



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Universidad de Málaga

Facultad de Ciencias

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y

Química Orgánica

**SÍNTESIS Y ESTUDIO DE
DETERMINANTES ANTIGÉNICOS DE CEFALOSPORINAS Y
ANTÍGENOS DENDRIMÉRICOS DE PENICILINAS,
PARA LA DETECCIÓN DE IgE DIRIGIDAS A β -LACTAMAS.**

Memoria que para optar al grado de **Doctora en Química**

por la Universidad de Málaga presenta

María Isabel Montañez Vega

Málaga, Diciembre de 2006



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. **Rafael Suau Suárez**, Catedrático de Química Orgánica y D. **Ezequiel Pérez-Inestrosa**, Profesor Titular de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

Certifican:

Que la memoria adjunta, titulada “SÍNTESIS Y ESTUDIO DE DETERMINANTES ANTIGÉNICOS DE CEFALOSPORINAS Y ANTÍGENOS DENDRIMÉRICOS DE PENICILINAS, PARA LA DETECCIÓN DE IgE DIRIGIDAS A β -LACTAMAS”, que para optar al grado de Doctora presenta María Isabel Montañez Vega, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Química Orgánica de la Universidad de Málaga.

Considerando que constituye un trabajo de Tesis Doctoral, autorizamos su presentación en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

Y para que conste, firmamos el presente certificado en Málaga a Diciembre de 2006.

Fdo. Dr. Rafael Suau Suárez

Fdo. Dr. Ezequiel Pérez-Inestrosa

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado, ilusionado y ayudado durante la realización de esta Tesis Doctoral, sin ellos no habría sido posible la realización de esta memoria y, muy especialmente,

A los Dres. Rafael Suau y Ezequiel Pérez-Inestrosa, directores de esta Tesis, a quienes debo mi formación profesional. Mi más sincero agradecimiento por todo el entusiasmo y esfuerzo que le han dedicado a la realización de esta memoria, su ayuda, sus enseñanzas, su paciencia y la confianza depositada en mí.

A los profesores del Departamento de Química Orgánica, María Valpuesta, Rodrigo Rico, Rafael García, Gregorio Torres, M^a Soledad Pino, Francisco Sarabia, Juan Manuel López y Francisco Nájera, por la formación de ellos recibida durante los años de carrera y en el desarrollo de la presente memoria.

Al Dr. Blanca y su equipo de la Unidad de Investigación de Enfermedades Alérgicas (Complejo Hospitalario Universitario Carlos Haya), Lina Mayorga y M^a José Torres, entre otros, por estar dispuestos a resolver mis dudas en todo momento y por su valiosa colaboración con la evaluación de las estructuras sintetizadas en el desarrollo de esta memoria. Gracias a ellos, ya que sus estudios de validación clínica dan sentido y aplicación a este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Antonio Jesús, Diego, Jesús, Elena, Cristóbal, Javier, sobre todo a aquellos con los que he compartido incontables horas de laboratorio: Daniel, José María y, a mi compañera y amiga, Yolanda.

A mis compañeros del laboratorio de plantas, Amelia, Carmen, Manuela y Cristina.

A mis compañeros del laboratorio de azúcares, Laura, Samy, Antonio, Francisca, Miguel y Noé.

A nuestra secretaria, Isabel Viola, y a nuestro técnico siempre dispuesto a ayudarnos, José Beltrán.

A otros compañeros que se marcharon pero con los que me alegro de seguir en contacto de vez en cuando, Jose, Teresa, Sheima y Paco Sánchez.

I would like to acknowledge Prof. Donald Tomalia the opportunity to join his group and work with him in the exciting dendrimers field. I also want to thank all lab's members for their help during my 3 months stay at Central Michigan University, where I met very nice people: Linda, Shu, Corey and Lory, among others.

Al Dr. Paco Nájera por su ayuda en la realización de los espectros de masas.

Al Dr. Javier Sardina de la Universidad de Santiago de Compostela por los espectros de resonancia realizados.

A la Dr. Gloria Sancliments de la Universidad de Barcelona por los espectros de masas MALDI-TOF realizados.

Al Ministerio de Educación Cultura y Deporte por la beca predoctoral concedida

A mis amigos Carolina, Ana, Mónica, Victoria, Alonso, Ángel y Raquel, todos iniciamos juntos con ilusión nuestras carreras profesionales en la Universidad de Málaga; a mis amigas de toda la vida Rocío, Laura, Irene, Cristi, mi prima Isa, y a otros muchos, que son más recientes: Juanma, Toni, Noelia, Ana, Javi, Maika, Gabino, Beshi, ...no puedo nombrarlos a todos, con los que siempre he podido contar.

A mi primo Alfonso, gracias a su ayuda y la de los suyos en otros temas, he podido dedicar a esta tesis el tiempo que se merecía.

Gracias a mis padres, hermanos y abuelos, por los apoyos y ánimos dados siempre. A mis padres, quienes me estimularon siempre a superarme, por los valores que me han transmitido, por su ejemplo y apoyo invaluable. A mis hermanos, por su ayuda y por lo importante que son para mí. Gracias a toda mi familia por estar siempre ahí.

A Pablo, por la comprensión, el cariño y la paciencia mostrada durante todos estos años, por su apoyo, su confianza en mí y por su particular manera de ser incondicional conmigo.

A todos aquellos que de alguna manera han contribuido a la realización de esta memoria.

*A mi padre y a mi madre,
a mis hermanos y
a Pablo.*

Abreviaturas

a	Ancho
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AX	Amoxicilina
AXO	Amoxiciloilo
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
BP	Bencilpenicilina
BPO	Bencilpeniciloilo
c	Cuadruplete
CAN	Cerium (IV) Ammonium Nitrate
CDR	Complementarity Determining Region
CE	Capilar Electrophoresis
COSY	Correlated Spectroscopy
CPA	Células Presentadoras de Antígenos
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CPO	Cefalosporoilo
d	Doblete
δ	Desplazamiento químico
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
dd	Doble doblete
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
dt	Doble triplete
DTT	Ditiotreitol
EDCI	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM (IE)	Espectro de Masas por Impacto Electrónico
eq.	Equivalente
FAB	Fast Atom Bombardment
Fab	Fragment Antigen Binding
Fc	Fragment Crystallizable
FEIA	Fluorescente Enzyme ImmunoAssay
G	Generación
H2BC	Heteronuclear two Bond Correlation
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOBT	1-Hidroxibenzotriazol
H-P	Hapteno-Portador
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

Abreviaturas

HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
HSA	Human Serum Albumin
Ig	Inmunoglobulina
IgE	Inmunoglobulina Específica
IE	Impacto electrónico
J	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
NMM	<i>N</i> -Metilmorfolina
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ppm	Partes por millón
MALDI-TOF	Matrix Assisted Lasser Desorption Ionitation-Time Of Flight
MDM	Mezcla de determinantes menores
PAMAM	Poliamidoamina
PAGE	Polyacrilamide Gel Electrophoresis
PO	Peniciloilo
PEG	Polietilenglicol
PBS	Phosphate Buffer Saline.
PCC	Pyridinium Chlorochromate
PPI	Polipropilenimina
PLL	Poli-L-lisina
ppm	Partes por millón
q	Quintuplete
RAST	RadioAllergoSorbentTest
RcT	Receptor de células T
RIA	Radio Immuno Assay
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singlete
t	Triplete
TEA	Trietilamina
TEG	Tetraetilenglicol
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidinoxyl
THAP	TriHidroxyAcetoPhenone
TFA	Trifluoroacetic Acid
TMAPS	TrimetoxiAminoPropilSilano
Try	Tritilo

Índice

Introducción	1
El Sistema Inmunológico.....	4
Inmunoglobulinas.....	11
Unión de los anticuerpos a los antígenos.....	20
Enfermedades producidas por respuestas inmunológicas.....	26
Reacciones inmediatas alérgicas a β -lactamas.....	34
Objetivos	47
Capítulo I. Estudio de los determinantes antigénicos	55
I-1. Determinantes antigénicos de Penicilinas	57
1.1. Estudio de determinantes antigénicos de Bencilpenicilina	57
1.1.1. Estructura, características de RMN y estabilidad de Bencilpeniciloato sódico (2)	57
1.1.2. Aminólisis de bencilpenicilina: Obtención de 6	65
1.2. Estudio de determinantes antigénicos de Amoxicilina	69
1.2.1. Estructura, características de RMN y estabilidad del ácido amoxiciloico (5)	69
1.2.2. Aminólisis de Amoxicilina: Obtención de 7	74
I-2. Determinantes antigénicos de Cefalosporinas	77
2.1. Antecedentes	77
2.2. Determinantes antigénicos de Cefalosporinas: Degradación	89
2.2.1. Reactividad de nucleófilos con Cefalosporinas	89
2.2.2. Ensayos clínicos	94
2.3. Determinantes antigénicos de cefalosporinas: Síntesis	98
2.3.1. Fragmentos A y Fragmentos B	101
2.3.1.1. Esquema sintético de las aminas precursoras (Fragmento B)	101
2.3.1.2. Protección de las cadenas laterales: c, d y e (Fragmento A)	102
2.3.2. Estructuras hapténicas tipo 31 con grupo G = CH₃	104
2.3.2.1. Síntesis de la amina 46	105
2.3.2.2. Síntesis de Z-38	105
2.3.2.3. Estudios inmunológicos: Confirmación de que la estructura se reconoce	112
2.3.3. Estructuras hapténicas tipo 31 con grupo G = CH₂OH	115
2.3.3.1. Síntesis de la amina 52	115
2.3.3.2. Síntesis de Z-53	115
2.3.3.3. Síntesis de 56	118
2.3.3.4. Síntesis de 58	118
2.3.3.5. Síntesis de 60	119

2.3.3.6. Síntesis de 62 ..	120
2.3.3.7. Síntesis de 64	121
2.3.3.8. Estudios inmunológicos: Influencia del grupo G.....	122
2.3.4. Síntesis de estructuras hapténicas tipo 31 con grupo G = CH ₂ SH.....	125
2.3.4.1. Síntesis de la amina 75 ..	127
2.3.4.2. Síntesis de Z-77	128
2.3.4.3. Síntesis de 79	130
2.3.4.4. Síntesis de 72	131
2.3.4.5. Síntesis de 84	132
2.3.4.6. Síntesis de 87	134
2.3.4.7. Síntesis de 89	136
2.3.4.8. Estudios inmunológicos: Influencia del grupo G.....	137
2.3.5. Síntesis de estructuras tipo 31 con G = CHO.....	139
2.3.5.1. Síntesis de la amina 93	139
2.3.5.2. Síntesis de Z-95	142
2.3.5.3. Síntesis de 97	145
2.3.5.4. Síntesis de 99	145
2.3.5.5. Síntesis de 100	146
2.3.5.6. Desprotección del grupo dimetilacetal en estructuras tipo 31	147
2.3.5.7. Oxidación de estructuras tipo 31 con G = CH ₂ OH.....	149
2.3.6. Discusión de los resultados obtenidos por inhibición de RAST.....	150
Capítulo II. Conjugados Hapteno-Portador	155
Dendrímeros.....	157
Diagnóstico de alergia a fármacos.....	171
II-1. Obtención de antígenos dendriméricos	174
1.1. Obtención de antígenos dendriméricos de bencilpenicilina. ..	175
1.1.1. Preparación del conjugado G₀BPO₄ (101)	176
1.1.2. Preparación del conjugado G₁BPO₈ (102)	180
1.1.3. Preparación del conjugado G₂BPO₁₆ (103)	181
1.1.4. Preparación de G_nBPO (n = 3-6): 104, 105, 106 y 107	185
1.1.5. Ensayos de inhibición del RAST de los antígenos dendriméricos 101-107	192
1.2. Obtención de antígenos dendriméricos de amoxicilina	194
1.3. Primera aproximación a la obtención de antígenos dendriméricos mixtos	198
II-2. Antígenos dendriméricos sintéticos acoplados a fase sólida	201
2.1. Antígenos dendriméricos acoplados a fase sólida: Tipo A	202

2.1.1. Obtención.....	202
2.1.2. Caracterización.....	203
2.1.3. Evaluación de discos D-5 : Ensayos in vitro mediante RAST.....	207
2.2. Antígenos dendriméricos acoplados a fase sólida: Tipo B.....	209
2.2.1. Obtención.....	210
2.2.2. Evaluación de discos D-9 : Ensayos in vitro mediante RAST.....	211
2.3. Antígenos dendriméricos acoplados a fase sólida: Tipo C.	212
2.3.1. Obtención.....	214
2.3.2. Caracterización.....	215
2.4. Antígenos sintéticos acoplados a fase sólida: Tipo D.....	217
2.4.1. Obtención.....	218
2.4.2. Caracterización.....	220
2.5. Comparación de los diferentes métodos de activación de la superficie.....	222
2.6. Evaluación de discos preparados con el método C y D y comparación con los obtenidos por el método A: Ensayos in vitro mediante RAST.....	224
Conclusiones.....	227
Parte Experimental.....	233
Síntesis del Capítulo I-1: Aminólisis de penicilinas.....	237
1. (2 <i>R</i> , 4 <i>S</i>)-2-[(1 <i>R</i>)-(Butilamino)(oxo)-1-[(fenilacetil)amino]etil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolano-4-carboxilato sódico (6).....	237
2. (2 <i>R</i> , 4 <i>S</i>)-2-[(1 <i>R</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-Amino(4-hidroxifenil)acetil]amino}(butilamino)(oxo)etil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolano-4-carboxilato sódico · Butilamina (7).....	238
Síntesis del Capítulo I-2: Estructuras tipo 31.....	239
1. Síntesis de las aminas precursoras.....	239
1.1. Hidrocloruro de <i>N</i> ¹ -butil-L-alaninamida (46).....	239
1.2. Hidrocloruro de <i>N</i> ¹ -butil-L-serinamida (52)	240
1.3. <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ^{1'} -Dibutyl-L-cistinadiamida (75).....	242
1.4. 2-Amino- <i>N</i> ¹ -(butil)-3,3-dimetoxipropanamida (93)	244
2. Protección de las cadenas laterales.....	247
2.1. Acido 2-(<i>Z</i> -metoxiimino)-2-[2-(tritolamino)-1,3-tiazol-4-il]acético (33).....	247
2.2. <i>N-tert</i> -Butoxicarbonil-D-fenilglicina (35).....	248
2.3. <i>N-tert</i> -Butoxicarbonil-D-4-hidroxifenilglicina (37).....	249
3. Síntesis de estructuras hapténicas tipo 31 con grupo G= CH ₃	250
3.1. <i>N</i> ¹ -Butil- <i>N</i> ² -[2-furil(<i>Z</i> -metoxiimino)acetil]-L-alaninamida (Z-38).....	250

4. Síntesis de estructuras hapténicas tipo 31 con grupo G= CH ₂ OH.....	254
4.1. N ¹ -Butil-N ² -[2-furil(Z-metoxiimino)acetil]-L-serinamida (Z-53).....	254
4.2. N ¹ -Butil-N ² -(2-tienilacetil)-L-serinamida (56).....	257
4.3. N ² -[(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(Z-metoxiimino)acetil]-N ¹ -butil-L-serinamida (58).....	258
4.4. Hidrocloruro de (2S)-N ² -[(2R)-amino(fenil)acetil]-N ¹ -butil-L-serinamida (60).....	260
4.5. Hidrocloruro de (2S)-N ² -{[(2R)-amino(4-hidroxifenil)acetil]amino}-N ¹ -butil-serinamida (62).....	262
4.6. (2R)-N ¹ -Butil-N ² -[(2R)-hidroxi(fenil)acetil]-serinamida (64).....	263
5. Síntesis de estructuras hapténicas tipo 31 con grupo G= CH ₂ SH.....	264
5.1. N ¹ -Butil-N ² -[2-furil(Z-metoxiimino)acetil]-L-cisteinamida (Z-77).....	264
5.2. N ¹ -Butil-N ² -(2-tienilacetil)-L-cisteinamida (79).....	266
5.3. N ² -[(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(Z-metoxiimino) acetil]-N ¹ -butil-L-cisteinamida (72).....	268
5.4. (2R)-N ¹ -Butil-N ² -[(2R)-amino(fenil)acetil]-L-cisteinamida (84).....	271
5.5. Hidrocloruro de (2R)-N ² -[(2R)-amino(4-hidroxifenil)acetil]amino}-N ¹ -butil-cisteinamida (87).....	274
5.6. (2R)-N ¹ -Butil-N ² -[(2R)-hidroxi(fenil)acetil]-cisteinamida (89).....	277
6. Síntesis de estructuras tipo 31 con grupo G= C(OCH ₃) ₂	279
6.1. N ¹ -(Butil)-2-{[2-furil(Z-metoxiimino)acetil]amino}-3,3-dimetoxipropanamida (Z-95).....	279
6.2. N ¹ -Butil-2-[(2-tienilacetil)amino]-3,3-dimetoxipropanamida (97).....	282
6.3. 2-{[(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(Z-metoxiimino)acetil]amino}-N ¹ -butil-3,3- dimetoxipropanamida (99).....	283
6.4. N ¹ -Butil-2-{[(2R)-(tert)butoxicarbonilamino](fenil)acetil]amino}-3,3-dimetoxipropanamida (100).....	285
Síntesis del Capítulo II-1: Antígenos Dendríméricos	286
1. Preparación de antígenos dendríméricos G _n BPO.....	286
Procedimiento general para la síntesis de dendrímeros G _n BPO (n = 0-6), (101-107).....	286
1.1. Obtención de G ₀ BPO ₄ (101).....	286
1.2. Obtención de G ₁ BPO ₈ (102).....	287
1.3. Obtención de G ₂ BPO ₁₆ (103).....	288
1.4. Obtención de G ₃ BPO ₃₂ (104).....	289
1.5. Obtención de G ₄ BPO ₆₄ (105).....	290
1.6. Obtención de G ₅ BPO ₁₂₈ (106).....	291
1.7. Obtención de G ₆ BPO ₂₅₆ (107).....	291
2. Preparación de antígenos dendríméricos G _n AXO.....	292
Procedimiento general para la síntesis de dendrímeros G _n AXO (n = 1, 2), (108, 109).....	292

2.1. Obtención de G ₁ AXO ₈ (108).....	293
2.2. Obtención de G ₂ AXO ₁₆ (109).....	294
Síntesis del Capítulo II-2: Antígenos Dendriméricos-Fase Sólida.....	295
1. Síntesis de espaciadores: Obtención de 113 y 114	295
1.1. 1-(p-Bencilcloro)-13-(p-benzoil)-1,4,7,10,13-pentaoxatridecano (113).....	295
1.2. 1-(p-Bencilcloro)-13-(N-(trimetoxisililpropil)-p-benzoilamido)-1,4,7,10,13- pentaoxatridecano (114).....	296
2. Obtención de discos de celulosa acoplados a antígenos dendriméricos.....	297
2.1. Procedimiento tipo A.....	297
2.2. Procedimiento tipo B.....	299
2.3. Procedimiento tipo C.....	301
2.4. Procedimiento tipo D.....	303
2.5. Cuantificación del n° de aminos en fase sólida.....	304
Anexo I: Métodos Diagnósticos en Alergia a Fármacos.	305
Anexo II: Términos empleados en esta memoria.....	311
Anexo III: Cefalosporinas clínicamente más usadas.....	323

Introducción

El término *inmunidad* deriva de la voz latina *immunitas*, que se refiere a la protección frente a los procedimientos judiciales que se ofrecía a los senadores romanos durante el ejercicio de su cargo. Históricamente, inmunidad significa protección contra la enfermedad y, de forma más específica, frente a una enfermedad infecciosa. Las células y las moléculas responsables de la inmunidad forman el sistema inmunológico y la respuesta colectiva, y coordinada frente a sustancias extrañas, se denomina respuesta inmunológica.

Aunque los historiadores atribuyen con frecuencia a Tucúlides, durante el siglo V antes de Cristo en Atenas, la primera mención al término inmunidad en relación con una infección que él llamó “peste”, el concepto de inmunidad puede ser anterior, como hace pensar la costumbre que existía en la antigua China de proteger a los niños frente a la viruela, mediante la inhalación de polvos obtenidos a partir de lesiones cutáneas de pacientes que se recuperaban de la enfermedad.^{1,2}

¹ A. K. Abbas, A. H. Lichtman. *Inmunología Celular y Molecular*. Elseiver: Madrid, 2004.

² A. M. Silverstein. *History of Immunology*. Academic Press: San Diego, 1989.

El Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico es un sistema biológico complejo diseñado para protegernos de sustancias químicas, microorganismos y tumores. Este sistema de defensa está formado por numerosos componentes proteicos y celulares que interaccionan de una manera muy compleja para, fundamentalmente, preservar lo propio y neutralizar o destruir lo ajeno. A lo largo del proceso evolutivo, este sistema ha demostrado ser extraordinariamente eficiente en conservar la vida humana. Sin embargo, como parte de, o como consecuencia de, este sistema de protección, las respuestas inmunológicas han evolucionado a ser insuficientes o perjudiciales, conduciendo a enfermedades humanas. La alergia es un claro ejemplo de esta faceta del sistema inmunológico, una reacción exagerada en ciertos individuos por un mecanismo de defensa específico, respondiendo inapropiadamente cuando entra en contacto con sustancias que reconoce como extrañas, desencadenando molestos y a veces debilitantes efectos secundarios.³

La función principal del sistema inmunológico es proteger al organismo humano (el huésped) de sustancias extrañas o microbios infecciosos en su medio. Los patógenos que se encuentran en el medio amenazan al organismo con un gran espectro de mecanismos patológicos. Así, la respuesta inmunológica emplea un conjunto complejo de mecanismos de protección, para controlar y normalmente eliminar estos microorganismos o sustancias extrañas para el huésped. Todos estos mecanismos se basan en detectar características estructurales de los patógenos o sustancias extrañas que presentan diferencias de las células propias (células huésped). Esta discriminación "huésped-sustancia extraña" es esencial para permitir que el huésped elimine las sustancias ajenas sin causar un daño excesivo a sus propios tejidos.^{4,5}

³ W. T. Shearer, T. A. Fleisher. "The Immune System", en: E. Middleton, C. E. Reed, E. F. Ellis, N. F. Adkinson, J. W. Yunginger, W. W. Buss. *Allergy principles and practice*. Mosby: St Louis, 1998.

⁴ D. D. Chaplin. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117*, S430-435.

⁵ D. D. Chaplin. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *111*, S442-459.

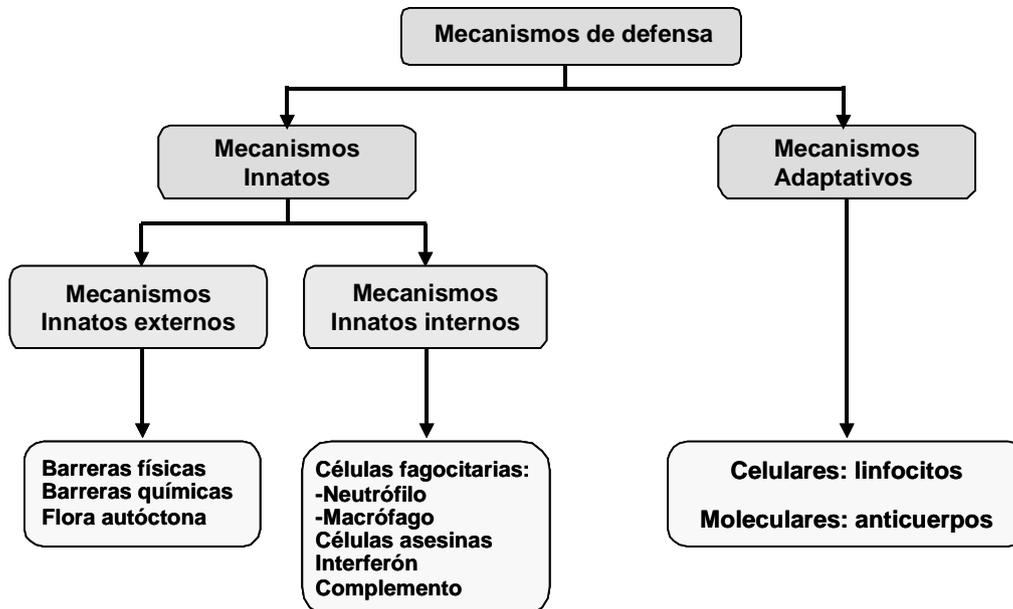


Figura 1. Esquema de la clasificación de las defensas del organismo.

Pueden distinguirse dos tipos generales de mecanismos de defensa (Figura 1) dependiendo de cómo se reconocen las estructuras extrañas: (1) *respuestas innatas o no específicas* que se codifican por genes de líneas germinales, que reconocen estructuras moleculares compartidas por muchos microorganismos, pero ausente en los huéspedes mamíferos, y (2) *respuestas específicas, adaptativas o adquiridas* que se codifican por genes elementales que somáticamente se reorganizan, para ensamblar antígenos (estructuras específicas que pertenecen a microbios o a otras sustancias extrañas) con moléculas que presenten una especificidad precisa por esos antígenos. De este modo, puede decirse que el que actúe un mecanismo de defensa u otro, depende de si se requiere o no estimulación por parte del antígeno para que el mecanismo de defensa particular funcione eficientemente.^{1,4,6} Las características y diferencias principales entre los dos tipos de respuestas se resumen en la Tabla 1.

	Innata	Adaptativa
Características		
Especificidad	Por estructuras compartidas por grupos de microbios relacionados entre si.	Por antígenos microbianos y no-microbianos.
Diversidad	Limitada; según línea germinal	Muy amplia; los receptores son producidos por recombinación de segmentos genéticos
Tiempo de respuesta	Hay respuesta inmediata	Hay un tiempo de retraso entre la exposición y la máxima respuesta
Memoria	No	Sí
Autorreactividad	No	Sí
Componentes		
Barreras físicas y químicas	Piel, epitelios de mucosas; químicos antimicrobianos	Linfocitos en epitelios; anticuerpos secretados en superficies epiteliales
Proteínas Sanguíneas	Complemento	Anticuerpos
Células	Fagocitos (macrófagos, neutrófilos), células asesinas (linfocitos NK)	Linfocitos en epitelios; anticuerpos secretados en superficies epiteliales

Tabla 1. Características y componentes de la Inmunidad Innata y la Inmunidad Adaptativa.

Las moléculas de reconocimiento del *sistema inmunológico innato* se expresan en una gran cantidad de células (Figura 2), por lo que este sistema actúa rápidamente después de la invasión de un patógeno, incluso antes de que produzca la infección. La inmunidad innata proporciona la primera línea de defensa frente a los microorganismos. Sin embargo, el *sistema inmunológico adaptativo* produce inicialmente sólo pequeñas cantidades de células con especificidad a cualquier patógeno individual o molécula extraña, por lo que las células que encuentran y reconocen un patógeno o sustancia extraña deben proliferar hasta alcanzar una cantidad suficiente que pueda lanzar una respuesta efectiva. De este modo, la respuesta adaptativa generalmente se expresa temporalmente después de la respuesta innata (Figura 3). Una característica clave de la respuesta adaptativa es que produce células de vida prolongada que permanecen en un estado aparentemente dormido, pero que pueden volver a expresar funciones efectoras rápidamente cuando se encuentren con sus antígenos por segunda vez. Esto permite a la

respuesta adaptativa expresar memoria inmunológica, la cual es responsable de la naturaleza más rápida y vigorosa de las respuestas secundarias al mismo antígeno.^{1,4,6}

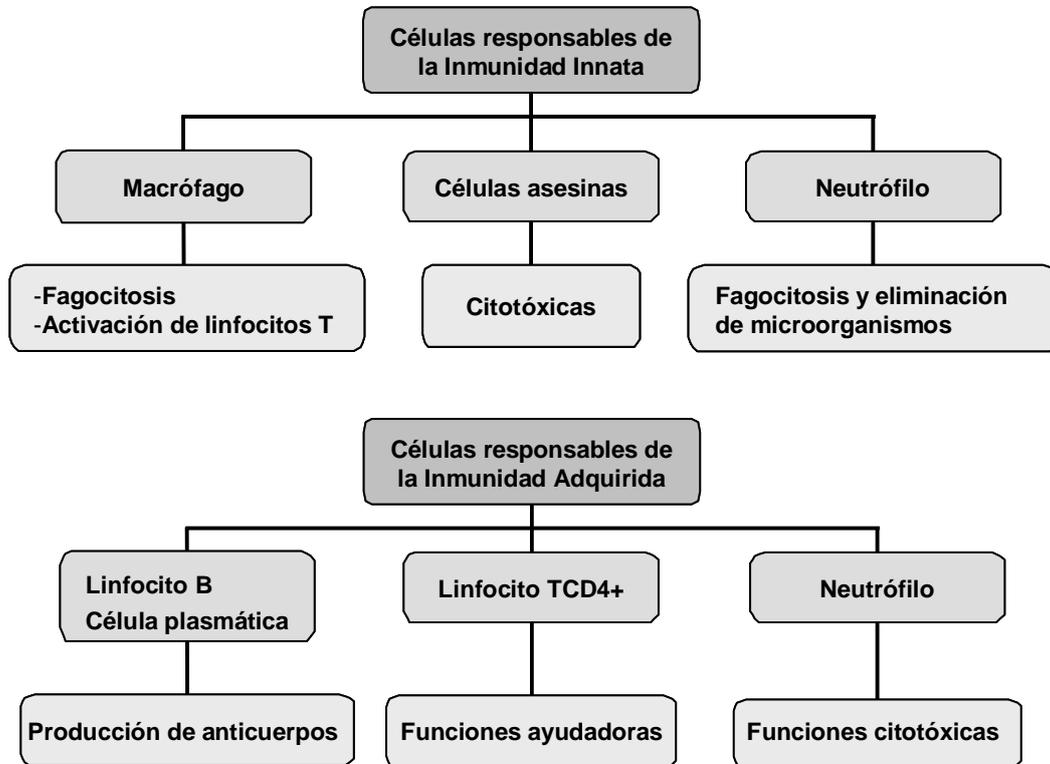


Figura 2. Esquema de las células responsables de los dos tipos de inmunidad y sus funciones.

A pesar de que el sistema inmunológico innato y el específico se describen a menudo como miembros separados de la respuesta inmunológica, normalmente actúan juntos, con la respuesta innata en primera línea de defensa y, la repuesta adaptativa que llega a ser sobresaliente después de varios días, cuando las células B y T específicas a antígenos han sufrido expansión clonal. Aunque las respuestas inmunológicas innatas y las adaptativas son diferentes en sus mecanismo de acción, el sinergismo entre ellas es esencial para una respuesta inmunológica totalmente efectiva.^{1,4,5}

⁶ S. C. Gilman, A. J. Jewis, P. H. Wooley "The Immune System" en: Vol. 1, C. Hansch, P. G. Sammes., J. B. Taylor "Comprehensive Medicinal Chemistry". Pergamon Press: Oxford, 1990. Pag. 223-238.

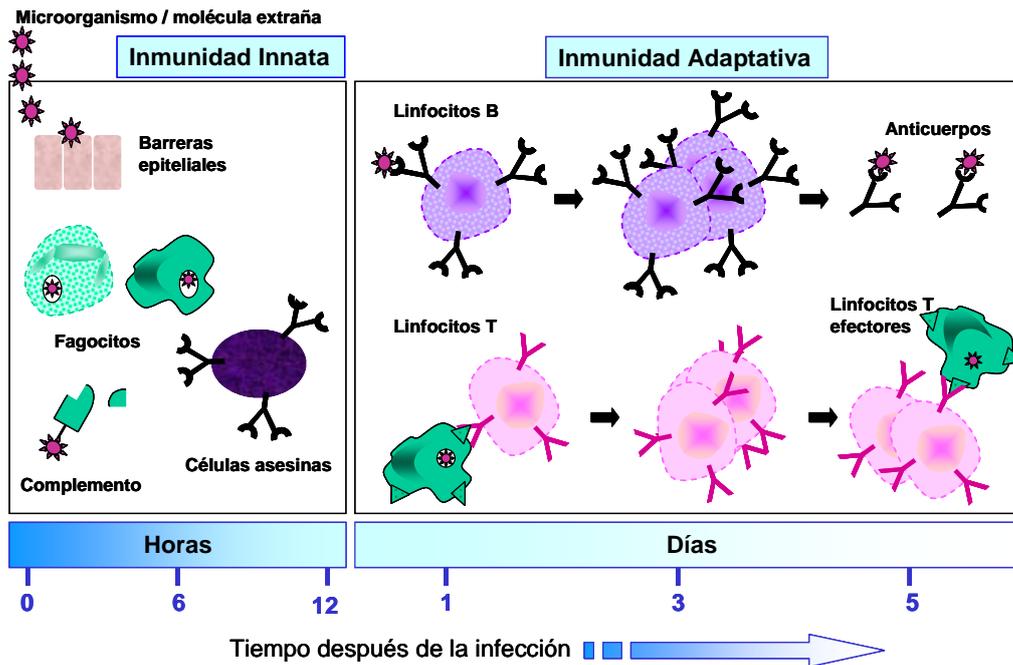


Figura 3. Inmunidad Innata y adaptativa. La cinética de las respuestas inmunológicas son aproximaciones y pueden variar en las distintas infecciones.

Inmunidad específica o adaptativa

Los organismos que desarrollan inmunidad específica reaccionan desencadenando dos tipos de respuesta, representadas en la figura 4: (1) *Inmunidad humoral*, respuesta mediada por los linfocitos B y sus productos de secreción, los anticuerpos, que actúa en la defensa contra los microorganismos y sustancias extrañas extracelulares; y (2) *Inmunidad celular*, respuesta mediada por los linfocitos T y sus productos, como las citoquinas, que resulta esencial en la defensa contra las estructuras extrañas y los microorganismos intracelulares. Ambas respuestas actúan coordinadamente contra los agentes patógenos circulantes, los que se encuentran en el interior de las células y las toxinas producidas por ellos.¹

Las respuestas inmunológicas específicas frente a antígenos extraños poseen unas características fundamentales (resumidas en la Tabla 2) que reflejan las propiedades de los linfocitos que median estas respuestas:

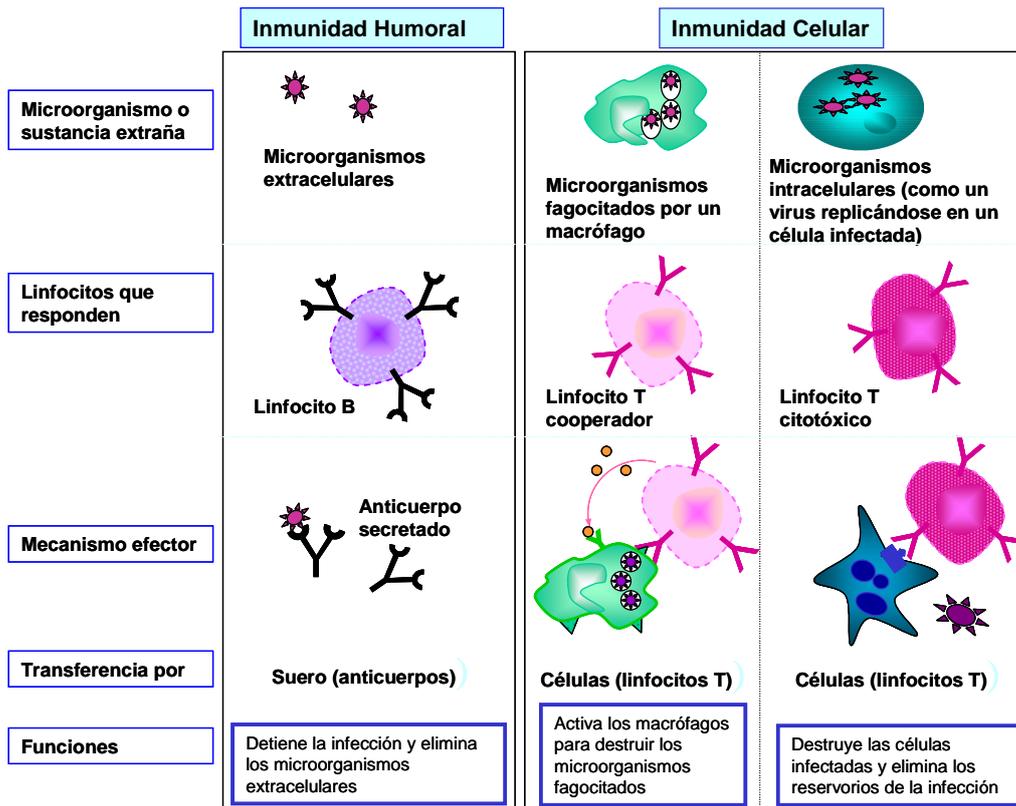


Figura 4. Tipos de inmunidad adaptativa. En la inmunidad humoral los linfocitos B sintetizan anticuerpos que evitan las infecciones y eliminan los microorganismos extracelulares. En la inmunidad celular, los linfocitos T activan los macrófagos para destruir los microorganismos fagocitados o, los linfocitos T citotóxicos destruyen directamente las células infectadas.

Especificidad por diferentes antígenos y, para las distintas regiones de antígenos macromoleculares (determinantes antigénicos). Esta especificidad existe porque cada linfocito expresa receptores de membrana que son capaces de distinguir diferencias estructurales mínimas entre los distintos antígenos. El número total de especificidades antigénicas de los linfocitos de una persona, denominado repertorio linfocítico, es muy amplio. Se calcula que el sistema inmunológico puede discriminar de 10^7 a 10^9 determinantes antigénicos diferentes. Esta propiedad se denomina *diversidad*, y es el resultado de la variabilidad de las estructuras de los lugares de fijación antígeno-anticuerpo de los receptores de los linfocitos para los antígenos.¹

Memoria, debida a que, con cada exposición a un antígeno, el clon de linfocitos específico para ese antígeno se expande. Además, la estimulación de los linfocitos (T o B maduros que no se ha encontrado aún con ningún antígeno) por los antígenos genera células de memoria de vida prolongada. Estas células de memoria tienen características

especiales que las hacen más eficaces en la eliminación del antígeno en comparación con los linfocitos que no han tenido un contacto previo con el antígeno.¹

Especialización, que se refiere a la forma especial y distinta con la que el sistema inmunológico responde a los diferentes microorganismos, lo que aumenta al máximo la eficacia de los mecanismos de defensa antimicrobianos.¹

Autolimitación. Todas las respuestas inmunológicas normales disminuyen con el tiempo después de la estimulación antigénica, de modo que el sistema inmunológico recupera su estado basal, un proceso denominado homeostasis. La homeostasis se mantiene en gran medida porque las respuestas inmunitarias están desencadenadas por los antígenos y su función es la eliminación del antígeno, lo que suprime el estímulo esencial para la activación de los linfocitos.^{1,5}

Tolerancia. Una de las características más notables de todo sistema inmunológico normal es su capacidad para reconocer, responder y eliminar antígenos extraños al tiempo que no reacciona de forma dañina frente a sustancias del propio organismo. La ausencia de esta respuesta inmunológica al huésped se denomina tolerancia. Las anomalías en el mantenimiento de la autotolerancia desencadenan respuestas inmunológicas contra moléculas o células del propio organismo, lo que originan trastornos denominados enfermedades autoinmunológicas.¹

Característica	Significado funcional
Especificidad	Respuestas específicas para cada antígeno específico
Diversidad	Permite al sistema inmunológico responder a una amplia variedad de antígenos
Memoria	Permite respuestas más eficientes y amplificadas ante la exposición de antígenos ya conocidos
Especialización	Genera respuestas que son adecuadas para defenderse contra diferentes tipos de microorganismos
Autolimitación	Regula la respuesta inmunológica para que el sistema pueda responder a nuevos antígenos
Tolerancia	Evita la lesión del huésped durante las respuestas frente a antígenos extraños

Tabla 2. Características de las respuestas inmunológicas adaptativas.

Las respuestas inmunológicas específicas pueden dividirse en distintas fases. Todas las respuestas inmunológicas comienzan con el reconocimiento específico de los antígenos. Este reconocimiento conduce a la activación de los linfocitos que reconocen al antígeno, que responden proliferando y diferenciándose en células efectoras, cuya función es eliminar el antígeno, y en células de memoria, las cuales exhiben una respuesta amplificada en contactos posteriores con el antígeno. Al término de una respuesta inmunológica, el sistema inmunológico recupera su estado basal de reposo.^{1,5}

Inmunoglobulinas

El acontecimiento más significativo en inmunología es el reconocimiento del antígeno. Sólo dos tipos de moléculas relacionadas pueden reconocer antígenos: son las inmunoglobulinas y las células T receptoras. Las inmunoglobulinas (Ig) pueden presentarse de dos formas: una asociada a membrana de células B que sirve como receptor de antígeno, y una forma secretada que media la respuesta inmunológica humoral.⁷

El anticuerpo está construido elegantemente para realizar sus dos funciones principales. Una parte de la molécula le confiere capacidad para reconocer y unir una enorme variedad de determinantes antigénicos. Una región diferente de la molécula de anticuerpo se implica en mediar los efectos biológicos de la manipulación de antígenos, a través de la interacción específica con proteínas huéspedes y células inflamatorias.⁷

Estructura de las inmunoglobulinas. Todas las moléculas de inmunoglobulinas comparten una estructura de cuatro polipéptidos (Figura 5), que consisten en dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos cadenas ligeras idénticas (L). Cada cadena ligera se une a una cadena pesada a través de enlaces disulfuros entre el último o penúltimo residuo carboxílico-terminal de cisteína de la cadena ligera y un residuo de cisteína de una de las cadenas pesadas. Las cadenas pesadas están unidas entre sí por un número

⁷ J. T. C. Li. "Immunoglobulin Structure and Function" en: E. Middleton, C. E. Reed, E. F. Ellis, N. F. Adkinson, J. W. Yunginger, W. W. Buss. *Allergy principles and practice*. Mosby: St Louis, 1998.

variable de puentes disulfuro. La estructura secundaria de la molécula se muestra en la Figura 6. Las interacciones no covalentes entre las cadenas ligeras y pesadas y entre ambas cadenas pesadas contribuyen significativamente a la estructura cuaternaria de esta molécula (Figura 7).⁷

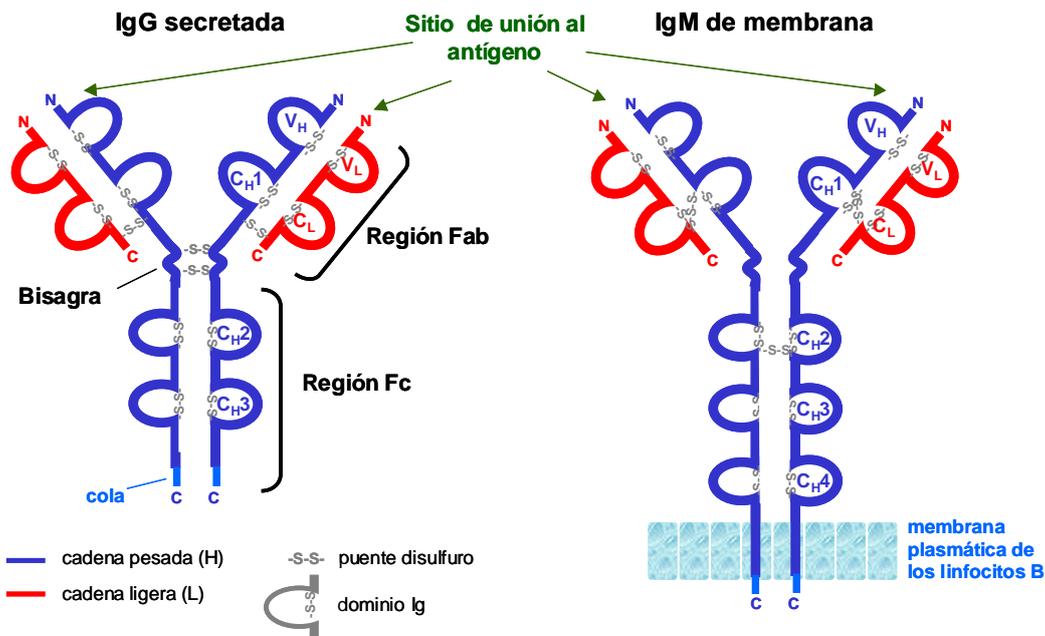


Figura 5. Diagrama esquemático de una molécula de IgG secretada y de una molécula de IgM unida a la membrana en la superficie de un linfocito B.

Tanto las cadenas ligeras como las pesadas contienen una serie de unidades homólogas que se repiten, cada una de unos 110 aminoácidos de longitud, y que se repliegan de forma independiente en una estructura globular denominada dominio Ig. Cada segmento contiene un puente disulfuro intracatenario formado por dos medios residuos de cisteína apartados por unos 60 aminoácidos. Una región o dominio Ig está formada por dos capas de láminas con plegamiento β , compuestas cada una de ellas de tres a cinco hebras de cadenas polipeptídicas antiparalelas (Figura 7). Otras muchas moléculas importantes en el sistema inmunológico contienen dominios que utilizan el mismo patrón de plegamiento y tienen secuencias de aminoácidos que son similares a las de las Ig, se cree que todas ellas han evolucionado de un gen ancestral precursor común.^{1,7}

La cadena ligera es un polipéptido con un peso molecular aproximado de 23000 Da y contiene unos 220 residuos de aminoácidos. La secuencia completa de una cadena ligera

se compone de dos dominios: uno variable en el extremo amino-terminal (V_L), y uno constante en el extremo carboxi-terminal (C_L).⁷ Cada cadena pesada tiene un peso molecular aproximado de 58000 Da, y se compone de cuatro o cinco dominios. La región N-terminal es variable y se designa como V_H . Los otros tres o cuatro dominios son constantes dentro de cada clase de inmunoglobulinas, y se designan como C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , y, cuando está presente, C_{H4} .^{6,7}

El plegamiento tridimensional de la molécula resulta en una interacción entre las dos regiones variables, lo que crea el sitio de unión al antígeno. La variabilidad de la secuencia de aminoácidos en la región variable justifica la gran variedad de antígenos que pueden reconocer y unirse al anticuerpo.⁷

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas, y el sitio de unión al grupo carbohidrato se limita generalmente a las regiones constantes de la cadena pesada.⁷

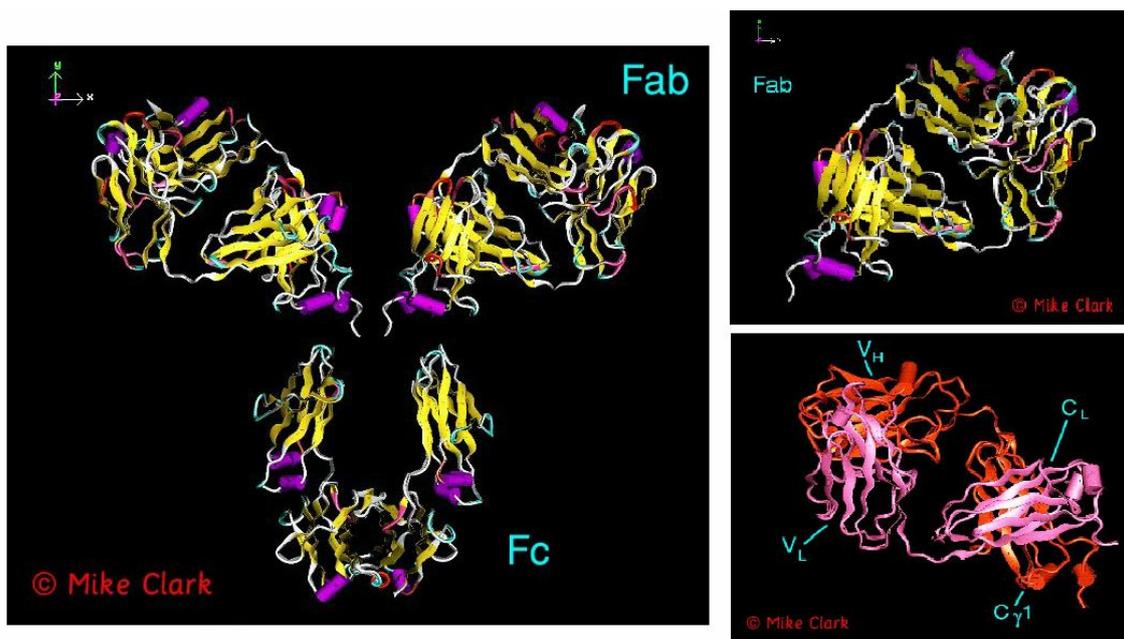


Figura 6. Representación de las estructuras secundarias: del modelo humano de IgG1 (izquierda), de uno de sus brazos Fab (derecha arriba), y del mismo brazo Fab girado 180° (derecha abajo), mostrando la cadena ligera en rosa y la pesada en rojo.

Región bisagra. Las Ig que contienen cuatro dominios también contienen un segmento entre los dominios C_{H1} y C_{H2} denominado región bisagra. Este segmento es rico en residuos de glicina y prolina, que contribuyen a la flexibilidad de la molécula de inmunoglobulina. Los brazos de la molécula de Ig que unen al antígeno rotan en la

región bisagra, permitiendo una configuración como de Y. Esta región es única para cada clase y subclase de cadena pesada, con longitud y secuencia variables. Las Ig cuyas cadenas pesadas están compuestas de cinco dominios no contienen una región bisagra. Sin embargo, la región C_{H2} de estas moléculas ofrecen la misma función a la molécula.⁷

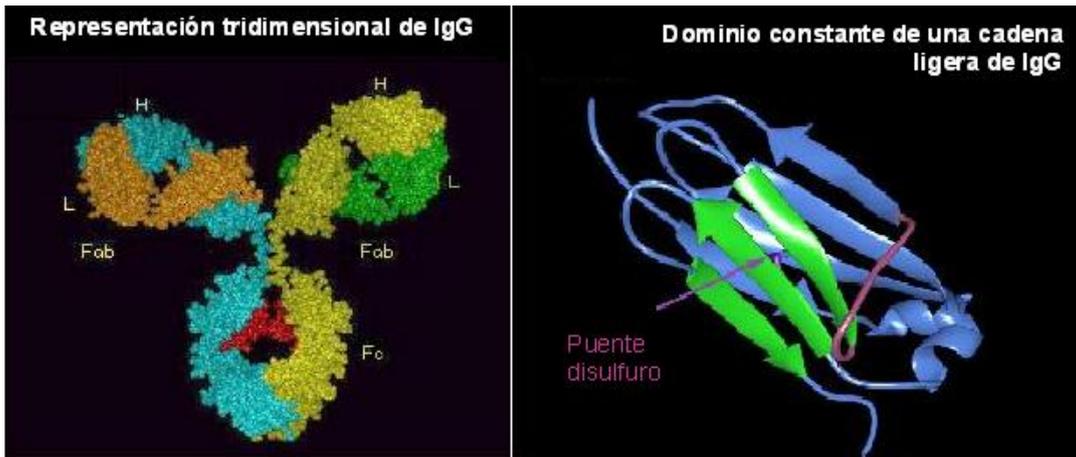


Figura 7. (A) Representación tridimensional de una molécula de IgG. (B) Representación de la estructura terciaria de un dominio Ig de una cadena ligera.

Fragmentos de Inmunoglobulina. La ruptura enzimática de la molécula permite dividirla en fragmentos y poder relacionar su estructura / función (Figura 8).

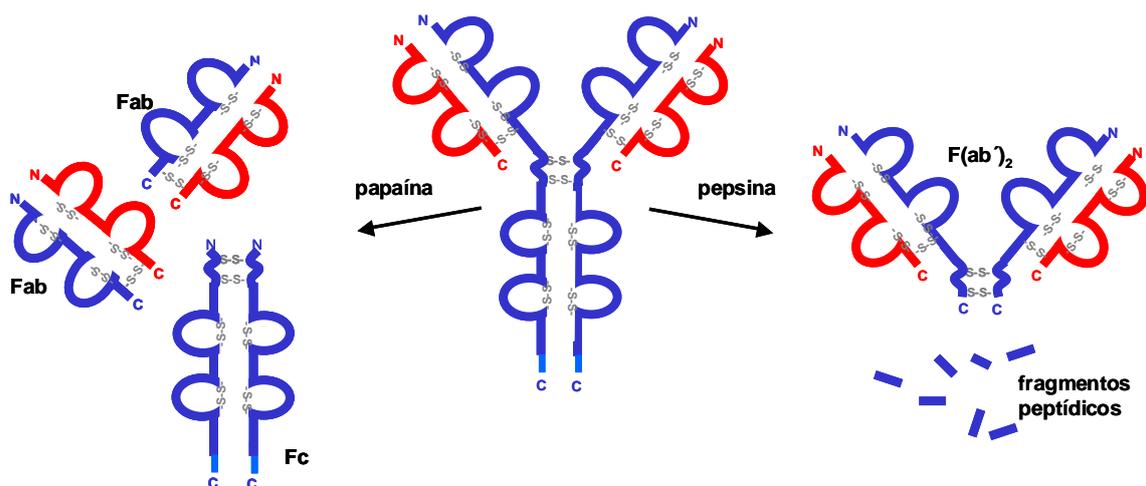


Figura 8. Fragmentos proteolíticos de una molécula de IgG.

La enzima papaína actúa sobre la región bisagra y rompe a la IgG en tres fragmentos separados. Dos de ellos son idénticos y consisten en una cadena ligera intacta asociada con las regiones V_H y C_{H1} de las cadenas pesadas. Estos fragmentos conservan la capacidad de unirse al antígeno y se conocen como Fab (fragmento de unión al antígeno). Son monovalentes y no exhiben las funciones efectoras de los Ig. El tercer segmento está compuesto por dos péptidos idénticos, que contienen los dominios C_{H2} y C_{H3} . Este fragmento denominado Fc (fracción cristalizable) no se une a antígenos, pero sí puede unirse a complementos o receptores específicos de ciertos tipos de células. Se conoce que el dominio C_{H2} está involucrado en la unión con el complemento y el dominio C_{H3} presenta otras funciones biológicas dependiendo de la clase de Ig que sea.^{1,7}

Cuando se utiliza pepsina, se libera un fragmento denominado $F(ab')_2$, que consiste en dos fragmentos Fab unidos por puentes disulfuro. Este fragmento es bivalente y retiene la capacidad de unir antígenos. La porción Fc restante se degrada y no se recupera.^{1,7}

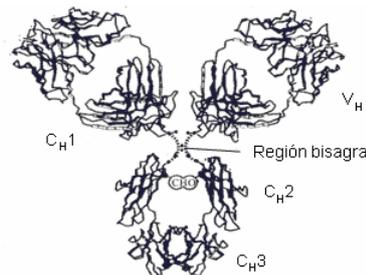


Figura 9. Modelo de IgG, generado por cristalografía de difracción de rayos X.

Estructura tridimensional. Se ha generado un modelo tridimensional de IgG por estudios de cristalografía de rayos X (Figura 9). El modelo describe una IgG como una molécula con forma de Y o T, con cada región globular Fab unida a la región globular Fc por los segmentos bisagra. Las regiones Fab pueden girar sobre la región bisagra de manera que el ángulo entre los dos brazos Fab puede variar. Además, los estudios por microscopía electrónica muestran que la región Fab puede rotar a lo largo de su eje x (Figura 10). Todos los dominios comparten la misma estructura terciaria de dos capas de láminas β , una compuesta por cuatro hebras de cadenas polipeptídicas antiparalelas, y la otra por tres. Las dos láminas forman una estructura tipo sándwich con enlace disulfuro intracatenario (dominio) y residuos de aminoácidos hidrofóbicos

entre las dos láminas. Una serie de secuencias ricas en glicina unen las hebras antiparalelas. Los dominios V contienen una secuencia extra que contribuyen directamente al sitio de unión con el antígeno.⁷

Hay un número de residuos invariables de aminoácidos en las secuencias de V_L , C_L , V_H y C_H que se localizan en los puntos de contacto entre dominios de cadena ligera y dominios de cadena pesada. Estos dominios invariables justifican la capacidad de diferentes cadenas ligeras y pesadas para emparejarse en un gran número de combinaciones.

Los dominios V_H y V_L interaccionan entre sí para formar una unidad globular que contiene el sitio de unión con el anticuerpo. Las láminas plegadas β de tres hebras de cada dominio, juntas, forman un surco poco profundo que actúa como un sitio de unión al ligando. El tamaño del canal depende en parte de la especificidad, pero es del orden de $12 \text{ \AA} \times 15 \text{ \AA} \times 20 \text{ \AA}$. El tamaño de la unidad de V_H y V_L es aproximadamente de $40 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA}$.⁷

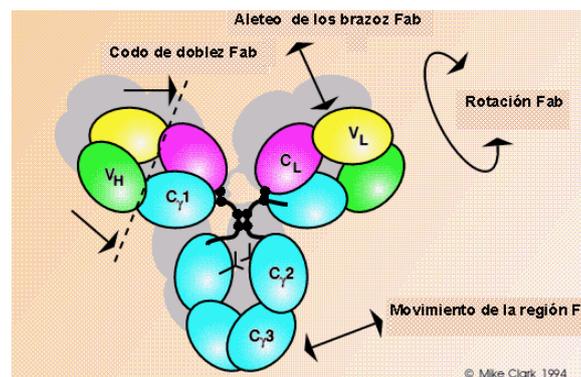


Figura 10. Representación esquemática de una IgG mostrando la flexibilidad de la molécula de las regiones Fab y Fc.

Región hipervariable. La estructura tridimensional de la zona de reconocimiento del anticuerpo está determinada por la secuencia de aminoácidos de las regiones variables. Ambas cadenas, pesadas y ligeras, contribuyen al sitio de unión del anticuerpo. Ciertos segmentos de las regiones V son muy variables, mientras que otros residuos de aminoácidos son relativamente constantes. Los segmentos que muestran una gran variación en la secuencia se denominan regiones hipervariables. Los humanos contienen 3 en las cadenas ligeras y 4 en las cadenas pesadas.⁷ Estas regiones hipervariables constan de unos diez residuos de aminoácidos cada una. Estas secuencias forman una superficie que es complementaria a la estructura tridimensional del antígeno al que se

une (Figura 11A), por lo que también se denominan regiones determinantes de complementariedad o CDR (Figura 11B).⁸ Estas regiones, procedentes de los extremos aminos V_L o V_H , reciben el nombre de CDR1, CDR2, CDR3 y CDR4, respectivamente.¹

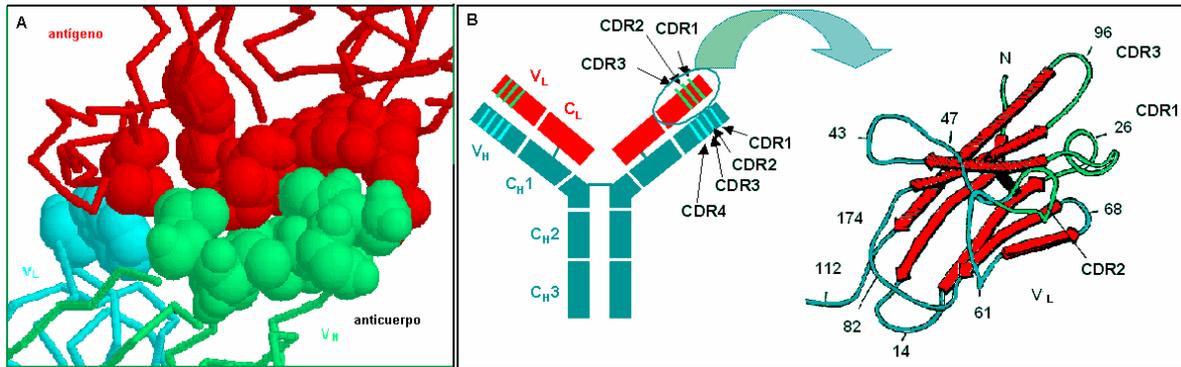


Figura 11. (A) Visualización de la complementariedad de la configuración espacial que existe entre Ag y Ac. (B) Representación esquemática de las regiones hipervariables de una IgG y estructura secundaria del dominio V_L con las regiones determinantes de complementariedad señaladas.

Paratopo. Las inmunoglobulinas se unen a los epítomos de los antígenos por sus sitios activos, constituidos como se ha indicado anteriormente, por los segmentos variables de las cadenas pesadas y ligeras y donde intervienen principalmente las regiones hipervariables. Esta zona de unión al epítomo se conoce con el nombre de paratopo.

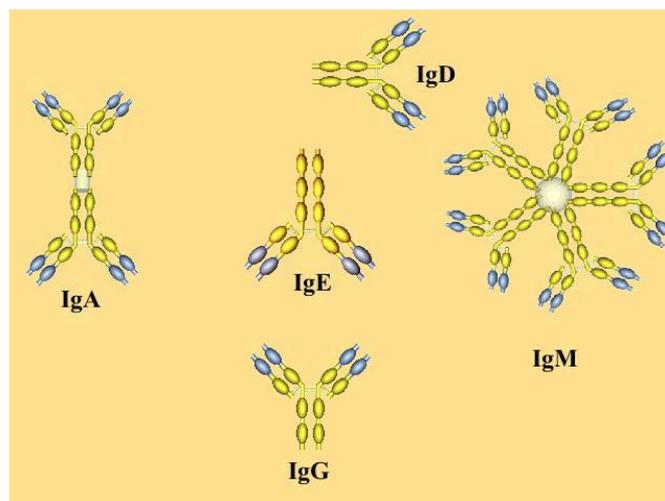


Figura 12. Representación de las clases generales de inmunoglobulinas.

⁸ E. Harlow, D. Lane. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press: NY, 1999.

IgE. Hay nueve clases (isotipos) de anticuerpos en humanos: IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 e IgE.⁹ Todas presentan la misma estructura general (Figura 12) formadas por cadenas H y L compuestas de dominios Ig, que presentan estructura tipo sándwich de láminas β compuestas por tres y cuatro hebras con topología de tipo-C (Figura 13).¹⁰

La inmunoglobulina E se caracteriza por sus cadenas pesadas tipo ϵ , que contienen un dominio variable (V_H) y cuatro dominios constantes ($C_{\epsilon 1-4}$) en la cadena pesada (Figura 13A). IgD, IgG e IgA tienen una región bisagra flexible en lugar de los dominios C_{H2} presentes en IgM e IgE, pero ambos tipos de estructuras conservan un puente disulfuro intercatenario que une las cadenas H, entre los dominios C_{H2} o en la región bisagra (Figura 5 y Figura 13A). A causa del dominio Ig ausente en IgD, IgG e IgA, los dominios C_{H2} y C_{H3} de éstas Ig son homólogos, respectivamente, a C_{H3} y C_{H4} en IgM e IgE. El dominio extra $C_{\epsilon 2}$ en IgE es un determinante crítico en sus propiedades físicas distintivas y funciones específicas de isotipo.⁹

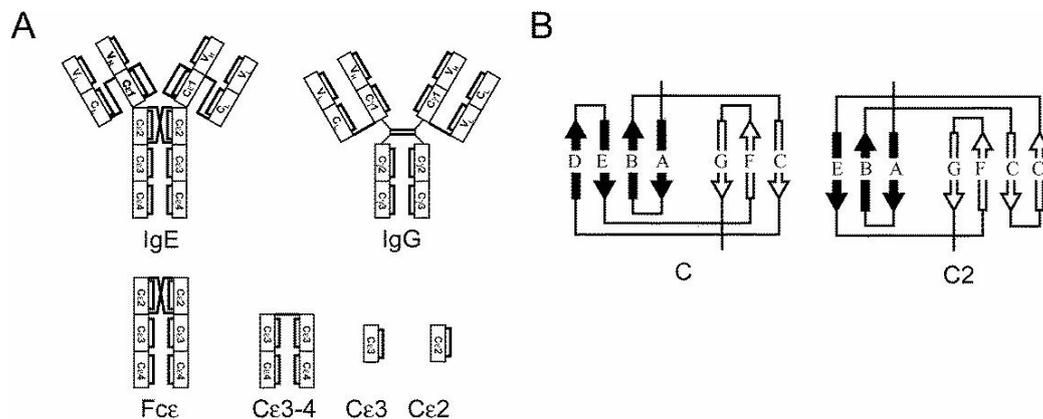


Figura 13. (A) Dominio de la estructura de IgE, IgG, y fragmentos empleados de IgE en estudios estructurales. (B) Topología de tipo C y C2 de las hebras β de dominios de Ig.

Las regiones V expresadas en células B determinan su especificidad antigénica, y éstas en toda la población de células B determinan el repertorio de anticuerpos de un individuo en un tiempo dado. El repertorio V_H de IgE en individuos alérgicos, sin

⁹ H. J. Gould, B. J. Sutton, A. J. Beavil, R. L. Beavi, N. McCloskey, H. A. Coker, D. Fear, L. Smurthwaite. *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, 21, 579-628.

¹⁰ A. F. Williams, A. N. Barclay. *Annu. Rev. Immunol.* **1988**, 6, 361-405.

embargo, difiere de los de otras clases de anticuerpo. Esto puede reflejar la acción de alergenios como superantígenos.⁹

La maduración de células B tras la activación por parte del antígeno comienza por expresar IgM pero, posteriormente puede cambiar de isotipo y producir otra clase de anticuerpo o producir secuencialmente dos o más clases de otros anticuerpos. Las clases de anticuerpos prestan diversidad a las funciones efectoras permitiendo al anticuerpo unirse a receptores de Fc específicos, distribuidos desigualmente entre los varios tipos de células efectoras, concentradas en diferentes microambientes. La vida media de la IgE en suero (sangre periférica) es de tres días, comparada con los veinte días que tiene la IgG, pero el tiempo de vida aumenta cuando la IgE se retiene en los tejidos (unida a receptores de superficie celular de mastocitos y basófilos).¹¹ Así la vigilancia inmunológica ocurre principalmente por IgG en la circulación, por IgE en los tejidos, y por IgA en las secreciones.

La IgE es la menos abundante de las clases de inmunoglobulinas en el suero, con una concentración de unos 150 ng/mL, en comparación con la IgG que se encuentra a 10 mg/mL en individuos sanos. Las concentraciones séricas de IgE reflejan el número de células B circulantes que están implicadas en la síntesis de IgE.^{12,13} En ciertas enfermedades parasitarias y en el síndrome hiper-IgE, las concentraciones séricas de IgE pueden ser tres órdenes de magnitud más altas de lo normal sin signos de enfermedad alérgica.¹⁴

Las concentraciones de IgE circulante pueden superar unas 10 veces los valores normales en individuos “atópicos”, quienes han aumentado el riesgo de desarrollar alergias. Las concentraciones de anticuerpos IgE específicos a alergenios están normalmente estrechamente relacionadas con los síntomas y puede ser unas 1000 veces mayor que el nivel mínimo de detección (~0.6 ng/mL) encontrado en la mayoría de los sujetos sanos.¹⁵ Sin embargo, en algunos individuos con fiebre del heno o asma los

¹¹ A. Lio, T. A. Waldmann, W. Strober. *J. Immunol.* **1978**, *20*, 1696-1701.

¹² A. Lanzavecchia, B. Parodi. *Clin. Exp. Immunol.* **1984**, *55*, 197-203.

¹³ C. L. King, R. W. Poindexter, J. Ragunatham, T. A. Fleisher, E. A. Ottensen, T. B. Nutman. *J. Immunol.* **1991**, *146*, 1478-1483.

¹⁴ R. Patterson, I. M. Suszko, C.C. Hsu, M. Roberts, S. H. Oh. *Clin. Exp. Immunol.* **1975**, *20*, 265-272.

¹⁵ L. Smurthwaite, S. R. Durhan. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2002**, *2*, 231-238.

anticuerpos IgE se detectan sólo en secreciones del órgano diana. Esto puede reflejar el hecho de la síntesis local de anticuerpos IgE contra autoantígenos en el órgano diana.⁹

Los linfocitos B no sólo producen IgE sino que también pueden producir cada una de las 9 inmunoglobulinas existentes en humanos. En los momentos iniciales tras la activación de los linfocitos B por los linfocitos T, se empieza a producir IgM, posteriormente se puede dar un cambio de isotipo para producir otras inmunoglobulinas. Para que ocurra el cambio hacia la generación de IgE se necesitan dos señales fundamentales: la primera es dependiente de citoquinas, las cuales provocan en los linfocitos B la transcripción específica de la línea germinal ϵ . La otra señal está relacionada con un receptor (CD40) que se expresa de forma constitutiva en células B. Existen dos tipos de receptores que se encuentran en superficie de membrana celular y a los que los anticuerpos IgE se fijan de forma reversible mediante su región Fc ϵ :¹⁶ receptor de alta afinidad (Fc ϵ RI) y receptor de baja afinidad (Fc ϵ RII, CD23).

Unión de los anticuerpos a los antígenos.

Características de los antígenos biológicos.

Un *antígeno* es una sustancia que puede unirse específicamente a una molécula de anticuerpo o a un receptor de linfocito T. Los anticuerpos pueden reconocer como antígenos a casi todos los tipos de moléculas biológicas, tales como metabolitos intermediarios simples, azúcares, lípidos y hormonas, así como a macromoléculas tales como hidratos de carbono complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Esto contrasta con los linfocitos T, que sólo reconocen péptidos. Únicamente las macromoléculas son capaces de estimular a los linfocitos B para que inicien las respuestas inmunológicas humores. Las moléculas que estimulan respuestas inmunológicas se denominan *inmunógenos*.¹

¹⁶ B. J. Sutton, H. J. Gould. *Nature* **1993**, 366, 421-428.

No todas las moléculas son inmunógenas. En general, los mejores inmunógenos son las proteínas, los hidratos de carbono son inmunógenos más débiles y los lípidos y ácidos nucleicos son pobres inmunógenos. Asimismo, por regla general, el inmunógeno debe tener un tamaño suficiente para poder ser degradado por los fagocitos y que de este modo puedan ser “presentadas” a los linfocitos e iniciar la aparición de una respuesta inmunológica.¹⁷

Las sustancias químicas de bajo peso molecular, pueden unirse a los anticuerpos, pero no pueden activar a los linfocitos B por sí mismas (es decir, no son inmunógenas). Para generar anticuerpos específicos para estas sustancias químicas pequeñas, los inmunólogos normalmente las fijan a macromoléculas antes de la inmunización. En estos casos, la sustancia química se denomina *hapteno* y la macromolécula, *molécula portadora* o *portador*. El conjugado o complejo hapteno-portador (H-P), a diferencia del hapteno aislado, puede actuar como un inmunógeno.^{1,17}

Las macromoléculas suelen ser mucho más grandes que los puntos de unión del antígeno a una molécula de anticuerpo, por tanto, cualquier anticuerpo se fija sólo a una porción de la macromolécula. El reconocimiento de los antígenos por Ig o células específicamente alergizadas se lleva a cabo a nivel del determinante antigénico. Un *determinante antigénico* o *epítopo* puede definirse como la parte específica de una molécula antigénica que se fija en el sitio de interacción de inmunoglobulinas y/o receptores de membrana específicos de células inmunocompetentes. Las macromoléculas contienen por lo general múltiples determinantes, algunos de los cuales pueden estar repetidos y cada uno, por definición, puede unirse a un anticuerpo. La presencia de múltiples determinantes idénticos en un antígeno se conoce como polivalencia o multivalencia.

La configuración espacial de los diferentes epítomos en una molécula de proteína puede influir en la unión de los anticuerpos de diferentes maneras. Cuando los determinantes están bien separados, se pueden unir dos o más moléculas de anticuerpo al mismo antígeno proteico sin que se influyan entre sí; se considera que estos determinantes no producen solapamiento. Cuando dos determinantes están próximos entre sí, la unión del anticuerpo al primero puede provocar una interferencia estérica en la unión al segundo; se dice que estos determinantes presentan solapamiento. En casos menos frecuentes, la

¹⁷ P. R. Murray, K. S. Rosenthal, M. A. Pfaller. *Microbiología Médica*. Elsevier: Madrid, 2006.

unión del primer anticuerpo puede producir un cambio de conformación de la estructura del antígeno, que influye en la unión del segundo anticuerpo mediante un obstáculo diferente a la interferencia estérica. Estas interacciones reciben el nombre de efectos alostéricos.

Los determinantes antigénicos pueden estar formados por la estructura covalente de una molécula o, en el caso de las proteínas y los ácidos nucleicos, por el plegamiento tridimensional de la molécula. Los epítomos formados por una secuencia específica de aminoácidos reciben el nombre de *determinantes lineales*; y los *determinantes conformacionales* están constituidos por residuos de aminoácidos que no están secuencialmente unidos, pero que quedan espacialmente yuxtapuestos al plegarse la proteína.¹

Antígenos T-independientes. Son antígenos que pueden estimular directamente las células B para producir anticuerpos sin ayuda de las células T. Las respuestas a estos antígenos difieren de las respuestas a otros antígenos. Sus propiedades son:

- a. Estructura polimérica. Estos antígenos se caracterizan por tener el mismo determinante antigénico repetido muchas veces, como se muestra en la Figura 14A.
- b. Activación policlonal de células B. Muchos de estos antígenos pueden activar clones de células B específicas para otros antígenos. Basándonos en su capacidad para activar policlonalmente células B, los antígenos T-independientes se pueden subdividir en dos tipos: Tipo 1 y Tipo 2. Los antígenos T-independientes Tipo 1 son activadores policlonales, mientras que los Tipo 2 no lo son.
- c. Resistencia a la degradación. Los antígenos T-independientes son generalmente más resistentes a la degradación, de este modo resisten largos periodos de tiempo y continúan estimulando el sistema inmunológico.

Antígenos T-dependientes. Son antígenos que no estimulan directamente la producción de anticuerpos sin la ayuda de células T. Las proteínas son antígenos T-dependientes. Estructuralmente estos antígenos se caracterizan por presentar algunas copias de diferentes determinantes antigénicos, como se ilustra en la Figura 14B.^{17,18}

Conjugados hapteno-portador. Son moléculas inmunogénicas que presentan haptenos unidos covalentemente. Estructuralmente se caracterizan por presentar determinantes antigénicos del portador y determinantes creados por la unión del hapteno (determinante hapténico) como se ilustra en la Figura 14C. Este determinante creado por la unión con el hapteno consiste en el hapteno y algunos residuos adyacentes a él de la proteína portadora. En estos conjugados el tipo de portador determinará si la respuesta será T-dependiente o T-independiente.

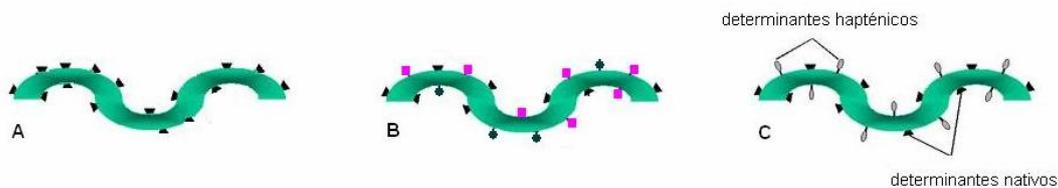


Figura 14. (A) Antígeno T-independiente, (B) Antígeno T-dependiente y (C) Complejo Hapteno-Portador.

Determinantes reconocidos por células B. Los determinantes antigénicos que se reconocen por células B y por los anticuerpos secretados por ellas están formados por la secuencia primaria de residuos en el polímero (determinante lineal) y/o por la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de la molécula (determinante conformacional). En general son pequeños y se limitan aproximadamente a 4-8 residuos. Con respecto al número, aunque en teoría cada 4-8 residuos pueden constituir un determinante antigénico, en la práctica el número de determinantes antigénicos es mucho menor del teóricamente posible. Normalmente estos determinantes se limitan a los fragmentos de antígeno que son accesibles a los anticuerpos.

Determinantes reconocidos por células T. Los determinantes antigénicos que se reconocen por células T están formados por la secuencia primaria de aminoácidos en proteínas. Estos determinantes no necesitan estar localizados en la superficie del antígeno porque el reconocimiento por las células T requiere que el antígeno se degrade proteolíticamente en péptidos más pequeños. Los péptidos libres no se reconocen por células T, sin embargo la asociación de péptidos con moléculas se codifica por el complejo principal de histocompatibilidad (CPH) y, es el complejo formado por moléculas del CPH con el péptido (CPH-péptido) el que es reconocido por las células T.

El tamaño de estos determinantes se limita generalmente a 8-15 aminoácidos. Aunque, en teoría, también cada 8-16 residuos podría constituir un determinante antigénico, el número de determinantes por antígenos es mucho menor del que cabría esperar teóricamente. Los determinantes antigénicos están limitados a las fracciones del antígeno que se pueden unir a las moléculas del CPH.^{17,18}

La Reacción Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac).

Naturaleza. La unión de los determinantes antigénicos a la zona de reconocimiento del anticuerpo es similar a otras formas de interacción ligando-receptor.⁷ La zona de fijación del anticuerpo se localiza en el fragmento Fab de la molécula, y está constituida por las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras. Cuando se produce la interacción, el determinante antigénico conformacional encaja en un hueco formado por el sitio de reconocimiento del anticuerpo. Los enlaces que mantienen el antígeno en el sitio de fijación del anticuerpo son de naturaleza no covalente, lo que implica una unión reversible.^{1,18}

Afinidad y avidéz. El término afinidad es una medida de la fuerza de unión de un anticuerpo con un hapteno univalente. El término avidéz expresa la fuerza de interacción global entre el anticuerpo multivalente y el antígeno multivalente. La avidéz es más que la suma de las afinidades individuales (Figura 15) y está gobernada por tres factores principales: la afinidad intrínseca del anticuerpo por el epítopo, la valencia del anticuerpo y del antígeno, y la disposición geométrica de los componentes que interaccionan.⁸



Figura 15. Representación de los conceptos y de las constantes de equilibrio de afinidad y avidéz.

¹⁸ I. M. Roitt, J. Brostoff, D. K. Male. *Immunología*, Salvat: Barcelona, 1991.

La afinidad de una zona de reconocimiento del anticuerpo por un determinante antigénico, está determinada por la suma de fuerzas no covalentes entre los residuos de aminoácidos que forman el área de reconocimiento y la estructura química del determinante antigénico. Debido a que la intensidad de estas interacciones no covalentes aumenta enormemente a distancias cortas, la interacción más fuerte anticuerpo-determinante ocurre cuando existe complementariedad entre las dos estructuras. La interacción de dipolos oscilantes de átomos adyacentes genera fuerzas de Van der Waals, que resultan de la atracción mutua de los átomos. A causa de que la fuerza atractiva es más grande a distancias de sólo 1.8 a 2.0 Å, la unión más fuerte del antígeno al anticuerpo ocurre cuando la complementariedad es mayor. Los grupos carboxilatos o amonios en aminoácidos polares en las paredes interiores de la zona de reconocimiento del anticuerpo, pueden interactuar con cargas opuestas de los determinantes antigénicos para formar enlaces electrostáticos. Los puentes de hidrógeno también pueden estar implicados en la interacción Ag-Ac y son máximas a distancias de 2 a 3 Å. De este modo, tanto la fijación estérica del antígeno a la zona de reconocimiento como la aproximación de grupos químicos atractivos son esenciales para una aproximación Ag-Ac efectiva. Además puede ocurrir que los dominios V_H y V_L se “deslicen” unos cuantos angstroms cuando sucede la unión.⁷

Especificidad y Reacción Cruzada. La especificidad se refiere a la capacidad de un anticuerpo individual para que su sitio de reconocimiento reaccione con un solo determinante antigénico. En general hay un alto grado de especificidad en las reacciones Ag-Ac. Los anticuerpos pueden distinguir diferencias en 1) la estructura primaria de un antígeno, 2) formas isoméricas de un antígeno, y 3) las estructuras secundarias y terciarias de un antígeno. La reactividad cruzada se refiere a la capacidad de un anticuerpo individual para que su sitio de reconocimiento reaccione con más de un antígeno. Las reacciones cruzadas surgen a causa de que distintos antígenos que reaccionan cruzadamente comparten un epítipo común, o bien tienen un epítipo estructuralmente similar al que desencadenó la producción del anticuerpo (Figura 16).¹⁸

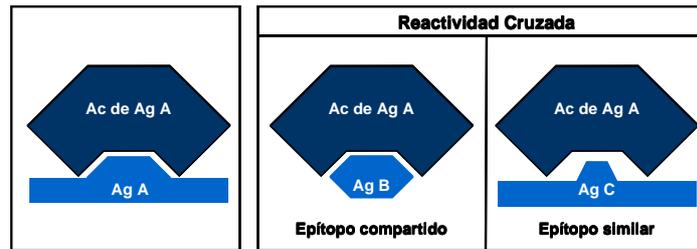


Figura 16. Esquema representativo de reacción selectiva y reactividad cruzada.

Enfermedades producidas por respuestas inmunológicas.

La inmunidad adaptativa tiene la importante misión de defender al huésped frente a las infecciones microbianas, pero las respuestas microbianas también pueden producir lesiones hísticas y enfermedades. Los trastornos causados por respuestas inmunológicas reciben el nombre de *enfermedades por hipersensibilidad*. Una causa frecuente de estas enfermedades es el fracaso de la autotolerancia. Las enfermedades secundarias al fracaso de la autotolerancia y las consiguientes respuestas inmunológicas contra los antígenos propios, o autólogos, se denominan *enfermedades autoinmunológicas*. Las enfermedades por hipersensibilidad pueden deberse también a respuestas excesivas o no controladas frente a antígenos extraños, tanto microbianos como ambientales no infecciosos.¹

Las enfermedades por hipersensibilidad se clasifican según el tipo de respuesta inmunológica y el mecanismo efector responsable de la lesión celular e hística. La hipersensibilidad inmediata o de tipo I tiene lugar cuando la IgE estimula a los mastocitos o los basófilos, lo que en la práctica clínica se conoce como alergia o atopía.

Alergia

La respuesta alérgica es una intensa reacción de ciertos componentes del sistema inmunológico contra una sustancia extraña que por lo general es inofensiva. Un individuo es atópico, y por lo tanto propenso a padecer enfermedades alérgicas, cuando presenta una predisposición genética a desarrollar respuestas de hipersensibilidad frente a alérgenos que son inocuos para individuos que carecen de esa predisposición genética. Las reacciones alérgicas se caracterizan por la producción de anticuerpos IgE. Es necesario hacer constar que no todas las reacciones alérgicas están producidas por estos anticuerpos, pero en general, un gran porcentaje de enfermedades alérgicas se caracteriza por la superproducción de anticuerpos IgE y por ello nos referimos exclusivamente a este tipo de reacciones. Estos anticuerpos presentan la propiedad de unirse, a través de receptores Fc de alta afinidad, a la superficie de determinadas células de nuestro organismo: los mastocitos, que se encuentran a nivel de diversos tejidos (mucosa bronquial, nasal, conjuntival, intestinal, piel, etc.); y los basófilos, que se encuentran en la circulación sanguínea.

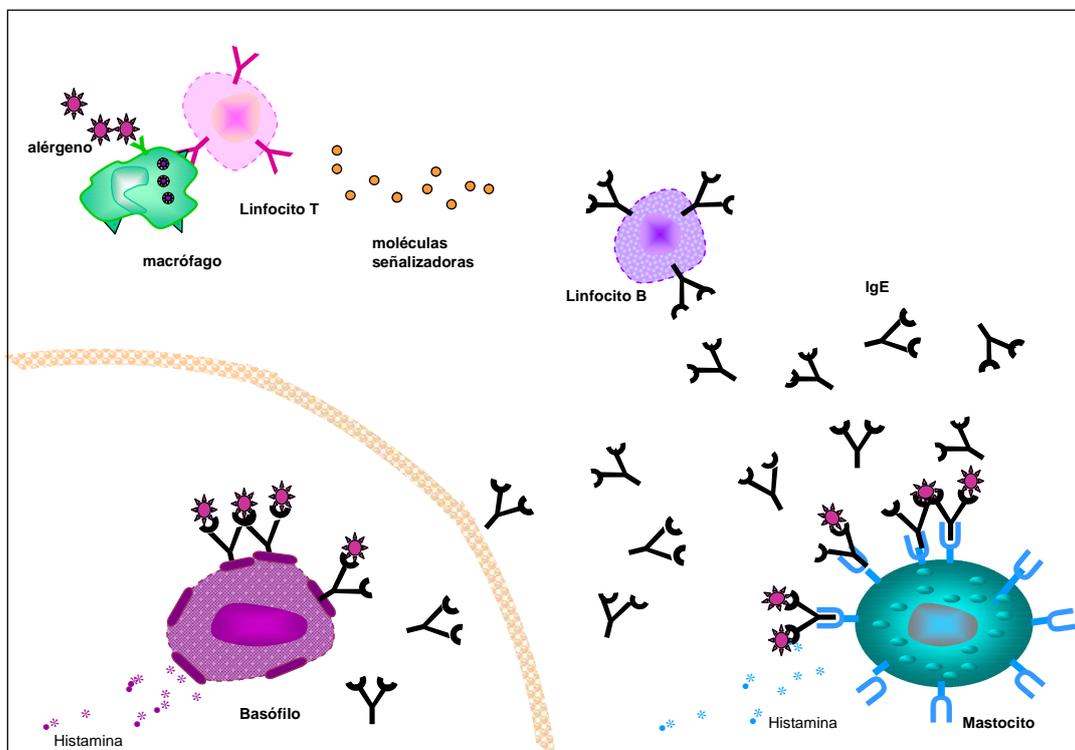


Figura 17. Alergia.

La entrada en el organismo de un alérgeno pone en marcha un proceso silencioso de sensibilización al alérgeno (Figura 17), que empieza cuando los macrófagos degradan al alérgeno, lo procesan en péptidos y lo presentan a los linfocitos T. De este modo se activan los linfocitos T, que segregan interleucinas que desencadenan la maduración de los linfocitos B y su transformación en células plasmáticas que secretan inmunoglobulinas.

De este modo el proceso de sensibilización da lugar a una alta producción de anticuerpos IgE dirigidos frente al alérgeno en cuestión. De estos anticuerpos formados, una parte se encuentra circulando libremente en la corriente sanguínea, pero una gran proporción de los mismos se fijará en la superficie de mastocitos y basófilos. Una posterior entrada del mismo alérgeno en este organismo dará lugar a la captación del mismo por las IgE fijadas en las superficies del mastocito y del basófilo. La interacción del alérgeno con los anticuerpos IgE fijados en la superficie de los mastocitos y basófilos, conducen a la degranulación de éstos, así como a la síntesis de diversas citoquinas y mediadores de reacciones inflamatorias, que son las responsables de la sintomatología de las reacciones alérgicas.

La reacción inmediata, que se produce en un periodo de 15 minutos desde la provocación del alérgeno, resulta en la liberación de mediadores que conducen a los síntomas característicos del órgano diana. Una respuesta tardía asociada con la afluencia de células T, monocitos, y eosinófilos puede originarse horas después. La fiebre del heno, el asma, las reacciones a alimentos, y los eccemas son las respuestas alérgicas más comunes, causadas por la activación de los mastocitos en los tejidos conjuntivos de, respectivamente, la nariz, los pulmones, el intestino, y la piel. Cuando un alérgeno llega a la circulación sanguínea, los basófilos se activan y manifiestan la poco común, pero más peligrosa reacción de anafilaxis.⁹

Alergia a fármacos.

Las reacciones adversas a fármacos se definen, según la Organización Mundial de la Salud, como toda respuesta nociva y no intencionada a un fármaco que ocurre en dosis

terapéuticas.¹⁹ Estas reacciones se han clasificado en dos tipos principales: *Reacciones Tipo A*, que son las más frecuentes, son dosis dependientes, predecibles y están relacionadas con la actividad farmacológica del medicamento; y *Reacciones Tipo B* que son impredecibles y no dependen de la dosis del fármaco, estas reacciones aparecen solamente en ciertos individuos y no están relacionadas con la acción farmacológica del medicamento.²⁰ Estas últimas representan sólo entre un 10 y un 15% de las reacciones adversas a fármacos.

Las reacciones adversas a fármacos con base inmunológica, también denominadas alergias a fármacos,²¹ han sido clasificadas atendiendo a distintas características de las mismas como pueden ser el tiempo de aparición o el mecanismo subyacente.

Clasificación de Levine. Levine en 1966 clasificó estas reacciones dependiendo del tiempo de aparición de los síntomas clínicos tras la toma del fármaco en: inmediatas, aceleradas y tardías. Las reacciones inmediatas ocurren en menos de una hora tras la toma del fármaco y son mediadas por anticuerpos IgE, las reacciones aceleradas aparecen entre 6-48 horas, y las tardías son aquellas que aparecen tras las 48 horas después de la administración del fármaco y cuya patología se ha demostrado que está mediada por células T. Las reacciones aceleradas son más difíciles de diferenciar debido al solapamiento existente con los otros dos tipos de reacciones, y si bien en un principio se definió a estas reacciones como mediadas por IgE, las evidencias actuales apuntan a que estas reacciones son mediadas por células T. Por ello resulta más práctico diferenciar las reacciones adversas a fármacos como inmediatas o no inmediatas, estas últimas incluirán las aceleradas y las tardías. Aunque existen manifestaciones clínicas comunes en cada uno de estos tipos de reacciones, como es el caso de la urticaria, existen otras manifestaciones que son características de un tipo, por ejemplo la anafilaxis sólo aparece en reacciones inmediatas.²²

¹⁹ World Health Organization. International drug monitoring: the role of the hospital. Geneva: The Organization; **1966**.

²⁰ R. S. Gruchalla. *J. Allergy Immunol.* **2003**, *111*, S548-559.

²¹ N. F. Adkinson. “Drug Allergy” en: E. Middleton, C. E. Reed, E. F. Ellis, N. F. Adkinson, J. W. Yunginger, W. W. Buss. *Allergy principles and practice*, Mosby: St Louis, 1998.

²² A. P. Kaplan. “Urticaria and angioedema” en: E. Middleton, C. E. Reed, E. F. Ellis, N. F. Adkinson, J. W. Yunginger, W. W. Buss. *Allergy principles and practice*, Mosby: St Louis, 1998.

Clasificación de Gell y Coombs.²³ Esta clasificación se realizó en la misma fecha, en la década de 1960, y se basa en los mecanismos fisiológicos implicados, proponiendo la existencia de cuatro mecanismos principales.

Las reacciones de Tipo I se corresponden con las reacciones inmediatas anteriormente descritas. Se producen por la interacción de un antígeno o un complejo hapteno-portador a un anticuerpo IgE unido a receptores de superficie de mastocitos y basófilos. Principalmente causan urticaria, anafilaxis y asma.²⁴

Las reacciones de Tipo II son mediadas por inmunoglobulinas G, M y, en menor medida la A, que reconocen antígenos unidos a la membrana de eritrocitos, neutrófilos, plaquetas y células epiteliales de glándulas o mucosas induciendo la activación del complemento. En el caso de las reacciones medicamentosas, las células que se afectan con mayor frecuencia son las de la circulación sanguínea, hígado y riñón.

Las reacciones de Tipo III se producen por el depósito de complejos antígeno-anticuerpo en determinados tejidos.

Las reacciones de Tipo IV, de hipersensibilidad retardada o mediada por células T, se corresponde con las reacciones tardías de la clasificación de Levine. No son mediadas por anticuerpos, sino que el antígeno interacciona directamente con los linfocitos T.

El hecho de que la mayor parte de los individuos que toman fármacos no desarrollen una reacción inmunológica, pese a ser moléculas extrañas para el organismo, demuestra la existencia de mecanismos de tolerancia inmunológica generados frente a moléculas exógenas inocuas. En ese sentido, las reacciones alérgicas a fármacos se producirían en situaciones en las que el sistema inmunológico reconoce específicamente a estas estructuras y en lugar de generar una respuesta de tolerancia, como ocurre en la mayoría de los sujetos, desencadena una respuesta efectora frente a ellas generando daño, potencialmente severo, en los tejidos diana donde el fármaco puede ser reconocido por el sistema inmunológico. Además dicha respuesta conlleva una memoria inmunológica,

²³ P. R. Coombs, P. G. Gell. "Clasificación de reacciones alérgicas responsables de la clínica de hipersensibilidad y enfermedad" en: R. R. Gell. *Clinical Aspects of Immunology*, Oxford Univ Pr: Oxford, 1968.

²⁴ W. J. Pichler. *Ann. Intern. Med.* **2003**, 139, 683-693.

por lo que en posteriores tomas del fármaco la respuesta será más rápida y efectiva que en el primer contacto.

Fármacos como haptenos.

El conocimiento actual de cómo el sistema inmunológico puede reconocer a los fármacos está basado en la hipótesis de los haptenos, formulada por Landsteiner²⁵ a principios del siglo XX. Esta teoría establece que para que una estructura de pequeño peso molecular pueda ser reconocida por el sistema inmunológico debe unirse previamente, de forma covalente, a proteínas endógenas para así ser procesada y presentada por las células presentadoras de antígeno (CPA) a los linfocitos específicos.

De este modo, el reconocimiento de moléculas pequeñas (como los fármacos) por células B y T se explica normalmente por el concepto del hapteno. Los haptenos son moléculas pequeñas (la mayoría con pesos moleculares menores a 1000 Da) que son químicamente reactivas y capaces de reaccionar covalentemente con una proteína o péptido más grande.^{24,25,26,27} Esta modificación de la proteína o péptido lo hace inmunogénico: inmunoglobulinas solubles o unidas a células pueden reconocerlo directamente, mientras que las células T reconocen un fragmento hapteno-péptido que es generado por un procesado intracelular del complejo hapteno-proteína y se presenta a las células T por moléculas de CPH. La penicilina G es un hapteno típico que tiende a unirse covalentemente a los residuos de lisina tanto en solución como en células unidas a proteínas.^{20,21,24,28}

Alternativamente, si el fármaco no es químicamente reactivo *per se*, puede ser un prohapteno, es decir, que a partir de su metabolismo pueden originarse compuestos intermediarios reactivos con capacidad para unirse covalentemente a moléculas. Se conoce muy poco acerca de las proteínas diana que haptinizan medicamentos *in vivo*,

²⁵ K. Landsteiner, J. Jacobs. *J. Exp. Med.* **1935**, *61*, 643-653.

²⁶ B. P. Park, M. Pirmohamed, N. K. Kitteringham. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 969-988.

²⁷ M. Pirmohamed, N. K. Kitteringham B. P. Park. *DrugSaf.* **1994**, *11*, 114-144.

²⁸ P. A. Greenberger. *J. Clin. Immunol.* **2006**, *117*, S464-470.

aunque son muchas las candidatas.^{24,29} Sulfametoxiazol se ha propuesto como un ejemplo típico de prohapteno.^{20,24}

Recientemente, se ha considerado una tercera posibilidad denominada como “the p-i concept” (del inglés pharmacologic interaction), interacción farmacológica de fármacos con receptores inmunológicos. Los medicamentos inertes químicamente, incapaces de unirse covalentemente a péptidos o a proteínas, pueden unirse *in vitro* de forma no covalente a las moléculas de antígeno de leucocito humano de células presentadoras de antígeno o al receptor de las células T (RcT) posibilitando la proliferación de clones linfocitarios específicos sin previo procesamiento antigénico.^{24,30}

Mecanismo de activación mediado por IgE

Las reacciones inmediatas a fármacos están mediadas por anticuerpos IgE específicos. Su actividad biológica se realiza mediante su unión a receptores de alta y baja afinidad (FcεR) en mastocitos y basófilos principalmente, donde induce la liberación de mediadores de la inflamación. La unión de un alérgeno polivalente a la porción variable de dos o más IgE, conduce al entrecruzamiento del receptor que activa a la célula, produciéndose la liberación de diferentes mediadores preformados, responsables de los síntomas alérgicos de las reacciones inmediatas.³¹ Además, la respuesta inducida provoca la secreción de una serie de citoquinas que atraen y activan a las células inflamatorias aumentando la expresión del receptor FcεRII. Este interviene en la presentación de IgE fármaco-dependiente a células T y en la adhesión de células B, así como en la migración de estas células a los folículos secundarios de los centros germinales de nódulos linfoides y bazo. Todo esto se traduce en un aumento de los niveles de anticuerpos IgE fármaco-específicos circulantes, pudiendo pasar desde niveles indetectables hasta niveles elevados en un período de tiempo tan corto como 24

²⁹ A. E. Crib. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1993**, *51*, 522-526.

³⁰ W. J. Pichler. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2002**, *2*, 301-305.

³¹ R. P. Siraganian. “Mechanism of IgE-mediated hypersensitivity” en: E. Middleton, C. E. Reed, E. F. Ellis, N. F. Adkinson, J. W. Yunginger, W. W. Buss. *Allergy principles and practice*, Mosby: St Louis, 1998.

horas. Este fenómeno es lo que clásicamente se ha denominado como respuesta secundaria al fármaco.

Los antígenos deben interactuar con dos o más moléculas de IgE, unidas mediante su fracción Fc a receptores de mastocitos y basófilos, en lo que se denomina fenómeno de puenteo, para que se pueda desarrollar la respuesta y como consecuencia la liberación de mediadores inflamatorios. En el caso de los fármacos, debido a que son frecuentemente moléculas de bajo peso molecular, es necesario que estos se unan a proteínas formando un conjugado hapteno-proteína transportadora. Cada proteína puede unir varias moléculas de hapteno, cada uno de los cuales conformarían un epitopo produciendo así estructuras con múltiples determinantes antigénicos de forma análoga a lo que ocurre en cualquier proteína antigénica. De esta forma, alcanzan el tamaño suficiente para unir varios anticuerpos IgE e inducir el puenteo.

Determinación de anticuerpos IgE y estudio de especificidad

La metodología más ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos IgE ha sido el inmunoensayo y en la actualidad se están empleando nuevos métodos basándose en la capacidad de un determinado fármaco de activar los basófilos de los pacientes alérgicos a través de los anticuerpos IgE unidos a sus receptores de membrana. En cualquier caso, el modelo que hasta la actualidad ha sido estudiado con mayor profundidad ha sido el de las penicilinas por razones metodológicas.

Para el reconocimiento por parte de los linfocitos T en la respuesta primaria como por los anticuerpos IgE unidos a membrana de mastocitos y basófilos, es necesario que el fármaco se encuentre unido a una proteína. Esta estructura que va a ser la reconocida por los anticuerpos es la que interesa utilizar en los métodos diagnósticos. El conocimiento de la estructura química del fármaco tras la unión con la proteína que indujo la respuesta inmunológica es un problema que aún hoy día no ha podido ser resuelto. Aunque en el caso de las penicilinas desde un principio se estableció que el peniciloilo era el determinante fundamental para la inducción de una respuesta inmunológica y, por tanto, de una reacción alérgica.^{32,33}

³² F. R. Batchelor, J. M. Dewdney, D. Gazzard. *Nature*. **1965**; 206, 362-364.

Reacciones inmediatas alérgicas a β -lactamas

Las reacciones alérgicas a β -lactámicos son la causa más frecuente de reacciones adversas a fármacos mediadas por un mecanismo inmunológico específico^{34,35} De éstos, las penicilinas son los antibióticos más estudiados, debido a su alto consumo y la estabilidad química de los conjugados que se forman, y es por esta razón que su inmunología es bastante conocida y sirve como modelo para el estudio de alergia a otros fármacos.³⁶

Estructura química de los antibióticos β -lactámicos.

La estructura química de penicilinas y cefalosporinas consiste en un anillo β -lactámico fusionado en cis a un anillo de tiazolidina en penicilinas, y a un anillo de dihidrotiazina en cefalosporinas (Figura 18). La sustitución en R se refiere a las distintas cadenas laterales que dan nombre a las distintas penicilinas (Figura 19).

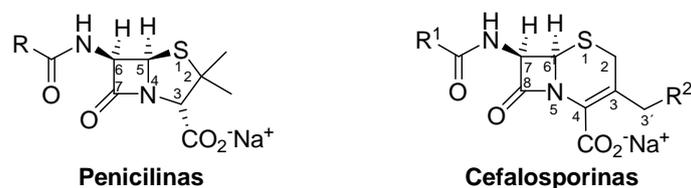


Figura 18. Estructuras químicas de penicilinas y cefalosporinas.

La conversión enzimática por *expandedasa*, la deacetoxi cefalosporina C sintetasa, convierte el anillo de cinco miembros de tiazolidina de penicilinas en uno más grande de seis miembros, el anillo de dihidrotiazina.³⁷ Las distintas sustituciones en R¹ y R²

³³ B. B. Levine, V. H. Price. *Immunology*, **1964**, 7, 542.

³⁴ J.M. Dewdney. "Immunology of the antibiotics" en: M. Sela. *The Antigens*, Vol 5, New York: Academic Press, 1977.

³⁵ M. E. Weiss, N. F. Adkinson. *Clin. Allergy*. **1988**, 18, 515-540.

³⁶ S. Ahlsted, A. Kristofferson. *Prog. Allergy*. **1982**, 30, 67-134.

³⁷ C. Walsh. *Antibiotics: actions, origins and resistance*. ASM press: Washigton, 2003.

dan lugar a una gran variedad de estructuras químicas resultando en diferentes agentes antibióticos. Éstas permiten a las cefalosporinas penetrar las cápsulas bacterianas y ejercer sus propiedades antibacterianas. Comparadas con las penicilinas, las cefalosporinas son generalmente efectivas contra un rango de organismos más amplio y son más resistentes a las β -lactamasas.³⁸

En la Figura 20 se representan las estructuras más citadas en esta memoria. Además, las estructuras de cefalosporinas clínicamente más usadas se representan en el Anexo III.

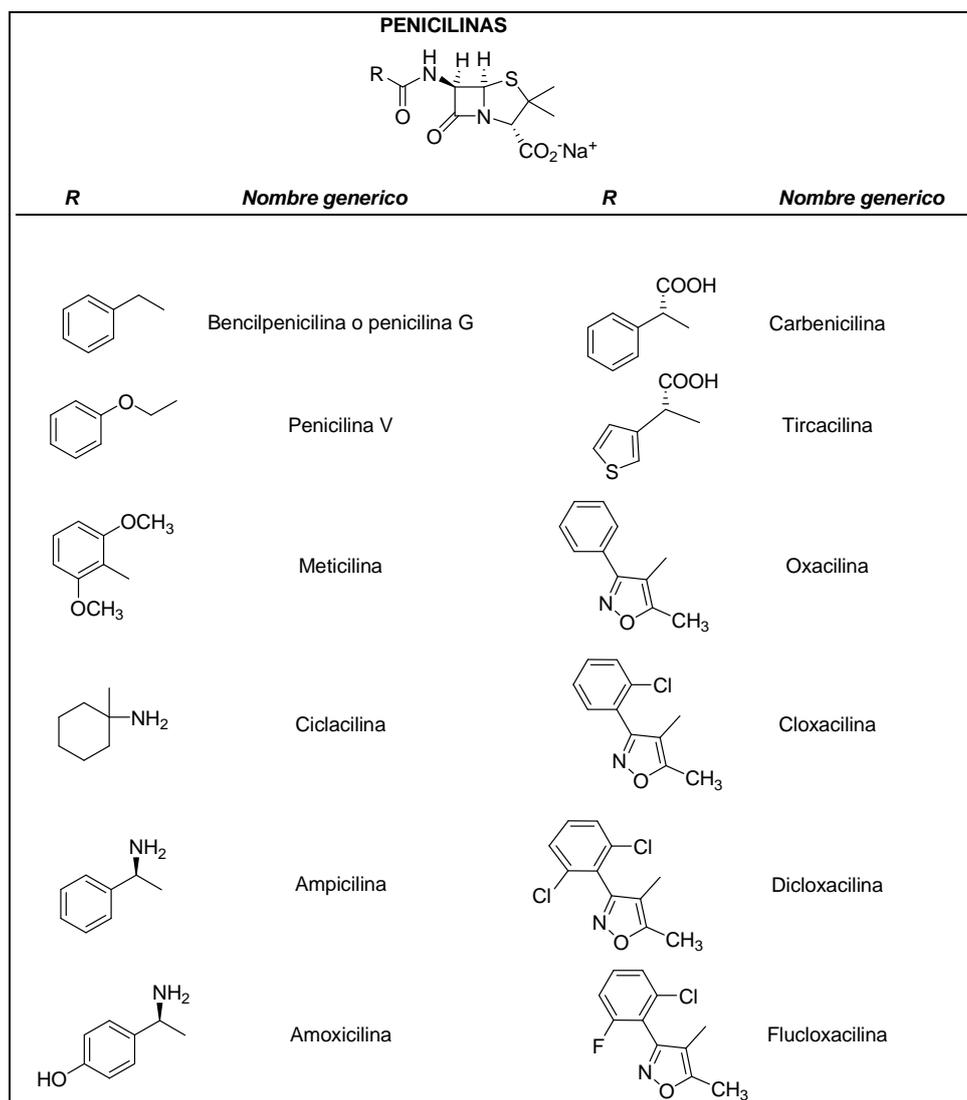


Figura 19. Penicilinas clínicamente más usadas.

³⁸ K.G. Holden "Cephalosporins" y D. N. McGregor "Penicillins" en: A.R. Katritzky, C.R. Rees. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Vol. 7, Pergamon Press: Oxford, 1984.

CEFALOSPORINAS					
R^1	R^2	Nombre Genérico	R^1	R^2	Nombre Genérico
	-H	Cefalexina			Cefotaxima
		Cefaloglicina			Ceftriaxona
		Cefamandol			Cefepima
		Cefonicid			Cefodizima
	-H	Cefadroxilo			Ceftazidima
		Cefprozilo			Cefalotina
		Cefuroxima			Cefalonio
R^1	$3'$	Nombre Genérico	R^1	$3'$	Nombre Genérico
	-Cl	Cefaclor		-H	Ceftizoxima

Figura 20. Estructuras de cefalosporinas.

Penicilinas como haptenos.

Las penicilinas son reactivas frente a una amplia variedad de reactivos nucleófilos. Como consecuencia de su relativa alta reactividad, su transformación *in vivo* genera diferentes metabolitos que son reconocidos por el sistema inmunológico.

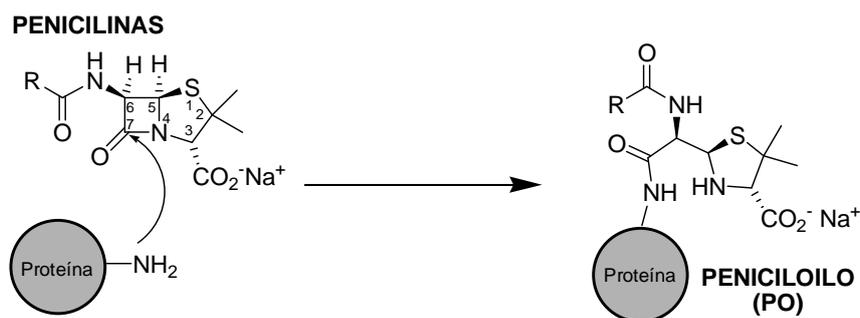


Figura 21. Formación del determinante antigénico mayor de penicilina.

El bencilpeniciloilo (BPO), determinante antigénico mayor de la bencilpenicilina o penicilina G (Figura 21; R=CH₂-Ph), se forma a partir del ataque nucleofílico a la molécula de penicilina por el grupo amino de los restos de lisina de la albúmina de suero humano (HSA) presente tanto en plasma como en membranas celulares. Las albúminas del suero humano son los constituyentes proteicos solubles mayoritarios del sistema circulatorio y están implicados en el transporte, circulación, y metabolismo de algunos ligandos exógenos y también de numerosos medicamentos. La apertura nucleofílica tiene lugar de manera rápida y efectiva, y está relacionado con la capacidad del grupo carbonilo de la β-lactama como agente acilante, debido a la tensión existente en la estructura química causada por la fusión *cis* entre los dos heterociclos de 4 y 5 átomos (β-lactama y tiazolidina). Además, el conjugado obtenido de este modo el determinante antigénico mayor de bencilpenicilina, es lo suficientemente estable para ser aislado y caracterizado por métodos comunes.

Este mismo comportamiento se observa para la ampicilina y amoxicilina, dando lugar a ampiciloilo (APO) y amoxiciloilo (AXO) como determinantes mayores, y por extensión se asume este comportamiento para el resto de las penicilinas.

En la actualidad las pruebas cutáneas se realizan con conjugados de peniciloilos acoplados a poli-L-lisina (conjugado H-P comercial). Además, actualmente existen serias evidencias de la existencia de otros derivados de la penicilina con capacidad inmunogénica. A causa de su importancia, no sólo el conjugado de PLL debería emplearse como reactivo para los ensayos de detección de IgE, sino que también debería usarse una mezcla de determinantes menores. La mezcla de determinantes menores original (Figura 22), consistía en bencilpenicilina (**1**), bencilpeniciloato (**2**) y bencilpeniloato (**3**).²⁰

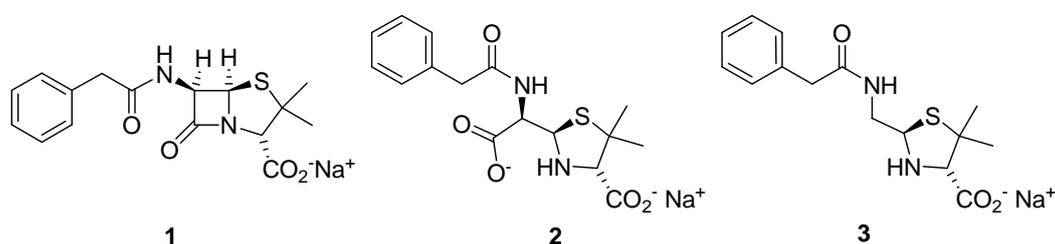


Figura 22. Mezcla de determinantes menores (MDM) original.

Un hecho importante en reacciones a medicamentos es que los anticuerpos específicos pueden tener lugares de unión para epítopos pequeños. Generalmente, se considera que el tamaño medio para inducir una respuesta es aproximadamente de unos tres aminoácidos. En el caso de la penicilina, la mayoría de los anticuerpos formados son específicos a la molécula de antibiótico completa, que se corresponde con tres aminoácidos. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de anticuerpos específicos solamente a la cadena lateral de estos betalactámicos, o incluso a pequeñas porciones de dichas cadenas, tal es el caso de anticuerpos que diferencian entre estructuras que solo se distinguen por un grupo amino y un grupo alcohol (bencilpenicilina y amoxicilina).³⁹ Además, la existencia de anticuerpos frente a epítopos pequeños explicaría la observación frecuente de reacciones alérgicas a varios fármacos que aunque son diferentes comparten alguna parte de su estructura.^{40,41,42}

³⁹ M. Blanca, J. M. Vega, J. Garcia, M. J. Carmona, S. Terrados, A. Miranda, M. J. Avila, C. Juárez. *Clin. Exp. Allergy* **1990**, 20, 475-481.

⁴⁰ A. L. de Weck. "Low molecular weight antigens" en: M. Sela. *The Antigens*, Vol 2, Academic Press: New York, 1974.

⁴¹ B. A. Baldo, M. M. *Nature* **1983**; 306, 262-264.

Tras diversos estudios se ha comprobado que existen otras estructuras en la molécula de la penicilina, como la cadena lateral, que también participan en la inducción de la respuesta, y que además pueden determinar la aparición de reacciones selectivas.^{43,44, 45}

La selectividad en las reacciones a penicilinas se describió cuando se demostró que pacientes con una reacción inmediata a amoxicilina tenían buena tolerancia a otros β -lactámicos.³⁹ En la actualidad, son muchos otros los antibióticos betalactámicos frente a los cuales se ha demostrado la presencia de anticuerpos IgE específicos con diferentes grados de reactividad cruzada y de selectividad,⁴⁶ confirmándose la importancia de la cadena lateral además de otras estructuras de la molécula del antibiótico en la inducción de una respuesta inmunológica y, por tanto, una reacción alérgica mediada por anticuerpos IgE específicos. Con respecto a otro tipo de betalactámicos como son las cefalosporinas, también se han realizado estudios de especificidad y se ha comprobado la existencia de diferentes patrones de reconocimiento, según los anticuerpos estén dirigidos frente a la región nuclear o a la cadena lateral. Así existen pacientes que reaccionan de forma específica a la cefalosporina que indujo la reacción, otros tienen reactividad cruzada solamente con otras cefalosporinas y, otro grupo de pacientes que son capaces de reaccionar tanto a cefalosporinas como a penicilinas.⁴⁶

La especificidad frente a la cadena lateral puede ser también causa de reactividad cruzada entre diferentes betalactámicos como es el caso de penicilinas y cefalosporinas que poseen una región nuclear diferente, pero pueden tener una misma estructura química en la cadena lateral.

La especificidad de los anticuerpos a betalactámicos puede depender del isotipo, IgE o IgG, siendo los anticuerpos IgE más específicos de la cadena lateral de las penicilinas

⁴² A.L. de Weck. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1986**, 78, 1047-1050.

⁴³ A. Romano, D. Quarantino, I. Aimone-Gastin, C. Mayorga, G. Papa, A. Venuti, J. L. Gueant, M. Blanca. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **1997**, 10, 187-191.

⁴⁴ D. F. Silviu, S. Mc Philipps, R. Warrington. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1993**, 91, 694-701.

⁴⁵ A. Romano, D. Quarantino, L. Venemalm, M. J. Torres, A. Venuti, M. Blanca. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1999**, 104, 1113-1114.

⁴⁶ A. Romano, C. Mayorga, M. J. Torres, M. C. Artesani, R. Suau, F. Sánchez, E. Pérez, A. Venuti, M. Blanca. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000**; 106, 1177-1183.

mientras que los anticuerpos IgG están fundamentalmente dirigidos a la región nuclear del betalactámico con lo que la posibilidad de reactividad cruzada es mayor.⁴⁷

Tanto a nivel de anticuerpos policlonales como monoclonales, cuando se realizan estudios de inhibición del RAST (RadioAllergoSorbent Test) para analizar la especificidad de los mismos, se demuestra que además de la cadena lateral son necesarias otras estructuras de la molécula para que el reconocimiento sea óptimo.^{48,49}

El problema clínico.

En los últimos años ha mejorado el proceso de producción de los β -lactámicos, disminuyendo no solo su alergenicidad sino también su inmunogenicidad. Sin embargo, el número de reacciones alérgicas no ha disminuido de forma paralela, y esto es probablemente, debido a que el número de sujetos expuestos a estos fármacos ha aumentado y a la variación en la estructura química de los β -lactámicos, necesaria para aumentar su espectro antibiótico.^{34,50} Esto último implica la aparición de nuevos determinantes antigénicos que pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico, con la existencia de reactividades cruzadas y mecanismos selectivos en respuestas inmediatas mediadas tanto por IgE como por células T.⁵⁰

Además existe otro aspecto que puede influir en la aparición de reacciones alérgicas a β -lactámicos, y es la variabilidad de su consumo en un mismo país con el tiempo y en el mismo período de tiempo de unos países a otros, con el denominador común de un alto consumo de amoxicilina y la progresiva desaparición de la bencilpenicilina⁵⁰

En las últimas dos décadas numerosos artículos, muchos de ellos difiriendo del punto de vista clásico, han contribuido a cambiar las opiniones mantenidas sobre las reacciones

⁴⁷ M. J. Torres, F. J. Gonzalez, C. Mayorga, M. Fernandez, C. Juárez, A. Romano, M. Blanca. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1997**, *113*, 342-344.

⁴⁸ C. Mayorga, T. Obispo, L. Jimeno, M. Blanca, J. Moscoso del Prado, J. Carreira, J. J. Garcia, C. Juarez. *Toxicology* **1995**, *97*, 225-234.

⁴⁹ F. Moreno, M. Blanca, C. Mayorga, S. Terrados, C. Moya, E. Pérez-Inestrosa, R. Suau, J. M. Vega, J. García, A. Miranda, M. J. Carmona. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1995**, *108*, 74-81.

⁵⁰ M. Blanca, J. M. Vega, J. García. *Clin. Exp. Allergy.* **1994**, *24*, 407-415.

alérgicas a β -lactámicos.^{39,51,52,53,54} Aunque estos incluyen tanto investigación clásica como clínica con respuestas mediadas por IgE y células-T,⁵⁵ nos centraremos exclusivamente en respuestas mediadas por IgE.

Las primeras investigaciones indicaron que había pacientes que desarrollaron reacciones anafilácticas severas a amoxicilina, pero eran tolerantes a la bencilpenicilina.^{39,51} Los estudios *in vitro* indicaron que estos pacientes desarrollaron anticuerpos IgE que reconocían preferentemente la estructura de la cadena lateral.⁵⁶ Posteriores investigaciones indicaron que los test cutáneos con determinantes mayores y menores no eran suficientes para establecer el diagnóstico. Puesto que pacientes con tests negativos no presentaban tolerancia.³⁵ Otra observación era que la amoxicilina tomada vía oral era a veces causante de anafilaxis, en contra de las opiniones publicadas.^{35,57}

El análisis del consumo de antibióticos durante este periodo reveló que en 1995, la amoxicilina se prescribía el doble que la eritromicina y diez veces más que ampicilina. Desde 1984 las tendencias de prescripción de fármacos antimicrobianos y penicilina G han disminuido y la prescripción de cefalosporinas ha aumentado.⁵⁸ En un estudio reciente llevado a cabo en pacientes alérgicos a penicilinas, la amoxicilina fue el fármaco que con más frecuencia inducía reacciones alérgicas.⁵⁹ Por ello, se considera necesario incluir la amoxicilina en los test rutinarios cutáneos.^{35,60} Debido a que los test cutáneos no presentan una sensibilidad óptima, los test *in vitro* podrían requerirse como

⁵¹ M. Blanca, E. Pérez-Inestrosa, J. García, A. Miranda, J. M. Vega, S. Tarrados, M. Avila, A. Martín, R. Suau. *Allergy*. **1988**, *43*, 508-510.

⁵² C. Marcos Bravo, I. Luna Ortiz, R. González Vázquez. *Allergy*. **1995**, *50*, 359-361.

⁵³ B. A. Baldo, D. G. Harle. *Mol. Immunol.* **1990**, *27*, 1063-1071.

⁵⁴ P. Demoly, D. Messaad, H. Sahla, D. Hillairebuys, J. Bousquet. *Allergy* **2000**, *55*, 418-419.

⁵⁵ M. Blanca. *Allergy* **1995**, *50*, 777-782.

⁵⁶ M. Blanca, C. Mayorga, E. Pérez-Inestrosa, R. Suau, C. Juárez, J. M. Vega, M. J. Carmona, M. Pérez-Estrada, J. García. *J. Immunol. Methods* **1992**, *153*, 99-105.

⁵⁷ E. Macy, P. K. Ritcher, R. Falkkoff, R. Zeiger. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1997**, *100*, 586-591.

⁵⁸ L. Mc Caig, J. M. Hughes. *JAMA*. **1995**, *273*, 214-219.

⁵⁹ E. Macy, R. J. Burchette. *Allergy* **2002**, *57*, 1151-1158.

⁶⁰ M. J. Torres, M. Blanca, A. Weck, W. Aberer, K. Brockow, W. J. Pichler, P. Demoly, for ENDA, the EAACI interest group on Drug Hypersensitivity. *Allergy* **2003**, *58*, 961-972.

test complementario^{39,60} Incluso así, casi el 30% de los pacientes requerirían administración controlada del antibiótico,^{61,62} aunque tampoco sería recomendable la administración controlada en pacientes que sean muy susceptibles.^{60,63,64}

¿Cuáles son los determinantes a penicilinas?

La definición del epitopo o determinante antigénico es una cuestión crítica para la comprensión de las reacciones de hipersensibilidad inmediata a β -lactamas.^{33,34,42,64} Desde el principio, el determinante BPO ha sido la estructura mejor identificada reconocida por anticuerpos IgE e IgG.³³ Sin embargo, la posible formación de distintos metabolitos de penicilina debido a los diferentes grupos funcionales que ofrece esta estructura a la conjugación, condujo a algunos investigadores a buscar nuevos determinantes. Se han considerado así estructuras como bencilpeniciloico, bencilpenicilénico, bencil penalmaldato, bencil penaldato, bencilpenicoilo y bencilpenicilanilo, representadas en la Figura 23, que han sido propuestas como determinantes antigénicos menores. No se tienen análisis avanzados inmunoquímicos con respecto a especificidades de IgE. Un estudio reciente mostró que la estructura equivalente a peniciloilo y penicanilo en penicilina V y amoxicilina, no contribuyeron significativamente al reconocimiento. Sin embargo, cuando se usaron varias combinaciones para el estudio de anticuerpos IgE *in vitro*, fue aparente un aumento en la sensibilidad del diagnóstico del test.⁶⁵

⁶¹ M. J. Torres, A. Romano, C. Mayorga, M. Carmen, A. E. Guzmán, M. Reche, C. Juárez, M. Blanca. *Allergy*. **2001**, 56, 850-856.

⁶² M. J. Torres, C. Mayorga, L. Leyva, A. E. Guzmán, J. A. Cornejo-García, C. Juárez, M. Blanca. *Clin. Exp. Allergy*, **2002**, 32, 270-276.

⁶³ M. Blanca, C. Mayorga, M. J. Torres, R. Warrington, A. Romano, P. Demoly, F. Silviu Dan, M. Moya, J. Fernandez and C. Juárez. *Clin. Exp. Allergy* **2002**, 32, 192-197.

⁶⁴ M. Blanca, M. J. Torres, C. Mayorga, E. Pérez-Inestrosa, R. Suau, M. I. Montañez, C. Juárez. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, 4, 261-266.

⁶⁵ Z. Daxun, J. Adriansson, A. Martín. *J. Inves. Clin. Immunol.* **1992**, 2, 240-246.

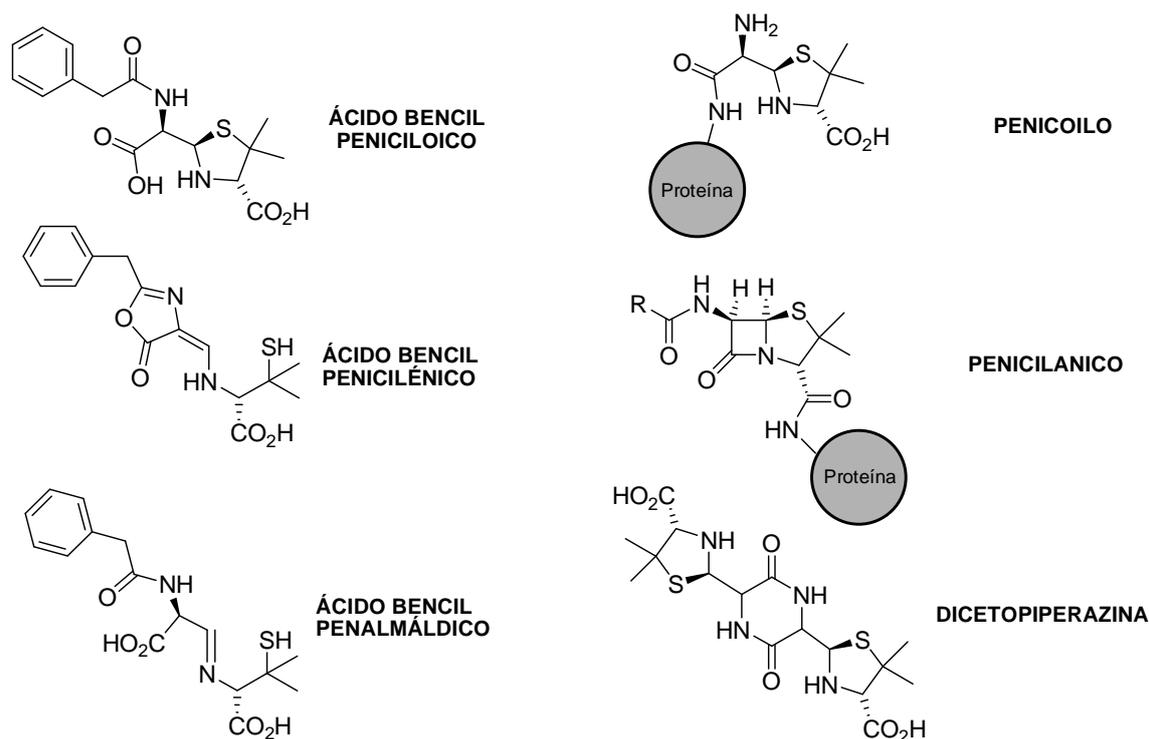


Figura 23. Determinantes menores propuestos de bencilpenicilina.

Los tests *in vitro* mostraron desde el principio que un número de pacientes daban negativo al test a BPO, pero positivo a la mezcla de determinantes menores (MDM). La definición de determinantes menores se hizo sin una validación inmunoquímica *in vitro*. Consecuentemente, existe mucha confusión en la bibliografía si comparamos los determinantes menores originales descritos y los empleados *in vivo*.

Desde el punto de vista clínico se ha asociado el concepto de determinante mayor a la aparición de urticaria, mientras que el concepto de determinante menor se relaciona con la mayoría de las reacciones anafilácticas. Algunos investigadores han propuesto que pacientes anafilácticos tienen anticuerpos IgE que principalmente reconocen los determinantes menores, mientras que pacientes con urticaria tienen, además de anticuerpos IgE, anticuerpos IgG específicos a bencilpeniciloilo (BPO). Este aspecto controvertido no se ha verificado lo suficiente desde que se propuso hace más de cincuenta años.⁶⁶

⁶⁶ M. J. Torres, C. Mayorga, R. Pamies, J. L. Rodríguez, C. Juárez, A. Romano, M. Blanca. *Allergy* **1999**, 54, 936-943.

El problema clínico de reactividad cruzadas entre β -lactamas

Se cuestiona muy a menudo que un paciente con una reacción alérgica a penicilinas pueda tomar con seguridad otras β -lactamas. De éstas, las cefalosporinas son las más importantes, aunque otras β -lactamas también pueden emplearse.^{50,63}

La mayoría de los estudios dirigidos a cefalosporinas se han hecho en pacientes que inicialmente fueron alérgicos a penicilina. Así que la cuestión a resolver es la probabilidad que tiene un paciente de tolerar la penicilina si es alérgico a cefalosporina. En un estudio muchos de los pacientes que desarrollaron respuesta IgE a cefalosporinas resultaron ser también alérgicos a penicilinas. Aun no se conocen cuales son los factores que establecen la reactividad cruzada, aunque se ha sugerido que estudios inmunoquímicos podrían predecir la reactividad cruzada,^{67,68} pero esto no ha sido corroborado completamente.^{53,69} Los anticuerpos IgE a BPO reconocen otras estructuras β -lactámicas, incluyendo monobactamas, pero a pesar de este reconocimiento inmunoquímico, también se ha observado buena tolerancia en pacientes muy sensibles a bencilpenicilina.^{70,71}

¿Qué se espera de los estudios in-vitro?

Uno de los principales problemas a los que nos enfrentamos es que la sensibilidad de las pruebas *in vitro* e *in vivo* está decreciendo. Otro problema es que para lograr sensibilidad óptima *in vivo* con determinantes de amoxicilina, deben emplearse concentraciones tan altas como de 20 mg/mL, con los consecuentes riesgos de reacciones sistémicas.^{61,62} Además se necesitan nuevas pruebas *in vitro* o mejoras de las existentes.

⁶⁷ B. A. Baldo. *Clin. Exp. Allergy* **1999**, 29, 744-749.

⁶⁸ D. G. Harle, B. A. Baldo. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1990**, 92, 439-444.

⁶⁹ B. A. Baldo, N. H. Pham. *J. Mol. Recognit.* **1995**, 8, 1-7.

⁷⁰ M. Blanca, J. Fernández, A. Miranda. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1989**, 83, 381-385.

⁷¹ A. Miranda, M. Blanca, J. M. Vega. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1996**, 98, 671-677.

Durante muchos años, se ha estado usando la albúmina de suero humano como un portador adecuado para los ensayos clínicos en fase sólida *in vitro*,⁷² pero para poder realizar ensayos en una fase sólida con mayor capacidad de fijar haptenos, se han empleado con éxito poli-L-lisina o espaciadores de amino.⁵⁶ Sin embargo, estos estudios *in vitro* tienen limitaciones, debido a que no todos los casos se diagnostican y, a que numerosos casos continúan siendo positivos a las pruebas cutáneas pero negativos al RAST.^{7,61,62} Además algunos casos pueden ser positivos al RAST pero negativos a pruebas cutáneas, así que ambas aproximaciones son frecuentemente necesarias.⁷³

Para muchos investigadores, los estudios *in vitro* se han usado como un modelo para definir en detalle muchas de las especificidades descritas y para comprender reactividades cruzadas. Las experiencias de Blanca y colaboradores con numerosos sueros, indican que se pueden identificar tres grupos de pacientes principales que son alérgicos a penicilinas: aquellos que reconocen la estructura común, aquellos que reconocen la cadena lateral de penicilina con un alto grado de reactividad cruzada con otras β -lactamas, y aquellos que principalmente reconocen la cadena lateral de amoxicilina.⁴⁹

⁷² L. Juhlin, L. Wide. *Lancet* **1979**, 2, 261.

⁷³ M. J. Torres, C. Mayorga, J. A. Cornejo-García. *Allergy* **2002**, 57, 963.

Objetivos

El objetivo de este estudio está enfocado al desarrollo y la mejora de los métodos de diagnósticos *in vitro* e *in vivo*, para la detección de anticuerpos IgE dirigidos a antibióticos β -lactámicos.

Desde el punto de vista químico, nuestro principal reto se centra en emular *in vitro* los procesos de reconocimiento molecular que ocurren *in vivo*. Se necesita conocer tanto la estructura química del determinante antigénico, como la naturaleza de la proteína portadora, para obtener conjugados hapteno-portador (H-P) capaces de reproducir los procesos de reconocimiento que ocurren *in vivo*.

El trabajo realizado se presenta en esta memoria dividido en dos capítulos.

Los objetivos del primer capítulo se basan en estudios relacionados con la estructura química y/o estabilidad de los determinantes antigénicos responsables de las reacciones alérgicas a penicilinas y a cefalosporinas. Mientras que el estudio de conjugados completos (hapteno y portador) se discutirá en el capítulo segundo, conjugados para los que se emplearán determinantes antigénicos cuyas estructuras están bien establecidas.

En el *primer capítulo*, la caracterización química de los epítopes que forman parte de los conjugados en las reacciones inmunológicas, conducirá a una mejor comprensión del proceso alérgico y, al mismo tiempo, permitirá mejorar los métodos de diagnósticos existentes actualmente. Una manera de estudiar las estructuras químicas resultantes del proceso de conjugación de estas β -lactamas con proteínas, sería experimentar la reacción de estos antibióticos con nucleófilos pertenecientes a moléculas más pequeñas, siendo de mayor interés los nucleófilos nitrogenados. De esta manera, y aproximándonos al proceso de conjugación que ocurre *in vivo*, se empleará *n*-butilamina como modelo nucleófilo nitrogenado para emular los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina presentes en las proteínas.

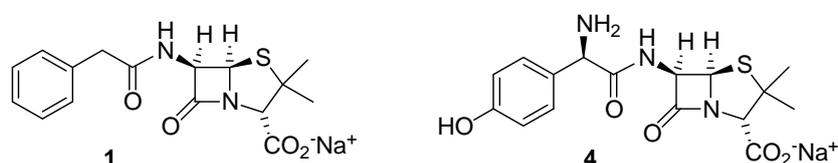


Figura 24. Bencilpenicilina y Amoxicilina.

En el caso de las penicilinas, la estructura de los determinantes antigénicos está muy bien establecida pero aún así es necesario el conocimiento de otras cuestiones, por lo que nos proponemos los siguientes objetivos concretos:

- Estudiar la estabilidad en disolución acuosa de los determinantes antigénicos menores de dos de las penicilinas más empleadas —BP (**1**) y AX (**4**), en Figura 24—, cuyas estructuras corresponden a sus productos de hidrólisis **2** y **5**, respectivamente (Figura 25).
- Sintetizar, caracterizar y estudiar la estabilidad de los productos resultantes de la conjugación de butilamina con bencilpenicilina y con amoxicilina, productos **6** y **7** respectivamente, representados en la Figura 25.

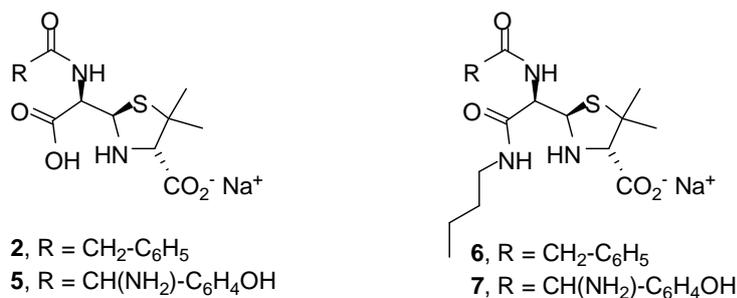


Figura 25. Estructuras hapténicas de penicilinas.

En el caso de las cefalosporinas, la estructura química de los determinantes antigénicos es aún desconocida, lo que ha impedido la interpretación clínica de las reacciones alérgicas a estos fármacos, por lo que nos proponemos estudiar qué tipos de estructuras derivadas de cefalosporinas se reconocen mejor por los anticuerpos IgE y, para acercarnos a este tipo de estructuras, nos planteamos los siguientes objetivos químicos:

- i.** Estudio de la reacción de conjugación de cefalosporinas con butilamina.
- ii.** Síntesis química y caracterización estructural de moléculas que puedan ser reconocidas por anticuerpos IgE específicos a cefalosporinas.

Aunque el proceso de conjugación de cefalosporinas con nucleófilos nitrogenados puede dar lugar a diferentes estructuras, un estudio de la reacción de cefalosporinas con una amina de pequeño peso molecular nos dará una aproximación al tipo de estructuras que se forman. Así, se empleará esta información para orientarnos en la síntesis de estructuras químicas bien definidas que puedan resultar de ese proceso de aminólisis.

Como parte de nuestra colaboración con la Unidad de Investigación de Enfermedades Alérgicas (Complejo Hospitalario Universitario Carlos Haya), se realizarán estudios de validación clínica, mediante técnicas de inhibición del RAST (sobre sueros de pacientes que presentaron episodios adversos a cefalosporinas), para determinar la sensibilidad y especificidad de las técnicas de inmunoanálisis con los productos que obtengamos. Por tanto, como aplicación a los objetivos químicos planteados en este apartado, se plantean los siguientes objetivos clínicos:

- i.** Evaluar la respuesta IgE *in vitro* y la reactividad cruzada a β -lactamas en pacientes con reacciones alérgicas inmediatas a cefalosporinas, empleando los productos resultantes de la conjugación “cefalosporina-butilamina”.
- ii.** Estudiar qué determinantes de las nuevas estructuras sintéticas generadas, son los relevantes en la inducción de las reacciones alérgicas a cefalosporinas mediadas por IgE.

En el *segundo capítulo* se plantea el diseño y la síntesis de una secuencia de estructuras moleculares perfectamente definidas, para conseguir conjugados haptenos-portador, con grupos bencilpeniciloilo en la superficie, con el fin de explotar sus propiedades exo-receptoras en procesos de reconocimiento molecular.

Una de las estrategias a seguir sería la utilización de una estructura química que actúe como transportadora y que no presente los problemas de las macromoléculas tradicionales (HSA y PLL). Una de las moléculas candidatas son los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) que serían los sustitutos de las proteínas globulares en inmunodiagnóstico, ya que existe una serie de diferencias importantes entre ambos portadores. 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 y además se ha demostrado que no son inmunogénicos ni tóxicos lo que puede permitir su uso *in vivo*. Estas propiedades hacen de estos compuestos candidatos idóneos para su empleo en inmunoensayo.

Además de estas propiedades, otras características de estos dendrímeros adecuadas para nuestros objetivos son las siguientes:

- Hay comercialmente disponibles una serie de generaciones, lo que permitiría la formación de conjugados de tamaños diferentes.
- Poseen en su superficie grupos aminos, por lo que pueden reaccionar con los anillos β -lactámicos.
- Son solubles en disoluciones acuosas, por lo que pueden emplearse *in vivo* y para ensayos *in vitro* de RAST e inhibición del RAST (ver anexo I).

Nos planteamos dos objetivos muy concretos:

- Obtención y caracterización estructural de estos antígenos dendriméricos BPO-PAMAM de diferentes generaciones (G_n , $n = 0 - 6$) con estructuras definidas, a partir de los dendrímeros comerciales PAMAM y bencilpenicilina. En función de los resultados obtenidos, podría extenderse la formación de estos conjugados a otros derivados de penicilina, como amoxicilina.
- Preparación de antígenos dendriméricos anclados a fase sólida. Debido a la dificultad de la caracterización de los conjugados hapteno-portador una vez anclados

a la fase sólida, nos planteamos la cuantificación bien de los moles de dendrímero (antígeno) o bien de los equivalentes de BPO en la fase sólida. Para de este modo, estimar el grado de funcionalización que presenta la fase sólida y poder estudiar la reproducibilidad del método de diagnóstico.

Los antígenos dendriméricos en fase fluida y acoplados a fase sólida serán evaluados clínicamente mediante ensayos de inhibición del RAST y RAST directo, respectivamente, por la Unidad de Investigación de Enfermedades Alérgicas.

Capítulo I.
Estudio de los determinantes antigénicos

I-1. Determinantes antigénicos de Penicilinas.

En la práctica clínica el empleo de los kits comercializados actualmente por las compañías farmacéuticas para la realización de las pruebas cutáneas presenta cierta controversia. Este hecho está demandando un conocimiento de la estabilidad y de la evolución de los determinantes antigénicos comerciales de penicilinas utilizados. Además de comprender qué moléculas son las que se reconocen por los anticuerpos específicos a penicilinas, es necesario conocer sus estabilidades en disolución y, sobre todo nos parece importante, las implicaciones estereoquímicas asociadas a la estabilidad de estos compuestos.

1.1. Estudio de determinantes antigénicos de Bencilpenicilina.

1.1.1. Estructura, características de RMN y estabilidad de Bencilpeniciloato sódico (2).

La obtención del ácido bencilpeniciloico por degradación de bencilpenicilina ya se conoce y está bien descrita.^{57,74} Los trabajos que describen la identificación de los antibióticos β -lactámicos y la monitorización de sus procesos de degradación en disolución emplean sobre todo espectroscopía de RMN-¹H.

Determinados estudios han llamado la atención sobre la influencia de la concentración de bencilpenicilina en D₂O en los desplazamientos químicos de los protones β -lactámicos.⁷⁵ La resonancia de casi todos los protones muestran cambios significativos cuando aumenta la concentración, hecho que podría explicarse por la formación de

⁷⁴ A. C. Munro, M. G. Chainey, S. R. Woroniecki. *J. Pharm. Sci.* **1978**, 67, 1197-1204.

⁷⁵ A. L. Thakkar, W. L. Wilham. *J. Chem. Soc. D, Chem. Commun.* **1971**, 320-322.

agregados y la superposición o apilamiento de las cadenas laterales bencílicas de los núcleos no polares en la bencilpenicilina, lo que conduce a efectos de apantallamiento. Así se ha publicado que los desplazamientos químicos de los protones aromáticos y del metileno bencílico son los más sensibles a la concentración. Además, hay otros factores que influyen en los espectros de este tipo de moléculas, como la naturaleza del disolvente y el pH del medio.⁷⁶

Los estudios publicados sobre RMN-¹H y ¹³C de penicilinas y derivados, presentan diferencias en algunos factores como la concentración o temperatura, por lo que hacen difícil la comparación directa de los datos espectrales.^{76,77,78} De tal manera que hemos decidido realizar una investigación sistemática de la estructura de los productos de evolución de penicilinas en disolución acuosa.

Cuando tiene lugar la apertura del anillo de 4 miembros de las penicilinas, la resonancia de los protones β-lactámicos es la más afectada, de hecho son estos protones los que se emplean para seguir el proceso de reacción. Sin embargo, los dobletes correspondientes a los protones H-5 y H-6 de las estructuras de bencilpeniciloato en los espectros monodimensionales de RMN-¹H en D₂O no permiten la asignación de cada uno de ellos. Las características espectrales del ácido bencilpeniciloico son similares a las de su antibiótico precursor, por lo que se resumen a continuación algunas de ellas que nos resultan más útiles.

Ambos protones β-lactámicos (H-5 y H-6) aparecen como un sistema AB en D₂O con $J_{5,6}$ de 3.9 Hz, típico de los protones vecinales en *cis* en penicilinas (Figura 26b). Sin embargo, cuando acidificamos la bencilpenicilina en disolución acuosa, puede extraerse el ácido bencilpenicilínico en CHCl₃ y la multiplicidad que presentan los H-5 y H-6 en el espectro de RMN-¹H en CDCl₃ permite la asignación de estos protones (Figura 26a), ya que puede observarse la constante de acoplamiento J_{NH-H6} debido a que no hay intercambio con deuterio de los protones NH. Estos espectros presentan el δ de H-5 a mayor campo que H-6. Sin embargo, el espectro de la bencilpenicilina en D₂O, muestra

⁷⁶ S. K. Branco, A. F. Casy, E. M. A. Ominde. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1987**, 5, 73-103.

⁷⁷ S. K. Branch, A. F. Casy, A. Lipczynski, E. M. A. Ominde. *Magn. Reson. Chem.* **1986**, 24, 465-479.

⁷⁸ T. Kupka, J. O. Dziegielewski, G. Pasterna. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, 11, 103-116.

el δ de H-5 a menor campo que H-6 (asignación obtenida de SDBS⁷⁹). Estos datos se describen en la Tabla 3.

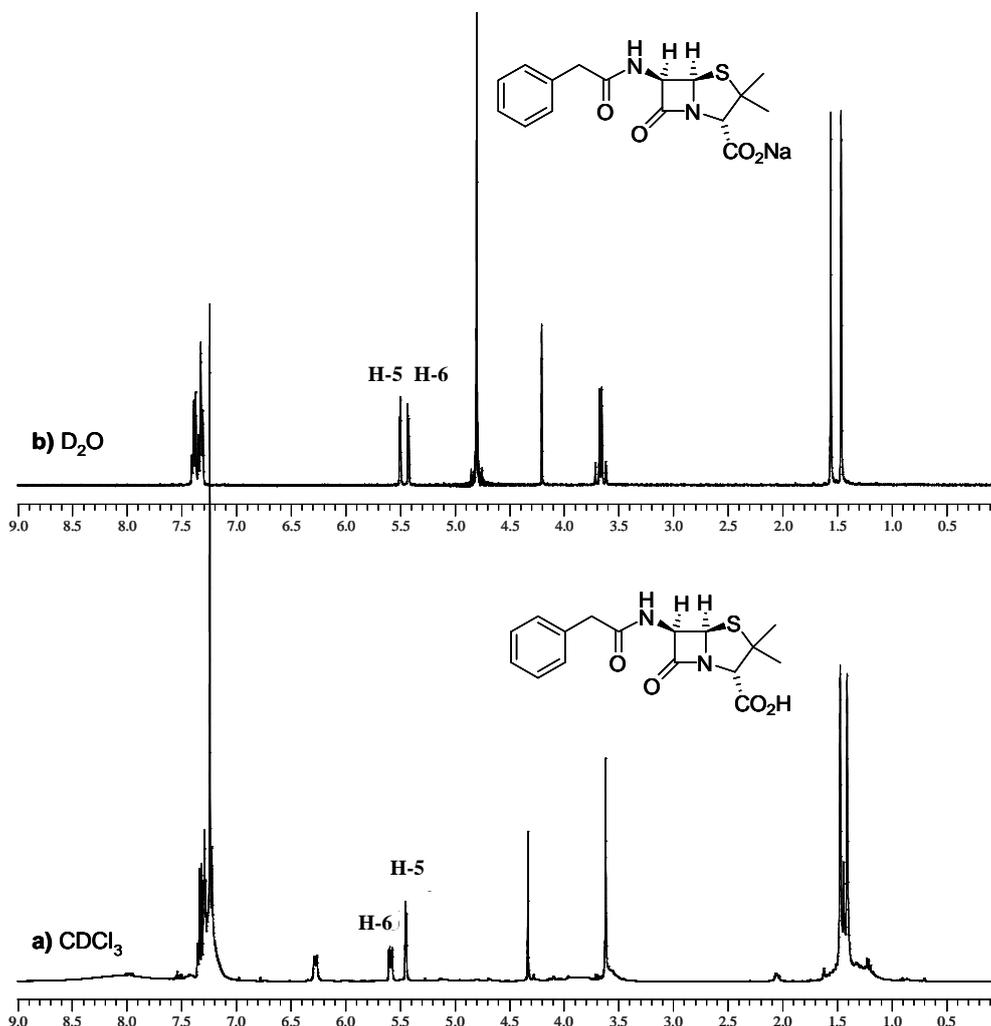


Figura 26. Espectros de RMN-¹H de **1**: a) la especie ácida en CDCl₃; b) la sal sódica en D₂O.

La molécula presenta efecto NOE entre CH₃(β) y H-3, y en la cara α entre H-5 y H-6. Una estructura tridimensional se representa en la Figura 27.

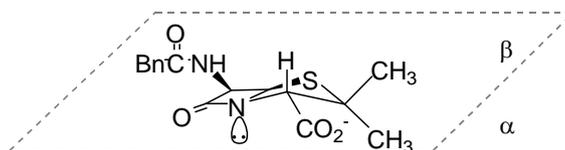
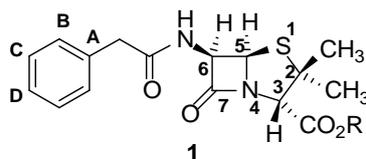


Figura 27. Estructura de bencilpenicilina (**1**).

⁷⁹ SDBS: Spectral Database for Organic Compounds. SDBSWeb: <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 17/07/06).



		Ácido Bencilpenicilínico en CDCl ₃ (R = H)	Bencilpenicilina en D ₂ O (SDBS) (R = K)		
RMN- ¹ H	δ (ppm)	descripción	δ (ppm)	descripción	RMN- ¹³ C δ (ppm)
CH ₃ -C2	1.41	s, 3H	1.49	s, 3H	CH ₃ 27.2
CH ₃ -C2	1.47	s, 3H	1.58	s, 3H	CH ₃ 31.4
CH ₂	3.62	s, 2H	3.67	s, 2H	CH ₂ 42.7
H-3	4.33	s, 1H	4.23	s, 1H	C-3 74.0
H-5	5.45	d, 1H, J = 4.2 Hz	5.51	d, 1H, J = 3.9 Hz	C-5 67.4
H-6	5.59	dd, 1H, J = 4.2 Hz, J = 8.7 Hz	5.44	d, 1H, J = 3.9 Hz	C-6 59.9
NH-C6	6.27	d, 1H, J = 8.7 Hz			C-2 65.1
Ph	7.29	m, 5 H	7.35	m, 5 H	C(D)-Ph 128.3
					C(C)-Ph 129.8
					C(B)-Ph 130.2
					C(A)-Ph 135.3
					COOK 175.2
					CO (7) 175.4
					CO-CH ₂ 175.5

Tabla 3. Datos de RMN del ácido bencilpenicilínico (CDCl₃) y bencilpenicilina (D₂O)⁷⁹.

La formación del bencilpeniciloato sódico (**2**) a partir de la bencilpenicilina (**1**) en disolución acuosa básica, es espontánea, y da lugar a un único producto con la estereoquímica que deriva de la penicilina original (Figura 28). Así se comprobó cuando se registró el espectro de RMN-¹H de una disolución recién preparada de **1** en D₂O/NaOH a pD~13: el espectro (Figura 29c) corresponde a una única estructura con estereoquímica (3*S*, 5*R*, 6*R*).

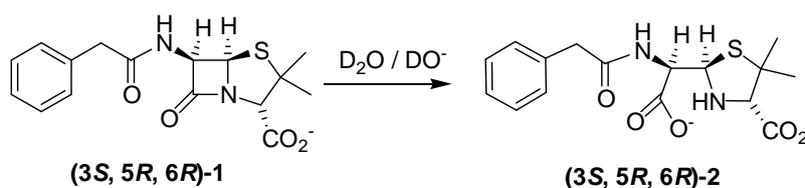


Figura 28. Reacción de hidrólisis de **1**: Formación de BPO (**2**).

Puede observarse que los δ de H-5 y H-6 aparecen más separados y más desplazados hacia campo alto, acoplados con una constante $J = 5.9$ Hz. Además, el δ de H-3 aparece más apantallado y la distancia entre los δ de los metilos geminales en C-2 aumenta.

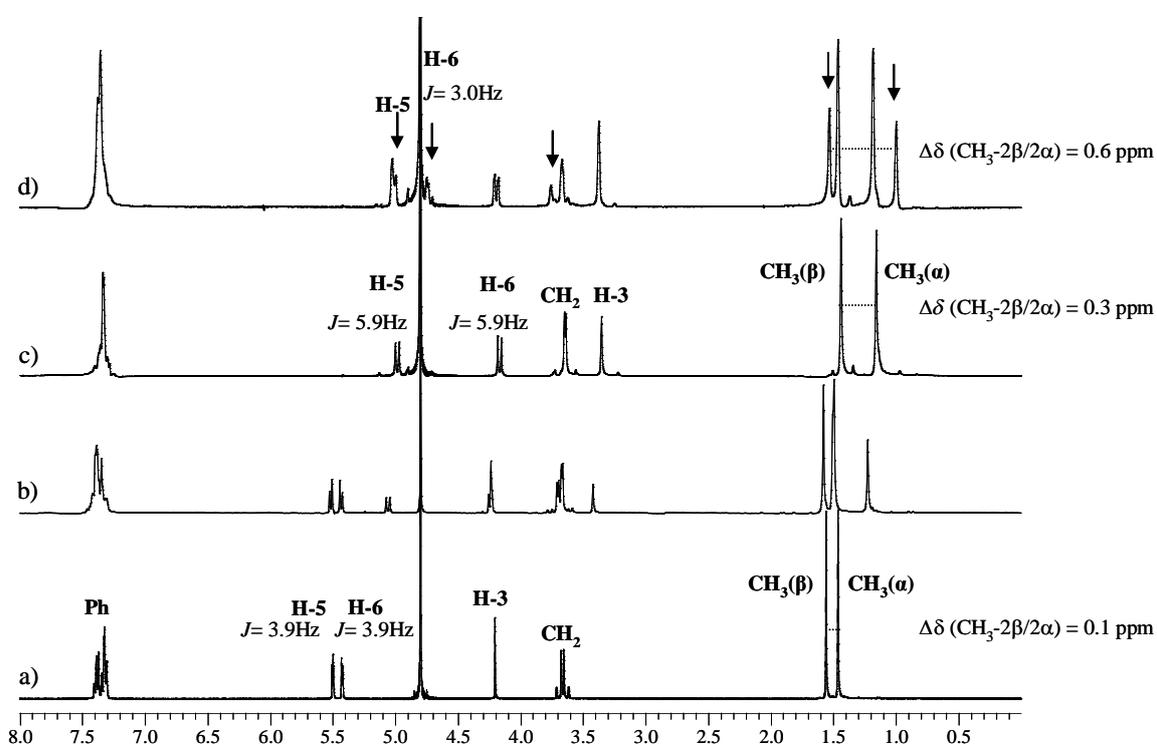


Figura 29. Espectros de RMN- ^1H (200 MHz) de una misma muestra (**1**) en D_2O a distintos tiempos y con distintas cantidades de base: a) **1** en D_2O ; b) Adición de 0.5 equivalentes de NaOH (registro 5 minutos tras la adición: ha comenzado a formarse el **(5R,6R)-2**); c) Adición de 5.5 equivalentes más de NaOH (registro 5 minutos tras la adición de NaOH: el único producto es el **(5R,6R)-2**); d) Registro 2 horas después de la adición anterior: las flechas indican la aparición de nuevas señales correspondientes a la formación de **(5S,6R)-2**.

Para comprobar la estabilidad de este compuesto en disolución acuosa básica, se monitorizó mediante RMN- ^1H la evolución de **(5R, 6R)-2** en D_2O a pH básico (Figura 29d). Se observó la aparición de nuevas señales, cuya intensidad iba aumentando en el tiempo a costa de la disminución de las anteriores. El doblete correspondiente a H-6 se

desplaza a campo bajo (4.7 ppm) y se acopla a H-5 con una constante $J = 3.0$ Hz. Además los nuevos singletes correspondientes a los metilos en C-2 aparecen todavía más separados uno del otro. La interpretación de este resultado apunta a que el compuesto **(5R, 6R)-2** epimeriza en C-5 hacia la forma más estable **(5S, 6R)-2** (Figura 30).

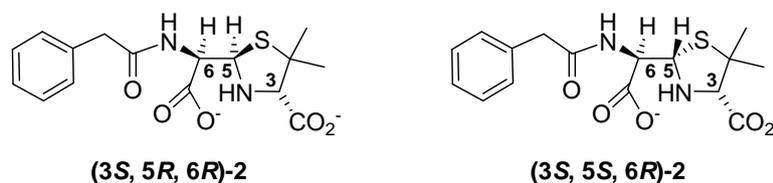


Figura 30. Epímeros de **2** en C-5.

Este proceso de epimerización sólo puede ocurrir mediante un equilibrio con formación de un intermedio imina, como ya se había descrito,^{76,80} y no enamina (como también había llegado a publicarse),⁸¹ ya que la interconversión de los epímeros no condujo al intercambio de deuterio en C-6 como ocurriría si la especie enamina estuviera implicada (Figura 31). La formación de este intermedio imina implica la ruptura del enlace C5-C6 en β al átomo de N.

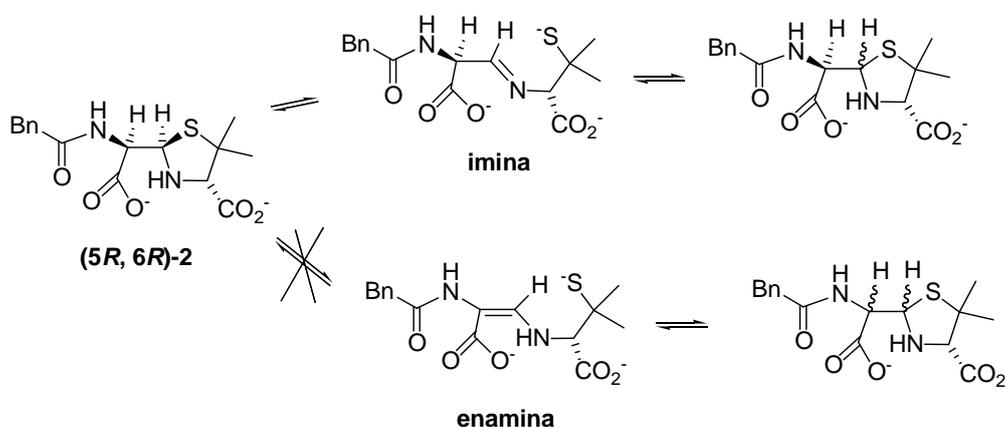


Figura 31. Intermedios que se han propuesto para la epimerización de **2** en medio acuoso alcalino.

⁸⁰ A. Llinás, B. Vilanova, F. Muñoz, J. Donoso. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2001**, 175, 3-16.

⁸¹ A. M. Davis, M. I. Page. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1702-1704.

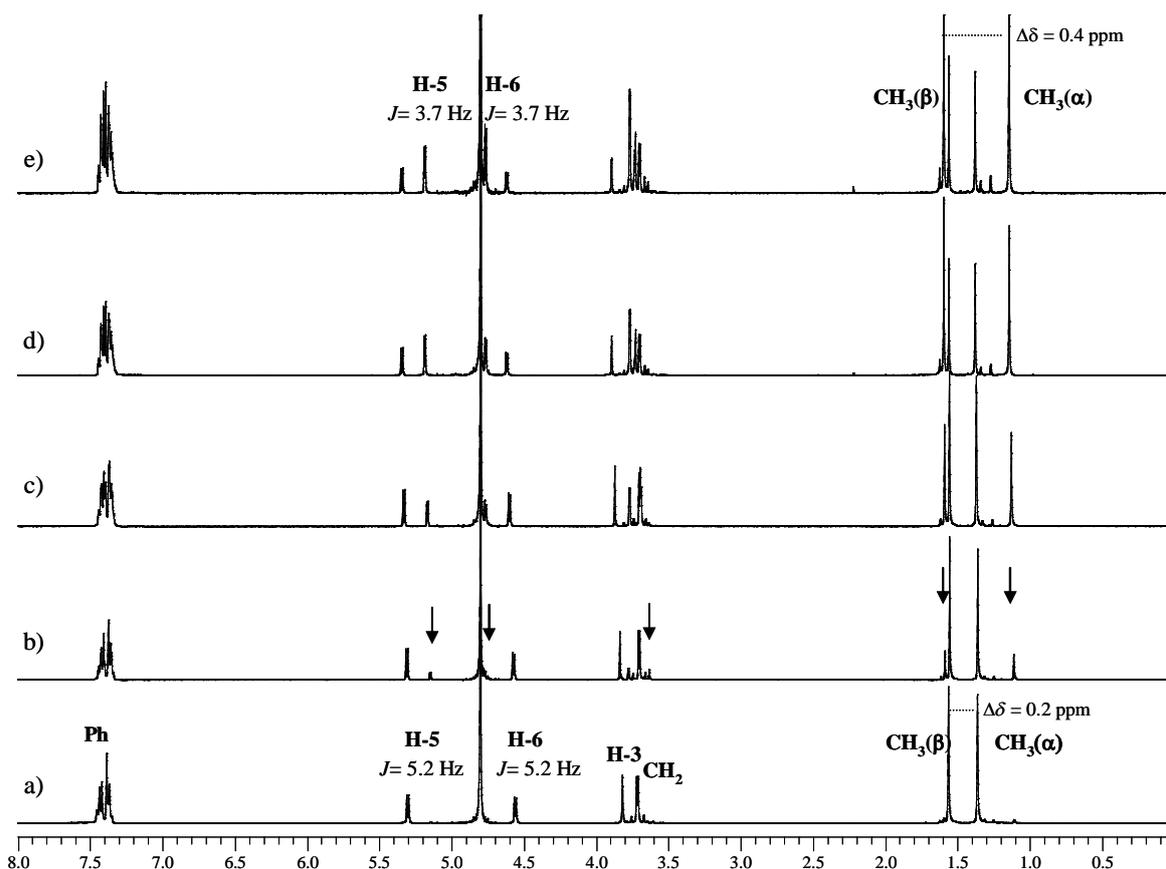


Figura 32. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz) de $(5R, 6R)$ -2 en D_2O , pD: 7.2. Registro del espectro de la muestra a distintos tiempos: a) $t = 0$; b) $t = 3$ h; c) $t = 10$ h; d) $t = 24$ h; e) $t = 32$ h. Las datos del isómero- $(5R, 6R)$ se muestran en el espectro a y los del isómero- $(5S, 6R)$ se muestran en el espectro e. Las flechas en b indican la aparición de nuevas señales correspondientes a $(5S, 6R)$ -2.

Cuando estudiamos la estabilidad del bencilpeniciloato $(5R, 6R)$ -2 en D_2O (pD = 7.2, 23°C) mediante RMN- ^1H (Figura 32), observamos que el producto evoluciona también a través de este mismo proceso de epimerización hacia $(5S, 6R)$ -2, aunque con una cinética más lenta, hasta que la mezcla alcanza un equilibrio con una proporción de isómeros 1/3 a favor del epímero $(5S, 6R)$. Este hecho implica que el equilibrio para la formación de la especie imina no ocurre sólo catalizado a pH básico.

Cuando se disuelve el bencilpeniciloato en D_2O la disolución tiene un pD ligeramente ácido, pD 6, y hemos podido observar que el bencilpeniciloato $(5R, 6R)$ -2 evoluciona de la misma manera (D_2O , 23°C), alcanzando un equilibrio de epímeros 1/3 tras 44 horas en disolución. Todos estos datos apuntan a que el proceso de epimerización en C-5 es más rápido a mayor pH.

En resumen, pueden destacarse una serie de características espectrales de RMN-¹H para derivados de bencilpenicilinas:

-La separación de los desplazamientos químicos correspondientes a las señales de los metilos geminales α/β en C-2 varían en este orden: **1** < (**5R**, **6R**)-**2** < (**5S**, **6R**)-**2**.

Además, para las estructuras **2** la separación aumenta más cuando el espectro se registra en medio básico.

-La separación entre los desplazamientos químicos correspondientes a H-5 y H-6 van en este orden: **1** < (**5S**, **6R**)-**2** < (**5R**, **6R**)-**2**. Y esta separación disminuye en medio básico.

-Las constantes de acoplamiento vecinales J_{H5-H6} confirman la estereoquímica *cis/trans* de estos protones. Para las penicilinas la conformación *cis* entre H-5 y H-6 presenta una constante $J = 4-5$ Hz y, la *trans* de las 6-epipenicilinas se caracteriza por una constante $J = 1.5-2$ Hz. Los acoplamientos de estos protones muestran $J \approx 5$ Hz para (**5R**, **6R**)-**2** y $J \approx 3$ Hz para su epímero (**5S**, **6R**)-**2**.

-La resonancia del H-3 varía mucho de la lactama cerrada (~4.2 ppm) a la lactama abierta (~3.4-3.9). Además, el δ del singlete correspondiente a H-3 en **2** depende mucho del pH, debido a la influencia que ejerce el grupo carboxilo en α , que puede presentarse en forma de carboxilato o en forma de ácido, función que provoca un mayor desapantallamiento.

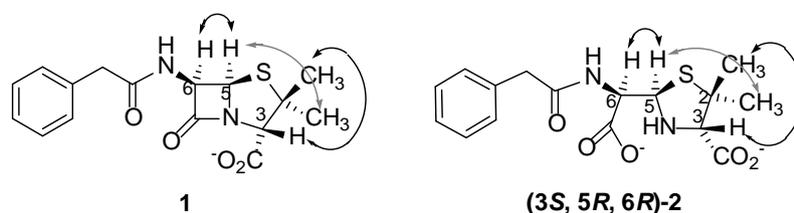


Figura 33. Efectos NOE más destacados de **1** y (**3S**, **5R**, **6R**)-**2**.

En la Figura 33 se representan los efectos NOE de las estructuras **1** y (**5R**, **6R**)-**2**, ambas moléculas presentan la misma estereoquímica y muestran efectos NOE entre los átomos de posiciones equivalentes del esqueleto β -lactámico.

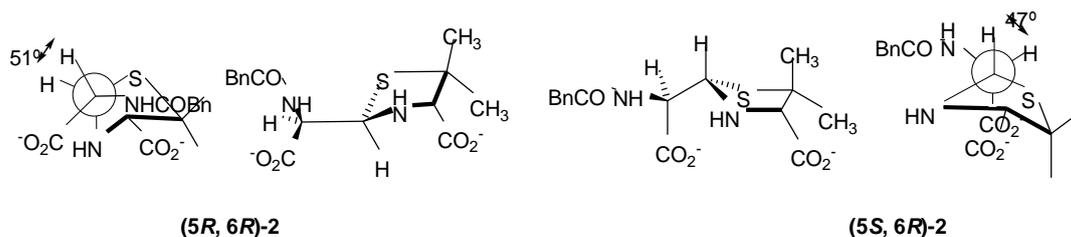


Figura 34. Confórmeros estructurales que participan en la estructura de los epímeros en C-5 de **2**.

Sin embargo, la disposición tridimensional del esqueleto β -lactámico varía, puesto que la estructura de **2** presenta muchas menos restricciones que la de **1** ya que se libera la tensión que provoca el bicyclo y el enlace C5-C6 puede rotar. No obstante, los valores de las constantes de acoplamiento vecinales indican que no hay rotación libre y que algunas conformaciones contribuyen más a la estructura que otras. Una posible conformación que participa en las estructuras de **2** (*5R* y *5S*) se representa en la Figura 34, y se ha hecho teniendo en cuenta el cálculo del ángulo diedro por las constantes de acoplamiento vecinales $J_{5,6}$ y efectos NOE.

1.1.2. Aminolisis de bencilpenicilina: Obtención de **6**.

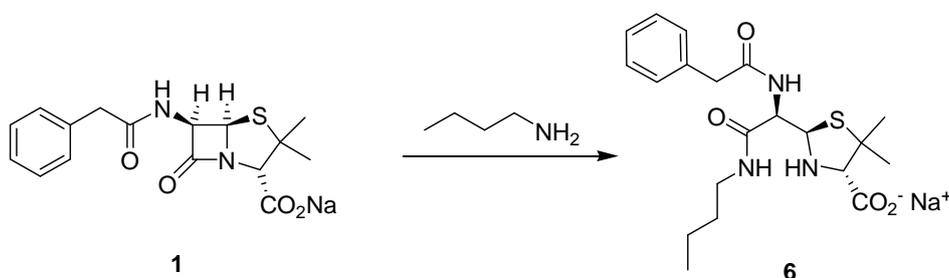


Figura 35. Apertura de la β -lactama de bencilpenicilina por ataque de nucleófilos nitrogenados.

El interés en sintetizar una estructura como **6** (Figura 35) radica en que sería una aproximación química a lo que ocurre con nucleófilos nitrogenados pertenecientes a proteínas u otras macromoléculas que emplearemos para obtener antígenos sintéticos. Cuando se hace reaccionar la sal sódica de bencilpenicilina con butilamina a escala de RMN empleando D_2O como disolvente, se observa que sólo se detecta el producto de aminolisis y que la apertura de la β -lactama tiene lugar rápidamente, tanto que cuando se registra el espectro inmediatamente después de añadir la butilamina, no se observa producto de partida. Las señales características para los protones H-5 y H-6 en el anillo β -lactámico de la bencilpenicilina se usaron para seguir el progreso de la reacción (Figura 36).⁸²

⁸² La numeración de los átomos del compuesto **6** y de otros derivados de la apertura de la β -lactama en esta memoria no es la correcta, ya que el C-5 de la tiazolidina debería ser el C-2, pero se mantiene la misma que la correspondiente a la de penicilinas con la β -lactama cerrada, para poder comparar más fácilmente los espectros de RMN.

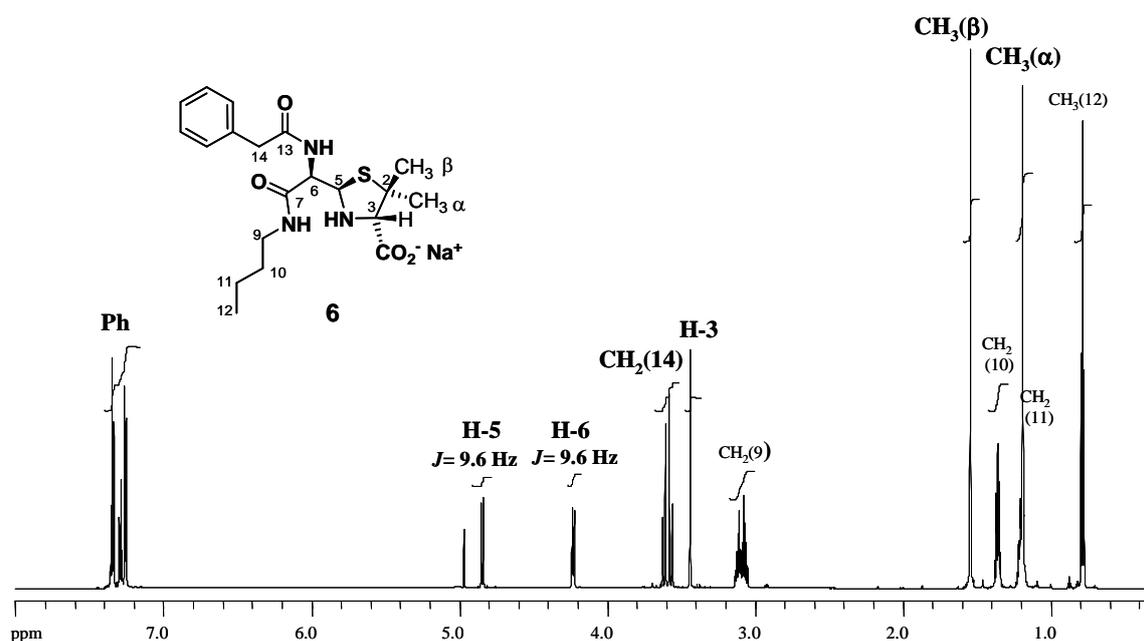


Figura 36. Espectro de RMN-¹H de **6** en D₂O con supresión de señal de disolvente.⁸³

posición	RMN- ¹ H	RMN- ¹³ C	Correlaciones	Correlaciones
	δ (ppm)	δ (ppm)	HMBC (<i>J</i> ³)	H2BC (<i>J</i> ³)
2-CH ₃ (α)	1.21 (s, 3H)	26.7	C-2, C-3	
2-CH ₃ (β)	1.56 (s, 3H)	27.1	C-2, C-3	
3	3.44 (s, 1H)	74.4	CH ₃ (α/β), C-2, C-5	
5	4.86 (d, 1H, <i>J</i> = 9.6 Hz)	64.6	C-3, C-6, C-7	C-6
6	4.25 (d, 1H, <i>J</i> = 9.6 Hz)	59.3	C-5, C-7, C-13	C-5
9	2.75 (m, 2H)	39.0	C-3, C-6, C-7	C-10
10	1.026 (m, 2H)	30.3	C-9, C-11, C-12	C-11
11	0.86 (m, 2H)	19.3	C-9, C-10, C-12	C-10, C-12
12	0.48 (t, 3H, <i>J</i> = 7.4 Hz)	13.0	C-10, C-11	C-11
14	3.62 (d, <i>J</i> = 20 Hz)	42.0	C-13, Ph	

Tabla 4. Datos espectroscópicos asignados a partir de los espectros de HMQC, HMBC y H2BC de **6**.⁸³

⁸³ Estos experimentos de RMN fueron realizados por el Prof. F. Javier Sardina López en la Facultad de Químicas de la Universidad de Santiago de Compostela.

El espectro de RMN- ^{13}C presenta 11 señales comprendidas entre 12 y 75 ppm correspondientes a los carbonos alifáticos, 4 señales correspondientes a carbonos aromáticos entre 126 y 135 ppm y otras 3 a campo más bajo de los carbonos carbonílicos de la estructura **6**. El espectro de RMN- ^1H confirma la apertura de la β -lactama por el desplazamiento de las señales de los protones β -lactámicos de bencilpenicilina a campo alto y el aumento de la separación entre estos dos dobletes, acoplados con una constante de $J_{5,6} = 9.6$ Hz. En la Figura 36 se observa, además, la incorporación del resto aminobutilo al esqueleto de la molécula por la presencia de las señales comprendidas entre 0.4 y 3.2 ppm. Los singletes correspondientes a los metilos en C-2 aparecen separados por 0.35 ppm. Para la correcta asignación de la estereoquímica de los protones H-5 y H-6 se emplearon técnicas bidimensionales de RMN (Tabla 4, Figura 36 y Figura 37).⁸³

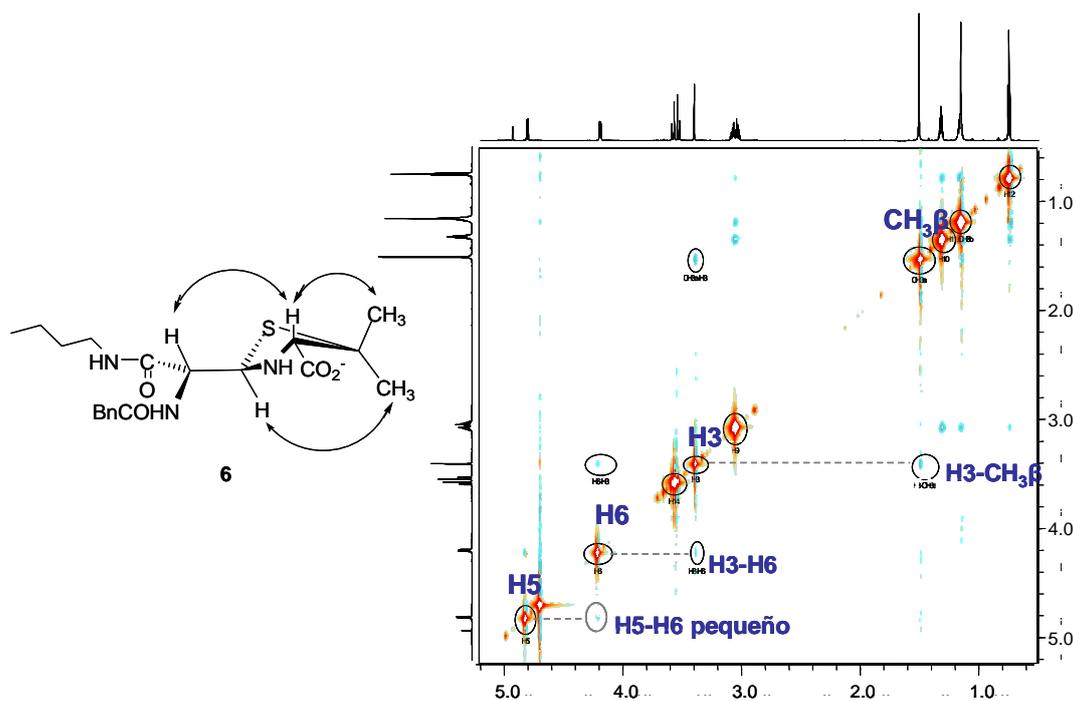


Figura 37. Representación de los efectos NOE de **6** y ampliación de su espectro NOESY.

El experimento NOESY de **6** mostró diferencias en los efectos NOE que presenta su esqueleto β -lactámico con respecto a los de **2** y **1** (Figura 33). Concretamente la diferencia reside en la manifestación del efecto NOE entre H-6 y H-3 y, que el efecto NOE es pequeño entre H-5 y H-6 (Figura 37). Estos datos junto con el valor de la

constante de acoplamiento apuntan a que una contribución importante a la estructura tridimensional de **6** es aquella que presenta los H-5 y H-6 en conformación *anti*, como la representación que se ofrece en la Figura 37.

El estudio de la estabilidad de este compuesto en medio acuoso a pH neutro y básico se llevó a cabo registrando espectros de RMN-¹H de la muestra **6** en estos medios a distintos tiempos.

Se observó que la molécula **6** tras 10 días en disolución a una temperatura de 23±2°C no dio lugar a ningún otro producto de evolución. De esta manera pudo comprobarse que **6** no sufre epimerización en C-5 como en el caso del bencilpeniciloato sódico.

Estos datos demuestran que existen diferencias de estabilidad entre los productos **2** y **6**, por lo que estas estructuras β-lactámicas abiertas por nucleófilos nitrogenados formando grupos amidas, se preferirán frente a las que forman ácido o carboxilato, cuando se emplean disueltas en medio acuoso durante cierto tiempo.

La cuestión que nos planteamos a continuación es la siguiente: cuál es la causa que permite la estabilidad de la estructura **6** en medio acuoso y no de la estructura **2**.

Para la epimerización en C-5 tiene que formarse el intermedio imina, lo que implica que los pares de electrones de N-4 tienen que estar disponibles para que ocurra la formación del enlace imina y, por lo tanto, ocurra la ruptura del enlace C-S del anillo de tiazolidina, anillo que luego vuelve a cerrar para epimerizar.

De acuerdo con la estructura tridimensional planteada para **6** de conformación H-5 y H-6 en *anti*, una posible interpretación de esta estabilidad podría implicar que los pares de electrones de N-4 intervengan en la formación de enlace de hidrógeno con el protón amídico en N-7, con una geometría de un ciclo de 5 miembros. Así, esta implicación de los pares de electrones en la interacción por puentes de hidrógeno no permitiría su disposición para la formación de la imina.

Otra causa podría ser que la geometría de la molécula **6** muestre restricciones para la formación del doble enlace plano del intermedio imina.

También podría ocurrir que se formase el intermedio imina de **6**, y que una vez abierto el anillo de tiazolidina, sea más favorable que el azufre ataque por la cara β, bien sea por la geometría del intermedio o bien por impedimentos estéricos y, de este modo, al

volver a cerrar el ciclo de 5 miembros, se mantenga la estereoquímica *cis* de la estructura (Figura 38).

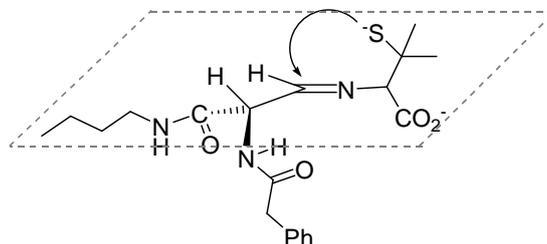


Figura 38. Representación de una posible estructura del intermedio imina de **6**.

1.2. Estudio de determinantes antigénicos de Amoxicilina.

1.2.1. Estructura, características de RMN y estabilidad del ácido amoxiciloico (5).

Hemos llevado a cabo un estudio de las características espectrales de resonancia y de estabilidad de amoxiciloato (**5**) similar al realizado para bencilpeniciloato (**2**).

Los espectros de estos compuestos también dependen de varios factores como la concentración, pH del medio y viscosidad.⁷⁴ Las características espectrales de estos derivados de amoxicilina (**4**) son similares a los derivados de bencilpenicilina (**1**).

La resonancia de los protones de la amoxicilina (**4**), sobre todo los correspondientes a la cadena lateral R, muestran una mayor variación en función del pH, debido al grado de protonación-desprotonación que pueden sufrir los grupos funcionales amino y fenol de la cadena lateral en el medio acuoso. Así, el δ del metino bencílico puede variar de 5.1 a 4.4 ppm, cuando pasa de $\text{pD} \leq 6$ a 12; al igual que los dobletes correspondientes a los protones aromáticos que también se desplazan a campo alto, aproximadamente 0.2 ppm. Estas sustituciones afectan también a los metilos en C-2: aparecen solapados a 1.45 ppm a $\text{pD} 7.2$, y se resuelven y se separan 0.06 ppm a mayor pH. En los espectros a y b de la

Figura 40 pueden observarse distintos desplazamientos químicos de **4** a dos pD distintos.

La apertura del anillo β -lactámico de amoxicilina (**4**) en medio acuoso básico para dar amoxiciloato (**5**) es inmediata (Figura 39), y así pudo comprobarse mediante RMN- ^1H (Figura 40c).

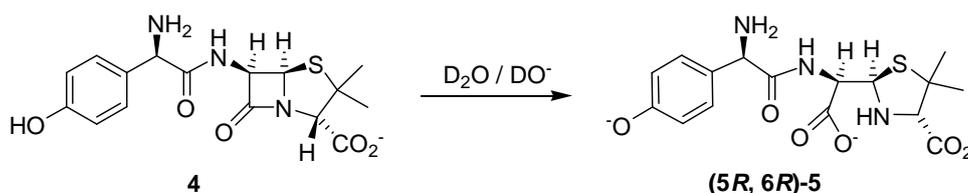


Figura 39. Reacción de hidrólisis de **4**: Formación de AXO (**5**).

La formación de AXO (**5**) se confirma por desplazamiento de las señales correspondientes a H-5 y H-6 a campo alto, acopladas con una constante $J_{5,6} = 5.6 \text{ Hz}$ y un aumento en la separación entre estos dos dobletes. También se produce una separación entre los desplazamientos químicos de los metilos geminales en C-2 ($\Delta\delta = 0.2 \text{ ppm}$), y desplazamiento a campo alto del singlete correspondiente a H-3.

Después de la formación inmediata de **5** en medio básico, a partir de AX (**4**) y 2 equivalentes de NaOH, puede observarse la aparición de otro producto derivado tras 2 horas de permanecer en esta disolución y, la conversión hacia esta nueva molécula es prácticamente completa en 24 horas. Este otro producto parece corresponder al epímero (**5S, 6R**)-**5**, debido a que su formación no implica el intercambio de D.

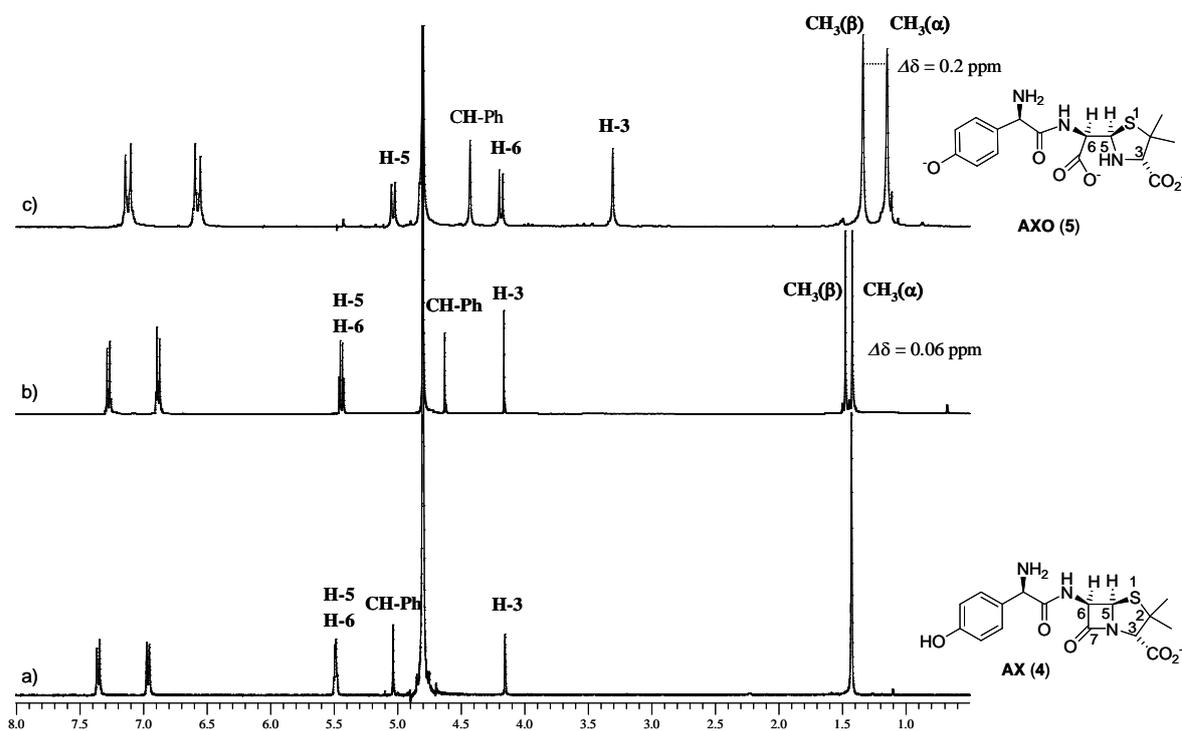


Figura 40. Espectro de RMN- ^1H de **4** (400 MHz, D_2O): a) $\text{pD} = 7.2$; b) Adición de 1 equivalente de NaOH: Formación del fenolato; c) Adición de 2 equivalentes de NaOH: Formación de AXO (**5**).

Cuando estudiamos la evolución del ácido (**5R, 6R**)-**5** en D_2O ($\text{pD} = 7.2$) en el tiempo, a una temperatura de 23°C (espectros representados en Figura 41), observamos la disminución de las señales correspondientes a este compuesto y el aumento de otras similares, que apuntan hacia la formación de su epímero-(**5S, 6R**), con una cinética menor que su equivalente **2**.

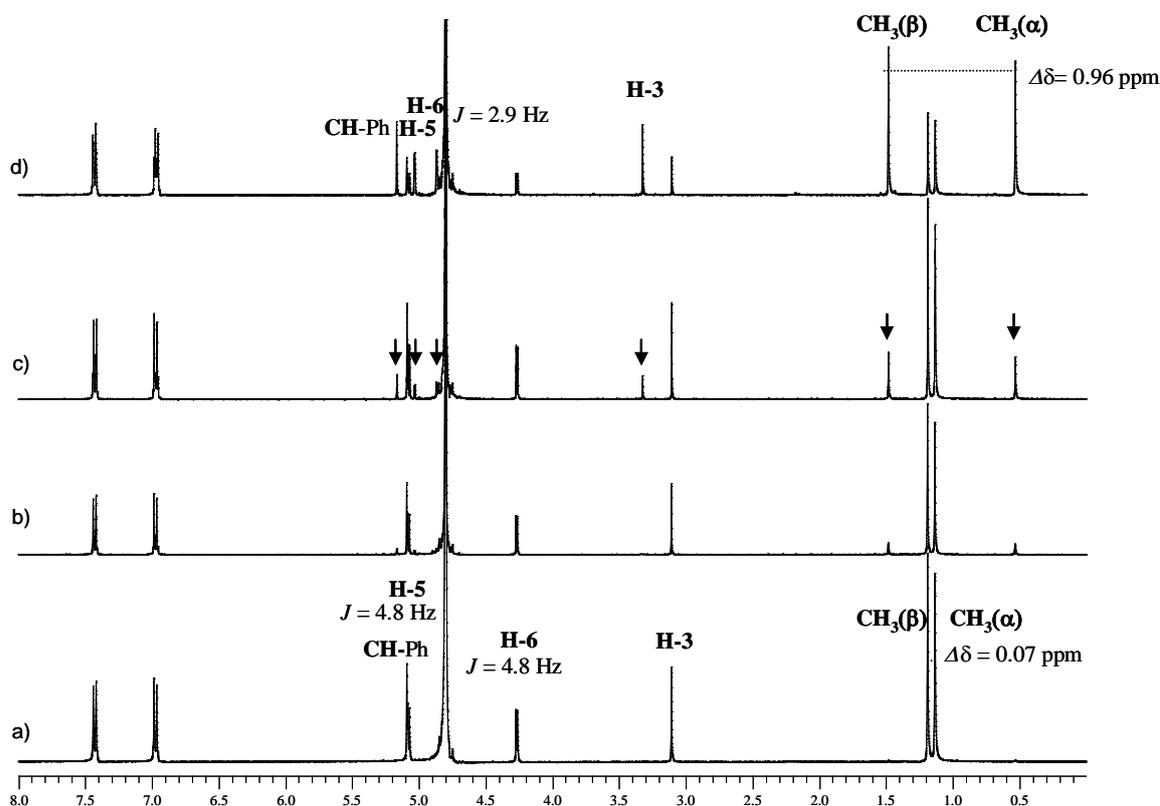


Figura 41. Evolución del ácido amoxiciloico (**5**) en D_2O , $pD = 7.2$, en el tiempo: a) $t = 0$; b) $t = 7$ h; c) $t = 23$ h; d) $t = 144$ h. Se describen las señales del ácido (**5R**, **6R**)-**5** en a y de su epímero-(**5S**, **6R**)-**5** en d.

En el epímero-(**5S**, **6R**), los singletes correspondientes a los metilos geminales en C-2 aumentan notablemente su diferencia de δ , y los protones H-5 y H-6 aparecen a desplazamientos químicos más equivalentes. La variación de la constante de acoplamiento de estos protones de $J = 4.8$ Hz a $J = 2.9$ Hz y el hecho de que ninguno de estos protones tenga intercambio con D, confirman la epimerización en C-5.

Proponemos, por tanto, un mecanismo de epimerización en disolución acuosa para AXO (**5**) análogo al descrito para BPO (**2**), vía formación de imina, como se representa en la Figura 42, descartando el mecanismo vía enamina.

De este modo, podría concluirse que el ácido (**5R**, **6R**)-**5** no es estable en disolución acuosa, puesto que evoluciona hacia su epímero en C-5. Además, esta conversión es mucho más rápida a pH básico que a pH neutro.

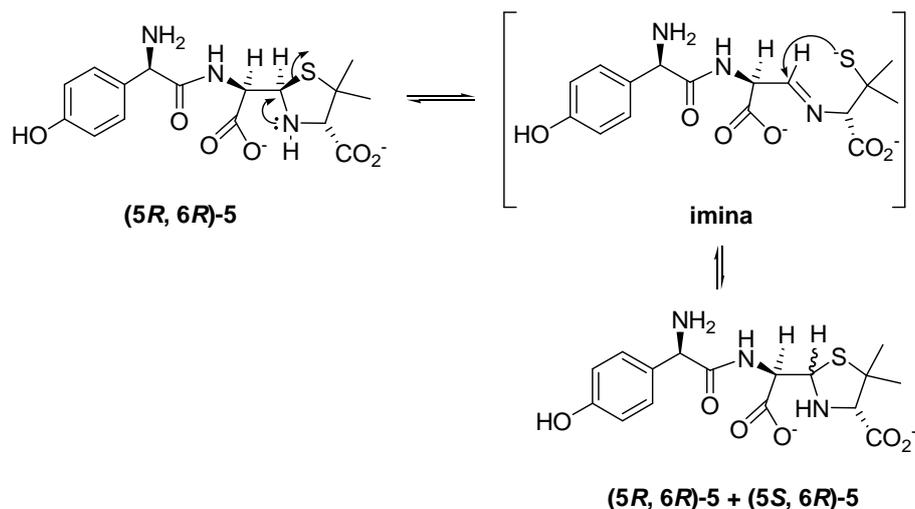


Figura 42. Mecanismo de formación de epímero en C-5 de **5**.

En resumen, pueden destacarse una serie de características de espectros de RMN-¹H para derivados de AX (**4**), muchas son similares a los derivados de BP (**1**):

-La separación de los desplazamientos químicos correspondientes a las señales de los metilos geminales α/β en C-2 varían en este orden: **4** < **(5R, 6R)-5** < **(5S, 6R)-5**. Y esta separación aumenta cuando el espectro se registra en medio básico, excepto para el caso de **(5S, 6R)-5**.

-La separación entre los desplazamientos químicos correspondientes a H-5 y H-6 van en este orden: **4** < **(5S, 6R)-5** < **(5R, 6R)-5**. Y esta distancia aumenta en medio básico.

-Las constantes de acoplamiento vecinales J_{H5-H6} confirman la estereoquímica *cis/trans* de estos protones en **5**, muestran $J \approx 5$ Hz para **(5R, 6R)-5** y $J \approx 3$ Hz para su epímero **(5S, 6R)-5**.

-La resonancia de H-3 varía igualmente mucho de la lactama cerrada (~4.2 ppm) a la lactama abierta (~3.1-3.4), y el δ de este singlete resuena a menor campo en **(5S, 6R)-5** que en **(5R, 6R)-5**.

-Los desplazamientos químicos de los protones del anillo aromático y del metino bencílico aparecen a mayor campo cuando el espectro se registra a mayor pH debido a una mayor influencia de desapantallamiento del fenolato que el fenol sobre estos protones. La diferencia es más acentuada en el protón en posición bencílica, que pasa de 5.1 ppm a pH 6 a 4.5 ppm a pH 12.

1.2.2. Aminólisis de Amoxicilina: Obtención de 7.

Para la formación de **7**, el equivalente a **6** de amoxicilina, por ataque de butilamina a AX (**4**), la reacción podría presentar un problema y es la posibilidad de que se diese reacción intramolecular o intermolecular por ataque del grupo amino de la cadena lateral al grupo carbonilo de la β -lactama. Un exceso de butilamina en el medio de reacción competiría con esta reacción y evitaría ese problema.

La reacción de apertura es rápida y da lugar a un único producto, como se representa en la Figura 43.

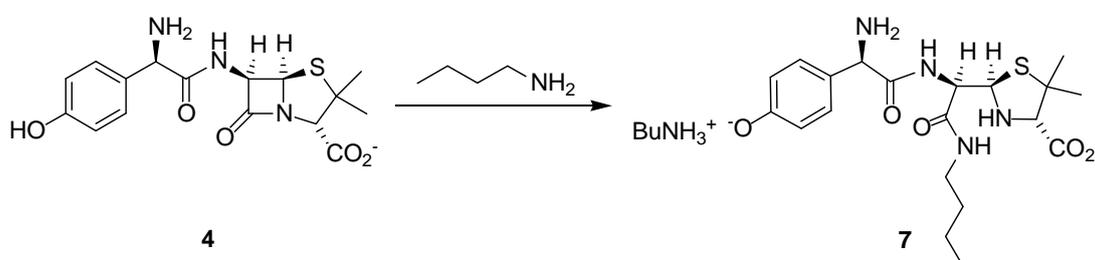


Figura 43. Apertura de la β -lactama de amoxicilina por ataque intermolecular de nucleófilos nitrogenados.

El espectro de RMN- ^1H confirma la apertura de la β -lactama por el desapantallamiento de los protones β -lactámicos de la amoxicilina y la separación entre estos dos dobletes, acoplados con una constante de $J_{5,6} = 8.6$ Hz. En la Figura 44 se observa también la presencia de dos restos de aminobutilo por la presencia de las señales comprendidas entre 0.4 y 3.2 ppm: uno el que abre la β -lactama y forma la amida y; otro, cargado positivamente de contraíón del fenolato. Los singletes correspondientes a los metilos en C-2 aparecen separados por 0.3 ppm. Se emplearon técnicas bidimensionales de RMN para la determinación estructural de esta molécula (Figura 44 y Tabla 5).

El espectro de RMN- ^{13}C presenta 4 señales comprendidas entre 170 y 177 ppm, correspondientes a los carbonos carbonílicos de la estructura **7**, 4 señales entre 116 y 159 ppm de carbonos aromáticos, y las correspondientes a los carbonos alifáticos.

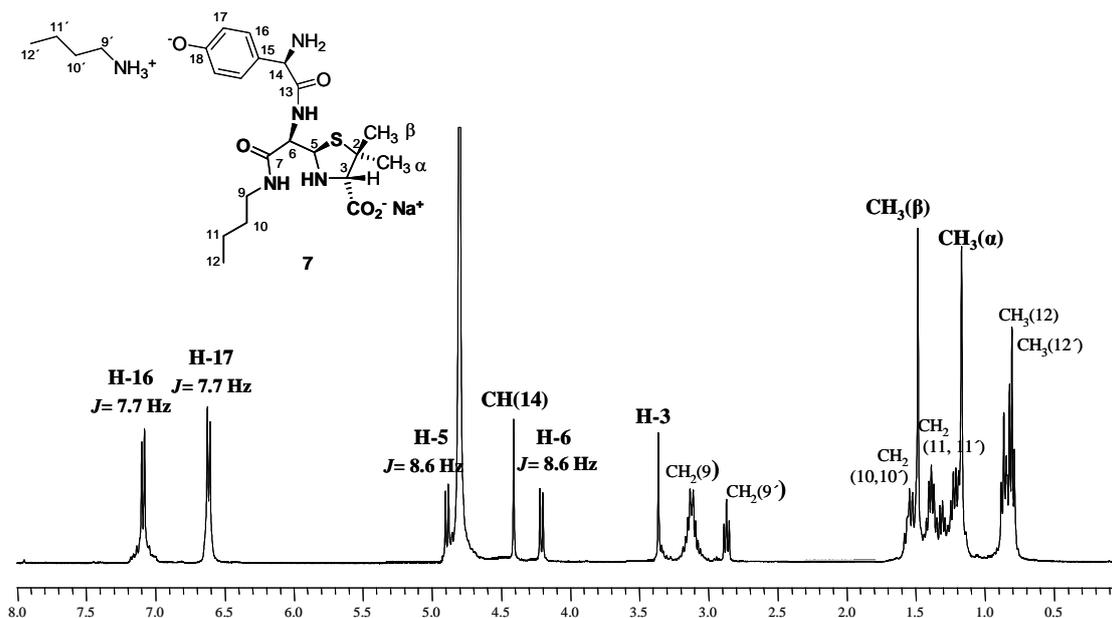


Figura 44. Espectro de RMN-¹H de 7 en D₂O / Na₂CO₃.

posición	RMN- ¹ H δ (ppm)	RMN- ¹³ C δ (ppm)	Correlaciones HMBC (J ³)
2-CH ₃ (α)	1.17 (s, 3H)	27.6	C-2, C-3
2-CH ₃ (β)	1.48 (s, 3H)	27.3	C-2, C-3
3	3.36 (s, 1H)	75.0	CH ₃ (α/β), C-2, C-5, 3-CO ₂ ⁻
6	4.21 (d, 1H, J = 8.6 Hz)	59.6	C-5, C-7, C-13
5	4.89 (d, 1H, J = 8.6 Hz)	65.2	C-3, C-6, C-7
14	4.21 (s, 1H)	58.9	C-13
16	6.61 (d, 2H, J = 7.7 Hz)	128.8	C-17, C-18
17	7.08 (d, 2H, J = 7.7 Hz)	129.4	C-15, C-16, C-17

Tabla 5. Datos espectroscópicos asignados a partir de los espectros de HMQC y HMBC de 7 en D₂O/Na₂CO₃.

Se estudiaron los productos de evolución de 7 en disolución acuosa básica y a pH neutro mediante el registro de espectros de RMN-¹H de la muestra a distintos tiempos. Tras 4 horas en disolución se observó que todavía existe más de un 90% de producto (5R, 6R)-7 y, además, que la estructura es más estable en pH neutro que en básico. De este modo, los estudios revelaron que aunque la estructura 7 no presenta tan elevada estabilidad

como la **6**, si es lo suficientemente estable como para poder realizar ensayos de diagnósticos clínicos en disolución acuosa.

I-2. Determinantes antigénicos de Cefalosporinas.

2.1. Antecedentes

Introducción al problema clínico: Cefalosporinas como haptenos.

Dentro de las reacciones alérgicas severas a antibióticos, las cefalosporinas son los fármacos responsables en un importante porcentaje de casos (15%).⁸⁴

Las reacciones alérgicas a cefalosporinas pueden ser inducidas por la estructura del anillo β -lactámico, común a todos los antibióticos de esta familia, o bien por el reconocimiento específico a los determinantes de cefalosporinas.

A diferencia de las estructuras bien establecidas responsables de alergias a penicilinas, las estructuras químicas exactas de los determinantes antigénicos de cefalosporinas son aún desconocidas, hecho que ha obstaculizado la adecuada evaluación de sus reacciones alérgicas.

⁸⁴ G. Kanny, L. Guenard, P. Demoly, C. Ponvert, J. Grand, C. Gallen, P. Chalmet, A. Croizier, J. Jacquier, M. Morisset, A. Auffret, V. Cordebar, C. Debavelaere, C. Debavelaere, J. Devoisins, C. Nootens, N. Petit, F. Pirson, A. Sorlin, A. Andrier-Schmitt, A. Andrier-Schmitt, E. Beaudouin, I. Bossé, M. Buard, C. Chappard. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, *115*, S183.

Aunque los clínicos no disponen de pruebas diagnósticas estandarizadas para alergia a β -lactamas, las cefalosporinas, sin embargo, se prescriben abundantemente en la práctica clínica para tratamiento de diferentes infecciones bacterianas y como agente profiláctico en cirugía.

Clasificación de cefalosporinas.

Las cefalosporinas se pueden clasificar de acuerdo a diferentes criterios,⁸⁵ tales como su metabolismo y estabilidad frente a la acción de β -lactamasas,⁸⁶ la sustitución de la cadena lateral R²,⁸⁷ sus propiedades farmacocinéticas,⁸⁸ o sus propiedades microbiológicas.⁸⁷

Una clasificación microbiológica agrupa a las cefalosporinas de acuerdo a su espectro antibacteriano: en el grupo I agrupa a las moléculas con mayor actividad sobre Gram positivos; en el grupo II, a cefalosporinas con mayor actividad sobre Gram negativos; en el grupo III a compuestos con actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*; y en el grupo IV a moléculas con actividad frente a bacterias anaerobias.⁸⁹

Sin embargo, desde el punto de vista clínico, la clasificación más utilizada divide las cefalosporinas de acuerdo al desarrollo histórico y a algunas características comunes microbiológicas y estructurales. Esta clasificación distingue cuatro generaciones de cefalosporinas,^{90,91,92,93} tal y como se describen en la Tabla 6. A las ya conocidas cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, se añaden las de cuarta

⁸⁵ J. D. Williams, K. G. Naber, A. Bryskier, N. Hoiby, I. M. Gould, P. Periti, H. Giamarellou, B. Rouveix. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2001**, *17*, 443-450.

⁸⁶ C. H. Callaghan. *J. Antimicrob. Chemother.* **1979**, *5*, 635-671.

⁸⁷ A. Briskyer, T. Procyk, M. T. Labro. *J. Antimicrob. Chemother.* **1990**, *26* (Suppl C), 1-8

⁸⁸ A. Bryskier, T. Procyk, D. Tremblay, B. Lenfant, J. B. Fourtillan. *J. Antimicrob. Chemother.* **1990**, *26* (Suppl C), 59-63.

⁸⁹ J. D. Williams. *Drugs.* **1987**, *34* (Suppl 2), 15-22.

⁹⁰ S. J. Friend, D. R. Hinthorn. *Dis. Mon.* **1985**, *31*, 1-60.

⁹¹ H. C. Neu. *Rev. Infect. Dis.* **1983**, *5* (Suppl 2), S319-S337.

⁹² W. F. Marshall, J. E. Blair. *Mayo Clinic. Proc.* **1999**, *74*, 187-195.

⁹³ H. C. Neu. *Am. J. Med.* **1985**, *79* (Suppl 2A), 2-13.

generación, incluyendo en este grupo las que todavía se encuentran en fase de desarrollo.^{94,95,96,97,98}

La cadena lateral R¹ en las cefalosporinas de primera y segunda generación se diseñó siguiendo la experiencia con penicilinas e incluye las cadenas laterales de tiazolil y fenil glicil. La cadena lateral R¹ de cefalosporinas de tercera y cuarta generación tiene una estructura común: la unidad de aminotiazol-oxima más algunas sales derivadas de ácidos carboxílicos (ceftazidima, cefixima) las cuales permiten la penetración a través de la célula de las bacterias gram negativas. En la posición R² existe una variación más amplia de sustituciones. Algunas sustituciones contienen grupos amino cargados positivamente que afectan a los efectos farmacológicos y antibacterianos de la cefalosporina.

<i>Generación de Cefalosporinas</i>	<i>Tipo de cefalosporina</i>		
1ª generación	Cefadroxilo Cefalexina Cefalotina	Cefapirina Cefazolina	Cefprozilo Cefradina
2ª generación	Cefaclor Cefamandol Cefmetazol Cefminox	Cefonicid Ceforanida Cefotetán Cefotiam	Cefoxitina Cefuroxima Cefuroxima axetilo Loracarbacef
3ª generación	Cefdinir Cefetamet pivoxilo Cefixima Cefodizima Cefoperazona	Cefotaxima Cefpodoxima proxetilo Ceftizoxima Cefpiramida	Cefsulodina Ceftazidima Ceftibuteno Ceftriaxona
4ª generación	Cefepima	Cefpiroma	

Tabla 6. Clasificación de cefalosporinas por generaciones.

⁹⁴ L. R. Wiseman, H. M. Lamb. *Drugs* **1997**, *57*, 117-140.

⁹⁵ J. C. Pechere, W. Wilson, H. Neu. *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, *36*, 757-771.

⁹⁶ E. J. Giamarellos, P. Greca, A. Tsitsika, C. Tympanidou, H. Giamarellou. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2000**, *36*, 185-191.

⁹⁷ R. N. Jones, M. E. Erwin, M. S. Barret, D. M. Jonson, B. M. Briggs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **1991**, *14*, 301-309.

⁹⁸ Y. Iiawa, K. Okonogi, R. Hayashi, T. Iwahi, T. Yamazaki, A. Imada. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 100-105.

Inmunológicamente, las cefalosporinas se pueden clasificar de acuerdo a sus propiedades electrofílicas que permiten la unión a la proteína, con la consecuente formación del epítopo. La estructura química resultante después de este proceso de conjugación depende de las propiedades químicas de las cefalosporinas implicadas en cada caso.

Inmunoquímica: incertidumbre sobre el determinante antigénico.

La mayor parte de la bibliografía existente sobre cefalosporinas trata sobre la síntesis de estos antibióticos^{38,99,100,101} y la aparición de nuevas estructuras que mejoran las propiedades antibióticas de las existentes anteriormente. Las escasas publicaciones dedicadas a su inmunoquímica, tratan sobre todo la cinética de reacción y reflejan que los metabolitos implicados en estas respuestas inmunológicas son en gran parte desconocidos. Incluso sin conocer con certeza estas estructuras, se han publicado varios estudios^{67,68} cuyas conclusiones deben tomarse con cierta precaución.

A pesar de las similitudes estructurales entre penicilinas y cefalosporinas (Figura 18) difieren considerablemente en su reactividad química: tanto en los aspectos mecanísticos como en los productos obtenidos de la apertura nucleófila del anillo β -lactámico.⁶⁴

El comportamiento inmunológico de los antibióticos β -lactámicos está determinado por su reactividad química intrínseca, la cual está relacionado con la capacidad del grupo carbonilo de la β -lactama para actuar como agente acilante con los grupos aminos de proteínas.

En penicilinas, la elevada tensión que soporta el anillo β -lactámico, debido a la estructura química que resulta de la condensación de la β -lactama con el anillo de tiazolidina, causa una elevada reactividad química. En las cefalosporinas, los

⁹⁹ G. I. Georg. *The Organic Chemistry of β -lactams*. VCH Publishers Inc.: New York, 1993.

¹⁰⁰ M. S. Manhas, A. K. Bose. *Beta-Lactams: Natural and Synthetic. Part I*. A. K. Bose, Willey Interscience: New York, 1971.

¹⁰¹ H. Yamamoto, Y. Eikyu, S. Okuda, K. Kawabata, H. Takasugi, H. Tanaka, S. Matsumoto, Y. Matsumoto, S. Tawara. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1535-1545.

heterociclos condensados están formados por 4 y 6 átomos, resultando en una menor tensión del anillo β-lactámico. La haptización de proteínas por penicilinas es además más rápida y eficiente que por cefalosporinas (Figura 45). El conjugado formado por penicilinas, PO, es una estructura química lo suficientemente estable como para permitir su purificación y caracterización por técnicas espectroscópicas comunes.

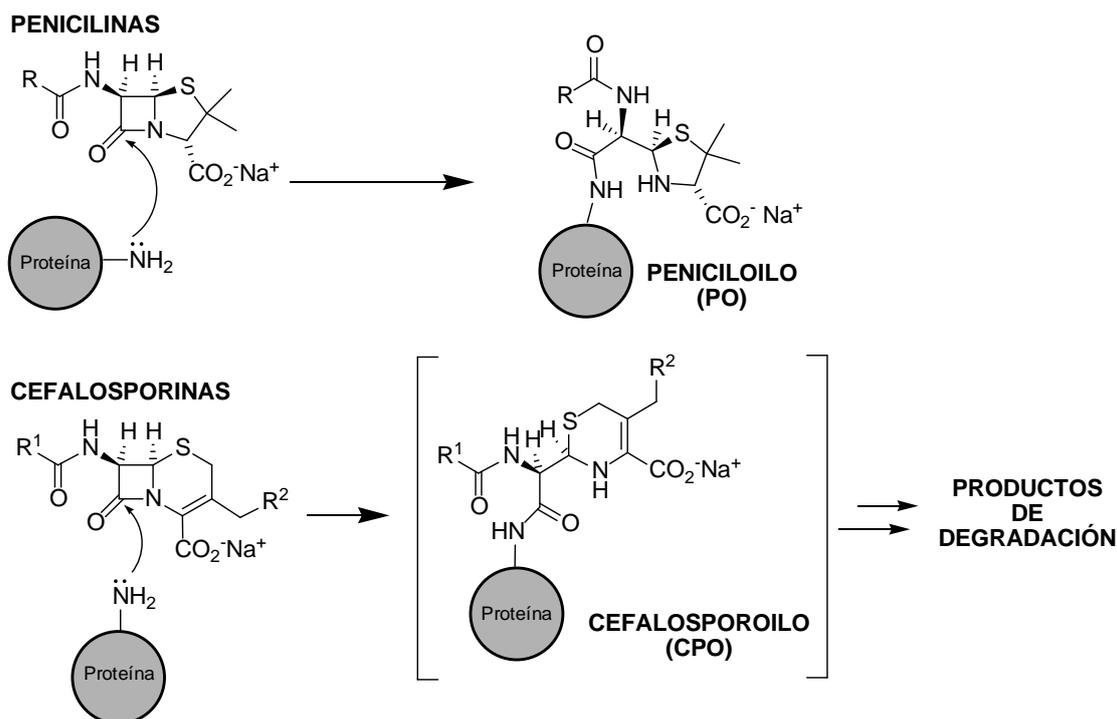


Figura 45. Conjugación de penicilinas y cefalosporinas a proteínas portadoras. Formación del intermedio peniciloilo (estructura estable) y cefalosporoilo (estructura inestable).

En cefalosporinas, la menor reactividad del anillo β-lactámico ralentiza la haptización. La estructura química de R² puede modular esta reactividad dependiendo de la capacidad de la cadena lateral para polarizar el enlace. En ceftizoxima, cefroxadina, cefadroxilo, cefalexina y cefradina, la posición 3' está ocupada por un átomo de hidrógeno, un grupo metoxilo o metilo (en vez de por un metileno con sustituyente R²), por lo que ésta posición no aumenta la cinética de hidrólisis del anillo β-lactámico.¹⁰²

¹⁰² E. Pérez-Inestrosa, R. Suau, M. I. Montañez, R. Rodríguez, C. Mayorga, M. J. Torres, M. Blanca. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, 5, 323-330.

Cefaclor tiene un átomo de cloro en la posición 3', por lo que su electronegatividad facilita la apertura del anillo β -lactámico por efecto inductivo.

La cadena lateral R^2 en la posición 3' puede actuar como grupo saliente, como ocurre en la mayoría de las cefalosporinas clínicamente relevantes, de este modo aumenta la reactividad del grupo β -lactámico (Figura 46). Esta sustitución no sólo afecta a la unión de cefalosporinas a proteínas portadoras, sino que también tiene un efecto electrónico en la reactividad química del grupo carbonilo de la β -lactama, lo cual está relacionado con su actividad antibiótica.

Evidencia de la salida del grupo R^2 con la apertura de la β -lactama.

Existen varios estudios dirigidos hacia la eliminación del grupo R^2 por hidrólisis, aminólisis, e hidrazinolisis de diferentes cefalosporinas.^{103,104} Los datos experimentales^{105,106,107} y teóricos^{108,109} se han interpretado en términos de apertura del anillo β -lactámico concertada con la expulsión del grupo R^2 , en los casos en que R^2 actúa como buen grupo saliente, como acetoxi o piridinio, casos en los que no se demuestra la formación del cefalosporoilo. Sin embargo, en otros casos se manifiesta que la expulsión de buenos grupos salientes en R^2 no tiene porqué ser un proceso concertado con la apertura del anillo β -lactámico, y que este proceso puede ocurrir en presencia de β -lactamasas y nucleófilos no enzimáticos. El estudio de la cinética combinado con espectroscopía de absorción y de RMN ha evidenciado la formación de la estructura de la apertura del anillo β -lactámico: cefalosporoilo (CPO).^{103,104}

¹⁰³ W. S. Faraci, R. F. Pratt. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1489-1490.

¹⁰⁴ R. F. Prat, W. S. Faraci. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5328-5333.

¹⁰⁵ C. H. O'Callahan, S. M. Kirby, A. Morris, R. E. Waller, R. E. Duncombe. *J. Bacteriol.* **1972**, *110*, 988-991.

¹⁰⁶ R. E. Waller. *Analyst.* **1973**, *95*, 535-541.

¹⁰⁷ H. Bundgaard. *Arch. Pharm. Chemi., Sci. Ed.* **1975**, *3*, 94-123.

¹⁰⁸ D. B. Boyd, R. B. Hermann, D. E. Presti, M. M. Marsh. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 408-417.

¹⁰⁹ D. B. Boyd, W. H. W. Lunn. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 778-784.

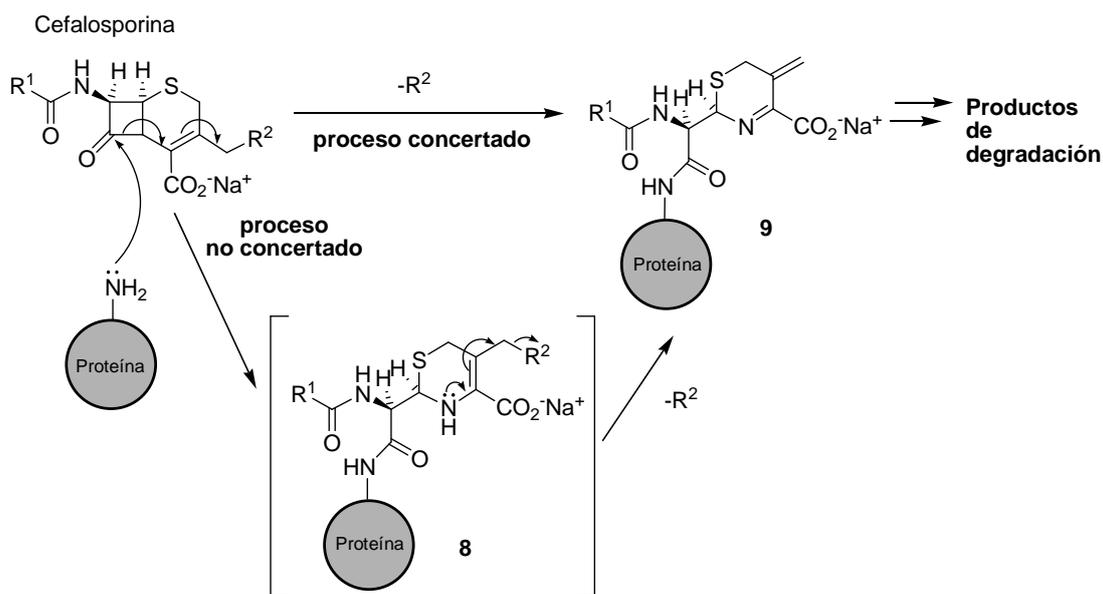


Figura 46. Los dos mecanismos propuestos para la conjugación de cefalosporinas con proteínas mediante la apertura del anillo β -lactámico: concertado y no concertado.

Sea un proceso concertado o en etapas, como los representados en la Figura 46, la apertura del anillo β -lactámico conduce a la eliminación de R^2 cuando éste es un buen grupo saliente, conduciendo a la formación del derivado 3-metilideno (9). El proceso está bien determinado químicamente, tanto, que esta propiedad se usa como estrategia para obtener cefalosporinas que pueden aplicarse con doble acción:^{110,111,112,113,114} cuando el grupo R^2 se configura como la forma inactiva de un fármaco, la acción de la β -lactamasa sobre la cefalosporina implica la liberación del fármaco *in situ* (Figura 47).

¹¹⁰ S. Mobashery, M. Johnston. *Biochemistry*. **1987**, 26, 5878-5884.

¹¹¹ H. A. Albrecht, G. Beskid, J. G. Christenson, N. H. Georgopapadakou, D. D. Keith, F. M. Koncelmann, D. L. Pruess, P. L. Rossman, C. C. Wei. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2857-2864.

¹¹² J. W. Grant, T. P. Smyth. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7965-7970.

¹¹³ G. Veinberg, I. Shestakova, M. Vorona, I. Kenepe, I. Domrachova, E. Lukevics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1007-1010.

¹¹⁴ V. M. Vrudhula, D. E. Kerr, N. O. Siermers, G. M. Dubowchik, P. D. Senter. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 539-542.

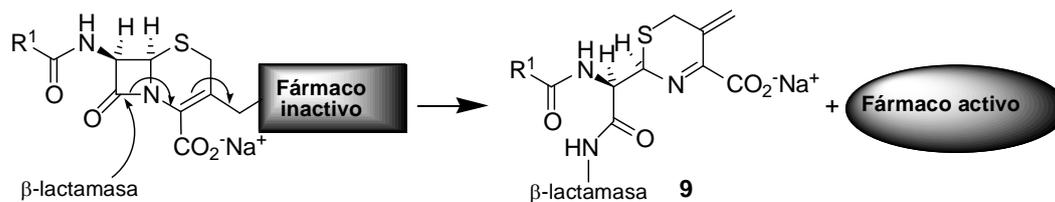


Figura 47. Doble acción de cefalosporina.

Las cefalosporinas también pueden usarse como sensores para monitorizar procesos o interacciones biológicas, basándonos en la capacidad del grupo R^2 para actuar como buen grupo saliente (Figura 48).¹¹⁵

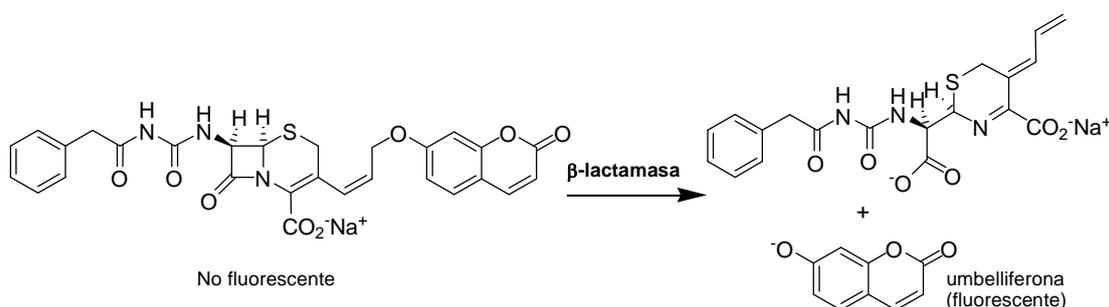


Figura 48. Rotura del anillo β -lactámico de una cefalosporina: liberación del grupo saliente en 3'.

El producto inicial que se forma como resultado de la aminólisis de cefalosporinas (CPO, **8**) es inestable, y probablemente se degrada tras la ruptura del anillo de dihidrotiazina.^{116,117} Aparte de la evidencia de la salida de la cadena lateral R^2 , cuando ésta puede actuar como grupo saliente, todavía no se conoce con certeza cual es la estructura química resultante, y no ha sido posible ni aislar ni caracterizar los productos de aminólisis consecuentes de la ruptura del anillo de dihidrotiazina de cefalosporinas.¹¹⁸

Recientemente se ha descrito la adición de agua al doble enlace exocíclico de la estructura **9** para generar la estructura **10** (Figura 49), ambas estructuras son precursores

¹¹⁵ W. Gao, B. Xing, R. Y. Tsien, J. Rao. *Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11146-11147.

¹¹⁶ J. M. T. Hamilton Miller, E. Richards, E. P. Abraham. *Biochem J.* **1970**, *116*, 385-395.

¹¹⁷ J. M. T. Hamilton Miller, G. G. F. Newton, E. P. Abraham. *Biochem J.* **1970**, *116*, 371-384.

¹¹⁸ L. Venemalm. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1869-1870.

de los productos de degradación del anillo de dihidrotiazina.¹¹⁹ La imina α,β -insaturada **9** también podría sufrir una adición de Michael por nucleófilos sulfurados para generar estructuras tipo **11**.¹²⁰

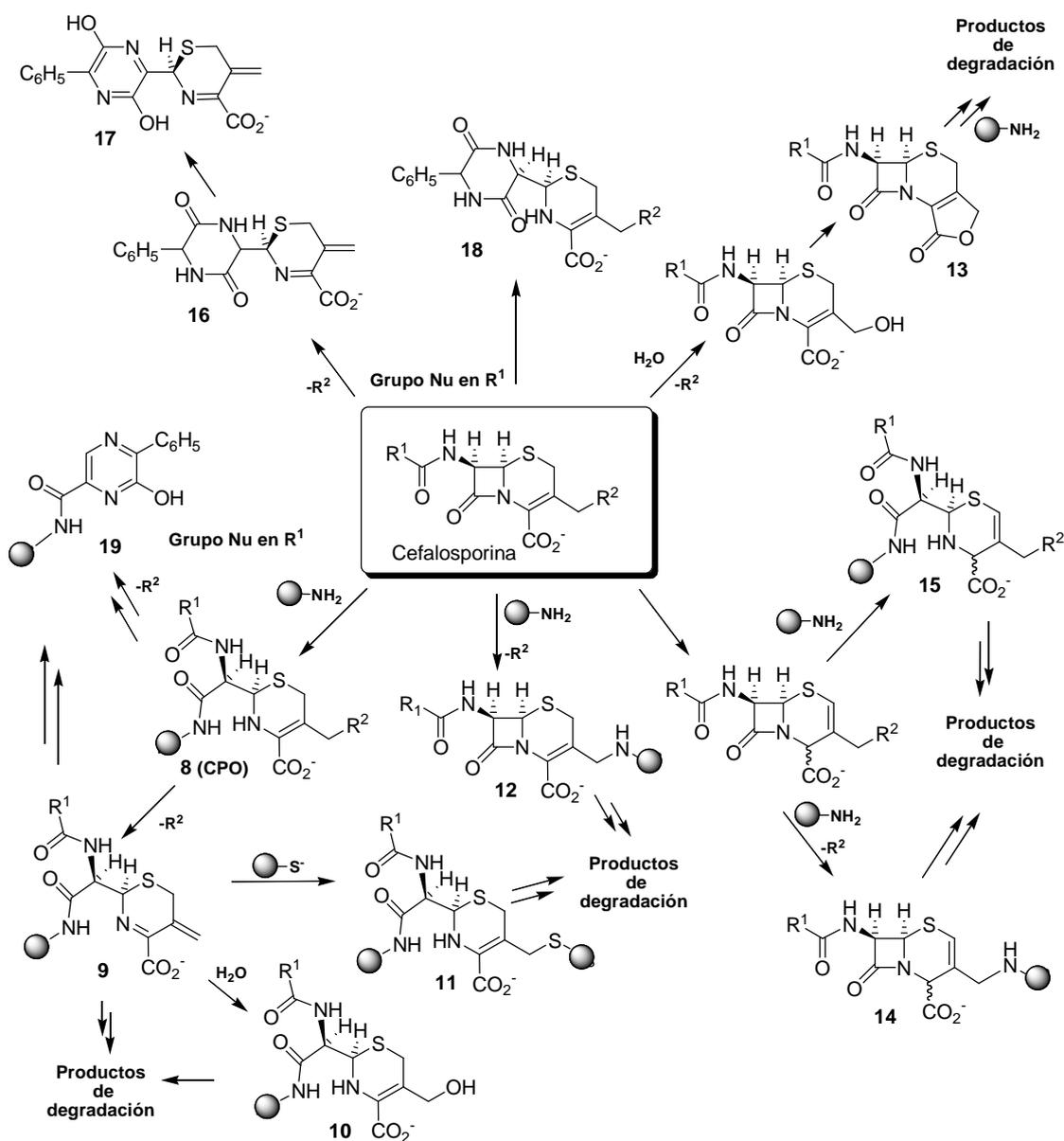


Figura 49. Posibles rutas de reactividad química de cefalosporinas con nucleófilos.

¹¹⁹ K. Baker, C. Belczinski, H. Lin, G. Salazar-Jimenez, D. Sengupta, S. Krane, V. W. Cornish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2002**, 99, 16537-16542.

¹²⁰ A. Llinás, B. Vilanova, M. I. Page. *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, 17, 521-528.

Algunas investigaciones apuntan hacia la formación de una gran cantidad de productos de degradación de diferentes cefalosporinas, dependiendo de la estructura química de la cefalosporina en concreto y de las condiciones de reacción, principalmente el pH.^{121,122} Se ha descrito la facilidad con la que el grupo R² acetoxi puede ser reemplazado por diferentes nucleófilos y su reactividad con nucleófilos nitrogenados.⁹⁹ Las cefalosporinas que presentan ciertos grupos R² pueden sufrir así reacciones con los grupos aminos de las proteínas portadoras, no sólo por el grupo carbonilo del anillo β -lactámico, sino también por la sustitución de R², dando lugar a estructuras tipo **12** (Figura 49). Este mecanismo de acción permite a la cefalosporina unirse a la proteína portadora conformando un conjugado hapteno-portador en el cual la estructura β -lactámica está intacta, aunque su capacidad para unirse a nuevos nucleófilos ha disminuido. Estos tipos de estructuras forman nuevos epitopes en los que la cadena lateral R² no está presente.¹⁰²

La facilidad de sustitución de cadenas laterales R² por nucleófilos sulfurados o nitrogenados, no es la misma que cuando los nucleófilos son oxigenados, ya que no se tiene certeza de la formación directa de una lactona como la estructura **13** (Figura 49). Sin embargo, tras la hidrólisis acuosa del éster acético en R² al correspondiente alcohol, si puede observarse la lactonización a la estructura **13**. Este derivado puede sufrir la apertura del anillo β -lactámico por reacción con nucleófilos, facilitando su conjugación a portadores y, por tanto también, la formación de un nuevo epitope.

Además de la hidrólisis, aminólisis y tiólisis de la β -lactama o de la sustitución en R², también puede ocurrir, aunque con una cinética menor, una isomerización del doble enlace 3-4 y epimerización del carbono en posición 7.¹²⁰ La isomerización del doble enlace 3-4 a la posición 2-3, reduce la reactividad del grupo carbonilo β -lactámico, debido a que disminuye la tensión del anillo y la activación electrónica.³⁸ De este modo se equilibra la reactividad de los dos centros nucleófilos de la molécula y, consecuentemente, la posible competencia de la posición 3' permita la formación de conjugados con estructura tipo **14**, además de tipo **15** (Figura 49).

¹²¹ S. W. Baertschi, D. E. Dorman, J. L. Occolowitz, M. W. Collins, L. A. Spangle, G. A. Stephenson, L. J. Lorenz. *J. Pharm. Sci.* **1997**, 85, 526-539.

¹²² J. M. Indelicato, T. T. Norvilas, R. R. Pfeiffer, W. Wheeler, W. Wilham. *J. Med. Chem.* **1974**, 17, 523-527.

A todo el amplio abanico de estructuras descritas en el esquema de la Figura 49 podrían añadirse los correspondientes 7-epímeros y 6-epímeros. En el estudio de la hidrólisis alcalina de algunas cefalosporinas se han detectado la epimerización en C-7 de cefalosporina y la epimeración en C-6 de los compuestos 3-metilidenos (**9**).¹²³

En las cefalosporinas que presentan grupos nucleófilos en la posición R¹, como cefaloglicina, cefaclor, cefalexina, cefadroxilo y cefradina, puede ocurrir la autoaminólisis dando compuestos como la estructura **16** (Figura 49), en las que la apertura intramolecular del anillo β-lactámico precede a la eliminación de R², cuando éste puede actuar como buen grupo saliente, por ejemplo en cefaloglicina. En el caso de aquellas que presentan un mal grupo saliente en R², como es el caso de cefradina, ha llegado a aislarse la estructura **18**.¹²¹

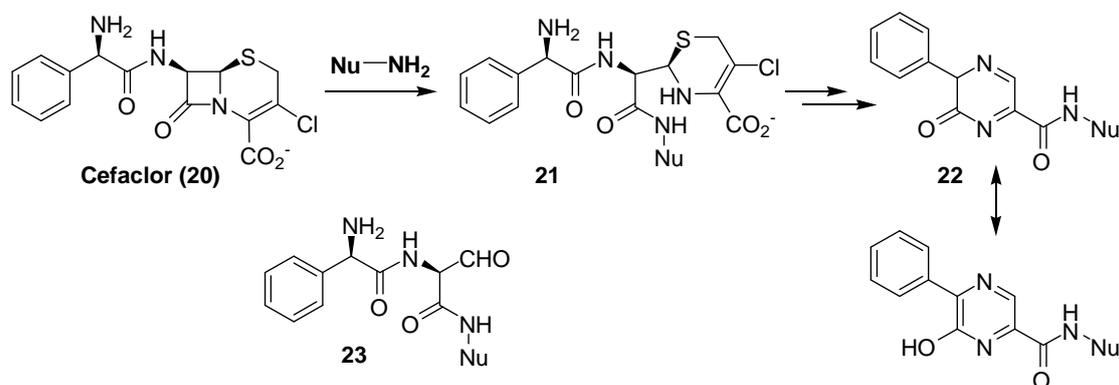


Figura 50. Aminólisis de aminocefalosporinas, ejemplo de cefaclor.

Para cefaclor (**20**), se han identificado varios productos fluorescentes diferentes con estructuras derivadas a la pirazina **17** (Figura 49).¹²¹ También podrían obtenerse productos con estructura tipo **19**, si después de la apertura de la β-lactama el nucleófilo en R¹ reacciona con el carbono en posición 6, desprendiéndose del resto del anillo de dihidrotiazina. Este caso se ha descrito para cefaclor y cefalexina: cuando cefaclor reacciona con nucleófilos nitrogenados (Figura 50) la aminólisis intramolecular compite con el proceso intermolecular, y el intermedio cefalosporoilo de estructura **21** puede reaccionar intramolecularmente para dar un compuesto como el de la estructura **22**.¹¹⁸ La formación de un intermedio tipo aldehído de estructura **23** (Figura 50) parece ser la hipótesis más convincente para la formación de pirazinona fluorescente (**22**).

¹²³ B. Vilanova, F. Muñoz, J. Donoso, F. G. Blanco. *Helv. Chim. Acta.* **1993**, 76, 2789-2802.

Aunque ninguno de los estudios nos lleve a una conclusión clara y el problema resulta más complejo que para penicilinas, el conocimiento de la reactividad de cefalosporinas nos puede dar una aproximación de los derivados de cefalosporinas que las IgE reconocen, siempre sin ignorar que éstos se forman *in vivo* a pH fisiológico.

Aproximaciones a la identificación química del epítopo.

Hay muy poca información sobre la alergenicidad de cefalosporinas, especialmente acerca de las diferencias estructurales existentes entre ellas. Se ha investigado muy poco en identificar qué parte de la estructura de cefalosporinas es reconocida por los anticuerpos IgE. De hecho, muchos de los datos referentes a la naturaleza química de los determinantes alergénicos se han realizado empleando IgG u otros isotipos de anticuerpos policlonales humanos.¹²⁴ En contraste a los muchos estudios sobre el comportamiento químico de penicilinas, en los cuales la estructura química de los compuestos implicados están bien establecidas, son muy pocos los estudios sobre el comportamiento químico de cefalosporinas. A pesar de esta falta de conocimientos, se asumen modelos clínicos de comportamiento similares entre penicilinas y cefalosporinas, sin tener en cuenta el hecho de que diferentes cefalosporinas pueden tener diferentes modelos de reactividad química, dependiendo de la estructura de sus cadenas laterales. Se han publicado varias hipótesis en artículos de contenido inmunológico y clínico, que resultan contradictorias cuando se interpretan los datos.

Los esfuerzos en identificar los determinantes antigénicos han resultado especulativos, resultando muy difícil tomar decisiones en este campo.^{67,68,125} Pueden ocurrir tres modelos de respuesta en las personas que son alérgicas a cefalosporinas: personas que tienen reactividad cruzada con determinantes de penicilinas, personas que presentan reactividad cruzada con diferentes cefalosporinas y personas con reactividad exclusivamente a una cefalosporina.⁴⁶

¹²⁴ S. Ahlstedt, A. Kristofferson. "Immune mechanisms of induction of penicillin allergy" en: P. Kallos *Recent trends in allergen and complement research: progress in allergy*. Basel: Kaerger Publishers; 1992. 67-134.

¹²⁵ N. H. Pham, B. A. Baldo. *J. Mol. Recognit.* **1996**, 9, 287-296.

2.2. Determinantes antigénicos de Cefalosporinas: Degradación

2.2.1. Reactividad de nucleófilos con Cefalosporinas

De la misma manera a como se ha realizado con penicilinas, procedimos a estudiar la reactividad de algunas cefalosporinas con nucleófilos.

De este modo se estudió el proceso de conjugación con las siguientes cefalosporinas: cefuroxima, cefadroxilo, cefaclor, cefonicid, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y ceftizoxima (ver estructuras en tabla de cefalosporinas en anexo III).

A medida que el consumo de estas cefalosporinas va en aumento, cada vez se encuentran más pacientes que presentan una reacción alérgica a dichas cefalosporinas. Así que la razón de escoger éstas, está en que el grupo de investigación de alergología con el que colaboramos, dispone de sueros de pacientes alérgicos a ellas y, por lo tanto sería posible realizar los ensayos clínicos de los productos que se obtengan.

A continuación se mostrarán los resultados de reactividad obtenidos con las 3 cefalosporinas representadas en la Figura 51. De esta manera se ejemplificará el comportamiento con cadenas laterales R^1 diferentes, así como grupos R^2 diferentes. La cadena lateral R^1 de **24** consiste en un sustituyente α -metoxiimino-2-furanacetilo y, R^2 es un buen grupo saliente. La cefalosporina **25**, con cadena lateral R^1 amino-(4-hidroxifenil)acetilo, pertenece al grupo de las aminocefalosporinas y, su sustituyente R^2 consiste en un hidrógeno, por lo que en este caso R^2 no es buen grupo saliente. La aminocefalosporina **20** presenta cadena lateral R^1 amino(fenil)acetilo y, es de aquellas cefalosporinas que no posee un metileno sustituido con grupo R^2 en C-3, sino que posee un sustituyente cloro en esta posición.

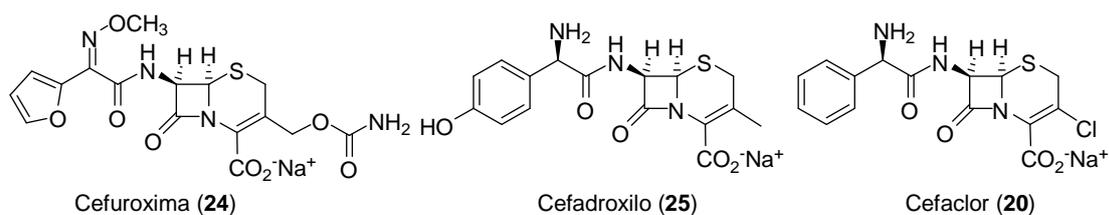


Figura 51. Estructura de cefalosporinas.

La reacción de cefuroxima (**24**) con un exceso de equivalentes de butilamina se monitorizó mediante espectroscopía de RMN-¹H. Los dobletes correspondientes a los protones β-lactámicos H-6 y H-7 de **24** (Figura 52a), se afectan tras la adición de butilamina (Figura 52b) y, además, puede observarse la aparición de un multiplete a 3.2 ppm. Esto puede indicar que ocurren rápidamente la apertura de la β-lactama y la formación de un enlace amida, respectivamente. También las señales correspondientes al metileno en 3' desaparecen, lo que podría apuntar a la expulsión del grupo saliente R², y a la formación del doble enlace entre C-3 y C-3'. Tras 180 minutos de reacción las señales correspondientes a los H-6 y H-7 desaparecen, y tras varios días sólo permanecen las señales correspondientes a la butilamida y sobre todo a la cadena lateral R¹ (Figura 52d y Figura 52e).

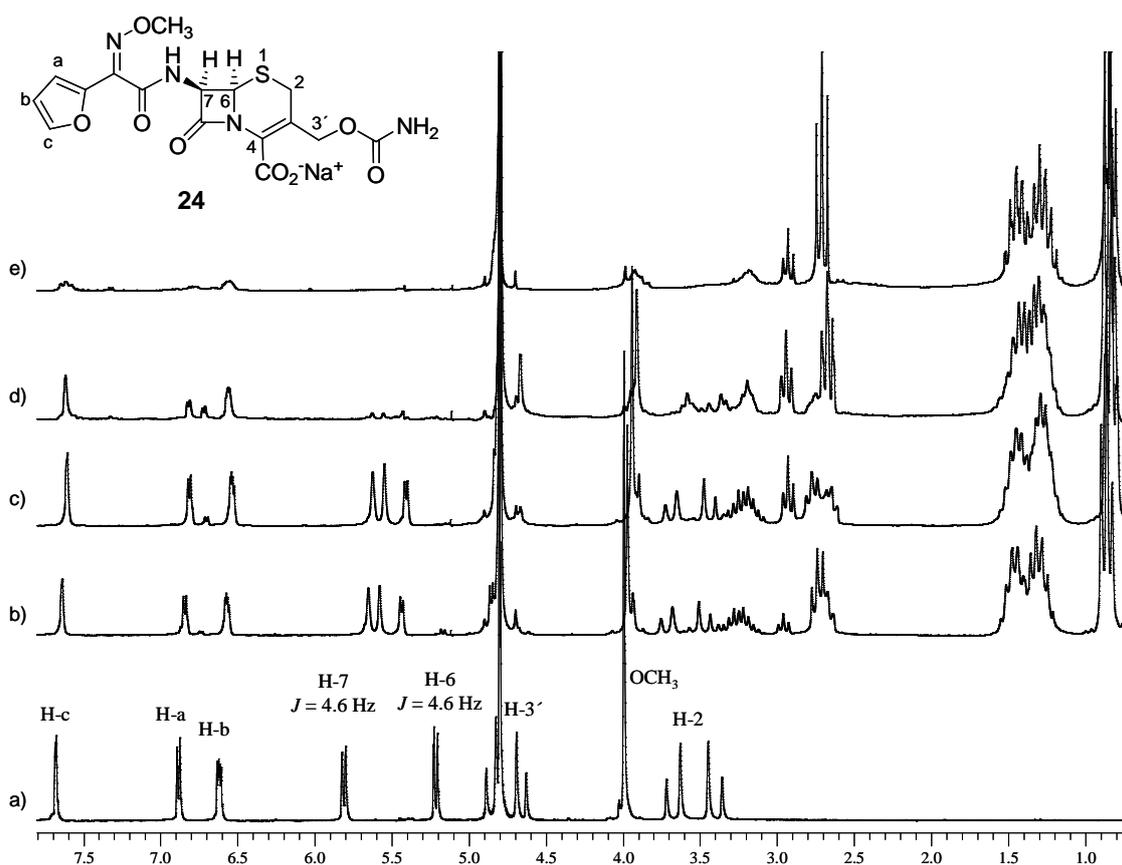


Figura 52. Espectro de RMN-¹H de **24** : (a) registrado en D₂O; y su evolución cuando se añaden 5 eq. de BuNH₂ a distintos tiempos de reacción: (b) 3 min., (c) 10 min. (d), 180 min. y (e) 9 días.

Cuando hacemos reaccionar la cefuroxima (**24**) con butilamina, añadiendo un total de un equivalente de butilamina, en un tiempo total de 12 días, se observa un comportamiento similar, aunque parece que la velocidad de reacción depende o bien de la concentración de nucleófilo o bien del pH del medio (Figura 53).

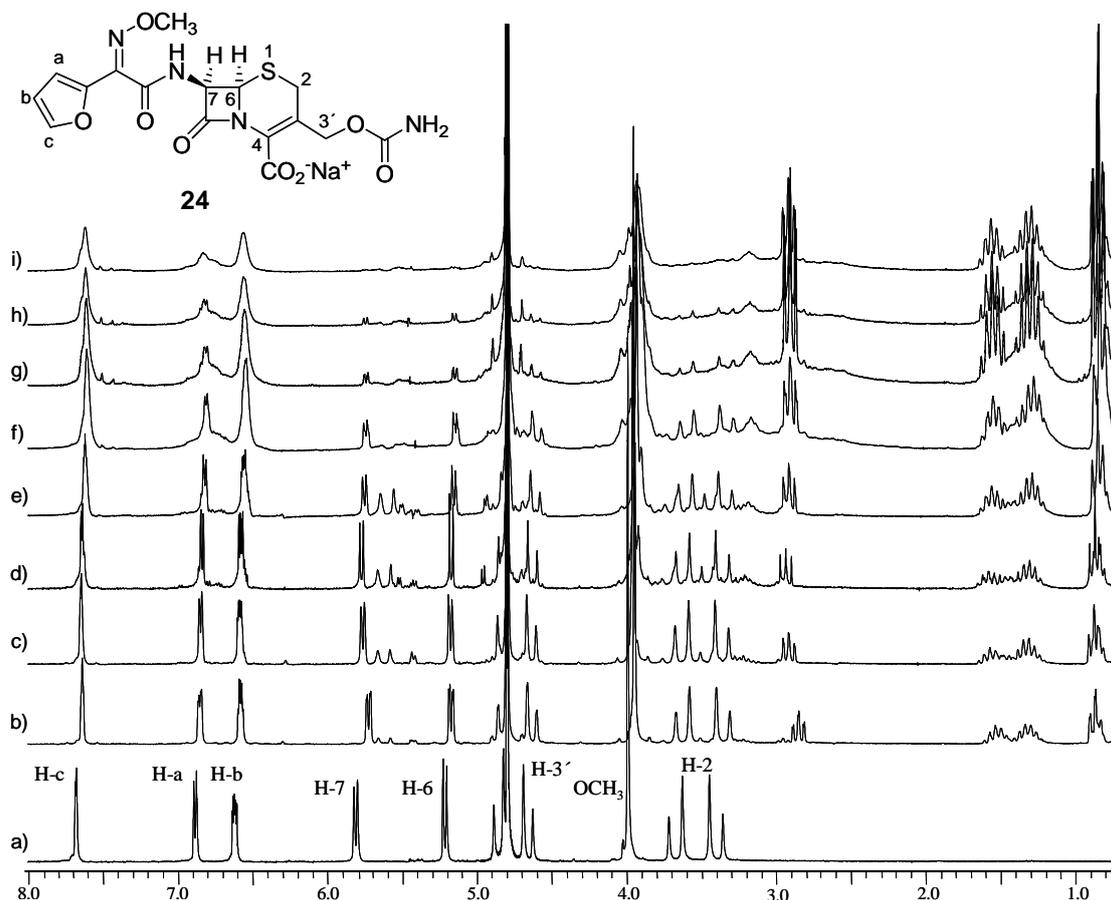


Figura 53. Reacción de **24** con BuNH₂ en D₂O. Adición de BuNH₂: 0.5 eq. (t = 0), 0.25 eq. (t = 32 h), 0.25 eq. (t = 12 días). Espectros de RMN-¹H: (a) **24** en D₂O; y a distintos tiempos de reacción: (b) 5 min., (c) 1 h, (d), 31 h, (e) 54 h, (f), 6 días, (g) 12 días, (h) 12,5 días (i) 13.5 días.

Para evitar que otras señales solapen con las correspondientes a cefalosporinas, y poder observar más claramente las señales de éstas, procedimos a seguir la degradación de cefadroxilo (**25**) en D₂O / Na₂CO₃ (Figura 54).

En este caso se observa que casi todas las señales permanecen inalteradas los primeros días de reacción, por lo que la reacción de apertura es más lenta. Parecen conservarse las señales aromáticas de la cadena lateral R¹ y desaparece el protón bencílico de ésta o se desplaza a campo alto. Además aparecen nuevas señales en la zona aromática y en la

zona alifática. Este tipo de cefalosporinas con grupo nucleófilo en R¹ permite una ciclación intramolecular.

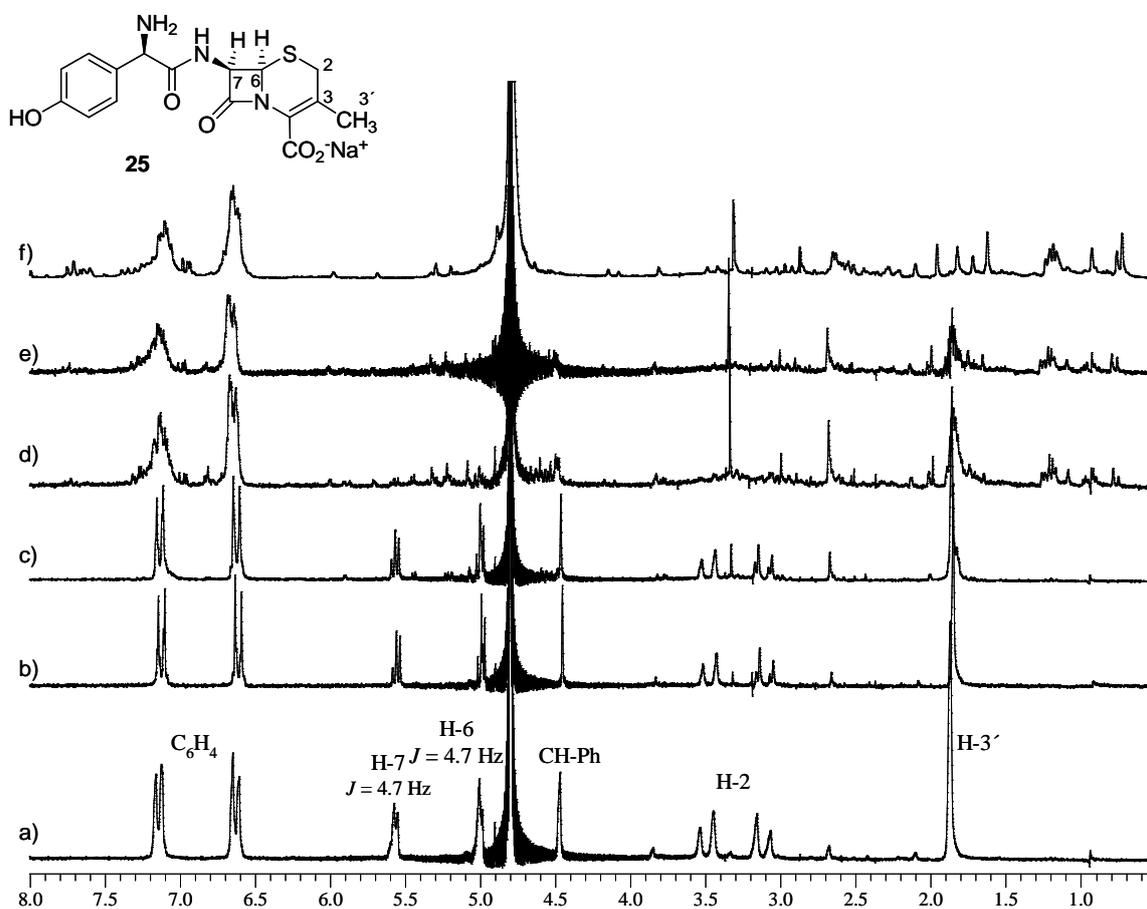


Figura 54. Degradación de **25** en D₂O básico (Na₂CO₃). Registro de espectros de RMN-¹H a distintos tiempos: (a) 0, (b) 15 min., (c) 4 h., (d) 3 días, (e) 5 días y (e) 12 días.

Un ejemplo de degradación de cefalosporinas que no poseen grupo R², también con grupo nucleófilo en R¹, se presenta en la Figura 55, es la degradación de cefaclor (**20**) en D₂O básico. En este caso también se observa que la apertura es más lenta, desaparecen o varían las señales correspondientes a los protones de la β-lactama, y aparecen nuevas señales en la zona aromática.

Aquí hemos representado tan sólo algunos resultados más significativos de numerosas pruebas realizadas empleando butilamina o medio básico para las reacciones de apertura de la β-lactama de distintas cefalosporinas. De estos estudios podría deducirse que el anillo β-lactámico se abre, la cadena lateral R¹ permanece inalterada y el anillo de dihidrotiazina se degrada.

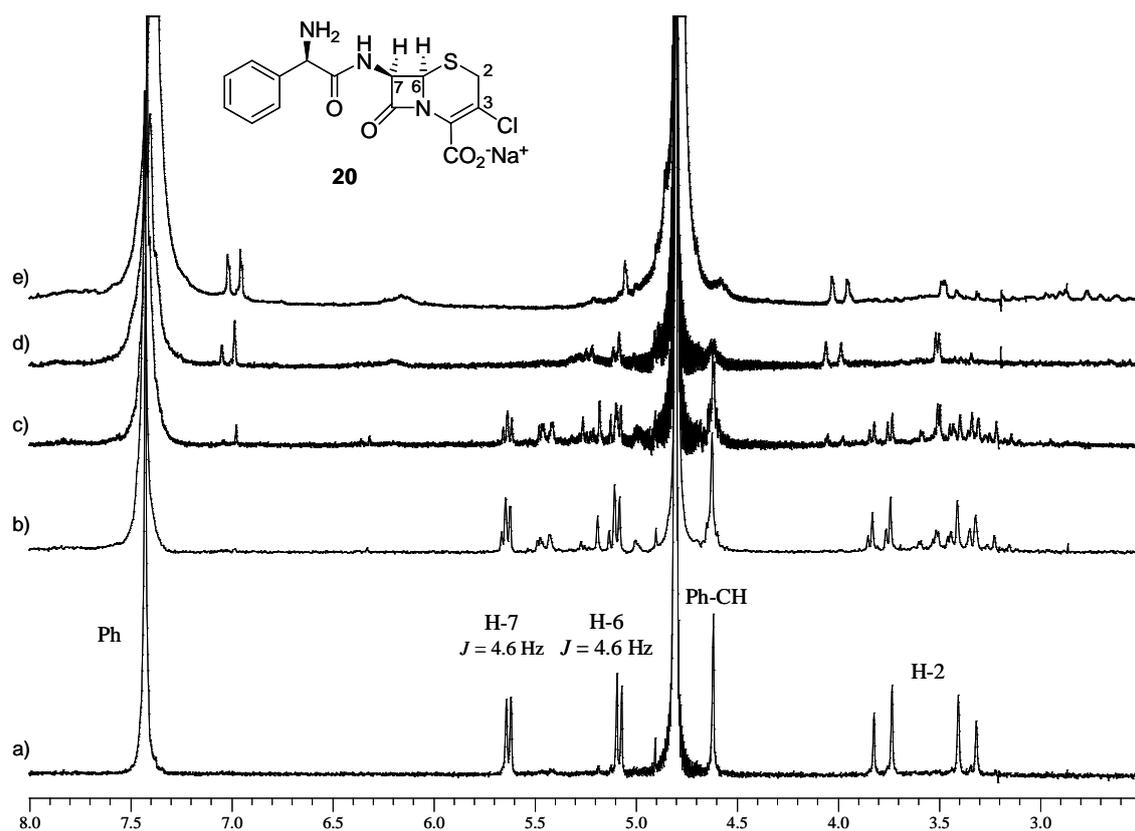


Figura 55. Degradación de **20** en D₂O básico (Na₂CO₃). Registro de espectros de RMN-¹H a distintos tiempos: (a) 0, (b) 15min., (c) 5 h, (d) 2 días, (e) 7 días.

También se realizó la conjugación de las diferentes cefalosporinas con butilamina empleando diferentes tiempos de reacción, se eliminó el exceso de butilamina y se procedió a sucesivas separaciones cromatográficas, pero en todos los casos los resultados obtenidos tras análisis por resonancia o espectrometría de masas no fueron satisfactorios. Además, otras experiencias realizadas anteriormente en nuestro grupo empleando HPLC tampoco dieron resultados concluyentes.

A pesar de que los estudios que hemos realizado no nos permitió concluir un resultado sobre la estructura química del producto de reacción de las diferentes cefalosporinas con nucleófilos nitrogenados, existe la evidencia clínica de que en el transcurso de esta reacción, cuando el nucleófilo nitrogenado está soportado sobre una macromolécula, tiene lugar una haptización de la misma y, como resultado, ocurre la conjugación de la cefalosporina al portador. Evidentemente, permanece la incertidumbre de cuál es la estructura que corresponde a este epítopo, y si comprende la molécula completa de las cefalosporinas o como consecuencia de este proceso reactivo, la misma se fracciona y el

epitope lo conforma sólo determinada parte de la estructura. El hecho de no poder resolver esta cuestión y sobre todo, si R¹ y/o R² forman parte del determinante antigénico tiene sus implicaciones en los ensayos clínicos de evaluación de respuesta IgE.

2.2.2. *Ensayos clínicos*

En el grupo de la Unidad de Investigaciones Alérgicas del Complejo Hospitalario Universitario Carlos Haya fueron evaluadas las tendencias de la respuesta de las pruebas cutáneas, la especificidad, y la reactividad cruzada frente a derivados β -lactámicos (cefalosporinas y penicilinas) de 24 sueros de pacientes que sufrieron episodios alérgicos a cefalosporinas, a nivel *in vivo* e *in vitro*.

Se realizaron pruebas cutáneas y análisis *in vitro*, empleando ensayos de RAST¹²⁶ y de inhibición del RAST, con un panel de diferentes compuestos β -lactámicos, incluyendo las 3 penicilinas y las 6 cefalosporinas representadas en la Figura 56.

El crudo de estas conjugaciones con butilamina, se empleó para hacer ensayos *in vitro* de inhibición competitiva de inmunoensayo RAST con el objetivo de evaluar la respuesta IgE y la reactividad cruzada a β -lactamas en más detalle.¹²⁷

Los resultados de las pruebas cutáneas mostraron que el 90% de los pacientes eran negativos a las pruebas cutáneas de los determinantes de penicilinas. De estos pacientes que toleraban penicilinas, pudieron distinguirse dos grupos: dos terceras partes de los casos reaccionaron sólo a la cefalosporina en cuestión y una tercera parte al menos a otra cefalosporina, además de a la cefalosporina responsable de la reacción alérgica. En este último grupo, excepto para un caso, las cefalosporinas implicadas compartían la misma cadena lateral. Ceftriaxona y cefotaxima fueron las cefalosporinas con el mayor grado de reactividad cruzada en pruebas cutáneas, probablemente debido a que

¹²⁶ M. Blanca, C. Mayorga, F. Sánchez, J. M. Vega, C. Juárez, R. Suau, E. Pérez-Inestrosa. *Allergy*. **1991**, 46, 632-638.

¹²⁷ C. Antúnez, N. Blanca-López, M. J. Torres, C. Mayorga, E. Pérez-Inestrosa, M. I. Montañez, T. Fernández, M. Blanca. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, 117, 404-410

comparten la misma cadena lateral R¹, mientras que cefuroxima y cefaclor tendieron a inducir reacciones más selectivas.

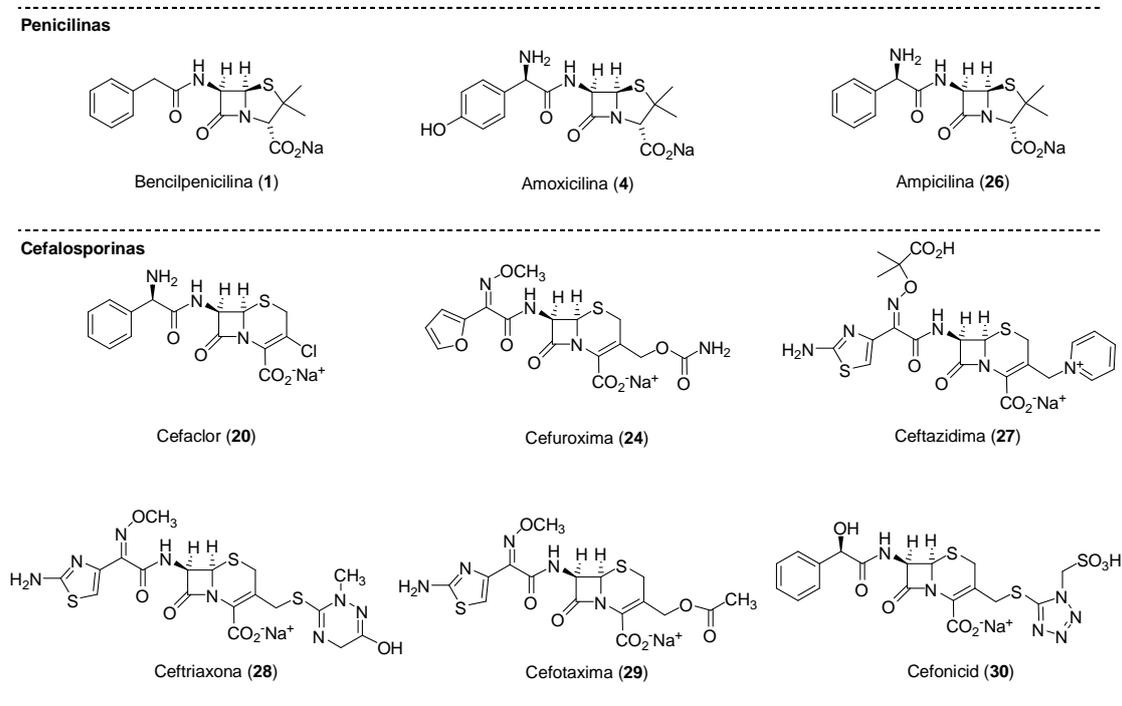


Figura 56. Estructuras de β -lactamas empleadas en el estudio.

El análisis de anticuerpos IgE específicos mediante RAST mostró bastante concordancia con las pruebas cutáneas, aunque no se le detectaron anticuerpos IgE a ningún paciente que respondió positivo a los determinantes de penicilinas por pruebas cutáneas, debido a la menor sensibilidad del RAST.^{60,61}

Los resultados de la inhibición del RAST se representan en la Figura 57, e implicaron 4 pacientes alérgicos a cefaclor, 1 a cefotaxima, 1 a ceftazidima, 1 a ceftriaxona y 4 a cefuroxima. En todos los casos, el inhibidor más potente fue la cefalosporina responsable de la reacción alérgica, con diferentes grados de reactividad cruzada a otras cefalosporinas y una buena correlación con los ensayos del RAST.

En estos ensayos, se encontró para los sueros específicos a cefaclor (casos 1, 3, 5 y 7) que, en 2 casos, cefaclor fue el único inhibidor relevante, y en los casos 1 y 3, se obtuvo más del 50% de inhibición con 2 cefalosporinas diferentes, que tienen distintas cadenas laterales. Sin embargo, la ampicilina (26), una penicilina que tiene la misma cadena

lateral R¹ que cefaclor, no tuvo una contribución relevante en la inhibición. Esto puede explicarse por el hecho de que el determinante generado por cefaclor, la cadena lateral R¹ unida a parte del resto de la estructura de la cefalosporina, forma parte del determinante antigénico, pero para la ampicilina aunque sí presenta la cadena lateral, se formaría otra estructura distinta que contendría el anillo de tiazolidina.

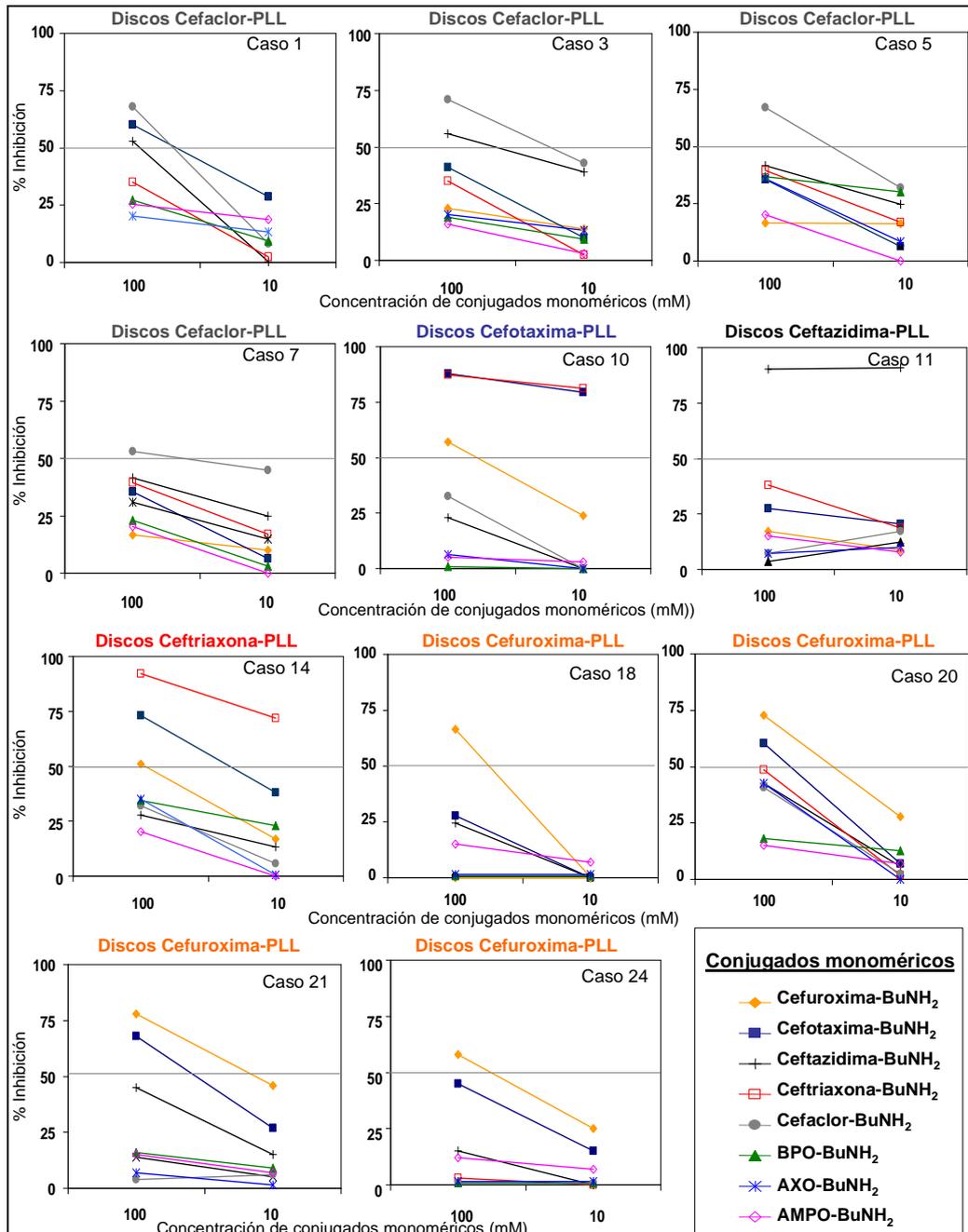


Figura 57. Ensayos de inhibición del RAST de diferentes muestras de suero empleando discos que soportan a la cefalosporina implicada conjugada a PLL como fase sólida, y diferentes β -lactamas conjugadas a butilamina como fase fluida.

El caso 10, de un paciente alérgico a cefotaxima, fue igualmente inhibido por cefotaxima y ceftriaxona, que tienen la misma cadena lateral y, en menor grado, por cefuroxima, cuya cadena lateral R¹ es muy similar. Es interesante destacar que este caso dio positivo a estos 3 compuestos tanto por pruebas cutáneas como de RAST. El caso 11 mostró una inhibición muy fuerte frente a ceftazidima. El caso 14, inicialmente positivo a ceftriaxona, también fue inhibido por cefotaxima (que tiene la misma cadena lateral R¹) y, en menor grado, con ceftazidima (con R¹ similar).

La cefuroxima resultó la β -lactama que más frecuentemente causó alergia en este estudio.¹²⁷ Para los pacientes alérgicos a cefuroxima (casos 18, 20, 21 y 24), se detectaron dos tendencias de respuestas. En los casos 20 y 21, cefotaxima, una cefalosporina con cadena lateral R¹ similar a cefuroxima, fue el mayor inhibidor después de cefuroxima, y en los casos 18 y 24, sólo el conjugado monomérico de cefuroxima estaba por encima del 50% de inhibición a la mayor concentración ensayada.

Esto indica que los ensayos de inhibición del RAST están de acuerdo con la hipótesis de que la sustitución en C-7, el sustituyente R¹, juega un papel importante en la determinación de la especificidad en las reacciones inmunológicas entre cefalosporinas individuales y, entre penicilinas y cefalosporinas, en un mayor grado que lo observado para penicilinas.¹⁰⁰ Este estudio¹²⁷ nos indica que el reconocimiento va dirigido principalmente a la cadena lateral R¹.

En resumen, en aquellos pacientes con una respuesta primaria a cefalosporinas, existe el reconocimiento selectivo dentro del grupo de cefalosporinas, con buena tolerancia a los determinantes de penicilinas. Además, dentro del grupo de cefalosporinas, se observó el reconocimiento selectivo de la cadena lateral R¹ en dos terceras partes de los casos, con algún grado de reactividad cruzada entre diferentes cefalosporinas, tratándose casi siempre de aquellas con cadenas laterales R¹ idénticas o similares. En consecuencia, en la práctica clínica se recomienda que, en la mayoría de los pacientes con hipersensibilidad inmediata confirmada a cefalosporinas, si las pruebas cutáneas a determinantes de penicilinas son negativas, la penicilina puede administrarse con seguridad. Y para la administración de otras cefalosporinas, la recomendación es seleccionar una cefalosporina con una cadena lateral R¹ diferente.

2.3. Determinantes antigénicos de cefalosporinas:

Síntesis.

Teniendo en cuenta la evidencia de la pérdida del grupo R^2 de cefalosporinas tras la apertura de la β -lactama por la proteína portadora y, la inestabilidad de la estructura resultante, proponemos la hipótesis de que tanto el grupo R^2 como el anillo de dihidrotiazina se pierden en el proceso de conjugación.

Además, de los estudios realizados en nuestro laboratorio mediante técnicas de RMN, empleando *n*-butilamina como nucleófilo, se puede deducir, como norma general, que la cadena lateral R^1 permanece inalterada tras el proceso de conjugación. Así como los estudios de inhibición del RAST (Figura 57) indican que el grupo R^1 contribuye al reconocimiento por IgE y, no parece probable que R^2 contribuya a la formación de los determinantes antigénicos de las cefalosporinas.

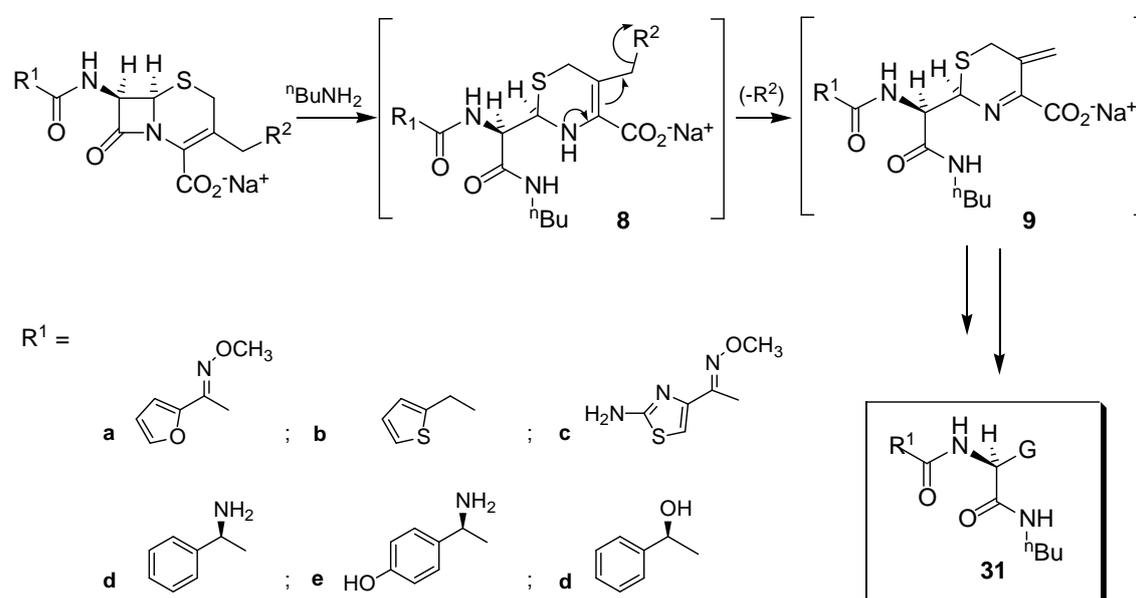


Figura 58. Aminólisis de cefalosporinas y estructura hipotética **31** propuesta como determinante antigénico de cefalosporinas.

Con todo esto, nuestra hipótesis, esquematizada en la Figura 58, implica que la apertura nucleofílica de la β -lactama cefalosporínica por nucleófilos nitrogenados lleva a la

formación del conjugado cefalosporoilo (**8**) y a la expulsión del grupo R^2 , sobre todo si éste es buen grupo saliente, lo que conduce a la formación del derivado 3-metilideno (**9**), cuya estructura inestable sufre sucesivos procesos de fragmentación en el anillo de dihidrotiazina dando lugar a compuestos con estructura tipo **31**. Este consiste en la estructura de la β -lactama abierta conjugada a la amina (**8** ó **9**) en la que sólo se conservaría del anillo de dihidrotiazina el átomo de carbono (grupo G) que comparte con el anillo β -lactámico.

El átomo de carbono del que procede el grupo G en la estructura **31**, presenta originariamente el estado de oxidación de un grupo carbonilo y su naturaleza es a priori especulativa, debido a que en el medio fisiológico podría sufrir diferentes reacciones.

Debido a las dificultades encontradas para el aislamiento de compuestos puros de las mezclas complejas obtenidas en el proceso de conjugación, nos hemos propuesto sintetizar conjugados con la estructura del compuesto **31**, en el cual el carbono en la posición G es un grupo metilo (síntesis a partir de derivados de alanina). Se empleará *n*-butilamina como modelo nucleófilo nitrogenado para emular los restos de lisina presentes en las proteínas. La síntesis de estos compuestos se hará para seis cadenas laterales R^1 (a-f), que equivaldrían a las cefalosporinas representadas en la Figura 59, de importante aplicación hospitalaria y/o clínica.

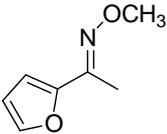
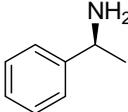
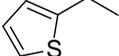
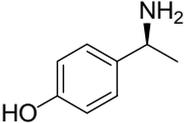
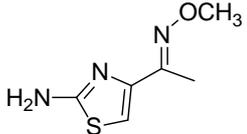
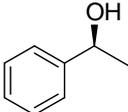
R^1	Cefalosporina	R^1	Cefalosporina
a 	Cefuroxima (24)	d 	Cefaclor (20) Cefalexina Cefaloglicina
b 	Cefalotina Cefalonio	e 	Cefadroxilo (25) Cefprozilo
c 	Cefotaxima (29) Ceftriaxona (28) Cefepima Cefozidima Cefotiam	f 	Cefonicid (30) Cefamandol

Figura 59. Cefalosporinas que comparten las cadenas laterales (a-f).

La síntesis de este tipo de estructuras, nos permitirá tener acceso a compuestos puros con estructuras químicas bien definidas y evaluar, de esta forma, su capacidad de reconocimiento por inmunoglobulinas específicas a antibióticos cefalosporínicos.

En caso de que estos compuestos derivados de cefalosporinas que mantienen la cadena lateral R¹, que han perdido el anillo de dihidrotiazina y sólo conservan de él el grupo G (como metilo), sean reconocidos por anticuerpos IgE específicos, significaría que con estas estructuras tipo **31** se cumplen los requerimientos estructurales básicos para que ocurra este proceso de reconocimiento molecular.

Por lo que, teniendo en cuenta que el carbono del anillo de dihidrotiazina que se mantiene en la estructura **31** proviene de un estado de oxidación mayor al de metilo, nos plantearíamos la síntesis de estructuras tipo **31** con otro grupo funcional en G, para de esta manera, poder evaluar si la variación de funcionalización en esta posición afecta al reconocimiento por IgE.

Esquema sintético de los determinantes antigénicos propuestos

Para abordar la síntesis de estructuras tipo **31** hemos propuesto una esquema general mostrado en la Figura 60, en el que una primera desconexión del enlace CO-N señalado conduce a dos sintones, que corresponden al ácido de la cadena lateral (fragmento A) y a la amina precursora (fragmento B).

Una segunda desconexión del enlace amídico CO-N del fragmento B, lleva a un α -aminoácido protegido, que proporcionaría la estereoquímica adecuada, y a la *n*-butilamina.

De cualquier modo, ambas desconexiones implicarían la formación de un enlace amida mediante la activación del grupo carboxilo.

De esta manera, para la mayoría de los productos que nos proponemos sintetizar, planteamos que procedan del correspondiente ácido de cadena lateral R¹ (a-f), un derivado de un α -aminoácido (dependiendo de G) y *n*-butilamina. Además, la posibilidad de usar diferentes aminoácidos incrementaría la versatilidad de la estrategia sintética, en relación con la posibilidad de variar la estructura del grupo funcional G.

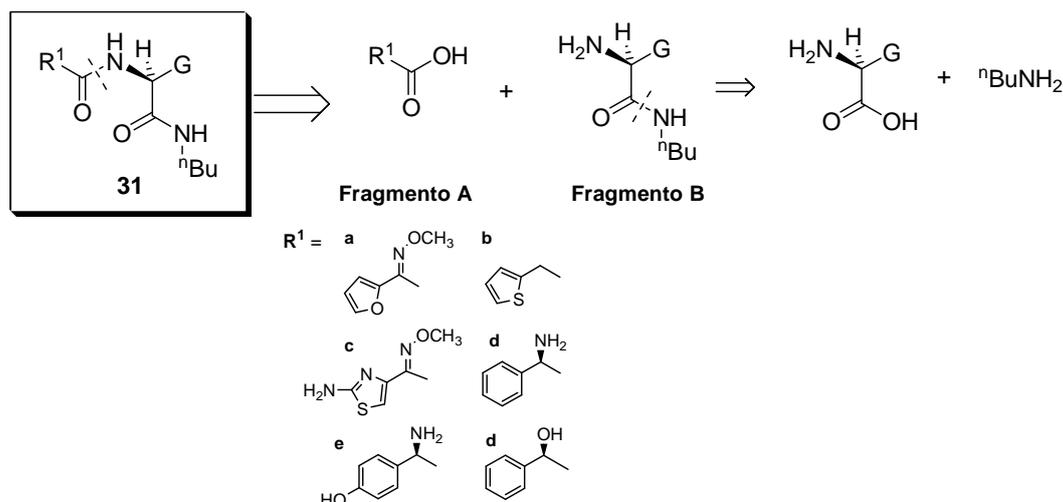


Figura 60. Desconexiones para la obtención de estructuras tipo 31.

El esquema sintético será esencialmente el mismo para todos los compuestos, difiriendo sólo en la naturaleza de los grupos protectores empleados para cada caso.

2.3.1. Fragmentos A y Fragmentos B.

En primer lugar se describe un esquema sintético para la obtención de estructuras tipo fragmento B a partir de α -aminoácidos y, también, la protección de las cadenas laterales R^1 que lo necesitan. Posteriormente, se describirá la síntesis de las aminas precursoras y su condensación con las ácidos de las cadenas laterales correspondientes R^1 .

2.3.1.1. Esquema sintético de las aminas precursoras (Fragmento B).

Atendiendo a las desconexiones planteadas en la figura 60, proponemos un esquema sintético descrito en la Figura 61, para la obtención del fragmento B. Así, se utilizarían como productos de partida aminoácidos protegidos en el grupo amino por Boc, siguiendo la secuencia mostrada en la Figura 61 mediante procedimientos comunes para la preparación de péptidos.^{128,129}

¹²⁸ R. Paruszewski, G. Rostaifinska-Suchar, M. Strupinska, P. Jaworski, JP. Stables. *Pharmazie* **1996**, *51*, 145-148.

¹²⁹ M. Wagatsuma, S. Terashima, S. I. Yamada. *Chem. Pharm. Bull.* **1973**, *21*, 422-427.

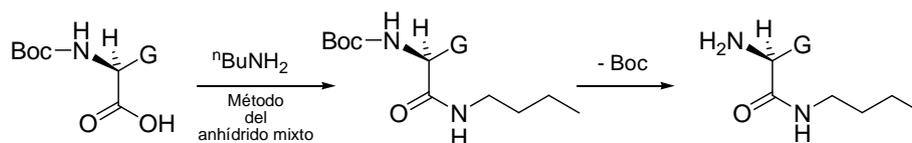


Figura 61. Esquema sintético general para la obtención del Fragmento B.

2.3.1.2. Protección de las cadenas laterales: c, d y e (Fragmento A).

Los fragmentos A de las cadenas laterales c, d y e, necesitan la protección del grupo amino con un grupo protector que sea estable frente a las condiciones de acoplamiento con la amina precursora (fragmento B).

Protección del ácido 32.

El grupo protector que se empleó para esta cadena lateral fue el tritilo, cuyos procedimientos de protección y desprotección, adecuados para conservar la geometría del doble enlace isomerizable, se encontraron descritos para este mismo fragmento de la cadena lateral.¹³⁰

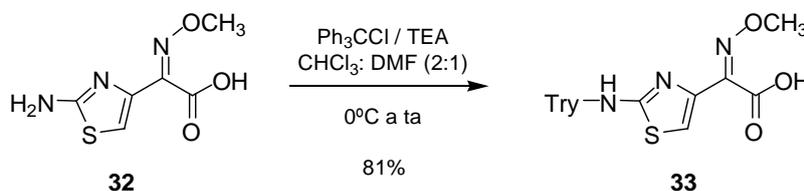


Figura 62. Protección del grupo amino de **32**.

El procedimiento para la obtención de la cadena lateral *N*-tritilada **33** consiste en la reacción de **32** en condiciones básicas con cloruro de tritilo (Figura 62).

La aparición en el espectro de RMN-¹H de un multiplete a 7.28 ppm que integra por 15 H indica la incorporación del grupo tritilo a la molécula. Además, la existencia de un sólo singlete en torno a 4 ppm, confirma que no se ha producido isomerización en torno al doble enlace C-N. El espectro de RMN-¹³C se corresponde con la estructura de **33**.

El EM del compuesto presenta el pico base con *m/z* 243 correspondiente al tritilo, lo que confirma la incorporación de dicho grupo a la molécula.

¹³⁰ R. Bucourt, R. Heymes, A. Lutz, L. Pénasse, J. Perronet. *Tetrahedron*. **1978**, *34*, 2233-2243.

Protección de los ácidos 34 y 36.

Se empleó como grupo protector el Boc, cuyos procedimientos de protección y desprotección resultaron adecuados para conservar la estereoquímica de este mismo fragmento y de las estructuras a las que posteriormente se incorpora.

De esta manera, la protección del grupo amino de la L-fenilglicina (**34**) y de la L-4-hidroxifenilglicina (**36**) se realizó con rendimientos cuantitativos por reacción con di-*tert*-butil-dicarbonato en medio básico (Figura 63).

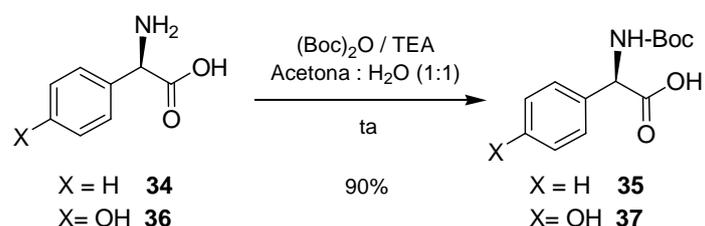


Figura 63. Protección del grupo amino de **34** y **36**.

En los espectros de RMN-¹H puede observarse un singlete ancho a 1.20 ppm, que integra por 9 H, que indica la presencia en la molécula de los tres metilos del Boc. El protón del metino de las moléculas **35** y **37**, dobles a 5.11 ppm, se acoplan con un sólo protón NH ($J = 5.0$ Hz), lo que también demuestra que se ha realizado la protección del grupo amino. La incorporación del grupo Boc en las moléculas también se confirma por la presencia en los espectros de RMN-¹³C de las señales a 28, 82 y 157 ppm.

Los EM muestran un fragmento con m/z ($M^+ - 45$), que indica la pérdida del grupo carboxilo, y otro fragmento con m/z ($M^+ - 101$), que implica la pérdida del grupo Boc.

2.3.2. Estructuras hapténicas tipo 31 con grupo $G = CH_3$.

Nuestro grupo de investigación ha realizado la síntesis de estas estructuras tipo **31** para varias cadenas laterales,¹³¹ descritas en la Figura 64, en el que se evalúa su reconocimiento por IgE. La síntesis de los productos **39-43** se llevó a cabo a partir de los ácidos comerciales de las cadenas laterales.¹³² Para la síntesis de la estructura **Z-38**, no se consiguió el ácido de la cadena lateral ($R^1 = a$) comercial, por lo que se partió del ácido α -oxo-2-furanacético.

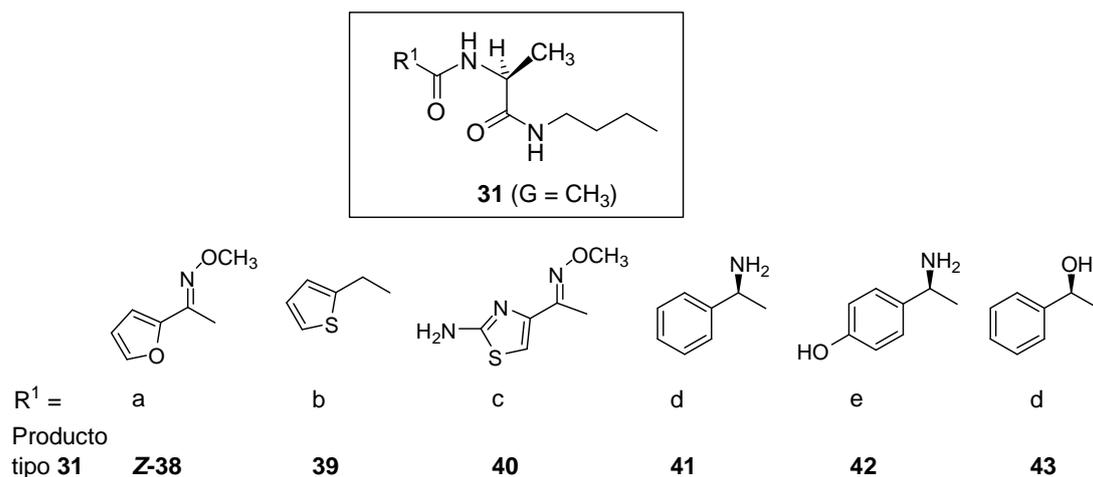


Figura 64. Estructuras **31** con grupo $G = CH_3$.

¹³¹ F. Sánchez, E. Pérez, R. Suau, M. I. Montañez, C. Mayorga, M. J. Torres, A. Romano, M. Blanca. *J. Mol. Recogn.* **2003**, *16*, 148-156.

¹³² Las estructuras **39-43** fueron sintetizadas por el Dr. Francisco Sánchez Sancho, en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Málaga.

2.3.2.1. Síntesis de la amina 46.

La obtención de **46** se llevó a cabo mediante las reacciones representadas en la Figura 65 partiendo de L-alanina protegida en su grupo amino (*N*-Boc-Ala, **44**).

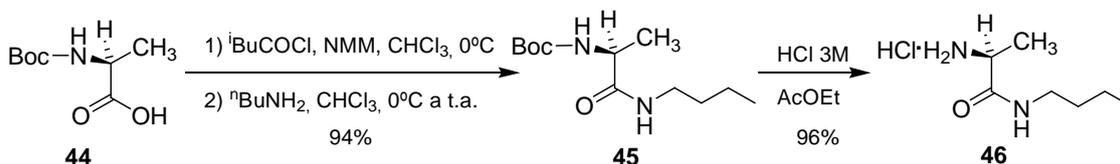


Figura 65. Síntesis de **46**.

La reacción de condensación entre **44** y *n*-butilamina se realizó mediante la activación del ácido por formación del anhídrido mixto. Se obtuvo de esta manera el producto **45** con un 94% de rendimiento.

En el espectro de RMN- ^1H de **45** se confirma la incorporación de la butilamina en la estructura. La aparición de una señal a 172 ppm en el espectro de RMN- ^{13}C confirma la formación de la amida. El espectro de masas muestra el ión molecular M^+ a m/z 244.

La desprotección del grupo amino se llevó a cabo en condiciones ácidas empleando AcOEt como disolvente para obtener el producto **46** con rendimientos cuantitativos.

La desaparición del singlete a 1.4 ppm, correspondiente al *tert*-butilo de **45**, en el espectro de RMN- ^1H de **46**, confirma la desprotección del grupo amino. En el espectro de RMN- ^{13}C también puede comprobarse la ausencia de los tres tipos de carbonos del grupo Boc a 28, 80 y 155 ppm.

2.3.2.2. Síntesis de Z-38.

Se planteó la síntesis de la estructura **Z-38** (Figura 66) empleando dos rutas sintéticas distintas (A y B). Ambas rutas parten de la cadena lateral **47** e implican el uso de los tres mismos compuestos, diferenciándose entre ellas tan sólo el orden de las reacciones para formación de amida con la amina precursora **46** y la formación del grupo metoxiimino. Teniendo en cuenta que en la etapa de formación de imina, tanto en la ruta

A como en la B, se van a obtener dos isómeros, la principal dificultad de esta síntesis se centra en la obtención del compuesto **38** con configuración *Z* puro.

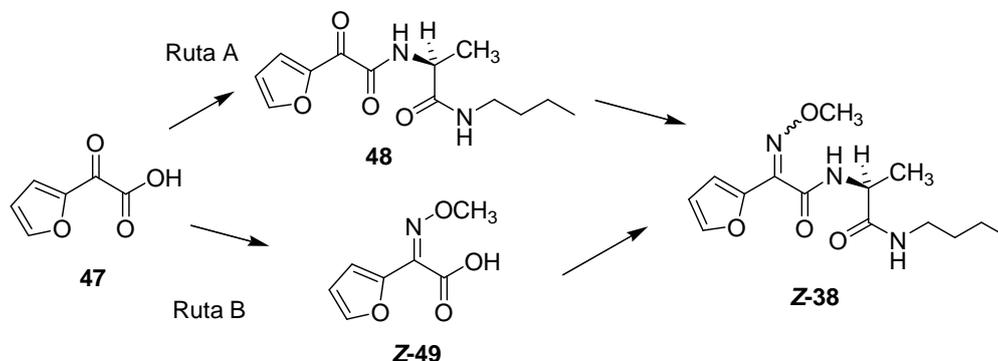


Figura 66. Rutas sintéticas para la obtención de **Z-38**.

2.3.2.2.1. Síntesis de **Z-38**. Ruta A.

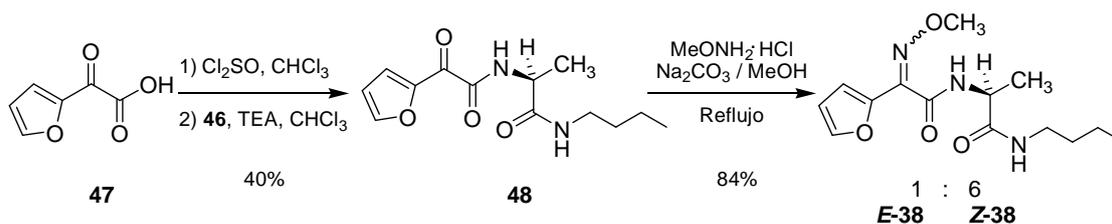


Figura 67. Síntesis de **38**. Ruta A

La reacción de condensación para la obtención de **48** se llevó a cabo mediante la activación del ácido **47** como cloruro de ácido con cloruro de tionilo y, posterior reacción con la amina precursora **46** en forma de base libre. Tras la purificación del crudo de reacción se obtiene el producto **48** con un 40% de rendimiento.

En el espectro de RMN- ^1H se observan las señales aromáticas correspondientes al furilo y, la aparición de un quintuplete a 4.44 ppm, perteneciente al protón del metino acoplado al metilo y al grupo amino ($J = 7.3 \text{ Hz}$), demuestra la presencia del fragmento de la amina precursora en la molécula **48**. Los datos de RMN- ^{13}C muestran las señales correspondientes a cada uno de los carbonos de la molécula. El EM muestra el ión molecular M^+ a m/z 295.

La síntesis de **38** se llevó a cabo por reacción de condensación del producto **48** con hidrocloreuro de metoxilamina y Na_2CO_3 , en metanol anhidro y a reflujo. El crudo de la reacción elaborada presentó mezcla de los dos isómeros *E/Z* en torno al doble enlace carbono-nitrógeno formado, en proporción relativa 1:6, que fueron separados mediante exhaustivas separaciones cromatográficas. De este modo se obtiene el isómero **Z-38** con un 33% del rendimiento total de reacción.

Los EM son muy similares para ambos isómeros, mostrando el ión molecular M^+ a m/z 295. Los espectros de RMN- ^{13}C de ambos compuestos presentan 14 señales, entre ellas la que aparece en torno a 63 ppm indica la incorporación del grupo metoxilo a la molécula.

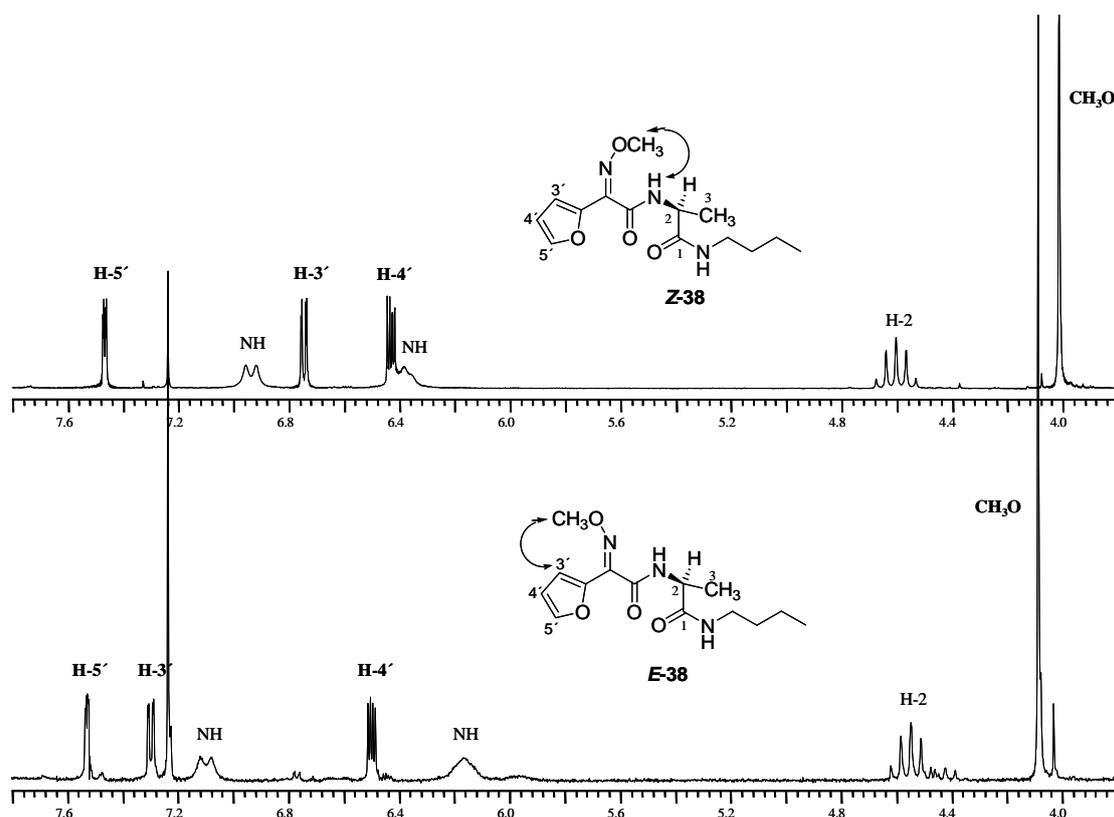


Figura 68. Ampliación de la zona del espectro de RMN- ^1H de **E-38** y **Z-38** comprendida entre 3.8 y 7.8 ppm y representación de los efectos NOE más significativos observados.

La asignación de estos compuestos pudo realizarse gracias a experimentos NOE, que confirmaron la configuración relativa *E/Z* de la estructura **38**. En la Figura 68 se muestra una representación de los efectos NOE más significativos empleados para la asignación de la configuración *E/Z* en torno al doble enlace. El isómero que muestra

efecto NOE entre el metoxilo y el H-3' del furilo, se asigna con configuración *E*. El isómero cuyo metoxilo no presenta efecto NOE con ningún protón del anillo y si con el protón amídico, se asigna con configuración *Z*.

Los espectros de RMN-¹H de estos compuestos isómeros se diferencian notoriamente en las señales correspondientes al metoxilo y al H-3' del furilo. La señal perteneciente al H-3' es la que más se afecta dependiendo de la configuración *E/Z*, apareciendo mucho más apantallada para el *Z* que para el *E*.

2.3.2.2.2. Síntesis de **Z-38**. Ruta B

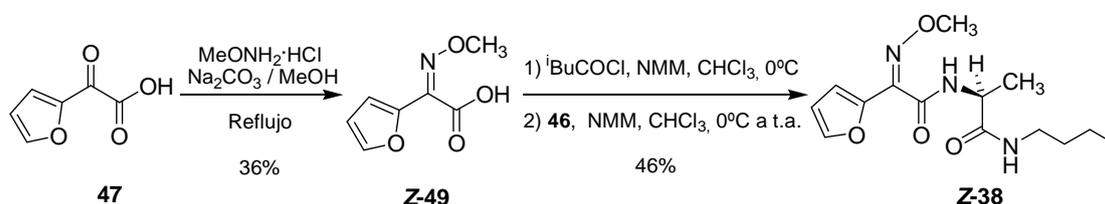


Figura 69. Síntesis de **38**. Ruta B.

Las mejores condiciones de reacción para la formación de la metoxilamina del ácido α -oxo-2-furanacético (**47**) se consiguieron haciendo reaccionar el ácido **47** con exceso de hidrocloreuro de metoxilamina y Na₂CO₃ en metanol anhidro, a reflujo durante 2 horas. Pudimos deducir por espectros de RMN-¹H (Figura 70) que el crudo de reacción corresponde a la mezcla de los dos isómeros **49** en proporción relativa 1:4 (*E/Z*). Esta mezcla se obtuvo con un 90% de rendimiento. Mayores tiempos de reacción condujeron a una mayor proporción del isómero *E*.

Los numerosos intentos de separación cromatográfica no rindieron buenos resultados. Los dos isómeros pudieron separarse mediante columna en alúmina neutra con eluyentes polares como (MeOH/TEA, 9.9:0.1) o (MeOH/NH₃, 9.9:0.1), pero en forma de sal amónica. Posteriormente en el proceso de extracción de los compuestos *E-49* y *Z-49* en forma de ácido libre, resultó que parte del isómero *Z* en condiciones ácidas isomeriza al *E*.

Finalmente la purificación del isómero **Z-49** se consiguió por recristalización de benceno para formar unos cristales blancos, 36% del rendimiento total de la reacción, que corresponden al exceso de isómero *Z*, quedando en disolución mezcla 1:1.

El producto **Z-49** puro se conserva bien en frigorífico y reservado de la luz, puesto que se ha observado la isomerización de muestras puras cuando se conserva en otras condiciones.

A pesar de la similitud estructural de ambos compuestos, la distinta configuración del doble enlace se manifiesta en los espectros de RMN-¹H en el δ del H-3 (Figura 70). El δ de H-3 es 7.4 ppm para el compuesto **E-49** y, para el **Z-49** es 6.8 ppm. Además, el δ del metoxilo del isómero **Z** (4.09 ppm) siempre aparece más apantallado que el correspondiente al isómero **E** (4.17 ppm).

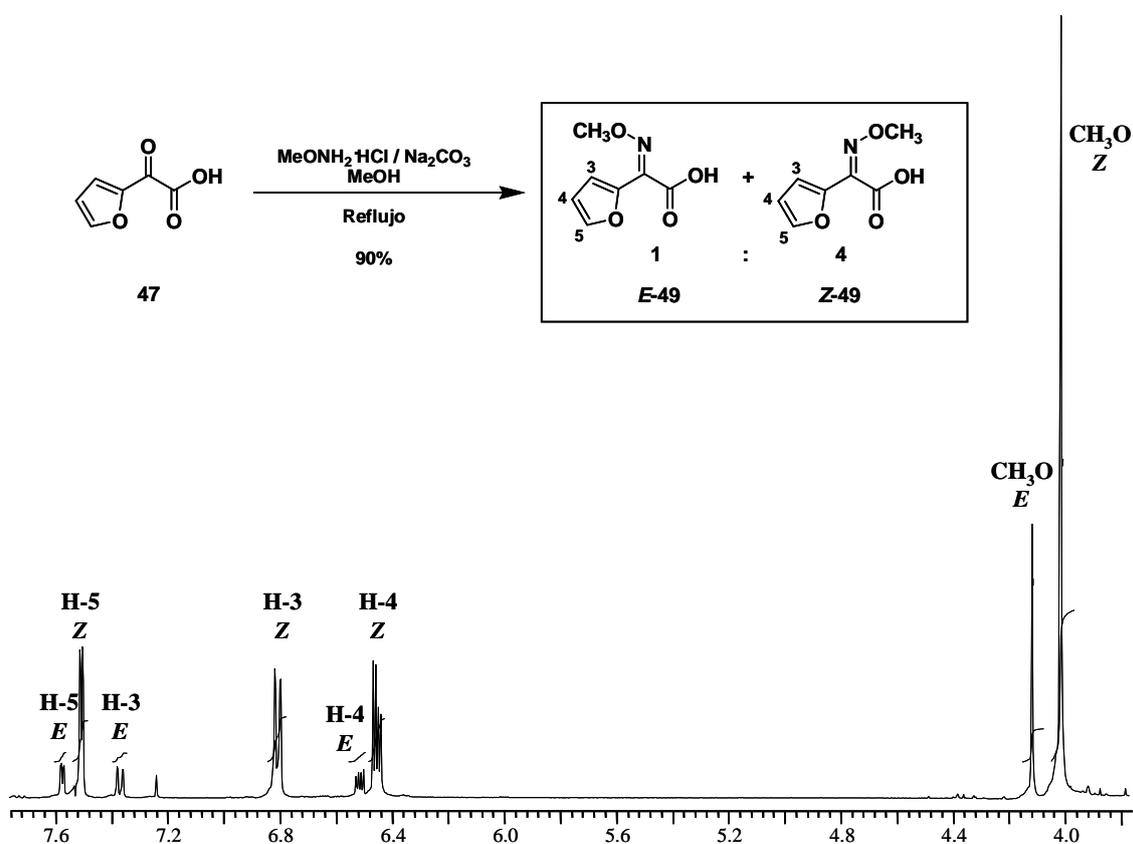


Figura 70. Ampliación del espectro de RMN-¹H del crudo de reacción para la formación de los isómeros (**E/Z**)-**49** en CDCl_3 .

Los espectros de RMN-¹³C son prácticamente iguales, la única diferencia viene dada por las señales correspondientes al C-3: la del isómero **Z** (114.0 ppm) se presenta a campo más alto que la del isómero **E** (118.8 ppm) con $\Delta\delta = 4.8$ ppm.

El EM de **Z-49** muestra el ión molecular M^+ a m/z 169 (22%), número impar que confirma la presencia de un átomo de nitrógeno en la molécula. Además el pico base

m/z 93 ($M^+ - 31 - 45$) correspondiente a la pérdida del grupo metoxilo y carboxilo, también demuestra la formación de la molécula. El EM de su isómero **E-49** presenta la mismas fragmentaciones con abundancias similares.

La obtención de **Z-38** se llevó a cabo mediante la activación del ácido **Z-49** por el método del anhídrido mixto y condensación con **46**, para obtener el producto con un 48% de rendimiento (Figura 69), presentando los datos espectroscópicos correspondientes.

Isomerización E/Z de 49.

Hay muchos ejemplos de la isomerización *E/Z* de iminas y compuestos derivados.^{133,134, 135,136} Con el objetivo de aumentar la proporción de isómero *Z*, se emplearon dos métodos de isomerización: a) Vía tratamiento ácido, y b) Vía fotoquímica.

Los distintos intentos para aumentar la proporción de isómero con configuración *Z* de la mezcla de reacción, por tratamiento ácido, dieron como resultado un incremento del isómero de configuración *E*. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Proporción de isómeros de partida 49 <i>E : Z</i>	Tratamiento ácido	Tiempo de reacción (horas)	Proporción de isómeros 49 obtenidos en reacción <i>E : Z</i>
1 : 1.5	HCl 10%	2	1.5 : 1
1 : 1.5	HCl 10%	12	2 : 1
1 : 1	AcOH 1M	2	1.5 : 1

Tabla 7. La concentración de los productos de partida es aproximadamente 1M. La isomerización se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Se ha descrito la isomerización fotoquímica del grupo metoxiimino de otros compuestos, en los que se definen algunos aspectos de la isomerización directa y sensibilizada de isómeros *Z* y *E*.¹³⁵ La irradiación de las metoxiiminas implica una rápida isomerización *E/Z*.¹³⁶ Así está descrito que la irradiación de *E*-iminas, bajo

¹³³ A. Padwa. *Chem. Rev.* **1977**, 77, 37-68.

¹³⁴ A. C. Pratt. *Chem. Soc. Rev.* **1977**, 6, 63-81.

¹³⁵ A. Padwa, F. Albrecht. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 4849-4857.

¹³⁶ A. Padwa, F. Albrecht. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 2361-2366.

condiciones de irradiación directa o sensibilizada, ocasiona la formación de isómeros-*Z*.¹³³

Se procedió al estudio de la isomerización fotoquímica de estos isómeros (*E,Z*)-**49** empleando distintas condiciones de reacción que se resumen en la Tabla 8. En primer lugar se realizó la irradiación directa del isómero *E* en cloroformo a 254 y a 320 nm. Estos resultados fueron esperanzadores, pues la proporción del isómero *Z* aumentaba con el progreso de la reacción hasta que alcanza el estado estacionario, quedando la mezcla en proporción 1:1 (*E/Z*). En segundo lugar, y con objeto de que toda conformación *E* isomerice a *Z*, se irradió en las mismas condiciones una mezcla de proporción 1:3.4 (*E/Z*). Sin embargo, se obtuvo el mismo resultado, la evolución de la reacción finalizó con mezcla en proporciones 1:2. Se realizaron otras irradiaciones a mezclas de isómeros en distintas proporciones, con varios sensibilizadores (acetofenona, benzofenona, fenantreno y antraceno), en concentración adecuada para asegurarnos que toda la luz es absorbida por el sensibilizador. Aunque los tiempos de reacción son distintos, los resultados obtenidos coinciden en que nunca se aumenta la proporción del isómero *Z*.

Proporción de isómeros de partida 49 <i>E</i> : <i>Z</i>	Tipo de reacción: Directa o sensibilizada	λ de irradiación (nm)	Tiempo de reacción (min.)	Proporción de isómeros 49 obtenidos <i>E</i> : <i>Z</i>
1 : 0	Directa	320 <small>*Descompone a los 50'</small>	20	1 : 1
1 : 0	Directa	254 <small>*Descompone a los 60'</small>	30	1 : 1
1 : 3.4	Directa	320	30	1 : 2
5 : 1	Sensibilizada (Benzofenona 0.04M)	254	60	1 : 0
1 : 2.3	Sensibilizada (Benzofenona 0.04M)	254	60	1 : 0
1 : 2.2	Sensibilizada (Acetofenona 0.2M)	254	90	1 : 0
1 : 2	Sensibilizada (Fenantreno 0.015M)	254	60	1 : 0
1 : 2.3	Sensibilizada (Antraceno 7mM)	254	60	1 : 0

Tabla 8. La reacción siempre se realiza en CHCl₃ destilado. La concentración de los productos de partida es 1mM.

2.3.2.3. Estudios inmunológicos: Confirmación de que la estructura se reconoce.

El grupo de la Unidad de Investigaciones Alérgicas del Complejo Hospitalario Universitario Carlos Haya ha evaluado *in vitro* la reactividad y especificidad frente a estos compuestos sintéticos tipo **31**. Durante estos estudios se pudo observar una alta correlación en cuanto al patrón de especificidad de los anticuerpos, obtenidos a partir de las diferentes metodologías: pruebas cutáneas, RAST e inhibición del RAST.

Ciertamente, el estudio del reconocimiento de las estructuras sintéticas tipo **31** por anticuerpos IgE específicos se han realizado por estudios de inhibición competitiva de inmunoensayo RAST, usando suero humano de pacientes que han ido padeciendo reacciones alérgicas a cefalosporinas. En estos estudios de inhibición se ha empleado como fase sólida discos activados con BrCN, acoplados a PLL y conjugados a la cefalosporina que provocó el episodio alérgico de cada paciente (Figura 71). Como productos en fase fluida se han utilizado las estructuras sintéticas tipo **31** (con grupo G = CH₃).

Los ensayos de RAST empleando discos de ceftriaxona con el suero 1 mostraron inhibición con las 3 estructuras ensayadas (**40**, **41** y **42**) a una concentración de 200 mM, siendo el compuesto **40** el que produce una mayor inhibición. A concentraciones más bajas de inhibidor mostró especificidad para el compuesto **40**, siendo negativo para las otras 2 estructuras. El compuesto **40** contiene la cadena lateral perteneciente a cefepima, ceftriaxona y cefozidima, cadena lateral también muy similar a la de cefuroxima, todas ellas cefalosporinas positivas al RAST directo en el suero 1.

El suero 2, con un nivel bajo de RAST directo a ceftriaxona, presenta una mayor especificidad para el compuesto tipo **31** que contiene esta misma cadena lateral (**40**).

Las inhibiciones con el suero 3 (con un alto nivel de RAST a cefalosporinas que poseen la cadena lateral R¹ de **40**) muestran claramente una especificidad óptima para **40** a todas las concentraciones.

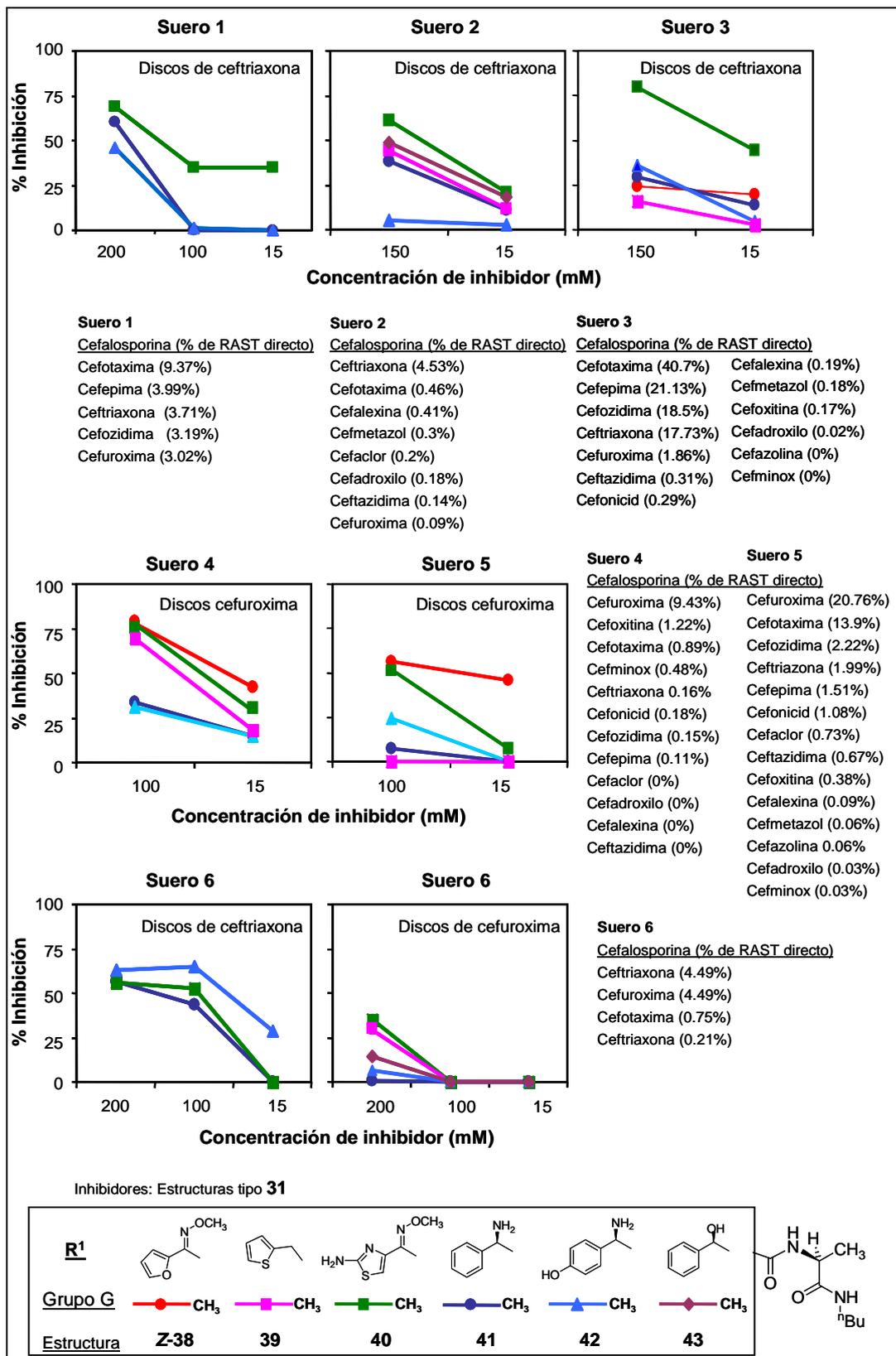


Figura 71. Estudios de inhibición del RAST con distintos sueros de pacientes alérgicos a cefalosporinas a distintas concentraciones de compuestos tipo 31 con G = CH₃.

También se llevaron a cabo ensayos de inhibición con sueros (4 y 5) específicos a cefuroxima empleando discos de la misma cefalosporina (Figura 71).

Los resultados con el suero 4 muestran que el reconocimiento óptimo se da con la estructura que contiene la cadena lateral de cefuroxima, **Z-38**, seguido por **39** y **40**, cuyas cadenas laterales presentan una estructura similar a la de **Z-38**. La inhibición con el suero 5 muestra, del mismo modo, un reconocimiento específico a la estructura **Z-38**. Hay también una unión específica con la estructura **40**, cuya cadena lateral similar a la de cefuroxima, además pertenece a cefotaxima (para el que también presenta altos niveles de RAST directo).

Se ensayaron dos inhibiciones distintas con el suero 6, específico a cefuroxima y ceftriaxona (Figura 71). Los estudios empleando discos con ceftriaxona mostraron inhibición para los 3 compuestos testados a concentración 200 mM, y a 100 mM mayor inhibición para **42** y **40**, aunque a concentraciones menores es negativo para el compuesto **40**. Empleando discos de cefuroxima, únicamente a altas concentraciones puede distinguirse un patrón diferencial de especificidad para las estructuras **39** y **40**, que poseen, como cefuroxima, también en R¹ un heterociclo de 5 miembros.

Con estos estudios se ha comprobado que estas moléculas sintéticas **31** (G = CH₃) se reconocen y que la estructura de las distintas cadenas laterales juega un papel importante en el reconocimiento molecular.

El siguiente paso que nos planteamos es la síntesis de estructuras tipo **31** con otro grupo G, hidroximetilo, para estudiar si la variación del grupo funcional en G influye en el reconocimiento por las IgE específicas a cefalosporinas.

2.3.3. Estructuras hapténicas tipo 31 con grupo $G = CH_2OH$

2.3.3.1. Síntesis de la amina 52.

El producto **52** (Figura 72) se sintetizó de manera similar al **46** siguiendo la secuencia sintética representada en el esquema de la Figura 61 (página 102) partiendo de L-serina protegida en su grupo amino (*N*-Boc-Ser, **50**).

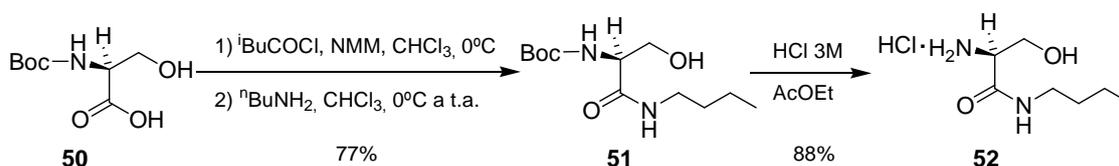


Figura 72. Secuencia sintética para la obtención de **52**.

La reacción de condensación entre *N*-Boc-Ala y *n*-butilamina se realizó mediante la activación del ácido por formación del anhídrido mixto, para obtener la amida **51** con un 77% de rendimiento.

En el espectro de RMN- 1H de **51** aparecen nuevas señales correspondientes a la butilamida formada. La señal a 172 ppm en el espectro de RMN- ^{13}C confirma la formación de la amida. El EM(IE) muestra el ión molecular M^+ a m/z 260.

La desprotección del grupo amino de **51**, mediante hidrólisis con HCl 3M en AcOEt a temperatura ambiente, dio el producto **52** con un 88% de rendimiento.

Los espectros de RMN confirman la desprotección del grupo amino por desaparición de las señales que corresponden al Boc.

2.3.3.2. Síntesis de Z-53.

Para la obtención de estructuras tipo **Z-53** también planteamos dos rutas sintéticas, representadas en la Figura 73, variando entre ellas tan sólo el orden de las reacciones para formación de amida con la amina precursora **52** y la formación del grupo metoxiimino.

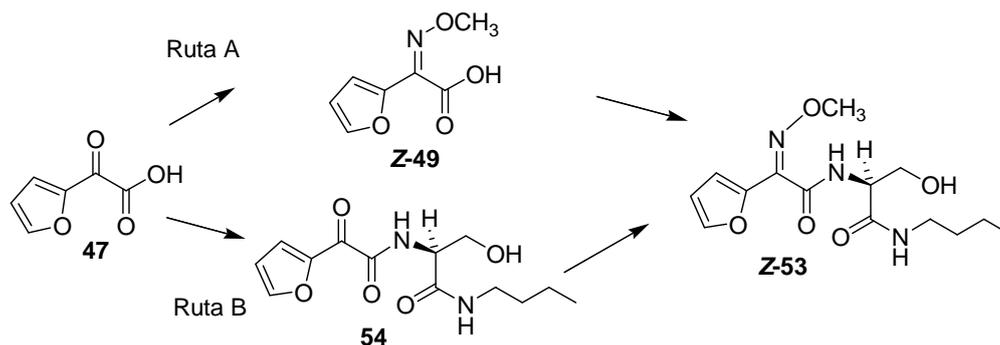


Figura 73. Rutas sintéticas para la formación de **Z-53**.

2.3.3.2.1 Síntesis de **Z-53**. Ruta A.

La síntesis por esta vía consiste primero en la formación de la cadena lateral R^1 (**Z-49**) y, después, en la condensación con la amina precursora **52** (Figura 74).

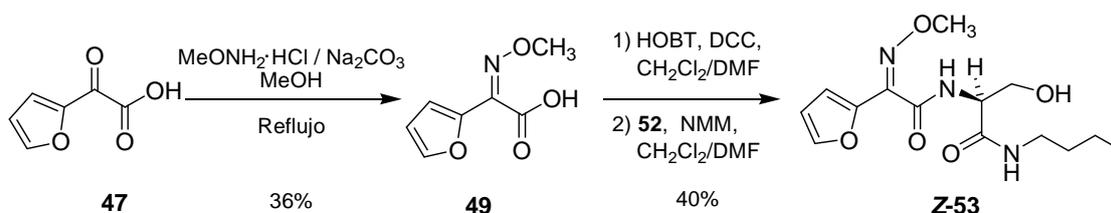


Figura 74. Síntesis de **Z-53** (ruta A).

El ácido de la cadena lateral, adecuadamente funcionalizada, **Z-49** se condensó con la amina **52** mediante la activación del ácido empleando HOBT y DCC, con un rendimiento del 40%.

Los datos de RMN^1H del producto obtenido corresponden a la estructura **Z-53**. El espectro de RMN^{13}C muestra 7 señales alifáticas, 5 señales entre 111 y 146 ppm correspondientes a los carbonos del anillo aromático y al carbono de la imina, y dos señales a 161 y 169 ppm correspondientes a los dos carbonos carbonílicos. El EM muestra el ión molecular M^+ del compuesto **Z-53** a m/z 311.

2.3.3.2.2. Síntesis de (*E/Z*)-**53**. Ruta B.

La síntesis por esta vía consiste primero en la condensación para la formación de la amida **54**, y después en la formación de la imina **53** (Figura 75). El problema de esta ruta se encontró en la dificultad para separar los isómeros del crudo de reacción.

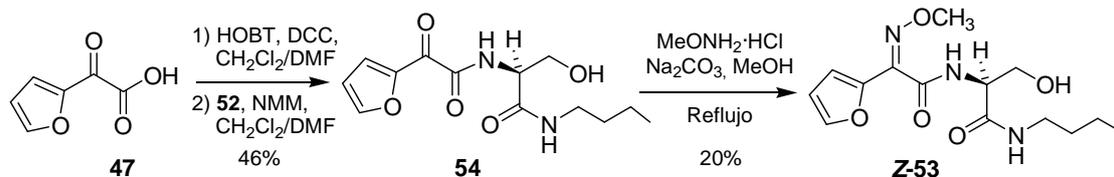


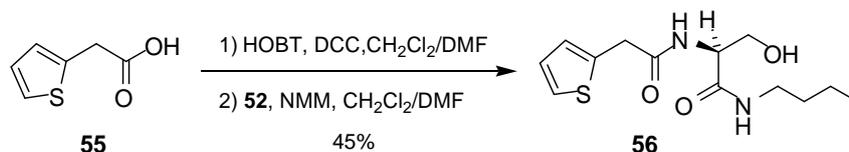
Figura 75. Síntesis de (*E/Z*)-**53**.

La activación del ácido **47** con HOBT y DCC en mezcla de CH₂Cl₂ y DMF, y la posterior adición de la amina **52** en forma de amina libre dio lugar a la formación de la amida **54** con un 46% de rendimiento.

Los datos espectroscópicos de RMN confirman la estructura de la molécula: como son las señales de los protones aromáticos a 6.6, 7.7 y 8.1 ppm de la cadena lateral y el cuartete a 3.22 ppm correspondiente al metileno unido a la amida y; las 3 señales de carbono entre 168 y 173 ppm pertenecientes a los tres grupos carbonilos que presenta **54**. El EM muestra el ión molecular M⁺ a m/z 282.

La reacción de condensación para la formación de imina **53** se realizó en las mismas condiciones que las empleadas para la obtención del producto **38**. Se obtuvo mezcla de isómeros (*E/Z*) del producto **53** en proporción (1:2).

Para llevar a cabo la separación de los dos isómeros, se realizaron sucesivas cromatografías, y así se obtuvo un 11% del isómero *E* y un 20% de isómero *Z*, quedando aún un 40% de mezcla de isómeros en fracciones mezcladas. Las fracciones más puras no presentaron la suficiente pureza como para poder caracterizarlas adecuadamente. Aunque de estas fracciones si pudieron extrapolarse los datos de RMN-¹H del isómero *E-53*, puesto que ya se conocían los del isómero *Z*.

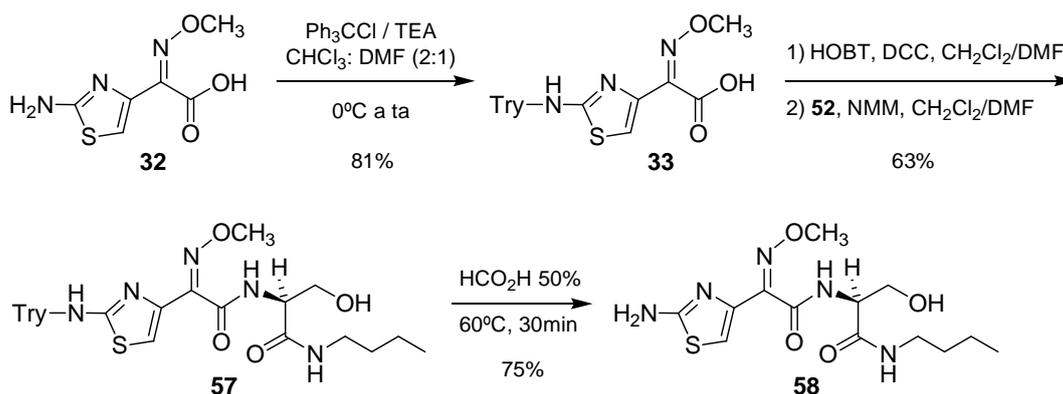
2.3.3.3. *Síntesis de 56.*Figura 76. Síntesis de **56**.

La obtención del producto **56** se llevó a cabo mediante la condensación del ácido **55**, activado con DCC/HOBT, con la amina **52** (Figura 76).

Los espectros de RMN-¹H de **56** muestran las señales correspondientes a los dos fragmentos condensados: la amina precursora **52** y al del ácido de la cadena lateral **55**. El espectro de RMN-¹³C se corresponde con la estructura del producto. El EM muestra el ión molecular M⁺ a *m/z* 284.

2.3.3.4. *Síntesis de 58.*

La síntesis del producto **58** se llevó a cabo partiendo del ácido **32** mediante la secuencia sintética descrita en la Figura 77. Consiste en la condensación del ácido protegido **33** con la amina **52** y posterior desprotección del grupo amino del producto de **57**.

Figura 77. Esquema sintético del compuesto **58**.

Los mejores resultados para el acoplamiento de **52** con **33**, se obtuvieron con la reacción de **33** con HOBT y DCC, de manera análoga a las reacciones anteriormente descritas. De este modo el producto **57** se obtuvo con un rendimiento del 63%.

Los datos de RMN-¹H confirman la formación del producto **52**. Entre las señales correspondientes a la cadena lateral protegida, aparece un sólo singlete en torno a 4 ppm, correspondiente al metoxilo, que ratifica la formación de un solo isómero. En el espectro de RMN-¹³C se muestran 18 señales, cuya asignación se deduce fácilmente por similitud con los espectros de los productos de partida. El EM muestra el pico base a m/z 243, correspondiente al fragmento del tritilo.

La desprotección del grupo tritilo se realizó satisfactoriamente por tratamiento del compuesto **57** con ácido acuoso, para obtener el compuesto puro **58**.

Los datos de RMN confirman la estructura de la molécula **58**. Desaparece el multiplete a 7.2 ppm correspondiente al tritilo en el espectro de RMN-¹H. En el espectro de RMN-¹³C desaparecen las 5 señales correspondientes al grupo tritilo. El EM muestra el ión molecular M⁺ a m/z 343 con una abundancia relativa del 6%.

2.3.3.5. Síntesis de 60.

La secuencia sintética que proponemos para la obtención del producto **60** se representa en la Figura 78. El primer paso consiste en la protección del grupo amino de la cadena lateral **34** para la obtención del ácido protegido **35**, cuya condensación con la amina **52** y posterior eliminación del grupo protector da el producto **60**.

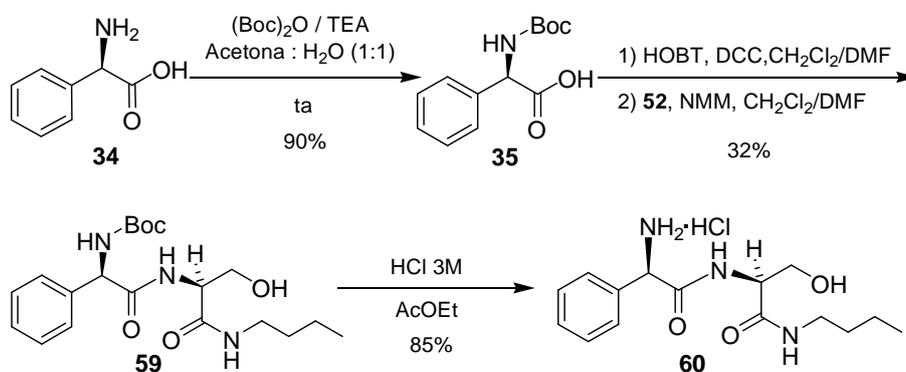


Figura 78. Esquema sintético para la obtención de **60**.

Se han empleado dos procedimientos para la formación de la amida **59**, dependiendo del método utilizado para activar el ácido **35**: a) formación del anhídrido mixto con t -BuOCOCi/NMM; y b) formación de aducto con HOBT/DCC. Finalmente, los mejores resultados se lograron empleando HOBT/DCC para la activación del ácido.

Los datos de RMN- 1 H se corresponden con la estructura del producto. Hay 3 señales que integran por un protón cada una y que intercambian con D, son las que se asignan a los 3 NH de la molécula. En el espectro de RMN- 13 C la presencia de dos señales en torno a 171 ppm confirma la existencia en la molécula de dos carbonos carbonílicos de amida. En el EM se observan dos fragmentaciones a m/z 187 y 206 que corresponde a la ruptura de la molécula entre el carbono carbonílico y el metino unido al Boc.

La eliminación del Boc del compuesto **59** se llevó a cabo por tratamiento ácido acuoso en AcOEt para obtener la sal de amina **60** con un 85% rendimiento.

Los datos de RMN- 1 H y 13 C se corresponden con la estructura del producto desprotegido. La desaparición del singlete intenso a 1.4 ppm en el espectro de RMN- 1 H, indica la ausencia del grupo Boc en la molécula. El espectro de RMN- 13 C tampoco muestra las señales correspondientes al grupo Boc del producto **59**.

2.3.3.6. Síntesis de **62**.

El producto **62** se obtuvo mediante la secuencia sintética mostrada en la Figura 79, partiendo del ácido **36**, cuyo producto protegido **37** se hizo condensar con la amina **52**, para obtener el producto de condensación **61**, cuya desprotección dio la estructura **62**.

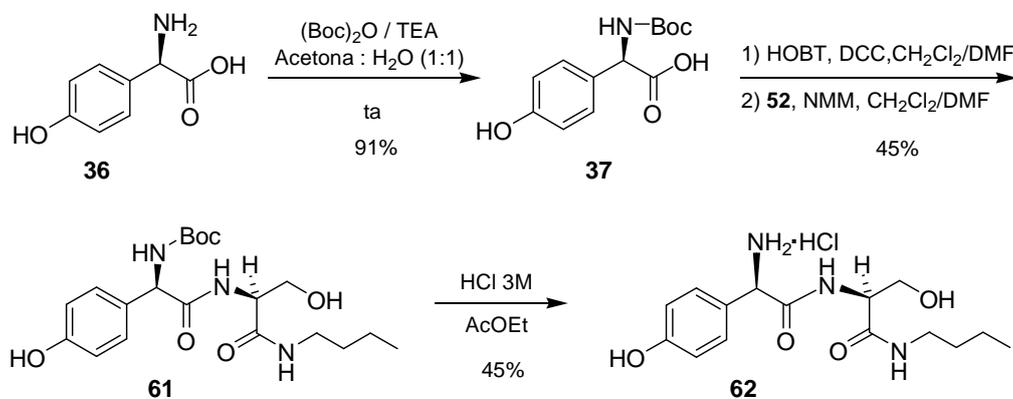


Figura 79. Secuencia sintética para la obtención de **62**.

La síntesis de **61** se llevó a cabo mediante la activación del ácido **37** con HOBT/DCC y posterior condensación con la amina **52**.

Los datos de RMN-¹H confirman la estructura de **61**. En el espectro de RMN-¹³C aparecen 16 señales correspondientes a los distintos tipos de carbono existentes en la estructura. El EM muestra el ión molecular a m/z 409.

La hidrólisis del grupo amino de **61** en condiciones ácidas empleando AcOEt como disolvente dio el producto desprotegido **62** con rendimientos cuantitativos.

Los datos de RMN-¹H confirman la desprotección, debido a la desaparición del singlete a 1.4 ppm correspondiente al Boc. El espectro de RMN-¹³C se corresponde con la estructura **62**. El EM muestra el catión radical amonio **62** a m/z 310, y el ión molecular de la molécula neutra a m/z 309. El pico base a m/z 122 corresponde al fragmento de bencilamina.

2.3.3.7. Síntesis de **64**.

El producto **64** se obtuvo por reacción de condensación del ácido mandélico **63** con la amina **52** empleando HOBT y DCC para la activación del ácido (Figura 80).

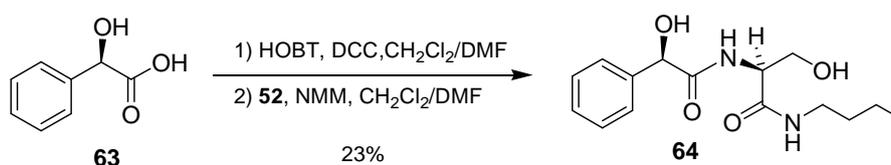


Figura 80. Obtención de **64**.

Los datos espectroscópicos confirman la estructura del compuesto **64**. Una ampliación del espectro de RMN-¹H se muestra en la Figura 81

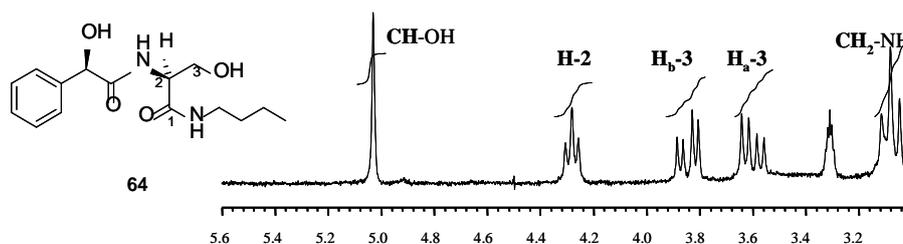


Figura 81. Ampliación de la zona del espectro de RMN-¹H comprendida entre 3.0 y 5.6 ppm del producto **64** en CDCl₃ + CD₃OD.

2.3.3.8. Estudios inmunológicos: Influencia del grupo G.

De la misma manera a como se evaluó el reconocimiento de las estructuras **31** con grupo G metilo, se ha estudiado el reconocimiento molecular de las nuevas moléculas sintéticas tipo **31** con grupo G hidroximetilo por anticuerpos IgE específicos a cefalosporinas, mediante ensayos de inhibición del RAST. Además se han comparado las inhibiciones de los dos tipos de moléculas, para estudiar si la variación del grupo funcional en G aumenta o disminuye el reconocimiento por las IgE específicas a cefalosporinas.

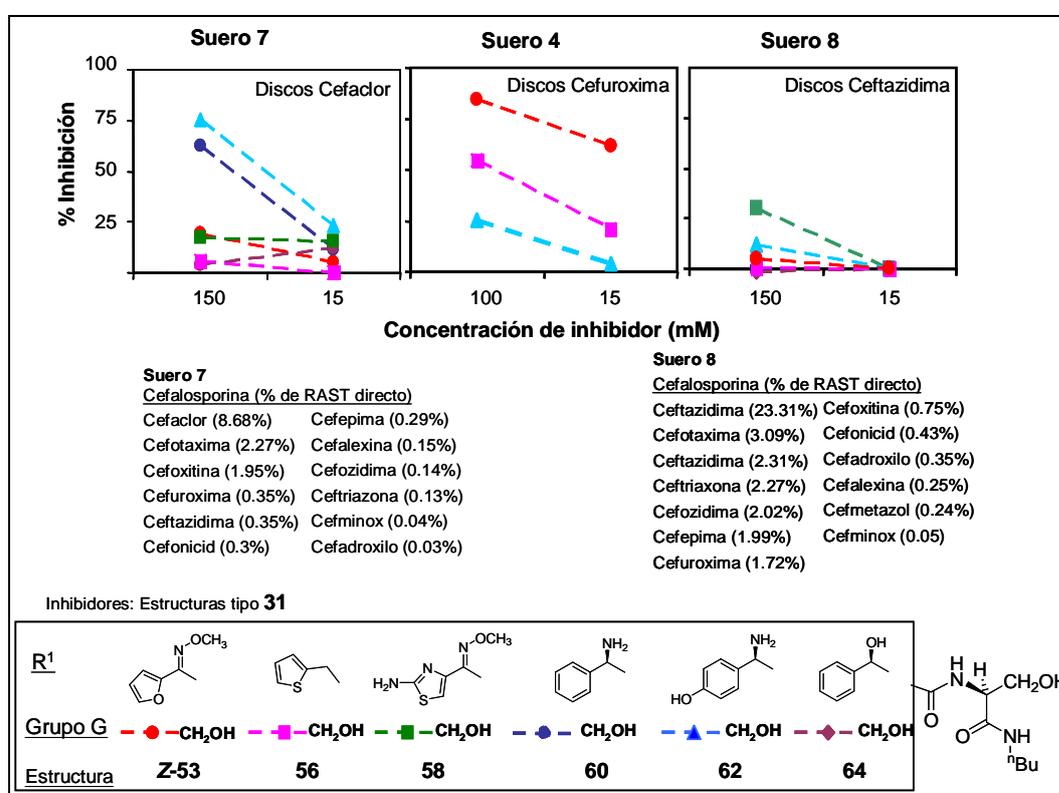


Figura 82. Estudios de inhibición del RAST con distintos sueros de pacientes alérgicos a cefalosporinas a distintas concentraciones de compuestos tipo **31** con G = CH₂OH.

En la Figura 82 se muestran los resultados de inhibición del RAST, obtenidos para tres sueros específicos a diferentes cefalosporinas. Los datos de estas inhibiciones manifiestan la misma tendencia que los representados en la Figura 71. Los ensayos con el suero 7, específico a cefaclor, a alta concentración sólo muestra una inhibición óptima con las estructuras **60** (que presenta la cadena lateral de cefaclor) y **62** (con cadena lateral muy similar). Para el suero 4, específico a cefuroxima, los resultados

muestran la mayor inhibición con el compuesto que contiene su cadena lateral, **Z-53**. Además puede distinguirse también especificidad para el compuesto **56** (con R¹ similar al de cefuroxima) si se compara con el **62**.

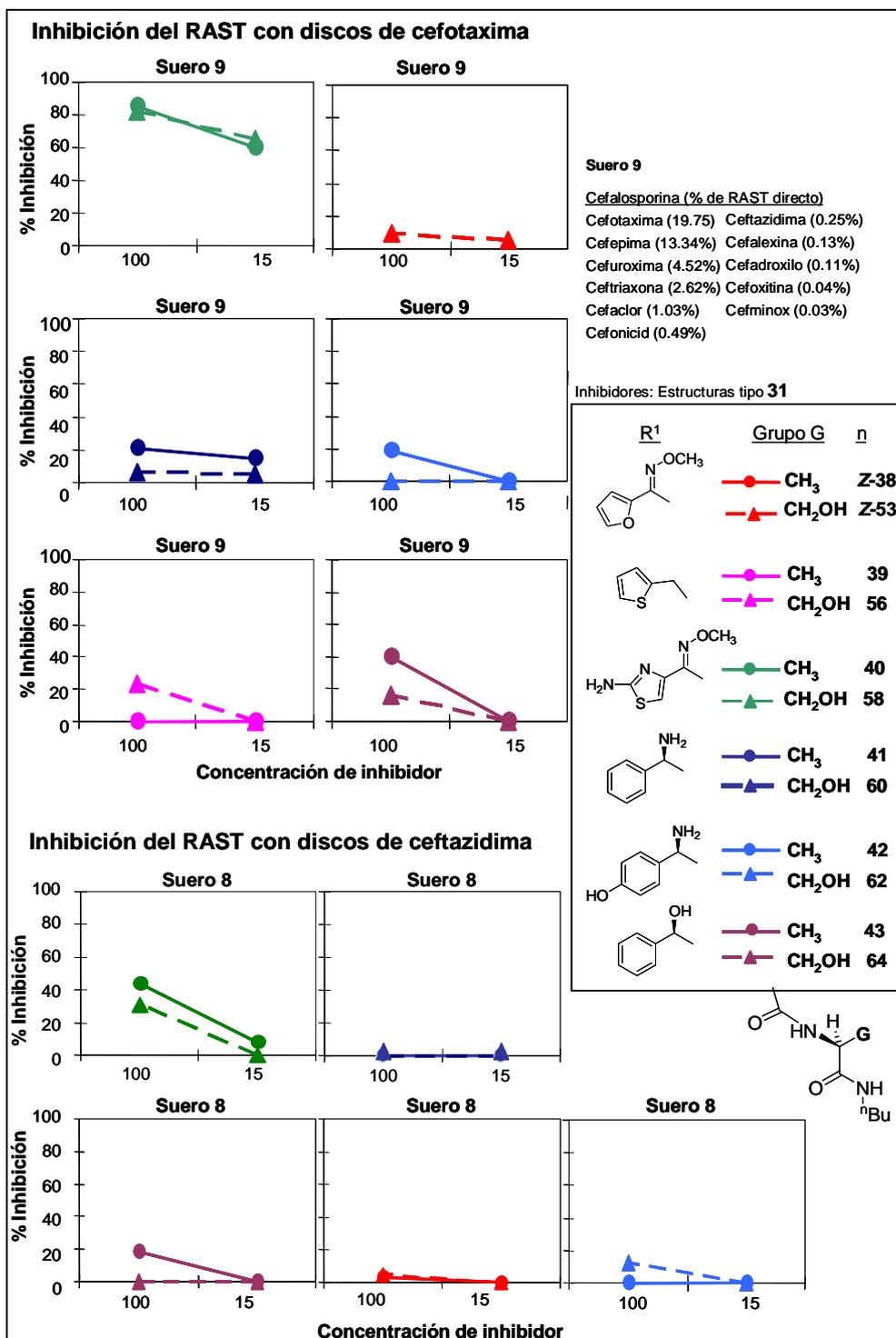


Figura 83. Estudios de inhibición de RAST, con estructuras tipo 31 variando el grupo funcional en G.

En la Figura 83 se representan los datos de inhibición del RAST obtenidos para dos sueros distintos, comparando tanto la influencia de la cadena lateral como la influencia del grupo funcional en G (CH₃ y CH₂OH).

Los resultados para el suero 9, específico a cefotaxima y cefepima, muestran una alta especificidad para los compuestos **40** y **58**, que contienen la cadena lateral de las cefalosporinas a las que es específico. El resto de los compuestos con otras cadenas laterales no presenta niveles óptimos de inhibición. Sin embargo, aunque la cadena lateral demuestra tener una gran importancia en el reconocimiento por IgE, la influencia del grupo funcional en C-3 no parece influir en este caso.

Para el suero 8, específico a ceftazidima, cuya cadena lateral R¹ es muy similar a la del compuesto **40** y **58**, la inhibición mayor se consiguió con estos compuestos, sólo a alta concentración, presentando la misma tendencia los dos compuestos. Los anticuerpos IgE presentes en este suero no muestran unión específica con las demás estructuras ensayadas con otras cadenas laterales.

Estos datos nos indican que las estructuras tipo **31** con grupos G metilo e hidroximetilo muestran la misma tendencia en el reconocimiento por IgE, y el hecho de que la estructura **31** presente un grupo G hidroximetilo no aumenta o disminuye en gran medida el reconocimiento con respecto a las moléculas con grupo G metilo. Siendo de esta manera, por ahora, la cadena lateral R¹ la que tienen una mayor influencia en el reconocimiento por IgE.

Con estos datos, nos propusimos la síntesis de estructuras tipo **31** con otro grupo funcional en G, mercaptometilo, para tener más estructuras distintas con las que estudiar la influencia de esta posición en el reconocimiento de las IgE.

2.3.4. Síntesis de estructuras hapténicas tipo 31 con grupo G = CH₂SH.

Debido a la alta nucleofilia del grupo tiol y a su facilidad para oxidarse, planteamos la síntesis de estructuras tipo **31** con grupo G = SH, preparando primero estas estructuras hapténicas con el grupo tiol protegido, para desprotegerlo en una última etapa sintética. El bloqueo de esta posición puede llevarse a cabo mediante la formación de un tiol-éster, un sulfuro o un disulfuro.

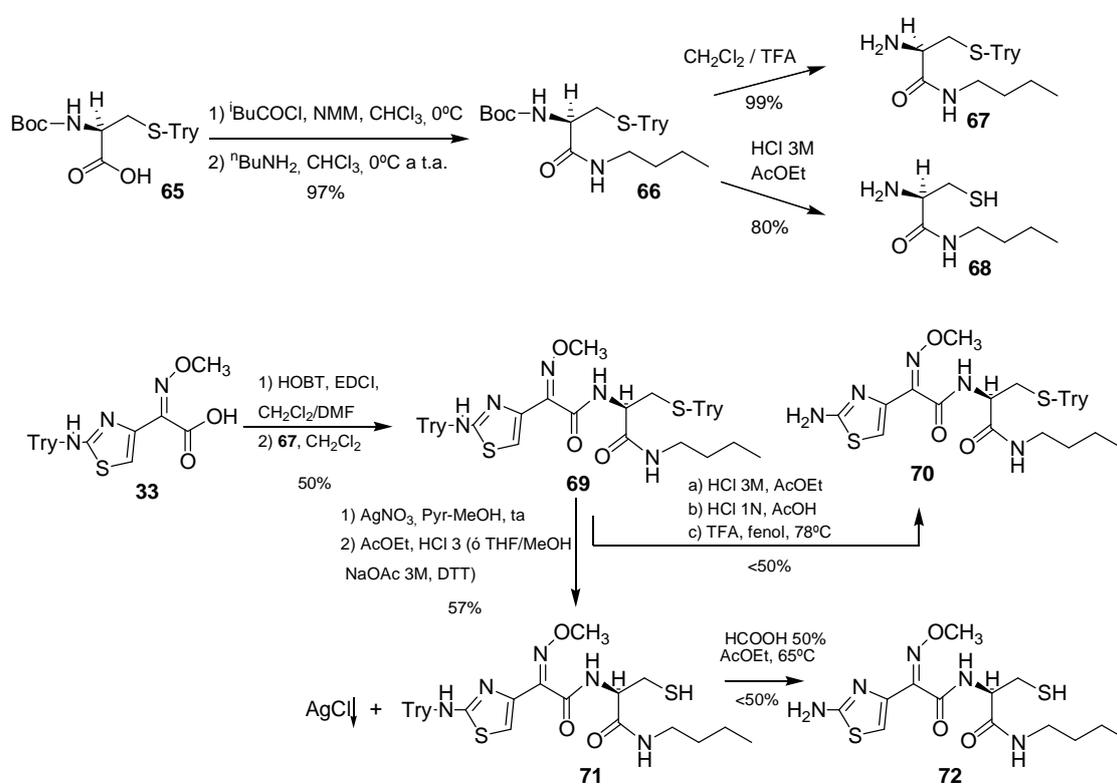


Figura 84. Primera ruta sintética empleada para: a) la formación de la amina precursora (fragmento B), **67**, de los compuestos con estructuras tipo **31** con G = SH; b) la obtención del compuesto **72**.

En un principio nos propusimos la protección del grupo tiol con un grupo tritilo. En la Figura 84 se muestra como la amina precursora **67** (fragmento B) fue preparada de esta manera y después condensada a una de las cadenas laterales. El paso más problemático resultó ser la desprotección del tiol, para el que algunos métodos descritos no dieron buenos resultados y sólo desprotegieron la cadena lateral para dar el compuesto **70**. El procedimiento con el que se consiguió desproteger el tiol necesitaba el empleo de

AgNO₃, cuyo uso pretendía evitarse debido al peligro que conllevaría un resto de sal de plata si se empleasen estos compuestos *in vivo*

Para la síntesis de estas estructuras **31** con grupo G mercaptometilo, en vez de emplear como precursor un fragmento B derivado de cisteína, decidimos emplear el aminoácido cistina, de este modo se mantiene protegido el grupo mercaptano hasta una última etapa de desprotección.

Así que finalmente abordamos la síntesis de este tipo de estructuras protegiendo el tiol de la amina precursora (fragmento B) como un disulfuro simétrico, del cual el tiol puede regenerarse por reducción, de manera que en el último paso de desprotección se obtienen 2 equivalentes del producto reducido por cada equivalente de producto de partida.

Para las seis cadenas laterales (a-f) adecuadamente protegidas se realizó la condensación con la diamina **75** (Figura 86), se desprotegeron los grupos protectores de las cadenas laterales, y se procedió en el último paso a la reducción del disulfuro.

Para la obtención de estructuras tipo **31** con G = SH, empleamos ditiotreitol (DTT) para la desprotección reductiva. La forma activa para el intercambio disulfuro es el anión tiolato del DTT, por lo que éstas reacciones van más rápidas a pH alto. El anión tiolato del DTT sufre intercambio disulfuro para liberar el tiol con pK_a más bajo, y en una segunda reacción el disulfuro mixto cicla rápidamente liberando el otro monotiol.

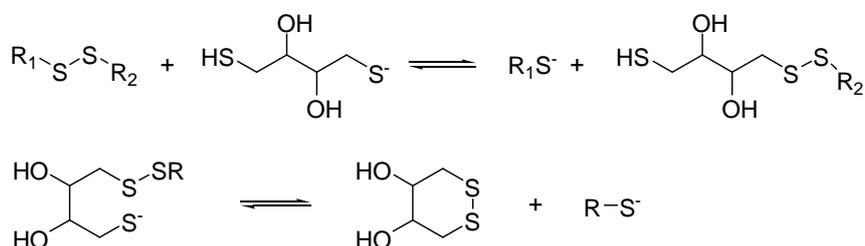


Figura 85. Mecanismo de reducción de disulfuros con DTT.

Esta desprotección se lleva a cabo empleando 2 equivalentes de TEA y 4 equivalentes de DTT en CH_2Cl_2 , en condiciones de atmósfera inerte.¹³⁷

Hay que señalar que algunos de los tioles obtenidos son muy inestables después de elaborar la reacción, puesto que se oxidan al disulfuro con mucha facilidad, por ello hay que tener la precaución de protegerlos de la oxidación del aire.

2.3.4.1. Síntesis de la amina 75

El producto **75** se obtuvo siguiendo el esquema sintético representado en la Figura 86.

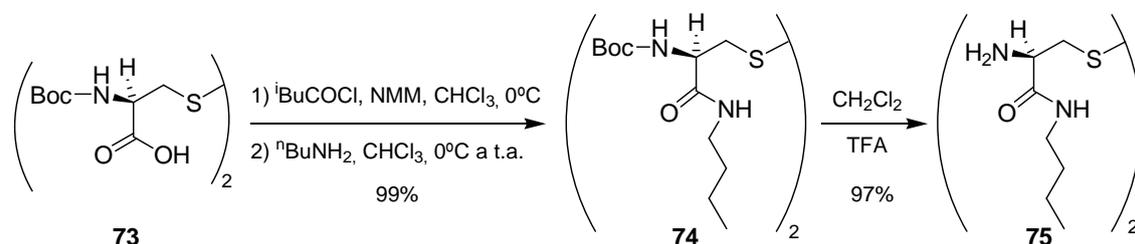


Figura 86. Esquema sintético para la obtención de la diamina **75**.

La condensación entre dos equivalentes de *n*-butilamina con uno de (*N*-Boc-Cys)₂ también se llevó a cabo mediante el método del anhídrido mixto, para obtener el producto **74** con rendimientos cuantitativos.

Los datos de RMN-¹H confirman la incorporación de dos residuos de butilamida en la estructura **74**. El EM(IE) muestra el ión molecular M⁺ a *m/z* 550.

La hidrólisis con TFA en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente proporcionó el producto **75** con rendimientos cuantitativos. Los datos de RMN muestran la desaparición de las señales correspondientes al Boc. El EM(IE) muestra el ión molecular M⁺ a *m/z* 350.

¹³⁷ D. Kadereit, H. Waldmann. *ChemBioChem*. **2000**, *1*, 200-203.

2.3.4.2. Síntesis de Z-77.

El compuesto **Z-77** se obtuvo siguiendo el esquema sintético mostrado en la Figura 87, que consiste en la condensación de la cadena lateral **Z-49** con la diamina **75**, para dar la diamida **Z-76**, que tras desprotección reductiva dio lugar al producto **Z-77**.

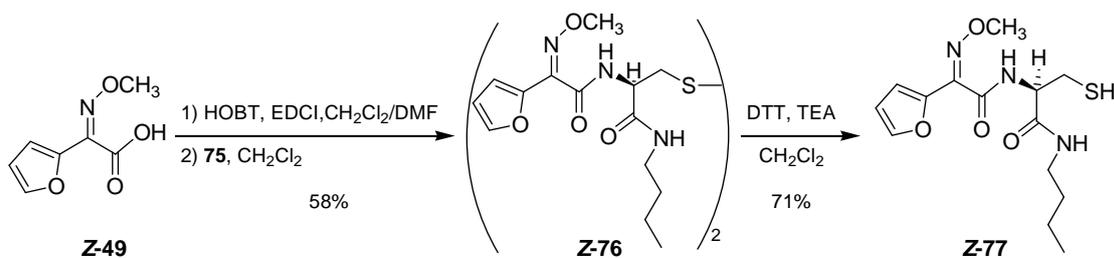


Figura 87. Esquema sintético de **Z-77**.

La condensación de dos equivalentes de **Z-49** con el dímero **75** empleando HOBT/EDCI, proporcionó el producto **Z-76** con un 58% de rendimiento.

Los datos espectroscópicos se corresponden con la estructura del dímero **Z-76**.

En los espectros de RMN-¹H, el δ del H-2 de la diamina **75** se desplaza a campo bajo en la diamida **Z-76**, de 3.7 ppm a 5.5 ppm. Los desplazamientos químicos que presentan los protones de la cadena lateral se corresponden con el isómero de configuración *Z* en torno al doble enlace C-N. En el espectro de RMN-¹³C aparecen 14 señales que pertenecen a los carbonos de la estructura de **Z-76**. El EM presenta el ión molecular M⁺ a m/z 652.

Cuando se intentó reducir el producto **Z-76** con DTT, empleando una proporción de dímero/DTT (1:1) o (1:2), en condiciones de atmósfera inerte en CH₂Cl₂ o en CH₂Cl₂/MeOH, la reacción no tenía lugar. Finalmente subiendo el pH de la reacción se obtuvo el monómero **Z-77**, mediante la reacción del dímero **Z-76** con DTT/TEA en CH₂Cl₂,¹³⁷ con la precaución de emplear condiciones de atmósfera inerte y degasificar el disolvente antes de llevar a cabo la reacción. Esta reacción tiene lugar en menos de una hora. El espectro de RMN-¹H del crudo de la reacción elaborada mostró que había mezcla de isómeros *E/Z* en torno al enlace C=N. Tras la purificación por cromatografía y recristalización de benceno, el producto **Z-77** se obtuvo puro con un 71% de rendimiento.

En el espectro de RMN-¹H del monómero **Z-77** (Figura 88) se observan diferencias con respecto al dímero **Z-76**. El H-2 en **Z-77** se desplaza a campo alto 0.6 ppm. Los H-3 diastereotópicos resuenan a δ más separados y se acoplan entre sí, con el H-2 y con el SH. El dd ($J = 7.3$ Hz, $J = 10.7$ Hz) a 1.6 ppm, correspondiente al protón del SH, confirma la reducción del compuesto. Por otro lado, el δ del protón del anillo H-3' corresponde con el isómero de configuración Z.

El espectro de RMN-¹³C se corresponde con la estructura del producto. El EM muestra el ión molecular M⁺ a m/z 327.

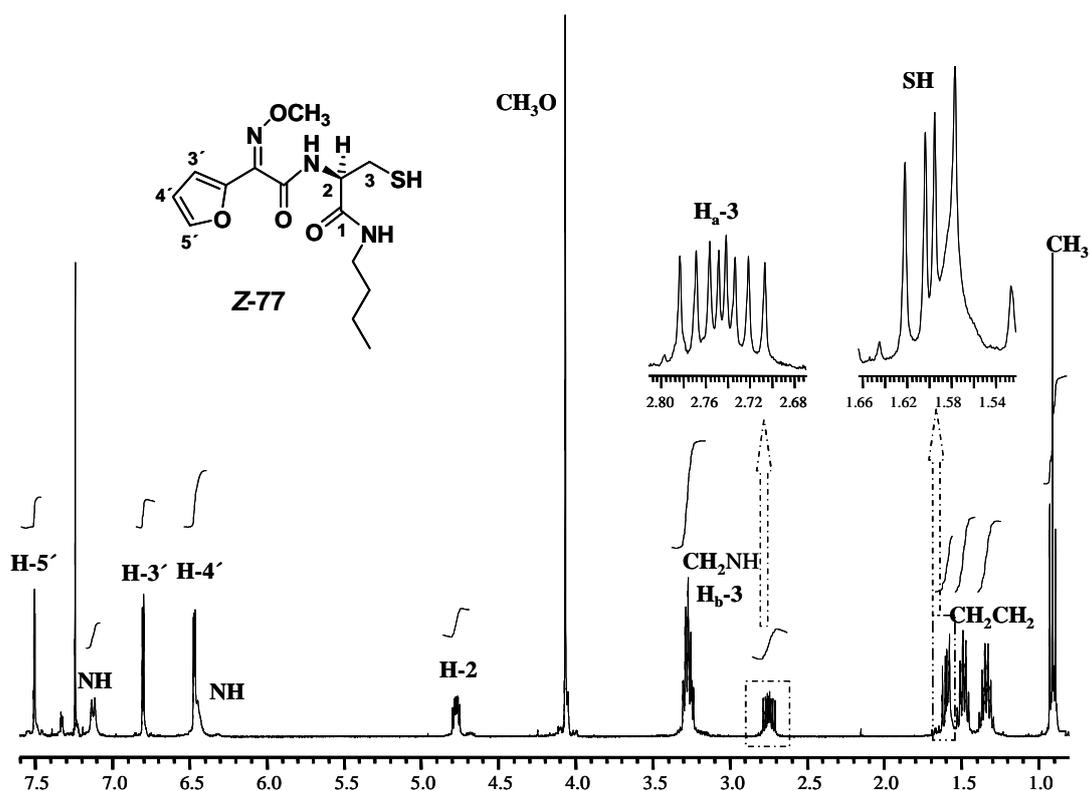


Figura 88. Ampliación del espectro de RMN-¹H de **Z-77**.

2.3.4.3. Síntesis de 79.

La síntesis del compuesto **79** se llevó a cabo siguiendo la ruta sintética mostrada en la Figura 89.

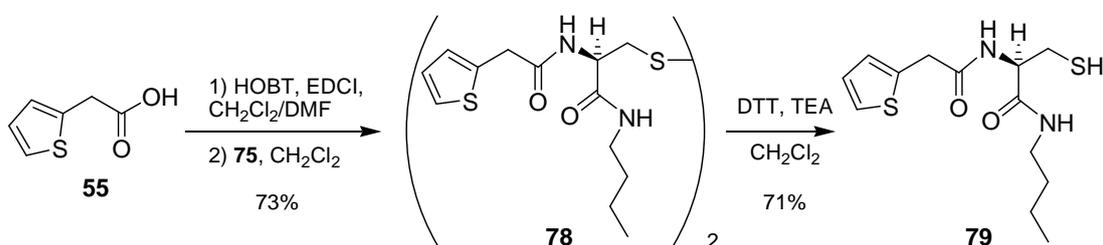


Figura 89. Esquema sintético para la obtención de **79**.

La reacción de condensación en la que intervienen dos equivalentes del ácido **55** con uno de la diamina **75** para dar lugar al dímero **78**, se realizó mediante otros métodos (Tabla 9), siendo el que emplea HOBT/EDCI el que dió mejores resultados.

Método de activación del ácido	Problema
HOBT / DCC ^t BuOCOCI	Difícil eliminación de la dicitohexilurea Queda mucho anhídrido mixto sin reaccionar

Tabla 9. Reacciones para la obtención de **78**.

El espectro de RMN-¹H de **78** muestra las señales correspondientes a la cadena lateral y, las correspondientes al fragmento que provienen de la amina. Los H-3 diastereotópicos aparecen a 2.82 y 2.91 ppm, acoplados entre sí y con el H-2.

En el espectro de RMN-¹³C aparecen 7 señales alifáticas comprendidas entre 13 y 54 ppm, 4 aromáticas entre 125 y 136 ppm y, otras 2 a 169 y 170 ppm correspondientes a los carbonos carbonílicos de amidas, que confirman la estructura del compuesto **78**.

El EM presenta el ión molecular M⁺ a m/z 598.

La obtención del monómero **79** se obtuvo mediante la reducción del dímero **78** con DTT/TEA en CH₂Cl₂. La reacción también tiene lugar rápidamente y tras purificación, el producto **79** se obtiene con un 75% de rendimiento.

El espectro de RMN-¹H de **79** muestra un dd a 1.54 ppm, que corresponde al protón del tiol, lo que confirma que la reducción ha tenido lugar.

El espectro de RMN-¹³C de **79** es muy similar al del dímero **78**, excepto por el desplazamiento a campo alto que sufre el C-3 en la especie reducida (de 47 a 26 ppm). El EM muestra el ión molecular del monómero a m/z 300.

2.3.4.4. Síntesis de **72**.

El producto **72** se obtuvo por condensación de la cadena lateral protegida con **33** con la diamina **75**, posterior desprotección de la cadena lateral y desprotección reductiva del enlace disulfuro. El esquema sintético se muestra en la Figura 90.

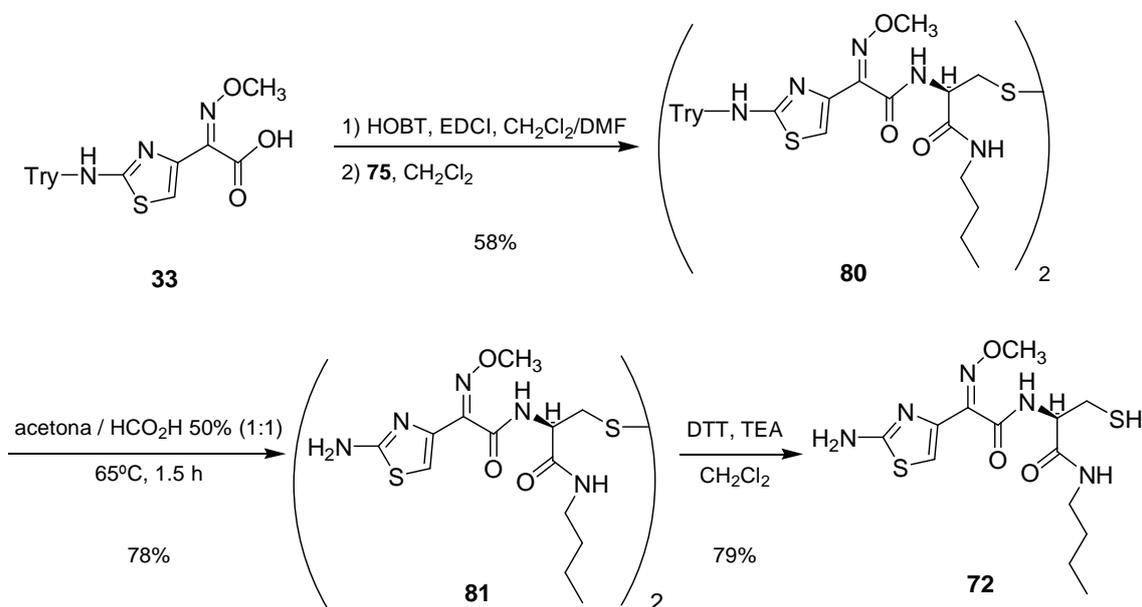


Figura 90. Esquema sintético de **72**.

La reacción de condensación entre el ácido protegido **33** con la diamina **75** se realizó empleando HOBT/EDCI para la activación del ácido, obteniendo el producto de acoplamiento con un 58%.

Los datos de RMN-¹H se corresponden con la estructura del producto.

El espectro de RMN-¹³C muestra 8 señales entre 13 y 72 ppm correspondientes a los carbonos alifáticos de la molécula **80**, 7 entre 113 y 149 ppm, correspondientes a los carbonos aromáticos, una a 162 ppm, perteneciente al carbono de la metoxiimina, y dos a 168 ppm, que confirman la presencia de los dos carbonilos en la molécula.

Se procedió a realizar la hidrólisis de **80** como en los casos anteriores, empleando ácido fórmico acuoso al 50% calentando a 60°C, pero no dio buenos resultados porque necesitaba más tiempo de reacción y se producían isomerizaciones. El empleo de acetona en proporción (1:1) con ácido fórmico acuoso al 50% ayudó a disolver mejor el producto y, de este modo, la desprotección se consiguió satisfactoriamente en 30 minutos sin isomerizaciones.

El EM muestra el ión molecular M^+ a m/z 716. En el espectro de RMN- 1H desaparecen las señales pertenecientes al grupo tritilo y se observan todas las señales correspondientes a la estructura **81**. El espectro de RMN- ^{13}C muestra las señales pertenecientes a 7 C alifáticos, 3 C aromáticos, 1 C de imino y 2 C carbonílicos, que corresponden con **81**.

La obtención del monómero **72** a partir del dímero **81** se llevó a cabo mediante la ruptura reductiva del enlace disulfuro con DTT y TEA en CH_2Cl_2 , con un rendimiento del 79%.

El EM muestra el ión molecular M^+ a 359, y el pico base a m/z 328 (M^+-31) correspondiente a la pérdida de un radical metoxilo.

Los datos de RMN- 1H se corresponden con los del monómero **72**. Los datos de RMN- ^{13}C son muy similares al del dímero del que procede, siendo el C-2 el que únicamente se afecta más, desplazándose a campo bajo, de 41 a 25 ppm.

2.3.4.5. Síntesis de 84.

La obtención del producto **84** se llevó a cabo mediante la condensación de la cadena lateral protegida **35** con la diamina **75**, posterior desprotección de la amina y ruptura reductiva (Figura 91).

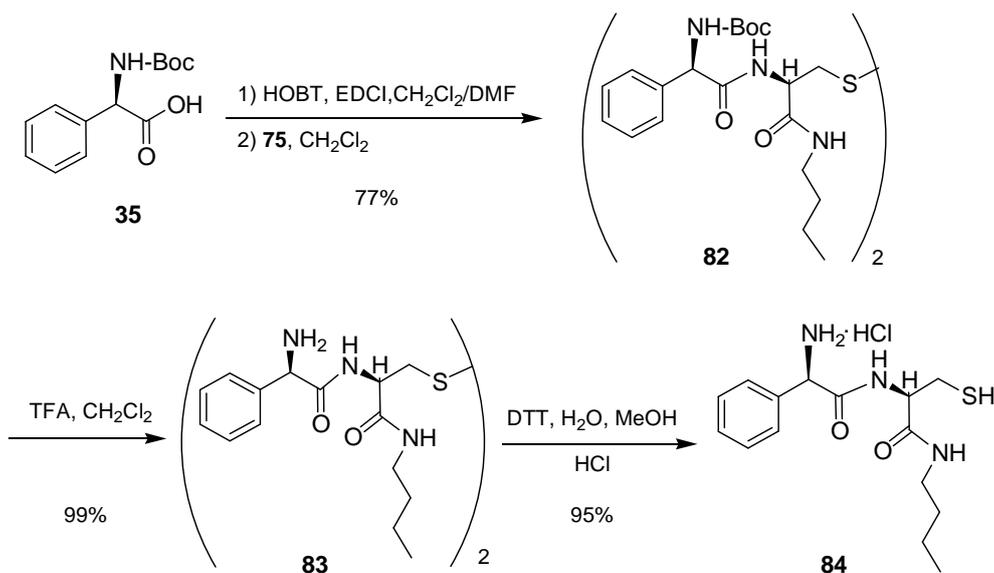


Figura 91. Esquema sintético de **84**.

La obtención del dímero **82** por condensación de **35** con **75** empleando HOBT/EDCI se consiguió con un 77% de rendimiento.

Los datos de RMN-¹H muestran las señales correspondientes a la estructura del producto **82**. El espectro de RMN-¹³C muestra las señales correspondientes a 9 C alifáticos, 4 C aromáticos y 3 C carbonílicos que presenta la molécula. El EM muestra el ión molecular M⁺ a m/z 816.

El tratamiento de **82** con HCl 3M en AcOEt no desprotegió el grupo amino, como se ha descrito en casos anteriores. El grupo Boc se eliminó cuando se hizo reaccionar **82** con TFA en CH₂Cl₂.

Los datos de RMN-¹H confirman la estructura del producto desprotegido. Desaparece el singlete a 1.4 ppm que integra por 9 H en el espectro de RMN-¹H, y las señales a 28, 80 y 169 ppm en el espectro de RMN-¹³C, todas correspondientes al grupo Boc.

En un principio se hizo reaccionar el dímero **83** con DTT y TEA en MeOH, como se ha descrito en los casos anteriores. Aunque de esta manera se obtenía el producto de reacción (**84**), en las etapas de elaboración y sobre todo en la de purificación por cromatografía nos encontramos con que el producto se oxidaba de nuevo al dímero (**83**), mucho más fácilmente que en los casos anteriores. Y la poca cantidad de producto

reducido que se recuperaba, era un aceite, que aunque se conservara en atmósfera inerte, se oxidaba muy fácilmente al dímero. Por ello se intentó realizar la reacción de manera que en la etapa de purificación se evite el proceso cromatográfico, para que el producto no se oxide durante su purificación. También se planteó recuperar el producto en forma de hidrocloreto, puesto que si la sal es un sólido, su manipulación resulta más fácil y podría evitarse su oxidación.

Aprovechando el hecho de que la cadena lateral posee un grupo amino, y éste podría aportar el pH necesario para la activación del DTT, la reacción se llevó a cabo sin el uso de TEA, empleando mezcla de H₂O y MeOH desgasificados, en proporción 1:1, como disolvente. Cuando todo el producto de partida se ha consumido en la reacción, el crudo se elabora y puede obtenerse el hidrocloreto del producto **84** puro como un sólido blanco, sin necesidad de procedimientos cromatográficos.

Los datos de RMN se corresponden con la estructura del producto. Los espectros de RMN-¹H del dímero y del monómero son muy similares, los desplazamientos químicos que más varían se comparan en la Tabla 10.

posición	83	84
H_a-3	2.60 (dd, 1H, $J = 9.4$ Hz, $J_{ab} = 14.2$ Hz)	2.72 (dd, 1H, $J = 7.8$ Hz, $J_{ab} = 14.2$ Hz)
H_b-3	2.89 (dd, 1H, $J = 4.7$ Hz, $J_{ab} = 14.2$ Hz)	2.80 (dd, 1H, $J = 5.1$ Hz, $J_{ab} = 14.2$ Hz)
H-2	4.52 (dd, 1H, $J = 4.7$ Hz, $J = 9.4$ Hz)	4.44 (dd, 1H, $J = 5.1$ Hz, $J = 7.8$ Hz)

Tabla 10. Comparación de algunos datos de espectros de RMN-¹H registrados en D₂O de los productos **83** y **84**.

2.3.4.6. Síntesis de **87**

La estructura **87** se obtuvo de la misma manera: condensación del ácido **37** con la diamina **75**, desprotección del grupo amino y desprotección reductiva, como se esquematiza en la Figura 92.

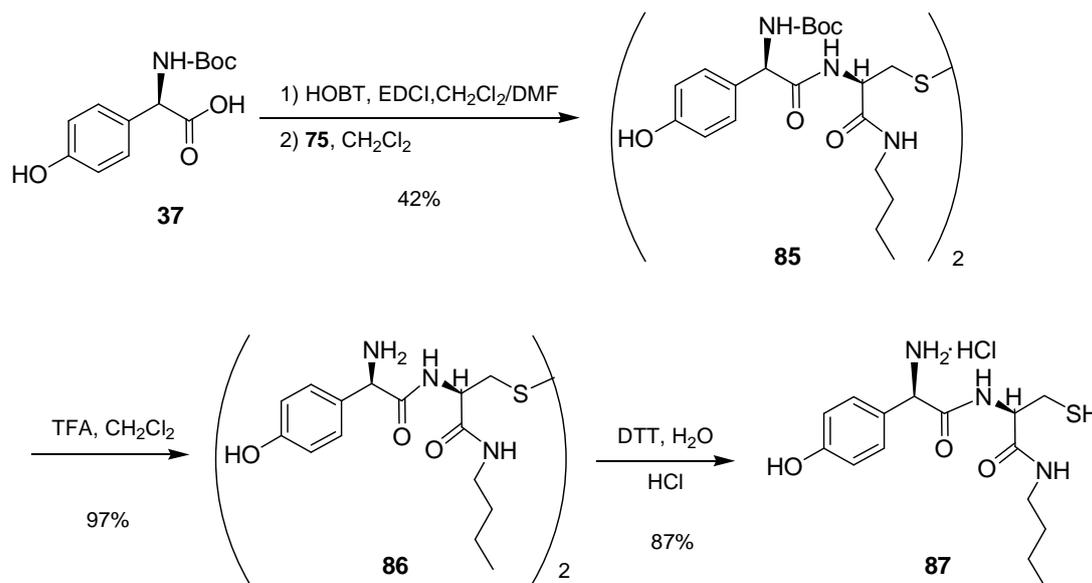


Figura 92. Esquema sintético de **87**.

El acoplamiento de 2 equivalentes de ácido **37** con uno de diamina **75** empleando EDCI/HOBT, dio el compuesto **85** con un 42% de rendimiento.

Los datos de RMN-¹H se corresponden con la estructura del producto. El espectro de RMN-¹³C presenta 16 señales correspondientes a cada uno de los carbonos de la molécula.

La hidrólisis del carbamato para la desprotección de las aminas de **85** se llevó a cabo mediante tratamiento con TFA en CH₂Cl₂.

El espectro de RMN-¹H en D₂O se corresponde con la estructura del dímero desprotegido **86** (Figura 93). En el espectro de RMN-¹³C desaparecen 3 señales con respecto al producto del que procede (**85**), pertenecientes al grupo Boc que se ha eliminado.

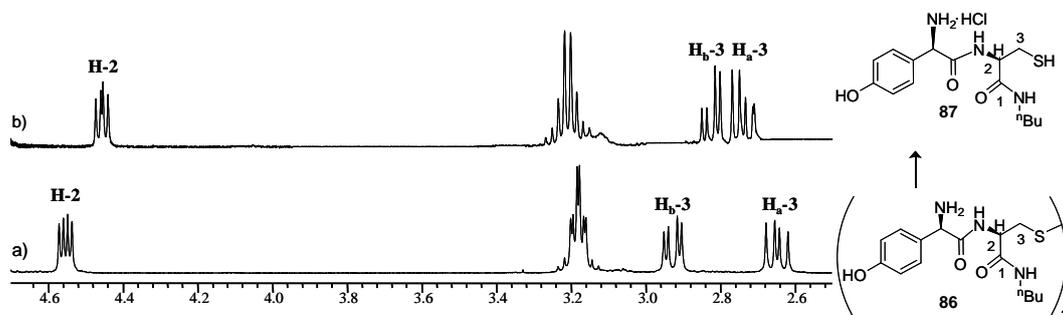


Figura 93. Ampliación de los espectros de RMN-¹H (D₂O, 400 MHz) de los productos **86** y **87**.

La reducción del enlace disulfuro para obtener el producto **87** consistió en emplear como disolvente agua desgasificada, y llevar a cabo la reacción en atmósfera de argón, añadiendo los equivalentes de DTT, pero sin utilizar la TEA, puesto que la molécula **84** ya posee un grupo amino en su estructura y puede servir como base para que el DTT actúe como reductor. De este modo nos evitamos las complicaciones de eliminar la TEA para purificar el producto, y éste se obtiene con un 87% de rendimiento.

Los datos de RMN-¹H se corresponden con la estructura de **87** (ampliación en Figura 93). De igual manera, los espectros de RMN-¹³C confirman la estructura del monómero **87**. El EM muestra el ión molecular de la molécula neutra (de la base libre) a *m/z* 325 y el catión amonio de la molécula a *m/z* 326.

2.3.4.7. Síntesis de **89**.

La condensación de 2 moléculas del ácido mandélico (**63**) con la diamina **75**, dio el dímero **88**, que por ruptura del enlace disulfuro rindió el monómero **89**, tal como se representa en la Figura 94.

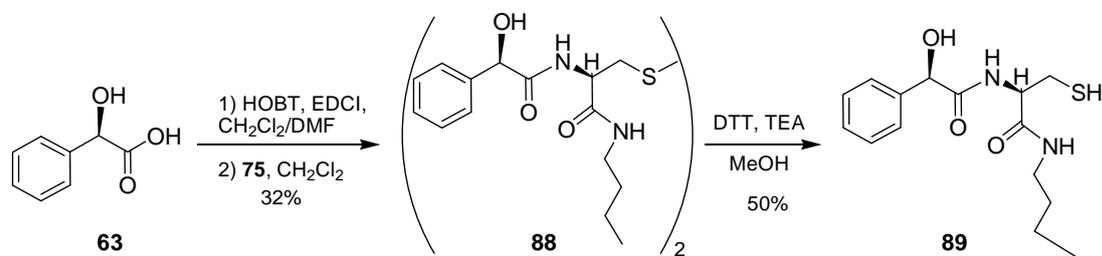


Figura 94. Esquema sintético de **89**.

La obtención de **88** se obtuvo mediante activación del ácido **63** con HOBT/EDCI, y condensación con la diamina **75**.

Los datos de RMN-¹H se corresponden con la estructura del dímero **88**. Los espectros de RMN-¹³C muestran 7 señales correspondientes a C alifáticos, 4 pertenecientes a C aromáticos y, 2 correspondientes a los C carbonílicos. El EM muestra el ión molecular M⁺ a *m/z* 618.

La ruptura del enlace disulfuro de **88** con DTT/TEA empleando como disolvente metanol desgasificado para dar el monómero **89**, tuvo lugar en menos de una hora.

El espectro de RMN-¹H se corresponde con la estructura del producto. Presenta un dd a 1.5 ppm, perteneciente al tiol del monómero, lo que confirma la reducción. El espectro de RMN-¹³C muestra 13 señales que corresponden con la molécula **89**. El EM muestra el ión molecular M⁺ a *m/z* 310.

2.3.4.8. Estudios inmunológicos: Influencia del grupo G.

Al igual que para las otras estructuras **31**, se realizó el estudio del reconocimiento para estas moléculas con grupo G mercaptometilo.

En la figura 3 se muestran los resultados de inhibición de RAST obtenidos para 5 sueros específicos a cefuroxima, comparando el reconocimiento de estructuras tipo **31** con la misma cadena lateral R¹ y distintos grupos funcionales en C-3. Aunque los resultados son distintos para cada suero, los datos si coinciden en que la inhibición con **Z-53** sigue la misma tendencia que con **Z-38**. Además los sueros con mayor nivel de RAST directo (4 y 5) presentan una mayor inhibición con **Z-53** que con **Z-38**. Otra tendencia que puede observarse en la Figura 95 es que el compuesto **Z-77**, el que presenta G mercaptometilo, no provoca inhibición de RAST.

Otra comparación de los resultados de inhibición del RAST con estructuras tipo **31**, realizada con sueros específicos a cefaclor, se muestra en la Figura 96. En este caso, la tendencia de las IgE a reconocer los 3 compuestos (**41**, **60** y **84**) es similar.

Con respecto a los resultados de inhibición obtenidos con estructuras tipo **31** con grupo G = CH₂SH en otros sueros, aparte de los aquí representados, hay que señalar que las inhibiciones que se obtienen no son específicas, obteniéndose en la mayoría de los casos porcentajes de inhibición del RAST por debajo de 25. Incluso a veces se han obtenido mayores valores de RAST cuando se emplean estos “inhibidores”, que cuando se realiza el RAST directo. Lo que no los capacita como estructuras adecuadas para estos estudios de inhibición.

Después de estos resultados nos planteamos la síntesis de estructuras tipo **31** con mayor grado de oxidación en el C-3.

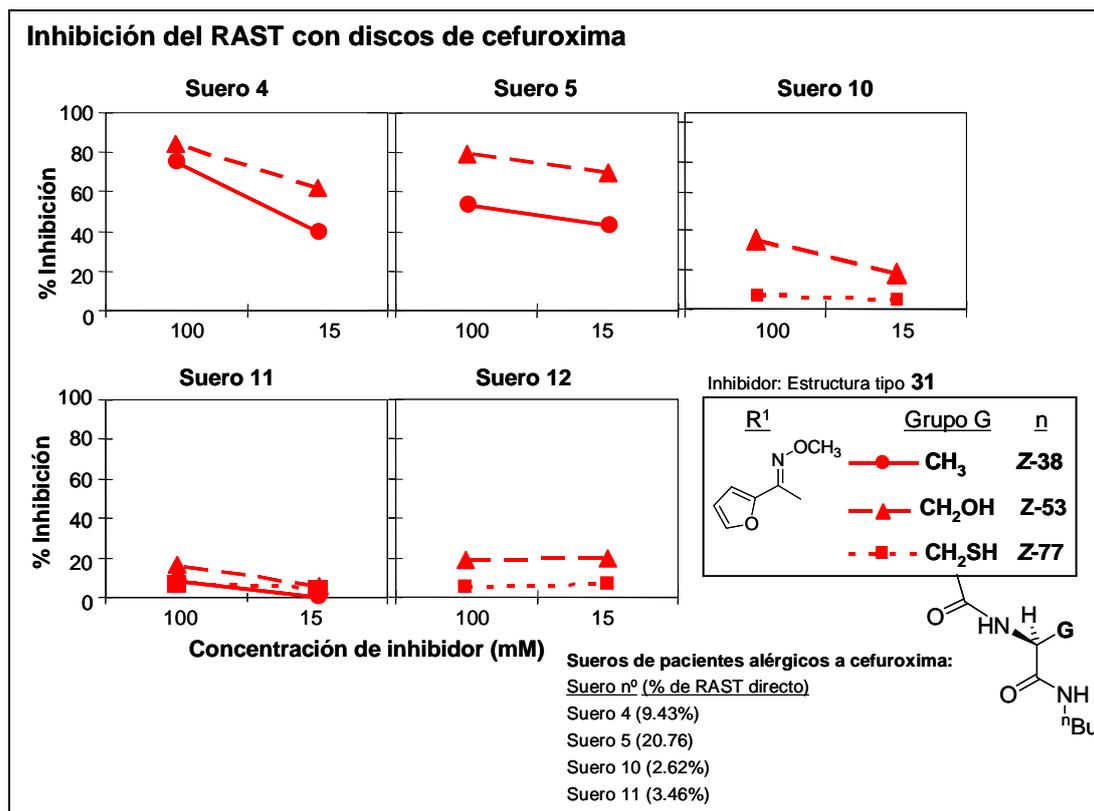


Figura 95. Estudios de inhibición de RAST, para 5 sueros específicos a cefuroxima, con estructuras tipo 31 con la misma cadena lateral, variando el grupo funcional en G.

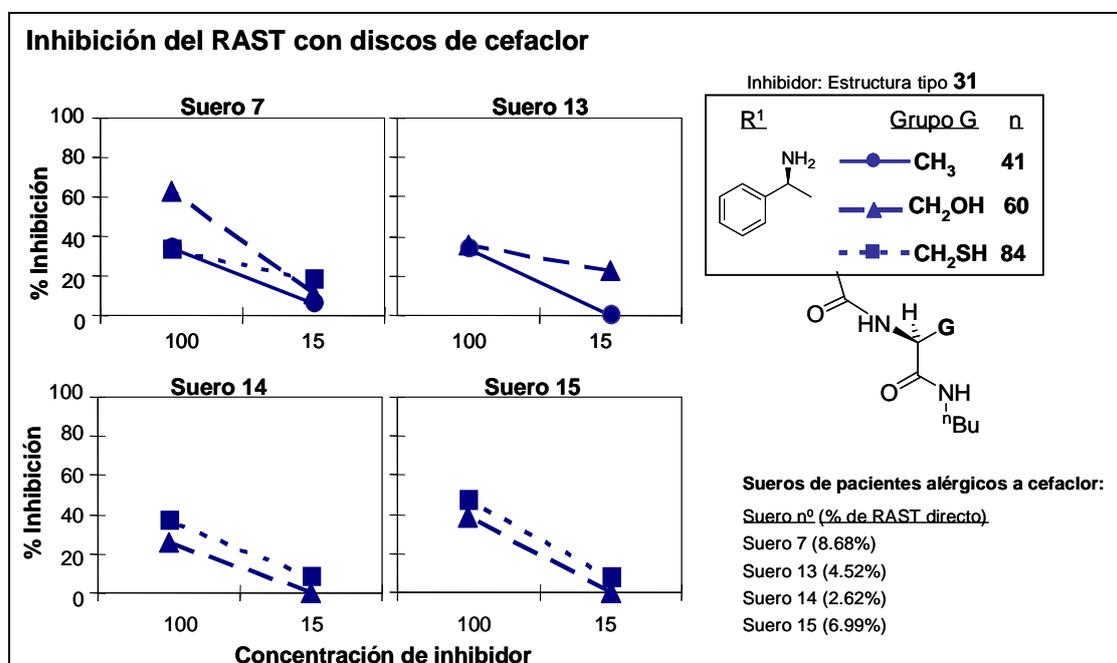


Figura 96. Estudios de inhibición de RAST, para 4 sueros específicos a cefaclor, con estructuras tipo 31 con la misma cadena lateral, variando el grupo funcional en G.

2.3.5. Síntesis de estructuras tipo **31** con $G = CHO$

2.3.5.1. Síntesis de la amina **93**.

Para la obtención del compuesto **31** con $G = CHO$, proponemos su síntesis a partir de la amina precursora **93**. De este modo el fragmento B (**93**) proporciona en G un grupo carbonilo que se encontraría adecuadamente protegido durante la etapa de condensación.

Con respecto a la estereoquímica, en un principio cabría proponer la síntesis de la amina precursora con la estereoquímica que muestra la estructura tipo **31**, la que resultaría si se conservara la estereoquímica de las moléculas de antibióticos después de la aminólisis. Sin embargo, teniendo en cuenta la estructura de la molécula, nos planteamos sintetizar el racémico de la amina precursora (Figura 97) cuando $G = CHO$, debido a que el carbono quiral de la molécula se encuentra en α a dos grupos carbonilos y, por tanto, el protón unido a este carbono, tendría la suficiente acidez como para que la molécula racemice y pierda su actividad óptica a pH fisiológico.

Además, las condiciones necesarias para la desprotección de un carbonilo en la etapa final de la síntesis de la estructura **31** con $G = CHO$, también podrían provocar la racemización del producto **31**, bien sea por formación del enol en medio ácido o bien por formación del enolato en medio básico.

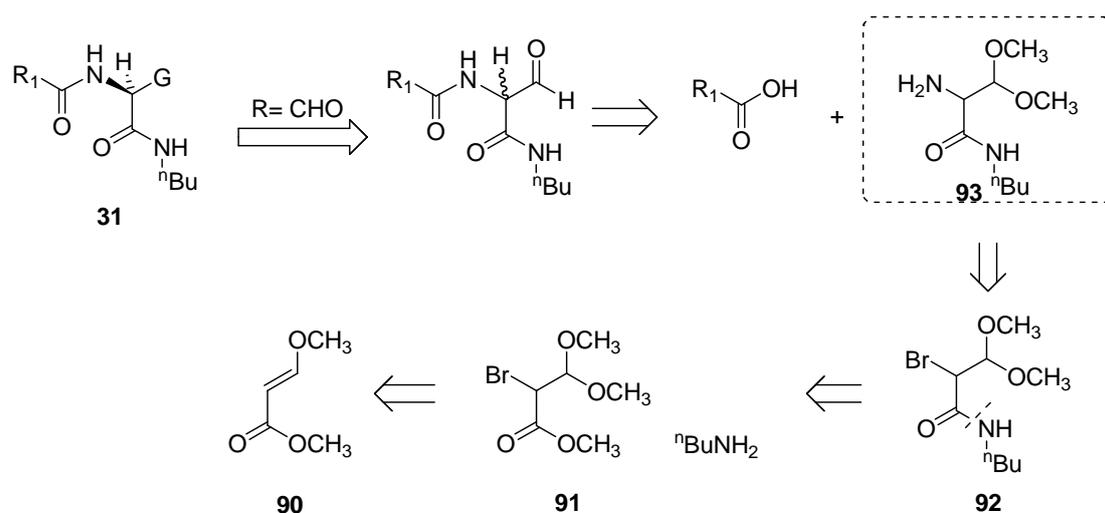


Figura 97. Estructura de **31** cuando $G = CHO$ y su análisis retrosintético.

Se propone como grupo protector y precursor del grupo aldehído un dimetilacetal, por lo que nos planteamos un esquema retrosintético del compuesto **93** (Figura 97), el cual pueda derivar mediante interconversión de grupos funcionales de una molécula que posea un buen grupo saliente en la posición a introducir el grupo amino, como el compuesto **92**. La desconexión del enlace C-N amídico de dicho compuesto implicaría dos sintones que corresponden a *n*-butilamina y a un derivado de ácido carboxílico como puede ser el éster **91**, el cual, a su vez, puede proceder del metoximetacrilato **90**.

De este modo, se deduce el esquema sintético mostrado en la Figura 98 para obtener la amina precursora **93**, en el que el metoxiacrilato **90** se convierte en el bromoacetal **91** por reacción de bromo-eterificación. La formación de un enlace amídico entre *n*-butilamina y **91** proporciona el compuesto **92**, el cual mediante el desplazamiento del bromo con bencilamina aporta la amina protegida **94**, que en una última etapa de hidrogenolisis genera la amina precursora **93**.

Esta síntesis tiene como ventaja la utilización de productos asequibles, como son el *trans*-metoximetacrilato de metilo, *n*-butilamina, bencilamina y NBS. Además productos similares a **93** se han preparado como precursores para la síntesis de *ifetroban*¹³⁸ empleando rutas sintéticas análogas.

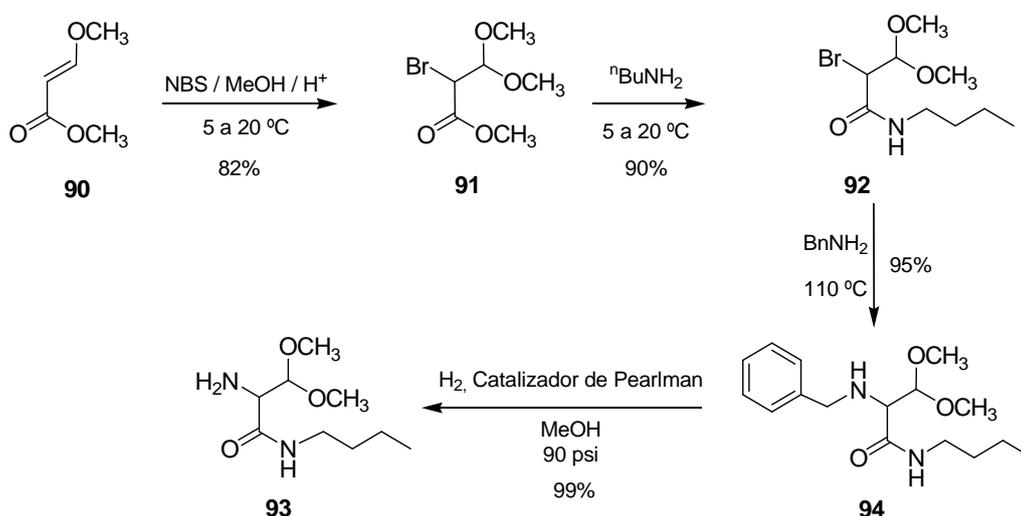


Figura 98. Síntesis de **93**.

¹³⁸ S. Swaminathan, A. K. Singh, W-S Li, J. J. Venit, K. J. Natalie, J. H. Simpson, R. E. Weaver, L. J. Silverberg. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4769-4772.

La NBS proporciona un tipo de bromo eficaz tanto para reacciones de sustitución radicalaria como de adición electrofílica. La bromo-eterificación de alquenos se puede llevar a cabo usando NBS en el alcohol deseado como disolvente con catálisis ácida.

Así, se hizo reaccionar el alqueno del *trans*-metoxiacrilato de metilo con NBS bajo catálisis ácida en metanol para obtener un producto correspondiente al α -bromo dimetil acetal **91**.¹³⁸

En el espectro de RMN-¹H se aprecia la incorporación del grupo acetal por la aparición de un singlete a 3.4 ppm, que integra por 6 H, correspondiente a los dos metoxilos del mismo. Además, la presencia de 2 dobletes a 4.2 ppm y 4.7 ppm, correspondientes a los 2 protones de los metinos acoplados ($J = 8.1$ Hz) presentes en la molécula, confirman la formación del compuesto **91**. Igualmente, se aprecia la formación del acetal en el espectro de RMN-¹³C con la aparición de una señal a 103 ppm. El EM(IE) muestra el ión molecular M^+ a m/z 225 y el $(M^+ + 2)$ a 227.

Está descrito que la reacción de **91** con una amina primaria alquílica proporciona la amida, mientras que la reacción con amoníaco conduce a la indeseada amino-amida,¹³⁸ es decir reacciona con las dos posiciones electrofílicas de la molécula **91**.

Cuando se hizo reaccionar **91** con un exceso de *n*-butilamina a temperatura ambiente rindió selectivamente la bromo-amida **92**.

Los datos de RMN confirman la desaparición del metoxilo del éster y la aparición de butilamina. El EM indica la presencia de bromo en la molécula.

La incorporación del grupo amino en la posición que nos interesa se llevó a cabo mediante el desplazamiento nucleófilo del bromuro **92** con bencilamina a 110°C, lo que suministró la amina protegida **94**.

La presencia en el espectro de RMN-¹H de las señales a 3.7 ppm y 7.3 ppm correspondientes al grupo bencílico, confirman la reacción de desplazamiento nucleofílico. El espectro de RMN-¹³C muestra 5 nuevas señales que confirman la incorporación del resto bencílico en la molécula. El EM muestra el ión molecular M^+ a m/z a 294 y un fragmento principal a m/z 91 (65%), correspondiente al fragmento bencílico.

La hidrogenación catalítica empleando Pd/C del producto **94** en distintos disolventes y a distintos tiempos de reacción no dio lugar a la desbencilación. Sin embargo, empleando el catalizador de Pearlman¹³⁹ a temperatura ambiente a una presión de H₂ de 90 psi durante dos días de reacción, se logró la desprotección del grupo amino del compuesto **94** para obtener **93**. Los espectros de RMN confirmaban la desprotección de la amina con la ausencia de las señales correspondientes al resto bencílico. El EM(IE) muestra el ión molecular M⁺ a m/z 294.

Para llevar a cabo la síntesis de estructuras tipo **31** primero se realizó la condensación de la amina precursora **93** con las distintas cadenas laterales, después se procedió a la desprotección, si la necesitan, de los grupos funcionales de las cadenas laterales y, el último paso consistía en la desprotección del dimetilacetal para obtener el aldehído, reacción cuyo resultado no fue el esperado. Por ello, por ahora se describe la síntesis hasta la obtención del producto protegido en el grupo G como dimetilacetal.

2.3.5.2. Síntesis de Z-95.

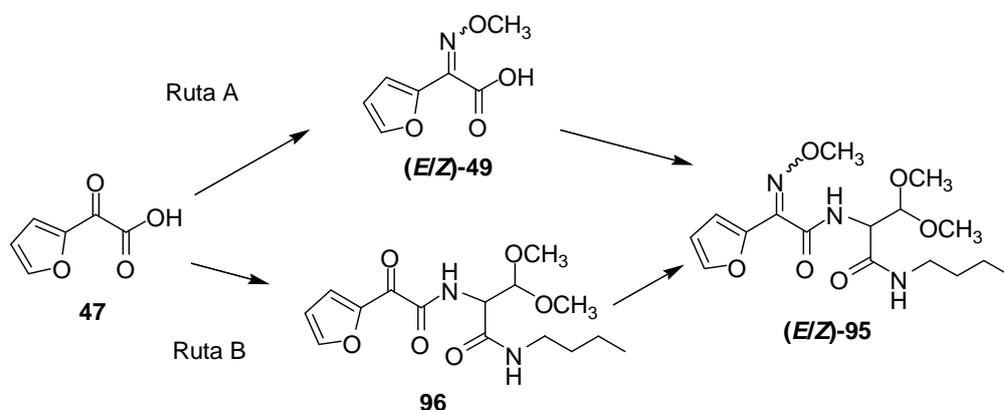


Figura 99. Rutas sintéticas planteadas para la obtención de Z-95.

La síntesis del producto Z-95 se planteó siguiendo las dos rutas sintéticas representadas en la Figura 99. La ruta B resultó ser inadecuada debido a que en la primera etapa sintética, para la formación del compuesto **96**, se obtenían rendimientos escasos. Por esta razón, se abandonó esta vía. Sin embargo, la estructura derivada del ácido **47**, la

¹³⁹ W. M. Pearlman. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 17, 1663-1964.

molécula **49**, resultó ser más reactiva frente a la amina **93**, y de este modo, atendiendo a la ruta sintética A se consiguieron muy buenos resultados. Otra posibilidad, que no se ha probado y mejoraría el rendimiento, sería la síntesis por reacción de acoplamiento del isómero con la configuración adecuada (**Z-49**) con la amina **93**.

2.3.5.2.1. Síntesis de **Z-95**. Ruta A.

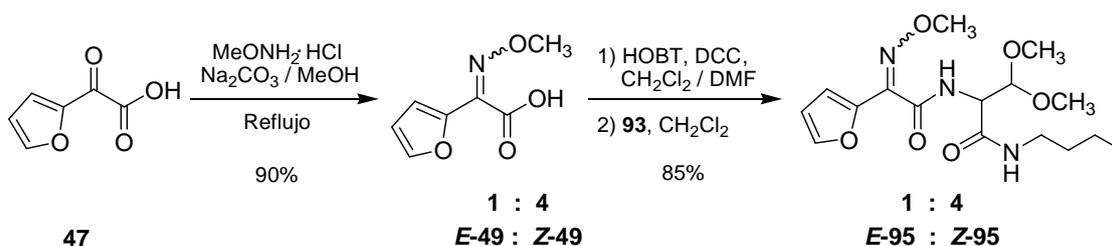


Figura 100. Síntesis de (*E/Z*)-**95**. Ruta A.

En esta ruta (Figura 100) primero se funcionalizó adecuadamente la cadena lateral por formación del metoxiimino, y se empleó la mezcla de isómeros (*E/Z*)-**49** en la proporción en la que se obtienen en esta reacción para la siguiente etapa de condensación.

La condensación se realizó empleando la mezcla de (*E/Z*)-**49**, HOBT, DCC y la amina libre **93**. Se obtuvo la amida **95** con un 85% de rendimiento, conservando la misma proporción de configuración *E/Z* del producto de partida **49**. El isómero de configuración *Z* puede obtenerse puro tras varias cromatografías en columna, con un 62% de rendimiento con respecto al global de reacción. El de configuración *E* se obtiene siempre impurificado por el *Z*, con un 18% de rendimiento.

En el espectro RMN-¹H se observan las señales correspondientes a la estructura del compuesto. Se asignan las señales que corresponden al isómero **Z-95** fundamentándonos en que en éste el singlete del metoxiimino sale más apantallado que en el *E* y, el H-3 del furilo también sale a campo más alto que el H-3 correspondiente del isómero *E*.

El espectro de RMN-¹³C del producto **Z-95** muestra dos señales a campo bajo, 161 ppm y 167 ppm, indicativas de grupos amidas, lo confirma la formación del nuevo enlace amida.

En el cromatograma de mezcla (*E/Z*)-**95** pueden observarse dos picos, correspondientes a cada uno de los isómeros, presentando ambos compuestos el mismo EM. En él prácticamente sólo puede verse el pico base a m/z 75, correspondiente al resto acetálico, aunque también puede verse con una abundancia menor al 1% el ión molecular M^+ con m/z 355.

2.3.5.2.2. Síntesis de *Z*-**95**. Ruta B.

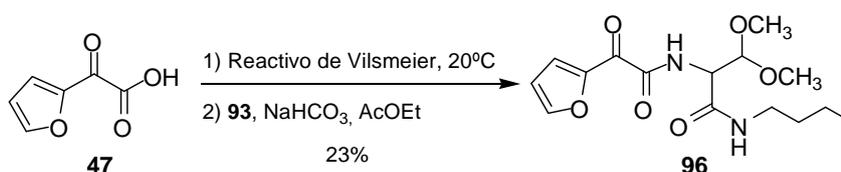


Figura 101. Primera etapa de la ruta sintética B de *Z*-**78**: Síntesis de **96**.

La condensación del ácido **47** con la amina **93** se realizó mediante varios métodos, no consiguiendo con ninguno de ellos rendimientos cuantitativos. La activación del ácido se realizó empleando distintos reactivos y los rendimientos más significativos tras el acoplamiento con la amina **93**, se resumen en la Tabla 11.

Método de activación del ácido	Rendimiento
HOBT / DCC	9%
Cl ₂ SO	12%
Reactivo de Vilsmeier	23%

Tabla 11. Procedimiento para la obtención de la amida **96**.

La activación del ácido más efectiva resultó empleando el reactivo de Vilsmeier.

Los datos de RMN confirmaron la estructura de la molécula. En el espectro de RMN-¹³C, las 4 señales que aparecen entre 13 y 35 ppm corresponden al resto butilo; otras 3 comprendidas entre 55 y 57 ppm, pertenecen a los dos metilos acetálicos y al carbono en α al acetal; a 104 ppm se observa una señal que corresponde al carbono acetálico; las señales comprendidas entre 113 y 145.5 ppm pertenecen al heterociclo aromático; y las 3 restantes que salen a campo más bajo, corresponden a los 3C carbonílicos presentes en la molécula. El EM muestra el ión molecular M^+ a m/z 326.

2.3.5.3. Síntesis de 97.

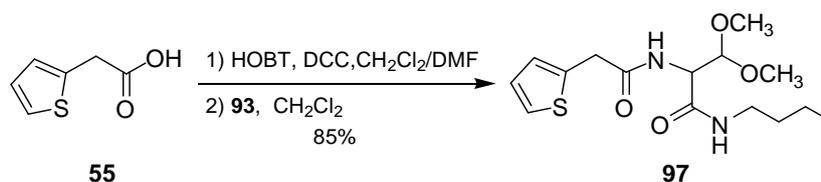


Figura 102. Síntesis de 97.

La reacción de acoplamiento entre el ácido **55** y la amina **93**, representada en la Figura 102, da la amida **97**.

El EM muestra el ión molecular M⁺ a m/z 328, y el pico base a m/z 75, correspondiente al fragmento acetálico.

El espectro de RMN-¹H muestra la incorporación del resto acilo de **55** y de la amina **93** a la estructura **97**. El espectro de RMN-¹³C se corresponde con la estructura de la molécula. La presencia de 2 señales a campo bajo, indican la presencia de 2 carbonilos y, confirman por tanto la formación del enlace amida.

2.3.5.4. Síntesis de 99.

La síntesis del compuesto **99** se llevó a cabo mediante el esquema mostrado en la Figura 103.

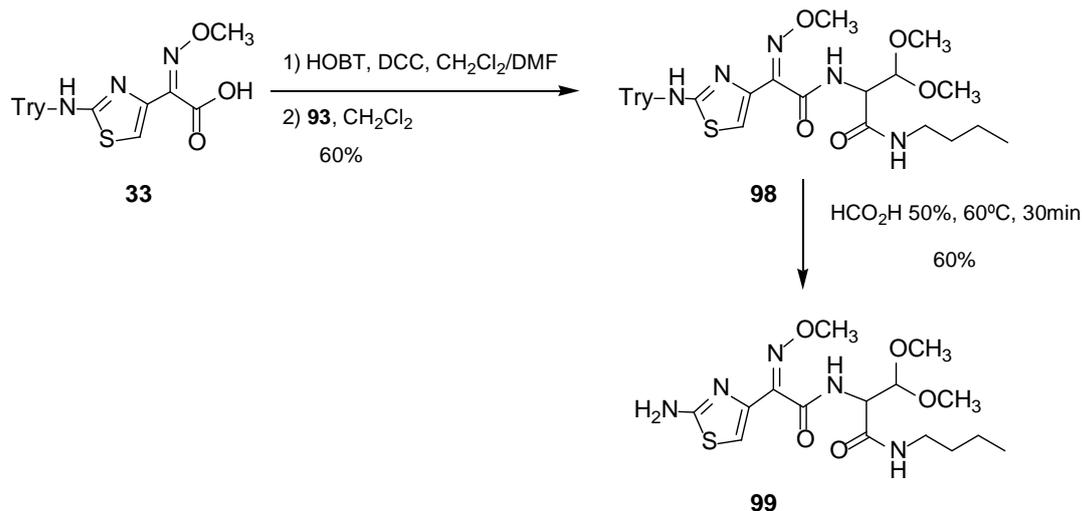


Figura 103. Síntesis de 99.

La amida **98** se sintetizó mediante la activación del ácido **33** con HOBT/DCC, y posterior acoplamiento con la amina **93**.

Los datos espectroscópicos confirman la estructura del producto. El espectro de RMN-¹³C presenta 10 C alifáticos, 7 C aromáticos y 3 C carbonílicos. Los datos de RMN-¹H presentan las señales correspondientes a la cadena lateral y al fragmento procedente de la amina.

La desprotección del grupo amino se llevó a cabo por tratamiento ácido acuoso a 60°C durante 30 minutos. De esta manera se obtiene el compuesto **99**. Cuando se emplean mayores tiempos de reacción, para intentar desproteger el grupo dimetilacetal, puede observarse que no se desprotege la posición C-3, pero si empieza a formarse el isómero en torno al doble enlace C-N de configuración Z.

Los datos espectroscópicos del producto resultante cuando la reacción dura 30 minutos corresponden con la estructura del producto **99** (de configuración Z). En los espectros de RMN de **99** se observa la desaparición de las señales correspondientes al tritilo con respecto a los espectros del producto protegido **98**. El EM muestra el ión molecular M⁺ a *m/z* 387.

2.3.5.5. Síntesis de **100**.

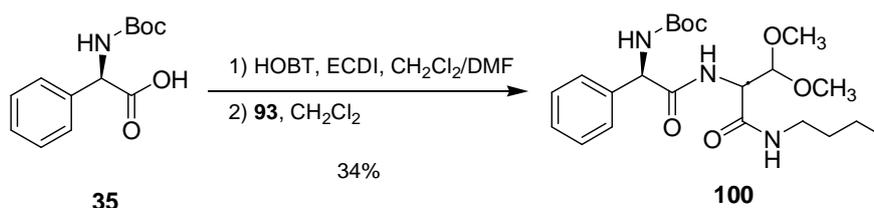


Figura 104. Síntesis de **100**.

La condensación del ácido **35** con la amina **93** empleando HOBT y DCC proporcionó el compuesto **100**. El espectro de RMN-¹³C presenta 11 señales comprendidas entre 13 y 105 ppm, correspondientes a los C alifáticos, 4 entre 127 y 138 pertenecientes a C aromáticos y, 3 más desapantalladas de C carbonílicos. El espectro de RMN-¹H se corresponde con la estructura del producto de condensación (**100**).

2.3.5.6. Desprotección del grupo dimetilacetal en estructuras tipo 31.

En una primera aproximación hacia la síntesis de estructuras tipo **31** con grupo G = CHO (Figura 105), se han llevado a cabo numerosos intentos de desprotección de este grupo, y los resultados que se obtuvieron no fueron satisfactorios. Cuando se han tratado los productos **Z-95**, **96**, **97**, **99**, **100** y, también su amina precursora **93** en condiciones de desprotección del acetal, han podido observarse dos casos distintos: a) la obtención del producto de partida sin reaccionar o, al menos sin eliminar el grupo dimetil acetal, y b) consumo del producto de partida, sin detección ni aislamiento del aldehído correspondiente mediante técnicas de RMN o técnicas de EM. Algunas de las reacciones llevadas a cabo se resumen en la Tabla 12.

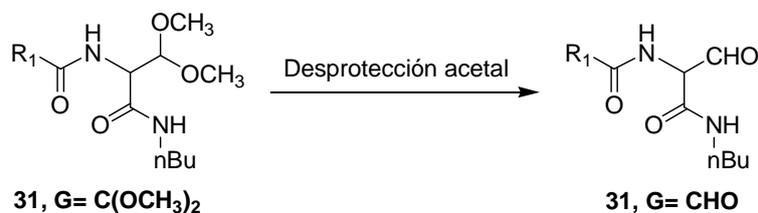


Figura 105

Producto de partida	Tratamiento	Tiempo de reacción	Productos resultantes
Z-95	Ac. p-toluensulfónico, acetona / H ₂ O (1:1) t.a.	8 h	No reacciona
Z-95	Ac. p-toluensulfónico, acetona/H ₂ O (1:1). Reflujo.	24 h	Formación de nuevos productos: E-78 y 79
Z-95	HCO ₂ H / H ₂ O (1:1) t.a	18 h	No reacciona
Z-95	HCO ₂ H / H ₂ O (1:1) 70°C	7 h	Z-78 + E-78 + 79
Z-95	THF / HCl 3N (1:1), t.a.	24 h	Z-78 + E-78 + 79
Z-95	THF / HCl 6N, t.a.	3 días	Z-78 + E-78 + 79
Z-95	THF/HCl 1N, (1:1) Reflujo	6 h	Z-78 + E-78 + 79
Z-95	Acetona / HCl 10%, t.a.	10 h	No reacciona
Z-95	Acetona / H ₂ O (1:1) t.a, ac oxálico, t.a.	12 h	No reacciona
Z-95	TFA 50%, ta	18 h	No reacciona
Z-95	TFA 95% , 0-4°C	18 h	Z-78 + E-78 + productos en muy poca proporción sin identificar
Z-95	Ce(OTf) ₃ xH ₂ O / CH ₃ NO ₂ (sat. H ₂ O) 40°C	6 días	No reacciona
97	HCl 4N, THF, ta	12 h	Degradación. No se detecta formación de aldehído
99	Ce(OTf) ₃ xH ₂ O / CH ₃ NO ₂ (sat. H ₂ O) 40°C	3 días	No reacciona
99	TFA 95% , 0-4°C	20 h	Z-78 + E-78 + productos en muy poca proporción sin identificar
100	Ac. Oxálico 4%, acetona / H ₂ O, 0°C	48 h	No reacciona
100	HCl/acetona, ta	16 h	No reacciona
100	TFA 50%, CHCl ₃ , H ₂ O, 0°C	20 h	No reacciona
100	TFA 95%,	2 h	Degradación. No se detecta formación de aldehído
100	HCl 4N, THF, ta	12 h	Degradación. No se detecta formación de aldehído
100	Ac. p-toluensulfónico, THF / H ₂ O, t.a.	48 h	No reacciona
93	TFA 50%, ta	8 h	No reacciona
93	TFA 95%, ta	5 h	No reacciona
93	Ce(OTf) ₃ xH ₂ O / CH ₃ NO ₂ (sat. H ₂ O), t.a.	2 h	No reacciona
93	CHCl ₃ , TFA, H ₂ SO ₄ (2:1:1),	16 h	No reacciona
93	CuCl ₂ x 2H ₂ O, CH ₃ CN, t.a.	3 h	No reacciona
93	2.5 eq. CAN, CH ₃ CN / H ₂ O (1:1), 70°C	21 h	No reacciona
93	2.5 eq. CAN, CH ₃ CN / tampón CO ₃ ⁻² (1:1), NaCO ₃ 70°C	5 h	No reacciona

Tabla 12. Reacciones para la desprotección del dimetilacetal.

2.3.5.7. Oxidación de estructuras tipo 31 con $G = CH_2OH$.

Figura 106

Otro modo de obtener el grupo aldehído en el C-3 de estructuras tipo **31**, sería mediante la oxidación del alcohol (Figura 106). Y aunque hasta ahora no se han probado muchos métodos, los primeros intentos realizados no han dado lugar a la reacción. En la tabla 10 se resumen los distintos procedimientos.

Producto de partida	Tratamiento	Tiempo de reacción	Productos resultantes
47	P ₂ O ₅ , DMSO (1:1) t.a.	24 - 48 h	No reacciona
Z-45	TEMPO / NaBr, CH ₂ Cl ₂ , NaOCl, NaHCO ₃ ,	24 h	No reacciona
Z-45	TEMPO / Oxone®, Bu ₄ NBr, CH ₂ Cl ₂ , t.a.	40 h	No reacciona
48	COCl ₂ , CH ₂ Cl ₂ / DMSO, CH ₂ Cl ₂ / TEA, - 60°C	20 min	No reacciona
48	SOCl ₂ , CH ₂ Cl ₂ / DMSO, CH ₂ Cl ₂ , - 60°C	24 h	No reacciona
48	KMnO ₄ , eter-18-corona-6, benceno, t.a.	5 h	No reacciona
48	PCC, CH ₂ Cl ₂	2 días	No reacciona

Tabla 13. Métodos empleados para la oxidación del alcohol.

2.3.6. Discusión de los resultados obtenidos por inhibición de RAST.

Estos estudios indican que existen diferencias en el comportamiento de los anticuerpos específicos IgE del suero de cada paciente estudiado. En la mayor parte de los sueros ensayados, el reconocimiento ha sido más específico a la estructura de la cadena lateral acilo. Con estos datos se demuestra que la cadena lateral R^1 está especialmente involucrada en la inducción de anticuerpos IgE específicos, aunque también es cierto que se necesita parte de la estructura nuclear para que éste sea óptimo.

Sin embargo, las inhibiciones de los sueros ensayados no varían mucho con respecto a los distintos grupos funcionales en el C-3 (metilo e hidroximetilo) de la estructura nuclear de **31**. Así por ejemplo, para los sueros 4, 8 y 9 (Figura 107), específicos a cefuroxima, ceftazidima y cefotaxima, respectivamente, puede observarse que, en líneas generales, reconocen mejor las estructuras que contienen la cadena lateral de la cefalosporina que provocó la reacción alérgica y, mantienen la misma tendencia en relación a los diferentes grupos G: el reconocimiento de los derivados sintéticos con $G = CH_2OH$ mejora levemente o es similar al de las estructuras con $G = CH_3$. Esta mejora nos indica que el determinante antigénico real podría contener en esa posición un grupo con un estado de oxidación mayor al del metilo.

Aunque la presencia del grupo mercaptometilo también aporta un estado de oxidación mayor al del metilo, puede ocurrir que sea el volumen mayor del átomo de azufre con respecto al de oxígeno el que impida que el reconocimiento sea tan efectivo.

Los resultados obtenidos con las estructuras **31** con $G = CH_2SH$ no manifiestan siempre el mismo comportamiento: en algunos casos muestran la misma tendencia que las estructuras con metilo e hidroximetilo, pero nunca inhibiciones mayores al 50%; en varios casos muestran inhibiciones inespecíficas con respecto a la cadena lateral (como es el caso del suero 7 de la Figura 107); y en otros casos presentan mayores porcentajes de RAST cuando se realiza la inhibición que cuando no (suero 10 y 16 de la Figura 107).

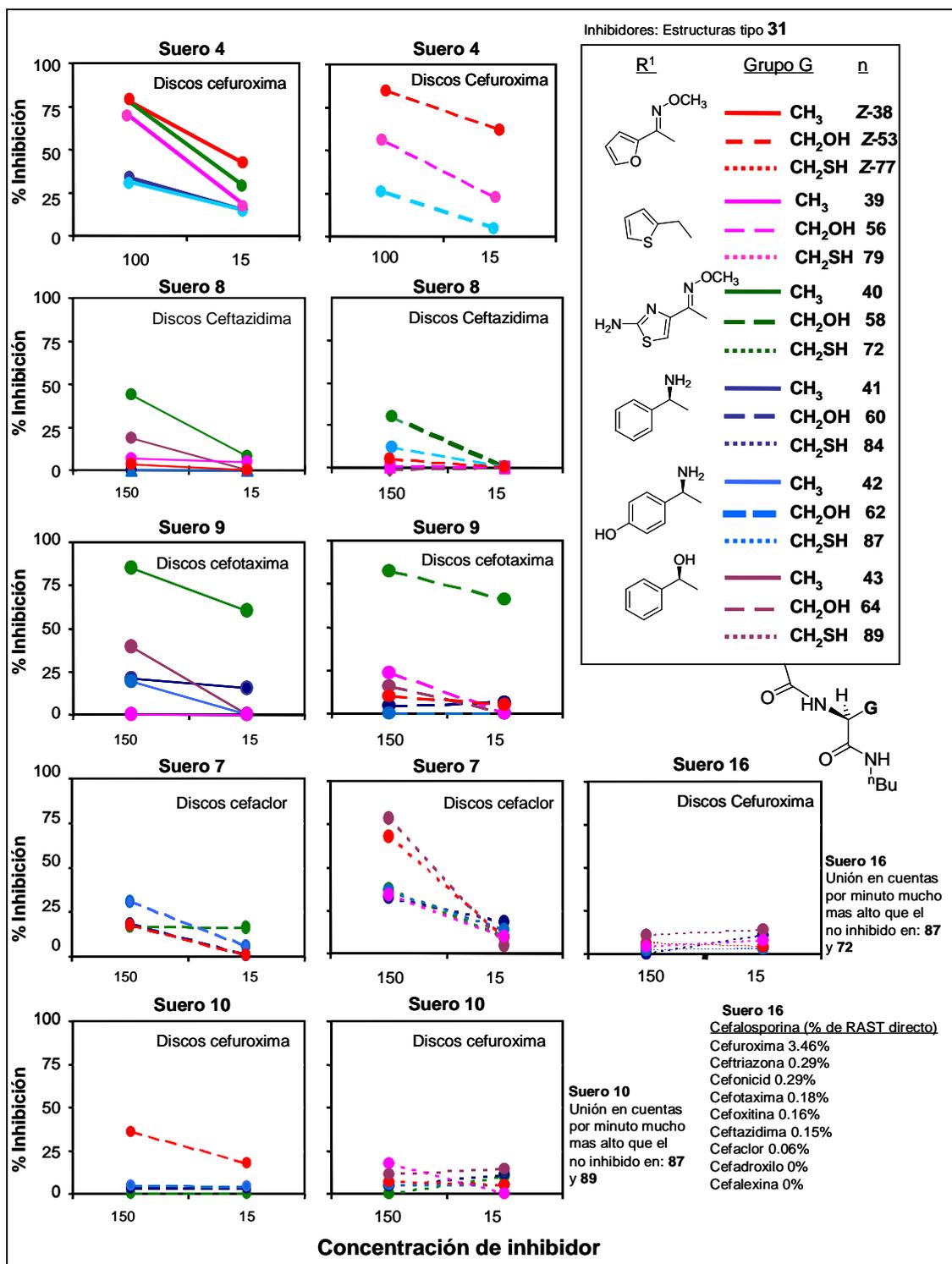


Figura 107. Estudios de inhibición de RAST, para sueros específicos a distintas cefalosporinas, con estructuras tipo 31 con distintas cadenas laterales y diferentes grupos funcionales en G.

Un factor a tener en cuenta en estos resultados de inhibición es la reactividad de los grupos mercaptanos, pudiendo ocurrir (a) reacción de formación de puente disulfuro entre las estructuras sintéticas formando dímeros, o entre las estructuras sintéticas y los anticuerpos, que se traduciría en una menor inhibición; o (b) reacción entre las estructuras sintéticas y las cefalosporinas acopladas a la fase sólida, lo que podría explicar mayores porcentajes de RAST cuando se lleva a cabo la inhibición que cuando se realiza el RAST directo.

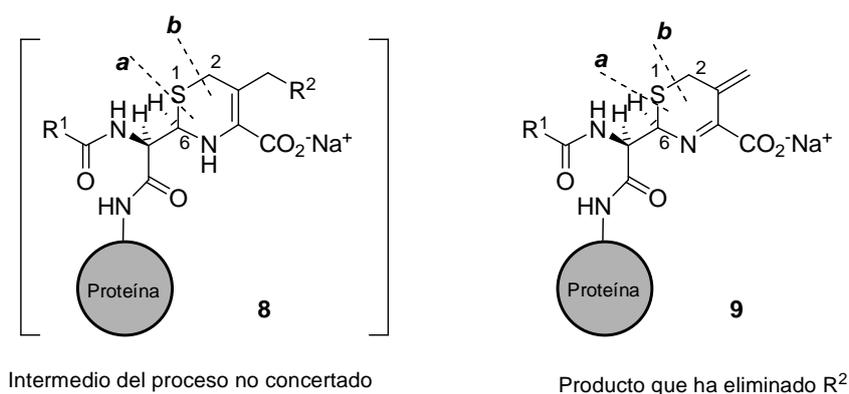


Figura 108. Hipótesis de los productos que podrían formarse en caso de la ruptura del enlace a y b de las estructuras procedentes de la apertura de la β -lactama.

Estos datos que no muestran especificidades hacia las estructuras con el grupo mercaptano ni porcentajes de inhibición óptimos, podrían ayudarnos a comprender el mecanismo de formación de estos metabolitos, concretamente cuál es el enlace que se rompe en el anillo de dihidrotiazina de la cefalosporina durante la formación de sus determinantes antigénicos.

En la Figura 108 se representan las hipotéticas estructuras intermedias que se formarían tras la conjugación de la cefalosporina a proteínas y se señalan los enlaces que posiblemente podrían sufrir ruptura.

La ruptura del **enlace a** (S1-C6) formaría un carbocatión secundario, estabilizado por resonancia por la presencia en α de una enamina (en la estructura **8** que no ha perdido R²) o estabilizado por la presencia de una imina conjugada a un doble enlace (en la estructura **9** que ha perdido el R²). Tras la formación de este carbocatión, la entrada de una molécula de agua explicaría la existencia de un átomo de oxígeno en esta posición. La ruptura del **enlace b** (S1-C2) formaría un carbocatión primario alílico (en ambas

estructuras **8** y **9**) y por tanto estaría estabilizado por resonancia. Esta ruptura implicaría la presencia de un átomo de azufre unido al carbono en la posición G.

Las estructuras tipo **31** con el grupo alcohol en C-3 se reconocen por las IgE específicas, por lo que la ruptura del enlace **a** puede ser una vía para la formación de los determinantes antigénicos de cefalosporinas *in vivo*. Sin embargo, aunque las estructuras tipo **31** con el grupo tiol en C-3 no se reconocen, no podemos descartar que el enlace **b** se rompa durante la formación de los determinantes antigénicos *in vivo*. Pues estas estructuras presentarían la misma reactividad *in vivo* que *in vitro*, de este modo podrían reaccionar a través del grupo tiol intramolecularmente y formar dímeros o, unirse a proteínas o anticuerpos inespecíficamente.

Estos resultados revelan que las estructuras tipo **31**, que representa un fragmento del cefalosporoilo intermedio propuesto, se reconocen favorablemente por anticuerpos IgE dirigidos a cefalosporinas, y estas especificidades son relativas tanto a la cadena lateral acilo como también al fragmento β -lactámico, el cual queda unido a la proteína portadora en el proceso de conjugación.

El grupo funcional en C-3 de estructuras tipo **31** no parece influir de forma decisiva en el reconocimiento. A priori, las estructuras con grupo hidroximetilo parecen ser las que dan mejor reconocimiento, siendo también óptimos los resultados obtenidos con las que presentan el metilo. Las estructuras con el grupo hidroximetilo presentan una ventaja adicional, y es una mayor facilidad para su disolución en medio acuoso para realizar los ensayos clínicos. Por ello podrían usarse en la mejora de los métodos *in vitro* disponibles para la detección de dichos anticuerpos, ya que con estas estructuras pueden detectarse con una alta especificidad.

La síntesis de estas estructuras ha proporcionado información estructural referente a las implicaciones químicas requeridas en el proceso de reconocimiento. Así, estos compuestos tipo **31** incorporan el epítopo apropiado, o al menos muy similar al determinante antigénico real, que es reconocido por anticuerpos IgE y, el grupo funcional en G podría modular el grado de reconocimiento. Estos estudios proporcionan las bases para comprender el mecanismo por el que las cefalosporinas se conjugan a proteínas portadoras.

Capítulo II.
Conjugados Hapteno-Portador

Dendrímeros

En los últimos años se ha descubierto que las propiedades de las macromoléculas altamente ramificadas pueden diferir mucho de los polímeros convencionales. La estructura de estos materiales tienen gran importancia desde el punto de vista de sus aplicaciones. El desarrollo de nanoestructuras moleculares con tamaño y forma bien definido tiene gran interés en aplicaciones biomédicas.^{140,141}

En la década de 1980 uno de los pioneros en el estudio y síntesis de estas moléculas muy ramificadas fue Donald A. Tomalia,¹⁴² quien llamó a estos compuestos dendrímeros. En la misma época, G. R. Newkome, otro investigador importante en este campo, nombró a estos compuestos arborols. La palabra *dendrímero*, que proviene del griego (*dentro*: árbol, y *meros*: parte de), y el término *arborol*, que tiene su origen en el latín (*arbor*: árbol), se emplean debido a la similitud de su patrón estructural con las copas de los árboles. También se conocen como árboles moleculares o polímeros en cascada.

¹⁴⁰ S. Svenson, D. A. Tomalia. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, 2106-2129.

¹⁴¹ U. Boas, P. M. H. Heegaard. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 43-63.

¹⁴² D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polymer. J.(Tokyo)* **1985**, 17, 117-132.

Definición de dendrímero.

Un *dendrimer* se describe generalmente como una macromolécula, que se caracteriza por una estructura tridimensional altamente ramificada, y bien definida, lo que le proporciona un alto grado de funcionalidad superficial y versatilidad. Su estructura se construye siempre alrededor de un centro multifuncional que es el *núcleo de la molécula*, con *ramificaciones* y *grupos terminales*.^{143,144,145}

En la Figura 109 se representa esquemáticamente la estructura general de un dendrímero: del núcleo emergen ramificaciones, que en cada nudo se vuelven a ramificar en un número de ramas determinado; y los grupos terminales son los que quedan expuestos en su superficie. A cada capa de crecimiento de un dendrímero se le llama generación.

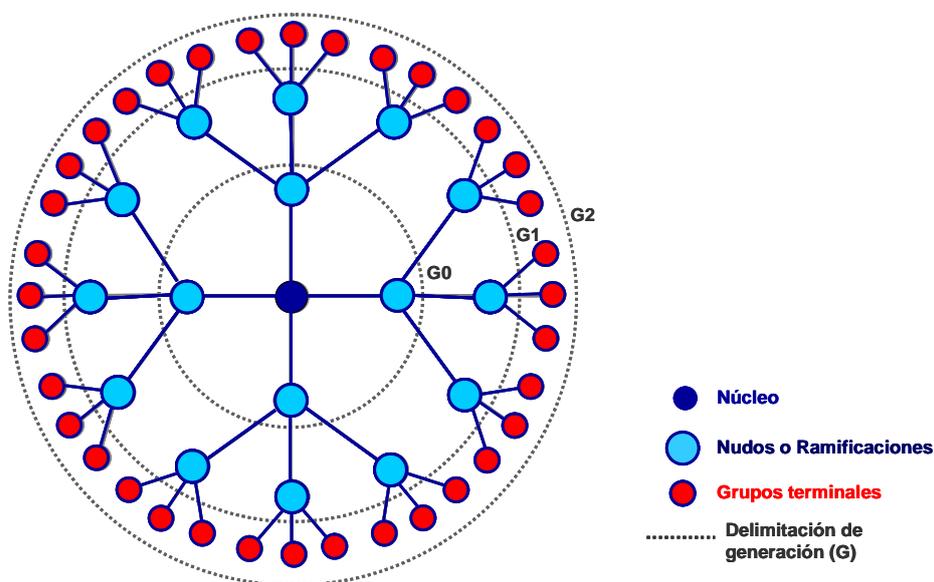


Figura 109. Representación de la estructura de un dendrímero.

Los dendrímeros pueden formarse prácticamente a partir de cualquier material que pueda ramificarse (átomos metálicos, grupos organometálicos, o materiales orgánicos puros) y pueden presentar una amplia variedad de funcionalidades dependiendo de lo

¹⁴³ Willems & van den Wildenberg. <http://www.nanoroadmap.it/> (acceso 13/07/2006) "Road map Report on Dendrimers".

¹⁴⁴ J. M. J. Fréchet, D. A. Tomalia *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*. Wiley: Chichester, 2001.

¹⁴⁵ G. R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vögtle. *Dendrimers and dendrons: Concepts, Syntheses, Applications*. Wiley-VCH: Weinheim, Alemania, 2001.

que están contruidos y como. Se construyen etapa por etapa mediante una secuencia de reacciones de acoplamiento, cuya repetición permite la multiplicación del número de unidades repetitivas y grupos funcionales terminales, y por tanto conduce a dendrimeros de generaciones mayores. Cuando el número de generaciones es alto, la molécula llega a tener aspecto de esfera.¹⁴³

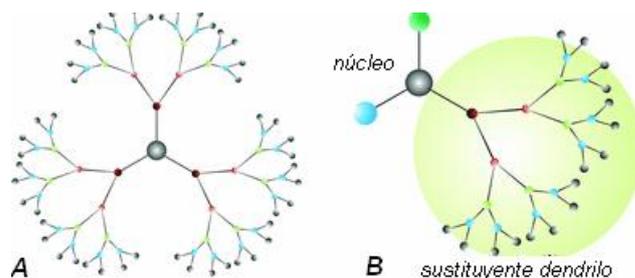


Figura 110. Ejemplos de estructuras dendríticas.

Las *estructuras dendríticas* se consideran actualmente como la cuarta clase de arquitectura macromolecular (junto con las arquitecturas lineales, entrecruzadas y ramificadas). Una descripción esquemática de estas estructuras se ofrece en la Figura 111.

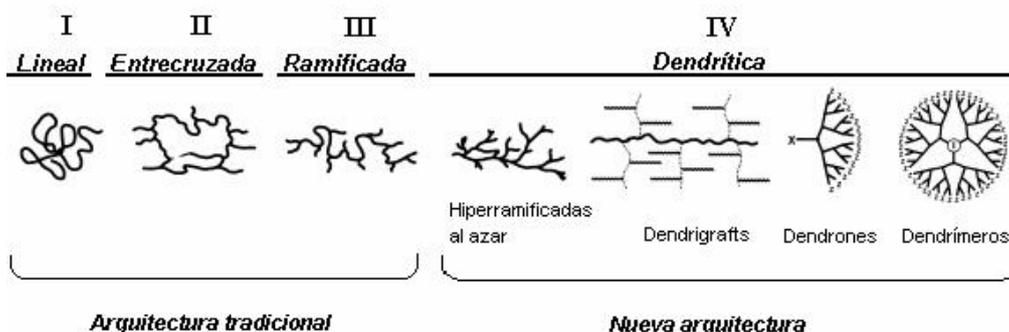


Figura 111. Esquema de las 4 clases de arquitectura macromolecular y de los 4 subtipos dentro de la dendrítica.

Esta clase de arquitectura se divide en 4 subcategorías: libremente hiperramificadas, estructuras dendríticas insertadas (o dendrigrft), dendrones y dendrimeros.^{142,143,144} Siendo estas dos últimas las que han llamado más poderosamente la atención de investigadores de muy diversas ramas de la ciencia, ya que presentan un tamaño nanométrico, una estructura globular o semiglobular, y sus métodos de síntesis permiten

un buen control estructural y la obtención de materiales esencialmente monodispersos, es decir con todas las moléculas de exactamente el mismo peso molecular, estructura y dimensiones. Estas características diferencian a los dendrímeros de las moléculas hiperramificadas, dendrigrafts y polímeros convencionales.

Síntesis

La síntesis de dendrímeros se puede llevar a cabo a través de diferentes métodos. Sin embargo, en general, todos pueden englobarse dentro de los métodos sintéticos convergentes y divergentes.¹⁴²

Con el enfoque divergente, la síntesis comienza a partir del núcleo y el dendrímero se va haciendo crecer desde dentro hacia fuera (Figura 112). El núcleo, que presenta múltiples grupos reactivos, se trata con un exceso del primer monómero, que reacciona con todos los sitios reactivos del núcleo. Este monómero también posee grupos reactivos adicionales. Un exceso del segundo monómero se hace reaccionar con la primera media generación formada (núcleo y monómero), dando lugar a la primera generación. La repetición de este proceso conduce a mayores generaciones. Generalmente los dendrímeros con estas generaciones altas, llegan a ser bastantes globulares y manifiestan algunas de sus propiedades excepcionales.^{142,143,144}

Con la síntesis convergente, el dendrímero se hace crecer desde fuera hacia dentro (Figura 112). Este método implica la creación de dendrones y sus acoplamientos alrededor del núcleo. Se requiere un número limitado de reacciones en cada etapa del proceso de crecimiento. La síntesis convergente hace más fácil conseguir el dendrímero deseado y tener bastante control sobre todos los parámetros de diseño molecular.^{142,143,144}

El método divergente es exitoso en la producción de grandes cantidades de dendrímeros. Sin embargo, presenta problemas debido a reacciones incompletas y a reacciones colaterales de los grupos funcionales terminales, que ocasionan defectos estructurales. Por ello, la mayoría de las síntesis divergentes requieren exceso de

monómero y largos procesos de separación, sobre todo en las generaciones superiores. Por otro lado, el método convergente disminuye los defectos estructurales y facilita la purificación, en comparación con la síntesis divergente. No obstante, las estrategias sintéticas convergentes sólo permiten la construcción de dendrimeros de generaciones inferiores, debido a los efectos estéricos que dificultan las reacciones entre los dendrones y el núcleo.^{142,144}

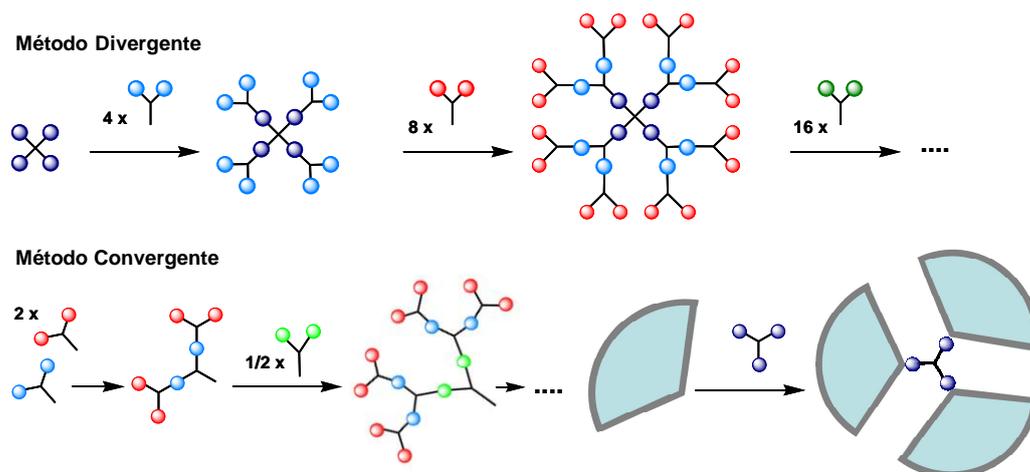


Figura 112. Representación esquemática de los métodos sintéticos de dendrimeros: divergente y convergente.

Históricamente los primeros desarrollos en este campo se basaron en métodos divergentes. Vögtle¹⁴⁶ en 1978 publicó la síntesis de varias estructuras (Figura 113) mediante una metodología repetitiva, lo que se definió como una *síntesis en cascada*.

Entre 1979 y 1981, Denkewalter^{147,148,149} patentó las tres primeras preparaciones de polipéptidos dendríticos, utilizando la L-lisina diprotégeda en los grupos aminos como unidad monomérica básica. La repetición de secuencias de acoplamiento peptídico y de desprotección condujeron a polímeros de lisina. Los biopolímeros publicados en estas patentes implican un patrón de ramificación asimétrica $1 \rightarrow 2$ y la incorporación de múltiples centros quirales en cada nivel. Sin embargo, aunque en estas patentes no se

¹⁴⁶ E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle. *Synthesis*. **1978**, 155-158.

¹⁴⁷ R. G. Denkewalter, J. F. Kolc, W. J. Lukasavage. **1979**, *U. S. Pat. 4*, 360, 646.

¹⁴⁸ R. G. Denkewalter, J. F. Kolc, W. J. Lukasavage. **1981**, *U. S. Pat. 4*, 289, 872.

¹⁴⁹ R. G. Denkewalter, J. F. Kolc, W. J. Lukasavage. **1983**, *U. S. Pat. 4*, 410, 688.

ofrecía caracterización estructural, otros estudios llevaron a publicar que estos dendrímeros de lisina eran monodispersos.¹⁵⁰

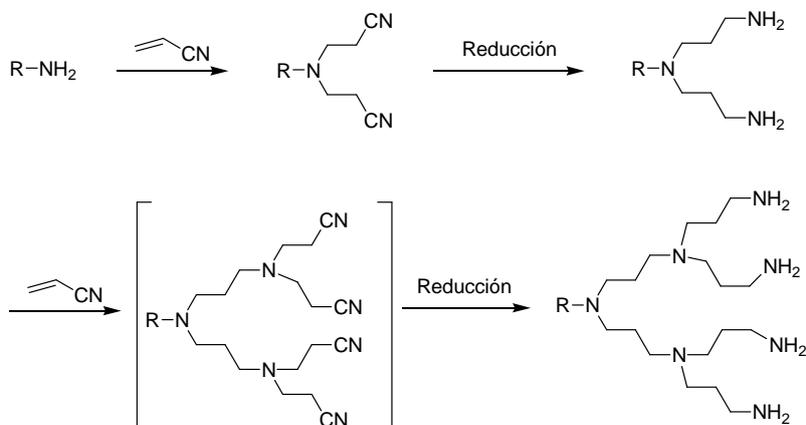


Figura 113. Síntesis en cascada introducida por Vögtle.

En 1985, Newkome¹⁵¹ y Tomalia¹⁴² publicaron diferentes rutas divergentes para la preparación de dendrímeros y describieron la asignación estructural avalada por su caracterización espectroscópica. Hay una ligera, pero importante diferencia entre los dos métodos (representados en la Figura 114). En la ruta inicial de Vögtle-Tomalia la ramificación ocurre en los grupos funcionales de la superficie (Figura 114a), mientras que el método de Denkewalter-Newkome implica un sólo acoplamiento de los grupos periféricos con estructuras ramificadas (Figura 114b), por lo que los monómeros poseen nudos con 2 ó 3 ramas, respectivamente.

En 1979, la aplicación de esta metodología por Tomalia condujo a la síntesis de una serie de dendrímeros poliamidoamina (PAMAM) (G = 0-7) bien caracterizados, y a su publicación en 1985,¹⁴² proporcionando la primera ruta sintética comercial de dendrímeros.

¹⁵⁰ S. M. Aharoni, C. R. Crosby III, E. K. Walsh. *Macromolecules*. **1982**, *15*, 1093-1098.

¹⁵¹ G. R. Newkome, Z. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003-2004.

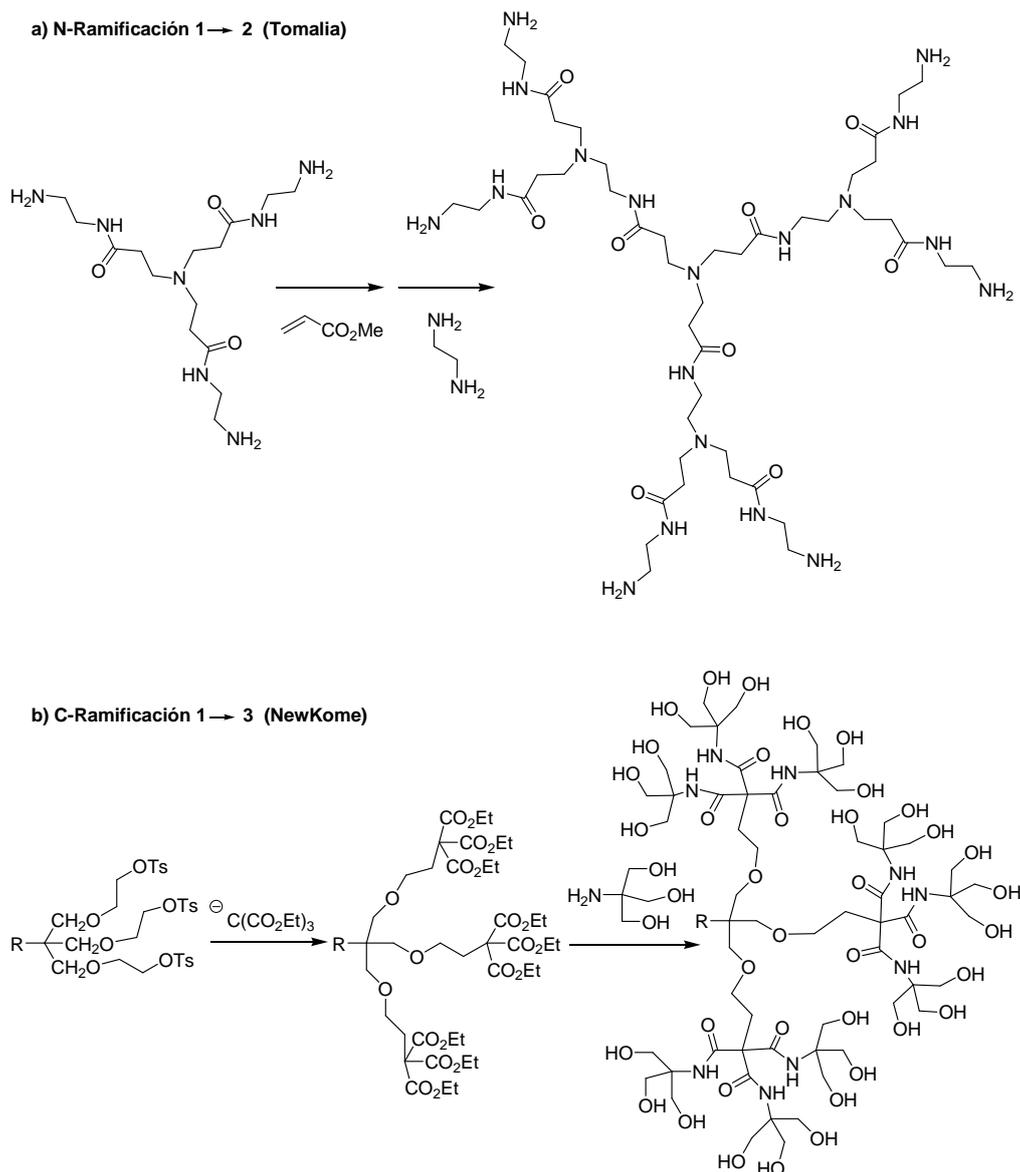


Figura 114. Primeras síntesis de dendrimeros (métodos divergentes).

Posteriormente, en 1989, Hawker y Fréchet^{152,153} seguidos por Miller y Neenan¹⁵⁴ publicaron la construcción convergente de dendrimeros. Consiste en la síntesis de dendrones que posean un único centro reactivo en el punto focal o raíz de la estructura. El posterior acoplamiento de los dendrones a través de su punto focal al núcleo da lugar a los correspondientes dendrimeros. Debido a la disponibilidad de grupos funcionales ortogonales tanto en el punto focal como en la periferia de los dendrones, la síntesis

¹⁵² C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638-7647.

¹⁵³ C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1010-1013.

¹⁵⁴ T. M. Miller, T. X. Neenan. *Chem. Mater.* **1990**, *2*, 346-349.

convergente es particularmente útil para la obtención de arquitecturas macromoleculares más complejas como híbridos lineares dendríticos, unidades básicas estructurales dendríticas (block dendrimers) o polímeros dendríticos.

El creciente interés en la química de dendrímeros se observa desde que se sintetizaron los primeros dendrímeros. Empleando estas dos estrategias sintéticas, se han sintetizado alrededor de 100 familias de dendrímeros diferentes y unas 1000 diferenciaciones debido a las modificaciones en su superficie.¹⁵⁵

Al principio los trabajos se centraron en métodos de síntesis y en investigaciones de sus propiedades como macromoléculas y, poco después aparecieron las primeras aplicaciones.

Propiedades y aplicaciones

Los dendrímeros se consideran las unidades básicas provenientes de síntesis, fundamentalmente de arquitectura más versátil a escala nanométrica, en cuanto a composición y estructura controlada se refiere. A continuación se enumeran las propiedades más destacadas que presentan los dendrímeros, junto con algunas de las aplicaciones que se derivan de ellas.

Multivalencia. La facilidad con la que los grupos terminales de los dendrímeros pueden reaccionar, permiten la adición de múltiples funcionalidades en su periferia.

Los dendrímeros que presentan en su superficie múltiples ligandos idénticos son muy atractivos desde el punto de vista farmacológico, debido a que estas sustancias exponen un gran número de grupos superficiales y, por lo tanto, pueden presentar un mayor número de interacciones con el sustrato. Por ejemplo, se ha publicado la síntesis de núcleos dendríticos PAMAM que presentan varios residuos sacáridos unidos en la periferia, y se ha demostrado que incrementa la afinidad en la unión para ciertas proteínas cuando se compara con unidades monoméricas de azúcar.¹⁵⁶ El aumento de uniones con el sustrato se origina tanto por efectos estadísticos como cooperativos.¹⁵⁷

¹⁵⁵ D. Tomalia. *Aldrichchimica Acta*. **2004**, 37 (2), 39-57.

¹⁵⁶ K. Aoi, K. Itoh, M. Okada. *Macromolecules*. **1995**, 28, 5391-5393.

¹⁵⁷ M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, 37, 2754-2794.

Una aplicación que se basa en esta propiedad es el diseño de agentes terapéuticos antivirales que puedan presentar múltiples interacciones con los receptores biológicos.^{158,159,160} El empleo de una plataforma dendrítica multifuncional para aumentar el reconocimiento del sustrato también se ha aprovechado para generar anticuerpos, los resultados muestran una mejora de la inmunorespuesta que se atribuye al alto contenido de antígeno.¹⁶¹

Además, la multivalencia es muy útil para proporcionar funcionalización versátil. Por ejemplo, pueden emplearse dendrímeros para la liberación de fármacos, actuando como transportadores de fármacos a través del organismo, aportando a éstos una mayor estabilidad frente a la degradación y facilitando su difusión a través de las barreras biológicas y, por tanto el acceso a las células dianas. Así por ejemplo, se ha descrito la síntesis de moléculas dendríticas para aplicación como agente quimioterapéutico contra el cáncer, en las que algunas ramas se conjugan a ácido fólico, otras a agentes fluorescentes, y otras a agentes anticancerígenos, para respectivamente, dirigir, detectar y eliminar, las células tumorales.¹⁶²

La funcionalización de la periferia también puede dar lugar a copolímeros con propiedades interesantes como estabilidad, viscosidad, etc., por lo que el empleo de dendrímeros está bastante extendido en aditivos y otros materiales para modificar estas propiedades.

Arquitectura definida, tamaño y forma controlada. En su construcción, los dendrímeros se extienden de una manera muy predecible formando estructuras tridimensionales amplificadas con arquitecturas muy ordenadas. Este control estructural y las dimensiones nanométricas que presentan son propiedades relevantes para aplicaciones como la mimetización de proteínas globulares^{163,164} o catálisis^{165,166}.

¹⁵⁸ K. Bezouka. *Reviews in Molecular Biotechnology*. **2002**, 90, 269-290.

¹⁵⁹ J. Rojo, M. Delgado. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, 54, 579-581.

¹⁶⁰ J. J. Reina, J. Rojo. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 2475-2478.

¹⁶¹ D. N. Posnett, H. MacGrath, J. P. Tam. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 1719-1725.

¹⁶² I. J. Majoros, T. P. Thomas, C. B. Mehta, J. R. Baker. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5892-5899.

¹⁶³ D. A. Tomalia, K. Mardel, S. A. Henderson, G. Holan, R. Esfand. "Dendrimers-An enabling Synthetic Science to Controlled Organic Nanostructures" en: W. A. Goddard III *Handbook of Nanoscience, Engineering and Technology*, Cap. 20, pág. 1-34, CRC press: Boca Raton, 2003.

Además, el control sobre el tamaño es importante en aplicaciones terapéuticas, pues tamaños moleculares diferentes muestran diferentes farmacocinéticas.

A medida que aumenta la generación del dendrímero se modifica la estructura y la distancia entre los grupos superficiales. Dentro de una serie generacional de una familia de dendrímeros, normalmente, los dendrímeros de generaciones inferiores son abiertos y flexibles, los de generaciones intermedias presentan estructuras semirígidas capaces de retener y alternativamente liberar moléculas en su interior y, los de generaciones superiores son estructuras rígidas incapaces de aceptar moléculas en su interior, con limitada permeabilidad superficial.

La propiedad que poseen los dendrímeros de generaciones intermedias de presentar una cierta rigidez en su estructura es muy valiosa, pues permite la presencia de grupos funcionales en posiciones definidas, y no sólo en la superficie dendrímica sino también dentro de la estructura. Esto es de crucial importancia para varias aplicaciones, por ejemplo en detección: se han diseñado dendrímeros que complejan gadolinio en su interior para su empleo como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (MRI).^{167,168,169}

Además, la presencia de poros o huecos definidos en estructuras dendríticas rígidas permite la incorporación de moléculas huésped en su interior, y su aplicación en el diseño de cristales líquidos (Liquid Quasi Crystals: QC). Así, los dendrímeros son materiales orgánicos que presentan propiedades ópticas y mecánicas interesantes para este empleo.¹⁷⁰

¹⁶⁴ D. A. Tomalia, B. Huang, D. R. Swanson, H. M. Brothers, J. W. Klimash. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 3799-3813.

¹⁶⁵ R. H. Holm., E. I. Solomon. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2237-2238.

¹⁶⁶ H. F. Chow, T. K. K. Mong, M. F. Nongrum, C. W. Wan. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 8547-8660.

¹⁶⁷ S. Langereis, Q. G. de Lussanet, M. H. P. Van Genderen, W. H. Baches, E. W. Meijer. *Macromolecules*, **2004**, *37*, 3084-3091.

¹⁶⁸ S. Langereis, Q. G. Lussanet, M. H. P. v. Genderen, E. W. Meijer, R. G. H. Beets-Tan, A. W. Griffioen, J. M. A. v. Engelsehoven and W. Backes. *NMR in Biomedicine* **2006**, *19*, 133-141.

¹⁶⁹ M. Takahashi, Y. Hara, K. Aoshima, H. Kurihara, T. Oshikawa, M. Yamashita. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8485-8488.

¹⁷⁰ J. Barberá, B. Donnio, L. Gehringer, D. Guillon, M. Marcos, A. Omenat, J. L. Serrano. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 4093-4105.

Monodispersidad. La síntesis etapa por etapa permite la producción de dendrímeros que presentan tamaños uniformes y funcionalidad definida en la superficie. La monodispersidad ofrece la posibilidad de trabajar con una serie de tamaños escalares bien definidos. Esta propiedad es útil en aplicaciones como la síntesis de moléculas contenedoras usándolos como plantilla o en aplicaciones electrónicas.

Capacidad portadora (propiedad de encapsular). Las cavidades internas de las estructuras dendríticas pueden emplearse para transportar y / o alojar un amplio rango de metales, moléculas orgánicas e inorgánicas por encapsulación y absorción. El tipo y grado de funcionalización modulan la capacidad portadora. Esta propiedad hace a los dendrímeros muy adecuados como transportadores y liberadores de fármacos y también muy apropiados como dispositivos electro-ópticos o magnéticos.

Un ejemplo de empleo como liberadores de fármacos se está estudiando en la terapia contra el cáncer, en la que moléculas de PAMAM funcionalizadas con cadenas de polietilenglicol para mejorar su biocompatibilidad, encapsulan fármacos anticancerígenos.^{171,172}

Biocompatibilidad / baja toxicidad. En lo que se refiere a biocompatibilidad y toxicidad, los dendrímeros cargados positivamente, como otras macromoléculas y estructuras policatiónicas, son propensos a producir una desestabilización de las membranas celulares y causar su lisis.^{173,174}

Algunos sistemas dendriméricos exhiben muy bajos niveles de toxicidad (siendo menos tóxicos los dendrímeros que llevan grupos aniónicos que aquellos que llevan grupos catiónicos).¹⁷³ Además los dendrímeros formando complejos con moléculas de ADN presentan menos efectos citotóxicos comparado con estos mismos sistemas dendriméricos libres.¹⁷⁵

Los dendrímeros empleados comúnmente también muestran muy baja respuesta inmunogénica o insignificante, en inyección o uso tópico. Estas propiedades los hacen muy adecuados para su empleo en la liberación de fármacos y como biomarcadores.¹⁴¹

¹⁷¹ C. Kojima, K. Kono, K. Maruyama, T. Takaguishi. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 910-917.

¹⁷² D. Bhadra, S. Bhadra, S. Jain, N. K. Jain. *Int. J. Pharm.* **2003**, *257*, 11-124.

¹⁷³ R. Jevprasesphant, J. Penny, R. Jalal, D. Attwood, N. B. Mackeown, A. D'Emanuele. *Int. J. Pharm.* **2003**, *252*, 263-266.

¹⁷⁴ D. Fisher, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel. *Biomaterials.* **2003**, *24*, 1121-1131.

¹⁷⁵ D. S. Shah, T. Sakthivel, I. Toth, A. T. Florence, A. F. Wilderspin. *Int. J. Pharm.* **2000**, *208*, 41-48.

Propiedad de transfección: transportar material genético al interior de las células. La gran diversidad de estructuras químicas posibles en arquitecturas dendríticas permiten el diseño de macromoléculas selectas que son capaces de atravesar membranas. De hecho los PAMAM se han probado con éxito como agente de transfección en la terapia génica: transfieren los genes a través de la membrana celular hasta el núcleo.^{176,177,178} Sus grupos aminos terminales interactúan con los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos, lo que asegura la formación de complejos de transfección.

En resumen: los dendrímeros representan un amplio rango de composiciones orgánicas/organometálicas y estructuras controladas en función del tamaño, forma, flexibilidad, y superficie química, y desde esta perspectiva se les considera como unidades fundamentales arquitectónicas básicas a escala nanométrica, que permiten la construcción de un amplio rango de estructuras, mostrando importantes usos y propiedades en una gran variedad de campos, como en biomedicina, nanoelectrónica, materiales avanzados, y nanocatalizadores.

Tanta es la importancia que están adquiriendo estos materiales, que se ha incluido dentro de un proyecto (NRM)¹⁴³ financiado por la Comisión Europea dentro del VI Programa Marco y su objetivo principal es producir un pronóstico a largo plazo que destaca los usos de la nanotecnología en 3 campos industriales principales: salud y servicios médicos, materiales y energía.

La agencia estadounidense del medicamento considera el dendrímero como patrón para los estudios de nanotecnología, por esta razón y porque actualmente no se están desarrollando ninguna patente en este tema en Europa surge el proyecto NRM, estudiando sus aplicaciones en diversos campos. Otra razón muy importante es que actualmente están comercializando estos productos dos empresas estadounidenses a un precio muy elevado.

¹⁷⁶ J. Haensler, F. C. Szoka. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 372-379.

¹⁷⁷ T. V. Chirila, P. E. Rakoczy, K. L. Garret, X. Lou, I. J. Constable. *Biomaterials* **2002**, *23*, 321-342.

¹⁷⁸ A. U. Bielinska, A. Yen, H. Liang Wu, K. M. Zahos, R. Sun, N. D. Weiner, J. R. Baker, B. J. Roessler. *Biomaterials* **2000**, *21*, 877-887.

Dendrímeros comerciales.

Con el interés que los dendrímeros ha despertado en diversos campos de la ciencia, no extraña que actualmente algunos esqueletos dendriméricos como los polipropilenimina (PPI, conocidos con el nombre de Astramol) o los PAMAM (con el nombre de Starbust), representados en Figura 115, sean comerciales. Aparte de estar disponibles comercialmente, una ventaja de estos dendrímeros es que están muy bien caracterizados y, por tanto, sus estructuras están bien establecidas. Además, el hecho de ser comerciales implica un uso más extendido, por lo que otras muchas propiedades también se conocen, como por ejemplo su biocompatibilidad.

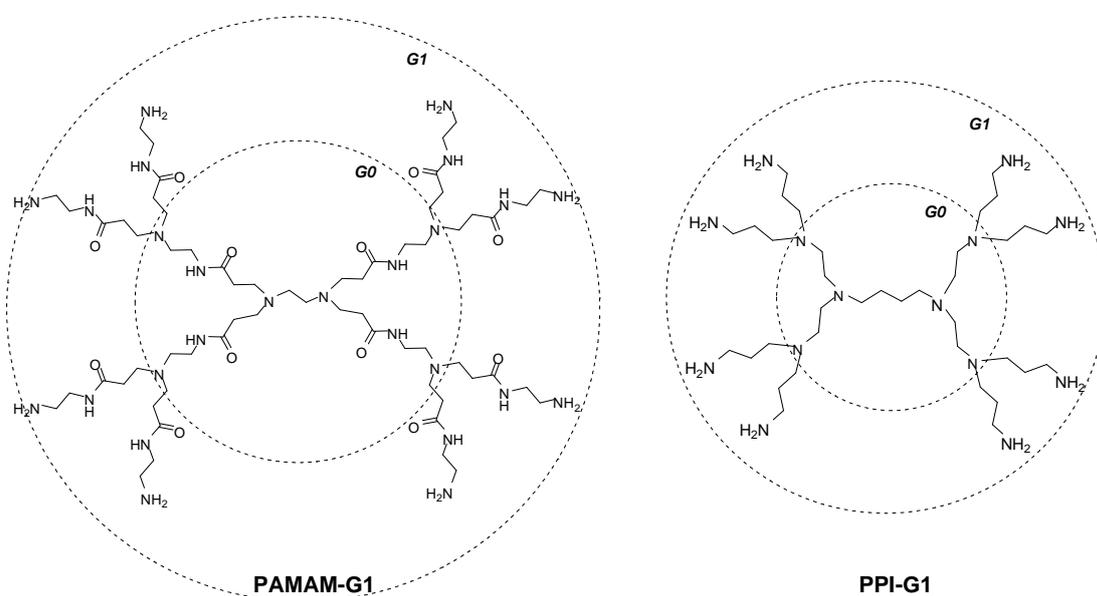


Figura 115. Dendrímeros comerciales disponibles (de generación 1).

Para los dendrímeros PAMAM cuyo núcleo es etilendiamina, cada generación aumenta aproximadamente 1 nm el diámetro de su estructura, además de duplicar el número de grupos terminales y aumentar aproximadamente el doble su peso molecular. Como consecuencia se producen los fenómenos de congestión estérica y, en función del núcleo y de las multiplicidades de las ramificaciones, se producen nanoestructuras cerradas geométricamente que pueden alojar moléculas en sus cavidades interiores. En estos sistemas la modificación de los grupos terminales permitirá modular las propiedades de las moléculas a encapsular, dando lugar a interacciones ligando-sustrato y, confiriendo de esta manera al dendrímero propiedades endoreceptoras.

En el caso de los dendrímeros PAMAM, los de las primeras generaciones (G1 a G3) presentan una distancia de 10.7 Å entre los grupos terminales y una forma lenticular sin características bien definidas en el interior; los dendrímeros de generación 4 a 6 tienen una laxa estructura globular, una distancia de 8.6 a 10.2 Å entre los grupos superficiales y permiten la inclusión de moléculas por lo que son de elección en la encapsulación y liberación controlada de fármacos. Finalmente los dendrímeros de generación 7 a 10 tienen estructura globular compacta, con una distancia de 7.12 a 5.62 Å entre los grupos periféricos y son de elección en terapia génica.

Los dendrímeros PPI y PAMAM con grupos terminales aminos se comportan de manera similar con respecto a la citotoxicidad y efectos hemolíticos, además algunos estudios han demostrado que ambos efectos aumentan en función del incremento de generación.^{173,174,179} Los dendrímeros PAMAM aniónicos, con grupos carboxilo en la superficie, tienen menor citotoxicidad y efecto hemolítico, e incluso los de baja generación no muestran estos efectos.¹⁷⁹ Por lo que respecta a la toxicidad *in vivo*, aun siendo pocos los estudios realizados en ratones, parece deducirse que los dendrímeros PAMAM hasta la generación 5 inyectados por vía intraarterial a razón de 10 mg/Kg no producen efecto tóxico.^{180,181}

En cuanto a la inmunogenicidad de dendrímeros PAMAM con grupos aminos terminales sin modificar, los primeros estudios mostraron ninguna o sólo débil inmunogenicidad de los dendrímeros de generaciones G3-G7.^{180,182} Sin embargo, estudios posteriores revelaron cierta inmunogenicidad de estos dendrímeros, y demostraron que ésta podía reducirse con la modificación de los grupos aminos terminales con cadenas de polietilenglicol (PEG).¹⁸³

¹⁷⁹ N. Malik, R. Wiwattanapatapee, R. Klopsch, K. Lorenz, H. Frey, J. W. Weener, E. W. Meijer, W. Paulus, R. Duncan. *J. Control. Release* **2000**, *65*, 133-148.

¹⁸⁰ J. C. Roberts, M. K. Bhargat, R. T. Zera. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *30*, 53-65.

¹⁸¹ N. Bourne, L. R. Stanberry, E. R. Kern, G. Holan, B. Mattheus, D. I. Bernstein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2471-2474.

¹⁸² P. Rajanathanan, G. S. Attard, N. A. Sheik, W. J. Morrow. *Vaccine.* **1999**, *17*, 715-730.

¹⁸³ H. Kobayashi, S. Kawamoto, T. Saga, N. Sato, A. Hiraga, T. Ishimori, J. Konishi, K. Togashi, M. W. Brechbie, *Magn. Reson. Med.* **2001**, *46*, 781-788.

Las propiedades conocidas y las estructuras definidas que presentan los dendrímeros plantea el estudio de su empleo en aplicaciones en las que actualmente se utilizan otras macromoléculas convencionales. Este es el caso de los portadores de haptenos para el estudio de diagnóstico de alergia a fármacos.

Diagnóstico de alergia a fármacos.

Conjugados hapteno-portador. Empleo de macromoléculas tradicionales.

Como ya se ha explicado anteriormente, los antibióticos β -lactámicos necesitan estar conjugados a una proteína portadora para la inducción de anticuerpos IgE específicos. Las técnicas comerciales de inmunoensayo disponibles en la actualidad utilizan un soporte en fase sólida donde se acopla el medicamento a una molécula transportadora.

Tanto los tests cutáneos como los tests *in vitro* para el diagnóstico de alergias a penicilinas o derivados emplean conjugados antibiótico-macromolécula.

El interés de numerosas investigaciones se ha centrado en la síntesis y desarrollo de estos conjugados “ β -lactámicos-macromoléculas portadoras” como estrategia clave para poder identificar y cuantificar anticuerpos IgE dirigidos a estos antibióticos. Esto resulta crítico para el desarrollo de métodos de diagnóstico que tengan una sensibilidad y especificidad óptima.

El componente hapténico responsable de las alergias a penicilinas ha sido intensamente estudiado (ver apartado I-1). Comparativamente, el componente portador ha recibido mucha menos atención, sobre todo teniendo en cuenta que tanto el tamaño del portador como la distribución y densidad de hapteno que presenta, son factores claves para el reconocimiento molecular. Los portadores tradicionales peptídicos empleados para la formación de estos conjugados son HSA y PLL. Sin embargo, ninguno de los conjugados que se forman con ellos están bien caracterizados químicamente.

La HSA se ha considerado tradicionalmente como la macromolécula portadora clásica *in vivo*. La funcionalización de los restos de lisina en la HSA ocurre tanto *in vivo* como *in vitro* por reacción con las penicilinas. Este conjugado de BPO-HSA se considera el principal responsable de los fenómenos de alergias a estos antibióticos.

En la actualidad se conoce cómo la HSA es haptenizada por la penicilina, y se han identificado los puntos de anclaje de los correspondientes BPO en la misma.^{184,185,186,187}

Se ha observado que no más de 6 residuos de BPO están expuestos en la superficie de la molécula de HSA y, por tanto, el resto están inaccesibles para la unión con el anticuerpo, hecho que puede implicar que la molécula no sea la más adecuada para una extrapolación *in vitro* o utilización sintética para su empleo en la detección de IgE.

La PLL, que se ha empleado mucho como proteína artificial, también se ha utilizado para formar estos conjugados H-P. Esta aproximación ha resultado útil, ya que se supera la limitación de una intrínseca baja densidad H-P de los conjugados de HSA, pues la PLL presenta una inherente mayor densidad de hapteno en sus conjugados. Ello repercute en la sensibilidad y reproducibilidad de la técnica, ya que algunos estudios han demostrado mediante RAST e inhibición del RAST que los conjugados BPO-PLL son superiores a los conjugados BPO-HSA en su capacidad de unirse específicamente a anticuerpos IgE.⁵⁶

Sin embargo, los conjugados BPO-PLL también presentan inconvenientes:

1. Los conjugados de PLL realmente consisten en la mezcla de varias estructuras, debido a las diferencias existentes en el grado de polimerización de las moléculas de PLL. Por lo que estos conjugados consisten en mezcla de conjugados de diferentes tamaños y densidad de haptenos, donde la distribución y proporción de haptenos sería casi estadística. Este hecho afecta a la reproducibilidad y a la fiabilidad de los tests de detección de anticuerpos.

¹⁸⁴ M. Yvon, P. Anglade, J. M. Wal. *FEBS Lett.* **1988**, 239, 237-240.

¹⁸⁵ M. Yvon, P. Anglade, J. M. Wal. *FEBS Lett.* **1989**, 247, 273-278.

¹⁸⁶ M. Yvon, P. Anglade, J. M. Wal. *FEBS Lett.* **1990**, 263, 237-240.

¹⁸⁷ N. Díaz, D. Suárez, T. L. Sordo, Jr. K. M. Merz. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7574-7583.

2. Tanto la estructura tridimensional como la distribución de los haptenos son factores muy importantes en los procesos de reconocimiento inmunológico, al igual que en todos los procesos de reconocimiento molecular. La PLL posee cadenas poliméricas con estructura lineal flexible por lo que la configuración tridimensional del polipéptido es variable y difícil de predecir, además, el número de haptenos expuestos en la superficie también es difícil de establecer.

II-1. Obtención de antígenos dendríméricos.

La eficiencia y rendimiento de la reacción para la formación de **6** partiendo de bencilpenicilina y butilamina, nos permitió emplear esta reactividad como estrategia para funcionalizar los grupos aminos terminales de la superficie de los dendrímeros PAMAM con sustituyentes peniciloilos (Figura 116).

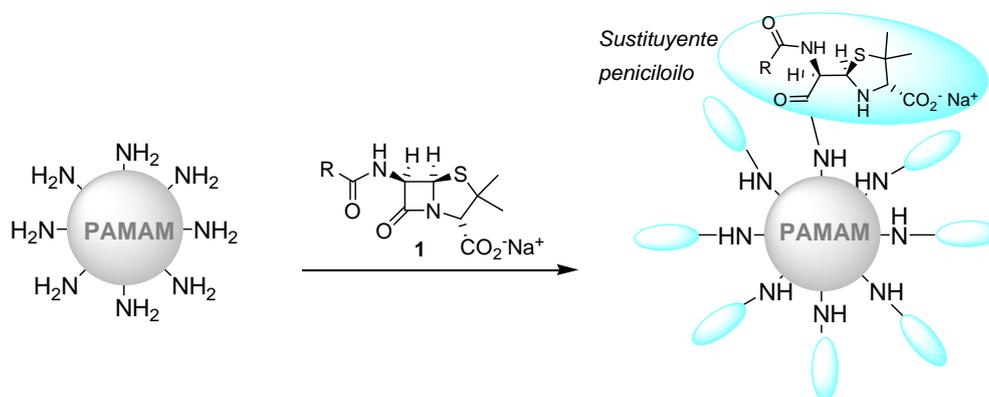


Figura 116. Esquema de reacción de dendrímeros PAMAM con penicilinas.

1.1. Obtención de antígenos dendríméricos de bencilpenicilina.

La síntesis de los conjugados bencilpeniciloilo-dendrímtero PAMAM (G_n BPO, $n = 0-6$), compuestos **101-107**, se logró mediante un método eficaz que ha permitido la funcionalización completa de los grupos aminos terminales de las siete generaciones ($G_n = 0$ a 6) de los dendrímteros PAMAM utilizados .

Las reacciones se llevaron a cabo disolviendo el correspondiente dendrímtero de partida en tampón carbonato acuoso a pH 10.8 (para asegurar que todos los grupos aminos de la superficie de los PAMAM estuvieran desprotonados), usando exceso de bencilpenicilina, agitando durante el tiempo indicado en cada caso, y controlando la temperatura, lo que llegó a resultar un factor clave.¹⁸⁸ Todos los productos se purificaron por cromatografía de exclusión molecular, empleando Sephadex G10.

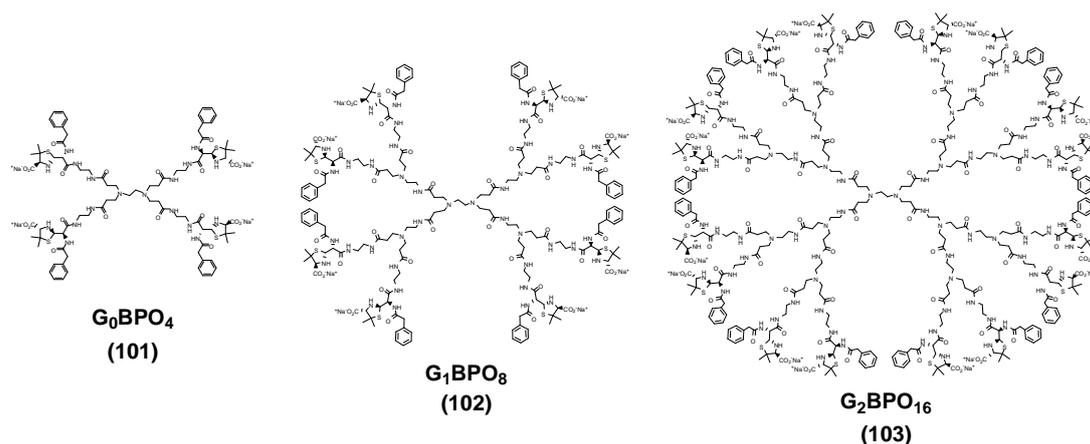


Figura 117. Antígenos sintéticos de 3 generaciones: dendrímteros G_n BPO ($n = 0-2$).

La funcionalización de los dendrímteros terminados en grupos aminos se puede monitorizar por espectroscopía de RMN por la modificación de las resonancias de las señales correspondientes a los metilenos unidos a los grupos aminos terminales, ya que éstos pasan de estar unidos de una función amina a una función amida.

Finalmente, se obtuvieron sólidos blancos cristalinos correspondientes a los conjugados sintéticos. De este modo, las diferentes generaciones de los dendrímteros PAMAM dieron lugar a distintos antígenos sintéticos, que incrementan su tamaño y duplican la

¹⁸⁸ F. Sánchez, E. Pérez-Inestrosa, R. Suau, C. Mayorga, M. J. Torres, M. Blanca. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 647-653.

cantidad de determinantes antigénicos en su superficie, a medida que aumenta la generación del dendrímero (Figura 117 y Tabla 14).

Antígenos Sintéticos: G _n BPO					
G	Nº de grupos BPO	Producto (n)	Fórmula Molecular Calculada	Peso Molecular Calculado	
0	4	G ₀ BPO ₄ 101	C ₈₆ H ₁₁₆ N ₁₈ O ₂₀ S ₄ Na ₄	1942	
1	8	G ₁ BPO ₈ 102	C ₁₉₀ H ₂₆₄ N ₄₂ O ₄₄ S ₈ Na ₈	4281	
2	16	G ₂ BPO ₁₆ 103	C ₃₉₈ H ₅₆₀ N ₉₀ O ₉₂ S ₁₆ Na ₁₆	8958	
3	32	G ₃ BPO ₃₂ 104	C ₈₁₄ H ₁₁₅₂ N ₁₈₆ O ₁₈₈ S ₃₂ Na ₃₂	18313	
4	64	G ₄ BPO ₆₄ 105	C ₁₆₄₆ H ₂₃₃₆ N ₃₇₈ O ₃₈₀ S ₆₄ Na ₆₄	37023	
5	128	G ₅ BPO ₁₂₈ 106	C ₃₃₁₀ H ₄₇₀₄ N ₇₆₂ O ₇₆₄ S ₁₂₈ Na ₁₂₈	74441	
6	256	G ₆ BPO ₂₅₆ 107	C ₆₆₃₈ H ₉₄₄₀ N ₁₅₃₀ O ₁₅₃₂ S ₂₅₆ Na ₂₅₆	149279	

Tabla 14.

1.1.1. Preparación del conjugado G₀BPO₄ (101).

El primer conjugado logró obtenerse por reacción del dendrímero PAMAM-G0 con exceso de bencilpenicilina, como se explica en el apartado anterior, a temperatura ambiente tras 24 horas de reacción.

Caracterización por RMN.

El producto obtenido se analizó por RMN-¹H en D₂O a pH básico (obtenido por adición de Na₂CO₃). En estas condiciones, las resonancias de los protones de los metilenos directamente unidos a los grupos aminos terminales resultaron muy útiles (protones e en la Figura 118), ya que el desapantallamiento de esta señal de 2.70 ppm a 3.22 ppm indica que la reacción de acoplamiento ha tenido lugar. Puede observarse también, que

las resonancias de los dos protones β-lactámicos, H-5 y H-6, de la bencilpenicilina (**1**) indican la apertura del anillo. Además, el resto de las señales correspondientes a las unidades de bencilpeniciloilo muestran desplazamientos químicos muy similares a las de este radical en el producto **6** y, de las integrales de estas señales, se deduce la incorporación de 4 grupos BPO por molécula de dendrímico.

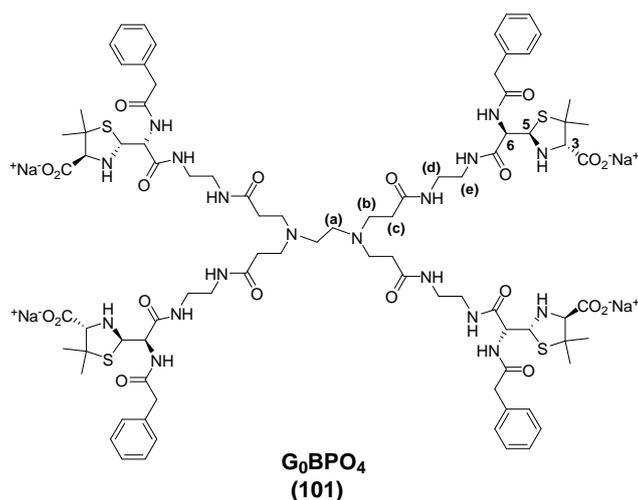


Figura 118. Estructura del conjugado G₀BPO₄.

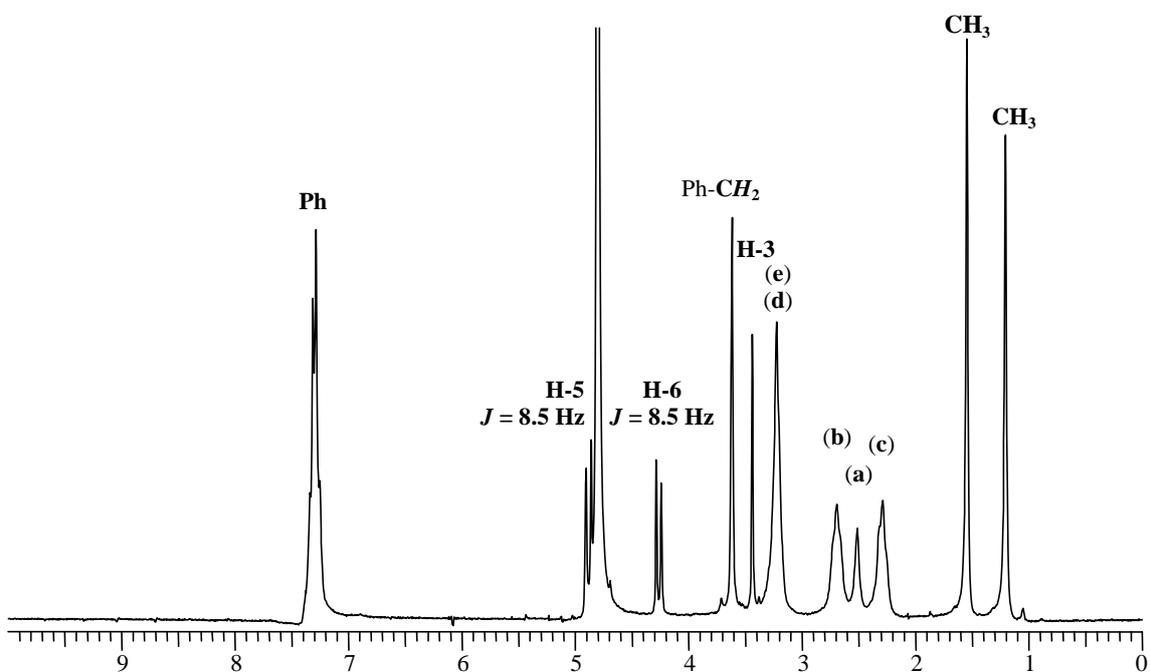


Figura 119. Espectro de RMN-¹H de G₀BPO₄ (**101**) en D₂O, pD ≈ 11.

El espectro de RMN- ^{13}C fue muy útil para confirmar la homogeneidad estructural del compuesto **101**. Los carbonos (e) y (d) aparecen a 42.8 y 40.8 ppm, respectivamente, en el dendrímero de partida PAMAM-G0, y en el conjugado G_0BPO_4 estos resuenan prácticamente casi a la misma frecuencia, a 39.6 y 39.5 ppm. Por lo que la ausencia de señales correspondientes a carbonos unidos a grupos aminos sin sustituir, nos confirman la eficiencia del proceso de acoplamiento.

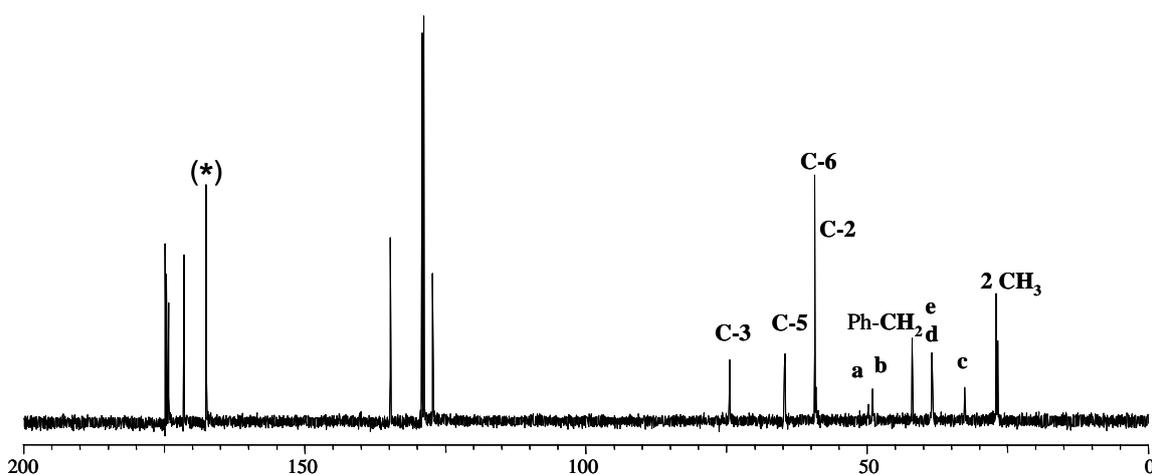


Figura 120. Espectro de RMN- ^{13}C de G_0BPO_4 (**101**) en $\text{D}_2\text{O} / \text{Na}_2\text{CO}_3$, $\text{pD} \approx 11$.

Análisis por espectroscopía de masas.

El análisis por espectroscopía de masas¹⁸⁹ se llevó a cabo mediante las técnicas de ionización por bombardeo de átomos rápidos (FAB) e ionización por desorción de láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (Tabla 15).

El análisis del conjugado bencilpeniciloilado de generación 0, G_0BPO_4 (**101**), por FAB permitió identificar un ión molecular de $m/z = 1943$ en el espectro, correspondiente a la especie G_0BPO_4 protonada $[\text{M}_{\text{COONa}} + \text{H}]^+$. El producto detectado se denomina en la Tabla 15 como $\text{G}_0\text{BPO}_4(\text{COONa})$ debido a que sus unidades carboxílicas en C-3 siguen estando en forma de carboxilato sódico y, de esta manera se pueden diferenciar de otros casos en que ocurre protonación en estos grupos funcionales.

¹⁸⁹ Los espectros de masas MALDI-TOF de los conjugados dendriméricos fueron realizados por la Dr. Gloria Sanclimens en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Barcelona.

También pudo confirmarse la incorporación de los 4 residuos de BPO a este conjugado por espectro de masas MALDI-TOF. Las mejores condiciones para registrar este espectro fue disolviendo el producto en una mezcla 1:1 de H₂O/CH₃CN que contiene 0.1% de ácido trifluoracético (TFA) y usando 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP) como matriz. Bajo estas condiciones ácidas, las unidades carboxílicas enlazadas a los C-3 de los BPO en G₀BPO₄ estarían en forma de ácido carboxílico, por lo que designamos a esta especie como G₀BPO₄(COOH). Así, como puede observarse en la Figura 121, en el espectro aparece un pico con valores de $m/z = 1855$, correspondiente a esta especie (con las 4 funciones carboxílicas en forma de ácidos carboxílicos) protonada [$M_{(COOH)}+H$].

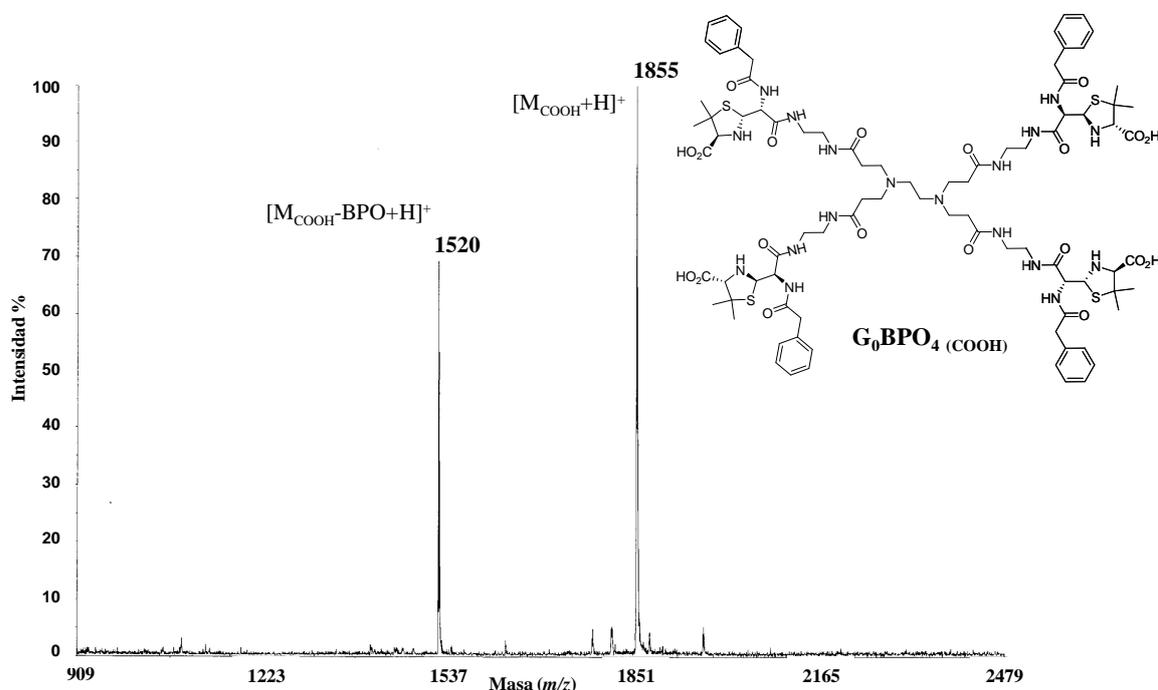


Figura 121. EM (MALDI-TOF) de G₀BPO₄ (101).

Compuesto	(n)	Fórmula Molecular	Peso Molecular		técnica
			Calculado	Observado	
G ₀ BPO ₄ (COONa)	101	C ₈₆ H ₁₁₆ N ₁₈ O ₂₀ S ₄ Na ₄	1942	1943 (M+H) ⁺	FAB
G ₀ BPO ₄ (COOH)	101	C ₈₆ H ₁₂₀ N ₁₈ O ₂₀ S ₄	1854	1855 (M+H) ⁺	MALDI-TOF
G ₁ BPO ₈ (COOH)	102	C ₁₉₀ H ₂₇₂ N ₄₂ O ₄₄ S ₈	4105	4106 (M+H) ⁺	MALDI-TOF
G ₂ BPO ₁₆ (COOH)	103	C ₃₉₈ H ₅₇₆ N ₉₀ O ₉₂ S ₁₆	8606	8607 (M+H) ⁺	MALDI-TOF

Tabla 15. Datos de espectroscopía de masas de los antígenos dendríméricos.

1.1.2. Preparación del conjugado G_1BPO_8 (**102**).

El dendrímero bencilpeniciloilado de generación 1, representado en la Figura 122, se preparó de la misma manera, partiendo del dendrímero PAMAM-G1 en tampón a pH básico y usando exceso de bencilpenicilina, aunque en este caso se necesitaron mayores tiempos de reacción.

Caracterización por RMN.

Los espectros de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto obtenido, **102**, fueron muy similares a los del conjugado **101** y, las integrales de las señales correspondientes a los protones de los grupos bencilpeniciloilos indicaron la incorporación de 8 unidades periféricas. Los datos de RMN se resumen en las Tabla 17, Tabla 18 y Tabla 19.

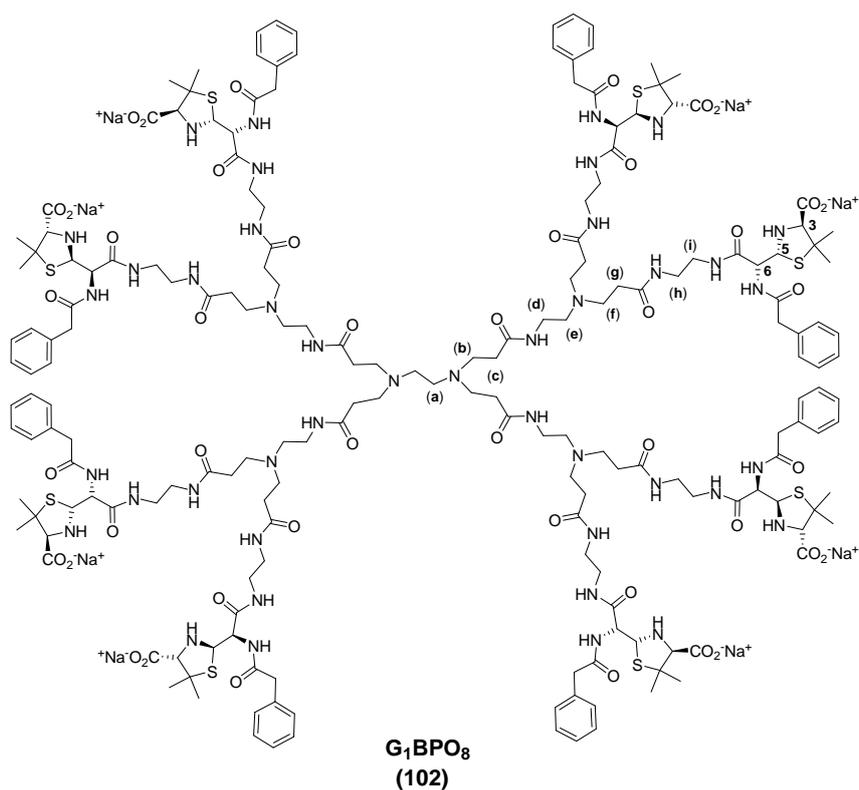


Figura 122.

Análisis por espectrometría de masas.

El análisis de espectroscopía de masas se realizó utilizando técnicas de MALDI-TOF bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para el producto G_0BPO_4 . De esta manera, se identificó un pico correspondiente al ión molecular protonado del conjugado $[M_{COOH} + H]^+$, con grupos ácidos carboxílicos en los C-3 de las unidades de bencilpeniciloilo.

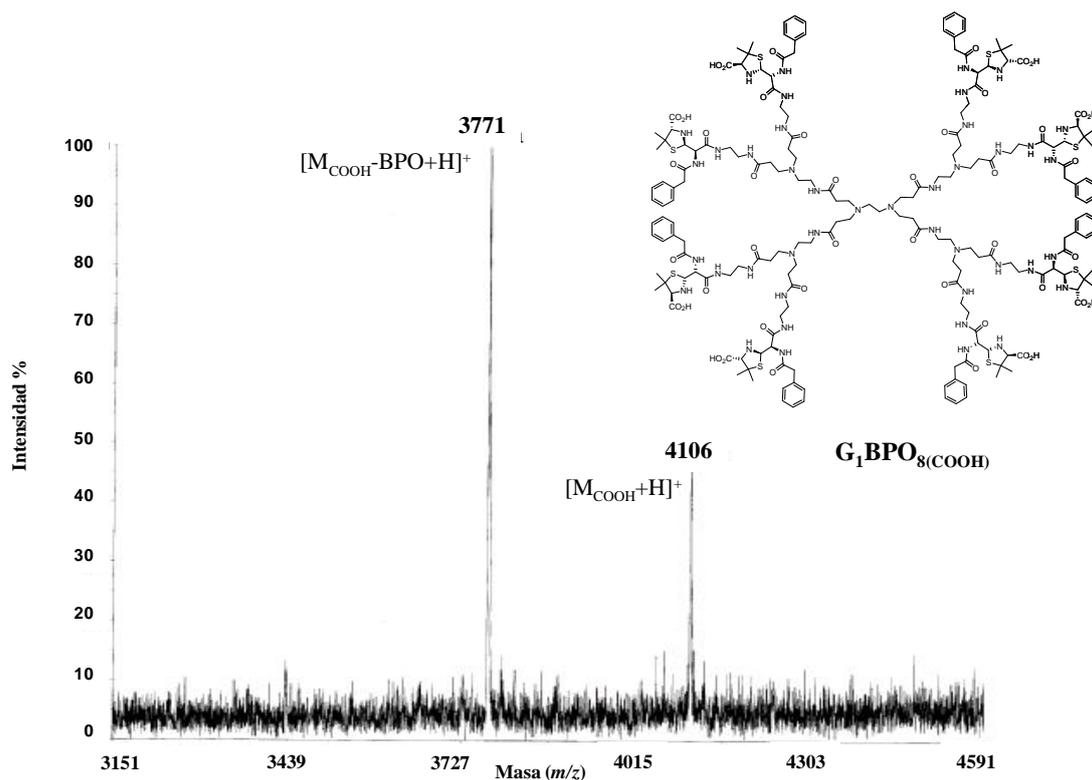


Figura 123. EM (MALDI-TOF) de G_1BPO_8 .

1.1.3. Preparación del conjugado G_2BPO_{16} (103).

El empleo de estas mismas condiciones de reacción para la obtención del dendrímero conjugado G_2BPO_{16} , partiendo de PAMAM-G2, no dio lugar a los mismos resultados. En este caso, sin embargo, se obtuvo un conjugado con una sustitución periférica incompleta de grupos BPO. El espectro de RMN- ^{13}C mostró pequeñas señales que podrían asignarse a los carbonos directamente unidos a los grupos aminos terminales sin

sustituir, tal y como también confirmó el análisis por espectroscopía de masas (MALDI-TOF).

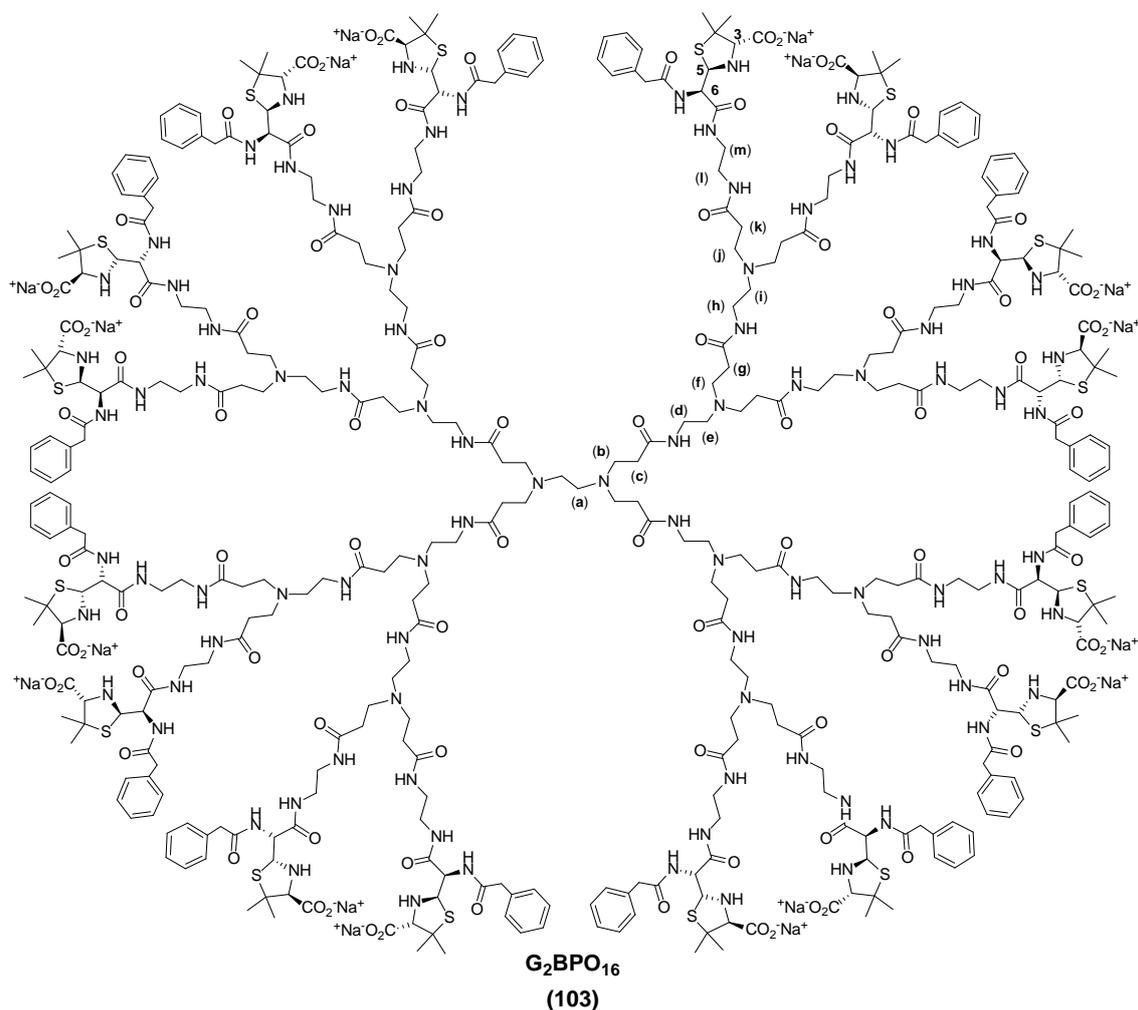


Figura 124. Estructura de G₂BPO₁₆ (completamente funcionalizado).

Para mejorar estos resultados, intentamos llevar a cabo la reacción mediante el empleo de condiciones más drásticas, como la adición de un mayor exceso de bencilpenicilina, más elevadas temperaturas o, mayores tiempos de reacción, partiendo tanto del dendrímero PAMAM-G2 como del conjugado ya parcialmente funcionalizado y, sin embargo, no se obtuvo ningún progreso.

La estructura dendrítica es un sistema dinámico¹⁹⁰ y, como tal, debido a su movilidad conformacional¹⁹¹ debería ocupar un volumen estadístico espacial mayor con cada

¹⁹⁰ P. R. Ashton, D. W. Anderson, C. L. Brown, A. N. Shipway, J. F. Stoddart, M. S. Tolley. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 781-795.

¹⁹¹ J.-L. Chaumette, M. J. Laufferweiler, J. R. Parquette. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9399-9405.

grupo terminal voluminoso bencilpeniciloilo. De manera que este hecho podría introducir impedimentos estéricos adicionales a la bencilpenicilina en su aproximación a los grupos terminales aminos sin sustituir.

De acuerdo con esta hipótesis, un modo de reducir este factor restrictivo sería disminuyendo la movilidad del dendrímero parcialmente funcionalizado. De hecho, ya se han publicado observaciones similares para una familia de dendrímeros diferente, para los que la formación de un precursor dendrímérico se consiguió terminando la reacción a baja temperatura.¹⁹²

Teniendo en cuenta esta consideración, comprobamos, empleando bajas temperaturas durante la reacción de acoplamiento, que un factor clave para conseguir la completa funcionalización consiste en minimizar estos fenómenos de congestión estérica. Se preparó de esta manera el conjugado G_2BPO_{16} (**103**, Figura 124) a baja temperatura (4°C) para asegurar la completa funcionalización de los grupos periféricos.

Caracterización por RMN.

El conjugado de segunda generación obtenido así, presentó espectros de RMN muy similares a los ya obtenidos con G_0BPO_4 y G_1BPO_8 (ver Tabla 17, Tabla 18 y Tabla 19). Los integrales correspondientes a los protones de las unidades periféricas bencilpeniciloilo apuntan a la incorporación de 16 restos BPO. Además, el espectro de RMN-¹³C de este producto, obtenido a baja temperatura, indicaba la completa funcionalización de la molécula por desaparición de las pequeñas señales correspondientes a carbonos directamente unidos a los grupos aminos terminales sin sustituir.

Análisis por espectrometría de masas.

El análisis de espectroscopía de masas MALDI-TOF del dendrímero bencilpeniciloilado de segunda generación se llevó a cabo disolviendo la muestra en H_2O/CH_3CN (1:1) con 0.1% TFA, como en las ocasiones anteriores. Sin embargo, el empleo de la matriz THAP, no dio resultados y, fue el ácido sinapínico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico) el que resultó la matriz adecuada para este producto.

¹⁹² K. Aoi, K. Tsutsumiuchi, A. Yamamoto, M. Okada. *Tetrahedron* **1997**, 53, 15415-15427.

De esta manera, el espectro de masas MALDI-TOF mostró un primer grupo de señales en una zona comprendida entre 7500 y 8700 m/z , representado en la Figura 125. Entre ellas, el pico a $m/z = 8607$ podría corresponder al aducto $[M_{\text{COOH}} + H]^+$, es decir, al dendrímero funcionalizado deseado con los 16 residuos de BPO incorporados y protonado, en el que cada una de las unidades carboxílicas estarían protonadas en forma de ácido.

También aparece un segundo grupo de señales con menos intensidad en la zona comprendida entre 3850-4350 m/z , que podría corresponder a la fragmentación en dos del producto $G_2\text{BPO}_{16}$, o simplemente a la doble ionización de la molécula, $(M_{\text{COOH}} + 2H)^{2+}$ y por lo tanto la masa observada es $[M_{\text{COOH}} + 2H / 2z]$.

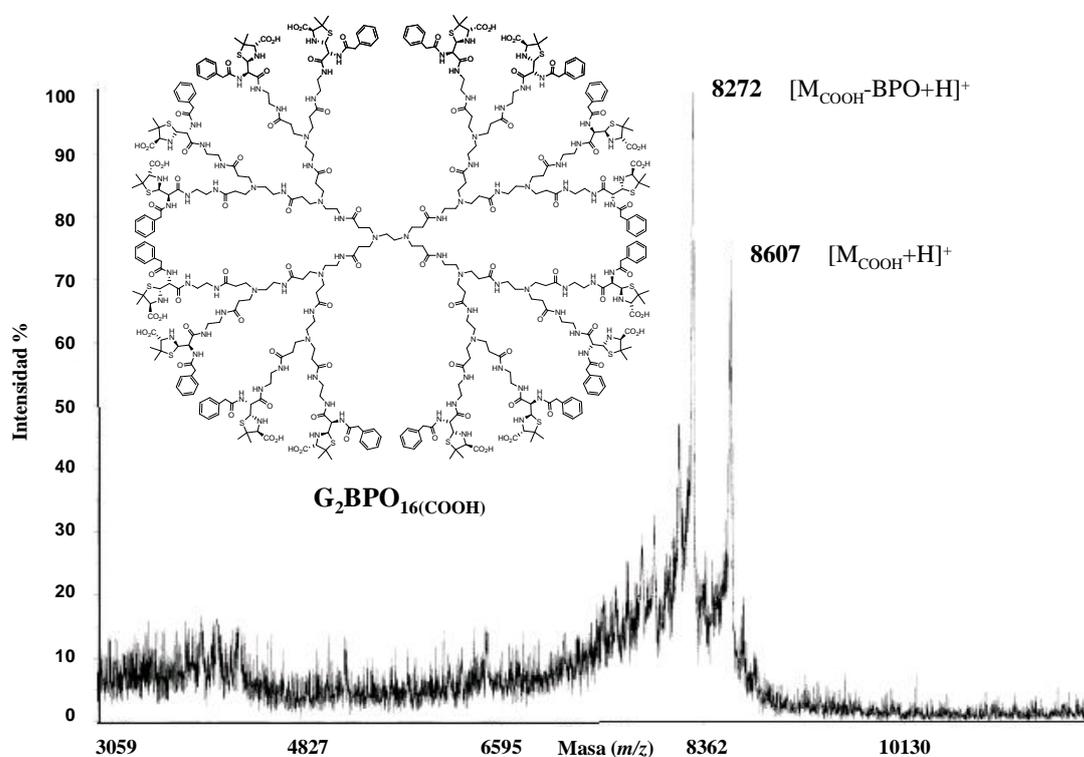


Figura 125. EM (MALDI-TOF) de $G_2\text{BPO}_{16}$.

1.1.4. Preparación de G_n BPO ($n = 3-6$): 104, 105, 106 y 107.

Teniendo en cuenta que la reacción del dendrímero de generación 2 con bencilpenicilina, pudo completarse gracias a la disminución de los efectos estéricos, los conjugados de las siguientes generaciones, que eran nuestro próximo objetivo, se obtuvieron también partiendo de dendrímeros PAMAM de generaciones 3, 4, 5 y 6, respectivamente, en condiciones de baja temperatura, aunque para estas generaciones se necesitaron mayores tiempos de reacción (Tabla 16).

En todos los casos la funcionalización de los dendrímeros se monitoriza extrayendo una alícuota de reacción, que se filtra por cromatografía de exclusión molecular, para eliminar las sales y la bencilpenicilina en exceso, con lo que se obtiene el conjugado disuelto en agua, que se concentra, para registrar los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C . Los espectros de RMN- ^{13}C son los que ofrecen una mayor información sobre la funcionalización de los grupos aminos terminales y, en función de sus resultados se establecen los tiempos de reacción.

(n)	Producto	Rendimiento	Temperatura	Tiempo de reacción
101	$G_0\text{BPO}_4$	73 %	20-23 °C	1 día
102	$G_1\text{BPO}_8$	70 %	20-23 °C	2 días
103	$G_2\text{BPO}_{16}$	80 %	4 °C	4 días
104	$G_3\text{BPO}_{32}$	70 %	4 °C	5 días
105	$G_4\text{BPO}_{64}$	82 %	4 °C	6 días
106	$G_5\text{BPO}_{128}$	67%	4 °C	7 días
107	$G_6\text{BPO}_{256}$	85 %	4 °C	8 días

Tabla 16. Datos de las reacciones para la obtención de los antígenos dendriméricos G_n BPO ($n = 0 - 6$).

Caracterización estructural (RMN).

Los datos espectroscópicos de todos estos antígenos dendriméricos se resumen en la Tabla 17, Tabla 18, y Tabla 19. Todos presentan espectros muy similares de RMN-¹H y ¹³C, que indican que se trata de estructuras altamente simétricas y, de naturaleza monodispersa. Por ejemplo, las señales de RMN-¹H correspondientes a las unidades de bencilpeniciloilo son representativas de esta monodispersidad (Tabla 17). Además, no aparecen señales pertenecientes a la β-lactama cerrada ni al bencilpeniciloato sódico, lo que indica que no existen especies encapsuladas en el interior de los dendrímeros.

Tipo de H		Ph	H-5	H-6	Ph-CH ₂ -	H-3	CH ₃	CH ₃
δ (ppm)		7.28	4.88	4.26	3.61	3.43	1.54	1.20
descripción		m	d (J = 8.5 Hz)	d (J = 8.5 Hz)	s	s	s	s
G₀BPO₄	N° de Hidrógenos	20 H	4 H	4 H	8 H	4 H	12 H	12 H
G₁BPO₈		40 H	8 H	8 H	16 H	8 H	24 H	24 H
G₂BPO₁₆		80 H	16 H	16 H	32 H	16 H	48 H	48 H
G₃BPO₃₂		160 H	32 H	32 H	64 H	32 H	96 H	96 H
G₄BPO₆₄		320 H	64 H	64 H	128 H	64 H	192 H	192 H
G₅BPO₁₂₈		640 H	128 H	128 H	256 H	128 H	384 H	384 H
G₆BPO₂₅₆		1280 H	256 H	256 H	512 H	256 H	768 H	768 H

Tabla 17. Datos de RMN-¹H correspondientes a los protones de los restos BPO en los productos G_nBPO.

En cuanto a los espectros de RMN-¹³C, éstos se registran para los conjugados de mayores generaciones a menor concentración, debido a su elevado peso molecular, por lo que necesitan mayores tiempos para la adquisición del experimento y, aún empleando largos tiempos de adquisición, no hay tanta seguridad de que puedan apreciarse las señales que nos indican la completa funcionalización.

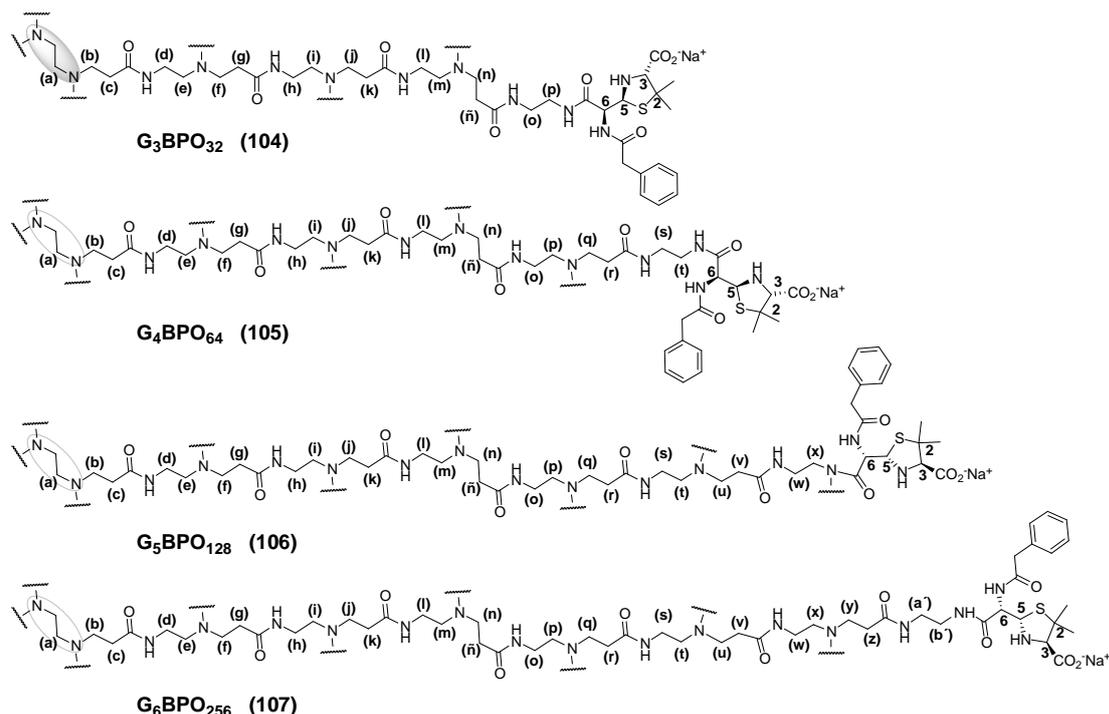


Figura 126. Representación de los distintos tipos de hidrógenos en los conjugados G_nBPO.

Tipo de H	Asignación / n° de H			
Rango de δ (ppm) / descripción	3.30-3.08 (m)	2.79-2.57 (m)	2.55-2.40 (m)	2.32-2.17 (m)
G₀BPO₄	d, e 16 H	b 8 H	a 4 H	c 8 H
G₁BPO₈	d, h, i 40 H	b, f 24 H	a, e 12 H	c, g 24 H
G₂BPO₁₆	d, h, l, m 88 H	b, f, j 56 H	a, e, i 28 H	c, g, k 56 H
G₃BPO₃₂	d, h, l, o, p 184 H	b, f, j, n 120 H	a, e, i, m 60 H	c, g, k, ñ 120 H
G₄BPO₆₄	d, h, l, o, s, t 376 H	b, f, j, n, q 248 H	a, e, i, m, p 124 H	c, g, k, ñ, r 148 H
G₅BPO₁₂₈	d, h, l, o, s, w, x 760 H	b, f, j, n, q, u 504 H	a, e, i, m, p, t 252 H	c, g, k, ñ, r, v 504 H
G₆BPO₂₅₆	d, h, l, o, s, w, a', b' 1528 H	b, f, j, n, q, u, y 1016 H	a, e, i, m, p, t, x 508 H	c, g, k, ñ, r, v, z 1016 H

Tabla 18. Datos de RMN-¹H correspondientes al esqueleto dendrímérico de G_nBPO.

Rango de δ (ppm)	Tipos de Carbono
176.0 - 173.5	CO-NH
173.0 - 171.0	C3-CO ₂ ⁻ Na ⁺
136.0 - 135.0	
130.2 - 129.5	
129.9 - 128.5	Aromáticos
127.6 - 128.3	
75.7 - 74.4	C-3
66.9 - 64.6	C-5
60.3 - 59.6	C-6
60.2 - 59.5	C-2
52.2 - 50.8	N-CH ₂ -CH ₂ -N
50.0 - 49.3	NHCO-CH ₂ -CH ₂ -N
43.0 - 42.4	Ph-CH ₂
39.6 - 38.5	CH ₂ -NH-CO
33.7 - 32.8	CH ₂ -CO-NH
28.3 - 26.6	(CH ₃) ₂ -C2

Tabla 19. Datos de RMN-¹³C de los productos G_nBPO (101-107).

Disposición tridimensional de estas macromoléculas (G_nBPO) en disolución acuosa.

Los ensayos con los antígenos dendríméricos se realizan en disolución acuosa, por lo que sería interesante conocer la disposición tridimensional que toman las unidades de BPO en la periferia del dendrímico.

Para ello se realizó experimentos de RMN-NOESY del conjugado G₂BPO₁₆, para demostrar la localización de estos grupos en la periferia del dendrímico. Los efectos NOE, representados en la Figura 127, indican que la estereoquímica de las unidades de bencilpeniciloilo es la misma que de la bencilpenicilina original, tal y como ocurre en el producto **6**, y apuntan a que estas unidades dirigen los anillos de tiazolidina hacia el exterior con sus grupos carboxilos hacia fuera, mientras que el resto de bencilpeniciloilo se encuentra situado en un medio más apolar entre las ramas del dendrímico. Los

protones H-3 y CH₃(β) son los únicos de las unidades de BPO que no tienen ningún efecto NOE con los protones de (l) y (m) del esqueleto dendrímérico.

De esta manera, estos compuestos en disolución acuosa se comportan como estructuras micelares que tienen un núcleo de carácter más hidrofóbico, donde se sitúa la cadena lateral de la bencilpenicilina, que están aisladas del medio acuoso externo por segmentos hidrofílicos cargados negativamente en la periferia, correspondientes a la porción del anillo de dihidrotiazina.

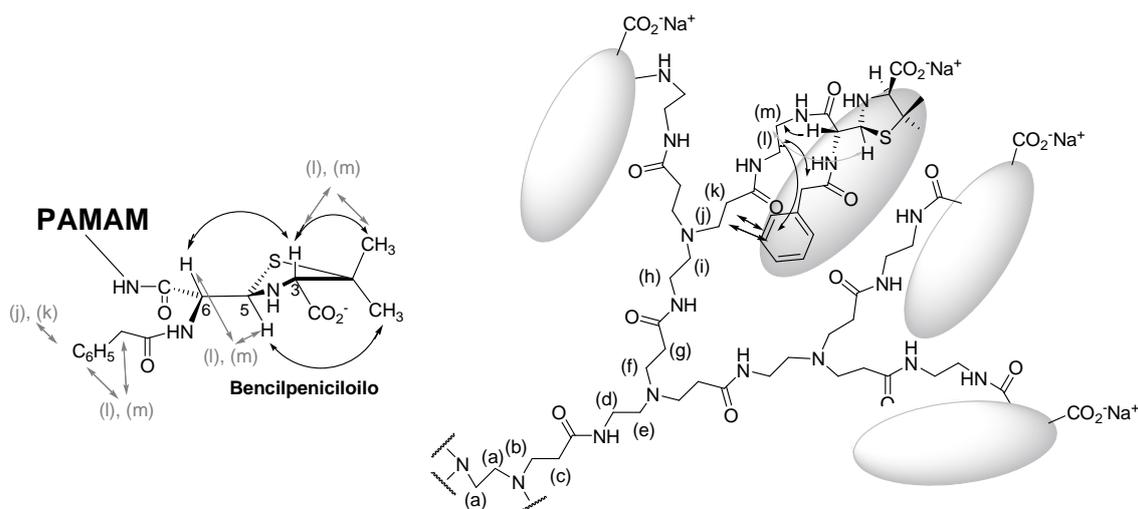


Figura 127. Representación de los efectos NOE de G₂BPO₁₆ y ampliación de una unidad de BPO.

Análisis por espectrometría de masas.

Aunque hayamos confirmado las estructuras químicas exactas por EM (MALDI-TOF) de los antígenos sintéticos de las 3 primeras generaciones ($n = 0, 1$ y 2), aún no se han obtenido los espectros de masas de los conjugados de generaciones mayores, probablemente debido a la complejidad de estas grandes estructuras moleculares.

Sin embargo, la electroforesis en gel y la RMN-¹³C nos ha permitido aproximarnos a la pureza de los dendrímeros de generaciones mayores. La ausencia de señales correspondientes a carbonos directamente unidos a aminas primarias nos indica cierto grado de pureza.

Electroforesis

En la ciencia de dendrímeros la electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida (PAGE) se emplea para analizar la pureza y la homogeneidad de los dendrímeros, para estimar pesos moleculares de materiales similares, o para medir la interacción o complejación entre dendrímeros y otros biopolímeros, como el ADN.¹⁴⁴ Por ello adicionalmente, se ha empleado la electroforesis en gel de poliacrilamida como una técnica de análisis de pureza para los conjugados obtenidos de bencilpenicilina.

En nuestros antígenos dendríméricos H-P, el paso de una generación a otra mayor implica doblar el número de grupos terminales y doblar aproximadamente la masa. Como resultado, los conjugados G_n BPO de diferentes generaciones presentan aproximadamente la misma densidad de carga (relación q/r) asumiendo que todos los grupos bencilpeniciloilos terminales llevan una carga negativa. Por tanto, eliminando la influencia de la densidad de carga, la electroforesis en gel puede emplearse para analizar los pesos moleculares de esta serie de macromoléculas conjugadas H-P.

En la Figura 128 se muestra el electroforetograma de los antígenos sintéticos G_n BPO ($n = 0 - 6$) en un gel homogéneo 15% T, con polaridad normal.¹⁹³

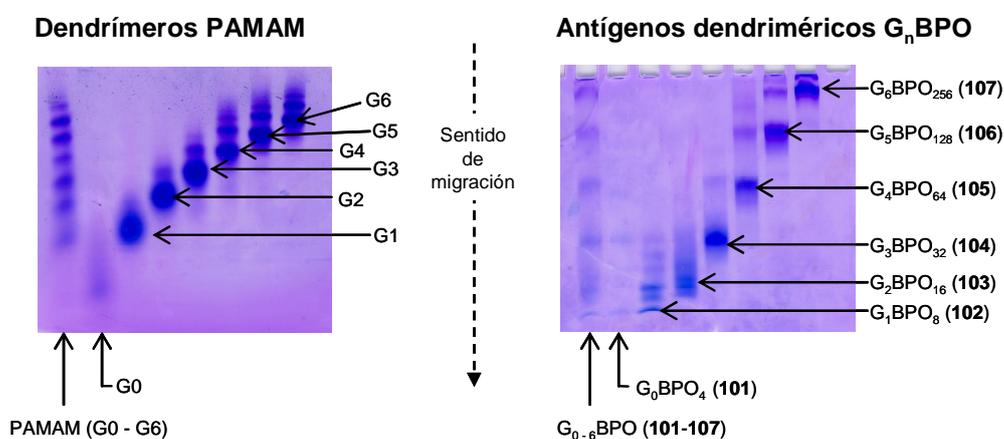


Figura 128. PAGE de dendrímeros PAMAM y de los antígenos sintéticos. Se puede comparar la migración de todos los analitos juntos, que están a la izquierda.

¹⁹³ Los análisis por electroforesis fueron realizados en los laboratorios de Dendritic Nanotechnologies, Inc. en Central Michigan University bajo la dirección del Prof. Donald A. Tomalia.

Esta técnica se llevó a cabo utilizando gel con distintas proporciones de poliacrilamida, pero resultó más adecuado un contenido de un 15% de acrilamida en un gel homogéneo y, un tampón cuyo pH permite a los grupos carboxilos estar en forma aniónica. Los resultados muestran que, las generaciones más bajas, de tamaño más pequeño, migran claramente mas lejos que sus congéneres de mayor tamaño. De hecho, el conjugado de generación 0 se sale del gel (Figura 128).

Además, pueden observarse que hay algunas impurezas de mayor y, en menor medida, de menor peso molecular en cada una de las generaciones. Así que procedimos a comparar estos resultados con la electroforesis en gel de los productos de partida, dendrímeros PAMAM (utilizando un gel heterogéneo 4-20% T, con polaridad reversa).

En la Figura 128 se muestra los datos de PAGE de los dendrímeros PAMAM de partida de las 7 generaciones, en un tampón que deja los grupos aminos terminales protonados, permitiendo que las partículas cargadas positivamente se muevan hacia el cátodo en el gel de polaridad reversa.

Puede observarse que las muestras de los dendrímeros de partida de cada generación están acompañados por sus precursores (G - 1) y sus próximas generaciones (G + 1) en el electroforetograma, procedentes de su proceso sintético.

De este modo se podría concluir que las impurezas presentes en los dendrímeros conjugados tienen su origen en los productos de partida.

También la electroforesis capilar (CE) ofrece características análogas a la electroforesis en gel y, ha demostrado un gran potencial en el análisis de polímeros dendriméricos.

Mediante la electroforesis capilar los diferentes conjugados pudieron ser separados en función de la generación. Así la electroforesis capilar de los dendrímeros de partida se realizó utilizando una disolución tampón a pH ácido, para asegurar la protonación de los grupos aminos. Sin embargo, para los dendrímeros conjugados, el empleo de una disolución tampón a pH básico, resultó ser más adecuado, pues en estas condiciones los grupos carboxilos de las unidades de bencilpeniciloilo se encuentran desprotonadas.

Los resultados para los dendrímeros conjugados con bencilpeniciloilo mostraron una pureza del 80-88% para G_3BPO_{32} y G_4BPO_{64} ; y del 98% para los conjugados de generación 5 y 6.

1.1.5. Ensayos de inhibición del RAST de los antígenos dendriméricos 101-107.

La capacidad de los diferentes antígenos sintéticos de ser reconocidos por anticuerpos IgE específicos a bencilpenicilina, fue determinada mediante estudios de inhibición del RAST, empleando sueros de pacientes alérgicos a penicilinas. Estos sueros tienen diferentes niveles de anticuerpos IgE específicos (que van del 7 al 13%), determinados anteriormente por RAST.⁴⁹

Los estudios de inhibición del RAST se llevaron a cabo empleando en la fase sólida conjugados de BPO-PLL,⁴⁹ mientras que en la fase fluida, el suero de los pacientes se incubaba con los diferentes antígenos dendriméricos **101-107**, como inhibidores, a 3 concentraciones.

De esta manera, pudo comprobarse que con estos antígenos dendriméricos ocurre inhibición, por lo que se confirma que estos dendrímeros funcionalizados son reconocidos por anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a penicilinas.

Cuando se comparan los resultados obtenidos con los diferentes conjugados usando el mismo número de equivalentes de BPO, no se encontraron grandes diferencias entre las inhibiciones del monómero de butilamina (**6**) y las de los demás antígenos sintéticos (**101-107**). Además, los 3 sueros mostraron la misma tendencia. Esto significa que aproximadamente se obtiene la misma inhibición empleando 1 mol de G₃BPO₃₂ que 8 moles de G₀BPO₄.

Sin embargo, al representar en la Figura 129 las curvas de inhibición, comparando los resultados en términos de concentraciones de antígenos dendriméricos, pueden observarse claras diferencias en la capacidad de los diferentes dendrímeros y el conjugado de butilamina (**6**) en su reconocimiento por anticuerpos IgE específicos. Para cada uno de los dendrímeros existe inhibición, al menos en la concentración más alta de inhibidor, y el máximo de inhibición se produjo entre las generaciones 2, 3 y 4.

Esto indica que para obtener una inhibición igual a la del antígeno sintético G₂BPO₁₆ se necesita una concentración aproximadamente unas 100 veces mayor de **6**. Aunque no se

observan diferencias muy claras, si puede distinguirse una correlación directa entre el peso molecular del antígeno sintético y su capacidad para ser reconocido por IgE: para obtener un determinado rango de porcentaje de inhibición del RAST, se necesitan concentraciones menores de los antígenos de generaciones mayores.

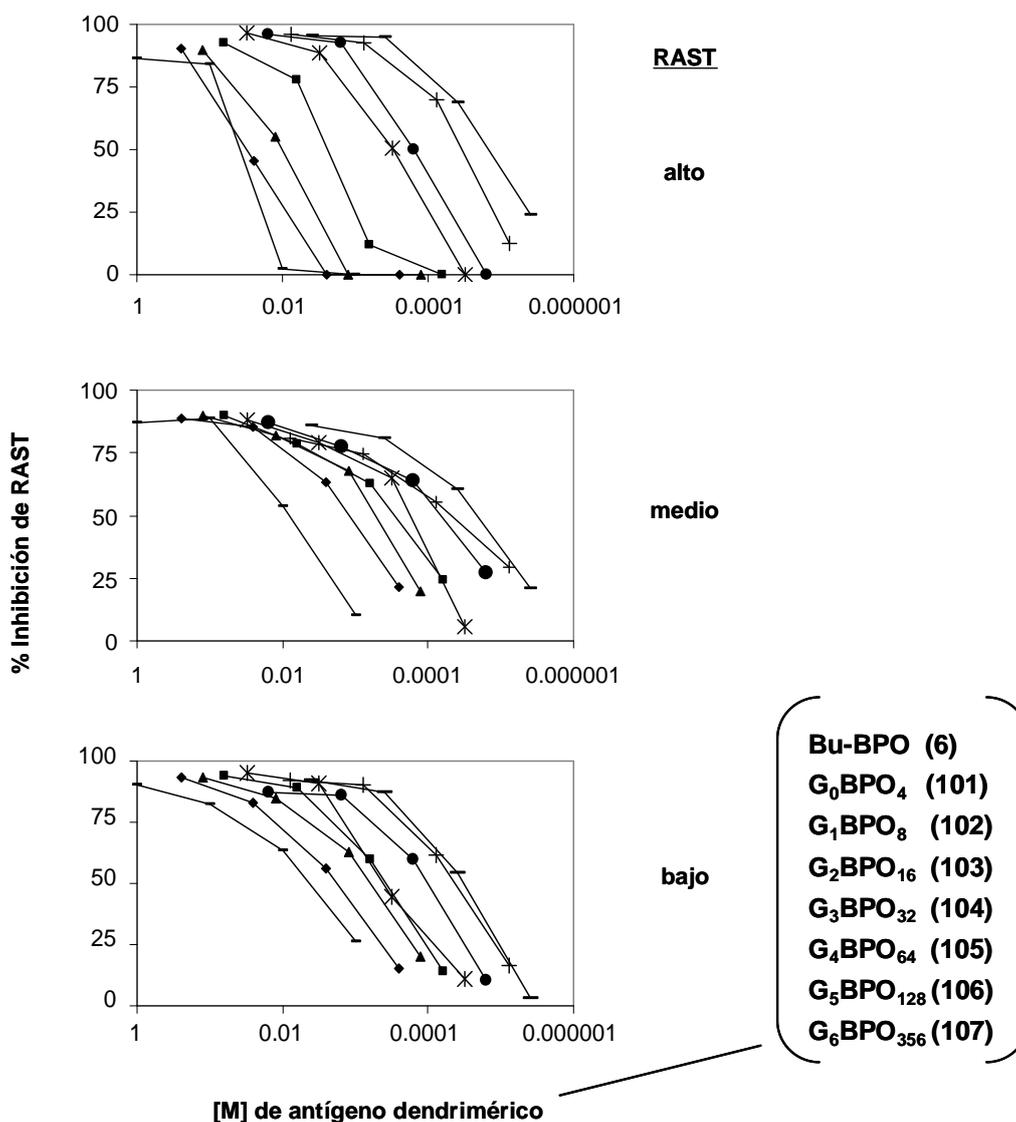


Figura 129. Ensayos de inhibición del RAST, empleando: 3 sueros con diferentes niveles de RAST, discos de PLL-BPO como fase sólida y, los antígenos sintéticos (101-107) y el monómero 6 como inhibidores en la fase fluida.

Estos datos iniciales demuestran que estos conjugados sintetizados con dendrímeros son reconocidos por IgE de pacientes alérgicos a betalactámicos y que emulan a conjugados con proteínas actuando como moléculas transportadoras. Como consecuencia estos

compuestos, cuya estructura química puede ser bien caracterizada, se consideran como buenos candidatos para su uso en el desarrollo de test *in vitro* o *in vivo* para el diagnóstico de alergia a betalactámicos.

1.2. Obtención de antígenos dendríméricos de amoxicilina.

La síntesis de los conjugados amoxiciloilo-dendrímico PAMAM (G_n AXO), cuyas estructuras están representadas en la Figura 128, se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento empleado para la obtención de los conjugados G_n BPO, empleando exceso de amoxicilina en tampón carbonato acuoso a 4°C y, en este caso, y como una primera aproximación, sólo algunas generaciones de Starbust® PAMAM. Del mismo modo, todos los productos se purificaron por cromatografía de exclusión molecular, empleando Sephadex G10.

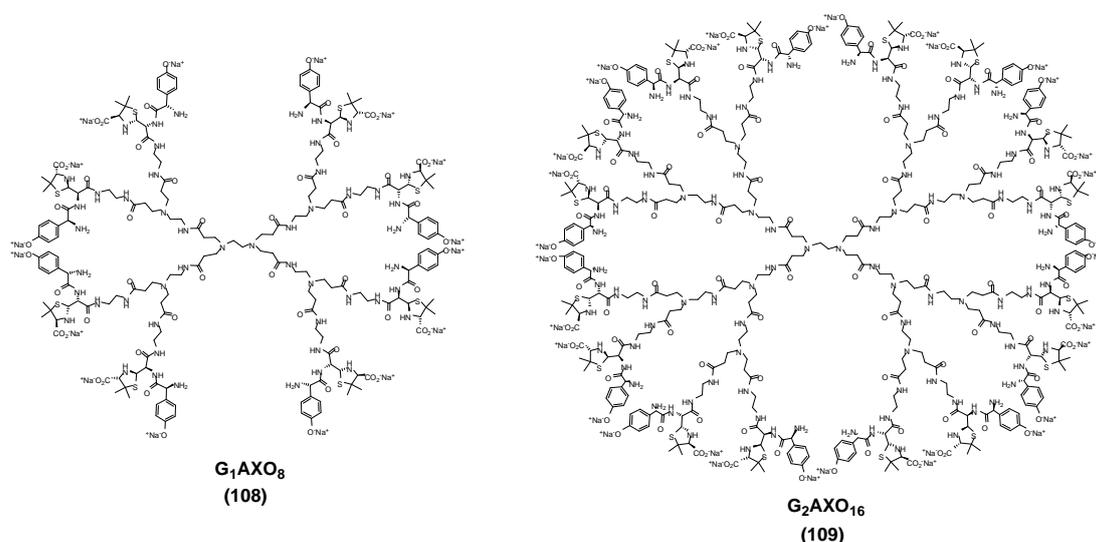


Figura 130. Antígenos sintéticos de 2 generaciones: dendrímeros G_n AXO ($n = 1-2$).

Las reacción se realizó primero con un dendrímico de generación baja, PAMAM-G1, para comprobar que la reacción daba el producto deseado y, posteriormente, con una generación más alta, G2.

De este modo, empleando un procedimiento similar al utilizado para la obtención de **101-107**, se obtuvieron sólidos cristalinos correspondientes a los conjugados dendriméricos **108** y **109**, mostrados en la Tabla 20.

Antígenos Sintéticos: PAMAM G _n AXO					
G	Nº de grupos AXO	Producto (n)	Fórmula Molecular Calculada	Peso Molecular Calculado	Rendimiento de reacción
1	8	G ₁ AXO ₈ 108	C ₁₉₀ H ₂₆₄ N ₅₀ O ₅₂ Na ₁₆ S ₈	4705	74%
2	16	G ₂ AXO ₁₆ 109	C ₃₉₈ H ₅₆₀ N ₁₀₆ O ₁₀₈ Na ₃₂ S ₁₆	9806	83%

Tabla 20.

Caracterización estructural (RMN).

El análisis de estos productos por RMN-¹H, en D₂O a pH básico, mostró el desapantallamiento de las resonancias de los protones de los metilenos directamente unidos a los grupos aminos terminales, de 2.70 ppm a 3.28 ppm, lo que indica la funcionalización de los grupos aminos de la superficie. Además, las resonancias de los dos protones β-lactámicos, H-5 y H-6, de la amoxicilina (**4**) muestran la apertura del anillo, así como el resto de las señales correspondientes a las unidades de amoxiciloilo presentan desplazamientos químicos muy similares a las de este sustituyente en el producto **7**. En la Figura 132 se muestra el espectro de RMN-¹H del conjugado dendrimérico de generación 2.

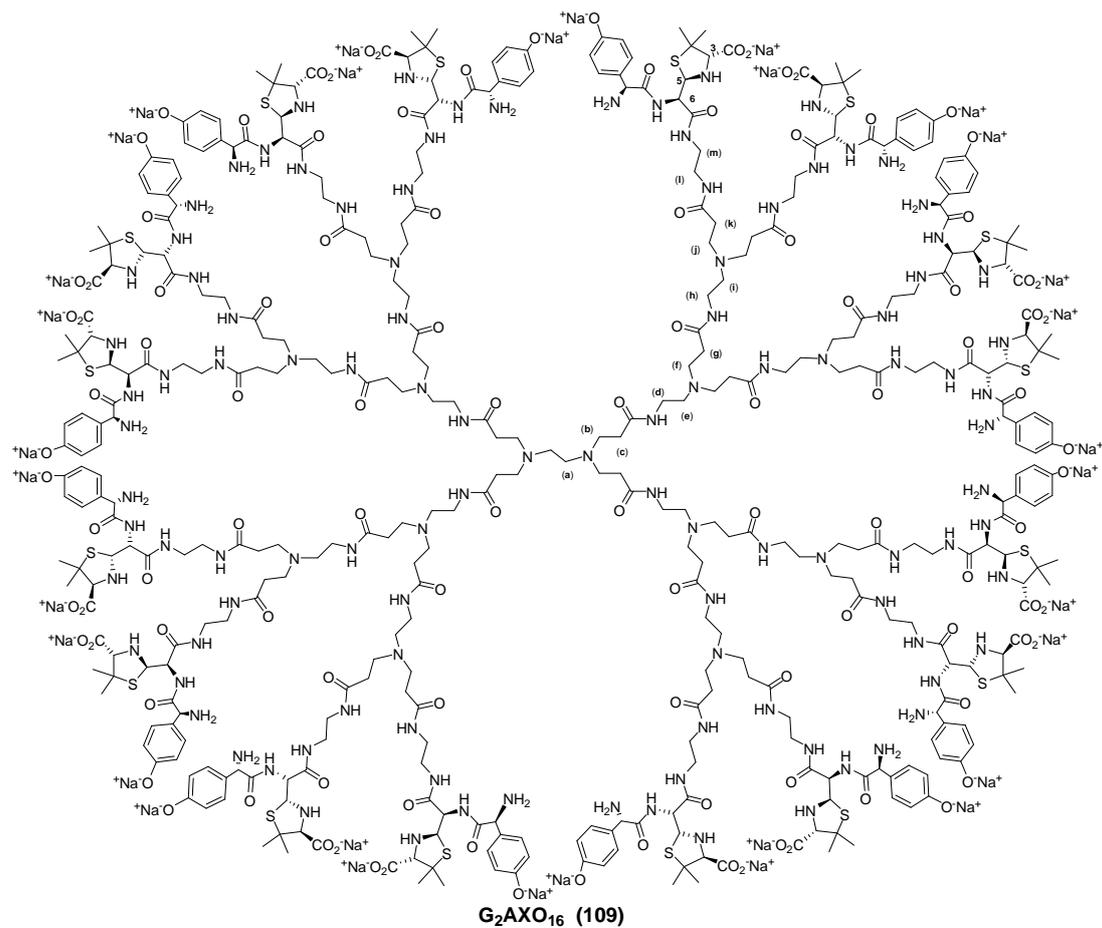
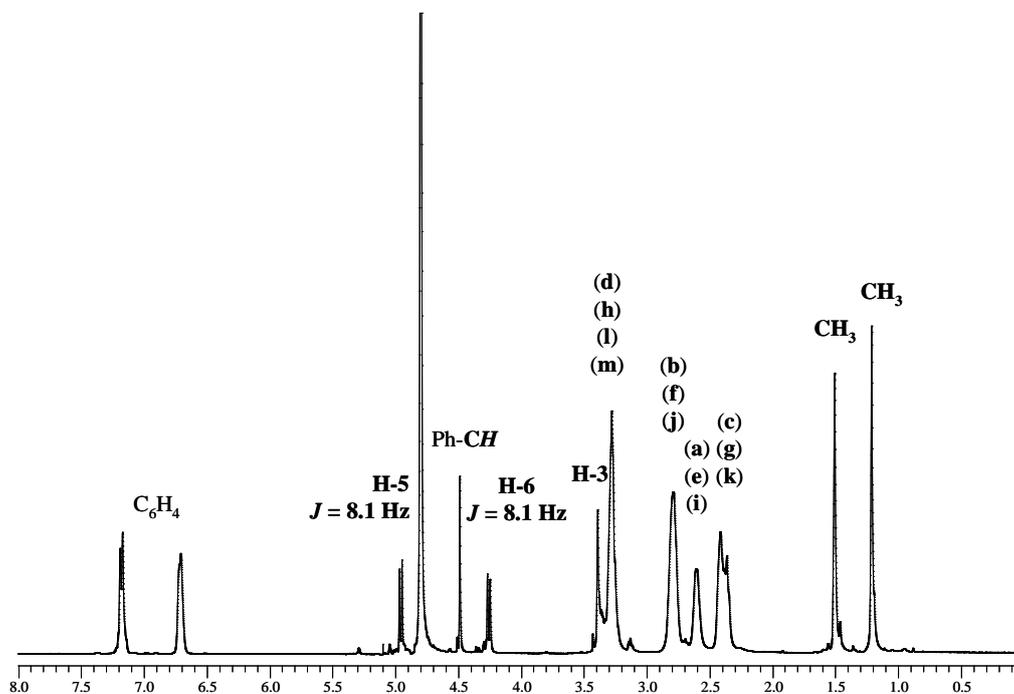


Figura 131. Estructura del conjugado G₂AXO₁₆.



Además los espectros de RMN- ^{13}C mostraron señales similares a las del producto **7**, correspondientes a los restos de amoxiciloilo y, la ausencia de las señales correspondientes a los carbonos de los metilenos unidos a los grupos aminos terminales libres del dendrímero parecen indicar la completa funcionalización de los grupos periféricos.

Con respecto al análisis por espectroscopía de masas, aún no se han obtenido los espectros de masas de estos conjugados.

Disposición tridimensional de estas macromoléculas (GnAXO) en disolución acuosa.

Se realizó el experimento NOESY de G_1AXO_8 (**108**) para averiguar la disposición tridimensional de las unidades de determinante antigénico AXO en el conjugado dendrímérico, cuando éste se encuentra disuelto en medio acuoso.

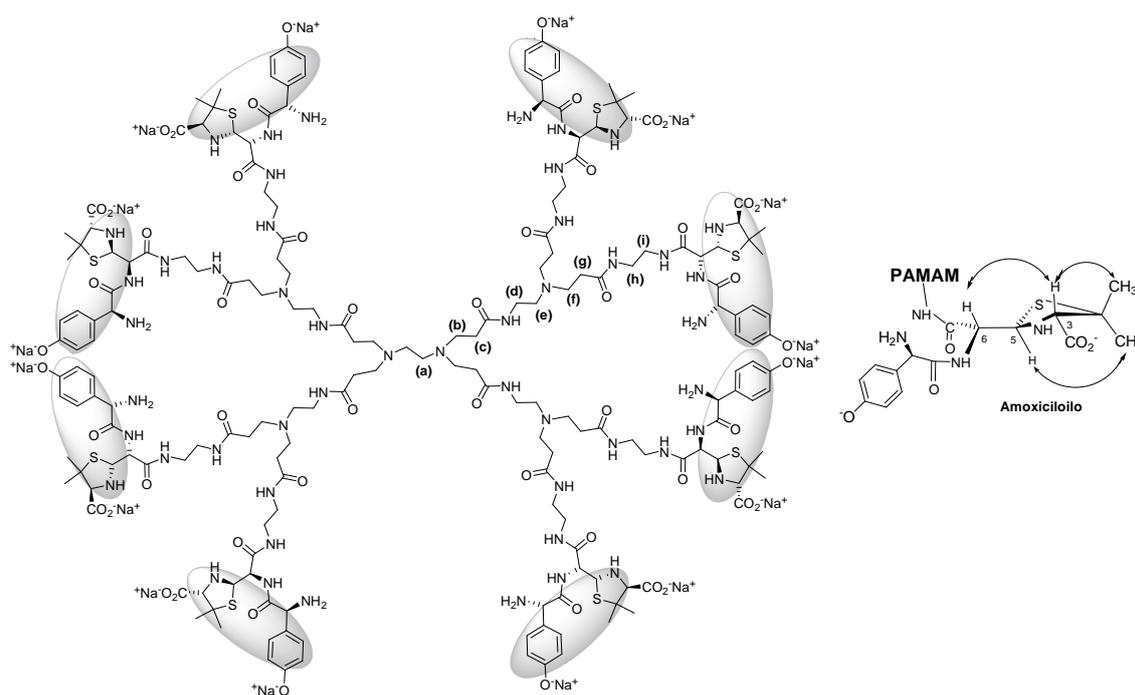


Figura 133. Representación de la orientación de los determinantes antigénicos AXO en el conjugado sintético G_1AXO_8 , y efectos NOE observados en las unidades AXO.

Los efectos NOE más intensos indican que la estereoquímica de los restos de AXO es la que deriva de la amoxicilina original, con configuración (*5R*, *6R*). Además, en este caso, al contrario que en el conjugado de BPO **103**, no se observa efecto NOE significativo

entre los protones correspondientes a los metilenos de las cadenas del dendrímtero y los correspondientes a los restos de amoxiciloilo, lo que indica que las unidades de amoxiciloilo están dispuestas en la superficie, como se muestra en la Figura 133 dirigiendo sus grupos cargados fenolato y carboxilato hacia el exterior del esqueleto dendrímérico, evitando así permanecer en un entorno más hidrofóbico.

1.3. Primera aproximación a la obtención de antígenos dendríméricos mixtos.

Hemos realizado unas primeras aproximaciones a la preparación de dendrímteros de 2^a, 3^a y 4^a generación funcionalizados con dos penicilinas diferentes (**1** y **4**), con el objetivo de obtener derivados mixtos de bencilpeniciloilo y amoxiciloilo, empleando de igual modo, las condiciones descritas anteriormente (4°C y tampón acuoso básico).

Estas reacciones se han llevado a cabo empleando diferentes proporciones de las dos penicilinas para comparar el grado de funcionalización de los grupos terminales del dendrímtero por cada uno de ellos y, también conocer la cinética de reacción de cada uno. En estos primeros estudios nos basamos principalmente en los espectros de RMN-¹H para cuantificar el número de unidades de BPO y AXO por unidad de dendrímtero (Figura 134).

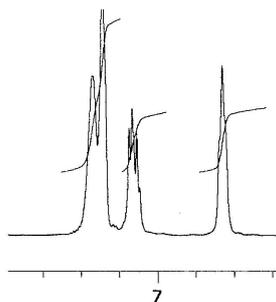


Figura 134. Zona del espectro de RMN-¹H correspondiente a los protones aromáticos de un antígeno dendrímérico mixto.

Así por ejemplo, con el dendrímtero PAMAM de generación 2, la reacción se realizó empleando exceso de bencilpenicilina y amoxicilina, ambas en la misma proporción (Tabla 14). Las integrales de las señales correspondientes a los protones aromáticos de los espectros de RMN-¹H nos sirvieron para calcular la cantidad de restos de AXO y de

BPO conjugados en la superficie dendrímica. De esta manera se calcula que por equivalente de dendrímtero hay 8.5 unidades de BPO y 7.5 unidades de AXO. En la Figura 135 se representa una aproximación a la estructura de este conjugado, aunque los diferentes determinantes antigénicos aparecerían distribuidos al azar.

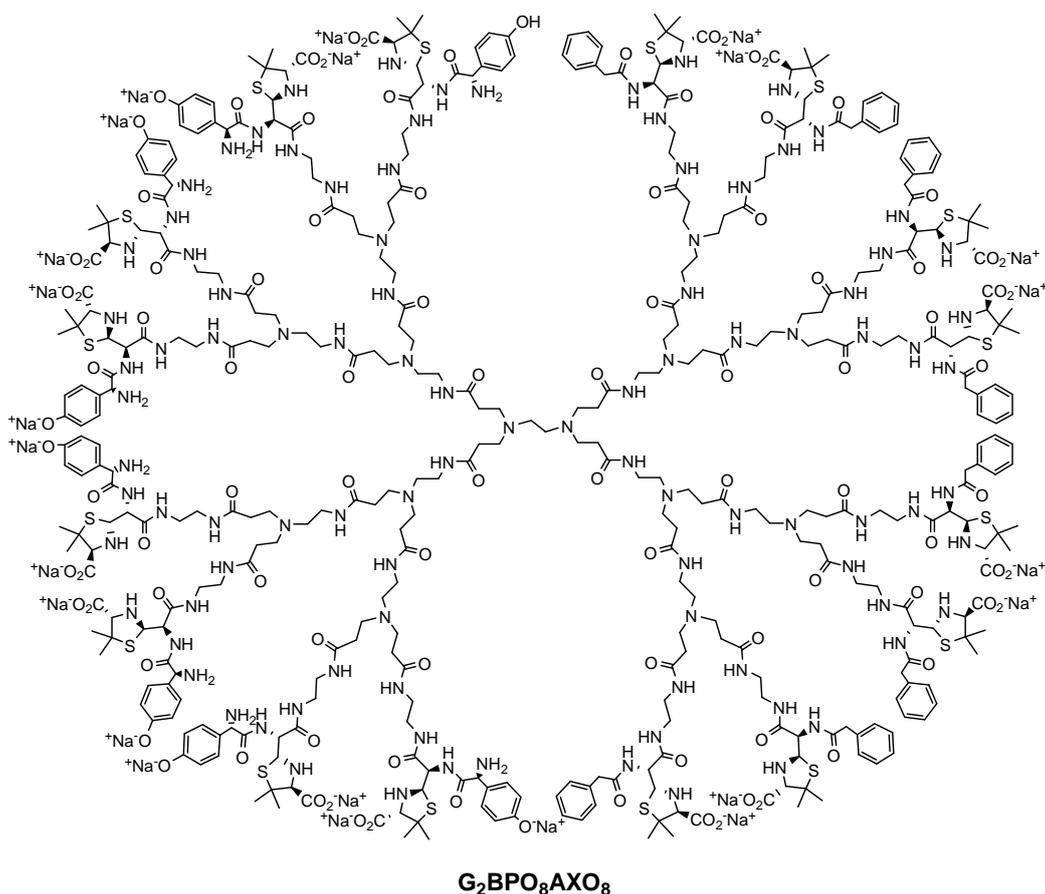


Figura 135. Dendrímtero mixto de generación 2.

También se han realizado las primeras conjugaciones para los dendrímteros de generación 3 y 4 con distintas proporciones de las penicilinas, descritas en la Tabla 21. Algunas de las reacciones nos ofrecen resultados diferentes en cada caso y aquí se han representado sólo los primeros resultados, aunque aun quedan por optimizar adecuadamente las condiciones de reacción. La electroforesis en gel de los compuestos obtenidos se representa en la Figura 136.

PAMAM generación	Bencilpenicilina (equivalentes)	Amoxicilina (equivalentes)	Producto de reacción	Rendimiento
2	1	1	G ₂ BPO ₈ AXO ₈	80%
3	1	1.5	G ₃ BPO ₁₃ AXO ₁₉	72%
3	1	1	G ₃ BPO ₁₆ AXO ₁₆	69%
3	1.5	1	G ₃ BPO ₁₅ AXO ₁₇	75%
4	1	1.5	G ₄ BPO ₃₈ AXO ₂₆	65%
4	1	1	G ₄ BPO ₃₃ AXO ₃₁	72%
4	1.5	1	G ₄ BPO ₃₂ AXO ₃₂	68%
4	1	1.5	G ₄ BPO ₄₁ AXO ₂₃	79%
4	1	1	G ₄ BPO ₃₃ AXO ₃₁	60%
4	1.5	1	G ₄ BPO ₂₉ AXO ₃₅	90%

Tabla 21. Equivalentes empleados de penicilinas por cada equivalente de dendrímero PAMAM utilizado para la obtención de antígenos sintéticos mixtos, y rendimiento de reacción.

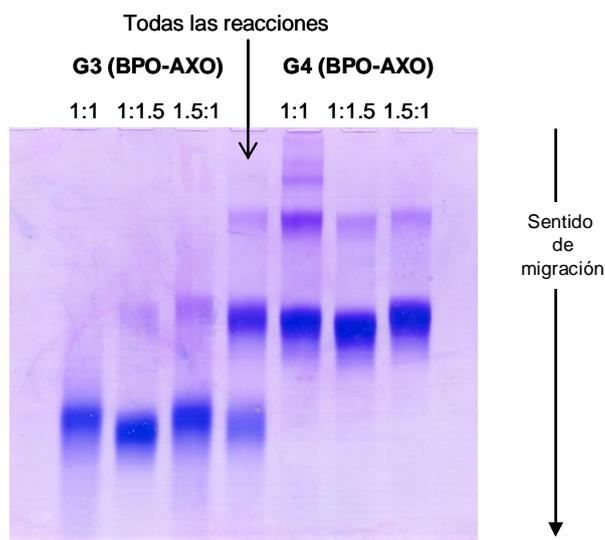


Figura 136. PAGE de los antígenos mixtos de 3^a y 4^a generación.

II-2. Antígenos dendriméricos sintéticos acoplados a fase sólida. (Obtención de un test in vitro mediante RAST).

Tras conocer que los antígenos dendriméricos sintéticos G_nBPO (n = 0-6) dieron buenos resultados en los ensayos de inhibición del RAST, el siguiente paso que nos propusimos llevar a cabo fue soportar estos conjugados sobre fase sólida (Figura 137), para poder realizar con ellos ensayos de RAST.

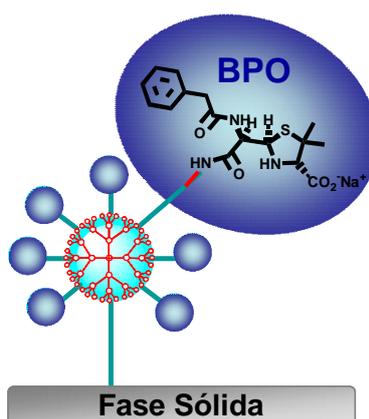


Figura 137

Para ello, desarrollamos 4 métodos apropiados que consisten en diferentes funcionalizaciones de la fase sólida, para acoplar sobre ésta los dendrímeros PAMAM con unidades de BPO en su periferia.

Empleamos discos de celulosa (de 6 mm de diámetro) como fase sólida, que se preparan fácilmente a partir de papel Whatman 54. Este soporte tiene la ventaja de ser económico, fácil de manipular, compatible con la conjugación a dendrímeros PAMAM y con los medios fisiológicos empleados en los ensayos biológicos.¹⁹⁴

¹⁹⁴ R. Frank. *J. Immunol. Method.* **2002**, 267, 13-26

2.1. Antígenos dendriméricos acoplados a fase sólida: Tipo A.

El primer procedimiento que empleamos para obtener estos antígenos soportados sobre la fase sólida se basó en la derivatización de la celulosa con bromuro de cianógeno.¹⁹⁵ Este método lleva siendo, durante mucho tiempo, uno de los procedimientos de activación de soportes sólidos más empleados. Las superficies activadas mediante este procedimiento tienen actualmente un amplio rango de aplicaciones.¹⁹⁶

El empleo del método de bromuro de cianógeno nos permitirá comparar los resultados de los nuevos discos obtenidos (con PAMAM) con los discos empleados tradicionalmente (con PLL o HSA) para diagnóstico de alergias a penicilinas.^{56,126}

2.1.1. Obtención

El procedimiento tipo A para la obtención de antígenos dendriméricos acoplados a fase sólida implica las siguientes etapas, representadas en la Figura 138:

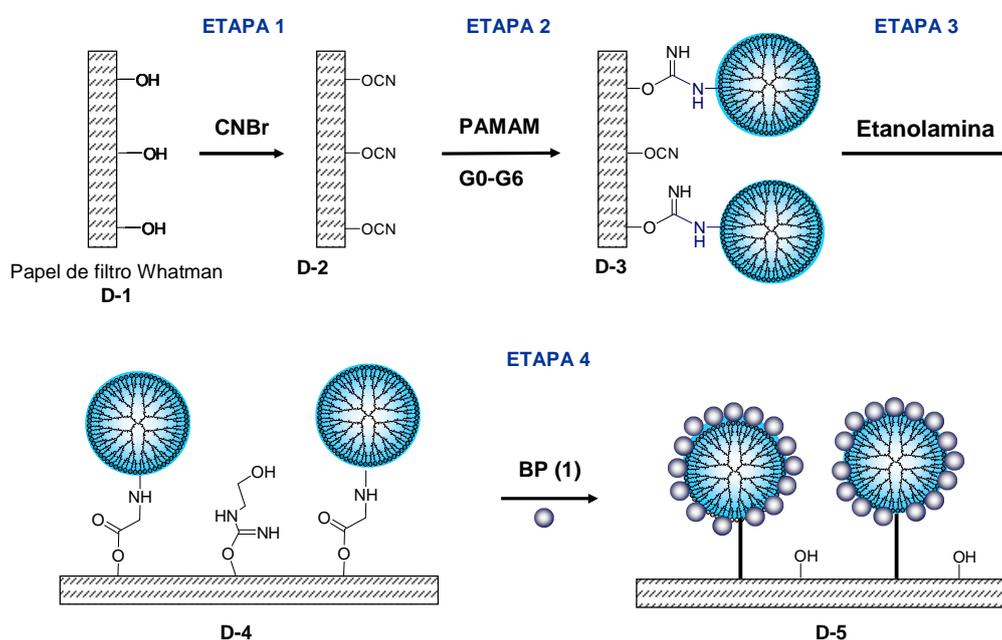


Figura 138. Preparación de antígenos dendriméricos soportados sobre discos de celulosa: Método A.

¹⁹⁵ R. G. Edwards, D. A. Spackman, J. M. Dewdney. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1982**, 68, 352-357.

¹⁹⁶ H. P. Jennissen. *J. Mol. Recogn.* **1995**, 8, 116-124.

ETAPA 1. Activación de los grupos hidroxilos del soporte sólido por reacción con bromuro de cianógeno. La reacción de los discos de celulosa **D-1** (papel de filtro Whatman 54) con bromuro de cianógeno, consiste en una sustitución nucleofílica de los grupos hidroxilos de la celulosa al grupo nitrilo, en la que los grupos hidroxilos se activan formando ésteres de cianato, dando lugar a los discos **D-2**.

ETAPA 2. Reacción de acoplamiento de los dendrímeros PAMAM. La fijación de los dendrímeros (G0 a G6) a la fase sólida **D-2**, se lleva a cabo por formación de enlace covalente a partir de la reacción de ataque nucleofílico de los grupos aminos del dendrímero sobre los ésteres de cianato, resultando en la formación de derivados de isourea en la fase sólida **D-3**.

ETAPA 3. Bloqueo de los grupos hidroxilos activados que no han reaccionado en la etapa 2 con los grupos aminos del dendrímero. Con este fin se emplea como reactivo etanolamina, cuyos grupos aminos reaccionan con los grupos cianatos. De esta manera, cada unidad de cianato que queda en la fase sólida **D-3** pasa a presentar un grupo alcohol primario en la fase sólida **D-4**, recuperando así el carácter hidrofílico del disco de celulosa.

ETAPA 4. Conjugación mediante enlace covalente de bencilpenicilina a dendrímeros PAMAM. Finalmente, este acoplamiento tiene lugar por ataque nucleofílico de los grupos aminos terminales del dendrímero al carbono carbonílico del anillo β -lactámico. Esta reacción se lleva a cabo en las mismas condiciones en las que se preparan los antígenos sintéticos en disolución: en tampón carbonato acuoso para asegurar que los grupos aminos estén desprotonados, empleando exceso de bencilpenicilina y a 4°C.

2.1.2. Caracterización

La caracterización de la fase sólida obtenida se lleva a cabo mediante el empleo de un método para la cuantificación de los grupos aminos que hay en cada disco, de modo que puede calcularse, de manera indirecta, el número de moléculas de dendrímero acopladas a la superficie. Esto nos permitirá obtener una primera aproximación de la densidad de antígenos sintéticos por unidad de área o por unidad de masa.

La determinación de los grupos aminos presentes en la fase sólida se lleva a cabo por reacción con ninhidrina. Sólo las moléculas con grupos aminos primarios o amoniaco pueden reaccionar con dos moléculas de ninhidrina para formar el compuesto de Ruhemann de color púrpura (Figura 139). El paso determinante de esta reacción implica el desplazamiento nucleofílico de un grupo hidroxilo de la ninhidrina por un grupo amino primario no protonado. De este modo, la reacción de ninhidrina con los grupos aminos primarios da lugar a este compuesto de color púrpura, y la medida de la absorbancia a la longitud de onda adecuada indica la cantidad de grupos aminos. Este método de detección y determinación de aminos primarios se emplea frecuentemente en bioquímica y en otras técnicas analíticas.¹⁹⁷

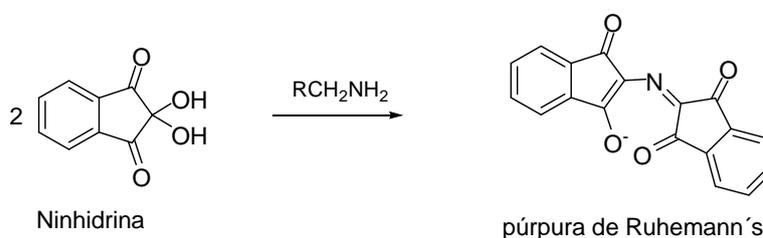


Figura 139. Reacción de ninhidrina con grupos aminos primarios.

De esta manera, se determinaron los moles de los grupos aminos en discos funcionalizados **D-3** con cada generación de dendrímeros PAMAM. En la Figura 140 se representa el espectro de absorbancia que corresponde a un disco **D-3** (acoplado a PAMAM-G3) y al blanco o referencia **D-2**.

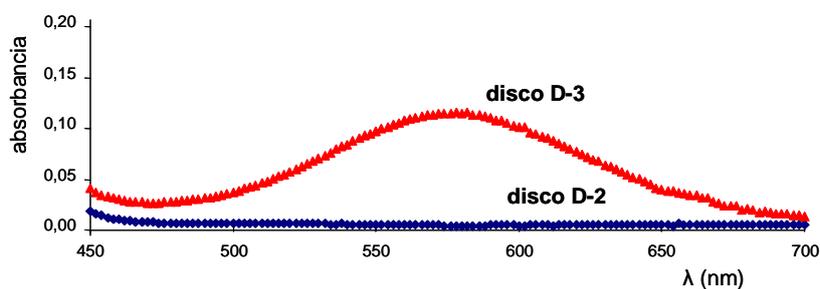


Figura 140. Espectro de absorbancia de UV/Vis de la disolución en que se lleva a cabo la reacción con ninhidrina de: la fase sólida acoplada con dendrímero PAMAM-G3 (**D-3**) y, del soporte activado sólo con BrCN (**D-2**), empleándose esta última como blanco. La absorbancia a 570 nm indica la cantidad de aminos presentes en la fase sólida.

¹⁹⁷ M. Friedman. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 385-406.

Se repitieron estas medidas para 15 discos de cada generación, con el objetivo de poder estudiar la reproducibilidad de las fases sólidas obtenidas **D-3** y, pudo observarse que los resultados obtenidos eran muy similares dentro de la misma generación.

Además, la determinación de los grupos aminos de las fases sólidas **D-5**, nos ofrece información de la cantidad de grupos aminos de los dendrímeros PAMAM que se han funcionalizado con bencilpeniciloilo. Por ejemplo, en la Figura 141 se representan los nanomoles de aminos presentes en cada disco con superficies tipo **D-3** (con PAMAM-G2) y con superficies tipo **D-5**. En ella, puede observarse que los datos obtenidos son reproducibles y, además, podemos calcular el porcentaje de funcionalización de los grupos aminos, de los dendrímeros acoplados a los discos de celulosa, con penicilina.

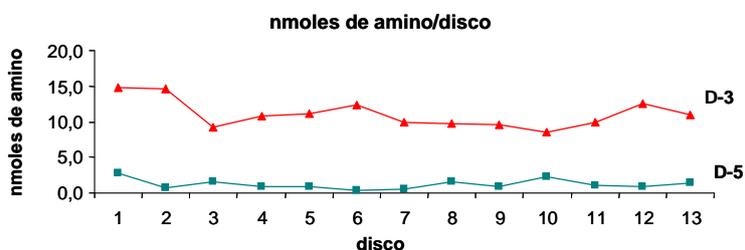


Figura 141. Datos calculados para 13 discos tipo **D-3** y **D-5** funcionalizado con PAMAM G-2.

El promedio de los datos obtenidos para las superficies **D-3** de cada generación se representa en la Figura 142, en función del número de moles de aminos y del número de moles de dendrímeros por unidad de masa.

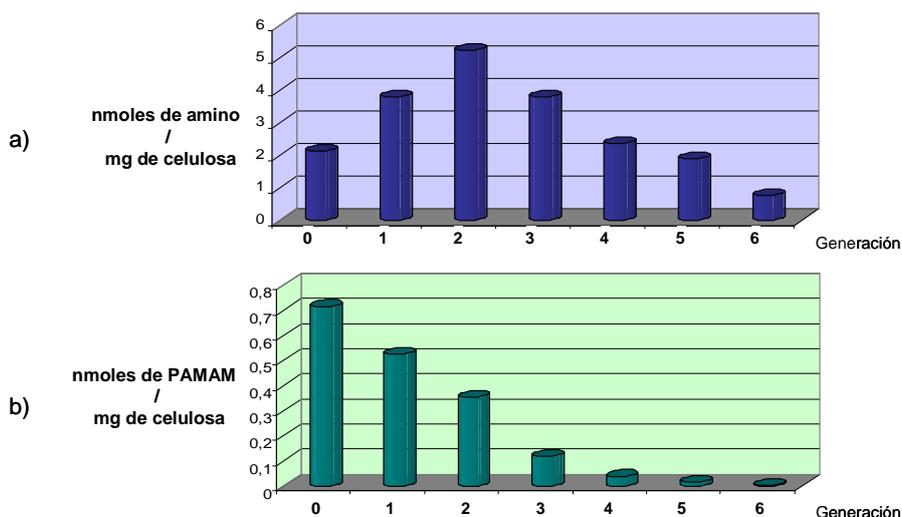


Figura 142. Promedio de moles de a) aminos y b) antígenos sintéticos, por unidad de masa, para **D-3**.

Estos datos indican que el número de aminos presentes en las fases sólidas **D-3** tiene su máximo cuando se emplea el dendrímero de generación 2, sin embargo, el cálculo de moles de antígenos dendríméricos que implica esa cantidad de aminos, apunta a que el número de antígenos sintéticos aumenta casi exponencialmente desde G6 a G0.

Por otro lado, teniendo en cuenta los datos de cantidades de moles de aminos en discos tipo **D-3** y **D-5**, se calcula el porcentaje de ocupación de los grupos aminos por reacción con bencilpenicilina. Estos datos se comparan con los obtenidos para el polímero de PLL en la Figura 143.

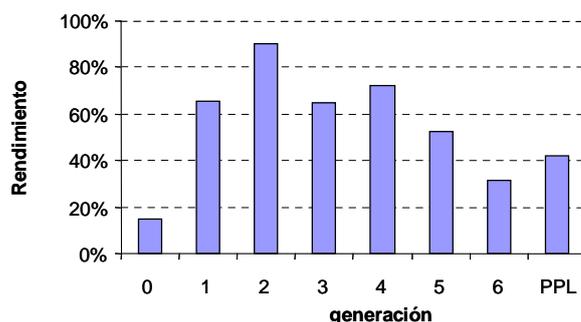


Figura 143. Porcentaje de grupos aminos de PAMAM (anclados a celulosa) que reaccionan con bencilpenicilina.

Estos mismos datos se han utilizado para calcular indirectamente el número de unidades de BPO que quedan acoplados a los dendrímeros PAMAM anclados a la superficie **D-5**, mediante diferencia de los moles de aminos entre **D-5** y **D-3**. Estas cifras calculadas por unidad de masa, para **D-5** con cada generación, se representa en la Figura 144.

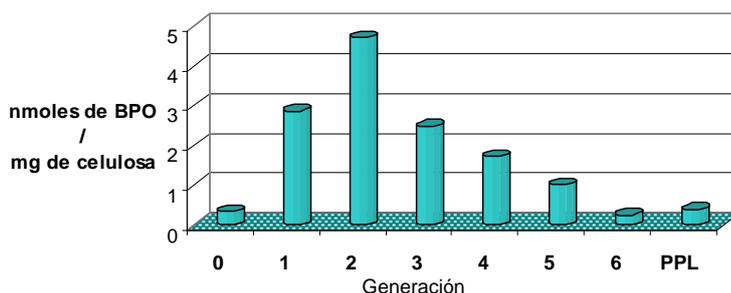


Figura 144. Promedio de moles de bencilpeniciloilo calculados por unidad de masa para superficies **D-5**.

De esta manera, pudo comprobarse que existen diferencias en la funcionalización de estos soportes sólidos cuando se emplean distintas generaciones de los dendrímeros PAMAM. Los resultados obtenidos indican que los discos acoplados con dendrímeros

de generación 2, son los que poseen un mayor número de grupos aminos en la fase sólida, además de presentar el mayor porcentaje de ocupación por unidades de BPO.

2.1.3. Evaluación de discos D-5: Ensayos *in vitro* mediante RAST.

El empleo en ensayos *in vitro* de los discos **D-5**, con antígenos dendriméricos fijados sobre su superficie, se evaluó mediante RAST con sueros de pacientes alérgicos a bencilpenicilina.

En la Figura 145 se representa, a modo de ejemplo, los resultados que se obtuvieron con 15 de los sueros ensayados, empleando discos **D-5** con cada una de las generaciones (G = 0-6). Puede comprobarse que todos los sueros presentan valores de RAST por encima de un 2.5%, al menos para algunas de las generaciones acopladas a **D-5**, lo que confirma que estos antígenos dendriméricos fijados a soportes (**D-5**) se reconocen por anticuerpos IgE y, por tanto, pueden emplearse en los test de diagnósticos *in vitro* para la detección de IgE dirigida a bencilpenicilina.

Además, los resultados del RAST varían de una generación a otra, mostrando casi siempre la misma tendencia para cada uno de los sueros, lo que corrobora que la generación del dendrímero empleada es un factor crucial en los resultados de estos ensayos clínicos.

De esta manera, aunque el suero de cada paciente muestra un comportamiento diferente, si puede observarse que, como norma general, el porcentaje de RAST de cada suero va aumentando a medida que aumenta la generación del dendrímero empleada, hasta generación en torno a 4. Sin embargo, a partir de esta generación no se observan mejoras en los resultados del RAST obtenidos: para la mayoría de los casos los niveles de RAST con G5 y G6 permanecen constante o decrecen. Así, normalmente, se obtienen valores máximos de RAST con las generaciones intermedias utilizadas (2, 3 y 4).

El perfil de las gráficas del RAST obtenido para estos sueros (Figura 145) es más coincidente con el perfil de la Figura 144, por lo que de alguna manera, podría correlacionarse el porcentaje de RAST con el número de grupos BPO en el disco. Estos resultados coinciden con los resultados de los ensayos de inhibición del RAST, en los

que la inhibición era proporcional a la cantidad de epítopes que se empleaban como inhibidor.

Tanto una alta densidad de hapteno en macromoléculas transportadoras, como un elevado número de determinantes antigénicos en los ensayos del RAST, hacen más eficientes la detección de los anticuerpos.

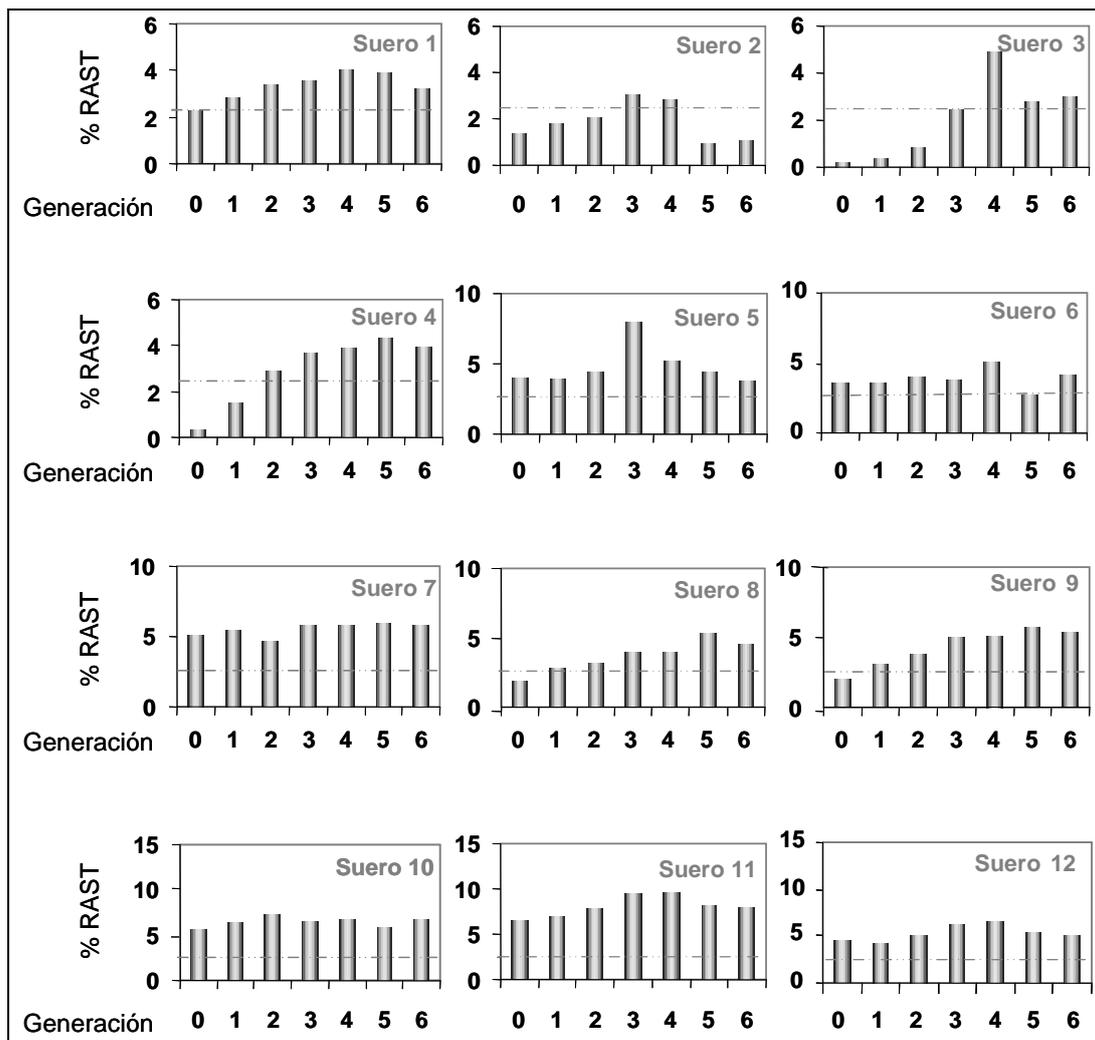


Figura 145. Resultados del RAST con discos **D-5** empleando sueros de pacientes alérgicos a BP.

Aunque, también es cierto que, otros factores pueden influir en la detección de anticuerpos, ya que el reconocimiento de estructuras antigénicas por IgE resulta más favorable cuando cumple unos requisitos estructurales, como puede ser el tamaño del dendrímero, lo que se correlaciona con el incremento de la densidad de hapteno en el portador.

Probablemente, existirá un tamaño adecuado de antígeno dendrímérico que presente los epítopes en su superficie de manera que éstos puedan ser reconocidos por los dos puntos de reconocimiento de IgE directamente, sin que ello conlleve un gasto de energía en modificar la estructura tridimensional del anticuerpo para poder llevar a cabo el reconocimiento por los dos sitios.

2.2. Antígenos dendríméricos acoplados a fase sólida: Tipo B.

Una vez conocido el comportamiento de los dendrímeros PAMAM como portadores en los soportes sólidos activados mediante la metodología tradicional (procedimiento A), nos planteamos el empleo de otro método de activación de la celulosa para desarrollar otros procedimientos de preparación de antígenos dendríméricos acoplados a la fase sólida. De este modo, se estudiaría si una diferente derivatización de la celulosa implicaría mejoras en los niveles de RAST.

Concretamente, nos planteamos el empleo de moléculas que posean grupos funcionales reactivos diferentes en dos extremos, con el fin de poder controlar los procesos de conjugación. Por un lado, se necesita un primer grupo funcional electrofílico (GF1, Figura 146), que sea reactivo frente a los grupos hidroxilos de la celulosa, y por otro lado un segundo grupo funcional (GF2, Figura 146) también electrofílico, pero que sea selectivo a los grupos aminos primarios de los dendrímeros. Todo ello nos condujo a elegir como reactivos halo-halogenuros de alcanóilo y concretamente elegimos el cloruro de cloroacetilo (**110**) y el bromuro de 2-bromoisobutirilo (**111**).

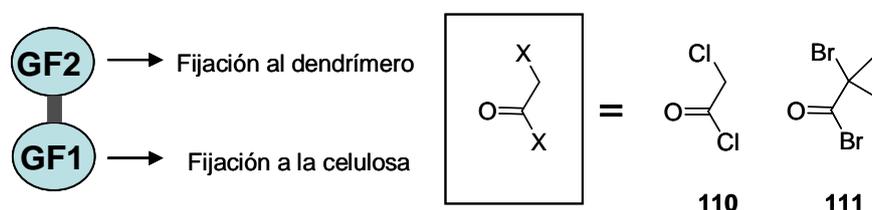


Figura 146. Estructura del reactivo acoplante en el procedimiento tipo B.

De esta manera, se emplearon estos dos reactivos para derivatizar la celulosa y dos portadores diferentes: PLL y PAMAM-G3.

2.2.1. Obtención

El procedimiento tipo B para la obtención de antígenos dendríméricos acoplados a fase sólida implica las siguientes etapas, representadas en la Figura 147:

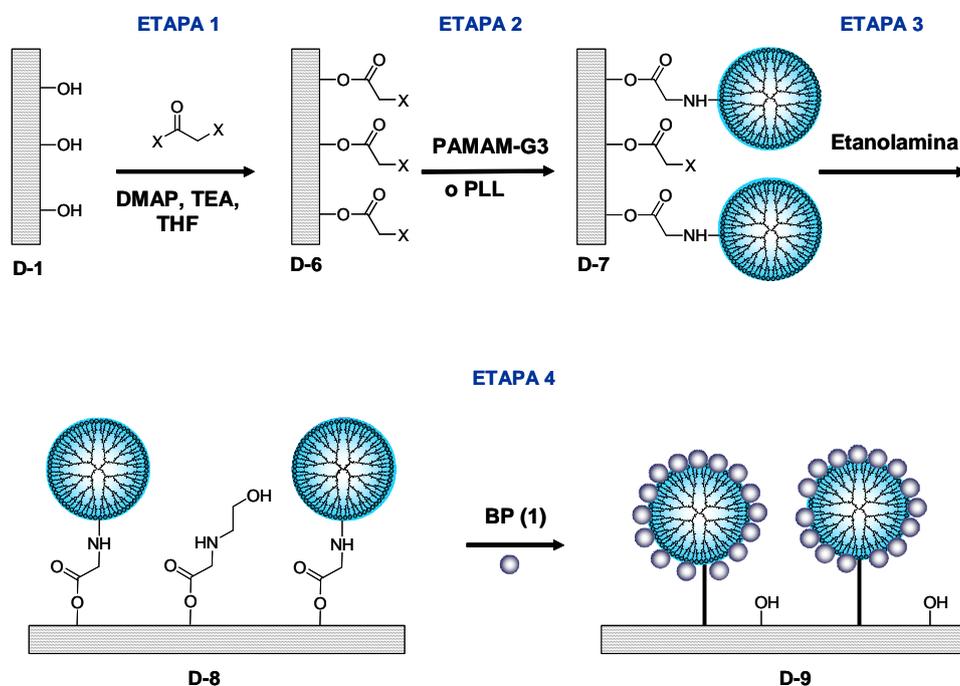


Figura 147. Preparación de antígenos dendríméricos soportados sobre discos de celulosa: Método B.

ETAPA 1. Activación de los grupos hidroxilos del soporte sólido por reacción con

haluros de acilo. Ya se han descrito métodos para la funcionalización de los grupos hidroxilos de celulosa por reacción con bromuro de 2-bromoisobutirilo (**111**).¹⁹⁸ La reacción consiste en la esterificación de los grupos alcoholes de los discos de celulosa **D-1**. Ésta se lleva a cabo haciendo reaccionar la celulosa con el haluro de acilo **110** o **111**, empleando una amina terciaria como base (TEA), DMAP en cantidades catalíticas y THF como disolvente.

ETAPA 2. Reacción de acoplamiento de los dendrímeros PAMAM. La fijación de los portadores (PLL y PAMAM-G3) a la fase sólida **D-6**, se lleva a cabo por la sustitución nucleofílica del dendrímérico sobre los reactivos acoplados **110** y **111**, para dar lugar a la fase sólida **D-7**.

¹⁹⁸ A. Carlmark, E. Malmström. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 900-901.

ETAPA 3. Bloqueo de los grupos cloruros y bromuros que no han reaccionado en la etapa 2 con los grupos aminos del dendrímico. De nuevo se emplea etanolamina como reactivo para bloquear las posiciones activadas.

ETAPA 4. Conjugación mediante enlace covalente de bencilpenicilina a dendrímicos PAMAM. Las condiciones de reacción son las mismas que las empleadas en el procedimiento tipo A.

2.2.2. Evaluación de discos D-9: Ensayos in vitro mediante RAST.

Los nuevos discos preparados por el método B se evalúan mediante ensayos de RAST con sueros de pacientes alérgicos a bencilpenicilina.

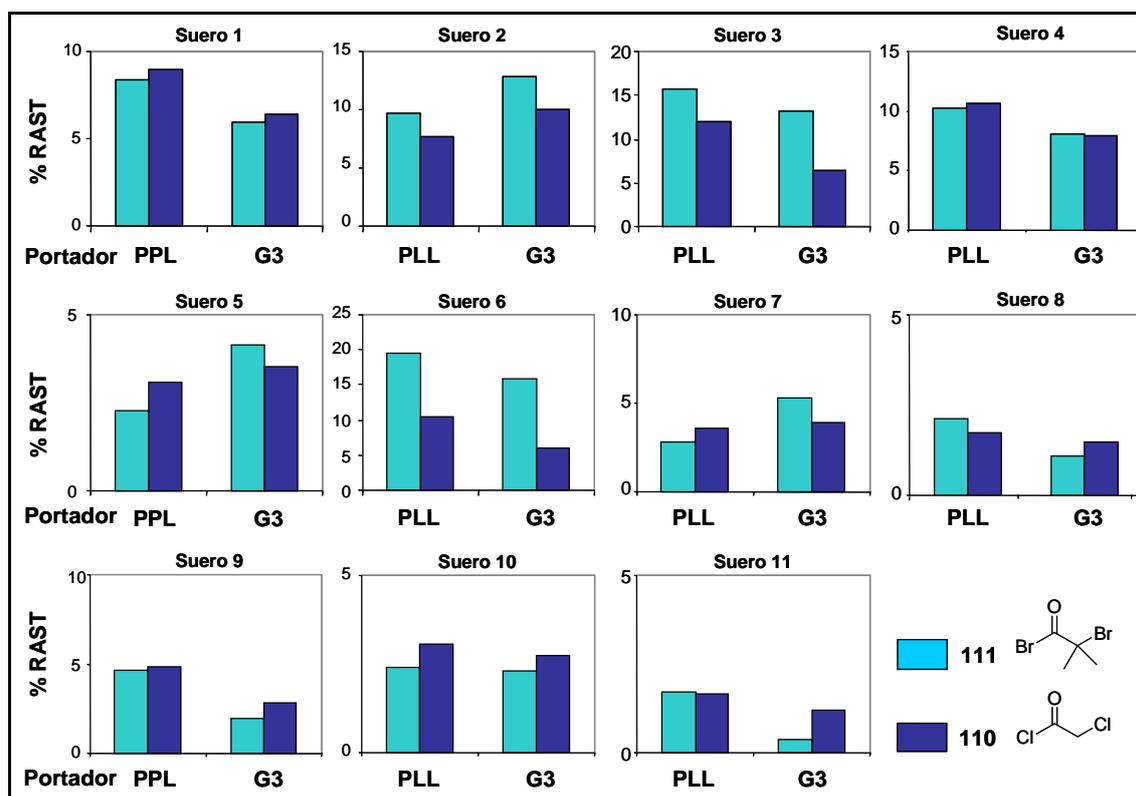


Figura 148. Resultados del RAST con discos D-9 empleando sueros de pacientes alérgicos a BP.

Los resultados obtenidos para 11 sueros se representan en la Figura 148. En ella se comparan los niveles de RAST obtenidos con cada uno de los portadores (PLL y PAMAM-G3) y con cada uno de los reactivos empleados para activar la superficie de la celulosa (111 y 110). Podemos comprobar que los niveles de RAST obtenidos con estos

discos son positivos para la mayoría de los sueros. Lo que significa que este procedimiento tipo B para acoplar antígenos dendriméricos al soporte de celulosa, incorpora adecuadamente el conjugado H-P de manera que son reconocidos por IgE.

Los datos muestran que no existe mucha diferencia entre los niveles de RAST obtenidos con discos con un mismo portador para cada uno de los sueros, es decir el empleo de un reactivo u otro para la activación de la superficie celulósica, da resultados similares para cada uno de los portadores. Por otro lado, en cuanto al reconocimiento de IgE a los diferentes portadores, algunos sueros dan mejores resultados con PLL y otros con PAMAM-G3. Lo que significa que cada suero presenta un comportamiento distinto, no obstante para la mayoría de ellos los resultados del RAST son positivos.

2.3. Antígenos dendriméricos acoplados a fase sólida: Tipo C.

Tras comprobar que la fase sólida obtenida mediante el procedimiento B, daba resultados positivos de RAST, nos propusimos llevar a cabo una mejora del método, empleando reactivos con grupos funcionales similares al del procedimiento B.

Concretamente, nos centramos en el empleo de un reactivo que, además de activar la fase sólida, pueda presentar una estructura larga y flexible, de manera que actúe como un espaciador entre el dendrímero y la fase sólida. Así, se evitarían los impedimentos estéricos de la becilpencilina para reaccionar con aquellos grupos aminos que, con los métodos anteriores, quedaban más cercanos a la superficie de celulosa (Figura 149).

De este modo, además, cabe pensar que los antígenos dendriméricos se encontrarían más accesibles frente a las IgE, por lo que mediante ensayos de RAST también podrá evaluarse la influencia de un espaciador en el reconocimiento por IgE.

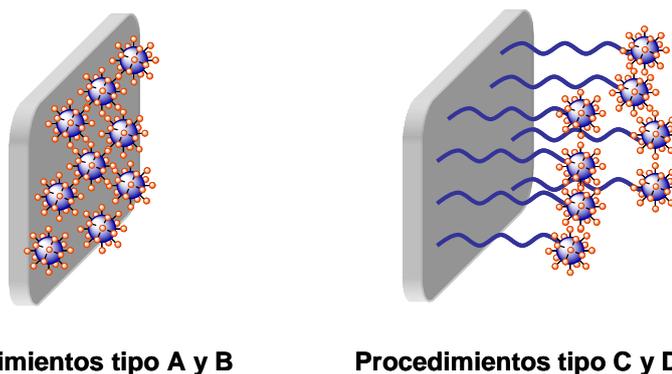


Figura 149. Representación esquemática de los antígenos dendriméricos acoplados a fases sólidas, según procedimiento.

Para el diseño de la molécula espaciadora nos planteamos que contenga una cadena espaciadora y dos grupos funcionales reactivos diferentes en cada uno de los extremos, como se representa en la Figura 150. La idea es que los grupos funcionales (GF1 y GF2) tengan reactividad similar a la de los reactivos **110** y **111**, empleados en el procedimiento B. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la cadena espaciadora situada entre los dos centros reactivos debe ser de naturaleza no hidrofóbica, para que no quede replegada al soporte sólido en disolución acuosa durante los ensayos de RAST. Así sería adecuado el empleo de un espaciador constituido por una cadena polar, que puede derivar de un poliéter.

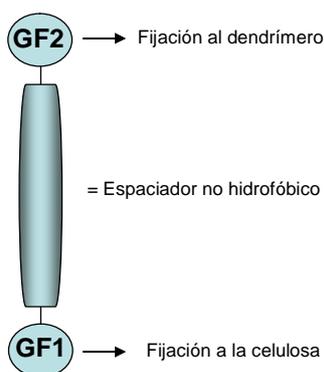


Figura 150. Diseño de la molécula espaciadora.

Finalmente, la molécula que se eligió fue la que se obtuvo mediante cloración de los dos grupos funcionales reactivos situados en los extremos de la molécula disimétrica **112**,

cuya obtención ya se ha descrito mediante reacción de Cannizzaro del dialdehído simétrico precursor.¹⁹⁹

La cloración se obtuvo en un solo paso (Figura 151) con rendimientos cuantitativos y, los datos espectroscópicos estaban de acuerdo con la estructura del producto obtenido.

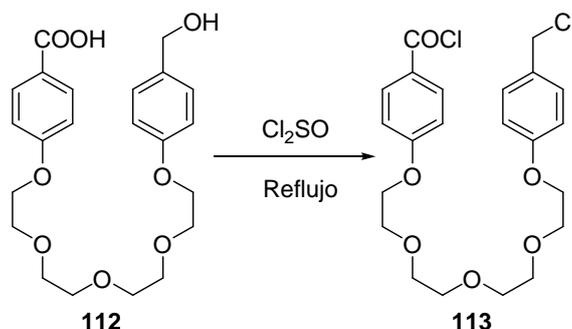


Figura 151. Síntesis de 113.

2.3.1. Obtención.

El empleo de esta molécula **113** permitirá su acoplamiento a la fase sólida por reacción del cloruro de ácido, quedando, de este modo, un centro electrófilo en el otro lado de la estructura que es reactivo frente a los grupos aminos de los dendrímeros PAMAM.

Así, el procedimiento tipo C para obtener antígenos dendriméricos anclados a soportes de celulosa implica los siguientes etapas:

ETAPA 1. Activación de los grupos hidroxilos del soporte sólido D-1 por reacción con la molécula espaciadora (113). La reacción consiste en la formación de un enlace covalente éster entre los grupos hidroxilos de la celulosa y el cloruro de acilo del espaciador. Ésta se lleva a cabo haciendo reaccionar los discos de celulosa con el espaciador **113** en THF, empleando TEA como base y DMAP como catalizador. De esta manera se obtienen los discos **D-10**.

ETAPA 2. Acoplamiento de los dendrímeros PAMAM (G2 y G4) a la fase sólida D-10, para la obtención de D-11. En esta etapa se comprobó que la reacción de sustitución daba mejores rendimientos cuando se empleaba mezcla de disolución acuosa de NaHCO₃ 0.2 M con DMF como disolvente, que cuando se empleaba sólo la disolución acuosa de NaHCO₃ 0.2 M.

¹⁹⁹ Y. Vida, E. Pérez-Inestrosa, R. Suau. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 1575-1577.

ETAPA 3. Bloqueo de los grupos hidroxilos activados que no han reaccionado en la etapa 2, empleando metilamina.

ETAPA 4. Conjugación mediante enlace covalente de bencilpenicilina a los grupos aminos de la superficie de los dendrímeros PAMAM. Esta se realiza empleando las mismas condiciones que en los métodos anteriores: A y B.

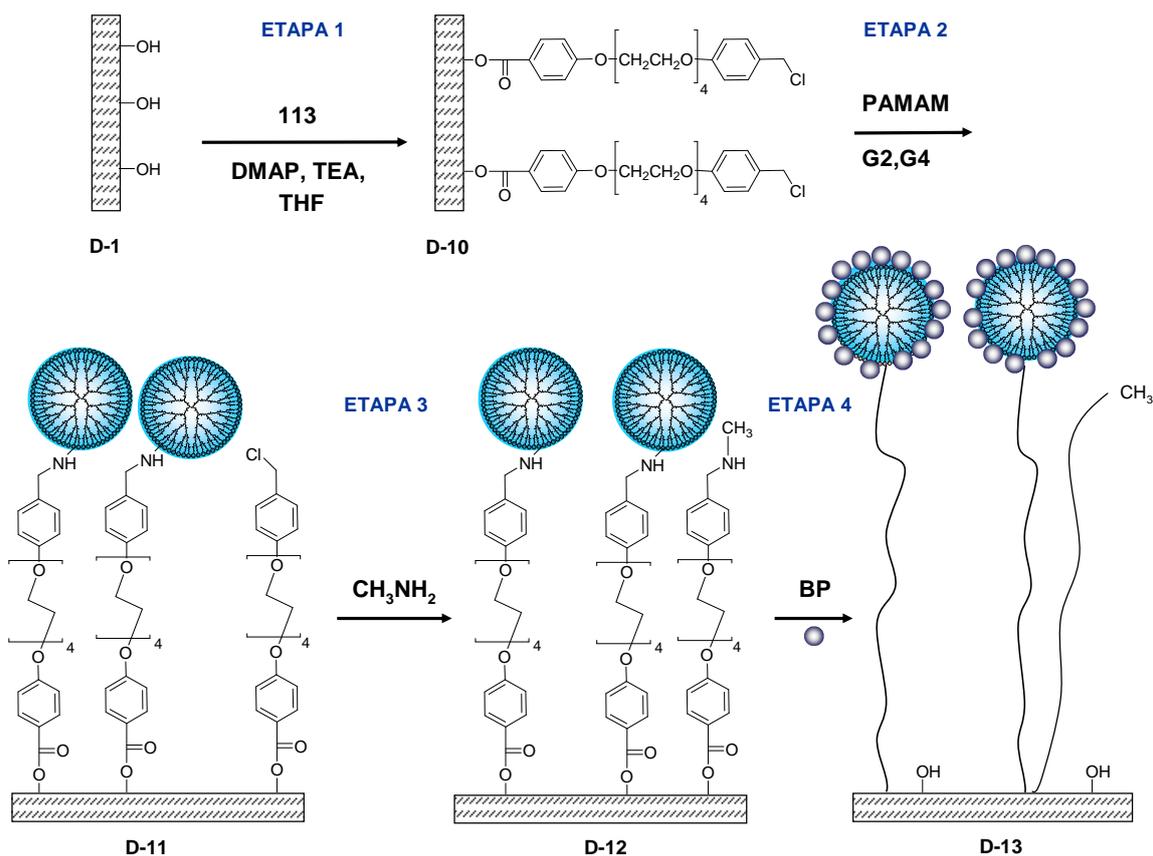


Figura 152. Preparación de antígenos sintéticos soportados sobre discos de celulosa: Método C.

2.3.2. Caracterización.

Se llevó a cabo la cuantificación con el método de ninhidrina de los grupos aminos en superficies **D-11** y **D-13**, de manera que podemos calcular además de manera indirecta el número de moles dendrímeros que se han fijado a la superficie en la etapa 2 y, el rendimiento de conjugación de los grupos aminos de los dendrímeros PAMAM con la penicilina en la etapa 4.

Los valores obtenidos del número de aminos por disco, mostraron un comportamiento reproducible, y una cantidad de aminos muy similar entre los discos que fijan dendrímeros de generación 2 y 4, en torno a 17 nmoles de aminos por mg de celulosa en disco **D-11**, de lo que se deduce que se acoplan 1.1 nmoles de PAMAM-G2 mg^{-1} de celulosa, y 0.3 nmoles de PAMAM-G4 mg^{-1} de celulosa.

Los rendimientos de la conjugación con penicilina resultaron del 71% para **D-11** (G-2) y del 85% para **D-11** (G4). Estos datos apuntan a un número de unidades de BPO fijados a los discos **D-13** (G-2) de 12 nmoles mg^{-1} de celulosa y, a los discos **D-13** (G-4) 15 nmoles mg^{-1} de celulosa.

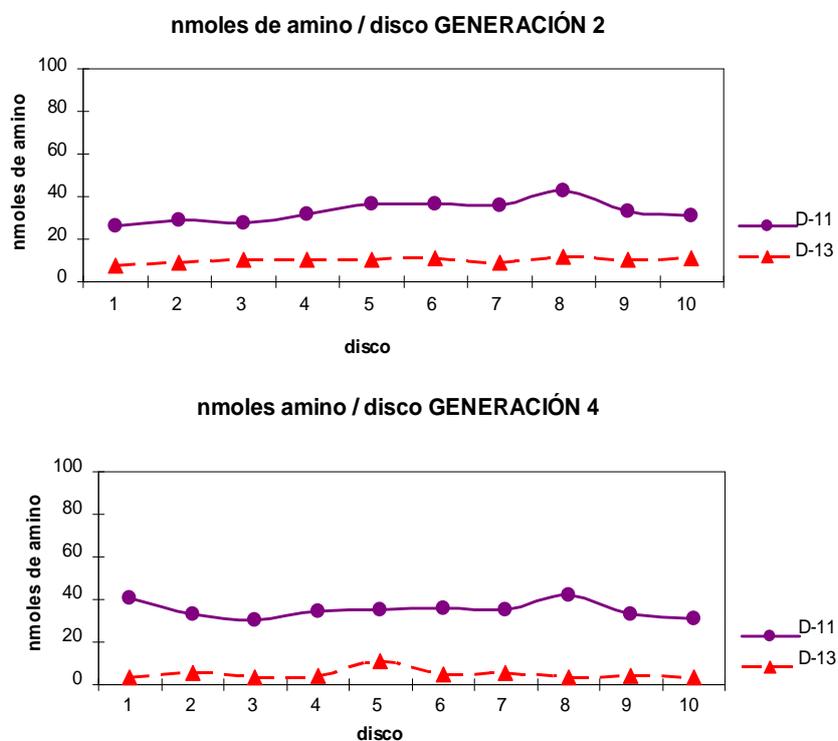


Figura 153. Cálculo de los grupos aminos para series de 10 discos **D-11** y **D-13** con generación 2 y 4.

2.4. Antígenos dendríméricos acoplados a fase sólida: Tipo D.

Este tercer procedimiento para anclar los conjugados sintéticos a la fase sólida se basó también en el empleo de un espaciador. La diferencia con el método tipo B radica en la obtención de un espaciador más largo, para poder evaluar si influye la longitud de esta cadena en los ensayos de RAST.

Con este fin, decidimos funcionalizar la superficie de celulosa con una molécula que añada unos cuantos átomos más al espaciador anterior (**113**) y, que además podamos aprovechar para cuantificar la activación de la fase sólida.

Para ello utilizamos el trimetoxiaminopropilsilano (TMAPS), ya que es uno de los reactivos más empleados para la activación de fases sólidas.²⁰⁰

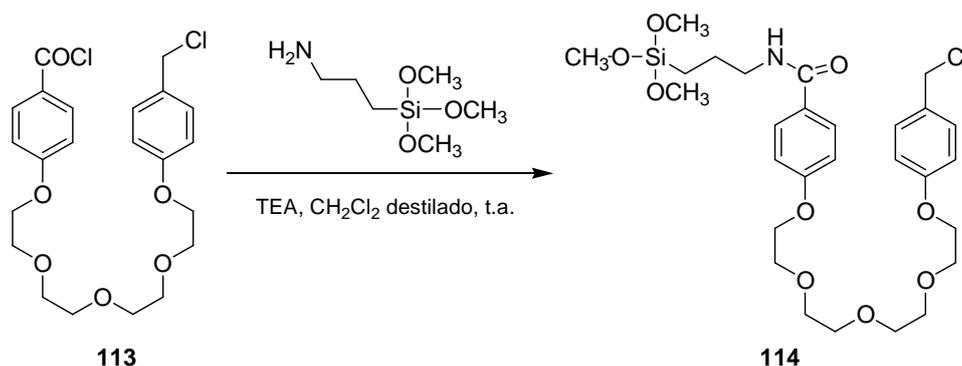


Figura 154

La reacción de TMAPS con **113** se optimizó primero en disolución para después extrapolar la reacción a la fase sólida.

Los intentos de formar la amida **114** empleando la molécula **113**, la amina TMAPS y TEA destilada en proporciones (1:1:1) en THF destilado, a diferentes temperaturas y tiempos de reacción, no dieron lugar a la reacción.

Sin embargo, llevando a cabo la reacción con la misma proporción de reactivos, pero empleando CH₂Cl₂ como disolvente y a temperatura ambiente, la reacción tuvo lugar en una hora con rendimientos cuantitativos (Figura 154). La formación del producto pudo

²⁰⁰ R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Wörle. *ChemBioChem*. **2001**, 2, 686-694.

comprobarse por los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C, pero éste no resultó lo suficientemente estable como para ser caracterizado por otras técnicas.

2.4.1. Obtención

Así el procedimiento tipo D, esquematizado en la Figura 155, para obtener antígenos dendríméricos anclados a soportes de celulosa implica las siguientes etapas:

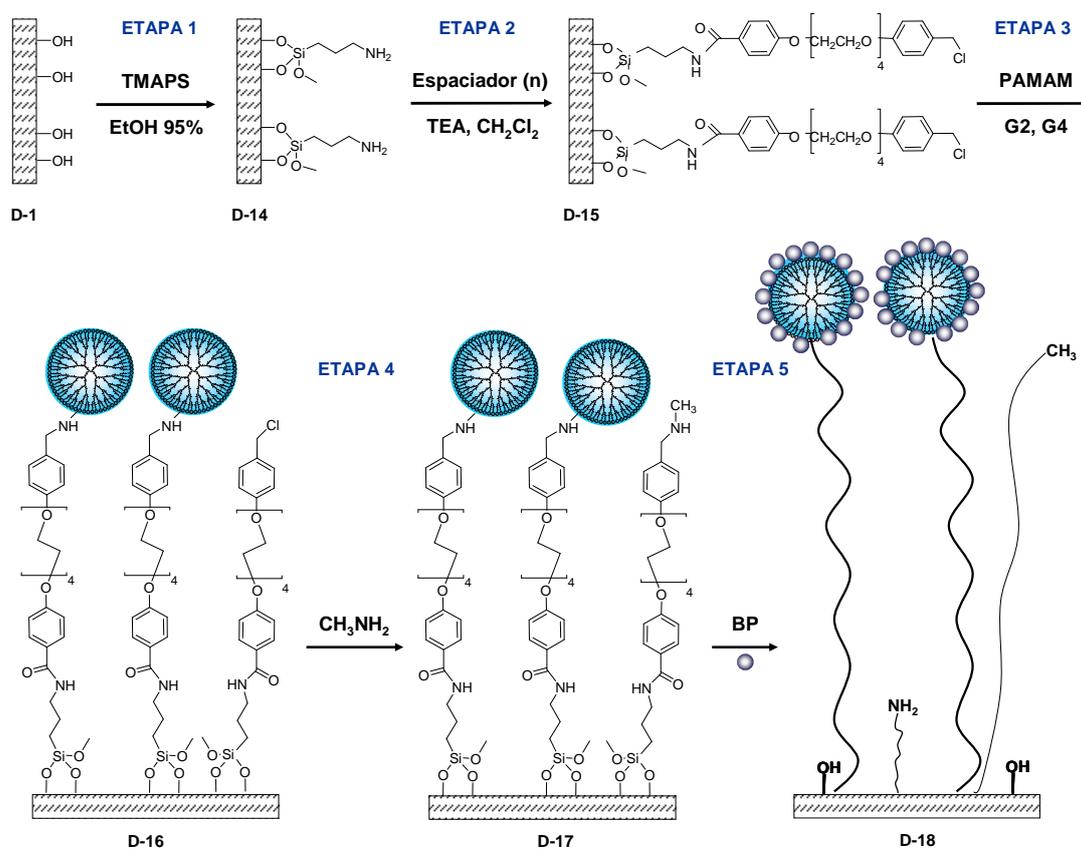


Figura 155. Preparación de antígenos dendríméricos soportados sobre discos de celulosa: Método D.

ETAPA 1. Modificación de la superficie de los discos de celulosa D-1 con aminas primarias, por reacción con TMAPS. En el procedimiento de sililación se pretende que la superficie de los discos **D-1** se funcione con este reactivo de manera homogénea y, maximizar el número de grupos funcionales introducidos por el agente sililante. Evidentemente, un gran número de grupos acoplantes en la superficie de celulosa permitiría una alta densidad de espaciadores en el disco.

Para la sililación de las superficies **D-1** se tuvo en cuenta la optimización de los dos parámetros, el tiempo y el medio de reacción, que ya se ha realizado experimentalmente para superficies de vidrio.²⁰⁰ En un tiempo de reacción de 4 horas, la aminosililación de la celulosa resultó mayor cuando se empleaba como disolvente etanol/agua (95:5) que cuando se empleaba tolueno (seco o con una pequeña proporción de agua). Se ha descrito que el agua presente en la disolución del reactivo sililante, hidroliza los alcoxisilanos a formar silanoles, los cuales entonces condensan intramolecularmente.²⁰¹ Por otro lado, se ha publicado que un aumento del tiempo de sililación, conduce a deposiciones de sílica no homogéneas en la superficie.²⁰⁰

ETAPA 2. Reacción de las aminas primarias de los discos D-14 con la molécula espaciadora 113, formando una unión covalente amida. Hay descritas reacciones similares en soportes sólidos funcionalizados con aminas primarias.²⁰² La reacción se realiza en las condiciones de reacción que se emplearon para la síntesis de **114** (Figura 154) haciendo reaccionar los discos de celulosa con la molécula **113**, TEA y empleando CH₂Cl₂ como disolvente.

ETAPA 3. Reacción de acoplamiento de los dendrímeros PAMAM (G2 y G4) a la fase sólida D-15. La fijación de los dendrímeros tiene lugar por sustitución nucleofílica de los grupos aminos de los dendrímeros al cloruro de bencilo de **113**, empleando como disolvente mezcla de NaHCO₃ acuoso 0.2 M con DMF, obteniéndose así discos **D-16**.

ETAPA 4. Bloqueo de los grupos cloruros que no han reaccionado en la etapa 3. Para ello se emplea como reactivo metilamina, obteniendo los discos **D-17**.

ETAPA 5. Acoplamiento de BP a los grupos superficiales aminos de los dendrímeros PAMAM. Se realiza en las mismas condiciones empleadas para métodos anteriores, dando lugar a las superficies **D-18**.

²⁰¹ J. D. Le Grange, J. L. Markham. *Langmuir*. **1993**, 9, 1749-1753.

²⁰² P. A. Wheeler, J. Wang, J. Baker, L. J. Mathias. *Chem. Mater.* **2005**, 17, 3012-3018.

2.4.2. Caracterización.

El número de aminos fijados sobre los discos **D-14** se determinó por cuantificación con ninhidrina, siendo la media de 17 nmol mg^{-1} de celulosa, cuando el tiempo de reacción de sililación es 4 horas (Figura 156).

También se cuantificó el número de aminos en superficies **D-15**, para calcular la conversión de los grupos aminos a amidas tras la reacción con el espaciador **113**. De esta manera, se calcula indirectamente la cantidad de moléculas espaciadoras que se fijan en la celulosa, siendo la media de 13 nmol mg^{-1} . Estos cálculos implican un 73% de conversión de los grupos aminos a amidas.

Para la cuantificación de los grupos aminos después de la conjugación del dendrímero se tuvo en cuenta la cantidad de aminos que quedaron sin reaccionar con el cloruro de ácido **113** en el paso 2 (para la formación de los discos **D-15**).

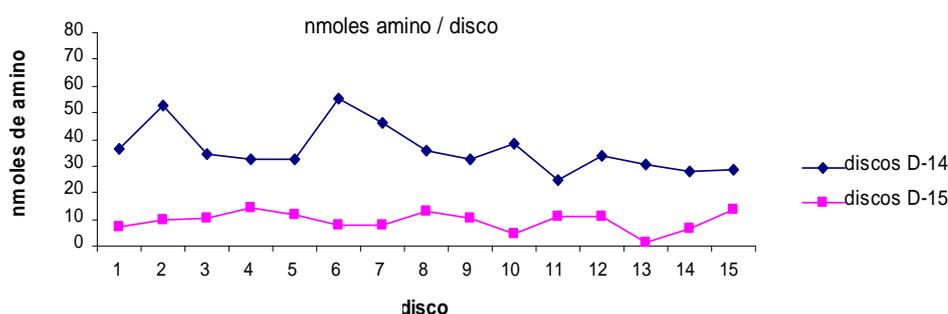


Figura 156. Cuantificación de grupos aminos: Datos calculados para 15 discos tipo **D-14** y **D-15**.

Los datos obtenidos para 10 de los discos **D-16** (G2 y G4) se representan en la Figura 157, mostrando una cantidad de aminos regular entre los discos.

Así, los promedios nos dieron resultados muy similares para el número de aminos que presentan las superficies **D-16** con dendrímeros de generación 2 y 4, de valores 42 y 40 nmol mg^{-1} de celulosa, respectivamente. Con estos valores, se calculó el número de moles de dendrímeros PAMAM fijados a la superficie: $2.8 \text{ nmol (G2) mg}^{-1}$ (celulosa) y $0.6 \text{ nmol (G4) mg}^{-1}$ (celulosa).

Se realizaron cuantificaciones de los grupos aminos primarios restantes en los discos **D-18** tras la conjugación de bencilpenicilina, que corresponden a los que no han reaccionado con el antibiótico. Los resultados para 10 discos **D-18** se representan en la Figura 157 y se comparan con los datos obtenidos antes de la conjugación. Así, los

porcentajes de conversión de grupos aminos a BPO fueron bastante altos: 97% para **D-18(G2)** y 95% **D-18(G4)**.

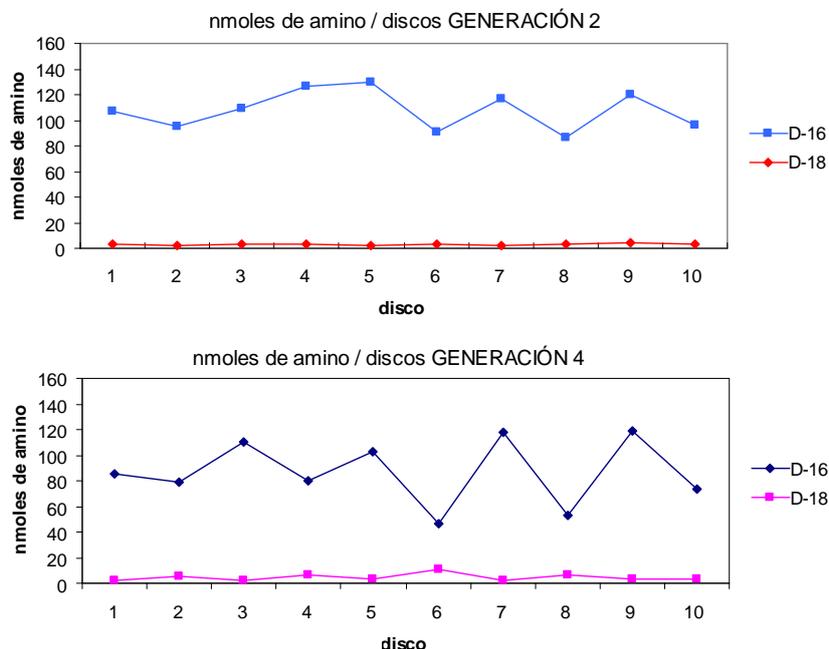


Figura 157. Cálculo de los grupos aminos para series de 10 discos **D-16** y **D-18** con generación 2 y 4.

En la Figura 158 se representa de modo esquemático el número de grupos funcionales que se introducen en cada una de las etapas de la preparación de los discos **D-18**. Hay un 73% de rendimiento en la conversión de los grupos aminos de **D-14** a amidos de **D-15**. Estos dos pasos se han realizado para obtener una adecuada derivatización de la celulosa para nuestro objetivo, y además poder cuantificar los sitios activos de los que se dispone en la fase sólida para fijar los dendrímeros.

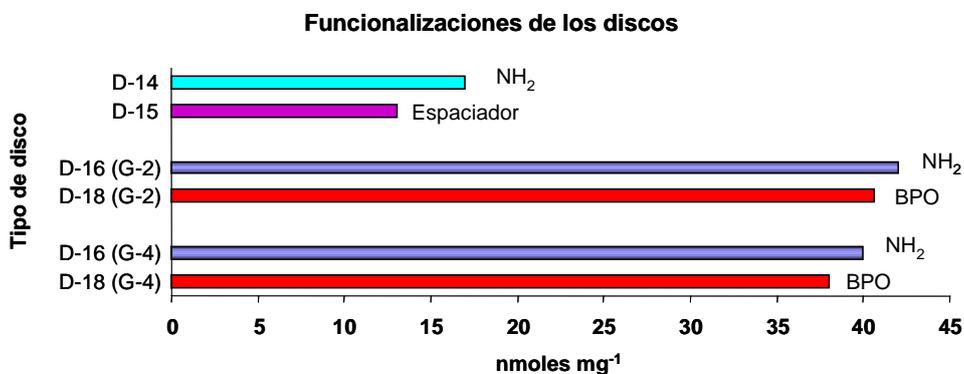


Figura 158. Representación del número de grupos funcionales que se introducen en cada una de las etapas.

Sin embargo, aunque los discos **D-16** presentan una gran cantidad de aminos, según nuestros cálculos, el número de extremos clorobencílicos de las moléculas espaciadoras que reaccionan con dendrímeros PAMAM es muy inferior.

2.5. Comparación de los diferentes métodos de activación de la superficie.

En la Figura 159 se representa las diferentes cantidades de epitopes (BPO) que se acoplan a los discos para las generaciones 2 y 4 con los métodos A, C y D descritos. Los resultados muestran que para el método de preparación A, el número de unidades BPO fijadas es 10 veces mayor para G2 que para G4. Sin embargo, cuando el método de activación de la superficie sólida implica el empleo de una molécula espaciadora (procedimientos C y D), la cantidad de unidades BPO fijadas a la superficie es prácticamente la misma, empleando una generación u otra, dentro de cada procedimiento.

Es posible que el acoplamiento de los dendrímeros PAMAM a los discos sea mucho más efectivo por el procedimiento C y D, debido a que se produce una disminución de los efectos estéricos en el acercamiento del dendrímero a los grupos reactivos de las moléculas espaciadoras, efectos estéricos producidos por la misma superficie sólida y la poca movilidad que presentan las moléculas acopladas a ella. Esta razón podría explicar el hecho de que el número de grupos de BPO en discos preparados mediante el procedimiento A sea menor cuando se emplea dendrímeros de generación 4, de mayor volumen, que cuando se emplean los de menor tamaño, de generación 2.

Dentro de los procedimientos de derivatización del disco empleando espaciadores, podemos observar que el método D fija más del doble de unidades BPO que el método C. La explicación a estos resultados podría deberse bien a una mayor longitud del espaciador en el procedimiento D que en el C, o también podría ocurrir que con el método D se consiguiera una mayor funcionalización de la fase sólida.

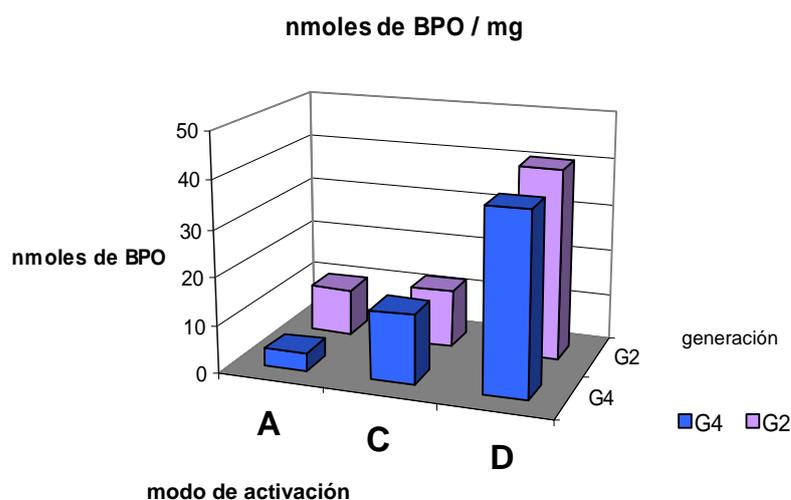


Figura 159. Comparación de los resultados obtenidos en el número de determinantes antigénicos acoplados a la fase sólida.

Por otro lado, cuando comparamos el número de antígenos dendríméricos acoplados a los discos (Figura 160), podemos comprobar que para todos los casos se siguen dos tendencias:

- 1) El número de dendrímeros fijados es siempre mayor para generación 2 que para generación 4, para cada uno de los procedimientos de preparación.
- 2) Dentro de cada generación empleada, el número de antígenos dendríméricos presentes en la fase sólida es mayor a medida que aumenta la distancia de separación entre la fase sólida y el dendrímero fijado a ella.

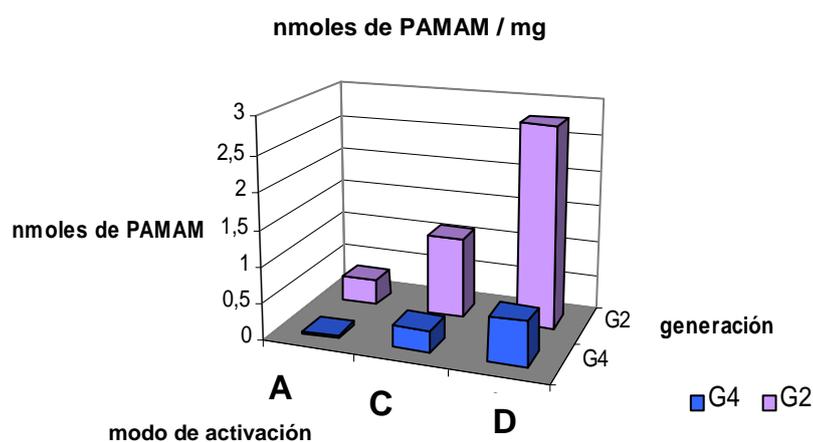


Figura 160. Comparación de los resultados obtenidos en el número de antígenos dendríméricos acoplados a la fase sólida.

2.6. Evaluación de discos preparados con el método C y D y comparación con los obtenidos por el método A: Ensayos in vitro mediante RAST.

Los primeros ensayos clínicos con estos tipos de antígenos dendriméricos (de generaciones 2 y 4) acoplados a fases sólidas mediante los procedimientos C y D se han realizado con 20 sueros de pacientes alérgicos a penicilinas mediante RAST y, se han comparado con los resultados obtenidos para los discos obtenidos por el método A.

Los datos se esquematizan en la Figura 161, en la cual puede comprobarse que el comportamiento para cada uno de los sueros ensayados es diferente. Aunque sí pueden clasificarse en grupos de sueros que siguen tendencias similares. Así es como se han ordenado los sueros en la Figura 161.

Los sueros 1 - 4 muestran una tendencia similar, obteniéndose los niveles de RAST de mayor a menor en este orden: $A > C > D$. Lo que significaría que en estos sueros la presencia de un espaciador entre la fase sólida y el dendrímero no proporciona una mejora en la detección de IgE, ya que incluso los porcentajes de RAST decrecen a medida que aumenta la longitud del espaciador.

Los datos obtenidos con los sueros 5-8 muestran detecciones de IgE más elevadas con las fases sólidas tipo A y D que con la C.

También se dio el caso (sueros 19 y 20) de que ninguna de las fases sólidas ensayadas detectaban los niveles mínimos de IgE para considerar los resultados de RAST positivos.

De todos estos, el mayor número de sueros que se comporta siguiendo una misma tendencia son los sueros 9-18, que presentan los niveles del RAST más elevados con los discos con espaciadores, tipo C y D, mostrando para casi todos estos sueros mayores niveles de RAST a medida que aumenta la separación entre el dendrímero y el disco. Además, este comportamiento también se correlaciona con el aumento de unidades de epitopes y de antígenos en cada método de preparación del disco empleado: $A < C < D$ (Figura 159 y Figura 160).

Los resultados no indican la existencia de una diferencia muy significativa, en términos de detección de sensibilidad, entre las generaciones G2 y G4 dentro de un mismo método de preparación del disco.

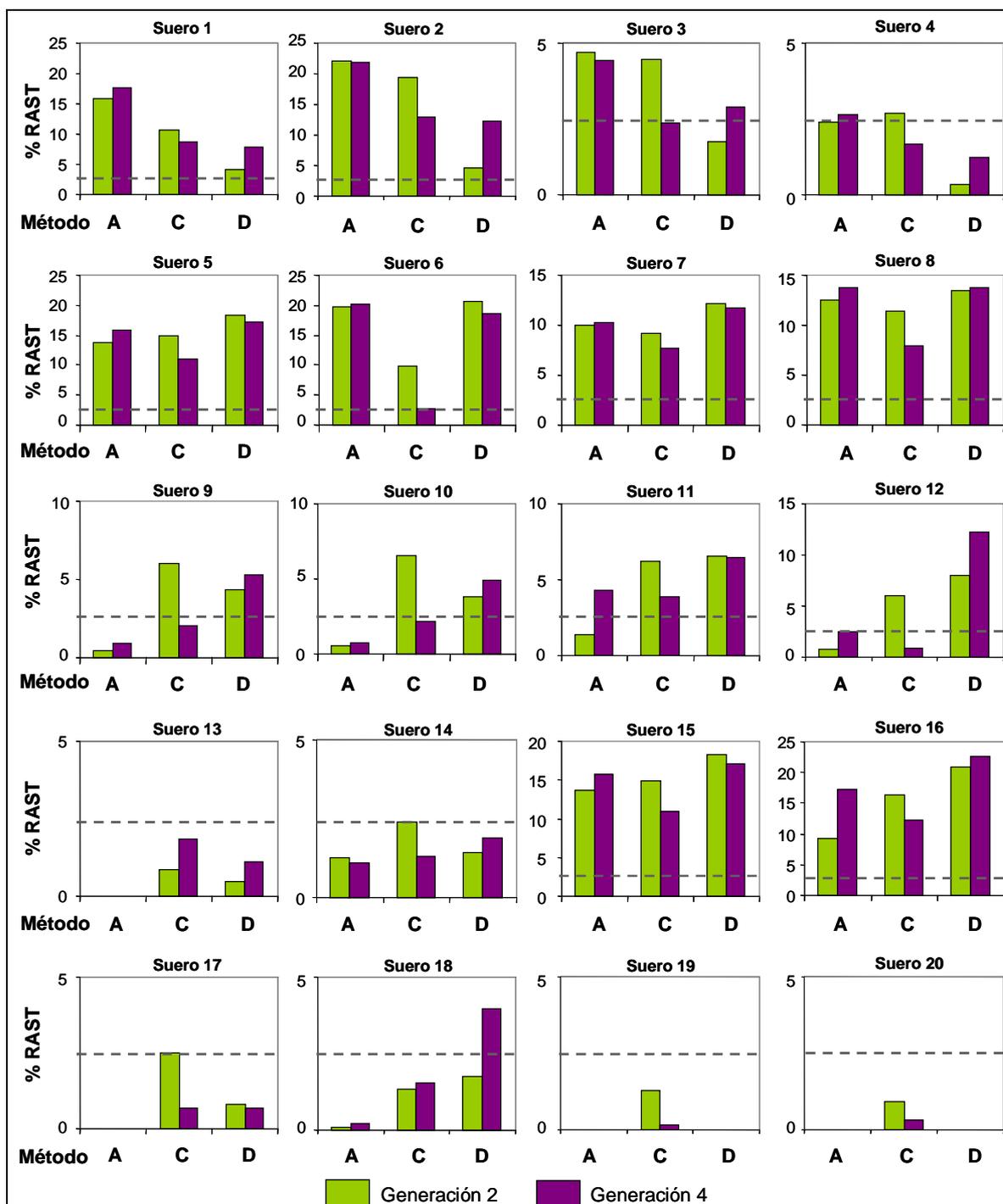


Figura 161. Ensayos de RAST con 20 sueros de pacientes alérgicos a penicilinas, empleando los discos preparados por los métodos A, C y D, respectivamente.

La detección de anticuerpos no se correlaciona linealmente con el contenido de grupos BPO para las diferentes generaciones de dendrímeros en los distintos tipos de superficies, aunque la mayoría de los sueros ensayados hasta ahora sí siguen la tendencia de la Figura 159. Una posible explicación sería que los dendrímeros acoplados a la fase sólida mediante un espaciador, además de presentar menos impedimentos al acercamiento de IgE por efectos estéricos de la superficie, proporcionan flexibilidad con respecto a la orientación de los anticuerpos lo que conduce a una mejor accesibilidad de las IgE.

Conclusiones

1. Del estudio de la estabilidad de las disoluciones acuosas del bencilpeniciloato sódico (**2**) por RMN-¹H se deduce que, este producto de hidrólisis del anillo de β-lactama de la bencilpenicilina, epimeriza fácilmente en disolución acuosa. La epimerización tiene lugar exclusivamente por racemecización del C-5 del anillo de tiazolidina y únicamente vía un intermedio tipo imina, en lugar del posible intermedio vía enamina que queda descartado. Este proceso de racemización se ve favorecido por un aumento del pH. Para el producto de aminólisis (**6**) por el contrario, no se ha observado proceso de isomerización alguno, resultando estable la disolución acuosa a diferentes pH y a lo largo del tiempo.

Un comportamiento similar presenta el derivado de hidrólisis de amoxicilina (**5**), aunque para el correspondiente derivado de aminólisis (**7**) la estabilidad es comparativamente menor.

2. De la síntesis de las estructuras tipo **31** (**Z-38, 39, 40, 41, 42 y 43**) se deduce que este fragmento de la cefalosporina original, es reconocido específicamente por anticuerpos IgE de pacientes que han presentado un episodio alérgico a las correspondientes cefalosporinas con la misma cadena lateral R¹.

La funcionalización adicional en el carbono que inicialmente se encontraba en la posición 6 de la cefalosporina parece implicar una mejora en el reconocimiento por IgE, siempre que ésta ha supuesto la introducción de un grupo hidroxilo (**Z-53**, **56**, **58**, **60**, **62** y **64**), mientras que el estudio del correspondiente derivado sintetizado con un grupo tiol en dicha posición (**Z-77**, **79**, **72**, **84**, **87** y **89**) no ha supuesto mejora en el proceso de reconocimiento.

Los compuestos tipo **31** incorporan el epítipo apropiado que es reconocido por anticuerpos IgE y, el grupo funcional en C-3 podría modular el grado de reconocimiento. Estos estudios proporcionan las bases para comprender el mecanismo por el que se conforma el epítipo reconocido por IgE dirigidas a cefalosporinas tras su conjugación a proteínas portadoras.

3. Mientras que para penicilinas los denominados determinantes antigénicos mayores y menores son estructuras químicas bien definidas, para las cefalosporinas existe un alto grado de incertidumbre en su naturaleza química. Los resultados revelan que las estructuras tipo **31**, que representa un fragmento del cefalosporoilo intermedio propuesto, se reconocen favorablemente por anticuerpos IgE dirigidos a cefalosporinas, y estas especificidades son relativas tanto a la cadena lateral R¹ como también al fragmento β -lactámico que queda unido a la proteína portadora en el proceso de conjugación, y no debe implicar la cadena R². Nuestros estudios representan la primera aproximación sintética al establecimiento de la estructura química que define de forma concreta el determinante antigénico de cefalosporinas.

4. Los dendrímeros tipo poliamidoamina, PAMAM, funcionalizados en su superficie con grupos bencilpeniciloilo (BPO) son reconocidos por IgE como conjugados sintéticos antigénicos que permiten imitar a la proteína natural responsable de la formación del conjugado *in vivo*. Por tanto, el empleo de dendrímeros de diferentes generaciones (hasta generación 6 en la presente memoria) permite preparar antígenos dendriméricos sintéticos con estructuras y disposiciones espaciales bien definidas desde el punto de vista químico.

Se ha abordado con éxito la preparación de los equivalentes derivados antigénicos dendriméricos de amoxicilina.

5. Los dendrímeros PAMAM son macromoléculas factibles de ser soportadas sobre fases sólidas tipo celulosa y de fijar en su superficie libre los determinantes antigénicos a β -lactama (tipo BPO), para conformar antígenos dendriméricos sintéticos soportados en fase sólida, apropiados para ser aplicados a métodos de cuantificación de anticuerpos IgE tipo RAST.

La unión del dendrímero a la fase sólida puede efectuarse por distintos reactivos de activación de los hidroxilos de la celulosa como BrCN o la utilización de α -halohaluros de alcanóilo.

6. El proceso de reconocimiento molecular por las IgE a los antígenos dendriméricos sintéticos soportados sobre la fase sólida puede resultar favorecido si entre la fase sólida y dicho derivado dendrimérico se conecta un espaciador tipo polietilenglicol.

Se ha podido evaluar y cuantificar el número de estructuras dendriméricas antigénicas y el número de unidades de BPO que se soportan sobre la fase sólida.

Esto nos ha permitido, por un lado, establecer un método de control de la calidad del soporte sólido que hemos ido modificando en cada paso del proceso de preparación de estos materiales para su aplicación en métodos diagnósticos tipo RAST.

Por otro lado, los resultados obtenidos con el material que previamente se trató con trimetilaminopropilsilano (TMAPS), seguido del espaciador tipo polietilenglicol, nos ha permitido preparar fases sólidas con una mayor densidad de antígenos sintéticos y determinantes BPO por unidad de soporte sólido. Los primeros estudios de determinación de IgE mediante RAST indican una mejor disposición de los antígenos dendriméricos sintéticos soportados sobre esta fase sólida en comparación con los otros métodos empleados en esta memoria.

Parte Experimental

General

Productos Químicos: Los productos empleados son comerciales sin más purificación. Los dendrímeros Starbust PAMAM de generaciones 0-6 (disueltos en metanol) se compraron en Aldrich o en Dendritic Nanotechnologies (dnt). Las muestras de bencilpeniciloato y amoxiciloato sódico fueron suministradas por laboratorios Diater. Los disolventes se destilaron cuando fue necesario.²⁰³

Puntos de fusión: Los puntos de fusión se han determinado en un aparato Gallenkamp y están sin corregir.

Rotación óptica: Los poderes rotatorios ($[\alpha_D]$) se midieron en un polarímetro digital Perkin Elmer 241 a temperatura ambiente, con las concentraciones y los disolventes indicados en cada caso.

Resonancia Magnética Nuclear: Los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C se han realizado en los aparatos Bruker WP 200 SY (200 MHz para ¹H y 50.3 MHz para ¹³C) y Bruker ARX-400 (400 MHz para ¹H y 100.6 MHz para ¹³C). Los valores de los desplazamientos químicos (δ) están expresados en ppm, empleando como referencia interna los valores de las señales del disolvente protonado residual en disolvente deuterado (para cloroformo: δ RMN-¹H 7.24 ppm, δ RMN-¹³C 77 ppm; para agua: δ RMN-¹H 4.8 ppm, empleando Na₂CO₃ δ RMN-¹³C 168 ppm como referencia en los espectros realizados a los dendrímeros). Los valores de las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en Hz y en cada caso se indica la multiplicidad de las señales. Algunos experimentos de resonancia (NOE y algunos bidimensionales) se han llevado a cabo en un aparato Bruker (500 MHz) en la Universidad de Santiago de Compostela.

Espectrometría de masas.

Los *EM de baja resolución* se han registrado en los espectrómetros de masas HP5988A por impacto electrónico a 70 eV (con introducción directa de la muestra o a través de un

²⁰³ W. L. F. Armarego, D. D. Perrin. *Purification of Laboratory Chemicals*. Butterworth-Heinemann: Oxford, 1996.

cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890A, equipado con una columna capilar HP1 (crosslinked methyl silicone gum) de 12 m x 0.2 mm x 0.33 μm) y Termo Finnigan Trace DSQ a 70 eV, usando una sonda de exposición directa (con rampa inicial de 0 a 20 mA en 30 seg. y una segunda rampa de 20 a 1000 mA en 30 seg.)

Los *EM de alta resolución* se registraron en un espectrómetro VG Autospec (C.A.C.T.I. Univesidad de Vigo).

Los *EM FAB* en un espectrómetro de masas VG Quatro en la Universidad de La Coruña.

Los *MALDI-TOF* se registraron en un PE Biosystems Voyager System 2081, en el departamento de química orgánica de la Universidad de Barcelona.

Análisis elemental: Los análisis elementales se han realizado en el laboratorio de microanálisis, SCAI, Universidad de Málaga.

Cromatografía

Las cromatografías en capa fina se han realizado en cromatoplasmas de gel de sílice 60 F254 (Merck 5719) o de alúmina 60 F254 (Merck 5550).

Las cromatografías en capa fina preparativa se han hecho sobre placas preparadas en nuestro laboratorio con gel de sílice 60 F254 (Merck 7747) o sobre cromatoplasmas de gel de sílice 60 F254 (Merck 13895).

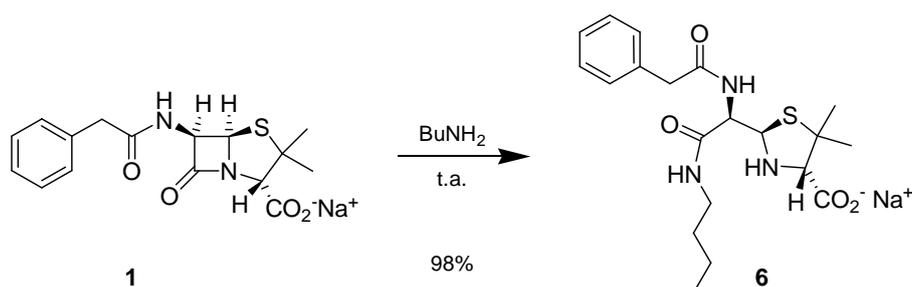
Las cromatografías en columna se han realizado con gel de sílice 60 (63-200 μm , Merck 7734) a presión atmosférica.

Filtración en gel: La cromatografía de exclusión molecular se ha realizado con Sephadex TM G-10 de Amersham Pharmazia Biotech AB.

Espectros de absorción: Los espectros de absorción se realizaron en un espectrómetro Hewlett-Packard 8452A Diode Array.

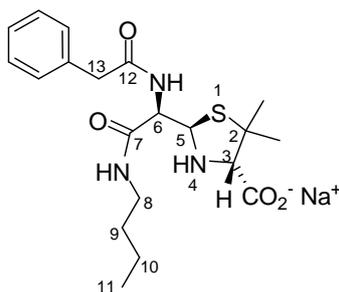
Síntesis del Capítulo I-1: Aminólisis de penicilinas.

1. (2*R*, 4*S*)-2-[(1*R*)-(Butilamino)(oxo)-1-[(fenilacetil)amino]etil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolano-4-carboxilato sódico (**6**).



Penicilina G sódica se disuelve en la mínima cantidad de agua, se añade *n*-butilamina (en exceso) y se mantiene durante una hora agitando a temperatura ambiente. Posteriormente el disolvente y exceso de butilamina se elimina en desecador a vacío que contiene H₂SO₄ conc. Se obtiene un sólido cristalino blanco con rendimientos cuantitativos correspondientes a **6**.

(2*R*, 4*S*)-2-[(1*R*)-(Butilamino)(oxo)-1-[(fenilacetil)amino]etil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolano-4-carboxilato sódico (**6**).²⁰⁴



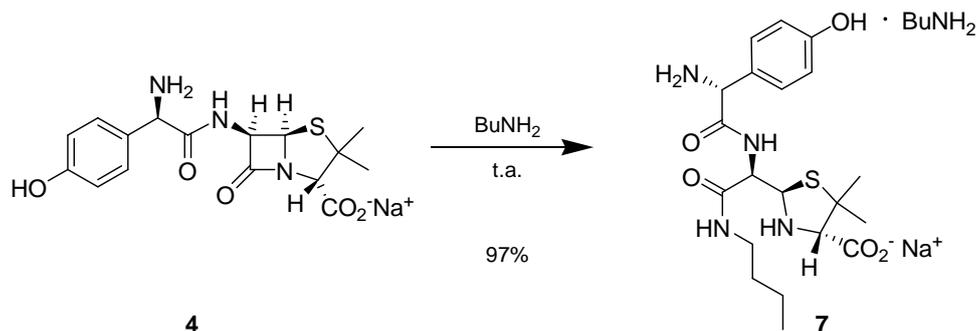
Sólido cristalino blanco. **Pf** 150-155°C [α]_D = + 83.4 (c = 0.5, H₂O). **RMN-¹H** (400 MHz, D₂O) δ ppm: 0.81 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-CH₃), 1.21 (s, 3H, 2-CH₃- α), 1.23 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.38 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₃), 1.56 (s, 3H, 2-CH₃- β), 3.12 (m, 2H, CH₂-NH), 3.44 (s, 1H, H-3), 3.62 (d, 2H, *J* = 5.4, CH₂-Ph), 4.25 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-6), 4.86 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-5), 7.32 (m, 5H, Ph). **RMN-¹³C** (100

MHz, D₂O + CDCl₃) δ ppm: 12.9, 19.3, 26.7, 27.1, 30.3, 39.0, 42.0, 59.2, 59.3, 64.7,

²⁰⁴ La nomenclatura correcta de la molécula **6** y **7** no se corresponde con la numeración de las posiciones de la molécula mostrada en esta memoria, pero la numeración que se presenta es la procedente de las penicilinas cerradas.

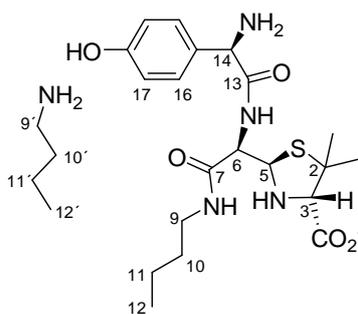
74.4, 127.3, 128.9, 129.1, 134.8, 171.0, 174.4, 174.9. **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para $C_{20}H_{29}N_3NaO_4S$ $[M+H]^+$: 430.1776; encontrado: 430.1776.

2. (2R, 4S)-2-[(1R)-1-[(2R)-Amino(4-hidroxifenil)acetil]amino}(butilamino)(oxo)etil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolano-4-carboxilato sódico · Butilamina (7).



Amoxicilina sódica se disuelve en *n*-butilamina (exceso) y se mantiene durante una hora agitando a temperatura ambiente. Posteriormente el exceso de butilamina se elimina en desecador a vacío que contiene H_2SO_4 conc. Se obtiene un sólido cristalino anaranjado con rendimientos cuantitativos correspondientes a 7.

(2R, 4S)-2-[(1R)-1-[(2R)-Amino(4-hidroxifenil)acetil]amino}(butilamino)(oxo)etil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolano-4-carboxilato sódico · Butilamina (7).²⁰⁴



Sólido cristalino naranja. **Pf** 225-230°C. $[\alpha]_D = +23.3$ ($c = 0.5$, H_2O). **RMN-¹H** (400 MHz, D_2O) δ ppm: 0.85 (t, $J = 7.5$ Hz, CH_3), 0.93 (t, $J = 7.5$ Hz, CH_3), 1.22 (s, 3H, 2- CH_3 - α), 1.52 (s, 3H, 2- CH_3 (β)), 1.20-1.67 (m, 8 H, H-10, H-11, H-10', H-11'), 2.97 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H-9'), 3.19 (m, 2H, H-9), 3.40 (s, 1H,

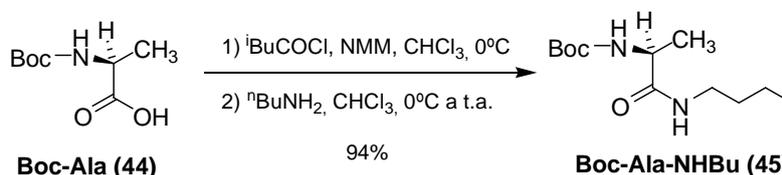
H-3), 4.25 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, H-6), 4.52 (s, 1H, H-14), 4.95 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, H-5), 6.82 y 7.24 (AA'BB', 4H, $J = 7.7$ Hz, H-16 y H-17). **RMN-¹³C** (50 MHz, $D_2O + CDCl_3$) δ ppm: 12.9, 12.9, 19.4, 19.4, 26.6, 26.7, 30.3, 39.1, 39.2, 59.3, 64.6, 74.4, 77.3, 116.7, 128.4, 129.8, 158.3, 170.9, 174.9, 176.1.

Síntesis del Capítulo I-2: Estructuras tipo 31.

1. Síntesis de las aminas precursoras.

1.1. Hidrocloruro de *N*¹-butil-*L*-alaninamida (46)

1.1.1. *N*¹-Butil-*N*²-(*tert*-butoxicarbonil)-*L*-alaninamida (45)



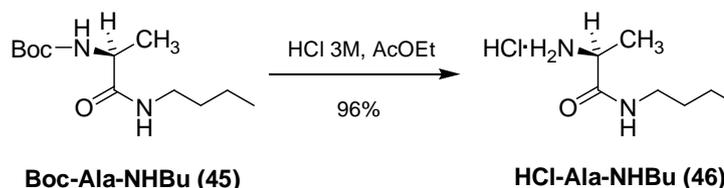
A una disolución de 3 g (15.9 mmol) de *N*-Boc-*L*-alanina (**44**) en 35 mL de CHCl_3 anhidro en atmósfera inerte y en agitación a 0°C , se añaden secuencialmente, gota a gota, 1.95 mL (17.6 mmol) de NMM y 2.25 mL (17.6 mmol) de cloroformiato de isobutilo. Transcurridos 30 minutos, se añaden, gota a gota, 1.8 mL (19.1 mmol) de *n*-butilamina y, lentamente, se deja subir la temperatura de la reacción hasta temperatura ambiente. Tras 48 horas, el crudo se lava consecutivamente con H_2O , disolución acuosa de HCl al 5%, H_2O , disolución acuosa de NaHCO_3 al 10% y H_2O . La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro y se concentra a sequedad. Se obtienen 3.68 g (94%) de un sólido blanco correspondiente al producto **45**.

*N*¹-Butil-*N*²-(*tert*-butoxicarbonil)-*L*-alaninamida (45)

Sólido blanco. **Pf** $70\text{--}72^\circ\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}} = -35.2$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.31 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH-CH_3), 1.41 (s, 9H, ^tBu), 1.20-1.52 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 3.22 (c, 2H, $J = 6.4$ Hz, NH-CH_2), 4.10 (q, 1H, $J = 7.0$ Hz, CH-CH_3), 5.05 (sa, 1H, NH), 6.25 (sa, 1H, NH). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl_3) ppm: 13.7, 18.3, 19.9, 28.3, 31.5, 39.1, 50.0, 80.0, 155.5, 172.5. **EM (IE)** m/z (%): 244

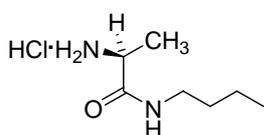
(M⁺,1), 171 (19), 145 (26); 144 (38); 100 (12), 88 (100). **Análisis elemental** calculado para C₁₂H₂₄N₂O₃: C, 58.99; H, 9.90; N, 11.47; encontrado: C, 59.00; H, 10.43; N, 11.47.

1.1.2. Hidrocloruro de N¹-butil-L-alaninamida (46)



A una disolución de 1.8 g (7.4 mmol) de **45** en 10 mL de AcOEt se le añaden 9 mL (exceso) de una disolución acuosa de HCl 3M, y se mantiene con agitación durante 3 horas. El disolvente se evapora a sequedad, y el residuo aceitoso se tritura con Et₂O. Por filtración o decantación se obtienen cuantitativamente 1.3 g de un sólido blanco (**46**).

Hidrocloruro de N¹-butil-L-alaninamida (46)



Sólido blanco. **Pf** 110-112°C. $[\alpha]_{\text{D}} = +13.0$ (c = 0.15, H₂O).

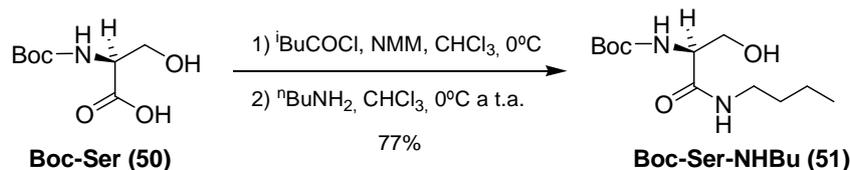
RMN-¹H (200 MHz, D₂O) δ ppm: 0.95 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-CH₃), 1.30-1.65 (m, 4H, CH₂-CH₂), 1.57 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH-CH₃), 3.29 (m, 2H, NH-CH₂), 4.10 (c, 1H, *J* = 7.0 Hz, CH-CH₃).

RMN-¹³C (100 MHz, D₂O + CDCl₃) δ ppm: 13.0, 16.6, 19.4, 30.3, 39.3, 49.2, 170.5.

Análisis elemental calculado para C₇H₁₇ClN₂O: C, 46.53; H, 9.48; N, 15.50; encontrado: C, 46.08; H, 9.43; N, 15.55.

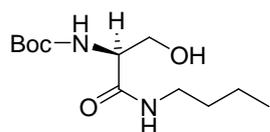
1.2. Hidrocloruro de N¹-butil-L-serinamida (52)

1.2.1. N¹-Butil-N²-(tert-butoxicarbonil)-L-serinamida (51)



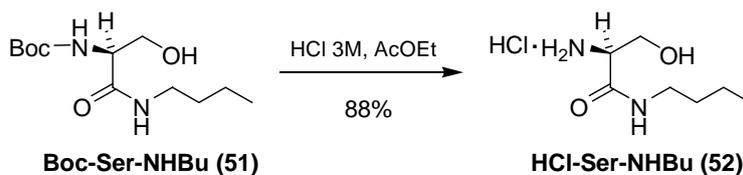
La reacción se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **45**, empleando 1.4 g (6.9 mmol) de *N*-Boc-*L*-serina (**50**), 0.9 mL (7.6 mmol) de NMM, 1 mL (7.6 mmol) de cloroformiato de isobutilo, 0.8 mL (8.3 mmol) de *n*-butilamina y 48 horas de reacción. Se obtiene un sólido que se recrystaliza de AcOEt-Hexano para obtener 1.4 g (77%) de cristales blancos correspondientes al producto deseado.

*N*¹-Butil-*N*²-(*tert*-butoxicarbonil)-*L*-serinamida (**51**)

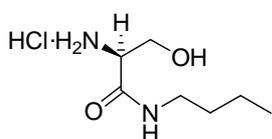


Sólido cristalino blanco. **Pf** 102-104°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -69.0$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.89 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH_3), 1.18-1.52 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.39 (s, 9H, ^tBu), 3.19 (c, 2H, $J = 6.4$ Hz, NH-CH_2), 3.55 (dd, 1H, $J = 5.3$ Hz, $J_{\text{ab}} = 11.0$ Hz, $H_{\text{a}}\text{-CH-OH}$), 3.89 (dd, 1H, $J = 3.7$ Hz, $J_{\text{ab}} = 11.0$ Hz, $H_{\text{b}}\text{-CH-OH}$), 3.96-4.07 (m, 1H, CH), 5.73 (da, 1H, $J = 6.7$ Hz, OCONH), 6.92 (sa, 1H, NH-CO). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.6, 19.9, 28.2, 31.4, 39.1, 54.9, 62.8, 80.4, 156.3, 171.2. **EM** (IE) m/z (%): 260(M^+ , 1), 187 (24), 174 (26), 160 (40), 143 (44), 129 (28), 100 (16), 87 (100). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 261.1814; encontrado: 261.1814

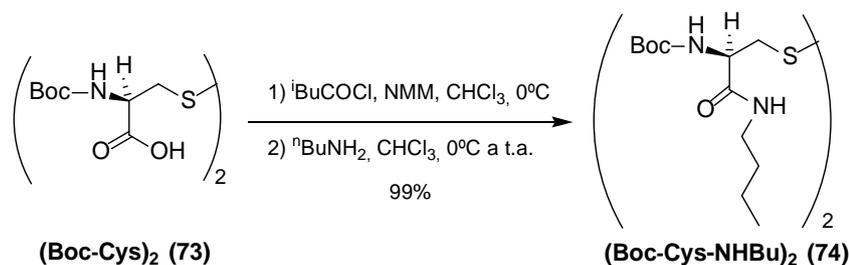
1.2.2 Hidrocloruro de *N*¹-butil-*L*-serinamida (**52**)



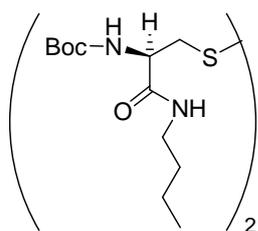
A una disolución de 1.4 g (5.4 mmol) de **51** en 6 mL de AcOEt, se le añaden 4 mL de una disolución de HCl 3M y se mantiene con agitación mecánica a temperatura ambiente. Tras 3 horas de reacción, el disolvente se evapora a sequedad y el residuo aceitoso se mantiene a vacío en desecador con NaOH durante unas 48 horas. Se obtienen 940 mg (88%) de un aceite que corresponde al producto **52**.

Hidrocloreto de N^1 -butil-L-serinamida (52)

Aceite incoloro. $[\alpha]_D = +11.0$ ($c = 1.0$, H_2O). **RMN- 1H** (400 MHz, D_2O) δ ppm: 0.87 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH_3), 1.30 (m, 2H, CH_2-CH_3), 1.48 (m, 2H, $CH_2-CH_2-CH_3$), 3.23 (ta, 2H, $NH-CH_2$), 3.88 (dd, 1H, $J = 5.8$ Hz, $J_{ab} = 12.3$ Hz, $H_a-CH-OH$), 3.96 (dd, 1H, $J = 4.2$ Hz, $J_{ab} = 12.3$ Hz, $H_b-CH-OH$), 4.05 (t, 1H, $J = 4.9$ Hz, CH). **RMN- ^{13}C** (50 MHz, $D_2O + CD_3OD$) δ ppm: 14.0, 20.4, 31.4, 40.4, 55.6, 61.3, 168.2. **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para $C_7H_{17}N_2O_2$ $[M]^+$: 161.1290; encontrado: 161.1291

1.3. $N^1, N^{1'}$ -Dibutil-L-cistinadiamida (75)**1.3.1 $N^1, N^{1'}$ -Dibutil- $N^2, N^{2'}$ -bis-(*tert*-butoxicarbonil)-L-cistinadiamida (74)**

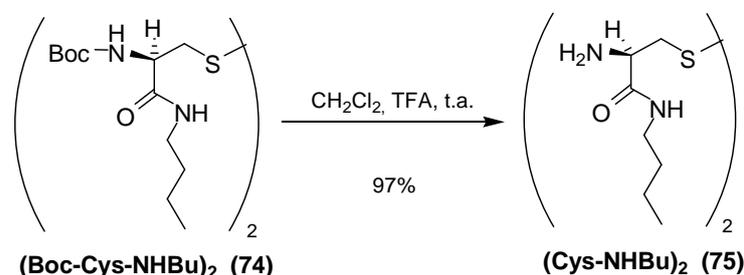
La síntesis se lleva a cabo mediante el método del anhídrido mixto, descrito para la preparación del compuesto **45**, utilizando 2.6 g (6 mmol) de **73**, 1.5 mL (13.2 mmol) de NMM, 1.7 mL (13.2 mmol) de clorocarbonato de isobutilo y 1.4 mL (14.4 mmol) de *n*-butilamina, empleando 1 hora para la formación del anhídrido mixto y 48 horas para la reacción de condensación, obteniendo cuantitativamente 1.6 g de un sólido blanco correspondiente al producto **74**. Se recrystaliza de $CHCl_3$ -AcOEt.

 $N^1, N^{1'}$ -Dibutil- $N^2, N^{2'}$ -bis-(*tert*-butoxicarbonil)-L-cistinadiamida (74)

Sólido blanco. **Pf** 179-180°C. $[\alpha]_D = +58.5$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$). **RMN- 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 0.88 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH_2-CH_3), 1.27-1.37 (m, 2H, CH_2-CH_3), 1.44 (s, 9H, tBu), 1.45-1.55 (m, 2H, $CH_2-CH_2-CH_3$), 2.86 (dd, 1H, $J = 10.2$ Hz, $J_{ab} = 14.5$ Hz, H_a-CH-S), 2.93 (dd, 1H, $J = 4.5$ Hz, $J_{ab} = 14.5$ Hz, H_b-CH-S),

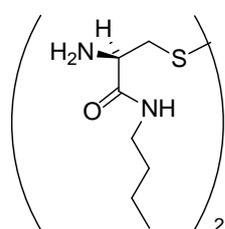
3.12-3.32 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 4.76 (dt, 1H, $J = 4.5$ Hz, $J = 9.6$ Hz, CH-CH_2), 5.54 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, OCONH), 7.65 (ta, 1H, CONH). **RMN- ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.7, 20.1, 28.3, 31.7, 39.3, 47.5, 54.6, 79.9, 155.8, 170.0. **EM** (IE) m/z (%): 550 (M^+ , 3), 243 (47), 220 (100), 219 (96), 187 (89), 177 (44), 175 (51), 154 (44), 57 (75). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 551.2937; encontrado: 551.2937

1.3.2. $N^1, N^{1'}$ -Dibutil-L-cistinadiamida (75)



A una suspensión de 2.4 g (4.35 mmol) de **74** en 25 mL de CH_2Cl_2 se le añaden 8 mL de TFA. Tras agitar a temperatura ambiente durante 19 horas, se añaden 75 mL más de CH_2Cl_2 , se lava primero con disolución acuosa de NaOH concentrada (confirmar pH básico), después con H_2O y se seca con MgSO_4 anhidro. Se obtiene cuantitativamente un sólido blanco correspondiente al producto puro. Se recristaliza de AcOEt-Hexano.

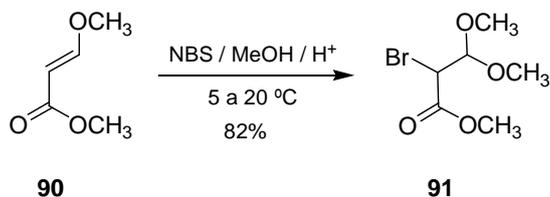
$N^1, N^{1'}$ -Dibutil-L-cistinadiamida (75)



Sólido blanco. **Pf** 79-81°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -16.5$ ($c = 1.0$, MeOH). **RMN- ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.89 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.25-1.35 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.43-1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.68 (sa, 2H, NH_2), 2.74 (dd, 1H, $J = 8.3$ Hz, $J_{\text{ab}} = 13.9$ Hz, $H_{\text{a}}\text{-CH-S}$), 3.23 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-NH} + H_{\text{b}}\text{-CH-S}$), 3.69 (dd, 1H, $J = 4.3$ Hz, $J = 8.3$ Hz, CH), 7.50 (ta, 1H, CONH). **RMN- ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.7, 20.0, 31.5, 38.9, 43.7, 53.8, 172.9. **EM** m/z (%): 350 (M^+ , <1), 233 (69), 175 (10), 129 (51), 97 (28), 83 (29), 76 (100), 72 (31), 57 (43). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 351.1888; encontrado: 351.1888.

1.4. 2-Amino-*N*¹-(butil)-3,3-dimetoxipropanamida (93)

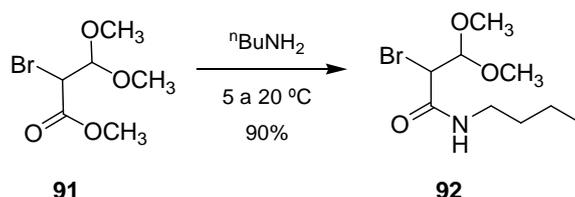
1.4.1. 2-Bromo-3,3-dimetoxipropanoato de metilo (91)



Se disuelven 5.8 g (0.05 mol) de *trans*-3-metoxiacrilato de metilo en 15 mL de MeOH anhidro, bajo atmósfera de argón. La mezcla se enfría en baño de agua-hielo, se añaden unas gotas de H₂SO₄ concentrado y se mantiene con agitación. Se adicionan 8.895 g (0.05 mol) de NBS en pequeñas porciones durante una hora sobre la mezcla fría. Seguidamente, se deja agitando a temperatura ambiente durante 16 horas. Concluido el tiempo de reacción, se añade Na₂CO₃ sólido hasta alcanzar pH 7, y se mantiene con agitación durante 30 minutos. A continuación se adiciona el crudo de reacción a un embudo de decantación, junto con 15 mL de agua y 40 mL de CH₂Cl₂. Se recoge la fase orgánica, y la fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ (2 x 25 mL). Se reúnen todas las fases orgánicas, se lavan con 2 x 80 mL de H₂O y se secan sobre MgSO₄ anhidro. Tras evaporación del disolvente se obtienen 9.4 g (82%) de un líquido incoloro, que corresponde al producto **91**.

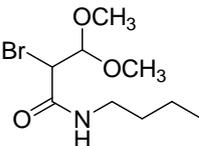
2-Bromo-3,3-dimetoxipropanoato de metilo (91)

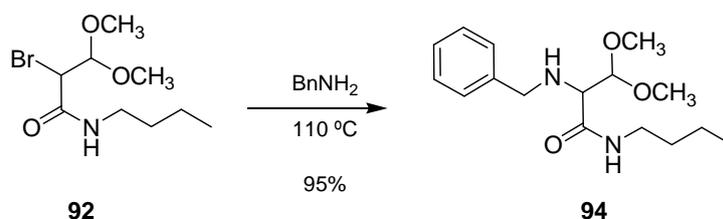
Líquido incoloro. **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 3.40 (s, 6 H, CH(OCH₃)₂), 3.77 (s, 3H, OC-OCH₃), 4.22 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, CH-Br), 4.72 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, CH(OCH₃)₂). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 43.5, 52.8, 53.7, 55.5, 103.2, 167.8. **EM** *m/z* (%): 227 (M⁺ + 2, <1), 225 (M⁺, <1), 197 (12), 195 (11), 75 (100). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₆H₁₂⁷⁹BrO₄ [M+H]⁺: 226.9919; encontrado: 226.9911.

1.4.2. 2-Bromo-*N*¹-(butilamino)-3,3-dimetoxipropanamida (**92**)

A una disolución de 6 g (26.4 mmol) del bromo-acetal **91** en atmósfera de argón a 5°C y en agitación, se le añade gota a gota un exceso de *n*-butilamina (5.75 mL, 58.1 mmol). Terminada la adición, se deja alcanzar lentamente temperatura ambiente y se mantiene agitando durante 24 horas. Seguidamente, se concentra la mezcla a sequedad. El residuo resultante se disuelve en CHCl₃, se lava con HCl 1N, se seca sobre MgSO₄ anhidro y se concentra a sequedad. Se obtienen 6.38 g (90%) de un sólido amarillo correspondiente a la bromo-amida **92**.

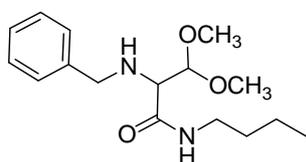
2-Bromo-*N*¹-(butilamino)-3,3-dimetoxipropanamida (**92**)

 Sólido amarillo. **Pf** 70-72°C. **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.89 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 1.22-1.60 (m, 4H, CH₂-CH₂), 3.25 (ca, 2H, *J* = 6.7 Hz, NH-CH₂), 3.45 (s, 3H, OCH₃), 3.47 (s, 3H, OCH₃), 4.29 (d, 1H, *J* = 4.2 Hz, CH-Br), 4.62 (d, 1H, *J* = 4.2 Hz, CH(OCH₃)₂), 6.50 (sa, 1H, NH). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.6, 19.8, 31.2, 39.7, 49.9, 56.2, 56.8, 104.2, 165.9. **EM (IE)** *m/z* (%): 269 (M⁺ + 2, < 1), 267 (M⁺, < 1), 194 (4), 192 (5), 188 (7), 85 (35), 75 (100). **HRMS (FAB)** Masa exacta calculada para C₉H₁₉N₃⁷⁹Br [M+H]⁺: 268.0548; encontrado: 268.0560.

1.4.3. 2-(Bencilamino)-*N*¹-(butil)-3,3-dimetoxipropanamida (**94**).

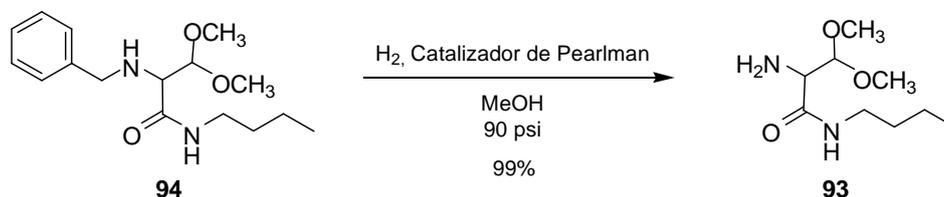
En un matraz que contiene 2 g (7.5 mmol) de **92**, se añaden 3.25 mL (29.8 mmol) de bencilamina y se mantiene con agitación durante 48 horas a 110°C. Finalizada la reacción, se deja enfriar el crudo de reacción, se disuelve en la mínima cantidad de CHCl_3 frío y se filtra a vacío para eliminar el hidrobromuro de bencilamina (sólido blanco). Seguidamente, se aumenta el volumen de CHCl_3 en que se disuelve el crudo hasta 50 mL, se lava tres veces con H_2O para arrastrar la bencilamina en exceso, se seca sobre MgSO_4 anhidro y se concentra a sequedad, resultando un líquido viscoso marrón que se purifica por cromatografía en columna (Hexano/AcOEt, 1:1) para obtener 2.1 g (95%) de un aceite amarillo, correspondiente al producto **94**.

2-(Bencilamino)- N^1 -(butil)-3,3-dimetoxipropanamida (**94**)



Aceite amarillo. **RMN- ^1H** (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.90 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.20-1.57 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.09 (sa, 1H, $\text{NH-CH}_2\text{-Ph}$), 3.22 (ca, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.26 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz, NH-CH-C=O), 3.34 (s, 3H, OCH_3), 3.35 (s, 3H, OCH_3), 3.76 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.60 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz, $\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$), 6.43 (sa, 1H, NH-CO). **RMN- ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.6, 19.9, 31.5, 38.6, 53.2, 55.5, 56.3, 63.4, 105.5, 127.1, 128.2, 128.3, 139.5, 170.6. **EM (IE)** m/z (%): 294 (M^+ , < 1), 219 (5), 194 (8), 162 (18), 91 (65), 75 (100). **HRMS (FAB)** Masa exacta calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 295.2022; encontrado: 295.2030.

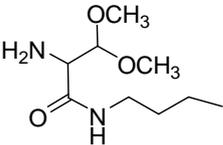
1.4.4. 2-Amino- N^1 -(butil)-3,3-dimetoxipropanamida (**93**)



Una mezcla de 800 mg (2.7 mmol) de **94** y 670 mg de catalizador de Pearlman ($\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 10%) en 90 mL de MeOH se hidrogena a temperatura ambiente con una presión de H_2 de 90 psi (aprox. 6 atm.) durante 48 horas. El sólido se filtra a través de celita y se lava con MeOH. El disolvente se elimina a presión reducida para obtener

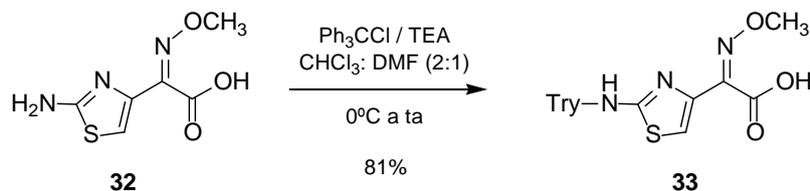
cuantitativamente 550 mg de un líquido amarillo correspondiente a la amina libre deseada.

2-Amino-*N*¹-(butil)-3,3-dimetoxipropanamida (93)


 Líquido amarillo. **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.87 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 1.21-1.53 (m, 4H, CH₂-CH₂), 1.90 (sa, 2H, NH₂), 3.21 (c, 2H, $J = 6.7$ Hz, CH₂-NH), 3.37 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, CH-NH₂), 3.40 (s, 3H, OCH₃), 3.41 (s, 3H, OCH₃), 4.67 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, CH(OCH₃)₂), 7.31 (sa, 1H, NH). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.7, 19.9, 31.5, 38.7, 56.0, 56.9, 57.1, 105.4, 171.2. **EM** m/z (%): 173 (M⁺-31, <1), 144(7), 104 (11), 75 (100), 73 (13), 72 (15). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₉H₂₁N₂O₃ [M+H]⁺: 205.1552; encontrado: 205.1552.

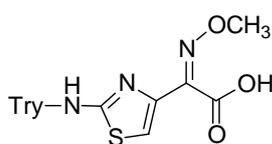
2. Protección de las cadenas laterales

2.1. Acido 2-(*Z*-metoxiimino)-2-[2-(tritolamino)-1,3-tiazol-4-il]acético (33)

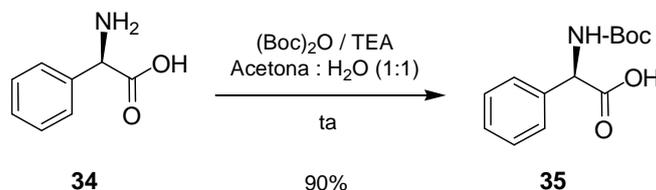


Una solución de 6 g (29.8 mmol) de ácido **32** y 9.2 mL (65.6 mmol) de TEA en 150 mL de una mezcla de CHCl₃/DMF 2:1, se mantiene en agitación y enfriada en baño de agua-hielo. A continuación, se añaden 9.14 g (32.8 mmol) de cloruro de tritilo en pequeñas porciones durante una hora. La mezcla se deja alcanzar temperatura ambiente y se mantiene en agitación durante 12 horas.

Posteriormente, se añade una solución de HCl 1M y la mezcla se extrae varias veces con CHCl₃. La fase orgánica extraída se seca sobre MgSO₄ anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. Se obtiene 10.7 g (81%) de un sólido blanco correspondiente al ácido *N*-protegido **33**.

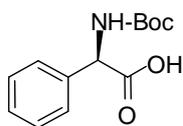
Acido 2-Z-(metoxiimino)-2-[2-(trifilamino)-1,3-tiazol-4-il]acético (33)

Sólido blanco. **Pf** 105-110°C. **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 3.98 (s, 3H, OCH₃), 6.65 (s, 1H, CH-S), 7.28 (m, 15H, 3 Ph), 8.20 (sa, 1H, NH), 11.0 (sa, 1H, COOH). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 63.0, 72.9, 108.4, 127.8, 128.3, 129.2, 136.0, 141.6, 145.1, 164.9, 169.3. **EM** *m/z* (%): 367 (<1), 285 (3), 243 (100), 208 (11), 165 (79). **Análisis elemental** calculado para C₂₅H₂₁N₃O₃S: C, 67.70; H, 4.77; N, 9.47, S, 7.23; encontrado: C, 65.75; H, 5.09; N, 9.19, S, 6.72.

2.2. N-tert-Butoxicarbonil-D-fenilglicina (35)

A una solución de 4 g (26.4 mmol) de D-fenilglicina (**34**) y 7.2 mL (52.8 mmol) de TEA en 50 mL de una mezcla de acetona / H₂O (1:1) a temperatura ambiente y con agitación mecánica, se le añade lentamente una solución de 6.9 g (31.6 mmol) de di-*tert*-butildicarbonato en 10 mL de acetona. La reacción se mantiene a temperatura ambiente y con agitación mecánica durante 24 horas y, seguidamente, se evapora la acetona a presión reducida.

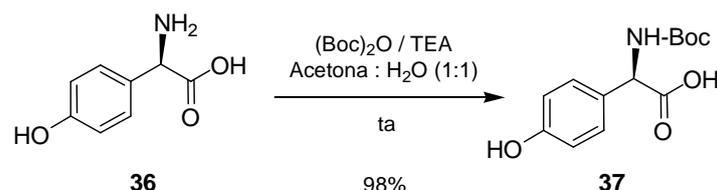
La fase acuosa se acidifica con solución acuosa de HCl al 10% hasta alcanzar pH 2 y se extrae dos veces con Et₂O. La fase etérea se seca sobre MgSO₄ anhidro y se evapora a vacío para obtener 5.97 g (90%) de un aceite espeso correspondiente al producto puro **35**.

N-tert-Butoxicarbonil-D-fenilglicina (35)

Aceite denso. $[\alpha]_D = -137.3$ (*c* = 1.0, CHCl₃). **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.20 (s, 9H, ^tBu), 5.11 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, CH), 7.32 (s, 5H, Ph), 8.18 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, NH), 10.01 (sa, 1H, COOH). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 27.8, 58.7, 81.6, 127.1, 127.8, 128.3,

138.3, 156.9, 173.3. **EM (IE) m/z (%)**: 206 (M^+ - 45, 18), 177 (12), 150 (88), 135 (15), 106 (100), 77 (48). **Análisis elemental** calculado para $C_{13}H_{17}NO_4$: C, 61.09; H, 7.32; N, 5.52; encontrado: C, 62.14; H, 6.82; N, 5.57.

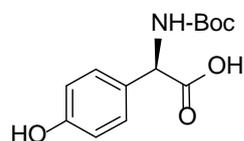
2.3. *N*-*tert*-Butoxicarbonil-D-4-hidroxifenilglicina (**37**)



La amina protegida **37** se obtuvo empleando el procedimiento descrito para la obtención del ácido protegido **35**, a partir de D-4-hidroxifenilglicina (2 g, 12 mmol), TEA (3.3 mL, 24 mmol), y di-*tert*-butildicarbonato (2.9 g, 13.2 mmol).

Se obtuvo un sólido blanco (3.1 g) correspondiente al ácido **37** con rendimiento cuantitativo.

N-*tert*-Butoxicarbonil-D-4-hidroxifenilglicina (**37**)



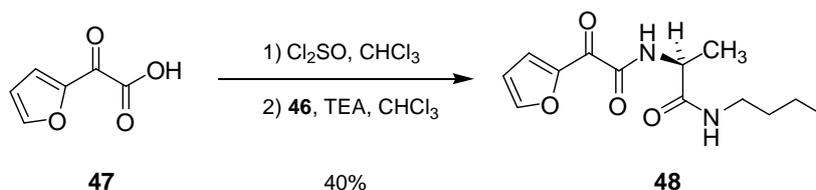
Sólido blanco. **Pf** 54-56°C. $[\alpha]_D = -155.7$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **RMN- ^1H** (200 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 1.37 (s, 9H, ^tBu), 4.94 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, CH), 6.70 y 7.17 (AA'BB', ^4H , C_6H_4), 7.39 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, NH), 9.45 (sa, 1H, COOH). **RMN- ^{13}C** (50 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 28.2, 57.1, 78.3, 115.1, 127.5, 129.0, 155.2, 157.0, 172.8. **EM (IE) m/z (%)**: 267 (M^+ , <1), 222 (5), 221 (9), 193 (24), 166 (100), 151 (19), 122 (96), 95 (26), 77 (22). **Análisis elemental** calculado para $C_{13}H_{17}NO_5$: C, 58.42; H, 6.41; N, 5.24; encontrado: C, 55.18; H, 7.17; N, 4.81.

3. Síntesis de estructuras hapténicas tipo 31 con grupo G= CH₃

3.1. N¹-Butil-N²-[2-furil(Z-metoxiimino)acetil]-L-alaninamida (Z-38).

3.1.1. Z-38: Ruta A.

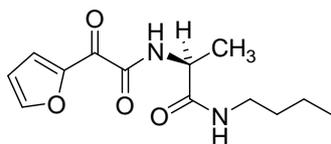
3.1.1.1. N¹-Butil-N²-[2-furil(oxo)acetil]-L-alaninamida (48)



A una disolución de 1.0 g (7.14 mmol) de ácido α -oxo-2-furanacético (**47**) en 40 mL de CHCl₃ anhidro, en atmósfera de argón y en agitación, se le adicionan gota a gota 0.6 mL (7.9 mmol) de cloruro de tionilo. Tras 7 horas de reacción, la mezcla se enfría en baño de agua-hielo y, se añaden, sobre esta disolución, 1.7 g (9.4 mmol) de amina **46** y 4.5 mL (32.1 mmol) de TEA disueltos en 40 mL de CHCl₃ anhidro. La adición se realiza gota a gota en un tiempo de 30 minutos. Una vez concluida la adición, se deja alcanzar lentamente temperatura ambiente.

Después de 20 horas de reacción, la mezcla se lava consecutivamente con H₂O, disolución acuosa de HCl al 10%, H₂O, disolución acuosa de NaHCO₃ al 10% y H₂O. La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro y se concentra a sequedad. Se obtiene un aceite que se cromatografía en columna (Hexano/AcOEt, 1:2) para dar lugar a un sólido amarillo (760 mg, 40%) correspondiente al producto de condensación **48**.

N¹-Butil-N²-[2-furil(oxo)acetil]-L-alaninamida (48)

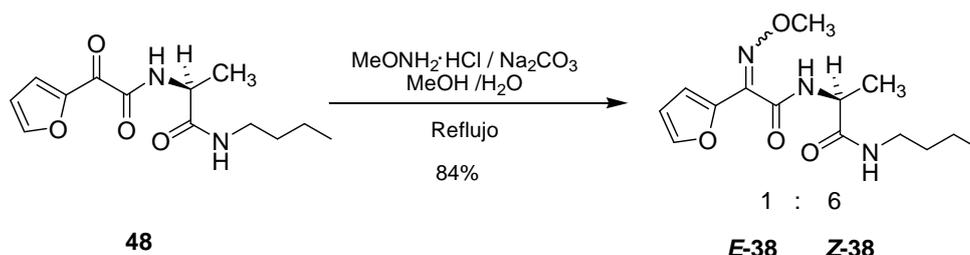


Sólido amarillo. Pf 84-86°C. [α]_D = - 82.1 (c = 1.0, CHCl₃).

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.88 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz, CH₂-CH₃), 1.45 (d, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH-CH₃), 1.3-1.7 (m, 4H, CH₂-CH₂), 3.24 (c, 2H, *J* = 6.7 Hz, NH-CH₂), 4.44 (q, 1H, *J* = 7.3 Hz, CH-CH₃), 6.06 (sa, 1H, NH), 6.60 (dd, 1H, *J* = 3.7 Hz, *J* = 1.8 Hz, CH=CH-O), 7.74 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 0.9 Hz, CH=C-O), 7.75 (sa, 1H, NH), 8.09 (dd, 1H, *J* = 3.7 Hz, *J* = 0.9 Hz, =CH-O). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.6,

17.9, 19.9, 31.5, 39.4, 49.1, 113.1, 126.7, 149.3, 149.6, 159.9, 170.7, 172.9. **EM** (IE) m/z (%): 266 (M^+ , 1), 171 (84), 167 (39), 95 (100). **Análisis elemental** calculado para $C_{13}H_{18}N_2O_4$: C, 58.63; H, 6.81; N, 10.52; encontrado: C, 58.63; H, 6.91; N, 10.51.

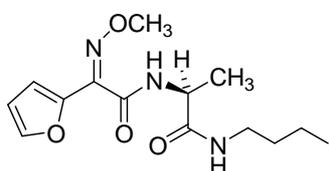
3.1.1.2. N^1 -Butil- N^2 -[2-furil(*Z*-metoxiimino)acetil]-*L*-alaninamida (**Z-38**)



Una disolución de 840 mg (3.1 mmol) de **48**, 526 mg (6.3 mmol) de hidrocloreuro de metoxilamina y 500 mg (4.7 mmol) de Na_2CO_3 en MeOH anhidro (40 mL) en atmósfera inerte, se calienta a reflujo durante 22 horas.

El crudo de reacción se deja enfriar y se evapora el disolvente, el sirupo resultante se disuelve en 20 mL de H_2O y el producto se extrae 3 veces con CHCl_3 . Las fases orgánicas extraídas se lavan con H_2O (2 x 10 mL), se secan con MgSO_4 anhidro y se concentran a sequedad. El crudo de reacción contiene mezcla de los dos isómeros, *E/Z*, obtenidos con un 84% de rendimiento en proporción relativa 1:6, que tras varias separaciones por cromatografía flash ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9.8:0.2), rindieron 310 mg (33%) de un sólido amarillo correspondiente al isómero *Z* puro.

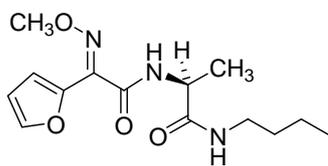
N^1 -Butil- N^2 -[2-furil(*Z*-metoxiimino)acetil]-*L*-alaninamida (**Z-38**)



Sólido amarillo. **Pf** 102-105 °C. $[\alpha]_D = -48.3$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **RMN- ^1H** (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.90 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.5-1.2 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.45 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, CH-CH_3), 3.25 (c, 2H, $J = 6.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 4.04 (s, 3H, O- CH_3), 4.58 (q, 1H, $J = 7.3$ Hz, CH-CH_3), 6.17 (sa, 1H, NH), 6.45 (dd, 1H, $J = 3.7$ Hz, $J = 1.8$ Hz, CH=CH-O), 6.78 (dd, 1H, $J = 3.7$ Hz, $J = 0.9$ Hz, CH=C-O), 6.79 (da, 1H, $J = 7.3$ Hz, NH), 7.49 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 0.9$ Hz, CH=CH-O). **RMN- ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.7, 19.2, 19.9, 31.5, 39.4, 49.2, 63.5, 111.8, 113.9, 144.0, 144.7, 145.7, 160.4, 171.1. **EM** (IE) m/z (%):

295 (M^+ , 5), 195 (100), 165 (99), 152 (41), 124 (98), 94 (74), 93 (90). **HRMS** (IE) Masa exacta calculada para $C_{14}H_{21}N_3O_4$: 295.1532; encontrado: 295.1536.

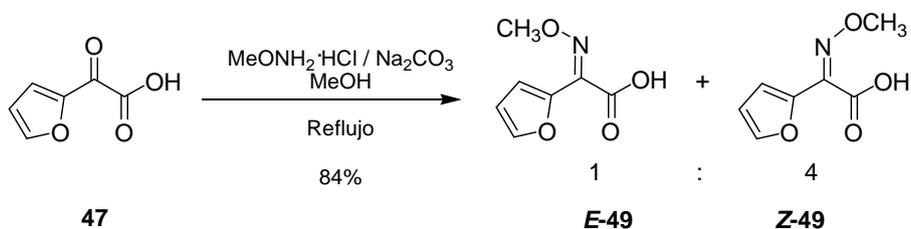
***N*¹-Butil-*N*²-[2-furil(*E*-metoxiimino)acetil]-*L*-alaninamida (*E*-38)**



Sólido amarillo. **Pf** 97-99 °C. $[\alpha]_D = -10.0$ ($c = 0.2$, $CHCl_3$). **RMN-¹H** (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 0.89 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH_2-CH_3), 1.5-1.2 (m, 4H, CH_2-CH_2), 1.45 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz, $CH-CH_3$), 3.25 (c, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2-NH), 4.09 (s, 3H, CH_3-O), 4.55 (q, 1H, $J = 7.3$ Hz, $CH-CH_3$), 6.17 (sa, 1H, NH), 6.50 (dd, 1H, $J = 3.6$ Hz, $J = 1.8$ Hz, $CH=CH-O$), 7.30 (dd, 1H, $J = 3.6$ Hz, $J = 0.9$ Hz, $CH=C-O$), 7.10 (da, 1H, NH), 7.53 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 0.9$ Hz, $CH=CH-O$). **RMN-¹³C** (50 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 13.7, 18.0, 19.9, 31.5, 39.3, 49.0, 63.9, 111.5, 119.5, 142.8, 144.0, 146.3, 160.4, 169.5. **EM** (IE) m/z (%): 295 (M^+ , 5), 195 (100), 165 (68), 152 (54), 124 (43), 94 (21), 93 (28).

3.1.2. Z-38: Ruta B.

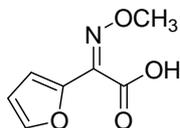
3.1.2.1. Acido α -Z-metoxiimino-2-furanacético (Z-49)



Una mezcla de 840 mg (6 mmol) de ácido α -oxo-2-furanacético **47**, 1g (12 mmol) de hidrocloreto de metoxiimina y 2.5 g (24 mmol) de Na_2CO_3 en 35 mL de MeOH anhidro se mantienen con agitación y a reflujo (80°C) durante 90 minutos. Cuando el crudo de reacción ha alcanzado temperatura ambiente, se añade HCl concentrado hasta que la mezcla de reacción alcance pH 3. El disolvente se evapora y el residuo que se obtiene se extrae primero con 70 mL de Et_2O y, después, 3 x 25 mL de Et_2O . Se reúnen las fases orgánicas, se secan con $MgSO_4$ anhidro y se concentran a sequedad. Se obtiene 912 mg (84 %) de un líquido viscoso marrón, que posteriormente solidifica, y que corresponde a la mezcla de los dos isómeros en proporción 1:4 (*E/Z*). Mediante la recrystalización de

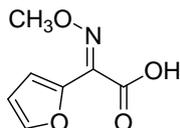
esta mezcla en benceno se obtiene 364 mg (36% con respecto al rendimiento global de la reacción) de un sólido blanco que corresponde al isómero **Z-49** puro.

Acido α -*Z*-metoxiimino-2-furanacético (**Z-49**)



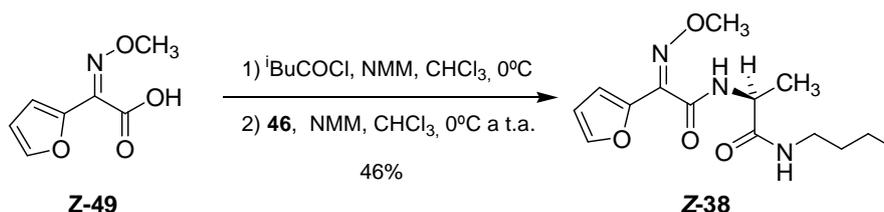
Sólido cristalino blanco. **Pf** 78-80 °C. **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 4.09 (s, 3H, CH₃), 6.39 (dd, 1H, $J = 3.6$ Hz, $J = 1.8$ Hz, CH=CH-O), 6.78 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, CH=C-O), 7.42 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, =CH-O). 9.09 (sa, 1H, OH). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 63.7, 111.9, 114.0, 141.2, 144.5, 145.0, 164.0. **EM** (IE) m/z (%): 169 (M⁺, 22), 94 (34), 93 (100), 65 (18), 64 (30). **HRMS** (IE) Masa exacta calculada para C₇H₇NO₄: 169.0375; encontrado: 169.0377.

Acido α -*E*-metoxiimino-2-furanacético (**E-49**)



Sólido amarillo. **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 4.17 (s, 3H, CH₃), 6.52 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 3.3$ Hz, CH=CH-O), 7.25 (sa, 1H, OH), 7.37 (d, 1H, $J = 3.3$ Hz, CH=C-O), 7.57 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, =CH-O). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ ppm: 63.1, 111.5, 118.8, 139.6, 142.1, 143.4, 163.6. **EM** (IE) m/z (%): 169 (M⁺, 11), 94 (33), 93 (100), 65 (20), 64 (34).

3.1.2.2. *N*¹-Butil-*N*²-[2-furil(*Z*-metoxiimino)acetil]-*L*-alaninamida (**Z-38**)



Una disolución de 50 mg de **Z-49** (0.29 mmol) en 5 mL de CHCl₃ anhidro en atmósfera inerte y en agitación a 0°C, se añaden secuencialmente, gota a gota, 0.07 mL de NMM (0.58 mmol) y 0.04 mL de cloroformiato de isobutilo (0.29 mmol). El matraz de reacción se aísla de la luz.

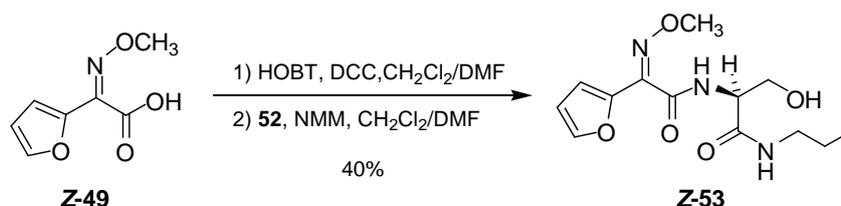
Tras 30 minutos, esta mezcla se añade, gota a gota, a una disolución de 78 mg (0.43 mmol) de **46** y 0.06 mL de NMM (0.52 mmol), y lentamente, se deja subir la temperatura de la reacción hasta temperatura ambiente. Tras 48 horas, el crudo se lava

consecutivamente con H₂O, disolución acuosa de HCl al 5%, H₂O, disolución acuosa de NaHCO₃ al 10% y H₂O. La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro y se concentra a sequedad. Las sucesivas separaciones cromatográficas en placas preparativas (Hexano/AcOEt, 1:3, y CHCl₃) proporcionan 40 mg (46%) de un sólido blanco correspondiente al producto (**Z-38**).

4. Síntesis de estructuras hapténicas tipo 31 con grupo G= CH₂OH

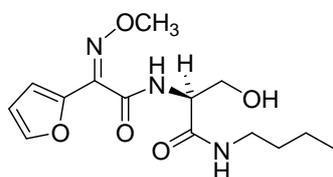
4.1. N¹-Butil-N²-[2-furil(Z-metoxiimino)acetil]-L-serinamida (**Z-53**)

4.1.1. N¹-Butil-N²-{[2-furil(Z-metoxiimino)acetil]-L-serinamida (**Z-53**): Ruta A.



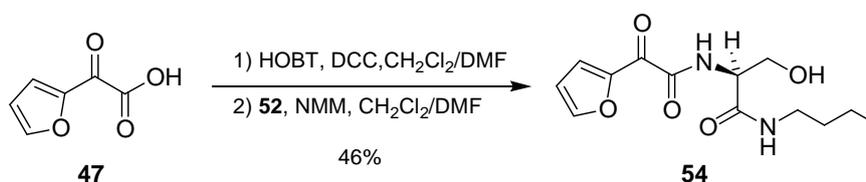
A una disolución de 338 mg de **Z-49** en 4 mL de CH₂Cl₂ anhidro bajo atmósfera inerte, enfriada en baño de hielo, se le añaden 321 mg (2.4 mmol) de HOBT recristalizado disueltos en 2.4 mL de DMF, y 412 mg (2 mmol) de DCC disueltos en 2 mL de CH₂Cl₂ anhidro. Tras 2 horas de agitación magnética a temperatura ambiente, se añaden gota gota, a temperatura ambiente, una disolución de 393 mg (2 mmol) de hidrocloreuro de amina **52** y 0.27 mL (2.4 mmol) de NMM en 3 mL de una mezcla DMF:CH₂Cl₂ (1:2).

Pasadas 48 horas, el crudo de reacción se filtra, lavando con pequeñas fracciones de CH₂Cl₂, para eliminar así parte de la dicitclohexilurea que se forma en la reacción. Se evaporan los disolventes a sequedad, el sirupo resultante se disuelve en CH₂Cl₂, se lava con una disolución de NaHCO₃ al 10% y se seca sobre MgSO₄ anhidro. El crudo se cromatografía en columna (Hexano/AcOEt, 4:6) y, se obtienen 250 mg (40%) de un sólido, que corresponde al producto de condensación **Z-53**. Se recristaliza de benceno.

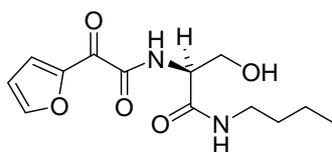
***N*¹-Butil-*N*²-[2-furil(*Z*-metoxiimino)acetil]-*L*-serinamida (**Z-53**).**

Sólido blanco. **Pf** 80-85°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -20.0$ ($c = 0.5$, CH₃OH).

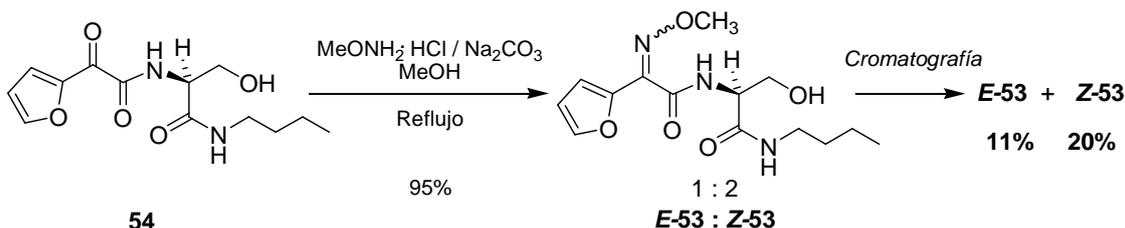
RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.91 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₂-CH₃), 1.34 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.49 (m, 3H, CH₂-CH₂-CH₃), 3.28 (m, 2H, NH-CH₂), 3.66 (dd, 1H, $J = 4.3$ Hz, $J_{\text{ab}} = 11.5$ Hz, H_{a} -CH-OH), 4.05 (s, 3H, OCH₃), 4.27 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J_{\text{ab}} = 11.5$ Hz, H_{b} -CH-OH), 4.56 (m, 1H, CH), 6.46 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 3.5$ Hz, CH=CH-O), 6.68 (sa, 1H, NH), 6.78 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz, CH=C-O), 7.50 (da, 1H, $J = 1.8$ Hz, =CH-O). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.6, 19.9, 31.4, 39.4, 54.1, 62.3, 63.5, 111.8, 113.9, 143.9, 144.8, 145.4, 161.2, 169.7. **EM (IE)** m/z (%): 311 (M⁺, 2), 211 (26), 181 (39), 152 (20), 135 (14), 124 (57), 109 (39), 94 (74), 93 (100). **HRMS (FAB)** Masa exacta calculada para C₁₄H₂₂N₃O₅ [M+H]⁺: 312.1559; encontrada: 312.1562.

4.1.2. Z-53: Ruta B.**4.1.2.1. *N*¹-Butil-*N*²-[2-furil(oxo)acetil]-*L*-serinamida (**54**)**

Se preparó según el método descrito para el compuesto **Z-53** (ruta A) a partir de 756 mg (5.4 mmol) de ácido α -oxo-2-furanacético, 868 mg (6.5 mmol) de HOBT, 1.11 g (5.4 mmol) de DCC, 1.061g (5.4 mmol) de hidrocloreuro de amina **52** y 0.74 mL (6.48 mmol) de NMM. El tiempo de reacción es de 48 horas. El crudo de la reacción elaborada se cromatografía en columna (Hexano/AcOEt, 4:6) para obtener 710 mg (46%) de sólido amarillo que corresponde al producto de condensación **54**.

***N*¹-Butil-*N*²-[2-furil(oxo)acetil]-L-serinamida (**54**)**

Sólido amarillo. **Pf** 115-120°C. $[\alpha]_{\text{D}}$ = - 5.6 ($c = 0.5$, CH₃OH). **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.87 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₂-CH₃), 1.15-1.57 (m, 4H, CH₂-CH₂), 2.6 (sa, 1H, OH), 3.24 (ca, 2H, $J = 6.7$ Hz, NH-CH₂), 3.73 (dd, 1H, $J = 4.8$ Hz, $J = 11.5$ Hz, H_a-CH-OH), 4.13 (dd, 1H, $J = 3.3$ Hz, $J = 11.5$ Hz, H_b-CH-OH), 4.45 (m, 1H, CH), 6.55 (sa, 1H, NH) 6.60 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 3.7$ Hz, CH=CH-O), 7.74 (dd, 1H, $J = 0.6$ Hz, $J = 1.8$ Hz, CH=C-O), 8.06 (dd, 1H, $J = 0.6$ Hz, $J = 3.7$ Hz, =CH-O), 8.21 (sa, 1H, NH). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.6, 19.9, 31.3, 39.5, 53.9, 62.2, 113.2, 126.7, 149.3, 149.7, 160.8, 169.7, 172.5. **EM** (IE) m/z (%): 282 (M⁺, <1), 187 (55), 182 (5), 165 (21), 100 (3), 96 (19), 94 (100). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₁₃H₁₉N₂O₅ [M+H]⁺: 283.1294; encontrado: 283.1306.

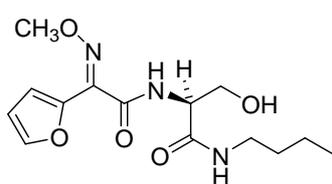
4.1.2.2. *N*¹-Butil-*N*²-[2-furil(*E*-metoxiimino)acetil]-3-serinamida (*E/Z*-**53**)

Se preparó según el método descrito para el compuesto **Z-38** (ruta A) a partir de 200 mg (0.87 mmol) de **54**, 80 mg (0.96 mmol) de hidrocloreuro de metoxilamina y 102 mg (0.96 mmol) de Na₂CO₃. El tiempo de reacción es de 22 horas.

Una vez alcanzada temperatura ambiente, se evaporan los disolventes, el sirupo resultante se extrae en CHCl₃ y resulta una suspensión que se filtra a vacío, esta operación de extracción se repite tres veces. Se obtienen 250 mg de crudo que contiene mezcla *E:Z* en proporción 1:2 del producto de condensación. Se procedió a su purificación mediante cromatografía flash (Hexano/AcOEt, 4:6), seguido de cromatografía preparativa en placa fina (Hexano/AcOEt, 4:6), que rindieron 28 mg (11%) de isómero *E* y 49 mg (20%) del *Z*, impurificados con trazas del otro isómero. El resto de las fracciones recogidas tras estos procesos cromatográficos contenían todavía

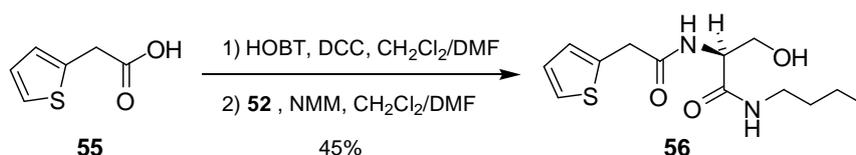
mezcla de los productos de condensación. La separación cromatográfica empleando otro eluyente ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9.3:0.7) produjo el mismo resultado. De la mezcla pudieron extrapolarse los datos espectroscópicos de $\text{RMN-}^1\text{H}$ para el isómero *E*.

*N*¹-Butil-*N*²-[2-furil(*E*-metoxiimino)acetil]-3-serinamida (*E*-53)



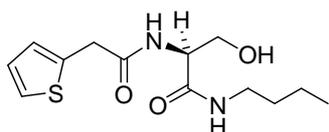
RMN-¹H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.89 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.20-1.52 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.65 (sa, 1H, OH), 3.25 (c, 2H, $J = 6.7$ Hz, NH-CH_2), 3.73 (m, 1H, $H_a\text{-CH-OH}$), 4.12 (s, 3H, OCH_3), 4.23 (da, 1H, $H_b\text{-CH-OH}$), 4.50 (m, 1H, CH), 6.52 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 3.6$ Hz, CH=CH-O), 6.76 (sa, 1H, NH), 7.32 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, CH=C-O), 7.54 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, $=\text{CH-O}$), 7.62 (da, 1H, NH).

4.2. *N*¹-Butil-*N*²-(2-tienilacetil)-*L*-serinamida (56)



Se preparó según el método descrito para el compuesto *Z*-53 (ruta A) a partir de 284 mg (2 mmol) de ácido 2-(2-tienil)acético (55), 324 mg (2.4 mmol) de HOBT, 413 mg de DCC, 450 mg (2mmol) de amina 52 y 0.35 mL (3.12 mmol) de NMM. Tras 2 días de reacción, la mezcla se lava con NaHCO_3 al 5% y se seca con MgSO_4 anhidro. De la separación en columna cromatográfica (AcOEt) se obtienen 250 mg (45%) de un sólido blanco correspondiente al producto 56. Se recristaliza de CHCl_3 -Hexano.

*N*¹-Butil-*N*²-(2-tienilacetil)-*L*-serinamida (56)

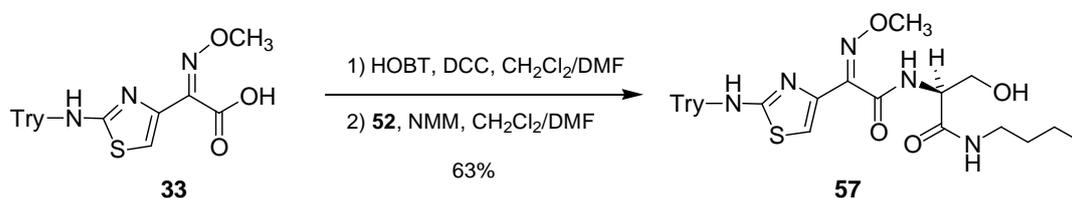


Sólido blanco. **Pf** 128-130 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -47.0$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.27 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.41(m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 3.18 (c, 2H, $J = 7.0$ Hz, NH-CH_2), 3.55 (dd, 1H, $J = 5.0$ Hz, $J = 11.2$ Hz, $H_a\text{-CH-OH}$), 3.79 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$), 4.00 (dd, 1H, $J = 3.4$ Hz, $J = 11.2$ Hz, $H_b\text{-CH-OH}$), 4.41 (m, 1H, CH), 6.86-7.00 (m, 4H, $2\text{NH} + \text{CH=C-S} + \text{CH=CH-S}$), 7.21 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, $=\text{CH-S}$). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm:

13.7, 19.9, 31.3, 37.2, 39.2, 53.9, 62.7, 125.5, 125.5, 127.2, 135.3, 170.4, 170.9. **EM** (IE) m/z (%): 284 (M^+ , 42), 211 (100), 187 (78), 167 (71), 124 (79), 97 (95), 60 (73). **HRMS** (IE) Masa exacta calculada para $C_{13}H_{20}N_2O_3S$: 284.1195; encontrada: 284.1208.

4.3. N^2 -[(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(*Z*-metoxiimino)acetil]- N^1 -butil-L-serinamida (**58**)

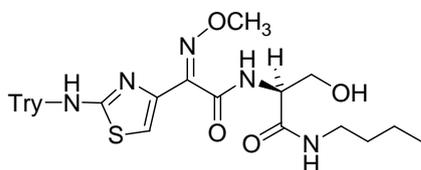
4.3.1. N^1 -Butil- N^2 -{(Z-metoxiimino)[2-(tritolamino)-1,3-tiazol-4-il]acetil}-L-serinamida (**57**)



Se preparó según el método de condensación descrito para el compuesto **Z-53** (ruta A) a partir de 887 mg (2.0 mmol) del ácido protegido **33**, 322 mg (2.4 mmol) de HOBT, 413 mg (2.0 mmol) de DCC, 393 mg (2.0 mmol) de la sal de amina **52** y 0.25 mL (2.4 mmol) de NMM, empleando 35 horas de reacción.

La mezcla resultante se cromatografía en columna (Hexano/AcOEt, 1:1) para obtener 730 mg (63%) de un sólido amarillo correspondiente al producto de condensación **57**. Se recrystaliza de AcOEt-Hexano.

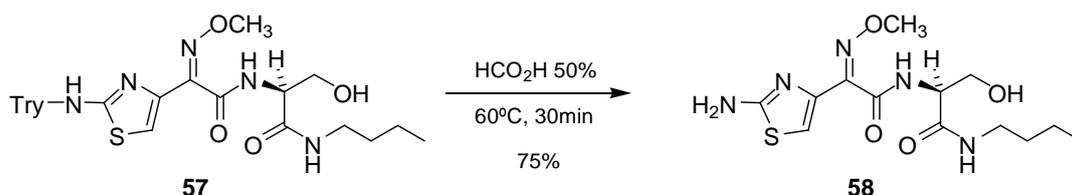
N^1 -Butil- N^2 -{(Z-metoxiimino)[2-(tritolamino)-1,3-tiazol-4-il]acetil}-L-serinamida (**57**)



Sólido amarillo. **Pf** 107-111°C [α]_D = - 61.0 (c = 1.0, CHCl₃). **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ ppm: 0.80 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH₂-CH₃), 1.12-1.48 (m, 4H, CH₂-CH₂), 3.13 (c, 2H, J = 7.0 Hz, NH-CH₂), 3.61 (dd, 1H, J = 4.8 Hz, J = 11.3 Hz, H_a-CH-OH), 3.90 (dd, 1H, J = 4.2 Hz, J = 11.3 Hz, H_b-CH-OH), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 4.41 (t, J = 4.5 Hz, 1H, CH), 6.61 (s, 1H, CH-S), 7.20 (s, 15H, 3 Ph). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.7, 19.9, 31.5, 39.4, 54.3, 62.3, 63.2, 71.7, 112.6, 127.7, 128.3, 129.1,

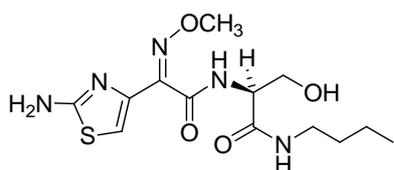
140.6, 142.9, 148.4, 162.6, 168.8, 169.4. **EM** (IE) m/z (%): 243 (Try⁺, 100), 165 (81), 125 (88). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₃₂H₃₆N₅O₄S [M+H]⁺: 586.2488; encontrado: 586.2494.

4.3.1.2. *N*²-[(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(*Z*-metoxiimino)acetil]-*N*¹-butil-L-serinamida (**58**)



Se tratan 680 mg (1.2 mmol) de **57** con 10 mL de una disolución acuosa al 50 % de ácido fórmico, durante 30 minutos a 60°C. A continuación el crudo de reacción se deja alcanzar temperatura ambiente y se le añade 10 mL de H₂O. El trifenilcarbinol se separa por filtración y se lava con agua. El filtrado se concentra a sequedad a presión reducida y el residuo se tritura con Et₂O. El sólido se filtra y se seca sobre MgSO₄ anhidro. Se obtienen 298 mg (75%) de un sólido amarillo correspondiente al producto desprotegido puro **58**.

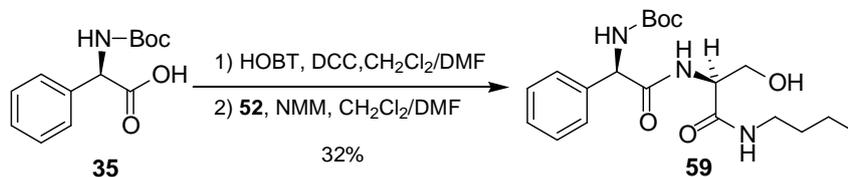
*N*²-[(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(*Z*-metoxiimino)acetil]-*N*¹-butil-L-serinamida (**58**).



Sólido amarillo. **Pf** 110-115°C. $[\alpha]_D = -29.0$ ($c = 1.0$, MeOH). **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.89 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 1.20-1.55 (m, 4H, CH₂-CH₂), 3.26 (c, 2H, $J = 7.0$ Hz, NH-CH₂), 3.80 (dd, 1H, $J = 3.7$ Hz, $J_{ab} = 11.6$ Hz, H_a-CH-OH), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 4.21 (dd, 1H, $J = 4.3$ Hz, $J_{ab} = 11.6$ Hz, H_b-CH-OH), 4.63 (m, 1 H, CH), 5.55 (sa, 2H, NH₂), 6.79 (s, 2H, CH-S+ NH), 8.07 (d, 1H, CH-NH). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.3, 19.6, 31.0, 39.1, 54.9, 61.5, 62.5, 110.9, 141.5, 148.2, 162.8, 169.3, 169.6. **EM** (IE) m/z (%): 343 (M⁺, 6), 243 (18), 225 (23), 213 (20), 183 (33), 156 (45), 126 (79), 125 (100), 100 (7), 99 (10), 83 (25). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₁₃H₂₂N₅O₄S [M+H]⁺: 344.1393; encontrado: 344.1397.

4.4. Hidrocloruro de (2S)-N²-[(2R)-amino(fenil)acetil]-N¹-butil-L-serinamida (60)

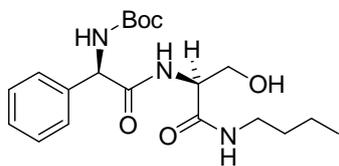
4.4.1. (2S)-N¹-Butil-N²-[(2R)-(tert-butoxicarbonilamino)(fenil)acetil]-L-serinamida (59)



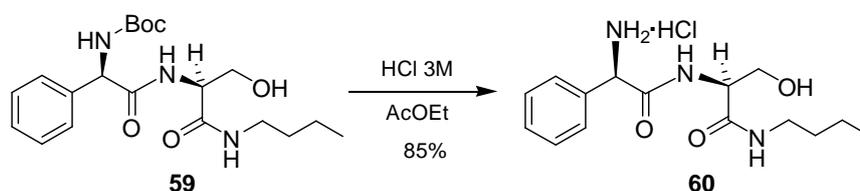
Se preparó según el método general de condensación descrito para la obtención de **Z-53** (ruta A) a partir de 948 mg (7.08 mmol) de HOBT, 1.217 g (5.9 mmol) de DCC, 1.48 g (5.9 mmol) de **35**, 1.159 mg (5.9 mmol) de sal de amina **52** y 0.81 mL (7.08 mmol) de NMM. El tiempo de reacción es 17 horas.

La separación cromatográfica en columna a presión atmosférica (Hexano/AcOEt, 4:6) del crudo de la reacción elaborada proporciona 760 mg (32%) del producto de condensación **59**. Se recristaliza de AcOEt-Hexano.

(2S)-N¹-Butil-N²-[(2R)-(tert-butoxicarbonilamino)(fenil)acetil]-serinamida (59)



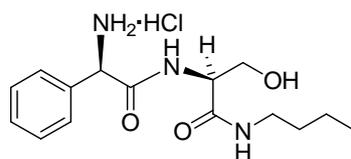
Sólido blanco. **Pf** 170-175°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -104.0$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.86 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.18-1.38 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.40 (s, 9H, ^tBu), 3.18 (c, 2H, $J = 6.4$ Hz, NH-CH_2), 3.50 (m, 1H, $H_{\text{a}}\text{-CH-OH}$), 4.02 (da, 1H, $J = 10.1$ Hz, $H_{\text{b}}\text{-CH-OH}$), 4.42 (m, 1H, CH), 5.15 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz, CH), 5.62 (sa, 1H, NH), 7.02 (sa, 1H, NH), 7.26 (m, 6H, $\text{Ph} + \text{NH}$). **RMN-¹³C** (50 Mz, CDCl_3) δ ppm: 13.6, 19.8, 28.2, 31.1, 39.2, 54.5, 58.8, 62.3, 80.5, 126.9, 128.4, 128.9, 137.3, 155.5, 170.0, 171.0. **EM (IE)** m/z (%): 320 ($\text{M}^+\text{-O}^t\text{Bu}$, 1), 206 (11), 187 (19), 150 (72), 106 (100), 83 (22), 81 (15), 79 (21), 77 (17). **HRMS (FAB)** Masa exacta calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 394.2342; encontrado: 394.2339.

4.4.2. Hidrocloruro de (2S)-N²-[(2R)-amino(fenil)acetil]-N¹-butil-serinamida (**60**)

Una suspensión de 95 mg (0.24 mmol) de **59** en 1 mL de AcOEt se trata con un exceso de HCl 3M (4 mL) con agitación mecánica a temperatura ambiente. Después de 6 horas de reacción, la mezcla se concentra a sequedad. El residuo aceitoso resultante se tritura con Et₂O y precipita un sólido blanco, que corresponde al producto desprotegido. La posterior eliminación del disolvente por decantación o filtración proporciona 67 mg (85%) de un sólido blanco (**60**).

Hidrocloruro de (2S)-N²-[(2R)-amino(fenil)acetil]-N¹-butil-serinamida (60**)**

Sólido blanco. **Pf** 140-142°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -71.0$ (c = 1.0, H₂O).

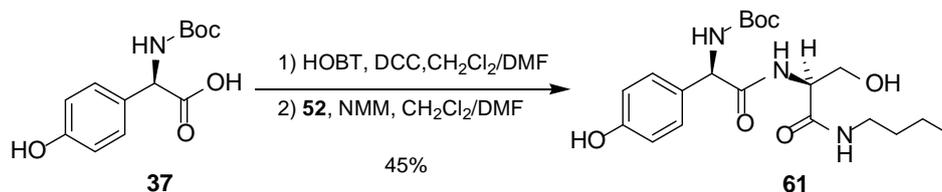


RMN-¹H (200 MHz, D₂O) δ ppm: 0.94 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₃), 1.20-1.60 (m, 4H, CH₂-CH₂), 3.26 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz, NH-CH₂), 3.76 (d, 2H, $J = 5.7$ Hz, CH₂-OH), 4.44 (t,

1H, $J = 5.7$ Hz, NH-CH), 5.30 (s, 1H, CH-Ph), 7.58 (m, 5H, Ph). **RMN-¹³C** (400 MHz, D₂O+CD₃OD) δ ppm: 14.0, 20.5, 31.5, 40.3, 57.0, 57.6, 62.0, 129.0, 130.7, 131.5, 132.8, 169.7, 171.2. **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₁₅H₂₄N₃O₃ [M]⁺: 294.1818; encontrado: 294.1829.

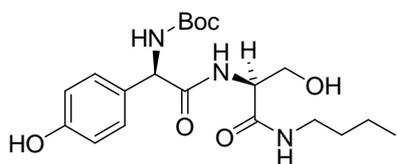
4.5. Hidrocloruro de (2S)-N²-{[(2R)-amino(4-hidroxifenil)acetil]amino}-N¹-butil-serinamida (62)

4.5.1. (2S)-N¹-Butil-N²-[(2R)-(tert-butoxicarbonilamino)(4-hidroxifenil)acetil]-L-serinamida (61)



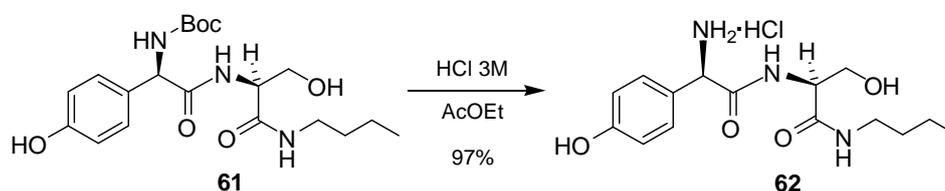
Se obtiene siguiendo el método general descrito para **Z-53** (ruta A) a partir de 512 mg (1.9 mmol) de **37**, 310 mg (2.3 mmol) de HOBT, 394 mg (1.9 mmol) de DCC, 450 mg (2.3 mmol) de amina **52** y 0.33 mL (2.9 mmol) de NMM, y empleando 48 horas de reacción. La separación cromatográfica en columna (Hexano/AcOEt, 1:1) proporcionó 370 mg (47%) de un sólido blanco correspondiente a **61**.

(2S)-N¹-Butil-N²-[(2R)-(tert-butoxicarbonilamino)(4-hidroxifenil)acetil]-serinamida (61)



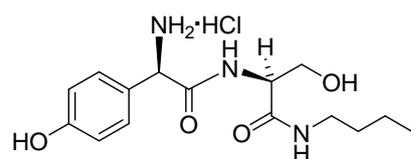
Sólido blanco. **Pf** 132-137°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -12.2$ ($c = 0.15$, MeOH). **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ ppm: 0.83 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₂-CH₃), 1.15-1.45 (m, 4H, CH₂-CH₂), 1.37 (s, 9H, ^tBu), 3.15 (m, 2H, NH-CH₂), 3.46 (dd, 1H, $J = 4.4$ Hz, $J_{\text{ab}} = 11.5$ Hz, H_a-CH-OH), 3.87 (da, 1H, $J_{\text{ab}} = 11.5$ Hz, H_b-CH-OH), 4.29 (m, 1H, CH-CH₂), 4.9 (sa, 1H, CH-NHBoc), 6.73 y 7.18 (AA'BB', 4H, $J = 8.4$ Hz, C₆H₄). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ ppm: 13.5, 19.8, 28.0, 31.0, 39.4, 54.7, 58.6, 61.6, 80.3, 115.6, 126.9, 128.5, 155.8, 157.1, 170.3, 171.8. **EM** m/z (IE) (%): 409 (M⁺, <1), 233 (40), 22 (53), 167 (77), 166 (100), 123 (36), 122 (50), 57 (28). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₂₀H₃₂N₃O₆ [M+H]⁺: 410.2291; encontrado: 410.2290.

4.5.2. Hidrocloruro de (2S)-N²-{[(2R)-amino(4-hidroxifenil)acetil]amino}-N¹-butil-serinamida (**62**)



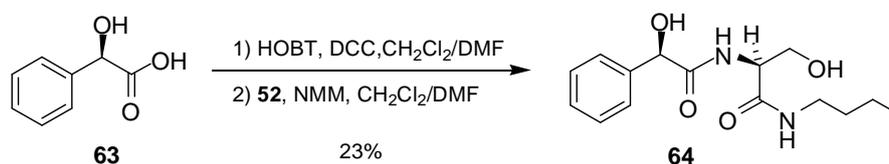
Se obtiene cuantitativamente mediante el método de desprotección descrito para la obtención de **60**, empleando 340 mg (0.7 mmol) de **61** y un exceso de HCl 3M.

Hidrocloruro de (2S)-N²-{[(2R)-amino(4-hidroxifenil)acetil]amino}-N¹-butil-serinamida (**62**).



Sólido blanco. **Pf** 194-197°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -1.0$ (c = 0.05, MeOH). **RMN-¹H** (400 MHz, D₂O) δ ppm: 0.86 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH₃), 1.28 (m, 2H, CH₂-CH₂), 1.44 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₃), 3.19 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, NH-CH₂), 3.69 (d, 2H, $J = 5.6$ Hz, CH₂-OH), 4.34 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, NH-CH), 5.13 (s, 1H, CH-Ph), 6.94 y 7.34 (AA'BB', 4H, $J = 8.6$ Hz, C₆H₄). **RMN-¹³C** (100 MHz, D₂O + CDCl₃) δ ppm: 13.0, 19.4, 30.5, 39.4, 56.0, 56.1, 61.0, 116.4, 123.6, 130.0, 157.3, 169.2, 171.1. **EM (IE)** m/z (%): 310 ((M+H)⁺, 1), 309 (M⁺, 2), 293 (25), 292 (69), 128 (65), 122 (100), 121 (56), 07 (55).

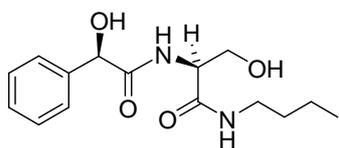
4.6. (2R)-N¹-Butil-N²-[(2R)-hidroxi(fenil)acetil]-serinamida (**64**)



Se obtiene siguiendo el método general descrito para **Z-53** (ruta A) a partir de 221 mg (1.45 mmol) de ácido mandélico (**63**), 235 mg (1.74 mmol) de HOBT, 300 mg (1.45 mmol) de DCC, 414 mg (1.6 mmol) de amina **52** y 0.25 mL (2.17 mmol) de NMM, y empleando 48 horas de reacción. La separación cromatográfica en columna primero con

(Hexano/AcOEt, 1:1) y después aumentando la polaridad con (AcOEt/MeOH, 9.5:0.5) proporcionó 100 mg (23%) de un sólido blanco correspondiente a **64**.

(2R)-N¹-Butil-N²-[(2R)-hidroxi(fenil)acetil]-serinamida (64**)**

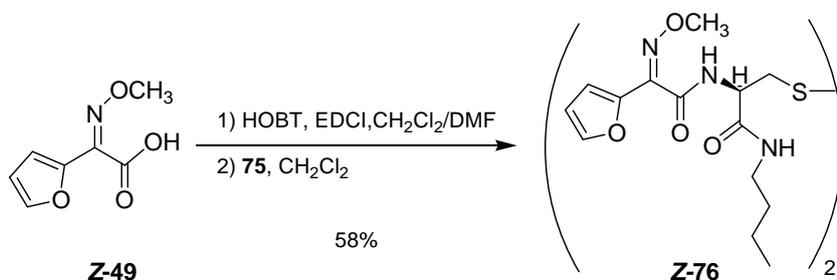


Sólido blanco. **Pf** 118-121°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -6.2$ ($c_1 = 0.3$). **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ ppm: 0.79 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃), 1.09-1.38 (m, 2H, CH₂-CH₂), 3.08 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, NH-CH₂), 3.60 (dd, 1H, $J = 5.2$ Hz, $J_{\text{ab}} = 11.4$ Hz, H_a-CH-OH), 3.85 (dd, 1H, $J = 4.6$ Hz, $J_{\text{ab}} = 11.4$ Hz, H_a-CH-OH), 4.28 (t, 1H, $J = 4.8$ Hz, NH-CH), 5.03 (s, 1H, CH-Ph), 7.24-7.41 (m, 5H, C₆H₅). **RMN-¹³C** (200 MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ ppm: 14.3, 21.0, 27.1, 32.4, 40.2, 55.3, 75.4, 128.3, 129.5, 129.7, 141.3, 171.2, 175.6.

5. Síntesis de estructuras hapténicas tipo 31 con grupo G= CH₂SH.

5.1. N¹-Butil-N²-[2-furil(Z-metoxiimino)acetil]-L-cisteinamida (Z-77)

5.1.1. N¹,N^{1'}-Dibutil-N²,N^{2'}-bis-[2-furil(Z-metoxiimino)acetil]-L-cistinadiamida (Z-76)

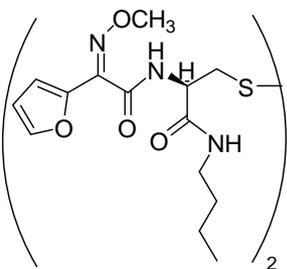


Una disolución de 507 mg (3 mmol) de **Z-49** en 6 mL de CH₂Cl₂ anhidro en atmósfera inerte se enfría en baño de agua-hielo, y se añaden a la mezcla una disolución de 441 mg (3.3 mmol) de HOBT en DMF/CH₂Cl₂ 1:2 y, otra de 576 mg (3 mmol) de EDCI en 15 ml de CH₂Cl₂ en atmósferas inertes. Se retira el baño de hielo y, tras una hora y media con agitación magnética, se añade gota a gota a temperatura ambiente, una disolución de 525 mg (1.5 mmol) de **75** en 3 mL de CH₂Cl₂.

Tras 20 horas de reacción se evaporan los disolventes a sequedad. El residuo resultante se disuelve en CH₂Cl₂, se lava con una disolución acuosa de HCl al 10%, con disolución acuosa de NaHCO₃ al 10% y H₂O, y se seca sobre MgSO₄ anhidro. La mezcla resultante

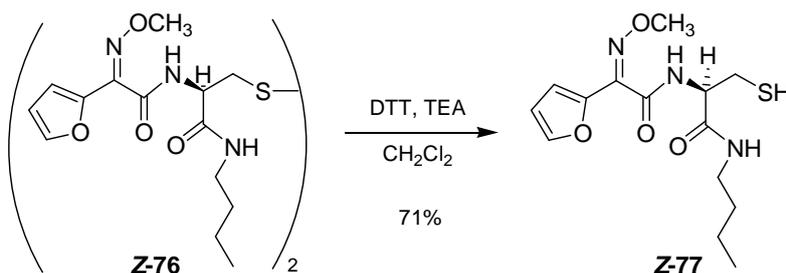
se purifica por cromatografía flash ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10:0.15), para obtener 570 mg (58%) de un sólido blanco, que corresponde al producto **Z-76** puro. Se forman cristales blancos de CHCl_3 -Benceno-Hexano.

***N*¹,*N*^{1'}-Dibutil-*N*²,*N*^{2'}-bis-[2-furil(*Z*-metoxiimino)acetil]-*L*-cistinadiamida (**Z-76**)**



Sólido cristalino blanco. **Pf** 191-193 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -4.2$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.76 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.18-1.27 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.31-1.41 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 2.98 (dd, 1H, $J = 10.3$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.6$ Hz, $H_{\text{a}}\text{-CH-S}$), 3.05 (dd, 1H, $J = 4.1$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.6$ Hz, $H_{\text{b}}\text{-CH-S}$), 3.15 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 4.01 (s, 3H, OCH_3), 5.50 (m, 1H, CH-NH), 6.43 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 3.5$ Hz, CH=CH-O), 6.77 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz, $J = 3.5$ Hz, CH=C-O), 7.47 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, $=\text{CH-O}$), 7.54 (da, 1H, $J = 9.0$ Hz, NH-CH), 7.70 (ta, 1H, $J = 5.3$ Hz, NH-CH_2). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.5, 19.9, 31.0, 39.4, 46.6, 53.6, 63.5, 111.7, 114.1, 143.7, 144.9, 145.8, 161.0, 168.8. **EM** m/z (%): 652 (M^+ , 4), 326 (42), 296 (59), 294 (100), 281 (42), 253 (38), 225 (49), 195 (39), 169 (45), 124 (70), 109 (43), 94 (53), 93 (57), 74 (89). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 653.2427; encontrado: 653.2427.

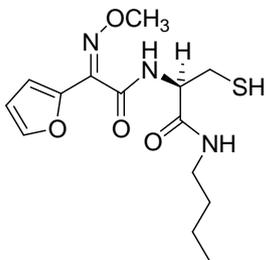
5.1.2. *N*¹-Butil-*N*²-[2-furil(*Z*-metoxiimino)acetil]-*L*-cisteinamida (**Z-77**)



A un matraz que contiene 300 mg (0.46 mmol) del disulfuro **Z-76** en atmósfera de Ar, se le añaden 12 mL de CH_2Cl_2 ya desgasificados con Ar, 0.42 mL (0.91 mmol) de TEA, 224 mg (1.84 mmol) de DTT. Tras 1 hora de reacción con agitación, el crudo se diluye con más CH_2Cl_2 , se lava con agua y se seca con MgSO_4 anh. La separación por cromatografía flash ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10:1.5) proporciona 250 mg de mezcla de isómeros del producto reducido. La recristalización en atmósfera inerte con benceno

desgasificado nos proporciona 180 mg (71%) de agujas blancas que corresponden al isómero **Z-77** puro.

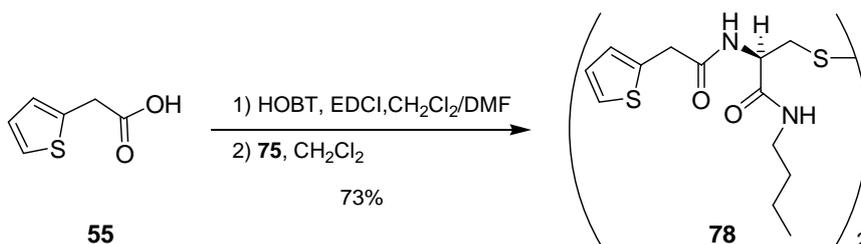
***N*¹-Butil-*N*²-[2-furil(*Z*-metoxiimino)acetil]-*L*-cisteinamida (**Z-77**).**



Sólido cristalino blanco. **Pf** 120-122 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -43.2$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.91 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.29-1.39 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.44-1.53 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.60 (dd, 1H, $J = 7.3$ Hz, $J = 10.7$ Hz, SH), 2.74 (ddd, 1H, $J = 5.9$ Hz, $J = 10.7$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.0$ Hz, $H_{\text{a-CH-S}}$), 3.23-3.31 (m, 3H, $H_{\text{b-CH-S}} + \text{CH}_2\text{-NH}$), 4.07 (s, 3H, OCH_3), 4.77 (m, 1H, CH-NH), 6.45 (sa, 1H, NH), 6.47 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 3.5$ Hz, CH=CH-O), 6.80 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz, $J = 3.5$ Hz, CH=C-O), 7.12 (da, 1H, $J = 8.2$ Hz, NH), 7.50 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, $=\text{CH-O}$). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.6, 19.9, 26.3, 31.4, 39.5, 54.1, 63.5, 11.8, 114.2, 143.9, 144.8, 145.2, 160.4, 168.3. **EM *m/z* (IE) (%)**: 327 (M^+ , 5), 296 (71), 281 (45), 227 (45), 225 (61), 195 (47), 180 (40), 169 (45), 152 (60), 124 (100), 109 (44), 94 (60), 93 (61). **HRMS (IE)** Masa exacta calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 327.1253; encontrado: 327.1253.

5.2. *N*¹-Butil-*N*²-(2-tienilacetil)-*L*-cisteinamida (79**)**

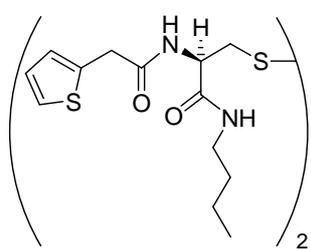
5.2.1. *N*¹,*N*^{1'}-Dibutil-*N*²,*N*^{2'}-bis-(2-tienilacetil)-*L*-cistinadiamida (78**)**



El producto se prepara mediante el método descrito para la obtención de **Z-76** empleando 428 mg (3 mmol) de ácido 2-(2-tienil)acético (**55**), 441 mg (3.3 mmol) de HOBT, 576 mg (3 mmol) de EDCI y 525 mg (1.5 mmol) de **75** en 24 horas de reacción. Tras elaboración, un sólido blanco (661 mg, 73%) cristaliza de CHCl_3 -Hexano, correspondiente al producto **78** puro.

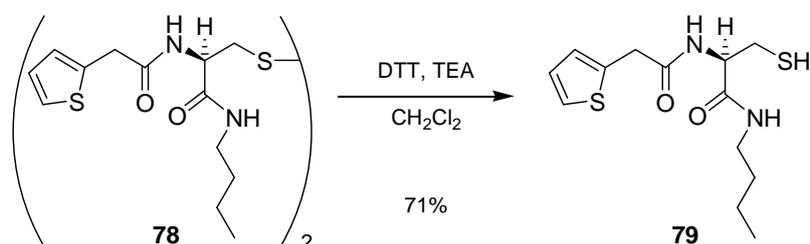
***N*¹,*N*^{1'}-Dibutil-*N*²,*N*^{2'}-bis-(2-tienilacetil)-*L*-cistinadiamida (**78**)**

Sólido blanco. Pf 220-222°C. $[\alpha]_{\text{D}} = +11.6$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **RMN-¹H** (400 MHz,

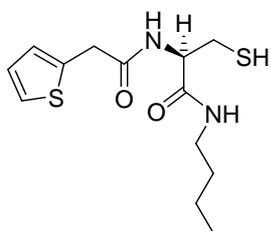


CDCl_3) δ ppm: 0.87 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.23-1.34 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.35-1.45 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 2.82 (dd, 1H, $J = 10.7$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.5$ Hz, $H_{\text{a}}\text{-CH-S}$), 2.91 (dd, 1H, $J = 4.0$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.5$ Hz, $H_{\text{b}}\text{-CH-S}$), 3.11-3.23 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.80 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$), 5.35 (m, 1H, CH), 6.91 (m, 1H,

CH=C-S), 6.94 (m, 1H, CH=CH-S), 7.16 (da, 1H, $J = 9.1$ Hz, NH-CH), 7.19 (da, 1H, $J = 5.1$ Hz, $=\text{CH-S}$), 8.06 (ta, 1H, NHCH_2). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.7, 20.0, 31.2, 37.2, 39.3, 46.7, 53.4, 125.2, 126.9, 127.0, 135.7, 169.7, 170.2. **EM *m/z*** (IE) (%): 598(M^+ , 4), 332 (24), 299 (31), 267 (80), 227 (71), 175 (26), 159 (23), 158 (31), 124 (36), 97 (100), 74 (61). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 599.1854; encontrado: 599.1854

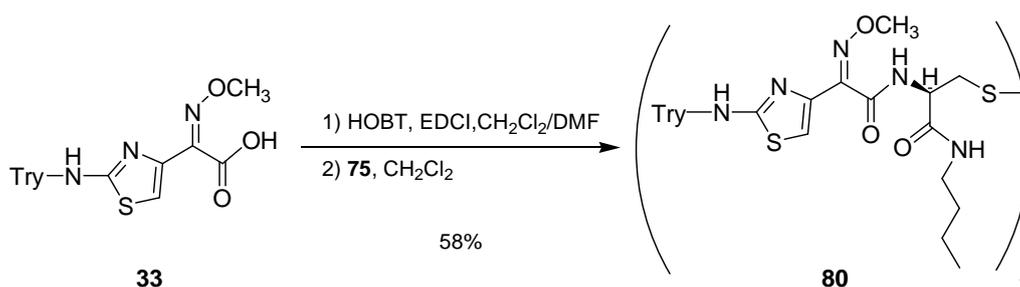
5.2.2. *N*¹-Butil-*N*²-(2-tienilacetil)-*L*-cisteinamida (79**)**

Se obtiene mediante el procedimiento descrito para la obtención del producto **77**, a partir de 423 mg (0.7 mmol) del disulfuro **78**, 0.2 mL (1.4 mmol) de TEA y 431 mg (2.8 mmol) de DTT y 12 mL de CH_2Cl_2 desgasificados y empleando una hora de reacción. El crudo se purifica en columna y placa cromatográfica ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10:0.5) y, se obtienen 300 mg (71%) de un sólido blanco, que corresponde al producto de reducción **79** puro.

***N*¹-Butil-*N*²-(2-tienilacetil)-L-cisteinamida (79)**

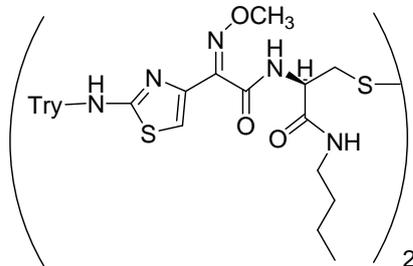
Sólido blanco. **Pf** 152-154 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -24.2$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

RMN-¹H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.22-1.33 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.39-1.47 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.54 (dd, 1H, $J = 7.8$ Hz, $J = 10.2$ Hz, SH), 2.66 (ddd, 1H, $J = 6.7$ Hz, $J = 10.2$ Hz, $J_{\text{ab}} = 13.7$ Hz, $H_{\text{a}}\text{-CH-S}$), 2.98 (ddd, 1H, $J = 4.5$ Hz, $J = 7.8$ Hz, $J_{\text{ab}} = 13.7$ Hz, $H_{\text{b}}\text{-CH-S}$), 3.13-3.25 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.80 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$), 4.54 (ddd, 1H, $J = 4.5$ Hz, $J = 6.7$ Hz, $J = 7.8$ Hz, CH), 6.38 (ta, 1H, NH-CH_2), 6.68 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, CO-NH-CH), 6.94 (dd, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 3.5$ Hz, CH=C-S), 6.98 (dd, 1H, $J = 3.5$ Hz, $J = 5.1$ Hz, CH=CH-S), 7.23 (dd, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 5.1$ Hz, $=\text{CH-S}$). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.6, 19.9, 26.4, 31.3, 37.4, 39.3, 54.2, 125.7, 127.4, 127.4, 135.3, 169.1, 170.0. **EM** m/z (IE) (%): 300 (M^+ , 3), 227 (19), 182 (18), 124 (24), 99 (16), 97 (100), 76 (48). **HRMS** (IE) Masa exacta calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$: 300.0966; encontrado: 300.0966

5.3. *N*²-[(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(*Z*-metoxiimino) acetil]-*N*¹-butil-L-cisteinamida (72)**5.3.1. *N*¹,*N*^{1'}-Dibutil-*N*²,*N*^{2'}-bis-[(*Z*-metoxiimino)[2-(tritolamino)-1,3-tiazol-4-il]acetil]-L-cistinadiamida (80)**

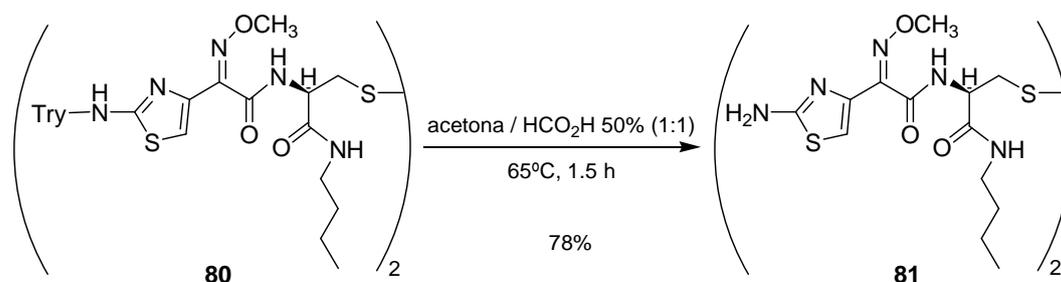
Se prepara mediante el procedimiento descrito para la síntesis del producto **Z-76**, a partir de 1.330 g (3 mmol) de **33**, 441 mg (3.3 mmol) de HOBT, 576 mg (3 mmol) de EDCI y 525 mg (1.5 mmol) de **75**. La mezcla resultante se purifica en columna (Hexano/AcOEt, 8:3), para obtener 1.045 g (58%) de un sólido amarillo, que corresponde al producto de condensación **80** puro. Recristaliza de CHCl_3 -Hexano.

***N*¹,*N*^{1'}-Dibutil-*N*²,*N*^{2'}-bis-[(*Z*-metoxiimino)[2-(tritolamino)-1,3-tiazol-4-il]acetil]-*L*-cistinadiamida (**80**)**



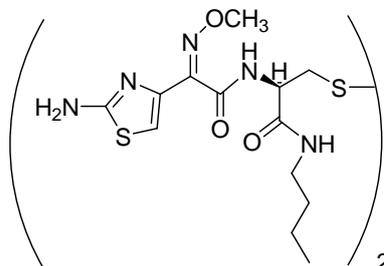
Sólido amarillo claro. **Pf** 130-132 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -25.4$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.76 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.17-1.26 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.32-1.41 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 2.92 (dd, 1H, $J = 10.7$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.7$ Hz, $H_{\text{a}}\text{-CH-S}$), 2.99 (dd, 1H, $J = 3.7$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.7$ Hz, $H_{\text{b}}\text{-CH-S}$), 3.14 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 4.02 (s, 3H, OCH_3), 5.48 (dt dist, 1H, $J = 3.7$ Hz, $J = 10.2$ Hz, CH), 6.73 (s, 1H, CH-S), 7.01 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, NH-CH), 7.05 (s, 1H, NH-Try), 7.28 (m, 15H, 3 Ph), 7.68 (t, 1H, $J = 5.3$ Hz, NH-CH_2). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.6, 19.8, 30.9, 39.2, 46.6, 53.4, 63.2, 71.7, 113.1, 127.6, 128.2, 129.2, 141.3, 143.0, 148.1, 162.8, 168.6, 168.8. **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para $\text{C}_{64}\text{H}_{68}\text{N}_{10}\text{O}_6\text{S}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1201.4284; encontrado: 1201.4279

5.3.2. *N*²,*N*^{2'}-bis-[(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(*Z*-metoxiimino) acetil]-*N*¹,*N*^{1'}-dibutil-*L*-cistinadiamida (81**)**



Se tratan 370 mg (0.31 mmol) de **80** en 8 mL de acetona con 8 mL de una disolución acuosa al 50% de ácido fórmico, durante 1.5 h a 65°C. A continuación la mezcla se deja enfriar, se evapora la acetona en el rotavapor y comienza a precipitar un sólido blanco. Se le añaden 8 mL de H_2O con lo que se forma mas precipitado. El trifenilcarbinol se separa por filtración y se lava con agua. El filtrado se concentra a sequedad a presión reducida y el residuo se tritura con Et_2O . El sólido se filtra y se seca para obtener 172 mg (78%) de un sólido amarillo correspondiente al producto desprotegido puro **81**.

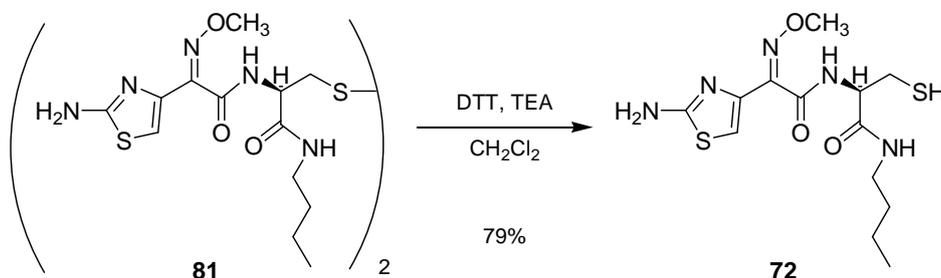
***N*²,*N*^{2'}-bis-[(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(*Z*-metoxiimino) acetil]-*N*¹,*N*^{1'}-dibutil-L-cistinadiamida (**81**)**



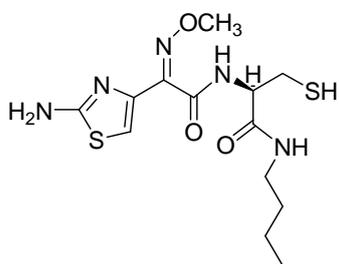
Sólido Amarillo. **Pf** 197-200 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -59.9$ ($c = 0.5$, MeOH). **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ ppm: 0.79 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₂-CH₃), 1.18-1.28 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.33-1.42 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₃), 2.97 (dd, 1H, $J = 9.9$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.9$ Hz, H_a-CH-S), 3.05-3.17 (m, 3H, H_b-CH-S + CH₂-NH), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 5.02 (dd, 1H, $J = 4.1$ Hz, $J = 9.9$ Hz, CH), 6.79 (s, 1H, CH-

S), 7.66 (ta, 1H, $J = 5.3$ Hz, NH-CH₂). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ ppm: 13.1, 19.5, 30.8, 39.2, 41.4, 52.4, 62.4, 111.3, 141.6, 148.1, 163.0, 169.2, 169.5. **EM *m/z*** (%): 716 (M⁺, <1), 328 (71), 257 (36), 183 (34), 156 (53), 126 (84), 125 (100). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₂₆H₄₁N₁₀O₆S₄ [M+H]⁺: 717.2093; encontrado: 717.2093

5.3.3. *N*²-[(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(*Z*-metoxiimino)acetil]-*N*¹-butil-L-cisteinamida (**72**)

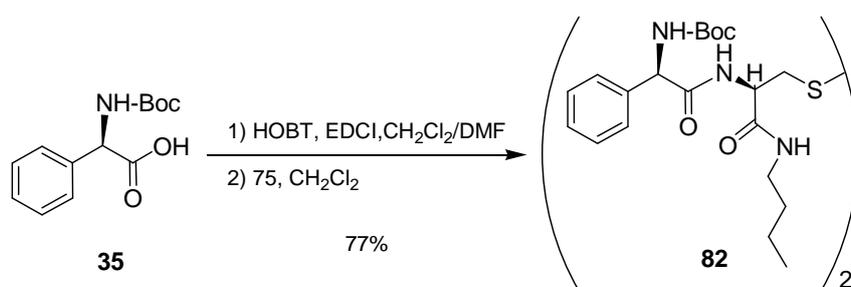


Se obtiene mediante el procedimiento descrito para la obtención del producto **Z-77**, a partir de 165 mg (0.23 mmol) de **81**, 0.06 mL (0.46 mmol) de TEA, 142 mg (0.92 mmol) de DTT y empleando como disolvente 4 mL de MeOH desgasificado. Tras 3 horas de reacción, se concentra a sequedad, el residuo resultante se disuelve en AcOEt, se lava con agua y se seca con MgSO₄ anhidro. El crudo se cromatografía en columna (Hexano/AcOEt, 1:1), para obtener 130 mg (79%) de un sólido blanco, que corresponde al producto de reducción **72** puro.

***N*²-[(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(*Z*-metoxiimino)acetil]-*N*¹-butil-L-cisteinamida (**72**)**

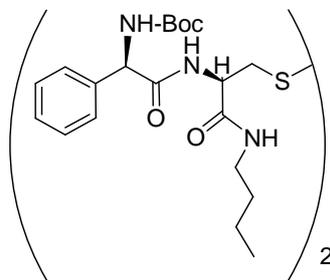
Sólido amarillo claro. **Pf** 98-100 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -14.7$ ($c = 0.5$, MeOH). **RMN-¹H** (400 MHz, CD₃OD) δ ppm: 0.95 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₂-CH₃), 1.33-1.43 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.48-1.57 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₃), 2.85 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J_{\text{ab}} = 13.9$ Hz, H_a-CH-S), 2.97 (dd, 1H, $J = 5.2$ Hz, $J_{\text{ab}} = 13.9$ Hz, H_b-CH-S), 3.26 (c dist., 2H, CH₂-NH), 3.99 (s, 3H, OCH₃),

4.58 (dd, 1H, $J = 5.2$ Hz, $J = 7.6$ Hz, CH), 6.95 (s, 1H, CH-S), 7.96 (ta, 1H, NH-CH₂). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ ppm: 13.3, 19.7, 25.7, 31.1, 39.3, 55.0, 62.6, 111.0, 141.6, 147.9, 162.7, 169.1, 169.4. **EM** m/z (%): 359 (M⁺, 2), 328 (100), 357 (47), 183 (36), 156 (50), 126 (55), 125 (67). **HRMS** (IE) Masa exacta calculada para C₁₃H₂₁N₅O₃S₂: 359.1085; encontrado: 359.1086

5.4. (2*R*)-*N*¹-Butil-*N*²-[(2*R*)-amino(fenil)acetil]-L-cisteinamida (84**)****5.4.1. (2*R*)-*N*¹,*N*^{1'}-Dibutil-*N*²,*N*^{2'}-bis-[(2*R*)-(tert-butoxicarbonilamino)(fenil)acetil]-cistinadiamida (**82**)**

Se prepara por el método de condensación descrito para el compuesto **Z-76** a partir de 753 mg (3 mmol) del ácido **35**, 441 mg (3.3 mmol) de HOBT, 576 mg (3 mmol) de EDCI y 525 mg (1.5 mmol) de **75**, y tras 24 horas, la reacción se elabora. Un sólido blanco (946 mg, 77%) precipita de CHCl₃-Et₂O, correspondiente al producto **82** puro.

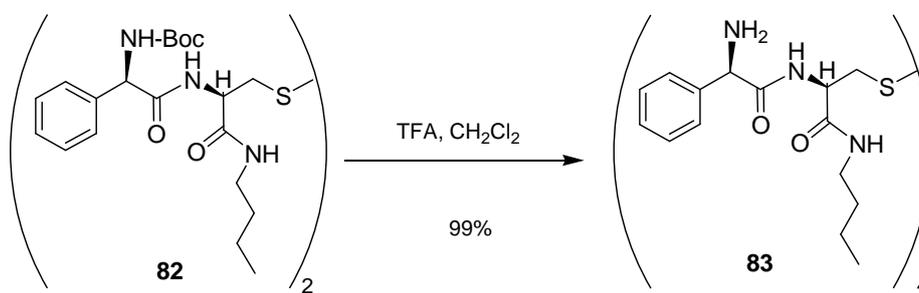
(2R)-N¹,N^{1'}-Dibutil-N²,N^{2'}-bis-[(2R)-(tert-butoxicarbonilamino)(fenil)acetil]-cistinadiamida (82**)**



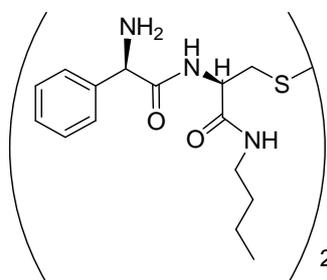
Sólido blanco. **Pf** 172-174 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -35.5$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.87 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH_3), 1.24-1.47 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.40 (s, 9H, $^t\text{BuOCO}$), 2.79 (dd, 1H, $J = 3.9$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.2$ Hz, $H_{\text{a-CH-S}}$), 2.93 (sa, 1H, $H_{\text{b-CH-S}}$), 3.10-3.25 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 5.11 (sa, 1H, CH-NH), 5.22 (s, 1H, CH-NH), 5.42 (sa, 1H, NH), 7.33 (m, 5H, Ph), 7.72 (sa, 1H, NH). **RMN-¹³C**

(100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.7, 20.0, 28.2, 31.1, 39.4, 45.3, 53.5, 59.0, 80.4, 127.4, 128.5, 128.9, 137.3, 154.9, 169.3, 171.0. **EM** (IE) m/z (%): 716 (M^+ , <1), 353 (35), 206 (38), 150 (95), 106 (100), 57 (56). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para $\text{C}_{40}\text{H}_{61}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2[\text{M}+\text{H}]^+$: 817.3992; encontrado: 817.3992

5.4.2. (2R)-N¹,N^{1'}-Dibutil-N²,N^{2'}-bis-[(2R)-amino(fenil)acetil]-cistinadiamida (**83**)

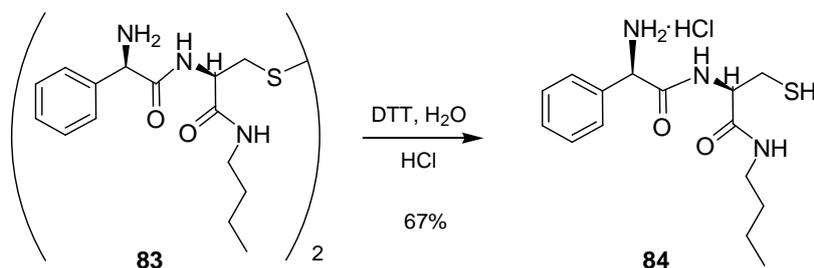


A una disolución de 250 mg (0.31 mmol) de **82** en 5 mL de CH_2Cl_2 , se le añade 1 mL de TFA y se deja con agitación mecánica durante 5 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se concentra a sequedad a presión reducida. El residuo resultante se tritura con Et_2O y se forma un precipitado blanco que corresponde al producto desprotegido. La posterior eliminación del disolvente por decantación o filtración proporcionan cuantitativamente un sólido blanco (**83**) correspondiente al producto desprotegido.

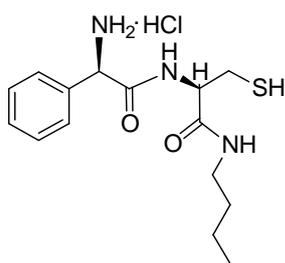
(2R)-N¹,N^{1'}-Dibutil-N²,N^{2'}-bis-[(2R)-amino(fenil)acetil]-cistinadiamida (83)

Sólido blanco. **Pf** 142-146°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -167.5$ ($c = 1.0$, MeOH). **RMN-¹H** (400 MHz, D₂O) δ ppm: 0.86 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₃), 1.28 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.45 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₃), 2.60 (dd, 1H, $J = 9.4$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.2$ Hz, H_a-CH-S), 2.89 (dd, 1H, $J = 4.7$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.2$ Hz, H_b-CH-S), 3.17 (ta, 2H, CH₂-NH), 4.52 (dd, 1H, $J = 4.7$ Hz, $J = 9.4$ Hz, CH-NH), 5.10 (s, 1H, CH-NH₂), 7.45 (sa, 5H, Ph). **RMN-¹³C**

(100 MHz, D₂O + CDCl₃) δ ppm: 13.0, 19.4, 30.4, 37.9, 39.4, 52.8, 56.6, 128.0, 129.6, 130.4, 131.7, 168.7, 171.1. **EM** m/z (%): 236 (16), 175 (17), 107 (28), 106 (100), 79 (31). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₃₀H₄₅N₆O₄S₂[M+H]⁺: 617.2944; encontrado: 617.2944

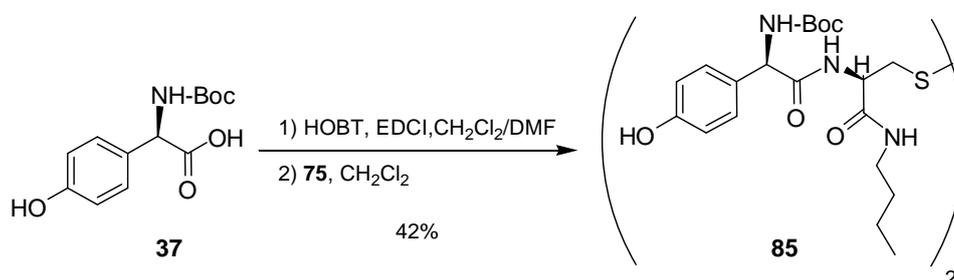
5.4.3. Hidrocloruro de (2R)-N¹-butil-N²-[(2R)-amino(fenil)acetil]-cisteinamida (84)

A 280 mg (0.45 mmol) de **83** en atmósfera de Ar se le añaden 8 mL de mezcla H₂O:MeOH (en proporción 1:1) desgasificada y 277 mg (1.8 mmol) de DTT, y se deja agitando a temperatura ambiente durante 21 horas. A continuación, se concentra el MeOH, se añaden unas gotas de HCl concentrado, y se lava 3 veces con CH₂Cl₂. La fase acuosa se concentra a sequedad, y el residuo resultante se precipita en Et₂O desgasificado con Ar. Se obtienen 190 mg (67%) de un sólido blanco correspondiente al producto deseado.

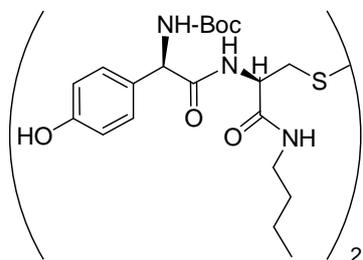
Hidrocloruro de (2R)-N¹-butil-N²-[(2R)-amino(fenil)acetil]-L-cisteinamida (84)

Sólido blanco. **Pf** 132-135. $[\alpha]_{\text{D}} = -49.5$ ($c = 0.5$, MeOH).

RMN-¹H (400 MHz, D₂O) δ ppm: 0.87 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃), 1.29 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.46 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₃), 2.72 (dd, 1H, $J = 7.8$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.2$ Hz, H_{a} -CH-S), 2.80 (dd, 1H, $J = 5.1$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.2$ Hz, H_{b} -CH-S), 3.20 (c dist, 2H, CH₂-NH), 4.44 (dd, 1H, $J = 5.1$ Hz, $J = 7.8$ Hz, CH-NH), 5.12 (s, 1H, CH-NH₂), 7.49 (sa, 5H, C₆H₅). **RMN-¹³C** (100 MHz, D₂O + CDCl₃) δ ppm: 13.6, 19.5, 26.2, 31.2, 39.1, 53.7, 59.8, 126.6, 128.2, 128.9, 140.5, 169.3, 173.6.

5.5. Hidrocloruro de (2R)-N²-[(2R)-amino(4-hidroxifenil)acetil]amino}-N¹-butil-cisteinamida (87)**5.5.1. (2R)-N¹,N^{1'}-Dibutil-N²,N^{2'}-bis-[(2R)-(tert-butoxicarbonilamino)(4-hidroxifenil)acetil]-cistinadiamida (85)**

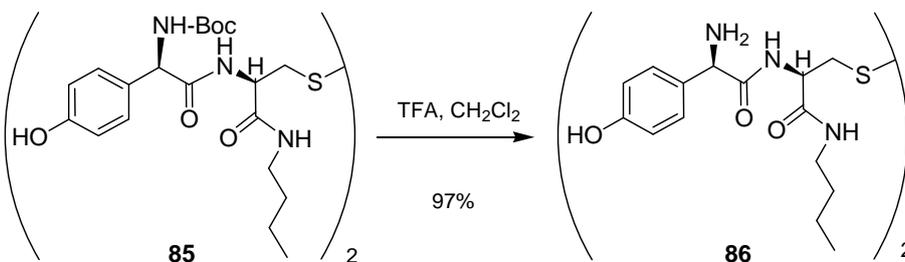
Se prepara por el método de condensación descrito para el compuesto **Z-76** a partir de 801 mg (3 mmol) de la **37**, 441 mg (3.3 mmol) de HOBT, 576 mg (3 mmol) de EDCI y 525 mg (1.5 mmol) de **75**. Tras 20 horas de reacción la mezcla se concentra a sequedad, el residuo resultante se disuelve en CH₂Cl₂ y se lava primero con disolución acuosa de HCl al 10%, después, con agua y se seca con MgSO₄ anhidro. El crudo de reacción se cromatografía en columna a presión (Hexano/AcOEt, 1:1). Se obtiene un sólido blanco (535mg, 42%), correspondiente al producto **85**.

(2R)-N¹,N^{1'}-Dibutil-N²,N^{2'}-bis-[(2R)-(tert-butoxicarbonilamino)**(4-hidroxifenil)acetil]-cistinadiamida (85)**

Sólido blanco cristalino. **Pf** 141-142°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -65.3$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **RMN-¹H** (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ ppm: 0.87 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH_3), 1.18-1.50 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.38 (s, 9H, $^t\text{BuOCO}$), 2.80 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 3.18 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 4.87 (sa, 1H, CH-NH), 5.07 (s, 1H, CH-NH), 5.58 (sa, 1H, NH), 6.69 y 7.13

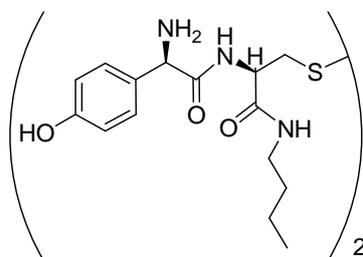
(AA'BB', 4H, $J = 8.4$ Hz, C_6H_4), 7.64 (sa, 1H, NH). **RMN-¹³C** (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ ppm: 13.5, 19.9, 28.1, 30.9, 39.3, 42.2, 52.8, 58.2, 80.5, 115.7, 127.7, 128.5, 155.4, 156.9, 169.8, 171.7. **EM** m/z (%): 308 (12), 223 (31), 166 (89), 122 (100), 57 (37), 56 (45). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para $\text{C}_{40}\text{H}_{61}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 849.3891; encontrado: 849.3891

5.5.2. **(2R)-N¹,N^{1'}-Dibutil-N²,N^{2'}-bis-[(2R)-amino(4-hidroxifenil)acetil]-cistinadiamida (86)**



Se preparó mediante el método descrito para la obtención del producto **84**, a partir de 310 mg (0.36 mmol) de **85** en 10 mL de CH_2Cl_2 , y 1 mL de TFA, empleando 4 horas de reacción. Se obtiene cuantitativamente un sólido blanco correspondiente al producto deseado.

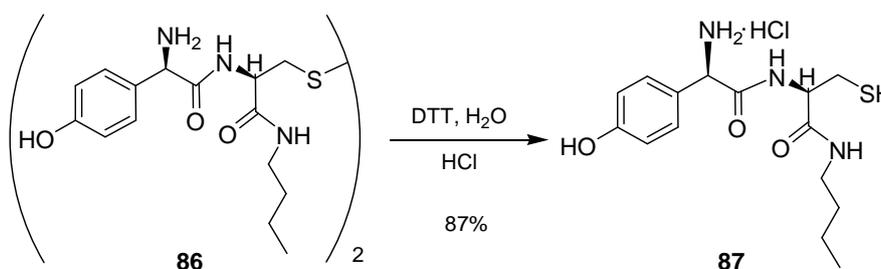
(2R)-N¹,N^{1'}-Dibutil-N²,N^{2'}-bis-[(2R)-amino(4-hidroxifenil)acetil]-cistinadiamida (86)



Sólido blanco. **Pf** 145-151°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -151.8$ ($c = 1.0$, MeOH). **RMN-¹H** (400 MHz, D₂O) δ ppm: 0.88 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, -CH₃), 1.25-1.35 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.47-1.51 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₃), 2.68 (dd, 1H, $J = 9.1$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.2$ Hz, H_a-CH-S), 2.95 (dd, 1H, $J = 4.5$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.2$ Hz, H_b-CH-S), 3.19 (t dist, 2H, CH₂-NH), 4.57 (dd, 1H, $J = 4.5$ Hz, $J = 9.1$ Hz, CH-NH), 5.11 (s, 1H, CH-NHBoc),

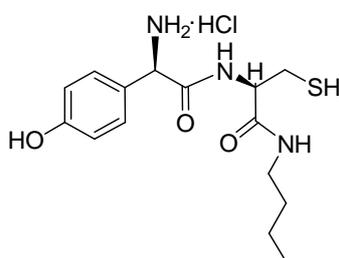
6.91 y 7.35 (AA'BB', 4H, $J = 8.6$ Hz, C₆H₄). **RMN-¹³C** (100 MHz, D₂O + CDCl₃) δ ppm: 13.3, 19.7, 30.7, 38.6, 39.7, 53.1, 56.4, 116.6, 123.7, 130.2, 157.5, 169.2, 171.4. **EM (IE) m/z (%)**: 324 (1), 309 (28), 308 (68), 208 (46), 191 (71), 169 (56), 139 (57), 137 (85), 122 (100), 107 (66), 93 (33), 69 (42). **HRMS (FAB)** Masa exacta calculada para C₃₀H₄₅N₆O₆S₂[M+H]⁺: 649.2842; encontrado: 649.2842

5.5.3 Hidrocloruro de (2R)-N²-{[(2R)-amino(4-hidroxifenil)acetil]amino}-N¹-butil-cisteinamida (87)



A 105 mg (0.16 mmol) de **86** en atmósfera de Ar se le añaden 3 mL de H₂O desgasificada y 105 mg (0.68 mmol) de DTT, y se deja agitando a temperatura ambiente durante 21 horas. A continuación, se añaden unas gotas de HCl concentrado, y se lava 3 veces con CH₂Cl₂. La fase acuosa se concentra, y el residuo resultante se precipita en Et₂O desgasificado con Ar. Se obtienen 100 mg (87%) de un sólido blanco correspondiente al producto deseado.

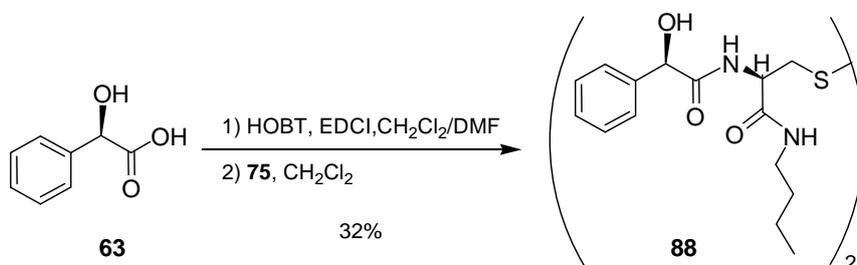
Hidrocloreuro de (2R)-N²-{[(2R)-amino(4-hidroxifenil)acetil]amino}-N¹-butilcisteinamida (87)



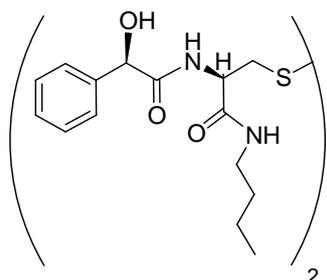
Sólido blanco. **Pf** 164-168 °C. $[\alpha]_D = -24.0$ ($c = 0.5$, MeOH). **RMN-¹H** (400 MHz, D₂O) δ ppm: 0.87 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, -CH₃), 1.25-1.35 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.44-1.52 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₃), 2.74 (dd, 1H, $J = 7.8$ Hz, $J_{ab} = 14.1$ Hz, H_a-CH-S), 2.82 (dd, 1H, $J = 5.3$ Hz, $J_{ab} = 14.1$ Hz, H_b-CH-S), 3.21 (m, 2H, CH₂-NH), 4.46 (dd, 1H, $J = 5.3$ Hz, $J = 7.8$ Hz, CH-NH), 5.11 (s, 1H, CH-NH₂), 6.90 y 7.40 (AA'BB', 4H, $J = 8.7$ Hz, C₆H₄). **RMN-¹³C** (100 MHz, D₂O + CDCl₃) δ ppm: 13.0, 19.4, 25.4, 30.5, 39.3, 56.1, 56.1, 116.4, 123.6, 130.0, 157.3, 169.1, 171. **EM** (IE) m/z (%): 326 (M⁺, <1), 325 (<1), 308 (31), 175 (33), 134 (53), 122 (100), 107 (97), 106 (38), 57 (45). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₁₅H₂₄N₃O₃S [M⁺]: 326.1538; encontrado: 326.1538

5.6. (2R)-N¹-Butil-N²-[(2R)-hidroxi(fenil)acetil]-cisteinamida (89)

5.6.1. (2R)-N¹,N^{1'}-Dibutil-N²,N^{2'}-bis-[(2R)-hidroxi(fenil)acetil]-cistinadiamida (88)



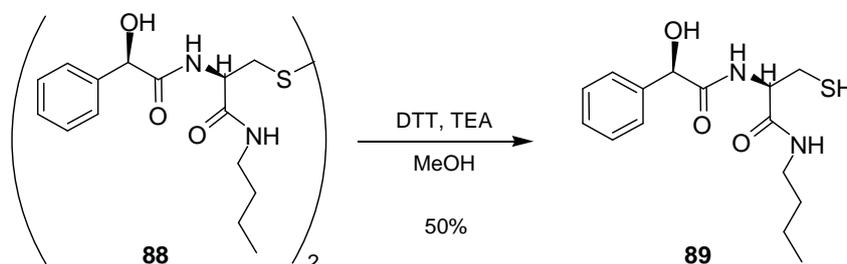
Se obtiene mediante el procedimiento descrito para la obtención de **Z-76**, partiendo de 229 mg de **63** (1.5 mmol), 220 mg (1.65 mmol) de HOBT, 288 mg (1.5 mmol) de EDCI y 263 mg (0.75 mmol) de **75**. Tras 20 horas de reacción, se concentra para eliminar la DMF, el sirupo se disuelve en CHCl₃, se lava con HCl 10%, se seca con MgSO₄ y se concentra a sequedad. El producto se purifica por separación en columna cromatográfica en (Hexano/AcOEt, 8:2) o mediante recristalización en MeOH-CHCl₃-Hexano (150 mg, 32%).

(2R)-N¹,N^{1'}-Dibutil-N²,N^{2'}-bis-[(2R)-hidroxi(fenil)acetil]-cistinadiamida (88)

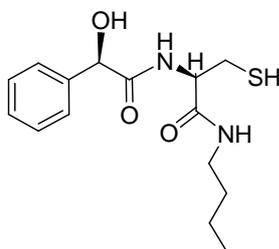
Sólido blanco. **Pf** 157-160°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -5.1$ ($c = 0.1$, MeOH).

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ ppm: 0.77 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, -CH₃), 1.11-1.28 (m, 4H, CH₂-CH₂), 2.88 (dd, 1H, $J = 9.8$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.5$ Hz, H_{a} -CH-S), 2.95 (dd, 1H, $J = 4.7$ Hz, $J_{\text{ab}} = 14.5$ Hz, H_{b} -CH-S), 3.02 (m, 2H, CH₂-NH), 4.97 (dd, 1H, $J = 4.7$ Hz, $J = 9.8$ Hz, CH-NH), 5.02 (s, 1H,

CH-OH), 7.20-7.35 (m, 5H, Ph). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ ppm: 13.4, 19.8, 30.7, 39.1, 44.3, 52.6, 74.1, 126.6, 128.1, 128.3, 139.3, 169.7, 173.3. **EM** m/z (%): 618 (M⁺, <1), 203 (44), 178 (41), 177 (68), 176 (100), 175 (62), 169 (82), 129 (37), 128 (59), 107 (73), 105 (38), 79 (69). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₃₀H₄₃N₄O₆S₂[M+H]⁺: 619.2624; encontrado: 619.2624

5.6.2. (2R)-N¹-Butil-N²-[(2R)-hidroxi(fenil)acetil]-cisteinamida (89)

Se obtiene mediante el procedimiento descrito para la obtención **Z-77**, empleando 160 mg (0.25 mmol) de **88**, 0.07 mL (0.05 mmol) de TEA, 154 mg (1 mmol) de DTT, 10 mL de MeOH desgasificado y 3 horas de reacción. Seguidamente, se concentra el MeOH y el residuo resultante se disuelve en AcOEt, se lava con H₂O, se seca con MgSO₄ y se concentra a sequedad. Mediante separación cromatográfica en placa (CHCl₃/MeOH, 10:0.3) se obtuvo 78 mg (50%) de un sólido blanco correspondiente al producto deseado.

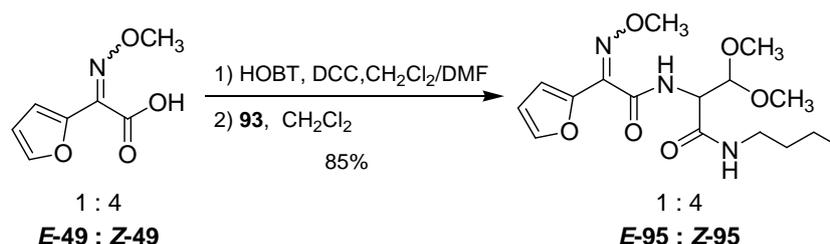
(2R)-N¹-Butil-N²-[(2R)-hidroxi(fenil)acetil]-cisteinamida (89)

Sólido blanco. **Pf** 123-125 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = +3.8$ (c = 0.2, MeOH).

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ ppm: 0.82 (t, 3H, J= 7.3 Hz, CH₃), 1.14-1.25 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.26-1.36 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₃), 1.51 (dda, 1H, J= 8.2 Hz, J= 9.5 Hz, SH), 2.73 (m, 1H, H_a-CH-S), 2.89 (m, 1H, H_b-CH-S), 3.11 (c dist, 2H, CH₂-NH), 4.45 (m, 1H, CH-NH), 6.69 (ta, 1H, CH₂-NH), 7.25-

7.40 (m, 5H, Ph), 7.63 (d, 1H, J= 8.1 Hz, CH-NH). **RMN-¹³C** (100 MHz, CD₃OD) δ ppm: 14.1, 21.0, 27.1, 32.4, 40.2, 56.3, 75.4, 128.1, 129.2, 129.5, 141.5, 171.7, 175.3.

EM m/z (%): 310 (M⁺, 7), 204 (47), 203 (87), 178 (50), 177 (69), 159 (60), 128 (100), 107 (70), 79 (69), 76 (85), 74 (69), 57 (37). **HRMS** (IE) Masa exacta calculada para C₁₅H₂₂N₂O₃S: 310.1351; encontrado: 310.1351

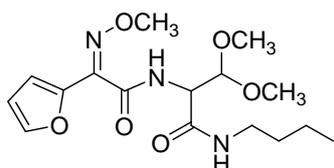
6. Síntesis de estructuras tipo 31 con grupo G= C(OCH₃)₂**6.1. N¹-(Butil)-2-[[2-furil(Z-metoxiimino)acetil]amino]-3,3-dimetoxipropanamida (Z-95).****6.1.1. N¹-Butil-2-[[2-furil(Z-metoxiimino)acetil]amino]-3,3-dimetoxipropanamida (Z-95): Ruta A**

Se prepara según el método descrito para el compuesto **Z-53** (ruta A) empleando 507 mg (3 mmol) de mezcla de isómeros (**E/Z**)-**49** en proporción 1:4, 482 mg (3.6 mmol) de HOBT, 619 mg (3 mmol) de DCC y 613 mg (3 mmol) de amina **93**. El tiempo de reacción es 62 horas.

El crudo de reacción se purifica en columna cromatográfica (CHCl₃) para obtener 910 mg (85%) de mezcla de isómeros 1:4 (**E/Z**). Los dos isómeros, una vez purificados del

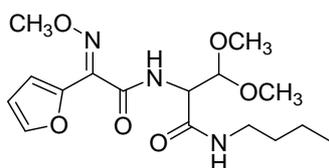
crudo de reacción, pueden separarse con más polaridad ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10:0.5) en columna cromatográfica. Se obtienen 200 mg (18%) enriquecidos de isómero *E* (***E*-95**) y 665 mg (62%) de isómero ***Z*-95**. Los datos de RMN- ^1H del isómero *E* pueden extrapolarse de la mezcla.

N*¹-Butil-2-[[2-furil(*Z*-metoxiimino)acetil]amino]-3,3-dimetoxipropanamida (Z*-95**).**

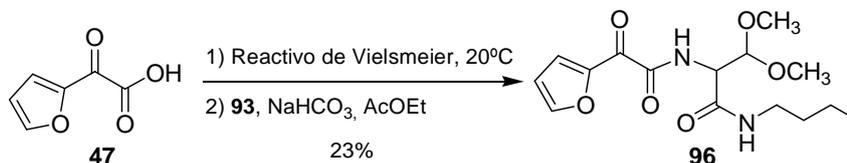


Sólido amarillo. Pf 107-110°C. RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.89 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.22-1.70 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 3.26 (c, 2H, $J = 6.3$ Hz, NH-CH_2), 3.46 (s, 3H, OCH_3), 3.48 (s, 3H, OCH_3), 4.05 (s, 3H, N-OCH_3), 4.66 (dd, 1H, $J = 2.7$ Hz, $J = 7.3$ Hz, CH-CO), 4.8 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, $\text{CH-C(OCH}_3)_2$), 6.44 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 3.4$ Hz, CH=CH-O), 6.50 (ta, 1H, NH), 6.78 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz, CH=C-O), 7.08 (da, 1H, $J = 7.3$ Hz, NH), 7.48 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, $=\text{CH-O}$). RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.6, 19.8, 31.4, 39.4, 55.3, 56.3, 56.9, 63.4, 103.9, 111.8, 114.1, 144.3, 144.7, 145.5, 160.8, 167.0. EM (IE) m/z (%): 355 (M^+ , <1), 75 (100).

N*¹-Butil-2-[[2-furil(*E*-metoxiimino)acetil]amino]-3,3-dimetoxipropanamida (E*-95**).**



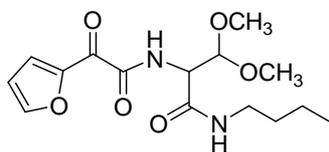
RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.89 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.22-1.70 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 3.26 (c, 2H, $J = 6.3$ Hz, NH-CH_2), 3.46 (s, 3H, OCH_3), 3.51 (s, 3H, OCH_3), 4.10 (s, 3H, N-OCH_3), 4.60 (dd, 1H, $J = 2.7$ Hz, $J = 6.7$ Hz, CH-CO), 4.74 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, $\text{CH-C(OCH}_3)_2$), 6.49 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 3.4$ Hz, CH=CH-O), 7.20 (da, 1H, NH), 7.30 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz, CH=C-O), 7.53 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, $=\text{CH-O}$), 7.6 (da, 1H, NH). EM (IE) m/z (%): 355 (M^+ , <1), 75 (100)

6.1.2. **Z-95**: Ruta B.6.1.2.1. *N*¹-Butil-2-[[2-furil(oxo)acetil]amino]-3,3-dimetoxipropanamida (**96**).

A una mezcla de 2.5 mL de CH₂Cl₂ y 0.15 mL (2.15 mmol) de DMF, enfriada en baño de hielo y con agitación mecánica, se le añaden 0.27 mL (3.07 mmol) de cloruro de oxalilo. Se mantiene agitando durante una hora más, y el exceso de reactivos y disolvente se eliminan a vacío quedando una pasta blanca.

A continuación una disolución de 200 mg (1.4 mmol) de ácido α-oxo-2-furanacético (**47**) en 5 mL de CH₂Cl₂ seco bajo atmósfera de argón, se adiciona gota a gota sobre el reactivo de Vielsmeier manteniendo el matraz en un baño de agua, y se deja agitando durante 2 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, se añade el cloruro formado sobre una mezcla que contiene 350 mg de amina **93** (1.7 mmol) y 478 mg (5.7 mmol) de NaHCO₃ en 5 mL de AcOEt, en atmósfera inerte y enfriada en baño de agua-hielo. Tras 12 horas de reacción, el crudo se filtra a vacío, lavando repetidas veces con pequeñas porciones de CH₂Cl₂, se seca con MgSO₄ y, tras evaporación del disolvente, la separación cromatográfica en columna a presión atmosférica (Hexano/AcOEt, 1:1) proporciona 110 mg (23%) de un sólido amarillo correspondiente al producto **96** puro.

***N*¹-Butil-2-[[2-furil(oxo)acetil]amino]-3,3-dimetoxipropanamida (**96**).**

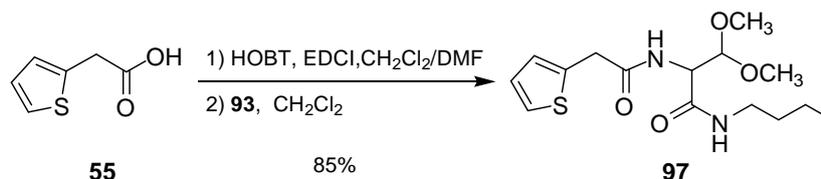
Sólido amarillo. **Pf** 96-100°C. **RMN**⁻¹**H** (200 MHz, CDCl₃)

δ ppm: 0.89 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-CH₃), 1.20-1.55 (m, 4H, CH₂-CH₂), 3.26 (c, 2H, *J* = 6.7 Hz, NH-CH₂), 3.42 (s, 3H, OCH₃), 3.49 (s, 3H, OCH₃), 4.52 (dd, 1H, *J* = 3.3 Hz, *J* =

7.6 Hz, CH-CO), 4.67 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, CH-C(OCH₃)₂), 6.28 (ta, 1H, NH), 6.59 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 3.7 Hz, CH=CH-O), 7.74 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz, CH=C-O), 8.04 (sa, 1H, NH), 8.08 (dd, 1H, *J* = 3.7 Hz, =CH-O). **RMN**⁻¹³**C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.6, 19.8, 31.3, 39.4, 55.1, 56.1, 56.9, 103.9, 113.0, 126.5, 149.4, 149.5, 160.3, 166.8, 172.6.

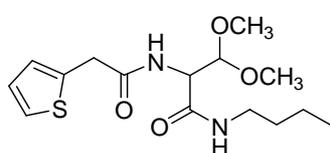
EM (IE) m/z (%): 326 (M^+ , <1%), 100 (12), 95 (37), 75 (100), 69 (10). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para $C_{15}H_{23}N_2O_6$ $[M+H]^+$: 327.1556; encontrado: 327.1562.

6.2. N^1 -Butil-2-[(2-tienilacetil)amino]-3,3-dimetoxipropanamida (**97**)



Se obtiene mediante el procedimiento descrito para la obtención de **Z-76**, partiendo de 142 mg de **55** (1 mmol), 160 mg (1.2 mmol) de HOBT, 206 mg (1 mmol) de EDCI y 204 mg (1 mmol) de amina **93** y 24 horas de reacción. El crudo de la reacción elaborada se cromatografía (Hexano/AcOEt, 3:7) para obtener 155 mg (47%) de un sólido blanco correspondiente al producto **97**. Se recristaliza de CHCl_3 -ciclohexano.

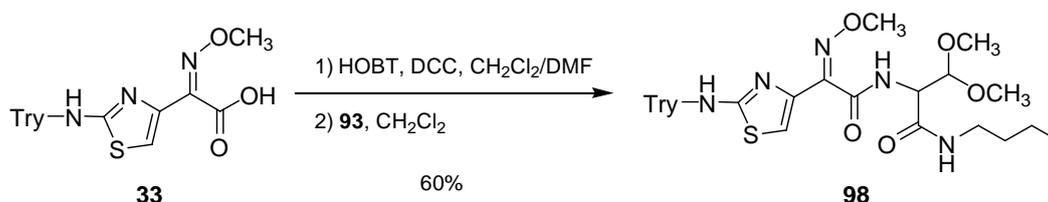
N^1 -Butil-2-[(2-tienilacetil)amino] -3,3-dimetoxipropanamida (**97**).



Sólido blanco. **Pf** 120-122. **RMN- ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.30 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.43 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 3.21 (m, 2H, NH-CH_2), 3.36 (s, 3H, OCH_3), 3.45 (s, 3H, OCH_3), 3.81 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$), 4.45 (dd, 1H, $J = 2.9$ Hz, $J = 6.6$ Hz, CH-NH), 4.59 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, $\text{CH-C}(\text{OCH}_3)_2$), 6.32 (sa, 1H, NH), 6.68 (da, 1H, $J = 6.6$ Hz, NH-CH), 6.97 + $\text{CH=C-S} + \text{CH=CH-S}$, 7.22 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 4.8$ Hz, $=\text{CH-S}$). **RMN- ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.7, 19.9, 31.3, 37.5, 39.3, 55.0, 56.0, 57.3, 104.2, 125.5, 127.2, 127.3, 135.7, 167.3, 170.0. **EM** (IE) m/z (%): 328 (M^+ , <1), 100 (19), 97 (35), 75 (100), 69 (12), 57 (20). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para $C_{15}H_{25}N_2O_4\text{S}$ $[M+H]^+$: 329.1535; encontrado: 329.1532.

6.3. 2-[[2-(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(Z-metoxiimino) acetil]amino}-N¹-butil-3,3-dimetoxipropanamida (99).

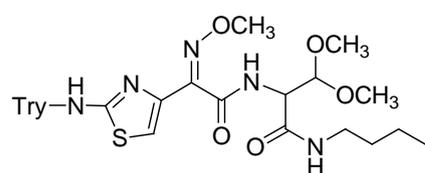
6.3.1. N¹-Butil-2-((Z-metoxiimino)[2-(tritolamino)-1,3-tiazol-4-il]acetil)amino)-3,3-dimetoxipropanamida (98).



Se prepara por el método de condensación descrito para el compuesto **Z-53** (ruta A) a partir de 655 mg (1.5 mmol) de **33**, 238 mg (1.8 mmol) de HOBT, 305.36 mg (1.5 mmol) de DCC y 302 mg (1.48 mmol) de amina **93**, empleando 50 horas de reacción.

El crudo de reacción se cromatografía en columna a presión atmosférica (CHCl₃) para obtener 559 mg (60%) de un sólido amarillo, que corresponde al producto de condensación **98**.

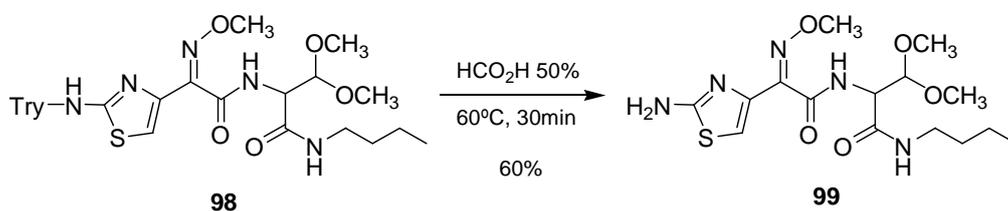
N¹-Butil-2-((Z-metoxiimino)[2-(tritolamino)-1,3-tiazol-4-il]acetil)amino)-3,3-dimetoxipropanamida (98).



Sólido amarillo. **Pf** 89-98°C. **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.88 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH₂-CH₃), 1.20-1.50 (m, 4H, CH₂-CH₂), 3.24 (c, 2H, $J = 6.7$ Hz, NH-CH₂), 3.40 (s, 3H, OCH₃), 3.44 (s, 3H, OCH₃),

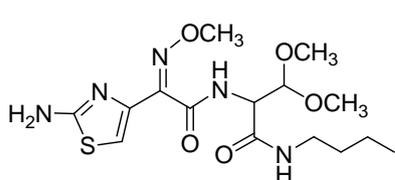
4.03 (s, 3H, N-OCH₃), 4.65 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J = 7.6$ Hz, CH-CO), 4.79 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, CH-C(OCH₃)₂), 6.61 (ta, 1H, $J = 6.7$ Hz, NH-CH₂), 6.66 (s, 1H, CH-S), 6.71 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, NH-CH), 6.98 (sa, 1H, NH-CPh₃), 7.27 (m, 15H, 3Ph). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.6, 19.9, 31.4, 39.3, 55.1, 56.4, 56.6, 63.2, 71.7, 103.8, 113.2, 127.6, 128.2, 129.2, 140.9, 143.0, 148.6, 162.4, 167.1, 168.8. **EM** (IE) m/z (%): 243 (Try⁺, 14), 165 (15), 105 (38), 99 (35), 98 (23), 85 (25), 83 (37), 77 (50), 75 (100), 61 (28). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₃₄H₄₀N₅O₅S [M+H]⁺: 630.2750; encontrado: 630.2759.

6.3.2. 2-[[2-(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(Z-metoxiimino) acetil]amino]-N¹-butil-3,3-dimetoxipropanamida (**99**).



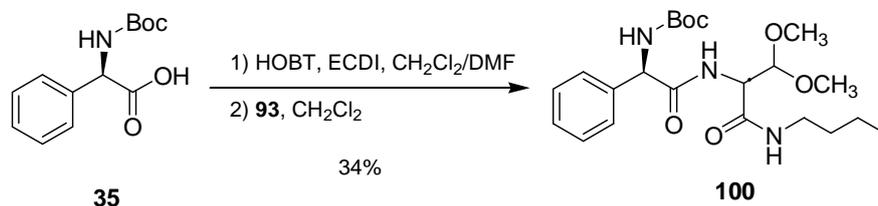
Se desprotege según el método descrito para la obtención de **58** partiendo de 750 mg (1.19 mmol) de **98**. Se obtienen 300 mg (60%) de un precipitado blanco correspondiente al producto **99** desprotegido en su grupo amino.

2-[[2-(2-Amino-1,3-tiazol-4-il)(Z-metoxiimino) acetil]amino]-N¹-butil-3,3-dimetoxipropanamida (**99**).



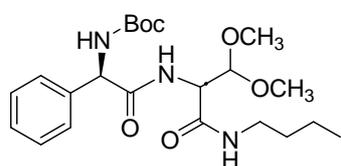
Sólido blanco. **Pf** 92-100°C. **RMN-¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.87 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH₂-CH₃), 1.20-1.55 (m, 4H, CH₂-CH₂), 3.25 (m, 2H, NH-CH₂), 3.46 (s, 3H, OCH₃), 3.47 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (s, 3H, N-OCH₃), 4.77 (dd, 1H, $J = 2.7$ Hz, $J = 7.9$ Hz, CH-CO), 4.83 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, CH-C(OCH₃)₂), 5.41 (sa, 2H, NH₂), 6.78 (ta, $J = 6.7$ Hz, NH), 6.87 (s, 1H, CH-S), 7.43 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, NH-CH). **RMN-¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.6, 19.8, 31.4, 39.3, 55.1, 56.5, 56.7, 62.9, 104.3, 112.2, 142.6, 148.2, 162.3, 167.4, 168.0. **EM** (IE) m/z (%): 387 (M⁺, <1), 125 (15), 83 (15), 75 (100), 69 (20). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₁₅H₂₆N₅O₅S [M+H]⁺: 388.1655; encontrado: 388.1656.

6.4. *N*¹-Butil-2-[[*(2R)*-(*tert*-butoxicarbonilamino)(*fenil*)acetil]amino]-3,3-dimetoxipropanamida (100**)**



Se obtiene mediante el procedimiento descrito para la obtención de **Z-76**, partiendo de 251 mg de **35** (1 mmol), 160 mg (1.2 mmol) de HOBT, 206 mg (1 mmol) de EDCI y 204 mg (1 mmol) de amina **93** y 24 horas de reacción. El crudo de la reacción elaborada se cromatografía a presión atmosférica (Hexano/AcOEt, 1:1) para obtener 150 mg (34%) de un sólido blanco correspondiente al producto **100**. Se recristaliza de CHCl₃-MeOH-ciclohexano.

***N*¹-Butil-2-[[*(2R)*-(*tert*-butoxicarbonilamino)(*fenil*)acetil]amino]-3,3-dimetoxipropanamida (**100**)**



Sólido blanco. **Pf** 85-91°C. $[\alpha]_{\text{D}} = -52.0$ ($c = 1.0$, CHCl₃).

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.87 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₂-CH₃), 1.21-1.49 (m, 4H, CH₂-CH₂), 1.42 (s, 9H, ^tBu), 3.09-3.22 (m, 2H, NH-CH₂), 3.41 (s, 3H, OCH₃), 3.45 (s, 3H, OCH₃), 4.49 (da, 1H, $J = 6.2$ Hz, NH-CH), 4.75 (sa, 1H, CH(OCH₃)₂), 5.10 (sa, 1H, CH-NH-Boc), 5.49 (sa, 1H, NH), 6.45 (sa, 1H, NH), 6.84 (sa, 1H, NH), 7.31-7.37 (m, 5H, C₆H₅). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.5, 19.7, 28.0, 31.1, 39.1, 55.1, 56.4, 56.7, 59.0, 80.5, 104.0, 127.2, 128.6, 129.1, 137.3, 155.1, 167.4, 170.0. **EM** (IE) m/z (%): 231(M⁺ - PhCHBoc, 3), 150 (14) 106 (30), 100(14), 77 (8), 75 (100). **HRMS** (FAB) Masa exacta calculada para C₂₂H₃₆N₃O₆ [M+H]⁺: 438.2604; encontrado: 438.2591.

Síntesis del Capítulo II-1: Antígenos Dendríméricos.

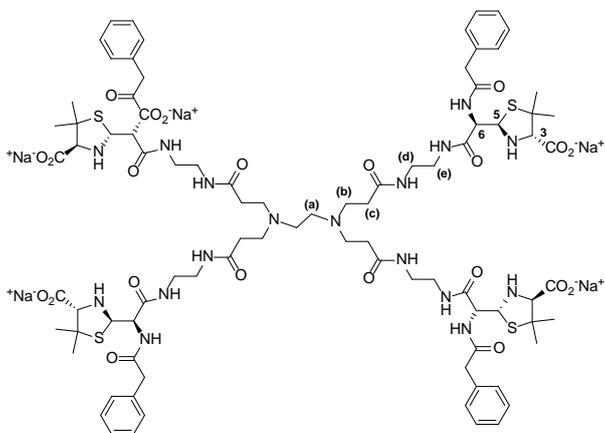
1. Preparación de antígenos dendríméricos G_n BPO.

Procedimiento general para la síntesis de dendrímeros G_n BPO ($n = 0-6$), (101-107).

Se añade un exceso de bencilpenicilina sódica a una disolución en agitación del correspondiente dendrímero PAMAM en tampón carbonato acuoso 0.02 M, pH = 10.8, a 20°C (G_0 BPO₄ y G_1 BPO₈) o a 4°C (G_2 BPO₁₆- G_6 BPO₂₅₆). Se adicionan cantidades de bencilpenicilina sódica (~ 0.2 equivalentes) cada 24 horas aproximadamente a la mezcla y se agita a la temperatura y durante el tiempo indicado en cada caso. Posteriormente, se purifica por filtración en gel, empleando Sephadex G10 como fase estacionaria y agua destilada como eluyente. Tras la separación, el disolvente de la fracción correspondiente al producto conjugado se evapora a vacío, para obtener el correspondiente producto puro, con aspecto de sólido blanco cristalino.

1.1. Obtención de G_0 BPO₄ (101).

Se obtuvo siguiendo el procedimiento general partiendo de 8 equivalentes de bencilpenicilina sódica, y dendrímero PAMAM de generación 0, a 20-23°C durante 24 horas. Se aísla el producto con un 73% de rendimiento.

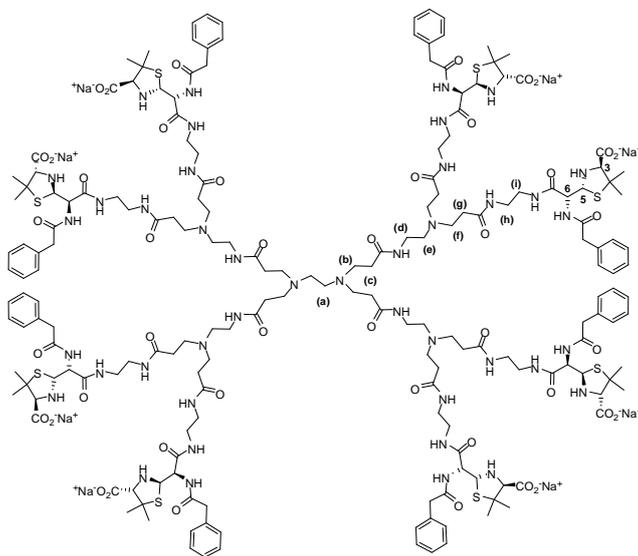


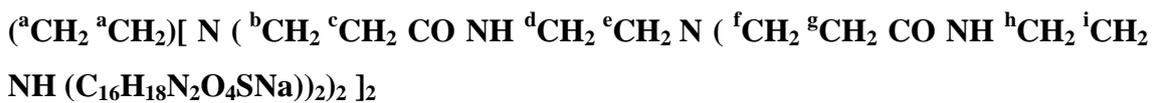


Sólido blanco cristalino. $[\alpha]_{\text{D}} = +45.0$ ($c = 0.5$, H_2O). **RMN- ^1H** (400 MHz, D_2O pD ≈ 11) δ (ppm): 1.20 (s, 12 H, $\alpha\text{-CH}_3\text{-C2}$), 1.54 (s, 12 H, $\beta\text{-CH}_3\text{-C2}$), 2.28 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{-CONH}$; (c)), 2.51 (sa, 4 H, CH_2N : (a)), 2.69 (m, 8 H, CH_2N : (b)), 3.22 (m, 16 H, $\text{CH}_2\text{-NHCO}$: (d, e)), 3.43 (s, 4 H, H-3), 3.61 (s, 8 H, CH_2Ph), 4.26 (d, 4 H, $J = 8.5$ Hz, H-6), 4.88 (d, 4H, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.28 (m, 20 H, Ph). **RMN- ^{13}C** (50 MHz, $\text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$, pD ≈ 11) δ (ppm): 175.7, 175.5, 175.1, 172.4, 135.6, 129.9, 129.6, 128.1, 75.2, 65.4, 60.2, 60.1, 50.6, 49.8, 42.7, 39.3, 39.2, 33.4, 27.6, 27.3. **FAB-MS** [$\text{G}_0\text{BPO}_4(\text{COONa})$]: 1943 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{M} = \text{C}_{86}\text{H}_{116}\text{N}_{18}\text{Na}_4\text{O}_{20}\text{S}_4 = 1942$. **EM (MALDI-TOF)** (matriz: 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP)), [$\text{G}_0\text{BPO}_4(\text{COOH})$]: 1855 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{M} = \text{C}_{86}\text{H}_{120}\text{N}_{18}\text{O}_{20}\text{S}_4 = 1854$.

1.2. Obtención de G_1BPO_8 (102).

Se obtuvo siguiendo el procedimiento general partiendo de 16 equivalentes de bencilpenicilina sódica, y dendrímero PAMAM de generación 1, a 20-23°C durante 48 horas. Se aísla el producto con un 70% de rendimiento.

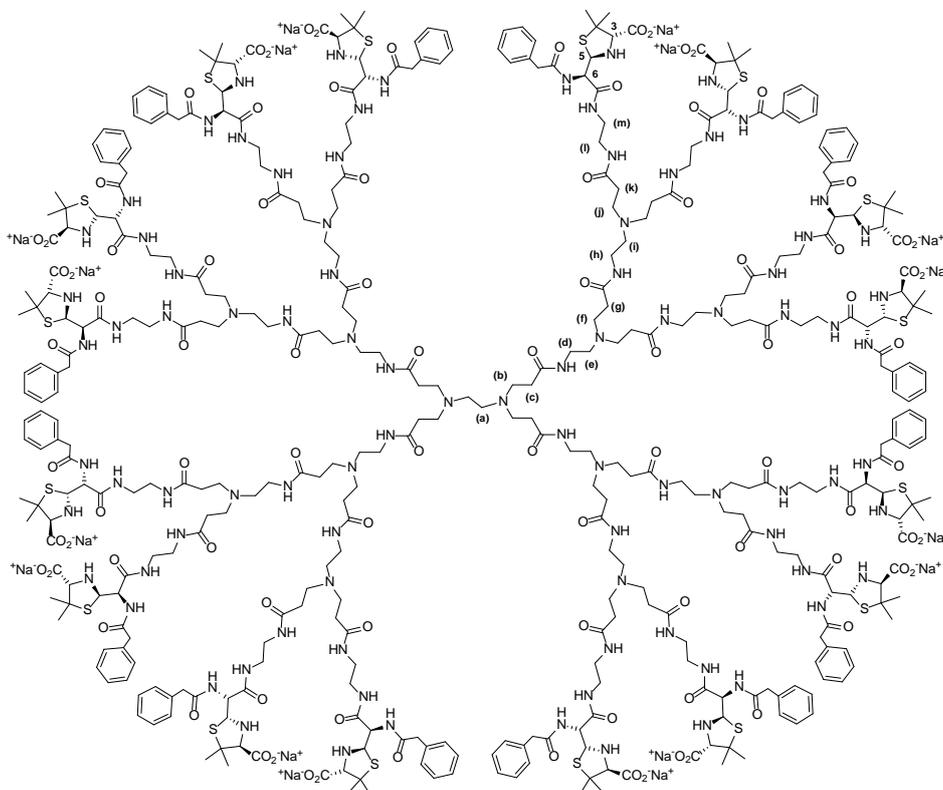


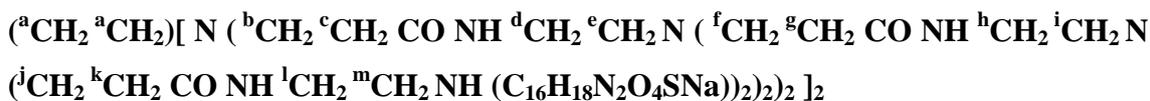


Sólido blanco cristalino. $[\alpha]_{\text{D}} = +42.8$ ($c = 0.5$, H_2O). **RMN- ^1H** (400 MHz, D_2O pD ≈ 11) δ (ppm): 1.20 (s, 24 H, $\alpha\text{-CH}_3\text{-C2}$), 1.54 (s, 24 H, $\beta\text{-CH}_3\text{-C2}$), 2.28 (m, 24 H, $\text{CH}_2\text{-CONH}$; (c, g)), 2.51 (sa, 12 H, CH_2N ; (a, e)), 2.69 (m, 24 H, CH_2N ; (b, f)), 3.22 (m, 40 H, $\text{CH}_2\text{-NHCO}$: (d, h, i)), 3.43 (s, 8 H, H-3), 3.61 (s, 16 H, CH_2Ph), 4.26 (d, 8 H, $J = 8.5$ Hz, H-5), 4.88 (d, 8H, $J = 8.5$ Hz, H-6), 7.28 (m, 40 H, Ph). **RMN- ^{13}C** (50 MHz, $\text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$, pD ≈ 11) δ (ppm): 175.5, 175.3, 174.7, 172.1, 135.5, 129.8, 128.5, 127.9, 75.1, 65.3, 59.9, 59.8, 51.8, 49.6, 42.6, 39.1, 37.4, 33.3, 27.7, 27.4. **EM (MALDI-TOF)** (matriz: 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP)), $[\text{G}_1\text{BPO}_8(\text{COOH})]$: 4106 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{M} = \text{C}_{190}\text{H}_{272}\text{N}_{42}\text{O}_{44}\text{S}_8 = 4105$.

1.3. Obtención de $\text{G}_2\text{BPO}_{16}$ (103).

Se obtuvo siguiendo el procedimiento general partiendo de 32 equivalentes de bencilpenicilina sódica, y dendrímero PAMAM-G2. Tras un tiempo de reacción de 4 días a 4°C se aisló el producto con un 80% de rendimiento.

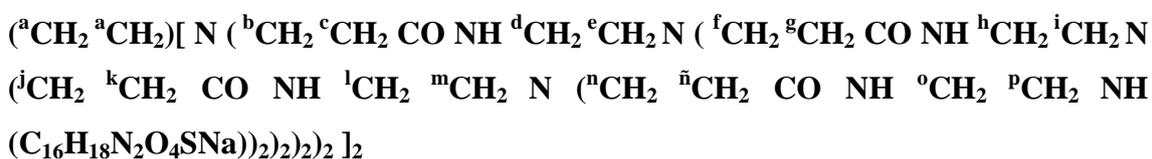
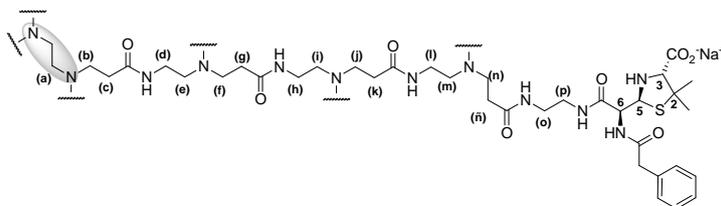




Sólido blanco cristalino. $[\alpha]_{\text{D}} = +41.5$ ($c = 0.5$, H_2O). **RMN-¹H** (400 MHz, D_2O pD ≈ 11) δ (ppm): 1.20 (s, 48 H, $\alpha\text{-CH}_3\text{-C2}$), 1.54 (s, 48 H, $\beta\text{-CH}_3\text{-C2}$), 2.28 (m, 56 H, $\text{CH}_2\text{-CONH}$: (**c**, **g**, **k**)), 2.51 (sa, 28 H, CH_2N : (**a**, **e**, **i**)), 2.69 (m, 56 H, CH_2N : (**b**, **f**, **j**)), 3.22 (m, 88 H, $\text{CH}_2\text{-NHCO}$: (**d**, **h**, **l**, **m**)), 3.43 (s, 16 H, H-3), 3.61 (s, 32 H, CH_2Ph), 4.26 (d, 16 H, $J = 8.5$ Hz, H-6), 4.88 (d, 16H, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.28 (m, 80 H, Ph). **RMN-¹³C** (50 MHz, $\text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$, pD ≈ 11) δ (ppm): 175.2, 175.0, 174.4, 171.8, 135.2, 129.5, 129.2, 127.6, 74.9, 65.1, 59.6, 59.5, 51.5, 49.3, 42.4, 38.8, 37.2, 33.0, 27.4, 27.1. **EM (MALDI-TOF)** (matriz: ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico (ácido sinapínico)), $[\text{G}_2\text{BPO}_{16}(\text{COOH})]^-$: 8607 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{M} = \text{C}_{398}\text{H}_{576}\text{N}_{90}\text{O}_{92}\text{S}_{16} = 8606$.

1.4. Obtención de $\text{G}_3\text{BPO}_{32}$ (104).

Se obtuvo siguiendo el procedimiento general partiendo de dendrímero PAMAM-G3 y 64 equivalentes de bencilpenicilina sódica. La reacción se llevó a cabo a 4°C durante 5 días, aislándose el producto con un 70% de rendimiento.

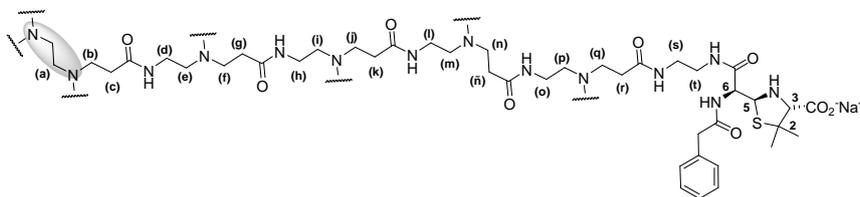


Sólido blanco cristalino. $[\alpha]_{\text{D}} = +31.7$ ($c = 0.5$, H_2O). **RMN-¹H** (400 MHz, D_2O pD ≈ 11) δ (ppm): 1.20 (s, 96 H, $\alpha\text{-CH}_3\text{-C2}$), 1.54 (s, 96 H, $\beta\text{-CH}_3\text{-C2}$), 2.28 (m, 120 H, $\text{CH}_2\text{-CONH}$: (**c**, **g**, **k**, **ñ**)), 2.51 (sa, 60 H, CH_2N : (**a**, **e**, **i**, **m**)), 2.69 (m, 120 H, CH_2N : (**b**, **f**, **j**, **n**)), 3.22 (m, 184 H, $\text{CH}_2\text{-NHCO}$: (**d**, **h**, **l**, **o**, **p**)), 3.43 (s, 32 H, H-3), 3.61 (s, 64 H, CH_2Ph), 4.26 (d, 32 H, $J = 8.5$ Hz, H-6), 4.88 (d, 32 H, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.28 (m, 160

H, Ph). **RMN-¹³C** (50 MHz, D₂O + Na₂CO₃, pD ≈ 11) δ (ppm): 175.8, 175.5, 175.1, 174.8, 172.3, 135.8, 130.1, 129.8, 128.2, 75.6, 65.8, 60.2, 60.0, 52.0, 50.0, 43.0, 39.4, 37.8, 33.6, 28.0, 27.7.

1.5. Obtención de G₄BPO₆₄ (105).

Se obtuvo siguiendo el procedimiento general partiendo de dendrímico PAMAM-G4 y 128 equivalentes de bencilpenicilina sódica. La reacción se llevó a cabo a 4°C durante 6 días, aislándose el producto con un 82% de rendimiento.

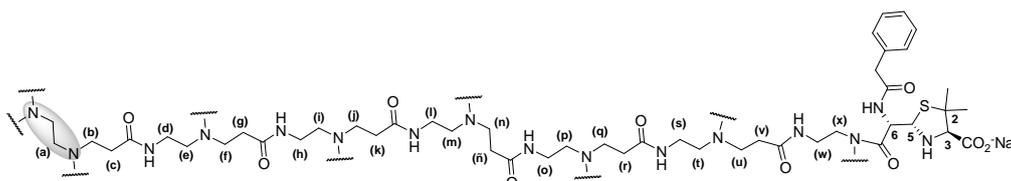


(^aCH₂ ^aCH₂) [N (^bCH₂ ^cCH₂ CO NH ^dCH₂ ^eCH₂ N (^fCH₂ ^gCH₂ CO NH ^hCH₂ ⁱCH₂ N (^jCH₂ ^kCH₂ CO NH ^lCH₂ ^mCH₂ N (ⁿCH₂ ^ñCH₂ CO NH ^oCH₂ ^pCH₂ N (^qCH₂ ^rCH₂ CO NH ^sCH₂ ^tCH₂ NH (C₁₆H₁₈N₂O₄SNa))₂)₂)₂)₂)₂]₂

Sólido blanco cristalino. [α]_D = + 33.9 (c = 0.5, H₂O). **RMN-¹H** (400 MHz, D₂O pD ≈ 11) δ (ppm): 1.20 (s, 192 H, α-CH₃-C2), 1.54 (s, 192 H, β-CH₃-C2), 2.28 (m, 248 H, CH₂-CONH: (c, g, k, ñ, r)), 2.51 (sa, 124 H, CH₂N: (a, e, i, m, p)), 2.69 (m, 248 H, CH₂N: (b, f, j, n, q)), 3.22 (m, 376 H, CH₂-NHCO: (d, h, l, o, s, t)), 3.43 (s, 64 H, H-3), 3.61 (s, 128 H, CH₂Ph), 4.26 (d, 64 H, J = 8.5 Hz, H-6), 4.88 (d, 64 H, J = 8.5 Hz, H-5), 7.28 (m, 320 H, Ph). **RMN-¹³C** (50 MHz, D₂O + Na₂CO₃, pD ≈ 11) δ (ppm): 175.8, 175.7, 175.5, 172.2, 174.9, 172.3, 135.9, 130.4, 129.8, 128.2, 75.6, 65.8, 60.3, 60.1, 52.3, 50.1, 43.0, 39.5, 87.8, 33.7, 28.1, 27.8.

1.6. Obtención de G_5BPO_{128} (106).

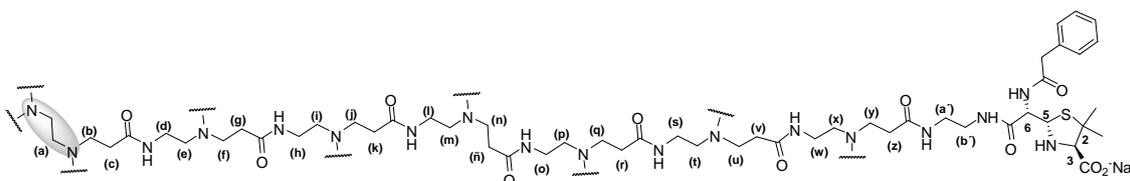
Se obtuvo siguiendo el procedimiento general partiendo de dendrímero PAMAM-G5 y 256 equivalentes de bencilpenicilina sódica. La reacción se llevó a cabo a 4°C durante 7 días, aislándose el producto con un 67% de rendimiento.

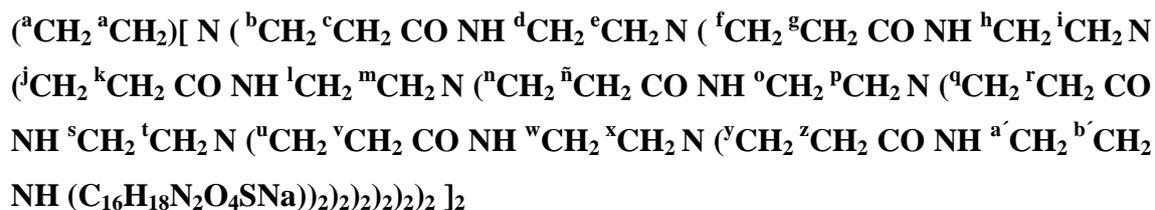


$(^a\text{CH}_2\ ^a\text{CH}_2)[\text{N}(^b\text{CH}_2\ ^c\text{CH}_2\ \text{CO}\ \text{NH}\ ^d\text{CH}_2\ ^e\text{CH}_2\ \text{N}(^f\text{CH}_2\ ^g\text{CH}_2\ \text{CO}\ \text{NH}\ ^h\text{CH}_2\ ^i\text{CH}_2\ \text{N}(^j\text{CH}_2\ ^k\text{CH}_2\ \text{CO}\ \text{NH}\ ^l\text{CH}_2\ ^m\text{CH}_2\ \text{N}(^n\text{CH}_2\ ^ñ\text{CH}_2\ \text{CO}\ \text{NH}\ ^o\text{CH}_2\ ^p\text{CH}_2\ \text{N}(^q\text{CH}_2\ ^r\text{CH}_2\ \text{CO}\ \text{NH}\ ^s\text{CH}_2\ ^t\text{CH}_2\ \text{N}(^u\text{CH}_2\ ^v\text{CH}_2\ \text{CO}\ \text{NH}\ ^w\text{CH}_2\ ^x\text{CH}_2\ \text{NH}(\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{SNa}))_2)_2)_2)_2)_2)_2]_2$
 Sólido blanco cristalino $[\alpha]_D = +29.8$ ($c = 0.5$, H_2O). **RMN- ^1H** (400 MHz, D_2O pD ≈ 11) δ (ppm): 1.20 (s, 384 H, $\alpha\text{-CH}_3\text{-C}_2$), 1.54 (s, 384 H, $\beta\text{-CH}_3\text{-C}_2$), 2.28 (m, 504 H, $\text{CH}_2\text{-CONH}$: (c, g, k, ñ, r, v)), 2.51 (sa, 252 H, CH_2N : (a, e, i, m, p, t)), 2.69 (m, 504 H, CH_2N : (b, f, j, n, q, u)), 3.22 (m, 760 H, $\text{CH}_2\text{-NHCO}$: (d, h, l, o, s, w, x)), 3.43 (s, 128 H, H-3), 3.61 (s, 256 H, CH_2Ph), 4.26 (d, 128 H, $J = 8.5$ Hz, H-6), 4.88 (d, 128 H, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.28 (m, 640 H, Ph). **RMN- ^{13}C** (50 MHz, $\text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$, pD ≈ 11) δ (ppm): 175.1, 174.9, 174.5, 174.3, 171.7, 135.2, 129.7, 129.2, 127.7, 74.9, 65.2, 59.6, 58.6, 51.3, 49.4, 42.4, 38.8, 38.7, 33.0, 27.4, 27.1.

1.7. Obtención de G_6BPO_{256} (107).

Se obtuvo siguiendo el procedimiento general partiendo de 512 equivalentes de bencilpenicilina sódica, y dendrímero PAMAM-G6. Tras un tiempo de reacción de 8 días a una temperatura de 4°C se aisló el producto con un 85% de rendimiento.





Sólido blanco cristalino $[\alpha]_{\text{D}} = +30.3$ ($c = 0.5$, H_2O). **RMN- ^1H** (400 MHz, D_2O pD ≈ 11) δ (ppm): 1.20 (s, 768 H, $\alpha\text{-CH}_3\text{-C2}$), 1.54 (s, 768 H, $\beta\text{-CH}_3\text{-C2}$), 2.28 (m, 1016 H, $\text{CH}_2\text{-CONH}$: (c, g, k, ñ, r, v, z)), 2.51 (sa, 508 H, CH_2N : (a, e, i, m, p, t, x)), 2.69 (m, 1016 H, CH_2N : (b, f, j, n, q, u, y)), 3.22 (m, 1528 H, $\text{CH}_2\text{-NHCO}$: (d, h, l, o, s, w, a', b')), 3.43 (s, 256 H, H-3), 3.61 (s, 512 H, CH_2Ph), 4.26 (d, 256 H, $J = 8.5$ Hz, H-6), 4.88 (d, 256 H, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.28 (m, 1280 H, Ph). **RMN- ^{13}C** (50 MHz, $\text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$, pD ≈ 11) δ (ppm): 175.3, 175.1, 174.6, 174.4, 171.9, 135.4, 129.9, 129.4, 127.9, 75.2, 65.4, 59.8, 58.8, 51.8, 49.6, 42.6, 39.0, 37.3, 33.0, 27.6, 27.4.

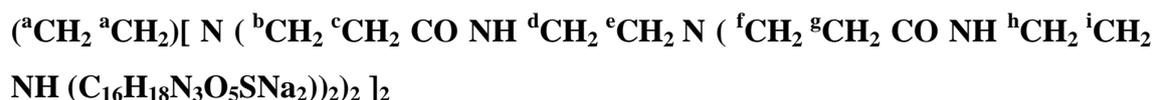
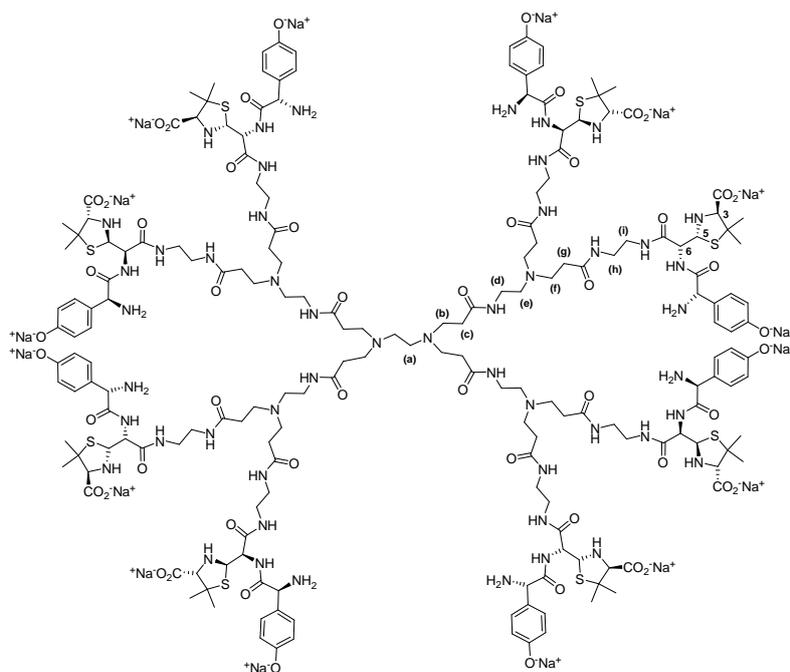
2. Preparación de antígenos dendriméricos $G_n\text{AXO}$.

Procedimiento general para la síntesis de dendrímeros $G_n\text{AXO}$ ($n = 1,2$), (108, 109).

Se añade un exceso de amoxicilina sódica a una disolución en agitación del correspondiente dendrímero PAMAM en tampón carbonato acuoso 0.02 M, pH = 10.8, a 4°C ($G_1\text{AXO-G}_6\text{BPO}$). Se adicionan cantidades de amoxicilina sódica (~ 0.2 equivalentes) cada 24 horas aproximadamente a la mezcla y se agita durante el tiempo indicado en cada caso. Posteriormente, se purifica por filtración en gel, empleando Sephadex G10 como fase estacionaria y agua destilada como eluyente. Tras la separación, el disolvente de la fracción correspondiente al producto conjugado se evapora a vacío, para obtener el correspondiente producto puro, con aspecto de sólido amarillo cristalino.

2.1. Obtención de G_1AXO_8 (108).

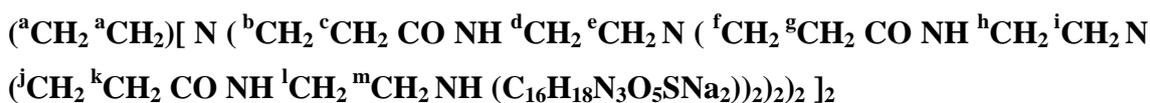
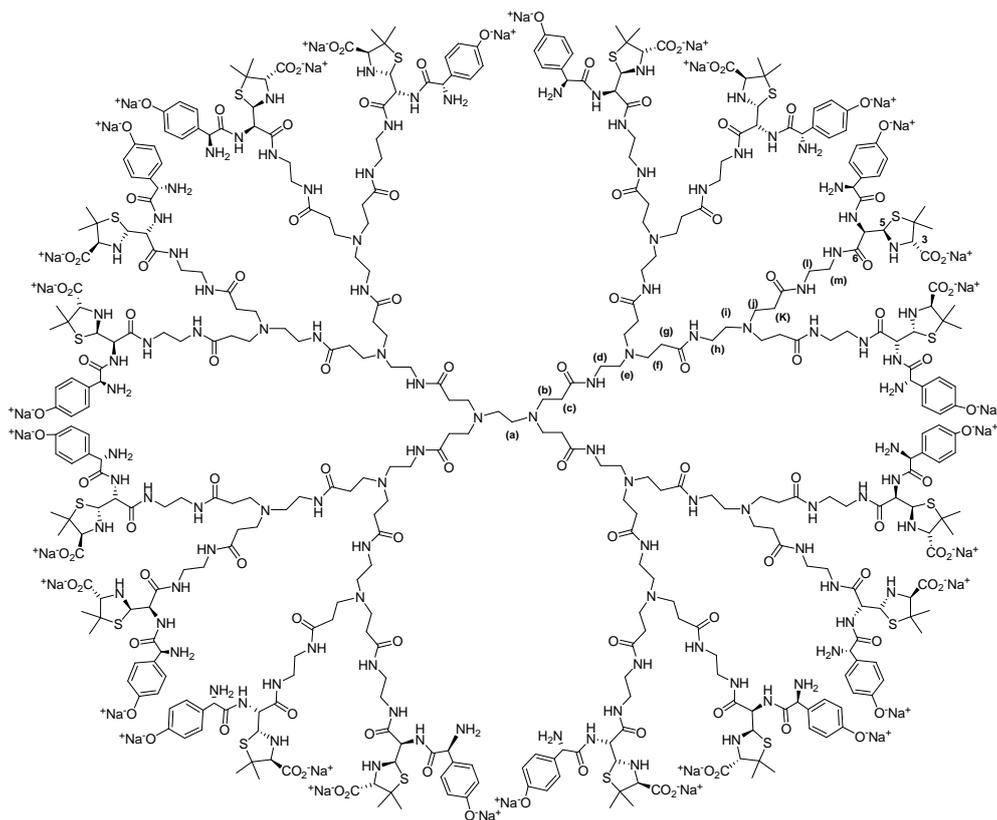
Se obtuvo siguiendo el procedimiento general partiendo de 16 equivalentes de amoxicilina sódica, y dendrímero PAMAM de generación 1, a 4°C durante 48 horas. Se aísla el producto con un 74% de rendimiento.



Sólido amarillo cristalino. $[\alpha]_{\text{D}} = +57.6$ ($c = 0.5$, H_2O). **RMN- ^1H** (400 MHz, D_2O pD ≈ 11) δ (ppm): 1.19 (s, 24 H, $\alpha\text{-CH}_3\text{-C2}$), 1.49 (s, 24 H, $\beta\text{-CH}_3\text{-C2}$), 2.37 (m, 24 H, $\text{CH}_2\text{-CONH}$; (c, g)), 2.56 (sa, 12 H, CH_2N ; (a, e)), 2.69 (m, 24 H, CH_2N ; (b, f)), 3.22 (m, 40 H, $\text{CH}_2\text{-NHCO}$; (d, h, i)), 3.38 (s, 8 H, H-3), 4.24 (d, 8 H, $J = 8.1$ Hz, H-6), 4.42 (s, 8 H, CHPh), 4.89 (d, 8 H, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.58 y 7.09 (AA'BB', 40 H, $J = 8.2$ Hz, C_6H_4). **RMN- ^{13}C** (100 MHz, $\text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$, pD ≈ 11) δ (ppm): 175.9, 175.8, 174.7, 164.2, 130.3, 129.8, 119.5, 75.4, 65.5, 60.1, 60.2, 51.8, 49.8, 41.3, 40.8, 39.4, 37.7, 33.6, 27.7, 27.6.

2.2. Obtención de G₂AXO₁₆ (109).

Se obtuvo siguiendo el procedimiento general partiendo de 32 equivalentes de amoxicilina sódica, y dendrímero PAMAM-G2. Tras un tiempo de reacción de 4 días a 4°C se aisló el producto con un 83% de rendimiento.



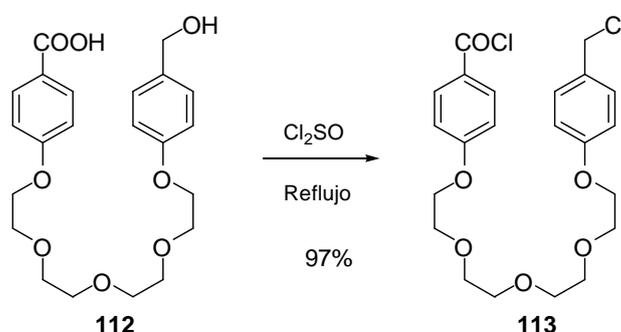
Sólido amarillo cristalino. $[\alpha]_{\text{D}} = +54.0$ ($c = 0.5$, H₂O). **RMN-¹H** (400 MHz, D₂O pD ≈ 11) δ (ppm): 1.21 (s, 48 H, α -CH₃-C2), 1.50 (s, 48 H, β -CH₃-C2), 2.28 (m, 56 H, CH₂-CONH: (c, g, k)), 2.51 (sa, 28 H, CH₂N: (a, e, i)), 2.69 (m, 56 H, CH₂N: (b, f, j)), 3.22 (m, 88 H, CH₂-NHCO: (d, h, l, m)), 3.39 (s, 16 H, H-3), 4.25 (d, 16 H, $J = 8.1$ Hz, H-6), 4.48 (s, 16 H, CHPh), 4.95 (d, 16H, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.70 y 7.18 (AA'BB', 80 H, $J = 8.1$ Hz, C₆H₄). **RMN-¹³C** (100 MHz, D₂O + Na₂CO₃, pD ≈ 11) δ (ppm): 177.2, 175.9, 173.3, 172.3, 164.2, 130.2, 129.7, 129.3, 119.5, 75.5, 65.6, 52.1, 59.5, 49.8, 39.5, 37.6, 33.6, 26.7, 26.6.

Síntesis del Capítulo II-2:

Antígenos Dendriméricos-Fase Sólida

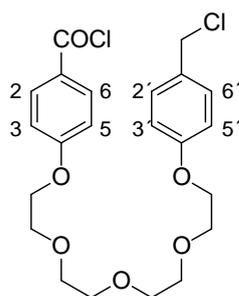
1. Síntesis de espaciadores: Obtención de 113 y 114.

1.1. 1-(p-Bencilcloro)-13-(p-benzoil)-1,4,7,10,13-pentaoxatridecano (113)



Un matraz de fondo redondo que contiene 300 mg (0.71 mmol) de producto desimetrizado (**112**) se introduce en un baño de agua-hielo y se añaden gota a gota, con embudo de adición compensada, 1.5 mL (exceso) de cloruro de tionilo. La reacción se deja alcanzar temperatura ambiente y posteriormente, se calienta a reflujo durante dos horas. Seguidamente se deja enfriar y se concentra a sequedad para dar 316 mg (97%) de un aceite amarillo correspondientes al producto **113**, clorobencilado y clorobenzoilado.

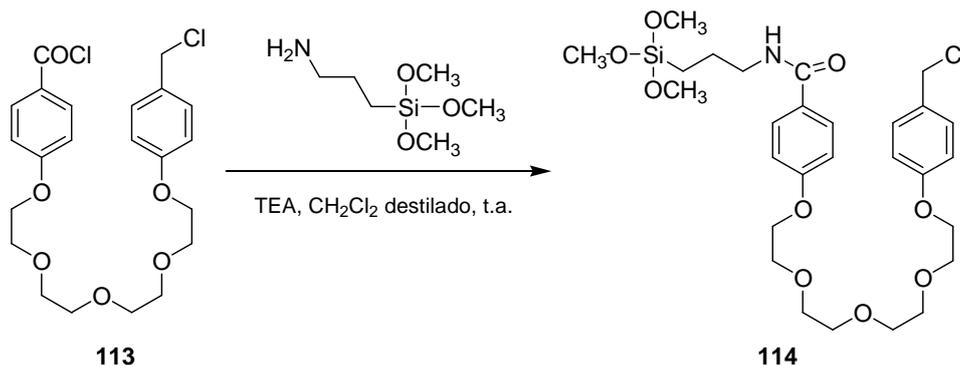
1-(p-Bencilcloro)-13-(p-benzoil)-1,4,7,10,13-pentaoxatridecano (113)



Aceite amarillo. **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 3.63-3.72 (m, 8H, TEG), 3.80-3.90 (m, 4H, TEG), 4.10 (m, 4H, TEG), 4.53 (s, 2H, Ph-CH₂), 6.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-3, H-5), 6.95 (d, *J* = 9.0 Hz, H-3', H-5'), 7.27 (d, *J* = 8.6 Hz, H-2', H-6'), 8.04 (d, *J* = 9.0 Hz, H-2, H-6). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃) ppm: 46.2, 67.4, 67.8, 69.3, 69.6, 70.6, 70.8, 70.8, 114.7, 114.7, 125.5, 129.8, 129.9,

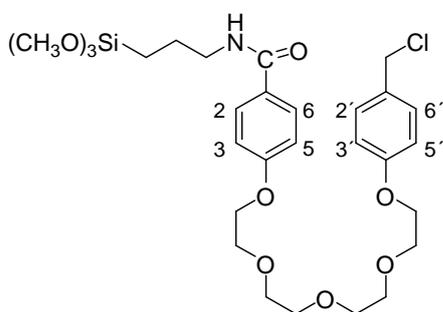
133.9, 158.8, 164.6, 167.1. **EM (IE) m/z (%)**: 458 ($M^+ + 2$, 7), 456 (M^+ , 11), 422 (39), 421 (44), 420 (93), 193 (32), 183 (100), 155 (38), 120 (37), 107 (48), 89 (38).

1.2. 1-(*p*-Bencilcloro)-13-(*N*-(trimetoxisililpropil)-*p*-benzoilamido)-1,4,7,10,13-pentaoxatridecano (114)



Una disolución que contiene 128 mg (0.7 mmol) de TMAPS y 98 μL de TEA recién destilada en 3 mL de CH_2Cl_2 seco en atmósfera inerte, se añade gota a gota sobre 320 mg (0.7 mmol) de **113** en 1 mL de CH_2Cl_2 seco en atmósfera inerte. La mezcla de reacción se agita durante una hora a temperatura ambiente. Este crudo se concentra a sequedad y se añaden 2 mL de THF seco, donde precipita el cloruro de trietilamonio formado. El precipitado se filtra rápidamente y la disolución resultante se concentra. El compuesto **114** se aisló como una aceite incoloro con rendimientos cuantitativos.

1-(*p*-Bencilcloro)-13-(*N*-(trimetoxisililpropil)-*p*-benzoilamido)-1,4,7,10,13-pentaoxatridecano (114)



Aceite incoloro. **RMN- ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.68 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Si}$), 1.71 (m, 2H, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si}$), 3.41 (m, 2H, CH_2NH), 3.54 (s, 9H, 3(OCH_3)), 3.66 (m, 8H, TEG), 3.83 (m, 4H, TEG), 4.09 (m, 4H, TEG), 4.52 (s, 2H, Ph- CH_2), 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, H-3, H-5), 6.89 (d, $J =$

8.7 Hz, H-3', H-5'), 7.26 (d, $J = 8.7$ Hz, H-2', H-6'), 7.68 (d, $J = 8.7$ Hz, H-2, H-6).

RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ppm: 6.5, 22.7, 42.1, 42.6, 50.6, 67.4, 67.5, 69.5, 69.6, 70.6, 70.7, 114.2, 114.7, 127.1, 128.5, 129.8, 130.0, 158.8, 161.1, 166.9.

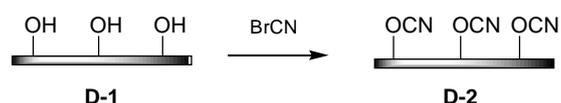
2. Obtención de discos de celulosa acoplados a antígenos dendriméricos.

Soportes de celulosa: Se preparan discos de celulosa (papel de filtro Whatman 54) de 6 mm de diámetro. Se emplean así para el procedimiento A.

Método de preparación y preactivación de los discos. Se preparan discos de celulosa (papel de filtro Whatman 54) de 6 mm de diámetro. Los discos se sumergen en una disolución de TFA en CH_2Cl_2 al 20% durante 5 minutos en un erlenmeyer en agitación.²⁰⁵ La disolución ácida se decanta y los discos se enjuagan 7 veces con CH_2Cl_2 con posterior filtrado en placa filtrante. Los discos lavados se introducen en el desecador a vacío durante 24 horas. Esta preactivación de los discos se emplea para los procedimientos B, C y D.

2.1. Procedimiento tipo A.

1.- Derivatización de la celulosa: Obtención de discos D-2.

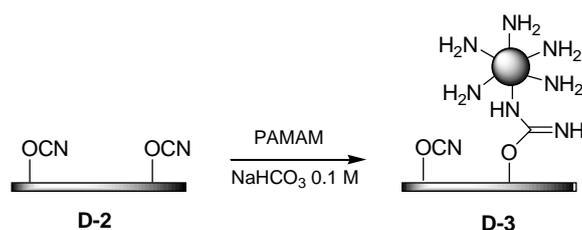


- Se pesan tandas de 10 g de discos y se tienen durante media hora lavando en agua destilada. El agua se cambia 4 veces durante el lavado.
- Una vez estén los discos lavados, se cambia el agua y se ajusta a pH 11 con NaOH 2N.
- Se disuelven 10 g de BrCN en el mínimo volumen de acetona, por cada 10 g de discos.
- Se añade la disolución de bromuro de cianógeno en acetona a los discos, agitando y controlando el pH. Se añade NaOH 2N para evitar que el pH baje de 10'5. Se deja de añadir NaOH cuando se estabiliza el pH en 11.
- Los discos se lavan con disolución acuosa de NaHCO_3 0'1 M (x 5).

²⁰⁵ M. D. Bowman, C. J. Ryan, H. H. Blackwell. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2019-2022

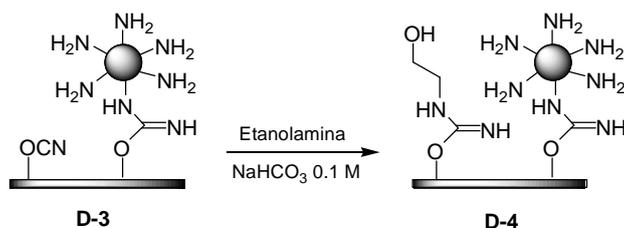
- Después se lava con 400 mL de mezcla de acetona-agua a diferentes concentraciones de acetona: 1x (25% acetona), 1x (50% acetona), 2x (75% acetona) y 2x (100% acetona).
- Se secan en desecador a vacío durante 12 horas.
- Los discos se conservan congelados en seco.

2.- Fijación de los dendrímeros PAMAM (G0-G6): Obtención de discos D-3.



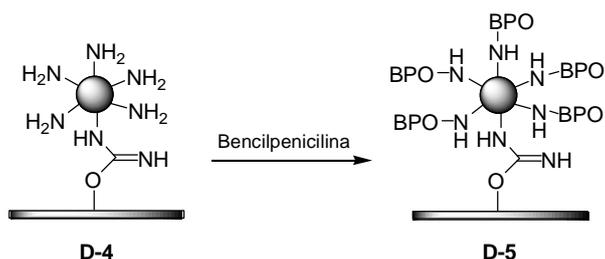
- Se preparan viales o tubos de ensayo que contengan grupos de 50 discos.
- Se añaden 2 mL de disolución de dendrímero PAMAM-Gn (10 mg/mL) en NaHCO_3 0.1M y, se agita durante 4 horas a temperatura ambiente.
- Se decanta la disolución y se lavan los discos con disolución NaHCO_3 0.1M (x4).
- Los discos que se emplearán para realizar el test de la ninhidrina se lavan con H_2O , se filtran y se secan.

3.- Bloqueo de posiciones activadas no ocupadas: Obtención de discos D-4.



- Se tratan los discos con disolución NaHCO_3 0.1M-etanolamina 50mM durante una hora.
- Se decanta la disolución y se lavan los discos con disolución NaHCO_3 0.1M (x3), la última vez con agitación durante 30 minutos y posterior filtración.
- A continuación se lava con tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0.05M, pH 10.2.
- Los discos que se utilizarán como blanco para ensayos de RAST (que se conjugan sólo con el portador) se dejan en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0.05 M, pH=10.2, a 5°C.

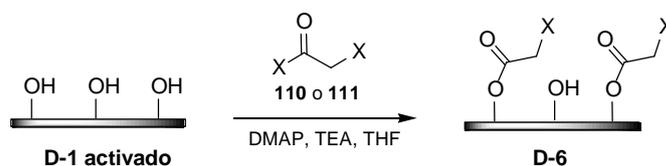
4.- Conjugación de bencilpenicilina. Obtención de discos D-5.



- Los discos se tratan con 2 mL de disolución recién preparada de bencilpenicilina, 10 mg/mL, en tampón Na₂CO₃/NaHCO₃ 0.05M, pH = 10.2 y, se mantienen en agitación durante 6 días a 4°C.
- Se añaden aproximadamente cada 24 horas 1 mL de la disolución de bencilpenicilina.
- Tras los 6 días, se decanta la disolución y los discos se lavan con NaHCO₃ 0.1M (x2) y dos lavados alternativos con NaHCO₃ 0.1M y tampón acetato 0.1M.
- Se lavan con PBS (x 3) y se conservan en PBS a 4°C.

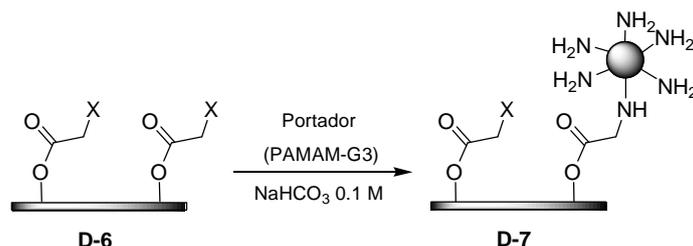
2.2. Procedimiento tipo B.

1.- Derivatización de la celulosa: Obtención de discos D-6.



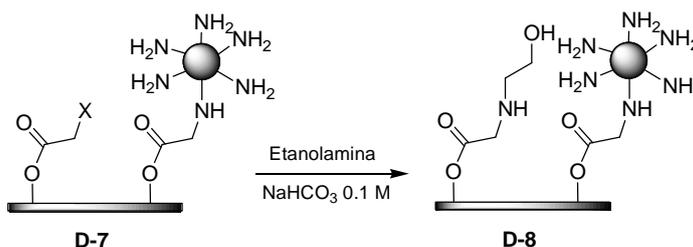
- En viales cerrados con septum se introducen grupos de 50 discos en atmósfera de argón. Estos se suspenden en 3 mL de THF seco y se les añaden a cada vial 12 mg (0.1 mmol) de DMAP y 0.3 mL (2.1 mmol) de TEA destilada.
- Los viales se introducen en baño de agua-hielo. A los grupos de 50 discos se les añade gota a gota una disolución de 1.9 mmol de halo halogenuro de alquilo (0.24 mL de **110** o 0.15 mL de **111**) en 1 mL de THF seco, y se dejan reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas en agitación.
- Posteriormente la disolución se decanta y los discos se lavan con CH₂Cl₂ (x 4).

2.- Fijación del dendrímero PAMAM-G3 y PLL: Obtención de discos D-7.



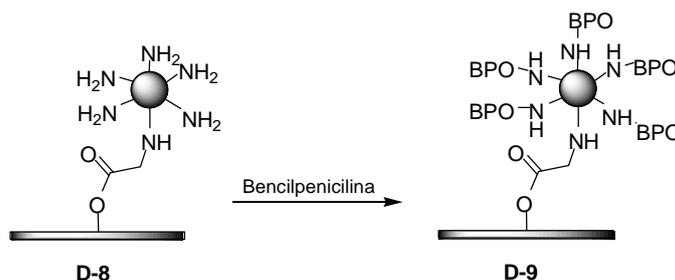
- Se añaden a cada vial 2 mL de disolución de dendrímero PAMAM-G3 (10 mg/mL) o 2 mL de PLL (10 mg/mL) en NaHCO_3 0.1M, y se mantiene en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente.
- Se decanta la disolución y se lavan los discos con disolución NaHCO_3 0.1M (x 4).
- Los discos que se emplearán para realizar el test de la ninhidrina se lavan con H_2O , y se secan.

3.- Bloqueo de posiciones activadas no ocupadas: Obtención de discos D-8.



- Los discos se tratan con disolución NaHCO_3 0.1M-etanolamina 50mM durante una hora.
- Se decanta la disolución y se lavan los discos con disolución NaHCO_3 0.1M (x3), la última vez con agitación durante 30 minutos y posterior filtración. A continuación se lava con tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0.05M, pH=10.2.
- Los discos que se utilizarán como blanco para ensayos de RAST (que se conjugan sólo con el portador) se dejan en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0.05 M, pH=10.2, a 5°C.

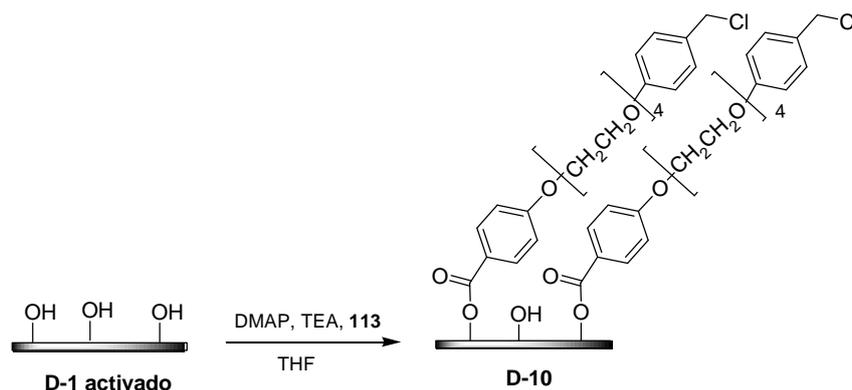
4.- Conjugación de bencilpenicilina. Obtención de discos D-9.



La obtención de discos **D-9** a partir de discos **D-8** se realiza siguiendo el procedimiento descrito para la obtención de los discos **D-5**.

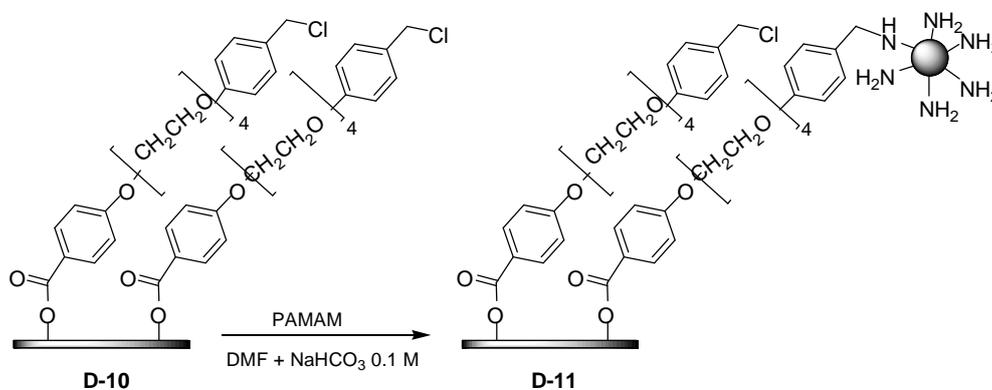
2.3. Procedimiento tipo C.

1.- Derivatización de la celulosa: Obtención de discos D-10.



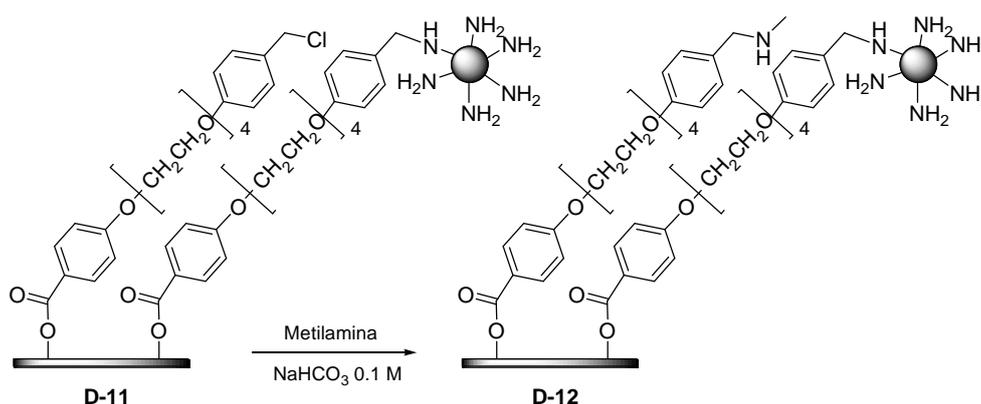
- En viales cerrados con septum se introducen grupos de 50 discos en atmósfera de argón. Estos se suspenden en 3 mL de THF seco y se les añaden a cada vial 12 mg (0.1 mmol) de DMAP y 0.3 mL (2.13 mmol) de TEA destilada.
- Los viales se introducen en baño de agua-hielo. A los grupos de 50 discos se les añade gota a gota una disolución de 884 mg (1.9 mmol) en 2 mL de THF seco, y se dejan reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas en agitación.
- Posteriormente la disolución se decanta y los discos se lavan con CHCl_3 (x4).

2.- Fijación de los dendrímeros PAMAM (G2 y G4): Obtención de discos D-11.



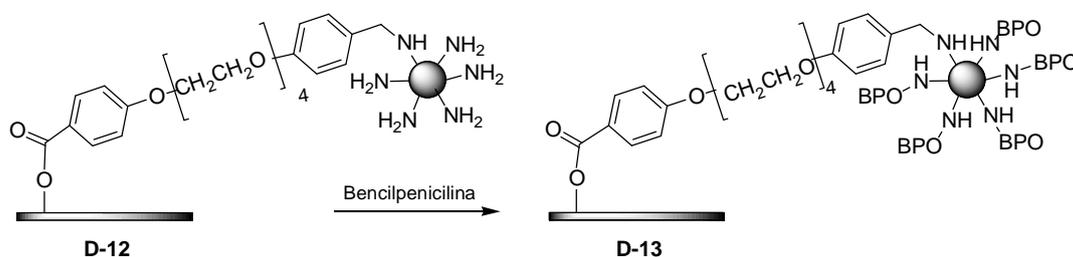
- Se añade a cada vial, que contiene 50 discos, 2 mL de disolución de dendrímero PAMAM Gn (10 mg/mL) en mezcla de (DMF / NaHCO₃ 0.1M, 1:1) y, se mantiene en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente.
- Se decanta la disolución y se lavan los discos con disolución NaHCO₃ 0.1M (x 4).
- Los discos que se emplearán para realizar el test de la ninhidrina se lavan con H₂O, se filtran y se secan.

3.- Bloqueo de posiciones activadas no ocupadas: Obtención de discos D-12.



- Los discos se tratan con disolución NaHCO₃ 0.1M-metilamina 50mM durante una hora.
- Se decanta la disolución y se lavan los discos con disolución NaHCO₃ 0.1M (x3), la última vez con agitación durante 30 minutos y posterior filtración. A continuación se lava con tampón Na₂CO₃/ NaHCO₃ 0.05M, pH=10.2.
- Los discos que se utilizarán como blanco para ensayos de RAST (que se conjugan sólo con el portador) se dejan en tampón Na₂CO₃/NaHCO₃ 0.05 M, pH=10.2, a 5°C.

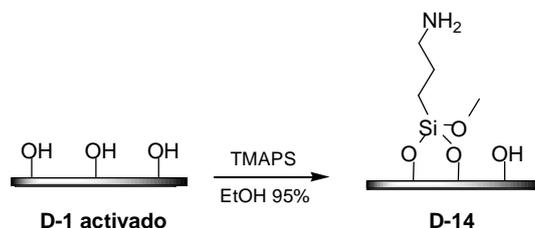
4.- Conjugación de bencilpenicilina. Obtención de discos D-13.



La obtención de discos **D-13** a partir de discos **D-12** se realiza siguiendo el procedimiento descrito para la obtención de los discos **D-5**.

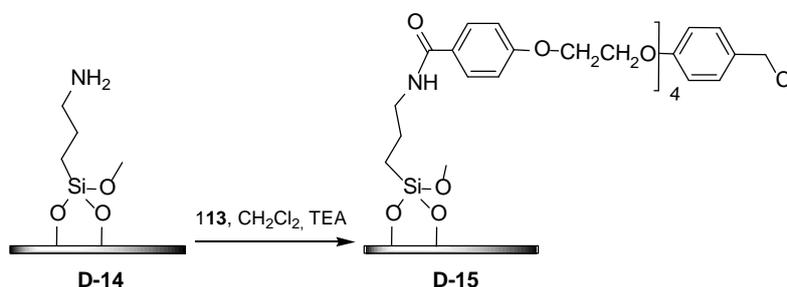
2.4. Procedimiento tipo D.

1-. Silanización de la celulosa: Obtención de discos D-14.



- 400 discos preactivados contenidos en un erlenmeyer se tratan con 60 mL de una disolución de TMAPS al 25% en etanol del 95% durante 4 horas con agitación
- La disolución se decanta cuidadosamente de los discos de celulosa. Los discos se lavan con 50 mL de EtOH (x 3) y después con acetona (x3).
- Finalmente se introducen 10 minutos en la estufa a 100°C.

2-. Condensación de los discos sililados con 113: Obtención de discos D-15.

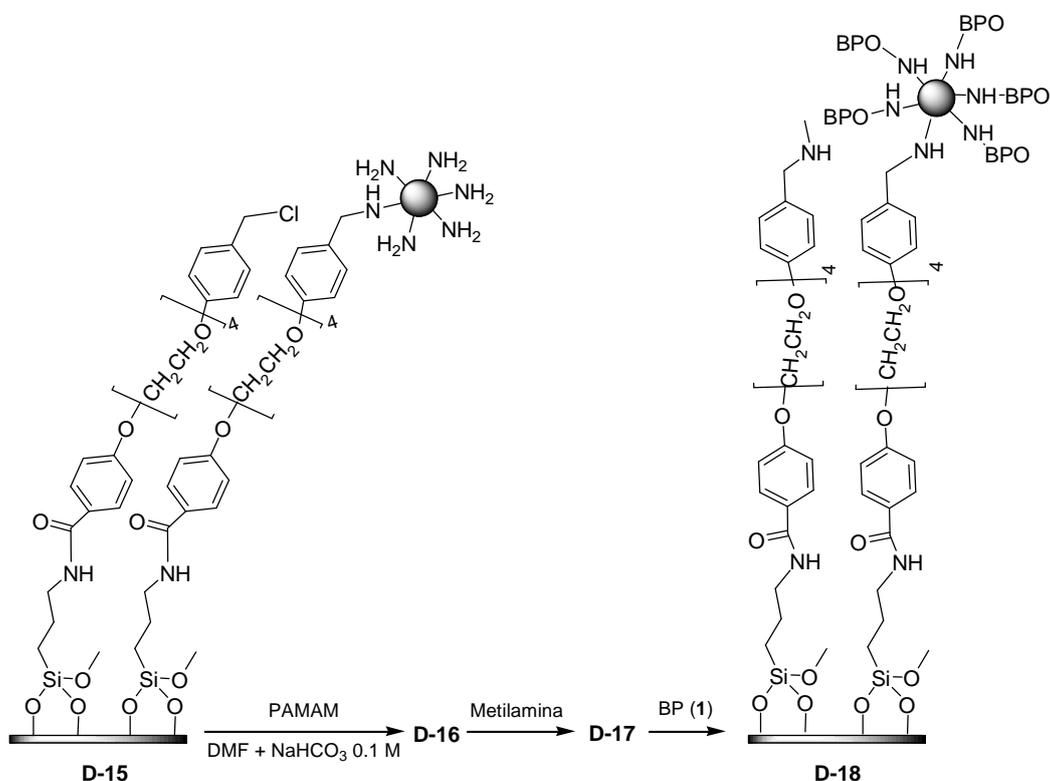


- Se introducen grupos de 50 discos En viales cerrados con septum en atmósfera de argon. Estos se suspenden en 2.5 mL de CH₂Cl₂ seco y se les añade, a cada vial, 100 µL (0.7 mmol) de TEA destilada y una disolución de 272 mg (0.6 mmol) de **113** en 5 mL de CH₂Cl₂.
- La mezcla se deja reaccionar durante 24 horas con agitación y, posteriormente los discos se lavan con CH₂Cl₂ (x 4).

3.- Fijación de los dendrímeros PAMAM (G2 y G4): Obtención de discos D-16.

4.- Bloqueo de posiciones activadas no ocupadas: Obtención de discos D-17.

5.- Conjugación de bencilpenicilina. Obtención de discos D-18.



Estos 3 etapas se realizan a partir de los discos **D-15**, siguiendo los procedimientos anteriormente descritos para la obtención de los discos **D-11**, **D-12** y **D-13**.

2.5. Cuantificación del n° de aminos en fase sólida.

Una unidad de disco de celulosa seco se introduce en tubo de boca esmerilada, y se le añade 1 mL de disolución de ninhidrina (10 mg de ninhidrina /mL de EtOH 95%). La mezcla se calienta a reflujo durante 45 minutos. Tras dejar enfriar, el volumen de reacción se enrasa a 2 mL con EtOH al 95%, y se mide la absorbancia a 570 nm.

Anexo I:
Métodos Diagnósticos en Alergia a Fármacos.

Métodos diagnósticos de uso habitual.

El diagnóstico de los individuos con hipersensibilidad a medicamentos se basa en la realización de una correcta historia clínica donde se deben de recoger de forma detallada todos los fármacos que se han tomado previa a la reacción, el intervalo de tiempo entre la reacción y la toma de dichos fármacos con objeto de ver la relación de temporalidad y posible causalidad, y el número de días que el paciente está tomando el o los medicamentos previos a la aparición de la reacción. El alergólogo debe recoger la máxima información, ya que esto va a condicionar las pruebas diagnósticas que se indiquen y las orientaciones pronósticas y terapéuticas subsiguientes.

El estudio de alergia a medicamentos lleva consigo la realización de pruebas diagnósticas *in vivo* entre las que se incluyen las pruebas cutáneas y estudios de tolerancia a simple ciego controladas utilizando placebos.

La información suministrada por los tests *in vivo* se puede complementar con tests *in vitro*, que van destinados fundamentalmente a estudiar la respuesta IgE (RAST o FEIA), la liberación de mediadores inflamatorios *in vivo* (triptasa e histamina), que en muchos casos son pruebas de extraordinaria utilidad

1. Métodos in vivo

1.1 Pruebas cutáneas:

Las pruebas cutáneas con medicamentos son de uso generalizado, están bien establecidas. En general, la técnica consiste en aplicar un hapteno diluido que se transformará *in vivo* mediante su unión a proteínas en un antígeno completo con capacidad de inducir una respuesta inmunológica. En algunos casos el hapteno se aplica unido ya a la molécula transportadora como es el caso de peniciloilpolisina. Las pruebas cutáneas se pueden realizar por varios métodos: prick, intradermorreacción, patch test (también llamadas parche o epicutáneas), foto-patch test.

Las pruebas se pueden realizar con múltiples haptenos:

- Haptenos comerciales: Como son los determinantes mayores (PLL o BPO) y menores de la bencilpenicilina (MDM). El MDM está compuesto por bencilpenicilina y ácido

bencilpenicilínico exclusivamente. Estos determinantes están bien validados por la práctica médica conociéndose las concentraciones a usar y estando disponibles en general en toda Europa y otros países, aunque el MDM aun no se ha validado en Estados Unidos.

- Haptenos no comerciales pero suficientemente validados: Es el caso de la amoxicilina o ampicilina en las cuales está ampliamente aceptado en España que a concentraciones de 20 mg/ml no son irritativas o al menos producen una respuesta claramente diferenciadas de los falsos positivos.

- Haptenos no comerciales no suficientemente validados: En este caso para conocer el poder irritativo del fármaco, los falsos positivos y negativos se debe recurrir a la información que suministra la literatura y realizar pruebas en un grupo control negativo.

1.2 Administración controlada del fármaco:

Básicamente consiste en la administración de dosis crecientes de fármaco a intervalos variables de 30 a 60 minutos hasta alcanzar la dosis terapéutica habitual, utilizando placebos.

2. Métodos in vitro

2.1. Inmunidad humoral.

2.1.1. Estudio de IgE específica.

La concentración sérica de los anticuerpos IgE en individuos normales es muy baja oscilando de 10 a 400 ng/ml. Estos niveles son aún más bajos cuando se intenta detectar IgE específica por lo que se necesitan técnicas altamente sensibles. Se han desarrollado muchas técnicas en el laboratorio para la medición de estos anticuerpos. De todas ellas la más usada ha sido el inmunoanálisis en sus diferentes modalidades: radioinmunoanálisis (RIA), enzoinmunoanálisis (ELISA) y fluoroinmunoanálisis (FEIA). Se basan fundamentalmente en la detección de la unión antígeno-anticuerpo.

La medición de anticuerpos IgE específicos a medicamentos tiene ciertas ventajas comparado con los test cutáneos: están exentas de riesgo para el paciente, los resultados no se ven influenciados por el tratamiento con medicamentos concomitantes, pueden ser

preferible en ciertos grupos tales como niños o pacientes con una dermatitis extendida. Pero los tests *in vitro* también tienen desventajas: es más caro que el test cutáneo, es menos sensible aunque existen pacientes con pruebas cutáneas negativas y tests *in vitro* positivos, los resultados no se disponen inmediatamente y prácticamente solo están puestos a punto para betalactámicos por lo que la mayoría de los estudios se han realizado con estos antibióticos.

Radio-allergo-sorbent-test (RAST) Es una modalidad del RIA y ha sido el método más validado por los laboratorios para la medición de anticuerpos IgE específicos.¹⁹⁵ En esta técnica se utiliza como soporte sólido discos de celulosa activados con bromuro de cianógeno a los que se une el hapteno acoplado a una molécula portadora.

Los alérgenos pegados sobre los discos de celulosa se incuban con el suero de referencia o control y, aparte, con el suero del paciente, permitiendo que haya reconocimiento molecular. La fase sólida se lava y el anticuerpo IgE que ha quedado unido a la fase sólida se detecta con anti-anticuerpo humano policlonal IgE marcado radiactivamente con ¹²⁷I. La medida de radiactividad se relaciona directamente con el contenido en suero de IgE específica.

La naturaleza del portador influye en la capacidad de detectar anticuerpos IgE específicos a β -lactámicos. En estudios realizados con diferentes portadores (albúmina sérica humana, polilisina y un polialcohol como molécula espaciadora) en sueros de pacientes alérgicos a penicilina se encuentra que los tres sistemas del RAST están altamente correlacionados pero con el uso de polilisina y molécula espaciadora se pueden conseguir una mayor sensibilidad y especificidad de la técnica que con la albúmina.²⁰⁶ Otra técnica muy utilizada y suficientemente validada es el sistema de CAP FEIA cuyos resultados tienen una alta correlación con el RIA con la ventaja de no utilizar isótopos radiactivos.

Técnicas de inhibición del RAST. Estas técnicas se realizan para estudiar las especificidades. Evalúan los determinantes antigénicos de β -lactámicos que han inducido los anticuerpos IgE durante la reacción alérgica.²⁰⁷ Básicamente consisten en

²⁰⁶ J. J. García, M. Blanca, F. Moreno, J. M. Vega, C. Mayorga, J. Fernández, C. Juárez, A. Romano, E. de Ramón. *J. Clin. Lab. Anal.* **1997**, *11*, 251-257.

²⁰⁷ M. R. Ceska, R. Ericson, J. M. Varga. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1962**, *49*, 1-9.

una reacción de competencia entre la molécula completa que se encuentra en fase sólida y diferentes conjugados que se encuentran en fase fluida.

2.1.2. Estudio de IgG específica.

Los anticuerpos IgG frente a β -lactámicos se producen en una fase temprana de la respuesta inmunológica a penicilinas y esta respuesta tiene poca especificidad para la penicilina inductora. No tienen valor diagnóstico en los pacientes alérgicos a betalactámicos ya que la población general posee niveles elevados de los mismos siendo un indicador de consumo mas que de reacción.

2.1.3. Estudio de mediadores inflamatorios.

Los mastocitos y basófilos son las principales células activadas en las reacciones alérgicas inmediatas. La liberación de mediadores por parte de estas células tras la interacción del antígeno a los anticuerpos específicos unidos a su superficie es la señal de una respuesta alérgica inmediata.²⁰⁸ Existen varios mediadores que son considerados como indicadores de este tipo de reacción y activación: histamina y triptasa.

2.2.- Inmunidad celular.

En las reacciones de hipersensibilidad a fármacos están implicadas una serie de células cuyo estudio nos puede ser de gran ayuda para el diagnóstico de las mismas. Para ello existen una serie de técnicas complejas y no disponibles en todos los hospitales pero que quizás en un futuro sean de uso habitual:

Estudios de marcadores celulares mediante citometría de flujo; Test de transformación linfocitaria (TTL); Medición de citoquinas; Biopsias.

²⁰⁸ J. Fernández, M. Blanca, F. Moreno, J. Garcia, E. Segurado, A. del Cano, F. Aguilar. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1995**, *107*, 160-162.

Anexo II:
Términos empleados en esta memoria.

Afinidad - Fuerza de la unión entre un único lugar de fijación de una molécula —anticuerpo (paratopo)— y un ligando —determinante antigénico—.

Alérgeno - Antígeno que tiene capacidad de producir reacciones alérgicas. Los alérgenos son proteínas o sustancias químicas unidas a proteínas que inducen respuestas de anticuerpos IgE en las personas atópicas.

Alergia - Forma de atopía o enfermedad por hipersensibilidad inmediata, que a menudo hace referencia al tipo de antígeno que provoca la enfermedad, como alergia alimentaria, alergia a la picadura de abeja o alergia a penicilina. Todos estos cuadros dependen de la activación de mastocitos o basófilos inducida por el antígeno.

Anafilaxia - Reacción de hipersensibilidad inmediata, severa y potencialmente fatal, que puede afectar a varias partes del cuerpo (tales como la piel, el tracto respiratorio, el tracto intestinal y el sistema cardiovascular). Los síntomas ocurren en un lapso que va desde algunos minutos hasta dos horas después del contacto con la sustancia que provoca la alergia, aunque en algunos casos pueden ocurrir hasta cuatro horas después. Las reacciones anafilácticas pueden ser desde leves hasta potencialmente mortales. Se debe a la liberación de mediadores desde mastocitos sensibilizados por IgE.

Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (enzyme-linked immunosorbent assay) - Método para detectar sustancias que tienen propiedades antigénicas principalmente proteínas, usando un anticuerpo específico unido covalentemente a un enzima. La cantidad de anticuerpo que se une al antígeno es proporcional a la cantidad de existente de éste y se determinan midiendo por espectrofotometría la conversión a un producto coloreado por la acción de la enzima unida al anticuerpo.

Anticuerpo (Ac) - Molécula glucoproteica, también denominada inmunoglobulina (Ig), producida por linfocitos B como respuesta a un inmunógeno, y que interacciona con el antígeno a menudo con un grado de especificidad y afinidad. La unidad estructural básica consta de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas idénticas, cada una con regiones variables y constantes. Las regiones variables N-terminales de las cadenas ligera y pesada constituyen los lugares de unión al antígeno, mientras que las regiones constantes C-terminales de las cadenas pesadas establecen interacciones funcionales con otras moléculas del sistema inmunológico. Los anticuerpos unidos a membrana actúan como receptores que median la activación de los linfocitos B desencadenada por el antígeno. Los anticuerpos secretados ejercen funciones efectoras que sirven para eliminar los antígenos fijados.

Antígeno (Ag) - Sustancia que reacciona con los productos de una respuesta inmunológica específica (anticuerpos o receptor de células T) y, por tanto, capaz de provocar reacciones de hipersensibilidad. Los antígenos que se unen a anticuerpos son moléculas de todo tipo. Los

receptores de células T sólo se unen a fragmentos peptídicos de proteínas que han formado un complejo con moléculas del CPH; tanto el ligando peptídico como la proteína original del que deriva reciben el nombre de antígenos de linfocitos T.

Atopia - Tendencia genética de un individuo a padecer las enfermedades alérgicas clásicas, es decir, la rinitis alérgica, el asma y la dermatitis atópica. Generalmente estos individuos sintetizan anticuerpos IgE en respuestas a alérgenos comunes ambientales (como el polen o el polvo doméstico), especialmente inhalados y de alimentos.

Autoinmunidad - Estado inmunológico que se caracteriza por la pérdida de la tolerancia a lo propio.

Autólogo - Parte del mismo individuo.

Autotolerancia - Ausencia de respuesta del sistema inmunológico adaptativo a los autoantígenos. La autotolerancia es una característica fundamental del sistema inmunológico normal y su fracaso conduce a la aparición de enfermedades autoinmunes.

Avidez - Fuerza de interacción global entre los componentes de una reacción antígeno-anticuerpo. La avidéz depende tanto de la afinidad como de la valencia de las interacciones.

Basófilo - Tipo de granulocito circulante, derivado de la médula ósea, con similitudes estructurales y funcionales con los mastocitos, que poseen gránulos ricos en muchos de los mismos mediadores que los mastocitos y que expresa un receptor Fc de alta afinidad por IgE. Los basófilos que acuden a los tejidos donde se encuentra el antígeno pueden contribuir a las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

Cadena ligera (L) - Cadena de polipéptidos presente en todas las moléculas de inmunoglobulinas. La unidad básica de Ac consta de dos cadenas L, cada una unida por enlaces disulfuros a una de dos cadenas pesadas idénticas. Cada cadena L está formada por un dominio Ig variable (V) y uno constante (C). Existen dos tipos de cadenas ligeras: κ y λ .

Cadena pesada (H) - Cadena de polipéptidos presente en todas las moléculas de inmunoglobulinas. La unidad básica de Ac consta de dos cadenas H unidas por puente disulfuro, cadenas ligeras idénticas. Cada cadena H está formada por un dominio Ig variable (V) y 3 o 4 dominios Ig constantes (C). Los distintos tipos de anticuerpos, IgM, IgG, IgA e IgE, se distinguen por diferencias estructurales en las regiones constantes de las cadenas pesadas. Las regiones constantes de las cadenas pesadas intervienen también en funciones efectoras como la activación del complemento o el acoplamiento de los fagocitos.

Cambio de clase de cadena pesada (isotipo) - Proceso por el que los linfocitos B cambian la clase o isotipo de anticuerpos que sintetizan, pasando, por ejemplo, de de IgM a IgG, sin modificar la especificidad antigénica del anticuerpo.

CDRs (regiones determinantes de complementaridad) - Es la parte de la región V de un anticuerpo o del receptor de células T (RCT) responsable de la unión a antígenos o de la unión antígeno-HLA. Estos segmentos hipervariables adoptan estructuras en bucle que, en conjunto, constituyen una superficie complementaria de la estructura tridimensional del antígeno al que se unen.

Célula inmunocompetente - Poblaciones celulares que hacen posible la acción del sistema inmunológico: son los linfocitos T, B, células K (asesinas), células NK (asesinas naturales), macrófagos y polimorfonucleares.

Célula K - Célula responsable de la citotoxicidad célula-mediada dependiente de anticuerpo.

Célula NK - Células responsables de la citotoxicidad no HLA restringida.

Célula presentadora de antígenos (CPA)- Célula que muestra fragmentos peptídicos o antígenos proteicos, asociados a moléculas de su CPH, sobre su superficie, con el fin de activar a linfocitos T específicos de esos antígenos. Además de presentar los complejos péptido-CPH, las CPA han de expresar moléculas coestimuladoras para que la activación de los linfocitos T sea óptima.

Citocinas - Proteínas sintetizadas por muchos tipos de células distintas que intervienen en las reacciones inflamatorias e inmunológicas. Las citocinas son los principales mediadores de la comunicación entre células del sistema inmunológico.

Citometría de flujo - Método de análisis del fenotipo de las poblaciones celulares.

Citotoxicidad - Mecanismo efector de determinadas poblaciones celulares especializadas del sistema inmunológico consistente en la capacidad para interactuar con otras células y destruirlas.

Clon - Células derivadas de la misma progenitora, y por tanto con igual constitución genética.

Complejo principal de histocompatibilidad (CPH) - Grupo de genes al que se atribuye la capacidad de discriminación entre lo propio y lo extraño. En el hombre, este complejo está situado en el cromosoma 6 y se denomina HLA, del inglés human leucocyte antigen. Este grupo de genes codifica al menos 3 clases de moléculas, las moléculas de clase I, II y III, aunque el peso de las funciones de histocompatibilidad y reconocimiento antigénico recae principalmente sobre las proteínas producidas por los genes de clase I y II (CPH-I y CPH-II).

Complemento - Grupo de proteínas séricas y de la superficie celular involucradas en el control de la inflamación, activación de fagocitos y ataque lítico a membranas celulares.

Dendrímero - Macromolécula tridimensional sintética formada a partir de procesos de fabricación a nanoescala. Un dendrímero se constituye de monómeros, con nuevas ramificaciones añadidas en las distintas etapas hasta crear una estructura tridimensional.

Dominios - Segmentos repetidos en las cadenas H o L que están plegados tridimensionalmente y estabilizados por enlaces disulfuro.

Electroforesis - Separación de moléculas en un campo eléctrico.

Epitopo - También llamado determinante antigénico. Cada uno de los grupos químicos reconocidos como extraños por el organismo y que va a determinar la formación de un Ac específico.

Fragmento Fab (abrev. de fragmento de unión al antígeno) - Fragmento de una molécula de inmunoglobulina que se obtiene mediante la escisión con papaína. Se obtienen siempre dos fragmentos Fab idénticos, cada uno de los cuales posee un único sitio de unión al antígeno. Contienen el idiotipo.

Fragmento Fc (abrev. de fragmento cristizable) - Fragmento de una molécula de inmunoglobulina que se obtiene mediante la escisión con papaína. En este fragmento residen las propiedades biológicas de la inmunoglobulina. Contiene el alotipo y determina la clase de cadena pesada.

Generación de dendrímero - El número de ciclos sintéticos que el dendrímero ha pasado. El primer ciclo da lugar al dendrímero de generación 0 (G0), el siguiente al dendrímero de generación 1 (G1),...

Hapteno - Molécula de bajo peso molecular capaz de reaccionar con un anticuerpo, pero incapaz de desencadenar su producción en un animal. Puede hacerse inmunógeno uniéndose a una proteína transportadora.

Hipersensibilidad - respuesta inmunológica que causa daño al individuo. Puede ser mediada por anticuerpos (tipo I, II y III) o células T (tipo IV).

Histamina - Amina almacenada en los gránulos de los mastocitos y basófilos, y uno de los mediadores más importantes de la hipersensibilidad inmediata. La histamina se une a receptores específicos de varios tejidos e incrementa la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso bronquial e intestinal.

HLA (human leukocyte antigen) - Antígeno leucocítico humano: es el nombre general de un grupo de genes situados en la región del CPH, que en humanos está en el cromosoma 6, que codifica la superficie celular de proteínas presentadoras de antígenos. Estas proteínas se designan como moléculas del CPH.

HSA (Human serum albumin) - Es la proteína mas abundante en el plasma sanguíneo humano. Se produce en el hígado. El rango de referencia para concentraciones en sangre es de 30 a 50 g/L Tiene una vida media aproximada de 20 días. Y un peso molecular de 67 kDa.

Homeostasis - En el sistema inmunológico adaptativo, mantenimiento de un número constante y un repertorio diverso de linfocitos, pese a la aparición de nuevos linfocitos y a la tremenda

expansión de clones individuales que pueden ocurrir durante las respuestas a antígenos inmunógenos. La homeostasis se mantiene gracias a varias vías de regulación de la muerte y la inactivación de linfocitos.

Ig - Grupo de glicoproteínas estructuralmente relacionadas que son producidas por linfocitos B y células plasmáticas y que son responsables de la inmunidad humoral (ver anticuerpo).

Ig monoclonales - Ig idénticas entre sí que son producidas exclusivamente por linfocitos de una solo clon.

IgA - Inmunoglobulina predominante en las secreciones externas. Es un dímero formado por la cadena J, al que se halla unido un polipéptido denominado pieza secretora. La IgA sérica es en su mayor parte monomérica.

IgD - Inmunoglobulina cuyo significado fisiológico no se conoce. Su concentración sérica es muy pequeña aunque paradójicamente la mayoría de linfocitos B maduros coexpresan en su superficie IgM y IgD.

IgE - Inmunoglobulina involucrada en reacciones de hipersensibilidad inmediata con capacidad de unirse a basófilos y mastocitos a través de receptores de gran afinidad que estas células poseen para su extremo Fc.

IgG - Inmunoglobulina predominante en suero, en el espacio extravascular, en las secreciones internas y en la fase secundaria de la respuesta inmunológica.

IgM - Inmunoglobulina más primitiva y la más frecuente durante la respuesta primaria caracterizada por ser un pentámero y por su gran peso molecular lo que origina su situación exclusivamente intravascular.

Inmunidad - Estado de capacidad de defensa de un individuo en principio sensible frente a sustancias antigénicas, adquirido de forma activa o pasiva.

Inmunidad Celular - Inmunidad en la cual es predominante la participación de linfocitos y macrófagos.

Inmunidad Humoral - Respuesta inmunológica mediada por anticuerpos y complemento.

Inmunización - Conjunto de procesos que conducen a la formación de inmunidad. Se puede adquirir de forma activa dando por resultado una respuesta inmunológica primaria y formación de memoria o pasiva en la que no se forma memoria.

Inmunocompetencia - Capacidad de responder al contacto con un antígeno mediante una reacción inmunológica específica.

Inmunocomplejo - Complejo Ag-Ac.

Inmunodeficiencia - Falta parcial o total de la capacidad de reacción inmunológica de un organismo.

Inmunogenicidad - Conjunto de propiedades que capacitan a una sustancia para inducir en organismos o células inmunocompetentes una inmunidad celular y/o humoral.

Inmunógeno - Sustancia que introducida en un animal puede estimular la respuesta inmunológica.

Inmunotolerancia - Estado de reactividad inmunológica específica que es producido por un contacto previo con el Ag y que está limitado solo a este antígeno o a otro que reaccione con este de forma cruzada.

Interferón - Son una familia de polipéptidos producidos por varios tipos de células tras su estimulación con diversas sustancias. Incrementan la resistencia de las células a infecciones virales y actúan como citocinas.

In Vitro - Se refiere a una prueba de laboratorio (por ejemplo, ELISA) para diagnosticar los alérgenos a los que una persona está sensibilizada.

Isotipo - Se denominan así a las distintas clases y subclases de inmunoglobulinas según la región constante de las cadenas pesadas y es el mismo en el suero de todos los individuos normales de la misma especie.

Linfocito - Célula móvil perteneciente a la serie blanca con gran núcleo y escaso citoplasma. Realiza múltiples funciones en los mecanismos de defensa inmunológica. Se distinguen dos tipos: los T o timodependientes y los B dependientes de la "Bursa" o de la médula ósea.

Locus - Específico sitio de un gen en un cromosoma.

Macrófago - Leucocito mononuclear que interviene en la captación, transformación y presentación del antígeno a los linfocitos inmunocompetentes y que posee capacidad fagocítica.

Mastocito - Célula presente sobre todo en el tejido conectivo que posee en su citoplasma histamina, serotonina y heparina. Tras la fijación de anticuerpos tipo IgE a la membrana y subsiguiente reacción con el antígeno específico, liberan estas sustancias.

Memoria - Capacidad de responder tras un primer contacto con un rápido aumento en el título de anticuerpos o con una acelerada proliferación de linfocitos sensibilizados un posterior contacto con el mismo antígeno.

Moléculas del CPH (las glucoproteínas que son codificadas por la familia del complejo principal de histocompatibilidad) procesan antígenos del interior de las células y las transportan al exterior para ser reconocidas por las células T

Núcleo del dendrímoro - Centro del dendrímoro del cual parten las ramificaciones. El núcleo determina el grado inicial de ramificación y contribuye a las propiedades internas del dendrímoro.

Órganos linfoides primarios - Organo donde los linfocitos se diferencian a partir de células madres linfoides y proliferan y maduran hacia células con capacidad efectora. Son la médula ósea para linfocitos B y el timo para los T.

Órganos linfoides secundarios - Son aquellos donde se disponen los linfocitos ya maduros e inmunológicamente competentes y donde se producen las respuestas inmunológicas frente a los estímulos antigénicos. Incluyen los ganglios linfáticos, el bazo y el tejido linfoide asociado a las mucosas del tracto respiratorio y gastrointestinal.

Paratopo - Sitio de unión del anticuerpo al antígeno localizado en la región variable de la cadena H y L que sirve para la unión específica de un determinante antigénico (epítipo).

Patogenicidad - Capacidad de un microorganismo para producir enfermedad. Son muchos los mecanismos que pueden contribuir a la patogenicidad, tales como la producción de toxinas, la estimulación de las respuestas inflamatorias del huésped o la alteración del metabolismo de las células del huésped.

Presentación antigénica - Proceso por el cual ciertas células (células presentadoras de antígenos) expresan antígenos en su superficie en una forma reconocible para los linfocitos.

Polímero hiperramificado – Polímero altamente ramificado (lo contrario a un polímero lineal). Los dendrímeros son los polímeros hiperramificados de mayor control sintético y mejor definidos.

Procesamiento de antígenos - Degradación de antígenos en fragmentos y la asociación de estos fragmentos con moléculas de HLA para la presentación por células presentadoras de antígenos a células T específicas.

Provocación alimentaria de doble ciego, controlada con placebo: se considera el método de referencia para el diagnóstico de las alergias a alimentos.

Prueba del Prick o por punción - prueba que se utiliza para confirmar la hipersensibilidad a una amplia gama de alérgenos. Es el método más cómodo y específico para detectar anticuerpos IgE.

Prueba epicutánea (con parche) - tipo de prueba para alergias que identifica o confirma reacciones mediadas por linfocitos T, hipersensibilidad retardada y alérgenos de contacto en la dermatitis eccematosa por contacto.

Ramificación de dendrímeros - Unidades repetitivas del dendrímero entre el núcleo y la superficie, que multiplica el número de grupos terminales de cada generación. Las ramificaciones juegan un papel importante en la definición del medio químico y espacios vacíos en el interior del dendrímero

RAST (radioalergosorbent test) - Test *in vitro* para determinar a qué es alérgico una persona. Un ensayo de RAST emplea suero del paciente y detecta las cantidades de IgE que reaccionan

específicamente con la sustancia sospechosa o con los alérgenos conocidos que provocaron la reacción alérgica. La cuantificación se lleva a cabo mediante la medida de radiactividad procedente de IgE marcada con ¹²⁷I.

Receptor antigénico - Es la molécula de los linfocitos B o T responsable de conferir la especificidad en el reconocimiento antigénico. Son las inmunoglobulinas de superficie en los linfocitos B y el receptor T (TCR) en linfocitos T.

Receptor de células T (RcT) - Receptor para antígenos de células T.

Receptor Fc - Receptor presente en varias subclases de linfocitos para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas.

Región bisagra - Segmento de unos 15 aminoácidos de gran flexibilidad donde se deforma la molécula de Ig cuando se produce la unión con el Ag facilitándose así el acoplamiento entre Ag y Ac.

Región constante - Porción carboxiterminal de las cadenas H o L caracterizada por una secuencia de aminoácidos idéntica tanto dentro de las clases como de las subclases de inmunoglobulinas. También se refiere a la parte invariable de las cadenas α, β, γ y δ del TcR.

Región variable - Porción N-terminal de las cadenas H y L con una secuencia variable de cadena polipeptídica a cadena polipeptídica que pertenece al fragmento Fab y comprende aproximadamente 110 aa.

Regiones hipervariables - Al menos cuatro regiones en la zona N-terminal de las cadenas H y L de las inmunoglobulinas que se caracterizan por una especial variabilidad de la secuencia de aminoácidos y es la zona de unión del anticuerpo (ver CDR's).

Respuesta inmunológica primaria - Respuesta inmunológica que se produce durante el primer contacto con un antígeno.

Respuesta inmunológica secundaria - Respuesta que se produce durante el segundo contacto con un antígeno. Juega un importante papel la memoria inmunológica.

Síntesis convergente de dendrímeros - Método sintético de dendrímeros en el que primero se sintetizan las ramificaciones (dendrones), luego se unen para alcanzar mayores generaciones y finalmente se unen al núcleo.

Síntesis divergente de dendrímeros - Método sintético en el que las ramificaciones se sintetizan a partir del núcleo en sucesivas generaciones.

Shock anafiláctico - Colapso cardiovascular que se produce en el contexto de una reacción de hipersensibilidad de tipo inmediato.

Sistema inmunológico - Moléculas, células, tejidos y órganos que actúan en conjunto para proporcionar inmunidad, o protección, frente a los organismos extraños.

Suero - Líquido sin células que queda cuando la sangre o el plasma forman un coágulo. Los anticuerpos sanguíneos se encuentran en la fracción del suero.

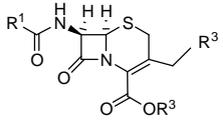
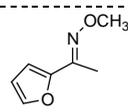
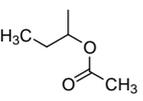
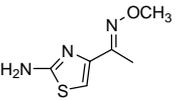
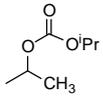
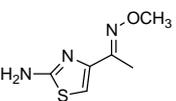
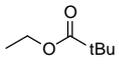
Superficie del dendrímero - Capa más exterior del dendrímero donde las ramificaciones terminan. La superficie define mucha de las propiedades químicas y de reactividad del dendrímero.

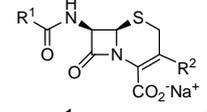
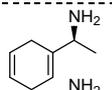
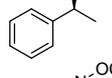
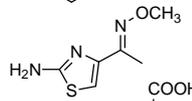
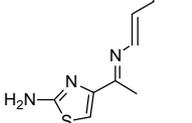
Tolerancia - Ausencia de respuesta del sistema inmunológica adaptativo ante un antígeno como consecuencia de la inactivación o muerte de los linfocitos específicos para ese antígeno, inducidas por la exposición la mismo. La tolerancia a los antígenos propios es una característica normal del sistema inmunológico adaptativo, pero en determinadas condiciones puede aparecer tolerancia a antígenos extraños mediante exposición a los mismos.

Toxina - Sustancias tóxicas que producidas y secretadas por animales plantas y microorganismos.

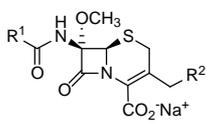
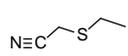
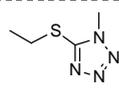
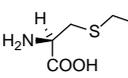
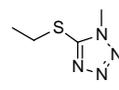
***Anexo III:
Cefalosporinas clínicamente más usadas***

CEFALOSPORINAS					
R^1	R^2	Nombre Genérico	R^1	R^2	Nombre Genérico
		Cefaloram			Cefotaxima
		Cefapirina			Ceftriaxona
	-H	Cefalexina			Cefepima
		Cefaloglicina			Cefodizima
		Cefamandol			Cefpiroma
		Cefonidicid			Ceftazidima
	-H	Cefadroxilo			Cefixima
		Cefprozilo			Cefotiam
		Ceforanida			Cefixima
		Cefsulodina			Cefuroxima
	-H	Cefradrina			Cefalotina
		Cefpiramida			Cefalonio
		Cefoperazona			Cefazolina
		Cefalosporina C	$\text{N}=\text{C}-\text{CH}_2-$		Cefacetrilo

			Nombre Genérico
R ¹	R ²	R ³	
			Cefuroxima Axetilo
			Cefpodoxima proxetilo
			Cefetamet pivoxilo

			Nombre Genérico
R ¹	R ²	3 ⁺	
			Cefroxadina
			Cefaclor
			Ceftizoxima
			Ceftibuteno

CEFOMICINAS

			Nombre Genérico
R ¹	R ²		
			Cefmetazol
			Cefminox
			Cefoxitina