe), 7.00-7.38 (m, 18H, NH, aromáticos).

Anal. calculado para C₂₈H₂₈N₆O₄: C, 65.61; H, 5.51; N, 16.40. Encontrado: C, 65.73; H, 5.42; N, 16.28.

Ácido-(2S,2'S)-2,2'-(6-(2-(2-hidroxietoxi)etilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-fenilpropanoico) (20)



Una disolución del compuesto **17** (68 mg, 0.13 mmol) en THF (1 ml) se trata con LiOH·H₂O (22 mg, 0.50 mmol) en H₂O (1 ml) durante 7 horas. Transcurrido este tiempo se neutraliza la mezcla de reacción con HCl 1M y se evapora el disolvente. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en fase reversa empleando como eluyente un gradiente de CH₃CN:H₂O (0:100 a 10:90). Se obtienen 46 mg (69%) de un sólido blanco que se identifica como **20**. Pf 110-112 °C.

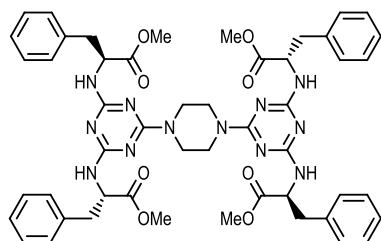
EM (ES, modo positivo): m/z 511 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 2.93-3.07 (m, 4H, β-CH₂Phe), 3.19-3.65 (m, 8H, CH₂N, CH₂O), 4.46-4.58 (m, 2H, α-CHPhe), 6.38-6.73 (m, 4H, NH, OH), 7.17-7.23 (m, 10H, aromáticos), 12.20 (s ancho, 2H, COOH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ: 36.6 (β-CH₂Phe), 39.0 (CH₂N), 54.6 (α-CHPhe), 60.2, 68.9, 72.1 (CH₂O), 126.2, 128.1, 129.0, 138.3 (C aromáticos), 165.2 (C-2, C-4), 165.6 (C-6), 174.1 (COOH).

Anal. calculado para C₂₅H₃₀N₆O₆: C, 58.81; H, 5.92; N, 16.46. Encontrado: C, 58.63; H, 5.71; N, 16.85.

(2S,2'S,2''S,2'''S)-Tetrametil-2,2',2'',2'''-(6,6'-(piperazin-1,4-diil)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-fenilpropanoato) (23)



Según el procedimiento A para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar el compuesto **14** (128 mg, 0.25 mmol) con piperazina (70 mg, 0.15 mmol) en presencia de DIPEA (0.35 ml, 2.0 mmol) en 1,4-dioxano (8 ml). La reacción se calienta a 90 °C durante 48 h en tubo de presión. El residuo se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente un gradiente de hexano:AcOEt (3:1) a (1:1). Se obtienen 197 mg (83%) de un sólido blanco que se identifica como **23**. Pf 138-139 °C.

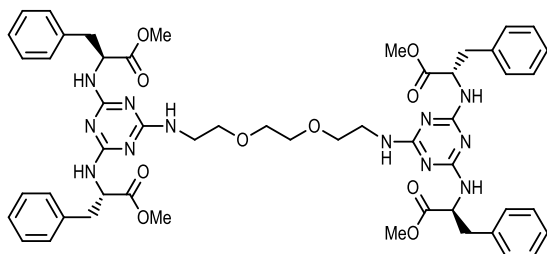
EM (ES, modo positivo): m/z 477 (M+2H)²⁺, 953 (M+H)⁺.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 3.05 (m, 8H, β-CH₂Phe), 3.60 (m, 20H, CH₃O, CH₂N), 4.76 (m, 4H, α-CHPhe), 5.60-5.95 (s ancho, 4H, NH), 7.02-7.21 (m, 20H, aromáticos).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 37.2 (β-CH₂Phe), 41.9 (CH₂N), 51.0 (CH₃O), 54.1 (α-CHPhe), 125.9, 127.5, 128.2, 135.3 (C aromáticos), 163.9 (C-6), 165.5 (C-2, C-4), 171.6 (COOCH₃)

Anal. calculado para C₅₀H₅₆N₁₂O₈: C, 63.01; H, 5.92; N, 17.64. Encontrado: C, 62.74; H, 6.28; N, 17.66.

(2S,2'S,2''S,2'''S)-Tetrametil-2,2',2'',2'''-(6,6'-(2,2'-(etilendioxo)diethylamino)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-fenilpropanoato) (24)



Según el procedimiento B para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar el compuesto **14** (300 mg, 0.64 mmol) con 2,2'-(etilendioxo)diethylamina (57 μl, 0.38 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml) en presencia de DIPEA (0.18 ml, 1.02 mmol). La reacción se calienta a 110 °C durante 48 h en tubo de presión. El residuo se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente CH₂Cl₂:AcOEt (2:1). Se obtienen 191 mg (60%) de un sólido blanco que se identifica como **24**. Pf 69-70 °C.

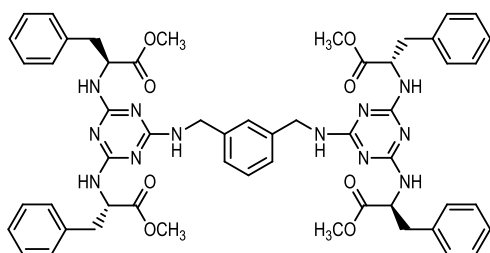
EM (ES, modo positivo): m/z 508 (M+2H)²⁺, 1015 (M+H)⁺.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 3.17 (m, 4H, β-CH₂Phe), 3.31-3.65 (m, 12H, CH₂N, CH₂O), 3.69 (s, 12H, CH₃O), 4.85 (m, 4H, α-CHPhe), 5.12 (s ancho, 2H, NH), 7.03-7.83 (m, 24H, NH, aromáticos).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 37.3 (β-CH₂Phe), 39.6 (CH₂N), 50.9 (CH₃O), 54.0 (α-CHPhe), 69.8 (CH₂O), 125.5, 127.3, 128.2, 135.4 (C aromáticos), 164.5 (C-6), 165.8 (C-2, C-4), 171.6 (COOCH₃)

Anal. calculado para C₅₂H₆₂N₁₂O₁₀: C, 61.53; H, 6.16; N, 16.56. Encontrado: C, 61.89; H, 6.38; N, 16.26.

(2S,2'S,2''S,2'''S)-Tetrametil-2,2',2'',2'''-(6,6'-(1,3-xililendiamino)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-fenilpropanoato) (26)



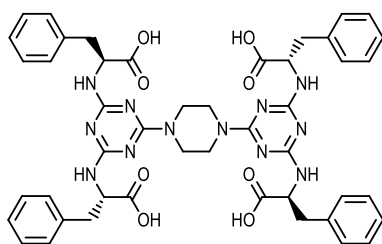
Según el procedimiento B para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar la clorotriazina **14** (386 mg, 0.80 mmol) con 1,3-xililendiamina (66 μ l, 0.48 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml) en presencia de DIPEA (0.18 μ l, 1.02 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 2 h. El residuo se purifica por cromatografía flash, empleando como eluyente un gradiente de hexano:AcOEt (1:1) a (1:2). Se obtienen 179 mg (58%) de un sólido blanco que se identifica como **26**. Pf 102-104 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 502 (M+2H)²⁺, 1003 (M+H)⁺.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ : 3.20 (m, 8H, β -CH₂Phe), 3.33-3.64 (m, 12H, CH₃O), 4.52-4.59 (m, 8H, α -CHPhe, CH₂N), 5.30-6.34 (m, 2H, NH), 7.02-7.48 (m, 24H, NH, aromáticos).

Anal. calculado para C₅₄H₅₈N₁₂O₈: C, 64.66; H, 5.83; N, 16.76. Encontrado: C, 64.79; H, 5.68; N, 16.98.

Ácido (2S,2'S,2''S,2'''S)-2,2',2'',2'''-(6,6'-(piperazin-1,4-diil)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil)) tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-fenilpropanoico) (27)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **23** (100 mg, 0.10 mmol) en THF (1 ml) con LiOH·H₂O (36 mg, 0.84 mmol) en H₂O (1 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite® IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 42 mg (47%) de un sólido blanco que se identifica como **27**. Pf > 165 °C, descompone.

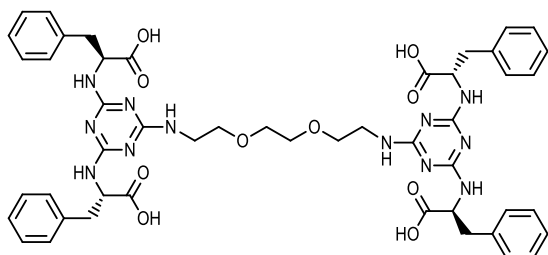
EM (ES, modo positivo): m/z 449 (M+2H)²⁺, 897 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 3.19 (m, 8H, β -CH₂Phe), 3.46 (m, 8H, CH₂N), 4.40 (m, 4H, α -CHPhe), 6.68-6.93 (m, 4H, NH), 7.12-7.21 (m, 20H, aromáticos), 12.30 (s, 4H, COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₄₆H₄₈N₁₂O₈: 896.3718. Encontrado: 896.3710.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 6.5 min (98%), Sistema B: 3.7 min (99%).

Ácido (2S,2'S,2''S,2'''S)-2,2',2'',2'''-(6,6'-(2,2'-(etilendioxo)diethylamino)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-fenilpropanoico) (28)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **24** (52 mg, 0.05 mmol) en THF (0.5 ml) con LiOH·H₂O (17 mg, 0.41 mmol) en H₂O (0.5 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 38 mg (78%) de un

sólido blanco que se identifica como **28**. Pf 159-160 °C.

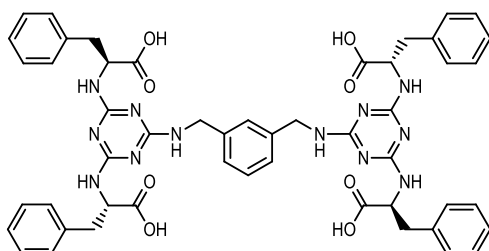
EM (ES, modo positivo): m/z 480 (M+2H)²⁺, 959 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 3.01-3.62 (m, 20H, β-CH₂Phe, CH₂N, CH₂O), 4.02-4.60 (m, 4H, α-CHPhe), 6.12-6.65 (s ancho, 2H, NH), 7.15-7.62 (m, 24H, NH, aromáticos), 12.52 (s, 4H, COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₄₈H₅₄N₁₂O₁₀: 958.4086. Encontrado: 958.4085.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 6.5 min (99%), Sistema B: 3.8 min (99%).

Ácido (2S,2'S,2''S,2'''S)-2,2',2'',2'''-(6,6'-(1,3-xililendiamino)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-fenilpropanoico) (29)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **26** (120 mg, 0.12 mmol) en THF (1.5 ml) con LiOH·H₂O (41 mg, 0.95 mmol) en H₂O (1.5 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 83 mg (73%)

de un sólido blanco que se identifica como **29**. Pf >215 °C, descompone.

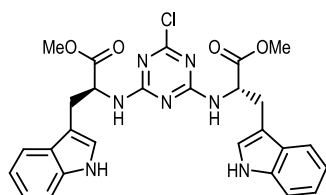
EM (ES, modo positivo): m/z 474 (M+2H)²⁺, 947 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 2.95-3.17 (m, 8H, β-CH₂Phe), 4.22-4.58 (m, 8H, α-CHPhe, CH₂N), 6.03-6.56 (m, 2H, NH), 7.09-7.35 (m, 28H, NH, aromáticos), 12.61 (s, 4H, COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₅₀H₅₀N₁₂O₈: 946.3875. Encontrado: 946.3883.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 6.6 min (99%), Sistema B: 3.9 min (99%).

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-cloro-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(1H-indol-3-il)propanoato) (30)



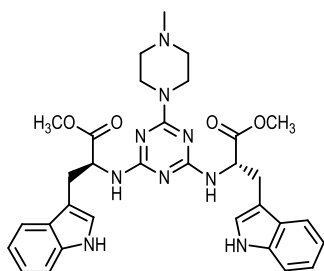
Según el procedimiento general para la obtención de triazinas disustituidas, una disolución de cloruro cianúrico (357 mg, 1.94 mmol) en THF (15 ml), se añadió H-Trp(OMe)HCl (1.0 g, 3.87 mmol) y DIPEA (4.0 ml, 23.20 mmol). El residuo se purifica por cromatografía en columna

empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (20:1). Se obtienen 987 mg (82%) de un sólido blanco que se identifica como **30**. Pf 95-97 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 548 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 3.19-3.25 (m, 4H, β-CH₂Trp), 3.62 (s, 6H, CH₃O), 4.90 (m, 2H, α-CHTrp), 5.72-5.91 (m, 2H, NH), 6.88 (s ancho, 2H, H-2ⁱ Trp), 6.99-7.61 (m, 8H, aromáticos), 8.21 (s ancho, 2H, NH-1ⁱ Trp).

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(1H-indol-3-il)propanoato) (31)



Según el procedimiento B para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del derivado **30** (511 mg, 0.93 mmol) en dioxano (10 ml), se añadió *N*-metilpiperazina (0.31 ml, 2.79 mmol) y DIPEA (1.3 ml, 7.44 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 1 hora. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente un

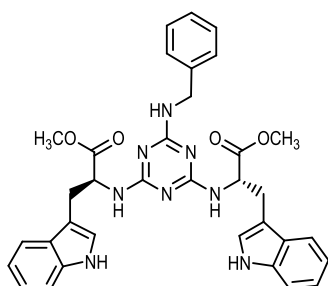
gradiente de CH₂Cl₂:MeOH (10:1) a (5:1). Se obtienen 369 mg (65%) de un sólido blanco que se identifica como **31**. Pf 96-98 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 612 (M+H)⁺.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 2.29 (s, 3H, NCH₃), 2.33-2.35 (m, 4H, CH₂N), 3.17-3.38 (m, 4H, β-CH₂Trp), 3.62 (s, 6H, CH₃O), 3.70 (m, 4H, CH₂N), 4.83 (m, 2H, α-CHTrp), 5.40 (s ancho, 2H, NH), 6.89 (s ancho, 2H, H-2ⁱ Trp), 7.01-7.63 (m, 8H, aromáticos), 8.16 (s, 2H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para C₃₂H₃₇N₉O₄: C, 62.83; H, 6.10; N, 20.61. Encontrado: C, 62.91; H, 6.11; N, 20.41.

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-(bencilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(1H-indol-3-il)propanoato) (32)



Según el procedimiento B para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del compuesto **30** (300 mg, 0.54 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml), se añadió bencilamina (0.17 ml, 1.62 mmol) y DIPEA (0.28 ml, 1.62 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 2 horas. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (30:1). Se obtienen 189 mg (57%) de un sólido blanco que se identifica como **32**. Pf 98-100 °C.

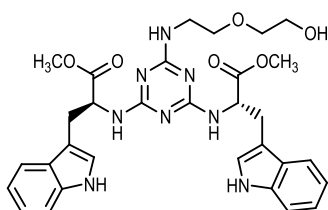
EM (ES, modo positivo): m/z 619 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO, 300 MHz) δ : 3.10-3.21 (m, 4H, β -CH₂Trp), 3.62 (s, 6H, CH₃O), 4.18-4.71 (m, 4H, α -CHTrp, CH₂N), 6.41-6.82 (m, 3H, NH), 6.90-7.62 (m, 10H, H-2ⁱ Trp, aromáticos), 10.81 (s ancho, 2H, NH-1ⁱ Trp).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 75 MHz) δ : 27.5 (β -CH₂Trp), 43.3 (CH₂N), 51.9 (CH₃O), 54.9 (α -CHTrp), 110.3, 111.8, 118.3, 121.3, 124.2, 126.7, 127.6, 128.4, 136.5 (C aromáticos), 165.5 (C-2, C-4, C-6), 173.8 (COOCH₃).

Anal. calculado para C₃₄H₃₄N₈O₄: C, 66.01; H, 5.54; N, 18.11. Encontrado: C, 66.34; H, 5.61; N, 17.87

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-(2-(2-hidroxi)etoxi)etilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(1H-indol-3-il)propanoato) (33)



Según el procedimiento A para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del compuesto **30** (315 mg, 0.57 mmol) en 1,4-dioxano (15 ml), se añadió 2-(2-amino)etanol (0.18 ml, 1.72 mmol) y DIPEA (0.10 ml, 0.57 mmol). La reacción se calienta a 80 °C durante 24 horas en tubo de presión. El residuo se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (15:1). Se obtienen 224 mg (64%) de un sólido blanco que se identifica como **33**. Pf 68-70 °C.

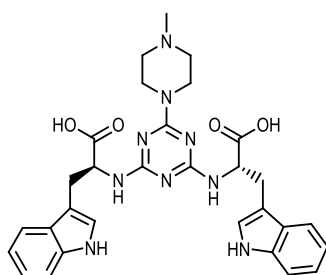
EM (ES, modo positivo): m/z 617 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 3.20-3.60 (m, 12H, β -CH₂Trp, CH₂N, CH₂O), 3.65 (s ancho, 6H, CH₃O), 4.97 (m, 2H, α -CHTrp), 5.81 (s ancho, 1H, OH), 6.01-6.40 (m, 3H, NH), 6.88-7.61 (m, 10H, H-2ⁱ Trp, aromáticos), 10.80 (s ancho, 2H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para C₃₁H₃₆N₈O₆: C, 60.38; H, 5.88; N, 18.17. Encontrado: C, 60.56; H, 6.09; N, 18.08

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 3411 ($\nu_{\text{N-H}}$, -NH), 2923 ($\nu_{\text{C-H}}$, -CH₂), 1622 ($\nu_{\text{C=O}}$, -COO⁻), 1547 ($\nu_{\text{C=C}}$, anillos aromáticos), 1410 ($\nu_{\text{s C-O}}$, -COO⁻), 1448 ($\delta_{\text{C-H}}$, -CH₂), 746 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromáticos 1,2-disustituidos).

Ácido (2S,2'S)-2,2'-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(1H-indol-3-il)propanoico) (34)



Siguiendo el procedimiento general de desprotección de ésteres metílicos, se prepara una disolución del compuesto **31** (100 mg, 0.16 mmol) en THF (1 ml) y se trata con una disolución de LiOH·H₂O (28 mg, 0.64 mmol) en agua (1 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 65 mg (43%) de un sólido blanco que se identifica como **34**. Pf > 250 °C, descompone.

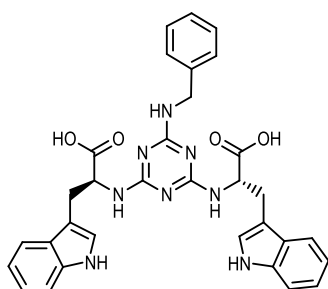
EM (ES, modo positivo): m/z 584 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.18 (s, 3H, CH₃N), 2.34 (m, 4H, CH₂N), 3.08-3.18 (m, 4H, β-CH₂Trp), 3.71 (m, 4H, CH₂N), 4.30-4.75 (m, 2H, α-CHTrp), 6.49 (s ancho, 1H, NH), 6.75 (s ancho, 1H, NH), 6.89-7.59 (m, 10H, H-2ⁱ Trp, aromáticos), 10.81 (s, 2H, NH-1ⁱ Trp), 12.30 (s ancho, 2H, COOH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 75 MHz) δ: 37.7 (β-CH₂Trp), 42.6 (CH₂N), 46.0 (CH₃N), 54.6 (CH₂N, α-CHTrp), 110.7, 111.7, 118.7, 121.2, 124.1, 127.6, 136.4 (C aromáticos), 164.5 (C-6), 165.5 (C-2, C-4), 174.9 (COOH).

Anal. calculado para C₃₀H₃₃N₉O₄: C, 61.74; H, 5.70; N, 21.60. Encontrado: C, 61.42; H, 5.86; N, 21.73.

Ácido (2S,2'S)-2,2'-(6-(bencilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(1H-indol-3-il)propanoico) (35)



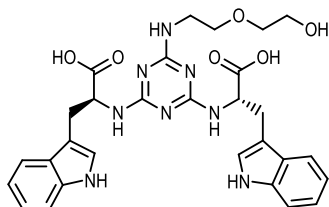
Siguiendo el procedimiento general de desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución del compuesto **32** (80 mg, 0.13 mmol) en THF (1 ml) con una disolución de LiOH·H₂O (22 mg, 0.52 mmol) en agua (1 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 64 mg (83%) de un sólido blanco que se identifica como **35**. Pf 129-131 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 591 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO, 400 MHz) δ: 3.11-3.23 (m, 4H, β-CH₂Trp), 4.32- 4.58 (m, 4H, α-CHTrp, CH₂N), 6.67-6.82 (m, 3H, NH), 6.85-7.65 (m, 10H, H-2ⁱ Trp, aromáticos), 10.78 (s ancho, 2H, NH-1ⁱ Trp), 12.42 (s, 2H, COOH).

Anal. calculado para C₃₂H₃₀N₈O₄: C, 65.07; H, 5.12; N, 18.97. Encontrado: C, 65.21; H, 5.33; N, 18.61

Ácido (2S,2'S)-2,2'-(6-(2-(2-hidroxietoxi)etilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(1H-indol-3-il)propanoico) (36)



Una disolución que contiene el compuesto **33** (80 mg, 0.13 mmol) en THF (1 ml) se trata con LiOH·H₂O (22 mg, 0.52 mmol) en agua (1 ml) durante 7 h. Transcurrido este tiempo se neutraliza la mezcla de reacción con HCl y se evapora el disolvente. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en fase reversa empleando como eluyente un gradiente de CH₃CN:H₂O (0:100) a (20:80). Se obtienen 51 mg (66%) de un sólido blanco que se identifica como **36**. Pf 165-167 °C.

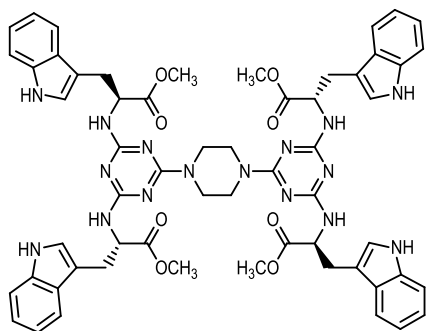
EM (ES, modo positivo): m/z 589 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 3.15-3.58 (m, 12H, β-CH₂Trp, CH₂N, CH₂O), 4.53 (m, 2H, α-CHTrp), 6.04-6.58 (m, 4H, NH, OH), 6.83-7.55 (m, 10H, H-2ⁱ Trp, aromáticos), 10.78 (s ancho, 2H, NH-1ⁱ Trp).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 27.4 (β-CH₂Trp), 40.5 (CH₂N), 54.8 (α-CHTrp), 60.6, 69.6, 72.5 (CH₂O), 110.8, 111.8, 118.7, 121.3, 124.1, 127.7, 127.9, 136.5 (C aromáticos), 165.6 (C-6), 165.8 (C-2, C-4), 174.9 (COOH).

Anal. calculado para C₂₉H₃₂N₈O₆: C, 59.17; H, 5.48; N, 19.04. **Encontrado**: C, 59.32; H, 5.58; N, 18.71.

(2S,2'S,2''S,2'''S)-Tetrametil-2,2',2'',2'''-(6,6'-(piperazin-1,4-diil)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-(1H-indol-3-il)propanoato) (37)



Según el procedimiento A para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar el derivado **30** (265 mg, 0.48 mmol) con piperazina (25 mg, 0.29 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml) en presencia de DIPEA (0.50 ml, 2.88 mmol). La reacción se calienta a 90 °C durante 48 h en tubo de presión. El residuo se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente en primer lugar hexano:AcOEt (2:1) y posteriormente CH₂Cl₂:MeOH

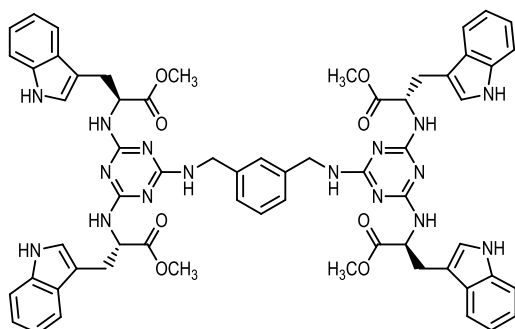
(20:1). Se obtienen 382 mg (65%) de un sólido blanco que se identifica como **37**. Pf 114-115 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 555 (M+2H)²⁺, 1109 (M+H)⁺.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 3.01-3.30 (m, 8H, β-CH₂Trp), 3.35-3.65 (m, 20H, CH₂N, CH₃O), 4.62-4.91 (m, 4H, α-CHTrp), 5.83-5.98 (m, 4H, NH), 6.62-6.89 (m, 4H, H-2' Trp), 6.95-7.56 (m, 16H, aromáticos), 8.21 (s ancho, 4H, NH-1' Trp).

Anal. calculado para C₅₈H₆₀N₁₆O₈: C, 62.80; H, 5.45; N, 20.20. **Encontrado**: C, 62.66; H, 5.69; N, 19.98.

(2S,2'S,2''S,2'''S)-Tetrametil-2,2',2'',2'''-(6,6'-(1,3-xililendiamino)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-(1H-indol-3-il)propanoato) (38)



Si siguiendo el procedimiento B para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar el derivado **30** (380 mg, 0.69 mmol) con 1,3-xililendiamina (54 μl, 0.41 mmol) en dioxano (10 ml) en presencia de DIPEA (0.72 ml, 4.14 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 2 h. El residuo se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (30:1). Se obtienen 120 mg (30%) de un sólido blanco que se identifica como **38**.

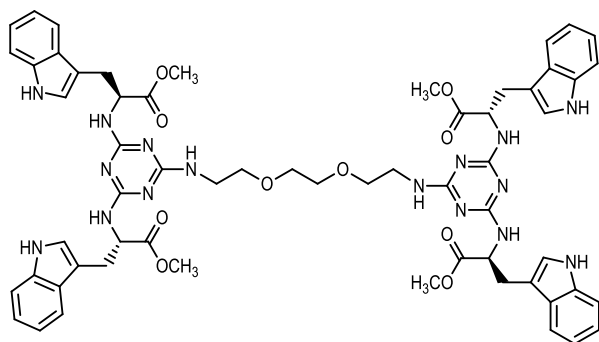
Pf 115-116 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 580 (M+2H)²⁺, 1159 (M+H)⁺.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 2.99-3.20 (m, 8H, β-CH₂Trp), 3.41-3.62 (m, 12H, CH₃O), 4.22-4.41 (m, 8H, α-CHTrp, CH₂N), 4.82-4.91 (m, 2H, NH), 6.52-6.79 (m, 4H, H-2ⁱ Trp), 6.93-7.56 (m, 24H, aromáticos, NH), 8.20 (s ancho, 4H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para C₆₂H₆₂N₁₆O₈: C, 64.24; H, 5.39; N, 19.33. Encontrado: C, 64.49; H, 5.60; N, 19.03

(2S,2'S,2''S,2'''S)-Tetrametil-2,2',2'',2'''-(6,6'-(2,2'-(etilendioxo)diethylamino)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil)) tetrakis (azanodiil)tetrakis(3-(1H-indol-3-il)propanoato) (39)



Según el procedimiento B para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar el derivado **30** (200 mg, 0.36 mmol) con 2,2'-(etilendioxo)diethylamina (0.12 ml, 0.22 mmol) en dioxano (10 ml) en presencia de DIPEA (0.38 ml, 2.16 mmol). La reacción se calienta a 100 °C durante 48 h en tubo de presión. El residuo

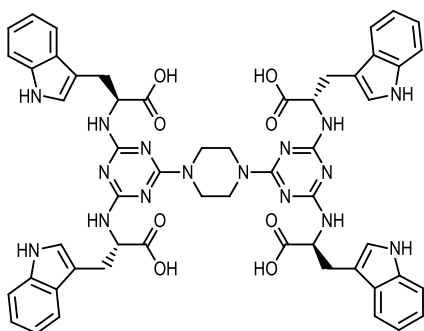
obtenido se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente CH₂Cl₂:EtOH (10:1). Se obtienen 60 mg (28%) de un sólido blanco que se identifica como **39**. Pf 106-108 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 586 (M+2H)²⁺, 1171 (M+H)⁺.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 3.02-3.62 (m, 20H, β-CH₂Trp, CH₂N, CH₂O), 3.64 (s, 12H, CH₃O), 4.82 (m, 4H, α-CHTrp), 5.43-5.51 (m, 2H, NH), 6.62-6.82 (m, 4H, NH), 6.80-7.63 (m, 20H, H-2ⁱ Trp, aromáticos), 8.17 (s ancho, 4H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para C₆₀H₆₆N₁₆O₁₀: C, 61.53; H, 5.68; N, 19.13. Encontrado: C, 61.22; H, 5.36; N, 19.40.

Ácido (2S,2'S,2''S,2'''S)-2,2',2'',2'''-(6,6'-(piperazin-1,4-diil)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis (azanodiil)tetrakis(3-(1H-indol-3-il)propanoico) (40)



Según el procedimiento descrito para la desprotección de ésteres metílicos, se trata el compuesto **37** (150 mg, 0.13 mmol) en THF (1.5 ml) con LiOH·H₂O (46 mg, 1.08 mmol) en H₂O (1.5 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 138 mg (97%) de un sólido blanco que se identifica como **40**. Pf >180 °C, descompone.

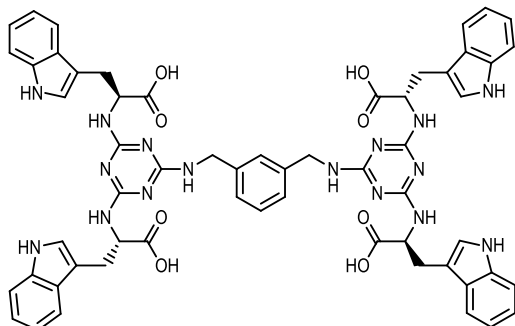
EM (ES, modo positivo): m/z 527 (M+2H)²⁺, 1053 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 3.07-3.62 (m, 16H, β-CH₂Trp, CH₂N), 4.75 (m, 4H, α-CHTrp), 6.94-7.55 (m, 24H, H-2ⁱ Trp, aromáticos, NH), 10.82 (s, 4H, NH-1ⁱ Trp), 12.31 (s ancho, 4H, COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₅₄H₅₂N₁₆O₈: 1052.4154. Encontrado: 1052.4135.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 6.1 min (98%), Sistema B: 3.5 min (98%).

Ácido (2S,2'S,2''S,2'''S)-2,2',2'',2'''-(6,6'-(1,3-xililendiamino)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis (azanodiil)tetrakis(3-(1H-indol-3-il)propanoico) (41)



Siguiendo el procedimiento general de desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **38** (100 mg, 0.09 mmol) en THF (1 ml) con LiOH·H₂O (29 mg, 0.69 mmol) en H₂O (1 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 80 mg (84%) de un sólido blanco que se identifica como **41**. Pf >210 °C, descompone.

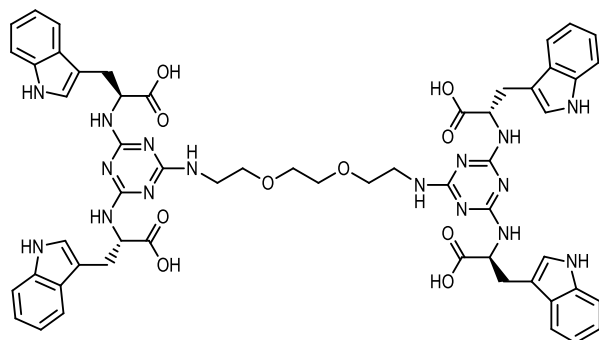
EM (ES, modo positivo): m/z 552 (M+2H)²⁺, 1103 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 3.10 (m, 8H, β-CH₂Trp), 4.30 (s ancho, 4H, α-CHTrp), 4.61 (s ancho, 4H, CH₂N), 5.31 (s ancho, 4H, NH), 6.89-7.50 (m, 22H, H-2^o Trp, aromáticos, NH), 10.85 (s, 4H, NH-1^o Trp), 12.71 (s ancho, 4H, COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₅₈H₅₄N₁₆O₈: 1102.4311. Encontrado: 1102.4318

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 4.7 min (98%), Sistema B: 3.0 min (98%).

Ácido (2S,2'S,2''S,2'''S)-2,2',2'',2'''-(6,6'-(2,2'-(etilendioxi)dietilamino)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis (azanodiil)tetrakis(3-(1H-indol-3-il)propanoico) (42)



Siguiendo el procedimiento general de desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **39** (35 mg, 0.026 mmol) en THF (0.5 ml) con LiOH·H₂O (9 mg, 0.21 mmol) en H₂O (0.5 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 27 mg (90%) de un sólido blanco que se identifica como **42**. Pf >220 °C, descompone.

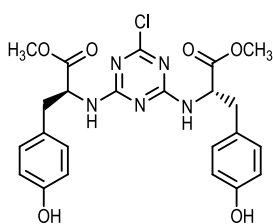
EM (ES, modo positivo): m/z 558 (M+2H)²⁺, 1115 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 3.02-3.75 (m, 20H, β-CH₂Trp, CH₂N, CH₂O), 4.35-4.66 (m, 4H, α-CHTrp), 5.98-6.66 (m, 6H, NH), 6.98-7.61 (m, 20H, H-2^o Trp, aromáticos), 10.81 (s, 4H, NH-1^o Trp), 12.30 (s ancho, 4H, COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₅₆H₅₈N₁₆O₁₀: 1114.4522. Encontrado: 1114.4531

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 6.3 min (98%), Sistema B: 3.7 min (99%).

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-cloro-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(4-hidroxifenil)propanoato) (43)

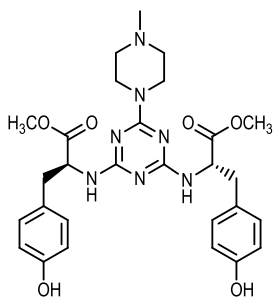


Según el procedimiento general para la obtención de triazinas disustituidas, a una disolución de cloruro cianúrico (199 mg, 1.08 mmol) en THF (12 ml), se añadió H-Tyr(OMe)HCl (500 mg, 2.16 mmol) y DIPEA (1.5 ml, 8.64 mmol). El residuo se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 502 mg (78%) de un sólido blanco que se identifica como **43**. Pf 99-100 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 502 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.79-2.97 (m, 4H, β-CH₂Tyr), 3.57 (s, 6H, CH₃O), 4.25-4.58 (m, 2H, α-CHTyr), 6.64 (d, J=8.4 Hz, 4H, aromáticos), 6.96 (d, J=8.4 Hz, 4H, aromáticos), 8.03-8.36 (m, 2H, NH), 9.24 (s, 2H, OH).

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(4-hidroxifenil)propanoato) (44)



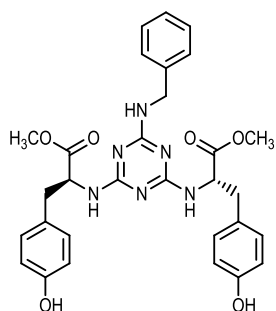
Según el procedimiento B para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del compuesto **43** (220 mg, 0.44 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml), se añadió *N*-metilpiperazina (0.12 ml, 1.15 mmol) y DIPEA (0.20 ml, 1.15 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 1 h. El residuo obtenido se purifica por CCTLC empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (12:1). Se obtienen 150 mg (60%) de un aceite transparente que se identifica como **44**. Pf 89-91 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 566 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.15-2.22 (m, 7H, CH₂N, CH₃N), 2.86 (m, 4H, β-CH₂Tyr), 3.46-3.62 (m, 10H, CH₂N, CH₃O), 4.24-4.60 (m, 2H, α-CHTyr), 6.64 (d, J = 7.3 Hz, 4H, aromáticos), 6.87-7.20 (m, 6H, NH, aromáticos), 9.22 (s, 2H, OH).

Anal. calculado para C₂₈H₃₅N₇O₆: C, 59.46; H, 6.24; N, 17.33. Encontrado: C, 59.22; H, 6.31; N, 17.12

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-(bencilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(4-hidroxifenil)propanoato) (45)



Según el procedimiento B para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del compuesto **43** (300 mg, 0.60 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml), se añadió bencilamina (0.19 ml, 1.80 mmol) y DIPEA (0.31 ml, 1.80 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 2 h. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash

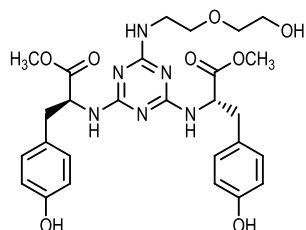
empleando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (30:1). Se obtienen 275 mg (80%) de un sólido blanco que se identifica como **45**. Pf 89-90 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 573 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.81-2.87 (m, 4H, β - CH_2Tyr), 3.60 (s, 6H, CH_3O), 4.23-4.60 (m, 4H, α - CHTyr , CH_2N), 6.63 (d, $J = 7.3$ Hz, 4H, aromáticos), 6.87-7.17 (m, 7H, NH, aromáticos), 7.27 (m, 5H, aromáticos), 9.20 (s, 2H, OH).

Anal. calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_6$: C, 62.93; H, 5.63; N, 14.68. Encontrado: C, 62.71; H, 5.82; N, 14.70

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-(2-(2-hidroxietoxi)etilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(4-hidroxifenil)propanoato) (46)



Según el procedimiento A para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del compuesto **43** (300 mg, 0.60 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml), se añadió 2-(2-aminoetoxi)etanol (0.18 ml, 1.81 mmol) y DIPEA (0.31 ml, 1.81 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 1.5 h. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$

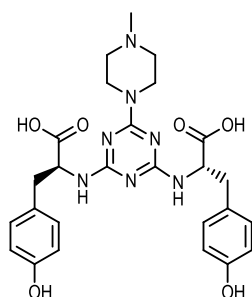
(10:1). Se obtienen 260 mg (88%) de un sólido blanco que se identifica como **46**. Pf 72-74 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 571 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.85 (m, 4H, β - CH_2Tyr), 3.36-3.47 (m, 8H, CH_2O , CH_2N), 3.53 (s, 6H, CH_3O), 4.33-4.59 (m, 2H, α - CHTyr), 6.63 (d, $J = 7.2$ Hz, 4H, aromáticos), 6.75-6.98 (m, 7H, NH, aromáticos), 9.20 (s, 2H, OH).

Anal. calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_8$: C, 56.83; H, 6.01; N, 14.73. Encontrado: C, 56.79; H, 5.87; N, 14.61

Ácido (2S,2'S)-2,2'-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(4-hidroxifenil)propanoico) (47)



Siguiendo el procedimiento general de desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **44** (80 mg, 0.14 mmol) en THF (1.5 ml) con $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (24 mg, 0.56 mmol) en H_2O (1.5 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO^-) obteniéndose 63 mg (84%) de un sólido blanco que se identifica como **47**. Pf >206 °C, descompone.

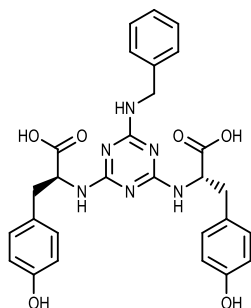
EM (ES, modo positivo): m/z 538 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 2.41 (s, 3H, CH_3N), 2.55 (m, 4H, CH_2N), 2.72-2.93 (m, 4H, β - CH_2Tyr), 3.64 (m, 4H, CH_2N), 4.23-4.45 (m, 2H, α - CHTyr), 6.62 (d, $J = 7.2$ Hz, 4H, aromáticos), 6.98-7.28 (m, 6H, NH, aromáticos), 9.22 (s, 2H, OH), 12.67 (s, 2H, COOH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ : 35.9 (β -CH₂Tyr), 41.2 (CH₂N), 44.5 (CH₃N), 53.5 (CH₂N), 55.0 (α -CHTyr), 114.8, 128.2, 130.1 (C aromáticos), 156.1 (C_{Ar}OH), 164.5 (C-6), 165.5 (C-2, C-4) 174.2 (COOH).

Anal. calculado para C₂₆H₃₁N₇O₆: C, 58.09; H, 5.81; N, 18.24. Encontrado: C, 57.72; H, 5.97; N, 18.44.

Ácido (2S,2'S)-2,2'-(6-(bencilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(4-hidroxi fenil)propanoico) (48)



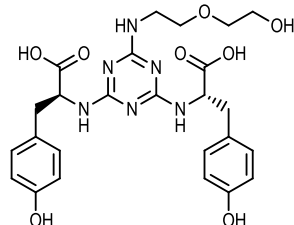
Siguiendo el procedimiento general de desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **45** (80 mg, 0.13 mmol) en THF (1.5 ml) con LiOH·H₂O (22 mg, 0.52 mmol) en H₂O (1.5 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite® IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 64 mg (83%) de un sólido blanco que se identifica como **48**. Pf 191-193 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 545 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2-79-3.01 (m, 4H, β -CH₂Tyr), 4.20-4.51 (m, 4H, α -CHTyr, CH₂N), 6.20-7.51 (m, 16H, NH, aromáticos), 9.21 (s, 2H, OH).

Anal. calculado para C₂₈H₂₈N₆O₆: C, 61.76; H, 5.18; N, 15.43. Encontrado: C, 61.85; H, 5.38; N, 15.17

Ácido (2S,2'S)-2,2'-(6-(2-(2-hidroxietoxi)etilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(4-hidroxi fenil)propanoico) (49)



Una disolución del compuesto **46** (50 mg, 0.09 mmol) en THF (1 ml) se trata con LiOH·H₂O (23 mg, 0.53 mmol) en H₂O (1 ml) durante 6h. Transcurrido este tiempo se neutraliza la mezcla de reacción con HCl y se evapora el disolvente. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en fase reversa, empleando como eluyente un gradiente de CH₃CN:H₂O de 0:100 a 20:80. Se obtienen 31 mg (65%) de un sólido blanco que se identifica como

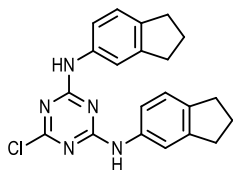
49. Pf 112-114 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 543 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 2.90 (m, 4H, β -CH₂Tyr), 3.39-3.58 (m, 8H, CH₂O, CH₂N), 4.42 (m, 2H, α -CHTyr), 6.29-7.00 (m, 12H, NH, OH, aromáticos), 9.20 (s, 2H, OH).

Anal. calculado para C₂₅H₃₀N₆O₈: C, 55.34; H, 5.57; N, 15.49. Encontrado: C, 55.12; H, 5.72; N, 15.23.

2-Cloro-4,6-di(indan-5-ilamino)1,3,5-triazina (50)¹



Sobre una disolución que contiene cloruro cianúrico (500 mg, 2.71 mmol) en acetona (5 ml) se añade una mezcla que contiene 5-aminoindano (866 mg, 6.51 mmol) en acetona (10 ml) y Na₂CO₃ (690 mg, 6.51 mmol) en agua (15 ml).

La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 10 horas. Transcurrido ese tiempo se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en 30 ml de acetato de etilo y se trata con salmuera (10 ml). La fase

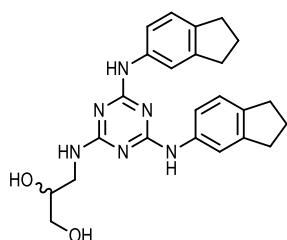
orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente hexano:AcOEt (4:1). Se obtienen 806 mg (79%) de un sólido blanco que se identifica como **50**. Pf 180 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 378 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 2.03 (m, 4H, CH₂), 2.88 (m, 8H, CH₂), 6.90 (s ancho, 2H, NH), 7.16-7.19 (m, 4H, aromáticos), 7.25 (s, 2H, aromáticos).

1. Palanisamy, U. D.; Winzor, D. J.; Lowe, C. R. Synthesis and evaluation of affinity adsorbents for glycoproteins: an artificial lectin. *J. Chromatogr. B* **2000**, 746, 265-281.

3-(4,6-Di(indan-5-ilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-1,2-propanodiol (**51**)



Sobre una disolución del compuesto **50** (300 mg, 0.80 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml), se añade una mezcla que contiene 3-amino-1,2-propanodiol (87 mg, 0.96 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml) y NaHCO₃ (81 mg, 0.96 mmol) en agua (10 ml). La mezcla se calienta a 100 °C durante 36 horas. La mezcla de reacción se trata con CH₂Cl₂ (3x20 ml). Las fases orgánicas se combinan y se lavan con agua (2x20 ml). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente AcOEt. Se obtienen 132 mg (38%) de un sólido blanco que se identifica como **51**.

orgánicas se combinan y se lavan con agua (2x20 ml). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente AcOEt. Se obtienen 132 mg (38%) de un sólido blanco que se identifica como **51**.

EM (ES, modo positivo): m/z 433 (M+H)⁺.

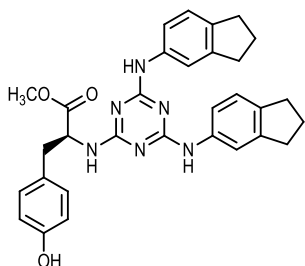
¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 1.98 (m, 4H, CH₂), 2.78 (m, 8H, CH₂), 3.18-3.26 (m, 2H, CH₂N), 3.43-3.49 (m, 2H, CH₂O), 3.66 (m, 1H, CHOH), 4.55 (t, 1H, J= 5.7 Hz, OH), 4.78 (d, 1H, J= 4.3 Hz, OH), 6.64 (s ancho, 1H, NH), 7.07 (d, 2H, J= 8.1 Hz, aromáticos), 7.45 (d, 2H, J= 8.0 Hz, aromáticos), 7.63 (s, 2H, aromáticos), 8.81 (s ancho, 1H, NH), 8.93 (s ancho, 1H, NH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 75 MHz) δ: 25.6 (CH₂), 32.1 (CH₂), 32.9 (CH₂), 44.1 (CH₂N), 64.4 (CH₂O), 70.9 (CHOH), 116.6, 118.6, 120.0, 136.7, 138.7, 144.0, (C aromáticos), 164.4 (C-2), 166.2 (C-4, C-6).

Anal. calculado para C₂₄H₂₈N₆O₂: C, 66.65; H, 6.53; N, 19.43. Encontrado: C, 66.48; H, 6.61; N, 19.19.

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 3428 (ν_{N-H}, -NH), 3313 (ν_{O-H}, -OH), 2948 (ν_{C-H}, -CH₂), 1574, 1503 (ν_{C=C}, anillos aromáticos), 1425 (δ_{C-H}, -CH₂), 807 (ν_{C=C}, aromáticos 1,3,4-disustituidos).

(S)-Metil-2-(4,6-bis(indan-5-ilamino)-1,3,5-triazin-2-il)-3-(4-hidroxifenil)propanoato (52)



Según el procedimiento B para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del compuesto **50** (250 mg, 0.66 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml), se añadió H-Tyr-OMe-HCl (461 mg, 1.99 mmol) y DIPEA (1.00 ml, 5.94 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 120 °C durante 3 h. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH

(30:1). Se obtienen 145 mg (41%) de un sólido blanco que se identifica como **52**. Pf 79-81 °C.

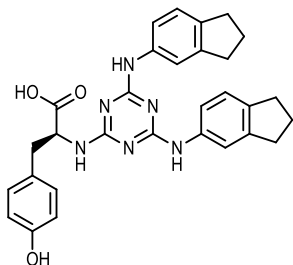
EM (ES, modo positivo): m/z 537 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 1.97 (m, 4H, CH₂), 2.76-2.89 (m, 10H, CH₂ β-CH₂Tyr), 3.60 (s, 3H, CH₃O), 4.63 (m, 1H, α-CHTyr), 6.61 (d, J = 8.1 Hz, 2H, aromáticos), 7.00-7.68 (m, 9H, NH, aromáticos), 8.90 (m, 2H, NH), 9.20 (s, 1H, OH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 75 MHz) δ: 25.6 (CH₂), 32.1 (CH₂), 32.9 (CH₂), 36.3 (β-CH₂Tyr), 52.1 (CH₃O), 55.7 (α-CHTyr), 116.6, 118.6, 124.0, 138.7, 144.0 (C aromáticos), 164.2 (C-2), 165.8 (C-4, C-6), 173.5 (COOCH₃).

Anal. calculado para C₃₁H₃₂N₆O₃: C, 69.38; H, 6.01; N, 15.66. Encontrado: C, 69.58; H, 5.74; N, 15.76

Ácido (S)-2-(4,6-bis(indan-5-ilamino)-1,3,5-triazin-2-il)-3-(4-hidroxifenil)propanoico (53)



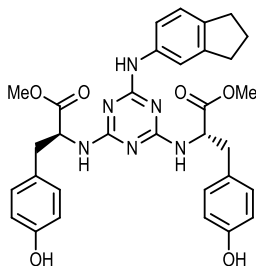
Siguiendo el procedimiento general de desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **52** (128 mg, 0.24 mmol) en THF (1.5 ml) con LiOH·H₂O (21 mg, 0.48 mmol) en H₂O (1.5 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 91 mg (73%) de un sólido blanco que se identifica como **53**. Pf 166-168 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 523 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 1.99 (m, 4H, CH₂), 2.78-2.89 (m, 10H, CH₂ β-CH₂Tyr), 4.48 (m, 1H, α-CHTyr), 6.62 (d, J = 8.2 Hz, 2H, aromáticos), 7.01-7.70 (m, 9H, NH, aromáticos), 8.90 (m, 2H, NH), 9.20 (s, 1H, OH).

Anal. calculado para C₃₀H₃₀N₆O₃: C, 68.95; H, 5.79; N, 16.08. Encontrado: C, 68.80; H, 5.68; N, 16.39.

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-(indan-5-ilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(4-hidroxi fenil)propanoato) (54)



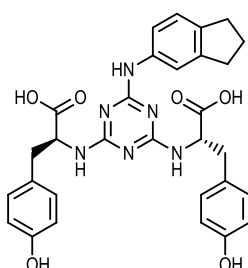
Según el procedimiento B para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del compuesto **43** (200 mg, 0.40 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml), se añadió 5-aminoindano (160 mg, 1.20 mmol) y DIPEA (0.62 ml, 3.60 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 120 °C durante 3 h. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente un gradiente de CH₂Cl₂:MeOH (30:1) a (15:1). Se obtienen 91 mg (38%) de un sólido blanco que se identifica como **54**. Pf 108-110 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 599 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 1.97 (m, 2H, CH₂), 2.74-2.91 (m, 8H, CH₂, β-CH₂Tyr), 3.55 (s, 6H, CH₃O), 4.38-4.64 (m, 2H, α-CHTyr), 6.63 (d, J = 8.3 Hz, 4H, aromáticos), 6.81-7.98 (m, 9H, NH, aromáticos), 8.76 (m, 1H, NH), 9.21 (s, 2H, OH).

Anal. calculado para C₃₂H₃₄N₆O₆: C, 64.20; H, 5.72; N, 14.04. Encontrado: C, 64.56; H, 5.84; N, 13.71

Ácido (2S,2'S)-2,2'-(6-(indan-5-ilamino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(4-hidroxi fenil)propanoico) (55)



Siguiendo el procedimiento general de desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **54** (100 mg, 0.17 mmol) en THF (1.5 ml) con LiOH·H₂O (29 mg, 0.67 mmol) en H₂O (1.5 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 73 mg (75%) de un sólido blanco que se identifica como **55**. Pf > 150 °C, descompone.

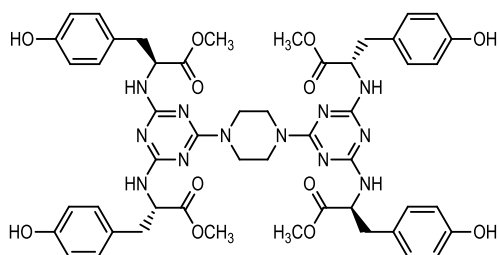
EM (ES, modo positivo): m/z 571 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.01 (m, 2H, CH₂), 2.79-2.89 (m, 8H, CH₂, β-CH₂Tyr), 4.50 (m, 2H, α-CHTyr), 6.74-7.72 (m, 13H, NH, aromáticos), 8.76 (m, 1H, NH), 9.23 (s, 2H, OH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 75 MHz) δ: 25.6 (CH₂), 32.1 (CH₂), 32.9 (CH₂), 36.3 (β-CH₂Tyr), 55.4 (α-CHTyr), 115.3, 116.2, 118.2, 123.9, 128.5, 130.4, 136.7, 138.8, 144.2, 156.2 (C aromáticos), 164.0 (C-6), 165.7 (C-2, C-4), 174.4 (COOH).

Anal. calculado para C₃₀H₃₀N₆O₆: C, 63.15; H, 5.30; N, 14.73. Encontrado: C, 63.35; H, 5.16; N, 14.65.

(2S,2'S,2''S,2'''S)-Tetrametil-2,2',2'',2'''-(6,6'-(piperazin-1,4-diil)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-(4-hidroxifenil)propanoato) (56)



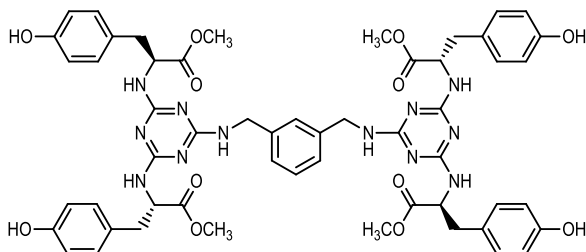
Seguendo el procedimiento A para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar el derivado **43** (184 mg, 0.37 mmol) con piperazina (19 mg, 0.22 mmol) en presencia de DIPEA (0.39 ml, 2.22 mmol) en dioxano (5 ml). La reacción se calienta a 100 °C durante 48 h en tubo de presión. El residuo se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente AcOEt:CH₂Cl₂:AcOH (2:1:0.4). Se obtienen 121 mg (65%) de un sólido blanco que se identifica como **56**. Pf 120-121 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 509 (M+2H)²⁺, 1017 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 2.81-2.95 (m, 8H, β-CH₂Tyr), 3.45-3.59 (m, 20H, CH₃O, CH₂N), 4.48 (s ancho, 4H, α-CHTyr), 6.60 (d, J= 7.3 Hz, 8H, aromáticos), 7.00 (d, J= 7.3 Hz, 8H, aromáticos), 9.21 (s, 4H, OH).

Anal. calculado para C₅₀H₅₆N₁₂O₁₂: C, 59.05; H, 5.55; N, 16.53. Encontrado: C, 59.10; H, 5.59; N, 16.61.

(2S,2'S,2''S,2'''S)-Tetrametil-2,2',2'',2'''-(6,6'-(1,3-xililendiamino)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-(4-hidroxifenil)propanoico) (57)



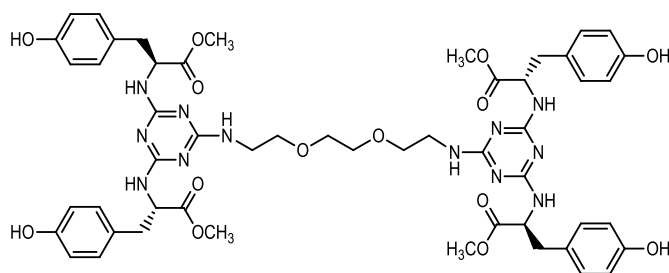
Seguendo el procedimiento B para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar el derivado **43** (200 mg, 0.40 mmol) con 1,3-xililendiamina (32 μl, 0.24 mmol) en dioxano (5 ml) en presencia de DIPEA (0.56 ml, 3.20 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 2 h. El residuo se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente AcOEt:CH₂Cl₂:AcOH (4:1:0.25). Se obtienen 119 mg (56%) de un sólido blanco que se identifica como **57**. Pf 126-127 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 534 (M+2H)²⁺, 1067 (M+H)⁺

¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 2.84 (m, 8H, β-CH₂Tyr), 3.57 (s, 12H, CH₃O), 4.20-4.60 (m, 8H, α-CHTyr, CH₂N), 6.65 (d, J= 7.3 Hz, 8H, aromáticos), 6.83 (s ancho, 2H, NH), 7.02 (d, J= 7.3 Hz, 8H, aromáticos), 7.13-7.18 (s ancho, 4H, NH), 9.18 (s, 4H, OH).

Anal. calculado para C₅₄H₅₈N₁₂O₁₂: C, 60.78; H, 5.48; N, 15.75. Encontrado: C, 60.44; H, 5.78; N, 15.55.

(2*S*,2'*S*,2''*S*,2'''*S*)-Tetrametil-2,2',2'',2'''-(6,6'-(2,2'-(etilendioxi)diethylamino)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-(4-hidroxifenil)propanoato) (58)



Siguiendo el procedimiento B para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar el derivado **43** (240 mg, 0.48 mmol) con 2'-(etilendioxi)diethylamina (29 μ l, 0.20 mmol) en dioxano (5 ml) en presencia de DIPEA (0.50 ml, 2.88

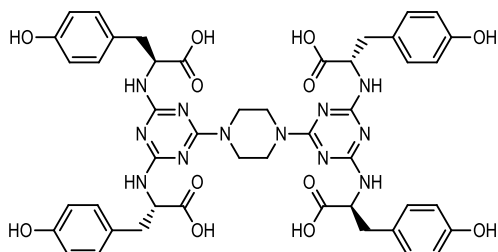
mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 2 h. El residuo se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (15:1). Se obtienen 151 mg (70%) de un sólido blanco que se identifica como **58**. Pf 94-96 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 540 (M+2H)²⁺, 1079 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 2.87 (m, 8H, β -CH₂Tyr), 3.41-3.61 (m, 24H, CH₃O, CH₂N, CH₂O), 4.31-4.67 (m, 8H, α -CHTyr), 6.65 (d, J = 7.8 Hz, 8H, aromáticos), 6.68-6.86 (m, 14H, aromáticos, NH), 9.22 (s, 4H, OH).

Anal. calculado para C₅₂H₆₂N₁₂O₁₄: C, 57.88; H, 5.79; N, 15.58. Encontrado: C, 57.98; H, 5.61; N, 15.42.

Ácido (2*S*,2'*S*,2''*S*,2'''*S*)-2,2',2'',2'''-(6,6'-(piperazin-1,4-diil)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-(4-hidroxifenil)propanoico) (59)



Según el procedimiento descrito para la desprotección de ésteres metílicos, se trata el compuesto **56** (76 mg, 0.07 mmol) en THF (1 ml) con LiOH·H₂O (26 mg, 0.60 mmol) en H₂O (1 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 51 mg (62%)

de un sólido blanco que se identifica como **59**. Pf >220 °C, descompone.

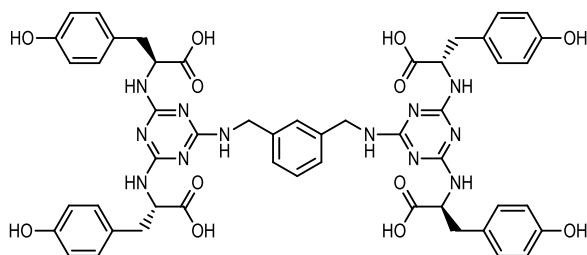
EM (ES, modo positivo): m/z 481, (M+2H)²⁺, 961 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 2.84-2.99 (m, 8H, β -CH₂Tyr), 3.40-3.63 (m, 8H, CH₂N), 4.50 (m, 4H, α -CHTyr), 6.62 (d, J = 7.3 Hz, 8H, aromáticos), 7.00-7.13 (m, 12H, aromáticos, NH), 9.22 (s, 4H, OH), 12.69 (s ancho, 4H, COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₄₆H₄₈N₁₂O₁₂: 960.3515. Encontrado: 960.3512.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 4.5 min (98%), Sistema B: 3.0 min (98%).

Ácido (2S,2'S,2''S,2'''S)-2,2',2'',2'''-(6,6'-(1,3-xililendiamino)bis(azanodiil)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-(4-hidroxifenil)propanoico) (60)



Siguiendo el procedimiento general de desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **57** (94 mg, 0.089 mmol) en THF (1 ml) con LiOH·H₂O (30 mg, 0.71 mmol) en H₂O (1 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 56 mg (62%) de un sólido blanco que se identifica como **60**. Pf >220 °C, descompone.

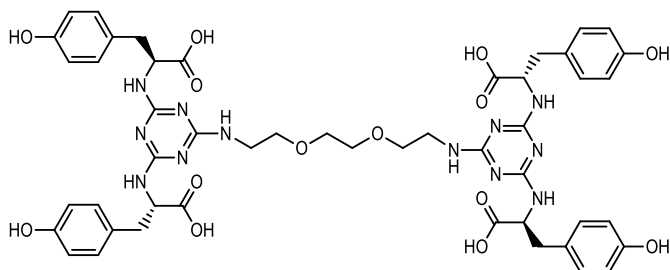
EM (ES, modo positivo): m/z 506 (M+2H)²⁺, 1011 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 2.86-2.99 (m, 8H, β-CH₂Tyr), 4.36-4.54 (m, 8H, α-CHTyr, CH₂N), 6.65 (d, J= 7.7 Hz, 8H, aromáticos), 7.01 (d, J= 7.7 Hz, 8H, aromáticos), 6.75 (s ancho, 2H, NH), 7.17-7.23 (m, 4H, NH), 9.29 (s, 4H, OH), 12.66 (s ancho, 4H, COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₅₀H₅₀N₁₂O₁₂: 1010.3671; Encontrado: 1010.3679

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 4.7 min (98%), Sistema B: 3.1 min (98%).

Ácido (2S,2'S,2''S,2'''S)-2,2',2'',2'''-(6,6'-(2,2'-(etilendioxi)diethylamino)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-(4-hidroxifenil)propanoico) (61)



Según el procedimiento descrito para la desprotección de ésteres metílicos, se trata el compuesto **58** (100 mg, 0.09 mmol) en THF (1.5 ml) con LiOH·H₂O (32 mg, 0.74 mmol) en H₂O (1.5 ml). El residuo se purifica con resina Amberlite IRA400 (HCOO⁻) obteniéndose 79 mg (84%) de un sólido blanco que se identifica como **61**. Pf >210 °C, descompone.

EM (ES, modo positivo): m/z 512 (M+2H)²⁺, 1023 (M+H)⁺.

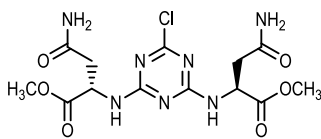
¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 2.87-2.92 (m, 8H, β-CH₂Tyr), 3.23-3.45 (m, 12H, CH₂N, CH₂O), 4.38 (m, 4H, α-CHTyr), 6.20-6.75 (m, 14H, aromáticos, NH), 7.01 (d, J= 7.7 Hz, 8H, aromáticos), 9.23 (s, 4H, OH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ: 35.8 (β-CH₂Tyr), 41.7 (CH₂N), 55.1 (α-CHTyr), 69.7 (CH₂O), 114.8, 128.3, 130.0 (C aromáticos), 155.7 (C_AOH), 165.0 (C-6), 165.3 (C-2, C-4) 174.3 (COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₄₈H₅₄N₁₂O₁₄: 1022.3882. Encontrado: 1022.3870.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 4.4 min (100%), Sistema B: 3.0 min (99%).

(2S,2'S)-Dimetil-2,2'-(6-cloro-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(4-amino-4-oxobutanoato) (62)

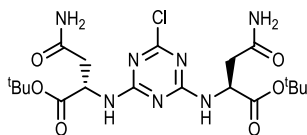


Según el procedimiento general para la obtención de triazinas disustituidas, a una disolución de cloruro cianúrico (244 mg, 1.32 mmol) en THF (15 ml), se añadió H-Asn-OMe-HCl (577 mg, 3.17 mmol) y DIPEA (1.4 ml, 7.92 mmol). El residuo se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (10:1). Se obtienen 201 mg (50%) de un sólido blanco que se identifica como **62**. Pf 87- 89 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 404 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 2.54 (m, 4H, β-CH₂Asn), 3.62 (s, 6H, CH₃O), 4.42-4.71 (m, 2H, α-CHAsn), 6.90-6.94 (m, 4H, CONH₂), 7.76-8.03 (m, 2H, NH).

(2S,2'S)-Terc-butil-2,2'-(6-cloro-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(4-amino-4-oxobutanoato) (63)

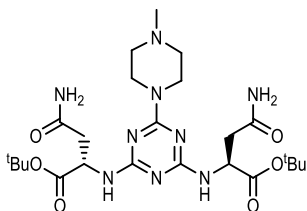


Según el procedimiento general para la obtención de triazinas disustituidas, a una disolución de cloruro cianúrico (225 mg, 1.22 mmol) en THF (15 ml), se añadió H-Asn-OtBu-HCl (660 mg, 2.94 mmol) y DIPEA (1.3 ml, 7.32 mmol). El residuo se purifica mediante por cromatografía en columna, empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (10:1). Se obtienen 576 mg (82%) de un sólido blanco que se identifica como **63**. Pf 140-142 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 488 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 1.39 (s, 18H, CH₃), 2.55 (m, 4H, β-CH₂Asn), 4.45-4.72 (m, 2H, α-CHAsn), 6.96 (m, 4H, CONH₂), 7.78-8.16 (m, 2H, NH).

(2S,2'S)-Terc-butil-2,2'-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(4-amino-4-oxobutanoato) (64)



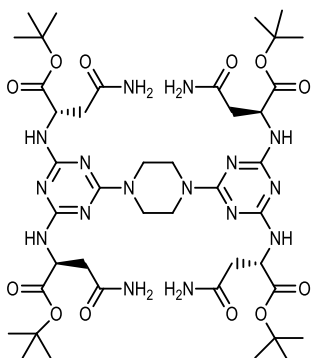
Según el procedimiento A para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del compuesto **63** (132 mg, 0.27 mmol) en 1,4-dioxano (8 ml), se añadió N-metilpiperazina (90 μl, 0.81 mmol) y DIPEA (0.14 ml, 0.81 mmol). La reacción se calienta a 70 °C durante 24 h en tubo de presión. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (10:1:0.2). Se obtienen 126 mg (85%) de un sólido blanco que se identifica como **64**. Pf 160-161 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 552 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 1.35 (s, 18H, CH₃), 2.11 (s, 3H, CH₃N), 2.18 (m, 4H, CH₂N), 2.55 (m, 4H, β -CH₂Asn), 3.62 (m, 4H, CH₂N), 4.36-4.72 (m, 2H, α -CHAsn), 6.51-6.82 (m, 4H, CONH₂), 6.93 (s ancho, 1H, NH), 7.32 (s ancho, 1H, NH).

Anal. calculado para C₂₄H₄₁N₉O₆: C, 52.25; H, 7.49; N, 22.85. Encontrado: C, 51.98; H, 7.12; N, 23.15

(2S,2'S,2''S,2'''S)-Terc-butil-2,2',2'',2'''-(6,6'-(piperazin-1,4-diil)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis (azanodiil)tetrakis(4-amino-4-oxobutanoato) (65)



Seguendo el procedimiento B para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar el derivado **63** (380 mg, 0.78 mmol) con piperazina (41 mg, 0.47 mmol) en presencia de DIPEA (0.41 ml, 2.34 mmol) en dioxano (5 ml). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 2 h. El residuo se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (7:1:0.1). Se obtienen 250 mg (62%) de un sólido blanco que se identifica como **65**. Pf 162-164 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 495 (M+2H)²⁺, 990 (M+H)⁺.

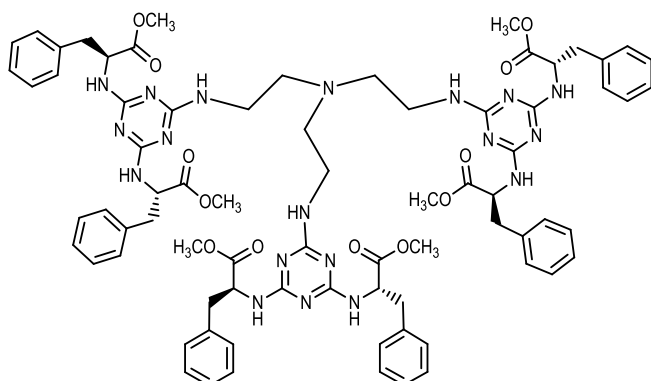
¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 1.39 (s, 36H, CH₃), 2.52 (m, 8H, β -CH₂Asn), 3.66 (m, 8H, CH₂N), 4.42-4.74 (m, 4H, α -CHAsn), 6.67-7.02 (m, 8H, CONH₂), 7.30-7.42 (m, 4H, NH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 75 MHz) δ : 27.6 ((CH₃)₃C), 36.6 (β -CH₂Asn), 42.4 (CH₂N), 51.5 (α -CHAsn), 80.2 ((CH₃)₃C) 164.1, 165.0 (C-2, C-4, C-6), 171.4 (COO(CH₃)₃, CONH₂)

Anal. calculado para C₄₂H₆₈N₁₆O₁₂: C, 51.00; H, 6.93; N, 22.66. Encontrado: C, 50.68; H, 6.87; N, 23.01.

SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS DE LA SERIE III

Derivado de tris(2-aminoetil)amina y triazina disustituida con éster metílico de fenilalanina (**72**)



Según el procedimiento general para la obtención de trímeros, se hace reaccionar el derivado **14** (214 mg, 0.46 mmol) con tris(2-aminoetil)amina (22 mg, 0.15 mmol) en presencia de DIPEA (0.24 ml, 1.38 mmol), en dioxano (4 ml). El residuo obtenido se purifica por cromatografía en

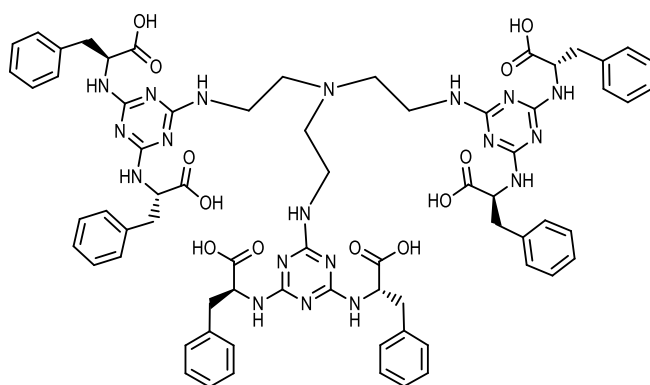
columna empleando como eluyente un gradiente de CH₂Cl₂:MeOH (20:1) a (10:1). Se obtienen 100 mg (46%) de un sólido blanco que se identifica como **72**. Pf 71-72 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 724 (M+2H)²⁺, 1447 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.58 (m, 6H, CH₂N), 2.96-3.25 (m, 18H, β-CH₂Phe, CH₂N), 3.47 (s, 18H, CH₃O), 4.56 (m, 6H, α-CHPhe), 6.19-6.51 (m, 6H, NH), 7.08-7.28 (m, 33H, aromáticos, NH).

Anal. calculado para C₇₅H₈₇N₁₉O₁₂: C, 62.27; H, 6.06; N, 18.40. Encontrado: C, 62.01; H, 6.36; N, 18.01

Derivado de tris(2-aminoetil)amina y triazina disustituída con fenilalanina (**73**)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **72** (100 mg, 0.07 mmol) en THF (0.7 ml) con LiOH·H₂O (35 mg, 0.83 mmol) en agua (0.7 ml). El residuo se purifica con resina Dowex 1X2 (HCOO⁻) obteniéndose 32 mg (34%) de un sólido blanco que se identifica como **73**. Pf

> 230 °C, descompone.

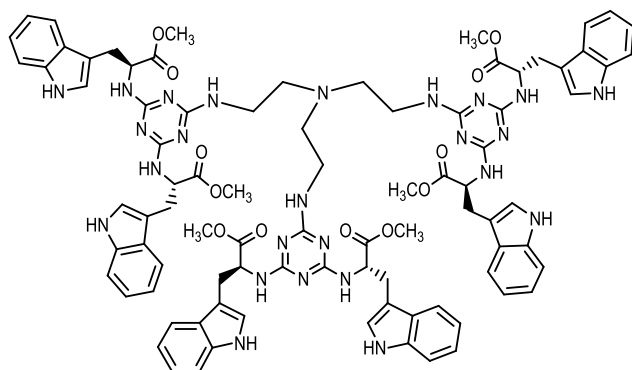
EM (ES, modo positivo): m/z 682 (M+2H)²⁺, 1363 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.56 (m, 6H, CH₂N), 2.93-3.18 (m, 12H, β-CH₂Phe), 3.25 (m, 6H, CH₂N), 4.56 (m, 6H, α-CHPhe), 6.21-6.57 (m, 6H, NH), 7.08-7.28 (m, 33H, aromáticos, NH), 12.53 (s ancho, 6H, COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₆₉H₇₅N₁₉O₁₂: 1361.5843. Encontrado: 1361.5833.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 6.8 min (98%), Sistema B: 3.8 min (98%).

Derivado de tris(2-aminoetil)amina y triazina disustituída con éster metílico de triptófano (**74**)



Según el procedimiento descrito para la obtención de trímeros, se hace reaccionar el derivado **30** (400 mg, 0.73 mmol) con tris(2-aminoetil)amina (36 μl, 0.22 mmol) en presencia de DIPEA (0.38 ml, 2.16 mmol), en dioxano (5 ml). El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna

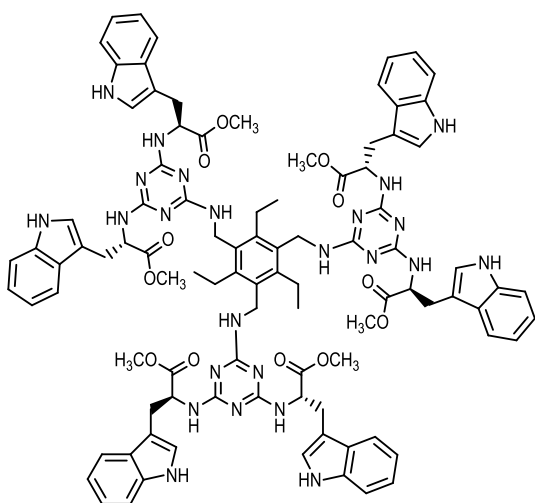
empleando como eluyente un gradiente de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (25:1) a (10:1). Se obtienen 187 mg (51%) de un sólido blanco que se identifica como **74**. Pf 109-110 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 841 ($M+2H$)²⁺.

¹H-RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.52 (m, 6H, CH_2N), 3.09-3.34 (m, 18H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$, CH_2N), 4.37-4.71 (m, 6H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 6.39-6.66 (m, 6H, NH), 6.92-7.45 (m, 33H, aromáticos, H-2ⁱ Trp, NH), 10.85 (s ancho, 6H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para $\text{C}_{87}\text{H}_{93}\text{N}_{25}\text{O}_{12}$: C, 62.17; H, 5.58; N, 20.83; Encontrado: C, 62.42; H, 5.76; N, 20.46.

Derivado de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenzenc y triazina disustituida con éster metílico de triptófano (**75**)



Según el procedimiento descrito para la obtención de trímeros, se hace reaccionar el derivado **30** (200 mg, 0.36 mmol) con 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenzenc¹ (29 mg, 0.12 mmol) en presencia de DIPEA (0.19 ml, 1.12 mmol), en dioxano (4 ml). El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (30:1). Se obtienen 70 mg (33%) de un sólido blanco que se identifica como **75**. Pf 183-185 °C.

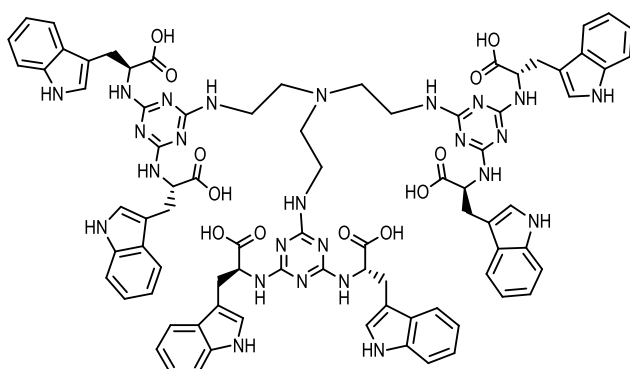
EM (ES, modo positivo): m/z 892 ($M+2H$)²⁺.

¹H-RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 1.00 (m, 9H, CH_2CH_3), 2.56 (m, 6H, CH_2CH_3), 3.12 (m, 12H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.50 (s, 18H, CH_3O), 4.26 (s, 6H, CH_2N), 4.41-4.78 (m, 6H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 5.85-6.68 (m, 6H, NH), 6.85-7.58 (m, 33H, NH, H-2ⁱTrp, aromáticos), 10.83 (s, 6H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para $\text{C}_{96}\text{H}_{102}\text{N}_{24}\text{O}_{12}$: C, 64.63; H, 5.76; N, 18.84; Encontrado: C, 64.52; H, 6.01; N, 18.61.

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

Derivado de tris(2-aminoetil)amina y triazina disustituida con triptófano (**76**)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **74** (80 mg, 0.045 mmol) en THF (1 ml) con $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (24 mg, 0.57 mmol) en agua (1 ml). El residuo se purifica con resina Dowex 1X2 (HCOO^-) obteniéndose 56 mg (78%) de un sólido

blanco que se identifica como **76**. Pf > 230 °C, descompone.

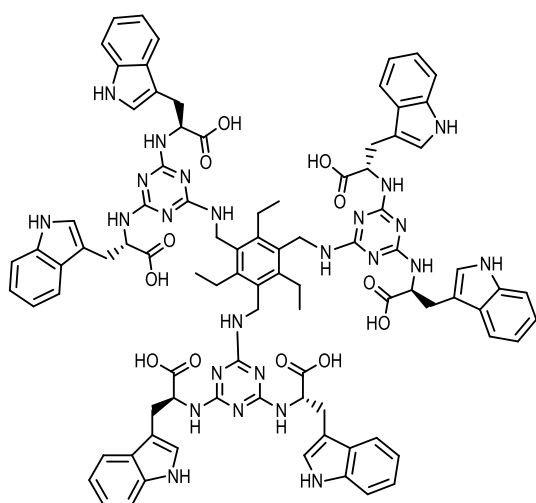
EM (ES, modo positivo): m/z 799 (M+2H)²⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 2.56 (m, 6H, CH₂N), 3.02-3.30 (m, 18H, β-CH₂Trp, CH₂N), 4.61 (m, 6H, α-CHTrp), 5.99-6.70 (m, 6H, NH), 6.90-7.58 (m, 33H, aromáticos, H-2ⁱ Trp, NH), 10.84 (s ancho, 6H, NH-1ⁱ Trp), 12.31 (s ancho, 6H, COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₈₁H₈₁N₂₅O₁₂: 1595.6497. Encontrado: 1595.6527.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 6.8 min (98%), Sistema B: 3.7 min (98%).

Derivado de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno y triazina disustituida con triptófano (**77**)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **75** (67 mg, 0.04 mmol) en THF (1 ml) con LiOH·H₂O (19 mg, 0.45 mmol) en agua (1 ml). El residuo se purifica con resina Dowex 1X2 (HCOO⁻) obteniéndose 47 mg (74%) de un sólido blanco que se identifica como **77**. Pf > 230 °C, descompone.

EM (ES, modo positivo): m/z 850 (M+2H)²⁺, 1700 (M+H)⁺.

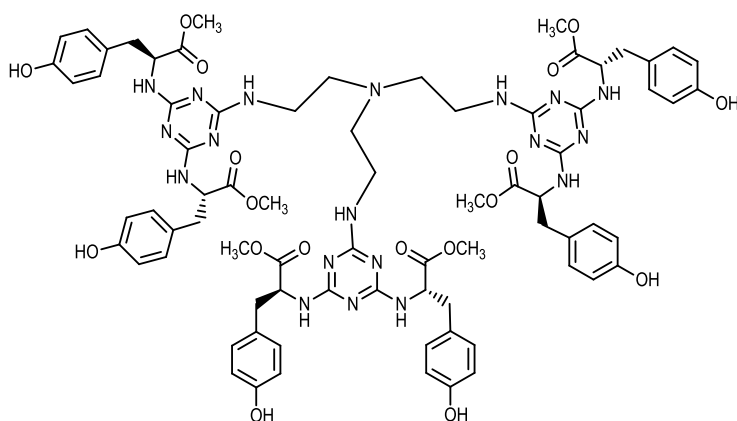
¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 0.98 (m, 9H, CH₂CH₃), 2.71 (m, 6H, CH₂CH₃), 3.18 (m, 12H, β-CH₂Trp), 4.36-4.79 (m, 12H, CH₂N, α-CHTrp), 5.89-6.38 (m, 6H, NH), 6.86-7.93 (m, 33H, aromáticos, H-2ⁱ Trp, NH), 10.81-10.89 (m, 6H, NH-1ⁱ Trp).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ: 16.6 (CH₂CH₃), 22.5 (CH₂CH₃), 36.0 (β-CH₂Trp), 38.6 (CH₂N), 54.5 (α-CHTrp), 111.9, 118.5, 118.9, 127.6, 121.4, 124.3, 127.6, 136.6 (C aromáticos), 164.8 (C triazina), 174.0 (COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₉₀H₉₀N₂₄O₁₂: 1698.7170. Encontrado: 1698.7158.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 7.4 min (99%), Sistema B: 3.8 min (99%).

Derivado de tris(2-aminoetil)amina y triazina disustituida con éster metílico de tirosina (78)



Según el procedimiento general para la obtención de trímeros, se hace reaccionar el derivado **43** (425 mg, 0.85 mmol) con tris(2-aminoetil)amina (41 μ l, 0.28 mmol) en presencia de DIPEA (0.44 ml, 2.55 mmol), en dioxano (10 ml). El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna

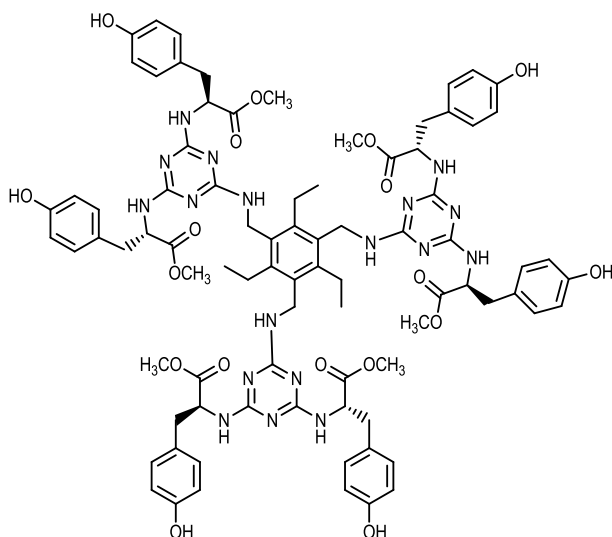
empleando como eluyente un gradiente de CH_2Cl_2 :MeOH (15:1) a (5:1). Se obtienen 178 mg (44%) de un sólido blanco que se identifica como **78**. Pf 135-137 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 772 ($M+2H$)²⁺, 1543 ($M+H$)⁺.

¹H-RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.61 (m, 6H, CH_2N), 3.10-3.28 (m, 18H, β - CH_2Tyr , CH_2N), 3.61 (s, 18H, CH_3O), 4.30-4.61 (m, 6H, α - CHTyr), 6.45-7.31 (m, 34H, NH, aromáticos), 9.21 (s, 6H, OH).

Anal. calculado para $\text{C}_{75}\text{H}_{87}\text{N}_{19}\text{O}_{18}$: C, 58.39; H, 5.68; N, 17.25. Encontrado: C, 58.14; H, 5.86; N, 17.01.

Derivado de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno y triazina disustituida con éster metílico de tirosina (79)



Según el procedimiento general para la obtención de trímeros, se hace reaccionar el derivado **43** (350 mg, 0.70 mmol) con 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno (58 mg, 0.23 mmol) en presencia de DIPEA (0.40 ml, 2.10 mmol), en dioxano (5 ml). El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente un gradiente de CH_2Cl_2 :MeOH (20:1) a (10:1). Se obtienen 116 mg (30%) de un sólido blanco que se identifica como **79**. Pf 158-160 °C.

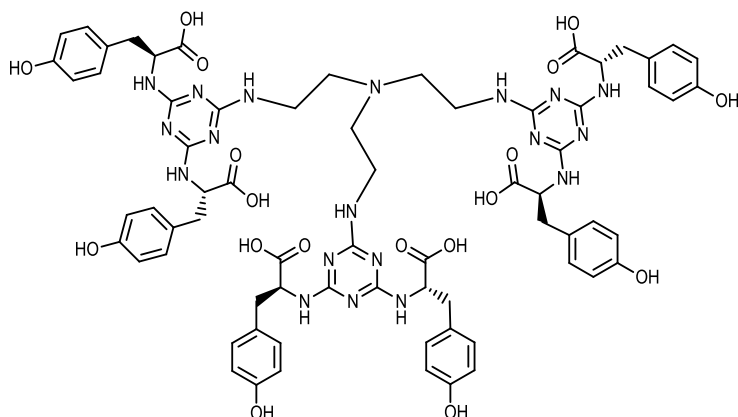
EM (ES, modo positivo): m/z 823 ($M+2H$)²⁺, 1646 ($M+H$)⁺.

¹H-RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 1.03 (m, 9H, CH_2CH_3), 2.61 (m, 6H, CH_2CH_3), 2.89 (m, 12H, β - CH_2Tyr), 3.55 (s, 18H, CH_3O), 4.33-4.52 (m, 12H, α - CHTyr , CH_2N), 5.91-6.12 (m, 6H, NH), 6.44-6.61 (m, 15H, NH, aromáticos), 6.98 (d, $J=7.8$ Hz, 12H, aromáticos), 9.23 (s, 6H, OH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 16.1 (CH₂CH₃), 20.9 (CH₂CH₃), 35.7 (β-CH₂Tyr), 38.8 (CH₂N), 51.3 (CH₃O), 54.7 (α-CHTyr), 114.9, 127.6, 129.8, 130.1, 142.8, 155.8 (C aromáticos), 165.1 (C triazina), 173.0 (COOCH₃).

Anal. calculado para C₈₄H₉₆N₁₈O₁₈: C, 61.30; H, 5.88; N, 15.32. Encontrado: C, 61.67; H, 5.67; N, 15.12.

Derivado de tris(2-aminoetil)amina y triazina disustituida con tirosina (80)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **78** (150 mg, 0.097 mmol) en THF (1 ml) con LiOH·H₂O (50 mg, 1.16 mmol) en agua (1 ml). El residuo se purifica con resina Dowex1X2 (HCOO⁻) obteniéndose 107 mg (76%) de un sólido blanco

que se identifica como **80**. Pf > 210 °C, descompone.

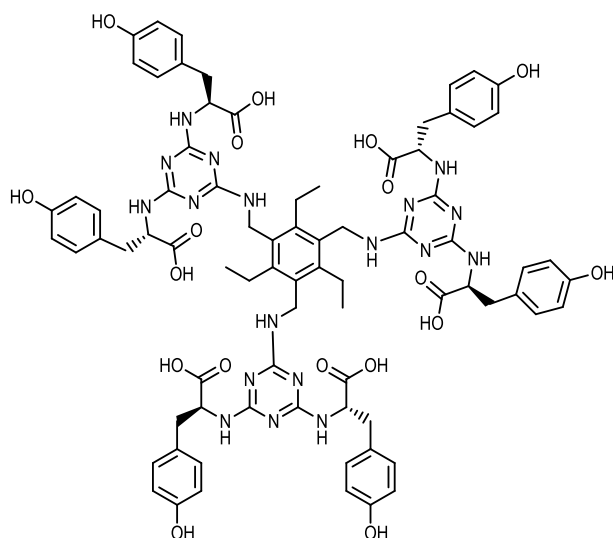
EM (ES, modo positivo): m/z 730 (M+2H)²⁺, 1459 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 2.59 (m, 6H, CH₂N), 2.97-3.04 (m, 12H, β-CH₂Tyr), 3.27 (m, 6H, CH₂N), 4.21-4.71 (m, 6H, α-CHTyr), 6.22-6.65 (m, 18H, NH, aromáticos), 7.01-7.15 (m, 15H, NH, aromáticos), 9.23 (s, 6H, OH), 12.42 (s ancho, 6H, COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₆₉H₇₅N₁₉O₁₈: 1457.5535. Encontrado: 1457.5537.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 4.3 min (98%), Sistema B: 2.9 min (98%).

Derivado de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno y triazina disustituida con tirosina (81)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **79** (132 mg, 0.08 mmol) en THF (1.5 ml) con LiOH·H₂O (41 mg, 0.96 mmol) en agua (1.5 ml). El residuo se purifica con resina Dowex 1X2 (HCOO⁻) obteniéndose 105 mg (84%) de un sólido blanco que se identifica como **81**. Pf > 210 °C, descompone.

EM (ES, modo positivo): m/z 781 (M+2H)²⁺

1562 (M+H)⁺.

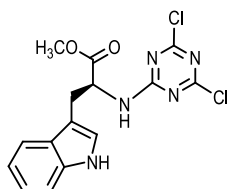
¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 1.04 (m, 9H, CH₂CH₃), 2.62 (m, 6H, CH₂CH₃), 2.81-2.95 (m, 12H, β-CH₂Tyr), 4.21-4.69 (m, 12H, α-CHTyr, CH₂N), 5.91-6.20 (m, 6H, NH), 6.63 (m, 15H, NH, Ar), 6.99 (d, J=7.8 Hz, 12H, Ar), 9.19 (s, 6H, OH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ: 16.2 (CH₂CH₃), 22.6 (CH₂CH₃), 35.8 (β-CH₂Tyr), 38.8 (CH₂N), 54.9 (α-CHTyr), 114.9, 127.9, 129.9, 142.8, 155.7 (C aromáticos), 164.7, 165.2 (C triazina), 173.9 (COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₇₈H₈₄N₁₈O₁₈: 1560.6211. Encontrado: 1560.6210.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 5.2 min (98%), Sistema B: 3.3 min (98%).

(2S)-Metil-2-(4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-il)azanodiil-3-(1H-indol-3-il)propanoato (82)

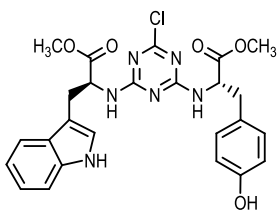


Sobre una disolución que contiene cloruro cianúrico (277 mg, 1.50 mmol) en THF (5 ml) a 0 °C se añade una mezcla que contiene H-Trp-OMe·HCl (420 mg, 1.65 mmol) y DIPEA (1.7 ml, 9.9 mmol) en THF (10 ml). La mezcla se agita a 0 °C durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en 15 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH₄Cl. La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía flash, empleando un gradiente de hexano:AcOEt (100:0 a 60:40). Se obtienen 461 mg (84%) de un sólido blanco que se identifica como **82**. Pf 113-115 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 366 (M+H)⁺ con distribución isotópica de 2 cloros.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 3.20-3.25 (m, 2H, β-CH₂Trp), 3.61 (s, 3H, CH₃O), 4.91 (m, 1H, α-CHTrp), 5.72-5.91 (m, 1H, NH), 6.88 (s ancho, 1H, H-2^o Trp), 6.98-7.58 (m, 4H, aromáticos), 8.16 (s ancho, 1H, NH-1^o Trp).

(S)-Metil-2-(4-((S)-3-(1H-indol-3-il)-1-metoxi-1-oxopropan-2-ilamino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino)-3-(4-hidroxifenil)propanoato (83)

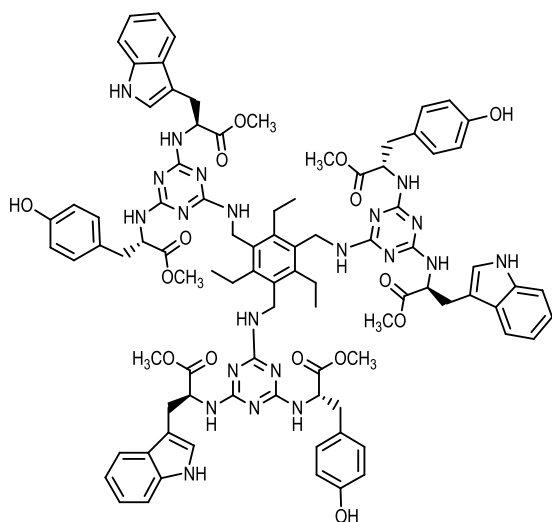


Sobre una disolución que contiene la triazina monosustituída **82** (300 mg, 0.82 mmol) en THF (20 ml) se añade H-Tyr-OMe·HCl (228 mg, 0.98 mmol) y DIPEA (0.80 ml, 4.92 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 10 horas. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en 15 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH₄Cl. La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía flash, empleando un gradiente de CH₂Cl₂:MeOH (100:0) a (85:15). Se obtienen 352 mg (81%) de un sólido blanco que se identifica como **83**. Pf 112-114 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 525 ($M+H$)⁺ con distribución isotópica de un Cl.

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 2.81-2.94 (m, 2H, β -CH₂Tyr), 3.21-3.25 (m, 2H, β -CH₂Trp), 3.59 (s, 6H, CH₃O), 4.31-4.88 (m, 2H, α -CHTyr, α -CHTrp), 5.72-5.91 (m, 2H, NH), 6.64-7.61 (m, 9H, H-2ⁱ Trp, aromáticos), 9.20 (s, 1H, OH), 10.83 (s ancho, 1H, NH-1ⁱ Trp).

Derivado de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno y triazina disustituida con los ésteres metílicos de tirosina y triptófano (84)



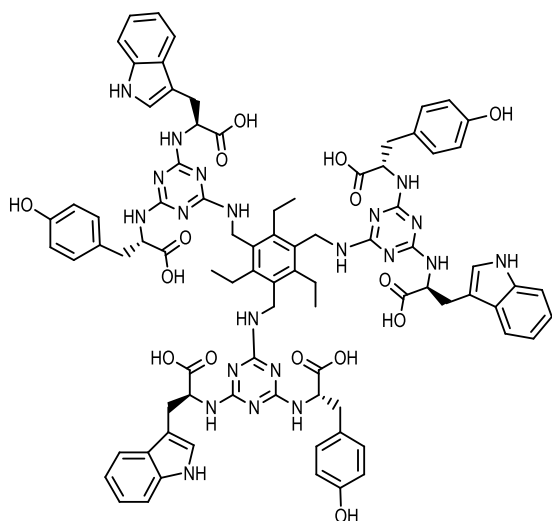
Según el procedimiento general para la obtención de trimeros, se hace reaccionar el derivado **83** (317 mg, 0.55 mmol) con 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno (34 mg, 0.14 mmol) en presencia de DIPEA (0.30 ml, 1.6 mmol), en dioxano (5 ml). El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente un gradiente de CH₂Cl₂:MeOH (30:1) a (10:1). Se obtienen 91 mg (38%) de un sólido blanco que se identifica como **84**. Pf 154-156 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 858 ($M+2H$)²⁺

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 1.00 (m, 9H, CH₂CH₃), 2.59 (m, 6H, CH₂CH₃), 2.87 (m, 6H, β -CH₂Tyr), 3.14 (m, 6H, β -CH₂Trp), 3.51 (s, 18H, CH₃O), 4.27-4.78 (m, 12H, α -CHTyr, α -CHTrp, CH₂N), 5.89-6.24 (m, 3H, NH), 6.51-7.49 (m, 33H, NH, H-2ⁱ Trp, aromáticos), 9.21 (s, 3H, OH), 10.84 (s, 3H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para C₉₀H₉₉N₂₁O₁₅: C, 63.03; H, 5.82; N, 17.15. Encontrado: C, 63.41; H, 5.62; N, 16.95.

Derivado de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno y triazina disustituida con tirosina y triptófano (85)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **84** (60 mg, 0.04 mmol) en THF (1 ml) con LiOH·H₂O (18 mg, 0.42 mmol) en agua (1 ml). El residuo se purifica con resina Dowex 1X2 (HCOO⁻) obteniéndose 41 mg (72%) de un sólido blanco que se identifica como **85**. Pf > 220 °C, descompone.

EM (ES, modo positivo): m/z 816 ($M+2H$)²⁺,

1631(M+H)⁺.

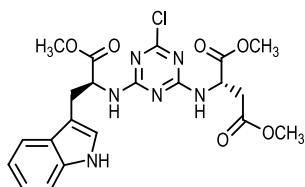
¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 1.21 (m, 9H, CH₂CH₃), 2.59 (m, 6H, CH₂CH₃), 2.87-3.19 (m, 12H, β-CH₂Tyr, β-CH₂Trp), 4.29-4.68 (m, 12H, α-CHTyr, α-CHTrp, CH₂N), 5.90-7.50 (m, 36H, NH, H-2^o Trp, aromáticos), 9.19 (s, 3H, OH), 10.81 (s, 3H, NH-1^o Trp), 12.40 (s ancho, 6H, COOH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ: 16.3 (CH₂CH₃), 22.8 (CH₂CH₃), 27.0 (β-CH₂Trp), 35.9 (β-CH₂Tyr), 37.1 (CH₂N), 53.9 (α-CHTrp), 54.9 (α-CHTyr), 114.9, 127.4, 129.9, 130.0, 142.8, 155.8 (C aromáticos), 164.7, 165.3 (C triazina), 174.1, 174.4 (COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₈₄H₈₇N₂₁O₁₅: 1629.6691. Encontrado: 1629.6691.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 6.1 min (99%), Sistema B: 3.6 min (99%).

(S)-Dimetil-2-(4-((S)-3-(1H-indol-3-il)-1-metoxi-1-oxopropan-2-ilamino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino)succinato (86)

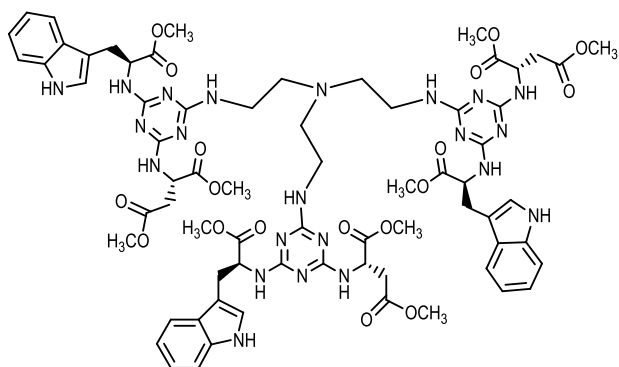


Sobre una disolución que contiene el derivado monosustituido **82** (273 mg, 0.75 mmol) en THF (20 ml) se añade H-Asp(OMe)OMe-HCl (178 mg, 0.90 mmol) y DIPEA (0.9 ml, 5.4 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 10 horas. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en 15 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH₄Cl. La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente un gradiente de hexano:AcOEt (1:1) a (2:). Se obtienen 226 mg (62%) de un sólido blanco que se identifica como **86**. Pf 85-86 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 491 (M+H)⁺ con distribución isotópica de un cloro.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 2.71 (m, 2H, β-CH₂Asp), 3.20 (m, 2H, β-CH₂Trp), 3.65 (s, 9H, CH₃O), 4.21- 4.59 (m, 2H, α-CH-Asp, α-CHTrp), 5.71-5.88 (m, 2H, NH), 6.85 (s ancho, 1H, H-2^o Trp), 6.98-7.58 (m, 4H, aromáticos), 10.82 (s ancho, 2H, NH-1^o Trp).

Derivado de tris(2-aminoetil)amina y triazina disustituida con éster metílico de aspártico y triptófano (87)



Según el procedimiento general para la obtención de trímeros, se hace reaccionar el derivado **86** (280 mg, 0.57 mmol) con tris(2-aminoetil)amina (30 μl, 0.19 mmol) en presencia de DIPEA (0.30 ml, 1.71 mmol), en dioxano (10 ml). El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna

empleando como eluyente un gradiente de CH₂Cl₂:MeOH (20:1) a (10:1). Se obtienen 107 mg (37%) de un sólido blanco que se identifica como **87**. Pf 96-98 °C.

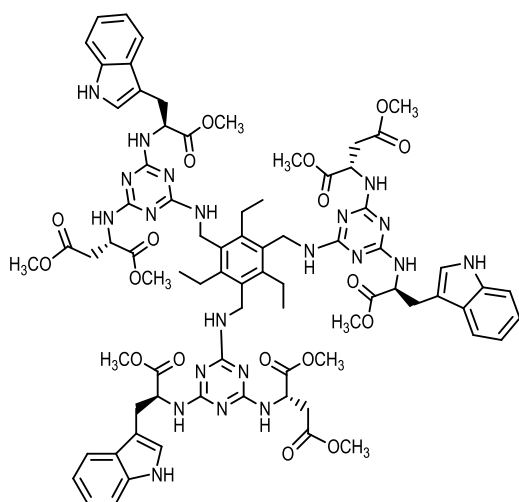
EM (ES, modo positivo): m/z 755 (M+2H)²⁺, 1510 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 2.55 (m, 6H, CH₂N), 2.68-2.81 (m, 6H, β-CH₂Asp), 3.13-3.22 (m, 12H, β-CH₂Trp, CH₂N), 3.60-3.65 (m, 27H, CH₃O), 4.42-4.97 (m, 6H, α-CHAsp, α-CHTrp), 6.05-7.50 (m, 24H, NH, H-2ⁱ Trp, aromáticos), 10.80 (s ancho, 3H, NH-1ⁱ Trp).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ: 26.8 (β-CH₂Trp), 35.5 (β-CH₂Asp), 38.1 (CH₂N), 50.0 (α-CHAsp), 52.0 (CH₃O), 54.0 (α-CHTrp, CH₂N), 109.8, 111.4, 117.9, 118.4, 120.9, 123.8, 127.0, 136.1 (C aromáticos), 164.8, 165.2, 165.6 (C triazina), 170.7, 172.1, 173.4 (COOCH₃).

Anal. calculado para C₆₉H₈₄N₂₂O₁₈: C, 54.90; H, 5.61; N, 20.41. Encontrado: C, 54.76; H, 5.86; N, 20.19.

Derivado de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno y triazina disustituida con éster metílico de aspártico y triptófano (**88**)



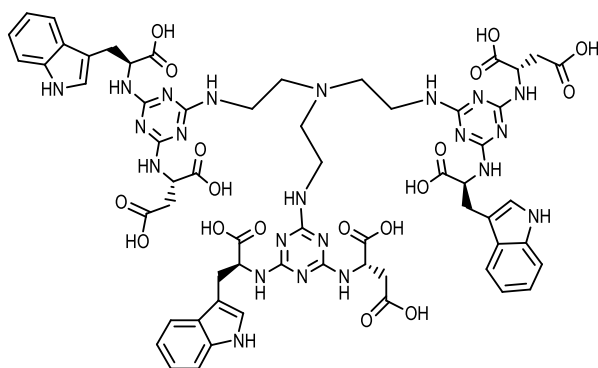
Según el procedimiento general para la obtención de trímeros, se hace reaccionar el derivado **86** (263 mg, 0.54 mmol) con 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno (44.6 mg, 0.18 mmol) en presencia de DIPEA (0.30 ml, 1.6 mmol), en dioxano (4 ml). El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente AcOEt:hexano (4:1). Se obtienen 116 mg (40%) de un sólido blanco que se identifica como **88**. Pf 138-140 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 807 (M+2H)²⁺, 1613 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 1.02 (m, 9H, CH₂CH₃), 2.59 (m, 6H, CH₂CH₃), 2.64-2.98 (m, 6H, β-CH₂Asp), 3.16 (m, 6H, β-CH₂Trp), 3.60-3.68 (m, 27H, CH₃O) 4.31 (s ancho, 6H, CH₂N), 4.50-4.81 (m, 6H, α-CHTrp, α-CHAsp), 5.90-6.68 (m, 6H, NH), 6.95-7.58 (m, 18H, NH, H-2ⁱ Trp, aromáticos), 10.83 (s, 3H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para C₇₈H₉₃N₂₁O₁₈: C, 58.09; H, 5.81; N, 18.24. Encontrado: C, 58.35; H, 5.67; N, 18.45.

Derivado de tris(2-aminoetil)amina y triazina disustituida con aspártico y triptófano (89)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **87** (80 mg, 0.053 mmol) en THF (1.5 ml) con LiOH·H₂O (41 mg, 0.95 mmol) en agua (1.5 ml). El residuo se purifica con resina Dowex 1X2 (HCOO⁻) obteniéndose 70 mg (96%) de un sólido blanco que se identifica como **89**. Pf > 210 °C, descompone.

EM (ES, modo positivo): m/z 692 (M+2H)²⁺, 1383 (M+H)⁺.

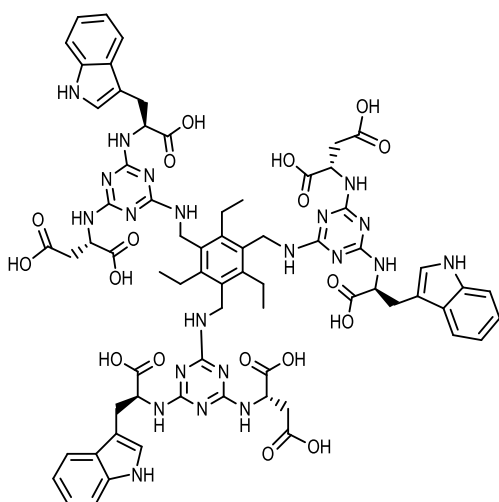
¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 2.56 (m, 6H, CH₂N), 2.66 (m, 6H, β-CH₂Asp), 3.09-3.27 (m, 12H, β-CH₂Trp, CH₂N), 4.59 (m, 6H, α-CH-Asp, α-CHTrp), 6.40-6.71 (m, 6H, NH), 6.94-7.50 (m, 18H, NH, H-2^o Trp, aromáticos), 10.78 (s ancho, 3H, NH-1^o Trp), 12.78 (s ancho, 9H, COOH).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 27.4 (β-CH₂Trp), 37.5 (β-CH₂Asp), 38.9 (CH₂N), 51.3 (α-CHAsp), 53.1 (CH₂N), 54.2 (α-CHTrp), 110.4, 111.7, 118.5, 118.8, 121.3, 123.9, 127.4, 136.2 (C aromáticos), 165.4 (C triazina), 172.9, 173.8 (COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₆₀H₆₆N₂₂O₁₈: 1382.4925. Encontrado: 1382.4934.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 4.7 min (99%), Sistema B: 3.0 min (98%).

Derivado de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno y triazina disustituida con aspártico y triptófano (90)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **88** (80 mg, 0.050 mmol) en THF (1.5 ml) con LiOH·H₂O (38 mg, 0.89 mmol) en agua (1.5 ml). El residuo se purifica con resina Dowex 1X2 (HCOO⁻) obteniéndose 67 mg (91%) de un sólido blanco que se identifica como **90**. Pf > 210 °C, descompone.

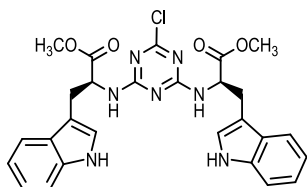
EM (ES, modo positivo): m/z 744 (M+2H)²⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 1.02 (m, 9H, CH₂CH₃), 2.60 (m, 6H, CH₂CH₃), 2.89-3.21 (m, 12H, β-CH₂Trp, β-CH₂Asp), 4.21-4.75 (m, 12H, α-CHTrp, α-CHAsp, CH₂N), 6.15-6.68 (m, 6H, NH), 6.95-7.58 (m, 18H, NH, H-2^o Trp, aromáticos), 10.81 (s, 3H, NH-1^o Trp), 12.70 (s ancho, 9H, COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₆₉H₇₅N₂₁O₁₈: 1485.5599. Encontrado: 1485.5618.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 5.6 min (98%), Sistema B: 3.3 min (98%).

(2*S*,2'*R*)-Dimetil-2,2'-(6-cloro-1,3,5-triazin-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(1*H*-indol-3-il)propanoato (91)



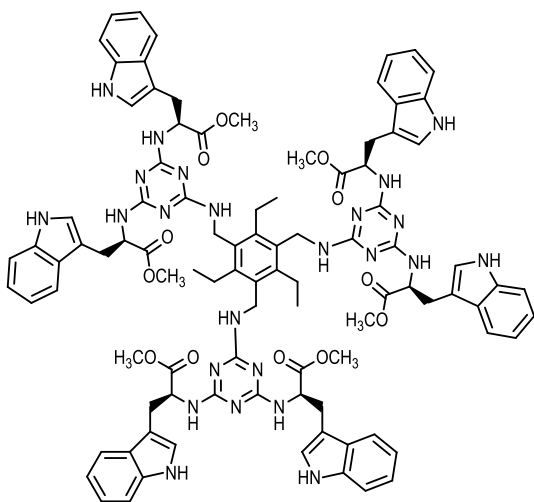
Sobre una disolución que contiene el derivado monosustituido **82** (240 mg, 0.65 mmol) en THF (7 ml) se añade H-D-Trp-OMe-HCl (200 mg, 0.80 mmol) y DIPEA (0.7 ml, 4.0 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 10 horas. Transcurrido este tiempo se evapora el

disolvente. El residuo se disuelve en 15 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH₄Cl. La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (20:1). Se obtienen 320 mg (90%) de un sólido blanco que se identifica como **91**. Pf 101-103 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 548 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 3.11 (m, 4H, β-CH₂Trp), 3.54 (s, 6H, CH₃O), 4.50 (m, 2H, α-CHTrp), 5.61 (s, 2H, NH), 6.91-7.48 (m, 10H, H-2ⁱ Trp, aromáticos), 10.86 (s ancho, 2H, NH-1ⁱ Trp).

Derivado de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno y triazina disustituida con éster metílico de D- y L- triptófano (92)



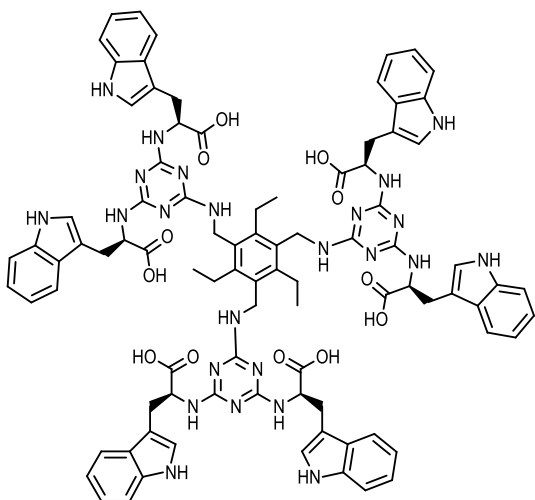
Según el procedimiento descrito para la obtención de trímeros, se hace reaccionar el derivado **91** (197 mg, 0.36 mmol) con 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno (30 mg, 0.12 mmol) en presencia de DIPEA (0.19 ml, 1.12 mmol), en dioxano (4 ml). El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (30:1). Se obtienen 50 mg (34%) de un sólido blanco que se identifica como **92**. Pf 180-182 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 892 (M+2H)²⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 0.97 (m, 9H, CH₂CH₃), 2.57 (m, 6H, CH₂CH₃), 3.14 (m, 12H, β-CH₂Trp), 3.59 (s, 18H, CH₃O), 4.27 (s, 6H, CH₂N), 4.59 (m, 6H, α-CHTrp), 6.50 (m, 6H, NH), 6.93-7.49 (m, 33H, NH, H-2ⁱTrp, aromáticos), 10.82 (s, 6H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para C₉₆H₁₀₂N₂₄O₁₂: C, 64.63; H, 5.76; N, 18.84; Encontrado: C, 64.76; H, 5.55; N, 18.97.

Derivado de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno y triazina disustituida con D- y L- triptófano (93)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **92** (50 mg, 0.03 mmol) en THF (0.8 ml) con LiOH·H₂O (14 mg, 0.33 mmol) en agua (1 ml). El residuo se purifica con resina Dowex 1X2 (HCOO⁻) obteniéndose 41 mg (86%) de un sólido blanco que se identifica como **93**. Pf > 210 °C, descompone.

EM (ES, modo positivo): m/z 851 (M+2H)²⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 0.97 (m, 9H, CH₂CH₃), 2.55 (m, 6H, CH₂CH₃), 3.16 (m, 12H, β-CH₂Trp), 4.30 (m,

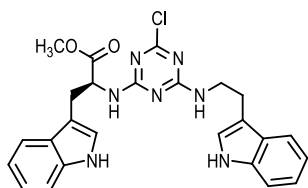
6H, CH₂N), 4.62 (m, 6H, α-CHTrp), 6.10 (m, 6H, NH), 6.91-7.53 (m, 33H, NH, H-2ⁱTrp, aromáticos), 8.61 (m, 3H, NH), 10.81 (s ancho, 6H, NH-1ⁱ Trp).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz) δ: 16.3 (CH₂CH₃), 22.7 (CH₂CH₃), 36.0 (β-CH₂Trp), 38.0 (CH₂N), 54.0 (α-CHTrp), 110.2, 110.5, 111.4, 118.1, 119.6, 120.9, 124.3, 127.2, 136.1 (C aromáticos), 164.7 (C triazina), 174.2 (COOH).

HRMS (ES, modo negativo): calculado para C₉₀H₉₀N₂₄O₁₂: 1698.7170. Encontrado: 1698.7160.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 7.4 min (99%), Sistema B: 3.9 min (98%).

(S)-Metil-2-(4-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)azanodiil-3-(1H-indol-3-il)propanoato (94)



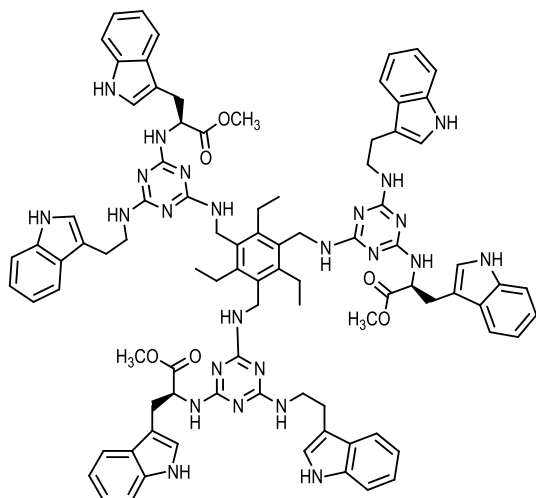
Sobre una disolución que contiene el derivado monosustituido **82** (250 mg, 0.70 mmol) en THF (8 ml) se añade triptamina (130 mg, 0.81 mmol) y DIPEA (0.7 ml, 4.0 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 10 horas. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente. El

residuo se disuelve en 15 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH₄Cl. La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (30:1). Se obtienen 196 mg (59%) de un sólido blanco que se identifica como **94**. Pf 101-102 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 490 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 2.82 (m, 2H, CH₂), 3.19 (m, 2H, CH₂), 3.40 (m, 2H, β-CH₂Trp), 3.50 (s, 3H, CH₃O), 4.62 (m, 1H, α-CHTrp), 6.46-7.52 (m, 12H, NH, H-2ⁱ Trp, aromáticos), 10.86 (s ancho, 2H, NH-1ⁱ Trp, NH-1ⁱ).

Derivado de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno y triazina disustituida con triptamina y el éster metílico de triptófano (95)



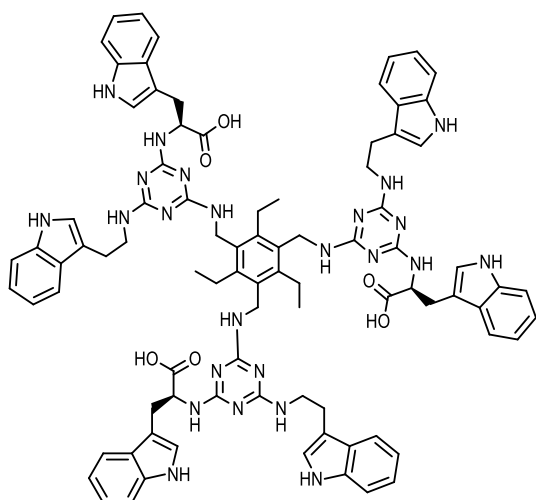
Según el procedimiento descrito para la obtención de trímeros, se hace reaccionar el derivado **94** (185 mg, 0.38 mmol) con 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno (31 mg, 0.13 mmol) en presencia de DIPEA (0.19 ml, 1.12 mmol), en dioxano (4 ml). El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash empleando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (30:1). Se obtienen 67 mg (36%) de un sólido blanco que se identifica como **95**. Pf 157-159 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 806 ($M+2H$)²⁺.

¹H-RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 0.98 (m, 9H, CH_2CH_3), 2.58 (m, 6H, CH_2CH_3), 2.82 (m, 6H, CH_2), 3.14-3.20 (m, 12H, CH_2N , $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.58 (s, 9H, CH_3O), 4.00-4.69 (m, 9H, CH_2N , $\alpha\text{-CHTrp}$), 6.09 (m, 6H, NH), 6.90-7.59 (m, 33H, NH, H-2^oTrp, aromáticos), 10.73-10.83 (m, 6H, NH-1^o Trp, NH-1^o).

Anal. calculado para $\text{C}_{90}\text{H}_{96}\text{N}_{24}\text{O}_6$: C, 67.15; H, 6.01; N, 20.88; Encontrado: C, 67.37; H, 5.75; N, 21.07.

Derivado de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno y triazina disustituida con triptamina y triptófano (96)



Según el procedimiento general para la desprotección de ésteres metílicos, se trata una disolución de **95** (60 mg, 0.04 mmol) en THF (1 ml) con $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (10 mg, 0.22 mmol) en agua (1 ml). El residuo se purifica con resina Dowex 1X2 (HCOO^-) obteniéndose 54 mg (93%) de un sólido blanco que se identifica como **96**. Pf > 210 °C, descompone.

EM (ES, modo positivo): m/z 785 ($M+2H$)²⁺.

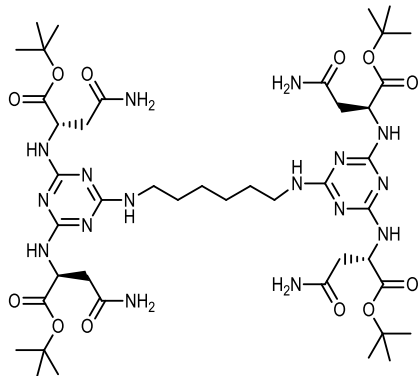
¹H-RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 0.96 (m, 9H, CH_2CH_3), 2.58 (m, 6H, CH_2CH_3), 2.83 (m, 6H, CH_2), 3.12-3.20 (m, 12H, CH_2N , $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 4.10-4.70 (m, 9H, CH_2N , $\alpha\text{-CHTrp}$), 6.01 (m, 6H, NH), 6.90-7.60 (m, 33H, NH, H-2^oTrp, aromáticos), 10.75-10.83 (m, 6H, NH-1^o Trp, NH-1^o). No ácidos

HRMS (ES, modo negativo): calculado para $\text{C}_{87}\text{H}_{90}\text{N}_{24}\text{O}_6$: 1566.7475. Encontrado: 1566.7462.

HPLC (porcentaje de área). Sistema A: 8.4 min (99%), Sistema B: 4.2 min (99%).

SÍNTESIS DE COMPUESTOS DEL CAPÍTULO 2

(2S,2'S,2''S,2'''S)-(Terc-butil-2,2',2'',2'''-(6,6'-(hexano-1,6-diilbis(azanodiil))bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(4-amino-4-oxobutanoato) (107)



Siguiendo el procedimiento A para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar el derivado disustituido **63** (193 mg, 0.40 mmol) con 1,6-hexanodiamina (28 mg, 0.24 mmol) en presencia de DIPEA (0.21 ml, 1.20 mmol) en dioxano (5 ml). La reacción se calienta a 100 °C durante 24 h en tubo de presión. El residuo se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (5:1:0.1). Se obtienen 104 mg (26%) de un sólido blanco que se identifica como **107**. Pf >150

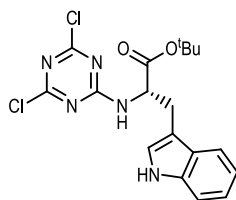
°C, descompone.

EM (ES, modo positivo): m/z 1020 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 1.21-1.48 (m, 44H, CH₃, CH₂), 2.50 (m, 8H, β-CH₂Asn), 3.11 (m, 4H, CH₂N), 4.39-4.69 (m, 4H, α-CHAsn), 6.31-6.83 (m, 8H, CONH₂), 6.86-7.41 (m, 6H, NH).

Anal. calculado para C₄₄H₇₄N₁₆O₁₂: C, 51.85; H, 7.32; N, 21.99. Encontrado: C, 51.49; H, 7.12; N, 22.08.

(2S)-Terc-butil-2-(4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-il)azanoil-3-(1H-indol-3-il)propanoato (108)



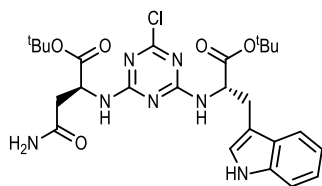
Sobre una disolución que contiene cloruro cianúrico (184.4 mg, 1.00 mmol) y DIPEA (0.5 ml, 3.00 mmol) en THF (20 ml) a 0 °C, se añade H-Trp-OtBu·HCl (297 mg, 1.00 mmol). La mezcla se agita a 0 °C durante 8 horas. Transcurrido ese tiempo se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en 20 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH₄Cl (10 ml). La fase orgánica

se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna empleando como eluyente hexano:AcOEt (3:1). Se obtienen 338 mg (83%) de un sólido blanco que se identifica como **108**. Pf 58-60 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 408 (M+H)⁺ con distribución isotópica de 2 cloros.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.41 (s, 9H, CH₃), 3.31 (dd, J = 14.9, 6.5 Hz, 1H, β-CH₂Trp), 3.40 (dd, J = 14.9, 5.6 Hz, 1H, β-CH₂Trp), 4.89 (ddd, J = 7.5, 6.5, 5.7 Hz, 1H, α-CHTrp), 6.36 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NH), 7.01 (s, 1H, H-2ⁱ Trp), 7.13 (dd, J = 8.0, 7.1 Hz, 1H, Ar), 7.21 (dd, J = 8.2, 7.1 Hz, 1H, Ar), 7.35 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar), 7.58 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Ar), 8.16 (s ancho, 1H, NH-1ⁱ Trp).

(2S)-Terc-butil-4-amino-2-(4-((S)-1-terc-butoxi-3-(1H-indol-3-il)-1-oxopropan-2-ilamino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino)-4-oxobutanoato (109)

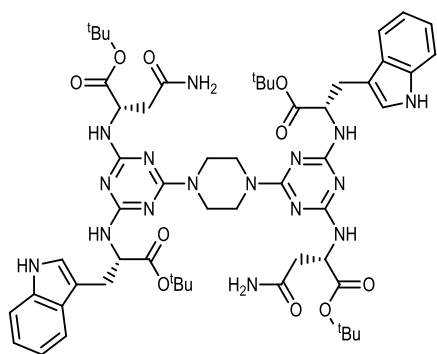


Sobre una disolución que contiene el derivado monosustituido **108** (330 mg, 0.80 mmol) y DIPEA (0.8 ml, 4.81 mmol) en THF (16 ml) se añade H-Asn-OtBu·HCl (218 mg, 0.97 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en 20 ml de acetato de etilo y se trata con una disolución saturada de NH₄Cl (10 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (12:1). Se obtienen 380 mg (84%) de un sólido blanco que se identifica como **109**. Pf 102-104 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 560 (M+H)⁺ con distribución isotópica de un cloro.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.38 (s, 9H, CH₃), 1.45 (s, 9H, CH₃), 2.68-2.95 (m, 2H, β-CH₂Asn), 3.18-3.38 (m, 2H, β-CH₂Trp), 4.56-4.61 (m, 1H, α-CHAsn), 4.77-4.82 (m, 1H, α-CHTrp), 5.68-5.81 (m, 2H, CONH₂), 6.11 (m, 1H, NH), 6.77 (m, 1H, NH), 7.01-7.19 (m, 3H, H-2ⁱ Trp, Ar), 7.36-7.59 (m, 2H, Ar), 8.20 (s ancho, 1H, NH-1ⁱ Trp).

(2S,2'S)-Terc-butil-2,2'-(S)-6,6'-(piperazina-1,4-diil)bis(4-((S)-1-terc-butoxi-3-(1H-indol-3-il)-1-oxopropan-2-ilamino)-1,3,5-triazina-2,6-diil)bis(azanodiil)bis(4-amino-4-oxobutanoato) (110)



Siguiendo el procedimiento B para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar el derivado **109** (200 mg, 0.36 mmol) con piperazina (18.5 mg, 0.21 mmol) en presencia de DIPEA (0.50 ml, 2.86 mmol) en dioxano (10 ml), irradiando en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 2.5 h. El residuo se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente AcOEt:MeOH (8:1). Se obtienen 172 mg (84%) de un sólido blanco que se identifica como **110**. Pf 118-120 °C.

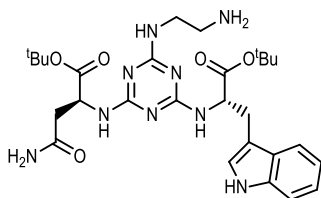
EM (ES, modo positivo): m/z 1133 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 1.28-1.33 (s, 36H, CH₃), 2.51 (m, 4H, β-CH₂Asn), 3.12 (m, 4H, β-CH₂Trp), 3.50-3.64 (m, 8H, CH₂N), 4.38-4.70 (m, 4H, α-CHTrp, α-CHAsn), 6.56-6.88 (m, 8H, CONH₂, NH), 6.92-7.52 (m, 10H, H-2ⁱ Trp, Ar), 10.83 (s ancho, 2H, NH-1ⁱ Trp).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ: 26.8 (β-CH₂Trp), 27.6 ((CH₃)₃C), 36.6 (β-CH₂Asn), 42.4 (CH₂N), 50.93 (α-CHAsn), 55.6 (α-CHTrp), 80.0 ((CH₃)₃C), 110.0, 111.4, 118.4, 120.9, 123.9, 127.1, 136.1 (Ar), 164.1, 165.2 (C-2, C-4, C-6), 171.4 (CO(CH₃)₃), 172.4 (CONH₂).

Anal. calculado para C₅₆H₇₆N₁₆O₁₀: C, 59.35; H, 6.76; N, 19.77. Encontrado: C, 59.05; H, 7.04; N, 19.57.

(2S)-Terc-butil-4-amino-2-(4-((S)-1-terc-butoxi-3-(1H-indol-3-il)-1-oxopropan-2-ilamino)-6-(2-aminoetilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-4-oxobutanoato (111)



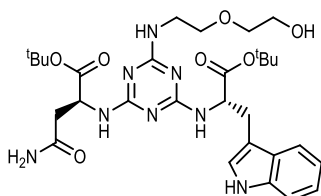
Según el procedimiento general para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del compuesto **109** (238 mg, 0.43 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml), se añadió 1,2-etanodiamina (0.11 ml, 1.70 mmol) y DIPEA (0.22 ml, 1.29 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 70 °C durante 1 h. El residuo obtenido se purifica empleando un cartucho SCX (Varian), eluyéndose el producto final con una disolución de NH₃ 2M en MeOH. Se obtienen 180 mg (72%) de un sólido blanco que se identifica como **111**. Pf 119-121 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 584 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 1.26-1.42 (m, 18H, CH₃), 2.68-2.78 (m, 8H, β-CH₂Asn, CH₂N), 2.98-3.19 (m, 2H, β-CH₂Trp), 4.31-4.71 (m, 2H, α-CHAsn, α-CHTrp), 6.27-6.62 (m, 5H, NH, NH₂), 6.81-7.62 (m, 7H, CONH₂, H-2ⁱ Trp, Ar), 10.81 (s ancho, 1H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para C₂₈H₄₁N₉O₅: C, 57.62; H, 7.08; N, 21.60. Encontrado: C, 57.38; H, 7.11; N, 21.94.

(2S)-Terc-butil -4-amino-2-(4-((S)-1-terc-butoxi-3-(1H-indol-3-il)-1-oxopropan-2-ilamino)-6-(2-(2-hidroxi)etoxi)etilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-4-oxobutanoato (113)



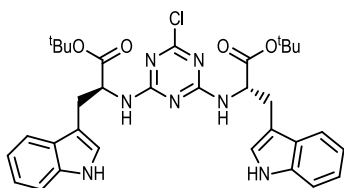
Según el procedimiento general para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del compuesto **109** (100 mg, 0.18 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml), se añadió 2-(2-aminoetoxi)etanol (72 μl, 0.71 mmol) y DIPEA (0.94 ml, 0.54 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 70 °C durante 1 h. El residuo obtenido se purifica por CCTLC empleando como eluyente AcOEt:MeOH:NH₄OH (10:2:0.1). Se obtienen 90 mg (80%) de un sólido blanco que se identifica como **113**. Pf 82-84 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 629 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 1.28-1.51 (m, 18H, CH₃), 2.69 (m, 2H, β-CH₂Asn), 3.11 (m, 2H, β-CH₂Trp), 3.37-3.52 (m, 8H, CH₂O, CH₂N), 4.33-4.72 (m, 2H, α-CHAsn, α-CHTrp), 6.27-6.82 (m, 4H, NH, OH), 6.83-7.64 (m, 7H, CONH₂, H-2ⁱ Trp, Ar), 10.83 (s ancho, 1H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para C₃₀H₄₄N₈O₇: C, 57.31; H, 7.05; N, 17.82. Encontrado: C, 57.05; H, 7.22; N, 17.99

(2*S*,2'*S*)-Terc-butil-2,2'-(6-cloro-1,3,5-triazina-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(1*H*-indol-3-il)propanoato) (114)

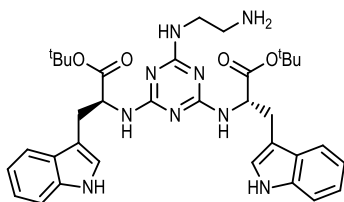


Según el procedimiento general para la obtención de triazinas disustituidas, se añadió a una disolución de cloruro cianúrico (92 mg, 0.50 mmol) en THF (6 ml), H-Trp-OtBu-HCl (356 mg, 1.20 mmol) y DIPEA (0.5 ml, 3.00 mmol). El residuo se purifica mediante por cromatografía en columna, empleando como eluyente hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 301 mg (95%) de un sólido blanco que se identifica como **114**. Pf 122-124 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 632 (M+H)⁺ con distribución isotópica de Cl.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 1.38 (s, 18H, CH₃), 3.27-3.40 (m, 4H, β-CH₂Trp), 4.89 (m, 2H, α-CHTrp), 6.36 (m, 2H, NH), 6.98-7.59 (m, 10H, H-2ⁱ Trp, Ar), 8.17 (s ancho, 2H, NH-1ⁱ Trp).

(2*S*,2'*S*)-Terc-butil-2,2'-(6-(2-aminoetilamino)-1,3,5-triazina-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(1*H*-indol-3-il)propanoato) (115)



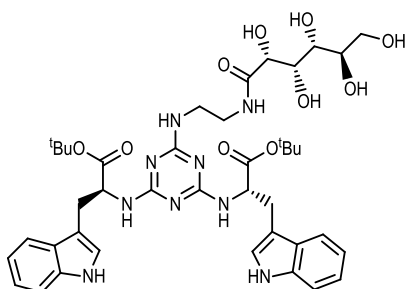
Según el procedimiento general para la obtención de estructuras monoméricas de triazina, a una disolución del compuesto **114** (300 mg, 0.47 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml), se añadió 1,2-etanodiamina (0.16 ml, 2.35 mmol) y DIPEA (0.41 ml, 2.35 mmol). La reacción se irradia en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 1 h. El residuo obtenido se purifica empleando un cartucho SCX (Varian), eluyéndose con una disolución de NH₃ 2M en MeOH. Se obtienen 181 mg (58%) de un sólido blanco que se identifica como **115**. Pf 110-112 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 656 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 1.32 (s, 18H, CH₃), 2.58 (m, 4H, CH₂N), 2.90-3.20 (m, 4H, β-CH₂Trp), 4.31-4.62 (m, 2H, α-CHTrp), 6.31-6.72 (m, 5H, NH, NH₂), 6.90-7.60 (m, 10H, H-2ⁱ Trp, Ar), 10.83 (s ancho, 2H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para C₃₅H₄₅N₉O₄: C, 64.10; H, 6.92; N, 19.22. Encontrado: C, 64.38; H, 6.63; N, 19.42.

(2*S*,2'*S*)-Terc-butil-2,2'-(6-(2-((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexanamido)etilamino)-1,3,5-triazina-2,4-diil)bis(azanodiil)bis(3-(1*H*-indol-3-il)propanoato) (116)



Una disolución del compuesto **115** (170 mg, 0.26mmol) en DMF anhidra (2 ml), se adiciona gota a gota a una disolución de D-glucono-1,5-lactona (463 mg, 2.60 mmol) en DMF anhidra (20 ml). La mezcla se agita a 50 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se lleva el crudo de reacción a sequedad y se disuelve en 20 ml de AcOEt. Sobre esta disolución se añade 0.5 ml de

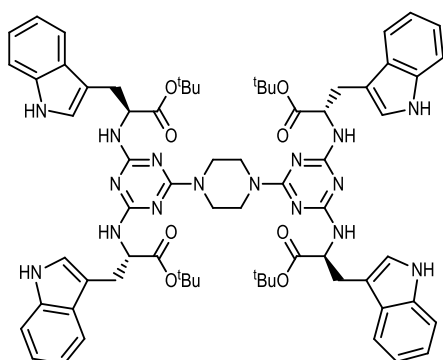
MeOH y se enfría durante la noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo se aísla el precipitado por filtración obteniéndose 70 mg (32%) de un sólido blanco que se identifica como **116**. Pf 108-110 °C

EM (ES, modo positivo): m/z 834 (M+H)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ: 1.32 (s, 18H, CH₃), 2.90-3.20 (m, 4H, β-CH₂Trp), 3.42-4.21 (m, 10H, CH₂N, CHOH), 4.74-4.76 (m, 2H, α-CHTrp), 5.75-6.62 (m, 9H, NH, OH), 7.01-7.60 (m, 10H, H-2ⁱ Trp, Ar), 10.82 (s ancho, 2H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para C₄₁H₅₅N₉O₁₀: C, 59.05; H, 6.65; N, 15.12. Encontrado: C, 59.24; H, 6.97; N, 14.78

(2S,2'S,2''S,2'''S)-Terc-butil-2,2',2'',2'''-(6,6'-(piperazin-1,4-diil)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triil))tetrakis(azanodiil)tetrakis(3-(1H-indol-3-il)propanoato) (117)



Siguiendo el procedimiento B para la obtención de dímeros, se hizo reaccionar la monoclorotriazina **114** (200 mg, 0.32 mmol) con piperazina (16.3 mg, 0.19 mmol) en presencia de DIPEA (0.17 ml, 0.96 mmol) en dioxano (10 ml) mediante irradiación en un equipo microondas monomodo a 100 °C durante 2 h. El residuo se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente AcOEt:MeOH (20:1). Se obtienen 199 mg (48%) de un sólido blanco que se identifica como **117**. Pf 138-140 °C.

EM (ES, modo positivo): m/z 1278 (M+H)⁺.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 1.30 (s, 36H, CH₃), 3.18 (m, 8H, β-CH₂Trp), 3.55 (m, 8H, CH₂N), 4.60 (m, 4H, α-CHTrp), 5.60 (m, 4H, NH), 6.92-7.63 (m, 20H, H-2ⁱ Trp, Ar), 8.02 (s ancho, 4H, NH-1ⁱ Trp).

Anal. calculado para C₇₀H₈₄N₁₆O₈: C, 65.81; H, 6.63; N, 17.54. Encontrado: C, 66.19; H, 6.74; N, 17.18.

ENSAYOS BIOLÓGICOS EN CULTIVO

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(IIIB) 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 SUPERFICIAL

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 estándar de acoplamiento de aminas. Se empleó 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), con un 5% de dimetilsulfóxido (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 emplearon correcciones para el DMSO. La superficie el chip CM5 fue regenerada con una inyección de NaOH (50 mM) durante 5 segundos con un flujo de 100 µl/min.

CARACTERIZACIÓN DE LOS GELES

Para realizar el test de gelificación se tomó una determinada cantidad de los compuestos de estudio, se suspendió en 1 ml de los disolventes especificados y se calentó con una pistola de calor en un vial cerrado herméticamente, hasta conseguir una disolución homogénea. Tras ello, se dejó a la muestra alcanzar temperatura ambiente y pasados 30 minutos, se comprobó la formación del gel mediante el método de inversión del vial.

La temperatura de transición gel-disolución (T_{gel}) se determinó mediante el método de inversión del vial. La muestra del gel se preparó en un vial sellado y se sumergió en un baño de silicona termostatzado. La temperatura del baño se incrementó a una velocidad de 2 °C / min. La T_{gel} se consideró como la temperatura a la cual el gel comienza a fluir.

Los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) se registraron en un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum One. La muestra del gel se analizó mediante su colocación entre dos cristales de NaCl, mientras que el análisis de la disolución se realizó en una cubeta convencional.

Las medidas de viscoelasticidad dinámica se realizaron en un reómetro de esfuerzo controlado marca TA Instruments modelo AR1000 utilizando el modo de cizalla que permite determinar el módulo de almacenamiento, G' , y el módulo de pérdidas, G'' . Para estos estudios se empleó la geometría de platos paralelos de 40 mm. Dado que la formación de los geles tenía lugar casi inmediatamente después de dejarlos reposar a temperatura ambiente, los geles se formaron directamente en el plato inferior del reómetro, añadiendo la disolución del compuesto en el interior de un anillo que mantenía la forma hasta la consolidación del gel. Una vez que el gel se formaba, se quitaba el anillo quedando un disco de gel de ~2 mm. Todos los experimentos se realizaron con un accesorio de medida especial que creaba una atmósfera saturada de disolvente, con el fin de evitar la evaporación del disolvente durante la realización del experimento. Las muestras fueron mantenidas en el reómetro a 15 °C durante 15 min antes de cada medida, para asegurar la correcta formación del gel, excepto para el barrido de tiempo, donde el experimento comenzó inmediatamente después de colocar la muestra en el reómetro. La región de viscosidad lineal, es decir, aquella región en la cual el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida son independientes del esfuerzo aplicado, se localizó mediante la aplicación de un barrido de esfuerzo a una frecuencia constante de 1 Hz; tras ello se seleccionó un par de fuerzas de 10 μ N.m para los ensayos subsiguientes. Se realizaron dos tipos de experimentos: i) barrido isoterma de tiempo a frecuencia constante de 1 Hz, ii) barrido isoterma de frecuencia desde 0.1 a 20 Hz. Para la evaluación de las propiedades tixotrópicas del gel formado por el compuesto **110**, se sometió a la muestra a un par de fuerzas de 200 μ N.m y se realizó un barrido de esfuerzo decreciente, desde 200 a 1 μ M.m. Todas las

Parte experimental. Caracterización de los geles

medidas se realizaron a temperatura constante (15 °C) y se repitieron tres veces para asegurar la reproducibilidad de los ensayos.

Para el estudio de la morfología de los geles por microscopía electrónica de barrido (SEM) las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y liofilizadas durante 24 horas, tras lo cual fueron fracturadas y recubiertas con oro/paladio en un aparato Sputter coater, marca Polaron y modelo SC7640. Las imágenes del gel liofilizado (xerogel) se tomaron con un microscopio electrónico de barrido Philips XL-30 ESEM a temperatura ambiente.

Para el estudio de los geles por microscopía de fuerza atómica (AFM), las muestras fueron transferidas a unos portaobjetos de vidrio y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas. La imagen topológica de las muestras se obtuvo mediante un microscopio de fuerza atómica en modo de *no-contacto* con sistema de control Nanoscope IIIe (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA). Las imágenes topográficas fueron registradas a temperatura ambiente con una punta estándar de silicón.

El espectro de ^1H -RMN del compuesto **110** se adquirió en un espectrómetro Bruker AVANCE de 500 MHz, a 298 K y en CD_3CN como disolvente. Los experimentos monodimensionales de ^1H y NOESY (tiempo de mezcla 5 y 500 ms) se realizaron con las frecuencias estándar del BRUKER. Para los espectros de STD, se aplicó una serie de pulsos de 49 ms separados por un retraso de 1 ms. El tiempo de saturación total aplicado fue de 0.5 s. Las frecuencias de “*off-resonance*” y “*on-resonance*” se fijaron en 100 y -1 ppm respectivamente. Se registraron 64 scans y el espectro se multiplicó por una función exponencial de 1 Hz antes de realizar la transformada de Fourier.

Los espectros de fluorescencia se registraron en un espectrómetro Perkin Elmer LS50B empleando una geometría de cara frontal. La disolución del compuesto **110** en acetonitrilo (20 mg/ml) se añadió a una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz y se empleó una longitud de onda de excitación de 280 nm. Las medidas se realizaron desde 290 a 900 nm, a 75 nm/min, y a temperatura ambiente.

Para la determinación de la capacidad de respuesta del gel del compuesto **110** en acetonitrilo frente a diferentes aniones, se depositó una disolución de los diferentes aniones (F^- , Cl^- , Br^- , I^- y CN^-) en forma de sal de tetrabutilamonio en acetonitrilo (5.3 $\mu\text{mol}/50\mu\text{l}$), sobre diferentes muestras del gel (5.3 $\mu\text{mol}/250\mu\text{l}$), de forma que la concentración final del compuesto **110** fue de 20 mg/ml (mínima concentración a la cual el gel se forma) y la relación entre el número de equivalentes del compuesto y de los aniones fue de 1:1.

