



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Universidad de Málaga  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química Orgánica

Tesis Doctoral

# **Síntesis eficiente de estructuras dendriméricas amino terminales para aplicaciones biomédicas**

Programa de Doctorado: Química y Tecnologías Químicas, Materiales y Nanotecnología

Directores: Dr. Ezequiel Pérez-Inestrosa y Dra. Yolanda Vida


Anjara Morgado Benítez

2022



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Anjara Morgado Benítez

 <https://orcid.org/0000-0003-4606-0458>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña Anjara Morgado Benítez

Estudiante del programa de doctorado QUÍMICA Y TECNOLOGÍAS QUÍMICAS, MATERIALES Y NANOTECNOLOGÍA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: SÍNTESIS EFICIENTE DE ESTRUCTURAS DENDRIMÉRICAS AMINO TERMINALES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

Realizada bajo la tutorización del Dr. Ezequiel Pérez-Inestrosa y dirección del Dr. Ezequiel Pérez-Inestrosa y la Dra. Yolanda Vida Pol.

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 26 de Septiembre de 2022

Fdo.:  
Doctorando/a

Fdo.:  
Tutor/a

Fdo.:  
Director/es de tesis



*A Miamores...*





Me encuentro muy agradecida con todas las personas que, a lo largo de estos años, me han apoyado y ayudado durante la realización de esta Tesis Doctoral.

Este trabajo no se habría logrado sin la dirección de los profesores Yolanda Vida y Ezequiel Pérez-Inestrosa. Son muchos ya los años que nos conocemos y, sin duda alguna, despertasteis mi interés por la química orgánica en la carrera y lo habéis reforzado y afianzado durante mi formación predoctoral. Os agradezco la oportunidad, la paciencia y la confianza que habéis depositado en mí para desarrollar esta Tesis.

También han sido muy importantes para la realización de este trabajo mis compañeros de LDBF, tanto los que están ahora como los que han pasado por el grupo, habéis hecho mis días más llevaderos. Noemi, gracias por cogerme de la mano y no soltarme hasta que sabías que podía caminar sola. Gracias también por estar siempre dispuesta a escuchar todo aquello que: “a nadie le importa”. En esto te uniste tú, Desi, mi apoyo incondicional, me haces mejor persona. Violeta, gracias por tu energía, son ya varios años trabajando juntas y parece que no se quedará en una única etapa. Esther e Irene, Irene y Esther, llegasteis en un momento duro para mí y, aunque al principio no lo supiese, cuánta falta me hacíais.

Al Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Málaga y a sus profesores por la docencia recibida durante todos estos años que ha contribuido a mi formación.

Son varios los profesores que, sin estar directamente involucrados en este trabajo, han hecho que sea más fácil. Así, me gustaría agradecer el trabajo y dedicación del profesor Paco Nájera en los estudios de Simulación de Dinámica Molecular. Paco, da gusto escucharte hablar de química orgánica. También le agradezco al profesor Cristian Strassert por suministrarnos el complejo de platino. A la profesora Teresa Sierra le muestro mi agradecimiento por ponernos en contacto con los servicios de espectrometría de masas de Zaragoza. También agradezco el trabajo del profesor Juan Antonio Guadix en el estudio en células, y a la profesora Anna Lagunas por los experimentos de AFM.

Para el desarrollo de este trabajo de investigación han sido imprescindibles las infraestructuras de Bionand. Gracias a todo el personal que hacéis de éste un centro de excelencia y que, de una u otra manera, me habéis acompañado en esta etapa. En especial, gracias a John, Rebeca, Diana, Roberto y Silvia. Asimismo, quiero mostrar mi agradecimiento a Marisa, Carmen y María de la unidad de Nanoimagen, por su ayuda en técnicas de Resonancia Magnética Nuclear. Al igual que al servicio de espectrometría de masas y al de fluorescencia de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de Málaga.

También quiero agradecer a esas personas que han formado parte de mi día a día durante estos años, aunque no hayan participado directamente en este trabajo, en especial a Maribel, Patri, Amene y Juanlu.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia los consejos, el apoyo y la paciencia mostrada durante todos estos años.

A mis padres, gracias por animarme a ser la científica que de pequeña quería ser, por enseñarme la constancia y perseverancia que en múltiples ocasiones he necesitado. Por no dejarme caer, o si lo he hecho, levantarme poquito a poco y empujarme a seguir adelante.

A Úrsula, mi sistra. Tan diferentes y complementarias. Gracias por estar ahí, porque incluso cuando no estás, sé perfectamente que, si lo necesito, paras el mundo para ayudarme. No sabes cuánto me estás enseñando.

Ainoa, la pequeña y sabia de la casa. Desde que llegaste has iluminado nuestros días. Jugar contigo entre rato y rato de estudio me llenaba de energía y me hacía volver a ser esa niña que todos tenemos en nuestro interior. Eres un ejemplo a seguir, te admiro.

Lo más bonito, sois pura energía positiva. Esas paellas, canturreos, casas rurales, tikstoks...Me cargáis las pilas.

A la familia que se elige, gracias por todas esas charlas en las que pretendemos cambiar el mundo. Gracias por tantas escapadas, cervezas, conciertos, barbacoas... tantos y tantos momentos de risas y desconexión. Os escribiría unas palabras a todos y cada uno de vosotros, pero para eso necesitaría 4-5 páginas. Os nombraría a todos y cada uno de vosotros, pero para eso ya tenemos 4 camisetas. Así que solo puedo decir que me siento muy afortunada de tener los amigos que tengo.

Migue, ¿qué puedo decirte que no sepas? Eres mi gran punto de apoyo, oídos, risas y abrazos de cada día. Me haces ver las cosas desde otra perspectiva, y a tu lado, me encanta ver que la vida es tan bonita que parece de verdad.





### Lista de abreviaturas

<b>AEMA</b>	2-(Acriloiloxi)etilmetacrilato ( <i>2-(Acryloyloxy) ethyl methacrylate</i> )
<b>AFM</b>	Microscopía de fuerza atómica ( <i>Atomic Force Microscopy</i> )
<b>AXO</b>	Amoxiciloilo
<b>BAPAD</b>	Dendrímero 2,2-Bis(aminoalquil)propanamida
<b>BnBr</b>	Bromuro de bencilo
<b>Boc</b>	<i>Terc</i> -butoxicarbonil
<b>BPO</b>	Bencilpeniciloilo
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>CDI</b>	1,1'-Carbonildiimidazol
<b>CHCA</b>	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinámico ( <i><math>\alpha</math>-Cyano-4-Hydroxycinamic Acid</i> )
<b>COSY</b>	Correlación espectroscópica homonuclear cuántica simple ( <i>Correlation Spectroscopy</i> )
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DeAN</b>	Dendrímero Antigénico
<b>DHB</b>	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
<b>DMPP</b>	Dimetil(fenil)fosfano ( <i>dimethyl(phenyl)phosphane</i> )
<b>DT</b>	Ditranol
<b>DMAP</b>	4-(Dimetilamino)piridina
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DOSY</b>	Espectroscopía de Orden Difusional ( <i>Diffusion ordered spectroscopy</i> )
<b>ECM</b>	Matriz extracelular ( <i>Extracellular matrix</i> )
<b>EDA</b>	Etilendiamina
<b>EDCI</b>	Hidrocloruro de <i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>HABA</b>	Ácido 2-(4'-hidroxifenilazo)benzoico ( <i>2-(4'-Hydroxyphenylazo) benzoic acid</i> )
<b>HOBt</b>	1-Hidroxibenzotriazol
<b>HSA</b>	Albúmina de suero humano ( <i>Human Serum Albumin</i> )
<b>HSQC</b>	Correlación espectroscópica heteronuclear cuántica simple ( <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> )
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina Específica
<b>IR</b>	Infrarrojo

### Lista de abreviaturas

<b>LC</b>	Cristal líquido ( <i>Liquid Crystal</i> )
<b>MEF</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón ( <i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> )
<b>MSC</b>	Células madre mesenquimales ( <i>Mesenchymal Stem Cells</i> )
<b>OLED</b>	Diodo orgánico de emisión de luz ( <i>Organic Light-Emitting Diode</i> )
<b>PAMAM</b>	Dendrímero poliamidoamina ( <i>Poly(amidoamine) Dendrimer</i> )
<b>PPI</b>	Polipropilenimina ( <i>Polypropilenimine</i> )
<b>PLIM</b>	Microscopía de imagen de tiempo de vida de fosforescencia ( <i>Phosphorescence Lifetime Imaging</i> )
<b>PLL</b>	Poli-L-Lisina ( <i>Poly-L-Lysine</i> )
<b>RAF</b>	Reacciones Adversas a Fármacos
<b>R<sub>r</sub></b>	Factor de retención
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RMI</b>	Resonancia Magnética de Imagen
<b>SDM</b>	Simulación de Dinámica Molecular
<b>SEC</b>	Cromatografía de exclusión por tamaño ( <i>Size Exclusion chromatography</i> )
<b>TFANa</b>	Trifluoroacetato sódico
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TPE</b>	Excitación en dos fotones ( <i>Two Photon Excitation</i> )

# ÍNDICE



<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>19</b>
<b>I.1. ESTRUCTURA GENERAL</b>	<b>21</b>
<b>I.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS</b>	<b>23</b>
<b>I.3. METODOLOGÍAS SINTÉTICAS</b>	<b>25</b>
I.3.1. SÍNTESIS DIVERGENTE	25
I.3.2. SÍNTESIS CONVERGENTE	26
I.3.3. OTROS MÉTODOS	27
<b>I.4. PROPIEDADES Y APLICACIONES</b>	<b>28</b>
<b>I.5. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>30</b>
I.5.1. ESTUDIO DE LAS REACCIONES ADVERSAS A FÁRMACOS (RAF)	30
I.5.2. REGENERACIÓN TISULAR	31
I.5.3. DISEÑO Y SÍNTESIS	33
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>III. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS ESTRUCTURAS</b>	
<b>DENDRIMÉRICAS AMINO TERMINALES</b>	<b>45</b>
<b>III.1 SÍNTESIS DE NUEVOS DENDRÍMEROS AMINO TERMINALES</b>	<b>47</b>
III.1.1. SÍNTESIS DEL MONÓMERO (4)	48
III.1.1.1. Síntesis de <i>terc-butil (3-bromopropil)carbamato (1)</i>	49
III.1.1.2. Síntesis de <i>di-terc-butil 2,2-bis(3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)malonato (2)</i>	49
III.1.1.3. Síntesis de <i>ácido 5-amino-2-(3-aminopropil)pentanoico (3)</i>	50
III.1.1.4. Síntesis de <i>ácido 5-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-(3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)pentanoico (4)</i>	51
III.1.2. SÍNTESIS DE <b>DG1</b>	51
III.1.2.1. Síntesis de <i>5-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-(3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)pentanoato de 1H-benzo[1,2,3]triazol-1-ilo (5)</i>	52
III.1.2.2. Síntesis de <b>DG1-NHBoc</b>	53
III.1.2.3. Síntesis de <b>DG1</b>	54
III.1.3. SÍNTESIS DE <b>DG2</b>	56
III.1.3.1. Síntesis de <b>DG2-NHBoc</b>	57
III.1.3.2. Síntesis de <b>DG2</b>	60
III.1.4. SÍNTESIS DE <b>DG3</b>	61
III.1.4.1. Síntesis de <b>DG3-NHBoc</b>	61
III.1.4.2. Síntesis de <b>DG3</b>	63
III.1.5. SÍNTESIS DE <b>DG4</b>	64
III.1.5.1. Síntesis de <b>DG4-NHBoc</b>	64
III.1.5.2. Síntesis de <b>DG4</b>	66
III.1.6. SÍNTESIS DE <b>DG5</b>	68
III.1.6.1. Síntesis de <b>DG5-NHBoc</b>	68
III.1.6.2. Síntesis de <b>DG5</b>	70

<b>III.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS DENDRÍMEROS</b>	<b>74</b>
III.2.1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD	74
III.2.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	75
III.2.3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO	75
III.2.4. EXPERIMENTOS DOSY	76
III.2.5. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)	79
III.2.6. SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR	80
<b>III.3. SÍNTESIS DE NUEVOS DENDRONES AMINO TERMINALES</b>	<b>86</b>
III.3.1. SÍNTESIS DE <b>dg1Bn</b>	86
III.3.1.1. <i>Síntesis de dg1Bn-NHBoc</i>	87
III.3.1.2. <i>Síntesis de dg1Bn</i>	88
III.3.2. SÍNTESIS DE <b>dg2Bn</b>	88
III.3.2.1. <i>Síntesis de dg2Bn-NHBoc</i>	89
III.3.2.2. <i>Síntesis de dg2Bn</i>	90
III.3.3. SÍNTESIS DE <b>dg3Bn</b>	91
III.3.3.1. <i>Síntesis de dg3Bn-NHBoc</i>	91
III.3.3.2. <i>Síntesis de dg3Bn</i>	93
III.3.4. SÍNTESIS DE <b>dg1-ino</b>	95
III.3.4.1. <i>Síntesis de dg1-ino-NHBoc</i>	96
III.3.4.2. <i>Síntesis de dg1-ino</i>	96
III.3.5. SÍNTESIS DE <b>dg2-ino</b>	98
III.3.5.1. <i>Síntesis de dg2-ino-NHBoc</i>	99
III.3.5.2. <i>Síntesis de dg2-ino</i>	102
III.3.6. SÍNTESIS DE <b>dg3-ino</b>	103
III.3.6.1. <i>Síntesis de dg3-ino-NHBoc</i>	103
III.3.6.2. <i>Síntesis de dg3-ino</i>	105
III.3.7. SÍNTESIS DE <b>dg1N<sub>3</sub></b>	107
III.3.7.1. <i>Síntesis de 6</i>	108
III.3.7.2. <i>Síntesis de dg1N<sub>3</sub>-NHBoc</i>	108
III.3.7.3. <i>Síntesis de dg1N<sub>3</sub></i>	109
III.3.8. SÍNTESIS DE <b>dg2N<sub>3</sub></b>	109
III.3.8.1. <i>Síntesis de dg2N<sub>3</sub>-NHBoc</i>	109
III.3.8.2. <i>Síntesis de dg2N<sub>3</sub></i>	110
III.3.9. SÍNTESIS DE <b>dg3N<sub>3</sub></b>	111
III.3.9.1. <i>Síntesis de dg3N<sub>3</sub>-NHBoc</i>	111
III.3.9.2. <i>Síntesis de dg3N<sub>3</sub></i>	114
<b>IV. SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS ANTIGÉNICOS PARA LA DETECCIÓN DE ALERGIA A FÁRMACOS</b>	<b>117</b>
IV.1. INTRODUCCIÓN	119
IV.2. SÍNTESIS DE DGnAXO	121
IV.2.1. SÍNTESIS DE DG1AXO	121

IV.2.2. SÍNTESIS DE <b>DG2AXO</b>	123
IV.2.3. SÍNTESIS DE <b>DG3AXO</b>	123
IV.2.4. SÍNTESIS DE <b>DG4AXO</b>	124
IV.2.5. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO	126
IV.2.6. EXPERIMENTOS DOSY	127
<b>IV.3. SÍNTESIS DE DG<sub>n</sub>BPO</b>	<b>128</b>
IV.3.1. SÍNTESIS DE <b>DG1BPO</b>	128
IV.3.2. SÍNTESIS DE <b>DG2BPO</b>	130
IV.3.3. SÍNTESIS DE <b>DG3BPO</b>	130
IV.3.4. SÍNTESIS DE <b>DG4BPO</b>	131
IV.3.5. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO	133
IV.3.6. EXPERIMENTOS DOSY	134
<b>V. SÍNTESIS DE ESTRUCTURAS RGD-DENDRIMÉRICAS</b>	<b>137</b>
<b>V.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>139</b>
<b>V.2. SÍNTESIS DE RGD-DG1</b>	<b>140</b>
V.2.1. SÍNTESIS DE <b>AEMA</b>	142
V.2.2. SÍNTESIS DE <b>DG1AEMA</b>	143
V.2.3. SÍNTESIS DE <b>RGD-DG1</b>	144
<b>V.3. SÍNTESIS DE RGD-DG2</b>	<b>146</b>
V.3.1. SÍNTESIS DE <b>DG2AEMA</b>	146
V.3.2. SÍNTESIS DE <b>RGD-DG2</b>	148
<b>V.4. EXPERIMENTOS DOSY</b>	<b>150</b>
<b>VI. SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS LUMINISCENTES COMO MARCADORES BIOLÓGICOS</b>	<b>153</b>
<b>VI.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>155</b>
<b>VI.2. SÍNTESIS DEL DENDRÍMERO LUMINISCENTE DG2Naft</b>	<b>155</b>
VI.2.1. SÍNTESIS DE <i>N</i> -(3-AZIDOPROPIL)-4-((3-AZIDOPROPIL)AMINO)-1,8-NAFTALIMIDA (7)	156
VI.2.2. SÍNTESIS DE <b>DG2Naft-NHBoc</b>	157
VI.2.3. SÍNTESIS DE <b>DG2Naft</b>	158
<b>VI.3. SÍNTESIS DEL DENDRÍMERO LUMINISCENTE DG2Pt</b>	<b>159</b>
VI.3.1. SÍNTESIS DE 3,5-BIS(AZIDOMETIL)PIRIDINA (11)	160
VI.3.2. SÍNTESIS DE LA ESTRUCTURA DENDRIMÉRICA <b>12</b>	162
VI.3.3. SÍNTESIS DE <b>DG2Pt</b>	164
<b>VI.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS DENDRÍMEROS LUMINISCENTES AMINO TERMINALES</b>	<b>165</b>
VI.4.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)	165
VI.4.2. EXPERIMENTOS DOSY	165
VI.4.3. CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA	166
VI.4.4. APROXIMACIÓN AL EMPLEO COMO MARCADORES BIOLÓGICOS	168
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>171</b>

<b>VIII. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>175</b>
<b>VIII.1 REACTIVOS, DISOLVENTES Y TÉCNICAS ANALÍTICAS</b>	<b>177</b>
<b>VIII.2. PROCEDIMIENTOS GENERALES</b>	<b>180</b>
VIII.2.1. DESPROTECCIÓN DE GRUPOS AMINO TERMINALES	180
VIII.2.2. REACCIONES DE CRECIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DENDRÍTICAS	180
VIII.2.3. REACCIONES CON AMOXICILINA Y BENCILPENICILINA	181
VIII.2.4. CONDICIONES DE LA APROXIMACIÓN AL EMPLEO COMO MARCADORES CELULARES	181
<b>VIII.3. SÍNTESIS DE NUEVAS ESTRUCTURAS DENDRIMÉRICAS AMINO TERMINALES</b>	<b>182</b>
<b>VIII.4. SÍNTESIS DE ANTÍGENOS DENDRIMÉRICOS PARA LA DETECCIÓN DE ALERGIA A FÁRMACOS</b>	<b>199</b>
<b>VIII.5. SÍNTESIS DE ESTRUCTURAS RGD-DENDRIMÉRICAS</b>	<b>204</b>
<b>VIII.6. SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS LUMINISCENTES COMO MARCADORES BIOLÓGICOS</b>	<b>206</b>
<b>ANEXO</b>	<b>213</b>
<b>ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR</b>	<b>215</b>
<b>EXPERIMENTOS DE RMN DOSY</b>	<b>320</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>329</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>349</b>

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**



Los dendrímeros son macromoléculas de gran interés que han sido objeto de numerosos estudios debido a sus propiedades intrínsecas únicas. El término dendrímero hace referencia a la similitud de su estructura con la copa de un árbol. Tiene su origen en el griego, donde la palabra *dendron* significa *árbol* mientras que la palabra *méros* significa *parte*.

Un dendrímero se describe generalmente como una macromolécula que se caracteriza por poseer una estructura tridimensional altamente ramificada, ordenada y controlada, lo que le proporciona un alto grado de funcionalidad superficial y versatilidad. Asimismo, un dendrón es como una porción en cuña de un dendrímero.

La principal diferencia entre los dendrímeros y los polímeros convencionales es el control de su estructura. Este control se lleva a cabo en el proceso de síntesis mediante pasos iterativos que permiten estructuras ordenadas, mientras que la síntesis de polímeros suele darse en un único paso de polimerización, dando lugar a macromoléculas sin orden en su geometría.<sup>1</sup>

### I.1. Estructura general

En la estructura general de una estructura dendrímica (dendrímeros y dendrones) se diferencian tres unidades estructurales:

- Un centro multivalente como núcleo del dendrímero ramificado o como grupo funcional disponible del dendrón, llamado punto focal
- Las estructuras dendrímicas que se ramifican desde el núcleo
- Los grupos funcionales terminales

Cada paso de crecimiento de la estructura dendrímica en la que se forma una nueva capa de ramificaciones conforma una generación. En la Figura 1 se representa un dendrímero de tercera generación donde las distintas generaciones se indican como un círculo con línea discontinua. En esta misma figura también se representan las distintas generaciones del correspondiente dendrón delimitado mediante una cuña con línea discontinua de color verde.

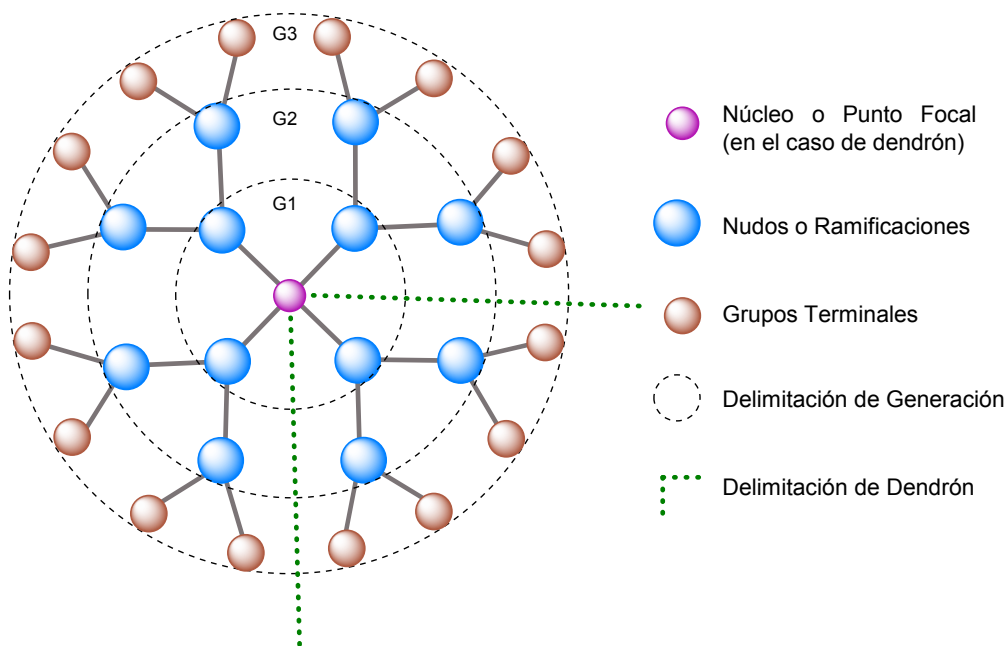


Figura 1. Estructura general de una estructura dendrímica

La cantidad de ramificaciones de la estructura dendrímica dependerá de la multivalencia del núcleo, que puede ser tanto un átomo, como una molécula, y del número de grupos terminales que queden en cada generación. Así, el número de ramificaciones determinará el tamaño y la multiplicidad de la estructura final, mientras que las propiedades variarán en función de los grupos funcionales que posea. De este modo, mediante una selección apropiada de los grupos terminales se pueden modular propiedades como la estabilidad, la viscosidad o la solubilidad, otorgándole distintas características a la estructura final esenciales para determinadas aplicaciones.

La síntesis de los dendrímeros se lleva a cabo por etapas, a través de una serie de reacciones de acoplamiento de manera reiterativa. Esta sucesión de reacciones da lugar a que el número de unidades repetitivas, llamadas monómeros, y grupos funcionales se multiplique, formando dendrímeros de generaciones superiores.

Los dendrímeros de generaciones pequeñas suelen tener una estructura flexible y abierta mientras que los de generaciones superiores tienden hacia una forma globular, incluso suelen tener aspecto de esfera. De manera general, los dendrímeros en solución suelen tener menor viscosidad de lo esperado, y ésta no aumenta linealmente con la masa molar.<sup>2</sup>

La estructura (semi)globular, el tamaño nanométrico y la monodispersidad,<sup>2</sup> son características que diferencian a los dendrímeros de las moléculas hiperramificadas y polímeros convencionales.<sup>3</sup> Otra de las diferencias entre estas estructuras es que, en los dendrímeros, cada una de las unidades monoméricas tiene, al menos, un grupo funcional que permite una ramificación para formar una generación superior.

## I.2. Antecedentes históricos

En 1978, Fritz Vögtle publicó la síntesis de una estructura dendrímica mediante una metodología repetitiva que definió como “síntesis en cascada”.<sup>4</sup> La ruta sintética consistía en la adición de Michael entre una amina y un grupo acrilonitrilo, seguida de la reducción de los grupos nitrilos a aminas. Los productos obtenidos se denominaron “moléculas cascada”.

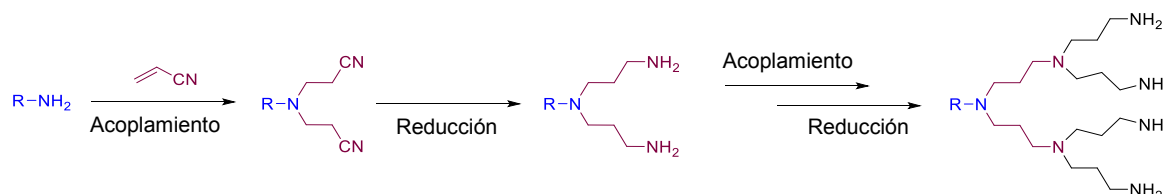


Figura 2. Síntesis de moléculas cascada

Entre 1979 y 1981 se patentaron las primeras síntesis de estructuras dendrímicas.<sup>5,6</sup> Robert G. Denkewalter empleó la molécula de L-lisina (con los grupos amino protegidos) como monómero y, tras una serie de reacciones de acoplamiento-desprotección, obtuvo dendrímeros de polilisina mediante la formación de enlaces amidas.<sup>7</sup> Como se observa en la Figura 3, estos dendrímeros presentan ramificaciones asimétricas debido a la propia estructura de L-lisina empleada como monómero.

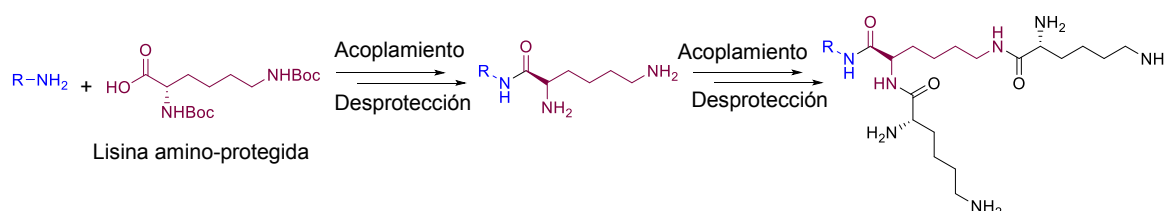


Figura 3. Síntesis de dendrímeros de polilisina

Unos años más tarde, en 1985, Donald A. Tomalia y George R. Newkome publicaron dos rutas sintéticas para la formación de diferentes dendrímeros. La síntesis de Tomalia dio lugar a 8 generaciones de dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) que fueron los primeros dendrímeros comerciales, conocidos con el nombre de “Dendrímeros Starburst”.<sup>8,9</sup> Para su obtención se empleó una metodología similar a la de Vögtle en la cual se repiten reacciones de acoplamiento mediante la adición de Michael entre grupos metilacrilato y grupos amino, seguidas de otra reacción de acoplamiento, en este caso entre etilendiamina y los grupos ésteres terminales. La sucesión de reacciones de acoplamiento da lugar a las distintas generaciones de dendrímeros PAMAM (Figura 4).

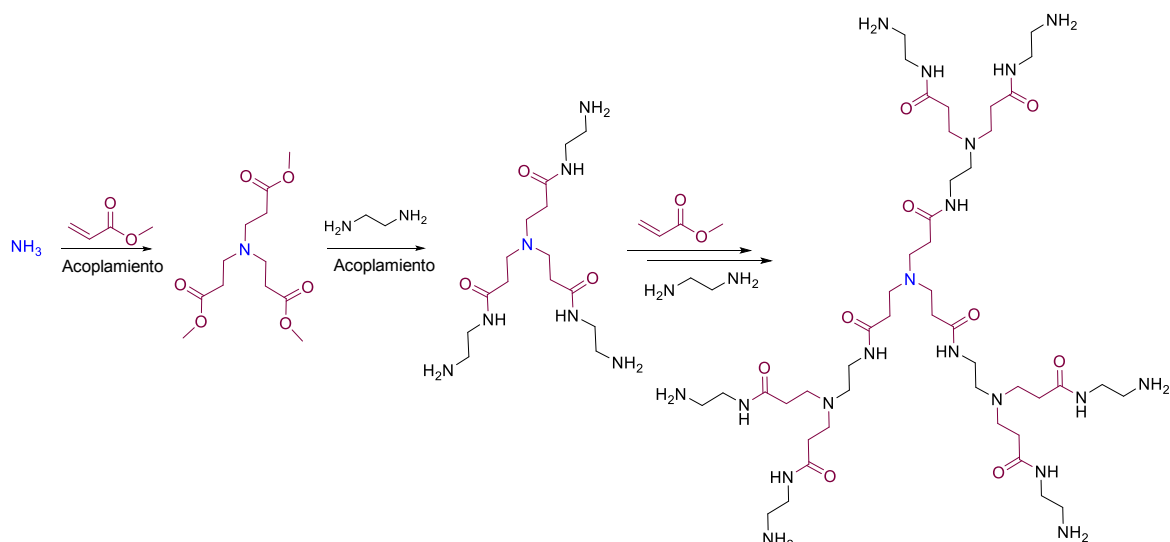


Figura 4. Síntesis de dendrímeros PAMAM

Por otro lado, la síntesis publicada por Newkome daba lugar a lo que se llamó “Sistema Arborol” en referencia a su estructura ramificada, ya que la palabra *arbor* en latín significa *árbol*. La ruta sintética propuesta consiste en el tratamiento de un haluro de alquilo con trietilmetanotricarboxilato de sodio para dar lugar a un poliéster seguido de la reacción con tri(hidroximetil)aminometano con el que, mediante la formación de enlaces amida, se origina la estructura dendrímica con grupos hidroxilo en su periferia (Figura 5).<sup>10</sup>

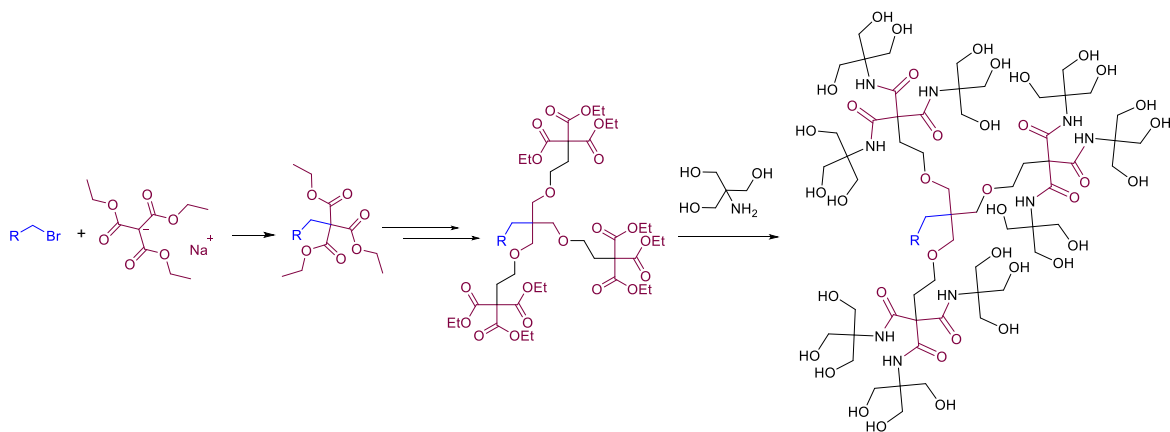


Figura 5. Síntesis de Arborol

Entre las síntesis descritas existe una diferencia destacable y es que, tanto en la ruta de Vögtle como en la de Tomalia, la estructura se va ramificando desde los grupos funcionales terminales mediante el empleo de monómeros lineales mientras que, en el caso de las síntesis propuestas por Denkewalter y Newkome, las ramificaciones surgen a través de un acoplamiento con estructuras ya ramificadas, lo que implica el uso de monómeros que contienen nudos con 2 y 3 ramas respectivamente.

Posteriormente, al inicio de los 90, tanto Hawker y Fréchet<sup>11,12</sup> como Miller y Neenan,<sup>13</sup> dieron a conocer sus trabajos sobre la síntesis de dendrímeros con un enfoque convergente, lo cual amplió el campo en la síntesis de dendrímeros. Esta síntesis, que se detalla en la siguiente sección, y que consiste en la formación de la estructura dendrímica del exterior hacia el interior, precisa de la formación de dendrones con un grupo funcional en el punto focal que posteriormente serán anclados al núcleo dendrímérico multivalente. Debido a la variedad de grupos funcionales en la periferia y en el punto focal, este enfoque resulta muy versátil para la formación de estructuras macromoleculares complejas.

En esta misma época se consiguieron grandes avances en la síntesis de dendrímeros, donde se establecieron los conceptos básicos de estas estructuras describiendo cómo controlar su tamaño, superficie, topología y flexibilidad.<sup>14</sup>

Debido al alto interés en las estructuras dendríméricas a lo largo de los años, se han sintetizado unas 100 familias de dendrímeros diferentes. Esto resulta en más de 1000 estructuras diversas por las modificaciones superficiales.<sup>15</sup>

### I.3. Metodologías Sintéticas

Los primeros métodos sintéticos empleados en la síntesis de dendrímeros fueron los enfoques divergentes y convergentes, propuestos por Vögtle,<sup>4</sup> Tomalia,<sup>8</sup> Newkome<sup>10</sup> y Fréchet.<sup>11</sup> Estas metodologías sentaron las bases para la síntesis de dendrímeros, empleándose de forma independiente o en combinación.<sup>2,16,17,18</sup>

#### I.3.1. Síntesis divergente

Mediante esta metodología, la formación del dendrímero se lleva a cabo desde un núcleo multifuncional hacia el exterior de la estructura. Para ello, se suelen emplear monómeros del tipo  $AB_n$  ( $n \geq 2$ ) donde A y B son grupos funcionales diferentes de manera que, para controlar el crecimiento de la estructura, uno de estos grupos funcionales estará activado mientras que el otro se encontrará protegido.<sup>19</sup> La cantidad de ramificaciones de la estructura dependerá del número de grupos funcionales B que tenga el monómero, que en la mayoría de los casos suele ser 2.<sup>20,21</sup> La reacción del núcleo multivalente ( $C_x$ ) con un exceso de monómero  $AB_n$  da lugar a la primera generación del dendrímero. La desprotección o activación de los grupos funcionales periféricos B, seguida de la reacción de acoplamiento entre los grupos B de este dendrímero de primera generación con el grupo funcional A del monómero  $AB_n$ , da lugar a la siguiente generación de dendrímero. Así, mediante una secuencia de pasos de activación/acoplamiento se van obteniendo las distintas

generaciones con mayor tamaño y peso molecular, y  $n$  veces el número de sitios reactivos en la periferia.<sup>22,8</sup>

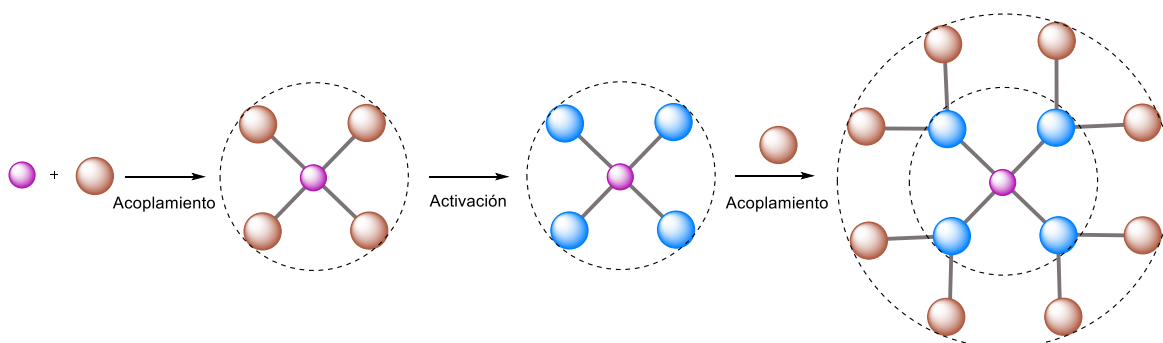


Figura 6. Síntesis divergente

Esta metodología es útil para dendrímeros con alto grado de ramificación y, además, suele tener buenos resultados con la síntesis de grandes cantidades de dendrímeros,<sup>23</sup> aunque en ocasiones, presenta problemas debido a reacciones incompletas que conlleven defectos estructurales y bajos rendimientos.<sup>9,24</sup> Es por ello que en la mayoría de los casos se emplea un exceso de monómero y procesos tediosos de purificación para la síntesis de las generaciones más grandes.

### I.3.2. Síntesis convergente

Mediante esta metodología, la formación del dendrimer tiene lugar desde el exterior hacia el interior. Fue Fréchet<sup>11</sup> el primero que introdujo este método donde los grupos terminales son el punto de partida en la ruta sintética. Para la obtención de dendrímeros mediante el enfoque convergente es necesaria la síntesis de dendrones que posteriormente son unidos a un núcleo polifuncional dando lugar al dendrimer de la generación correspondiente. Los monómeros que se emplean para la formación de los dendrones son del tipo  $AB_n$  ( $n \geq 2$ ) donde A es el grupo funcional protegido, o no activado, y B representa los grupos funcionales activados. La sucesión de pasos de acoplamiento/activación permite la formación de dendrones con un grupo funcional en el punto focal que, tras su activación, se unirá a otros monómeros para formar las siguientes generaciones de dendrones o al núcleo para la obtención del dendrimer final.

A diferencia del método anterior donde el número de enlaces que se forman aumenta con el aumento de la generación, con el enfoque convergente, el número de enlaces formados en cada paso de acoplamiento es constante, por lo que sólo es necesario un ligero exceso de monómero para llevar a cabo estas reacciones.<sup>25</sup> El método convergente suele minimizar los defectos estructurales y los procesos de purificación suelen ser más sencillos en comparación con el método divergente. Sin embargo, el procedimiento para obtener un dendrimer de una generación se ralentiza mediante este método respecto al anterior.

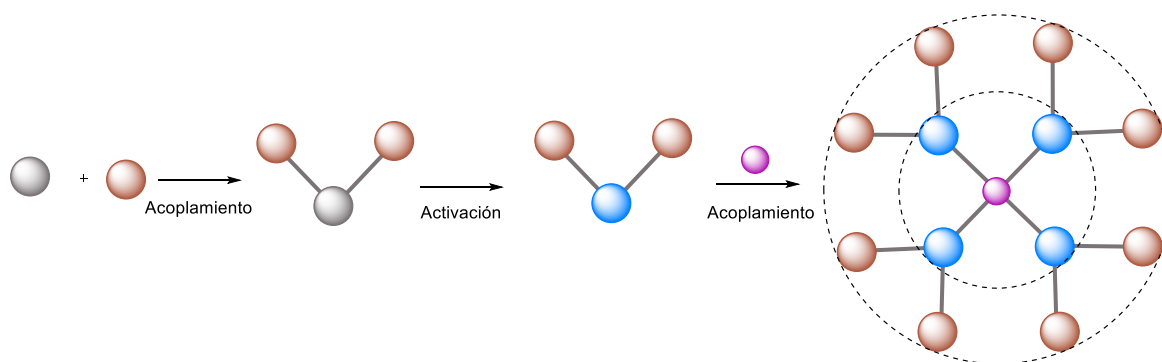


Figura 7. Síntesis convergente

La síntesis convergente permite funcionalizar selectivamente el punto focal de los dendrones y obtener así dendrímeros asimétricos mediante la unión de diferentes dendrones al núcleo polifuncional. No obstante, esta síntesis sólo permite la construcción de dendrímeros de generaciones relativamente bajas debido a los posibles efectos estéricos que surjan al intentar unir dendrones voluminosos a un núcleo multifuncional.<sup>26</sup>

### I.3.3. Otros métodos

En los últimos años, la química de dendrímeros ha proliferado con la introducción de diferentes metodologías con el objetivo de optimizar y acelerar la construcción de estas macromoléculas complejas. En este sentido, las estrategias aceleradas están enfocadas a reducir el número de pasos de reacción empleando reacciones ortogonales y quimioselectivas.<sup>27</sup> Un ejemplo es la estrategia de acoplamiento ortogonal en la que se emplean dos tipos diferentes de dendrones AB<sub>2</sub> que contienen grupos funcionales complementarios.<sup>28</sup>

Así, se han incorporado a la literatura numerosas adaptaciones e innovaciones de los métodos más extendidos, como el método “double-stage” que consiste en la unión de “hipermonómeros” (dendrones grandes y muy ramificados) con “hipernúcleos” (dendrímeros pequeños), multiplicando así el número de grupos terminales.<sup>29</sup>

La estrategia sintética basada en el empleo de reacciones tipo click juega un papel importante y permite la formación de dendrímeros con varias clases de grupos en su periferia, con elevada pureza y alto rendimiento a través de la síntesis de 1,2,3-triazoles por reacción entre grupos azidas y alquinos.<sup>30–32</sup>

La estrategia “one pot” también ha sido muy empleada,<sup>33,34</sup> y recientemente se ha aplicado para obtener dendrímeros de hasta cuarta generación utilizando cuatro reacciones quimioselectivas.<sup>35</sup> Sin embargo, aunque el tiempo de síntesis se reduce, se requiere la preparación de hasta cuatro monómeros diferentes con diferentes funcionalidades.

Otro método de síntesis de dendrímeros consiste en el autoensamblaje de dendrones por puentes de hidrógeno o enlaces con un centro metálico.<sup>36-39</sup> La incorporación de centros metálicos no debe ser necesariamente en el núcleo de la estructura dendrímica, sino que pueden formar parte de la unidad repetitiva, quedar en la periferia o permanecer encapsulado como en el caso de las nanopartículas dendríméricas.<sup>40-44</sup>

También se ha avanzado en una estrategia alternativa basada en el enfoque de autoensamblaje donde los pequeños componentes dendríméricos forman grandes estructuras supramoleculares no covalentes que imitan a los dendrímeros de alta generación.<sup>45</sup>

En la búsqueda de un método sintético más simple se ha descrito la “lego chemistry”,<sup>46,47</sup> que emplea núcleos multifuncionalizados y monómeros ramificados para dar lugar a dendrímeros con un elevado número de grupos terminales. Mediante esta estrategia, empleando monómeros tipo AB<sub>2</sub> y CD<sub>2</sub> donde A reacciona específicamente con D y B lo hace con C, se forman dendrímeros de cuarta generación en sólo 4 pasos en lugar de los 8 pasos necesarios por el método tradicional.

A través de todos estos métodos, se han obtenido diferentes tipos de dendrímeros con diferentes grupos funcionales. Estos se han clasificado, dependiendo de dónde se encuentren las modificaciones de los grupos funcionales, en dendrímeros de bloque de capa, dendrímeros de bloque de superficie o dendrímeros de bloque de segmento.<sup>48-51</sup> Estos dendrímeros multifuncionales han despertado el interés debido a la posibilidad de combinar diferentes propiedades en una misma estructura dendrímica. Entre ellos, los dendrímeros Janus<sup>52,53</sup> forman parte de este tipo de estructuras ya que poseen, al menos, dos funcionalidades distintas en su superficie.

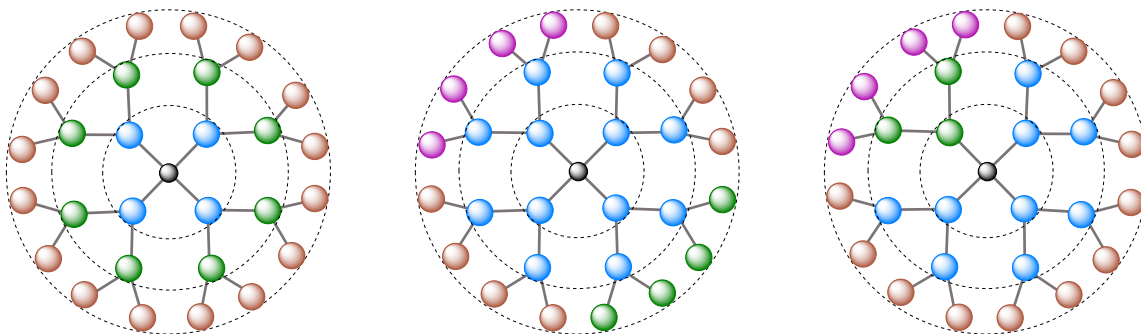


Figura 8. Dendrímeros de bloque de capa, superficie y segmento respectivamente

#### I.4. Propiedades y Aplicaciones

Hoy en día, los dendrímeros se consideran uno de los nanomateriales más atractivos para aplicaciones biológicas. Su estructura hiperramificada y bien definida, permite a los compuestos dendríméricos confinar una gran cantidad de grupos funcionales en un espacio relativamente pequeño, siendo este control sobre la multivalencia, la propiedad que hace que los dendrímeros sean

únicos para determinadas bioaplicaciones.<sup>54,55</sup> Además, la similitud de la escala de tamaño y de las propiedades físicoquímicas de los dendrímeros con biomoléculas los hace estructuras moleculares de interés para aplicaciones donde actúen como emuladores de proteínas globulares.<sup>56</sup>

Hoy día existen algunos dendrímeros comerciales ampliamente conocidos. Entre ellos, los más comunes son los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM o Starburst)<sup>16</sup> y los de polipropilenimina (PPI o Astramol)<sup>4</sup>. De ellos están bien establecidas muchas de sus propiedades como su biocompatibilidad, citotoxicidad y los efectos hemolíticos, los cuales aumentan en ambos casos con el aumento de la generación.<sup>57-59</sup> En este mismo sentido, estudios de toxicidad *in vivo* realizados en la década de los 90 indican que, hasta la quinta generación, los dendrímeros PAMAM no son tóxicos en una concentración de 10 mg/Kg inyectados por vía intraarterial.<sup>60,61</sup>

Los requisitos indispensables para que las estructuras dendriméricas puedan ser empleadas en aplicaciones médicas incluyen: no ser tóxicas, nocivas o no causar respuesta inmune, se deben excretar fácilmente y el tiempo de degradación debe ser tal que se evite la acumulación celular. En este sentido, los dendrímeros cuya estructura se basa en enlaces éster se degradan más fácilmente por hidrólisis y se ha estudiado su empleo como adhesivo tisular.<sup>62,63</sup>

Entre todos los dendrímeros descritos, los amino terminales son una excelente alternativa para aplicaciones biológicas ya que son solubles en medios acuosos y se conoce que son biocompatibles a generaciones bajas. Además de PPI y PAMAM, otros dendrímeros amino terminales comerciales bastante conocidos son los de poli L-lisina (PLL)<sup>5</sup> y una modificación de poliéster (bis-MPA).<sup>64</sup> Aunque, si bien es cierto, entre todos los dendrímeros comerciales probablemente PAMAM ha sido el más utilizado hasta el momento.<sup>45</sup>

Estos han sido estudiados en aplicaciones como la administración de fármacos dirigida, la obtención de imágenes y la terapia génica entre otras, donde se han transferido, exitosamente, genes a través de la membrana celular hasta el núcleo.<sup>65-67</sup>

Un gran número de estudios se ha centrado en intentar adaptar las propiedades de encapsulación de los dendrímeros para aplicaciones como, por ejemplo, la administración dirigida de fármacos.<sup>68</sup> La capacidad de encapsular también hace que puedan emplearse como moléculas portadoras de metales, moléculas orgánicas e inorgánicas. Además, esta capacidad se puede regular en base a la funcionalización periférica de la estructura dendrimérica. En este campo, se ha estudiado una modificación de PAMAM con cadenas de polietilenglicol con la intención de mejorar su biocompatibilidad y encapsular fármacos anticancerígenos.<sup>69,70</sup>

La multivalencia de los dendrímeros hace de estas estructuras útiles para el empleo como transportadores de fármacos, proporcionando mayor estabilidad y facilitando la difusión por las barreras biológicas hasta alcanzar a las células objetivos. De este modo, se han descrito compuestos

dendriméricos para aplicaciones terapéuticas contra el cáncer.<sup>71</sup> Estos potenciales agentes quimioterapéuticos poseen tres estructuras distintas que se encuentran en la periferia dendrímica y que poseen tres actividades diferentes, actúan como vectores, marcadores y como agentes anticancerígenos.<sup>72</sup>

La multivalencia de las estructuras dendriméricas también permite el diseño de agentes terapéuticos antivirales, que presentan múltiples interacciones con receptores biológicos.<sup>73,74,75</sup> El uso de una estructura multivalente aumenta la inmunorespuesta debido a la mayor cantidad de antígeno y, por tanto, mayor producción de anticuerpos.<sup>76</sup>

## I.5. Antecedentes del grupo de investigación

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis tiene una amplia experiencia en el campo de los dendrímeros. En particular, las líneas de investigación del grupo están basadas en el estudio de estructuras dendriméricas con potenciales aplicaciones en dos áreas biomédicas: en el estudio de las reacciones adversas a fármacos (RAF), y en los procesos de regeneración tisular empleando células madre mesenquimales (MSC). Inicialmente, para estos estudios se han empleado dendrímeros comerciales PAMAM. Posteriormente, y debido a las necesidades que han ido surgiendo a lo largo de los años, el grupo se embarcó en el diseño y síntesis de nuevas estructuras dendriméricas amino terminales.

### I.5.1. Estudio de las reacciones adversas a fármacos (RAF)

Las reacciones adversas a fármacos constituyen actualmente un problema sanitario importante ya que existe un gran desconocimiento sobre sus mecanismos. Esto se traduce en una ausencia de pruebas diagnósticas suficientemente sensibles y específicas. Como consecuencia existe una gran disparidad de criterios tanto en el diagnóstico como en el tratamiento, generando una gran incertidumbre en la valoración de este tipo de patologías. Existen dos grandes hándicaps a la hora de abordar el estudio de los aspectos relacionados con la respuesta inmune en los procesos de reacción adversa a fármacos: baja sensibilidad de los métodos diagnósticos *in vivo* e *in vitro* y falta de kits comerciales para todos los fármacos evaluados.<sup>77-79</sup>

En esta investigación, el estudio de las RAF con base inmunológica se realiza siempre en colaboración con el grupo de investigación liderado por la Dra. M. J. Torres Jaén (Jefa de Servicio de la Unidad de Gestión Clínica de Alergología) del Hospital Regional Universitario de Málaga (HRUM).

La capacidad que tienen los antibióticos betalactámicos para producir reacciones alérgicas se debe a su gran facilidad para unirse covalentemente a proteínas portadoras. Esta propiedad es la que se utiliza para su acoplamiento a proteínas exógenas u otras macromoléculas con grupos aminos disponibles, produciendo así conjugados *in vitro*. Estos conjugados son utilizados en las pruebas cutáneas (*in vivo*) y test *in vitro* para el diagnóstico de hipersensibilidad inmediata a antibióticos betalactámicos. La prueba cutánea ha sido la técnica más utilizada universalmente, así como la más sensible y práctica de todas las disponibles. Con respecto a las técnicas *in vitro*, se emplea una macromolécula sintética, la polilisina (PLL), como proteína portadora. El grupo de investigación se ha centrado en el estudio de la potencialidad de los dendrímeros para emular las proteínas portadoras endógenas, que conforman el conjugado hapteno-portador, es decir, el antígeno responsable del proceso alérgico a fármacos.<sup>80-83</sup>

En este sentido, en el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis se han realizado diferentes estudios sobre la síntesis de conjugados hapteno-portador en el que el hapteno es un antibiótico  $\beta$ -lactámico (bencilpenicilina y/o amoxicilina) y el portador es un dendrímero PAMAM. De este modo, se ha estudiado la síntesis y el desarrollo de dendrímeros antigénicos (conjugados antibiótico-dendrímero) con el objetivo de identificar y cuantificar anticuerpos IgE de manera sensible y específica, con objeto de implementar la sensibilidad y especificidad de los test de diagnóstico *in vitro* disponibles actualmente.<sup>84-86</sup> Se han realizado estudios sobre la inmovilización de estos conjugados hapteno-portador a diferentes superficies sólidas como discos de celulosa,<sup>87</sup> zeolitas,<sup>88</sup> nanodiscos de oro<sup>89</sup> y nanopartículas de sílica<sup>90,91</sup> y se han evaluado estos materiales mediante inmunoensayos *in vitro*.

Debido a los excelentes resultados en la detección y cuantificación de IgE en suero humano de pacientes alérgicos a amoxicilina y/o bencilpenicilina, estos nuevos materiales han supuesto un prometedor candidato para las pruebas *in vitro* en el diagnóstico clínico y una prometedora línea de investigación donde el grupo sigue enfocando su trabajo.

### I.5.2. Regeneración tisular

La segunda área biomédica en la que está involucrada el grupo de investigación se basa en las aplicaciones biotecnológicas de procesos de regeneración tisular empleando células madre mesenquimales. Es necesario dotar a los procesos de regeneración tisular de herramientas útiles que permitan fijar las células en los sustratos adecuados y su retención en el sitio apropiado para que se produzca el crecimiento celular y se regenere el tejido. La adhesión intercelular mediada por derivados dendriméricos puede presentar ventajas sobre otros métodos utilizados en la actualidad, como es la inclusión de las células en polímeros o geles. Durante los últimos años, hemos estado

realizando estudios preliminares para verificar la posibilidad de preparar estructuras dendriméricas que soporten en su superficie la secuencia peptídica RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico) como patrón de reconocimiento celular.<sup>92,93</sup>

Esta línea de trabajo se realiza en cooperación con el grupo de investigación del Ciber-BBN liderado por el Dr. J. Samitier y la Dra. A. Lagunas.

Para estos estudios se empleó el dendrímtero comercial PAMAM. En un primer estudio, se analizó si la orientación de la secuencia peptídica tenía influencia en la actividad del conjugado dendrímtero-peptídico. Para ello se emplearon los péptidos lineales RGD-Cys (Arginina-Glicina-Ácido aspártico-Cisteína) y Cys-RGD (Cisteína-Arginina-Glicina-Ácido aspártico), empleando la unidad de cisteína para el acoplamiento covalente del péptido al dendrímtero. Se obtuvieron dos dendrímteros modificados: (RGD-Cys)<sub>8</sub>-D1 y D1-(Cys-RGD)<sub>8</sub> respectivamente (Figura 9). De estos se observó que era el primero el que provocaba mejores procesos de fijación y crecimiento celular.<sup>94</sup>

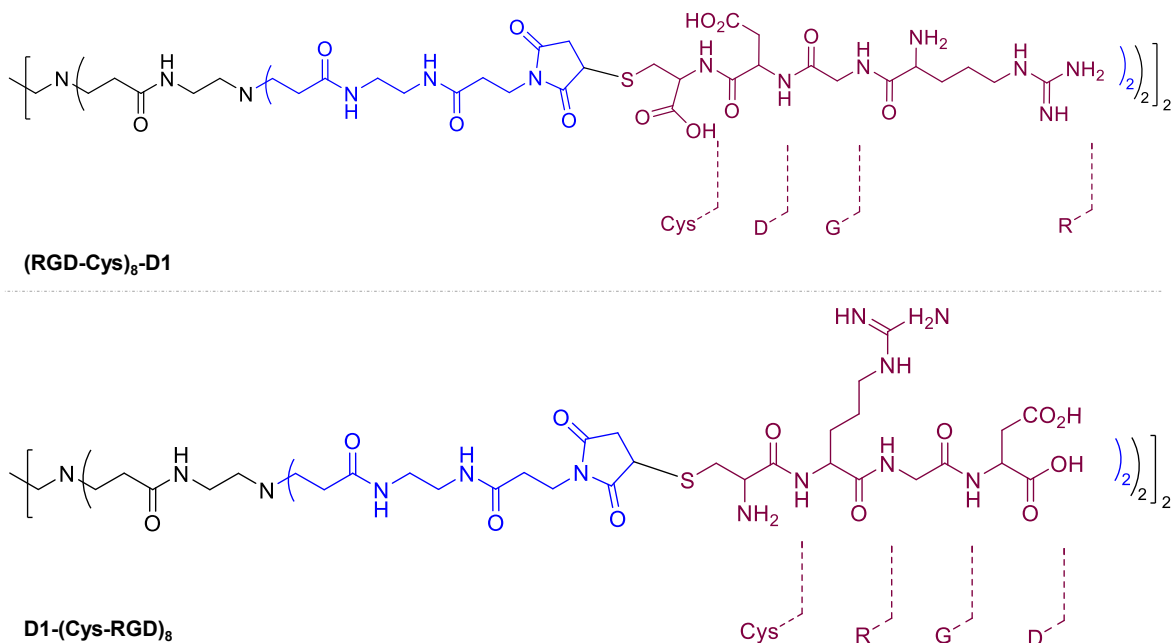


Figura 9. Dendrímteros PAMAM funcionalizados con el tripéptido RGD

Los estudios realizados, soportando el dendrímtero (RGD-Cys)<sub>8</sub>-D1 sobre diferentes superficies, como láminas de oro o polímeros de ácido poliláctico, han dado resultados muy prometedores. En estos estudios se ha presentado un método para la preparación de nanoestructuras con control sobre la densidad de RGD en la superficie de las mismas por adsorción superficial. Esta densidad local se ha cuantificado mediante microscopía de fuerza atómica y se ha correlacionado con la respuesta de adhesión y diferenciación celular. Los resultados revelan que la densidad local de RGD actúa como reguladora de la adhesión y favorece la condensación de MSC.<sup>95</sup> Las nanoestructuras se presentan, por tanto, como una herramienta adecuada y controlada para abordar

el efecto de la densidad local del ligando sobre la respuesta celular. Además, debido a la sencilla modificación de los grupos periféricos del dendrímero, las nanoestructuras dendriméricas pueden extenderse adicionalmente a otros ligandos de la matriz extracelular (ECM) que tienen efectos de densidad sobre las células.<sup>96-102</sup>

### I.5.3. Diseño y síntesis

Los alentadores resultados obtenidos en estas investigaciones previas motivaron el planteamiento de una nueva elección de dendrímero o dendrón a emplear. En los trabajos realizados se han empleado dendrímeros comerciales tipo PAMAM, sin embargo, estos presentan una serie de inconvenientes como son las reacciones de degradación que se han observado en el producto, las limitaciones inherentes a productos ya estructurados y no diseñados químicamente para satisfacer necesidades específicas, los elevados precios y la polémica de aplicar patentes de aplicación sobre la base de productos ya patentados previamente. Con estos antecedentes, el grupo de investigación se embarcó en el diseño y la síntesis de nuevos tipos de dendrímeros y dendrones que representarían un modelo versátil a la hora de incorporar determinadas funcionalidades en su estructura.

Como resultado el grupo diseñó y patentó un nuevo modelo de dendrímero basado en el acoplamiento iterativo de unidades de 2,2-Bis(aminoalquil)propanamidas (BAPAD).<sup>103</sup> La síntesis de este nuevo dendrímero se abordó utilizando como sustrato de partida el ácido 3,3'-dicloropiválico (comercial). La reacción de sustitución de los átomos de cloro de este precursor por grupos azido permite obtener el ácido 3,3'-diazidopiválico, que se emplea como unidad de crecimiento del dendrímero (Figura 10). Con este compuesto se acometió la síntesis de dendrímeros y dendrones mediante una secuencia de reacciones que requieren: 1) acoplamiento del monómero previamente activado a una unidad central, en este caso etilendiamina, mediante la formación de enlaces amida, para obtener un dendrímero de generación 1 con cuatro grupos azido en la superficie. 2) La reducción por hidrogenación catalítica de estos grupos azido a los correspondientes aminos, lo que da lugar a un dendrímero con cuatro grupos amino en la superficie situados en posiciones relativas 1,3. La repetición de estas secuencias permite obtener dendrímeros de generaciones superiores.

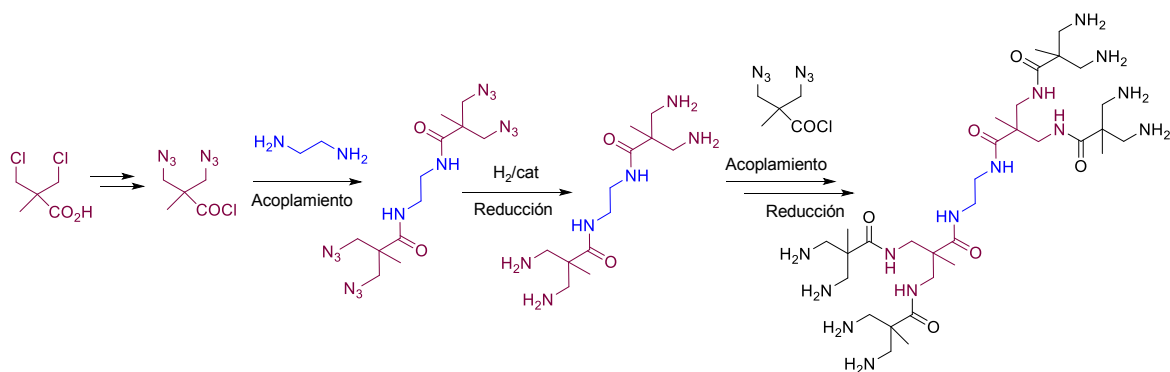


Figura 10. Síntesis de dendrímeros BAPAD

La estructura inherente del dendrímtero y la metodología sintética propuesta permite la construcción de dendrímeros hasta tercera generación, con 16 grupos amino terminales.<sup>103</sup> Estas estructuras dendriméricas basadas en enlaces tipo amida han resultado ser completamente estables, solubles en agua y lo suficientemente versátiles para ser utilizadas en diferentes aplicaciones de interés biológico.

En este sentido se ha sintetizado un dendrímtero antigénico (DeAn) basado en estructuras tipo BAPAD con grupos amoxiciloilos terminales (Figura 11).

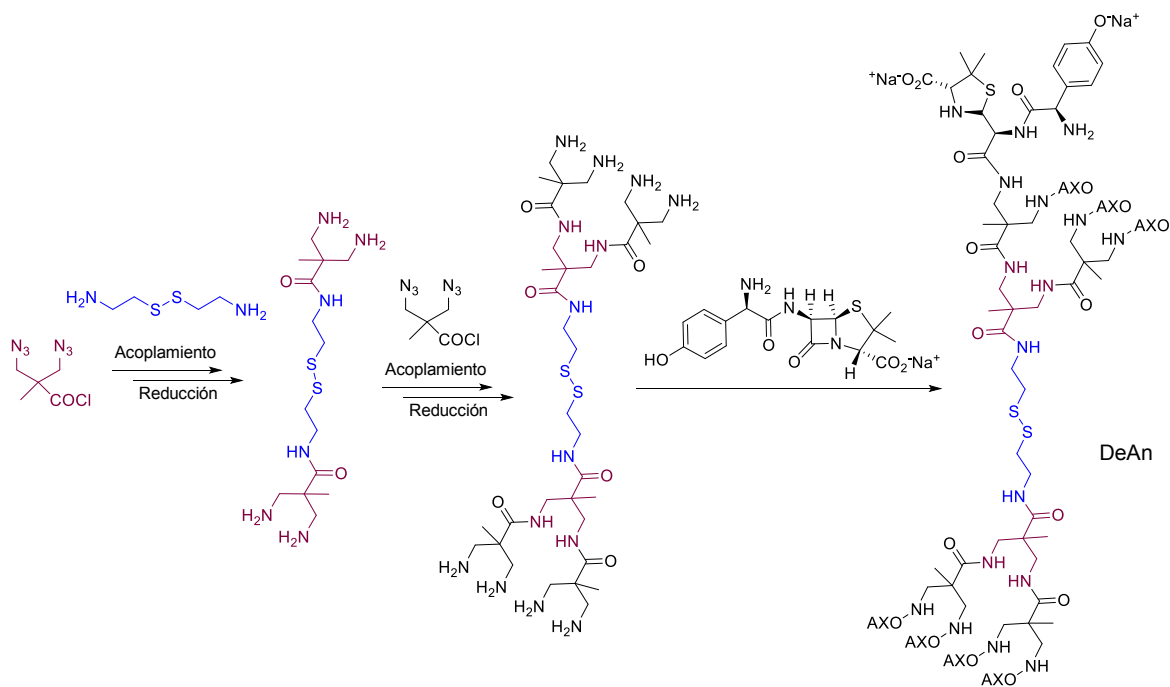


Figura 11. Síntesis de dendrímtero antigénico (DeAn) tipo BAPAD

En este estudio, además, se han combinado en una nueva estructura, las propiedades de este nuevo modelo de dendrón BAPAD con un marcador fluorescente, presentando una poderosa herramienta para estudios biomédicos. Por estrategia sintética, el dendrímtero BAPAD se ha diseñado con un núcleo de cisteamina, de modo que, la reducción del enlace disulfuro da lugar a la formación

de dendrones BAPAD con un grupo tiol en su punto focal. Esto permite su posterior acoplamiento a una estructura de 1,8-naftalimida funcionalizada con un grupo maleimida (Figura 12).

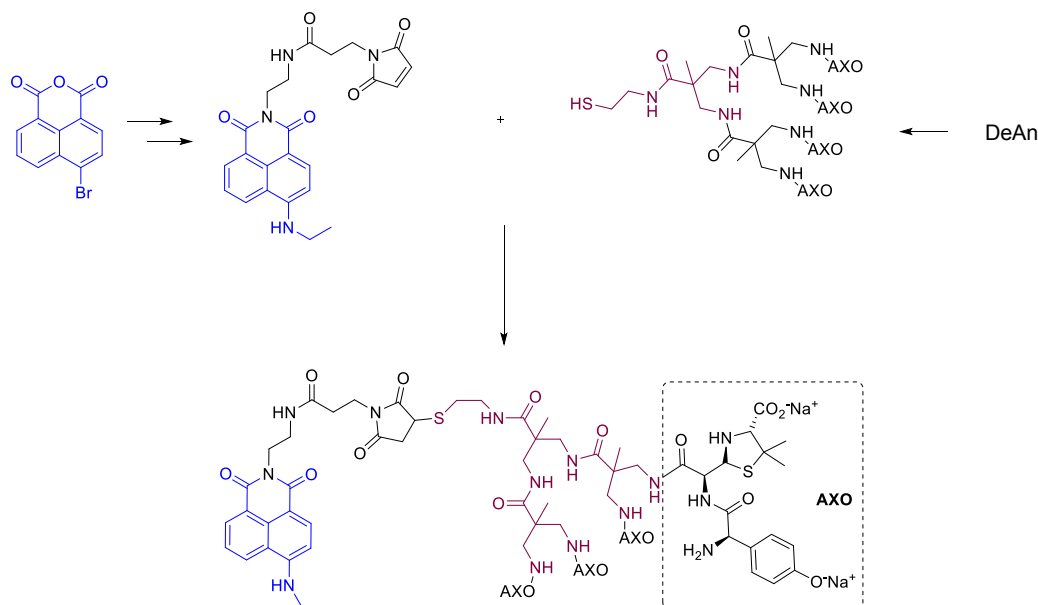


Figura 12. Dendrímero antigénico BAPAD fluorescente

Se ha estudiado el comportamiento de esta estructura en experimentos *in vitro* con células dendríticas humanas, observándose mediante microscopía confocal que internaliza eficientemente en el interior de las células, localizándose preferentemente en el citoplasma.<sup>104</sup>

En base a los buenos resultados obtenidos y, siguiendo la experiencia previa del grupo de investigación en estudios sobre regeneración tisular, se han empleado estructuras dendriméricas BAPAD como estructura de soporte de péptidos bioactivos (RGD-Cys) en discos de titanio empleados en implantes maxilofaciales. Para ello, los discos de Ti se han tratado inicialmente en condiciones oxidantes fuertes para activar la presencia de grupos hidroxilos que nos permitiesen la modificación química necesaria. Tras este tratamiento, los discos se han hecho reaccionar con una disolución de 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) y, posteriormente se han unido covalentemente dendrones BAPAD con un grupo ácido carboxílico en el punto focal. Una vez insertada la estructura dendrimérica en los discos, se han unido los tetra péptidos RGD-Cys empleando la metodología química optimizada previamente. En este estudio se ha observado un aumento de la biocompatibilidad de los implantes orales de titanio tras la inmovilización covalente de estas estructuras dendriméricas, demostrando que estos dendrones amino terminales basados en enlaces amida actúan como un andamiaje perfecto para presentar moléculas bioactivas, favoreciendo la interacción de las células con la superficie.<sup>105</sup>

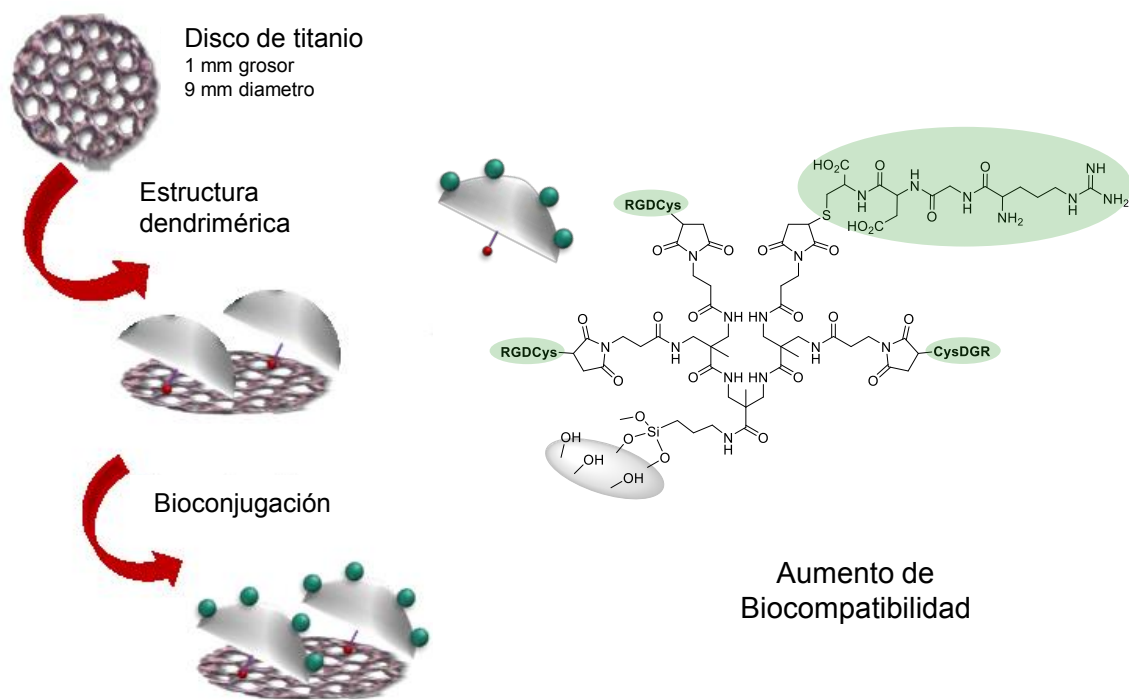


Figura 13. Disco de titanio modificado con restos RGD<sup>105</sup>

Tras los buenos resultados obtenidos con el desarrollo de estructuras tipo BAPAD, el grupo se planteó la formación de nuevos dendrímeros haciendo uso de la reactividad de los grupos azido empleados en la ruta sintética desarrollada. De esta forma, la unión entre los monómeros en esta nueva ruta sintética se basa en reacciones tipo click, por lo que, para llevar a cabo este tipo de reacciones, estos dendrones presentan un triple enlace en su punto focal que se hace reaccionar con los grupos azida presentes en el monómero (Figura 14). De este modo, mediante una metodología sintética convergente, se han diseñado, sintetizado y caracterizado dendrones de hasta tercera generación con rendimientos superiores al 85%.<sup>106</sup>

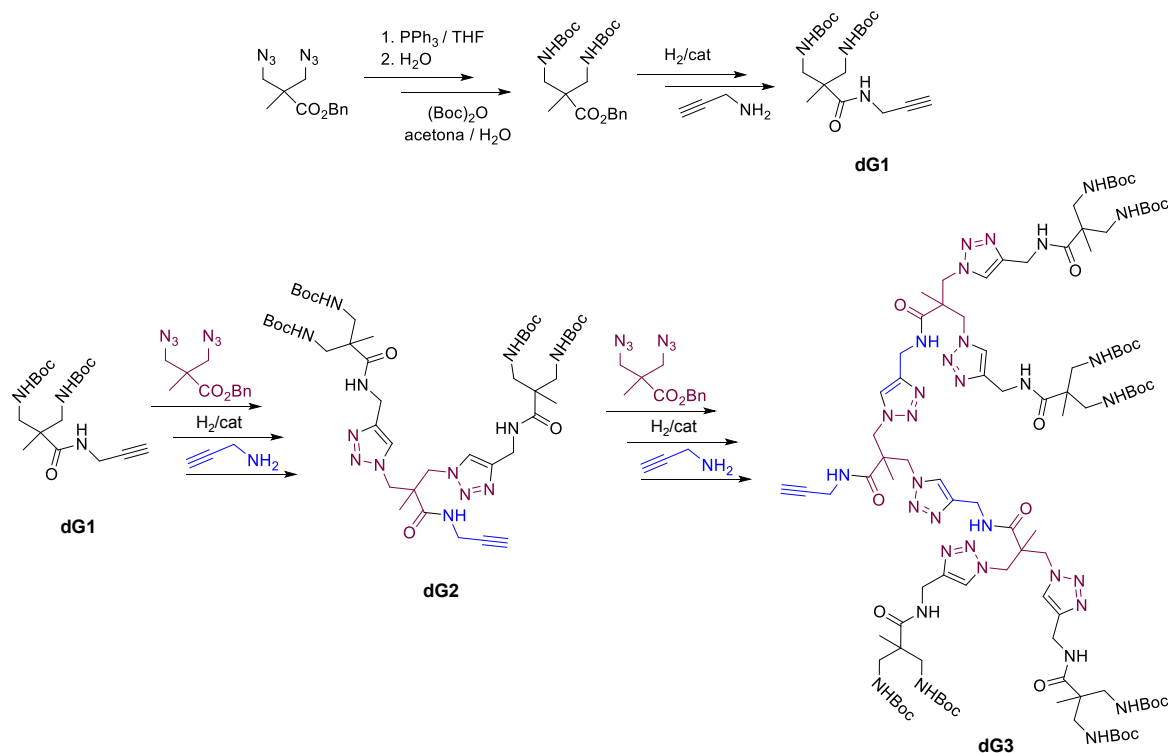


Figura 14. Síntesis de dendrones tipo click

A través de la unión de estos dendrones a núcleos de diferente multiplicidad se han preparado diferentes dendrímeros (Figura 15). Este proceso se ha llevado a cabo alternando el empleo de reacciones tipo click, reacciones de desprotección y reacciones para la formación de enlaces tipo amida. Se ha demostrado el potencial de esta metodología para el ensamblaje de dendrímeros con forma y número de grupos amino terminales controlados.

Además, se ha sintetizado un dendrímero empleando un derivado de 1,8-naftalimida como núcleo, originando por tanto un dendrímero fluorescente con potenciales aplicaciones en bioimagen.<sup>106</sup> La diferente multiplicidad de los núcleos hace que, partiendo del dendrón de tercera generación en todos los casos (**dG3**), se obtengan dendrímeros con diferente número de grupos amino en la periferia del producto final, variando entre 16 en el caso de los núcleos bifuncionales (**G3<sub>EDANH</sub>2** y **G3<sub>NaftNH</sub>2** en Figura 15) y 24 grupos amino periféricos en el caso del núcleo trifuncional (**G3<sub>3ABNH</sub>2** en Figura 15).

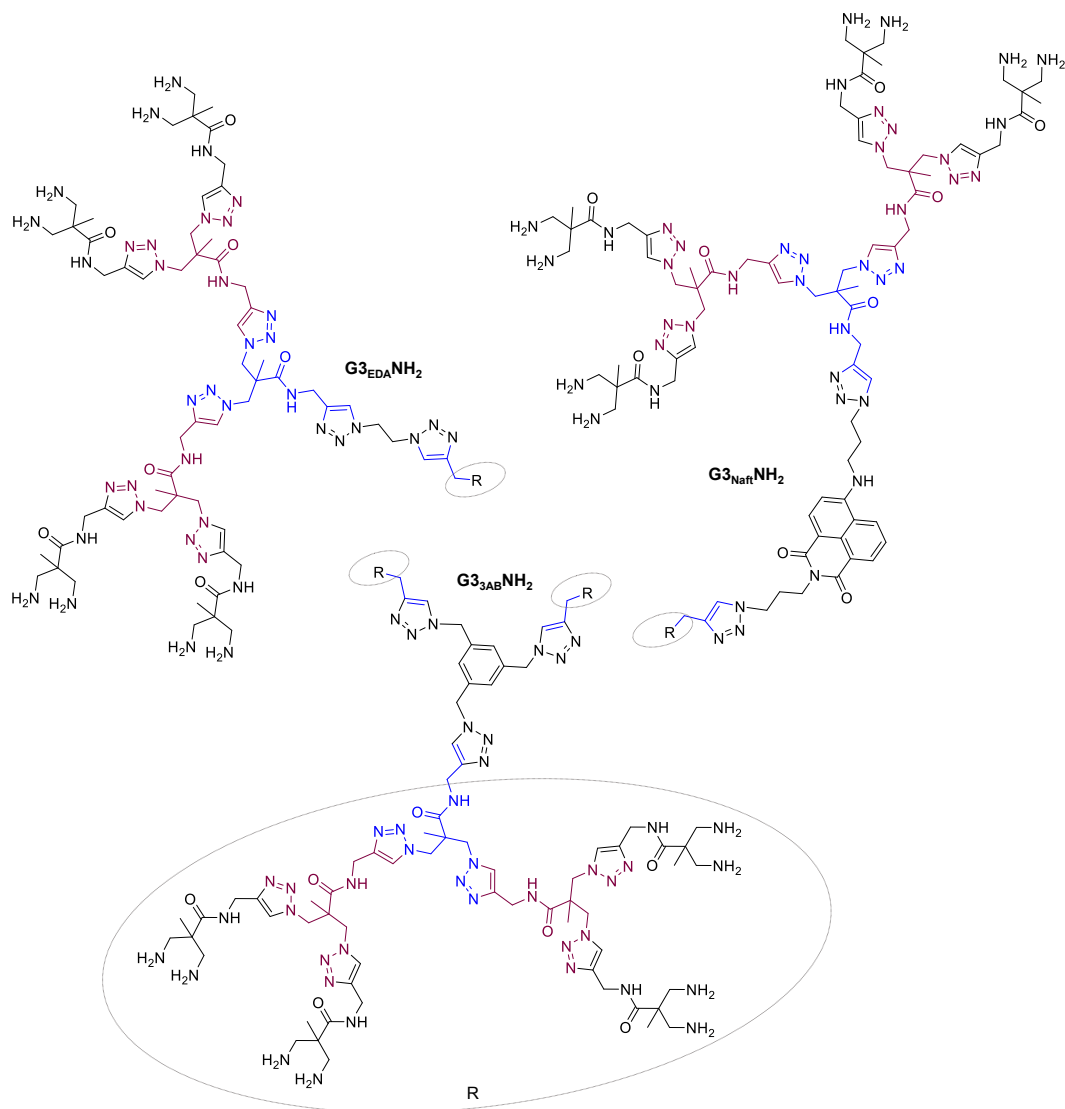


Figura 15. Dendrímeros amino terminales tipo click

Tras los resultados alentadores de la potencial aplicación en bioimagen de los dendrímeros luminiscentes sintetizados, se diseñó una nueva estructura dendrímica con un núcleo de Pt (II), ya que es bien conocido que los complejos de Platino (II) poseen unas propiedades fotofísicas que los hacen únicos<sup>107</sup> como su fotoestabilidad, su desplazamiento de Stokes<sup>108</sup> o la posibilidad de regular su luminiscencia a azul, verde, rojo o blanco mediante el diseño de sus ligandos.<sup>109–112</sup> Su largo tiempo de vida de luminiscencia permite la posibilidad de realizar imágenes de tiempo de vida de fosforescencia (PLIM) lo que ofrece ventajas sobre la tradicional imagen de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM).<sup>113</sup> Esto hace posible el registro de imágenes de tiempo de vida evitando la autofluorescencia, la emisión natural de luz que ocurre normalmente en la escala de nanosegundo y que constituye un problema importante en bioimagen.<sup>114</sup> Estas características suponen la potencial aplicación de marcaje de tejidos *in vivo* con estos complejos. Sin embargo, a pesar de estas

cualidades, su aplicación en el campo de la bioimagen es aún limitado debido a la baja solubilidad en medios acuosos que presentan y a los problemas de desactivación en estos medios.

Asimismo, la síntesis de complejos de platino solubles en agua puede abrir una ventana a aplicaciones en bioimagen. En imágenes celulares, la localización y absorción del cromóforo son aspectos importantes a tener en cuenta. Estas células se incuban normalmente en soluciones acuosas tamponadas, así que el cromóforo debe ser lo suficientemente soluble como para ser absorbido por las células. El transporte pasivo (difusión a través de la membrana) se favorece por la presencia de compuestos catiónicos y la localización se puede manipular mediante la selección de grupos que reaccionen específicamente con las especies objetivo o mediante el control de propiedades como la polaridad.<sup>115</sup>

Es por todo ello que se han insertado estructuras dendriméricas tipo BAPAD en complejos de Pt (II), confiriéndoles así propiedades únicas a estos complejos como son la solubilidad en agua, la protección frente a ser desactivados por oxígeno molecular y, además, se ha observado la unión a la pared bacteriana.<sup>116</sup> Este estudio abre camino para el desarrollo de nuevos biomarcadores fosforescentes con propiedades prometedoras

El uso del ácido 3,3'-diaminopiválico, empleado como unidad de crecimiento en la síntesis de los dendrímeros BAPAD, da lugar a una posición relativa 1-3 entre los grupos amino terminales en las estructuras dendriméricas. Esta proximidad de los grupos periféricos puede promover un empaquetamiento superficial extremadamente denso que, junto con el *back-folding* (plegamiento de la estructura hacia el interior), puede llegar a inhibir reacciones de los grupos terminales por impedimentos estéricos, impidiendo de esta manera la obtención de estructuras dendriméricas BAPAD de generaciones superiores a la tercera.<sup>117</sup> La menor reactividad de los grupos amino puede afectar, no solo en la dificultad de obtener dendrímeros de mayor generación, sino que también puede contribuir a la funcionalización incompleta de los grupos amino terminales necesarios para ciertas bioaplicaciones.<sup>118</sup>

Se nos planteó por tanto la necesidad de sintetizar estructuras dendriméricas estables, biocompatibles, solubles en agua y que minimicen los efectos estéricos a la hora de incorporar otras funcionalidades en su superficie para aplicaciones biológicas.

De este modo, esta tesis doctoral se ha centrado en el diseño, la síntesis y caracterización de nuevas estructuras dendriméricas donde los grupos amino superficiales se encuentren más alejados. De este modo, en este trabajo de tesis se proponen estructuras en las que dichos grupos queden en posiciones relativas 1,7, lo que formalmente implica la preparación de dendrímeros y dendrones con brazos más largos que podrán minimizar los problemas de congestión estérica.



## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**



En base a la necesidad manifiesta de poder disponer de estructuras dendriméricas estables, que puedan sintetizarse a gran escala y cuyos grupos amino-terminales puedan ser funcionalizados de forma eficiente con diferentes moléculas de interés biológico, y gracias a la amplia experiencia del grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis en el campo de los dendrímeros, tanto en el empleo de dendrímeros comerciales para diferentes aplicaciones en biomedicina, como en el diseño y síntesis de nuevas estructuras dendriméricas, se proponen los siguientes objetivos para este trabajo de tesis doctoral:

1. El diseño y la síntesis de nuevas estructuras dendriméricas amino terminales basadas en enlace tipo amida, en las que los grupos amino de la periferia queden en posiciones relativas 1,7, con objeto de minimizar los problemas ocasionados por impedimentos estéricos. Se diseñarán dendrímeros y dendrones con diferente funcionalización en el punto focal.
2. El empleo de las nuevas estructuras dendriméricas obtenidas en el diseño y síntesis de nuevos materiales funcionalizados convenientemente para su aplicación en varios campos, en particular:
  - 2.1 Preparación de nuevos dendrímeros antigénicos. Estos se ensayarán en la obtención de nuevos materiales empleados en la detección *in vitro* de alergia a fármacos, concretamente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos.
  - 2.2 Preparación de dendrímeros recubiertos en su periferia con péptidos que contengan la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) para su estudio en procesos de condrogénesis y diferenciación celular para aplicación en procesos de regeneración tisular.
  - 2.3 Preparación de estructuras dendriméricas amino terminales con núcleo luminiscente para el estudio de su posible aplicación como biomarcadores. En particular, la síntesis de estructuras que contengan complejos de Pt (II), con una fosforescencia tal que sea capaz de funcionar como marcador eficiente en técnicas FLIM y la síntesis de estructuras que contengan un núcleo de naftalimida, con una fluorescencia tal que sea capaz de funcionar como marcador eficiente bajo condiciones de excitación mono y bifotónica.



## **CAPÍTULO III**

# **SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS ESTRUCTURAS DENDRIMÉRICAS AMINO TERMINALES**



### III.1 Síntesis de nuevos dendrímeros amino terminales

En este trabajo se ha propuesto la síntesis, a través de una metodología divergente, de nuevos dendrímeros basados en enlaces amida con grupos amino terminales en los que la posición relativa de dichos grupos es 1-7, dando lugar a estructuras menos congestionadas.

La unidad estructural elegida de crecimiento (monómero) de estos dendrímeros es el ácido 5-amino-2-(3-aminopropil) pentanoico. Se ha elegido una única estructura tipo AB<sub>2</sub> sencilla que ya posee los grupos terminales en las posiciones relativas deseadas, mientras que el ácido carboxílico actúa como unidad de conexión. La ruta sintética diseñada para la obtención de este monómero consta de cuatro etapas en las que, inicialmente, se protege el grupo amino de la 3-bromopropilamina para dar lugar al compuesto **1**. Posteriormente se hace reaccionar **1** con di-*tert*-butil malonato dando como resultado el compuesto **2**, cuyo tratamiento en medio ácido a alta temperatura da lugar a **3**. Por estrategia sintética, es necesario que los grupos amino de este monómero se encuentren protegidos, de modo que, se lleva a cabo la protección de los grupos aminos de **3** para originar el monómero deseado **4**.

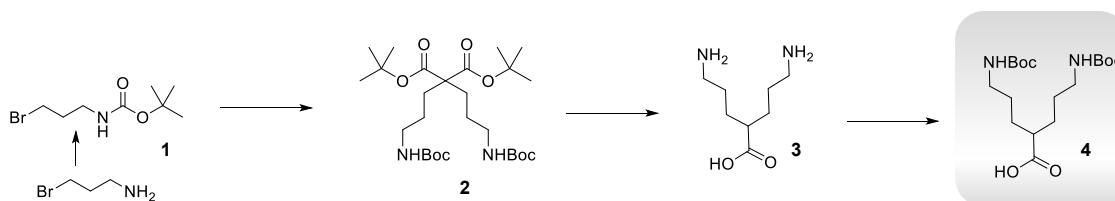


Figura 16. Esquema sintético del monómero o unidad de crecimiento (**4**)

Para la formación de la estructura dendrímica de primera generación (Figura 17), se lleva a cabo el acoplamiento entre dos unidades de monómero **4** y etilendiamina, elegida como núcleo del dendrímero. Para ello, se realiza un paso intermedio de activación del grupo ácido carboxílico de **4** originando el compuesto **5**.

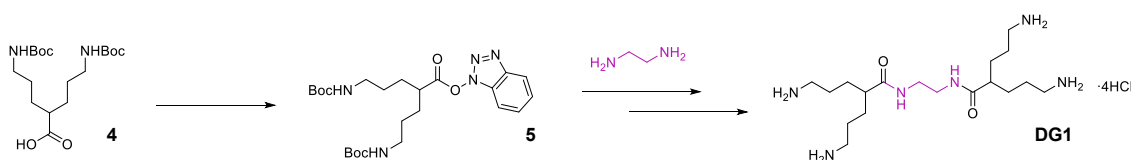


Figura 17. Esquema sintético de **DG1**

La ruta sintética para la obtención de generaciones superiores, esquematizada en la Figura 18, se basa en la sucesión de dos pasos:

- Acoplamiento entre el monómero activado (**5**) y los grupos amino periféricos del dendrímero mediante la formación de enlaces tipo amida.
- Desprotección de los grupos amino terminales.

Así, mediante reacciones iterativas de acoplamiento/desprotección se ha conseguido sintetizar hasta la quinta generación de esta familia de dendrímeros de poliamida, donde el número de grupos amino terminales se va duplicando con el aumento de las generaciones. Por tanto, se han sintetizado estructuras dendriméricas con 4, 8, 16, 32 y 64 grupos amino periféricos.

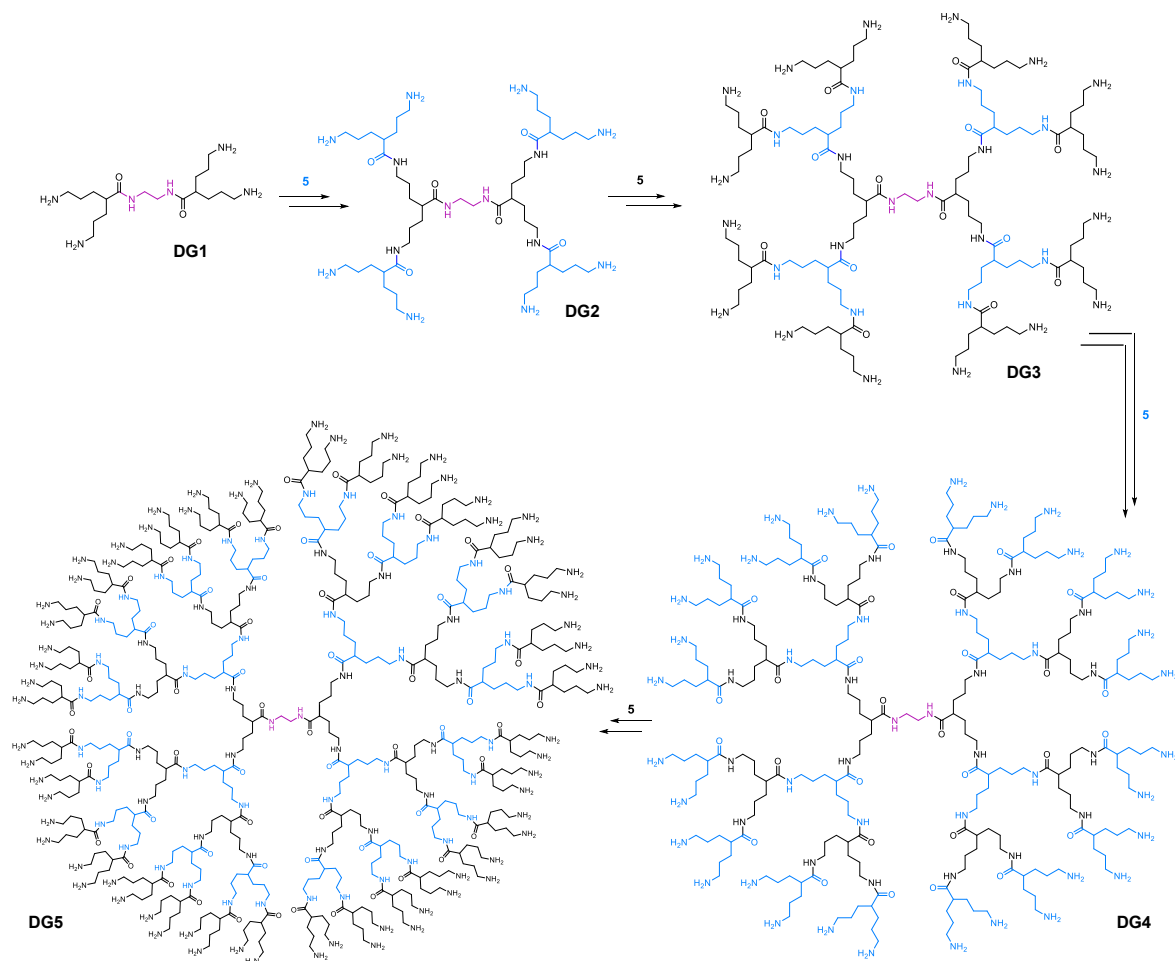


Figura 18. Esquema sintético dendrímeros

### III.1.1. Síntesis del monómero (**4**)

Para la síntesis de **4** se ha diseñado la ruta sintética mostrada en la Figura 16, en la que se parte de 3-bromopropilamina comercial. Tras proteger el grupo amino, se hace reaccionar con di-*tert*-butil malonato dando lugar al compuesto **2** cuya descarboxilación y posterior protección de los grupos amino originan el monómero **4**.

### III.1.1.1. Síntesis de *tert*-butil (3-bromopropil)carbamato (**1**)

La primera reacción para la síntesis del monómero, es la protección del grupo amino de la 3-bromopropilamina con di-*tert*-butil dicarbonato (Boc<sub>2</sub>O). Para ello, se emplea diclorometano como disolvente y la reacción se lleva a cabo en presencia de trietilamina (Figura 19).<sup>119</sup>

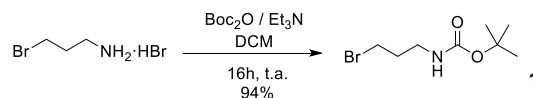


Figura 19. Síntesis de **1**

El compuesto **1** se ha obtenido con un rendimiento del 94% en escala de multigramo. Se ha caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón y carbono (Figura 139 y Figura 140 del ANEXO) así como por espectrometría de masas, donde se obtienen los picos correspondientes al catión  $[M+H]^+$  a  $m/z$  239.039 - 241.0370. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **1** se observa que aparece un singlete a 1.44 ppm correspondiente a las señales de los 9H de los metilos del grupo protector introducido en la estructura.

### III.1.1.2. Síntesis de di-*tert*-butil 2,2-bis(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propil)malonato (**2**)

El segundo paso en la síntesis de **4** es el acoplamiento de dos moléculas de **1** con di-*tert*-butil malonato.<sup>120</sup> Se han realizado numerosos ensayos para optimizar este proceso ya que, inicialmente, se observaba la introducción en la molécula de una única cadena alquílica como producto mayoritario, obteniendo, por tanto, rendimientos muy bajos para el producto deseado. Todas las condiciones de reacción ensayadas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de reacción ensayadas

Tiempo (h)	Base	Temperatura	Relación de equivalentes di- <i>tert</i> -butil malonato- <b>1</b>	Mmoles de di- <i>tert</i> -butil malonato- <b>1</b>	Volumen disolvente (mL)	Rendimiento
16	NaH	Reflujo	1-2.5	0.45-1.13	5	38%
16	NaH	t.a.	1-2.5	0.45-1.13	5	33%
16	LDA	t.a.	1-2.5	0.45-1.13	10	-
4	NaH	t.a.	1-2.5	0.27-0.67	5	24%
4	NaH	Reflujo	1-2.5	0.27-0.67	5	20%
16	NaH	Reflujo	1-4	0.45-1.8	5	30%
48	NaH	Reflujo	1-2.5	0.45-1.13	5	32%
16	NaH	t.a.	1-2.5	4.46-11-15	20	80%
16	NaH	t.a.	1-4	0.45-1.79	20	93%
16	NaH	t.a.	1-2.5	28.66-71.66	30	92%

Finalmente, el factor relevante en esta optimización ha resultado ser el volumen de tetrahidrofurano anhidro empleado. Se ha observado que ni la temperatura, ni el tiempo de reacción, ni un mayor exceso de reactivo, afectan al desplazamiento de la reacción hacia la síntesis del producto

disustituido tanto como la cantidad de disolvente. Además, como se puede ver en la última fila de la tabla anterior, el escalado a multigramos no afecta negativamente al rendimiento. Finalmente, la reacción se ha llevado a cabo en tetrahidrofurano anhidro, en presencia de hidruro sódico, a temperatura ambiente durante una noche. Tras la extracción y purificación por cromatografía en columna se obtiene el compuesto **2** en escala de multigramo como un sólido incoloro con un rendimiento del 92%.

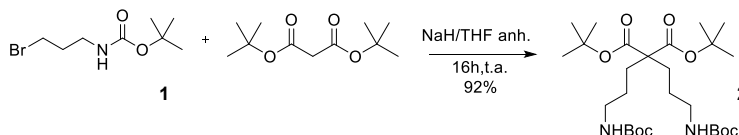


Figura 20. Síntesis de **2**

Mediante espectrometría de masas se observa el pico asociado a  $[M + Na]^+$  a  $m/z$  553.3462. Además, el compuesto obtenido se ha caracterizado completamente por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 141 - Figura 144 del ANEXO). En el espectro de protón del compuesto **2** (Figura 141 del ANEXO) se observan las señales a 3.10, 1.79 y 1.35 ppm correspondientes a los metilenos de la estructura. Además, se aprecian dos singletes a 1.44 y 1.43 ppm que integran por 18H, correspondientes a los metilos provenientes de los grupos protectores Boc.

### III.1.1.3. Síntesis de ácido 5-amino-2-(3-aminopropil)pentanoico (**3**)

El siguiente paso en la síntesis del monómero consiste en la descarboxilación de **2**.<sup>120</sup> Para ello, es necesario disolver dicho compuesto en una mezcla de ácido acético y HCl 3 M y calentar a reflujo durante una noche. En este proceso ocurre tanto la desprotección de los grupos aminos como la pérdida de una molécula de CO<sub>2</sub>. Tras enfriar a temperatura ambiente y eliminar completamente el disolvente, se obtiene **3** como un sólido viscoso e incoloro de manera cuantitativa. Como se pretendía, el compuesto **3** ya incluye en su estructura dos grupos aminos terminales en posiciones relativas 1,7 y conforma la estructura base en la formación y crecimiento de los dendrímeros.

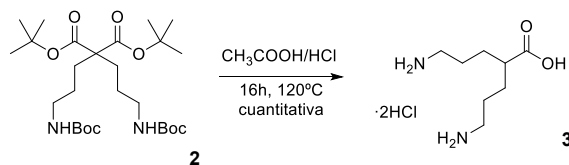


Figura 21. Síntesis de **3**

El compuesto **3** ha sido caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 145 - Figura 148 del ANEXO) y por espectrometría de masas donde se encuentra el pico asociado al catión  $[M + H]^+$  a  $m/z$  175.1440.

### III.1.1.4. Síntesis de ácido 5-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propil)pentanoico (**4**)

La protección de los grupos aminos del compuesto **3** da lugar al monómero empleado en la formación y crecimiento de las estructuras dendríméricas. El grupo protector *tert*-butoxicarbonilo (Boc) ha sido elegido ya que implica reacciones de protección/desprotección bien descritas, fáciles de llevar a cabo y prácticamente cuantitativas. La estrategia sintética de proteger estos grupos es estrictamente necesaria para evitar tanto reacciones intramoleculares como reacciones intermoleculares no deseadas entre los grupos aminos y el grupo ácido carboxílico. La reacción entre **3** y el grupo protector di-*tert*-butil dicarbonato en las condiciones descritas en la Figura 22, da lugar al compuesto **4** como un aceite incoloro con un rendimiento del 94%.

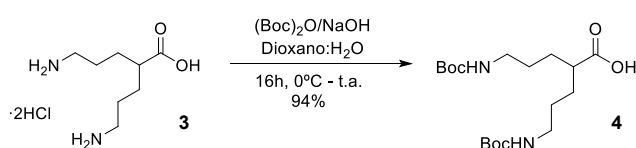


Figura 22. Síntesis de **4**

Este compuesto ha sido completamente caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 149 - Figura 152 del ANEXO), así como por espectrometría de masas donde se observa el pico correspondiente al catión  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  a  $m/z$  397.2309. El espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Figura 149 del ANEXO) muestra, además de las señales correspondientes a los metilenos que ya se observaban en el compuesto **3**, un singlete a 1.40 ppm correspondiente a los 18H de los metilos de los grupos protectores introducidos en **4**. En esta figura se observa por primera vez la distribución de las señales correspondientes a la estructura base de estos dendrímeros, que como se verá más adelante, sigue este patrón de distribución en los espectros de protón.

### III.1.2. Síntesis de **DG1**

Para la síntesis del dendrímero de primera generación (**DG1**) se ha diseñado la ruta sintética mostrada en la Figura 23, en la que la formación de los enlaces amidas para la construcción de **DG1-NHBoc** consta de dos etapas. La primera de ellas es la activación del grupo ácido carboxílico presente en **4**, dando lugar al compuesto **5**. La segunda etapa es el acoplamiento entre dos unidades de **5** y etilendiamina para la obtención del dendrímero **DG1-NHBoc**. La desprotección de los grupos aminos terminales da lugar a **DG1**.

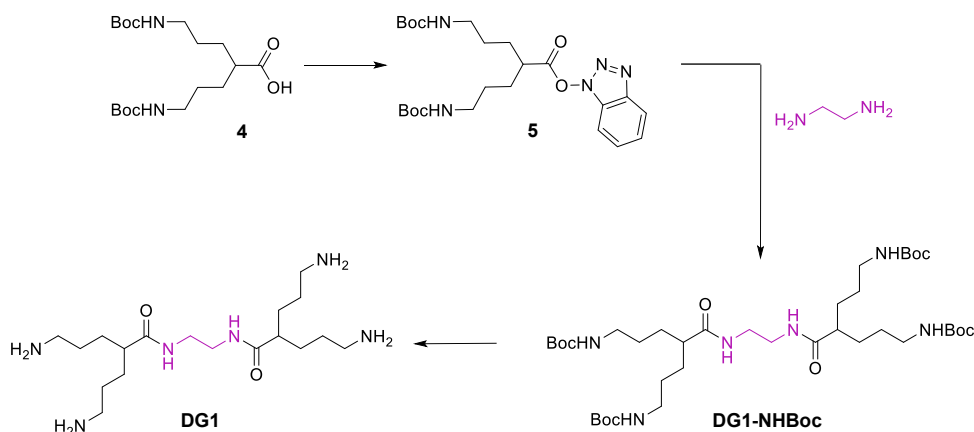


Figura 23. Esquema sintético de **DG1**

### III.1.2.1. Síntesis de 5-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propil)pentanoato de 1H-benzo[1,2,3]triazol-1-ilo (**5**)

La activación del ácido carboxílico con 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt), se lleva a cabo en condiciones anhidras, empleando DCM anhidro como disolvente y en presencia de la carbodiimida EDCI. Tras una noche en agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se elabora lavando con agua, HCl diluido y una disolución de NaHCO<sub>3</sub> 1M para eliminar el exceso de los reactivos añadidos. El producto formado, como un sólido viscoso incoloro, se obtiene con un rendimiento del 90%, estable si se mantiene en frío aproximadamente durante un mes, tiempo a partir del cual empieza a observarse la hidrólisis del grupo benzotriazol.

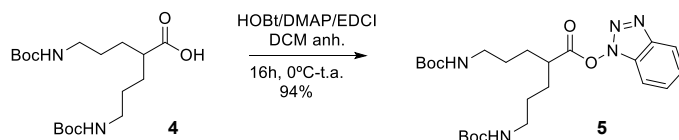


Figura 24. Síntesis de **5**

El compuesto **5** ha sido caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón y carbono (Figura 153 y Figura 154 del ANEXO) así como por espectrometría de masas, donde se observa la señal correspondiente a  $[M + Na]^+$  a  $m/z$  514.2627. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **5** (Figura 153 del ANEXO) aparecen entre 8.07 y 7.40 ppm las señales correspondientes al anillo aromático insertado. También es característico el desplazamiento del singlete ancho correspondiente al protón “a”, de 2.33 ppm en el espectro de **4** (Figura 149 del ANEXO) a 2.97 ppm en **5**. Este desplazamiento es debido a que el entorno químico de dicho protón se ve afectado tras la reacción. Las señales correspondientes a los metilos del grupo protector Boc así como las correspondientes a los metilenos “b”, “c” y “d” aparecen prácticamente a los mismos desplazamientos en ambos espectros.

La asignación de señales y correlación entre protones y carbonos realizada se muestra en la Tabla 2.

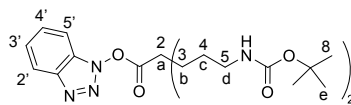


Tabla 2. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **5** (espectro en CDCl<sub>3</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
a	2	2.97 (s, 1H)	42.7
b	3	1.92-1.82 (m, 2H)	29.4
		1.83-1.75 (m, 2H)	
c	4	1.75-1.65 (m, 4H)	28.1
d	5	3.25-3.20 (m, 4H)	40.1
e	8	1.44 (s, 18H)	28.5
	2'	8.06 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H)	129.0
	3'	7.46-7.38 (m, 2H)	125.0
	4'		108.4
	5'	7.80-7.50 (m, 1H)	120.7

### III.1.2.2. Síntesis de DG1-NHBoc

La síntesis de **DG1-NHBoc** se realiza a través de la formación de dos enlaces amidas entre el compuesto **5** y etilendiamina, elegida como núcleo de la estructura dendrímica. Esta reacción se lleva a cabo en DCM anhidro, en presencia de trietilamina, durante una noche a temperatura ambiente. Tras la elaboración de la reacción se obtiene **DG1-NHBoc** con buen rendimiento sin necesidad de purificar.

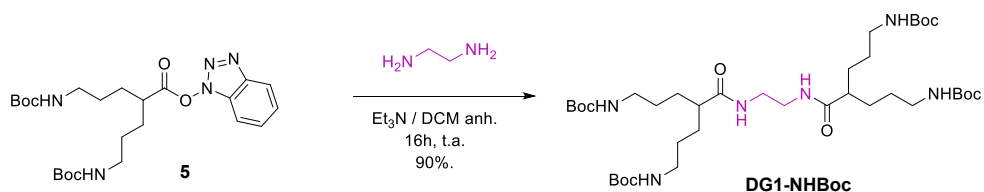


Figura 25. Síntesis de **DG1-NHBoc**

Por espectrometría de masas (MALDI-TOF) en matriz de DT se observa el pico correspondiente al ion  $[M + Na]^+$  a  $m/z$  795.9.

Este compuesto ha sido completamente caracterizado por resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C (SEFT), COSY y HSQC (Figura 155 - Figura 158 del ANEXO). En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de

**DG1NHBoc** (Figura 155 del ANEXO) se observa cómo la señal correspondiente a los metilenos terminales “d”, se desplaza a 2.89-2.80 ppm respecto de 3.25-3.20 ppm que aparecía en el espectro de **5** (Figura 153 del ANEXO). También se observa la aparición de la señal a 3.06 ppm, que integra por los 4H correspondiente a los protones del núcleo de etilendiamina. Otro dato significativo es el desplazamiento de la señal correspondiente a los protones “a” de 2.97 ppm en **5** a 2.03 ppm en **DG1-NHBoc**. Este desplazamiento es debido a que el entorno químico de ese protón se ve directamente afectado por la formación del enlace amida tras la reacción.

En la Tabla 3 se recoge la correlación entre las señales de protón y carbono de **DG1-NHBoc**.

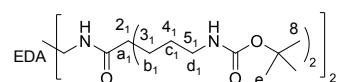


Tabla 3. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **DG1-NHBoc** (espectro en DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
EDA		3.10-3.03 (m, 4H)	38.3
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.03 (s, 2H)	45.3
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.40-1.33 (m, 4H)	29.8
		1.30-1.20 (m, 4H)	
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.30-1.20 (m, 8H)	27.6
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	2.89-2.80 (m, 8H)	39.8
e	8	1.40-1.33 (m, 36H)	28.3

### III.1.2.3. Síntesis de DG1

Mediante el tratamiento de **DG1-NHBoc** en medio ácido se produce la desprotección de los grupos aminos terminales de la estructura dendrímica, de este modo se obtiene **DG1** como un sólido viscoso de manera cuantitativa sin necesidad de purificación.

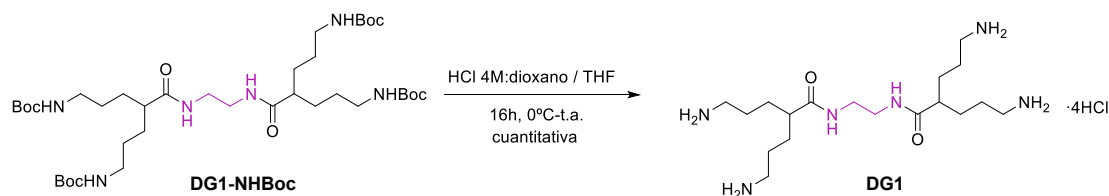


Figura 26. Síntesis de **DG1**

Mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) se confirma la formación del producto ya que se observa el pico a *m/z* 395.4 correspondiente a [M+Na]<sup>+</sup>. La matriz empleada para ello ha sido DHB.

Se ha caracterizado **DG1** mediante técnicas de resonancia magnética nuclear homonuclear de protón y carbono (Figura 159 - Figura 160 del ANEXO) asignándose todas sus señales con ayuda de los espectros bidimensionales de resonancia magnética nuclear heteronuclear COSY y HSQC (Figura 161 - Figura 162 del ANEXO). En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  de **DG1** (Figura 27 a) y Figura 41) aparece el singlete correspondiente a los metilenos del núcleo de etilendiamina “EDA” a 3.13 ppm, el multiplete de los metilenos terminales “d<sub>1</sub>” a 2.82-2.69 ppm y el singlete ancho correspondiente al protón del carbono terciario “a<sub>1</sub>” a 2.38 ppm. Cabe destacar que las señales correspondientes a los metilenos “b<sub>1</sub>” en  $\alpha$  al carbono terciario se desdoblan entre el multiplete de 1.56-1.46 ppm, donde solapan con la señal de los metilenos restantes “c<sub>1</sub>”, y el multiplete de 1.35-1.30 ppm. Este hecho se sigue observando a lo largo de las distintas generaciones de esta familia de dendrímeros. En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (SEFT) (Figura 27 b)) se identifica la señal correspondiente al carbono terciario “2<sub>1</sub>” a 43.9 ppm, que aparece como un carbono secundario. Las señales correspondientes a los metilenos “3<sub>1</sub>” y “4<sub>1</sub>” aparecen a 29.3 y 24.8 ppm respectivamente y, sobre 40 ppm, se observan las señales correspondientes a los carbonos de etilendiamina “EDA” y a los carbonos terminales de la estructura “5<sub>1</sub>”, muy cerca de la señal residual de DMSO- $d_6$ . Este patrón de distribución de señales se repite a lo largo de las generaciones.

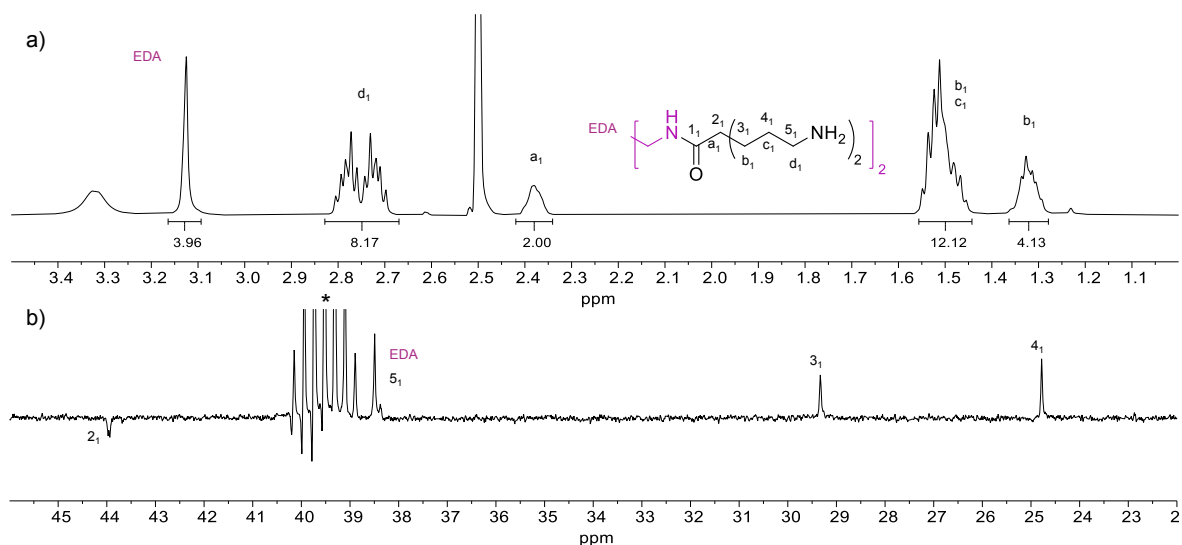


Figura 27. Espectros de **DG1** (DMSO- $d_6$ ) \* a) RMN- $^1\text{H}$  y b) RMN- $^{13}\text{C}$  (SEFT)

La correlación entre las señales de protón y carbono se recogen en la Tabla 4.

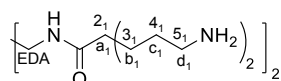


Tabla 4. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **DG1** (espectro en DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
EDA		3.13 (s, 4H)	38.4
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.38 (s, 2H)	43.9
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.56-1.46 (m, 4H)	29.3
		1.35-1.30 (m, 4H)	
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.56-1.46 (m, 8H)	24.8
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	2.82-2.69 (m, 8H)	38.5

### III.1.3. Síntesis de **DG2**

La síntesis de **DG2**, al igual que las reacciones de crecimiento de las generaciones posteriores, consta de dos etapas (Figura 28). La primera de ellas es el crecimiento del dendrímero mediante el acoplamiento de **DG1** con el monómero activado (**5**) para dar lugar al dendrímero de segunda generación con los grupos aminos protegidos. Posteriormente tiene lugar la desprotección de dichos grupos dando lugar a **DG2**.

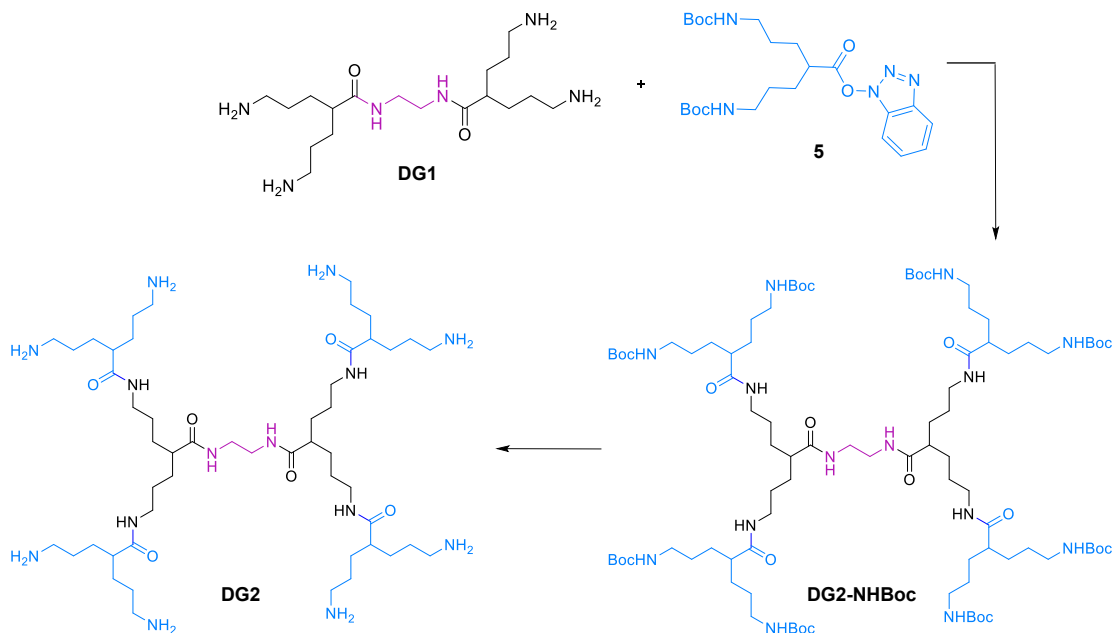


Figura 28. Esquema sintético de **DG2**

### III.1.3.1. Síntesis de DG2-NHBoc

La formación de **DG2-NHBoc** consiste en el acoplamiento, mediante enlaces amidas, entre **DG1** y 4 unidades del compuesto **5**.

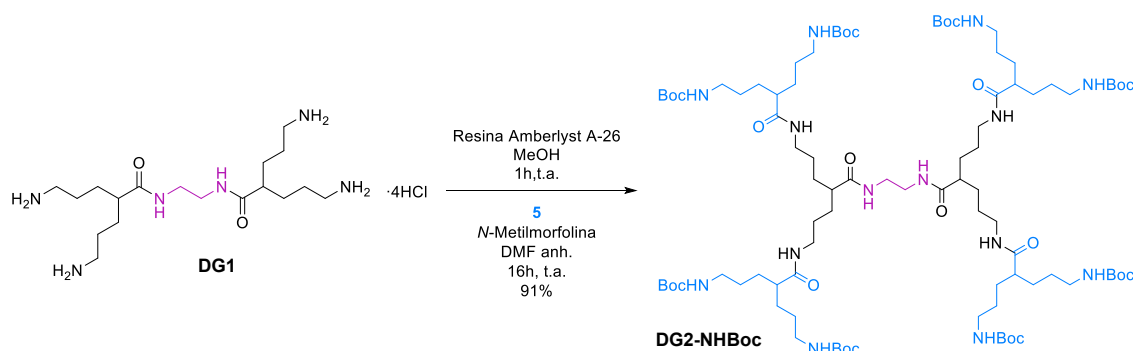


Figura 29. Síntesis de **DG2-NHBoc**

**DG1** se trata con la resina de intercambio iónico Amberlist A-26. En este proceso, mediante RMN-<sup>1</sup>H se observa un desplazamiento a campo alto de todas las señales (a excepción de las correspondientes al núcleo de etilendiamina “EDA”) tal y como se muestra en la Figura 30. No obstante, la señal correspondiente a los metilenos terminales “d<sub>1</sub>” son las que se desplazan de manera más drástica, de 3.01 ppm en el compuesto como sal de amonio a 2.63 ppm en el dendrímtero con los grupos aminos libres. Es lógico que sean éstas las señales que más se desplazan ya que son las que se encuentran en α a los grupos aminos afectados.

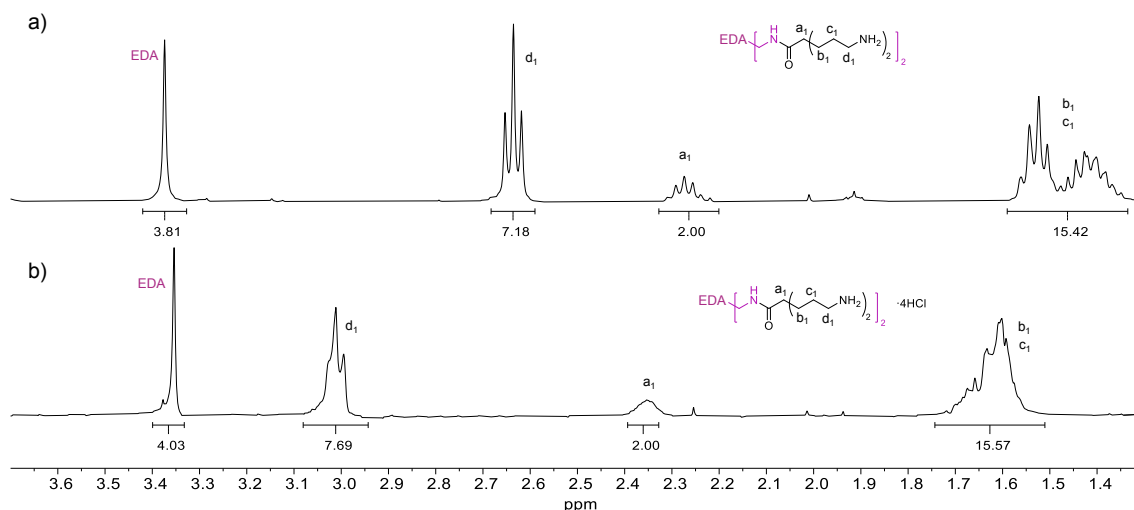


Figura 30. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de **DG1** en D<sub>2</sub>O a) después del tratamiento con resina y b) antes del tratamiento con resina

Una vez comprobado por RMN-<sup>1</sup>H que los grupos terminales se encuentran como aminos libres, se hace reaccionar **DG1** con un exceso de **5**, bajo condiciones anhidras y en presencia de *N*-

metilmorfolina. Tras una noche en agitación a temperatura ambiente se obtiene **DG2-NHBoc** sin necesidad de purificación, como un sólido incoloro, con un rendimiento de 91%.

Se ha caracterizado **DG2-NHBoc** completamente por resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (SEFT), COSY y HSQC (Figura 163 - Figura 166 del ANEXO). El espectro de masas (MALDI-TOF) en matriz de DT muestra el pico asociado al ion molecular  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  a  $m/z$  1822.6.

En la Figura 31 se muestran los espectros de RMN- $^1\text{H}$  de **DG1-NHBoc** y **DG2-NHBoc** en  $\text{DMSO-}d_6$ . En el espectro de protón del dendrímero de primera generación (Figura 31 b)) aparece una señal a 2.85 ppm, asociada a los metilenos “d<sub>1</sub>”, mientras que en el espectro del dendrímero de segunda generación (Figura 31 a)) aparecen dos señales a 2.09 ppm y 2.86 ppm. Esto indica que hay dos tipos de metilenos en esta posición, los que ya se encontraban en la estructura dendrimérica “d<sub>1</sub>” que ahora quedan internos en la estructura y los que se acaban de introducir que ocupan la posición de metilenos terminales “d<sub>2</sub>”. El resto de las señales aparecen a desplazamientos similares en ambos espectros, variando los valores de sus integrales y observándose un ensanchamiento de las bandas.

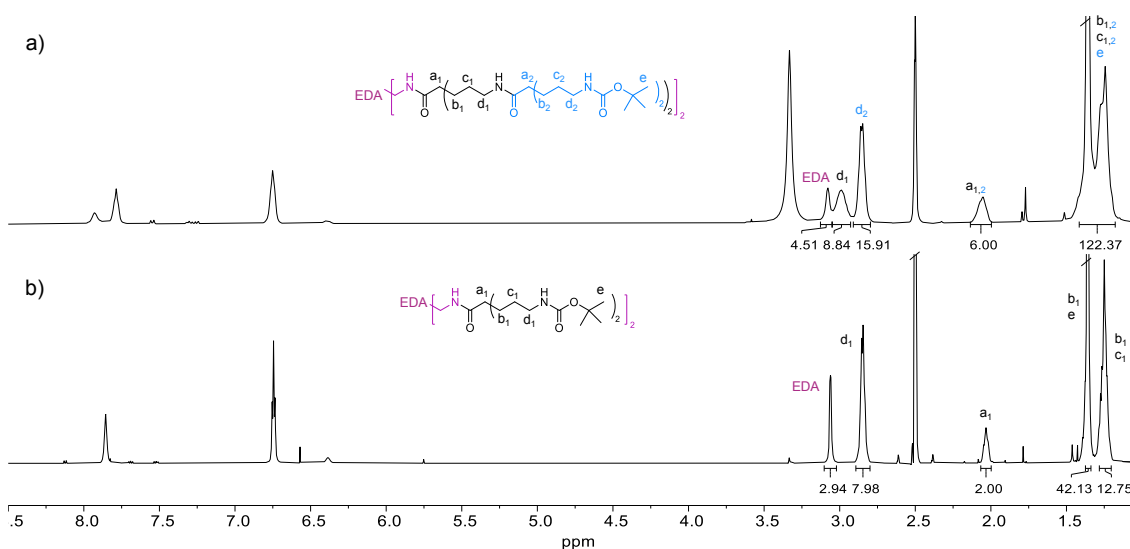


Figura 31. Espectros de RMN- $^1\text{H}$  de a) **DG2-NHBoc** y b) **DG1-NHBoc** en  $\text{DMSO-}d_6$

En el espectro obtenido por RMN- $^{13}\text{C}$  (SEFT) (Figura 32) se observan las señales correspondientes a los carbonos “6”, “7” y “8” del grupo protector di-*terc*-butil dicarbonato a 155.6, 77.3 y 28.3 ppm. También se aprecia la aparición de nuevas señales cercanas a las anteriores, correspondientes a los carbonos de la nueva generación. Así, se identifican “3<sub>1</sub>” y “3<sub>2</sub>” a 30.0 y 29.8 ppm y “4<sub>1</sub>” y “4<sub>2</sub>” a 27.2 y 27.6 ppm respectivamente, además de las señales de los carbonilos de las amidas formadas con etilendiamina “1<sub>1</sub>” a 174.9 ppm, y las amidas formadas en esta reacción de crecimiento con las aminas terminales de **DG1** y el monómero activado, “1<sub>2</sub>” a 174.5 ppm.

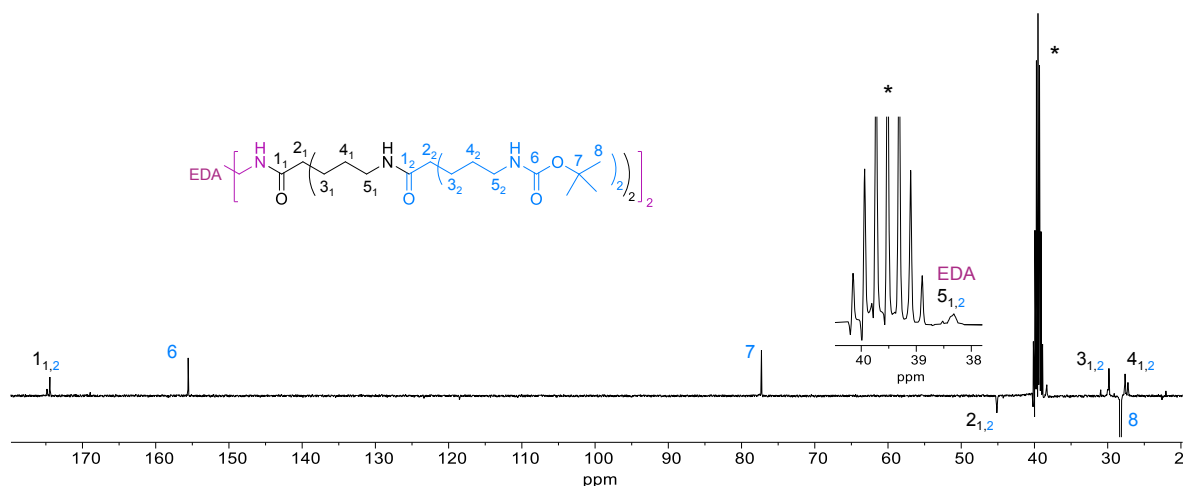


Figura 32. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DG2NHBoc** en DMSO-*d*<sub>6</sub>\*

Se han realizado también experimentos bidimensionales de resonancia magnética heteronuclear COSY y HSQC (Figura 165 y Figura 166 del ANEXO) que han sido muy útiles para la completa asignación de las señales tanto de protón como de carbono. La correlación de estas señales se recoge en la Tabla 5.

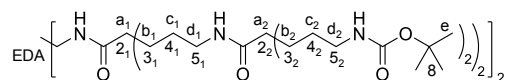


Tabla 5. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **DG2-NHBoc** (espectro en DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
EDA		3.08 (s, 4H)	38.3
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.13-2.00 (m, 2H)	45.1
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.40-1.32 (m, 4H)	30.0
		1.29-1.20 (m, 4H)	
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.40-1.32 (m, 8H)	27.2
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.05-2.93 (m, 8H)	38.5
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.13-2.00 (m, 4H)	45.1
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.40-1.32 (m, 8H)	29.8
		1.29-1.20 (m, 8H)	
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.40-1.32 (m, 16H)	27.6
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	2.91-2.80 (m, 16H)	39.8
e	8	1.40-1.32 (m, 72H)	28.3

### III.1.3.2. Síntesis de DG2

La desprotección de los grupos aminos de **DG2-NHBoc** con HCl 4M en dioxano da lugar a la estructura dendrímica de segunda generación amino terminal (**DG2**). Para llevar a cabo esta reacción de desprotección, primero se disuelve **DG2-NHBoc** en tetrahidrofurano y dicha mezcla se enfría en baño de agua-hielo donde, gota a gota, se añade el ácido mencionado para dejarla en agitación durante una noche. Tras este tiempo se elimina el disolvente completamente, se filtra en columna de Sephadex™ G-10 y se obtiene **DG2**, de manera cuantitativa, como un sólido viscoso.

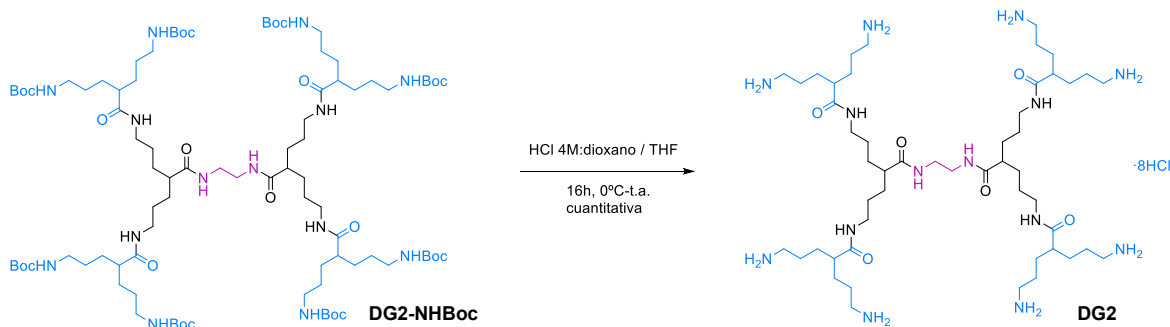


Figura 33. Síntesis de **DG2**

Mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), empleando DHB como matriz, se observa el pico asociado a  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  1020.5.

Este compuesto también está completamente caracterizado por técnicas de resonancia magnética nuclear de  $^1H$ ,  $^{13}C$  (SEFT), COSY y HSQC (Figura 41 y Figura 167 - Figura 170 del ANEXO). La correlación entre las señales de protón y carbono se recoge en la Tabla 6.

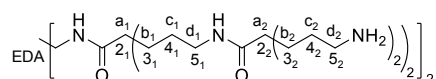


Tabla 6. Correlación de las señales en RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  en **DG2** (espectro en DMSO- $d_6$ )

Posición		RMN- $^1H$ (ppm)	RMN- $^{13}C$ (ppm)
EDA		3.11-2.90 (m, 4H)	38.4
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.32-2.15 (m, 2H)	45.2
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.56-1.22 (m, 8H)	30.1
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.56-1.22 (m, 8H)	27.3
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.11-2.90 (m, 8H)	38.6
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.32-2.15 (m, 4H)	44.1
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.56-1.22 (m, 16H)	29.3
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.56-1.22 (m, 16H)	24.8
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	2.84-2.65 (m, 16H)	38.6

### III.1.4. Síntesis de **DG3**

La síntesis de **DG3** se lleva a cabo siguiendo el procedimiento general de crecimiento de dendrímeros descrito previamente.

#### III.1.4.1. Síntesis de **DG3-NHBoc**

Para la síntesis de **DG3-NHBoc** se lleva a cabo el acoplamiento de **DG2** con el compuesto **5** siguiendo el procedimiento general de crecimiento de dendrímeros descrito previamente. Una vez elaborada la reacción, para su purificación, se añade hexano para precipitación de **DG3-NHBoc** como un sólido incoloro con un rendimiento del 91%.

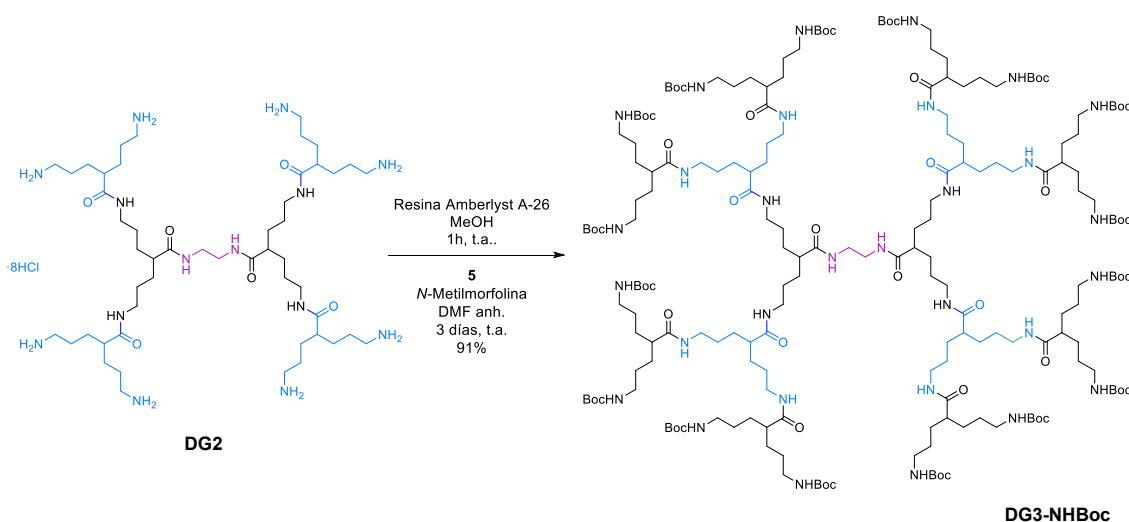


Figura 34. Síntesis de **DG3-NHBoc**

El espectro de masa (MALDI-TOF) en matriz de DT confirma la formación de **DG3-NHBoc** mediante la presencia del pico asociado a  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  3873.7.

Se ha caracterizado este compuesto por técnicas de resonancia magnética nuclear, y se ha comparado el espectro de RMN- $^1H$  de las tres generaciones de dendrímeros con los grupos amino protegidos (Figura 35). En ellos, se observa que en el espectro de **DG3-NHBoc** las señales correspondientes a los metilenos “d<sub>1</sub>” y “d<sub>2</sub>” se solapan en el mismo desplazamiento químico (en torno a 3.00 ppm) mientras que la señal de los metilenos “d<sub>3</sub>” aparece a 2.85 ppm donde, en los espectros de protón de **DG2-NHBoc** y **DG1-NHBoc**, se observaban “d<sub>2</sub>” y “d<sub>1</sub>” respectivamente. Es decir, las señales correspondientes a los metilenos terminales de cada generación van apareciendo al mismo desplazamiento químico (2.85 ppm) mientras que las señales asociadas a los metilenos “d” internos se van superponiendo unas con otras, además de con la señal correspondiente a EDA, a partir de la tercera generación. La distribución de las demás señales de protón de las tres generaciones es

prácticamente la misma, variando los valores de sus integrales, pero no sus desplazamientos químicos.

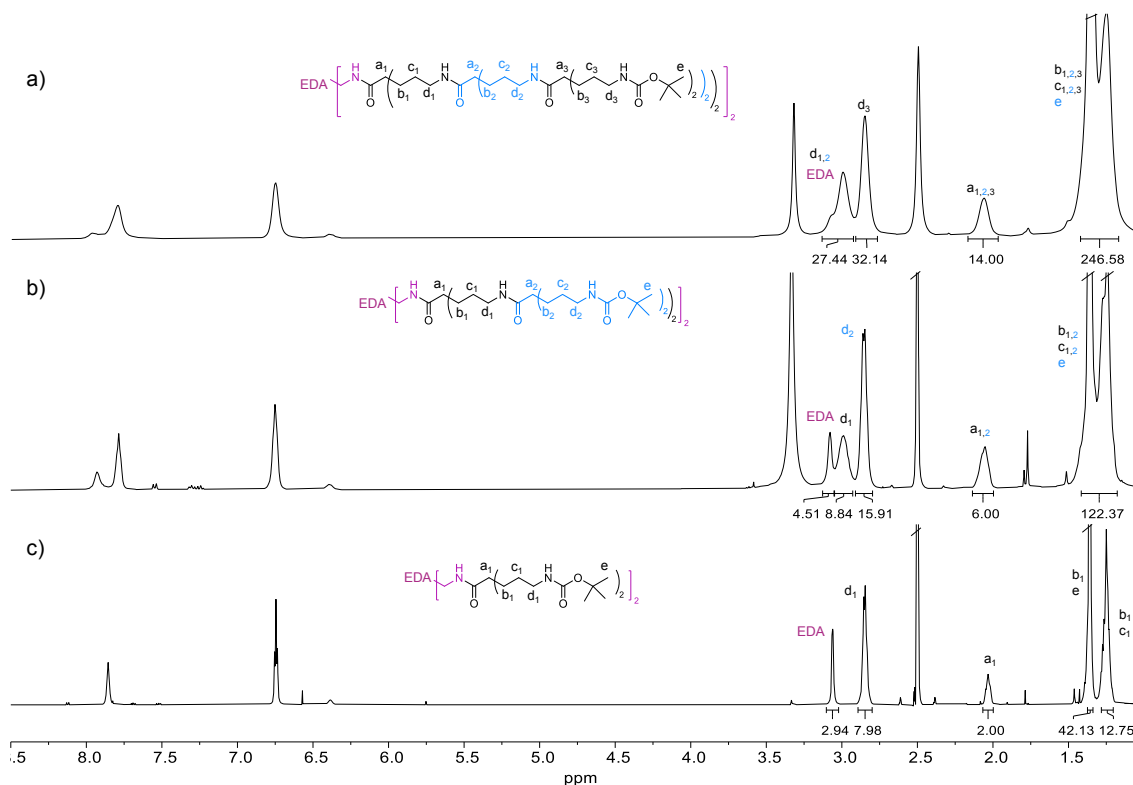
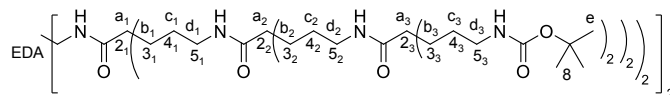


Figura 35. RMN- $^1\text{H}$  de a) DG3-NHBoc b) DG2-NHBoc y c) DG1-NHBoc en  $\text{DMSO-}d_6$

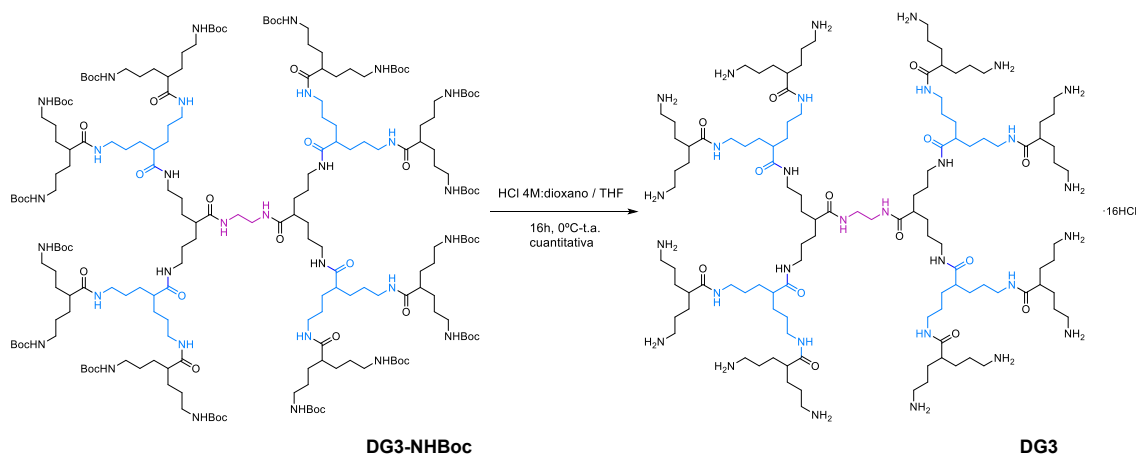
DG3NHBoc se ha caracterizado por resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (SEFT), COSY y HSQC (Figura 171 - Figura 174 del ANEXO). Con la ayuda de los experimentos bidimensionales se han asignado todas las señales. La correlación entre las señales de protón y de carbono se recoge en la Tabla 7.


 Tabla 7. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **DG3-NHBoc** (espectro en DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
EDA		3.13-2.93 (m, 4H)	38.3
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.16-1.98 (m, 2H)	45.1
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.48-1.17 (m, 8H)	30.0
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.48-1.17 (m, 8H)	27.3
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.13-2.93 (m, 8H)	38.3
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.16-1.98 (m, 4H)	45.1
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.48-1.17 (m, 16H)	29.8
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.48-1.17 (m, 16H)	27.6
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.13-2.93 (m, 16H)	38.3
a <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	2.16-1.98 (m, 8H)	45.1
b <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	1.48-1.17 (m, 32H)	29.8
c <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	1.48-1.17 (m, 32H)	27.6
d <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>	2.94-2.77 (m, 32H)	39.7
e	8	1.48-1.17 (m, 144H)	28.3

### III.1.4.2. Síntesis de DG3

Mediante el procedimiento general de desprotección de los grupos aminos, empleando HCl 4M en dioxano, y el posterior filtrado en columna de Sephadex™ G-15 se obtiene **DG3** cuantitativamente como un sólido viscoso.


 Figura 36. Síntesis de **DG3**

Este compuesto ha sido completamente caracterizado por técnicas de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (SEFT), COSY y HSQC (Figura 41 y Figura 175 - Figura 178 del ANEXO), los cuales han permitido la asignación de todas las señales y la correlación entre ellas que se recoge en la siguiente tabla:

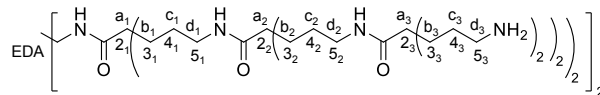


Tabla 8. Correlación de las señales en RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  en **DG3** (espectro en DMSO- $d_6$ )

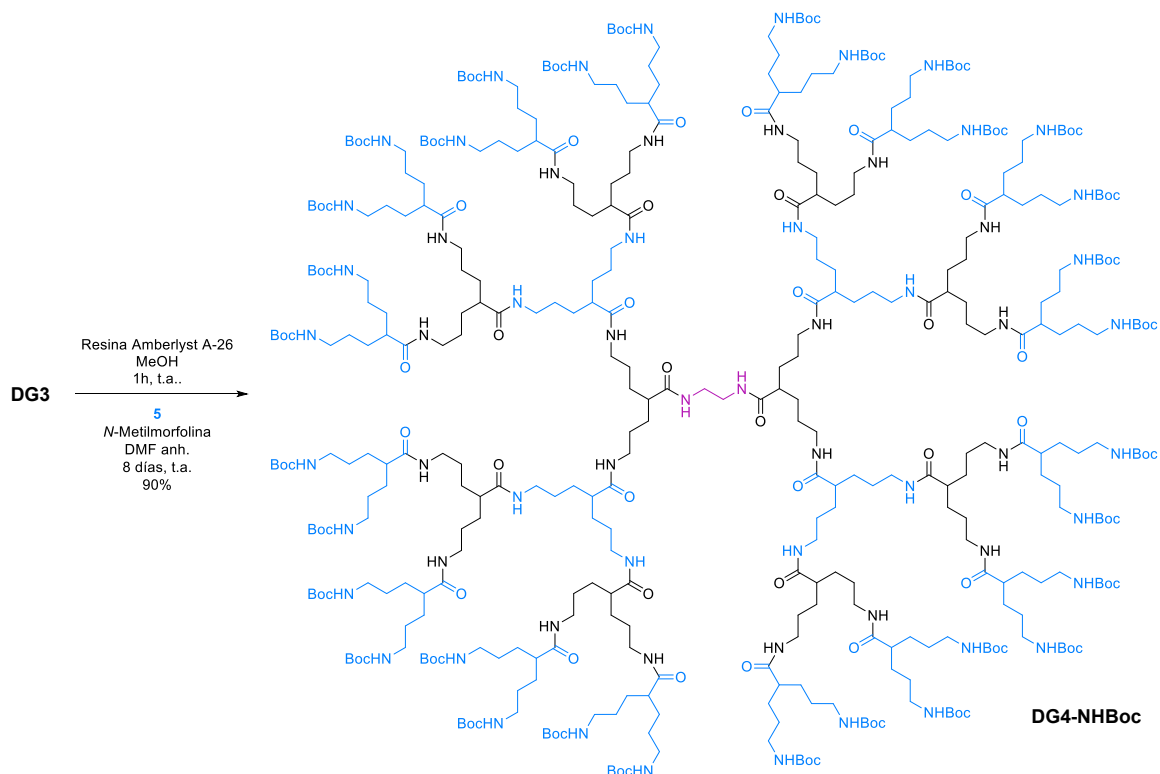
Posición		RMN- $^1\text{H}$ (ppm)	RMN- $^{13}\text{C}$ (ppm)
EDA		3.18-2.89 (m, 4H)	38.4
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.35-2.12 (m, 2H)	45.1
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.57-1.20 (m, 8H)	30.2
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.57-1.20 (m, 8H)	27.3
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.18-2.89 (m, 8H)	38.4
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.35-2.12 (m, 4H)	44.1
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.57-1.20 (m, 16H)	30.0
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.57-1.20 (m, 16H)	27.1
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.18-2.89 (m, 16H)	38.6
a <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	2.35-2.12 (m, 8H)	44.1
b <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	1.57-1.20 (m, 32H)	29.3
c <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	1.57-1.20 (m, 32H)	24.8
d <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>	2.84-2.67 (m, 32H)	38.6

### III.1.5. Síntesis de **DG4**

La síntesis del dendrímero amino terminal de cuarta generación se lleva a cabo en dos pasos, como en las generaciones anteriores.

#### III.1.5.1. Síntesis de **DG4-NHBoc**

La reacción de acoplamiento entre **DG3** y **5** para la formación de **DG4-NHBoc**, se lleva a cabo siguiendo el procedimiento previamente descrito.


 Figura 37. Síntesis de **DG4-NHBoc**

Tras el tratamiento de **DG3** con la resina de intercambio iónico, se hace reaccionar con un exceso **5**, en presencia de *N*-metilmorfolina, en DMF anhidra durante ocho días a temperatura ambiente. A los cuatro días, la mezcla de reacción se refresca con la misma cantidad de **5** y de *N*-metilmorfolina para forzar el sistema de reacción y que no quede ningún grupo amino de **DG3** sin reaccionar. Al cabo del tiempo indicado, se elimina el disolvente y el crudo de reacción se purifica mediante precipitación en hexano, dando lugar a **DG4-NHBoc** como un sólido incoloro con un rendimiento del 90%.

Se ha caracterizado **DG4-NHBoc** por RMN-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY y HSQC (Figura 179 - Figura 182 del ANEXO) observándose la misma tendencia en cuanto a las señales que las observadas para generaciones inferiores. La correlación entre las señales de protón y carbono se recoge en la Tabla 9.

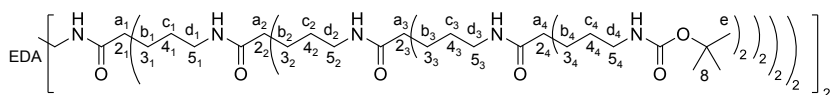


Tabla 9. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **DG4-NHBoc** (espectro en DMSO-d<sub>6</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
EDA		3.20-2.70 (m, 4H)	38.3
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.20-2.00 (m, 2H)	45.1
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.40-1.20 (m, 8H)	29.9
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.40-1.20 (m, 8H)	27.3
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.20-2.70 (m, 8H)	39.5
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.20-2.00 (m, 4H)	45.1
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.40-1.20 (m, 16H)	29.9
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.40-1.20 (m, 16H)	27.3
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.20-2.70 (m, 16H)	39.5
a <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	2.20-2.00 (m, 8H)	45.1
b <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	1.40-1.20 (m, 32H)	29.9
c <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	1.40-1.20 (m, 32H)	27.6
d <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>	3.20-2.70 (m, 32H)	39.5
a <sub>4</sub>	2 <sub>4</sub>	2.20-2.00 (m, 16H)	45.1
b <sub>4</sub>	3 <sub>4</sub>	1.40-1.20 (m, 64H)	29.9
c <sub>4</sub>	4 <sub>4</sub>	1.40-1.20 (m, 64H)	27.6
d <sub>4</sub>	5 <sub>4</sub>	3.20-2.70 (m, 64H)	39.5
e	8	1.40-1.20 (m, 288H)	28.2

### III.1.5.2. Síntesis de DG4

**DG4** se obtiene siguiendo el procedimiento general de desprotección de grupos aminos descrito anteriormente. Para ello se disuelve **DG4-NHBoc** en tetrahidrofurano, se enfría en baño de hielo y se adiciona, gota a gota, HCl 4M en dioxano. La mezcla de reacción se deja en agitación durante una noche y el producto deseado se obtiene cuantitativamente como un sólido viscoso tras la eliminación del disolvente y purificación por columna de exclusión por tamaño molecular de Sephadex™ G-15.

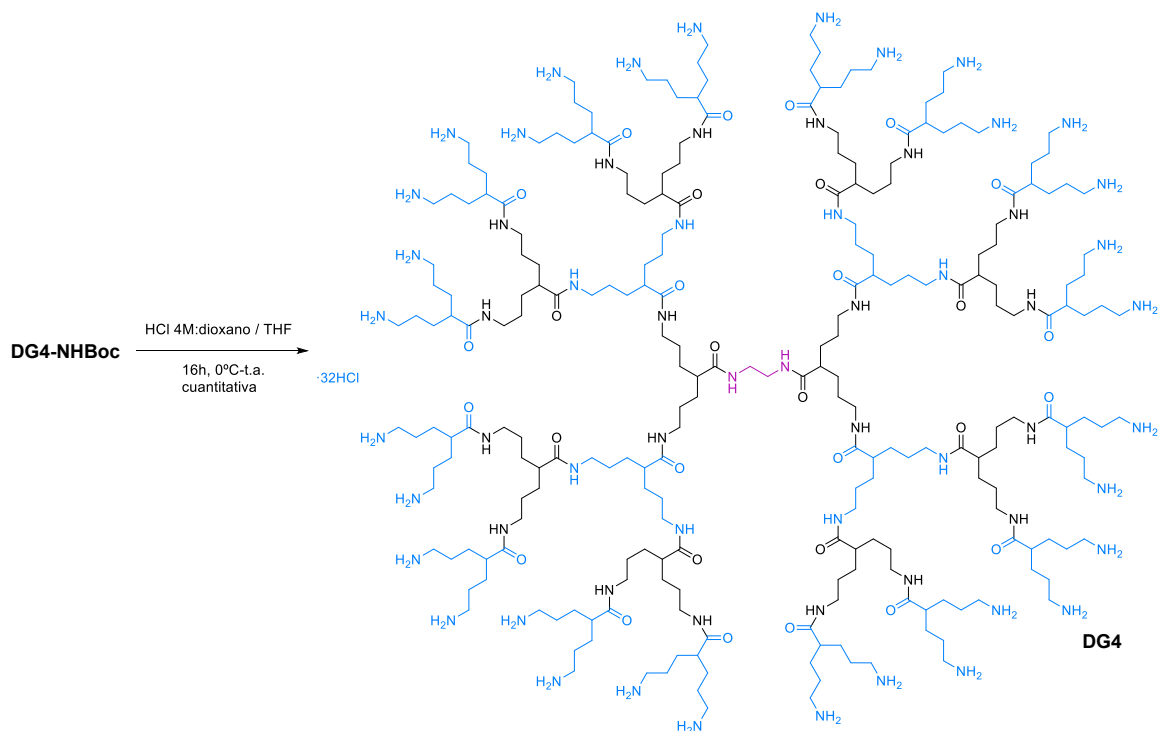


Figura 38. Síntesis de **DG4**

**DG4** se ha caracterizado mediante técnicas de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (SEFT), COSY y HSQC (Figura 41 y Figura 183 - Figura 186 del ANEXO) al igual que los dendrímeros sintetizados anteriormente. La correlación de las asignaciones de las señales de protón y carbono se recogen en la Tabla 10.

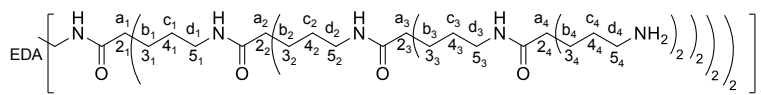


Tabla 10. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **DG4** (espectro en DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
EDA		3.17-2.90 (m, 4H)	38.5
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.34-2.16 (m, 2H)	45.0
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.60-1.21 (m, 8H)	30.2
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.60-1.21 (m, 8H)	24.8
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.17-2.90 (m, 8H)	39.5
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.34-2.16 (m, 4H)	45.0
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.60-1.21 (m, 16H)	29.3
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.60-1.21 (m, 16H)	24.8
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.17-2.90 (m, 16H)	39.5
a <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	2.34-2.16 (m, 8H)	44.1
b <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	1.60-1.21 (m, 32H)	29.3
c <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	1.60-1.21 (m, 32H)	24.8
d <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>	3.17-2.90 (m, 32H)	39.5
a <sub>4</sub>	2 <sub>4</sub>	2.34-2.16 (m, 16H)	44.1
b <sub>4</sub>	3 <sub>4</sub>	1.60-1.21 (m, 64H)	27.3
c <sub>4</sub>	4 <sub>4</sub>	1.60-1.21 (m, 64H)	24.8
d <sub>4</sub>	5 <sub>4</sub>	2.82-2.69 (m, 64H)	39.5

### III.1.6. Síntesis de **DG5**

Para la síntesis del dendrímico de quinta generación se siguen los pasos sucesivos de reacción de crecimiento con un exceso de monómero activado (**5**) seguido de la desprotección de los grupos amino terminales.

#### III.1.6.1. Síntesis de **DG5-NHBoc**

Mediante el procedimiento general de crecimiento de generación de los dendrímeros, se obtiene **DG5-NHBoc** a partir de **DG4**. Con la finalidad de asegurar la reacción completa de cada uno de los grupos amino presentes en **DG4** y debido a la dificultad de seguir la evolución de la reacción mediante cromatografía en capa fina o resonancia magnética nuclear, la mezcla de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante catorce días. A los días cuatro y ocho, se añade

la misma cantidad de **5** y de *N*-metilmorfolina que inicialmente. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se lleva a sequedad y el crudo de reacción se precipita en hexano, donde se obtiene **DG5-NHBoc** como un sólido incoloro con un rendimiento del 90%.

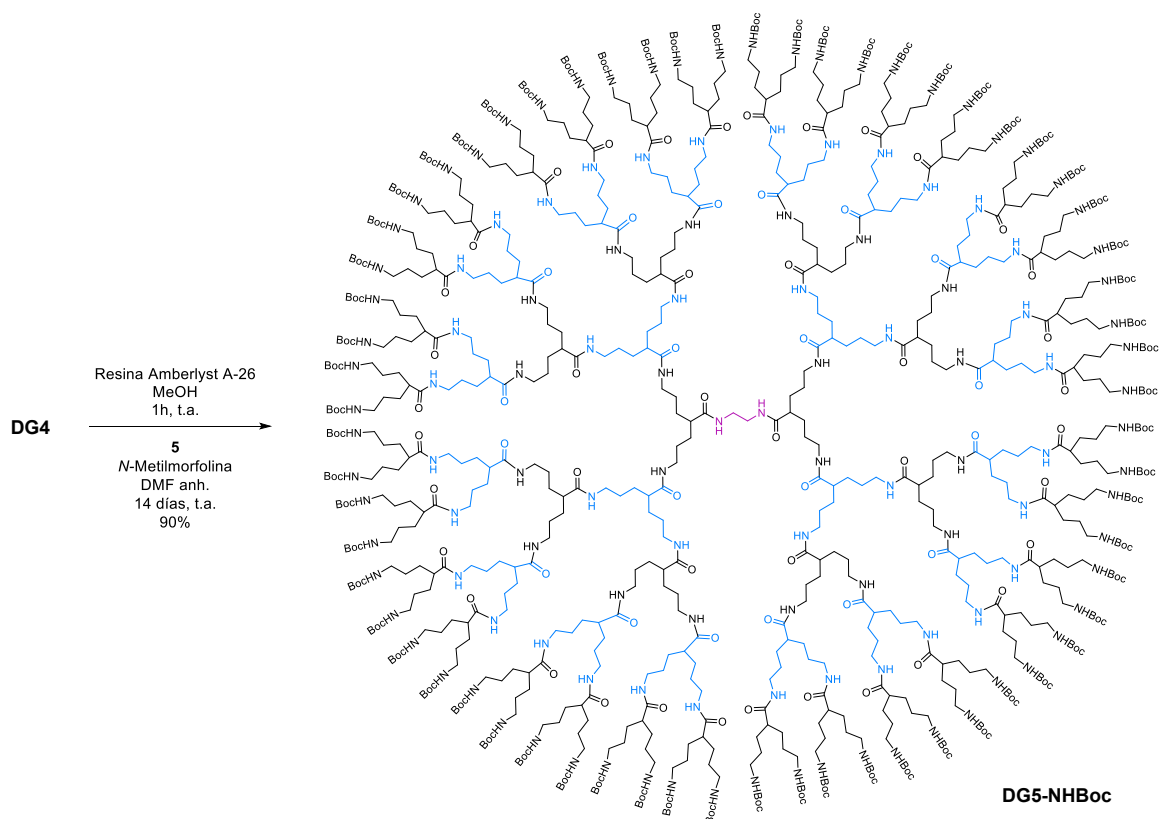


Figura 39. Síntesis de **DG5-NHBoc**

Se ha caracterizado **DG5-NHBoc** mediante técnicas mono y bidimensionales de resonancia magnética nuclear (Figura 187 - Figura 190 del ANEXO) recogándose en la Tabla 11 la correlación observada entre las señales de protón y carbono.

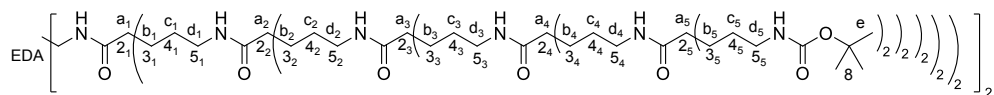


Tabla 11. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **DG5-NHBoc** (espectro en DMSO-d<sub>6</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
EDA		3.11-2.93 (m, 4H)	38.3
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.15-2.01 (m, 2H)	45.2
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.39-1.16 (m, 8H)	29.9
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.39-1.16 (m, 8H)	27.7
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.11-2.93 (m, 8H)	39.5
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.15-2.01 (m, 4H)	45.2
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.39-1.16 (m, 16H)	29.9
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.39-1.16 (m, 16H)	27.7
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.11-2.93 (m, 16H)	39.5
a <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	2.15-2.01 (m, 8H)	45.2
b <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	1.39-1.16 (m, 32H)	29.9
c <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	1.39-1.16 (m, 32H)	27.7
d <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>	3.11-2.93 (m, 32H)	39.5
a <sub>4</sub>	2 <sub>4</sub>	2.15-2.01 (m, 16H)	45.2
b <sub>4</sub>	3 <sub>4</sub>	1.39-1.16 (m, 64H)	29.9
c <sub>4</sub>	4 <sub>4</sub>	1.39-1.16 (m, 64H)	27.7
d <sub>4</sub>	5 <sub>4</sub>	3.11-2.93 (m, 64H)	39.5
a <sub>5</sub>	2 <sub>5</sub>	2.15-2.01 (m, 32H)	45.2
b <sub>5</sub>	3 <sub>5</sub>	1.39-1.16 (m, 128H)	29.9
c <sub>5</sub>	4 <sub>5</sub>	1.39-1.16 (m, 128H)	27.7
d <sub>5</sub>	5 <sub>5</sub>	2.90-2.81 (m, 128H)	39.5
e	8	1.39-1.16 (m, 288H)	28.3

### III.1.6.2. Síntesis de DG5

**DG5** se obtiene tras la desprotección de los grupos amino de **DG5-NHBoc** mediante el procedimiento previamente descrito, y posterior purificación mediante columna de exclusión por tamaño con Sephadex™ G-25 como fase estacionaria para dar lugar a **DG5** como un sólido muy higroscópico, de manera cuantitativa.

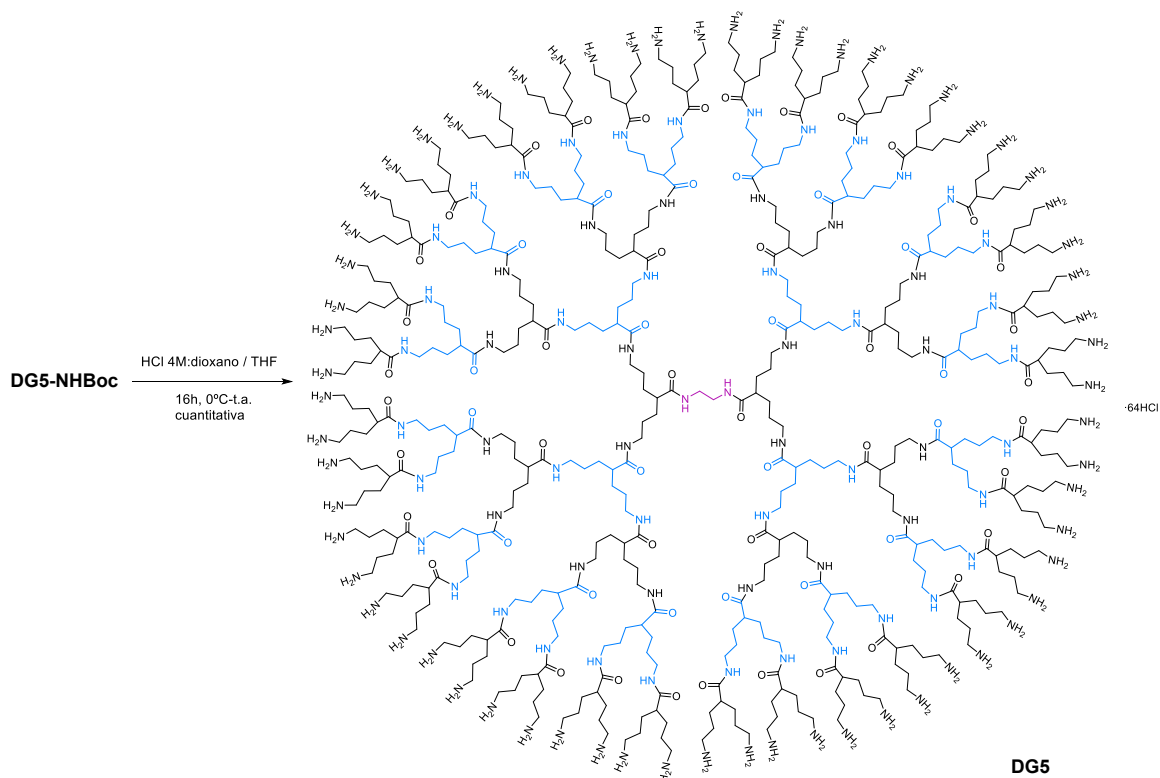


Figura 40. Síntesis de **DG5**

El estudio de este compuesto por resonancia magnética nuclear de protón, carbono (SEFT) y bidimensionales como COSY y HSQC (Figura 41 y Figura 191 - Figura 194 del ANEXO) ha permitido la completa caracterización de **DG5** asignando todas las señales de dichos espectros que, para mayor claridad, la correlación entre las señales de protón y de carbono, se presenta en la Tabla 12.

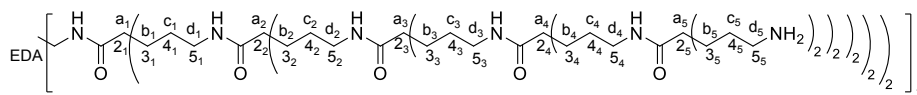


Tabla 12. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **DG5** (espectro en DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
EDA		3.17-2.86 (m, 4H)	38.6
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.36-2.13 (m, 2H)	45.0
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.64-1.10 (m, 8H)	29.9
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.64-1.10 (m, 8H)	27.2
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.17-2.86 (m, 8H)	39.5
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.36-2.13 (m, 4H)	45.0
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.64-1.10 (m, 16H)	29.9
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.64-1.10 (m, 16H)	24.7
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.17-2.86 (m, 16H)	39.5
a <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	2.36-2.13 (m, 8H)	44.5
b <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	1.64-1.10 (m, 32H)	29.2
c <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	1.64-1.10 (m, 32H)	24.7
d <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>	3.17-2.86 (m, 32H)	39.5
a <sub>4</sub>	2 <sub>4</sub>	2.36-2.13 (m, 16H)	44.5
b <sub>4</sub>	3 <sub>4</sub>	1.64-1.10 (m, 64H)	29.2
c <sub>4</sub>	4 <sub>4</sub>	1.64-1.10 (m, 64H)	24.7
d <sub>4</sub>	5 <sub>4</sub>	3.17-2.86 (m, 64H)	39.5
a <sub>5</sub>	2 <sub>5</sub>	2.36-2.13 (m, 32H)	44.0
b <sub>5</sub>	3 <sub>5</sub>	1.64-1.10 (m, 128H)	29.2
c <sub>5</sub>	4 <sub>5</sub>	1.64-1.10 (m, 128H)	24.7
d <sub>5</sub>	5 <sub>5</sub>	2.86-2.66 (m, 128H)	39.5

En la Figura 41 se recopilan los espectros de resonancia magnética nuclear de protón de las 5 generaciones de dendrímeros amino terminales sintetizados. Estos espectros se han realizado empleando DMSO-*d*<sub>6</sub> como disolvente. En el espectro de **DG1**, los protones correspondientes al etileno del núcleo “EDA” se distinguen claramente como un singlete a 3.13 ppm, los protones correspondientes a los metilenos adyacentes a los grupos amino terminales “d<sub>1</sub>” aparecen como un multiplete a 2.75 ppm, la señal ancha a 2.38 ppm corresponde al protón adyacente al grupo carbonilo “a<sub>1</sub>” y, finalmente, los protones correspondientes al resto de metilenos “b<sub>1</sub>” y “c<sub>1</sub>” aparecen como multipletes. Los protones de los metilenos “b<sub>1</sub>” presentan diferente desplazamiento químico,

apareciendo entre 1.33 ppm y 1.51 ppm junto con los protones “c<sub>1</sub>”. Este mismo comportamiento se había observado previamente en el caso de los dendrímeros tipo BAPAD.<sup>103</sup>

El crecimiento de una generación se puede observar claramente en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **DG2** donde la señal correspondiente a “d<sub>1</sub>” se desplaza de 2.85 ppm donde aparecía en el espectro del dendrímero de primera generación, a 3.08 ppm, indicando la reacción de los grupos amino de **DG1** formando enlaces amida en **DG2**. Las señales nuevas aparecen superpuestas a las correspondientes en **DG1**, provocando esto un ensanchamiento de las señales. Lo más relevante es la señal a 2.74 ppm, correspondiente a los nuevos metilenos adyacente a los grupos amino terminales “d<sub>2</sub>”. Esta misma tendencia se observa en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de los dendrímeros de generaciones superiores. Una nueva capa provoca la superposición de las señales de los protones “d-internos” debido a la formación de los nuevos enlaces amida. El ensanchamiento de esas señales también supone una superposición con la señal de los protones “EDA”, mientras que la nueva generación de protones “d-terminal” aparece alrededor de 2.75 ppm. En todos los casos, los picos correspondientes a los protones “a”, “b” y “c” se superponen, provocando un ensanchamiento de señales en cada generación.

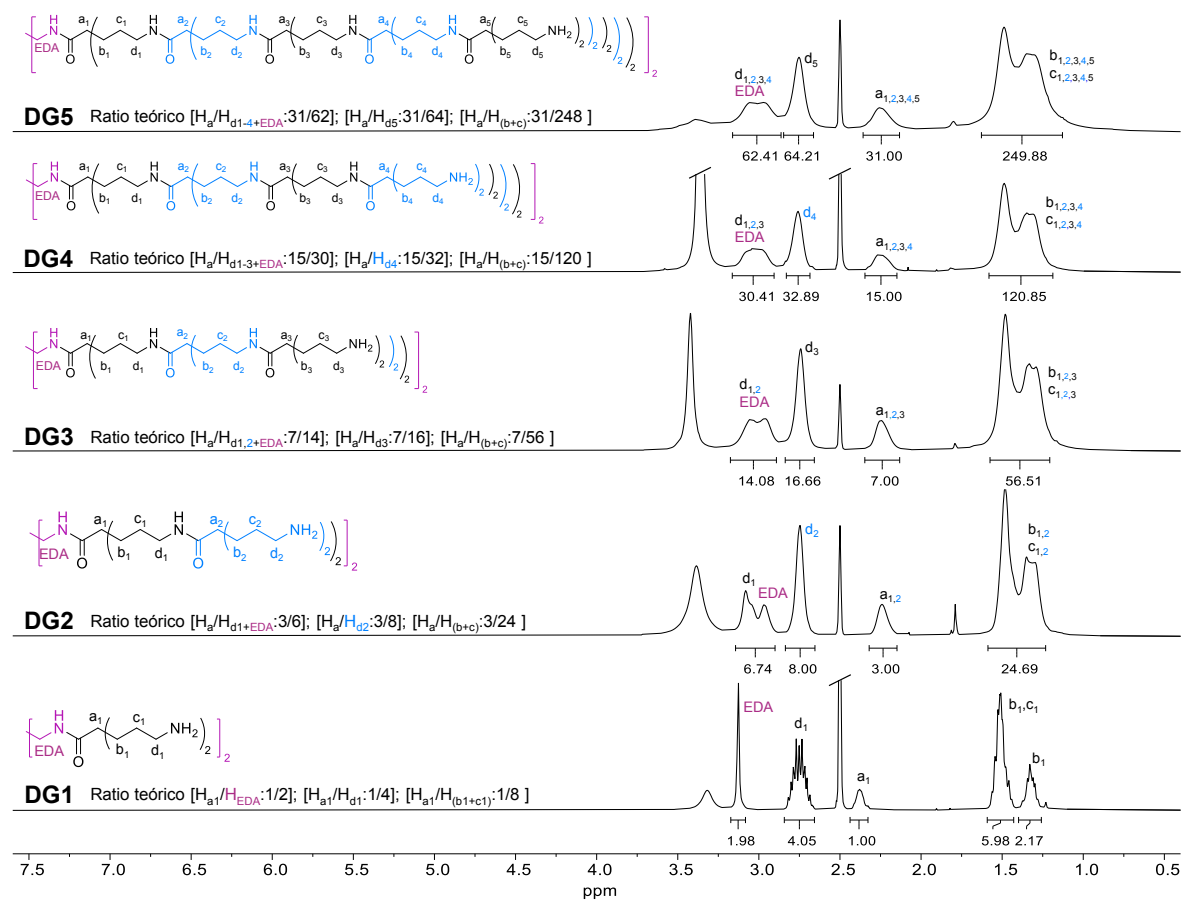


Figura 41. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de **DG1-5** en DMSO-*d*<sub>6</sub>

Para estudiar los valores de las integrales se ha usado la señal correspondiente a los protones “a” como referencia, ajustándose este valor al número de protones de este tipo en cada dendrímero. No obstante, se han usado los valores de medio dendrímero para simplificar, ya que el número de protones aumenta significativamente con el aumento de las generaciones. Como se puede observar en la Figura 41, los valores de las integrales en cada espectro se correlacionan muy bien con la relación teórica mostrada en la figura, lo que parece indicar una reacción de crecimiento completa en cada caso. Las caracterizaciones completas de RMN de **DG1-5** así como de los derivados protegidos con Boc se encuentran en el ANEXO de este trabajo de tesis (Figura 155 - Figura 194).

### III.2. Caracterización de los dendrímeros

Tras la síntesis y purificación de las cinco generaciones de esta familia de dendrímeros poliamida, así como tras su determinación estructural mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, se han llevado a cabo diferentes experimentos analíticos para su completa caracterización.

#### III.2.1. Estudios de estabilidad

Para evaluar la estabilidad de **DG5** en solución acuosa, se ha disuelto la muestra en D<sub>2</sub>O y se ha mantenido 7 días a 37°C, durante los cuales se ha hecho un seguimiento mediante resonancia magnética nuclear de protón. Como se observa en la Figura 42, el dendrímero se mantiene estable en estas condiciones, permaneciendo el espectro de RMN-<sup>1</sup>H invariable desde el momento de su preparación (Figura 42 b)) hasta transcurrida una semana a 37° C (Figura 42 a)).

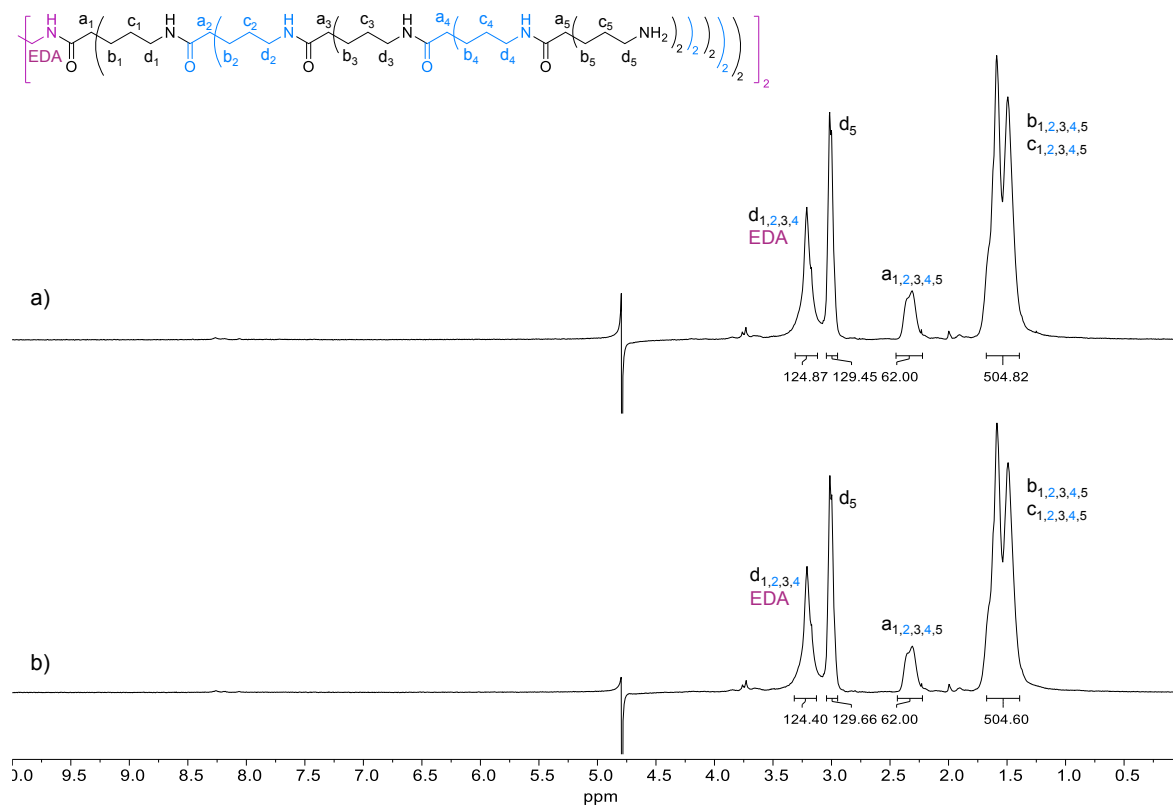


Figura 42. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **DG5** en D<sub>2</sub>O a) tras 7 días a 37°C y b) recién preparado

### III.2.2. Espectrometría de masas

Tal y como se ha mostrado en apartados previos (de III.1.2. a III.1.4.), para las generaciones más pequeñas de esta familia de dendrímeros se han obtenido valores de masas mediante MALDI-TOF que coinciden con los valores teóricos. Sin embargo, como ya se ha descrito anteriormente, la caracterización de dendrímeros con numerosas cargas y alto peso molecular mediante MALDI-TOF es extremadamente difícil.<sup>106,121,122</sup> Para las generaciones 4 y 5 no se han podido obtener espectros MALDI probablemente debido a la labilidad de los grupos protectores Boc (en **DGn-NHBoc**) y a la gran cantidad de cargas positivas (en **DG4-5**) durante las medidas.

### III.2.3. Cromatografía de exclusión por tamaño

Los dendrímeros protegidos (**DGn-NHBoc**) se han analizado mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Para ello se ha empleado una disolución de LiCl en DMF como eluyente y una columna Styragel® HR 4E, a un flujo de 0.7 mL/min, obteniéndose así los cromatogramas representados en la Figura 43. Éstos, muestran bandas a menor tiempo de elución a medida que aumentan las generaciones de los dendrímeros y, por tanto, los tamaños. Para las generaciones 4 y 5,

las bandas muestran un hombro a menor tiempo de elución (mayor masa molecular) probablemente debido a la presencia de agregados tal y como se ha descrito en otros casos para dendrímeros de generaciones altas.<sup>35</sup>

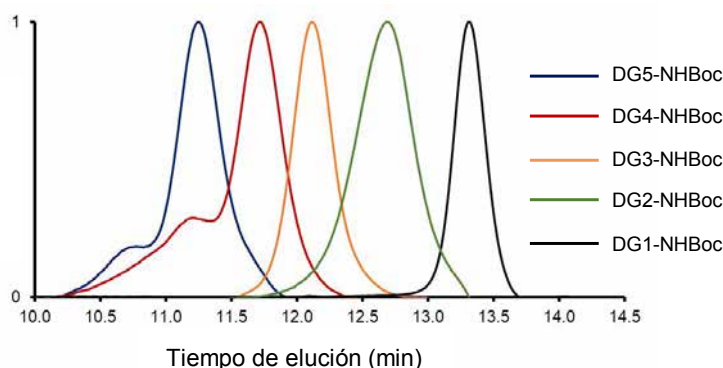


Figura 43. Cromatogramas de exclusión por tamaño de **DGn-NHBoc**. La banda negra corresponde a **DG1-NHBoc**, la verde a **DG2-NHBoc**, la naranja a **DG3-NHBoc**, la roja a **DG4-NHBoc** y la azul a **DG5-NHBoc**.

### III.2.4. Experimentos DOSY

Los experimentos de espectroscopía de difusión ordenada (DOSY) proporcionan una medida de la difusión molecular. DOSY es una técnica de resonancia magnética nuclear bidimensional en la que la intensidad de la señal decae exponencialmente al disminuir el gradiente, debido al comportamiento de difusión de las moléculas individuales.<sup>123</sup> Es decir, es una herramienta analítica muy útil para analizar la formación de copolímeros o agregados en una sustancia así como para evaluar la monodispersidad de la misma. El coeficiente de difusión que se obtiene depende, por tanto, de distintas propiedades como la agregación, el tamaño, la masa o la carga de la molécula, así como de propiedades del medio como la temperatura o el disolvente empleado. Los primeros experimentos de difusión con dendrímeros, concretamente dendrímeros de poli(propilenoimina), mostraron que los coeficientes de difusión disminuían con el aumento del tamaño molecular y con la disminución de la temperatura.<sup>124</sup> Como es de esperar, el coeficiente de difusión que se obtiene aumenta de forma inversamente proporcional a la generación de los dendrímeros.

Los dendrímeros amino terminales sintetizados en esta tesis se han analizado por técnicas de difusión empleando D<sub>2</sub>O como disolvente (Figura 349 - Figura 353 del ANEXO). En todas las generaciones se ha tomado como referencia la integral de la señal correspondiente a los protones “a” y se observa que el decaimiento de las señales es monoexponencial en todos los casos. En la Figura 44 se muestra el apilamiento de espectros de protón para **DG1** donde se aprecia el decaimiento de la señal. Esto mismo sucede con las 4 generaciones sucesivas de dendrímeros.

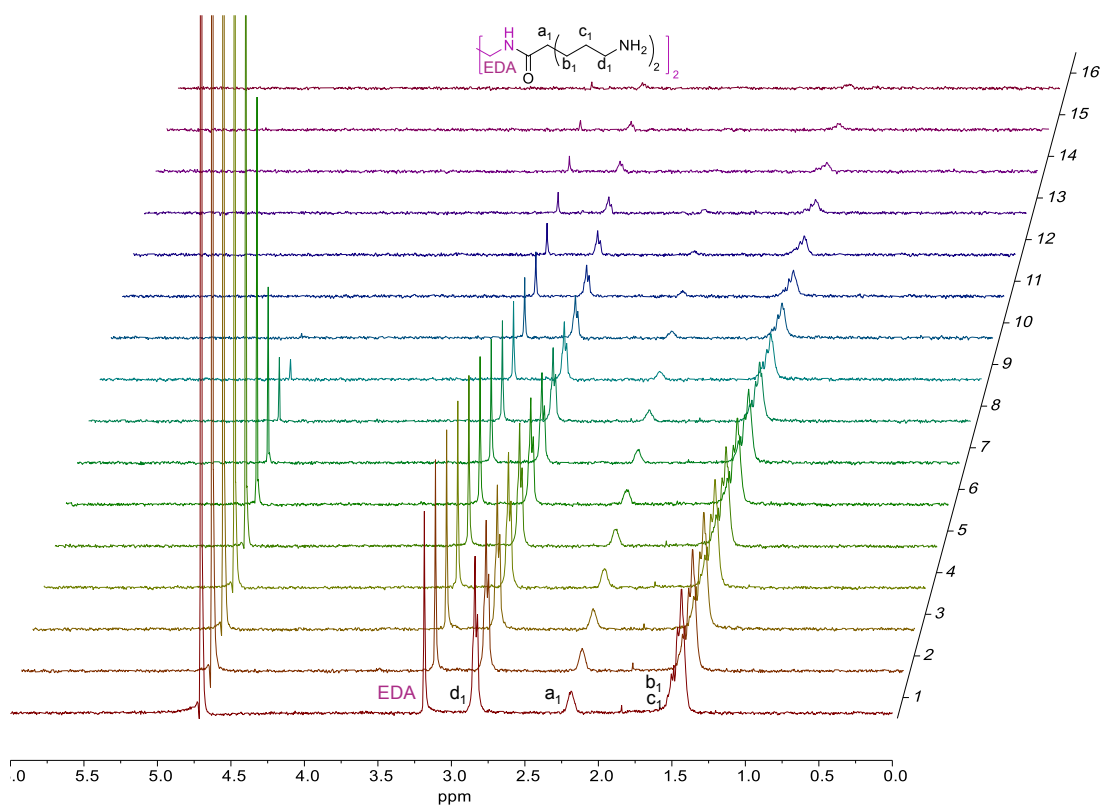


Figura 44. Apilamiento de espectros  $^1\text{H}$ -RMN de **DG1** ( $\text{D}_2\text{O}$ )

Este decaimiento se traduce en gráficos lineales de Stejskal-Tanner. La Figura 45 a) muestra la representación gráfica del decaimiento del logaritmo de la intensidad de señal normalizada, la correspondiente a los protones llamados “a”, frente al cuadrado del gradiente, en cada una de las generaciones para los dendrímeros sintetizados. La relación lineal indica que son macromoléculas monodispersas.<sup>125</sup> En la Figura 45 b) se representa el logaritmo del coeficiente de difusión frente al logaritmo del número aproximado de átomos por cada generación.

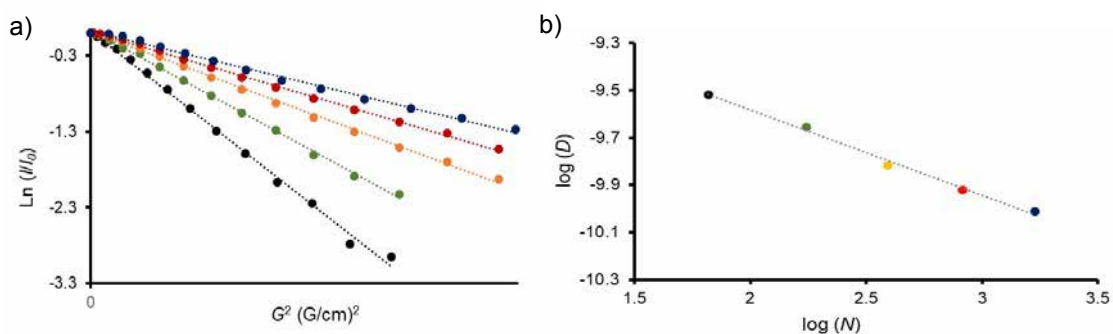


Figura 45. a) Gráfico de Stejskal-Tanner. b) Representación  $\log(D)$ - $\log(N)$ . Para ambas figuras se ha representado **DG1** negro, **DG2** verde, **DG3** naranja, **DG4** rojo y **DG5** azul.

Los coeficientes de difusión ( $D$ ) vienen determinados por la pendiente de la gráfica de Stejskal-Tanner según la siguiente ecuación:

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\gamma^2 \delta^2 G^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D$$

Donde  $G$  es la intensidad del campo del gradiente (Gauss/cm),  $I$  es la integral del área del pico a un valor  $G$  dado,  $I_0$  es la integral del área del pico a  $G=0$ ,  $\gamma$  es la constante giromagnética de los núcleos ( $2.672 \times 10^8 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$  para  $^1\text{H}$ ),  $\delta$  es el gradiente de difusión del parámetro longitud (4.0 ms),  $\Delta$  es el retraso de difusión (100.0 ms) y  $D$  es el coeficiente de difusión.<sup>126</sup>

A partir del coeficiente de difusión se puede estimar el tamaño de los dendrímeros en disolución mediante el cálculo del radio hidrodinámico ( $R_h$ ) por la ecuación de Stokes-Einstein.<sup>126,127</sup>

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann (J/K),  $T$  es la temperatura (K) y  $\eta$  es la viscosidad de la solución (1.0963 cP para  $\text{D}_2\text{O}$ ).<sup>126</sup>

En la Tabla 13 se recogen el coeficiente de difusión ( $D$ ) y el radio hidrodinámico ( $R_h$ ) determinado por este experimento para cada una de las generaciones de dendrímeros sintetizadas.

Tabla 13. Datos de difusión.

Dendrímero	DG1	DG2	DG3	DG4	DG5
Fórmula	$\text{C}_{18}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_2$	$\text{C}_{50}\text{H}_{104}\text{N}_{14}\text{O}_6$	$\text{C}_{114}\text{H}_{232}\text{N}_{30}\text{O}_{14}$	$\text{C}_{242}\text{H}_{488}\text{N}_{62}\text{O}_{30}$	$\text{C}_{498}\text{H}_{1000}\text{N}_{126}\text{O}_6$
-NH <sub>2</sub> terminal	4	8	16	32	64
M.M. (g/mol)	372.56	997.47	2247.31	4746.97	9746.30
$D$ (m <sup>2</sup> /s)	$3.039 \cdot 10^{-10}$	$2.2135 \cdot 10^{-10}$	$1.5275 \cdot 10^{-10}$	$1.2035 \cdot 10^{-10}$	$9.7121 \cdot 10^{-11}$
$R_h$ (Å)	6.59	9.05	13.12	16.65	20.63

Como era de esperar, los coeficientes de difusión y los radios hidrodinámicos varían con las generaciones. **DG1** presenta una  $D$  mayor, lo que corresponde al menor  $R_h$ . Ya se ha descrito previamente que los coeficientes de difusión de los dendrímeros PAMAM (hasta generación 5) aumentan exponencialmente con el número de átomos en la estructura, siguiendo la relación  $D \approx N^\alpha$  (donde  $N$  es el número de átomos y  $\alpha$  es la constante de variación).<sup>125,126,127</sup> La Figura 45 b) muestra la relación entre el logaritmo de  $D$  y el logaritmo de  $N$  de los dendrímeros sintetizados. Como puede observarse, las distintas generaciones de los dendrímeros se ajustan perfectamente a una dependencia lineal. De la pendiente de este gráfico se obtiene la constante de variación  $\alpha = -0.36$ , prácticamente idéntico al valor observado para las soluciones acuosas de PAMAM ( $\alpha = -0.35$ ).<sup>126,127</sup>

### III.2.5. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Los dendrímeros amino terminales se han analizado por microscopía de fuerza atómica (AFM) en colaboración con el grupo del Dr J. Samitier en Barcelona. Este análisis se ha realizado mediante la deposición de disoluciones de dendrímeros sobre sustratos monocristalinos de oro (111).<sup>96,97</sup>

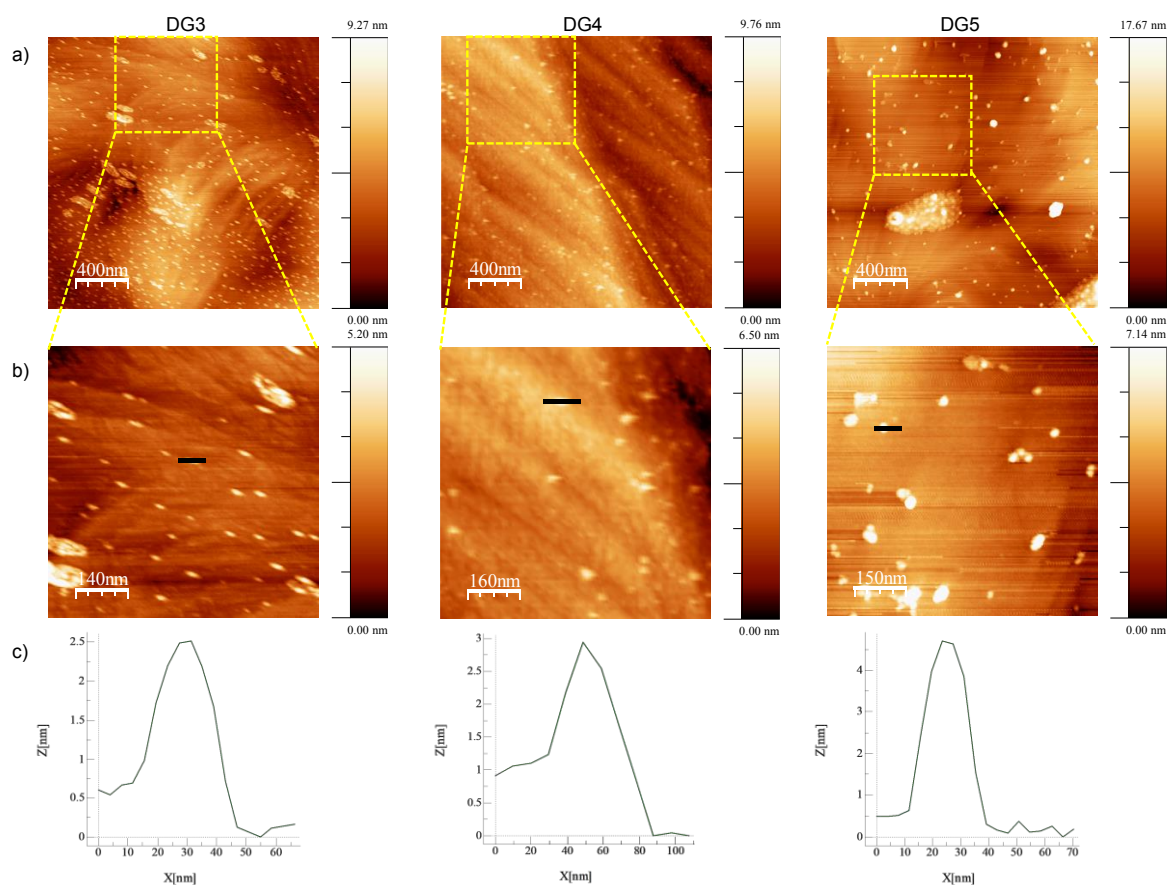


Figura 46. a) Imágenes obtenidas de **DG3**, **DG4** y **DG5** depositado en sustrato de oro (111). Las imágenes en b) corresponden a la ampliación de las secciones señaladas en a) y, por último, en c) se representan los perfiles de distancia obtenidos para la marca señalada con una línea negra en b).

Para **DG3** y **DG4** se encuentran dendrímeros aislados junto con algunos agregados bidimensionales, mientras que en **DG5** predomina la agregación apareciendo incluso agregados tridimensionales (Figura 46 a)). El análisis de los dendrímeros en las secciones ampliadas de las imágenes de AFM (Figura 46 b)) muestra que las medidas de sus diámetros son aproximadamente 25, 30 y 45 Å para **DG3**, **DG4** y **DG5** respectivamente. Estos valores concuerdan con los resultados observados mediante los experimentos DOSY mostrados en la Tabla 13.

### III.2.6. Simulación de Dinámica Molecular

Para obtener más información sobre la estructura de estos dendrímeros se han construido los modelos moleculares de cada uno de ellos y se han sometido a simulaciones de dinámica molecular en una caja de agua. Este estudio ha sido realizado en colaboración con el Dr. F. Nájera de la Universidad de Málaga.

La construcción de los modelos moleculares de los dendrímeros se ha realizado dividiéndolos en tres unidades. La correspondiente al núcleo (COR), la de la unidad de repetición (REP), y la unidad terminal (TAM), tal y como se ilustra en la Figura 47. Para mantener la integridad estructural de cada una de estas unidades se han completado con acetilos o *N*-metilos: **cap**-COR (*N,N'*-diacetiletildiamina), **cap**-REP (*N,N'*-(4-(metilcarbamoil)heptano-1,7-diil)diacetamida) y **cap**-TAM (4-(metilcarbamoil)heptano-1,7-diamino) (representados en rojo en la Figura 47).

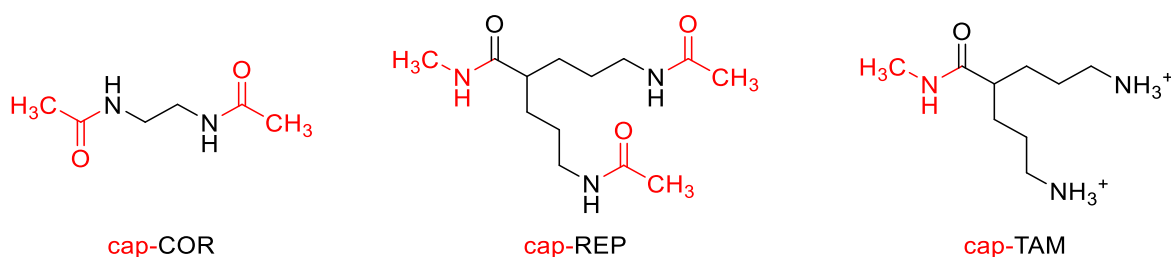


Figura 47. Unidades estructurales empleadas para la construcción de los dendrímeros. En negro se representan las unidades propias de los dendrímeros y en rojo los residuos empleados para mantener la integridad estructural de los residuos.

Todas las unidades estructurales se han optimizado usando el campo de fuerza AMBER (parm99) y los parámetros que no se incluyen se han obtenido mediante el campo de fuerza general AMBER (GAFF).<sup>128</sup> La conformación de mínima energía y la carga parcial de cada uno de sus átomos se han calculado mediante un cálculo DFT empleando el funcional B3LYP y la base 6-31G(d) usando Gaussian 09.<sup>129</sup> Los residuos **cap**-COR y **cap**-REP se han optimizado en el vacío mientras que el **cap**-TAM se ha optimizado empleando PCM (*Polarizable Continuum Model*) y agua como disolvente.<sup>130</sup> La carga total de los átomos **cap** y la carga total de los residuos se ha fijado a cero durante el cálculo. A excepción del residuo protonado TAM que se ha mantenido a +2. Los residuos (COR, REP y TAM) se han creado usando el módulo Antechamber de AmberTools12,<sup>131</sup> y se ha utilizado el potencial RESP (*Restrained Electrostatic Potential*) para el ajuste de las cargas parciales.<sup>132</sup> Finalmente, los residuos obtenidos se han usado para construir la generación de dendrímeros deseada con DBT (*Dendrimer Building Tool*).<sup>133</sup>

Todos los cálculos para la simulación se han realizado con el software AMBER 12 MD.<sup>131</sup> Para preservar la carga total del sistema se ha agregado la cantidad adecuada de iones Cl<sup>-</sup>. Las moléculas de agua se han agregado usando el modelo TIP3P<sup>134</sup> en una celda octaédrica truncada teniendo en

todos los casos, una capa de solvatación mínima de 10 Å alrededor de la estructura del dendrímero. Las propiedades iniciales de los dendrímeros y los detalles de la simulación se recogen en la Tabla 14, donde  $N_{den}$ ,  $N_{Cl^-}$ ,  $N_{disolvente}$  y  $N_{total}$  son, respectivamente, el número de átomos en el dendrímero, de iones cloruros, de átomos en las moléculas de disolvente y el número total de átomos, mientras que  $V$  es el volumen inicial de la celda octaédrica.

Tabla 14. Propiedades iniciales de los dendrímeros y detalles de la simulación

Dendrímero	$N_{den}$	$N_{Cl^-}$	$N_{disolvente}$	$N_{total}$	$V(\text{Å}^3)$
<b>DG1</b>	70	4	1423	1497	52445
<b>DG2</b>	182	8	3497	3687	124257
<b>DG3</b>	406	16	4318	4740	159319
<b>DG4</b>	854	32	7948	8834	290099
<b>DG5</b>	1750	64	13633	15447	501907

Las estructuras solvatadas se han estabilizado siguiendo un protocolo descrito previamente.<sup>106</sup> Inicialmente se ha permitido que las moléculas de agua de la caja se optimicen manteniendo los dendrímeros en su conformación inicial aplicando una fuerza de restricción armónica grande. Después, se ha seguido con cinco periodos de minimización en los que se ha disminuido la constante de fuerza de restricción armónica desde 20 kcal/mol·Å<sup>2</sup> a 0 kcal/mol·Å<sup>2</sup>.

Los dendrímeros minimizados se han calentado de 0 a 300 K empleando tres pasos de 40 ps de Dinámica Molecular (DM), el primero en condiciones de volumen y temperatura constantes (NVT) y el resto en condiciones de presión y temperatura constantes (NPT). Finalmente, se ha equilibrado el sistema a 300 K empleando DM durante 2 ns sin restricciones y en condiciones de NPT. La ecuación de movimiento se ha resuelto utilizando el algoritmo de Verlet<sup>135</sup> con un paso de integración de 2 fs. Las longitudes de los enlaces con átomos de hidrógeno se han restringido con el algoritmo SHAKE.<sup>136</sup>

Finalmente, se ha obtenido una trayectoria de 20 ns bajo condiciones NPT. Para la regulación de la temperatura se ha empleado el termostato de Berendsen.<sup>137</sup> Se ha empleado el algoritmo PME (*Particle Mesh Ewald*) para tratar las interacciones electrostáticas de largo alcance,<sup>138</sup> con un espacio real de corte de 9 Å. Para las interacciones de Van der Waals se ha utilizado la misma distancia de corte. Para el análisis estructural ( $R_g$ ,  $RDF$ , etc.) se ha usado el último nanosegundo de la trayectoria obtenida empleando los módulos *ptraj* y *cpptraj* de AMBER, mientras que para la obtención de las figuras de los dendrímeros se ha utilizado el software VMD.<sup>139</sup>

En la Figura 48 se representan las cinco generaciones de dendrímeros obtenidas mediante simulación de dinámica molecular donde, para simplificar, los átomos de carbono están en gris, los de oxígeno en rojo, los de nitrógeno en azul y los de hidrógeno en blanco.

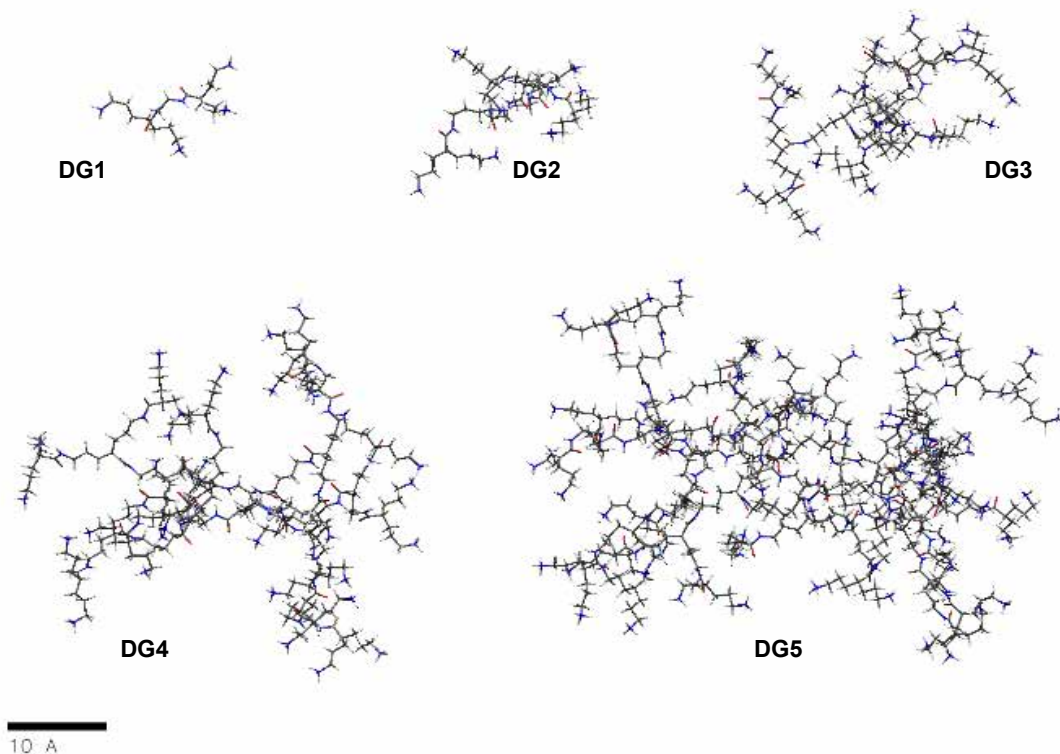


Figura 48. Imagen de simulación de dinámica molecular de **DG1-5**.

Al analizar las estructuras obtenidas se han calculado algunas propiedades como el radio de giro ( $R_g$ ), la relación de aspecto ( $I_x/I_y$  y  $I_x/I_z$ ) y la esfericidad ( $\delta$ ) que se recogen en la Tabla 15.

Tabla 15. Datos de dinámica molecular de los dendrímeros sintetizados

Dendrímero	DG1	DG2	DG3	DG4	DG5
Fórmula	$C_{18}H_{40}N_6O_2$	$C_{50}H_{104}N_{14}O_6$	$C_{114}H_{232}N_{30}O_{14}$	$C_{242}H_{488}N_{62}O_{30}$	$C_{498}H_{1000}N_{126}O_6$
-NH <sub>2</sub> terminal	4	8	16	32	64
M.M. (g/mol)	372.56	997.47	2247.31	4746.97	9746.30
$R_h$ (Å)	6.59	9.05	13.12	16.65	20.63
$R_g$ (Å)	$5.26 \pm 0.26$	$8.06 \pm 0.19$	$11.02 \pm 0.24$	$14.87 \pm 0.23$	$18.81 \pm 0.28$
$I_x/I_y$	$1.19 \pm 0.10$	$1.53 \pm 0.10$	$1.37 \pm 0.09$	$1.08 \pm 0.04$	$1.26 \pm 0.08$
$I_x/I_z$	$3.08 \pm 0.49$	$2.05 \pm 0.21$	$1.68 \pm 0.12$	$1.57 \pm 0.11$	$1.58 \pm 0.09$
$\delta$	$0.080 \pm 0.016$	$0.045 \pm 0.008$	$0.024 \pm 0.006$	$0.017 \pm 0.005$	$0.018 \pm 0.003$

En la Figura 49 se representan los  $R_g$  obtenidos para cada generación de dendrímero. Estos datos concuerdan con los radios hidrodinámicos previamente calculados por DOSY y muestran un aumento de tamaño de los dendrímeros con el aumento de generación.

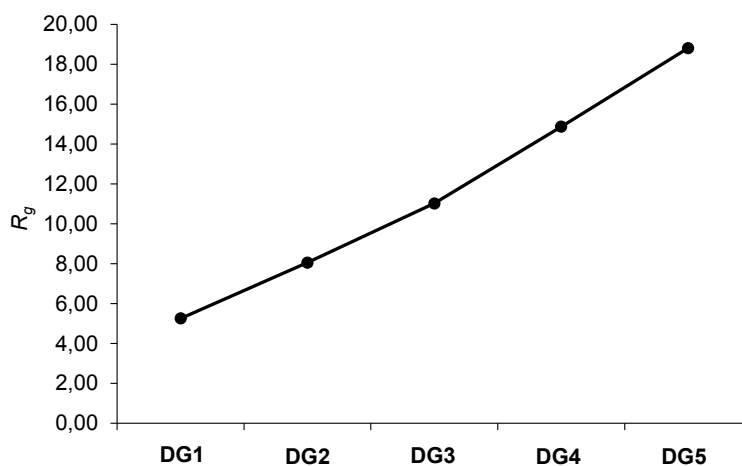


Figura 49. Valores del Radio de giro  $R_g$  para DG1-5.

A través de los valores de los tres momentos de inercia principales ( $I_x$ ,  $I_y$  y  $I_z$  en orden decreciente) se puede deducir la relación de aspecto de los dendrímeros. Las relaciones ( $I_x/I_y$ ) y ( $I_x/I_z$ ) son las medidas de la excentricidad (relación de ejes menores-mayores) de los dendrímeros. Al aumentar la generación del dendrímero, la relación entre los valores de  $I_x/I_y$  y  $I_x/I_z$  disminuye, lo que indica una modificación en la forma de elipsoide a globular de DG1 a DG5. Esta variación en el aspecto se corrobora con la disminución de los valores de esfericidad (Tabla 15 y Figura 50).

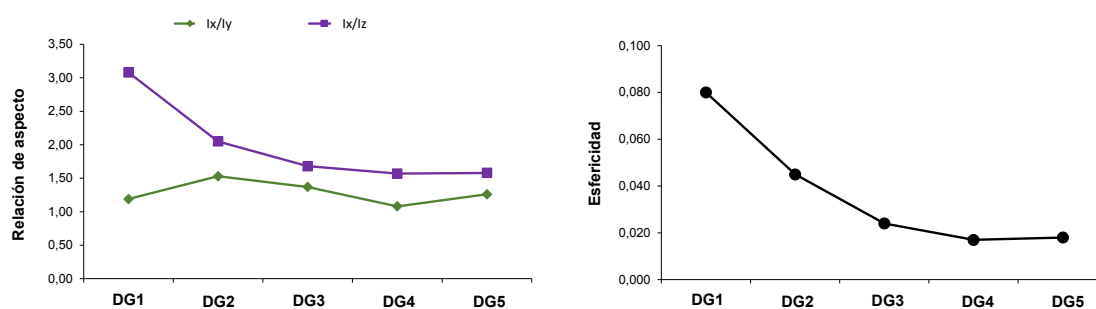


Figura 50. Valores de relación de aspecto y esfericidad para DG1-5.

La relación lineal entre el logaritmo del número de átomos ( $\log N$ ) y el del radio de giro ( $\log R_g$ ) permite calcular la dimensión fractal ( $d_f$ ), que se correlaciona con lo compacta que es la estructura interna de los dendrímeros. En una esfera perfecta y compacta el valor de  $d_f$  es 3.<sup>140</sup> Para los dendrímeros estudiados se ha obtenido un valor de  $N \approx R_g^{2,51}$  ( $d_f = 2,51$ , Figura 51). Esto implica que estos dendrímeros son más parecidos a una estructura polimérica en lugar de una perfecta esfera compacta.

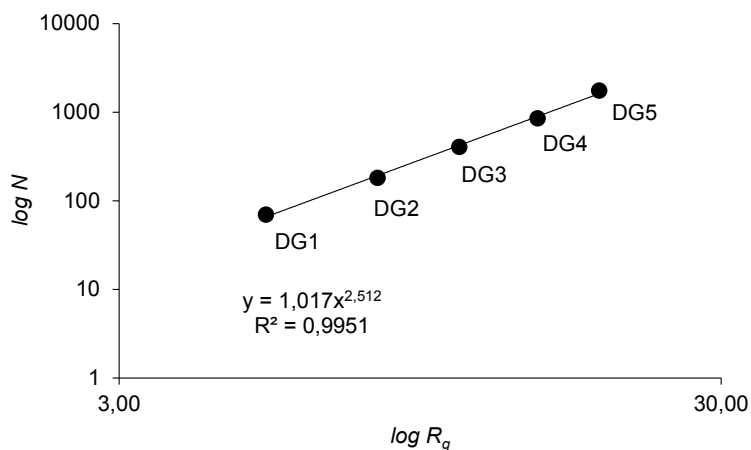


Figura 51. Relación entre el número de átomos ( $N$ ) de **DG1-DG5** y sus radios de giro ( $R_g$ ).

Las Funciones de Distribución Radial ( $\rho(r)$ ) de los dendrímeros y sus unidades se muestran en la Figura 52. Estas funciones permiten conocer la distribución de los átomos dentro de los dendrímeros. En todos los casos presentan la máxima densidad atómica cerca del núcleo del dendrímero y decrece hacia el exterior de la molécula. En los dendrímeros **DG3-DG5** aparece una meseta formada principalmente por la unidad REP que decae lentamente. Esto sugiere una región con alta localización y baja movilidad atómica, indicando una estructura del dendrímero densa. Con el aumento de generación se dobla el número de unidades TAM, apreciándose que en **DG1-3** están presentes siempre en la parte más exterior de los dendrímeros. Sin embargo, en las generaciones superiores **DG4-5** se aprecia un alto grado de *back-folding*, mostrando que las unidades TAM están distribuidas a lo largo de toda la molécula, aunque su presencia en la zona exterior de los dendrímeros sigue siendo significativa (Figura 52).

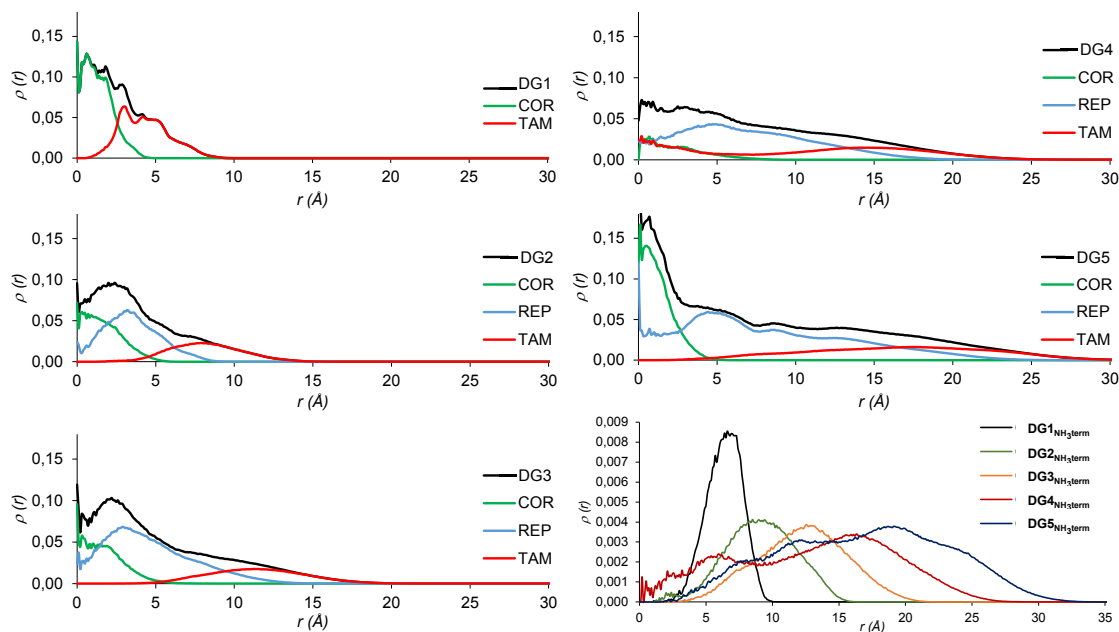


Figura 52. Función de distribución radial de **DG1-DG5** y sus monómeros usando el centro de masas del dendrímtero como referencia.  $\rho(r)$  está expresado en átomos/Å<sup>3</sup>.

En esta sección del capítulo III se ha diseñado, sintetizado, purificado y caracterizado una familia de dendrímeros amino terminales basados en enlaces tipo amida. Esta familia consta de 5 generaciones en las que el número de grupos aminos en la periferia se va duplicando, partiendo de 4 en el caso de **DG1** hasta 64 en **DG5**. Se han realizado numerosos intentos para optimizar los procesos de acoplamiento/desprotección de esta ruta sintética y finalmente se ha conseguido poner a punto una metodología eficaz empleando reactivos sencillos y económicos, obteniéndose rendimientos superiores al 90% sin necesidad de procesos de purificación tediosos. Se ha propuesto una ruta sintética de pocos pasos, en la que el crecimiento de cada generación consta sólo de dos etapas, una de acoplamiento y otra de desprotección de los grupos amino terminales. El uso de una única unidad de crecimiento (**5**) en la síntesis ha evitado la necesidad de construir una familia de diferentes monómeros, al tiempo que simplifica la estructura final del dendrímtero. Esta metodología sintética constituye una forma fácil y eficaz para la preparación de dendrímeros basados en enlaces tipo amida.

Estos dendrímeros solubles en agua son aparentemente estables ya que se han realizado estudios de estabilidad con el dendrímtero de mayor generación (**DG5**) sin observarse degradación del mismo. Las estructuras preparadas se han caracterizado y evaluado mediante espectrometría de masas (ESI y MALDI-TOF), resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, COSY, HSQC, DOSY), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y microscopía de fuerza atómica (AFM). También se han realizado simulaciones de dinámica molecular (SDM) con el resultado de valores concordantes con los determinados experimentalmente.<sup>141</sup>

### III.3. Síntesis de nuevos dendrones amino terminales

De manera paralela y debido al interés en estructuras dendriméricas estables, biocompatibles, solubles en agua y que minimicen los efectos estéricos a la hora de incorporar otras funcionalidades en su superficie, también se ha propuesto la síntesis de dendrones con la misma unidad estructural en la que los grupos amino superficiales quedan en posiciones relativas 1,7. De este modo se ha diseñado y optimizado la síntesis de tres familias de dendrones con el mismo esqueleto, pero con diferentes grupos funcionales en la posición del punto focal, lo que los hace extremadamente versátiles para diferentes aplicaciones.

En la Figura 53 se muestran los dendrones sintetizados en este trabajo donde los puntos focales varían entre: Ácido carboxílico (protegido con el grupo bencilo), grupo alquino y grupo azida. En todos los casos se ha sintetizado y caracterizado hasta la generación 3, con 8 grupos amino terminales, obteniéndose los dendrones en escala de gramos y con buenos rendimientos.

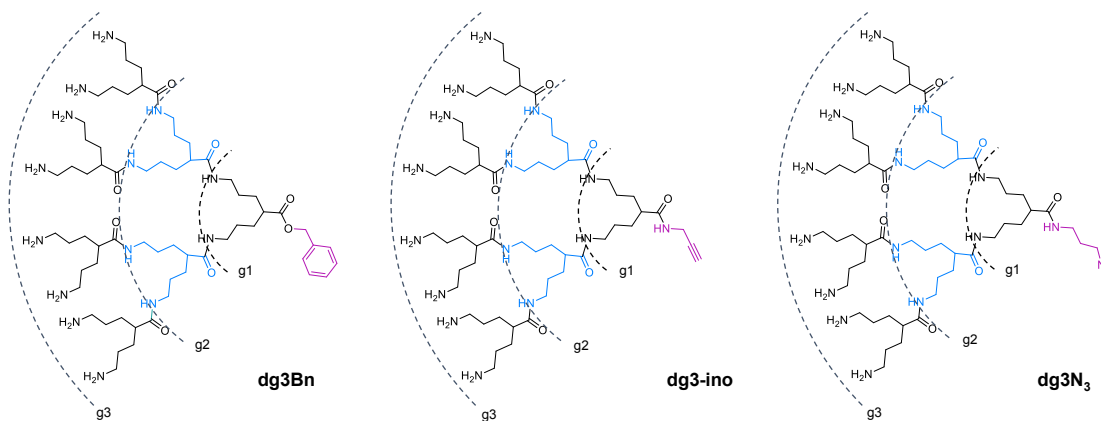


Figura 53. Dendrones sintetizados

#### III.3.1. Síntesis de dg1Bn

Para la obtención de **dg1Bn** se ha diseñado la ruta sintética mostrada en la Figura 54, que consta de la protección del grupo ácido carboxílico en el punto focal de **4** y la posterior desprotección de los grupos amino. De este modo, el punto focal se mantendrá protegido para las próximas reacciones de crecimiento, evitando que pueda interferir en reacciones secundarias no deseadas.

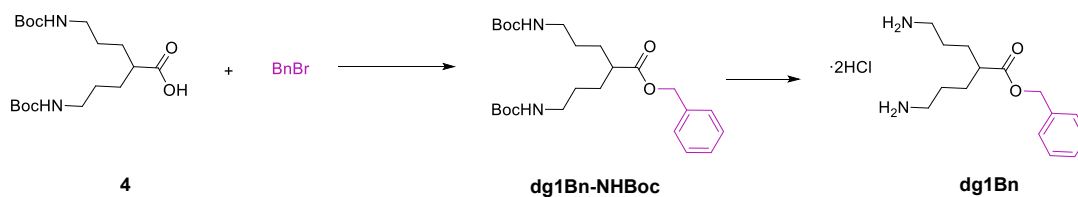


Figura 54. Esquema sintético de **dg1Bn**

### III.3.1.1. Síntesis de dg1Bn-NHBoc

Para la síntesis de **dg1Bn-NHBoc** se emplea como producto de partida el compuesto **4** y se hace reaccionar con bromuro de bencilo, dando lugar a la formación del correspondiente éster bencilo. Se ha elegido este grupo protector para poder desproteger selectivamente frente a los grupos protectores Boc y viceversa. Así, mediante hidrogenación catalítica se obtiene fácilmente el dendrón con el grupo ácido carboxílico en su punto focal y los grupos aminos protegidos, mientras que el grupo bencilo resiste a las condiciones ácidas de desprotección de los grupos *tert*-butoxicarbonil. La reacción de formación de este compuesto se lleva a cabo en DMF, en presencia de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, agitando durante una noche a temperatura ambiente. Posteriormente se purifica mediante cromatografía de sílica gel en columna para dar lugar a **dg1Bn-NHBoc** como un sólido incoloro.

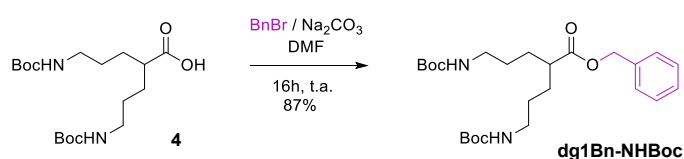


Figura 55. Síntesis de **dg1Bn-NHBoc**

El compuesto obtenido ha sido completamente caracterizado por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas donde, el pico asociado a [M + H]<sup>+</sup> aparece a *m/z* 465.2945.

Las señales de los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (Figura 61 y Figura 195 del ANEXO) y carbono (Figura 196 del ANEXO) han sido asignadas con ayuda de los espectros bidimensionales COSY y HSQC (Figura 197 y Figura 198 del ANEXO). Para mayor claridad, la correlación de estas señales se recoge en la Tabla 16.

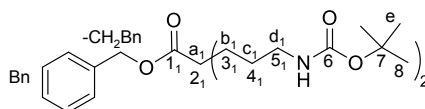


Tabla 16. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **dg1Bn-NHBoc** (espectro en CDCl<sub>3</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
Bn		7.39-7.32 (m, 5H)	136.2, 128.7, 128.5, 128.4
-CH <sub>2</sub> Bn		5.12 (s, 2H)	66.3
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.48-2.37 (m, 1H)	44.9
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.68-1.59 (m, 4H)	29.5
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.52-1.38 (m, 4H)	27.9
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	2.89-2.80 (m, 4H)	40.5
e	8	1.52-1.38 (m, 18H)	28.6

### III.3.1.2. Síntesis de dg1Bn

La desprotección de los grupos amino terminales de **dg1Bn-NHBoc** se lleva a cabo siguiendo el procedimiento general de desprotección, con HCl 4M en dioxano, durante una noche a temperatura ambiente. Tras este tiempo se elimina el disolvente y se obtiene **dg1Bn** de manera cuantitativa sin necesidad de purificación.

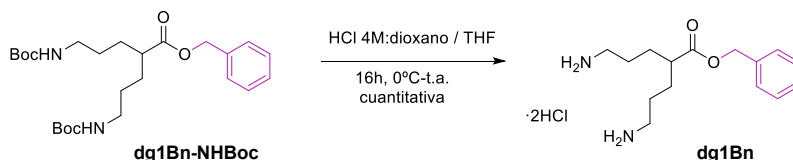


Figura 56. Síntesis de **dg1Bn**

Mediante espectrometría de masas se observa el pico asociado a  $[M + H]^+$  a  $m/z$  265.1911. Este compuesto también ha sido caracterizado por resonancia magnética nuclear de  $^1H$ ,  $^{13}C$  (SEFT), COSY y HSQC (Figura 199 - Figura 202 del ANEXO), donde en  $^1H$  y  $^{13}C$  se observa la desaparición de las señales típicas del grupo Boc. La correlación entre las señales de protón y carbono se recoge en la Tabla 17.

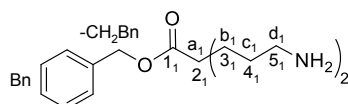


Tabla 17. Correlación de las señales en RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  en **dg1Bn** (espectro en  $D_2O$ )

Posición		RMN- $^1H$ (ppm)	RMN- $^{13}C$ (ppm)
Bn		7.49-7.46 (m, 5H)	135.8, 129.1, 129.0, 128.8
-CH <sub>2</sub> Bn		5.23 (s, 2H)	67.5
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.61-2.56 (m, 1H)	44.6
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.69-1.60 (m, 4H)	28.5
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.69-1.60 (m, 4H)	24.7
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	2.98-2.94 (m, 4H)	39.4

### III.3.2. Síntesis de dg2Bn

Siguiendo la estrategia de síntesis basada en las etapas de acoplamiento/desprotección, se ha sintetizado la segunda generación de dendrones con ácido carboxílico protegido en su punto focal. Al igual que en la síntesis de los dendrímeros, se emplea el monómero activado con hidroxibenzotriazol (**5**), descrito previamente, como unidad estructural de crecimiento.

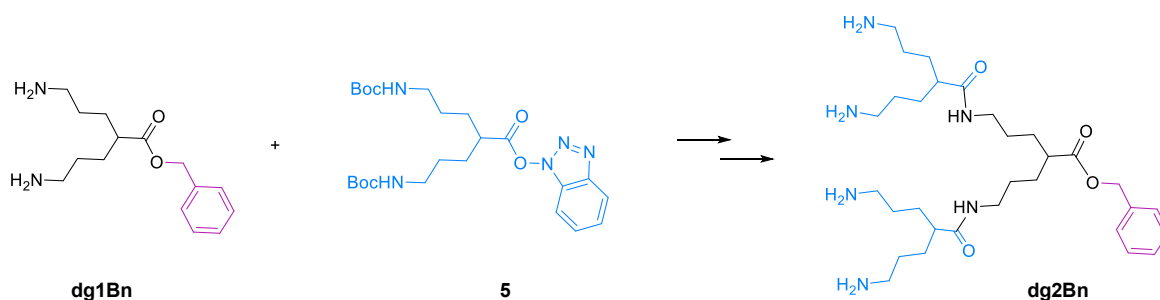


Figura 57. Esquema sintético de **dg2Bn**

### III.3.2.1. Síntesis de **dg2Bn-NHBoc**

El acoplamiento entre **dg1Bn** y el compuesto **5**, al igual que las reacciones de crecimiento de los dendrímeros, se lleva a cabo en DMF anhidra en presencia de base. En este caso, se observó que el producto no toleraba el tratamiento con la resina de intercambio iónico, probablemente por la hidrólisis del éster benílico. Con las condiciones descritas se ha obtenido un rendimiento del 96% en escala de gramos sin necesidad de purificación.

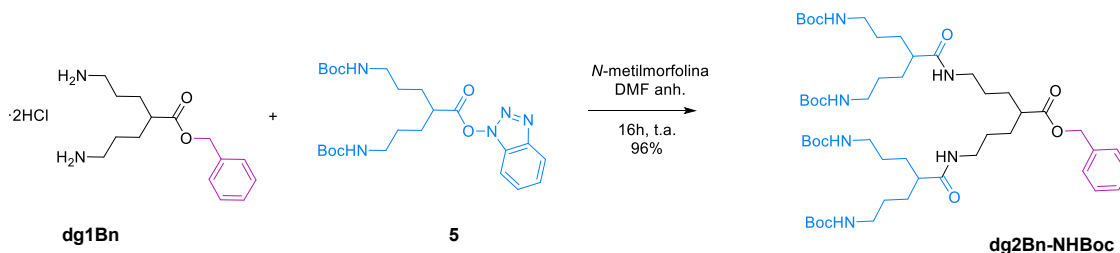


Figura 58. Síntesis de **dg2Bn-NHBoc**

Mediante espectrometría de masas se observa el pico asociado a  $[M + H]^+$  a  $m/z$  977.6549. Este compuesto también se ha caracterizado por resonancia magnética nuclear de  $^1H$ ,  $^{13}C$  (SEFT), COSY y HSQC (Figura 61 y Figura 203 - Figura 206 del ANEXO).

Para mayor claridad, se han recogido los desplazamientos químicos y la correlación de las señales de protón y carbono en la Tabla 18.

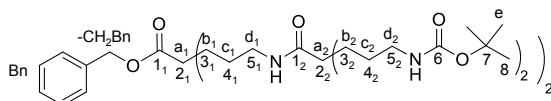


Tabla 18. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **dg2BnNHBOc** (espectro en CDCl<sub>3</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
Bn		7.37-7.31 (m, 5H)	136.0, 131.0, 128.7, 128.4
-CH <sub>2</sub> Bn		5.10 (s, 2H)	66.4
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.49-2.39 (m, 1H)	44.4
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.63-1.57 (m, 2H)	30.0
		1.48-1.33 (m, 2H)	
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.48-1.32(m, 4H)	28.1
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.27-3.14 (m, 4H)	40.3
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.20-2.08 (m, 2H)	46.2
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.63-1.57 (m,4H)	29.8
		1.48-1.33 (m, 4H)	
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.48-1.33 (m, 8H)	27.3
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.11-3.01 (m, 8H)	38.8
e	8	1.41 (s, 36H)	28.6

### III.3.2.2. Síntesis de dg2Bn

La desprotección de los grupos amino terminales de **dg2Bn-NHBOc** da lugar a este dendrón hidrosoluble de segunda generación de manera cuantitativa. Esta reacción se lleva a cabo en medio ácido, produciéndose la adición de HCl:dioxano en frío y dejando en agitación constante a temperatura ambiente durante una noche. Tras este tiempo, se elimina completamente el disolvente y se purifica mediante cromatografía de exclusión por tamaño empleando Sephadex™ G10 como fase estacionaria para dar lugar a **dg2Bn**.

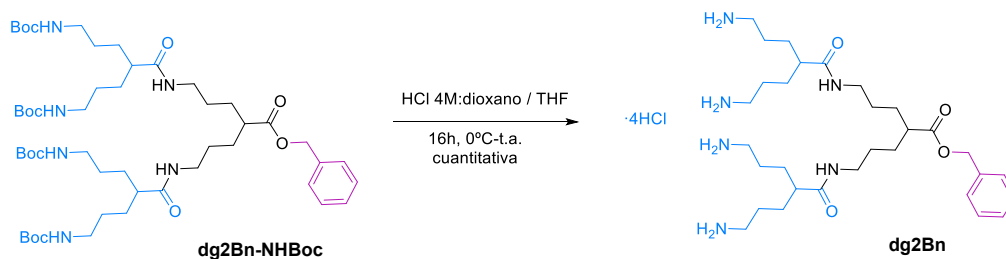


Figura 59. Síntesis de **dg2Bn**

Mediante espectrometría de masas se obtiene el pico asociado a [M + H]<sup>2+</sup> a m/z 289.2254. Se ha realizado la caracterización de este compuesto con técnicas de resonancia magnética nuclear,

asignando todas las señales de protón (Figura 63 y Figura 207 del ANEXO) y carbono (Figura 208 del ANEXO) con ayuda de los experimentos bidimensionales, homo y heteronucleares, COSY y HSQC (Figura 209 y Figura 210 del ANEXO). Además de indicar dicha asignación en las figuras correspondientes, se han recogido en la Tabla 19 indicando asimismo la correlación de señales entre protón y carbono.

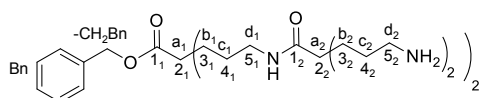


Tabla 19. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **dg2Bn** (espectro en D<sub>2</sub>O)

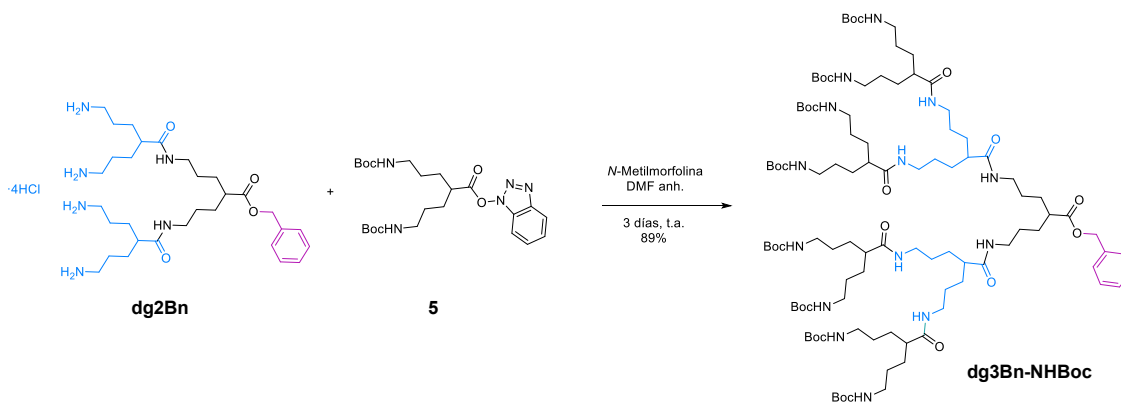
Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
Bn		7.51-7.40 (m, 5H)	135.9, 129.1, 128.9, 128.5
-CH <sub>2</sub> Bn		5.22 (s, 2H)	67.3
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.58-2.51 (m, 1H)	45.0
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.63-1.45 (m, 4H)	29.4
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.63-1.45 (m, 4H)	26.6
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.24-3.11 (m, 4H)	39.2
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.34-2.25 (m, 2H)	46.1
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.63-1.45 (m, 8H)	29.1
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.63-1.45 (m, 8H)	25.0
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.02-2.91 (m, 8H)	39.5

### III.3.3. Síntesis de **dg3Bn**

Mediante la misma estrategia sintética empleada anteriormente, se obtiene **dg3Bn-NHBoc** a partir de **dg2Bn** y del monómero activado (**5**) que, en una segunda etapa tras desprotección de los grupos aminos, da lugar a **dg3Bn**.

#### III.3.3.1. Síntesis de **dg3Bn-NHBoc**

La formación de enlaces amidas entre los grupos aminos del compuesto **dg2Bn** y el grupo carboxílico del compuesto **5** bajo condiciones anhidras, origina el dendrón de tercera generación **dg3Bn-NHBoc**. Para ello, es necesario emplear un exceso de monómero y asegurar así la reactividad de todos los grupos amino terminales de **dg2Bn**. Por esta misma razón, la reacción se deja en agitación a temperatura ambiente durante 3 días y, como en el caso anterior, se añade un exceso de *N*-metilmorfolina para asegurar la desprotonación de todos los grupos aminos.



El pico asociado a  $[M + Na]^{2+}$  se observa por espectrometría de masas a  $m/z$  1012.6784. Mediante técnicas de resonancia magnética nuclear de  $^1H$ ,  $^{13}C$  (SEFT), COSY y HSQC (Figura 211 - Figura 214 del ANEXO) se ha identificado y caracterizado este compuesto. En la Figura 61 se superponen los espectros de protón de **dg3Bn-NHBoc**, **dg2Bn-NHBoc** y **dg1Bn-NHBoc** en  $CDCl_3$ , donde se observa cómo las señales de las nuevas generaciones se van superponiendo a las anteriores, aumentando el valor de sus integrales. El espectro de **dg3Bn-NHBoc** se resuelve mejor empleando como disolvente  $DMSO-d_6$  (Figura 211 en ANEXO), sin embargo, para una correcta comparación, en la Figura 61 se ha incluido el espectro en  $CDCl_3$ .

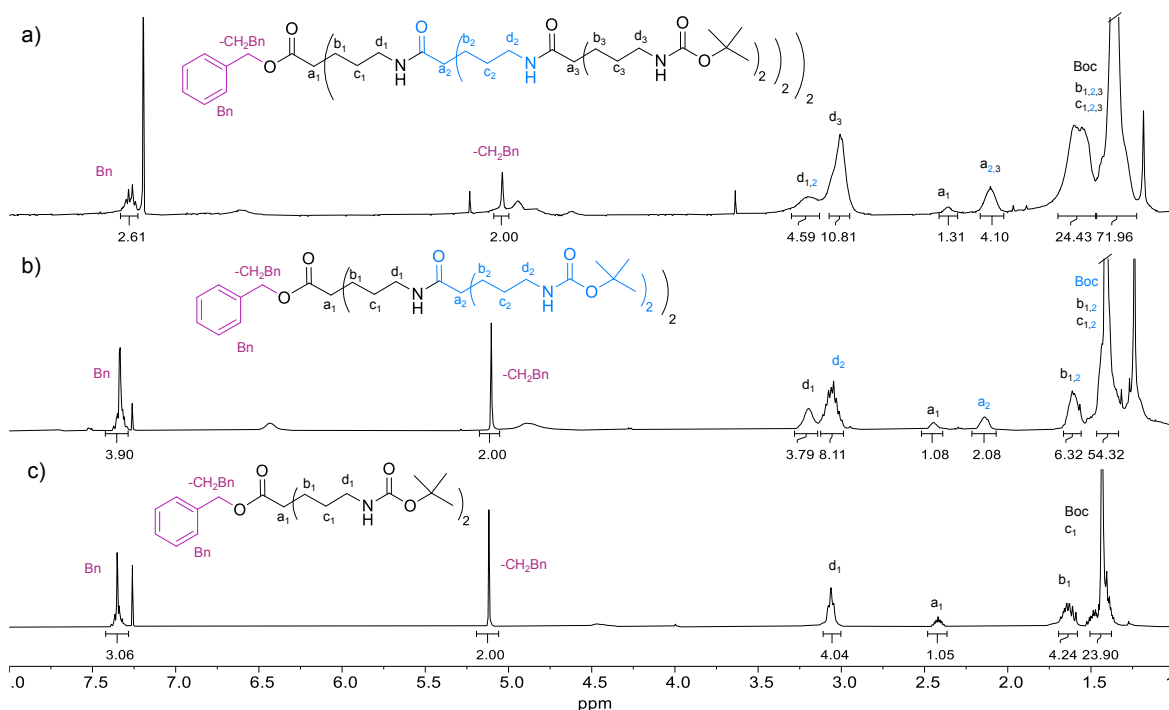
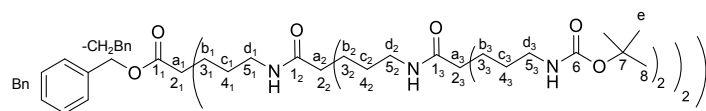


Figura 61. Espectros de RMN- $^1H$  de a) **dg3Bn-NHBoc** y b) **dg2Bn-NHBoc** y c) **dg1Bn-NHBoc** en  $CDCl_3$

En la Tabla 20 se recogen los desplazamientos químicos y la correlación correspondiente de las señales de protón y carbono de **dg3Bn-NHBoc**.


 Tabla 20. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **dg3Bn-NHBoc** (espectro en DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
Bn		7.37-7.31 (m, 5H)	136.2, 128.4, 128.0, 127.8
-CH <sub>2</sub> Bn		5.09 (s, 2H)	65.4
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.13-1.99 (m, 1H)	45.0
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.39-1.21 (m, 4H)	29.3
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.39-1.21 (m, 4H)	27.0
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.07-2.92 (m, 4H)	38.1
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.13-1.99 (m, 2H)	45.1
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.39-1.21 (m, 8H)	29.8
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.39-1.21 (m, 8H)	27.3
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.07-2.92 (m, 8H)	38.2
a <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	2.13-1.99 (m, 4H)	45.1
b <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	1.39-1.21 (m, 16H)	30.0
c <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	1.39-1.21 (m, 16H)	27.6
d <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>	2.90-2.79 (m, 16H)	39.8
e	8	1.35 (s, 72H)	28.3

### III.3.3.2. Síntesis de dg3Bn

La desprotección de los grupos amino del dendrón de tercera generación da lugar a **dg3Bn**. Esta reacción se hace siguiendo el procedimiento general descrito en este trabajo donde se adiciona el ácido en frío y se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante una noche. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente y se purifica mediante cromatografía de exclusión por tamaño para dar lugar a **dg3Bn** de forma cuantitativa.

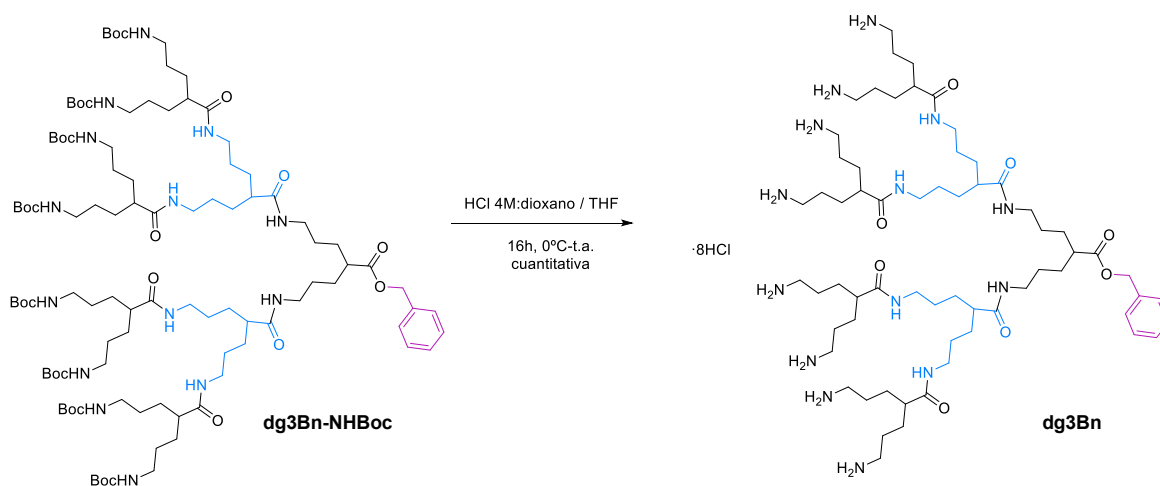


Figura 62. Síntesis de **dg3Bn**

Mediante espectrometría de masas se observa el pico asociado a  $[M + H]^{2+}$  a  $m/z$  601.4791. Además, **dg3Bn** se ha caracterizado por resonancia magnética nuclear de  $^1H$ ,  $^{13}C$  (SEFT), COSY y HSQC (Figura 63 y Figura 215 - Figura 218 del ANEXO), cuyos datos de desplazamientos químicos, así como la correlación de las señales de protón y carbono se recogen en la Tabla 21.

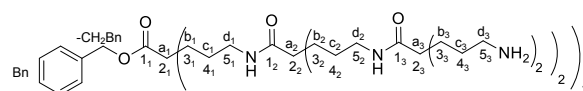


Tabla 21. Correlación de las señales en RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  en **dg3Bn** (espectro en  $D_2O$ )

Posición		RMN- $^1H$ (ppm)	RMN- $^{13}C$ (ppm)
Bn		7.58-7.39 (m, 5H)	136.0, 129.2, 129.0, 128.6
-CH <sub>2</sub> Bn		5.22 (s, 2H)	67.3
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.58-2.46 (m, 1H)	45.3
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.70-1.35 (m, 4H)	29.1
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.70-1.35 (m, 4H)	25.1
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.23-3.11 (m, 4H)	39.2
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.33-2.24 (m, 2H)	46.2
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.70-1.35 (m, 8H)	29.6
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.70-1.35 (m, 8H)	26.8
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.23-3.11 (m, 8H)	39.4
a <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	2.33-2.24 (m, 4H)	46.5
b <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	1.70-1.35 (m, 16H)	30.0
c <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	1.70-1.35 (m, 16H)	26.9
d <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>	3.05-2.91 (m, 16H)	39.6

En la Figura 63 se representan los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de las distintas generaciones de esta familia de dendrones donde se observa cómo varían las integrales de las señales correspondientes a los protones de la estructura del monómero, coincidiendo en todos los casos con la relación teórica. Las señales correspondientes al punto focal permanecen invariables, encontrándose a 7.5 – 7.4 ppm el multiplete correspondiente a los 5H del anillo de benceno y a 5.2 ppm el singlete que corresponde a los 2H del metileno del bencilo. La señal de los metileno terminales “d” aparece entre 3.0 – 2.9 ppm en todas las generaciones, desplazándose la señal correspondiente a “d<sub>1</sub>” y “d<sub>1,2</sub>” a 3.2 – 3.1 ppm en **dg2Bn** y **dg3Bn** respectivamente. Esto indica la transformación del entorno químico de estos metileno, que pasan de ser metileno en alfa a un grupo amino a metileno en alfa a un grupo amida. En el espectro de protón de **dg2Bn** también se aprecia la aparición de una señal a 2.3 – 2.2 ppm que corresponde a los protones a de la nueva generación “a<sub>2</sub>”. La señal de estos mismos protones aparece al mismo desplazamiento químico en la siguiente generación junto con los nuevos protones “a<sub>3</sub>”. Las señales correspondientes a los protones “b” y “c” se van superponiendo en todas las generaciones.

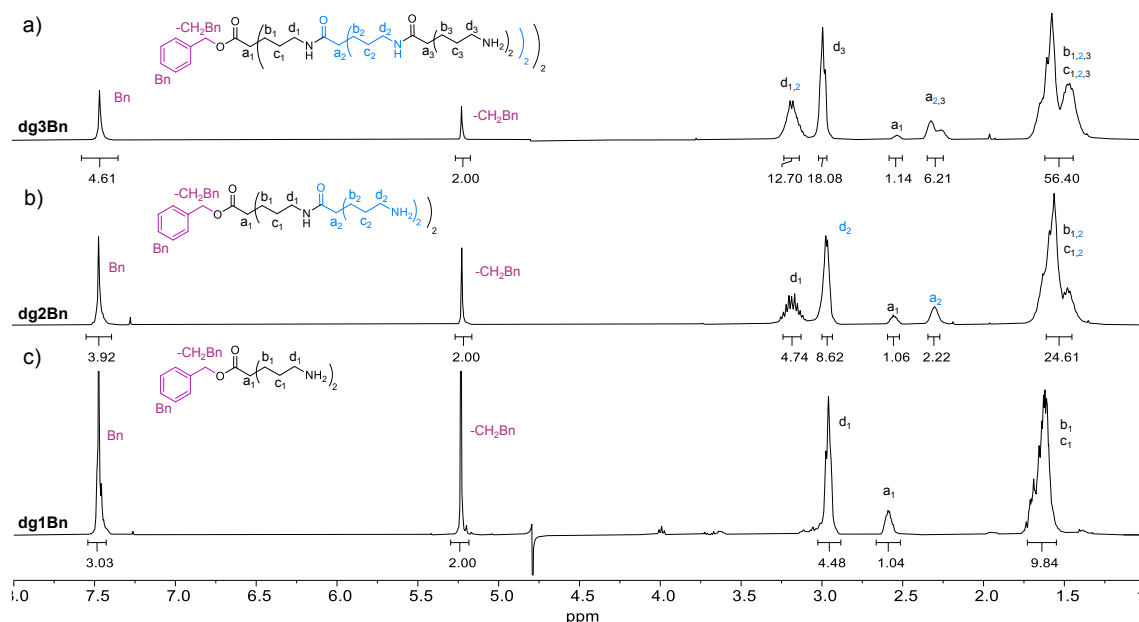


Figura 63. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H en D<sub>2</sub>O de a) **dg3Bn** Ratio teórico [ $H_{a1}/H_{d1,2}$ :1/12]; [ $H_{a1}/H_{d3}$ :1/16]; [ $H_{a1}/H_{a2,3}$ :1/6]; [ $H_{a1}/H_{(b+c)}$ :1/56] b) **dg2Bn** Ratio teórico [ $H_{a1}/H_{d1}$ :1/4]; [ $H_{a1}/H_{d2}$ :1/8]; [ $H_{a1}/H_{a2}$ :1/2]; [ $H_{a1}/H_{(b+c)}$ :1/24] c) **dg1Bn** Ratio teórico [ $H_{a1}/H_{-CH_2Bn}$ :1/2]; [ $H_{a1}/H_{d1}$ :1/4]; [ $H_{a1}/H_{(b+c)}$ :1/8]

### III.3.4. Síntesis de **dg1-ino**

Tal y como se ha detallado en el apartado III.3. Síntesis de nuevos dendrones amino terminales, otra familia de dendrones que se ha sintetizado y caracterizado en este trabajo contiene un grupo alquino en su punto focal, otorgándole así las propiedades de reactividad propias del triple enlace como, por ejemplo, las reacciones tipo click con moléculas o superficies que contengan grupos azida.

Para abordar la síntesis de esta familia de dendrones se ha empleado la misma unidad estructural que para la síntesis y crecimiento de las estructuras dendríméricas anteriores, donde las posiciones relativas de los grupos amino se encuentran a 1,7. El paso inicial en esta ruta sintética es, tal y como aparece en la Figura 64, la inserción del triple enlace en el punto focal del dendrón que, mediante la desprotección de los grupos amino, da lugar a **dg1-ino**.

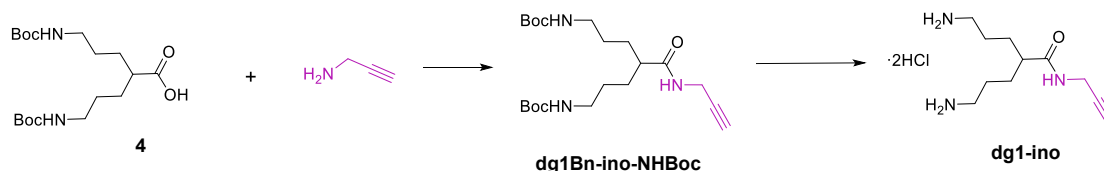


Figura 64. Esquema sintético de **dg1-ino**

### III.3.4.1. Síntesis de **dg1-ino-NHBoc**

Se hace reaccionar el monómero **4** con propargilamina para que, mediante la formación de un enlace amida, el grupo alquino se incorpore a la estructura. Se emplea 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) como agente de acoplamiento y la reacción se lleva a cabo en condiciones anhidras durante una noche a temperatura ambiente.

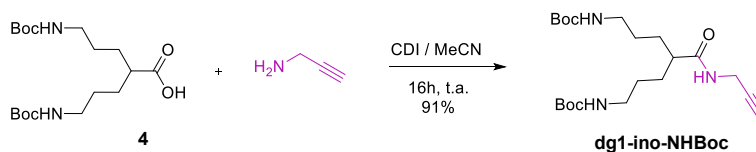


Figura 65. Síntesis de **dg1-ino-NHBoc**

El producto obtenido ha sido completamente caracterizado por resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (SEFT), COSY y HSQC (Figura 219 - Figura 222 del ANEXO). Además, se ha identificado mediante espectrometría de masas el pico asociado a  $[\text{M} + \text{H}]^+$  a  $m/z$  412.2805. En el espectro de protón de **dg1-ino-NHBoc** (Figura 219 del ANEXO) se observa la aparición de las señales correspondientes a los protones introducidos en la estructura con propargilamina donde la señal más característica es la que aparece sobre 4 ppm, que corresponde a los 2H del metileno introducido. El desplazamiento químico de la señal correspondiente al protón terminal del triple enlace coincide con la señal del protón “a<sub>1</sub>”, que además se ve ligeramente desplazada de 2.33 ppm en el producto de partida (**4**) a 2.22 ppm en **dg1-ino-NHBoc**.

### III.3.4.2. Síntesis de **dg1-ino**

Siguiendo el procedimiento general de desprotección de los grupos amino se obtiene **dg1-ino**. En este caso, la reacción se lleva a cabo en condiciones anhidras y se hace un seguimiento mediante

cromatografía en capa fina para mantenerla el menor tiempo posible, obteniéndose un resultado cuantitativo a las 2 horas. De esta manera, se ha observado que no se produce la adición de HCl al triple enlace.

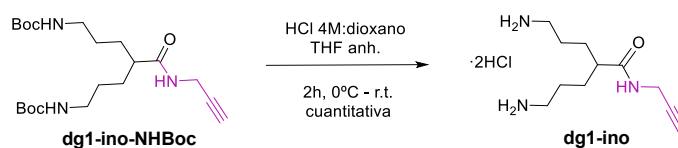


Figura 66. Síntesis de **dg1-ino**

Por espectrometría de masas se observa el pico asociado a  $[M + H]^+$  a  $m/z$  212.1757. Este compuesto ha sido completamente caracterizado por resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (SEFT), COSY y HSQC (Figura 67, Figura 77 y Figura 223 - Figura 226 del ANEXO) observándose la desaparición de las señales del grupo Boc y recogiendo la asignación y correlación de las señales en la Tabla 22.

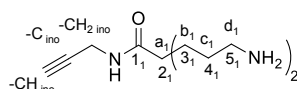


Tabla 22. Correlación de las señales en RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  en **dg1-ino** (espectro en  $\text{D}_2\text{O}$ )

Posición		RMN- $^1\text{H}$ (ppm)	RMN- $^{13}\text{C}$ (ppm)
-CH <sub>ino</sub>		2.67 (s, 1H)	72.1
-CH <sub>2</sub> <sub>ino</sub>		4.05-4.02 (d, 2H)	29.2
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.53-2.22 (m, 1H)	45.9
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.76-1.55 (m, 4H)	28.9
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.76-1.55 (m, 4H)	24.9
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.09-2.98 (m, 4H)	39.5

En la Figura 67 se han superpuesto los espectros de resonancia magnética nuclear de protón de **dg1-ino-NHBoc** y de **dg1-ino**. Estos experimentos se han tenido que realizar en diferentes disolventes deuterados debido a las diferentes solubilidades de los compuestos, no obstante, lo más destacable es cómo la señal correspondiente al hidrógeno del triple enlace que aparece a 2.17 ppm, coincidiendo con la señal correspondiente a “a<sub>1</sub>”, en el espectro de **dg1-ino-NHBoc** en  $\text{CDCl}_3$ , se desplaza a 2.67 ppm en el espectro de **dg1-ino** en  $\text{D}_2\text{O}$ . Esto mismo se observará en las siguientes generaciones en las que, para los dendrones amino protegidos aparecerán las señales de “a” y “-CH<sub>ino</sub>” superpuestas y para los dendrones amino terminales se separarán.

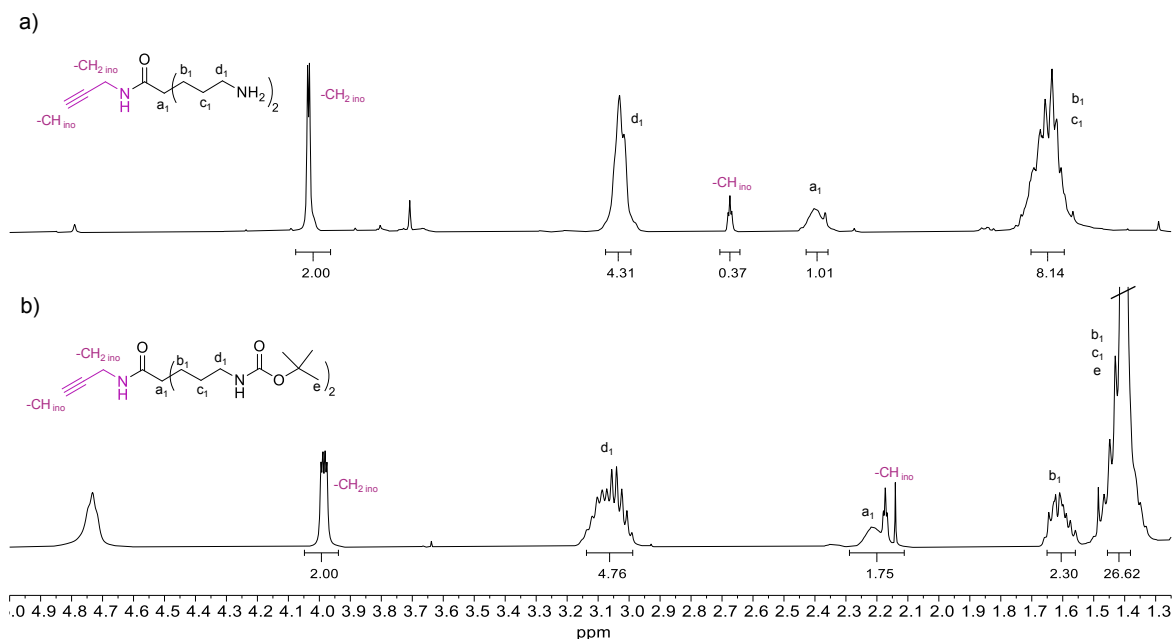


Figura 67. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de a) **dg1-ino** en D<sub>2</sub>O y b) **dg1-ino-NHBoc** en CDCl<sub>3</sub>

### III.3.5. Síntesis de **dg2-ino**

Para la síntesis de **dg2-ino** se han llevado a cabo dos estrategias sintéticas diferentes. Una de ellas (a la que se hace referencia como ruta a)) parte del dendrón de segunda generación con el grupo bencilo en el punto focal (**dg2Bn-NHBoc**) para dar lugar a dicho dendrón con el ácido carboxílico libre tras ser hidrogenado. Posteriormente, se introduce propargilamina en el punto focal obteniéndose **dg2-ino-NHBoc** (Figura 68).

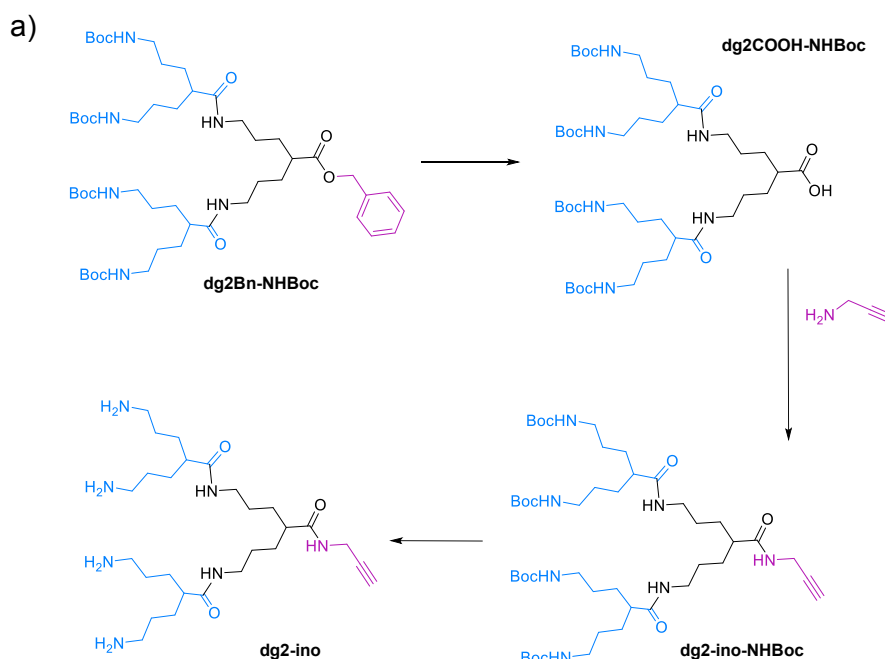


Figura 68. Esquema sintético a) de **dg2-ino**

La otra ruta sintética que se ha empleado (a la que se hace referencia como ruta b)) es la correspondiente al procedimiento general de crecimiento del dendrón de primera generación con triple enlace en el punto focal (**dg1-ino**), con el monómero activado (**5**) como unidad de crecimiento para dar lugar a **dg2-ino-NHBoc** (Figura 69).

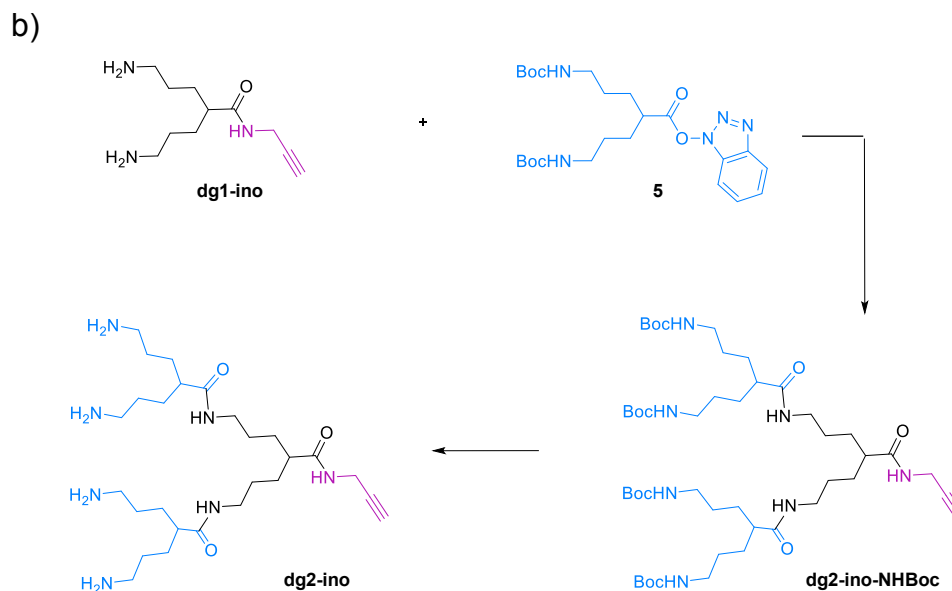


Figura 69. Esquema sintético b) de **dg2-ino**

El último paso, que es común para las dos vías, consiste en la desprotección de los grupos amino terminales para finalmente dar lugar a **dg2-ino**.

Mediante las dos rutas mencionadas se obtiene el dendrón objetivo con buenos rendimientos, teniendo así la posibilidad de seguir una u otra en función de los reactivos previamente preparados de los que se disponga.

### III.3.5.1. Síntesis de **dg2-ino-NHBoc**

#### Ruta a)

Para la obtención de este producto mediante esta vía, primero es necesaria la síntesis del dendrón de segunda generación con el ácido carboxílico libre. Para ello se lleva a cabo una reacción de hidrogenación empleando hidróxido de paladio (II) como catalizador. Posteriormente se introduce propargilamina en el punto focal a través de la formación de un enlace amida, empleando el agente de acoplamiento CDI en acetonitrilo, tal y como se ha descrito para la síntesis de **dg1-ino-NHBoc** en la sección III.3.4.1 de esta tesis.

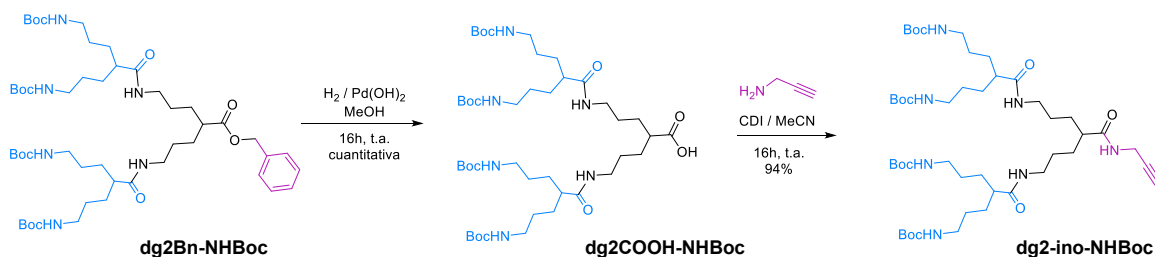


Figura 70. Síntesis a) de **dg2-ino-NHBoc**

En la Figura 71 se pueden observar los espectros de protón de los distintos productos. Se aprecia cómo desaparecen las señales correspondientes al grupo bencilo tras el primer paso, es decir, de **dg2Bn-NHBoc** a **dg2COOH-NHBoc** y cómo aparecen las señales correspondientes al resto de propargilamina tras el segundo paso, confirmando la síntesis de **dg2-ino-NHBoc**.

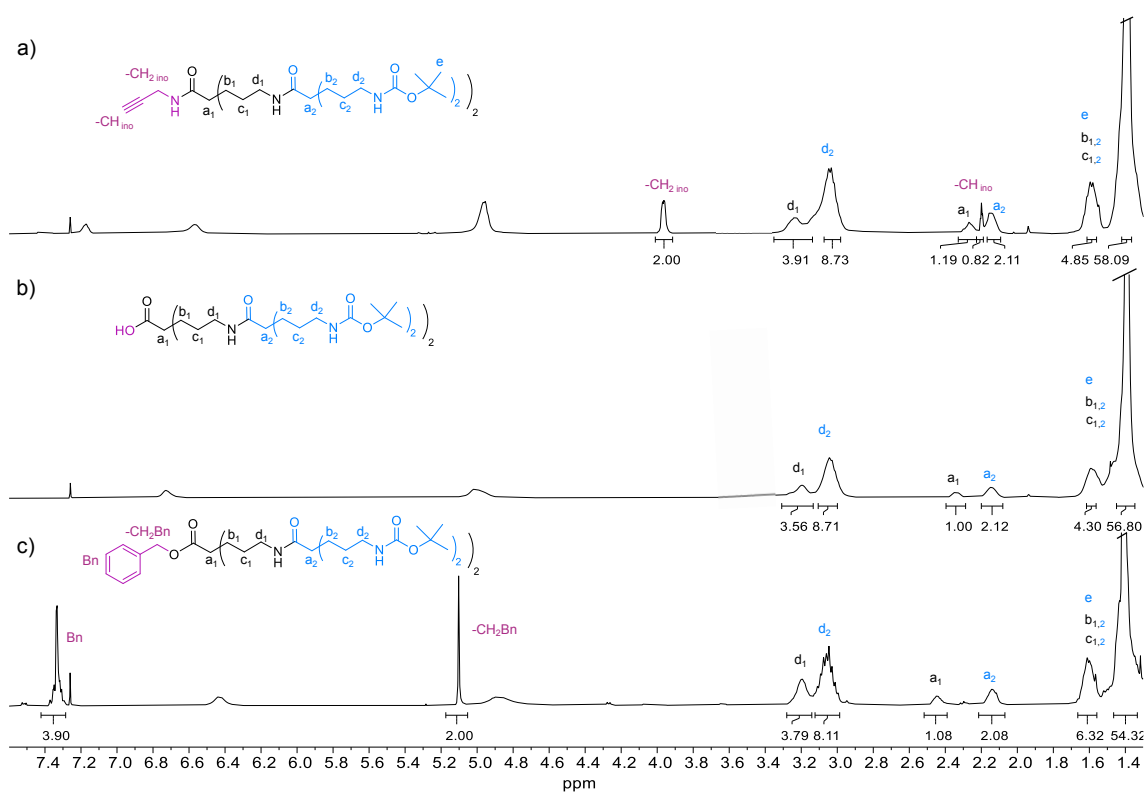


Figura 71. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de a) **dg2-ino-NHBoc** b) **dg2COOH-NHBoc** y c) **dg2Bn-NHBoc** en CDCl<sub>3</sub>

### Ruta b)

Siguiendo las condiciones de reacción descritas para el crecimiento de estas estructuras dendríméricas, se disuelve **dg1-ino** en DMF anhidra y se añade *N*-metilmorfolina. Al igual que en el caso de los dendrones con el grupo bencilo en el punto focal, éstos tampoco se tratan con la resina de intercambio iónico, sino que se adiciona un exceso de base en el crudo de reacción.

Posteriormente, se hace reaccionar, durante una noche a temperatura ambiente con el monómero activado **5** para dar lugar a **dg2-ino-NHBoc** con un buen rendimiento y sin necesidad de purificación.

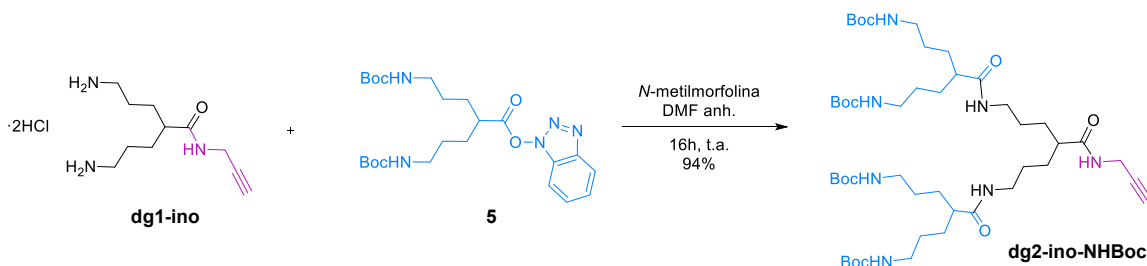


Figura 72. Síntesis b) de **dg2-ino-NHBoc**

Se ha identificado el pico asociado a  $[M + H]^+$  por espectrometría de masas a  $m/z$  924.6393. Además, **dg2-ino-NHBoc** ha sido caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón y carbono (Figura 227 y Figura 228 del ANEXO) siendo posible la asignación de todas las señales gracias a la ayuda de los espectros bidimensionales COSY y HSQC (Figura 229 y Figura 230 del ANEXO). En la Tabla 23 se recogen los datos de los espectros de protón y carbono de este producto.

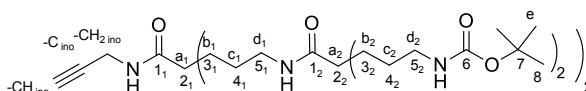


Tabla 23. Correlación de las señales en  $RMN-^1H$  y  $RMN-^{13}C$  en **dg2-ino-NHBoc** (espectro en  $CDCl_3$ )

Posición		$RMN-^1H$ (ppm)	$RMN-^{13}C$ (ppm)
-CH <sub>ino</sub>		2.20 (s, 1H)	71.3
-CH <sub>2</sub> <sub>ino</sub>		3.98-3.96 (d, 2H)	29.0
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.35-2.25 (m, 1H)	45.3
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.48-1.31 (m, 4H)	30.0
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.48-1.32(m, 4H)	28.0
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.30-3.19 (m, 4H)	40.2
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.17-2.10 (m, 2H)	46.1
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.64-1.53 (m,4H)	29.7
		1.48-1.31 (m, 4H)	
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.48-1.31 (m, 8H)	27.5
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.15-2.98 (m, 8H)	38.7
e	8	1.39 (s, 36H)	28.5

### III.3.5.2. Síntesis de dg2-ino

Una vez obtenido **dg2-ino-NHBoc**, se obtiene **dg2-ino** mediante la desprotección de los grupos aminos en medio ácido. En este proceso, al igual que con la primera generación, se tiene la precaución de mantener el sistema de reacción en condiciones anhidras para evitar adiciones al triple enlace.

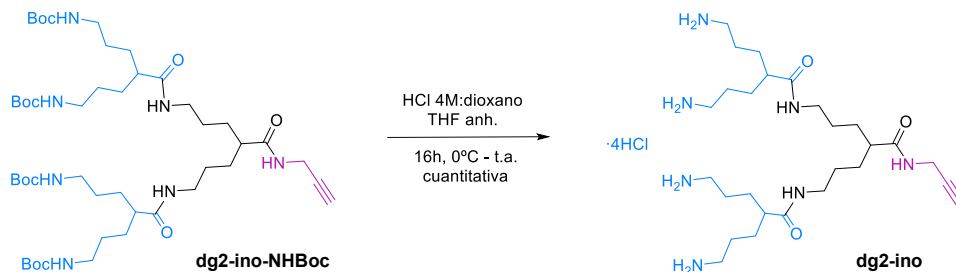


Figura 73. Síntesis de **dg2-ino**

El producto obtenido de manera cuantitativa se ha identificado mediante espectrometría de masas al observar el pico correspondiente a  $[M + H]^+$  a  $m/z$  524.4283. También se ha caracterizado completamente por técnicas de resonancia magnética nuclear (Figura 77 y Figura 231 - Figura 234 del ANEXO) cuya asignación de las señales presentes en los espectros de protón y carbono se recoge en la Tabla 24.

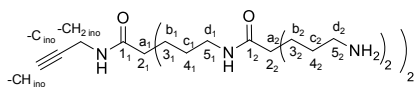


Tabla 24. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **dg2-ino** (espectro D<sub>2</sub>O)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
-CH <sub>ino</sub>		2.67 (s, 1H)	71.9
-CH <sub>2</sub> <sub>ino</sub>		4.02-4.00 (d, 2H)	28.8
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.38-2.34 (m, 1H)	46.2
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.69-1.51 (m, 4H)	30.1
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.69-1.51 (m, 4H)	26.8
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.99-3.15 (m, 4H)	39.3
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.38-2.34 (m, 2H)	46.3
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.69-1.51 (m, 8H)	29.1
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.69-1.51 (m, 8H)	25.0
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.10-2.98 (m, 8H)	39.5

### III.3.6. Síntesis de **dg3-ino**

La síntesis de la tercera generación se ha intentado abordar también siguiendo las dos estrategias descritas anteriormente. Sin embargo, en el caso de la ruta a), en la que se parte de **dg3Bn-NHBoc**, no se han obtenido buenos resultados. La reacción de hidrogenación para la desprotección del grupo -COOH sucede de manera cuantitativa, mientras que no se ha conseguido la inserción de propargilamina en el punto focal mediante la formación del enlace amida. Para ello se han probado diferentes condiciones como un aumento en el tiempo de reacción, en los equivalentes adicionados de CDI y en los de propargilamina. También se ha pretendido la formación de dicho enlace amida con las condiciones de reacción de crecimiento empleada en la síntesis de dendrímeros, es decir, la activación del ácido con HOBt, DMAP y EDCI en DCM anhidro en una primera etapa y el posterior acoplamiento con la amina en una segunda etapa. En ningún caso se ha observado la introducción del resto propargilo en la estructura del dendrón. Esto puede deberse a un posible *back-folding* de los brazos de la molécula, dificultando así el acceso al grupo ácido carboxílico e imposibilitando su reactividad.

De este modo, la generación más alta de esta familia de dendrones sintetizada en este trabajo se lleva a cabo siguiendo los procedimientos generales de crecimiento / desprotección ya descritos.

#### III.3.6.1. Síntesis de **dg3-ino-NHBoc**

La formación de enlaces amida entre los grupos amino de **dg2-ino** y el grupo carboxílico de **5** en las condiciones empleadas, da lugar a la formación de **dg3-ino-NHBoc**. En este caso, la mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 3 días con el fin de asegurar la reacción de todos y cada uno de los grupos amino terminales y evitar así la obtención de una estructura con defectos.

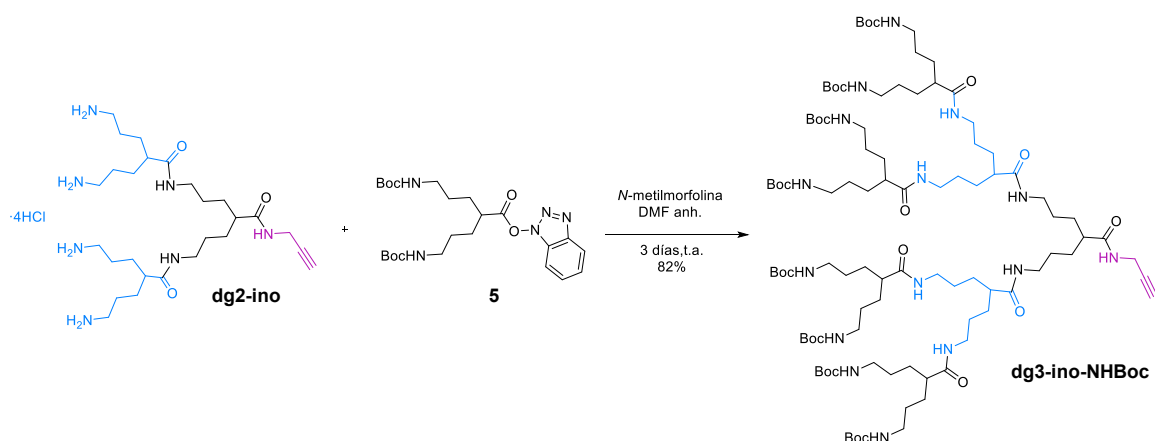


Figura 74. Síntesis de **dg3-ino-NHBoc**

La síntesis de este dendrón en escala de gramos se ha obtenido con un rendimiento del 82%. Mediante espectrometría de masas se ha identificado el pico correspondiente a  $[M + Na]^{2+}$  a  $m/z$

986.6729. En el espectro de protón de **dg3-ino-NHBoc** se observa una distribución de señales análoga al espectro del compuesto de segunda generación, apreciándose la superposición de las señales de la nueva generación con las señales correspondientes a los metilenos de las generaciones anteriores ensanchándose así, las señales. Asimismo, la señal correspondiente al protón terminal del triple enlace, aparece superpuesta con las señales correspondientes a los protones “a<sub>1,2,3</sub>”.

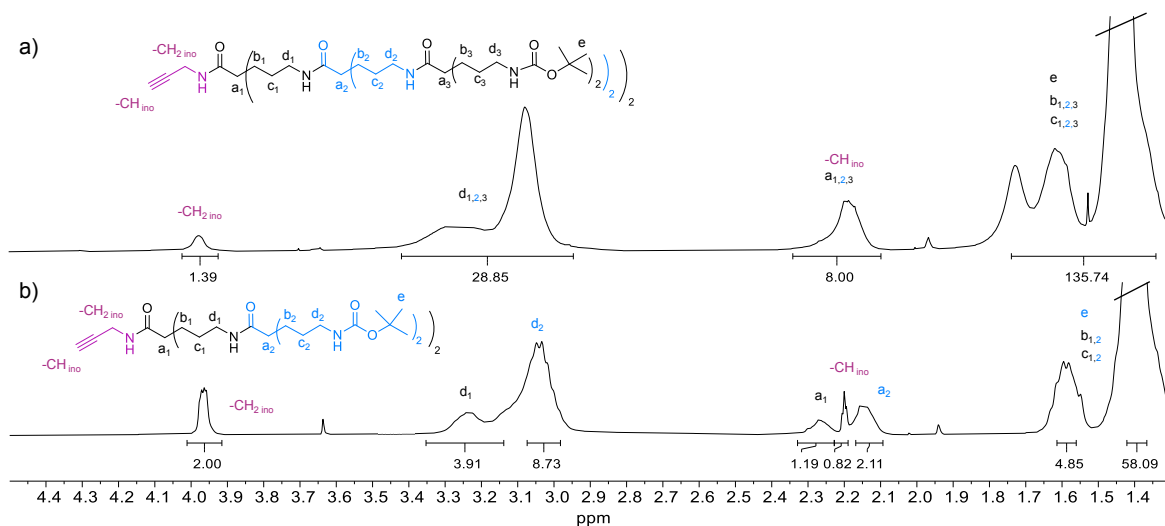
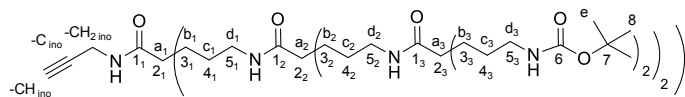


Figura 75. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de a) **dg3-ino-NHBoc** y b) **dg2-ino-NHBoc** en CDCl<sub>3</sub>

Se ha caracterizado **dg3-ino-NHBoc** por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 235 - Figura 238 del ANEXO). Se han asignado todas las señales y la correlación entre las señales de protón y carbono se recogen en la Tabla 25.


 Tabla 25. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **dg3-ino-NHBoc** (espectro en CDCl<sub>3</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
-CH <sub>ino</sub>		2.32-2.08 (m, 1H)	71.1
-CH <sub>2</sub> <sub>ino</sub>		3.98 (s, 2H)	28.9
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.32-2.08 (m, 1H)	46.3
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.82-1.19 (m, 4H)	29.8
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.82-1.19 (m, 4H)	27.8
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.42-2.95 (m, 4H)	38.9
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.32-2.08 (m, 2H)	46.3
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.82-1.19 (m, 8H)	29.8
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.82-1.19 (m, 8H)	28.0
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.42-2.95 (m, 8H)	39.1
a <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	2.32-2.08 (m, 4H)	46.3
b <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	1.82-1.19 (m, 16H)	30.1
c <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	1.82-1.19 (m, 16H)	28.1
d <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>	3.42-2.95 (m, 16H)	40.4
e	8	1.43 (s, 72H)	28.6

### III.3.6.2. Síntesis de dg3-ino

La desprotección de los grupos amino de **dg3-ino-NHBoc** en medio ácido da lugar al producto deseado de manera cuantitativa. Para ello, bajo condiciones anhidras, se disuelve el dendrón de tercera generación con los aminos protegidos en THF anhidro y se enfría en baño de agua-hielo. Posteriormente se adiciona, gota a gota, HCl 4M en dioxano y se deja en agitación constante durante una noche. Pasado este tiempo, se elimina completamente el disolvente y se purifica mediante cromatografía de exclusión molecular empleando Sephadex<sup>TM</sup> G10 como fase estacionaria.

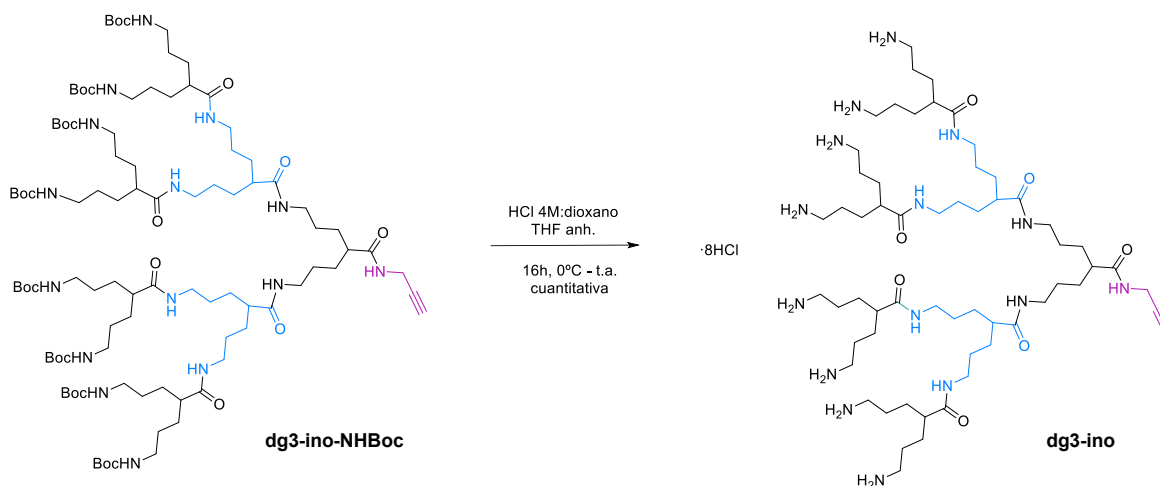


Figura 76. Síntesis de **dg3-ino**

Mediante espectrometría de masas se observa el pico correspondiente a  $[M + H]^{2+}$  a  $m/z$  574.9703. **dg3-ino** se ha caracterizado completamente por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 77 y Figura 239 - Figura 242 del ANEXO), recogiendo la asignación de las señales de protón y carbono en la Tabla 26.

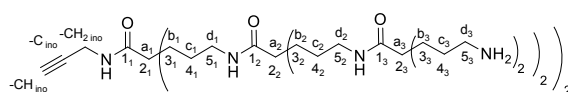


Tabla 26. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **dg3-ino** (espectro D<sub>2</sub>O)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
-CH <sub>ino</sub>		2.32-2.08 (m, 1H)	71.1
-CH <sub>2</sub> <sub>ino</sub>		3.98 (s, 2H)	28.9
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.32-2.08 (m, 1H)	46.3
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.82-1.19 (m, 4H)	29.8
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.82-1.19 (m, 4H)	27.8
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.42-2.95 (m, 4H)	38.9
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.32-2.08 (m, 2H)	46.3
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.82-1.19 (m, 8H)	29.8
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.82-1.19 (m, 8H)	28.0
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.42-2.95 (m, 8H)	39.1
a <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	2.32-2.08 (m, 4H)	46.3
b <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	1.82-1.19 (m, 16H)	30.1
c <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	1.82-1.19 (m, 16H)	28.1
d <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>	3.42-2.95 (m, 16H)	40.4

En la Figura 77 se muestran los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de a) **dg3-ino** b) **dg2-ino** y c) **dg1-ino** en D<sub>2</sub>O. Las integrales de las señales de protón varían entre las distintas generaciones, ajustándose a la

relación teórica indicada en el pie de la figura. La señal correspondiente a los metilenos terminales “d” aparece entre 3.3 – 2.9 ppm en todas las generaciones. En los espectros del dendrón de segunda y tercera generación, las señales correspondientes a “a<sub>2</sub>” y “a<sub>3</sub>” aparecen superpuestas con la señal correspondiente a “a<sub>1</sub>”. Las señales correspondientes a los protones “b” y “c” se van superponiendo en todas las generaciones produciéndose un ensanchamiento de las señales.

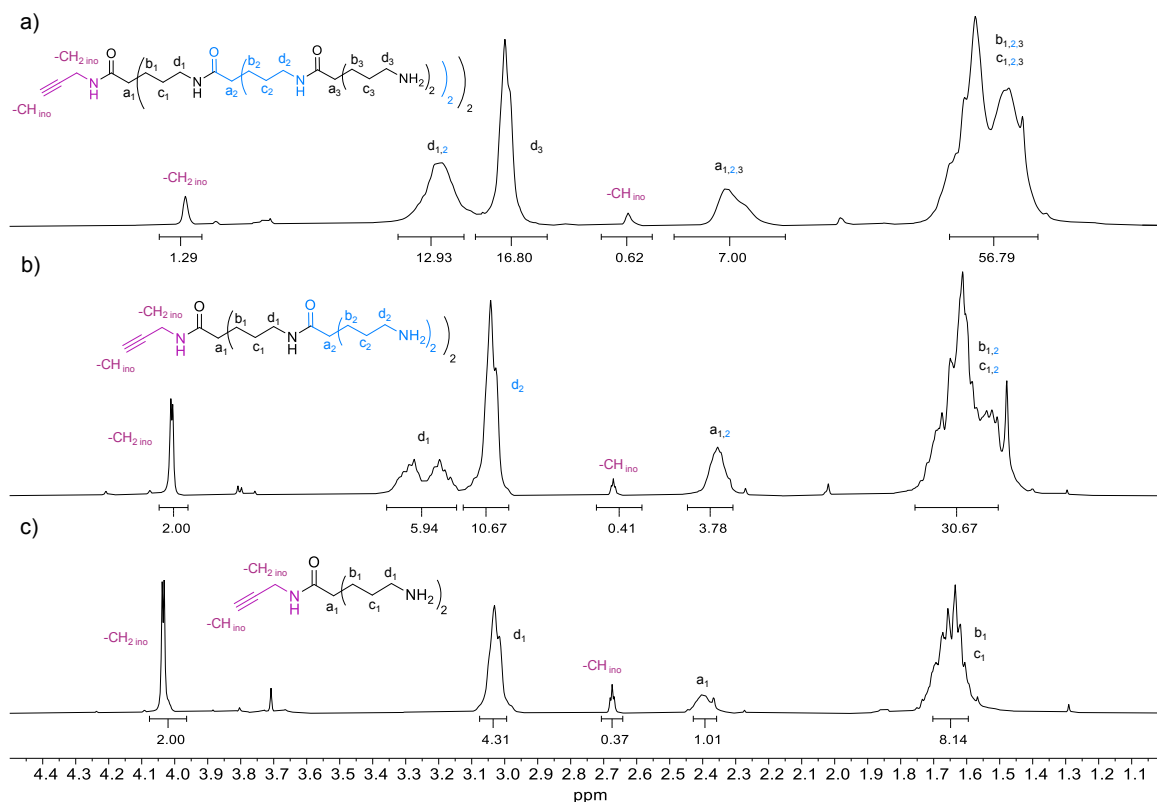


Figura 77. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H en D<sub>2</sub>O de a) **dg3-ino** Ratio teórico [H<sub>a</sub>/H-CH<sub>2</sub>ino:7/2]; [H<sub>a</sub>/H<sub>d1,2</sub>:7/12]; [H<sub>a</sub>/H<sub>a3</sub>:7/16]; [H<sub>a</sub>/H<sub>(b+c)</sub>:7/56] b) **dg2-ino** Ratio teórico [H<sub>a</sub>/H-CH<sub>2</sub>ino:3/2]; [H<sub>a</sub>/H<sub>d1</sub>:3/4]; [H<sub>a</sub>/H<sub>d2</sub>:3/8]; [H<sub>a</sub>/H<sub>(b+c)</sub>:3/24] c) **dg1-ino** Ratio teórico [H<sub>a1</sub>/H-CH<sub>2</sub>ino:1/2]; [H-CH<sub>2</sub>ino /H-CHino:2/1]; [H<sub>a1</sub>/H<sub>a1</sub>:1/4]; [H<sub>a1</sub>/H<sub>(b+c)</sub>:1/8]

### III.3.7. Síntesis de **dg1N<sub>3</sub>**

Otro tipo de dendrones sintetizados en este trabajo son, tal y como se ha detallado anteriormente, aquellos que poseen un grupo azida en su punto focal. La estructura base del dendrón continúa siendo la misma, por tanto, para su síntesis se parte del compuesto **4** y se introduce 3-azidopropilamina tal y como se refleja en la Figura 78.

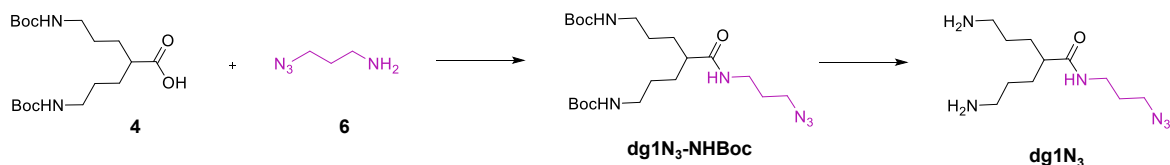


Figura 78. Esquema sintético de **dg1N<sub>3</sub>**

### III.3.7.1. Síntesis de **6**

Para la inserción del grupo azida en el punto focal, el primer paso es la sustitución de bromo por azida en 3-bromopropilamina. Esta reacción se lleva a cabo empleando un exceso de azida sódica en agua, calentando a 80°C durante 3 días. La peculiaridad de esta reacción sucede en la extracción y aislamiento del producto, la cual se realiza con dietiléter que, debido a la alta volatilidad del compuesto **6**, se elimina evaporando a temperatura ambiente.

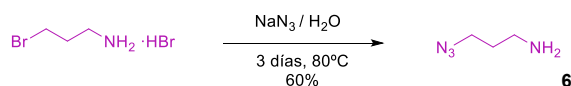


Figura 79. Síntesis de **6**

### III.3.7.2. Síntesis de **dg1N<sub>3</sub>-NHBoc**

El acoplamiento entre los compuestos **4** y **6** da lugar a la formación de un enlace amida por el cual queda introducido el resto propilazido en el punto focal del dendrón. Las condiciones de esta reacción son las mismas que se han empleado para la síntesis del dendrón con triple enlace, es decir, 1,1'-carbonyldiimidazol en acetonitrilo durante un día a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, y tras la elaboración de la reacción, se obtiene **dg1N<sub>3</sub>-NHBoc** sin necesidad de purificación.

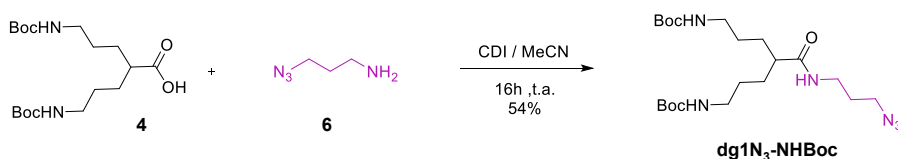


Figura 80. Síntesis de **dg1N<sub>3</sub>-NHBoc**

El compuesto obtenido se ha estudiado por espectrometría de masas donde se observa el pico correspondiente a  $[\text{M} + \text{H}]^+$  a  $m/z$  457.3131. Además, se ha caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 85 y Figura 244 - Figura 247 del ANEXO). En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **dg1N<sub>3</sub>-NHBoc** (Figura 85 y Figura 244 del ANEXO) se aprecia cómo se desplaza la señal correspondiente al protón unido al carbono terciario de 2.33 ppm en el producto de partida **4** a 2.15 ppm en el espectro de **dg1N<sub>3</sub>-NHBoc**. Esto es debido a que el entorno químico de

este protón se ha visto modificado con la formación del enlace amida. Además, se observan las señales correspondientes a los tres metilenos introducidos con la cadena de propilazida.

### III.3.7.3. Síntesis de $dg1N_3$

La desprotección de los grupos amino de  $dg1N_3\text{-NHBoc}$  en medio ácido, da lugar al compuesto con el grupo azida en el punto focal de manera cuantitativa.

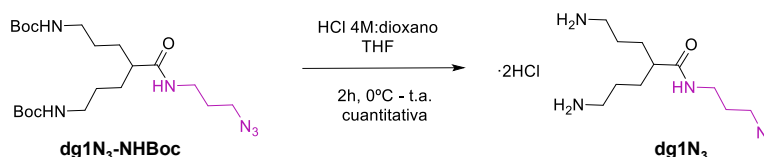


Figura 81. Síntesis de  $dg1N_3$

Para ello se siguen las condiciones descritas en el procedimiento general de desprotección de grupos aminos. El compuesto obtenido ha sido identificado mediante el pico correspondiente a  $[M + H]^+$  a  $m/z$  257.2081 por espectrometría de masas. Este compuesto también ha sido completamente caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 87 y Figura 248 - Figura 251 del ANEXO).

### III.3.8. Síntesis de $dg2N_3$

El crecimiento de  $dg1N_3$  mediante el protocolo general da lugar al dendrón de segunda generación. Este crecimiento consta de la etapa de acoplamiento con el monómero activado (**5**) y la posterior etapa de desprotección de los grupos aminos terminales.

#### III.3.8.1. Síntesis de $dg2N_3\text{-NHBoc}$

La reacción de acoplamiento entre  $dg1N_3$  y el monómero activado (**5**) se lleva a cabo en DMF anhidra empleando un exceso de base. Pasado este tiempo se elabora la reacción y, tras precipitación en hexano, se obtiene  $dg2N_3\text{-NHBoc}$  como un sólido incoloro.

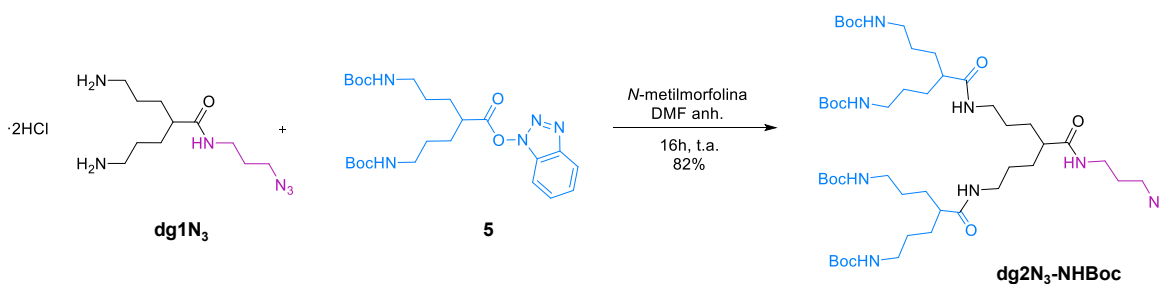


Figura 82. Síntesis de  $dg2N_3\text{-NHBoc}$

El compuesto obtenido ha sido identificado a través del pico correspondiente  $[M + H]^+$  a  $m/z$  969.6702 por espectrometría de masas. Además, este producto ha sido caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 85 y Figura 252 - Figura 255 del ANEXO). En el espectro de protón se identifican las señales correspondientes a todos los protones de la estructura. La distribución de señales a lo largo del espectro de **dg2N<sub>3</sub>-NHBoc** es muy similar a la de **dg1N<sub>3</sub>-NHBoc**, variando sobre todo el valor de las integrales y el ensanchamiento de las señales. La señal de los protones de los metilenos terminales de cada generación se desdobra y algunos se superponen con las señales de los metilenos correspondientes al resto de propilazida.

### III. 3.8.2. Síntesis de dg2N<sub>3</sub>

La desprotección de los grupos aminos del dendrón anterior da lugar a **dg2N<sub>3</sub>**. Mediante el procedimiento general de desprotección se obtiene este dendrón de manera cuantitativa sin necesidad de purificar.

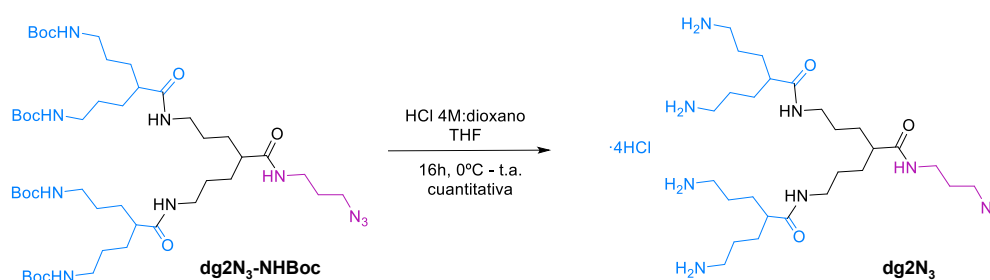
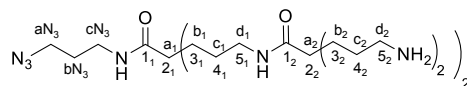


Figura 83. Síntesis de **dg2N<sub>3</sub>**

Se ha observado el pico correspondiente a  $[M + H]^+$  a  $m/z$  569.4606 mediante espectrometría de masas. Este dendrón ha sido caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 87 y Figura 256 - Figura 259 del ANEXO) donde ha sido posible asignar todas las señales cuya correlación se recoge en la Tabla 27.


 Tabla 27. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **dg2N<sub>3</sub>** (espectro DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
aN <sub>3</sub>		3.38-3.35 (t, 2H)	48.4
bN <sub>3</sub>		1.70-1.62 (m, 2H)	28.4
cN <sub>3</sub>		3.13-3.08 (m, 2H)	35.7
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.25-2.15 (m, 1H)	45.1
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.55-1.26 (m, 4H)	30.1
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.55-1.26 (m, 4H)	27.3
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.07-2.89 (m, 4H)	38.4
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.25-2.15 (m, 2H)	44.2
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.55-1.26 (m, 8H)	39.2
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.55-1.26 (m, 8H)	24.8
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	2.82-2.69 (m, 8H)	38.6

### III.3.9. Síntesis de **dg3N<sub>3</sub>**

La síntesis de la generación más alta que se ha preparado de esta familia de dendrones se lleva a cabo siguiendo el procedimiento general.

#### III.3.9.1. Síntesis de **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc**

El acoplamiento entre **dg2N<sub>3</sub>** y **5** se realiza siguiendo las condiciones descritas en el procedimiento general de crecimiento, el cual consta en hacer reaccionar ambos reactivos en DMF anhidra en presencia de *N*-metilmorfolina para dar lugar a **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc**. En este caso, la reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 3 días para asegurar la completa formación del dendrón de tercera generación. **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc** se obtiene con muy buen rendimiento tras precipitación en hexano.

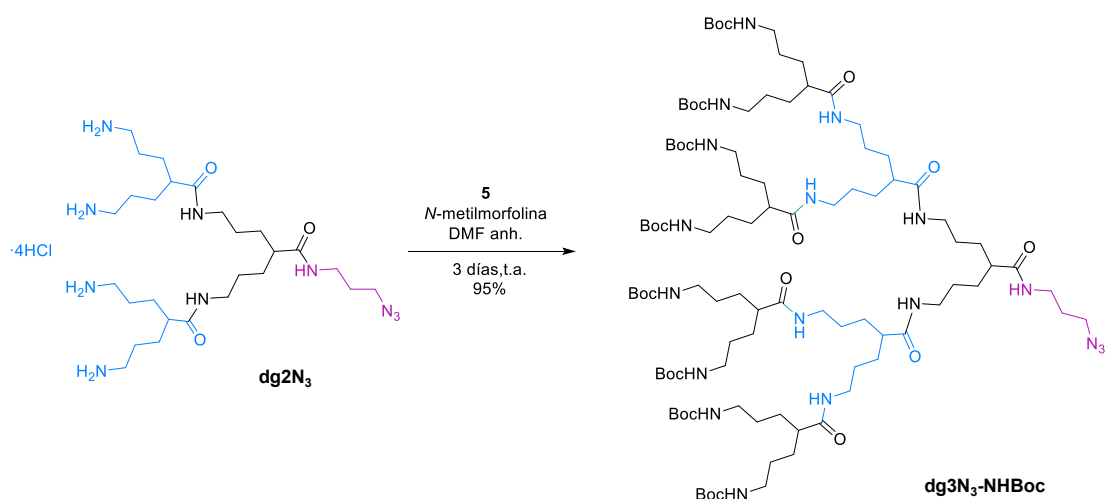
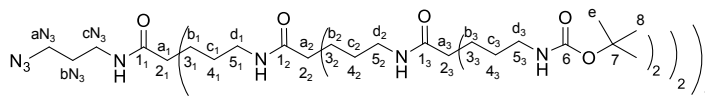


Figura 84. Síntesis de **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc**

Mediante espectrometría de masas se observa el pico correspondiente a  $[M + Na]^{2+}$  a  $m/z$  1008.6871 por el que se identifica **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc**. Además, este producto ha sido caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 85 y Figura 260 - Figura 263 del ANEXO) donde ha sido posible asignar todas las señales cuya correlación entre las de protón y carbono se recogen en la Tabla 28.


 Tabla 28. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc** (espectro DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
aN <sub>3</sub>		3.43-3.27 (m, 2H)	48.9
bN <sub>3</sub>		1.69-1.60 (m, 2H)	29.0
cN <sub>3</sub>		3.14-3.06 (m, 2H)	36.2
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.15-2.01 (m, 1H)	45.6
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.49-1.17 (m, 4H)	30.1
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.49-1.17 (m, 4H)	27.7
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.06-2.95 (m, 4H)	38.7
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.15-2.01 (m, 2H)	45.6
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.49-1.17 (m, 8H)	30.3
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.49-1.17 (m, 8H)	27.8
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.06-2.95 (m, 8H)	38.7
a <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	2.15-2.01 (m, 4H)	45.6
b <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	1.49-1.17 (m, 16H)	30.5
c <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	1.49-1.17 (m, 16H)	28.1
d <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>	2.91-2.78 (m, 16H)	38.7
e	8	1.49-1.17 (m, 72H)	28.7

En la Figura 85 se muestran los espectros de protón de las tres generaciones de dendrones con grupo azido en el punto focal y con los grupos amino terminales protegidos. En el caso de **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc** está realizado en DMSO-*d*<sub>6</sub> debido a la dificultad de disolver el compuesto en CDCl<sub>3</sub>, obteniéndose en este caso un espectro de <sup>1</sup>H-RMN con poca resolución. En estos espectros se observa el mismo patrón de distribución de las señales, coincidiendo el valor de las integrales en todos los casos con los valores teóricos. También se aprecia el ensanchamiento de las señales (por superposición de estas) a medida que aumenta la generación.

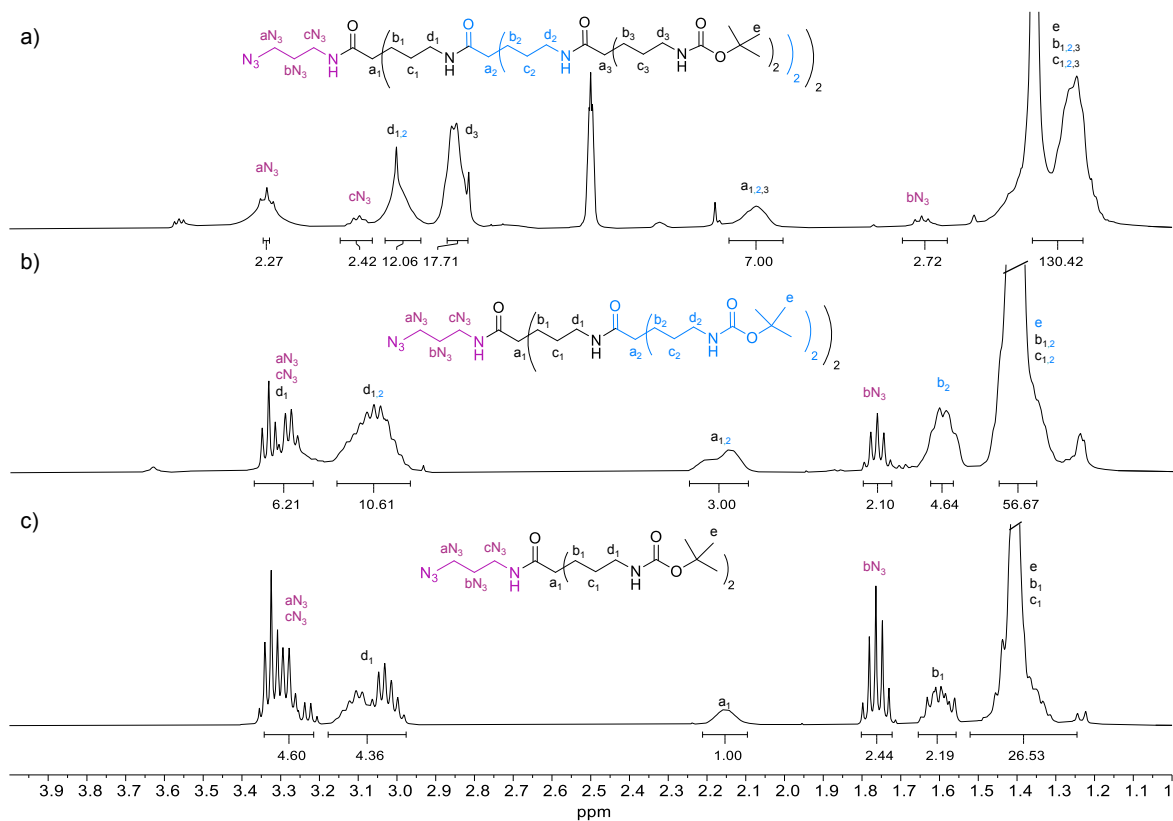


Figura 85. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de a) **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc** en DMSO-*d*<sub>6</sub> b) **dg2N<sub>3</sub>-NHBoc** en CDCl<sub>3</sub> y c) **dg1N<sub>3</sub>-NHBoc** en CDCl<sub>3</sub>

### III.3.9.2. Síntesis de dg3N<sub>3</sub>

La desprotección de los grupos aminos de **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc** mediante el procedimiento general, y posterior purificación por cromatografía de exclusión molecular con Sephadex™ G10 como fase estacionaria, da lugar a **dg3N<sub>3</sub>** de manera cuantitativa.

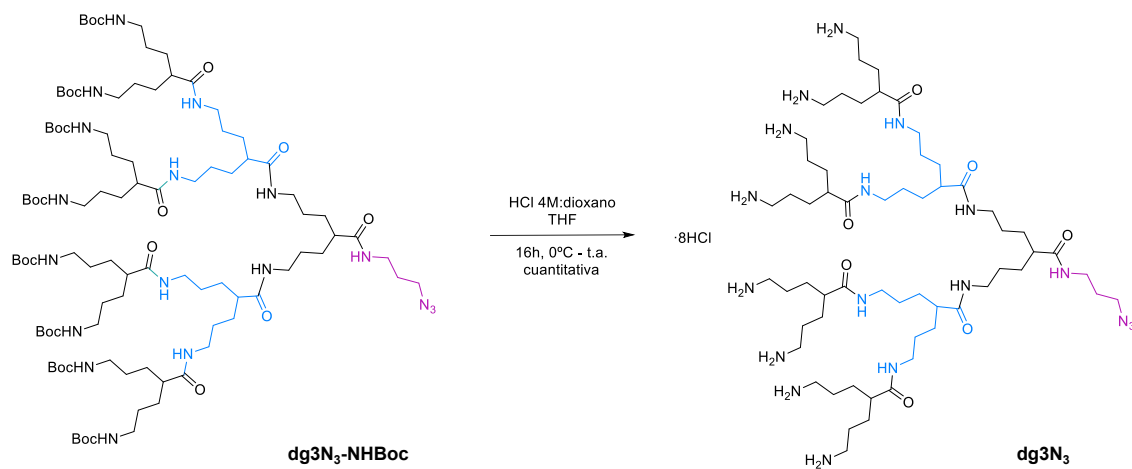


Figura 86. Síntesis de **dg3N<sub>3</sub>**

Por espectrometría de masas se observa el pico correspondiente a  $[M + H]^{2+}$  a  $m/z$  597.4718. **dg3N<sub>3</sub>** se ha caracterizado por técnicas de resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 87 y Figura 256 - Figura 259 del ANEXO) cuya asignación de las señales y la correlación entre las señales de protón y carbono se recoge en la Tabla 29.

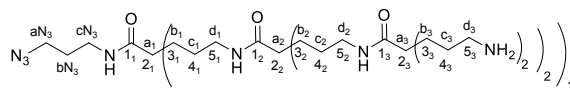


Tabla 29. Correlación de las señales en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en **dg3N<sub>3</sub>** (espectro DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Posición		RMN- <sup>1</sup> H (ppm)	RMN- <sup>13</sup> C (ppm)
aN <sub>3</sub>		3.40-3.34 (m, 2H)	48.5
bN <sub>3</sub>		1.71-1.63 (m, 2H)	28.5
cN <sub>3</sub>		3.17-2.92 (m, 2H)	35.7
a <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	2.30-2.19 (m, 1H)	44.1
b <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	1.56-1.25 (m, 4H)	30.1
c <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	1.56-1.25 (m, 4H)	27.3
d <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>	3.17-2.92 (m, 4H)	38.7
a <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	2.30-2.19 (m, 2H)	44.1
b <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	1.56-1.25 (m, 8H)	29.2
c <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	1.56-1.25 (m, 8H)	24.8
d <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>	3.17-2.92 (m, 8H)	38.5
a <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	2.30-2.19 (m, 4H)	43.8
b <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	1.56-1.25 (m, 16H)	28.9
c <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	1.56-1.25 (m, 16H)	24.7
d <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>	2.81-2.66 (m, 16H)	38.3

Al comparar los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de las diferentes generaciones de dendrones (Figura 87) se encuentra un patrón de asignación en las señales. En esta figura se aprecia como los protones “a” se van superponiendo conforme aumentan las generaciones siempre en el mismo rango de desplazamiento químico. Los metilenos periféricos “d” aparecen a menor desplazamiento que los correspondientes metilenos “d” internos, apareciendo muy cercanos e incluso superpuestos a los metilenos “cN<sub>3</sub>” en las segunda y tercera generaciones. Los metilenos del punto focal “aN<sub>3</sub>”, “bN<sub>3</sub>” y “cN<sub>3</sub>” permanecen a un desplazamiento prácticamente invariable en los espectros de protón de las tres generaciones de esta estructura dendrimérica.

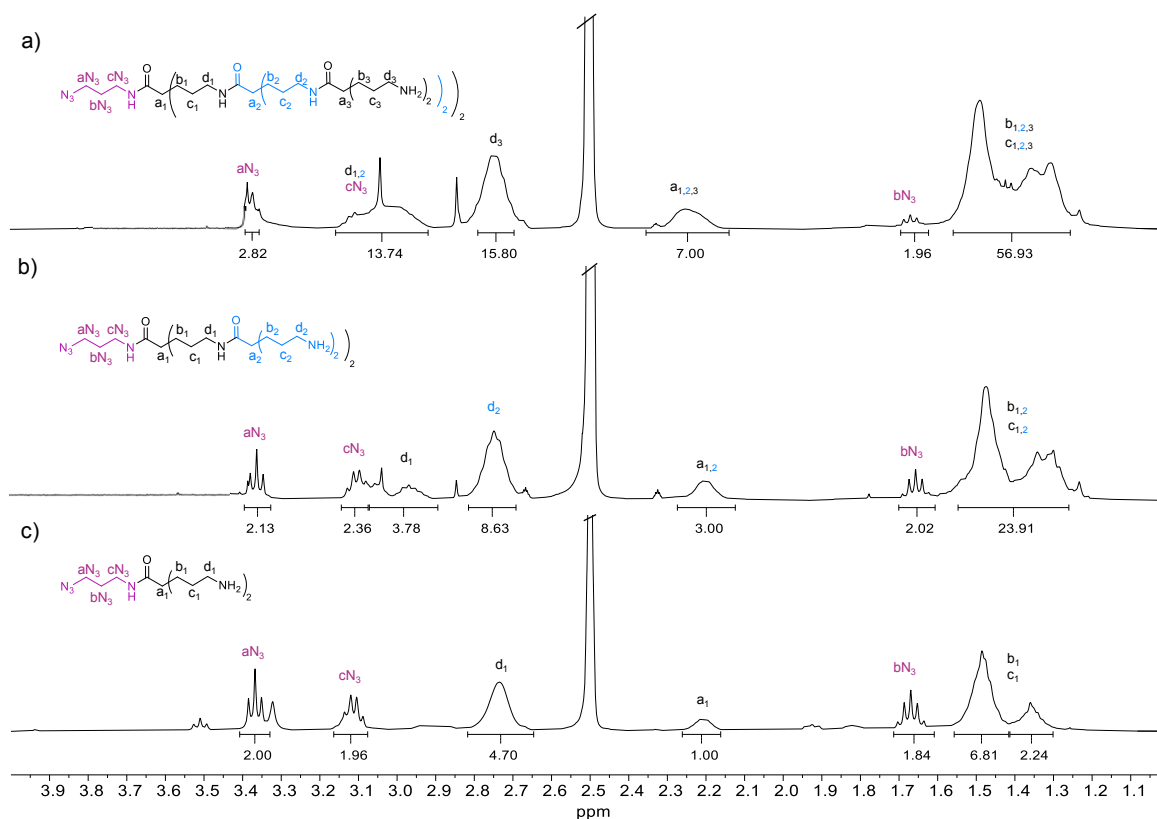


Figura 87. Espectros de RMN- $^1\text{H}$  en  $\text{DMSO}-d_6$  de a)  $\text{dg}3\text{N}_3$  Ratio teórico  $[\text{H}_a/\text{H}_{a\text{N}_3}:7/2]$ ;  $[\text{H}_a/\text{H}_{a\text{N}_3}:7/2]$ ;  $[\text{H}_a/\text{H}_{d_{1,2}}:7/12]$ ;  $[\text{H}_a/\text{H}_{d_3}:7/16]$ ;  $[\text{H}_a/\text{H}_{b\text{N}_3}:7/2]$ ;  $[\text{H}_a/\text{H}_{(b+c)}:7/56]$  b)  $\text{dg}2\text{N}_3$  Ratio teórico  $[\text{H}_a/\text{H}_{a\text{N}_3}:3/2]$ ;  $[\text{H}_a/\text{H}_{a\text{N}_3}:3/2]$ ;  $[\text{H}_a/\text{H}_{d_1}:3/4]$ ;  $[\text{H}_a/\text{H}_{d_2}:3/8]$ ;  $[\text{H}_a/\text{H}_{b\text{N}_3}:3/2]$ ;  $[\text{H}_a/\text{H}_{(b+c)}:3/24]$  c)  $\text{dg}1\text{N}_3$  Ratio teórico  $[\text{H}_{a1}/\text{H}_{a\text{N}_3}:1/2]$ ;  $[\text{H}_{a1}/\text{H}_{a\text{N}_3}:1/2]$ ;  $[\text{H}_{a1}/\text{H}_{d_1}:1/4]$ ;  $[\text{H}_{a1}/\text{H}_{b\text{N}_3}:1/2]$ ;  $[\text{H}_{a1}/\text{H}_{(b+c)}:1/8]$

En este trabajo se ha diseñado una metodología sintética eficiente y versátil para preparar estructuras dendríméricas basadas en enlaces tipo amida, donde la escala de gramo se logra con rendimientos muy buenos. Además, sólo son necesarios procesos de purificación a partir de la segunda generación, y éstos son muy sencillos tanto para las estructuras con los grupos amino terminales libre como protegidos. Se han obtenido dendrones con diferentes grupos funcionales en el punto focal, proporcionando así distinta reactividad y, por tanto, ampliando el rango de potenciales aplicaciones. Estos dendrones han sido completamente caracterizados por resonancia magnética nuclear (RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC) y espectrometría de masas (ESI-TOF).

## **CAPÍTULO IV**

# **SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS ANTIGÉNICOS PARA LA DETECCIÓN DE ALERGIA A FÁRMACOS**



#### IV.1. Introducción

Las reacciones adversas a antibióticos  $\beta$ -lactámicos son muy comunes y están mediadas por un mecanismo inmunológico específico.<sup>142,143</sup> El estudio de las penicilinas y su inmunquímica se usa como modelo en el estudio de reacciones adversas a otros medicamentos ya que ha sido el antibiótico más estudiado debido a su elevado consumo y a la estabilidad química de los conjugados formados.<sup>144</sup> Ciertos estudios demostraron que su determinante antigénico principal y por tanto, responsable de la reacción alérgica es el grupo peniciloilo.<sup>145,146</sup>

El inmunoensayo ha sido el método para detección de anticuerpos IgE más utilizado durante mucho tiempo. Actualmente se usan métodos basados en la activación de basófilos por la actividad de un determinado fármaco en pacientes alérgicos. Para los métodos de diagnóstico es necesario que el fármaco esté unido covalentemente a una proteína para que así pueda ser reconocido por los anticuerpos IgE de membrana de mastocitos y basófilos y por los linfocitos T. Por ello es necesario el estudio de la estructura química resultante tras la unión covalente entre fármaco y proteína.

Tal y como se puede ver en la Figura 88, el anillo  $\beta$ -lactámico en la estructura química de penicilinas se encuentra fusionado a un anillo de tiazolidina. Los distintos sustituyentes (R) dan lugar a las distintas penicilinas. En el caso de interés para este capítulo: amoxicilina y bencilpenicilina.

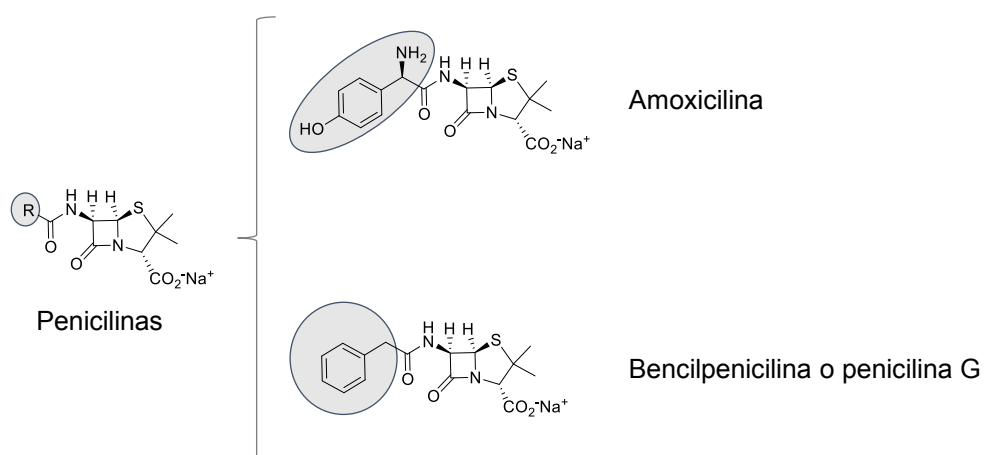


Figura 88. Estructura química de las penicilinas

La alta reactividad de las penicilinas, determinada por la gran tensión del anillo de  $\beta$ -lactama, provoca que, tras su reacción *in vivo*, se generen distintos metabolitos reconocibles por el sistema inmunológico.

El determinante antigénico principal de amoxicilina es amoxiciloilo (AXO), mientras que el que se forma tras metabolizar bencilpenicilina es bencilpeniciloilo (BPO). Estos determinantes antigénicos se generan tras el ataque nucleofílico de grupos aminos de restos de lisina presentes en las proteínas (portador) a la molécula de penicilina. Estos restos de lisina se encuentran generalmente en la albúmina de suero humano (HSA) en plasma y membranas celulares. Tras el ataque nucleófilo se produce la apertura del ciclo de  $\beta$ -lactama que, debido a la tensión de la estructura generada por los dos heterociclos fusionados, es una apertura rápida y efectiva.

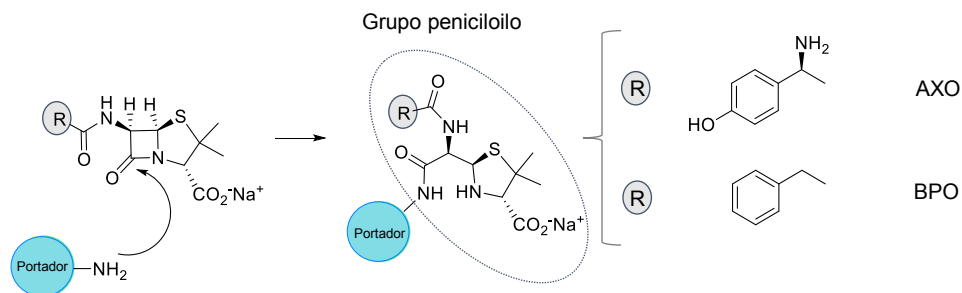


Figura 89. Determinantes antigénicos principales

AXO y BPO son lo suficientemente estables para ser aislados y caracterizados, de modo que estas mismas reacciones en las que se producen los determinantes antigénicos se pueden imitar *in vitro*. Además, se puede sustituir la molécula portadora por otra macromolécula que también disponga de grupos aminos y emule la proteína.

Uno de los mayores retos para el diagnóstico de alergia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos *in vitro* consiste en emular los procesos de reconocimiento molecular que tienen lugar *in vivo* entre el conjugado hapteno-portador y los anticuerpos.

En este caso, son factores clave para el reconocimiento molecular tanto el tamaño del portador como la distribución y densidad de hapteno en él. Tradicionalmente se han empleado albúmina de suero humano (HSA)<sup>147</sup> y poli-L-Lisina (PLL) artificial como moléculas portadoras en estos estudios, aunque los conjugados formados no se han caracterizado químicamente por completo. Estas moléculas han resultado muy útiles para el avance de los estudios, aunque presentan ciertos inconvenientes. Por ejemplo, en el conjugado BPO-HSA se observan pocos residuos de BPO en la superficie de la molécula quedando los demás impedidos para su reconocimiento por el anticuerpo, lo que hace pensar que HSA no es la más adecuada para extrapolarla al diagnóstico de IgE *in vitro*. En el caso de PLL se aumenta el número de haptenos por molécula respecto a HSA, lo que conlleva mayor sensibilidad y reproducibilidad en la técnica, sin embargo, en los conjugados con PLL se encuentra distinta densidad y distribución de haptenos lo cual repercute en la fiabilidad y reproducibilidad de los tests diagnósticos.<sup>148</sup>

Como estructura química alternativa que actúe como transportadora y que no presente los problemas de las macromoléculas tradicionales (HSA y PLL), el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis ha empleado los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM). En este caso se propone la síntesis del conjugado hapteno-portador, empleando como macromolécula portadora los nuevos dendrímeros sintetizados y descritos en el capítulo III.1 de este trabajo. Estos dendrímeros serían los sustitutos de las proteínas globulares en inmunodiagnóstico. Las proteínas globulares son muy susceptibles a condiciones desnaturalizantes como temperatura, luz, y pH, por el contrario, los dendrímeros son inertes, con estructuras tridimensionales fijas. Estas propiedades hacen de estos compuestos candidatos idóneos para su empleo en inmunoensayo. La presencia de grupos aminos en su superficie permite la reacción con los anillos  $\beta$ -lactámicos presentes en las penicilinas y, además, son solubles en medio acuoso.

## IV.2. Síntesis de DGnAXO

Se ha sintetizado hasta la cuarta generación de dendrímeros funcionalizados con grupos amoxiciloilos en su periferia. Para la síntesis de cada uno de ellos se parte del dendrímero amino terminal y se hace reaccionar con un exceso de amoxicilina. En esta reacción se produce un ataque nucleofílico de los grupos aminos terminales de la estructura dendrímica al ciclo  $\beta$ -lactámico del fármaco, produciéndose la apertura de éste y la formación de un enlace tipo amida.

### IV.2.1. Síntesis de DG1AXO

Se trata **DG1** con la resina de intercambio iónico Amberlist durante 1h en metanol, tras la cual se filtra y elimina el disolvente. Posteriormente se disuelve el dendrímero en tampón carbonato acuoso, pH 10.4 y se enfría a 4°C, donde se adiciona amoxicilina sódica y se mantiene en agitación a dicha temperatura durante 16h. Pasado este tiempo, el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía de exclusión por tamaño para dar lugar a **DG1AXO** como un sólido incoloro con un rendimiento del 87%.

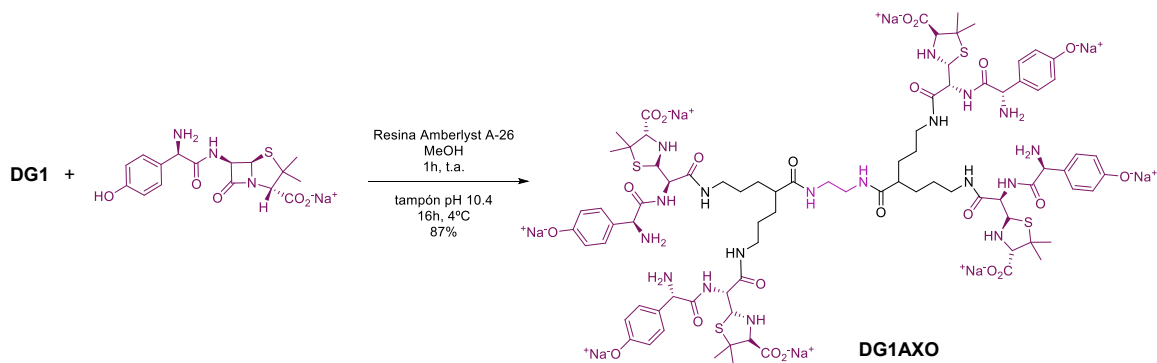


Figura 90. Síntesis de **DG1AXO**

Este compuesto ha sido caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón (Figura 91, Figura 95), carbono, y los bidimensionales COSY y HSQC, los cuales han sido de gran utilidad para la asignación de las señales (Figura 268 - Figura 271 del ANEXO).

Tanto la naturaleza del disolvente, el pH del medio o la temperatura afectan en los espectros de protón y carbono de estas estructuras.<sup>149,150</sup> Se ha estudiado la estabilidad de estas estructuras mediante RMN en D<sub>2</sub>O a distintos pD y distintos tiempos, observándose una mejor resolución en las señales de protón a pD básico.<sup>148</sup> Es por esto que, los espectros de RMN de los productos sintetizados en este capítulo se han realizado en D<sub>2</sub>O a pD básico por adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

En la Figura 91 se presenta el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de **DG1AXO** y el del conjugado amoxicilina-butilamina (Bu-AXO). En ella se han podido observar los picos característicos de la unidad AXO, como las señales correspondientes al anillo de β-lactama abierto “f” y “e” que aparecen a 4.96 y 4.29 ppm respectivamente. Cuando el anillo está cerrado, las señales correspondientes a estos protones aparecen juntas en torno a 5.5 ppm.

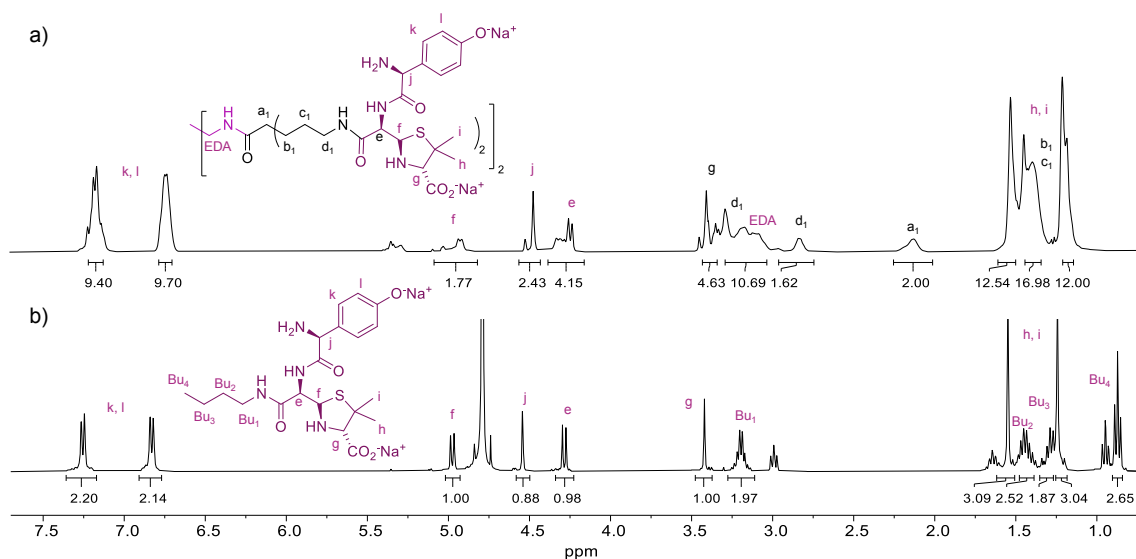


Figura 91. Espectros de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de a) **DG1-AXO** y b) **Bu-AXO**

Además, en el espectro de **DG1AXO** (Figura 91 a)), se observan las señales asociadas a los metilenos de la estructura dendrímica “EDA”, “a<sub>1</sub>”, “b<sub>1</sub>”, “c<sub>1</sub>” y “d<sub>1</sub>” ya estudiadas en el capítulo anterior. También son características las señales de la región aromática a 7.17 y 6.72 ppm correspondientes a “k” y “l”.

#### IV.2.2. Síntesis de **DG2AXO**

Para la síntesis de **DG2AXO** se sigue el procedimiento general, ya descrito en el apartado anterior, con la salvedad de que, en este caso, la reacción se mantiene 42h en agitación a 4°C refrescándose a las 24h con la misma cantidad de fármaco que se añadió inicialmente. Transcurrido el tiempo de reacción, se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño obteniéndose **DG2AXO** como un sólido incoloro con un 82% de rendimiento.

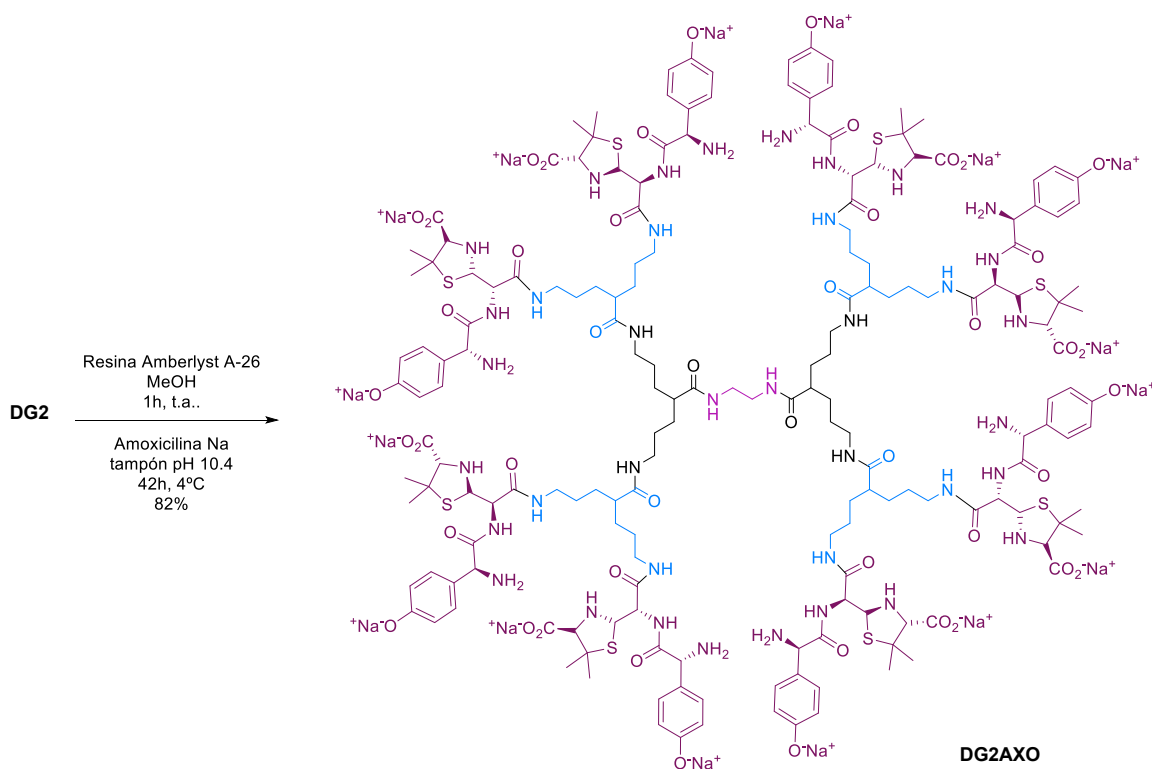


Figura 92. Síntesis de **DG2**

Se ha caracterizado esta estructura por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 95 y Figura 272 - Figura 275 del ANEXO)

#### IV.2.3. Síntesis de **DG3AXO**

**DG3AXO** se obtiene como un sólido incoloro con un 85% de rendimiento tras seguir el procedimiento general con **DG3** como sustrato de partida. Para ello, el tiempo de reacción se ha

prolongado a 3 días refrescando con un exceso de amoxicilina sódica cada 24h, y tras este tiempo, el crudo de reacción ha sido purificado mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular.

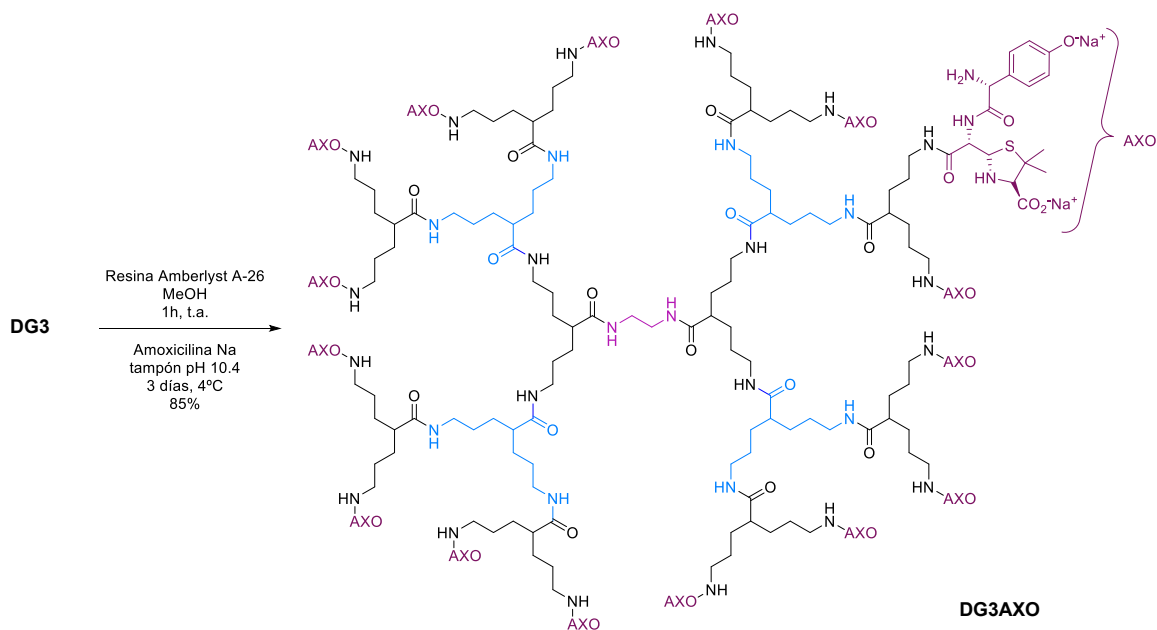


Figura 93. Síntesis de **DG3AXO**

Se ha caracterizado **DG3AXO** por técnicas de resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 95 y Figura 276 - Figura 279 del ANEXO). Con la ayuda de los experimentos bidimensionales ha sido posible la asignación de las señales de protón y carbono.

#### IV.2.4. Síntesis de **DG4AXO**

Siguiendo el procedimiento general, se mantiene la reacción en agitación a 4°C durante 4 días, refrescando con un exceso de fármaco cada 24h. Tras purificar mediante cromatografía de exclusión por tamaño, se obtiene **DG4AXO** como un sólido incoloro con un rendimiento del 87%.

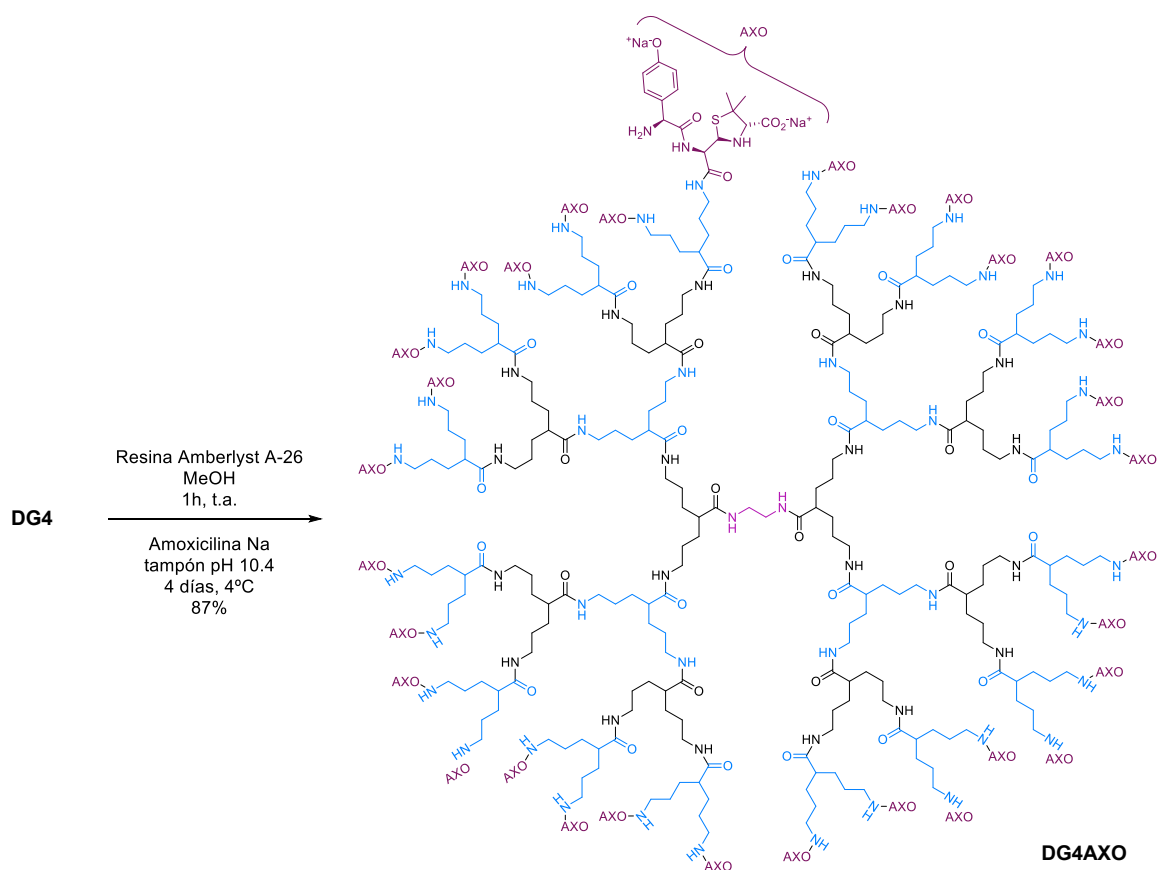


Figura 94. Síntesis de **DG4AXO**

**DG4AXO** ha sido caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 95 y Figura 280 - Figura 283 del ANEXO).

En la Figura 95 se muestran los espectros de protón de todas las generaciones de dendrímeros antigénicos sintetizadas en esta sección. En dichos espectros se identifican las señales correspondientes a los protones de las estructuras dendriméricas previamente descritas “EDA”, “a”, “b”, “c” y “d”, y se observan las señales correspondientes a los protones del resto amoxiciloilo. Son características las señales asociadas a los protones del anillo  $\beta$ -lactámico, llamados “e” y “f” que indican que éste se ha abierto. La variación en la multiplicidad de estas señales y de la señal correspondiente a los protones “g” se puede deber a las distintas configuraciones espaciales originando una variedad de epímeros en las distintas cadenas de cada estructura dendrimérica.

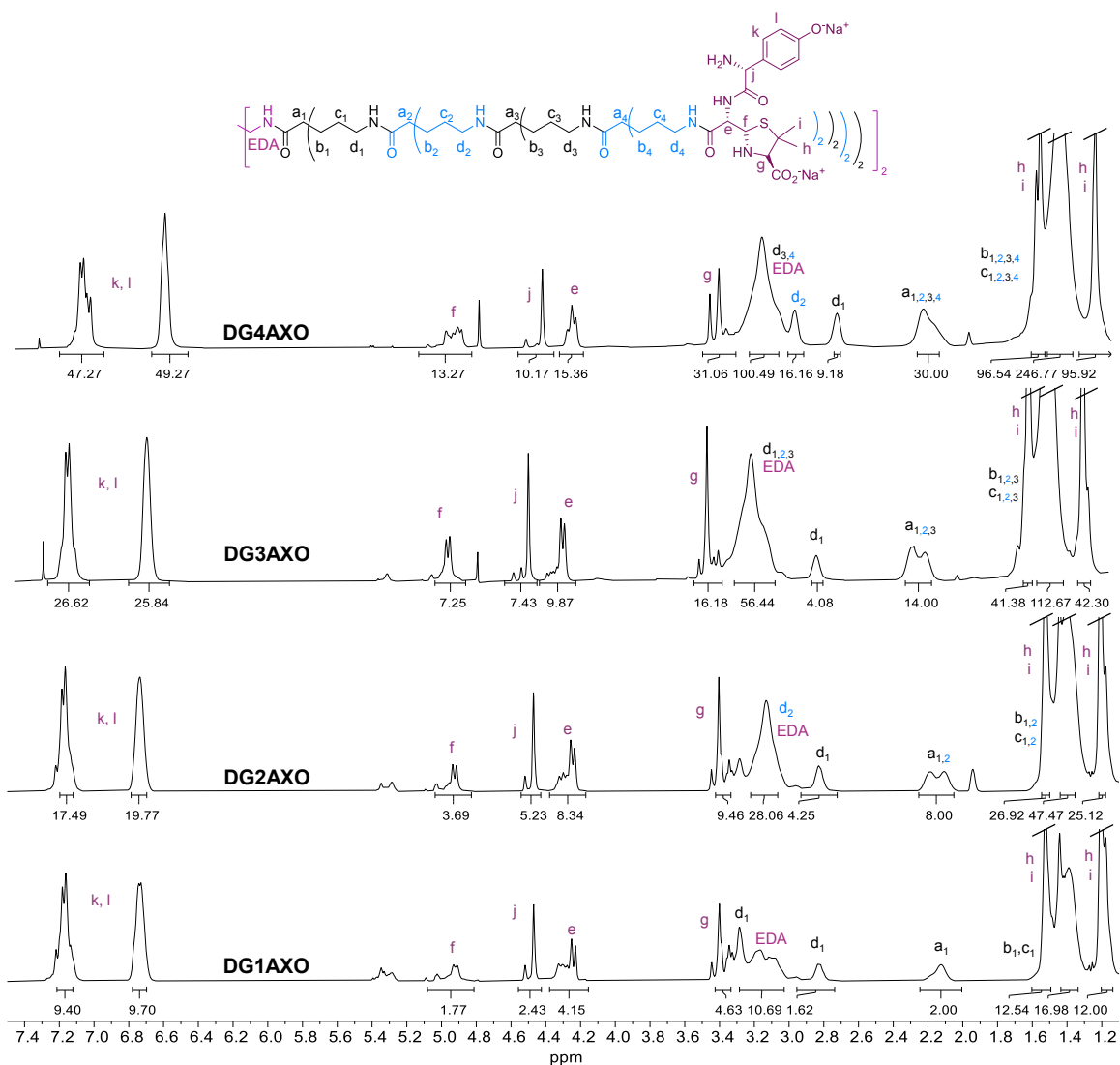


Figura 95. Espectros de RMN- $^1\text{H}$  de **DG1-4AXO** en  $\text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$

#### IV.2.5. Cromatografía de exclusión por tamaño

Esta familia de dendrímeros se ha analizado mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) empleándose agua Mili Q como fase móvil en una columna Ultrahydrogel<sup>TM</sup> 250 a un flujo de 0.7 mL/min. Los cromatogramas obtenidos, cuyas bandas se han normalizado, se presentan en la Figura 96. Éstos muestran una única banda en cada muestra donde los tiempos de retención van aumentando conforme disminuye la generación del dendrímero analizado.

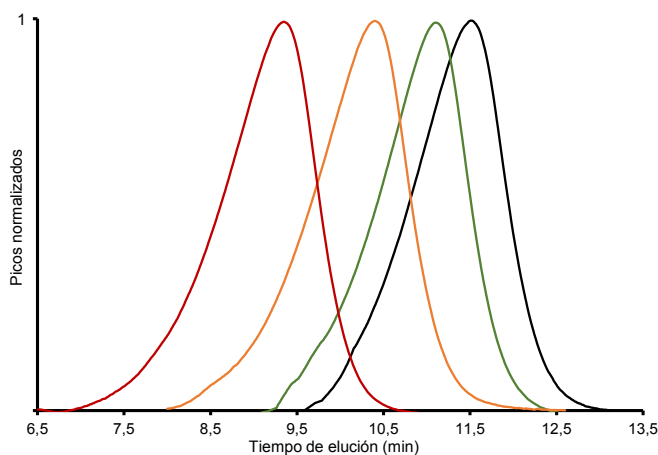


Figura 96. Cromatogramas de exclusión por tamaño de **DGnAXO**. La banda roja corresponde a **DG4AXO**, la naranja a **DG3AXO**, la verde a **DG2AXO** y la negra a **DG1AXO**.

#### IV.2.6. Experimentos DOSY

Se han realizado experimentos de difusión para esta familia de dendrímeros con restos de amoxiciloilo en su periferia y se observa que el decaimiento de la señal es monoexponencial en todas las generaciones, lo que indica que son muestras monodispersas. En la Figura 97 a) se muestra el decaimiento de las señales de protón para **DG4AXO** al variar el gradiente, obteniéndose resultados similares para las tres generaciones previas.

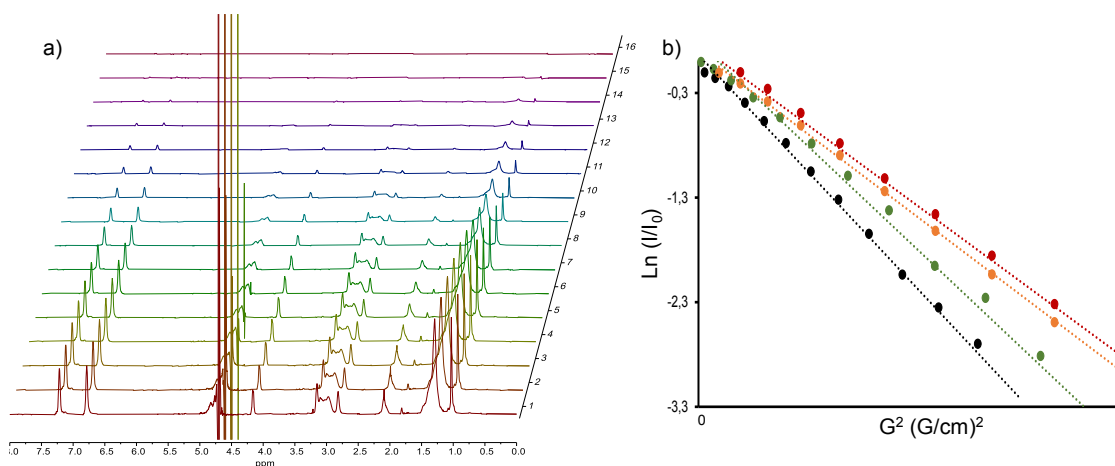


Figura 97. a) Apilamiento de espectros  $^1\text{H}$ -RMN de **DG4AXO** ( $\text{D}_2\text{O}$ ) usando pulsos de gradiente bipolar para difusión b) Gráfico de Stejskal-Tanner de **DGnAXO** en  $\text{D}_2\text{O}$ . Se ha empleado el color negro para **DG1AXO**, verde para **DG2AXO**, naranja para **DG3AXO** y rojo para **DG4AXO**.

El decaimiento monoexponencial de la señal se traduce en gráficos lineales de Stejskal-Tanner como el de la Figura 97 b), donde se muestra la representación gráfica del logaritmo de la intensidad de señal normalizada frente al cuadrado del gradiente en cada una de las generaciones.

Al igual que en el capítulo III.2.4., mediante el cálculo de los coeficientes de difusión ( $D$ ) y su relación con los radios hidrodinámicos ( $R_h$ ) por la ecuación de Stokes-Einstein se obtienen los datos recogidos en la Tabla 30, además de su peso y fórmula molecular.

Tabla 30. Datos de difusión de los dendrímeros **DGnAXO**

Dendrímero	<b>DG1AXO</b>	<b>DG2AXO</b>	<b>DG3AXO</b>	<b>DG4AXO</b>
Fórmula	$C_{82}H_{108}N_{18}Na_8O_{22}S_4$	$C_{178}H_{240}N_{38}Na_{16}O_{46}S_8$	$C_{370}H_{504}N_{78}Na_{32}O_{94}S_{16}$	$C_{754}H_{1160}N_{158}Na_{64}O_{190}S_{32}$
-AXO terminal	4	8	16	32
M.M. (g/mol)	2010.03	4272.41	8813.31	17879.97
$D$ (m <sup>2</sup> /s)	$1.482 \cdot 10^{-10}$	$1.242 \cdot 10^{-10}$	$1.145 \cdot 10^{-10}$	$9.884 \cdot 10^{-11}$
$R_h$ (Å)	13.52	16.13	17.50	20.27

Como era de esperar, los coeficientes de difusión disminuyen al aumentar la generación de dendrímero mientras que, los radios hidrodinámicos aumentan. Los resultados de este experimento indican que **DGnAXO** son macromoléculas monodispersas. Los espectros DOSY de estas estructuras se encuentran en el ANEXO de este trabajo (Figura 356 - Figura 359).

Desafortunadamente, todos los intentos realizados para obtener espectros por MALDI han resultado infructuosos.

### IV.3. Síntesis de **DGnBPO**

Con el mismo objetivo se han modificado los dendrímeros amino terminales, de generación 1 a 4, descritos en el capítulo III.1. de este trabajo de tesis con grupos bencilpeniciloilos. Esta familia de dendrímeros antigénicos se ha sintetizado siguiendo el mismo protocolo que para los análogos amoxiciloilos. La formación del enlace tipo amida entre los grupos amino de los dendrímeros y el grupo carbonilo del anillo  $\beta$ -lactámico de bencilpenicilina da lugar a las estructuras dendriméricas **DGnBPO** ( $n = 1-4$ ).

#### IV.3.1. Síntesis de **DG1BPO**

Siguiendo el procedimiento general para estas estructuras dendriméricas, se disuelve **DG1**, previamente tratado con la resina de intercambio iónico, en tampón carbonato acuoso, pH 10.4. Se

añade un exceso de bencilpenicilina sódica a dicha disolución y la mezcla de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 16h. Tiempo tras el cual se purifica el crudo de reacción por cromatografía de exclusión por tamaño para dar lugar a **DG1BPO** como un sólido incoloro.

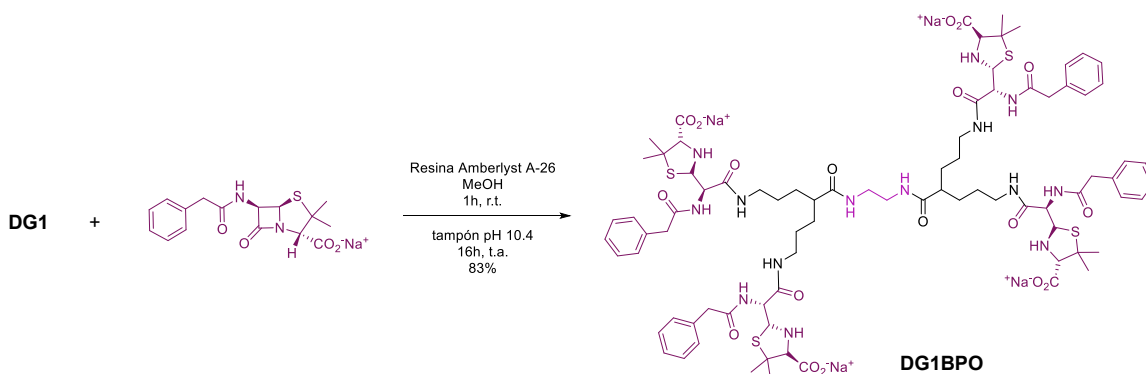


Figura 98. Síntesis de **DG1BPO**

Se ha caracterizado **DG1BPO** por resonancia magnética nuclear de protón (Figura 99, Figura 103), carbono, COSY y HSQC (Figura 284 - Figura 287 del ANEXO).

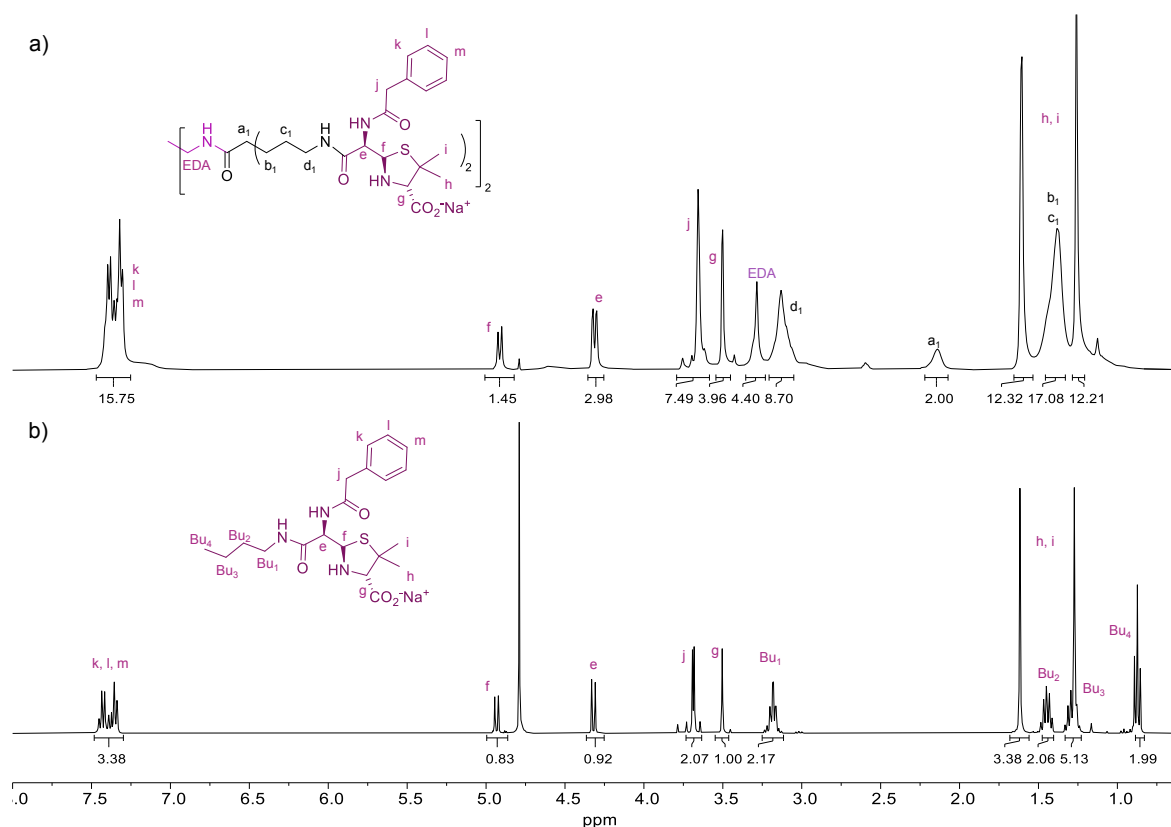


Figura 99. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$  de a) **DG1BPO** y b) **Bu-BPO**

En la Figura 99 se presentan los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de **DG1BPO** y del conjugado butilamina-bencilpenicilina (Bu-BPO). En ambos espectros se observa cómo aparecen los picos correspondientes al resto BPO donde el anillo de  $\beta$ -lactama se encuentra abierto, apareciendo las

señales asociadas a “f” y “e” a 4.92 y 4.33 ppm respectivamente, en lugar de a 5.5 ppm que es donde aparecen cuando dicho anillo se encuentra cerrado. La señal correspondiente a los hidrógenos aromáticos “k”, “l” y “m”, aparece sobre 7.36 ppm en los dos casos. Además, en el espectro de **DG1BPO** (Figura 99 a)), aparecen las señales asociadas a los metilenos de la estructura dendrímica “EDA”, “a<sub>1</sub>”, “b<sub>1</sub>”, “c<sub>1</sub>” y “d<sub>1</sub>” ya estudiadas en el capítulo III.1. de este trabajo de tesis.

### IV.3.2. Síntesis de **DG2BPO**

Para la obtención de **DG2BPO** se siguen las mismas condiciones que en el caso anterior a excepción de que el tiempo de reacción se aumenta a 42h. A las 24h se refresca la mezcla de reacción con la misma cantidad de fármaco. Pasado el tiempo de reacción, el crudo se purifica mediante cromatografía de exclusión por tamaño obteniéndose **DG2BPO** como un sólido incoloro con un 84% de rendimiento.

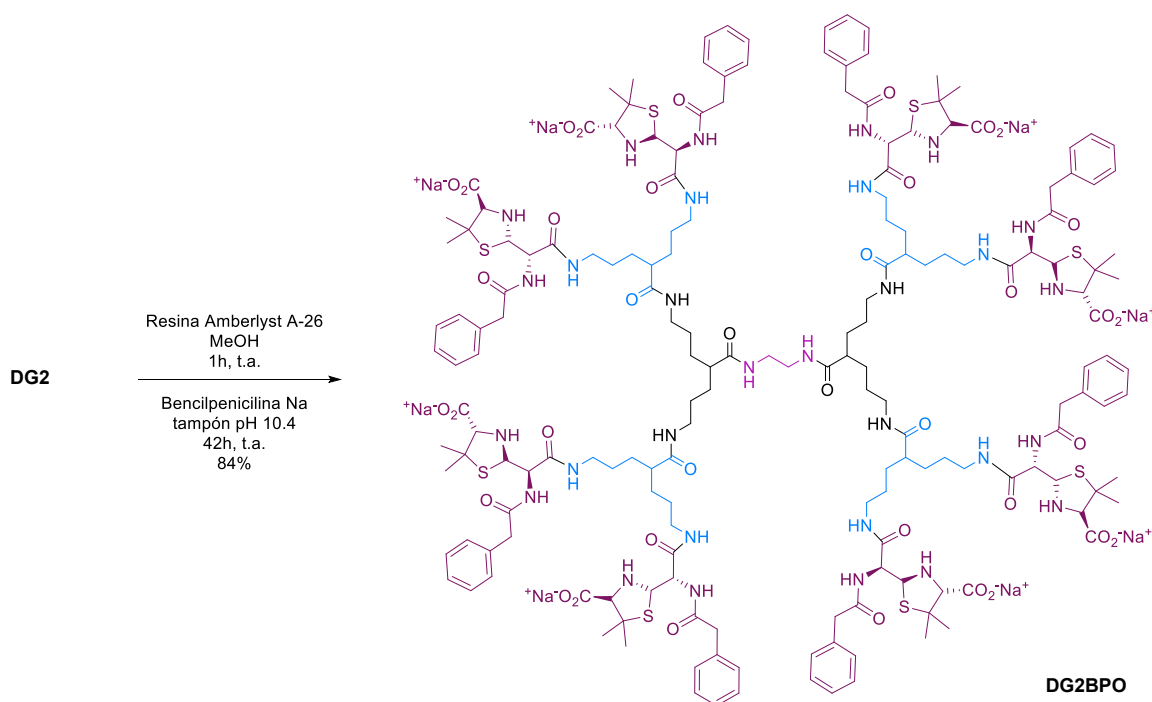


Figura 100. Síntesis de **DG2BPO**

Esta estructura dendrímica se ha caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 103 y Figura 288 - Figura 291 del ANEXO).

### IV.3.3. Síntesis de **DG3BPO**

La síntesis de **DG3BPO** se lleva a cabo siguiendo el procedimiento general, pero en este caso, la mezcla de reacción se enfría a 4°C y se mantiene en agitación durante 3 días. La reacción se

refresca cada 24h con la misma cantidad de bencilpenicilina sódica que se adicionó inicialmente y, pasado el tiempo de reacción, se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño para dar lugar a **DG3BPO** como un sólido incoloro con un 87% de rendimiento.

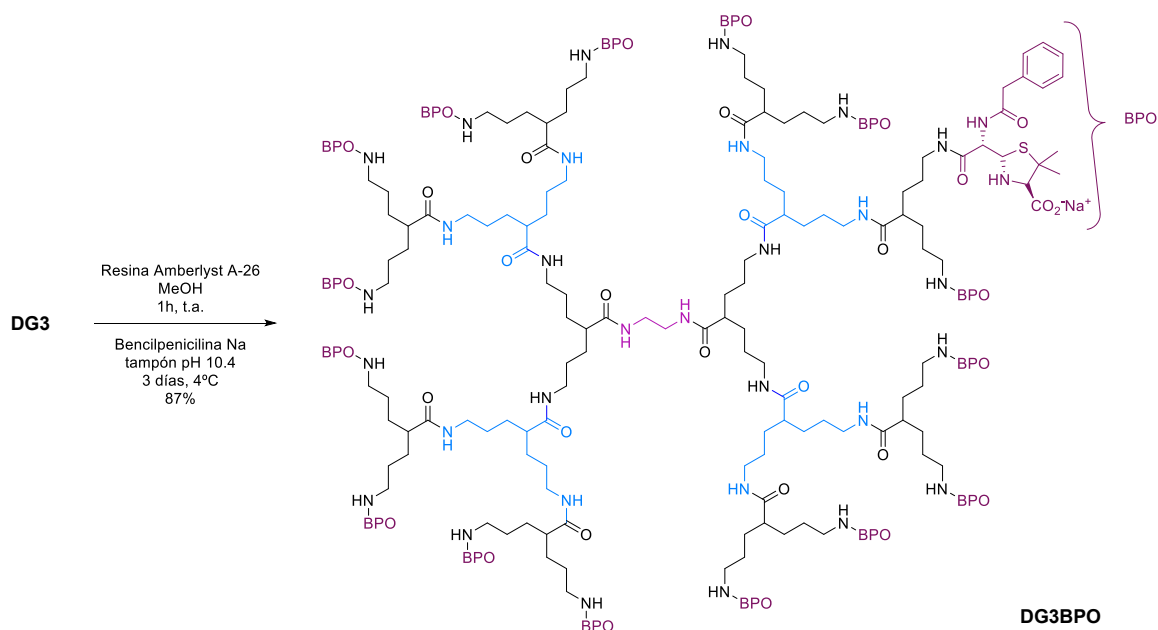


Figura 101. Síntesis de **DG3BPO**

Se ha caracterizado **DG3BPO** por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 103 y Figura 292 - Figura 295 del ANEXO).

#### IV.3.4. Síntesis de **DG4BPO**

Para la obtención de **DG4BPO**, se siguen las mismas condiciones que para el dendrímero antigénico anterior manteniendo la reacción 4 días, refrescándola cada día con la misma cantidad de fármaco que se añadió inicialmente. Tras este tiempo, se purifica por cromatografía en columna de exclusión por tamaño obteniéndose **DG4BPO** como un sólido incoloro con un 84% de rendimiento.

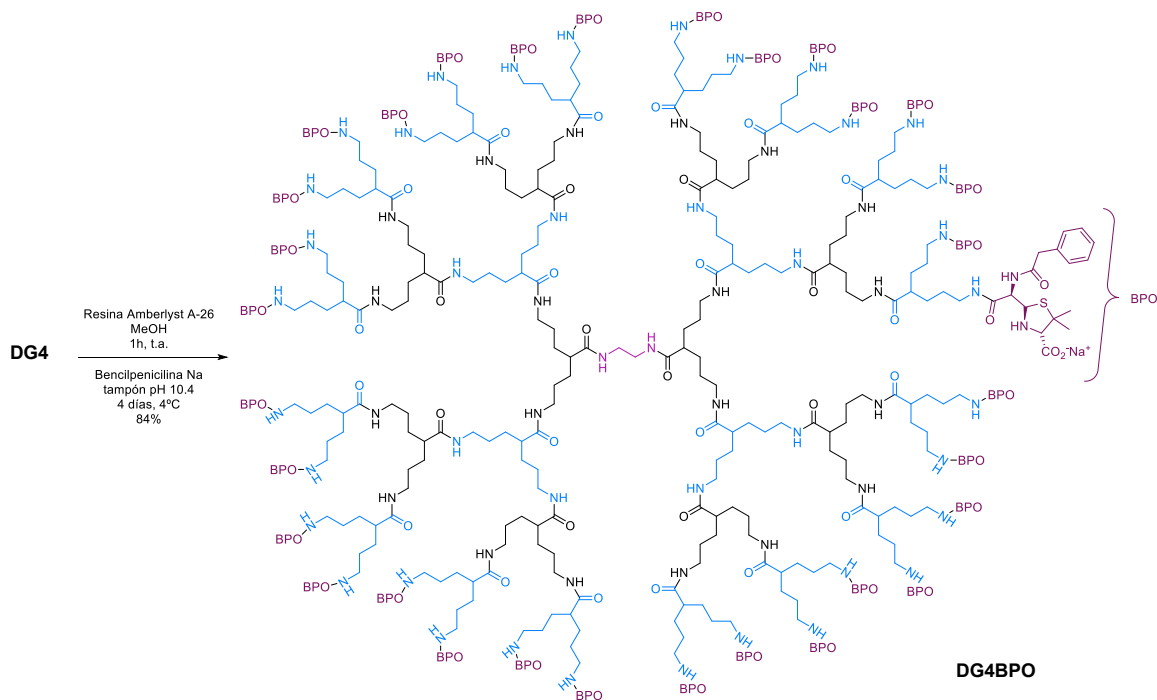


Figura 102. Síntesis de **DG4BPO**

Este dendrímero se ha caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY, HSQC (Figura 103 y Figura 296 - Figura 299). Los espectros bidimensionales han resultado de gran utilidad para la asignación de señales de protón y carbono.

Los espectros de protón de cada generación de estos dendrímeros antigénicos, al igual que ocurría con los análogos modificados con amoxiciloilo, presentan una distribución de señales que prácticamente difiere en los valores de sus integrales entre las distintas generaciones. Como se puede observar en la Figura 103, las señales correspondientes a los protones de distintas generaciones suelen superponerse con las señales correspondientes de dichos protones de las generaciones inferiores así, la señal correspondiente a los protones “b” y “c” se va ensanchando por superposición de la señal asociada a los nuevos protones “b” y “c” de la siguiente generación. Cabe destacar cómo ha variado el desplazamiento químico de la señal correspondiente a los protones “j” de 4.4 ppm en los espectros de **DGnAXO**, donde se encuentran en  $\alpha$  a un grupo amino, a 3.5 ppm en los de **DGnBPO**.

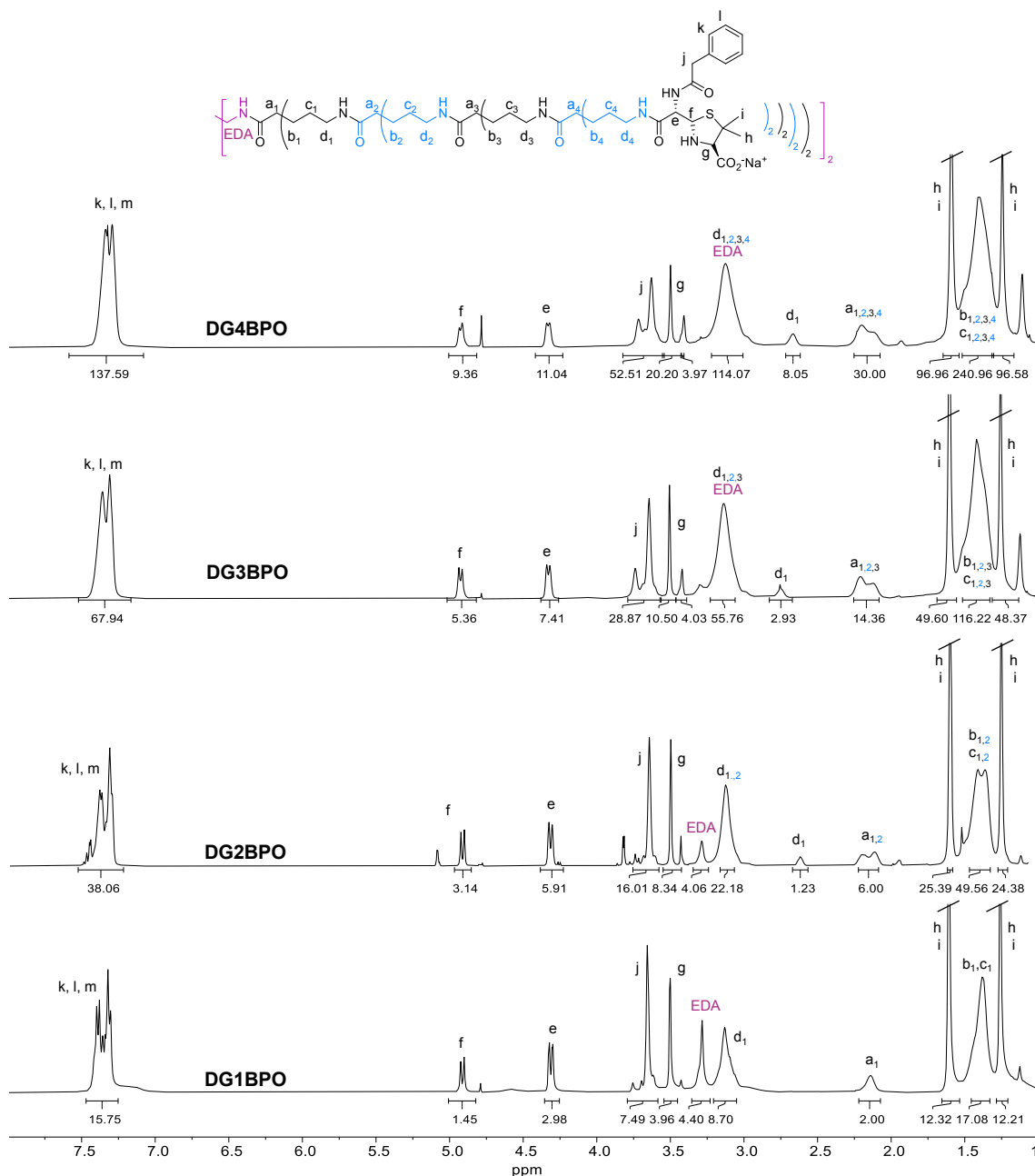


Figura 103. Espectros de RMN- $^1\text{H}$  de **DG1-4BPO** en  $\text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$

#### IV.3.5. Cromatografía de exclusión por tamaño

Al igual que con los análogos modificados con amoxiciloilo, estas estructuras dendriméricas con restos de bencilpeniciloilo se han analizado mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) empleándose agua Mili Q como fase móvil en una columna Ultrahydrogel<sup>TM</sup> 250 a un flujo de 0.7 mL/min. En la Figura 104 se muestran las bandas normalizadas de los cromatogramas resultantes. En ellos se observa una sola banda por muestra y los tiempos de retención disminuyen conforme aumenta la generación del dendrímico.

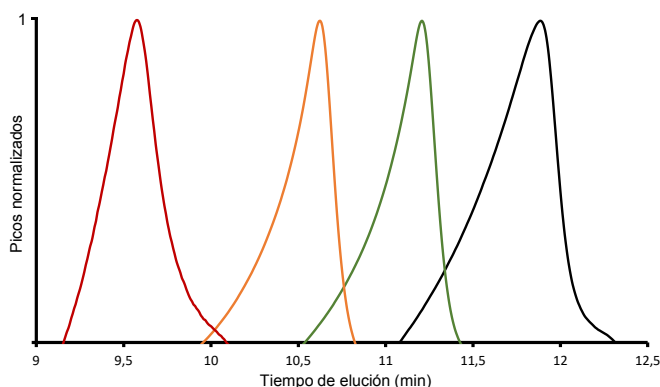


Figura 104. Cromatogramas de exclusión por tamaño de **DGnBPO**. La banda roja corresponde a **DG4BPO**, la naranja a **DG3BPO**, la verde a **DG2BPO** y la negra a **DG1BPO**.

### IV.3.6. Experimentos DOSY

El comportamiento de **DGnBPO** en los experimentos DOSY realizados es similar al de la familia de dendrímeros antigénicos **DGnAXO**, obteniéndose resultados que indican que tenemos macromoléculas monodispersas.

Para las cuatro generaciones sintetizadas se observa un decaimiento monoexponencial de las señales como el que se muestra en la Figura 105 a) para **DG3BPO** a modo de ejemplo. En la gráfica de Stejskal-Tanner de la Figura 105 b) se representa linealmente el logaritmo de la intensidad de señal normalizada frente al cuadrado del gradiente en cada una de las generaciones.

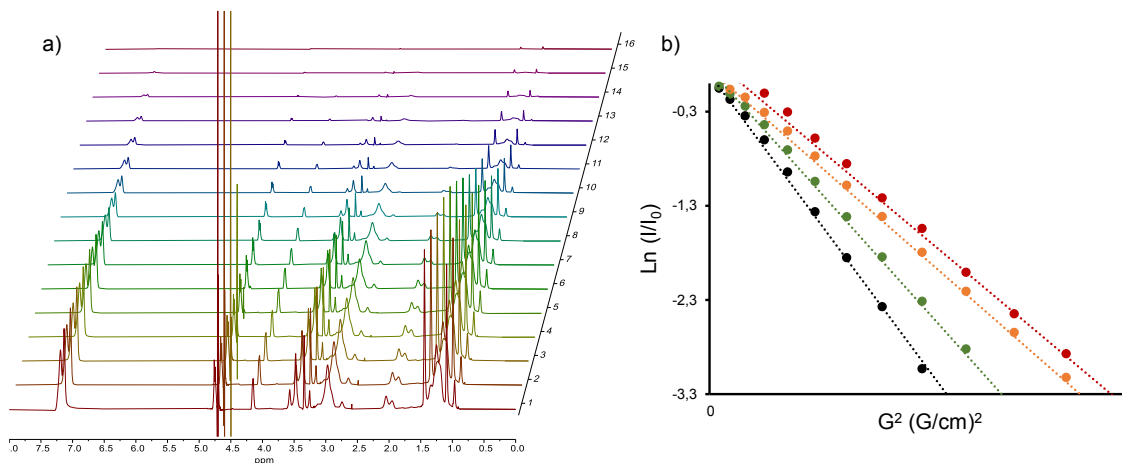


Figura 105. a) Apilamiento de espectros  $^1\text{H}$ -RMN de **DG3BPO** ( $\text{D}_2\text{O}$ ) usando pulsos de gradiente bipolar para difusión b) Gráfico de Stejskal-Tanner de **DGnBPO** en  $\text{D}_2\text{O}$ . Se ha empleado el color negro para **DG1BPO**, verde para **DG2BPO**, naranja para **DG3BPO** y rojo para **DG4BPO**.

Los datos calculados para cada generación de **DGnBPO** como sus coeficientes de difusión ( $D$ ) y sus radios hidrodinámicos ( $R_h$ ), se recogen en la Tabla 31.

Tabla 31. Datos de difusión de los dendrímeros **DGnBPO**

Dendrímero	<b>DG1BPO</b>	<b>DG2BPO</b>	<b>DG3BPO</b>	<b>DG4BPO</b>
Fórmula	C <sub>82</sub> H <sub>108</sub> N <sub>14</sub> Na <sub>4</sub> O <sub>18</sub> S <sub>4</sub>	C <sub>178</sub> H <sub>240</sub> N <sub>30</sub> Na <sub>8</sub> O <sub>38</sub> S <sub>8</sub>	C <sub>370</sub> H <sub>504</sub> N <sub>62</sub> Na <sub>16</sub> O <sub>78</sub> S <sub>16</sub>	C <sub>754</sub> H <sub>1160</sub> N <sub>126</sub> Na <sub>32</sub> O <sub>158</sub> S <sub>32</sub>
-BPO terminal	4	8	16	32
M.M. (g/mol)	1798.04	3848.45	7965.34	16184.02
<i>D</i> (m <sup>2</sup> /s)	1.663·10 <sup>-10</sup>	1.319·10 <sup>-10</sup>	1.051·10 <sup>-10</sup>	9.507·10 <sup>-11</sup>
<i>R<sub>h</sub></i> (Å)	12.05	15.19	19.05	21.07

Tal y como se había obtenido para los derivados antigénicos análogos, el coeficiente de difusión aumenta inversamente proporcional al aumento de la generación del dendrímero mientras que el radio hidrodinámico lo hace de manera directamente proporcional. Los espectros DOSY de estas estructuras se encuentran en el ANEXO de este trabajo de tesis (Figura 360 - Figura 363).

Con esta familia de dendrímeros antigénicos también han resultado infructuosos todos los intentos realizados para obtener espectros por MALDI.

En este capítulo se han sintetizado dos familias de dendrímeros antigénicos con distinto determinante antigénico en cada una de ellas, como son amoxiciloilo (AXO) y bencilpeniciloilo (BPO). Dentro de cada familia, se han obtenido 4 generaciones de dendrímeros antigénicos, duplicándose el número de restos AXO y BPO en la periferia de dichas estructuras en cada generación. La síntesis de estos dendrímeros se ha obtenido con muy buenos rendimientos (entre 82% y 87%), y todos ellos han sido completamente caracterizados por resonancia magnética nuclear.

Actualmente, estas estructuras se están empleando en el grupo de investigación liderado por la Dra. María José Torres de Enfermedades alérgicas a fármacos y alérgenos del Hospital Regional Universitario de Málaga para evaluar su comportamiento en ensayos de detección de alergias a fármacos.



## **CAPÍTULO V**

### **SÍNTESIS DE ESTRUCTURAS RGD-DENDRIMÉRICAS**



## V.1. Introducción

Hoy día son necesarias estructuras adecuadas para aplicaciones de regeneración tisular *in vivo*, donde son críticas las interacciones entre las células y el biomaterial implantado. Se han empleado técnicas mecánicas, físicas y químicas para la modificación de las superficies de los implantes. Entre ellas, ha sido ampliamente estudiado el empleo de la secuencia peptídica Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (RGD), conociéndose desde hace más de 40 años la importancia de este tripéptido en los procesos de adhesión celular.<sup>93,92</sup>

La cadena peptídica RGD puede funcionar como promotor de la adhesión y proliferación de células madre mesenquimales (MSC). Varios estudios se han centrado en la modificación de las superficies de implantes con este resto peptídico con la intención de mejorar la osteointegración.<sup>151</sup> Estos estudios demuestran que mayores concentraciones de RGD estimulan la unión y proliferación de MSC y sugiere potenciales aplicaciones en regeneración tisular. Se han publicado numerosos trabajos con los efectos positivos de RGD en la diferenciación de MSC cuando forman parte de diferentes estructuras como geles de PEG,<sup>152</sup> microesferas de ácido poli(láctico-glicólico) (PLGA),<sup>153</sup> materiales basados en poliuretanos<sup>154</sup> o materiales porosos basados en alginato.<sup>155</sup> Además, se ha demostrado recientemente que la inmovilización de RGD en implantes de titanio muestra prometedores resultados en la formación del hueso y la osteointegración.<sup>156,157</sup>

Las técnicas utilizadas tradicionalmente para la modificación de las superficies de biomateriales con el tripéptido RGD consisten en la disposición de monocapas<sup>158</sup> o la inmovilización de péptidos que contienen la secuencia peptídica RGD en superficies poliméricas.<sup>159</sup> La unión del péptido a estas superficies se puede lograr por adsorción o por enlace covalente, siendo la unión covalente más óptima ya que otorga una unión más estable y permite mejor adhesión celular. En este sentido, se han unido restos de RGD a superficies mediante formación de enlaces amida,<sup>160</sup> enlaces disulfuro,<sup>161</sup> a través de péptidos que contienen grupos tioles y pueden dar la adición de Michael<sup>162</sup> o con superficies funcionalizadas con unidades de maleimida.<sup>163</sup>

En el grupo de investigación en el que se ha realizado la tesis, se han empleado satisfactoriamente dendrímeros como soporte para el tripéptido RGD.<sup>94,100,105</sup> La posibilidad de modificar la naturaleza de las estructuras dendriméricas y controlar el número de grupos terminales en ellas, las convierte en una herramienta muy poderosa. Estudios previos han demostrado que los conjugados de dendrímeros PAMAM-RGD mejoran la eficacia de los fármacos hacia las dianas terapéuticas (Drug Delivery)<sup>164</sup> y pueden usarse como vectores de distribución.<sup>165</sup>

El objetivo de este trabajo es el diseño de dendrímeros que presenten en su periferia unidades de RGD y estén basados en las estructuras previamente preparadas. Para ello, se ha propuesto la unión covalente de restos RGD-Cys mediante enlaces tipo amida al dendrímero descrito en el capítulo III.1. de este trabajo de tesis.

## V.2. Síntesis de RGD-DG1

La obtención de esta estructura dendrímica ha constituido todo un reto sintético. Para ello, se ha invertido mucho esfuerzo en optimizar esta síntesis empleando distintos reactivos y condiciones hasta obtener el compuesto deseado.

Para la unión covalente del tetrapéptido RGD-Cys a la estructura dendrímica, es necesaria la inserción de un linker o espaciador entre el dendrímero y el péptido. Este linker debe ser tal que se pueda unir a los grupos amino terminales del dendrímero mediante enlace covalente y, además que posea un grupo funcional tal que, al quedar en la superficie de la estructura dendrímica sea capaz de reaccionar con el grupo tiol del resto de cisteína de la cadena peptídica RGD-Cys.

Inicialmente, y en concordancia a los trabajos previos del grupo de investigación, se propuso la estrategia sintética empleada con los dendrímeros PAMAM (Figura 106).<sup>94</sup>

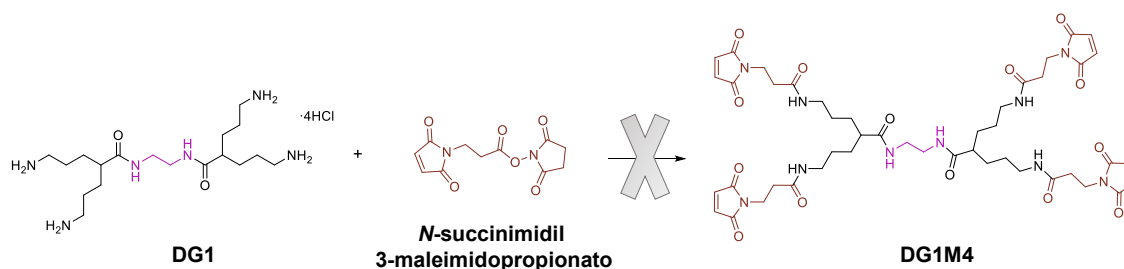


Figura 106. Esquema de reacción entre **DG1** y *N*-succinimidil-3-maleimidopropionato

Sin embargo, los resultados obtenidos no han sido satisfactorios. Se han probado distintas condiciones de reacción de acoplamiento entre el dendrímero de primera generación (**DG1**) y *N*-succinimidil-3-maleimidopropionato.<sup>166</sup> Para ello se ha ensayado con diferentes tiempos de reacción y disolventes. En todos los casos se ha obtenido un crudo de reacción completamente aglomerado difícil de disolver, complicando esto su purificación y análisis. A pesar de los distintos intentos, los resultados obtenidos por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas han mostrado que en ningún caso no se ha formado la estructura deseada.

Tabla 32. Condiciones de reacción ensayadas con derivado de maleimida

Relación de equivalentes entre grupo amino-derivado de maleimida	Disolvente	Tiempo	Temperatura
1-2	DCM anh.	16 h	t.a.
1-2	DCM anh.	2 días	t.a.
1-2	DMF anh.	16 h	t.a.
1-2	DMF anh.	2 días	t.a.
1-2	DCM/DMSO	2 días	t.a.

Este hecho ha redirigido la estrategia de síntesis a la propuesta de otro espaciador, el ácido cloroacético. En este caso, también se han probado diferentes condiciones de reacción, tanto con dicho ácido como con el cloruro de ácido correspondiente, sin obtener resultados alentadores. La Tabla 33 muestra las condiciones de reacción probadas partiendo del dendrímico de primera generación previamente tratado con la resina de intercambio iónico.

Tabla 33. Condiciones de reacción ensayadas con derivados del ácido cloroacético

Reactivo	Agentes de acoplamiento	Relación de equivalentes de <b>DG1</b> -reactivo	Base	Disolvente	Tiempo	Temperatura
ClAcOH	HOBt/DMAP/EDCI	1 – 4.4	<i>N</i> -metilmorfolina	DCM anh.	16 h	t.a.
ClAcOH	HOBt/DMAP/EDCI	1 – 4.4	<i>N</i> -metilmorfolina	DMF anh.	3 días	t.a.
ClAcOCl	-	1 – 4.4	NaOH 10%	DCM anh.	3 días	0°C – t.a.
ClAcOCl	-	1 – 4.4	Et <sub>3</sub> N	DCM anh.	3 días	0°C – t.a.
ClAcOH	CDI	1 – 4.4	<i>N</i> -metilmorfolina	MeCN anh.	16 h	t.a.
ClAcOH	EDCI/NHS	1 – 4.4	<i>N</i> -metilmorfolina	DMF anh.	16 h	0°C – t.a.
ClAcOH	EDCI/NHS	1 – 8.8	<i>N</i> -metilmorfolina	DMF anh.	3 días	0°C – t.a.
ClAcOH	EDCI/NHS	1 – 4.8	<i>N</i> -metilmorfolina	MeOH anh.	2 días	0°C – t.a.
ClAcOCl	-	1 – 6	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Acetona:H <sub>2</sub> O	1 h	0°C – t.a.
ClAcOCl	-	1 – 6	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Acetona:H <sub>2</sub> O	5 h	0°C – t.a.
ClAcOCl	-	1 – 6	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Acetona:H <sub>2</sub> O	16 h	0°C – t.a.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón de los crudos de estas reacciones muestran numerosas señales, que indican que no se ha formado un producto en particular, sino que han ocurrido una serie de reacciones inter o intra-moleculares que dificultan el proceso de caracterización y hacen que esta ruta sintética no sea viable.

Finalmente, basándonos en otros estudios de anclaje de péptidos a dendrímicos,<sup>167</sup> se ha propuesto la síntesis de 2-(acrililoxi)etilmetacrilato (AEMA) como espaciador entre el dendrímico y el tripéptido.

### V.2.1. Síntesis de AEMA

Para la síntesis de **AEMA** se parte de 2-hidroxietilmetacrilato y cloruro de acrililo que, en presencia de base y de 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (butilhidroxitolueno o BHT), da lugar a **AEMA** como un aceite amarillo pálido. El empleo de BHT es para inhibir la formación de radicales, asimismo ayuda a la estabilidad de **AEMA** al ser almacenada.<sup>167</sup>

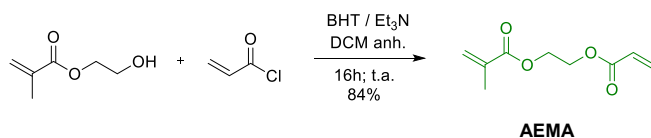


Figura 107. Síntesis de AEMA

Este compuesto se ha caracterizado por técnicas de resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 300 - Figura 303 del ANEXO). En la Figura 108 se muestra el espectro COSY, el cual ha sido muy útil para asignar la correlación entre las señales de protón de este compuesto.

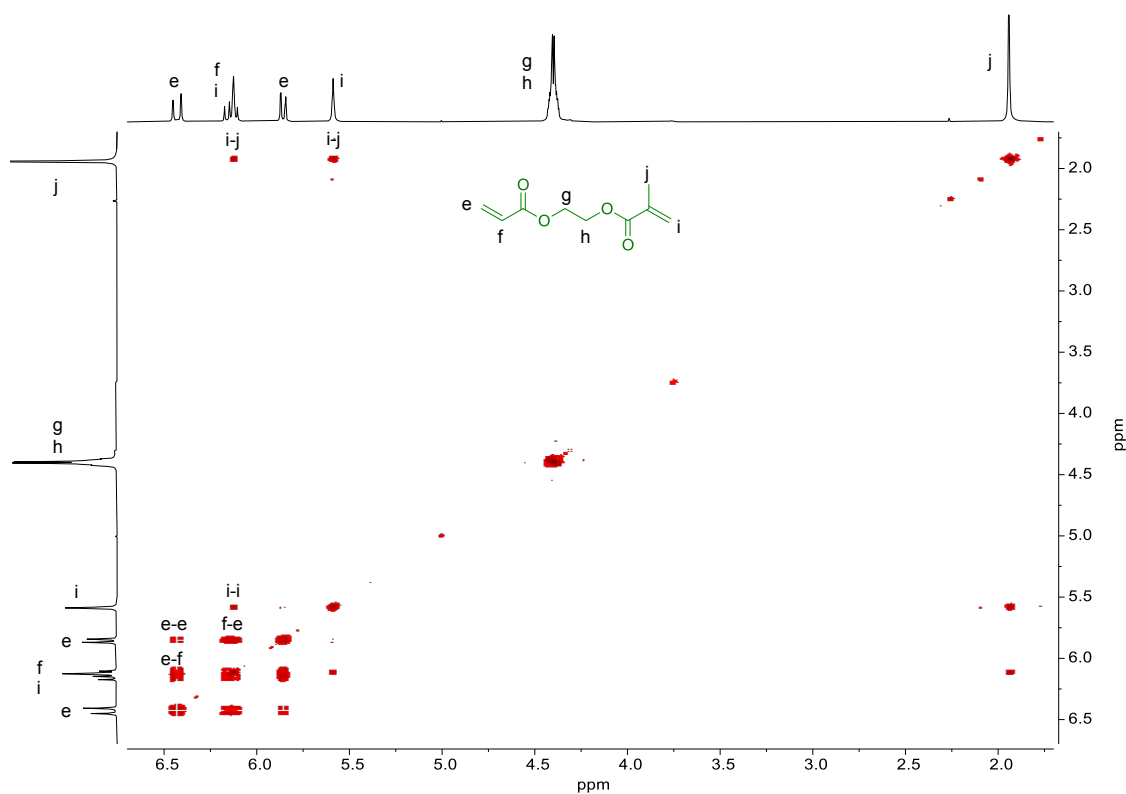


Figura 108. Espectro de RMN COSY de AEMA en  $CDCl_3$

## V.2.2. Síntesis de **DG1AEMA**

Para la reacción de **DG1** con **AEMA** se trata el dendrímico con la resina de intercambio iónico y se hace reaccionar con un exceso de **AEMA** en DMF. Esta reacción se lleva a cabo en condiciones anhidras y a 50°C durante 16h, tiempo tras el cual se obtiene **DG1AEMA** sin necesidad de purificación.

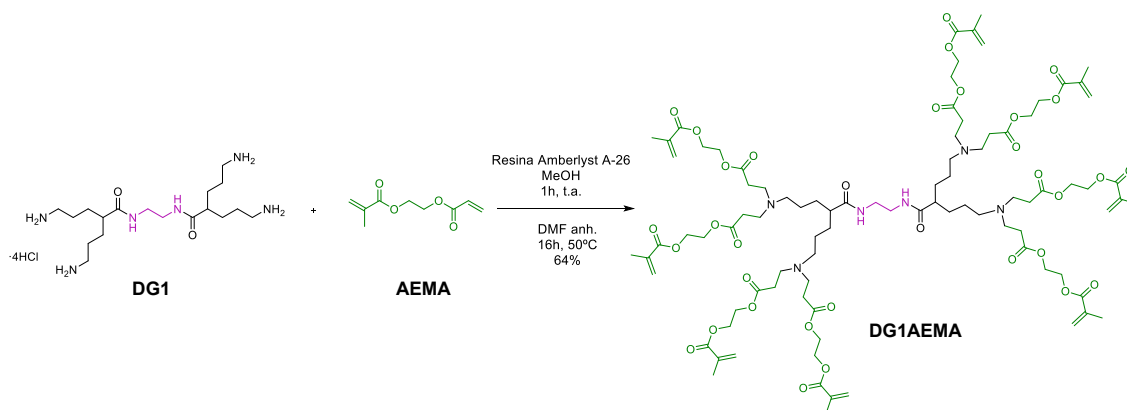


Figura 109. Síntesis de **DG1AEMA**

Por espectrometría de masas (MALDI-TOF) en matriz de DT/TFANa se observa el pico correspondiente a  $[M + H]^+$  a  $m/z$  1845.4 y a  $[M + Na]^+$  a  $m/z$  1867.5.

Este compuesto también se ha caracterizado por RMN de protón, carbono, COSY, HSQC y HMBC (Figura 304 - Figura 308 del ANEXO). Gracias a los espectros bidimensionales, se ha podido hacer una completa asignación de las señales. En el espectro de protón de **DG1AEMA** (Figura 110 b)) se observan las señales correspondientes a la estructura dendrímica y las nuevas señales de los sustituyentes **AEMA**. A 6.0 y 5.6 ppm aparecen las señales correspondientes a los protones “i” de los metilenos de los dobles enlaces terminales, tal y cómo se observa en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de **AEMA** (Figura 110 c)). Las señales correspondientes a “e” y “f”, por el contrario, se desplazan desde esta misma zona en el espectro de **AEMA** (Figura 110 c)) a 2.6 y 2.4 ppm en el compuesto **DG1AEMA**. Esto es indicador de que el doble enlace del compuesto **AEMA** ha reaccionado con los grupos amino terminales del dendrímico, además en el espectro de **DG1AEMA** se observa la señal correspondiente a “g” y “h” proveniente del compuesto **AEMA**. Las señales correspondientes a la estructura dendrímica se observan a los desplazamientos esperados, variando la señal asociada a “d” de 2.7 ppm en el caso de **DG1** a 3.0 ppm para **DG1AEMA**. Este desplazamiento se debe a que, tras la reacción, estos metilenos han pasado de estar en alfa a grupos amina primaria, a encontrarse en alfa a amina terciaria. Además, las integrales corresponden a la inserción de 8 cadenas de **AEMA** en la estructura. Cabe destacar que el poco exceso de **AEMA** añadido a la reacción, no es detectable por RMN, tal y como se observa en la Figura 110 b).

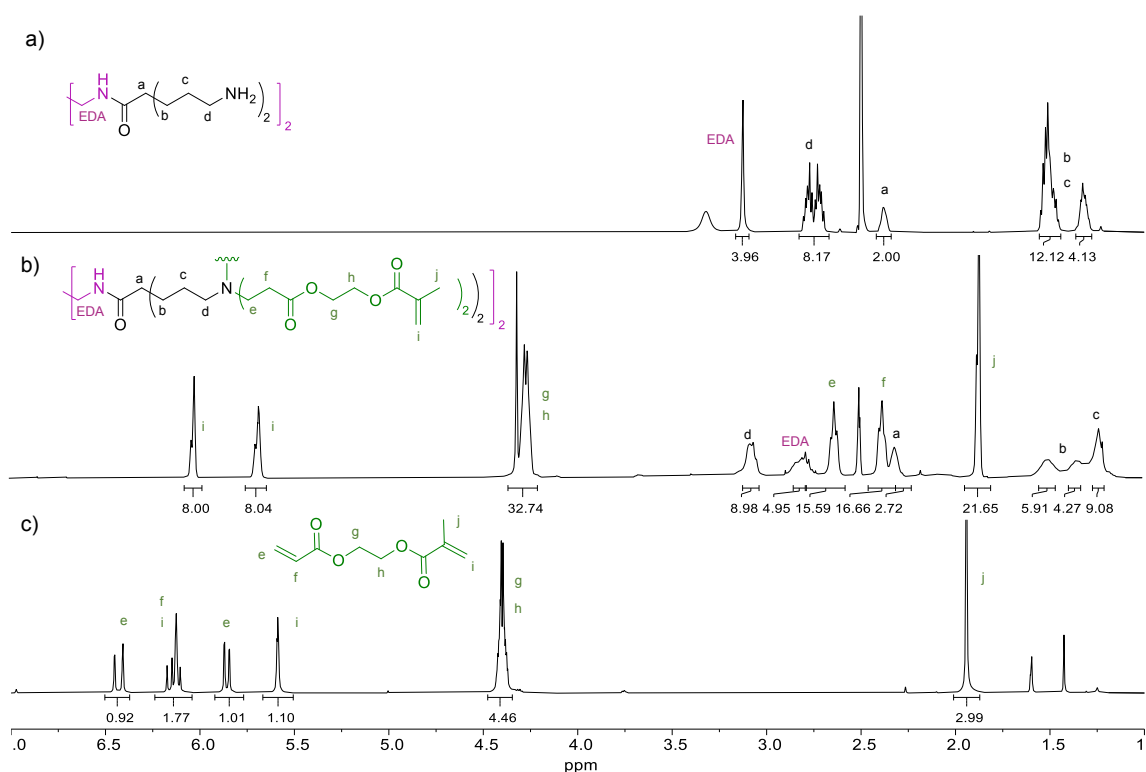


Figura 110. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de a) **DGI** (DMSO-d<sub>6</sub>), b) **DG1AEMA** (DMSO-d<sub>6</sub>) y c) **AEMA** (CDCl<sub>3</sub>)

### V.2.3. Síntesis de **RGD-DG1**

El dendrímero con restos del tripéptido en su periferia se obtiene mediante la reacción entre **DG1AEMA** y RGD-Cys en PBS bajo atmósfera de argón. Además, se adiciona dimetil(fenil)fosfano (DMPP) como catalizador. Tras 3 días a temperatura ambiente se purifica el crudo de reacción mediante cromatografía de exclusión por tamaño para dar lugar a **RGD-DG1** como un sólido amarillo pálido con un 72% de rendimiento.

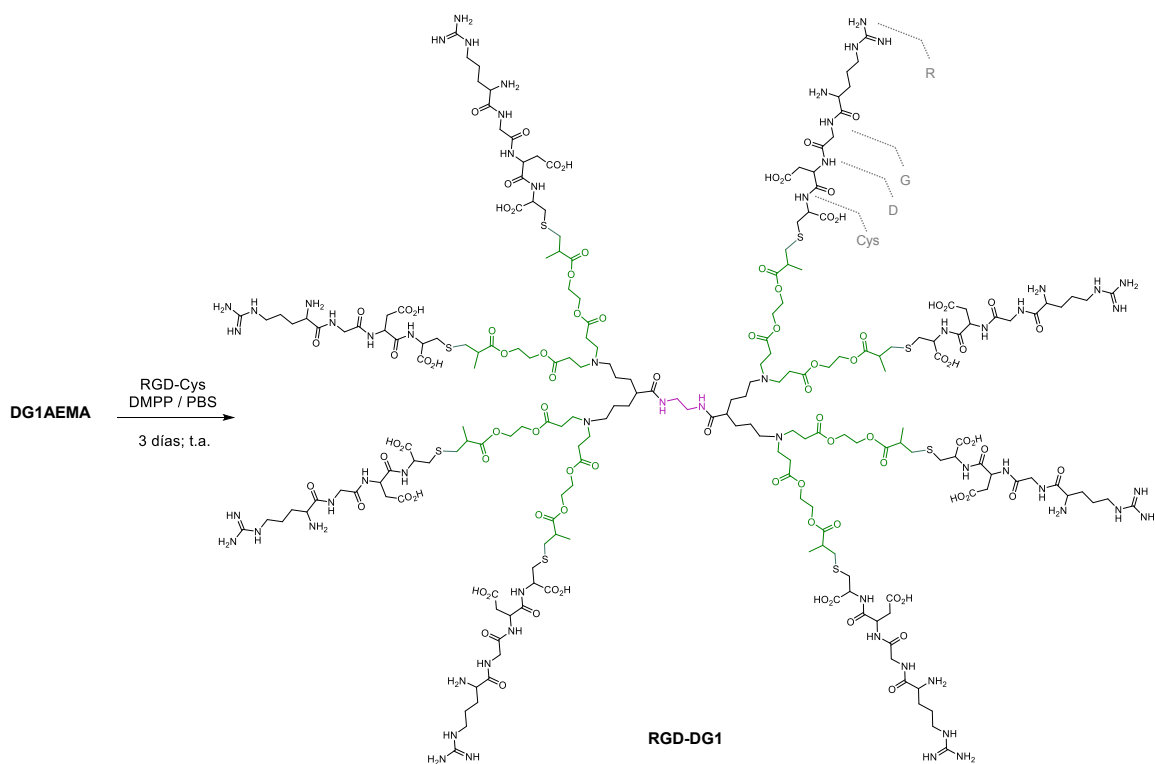


Figura 111. Síntesis de **RGD-DG1**

Mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) en matriz de CHCA se observa el pico correspondiente al ion  $[M + 4H]^{4+}$  a  $m/z$  1352.6.

Este compuesto se ha caracterizado por RMN de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 309 - Figura 312 del ANEXO) y, aunque la asignación completa de todas las señales de protón y carbono es bastante compleja, los desplazamientos de las señales son los esperados. En la Figura 112 se observa cómo las señales correspondientes a los protones terminales de los dobles enlaces, que se pueden ver a 6.0 y 5.6 ppm en el espectro de protón de **DG1AEMA**, desaparecen en el espectro de **RGD-DG1**. Este hecho indica que los dobles enlaces de la estructura dendrímica han reaccionado con el grupo tiol presente en RGD-Cys dando lugar a la formación de **RGD-DG1**. Las señales correspondientes a los restos de RGD, más las señales inherentes a la estructura dendrímica, aparecen entre 4.5 y 1 ppm a desplazamientos similares a los de sus correspondientes precursores.

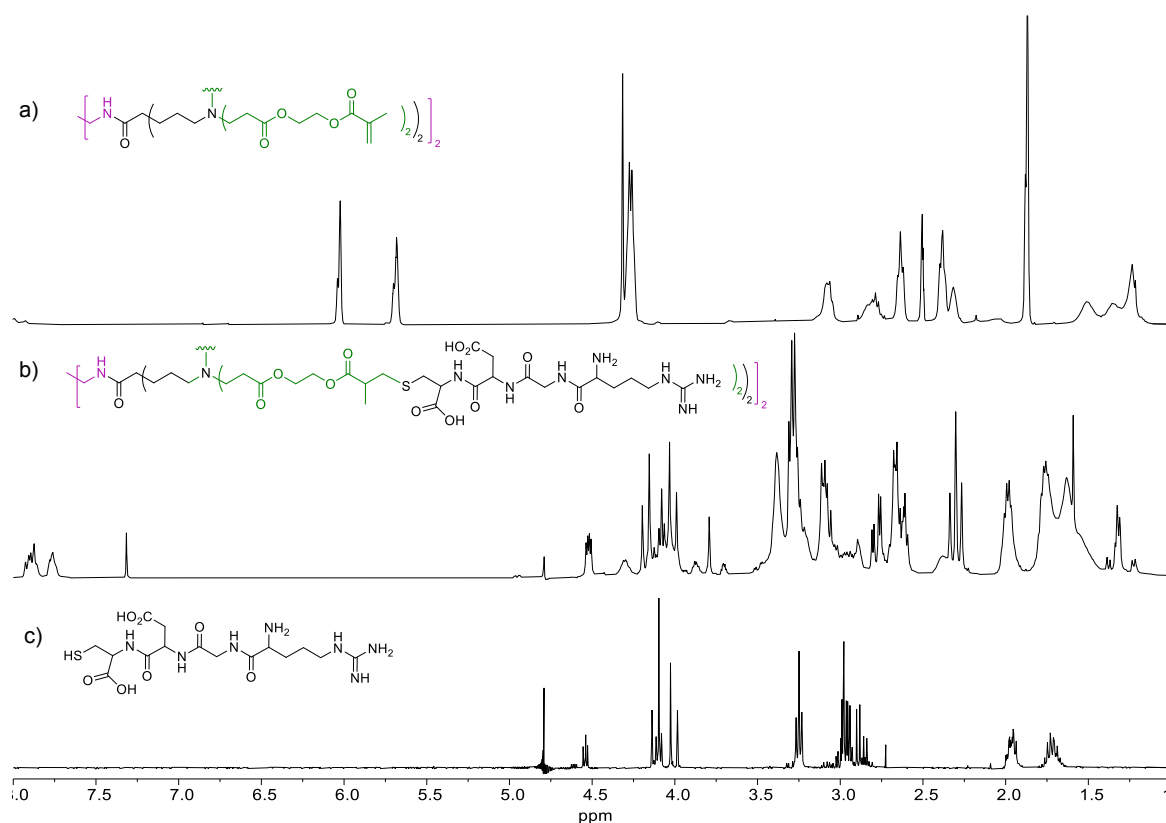


Figura 112. Espectros de  $^1\text{H-NMR}$  de a) **DG1AEMA** ( $\text{DMSO-}d_6$ ), b) **RGD-DGI** ( $\text{D}_2\text{O}$ ) y c) **RGD-Cys** ( $\text{D}_2\text{O}$ )

### V.3. Síntesis de RGD-DG2

Para la síntesis de **RGD-DG2** se ha seguido la misma estrategia sintética que para el análogo de primera generación. Así, inicialmente se ha sintetizado el compuesto **DG2AEMA** mediante la reacción entre **DG2** y el compuesto **AEMA** para el posterior acoplamiento de restos RGD en su periferia.

#### V.3.1. Síntesis de DG2AEMA

Para llevar a cabo la reacción de **DG2** con **AEMA**, previamente se trata el dendrímero con la resina de intercambio iónico Amberlyst y, tras llevarlo a sequedad, se hace reaccionar con un exceso de **AEMA** en DMF anhidra. La reacción tiene lugar a  $50^\circ\text{C}$  durante 3 días, obteniéndose **DG2AEMA** sin necesidad de purificar.

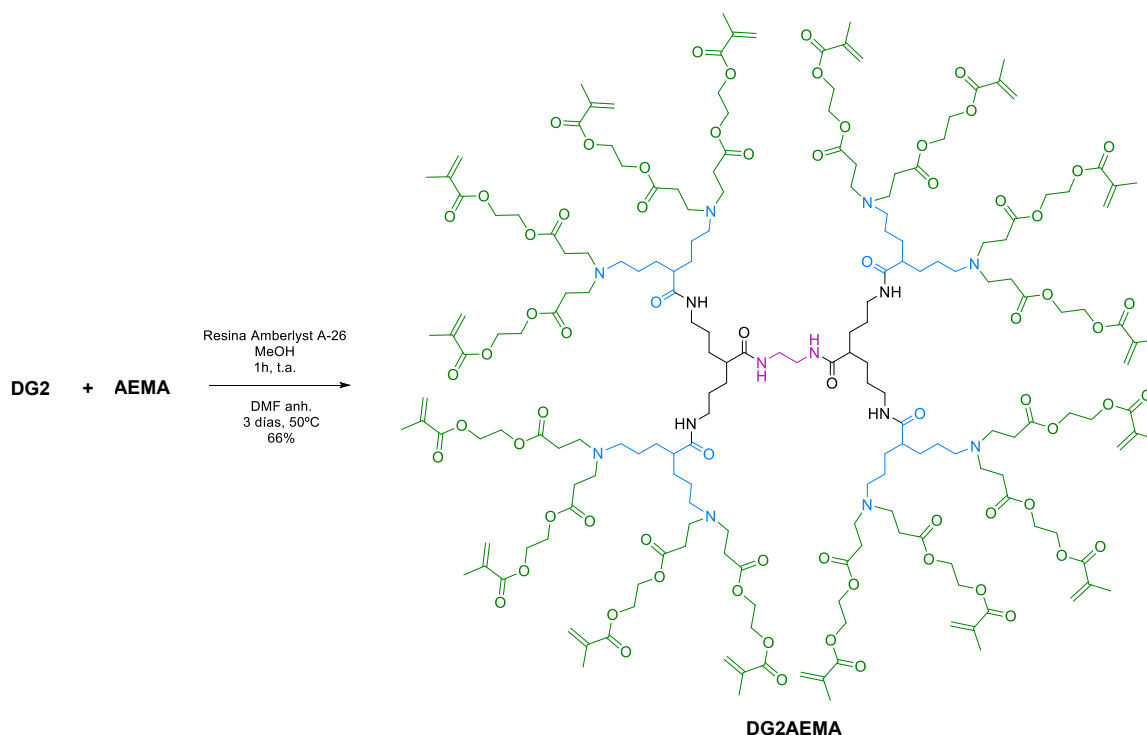


Figura 113. Síntesis de **DG2AEMA**

Este compuesto ha sido caracterizado por RMN de protón, carbono, COSY, HSQC y HMBC (Figura 313 - Figura 317 del ANEXO). En la Figura 114 se observa cómo en el espectro de protón de **DG2AEMA** aparecen las señales correspondientes a los protones terminales de los dobles enlaces provenientes de la inserción del compuesto **AEMA**, mientras que las señales correspondientes a los metilenos en  $\alpha$  y  $\beta$  a las aminas terciarias en **DG2AEMA** se desplazan desde 6.4-5.8 ppm en el espectro de **AEMA** a 2.6-2.4 ppm en el de **DG2AEMA**, indicando esto que se ha dado la reacción entre los dobles enlaces de **AEMA** y los grupos amino terminales de **DG2**. Además, en la zona alifática aparecen señales similares a las que se observaban en el dendrímero precursor **DG2**. Todas estas señales, junto con las del resto de experimentos realizados por RMN, parecen indicar la formación del compuesto deseado.

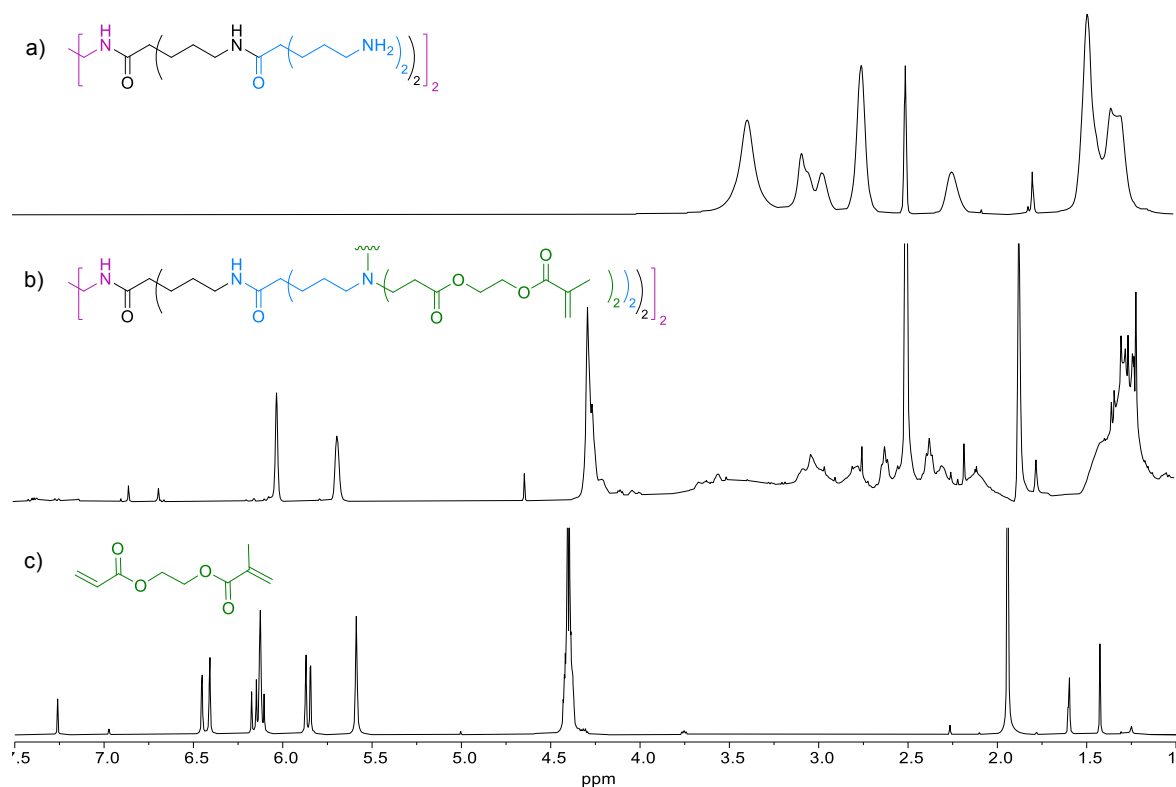


Figura 114. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de a) **DG2** (DMSO-*d*<sub>6</sub>), b) **DG2AEMA** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) y c) **AEMA** (CDCl<sub>3</sub>)

### V.3.2. Síntesis de **RGD-DG2**

La reacción entre **DG2AEMA** y RGD-Cys catalizada por dimetil(fenil)fosfano (DMPP), tiene lugar en PBS y atmósfera de argón. Después de 3 días a temperatura ambiente y tras purificación por cromatografía de exclusión por tamaño, se obtiene el dendrímico de segunda generación con restos RGD en su periferia (**RGD-DG2**) como un sólido amarillo pálido.

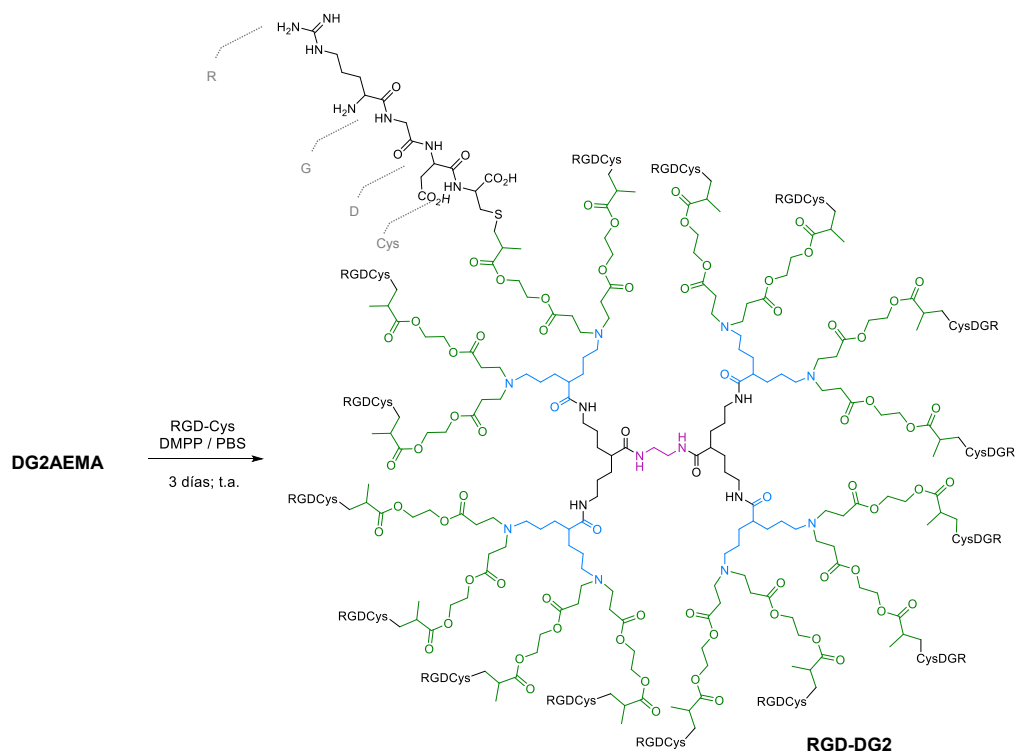


Figura 115. Síntesis de **RGD-DG2**

Se ha caracterizado este compuesto por RMN de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 318 - Figura 321 del ANEXO). Por RMN de protón (Figura 116 y Figura 318 del ANEXO) se observa cómo las señales correspondientes a los protones terminales del doble enlace a 6.0 y 5.6 ppm en el espectro de **DG2AEMA**, desaparecen en el espectro de **RGD-DG2**, lo que indica que se ha dado la reacción entre los dobles enlaces de la estructura dendrímérica y el grupo tiol de la secuencia peptídica RGD-Cys. El resto de distribución de señales del espectro de protón de **RGD-DG2**, aunque es complicada su asignación completa, al compararlo tanto con el espectro de **DG2AEMA** como con el del tetraéptido, parece indicar la formación del compuesto deseado, por lo que ha motivado su estudio en procesos de regeneración tisular.

Desafortunadamente, al igual que para los dendrímeros de mayor generación, todos los intentos realizados para obtener un espectro de masas han resultado infructuosos.

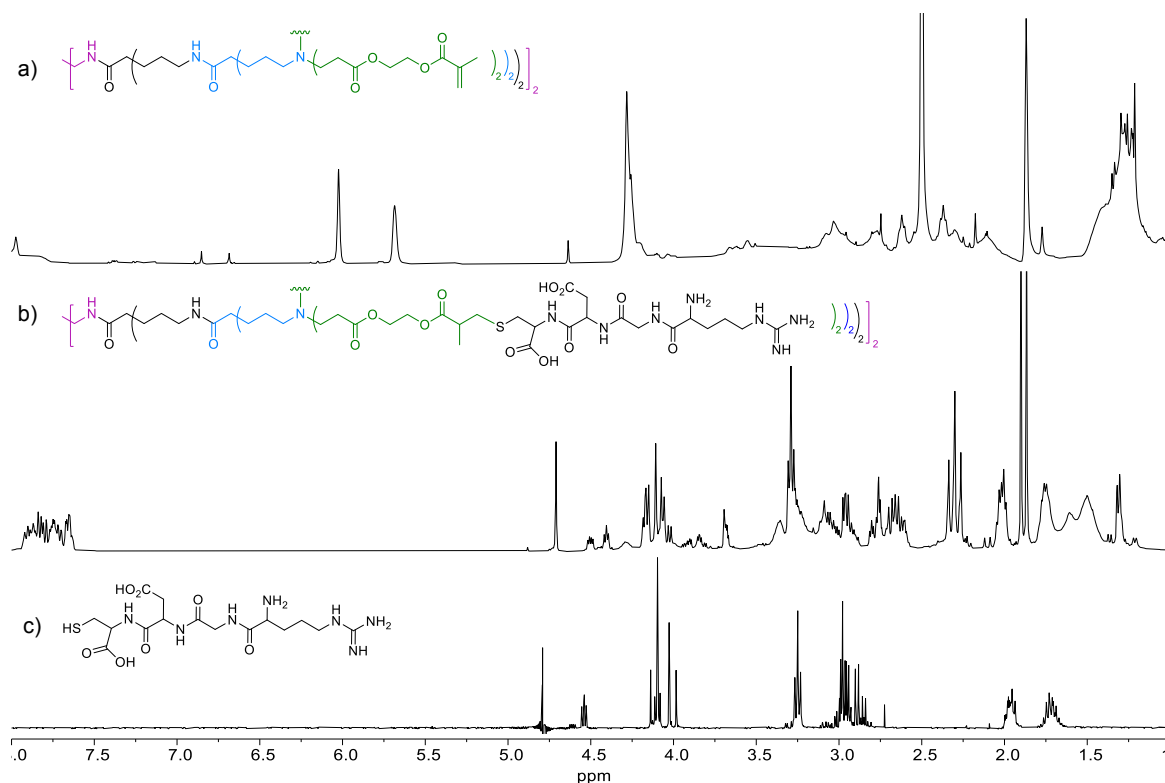


Figura 116. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de a) **DGLAEMA** ( $\text{DMSO-}d_6$ ), b) **RGD-DG1** ( $\text{D}_2\text{O}$ ) y c) **RGD-Cys** ( $\text{D}_2\text{O}$ )

#### V.4. Experimentos DOSY

Se ha realizado el experimento de RMN de difusión DOSY de estos dendrímeros con restos de RGD en su periferia. Las muestras se han disueltas en  $\text{D}_2\text{O}$  a una concentración de 1mM.

Los espectros obtenidos muestran, además de una única especie que difunde en el medio acuoso, un coeficiente de difusión de  $1.854 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  para **RGD-DG1** (Figura 117 a)) y de  $1.726 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  para **RGD-DG2** (Figura 117 b))

Por la ecuación de Stokes-Einstein se ha calculado que el  $R_h$  para **RGD-DG1** es de 10.81Å y para **RGD-DG2** de 11.60Å.

Como en el caso de las estructuras dendriméricas analizadas en la sección III.2.4. Experimentos DOSY de este trabajo de tesis, la gráfica lineal de Stejskal-Tanner (Figura 117 b)) también muestra un decaimiento monoexponencial de la señal en el caso de este dendrímero, lo cual indica que esta molécula es monodispersa y no forma agregados.<sup>127</sup>

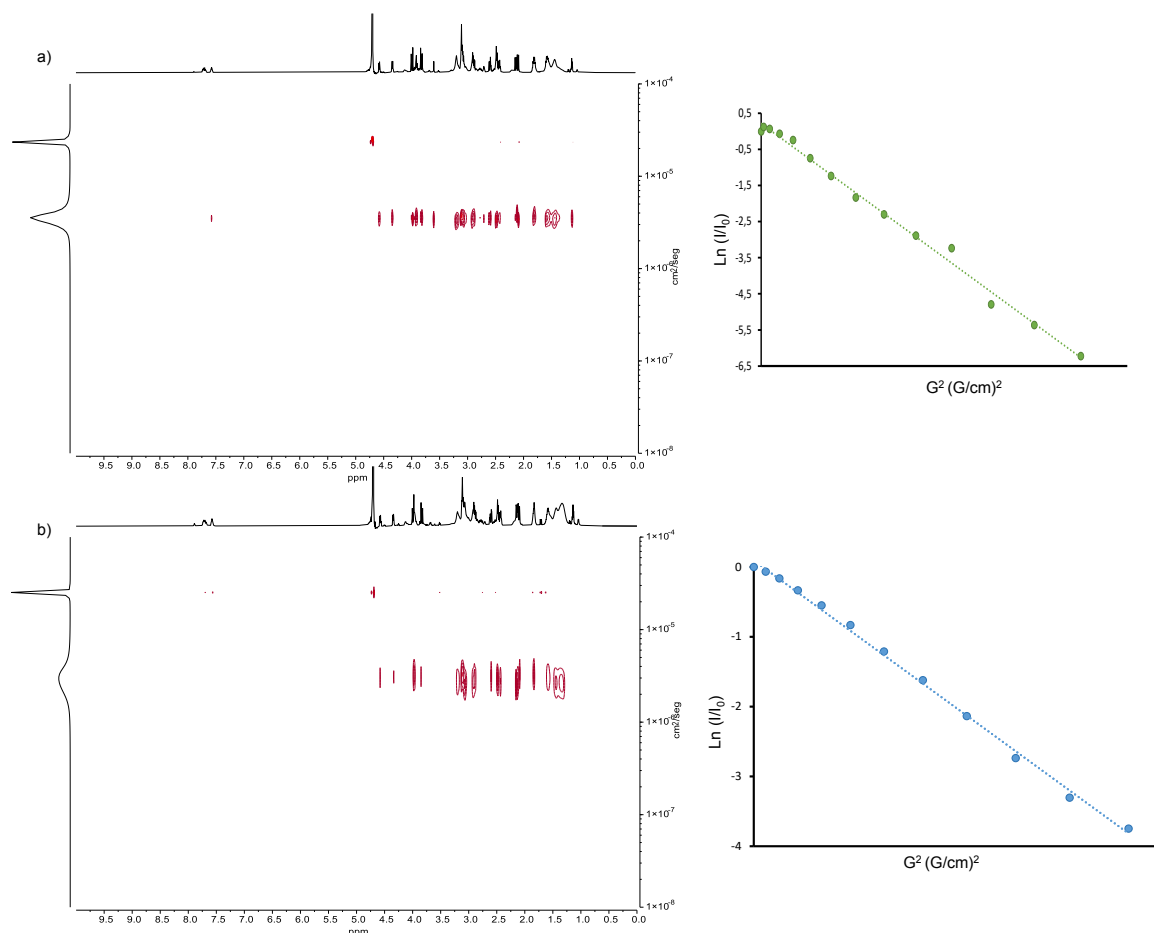


Figura 117.a) Espectro de RMN DOSY y Gráfica de Stejskal-Tanner de **RGD-DG1**; b) Espectro de RMN DOSY y Gráfica de Stejskal-Tanner de **RGD-DG2**

Se ha sintetizado una nueva estructura dendrímérica con restos RGD en su periferia, duplicándose el número de grupos funcionales respecto al número de grupos amino terminales que posee el dendrímérico de partida.

Estos compuestos se encuentran actualmente en el grupo de investigación liderado por el Dr. J. Samitier y la Dra. A. Lagunas del Instituto de Bioingeniería de Cataluña para evaluar la actividad de estos compuestos en procesos de regeneración tisular.



## **CAPÍTULO VI**

# **SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS LUMINISCENTES COMO MARCADORES BIOLÓGICOS**



## VI.1. Introducción

Como ya se ha descrito en la Introducción de este trabajo de tesis, el grupo de investigación en el que se ha desarrollado la tesis, ha sintetizado dendrímeros luminiscentes con excelentes propiedades para ser empleados como biomarcadores.<sup>104,106,116</sup> Así, debido a las potenciales aplicaciones en bioimagen de estos dendrímeros luminiscentes, se ha centrado el estudio en la síntesis y caracterización de nuevas estructuras dendriméricas, basadas en las descritas en el capítulo III.1. en las que los grupos terminales se encuentran en posiciones relativas 1,7, pero con la inserción de un núcleo luminiscente.

## VI.2. Síntesis del dendrímero luminiscente DG2Naft

Con el objetivo de introducir un núcleo fluorescente y debido a las potenciales aplicaciones luminiscentes de los derivados de naftalimida, se ha diseñado la estructura de un dendrímero cuyo núcleo está formado por 4-amino-1,8-naftalimida, otorgando excelentes propiedades luminiscentes a la estructura dendrimérica.

La síntesis de este compuesto se lleva a cabo mediante la reacción tipo click entre **dg2-ino-NHBoc** (descrito en el apartado III.3.5.1.) y el derivado de naftalimida (**7**), que seguido de la reacción de desprotección de los grupos amino, da lugar a **DG2Naft** (Figura 118)

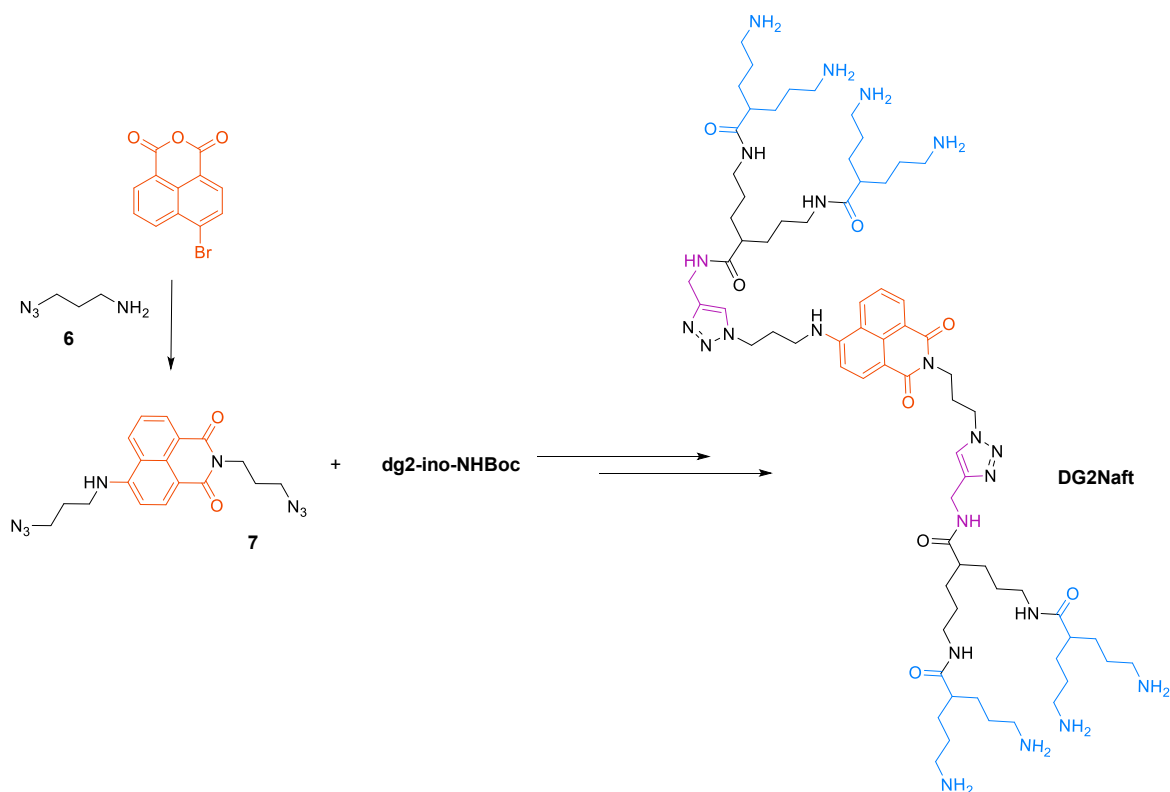


Figura 118. Esquema sintético de **DG2Naft**

### VI.2.1. Síntesis de *N*-(3-azidopropil)-4-((3-azidopropil)amino)-1,8-naftalimida (**7**)

Se propone la síntesis de la molécula 4-amino-1,8-naftalimida convenientemente funcionalizada con grupos azida para hacer posible una reacción click con el grupo acetileno de **dg2-ino-NHBoc**.

El primer paso de esta síntesis es la formación del compuesto **6** a partir de 1-bromo-3-aminopropano comercial, descrito previamente en el apartado III.3.7.1.

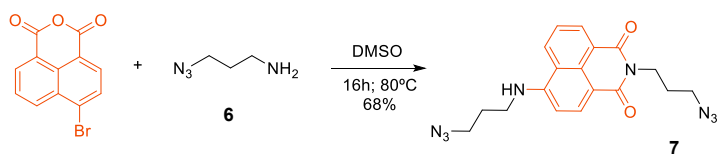


Figura 119. Síntesis de **7**

Posteriormente se hace reaccionar el anhídrido 4-bromo-1,8-naftálico con un exceso de **6** en DMSO, a 80°C, para dar lugar al compuesto **7** como un sólido amarillo tras ser purificado por cromatografía en columna.

Mediante espectrometría de masas se observa el pico asociado a  $[M + H]^+$  a  $m/z$  379.1625. Además, el compuesto **7** ha sido completamente caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 322 - Figura 325 del ANEXO), donde el espectro de protón

muestra que se han introducido las cadenas con los grupos azida en la estructura ya que aparecen nuevas señales correspondientes a los grupos alquílicos de la cadena a 4.25, 3.57, 3.41 y 2.06 ppm.

### VI.2.2. Síntesis de **DG2Naft-NHBoc**

La reacción click entre **dg2-ino-NHBoc** y el compuesto **7** da lugar a un dendrímero fluorescente con ocho grupos amino protegidos en su superficie que, tras su elaboración y precipitación en hexano, se obtiene como un sólido amarillo con un rendimiento del 91%.

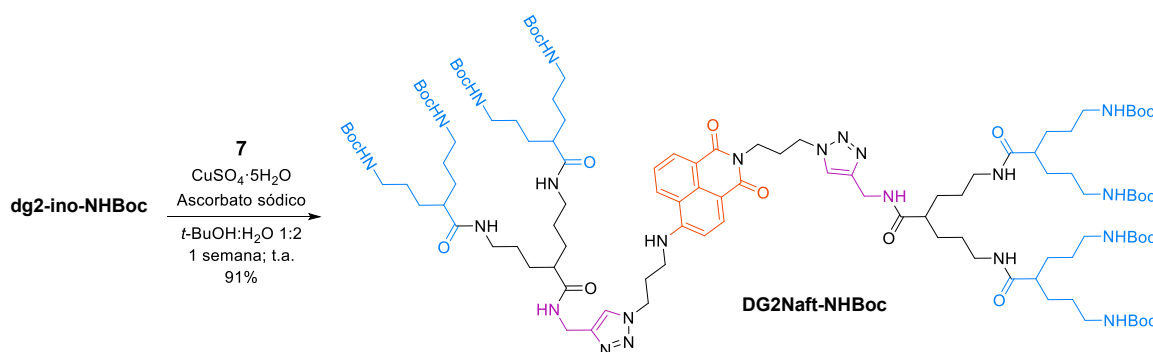


Figura 120. Síntesis de **DG2Naft-NHBoc**

El espectro de IR de **DG2Naft-NHBoc** (Figura 121) muestra que la banda característica del grupo funcional azida a  $2095\text{cm}^{-1}$ , presente en el espectro del compuesto **7** (mostrado con línea de color naranja en la Figura 121), desaparece tras la formación del dendrímero. Esto indica que los grupos azida han reaccionado con el grupo acetileno del dendrón de partida dando lugar a la formación de los dos ciclos de 1,2,3-triazol.

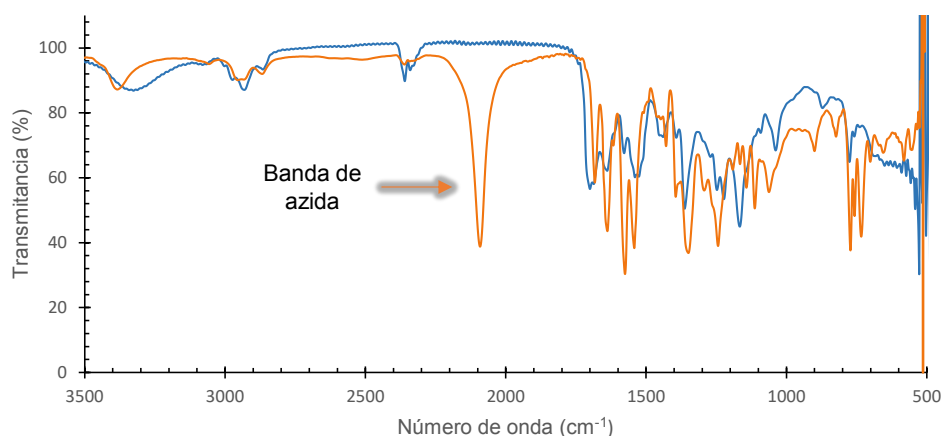


Figura 121. Espectro IR de **7** (naranja) y de **DG2Naft-NHBoc** (azul)

Mediante espectrometría de masas se observa el pico asociado a  $[M + K]^{2+}$  a  $m/z$  1133.1937. Además, este compuesto se ha caracterizado completamente mediante resonancia magnética nuclear

de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 326 - Figura 329 del ANEXO). En el espectro de protón (Figura 326 del ANEXO) se observan las señales típicas de esta estructura dendrímica además de las señales correspondientes al derivado de naftalimida. En la parte aromática, entre 8.73 y 7.97 ppm, aparecen las señales correspondientes a los protones del anillo de triazol y los protones aromáticos del núcleo. En la región alifática, entre 4.57 y 1.17 ppm, aparecen las señales correspondientes a todos los metilenos, tanto los de las cadenas del núcleo como los de las cadenas de la estructura dendrímica, así como la señal correspondiente a los metilos del grupo protector Boc a 1.36 ppm.

### VI.2.3. Síntesis de **DG2Naft**

Finalmente, se lleva a cabo la desprotección de los grupos amino periféricos bajo condiciones ácidas. El producto resultante ha resultado ser soluble en medios acuosos, por lo que se ha purificado mediante columna de exclusión por tamaño Sephadex obteniendo el dendrímero fluorescente con 8 grupos amino terminales como un sólido amarillo de manera cuantitativa.

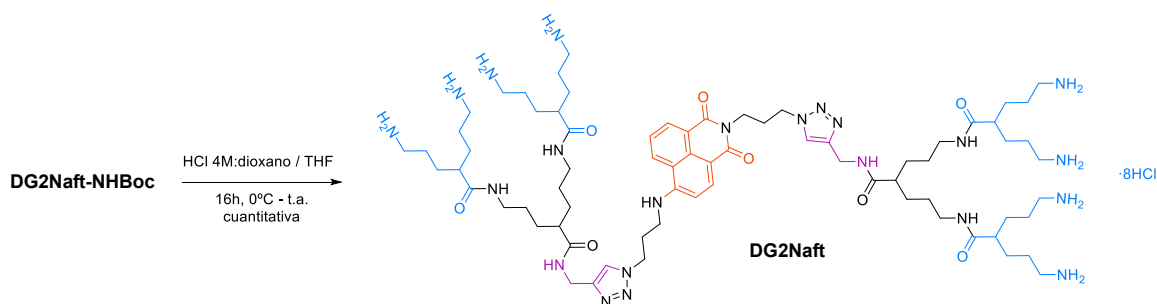


Figura 122. Síntesis de **DG2Naft**

Mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), empleando HABA como matriz, se observa el pico asociado a  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  1449.5.

Este dendrímero se ha caracterizado por técnicas de resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 330 - Figura 333 del ANEXO). En el espectro de protón (Figura 123) se observa cómo desaparece la señal correspondiente a los metilos de los grupos protectores Boc que se encontraba en el espectro de **DG2Naft-NHBoc**. Las señales correspondientes a los protones aromáticos del núcleo, así como las de los protones de los anillos de triazol, aparecen en torno a 8.23 – 7.84 ppm. Las señales asociadas a los metilenos de las cadenas alquílicas del núcleo se observan entre 4.58 – 3.97 ppm y 2.35 – 2.09 ppm, esta última señal aparece superpuesta a la de los protones de la estructura dendrímica “a<sub>1</sub>” y “a<sub>2</sub>”. Las señales correspondientes al resto de metilenos del compuesto aparecen entre 3.13 – 2.64 ppm y 1.58 – 1.10 ppm.

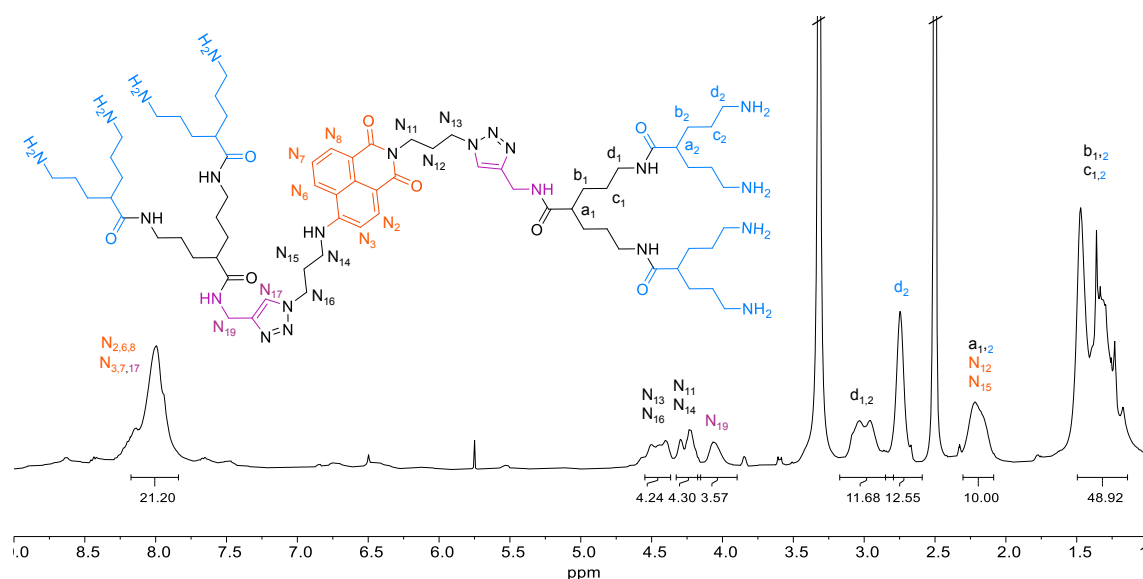


Figura 123. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **DG2Naft** en DMSO-*d*<sub>6</sub>

### VI.3. Síntesis del dendrímero luminiscente **DG2Pt**

Para llevar a cabo la síntesis de esta estructura dendrímica primero se procede a la formación de 3,5-bis(azidometil)piridina (**11**), que actuará como núcleo del dendrímero. Debido a la experiencia del grupo en colaboraciones previas, se ha elegido este derivado de piridina como punto de anclaje entre el dendrímero y el complejo de Pt (II), ya que el enlace entre el nitrógeno del resto de piridina y el platino ha sido previamente estabilizado.<sup>116,168</sup> Primero, se sintetiza el bromo-derivado de piridina (**10**) siguiendo el procedimiento previamente descrito.<sup>169</sup> Esta ruta sintética parte del ácido comercial 3,5-piridindicarboxílico, el cual se esterifica (**8**) y reduce (**9**), para finalmente dar lugar al compuesto **10** mediante una reacción de bromación con una disolución concentrada de ácido bromhídrico. El último paso para la obtención del núcleo (**11**) es la sustitución de los grupos bromuros por azidas.

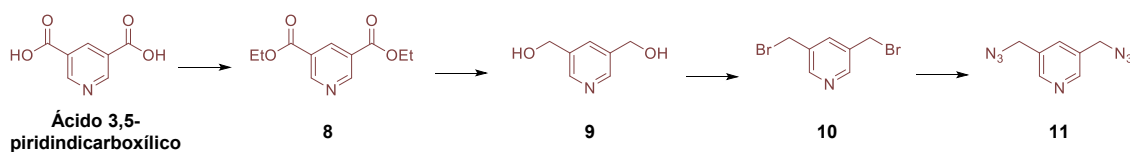


Figura 124. Esquema sintético de **11**

La reacción de acoplamiento tipo click entre **11** y **dg2-ino-NHBoc** (descrito en el apartado III.3.5.1.), seguida de la reacción con el complejo de platino (**13**) y, finalmente, de la desprotección de los grupos amino terminales, da lugar **DG2Pt**.

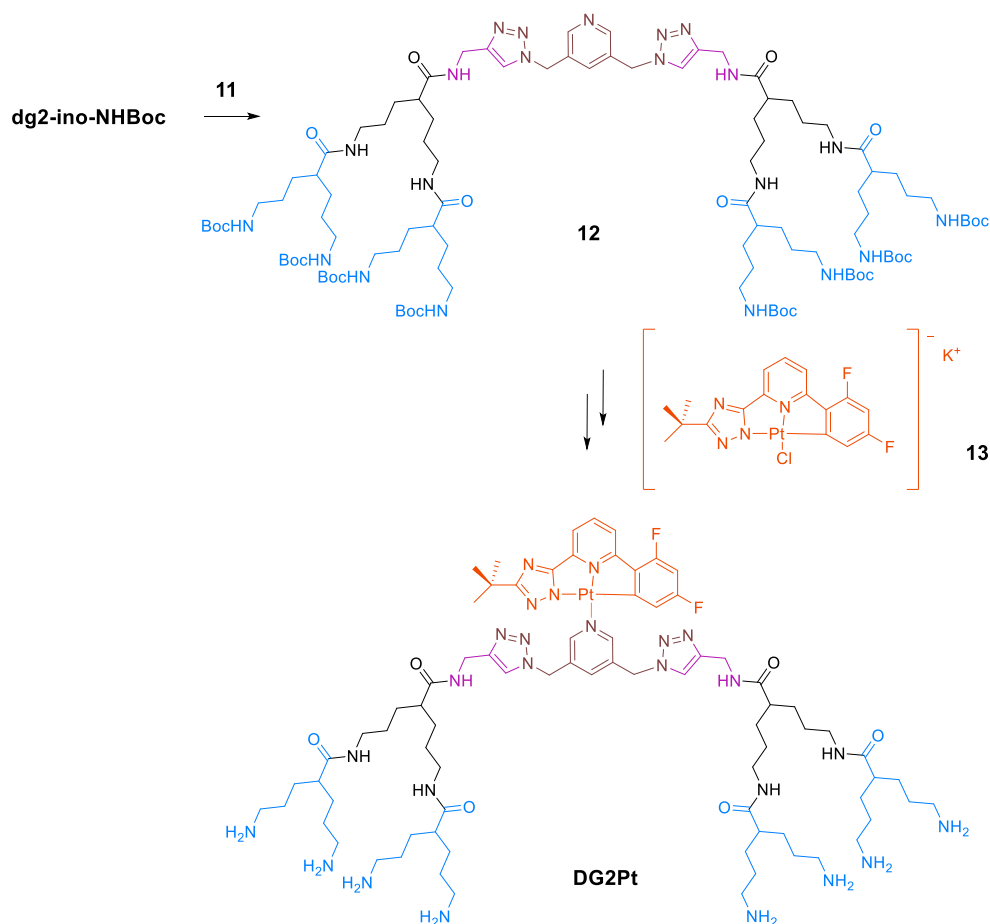


Figura 125. Esquema sintético de **DG2Pt**

### VI.3.1. Síntesis de 3,5-bis(azidometil)piridina (**11**)

Para la síntesis del azido-derivado de piridina primero se ha sintetizado el bromo-derivado (**10**) siguiendo un procedimiento ya descrito con anterioridad.<sup>169</sup> El primer paso en esta ruta sintética es la esterificación del ácido 3,5-piridindicarboxílico para dar lugar al compuesto **8**. Esta reacción tiene lugar con la adición, gota a gota, de ácido sulfúrico a una disolución del ácido dicarboxílico comercial en etanol absoluto. Tras una noche a reflujo se obtiene el compuesto **8** como un aceite amarillo con un 67% de rendimiento.

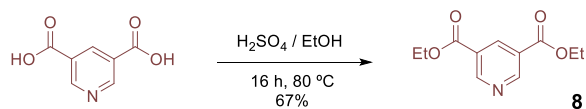


Figura 126. Síntesis de **8**

Mediante RMN-<sup>1</sup>H (Figura 334 del ANEXO) se observan las señales correspondientes a los protones del anillo aromático a 9.36 y 8.86 ppm. Las señales correspondientes a los metilenos de las

cadena alquílica aparecen como un cuadruplete a 4.45 ppm mientras que la señal correspondiente a los metilos se observa como un triplete a 1.43 ppm.

La reducción de **8** con  $\text{LiAlH}_4$  da lugar a 3,5-bis(hidroximetil)piridina (**9**). Para ello, se añade una suspensión de dicho agente reductor en THF anhidro a una disolución de **8**, en el mismo disolvente, bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación vigorosa. La reacción se detiene con la adición lenta de agua con el fin de hidrolizar el exceso de  $\text{LiAlH}_4$ . El precipitado blanco que aparece se elimina por filtración y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna, obteniendo el producto como un aceite incoloro con un 38% de rendimiento.

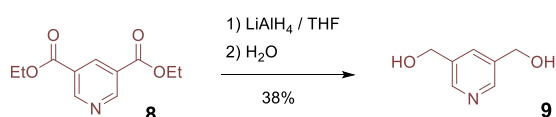


Figura 127. Síntesis de **9**

El espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Figura 335 del ANEXO) muestra las señales correspondientes a los protones del anillo aromático a 8.38 y 7.66 ppm mientras que los protones de los metilenos aparecen como un doblete a 4.53 ppm.

La sustitución de los grupos hidroxilos por bromo da lugar al compuesto **10**. Esta reacción se lleva a cabo con una disolución acuosa de ácido bromhídrico a 125°C durante una noche, tras la cual, la mezcla resultante se disuelve en  $\text{H}_2\text{O}$  y se añade  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  hasta pH 8. Esta disolución acuosa se extrae con DCM obteniéndose **10** con un rendimiento del 73%.

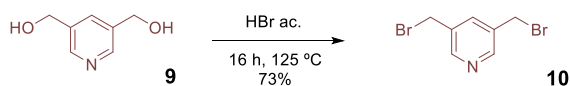


Figura 128. Síntesis de **10**

La estructura se confirma por RMN- $^1\text{H}$  (Figura 336 del ANEXO) donde se observan las señales correspondientes a los protones del anillo aromático a 8.54 y 7.75 ppm y el singlete correspondiente a los protones de los grupos metilenos a 4.45 ppm.

Finalmente, el intercambio de los sustituyentes bromuros por grupos azida da lugar al compuesto **11**, empleado como núcleo en la síntesis del dendrímero fosforescente **DG2Pt**. La reacción, previamente descrita,<sup>170</sup> se lleva a cabo en DMF donde, una vez disuelto el compuesto **10**, se añade  $\text{NaN}_3$  y se calienta a 85°C durante una noche. Tras este tiempo, la mezcla de reacción se lleva a temperatura ambiente, se añade  $\text{H}_2\text{O}$  y se extrae con DCM dando lugar al compuesto **11** como un aceite marrón con un 83% de rendimiento.



Por espectrometría de masas se observa el pico asociado a  $[M + K]^{2+}$  a  $m/z$  1038.6558. Además, este dendrímero se ha caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 341 - Figura 344 del ANEXO) donde se confirma la estructura. En el espectro de protón (Figura 131) se observa el desplazamiento, hacia campo bajo, de la señal correspondiente a los protones del grupo metileno en alfa al triple enlace en **dg2-ino-NHBoc** “-CH<sub>2</sub>ino” y al anillo 1,2,3-triazol en **12** “P<sub>7</sub>”, de 3.97 ppm a 4.24 ppm respectivamente. La señal correspondiente a los protones de los metileno del resto de piridina “P<sub>4</sub>” también se ve afectada, desplazándose de 4.44 ppm en el espectro de **11** a 5.62 ppm en el de **12**. Los desplazamientos de estos metileno confirman la formación de los ciclos de 1,2,3-triazol. Además, aparecen señales en la región aromática correspondientes al resto de piridina y a los ciclos de triazol formados. Los experimentos de RMN de este compuesto presentados en el ANEXO de esta tesis están realizados en DMSO-*d*<sub>6</sub>, donde las señales se resuelven mejor. No obstante, para llevar a cabo la comparación con los compuestos **dg2-ino-NHBoc** y **11**, en la Figura 131, se presenta el espectro de RMN-<sup>1</sup>H en CDCl<sub>3</sub>.

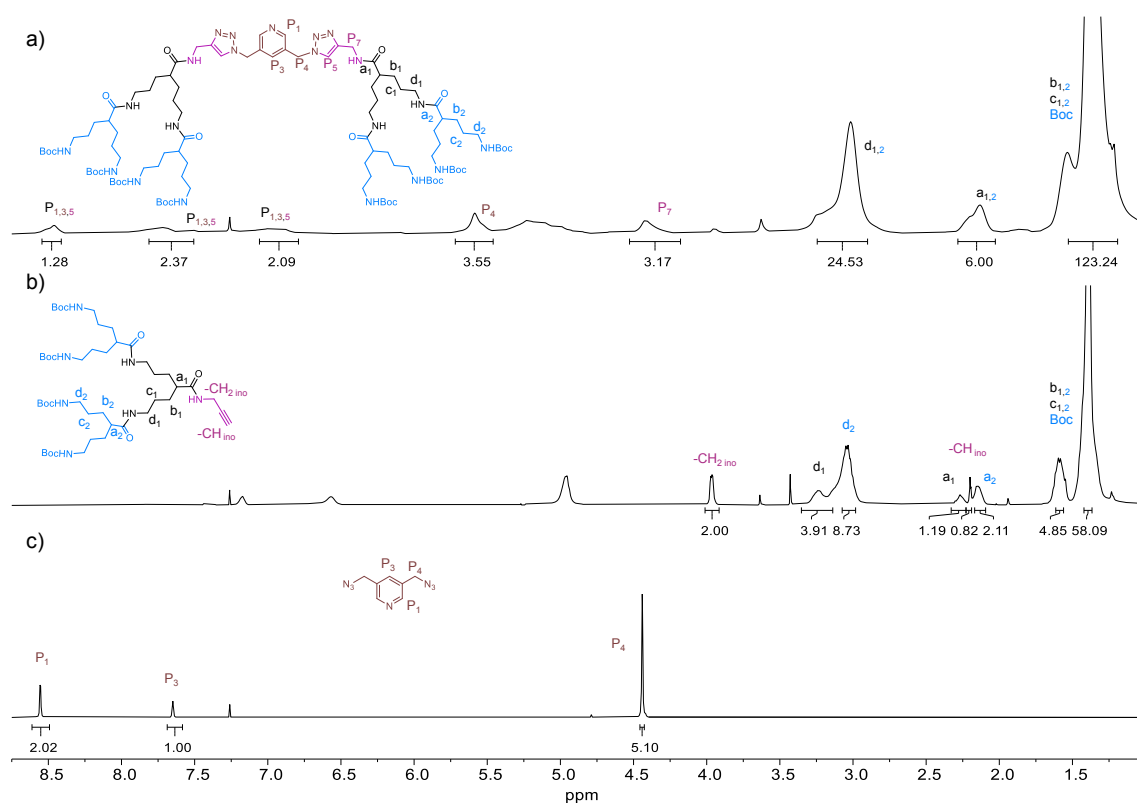


Figura 131. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de a) **12** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) b) **dg2-ino-NHBoc** (CDCl<sub>3</sub>) y c) **11** (CDCl<sub>3</sub>)

El espectro de IR (Figura 132) muestra cómo para el compuesto **12** (mostrado con línea de color azul), desaparece la banda típica de azida a 2095 cm<sup>-1</sup> que, puede observarse en el espectro del compuesto **11** (representado con línea naranja). Esto indica que se han formado los dos ciclos de triazol, además, la banda a 2030 cm<sup>-1</sup> en **12** es característica de piridina, lo que verifica que dicha estructura se ha integrado en la estructura dendrimérica.

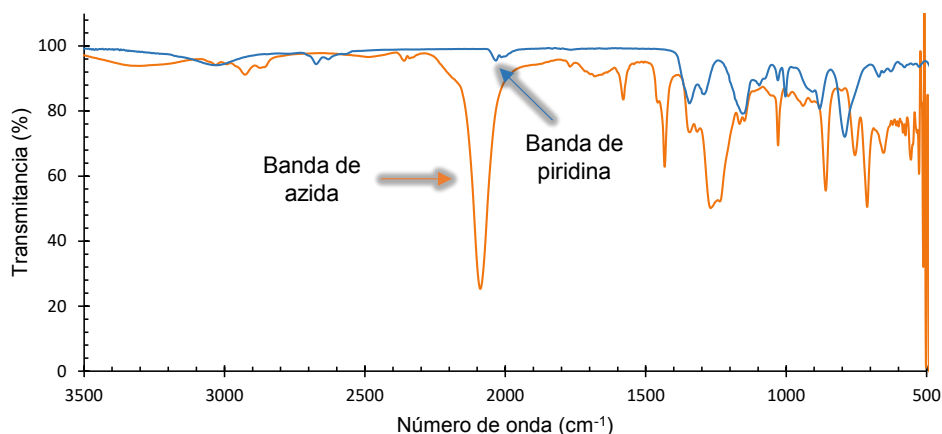


Figura 132. Espectro IR de **11** (naranja) y **12** (azul)

### VI.3.3. Síntesis de **DG2Pt**

La estructura dendrímica con Pt (II) se obtiene mediante la reacción de intercambio del ligando cloruro en la posición auxiliar del complejo de platino empleado (**13**). Esta reacción tiene lugar entre el dendrímico **12** y el compuesto de platino **13** suministrado por el grupo de investigación del Dr. Strassert de la Universidad de Münster.<sup>171</sup> La reacción de intercambio de ligandos se lleva a cabo en THF a reflujo durante una noche. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente y se procede a la desprotección de los grupos amino terminales en presencia de TFA dando como resultado un compuesto completamente soluble en medios acuosos. Tras purificación por cromatografía de exclusión por tamaño, se obtiene **DG2Pt** como un sólido amarillo con un 34% de rendimiento.

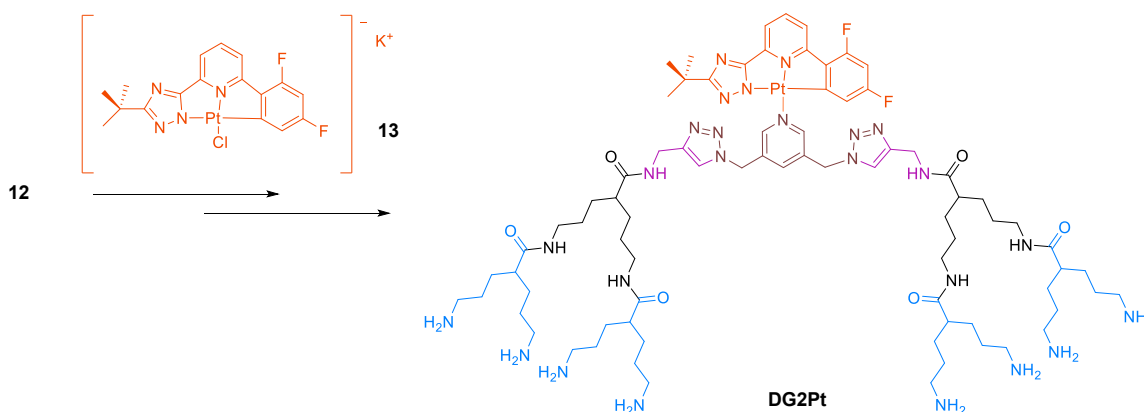


Figura 133. Síntesis de **DG2Pt**

Este dendrímico se ha caracterizado por resonancia magnética nuclear de protón, carbono, COSY y HSQC (Figura 345 - Figura 348 del ANEXO). Además, se ha confirmado su estructura mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), empleando DT/TFANa como matriz, donde se observa el pico asociado a  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  2656.1.

## VI.4. Caracterización de los dendrímeros luminiscentes amino terminales

Para complementar la caracterización de estas estructuras, además de las técnicas de resonancia magnética nuclear homo y heteronucleares y espectrometría de masas (MALDI), estos dendrímeros se han analizado por HPLC, DOSY y sus propiedades fotofísicas.

### VI.4.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Los dendrímeros amino terminales sintetizados se han analizado por HPLC obteniéndose los cromatogramas mostrados en la Figura 134. Para ello se ha empleado una columna de exclusión por tamaño (SEC) Ultrahydrogel™ 250 y agua como fase móvil. En los cromatogramas se observa un único pico en cada muestra, además, como era de esperar debido al tamaño de los dendrímeros, **DG2Pt** (Figura 134 b)) aparece a un tiempo de retención menor que **DG2Naft** (Figura 134 a)).

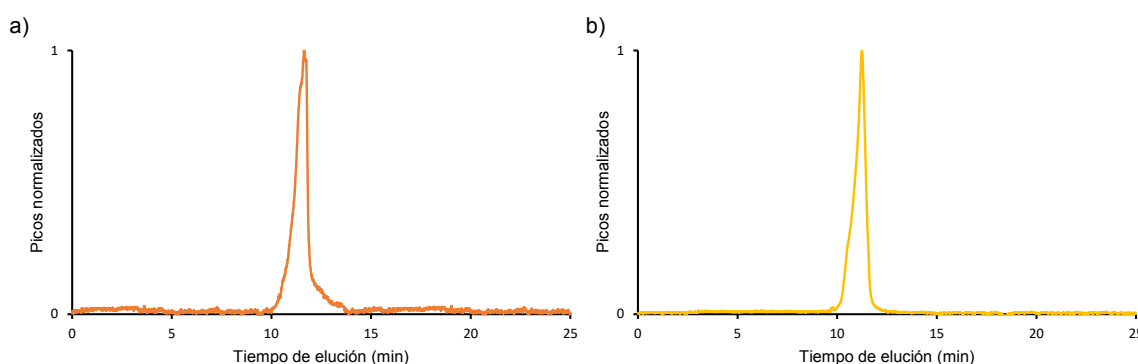


Figura 134. Cromatogramas de a) **DG2Naft** y b) **DG2Pt**

### VI.4.2. Experimentos DOSY

Se han realizado experimentos de difusión (DOSY) de estos compuestos, para ello, las muestras se han disuelto en D<sub>2</sub>O a una concentración de 1 mM.

Se han obtenido los coeficientes de difusión para estos compuestos que, en el caso de **DG2Naft** es  $1.925 \cdot 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s (Figura 135 a)) y en el de **DG2Pt**,  $1.845 \cdot 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s (Figura 135 b)).

Por la ecuación de Stokes-Einstein se puede estimar el tamaño de los dendrímeros en disolución mediante el cálculo del radio hidrodinámico ( $R_h$ ) a partir del coeficiente de difusión.<sup>126,127</sup>

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura expresada en Kelvin y  $\eta$  es la viscosidad de la solución (1.0963 cP para D<sub>2</sub>O).<sup>126</sup> Así, se ha calculado que el  $R_h$  para **DG2Naft** es de 10.41Å y para **DG2Pt** de 10.86Å.

Como en el caso de las estructuras dendriméricas analizadas en el apartado III.2.4. de este trabajo de tesis, la gráfica lineal de Stejskal-Tanner (Figura 135 c)) también muestra un decaimiento monoexponencial de la señal en el caso de estos dos dendrímeros, lo cual indica que las moléculas son monodispersas.<sup>127</sup>

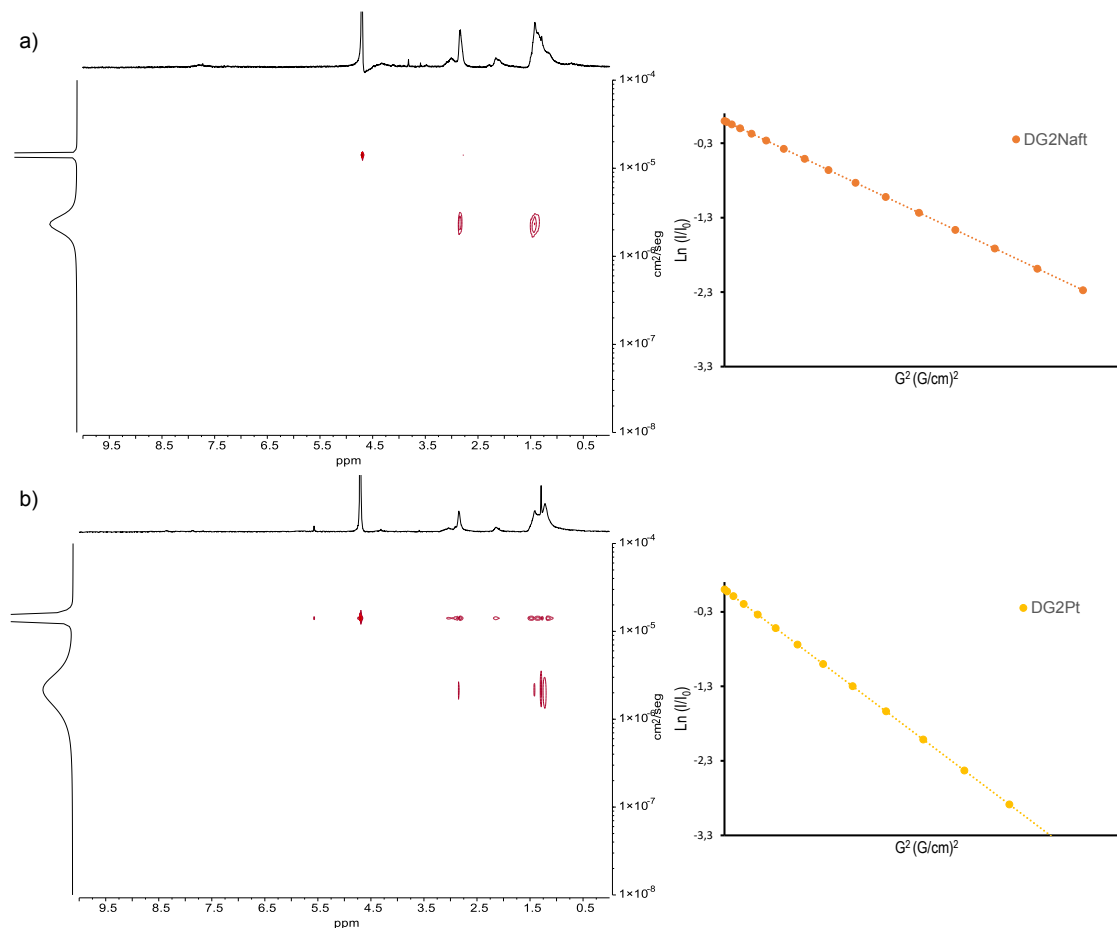


Figura 135. a) Espectro de RMN DOSY y gráfica de Stejskal-Tanner de **DG2Naft**; b) Espectro de RMN DOSY y gráfica de Stejskal-Tanner de **DG2Pt**

### VI.4.3. Caracterización fotofísica

Las propiedades fotofísicas de los derivados de naftalimida dependen considerablemente de los sustituyentes en el anillo aromático, en concreto, es especialmente importante el sustituyente en la posición C-4. La naturaleza de estos sustituyentes (electrón dador o aceptor) puede inducir una transferencia de carga polar (CT) a un estado excitado.<sup>172</sup> Se ha descrito cómo la introducción de

halógenos genera compuestos incoloros con fluorescencia azul<sup>173</sup> mientras que la sustitución con grupos amino en esa posición origina compuestos amarillos con fluorescencia verde.<sup>174</sup>

Tal y como se observa en la Figura 136 a), el espectro de absorción de **DG2Naft** en agua a una concentración de  $10^{-5}$  M presenta las siguientes bandas:  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon$ ,  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ): 258 (31361), 284 (27749) y 447 (20682). En la Figura 136 b) se muestra, en verde, una emisión de fluorescencia a 545 nm en solución acuosa de concentración  $10^{-5}$  M ( $\lambda_{\text{exc}} = 450$  nm) con un tiempo de vida del estado excitado de 6 ns y un rendimiento cuántico de 9.27%.

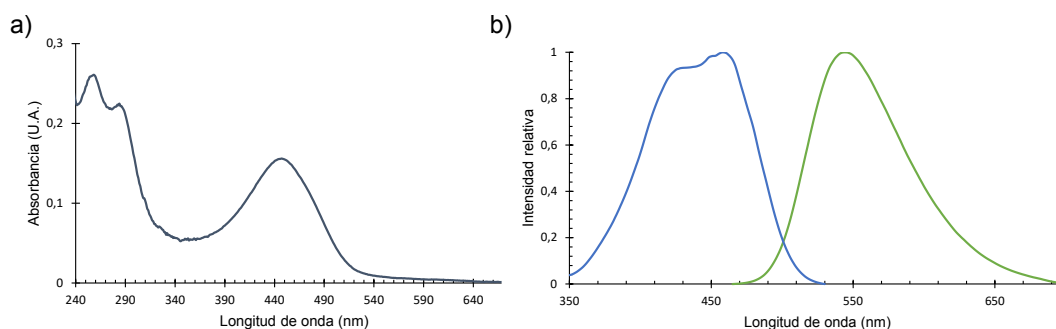


Figura 136. a) Espectro de absorción b) Espectros normalizados de excitación (azul) y emisión (verde). Ambos de **DG2Naft** ( $10^{-5}$  M) en agua

**DG2Naft** puede llegar a ser una excelente herramienta para bioaplicaciones donde se requiera luminiscencia. Esta molécula combina las excelentes propiedades de los dendrímeros amino terminales con un cromóforo ampliamente respaldado por sus excelentes propiedades físicas.<sup>175</sup>

Asimismo, se han estudiado las propiedades fotofísicas de **DG2Pt** en solución acuosa a una concentración de  $10^{-5}$  M. El espectro de absorción muestra las siguientes bandas:  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon$ ,  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ): 246 (40615) y 349 (40095). De acuerdo con los resultados observados en los experimentos DOSY, y al igual que ocurre con **DG2Naft**, no se aprecian señales que indiquen estados de agregación.

El complejo emite una luminiscencia verde,  $\lambda_{\max} = 503$  nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 350$  nm) con un rendimiento cuántico de 15.63%.

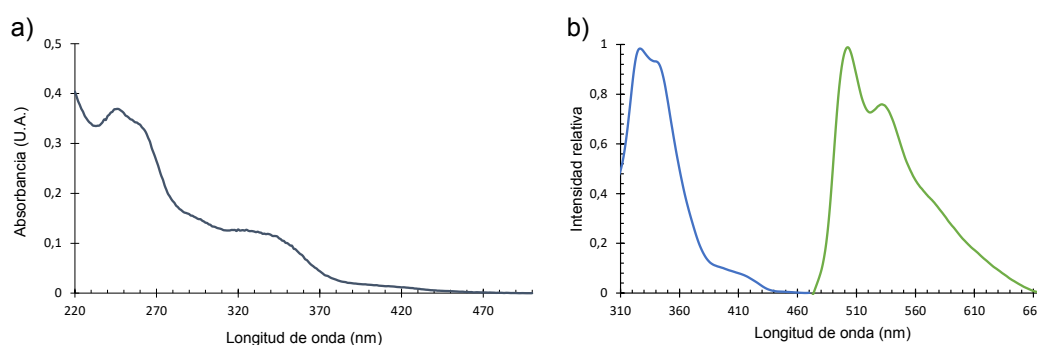
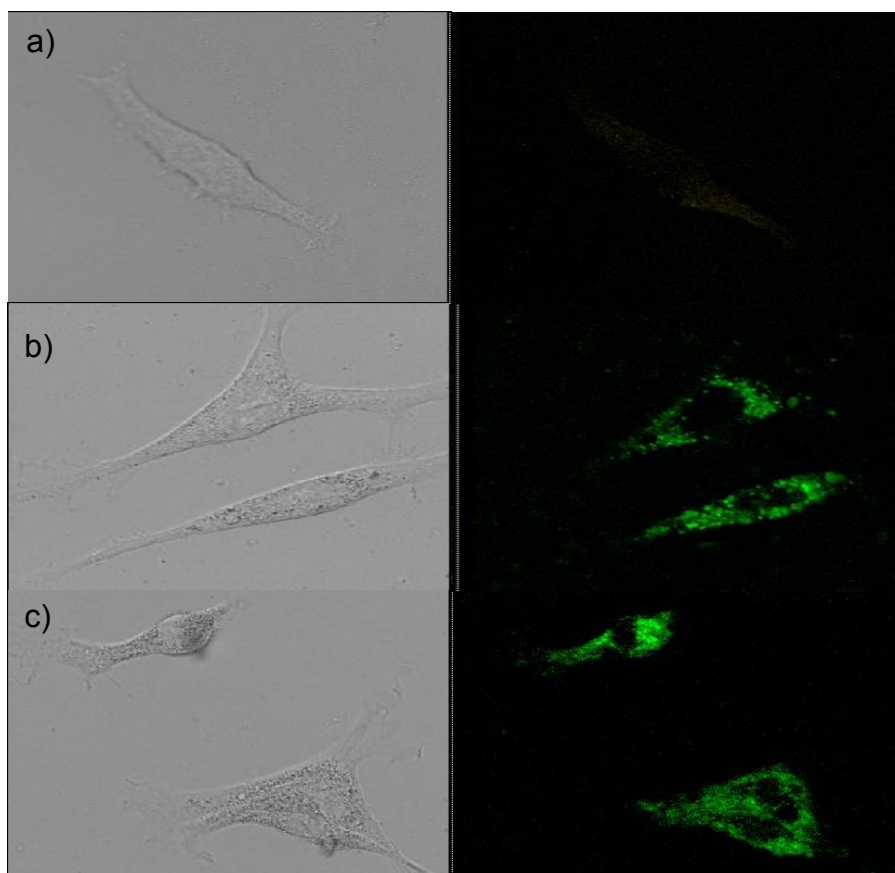


Figura 137. a) Espectro de absorción. b) Espectros normalizados de excitación (azul) y emisión (verde) de **DG2Pt** ( $10^{-5}$  M) en agua

#### VI.4.4. Aproximación al empleo como marcadores biológicos

Se han realizado estudios en colaboración con el grupo de investigación liderado por el Dr. Pérez-Pomares del Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga, para evaluar el uso de estos dendrímeros como marcadores luminiscentes en muestras biológicas. Para ello, se han empleado las condiciones descritas en el apartado VIII.2.4. Condiciones de la aproximación al empleo como marcadores celulares de esta tesis doctoral, obteniéndose las siguientes imágenes a partir del uso de un microscopio óptico multifotón.



*Figura 138. Imagen confocal de células de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) incubadas durante 5 h con a) PBS b) DG2Naft  $10^{-5}$  M en PBS y c) DG2Pt  $10^{-5}$  M en PBS*

Se puede observar en la Figura 138, que cuando las células se cultivan en presencia de determinadas disoluciones de dendrímeros, éstas se marcan de forma específica. Internalizándose las estructuras dendriméricas en las células de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) y pudiéndose localizar preferentemente en el citoplasma de las mismas.

Tras la obtención de estos resultados preliminares se puede plantear el uso de estas nuevas estructuras de dendrones caracterizadas por presentar un núcleo luminiscente, como una novedosa herramienta dirigida hacia estudios en bioimagen. En este sentido, sería interesante continuar con los trabajos preliminares que se han llevado a cabo hasta el momento y realizar nuevos ensayos de

toxicidad para estudiar los efectos que causan la presencia de estos dendrímeros en la viabilidad celular. De este modo, estos compuestos se encuentran actualmente en el grupo del prof. Strassert para continuar con estos estudios.



## **CAPÍTULO VII**

## **CONCLUSIONES**



1. El diseño de una metodología sintética apropiada ha permitido la preparación de una nueva familia de dendrímeros y dendrones amino terminales, basados en enlaces amida, que ha podido escalarse a cantidades multigramo. Estos han resultado ser solubles en agua y estables en las disoluciones acuosas. Se han alcanzado dendrímeros de generación 5 y dendrones de generación 3 con distintas funcionalidades en el punto focal.
2. Tanto los diferentes métodos empleados para analizar los compuestos (RMN, SEC, DOSY y AFM), como los valores de simulaciones de dinámica molecular (SDM) han permitido la caracterización completa de estos dendrímeros (**DG 1-5**).
3. Estas estructuras han resultado muy prometedoras para aplicaciones donde se requiere la combinación de estabilidad, multivalencia y conjugación eficiente. En este sentido:
  - 3.1. Se han preparado dendrímeros antigénicos para su evaluación en ensayos clínicos. Se han obtenido estructuras tipo DGnAXO y DGnBPO que están preparadas para su estudio en ensayos de reconocimiento de IgE específica de AX y BP.
  - 3.2. Se han preparado dendrímeros recubiertos en su periferia con el tetrapéptido RGD-Cys, que contiene la secuencia RGD con la orientación adecuada para reconocimiento molecular eficiente. Estas estructuras, sintetizadas con dendrímeros de generaciones 1 y 2, están preparadas para su estudio en procesos de regeneración tisular
  - 3.3. Se han preparado dendrímeros luminiscentes empleando como núcleos de los mismos una unidad de naftalimida y un complejo de Pt (II). En el primer caso, el dendrímero presenta la característica emisión de fluorescencia de la unidad de naftalimida. En la segunda estructura, las propiedades luminiscentes del dendrímero modificado con Pt (II) han resultado muy prometedoras en soluciones acuosas. En ambos casos, la estructura dendrímica les ha aportado a los núcleos luminiscentes no solo la solubilidad necesaria, sino que ha evitado los procesos de desactivación de la luminiscencia típicos en medios acuosos. Se ha demostrado, además, a través de una prueba de concepto, la capacidad de ambas moléculas para actuar como marcadores luminiscentes en células.



# **CAPÍTULO VIII**

## **PARTE EXPERIMENTAL**



### VIII.1 Reactivos, disolventes y técnicas analíticas

Todas las reacciones se han llevado a cabo usando reactivos y disolventes comerciales sin previa purificación. Los reactivos y disolventes empleados se han obtenido de diferentes casas comerciales como Sigma Aldrich, Alfa Aesar, Panreac o VWR. El agua ha sido purificada con un sistema de purificación Mili-Q de Millipore.

A menos que se indique lo contrario, las reacciones se han llevado a cabo en atmósfera de aire. Para aquellas reacciones que necesiten de condiciones anhidras se han empleado técnicas standard de atmósfera inerte libre de oxígeno con nitrógeno, empleando disolventes secos mediante un sistema de purificación MBRAUN (MB SPS-800) o, en su defecto, los correspondientes disolventes anhidros comerciales.

Las cromatografías en capa fina se han realizado en placas de aluminio cubiertas de Sílica Gel 60 F254 Merck de 0.25 mm de grosor. Los compuestos se han visualizado mediante luz UV (254 nm) o mediante el empleo de soluciones reveladoras como 0.04 % verde de bromocresol en etanol, 1.5 % ninhidrina en etanol o  $\text{KMnO}_4$ .

Para la purificación por cromatografía en columna se ha empleado gel de sílice 60 (tamaño de partícula 0.040-0.063 mm) de Merck. La purificación por cromatografía de exclusión de tamaño de los compuestos de masa molecular entre 700 y 1500 g/mol se ha realizado empleando como fase estacionaria Sephadex<sup>TM</sup> G-10 en una columna de 5 cm de diámetro o bien, para cantidades pequeñas con columnas pre-compactadas de Sephadex<sup>TM</sup> G-10 (GE Healthcare Life Science). Para aquellos compuestos hidrosolubles de masa molecular entre 1500 y 5000 g/mol se han empleado columnas de 2 y 4 cm de diámetro con fase estacionaria Sephadex<sup>TM</sup> G-15. En el caso de los compuestos de mayor masa molecular la fase estacionaria usada ha sido Sephadex<sup>TM</sup> G-25 empaquetada en columnas de 2 y de 4 cm de diámetro. En todos los casos se ha empleado como fase móvil agua Mili-Q por gravedad.

Los experimentos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C se han realizado en los disolventes deuterados indicados en cada caso a una temperatura de 25°C en un espectrómetro Bruker Ascend de 400 MHz. Los desplazamientos químicos de protón ( $\delta$ ) están referenciados respecto a los picos del disolvente empleado como patrón interno ( $\text{CDCl}_3$   $\delta$  7.26 ppm,  $\text{DMSO-}d_6$   $\delta$  2.50 ppm,  $\text{D}_2\text{O}$   $\delta$  4.79 ppm). Los datos de RMN-<sup>1</sup>H que se expresan son el desplazamiento químico (ppm), la multiplicidad, las constantes de acoplamiento (Hz) y las integrales. La multiplicidad se ha expresado mediante

abreviaturas (s: singlete, d: doblete, t: triplete, c: cuadruplete, q: quintuplete, dd: doble doblete, m: multiplete). Los desplazamientos químicos de carbono, expresados en ppm, están referenciados respecto al pico de resonancia del disolvente como patrón interno ( $\text{CDCl}_3$   $\delta$  77.16 ppm,  $\text{DMSO}-d_6$   $\delta$  39.52 ppm). Estos experimentos se han realizado en el Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (BIONAND).

Los compuestos sintetizados han sido examinados mediante técnicas de Resonancia Magnética Nuclear DOSY (difusión-ordered spectroscopy). Para ello, se han preparado las muestras en  $\text{D}_2\text{O}$  en una concentración entre 0.5 y 2 mM (dentro del rango de dilución infinita para muestras similares).<sup>127</sup> Los experimentos, realizados en BIONAND, se han llevado a cabo en un espectrómetro The Bruker Ascend™ 400 MHz equipado con una sonda BBFO<sup>PLUS</sup> de 5 mm con canal de “bloqueo” 2H y gradiente en Z. El espectrómetro también está equipado con un sistema de control de temperatura que permite trabajar entre 0 °C y 50 °C, realizándose estos experimentos a 27 °C. La fuerza del gradiente ha sido calibrada mediante la medida de la velocidad de difusión de los protones residuales de agua en agua deuterada. Para determinar la velocidad de difusión se ha utilizado una secuencia 2D doble Eco de espín estimulado con compensación por convección y LED utilizando pulsos bipolares para la difusión.

Los coeficientes de difusión ( $D$ ) se han determinado con la pendiente de la gráfica de Stejskal-Tanner, la cual relaciona la intensidad de la señal mediante la ecuación:

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\gamma^2 \delta^2 G^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D$$

Donde  $I$  es la integral del área del pico a un valor dado de  $G$ ,  $I_0$  es la integral del área del pico a  $G = 0$ ,  $G$  es la fuerza del gradiente,  $\gamma$  el radio giromagnético o constante giromagnética,  $\delta$  la duración del gradiente,  $\Delta$  el tiempo de difusión y  $D$  el coeficiente de difusión.<sup>126</sup> Los coeficientes de difusión determinados se han usado para calcular el radio hidrodinámico mediante la ecuación de Stokes-Einstein:

$$R_h = K_B T / 6\pi\eta D$$

Donde  $K_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura y  $\eta$  es la viscosidad dinámica del disolvente (1.0963 cP para el agua).<sup>127</sup>

Los espectros de masa (MS) de tiempo de vuelo con ionización por electrospray (ESI-TOF) se han realizado en un Espectrómetro de Masas de Alta Resolución Orbitrap, Q-Exactive™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), ya sea en modo de iones positivo o negativo. Estos experimentos se han llevado a cabo en los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Málaga.

Para la caracterización fotofísica de los compuestos luminiscentes se ha preparado una disolución en agua MilliQ de los mismos a una concentración  $10^{-5}$  M. Estos espectros se han realizado en los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Málaga.

Los espectros de MALDI se han realizado en un espectrómetro de masas Bruker MicroFlex MALDI-TOF MS. Los espectros obtenidos se han analizado con la versión FlexAnalysis Bruker Daltonics. El rango del detector de masa es de 100 a 5000 Da, dependiendo del tamaño de la estructura dendrítica analizada. Como matriz se ha usado una solución de 10 mg/mL de ditranol (DT), ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinámico (CHCA) o ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB). Este análisis se ha llevado a cabo en el Servicio de Espectrometría de Masas del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA).

Los espectros de infrarrojo (IR) se han obtenido usando un espectrofotómetro Jasco FT/IR-4100 a temperatura ambiente en BIONAND.

Las reacciones de hidrogenación se han realizado bajo una atmósfera de hidrógeno de 50 bar con un Mini-Reactor de Erie-Autoclave Engineers en BIONAND.

Los experimentos de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) de los dendrímeros amino terminales se han obtenido usando un sistema de HPLC Jasco equipado con dos detectores, uno de índice de refracción (IR) y otro detector ultravioleta (UV), y una columna de exclusión por tamaño (SEC) Ultrahydrogel™ 250. Las medidas se han realizado a temperatura ambiente usando H<sub>2</sub>O grado milli-Q como fase móvil y las muestras se han preparado a una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  con un flujo de  $0.7 \text{ mL min}^{-1}$ . Los cromatogramas de los correspondientes dendrímeros amino protegidos con Boc se han obtenido en el mismo equipo con una columna de exclusión por tamaño (SEC) Styragel® HR 4E a temperatura ambiente, empleando DMF/LiCl 10 mM como fase móvil manteniendo la misma concentración de las muestras y el mismo flujo.

Se han obtenido imágenes de los dendrímeros mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) en un equipo AFM Dimension 3100 (Veeco Instruments) operado en modo *tapping* en el aire. Se han empleado puntas AFM de silicio (Budget Sensors) con una constante de resorte  $k = 40 \text{ N/m}$  y una frecuencia de resonancia  $\nu = 300 \text{ kHz}$ . Se han analizado al menos 4 áreas en dos muestras independientes. Las imágenes AFM se han procesado con el Software WSxM.<sup>176</sup>

La deposición de los dendrímeros y el análisis de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) se ha realizado en el Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC) en Barcelona, por el grupo del Dr. J. Samitier. Para ello, los discos monocristalinos de Au (111) atómicamente planos de 10 mm de diámetro y 1 mm de espesor (MaTeck) se han calentado a la llama antes de ser usados y se han incubado con 150  $\mu\text{L}$  de una solución acuosa del dendrímero a  $1.5 \cdot 10^{-7}$ ,  $1.1 \cdot 10^{-7}$  y  $7.2 \cdot 10^{-8}$  p/p de **DG3**, **DG4** y **DG5** respectivamente.<sup>96,97</sup> Todas las soluciones se han preparado en agua pura (18 M $\Omega$

$\text{cm}^{-1} < 4$  ppb TOC Milli-Q, Millipore) y sonicadas durante 10 minutos antes de su uso. Las soluciones de los dendrímeros se han usado dentro de los 6 meses desde su preparación.

La Simulación de Dinámica Molecular se ha llevado a cabo en colaboración con el Dr. F. Nájera del Dpto. de Química Orgánica de la Universidad de Málaga, se ha realizado en agua como disolvente explícito usando el software AMBER12 MD.<sup>131</sup> Se han usado los parámetros de campo de fuerza AMBER (parm99) y los parámetros de campo de fuerza general del átomo (GAFF) para incluir parámetros cuando sea necesario.<sup>128</sup> Las conformaciones iniciales de los dendrímeros se han realizado utilizando la herramienta de construcción Dendrimer Building Tool (DBT).<sup>133</sup> Los sistemas se han minimizado y después se han calentado a 300 K alrededor de 40 ps. Las interacciones no enlazadas se han cortado a 9 Å. Se han llevado a cabo pasos de 2 fs de duración empleando la rutina SHAKE.<sup>136</sup> Las simulaciones se han realizado a pH fisiológico (7.4) en conjunto isotérmico-isobárico NPT (300 K y 1 atm). Se han equilibrado los dendrímeros durante 2 ns y a partir de estas configuraciones se han realizado corridas de producción de trayectorias de 20 ns. Los análisis de trayectoria se han realizado utilizando los módulos Amber *ptraj* y *cpptraj*. Las imágenes de las trayectorias se han obtenido con el software VMD.<sup>139</sup>

La caracterización fotofísica se ha realizado en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.

## VIII.2. Procedimientos generales

### VIII.2.1. Desprotección de grupos amino terminales

Se disuelve **Gx-NHBoc** (1 eq.) o **gx-NHBoc** (1 eq.) en THF (10 mL) y se enfría en baño de hielo-agua donde se adiciona, gota a gota, HCl 4M en dioxano (10 mL). La mezcla se deja en agitación hasta que la reacción se haya completado. Después de este tiempo, se evapora el disolvente dando lugar al producto de manera cuantitativa. En caso necesario, los compuestos se han purificado por cromatografía de exclusión por tamaño.

### VIII.2.2. Reacciones de crecimiento de las estructuras dendríticas

El dendrímero amino terminal **Gx** (1 eq.) como sal de amonio, se disuelve en la mínima cantidad posible de MeOH y se le añade la resina de intercambio iónico Amberlyst A-26 (OH) (500 mg/mmol de grupo amino). La mezcla se deja en el agitador durante una hora, tras la cual se elimina la resina mediante filtrado a vacío y el disolvente se evapora a presión reducida. La estructura dendrítica se disuelve en DMF anhidra bajo atmósfera de nitrógeno y se adicionan el compuesto **5** (1.1 eq. por grupo amino) y *N*-metilmorfolina (1.5 eq. por grupo amino). La mezcla de reacción se deja agitando

a temperatura ambiente hasta la completa reacción de todos los grupos amino terminales, para favorecer esto, en el caso de generaciones grandes se refresca la mezcla de reacción con la misma cantidad de **5** y de base, es por esto que el tiempo de reacción depende de la generación de la estructura dendrítica. Una vez terminada la reacción, se evapora el disolvente, el crudo se disuelve en DCM (60 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (2 x 30 mL) y NaHCO<sub>3</sub> ac. 1M (2 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evapora a sequedad. En caso necesario se purifica el producto por precipitación en hexano.

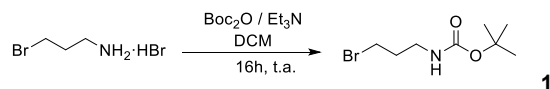
### VIII.2.3. Reacciones con amoxicilina y bencilpenicilina

El dendrímero amino terminal **DGn** (1eq.) se trata con la resina de intercambio iónico Amberlyst A-26 (OH) bajo las mismas condiciones anteriores. Tras este proceso, la estructura dendrítica se disuelve en tampón carbonato acuoso 0.02M, pH 10.4, se enfría a 4°C (excepto **DG1-2** en el caso de BPO que se mantiene a temperatura ambiente) y se adiciona amoxicilina sódica (2 eq. por grupo amino) o bencilpenicilina sódica (2 eq. por grupo amino) en exceso. La mezcla de reacción se mantiene a dicha temperatura durante el tiempo indicado en cada caso, que al igual que en el procedimiento anterior, es mayor para las generaciones más grandes. Cada 24 horas se adiciona un exceso de 0.2 eq. de reactivo β-lactámico por grupo amino terminal del dendrímero. Completada la reacción, el producto se purifica mediante columna de exclusión por tamaño con Sephadex como fase estacionaria.

### VIII.2.4. Condiciones de la aproximación al empleo como marcadores celulares

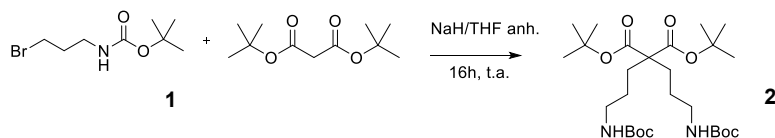
Para este estudio llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. J. M. Pérez del Dpto. de Biología Animal de la Universidad de Málaga, se ha seleccionado una línea celular sana que consiste en células de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Las células MEF se han aislado de embriones de ratón siguiendo protocolos estándar y se han cultivado en un medio a 37°C humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub>. Para los experimentos de microscopía, las células MEF se han cultivado en platos con fondo de vidrio adecuados para la microscopía óptica. Los compuestos **DG2Naft** y **DG2Pt** se han adicionado a las células completamente disueltos. Las propiedades de fluorescencia de **DG2Naft** y **DG2Pt** dentro de las células MEF vivas se han analizado mediante microscopía de 2 fotones. Después de incubar las células MEF con estos compuestos, se han visualizado tras la excitación 2P en 350 nm y 450 nm respectivamente, y se ha detectado fluorescencia en ambos casos entre 503 nm y 545 nm mediante un detector HyD

## VIII.3. Síntesis de nuevas estructuras dendríméricas amino terminales

Síntesis de *tert*-butil (3-bromopropil)carbamato (**1**)

Este compuesto se ha sido sintetizado empleando protocolos previamente descritos.<sup>119</sup> El hidrobromuro de 3-bromopropilamina (16.20 g, 74.00 mmol, 1.2 eq.) se disuelve en DCM (60 mL). A esta mezcla se adiciona di-*tert*-butil dicarbonato (13.57 g, 61.70 mmol, 1 eq.) disuelto en DCM (40 mL) y trietilamina (9.40 mL, 67.90 mmol, 1.1 eq.) y se deja agitar a temperatura ambiente durante 16h. La fase orgánica se lava con NaHCO<sub>3</sub> 1M (2 x 50 mL) y Brine (50 mL), se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida dando lugar al compuesto deseado como un aceite incoloro (13.75 g, 94%). Se realiza un seguimiento de la reacción mediante cromatografía en capa fina (AcOEt:Hexano; 1:9). **Rf**: 0.8

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 4.65 (s, 1H), 3.44 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.30 – 3.20 (m, 2H), 2.10 – 1.99 (m, 2H), 1.44 (s, 9H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 156.1, 79.6, 39.1, 32.8, 30.9, 28.5. **ESI-TOF** calculado para C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>BrNO<sub>2</sub>H<sup>+</sup>, 239.1328, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 239.0391.

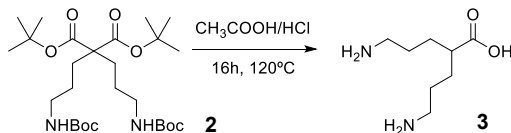
Síntesis de di-*tert*-butil 2,2-bis(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propil)malonato (**2**)

Este compuesto se ha sintetizado empleando protocolos previamente descritos.<sup>120</sup> Para ello, se disuelve NaH (60% en aceite mineral (3.09 g, 77.23 mmol, 3 eq.)) en THF anhidro (20 mL) en atmósfera de nitrógeno. A esta disolución se le añade di-*tert*-butil malonato (5.77 mL, 25.74 mmol, 1 eq.) y se deja agitar durante unos 15 minutos. Al cabo de este tiempo se adiciona gota a gota **1** (15.25 g, 64.35 mmol, 2.5 eq.) disuelto en THF anhidro (20 mL) en atmósfera inerte. La mezcla de reacción se deja agitando 16h a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, el disolvente se elimina a presión reducida, el residuo se disuelve en H<sub>2</sub>O (50 mL) y se extrae con AcOEt (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna (AcOEt:hexano; 2:8) dando lugar al producto deseado como un sólido incoloro (12.58 g, 23.73 mmol, 92%). Se comprueba que la reacción ha finalizado por cromatografía en capa fina (AcOEt:hexano; 2:8). **Rf**: 0.4

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 4.58 (s, 2H), 3.18 – 3.05 (m, 4H), 1.86 – 1.71 (m, 4H), 1.44 (s, 18H), 1.43 (s, 18H), 1.40 – 1.30 (m, 4H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 170.8, 156.0, 81.5,

79.2, 57.9, 40.8, 29.5, 28.5, 28.0, 24.6. **ESI-TOF** calculado para  $C_{27}H_{50}N_2O_8Na^+$ , 553.3465,  $[M + Na]^+$  experimental, 553.3462.

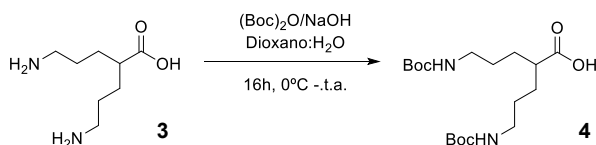
### Síntesis de ácido 5-amino-2-(3-aminopropil)pentanoico (3)



Este compuesto se ha sintetizado empleando protocolos previamente descritos.<sup>120</sup> El compuesto **2** (12.58 g, 23.73 mmol) se disuelve en AcOH (20 mL) y HCl 3 N (20 mL). La mezcla se calienta a reflujo durante 16h, tras lo cual se deja enfriar a temperatura ambiente, se elimina el disolvente en rotavapor y se liofiliza para eliminar las trazas de agua dando lugar a un sólido viscoso incoloro (5.86 g, 23.73 mmol) de manera cuantitativa.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  ppm: 8.12 (s, 4H), 2.81 – 2.65 (m, 4H), 2.27 (s, 1H), 1.67 – 1.34 (m, 8H). **RMN-<sup>13</sup>C** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  ppm: 176.2, 43.8, 38.3, 28.4, 24.7. **ESI-TOF** calculado para  $C_8H_{18}N_2O_2H^+$ , 175.1446,  $[M + H]^+$  experimental, 175.1440.

### Síntesis de ácido 5-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propil)pentanoico (4)



Se disuelven **3** (5.86 g, 23.70 mmol, 1 eq.) y NaOH (2.84 g, 71.10 mmol, 3 eq.) en una mezcla de dioxano:agua (2:1, 30 mL). La mezcla se enfría en baño de hielo-agua, donde se adiciona, gota a gota, di-*tert*-butil dicarbonato (11.07 g, 52.14 mmol, 2.2 eq.) disuelto en dioxano:agua (2:1, 15 mL). Una vez adicionado todo, la mezcla de reacción se lleva a temperatura ambiente y se deja agitando durante 16h. Se elimina el disolvente a presión reducida, el crudo se disuelve en H<sub>2</sub>O (50 mL) y se lava con AcOEt (2 x 30 mL). La fase acuosa se acidifica con HCl 1M hasta pH 1-2 y se extrae con AcOEt (3 x 40 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida dando lugar al compuesto **4** como un aceite incoloro (8.34 g, 22.31 mmol, 94%).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 4.75 (s, 2H), 3.16 – 2.95 (m, 4H), 2.33 (s, 1H), 1.73 – 1.55 (m, 2H), 1.52 – 1.30 (m, 24H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 180.4, 156.2, 79.3, 44.8, 40.4, 29.4, 28.5, 27.9. **ESI-TOF** calculado para  $C_{18}H_{34}N_2O_6Na^+$ , 397.2315,  $[M + Na]^+$  experimental, 397.2309.

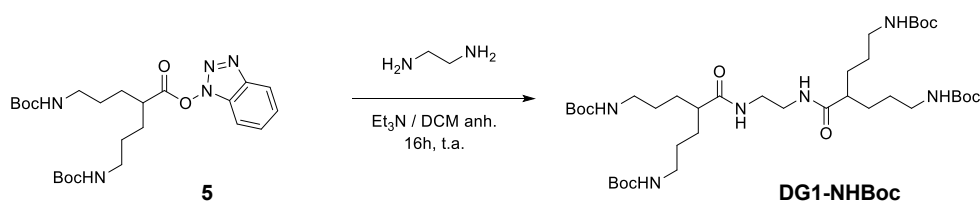
### Síntesis de 5-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-(3-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)pentanoato de 1H-benzo[1,2,3]triazol-1-ilo (5)



Se disuelve **4** (8.34 g, 22.31 mmol, 1 eq.) en DCM anhidro (50 mL) bajo atmósfera de nitrógeno y se enfría en baño de hielo. A la disolución previa se adiciona EDCI (4.70 g, 24.53 mmol, 1.1 eq.) disuelta en DCM anhidro (30 mL) gota a gota durante un periodo de 10 minutos. Después de este tiempo se añaden HOBt (9.03 g, 69.90 mmol, 3 eq.) y DMAP (218 mg, 1.78 mmol, 0.08 eq.) previamente disueltos en DCM anhidro (50 mL). La reacción se lleva a temperatura ambiente y se deja agitando durante 16h. Al cabo de este tiempo, se diluye con DCM (50 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (50 mL), HCl 0.5M (2 x 50 mL) y una disolución de NaHCO<sub>3</sub> saturada (2 x 50 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> y se concentra a presión reducida. El compuesto **5** se obtiene como un sólido viscoso incoloro (9.86 g, 20.08 mmol, 90%). La reacción se sigue mediante cromatografía en capa fina (EtOAc:n-hexano; 8:2). **Rf**: 0.6

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 8.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.80 – 7.50 (m, 1H), 7.46 – 7.38 (m, 2H), 4.70 (s, 2H), 3.25 – 3.20 (m, 4H), 2.97 (s, 1H), 1.92 – 1.82 (m, 2H), 1.83 – 1.75 (m, 2H), 1.75 – 1.65 (m, 4H), 1.44 (s, 18H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 172.2, 156.2, 143.6, 129.0, 128.7, 125.0, 120.7, 108.4, 79.5, 42.7, 40.1, 29.4, 28.6, 28.1. **ESI-TOF** calculado para C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>, 514.2642, [M + Na]<sup>+</sup> experimental, 514.2627.

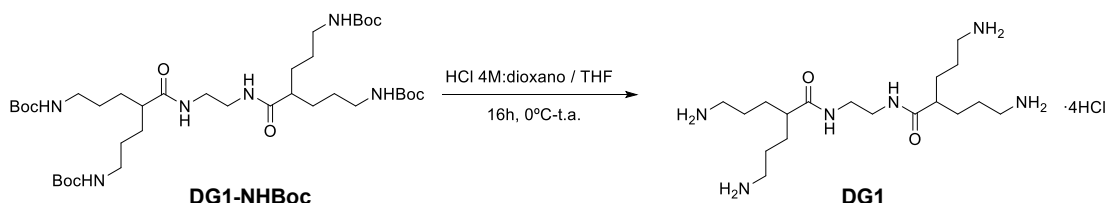
### Síntesis de DG1-NHBoc



El compuesto **5** (4.71 g, 9.60 mmol, 2.2 eq.), etilendiamina (290 μL, 4.36 mmol, 1 eq.) y trietilamina (1.82 mL, 13.08 mmol, 3 eq.) se disuelven en DCM anhidro bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se mantiene 16h agitando a temperatura ambiente y luego se lava con H<sub>2</sub>O (50 mL), HCl 0.5M (2 x 30 mL) y con NaHCO<sub>3</sub> saturado (2 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> y se concentra a presión reducida dando lugar a **DG1-NHBoc** como un sólido incoloro (3.03 g, 3.92 mmol, 90%) sin necesidad de purificación. Se comprueba que la reacción ha finalizado por cromatografía en capa fina (EtOAc:n-hexano; 7:3). **Rf**: 0.5

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 7.86 (s, 2H), 6.77 – 6.71 (m, 4H), 3.10 – 3.03 (m, 4H), 2.89 – 2.80 (m, 8H), 2.03 (s, 2H), 1.40 – 1.33 (m, 40 H), 1.30 – 1.20 (m, 12 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 174.8, 155.6, 77.3, 45.3, 39.8, 38.3, 29.8, 28.3, 27.6. **MALDI-TOF** calculado para C<sub>38</sub>H<sub>72</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>Na<sup>+</sup>, 795.5, [M + Na]<sup>+</sup> experimental, 795.9.

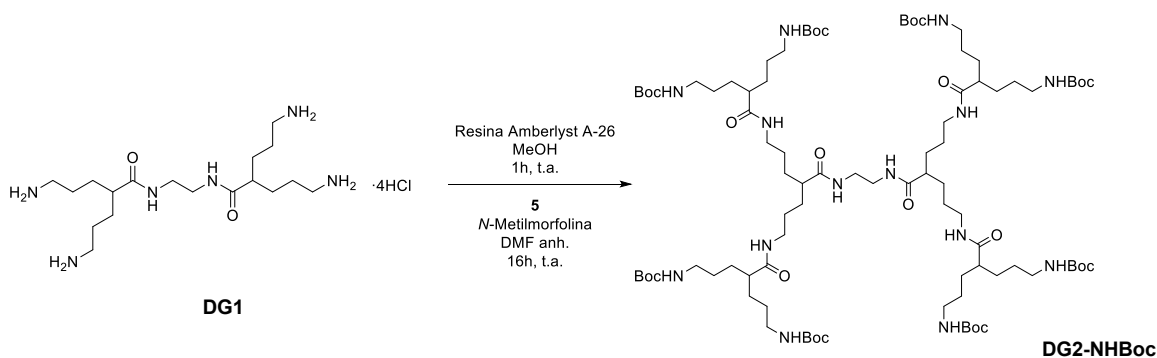
### Síntesis de DG1



La desprotección de **DG1-NHBoc** (2.05g, 2.65 mmol) con HCl 4M: dioxano, da lugar a **DG1** (1.35g, cuantitativamente) como un sólido viscoso de color amarillo pálido.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.46 (s, 2H), 8.10 (s, 8H), 3.13 (s, 4 H), 2.82 – 2.69 (m, 8 H), 2.38 (s, 2H), 1.56 – 1.46 (m, 12H), 1.35 – 1.30 (m, 4 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 174.4, 43.9, 38.5, 35.4, 29.3, 24.8. **MALDI-TOF** calculado para C<sub>18</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>, 395.3, [M + Na]<sup>+</sup> experimental, 395.4.

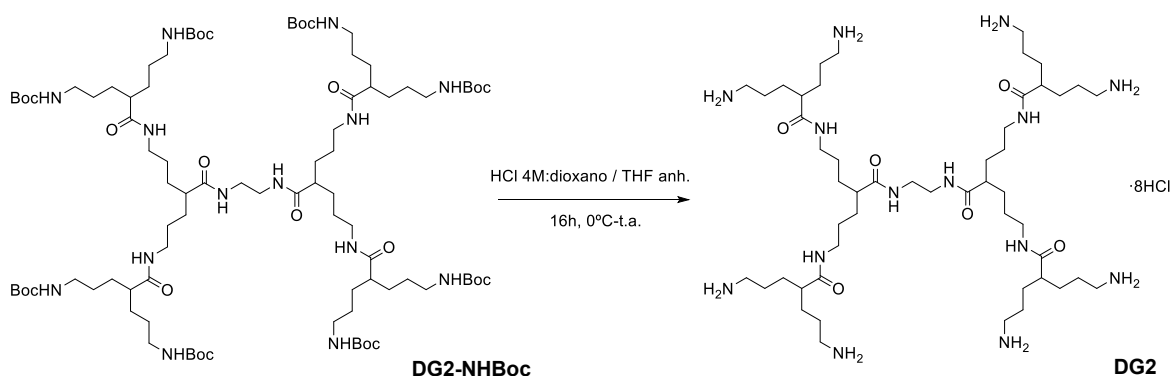
### Síntesis de DG2-NHBoc



**DG1** (1.80 g, 3.47 mmol) es tratado con la resina Amberlist A-26 (7g) en MeOH (10 mL) durante una hora. El compuesto obtenido, **5** (7.46 g, 15.20 mmol, 4.4 eq) y *N*-metilmorfolina (2.28 mL, 20.70 mmol, 6 eq) se disuelven en DMF anhidra (60 mL) bajo atmósfera de nitrógeno y se deja agitando durante 16h a temperatura ambiente. Se elimina completamente el disolvente, el crudo se disuelve en DCM (100 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (50 mL), HCl 0.5M (2 x 50 mL) y una disolución de NaHCO<sub>3</sub> saturada (2 x 50 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> y se concentra a presión reducida para obtener **DG2-NHBoc** (5.62 g, 3.12 mmol, 90 %) como un sólido incoloro. La reacción se monitoriza por cromatografía en capa fina (AcOEt:hexano; 7:3). **Rf**: 0.4

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 7.97 – 7.89 (m, 2 H), 7.83 – 7.75 (m, 4 H), 6.82 – 6.70 (m, 8 H), 3.13 – 3.05 (m, 4 H), 3.05 – 2.93 (m, 8 H), 2.91 – 2.80 (m, 16 H), 2.13 – 2.00 (m, 6 H), 1.42 – 1.17 (m, 120 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 174.9, 174.5, 155.6, 77.3, 45.1, 39.5 (con la señal de DMSO-*d*<sub>6</sub>), 38.5, 38.3, 30.0, 29.8, 28.3, 27.6, 27.2. **MALDI-TOF** calculado para C<sub>90</sub>H<sub>168</sub>N<sub>14</sub>O<sub>22</sub>Na<sup>+</sup>, 1821.4, [M + Na]<sup>+</sup> experimental, 1821.6.

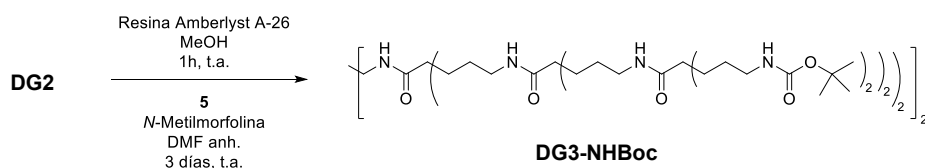
### Síntesis de DG2



La desprotección de los grupos aminos de **DG2-NHBoc** (5.39 g, 3.00 mmol) con HCl 4M:dioxano da lugar a **DG2** (3.85 g, cuantitativamente) como un sólido viscoso de color amarillo pálido.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.53 – 7.96 (m, 22 H), 3.11 – 2.90 (m, 12 H), 2.84 – 2.65 (m, 16 H), 2.32 – 2.15 (m, 6 H), 1.56 – 1.22 (m, 48 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 175.4, 174.0, 45.2, 44.1, 39.5 (con la señal de DMSO-*d*<sub>6</sub>), 38.6, 38.4, 30.1, 29.3, 27.3, 24.8. **MALDI-TOF** calculado para C<sub>50</sub>H<sub>104</sub>N<sub>14</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>, 1020.5, [M + Na]<sup>+</sup> experimental, 1020.5.

### Síntesis de DG3-NHBoc

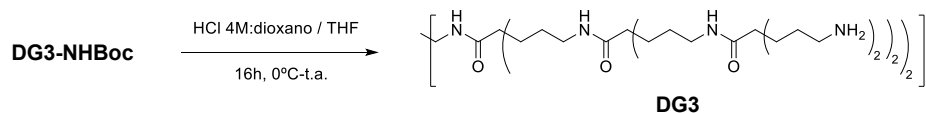


Se trata a **DG2** (1.73 g, 1.34 mmol) en MeOH (10 mL) con la resina Amberlyst A-26 (5.4 g) durante una hora. El compuesto obtenido, **5** (5.79 g, 11.80 mmol, 8.8 eq) y *N*-metilmorfolina (1.76 mL, 16.08 mmol, 12 eq) se disuelven en DMF anhidra (60 mL) y se deja agitando durante 3 días a temperatura ambiente bajo atmosfera de nitrógeno para obtener **DG3-NHBoc** (4.68 g, 1.22 mmol, 91 %) como un sólido incoloro tras precipitación en hexano.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.12 – 7.85 (m, 2 H), 7.86-7.67 (m, 12 H), 6.87 – 6.58 (m, 16 H), 3.13 – 2.93 (m, 28 H), 2.94 – 2.77 (m, 32 H), 2.16 – 1.98 (m, 14 H), 1.48 – 1.17 (m, 246 H).

**RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 174.9, 174.5, 155.6, 77.3, 45.1, 39.5 (con la señal de DMSO-*d*<sub>6</sub>), 38.3, 30.0, 29.8, 28.3, 27.6, 27.3. **MALDI-TOF** calculado para C<sub>194</sub>H<sub>360</sub>N<sub>30</sub>O<sub>46</sub>Na<sup>+</sup>, 3872.2, [M + Na]<sup>+</sup> experimental, 3873.7.

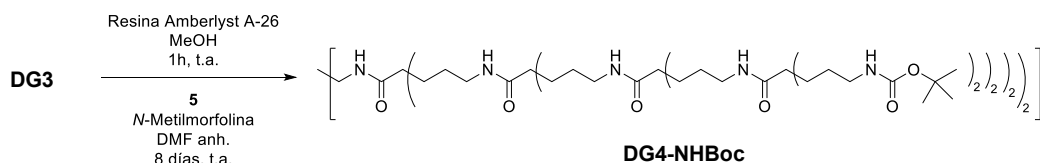
### Síntesis de DG3



La desprotección de **G3-NHBoc** (4.68 g, 1.22 mmol) con HCl 4M:dioxano da lugar a **DG3** (3.43 g, cuantitativamente) como un sólido viscoso de color amarillo pálido.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.40 – 8.05 (m, 46 H), 3.18 – 2.89 (m, 28 H), 2.84 – 2.67 (m, 32 H), 2.35 – 2.12 (m, 14 H), 1.57 – 1.20 (m, 112 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 175.3, 175.2, 174.1, 45.1, 44.1, 39.5 (con la señal de DMSO-*d*<sub>6</sub>), 38.6, 38.4, 30.2, 30.0, 29.3, 27.3, 27.1, 24.8.

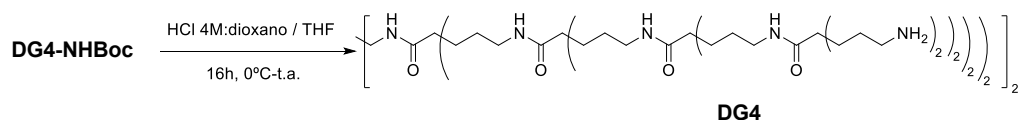
### Síntesis de DG4-NHBoc



Se trata **DG3** (831 mg, 0.30 mmol) en MeOH (10 mL) con la resina Amberlyst A-26 (2.40 g) durante una hora en agitación. El compuesto obtenido, **5** (2.45 g, 5 mmol, 17.6 eq) y *N*-metilmorfolina (740 μL, 6.72 mmol, 24 eq) se disuelven en DMF anhidra (60 mL) bajo atmósfera de nitrógeno, y la mezcla de reacción se deja agitando a temperatura ambiente durante ocho días. Después de cuatro días, la reacción se refresca con la misma cantidad de **5** y *N*-metilmorfolina para asegurar la reacción de todos los grupos amino terminales. A los ocho días se elimina la DMF y tras precipitación en hexano se obtiene **DG4-NHBoc** (2.00 g, 0.25 mmol, 90 %) como un sólido incoloro.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.20 – 7.80 (m, 30H), 6.90 – 6.30 (m, 32H), 3.20 – 2.70 (m, 124H), 2.20 – 2.00 (m, 30H), 1.40 – 1.20 (m, 318 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 174.5, 155.6, 77.3, 45.1, 39.5 (con la señal de DMSO-*d*<sub>6</sub>), 38.3, 29.9, 28.2, 27.6, 27.3.

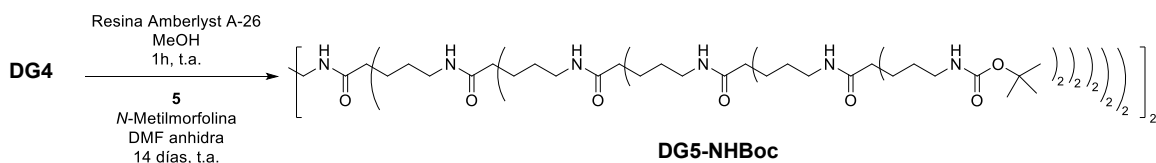
### Síntesis de DG4



La desprotección de los grupos amino de **G4-NHBoc** (2.00 g, 0.25 mmol) siguiendo el procedimiento general da lugar a **DG4** (1.45 g, cuantitativamente) como un sólido viscoso de color amarillo pálido.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.49 – 7.28 (m, 94 H), 3.17 – 2.90 (m, 60 H), 2.82 – 2.69 (m, 64 H), 2.34 – 2.16 (m, 30 H), 1.60 – 1.21 (m, 240 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 176.5, 175.2, 174.1, 45.0, 44.1, 39.5 (con la señal de DMSO-*d*<sub>6</sub>), 38.5, 30.2, 29.3, 27.3, 24.8.

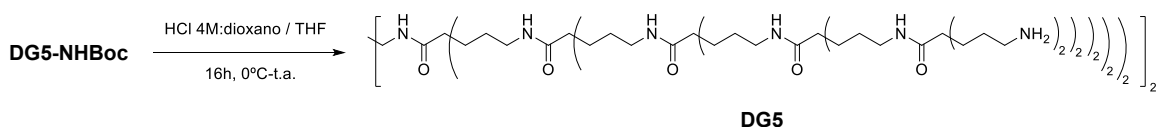
### Síntesis de DG5-NHBoc



Tras el tratamiento de **DG4** (600 mg, 0.10 mmol) con la resina de intercambio iónico Amberlyst A-26 (1.60 g) en MeOH (10mL) durante una hora, el producto obtenido se disuelve en DMF anhidra (60mL), donde se adicionan **5** (1.73 g, 3.52 mmol, 35.2 eq) y *N*-metilmorfolina (529 μL, 4.80 mmol, 48 eq) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se deja agitando a temperatura ambiente durante catorce días. A los cuatro y ocho días se refresca la reacción con la misma cantidad de **5** y *N*-metilmorfolina. **G5-NHBoc** (1.44 g, 0.09 mmol, 90 %) se obtiene como un sólido incoloro tras precipitación en hexano.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.05 – 7.67 (m, 62 H), 6.81 – 6.68 (m, 64 H), 3.11 – 2.93 (m, 124 H), 2.90 – 2.81 (m, 128 H), 2.15 – 2.01 (m, 62 H), 1.39 – 1.16 (m, 1072 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 174.6, 155.6, 77.3, 45.2, 39.5 (con la señal de DMSO-*d*<sub>6</sub>), 38.3, 29.9, 28.3, 27.7.

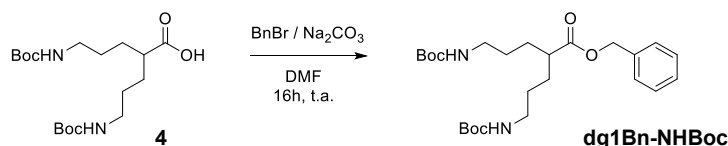
### Síntesis de DG5



La desprotección de los grupos amino de **DG5-NHBoc** (1.77 g, 0.11 mmol) da lugar a **DG5** (1.30 g, cuantitativamente) como un sólido viscoso de color amarillo pálido.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.42 – 8.02 (m, 190 H), 3.17 – 2.86 (m, 124 H), 2.86 – 2.66 (m, 128 H), 2.36 – 2.13 (m, 62 H), 1.64 – 1.10 (m, 496 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 175.1, 174.5, 174.0, 45.0, 44.5, 44.0, 39.5 (con la señal de DMSO-*d*<sub>6</sub>), 38.6, 29.9, 29.2, 27.2, 24.7.

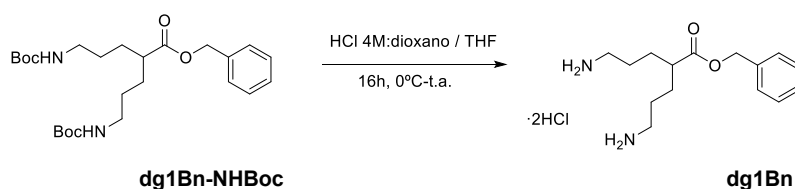
### Síntesis de dg1Bn-NHBoc



Se disuelve el compuesto **4** (3.19 g, 8.5 mmol, 1 eq.) en DMF y se añade Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.35 g, 12.8 mmol, 1.5 eq.). Tras cinco minutos en agitación se adiciona BnBr (1.5 mL, 13.2 mmol, 1.55 eq.) y la mezcla se deja en agitación durante 16h. Tras eliminar la DMF, el crudo de reacción se disuelve en DCM (50 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (3 x 50 mL). Se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt:Hexano; 1:9) para dar lugar al compuesto deseado como un sólido incoloro (3.44 g, 87%). **Rf**: 0.3

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 7.39 – 7.32 (m, 5 H), 5.12 (s, 2 H), 4.46 (s, 2 H), 3.06 (t, *J* = 6.2 Hz, 4 H), 2.48 – 2.37 (m, 1 H), 1.68 – 1.59 (m, 4 H), 1.52 – 1.38 (m, 22 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 175.8, 156.1, 136.2, 128.7, 128.5, 128.4, 79.3, 66.3, 44.9, 40.5, 29.5, 28.6, 27.9. **ESI-TOF** calculado para C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>H<sup>+</sup>, 465.2964, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 465.2945.

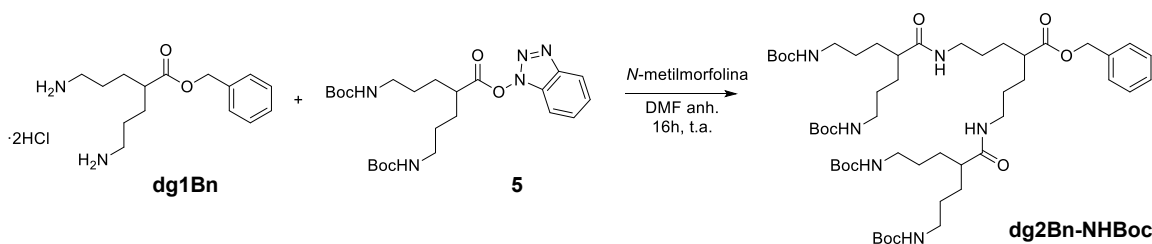
### Síntesis de dg1Bn



Se disuelve **dg1Bn-NHBoc** (3.44 g, 7.4 mmol, 1 eq.) en THF (10 mL) y se enfría en baño de hielo donde se añade, gota a gota, HCl 4M:dioxano (10 mL). La mezcla de reacción se deja en agitación durante 16h, tiempo tras el cual se evapora hasta sequedad dando lugar al compuesto deseado (2.49 g, cuantitativamente) como un sólido viscoso de color amarillo pálido.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm: 7.49 – 7.46 (m, 5 H), 5.23 (s, 2 H), 2.98 – 2.94 (m, 4 H), 2.61 – 2.56 (m, 1 H), 1.69 – 1.60 (m, 8 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm: 177.8, 135.8, 129.1, 129.0, 128.8, 67.5, 44.6, 39.4, 28.5, 24.7. **ESI-TOF** calculado para C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>H<sup>+</sup>, 265.1916, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 265.1911.

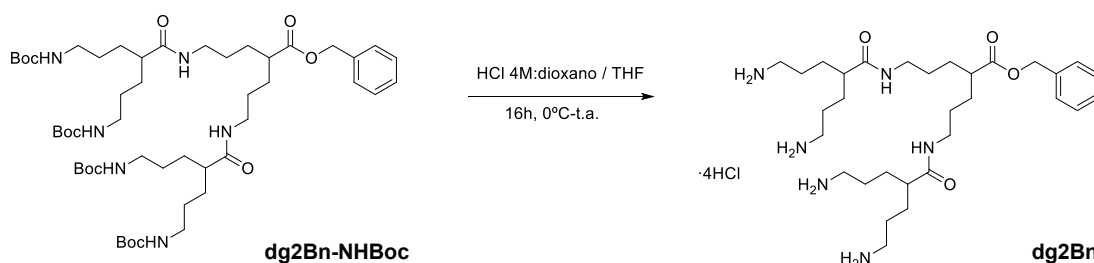
### Síntesis de dg2Bn-NHBoc



Se disuelve **dg1Bn** (1.39 g, 4.12 mmol, 1 eq.) en DMF anhidra (60 mL) y se le añade **5** (4.45 g, 9.06 mmol, 2.2 eq.) y *N*-metilmorfolina (2.76 mL, 24.72 mmol, 6 eq.). La mezcla de reacción se deja agitando a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante 16h. Al cabo de este tiempo se elimina la DMF, se disuelve en DCM (50 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (3 x 50 mL) dando lugar a **dg2Bn-NHBoc** como un sólido incoloro (3.87 g, 3.96 mmol, 96%).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 7.37 – 7.31 (m, 5 H), 6.43 (s, 2H), 5.10 (s, 2 H), 4.88 (s, 4H), 3.27 – 3.14 (m, 4 H), 3.11 – 3.01 (m, 8 H), 2.49 – 2.39 (m, 1 H), 2.20 – 2.08 (m, 2 H), 1.63 – 1.57 (m, 6 H), 1.48 – 1.33 (m, 54 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 175.9, 175.8, 156.4, 136.0, 131.0, 128.7, 128.4, 79.3, 66.4, 46.2, 44.4, 40.3, 38.8, 30.0, 29.8, 28.6, 28.1, 27.3. **ESI-TOF** calculado para C<sub>51</sub>H<sub>88</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>H<sup>+</sup>, 977.6538, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 977.6549.

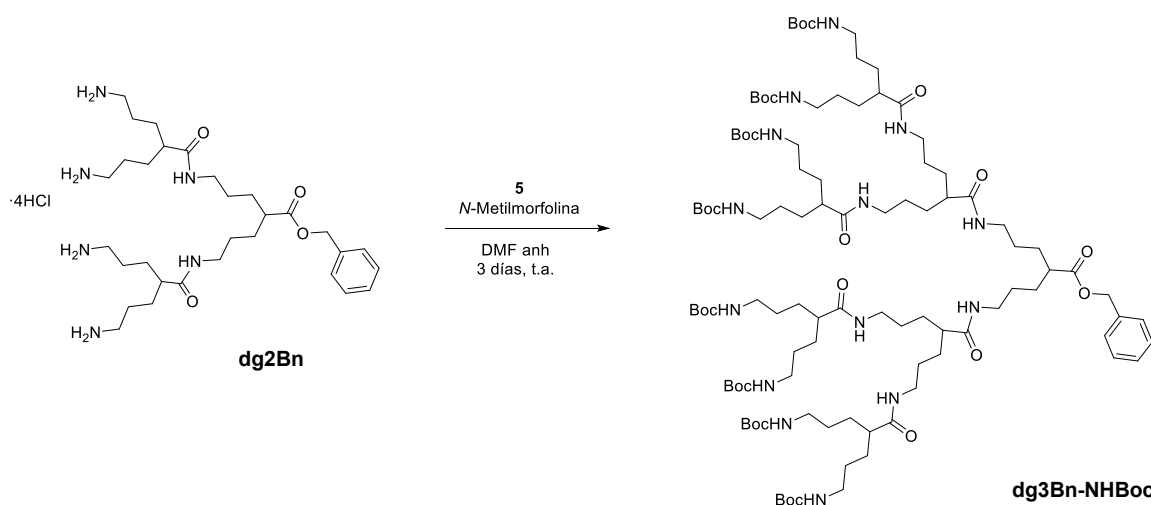
### Síntesis de dg2Bn



Se disuelve **dg2Bn-NHBoc** (1 g, 1.02 mmol, 1 eq.) en THF (10 mL) y se enfría en baño de hielo donde se añade, gota a gota, HCl 4M:dioxano (10 mL). La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 16h. Al cabo de este tiempo se elimina el disolvente dando lugar a **dg2Bn** (733 mg, cuantitativamente) como un sólido incoloro.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm: 7.51 – 7.40 (m, 5 H), 5.22 (s, 2 H), 3.24 – 3.11 (m, 4 H), 3.02 – 2.91 (m, 8 H), 2.58 – 2.51 (m, 1 H), 2.34 - 2.25 (m, 2 H), 1.63 – 1.45 (m, 24 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm: 178.8, 177.6, 135.9, 129.1, 128.9, 128.5, 67.3, 46.1, 45.0, 39.5, 39.2, 29.4, 29.1, 26.6, 25.0. **ESI-TOF** calculado para C<sub>31</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>H<sup>2+</sup>, 289.2260, [M + H]<sup>2+</sup> experimental, 289.2254.

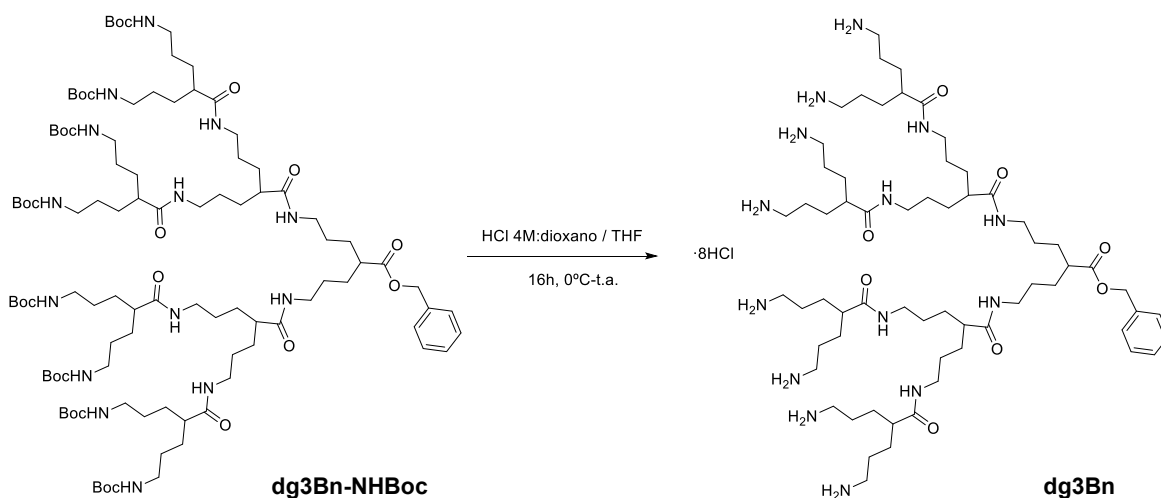
## Síntesis de dg3Bn-NHBoc



Se disuelven **dg2Bn** (76 mg, 0.11 mmol, 1 eq.), **5** (227 mg, 0.46 mmol, 4.4 eq.) y *N*-metilmorfolina (104  $\mu$ L, 0.95 mmol, 9 eq.) en DMF anhidra (60 mL). La mezcla de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante tres días bajo atmósfera de nitrógeno. Tras este tiempo se elimina el disolvente, el crudo se disuelve en DCM (50 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (3 x 50 mL) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M (3 x 50 mL) dando lugar a **dg3Bn-NHBoc** (187 mg, 89%) como un sólido incoloro.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 7.82 – 7.75 (m, 6 H), 7.37 – 7.31 (m, 5H), 6.77 – 6.74 (m, 8H), 5.09 (s, 2 H), 3.07-2.92 (m, 12 H), 2.90-2.79 (m, 16 H), 2.13-1.99 (m, 7 H), 1.39 – 1.21 (m, 128 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 175.1, 174.5, 174.4, 155.6, 136.2, 128.4, 128.0, 127.8, 77.3, 65.4, 45.1, 45.0, 39.8, 38.2, 38.1, 30.0, 29.8, 29.3, 28.3, 27.6, 27.3, 27.0. **ESI-TOF** calculado para C<sub>103</sub>H<sub>184</sub>N<sub>14</sub>O<sub>24</sub>Na<sup>2+</sup>, 1012.6769, [M + Na]<sup>2+</sup> experimental, 1012.6784.

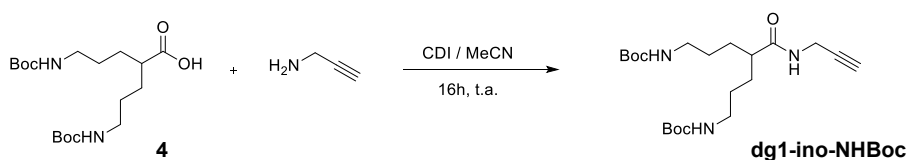
## Síntesis de dg3Bn



Se disuelve **dg3Bn-NHBoc** (182 mg, 0.09 mmol, 1eq.) en THF (10 mL) y se enfría en baño de hielo. Una vez esté la mezcla fría, se añade, gota a gota, HCl 4M:dioxano (10 mL). La mezcla de reacción se deja en agitación durante 16h tras lo cual se evapora hasta sequedad dando lugar a **dg3Bn** (132 mg, cuantitativamente).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm: 7.58 – 7.39 (m, 5 H), 5.22 (s, 2 H), 3.23 – 3.11 (m, 12 H), 3.05 - 2.91 (m, 16 H), 2.58 – 2.46 (m, 1 H), 2.33 – 2.24 (m, 6 H), 1.70 – 1.35 (m, 56 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm: 178.8, 178.5, 177.8, 136.0, 129.2, 129.0, 128.6, 67.3, 46.5, 46.2, 45.3, 39.6, 39.4, 39.2, 30.0, 29.6, 29.1, 26.9, 26.8, 25.1. **ESI-TOF** calculado para C<sub>63</sub>H<sub>120</sub>N<sub>14</sub>O<sub>8</sub>H<sup>2+</sup>, 601.4785, [M + H]<sup>2+</sup> experimental, 601.4791.

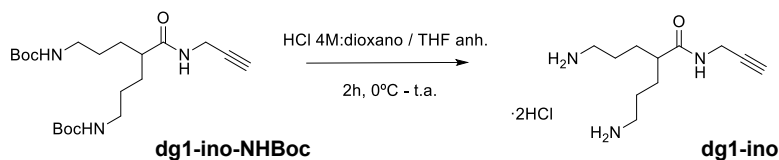
### Síntesis de dg1-ino-NHBoc



Bajo condiciones anhidras, se disuelve el compuesto **4** (350 mg, 0.94 mmol, 1 eq.) en MeCN (10 mL) y se añade CDI (228 mg, 1.41 mmol, 1.5 eq.) disuelta también en MeCN (10 mL). Esta mezcla de reacción se deja en agitación durante una hora, tras la cual se adiciona propargilamina (180 μL, 2.81 mmol, 3 eq.) y se agita durante 16h a temperatura ambiente. Se elimina el disolvente, se disuelve el crudo en DCM y se lava con HCl 0.05 M (3 x 20 mL). La fase orgánica se lleva a sequedad dando lugar a **dg1-ino-NHBoc** como un sólido incoloro (353 mg, 91 %).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 6.60 (s, 1H), 4.73 (s, 2H), 3.99 (dd, *J* = 5.4, 2.6 Hz, 2H), 3.14 – 3.01 (m, 4H), 2.22 – 2.14 (m, 2H), 1.64 – 1.58 (m, 2H), 1.45 – 1.38 (m, 24H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 175.5, 156.3, 79.9, 79.3, 71.3, 45.4, 39.91, 29.6, 29.0, 28.5, 27.9. **ESI-TOF** calculado para C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>H<sup>+</sup>, 412.2811, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 412.2805.

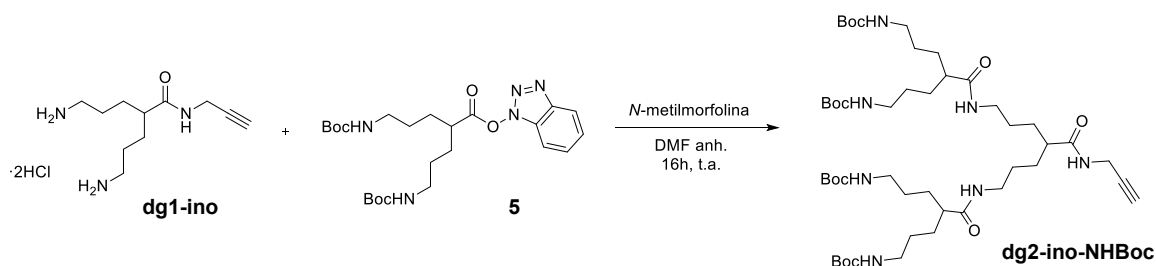
### Síntesis de dg1-ino



Se disuelve **dg1-ino-NHBoc** (353 mg, 0.86 mmol, 1 eq.) en THF anhidro (5 mL) y se enfría en baño de hielo. Una vez frío, se añade HCl 4M:dioxano (5 mL) gota a gota y la mezcla de reacción se deja agitando durante 2 horas. Al cabo de este tiempo se lleva a sequedad originando **dg1-ino** como un sólido incoloro (240 mg, cuantitativamente).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm: 4.03 (d,  $J = 2.6$  Hz, 2H), 3.09 – 2.98 (m, 4H), 2.67 (s, 1H), 2.53 – 2.22 (m, 1H), 1.76 – 1.55 (m, 8H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm: 177.9, 79.8, 72.1, 45.9, 39.5, 29.2, 28.9, 24.9. **ESI-TOF** calculado para C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>OH<sup>+</sup>, 212.1763, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 212.1757.

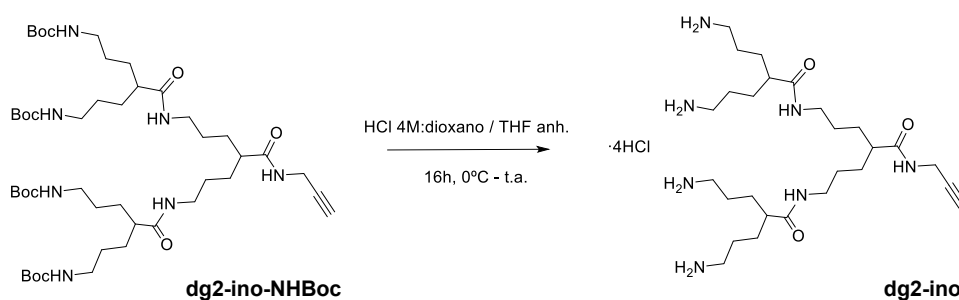
### Síntesis de dg2-ino-NHBoc



Bajo condiciones anhidras se disuelve **dg1-ino** (264 mg, 0.93 mmol, 1 eq.) en DMF anhidra (15 mL) y se añade *N*-metilmorfolina (615  $\mu$ L, 5.58 mmol, 6 eq.). Posteriormente se adiciona el compuesto **5** (1 g, 2.05 mmol, 2.2 eq.) disuelto también DMF anhidra (30 mL) y se deja en agitación durante 16h. Tras este tiempo, la mezcla de reacción se lava con H<sub>2</sub>O (3 x 30 mL) y HCl 0,05 M (3 x 20 mL), se evapora la fase orgánica y se obtiene **dg2-ino-NHBoc** como un sólido incoloro (807 mg, 94%).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 7.17 (s, 1H), 6.57 (s, 2H), 4.97 (s, 4H), 3.96 (dd,  $J = 5.5, 2.5$  Hz, 2H), 3.30 – 3.19 (m, 4H), 3.15 – 2.98 (m, 8H), 2.35 – 2.25 (m, 1H), 2.20 (s, 1H), 2.17 – 2.10 (m, 2H), 1.64 – 1.53 (m, 4H), 1.48 – 1.31 (m, 56H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 175.9, 175.8, 156.3, 80.1, 79.2, 71.3, 46.1, 45.3, 40.2, 38.7, 30.0, 29.7, 29.0, 28.5, 28.0, 27.5. **ESI-TOF** calculado para C<sub>47</sub>H<sub>58</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>H<sup>+</sup>, 924.6385, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 924.6393.

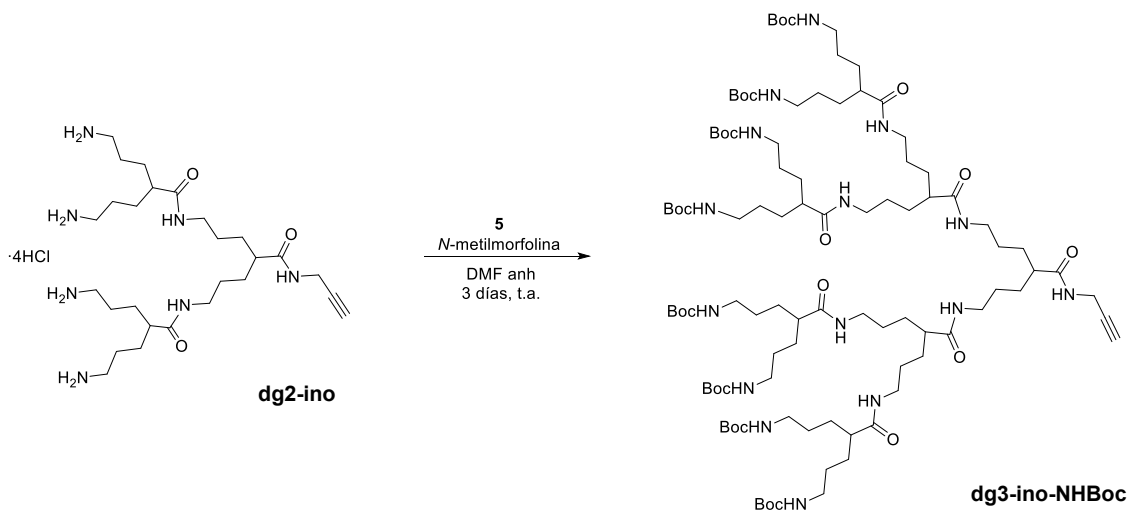
### Síntesis de dg2-ino



Se disuelve **dg2-ino-NHBoc** (321 mg, 0.35 mmol, 1 eq.) en THF anhidro (10 mL) y se enfría en baño de hielo donde se adiciona, gota a gota HCl 4M:dioxano (5 mL). La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 16h tras las cuales se lleva a sequedad para dar lugar a **dg2-ino** (180 mg, cuantitativamente) como un sólido incoloro.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm: 4.01 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 3.39 – 3.15 (m, 4H), 3.10 – 2.98 (m, 8H), 2.67 (s, 1H), 2.38 – 2.34 (m, 3H), 1.69 – 1.51 (m, 24H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm: 178.8, 177.6, 80.0, 71.9, 46.3, 46.2, 39.5, 39.3, 30.1, 29.1, 28.8, 26.8, 25.0. **ESI-TOF** calculado para C<sub>27</sub>H<sub>53</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>, 524.4288, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 524.4283.

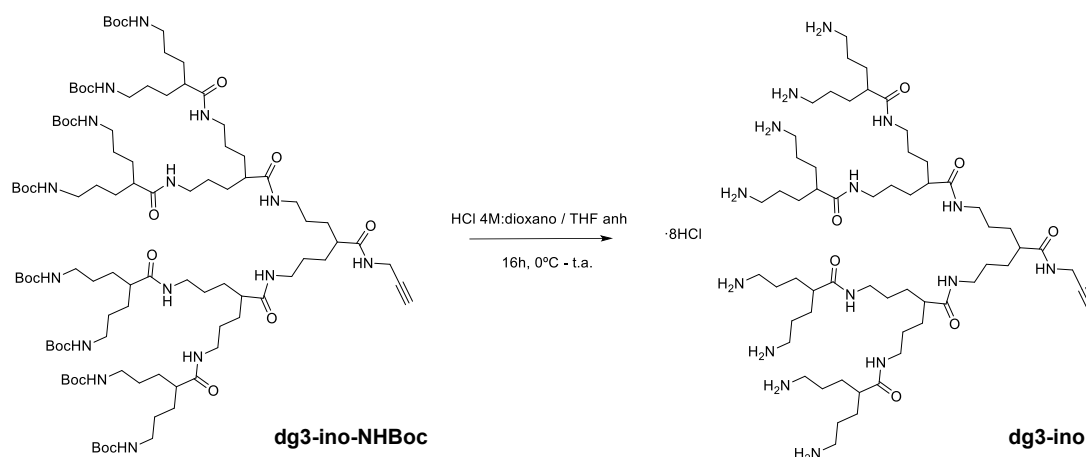
### Síntesis de dg3-ino-NHBoc



Se disuelve **dg2-ino** (489 mg, 0.73 mmol, 1 eq.) en DMF anhidra (15 mL) y se le añade *N*-metilmorfolina (724 μL, 6.57 mmol, 9 eq.). Posteriormente, se adiciona **5** (1.58 g, 3.21 mmol, 4.4 eq.) disuelto en DMF anhidra (40 mL). La mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente durante tres días bajo atmósfera de nitrógeno. Tras este tiempo se lava con H<sub>2</sub>O (3 x 50 mL) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M (3 x 50 mL) dando lugar a **dg3-ino-NHBoc** (1.167 g, 82 %) como un sólido incoloro.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 7.12 -6.52 (m, 7H), 5.22 – 4.79 (m, 8H), 3.98 (s, 2H), 3.42 – 2.95 (m, 28H), 2.32 – 2.08 (m, 8H), 1.82 – 1.19 (m, 128H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 175.7, 156.4, 85.3, 79.1, 71.1, 46.3, 40.4, 39.1, 38.9, 30.1, 29.8, 28.9, 28.6, 28.1, 28.0, 27.8. **ESI-TOF** calculado para C<sub>99</sub>H<sub>181</sub>N<sub>15</sub>O<sub>23</sub>Na<sup>2+</sup>, 986.1693, [M + Na]<sup>2+</sup> experimental, 986.6729.

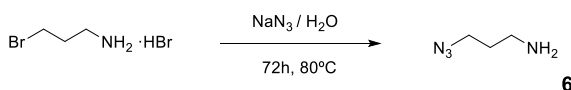
### Síntesis de dg3-ino



Se disuelve **dg3-ino-NHBoc** (207 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) en THF anhidro (10 mL) y se enfría en baño de hielo donde se adiciona, gota a gota, HCl 4 M:dioxano (10 mL) y se deja en agitación durante 16h. Tras este tiempo, se elimina completamente el disolvente y se obtiene **dg3-ino** (153 mg, cuantitativamente) como un sólido incoloro.

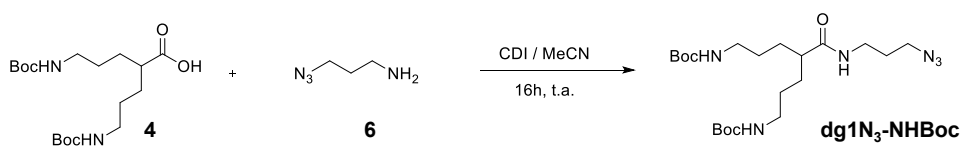
**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm: 3.97 (s, 2H), 3.23 – 3.15 (m, 12H), 3.01 – 2.98 (m, 16H), 2.62 (s, 1H), 2.37 – 2.19 (m, 7H), 1.65 – 1.43 (m, 56H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm: 178.7, 178.4, 177.7, 80.0, 71.9, 46.4, 46.1, 39.5, 39.3, 39.2, 30.0, 29.1, 28.8, 26.8, 25.0. **ESI-TOF** calculado para C<sub>59</sub>H<sub>117</sub>N<sub>15</sub>O<sub>7</sub>H<sub>2</sub><sup>2+</sup>, 574.9708, [M + H]<sup>2+</sup> experimental, 574.9703.

### Síntesis de 3-azidopropilamina (6)



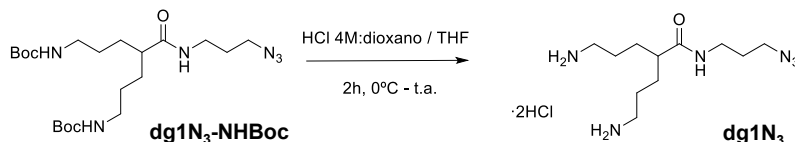
Se disuelven hidrobromuro de 3-bromopropilamina (3 g, 13.7 mmol, 1 eq.) y azida sódica (2.67 g, 41.1 mmol, 3 eq.) en H<sub>2</sub>O (10 mL). La mezcla de reacción se calienta a 80°C y se deja agitando durante tres días. Al cabo de este tiempo se enfría en baño de hielo y se añaden 20 mL de Et<sub>2</sub>O. Posteriormente se adiciona KOH hasta pH básico. Se separa la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con Et<sub>2</sub>O (3 x 20 mL). Las fases orgánicas se combinan, se seca con MgSO<sub>4</sub> y se concentra para obtener el producto (820 mg, 60%) como un aceite incoloro.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 3.37 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.80 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.76 – 1.69 (m, 2H).

Síntesis de dg1N<sub>3</sub>-NHBoc

Se disuelven **4** (782 mg, 2.1 mmol, 1 eq.) y CDI (510 mg, 3.15 mmol, 1.5 eq.) en MeCN (10 mL) bajo condiciones anhidras y se deja en agitación durante una hora. Tras este tiempo se adiciona el compuesto **6** (627 mg, 6.27 mmol, 3 eq.) previamente disuelto en MeCN (5 mL). La mezcla de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 16h. Tras este tiempo se elimina el disolvente a vacío, el crudo resultante se disuelve en DCM y se lava con HCl 0.05 M (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub>, se concentra y se eliminan las trazas de disolvente a vacío dando lugar a **dg1N<sub>3</sub>-NHBoc** (517 mg, 54 %) como un sólido incoloro.

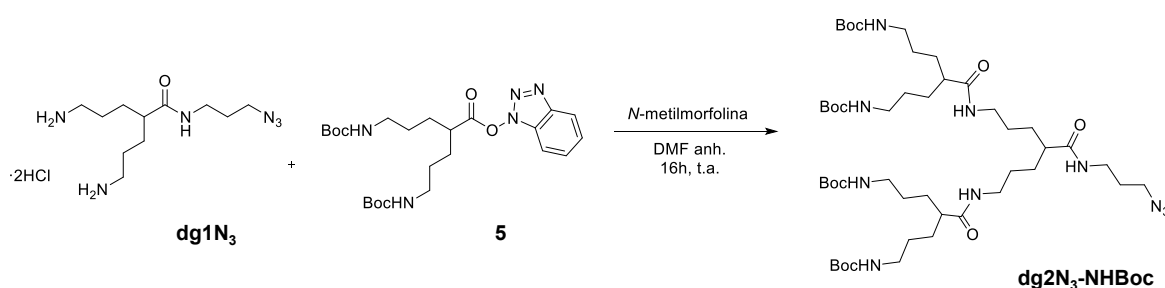
**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 6.39 (s, 1H), 4.71 (s, 2H), 3.36 – 3.22 (m, 4H), 3.12 – 3.00 (m, 4H), 2.15 (s, 1H), 1.76 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.63 – 1.56 (m, 2H), 1.44 – 1.38 (m, 24H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 175.8, 156.3, 79.3, 49.4, 45.7, 40.0, 37.0, 29.7, 29.1, 28.5, 28.0. **ESI-TOF** calculado para C<sub>21</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>H<sup>+</sup>, 457.3138, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 457.3131.

Síntesis de dg1N<sub>3</sub>

Se disuelve **dg1N<sub>3</sub>-NHBoc** (218 mg, 0.48 mmol, 1 eq.) en THF (10 mL) y se enfría en baño de hielo. A esta disolución, se le añade, gota a gota, HCl 4 M:dioxano (5 mL) y se deja en agitación durante 2 horas. Al cabo de este tiempo se elimina el disolvente a vacío para obtener el producto (153 mg, cuantitativamente) como un sólido viscoso de color amarillo pálido.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.25 – 8.17 (m, 1H), 8.12 – 7.98 (m, 4H), 3.37 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.14 – 3.09 (m, 2H), 2.80 – 2.68 (m, 4H), 2.27 – 2.16 (m, 1H), 1.67 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.55 – 1.43 (m, 6H), 1.41 – 1.30 (m, 2H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 174.0, 48.5, 44.2, 38.5, 35.7, 29.1, 28.5, 24.8. **ESI-TOF** calculado para C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>OH<sup>+</sup>, 257.2090, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 257.2081.

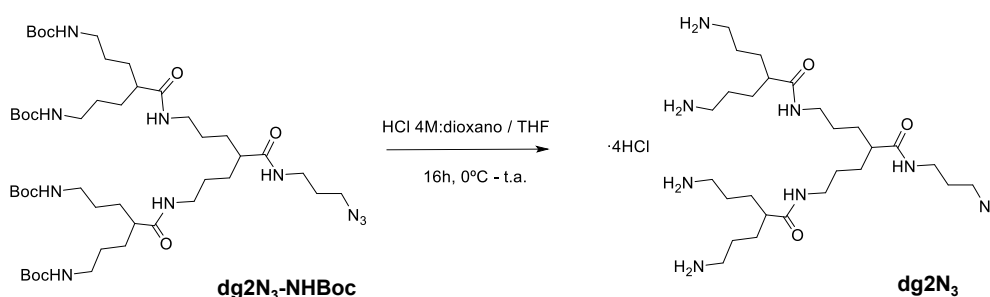
### Síntesis de dg2N<sub>3</sub>-NHBoc



Bajo condiciones anhidras se disuelve **dg1N<sub>3</sub>** (136 mg, 0.41 mmol, 1 eq.) en DMF anhidra (10 mL) y se adiciona *N*-metilmorfolina (271  $\mu$ L, 2.46 mmol, 6 eq.) Tras 5 minutos aproximadamente se añade el compuesto **5** (443 mg, 0.90 mmol, 2.2 eq.) disuelto en DMF anhidra (10 mL) y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 16h. Tras este tiempo, se elimina completamente el disolvente, se disuelve en DCM (50 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (50 mL), HCl 0.5M (2 x 30 mL) y con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> y se concentra a presión reducida. Para su purificación, el crudo obtenido se disuelve en la mínima cantidad de DCM y se precipita en hexano frío, dando lugar a **dg2N<sub>3</sub>-NHBoc** (326 mg, 82%) como un sólido incoloro.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 6.82 (s, 1H), 6.43 (s, 2H), 4.92 (s, 4H), 3.35 – 3.26 (m, 6H), 3.13 – 3.01 (m, 10H), 2.21 – 2.14 (m, 3H), 1.76 (q,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 1.62 – 1.55 (m, 6H), 1.45 – 1.34 (m, 54H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 176.0, 175.8, 156.4, 79.3, 49.5, 46.2, 45.5, 40.2, 38.7, 37.0, 30.0, 30.0, 29.1, 28.6, 28.1, 27.6. **ESI-TOF** calculado para C<sub>47</sub>H<sub>88</sub>N<sub>10</sub>O<sub>11</sub>H<sup>+</sup>, 969.6712, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 969.6702.

### Síntesis de dg2N<sub>3</sub>

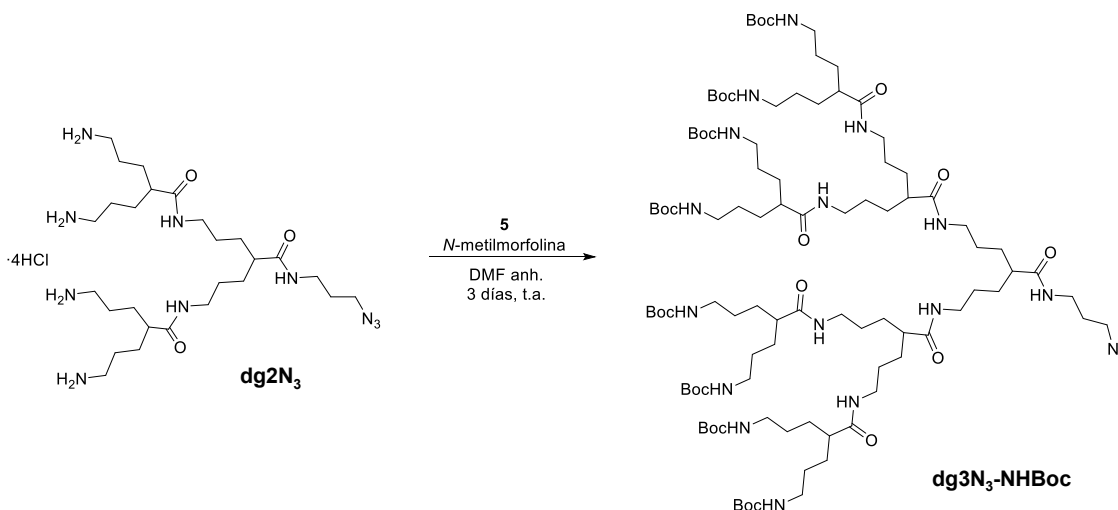


Se disuelve **dg2N<sub>3</sub>-NHBoc** (125 mg, 0.13 mmol, 1 eq.) en THF (10 mL) y se enfría en baño de hielo. Una vez frío, se añade, gota a gota, HCl 4M:dioxano (5 mL) y se mantiene en agitación durante 16h. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente a vacío obteniéndose el producto (90 mg, cuantitativamente) como un sólido viscoso de color amarillo pálido.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 8.25 (s, 1H), 8.12 (s, 2H), 7.98 (s, 8H), 3.37 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 3.13 – 3.08 (m, 2H), 3.07 – 2.89 (m, 4H), 2.82 – 2.69 (m, 8H), 2.25 – 2.15 (s, 3H), 1.66 (q,  $J$  =

6.7 Hz, 2H), 1.55 – 1.26 (m, 24H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 175.1, 173.7, 48.4, 45.1, 44.2, 38.6, 38.4, 35.7, 30.1, 29.2, 28.4, 27.3, 24.8. **ESI-TOF** calculado para C<sub>27</sub>H<sub>56</sub>N<sub>10</sub>O<sub>3</sub>H<sup>+</sup>, 569.4615, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 569.4606.

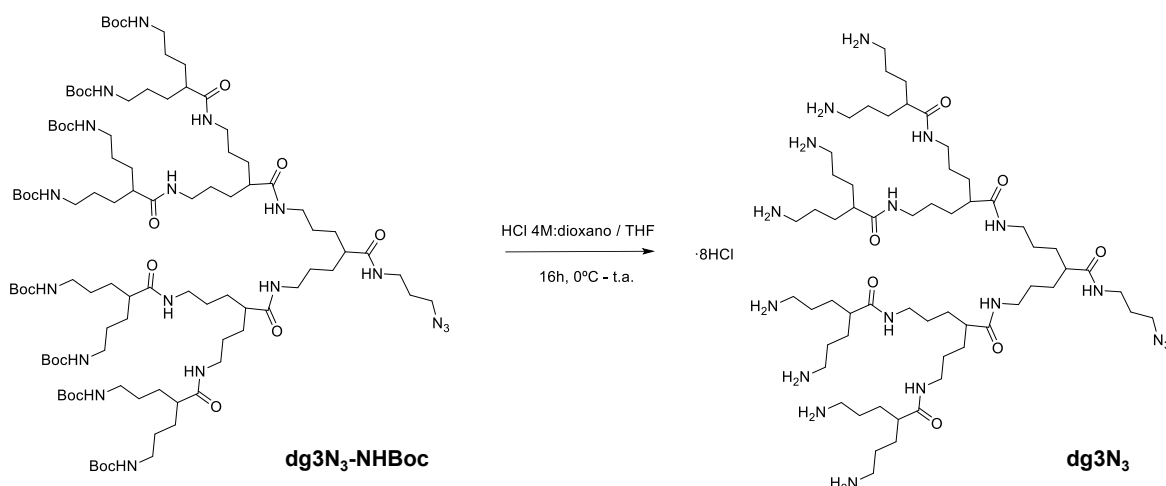
### Síntesis de dg3N<sub>3</sub>-NHBoc



Se disuelve **dg2N<sub>3</sub>** (71 mg, 0.10 mmol, 1 eq.) en DMF anhidra (10 mL) y se añade *N*-metilmorfolina (99 μL, 0.90 mmol, 9 eq.). Posteriormente, bajo condiciones anhidras, se adiciona el compuesto **5** (216 mg, 0.44 mmol, 4.4 eq.) disuelto en DMF anhidra (10 mL) y la mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente durante 3 días. Tras este tiempo, se elimina el disolvente, el crudo se disuelve en DCM (50 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (50 mL), HCl 0.5M (2 x 30 mL) y con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> y se concentra a presión reducida. Para su purificación, el crudo obtenido se disuelve en la mínima cantidad de DCM y se precipita en hexano frío, dando lugar a **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc** (189 mg, 95 %) como un sólido incoloro.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.03 (s, 1H), 7.89 – 7.76 (m, 6H), 6.78 – 6.66 (m, 8H), 3.43 – 3.27 (m, 2H), 3.14 – 3.06 (m, 2H), 3.06 – 2.95 (m, 12H), 2.91 – 2.78 (m, 16H), 2.15 – 2.01 (m, 7H), 1.65 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.49 – 1.17 (m, 128H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 175.3, 175.1, 174.9, 156.0, 77.7, 48.9, 45.6, 38.7, 36.2, 30.5, 30.3, 30.1, 29.0, 28.7, 28.1, 27.8, 27.7. **ESI-TOF** calculado para C<sub>99</sub>H<sub>184</sub>N<sub>18</sub>O<sub>23</sub>Na<sup>2+</sup>, 1008.1840, [M + Na]<sup>2+</sup> experimental, 1008.6871.

### Síntesis de dg3N<sub>3</sub>

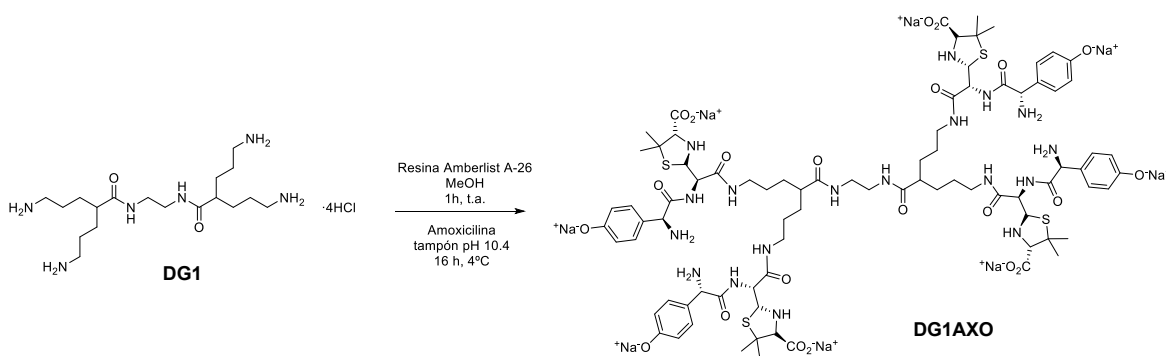


Se disuelve **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc** (92 mg, 0.05 mmol, 1 eq.) en THF (10 mL) y se enfría en baño de hielo. Una vez esté la mezcla fría, se añade, gota a gota, HCl 4M:dioxano (10 mL). La mezcla de reacción se deja en agitación durante 16h, tras lo cual se evapora hasta sequedad dando lugar a **dg3N<sub>3</sub>** (55 mg, cuantitativamente) como un sólido viscoso de color amarillo pálido.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.34 – 7.90 (m, 23H), 3.40 – 3.34 (m, 2H), 3.17 – 2.92 (m, 14H), 2.81 – 2.66 (m, 16H), 2.30 – 2.19 (m, 7H), 1.67 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.56 – 1.25 (m, 56H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 175.0, 174.0, 173.9, 48.5, 44.1, 43.8, 38.7, 38.5, 38.3, 35.7, 30.1, 29.2, 28.9, 28.5, 27.3, 24.8, 24.7. **ESI-TOF** calculado para C<sub>59</sub>H<sub>120</sub>N<sub>18</sub>O<sub>7</sub>H<sup>2+</sup>, 597.4872, [M + H]<sup>2+</sup> experimental, 597.4718.

## VIII.4. Síntesis de antígenos dendiméricos para la detección de alergia a fármacos

### Síntesis de DG1AXO

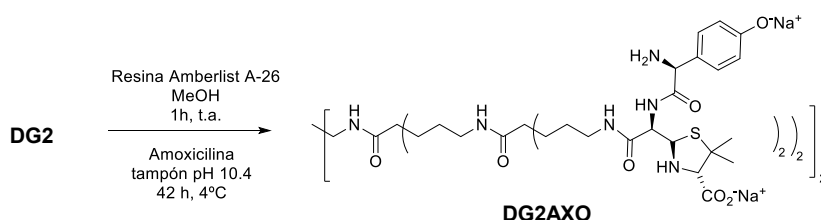


Siguiendo el procedimiento general, se disuelve **DG1** (31 mg,  $8.33 \cdot 10^{-2}$  mmol, 1 eq.), previamente tratado con la resina de intercambio iónico, en un tampón carbonato acuoso, pH 10.4 (5 mL) y se enfría a 4°C. Se añade amoxicilina sódica (258 mg, 0.66 mmol, 8 eq.) y la reacción se deja

16h a dicha temperatura. Tras la purificación del crudo de reacción mediante una columna de exclusión por tamaño de Sephadex™ G-15 se obtiene **DG1AXO** (146 mg, 87%) como un sólido blanco.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 7.19 – 7.01 (m, 8H), 6.71 – 6.56 (m, 8H), 4.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 4.40 (s, 4H), 4.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 3.46 – 3.33 (m, 4H), 3.30 – 3.10 (m, 8H), 3.08 – 2.96 (m, 4H), 2.10 (s, 2H), 1.56 – 1.44 (m, 12H), 1.43 – 1.26 (m, 16H), 1.20 – 1.09 (m, 12H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 178.7, 176.4, 174.9, 171.0, 159.0, 128.3, 126.4, 118.4, 74.4, 64.8, 59.3, 59.0, 57.9, 39.1, 38.6, 29.3, 27.0, 26.7, 26.2.

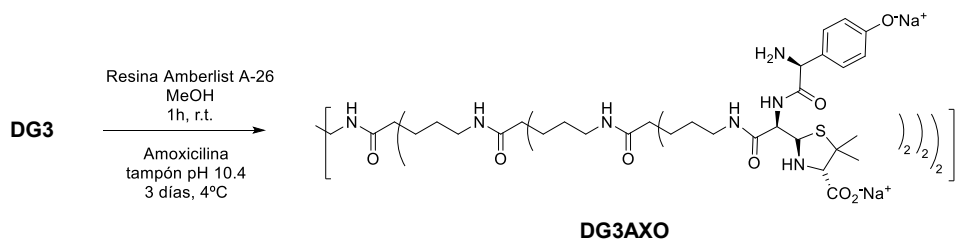
### Síntesis de DG2AXO



Mediante el procedimiento general, se hace reaccionar **DG2** (41 mg,  $4.1 \cdot 10^{-2}$  mmol, 1 eq.) con amoxicilina sódica (255 mg,  $6.58 \cdot 10^{-1}$  mmol, 16 eq.) en tampón de carbonato acuoso (5 mL) durante dos días. Se obtiene **DG2AXO** (144 mg, 82%) como un sólido blanco tras ser purificado con Sephadex™ G-15.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 7.23 – 7.11 (m, 16H), 6.69 (s, 16H), 4.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 8H), 4.48 (s, 8H), 4.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 8H), 3.50 – 3.41 (m, 8H), 3.40 – 3.29 (m, 8H), 3.26 – 3.09 (m, 26H), 2.19 (s, 6H), 1.57 (s, 24H), 1.53 – 1.38 (m, 48H), 1.25 (s, 24H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 175.1, 171.0, 170.9, 170.7, 157.1, 130.0, 127.3, 116.5, 74.8, 65.2, 59.8, 59.2, 56.6, 46.2, 39.5, 39.3, 39.1, 31.0, 29.7, 29.5, 26.8, 26.3, 25.0.

### Síntesis de DG3AXO

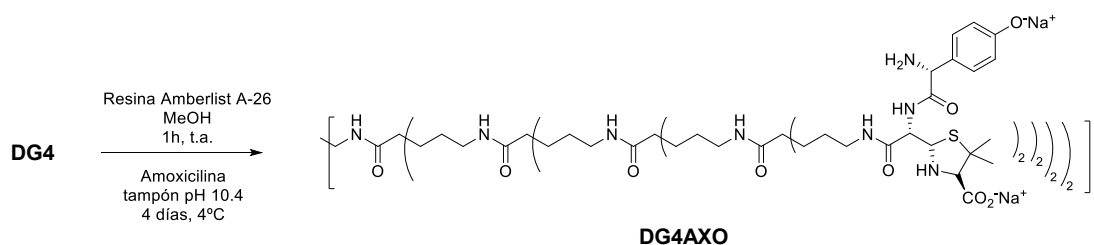


Tal y como se describe en el procedimiento general, este compuesto se obtiene al hacer reaccionar **DG3** (102 mg,  $3.6 \cdot 10^{-2}$  mmol, 1 eq.), tratado previamente con la resina de intercambio iónico, con amoxicilina sódica (447 mg, 1.15 mmol, 32 eq.) en tampón carbonato acuoso (5 mL)

durante tres días a 4°C. La reacción se refresca con un exceso de amoxicilina sódica (44 mg, 0.11 mmol, 3.2 eq.) cada 24 horas y una vez transcurrido el tiempo de reacción se purifica mediante columna de exclusión por tamaño con fase estacionaria Sephadex™ G-25. Finalmente se obtiene **DG3AXO** (270 mg, 85%) como un sólido blanco.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 7.27 – 7.09 (m, 32H), 6.72 (s, 32H), 4.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 16H), 4.49 (s, 16H), 4.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 16H), 3.45 (s, 16H), 3.34 – 3.01 (m, 56H), 2.81 (s, 4H), 2.32 – 2.10 (m, 14H), 1.57 (s, 42H), 1.53 – 1.34 (m, 112H), 1.25 (s, 42H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 178.3, 176.4, 175.1, 171.2, 155.0, 128.6, 127.6, 118.1, 74.7, 65.0, 59.6, 59.2, 58.6, 46.2, 39.4, 39.1, 29.9, 29.6, 29.5, 27.3, 27.0, 26.8, 26.5, 26.4.

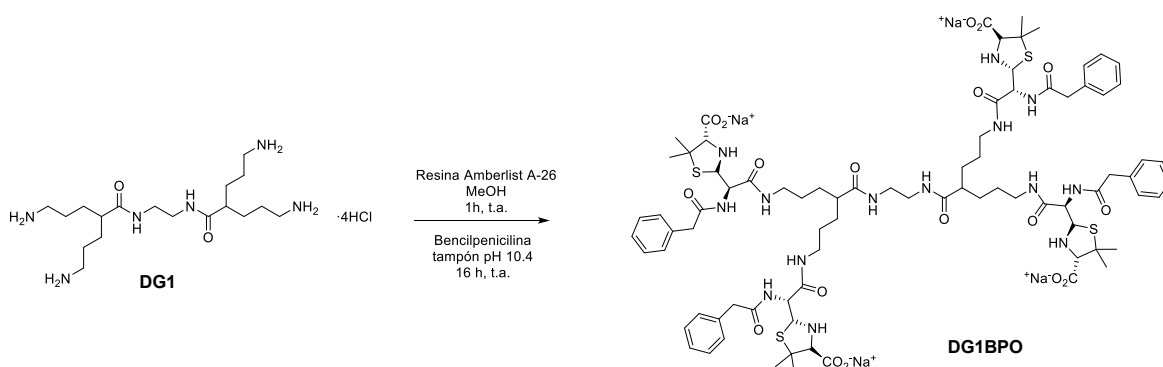
### Síntesis de DG4AXO



Siguiendo el procedimiento general se trata **DG4** con la resina de intercambio iónico y posteriormente se disuelve (52 mg,  $8.79 \cdot 10^{-3}$  mmol, 1 eq.) en tampón carbonato acuoso, pH 10.4 (5 mL) y se enfría a 4°C. Se añade amoxicilina sódica (218 mg,  $5.63 \cdot 10^{-1}$  mmol, 64 eq.) y la reacción se mantiene 4 días en agitación a dicha temperatura, refrescando cada 24 horas con un exceso de amoxicilina sódica (22 mg,  $5.68 \cdot 10^{-2}$  mmol, 6.4 eq.). Tras la purificación del crudo de reacción mediante una columna de exclusión por tamaño de Sephadex™ G-25 se obtiene **DG4AXO** (136 mg, 87%) como un sólido blanco.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 7.20 – 7.00 (m, 64H), 6.70 – 6.55 (m, 64H), 5.02 – 4.87 (m, 32H), 4.42 (s, 32H), 4.30 – 4.18 (m, 32H), 3.39 (s, 32H), 3.26 – 2.99 (m, 120H), 2.98 – 2.89 (m, 16H), 2.76 – 2.64 (m, 8H), 2.27 – 2.04 (m, 30H), 1.52 (s, 96H), 1.47 – 1.28 (m, 240H), 1.20 (s, 96H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 178.0, 176.4, 175.1, 171.1, 163.3, 128.5, 126.9, 118.5, 74.6, 65.0, 59.5, 59.1, 58.5, 46.1, 41.3, 40.0, 39.3, 39.1, 29.8, 29.5, 27.3, 27.0, 26.8, 26.4.

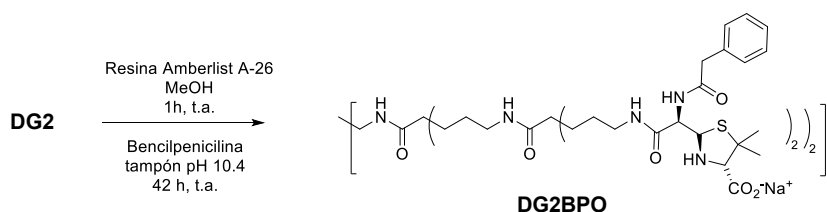
### Síntesis de DG1BPO



Tal y como se indica en el procedimiento general, se disuelve **DG1** (31 mg,  $8.33 \cdot 10^{-2}$  mmol, 1 eq.), tras haber sido tratado con la resina de intercambio iónico, en tampón carbonato acuoso, pH 10.4 (5 mL). A esta disolución se añade bencilpenicilina sódica (238 mg, 0.66 mmol, 8 eq.) y la reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 16h. Tras la purificación del crudo de reacción mediante una columna de exclusión por tamaño de Sephadex™ G-15 se obtiene **DG1BPO** (124 mg, 83%) como un sólido blanco.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 7.47 – 7.24 (m, 20H), 4.91 (d, *J* = 9.3 Hz, 4H), 4.31 (d, *J* = 9.3, Hz, 4H), 3.79 – 3.58 (m, 8H), 3.50 (s, 4H), 3.33– 3.24 (m, 4H), 3.20 – 3.03 (m, 8H), 2.14 (s, 2H), 1.60 (s, 12H), 1.48 – 1.32 (m, 16H), 1.26 (s, 12H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 178.8, 175.1, 174.4, 171.2, 135.1, 129.3, 129.1, 127.5, 74.6, 65.0, 59.6, 59.4, 45.9, 42.2, 39.1, 38.9, 29.4, 27.4, 27.0, 26.3.

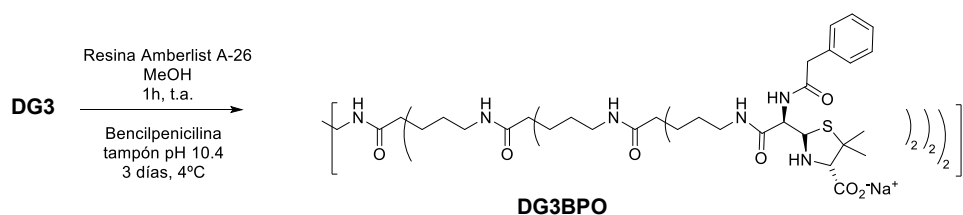
### Síntesis de DG2BPO



Siguiendo el procedimiento general, se trata **DG2** con la resina de intercambio iónico y posteriormente se disuelve (52 mg,  $5.2 \cdot 10^{-2}$  mmol, 1 eq.) en tampón carbonato pH 10.4 (5 mL). Se adiciona bencilpenicilina sódica (297 mg, 0.83 mmol, 16 eq.) y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 2 días. A las 24h, la mezcla de reacción se refresca con BPO (25 mg,  $8.3 \cdot 10^{-2}$  mmol, 1.6 eq). Pasado el tiempo indicado, el crudo de reacción se purifica mediante columna de exclusión por tamaño de Sephadex™ G-15 dando lugar a **DG2BPO** (168 mg, 84%) como un sólido blanco.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 7.51 – 7.13 (m, 40H), 4.85 (d, *J* = 9.1 Hz, 8H), 4.26 (d, *J* = 9.3, Hz, 8H), 3.57 (s, 16H), 3.43 (s, 8H), 3.27– 3.18 (m, 4H), 3.13 – 2.96 (m, 22H), 2.61-2.48 (m, 2H), 2.18 – 1.98 (m, 6H), 1.53 (s, 24H), 1.40 – 1.23 (m, 48H), 1.18 (s, 24H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 178.2, 175.1, 174.3, 171.2, 135.1, 129.4, 129.1, 127.5, 74.7, 65.0, 59.6, 59.4, 46.2, 46.0, 42.3, 39.2, 38.9, 29.8, 29.5, 27.5, 27.1, 26.5, 26.4.

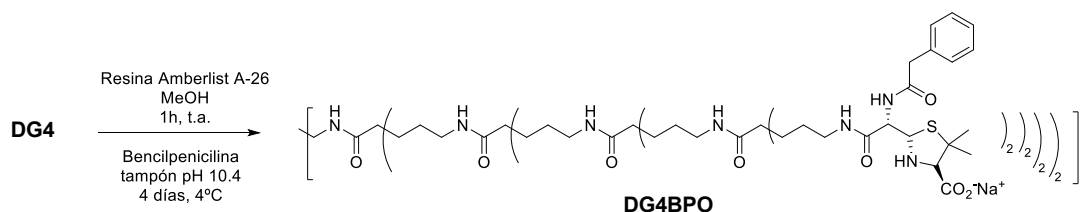
### Síntesis de DG3BPO



Tal y como se describe en el procedimiento general, este compuesto se obtiene al hacer reaccionar **DG3** (36 mg,  $1.6 \cdot 10^{-2}$  mmol, 1 eq.), tratado previamente con la resina de intercambio iónico, con bencilpenicilina sódica (183 mg,  $5.13 \cdot 10^{-1}$  mmol, 32 eq.) en tampón carbonato acuoso (5 mL) durante tres días a 4°C. A la reacción se le añade un exceso de BPO (18 mg,  $5.13 \cdot 10^{-2}$  mmol, 3.2 eq.) cada 24 horas y una vez transcurrido el tiempo de reacción se purifica mediante columna de exclusión por tamaño con fase estacionaria Sephadex™ G-25. Finalmente se obtiene **DG3BPO** (111 mg, 87%) como un sólido blanco.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 7.36 – 7.07 (m, 80H), 4.93 (d, *J* = 9.1 Hz, 16H), 4.33 (d, *J* = 9.0, Hz, 16H), 3.65 (s, 32H), 3.51 (s, 16H), 3.45– 3.37 (m, 4H), 3.26 – 3.02 (m, 54H), 2.83-2.68 (m, 2H), 2.26 – 1.93 (m, 14H), 1.61 (s, 48H), 1.52 – 1.33 (m, 112H), 1.26 (s, 48H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 177.9, 174.9, 174.6, 174.0, 171.0, 135.0, 129.5, 128.9, 127.3, 74.6, 64.9, 59.4, 59.2, 45.8, 42.1, 39.2, 38.9, 29.7, 29.6, 29.3, 28.3, 27.3, 26.7, 26.3, 26.2.

### Síntesis de DG4BPO



Siguiendo el procedimiento general se trata **DG4** con la resina de intercambio iónico y posteriormente se disuelve (43 mg,  $9.06 \cdot 10^{-3}$  mmol, 1 eq.) en tampón carbonato acuoso, pH 10.4 (5 mL) y se enfría a 4°C. Se añade bencilpenicilina sódica (207 mg, 0.58 mmol, 64 eq.) y la reacción se

mantiene en agitación durante 4 días a dicha temperatura, refrescando cada 24 horas con un exceso de BPO (21 mg,  $5.80 \cdot 10^{-2}$  mmol, 6.4 eq.). Tras la purificación del crudo de reacción mediante una columna de exclusión por tamaño de Sephadex<sup>TM</sup> G-25 se obtiene **DG4BPO** (124 mg, 84%) como un sólido blanco.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 7.46 – 7.19 (m, 160H), 4.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 32H), 4.33 (d, *J* = 8.8, Hz, 32H), 3.79 – 3.56 (m, 64H), 3.51 (s, 32H), 3.45– 3.39 (m, 4H), 3.28 – 3.00 (m, 114H), 2.73-2.60 (m, 8H), 2.27 – 2.06 (m, 30H), 1.60 (s, 96H), 1.54 – 1.29 (m, 240H), 1.25 (s, 96H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pD ≈ 11) δ ppm: 177.8, 174.9, 174.5, 173.9, 170.9, 135.0, 129.2, 128.9, 127.2, 74.6, 65.0, 59.4, 59.1, 45.8, 42.2, 40.1, 39.2, 38.9, 29.5, 29.4, 27.3, 27.0, 26.8, 26.2.

### VIII.5. Síntesis de estructuras RGD-dendriméricas

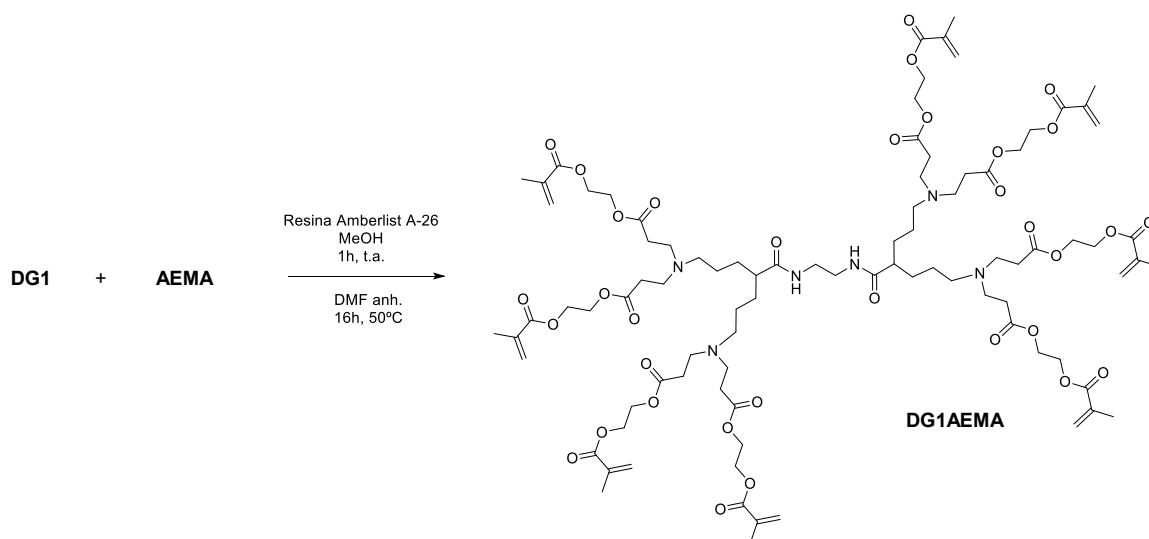
#### Síntesis de 2-(acrililoxi)etil metacrilato (AEMA)



Este compuesto se ha sintetizado empleando protocolos previamente descritos.<sup>167</sup> Para ello se disuelve 2-hidroxietilmetacrilato (2 mL, 16.44 mmol, 1 eq.) en DCM anhidro (10 mL) y se enfría en baño de hielo. Se añade 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (butilhidroxitolueno o BHT) (36 mg,  $1.64 \cdot 10^{-1}$  mmol, 0.01 eq.) disuelto en DCM anhidro (10 mL) y trietilamina (2.4 mL, 17.35 mmol, 1.055 eq.). Posteriormente se adiciona, gota a gota, cloruro de acrililo (1.4 mL, 17.35 mmol, 1.055 eq.) en DCM anhidro (10 mL). La mezcla de reacción se lleva a temperatura ambiente y se mantiene agitando durante 16h. Tras este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida, se disuelve en hexano y se filtra. El filtrado se lava con H<sub>2</sub>O (3 x 30 mL), se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se lleva a sequedad, dando lugar al producto deseado (2.54 g, 84%) como un aceite amarillo pálido.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 6.43 (dd, *J* = 17.4, 1.4 Hz, 1H), 6.20 – 6.08 (m, 2H), 5.85 (dd, *J* = 10.4, 1.4 Hz, 1H), 5.59 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 4.44 – 4.36 (m, 4H), 1.94 (s, 3H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 167.3, 166.0, 136.1, 131.5, 128.2, 126.2, 62.5, 62.3, 18.4.

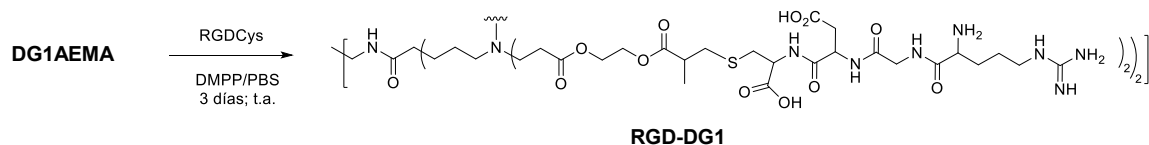
## Síntesis de DG1AEMA



Este compuesto se ha sintetizado empleando protocolos previamente descritos entre grupos amino y el compuesto **AEMA**.<sup>167</sup> Para ello, en un matraz de fondo redondo de 50 mL, se disuelve **DG1** (52 mg,  $1.38 \cdot 10^{-1}$  mmol, 1 eq.), previamente tratado con la resina de intercambio iónico, en DMF anhidra (20 mL). A esta disolución se añade **AEMA** (215 mg, 1.17 mmol, 8.4 eq.) y se calienta a 50°C durante 16h. Tras este tiempo, se elimina el disolvente dando lugar a **DG1AEMA** (163 mg, 64%) como un sólido viscoso de color amarillo pálido.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 6.06 – 5.99 (m, 8H), 5.72 – 5.64 (m, 8H), 4.33 – 4.22 (m, 32H), 3.16 – 3.00 (m, 8H), 2.90 – 2.72 (m, 4H), 2.63 (t, *J* = 6.9 Hz, 16H), 2.38 (t, *J* = 6.9 Hz, 16H), 2.34 – 2.29 (m, 2H), 1.86 (s, 24H), 1.59 – 1.13 (m, 16H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 171.8, 170.0, 166.3, 135.6, 126.0, 62.4, 61.6, 48.5, 46.8, 45.3, 42.3, 38.2, 31.8, 30.1, 24.3, 17.8. **MALDI-TOF**: calculado para C<sub>90</sub>H<sub>136</sub>N<sub>6</sub>O<sub>34</sub>H<sup>+</sup> 1845.9, [M+H]<sup>+</sup> experimental 1845.4.

## Síntesis de RGD-DG1

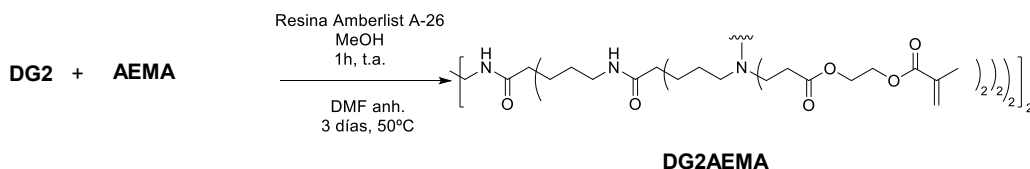


En un matraz de fondo redondo de 25 mL se disuelve **DG1AEMA** (10 mg,  $5.4 \cdot 10^{-3}$  mmol, 1 eq.) y DMPP (0.04 μL,  $2.7 \cdot 10^{-4}$  mmol, 0.05 eq.) en PBS (6 mL) y se desoxigena con argón. Por otro lado, se disuelve RGD-Cys (39 mg,  $8.64 \cdot 10^{-2}$  mmol, 16 eq.) en PBS (6 mL) y también se desoxigena con argón. Se adiciona la disolución del péptido sobre la del dendrímero y se mantiene en agitación durante 3 días a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el crudo se purifica mediante columna

de exclusión por tamaño de Sephadex™ G-25 para dar lugar al producto deseado (921 mg, 72%) como un sólido viscoso.

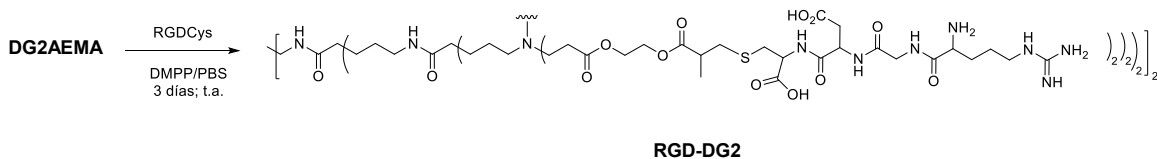
**MALDI-TOF:** calculado para  $C_{210}H_{352}N_{62}O_{90}S_8H_4^{4+}$  1353.2,  $[M+4H]^{4+}$  experimental 1352.6.

### Síntesis de DG2AEMA



En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se disuelve **DG2** (6 mg,  $5.79 \cdot 10^{-3}$  mmol, 1 eq.), previamente tratado con la resina de intercambio iónico, en DMF anhidra (20 mL). A esta disolución se añade **AEMA** (18 mg,  $9.7 \cdot 10^{-2}$  mmol, 16.8 eq.) y se calienta a 50°C durante 3 días. Tras este tiempo, se elimina el disolvente dando lugar a **DG2AEMA** (15mg, 66%) como un sólido viscoso de color amarillo pálido.

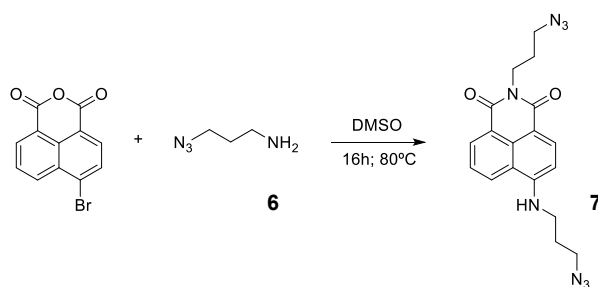
### Síntesis de RGD-DG2



En un matraz de fondo redondo de 25 mL se disuelve **DG2AEMA** (2.5 mg,  $1.39 \cdot 10^{-3}$  mmol, 1 eq.) y DMPP (0.1  $\mu$ L,  $6.95 \cdot 10^{-5}$  mmol, 0.05 eq.) en PBS (5 mL) y se desoxigena con argón. En otro matraz de fondo redondo, se disuelve RGD-Cys (20 mg,  $4.46 \cdot 10^{-2}$  mmol, 32 eq.) en PBS (5 mL) y también se desoxigena con argón. Se adiciona la disolución del péptido sobre la del dendrímero y se mantiene en agitación durante 3 días a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el crudo se purifica mediante columna de exclusión por tamaño de Sephadex™ G-25 para dar lugar al producto deseado (7 mg, 45%) como un sólido viscoso.

## VIII.6. Síntesis de dendrímeros luminiscentes como marcadores biológicos

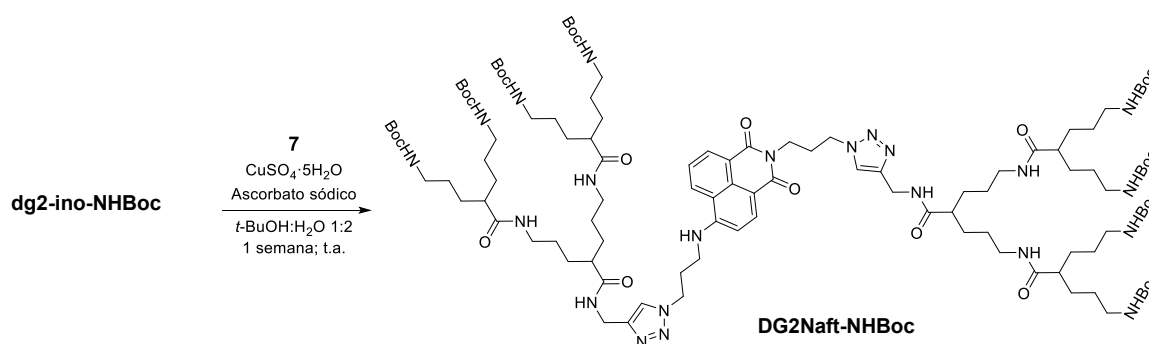
### Síntesis de *N*-(3-azidopropil)-4-((3-azidopropil)amino)-1,8-naftalimida (7)



Se disuelve el anhídrido 4-bromo-1,8-naftálico (500 mg, 1.80 mmol, 1 eq.) y el compuesto **6** (2.7 g, 27 mmol, 15 eq.) en DMSO (2.5 mL) en un tubo sellado y se calienta a 80°C durante 16h. Posteriormente se le añade DCM (50 mL) y se lava con HCl 0.5 M (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub>, se concentra y se eliminan las trazas de disolvente a vacío. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM:MeOH, 99:1) dando lugar al producto (4.23 g, 68 %) como un sólido amarillo. El compuesto **7** descompone a temperatura superior a 171 °C.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 8.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 8.45 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 8.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.62 (t, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 6.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 5.64 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.25 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 3.69 – 3.49 (m, 4 H), 3.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 2.18 – 1.93 (m, 4 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 164.8, 164.2, 149.4, 134.6, 131.4, 129.9, 126.1, 125.1, 123.1, 120.5, 110.6, 104.4, 49.9, 49.6, 41.8, 37.7, 28.0, 27.9. **ESI-TOF** calculado para C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>H<sup>+</sup>, 379.1631, [M + H]<sup>+</sup> experimental, 379.1625.

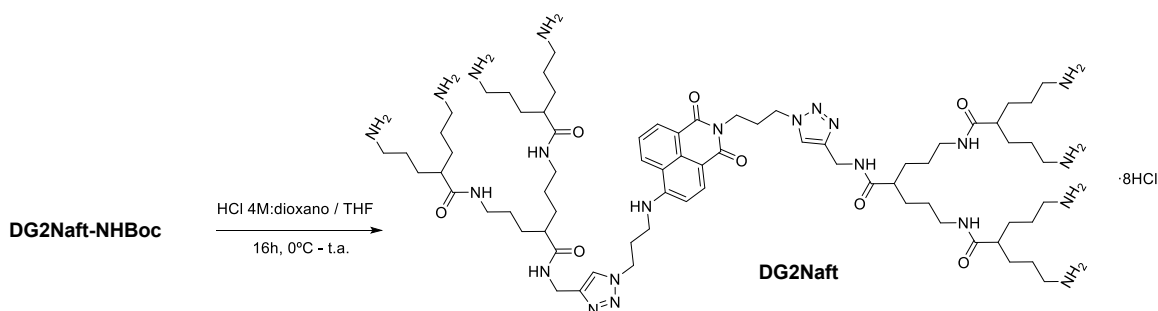
### Síntesis de DG2Naft-NHBoc



Se disuelven **dg2-ino-NHBoc** (317 mg, 0.34 mmol, 2.2 eq.), **7** (59 mg, 0.16 mmol, 1 eq.), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (4 mg, 0.016 mmol, 0.1 eq.) y la sal sódica del ácido L(+)-ascórbico (13 mg, 0.064 mmol, 0.4 eq.) en una mezcla de *tert*-butanol: agua 1:2 (18 mL) y se deja en agitación durante una semana. Tras este tiempo, se elimina el disolvente, el crudo se disuelve en DCM (50 mL) y se lava con una disolución de NH<sub>4</sub>OH al 25% (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub>, se concentra en rotavapor y se eliminan las trazas de disolvente a presión reducida para obtener el compuesto **DG2Naft-NHBoc** (323 mg, 91%) como un sólido amarillo.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.73 – 8.24 (m, 3 H), 7.98 – 7.91 (m, 2 H), 7.81 – 7.72 (m, 4 H), 7.44 – 7.97 (m, 3 H), 6.78 -6.67 (m, 8 H), 4.57 – 4.35 (m, 2 H), 4.32 – 4.19 (m, 2 H), 4.11 – 3.98 (m, 2 H), 3.87 – 3.82 (m, 2 H), 3.12-2.92 (m, 12 H), 2.90 – 2.80 (m, 16H ), 2.34 – 2.00 (m, 10 H), 1.44 – 1.17 (m, 120 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 174.4, 155.5, 153.3, 140.2, 134.1, 130.0, 129.4, 123.1, 122.7, 121.9, 120.2, 118.6, 115.6, 108.0, 103.8, 77.3, 47.5, 47.3, 45.1, 44.8, 39.8, 38.2, 35.0, 34.3, 33.7, 29.8, 28.2, 27.6, 27.2, 27.1. **ESI-TOF** calculado para C<sub>112</sub>H<sub>188</sub>N<sub>22</sub>O<sub>24</sub>K<sup>2+</sup>, 1132.9822, [M + K]<sup>2+</sup> experimental, 1133.1937.

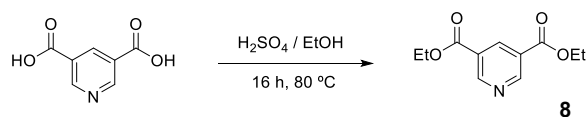
### Síntesis de DG2Naft



Bajo condiciones anhidras, se disuelve **DG2Naft-NHBoc** (105 mg, 0.047 mmol, 1eq.) en THF (5 mL) y se enfría en baño de hielo. Posteriormente se añade, gota a gota, HCl 4M:dioxano (2 mL) y se mantiene en agitación durante 16h. Tras este tiempo se elimina completamente el disolvente bajo presión reducida y el crudo obtenido se purifica mediante una columna pre-empaquetada de Sephadex™ G10 para dar lugar a **DG2Naft** (79 mg, cuantitativamente) como un sólido amarillo.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.74 – 7.80 (m, 23H), 4.64 – 4.34 (m, 4H), 4.33 – 4.17 (m, 2H), 4.11 – 3.90 (m, 4H), 3.15 – 2.89 (m, 8H), 2.85 – 2.63 (m, 16H), 2.34 – 2.05 (m, 10H), 1.64 – 1.10 (m, 48H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 173.9, 173.8, 163.8, 162.9, 157.9, 145.8, 144.7, 134.4, 130.5, 129.4, 124.1, 122.85, 122.5, 121.7, 120.1, 107.7, 103.6, 47.6, 47.3, 44.9, 44.1, 38.5, 36.9, 35.1, 34.2, 30.0, 29.2, 28.7, 27.2, 24.8. **MALDI** calculado para C<sub>72</sub>H<sub>124</sub>N<sub>22</sub>O<sub>8</sub>Na<sup>+</sup> 1448.9, [M+Na]<sup>+</sup> experimental 1449.5. **UV** (H<sub>2</sub>O): λ<sub>max</sub> nm (ε, cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>): 258 (31361), 284 (27749), 447 (20682).

### Síntesis de 3,5-bis(etoxicarbonil)piridina (**8**)

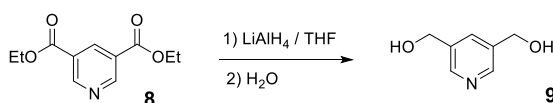


El compuesto **8** se ha sintetizado tal y como se describe en bibliografía.<sup>169</sup> Para ello se disuelve el ácido 3,5-piridindicarboxílico (12 g, 72 mmol, 1 eq.) en EtOH absoluto (150 mL) y se le añade,

gota a gota, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (24 mL, 69 mmol, 0.96 eq.). La mezcla de reacción se deja 16h a reflujo. Al cabo de este tiempo se elimina el disolvente, se añaden 60 mL de hielo-agua y se neutraliza con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M hasta pH 10. La fase acuosa resultante se extrae con Et<sub>2</sub>O (5 x 80 mL), se seca la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente a vacío dando lugar a **8** (10.8 g, 67%) como un aceite amarillo.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 9.36 (s, 2 H), 8.86 (s, 1 H), 4.45 (c, *J* = 7.1 Hz, 4 H), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 6 H).

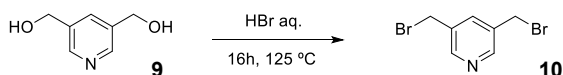
### Síntesis de 3,5-bis(hidroximetil)piridina (**9**)



Este compuesto se sintetiza como se recoge en bibliografía.<sup>169</sup> Se disuelve **8** (4 g, 18 mmol, 1 eq.) en THF (20 mL) y se añade, gota a gota bajo agitación vigorosa, una suspensión de LiAlH<sub>4</sub> (2.3 g, 59 mmol, 3.3 eq.) en THF (100 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. Después se adicionan, lentamente, 30 mL de H<sub>2</sub>O para hidrolizar el exceso de LiAlH<sub>4</sub>. Aparece un precipitado blanco que se filtra y el filtrado se evapora a vacío. El producto **9** se purifica por cromatografía en columna con DCM:MeOH 9:1 dando lugar a un aceite incoloro (960 mg, 38%).

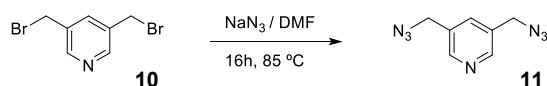
**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.38 (s, 2 H), 7.66 (s, 1 H), 5.31 (t, *J* = 5.7 Hz, 2 H), 4.53 (d, *J* = 5.7 Hz, 4 H).

### Síntesis de 3,5-bis(bromoetil)piridina (**10**)



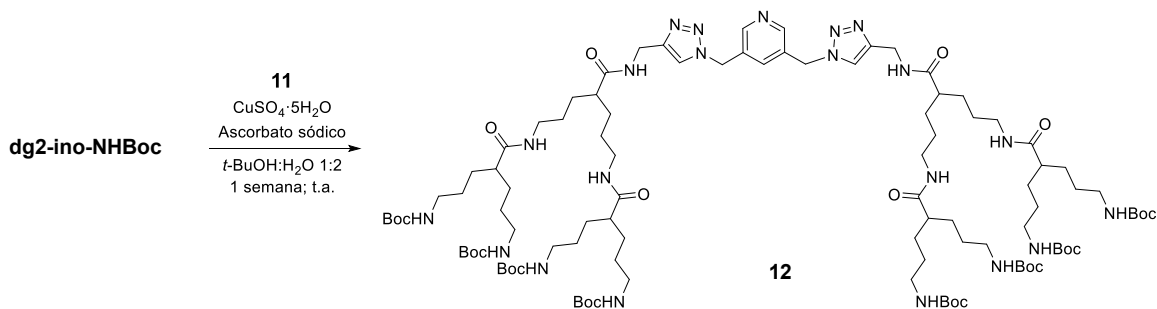
La síntesis del compuesto **10** se ha llevado a cabo tal y como se describe en bibliografía.<sup>169</sup> Para ello se añade el compuesto **9** (960 mg, 6.9 mmol, 1 eq.) a una disolución de HBr al 60% (10 mL) y la mezcla de reacción se calienta a 125°C durante 16h. Posteriormente se deja enfriar y se adicionan 50 mL de H<sub>2</sub>O para dar lugar a una disolución amarilla a la cual se le añade Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hasta pH 8. La solución acuosa resultante se extrae con DCM (4 x 50 mL), la fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente a vacío obteniéndose **10** (1.3 g, 73 %) como un aceite incoloro.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 8.54 (s, 2 H), 7.75 (s, 1 H), 4.45 (s, 4 H).

**Síntesis de 3,5-bis(azidometil)piridina (11)**

Se disuelve **10** (343 mg, 1.3 mmol, 1 eq.) en DMF (5 mL) y se calienta a 85°C durante 16h. Tras este tiempo, la mezcla de reacción se deja enfriar, se añaden 80 mL de H<sub>2</sub>O y se extrae con DCM (5 x 25 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente a vacío dando lugar a **11** (204 mg, 83 %) como un aceite marrón. Por IR se observa la banda característica del grupo azida a 2089 cm<sup>-1</sup>.

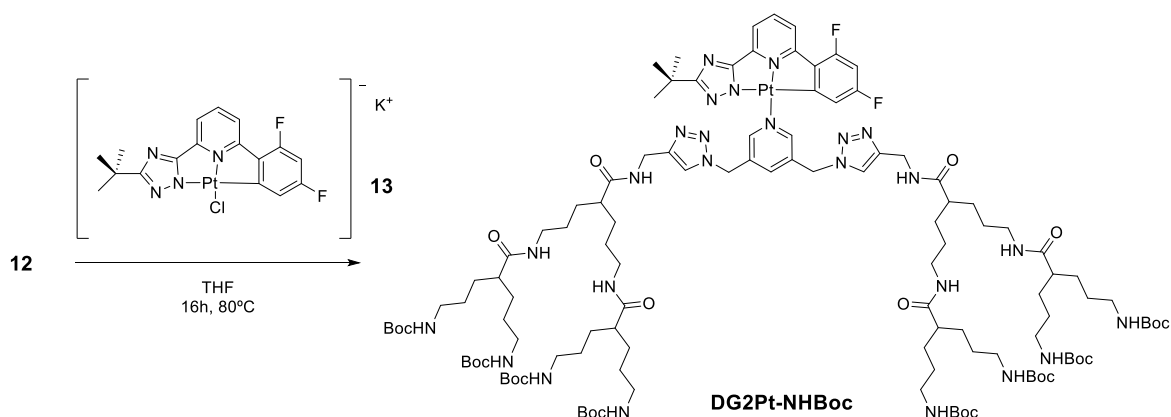
**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 8.55 (s, 2 H), 7.65 (s, 1 H), 4.44 (s, 4 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 149.3, 135.3, 131.6, 52.0. **ESI-TOF** calculado para C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>7</sub>H<sup>+</sup> 190.0841, [M + H]<sup>+</sup> experimental 190.0836.

**Síntesis del compuesto 12**

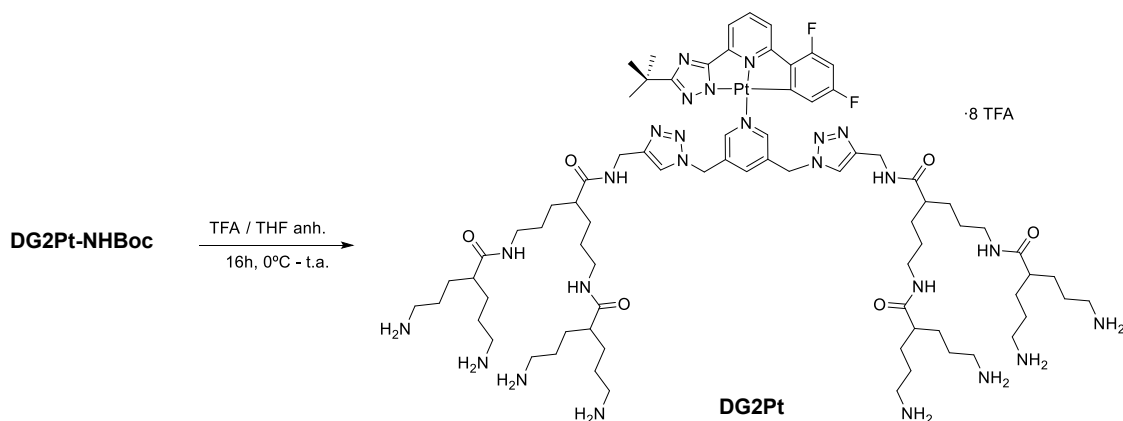
Se disuelven **dg2-ino-NHBoc** (586 mg, 0.63 mmol, 2.2 eq.), **11** (54.5 mg, 0.29 mmol, 1 eq.), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (7.3 mg, 0.029 mmol, 0.1 eq.) y la sal sódica del ácido L(+)-ascórbico (23 mg, 0.116 mmol, 0.4 eq.) en una mezcla de *tert*-butanol: agua 1:2 (18 mL) y se deja en agitación durante una semana. Tras este tiempo, se elimina el disolvente, el crudo se disuelve en DCM (50 mL) y se lava con NH<sub>4</sub>OH 25% (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se concentra en rotavapor y se eliminan las trazas de disolvente a presión reducida para obtener el compuesto **12** (488 mg, 83 %) como un sólido amarillo.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 8.58 – 7.93 (m, 4 H), 5.70 – 5.57 (m, 4 H), 4.36 – 4.16 (m, 4 H), 3.10 – 2.91 (m, 8 H), 2.91 – 2.76 (m, 16 H), 2.18 – 1.96 (m, 6 H), 1.51 – 1.10 (m, 120 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 174.8, 174.5, 148.9, 145.5, 135.5, 131.8, 123.0, 49.9, 45.1, 44.7, 38.3, 38.0, 34.1, 29.9, 29.8, 28.2, 27.6, 27.2. **ESI-TOF** calculado para C<sub>101</sub>H<sub>177</sub>N<sub>21</sub>O<sub>22</sub>K<sup>2+</sup>, 1038.3752, [M + K]<sup>2+</sup> experimental, 1038.6558.

## Síntesis de DG2Pt



El compuesto **12** (98 mg, 0.048 mmol, 1 eq.) y el compuesto **13**<sup>71</sup> (28 mg, 0.048 mmol, 1 eq.) se disuelven en THF (10 mL) y la mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 16h. Tras ese tiempo, se elimina el disolvente a vacío, se disuelve el residuo en EtOAc (30 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida.



El compuesto obtenido anteriormente se disuelve en THF anhidro (5 mL) y se enfría en baño de hielo donde se adiciona, gota a gota, TFA (2 mL) y se deja en agitación durante 16h. Después de este tiempo, se elimina el disolvente a vacío, el residuo se disuelve en 10 mL de EtOAc y se extrae con H<sub>2</sub>O (3 x 10 mL). La fase acuosa se liofiliza y el sólido resultante se purifica con una columna pre-empaquetada de sephadex<sup>TM</sup> G-10 para obtener **DG2Pt** (31 mg, 34%) como una sal de amonio.

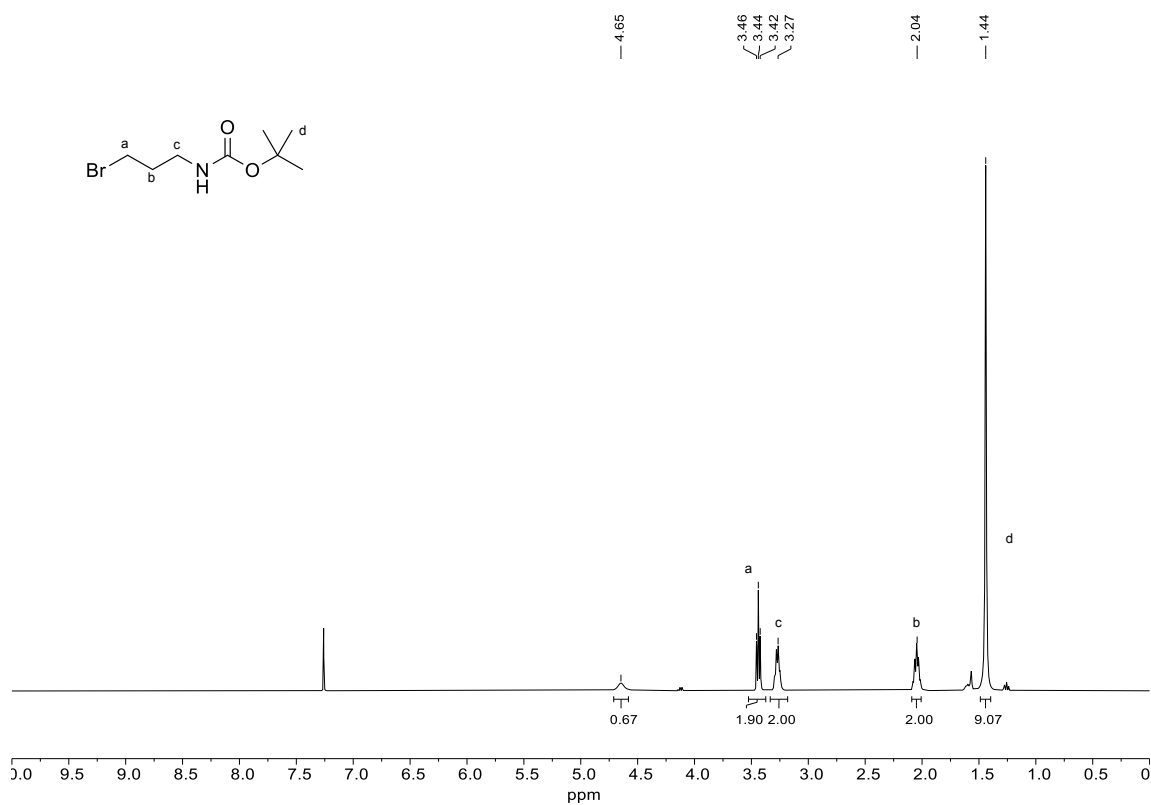
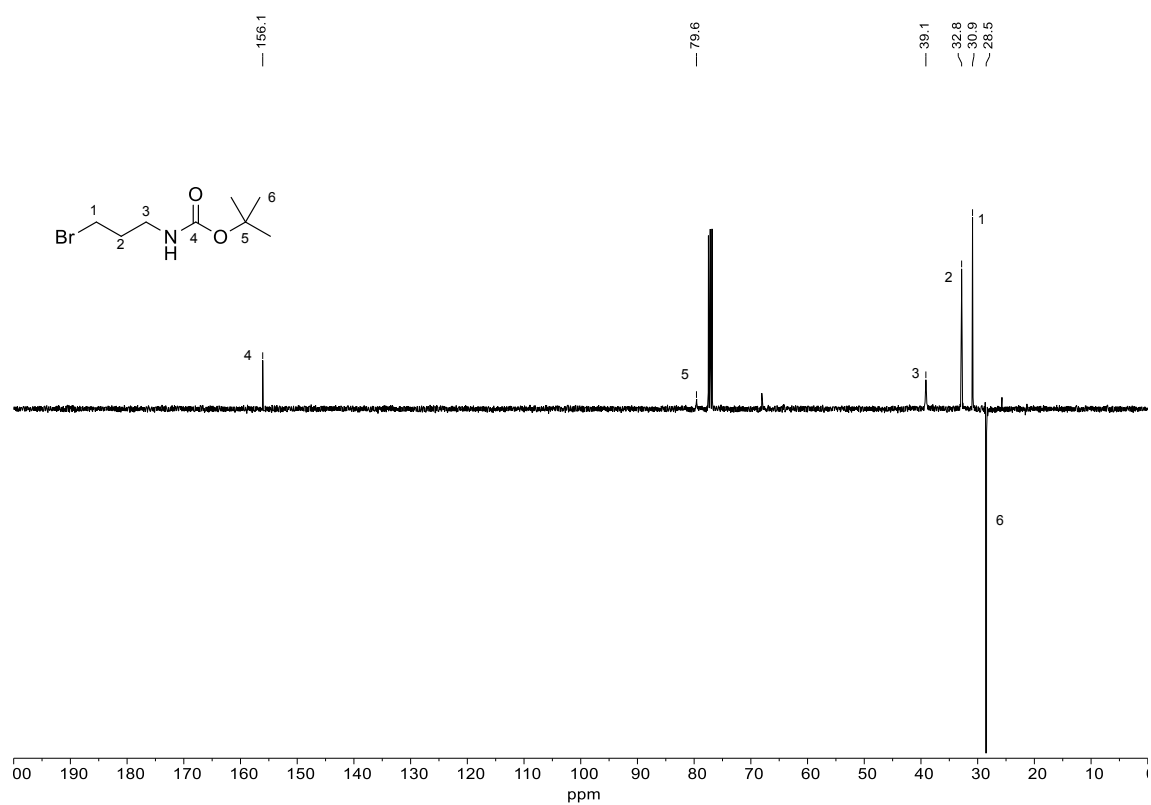
**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm: 8.96 – 7.74 (m, 10 H), 5.74 (s, 4 H), 3.36 – 3.10 (m, 8 H), 3.09 – 2.90 (m, 16 H), 2.45 – 2.22 (m, 6 H), 1.78 – 1.22 (m, 57 H). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  ppm: 178.0, 177.6, 158.3, 158.1, 148.2, 147.8, 146.7, 145.5, 145.2, 142.3, 140.3, 137.5, 137.4, 132.3, 124.6, 123.8, 122.8, 117.6, 115.7, 115.6, 52.5, 51.1, 46.3, 46.1, 39.5, 39.2, 34.4, 29.6, 29.1, 27.9, 26.7, 25.0. **MALDI** calculado para C<sub>78</sub>H<sub>127</sub>F<sub>2</sub>N<sub>25</sub>O<sub>6</sub>PtNa<sup>+</sup> 2564.3, [M+Na]<sup>+</sup> experimental 2564.1. **UV** (H<sub>2</sub>O):  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon$ , cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>): 246 (40615), 349 (40095).



# ANEXO



## Espectros de Resonancia Magnética Nuclear

Figura 139. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de *tert*-butil (3-bromopropil)carbamato (1) en CDCl<sub>3</sub>.Figura 140. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de *tert*-butil (3-bromopropil)carbamato (1) en CDCl<sub>3</sub>.

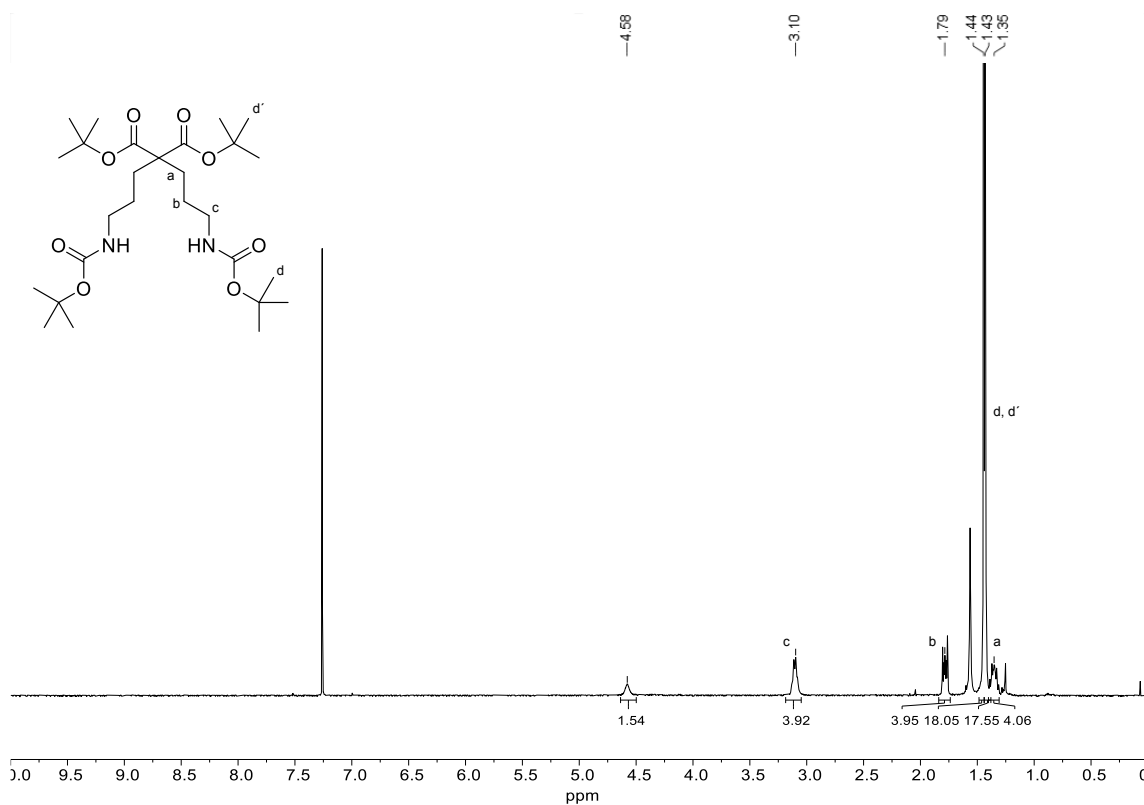


Figura 141. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de *di-tert-butil 2,2-bis(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propil)malonato (2)* en CDCl<sub>3</sub>.

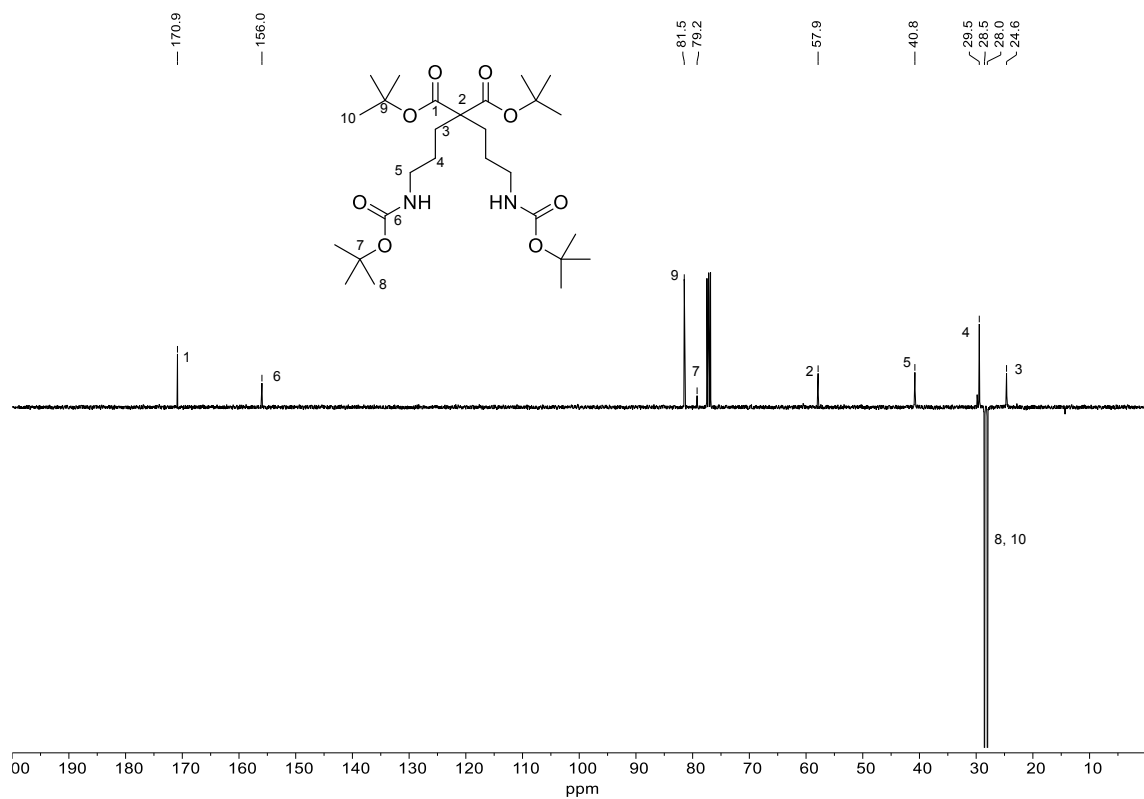


Figura 142. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de *di-tert-butil 2,2-bis(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propil)malonato (2)* en CDCl<sub>3</sub>.

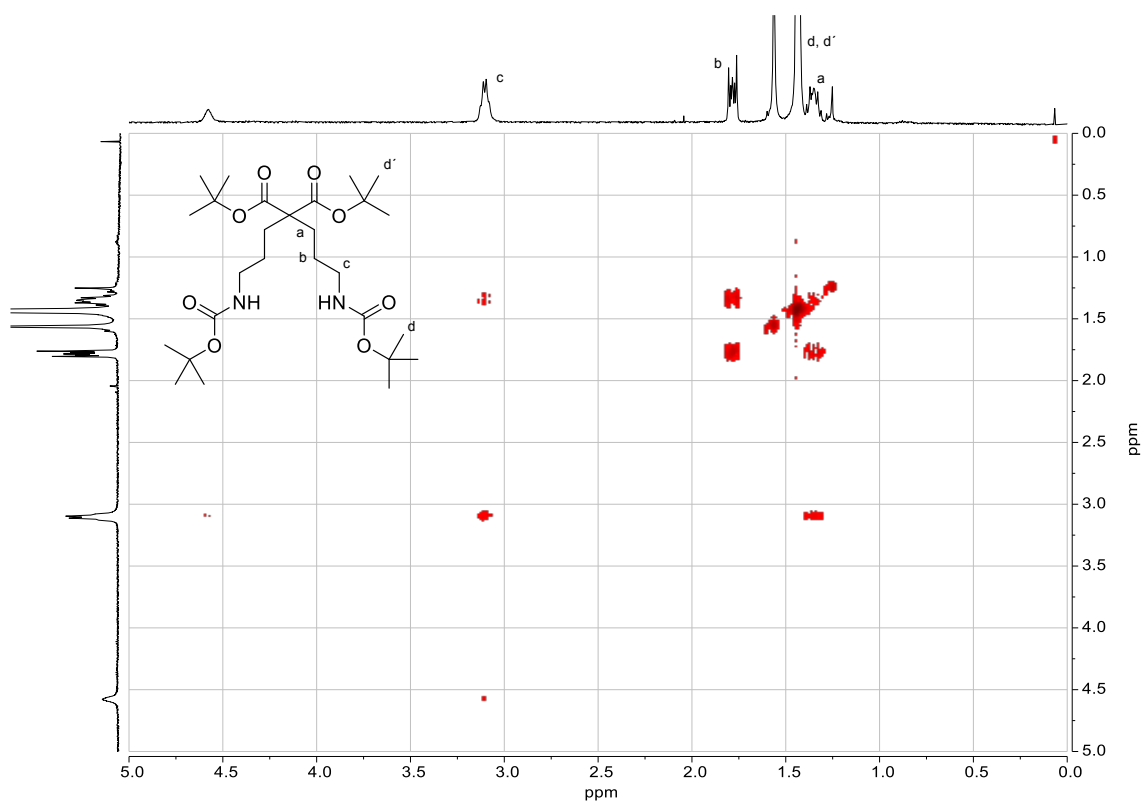


Figura 143. Espectro COSY de *di-tert-butyl 2,2-bis(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)malonato (2)* en  $CDCl_3$ .

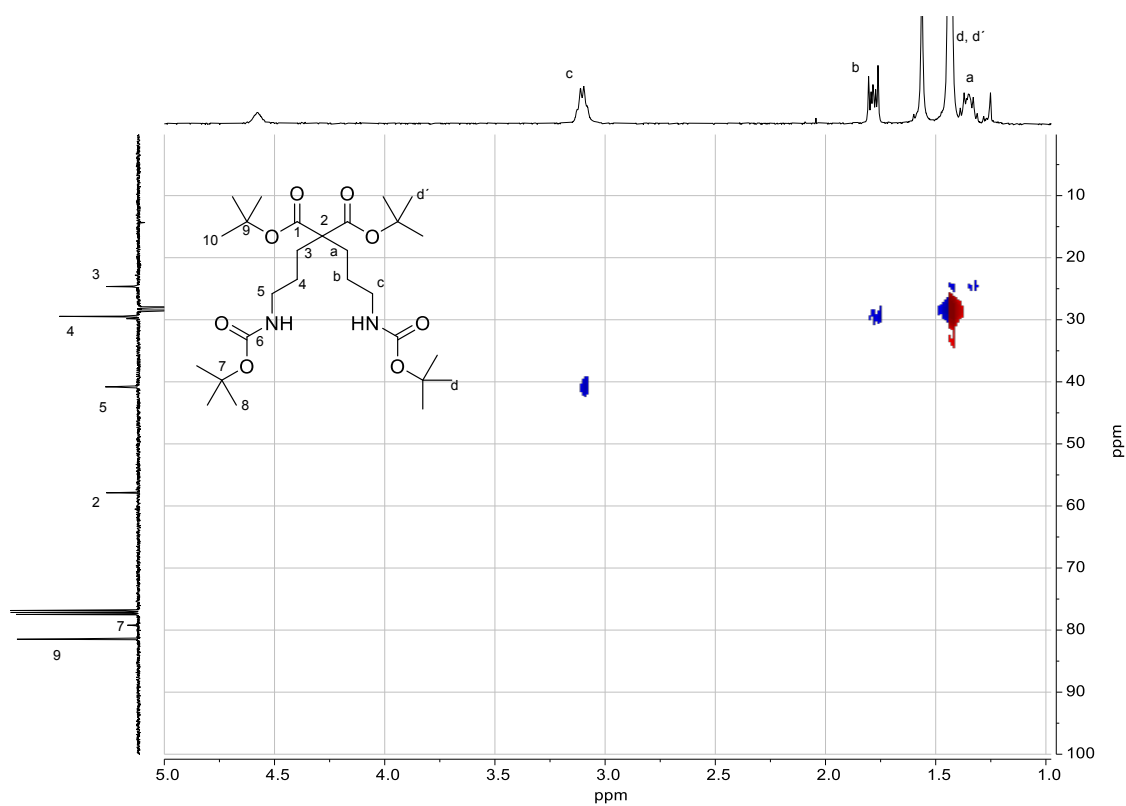


Figura 144. Espectro HSQC de *di-tert-butyl 2,2-bis(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)malonato (2)* en  $CDCl_3$ .

Anexo

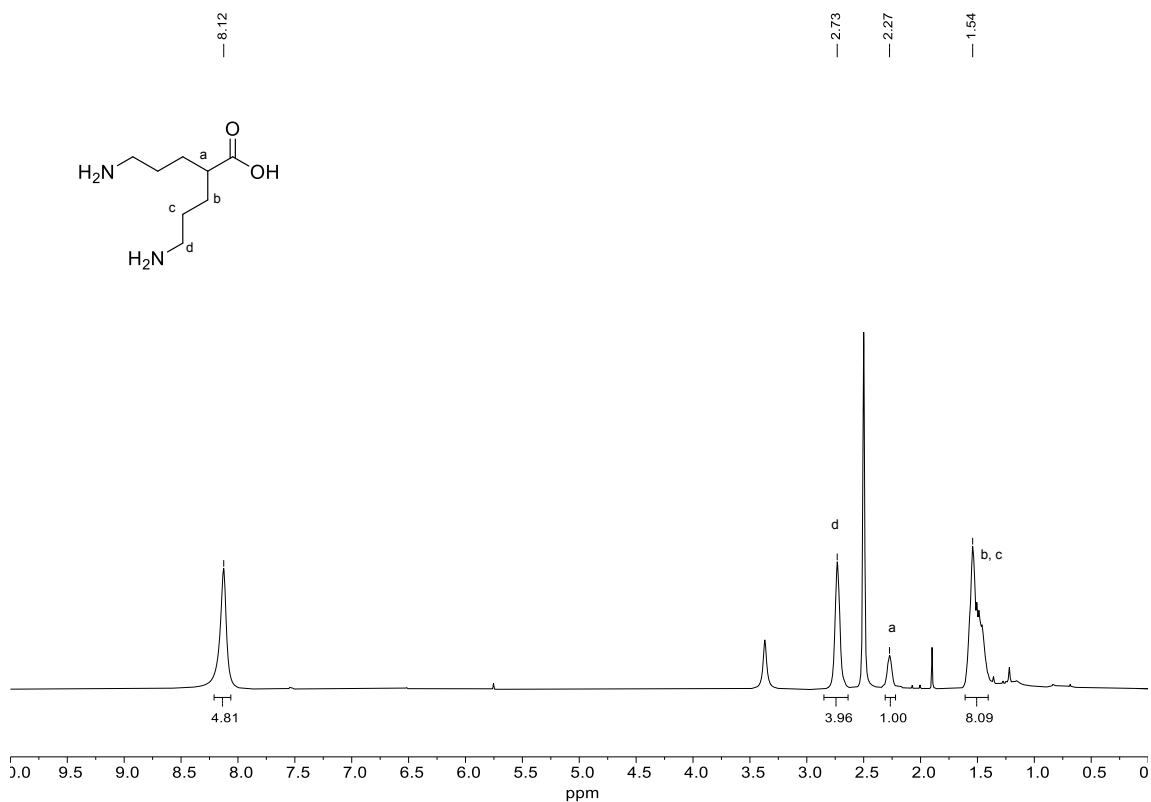


Figura 145. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de ácido 5-amino-2-(3-aminopropil) pentanoico (3) en DMSO-d<sub>6</sub>.

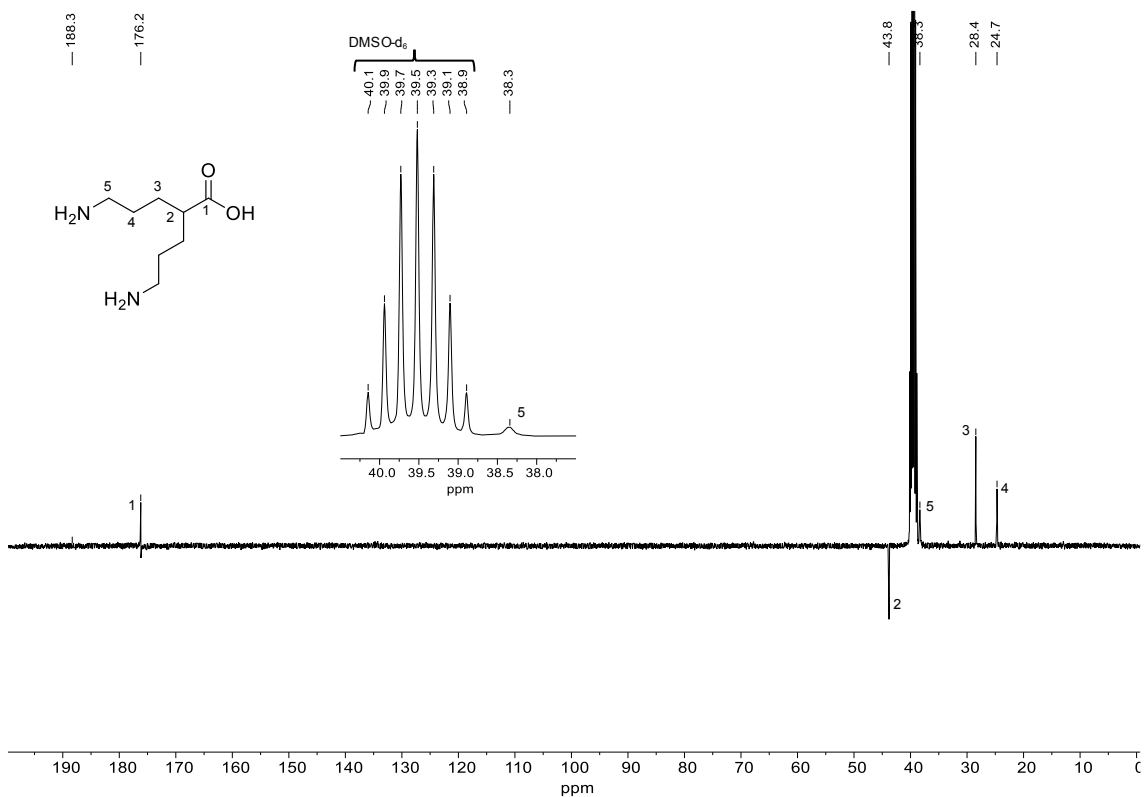


Figura 146. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de ácido 5-amino-2-(3-aminopropil) pentanoico (3) en DMSO-d<sub>6</sub>.

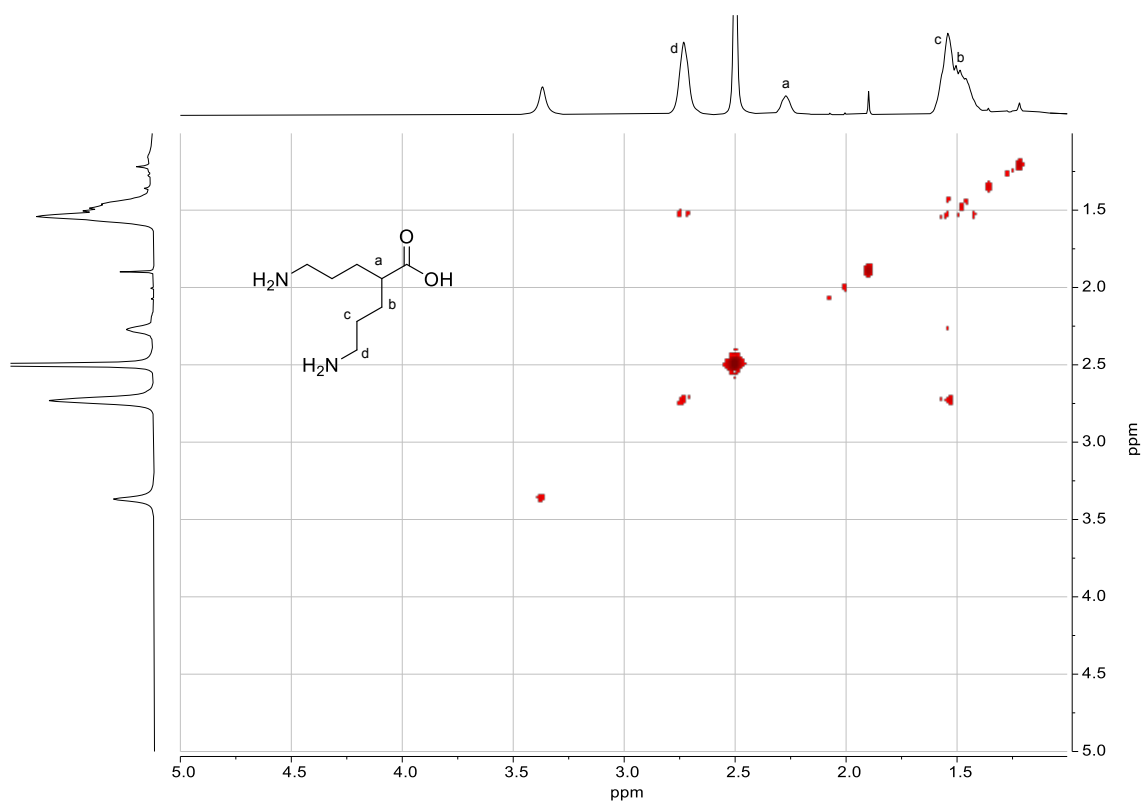


Figura 147. Espectro COSY de ácido 5-amino-2-(3-aminopropil) pentanoico (3) en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

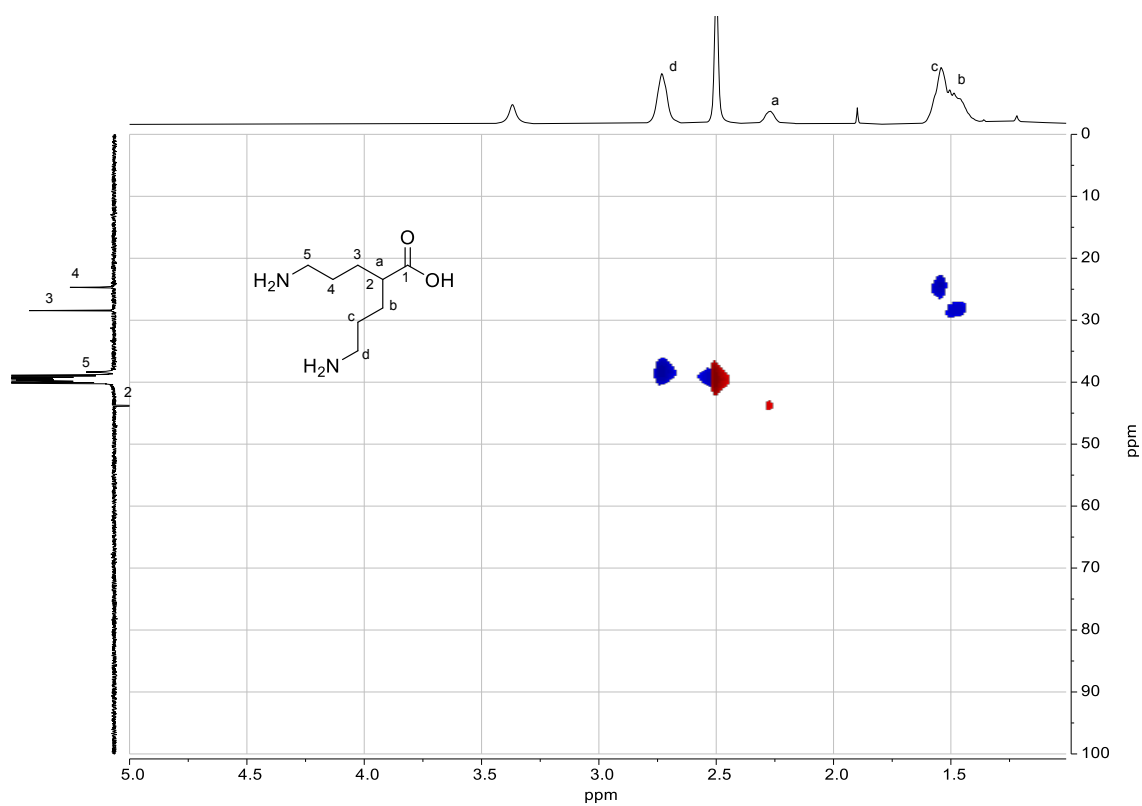


Figura 148. Espectro HSQC de ácido 5-amino-2-(3-aminopropil) pentanoico (3) en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

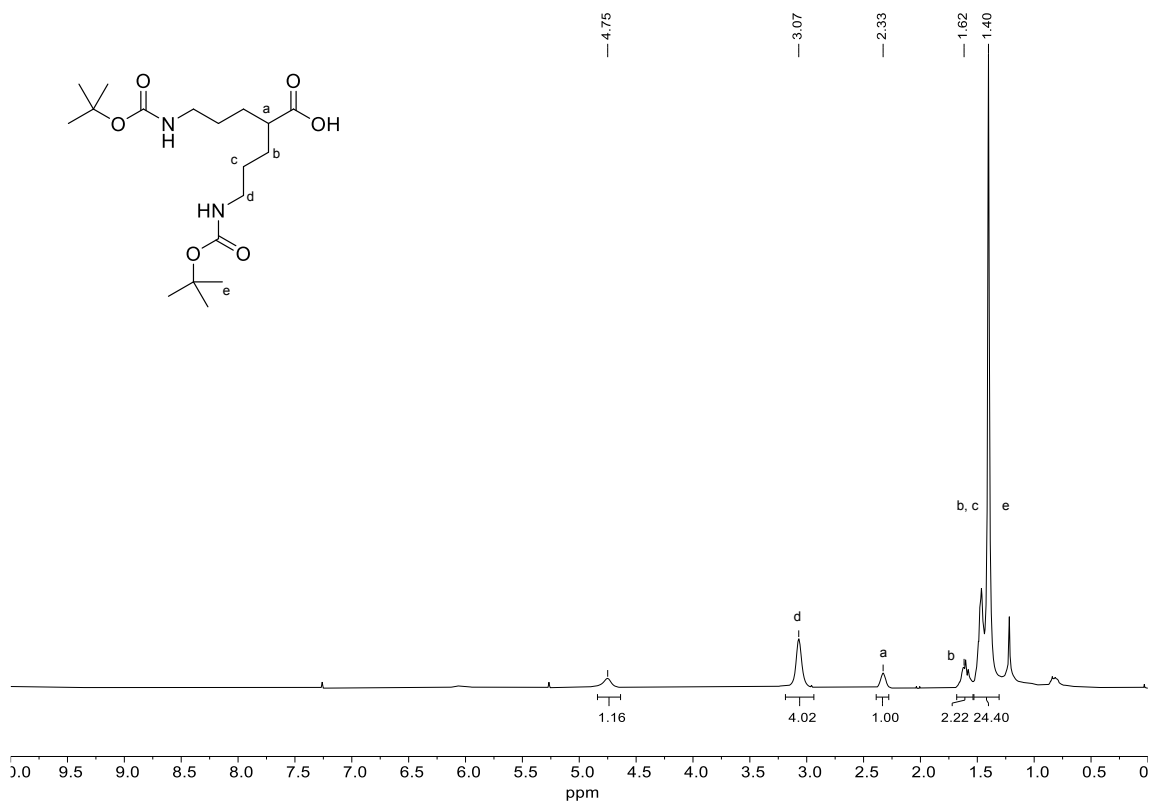


Figura 149. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de ácido 5-((*tert*-butoxicarbonyl)amino)-2-(3-(*tert*-butoxicarbonyl)amino)propil)pentanoico (4) en CDCl<sub>3</sub>.

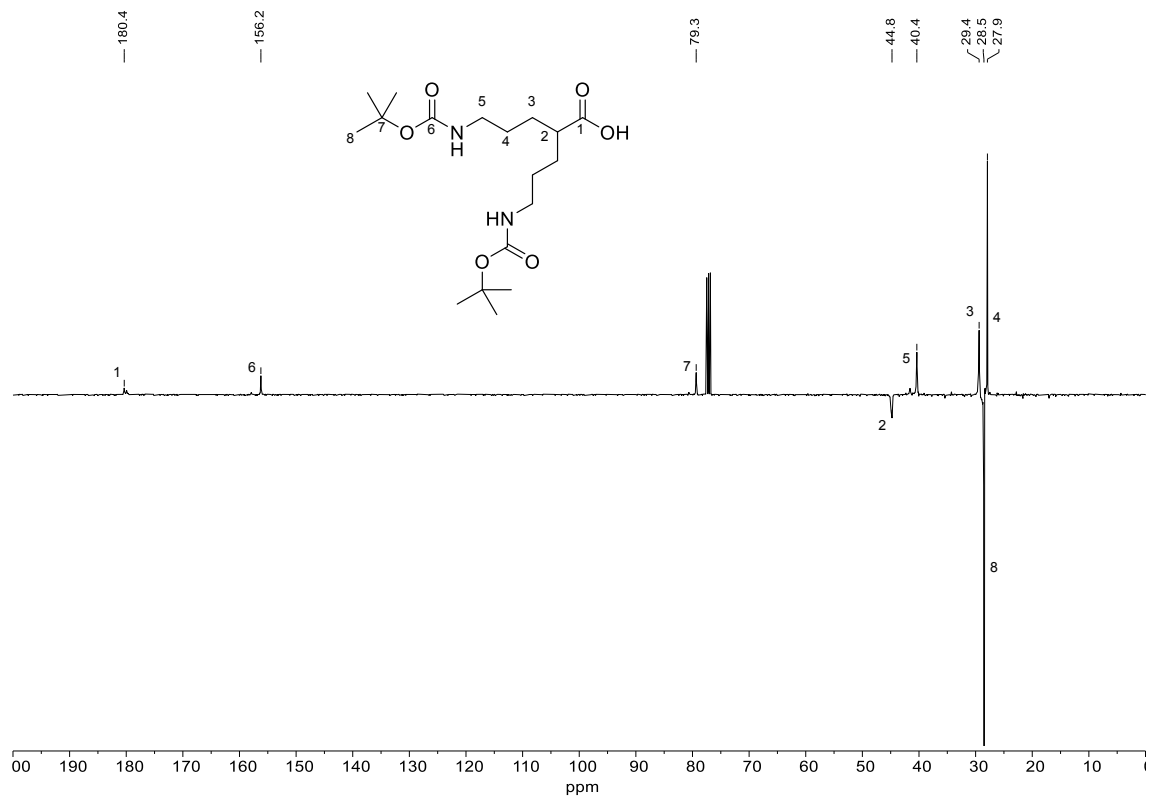


Figura 150. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de ácido 5-((*tert*-butoxicarbonyl)amino)-2-(3-(*tert*-butoxicarbonyl)amino)propil)pentanoico (4) en CDCl<sub>3</sub>.

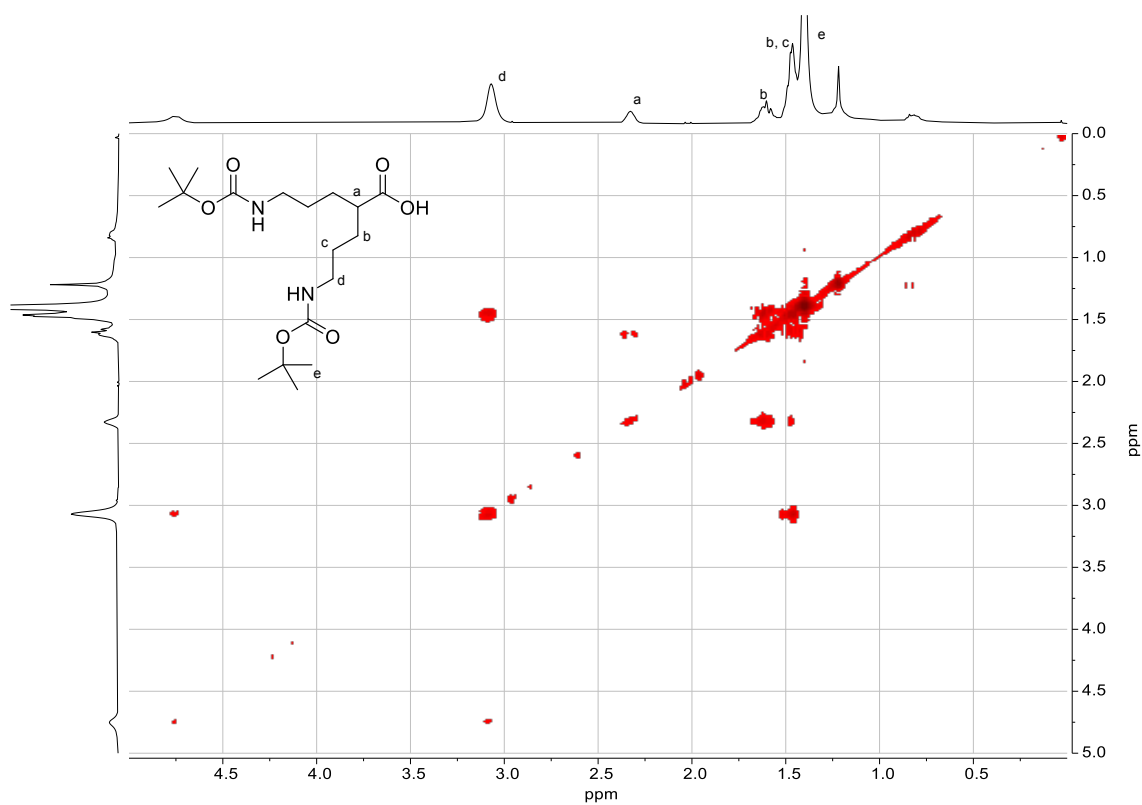


Figura 151. Espectro COSY de ácido 5-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(3-(*tert*-butoxicarbonil)amino)propil)pentanoico (4) en  $\text{CDCl}_3$ .

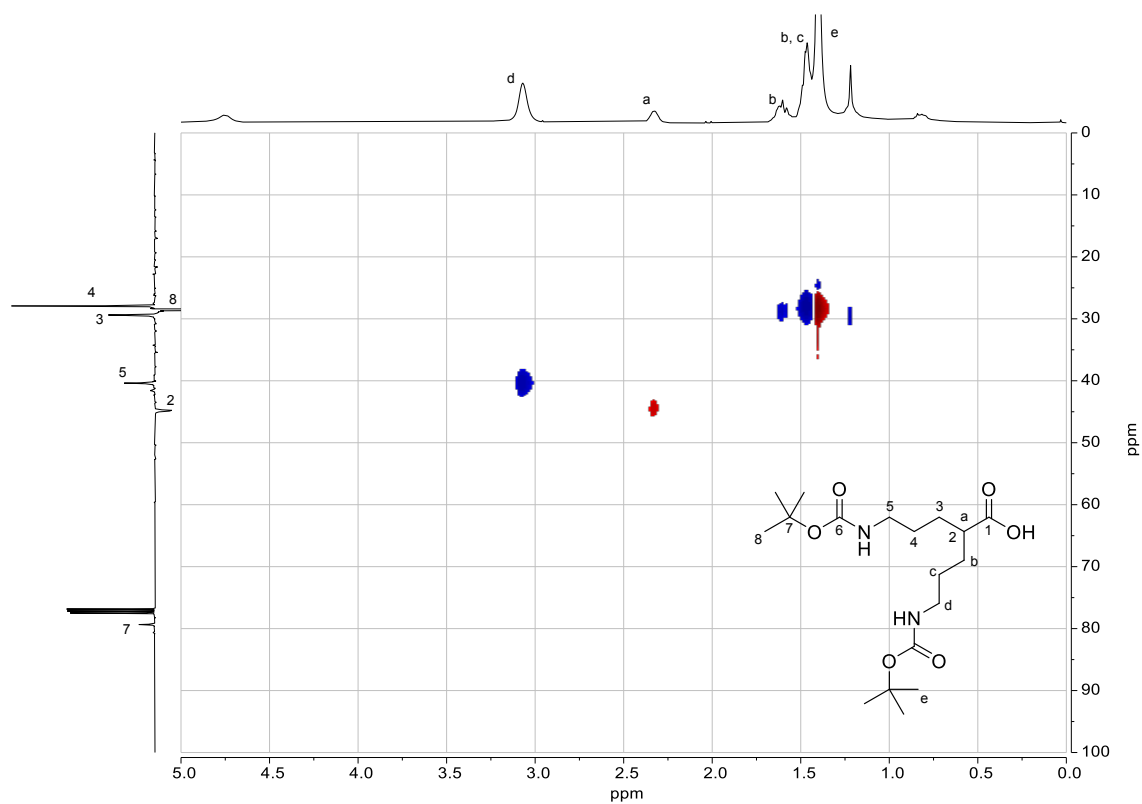


Figura 152. Espectro HSQC de ácido 5-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(3-(*tert*-butoxicarbonil)amino)propil)pentanoico (4) en  $\text{CDCl}_3$ .

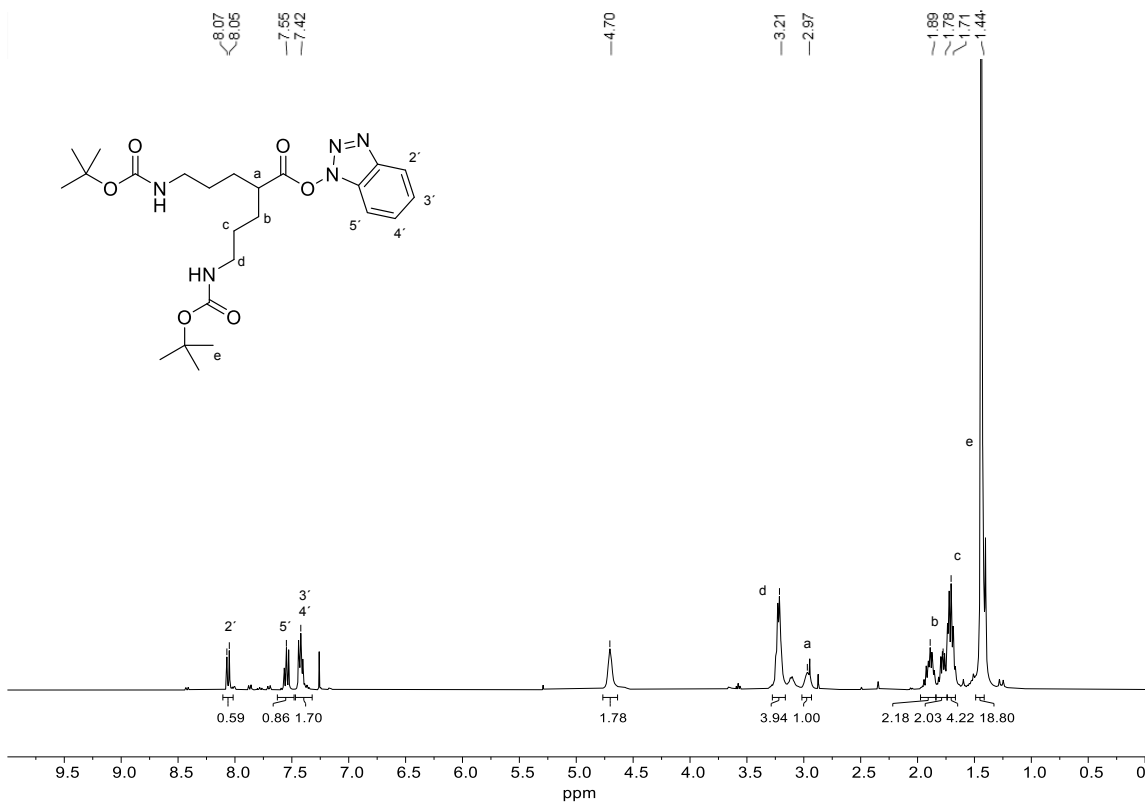


Figura 153. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 5-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propil)pentanoato de 1H-benzo[1,2,3]triazol-1-ilo (5) en CDCl<sub>3</sub>.

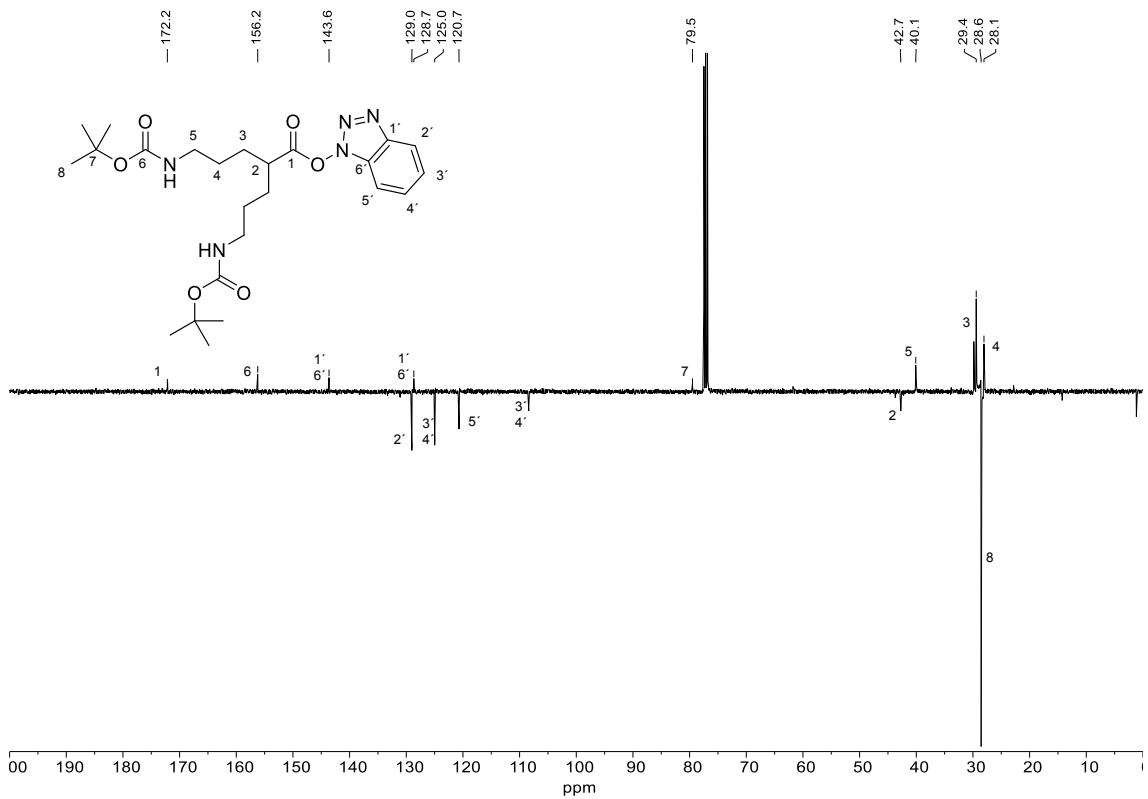


Figura 154. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de 5-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propil)pentanoato de 1H-benzo[1,2,3]triazol-1-ilo (5) en CDCl<sub>3</sub>.

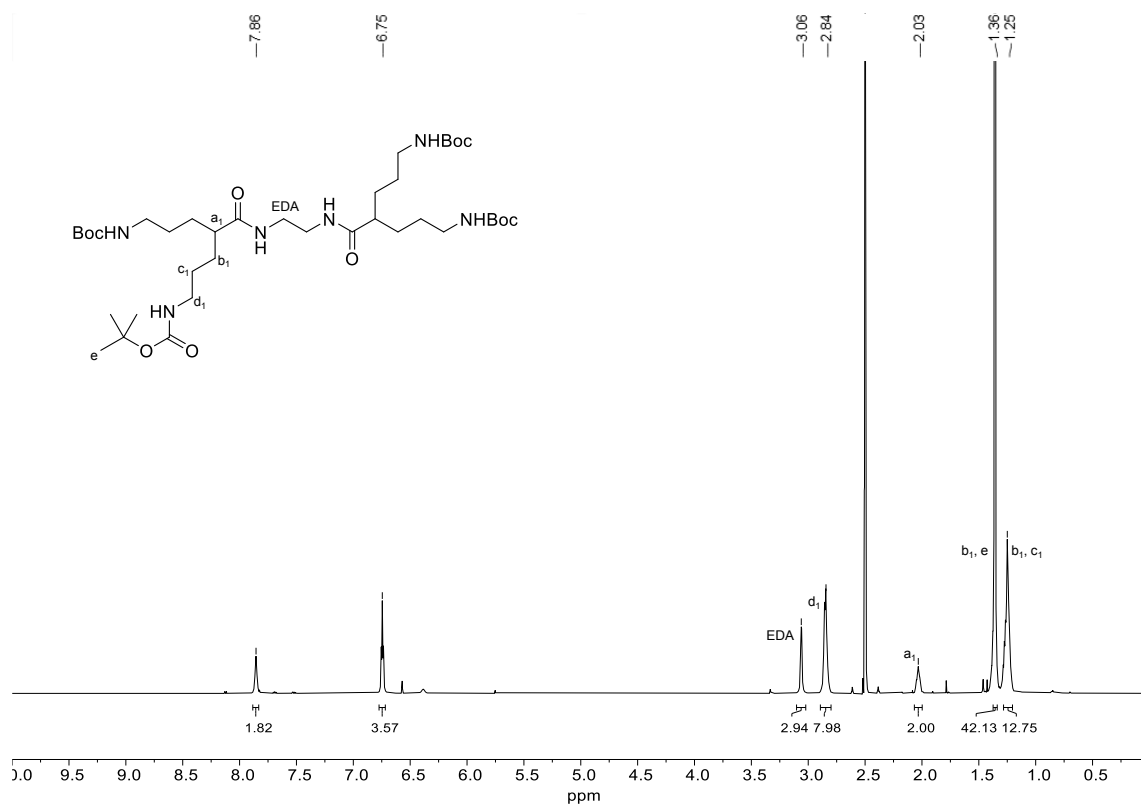


Figura 155. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **DGI-NHBoc** en DMSO-d<sub>6</sub>.

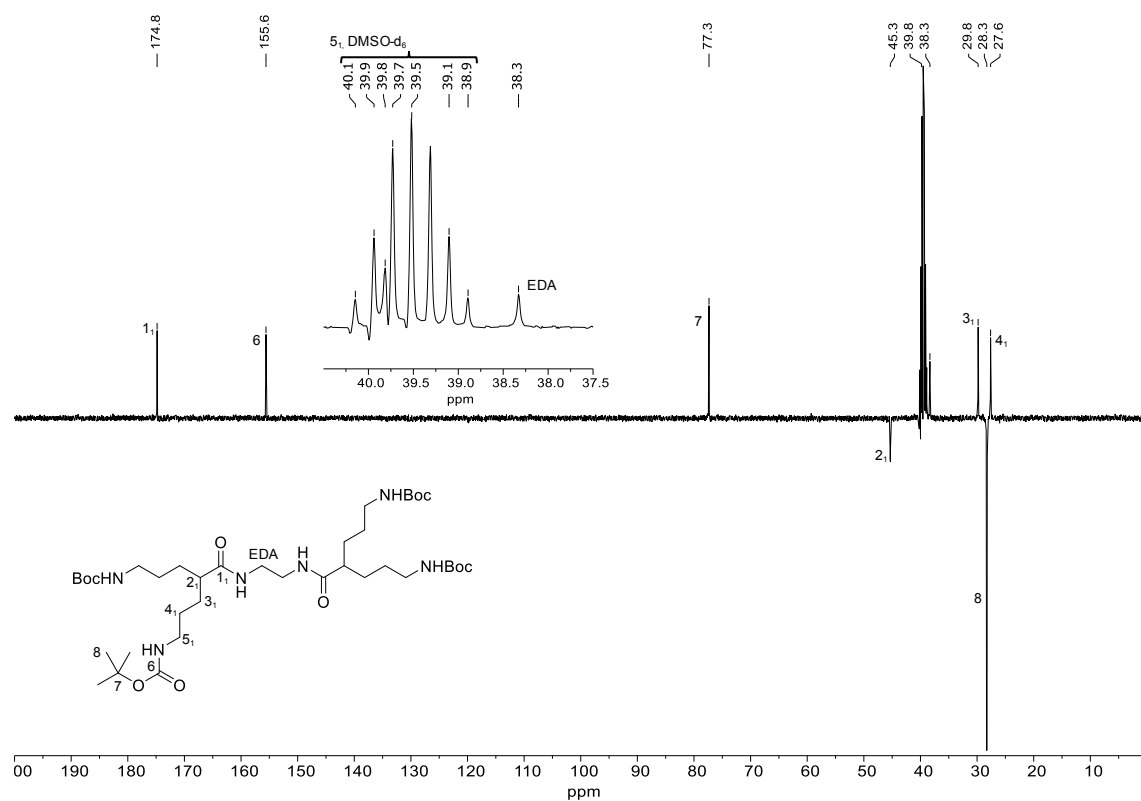


Figura 156. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DGI-NHBoc** en DMSO-d<sub>6</sub>.

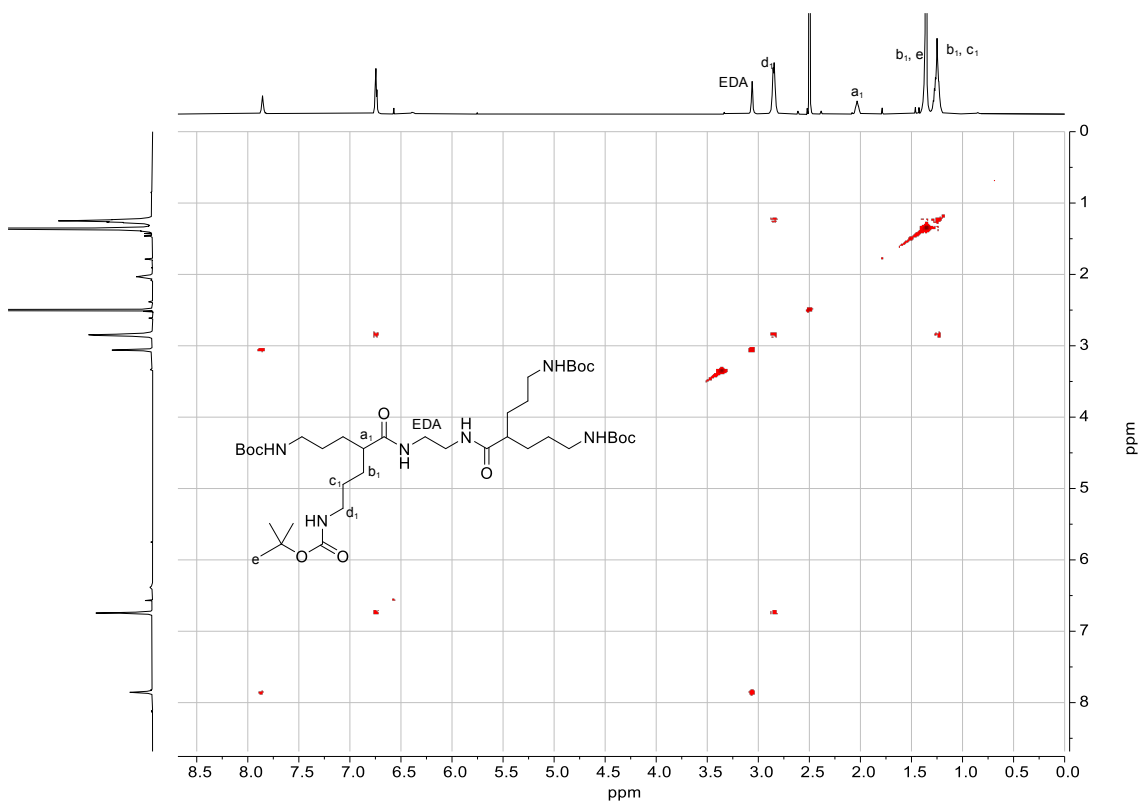


Figura 157. Espectro COSY de **DGI-NHBoc** en DMSO- $d_6$ .

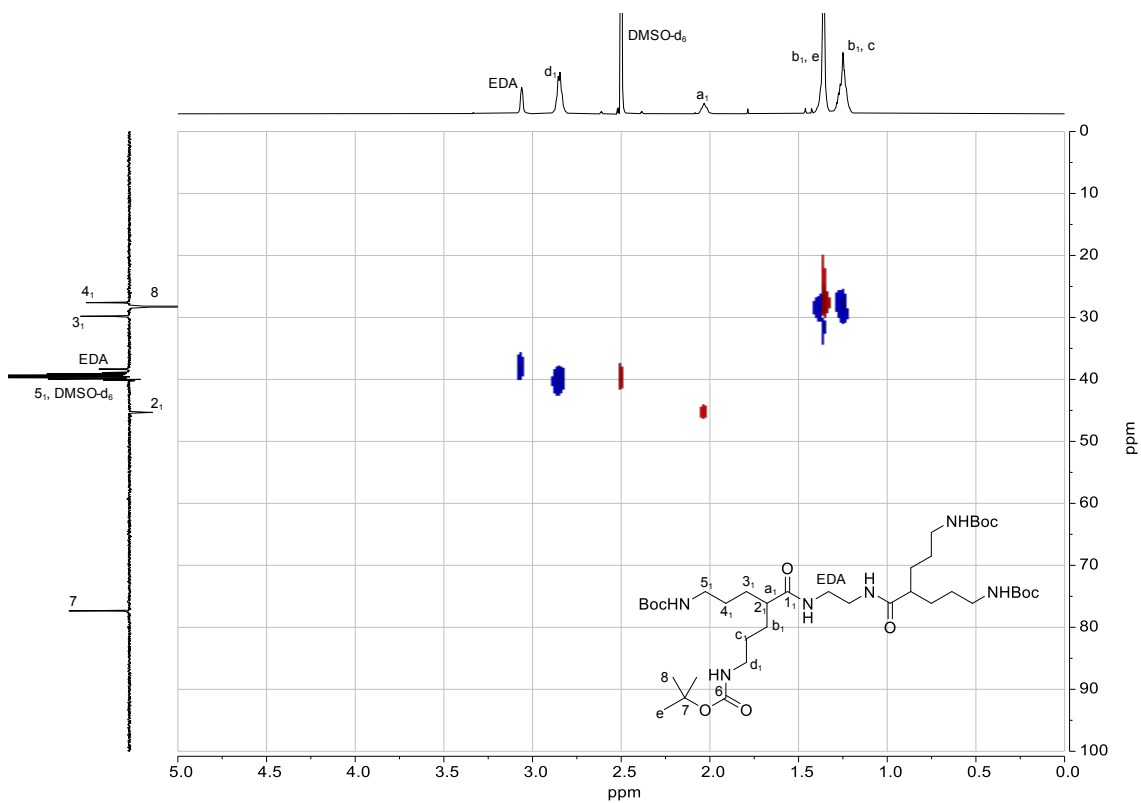


Figura 158. Espectro HSQC de **DGI-NHBoc** en DMSO- $d_6$ .

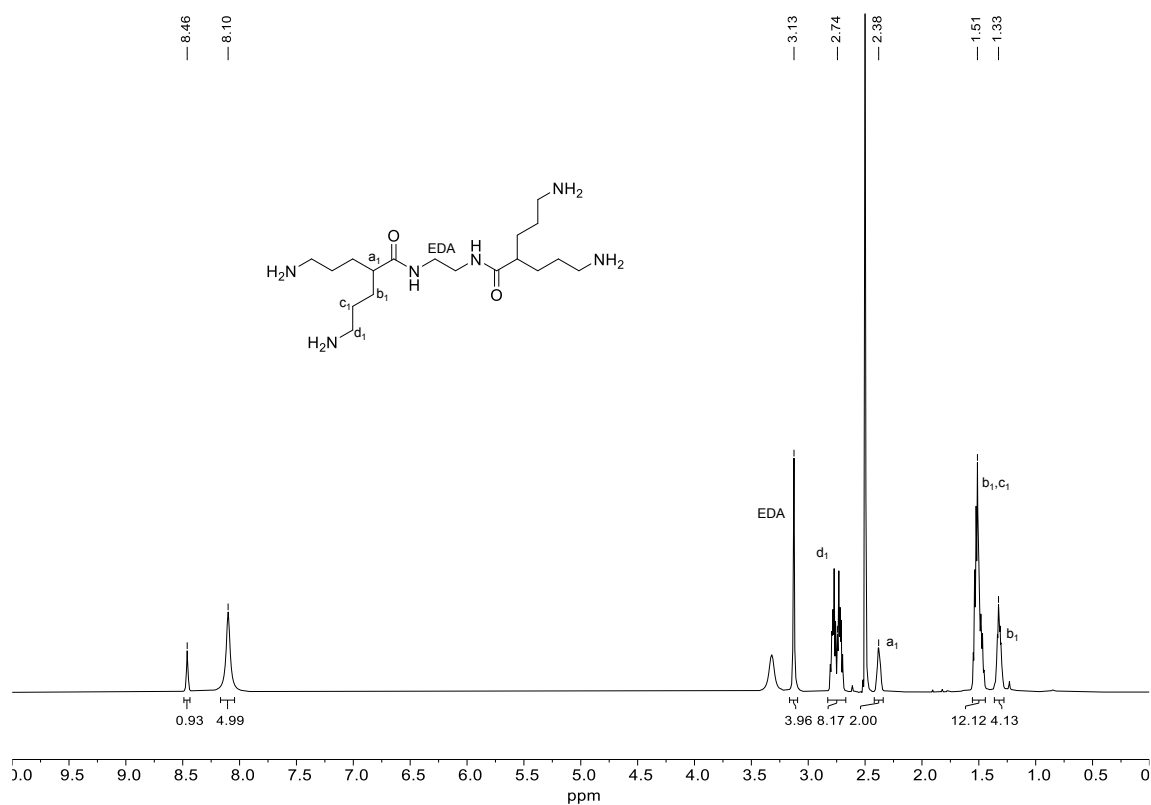


Figura 159. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **DGI** en DMSO-d<sub>6</sub>.

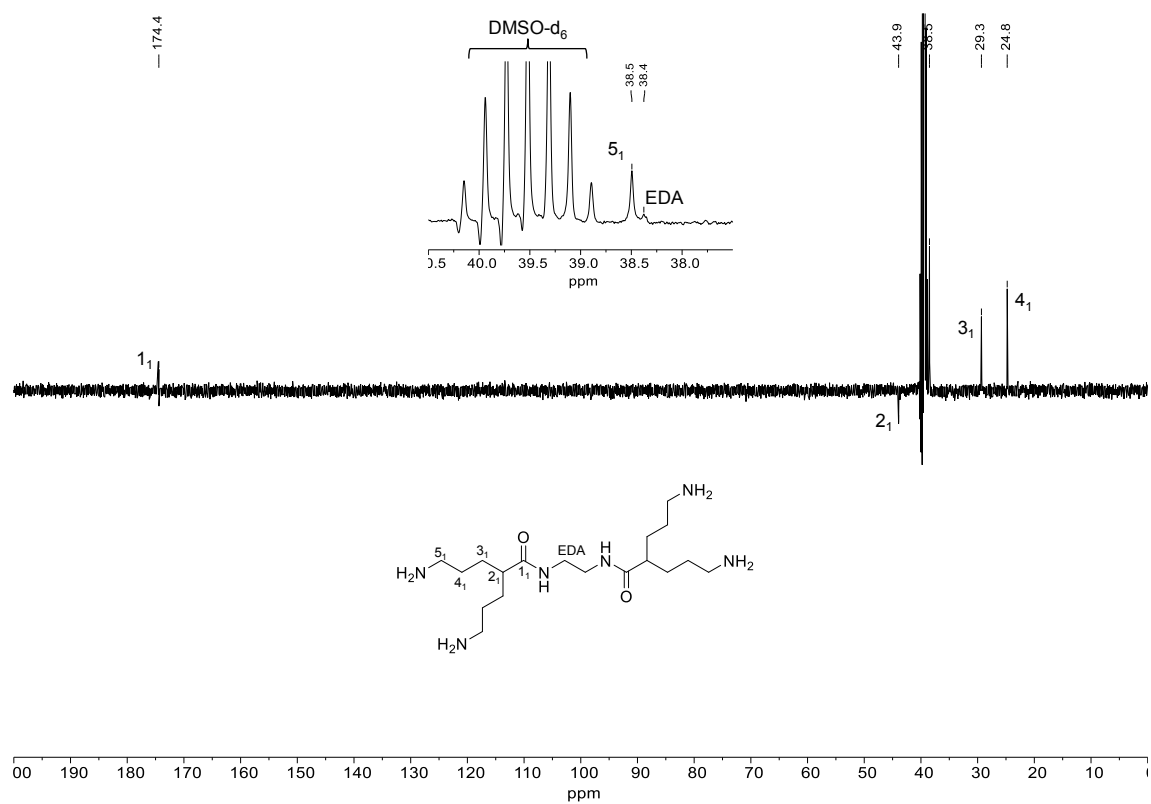


Figura 160. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DGI** en DMSO-d<sub>6</sub>.

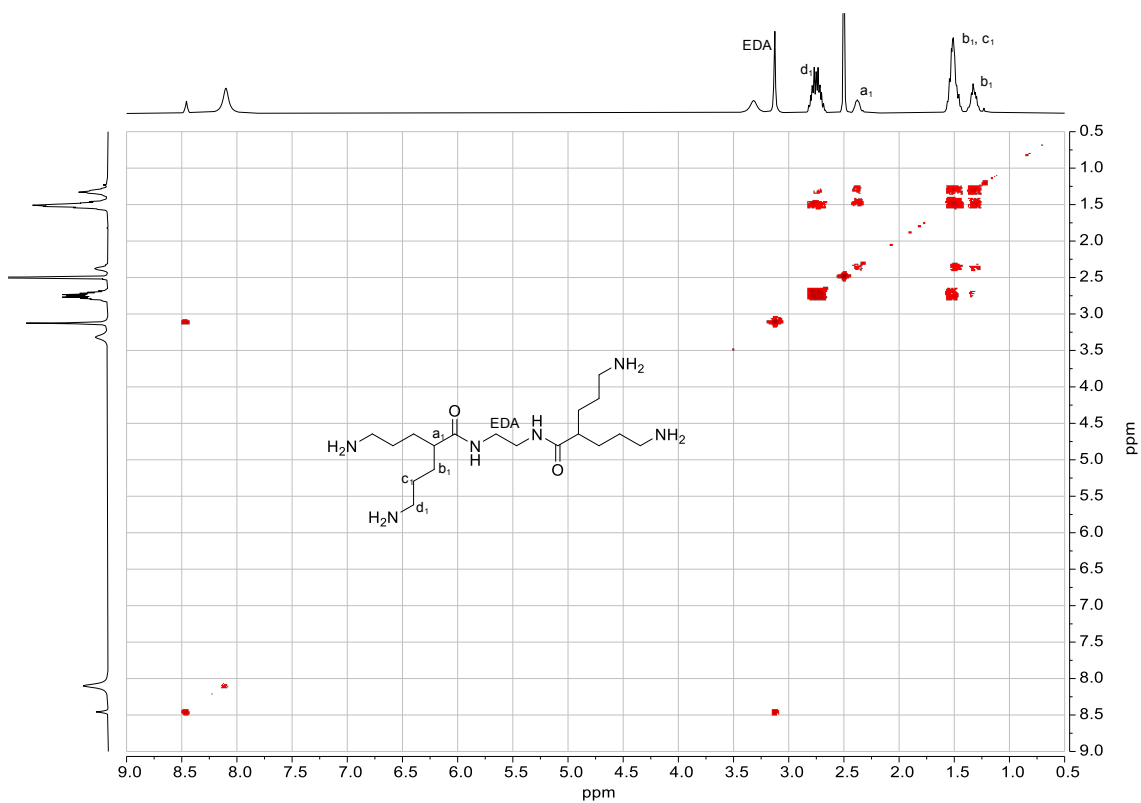


Figura 161. Espectro COSY de **DGI** en  $\text{DMSO-d}_6$ .

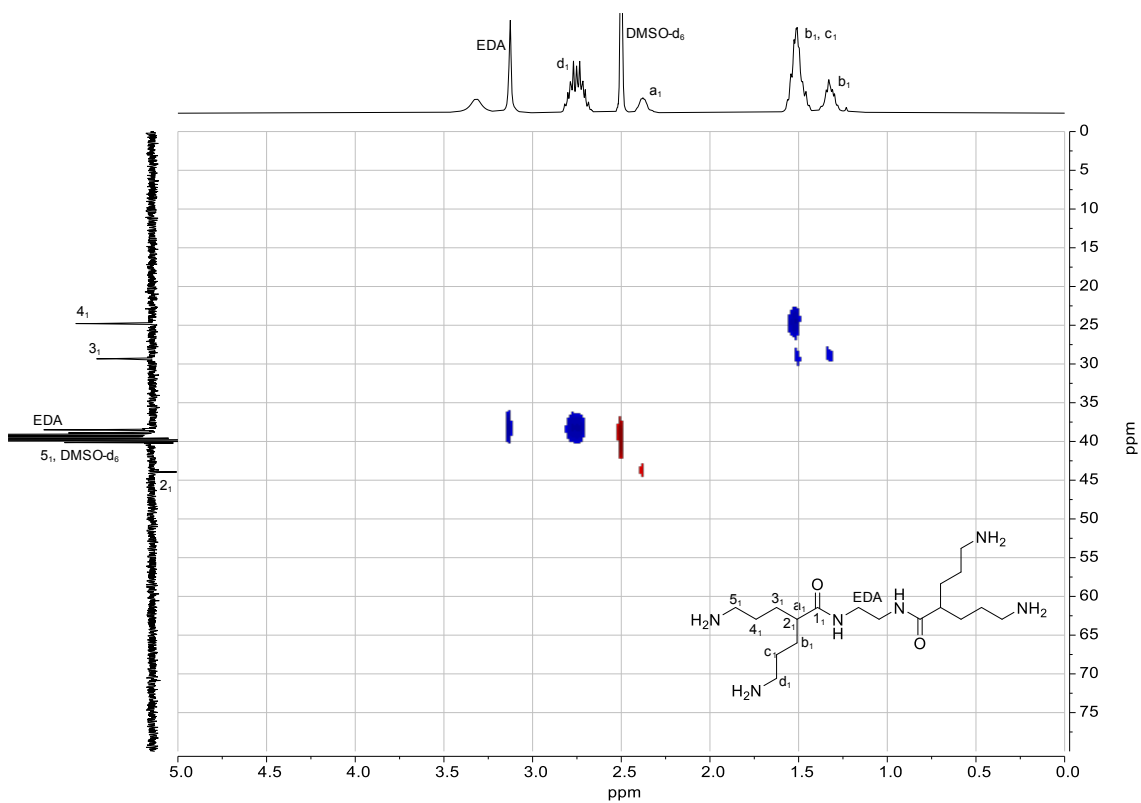


Figura 162. Espectro HSQC de **DGI** en  $\text{DMSO-d}_6$ .

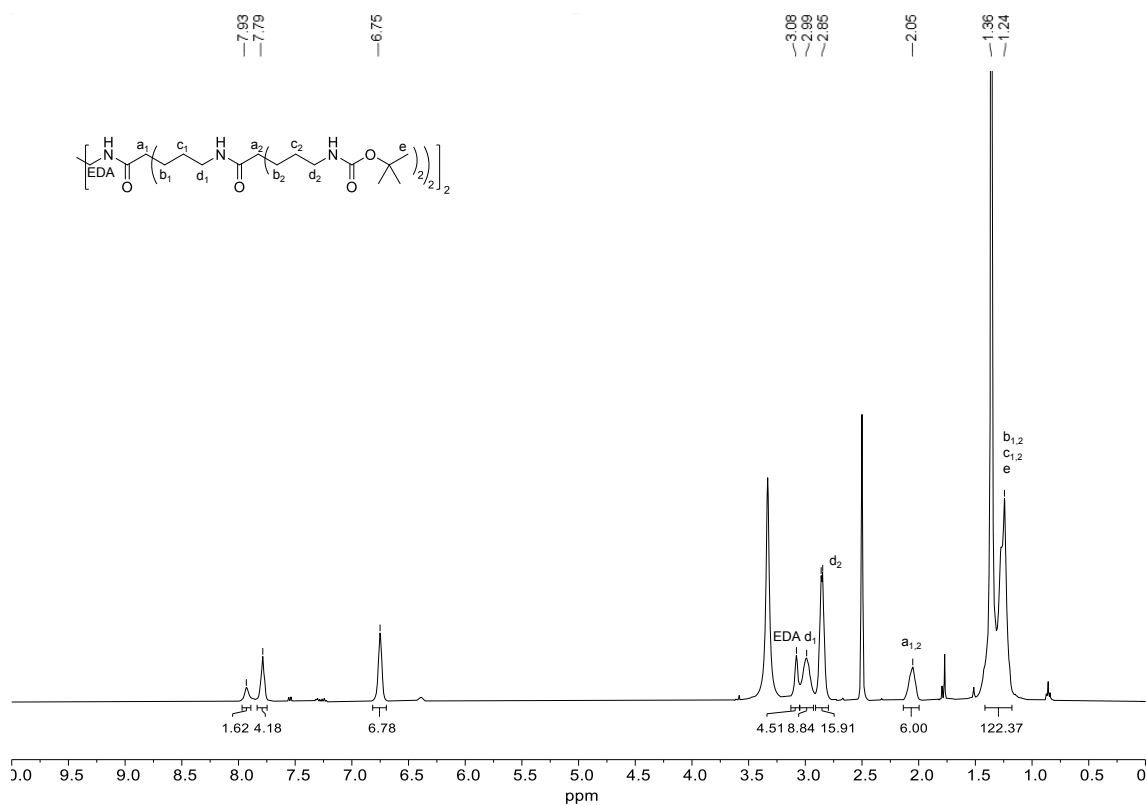


Figura 163. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DG2-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

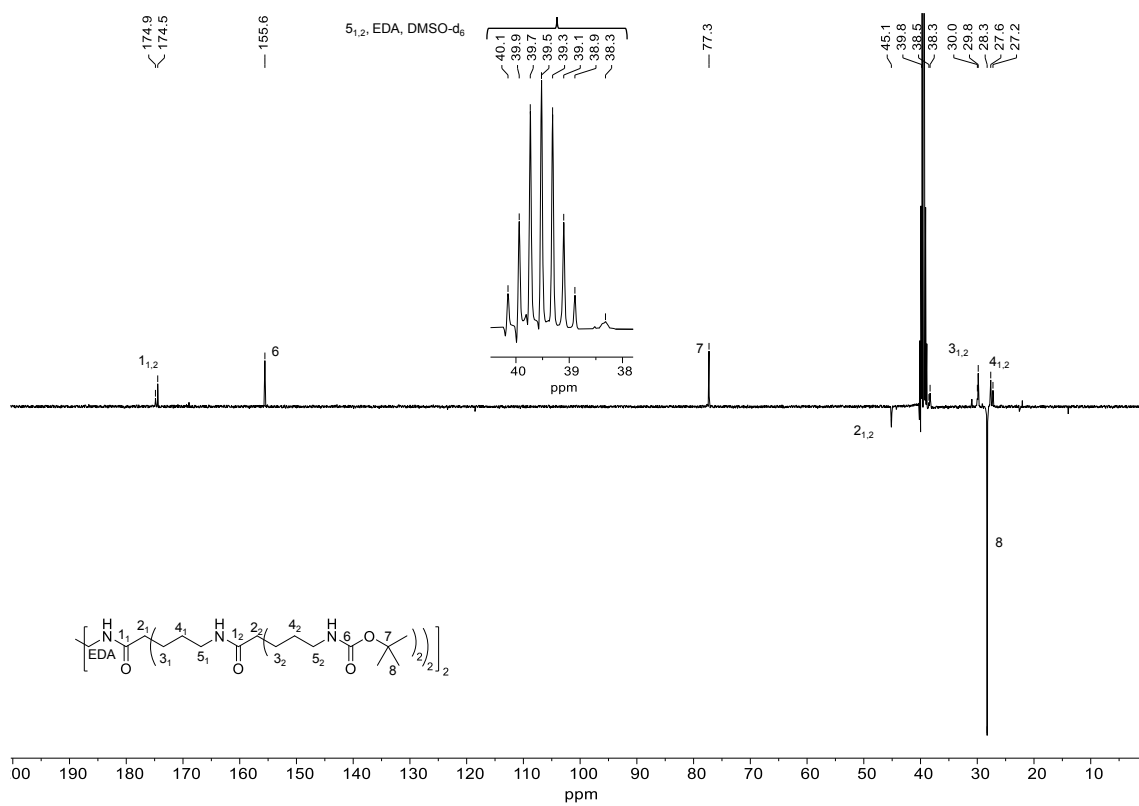


Figura 164. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de DG2-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

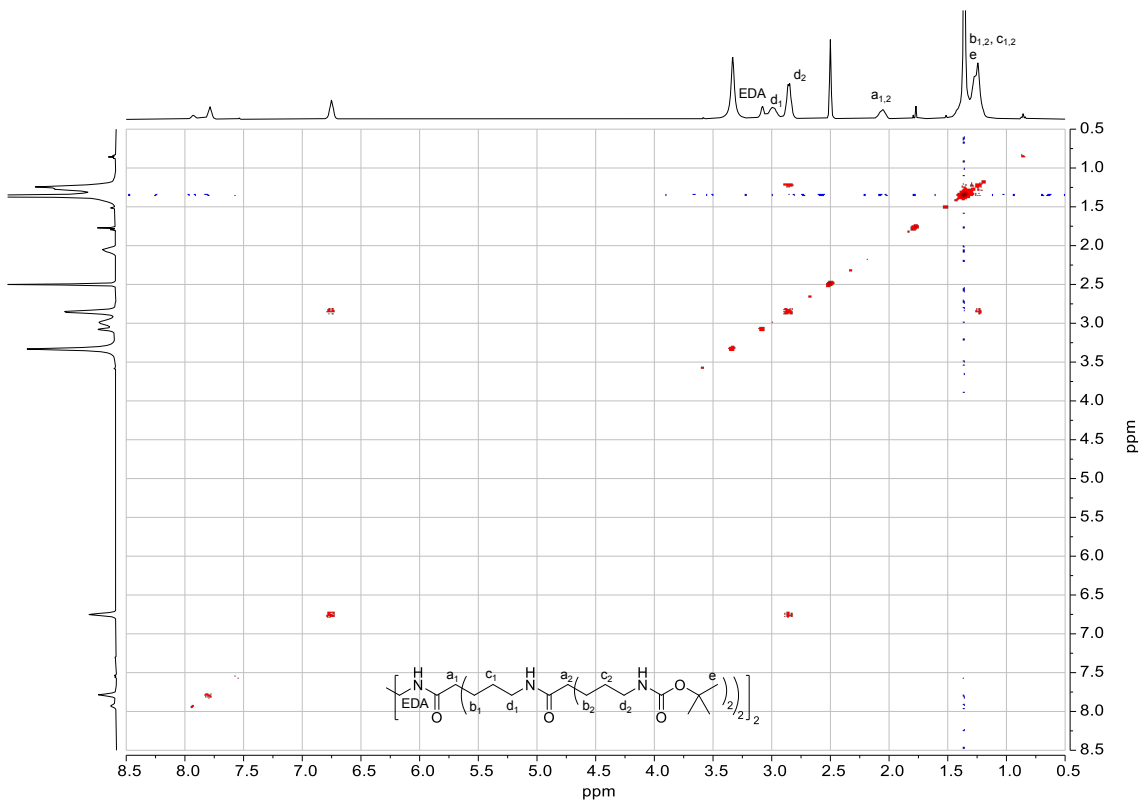


Figura 165. Espectro COSY de **DG2-NHBoc** en DMSO-d<sub>6</sub>.

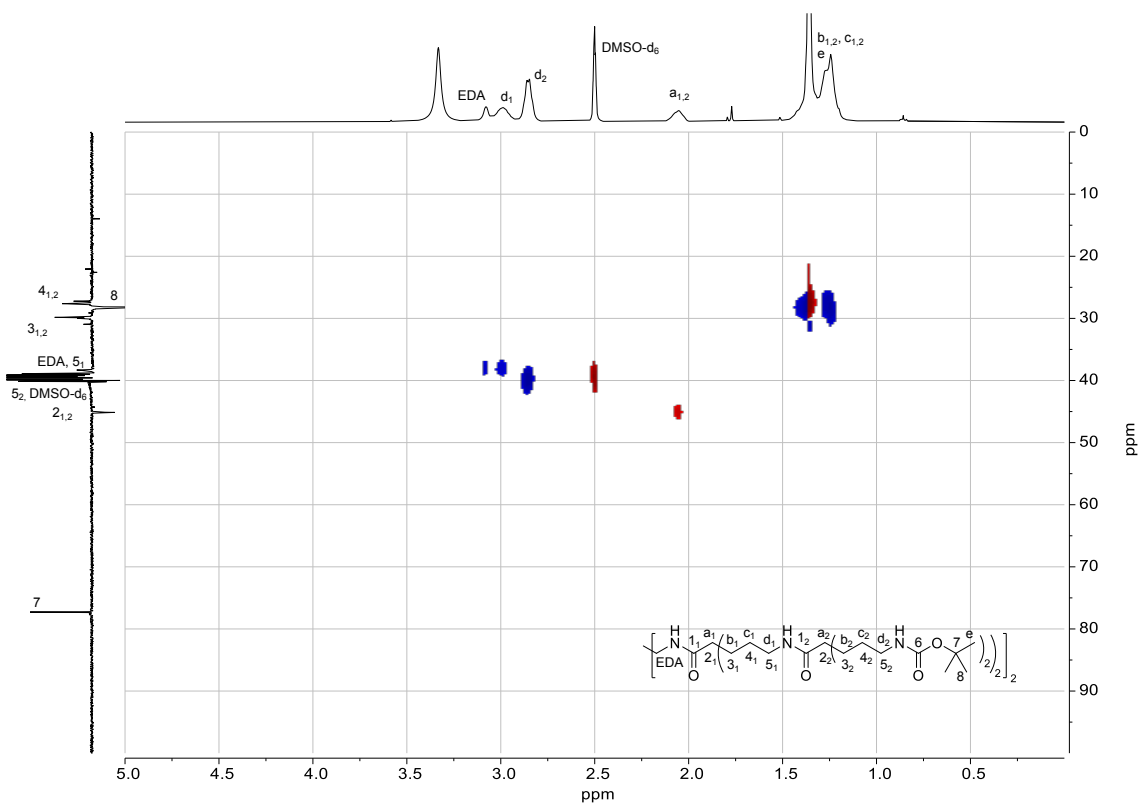


Figura 166. Espectro HSQC de **DG2-NHBoc** en DMSO-d<sub>6</sub>.

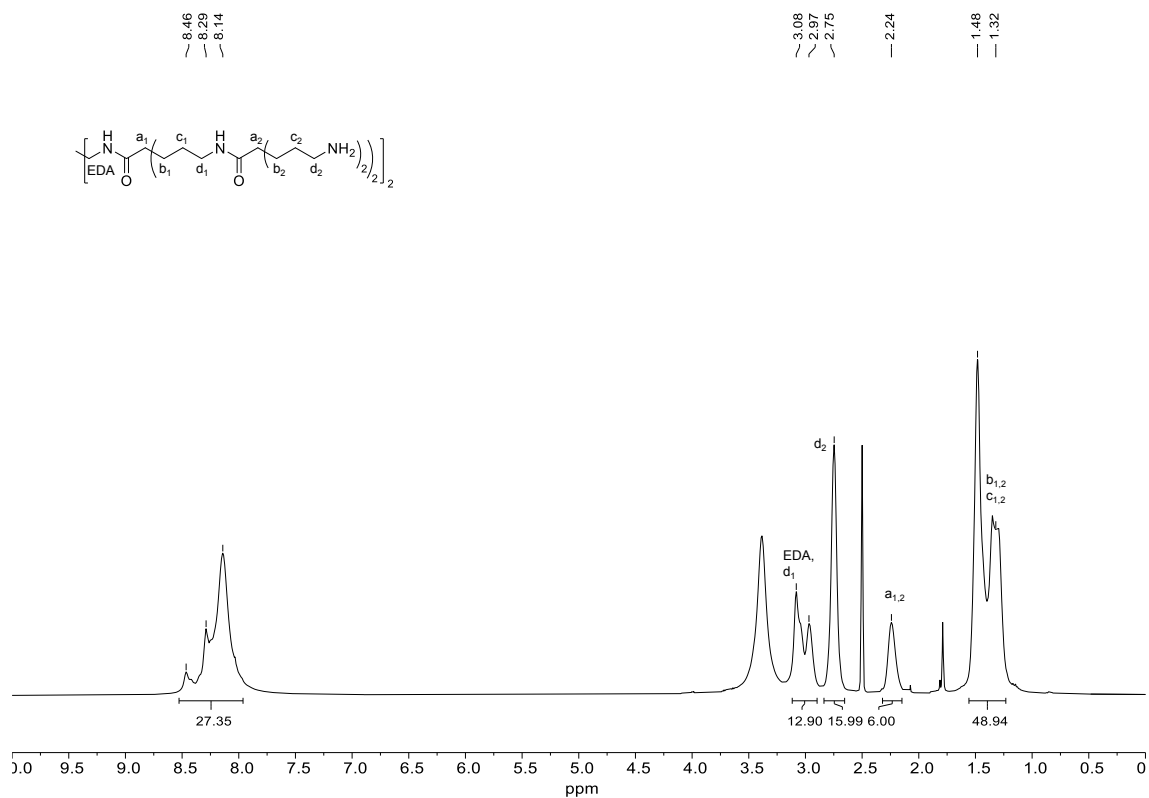


Figura 167. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DG2 en DMSO-d<sub>6</sub>.

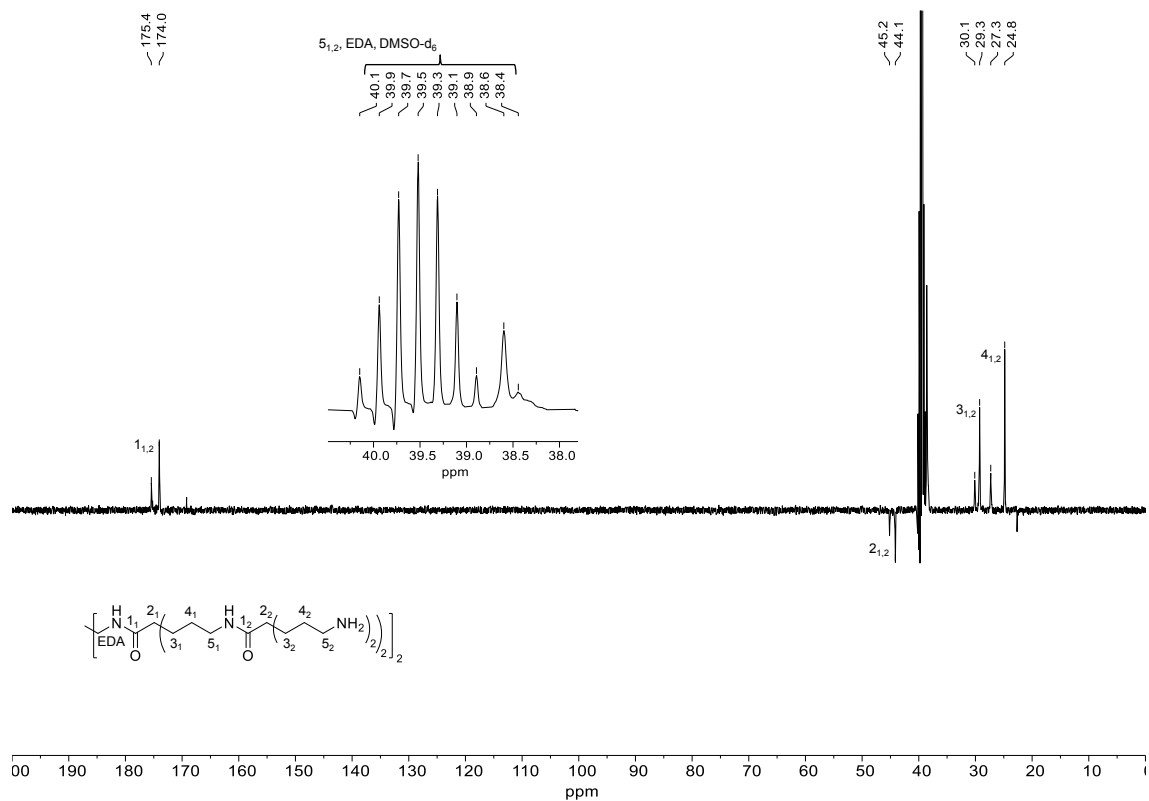


Figura 168. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de DG2 en DMSO-d<sub>6</sub>.

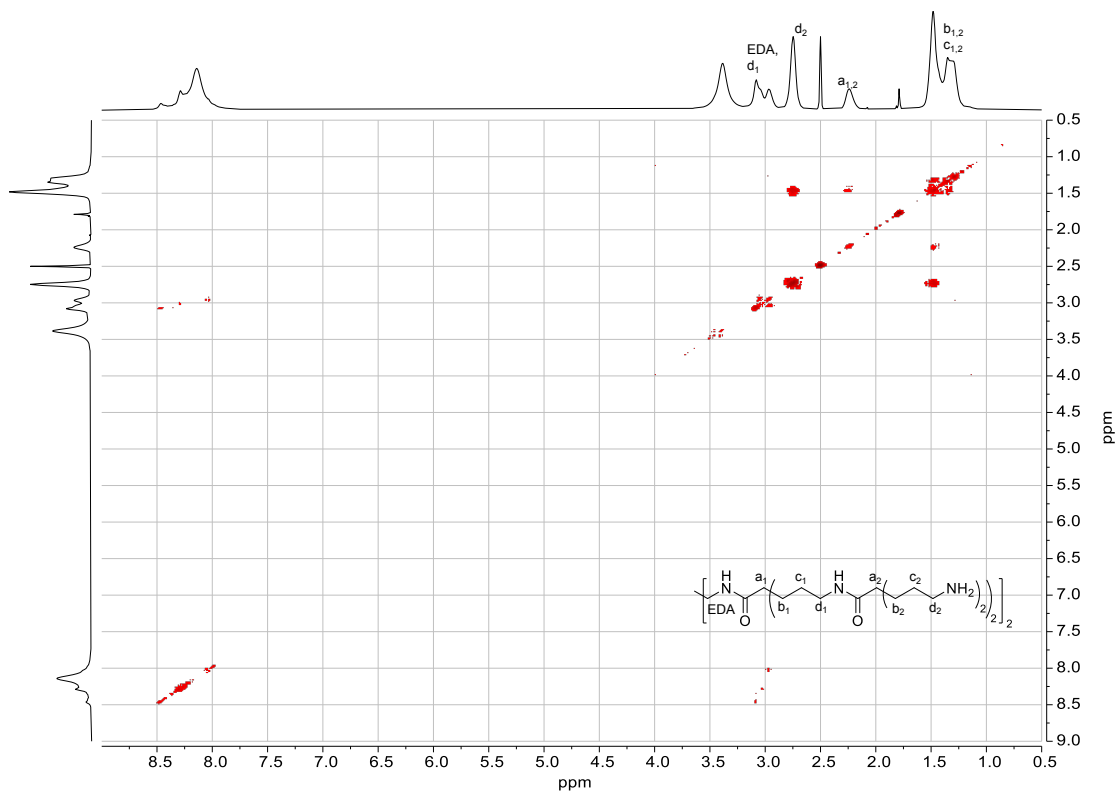


Figura 169. Espectro COSY de DG2 en DMSO-d<sub>6</sub>.

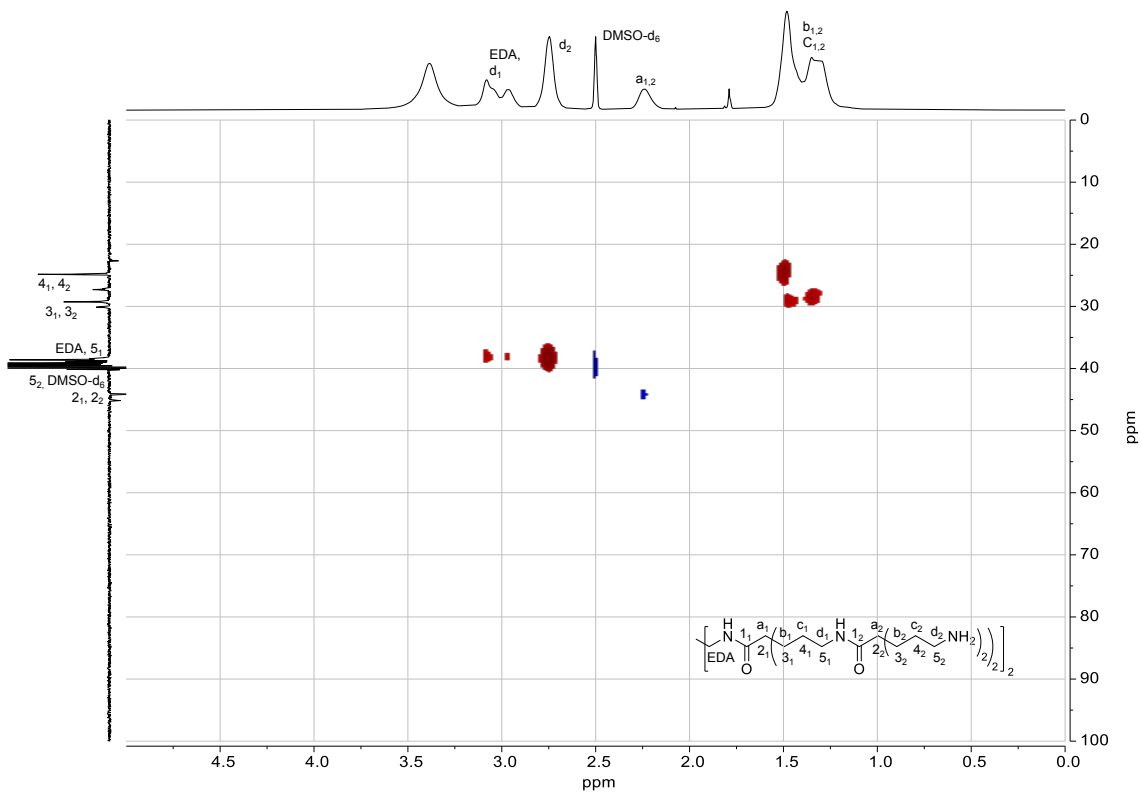


Figura 170. Espectro HSQC de DG2 en DMSO-d<sub>6</sub>.

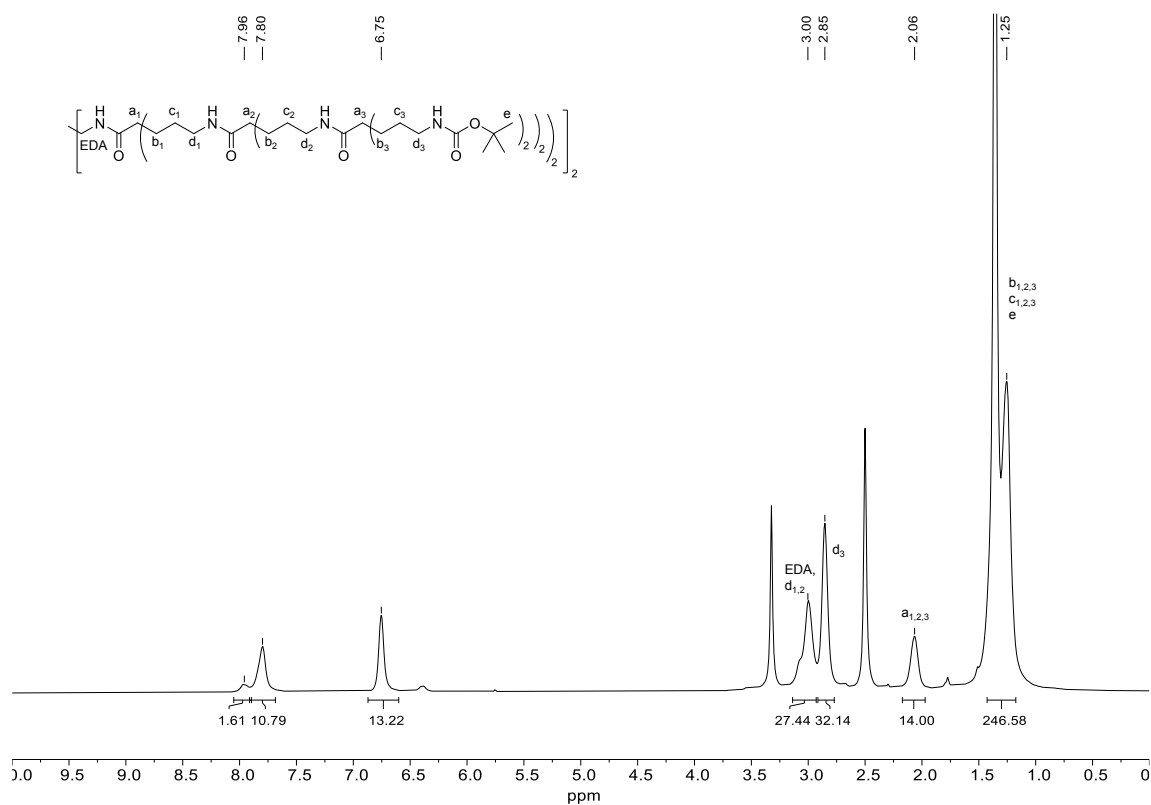


Figura 171. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DG3-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

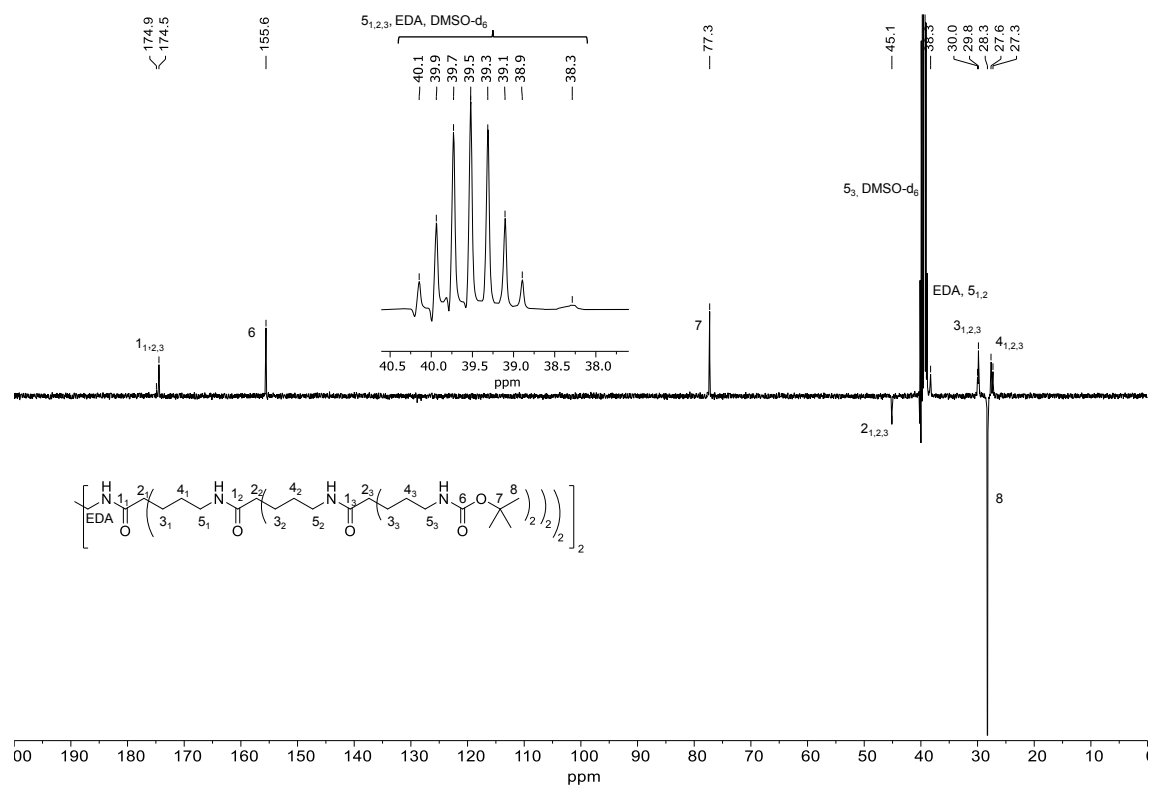


Figura 172. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de DG3-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

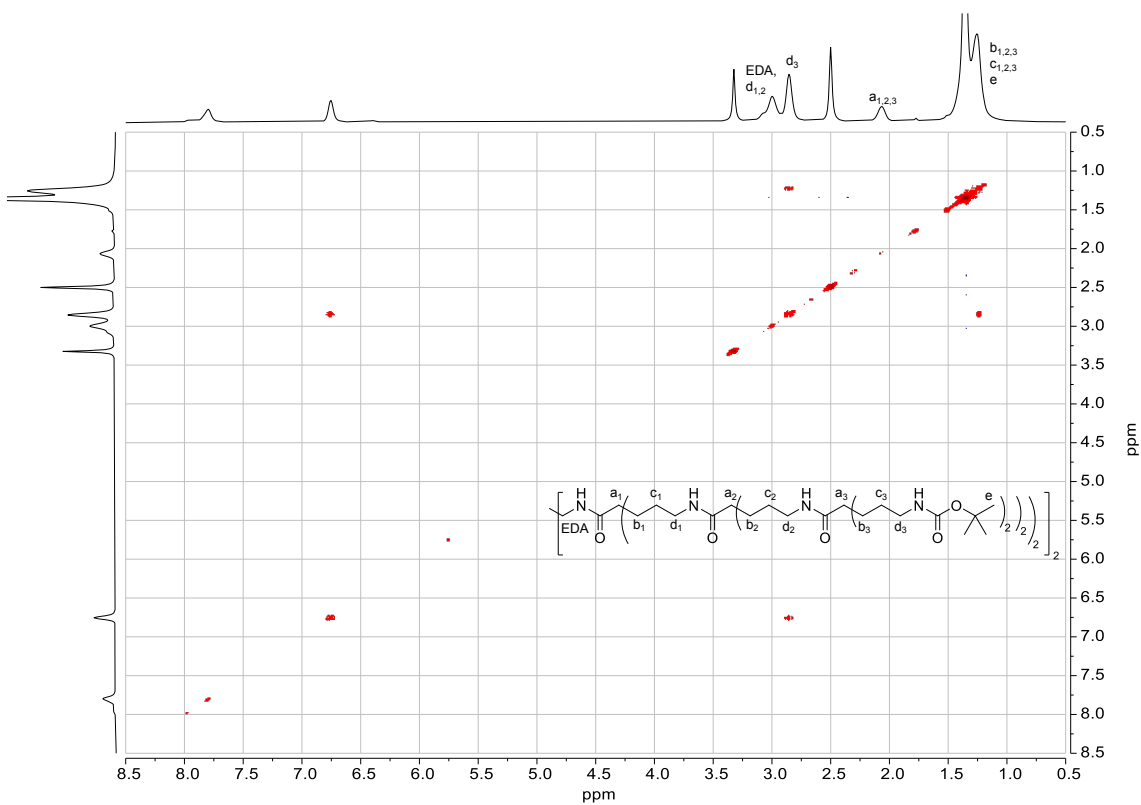


Figura 173. Espectro COSY de **DG3-NHBoc** en DMSO- $d_6$ .

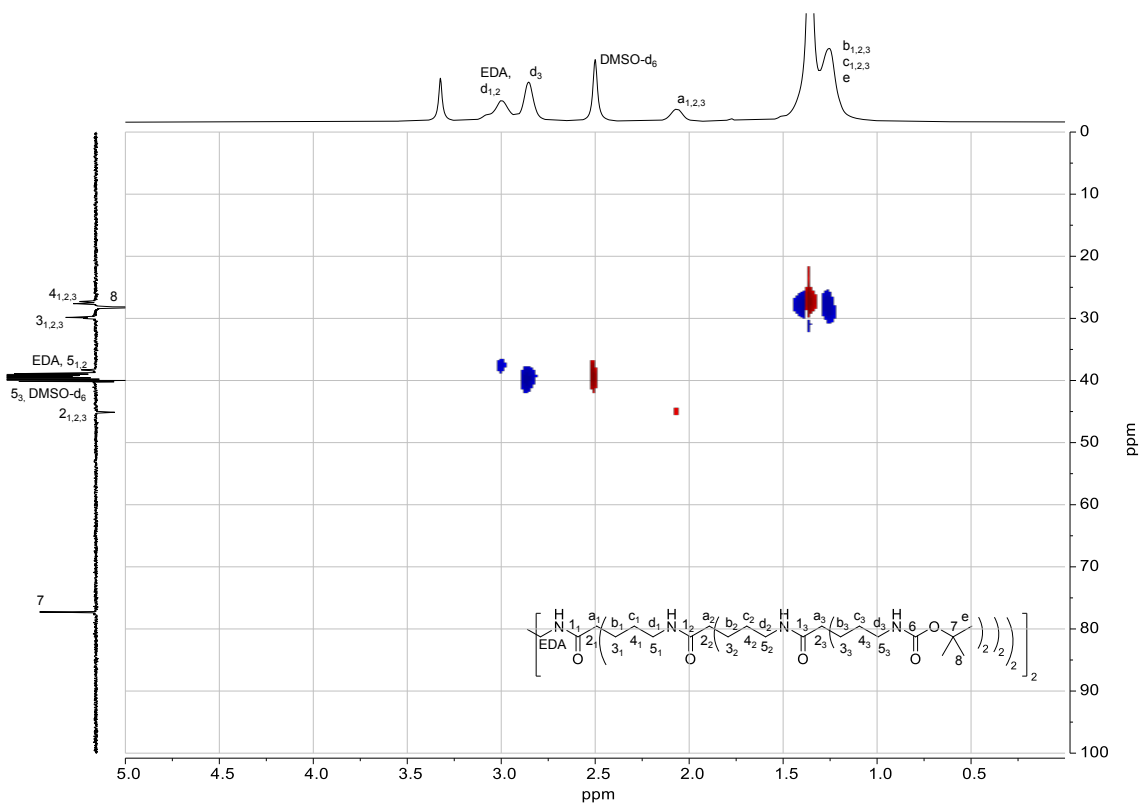


Figura 174. Espectro HSQC de **DG3-NHBoc** en DMSO- $d_6$ .

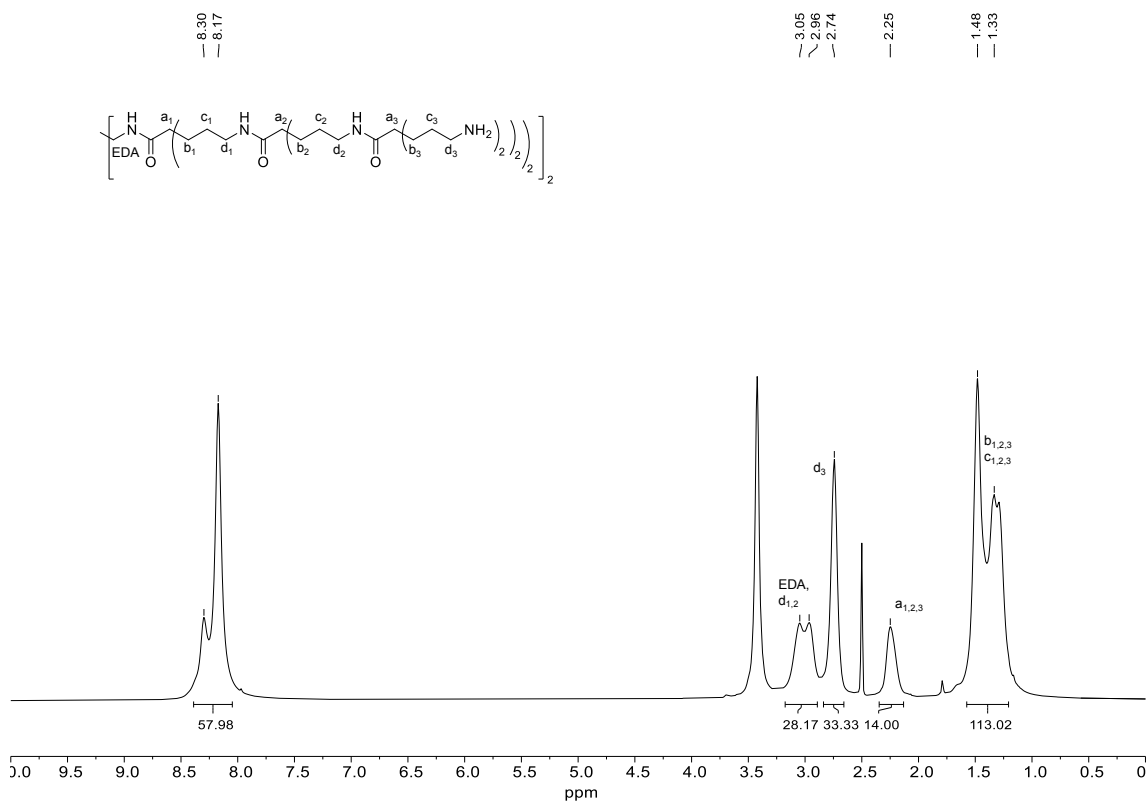


Figura 175. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DG3 en DMSO-d<sub>6</sub>.

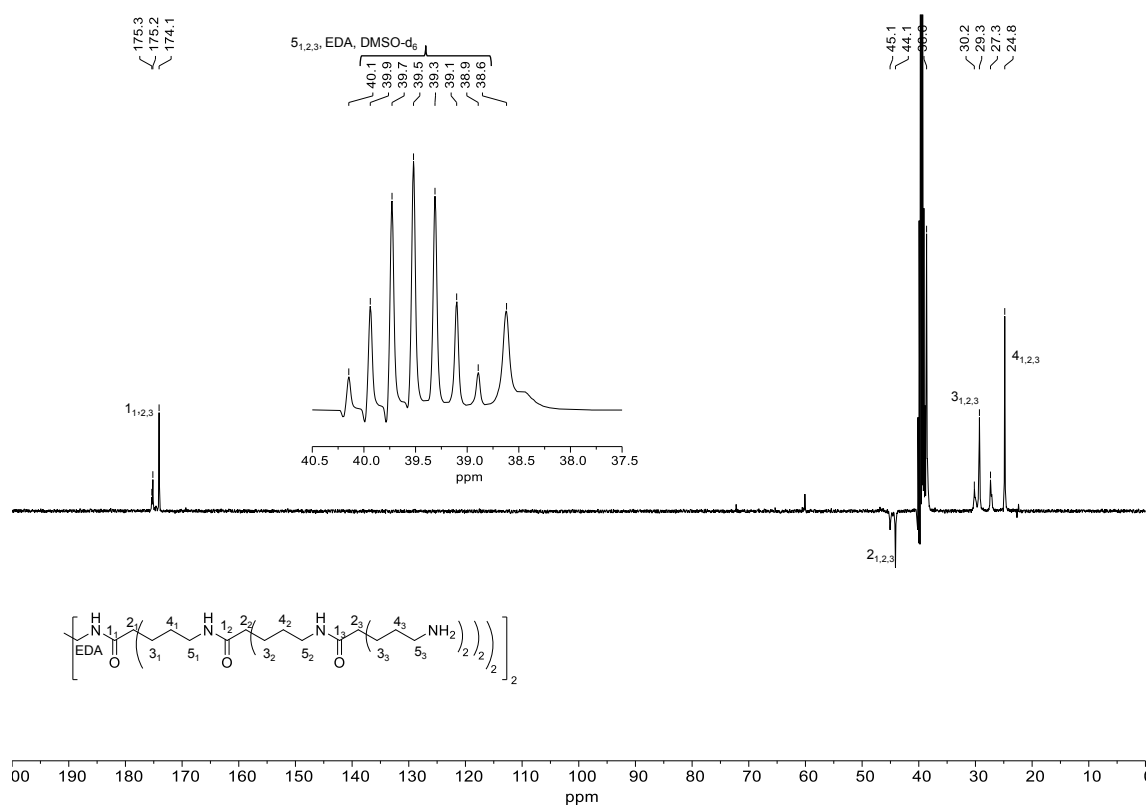


Figura 176. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de DG3 en DMSO-d<sub>6</sub>.

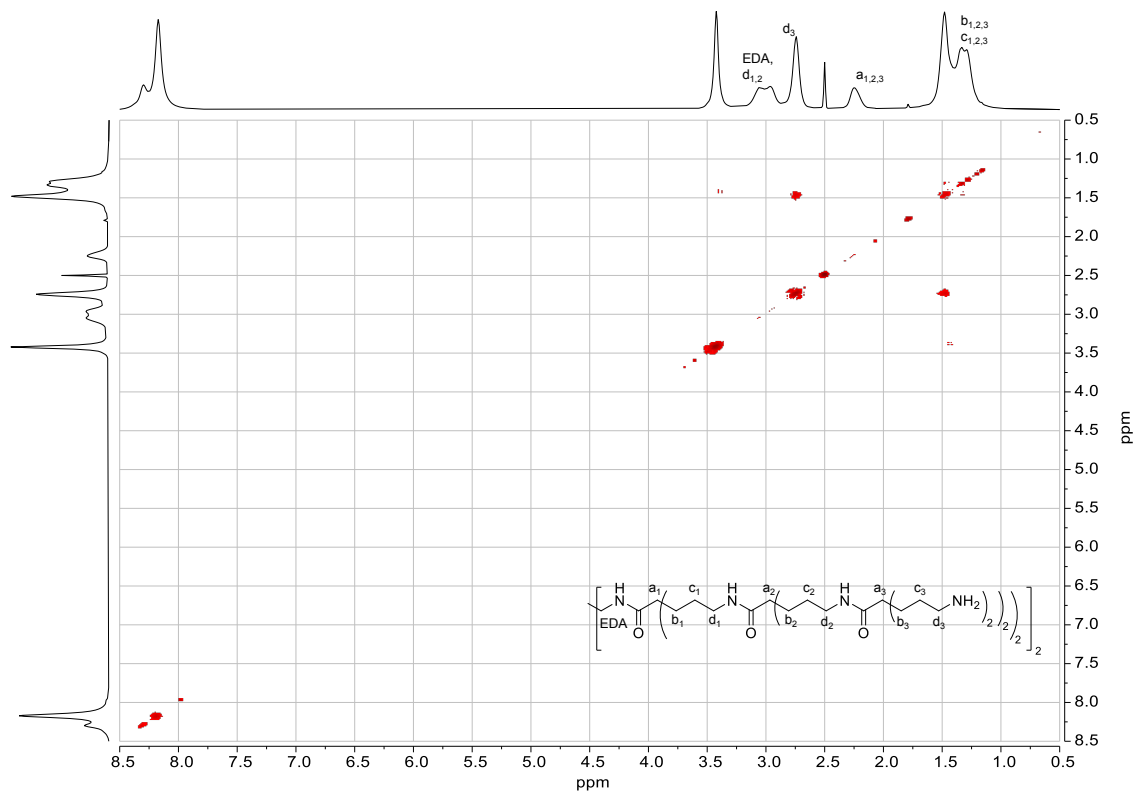


Figura 177. Espectro COSY de DG3 en DMSO-d<sub>6</sub>.

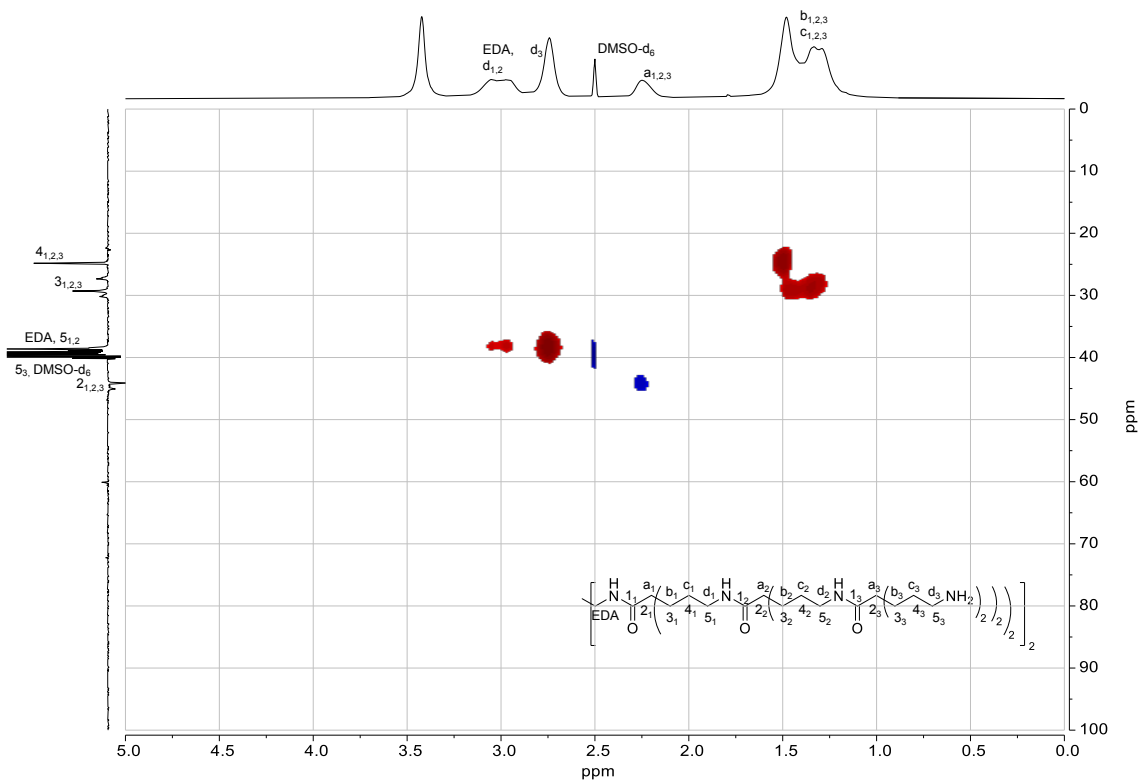


Figura 178. Espectro HSQC de DG3 en DMSO-d<sub>6</sub>.

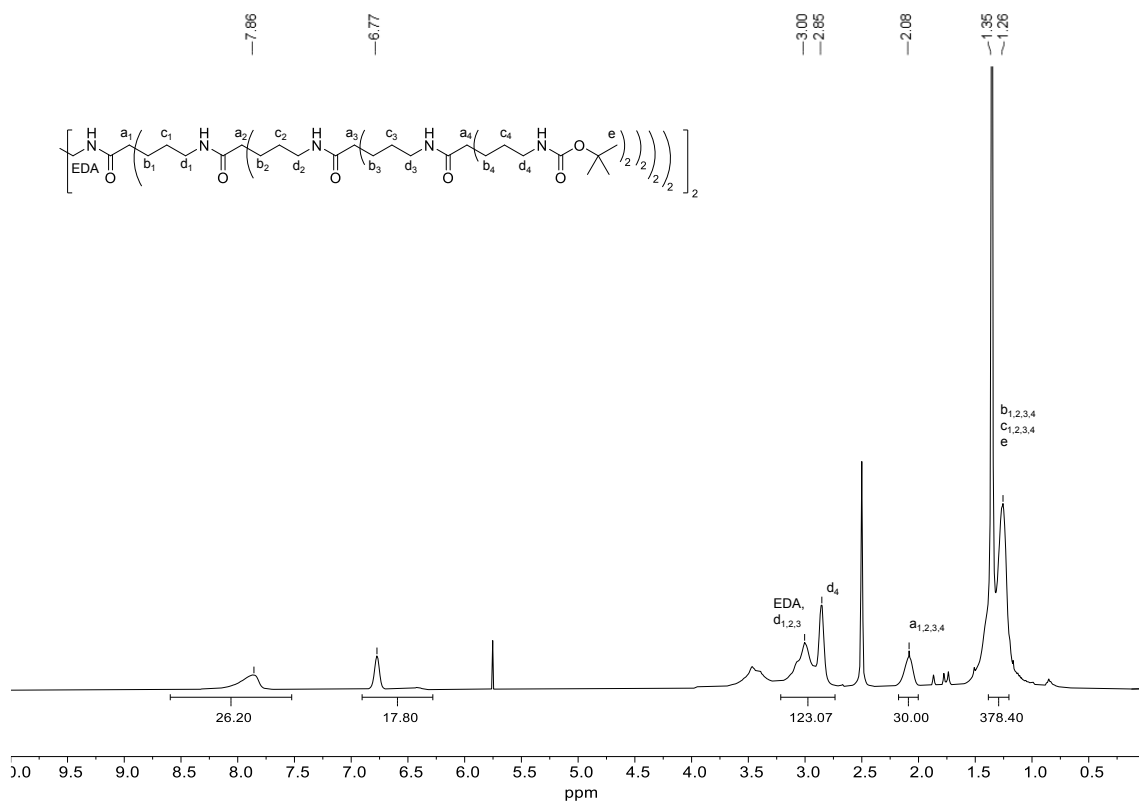


Figura 179. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DG4-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

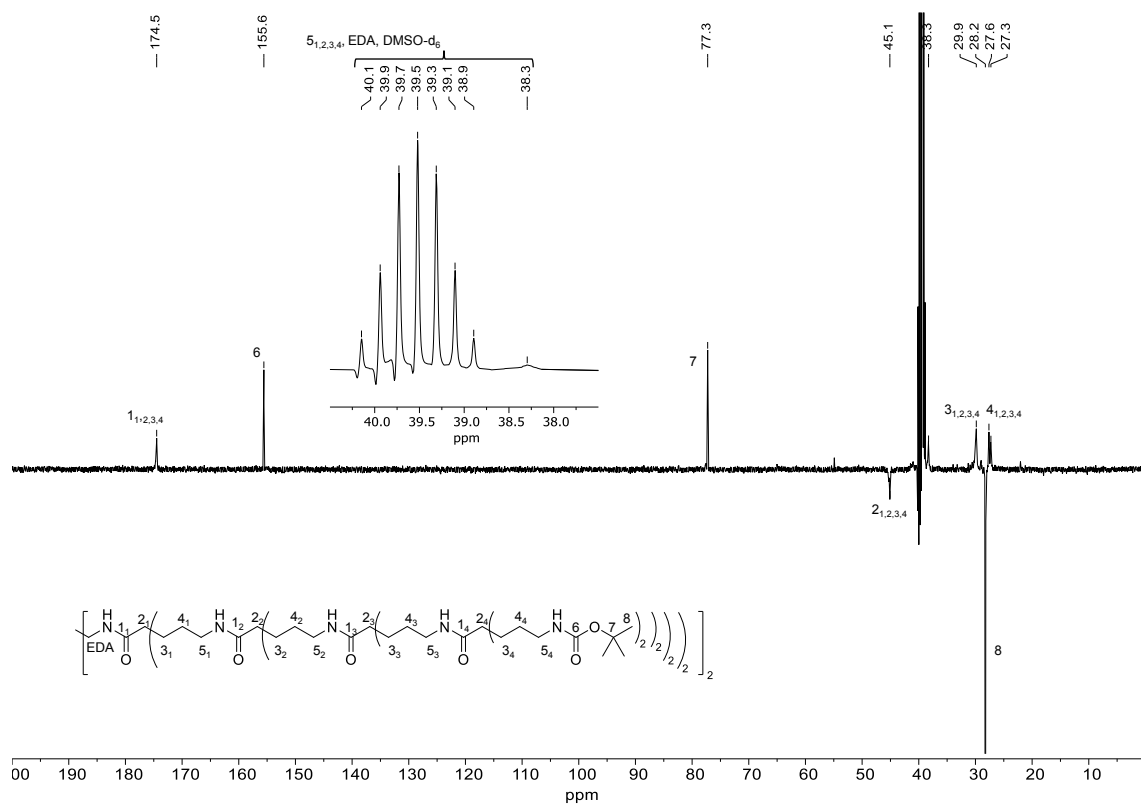


Figura 180. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de DG4-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

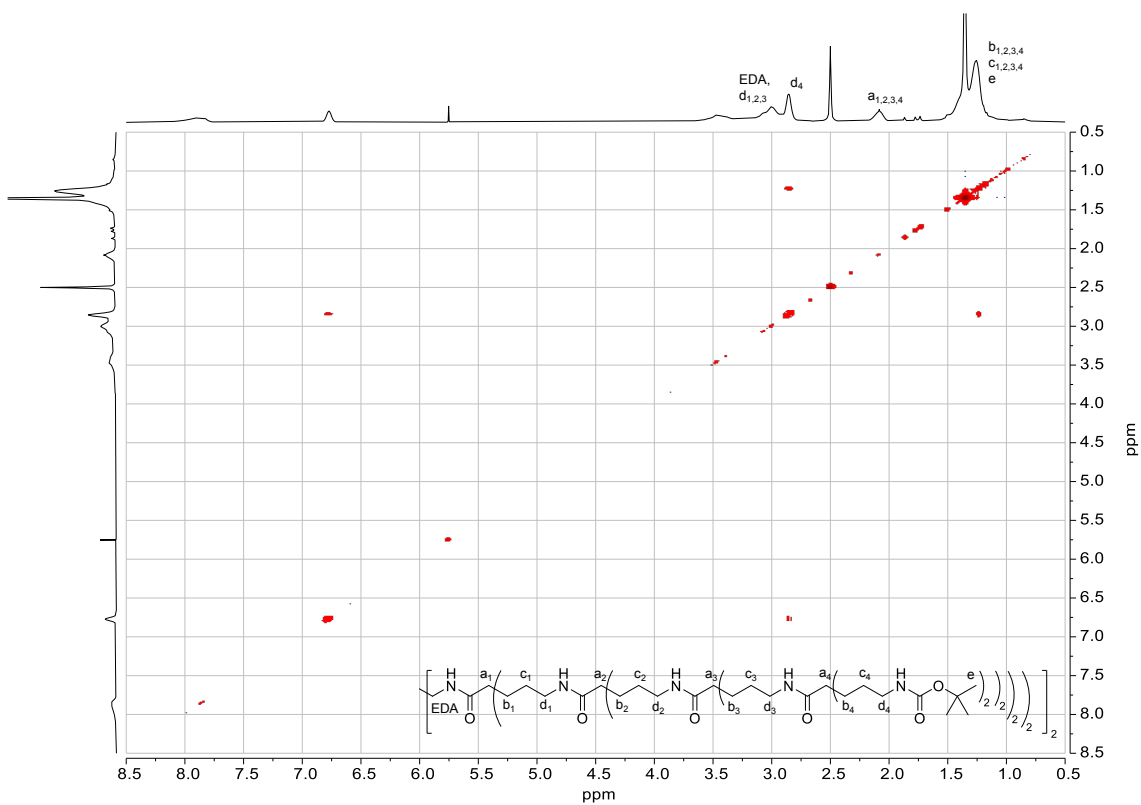


Figura 181. Espectro COSY de DG4-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

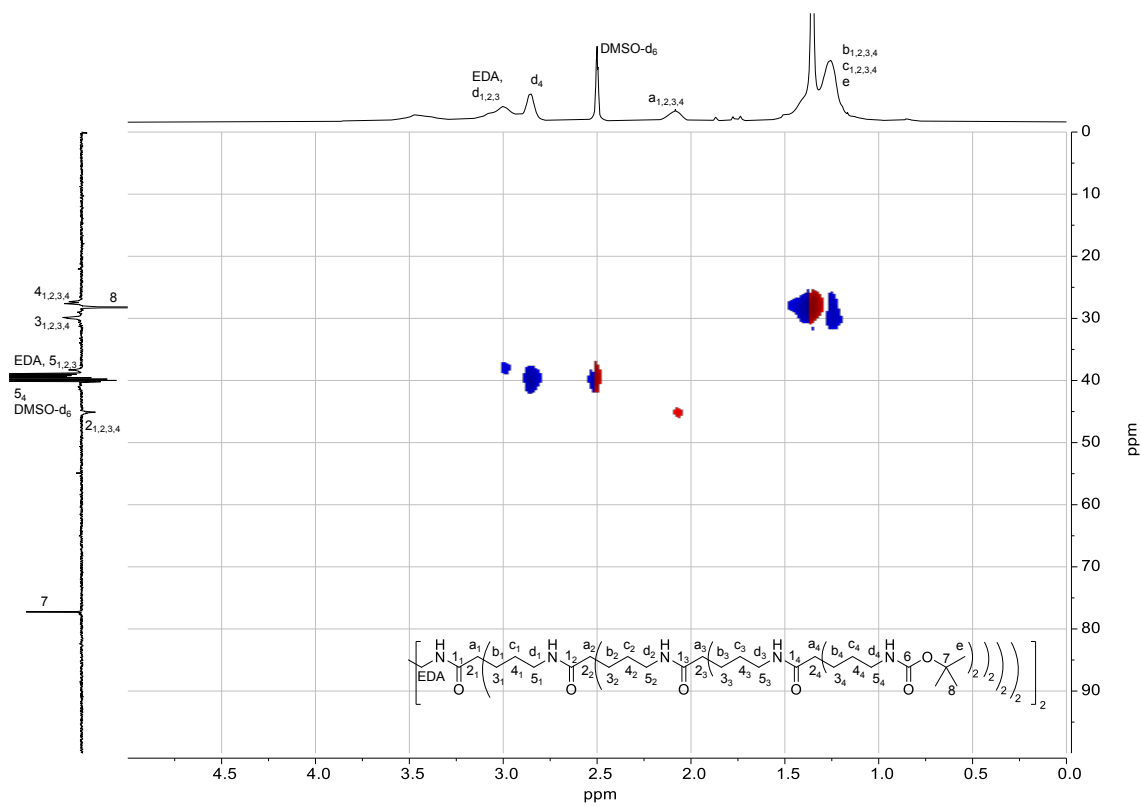


Figura 182. Espectro HSQC de DG4-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

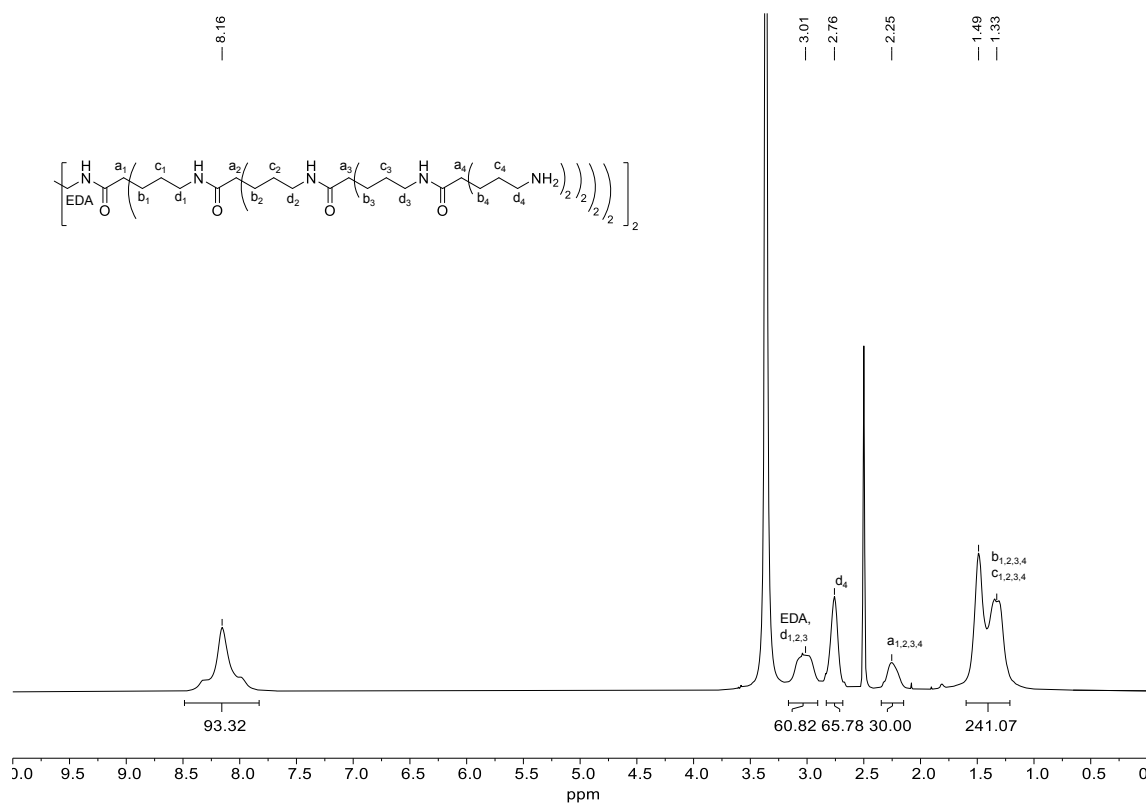


Figura 183. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DG4 en DMSO-d<sub>6</sub>.

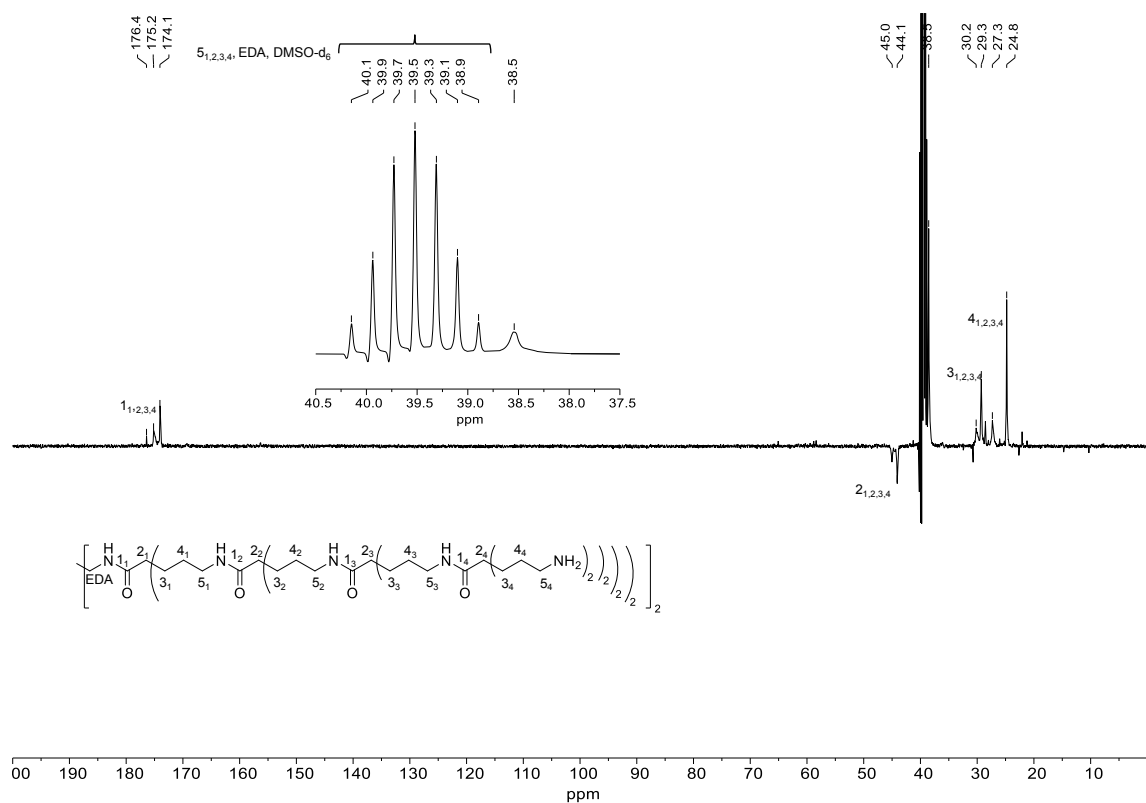


Figura 184. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de DG4 en DMSO-d<sub>6</sub>.

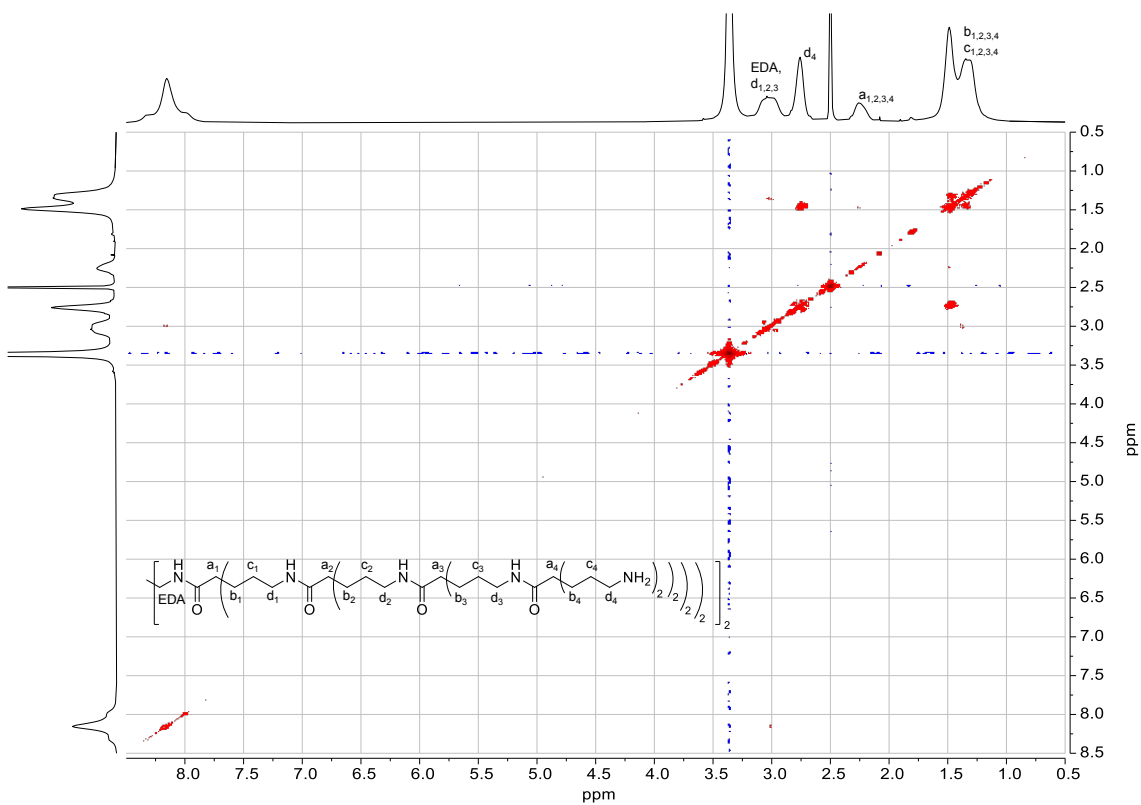


Figura 185. Espectro COSY de *DG4* en  $DMSO-d_6$ .

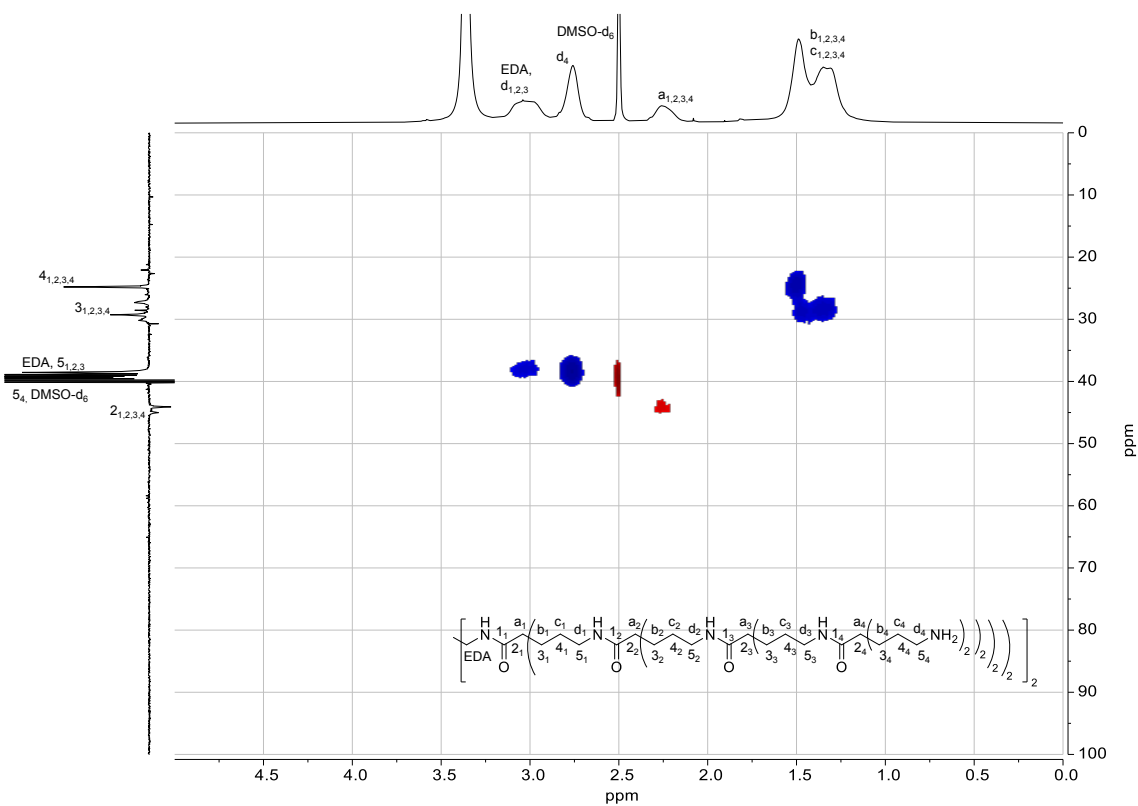


Figura 186. Espectro HSQC de *DG4* en  $DMSO-d_6$ .

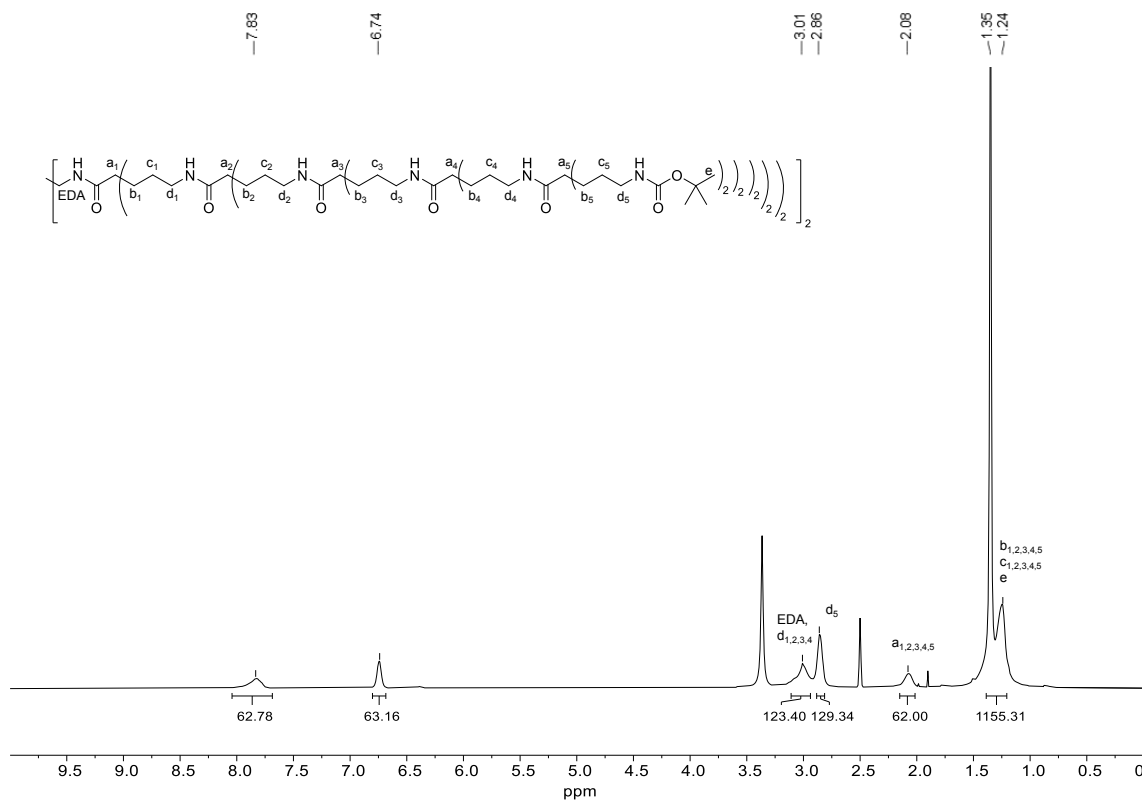


Figura 187. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DG5-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

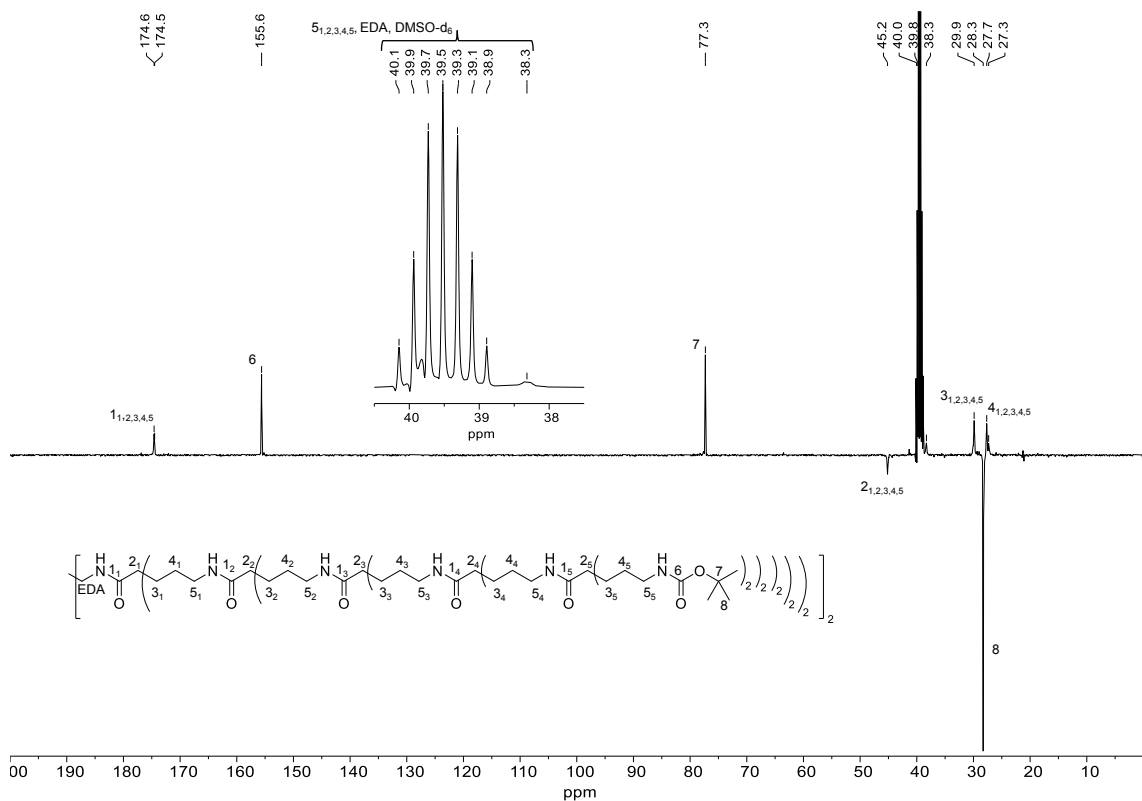


Figura 188. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de DG5-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

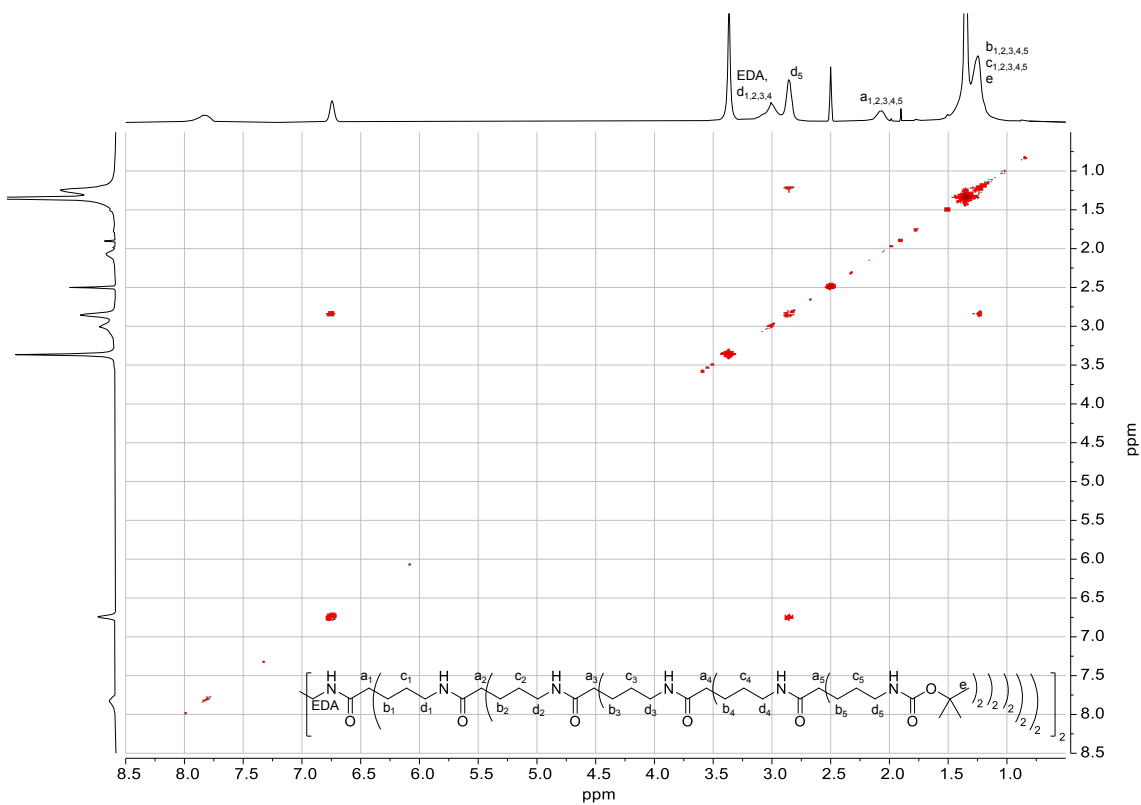


Figura 189. Espectro COSY de DG5-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

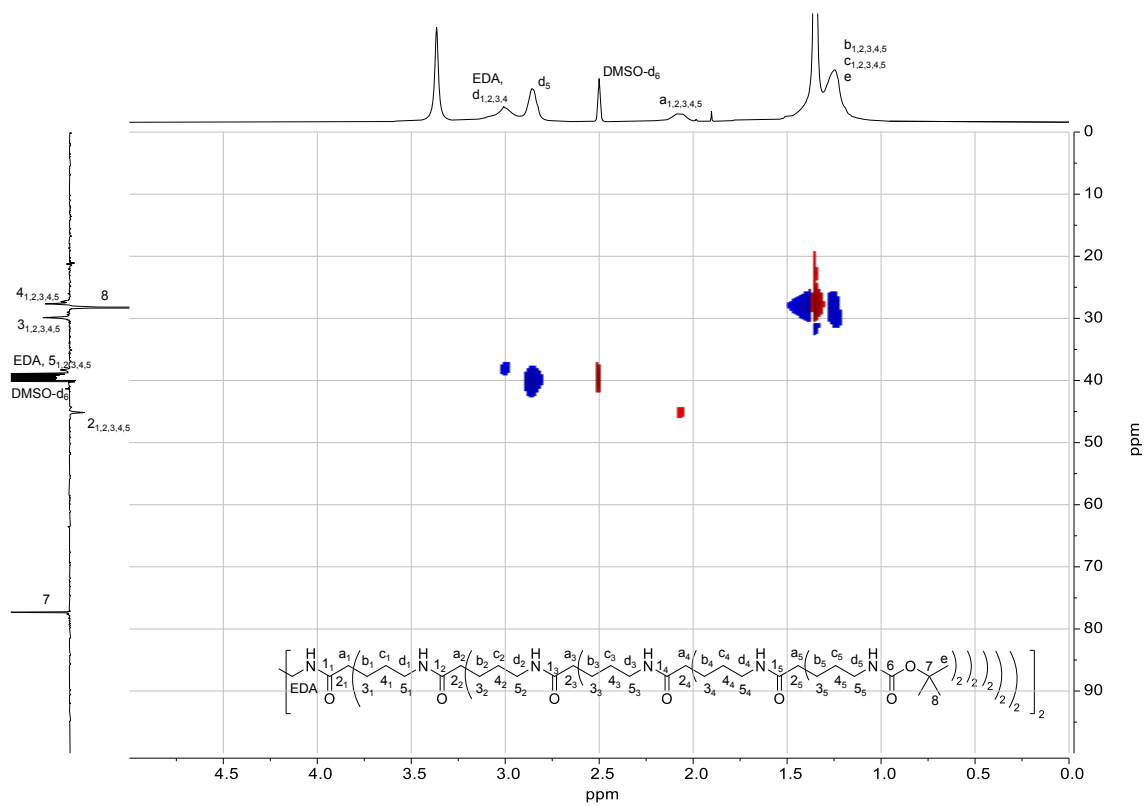


Figura 190. Espectro HSQC de DG5-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

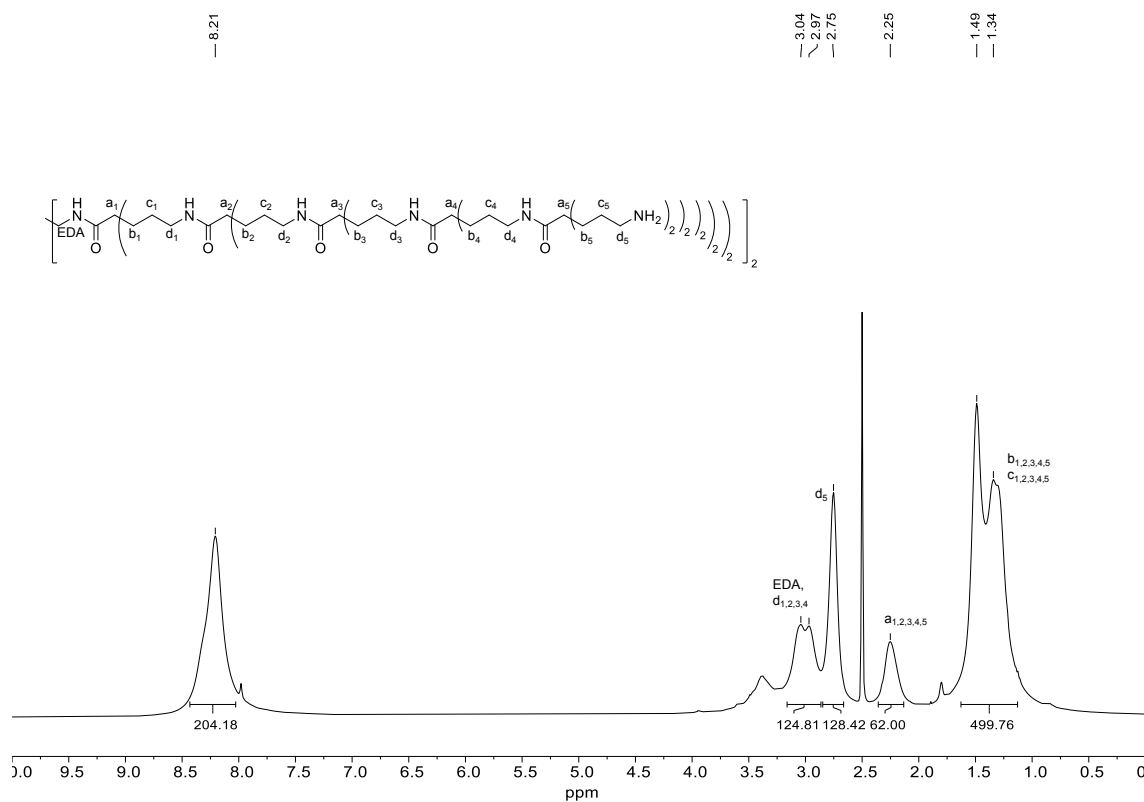


Figura 191. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DG5 en DMSO-d<sub>6</sub>.

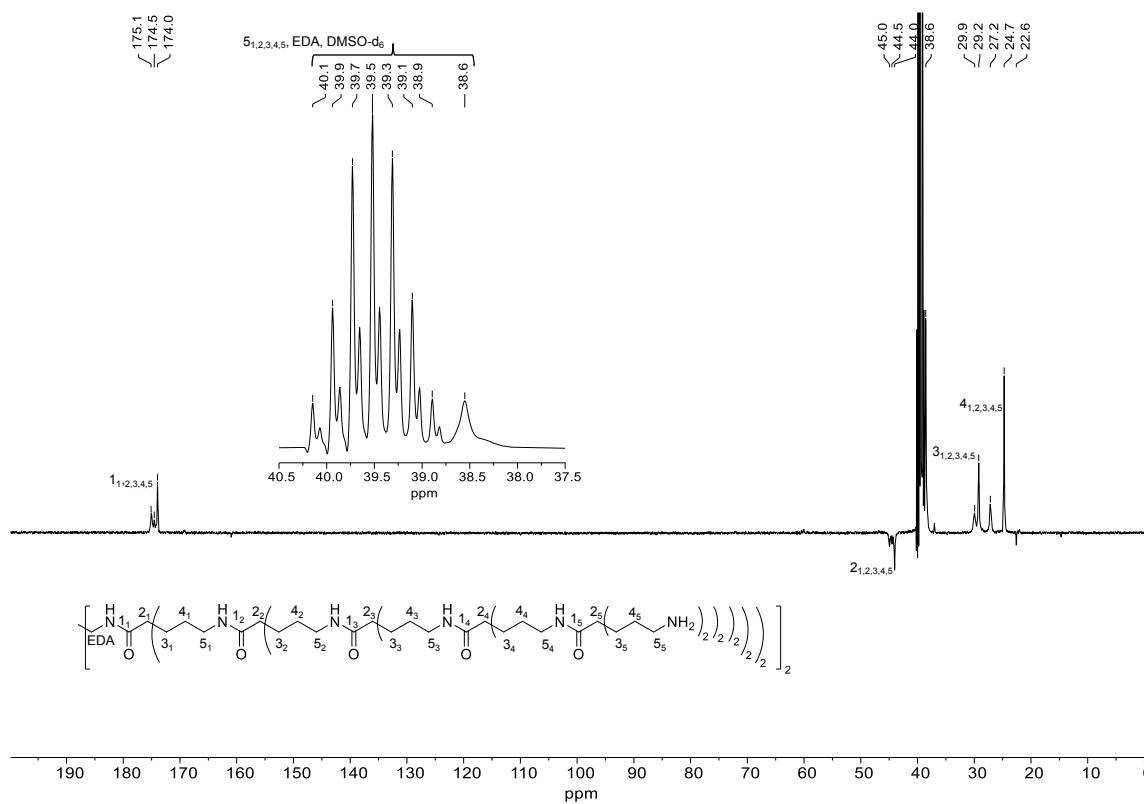


Figura 192. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de DG5 en DMSO-d<sub>6</sub>.

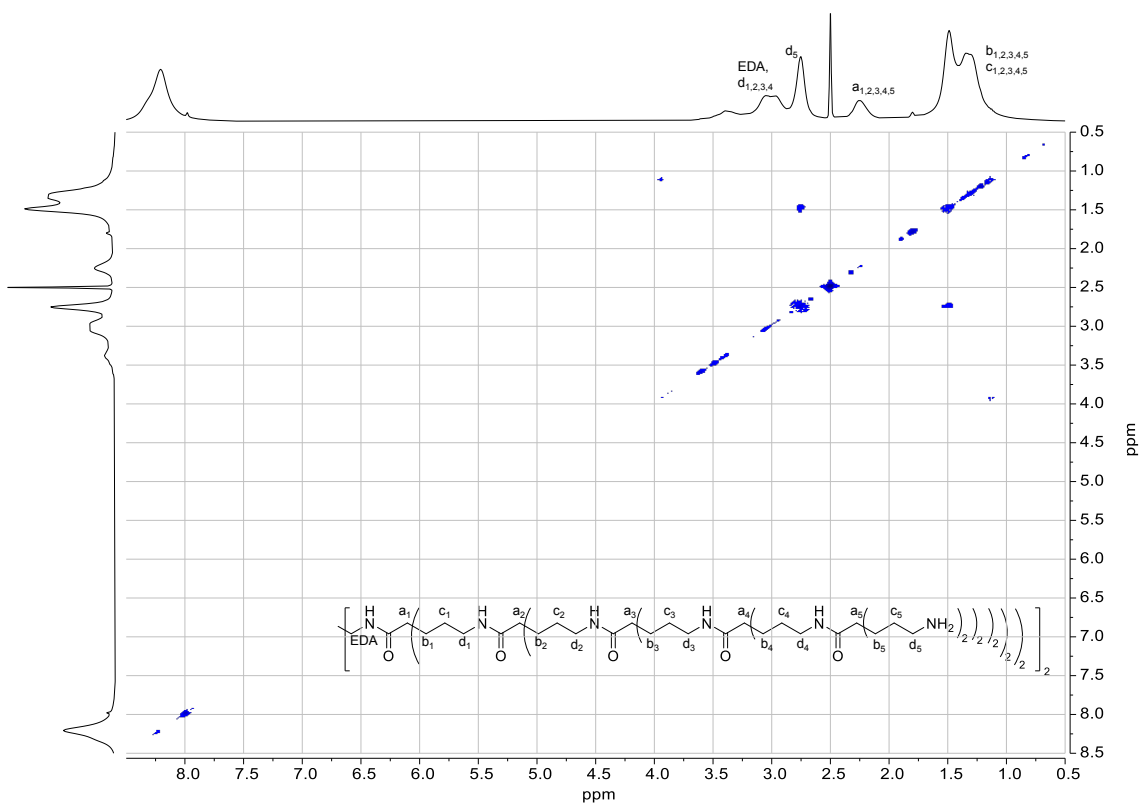


Figura 193. Espectro COSY de DG5 en DMSO-d<sub>6</sub>.

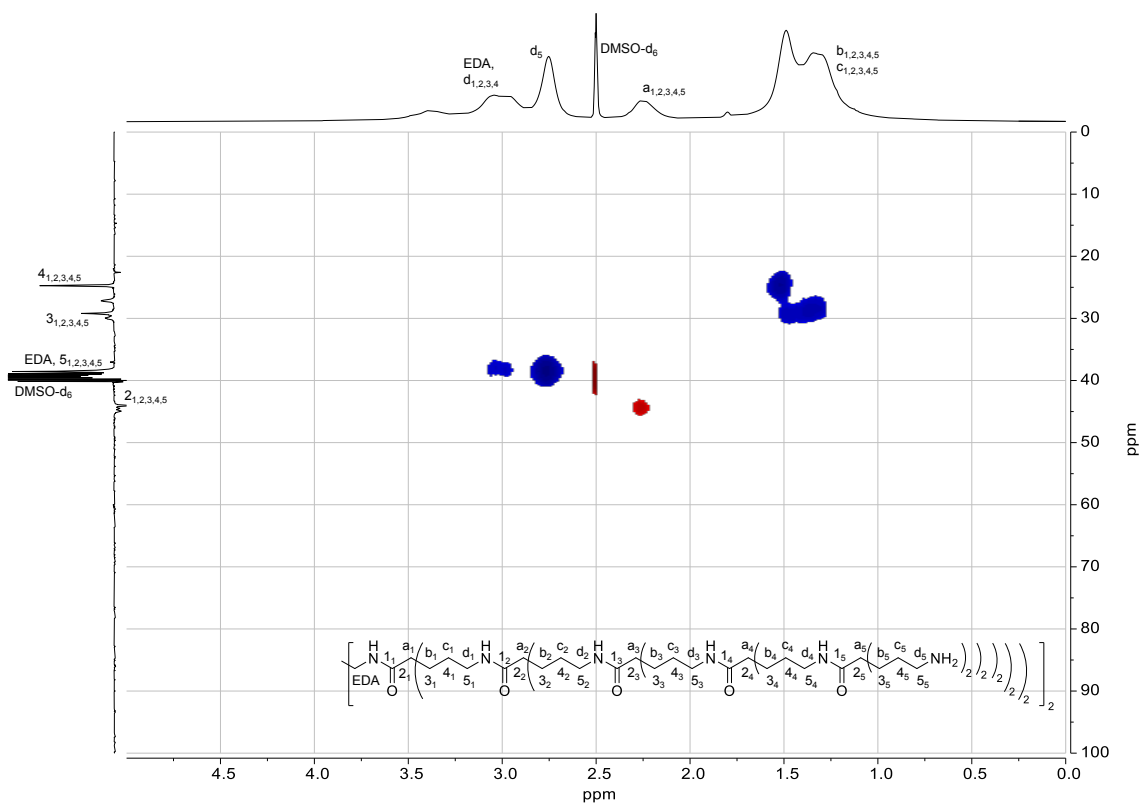


Figura 194. Espectro HSQC de DG5 en DMSO-d<sub>6</sub>.

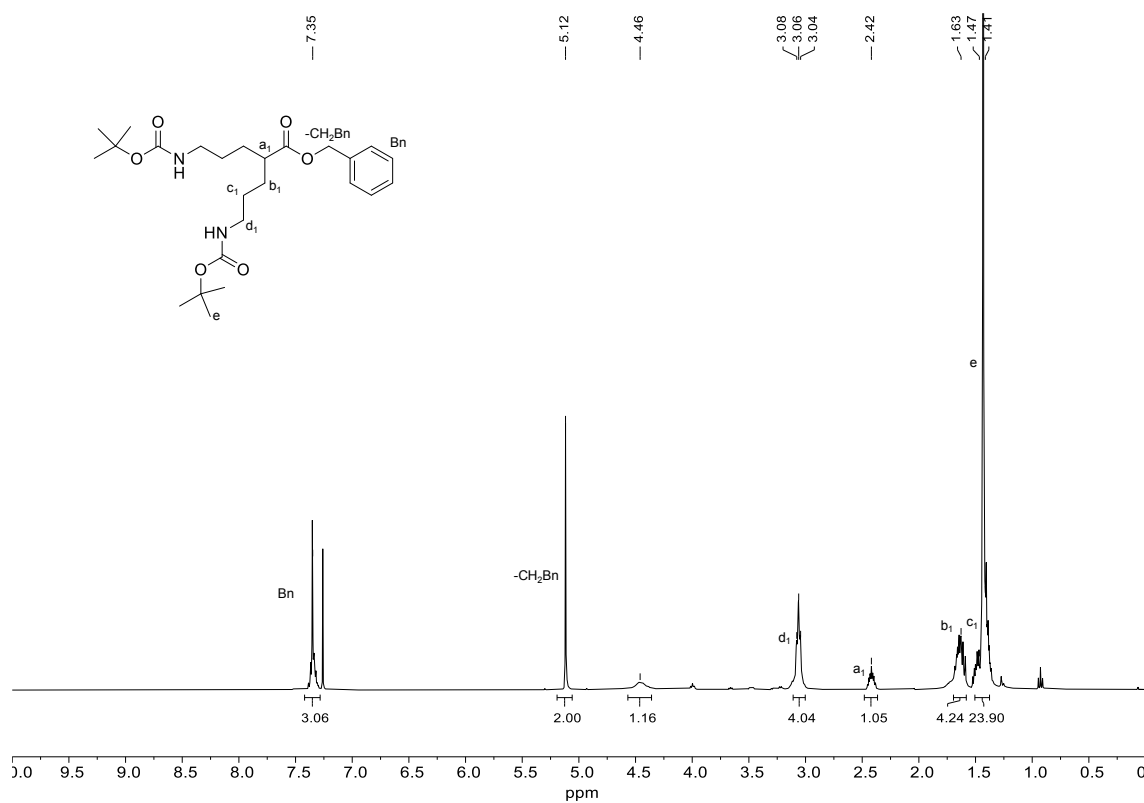


Figura 195. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de *dg1Bn-NHBoc* en CDCl<sub>3</sub>.

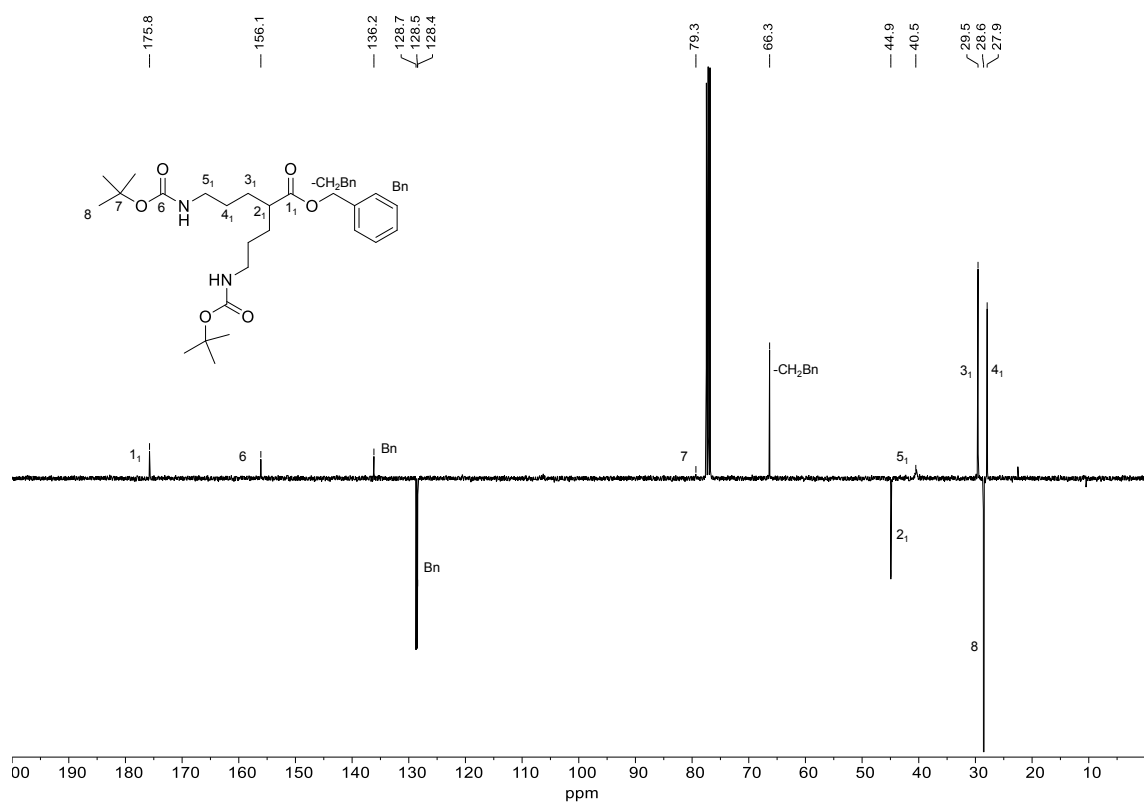


Figura 196. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de *dg1Bn-NHBoc* en CDCl<sub>3</sub>.

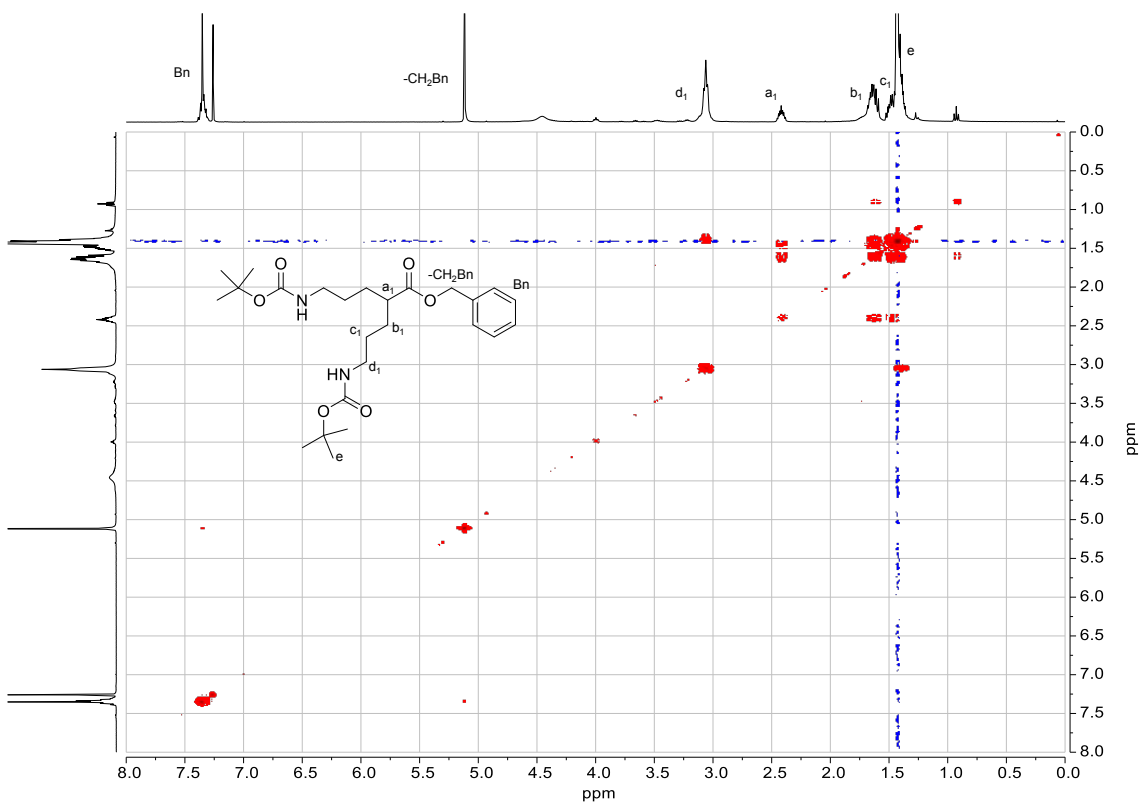


Figura 197. Espectro COSY de dg1Bn-NHBoc en CDCl<sub>3</sub>.

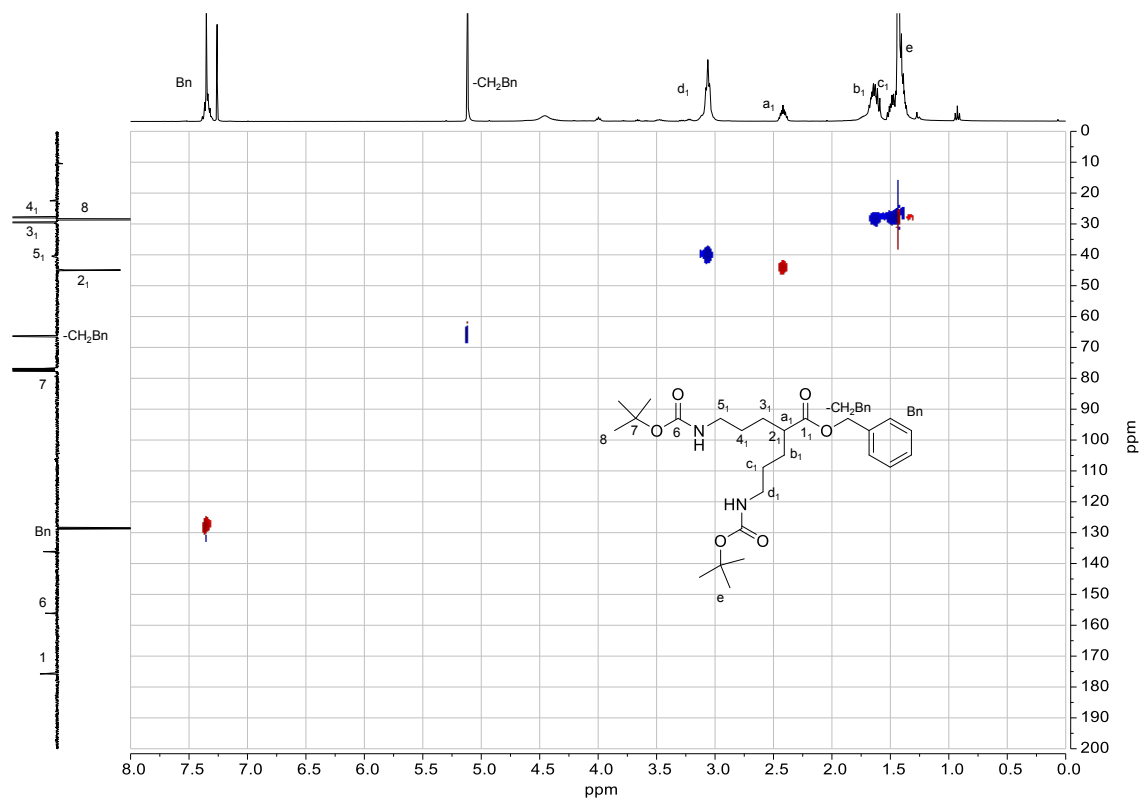


Figura 198. Espectro HSQC de dg1Bn-NHBoc en CDCl<sub>3</sub>.

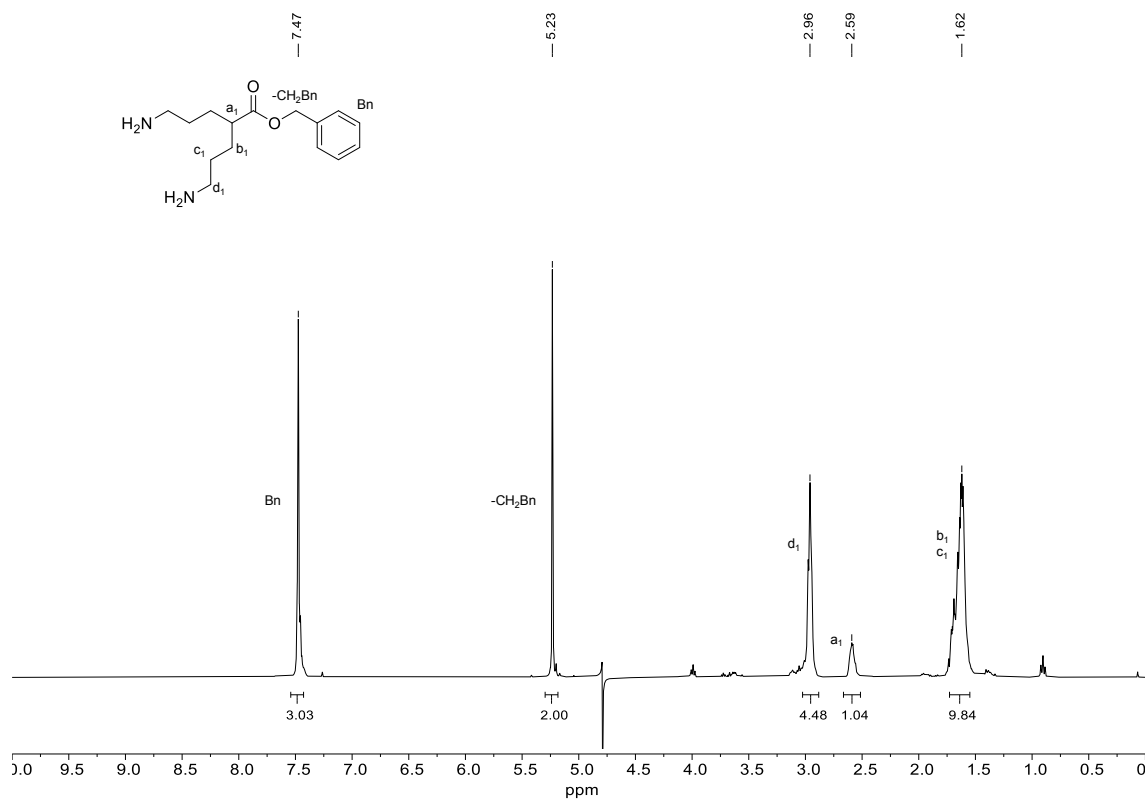


Figura 199. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de *dg1Bn* en  $\text{D}_2\text{O}$ .

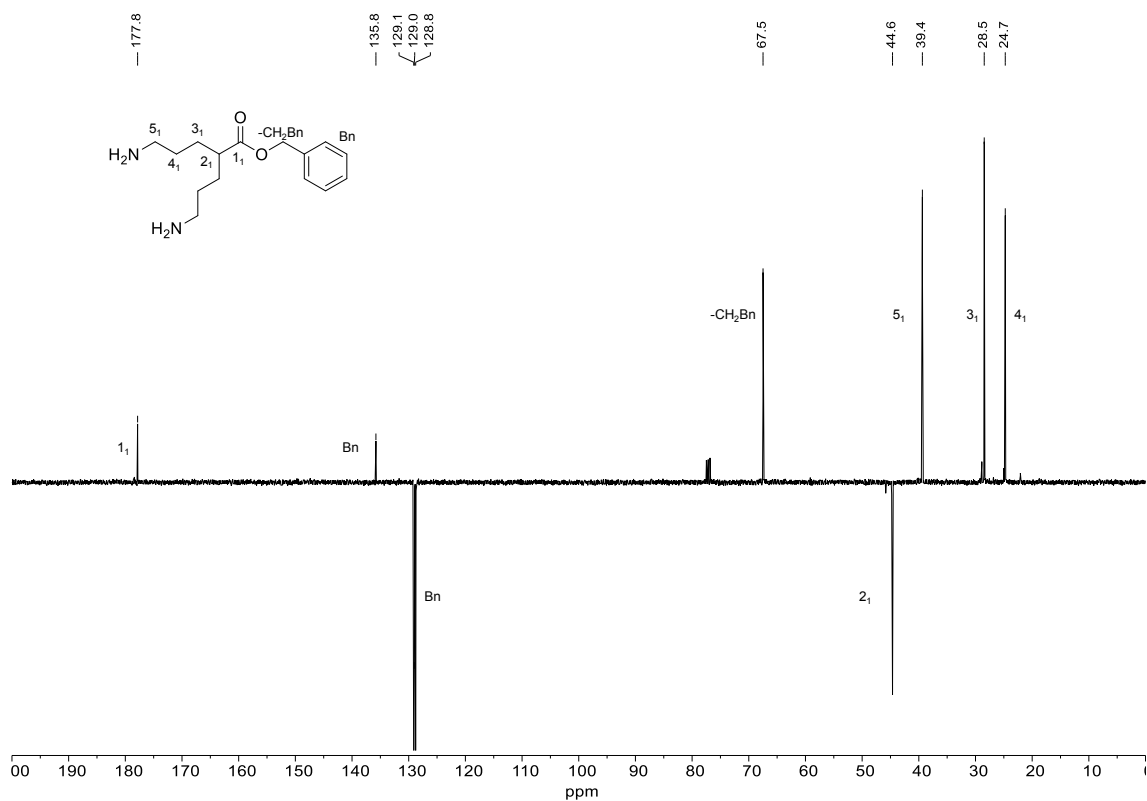


Figura 200. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (SEFT) de *dg1Bn* en  $\text{D}_2\text{O}$ .

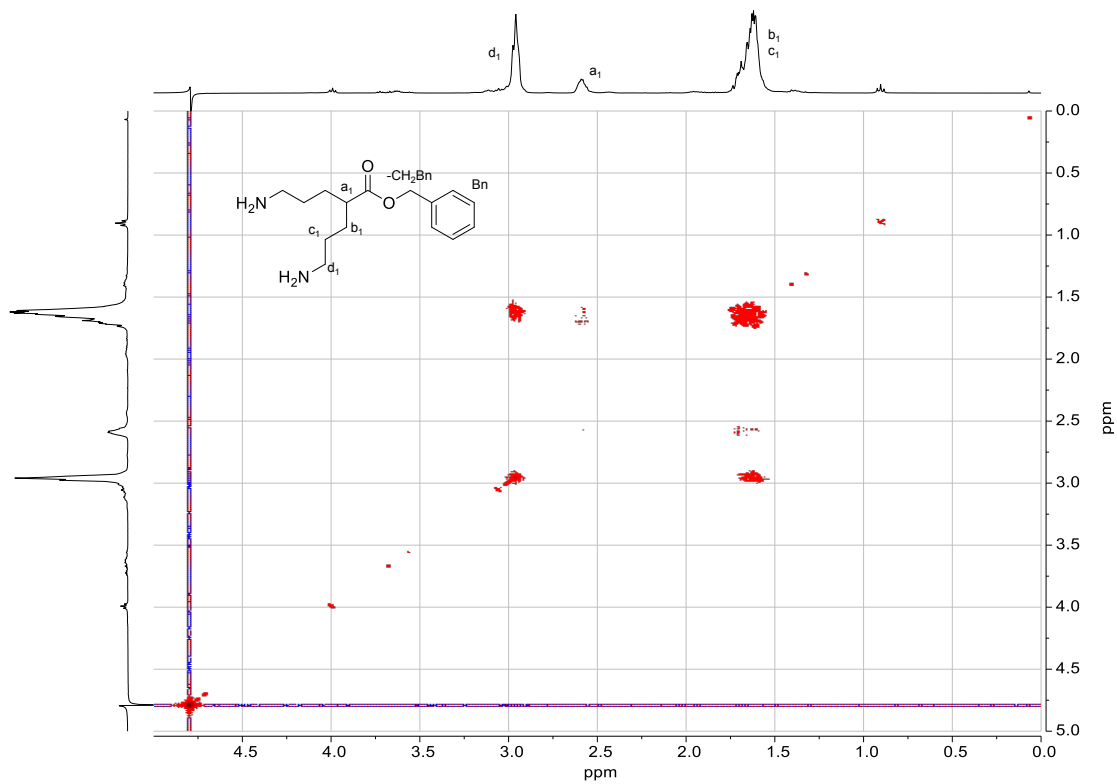


Figura 201. Espectro COSY de *dg1Bn* en  $D_2O$ .

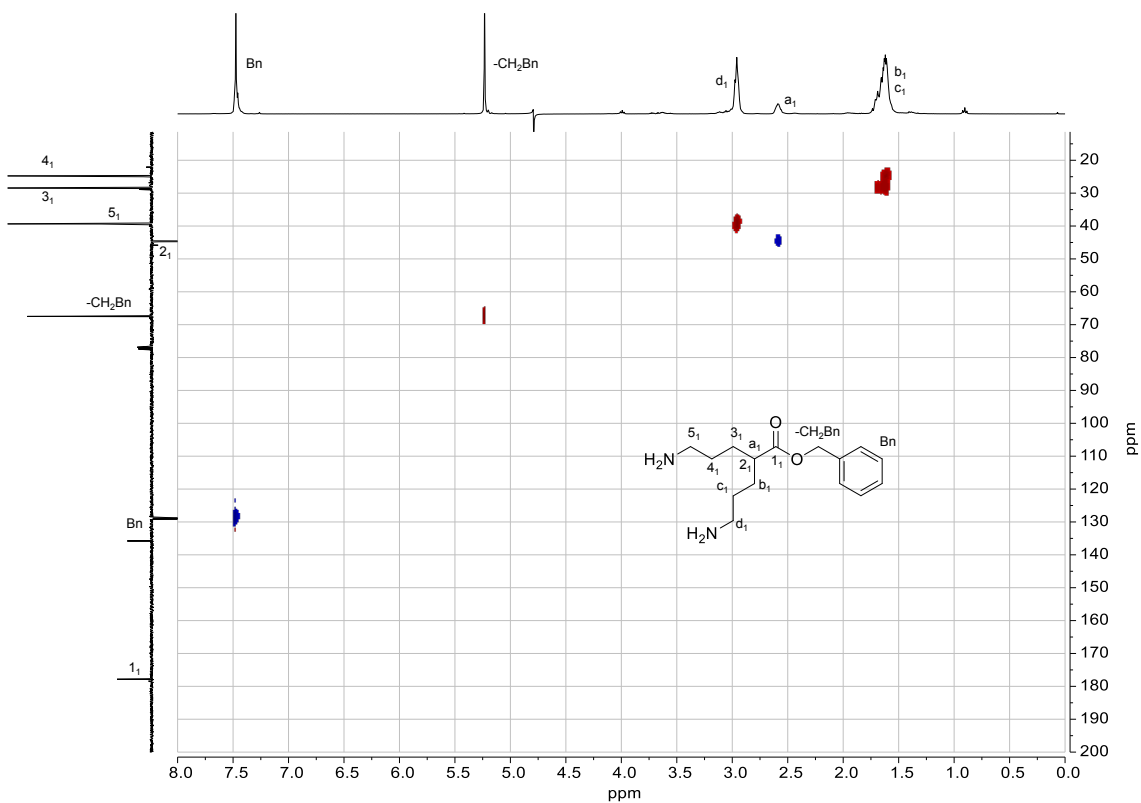


Figura 202. Espectro HSQC de *dg1Bn* en  $D_2O$ .

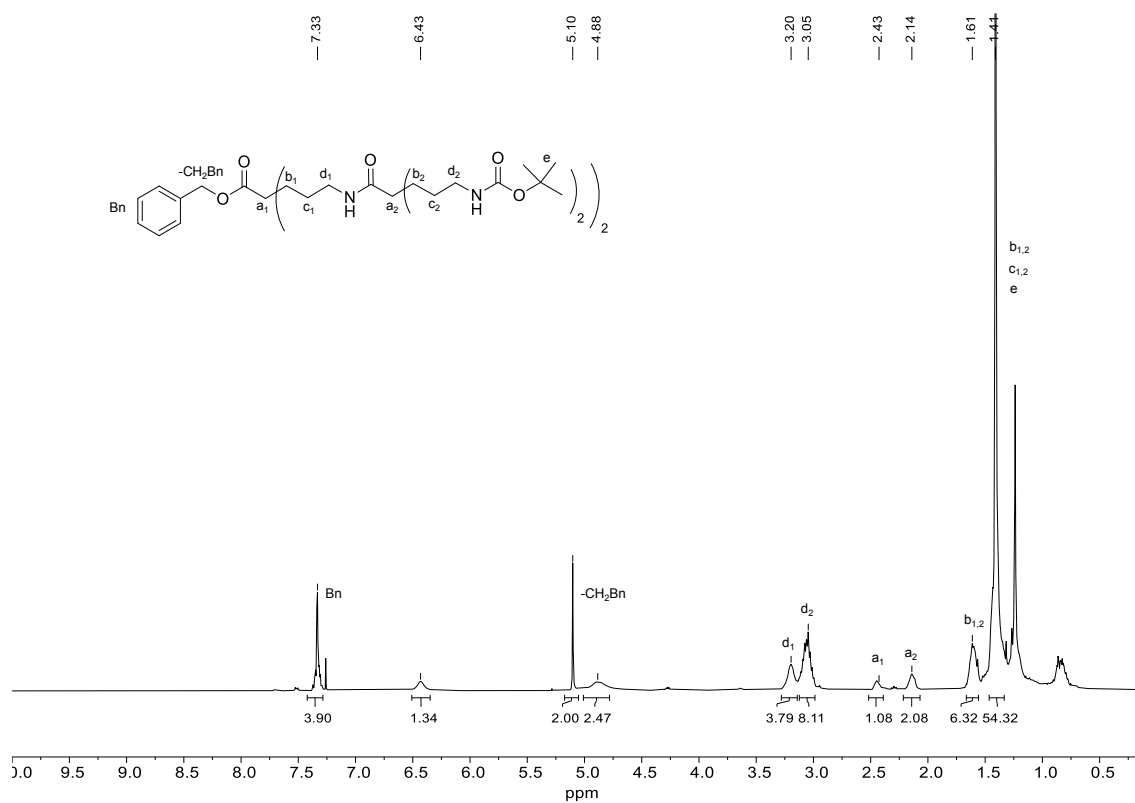


Figura 203. Espectro de RMN- $^1H$  de  $dg2Bn-NHBoc$  en  $CDCl_3$ .

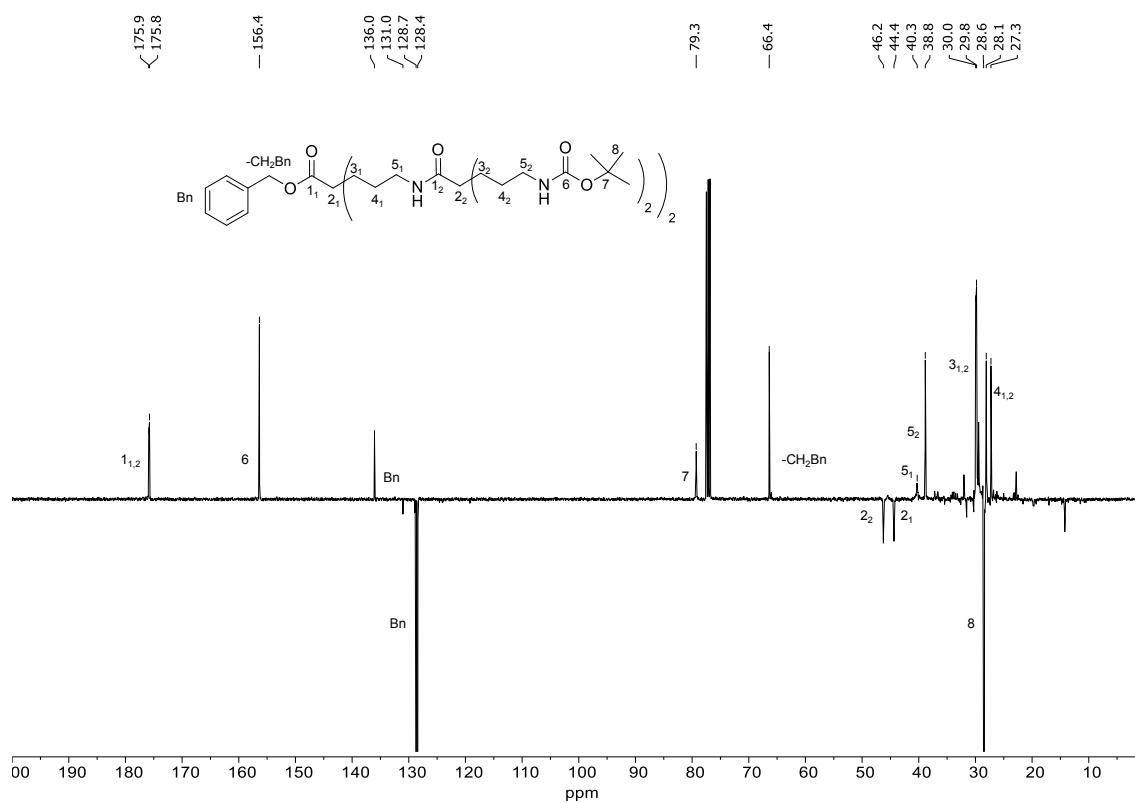


Figura 204. Espectro de RMN- $^{13}C$  (SEFT) de  $dg2Bn-NHBoc$  en  $CDCl_3$ .

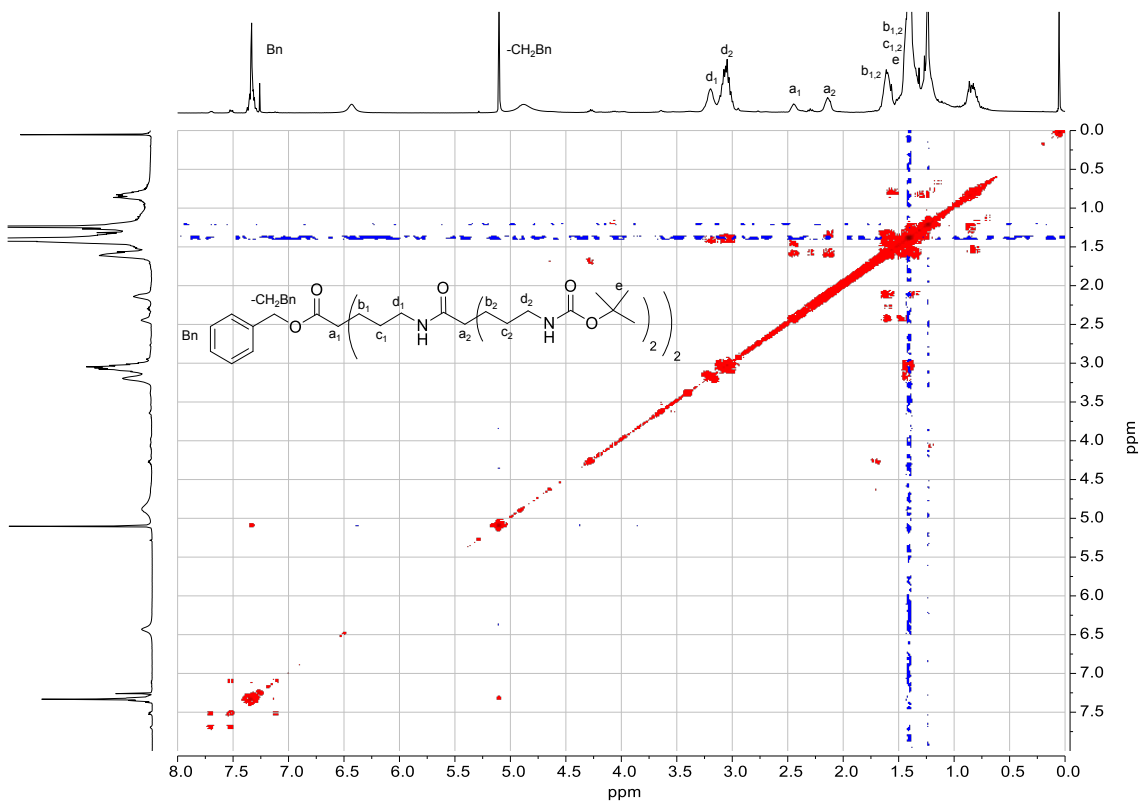


Figura 205. Espectro COSY de **dg2Bn-NHBoc** en  $CDCl_3$ .

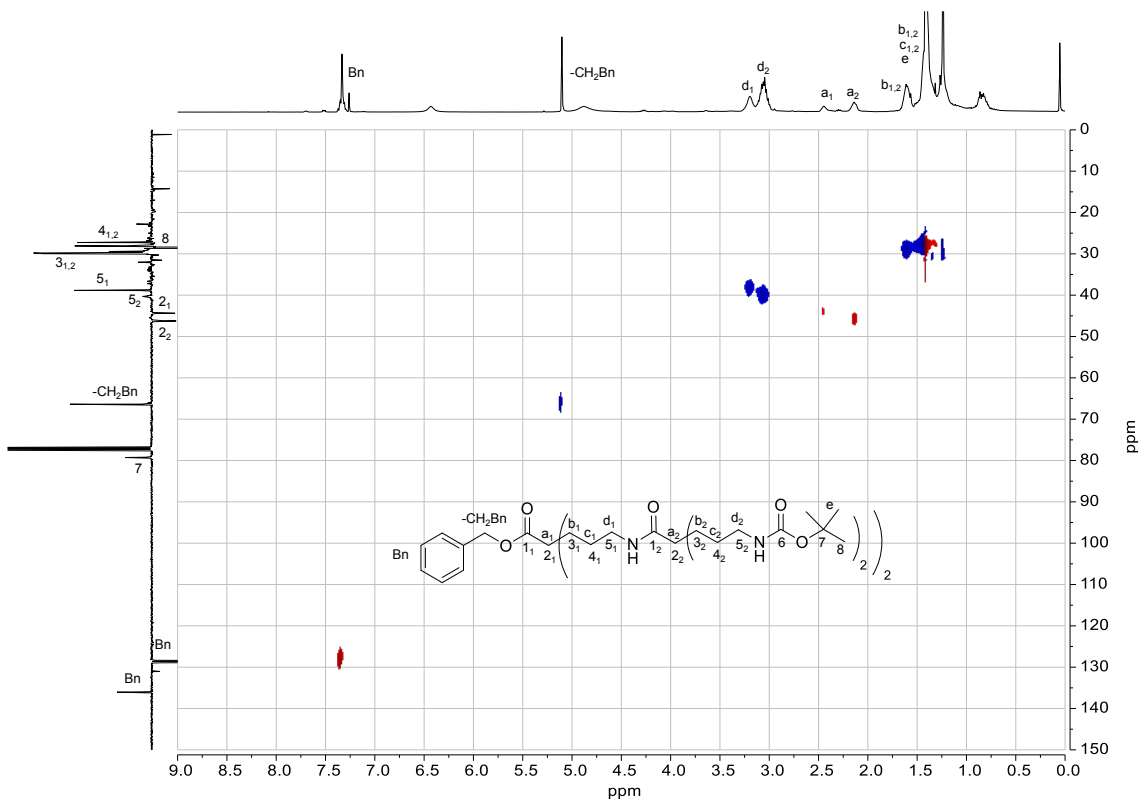


Figura 206. Espectro HSQC de **dg2Bn-NHBoc** en  $CDCl_3$ .

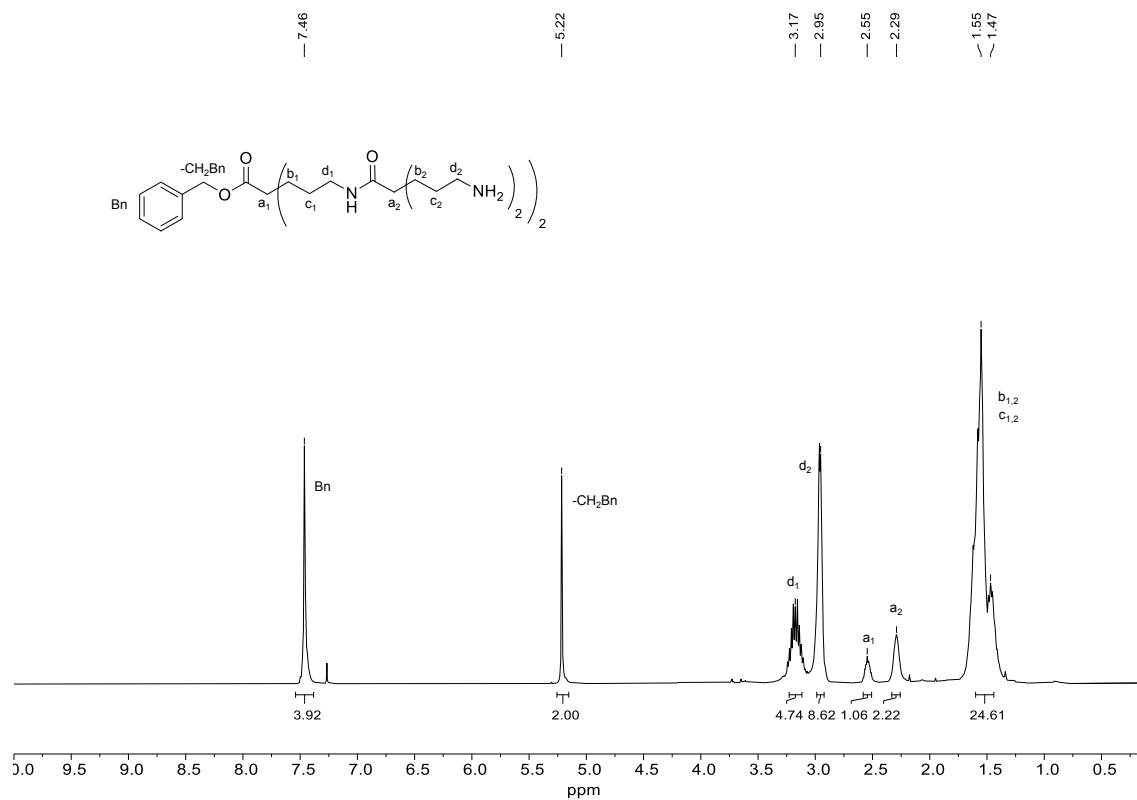


Figura 207. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **dg2Bn** en D<sub>2</sub>O.

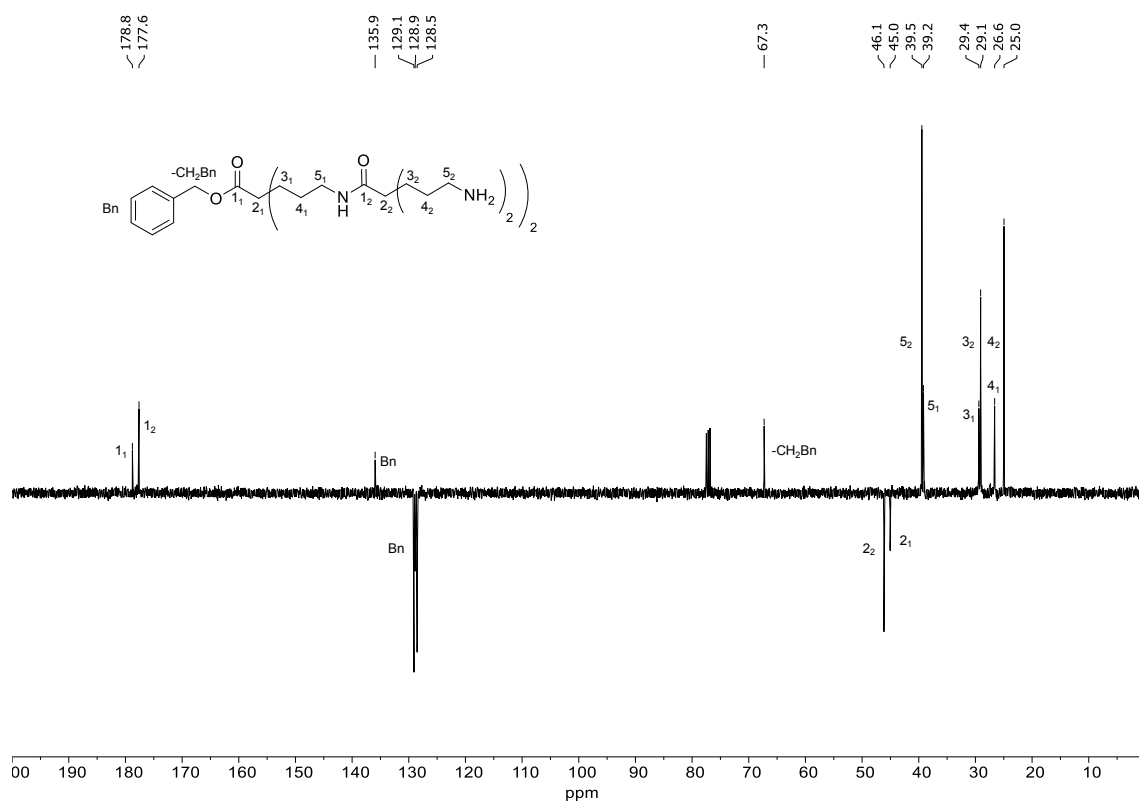


Figura 208. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **dg2Bn** en D<sub>2</sub>O.

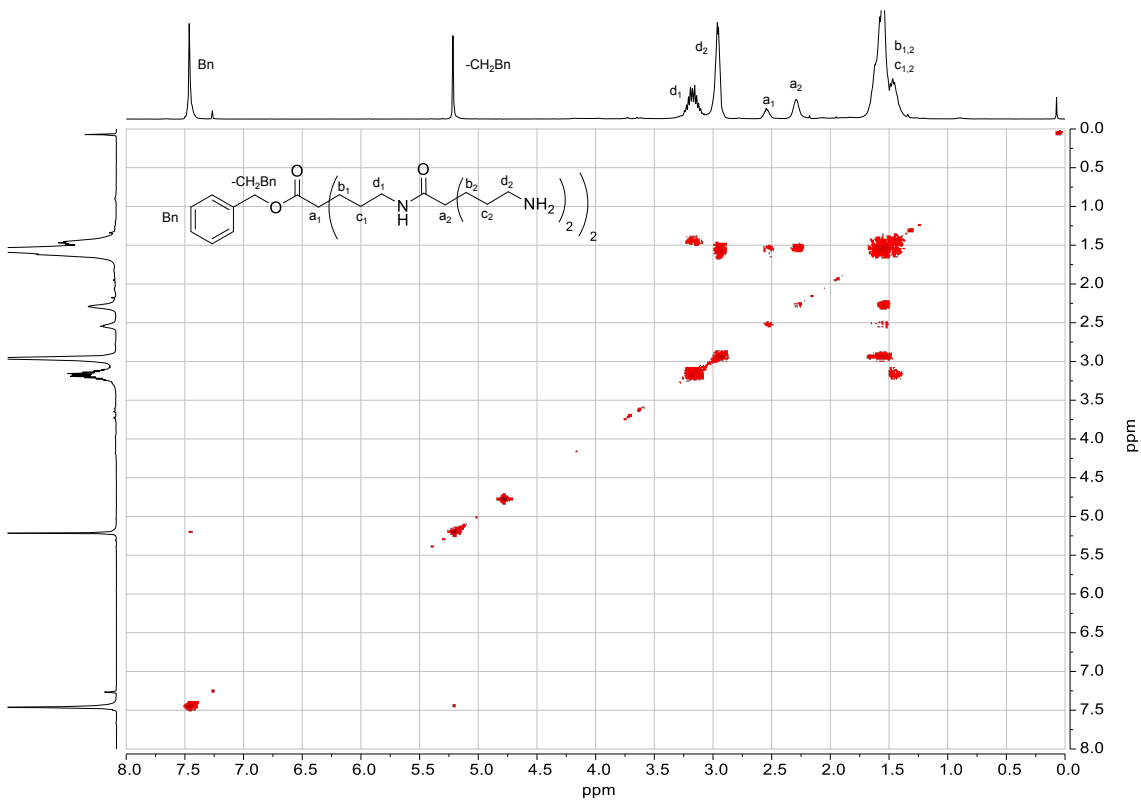


Figura 209. Espectro COSY de *dg2Bn* en  $D_2O$ .

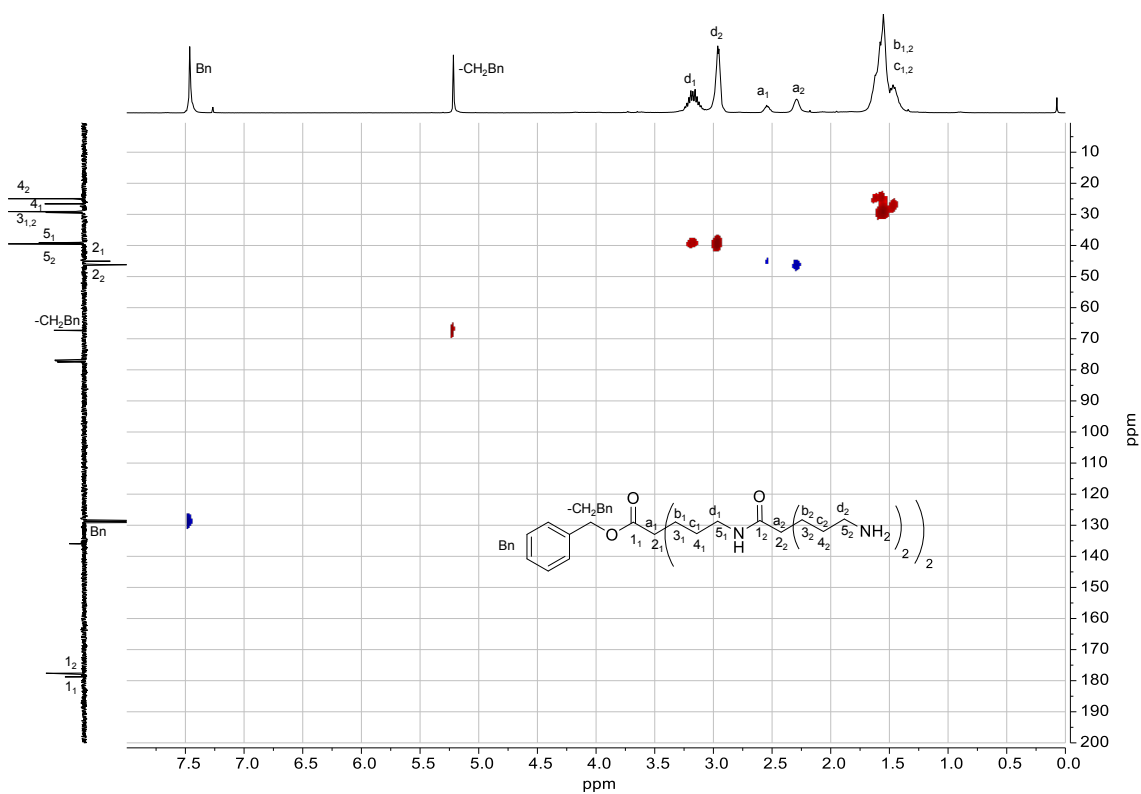


Figura 210. Espectro HSQC de *dg2Bn* en  $D_2O$ .

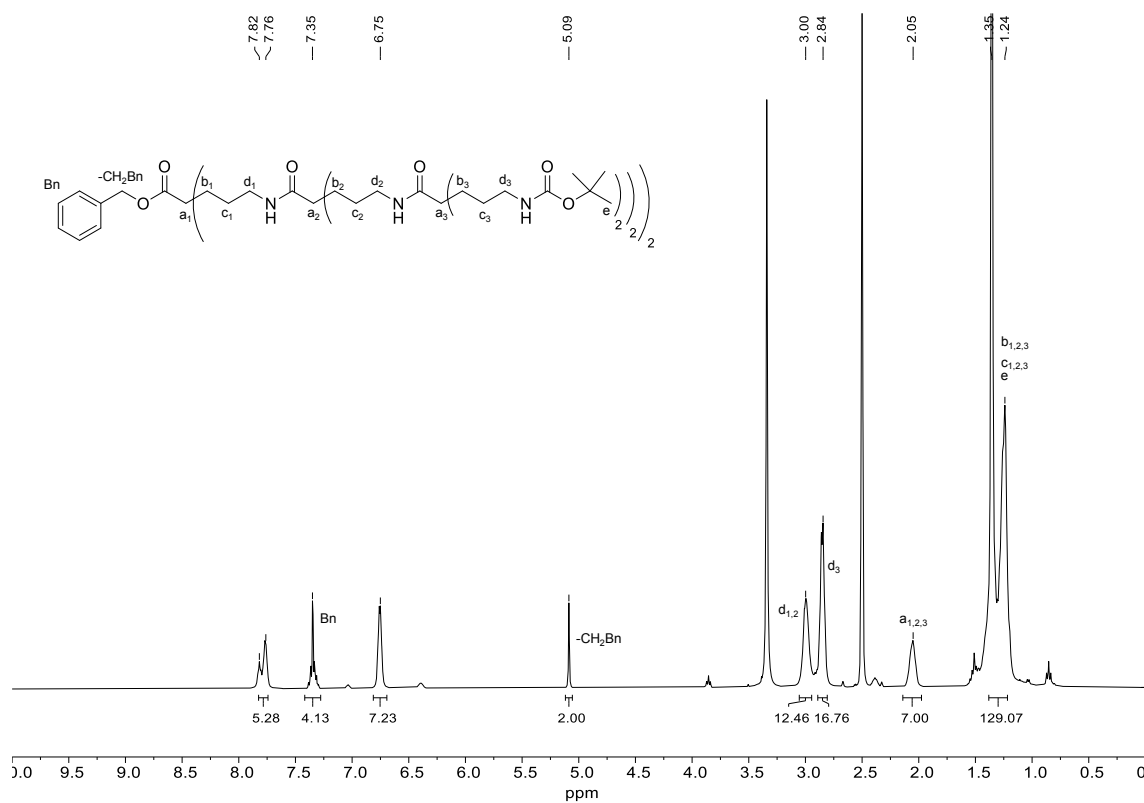


Figura 211. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de *dg3Bn-NHBoc* en DMSO-d<sub>6</sub>.

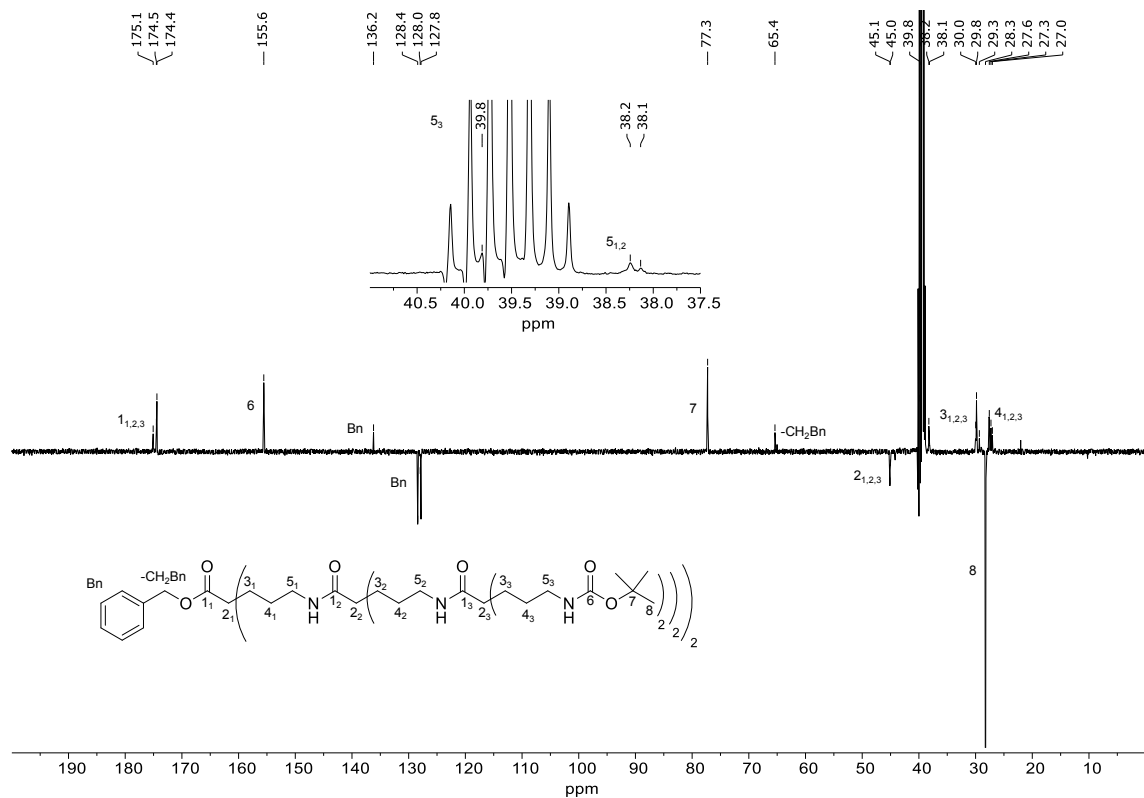


Figura 212. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de *dg3Bn-NHBoc* en DMSO-d<sub>6</sub>.

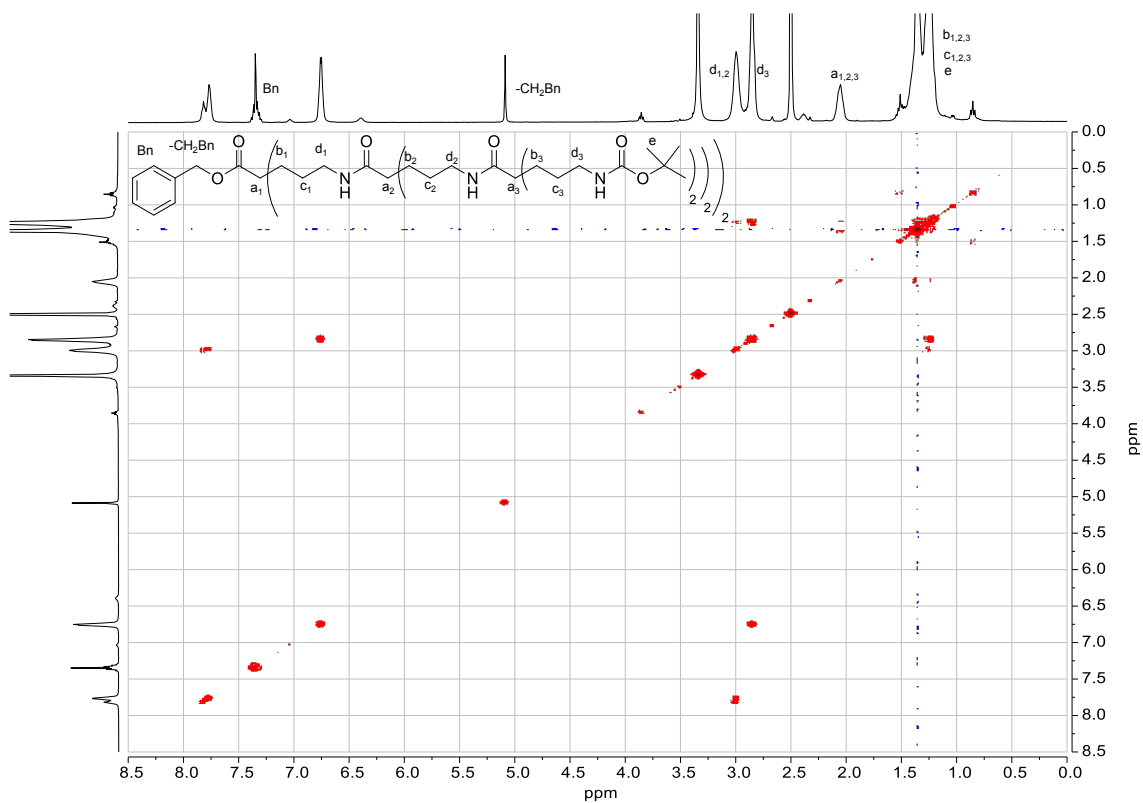


Figura 213. Espectro COSY de *dg3Bn-NHBoc* en  $DMSO-d_6$ .

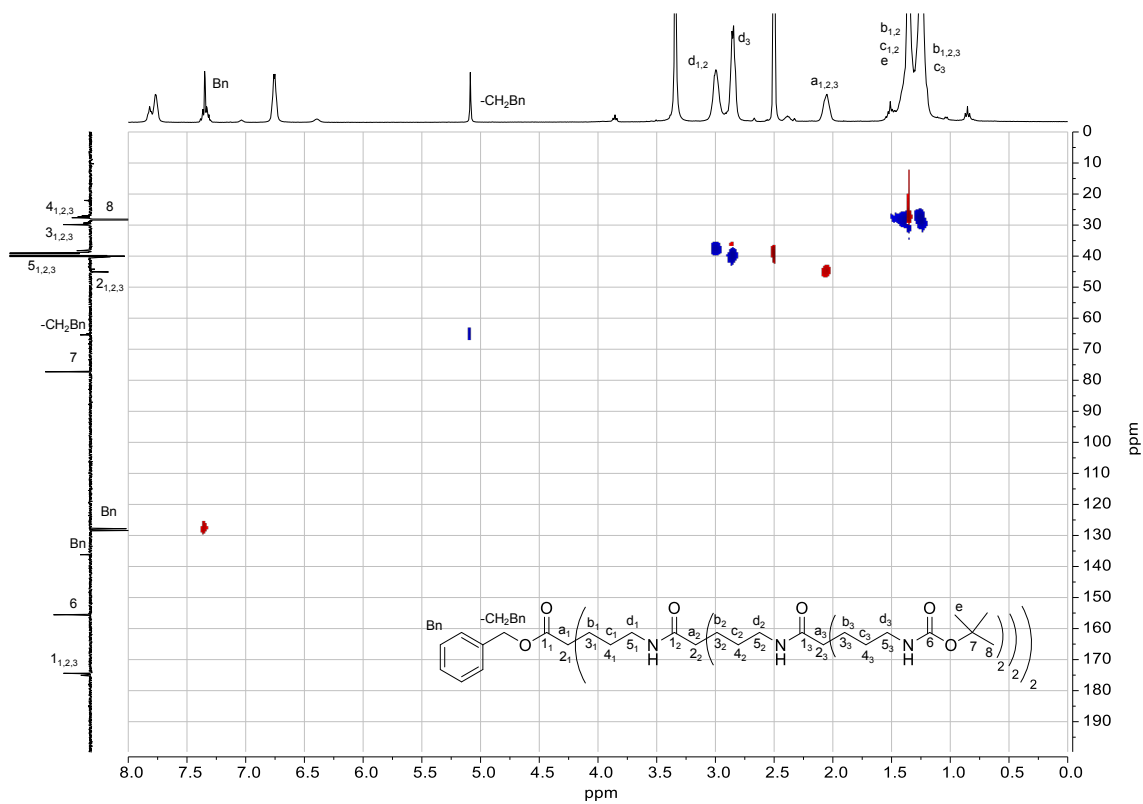


Figura 214. Espectro HSQC de *dg3Bn-NHBoc* en  $DMSO-d_6$ .

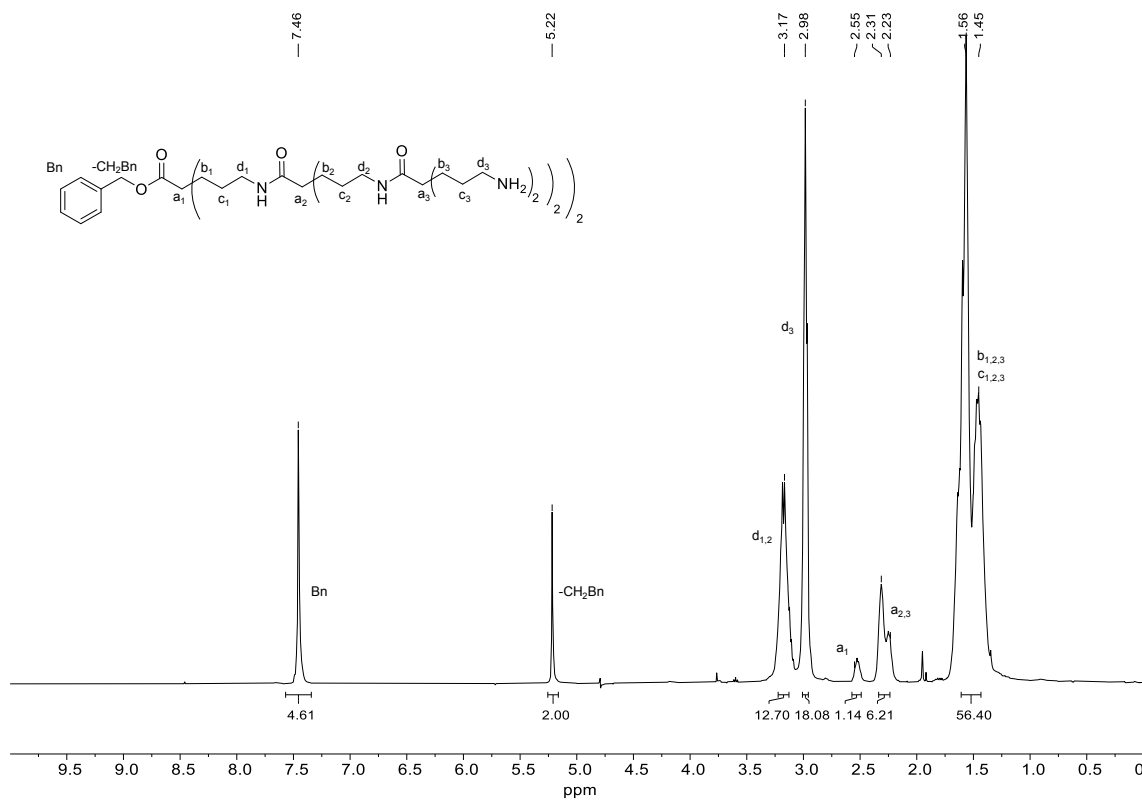


Figura 215. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de **dg3Bn** en  $\text{D}_2\text{O}$ .

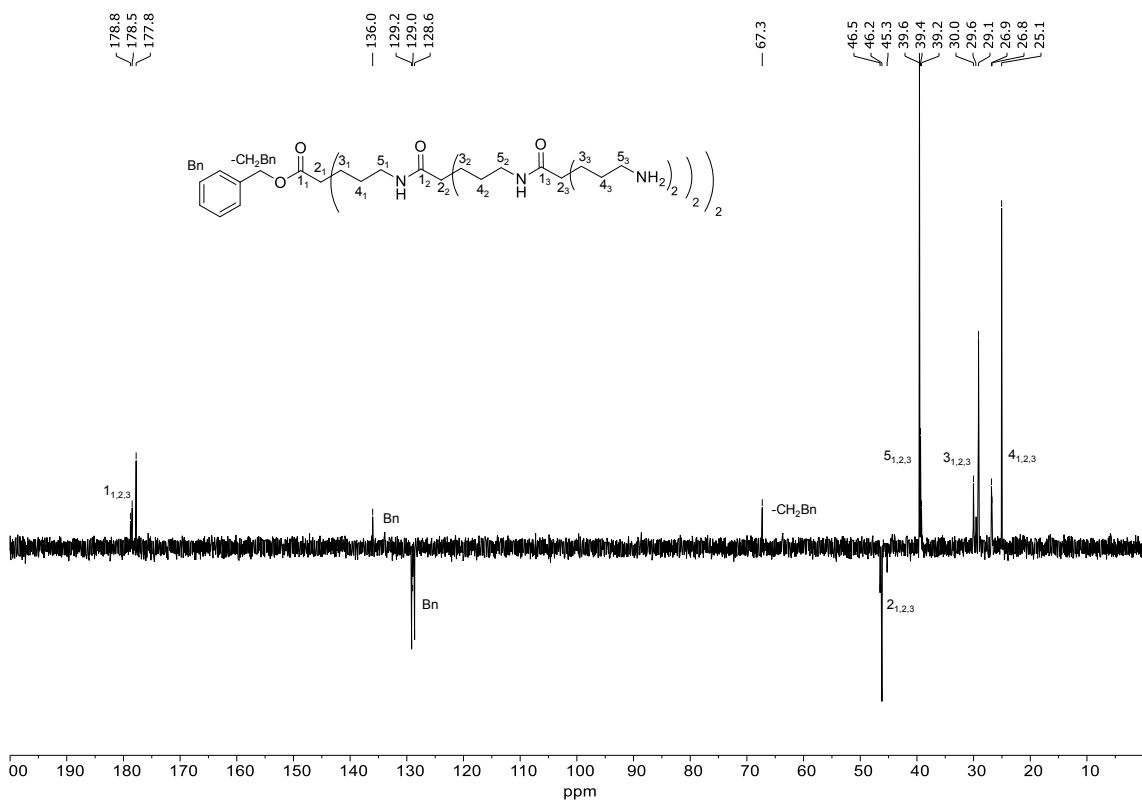


Figura 216. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (SEFT) de **dg3Bn** en  $\text{D}_2\text{O}$ .

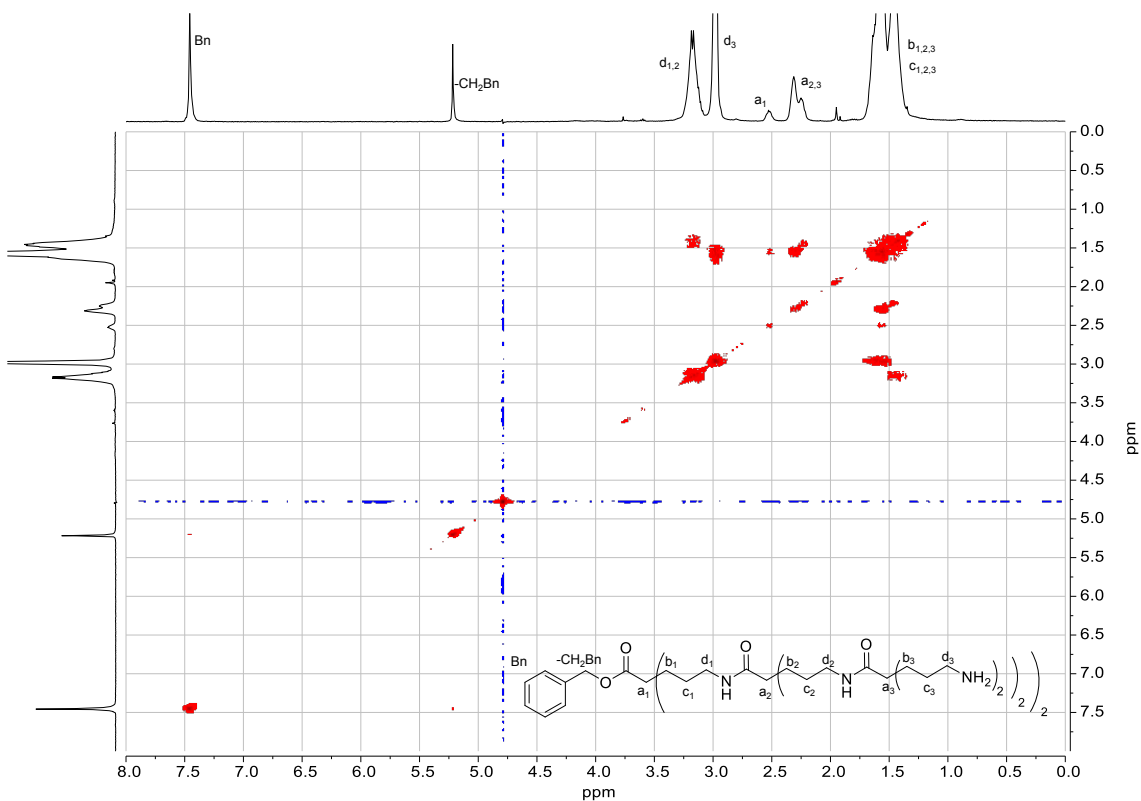


Figura 217. Espectro COSY de *dg3Bn* en  $D_2O$ .

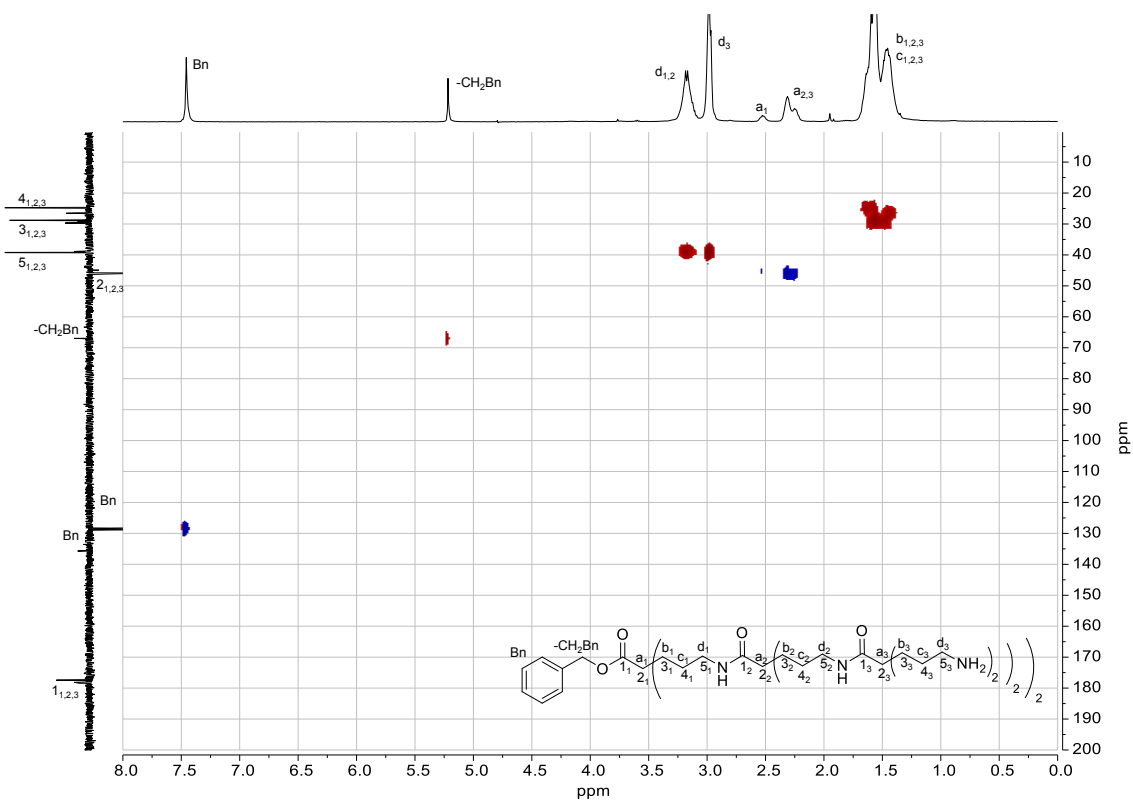


Figura 218. Espectro HSQC de *dg3Bn* en  $D_2O$ .

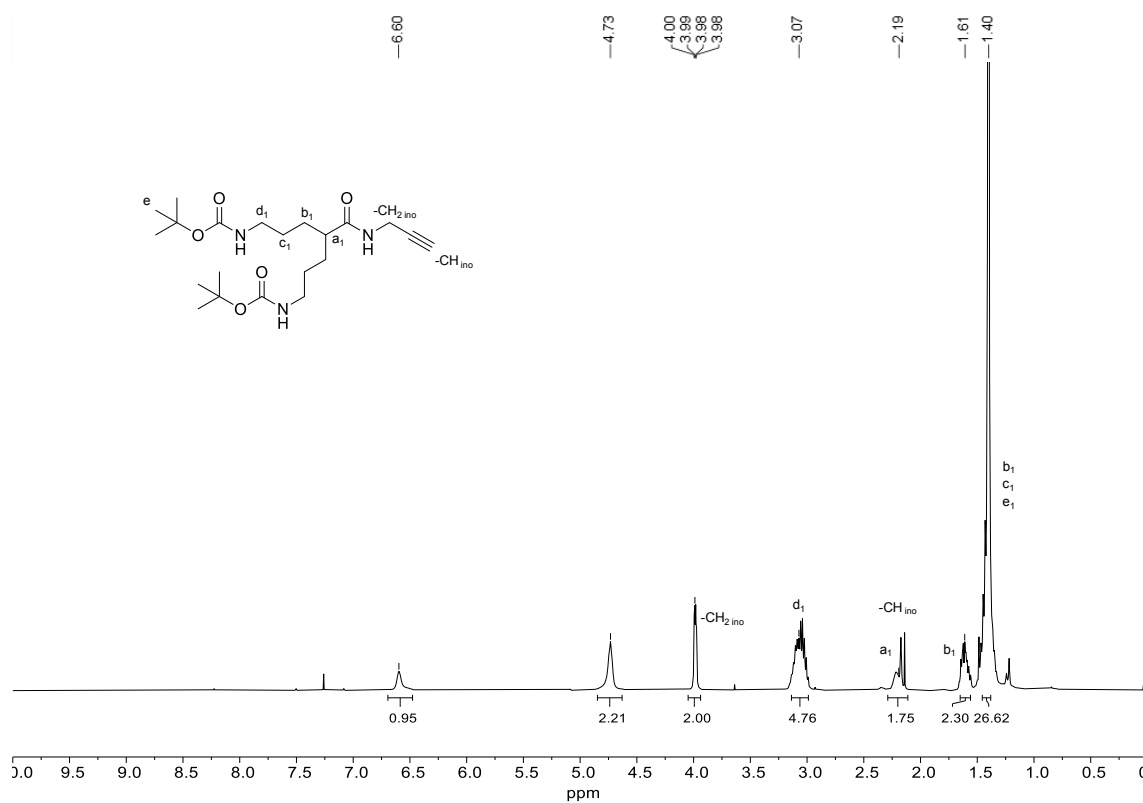


Figura 219. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de *dg1-ino-NHBoc* en CDCl<sub>3</sub>.

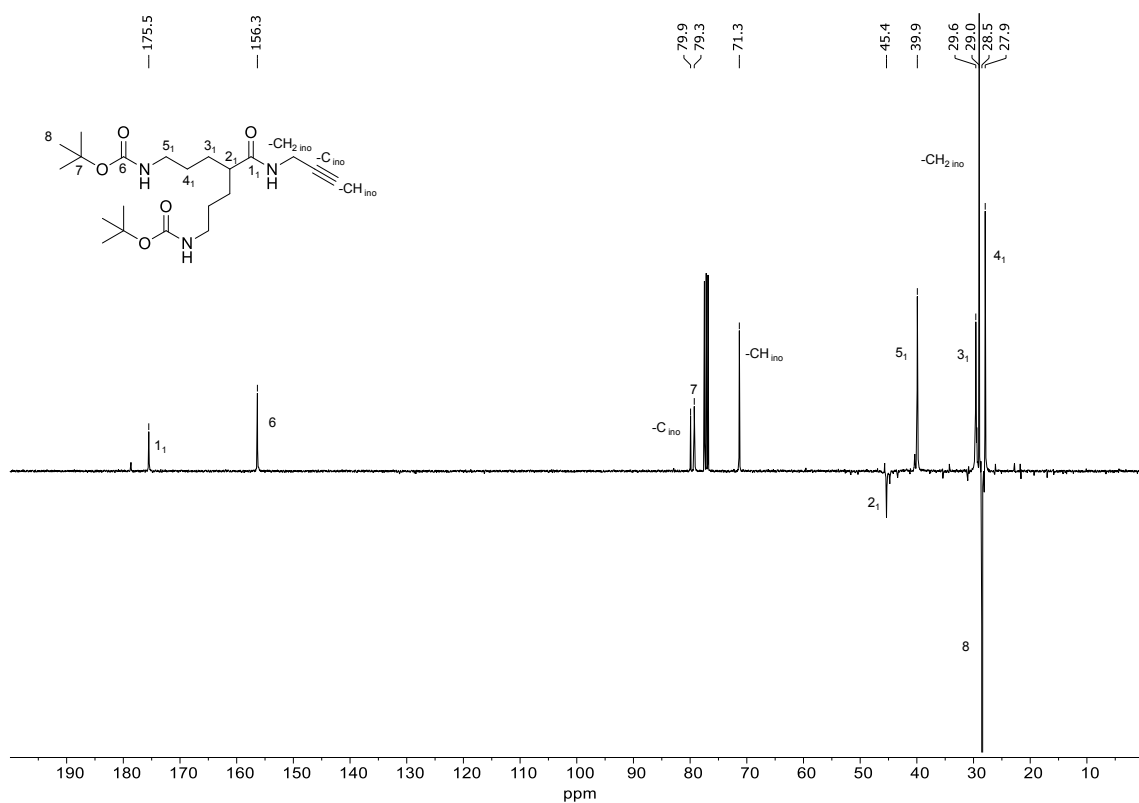


Figura 220. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de *dg1-ino-NHBoc* en CDCl<sub>3</sub>.

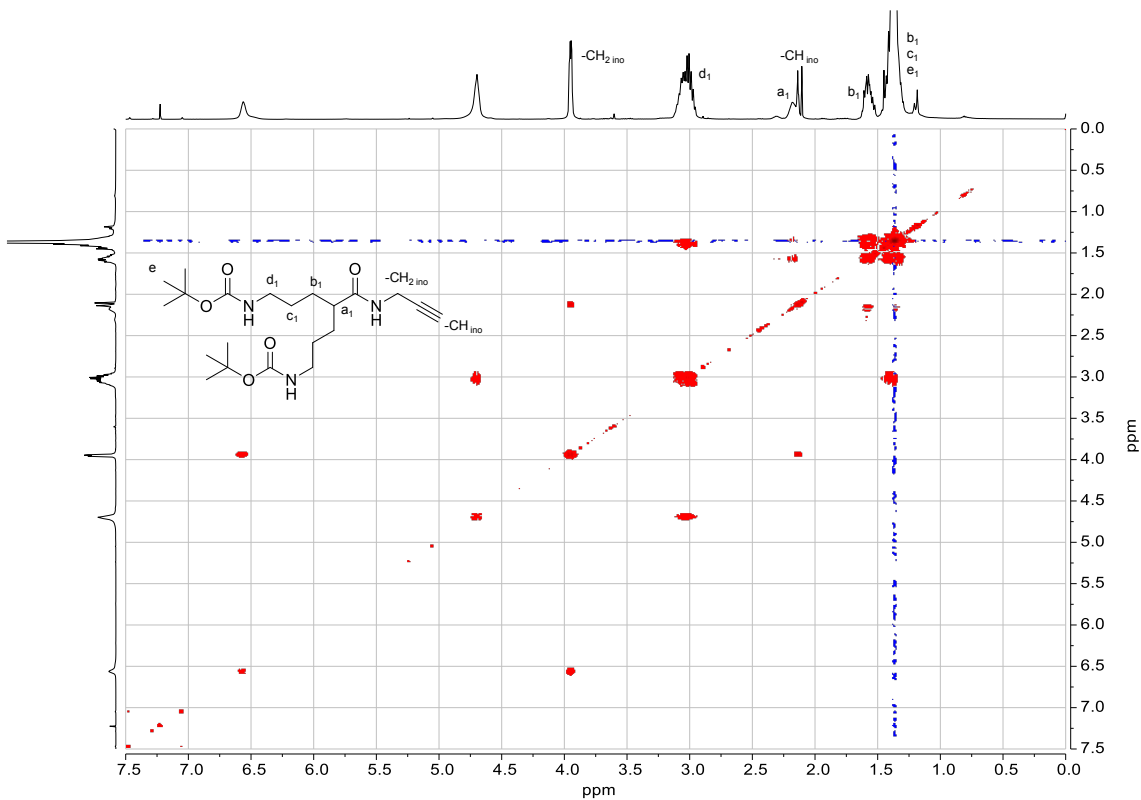


Figura 221. Espectro COSY de *dg1-ino-NHBoc* en  $CDCl_3$ .

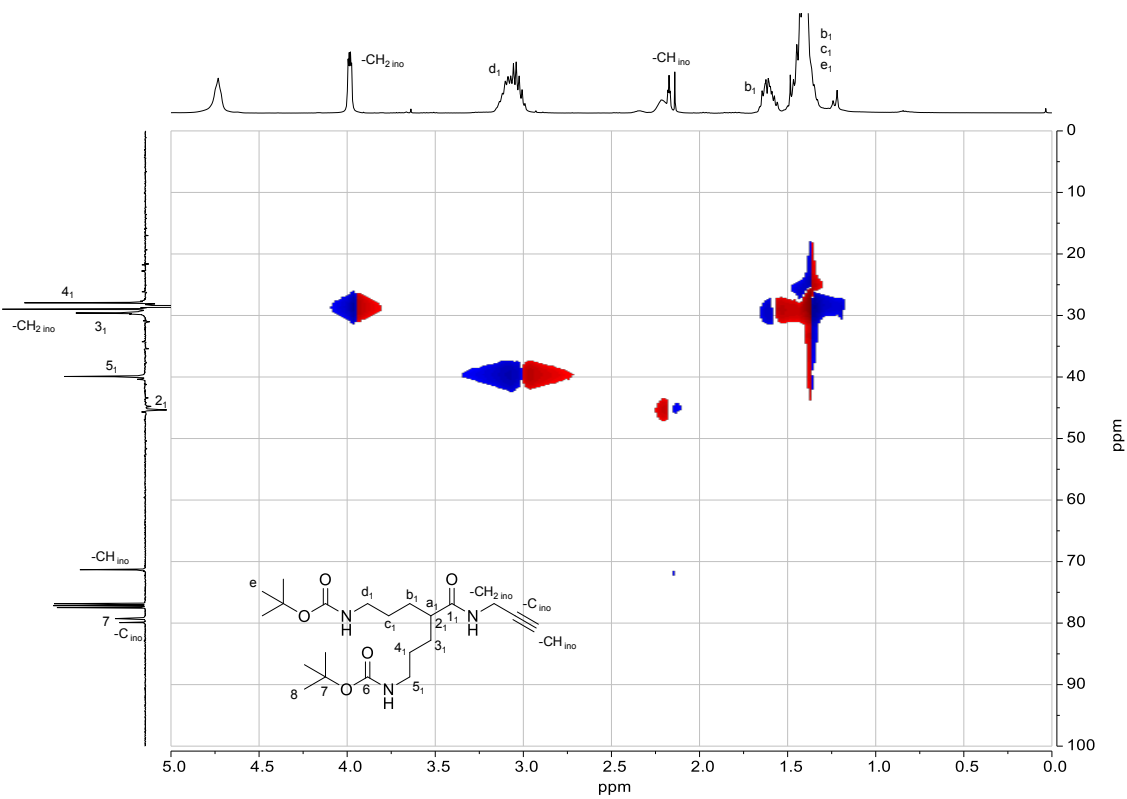


Figura 222. Espectro HSQC de *dg1-ino-NHBoc* en  $CDCl_3$ .

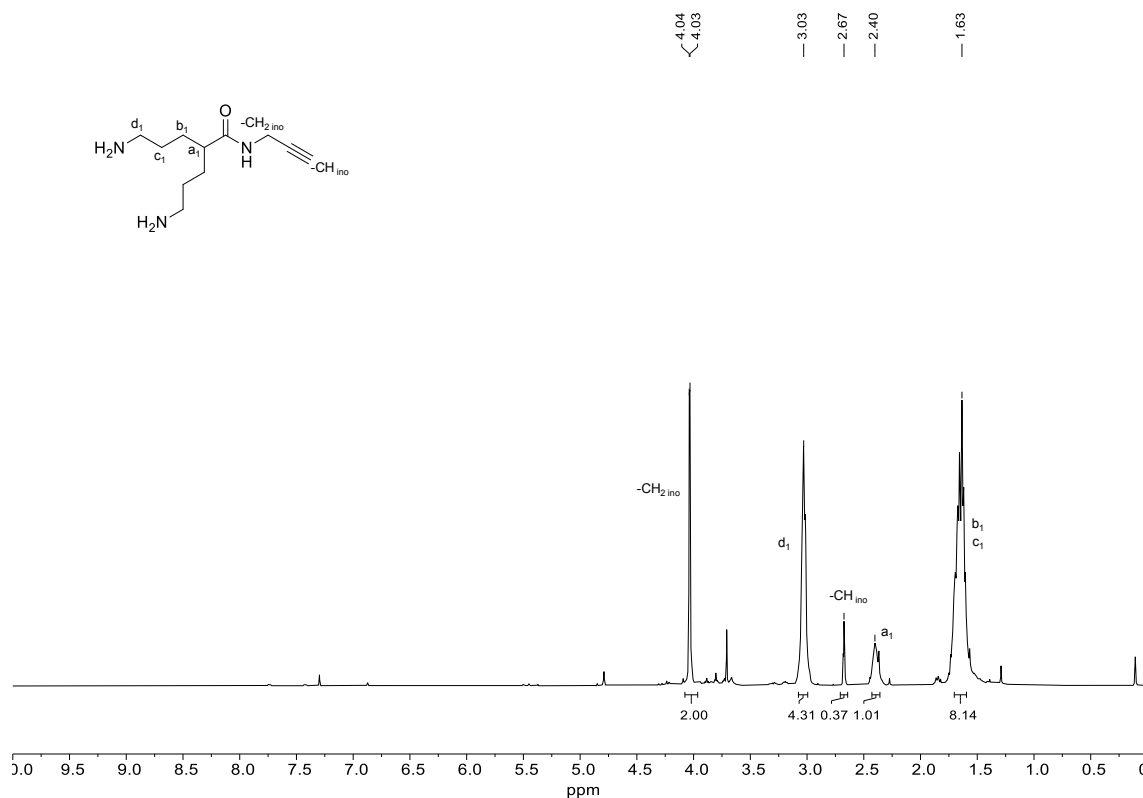


Figura 223. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de dg1-ino en  $\text{D}_2\text{O}$ .

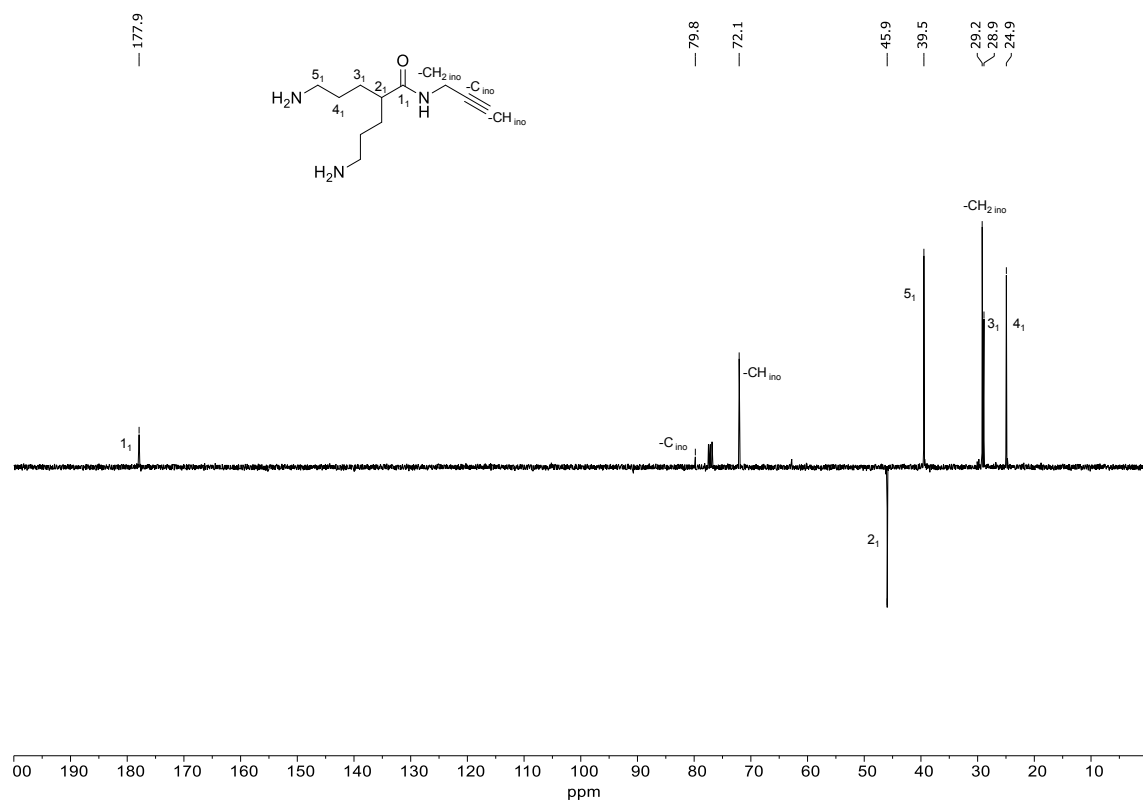


Figura 224. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (SEFT) de dg1-ino en  $\text{D}_2\text{O}$ .

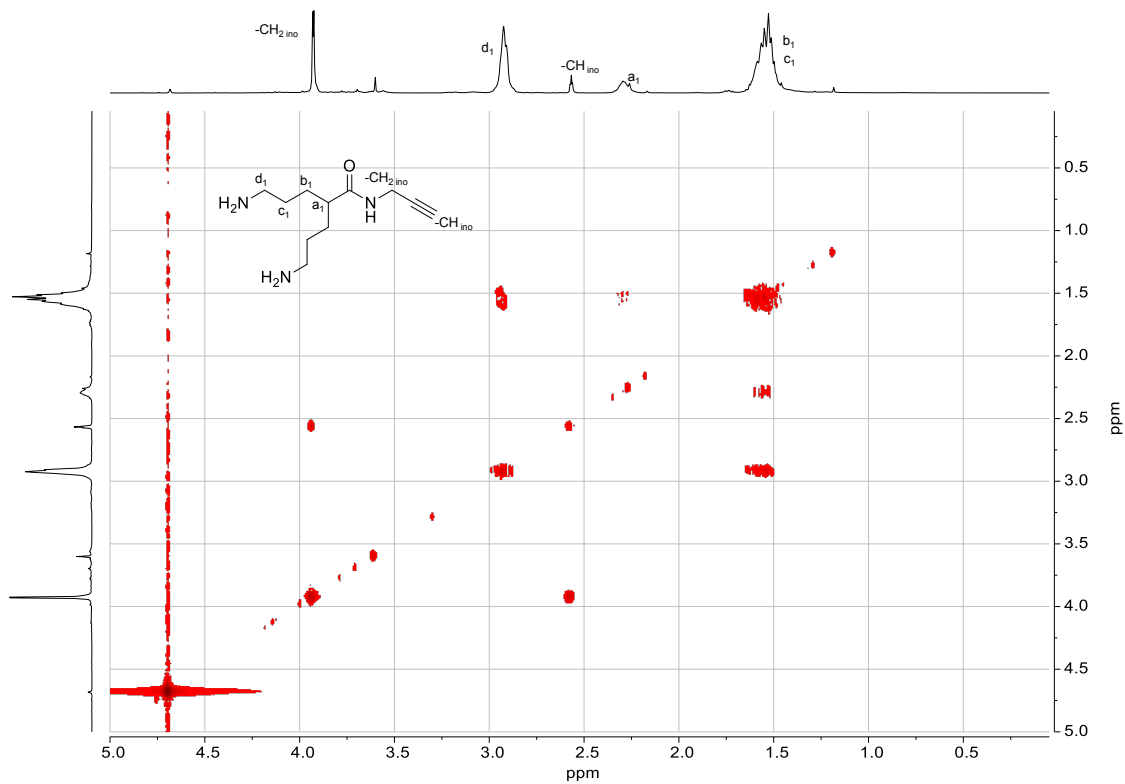


Figura 225. Espectro COSY de dg1-ino en D<sub>2</sub>O.

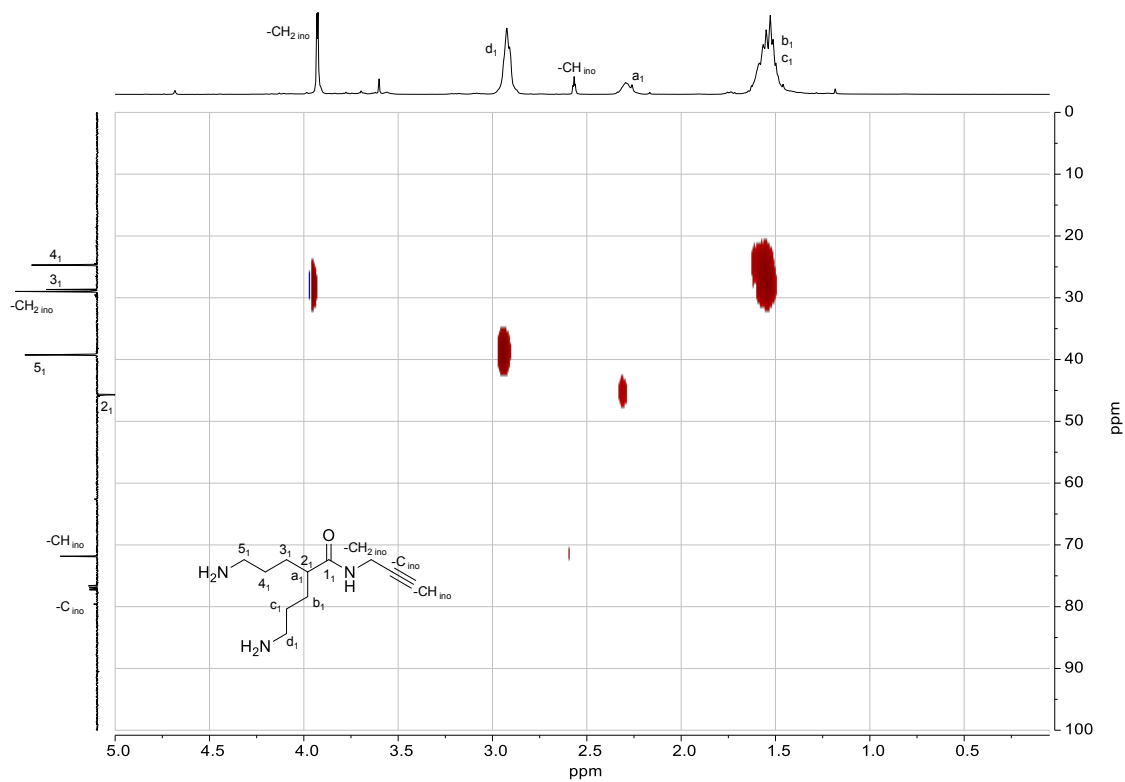


Figura 226. Espectro HSQC de dg1-ino en D<sub>2</sub>O.

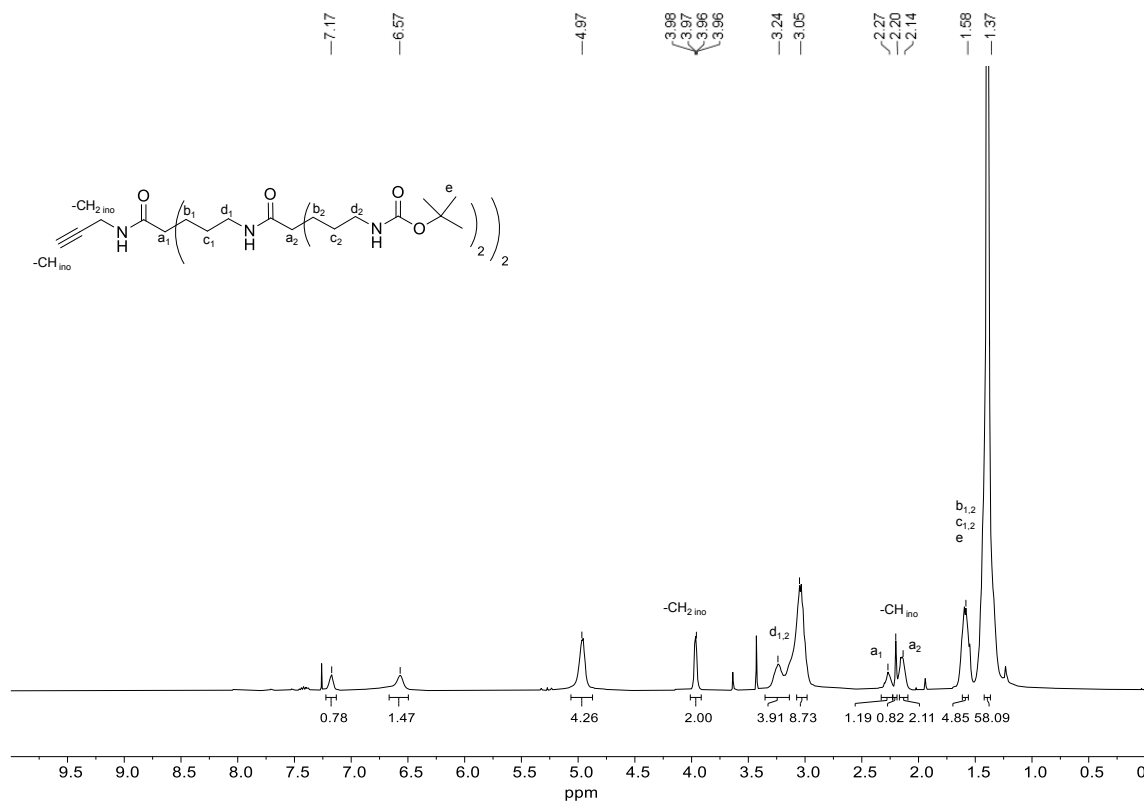


Figura 227. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de  $dg2\text{-ino-NHBoc}$  en  $\text{CDCl}_3$ .

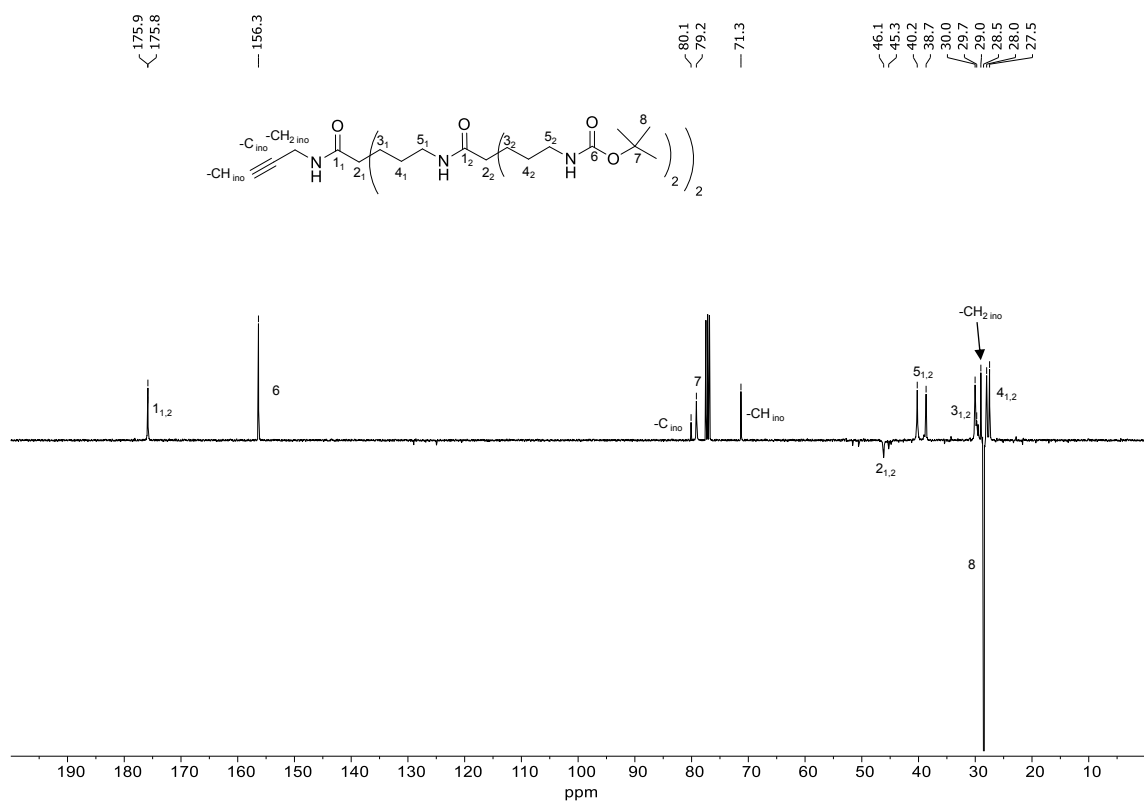


Figura 228. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (SEFT) de  $dg2\text{-ino-NHBoc}$  en  $\text{CDCl}_3$ .

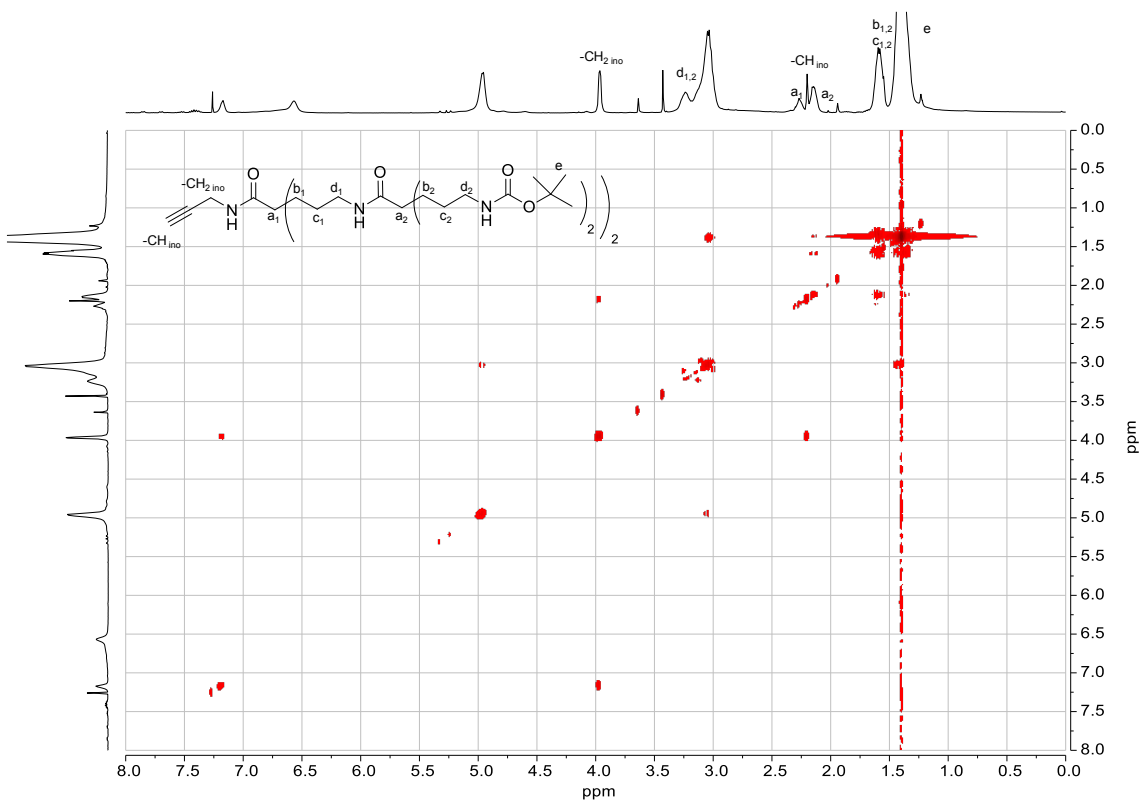


Figura 229. Espectro COSY de dg2-ino-NHBoc en CDCl<sub>3</sub>.

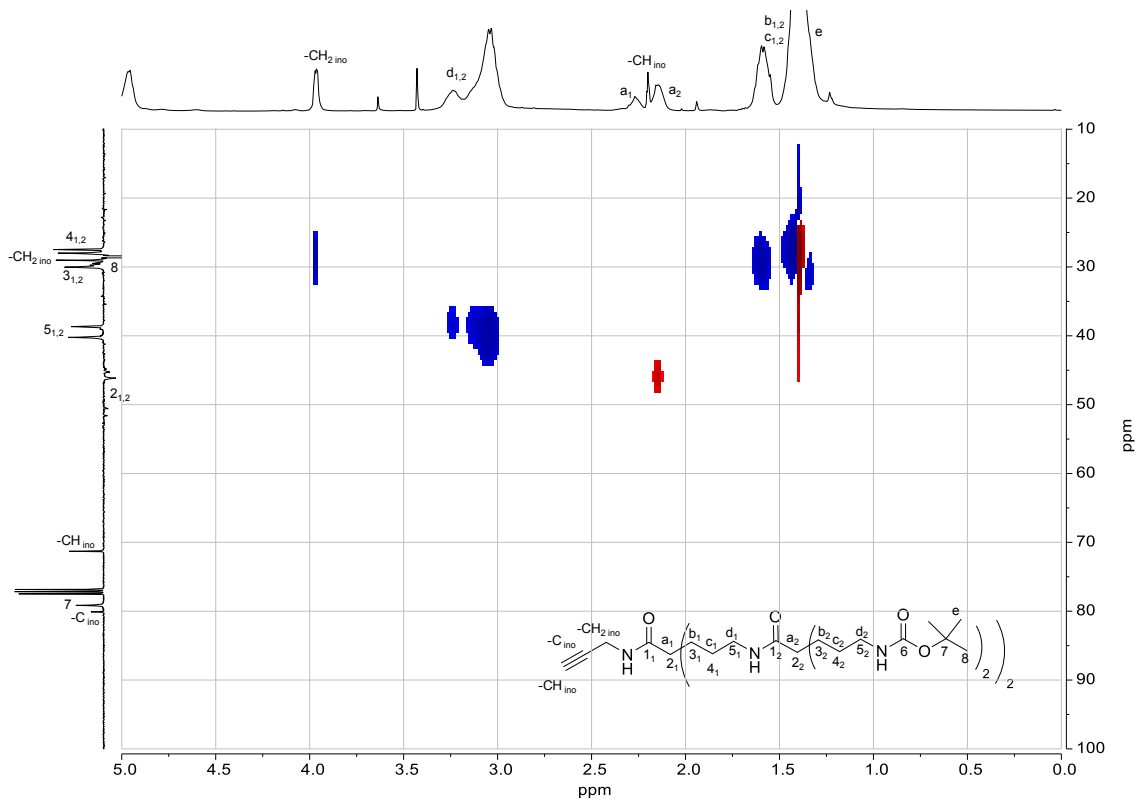


Figura 230. Espectro HSQC de dg2-ino-NHBoc en CDCl<sub>3</sub>.

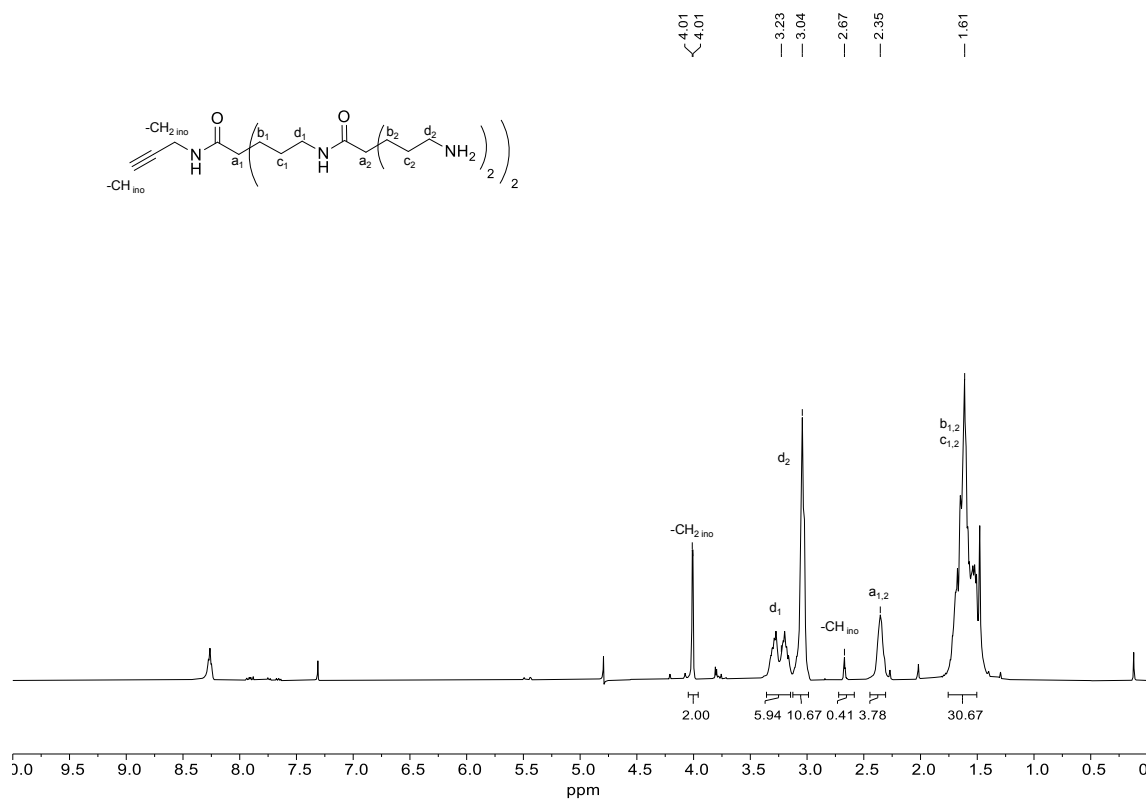


Figura 231. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **dg2-ino** en D<sub>2</sub>O.

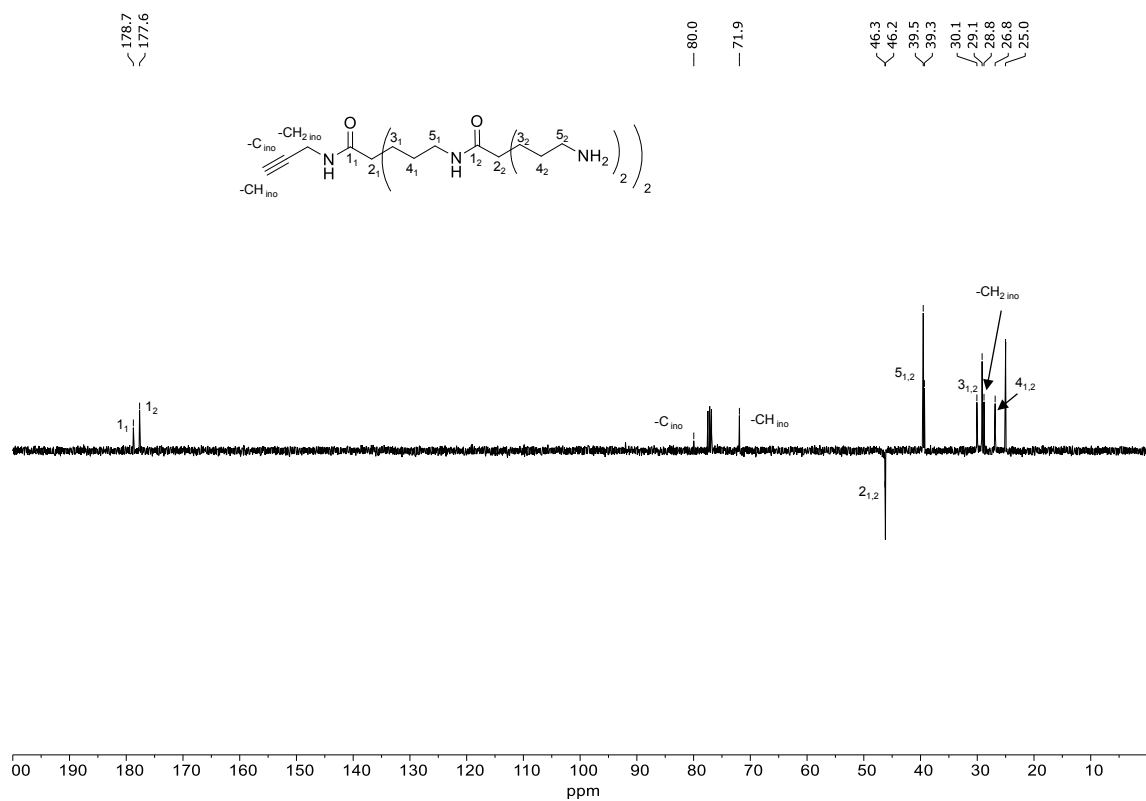


Figura 232. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **dg2-ino** en D<sub>2</sub>O.

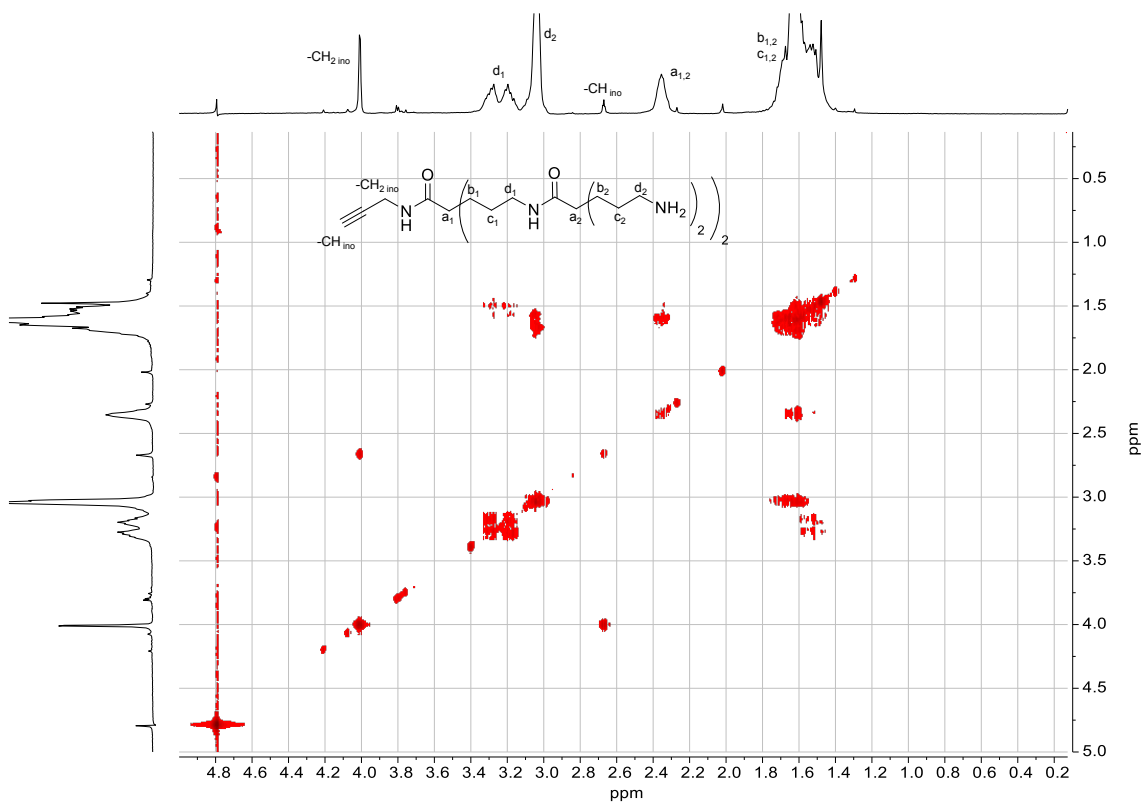


Figura 233. Espectro COSY de *dg2-ino* en  $D_2O$ .

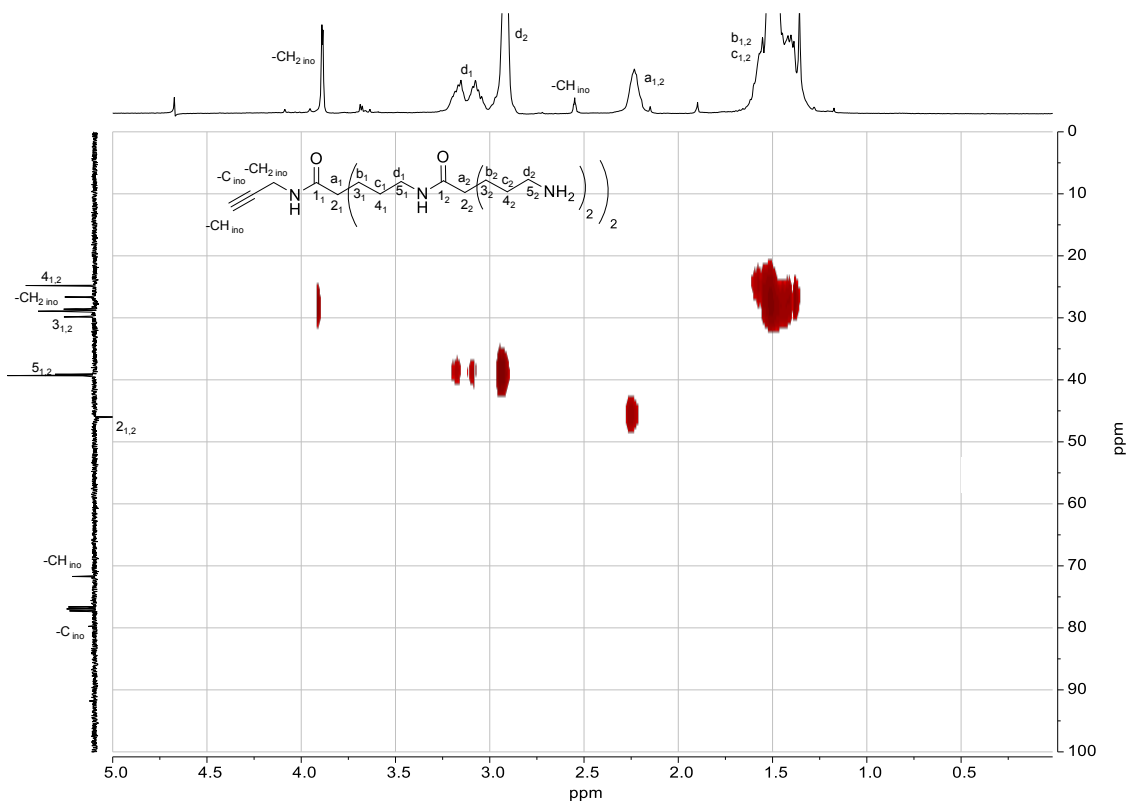


Figura 234. Espectro HSQC de *dg2-ino* en  $D_2O$ .

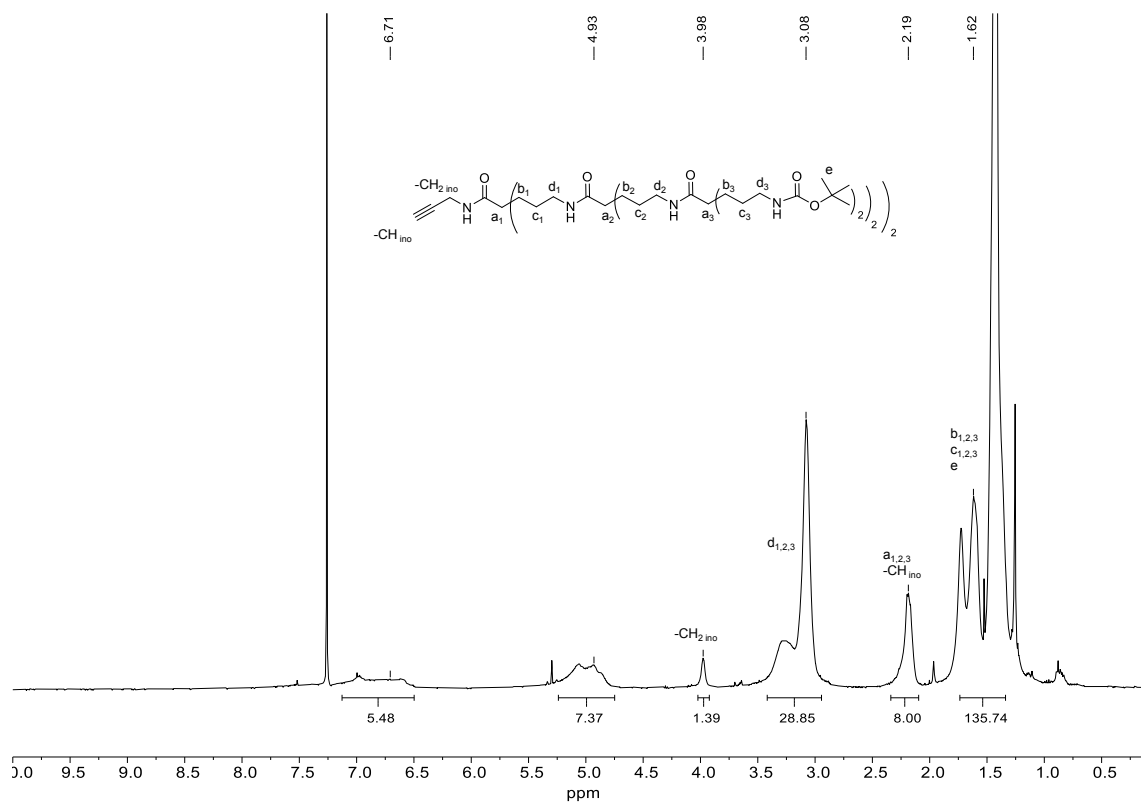


Figura 235. Espectro de RMN- $^1H$  de  $dg3\text{-ino-NHBoc}$  en  $CDCl_3$ .

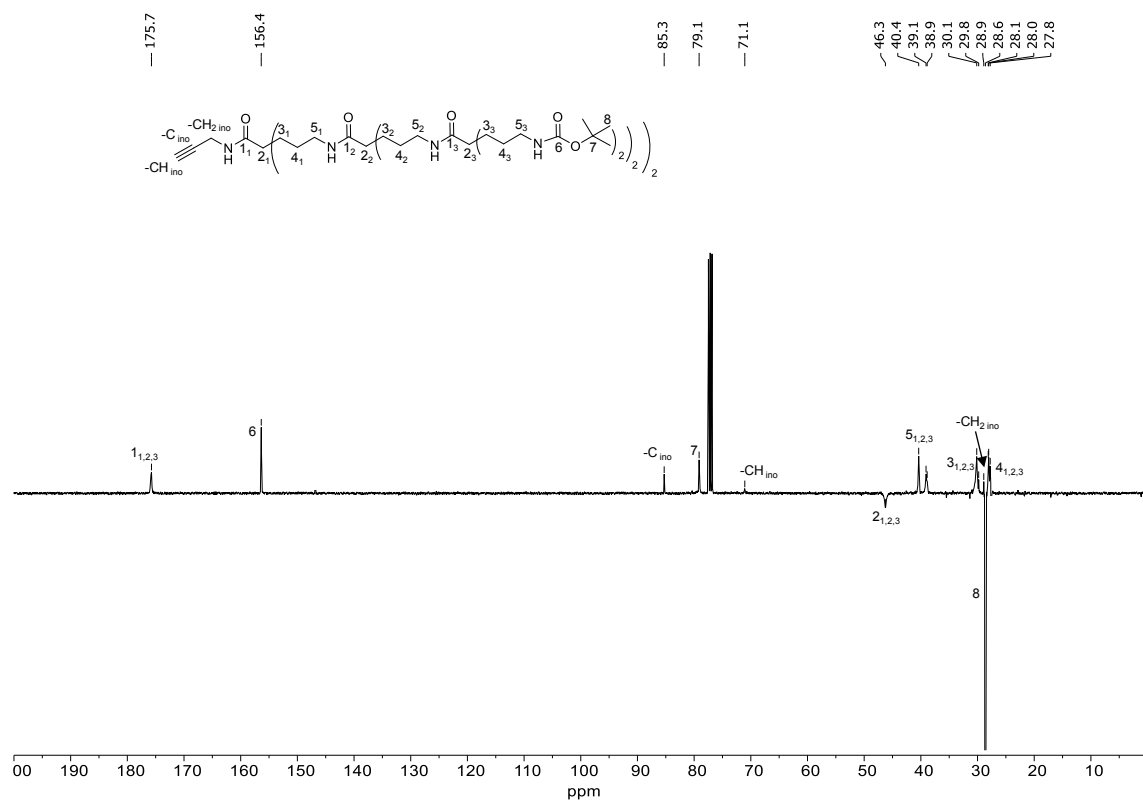


Figura 236. Espectro de RMN- $^{13}C$  (SEFT) de  $dg3\text{-ino-NHBoc}$  en  $CDCl_3$ .

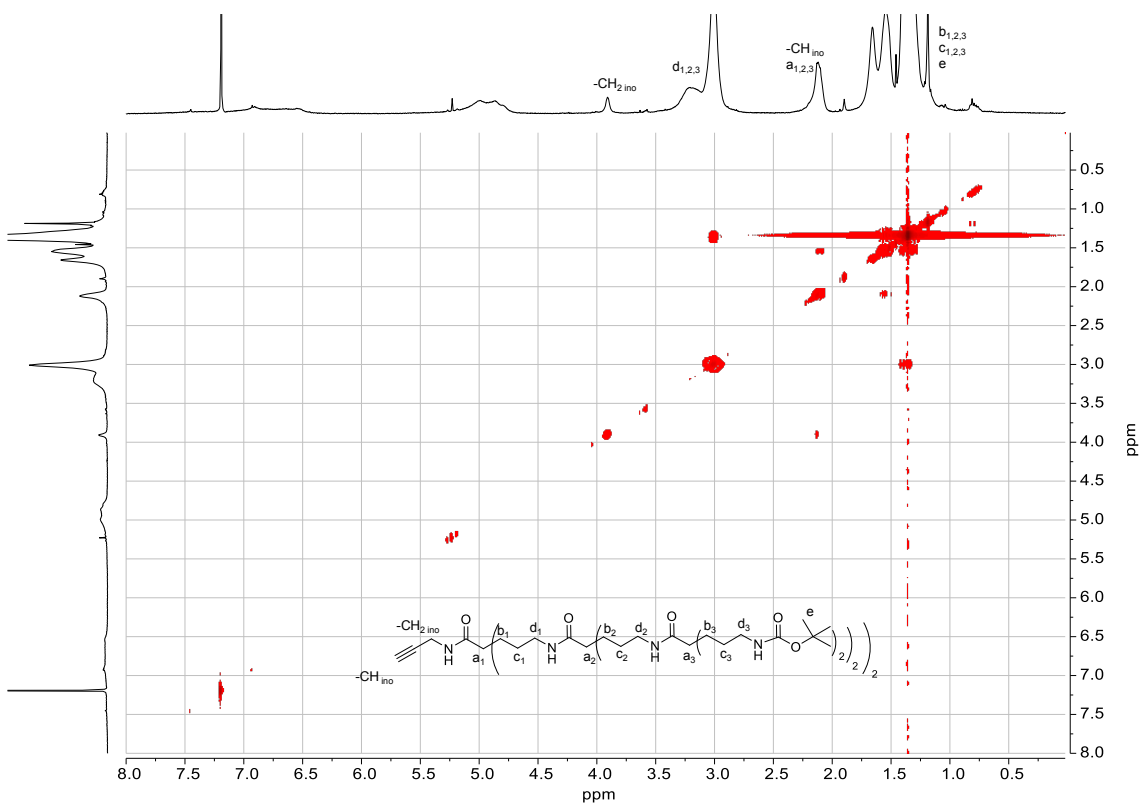


Figura 237. Espectro COSY de dg3-ino-NHBoc en CDCl<sub>3</sub>.

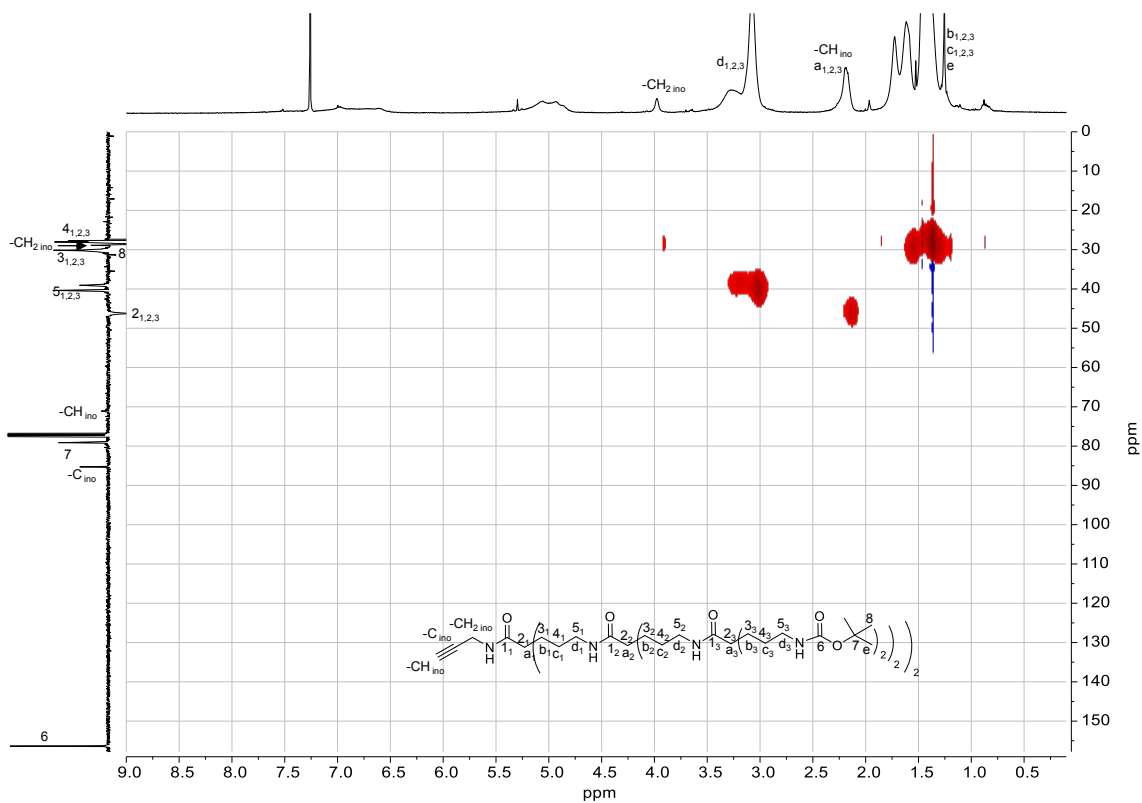


Figura 238. Espectro HSQC de dg3-ino-NHBoc en CDCl<sub>3</sub>.



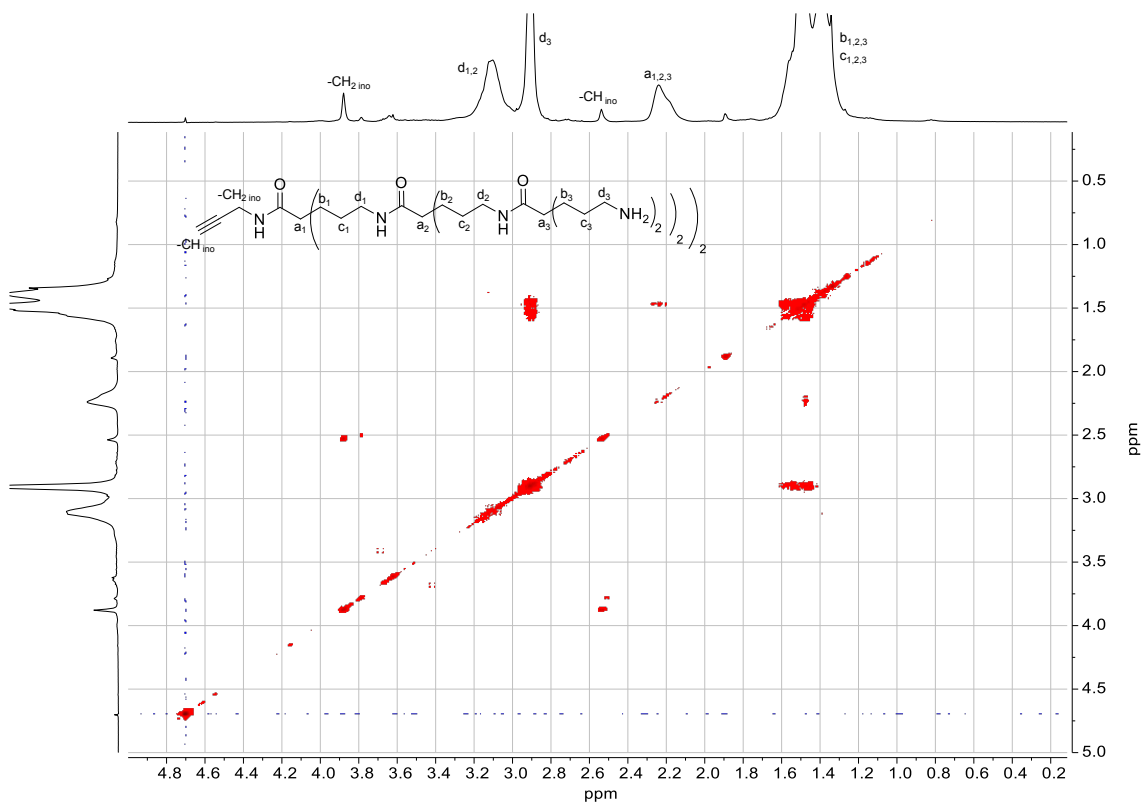


Figura 241. Espectro COSY de *dg3-ino* en  $D_2O$ .

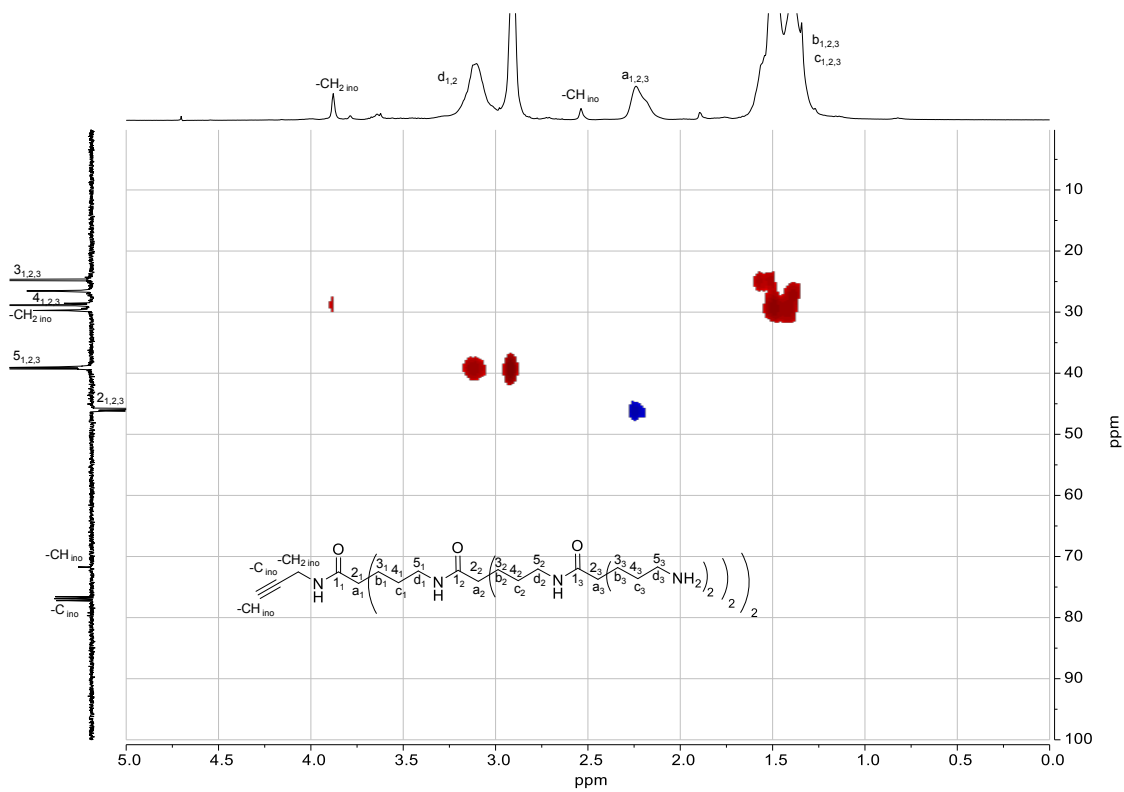


Figura 242. Espectro HSQC de *dg3-ino* en  $D_2O$ .



Anexo

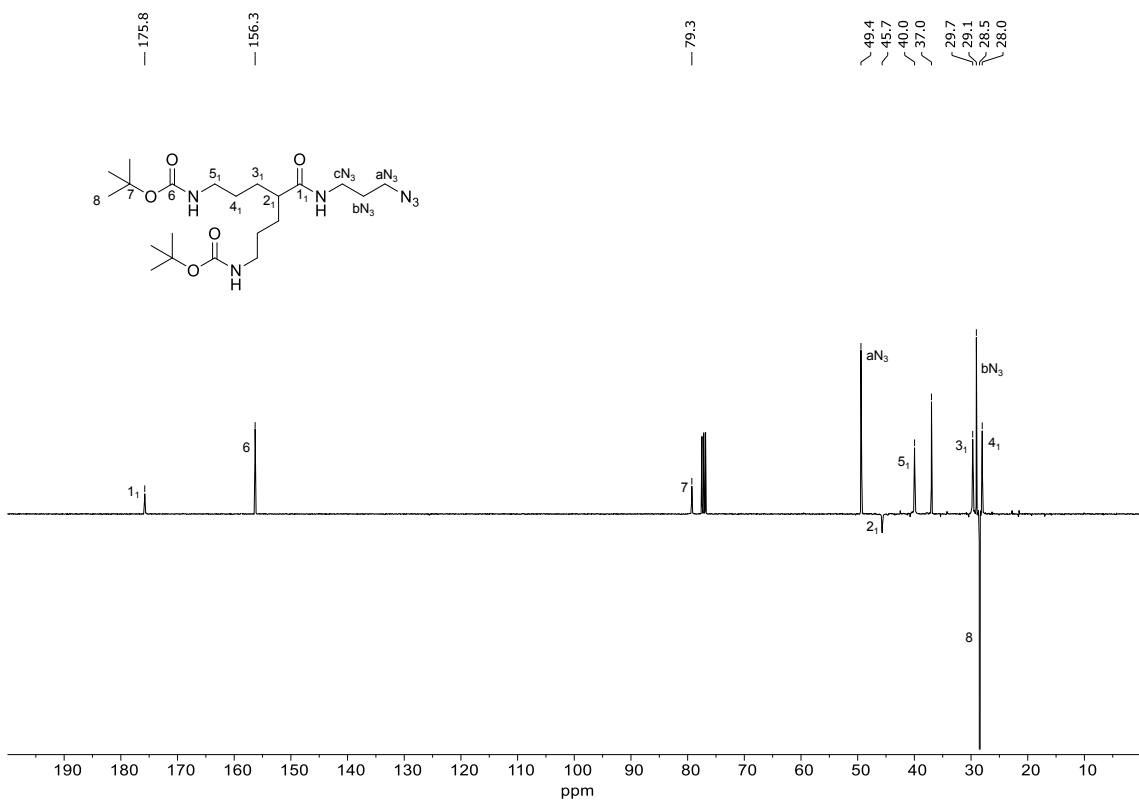


Figura 245. Espectro de RMN- $^{13}C$  (SEFT) de  $dg1N_3-NHBoc$  en  $CDCl_3$ .

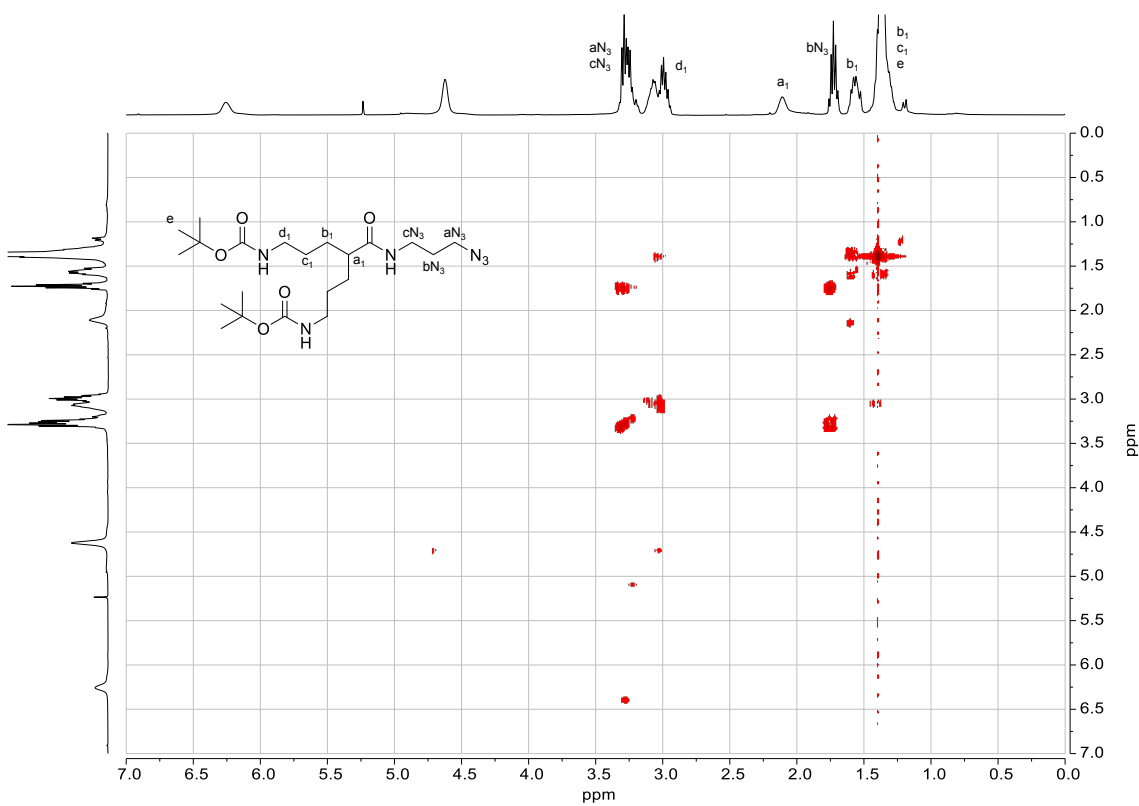


Figura 246. Espectro COSY de  $dg1N_3-NHBoc$  en  $CDCl_3$ .

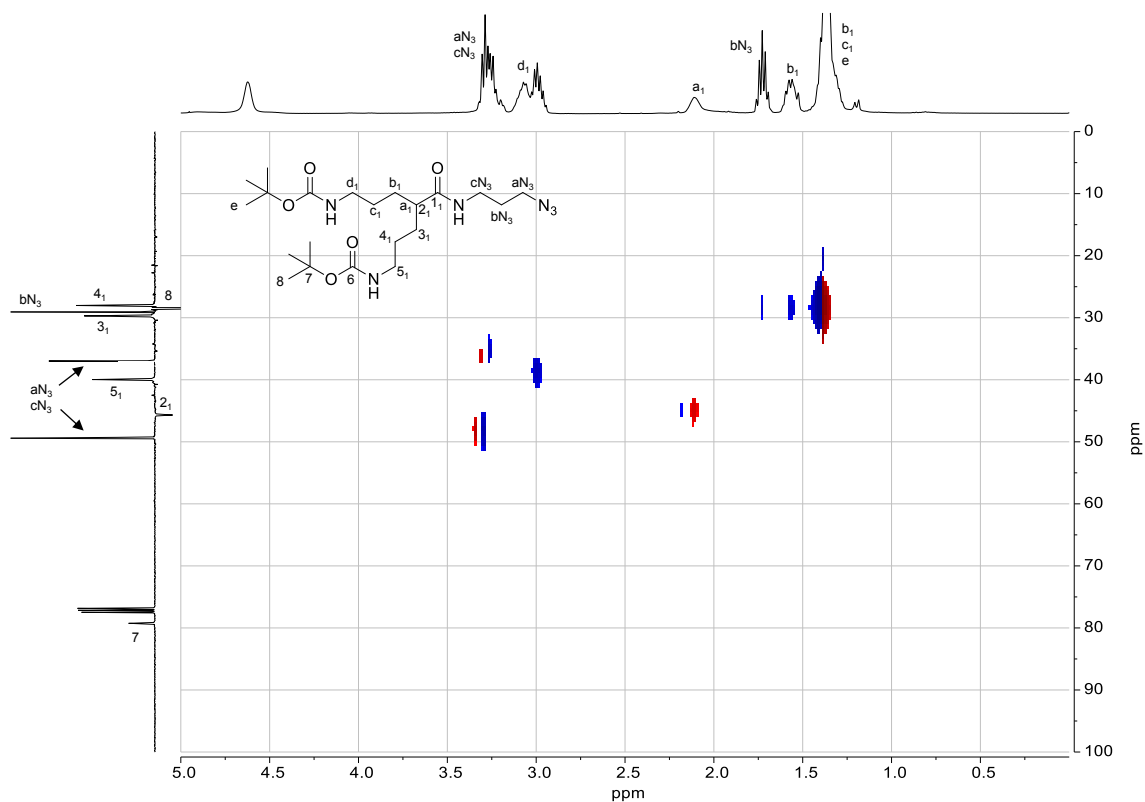


Figura 247. Espectro HSQC de *dg1N3-NHBoc* en  $CDCl_3$ .

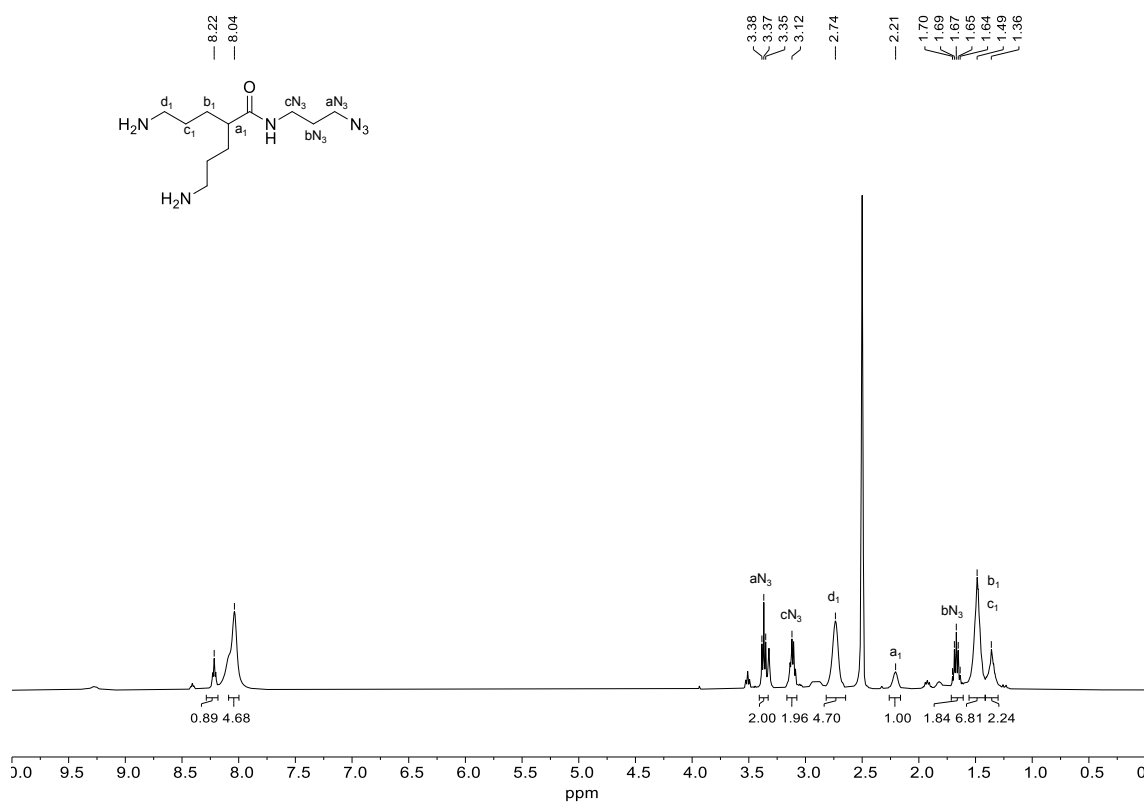


Figura 248. Espectro de RMN- $^1H$  de *dg1N3* en  $DMSO-d_6$ .

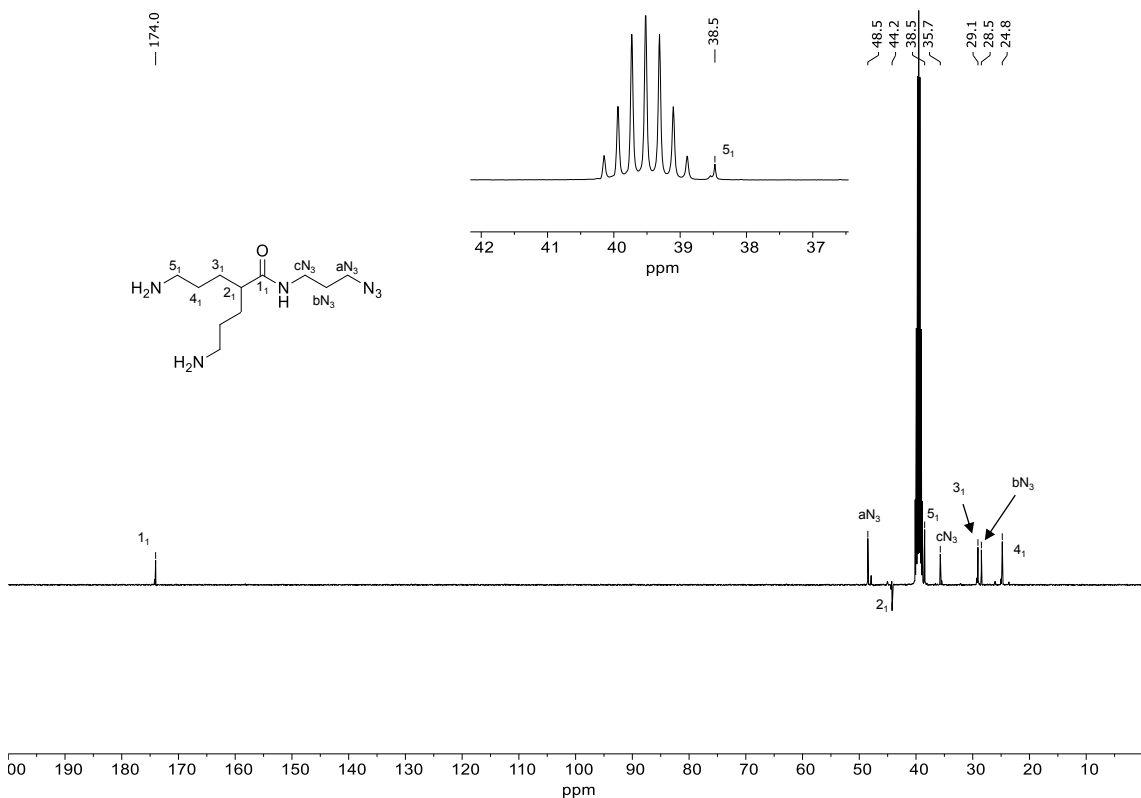


Figura 249. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (SEFT) de **dg1N<sub>3</sub>** en  $\text{DMSO-}d_6$ .

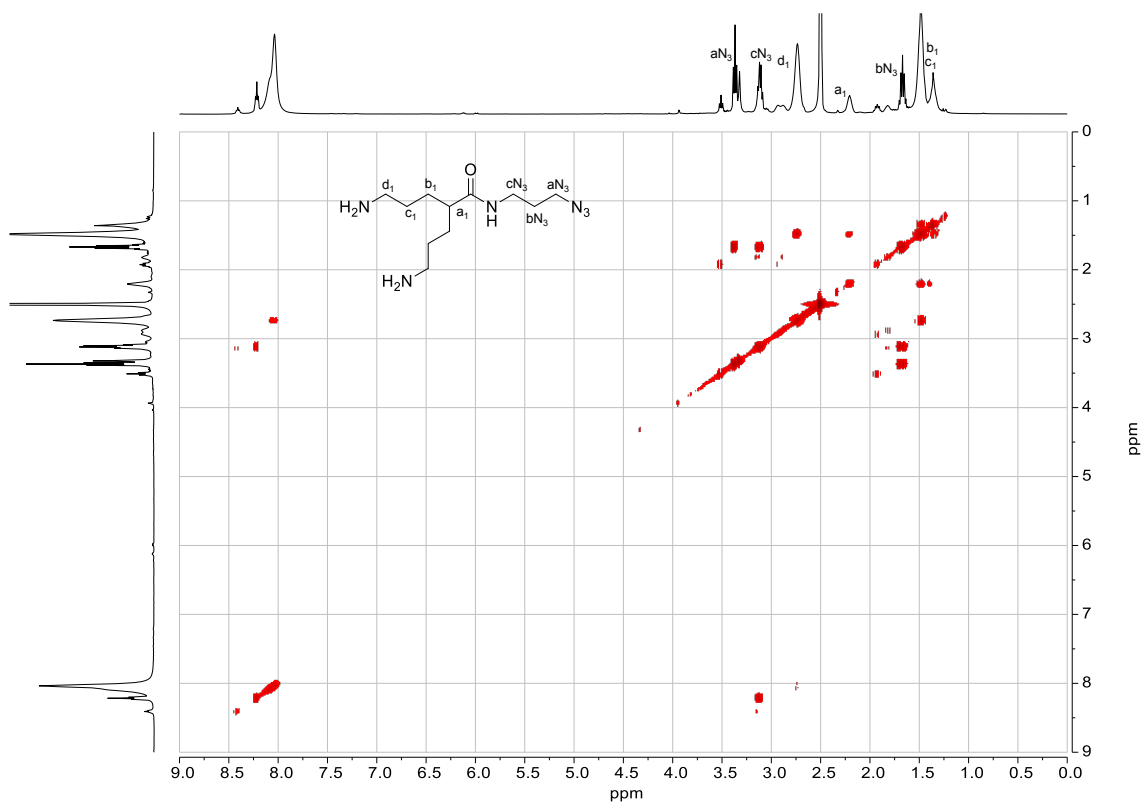


Figura 250. Espectro COSY de **dg1N<sub>3</sub>** en  $\text{DMSO-}d_6$ .

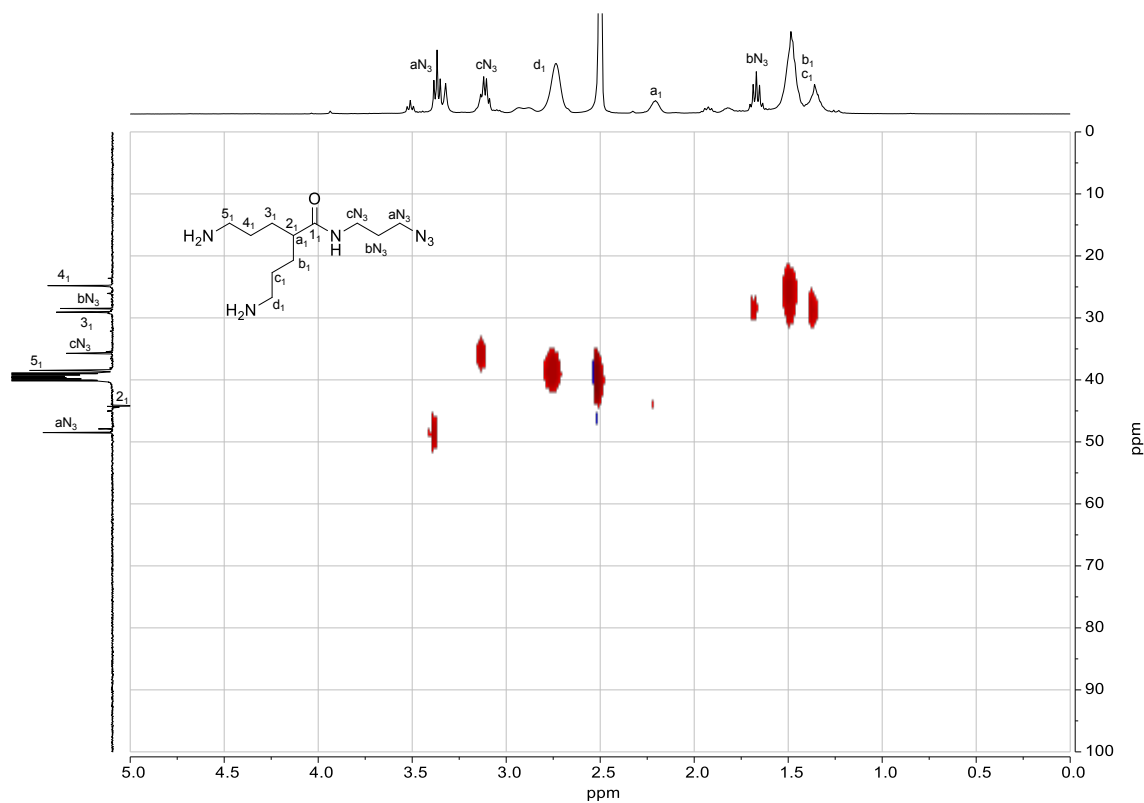


Figura 251. Espectro HSQC de  $dg1N_3$  en  $DMSO-d_6$ .

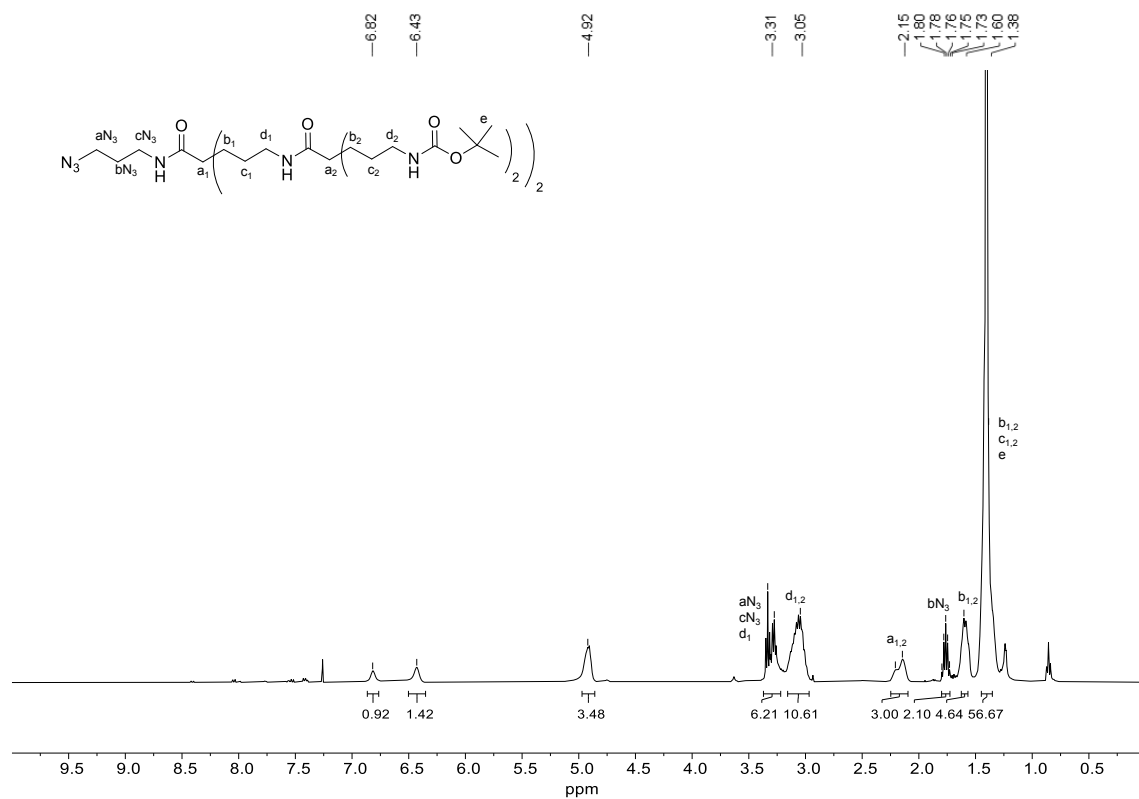


Figura 252. Espectro de  $RMN-^1H$  de  $dg2N_3-NHBoc$  en  $CDCl_3$ .

Anexo

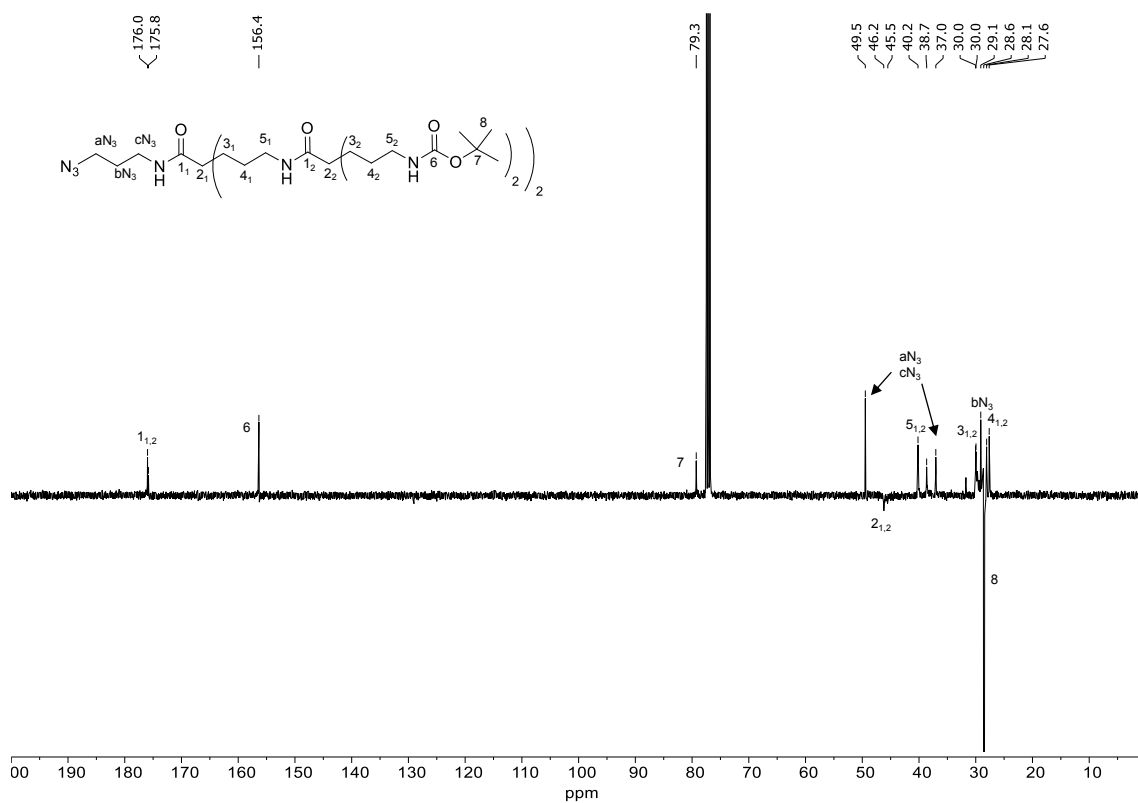


Figura 253. Espectro de RMN- $^{13}C$  (SEFT) de  $dg2N_3-NHBoc$  en  $CDCl_3$ .

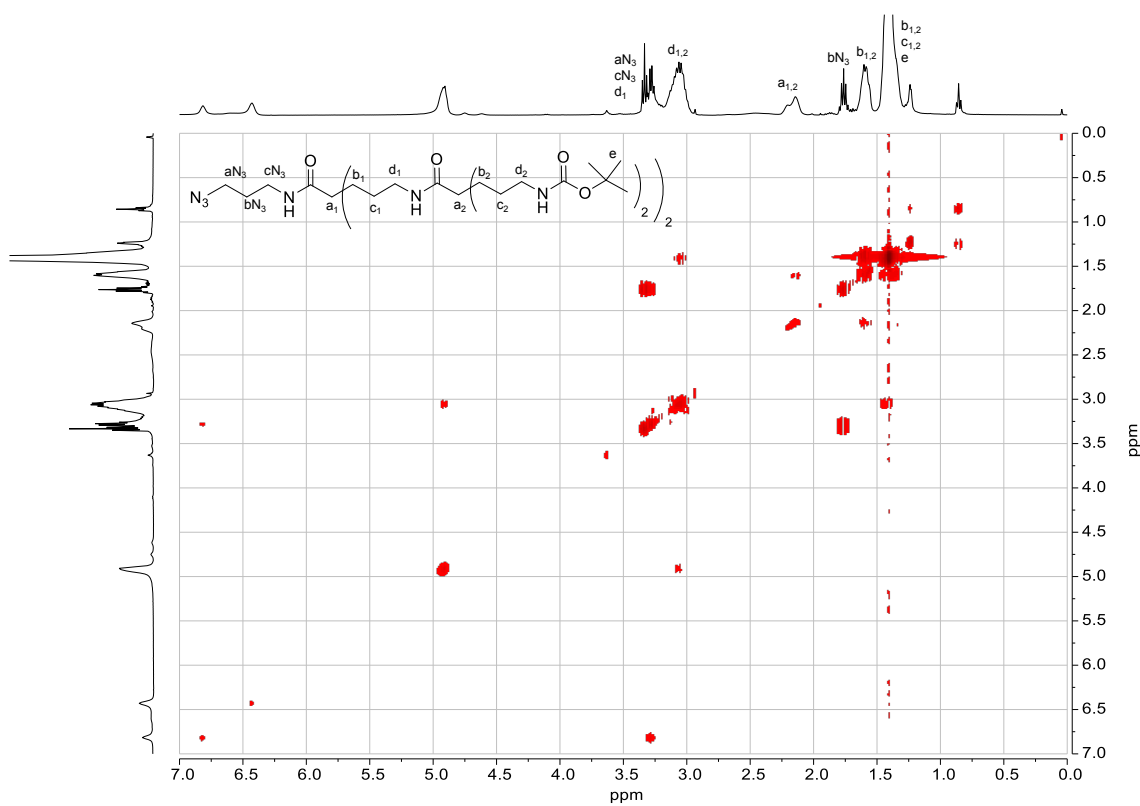


Figura 254. Espectro COSY de  $dg2N_3-NHBoc$  en  $CDCl_3$ .

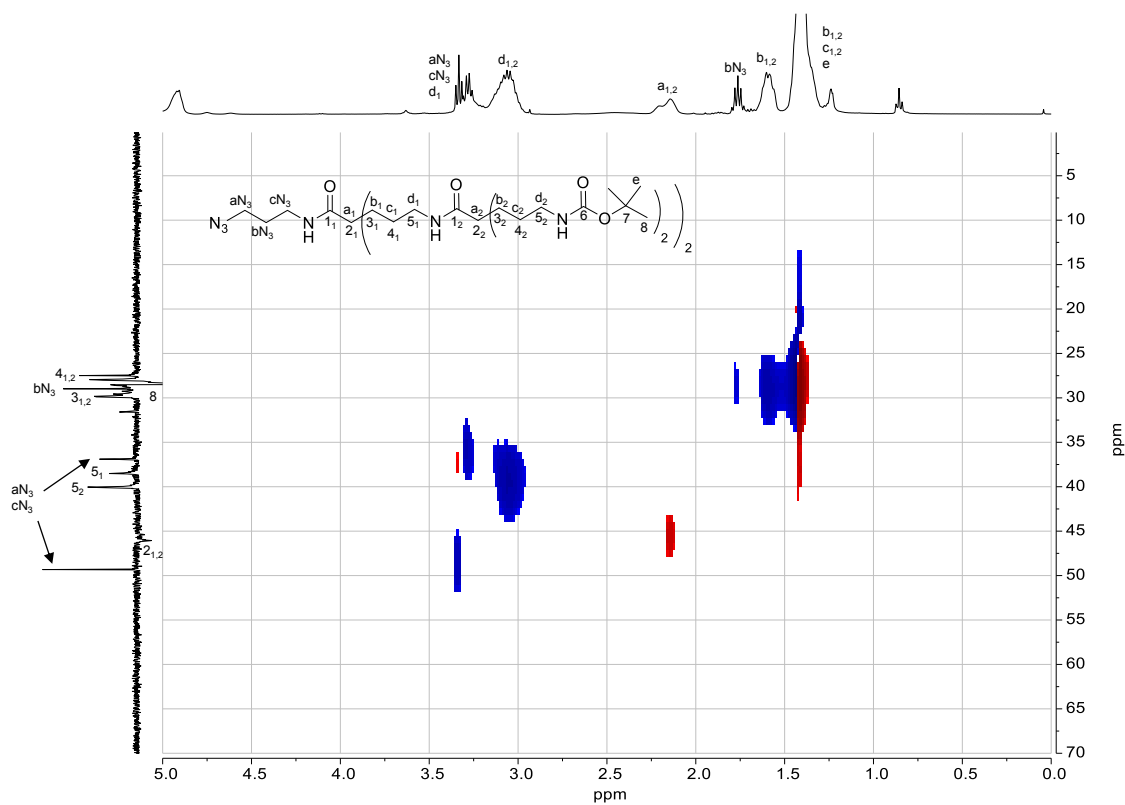


Figura 255. Espectro HSQC de  $dg2N_3$ -NHBoc en  $CDCl_3$ .

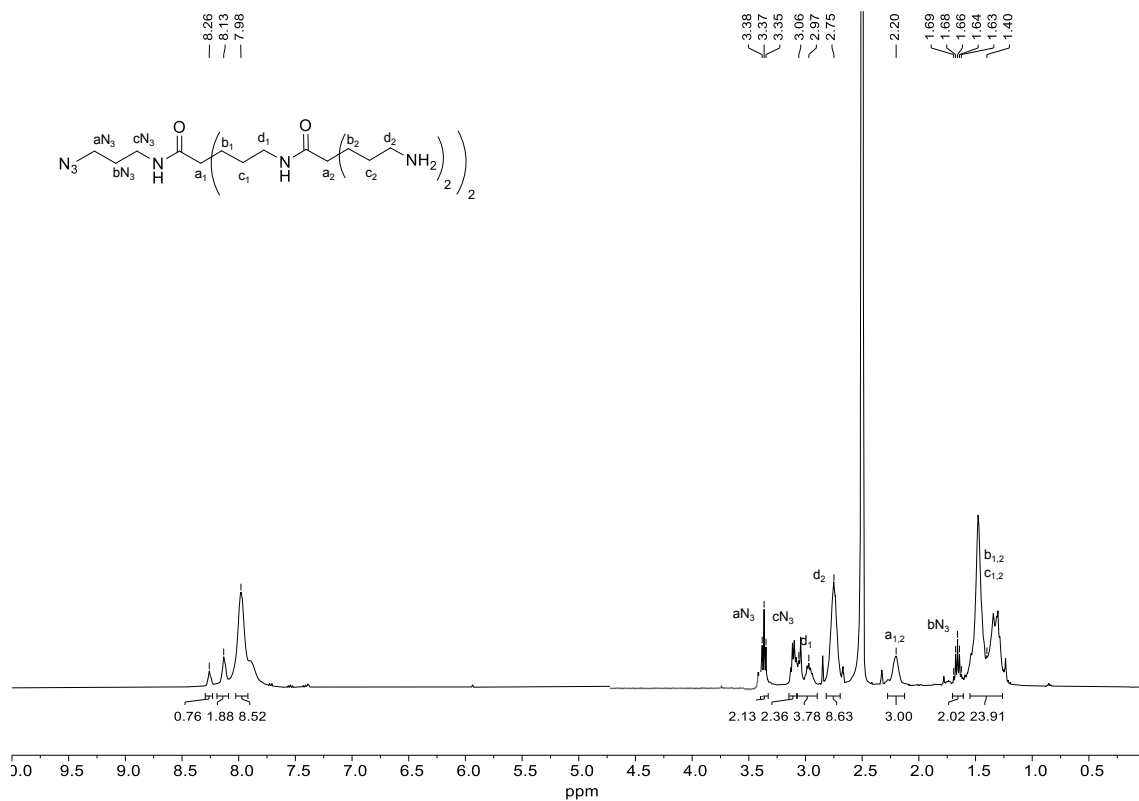


Figura 256. Espectro de RMN- $^1H$  de  $dg2N_3$  en  $DMSO-d_6$ .

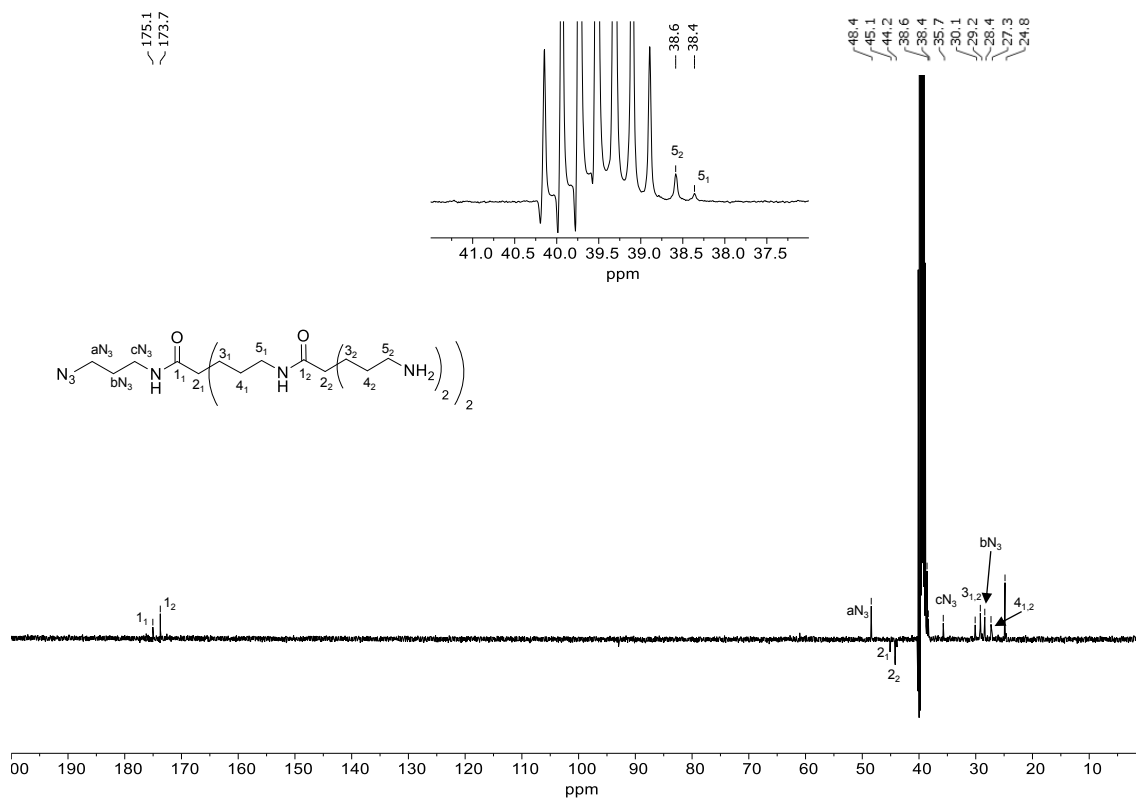


Figura 257. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de dg2N<sub>3</sub> en DMSO-d<sub>6</sub>.

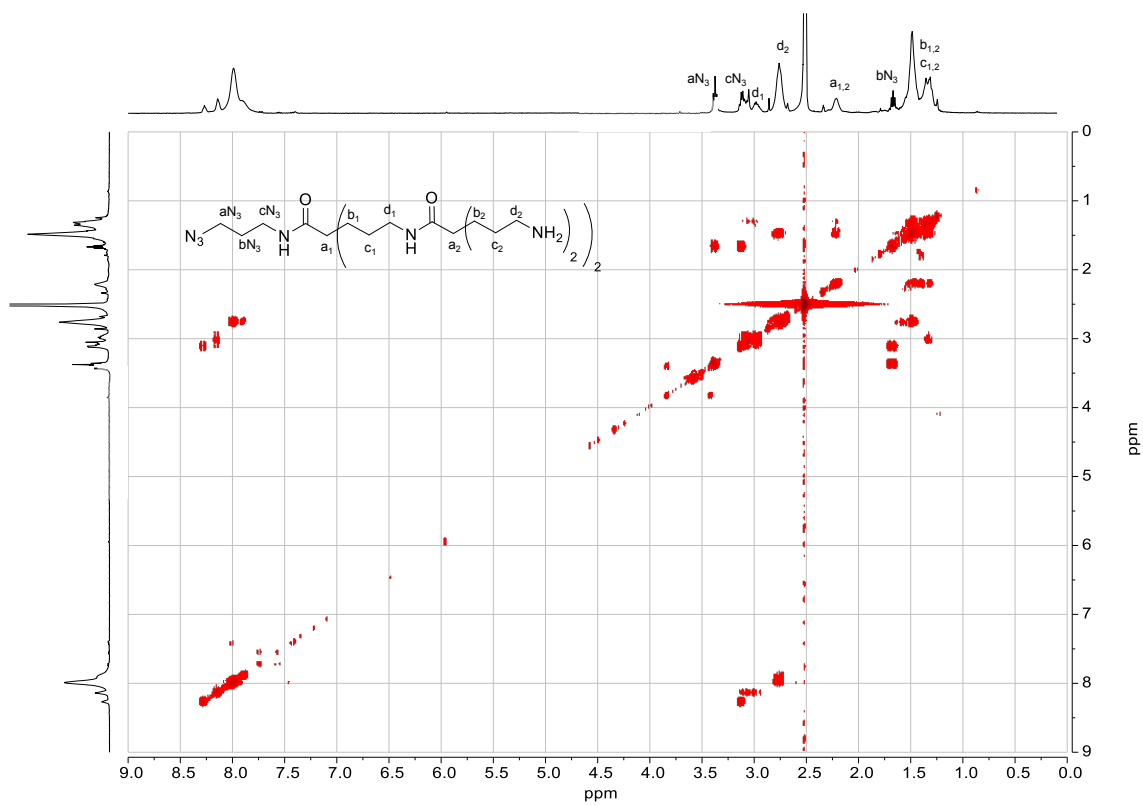


Figura 258. Espectro COSY de dg2N<sub>3</sub> en DMSO-d<sub>6</sub>.

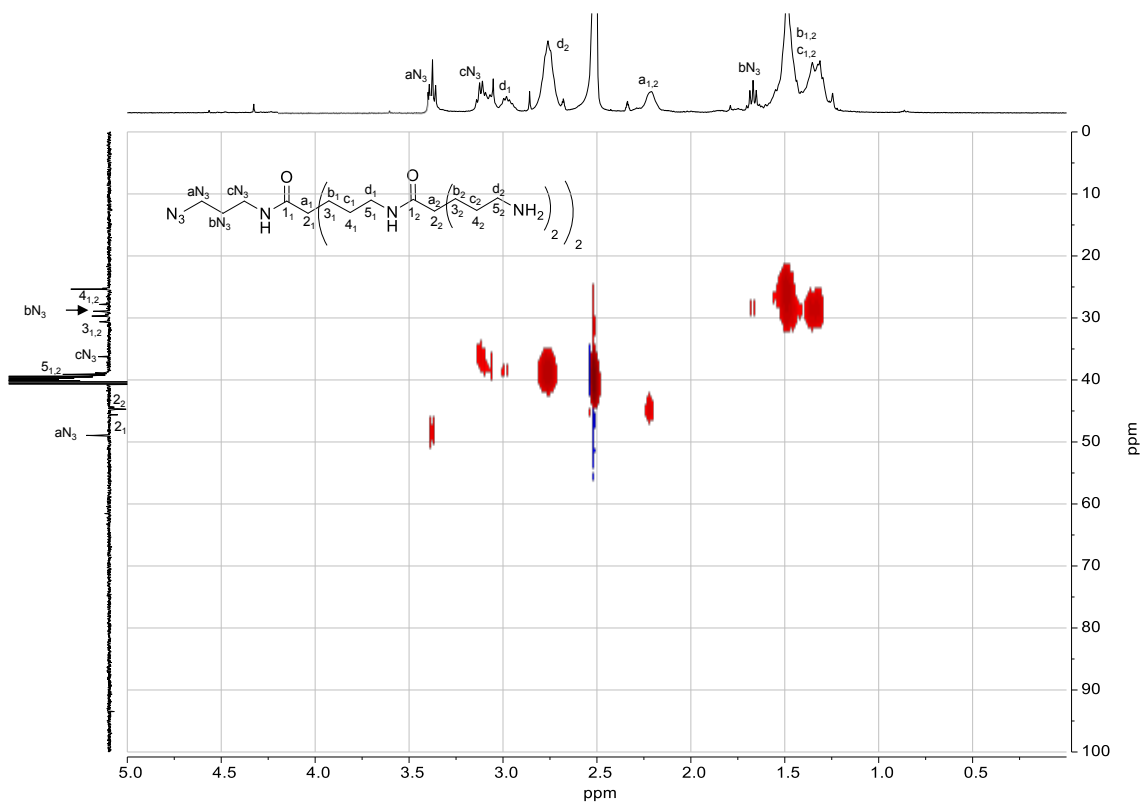


Figura 259. Espectro HSQC de **dg2N<sub>3</sub>** en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

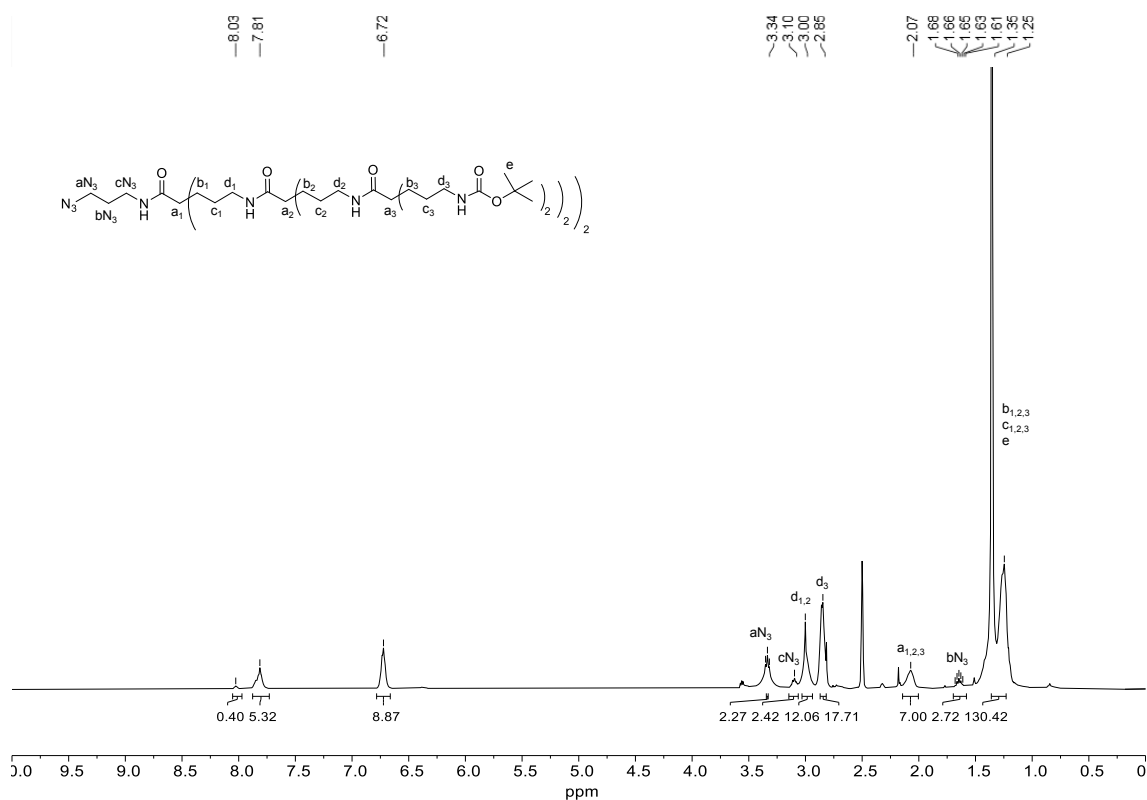


Figura 260. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc** en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

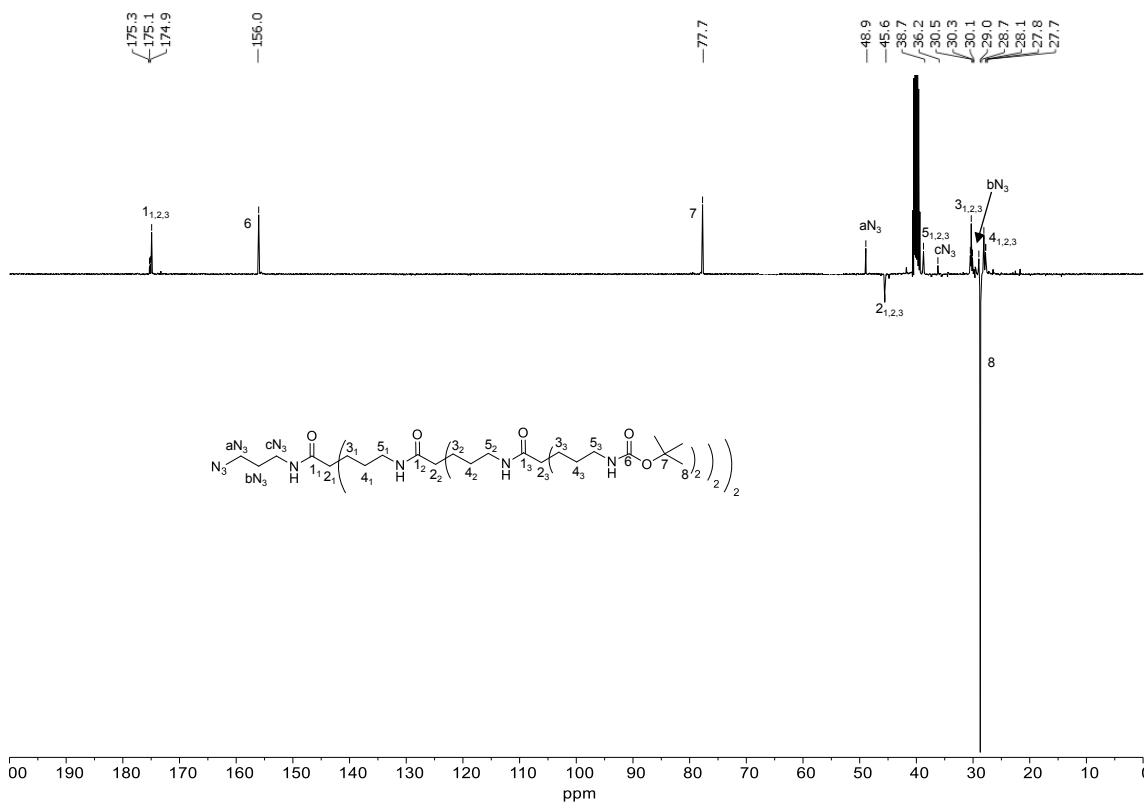


Figura 261. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc** en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

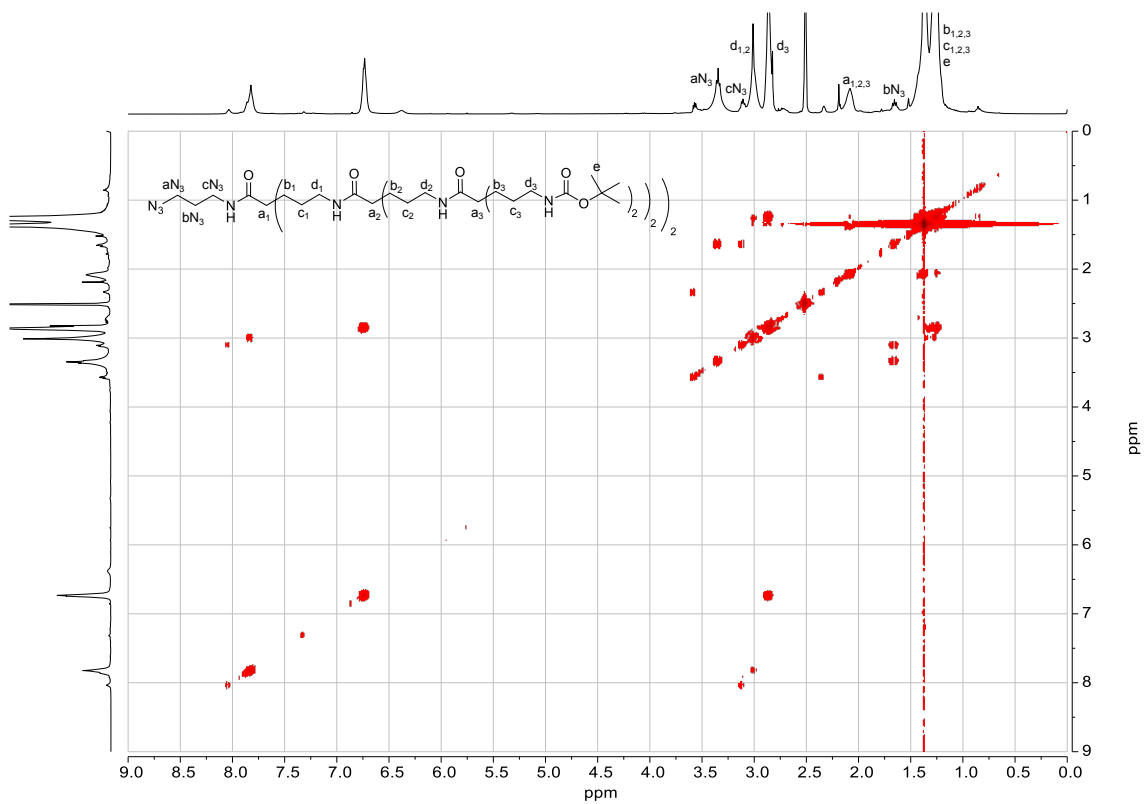


Figura 262. Espectro COSY de **dg3N<sub>3</sub>-NHBoc** en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

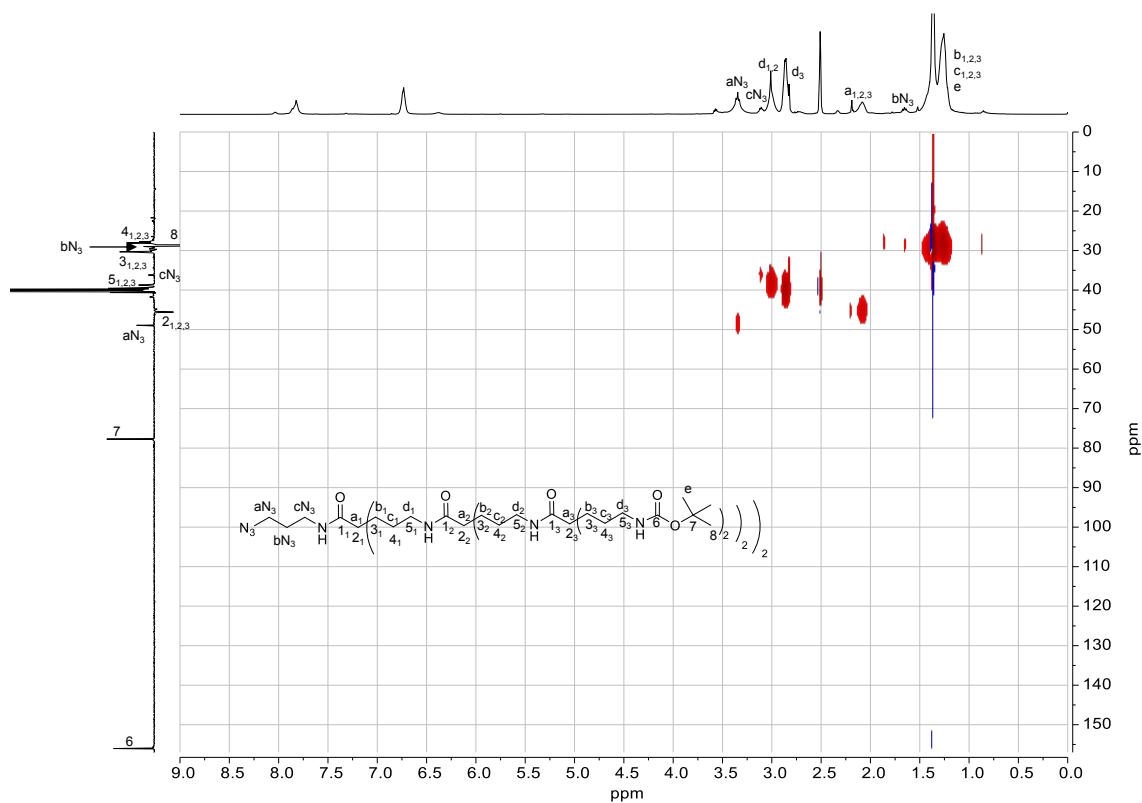


Figura 263. Espectro HSQC de dg3N<sub>3</sub>-NHBoc en DMSO-d<sub>6</sub>.

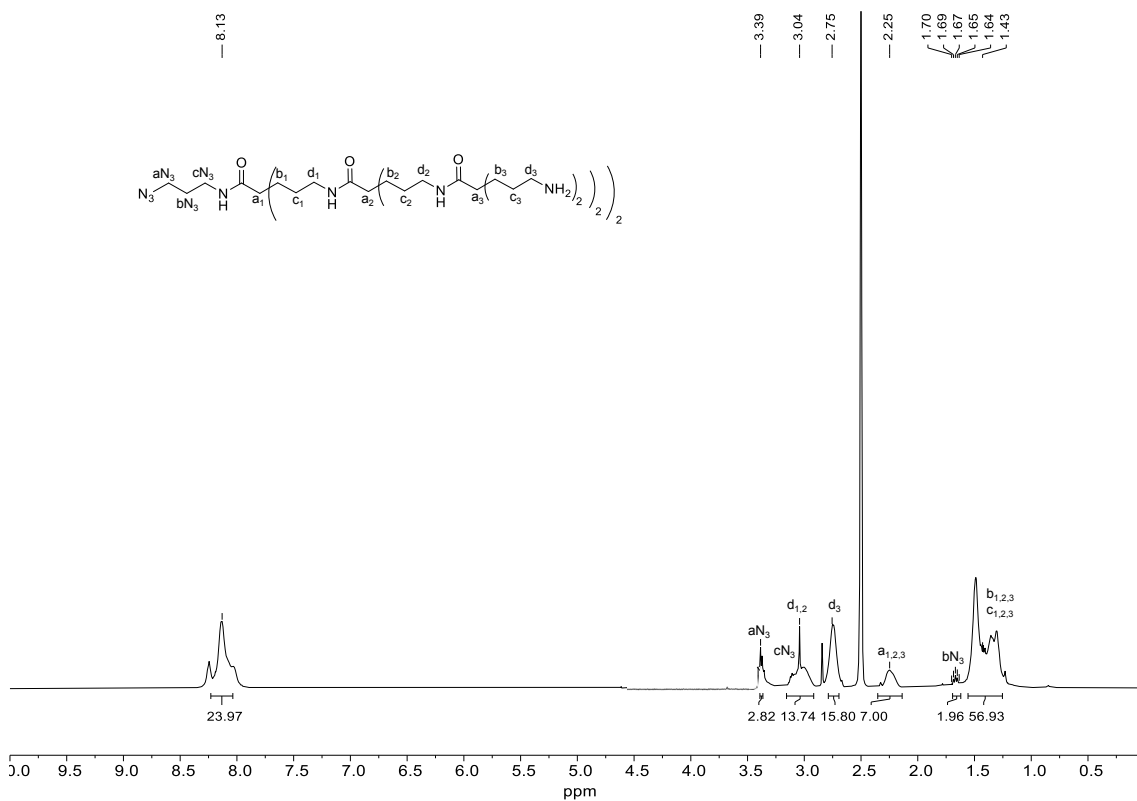


Figura 264. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de dg3N<sub>3</sub> en DMSO-d<sub>6</sub>.

Anexo

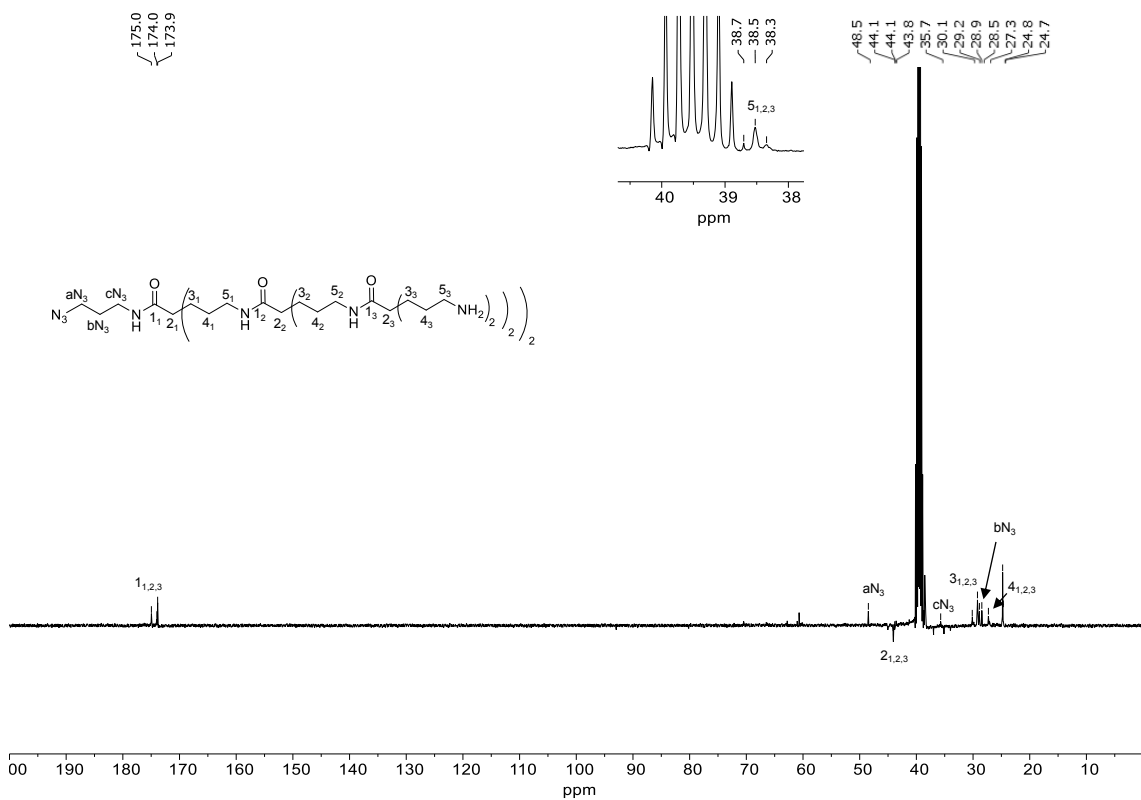


Figura 265. Espectro de RMN- $^{13}C$  (SEFT) de  $dg3N_3$  en DMSO- $d_6$ .

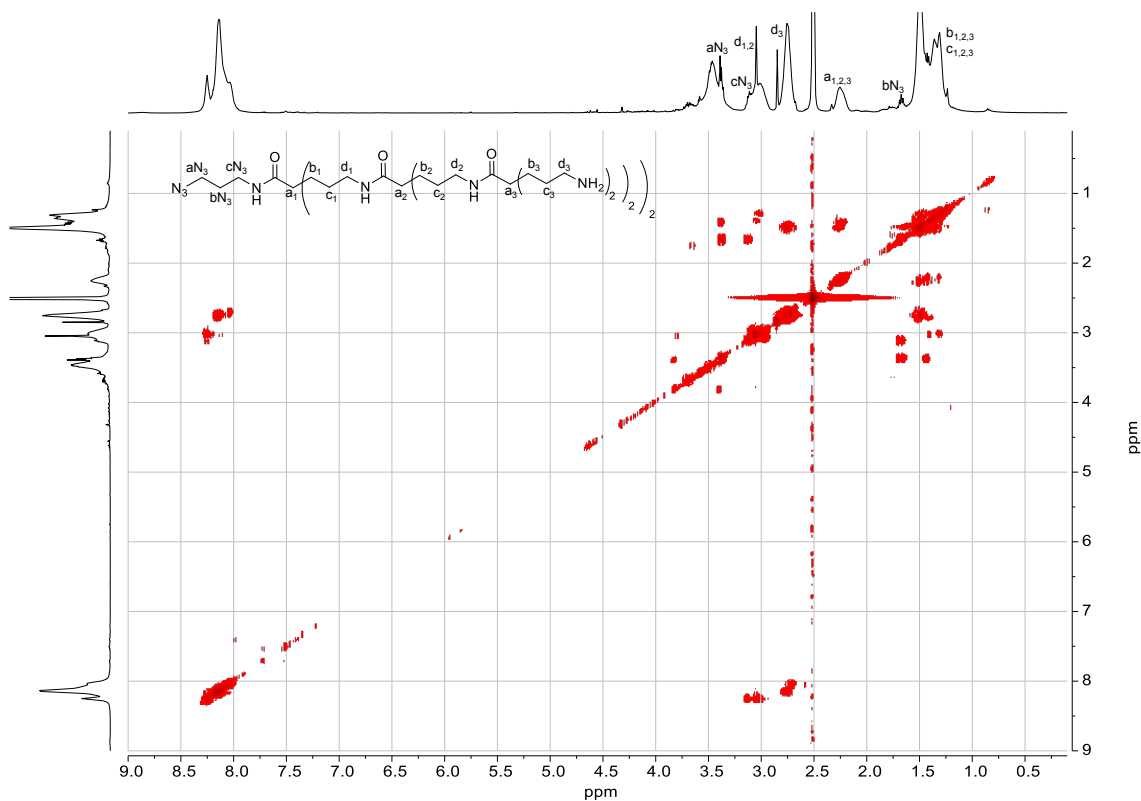


Figura 266. Espectro COSY de  $dg3N_3$  en DMSO- $d_6$ .

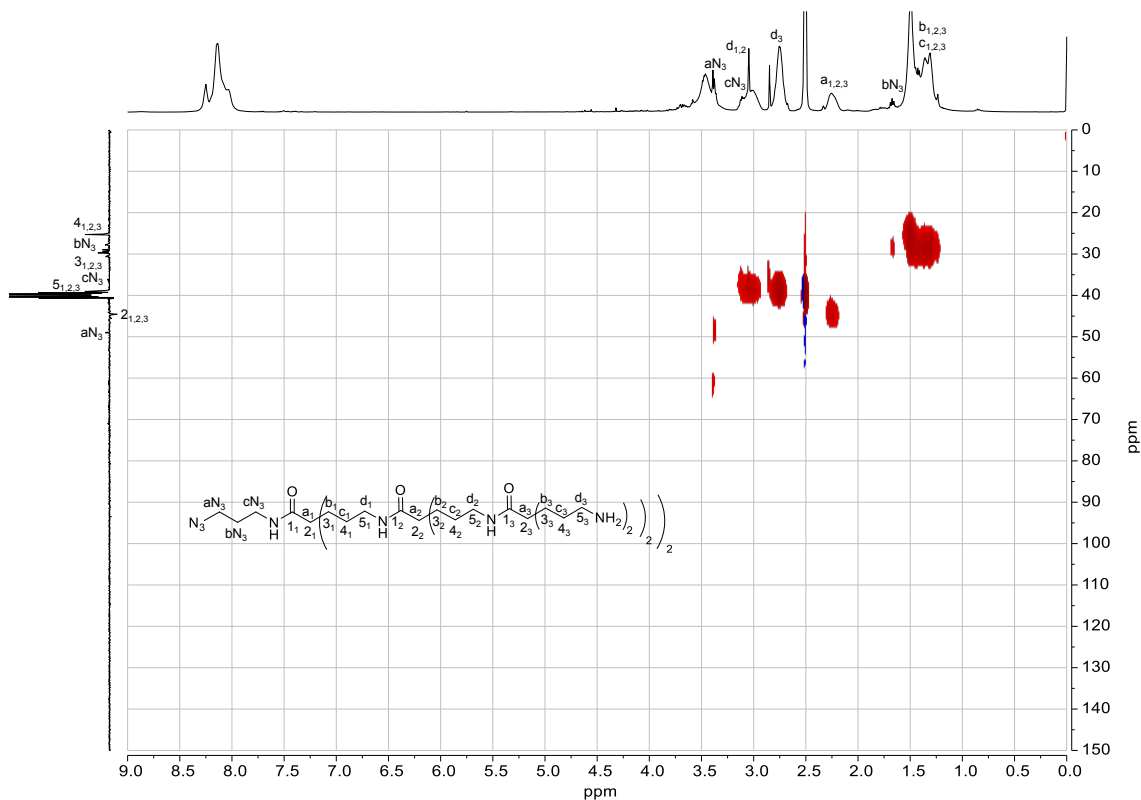


Figura 267. Espectro HSQC de **dg3N3** en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

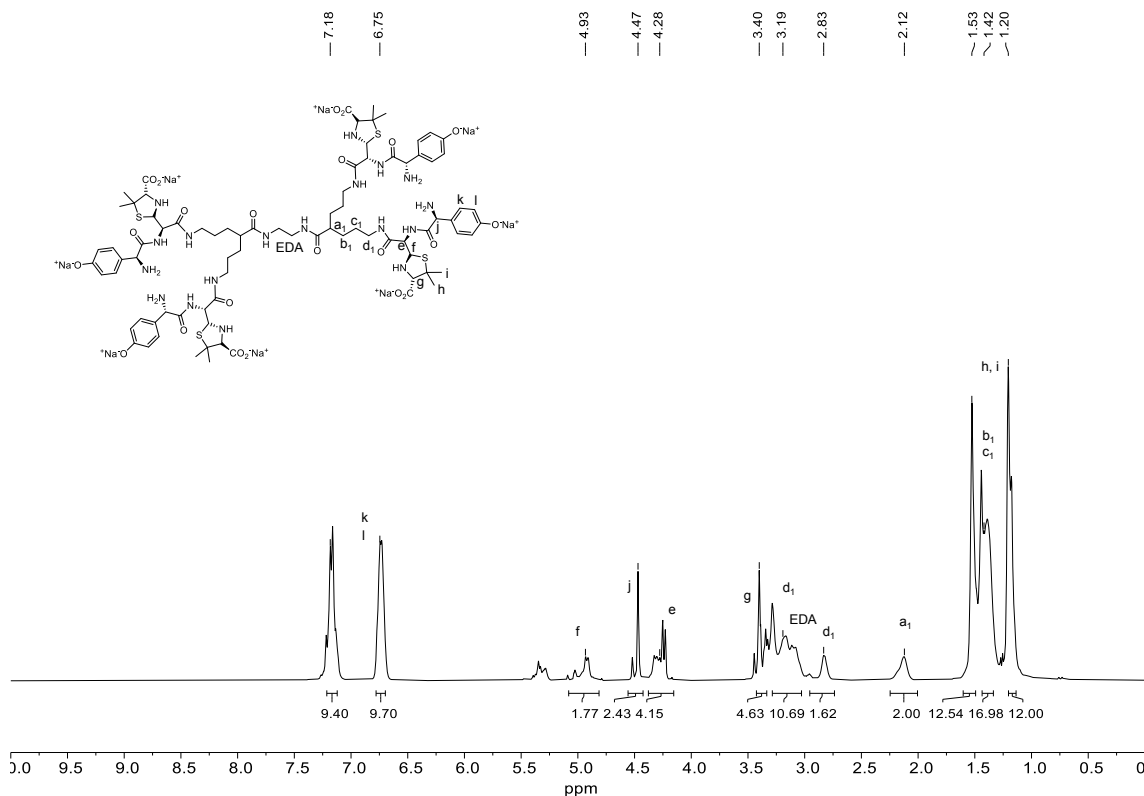


Figura 268. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **DGIAXO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

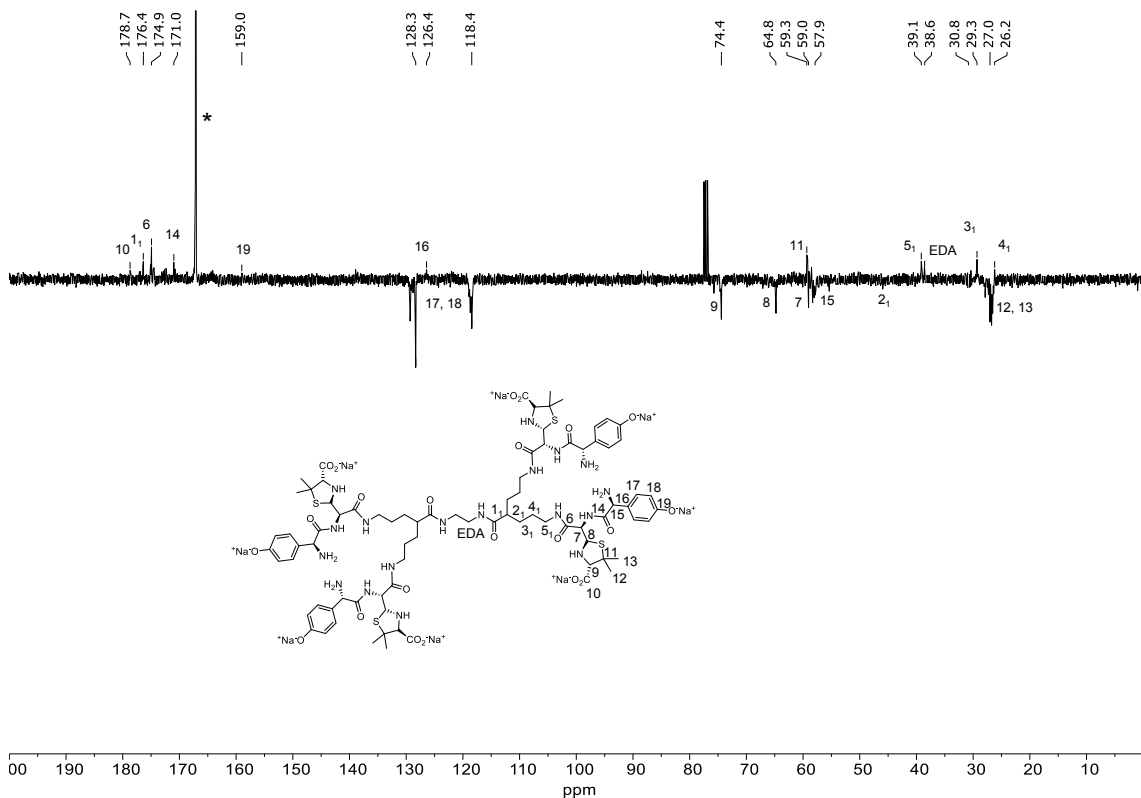


Figura 269. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DGIAXO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

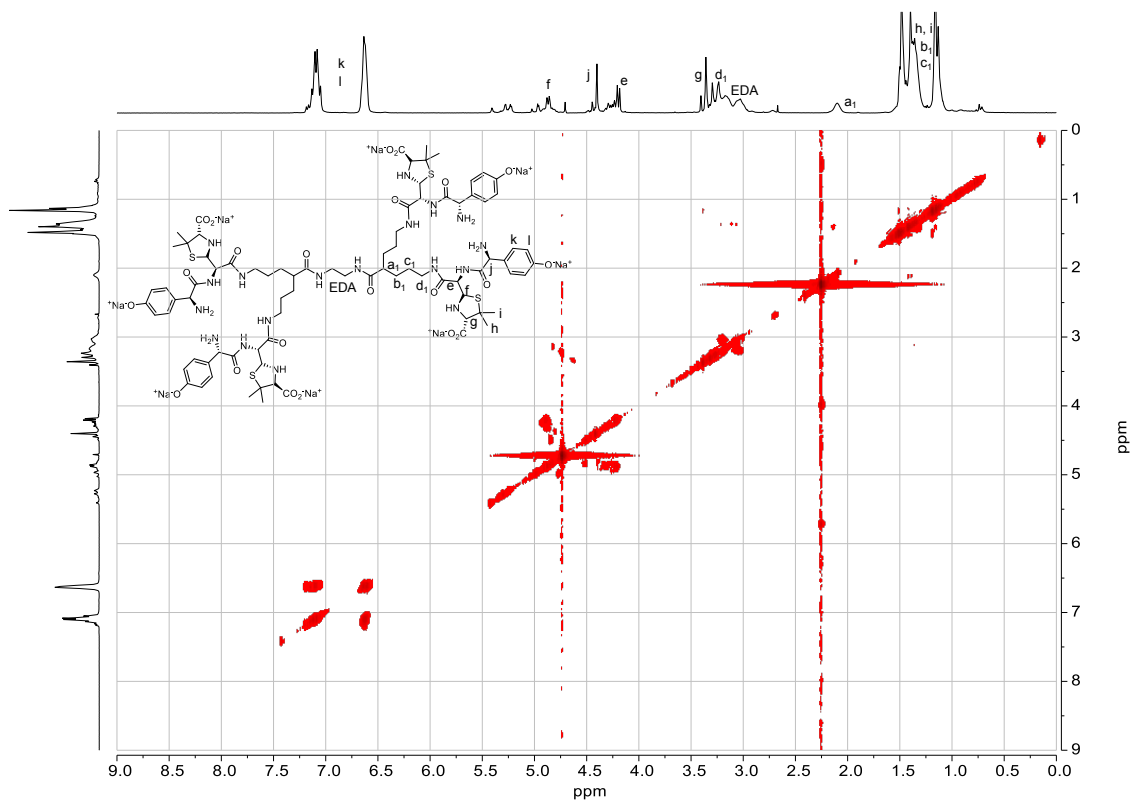


Figura 270. Espectro COSY de **DGIAXO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

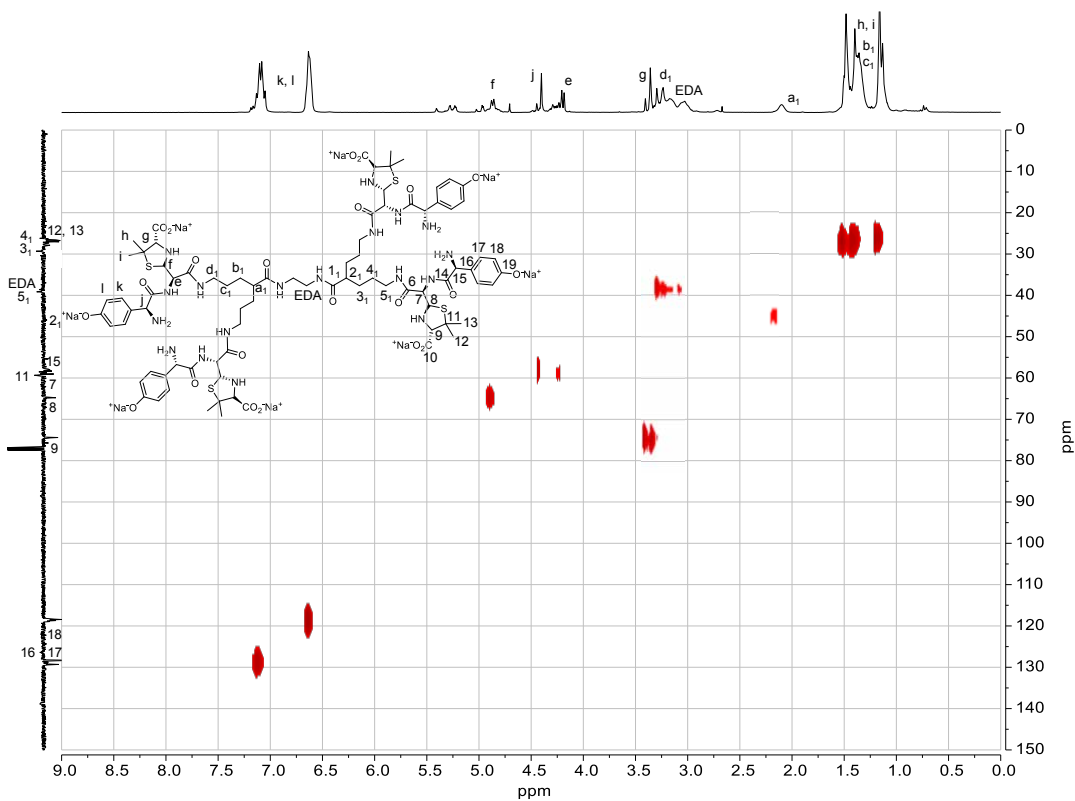


Figura 271. Espectro HSQC de **DGIAXO** en  $D_2O + Na_2CO_3$ .

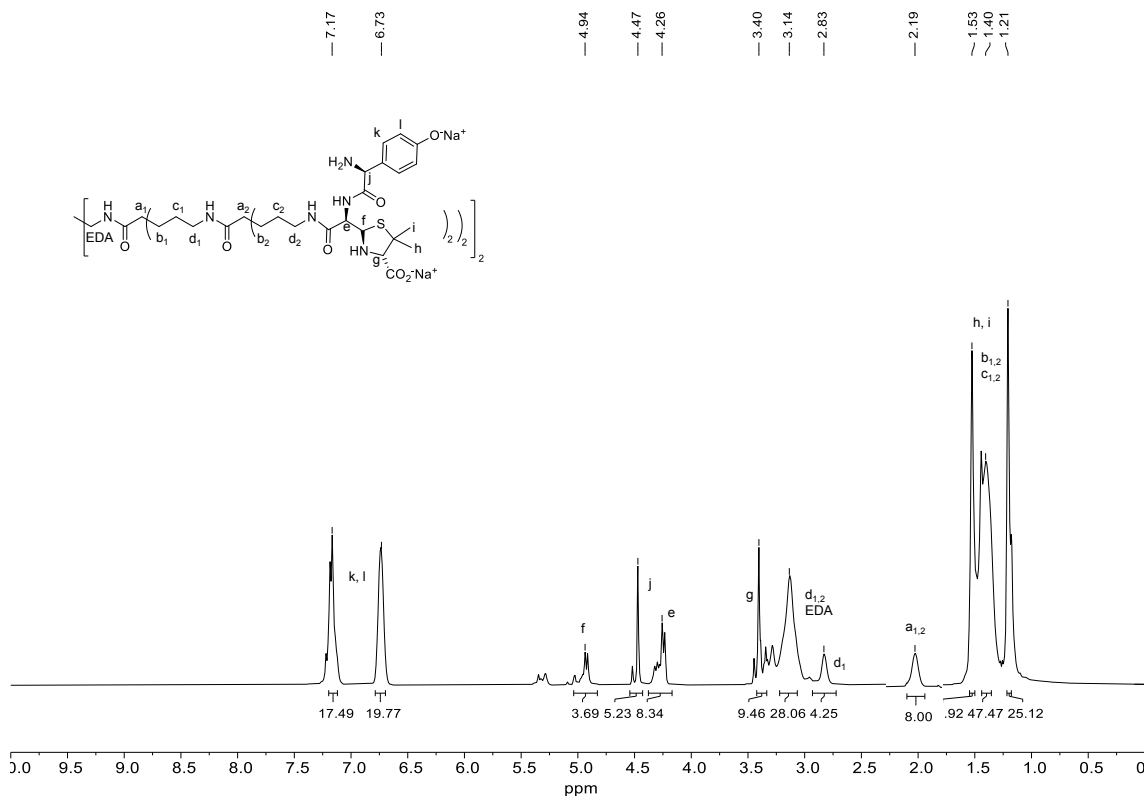


Figura 272. Espectro de  $RMN-^1H$  de **DG2AXO** en  $D_2O + Na_2CO_3$ .

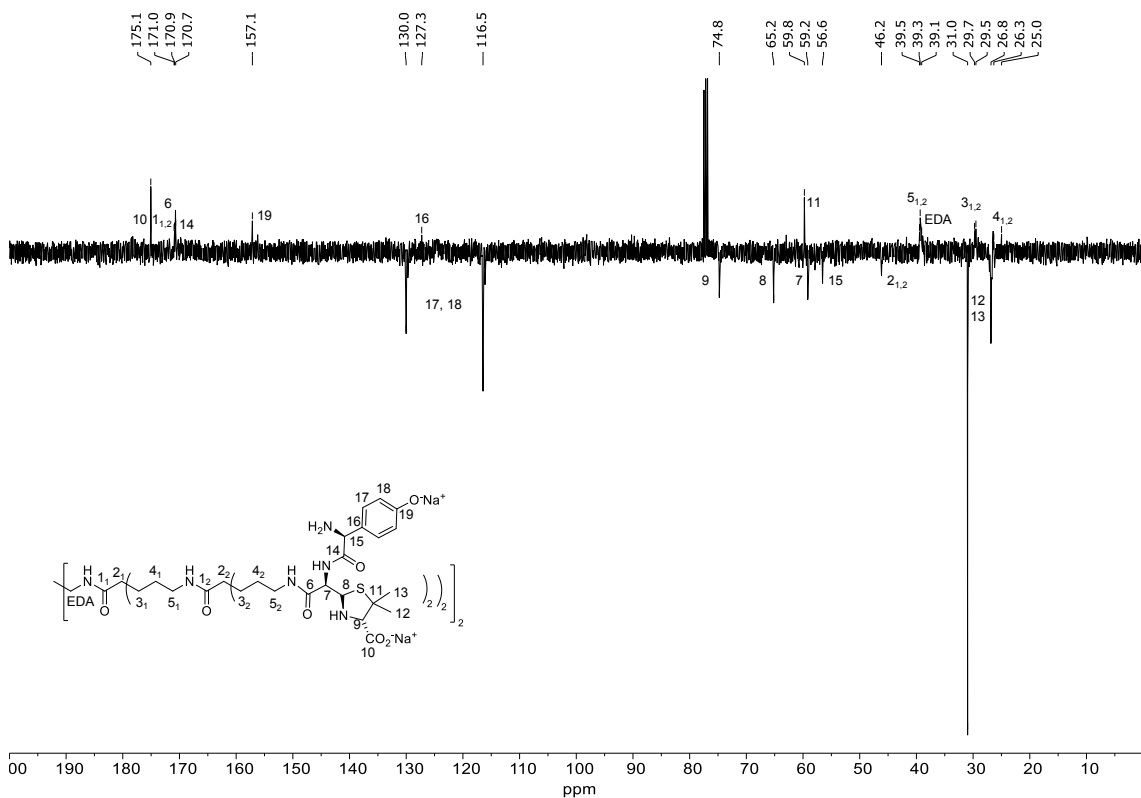


Figura 273. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DG2AXO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

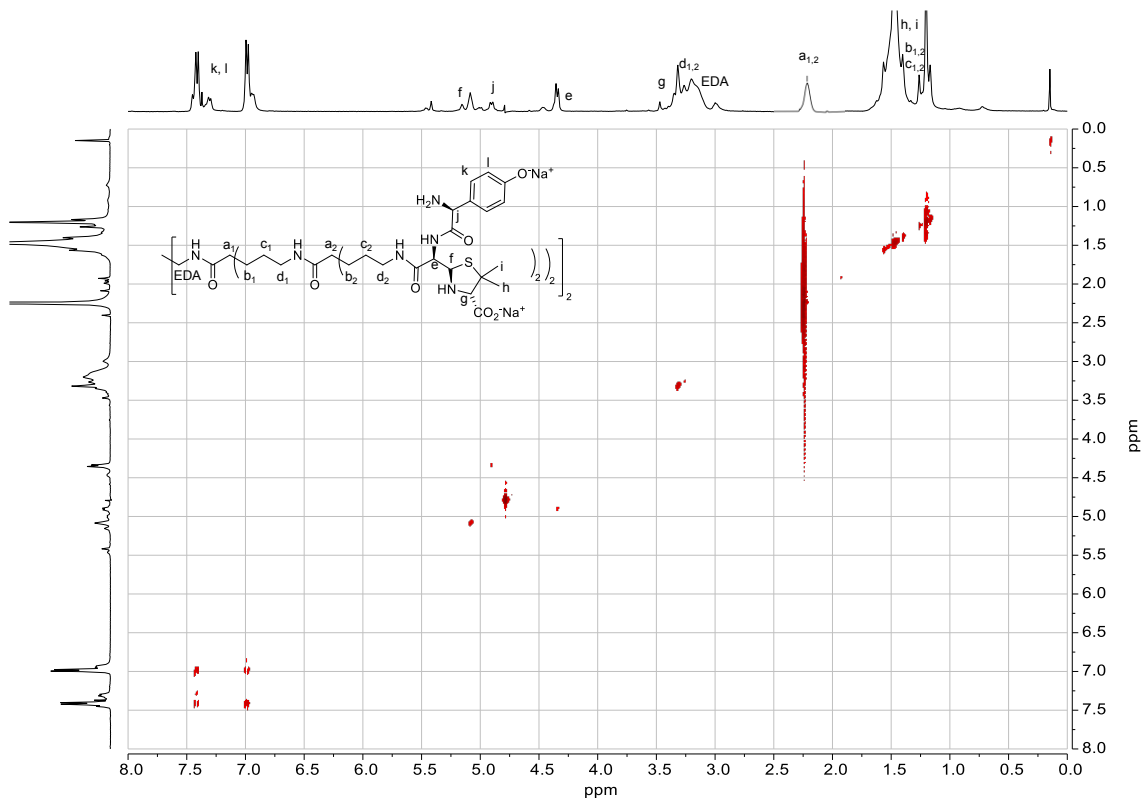


Figura 274. Espectro COSY de **DG2AXO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

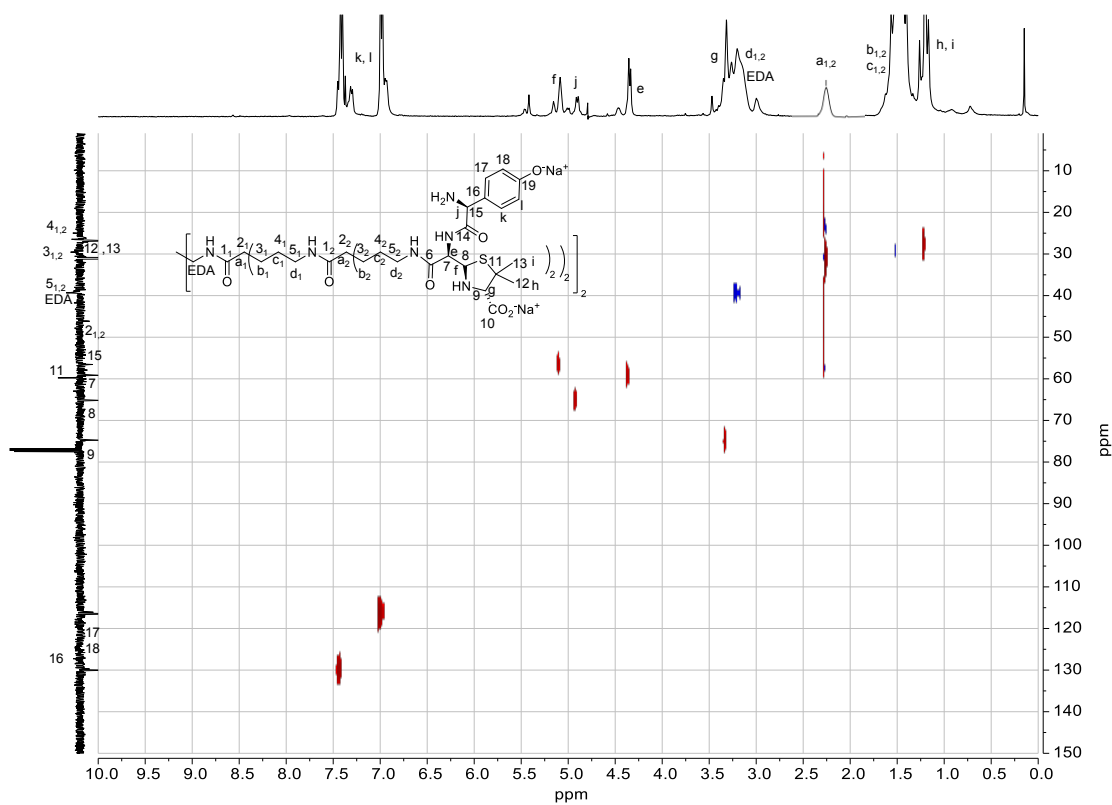


Figura 275. Espectro HSQC de **DG2AXO** en  $D_2O + Na_2CO_3$ .

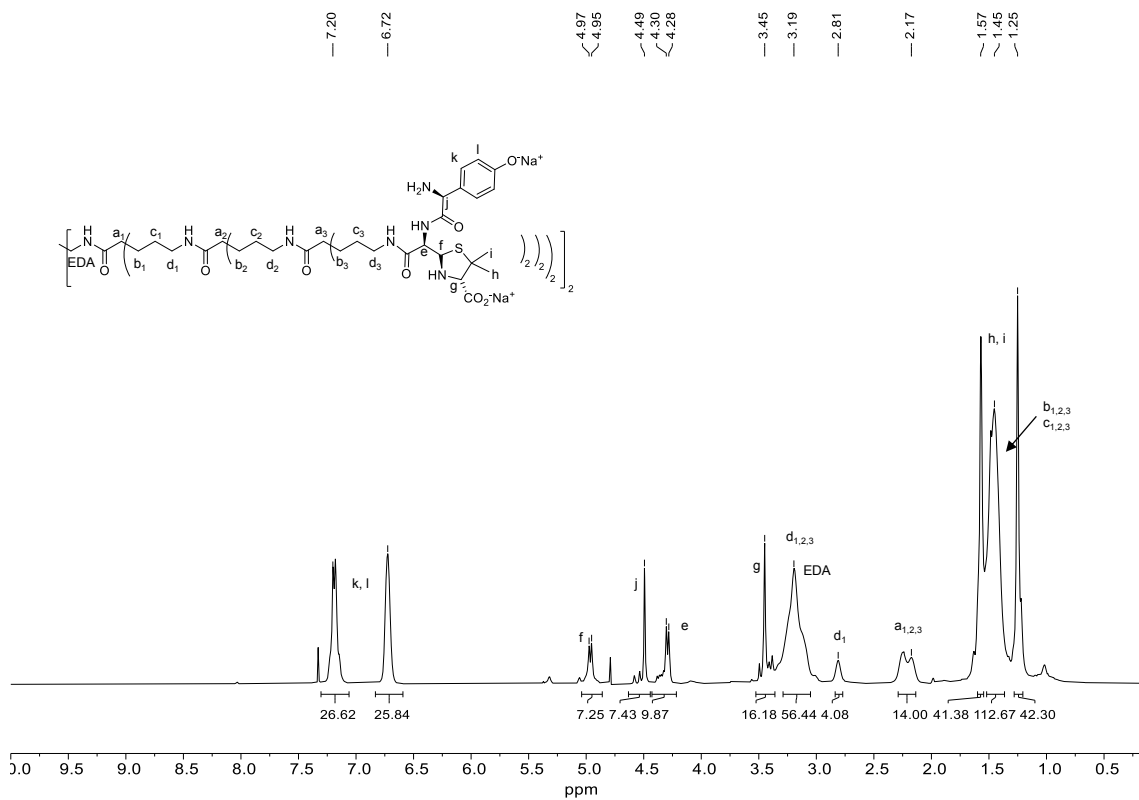


Figura 276. Espectro de RMN- $^1H$  de **DG3AXO** en  $D_2O + Na_2CO_3$ .

Anexo

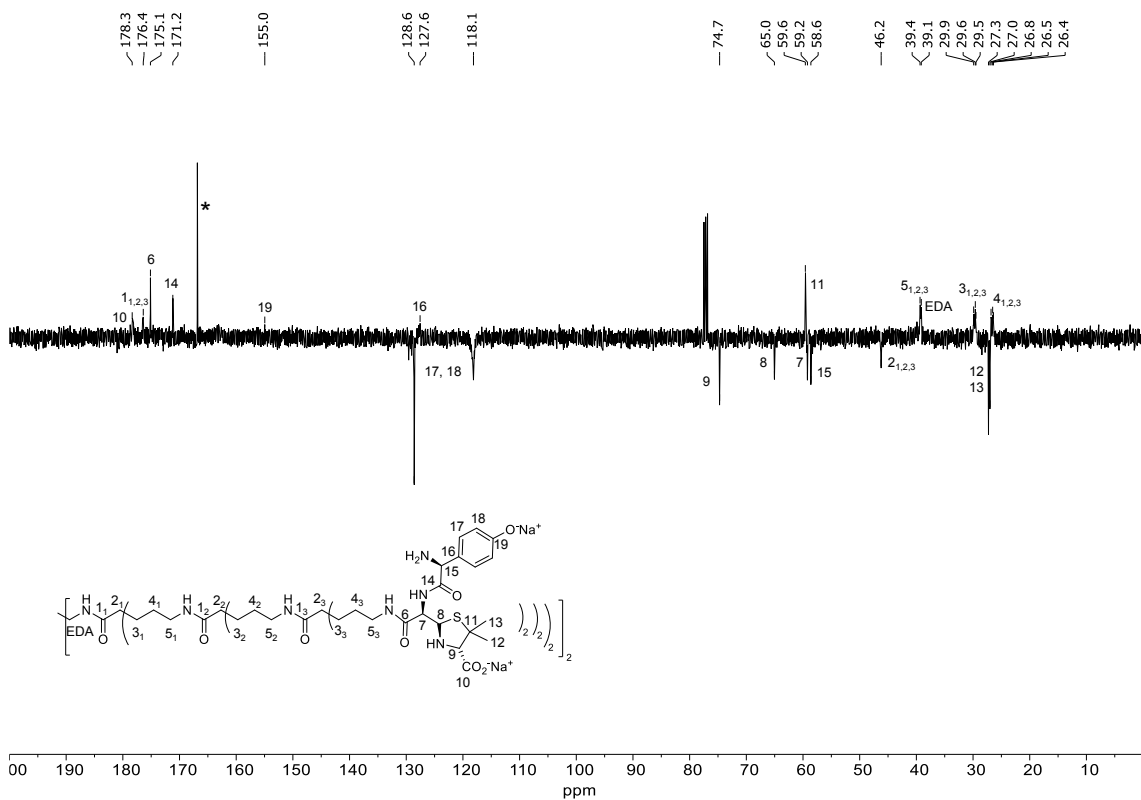


Figura 277. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DG3AXO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

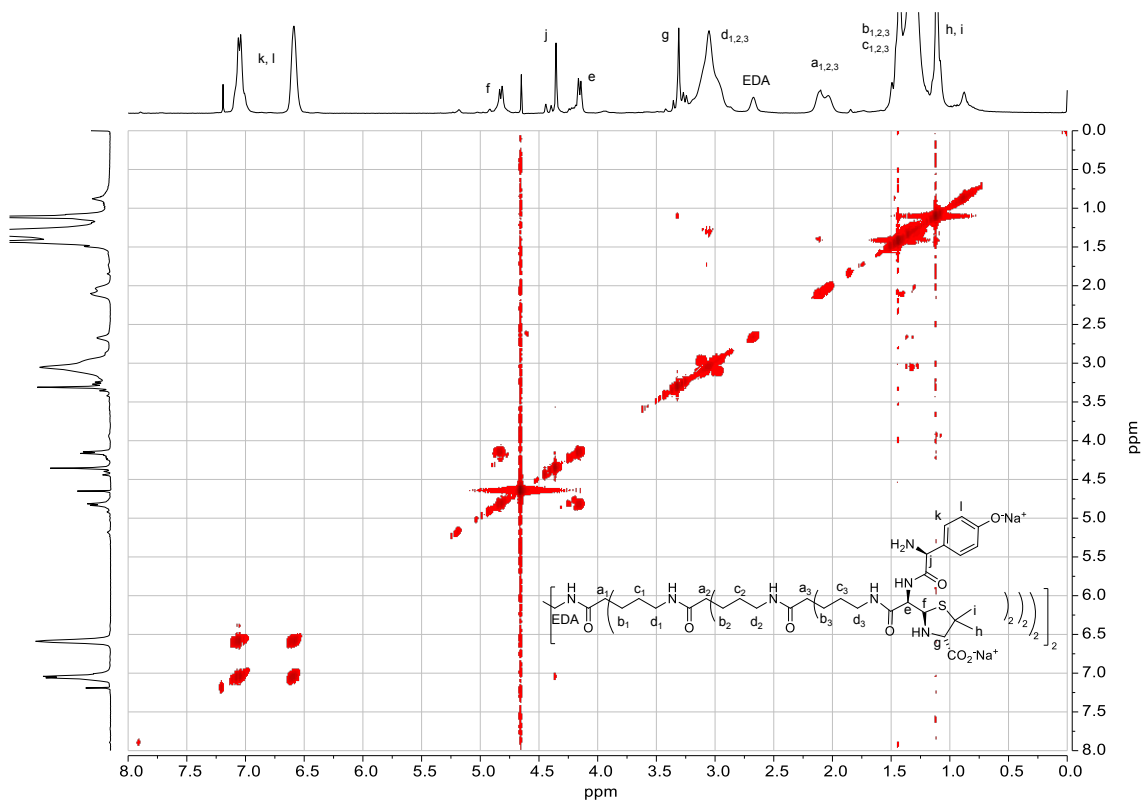
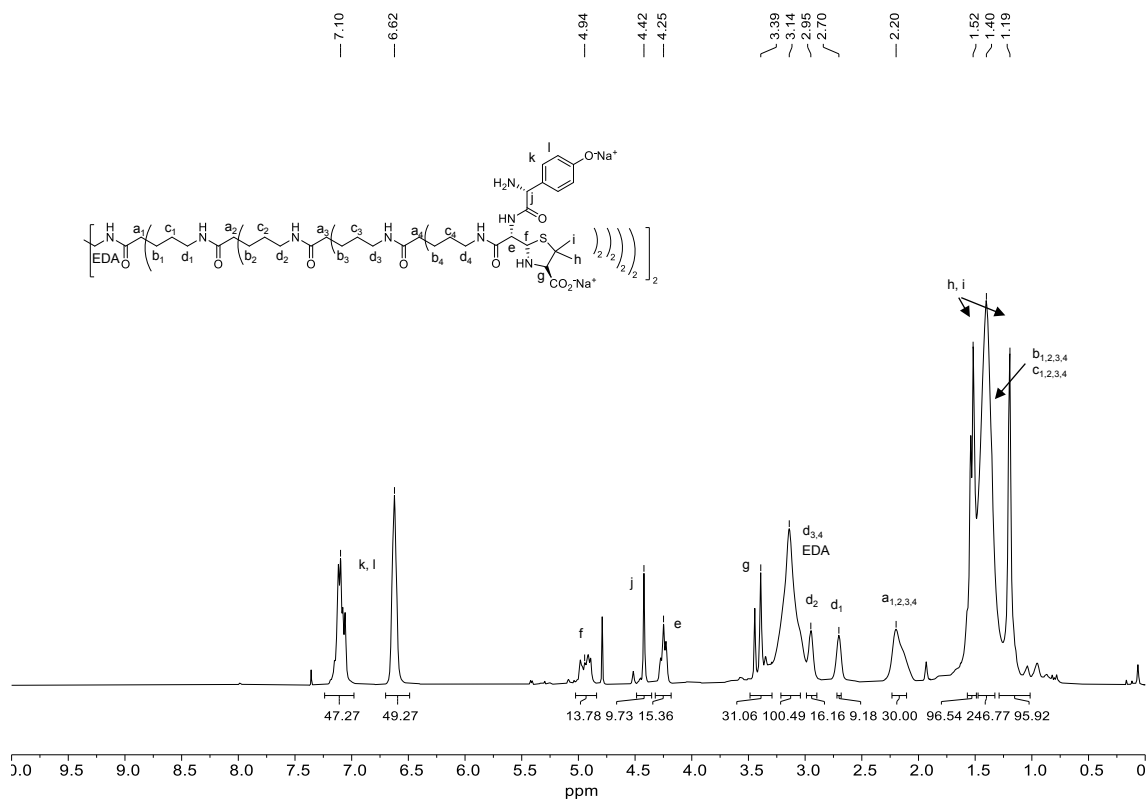
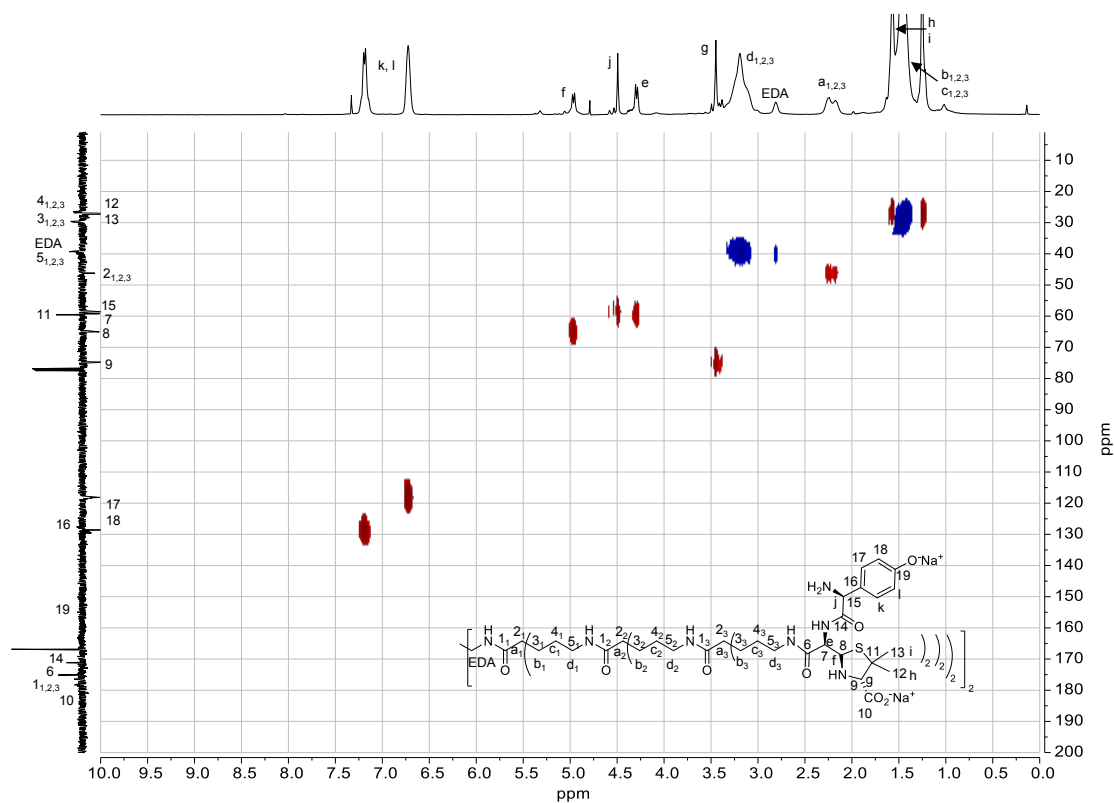


Figura 278. Espectro COSY de **DG3AXO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.



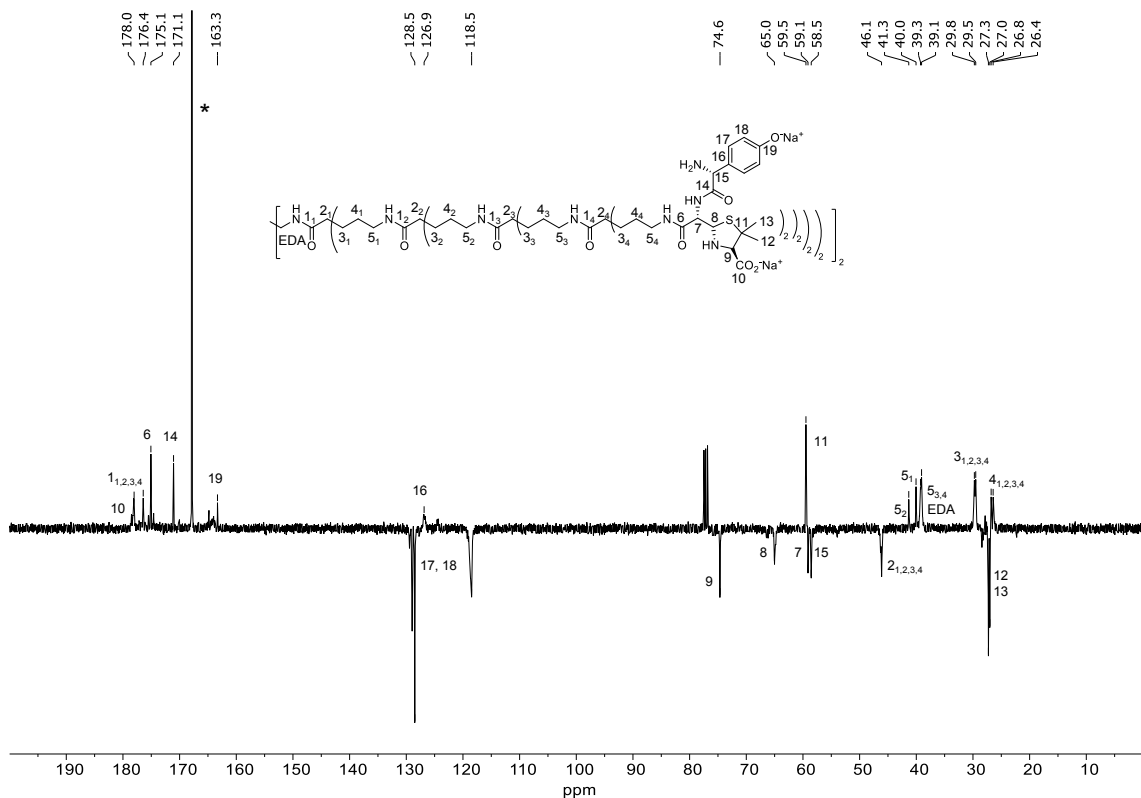


Figura 281. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DG4AXO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

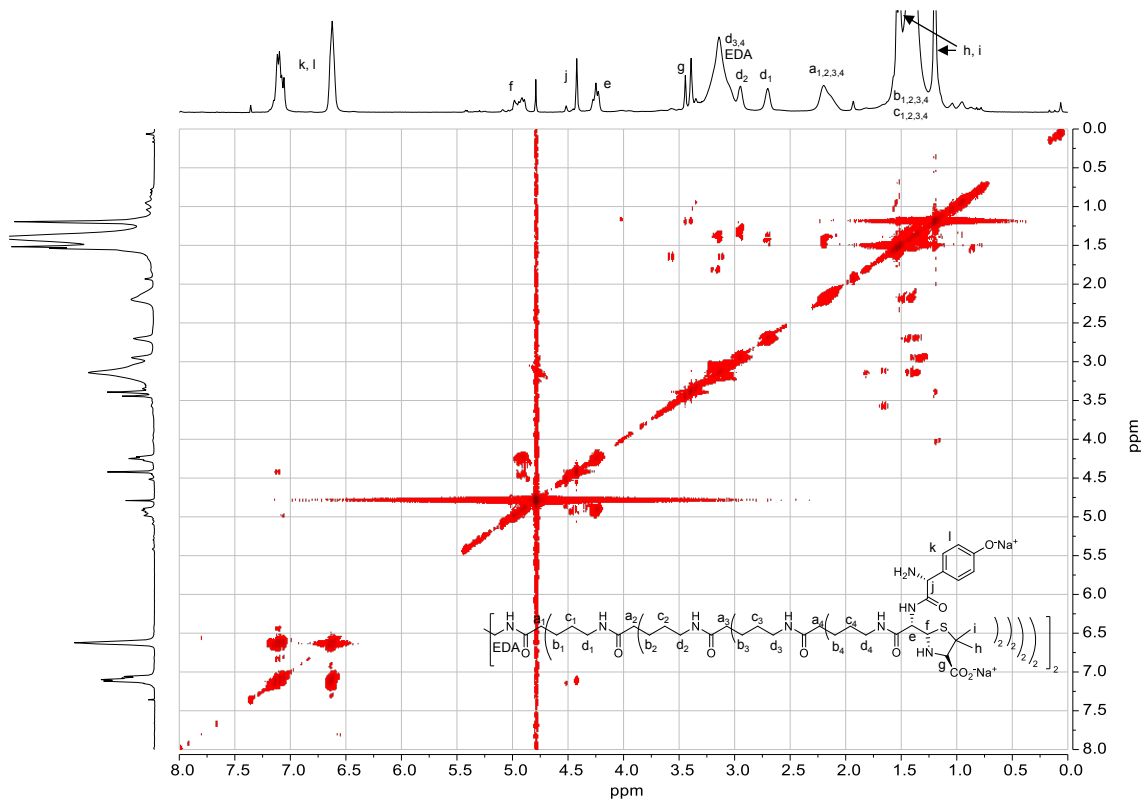


Figura 282. Espectro COSY de **DG4AXO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

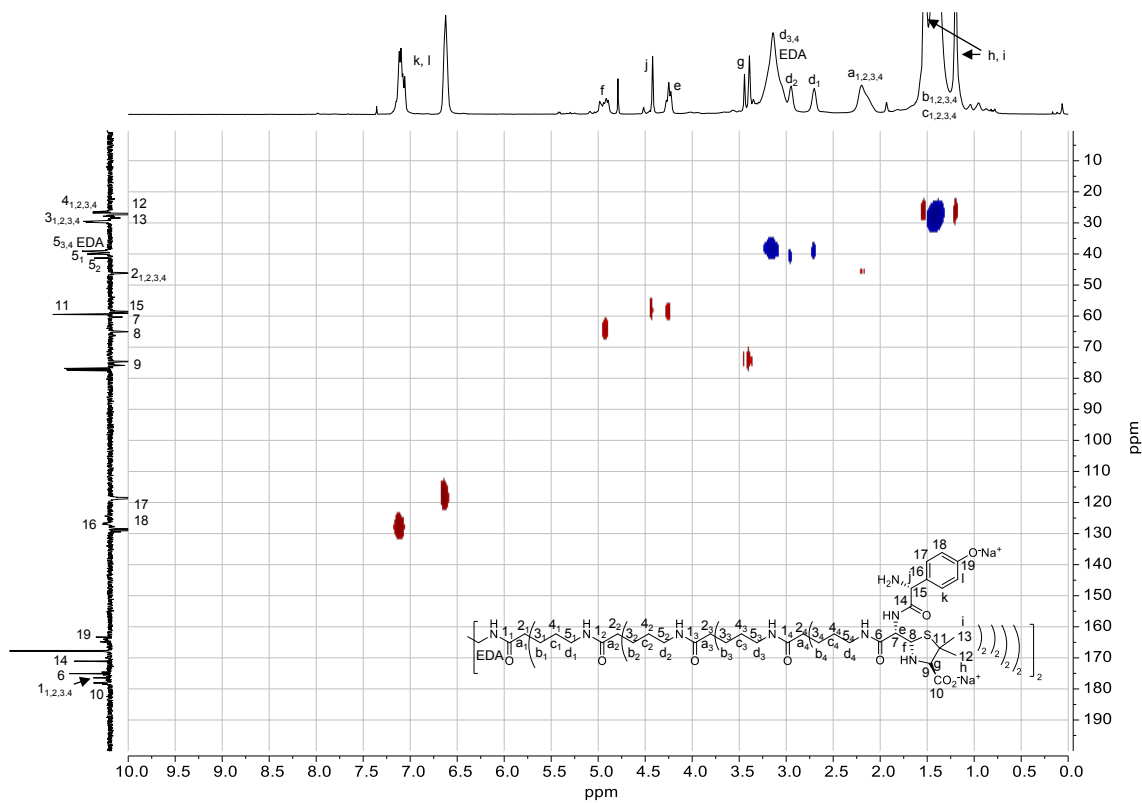


Figura 283. Espectro HSQC de **DG4AXO** en  $D_2O + Na_2CO_3$ .

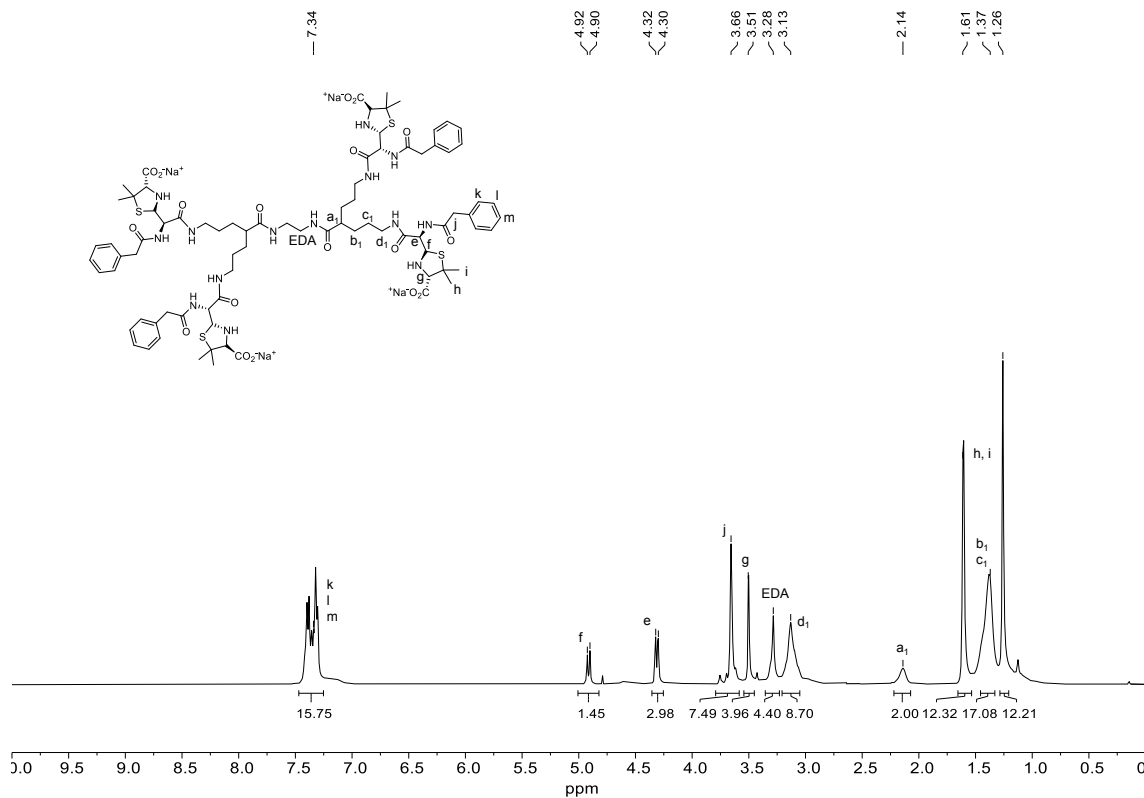


Figura 284. Espectro de RMN- $^1H$  de **DGIBPO** en  $D_2O + Na_2CO_3$ .

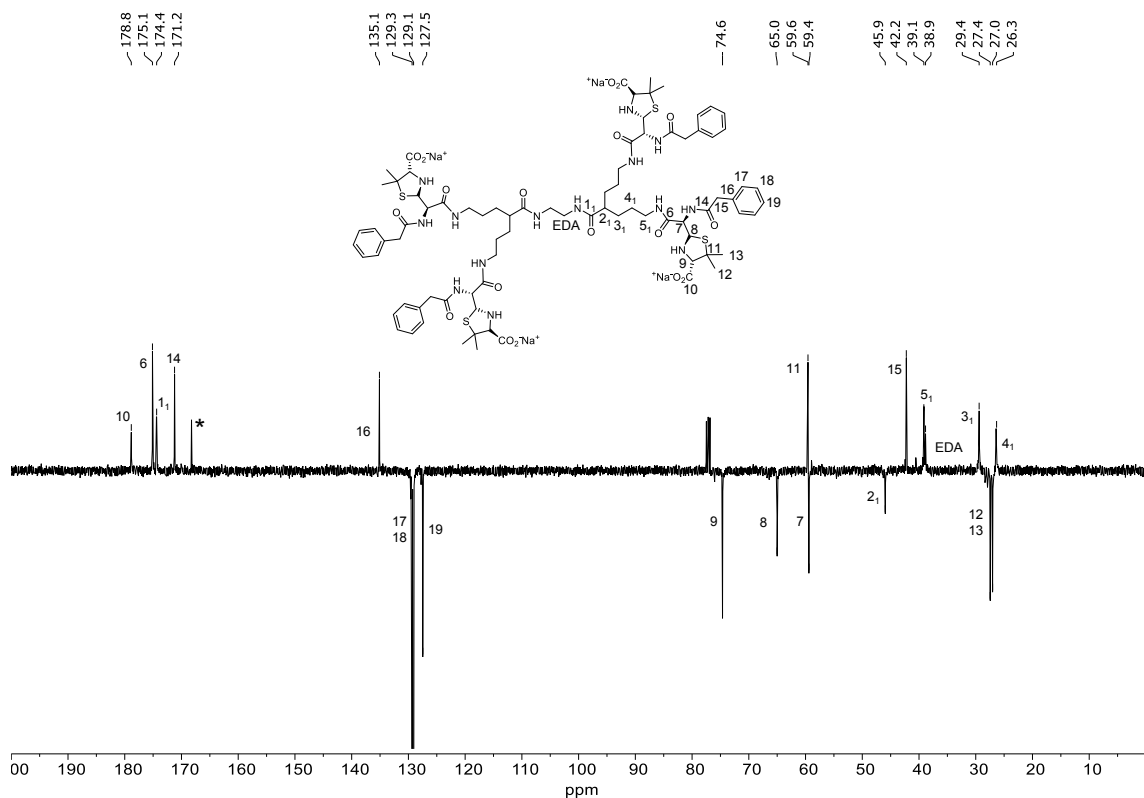


Figura 285. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DGIBPO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

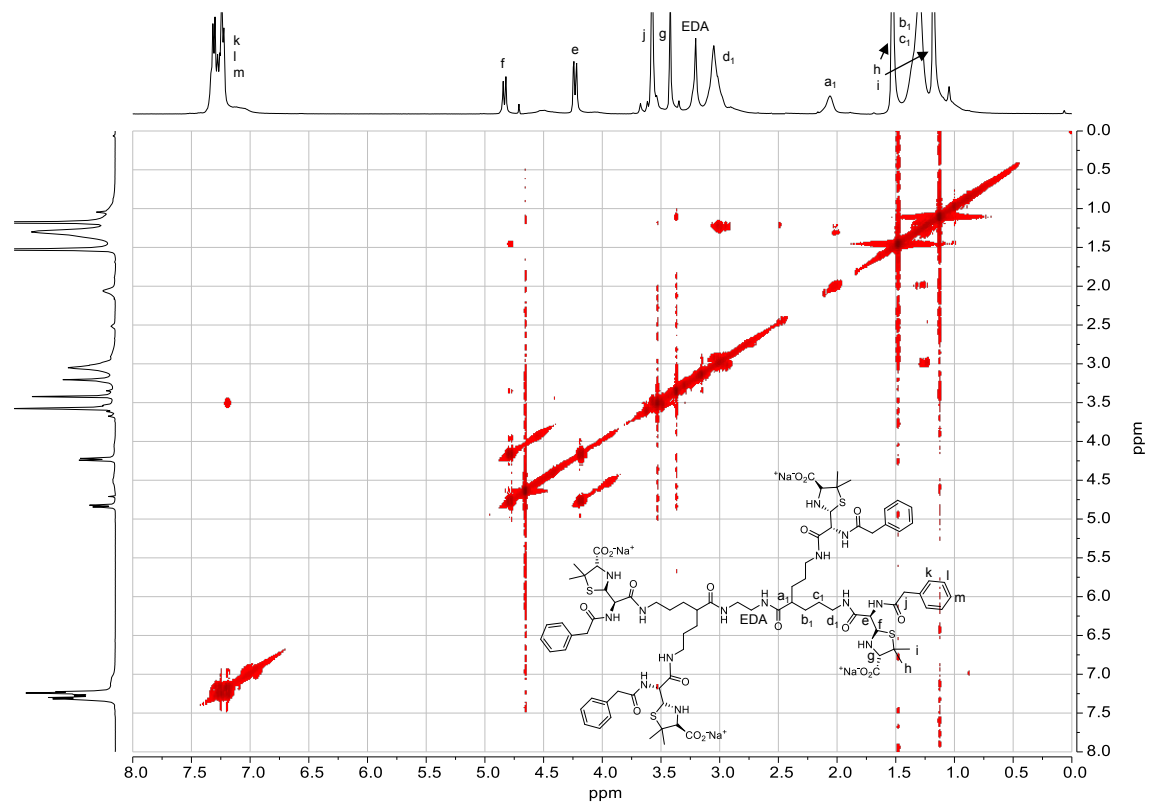


Figura 286. Espectro COSY de **DGIBPO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

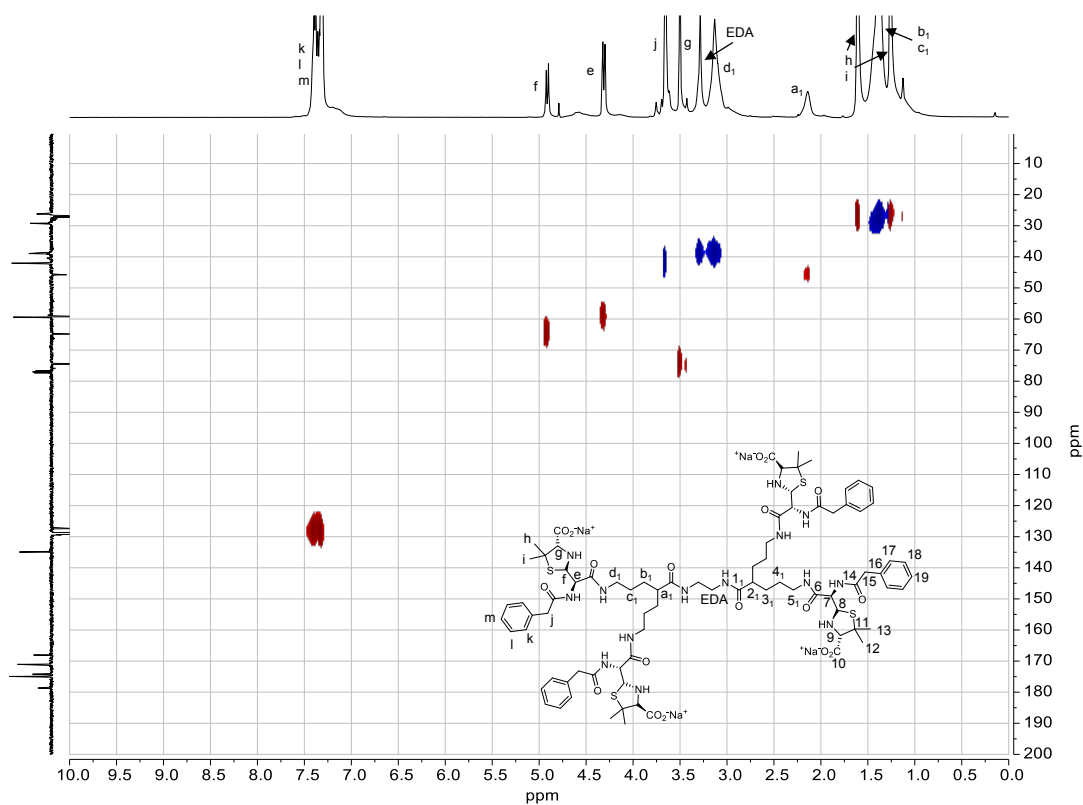


Figura 287. Espectro HSQC de **DG1BPO** en  $D_2O + Na_2CO_3$ .

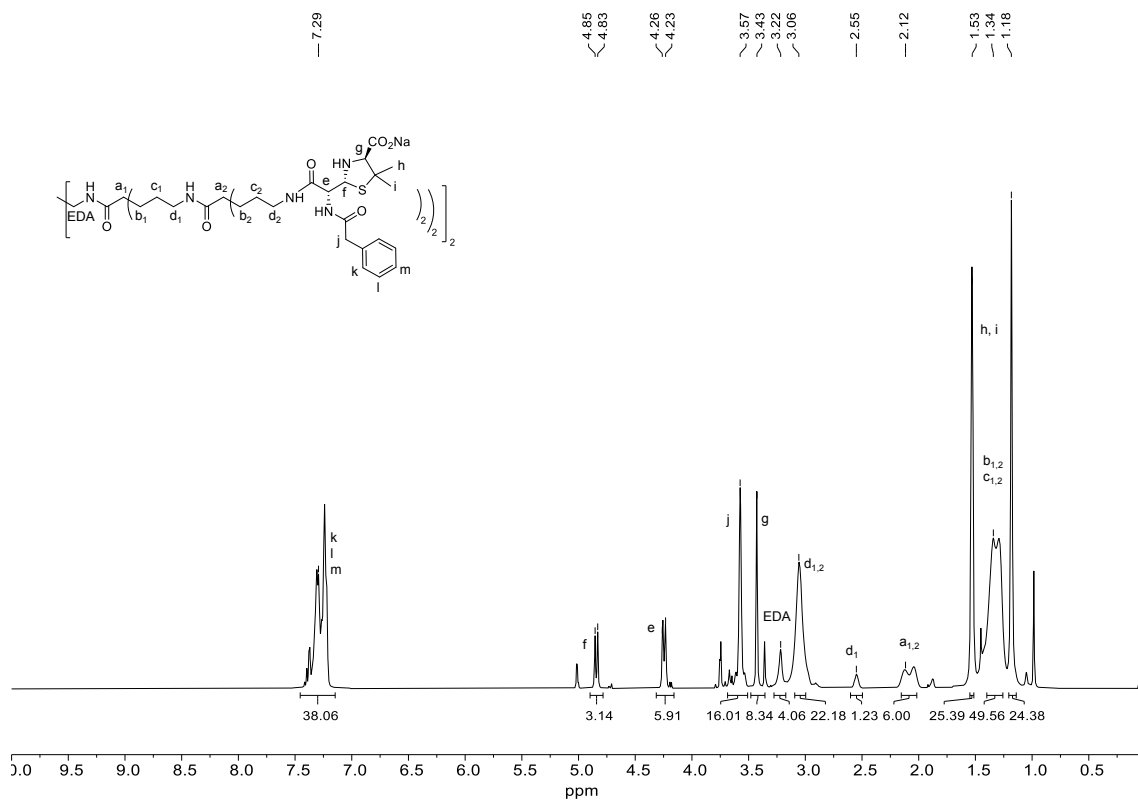


Figura 288. Espectro de  $RMN-^1H$  de **DG2BPO** en  $D_2O + Na_2CO_3$ .

Anexo

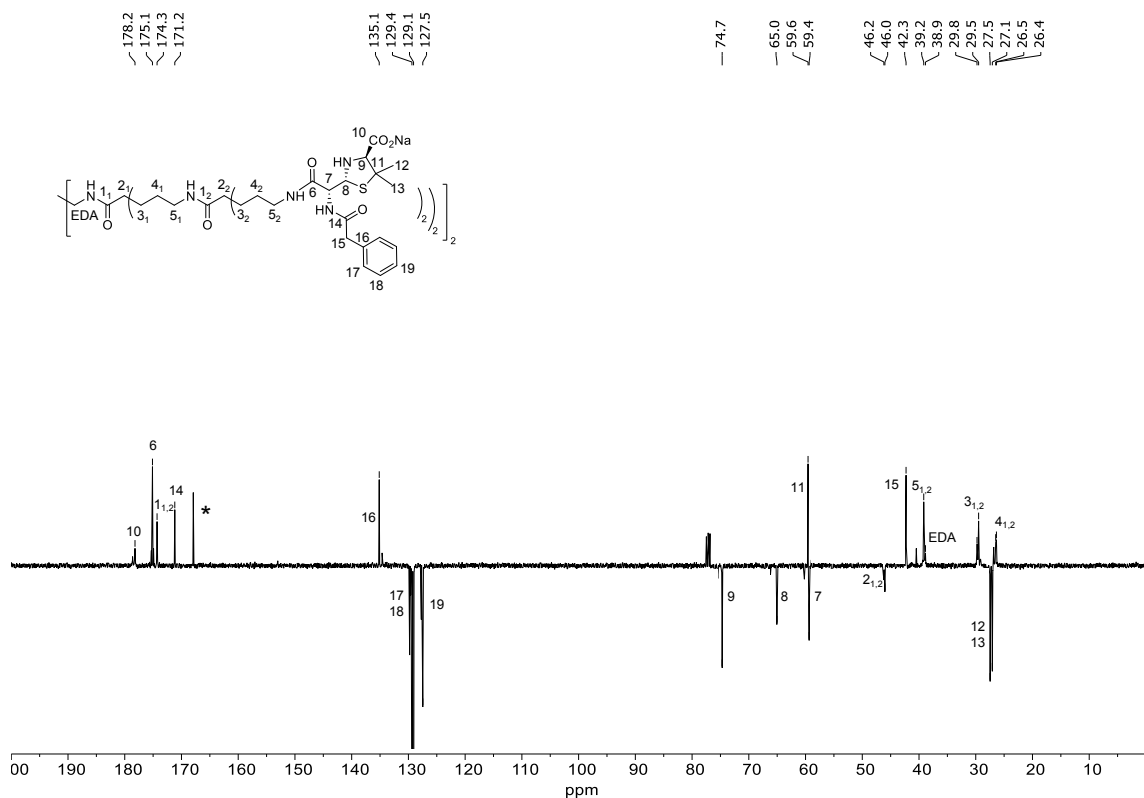


Figura 289. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DG2BPO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

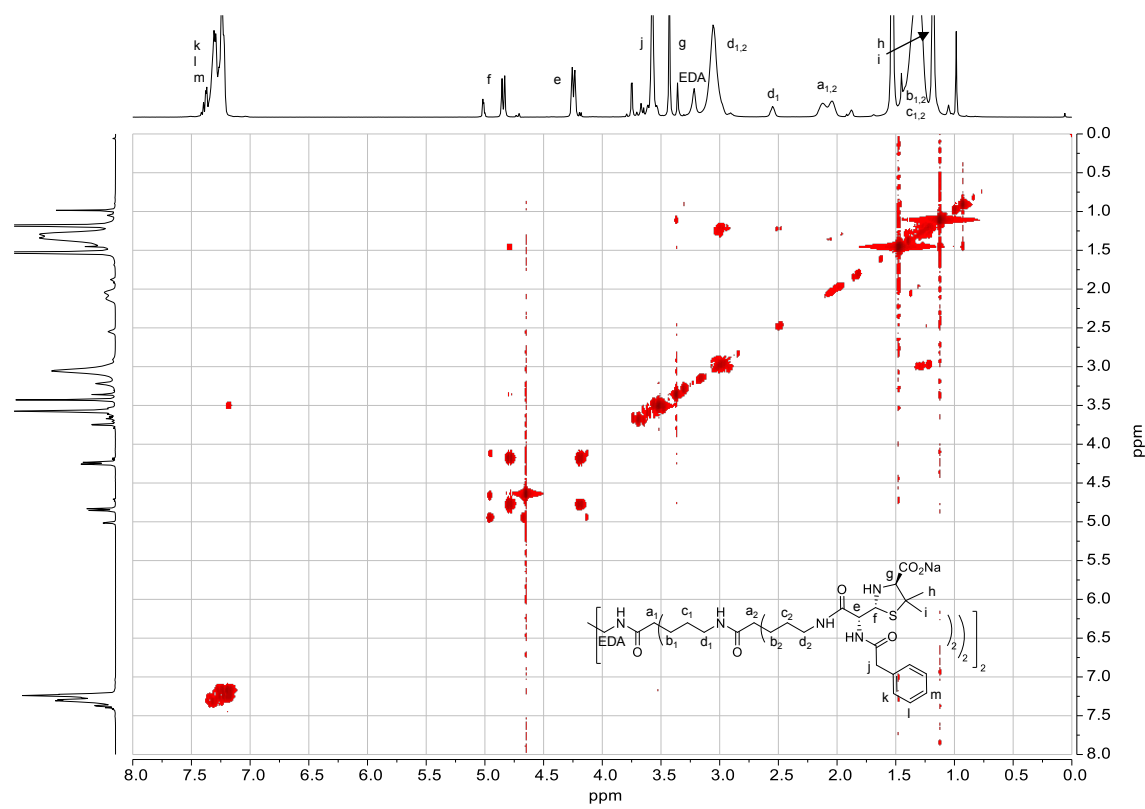


Figura 290. Espectro COSY de **DG2BPO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

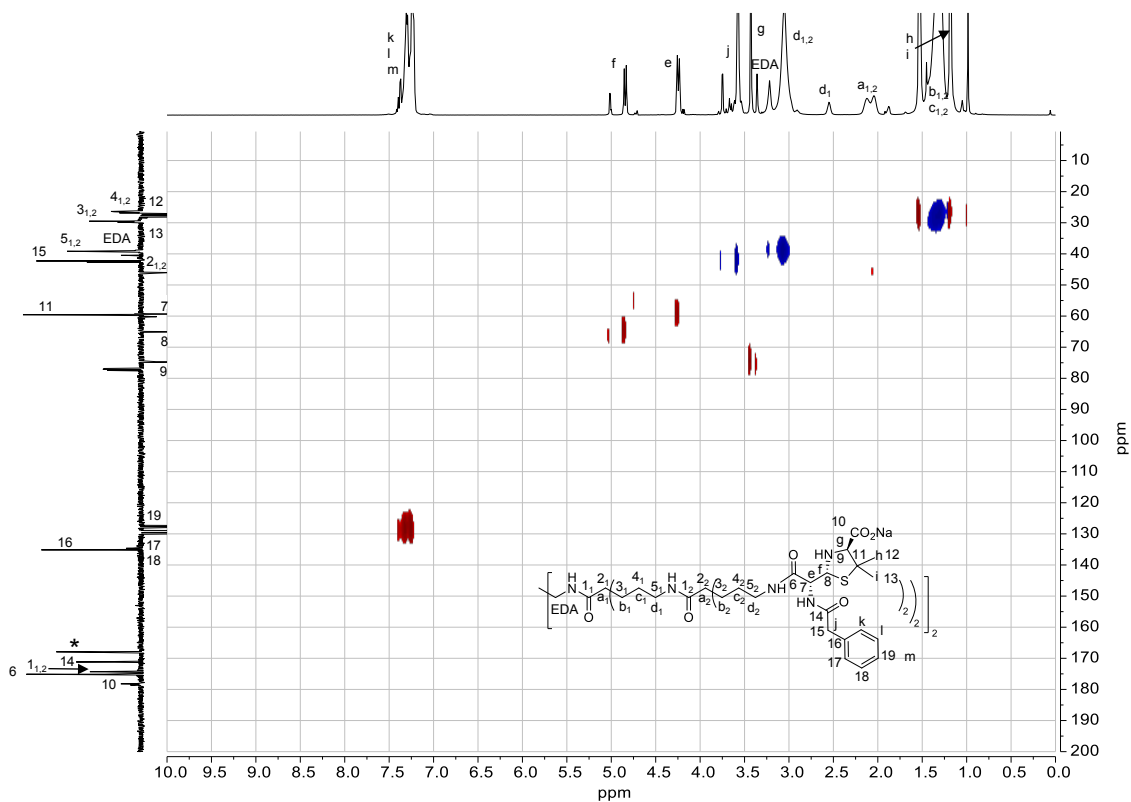


Figura 291. Espectro HSQC de **DG2BPO**  $D_2O + Na_2CO_3$ .

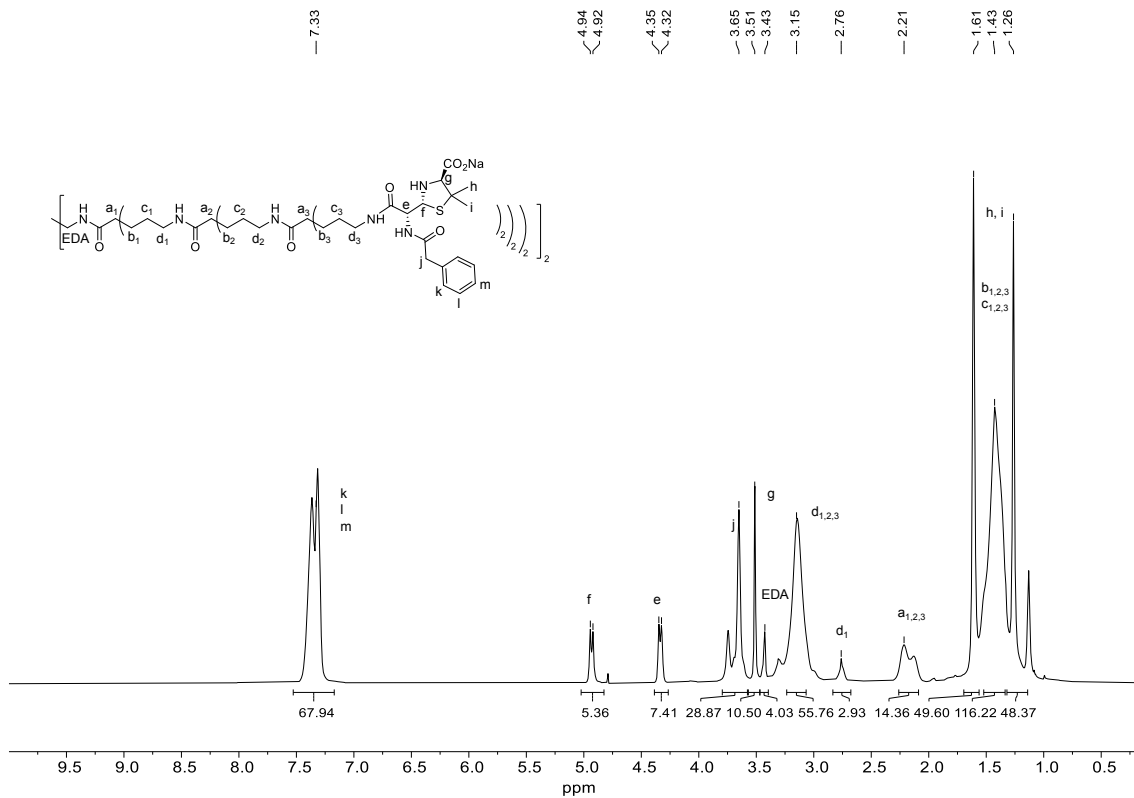


Figura 292. Espectro de  $RMN-^1H$  de **DG3BPO** en  $D_2O + Na_2CO_3$ .

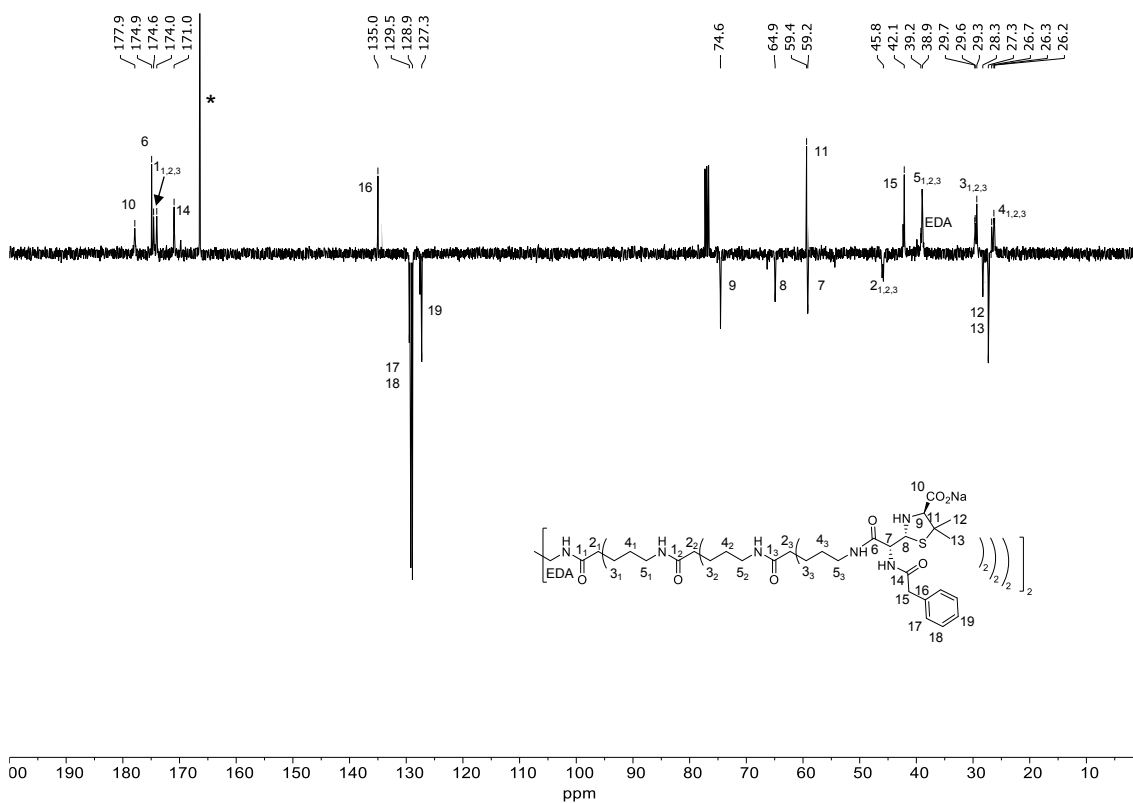


Figura 293. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DG3BPO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

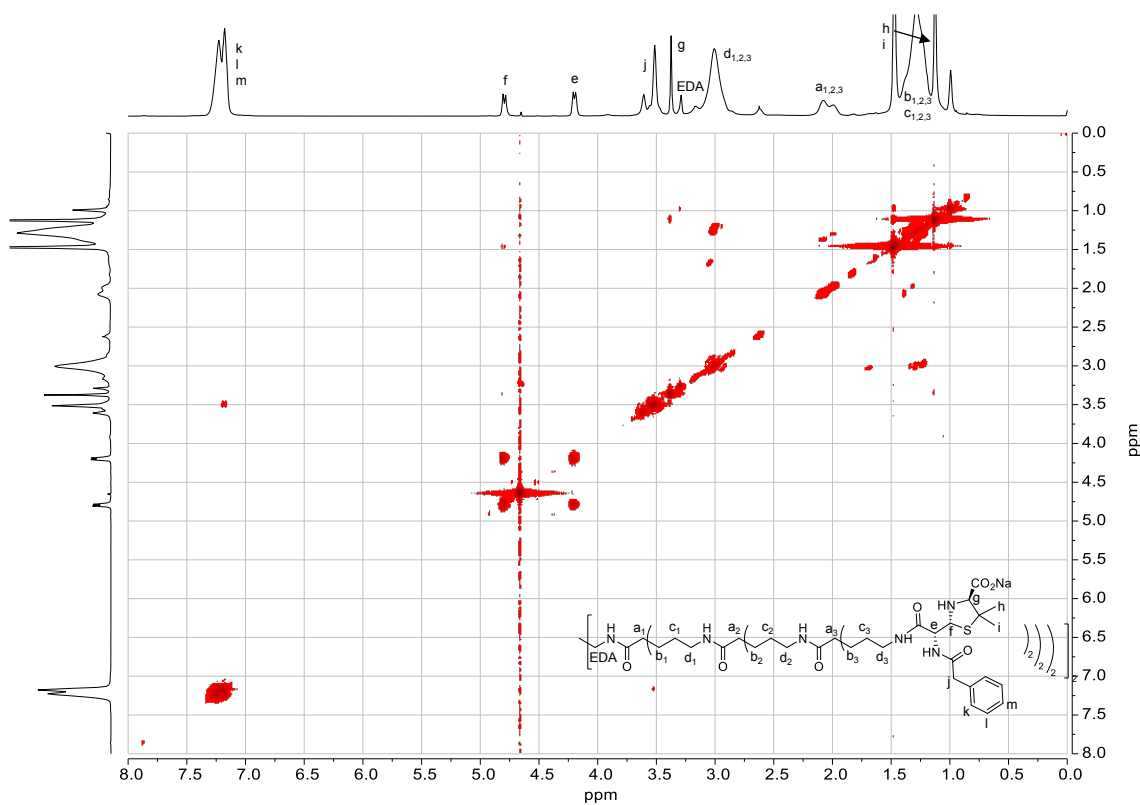


Figura 294. Espectro COSY de **DG3BPO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

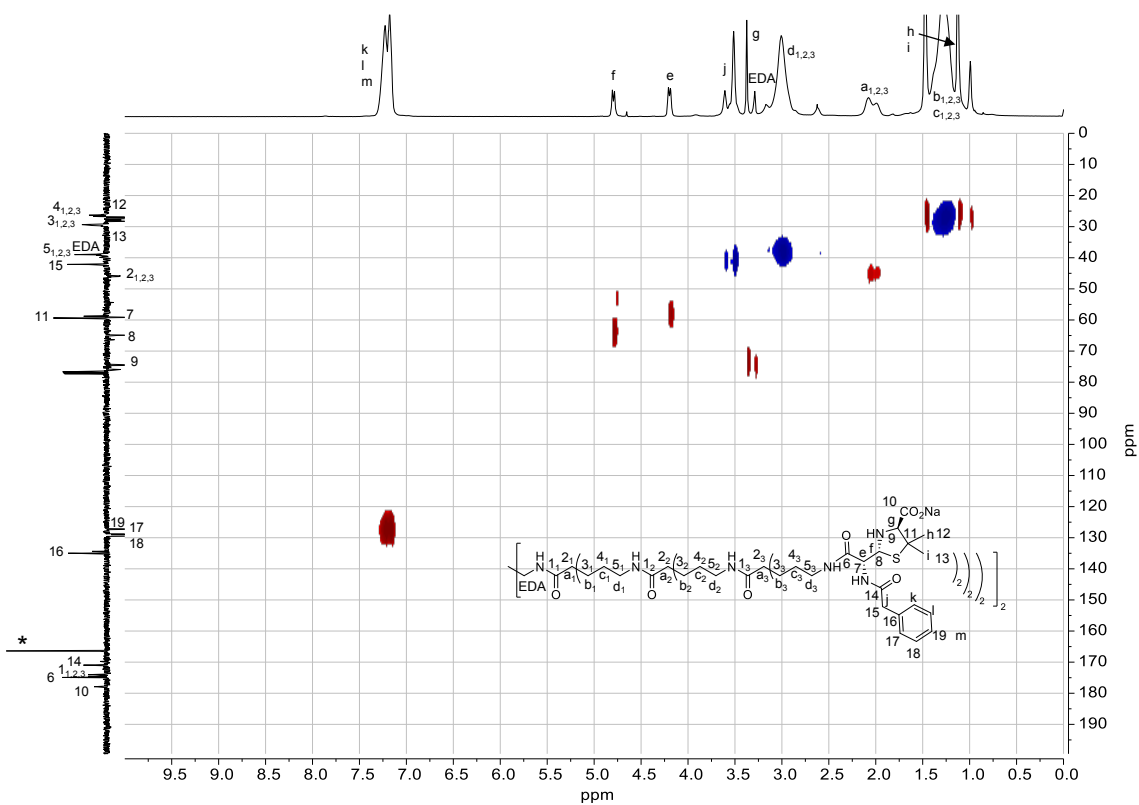


Figura 295. Espectro HSQC de DG3BPO en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

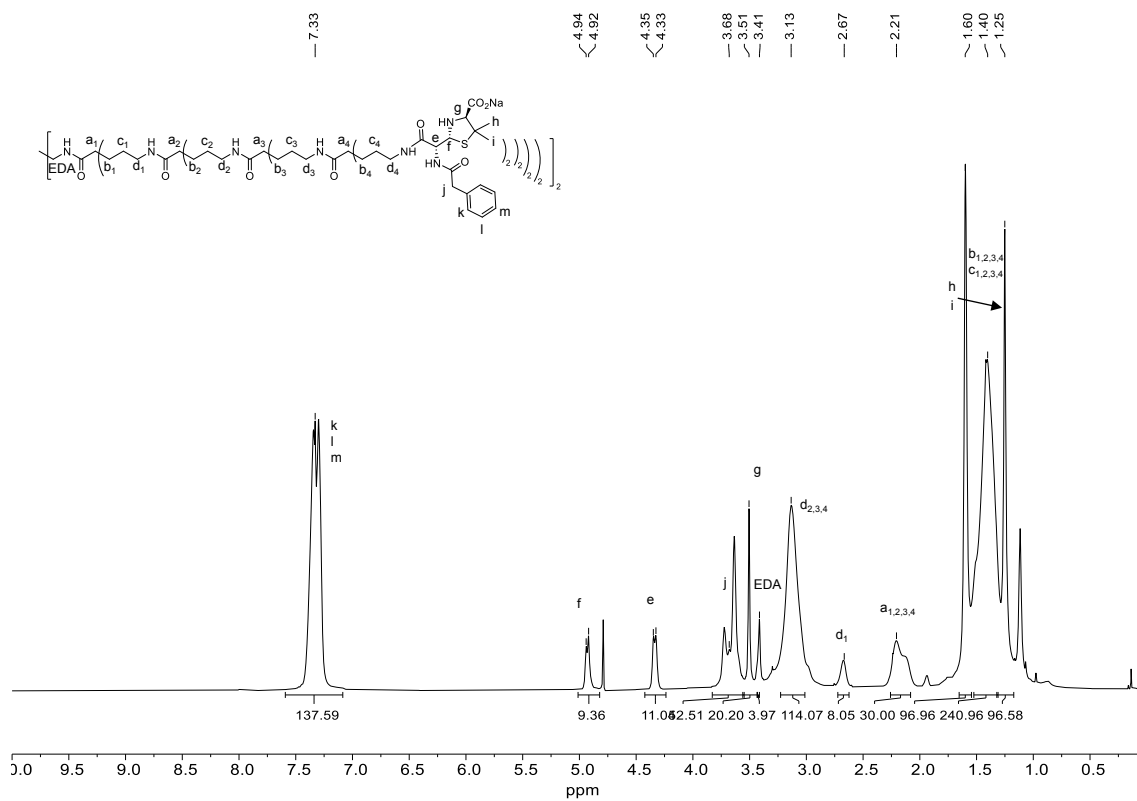


Figura 296. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DG4BPO en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

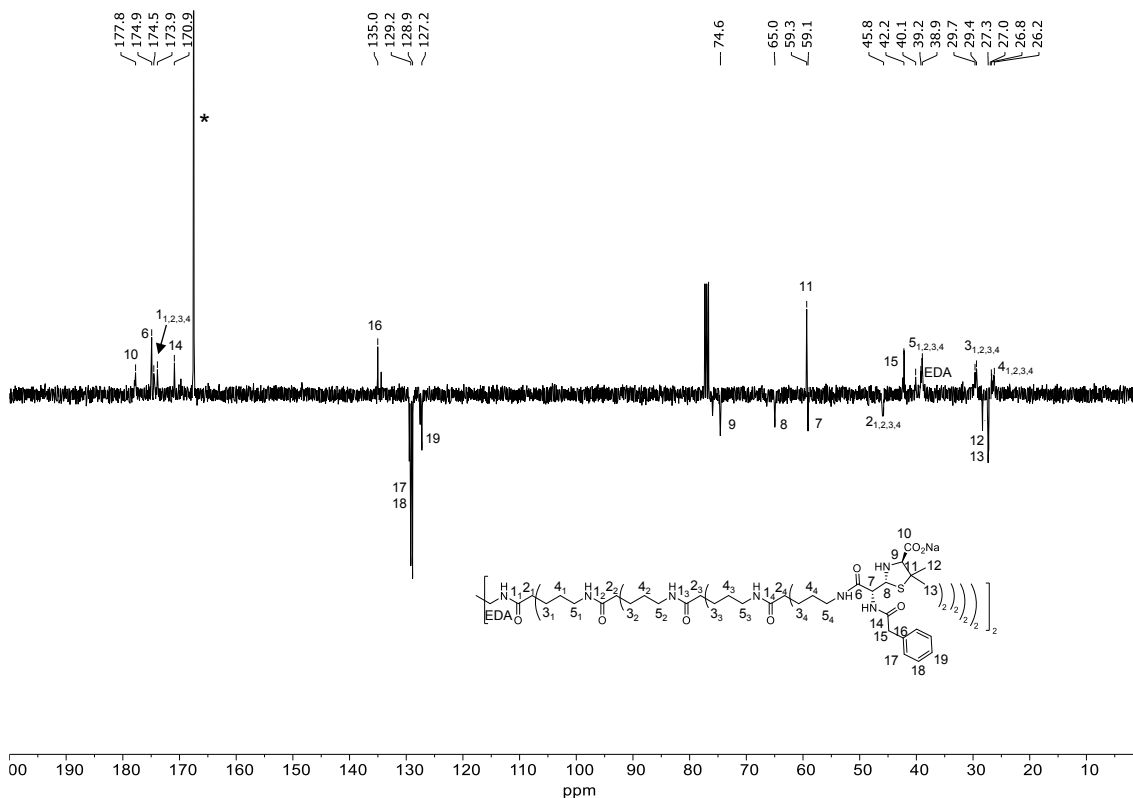


Figura 297. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DG4BPO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

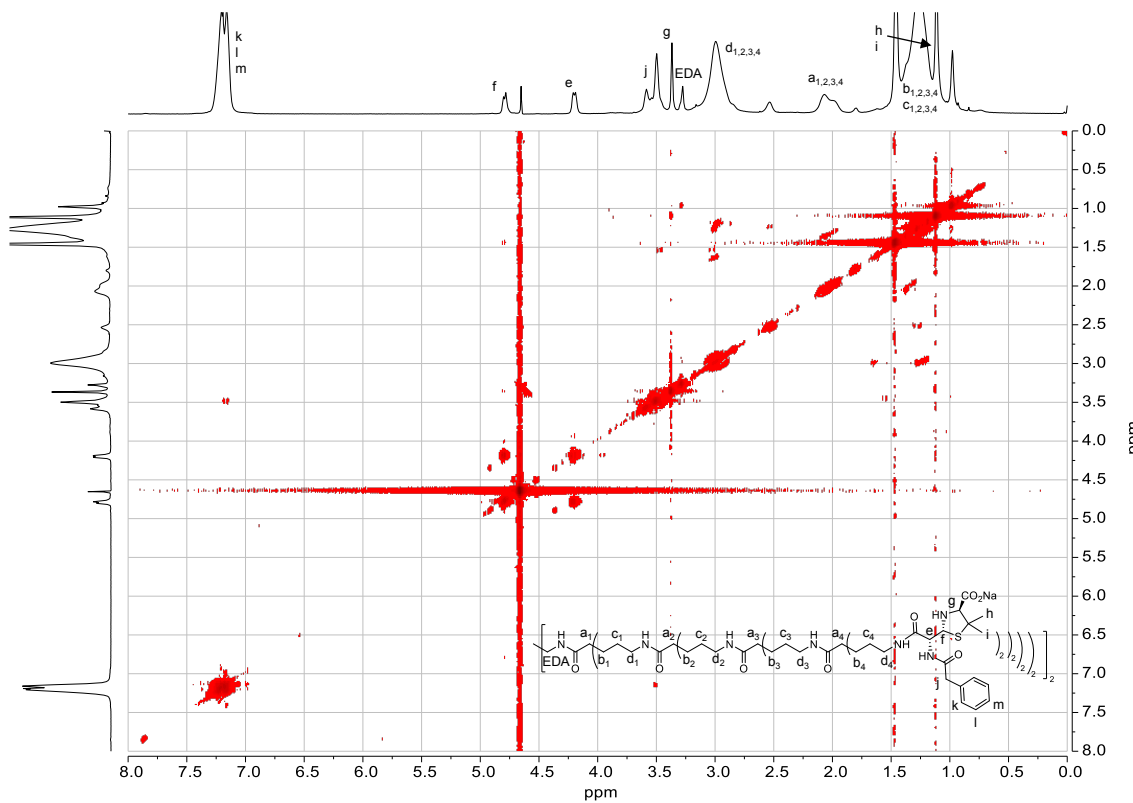


Figura 298. Espectro COSY de **DG4BPO** en D<sub>2</sub>O + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

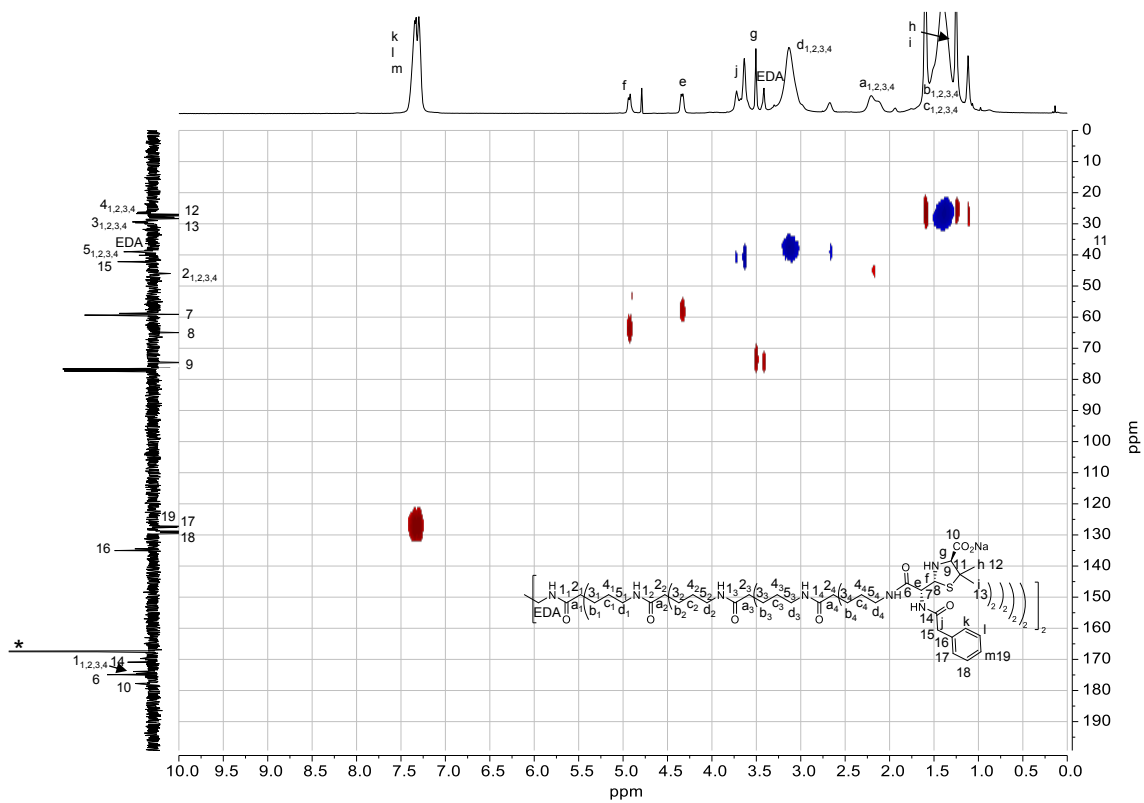


Figura 299. Espectro HSQC de **DG4BPO** en  $\text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$ .

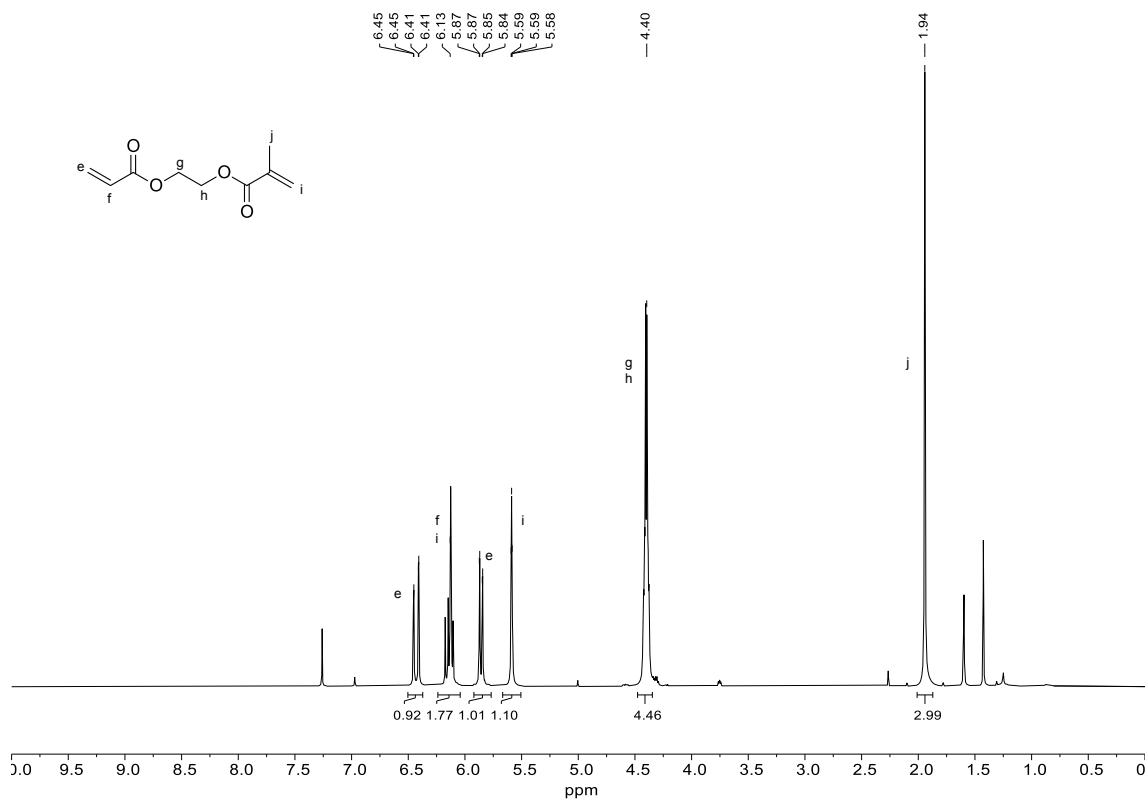


Figura 300. Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  de **AEMA** en  $\text{CDCl}_3$

Anexo

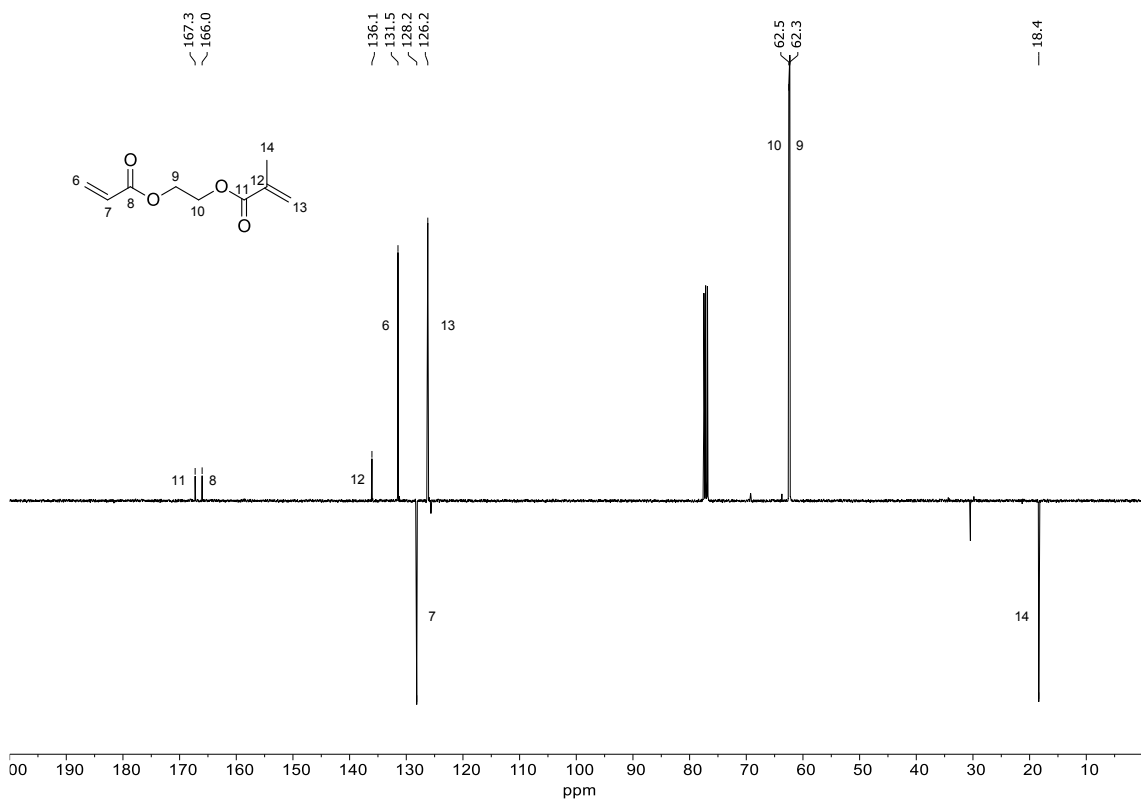


Figura 301. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de AEMA en CDCl<sub>3</sub>.

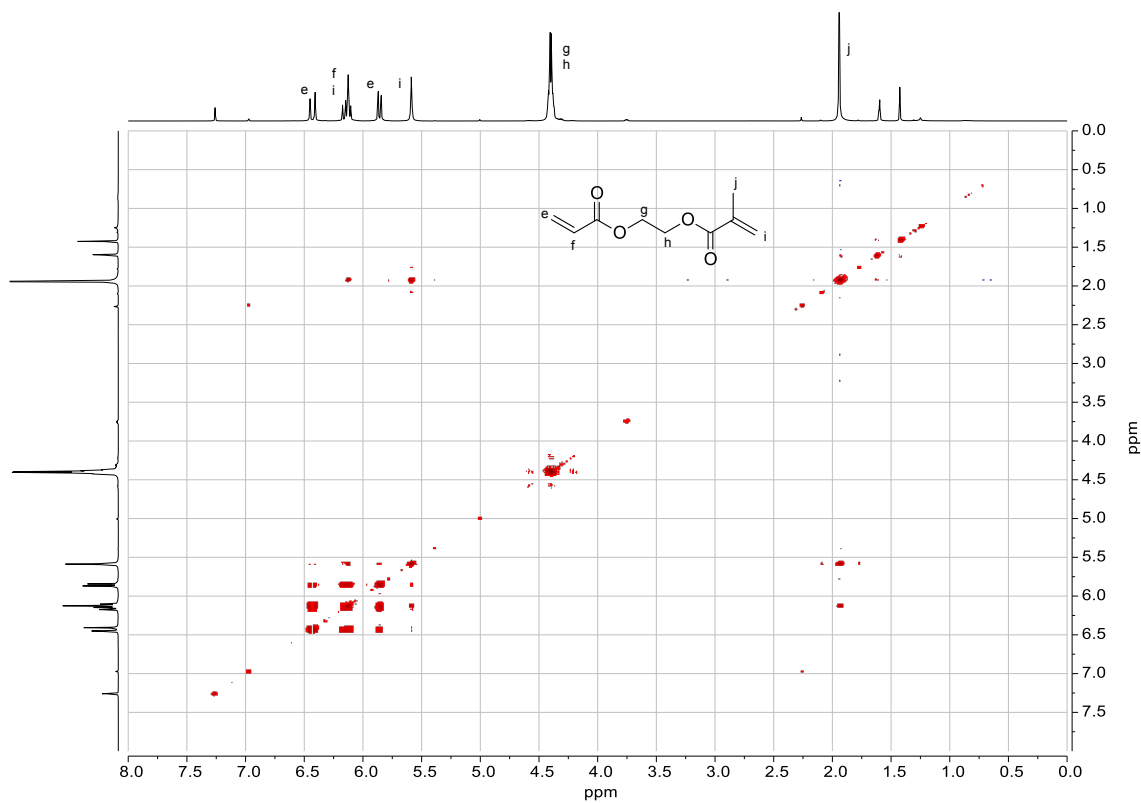


Figura 302. Espectro COSY de AEMA en CDCl<sub>3</sub>.

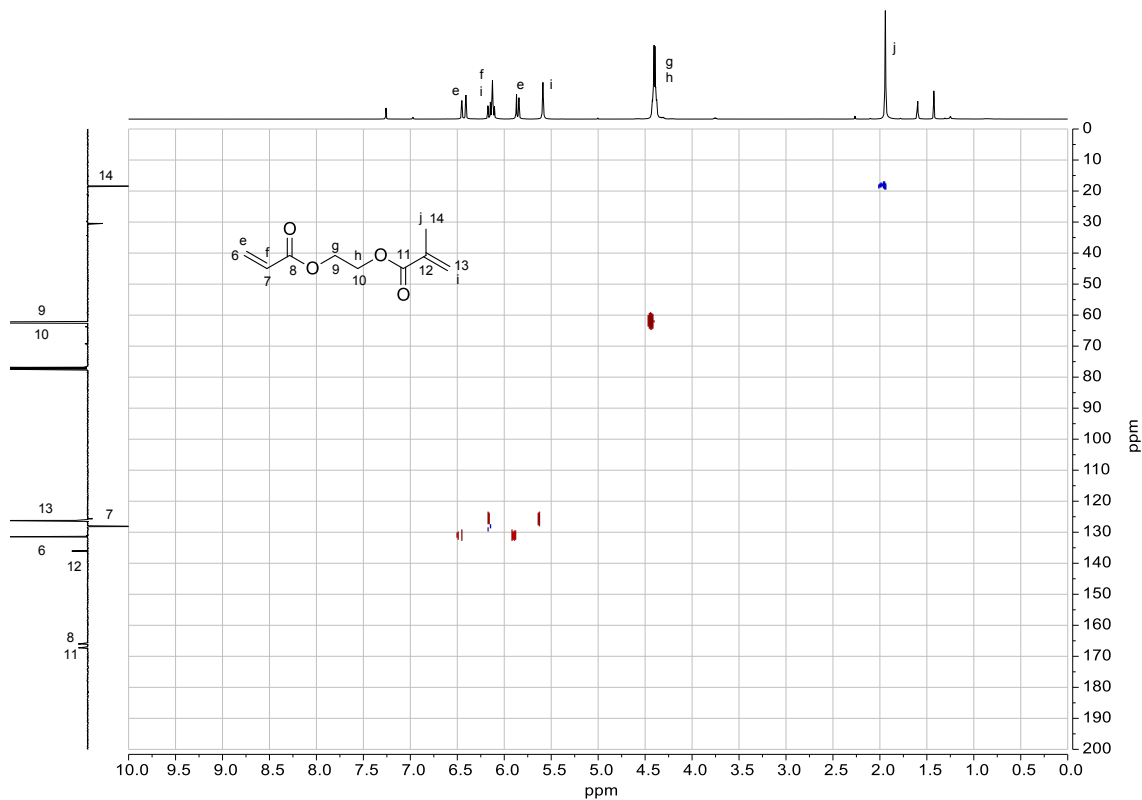


Figura 303. Espectro HSQC de AEMA en CDCl<sub>3</sub>.

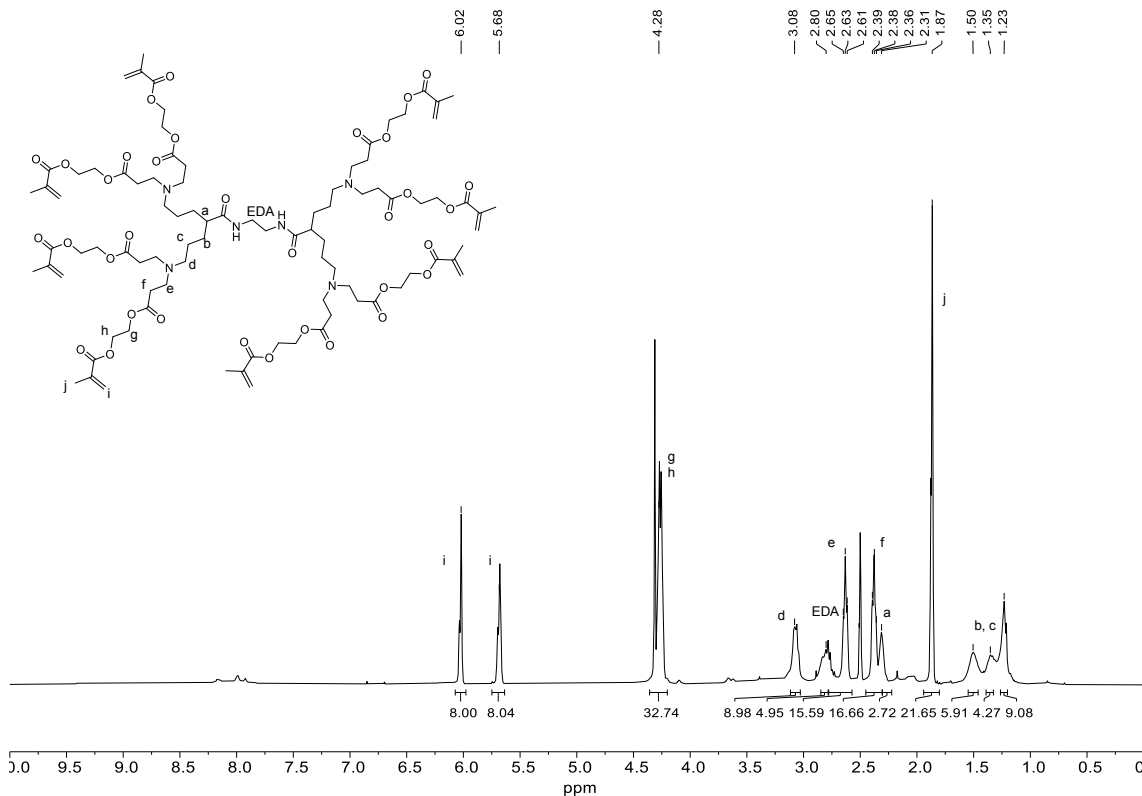


Figura 304. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DGIEMA en DMSO-d<sub>6</sub>.

Anexo

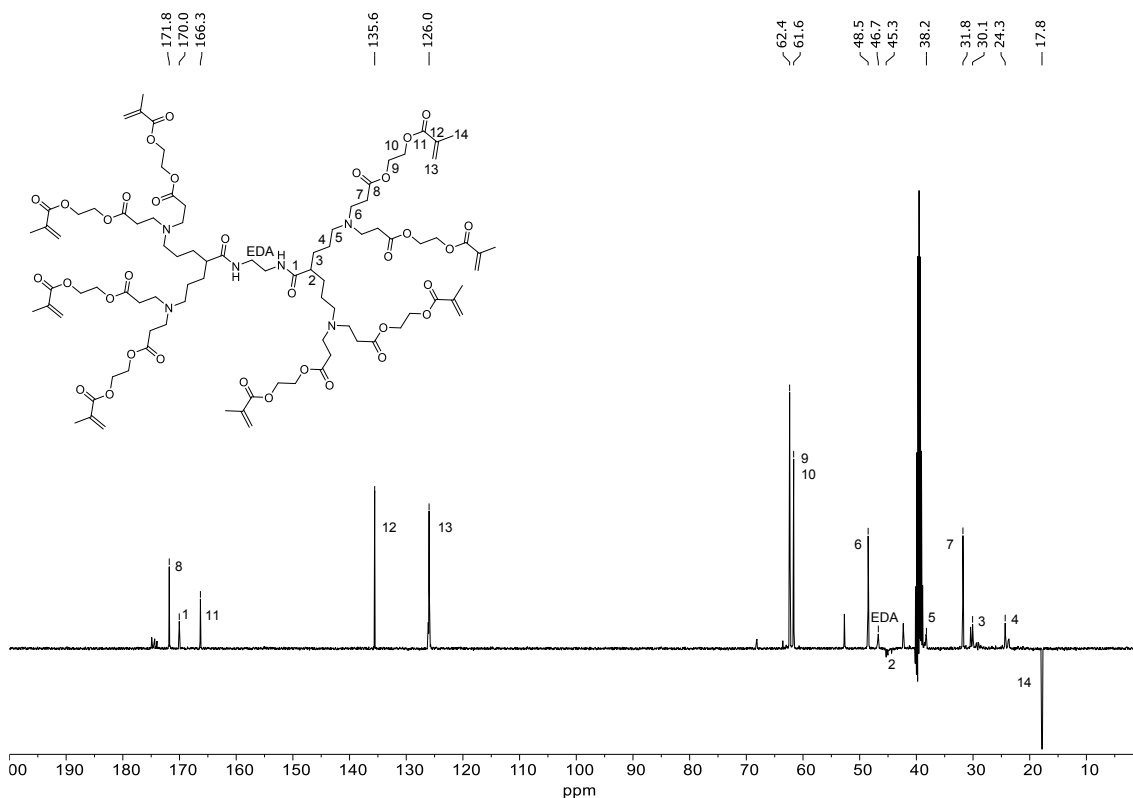


Figura 305. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DGIEMA** en DMSO-d<sub>6</sub>.

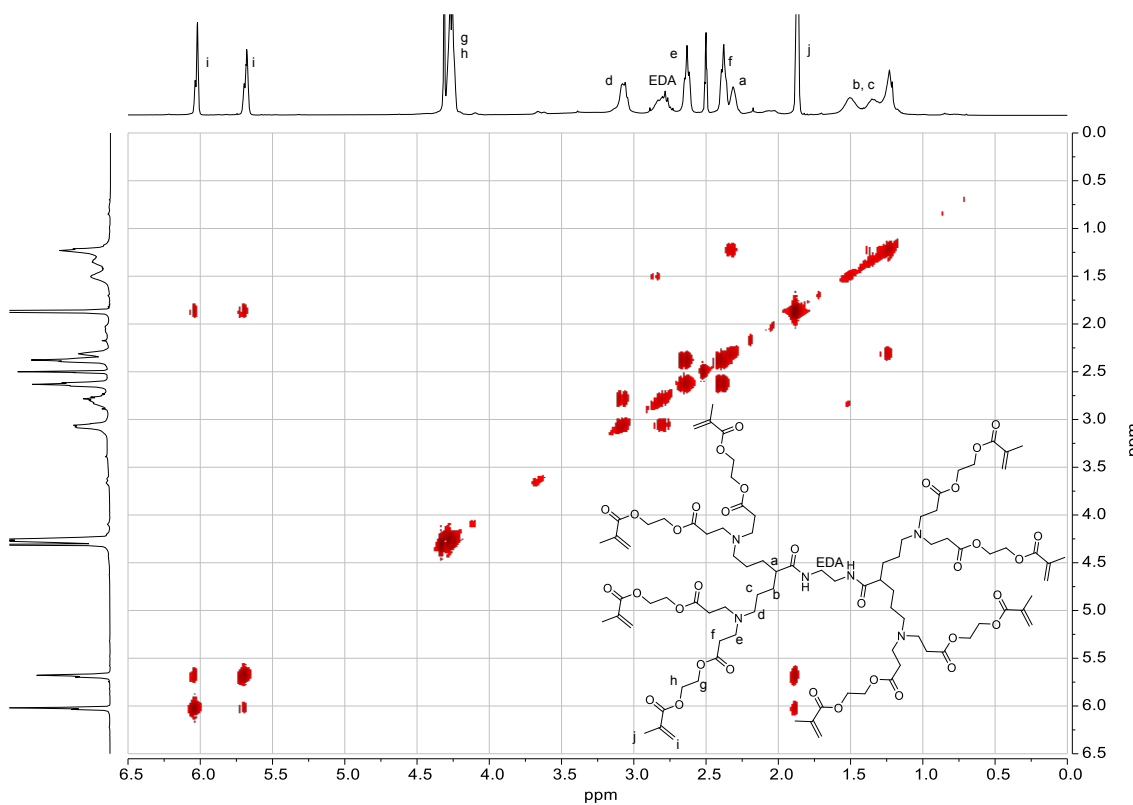


Figura 306. Espectro COSY de **DGIEMA** en DMSO-d<sub>6</sub>.

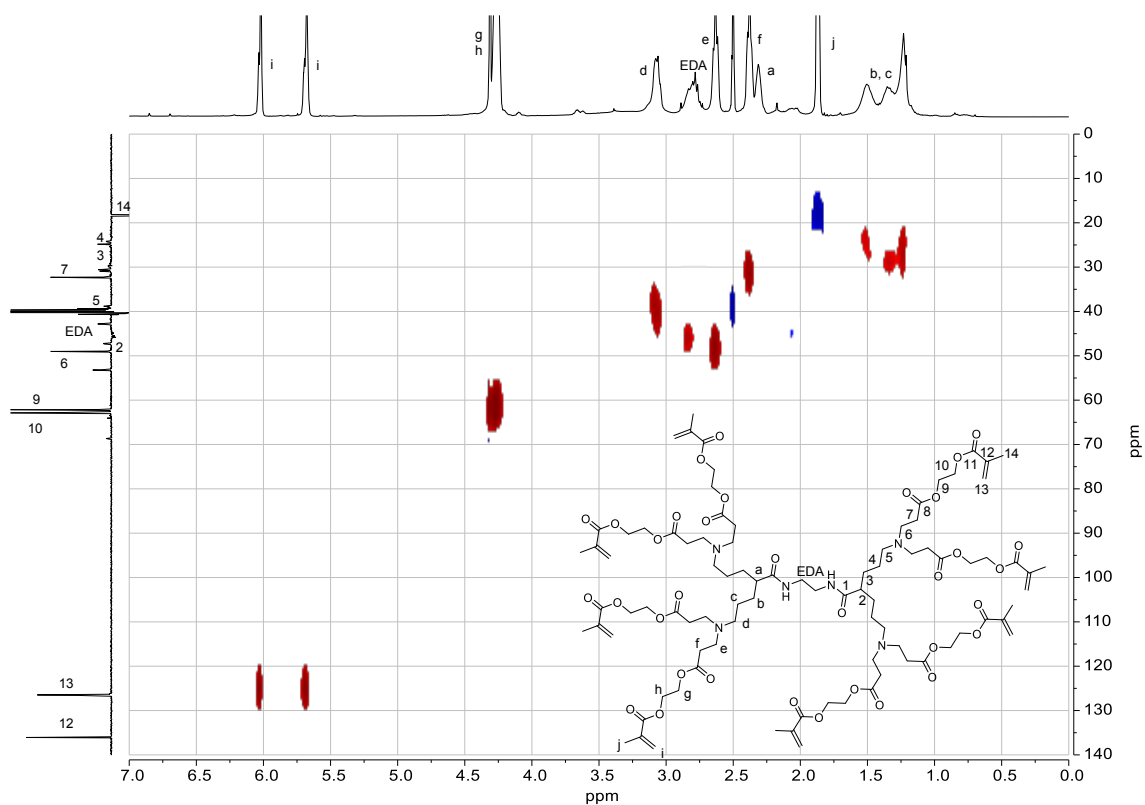


Figura 307. Espectro HSQC de **DGIEMA** en  $DMSO-d_6$ .

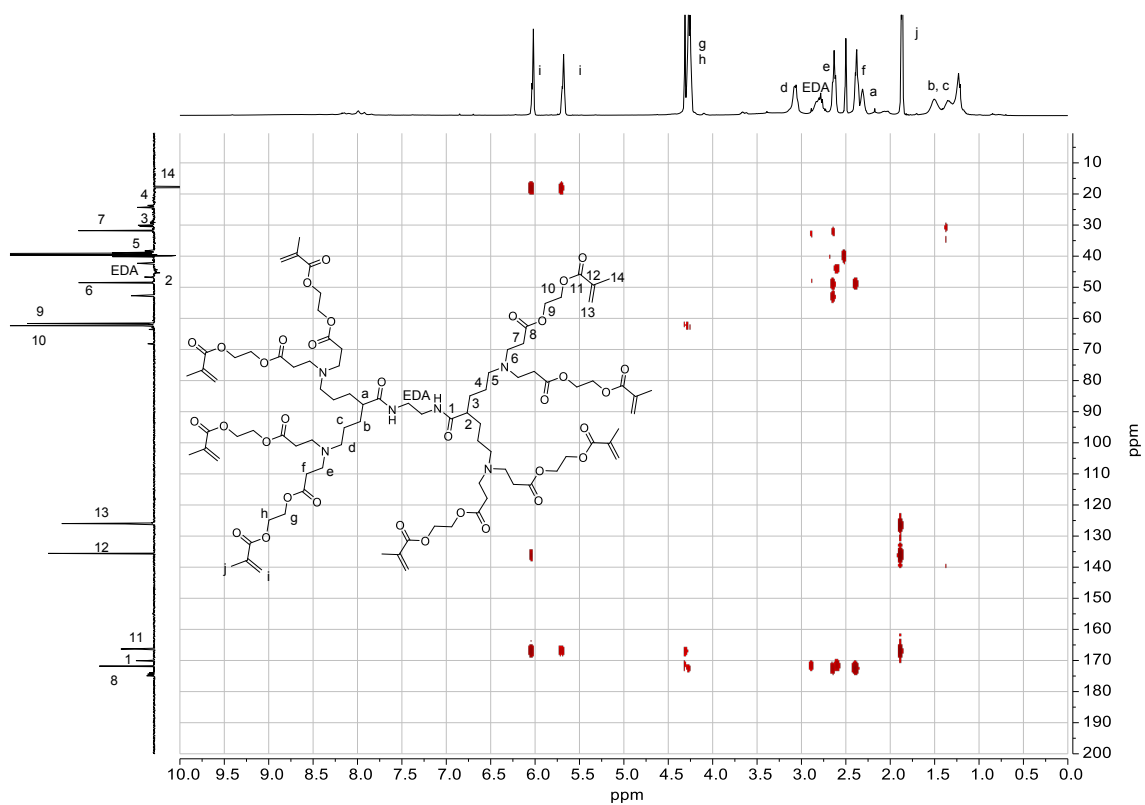


Figura 308. Espectro HMBC de **DGIEMA** en  $DMSO-d_6$ .

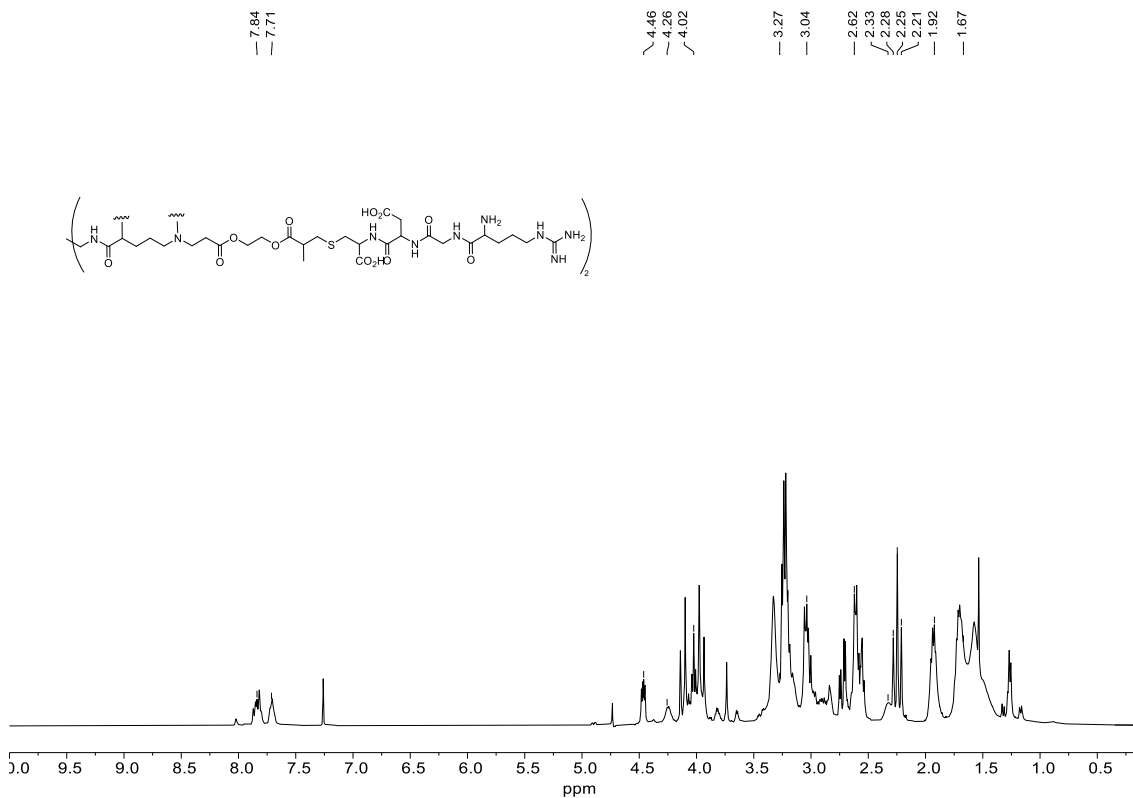


Figura 309. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de RGD-DG1 en D<sub>2</sub>O.

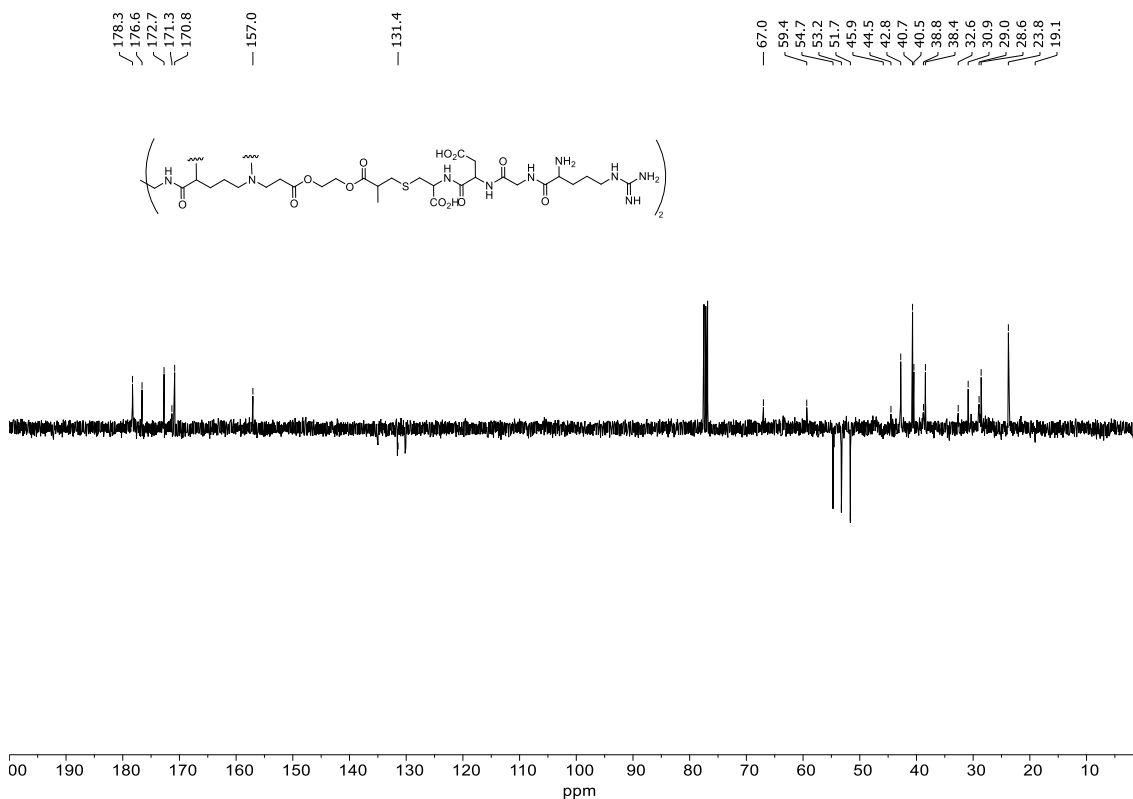


Figura 310. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de RGD-DG1 en D<sub>2</sub>O.

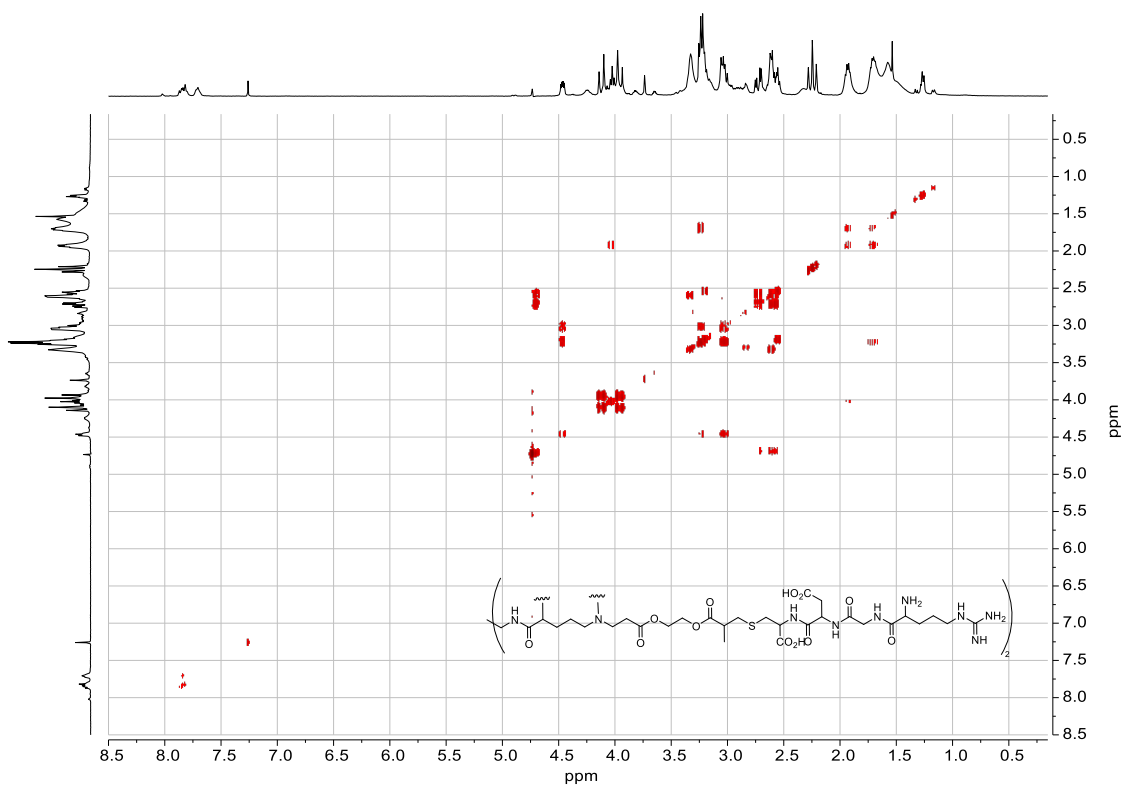


Figura 311. Espectro COSY de *RGD-DG1* en  $\text{D}_2\text{O}$ .

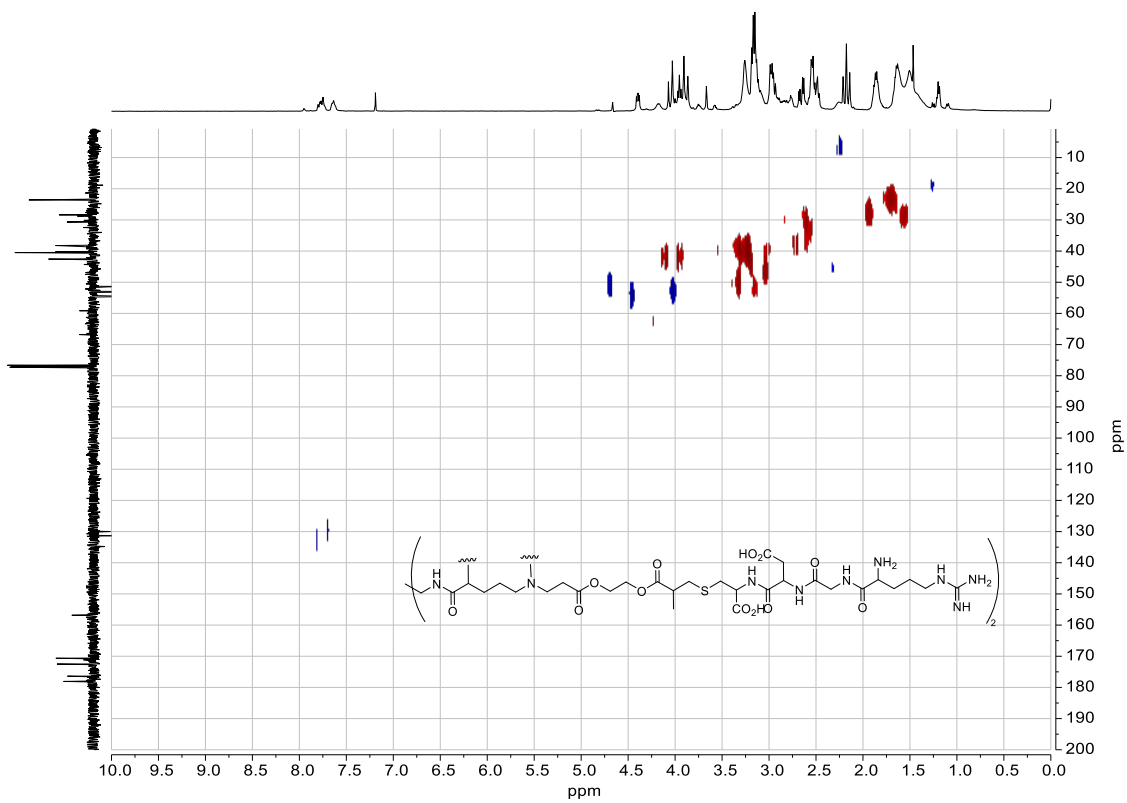


Figura 312. Espectro HSQC de *RGD-DG1* en  $\text{D}_2\text{O}$ .

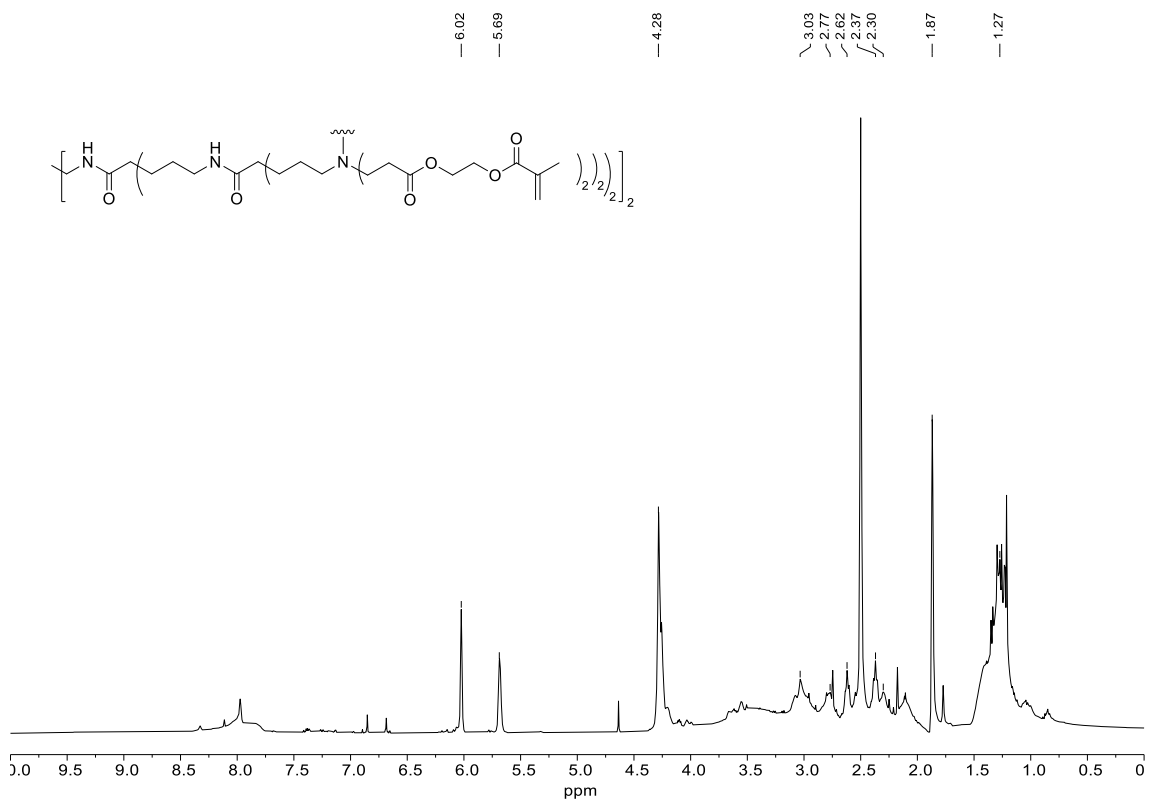


Figura 313. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DG2AEMA en DMSO-d<sub>6</sub>.

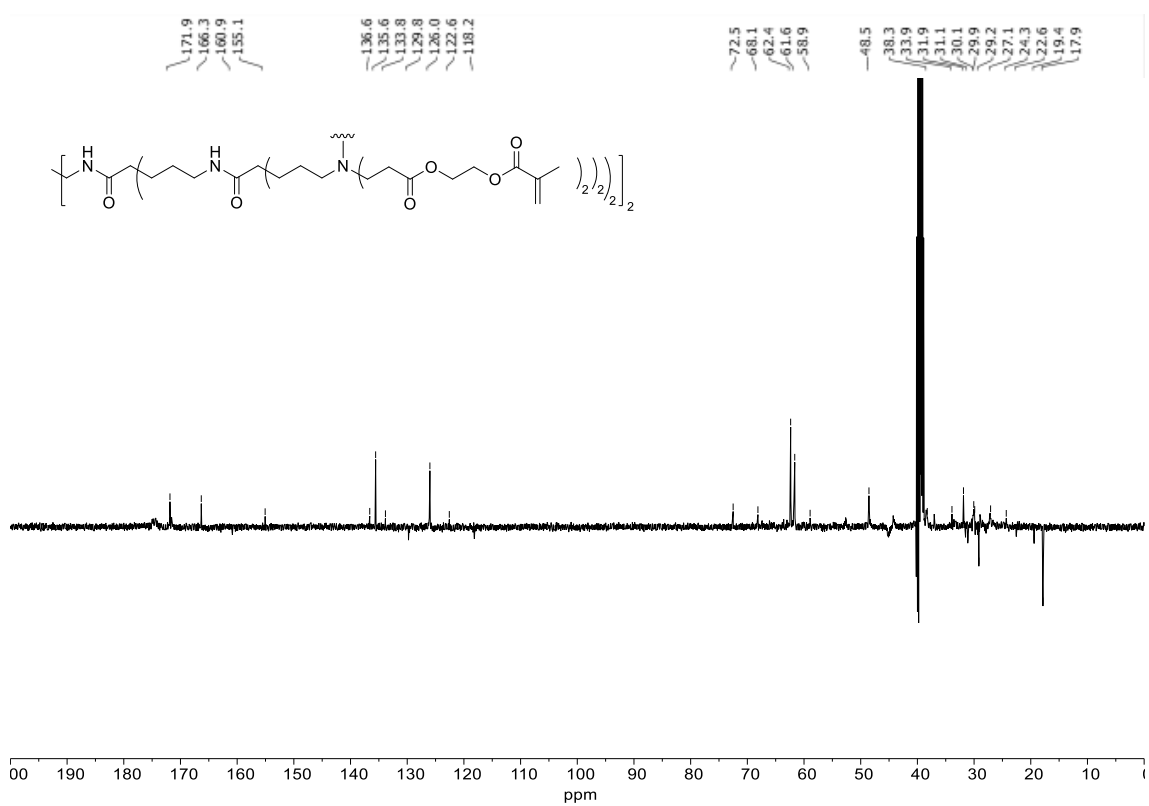


Figura 314. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de DG2AEMA en DMSO-d<sub>6</sub>.

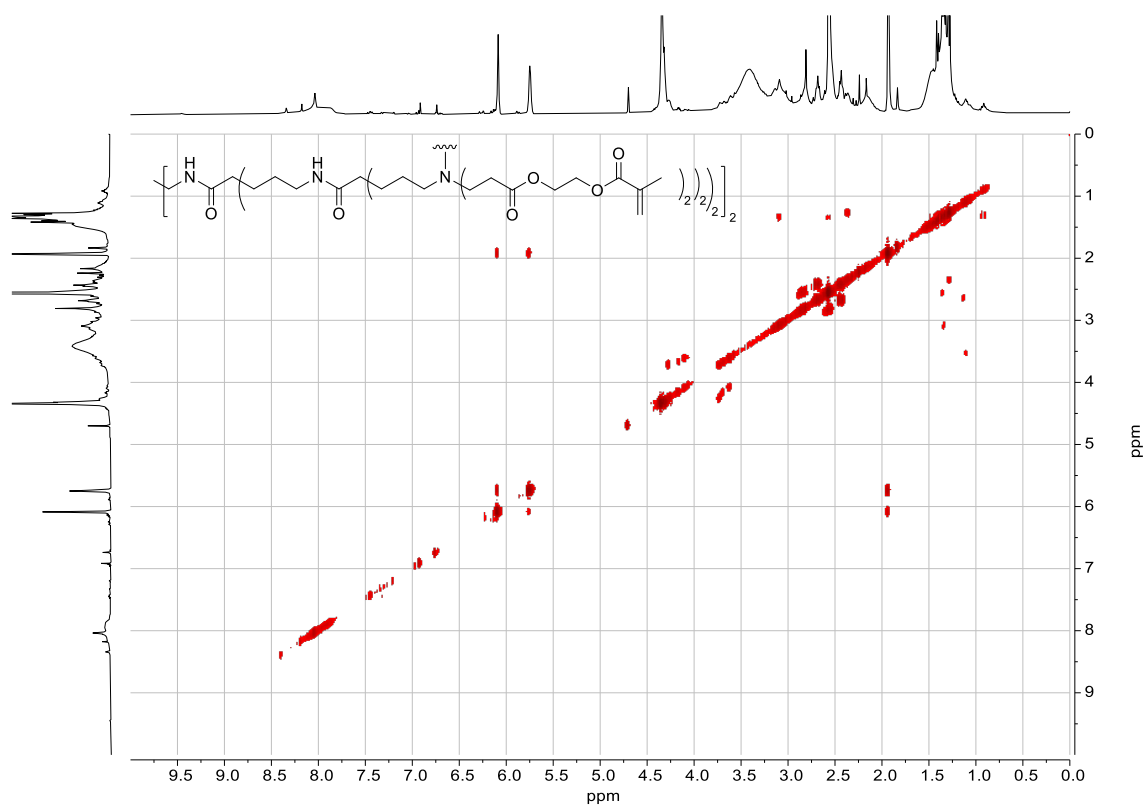


Figura 315. Espectro COSY de **DG2AEMA** en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

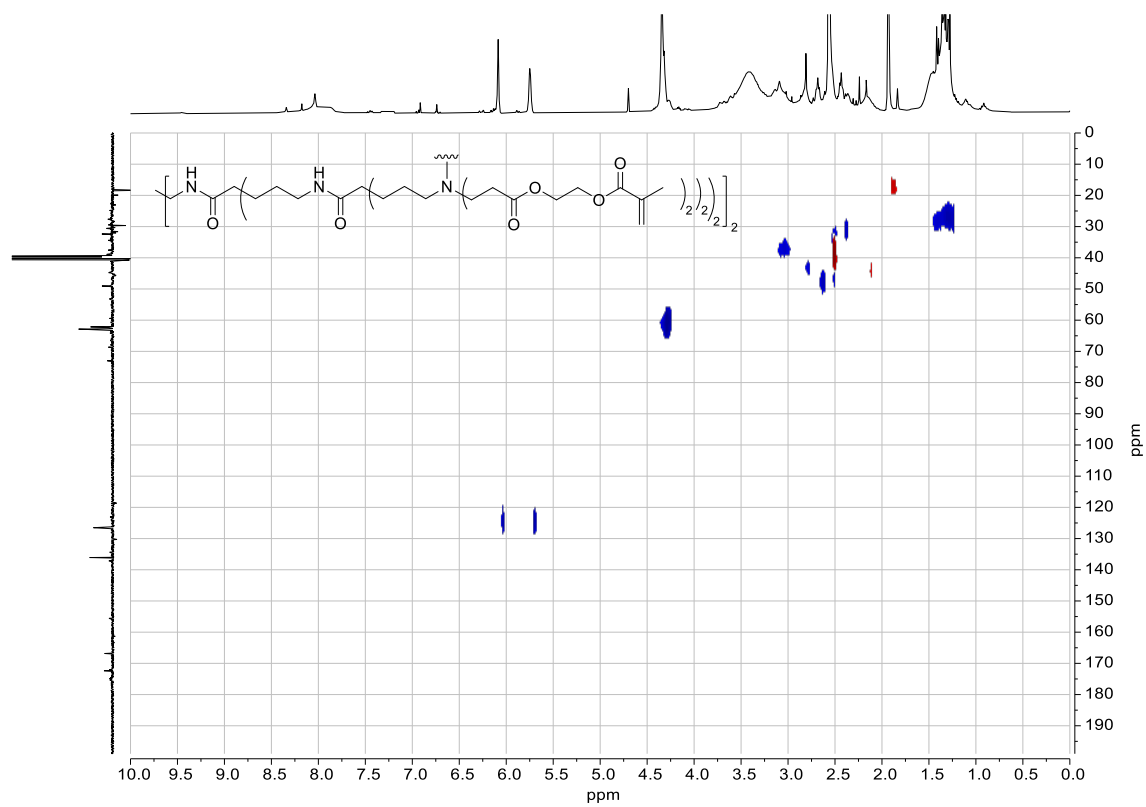


Figura 316. Espectro HSQC de **DG2AEMA** en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

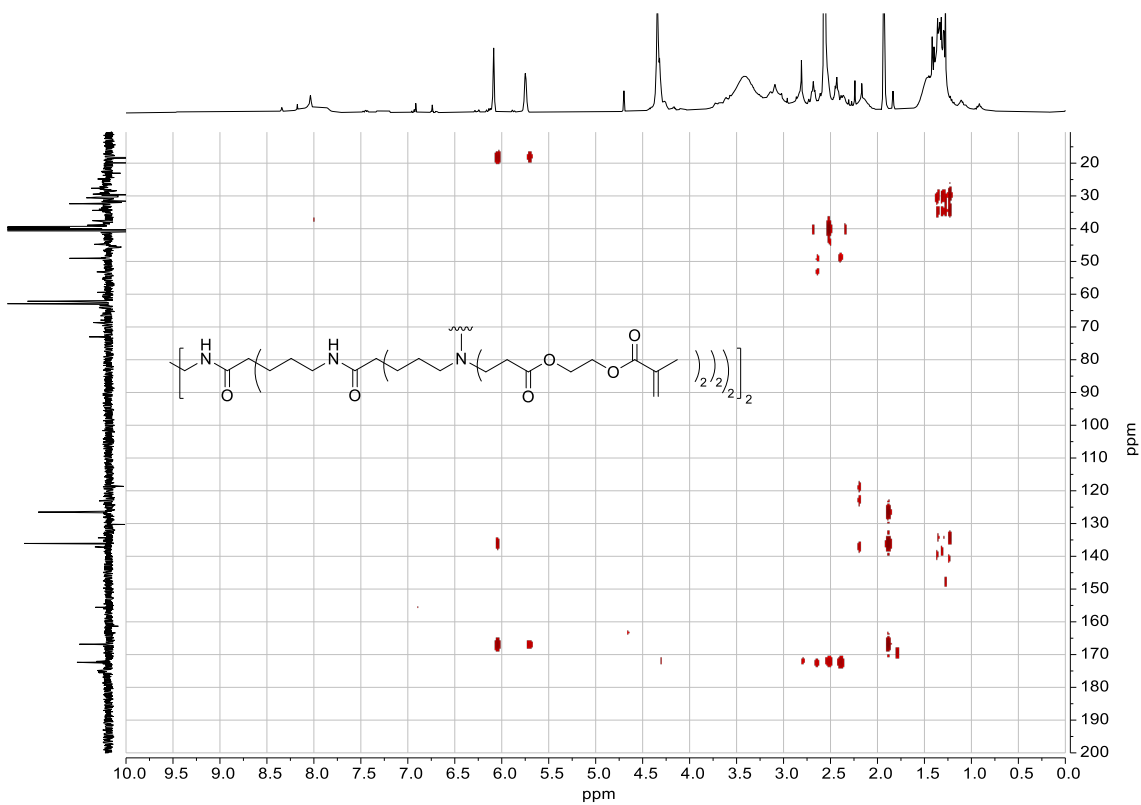


Figura 317. Espectro HMBC de **DG2AEMA** en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

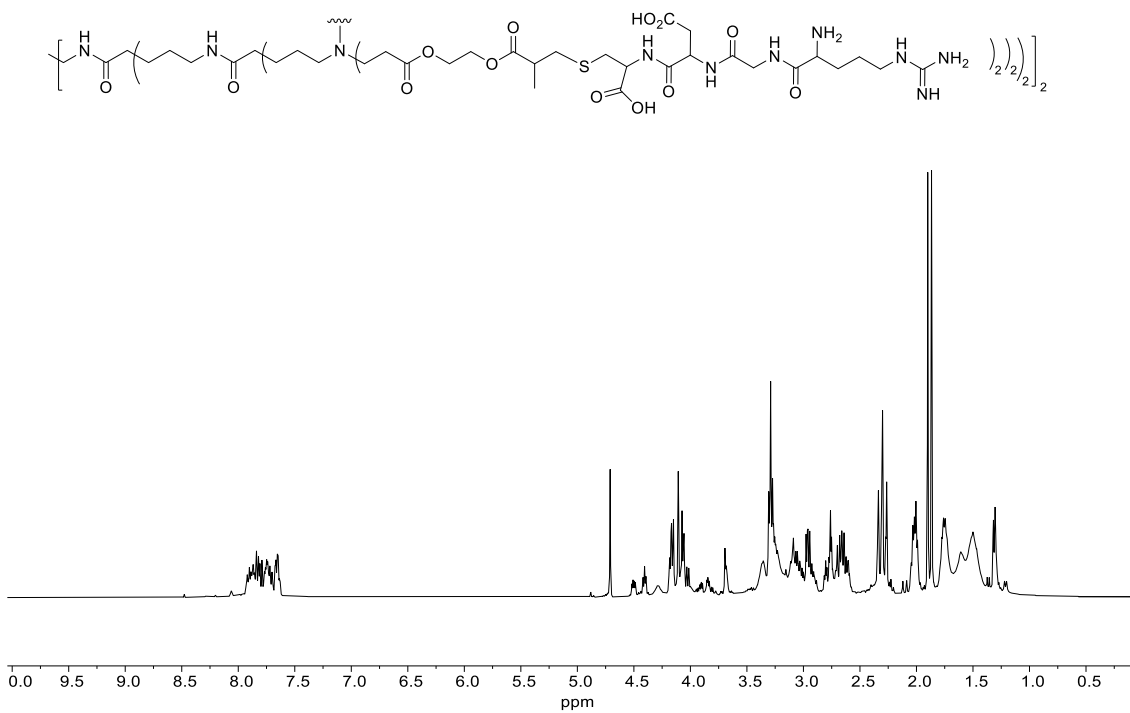


Figura 318. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **RGD-DG2** en D<sub>2</sub>O.

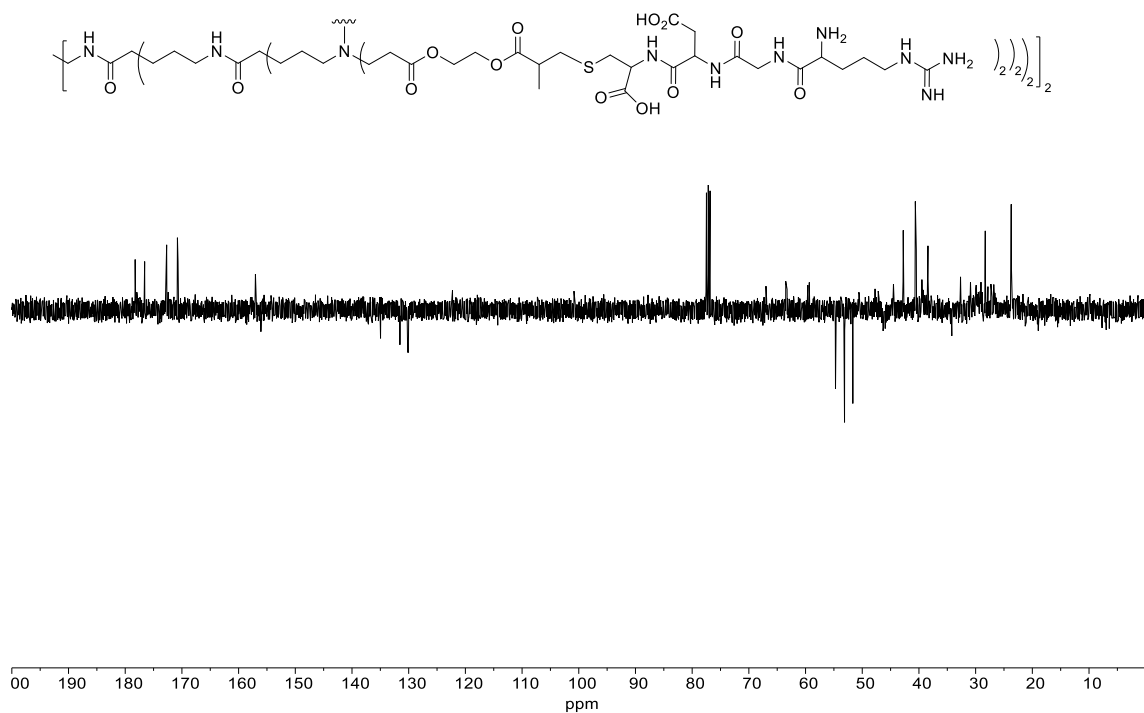


Figura 319. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (SEFT) de **RGD-DG2** en  $\text{D}_2\text{O}$ .

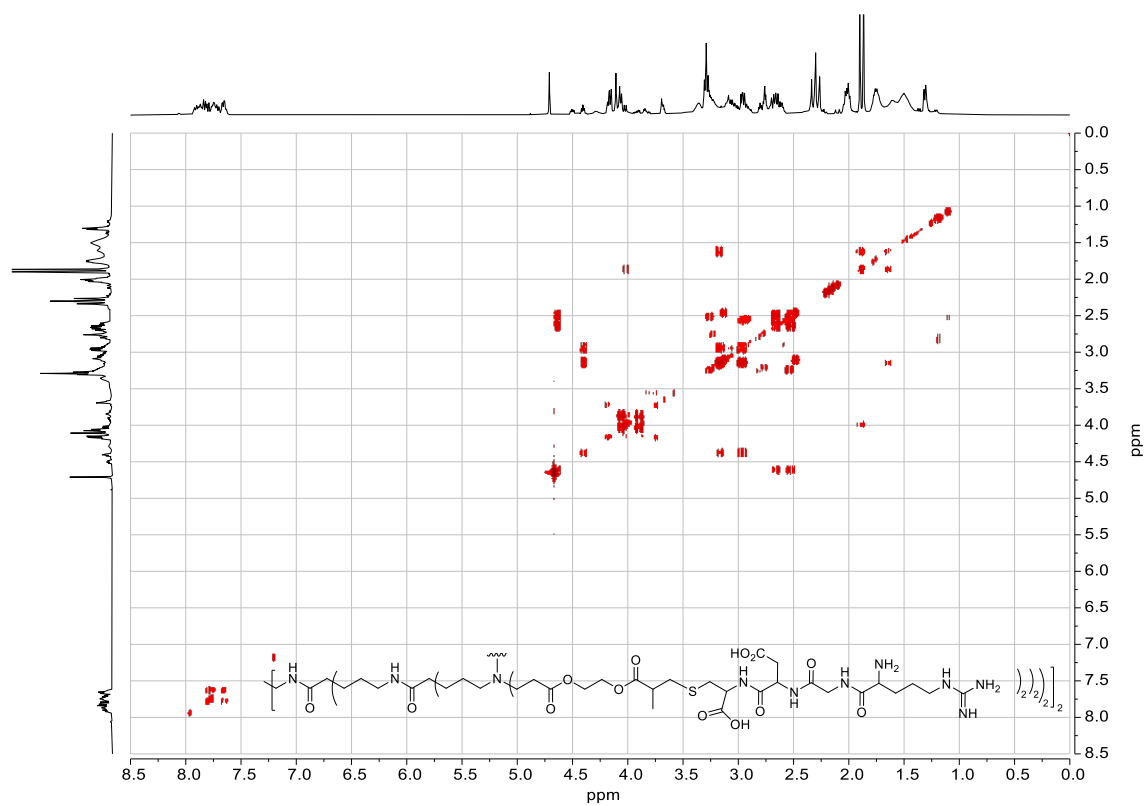


Figura 320. Espectro COSY de **RGD-DG2** en  $\text{D}_2\text{O}$ .

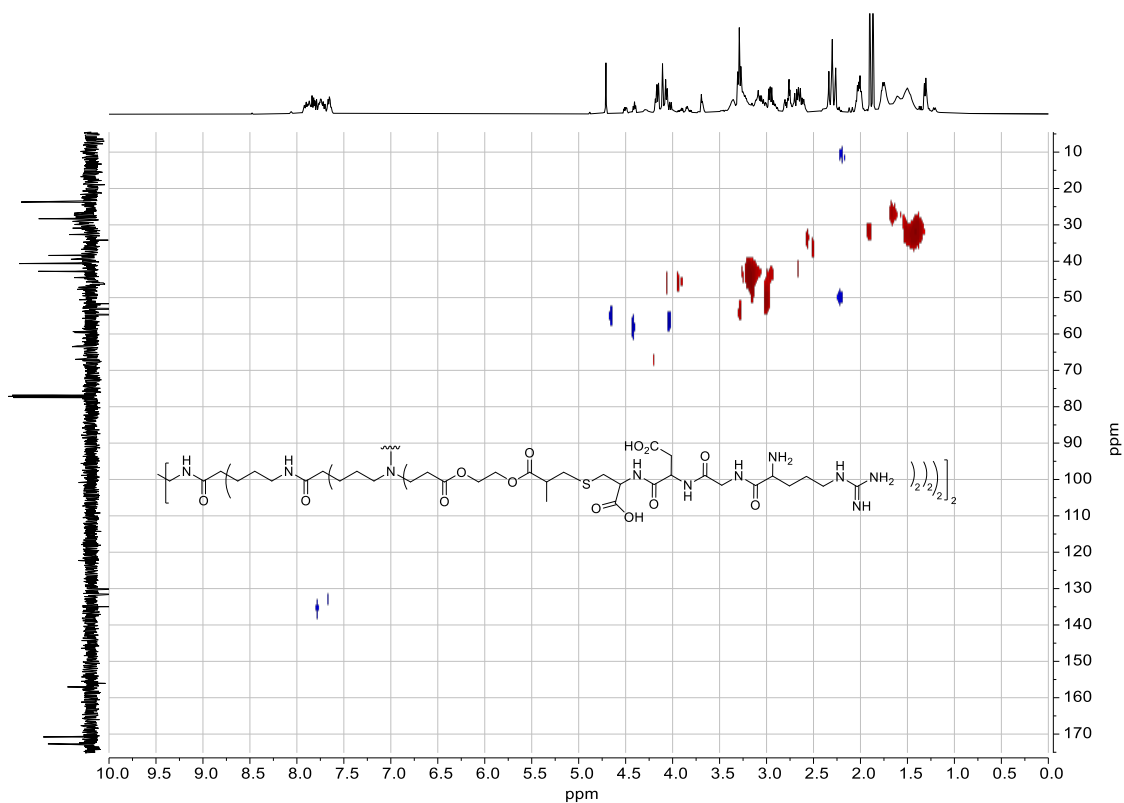


Figura 321. Espectro HSQC de **RGD-DG2** en  $D_2O$ .

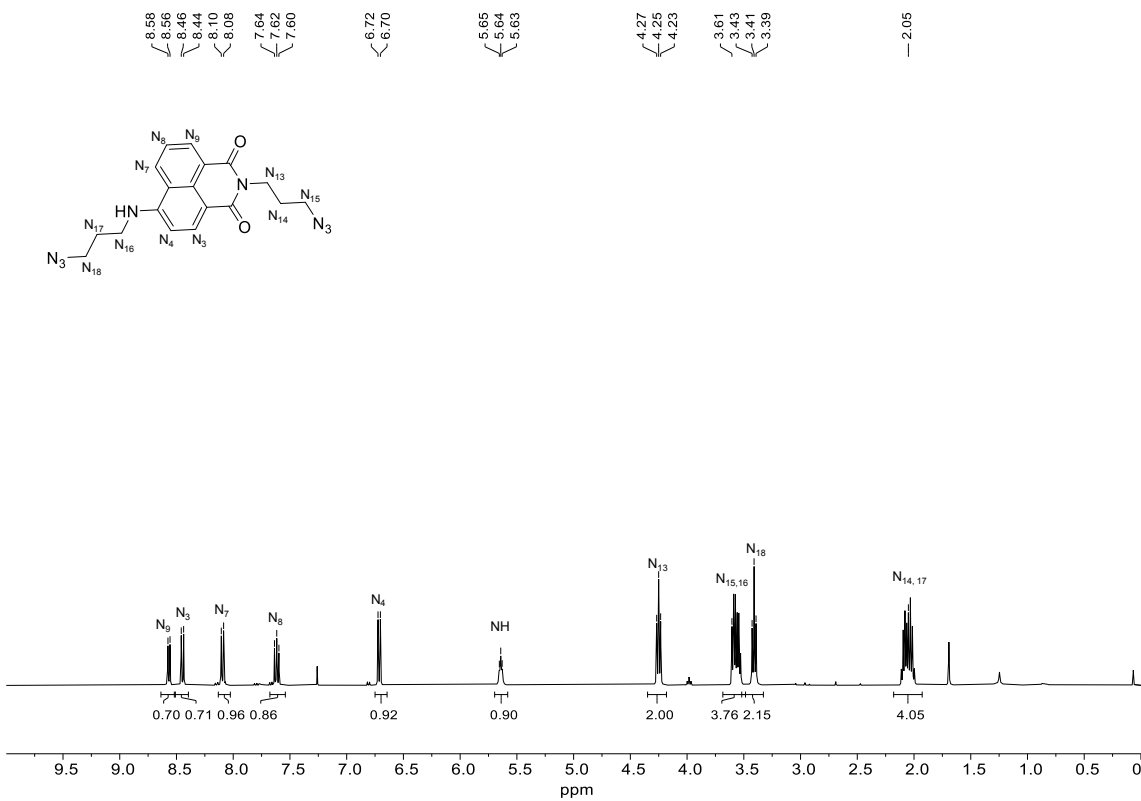


Figura 322. Espectro de RMN- $^1H$  de **N-(2-azidopropil)-4-((2-azidopropil)amino)-1,8-naftalimida (7)** en  $CDCl_3$ .

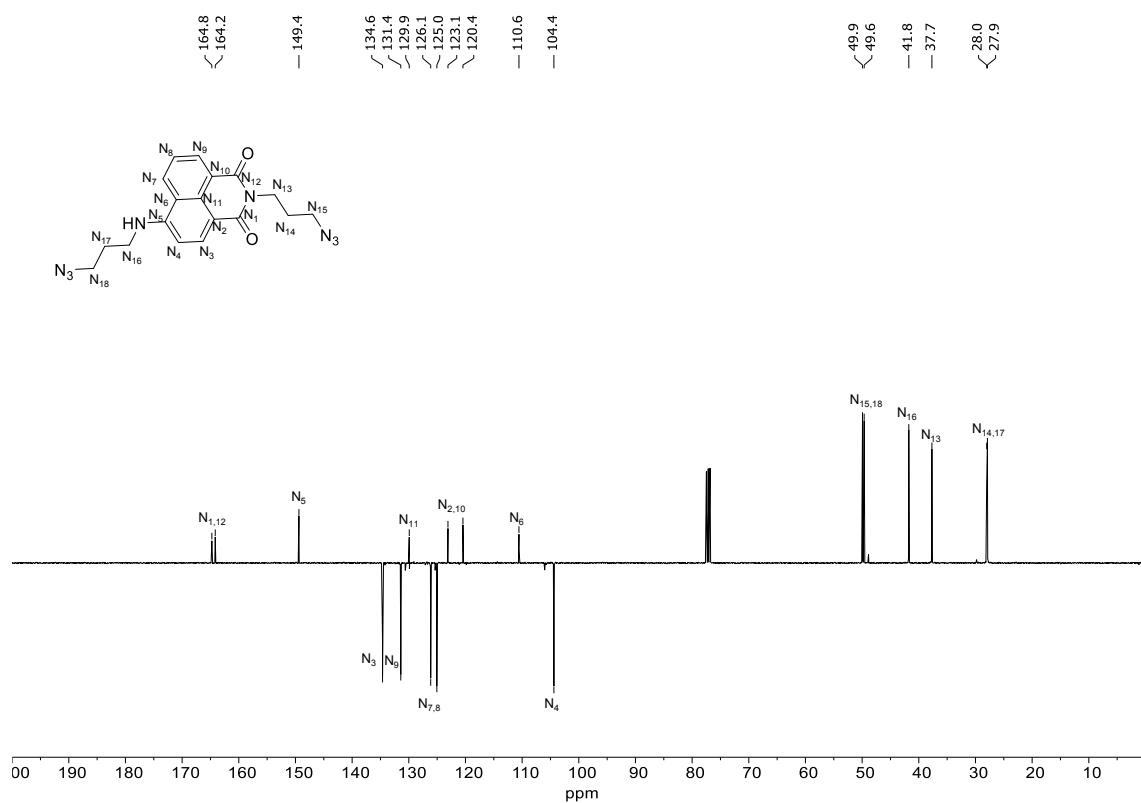


Figura 323. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de *N*-(2-azidopropil)-4-((2-azidopropil)amino)-1,8-naftalimida (7) en CDCl<sub>3</sub>.

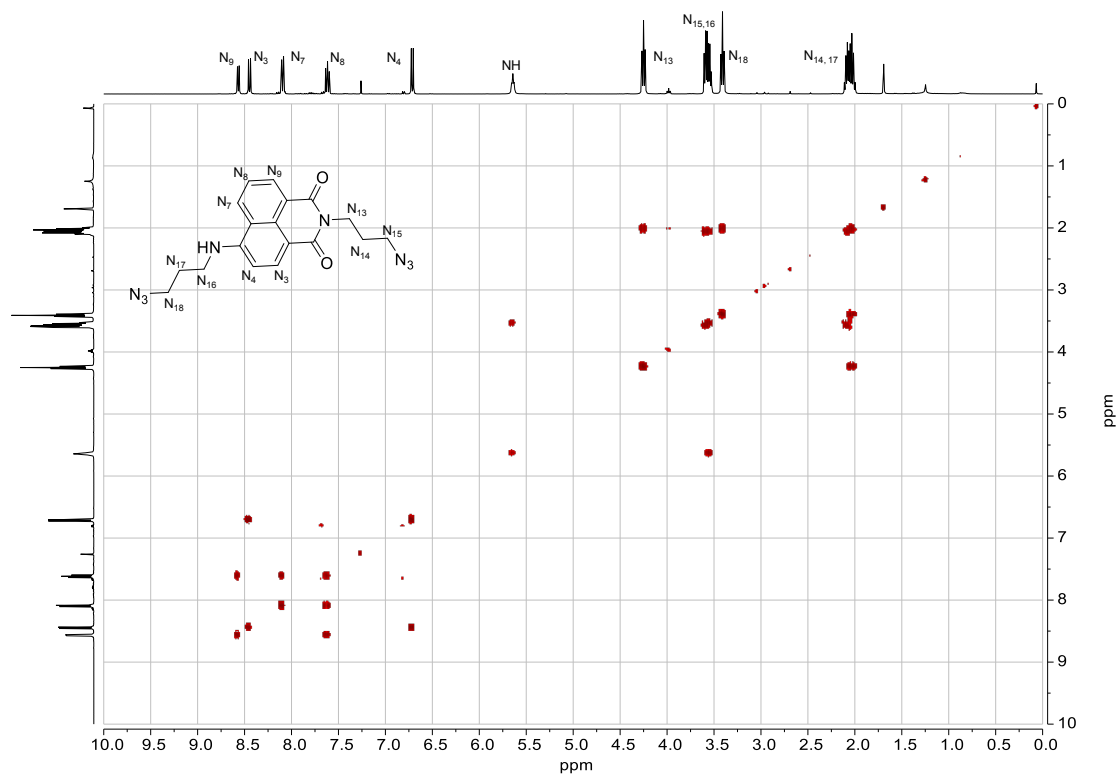


Figura 324. Espectro COSY de *N*-(2-azidopropil)-4-((2-azidopropil)amino)-1,8-naftalimida (7) en CDCl<sub>3</sub>.

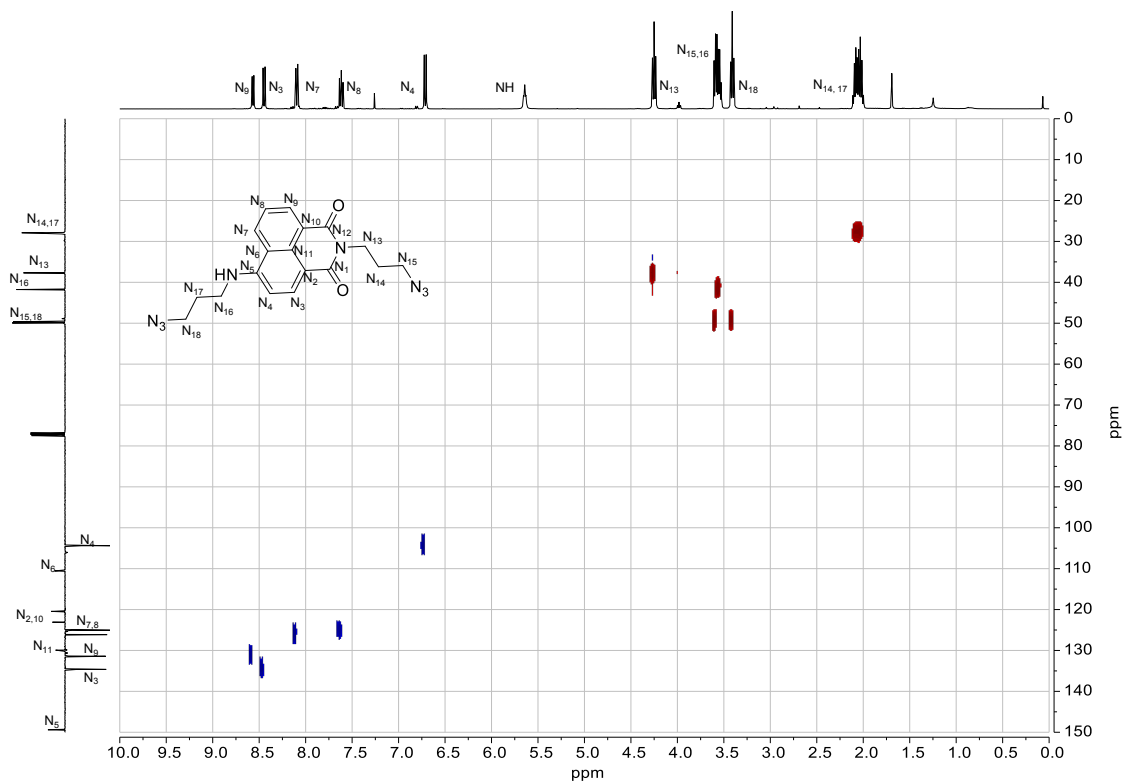


Figura 325. Espectro HSQC de *N*-(2-azidopropil)-4-((2-azidopropil)amino)-1,8-naftalimida (7) en  $CDCl_3$ .

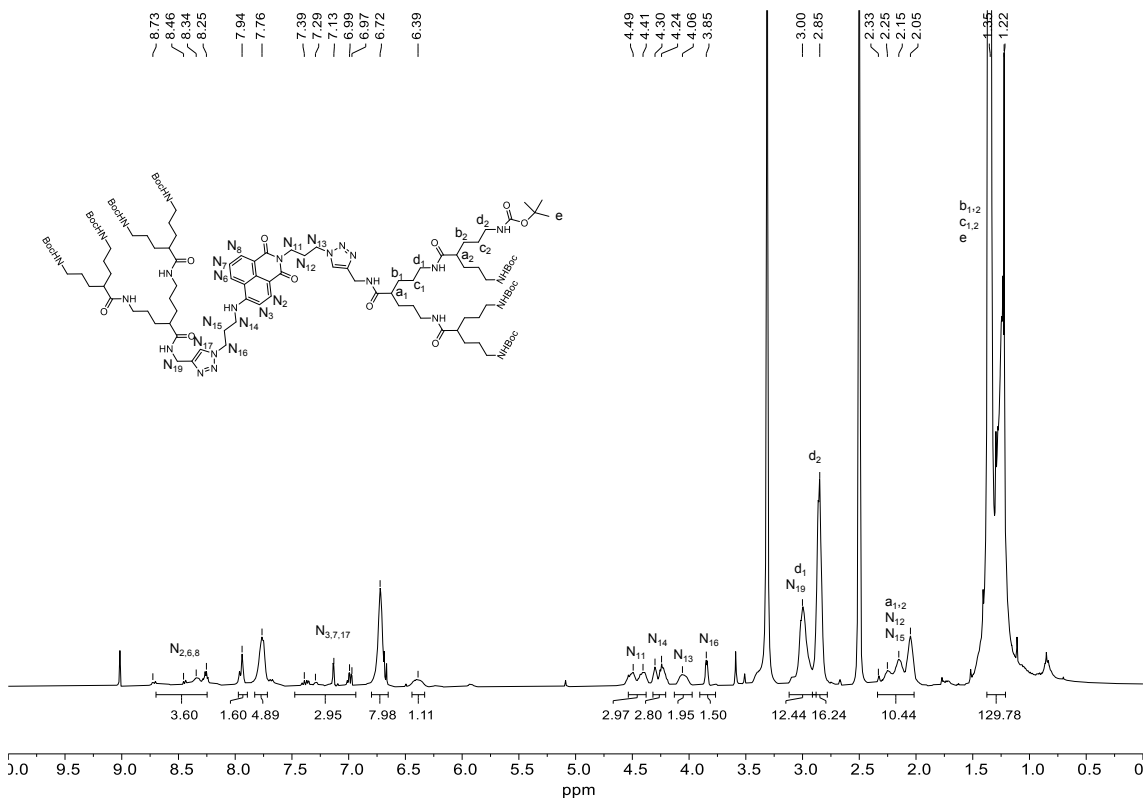


Figura 326. Espectro de RMN- $^1H$  de *DG2Naft-NHBoc* en  $DMSO-d_6$ .

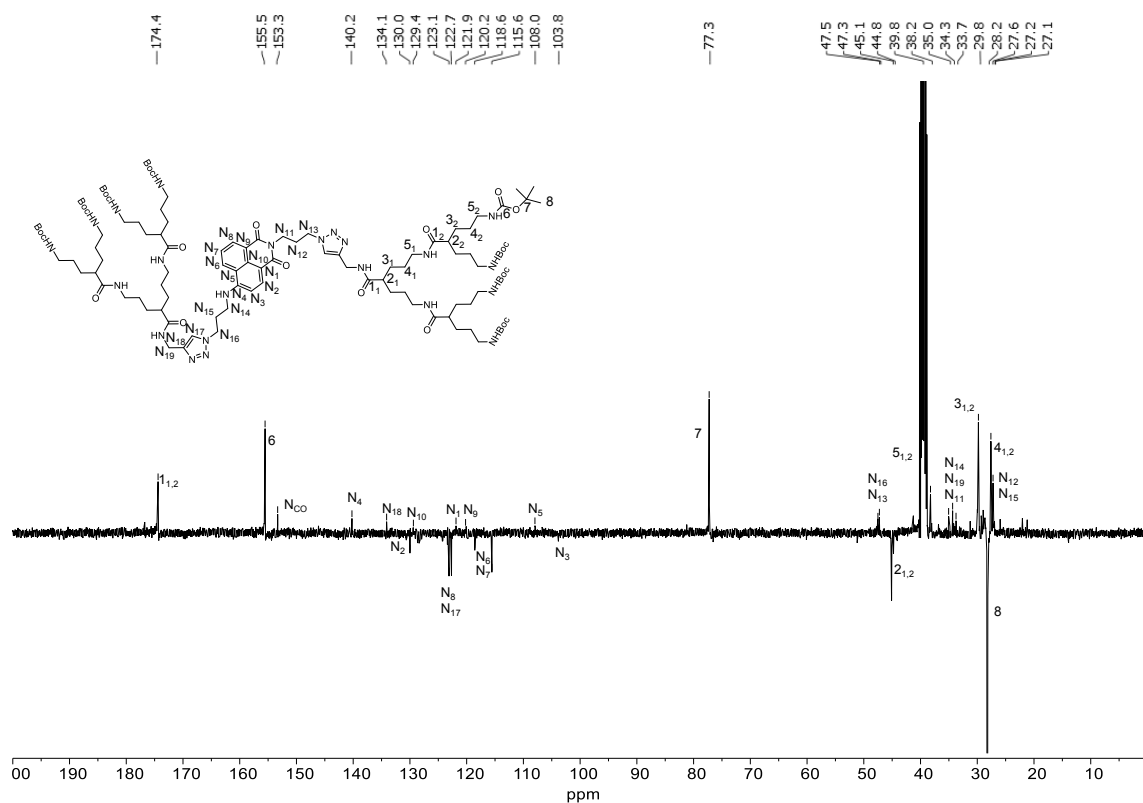


Figura 327. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de **DG2Naft-NHBoc** en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

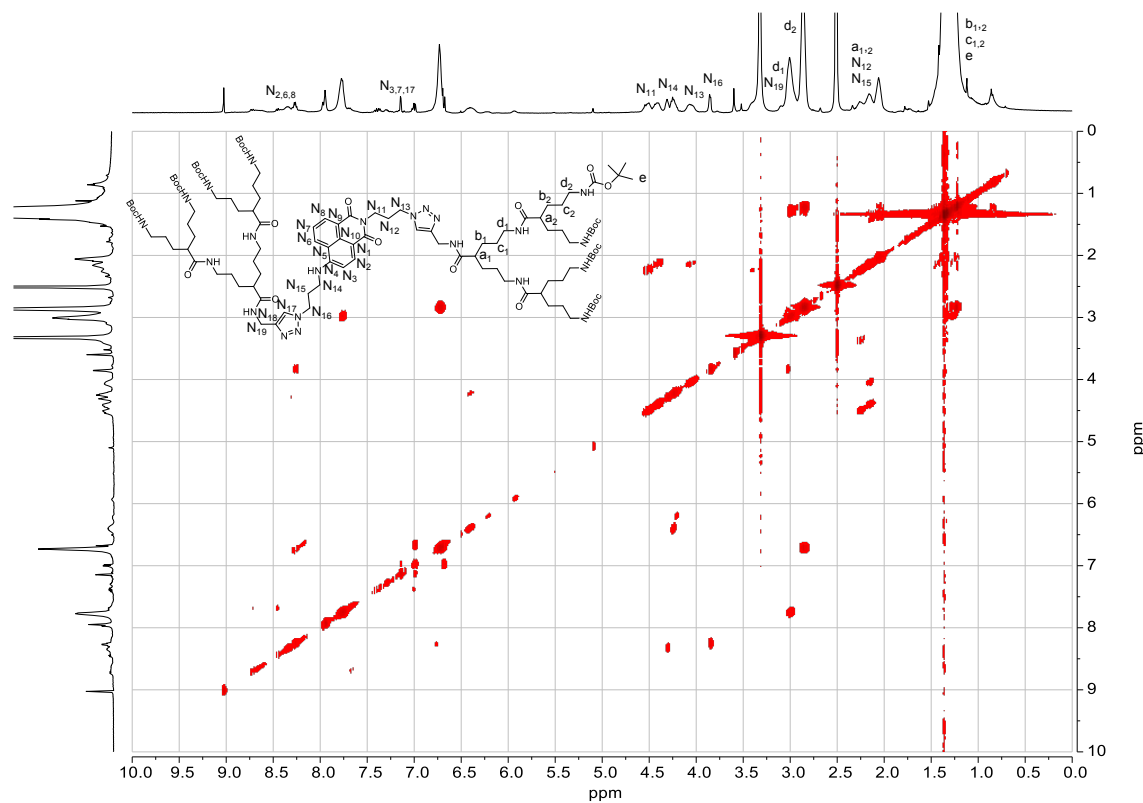


Figura 328. Espectro COSY de **DG2Naft-NHBoc** en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

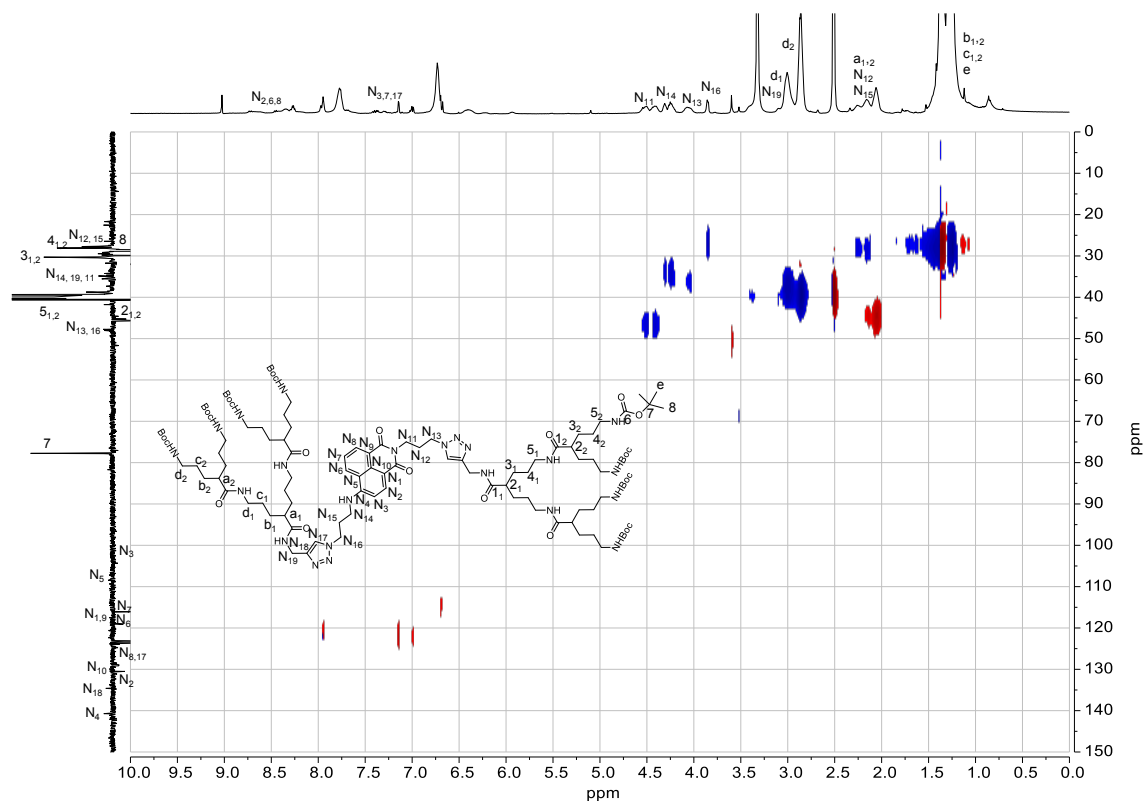


Figura 329. Espectro HSQC de **DG2Naft-NHBoc** en  $DMSO-d_6$ .

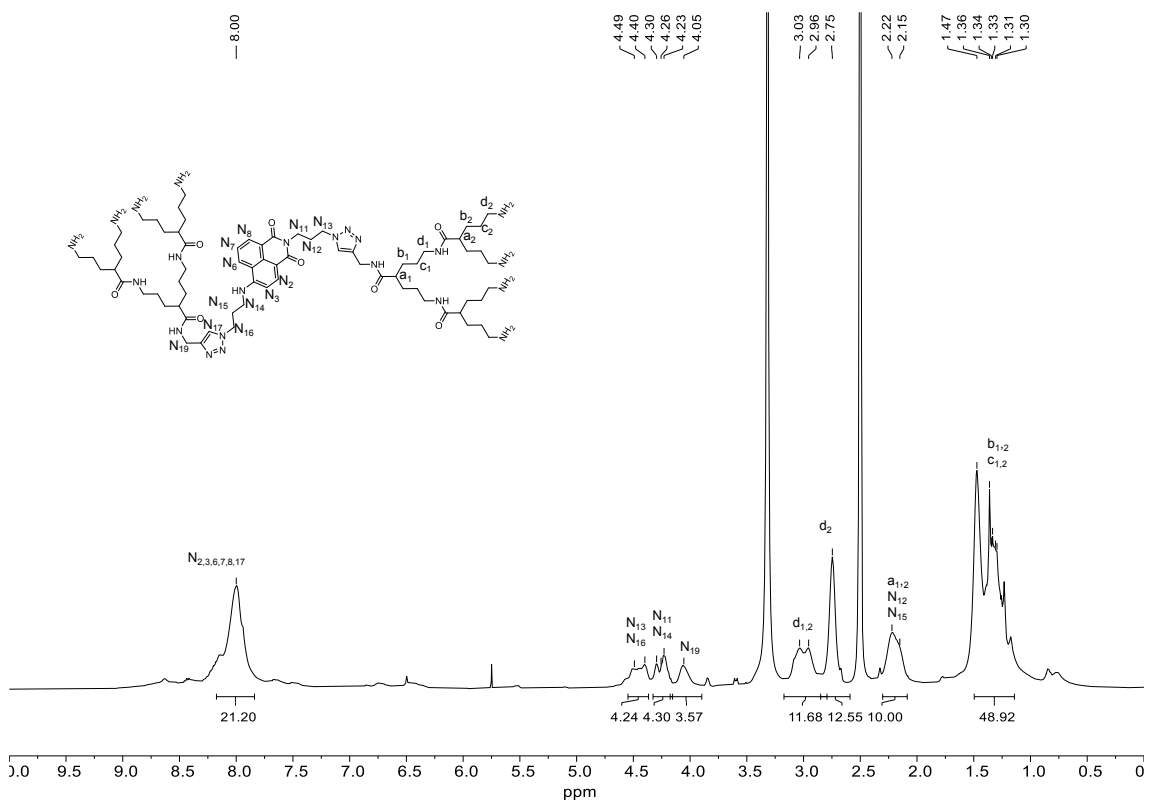


Figura 330. Espectro de  $RMN-^1H$  de **DG2Naft** en  $DMSO-d_6$ .

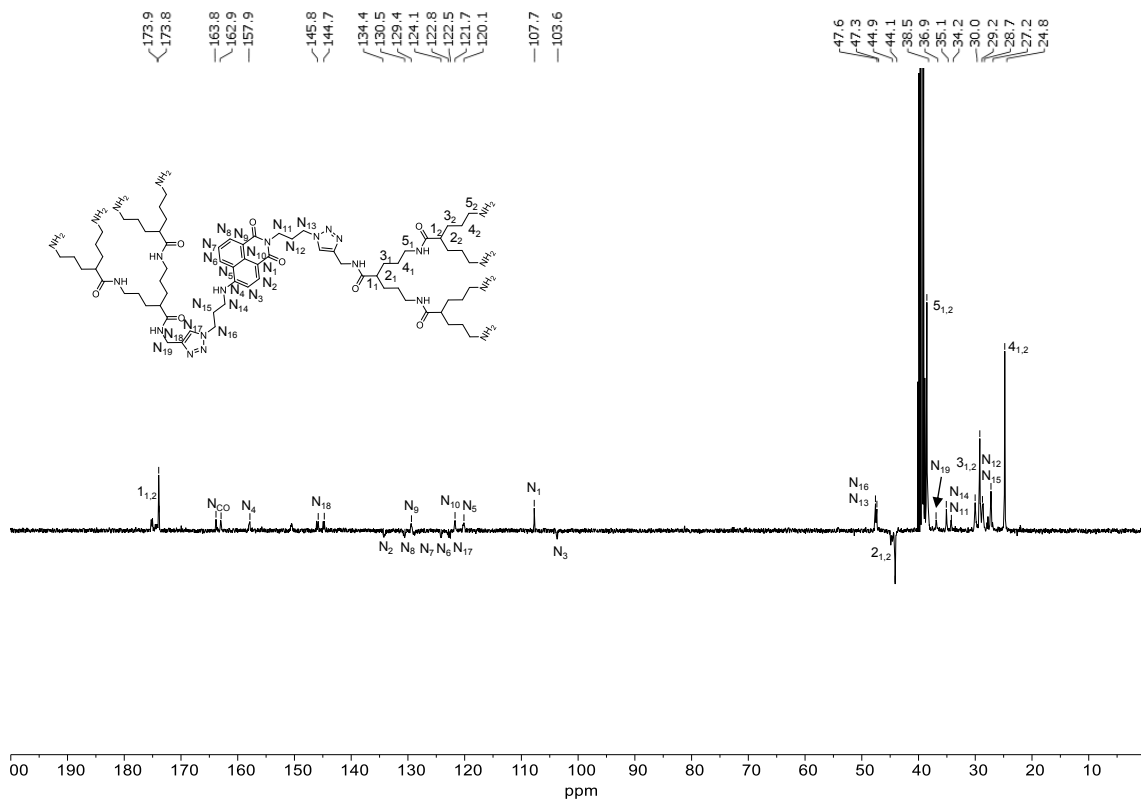


Figura 331. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de DG2Naft en DMSO-d<sub>6</sub>.

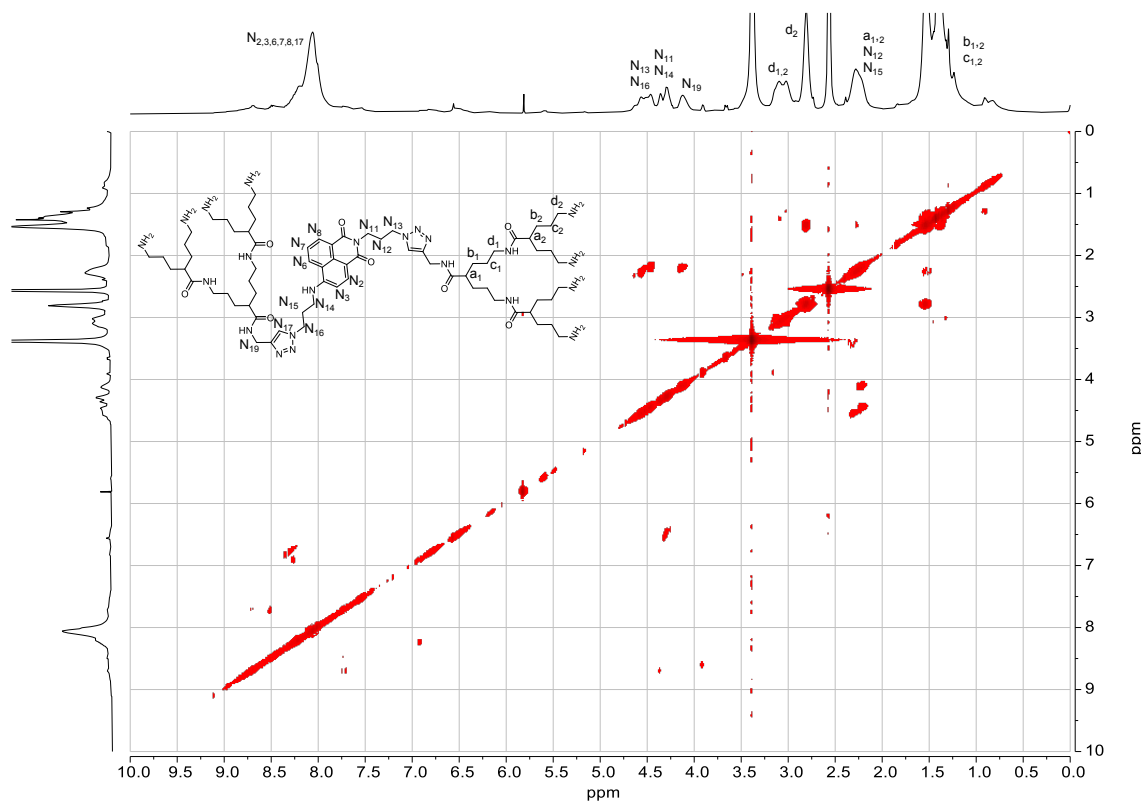


Figura 332. Espectro COSY de DG2Naft en DMSO-d<sub>6</sub>.

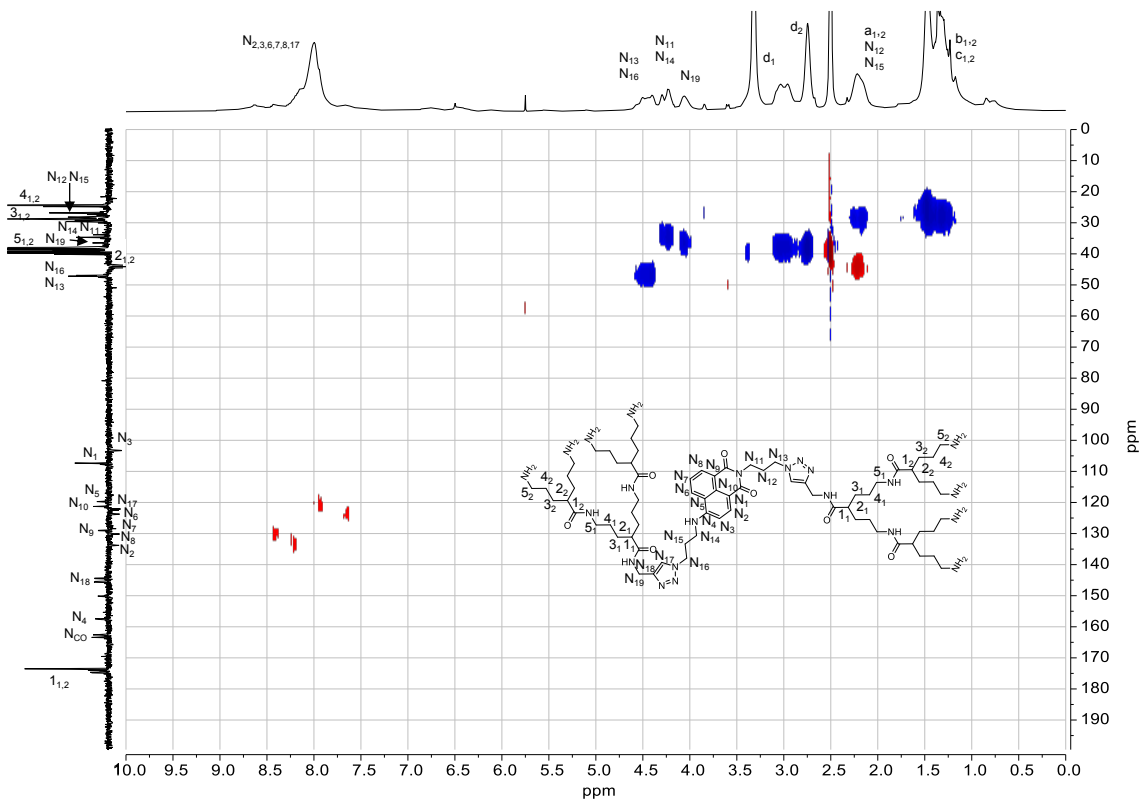


Figura 333. Espectro HSQC de DG2Naft en DMSO-d<sub>6</sub>.

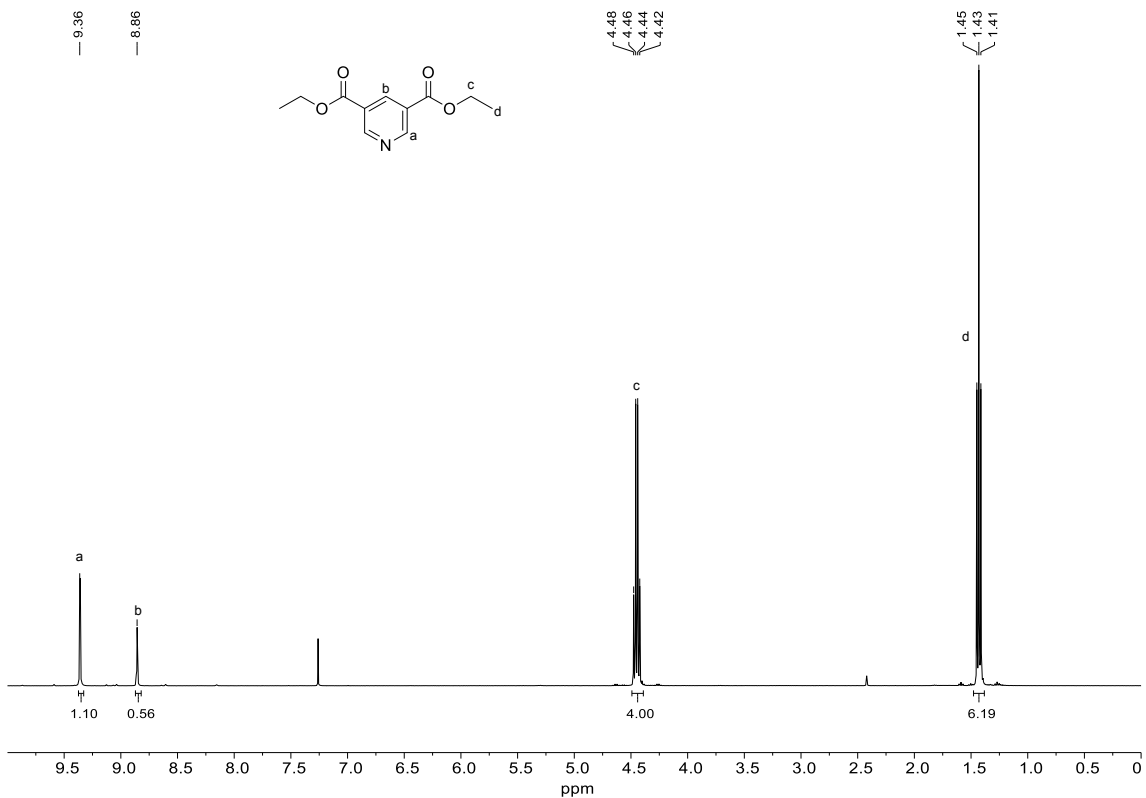


Figura 334. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 3,5-bis(etoxicarbonil)piridina (8) en CDCl<sub>3</sub>.

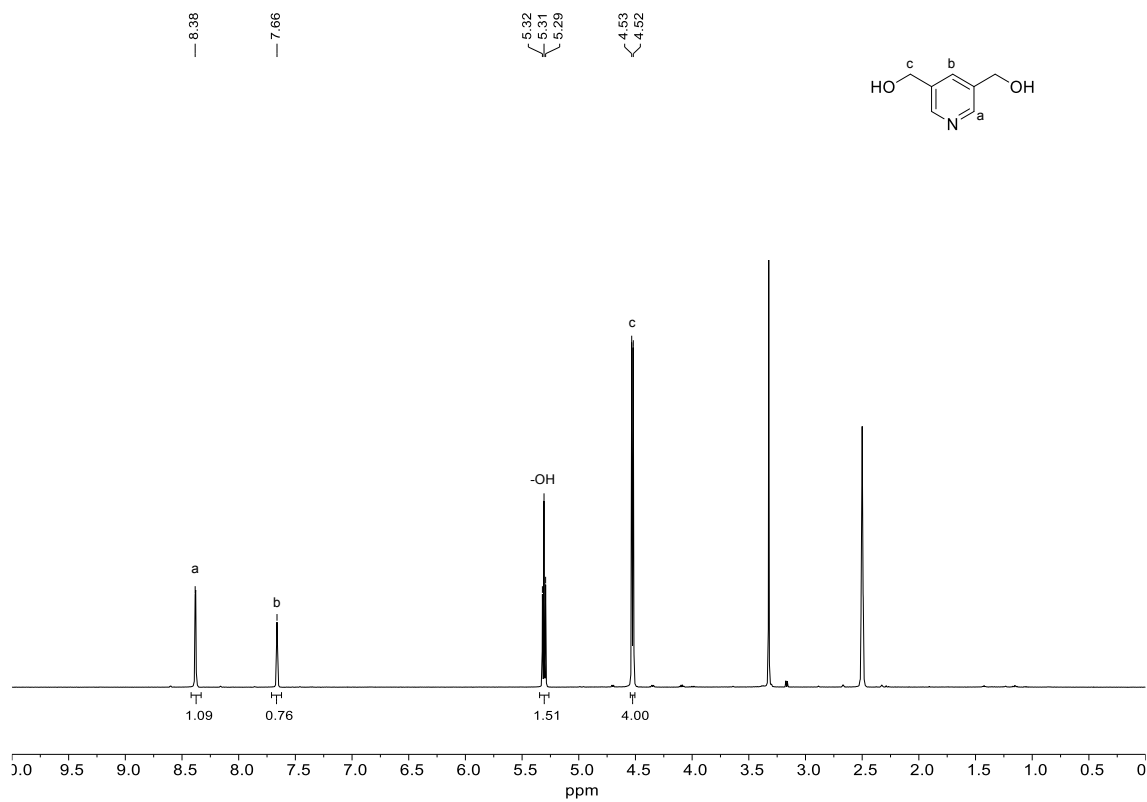


Figura 335. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de 3,5-bis(hidroxiometil)piridina (9) en DMSO- $d_6$ .

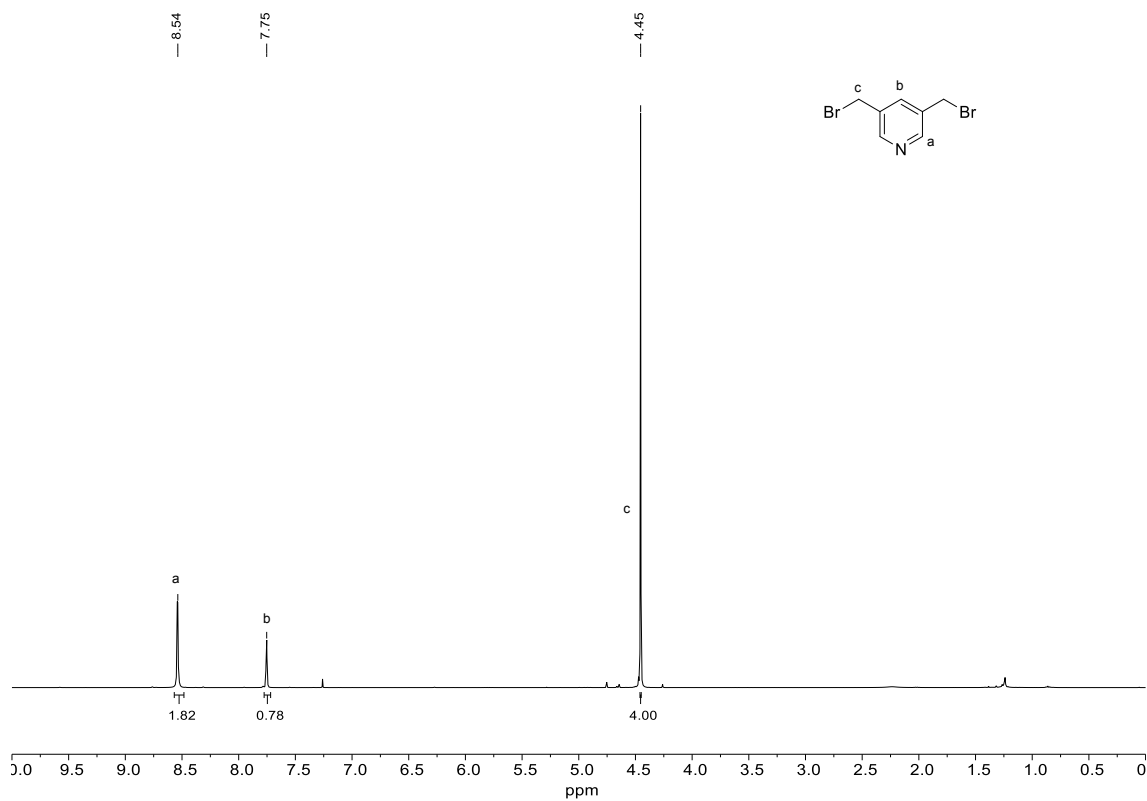


Figura 336. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de 3,5-bis(bromoetil)piridina (10) en  $\text{CDCl}_3$ .

Anexo

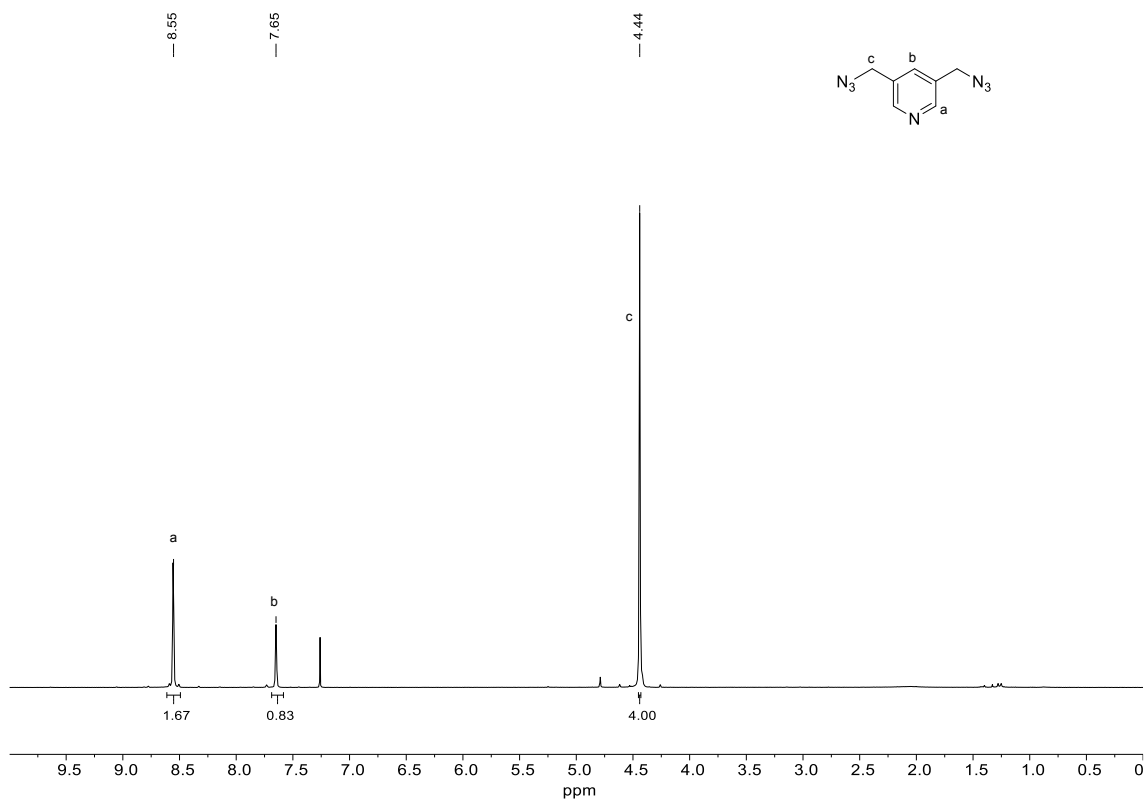


Figura 337. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 3,5-bis(azidometil)piridina (11) en CDCl<sub>3</sub>.

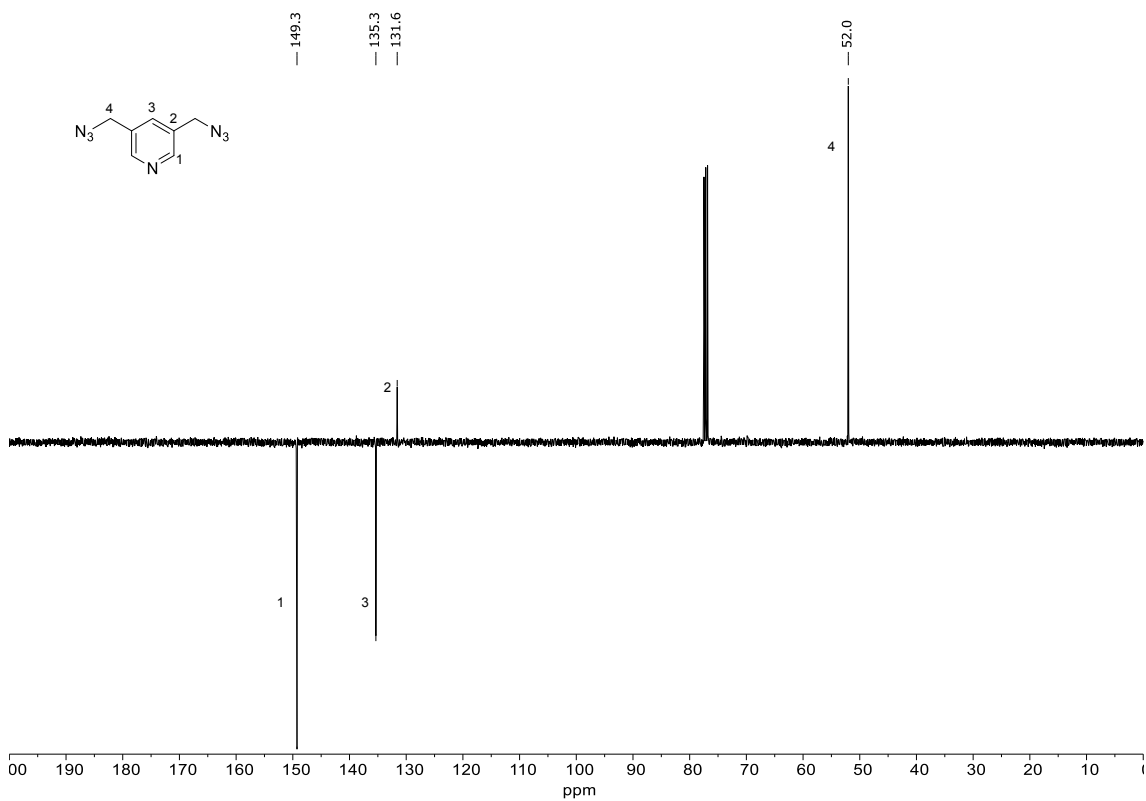


Figura 338. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de 3,5-bis(azidometil)piridina (11) en CDCl<sub>3</sub>.

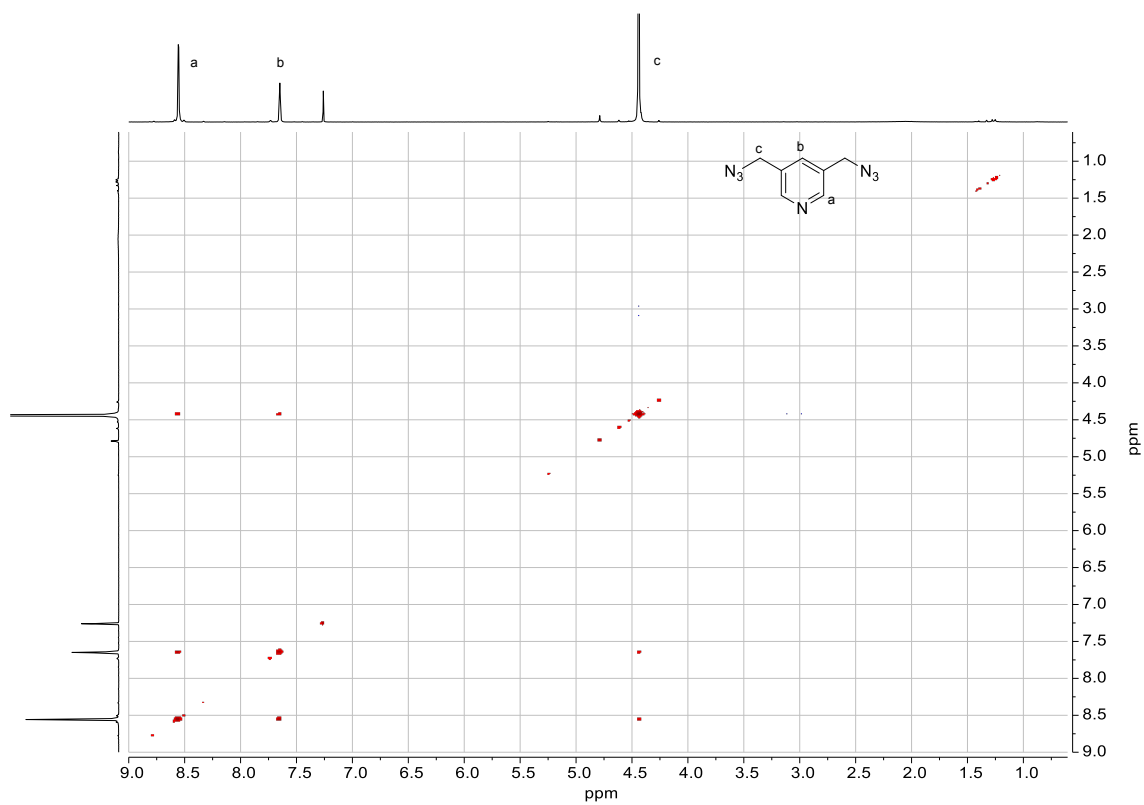


Figura 339. Espectro COSY de 3,5-bis(azidometil)piridina (11) en CDCl<sub>3</sub>.

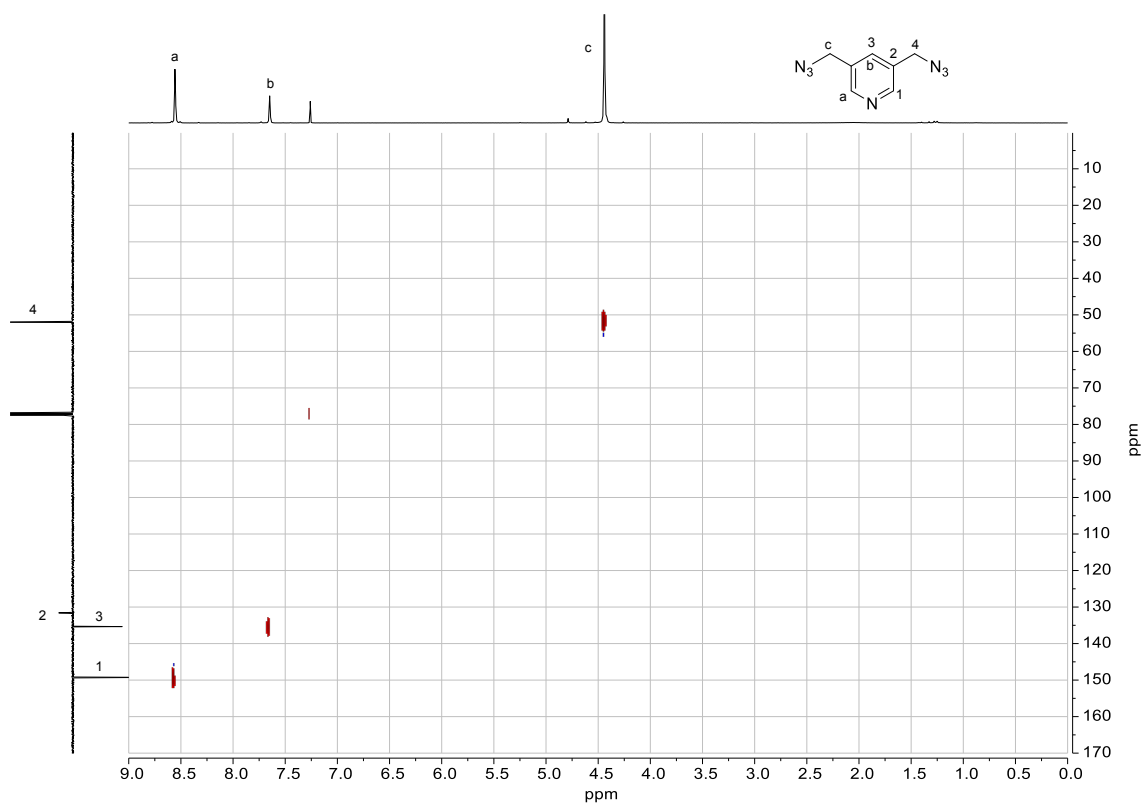


Figura 340. Espectro HSQC de 3,5-bis(azidometil)piridina (11) en CDCl<sub>3</sub>.

Anexo

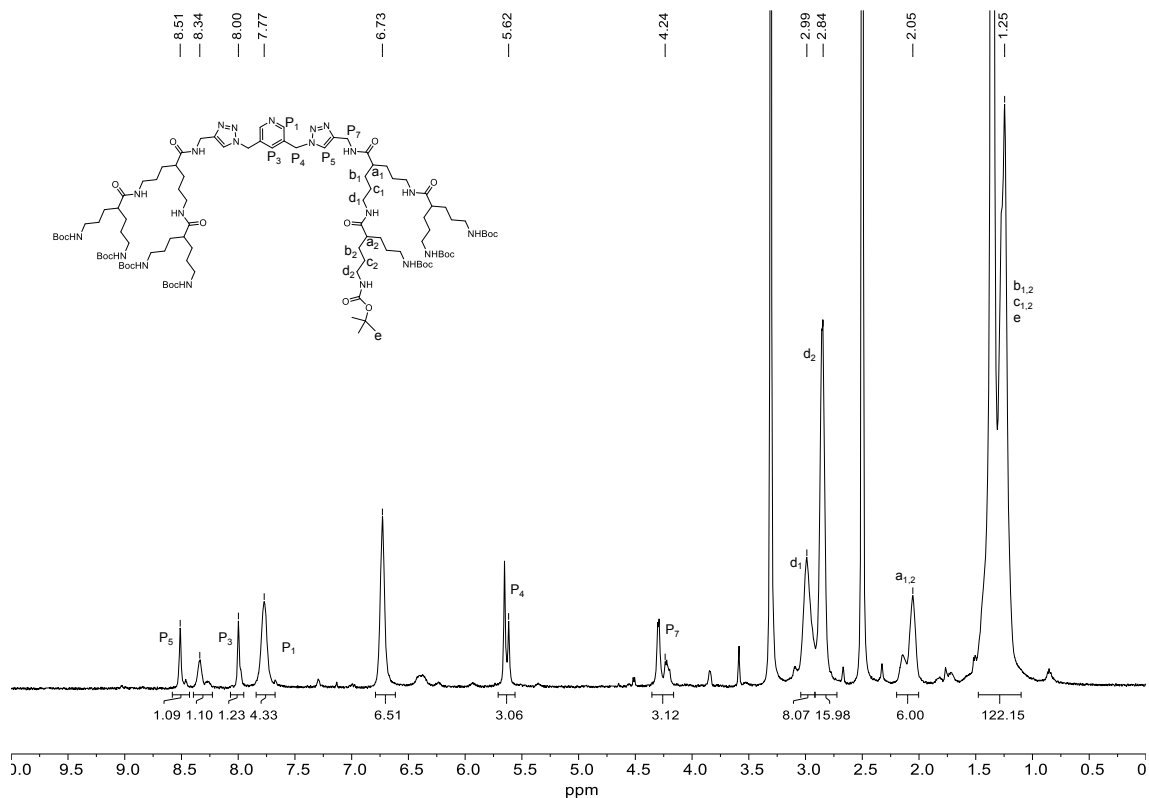


Figura 341. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 12 en DMSO-d<sub>6</sub>.

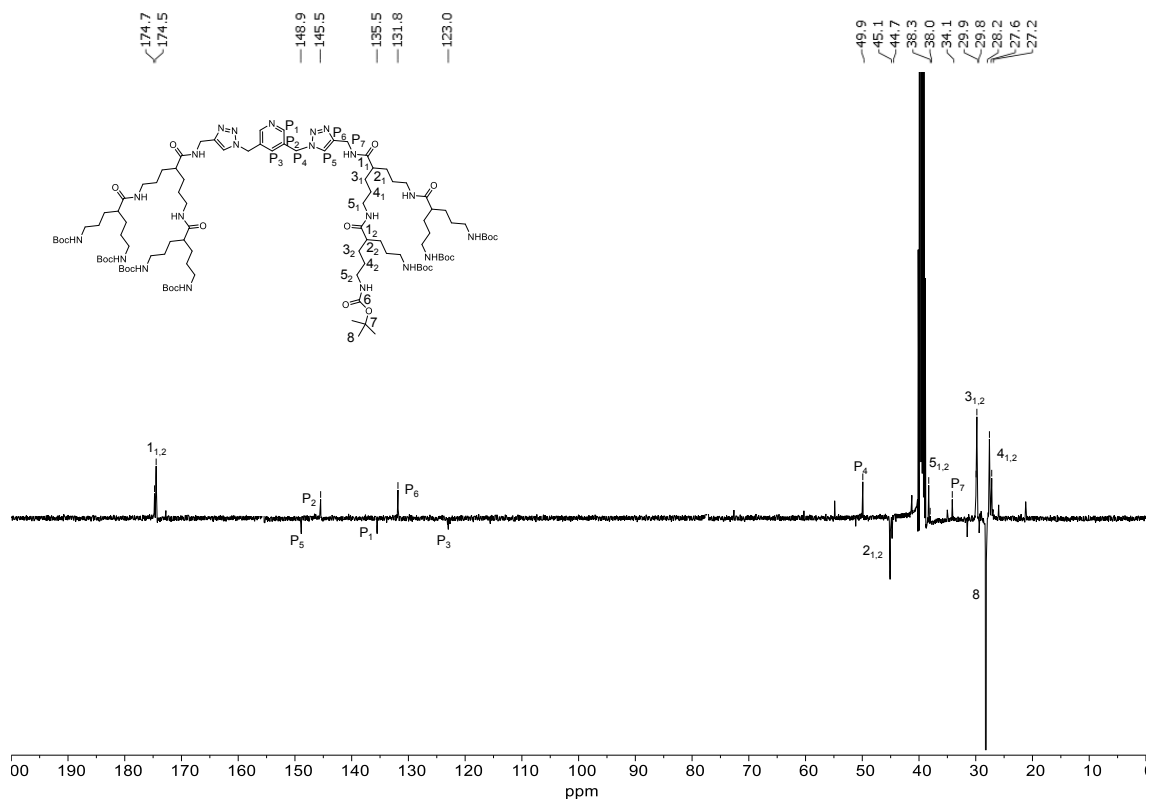


Figura 342. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de 12 en DMSO-d<sub>6</sub>.

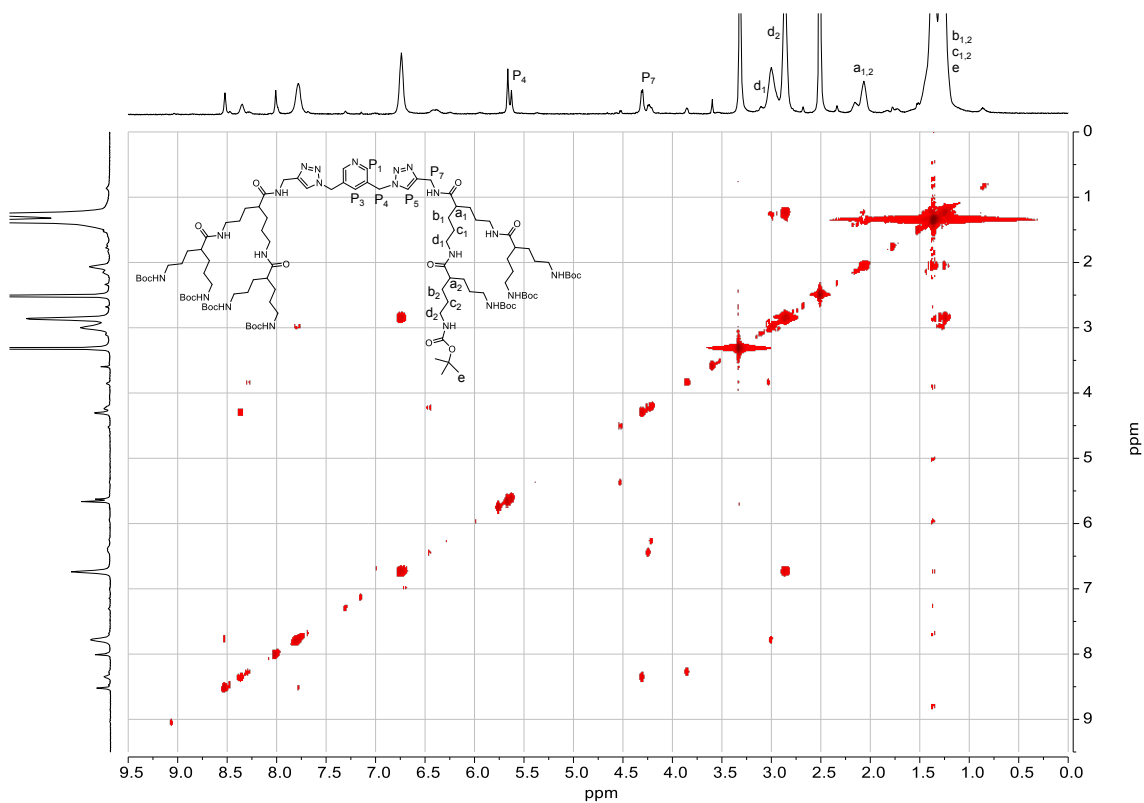


Figura 343. Espectro COSY de 12 en DMSO-d<sub>6</sub>.

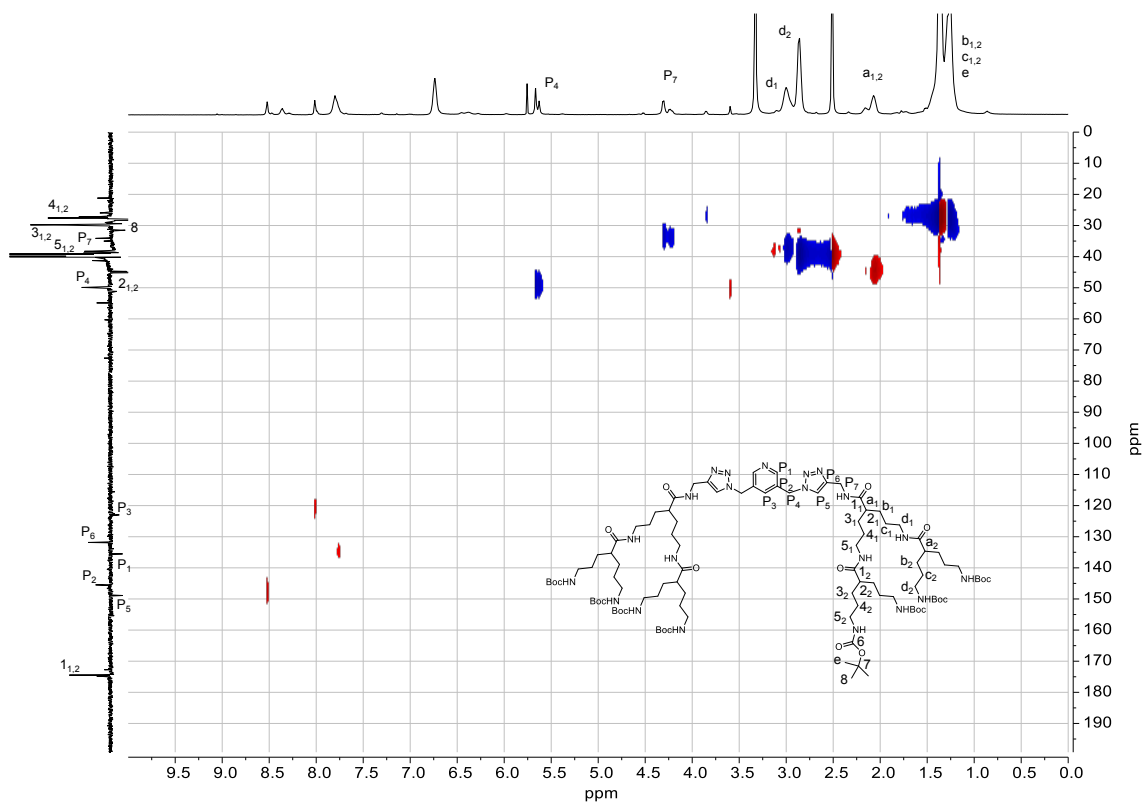


Figura 344. Espectro HSQC de 12 en DMSO-d<sub>6</sub>.

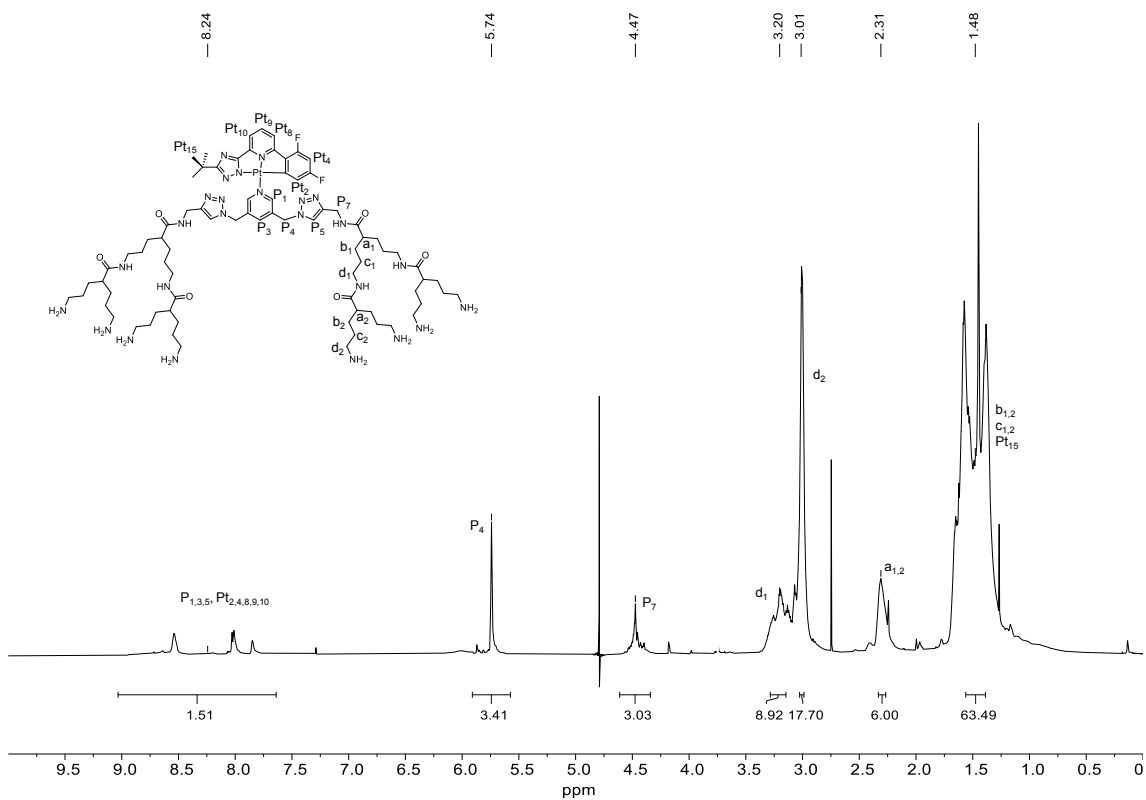


Figura 345. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de DG2Pt en D<sub>2</sub>O.

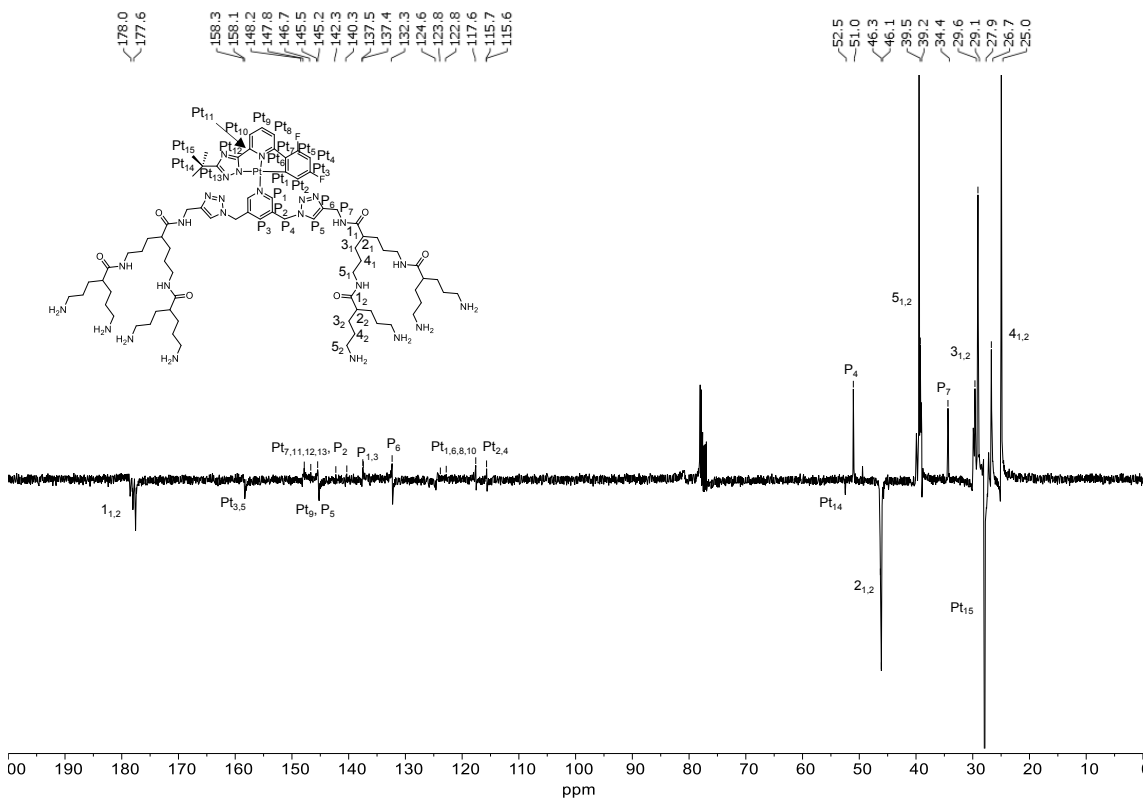


Figura 346. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (SEFT) de DG2Pt en D<sub>2</sub>O.

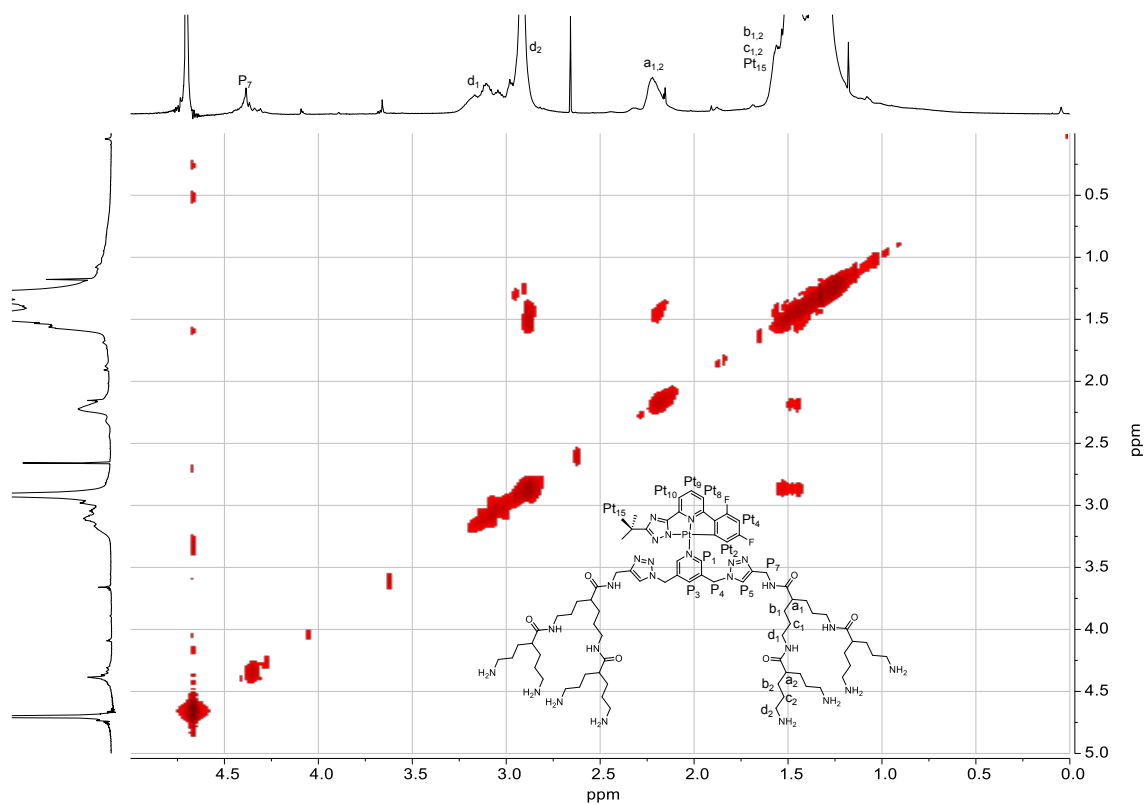


Figura 347. Espectro COSY de DG2Pt en D<sub>2</sub>O.

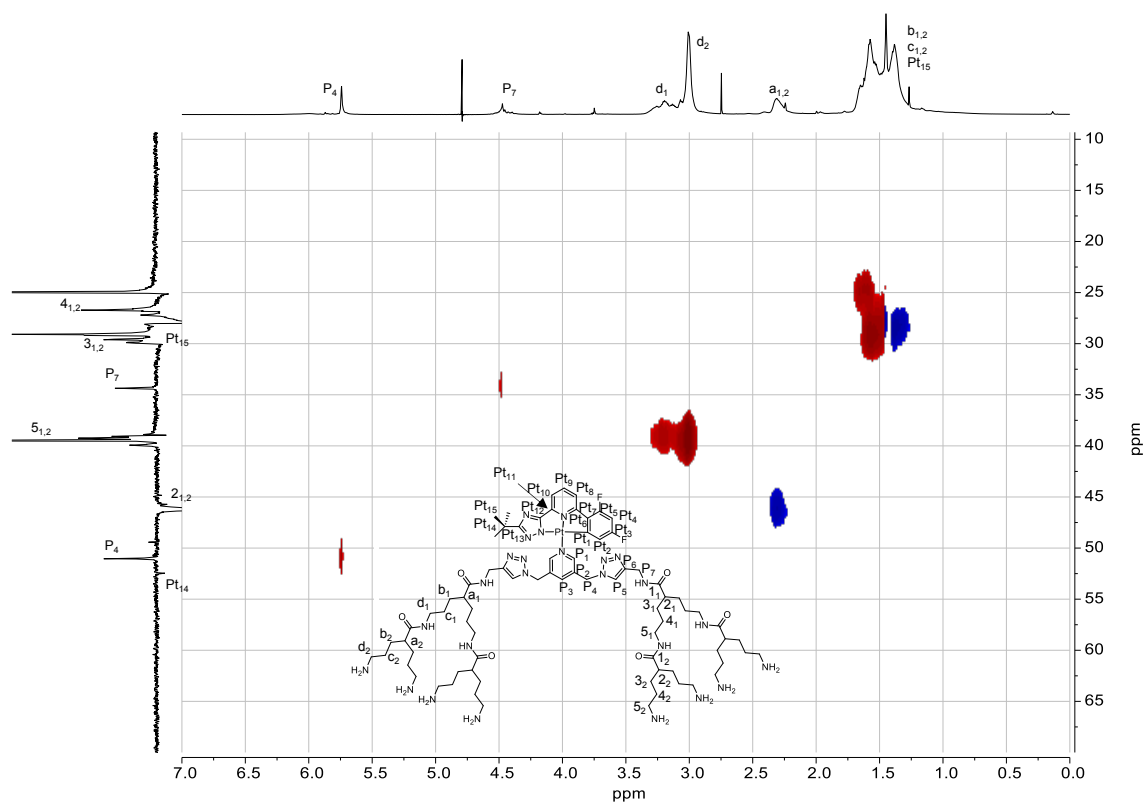


Figura 348. Espectro HSQC de DG2Pt en D<sub>2</sub>O.

### Experimentos de RMN DOSY

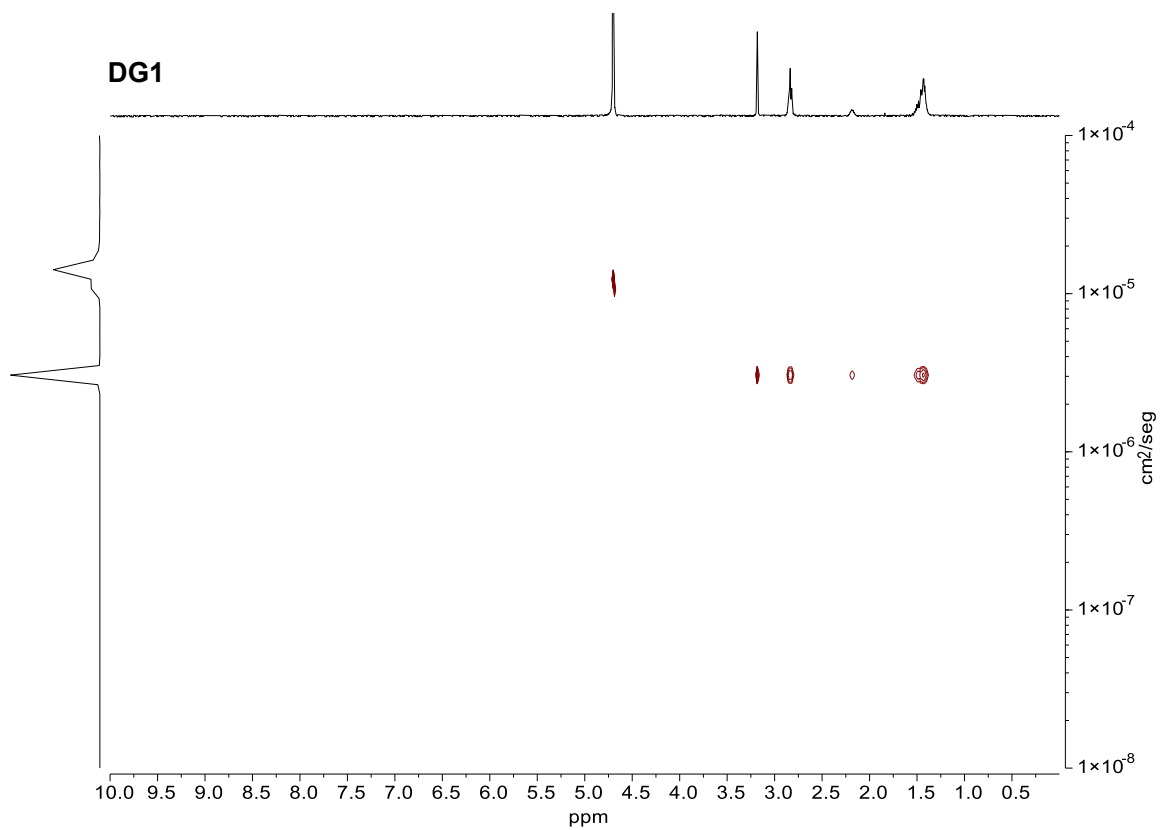


Figura 349. Experimento de RMN DOSY de **DG1** en  $D_2O$ .

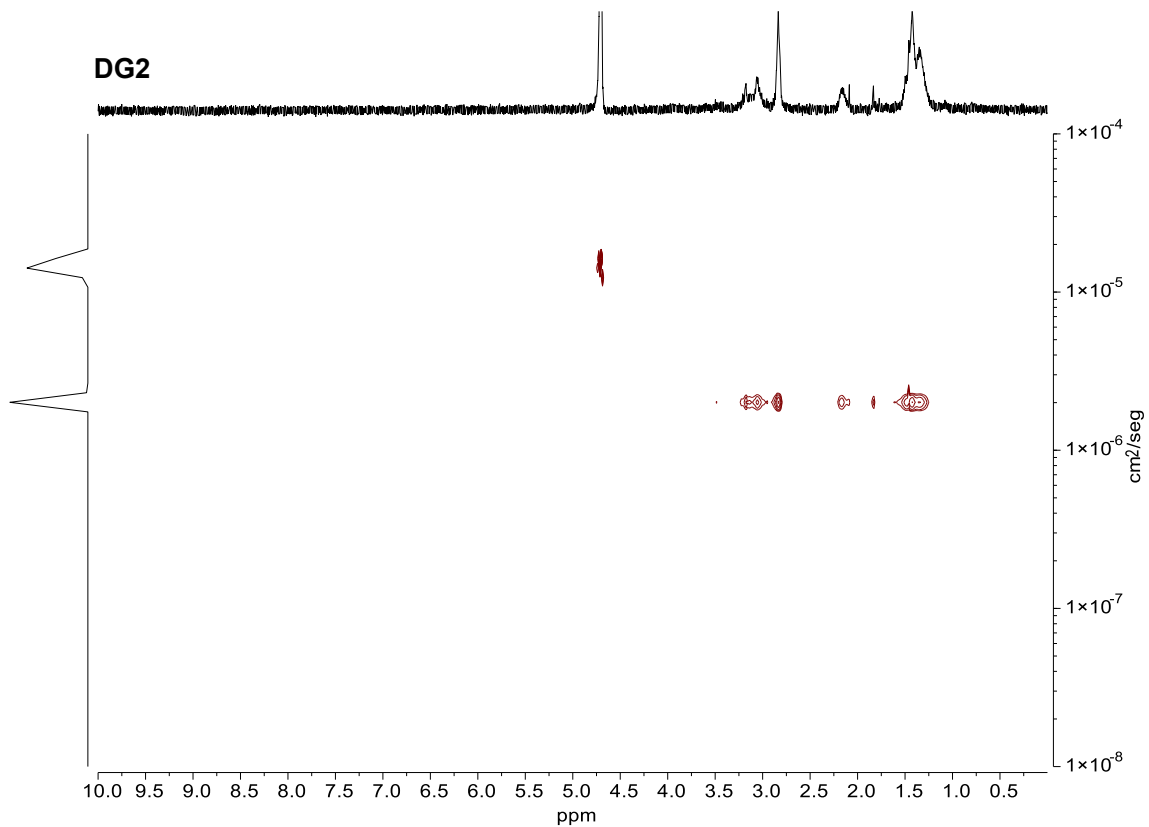


Figura 350. Experimento de RMN DOSY de **DG2** en  $D_2O$ .

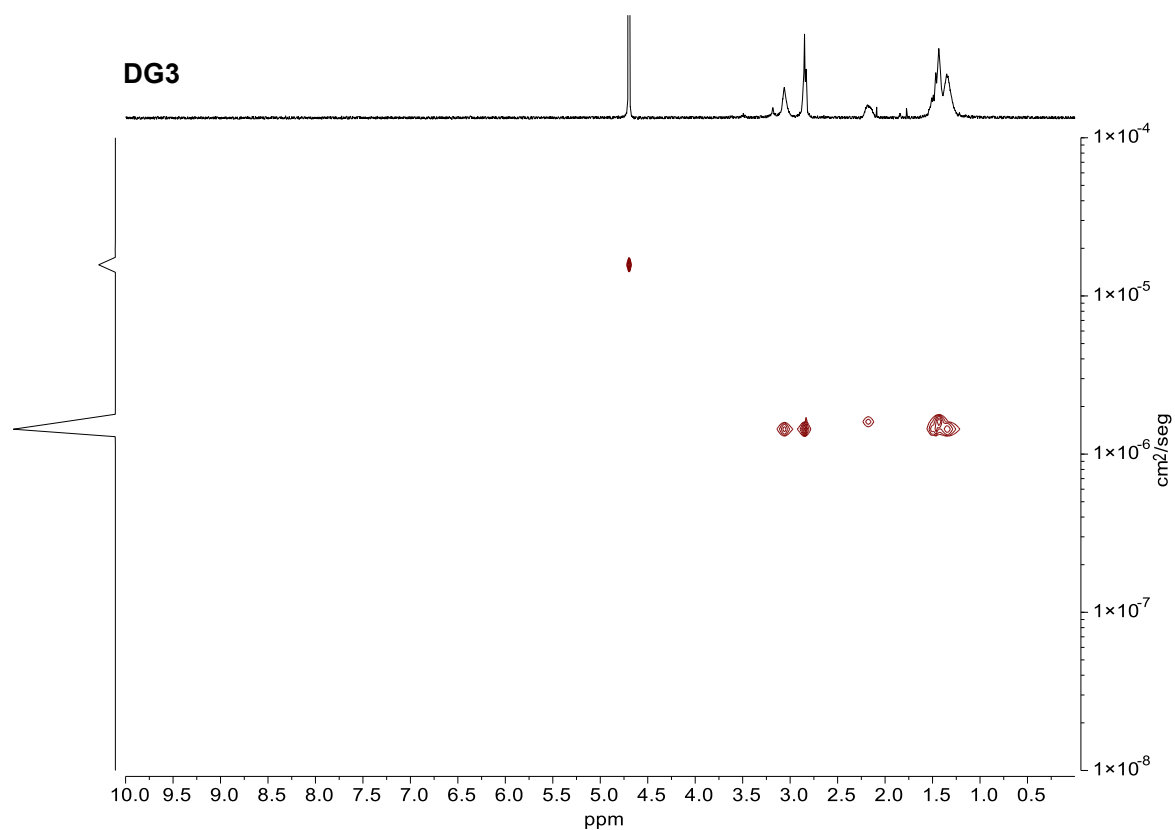


Figura 351. Experimento de RMN DOSY de **DG3** en D<sub>2</sub>O.

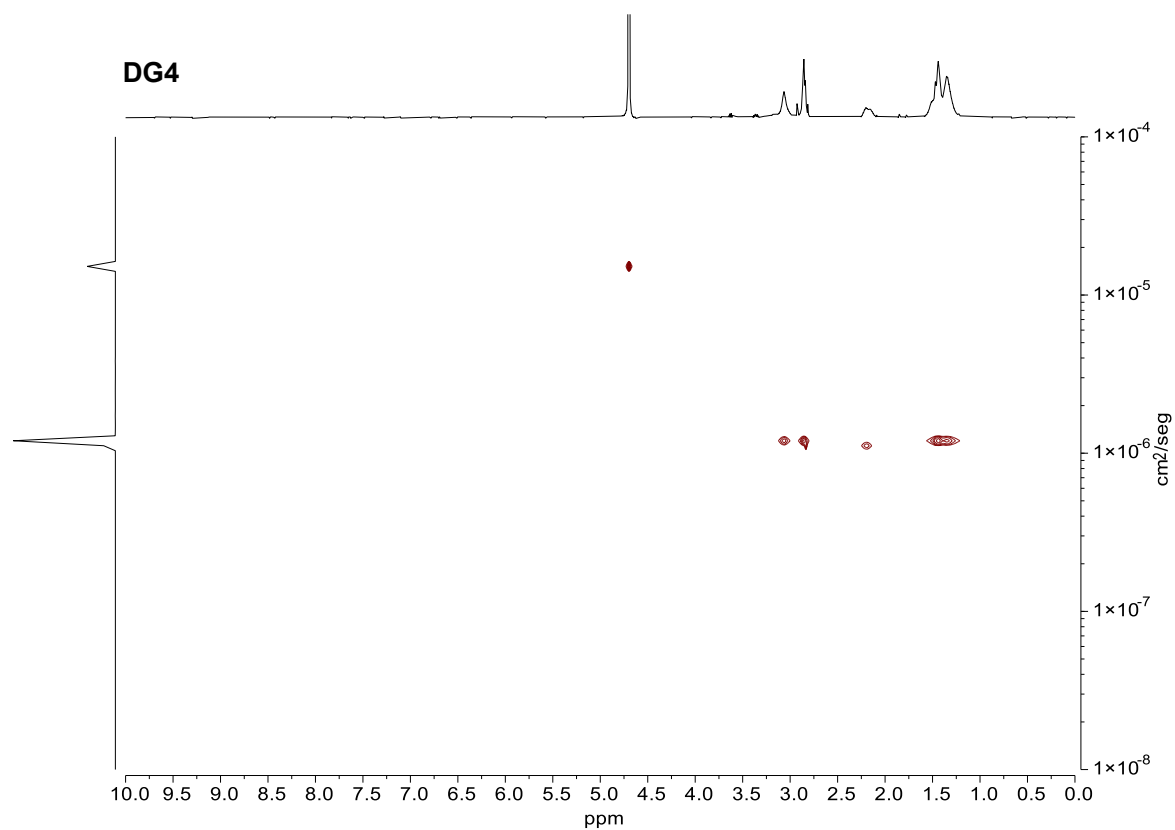


Figura 352. Experimento de RMN DOSY de **DG4** en D<sub>2</sub>O.

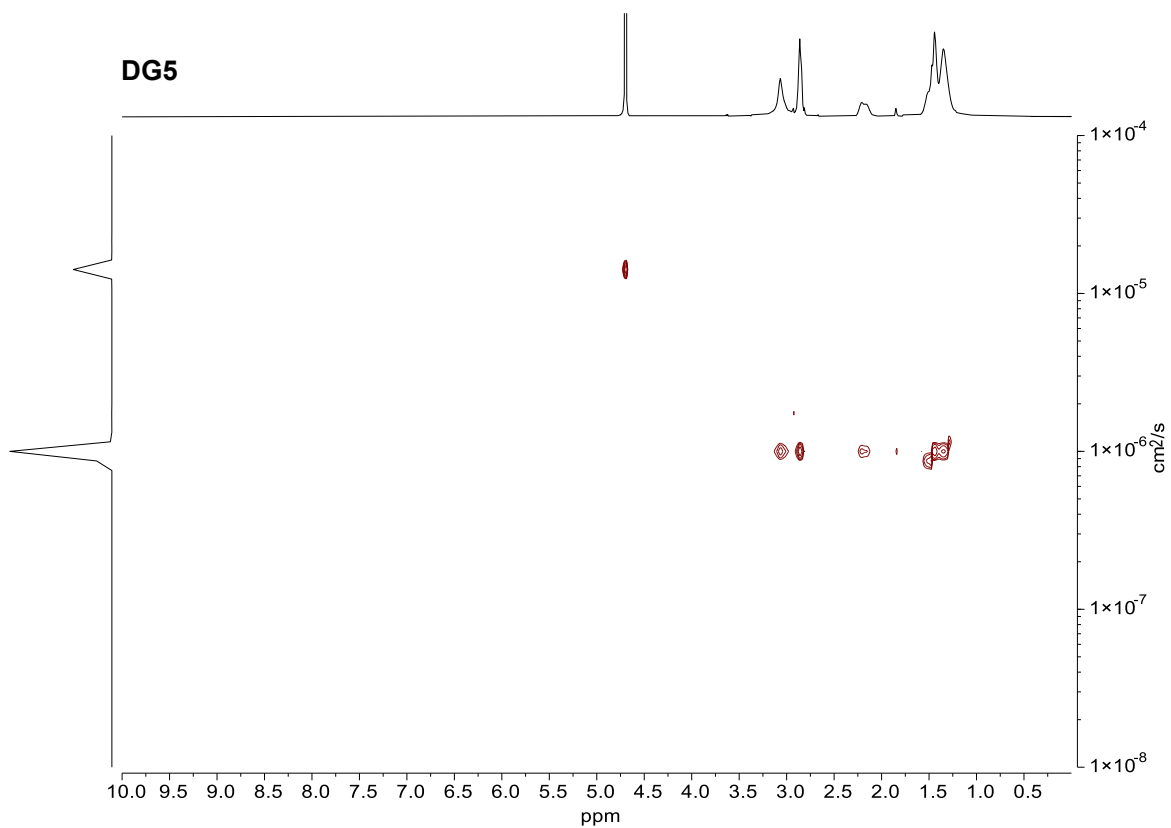


Figura 353. Experimento de RMN DOSY de **DG5** en D<sub>2</sub>O.

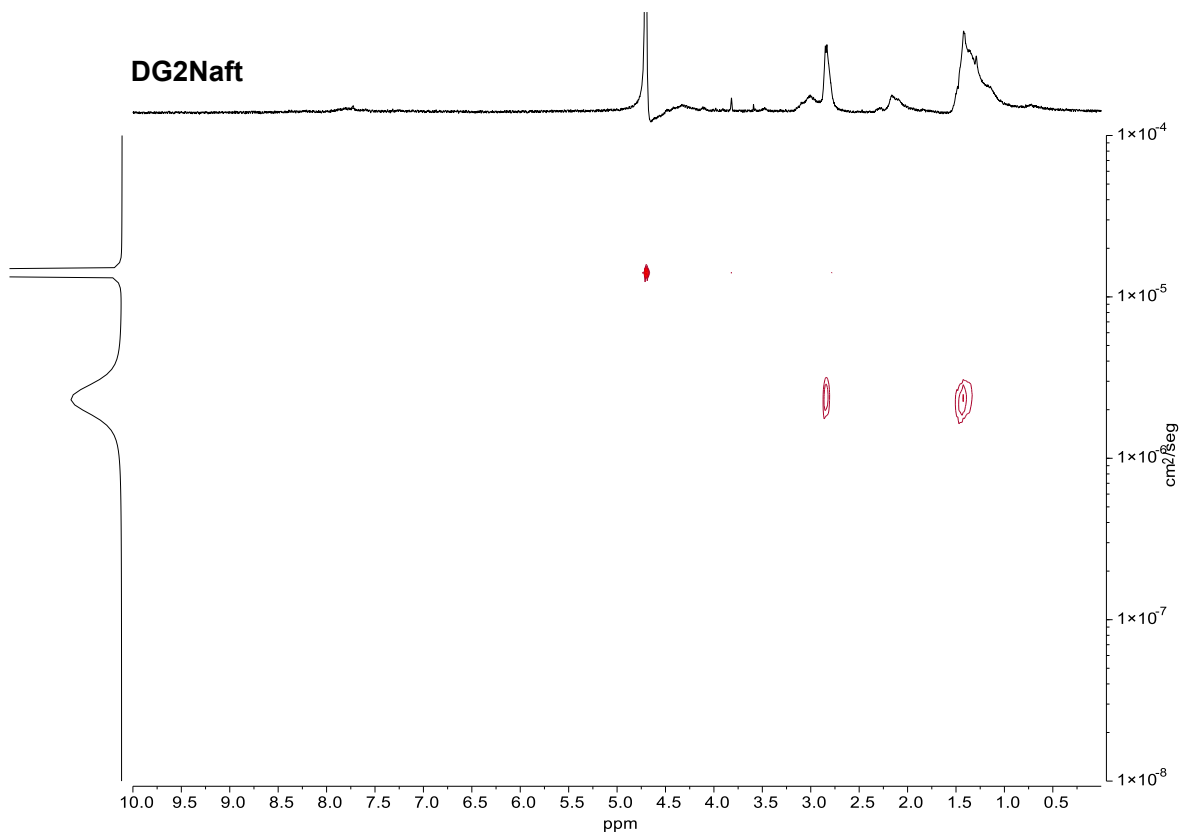


Figura 354. Experimento de RMN DOSY de **DG2Naft** en D<sub>2</sub>O.

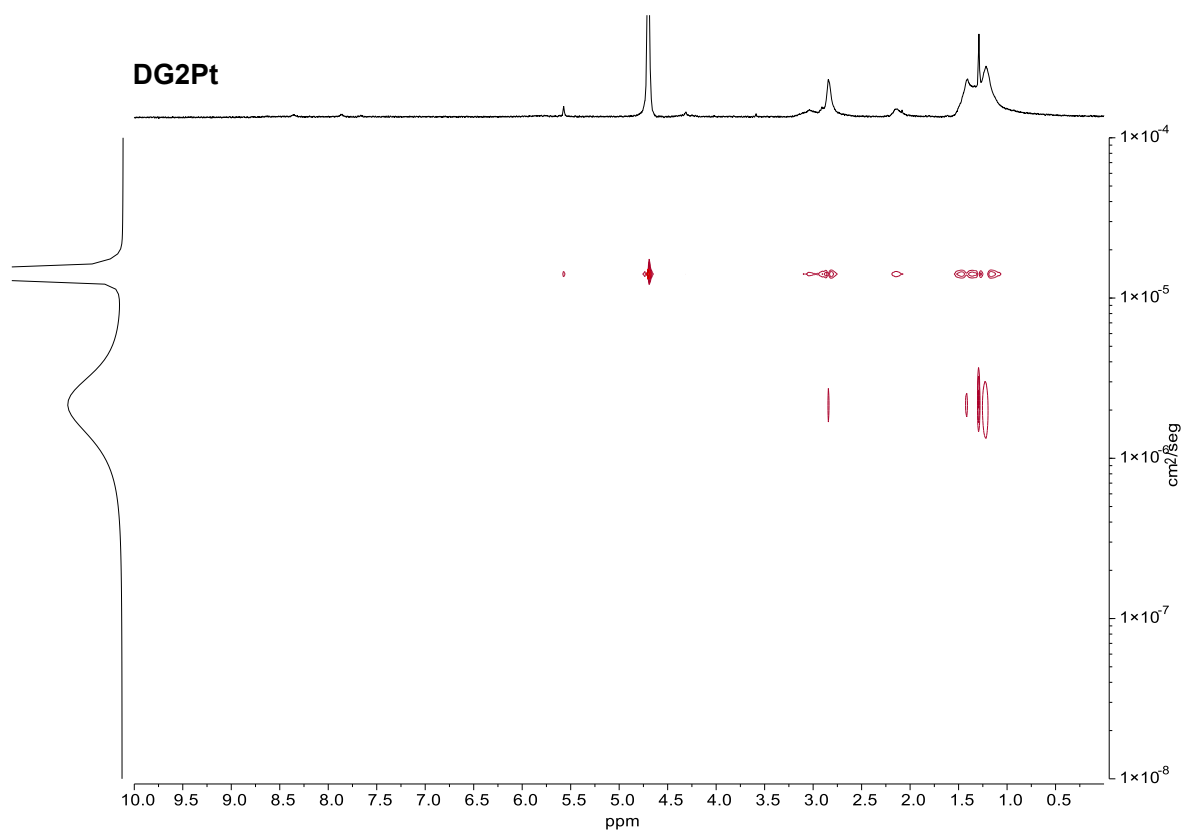


Figura 355. Experimento de RMN DOSY de **DG2Pt** en  $D_2O$ .

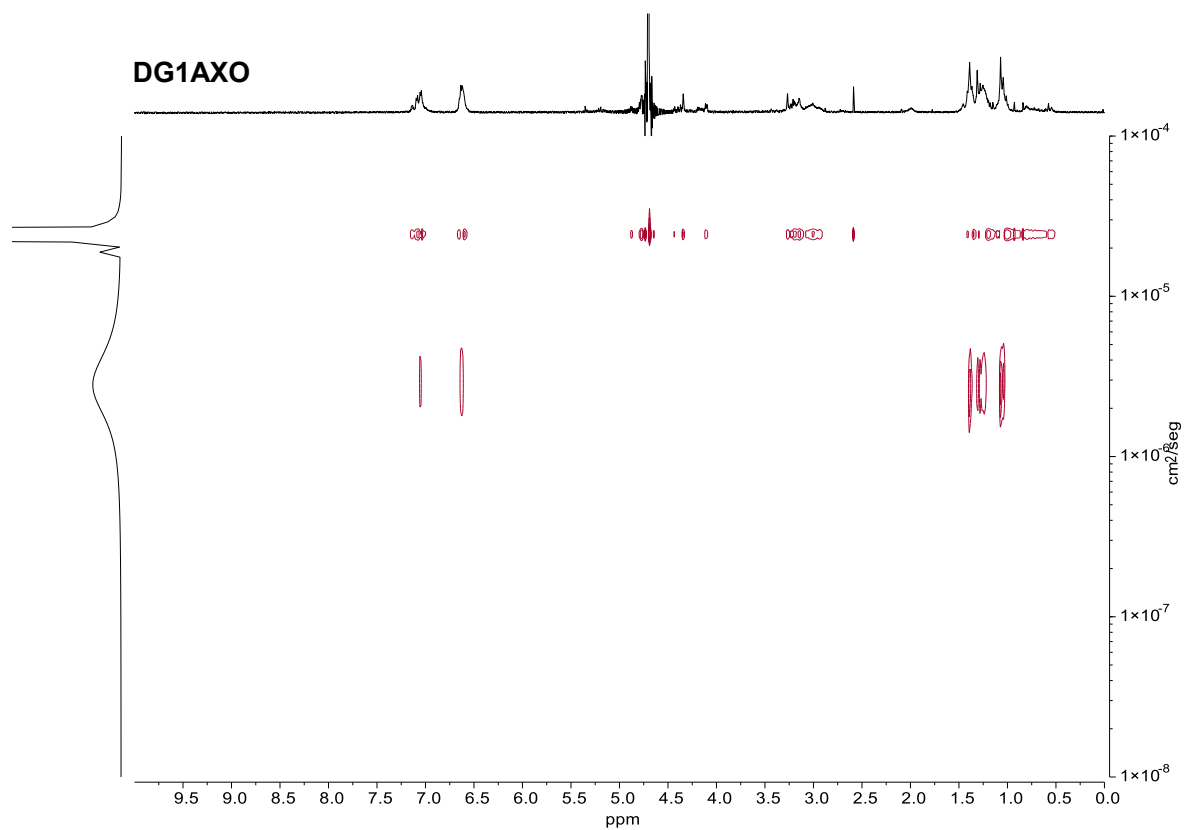


Figura 356. Experimento de RMN DOSY de **DG1AXO** en  $D_2O$ .

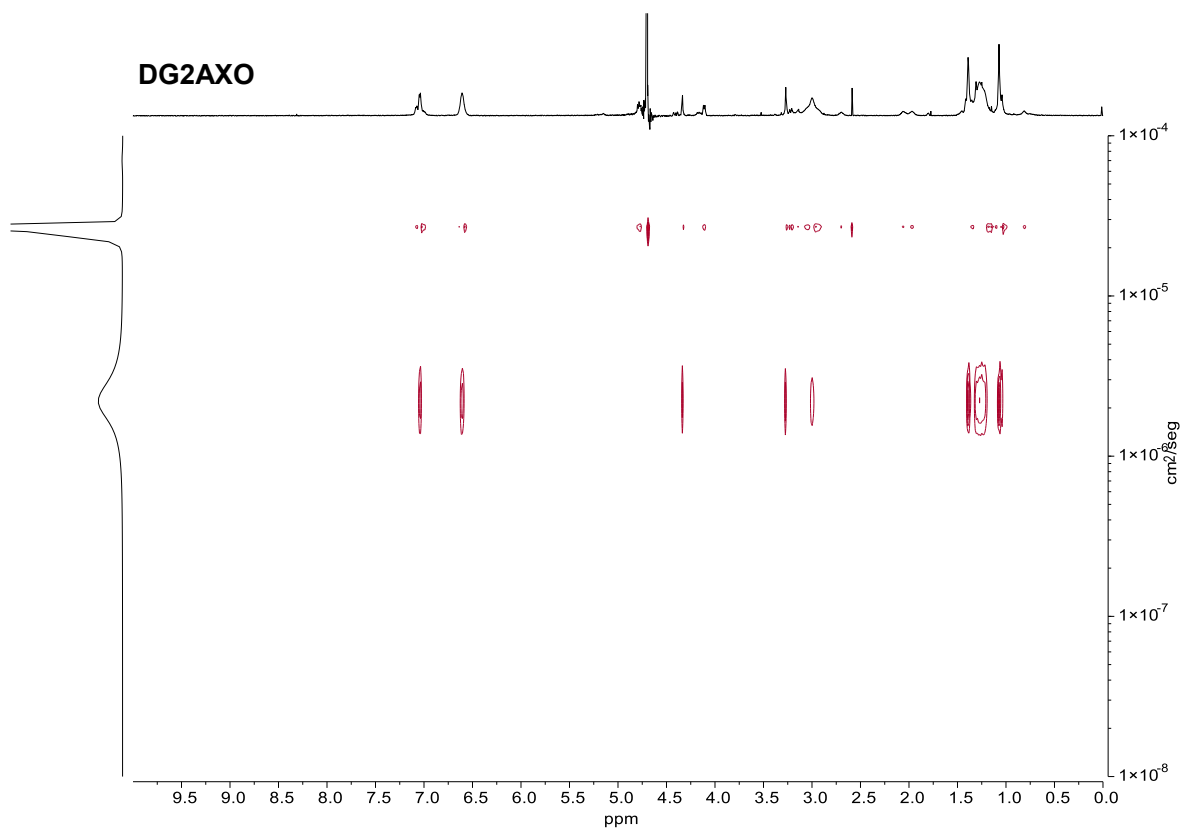


Figura 357. Experimento de RMN DOSY de **DG2AXO** en D<sub>2</sub>O.

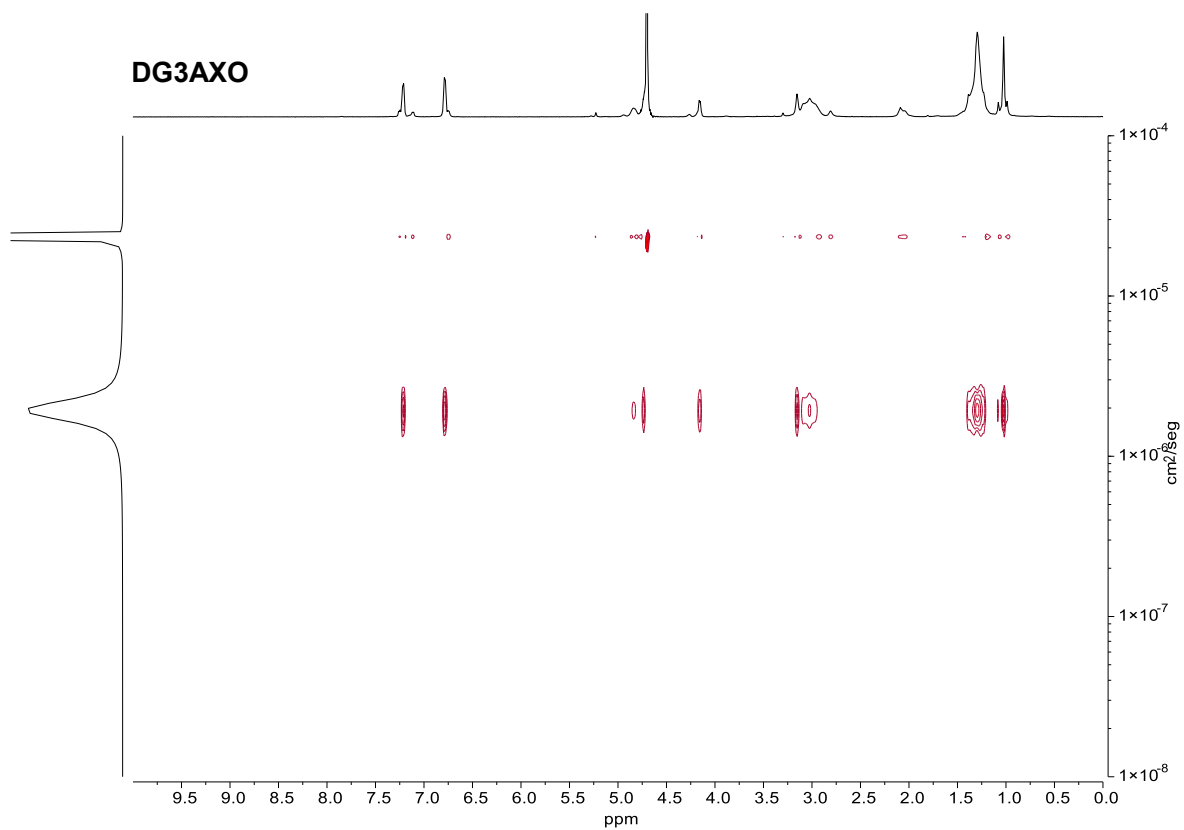


Figura 358. Experimento de RMN DOSY de **DG3AXO** en D<sub>2</sub>O.

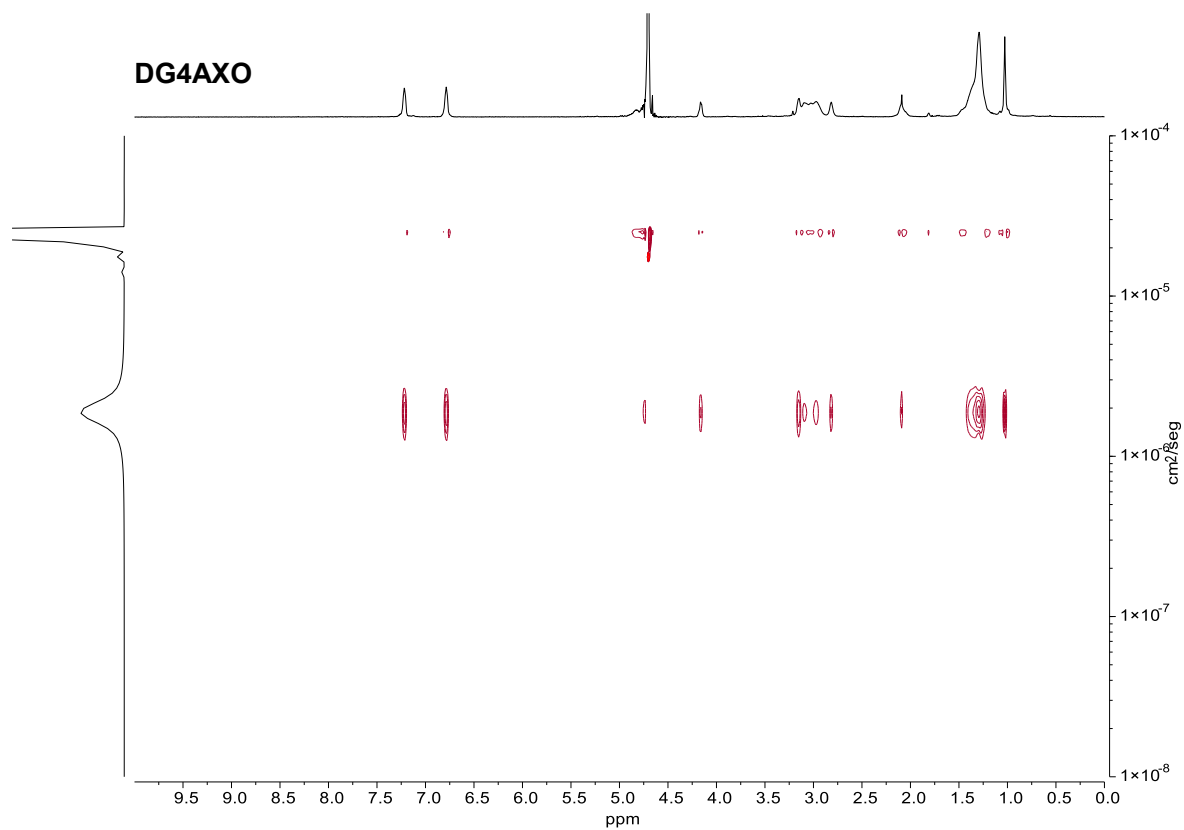


Figura 359. Experimento de RMN DOSY de **DG4AXO** en  $D_2O$ .

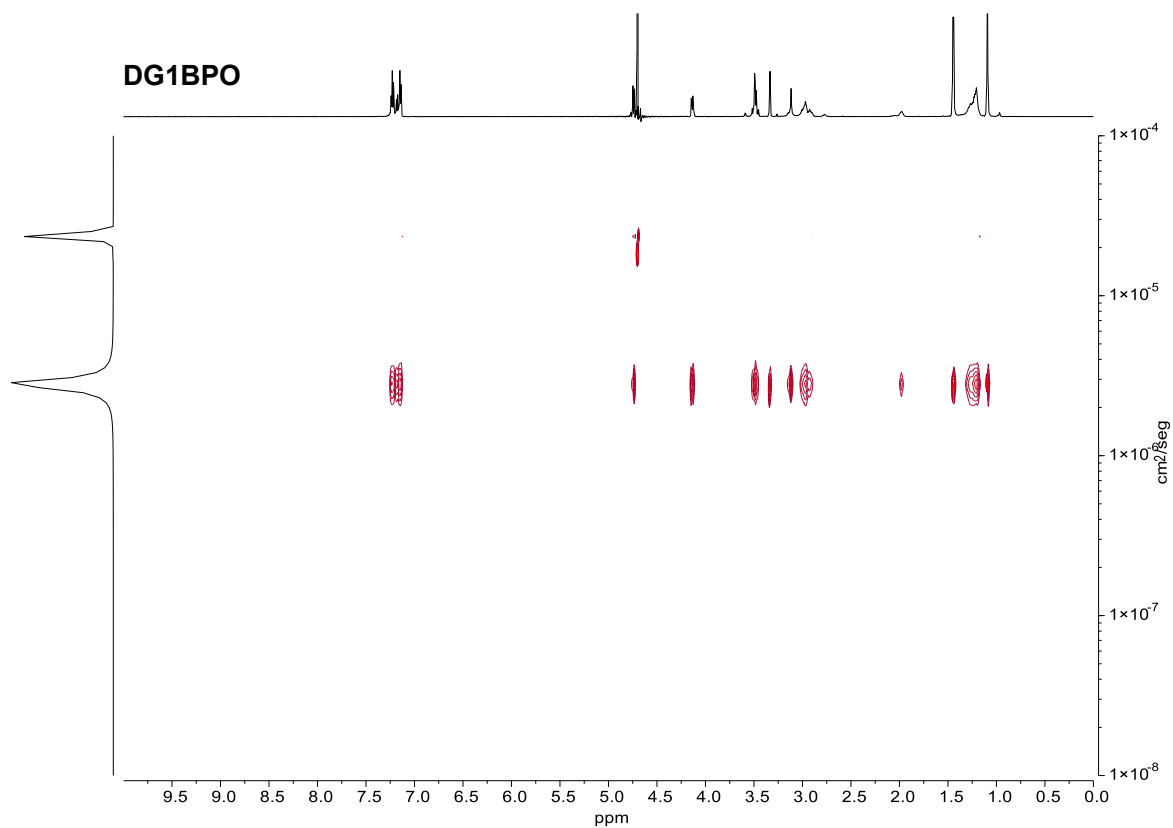


Figura 360. Experimento de RMN DOSY de **DG1BPO** en  $D_2O$ .

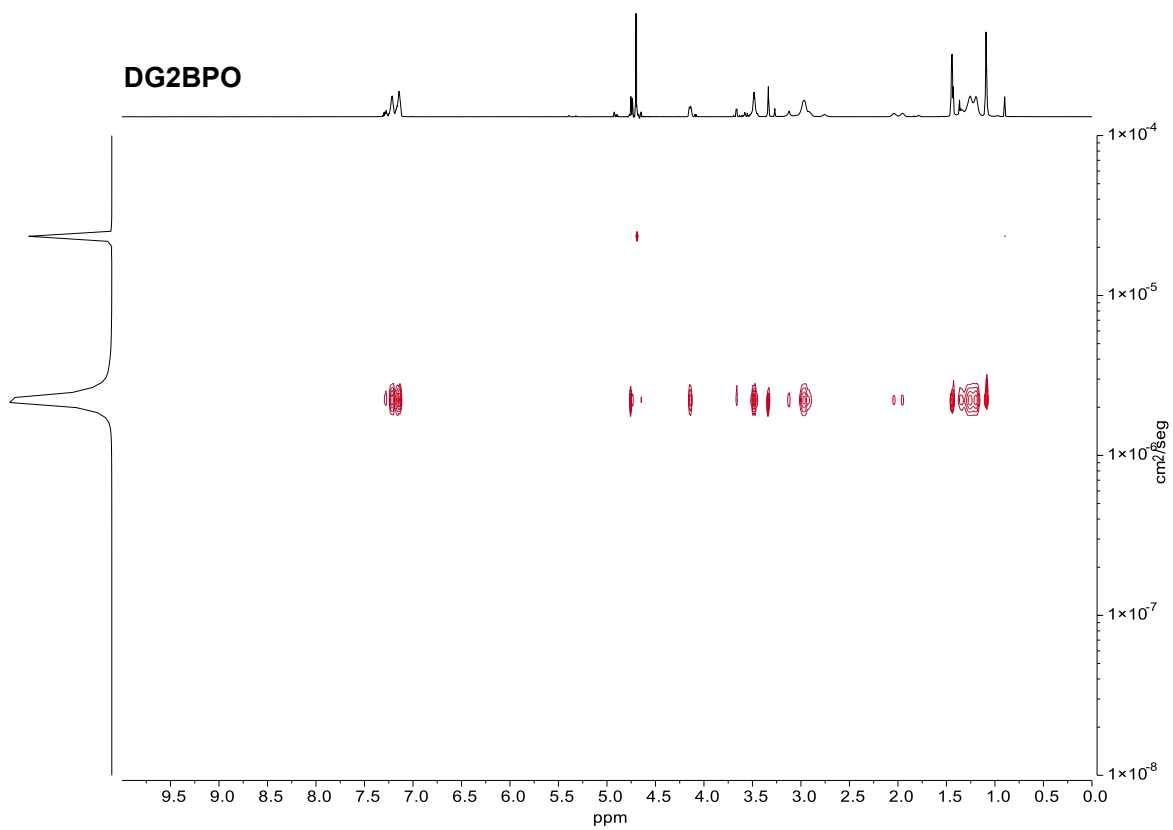


Figura 361. Experimento de RMN DOSY de **DG2BPO** en D<sub>2</sub>O.

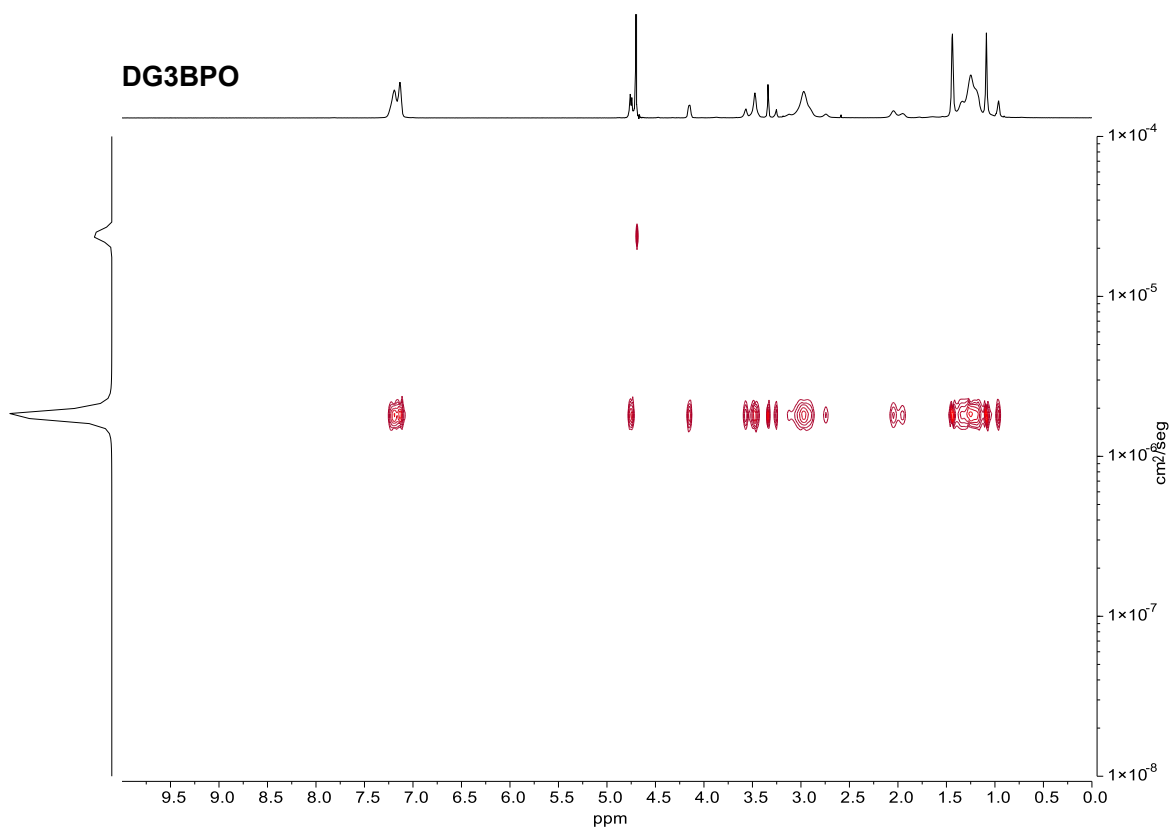


Figura 362. Experimento de RMN DOSY de **DG3BPO** en D<sub>2</sub>O.

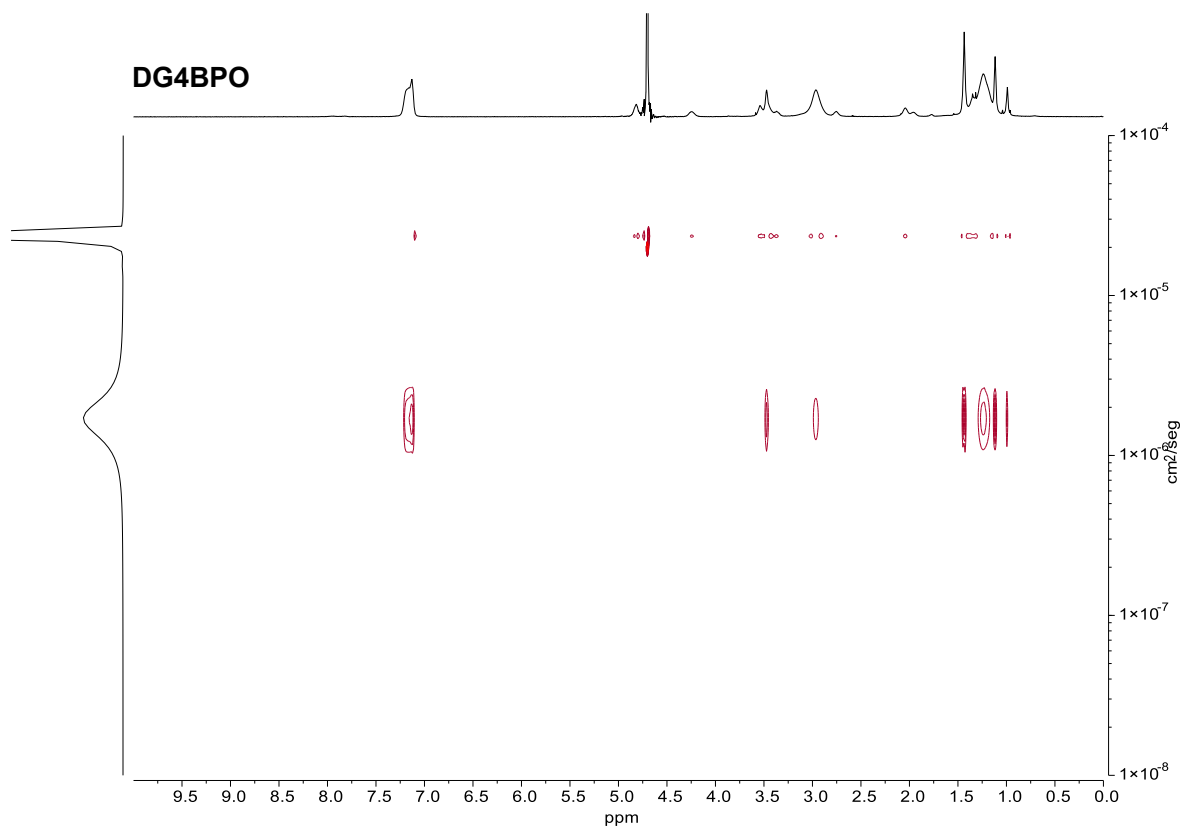


Figura 363. Experimento de RMN DOSY de **DG4BPO** en  $D_2O$ .

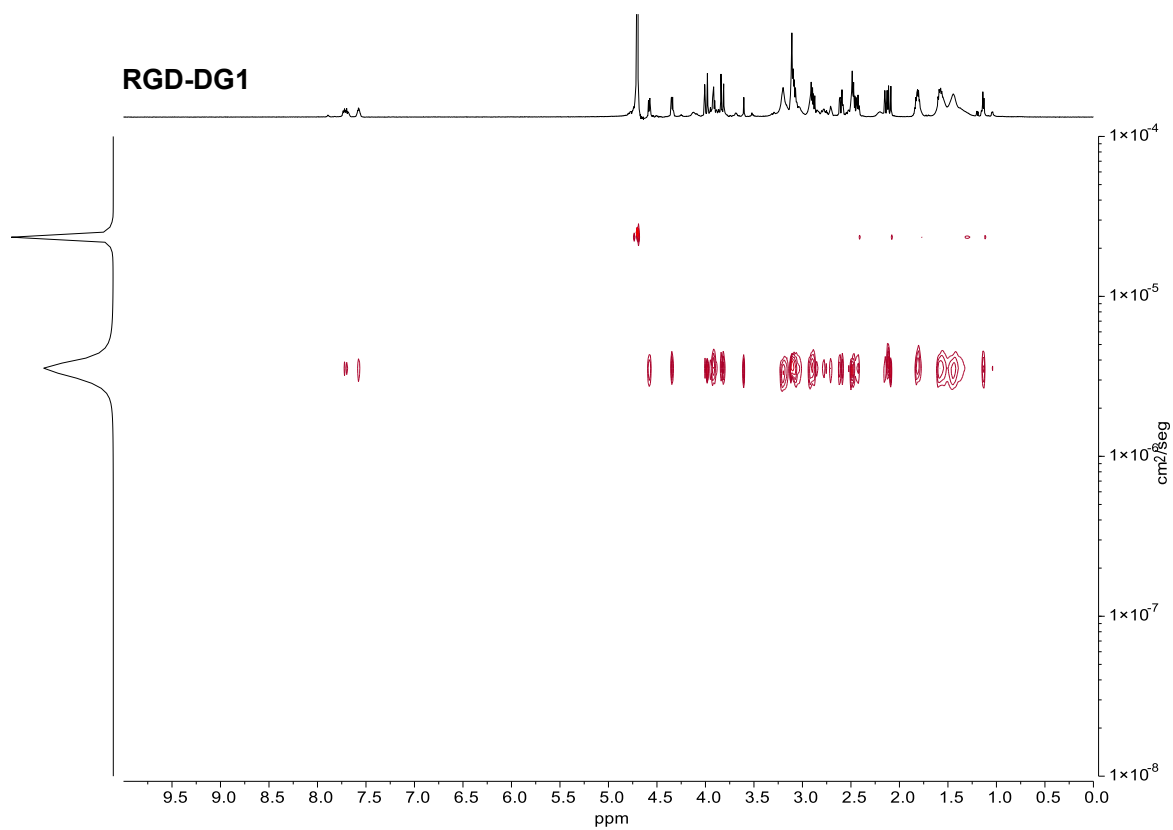


Figura 364. Experimento de RMN DOSY de **RGD-DG1** en  $D_2O$ .



## BIBLIOGRAFÍA



## Bibliografía

- (1) Caminade, A. M.; Yan, D.; Smith, D. K. Dendrimers and Hyperbranched Polymers. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (12), 3870–3873. <https://doi.org/10.1039/c5cs90049b>.
- (2) Vögtle, F. (Fritz); Richardt, G.; Werner, N. *Dendrimer Chemistry: Concepts, Synthesis, Properties, Applications*; Wiley-VCH, **2009**. <https://doi.org/10.1002/9783527626953>.
- (3) Peterson, G. I.; Choi, T. L. The Influence of Polymer Architecture in Polymer Mechanochemistry. *Chem. Commun.* **2021**, *57* (53), 6465–6474. <https://doi.org/10.1039/d1cc02501e>.
- (4) Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. “Cascade”- And “Nonskid-Chain-like” Syntheses of Molecular Cavity Topologies. *Synth.* **1978**, *1978* (2), 155–158. <https://doi.org/10.1055/s-1978-24702>.
- (5) Denkewalter, R. G.; Kolc, J. F.; Lukasavage, W. J.; Stroup, K. E.; Stewart, R. C.; Doernberg, A. M. Macromolecular Highly Branched Homogeneous Compound. United States Patent, 4,410,688, **1983**.
- (6) Denkewalter, R. G.; Kolc, J. F.; Lukasavage, W. J. Macromolecular Highly Branched Homogeneous Compound Based on Lysine Units. United States Patent, 4, 289, 872, **1981**.
- (7) Aharoni, S. M.; Crosby, C. R.; Walsh, E. K. Size and Solution Properties of Globular Tert-Butyloxycarbonyl-Poly( $\alpha,\epsilon$ -l-Lysine). *Macromolecules* **1982**, *15* (4), 1093–1098. <https://doi.org/10.1021/ma00232a026>.
- (8) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* **1985**, *17* (1), 117–132. <https://doi.org/10.1295/polymj.17.117>.
- (9) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. Dendritic Macromolecules: Synthesis of Starburst Dendrimers. *Macromolecules* **1986**, *19* (9), 2466–2468. <https://doi.org/10.1021/ma00163a029>.
- (10) Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. Cascade Molecules: A New Approach to Micelles. A [27]-Arborol. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (11), 2003–2004. <https://doi.org/10.1021/jo00211a052>.
- (11) Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture. A New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (21), 7638–7647. <https://doi.org/10.1021/ja00177a027>.
- (12) Frechet, J. M. J.; Hawker, C. J.; Philippides, A. E. Dendritic Molecules and Method of

Production. United States Patent 5, 041, 516, **1991**.

- (13) Miller, T. M.; Neenan, T. X. Convergent Synthesis of Monodisperse Dendrimers Based upon 1,3,5-Trisubstituted Benzenes. *Chem. Mater.* **1990**, *2* (4), 346–349. <https://doi.org/10.1021/cm00010a006>.
- (14) Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard, W. A. I. Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **1990**, *102* (2), 119–157. <https://doi.org/10.1002/anie.199001381>.
- (15) Tomalia, D. A. Birth of a New Macromolecular Architecture: Dendrimers as Quantized Building Bloks for Nanoscale Synthetic Organic Chemistry. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30* (3–4), 294–324. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.01.007>.
- (16) Tomalia, D. A.; Fréchet, J. M. J. Discovery of Dendrimers and Dendritic Polymers: A Brief Historical Perspective. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2002**, *40* (16), 2719–2728. <https://doi.org/10.1002/pola.10301>.
- (17) Tomalia, D. A.; Christensen, J. B.; Boas, U. *Dendrimers, Dendrons, and Dendritic Polymers. Discovery, Applications, and the Future*; Cambridge University Press The Edinburgh Building, Cambridge CB2 8RU, UK, **2012**. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139048859>.
- (18) Wooley, K. L.; Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. Hyperbranched Macromolecules via a Novel Double-Stage Convergent Growth Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (11), 4252–4261. <https://doi.org/10.1021/ja00011a031>.
- (19) Golshan, M.; Rostami-Tapeh-Esmail, E.; Salami-Kalajahi, M.; Roghani-Mamaqani, H. A Review on Synthesis, Photophysical Properties, and Applications of Dendrimers with Perylene Core. *Eur. Polym. J.* **2020**, *137* (July), 109933. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109933>.
- (20) Rosen, B. M.; Wilson, C. J.; Wilson, D. A.; Peterca, M.; Imam, M. R.; Percec, V. Dendron-Mediated Self-Assembly, Disassembly, and Self-Organization of Complex Systems. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6275–6540. <https://doi.org/10.1021/cr900157q>.
- (21) Newkome, G. R.; Shreiner, C. D. Poly(Amidoamine), Polypropylenimine, and Related Dendrimers and Dendrons Possessing Different 1 → 2 Branching Motifs: An Overview of the Divergent Procedures. *Polymer (Guildf)*. **2008**, *49* (1), 1–173. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.10.021>.
- (22) Willems & van den Wildenberg (W&W). “Roadmap Report on Nanoparticles” 6th Framework Programme; **2005**.

- (23) Razavi, B.; Abbaszadeh, R.; Salami-Kalajahi, M.; Roghani-Mamaqani, H. Multi-Responsive Poly(Amidoamine)-Initiated Dendritic-Star Supramolecular Structures Containing UV Cross-Linkable Coumarin Groups for Smart Drug Delivery. *J. Mol. Liq.* **2020**, *319*, 114138. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114138>.
- (24) Mintzer, M. A.; Grinstaff, M. W.; Paetsch, I.; Hunold, P.; Mahler, M.; Shamsi, K.; Nagel, E.; Price, C. F.; Clark, L. J.; Paull, J. R. A.; Fairley, C. K.; Lou, X.; Meijer, E. W. Biomedical Applications of Dendrimers: A Tutorial. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (1), 173–190. <https://doi.org/10.1039/B901839P>.
- (25) Freeman, A. W.; Frechet, J. M. J.; Tomalia, D. A. Developments in the Accelerated Convergent Synthesis of Dendrimers. In *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*; Fréchet, J. M. J., Tomalia, D. A., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2001**; pp 91–110. <https://doi.org/10.1002/0470845821>.
- (26) Grayson, S. M.; Fréchet, J. M. J. Convergent Dendrons and Dendrimers: From Synthesis to Applications. *Chem. Rev. Am. Chem. Soc.* **2001**, *101* (12), 3819–3867. <https://doi.org/10.1021/cr990116h>.
- (27) Walter, M. V.; Malkoch, M.; Soderlind, E.; Ohshimizu, K.; Hunt, J. N.; Sivanandan, K.; Montanez, M. I.; Malkoch, M.; Ueda, M.; Hawker, C. J.; DeSimone, J. M. Simplifying the Synthesis of Dendrimers: Accelerated Approaches. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (13), 4593. <https://doi.org/10.1039/c2cs35062a>.
- (28) Spindler, R.; Frechet, J. M. J. Two-Step Approach towards the Accelerated Synthesis of Dendritic Macromolecules. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, No. 8, 913–918. <https://doi.org/10.1039/P19930000913>.
- (29) Wooley, K. I.; Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. Hyperbranched Macromolecules via a Novel Double-Stage Convergent Growth Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (11), 4252–4261. <https://doi.org/10.1021/ja00011a031>.
- (30) Franc, G.; Kakkar, A. K. “Click” Methodologies: Efficient, Simple and Greener Routes to Design Dendrimers. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (5), 1536–1544. <https://doi.org/10.1039/b913281n>.
- (31) Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Frechet, J. M. J. Efficiency and Fidelity in a Click-Chemistry Route to Triazole Dendrimers by the Copper(I)-Catalyzed Ligation of Azides and Alkynes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43* (30), 3928–3932. <https://doi.org/10.1002/ange.200454078>.
- (32) Nandivada, H.; Jiang, X.; Lahann, J. Click Chemistry: Versatility and Control in the Hands

- of Materials Scientists. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (17), 2197–2208. <https://doi.org/10.1002/adma.200602739>.
- (33) Ornelas, C.; Aranzaes, J. R.; Cloutet, E.; Astruc, D. A One-Pot Synthesis of a 243-Allyl Dendrimer under Ambient Conditions. *Org. Lett.* **2006**, *8* (13), 2751–2753. <https://doi.org/10.1021/ol060811t>.
- (34) Brauge, L.; Magro, G.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. First Divergent Strategy Using Two AB<sub>2</sub> Unprotected Monomers for the Rapid Synthesis of Dendrimers [2]. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (27), 6698–6699. <https://doi.org/10.1021/ja0029228>.
- (35) García-Gallego, S.; Andrén, O. C. J.; Malkoch, M. Accelerated Chemoselective Reactions to Sequence-Controlled Heterolayered Dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (3), 1501–1509. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b11726>.
- (36) Zimmerman, S. C.; Zeng, F.; Reichert, D. E. C.; Kolotuchin, S. V. Self-Assembling Dendrimers. *Science* (80- ). **1996**, *271* (5252), 1095–1098. <https://doi.org/10.1126/science.271.5252.1095>.
- (37) Zeng, F.; Zimmerman, S. C. Dendrimers in Supramolecular Chemistry: From Molecular Recognition to Self-Assembly. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (5), 1681–1712. <https://doi.org/10.1021/cr9603892>.
- (38) Denti, G.; Campagna, S.; Serroni, S.; Ciano, M.; Balzani, V. C. Decanuclear Homo- and Heterometallic Polypyridine Complexes: Syntheses, Absorption Spectra, Luminescence, Electrochemical Oxidation, and Intercomponent Energy Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (18), 2944–2950. <https://doi.org/10.1021/ja00044a072>.
- (39) Balzani, V.; Juris, A.; Venturi, M.; Campagna, S.; Serroni, S. Luminescent and Redox-Active Polynuclear Transition Metal Complexes. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (2), 759–833. <https://doi.org/10.1021/cr941154y>.
- (40) Newkome, G. R.; He, E.; Moorefield, C. N. Suprasuper molecules with Novel Properties: Metallodendrimers. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (7), 1689–1746. <https://doi.org/10.1021/cr9800659>.
- (41) Cuadrado, I.; Moran, M.; Casado, C. M.; Alonso, B.; Losada, J. Organometallic Dendrimers with Transition Metals. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *193–195*, 395–445. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00036-3).
- (42) Gorman, C. B.; Smith, J. C. Structure-Property Relationships in Dendritic Encapsulation. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34* (1), 60–71. <https://doi.org/10.1021/ar000044c>.
- (43) Astruc, D.; Chardac, F. Dendritic Catalysts and Dendrimers in Catalysis. *Chem. Rev.* **2001**,

- 101 (9), 2991–3023. <https://doi.org/10.1021/cr010323t>.
- (44) Torozova, A. S.; Korolkova, A. A.; Krasnova, I. Y.; Shifrina, Z. B. New Pyridylphenylene Cyclopentadienon as a Building Block for Dendrimer Synthesis. *Russ. Chem. Bull.* **2020**. <https://doi.org/10.1007/s11172-020-2727-5>.
- (45) Lyu, Z.; Ding, L.; Huang, A. Y. T.; Kao, C. L.; Peng, L. Poly(Amidoamine)Dendrimers: Covalent and Supramolecular Synthesis. *Mater. Today Chem.* **2019**, *13*, 34–48. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2019.04.004>.
- (46) Pyzowski, J.; Caminade, A.; Majoral, J. “Lego” Chemistry for the Straightforward Synthesis of Dendrimers Chemistry , It Is Desirable That the Byproducts Are Envi- Ronmentally Friendly , That Only a Very Slight Excess of Reagents Is Used for Quantitative Reactions , and That No as Byproducts . *J. Org. Chem* **2003**, *68*, 6043–6046. <https://doi.org/10.1021/jo0344438>.
- (47) Maraval, V.; Laurent, R.; Marchand, P.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. Accelerated Methods of Synthesis of Phosphorus-Containing Dendrimers. *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690* (10), 2458–2471. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2004.10.021>.
- (48) Wooley, K. L.; Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. Unsymmetrical Three-Dimensional Macromolecules: Preparation and Characterization of Strongly Dipolar Dendritic Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (24), 11496–11505. <https://doi.org/10.1021/ja00077a055>.
- (49) Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. Unusual Macromolecula Architectures: The Convergent Growth Approach to Dendritic Polyesters and Novel Block Copolymers. *J. Am. Chem. Soc* **1992**, *4*, 8405–8413. <https://doi.org/10.1021/ja00048a009>.
- (50) Caminade, A. M.; Laurent, R.; Delavaux-Nicot, B.; Majoral, J. P. “Janus” Dendrimers: Syntheses and Properties. *New J. Chem.* **2012**, *36* (2), 217–226. <https://doi.org/10.1039/c1nj20458k>.
- (51) Maraval, V.; Laurent, R.; Donnadiou, B.; Mauzac, M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. Rapid Synthesis of Phosphorus-Containing Dendrimers with Controlled Molecular Architectures: First Example of Surface-Block, Layer-Block, and Segment-Block Dendrimers Issued from the Same Dendron. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (11), 2499–2511. <https://doi.org/10.1021/ja992099j>.
- (52) Tomalia, D. A.; Pulgam, V. R.; Swansons, D. R.; Huang, B. Janus Dendrimers and Dendrons. *US7977452*, **2011**.
- (53) Najafi, F.; Salami-Kalajahi, M.; Roghani-Mamaqani, H. Synthesis of Janus Dendrimers.

US20210206899, **2021**.

- (54) Kannan, R. M.; Nance, E.; Kannan, S.; Tomalia, D. A. Emerging Concepts in Dendrimer-Based Nanomedicine: From Design Principles to Clinical Applications. *J. Intern. Med.* **2014**, *276* (6), 579–617. <https://doi.org/10.1111/joim.12280>.
- (55) Li, X.; Naeem, A.; Xiao, S.; Hu, L.; Zhang, J. Safety Challenges and Application Strategies for the Use of Dendrimers in Medicine. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (1292). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061292>.
- (56) Tomalia, D. A.; Huang, B.; Swanson, D. R.; Brothers, H. M.; Klimash, J. W. Structure Control within Poly(Amidoamine) Dendrimers: Size, Shape and Regio-Chemical Mimicry of Globular Proteins. *Tetrahedron* **2003**, *59* (22), 3799–3813. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00430-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00430-7).
- (57) Shah, D. S.; Sakthivel, T.; Toth, I.; Florence, A. T.; Wilderspin, A. F. DNA Transfection and Transfected Cell Viability Using Amphipathic Asymmetric Dendrimers. *Int. J. Pharm.* **2000**, *208* (1–2), 41–48. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00534-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00534-2).
- (58) Fischer, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Kissel, T. In Vitro Cytotoxicity Testing of Polycations: Influence of Polymer Structure on Cell Viability and Hemolysis. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1121–1131. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00445-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00445-3).
- (59) Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J. W.; Meijer, E. W.; Paulus, W.; Duncan, R. Dendrimers: Relationship between Structure and Biocompatibility in Vitro, and Preliminary Studies on the Biodistribution of 125I-Labelled Polyamidoamine Dendrimers in Vivo. *J. Control. Release* **2000**, *65* (1–2), 133–148. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00246-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00246-1).
- (60) Roberts, J. C.; Bhalgat, M. K.; Zera, R. T. Preliminary Biological Evaluation of Polyamidoamine (PAMAM) Starburst Dendrimers. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *30* (1), 53–65. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199601\)30:1%3C53::AID-JBM8%3E3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199601)30:1%3C53::AID-JBM8%3E3.0.CO;2-Q).
- (61) Bourne, N.; Stanberry, L. R.; Kern, E. R.; Holan, G.; Matthews, B.; Bernstein, D. I. Dendrimers, a New Class of Candidate Topical Microbicides with Activity against Herpes Simplex Virus Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44* (9), 2471–2474. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2471-2474.2000>.
- (62) Hed, Y.; Öberg, K.; Berg, S.; Nordberg, A.; Von Holst, H.; Malkoch, M. Multipurpose Heterofunctional Dendritic Scaffolds as Crosslinkers towards Functional Soft Hydrogels and Implant Adhesives in Bone Fracture Applications. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (44), 6015–

6019. <https://doi.org/10.1039/c3tb21061h>.
- (63) Grinstaff, M. W. Biodendrimers: New Polymeric Biomaterials for Tissue Engineering. *Chem. - A Eur. J.* **2002**, *8* (13), 2838–2846. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20020703\)8:13%3C2838::AID-CHEM2838%3E3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20020703)8:13%3C2838::AID-CHEM2838%3E3.0.CO;2-I).
- (64) Stenström, P.; Hjorth, E.; Zhang, Y.; Andrén, O. C. J.; Guette-Marquet, S.; Schultzberg, M.; Malkoch, M. Synthesis and in Vitro Evaluation of Monodisperse Amino-Functional Polyester Dendrimers with Rapid Degradability and Antibacterial Properties. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (12), 4323–4330. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01364>.
- (65) Haensler, J.; Szoka, F. C. Polyamidoamine Cascade Polymers Mediate Efficient Transfection of Cells in Culture. *Bioconjug. Chem.* **1993**, *4* (5), 372–379. <https://doi.org/10.1021/bc00023a012>.
- (66) Chirila, T. V.; Rakoczy, P. E.; Garrett, K. L.; Lou, X.; Constable, I. J. The Use of Synthetic Polymers for Delivery of Therapeutic Antisense Oligodeoxynucleotides. *Biomaterials* **2002**, *23* (2), 321–342. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00125-9).
- (67) Bielinska, A. U.; Yen, A.; Wu, H. L.; Zahos, K. M.; Sun, R.; Weiner, N. D.; Baker, J. R. J.; Roessler, B. J. Application of Membrane-Based Dendrimer/DNA Complexes for Solid Phase Transfection in Vitro and in Vivo. *Biomaterials* **2000**, *21* (9), 877–887. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00229-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00229-X).
- (68) Svenson, S.; Tomalia, D. A. Dendrimers in Biomedical Applications - Reflections on the Field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57* (15), 2106–2129. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.09.018>.
- (69) Kojima, C.; Kono, K.; Maruyama, K.; Takagishi, T. Synthesis of Polyamidoamine Dendrimers Having Poly(Ethylene Glycol) Grafts and Their Ability to Encapsulate Anticancer Drugs. *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11* (6), 910–917. <https://doi.org/10.1021/bc0000583>.
- (70) Bhadra, D.; Bhadra, S.; Jain, S.; Jain, N. K. A PEGylated Dendritic Nanoparticulate Carrier of Fluorouracil. *Int. J. Pharm.* **2003**, *257* (1–2), 111–124. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00132-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00132-7).
- (71) Boas, U.; Heegaard, P. M. H. Dendrimers in Drug Research. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33* (1), 43–63. <https://doi.org/10.1039/b309043b>.
- (72) Majoros, I. J.; Thomas, T. P.; Mehta, C. B.; Baker, J. R. Poly(Amidoamine) Dendrimer-Based Multifunctional Engineered Nanodevice for Cancer Therapy. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (19), 5892–5899. <https://doi.org/10.1021/jm0401863>.

- (73) Bezouška, K. Design, Functional Evaluation and Biomedical Applications of Carbohydrate Dendrimers (Glycodendrimers). *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90* (3–4), 269–290. [https://doi.org/10.1016/S1389-0352\(01\)00064-2](https://doi.org/10.1016/S1389-0352(01)00064-2).
- (74) Reina, J. J.; Rojo, J. Synthesis of 2-Azidoethyl  $\alpha$ -D-Mannopyranoside Orthogonally Protected and Selective Deprotections. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (15), 2475–2478. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.02.063>.
- (75) Rojo, J.; Delgado, R. Glycodendritic Structures: Promising New Antiviral Drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54* (3), 579–581. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh399>.
- (76) Posnett, D. N.; McGrath, H.; Tam, J. P. A Novel Method for Producing Anti-Peptide Antibodies. Production of Site-Specific Antibodies to the T Cell Antigen Receptor B-Chain. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (4), 1719–1725. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)77935-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77935-6).
- (77) Mayorga, C.; Ebo, D. G.; Lang, D. M.; Pichler, W. J.; Sabato, V.; Park, M. A.; Makowska, J.; Atanaskovic-Markovic, M.; Bonadonna, P.; Jares, E. Controversies in Drug Allergy: In Vitro Testing. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *143* (1), 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.022>.
- (78) Decuyper, I. I.; Mangodt, E. A.; Van Gasse, A. L.; Claesen, K.; Uyttebroek, A.; Faber, M.; Sabato, V.; Bridts, C. H.; Mertens, C.; Hagendorens, M. M.; De Clerck, L. S.; Ebo, D. G. In Vitro Diagnosis of Immediate Drug Hypersensitivity Anno 2017: Potentials and Limitations. *Drugs R D* **2017**, *17* (2), 265–278. <https://doi.org/10.1007/s40268-017-0176-x>.
- (79) Mayorga, C.; Doña, I.; Perez-Inestrosa, E.; Fernández, T. D.; Torres, M. J. The Value of In Vitro Tests to Diminish Drug Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061222>.
- (80) W. J. Pichler. Delayed Drug Hypersensitivity Reactions. *Ann. Intern. Med.* **2003**, *139* (8), 683–693. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-139-8-200310210-00012>.
- (81) K. Landsteiner; J. Jacobs. Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. *J. Exp. Med* **1935**, *61*, 643–657. <https://doi.org/10.1084/jem.61.5.643>.
- (82) Park, B. K.; Pirmohamed, M.; Kitteringham, N. R. Role of Drug Disposition in Drug Hypersensitivity: A Chemical, Molecular, and Clinical Perspective. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11* (9), 969–988. <https://doi.org/10.1021/tx980058f>.
- (83) Pirmohamed, M.; Kitteringham, N. R.; Park, B. K. The Role of Active Metabolites in Drug Toxicity. *DrugSafety* **1994**, *11*, 114–144. <https://doi.org/10.2165/00002018-199411020-00006>.

- (84) Sánchez-Sancho, F.; Pérez-Inestrosa, E.; Suau, R.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Blanca, M. Dendrimers as Carrier Protein Mimetics for IgE Antibody Recognition. Synthesis and Characterization of Densely Penicilloylated Dendrimers. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13* (3), 647–653. <https://doi.org/10.1021/bc0155824>.
- (85) Montañez, M. I.; Najera, F.; Mayorga, C.; Ruiz-Sanchez, A. J.; Vida, Y.; Collado, D.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Perez-Inestrosa, E. Recognition of Multiepitope Dendrimeric Antigens by Human Immunoglobulin E. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**, *11* (3), 579–588. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.006>.
- (86) Molina, N.; Martin-Serrano, A.; Fernandez, T. D.; Tesfaye, A.; Najera, F.; Torres, M. J.; Mayorga, C.; Vida, Y.; Montañez, M. I.; Perez-Inestrosa, E. Dendrimeric Antigens for Drug Allergy Diagnosis: A New Approach for Basophil Activation Tests. *Molecules* **2018**, *23* (5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules23050997>.
- (87) Montañez, M. I.; Perez-Inestrosa, E.; Suau, R.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Blanca, M. Dendrimerized Cellulose as a Scaffold for Artificial Antigens with Applications in Drug Allergy Diagnosis. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (5), 1461–1466. <https://doi.org/10.1021/bm701380a>.
- (88) Ruiz-Sanchez, A. J.; Montañez, M. I.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Kehr, N. S.; Vida, Y.; Collado, D.; Najera, F.; De Cola, L.; Perez-Inestrosa, E. Dendrimer-Modified Solid Supports: Nanostructured Materials with Potential Drug Allergy Diagnostic Applications. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (29), 4942–4954. <https://doi.org/10.2174/0929867311209024942>.
- (89) Soler, M.; Mesa-Antunez, P.; Estevez, M. C.; Ruiz-Sanchez, A. J.; Otte, M. A.; Sepulveda, B.; Collado, D.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Perez-Inestrosa, E.; Lechuga, L. M. Highly Sensitive Dendrimer-Based Nanoplasmonic Biosensor for Drug Allergy Diagnosis. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *66*, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.081>.
- (90) Vida, Y.; Montañez, M. I.; Collado, D.; Najera, F.; Ariza, A.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Mayorga, C.; Perez-Inestrosa, E. Dendrimeric Antigen-Silica Particle Composites: An Innovative Approach for IgE Quantification. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (24), 3044–3050. <https://doi.org/10.1039/c3tb20548g>.
- (91) Gil-Ocaña, V.; Jimenez, I. M.; Mayorga, C.; Doña, I.; Céspedes, J. A.; Montañez, M. I.; Vida, Y.; Torres, M. J.; Perez-Inestrosa, E. Multiepitope Dendrimeric Antigen-Silica Particle Composites as Nano-Based Platforms for Specific Recognition of IgEs. *Front. Immunol.* **2021**, *12* (December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.750109>.
- (92) Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. Cell Attachment Activity of Fibronectin Can Be

- Duplicated by Small Synthetic Fragments of the Molecule. *Nature* **1984**, *309* (5963), 30–33. <https://doi.org/10.1038/309030a0>.
- (93) Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M. D. Argining-Glycine-Aspartic Acid: A Versatile Cell Recognition Signal Minireview. *Cell* **1986**, *44*, 517–518. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90259-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90259-x).
- (94) Vida, Y.; Collado, D.; Najera, F.; Claros, S.; Becerra, J.; Andrades, J. A.; Perez-Inestrosa, E. Dendrimer Surface Orientation of the RGD Peptide Affects Mesenchymal Stem Cell Adhesion. *RSC Adv.* **2016**, *6* (55), 49839–49844. <https://doi.org/10.1039/c6ra06177j>.
- (95) Lagunas, A.; Tsintzou, I.; Vida, Y.; Collado, D.; Pérez-Inestrosa, E.; Rodríguez Pereira, C.; Magalhaes, J.; Andrades, J. A.; Samitier, J. Tailoring RGD Local Surface Density at the Nanoscale toward Adult Stem Cell Chondrogenic Commitment. *Nano Res.* **2016**, *10* (6), 1959–1971. <https://doi.org/10.1007/s12274-016-1382-5>.
- (96) Lagunas, A.; Castaño, A. G.; Artés, J. M.; Vida, Y.; Collado, D.; Pérez-Inestrosa, E.; Gorostiza, P.; Claros, S.; Andrades, J. A.; Samitier, J. Large-Scale Dendrimer-Based Uneven Nanopatterns for the Study of Local Arginine-Glycine-Aspartic Acid (RGD) Density Effects on Cell Adhesion. *Nano Res.* **2014**, *7* (3), 399–409. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0406-2>.
- (97) Lagunas, A.; Tsintzou, I.; Vida, Y.; Collado, D.; Pérez-Inestrosa, E.; Rodríguez Pereira, C.; Magalhaes, J.; Andrades, J. A.; Samitier, J. Tailoring RGD Local Surface Density at the Nanoscale toward Adult Stem Cell Chondrogenic Commitment. *Nano Res.* **2017**, *10* (6), 1959–1971. <https://doi.org/10.1007/s12274-016-1382-5>.
- (98) Casanellas, I.; Lagunas, A.; Tsintzou, I.; Vida, Y.; Collado, D.; Pérez-Inestrosa, E.; Rodríguez-Pereira, C.; Magalhaes, J.; Gorostiza, P.; Andrades, J. A.; Becerra, J.; Samitier, J. Dendrimer-Based Uneven Nanopatterns to Locally Control Surface Adhesiveness: A Method to Direct Chondrogenic Differentiation. *J. Vis. Exp.* **2018**, *2018* (131), 1–10. <https://doi.org/10.3791/56347>.
- (99) Casanellas, I.; Lagunas, A.; Vida, Y.; Pérez-Inestrosa, E.; Andrades, J. A.; Becerra, J.; Samitier, J. Matrix Nanopatterning Regulates Mesenchymal Differentiation through Focal Adhesion Size and Distribution According to Cell Fate. *Biomimetics* **2019**, *4* (2). <https://doi.org/10.3390/biomimetics4020043>.
- (100) Rodríguez-Pereira, C.; Lagunas, A.; Casanellas, I.; Vida, Y.; Pérez-Inestrosa, E.; Andrades, J. A.; Becerra, J.; Samitier, J.; Blanco, F. J.; Magalhães, J. RGD-Dendrimer-Poly(L-Lactic) Acid Nanopatterned Substrates for the Early Chondrogenesis of Human Mesenchymal

- Stromal Cells Derived from Osteoarthritic and Healthy Donors. *Materials (Basel)*. **2020**, *13* (10). <https://doi.org/10.3390/ma13102247>.
- (101) Casanellas, I.; Lagunas, A.; Vida, Y.; Pérez-Inestrosa, E.; Andrades, J. A.; Becerra, J.; Samitier, J. The Janus Role of Adhesion in Chondrogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (15), 11–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21155269>.
- (102) Casanellas, I.; Lagunas, A.; Vida, Y.; Pérez-Inestrosa, E.; Rodríguez-Pereira, C.; Magalhaes, J.; Andrades, J. A.; Becerra, J.; Samitier, J. Nanoscale Ligand Density Modulates Gap Junction Intercellular Communication of Cell Condensates during Chondrogenesis. *Nanomedicine (Lond)* **2022**, *17* (11), 775–791. <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0399>.
- (103) Ruiz-Sanchez, A. J.; Mesa-Antunez, P.; Barbero, N.; Collado, D.; Vida, Y.; Najera, F.; Perez-Inestrosa, E. Synthesis of All-Aliphatic Polyamide Dendrimers Based on a 3,3'-Diaminopivalic Acid Scaffold. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (16), 3031–3038. <https://doi.org/10.1039/c5py00154d>.
- (104) Mesa-Antunez, P.; Collado, D.; Vida, Y.; Najera, F.; Fernandez, T.; Torres, M.; Perez-Inestrosa, E. Fluorescent BAPAD Dendrimeric Antigens Are Efficiently Internalized by Human Dendritic Cells. *Polymers (Basel)*. **2016**, *8* (4), 111. <https://doi.org/10.3390/polym8040111>.
- (105) Molina, N.; González, A.; Monopoli, D.; Mentado, B.; Becerra, J.; Santos-Ruiz, L.; Vida, Y.; Perez-Inestrosa, E. Dendritic Scaffold onto Titanium Implants. A Versatile Strategy Increasing Biocompatibility. *Polymers (Basel)*. **2020**, *12* (4), 770. <https://doi.org/10.3390/polym12040770>.
- (106) Molina, N.; Nájera, F.; Guadix, J. A.; Perez-Pomares, J. M.; Vida, Y.; Perez-Inestrosa, E. Synthesis of Amino Terminal Clicked Dendrimers. Approaches to the Application as a Biomarker. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (16), 10197–10208. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01369>.
- (107) Williams, J. A. G. Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Platinum. *Top. Curr. Chem.* **2007**, *281* (July), 205–268. [https://doi.org/10.1007/128\\_2007\\_143](https://doi.org/10.1007/128_2007_143).
- (108) Baggaley, E.; Weinstein, J. A.; Williams, J. A. G. Lighting the Way to See inside the Live Cell with Luminescent Transition Metal Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (15–16), 1762–1785. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.018>.
- (109) Yang, B. X.; Wang, Z.; Madakuni, S.; Li, J.; Jabbour, G. E. Efficient Blue- and White-Emitting Electrophosphorescent Devices Based on Platinum (II) [1,3-Difluoro-4,6-Di(2-Pyridinyl)Benzene] Chloride. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 2405–2409.

<https://doi.org/10.1002/adma.200702940>.

- (110) Sotoyama, W.; Satoh, T.; Sawatari, N.; Inoue, H. Efficient Organic Light-Emitting Diodes with Phosphorescent Platinum Complexes Containing NACAN -Coordinating Tridentate Ligand. *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *86* (15), 1–3. <https://doi.org/10.1063/1.1901826>.
- (111) Turner, E.; Bakken, N.; Li, J. Cyclometalated Platinum Complexes with Luminescent Quantum Yields Approaching 100%. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (13), 7344–7351. <https://doi.org/10.1021/ic302490c>.
- (112) Graham, K. R.; Yang, Y.; Sommer, J. R.; Shelton, A. H.; Schanze, K. S.; Xue, J.; Reynolds, J. R. Extended Conjugation Platinum(II) Porphyrins for Use in near-Infrared Emitting Organic Light Emitting Diodes. *Chem. Mater.* **2011**, *23* (24), 5305–5312. <https://doi.org/10.1021/cm202242x>.
- (113) Baggaley, E.; Sazanovich, I. V.; Williams, J. A. G.; Haycock, J. W.; Botchway, S. W.; Weinstein, J. A. Two-Photon Phosphorescence Lifetime Imaging of Cells and Tissues Using a Long-Lived Cyclometalated Npyridyl<sup>^</sup>Cphenyl<sup>^</sup>N Pyridyl Pt(Ii) Complex. *RSC Adv.* **2014**, *4* (66), 35003–35008. <https://doi.org/10.1039/c4ra04489d>.
- (114) Levenson, R. M.; Lynch, D. T.; Kobayashi, H.; Backer, J. M.; Backer, M. V. Multiplexing with Multispectral Imaging: From Mice to Microscopy. *ILAR J.* **2012**, *53* (1), 78–88. <https://doi.org/10.1093/ilar.49.1.78>.
- (115) Thorp-Greenwood, F. L.; Balasingham, R. G.; Coogan, M. P. Organometallic Complexes of Transition Metals in Luminescent Cell Imaging Applications. *J. Organomet. Chem.* **2012**, *714*, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2012.01.020>.
- (116) Molina, N.; Cnudde, M.; Guadix, J. A.; Perez-Pomares, J. M.; Strassert, C. A.; Vida, Y.; Perez-Inestrosa, E. Platinum-Doped Dendritic Structure as a Phosphorescent Label for Bacteria in Two-Photon Excitation Microscopy. *ACS Omega* **2019**, *4* (8), 13027–13033. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00639>.
- (117) de Gennes, P. G.; Hervet, H. Statistics of « starburst » Polymers. *J. Phys. Lettres* **1983**, *44* (9), 351–360. <https://doi.org/10.1051/jphyslet:01983004409035100>.
- (118) Jishkariani, D.; MacDermaid, C. M.; Timsina, Y. N.; Grama, S.; Gillani, S. S.; Divar, M.; Yadavalli, S. S.; Moussodia, R.-O.; Leowanawat, P.; Berrios Camacho, A. M.; Walter, R.; Goulian, M.; Klein, M. L.; Percec, V. Self-Interrupted Synthesis of Sterically Hindered Aliphatic Polyamide Dendrimers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114* (12), E2275–E2284. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700922114>.
- (119) Donnier-Maréchal, M.; Carato, P.; Larchanché, P.-E.; Ravez, S.; Boulahjar, R.; Barczyk, A.;

- Oxombre, B.; Vermersch, P.; Melnyk, P. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Benzamide Derivatives as Potent and Selective Sigma-1 Protein Ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 964–978. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.014>.
- (120) Nguyen, K. T.; Syed, S.; Urwyler, S.; Bertrand, S.; Bertrand, D.; Reymond, J.-L. Discovery of NMDA Glycine Site Inhibitors from the Chemical Universe Database GDB. *ChemMedChem* **2008**, *3* (10), 1520–1524. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200800198>.
- (121) Amaral, S. P.; Tawara, M. H.; Fernandez-Villamarin, M.; Borrajo, E.; Martínez-Costas, J.; Vidal, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. Tuning the Size of Nanoassemblies: A Hierarchical Transfer of Information from Dendrimers to Polyion Complexes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2018**, *57* (19), 5273–5277. <https://doi.org/10.1002/anie.201712244>.
- (122) Lee, J. W.; Kim, H. J.; Han, S. C.; Kim, J. H.; Jin, S.-H. Designing Poly(Amido Amine) Dendrimers Containing Core Diversities by Click Chemistry of the Propargyl Focal Point Poly(Amido Amine) Dendrons. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46* (3), 1083–1097. <https://doi.org/10.1002/pola.22451>.
- (123) Bakkour, Y.; Darcos, V.; Li, S.; Coudane, J. Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) as a Powerful Tool for Amphiphilic Block Copolymer Characterization and for Critical Micelle Concentration (CMC) Determination. *Polym. Chem.* **2012**. <https://doi.org/10.1039/c2py20054f>.
- (124) Bailie, W. E.; Malveau, C.; Zhu, X. X.; Kim, Y. H.; Ford, W. T. Self-Diffusion of Hydrophilic Poly(Propyleneimine) Dendrimers in Poly(Vinyl Alcohol) Solutions and Gels by Pulsed Field Gradient NMR Spectroscopy. *Macromolecules* **2003**. <https://doi.org/10.1021/ma025636k>.
- (125) Fritzing, B.; Scheler, U. Scaling Behaviour of PAMAM Dendrimers Determined by Diffusion NMR. *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, *206* (13), 1288–1291. <https://doi.org/10.1002/macp.200500048>.
- (126) Van Dongen, M. A.; Orr, B. G.; Banaszak Holl, M. M. Diffusion NMR Study of Generation-Five PAMAM Dendrimer Materials. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (25), 7195–7202. <https://doi.org/10.1021/jp504059p>.
- (127) Jiménez, V. A.; Gavín, J. A.; Alderete, J. B. Scaling Trend in Diffusion Coefficients of Low Generation G0-G3 PAMAM Dendrimers in Aqueous Solution at High and Neutral PH. *Struct. Chem.* **2012**, *23* (1), 123–128. <https://doi.org/10.1007/s11224-011-9844-6>.
- (128) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (9), 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>.

- (129) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, R., J.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ort, J. V.; Fox, D. J. Gaussian 09, Revision A.02. Gaussian, Inc., Wallingford CT **2016**.
- (130) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (8), 2999–3094. <https://doi.org/10.1021/cr9904009>.
- (131) Case, D. a.; Darden, T.; Cheatham, T. E.; Simmerling, C.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B. P.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Swails, J.; Götz, A. W.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wolf, R. M.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M.-J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Salomon-Ferrer, R.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. a. *Amber 12*; Universidad de California, San Francisco. **2012**.
- (132) Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (40), 10269–10280. <https://doi.org/10.1021/j100142a004>.
- (133) Maingi, V.; Jain, V.; Bharatam, P. V.; Maiti, P. K. Dendrimer Building Toolkit: Model Building and Characterization of Various Dendrimer Architectures. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33* (25), 1997–2011. <https://doi.org/10.1002/jcc.23031>.
- (134) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- (135) Verlet, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev.* **1967**, *159* (1), 98–103. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.159.98>.
- (136) Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23* (3), 327–341. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5).
- (137) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81* (8), 3684–3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>.
- (138) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089–10092.

- <https://doi.org/10.1063/1.464397>.
- (139) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14* (1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- (140) Maiti, P. K.; Çağın, T.; Wang, G.; Goddard, W. A. Structure of PAMAM Dendrimers: Generations 1 through 11. *Macromolecules* **2004**, *37* (16), 6236–6254. <https://doi.org/10.1021/ma035629b>.
- (141) Morgado, A.; Najera, F.; Lagunas, A.; Samitier, J.; Vida, Y.; Perez-Inestrosa, E. Slightly Congested Amino Terminal Dendrimers. The Synthesis of Amide-Based Stable Structures on a Large Scale. *Polym. Chem.* **2021**, *12* (36), 5168–5177. <https://doi.org/10.1039/d1py00667c>.
- (142) Dewdney, J. M. *The Antigens*; Sela, M., Ed.; Academic Press: New York, **1977**; Vol. 5.
- (143) WEISS, M. E.; ADKINSON, N. F. Immediate Hypersensitivity Reactions to Penicillin and Related Antibiotics. *Clin. Exp. Allergy* **1988**, *18* (6), 515–540. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1988.tb02904.x>.
- (144) Ahlstedt, S.; Kristofferson, A. Immune Mechanisms for Induction of Penicillin Allergy. *Prog. Allergy* **1982**, *30*, 67–134. <https://doi.org/10.1159/000400260>.
- (145) Batchelor, F. R.; Dewdney, J. M.; Gazzard, D. Penicillin Allergy: The Formation of the Penicilloyl Determinant. *Nature* **1965**, *206*, 362–364. <https://doi.org/10.1038/206362a0>.
- (146) Levine, B. B.; Price, V. H. Studies on the Immunological Mechanisms of Penicillin Allergy. II. Antigenic Specificities of Allergic Wheal-and-Flare Skin Responses in Patients with Histories of Penicillin Allergy. *Immunology* **1964**, *7*, 542–556.
- (147) Juhlin, L.; Wide, L. Detection of Penicillin Allergy by Radioallergosorbent Test. *Lancet* **1979**, *2*, 261. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5123.701>.
- (148) Montañez, M. I. Síntesis Y Estudio de Determinantes Antigénicos de Cefalosporinas y Antígenos Dendriméricos de Penicilinas, Para La Detección de IgE Dirigidas a Betalactamas. Tesis Doctoral, **2006**.
- (149) Branch, S. K.; Casy, A. F.; Ominde, E. M. A. Application of <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to the Analysis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics and Their Common Degradation Products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1987**, *5* (2), 73–103. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(87\)80011-0](https://doi.org/10.1016/0731-7085(87)80011-0).
- (150) Kupka, T.; Dziegielewska, J. O.; Pasterna, G. NMR Studies on Penicillins: Hydrogen Bonding, Self-Association and Micellar Solutions of Cloxacillin Na-Salt in D<sub>2</sub>O. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11* (2), 103–116. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(93\)80130-S](https://doi.org/10.1016/0731-7085(93)80130-S).

- (151) Sawyer, A. A.; Hennessy, K. M.; Bellis, S. L. Regulation of Mesenchymal Stem Cell Attachment and Spreading on Hydroxyapatite by RGD Peptides and Adsorbed Serum Proteins. *Biomaterials* **2005**, *26* (13), 1467–1475. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.05.008>.
- (152) Salinas, C. N.; Anseth, K. S. The Enhancement of Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Enzymatically Regulated RGD Functionalities. *Biomaterials* **2008**, *29* (15), 2370–2377. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.035>.
- (153) Park, J. S.; Yang, H. N.; Jeon, S. Y.; Woo, D. G.; Na, K.; Park, K. H. Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Using RGD-Modified BMP-2 Coated Microspheres. *Biomaterials* **2010**, *31* (24), 6239–6248. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.002>.
- (154) Tahlawi, A.; Klontzas, M. E.; Allenby, M. C.; Morais, J. C. F.; Panoskaltsis, N.; Mantalaris, A. RGD-Functionalized Polyurethane Scaffolds Promote Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cell Expansion and Osteogenic Differentiation. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2019**, *13* (2), 232–243. <https://doi.org/10.1002/term.2784>.
- (155) Re'em, T.; Tsur-Gang, O.; Cohen, S. The Effect of Immobilized RGD Peptide in Macroporous Alginate Scaffolds on TGFβ1-Induced Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells. *Biomaterials* **2010**, *31* (26), 6746–6755. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.025>.
- (156) Zhang, Q.; Wang, J.; Cheng, B. Effect of MinTBP-1-RGD/Titanium Implant on Osseointegration in Rats. *Mater. Lett.* **2018**, *228*, 424–426. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.06.074>.
- (157) Chen, J.; Bly, R. A.; Saad, M. M.; Alkhodary, M. A.; El-Backly, R. M.; Cohen, D. J.; Kattamis, N.; Fatta, M. M.; Moore, W. A.; Arnold, C. B.; Marei, M. K.; Soboyejo, W. O. In-Vivo Study of Adhesion and Bone Growth around Implanted Laser Groove/RGD-Functionalized Ti-6Al-4V Pins in Rabbit Femurs. *Mater. Sci. Eng. C* **2011**, *31* (5), 826–832. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.12.019>.
- (158) Roberts, C.; Chen, C. S.; Mrksich, M.; Martichonok, V.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M. Using Mixed Self-Assembled Monolayers Presenting RGD and (EG)3OH Groups to Characterize Long-Term Attachment of Bovine Capillary Endothelial Cells to Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (26), 6548–6555. <https://doi.org/10.1021/ja972467o>.
- (159) Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H. RGD Modified Polymers: Biomaterials for Stimulated Cell Adhesion and Beyond. *Biomaterials* **2003**, *24* (24), 4385–4415.

- [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00343-0).
- (160) Quirk, R. A.; Chan, W. C.; Davies, M. C.; Tendler, S. J. B.; Shakesheff, K. M. Poly(L-Lysine)-GRGDS as a Biomimetic Surface Modifier for Poly(Lactic Acid). *Biomaterials* **2001**, *22* (8), 865–872. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00250-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00250-7).
- (161) Neff, J. A.; Caldwell, K. D.; Tresco, P. A. A Novel Method for Surface Modification to Promote Cell Attachment to Hydrophobic Substrates. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *40* (4), 511–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19980615\)40:4<511::AID-JBM1>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19980615)40:4<511::AID-JBM1>3.0.CO;2-I).
- (162) Elbert, D. L.; Hubbell, J. A. Conjugate Addition Reactions Combined with Free-Radical Cross-Linking for the Design of Materials for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (2), 430–441. <https://doi.org/10.1021/bm0056299>.
- (163) Stile, R. A.; Healy, K. E. Thermo-Responsive Peptide-Modified Hydrogels for Tissue Regeneration. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (1), 185–194. <https://doi.org/10.1021/bm0000945>.
- (164) He, X.; Alves, C. S.; Oliveira, N.; Rodrigues, J.; Zhu, J.; Bányai, I.; Tomás, H.; Shi, X. RGD Peptide-Modified Multifunctional Dendrimer Platform for Drug Encapsulation and Targeted Inhibition of Cancer Cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, *125*, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.11.004>.
- (165) Pandita, D.; Santos, J. L.; Rodrigues, J.; Pêgo, A. P.; Granja, P. L.; Tomás, H. Gene Delivery into Mesenchymal Stem Cells: A Biomimetic Approach Using RGD Nanoclusters Based on Poly(Amidoamine) Dendrimers. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (2), 472–481. <https://doi.org/10.1021/bm1012647>.
- (166) Song, H. Y.; Song, H. Y.; Ngai, M. H.; Song, Z. Y.; Macary, P. A.; Lear, M. J. Practical Synthesis of Maleimides and Coumarin-Linked Probes for Protein and Antibody Labelling via Reduction of Native Disulfides †. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (17), 3400–3406. <https://doi.org/10.1039/b904060a>.
- (167) Zhou, K.; Nguyen, L. H.; Miller, J. B.; Yan, Y.; Kos, P.; Xiong, H.; Li, L.; Hao, J.; Minnig, J. T.; Zhu, H.; Siegwart, D. J. Modular Degradable Dendrimers Enable Small RNAs to Extend Survival in an Aggressive Liver Cancer Model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (3), 520–525. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520756113>.
- (168) Mydlak, M.; Mauro, M.; Polo, F.; Felicetti, M.; Leonhardt, J.; Diener, G.; De Cola, L.; Strassert, C. A. Controlling Aggregation in Highly Emissive Pt(II) Complexes Bearing Tridentate Dianionic N<sup>N</sup>N Ligands. Synthesis, Photophysics, and Electroluminescence.

- Chem. Mater.* **2011**, *23* (16), 3659–3667. <https://doi.org/10.1021/cm2010902>.
- (169) Monmoton, S.; Lefebvre, H.; Costa-Torro, F.; Fradet, A. Hyperbranched Poly[Bis(Alkylene)Pyridinium]S. *Macromol. Chem. Phys.* **2008**, *209* (23), 2382–2389. <https://doi.org/10.1002/macp.200800398>.
- (170) Xue, F.; Fang, J.; Delker, S. L.; Li, H.; Martásek, P.; Roman, L. J.; Poulos, T. L.; Silverman, R. B. Symmetric Double-Headed Aminopyridines, a Novel Strategy for Potent and Membrane-Permeable Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (7), 2039–2048. <https://doi.org/10.1021/jm101071n>.
- (171) Sanning, J.; Stegemann, L.; Ewen, P. R.; Schwermann, C.; Daniliuc, C. G.; Zhang, D.; Lin, N.; Duan, L.; Wegner, D.; Doltsinis, N. L.; Strassert, C. A. Colour-Tunable Asymmetric Cyclometalated Pt(II) Complexes and STM-Assisted Stability Assessment of Ancillary Ligands for OLEDs. *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4* (13), 2560–2565. <https://doi.org/10.1039/c6tc00093b>.
- (172) Kucheryavy, P.; Li, G.; Vyas, S.; Hadad, C.; Glusac, K. D. Electronic Properties of 4-Substituted Naphthalimides. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113* (23), 6453–6461. <https://doi.org/10.1021/jp901982r>.
- (173) Grabchev, I.; Konstantinova, T. Synthesis of Some Polymerisable 1,8-Naphthalimide Derivatives for Use as Fluorescent Brighteners. *Dye. Pigment.* **1997**, *33* (3), 197–203. [https://doi.org/10.1016/S0143-7208\(96\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S0143-7208(96)00053-8).
- (174) Alexiou, M. S.; Tychopoulos, V.; Ghorbanian, S.; Tyman, J. H. P.; Brown, R. G.; Brittain, P. The UV-Visible Absorption and Fluorescence of Some Substituted 1,8-Naphthalimides and Naphthalic Anhydrides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1990**, *2*, 837–842. <https://doi.org/10.1039/P29900000837>.
- (175) Collado, D.; Remón, P.; Vida, Y.; Najera, F.; Sen, P.; Pischel, U.; Perez-Inestrosa, E. Energy Transfer in Aminonaphthalimide-Boron-Dipyrromethene (BODIPY) Dyads upon One- and Two-Photon Excitation: Applications for Cellular Imaging. *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 979–804. <https://doi.org/10.1002/asia.201301334>.
- (176) Horcas, I.; Fernández, R.; Gómez-Rodríguez, J. M.; Colchero, J.; Gómez-Herrero, J.; Baro, A. M. WSXM: A Software for Scanning Probe Microscopy and a Tool for Nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, *78* (1). <https://doi.org/10.1063/1.2432410>.

## **RESUMEN**



Un dendrímero se describe generalmente como una macromolécula que se caracteriza por poseer una estructura tridimensional altamente ramificada, ordenada y controlada, lo que le proporciona un alto grado de funcionalidad superficial y versatilidad. Asimismo, un dendrón es como una porción en cuña de un dendrímero. El control de su estructura es la principal diferencia entre éstos y los polímeros convencionales.<sup>1</sup>

Los dendrímeros han sido objeto de numerosos estudios debido a sus propiedades intrínsecas únicas. El término dendrímero hace referencia a la similitud de su estructura con la copa de un árbol. Tiene su origen en el griego, donde la palabra *dendron* significa *árbol* mientras que la palabra *méros* significa *parte*.

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis ha centrado su investigación en los últimos años en el estudio de estructuras dendriméricas con potenciales aplicaciones en dos áreas biomédicas: en el estudio de las reacciones adversas a fármacos (RAF), y en los procesos de regeneración tisular empleando células madre mesenquimales (MSC). Inicialmente, para estos estudios se han empleado dendrímeros comerciales PAMAM. Posteriormente, y debido a las necesidades que han ido surgiendo a lo largo de los años, el grupo se embarcó en el diseño y síntesis de nuevas estructuras dendriméricas amino terminales.

Las reacciones alérgicas a fármacos constituyen un problema sanitario importante ya que existe un gran desconocimiento sobre sus mecanismos. Esto se traduce en una ausencia de pruebas diagnósticas suficientemente sensibles y específicas. Este problema se ha manifestado en numerosos foros científicos, existiendo un acuerdo unánime entre todas las partes interesadas en este problema (academia, industria, asociaciones de pacientes) para el desarrollo de iniciativas encaminadas a resolver dichas limitaciones. Actualmente nos enfrentamos a dos grandes problemas a la hora de abordar el estudio de los aspectos relacionados con la respuesta inmune (los procesos de reacción adversa a antígenos hapténicos -proceso alérgico- y en particular a fármacos):

- Menor sensibilidad de los métodos diagnósticos in vivo e in vitro que obliga a identificar las nuevas estructuras hapténicas que inducen las reacciones.
- Una retirada de los kits comerciales habiendo dejado un vacío que debe ser solucionado.

En el grupo de investigación se estudia la potencialidad de los dendrímeros para emular las proteínas portadoras endógenas, que conforman el conjugado hapteno-portador, el antígeno

responsable del proceso alérgico a medicamentos. Esta investigación pretende siempre abordar dos objetivos básicos:

- Disponer de una herramienta que nos permita estudiar el proceso de reconocimiento molecular antígeno-anticuerpo responsable de las reacciones alérgicas a medicamentos.
- Desarrollar test in vitro para la detección de las reacciones alérgicas a medicamentos.

Inicialmente, el grupo desarrolló su investigación empleando dendrímeros disponibles de forma comercial (en particular PAMAM).<sup>84-91</sup>

Los alentadores resultados obtenidos, motivaron el planteamiento de una serie de objetivos para avanzar en este área de trabajo. En primer lugar, se procedió a diseñar un nuevo tipo de dendrímero (dendrón) que representara un modelo versátil a la hora de incorporar determinadas funcionalidades en la estructura dendrimérica. Como resultado el grupo ha diseñado y patentado un nuevo modelo de dendrímero basado en el acoplamiento iterativo de unidades de 2,2-Bis(aminoalquil)propanamidas (BAPAD).<sup>103</sup> Este tipo de dendrímero se ha estudiado en una primera aproximación utilizando unidades de 2,2-Bis(aminometil)propanamidas. Una vez puesto de manifiesto la viabilidad de los dendrímeros BAPAD,<sup>104</sup> es necesario ampliar el campo de trabajo para poder extender la potencialidad de los mismos diseñando diferentes modelos y optimizando sus síntesis y caracterización. De esta manera, se conseguirá su aplicación en los estudios biomédicos que nos interesan. La síntesis del nuevo dendrímero BAPAD se abordó utilizando como sustrato de partida el ácido 3,3'-dicloropiválico. Los grupos amino que se obtienen de esta forma se encuentran en posiciones relativas 1,3 lo que, para determinadas aplicaciones, donde la funcionalización del dendrímero en su superficie requiere introducir grupos relativamente voluminosos, como pueden ser determinados determinantes antigénicos, supone un problema de reactividad dado la congestión estérica que se provoca.

Por otro lado, es necesario dotar a los procesos de regeneración tisular de herramientas adecuadas que permitan fijar las células en los sustratos adecuados para permitir su retención en el sitio apropiado para que se produzca el crecimiento celular y genere tejido. La adhesión intercelular por los derivados dendriméricos puede presentar ventajas sobre otros métodos utilizados en la actualidad, como es la inclusión de las células en polímeros o geles. Mientras que en estos métodos la difusión de las células es grande, apareciendo fenómenos de migración celular a otros tejidos, los métodos que mejor resultado están dando para aumentar la retención celular en la zona de implante, requieren de la funcionalización del polímero o gel con alguna unidad de reconocimiento celular. Sin embargo, la baja difusión de oxígeno en estos geles, entre otros factores, hace que las células localizadas hacia el exterior de la masa gel-célula pueda tener una aceptable oxigenación, mientras que en las zonas internas la menor difusión del oxígeno provoca que muchas de estas células mueran antes de que arraiguen, formen tejido, generen irrigación, etc.

El grupo de investigación en el que se ha realizado la tesis ha desempeñado estudios previos para verificar la posibilidad de preparar estructuras dendriméricas que soporten en su superficie la secuencia peptídica RGD como patrón de reconocimiento celular. Los estudios iniciales con el derivado PAMAM-G1-(RGD) sobre MSC han sido positivos, observándose procesos de fijación y crecimiento celular inusuales.<sup>96</sup> Asimismo, en el grupo se han empleado satisfactoriamente dendrímeros como soporte para el tripéptido RGD.<sup>94,100,105</sup> La posibilidad de modificar la naturaleza de las estructuras dendriméricas y controlar el número de grupos terminales en ellas, las convierte en una herramienta muy poderosa. Estudios previos han demostrado que los conjugados de dendrímeros PAMAM-RGD mejoran la eficacia de los fármacos hacia las dianas terapéuticas (*Drug Delivery*)<sup>164</sup> y pueden usarse como vectores de distribución.<sup>165</sup>

Así, los objetivos planteados para esta tesis son:

- Extender la síntesis de estructuras dendriméricas amino terminales para obtener compuestos más versátiles. De este modo, se propone la síntesis de dendrímeros y dendrones donde los grupos amino periféricos se encuentren en posiciones relativas 1-7, lo que formalmente implica la preparación de dendrímeros con brazos más largos y que podrán minimizar los problemas de congestión estérica.
- Modificar las estructuras dendriméricas con determinantes antigénicos derivados de penicilina para el estudio sobre la detección y el diagnóstico clínico de reacciones alérgicas a fármacos.
- La inserción de la secuencia peptídica RGD en estas nuevas estructuras para el estudio en procesos de reconocimiento y fijación celular que puedan ser útiles en procesos biotecnológicos de regeneración tisular.
- Combinar las estructuras dendriméricas con marcadores fluorescentes para obtener así unidades que interactúen con sistemas biológicos que presenten propiedades luminiscentes apropiadas.

### **1. Síntesis y caracterización de nuevas estructuras dendriméricas amino terminales.**

En este trabajo se ha propuesto la síntesis, a través de una metodología divergente, de nuevos dendrímeros basados en enlaces amida con grupos amino terminales en los que la posición relativa de dichos grupos es 1-7, dando lugar a estructuras menos congestionadas.

La unidad estructural elegida de crecimiento (monómero) de estos dendrímeros es el ácido 5-amino-2-(3-aminopropil) pentanoico. Se ha elegido una única estructura tipo AB<sub>2</sub> sencilla que ya posee los grupos terminales en las posiciones relativas deseadas, mientras que el ácido carboxílico actúa como unidad de conexión. La ruta sintética diseñada para la obtención de este monómero consta

de cuatro etapas en las que, inicialmente, se protege el grupo amino de la 3-bromopropilamina para dar lugar al compuesto **1**. Posteriormente se hace reaccionar **1** con di-*tert*-butil malonato dando como resultado el compuesto **2**, cuyo tratamiento en medio ácido a alta temperatura da lugar a **3**. Por estrategia sintética, es necesario que los grupos amino de este monómero se encuentren protegidos, de modo que, se lleva a cabo la protección de los grupos aminos de **3** para originar el monómero deseado **4**.

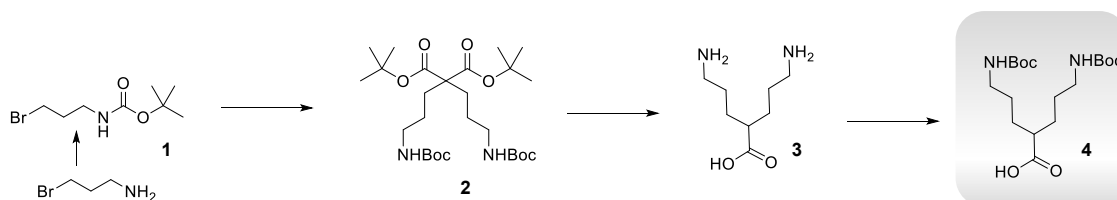


Figura 365. Esquema sintético del monómero o unidad de crecimiento (**4**)

Para la formación de la estructura dendrímica de primera generación (Figura 366), se lleva a cabo el acoplamiento entre dos unidades de monómero **4** y etilendiamina, elegida como núcleo del dendrímico. Para ello, se realiza un paso intermedio de activación del grupo ácido carboxílico de **4** originando el compuesto **5**.

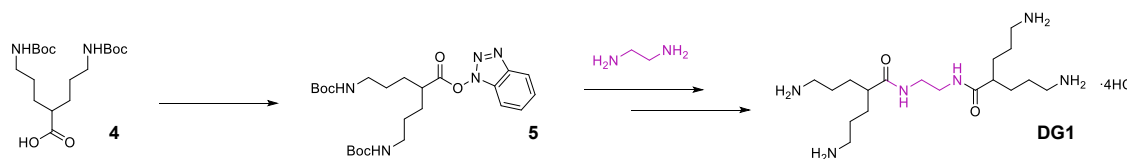


Figura 366. Esquema sintético de **DG1**

La ruta sintética para la obtención de generaciones superiores, esquematizada en la Figura 367, se basa en la sucesión de dos pasos:

- Acoplamiento entre el monómero activado (**5**) y los grupos amino periféricos del dendrímico mediante la formación de enlaces tipo amida.
- Desprotección de los grupos amino terminales.

Así, mediante reacciones iterativas de acoplamiento/desprotección se ha conseguido sintetizar hasta la quinta generación de esta familia de dendrímicos de poliamida, donde el número de grupos amino terminales se va duplicando con el aumento de las generaciones. Por tanto, se han sintetizado estructuras dendrímicas con 4, 8, 16, 32 y 64 grupos amino periféricos.

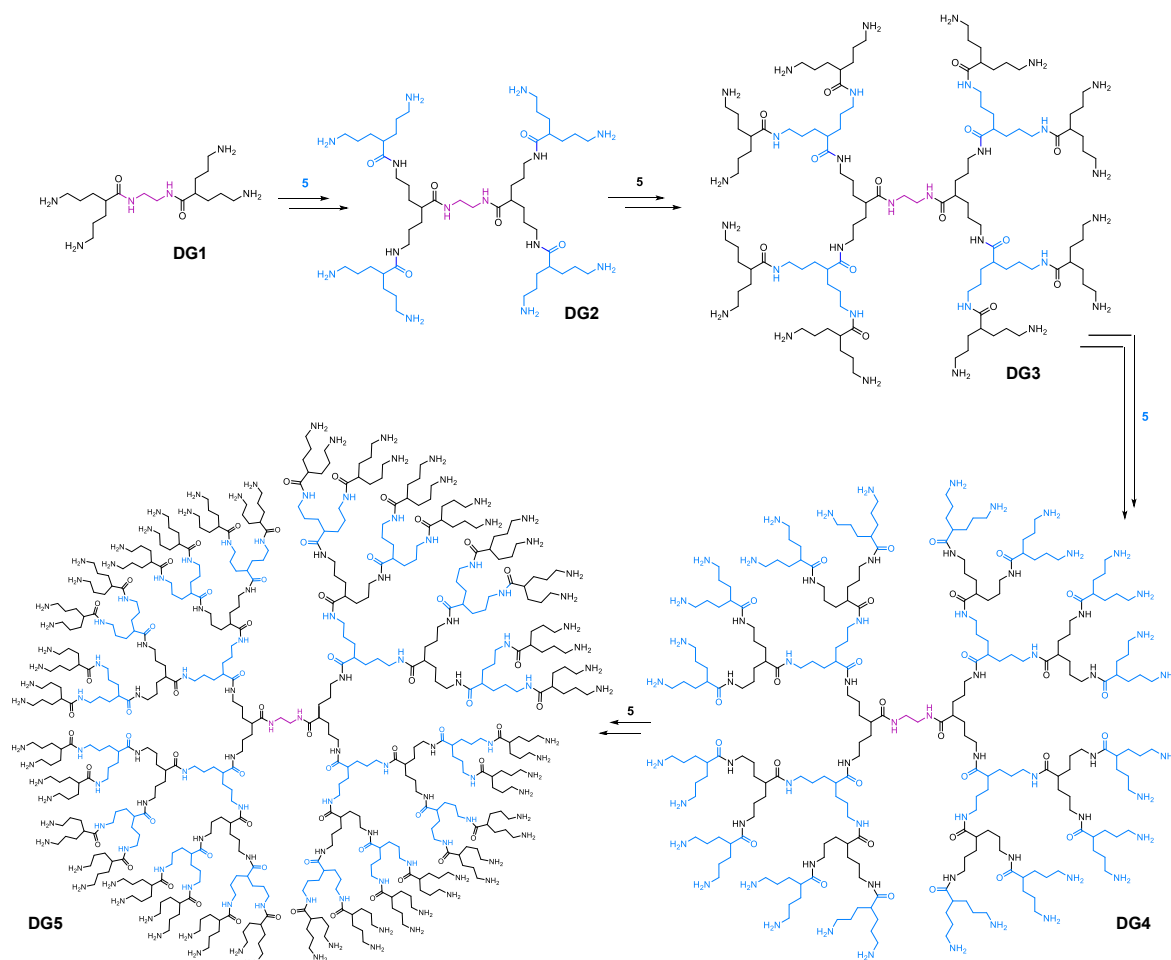


Figura 367. Esquema sintético para la preparación de los dendrímeros **DG1-DG5**

De manera paralela y debido al interés en estructuras dendriméricas estables, biocompatibles, solubles en agua y que minimicen los efectos estéricos a la hora de incorporar otras funcionalidades en su superficie, también se ha propuesto la síntesis de dendrones con la misma unidad estructural en la que los grupos amino superficiales quedan en posiciones relativas 1,7. De este modo se ha diseñado y optimizado la síntesis de tres familias de dendrones con el mismo esqueleto, pero con diferentes grupos funcionales en la posición del punto focal, lo que los hace extremadamente versátiles para diferentes aplicaciones.

En la Figura 368 se muestran los dendrones sintetizados en este trabajo donde los puntos focales varían entre: Ácido carboxílico (protegido con el grupo bencilo), grupo alquino y grupo azida. En todos los casos se ha sintetizado y caracterizado hasta la generación 3, con 8 grupos amino terminales, obteniéndose los dendrones en escala de gramos y con buenos rendimientos en todos los casos.

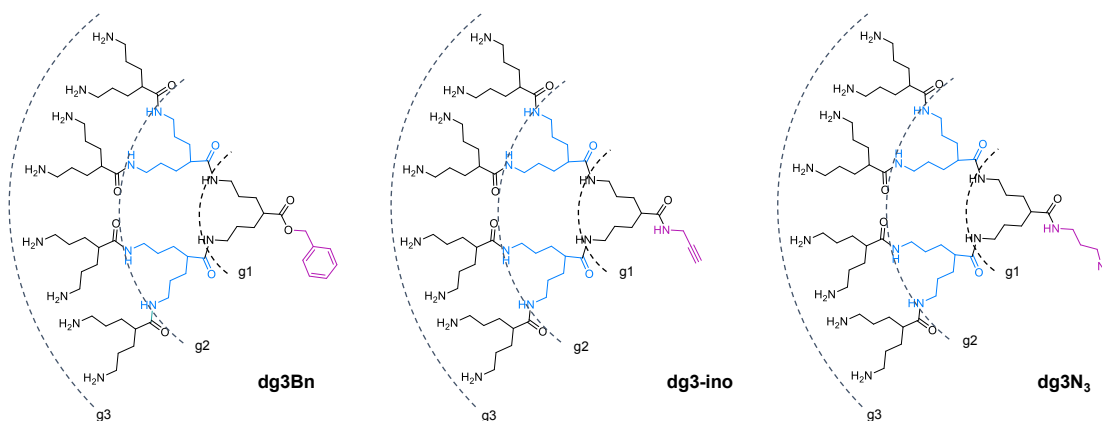


Figura 368. Dendrones sintetizados: **dg3Bn**, **dg3-ino** y **dg3N<sub>3</sub>**

En este trabajo se ha diseñado una metodología sintética eficiente y versátil para preparar estructuras dendriméricas basadas en enlaces tipo amida, donde la escala de gramo se logra fácilmente con rendimientos muy buenos. Además, sólo son necesarios procesos de purificación a partir de la segunda generación, y éstos son muy sencillos tanto para las estructuras con los grupos amino terminales libre como protegidos

Se ha llevado a cabo el diseño, la síntesis, purificación y caracterización de una familia de 5 generaciones de dendrímeros amino terminales basados en enlaces tipo amida. Se han realizado numerosos intentos para optimizar los procesos de acoplamiento/desprotección de esta ruta sintética y finalmente se ha conseguido poner a punto una metodología eficaz empleando reactivos sencillos y económicos, obteniéndose rendimientos superiores al 90% sin necesidad de procesos de purificación tediosos. Se ha propuesto una ruta sintética de pocos pasos, en la que el crecimiento de cada generación consta sólo de dos etapas, una de acoplamiento y otra de desprotección de los grupos amino terminales. El uso de una única unidad de crecimiento (**5**) en la síntesis ha evitado la necesidad de construir una familia de diferentes monómeros, al tiempo que simplifica la estructura final del dendrímero. Esta metodología sintética constituye una forma fácil y eficaz para la preparación de dendrímeros basados en enlaces tipo amida.

Estos dendrímeros solubles en agua son aparentemente estables ya que se han realizado estudios de estabilidad con el dendrímero de mayor generación (**DG5**) sin observarse degradación del mismo. Las estructuras preparadas se han caracterizado y evaluado mediante espectrometría de masas (ESI y MALDI-TOF), resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, COSY, HSQC, DOSY), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), y microscopía de fuerza atómica (AFM). También se han realizado simulaciones de dinámica molecular (SDM) con el resultado de valores concordantes con los determinados experimentalmente.<sup>141</sup>

Del mismo modo, se han obtenido los correspondientes dendrones con diferentes grupos funcionales en el punto focal, proporcionando así distinta reactividad y, por tanto, ampliando el rango

de potenciales aplicaciones. Estos dendrones han sido completamente caracterizados por resonancia magnética nuclear.

## 2. Síntesis de dendrímeros antigénicos para la detección de alergia a fármacos

Uno de los mayores retos para el diagnóstico de alergia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos *in vitro* consiste en emular los procesos de reconocimiento molecular que tienen lugar *in vivo* entre el conjugado hapteno-portador y los anticuerpos.

En este caso se propone la síntesis del conjugado hapteno-portador, empleando como macromolécula portadora los nuevos dendrímeros sintetizados en este trabajo. Estos dendrímeros serían los sustitutos de las proteínas globulares en inmunodiagnóstico. Las proteínas globulares son muy susceptibles a condiciones desnaturalizantes como temperatura, luz, y pH, por el contrario, los dendrímeros son inertes, con estructuras tridimensionales fijas. Estas propiedades hacen de estos compuestos candidatos idóneos para su empleo en inmunoensayo. La presencia de grupos aminos en su superficie permite la reacción con los anillos  $\beta$ -lactámicos presentes en las penicilinas y, además, son solubles en medio acuoso.

Se han sintetizado dos familias de dendrímeros antigénicos con distinto determinante antigénico en cada una de ellas, como son amoxiciloilo (AXO) y bencilpeniciloilo (BPO) (Figura 369). Para ello, se han llevado las reacciones en tampón carbonato empleando un exceso de fármaco. El tiempo de reacción es mayor cuanto mayor es la generación del dendrímero para así asegurar la funcionalización de todos los grupos amino terminales.

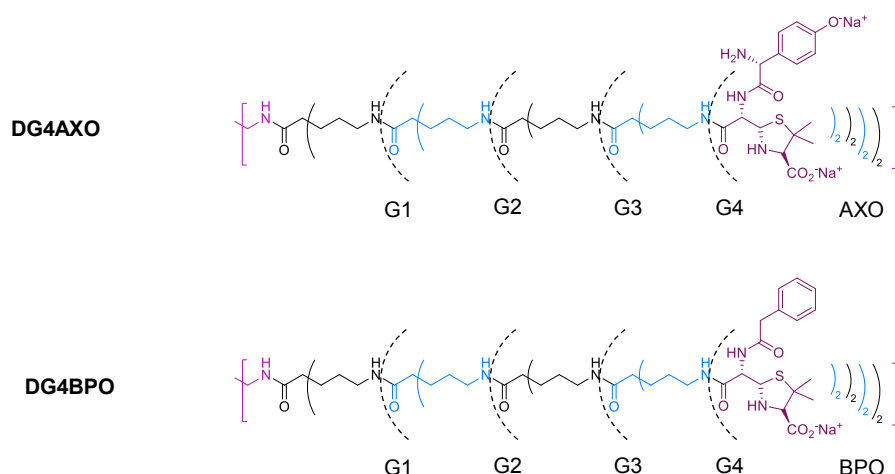


Figura 369. Estructuras abreviadas de **DG4AXO** y **DG4BPO**

Dentro de cada familia se han obtenido 4 generaciones de dendrímeros antigénicos, duplicándose el número de restos AXO y BPO en la periferia de dichas estructuras en cada generación. La síntesis de estos dendrímeros se ha obtenido con muy buenos rendimientos (entre 82% y 87%), y todos ellos

han sido completamente caracterizados por resonancia magnética nuclear (RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, DOSY) y HPLC.

### 3. Síntesis de estructuras RGD-Dendríméricas

Para alcanzar el objetivo de sintetizar dendrímeros que presenten en su periferia unidades de RGD, se ha propuesto la unión covalente de restos RGD-Cys mediante enlaces tipo amida a las estructuras dendríméricas sintetizadas en este trabajo.

Para ello, tras mucho esfuerzo empleado para la optimización de la síntesis, se ha llevado a cabo la reacción de los dendrímeros de primera y segunda generación con 2-(acrililoiloxi)etilmetacrilato (AEMA) previamente preparado<sup>167</sup> para, posteriormente, hacerlos reaccionar con RGD-Cys. Esta última reacción sucede entre el doble enlace terminal presente en la estructura dendrímica modificada y el grupo tiol presente en el resto de cisteína de RGD-Cys.

De este modo, se ha sintetizado una nueva estructura dendrímica con restos RGD en su periferia, duplicándose el número de grupos funcionales respecto al número de grupos amino terminales que posee el dendrímero de partida.

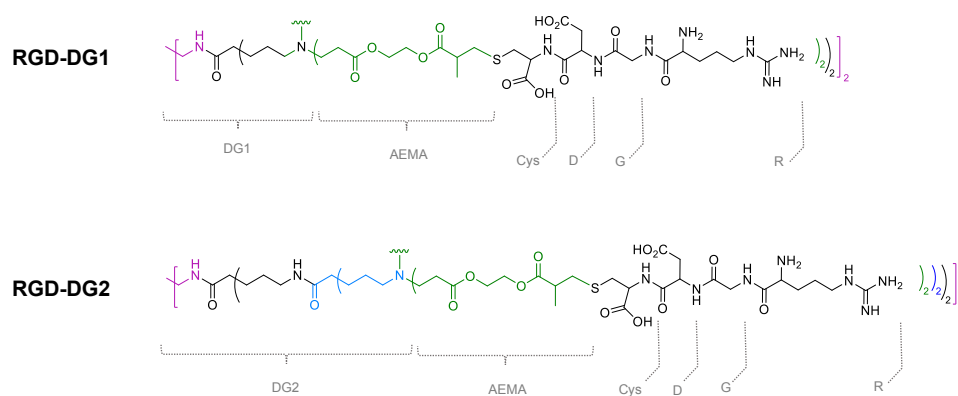


Figura 370. Estructuras simplificadas de **RGD-DG1** y **RGD-DG2**

### 4. Síntesis de dendrímeros luminiscentes como marcadores biológicos

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado la tesis ha sintetizado dendrímeros luminiscentes con excelentes propiedades para ser empleados como biomarcadores.<sup>104,106,116</sup> Así, debido a las potenciales aplicaciones en bioimagen de estos dendrímeros luminiscentes, se ha centrado el estudio en la síntesis y caracterización de nuevas estructuras dendríméricas, basadas en las nuevas estructuras desarrolladas en las que los grupos terminales se encuentran en posiciones relativas 1,7, pero con la inserción de un núcleo luminiscente.

Con el objetivo de introducir un núcleo fluorescente y debido a las potenciales aplicaciones luminiscentes de los derivados de naftalimida, se ha diseñado la estructura de un dendrímero cuyo núcleo está formado por 4-amino-1,8-naftalimida, otorgando excelentes propiedades luminiscentes a la estructura dendrímica.

La síntesis de este compuesto se lleva a cabo mediante la reacción tipo click entre el dendrón de segunda generación con un grupo alquino en el punto focal (**dg2-ino-NHBoc**) y el derivado de naftalimida (**7**), que seguido de la reacción de desprotección de los grupos amino, da lugar a **DG2Naft**.

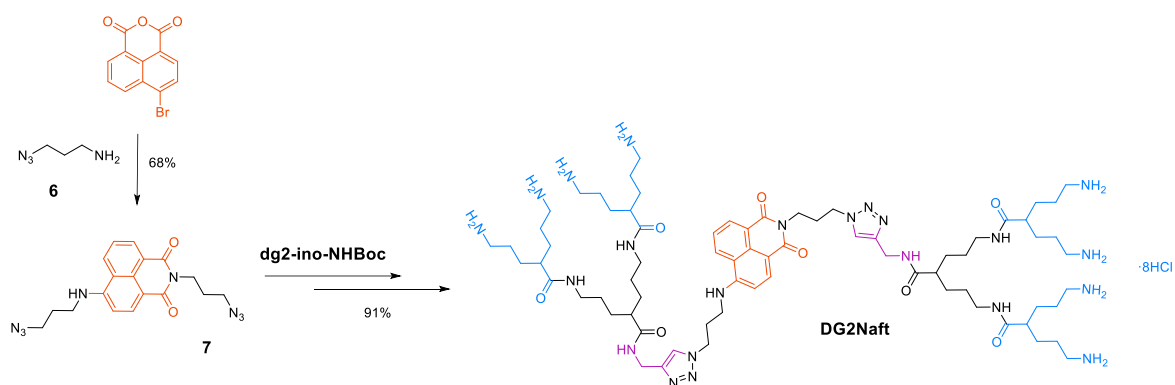


Figura 371. Esquema sintético de **DG2Naft**

Para llevar a cabo la síntesis del dendrímero fosforescente y debido a la experiencia del grupo de investigación, se ha elegido 3,5-bis(azidometil)piridina (**11**) como núcleo del dendrímero. Este compuesto actúa como punto de anclaje entre el dendrímero y el complejo de Pt (II).

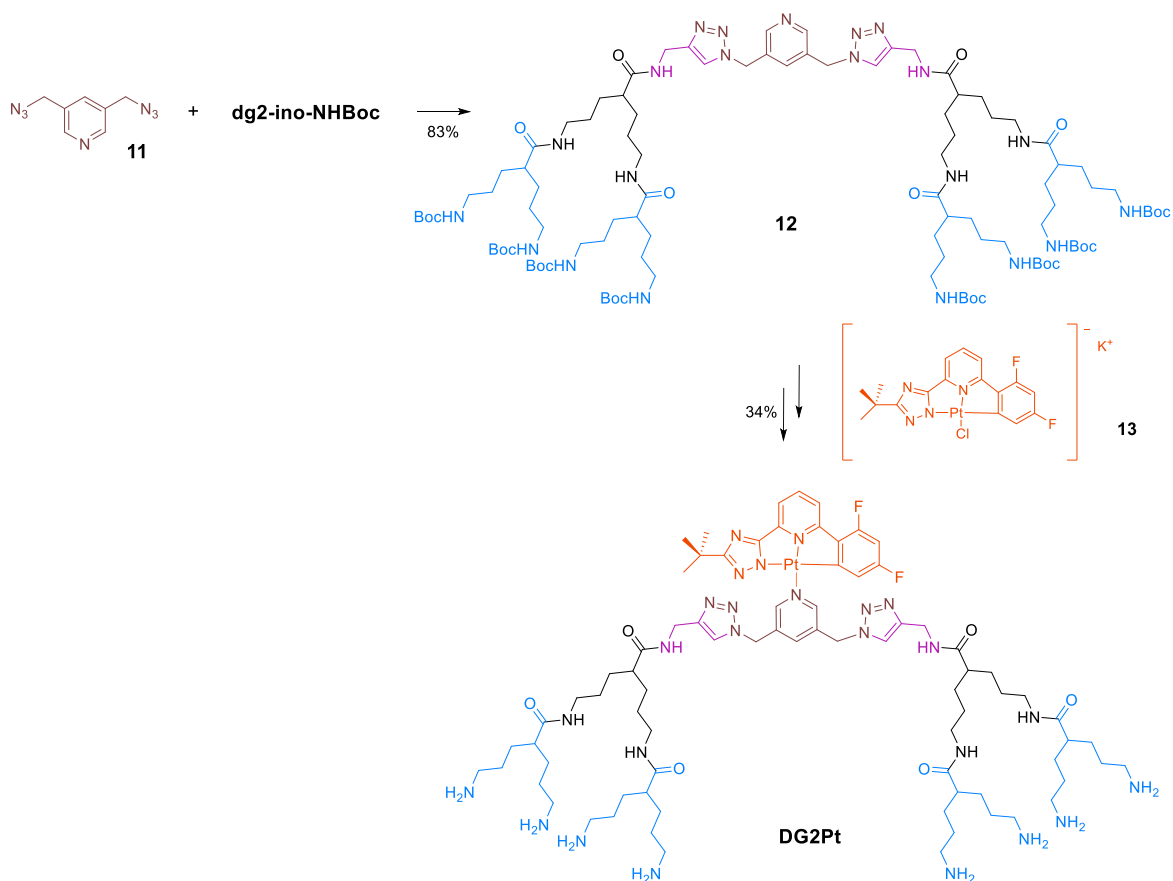


Figura 372. Esquema sintético de **DG2Pt**

Estos dendrímeros luminiscentes se han caracterizado mediante resonancia magnética nuclear (RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, DOSY), espectrometría de masas (MALDI) y HPLC. Además, se han analizado sus propiedades fotofísicas y se ha realizado un estudio en células mediante microscopía óptica con resultados que indican su acumulación, preferentemente en el citoplasma celular.