



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**“SÍNTESIS DE NUEVOS COMPUESTOS DENDRIMÉRICOS CON  
POSIBLE APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER”**

TESIS QUE PRESENTA:

**I.F. NANCY EVELYN MAGAÑA VERGARA**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE:

**CIENCIAS QUÍMICAS**

DIRECTORA DE TESIS:

**DRA. ROSA LUISA SANTILLAN BACA**

**MÉXICO, DISTRITO FEDERAL**

**ENERO 2014**

---

El presente trabajo se realizó en el departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Rosa Luisa Santillan Baca con el apoyo de la beca otorgada por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT). Parte de este trabajo se realizó en la Facultad de ciencias de la Universidad de Palacký, Republica Checa.

---

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

### **De manera especial a la Dra Rosa L. Santillan Baca**

Agradezco infinitamente la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación, por toda la confianza y apoyo que depositó en mí, por compartirme sus conocimientos y brindarme su paciencia cuando los días eran más oscuros, por mostrar su calidad humana y amistad más allá del área laboral.

### **Al Dr. Norberto Farfán**

Por todos sus consejos y su conocimiento transmitido durante mi doctorado, pero sobre todo por su invaluable amistad.

### **A los miembros del jurado**

Dra. Maria del Pilar Carreón Castro, Dra. María de Jesús Rosales Hoz, Dra. Rosa Santillan Baca, Dr. Francisco J. Martínez Martínez, Dr. Armando Ariza Castolo y Dr. Eusebio Juaristi y Cosio por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus valiosos comentarios que ayudaron a enriquecerlo.

Al Dr. Francisco Martínez por ser ese síntón por el cual seguí creciendo en el área de investigación.

### **Así mismo, agradezco a las personas que ayudaron a la realización de este trabajo:**

M. en C. Maria Eugenia Ochoa Becerra e I.Q.I. Rebeca Yépez Guerra por todo se apoyo y asesoría experimental brindada en el laboratorio pero sobre todo por las risas, lagrimas, sustos y todo lo vivido durante mi estancia, mil gracias por su amistad y confianza

.

---

---

---

---

A la Q.F.B. Ma. Teresa Cortez Picasso, y al Q.I. Victor González Díaz por la adquisición de los espectros de RMN de 400 y 500 MHz y a la Q.F.B. Ma Luisa Rodríguez Pérez por transmitirme su conocimiento del equipo de RMN de 300 MHz.

Al I.Q. Geiser Cuellar Rivera por la obtención de los espectros masas de alta resolución.

De manera especial al I.F. Marco A. Leyva Ramírez por enseñarme parte de un mundo fascinante y por transmitir su experiencia y conocimiento en la colección de cristales pero sobre todo por su amistad.

A Gloria León Maturano por todo su apoyo en el trámite de documentos.

Al Dr. Miroslav Strnad y Lucie Rárová por las evaluaciones biológicas realizadas en el Laboratorio de Reguladores de Crecimiento, Universidad Palacký, Olomouc, Rep. Checa.

A mis amigos del alma, Carlos Zepactonal, Humberto Pérez y Jesús Rodríguez aunque saben que un gracias es poco comparado con todo lo que han hecho por mí, les doy mil gracias por ser siempre incondicionales y por hacer de este viaje una aventura magnífica.

A mis amigos Mario Rodríguez, Pedro Ramírez, Arturo Jiménez por todos los agradables momentos que pasamos juntos y por todo su apoyo cuando lo necesitaba.

A la Dra. Delia Soto por sus apreciables consejos y su valiosa amistad.

A mis amigas Tania Ávila y Gisela Gamero que contribuyeron de gran manera con su trabajo y disposición en la realización de este trabajo sin hacer a un lado la gran amistad que recibí con su llegada.

A Vinicio Villegas Alcalá, Rosario Alcalá y Jorge Villegas por estar al principio de este proyecto y creer en mí, por sus consejos, amor y su valiosa amistad.

**Finalmente y como parte principal de todos mis proyectos de vida agradezco a Dios por enseñarme que a pesar de todos los obstáculos que pueden presentarse, con fe, esperanza y esfuerzo se puede lograr todo lo que te propones.**

---

---

---

---

## **DEDICATORIAS**

Con todo mi amor en donde quiera que estén

A mis abuelos

María Vergara Pérez por forjar 26 años de mi vida con todo tu amor y experiencia. A Juana Fortanel y Angel Magaña por su alegría y vivacidad que quiero conservar. A Mario Vergara por los pocos momentos pero bien disfrutados que vivimos.

A mi gran amigo

Raúl García que se fue a la mitad de este proyecto y que cada día me parecía verlo asomar por la puerta del laboratorio.

**A mi hija**

Daniela Villegas Magaña por aguantar todas las ausencias, por esperarme cada noche, por alentar mis días con tu sonrisa y por aterrizar todos mis pensamientos. Sin más te dedico estos años de esfuerzo por ser el motor de todos mis proyectos y porque sin duda eres lo mejor que me pudo pasar en esta vida. Te amo muchu

**A mis padres**

Silvia Vergara Pérez y Manuel Magaña Fortanel cada uno con su infinita bondad y amor han estado siempre tras de mí impulsándome y alentándome en los momentos más difíciles de mi vida. Por enseñarme a dar pasos firmes y luchar por mis ideales, por sus sacrificios y porque gracias a ustedes hoy puedo ver alcanzada mi meta. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por creer en mí. Los amo

---

---

---

---

### **A mi compañero de viaje**

Juan Carlos Sánchez Hernández que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido amigo y compañero inseparable, fuente de calma y consejos en todo momento. Por ser esa playa que busco siempre al final del día.

### **A mi hermano**

Joan Manuel Magaña Vergara por ser mi compañero de aventuras, por confiar en mí, por todo tu apoyo y sobre todo por los momentos inolvidables que hemos compartido.

### **A mi cuñada y sobrinos**

Sandra Alcantar Tomas y mis adorados Angel y Joan que han sido parte esencial de este viaje, por apoyar mis locuras, por enseñarme que el amor por la familia siempre esta primero.

Y a todos aquellos que confiaron en mí, porque hicieron que llegara hasta este punto. Gracias Familia y amigos todo esto va por ustedes.

*“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”*

*Albert Einstein*

---

---

---

---

## PARTICIPACIONES REALIZADAS

**El presente trabajo ha generado las siguientes publicaciones:**

**Magana-Vergara N. E.**, Rarova L., Soto-Castro D., Farfan N., Strnad M., Santillan R. “Synthesis and antiproliferative activity of novel steroidal dendrímer conjugates” *Steroids* **2013**, 78, 1254.

Soto-Castro D., **Magana-Vergara N. E.**, Farfan N., Santillan R. “Synthesis of steroidal dendrimers modified by “click” chemistry with PAMAM dendrons as unimolecular micelles” *Tetrahedron Lett.* **2013** (aceptado).

**Parte de los resultados han sido presentados en los siguientes foros:**

Soto-Castro D., **Magaña-Vergara N. E.**, Farfán N., Santillan R., “Synthesis of steroidal dendrimers modified by “click” chemistry with PAMAM dendrons as unimolecular micelles” International Conference on Polymers and Advanced Materials, “POLYMAT”/ Simposio Latinoamericano de Química de Coordinación y Organometálica “SILQCOM”, Huatulco, Oaxaca, octubre de 2013.

**Magaña-Vergara N. E.**, Rárová L., Soto-Castro D., Farfán N., Strnad M., Santillan R., “Síntesis y actividad antiproliferativa de nuevos conjugados esteroidales dendriméricos” 48° Congreso Mexicano de Química, y el 32° Congreso Nacional de Educación Química, Guanajuato, Agosto 31- Septiembre 4, 2013.

**Magaña-Vergara N. E.**, Ávila T., Farfán N., Santillan R. “Synthesis and characterization of two steroidal-dendrimer conjugate derivatives of ethynil estradiol and 17 $\alpha$ -estradiol”, 3rd EuCheMS Chemistry Congress Nürnberg, Agosto 29 - Septiembre 2, 2010.

Yépez-Guerra R., **Magaña-Vergara N. E.**, Rodríguez-Romero J., Santillan R., Farfán N., “Síntesis de dendrímeros de segunda generación con grupos alilo en la periferia y

---

---

---

---

fluoroglucinol como núcleo” 45° Congreso Mexicano de Química, 29° Congreso Nacional de Educación Química, Riviera Maya, Q. Roo, Septiembre 2010.

**Durante la estancia en el doctorado se generaron las siguientes publicaciones en colaboración:**

Jiménez C., Farfán N., Romero-Ávila M., Rodríguez M., Aparicio-Ixta L., Ramos-Ortiz G., Maldonado J. L., Santillan R., **Magaña-Vergara N. E.**, Ochoa Ma. E. Synthesis and chemical-optical characterization of novel two-photon fluorescent borinates derived from Schiff bases, *J Organomet Chem*, **2013** (aceptado)

Czajkowska-Szczykowska D., Rodríguez-Molina B., **Magaña-Vergara N. E.**, Santillan R., Morzycki J. W., Garcia-Garibay M. A. Macrocyclic Molecular Rotors with Bridged Steroidal Frameworks, *J. Org.Chem.*, **2012**, 77, 9970.

Pérez-Díaz J. O. H., Rárová L., Muñoz-Ocampo J. P., **Magaña-Vergara, N. E.**, Farfán, N., Strnad M., Santillan R. Synthesis and biological activity of 23-ethylidene-26-hydroxy-22-oxocholestane derivatives from spirostane sapogenins. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 51, 67.

Herrera-Ambriz V.M., Maldonado J. L., Rodríguez M., Castro-Beltrán R., Ramos-Ortiz G., **Magaña-Vergara N.E.**, Meneses-Nava M., Barbosa-García O.; Santillan R., Farfán N., Dang F., Lacroix P., Ledoux I. Highly Efficient Photorefractive Organic Polymers Based on Benzonitrile Schiff Bases Non-Linear Chromophores. *J. Phys. Chem. C.*, **2011**, 115, 23955.

---

---



---

---

**INDICE**

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>CAPITULO 2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>8</b>
2.1 Cáncer.....	8
2.2 Dendrímeros.....	9
2.3 Métodos de Síntesis.....	11
2.4 Propiedades Fisicoquímicas.....	14
2.5 Aplicaciones .....	16
2.5.1 Dendrímeros como dispositivos en la liberación de fármacos.....	16
2.5.2 Dendrímeros en terapia contra el cáncer .....	19
2.5.3 Estructuras dendriméricas como micelas unimoleculares .....	23
2.5.4 Estructuras dendriméricas funcionalizadas con carboranos en la periferia .....	25
<b>CAPITULO 3. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo General .....	30
3.2 Objetivos Específicos .....	30
<b>CAPITULO 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
4.1 Síntesis de las unidades de ramificación.....	31
4.2 Dendronas tetrafuncionalizadas 7, 8 y 9.....	32
4.2.1 Síntesis y caracterización espectroscópica de las dendronas <b>7, 8 y 9</b> .....	32
4.2.2 Análisis por difracción de rayos-X de las dendronas tetrafuncionalizadas <b>7, 8 y 9</b> .....	36
4.3 Conjugados esteroidales derivados del 17 $\alpha$ -etinilestradiol y del 17 $\alpha$ -estradiol .....	38
<b>4.3.1 Síntesis de las dendronas esteroidales 10, 11 y 12</b> .....	<b>40</b>
4.3.1.1 Caracterización espectroscópica de la dendrona esteroideal <b>10</b> derivada del 17 $\alpha$ -etinilestradiol. Caracterización de los dendrímeros <b>26 y 27</b> .....	42

---

---

---

4.3.1.2 Caracterización espectroscópica las dendronas esteroideas <b>11</b> y <b>12</b> derivadas del $17\alpha$ -estradiol.....	47
<b>4.3.2</b> Síntesis de los conjugados esteroideas dendriméricos por el método divergente.....	48
4.3.2.1 Síntesis y caracterización de los dendrímeros tipo Fréchet con núcleo de tetrametileno de primera (G1), segunda (G2) y tercera (G3) generación. ....	48
4.3.2.2 . Determinación estructural por difracción de rayos X de los compuestos <b>13</b> y <b>15</b> ....	55
4.3.2.3 Síntesis y caracterización de los conjugados esteroideas dendriméricos G1 y G2 con núcleo de tetrametileno derivados del $17\alpha$ -etinilestradiol ( <b>20</b> , <b>22</b> ) y del $17\alpha$ -estradiol ( <b>21</b> , <b>23</b> ). ....	58
4.3.2.4 Síntesis y caracterización de los dendrímeros <b>25</b> y <b>26</b> con núcleo aromático trisustituido.....	62
4.3.2.5 Síntesis de los conjugados esteroideas dendriméricos con núcleo aromático trisustituido de G0 y G1 derivados del $17\alpha$ -etinilestradio y $17\alpha$ -estradiol.....	63
<b>4.3.3</b> Evaluación in vitro de los conjugados esteroideas dendriméricos como anticancerígenos.....	67
4.4 Dendrímeros híbridos tipo Fréchet-PAMAM como micelas unimoleculares.....	74
4.4.1 Síntesis y caracterización de los dendrímeros híbridos tipo Fréchet-PAMAM <b>36</b> y <b>37</b> .....	74
4.5 Dendrímeros tipo fenilalil éter (APE) de primera (47) y segunda (49) generación con núcleo de fluoroglucinol .....	78
4.5.1 Síntesis de la unidad de ramificación <b>42</b> y de la dendrona <b>44</b> .....	78
4.5.2 Síntesis y caracterización de los dendrímeros alilfenil éter <b>47</b> y <b>48</b> .....	79
<b>CAPITULO 5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>88</b>
<b>CAPITULO 6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>90</b>
<b>CAPITULO 7. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>91</b>
<b>7.1 Materiales y métodos.....</b>	<b>91</b>
<b>7.2 Síntesis de las dendronas tetra funcionalizadas.....</b>	<b>93</b>
7.2.1 Dendrona 3,5-bis(3,5-bis(hidroximetil)fenoximetil)fenilalil éter ( <b>7</b> ).....	93
7.2.2 Dendrona 3,5-bis(3,5-bis(hidroximetil)fenoxi)metilfenilo ( <b>8</b> ) .....	93
7.2.3 Dendrona 3,5 bis (3,5-bis (clorometil)fenoximetil)fenilalil éter ( <b>9</b> ) .....	94
<b>7.3 Síntesis de las dendronas esteroideas derivadas del <math>17\alpha</math>-etinilestradiol y del <math>17\alpha</math>-estradiol</b>	<b>95</b>
7.3.1 Dendrona esteroidea derivada del $17\alpha$ -etinilestradiol ( <b>10</b> ) .....	95

---

---

7.3.2 Dendrona esteroideal derivada del 17 $\alpha$ -estradiol ( <b>11</b> ) .....	96
7.3.3 Dendrona esteroideal derivada del 17 $\alpha$ -estradiol con el punto focal activo ( <b>12</b> ) .....	97
<b>7.4 Síntesis de los dendrímeros G1, G2 y G3 con núcleo de tetrametileno .....</b>	<b>98</b>
7.4.1 Dendrímero 1,4-bis(3,5-bis(carboximetil)fenoxi)butano ( <b>13</b> ) .....	98
7.4.2 Dendrímero 1,4-bis(3,5-bis(hidroximetil)fenoxi)butano..( <b>14</b> ) .....	98
7.4.3 Dendrímero 1,4-bis(3,5-bis(bromometil)fenoxi)butano ( <b>15</b> ) .....	99
7.4.4 Dendrímero 1,4-bis(3,5-bis(3,5-bis(carboximetil)fenoximetil)fenoxi) butano ( <b>16</b> ) .....	99
7.4.5 Dendrímero 1,4-bis(3,5-bis(3,5-bis(hidroximetil))fenoximetil)fenoxi)butano ( <b>17</b> ) .....	100
7.4.6 Dendrímero 1,4-bis(3,5-bis(3,5-bis(clorometil))fenoximetil)fenoxi)butano ( <b>18</b> ) .....	101
7.4.7 Dendrímero 1,4-bis(3,5-bis(3,5-bis(3,5-bis(hidroximetil))fenoximetil)fenoximetil)fenoxi)butano ( <b>19</b> ) .....	102
<b>7.5 Conjugados esteroideales dendriméricos de G1 y G2 con núcleo de tetrametileno .....</b>	<b>103</b>
7.5.1 Conjugado esteroideal dendrimérico G1 derivado del 17 $\alpha$ -etinilestradiol ( <b>20</b> ) .....	103
7.5.2 Conjugado esteroideal dendrimérico G1 derivado del 17 $\alpha$ -estradiol ( <b>21</b> ) .....	104
7.5.3 Conjugado esteroideal dendrimérico G2 derivado del 17 $\alpha$ -etinilestradiol ( <b>22</b> ) .....	105
7.5.4 Conjugado esteroideal dendrimérico G2 derivado del 17 $\alpha$ -estradiol ( <b>23</b> ) .....	106
<b>7.6 Síntesis de los dendrímeros tipo Frechet con núcleo bencénico trisustituido .....</b>	<b>107</b>
7.6.1 Dendrímero 1,3,5-tri (3,5-bis(hidroximetil)fenoxi)benceno ( <b>25</b> ) .....	107
7.6.2 Dendrímero 1,3,5-tri (3,5-bis(clorometil)fenoxi)benceno ( <b>26</b> ) .....	107
<b>7.7 Síntesis de los conjugados esteroideales dendriméricos G0 y G1 con núcleo bencénico trisustituido .....</b>	<b>108</b>
7.7.1. Conjugado dendrimérico esteroideal G0 con núcleo bencénico trisustituido derivado del etinilestradiol ( <b>27</b> ) .....	108
7.7.2 Conjugado esteroideal G0 con núcleo bencénico trisustituido derivado del 17 $\alpha$ -estradiol ( <b>28</b> ) .....	109
7.7.3 Conjugado esteroideal G1 con núcleo bencénico trisustituido derivado del 17 $\alpha$ -etinilestradiol ( <b>29</b> ) .....	110
7.7.4 Conjugado esteroideal G1 con núcleo bencénico trisustituido derivado del estradiol ( <b>30</b> ) .....	111
<b>7.8 Síntesis de los dendrímeros híbridos.....</b>	<b>112</b>
7.8.1 3-[(2- <i>tert</i> -butoxicarbonil-etil)-(3-hidroxi-propil)-amino]-propionato de <i>tert</i> -butilo ( <b>33</b> )	112
7.8.2 3-[(2- <i>tert</i> -butoxicarbonil-etil)-(3-iodo-propil)-amino]-propionato de <i>tert</i> -butilo ( <b>34</b> )...	112
7.8.3 3-[(2- <i>tert</i> -butoxicarbonil-etil)-(3-azido-propil)-amino]-propionato de <i>tert</i> -butilo ( <b>35</b> )	113
7.8.4 Dendrímero híbrido <b>36</b> .....	113
7.8.5 Dendrímero híbrido <b>37</b> .....	114

---

---

---

<b>7.9. Síntesis de los dendrímeros tipo alilfenil éter (APE) G1 y G2 con núcleo de fluoroglucinol .....</b>	<b>115</b>
7.9.1 Dendrímero 1,3,5-tri(3,5-bis(aliloxi)benciloxi)benceno ( <b>47</b> ).....	115
7.9.2 Dendrímero 1,3,5-tri(3,5-bis(feniiloxi)benciloxi)benceno ( <b>48</b> ).....	116
7.9.3 Dendrímero 1,3,5-tri(3,5-bis(3,5-bis(aliloxi)benciloxi) benciloxi)benceno ( <b>49</b> ).....	116
<b>7.10 Evaluación anticancerígena de los conjugados esteroidales dendriméricos .....</b>	<b>117</b>
7.10.1 Materiales .....	117
7.10.2 Cultivos celulares.....	117
7.10.3 Evaluación de citotoxicidad celular mediante el ensayo de Calceína AM.....	118
 <b>CAPITULO 8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	 <b>119</b>
 <b>CAPITULO 9 APENDICE I.....</b>	 <b>125</b>
9.1 Estructuras de rayos-X.....	126

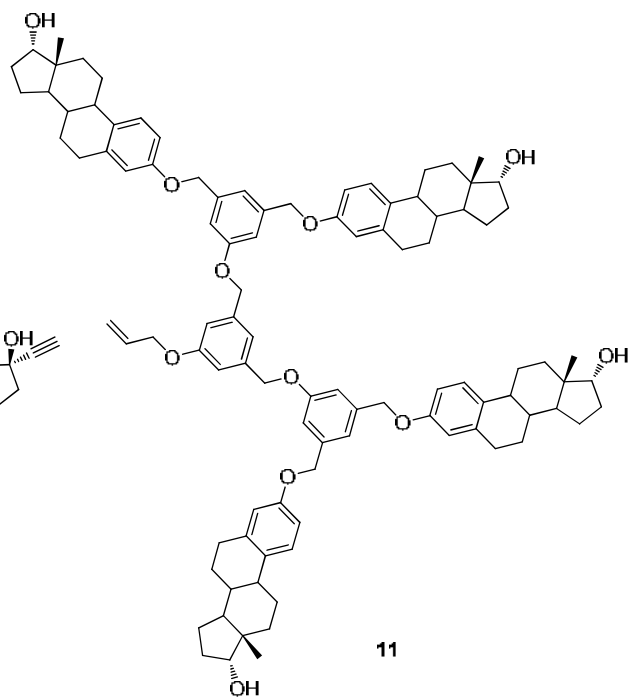
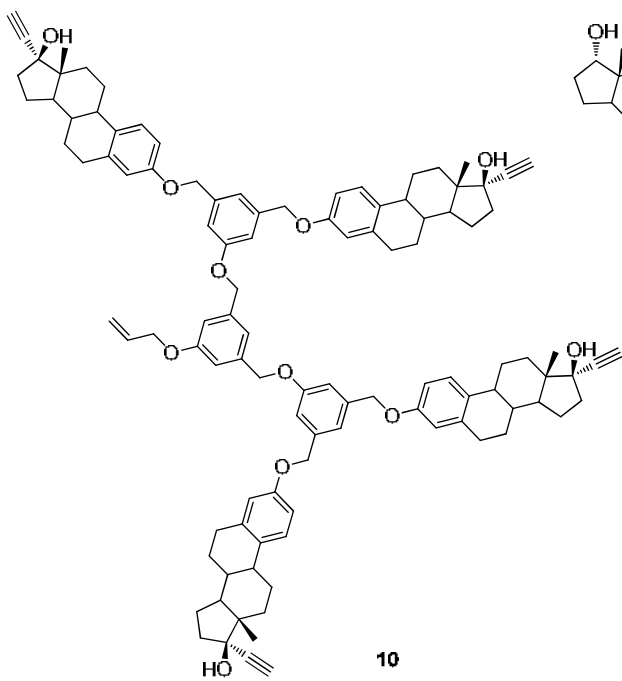
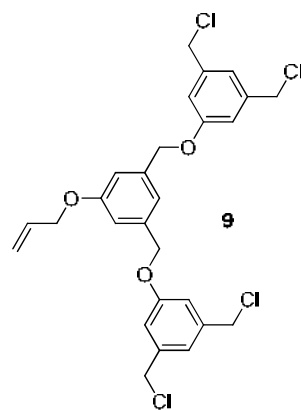
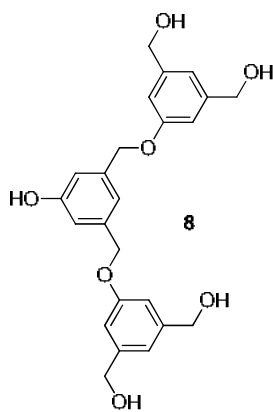
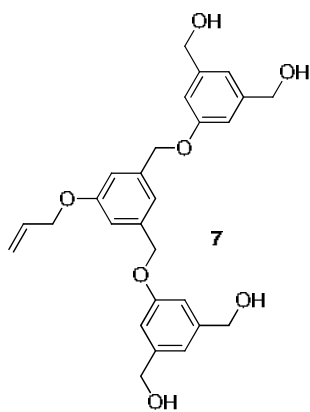
---

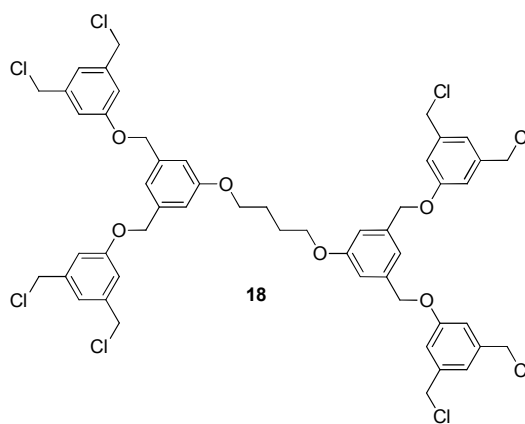
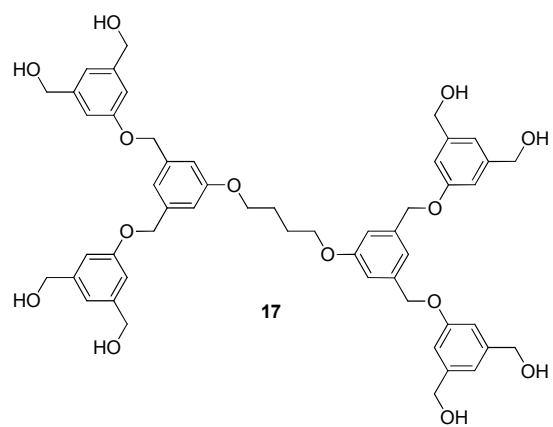
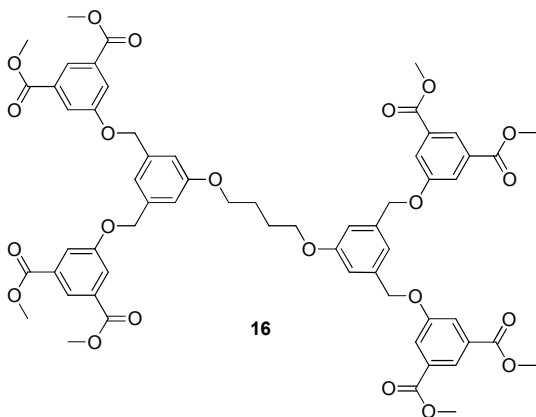
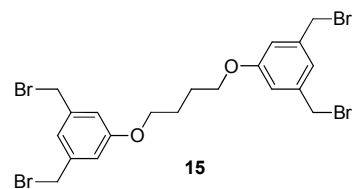
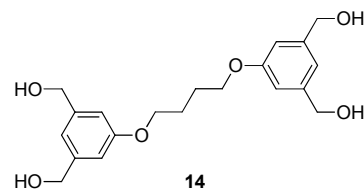
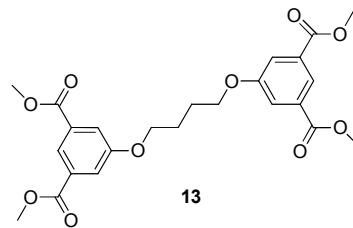
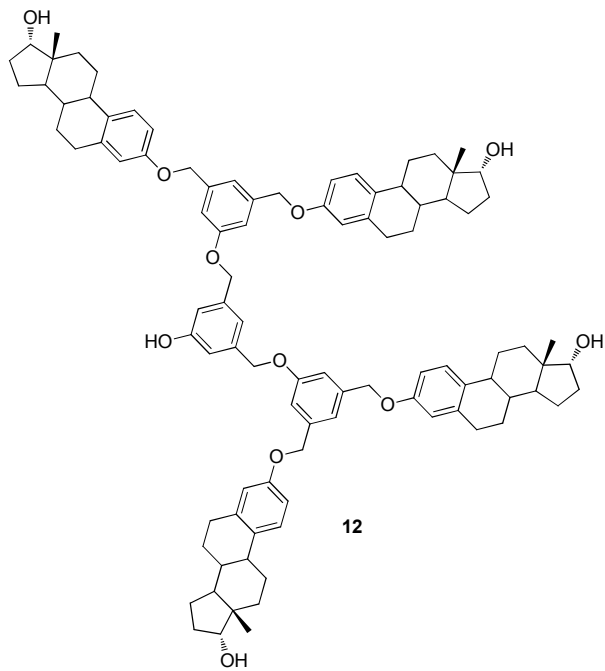
---

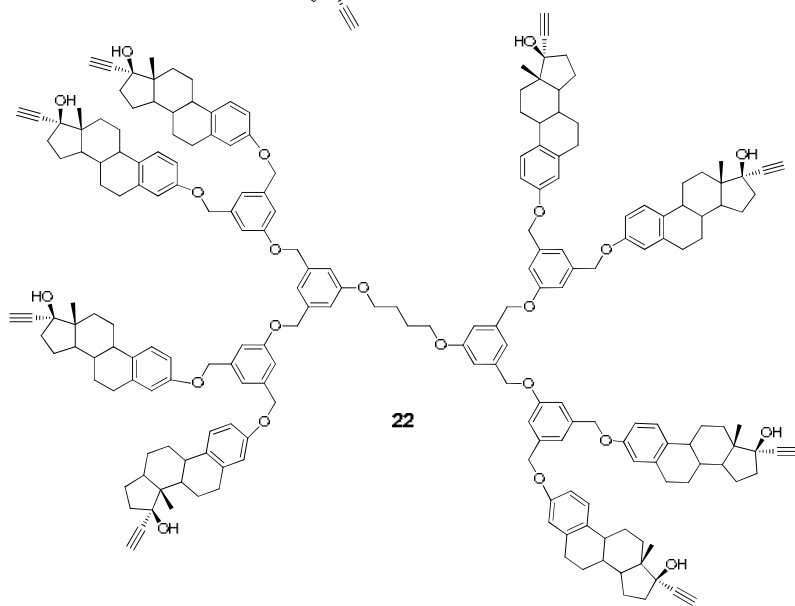
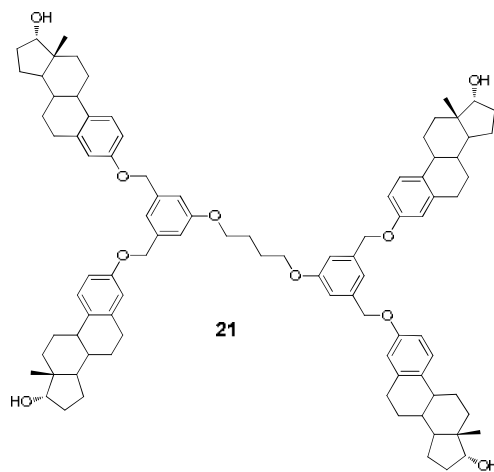
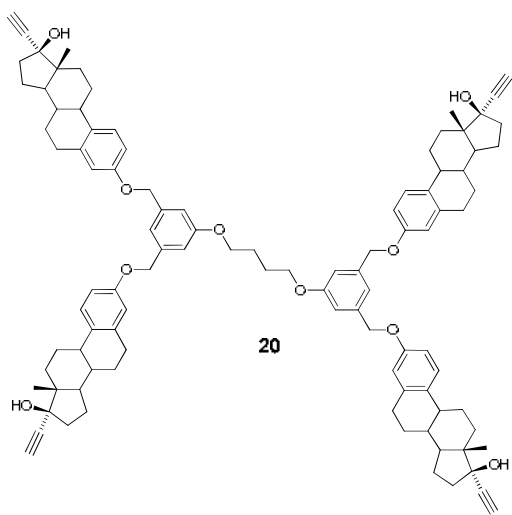
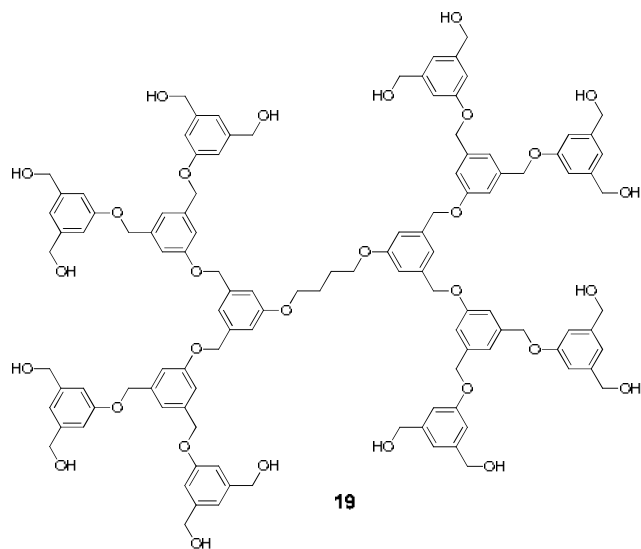
---

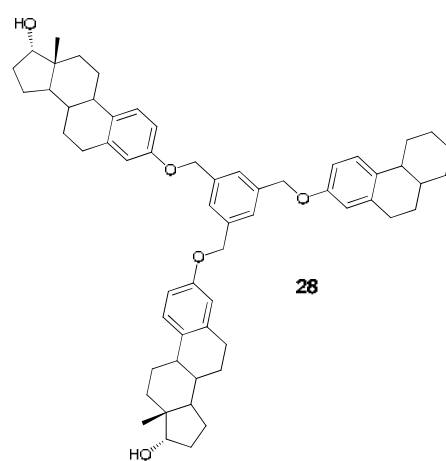
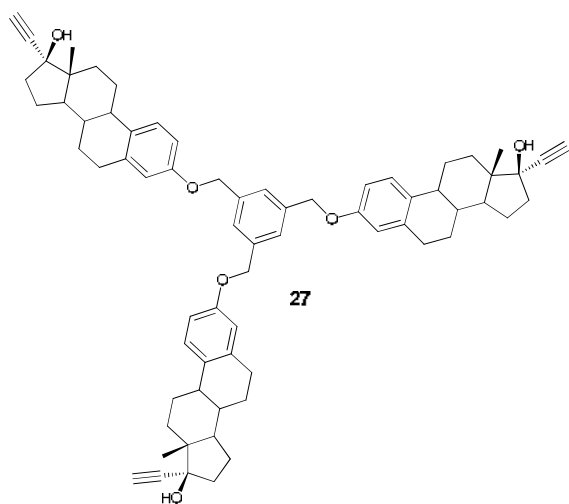
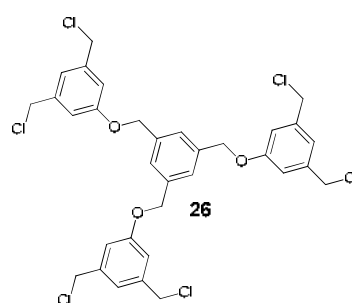
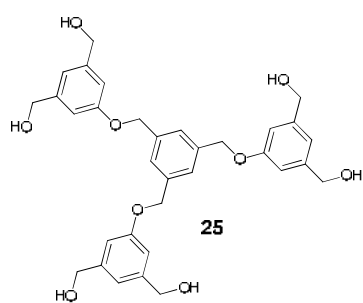
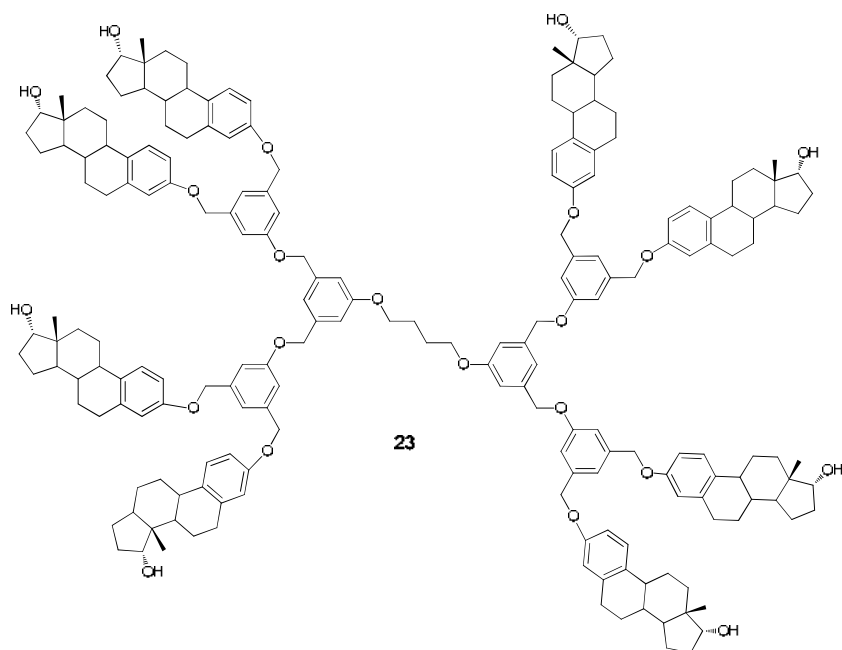
---

## ÍNDICE DE COMPUESTOS

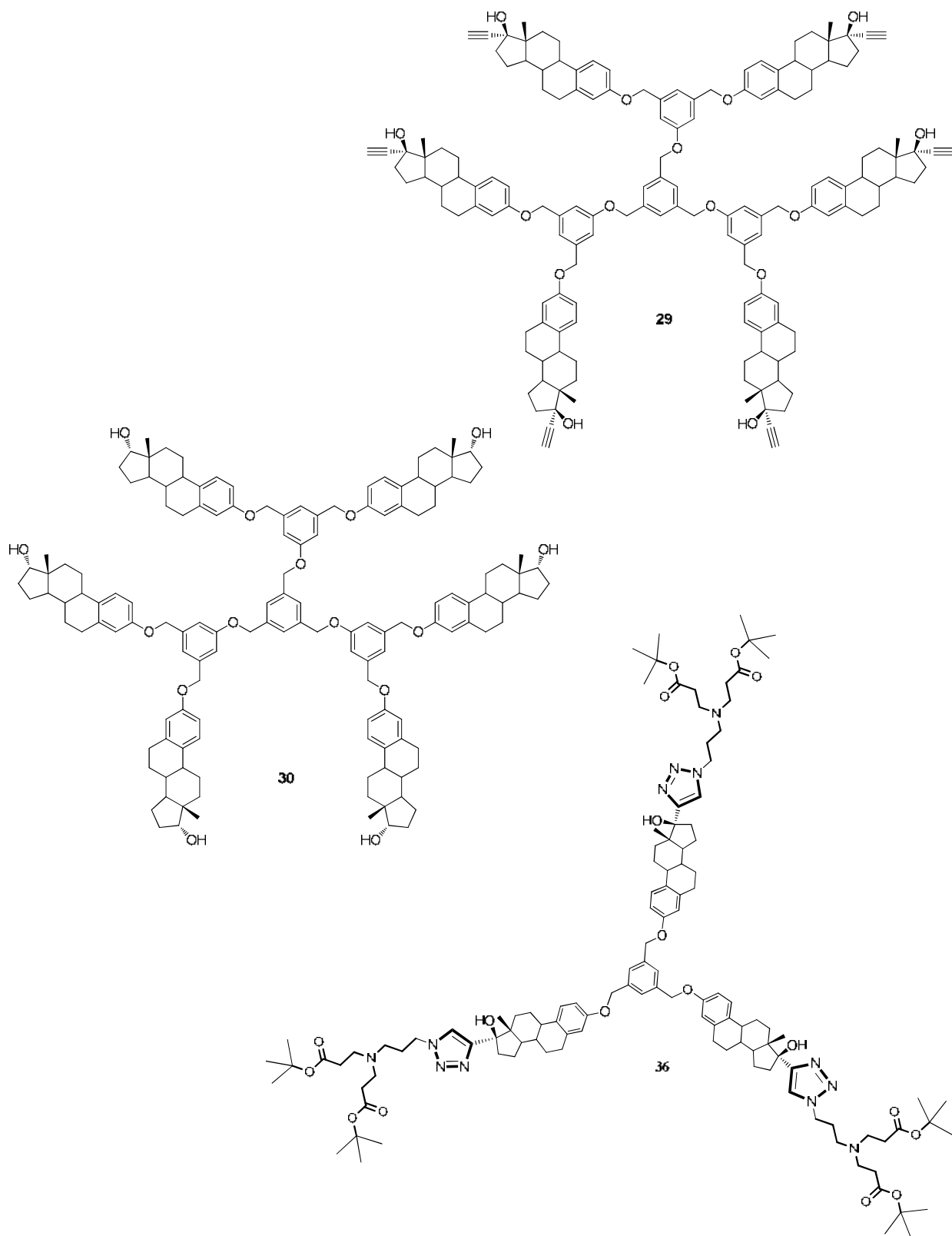


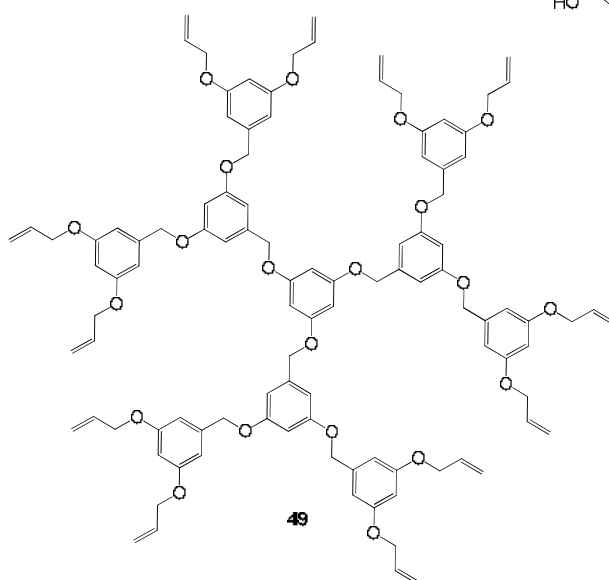
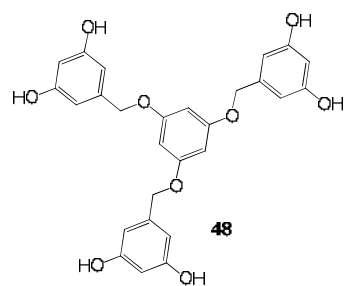
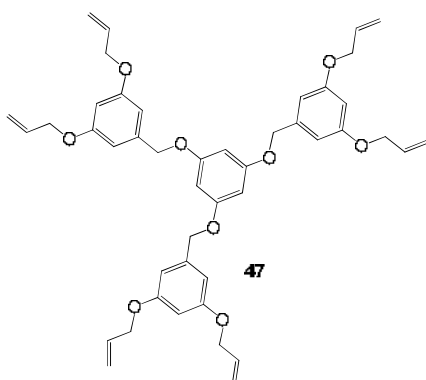
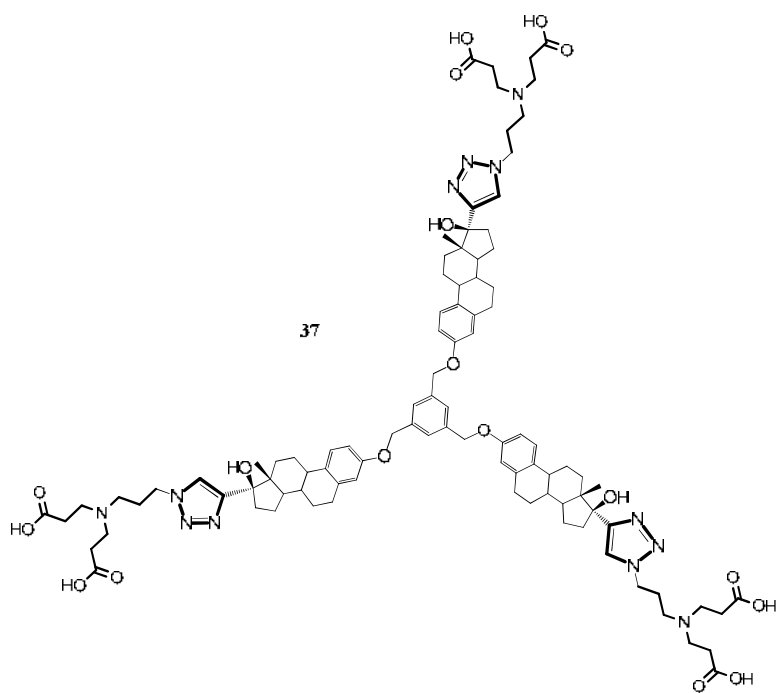












## RESUMEN

Los dendrímeros son macromoléculas con características estructurales bien definidas, su alto peso molecular y la facilidad de acoplar fármacos en la periferia los hace especies prometedoras en el tratamiento de enfermedades crónicas como el cáncer, siendo ésta una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. En el presente trabajo se describe la síntesis y caracterización de nuevas estructuras dendriméricas tipo Fréchet de primera, segunda y tercera generación con potencial aplicación en el tratamiento de cáncer.

Primeramente se realizó la síntesis de dos familias dendriméricas tipo Fréchet con núcleo de tetrametileno y aromático trisustituido y el 5-hidroxi-isoftalato de dimetilo como unidad de ramificación. Como primer paso de síntesis, considerando las ventajas sintéticas que ofrece el método convergente en la síntesis de los dendrímeros como son: mayores rendimientos, menor número de defectos estructurales y métodos de purificación más sencillos, se realizó la síntesis de dos dendronas esteroidales derivadas del  $17\alpha$ -etinilestradiol (**10**) y  $17\alpha$ -estradiol (**11**) con el punto focal protegido por un grupo alilo. Sin embargo, la desprotección del punto focal con acetato de paladio solo fue posible en el caso de la dendrona **11**, ya que en el caso de **10**, los alquinos terminales generan productos no deseados en presencia de paladio. Debido a los inconvenientes encontrados en el método convergente para esta síntesis en particular, se realizó la síntesis de los dendrímeros tipo Fréchet de primera y segunda generación con los núcleos y unidad repetitiva antes mencionados por el método divergente.

Conociendo la actividad anticancerígena presente en algunos derivados esteroidales como es el caso del  $17\alpha$ -etinilestradiol y  $17\alpha$ -estradiol en cáncer de próstata, colón y leucemia, se decidió preparar conjugados esteroidales dendriméricos de primera y segunda generación, aprovechando la carga útil máxima del esteroide en el dendrímero con el objetivo de evaluar el efecto dendrimérico (multivalencia, tamaño y estructura definida) en la actividad citotóxica.

Una vez obtenidos los ocho conjugados esteroidales de primera y segunda generación, de los cuales cuatro corresponden a los conjugados con núcleo de tetrametileno G1 (**20, 21**) y G2 (**22 y 23**) y 4 conjugados más con núcleo bencénico trisustituido G1 (**27,28**) y G2 (**29 y 30**),

así como las tres dendronas esteroidales (**10**, **11** y **12**), se evaluó la actividad citotóxica en líneas celulares de leucemia crónica (CEM), adenocarcinoma de seno (MCF7) y carcinoma cérvico uterino (HeLa) y en células normales de fibroblastos (BJ) como control. De los resultados obtenidos se determinó que los conjugados esteroidales G1 **20** y **21** con núcleo de tetrametileno presentan buena actividad citotóxica en células CEM de forma selectiva en comparación con los conjugados con núcleo bencénico trisustituido, demostrando así la influencia del núcleo en la actividad citotóxica ya que al tener un núcleo más pequeño el dendrímero tiende a formar estructuras globulares compactas.

En el caso de los conjugados con núcleo de tetrametileno se obtienen estructuras menos impedidas estéricamente debido a la forma menos globular que adopta, sin embargo, en contra de lo esperado, a pesar de tener mayor número de grupos esteroidales en la periferia cuando incrementa la generación, la actividad se pierde debido a que la estructura del conjugado G2 tiende a adoptar una forma globular por las interacciones presentes entre los fragmentos esteroidales y el dendrímero, lo que disminuye las interacciones con la célula.

Adicionalmente, con la finalidad de evaluar la posibilidad de sintetizar micelas unimoleculares a partir de los dendrímeros esteroidales previamente obtenidos se realizó la síntesis de dendrímeros híbridos por la combinación de fragmentos tipo Fréchet-PAMAM (poli(amidoamina)) unidos por unidades de triazol como micelas unimoleculares con un núcleo lipofílico rodeado por una capa hidrofílica. La síntesis partió del conjugado esteroideal **27** con tres unidades de etinilestradiol como núcleo lipofílico, mediante la reacción de cicloadición entre los grupos alquino del esteroide y la azida de los dendrones tipo PAMAM de generación 0.5 y 1.5 con grupos terminales éster obteniendo a **36**. Posteriormente, los grupos éster se hidrolizaron empleando ácido trifluoroacético obteniendo una micela dendrímica con ácidos carboxílicos como grupos terminales (**37**) que es completamente soluble en soluciones buffer de pH 7.0, 7.4, y 8.0. Estos dendrímeros pueden ser de gran utilidad en el transporte de compuestos bioactivos como fármacos en donde se protegen de la pronta degradación en el organismo liberándose por cambios de pH.

Adicionalmente, se llevó a cabo la obtención de dendrímeros con núcleo bencénico trisustituido y grupos alilo en la periferia de primera **47** y segunda generación **49**. Dichos compuestos presentan interés biológico, debido a que por medio de reacciones regioespecíficas de hidrosililación con derivados de grupos carboranos se pueden obtener especies con potencial aplicación en la Terapia de Captura de Neutrones por Boro en el tratamiento del cáncer.

## ABSTRACT

Dendrimers are macromolecules with well-defined structural features; their high molecular weight and ease of coupling drugs in the periphery, makes them promising species in the treatment of chronic diseases such as cancer, which is one of the leading causes of death worldwide. In this work we describe the synthesis and characterization of new Fréchet type dendrimer structures of first, second and third generation with potential application in the treatment of cancer.

The work consisted on the synthesis of two families of Fréchet type dendrimers having trisubstituted aromatic- and tetramethylene- as core, and 5-hydroxy-isophthalate as branching unit. As the first synthesis step, considering the advantages of the convergent method such as higher yields, fewer structural defects and simpler purification methods, two dendrons derived from 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (**10**) and 17 $\alpha$ -estradiol (**11**) with the focal point protected by an allyl group were prepared. However, deprotection of the focal point with palladium acetate was only possible in the case of the dendron **11** since the terminal alkyne in dendron **10** generated byproducts in the presence of the palladium catalyst. Due to the drawbacks encountered in the convergent approach for this particular synthesis, the Fréchet type dendrimers of first and second generation were obtained by divergent methods.

Due to the anticancer activity that steroidal derivatives like 17 $\alpha$ -ethynylestradiol and 17 $\alpha$ -estradiol have shown against prostate and colon cancer as well as leukemia, these steroids were selected for the preparation of steroidal dendrimeric conjugates of first and second generation. In this case, we took advantage of the maximum payload of the steroid in the dendrimer with the aim of evaluating the dendrimeric effect (multivalency, defined size and structure) in the cytotoxic activity.

Once the eight steroid conjugates of first and second generation, comprising conjugates G1 (**20**, **21**) and G2 (**22**, **23**) with tetramethylene core and four G0 (**27**, **28**) and G1 (**29** and **30**) conjugates containing trisubstituted aromatic core were available, the cytotoxic activity in chronic leukemia cell line (CEM), breast adenocarcinoma (MCF7) and cervical carcinoma

(HeLa) cells and normal fibroblasts (BJ) as control was evaluated. The results showed that G1 steroidal conjugates **20** and **21** with tetramethylene core exhibit good cytotoxic activity and selectively against CEM cells, in contrast with the trisubstituted conjugated aromatic core. This demonstrates the influence of the core since the cytotoxic activity decreased when the smaller core was used because it favors the formation of compact globular structures.

In the case of conjugate dendrimers having tetramethylene as core, the structure is less hindered. However, contrary to expectations, the presence of more steroidal groups on the periphery, as the generation increases, leads to loss of activity probably due to the fact that conjugate G2 tends to adopt a globular like shape which inhibits cell interactions.

Additionally, we designed a unimolecular micelle from the steroidal dendrimers previously prepared. The hybrid dendrimer combined Fréchet and PAMAM fragments linked by triazole units resembling a unimolecular micelle with a hydrophobic core surrounded by a hydrophilic surface. Starting from the steroidal conjugate containing three ethynylestradiol units as hydrophobic core, we carried out a cycloaddition reaction between the alkyne group and the azide at the PAMAM type dendron of generation 0.5 and 1.5 with terminal ester groups. Subsequently, the ester groups were hydrolyzed using trifluoroacetic acid to obtain a unimolecular micelle with carboxylic acids as terminal groups which is fully soluble in buffer solutions of pH 7.0, 7.4, and 8.0. These dendrimers could find application in the transport of bioactive compounds such as drugs which are protected from rapid degradation in the body and can be released by pH changes.

Finally, two dendrimers with trisubstituted aromatic core and allyl groups at the periphery of first and second generation were prepared. These compounds have biological interest for the incorporation of carborane units which have potential application in the treatment of cancer using Boron Neutron Capture Therapy.

## **CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN**

En la actualidad más de 11 millones de personas son diagnosticadas con cáncer cada año y se prevé que la incidencia de esta enfermedad aumente continuamente a 16 millones para el 2020. El tratamiento clínico del cáncer implica el uso de fármacos que actúan por la inducción de daño al ADN celular sin embargo, no son selectivos y afectan seriamente a células normales lo que conlleva un grave deterioro en la calidad de vida del paciente. Por esta razón, el desarrollo de nuevos fármacos y dispositivos de administración que puedan incrementar la actividad terapéutica y que a su vez disminuyan los efectos secundarios no deseados, es de crucial importancia.

Los dendrímeros son macromoléculas hiperramificadas, bien definidas, de tamaño nanométrico y alta multivalencia, estas características los colocan como una alternativa promisoría en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, actuando como dispositivos de reconocimiento de células cancerosas en etapas tempranas o como acarreadores y liberadores de fármacos. En sistemas de liberación de fármacos, el dendrímero puede actuar como profármaco mediante la conjugación de fármacos anticancerígenos como taxol o camptotecina por medio de enlaces covalentes, aumentando el tiempo de circulación en el organismo, lo que favorece una liberación sostenida a menores dosis.

En años recientes, el empleo de compuestos esteroidales como el etinilestradiol y el 17 $\alpha$ -estradiol, además de ser usados en el tratamiento de problemas hormonales y en trastornos neurodegenerativos, han demostrado su actividad antiproliferativa y la capacidad de inducir apoptosis en células cancerígenas de leucemia, próstata y colon.

Los esteroides también han sido empleados como materia prima en la síntesis de bioconjugados, como es el caso de los dendrímeros PAMAM funcionalizados con metilprednisolona. Sin embargo, en este caso la capacidad del dendrímero de actuar como acarreador se ve afectada por la alta toxicidad de las terminales amina y su estructura impedida estéricamente a altas generaciones limita su capacidad de carga.



Otra funcionalización promisorio de los dendrímeros en el tratamiento del cáncer es la incorporación de grupos carborano en su estructura. La combinación de estructuras dendríticas con grupos alilo pueden ser modificadas mediante reacciones de hidrosililación para su funcionalización con carboranos y de esta forma presentar potencial aplicación en la Terapia de Captura de Neutrones por Boro (TCNB), en el tratamiento de cáncer.

Por lo anterior, en este trabajo se sintetizaron once nuevos conjugados esteroidales como posibles profármacos, derivados del  $17\alpha$ -etinilestradiol y el  $17\alpha$ -estradiol con potencial actividad citotóxica frente a líneas celulares cancerosas. Adicionalmente se presenta un protocolo preliminar para la obtención de una nueva micela unimolecular dendrimerica a partir de los conjugados derivados del  $17\alpha$ -etinilestradiol, que proporciona la posibilidad de encapsular fármacos lipofílicos incrementando la solubilidad del fármaco en medios acuosos y finalmente la obtención de dos nuevos dendrímeros con grupos alilo en la periferia para su posterior incorporación con carboranos como posibles fármacos en Terapia de Captura de Neutrones por Boro.

## **CAPITULO 2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Cáncer.**

El cáncer ocurre cuando el crecimiento de las células en el cuerpo está fuera de control y éstas se dividen demasiado rápido. Igualmente, puede ocurrir cuando las células "olvidan" cómo morir. Existen diferentes tipos de cáncer y éste se puede desarrollar en casi cualquier órgano o tejido, como el pulmón, el colon, la mama, la piel, los huesos o el tejido nervioso.<sup>1</sup>

Los tratamientos administrados actualmente para el cáncer son muy variables y dependen de varios factores como: el tipo de cáncer que se presenta, el grado de la enfermedad, así como del estado físico del paciente. Los métodos que se emplean para combatirlo son la quimioterapia, la radioterapia o extirpación quirúrgica o una combinación de ellos. Dichos tratamientos son diseñados para matar o remover directamente a las células cancerosas interrumpiendo la división celular. Sin embargo, este fenómeno no es selectivo, afectando así, a células sanas, en particular del tipo epitelial, generando así un grave deterioro en la calidad de vida del paciente.

Existen varios tipos de muerte celular entre ellas: apoptosis, necrosis y autofagia. La necrosis consiste en la destrucción de la membrana celular permitiendo el escape al exterior de elementos tóxicos que provocan un proceso inflamatorio que tendrá efecto nocivo en el organismo, según la extensión del proceso. Por otra parte, la apoptosis es el proceso de muerte celular caracterizado por la escisión del DNA, la condensación y fragmentación del núcleo y la vesiculación de la membrana plasmática que provoca la fagocitosis de la célula sin inducir una respuesta inflamatoria.

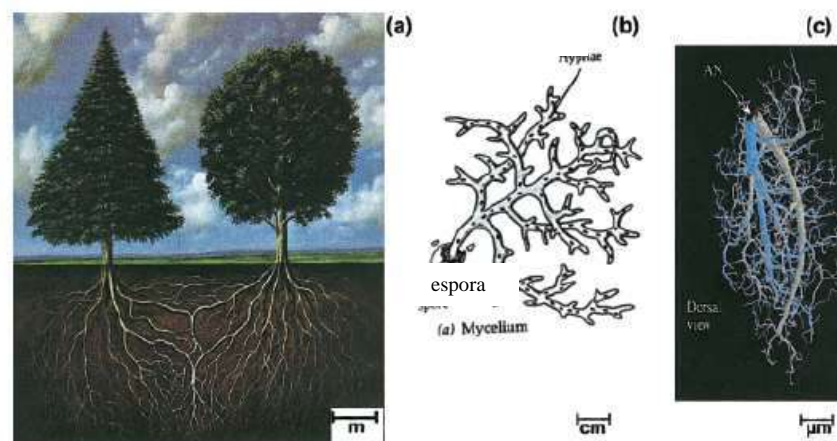
Numerosos fármacos han sido empleados al respecto como, el paclitaxel o Taxol en contra de cáncer de seno, próstata, pulmón, ovario; el cisplatino en contra de cáncer de pulmón, ovario; el Metotrexato en contra de cáncer de vejiga y páncreas; la camptotecina en el tratamiento de cáncer colorectal, gástrico; y agentes alquilantes como melfalan, hidracinas o derivados de triazinas empleados en leucemia crónica, linfomas de Hodgkin y mielomas múltiples.

El desarrollo de sistemas de liberación con la capacidad de acarrear uno o más agentes terapéuticos de reconocimiento, con agentes fluorescentes que faciliten la identificación del sistema dentro de la célula, es una ventaja fundamental en el tratamiento del cáncer y diferentes tipos de enfermedades infecciosas.

Uno de los campos más promisorios es el uso de sistemas dendriméricos en el diagnóstico y tratamiento del cáncer<sup>2</sup>. El objetivo primordial es la identificación temprana de cambios celulares que permitan la intervención con agentes que actúen específicamente en las células afectadas, evitando así los efectos tóxicos secundarios o la acción tóxica sobre células vecinas sanas.

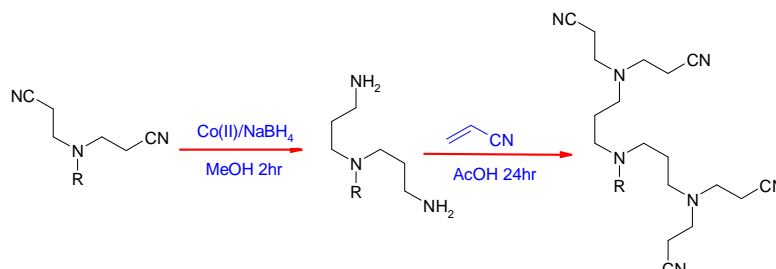
## 2.2 Dendrímeros

La arquitectura dendrímica es una de las topologías más observadas en nuestro planeta: Innumerables ejemplos de estos modelos pueden verse en sistemas tanto abióticos como los relámpagos de las tormentas eléctricas, los copos de nieve, como en bióticos como la copa y las raíces de los árboles y en las dendritas de las neuronas. En la Figura 2.1 se esquematizan diversos sistemas biológicos con topologías ramificadas; en metros (árboles), milímetros/centímetros (micelio de hongos) o micrómetros (neuronas).<sup>3</sup>



**Figura 2.1** Sistemas biológicos dendríticos: a) árboles de coníferas y de hoja caduca con sistema de raíces; b) anatomía de hongos; c) interneuronas de cucaracha

El concepto de crecimiento repetitivo mediante un método iterativo en cascada<sup>4</sup> fue reportado por primera vez en 1978 por Vögtle y colaboradores quienes desarrollaron la síntesis controlada de aminas ramificadas de bajo peso molecular (Esquema 2.1).

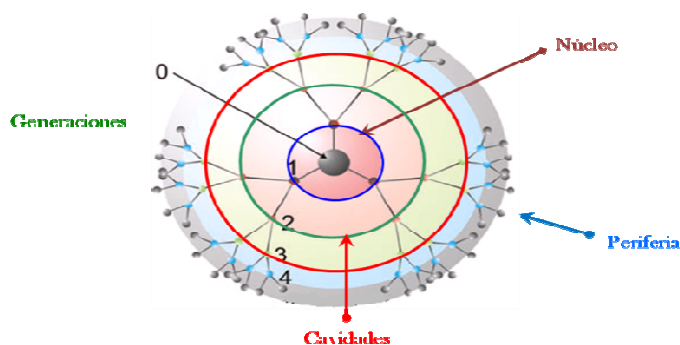


**Esquema 2.1** Síntesis controlada de aminas reportada por Vögtle.

Sin embargo, no fue hasta 1986 cuando Tomalia<sup>5</sup> sintetizó y caracterizó la primera familia del dendrímero de poli(amidoamina) conocido como PAMAM, introduciendo el término dendrímero para definir una macromolécula con arquitectura tridimensional altamente ramificada, cuyo tamaño, forma y topología pueden ser controlados de manera precisa durante el proceso de síntesis y preparada por medio de métodos iterativos.<sup>3</sup> Etimológicamente, la palabra dendrímero proviene de las raíces griegas, *dendron* = árbol y *meros* = parte.

La estructura geométrica del dendrímero está formada por tres partes<sup>6</sup> (Figura 2.2):

1. El núcleo que determina la forma y el impedimento estérico presente en la molécula.
2. Las capas llamadas generaciones formadas por las unidades de repetición con estructura ramificada y espacios vacíos entre las cadenas que pueden albergar especies químicas
3. Los grupos terminales que dan lugar a superficies multivalentes y determinan la reactividad y solubilidad.<sup>4</sup>



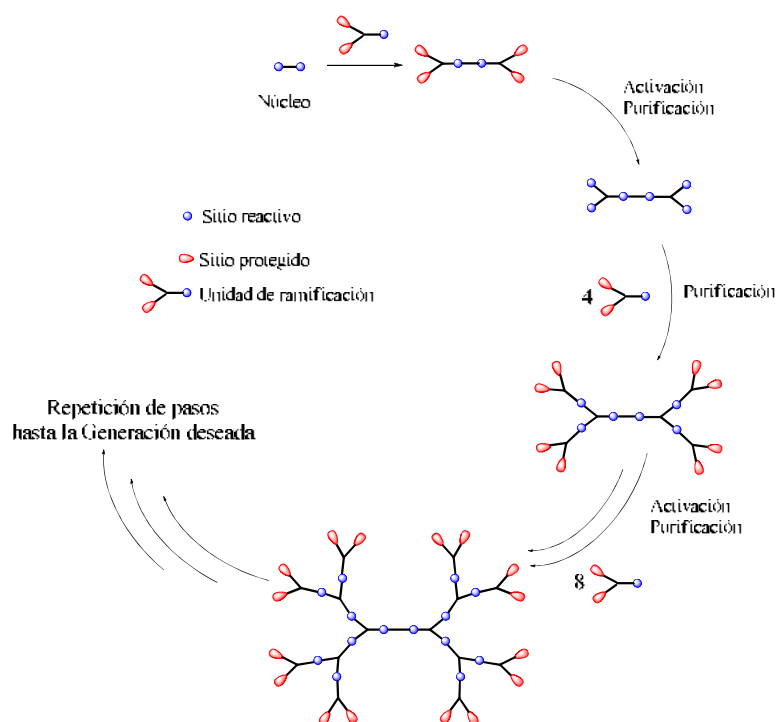
**Figura 2.2** Representación esquemática de un dendrímero.

## 2.3 Métodos de Síntesis.

A diferencia de los polímeros hiperramificados, los cuales con frecuencia tienen estructuras poco definidas, los dendrímeros se sintetizan por procesos controlados paso a paso, obteniendo como resultado estructuras perfectamente definidas. Existen dos métodos comúnmente utilizados para la síntesis de este tipo de estructuras: el método divergente y el convergente.

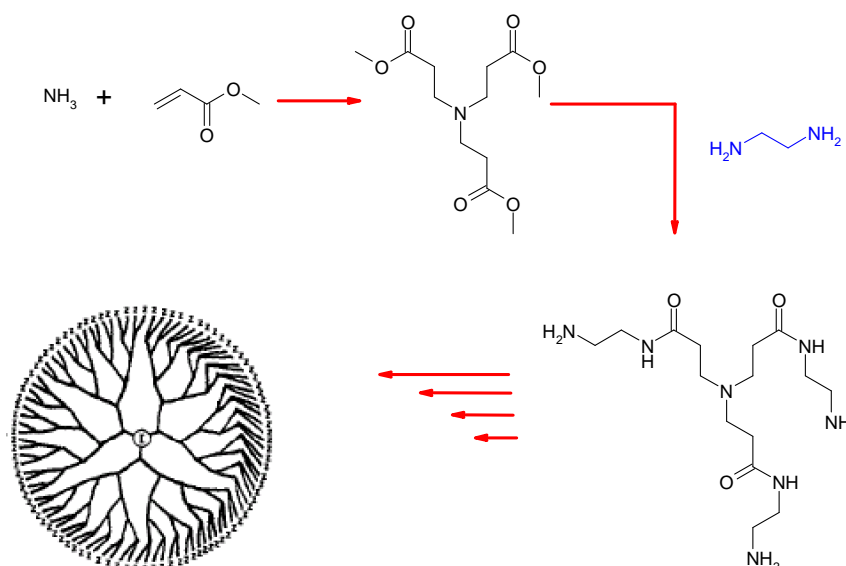
### Método Divergente.

El método divergente, desarrollado por Vögtle,<sup>4</sup> Tomalia<sup>7</sup> y Newkome,<sup>8</sup> consiste en el crecimiento del dendrímero a partir de un núcleo central o punto focal hacia la periferia capa por capa (Esquema 2.2). Cada una de las capas es referida como generación de crecimiento. Este método es teóricamente viable, ya que a medida que el dendrímero incrementa su tamaño, también se incrementa el número de grupos funcionales en la superficie. Como consecuencia, para formar la próxima generación se origina un incremento exponencial en el número de reacciones que se tendrían que llevar a cabo.<sup>4</sup>



Esquema 2.2 Método divergente.

En 1986, Tomalia reportó la síntesis del dendrímero poli(amidoamina) conocido como PAMAM, por medio del método divergente, que consistió en dos pasos: el primero fue una adición de Michael a una amina como núcleo con metilmetacrilato y el segundo la amidación del éster resultante con grandes excesos de etilendiamina<sup>3</sup> (Esquema 2.3).



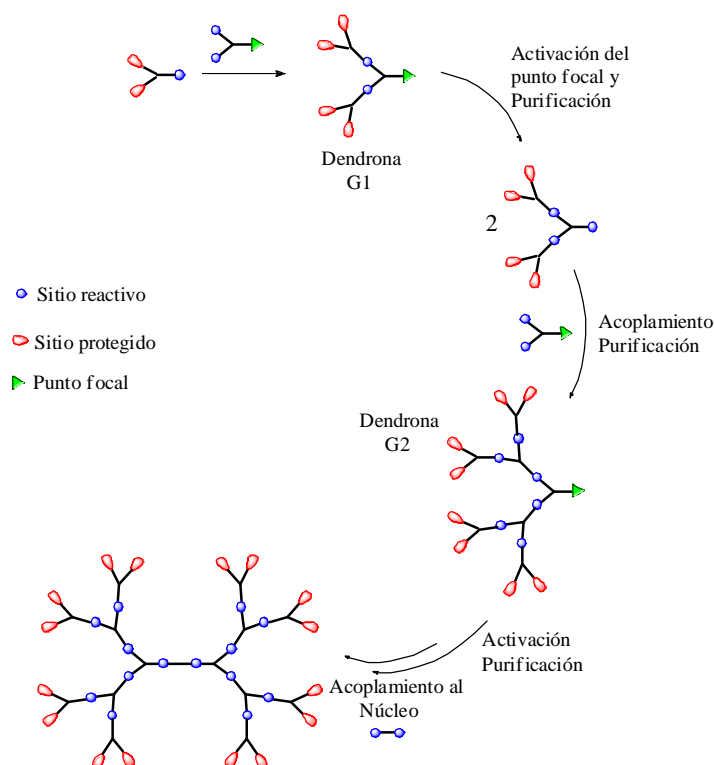
Esquema 2.3. Dendrímero PAMAM sintetizado por Tomalia.

### Método Convergente.

El método convergente es justamente lo contrario al método divergente, se parte de los componentes de la última generación del dendrímero que se desea construir; es decir, se construyen unidades de ramificación hasta formar macromoléculas de bajo peso molecular conocidas comúnmente como dendronas, las cuales son macromoléculas ramificadas que pueden tener un número variado de generaciones; estas macromoléculas se hacen reaccionar con un núcleo o molécula central para formar el dendrímero<sup>4</sup> (Esquema 2.4).

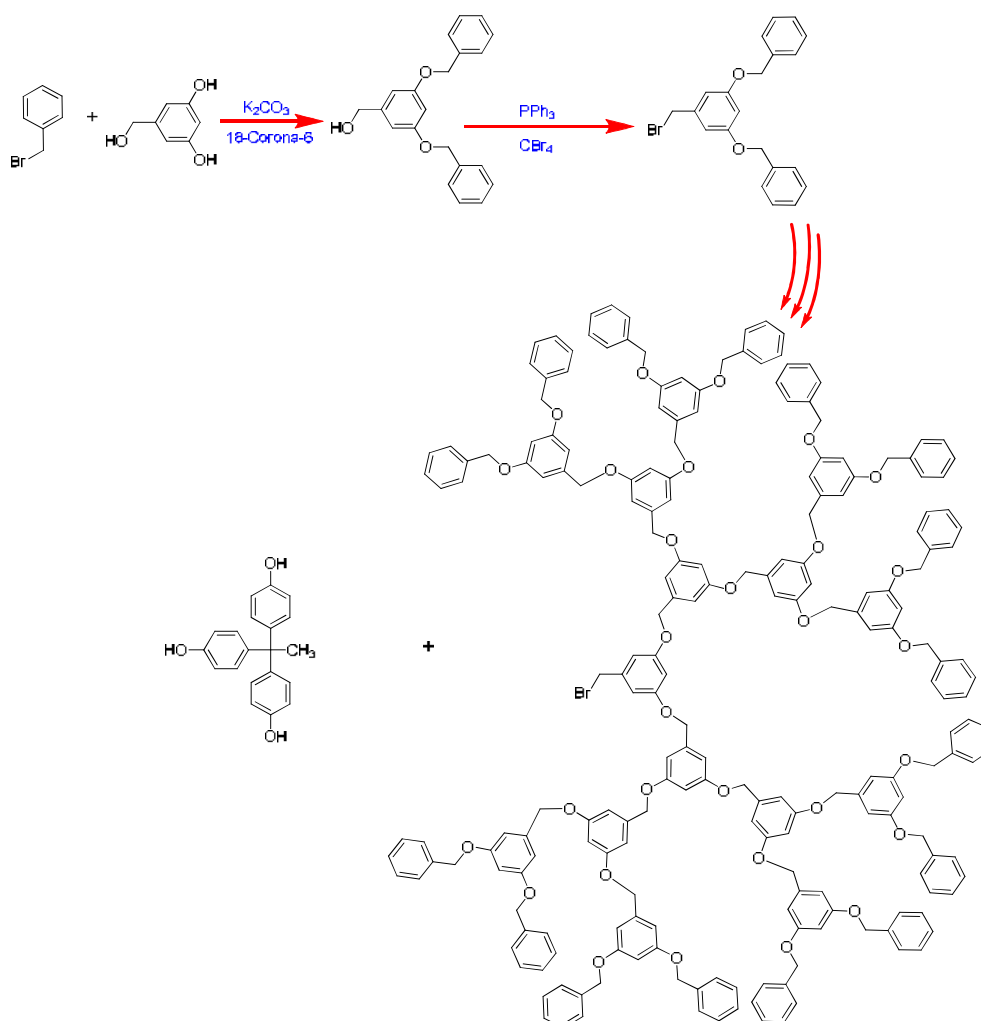
La ventaja de este método es que el número de grupos reactivos en cada etapa se mantiene constante, por lo que la formación de subproductos es menos probable. Además la diferencia de pesos moleculares entre los subproductos que pudieran formarse y el producto principal es amplia, facilitando el método de separación. Sin embargo, debido a que los dendrones se fijan

a los grupos reactivos del núcleo o grupo central, se incrementa el impedimento estérico, lo cual ocasiona que las reacciones sean más lentas y menos eficientes.<sup>3,6</sup>



Esquema 2.4 Método convergente.

En 1990, Fréchet<sup>9</sup> introdujo la primera síntesis convergente la cual consistió en la condensación de dos moléculas de bromuro de bencilo con los dos grupos fenólicos del alcohol 3,5-dihidroxibencílico. Posteriormente se llevó a cabo la activación del punto focal cambiando el grupo funcional de alcohol a bromuro repitiendo esta secuencia de reacciones hasta obtener una dendrona (fragmento del dendrónimo) de tamaño deseado y finalmente acoplarlo a un núcleo para obtener un dendrónimo tipo Fréchet (Esquema 2.5).



**Esquema 2.5** Estrategia convergente propuesta por Fréchet.

Debido a su estructura molecular los dendrímeros también han sido considerados como micelas unimoleculares<sup>10,11,12</sup> que constan de un núcleo lipofílico y una superficie lipofóbica comparables a las micelas tradicionales.<sup>13</sup> Los dendrímeros están formados por unidades de ramificación unidas covalentemente, lo que proporciona mayor estabilidad frente a cambios de pH, temperatura y fuerza iónica.

## 2.4 Propiedades Físicoquímicas

A diferencia de los polímeros lineales análogos cuya síntesis proporciona compuestos polidispersos, es decir, especies en un intervalo de peso molecular; el alto control en la síntesis



de dendrímeros permite obtener productos con baja polidispersidad ( $M_w/M_n < 1.01-1.05$ ) similares a las observadas en sistemas biológicos,<sup>14,15,16</sup> y debido a la gran cantidad de grupos funcionales en la periferia, crea superficies polivalentes aumentando la solubilidad, y reactividad comparado con las respectivas moléculas monovalentes (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1** Propiedades fisicoquímicas de los polímeros comparadas con los dendrímeros.

Propiedad	Polímero	Dendrímero
Forma	al azar	Esférico
Viscosidad	Alta	Baja
Solubilidad	Baja	Alta
Cristalinidad	Alta	Amorfa
Reactividad	Baja	Alta
Compresibilidad	Alta	Baja
Control estructural	Bajo	Muy alto

Las propiedades físicoquímicas de los dendrímeros se encuentran en función de la generación. La reactividad depende de los grupos funcionales presentes en la periferia por lo que a mayor generación mayor número de grupos funcionales en la periferia y por lo tanto presentará mayor reactividad, de forma similar se relaciona la solubilidad y la forma globular.

Las características químicas y estructurales que presentan los dendrímeros hacen de ellos materiales ampliamente usados en diversos campos, por lo que surge la necesidad de determinar no sólo su composición química, sino también su morfología, forma y homogeneidad empleando diversas técnicas de caracterización,<sup>17</sup> como: RMN, UV-visible, IR, espectrometría de masas, Rayos-X, fluorescencia, microscopía electrónica, entre otras.

## **2.5 Aplicaciones**

Los dendrímeros pueden ser modificados acoplando moléculas con características específicas que los hacen materiales idóneos con potencial aplicación en diversas áreas,<sup>18</sup> por ejemplo: en catálisis,<sup>19,20</sup> reconocimiento molecular,<sup>21</sup> antenas moleculares,<sup>18</sup> en sistemas biológicos como nanofármacos<sup>22,23,24</sup> en contra de tumores, bacterias y virus,<sup>25</sup> como vehículos para la liberación de fármacos,<sup>26,27,28</sup> terapia génica,<sup>29</sup> agentes de contraste en Resonancia Magnética de Imagen (IMR),<sup>30,31,32</sup> entre otras.

### **2.5.1 Dendrímeros como dispositivos en la liberación de fármacos**

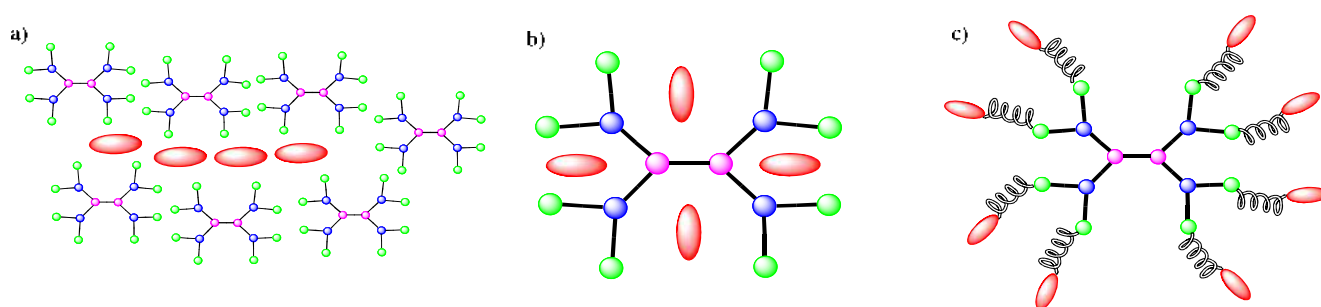
El paso de fármacos a través de las barreras biológicas está condicionado por las características fisicoquímicas de la sustancia. En particular, del tamaño o peso molecular; grado de ionización (carga eléctrica) y liposolubilidad (capacidad de disolverse en las grasas) que influyen en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos en el organismo. Los fármacos una vez administrados, se absorben en el sistema circulatorio, se distribuyen hacia los diferentes órganos (sin ser selectivo) y posteriormente son degradados para obtener metabolitos fáciles de eliminar.<sup>33</sup>

Es aquí donde radica la importancia de sintetizar partículas de tamaño determinado, con la habilidad de atravesar barreras biológicas y de dirigir el principio activo hacia órganos determinados (de forma selectiva) disminuyendo o eliminando la acumulación en otros órganos y de esta manera reducir los efectos secundarios.

Los dendrímeros pueden ser diseñados para que contengan no solo un fármaco, sino también un agente de diagnóstico o de imagen y un vector que oriente el sistema hacia determinadas áreas del organismo. Dichos dendrímeros deben cumplir con ciertas características para que puedan aplicarse a sistemas biológicos,<sup>9,15,34,35</sup> tomando en cuenta su toxicidad,<sup>36,37,38,39</sup> el tiempo de circulación en el organismo,<sup>40</sup> inmunogenicidad,<sup>24,41</sup> biopermeabilidad<sup>16,42</sup> y degradación.<sup>43,44,45,46,47</sup>

Los dendrímeros pueden ser usados como acarreadores de fármacos en alguna de las siguientes formas o por combinación de las mismas.<sup>48, 49</sup>

- Formación de redes fármaco-dendrímero (Figura 2.3a) en donde el fármaco es rodeado por varias moléculas de dendrímero protegiéndolo de la rápida absorción en el organismo.
- Encapsulación del fármaco. La forma elipsoidal o esferoidal del dendrímero crea cavidades vacías que permiten encapsular moléculas huésped. Por lo general estas cavidades presentan propiedades lipofílicas lo que genera un ambiente adecuado para interactuar con los fármacos poco solubles a través de interacciones hidrofóbicas (Figura 2.3b) Además, en estas cavidades de los dendrímeros reportados, existe una gran cantidad de átomos de nitrógeno y oxígeno los cuales pueden interactuar con el fármaco por medio de puentes de hidrógeno.
- Como profármaco, en donde un agente terapéutico se une sobre la superficie de un dendrímero por medio de interacciones electrostáticas o enlaces covalentes (conjugados dendriméricos) (Figura 2.3c) y su liberación ocurre vía química o enzimática, por ruptura de enlaces.<sup>16, 25</sup>

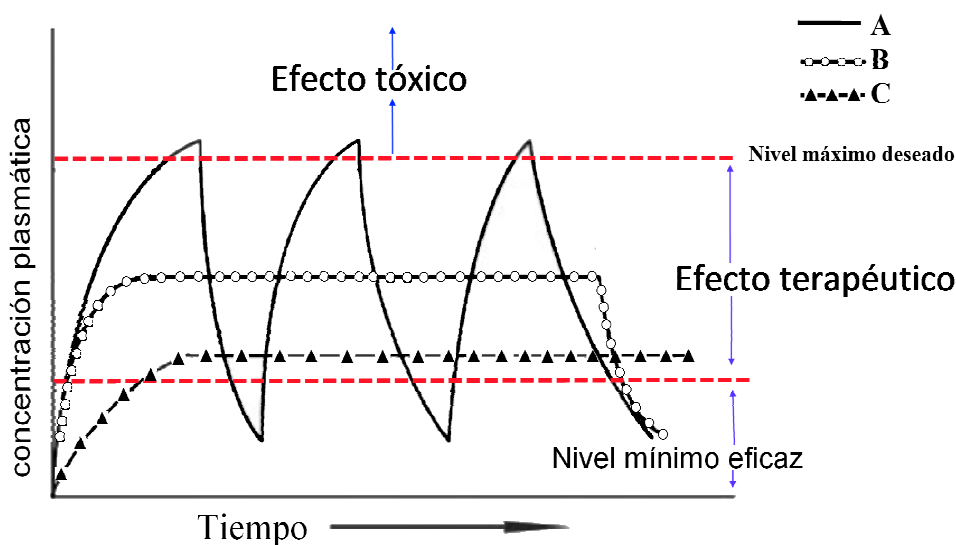


**Figura 2.3** Uso de los dendrímeros en sistemas de liberación de fármacos, a) Redes dendrímero-fármaco; b) encapsulación del fármaco en las cavidades dendriméricas y c) profármaco, enlazando el fármaco a la superficie del dendrímero por medio de enlaces covalentes.

Si bien es cierto que cualquiera de las tres estrategias del uso de dendrímeros en la liberación de fármacos presenta ventajas sobre la administración del fármaco libre, entre ellas

hay diferencias que pueden ser aprovechadas en función de las necesidades de administración. El encapsulamiento de los fármacos dentro de las cavidades o la absorción del mismo en la superficie del dendrímero por medio de interacciones electrostáticas, preservan las propiedades químicas y farmacológicas de la molécula, sin embargo, no siempre se logran liberaciones sostenidas. Por otro lado, la unión covalente del fármaco a la superficie del dendrímero ofrece la oportunidad de un mejor control en la liberación y mayor tiempo de circulación.<sup>50</sup>

En la Figura 2.4 se muestra la ventana terapéutica al administrar el fármaco asociado con el dendrímero formando complejos (B) y el fármaco asociado al dendrímero formando conjugados (C) comparada con la administración del fármaco libre (A). En el caso del fármaco libre, la concentración del fármaco en el plasma rebasa los niveles terapéuticos deseados provocando efectos tóxicos en el organismo (efectos secundarios no deseados). Sin embargo, cuando se administra el complejo o conjugado dendrimérico en el organismo la concentración del fármaco en el plasma llega al nivel terapéutico esperado y se mantiene constante, prolongando el efecto terapéutico hasta lograr su eliminación, reduciendo la dosis necesaria de fármaco y los efectos secundarios.

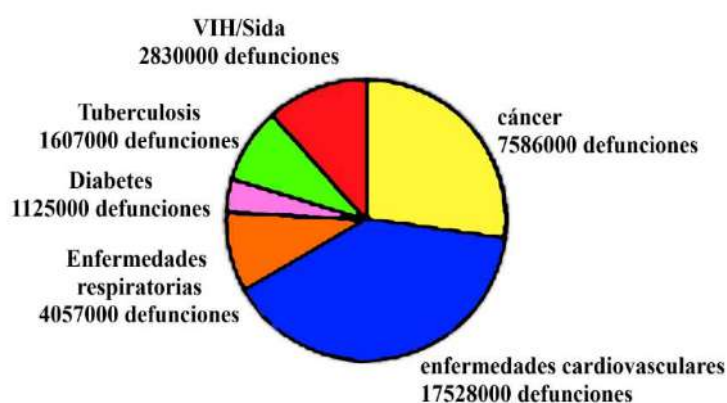


**Figura 2.4** Potencial farmacocinético de (A) dosis de un fármaco tradicional, (B) dosis de un complejo dendrímero-fármaco (C) dosis de un conjugado dendrímero-fármaco.

Dentro de la síntesis de profármacos dendriméricos, destaca el trabajo desarrollado por Yiyun en el 2005 utilizando fármacos antiinflamatorios no-esteroides<sup>51</sup> (AINES) como: ketoprofeno,<sup>52</sup> naproxeno<sup>53</sup> e ibuprofeno, los cuales son empleados en el tratamiento de síntomas asociados con osteoartritis y otras condiciones crónicas musculares. En el 2007 se reporta la incorporación de sulfametoxazol, un antibiótico empleado en el tratamiento de infecciones entéricas, del tracto urinario y respiratorio, en dendrímeros PAMAM.<sup>54</sup> Estos fármacos presentan baja solubilidad y su uso prolongado presenta efectos secundarios no deseados como: sangrado o perforación intestinal y daño renal. En estos estudios se logra aumentar la solubilidad de los fármacos al unirlos al dendrímero PAMAM en función de su generación, ofreciendo una posible reducción en los efectos secundarios.

### 2.5.2 Dendrímeros en terapia contra el cáncer.

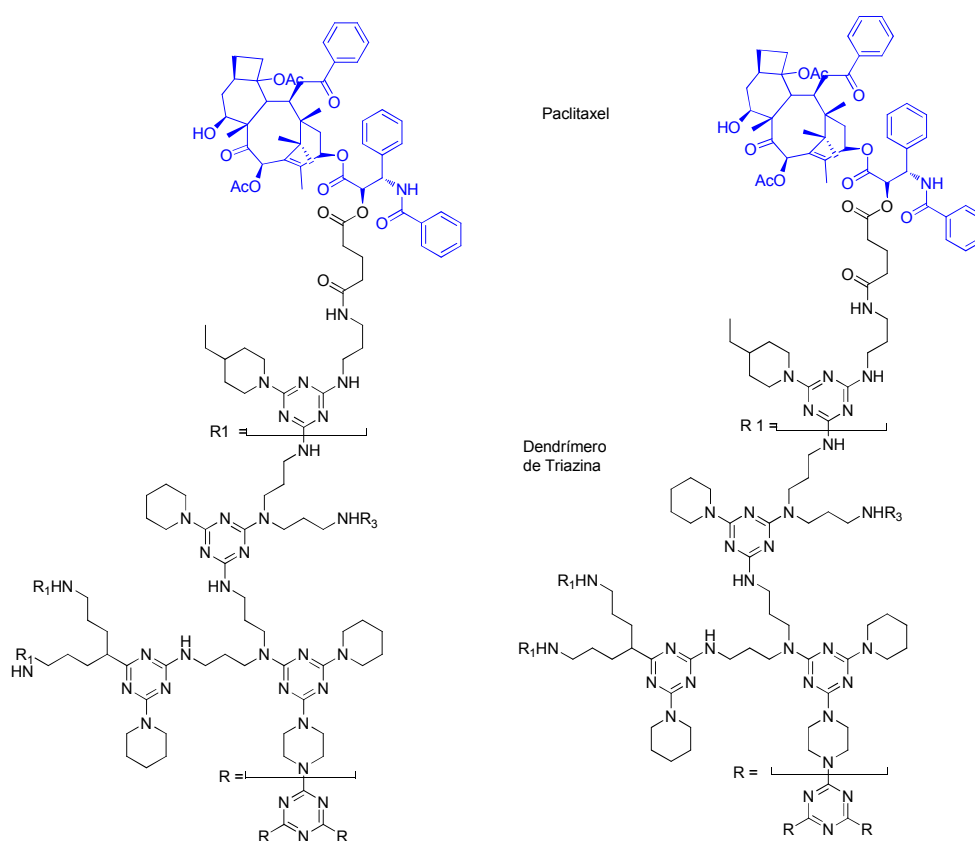
Hoy en día el diseño de nuevos conjugados dendriméricos es prometedor en el tratamiento de enfermedades crónicas como el cáncer, siendo ésta una de las primeras causas de muerte a nivel mundial (Figura 2.5). En el 2008, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 7,6 millones de defunciones (aproximadamente, un 13% del total) a causa de esta enfermedad. Entre los diferentes tipos de cáncer destacan: el cáncer de pulmón (1,4 millones); estómago (740 000); hígado (700 000); colon (610 000) y mama (460 000).y se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y pasará a 11 millones en 2030.



**Figura 2.5** Proporción de las principales enfermedades crónicas en el mundo que causan la muerte a personas menores de 70 años.

El uso de fármacos quimioterapéuticos puede ser eficaz en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, pero afecta también a células normales de todo el organismo. Por este motivo, es posible que surjan diversos efectos secundarios durante el tratamiento como daño hepático, renal, alopecia, náuseas, daño cardíaco, entre otros.

Los dendrímeros como vehículos pueden liberar altas cantidades de fármacos anticancerígenos en sitios específicos<sup>55,56</sup> con la ayuda de vectores que los dirijan y agentes de diagnóstico que ayuden a localizar el fármaco en el tumor, induciendo la apoptosis.<sup>57,58</sup> Un ejemplo de esto son los dendrímeros de triazina funcionalizados con doce unidades de paclitaxel (Figura 2.6) en la periferia unidos por enlaces éster y disulfuro los cuales presentan alta efectividad en cáncer de próstata a bajas dosis.<sup>59</sup>

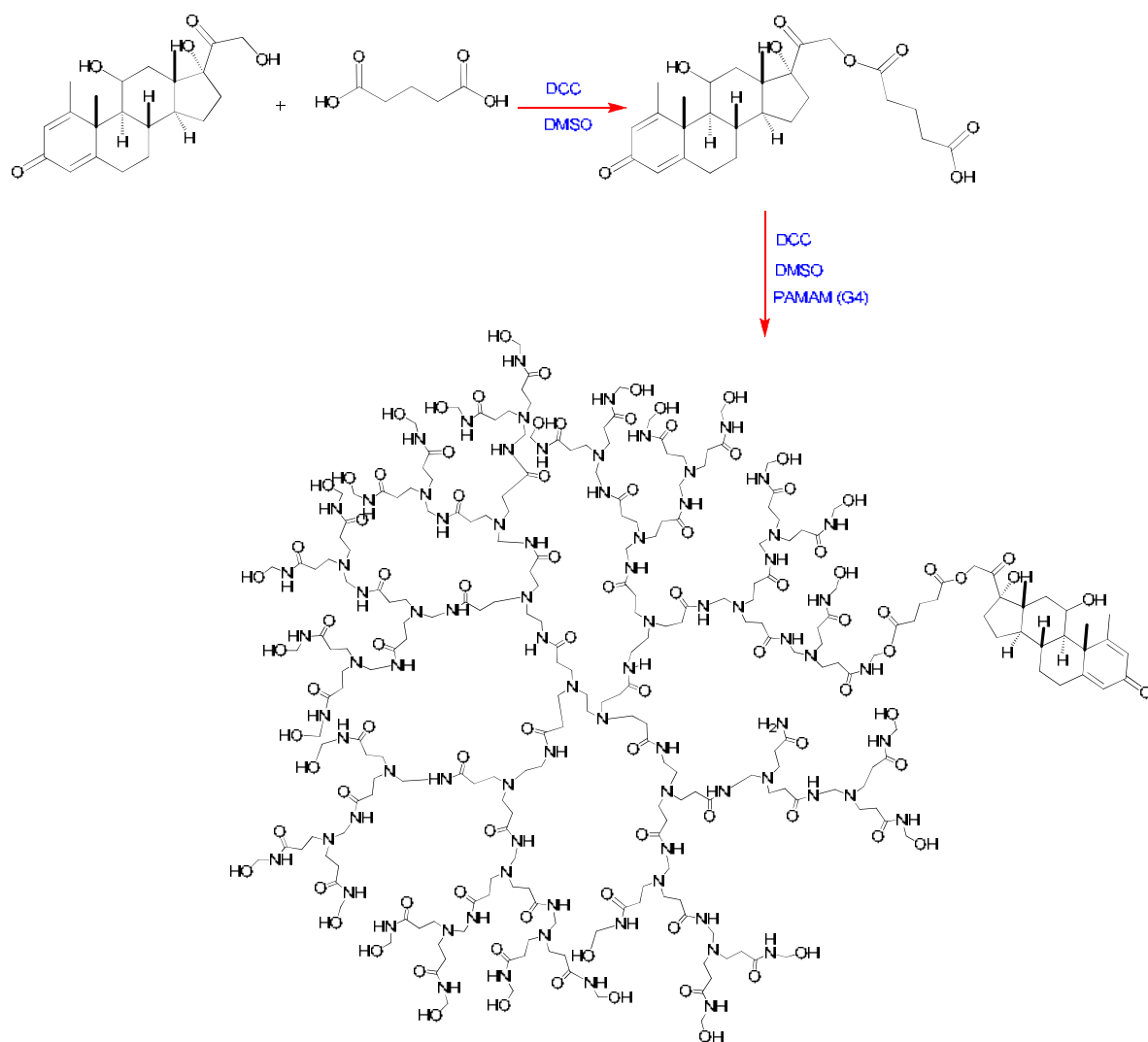


**Figura 2.6** Dendrímeros de triazina funcionalizados con paclitaxel con actividad citotóxica en cáncer de próstata.

En la actualidad el empleo de compuestos esteroideos ha ganado considerable atención en la búsqueda de nuevos fármacos que puedan ser empleados como agentes citotóxicos<sup>60</sup> y en quimioterapia.<sup>61</sup> Igualmente se han empleado como materia prima en la síntesis de bioconjugados esteroideos<sup>62</sup> que muestran amplios espectros de actividad biológica. El etinilestradiol y el 17 $\alpha$ -estradiol son ejemplo de estrógenos sintéticos que son utilizados para prevenir o reducir los síntomas de la menopausia, como anticonceptivos orales, en el tratamiento de la alopecia, y en los trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.<sup>63</sup> Además, recientemente han demostrado actividad antiproliferativa y capacidad de inducir la apoptosis.<sup>64</sup> En particular, se ha reportado la actividad citotóxica del 17 $\alpha$ -estradiol en contra de células humanas de leucemia, induciendo la apoptosis,<sup>65</sup> mientras que el etinilestradiol se ha evaluado con resultados citotóxicos en contra de células humanas cancerígenas de próstata<sup>66</sup> y de colon.<sup>67</sup>

La formación de estructuras dendriméricas funcionalizadas en la periferia con compuestos esteroideos mediante enlaces covalentes ha dado lugar a la formación de conjugados dendriméricos de especial interés en la terapia contra el cáncer ya que pueden contener no solo un fármaco que genere la actividad terapéutica dentro del organismo, sino también moléculas orientadoras como los péptidos, que dirigen al conjugado a un sitio de acción específico,<sup>57,58</sup> induciendo la apoptosis.<sup>2,59,68</sup>

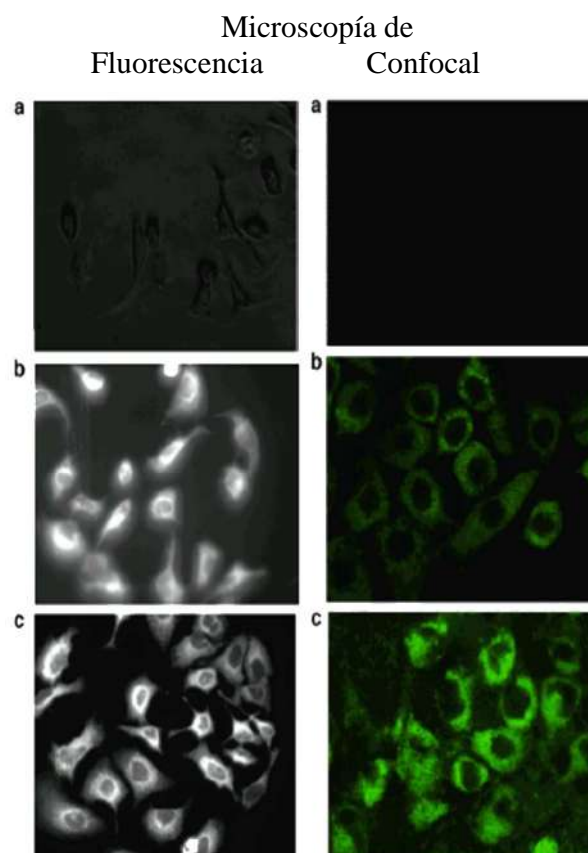
En este contexto, Khandare *et al*, describieron la síntesis y la actividad biológica del conjugado dendrímero PAMAM con doce moléculas de metilprednisolona en la periferia, demostrando su potencial aplicación como acarreador de fármacos.<sup>69</sup> La metilprednisolona es un corticosteroide con mayor actividad anti-inflamatoria que la prednisolona (Esquema 2.6).



**Esquema 2.6** Síntesis del conjugado esteroideal

Para determinar la actividad anti-inflamatoria de dichos compuestos, se adicionó al conjugado esteroideal y a la metilprednisolona libre, moléculas de fluoroisotiocianato, conocida por sus propiedades de fluorescencia, evaluando la dinámica del transporte hacia el interior de células epiteliales de carcinoma de pulmón (A549). Las células cancerígenas al ser tratadas con el conjugado esteroideal-fluoroisotiocianato muestran la rápida internalización del conjugado a los cinco minutos de exposición notando que la intensidad de la fluorescencia aumentaba gradualmente (Figura 2.7).





**Figura 2.7** Dinámica del transporte hacia el interior de células epiteliales de carcinoma de pulmón (A549) **a)** células control; **b)** células tratadas con el complejo metilprednisolona-fluoroisotiocianato y **c)** células tratadas con el conjugado metilprednisolona-fluoroisotiocianato-dendrímico.

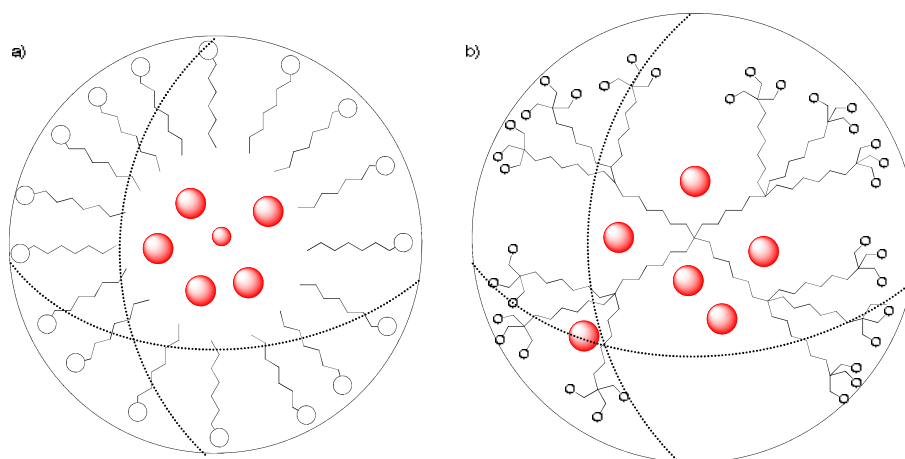
Además de las aplicaciones en el tratamiento de cáncer los conjugados esteroidales dendriméricos también han sido utilizados como sistemas en la liberación de fármacos<sup>70,71,72</sup> incrementando la afinidad de enlace con los receptores estrogénicos<sup>73</sup> y como profármacos en el tratamiento de la malaria.<sup>74</sup>

### 2.5.3 Dendrímicos como micelas unimoleculares

Adicionalmente, los dendrímicos han sido considerados como micelas unimoleculares, (Figura 2.8b) los cuales pueden ser diseñados para contener un núcleo lipofílico y una

superficie polar, como es el caso de las micelas tradicionales (Figura 2.8a) proporcionando la posibilidad de aplicarlos en la solubilización de especies insolubles en agua como es el caso de numerosos fármacos. Por lo anterior, las micelas unimoleculares son una alternativa atractiva para la liberación de fármacos encapsulándolos en el interior hidrófobo<sup>75,76,77</sup> resolviendo problemas tales como la baja solubilidad acuosa, la falta de permeabilidad, y en algunos casos mejorar la actividad de las moléculas bioactivas.<sup>78</sup>

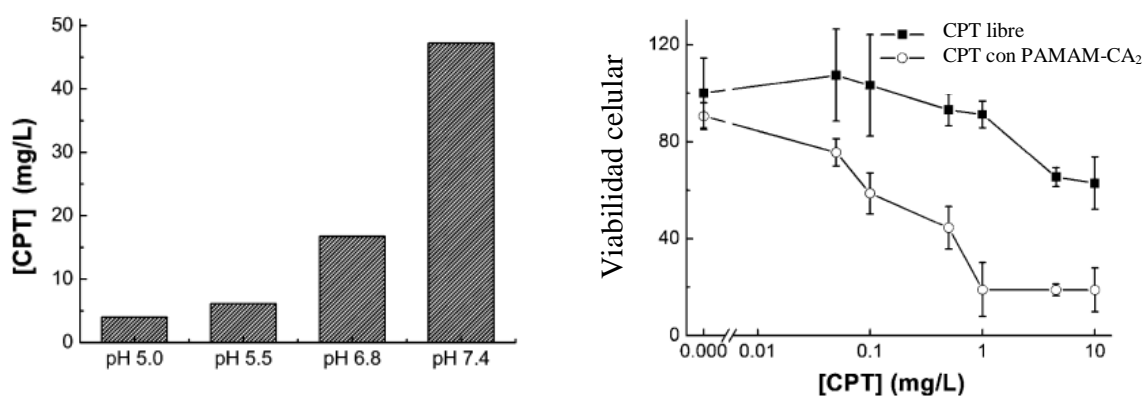
Las micelas unimoleculares son de gran importancia en la liberación de fármacos anticancerígenos debido a tres razones principales: 1) la acumulación de las micelas unimoleculares en tumores es mayor debido a la vasculatura permeable de las zonas con cáncer, incrementando el tiempo de retención en el organismo; 2) las micelas poliméricas son sensibles a cambios de pH o temperatura, lo cual es de potencial uso en la liberación de fármacos en el tratamiento del cáncer ya que muchos procesos patológicos en los tejidos cancerígenos se acompañan de aumento de temperatura o acidez en los tejidos; 3) se pueden unir receptores específicos en la periferia hidrofílica de la micela que puedan dirigir el pro fármaco de forma selectiva a las células cancerígenas.<sup>79</sup>



**Figura 2.8** a) Encapsulamiento de moléculas lipofílicas mediante la formación de una micela tradicional; b) encapsulamiento de moléculas lipofílicas en una micela unimolecular .

Desde el punto de vista arquitectónico, estas micelas unimoleculares están formadas por monómeros unidos covalentemente lo cual proporciona una mayor estabilidad frente a cambios de pH, temperatura y fuerza iónica.

Al respecto, Zhang y colaboradores<sup>80</sup> reportaron la síntesis de conjugados dendriméricos esteroidales capaces de formar micelas y encapsular moléculas anticancerígenas lipofílicas mediante la unión del dendrímero PAMAM de primera generación con dos moléculas de ácido cólico dando lugar a la formación de micelas adecuadas para encapsular la camptotecina (CPT) en medio acuoso (PAMAM-CA<sub>2</sub>) observando que la solubilidad del fármaco aumenta al aumentar el pH (Figura 2.9a) y que la actividad anticancerígena aumenta significativamente a bajas dosis del fármaco encapsulado en células de carcinoma humano de hígado (HepG2) en comparación con el fármaco libre (Figura 2.9b).

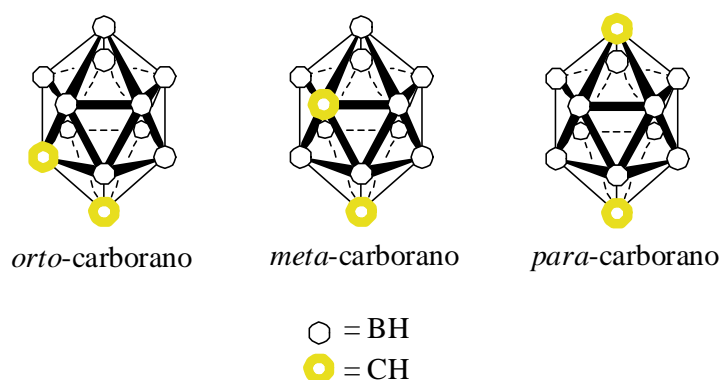


**Figura 2.9.** a) Solubilidad de la camptotecina en buffer de fosfatos con la micelas en función del pH, b) Pruebas de la actividad citotóxica en células HepG2 tratadas con el fármaco encapsulado en las micelas a 37°C por 24 h.

#### 2.5.4 Estructuras dendriméricas funcionalizadas con carboranos en la periferia.

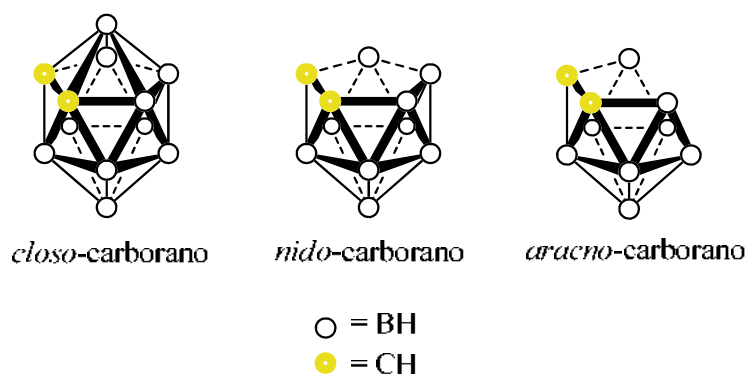
Dentro del campo de la medicina anticancerígena, la funcionalización de los dendrímeros con cluster de carboranos,<sup>81,82,83</sup> tiene potencial aplicación en la terapia de captura de neutrones por boro,<sup>84</sup> (TCNB), en el tratamiento de cáncer y en la sinovectomía por captura de neutrones de boro<sup>85</sup> (SCNB) en el tratamiento de artritis. Ambas terapias requieren la concentración de átomos de <sup>10</sup>B en células cancerosas, los cuales son capaces de absorber neutrones de baja energía, produciendo procesos de fisión nuclear que destruyen las células malignas. La incorporación en gran escala de boro por medio de sistemas dendriméricos es una opción en el tratamiento del cáncer.

Los carboranos son derivados poliédricos de boro, obtenidos por el intercambio del fragmento BH por el fragmento iso-electrónico CH. Uno de los carboranos más estudiados es el dicarba-closo-dodecarborano  $C_2B_{10}H_{12}$ , el cual adopta la forma de un icosaedro. Al carborano, cuyos carbonos están en posiciones vecinales, se les denomina *orto*-carborano, del cual se puede generar el *meta*-carborano mediante isomerización térmica ( $\sim 600\text{ }^\circ\text{C}$ ) y el *para*-carborano ( $\sim 700\text{ }^\circ\text{C}$ ) (Figura 2.10).



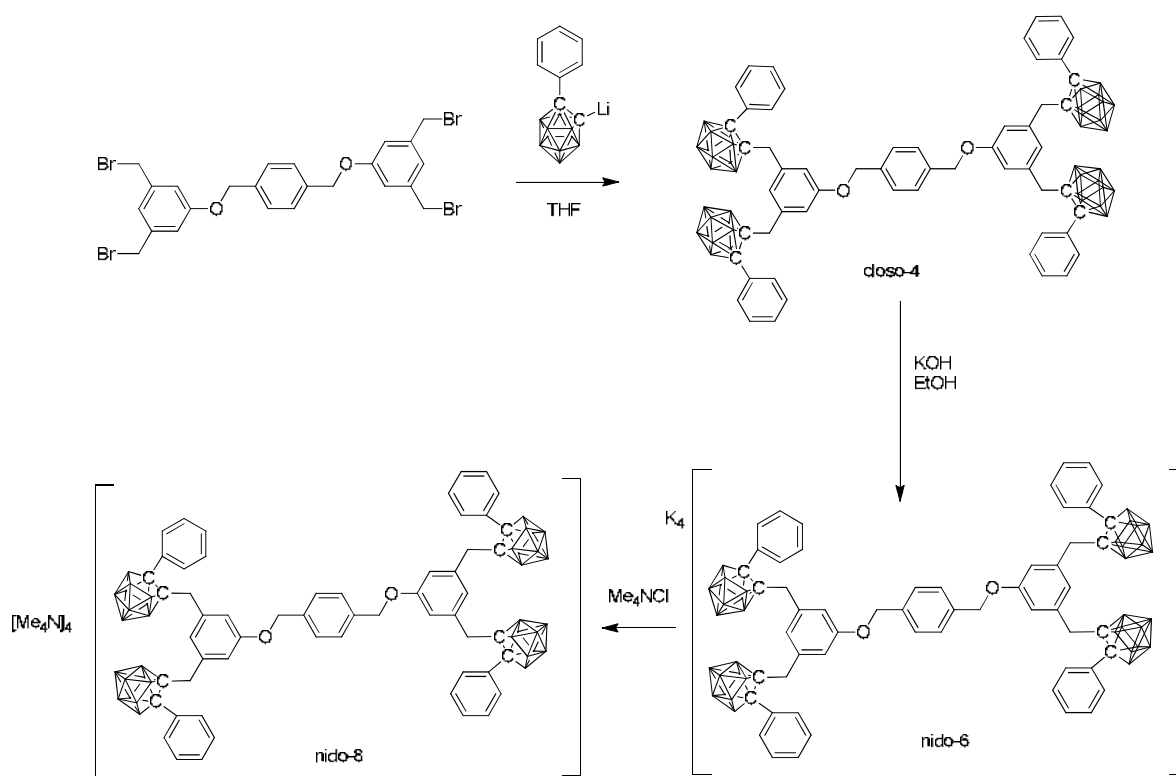
**Figura 2.10** Isómeros de carboranos.

Cuando una de las unidades BH es eliminada, se llega a la especie *nido*; al eliminar un segundo fragmento BH se obtiene la especie *aracno*.<sup>86</sup> El proceso mediante el cual se obtienen dichas especies es llamado decapitación y la ventaja principal que se presenta es que se generan especies aniónicas solubles en agua (Figura 2.11).



**Figura 2.11** Proceso de decapitación en los carboranos.

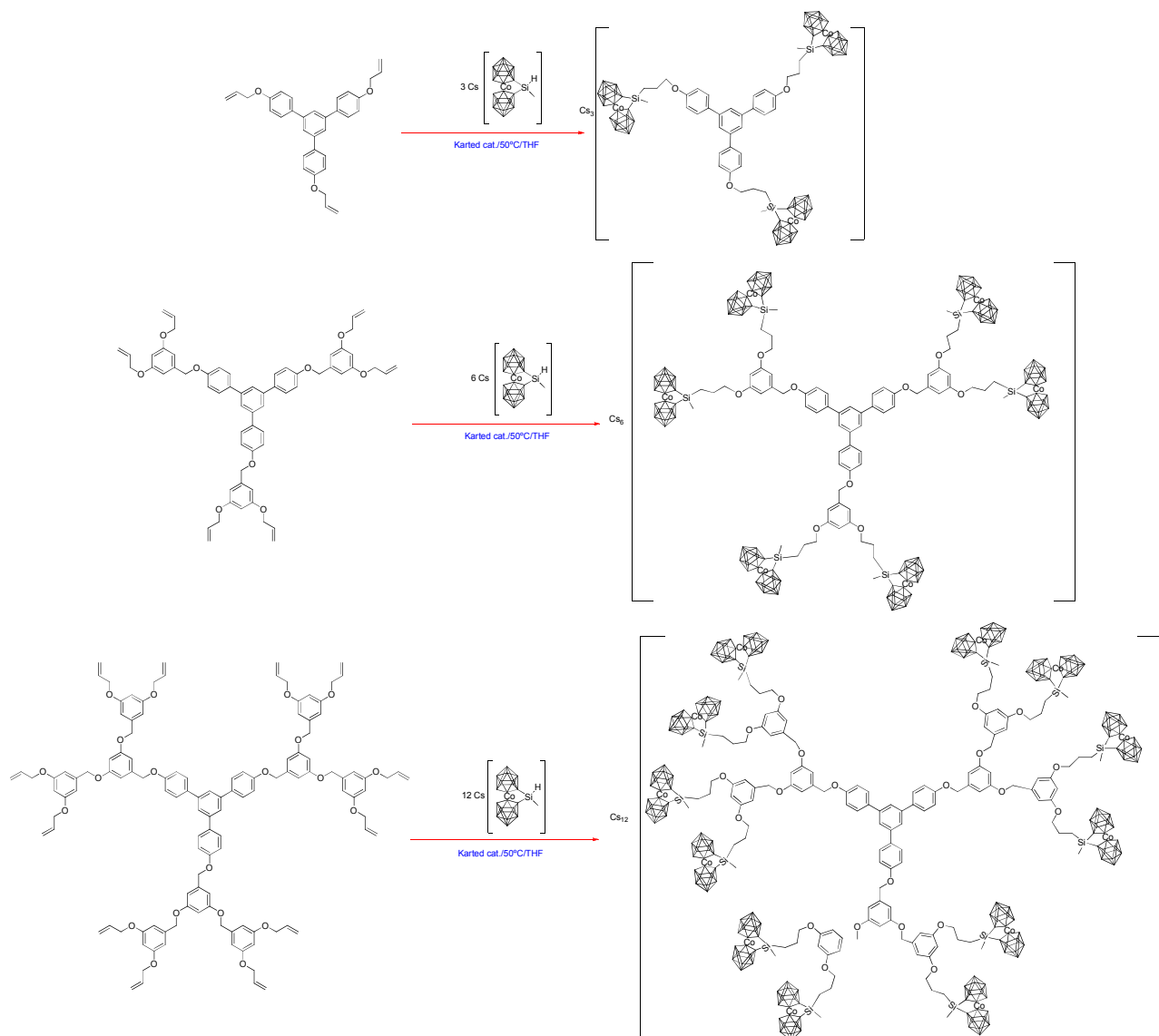
Teniendo en cuenta la necesidad de obtener especies solubles en agua con fines terapéuticos, nuestro grupo de investigación reportó la síntesis de nuevas estructuras dendríméricas con grupos alilo en la periferia para posteriormente funcionalizarlos con carboranos,<sup>87,88,89</sup> los cuales presentan propiedades de fluorescencia. Otra propiedad que se puede modular en este tipo de dendrímeros es la solubilidad pasando de la especie *closo* que es soluble en disolventes no polares a la especie *nido*, la cual al ser aniónica, presenta propiedades de solubilidad en disolventes polares (Esquema 2.7).



**Esquema 2.7** Incorporación de carboranos *closo* y la degradación de los mismos para obtener derivados polianiónicos.

Por otra parte se han llevado a cabo reacciones regioespecíficas de hidroxilación en los grupos alilo con derivados de Cs[1,1'-μ-SiMeH-3,3'-Co(1,2-C<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>10</sub>)<sub>2</sub>] para obtener metalodendrímeros con 3, 6, y 12 unidades de cobaltabisdicarbaluros en la periferia.<sup>55</sup> Los dendrímeros de partida presentaron propiedades de fotoluminiscencia a temperatura ambiente bajo irradiación ultravioleta, una vez que se llevó a cabo la funcionalización con los carboranos esta propiedad se perdió (Esquema 2.8). En este contexto, la aplicación de la ley de Lambert-Beer nos permite establecer el número de derivados metacarboranos unidos a la

periferia, De esta manera, podemos estudiar la tendencia de la absorptividad molar ( $\epsilon$ ) mediante la medición de la absorción UV-vis de las soluciones que contienen el dendrímero funcionalizado comparado con los compuestos de partida.



**Esquema 2.8** Reacción de hidrosililación para obtener metalodendrímeros con 3, 6, y 9 unidades de cobaltabisdicarballylos en la periferia

En este trabajo se describe la síntesis y caracterización de nuevas estructuras dendriméricas de primera, segunda y tercera generación con dos núcleos diferentes

(tetrametileno y aromático trisustituido), funcionalizados en la periferia con grupos OH, alilos, Cl, Br y éster como posibles plataformas en el acarreamiento de fármacos.

En primera instancia, con la finalidad de aprovechar las ventajas de la síntesis convergente, se obtuvieron tres nuevas dendronas esteroidales para su posterior acoplamiento a dos núcleos diferentes. Sin embargo, los inconvenientes presentados nos dejaron ver que la síntesis divergente es más adecuada en este caso particular. Por esta vía, cuatro dendrímeros de primera y segunda generación con núcleo de tetrametileno y cuatro más, con núcleo aromático trisustituido fueron sintetizados.

Una vez obtenidas las estructuras dendriméricas, con el objetivo de aprovechar la carga útil máxima de fármacos en los dendrímeros, conservando la monodispersidad, una estructura bien definida, y teniendo en cuenta las ventajas de la conjugación covalente en la administración de fármacos se llevó a cabo la síntesis de diversos conjugados esteroidales dendriméricos para explorar la posibilidad de potenciar la actividad citotóxica de  $17\alpha$ -etinilestradiol y  $17\alpha$ -estradiol, en líneas celulares cancerígenas. Finalmente, se evaluó la actividad citotóxica de los conjugados esteroidales dendriméricos obtenidos en líneas celulares de leucemia crónica (CEM), adenocarcinoma de seno (MCF7) y carcinoma cérvico uterino (HeLa) y en células normales de fibroblastos (BJ) como control.

Adicionalmente se presenta un protocolo preliminar para la obtención de una micela unimolecular dendrimérica a partir de los dendrímeros esteroidales con alquinos terminales y dos dendrímeros funcionalizados con grupos alilo con posible aplicación en el tratamiento del cáncer.

---

## CAPITULO 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo General

- Diseñar y establecer una ruta de síntesis para la obtención de nuevos compuestos dendriméricos tipo Fréchet partiendo de diferentes núcleos y con una funcionalidad adecuada para acoplar compuestos de interés biológico con posible aplicación en el tratamiento del cáncer.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Llevar a cabo la síntesis de compuestos dendriméricos de primera y segunda generación con núcleo de tetrametileno y núcleo de anillo bencénico trisustituido.
- Probar las estrategias sintéticas divergente y convergente en la obtención de los conjugados y determinar las mejores condiciones de síntesis.
- Funcionalizar los dendrímeros de primera y segunda generación con núcleo de tetrametileno y núcleo de anillo bencénico trisustituido con unidades de  $17\alpha$ -etinilestradiol y  $17\alpha$ -estradiol para la obtención de conjugados esteroidales dendriméricos
- Evaluar *in vitro* la actividad citotóxica de los diferentes conjugados esteroidales dendriméricos en líneas celulares cancerígenas y determinar la influencia que ejercen los diferentes núcleos y el número de generación (efecto dendrimérico) de los conjugados esteroidales dendriméricos en la actividad citotóxica
- Realizar la síntesis de micelas unimoleculares mediante la funcionalización de los conjugados esteroidales dendriméricos con fragmentos tipo PAMAM unidos por unidades de triazol como posibles profármacos en el encapsulamiento de fármacos anticancerígenos.
- Sintetizar dendrímeros con funcionalidades adecuadas para el acoplamiento con carboranos.

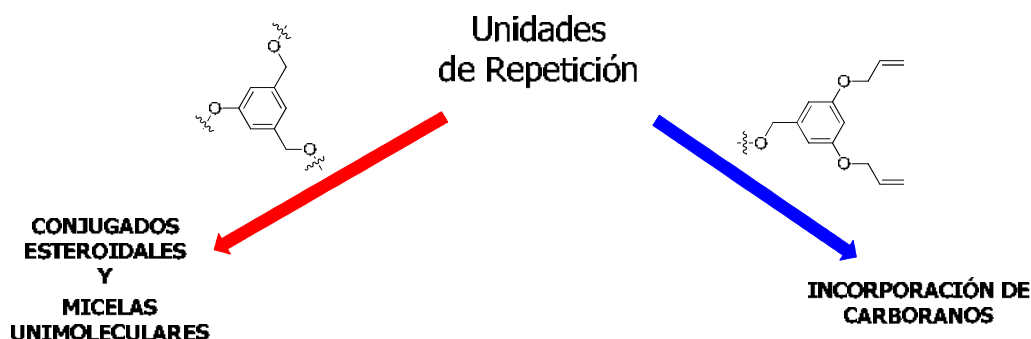


## CAPITULO 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 Síntesis de las unidades de ramificación.

La naturaleza química del dendrímero depende tanto de las ramificaciones que lo conforman como de los grupos terminales presentes en la periferia, por lo que el primer paso para la obtención de los dendrímeros fue la elección de las unidades de ramificación dependiendo de las necesidades requeridas en la estructura.

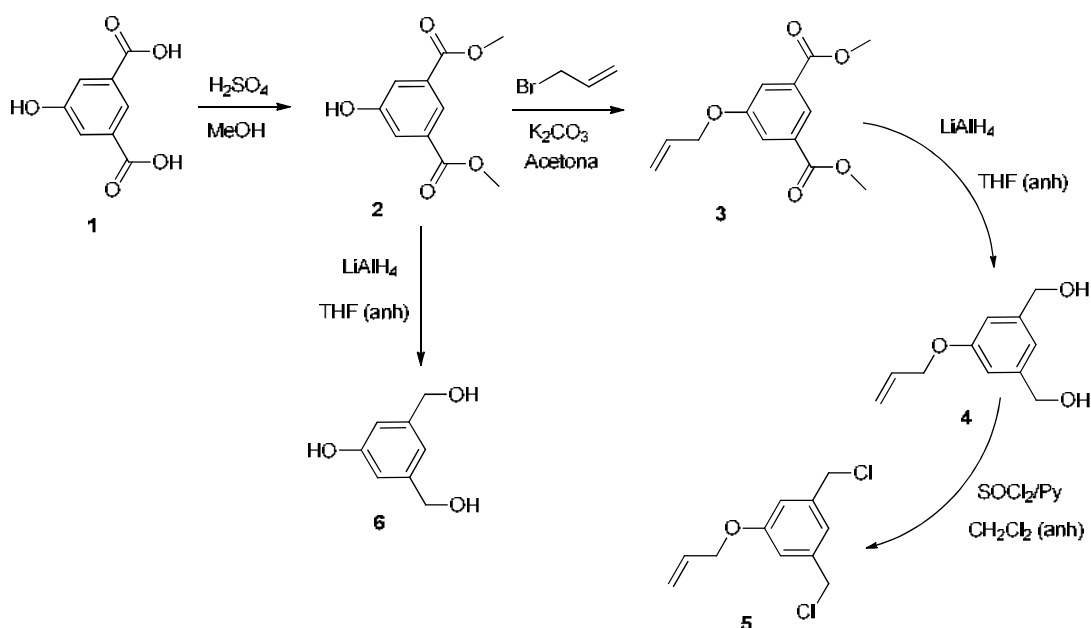
En este sentido, los dendrímeros diseñados son tipo Fréchet por lo que las unidades de ramificación seleccionadas fueron anillos aromáticos trisustituidos con un punto focal y dos ramas de crecimiento. Los conjugados dendriméricos y la micela unimolecular están formados por la unidad de ramificación del derivado del ácido 5-hidroxiisoftálico y los dendrímeros para su incorporación de carboranos con el derivado del ácido dihidroxibenzóico (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Unidades de ramificación o repetición para la síntesis de los dendrímeros.

La obtención de la unidad de ramificación ftalato de 5-hidroximetilo (**2**) (Esquema 4.1), que forma los conjugados esteroideos dendriméricos, se realizó por esterificación del ácido 5-hidroxiisoftálico (**1**) en presencia de  $H_2SO_4$  bajo reflujo de metanol, con un rendimiento del 97%.

En el Esquema 4.1 también se muestra la síntesis de la unidad de ramificación **4** con el grupo hidroxilo protegido, partiendo del ácido 5-hidroxiisoftálico (**1**) para su posterior esterificación (**2**),<sup>90</sup> seguido de la protección del hidroxilo con bromuro de alilo (**3**), la reducción de los grupos ésteres (**4**)<sup>91</sup> a hidroxilos y finalmente el cambio de grupo funcional al halogenuro para su posterior acoplamiento (**5**).<sup>83</sup> A partir de la unidad de ramificación **2**, fue posible la obtención de **6** por la reducción de los grupos ésteres presentes en la molécula.



**Esquema 4.1** Síntesis de las unidades de ramificación para la obtención de los dendrímeros y dendronas.

## 4.2 Dendronas tetrafuncionalizadas 7, 8 y 9.

### 4.2.1 Síntesis y caracterización espectroscópica de las dendronas 7, 8 y 9

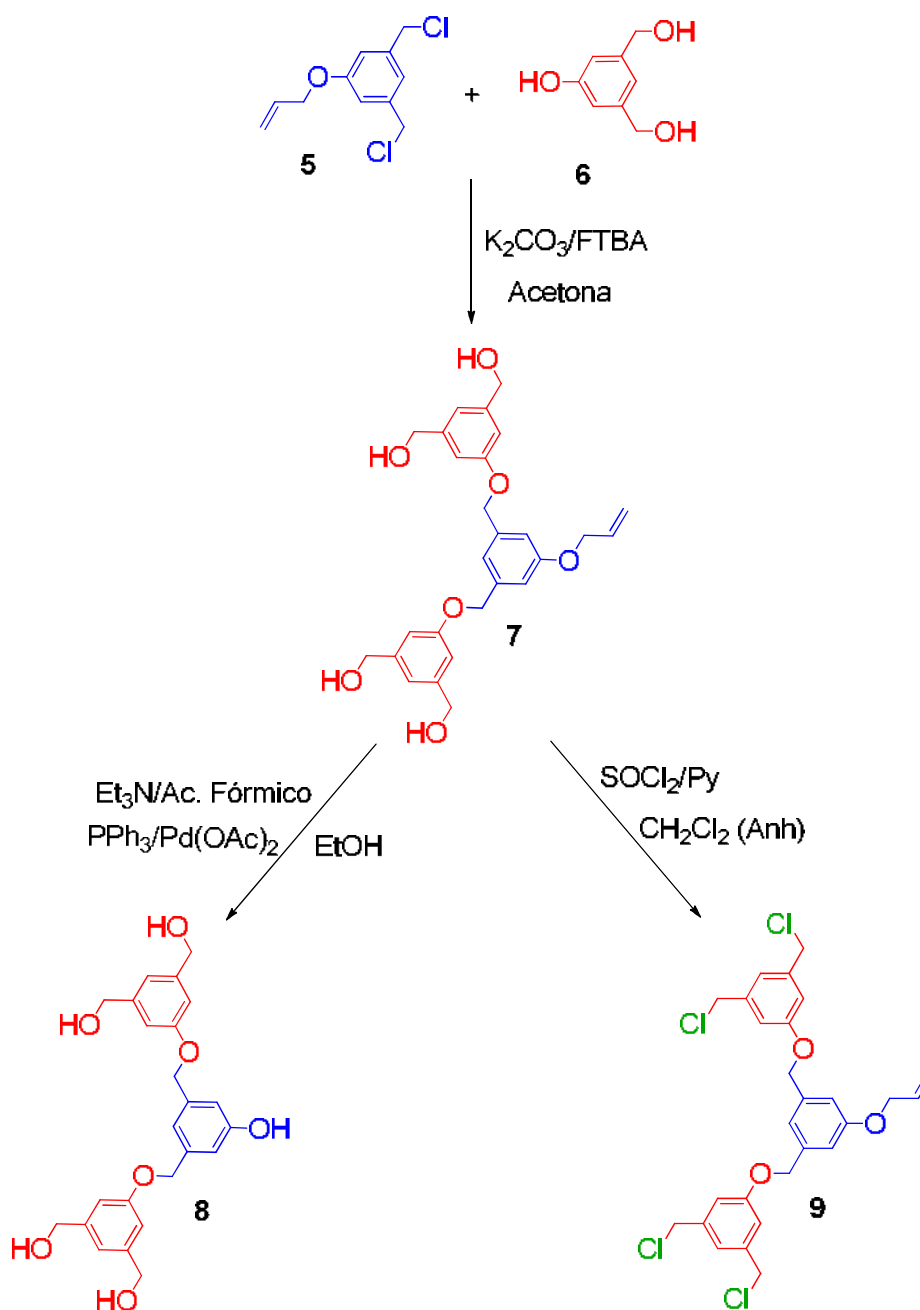
En la síntesis de los dendrímeros, el método convergente ofrece ventajas sintéticas para la obtención de productos de altas generaciones, ya que al construir macromoléculas de bajo peso molecular conocidas comúnmente como dendronas, y posteriormente acoplarlas a un núcleo, se disminuye el número de reacciones secundarias en cada paso, reduciendo la formación de subproductos y en consecuencia logrando mejorar la purificación.

En este contexto se planteó la síntesis de dendronas con grupos funcionales que permitieran el acoplamiento con unidades esteroideas y finalmente la activación del punto focal para acoplarlo al núcleo.

En el Esquema 4.2 se muestra la ruta sintética para la obtención de las dendronas **7**, **8** y **9** la cual inicia con el acoplamiento de las unidades de ramificación **5** y **6** con  $K_2CO_3$ , fluoruro de tetrabutilamonio (FTBA) en reflujo de acetona para obtener **7** con el punto focal protegido por el fragmento alílico evitando la competencia entre los grupos funcionales OH y la posible formación de subproductos en reacciones futuras. Posteriormente se realizó el cambio de grupo funcional el cual consistió en la halogenación de los alcoholes bencílicos con  $SOCl_2$ , obteniendo la dendrona **9** en un rendimiento del 65%.

El tener cloruros en la periferia permite dos posibilidades sintéticas: 1) seguir con el crecimiento del dendrímico mediante el acoplamiento de otra unidad de ramificación; o 2) el acoplamiento de la unidad esteroidea (fármaco de interés) a la dendrona seguido por la activación del punto focal y finalmente el acoplamiento con el núcleo.

La ruta alterna mostrada en el Esquema 4.2, muestra la obtención de la dendrona **8** con el punto focal activado la cual se obtiene a partir de la eliminación del grupo alilo de la dendrona **7**.



**Esquema 4.2** Ruta de síntesis para las dendronas tipo Fréchet.

En el espectro de RMN de  $^1H$  de la dendrona 7 (Figura 4.2) se observan nueve señales para los diferentes protones presentes en la molécula, apreciando la señal en 5.00 ppm para H-8 la cual corrobora la formación del compuesto mediante el enlace  $CH_2-O-$ , el protón del alcohol bencílico en la periferia (H-13) se observa en 4.53 ppm y las tres señales del

fragmento alílico, en 6.01 ppm la señal múltiple correspondiente a H-2, los protones H-1a y H-1b como señales dt en 5.36 (H-1a) ppm con  $^3J_{trans} = 17.3$  y  $^2J = 1.3$  Hz, y 5.42 (H-1b) ppm con  $^3J_{cis} = 10.5$  y  $^2J = 1.3$  Hz respectivamente y el protón H-3 (CH=CH-CH<sub>2</sub>-O) como un dd en 4.49 ppm con  $^3J = 5.3$  y 1.5 Hz. En la región aromática se pueden observar 4 señales que corresponde a los anillos aromáticos que forman las generaciones de la dendrona.

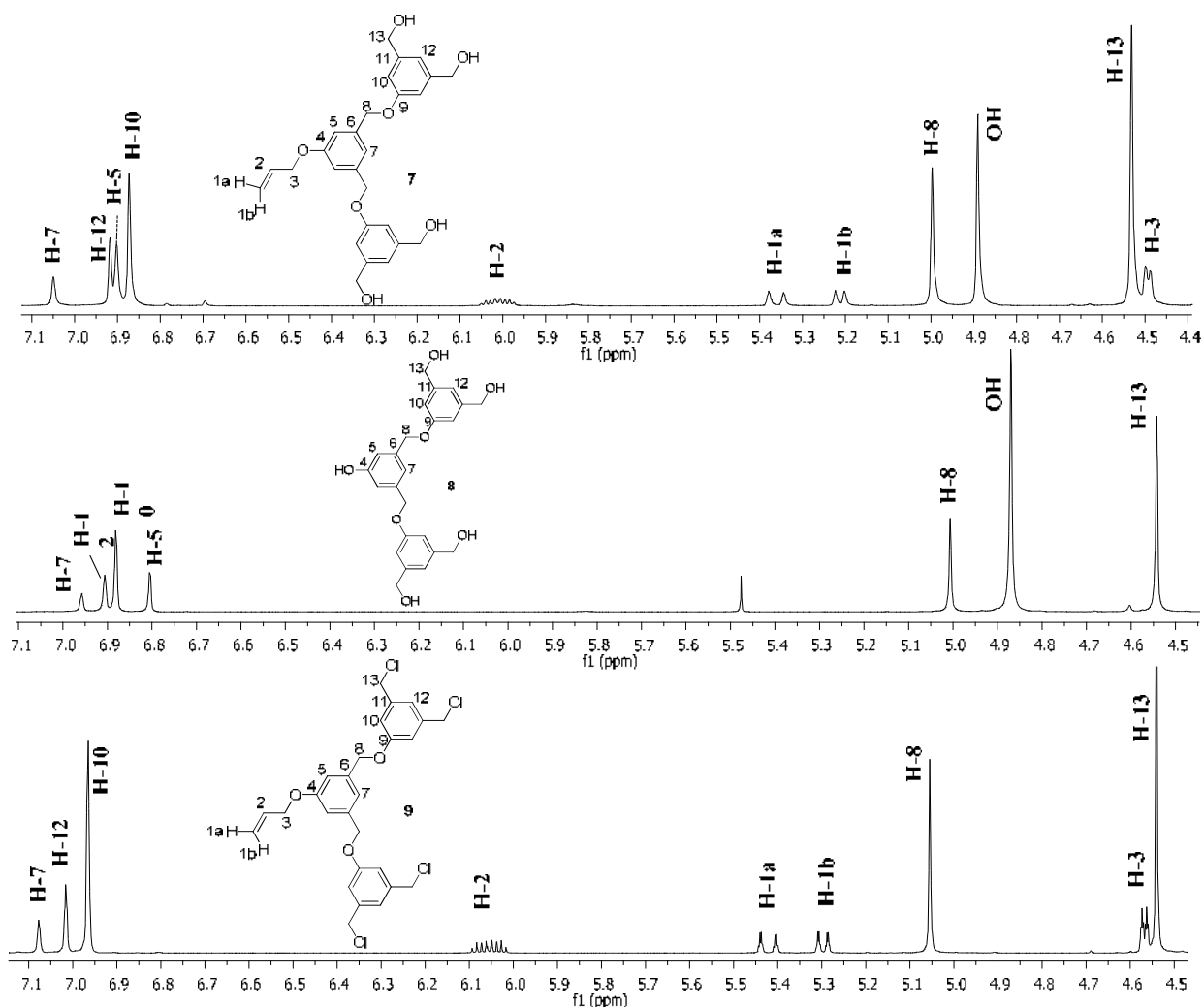
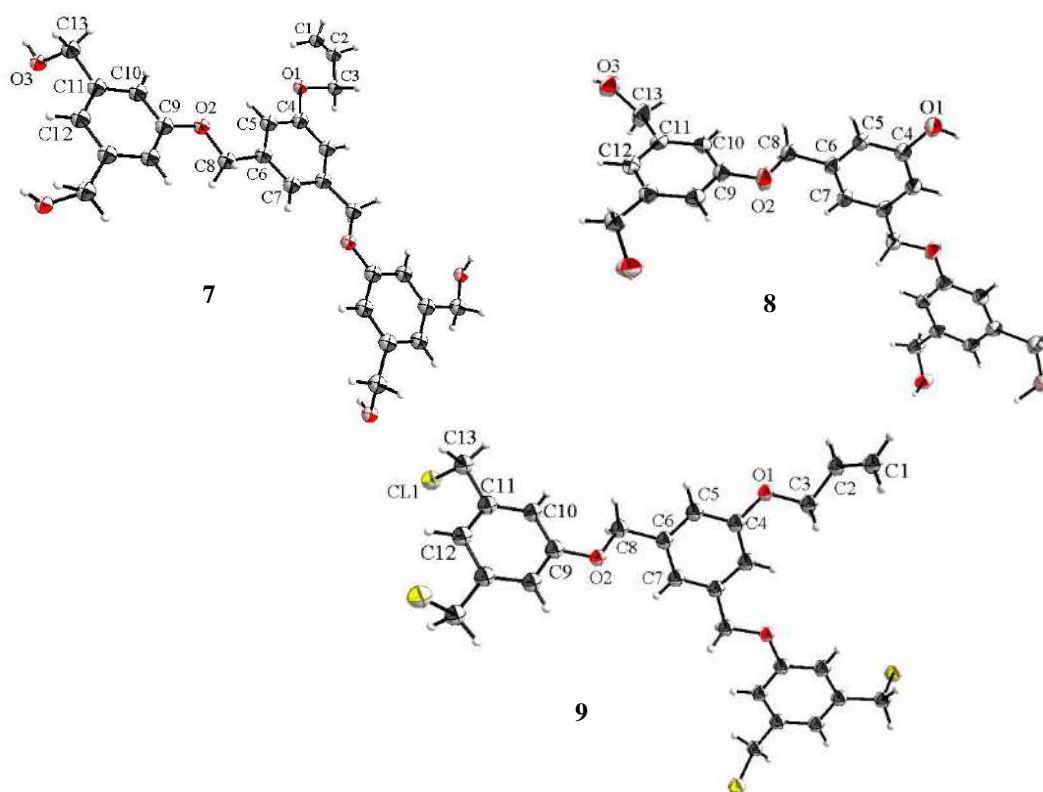


Figura 4.2 Espectro de RMN <sup>1</sup>H de las dendronas 7, 8 y 9.

Del mismo modo, las dendronas **8** y **9** fueron caracterizadas por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en donde para la dendrona **8** (Figura 4.2) se aprecia la pérdida del fragmento alílico y en 4.54 ppm la señal correspondiente al nuevo alcohol fenólico. Para la dendrona **9**, el cambio de grupo (OH a Cl) se corroboró por la desaparición de la señal para el alcohol bencílico de **7** (Figura 4.2); sin embargo, esto es más claro en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , observándose el corrimiento de la señal del C-13, en 45.9 ppm ( $\text{CH}_2\text{-Cl}$ ) con respecto al compuesto **7** ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ) en 63.7 ppm.

#### 4.2.2 Análisis por difracción de rayos-X de las dendronas tetrafuncionalizadas **7**, **8** y **9**.

Las dendronas **7**, **8** y **9** son sólidos que se lograron cristalizar adecuadamente para su análisis por difracción de rayos-X. La dendrona **7** cristalizó mediante la evaporación lenta de metanol a temperatura ambiente en un sistema triclinico *P-1* con dos moléculas por unidad asimétrica, mientras que las dendronas **8** y **9** cristalizaron en un sistema monoclinico con grupo espacial  $P2_1/n$  con cuatro moléculas por unidad asimétrica (Figura 14).



**Figura 4.3** Estructura de rayos-X de las dendronas tetrafuncionalizadas.

En el análisis de la estructura del cristal de **7** se observan enlaces de hidrógeno intermoleculares (Tabla 4.1) por la interacción de O3-H3...O3A [ $d_{O3...O3A} = 2.707 \text{ \AA}$ ] y en la dendrona **8** por la interacción de O3-H3...O3A [ $d_{O3...O3A} = 2.718 \text{ \AA}$ ] y O1A-H1A...O3 [ $d_{O1A...O3} = 2.721 \text{ \AA}$ ], considerados como enlaces de hidrógeno fuertes de acuerdo con lo reportado por Steiner y Desiraju.<sup>92,93</sup>

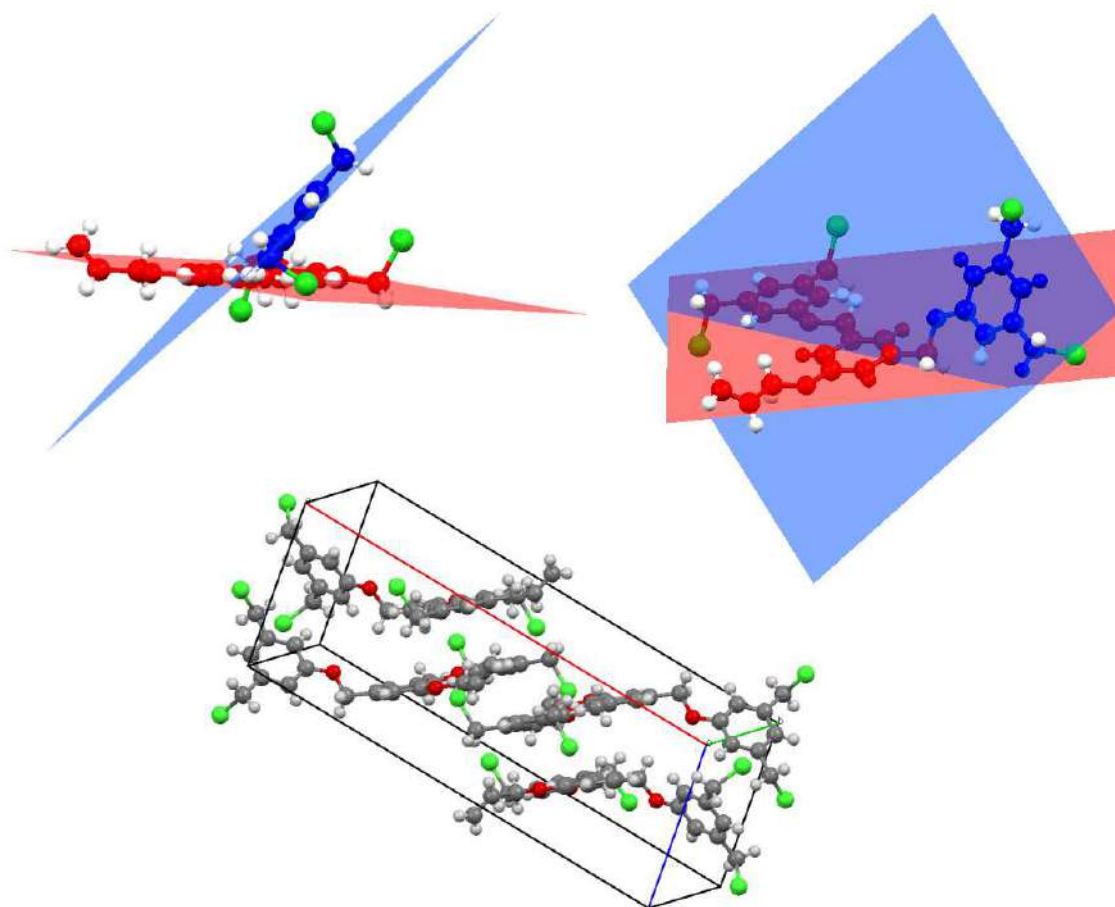
Tabla 4.1 Geometría de Enlaces de hidrógeno Intermoleculares ( $\text{\AA}$ , $^\circ$ ) del compuesto **7** y **8**.

Compuesto	D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A
<b>7</b>	O3-H3...O3A	0.839	1.898	2.707	161.59
<b>8</b>	O3-H3...O3A	1.167	2.59	2.718	164.25
<b>8</b>	O1A-H1A...O3	0.819	1.932	2.721	161.60

En la Figura 4.3 se puede observar la estructura de la dendrona **9** con cuatro cloros en la periferia con una longitud del enlace entre los átomos C13–Cl de  $1.803(3) \text{ \AA}$  y el ángulo de torsión formado entre los átomos C12—C11—C13—Cl es de  $-74.1^\circ(3)$ . Esto denota que cada cloro se encuentra en posición anti con respecto al otro en cada anillo aromático, reduciendo el impedimento estérico para la formación de las dendronas esteroideas (Figura 4.3).

El análisis de la estructura del cristal y del empaquetamiento de la dendrona **9** muestra la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular no-clásico por la interacción de C(5)—H(5)...O(1) [ $d_{O2...C2} = 2.692(3) \text{ \AA}$ ] considerados como enlaces de hidrógeno fuerte de acuerdo con lo reportado por Steiner and Desiraju.<sup>92,93</sup>

La estructura supramolecular del compuesto **9**, revela que el empaquetamiento cristalino es dirigido por la interacción CH- $\pi$  formadas por C13-H13...centroide 3 con una distancia de  $3.555(4) \text{ \AA}$  y el ángulo formado por esos átomos de  $121^\circ$ , con código de simetría  $[4544] = x, -1/2-y, -1/2+z$  que refuerza la estructura columnar a lo largo del eje “a” (Figura 4.4).

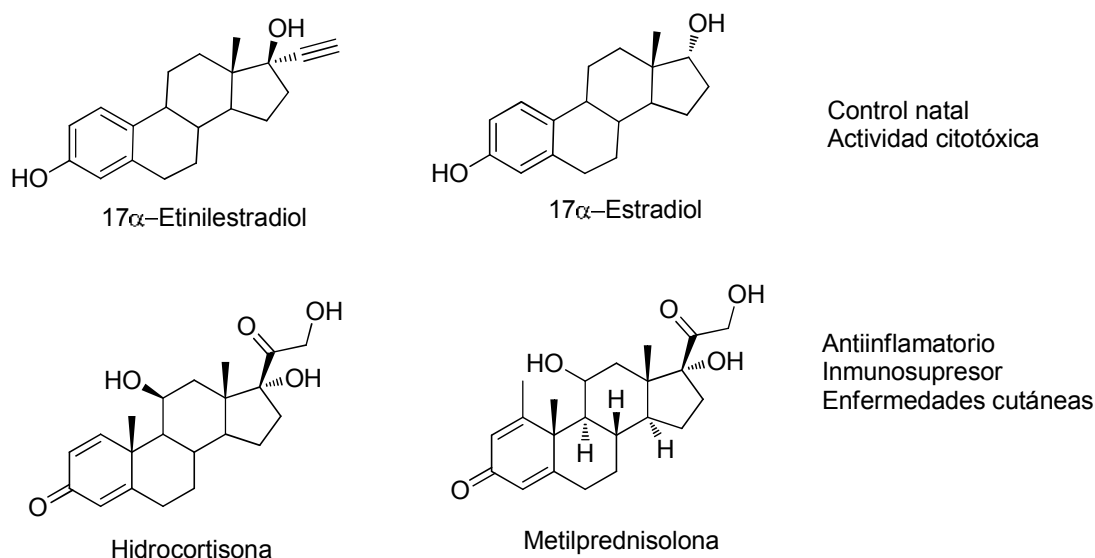


**Figura 4.4.** Arreglo cristalino de **9**.

### **4.3 Conjugados esteroidales derivados del $17\alpha$ -etinilestradiol y del $17\alpha$ -estradiol.**

Actualmente existen en el mercado diversos compuestos esteroidales con un amplio espectro terapéutico en enfermedades cutáneas, como antiinflamatorios e inmunosupresores. Algunos estrógenos sintéticos como el  $17\alpha$ -etinilestradiol y  $17\alpha$ -estradiol se han utilizado para prevenir o reducir los síntomas de la menopausia o en el control natal, así como también en el tratamiento de enfermedades crónicas como el cáncer de seno, prostático, colon y leucemia entre otras (Figura 4.5).





**Figura 4.5.** Ejemplos de compuestos esteroidales con actividad terapéutica.

Debido al amplio efecto terapéutico, la química de los esteroides ha alcanzado nuevos horizontes al encontrar en la ciencia de materiales una nueva área de oportunidad en el desarrollo de conjugados dendriméricos, como sistemas de liberación de fármacos al mostrar alta biocompatibilidad, larga vida media y baja toxicidad en el organismo,<sup>94,95,96,97</sup> además de que pueden ser empleados como agentes citotóxicos y en quimioterapia.

La gran cantidad de grupos funcionales en la periferia, hace a los dendrímeros moléculas idóneas para la conjugación con numerosos fármacos. Una vez que es administrado el fármaco, la liberación dentro del organismo puede ocurrir vía química o enzimáticamente. Cuando el fármaco es encapsulado o unido al dendrímero por medio de interacciones electrostáticas, la liberación del fármaco en el organismo es rápida por el simple cambio de pH, y el efecto terapéutico es menor que cuando se une el fármaco por medio de enlaces covalentes.

Un ejemplo de esto es el publicado por Kandare et al.,<sup>69</sup> en el cual describe la síntesis de un conjugado dendrimérico con doce moléculas de metilprednisolona. Sin embargo al tener un dendrímero con alto impedimento estérico para acoplar moléculas voluminosas como los

esteroides, no se logra la carga máxima del esteroide. Debido a la dificultad de incorporar fármacos en la estructura dendrímica con alto impedimento estérico, en este trabajo se realizó la síntesis de estructuras dendrímicas tipo Fréchet que puedan contrarrestar los efectos estéricos en la conjugación de fármacos voluminosos.

Teniendo en cuenta el efecto terapéutico que presentan el  $17\alpha$ -etinilestradiol y  $17\alpha$ -estradiol se realizó la síntesis de tres dendronas esteroidales (**10**, **11** y **12**) y ocho conjugados esteroidales dendrímicos de los cuales cuatro están formados por ftalato de 5-hidroximetilo (**2**) como unidad de ramificación y un núcleo de tetrametileno flexible de primera (**20**, **21**) y segunda generación (**22** y **23**), y los otros cuatro conjugados con núcleo bencénico trisustituido de G0 (**27**, **28**) y G1 (**29**, **30**).

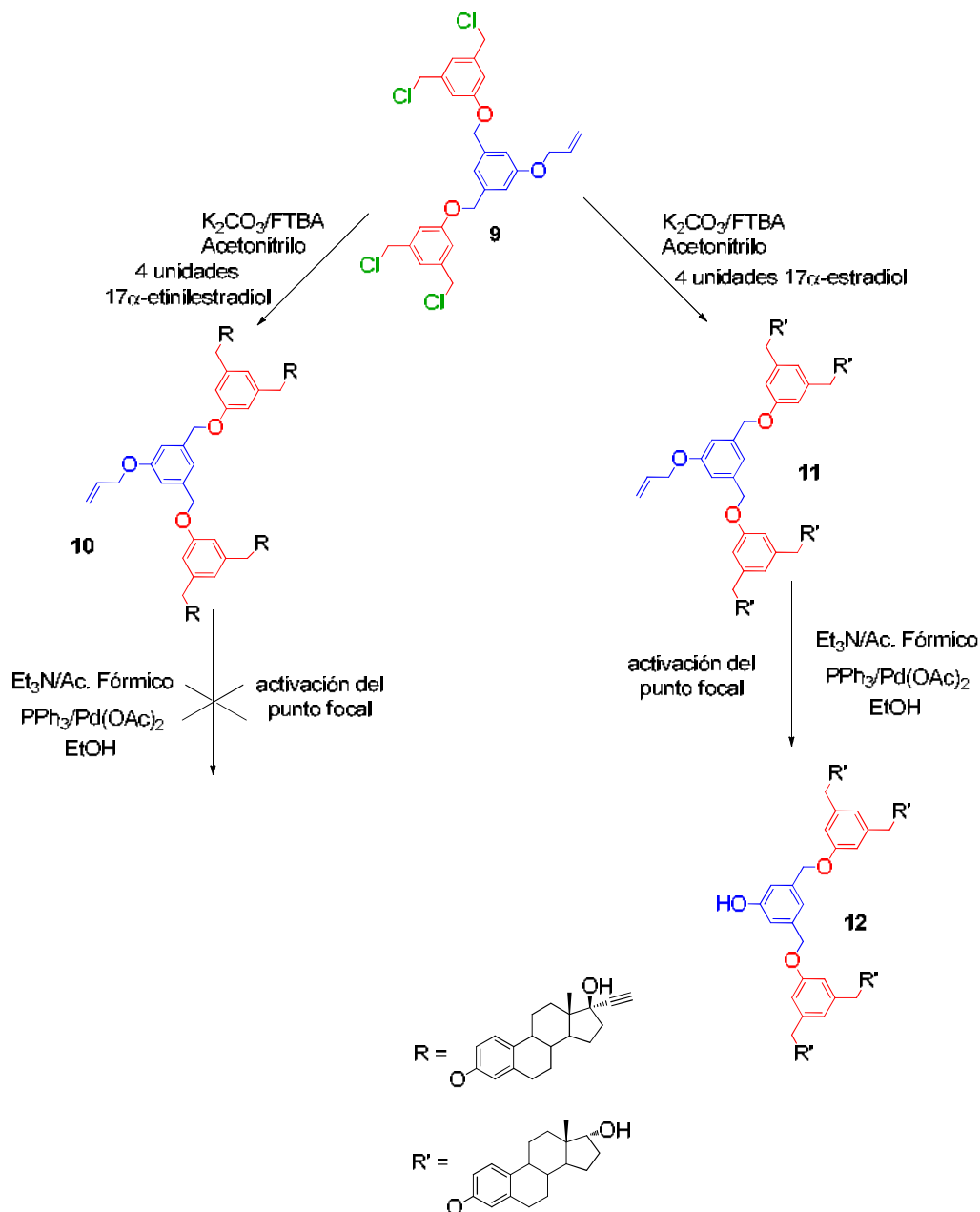
De esta forma, al tener estructuras dendríticas con diferentes características estructurales es posible evaluar el efecto del núcleo y el efecto dendrímico (multivalencia, tamaño y estructura bien definida) en la actividad citotóxica del  $17\alpha$ -etinilestradiol y el  $17\alpha$ -estradiol, aún cuando los alcances de este trabajo no impliquen pruebas de liberación.

#### **4.3.1 Síntesis de las dendronas esteroidales 10, 11 y 12.**

La síntesis de las dendronas esteroidales (Esquema 4.3) se llevó a cabo mediante el acoplamiento de la dendrona tetraclorada **9** con cuatro equivalentes de ambos esteroides en  $K_2CO_3$ , FTBA, a reflujo de acetonitrilo, obteniendo las dendronas derivadas de  $17\alpha$ -etinilestradiol **10** y  $17\alpha$ -estradiol **11** en un rendimiento del 94 % en ambo casos.

Una vez obtenidas las dendronas esteroidales, el siguiente paso de reacción propuesto fue la activación del punto focal, por la eliminación del fragmento alílico de ambas dendronas esteroidales **10** y **11** mediante la adición de acetato de paladio (0) como catalizador,  $Ph_3P$  y una mezcla de ácido fórmico:trietilamina en etanol como disolvente. Al tener el punto focal activado, se obtiene la posibilidad de acoplarlas a diferentes núcleos reduciendo la formación de subproductos y en consecuencia facilitar su purificación. Sin embargo, solo se obtuvo la desprotección de la dendrona esteroideal **11**, obteniéndose a la dendrona **12** para posteriores

acoplamientos a diversos núcleos en un rendimiento del 51%. En el caso de la dendrona derivada del  $17\alpha$ -etinilestradiol (**10**) no se obtuvo la desprotección del grupo hidroxilo debido a que existe una competencia entre el triple enlace presente en el esteroide y el doble enlace del grupo alilo.

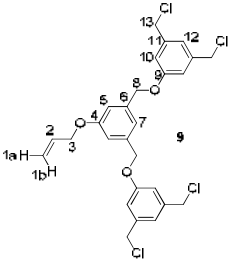
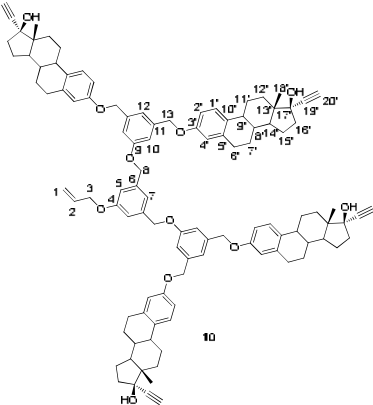


Esquema 4.3 Ruta de sntesis para las dendronas esteroidales.

4.3.1.1 Caracterización espectroscópica de la dendrona esteroidal **10** derivada del 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

La caracterización de la dendrona **10** se realizó por comparación de los desplazamientos de RMN de las dendronas y precursores así como del esteroide de partida. En la Tabla 4.1 se comparan algunos desplazamientos químicos de la dendrona tetraclorada **9**, la dendrona esteroidal **10** con cuatro unidades de etinilestradiol en la periferia y el esteroide de partida, notando en cada caso los principales cambios en el desplazamiento de las señales del C3' del anillo aromático del esteroide y del C13 de la dendrona, involucrados en la conjugación.

**Tabla 4.1** Desplazamientos químicos  $\delta$  (ppm) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  a 500 y 125 MHz de las dendronas **9**, **10** y el 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

	Compuesto	17 $\alpha$ -etinilestradiol	<b>9</b>	<b>10</b>		
	Posición	$^1\text{H} (^{13}\text{C})$	$^1\text{H} (^{13}\text{C})$	$^1\text{H} (^{13}\text{C})$		
	<b>1</b>	--	1a 5.42	1a 5.28		
	<b>D</b>		1b 5.30	1b 5.41		
	<b>E</b>	<b>2</b>	--	6.05(133.1)	6.05(133.1)	
	<b>N</b>	<b>3</b>	--	4.57(69.0)	4.55(68.9)	
	<b>D</b>	<b>5</b>	--	6.97(113.5)	6.96(113.4)	
	<b>R</b>	<b>7</b>	--	7.07(118.7)	7.04(118.7)	
	<b>O</b>	<b>8</b>	--	5.04(69.9)	5.04(69.9)	
	<b>N</b>	<b>10</b>	--	6.96(115.1)	7.00(113.2)	
	<b>A</b>	<b>12</b>	--	7.02(121.3)	7.07(118.8)	
		<b>13</b>	--	4.54(45.8)	5.00(69.8)	
		<b>E</b>	<b>1'</b>	7.20(126.3)	--	7.20(126.5)
		<b>S</b>	<b>2'</b>	6.71(111.5)	--	6.76(112.4)
		<b>T</b>	<b>3'</b>	(157.4)	--	(156.7)
		<b>E</b>	<b>4'</b>	6.63(113.8)	--	6.70(114.9)
<b>R</b>		<b>6'</b>	2.85(29.8)	--	2.85(29.9)	
<b>O</b>		<b>17'</b>	(79.8)	--	(79.9)	
<b>I</b>		<b>18'</b>	0.88(12.7)	--	0.88(12.8)	
<b>D</b>		<b>20'</b>	2.60(74.0)	--	2.60(74.1)	

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la dendrona esteroidea **10** (Figura 4.4) exhibe tres señales que corresponden al anillo aromático del esteroide: en 7.20 (H-1'), en 6.76 ppm (H-2') y en 6.70 (H-4'). En 2.60 y 0.87 ppm se aprecian las señales que corresponde al alquino (H-20') y al metilo (H-18'), los cuales coinciden con los descritos en la literatura para el esteroide de partida.<sup>98,99</sup>

La señal para el protón H-13, proporciona evidencia del acoplamiento del esteroide a la dendrona ya que la señal en 4.54 ppm en la dendrona de partida se desplaza a 5.00 ppm por la formación del enlace  $\text{CH}_2\text{-O}$ . Se observan también las señales del fragmento alílico y los protones correspondientes a la dendrona, manteniéndose los desplazamientos similares con respecto a la dendrona tetraclorada **9**.

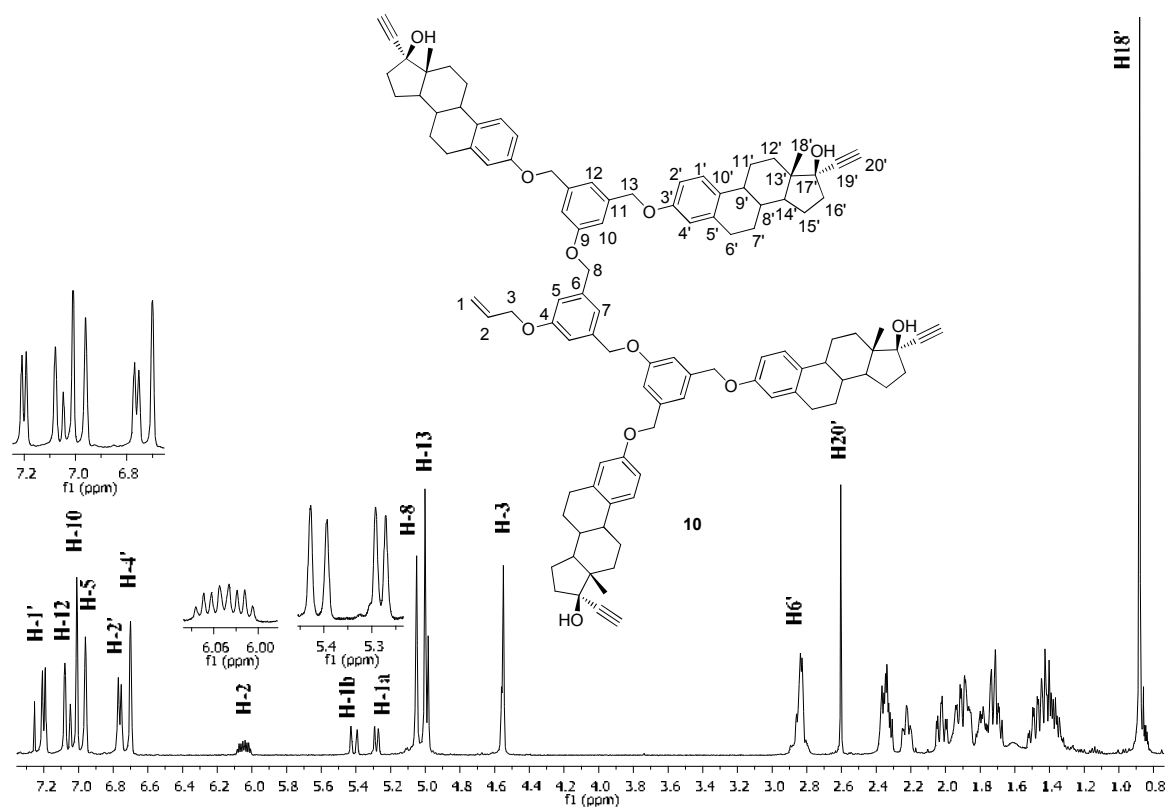


Figura 4.4. Dendrona esteroidea derivada del 17 $\alpha$ -etinilestradiol **10**.

En la Figura 4.5] se muestra el espectro de dos dimensiones COSY, el cual resulta de utilidad para la asignación de algunas señales de los protones aromáticos del fragmento esterooidal y los alílicos de la dendrona **10**.

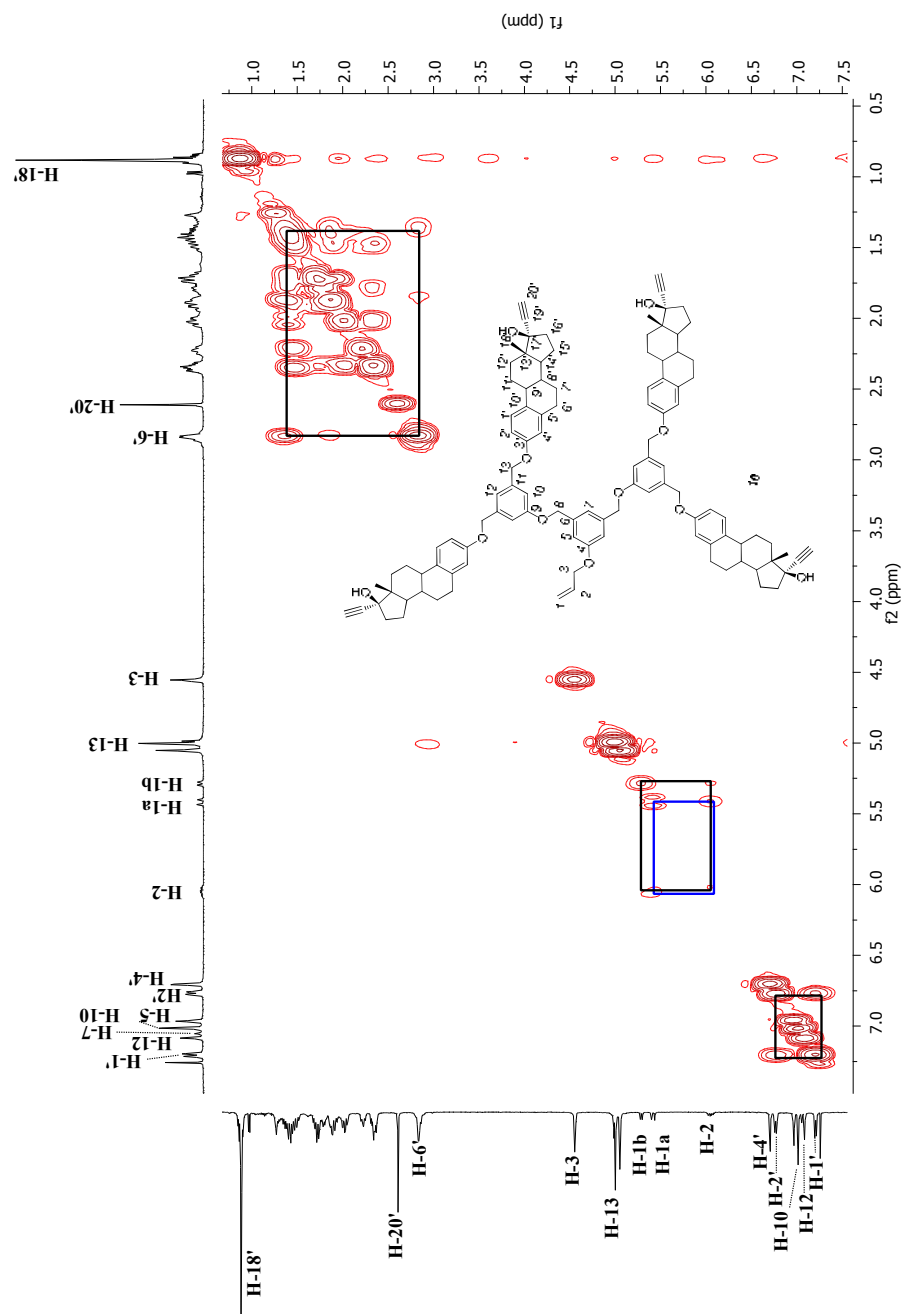


Figura 4.5 Espectro COSY de la dendrona **10** a 500 MHz en CDCl<sub>3</sub>

La asignación de las señales en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para **10** se realizó mediante el empleo simultáneo de experimentos DEPT  $90^\circ$ ,  $135^\circ$  (Figura 4.6) y técnicas en dos dimensiones como HETCOR (Figura 4.7). En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtenido por DEPT  $90^\circ$  se observan once señales en fase positiva que corresponden a los diez CH presentes en la molécula, mientras que en el espectro DEPT  $135^\circ$  se muestran doce señales en fase positiva correspondientes a los once metinos y un metilo, los cuales comparando con el espectro de DEPT  $90^\circ$  permiten determinar la señal del metilo. Por otra parte se observan diez señales en fase negativa que corresponden a los metilenos presentes en la dendrona **10**.

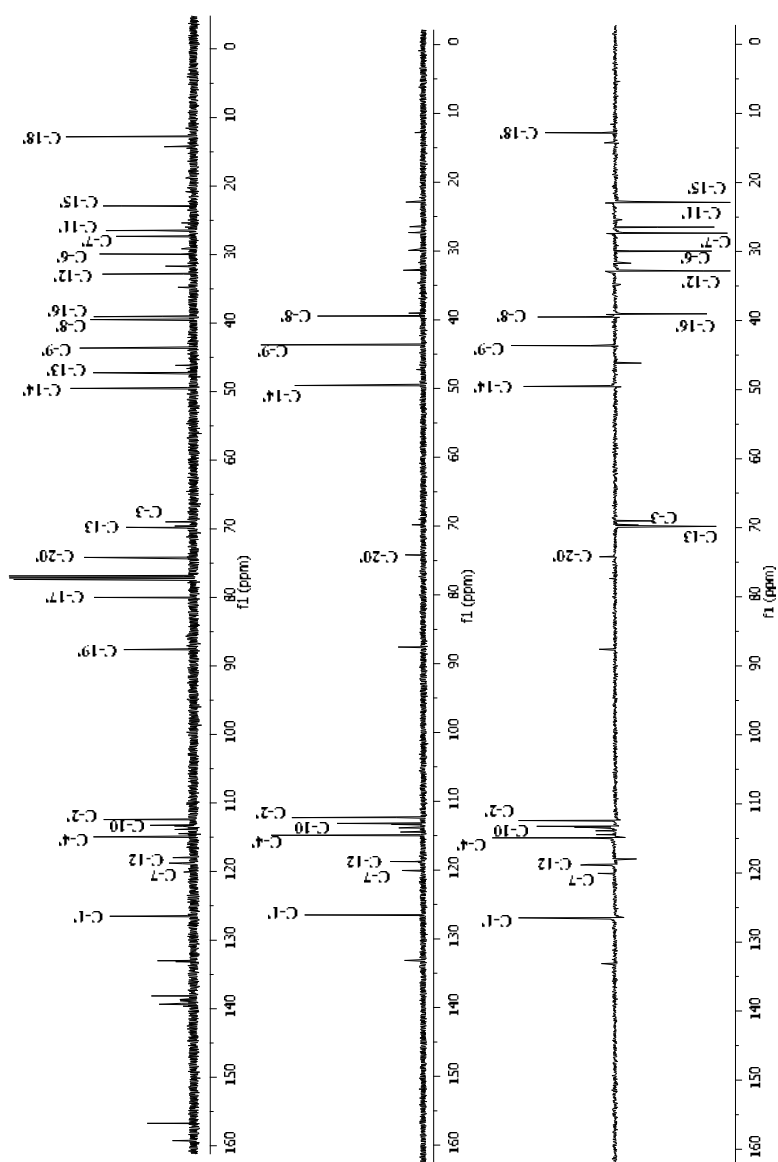


Figura 4.6 Espectro  $^{13}\text{C}$ , DEPT  $90^\circ$  y  $135^\circ$  de la dendrona **10** a 125 MHz en  $\text{CDCl}_3$

Por medio del espectro en dos dimensiones HETCOR (Figura 4.7) se determinaron inequívocamente las correlaciones heteronucleares a un enlace de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  para las señales correspondientes al anillo aromático del esteroide y para los dos fenilos de la dendrona **10**.

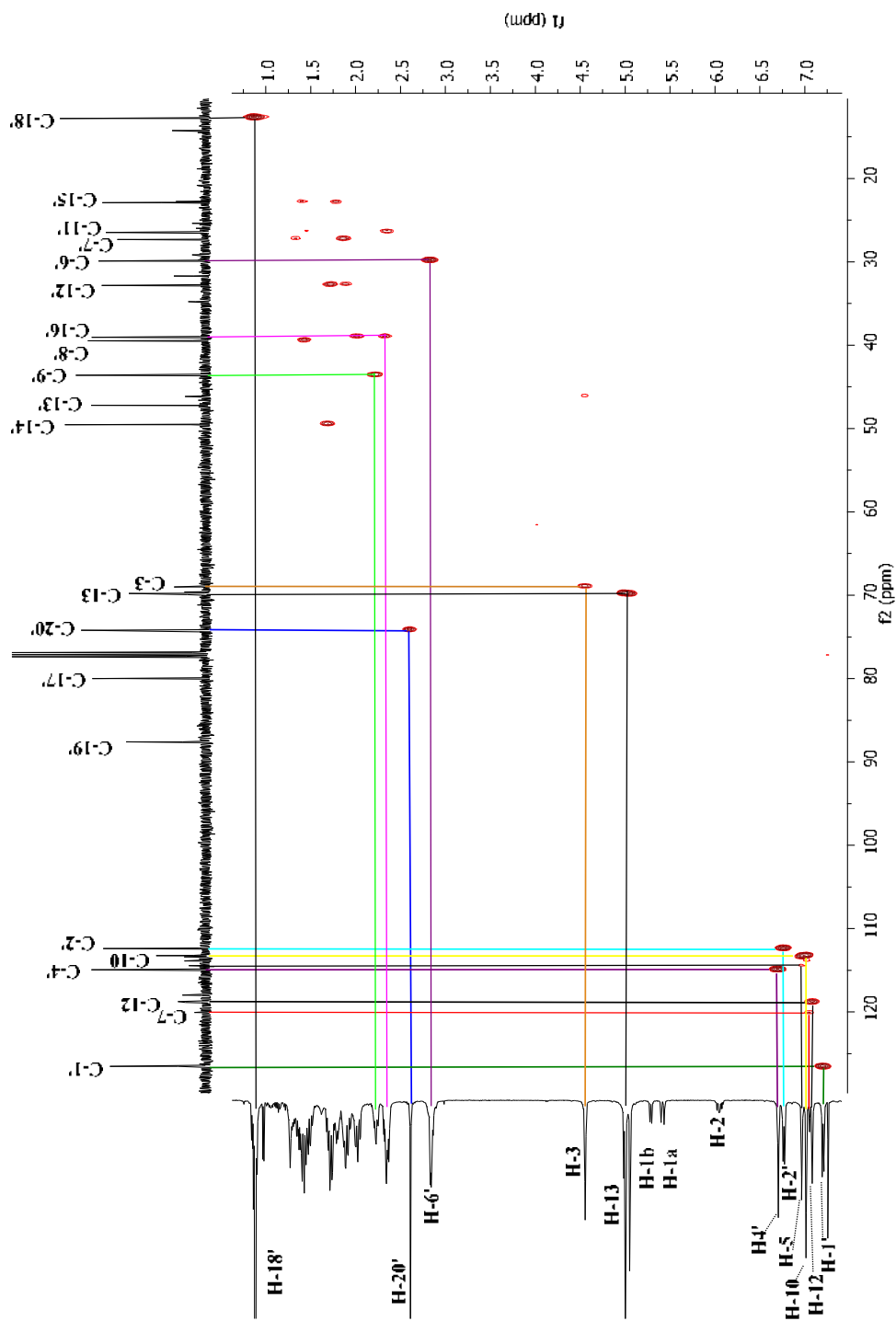


Figura 4.7 Espectro HETCOR de la dendrona **10** a 125 MHz en  $\text{CDCl}_3$



4.3.1.2 Caracterización espectroscópica las dendronas esteroidales **11** y **12** derivadas del 17 $\alpha$ -estradiol.

La caracterización de las dendronas esteroidales **11** y **12** se realizó de manera análoga a **10**. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para la dendrona **11** (Figura 4.8), se observan las señales características del grupo alílo así como las señales correspondientes al fragmento esteroidal, en la región alifática. La señal en 4.99 ppm para H-13, indica la formación de la dendrona por el nuevo enlace  $\text{CH}_2\text{-O}$ , lo cual se corrobora en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  con la señal para C-13 en 69.8 ppm.

La activación del punto focal para la obtención de la dendrona **12** se pudo corroborar en el espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 4.8) el cual no muestra las señales correspondientes al fragmento alílico.

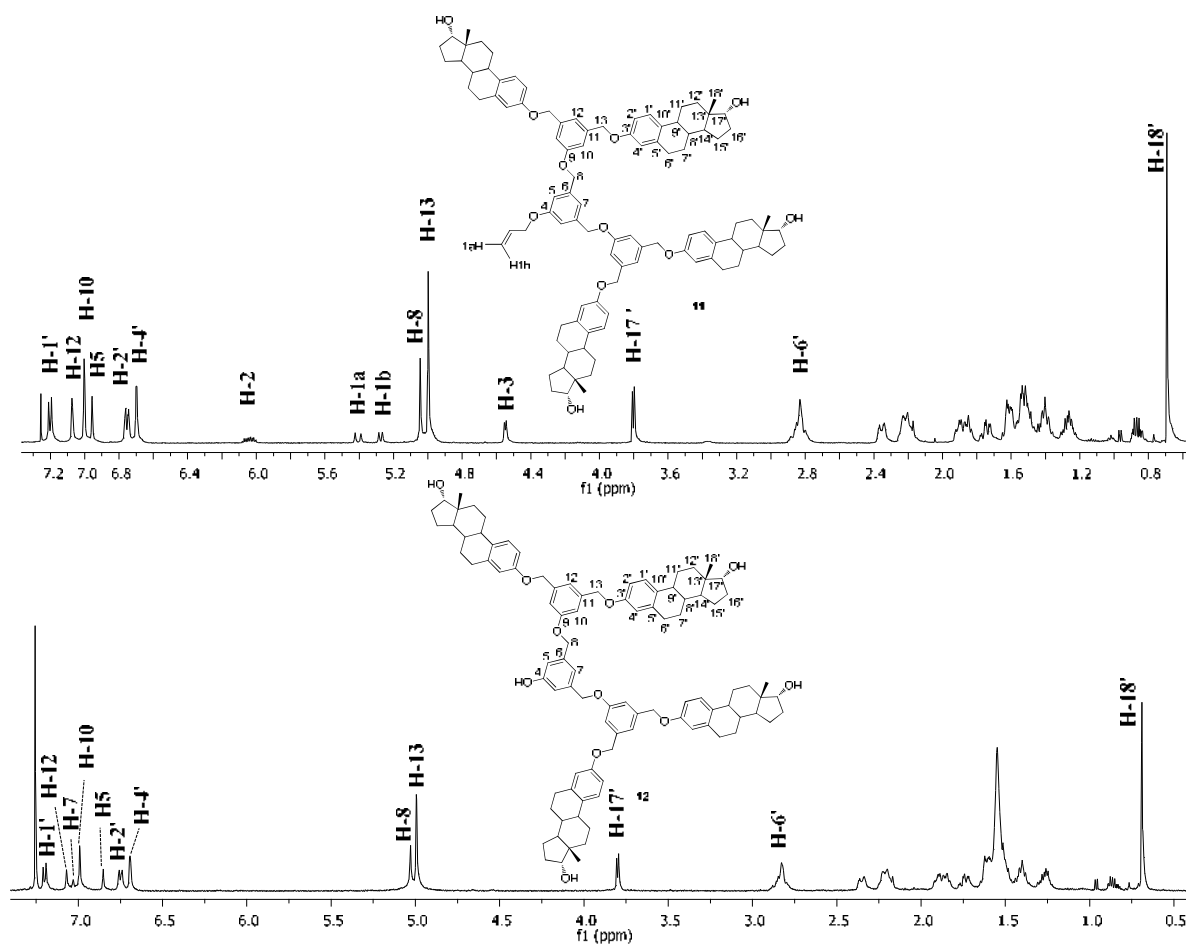


Figura 4.8 Espectros de  $^1\text{H}$  para las dendronas **11** y **12** derivadas del 17 $\alpha$ -estradiol

En esta parte del trabajo se determinó que la ruta convergente para la obtención de los conjugados esteroidales, no es la más eficiente ya que solo se pudo obtener la dendrona derivada del  $17\alpha$ -estradiol con el punto focal activo, no logrando reducir el número de pasos de reacción, ni mejorar los rendimientos. Por otra parte al intentar el acoplamiento del núcleo con la dendrona **12**, la reacción no procedió después de 5 días. Por este motivo, se exploró la síntesis de los conjugados esteroidales por el método divergente.

#### **4.3.2 Síntesis de los conjugados esteroidales dendriméricos por el método divergente.**

Debido a que por la metodología convergente no fue posible obtener los dendrímeros deseados, se recurrió a la síntesis divergente, que si bien presenta más posibilidad de defectos estructurales, para las generaciones alcanzadas en este trabajo no se observaron, como se discute a continuación.

4.3.2.1 Síntesis y caracterización de los dendrímeros tipo Fréchet con núcleo de tetrametileno de primera (G1), segunda (G2) y tercera (G3) generación.

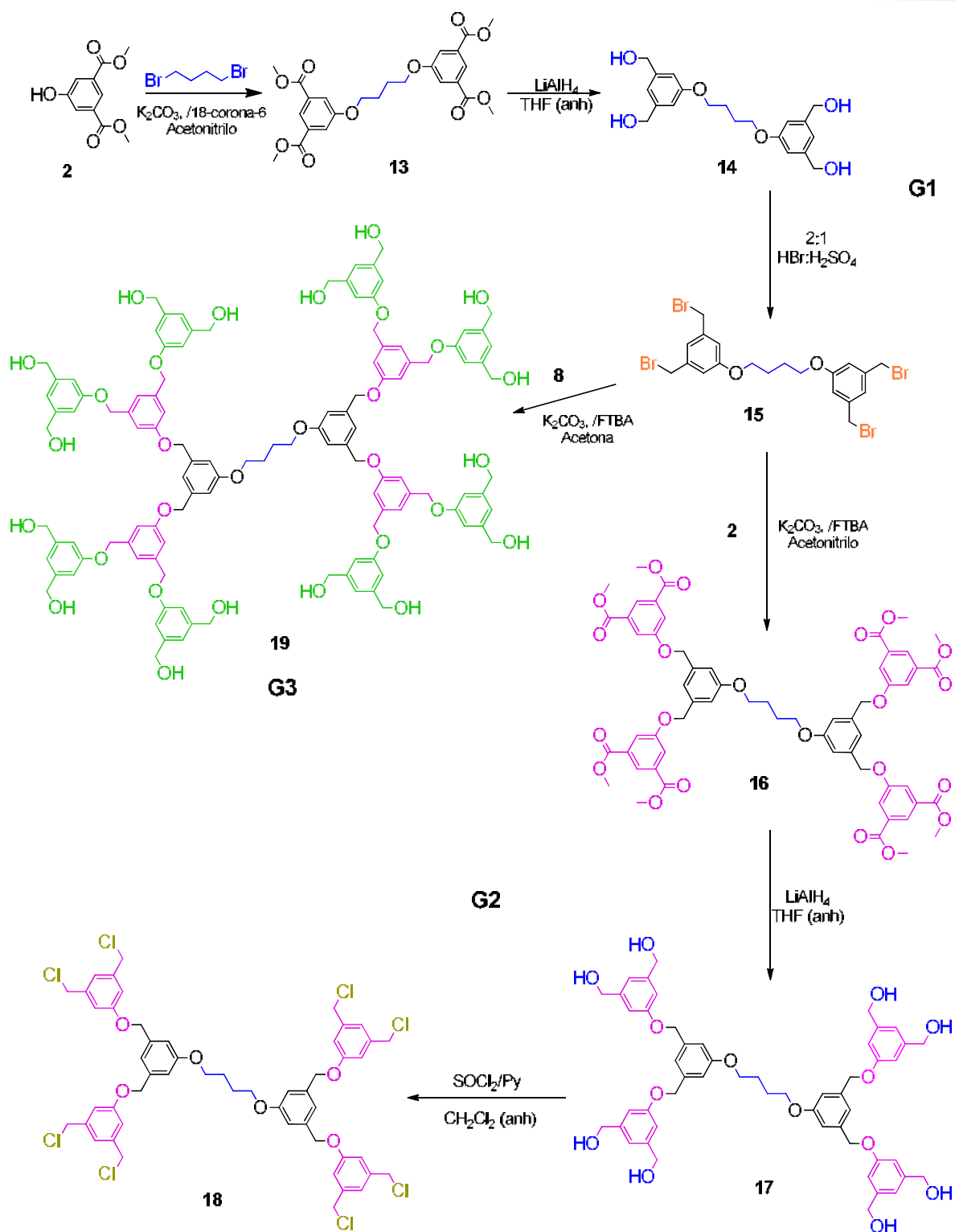
Como se mencionó, en la estructura dendrimérica el núcleo determina la forma y el impedimento estérico presente, promoviendo una forma esférica o elipsoidal. En este contexto, el dendrímero PAMAM (poliamidoamina) de primera generación con ocho grupos  $\text{NH}_2$  (1.430 KDa y 22 Å) adopta una forma esférica que incrementa la rigidez molecular y por lo tanto el impedimento estérico conforme aumenta la generación, complicando el acoplamiento de fármacos o moléculas activas en la periferia.<sup>29</sup> Por lo anterior, se planteó la síntesis de dos familias dendriméricas con diferentes núcleos, las cuales fueron modificadas para su posterior conjugación (acoplamiento del fármaco en la periferia mediante enlaces covalentes) con unidades esteroidales conocidas por su actividad hormonal y actividad citotóxica ante diversas líneas celulares cancerígenas. Teniendo entonces dendrímeros con diferentes características estructurales como posibles plataformas para el acoplamiento de fármacos, se puede evaluar el efecto dendrimérico en la actividad biológica de dichos conjugados.

La primera familia dendrímica consistió de un núcleo de tetrametileno con el objetivo de promover una forma elipsoidal y tratar de reducir el efecto estérico al acoplarse las unidades esteroideas logrando obtener dendrímeros de primera (**13**, **14** y **15**), segunda (**16**, **17** y **18**) y tercera generación (**19**). La segunda familia fue diseñada con un núcleo bencénico trisustituido (tres puntos activos de crecimiento) lo cual genera una estructura más globular que la anterior y por lo tanto más compacta y con mayor rigidez.

Como se ha mencionado con anterioridad, los dendrímeros son sintetizados por medio de métodos iterativos o en cascada, logrando controlar la estructura, el tamaño y los grupos funcionales durante la síntesis. La nomenclatura empleada para asignar el número de generación es diferente según el autor. En algunos casos se considera a la primera capa como G0, sin embargo autores como Tomalia consideran a esa G0 como G1. En este trabajo se sintetizaron dendrímeros de primera, segunda y tercera generación con diversas funcionalidades empleando la nomenclatura propuesta por Tomalia para asignar el número de generación.

La síntesis de los diferentes dendrímeros reportados en este trabajo se llevó a cabo por medio de sustituciones nucleofílicas entre la unidad de repetición y los halógenos en el núcleo o dendrímero correspondiente. El grupo alcohol presente en el monómero actúa como nucleófilo para formar los nuevos enlaces, ya que en condiciones básicas el alcohol es desprotonado antes de actuar como nucleófilo.

Una vez obtenida la unidad de repetición **2** se llevó a cabo la síntesis de los dendrímeros tetrafuncionalizados de primera generación (G1) (Esquema 4.4) a partir de la reacción estequiométrica entre el compuesto **2** y el 1,4-dibromobutano para obtener el compuesto con cuatro grupos éster **13**<sup>100,101</sup> con un rendimiento del 98%. Posteriormente, se realizó la reducción con LiAlH<sub>4</sub> para obtener el compuesto **14** con rendimiento del 66 % y finalmente la bromación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HBr para obtener el compuesto **15**<sup>100,101</sup> con un rendimiento del 55 %.



Esquema 4.4 Ruta sintética para la obtención de dendrímeros G1, G2 y G3.

Los dendrímeros G2 (Esquema 4.4) se sintetizaron siguiendo las mismas condiciones de reacción que se utilizaron para la obtención de los dendrímeros G1, comenzando con el acoplamiento de cuatro equivalentes de la unidad de repetición **2** con el dendrímero tetrabromado **15** en presencia de  $K_2CO_3$ , obteniendo a **16** (Esquema 4.4) en un rendimiento del 82 %. Posteriormente se realizó la reducción del grupo éster al hidroxilo, con  $LiAlH_4$  en THF anhidro obteniendo a **17** con ocho hidroxilos terminales en un rendimiento del 53 % y finalmente el cambio de grupo funcional con  $SOCl_2$  en  $CH_2Cl_2$  anhidro condujo al dendrímero **18** con ocho cloros en la periferia, en un rendimiento del 67 %.

Para la obtención del dendrímero G3 (**19**) con 16 grupos hidroxilo en la periferia se optó por el método convergente con el objetivo de disminuir la formación de subproductos y por lo tanto facilitar la purificación, por lo que la síntesis consistió en el acoplamiento de **15** con la dendrona **8** (Esquema 4.4) con  $K_2CO_3$  y FTBA en reflujo de acetona. El compuesto **19** se aisló de la mezcla de reacción mediante la filtración del sólido formado, en un rendimiento del 42 %.

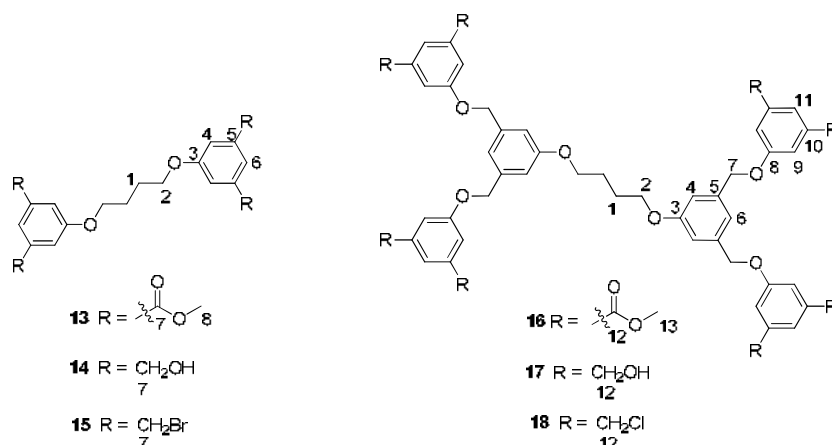
Los compuestos obtenidos se caracterizaron de forma inequívoca mediante la técnica de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  utilizando experimentos en dos dimensiones COSY y HETCOR así como experimentos DEPT 90° y 135°.

La obtención de los dendrímeros de primera generación se corroboró con los desplazamientos químicos de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  publicados en la literatura.<sup>100,101</sup> El espectro de RMN  $^1H$  de **14**, muestra la señal en 4.42 ppm para H-7 correspondiente al enlace  $CH_2-OH$  formado de la reducción del grupo éster del compuesto **13**, así como en 3.35 ppm la señal para el OH obtenido.

La formación de la segunda generación consistió en el aumento de una unidad de ramificación en cada punto reactivo del dendrímero, con respecto a la generación anterior y su posterior modificación de grupo funcional como se describió para los dendrímeros G1. Lo anterior se pudo determinar por el análisis de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  para los compuestos **16**, **17**, **18**

(G2) y **19** (G3). Las estructuras fueron asignadas tomando en cuenta la multiplicidad de las señales, sus desplazamientos químicos, pero sobre todo por la integración de las señales.

En la Tabla 4.2 se hace un comparativo de las señales características de los dendrímeros de primera y segunda generación, mostrando las principales diferencias en los desplazamientos al cambiar de grupos funcionales.



**Tabla 4.2.** Comparativo de los desplazamientos químicos para los compuestos **13** al **18**.

Compuesto	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>
	$^1\text{H}(^{13}\text{C})$	$^1\text{H}(^{13}\text{C})$	$^1\text{H}(^{13}\text{C})$	$^1\text{H}(^{13}\text{C})$	$^1\text{H}(^{13}\text{C})$	$^1\text{H}(^{13}\text{C})$
<b>Posición</b>						
<b>1</b>	2.01(25.8)	1.84(25.9)	1.98(25.8)	2.00(26.0)	1.87(25.8)	1.99(26.0)
<b>2</b>	4.11(68.0)	3.99(67.4)	4.04(67.5)	4.08(67.6)	4.05(67.6)	4.07(67.6)
<b>3</b>	(159.0)	(159.0)	(159.3)	(159.7)	(159.2)	(159.6)
<b>4</b>	7.71(119.8)	6.73 (111.0)	6.85(115.2)	6.96(113.3)	6.85(113.2)	6.94(113.2)
<b>5</b>	(131.8)	(144.3)	(139.6)	(138.1)	(139.4)	(138.5)
<b>6</b>	8.24(123.0)	6.82(116.9)	6.99(121.8)	5.10(118.5)	7.18(118.9)	7.06(118.5)
<b>7</b>	(166.2)	4.42(63.2)	4.42(32.9)	7.08(70.2)	5.04(69.3)	5.04(69.9)
<b>8</b>	3.91(52.4)		--	(158.7)	(158.7)	(159.2)
<b>9</b>		--	--	7.81(120.1)	6.82(111.3)	6.95(115.0)
<b>10</b>		--	--	(131.9)	(144.4)	(139.4)
<b>11</b>				8.27(123.4)	7.08(117.3)	7.01(121.3)
<b>12</b>				(166.1)	4.44(63.3)	4.53(45.8)
<b>13</b>				3.92(52.5)		

Para el compuesto **16** (Figura 4.9) con ocho grupos éster en la periferia, se observaron nueve señales para los diferentes protones presentes en la molécula, de las cuales cuatro señales corroboran el acoplamiento de la nueva unidad de ramificación con el compuesto **15** para formar la segunda generación. Dos señales en la región de aromáticos en 8.27 ppm para H-11 como una señal triple con  $^3J = 1.5$  Hz. y en 7.81 ppm como una señal doble para H-9 con  $^3J = 1.5$  Hz. En la región alifática se observa una señal simple en 3.92 ppm para H-13, que corresponde al grupo metilo del éster.

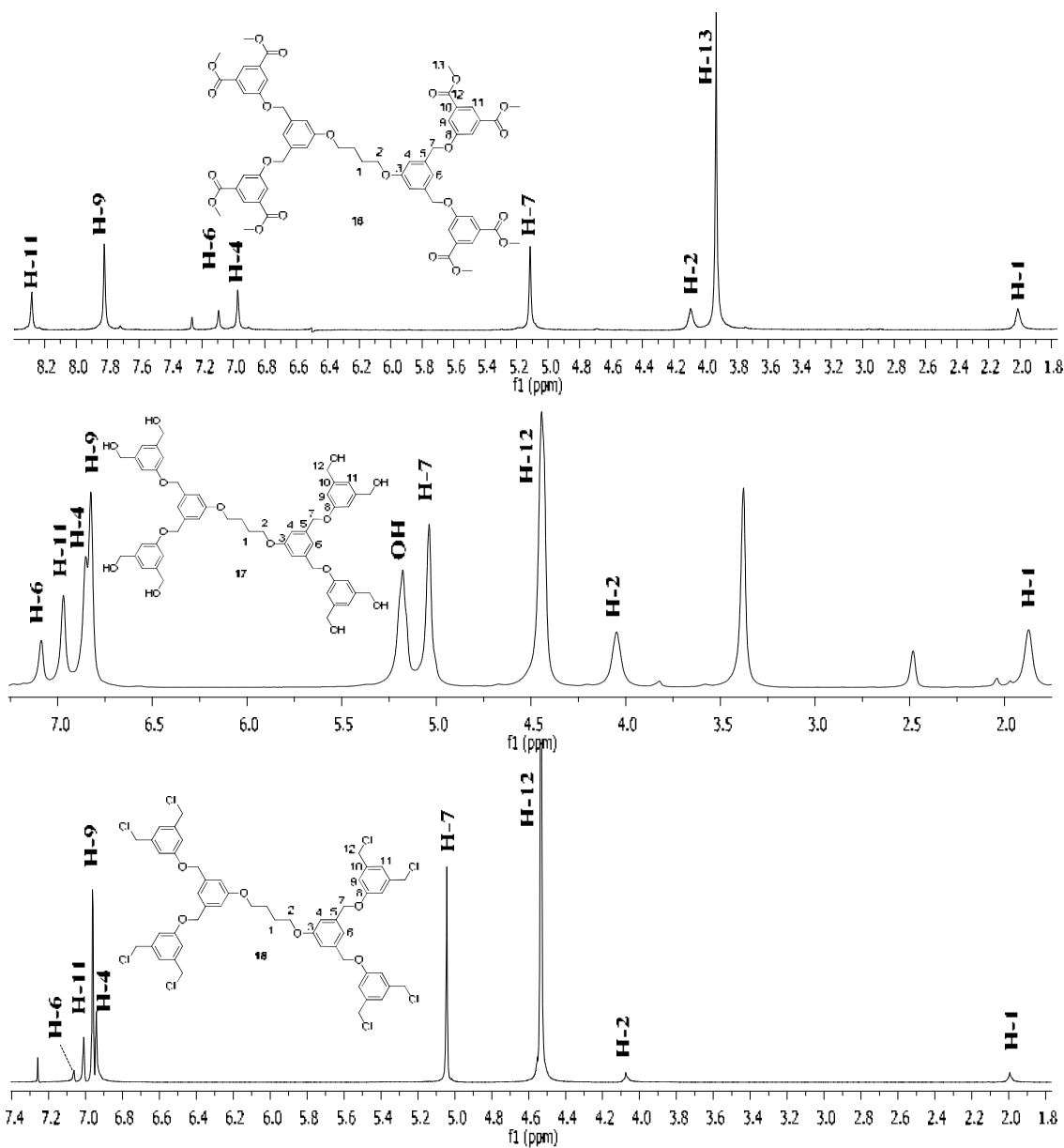


Figura 4.9 Espectros de  $^1\text{H}$  para los dendrímeros **16**, **17** y **18**.

La reducción del grupo éster para la obtención de **17** (Figura 4.9) se confirmó con la desaparición de la señal para el grupo carbonilo y del metilo en RMN, observándose solo la señal para H-12 en 4.48 ppm, correspondiente al nuevo enlace CH<sub>2</sub>-OH. Finalmente, la halogenación del compuesto **17**, para obtener **18** fue confirmada por la señal del enlace CH<sub>2</sub>-Cl en el espectro de RMN de <sup>13</sup>C en 45.8 (C-12) indicando un desplazamiento a frecuencias bajas debido a un efecto de protección al ser el Cl un átomo menos electronegativo que el oxígeno. El desplazamiento del resto de las señales se mantiene constante con las de su precursor (Tabla 4.2).

Los espectros de masas de alta resolución fueron obtenidos utilizando la metodología ESI-TOF para los compuestos **16** y **17** que mostraron el [M+Na]<sup>+</sup> (m/z) = 1153.3315 (calc. 1153.3317) para **16** y para **17** [M+Na]<sup>+</sup> (m/z) = 929.3720 (calc. 929.372), mientras que por la técnica de MALDI TOF se encontró el ión molecular para **18** [M+H]<sup>+</sup> (m/z) = 1050.1887 (calc 1051.1194).

El dendrímero G3 con 16 grupos hidroxilo en la periferia (**19**) se obtuvo como un sólido insoluble en metanol y acetato de etilo y con baja solubilidad en DMSO y DMF, que se aisló de la mezcla de reacción. La formación del compuesto se corrobora fácilmente por la relación de los valores de integración en el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 4.10). Un ejemplo ilustrativo se observa en las señales de la región aromática para los protones de los anillos que forman las generaciones en donde para el anillo de la tercera generación se observan dos señales en 7.17 y 6.93 ppm para H-16 y H-14 con el triple de intensidad en relación al anillo aromático de la primera generación.

Así mismo, en la región alifática se pueden observar tres señales correspondientes a los tres enlaces CH<sub>2</sub>-O- de las diferentes generaciones en el dendrímero; en 5.21 ppm se encuentra H-7 de la primera generación la cual es la evidencia de que se llevó a cabo el acoplamiento de la dendrona, en 5.10 ppm la señal para H-12 de la segunda generación y en 4.55 ppm la señal para H-17 del enlace CH<sub>2</sub>-OH con el triple de intensidad comparada con H-7 de la primera capa.



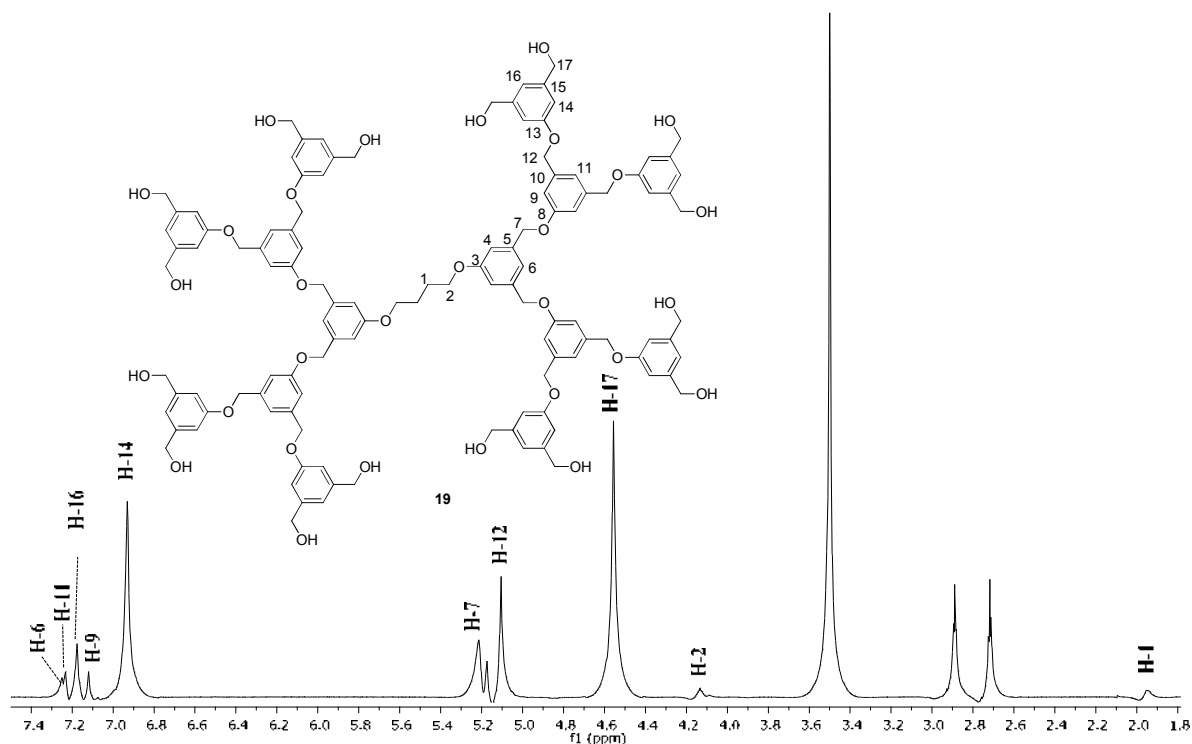
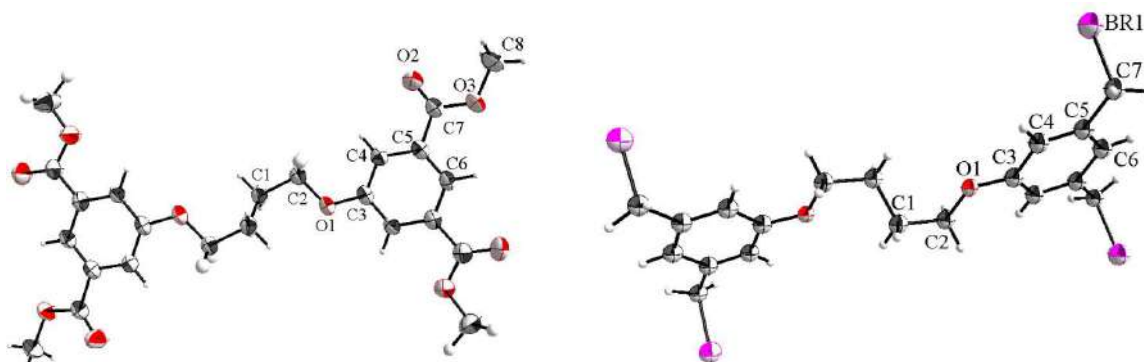


Figura 4.10. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para el dendrímero G3 **19**.

#### 4.3.2.2 Determinación estructural por difracción de rayos-X de los compuestos **13** y **15**.

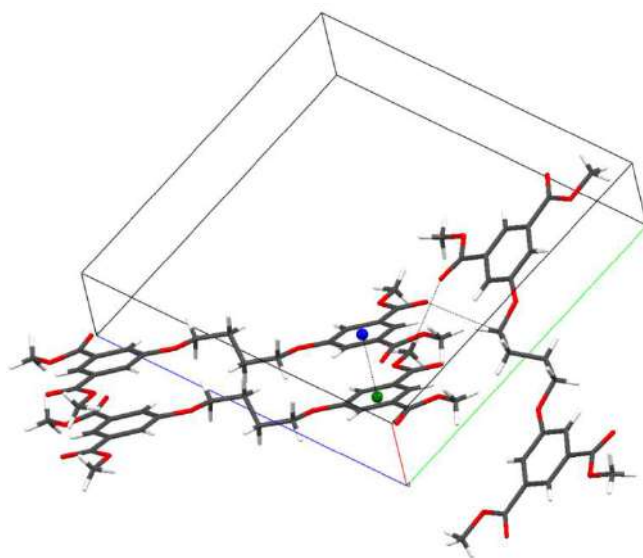
De los intermediarios de síntesis de los dendrímeros con núcleo de tetrametileno **13** y **15** se lograron obtener cristales adecuados para su análisis por difracción de rayos-X. Ambos compuestos, cristalizaron por evaporación lenta de cloruro de metileno a temperatura ambiente, en el sistema monoclinico con grupo espacial  $P2_1/c$  y con dos moléculas por unidad asimétrica.

Del análisis de la estructura se puede observar que el compuesto **13** adopta una conformación plana (Figura 24) con los carbonilos de los grupos ésteres en la periferia, mientras que el compuesto **15** muestra cada bromo en posición *anti*-clinal con respecto a otro con una longitud del enlace C–Br de 1.967 (10) Å y el ángulo formado entre los átomos C7—C6—Br es de 110.7° (6), de esta forma se reduce el impedimento estérico (Figura 4.11).



**Figura 4.11** Estructura de rayos-X para los compuestos **13** (izq) y **15** (der).

La estructura supramolecular del compuesto **13**, muestra que las moléculas se asocian a través de interacciones  $\pi$  por medio de desplazamientos paralelos, con una distancia del C7-O1...centroide 1 (C1) de 3.730(2) Å, con un ángulo de 70.70(13) °, así como el apilamiento  $\pi$ - $\pi$  cara a cara entre anillos bencénicos con una distancia entre el centroide 1 (C1) y el centroide 2 (C2) de 4.29 Å (Figura 4.12).



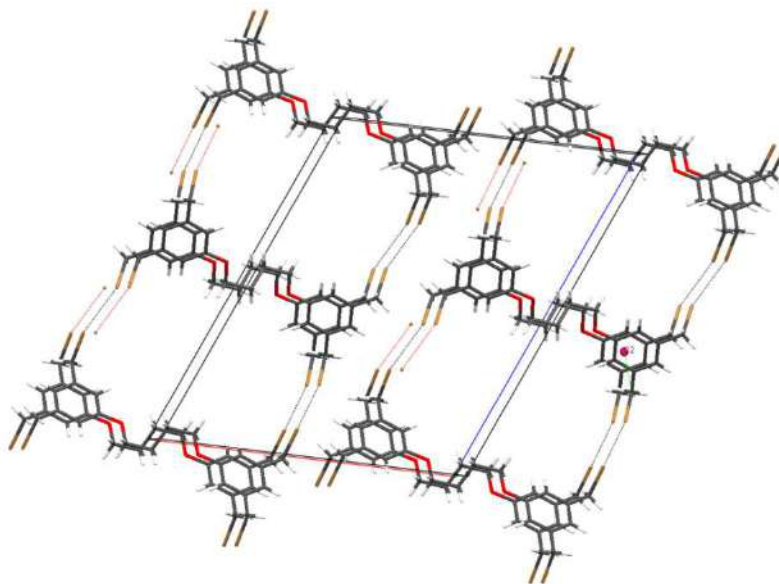
**Figura 4.12** La estructura cristalina de **13** muestra el apilamiento  $\pi$ - $\pi$  a lo largo del eje "a" con código de simetría: 1+x, y, z y para el enlace de hidrógeno (i) = 1-x, -1/2+y, 1/2-z y (ii) = 2-x, 1/2+y, 1/2-z.

En el análisis de la estructura del cristal de **13** se observan dos enlaces de hidrógeno intermoleculares no-clásicos (Tabla 4.2) por la interacción de C2-H2B...O2 [ $d_{O2...C2} = 3.442(3)$  Å] and C10-H10A...O4 [ $d_{O4...C10} = 3.375(4)$  Å], considerados como enlaces de hidrógeno débiles de acuerdo con lo reportado por Steiner y Desiraju.<sup>92,93</sup>

**Tabla 4.2** Geometría de Enlaces de hidrógeno Intermoleculares (Å, °) del compuesto **13**.

D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A
C2-H2B...O2	0.95(2)	2.59(2)	3.442(3)	150.8(18)
C10-H10A...O4	0.91(3)	2.48(3)	3.375(4)	170.0(3)

Una examinación detallada de la estructura supramolecular del compuesto **15** revela que el empaquetamiento cristalino está dirigido por la interacción fuerte Br...Br con distancia de enlace de 3.6767(17) Å y el ángulo formado de 166.3°, así como por las interacciones CH- $\pi$  formadas por C11-H11A...centroide 2 con una distancia de 3.518(10) Å y el ángulo formado por esos átomos es de 191°, con código de simetría [1545] = x,-1+y,z, que refuerza la estructura columnar a lo largo del eje “b”(Figura 4.13).



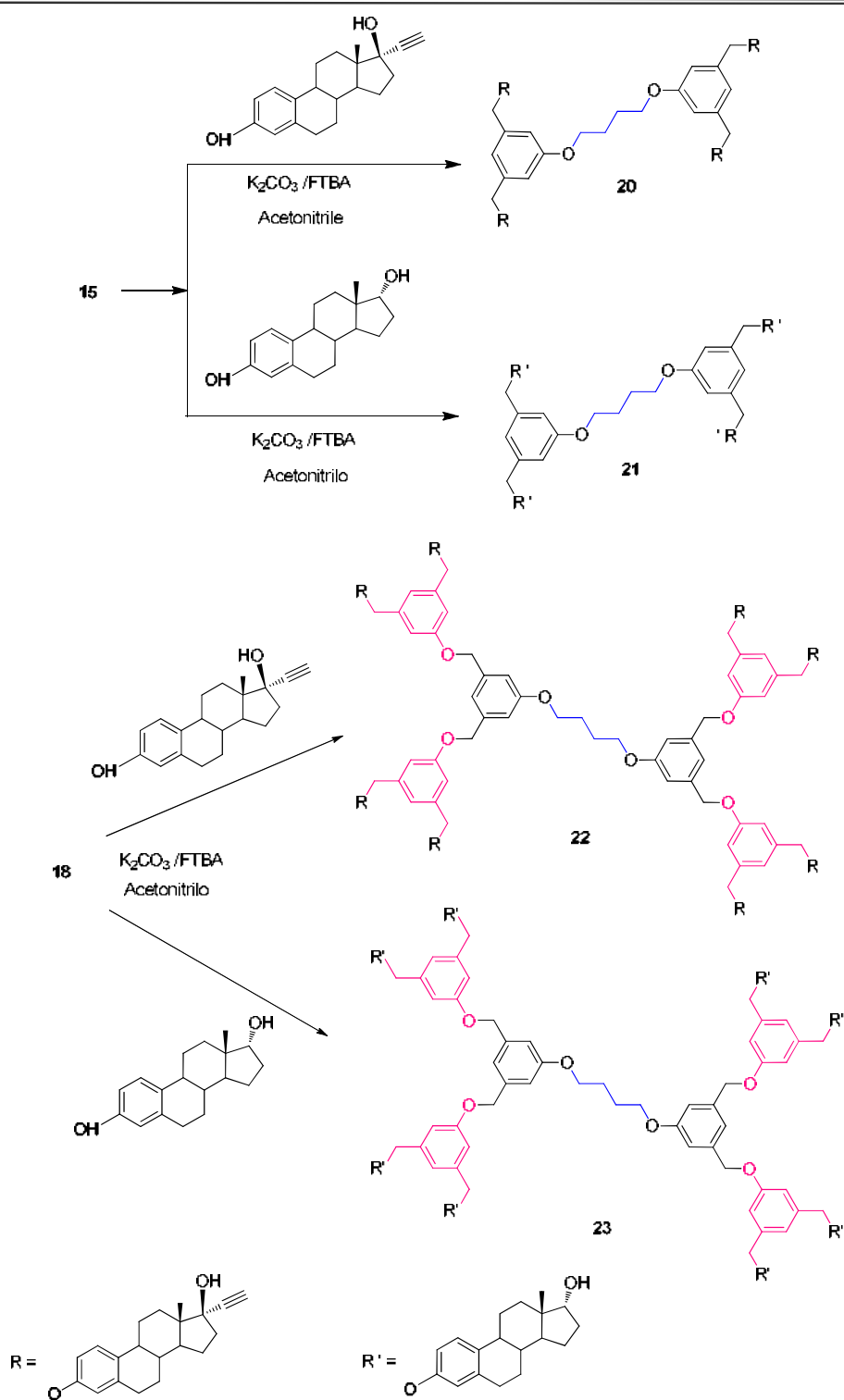
**Figura 4.13** Empaquetamiento del compuesto **15**, las líneas punteadas indican la interacción Br...Br.

4.3.2.4 Síntesis y caracterización de los conjugados esteroidales dendriméricos G1 y G2 con núcleo de tetrametileno derivados del  $17\alpha$ -etinilestradiol (**20**, **22**) y del  $17\alpha$ -estradiol (**21**, **23**).

Los conjugados esteroidales dendriméricos de primera generación (G1) **20** y **21** con cuatro unidades esteroidales en la periferia, fueron sintetizados por sustitución nucleofílica del compuesto tetrabromado **15** con el grupo hidroxilo localizado en la posición 3 de ambos estrógenos aromáticos ( $17\alpha$ -etinilestradiol y  $17\alpha$ -estradiol), en presencia de  $K_2CO_3$  y FTBA en acetonitrilo, obteniéndose para ambos casos un sólido amarillo claro, en rendimientos del 74 y 80 %, respectivamente (Esquema 4.5).

Siguiendo el mismo procedimiento de reacción, se realizó la síntesis de los conjugados dendriméricos esteroidales de segunda generación **22** y **23** (Esquema 4.5) con ocho unidades de  $17\alpha$ -etinilestradiol o  $17\alpha$ -estradiol. El compuesto final se pudo separar de la mezcla de reacción filtrando el sólido formado y haciendo lavados con agua, obteniéndose un sólido amarillo tenue con un rendimiento del 75 y el 89 % respectivamente, lo cual representa un incremento en el rendimiento al eliminar pasos de purificación por cromatografía en columna.

Los conjugados dendriméricos G1 y G2 derivados del  $17\alpha$ -etinilestradiol y  $17\alpha$ -estradiol son compuestos solubles en una variedad de disolventes orgánicos como cloroformo, cloruro de metileno, acetato de etilo, dimetilsulfoxido, dimetil formamida, acetona, tetrahidrofurano y en menor cantidad en metanol y etanol. La solubilidad de los compuestos sintetizados es determinada por los grupos funcionales terminales y la generación del dendrímero.



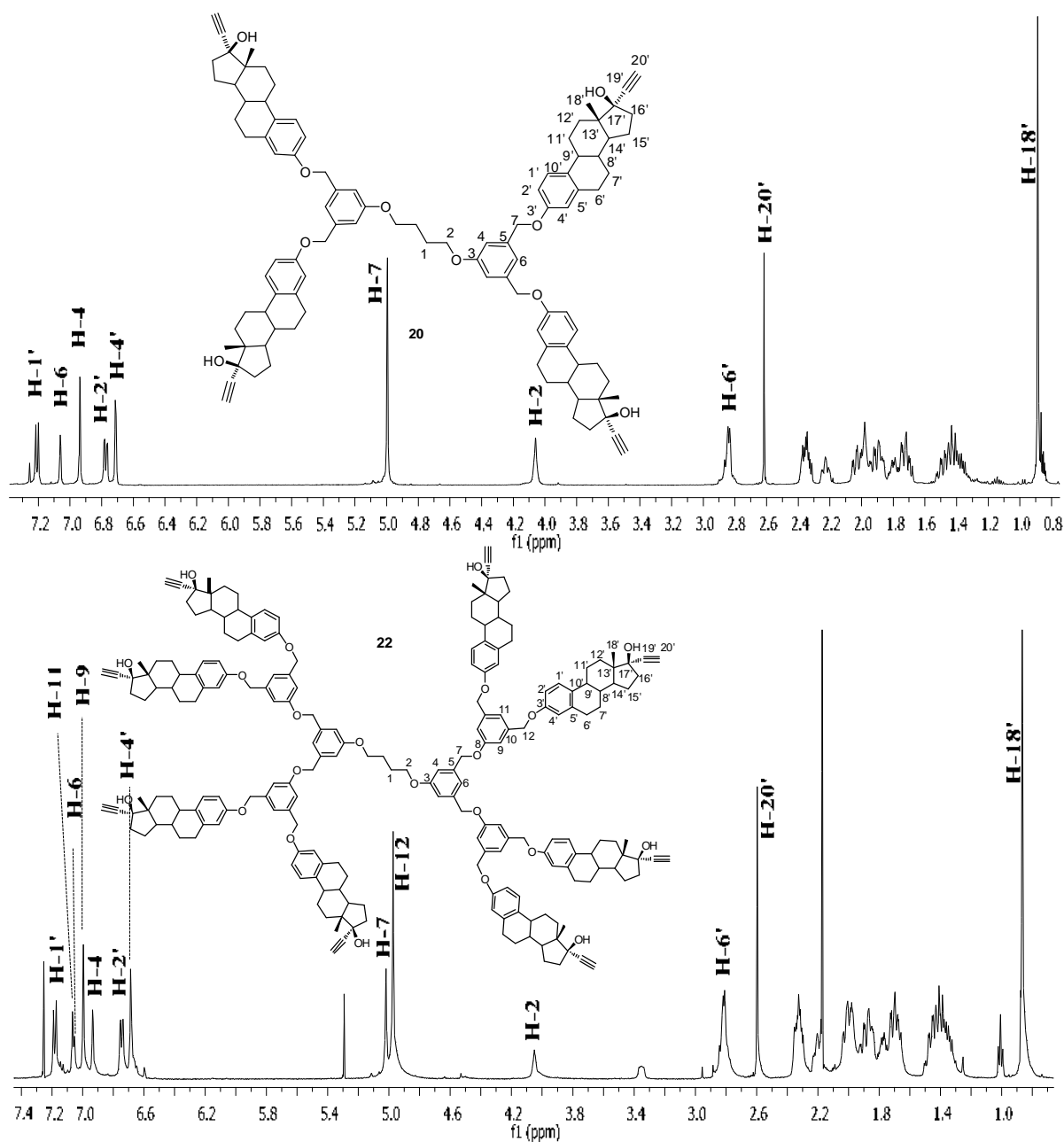
**Esquema 4.5** Ruta sintética para la obtención de los conjugados dendriméricos esteroidales G1 y G2.

Es importante notar que cuando se lleva a cabo el acoplamiento con los esteroides, para la obtención de los conjugados de G1, **20** y **21**, la señal del protón H-7 (4.42 ppm) en **15** (CH<sub>2</sub>-Br) se desplaza a 4.98 ppm (CH<sub>2</sub>-O) debido a la formación del conjugado esteroideal (Figura 4.14). En el espectro de <sup>13</sup>C el C-7 de **15** (CH<sub>2</sub>-Br) se encuentra en 32.9 ppm y cuando se forma el conjugado **20** y **21** la señal para C-7 se desplaza a 69.9 ppm.

En el espectro de <sup>1</sup>H para ambos conjugados esteroidales G1, también se pueden observar cinco señales en la región aromática, tres de ellas corresponden al anillo aromático del esteroide<sup>98,99</sup> y dos más para el anillo aromático del dendrímero que forman la primera generación H-6 y H-4 como una señal ancha en 7.06 y 6.93 ppm, respectivamente.

La caracterización de los conjugados G2 **22** y **23** se realizó por comparación de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C con sus precursores. El espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 4.14) muestra las señales correspondientes al anillo aromático de los esteroides para ambos conjugados **22** y **23** sin mostrar cambio significativos en sus desplazamientos. En la región aromática se observan las señales de los anillos aromáticos que forman la primera y segunda generación del dendrímero en 7.06 y 7.05, para H-4 y H-6 del anillo que forma la primera generación y en 6.99 y 6.93 para H-9 y H-11 para el anillo de la segunda generación.

De forma similar, se llevó a cabo la caracterización del conjugado esteroideal **21** derivado del 17 $\alpha$ -estradiol, observándose en el espectro los veinticinco carbonos diferentes que se esperaban, de los cuales, los tres carbonos correspondientes al anillo aromático del esteroide coinciden con el compuesto **20** así como el fragmento del dendrímero.



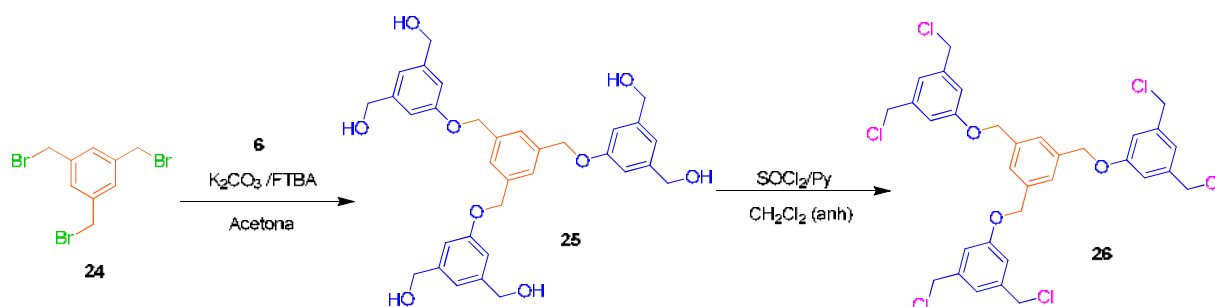
**Figura 4.14** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del conjugado esteroidal dendrimerico G1 **20** y G2 **22** con núcleo de tetrametileno derivados del  $17\alpha$ -etinilestradiol.

Los espectros de masas de alta resolución confirmaron la obtención de los conjugados esteroiales G1 y G2 utilizando la técnica APCI-TOF para los compuestos **20** y **21**, mostrando  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$ ) = 1497.8284 (calc. 1497.8309) y  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$ ) = 1401.8315 (calc.

1401.8304), respectivamente. Por la técnica de MALDI TOF se observó  $[M+Na+NH_3]^+$  ( $m/z$ ) = 3171.7646 (calc. 3171.7355) para **22**.

#### 4.3.2.4 Síntesis y caracterización de los dendrímeros **25** y **26** con núcleo bencénico trisustituido.

La síntesis de la segunda familia de dendrímeros preparados en este trabajo comenzó con el acoplamiento del 1,3,5-tri(bromometil)benceno con tres unidades de repetición **6**, en presencia de carbonato de potasio, obteniéndose al compuesto **25** como un sólido blanco en un rendimiento del 46 %. A continuación se llevó a cabo el cambio de grupo funcional con  $SOCl_2$  en cloruro de metileno anhidro obteniendo el dendrímero con seis cloros en la periferia **26** en un rendimiento del 38 % (Esquema 4.6).



Esquema 4.6 Síntesis de los dendrímeros **25** y **26** con núcleo bencénico trisustituido.

El espectro de RMN de  $^1H$  para el dendrímero **25** (Figura 4.15) muestra en la región aromática tres señales, de las cuales, una corresponde al protón del núcleo en 7.45 ppm como señal simple y dos más para los protones de la unidad de ramificación en 6.90 y 6.88 ppm para H-7 y H-5. Finalmente, la señal en 5.07 ppm (H-3) del  $CH_2-O$  confirma la formación del dendrímero. El cambio de grupo funcional para la obtención de **26** se confirmó por la señal del C-8 la cual se desplazó a frecuencias bajas (45.85 ppm, C-8) con respecto a **25** (63.71 ppm, C-8). El resto de las señales para el núcleo y la unidad de ramificación permanecen constantes.



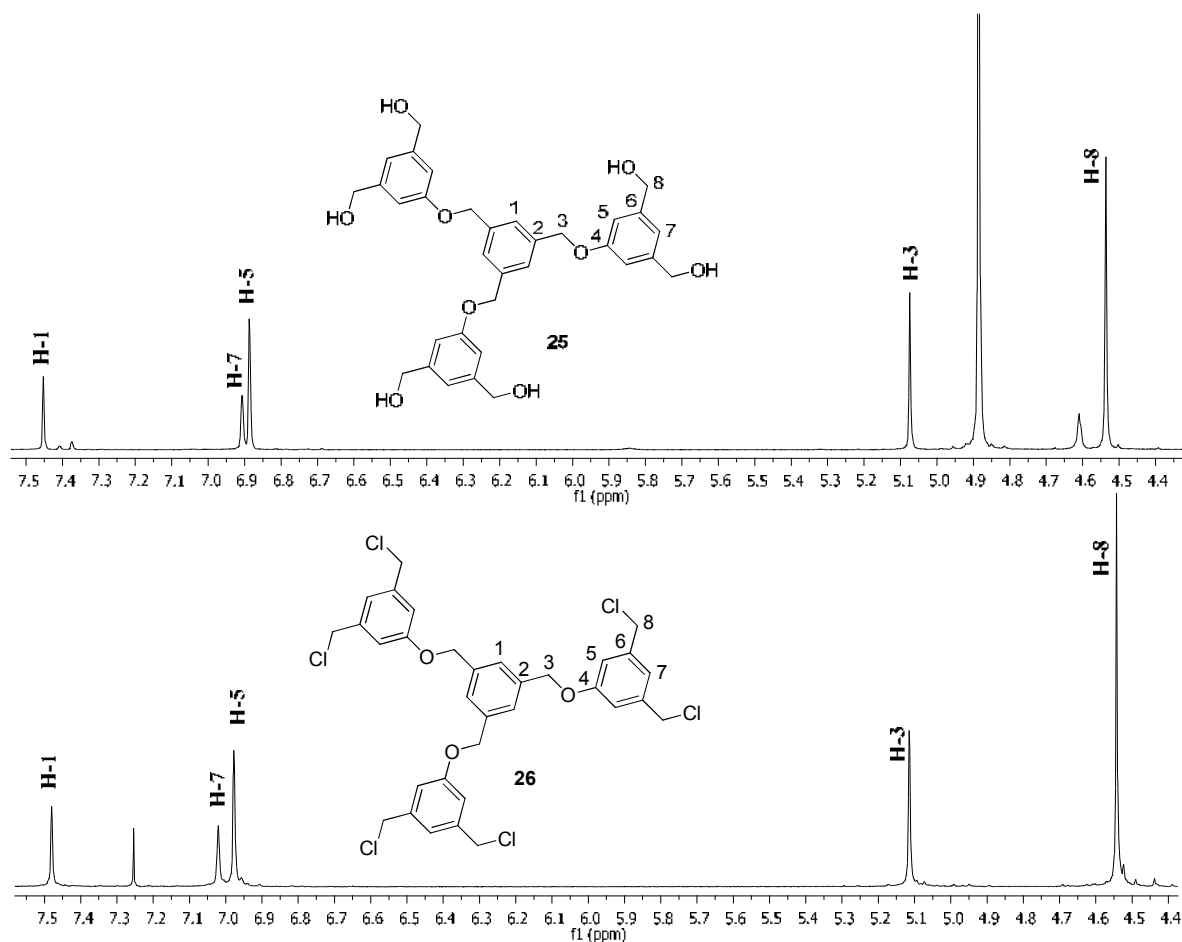


Figura 4.15 Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para los dendrímeros **25** y **26**.

#### 4.3.2.5 Síntesis de los conjugados esteroidales dendriméricos con núcleo bencénico trisustituido de G0 y G1 derivados del $17\alpha$ -etinilestradio y $17\alpha$ -estradiol.

Conforme a lo planteado en este trabajo se realizó la síntesis de la segunda familia de conjugados esteroidales dendriméricos de generación 0 (3 esteroides) y primera generación (6 esteroides) con núcleo bencénico trisustituido.

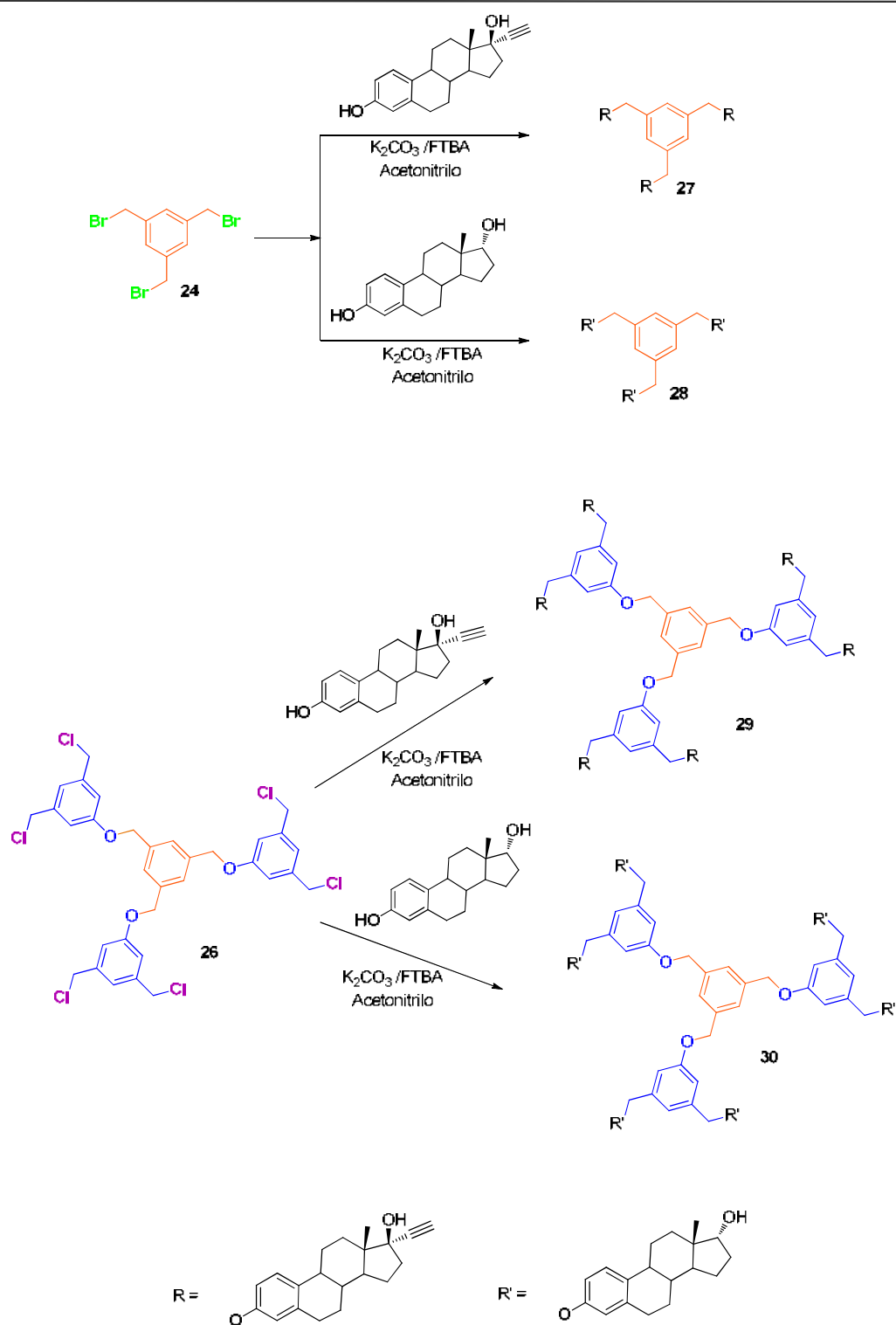
En el Esquema 4.7 se muestra la síntesis de los conjugados, que consistió en el acoplamiento de los esteroides antes mencionados al 1,3,5-tris(bromometil) benceno (**24**) en presencia de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y FTBA en acetonitrilo. Al término de la reacción se filtró el sólido

precipitado y se lavó con cloruro de metileno. Se evaporaron los disolventes a sequedad obteniendo a **27** y **28** como sólidos de color beige en un rendimiento del 90 y 92 %, respectivamente.

Los conjugados esteroidales dendriméricos G1 con núcleo bencénico trisustituido, se obtuvieron del acoplamiento entre el dendrímero **26** y seis unidades de 17 $\alpha$ -etinilestradiol y 17 $\alpha$ -estradiol en presencia de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y FTBA en acetonitrilo. Los conjugados **29** y **30** se aislaron en un rendimiento del 89 y 88 %, respectivamente (Esquema 4.7).

#### 6.3.4.4 Caracterización espectroscópica de los conjugados dendriméricos con núcleo bencénico trisustituido G0 y G1.

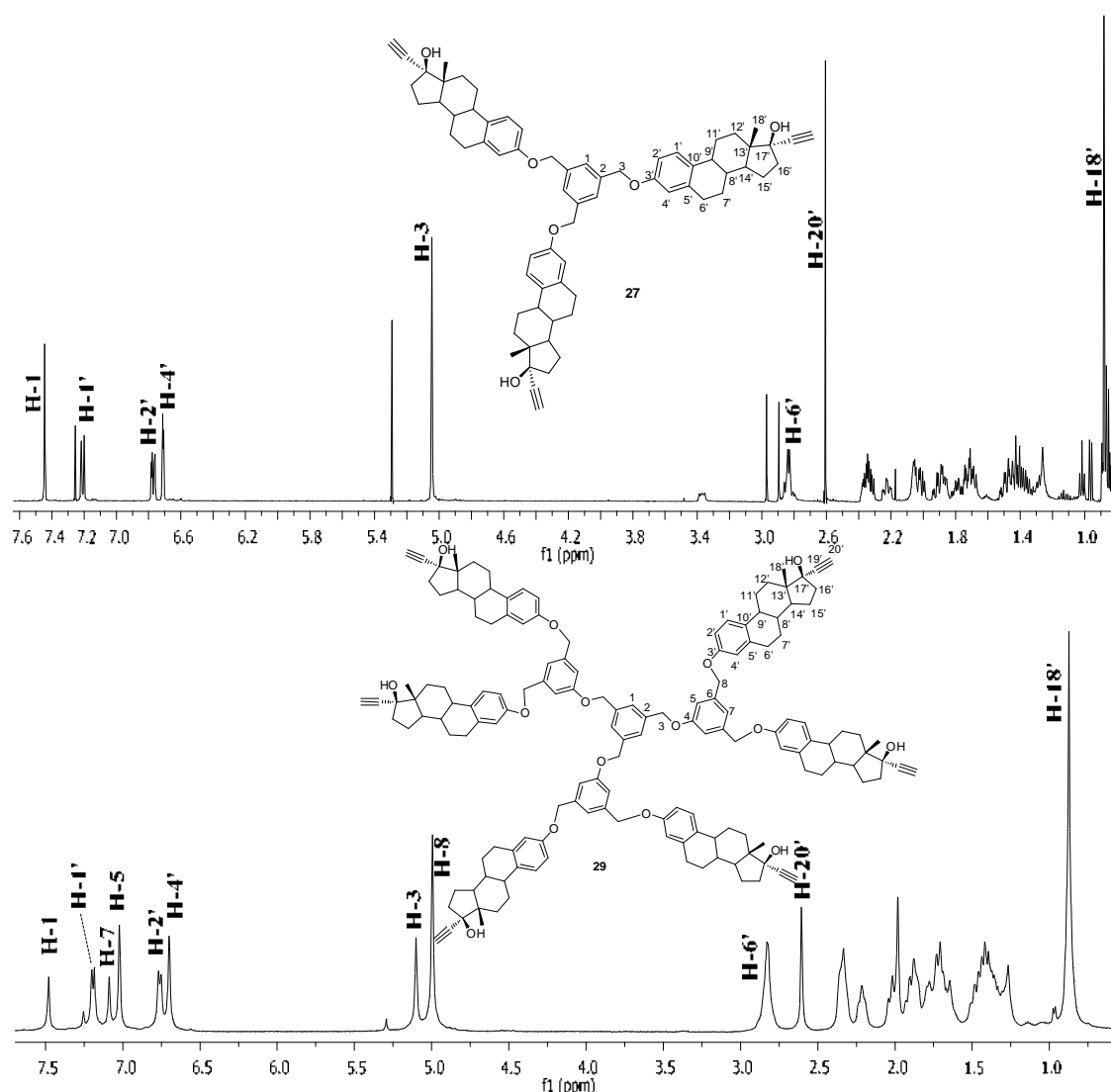
Teniendo en cuenta la asignación de los conjugados esteroidales con núcleo de tetrametileno antes mencionados, se llevó a cabo la caracterización de los conjugados esteroidales de G0 (**27**, **28**) y G1 (**29**, **30**), notando en todos los casos las señales características ya descritas para los esteroides de partida, variando solo la señal para el núcleo H-1 en 7.5 ppm del anillo bencénico trisustituido.



**Esquema 4.7** Síntesis de los conjugados esteroideos dendriméricos G0 y G1 con núcleo bencénico trisustituido.

El incremento de generación se determinó por la cantidad de metilenos observados en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , mediante la integral de las señales y los desplazamientos químicos para los diferentes conjugados.

Se confirmó entonces que en el conjugado G1 solo se observa una señal para el protón del metileno H-3 en 5.04 ppm mientras que para el conjugado G2 se observan dos señales correspondientes a los protones de los metilenos que forman las dos generaciones H-3 y H-8 en 5.09 y 4.90 ppm con el doble de intensidad (Figura 4.16).



**Figura 4.16** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de los conjugados esteroidales dendriméricos G0 (27) y G1 (29) derivados del  $17\alpha$ -etilnilestradiol.

### **4.3.3 Evaluación *in vitro* de los conjugados esteroidales dendriméricos como anticancerígenos.**

Los dendrímeros, gracias a la capacidad de unir moléculas en los grupos funcionales de la periferia, se convierten en dispositivos con una diversidad de funciones. Así los dendrímeros son diseñados no solo para contener un fármaco anticancerígeno, si no que también moléculas que permitan el reconocimiento de células cancerosas en etapas tempranas, o la identificación de cambios celulares como la sobreexpresión de ácido fólico o de receptores específicos.

Considerando la actividad citotóxica descrita para el  $17\alpha$ -estradiol en el tratamiento de cáncer, se evaluaron los diferentes conjugados dendriméricos derivados del  $17\alpha$ -etinilestradiol y del  $17\alpha$ -estradiol frente a tres líneas celulares cancerígenas: leucemia crónica linfoblástica T (*CEM*), adenocarcinoma de seno (MCF-7) y adenocarcinoma cervical (HeLa). Como control se utilizó la línea celular de linfoblastos epiteliales (*BJ*).

#### **Evaluación de citotoxicidad celular mediante el ensayo de calceína AM**

Los estudios de viabilidad celular se llevaron a cabo utilizando el kit comercial Calceína-AM (*Molecular Probes*). Este procedimiento permite la identificación de las células vivas cuando estas son incubadas en presencia de la calceína modificada. Esto es debido a que la calceína-AM que tiene suprimida su capacidad fluorescente, puede ser recuperada tras su metabolización intracelular, lo cual sólo puede suceder cuando las células están vivas. Este proceso promueve una fuerte emisión de fluorescencia verde, de tal manera que la actividad anticancerígena del compuesto evaluado es inversamente proporcional a la intensidad de la fluorescencia emitida al interior de las células

Los conjugados esteroidales dendriméricos **20-23** y **27-30** fueron disueltos en DMF y añadidos a los cultivos celulares. De acuerdo al procedimiento usual se obtuvo la  $IC_{50}$  (Tabla 4.3) que es el indicador de la concentración a la cual el 50 % de las células mueren. Cabe señalar que los conjugados de primera generación con núcleo de tetrametileno **20** y **21** presentaron buena actividad citotóxica (menores de 50  $\mu$ M) frente a la línea *CEM*. En

contraste con los precursores esteroidales y dendrímero de partida, los conjugados **20** y **21** son buenos candidatos para ser evaluados *in vivo* (en animales de laboratorio) ya que se requieren valores de IC<sub>50</sub> menores a 15 µM. El conjugado **22** presenta buena actividad frente a la línea HeLa sin embargo no es selectivo, ya que también presenta actividad frente CEM y MCF-7 afectando las células control.

**Tabla 4.3** IC<sub>50</sub> de compuestos esteroidales evaluados frente a tres líneas celulares cancerígenas.

		Compuesto	Líneas celulares			
		(µmol/l)	CEM	MCF7	HeLa	BJ
		<b>EE</b>	19.1±1.7	>50	1.4±0.1	>50
		<b>αE</b>	22.6±5.1	>50	14.8±1.1	>50
N Ú C L E O	<b>Dendrímero G1</b>	<b>14</b>	>50	>50	>50	>50
	<b>Conjugado</b>					
	<b>Esteroidal</b>	<b>20</b>	5.6/3.5±1.3	>50/>50	>50	>50/>50
	<b>G1</b>	<b>21</b>	2.5/2.1±0.2	>50/>50	>50	>50/>50
	<b>Dendrímero G2</b>	<b>17</b>	>50	>50	>50	3.3±1.2
	<b>Conjugado</b>					
E T R A M E T I L E N O	<b>esteroidal</b>	<b>22</b>	26.8±4.6	34.6±4.9	5.5±0.1	5.1±1.3
	<b>G2</b>	<b>23</b>	>50	>50	>50	>50
	<b>Dendrímero</b>					
		<b>25</b>	>50	>50	>50	>50
B E N Ú C É L E I O C O	<b>Conjugado</b>	<b>27</b>	>50	>50	35.6±1.7	21.3
	<b>G1</b>	<b>28</b>	>50	>50	>50	25.9
	<b>Conjugado</b>	<b>29</b>	>50	>50	27.5±5.1	22.1
	<b>G2</b>	<b>30</b>	>50	>50	>50	28.4

<sup>a</sup> Las células fueron tratadas por 72 h con los conjugados. Los experimentos se realizaron por triplicado usando 17α-etinilestradiol (EE), 17α-estradiol (αE), **14**, **17** y **25** como control frente a tres líneas celulares cancerígenas: leucemia crónica linfoblástica T (CEM), adenocarcinoma de seno (MCF-7) y adenocarcinoma cervical (HeLa), y la línea celular de linfoblastos epiteliales (BJ) como control.

Es importante mencionar que la actividad anticancerígena mostrada por los conjugados **20** y **21** es selectiva al no ejercer ningún efecto tóxico sobre las células epiteliales (*BJ*) control en concentraciones mayores a 50  $\mu\text{M}$  (Tabla 4.3). Esta actividad se incrementa cuando se forma el conjugado esteroidal en comparación con el esteroide de partida.

Al comparar los resultados de las dos familias de conjugados esteroidales con diferentes núcleos (Tabla 4.3), se puede notar la influencia de dos factores en la actividad citotóxica: el efecto del núcleo y el efecto dendrimérico. En el primer caso se observa que los conjugados G0 y G1 con núcleo bencénico no presentan actividad citotóxica frente a CEM, en contraste con los conjugados con núcleo de tetrametileno.

De esto se puede concluir que existe una influencia del núcleo en la actividad citotóxica, ya que a pesar de tener la misma unidad esteroidal no se tiene el mismo efecto biológico en los derivados con núcleo de tetrametileno y bencénico. Esto se debe a que al tener un núcleo más pequeño el dendrímero tiende a formar estructuras globulares compactas, y con mayor impedimento estérico para interactuar con la célula. Por otro lado, el núcleo de tetrametileno favorece la obtención de estructuras menos impedidas estéricamente.

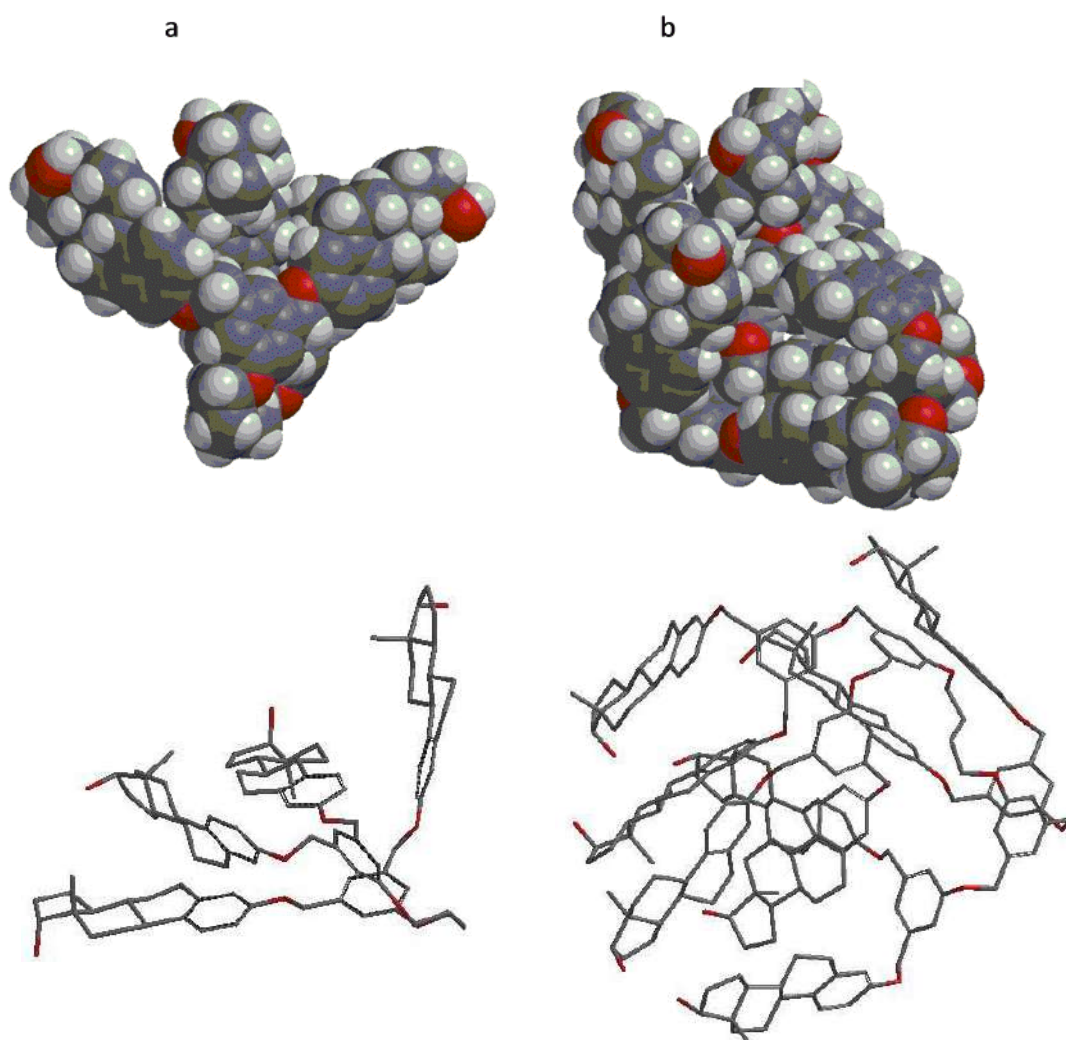
En contraste con lo esperado, al incrementar la generación del dendrímero y tener mayor carga esteroidal en la periferia, la actividad citotóxica se pierde (**22** y **23**) debido a que la estructura del conjugado G2 tiende a adoptar una forma más globular y por lo tanto más impedida, lo que genera menor contacto con la célula.

### **Análisis conformacional de los conjugados esteroidales dendriméricos**

Con la finalidad de estudiar el efecto del núcleo y dendrimérico en la actividad citotóxica de ambas familias de conjugados esteroidales, se realizó un análisis conformacional en agua utilizando el algoritmo de Monte-Carlo en Spartan 08. Para el análisis se hicieron cambios al azar en los ángulos de torsión, respetando la estereoquímica del esteroide durante la búsqueda. Los confórmeros de energía mínima de **20-23** y **27-30** se optimizaron en el nivel AM1.<sup>102</sup>

Del análisis conformacional se lograron obtener imágenes del arreglo 3D de todos los conjugados, en donde se puede observar que para el conjugado G1 **21** con núcleo de tetrametileno derivado del 17 $\alpha$ -estradiol los esteroides se encuentran más expuestos en comparación a los de G2 **23**. Esto se debe a que al incrementarse la generación, los anillos aromáticos del esteroide interactúan a través de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  formando una estructura más compacta y globular en la cual el sitio de reconocimiento del esteroide (OH-C17') queda más impedido para la interacción con los receptores celulares (Figura 4.17).

Este comportamiento también se observó para los conjugados **20** y **22** derivados del 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

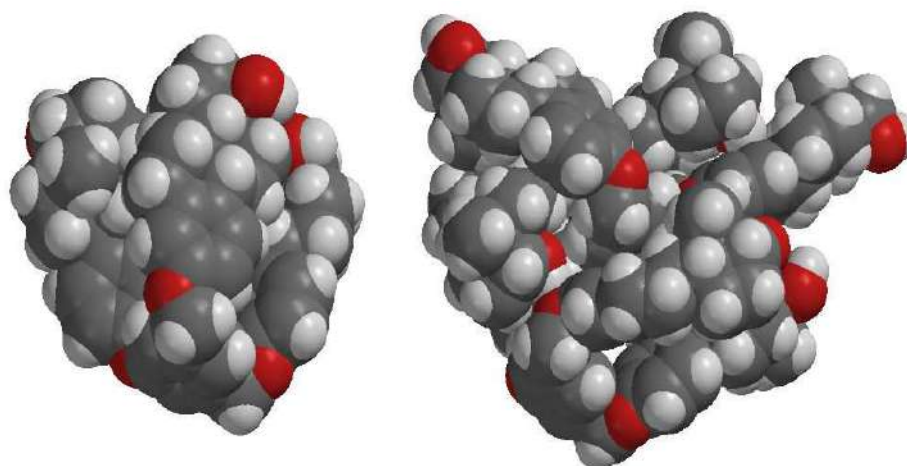


**Figura 4.17** Estructura 3D de los conjugados esteroidales dendrimérico **21** (a) y **23** (b) con núcleo de tetrametileno derivados del 17 $\alpha$ -estradiol.



Con respecto al análisis de los conjugados con núcleo bencénico trisustituido se determinó que el conjugado G0 **28**, en donde se tienen solo tres unidades esteroideas en la periferia, la estructura al ser más pequeña favorece la interacción entre el anillo aromático del esteroide y el anillo del núcleo, adoptando una forma globular más impedida estéricamente en comparación con el conjugado G1 **30** (Figura 4.18) y con los conjugados de núcleo de tetrametileno.

De estos resultados podemos concluir que las diferencias estructurales en el dendrímero (tipo de núcleo o ramificación) influyen en la actividad citotóxica. En particular, al tener estructuras más compactas o globulares, la actividad citotóxica disminuye debido a que el sitio de reconocimiento en los esteroides (OH-C17') se encuentra más impedido para interactuar con los receptores celulares.



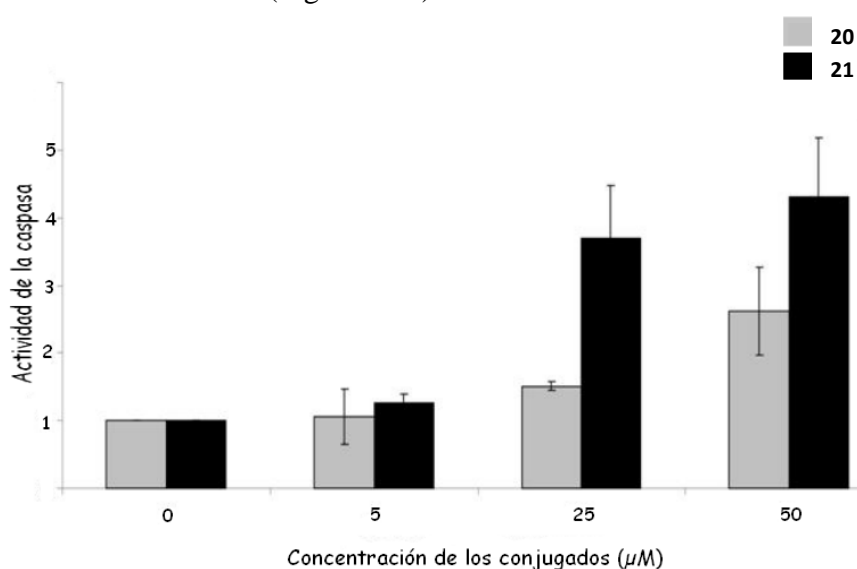
**Figura 4.18** Estructura 3D de los conjugados esteroideas dendriméricos **28** y **30** con núcleo aromático trisustituido derivados del 17 $\alpha$ -estradiol.

### **Actividad de la caspasa 3/7**

La función de la caspasa 3 es romper e inactivar la poliADP-ribosapolimerasa (PARP) que es la enzima involucrada en la reparación del ADN, provocando un incremento en el daño del ADN, seguido por la fragmentación a través de una incontrolada actividad de la endonucleasa lo que provoca apoptosis.<sup>103,104</sup> Una vez que se estableció que los conjugados **20** y **21**

presentan buena actividad citotóxica se determinó el efecto de la actividad de las caspasa 3 y 7 (3/7) en células CEM usando un substrato fluorogénico, Ac-DEVD-AMC y un inhibidor de la caspasa 3/7 (Ac-DEVD-CHO).

Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los conjugados excediendo su valor  $IC_{50}$ , tomando entonces 5, 25 y 50  $\mu M$  durante 24 h. Los resultados de esta prueba muestran que el conjugado **21** derivado del  $17\alpha$ -estradiol incrementa 4.3 veces la actividad de la caspasa 3/7 después de 24 h a concentraciones de 25  $\mu M$  y 50  $\mu M$  comparadas con el control. Por otra parte el conjugado **20** solo induce 2.5 veces la actividad de la caspasa después de 24 h a mayores concentraciones (Figura 4.19).



**Figura 4.19** Actividad de la caspasa de los conjugados **20** y **21** en células CEM

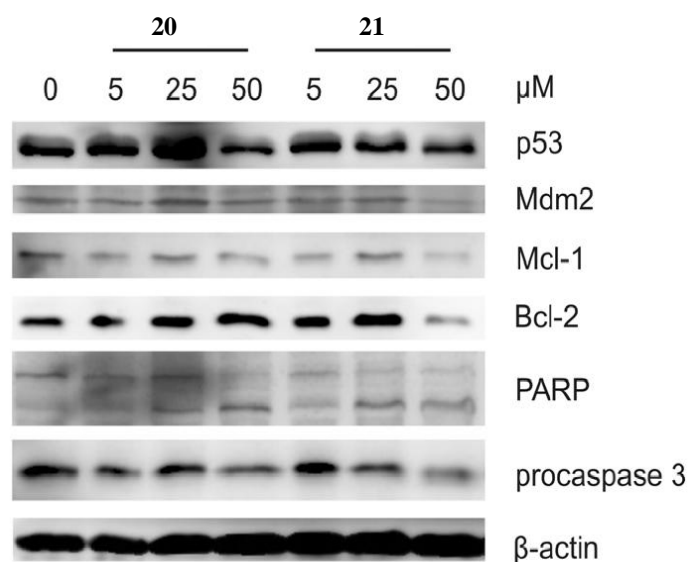
### Western Blot

El análisis de Western Blot es usado para detectar cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis. La línea celular de leucemia CEM fue tratada con los conjugados esteroideos **20** y **21** durante 24 h en concentraciones de 5, 25 y 50  $\mu M$ . Como se muestra en la Figura 4.20, a 25 y 50  $\mu M$  los conjugados dan lugar a un aumento en la actividad de la caspasa 3 lo cual induce el bloqueo de la actividad de la proteína PARP que se encuentra en el núcleo celular y tiene como función el detectar y reparar los daños en el ADN,

correlacionado mediante la disminución de los niveles de procaspasa 3. Así, también se observó la expresión de una proteína supresora tumoral p53 en las células CEM. La expresión de las proteínas p53 y Mdm2 se incrementó fuertemente después del tratamiento con 25  $\mu\text{M}$  de **21**, sin embargo a 50  $\mu\text{M}$  disminuyó la expresión de las proteínas. Para ambos conjugados (**20** y **21**) en 50  $\mu\text{M}$ , después de 24 h se observa una disminución en la expresión de proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-2, lo que indica el comienzo de la apoptosis.

Como se informó anteriormente, Mcl-1 es necesaria para la viabilidad celular y su disminución podría ser la causa de la muerte celular en células CEM. Esta proteína antiapoptótica Mcl-1 tiene un papel crucial en la regulación de la apoptosis de las células T. Cabe mencionar que la apoptosis está mediada por la activación de la cascada de caspasas bloqueando la activación de la proteína PARP, lo que da como resultado la degradación del ADN y la muerte apoptótica.

Finalmente, el incremento observado en la expresión de la caspasa 3/7 (Figura 4.20) en conjunto con los datos de fragmentación del ADN (Figura 4.19) confirman que ambos conjugados esteroidales dendriméricos de primera generación son capaces de inducir apoptosis en las células cancerosas de leucemia (CEM) incrementándose la actividad citotóxica comparada con los esteroides y el dendrímero de partida antes de su conjugación.



**Figura 4.20** Analisis de Western Blot de **20** y **21**.

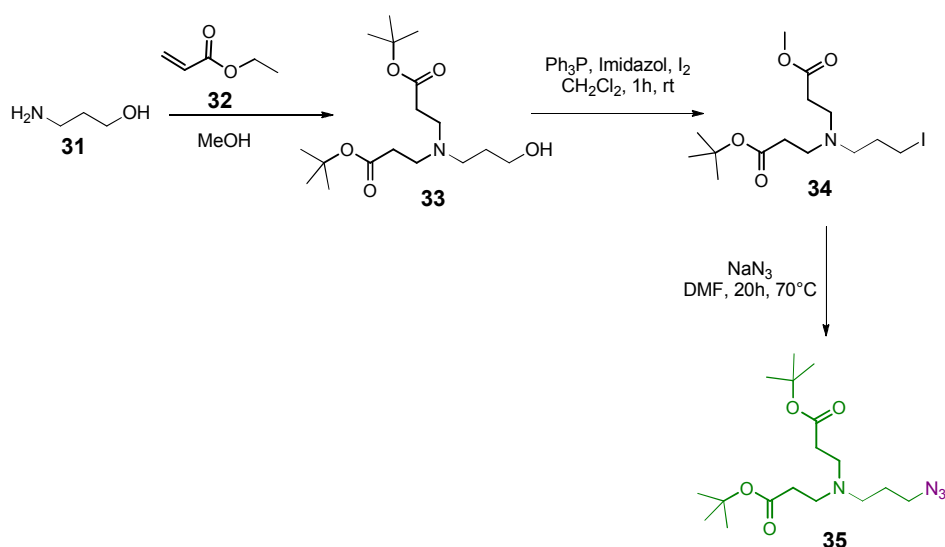
En resumen, con los resultados de la actividad anticancerígena de los conjugados esteroidales dendriméricos G1 sintetizados se pueden proponer como una nueva clase de compuestos prometedora en el tratamiento contra el cáncer.

#### 4.4 Dendrímeros híbridos tipo Fréchet-PAMAM como micelas unimoleculares.

##### 4.4.1 Síntesis y caracterización de los dendrímeros híbridos tipo Fréchet-PAMAM **36** y **37**

Con la finalidad de sintetizar micelas unimoleculares a partir de los dendrímeros esteroidales previamente obtenidos se realizó la síntesis de dendrímeros híbridos por la combinación de fragmentos tipo Fréchet-PAMAM unidos por unidades de triazol como micelas unimoleculares. La síntesis partió de la obtención de las ramificaciones tipo PAMAM mediante la adición de Michael del 3-amino propanol (**31**) al acrilato de *tert*-butilo. Los grupos *tert*-butil éster terminales se hidrolizaron para obtener ácidos carboxílicos como grupos terminales no tóxicos, para dar **33**,<sup>105</sup> posteriormente el punto focal -OH fue transformado al grupo yoduro con I<sub>2</sub> en presencia de imidazol y Ph<sub>3</sub>P.

Finalmente se preparó la azida **35** con NaN<sub>3</sub> en DMF a 70°C (Esquema 4.8) para poder llevar a cabo la formación del anillo de triazol mediante una reacción de cicloadición.

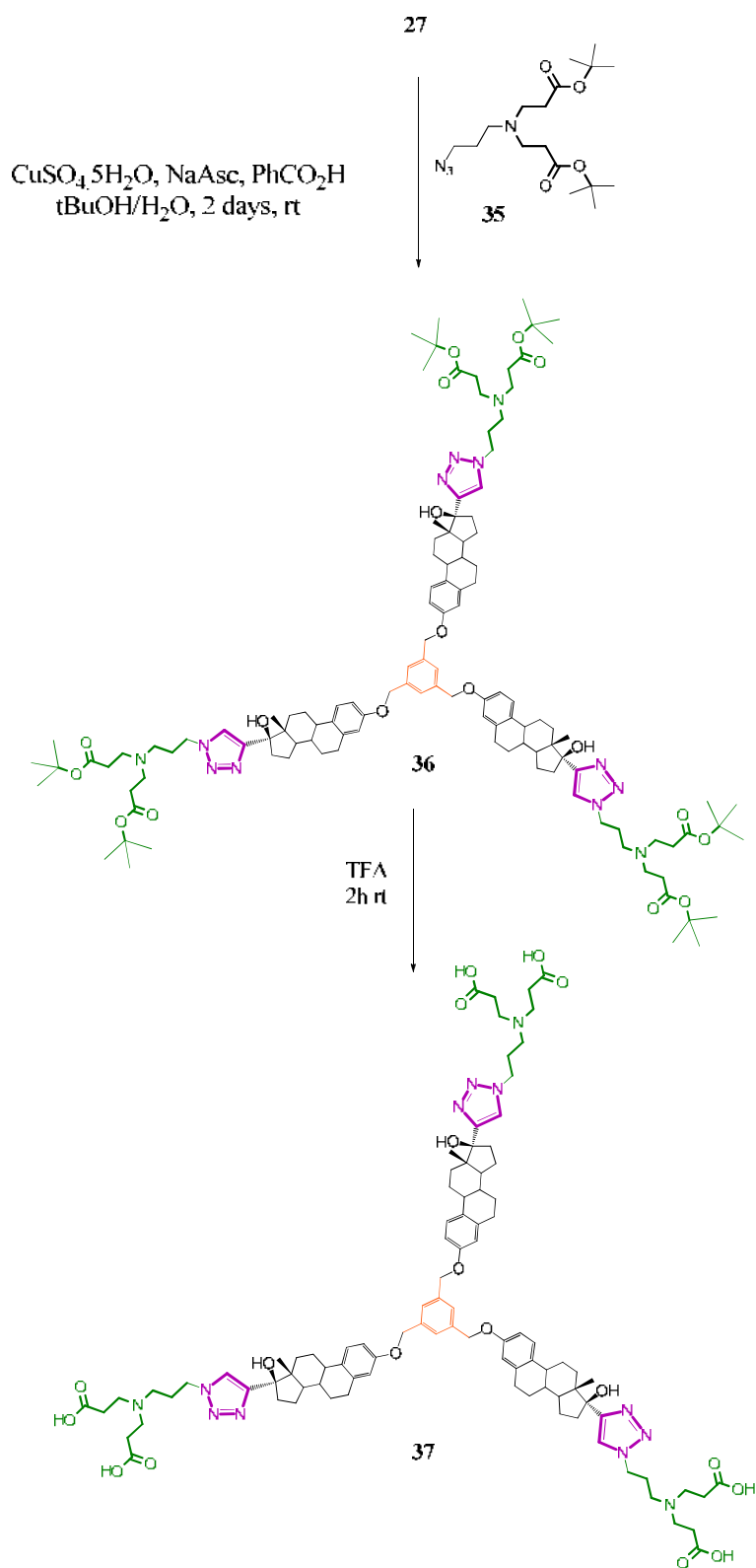


Esquema 4.8 Síntesis de la dendrona **35** con grupo azida como punto focal.

Teniendo en cuenta las características de las micelas unimoleculares, se sintetizó una micela dendrímica con tres elementos importantes: i) un núcleo lipofílico que puede ser ampliado progresivamente favoreciendo la encapsulación de moléculas lipofílicas, ii) tener al 17 $\alpha$ -etinilestradiol como enlazador, ya que puede promover la afinidad hacia otros compuestos esteroidales (sitio de reconocimiento), y iii) tipo de superficie hidrofílica PAMAM con ácidos carboxílicos como grupos terminales. Efectivamente, los dendrímeros con componentes aniónicos han demostrado ser menos tóxicos y menos hemolíticos que sus contrapartes catiónicos.<sup>106,107,108</sup> Los grupos terminales carboxílicos fueron sometidos a una reacción ácido-base con NaOH para producir los correspondientes carboxilatos.

Una vez obtenida la dendrona **35** se llevó a cabo el acoplamiento con el conjugado esteroideal **27** con tres unidades de 17 $\alpha$ -etinilestradiol como núcleo lipofílico, mediante la reacción de cicloadición entre los grupos alquino del esteroide y la azida de la dendrona tipo PAMAM de generación 0.5 con grupos terminales éster (Esquema 4.9). Se siguieron las condiciones de reacción establecidas por Shao et. al,<sup>109</sup> obteniendo a **37** en rendimiento del 77 %. Una vez que se logró el acoplamiento, los grupos éster se hidrolizaron en ácido trifluoroacético obteniéndose la micela dendrímica con grupos carboxílicos terminales (**37**). El dendrímero híbrido resultante fue completamente soluble en soluciones buffer de pH 7.0, 7.4, y 8.0.

Estos dendrímeros pueden ser de gran aplicación en el transporte de compuestos bioactivos como fármacos en donde se protegen de la pronta degradación en el organismo liberándose por cambios de pH.



Esquema 4.9 Síntesis de la micela unimolecular 37.

La formación de la micela dendrímica fue confirmada por la comparación de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  del dendrímico esteroide **27** con el espectro de **36**. En el espectro de  $^1\text{H}$  de **36** se puede notar la ausencia del protón en 2.61 ppm correspondiente al grupo alquino en su precursor **27** y en 7.63 (H-20') ppm aparece una nueva señal que corrobora la formación del triazol. En el espectro de  $^1\text{H}$  las señales correspondientes a la dendrona tipo PAMAM se traslapan con las señales correspondientes al fragmento esteroide. Adicionalmente en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.21) las señales correspondientes a C-17', C-19' y C-20' se desplazan debido al nuevo ambiente químico por la formación del triazol.

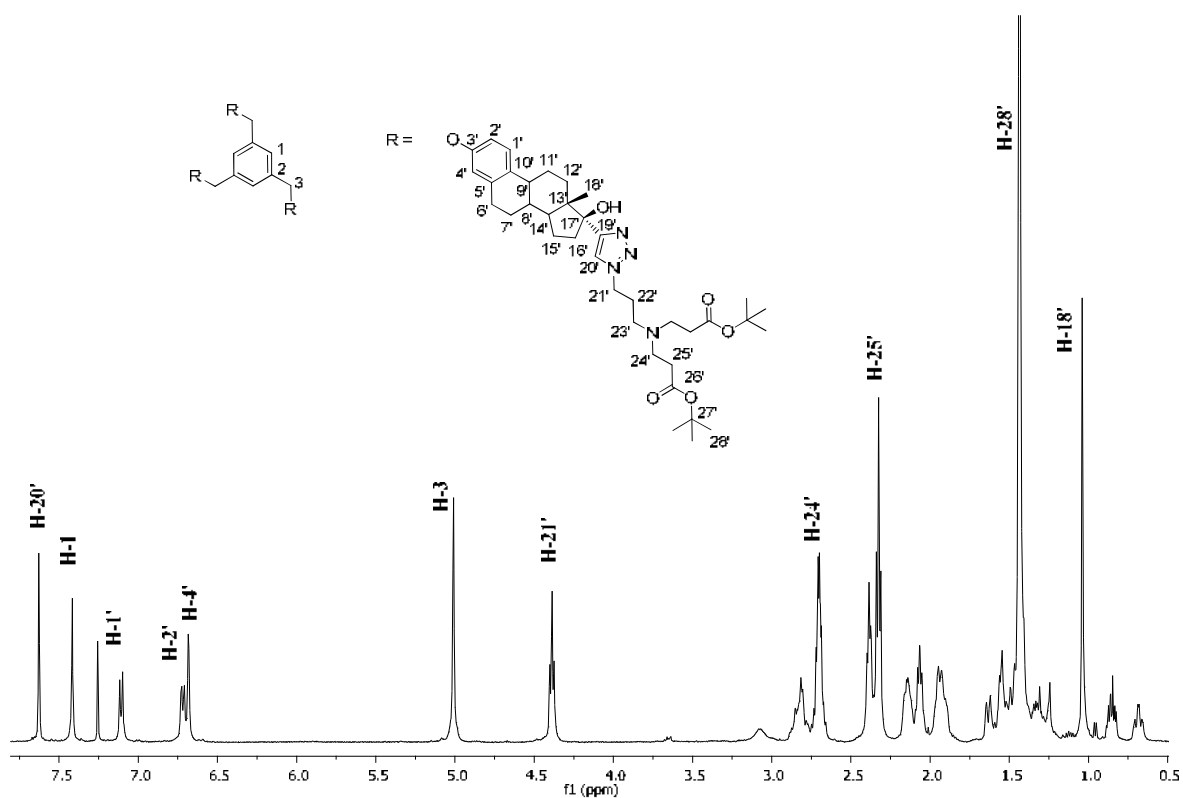


Figura 4.21 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del dendrímico híbrido Frechet-PAMAM **36**

#### **4.5 Dendrímeros tipo fenilalil éter (APE) de primera (47) y segunda (49) generación con núcleo de fluoroglucinol.**

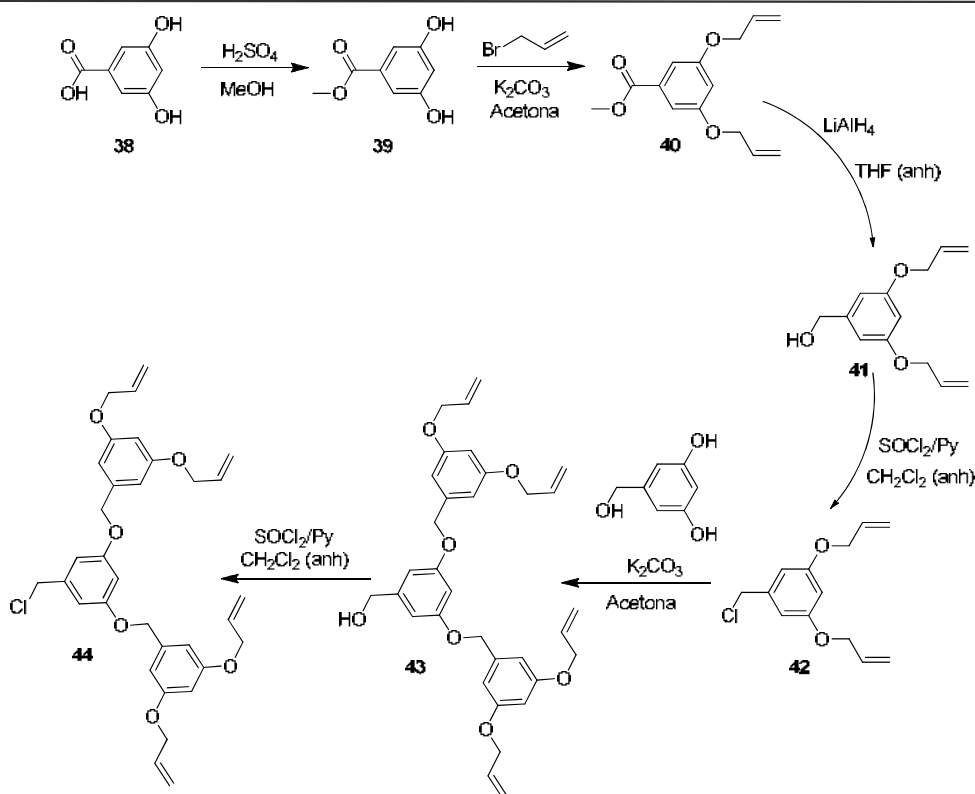
En esta parte del trabajo, se describe la síntesis de nuevos dendrímeros tipo fenilalil éter con fluoroglucinol como núcleo y al 3,5-dialiloxibenzil alcohol como unidad de ramificación funcionalizados en la periferia con seis grupos alilos para la primera generación y doce para la segunda por medio de ambos métodos (divergente y convergente). Los grupos alilo son útiles para incorporar carboranos en la periferia, mientras que la eliminación selectiva de los mismos nos permite continuar el crecimiento del dendrímero. De esta forma, se pudieron comparar las dos rutas sintéticas y establecer el mejor método de síntesis para la obtención de dicho dendrímero.

##### **4.5.1 Síntesis de la unidad de ramificación 42 y de la dendrona 44**

Para la obtención tanto de la unidad de ramificación (42)<sup>110</sup> como de la dendrona G2 (44) (Esquema 4.10), se partió del ácido 3,5-dihidroxibenzóico (38) para su posterior esterificación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en metanol obteniéndose el compuesto (39). La protección de los grupos hidroxilo con bromuro de alilo en acetona (40), reducción del grupo éster (41) y la sustitución por cloro condujo a la unidad de ramificación (42) como una miel ámbar.

La síntesis de la dendrona de segunda generación (44)<sup>88</sup> se llevó a cabo mediante la sustitución nucleofílica de dos equivalentes del compuesto 5 con el 3,5 dihidroxibencilalcohol en acetona. La obtención de dichos compuestos se corroboró con los datos de RMN descritos en la literatura.<sup>88, 110</sup>





**Esquema 4.10** Síntesis de la unidad de ramificación **42** y de la dendrona de segunda generación **44** con grupos alilo en la periferia.

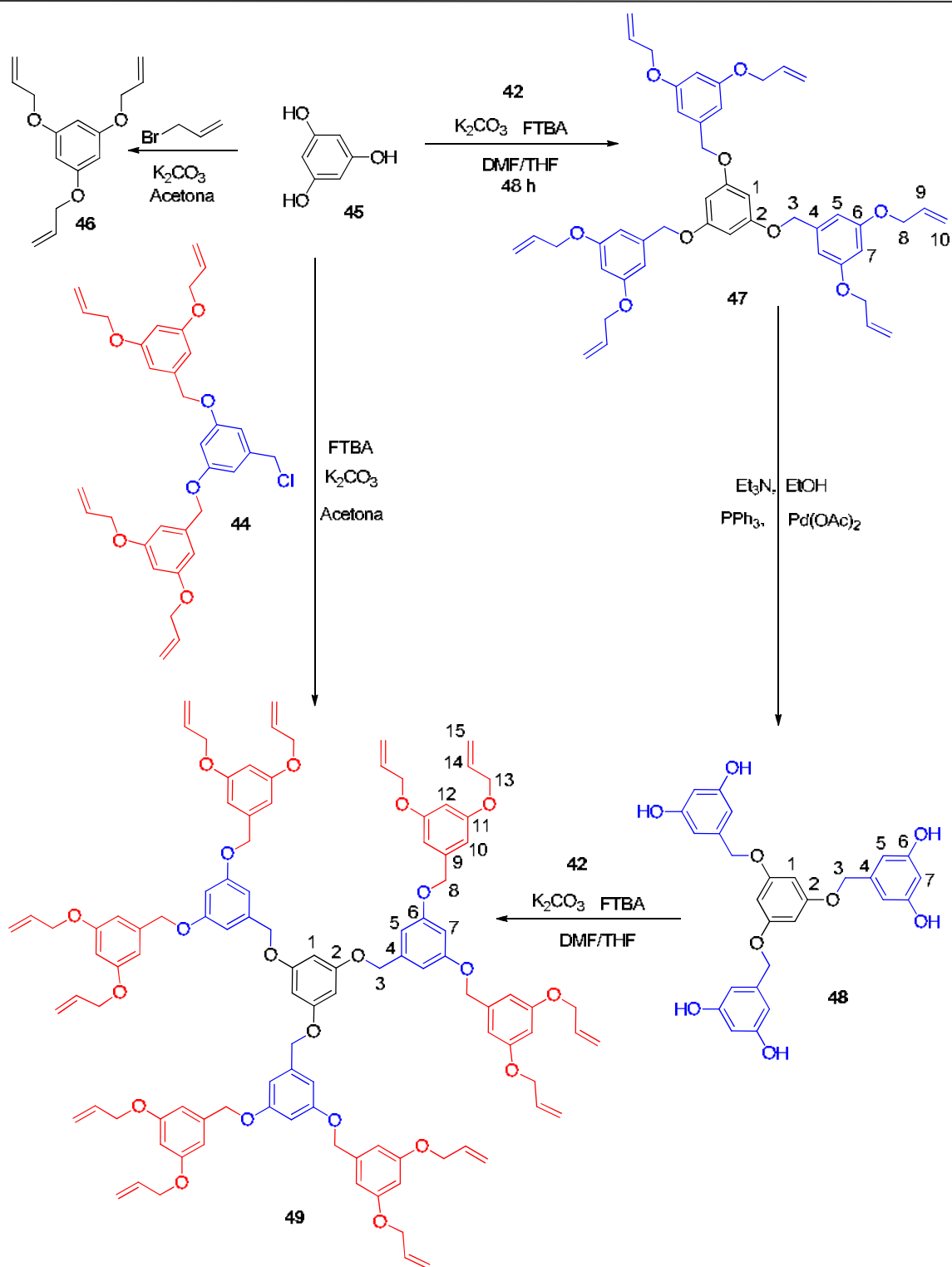
#### 4.5.2 Síntesis y caracterización de los dendrímeros alilfenil éter **47** y **48**

Una vez obtenidas la unidad de ramificación **42** y la dendrona **44** se llevó a cabo la preparación del dendrímero de segunda generación con doce grupos alilo en la periferia (**49**) mediante el método divergente (Esquema 4.11). El primer paso de la síntesis consistió en el acoplamiento al fluoroglucinol (**45**) como núcleo, con tres equivalentes de la unidad de ramificación (**42**) en DMF/THF para obtener el dendrímero G1 con seis alilos en la periferia (**47**) como un aceite color ámbar en un rendimiento del 52 %.

Cabe mencionar que esta reacción se llevó a cabo en diferentes disolventes como acetona y acetonitrilo, sin embargo, bajo estas condiciones de reacción se obtenían subproductos derivados de sustituciones incompletas aún en tiempos de reacción muy largos, encontrando la mezcla de DMF/THF como óptima para la síntesis de dichos compuestos.

Posteriormente, para continuar con el crecimiento del dendrímero siguiendo la metodología divergente, se llevó a cabo la remoción de los grupos alilo del compuesto **47** con Pd(OAc)<sub>2</sub> en EtOH, obteniendo al compuesto **48**, con hidroxilos como grupos terminales (Esquema 4.11). Cabe mencionar que **48** se utilizó directamente en el siguiente paso de acoplamiento, debido a que no fue posible purificarlo usando soportes como silica gel y florisil ya que el compuesto se retiene. Finalmente, el dendrímero de segunda generación con doce alilos (**49**), se obtuvo por el acoplamiento de **42** sobre **48** empleando una mezcla de DMF: THF como disolvente. El compuesto **49** se purificó mediante cromatografía en placa preparativa, usando hexano:acetato de etilo (7:3) como fase móvil, obteniéndose en un rendimiento del 30 %.

Por otro lado, con la metodología convergente, la síntesis consistió en el acoplamiento de tres equivalentes de la dendrona G2 **44** al núcleo **45** en acetona y fluoruro de tetrabutilamonio (FTBA) como catalizador para dar el compuesto **49** con un rendimiento del 40 %. Es importante resaltar que al comparar las dos rutas sintéticas para la obtención del compuesto **49**, el método convergente ofrece mayores ventajas en cuanto al método de purificación, ya que el producto final se aisló fácilmente, debido a la diferencia en los pesos moleculares de los subproductos que se forman en el transcurso de las reacciones y de este modo se incrementó un 10 % el rendimiento final. En el Esquema 19 también se muestra la ruta de síntesis para la obtención del compuesto **46**<sup>111</sup> modificando la ruta reportada para dicho compuesto.



**Esquema 4.11** Ruta sintética divergente y convergente para la obtención del dendrímero G2 (49) con 12 alilos en la periferia.

Caracterización espectroscópica de los dendrímeros fenilalil éter **47** y **49**.

La formación de los compuestos en cada etapa de reacción se corroboró por varias técnicas espectroscópicas identificando los principales cambios en los grupos funcionales en cada paso de reacción.

Una de las características principales de los dendrímeros es que pueden presentar un alto grado de simetría, lo cual representa una ventaja al ser caracterizados por la técnica de RMN debido a la obtención de espectros sencillos de asignar. En la Tabla 4.4 se presenta el comparativo en los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  para los dendrímeros de generación 1, 1.5 y 2 (**47**, **48** y **49**) que parten de un núcleo trivalente, presentando un eje de rotación  $C_3$  y tres planos verticales ( $\sigma_v$ ) de simetría por lo que se observa solo un tercio de la molécula.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para el dendrímero G1 **47** con seis grupos alilos en la periferia (Figura 4.22), se observan ocho tipos de protones diferentes. En la región aromática se encuentran tres señales, en 6.59 y 6.46 ppm correspondientes al protón H-5 y H-7, como una señal doble y una triple respectivamente, con una  $J = 2.2$  Hz, debido al acoplamiento entre ambos protones, y en 6.24 ppm una señal simple para el protón H-1 correspondiente al protón del núcleo. Así mismo, se observan las señales características para los cuatro protones del fragmento alílico, donde el protón H-9 aparece como una señal ddt en 6.05 ppm, con  $^3J_{trans} = 17.2$ ,  $^3J_{cis} = 10.5$  y  $^3J = 5.3$  Hz, los protones H-10a y H-10b como señales dt en 5.29 (H-10a) con  $^3J_{cis} = 10.5$  y  $^2J = 1.3$  Hz, y 5.42 ppm con  $^3J_{trans} = 17.2$  y  $^2J = 1.3$  Hz, y el protón H-8 como un dt en 4.52 ppm con  $^3J = 5.3$  Hz, finalmente la señal simple en 4.92 ppm, la cual demuestra la formación del enlace  $\text{CH}_2\text{-O}$  del acoplamiento entre la unidad de ramificación **42** con el núcleo **45**.

El paso siguiente de la reacción consistió en la eliminación de los grupos alilo, observándose en el espectro de  $^1\text{H}$  para el compuesto **48** (Figura 4.22) solo cuatro señales, lo cual corrobora la pérdida del fragmento alílico (Tabla 4.4) y un corrimiento de las señales a frecuencias bajas de los protones H-7 y H-5 con respecto a las observadas para el compuesto

de partida. Para el dendrímero G2 **49** con doce alilos en la periferia (Figura 4.22) se observan diez señales, de las cuales cinco se encuentran en la región aromática, y corresponden a los protones de los anillos

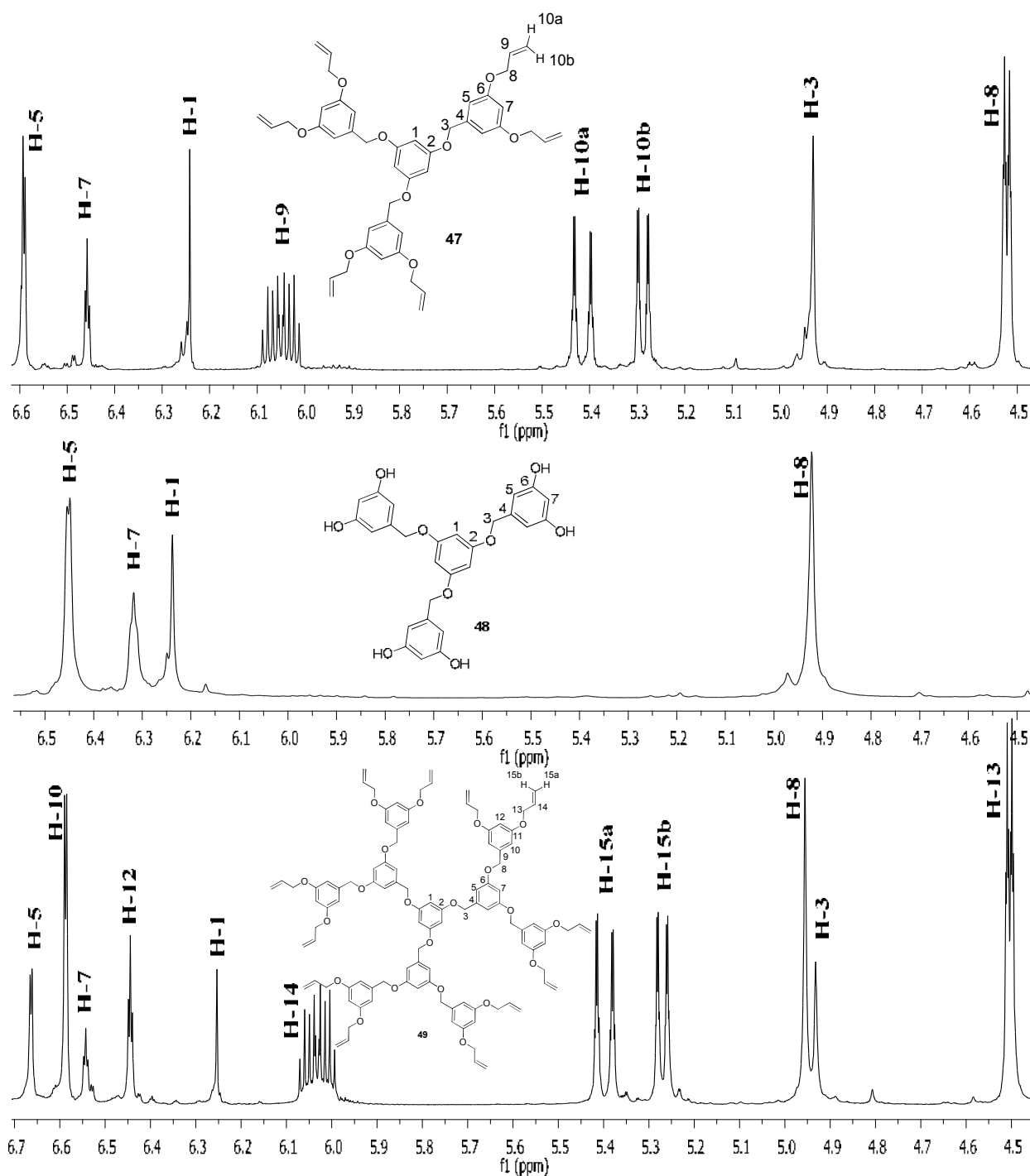


Figura 4.22 Espectros de RMN de <sup>1</sup>H para los dendrímeros **47**, **48** y **49**.

aromáticos que forman la primera generación H-5 y H-7 en 6.66 y 6.54 ppm respectivamente y en 6.58 y 6.44 ppm los protones H-10 como una señal doble y H-12 como una señal triple con  $J = 2.2$  que forman la segunda generación del dendrímero. La señal en 4.95 ppm para H-8 corrobora la formación del nuevo enlace  $\text{CH}_2\text{-O}$  debido la sustitución nucleofílica del protón fenólico del dendrímero G1 **47** y la unidad de repetición **42**.

**Tabla 4.4** Comparativo en los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de los dendrímeros **47**, **48** y **49**.

Compuesto	47		48		49	
	$^1\text{H}(^{13}\text{C})$		$^1\text{H}(^{13}\text{C})$		$^1\text{H}(^{13}\text{C})$	
<b>1</b>	6.24(90.0)	6.23(94.9)	6.25(94.9)			
<b>3</b>	4.92(70.0)	4.92(71.3)	4.93(70.0)			
<b>5</b>	6.59(106.2)	6.44(106.0)	6.66(106.5)			
<b>7</b>	6.46(101.4)	6.31(102.2)	6.54(101.7)			
<b>8</b>	4.52(68.9)		4.95(70.0)			
<b>9</b>	6.05(133.2)				(139.1)	
<b>10</b>	10a 5.29 (117.8) 10b 5.42				6.58(106.2)	
<b>12</b>					6.44(101.4)	
<b>13</b>					4.50(68.9)	
<b>14</b>					6.03(133.1)	
<b>15</b>					15a 5.27 (117.9) 15b 5.40	

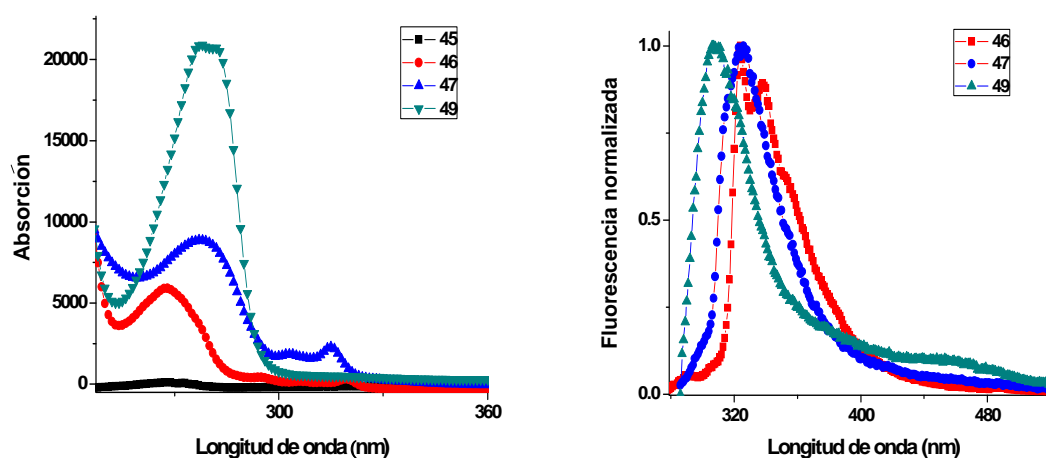
La espectroscopia UV-vis ha sido empleada para calcular el número de unidades terminales y corroborar el nivel de funcionalización y caracterización para metalodendrimeros.<sup>88</sup> La interacción entre las unidades periféricas en una estructura dendrítica es relativamente pequeña en el estado basal, de modo que cada unidad puede ser excitada de forma independiente y el espectro de absorción del dendrimeros será el resultado de la suma de las unidades periféricas, dando lugar a la ampliación de los efectos.<sup>112</sup> De tal manera, es posible correlacionar el número de grupos unidos en la periferia por su respuesta de emisión, incluso aún si estos grupos tienen una emisión de fluorescencia débil.

Los espectros de absorción y emisión para el núcleo de fluoroglucinol (**45**), y los compuestos **46**, **47** y **49** se determinaron empleando una concentración de  $3 \times 10^{-5}$  M en acetonitrilo y los datos obtenidos se resumen en la Tabla 4.5. A excepción del núcleo, los compuestos **46**, **47** y **49** muestran una banda de absorción fuerte en el intervalo de 268 y 278 nm debido al cromóforo fenólico, y la intensidad de la absorción incrementa conforme aumenta la generación (Figura 4.23).

**Tabla 4.5** Datos de absorción y emisión electrónica para los compuestos **46**, **47** y **49** con 3, 6 y 12 grupos alilo respectivamente en acetonitrilo.

Compuesto	$\lambda_{\max}$ (Abs)	$\lambda_{\max}$ (Em)	$\epsilon_{\max}$
	[nm]	[nm]	[dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
<b>7</b>	268		127
<b>8</b>	268	324	5912
<b>9</b>	277	326	8877
<b>11</b>	278	307	20880

<sup>a</sup>Todas las soluciones fueron preparadas en una concentración de  $3 \times 10^{-5}$  M a 25°C.



**Figura 4.23** a) Espectro de absorción; b) espectro de emisión de los compuestos **46**, **47** y **49** a  $3 \times 10^{-5}$  M en acetonitrilo

Basados en los datos obtenidos por espectroscopia de UV-vis se aplicó la ley de Lambert-Beer como método de caracterización de los dendrímeros determinando el número de grupos funcionales en la periferia. Tomando en cuenta que la cantidad de radiación absorbida es proporcional al número de moléculas que absorben la radiación, siendo ésta la absorptividad molar ( $\epsilon_{\max}$ ),<sup>113</sup> se estimó el número de grupos alilo terminales para cada dendrímero mediante la comparación de los coeficientes de absorción molar ( $\epsilon$ ) de los dendrímeros **47** y **49** con la obtenida para el compuesto **46** con tres grupos alilo en la periferia ( $\epsilon_0$ ).

En la Tabla 4.6 se muestran los valores de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) para los dendrímeros y el número de grupos alilo terminales calculados mediante la ley de Lambert-Beer. Haciendo una correlación lineal entre ambas variantes se puede observar que el número de grupos alilo calculados coinciden con el número de alilos teóricos, corroborando que la espectroscopia UV-vis es una técnica que puede servir como una herramienta importante para estimar el número de grupos terminales mediante el uso de la ley de Lambert-Beer.



**Tabla 4.6** Grupos alilo terminales empleando la ley de Lambert-Beer para los compuestos **46**, **47** y **49**.

Compuesto	$\lambda_{\text{max}}$ (Abs) [nm]	Grupos alilo esperados	$\epsilon_{\text{max}}$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	Grupos alilo calculados <sup>a</sup>
<b>8</b>	268	3	$\epsilon_0 = 5182.45$	
<b>9</b>	277	6	10324.50	5.98
<b>11</b>	278	12	20402.91	11.81

<sup>a</sup> [( $\epsilon/\epsilon_0$ )(3)]: representa el número de grupos alilo calculados mediante la ley de Lambert-Beer.

En resumen, en esta parte del trabajo se prepararon y caracterizaron dendrímeros de primera y segunda generación con seis y doce grupos alilo en la periferia. El dendrímero de segunda generación se obtuvo empleando las dos rutas sintéticas concluyendo que el método convergente para este tipo de dendrímeros no incrementa el rendimiento, ni reduce defectos estructurales que se pueden presentar al emplear el método divergente.

Estos dendrímeros serán usados como plataformas para la incorporación de carboranos como posibles fármacos en el tratamiento del cáncer. La incorporación de los carboranos se realizará en el grupo de la Dra. Rosario Nuñez en el Instituto de Ciencia de Materiales, CSIC, Campus U.A.B., 08193, Barcelona, España, Departamento de Química.

---

---

## CAPITULO 5. CONCLUSIONES

1. Para la obtención de los conjugados se probaron las rutas convergente y divergente, encontrando que la ruta convergente no ofrece ventajas dado que no se logran reducir los pasos de reacción, ni se mejoran los rendimientos. Por lo anterior, se obtuvieron los conjugados esteroidales por el método divergente.
2. Por el método divergente se obtuvieron dos familias dendriméricas, la primera formada por un núcleo de tetrametileno flexible, obteniendo dendrímeros de primera (**13**, **14** y **15**), segunda (**16**, **17** y **18**) y tercera generación (**19**). La segunda familia con un núcleo aromático trisustituido (**25** y **26**). A partir de los resultados de las pruebas de la actividad citotóxica se concluye que el núcleo de tetrametileno al ser más flexible favorece la interacción del conjugado esteroideal con la célula.
3. Se llevó a cabo la funcionalización de los dendrímeros con  $17\alpha$ -etinilestradiol y  $17\alpha$ -estradiol, conocidos por su actividad citotóxica, con la carga máxima del fármaco en el dendrímero obteniendo en buenos rendimientos cuatro conjugados G1 (**20**, **21**) y G2 (**22**, **23**) con núcleo de tetrametileno y cuatro conjugados más con núcleo aromático trisustituido G0 (**27**, **28**) y G1 (**29**, **30**) que serán evaluados frente a diferentes líneas celulares cancerígenas.
4. Los conjugados esteroidales **20-23** y **27-30** fueron evaluados *in vitro* mostrando **20** y **21** buena actividad citotóxica frente a líneas celulares cancerígenas: CEM (leucemia crónica). Dicha actividad demostró ser selectiva, al no atacar a células humanas no cancerígenas en concentraciones menores a 50  $\mu\text{M}$ .  
Se encontró que el conjugado **22** presenta buena actividad frente a la línea HeLa, sin ser selectivo ya que en menor grado también presenta actividad frente CEM y MCF-7 afectando las células control.  
Se determinó que el efecto del núcleo y el dendrimérico influyen en la actividad citotóxica ya que al tener un núcleo más pequeño y al incrementar la generación, el

dendrímtero tiende a formar estructuras globulares compactas, y con mayor impedimento estérico para interactuar con la célula.

5. Se sintetizó un dendrímtero híbrido del tipo Frechet-PAMAM **37** como micela unimolecular con potencial aplicación en el encapsulamiento de fármacos. El diseño de esta micela permite modular su solubilidad en agua mediante reacciones acido-base de los grupos carboxílicos terminales.
6. Se llevó a cabo la síntesis de nuevos dendrímteros de alilfenil éter de primera y segunda generación por medio de los métodos divergente y convergente. Esto permitió establecer que el método convergente no ofrece ventajas para la síntesis de estos derivados debido a que no se obtienen mejores rendimientos.

## CAPITULO 6. PERSPECTIVAS

Dado que los resultados de la actividad anticancerígena de los conjugados esteroidales dendriméricos G1 (**20** y **21**) fue buena, se propone continuar con las pruebas farmacológicas y de liberación *in vitro*, como una nueva clase de compuestos en el tratamiento contra el cáncer.

Realizar la funcionalización de los dendrímeros con grupos que incrementen su solubilidad en agua para la aplicación en sistemas biológicos.

Evaluar las propiedades del dendrímero **37** como posible cápsula molecular en el acarreamiento de fármacos lipofílicos; así como evaluar la afinidad para encapsular otros compuestos esteroidales (sitio de reconocimiento).

Realizar la incorporación de carboranos en los dendrímeros **47** y **49**, para su posible aplicación como profármacos en el tratamiento del cáncer. La incorporación de los carboranos se realizará en el grupo de la Dra. Rosario Nuñez en el Instituto de Ciencia de Materiales, CSIC, Campus U.A.B., 08193, Barcelona, España, Departamento de Química.

---

## CAPITULO 7. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

### 7.1 Materiales y métodos

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de una y dos dimensiones de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HETCOR, DEPT  $90^\circ$  y  $135^\circ$  se determinaron en espectrómetros JEOL ECA 500, JEOL Eclipse 400 y Bruker 300 Avance, utilizando dimetilsulfoxido (DMSO- $d_6$ ), cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol- $d_4$  y acetona- $d_6$  como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm), mientras que para las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se presentan en Hertz (Hz). Para la asignación de las señales se utilizaron las siguientes abreviaturas: s = señal simple, d = señal doble, t = señal triple, dd = señal doble de dobles.

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrómetro Varian FT-IR Series 640 ATR. Los datos se expresan en longitudes de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para los máximos principales de absorción.

Los espectros de alta resolución obtenidos por las técnicas de ESI-TOF (*Electron Spray Ionization time of flight*) o APCI-TOF (*Atmosferic Pressure Chemical Ionization Time of Flight*) fueron determinados con un espectrómetro Agilent Technologies LC/MSD TOF acoplado a un cromatógrafo de líquidos (HPLC) modelo 1100. Los espectros obtenidos por la técnica MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of-Flight*) se obtuvieron en un espectrómetro Applied Biosystems Voyager DE-STR MALDI-TOF.

Los puntos de fusión fueron determinados empleando el equipo Electrothermal 9200.

La determinación de las estructuras cristalinas mediante el análisis de difracción de rayos-X se realizó en un difractor Enraf Nonius-Fr Kappa-CCD ( $\lambda\text{MoK}\alpha = 0.71073 \text{ \AA}$ , con monocromador de grafito), CCD modo de escaneo de imágenes rotatorias. El refinamiento de las estructuras se llevó a cabo con el programa SHELXL-97 incluido en el programa WinGX

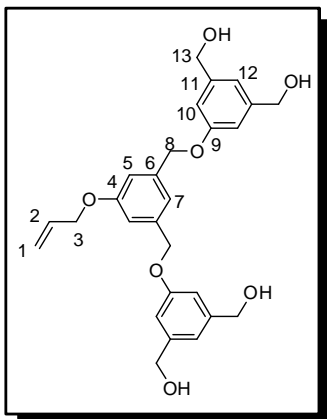
versión 1.80.05. Los hidrógenos se colocaron geoméricamente. Las figuras y las interacciones supramoleculares se graficaron en el programa DIAMOND y MERCURY.

La purificación de los compuestos se realizó por cromatografía en columna empacadas con gel de sílice grado 60(70-230 mallas), utilizando mezclas de disolventes como eluyente. El seguimiento de las reacciones así como la pureza de los productos se determinó por cromatografía de capa fina (TLC), utilizando placas de 5cm x 2.5 cm cubiertas por sílica gel de 0.2 mm de espesor, provistas de un factor de revelado F<sub>254</sub>. Para el revelado de las placas se utilizó una lámpara de luz ultravioleta de onda corta (254nm) y vainillina.

Los siguientes reactivos y disolventes fueron adquiridos en la casa comercial Aldrich: ácido 5-hidroxiisoftálico, 1,4-dibromobutano, fluoruro de tetrabutil amonio (FTBA), 18-corona-6, Hidruro de litio y aluminio (LiAlH<sub>4</sub>), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido bromhídrico (HBr), carbonato de potasio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), benzofenona, cloruro de amonio, bicarbonato de sodio, hidruro de calcio (CaH<sub>2</sub>), dimetilsulfoxido (DMSO), dimetilformamida (DMF); tetrahidrofurano (THF), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), metanol (MeOH), acetato de etilo (EtOAc); acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), hexano, acetona. El THF para la reacción de reducción de esterés, se secó a reflujo con sodio/benzofenona y se destiló a presión reducida bajo atmósfera de nitrógeno para garantizar las condiciones anhidras necesarias. El cloruro de metileno se seco con CaH<sub>2</sub> a reflujo y se destiló a presión reducida bajo atmósfera de nitrógeno.

## 7.2 Síntesis de las dendronas tetra funcionalizadas

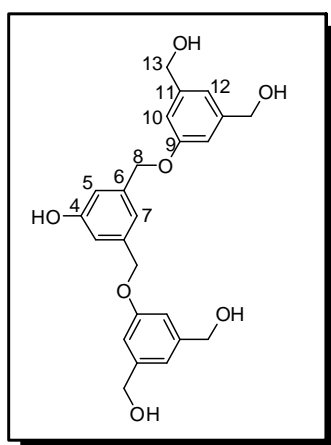
### 7.2.1 Dendrona 3,5-Bis(3,5-bis(hidroximetil)fenoximetil)fenilalil éter (**7**)



En un matraz balón de 100 mL se colocaron 1.50g (9.74 mmol) de 3,5-bis(hidroximetil)fenol (**6**), 4.43 g (32.10 mmol) de  $K_2CO_3$  y 1 mg de FTBA en 60 mL de acetona bajo agitación magnética. Después de 15 min se adicionaron 1.12 g (4.87 mmol) de 3,5-bis(clorometil)aliloxibenceno (**5**), la mezcla de reacción se mantuvo a reflujo durante 48 h. Al término de la reacción se filtraron las sales, se lavó con acetona y se concentró a presión reducida para obtener una miel ámbar que se purificó por columna cromatográfica empleando una mezcla  $CH_2Cl_2:MeOH$

(90:10) obteniendo a **7**, como sólido color blanco (1.51g, 66%) p. f. 111-113°C. IR ( $\nu_{max}/cm^{-1}$ ): 3191 (OH), 2896, 2866 (C-H), 1595 (C=C), 1445, 1367, 1294(O-C), 1153, 1066, 1027, 964, 932, 840, 755, 702, 683, 674, 571. RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 500 MHz)  $\delta_H$ : 7.05 (1H, señal ancha, H-7), 6.92 (2H, señal ancha, H-12), 6.90 (2H, señal ancha, H-5), 6.87 (4H, señal ancha, H-10), 6.01 (1H, m, H-2), 5.36 (1H, dt,  $J = 17.3, 1.6$  Hz, H-1a), 5.21 (1H, dt,  $J = 10.5, 1.6$  Hz, H-1b), 5.00 (4H, s, H-8), 4.53 (8H, s, H-13), 4.49 (2H, dt,  $J = 5.3, 1.6$  Hz, H-3). RMN  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 125 MHz)  $\delta_C$ : 159.0 (C-9, C-4), 143.1 (C-11), 139.2 (C-6), 133.4 (C-2), 118.3 (C-7), 117.5 (C-5), 116.3 (C-1), 112.7 (C-12), 111.8 (C-10), 69.2 (C-8), 68.4 (C-3). HRMS (APCI) (m/z): calculada para  $C_{27}H_{34}O_7N$   $[M + NH_4]^+$  484.2335, encontrada 484.2328  $[M + NH_4]^+$ .

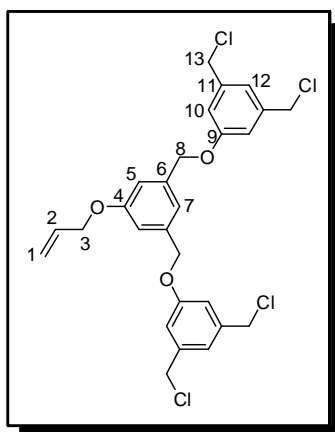
### 7.2.2 Dendrona 3,5-bis(3,5-bis(hidroximetil)fenoxi)metilfenilo (**8**).



En un matraz de 50 mL se adicionaron 0.68 g (1.46 mmol) de la dendrona 3,5-bis(3,5-bis(hidroximetil) fenoximetil)fenilalil éter (**7**), 0.09 g (0.36 mmol) de  $Ph_3P$ , y 5 gotas (0.19 mmol:0.19 mmol) de una mezcla de ácido fórmico-trietilamina (1:1) en etanol como disolvente. La mezcla de reacción se desgasificó por 30 minutos con  $N_2$ , y se agregaron 0.05 g de acetato de paladio (II). El crudo de reacción se purificó por columna cromatográfica empleando una fase móvil de  $CH_2Cl_2:MeOH$  (98:2), obteniendo a **8** como un sólido blanco

(0.400 g, 54 %) p. f. 104-106 °C. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3358, 3207 (OH), 2898, 2861, 1593, 1447, 1363, 1294, 1252 (OH fenólico), 1168, 1145 (C-OH), 1035, 1012, 989, 935, 868, 840, 749, 678, 599, 573. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 6.96 (1H, señal ancha, H-7), 6.91 (2H, señal ancha, H-12), 6.88 (4H, señal ancha, H-10), 6.81 (2H, señal ancha, H-5), 5.01 (4H, s, H-8), 4.54 (8H, s, H-13). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.1 (C-9), 157.6 (C-4), 143.1 (C-11), 139.2 (C-6), 117.5 (C-12), 117.0 (C-7), 113.3 (C-5), 111.8 (C-10), 69.3 (C-8), 63.7 (C-13). HRMS (APCI) (m/z): calculada para  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{Na}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  449.1576, encontrada 449.1323  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

### 7.2.3 Dendrona 3,5 Bis (3,5-bis(clorometil)fenoximetil)fenilalil éter (**9**).



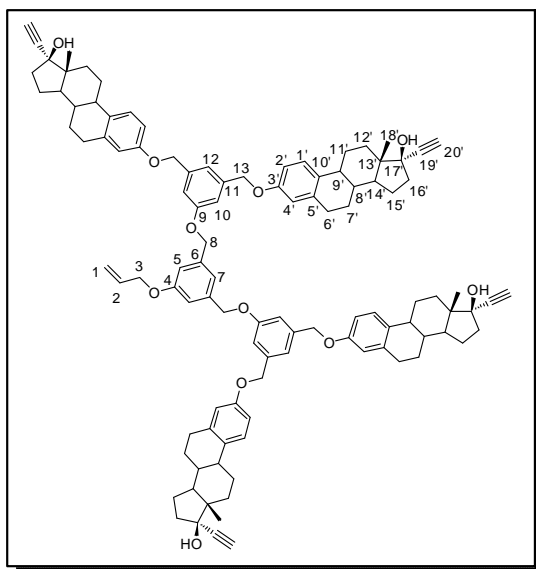
En un matraz balón de 50 mL se adicionaron 1.00 g (2.14 mmol) de la dendrona **7** en 60 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro bajo atmósfera de nitrógeno, posteriormente se adicionaron 0.70 mL (9.43 mmol) de piridina seca y después de 15 min se adicionaron lentamente 0.76 mL (9.43 mmol) de  $\text{SOCl}_2$ . La reacción permaneció a temperatura ambiente en agitación magnética por 48 h. Al término de la reacción se agregó agua para detener la reacción y se realizaron extracciones con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ , la fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se

concentró a presión reducida obteniendo una miel que se purificó por columna cromatográfica utilizando una mezcla de hexano:EtOAc (95:5) obteniendo a **9** como un sólido blanco (0.85 g, 73%) p. f. 82-84°C. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3082 (C=C), 3010, 2908, 2865 (C-H), 1593 (C=C), 1449, 1389, 1330, 1299, 1225, 1173, 1149, 1061, 1038, 993, 975, 938, 857, 839, 745, 706 (C-Cl), 672, 601, 561. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.07 (1H, señal ancha, H-7), 7.02 (2H, t,  $J = 1.3\text{Hz}$ , H-12), 6.97 (2H, d,  $J = 1.3\text{ Hz}$ , H-5), 6.96 (4H, señal ancha, H-10), 6.05 (1H, ddt,  $J = 17.2, 10.5, 5.3\text{ Hz}$ , H-2), 5.42 (2H, dq,  $J = 17.3, 1.6\text{ Hz}$ , H-1a), 5.30 (2H, dq,  $J = 10.5, 1.6\text{ Hz}$ , H-1b), 5.04 (4H, s, H-8), 4.57 (2H, dt,  $J = 5.3, 1.6$ , H-3), 4.54 (8H, señal ancha, H-13). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.2 (C-4), 159.1 (C-9), 139.5 (C-11), 138.5 (C-6), 133.0 (C-2), 121.3 (C-12), 118.7 (C-7), 110.0 (C-1), 115.0 (C-11), 113.4 (C-5), 69.9 (C-8), 69.0 (C-3), 45.8 (C-13). HRMS (APCI) (m/z): calculada para  $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{Cl}_4\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  539.0714, encontrada 539.0707, 541.0685, 543.0668, 545.0644  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



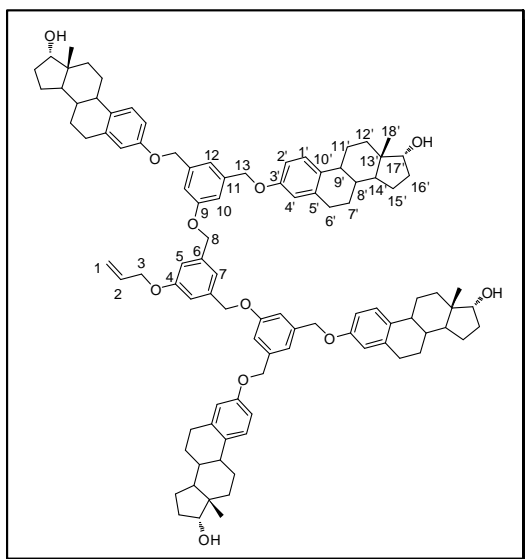
### 7.3 Síntesis de las dendronas esteroideas derivadas del 17 $\alpha$ -etinilestradiol y del 17 $\alpha$ -estradiol

#### 7.3.1 Dendrona esteroidea derivada del 17 $\alpha$ -etinilestradiol (**10**).



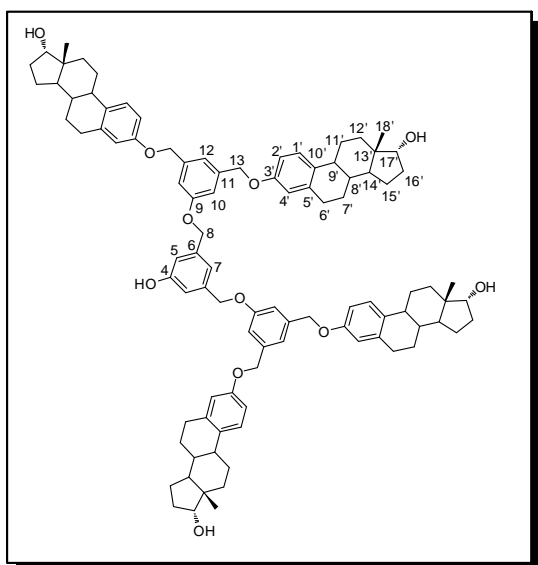
En un matraz balón se colocaron 0.18 g (0.59 mmol) de 17 $\alpha$ -etinilestradiol, 0.27 g (1.96 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 1 mg de FTBA en acetonitrilo bajo agitación magnética. Una vez disueltos los componentes se adicionaron 0.08 g (0.15 mmol) de **9**, la reacción se mantuvo a 70 °C durante 48 h. Al término de la reacción se filtraron las sales y se lavaron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se evaporaron los disolventes a sequedad obteniendo un sólido café, que se purificó por columna cromatográfica con fase móvil de

hexano:acetato de etilo (98:2) obteniendo a **10** como un sólido amarillo claro (0.22 g, 94 %) p. f. 122-124 °C. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3480 (O-H) 3239 (C=C), 2928, 2868 (C-H), 1599 (C=C), 1496, 1454, 1379, 1323, 1290, 1230, 1145, 1046, 1018, 929, 847, 820, 786, 654, 614, 586, 556. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.20 (4H, d,  $J=8.6$ , H-1'), 7.07 (2H, señal ancha, H-12), 7.04 (1H, señal ancha, H-7), 7.00 (4H, señal ancha, H-10), 6.96 (2H, señal ancha, H-5), 6.76 (4H, dd,  $J = 8.6, 2.4$  Hz, H-2'), 6.70 (4H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-4'), 6.05 (1H, ddt,  $J = 17.4, 10.4, 5.3$  Hz, H-2), 5.41 (1H, dt,  $J = 17.4, 1.0$  Hz, H-1a), 5.28 (1H, dt,  $J = 10.4, 1.0$  Hz, H-1b), 5.04 (4H, s, H-8), 5.00 (8H, s, H-13), 4.55 (2H, d,  $J = 5.3$ , H-3), 2.84 (8H, m, H-6'), 2.60 (4H, s, H-20'), 0.88 (12H, s, H-18'). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.2 (C-9), 159.2 (C-4), 156.6 (C-3'), 139.3 (C-11), 138.8 (C-6), 138.1 (C-5'), 133.1 (C-2), 133.0 (C-10'), 126.5 (C-1'), 118.8 (C-12), 118.7 (C-7), 117.9 (C-1), 114.9 (C-4'), 113.3 (C-5), 113.2 (C-10), 112.3 (C-2'), 87.6 (C-19'), 79.9 (C-17'), 74.1 (C-20'), 69.8 (C-8), 69.7 (C-13), 68.9 (C-3), 49.5 (C-14'), 47.2 (C-13'), 43.6 (C-9'), 39.4 (C-8'), 39.0 (C-16'), 32.8 (C-12'), 29.9 (C-6'), 27.3 (C-7'), 26.4 (C-11'), 22.9 (C-15'), 12.8 (C-18'). HRMS (ESI) ( $m/z$ ): calculada para C<sub>107</sub>H<sub>122</sub>O<sub>11</sub>N [M+ NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 1596.9018, encontrada 1596.9022 [M+ NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

7.3.2 Dendrona esteroidea derivada del 17 $\alpha$ -estradiol (**11**).

En un matraz balón se colocaron 0.27 g (0.98 mmol) de 17 $\alpha$ -estradiol, 0.45 g (3.26 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 1 mg de FTBA en acetonitrilo bajo agitación magnética. Una vez disueltos los componentes se adicionaron 0.13 g (0.25 mmol) de **9**, la reacción se mantuvo a 70 °C durante 48 h. Al término de la reacción se filtraron las sales y se lavaron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se evaporaron los disolventes a sequedad obteniendo un sólido amarillo que se purificó por columna cromatográfica con una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH

(99:1), obteniendo a la dendrona **11** como un sólido color amarillo claro (0.34 g, 94 % ) p.f. 131-133°C. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3418 (O-H), 2929(C=C alqueno), 2869(C-H), 2865, 1598 (C=C aromático), 1495, 1454, 1377, 1321, 1294, 1231 (C-O), 1154, 1101, 1073, 1053, 1035, 969, 932, 844,817, 788, 723, 643, 620, 581. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.20 (4H, d,  $J = 8.5$ , H-1'), 7.07 (2H, señal ancha, H-12), 7.00 (4H, señal ancha, H-10), 6.95 (2H, señal ancha, H-5), 6.75 (4H, dd,  $J = 8.5, 2.4$  Hz, H-2'), 6.70 (4H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-4'), 6.01 (1H, m, H-2), 5.41 (1H, dt,  $J = 17.3, 1.6$  Hz, H-1a), 5.21 (1H, dt,  $J = 10.6, 1.6$  Hz, H-1b), 5.04 (4H, s, H-8), 4.99 (8H, s, H-13), 4.49 (2H, d,  $J = 5.1, 1.6$  Hz, H-3), 3.80 (4H, d,  $J = 5.9$  Hz, H-17'), 2.84 (8H, m, H-6'), 0.69 (12H, s, H-18'). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.2 (C-9), 159.2 (C-4), 156.6 (C-3'), 139.3 (C-11), 138.8 (C-6), 138.2 (C-5'), 133.2 (C-2), 133.1 (C-10'), 126.4 (C-1'), 118.7 (C-12), 117.9 (C-1), 114.9 (C-4'), 113.3 (C-5), 113.2 (C-10), 112.3 (C-2'), 80.1 (C-17'), 69.8 (C-8), 69.8 (C-13), 68.9 (C-3), 47.8 (C-14'), 45.6 (C-13'), 43.7 (C-9'), 39.1 (C-8'), 32.5 (C-12'), 31.5 (C-16'), 30.0 (C-6'), 28.1 (C-7'), 26.3 (C-11'), 24.3 (C-15'), 17.1 (C-18'). HRMS (ESI) (m/z): calculada para C<sub>99</sub>H<sub>122</sub>O<sub>11</sub>N [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 1500.9018, encontrada 1500.9012 [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

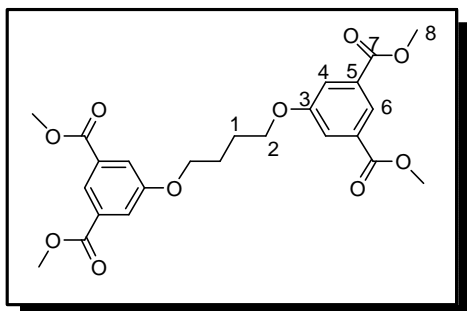
7.3.3 Dendrona esteroidal derivada del 17 $\alpha$ -estradiol con punto focal activo (**12**)

En un matraz balón de 100 mL se disolvió 0.20 g (0.14 mmol) de la dendrona (**11**), 0.008 g (0.03 mmol) de Ph<sub>3</sub>P y 5 gotas de una solución de ácido fórmico: trietilamina (0.19 mmol: 0.19 mmol) en 20 mL de etanol, la solución se desgasificó con nitrógeno por 30 min, posteriormente, se adicionó 1 mg de acetato de paladio (II) y la mezcla de reacción permaneció a reflujo por 48 h. Terminada la reacción se adicionó agua y se realizaron extracciones con EtOAc evaporando la fase orgánica a presión

reducida para obtener una miel ámbar que se purificó por columna de sílice con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH (99:1) obteniendo a **12** como un sólido amarillo tenue (0.194 g, 51.14 %) p.f. 117-119 °C. IR (v<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>): 3345(O-H), 2391, 2866(C-H), 1597(C=C aromático), 1496, 1455, 1377(CH<sub>3</sub>), 1322, 1296(C-O éter), 1230(O-H fenol), 1155, 1030, 967, 941, 844, 783, 720, 686, 627, 607, 586, 561. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ<sub>H</sub>: 7.20 (4H, d, J = 8.6, H-1'), 7.07 (2H, señal ancha, H-12), 7.03 (4H, señal ancha, H-7), 6.99 (4H, señal ancha, H-10), 6.85 (2H, señal ancha, H-5), 6.75 (4H, dd, J = 8.5, 2.4 Hz, H-2'), 6.70 (4H, d, J = 2.4 Hz, H-4'), 5.02 (4H, s, H-8), 4.99 (8H, s, H-13), 3.80 (4H, d, J = 5.7 Hz, H-17'), 2.84 (8H, m, H-6'), 0.69 (12H, s, H-18'). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ<sub>C</sub>: 159.1 (C-9, C-4), 156.6 (C-3'), 139.4 (C-11), 139.2 (C-6), 138.2 (C-5'), 126.4 (C-1'), 118.8 (C-12), 114.9 (C-4'), 113.8 (C-5), 113.1 (C-10), 112.3 (C-2'), 80.1 (C-17'), 69.7 (C-13), 69.5 (C-8), 47.8 (C-14'), 45.6 (C-13'), 43.7 (C-9'), 39.1 (C-8'), 32.5 (C-12'), 31.5 (C-16'), 30.0 (C-6'), 28.1 (C-7'), 26.3 (C-11'), 24.3 (C-15'), 17.1 (C-18').

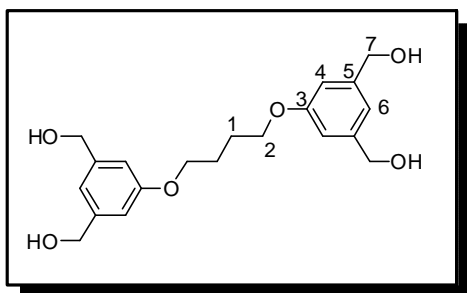
## 7.4 Síntesis de los dendrímeros de G1, G2 y G3 con núcleo de tetrametileno

### 7.4.1. Dendrímero 1,4-bis(3,5-bis(carboximetil)fenoxi)butano (**13**).



En un matraz balón se colocaron 4.29 g (20.41 mmol) de **2** y 8.29 g (59.98 mmol) de  $K_2CO_3$  en acetonitrilo, se adicionó lentamente 1.1 mL (9.26 mmol) de 1,4-dibromobutano y 1 mg de 18-corona-6 y la reacción se mantuvo a 70 °C durante 72 h. Al término de la reacción se filtraron las sales y se lavaron con  $CH_2Cl_2$ . Los disolventes se evaporaron a sequedad obteniendo a **13** como un sólido beige (4.30 g, 98 %) p.f. 152-153 °C (Lit<sup>100,101</sup>) 152-153 °C). IR ( $\nu_{max}/cm^{-1}$ ): 2951, 2852, 2360, 1725 (O-C=O), 1596, 1453, 1433, 1337, 1312, 1238 (C-O), 1111 (C-O), 1050, 1018, 1000, 902, 875, 753, 671, 628. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta_H$ : 8.24 (2H, t,  $J = 1.5$  Hz, H-6), 7.71 (4H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-4), 4.11 (4H, m, H-2), 3.91 (12H, s, H-8), 2.01 (4H, m, H-1). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta_C$ : 166.2 (C-7), 159.0 (C-3), 131.8 (C-5), 123.0 (C-6), 119.8 (C-4), 68.0 (C-2), 52.4 (C-8), 25.8 (C-1). HRMS (ESI) (m/z): calculada para C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>O<sub>10</sub> [M + H]<sup>+</sup> 475.1604, encontrada 475.1583 [M + H]<sup>+</sup>.

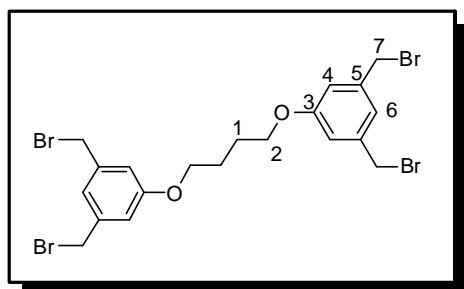
### 7.4.2 Dendrímero 1,4-bis(3,5-bis(hidroximetil)fenoxi)butano (**14**).



Siguiendo el procedimiento general para la reducción de ésteres, se preparó una suspensión de 3.00 g (6.32 mmol) de  $LiAlH_4$  en THF anhidro bajo atmósfera de  $N_2$  y se adicionó lentamente la solución de 1.52 g (40.00 mmol) de **13** en THF anh. La mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 24 h. Al término de la reacción se enfrió y se adicionó lentamente una solución saturada de cloruro de amonio, se filtraron las sales y se lavaron con EtOAc. Los disolventes se evaporaron a sequedad obteniendo **14** como un sólido color blanco (1.52 g, 56 %) p.f. 147-149 °C. IR ( $\nu_{max}/cm^{-1}$ ): 3291 (OH), 3170, 2943, 2873, 2853, 1595, 1449, 1297, 1265, 1168, 1064, 1027 (C-O), 979, 918, 841, 701, 677, 607. RMN <sup>1</sup>H (DMSO- $d_6$ , 300 MHz)  $\delta_H$ : 6.82 (2H, señal ancha, H-6), 6.73 (4H, señal ancha, H-4), 4.42 (8H, s, H-7),

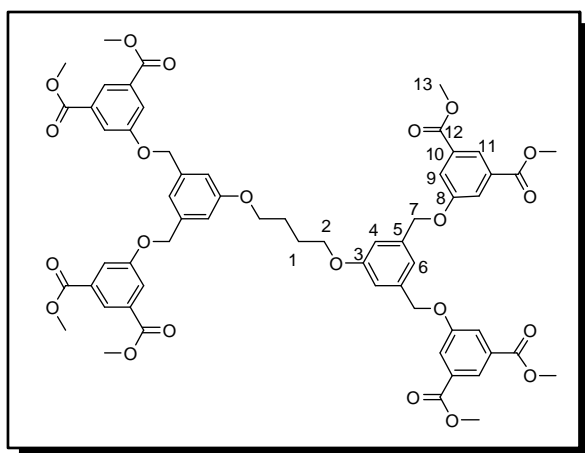
3.99 (4H, m, H-2), 3.35 (OH), 1.84 (4H, m, H-1). RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.0 (C-3), 144.3 (C-5), 116.9 (C-6), 111.0 (C-4), 67.4 (C-2), 63.2 (C-7), 25.9 (C-1). HRMS (ESI) (m/z): calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{Na}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  385.1627, encontrada 385.1609  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

#### 7.4.3 Dendrímero 1,4-bis(3,5-bis(bromometil)fenoxi)butano (**15**).



En un matraz balón se colocaron 1.28 g (3.53 mmol) de **14**, posteriormente se adicionó lentamente una solución de  $\text{HBr}:\text{H}_2\text{SO}_4$  (2:1) 66.66 mL (2,306.88 mmol) y 33.33 mL (625.30 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación magnética y a temperatura de  $110\text{ }^\circ\text{C}$  durante una hora, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió sobre agua fría, la fase orgánica se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , (3x150 mL), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y los disolventes se evaporaron a sequedad para obtener un sólido color beige que se purificó por columna cromatográfica en sílice 60 PF empleando una mezcla hexano:EtOAc (99:1) obteniendo a **15**, como sólido color blanco (1.84 g, 84 %) p.f.  $126\text{-}128\text{ }^\circ\text{C}$ , IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 2928, 2871, 1593, 1452, 1388, 1328, 1296 (C-O), 1166 (C-O-C), 1055, 1019, 940, 870, 848, 732, 697, 671, 648 y 633 (C-Br). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 6.99 (2H, señal ancha, H-6), 6.85 (4H, señal ancha, H-4), 4.42 (8H, s, H-7), 4.04 (4H, m, H-2), 1.98 (4H, m, H-1). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.3 (C-3), 139.6 (C-5), 121.8 (C-6), 115.2 (C-4), 67.5 (C-2), 32.9 (C-7), 25.8 (C-1).

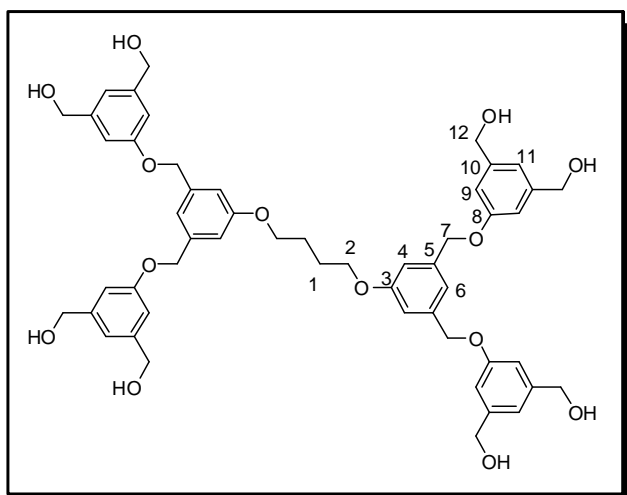
#### 7.4.4 Dendrímero 1,4-bis(3,5-bis(3,5-bis(carboximetil)fenoximetil)fenoxi)butano (**16**).



En un matraz balón se colocaron 0.13 g (0.62 mmol) de **2** y 0.30 g (2.17 mmol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en 20 mL de acetonitrilo, bajo agitación magnética. Posteriormente se adicionó 0.10 g (0.16 mmol) de **15**, transcurridos 5 min se agregó 1 mg de FTBA y la mezcla de reacción se mantuvo a  $70\text{ }^\circ\text{C}$  durante 72 horas. Al término de la reacción se filtraron las sales y se lavaron con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , el filtrado

se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó a vacío, para obtener a **16** como un sólido color blanco (0.15 g, 82 %) p. f. 176-177 °C. IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 2954, 1721 (O-C=O), 1597, 1431, 1339, 1311, 1239 (C-O), 1170, 1113, 1064, 1043, 1000, 907, 875, 836, 792, 752, 721, 682, 564.. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 8.27 (4H, señal ancha, H-11), 7.81 (8H, señal ancha, H-9), 7.08 (8H, señal ancha, H-6), 6.96 (4H, señal ancha, H-4), 5.10 (2H, s, H-7), 4.08 (4H, señal ancha, H-2), 3.92 (24H, s, H-13), 2.00 (4H, señal ancha, H-1). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 166.1 (C-12), 159.7 (C-3), 158.7 (C-8), 138.1 (C-5), 131.9 (C-10), 123.4 (C-11), 120.1 (C-9), 118.5 (C-6), 113.3 (C-4), 70.2 (C-7), 67.6 (C-2), 52.5 (C-13), 26.0 (C-1). HRMS (ESI) (m/z): calculada para  $\text{C}_{60}\text{H}_{58}\text{O}_{22}\text{Na}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  1153.3317, encontrada 1153.3315  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

#### 7.4.5 Dendrímtero 1,4-bis(3,5-bis(3,5-bis(hidroxi metil))fenoximetil)fenoxi butano (**17**).

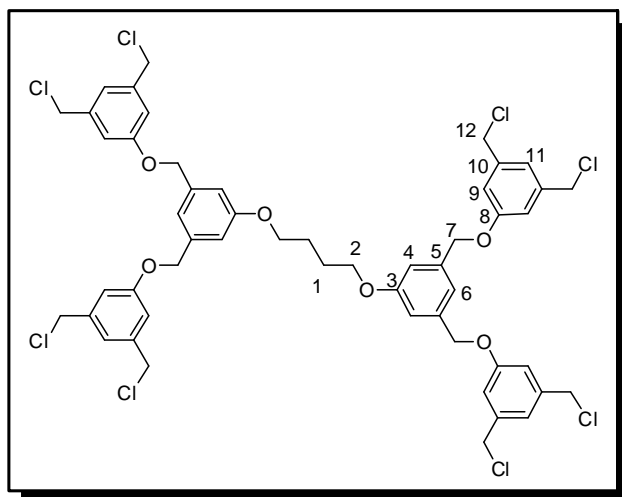


En un matraz balón de dos bocas de 100 mL se colocaron 0.04 g (1.05 mmol) de  $\text{LiAlH}_4$  en THF anhidro bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  y se adicionó lentamente la suspensión de 0.10 g (0.09 mmol) de **16** en THF anhidro. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 24 h. Al término de la reacción, se enfrió y se adicionó lentamente una solución

saturada de cloruro de amonio hasta que dejó de reaccionar. Posteriormente se agregó EtOAc y agua hasta que la reacción fue nula. Se filtraron las sales y se lavaron con EtOAc, los disolventes se evaporaron a sequedad obteniendo a **17** como un sólido color blanco (0.042 g, 53 %). y p.f. 146-147 °C. IR-ATR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3317 (OH), 2918, 2850, 2359, 1720, 1595, 1451, 1375, 1294, 1256, 1154, 1110, 1021 (C-O), 843, 801, 752, 684. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.18 (2H, señal ancha, H-6), 7.08 (4H, señal ancha, H-11), 6.85 (4H, señal ancha, H-4), 6.82 (8H, señal ancha, H-9), 5.04 (8H, s, H-7), 4.44 (16H, s, H-12), 4.05 (4H, señal ancha, H-2), 2.48 (8H, señal ancha, OH), 1.87 (4H, señal ancha, H-1). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.2 (C-3), 158.7 (C-8), 144.4 (C-10), 139.4 (C-5), 118.9 (C-6), 117.3 (C-11), 113.2 (C-4), 111.3 (C-9), 69.3 (C-7), 67.6 (C-2), 63.3 (C-12), 25.8 (C-1). HRMS

(APCI) (m/z): calculada para  $C_{52}H_{58}O_{14}Na$   $[M + Na]^+$  929.3724 encontrada 929.3720  $[M + Na]^+$ .

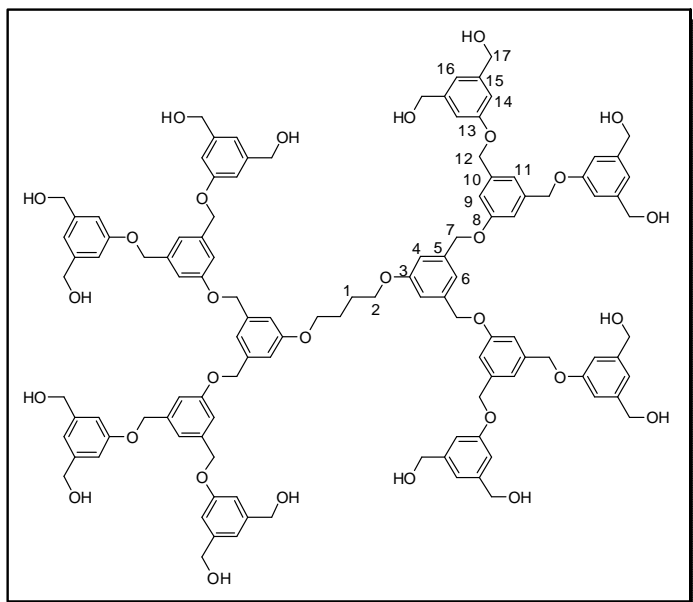
#### 7.4.6 Dendrímtero 1,4-Bis(3,5-Bis(3,5-Bis(clorometil))fenoximetil)fenoxibutano (**18**)



En un matraz balón se disolvió 0.75 g (0.83 mmol) de **17** en 60 mL de  $CH_2Cl_2$  anhidro en atmosfera de  $N_2$ , se inyectaron 0.59 mL (7.28 mmol) de piridina seca y 0.52 mL (7.28 mmol) de  $SOCl_2$ , dejando la reacción bajo agitación magnética por 48 h monitoreando por TLC. Al término de la reacción se adicionó agua lentamente y la fase orgánica se extrajo con  $CH_2Cl_2/H_2O$ , evaporando a sequedad. El

compuesto fue separado de la mezcla de reacción mediante lavados con agua y hexano obteniendo a **18** como un sólido beige (0.58 g, 67 %) p.f.107-109 °C. IR ( $\nu_{max}/cm^{-1}$ ): 2957, 2876 (C-H), 1729, 1594(C=C), 1259 (C-O éter), 1454, 1326, 1300, 1259, 1158, 1043, 958, 842, 708 (C-Cl), 674, 583. RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta_H$ : 7.06 (2H, señal ancha, H-6), 7.01 (4H, señal ancha, H-11), 6.95 (8H, señal ancha, H-9), 6.94 (4H, señal ancha, H-4), 5.04 (8H, s, H-7), 4.53 (16H, s, H-12), 4.07 (4H, señal ancha, H-2), 1.99 (4H, señal ancha, H-1). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 175 MHz)  $\delta_C$ : 159.6 (C-3), 159.2 (C-8), 139.4 (C-10), 138.5 (C-5), 121.3 (C-11), 118.5 (C-6), 115.0 (C-9), 113.2 (C-4), 69.9 (C-7), 67.6 (C-2), 45.8 (C-12), 26.0 (C-1). MALDI MS TOF calculada para  $C_{52}H_{51}Cl_8O_6$ ,  $[M + H]^+$  1051.1194, encontrada 1050.1887  $[M + H]^+$ .

7.4.7 Dendrímero 1,4-Bis(3,5-Bis(3,5-Bis(3,5-bis(hidroximetil))fenoximetil)fenoximetil)fenoxibutano (**19**)



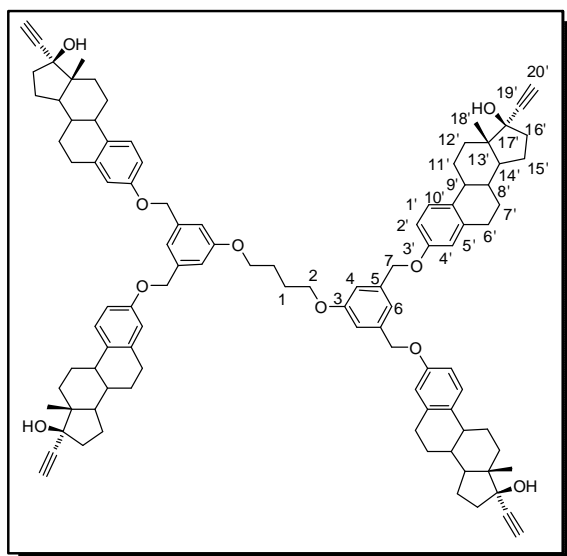
En un matraz balón de 50 mL se colocaron 1.00 g (2.34 mmol) de la dendrona **8**, 1.06 g (7.74 mmol) de  $K_2CO_3$  y FTBA en 30 mL de acetona. Posteriormente se adicionaron 0.35 g (0.58 mmol) de **15**, manteniendo la mezcla de reacción a reflujo durante 48 h. Al término de la reacción se observó la formación de un una miel ámbar que se lavó con acetona, y se precipitó con una solución MeOH/

hexano, para obtener a **19** como un sólido amarillo (0.490 g, 42 %) p.f. 185-187 °C. IR ( $\nu_{max}/cm^{-1}$ ): 3305 (OH), 2931, 2873, 2622, 1737, 1645, 1612, 1594(C=C aromático), 1447, 1393, 1370, 1324, 1292, 1228 (C-O éter), 1149, 1006, 983, 830, 701, 661, 596, 560. RMN  $^1H$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz)  $\delta_H$ : 7.24 (2H, señal ancha, H-6), 7.23 (4H, señal ancha, H-11), 7.17 (8H, señal ancha, H-16), 7.11 (8H, señal ancha, H-9), 6.93 (16H, señal ancha, H-14), 5.21 (8H, s, H-7), 5.10 (16H, s, H-12), 4.55 (32H, s, H-17), 4.13 (4H, señal ancha, H-2), 1.95 (4H, señal ancha, H-1). RMN  $^{13}C$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz)  $\delta_C$ : 159.2 (C-3), 159.2 (C-8), 159.0 (C-13), 144.5 (C-15), 139.6 (C-10), 139.3 (C-5), 119.3 (C-6), 119.2 (C-11), 117.2 (C-9), 113.4 (C-16), 111.3 (C-14), 69.7 (C-7), 69.3 (C-12), 67.7 (C-2), 63.7 (C-17), 26.0 (C-1).



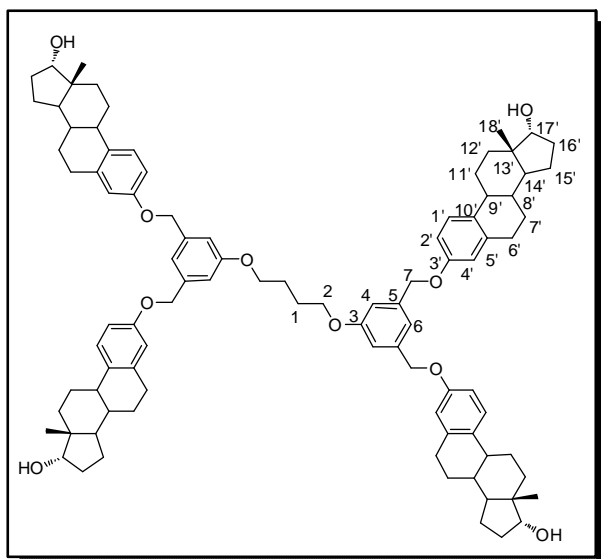
## 7.5 Conjugados esteroideos dendriméricos de (G1) y (G2) con núcleo de tetrametileno

### 7.5.1. Conjugado esteroideo dendrimérico G1 derivado del 17 $\alpha$ -etinilestradiol (**20**).



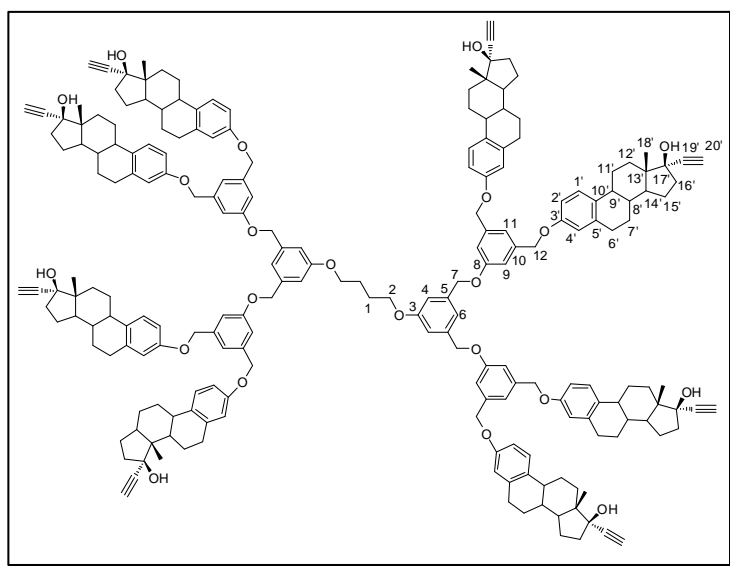
En un matraz balón se colocaron 0.19 g (0.64 mmol) de 17 $\alpha$ -etinilestradiol, 0.30 g (2.17 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 1 mg de FTBA en acetonitrilo, bajo agitación magnética. Una vez disueltos los componentes se adicionó 0.1 g (0.16 mmol) de (**15**). La reacción se mantuvo a 70 °C durante 72 horas. Al término de la reacción se filtraron las sales y se lavaron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se evaporaron los disolventes al vacío obteniendo un sólido color amarillo que se purificó por columna

cromatográfica en silica 60 PF con una mezcla hexano:EtOAc (60:40) para obtener a **20** como sólido color amarillo claro (0.18 g, 74 %) p.f. 129-131 °C. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3282 ( $\equiv\text{C-H}$ ), 2923, 2855, 2161 ( $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 1716, 1662, 1601, 1496, 1456, 1377, 1289, 1231, 1159, 1058, 1021, 844, 734, 624. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.20 (4H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-1'), 7.05 (2H, señal ancha, H-6), 6.92 (4H, señal ancha, H-4), 6.76 (4H, dd,  $J = 8.6, 2.7$  Hz, H-2'), 6.70 (4H, d,  $J = 2.7$  Hz, H-4'), 4.98 (8H, s, H-7), 4.05 (4H, señal ancha, H-2), 2.60 (4H, señal ancha, H-20'), 0.87 (12H, s, Me-18'). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.5 (C-3), 156.7 (C-3'), 139.2 (C-5), 138.1 (C-5'), 132.9 (C-10'), 126.5 (C-1'), 118.5 (C-4), 114.9 (C-4'), 112.9 (C-6), 112.4 (C-2'), 87.6 (C-19'), 79.9 (C-17'), 74.2 (C-20'), 69.9 (C-7), 67.6 (C-2), 49.5 (C-14'), 47.2 (C-13'), 43.6 (C-9'), 39.4 (C-8'), 39.0 (C-16'), 32.8 (C-12') 29.9 (C-6'), 27.3 (C-7'), 26.4 (C-11'), 26.0 (C-1), 22.9 (C-15'), 12.8 (C-18') HRMS (ESI) (m/z): calculada para C<sub>100</sub>H<sub>114</sub>O<sub>10</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup> 1497.8304, encontrada 1497.8284 [M + Na]<sup>+</sup>.

7.5.2 Conjugado esteroidal dendrimerico G1 derivado del 17 $\alpha$ -estradiol (**21**).

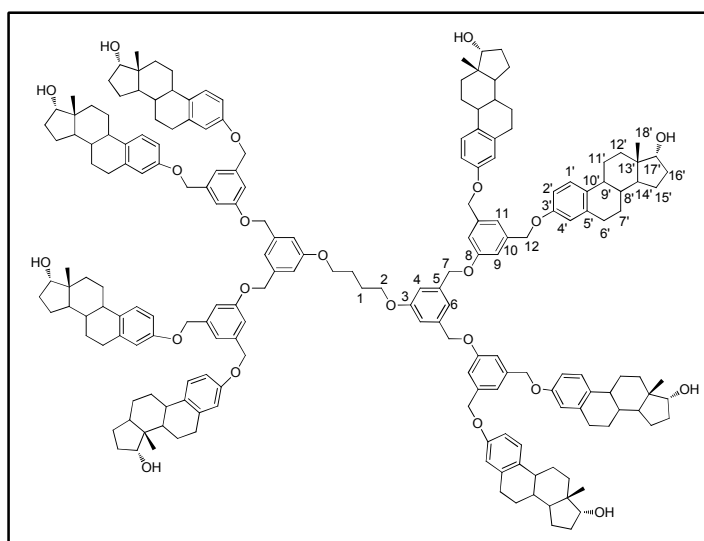
En un matraz balón se colocaron 0.18 g (0.66 mmol) de 17 $\alpha$  estradiol, 0.30 g (2.17 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 1 mg de FTBA en acetonitrilo, bajo agitación magnética. Una vez disueltos los componentes se adicionaron 0.10 g (0.16 mmol) de **15** y la reacción se mantuvo a 70 °C durante 72 h. Al término de la reacción se filtraron las sales, se lavaron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se evaporaron los disolventes a sequedad obteniendo un sólido amarillo que se

purificó por columna cromatográfica con una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (90:10), obteniendo al conjugado esteroidal **21** como un sólido color amarillo claro (0.18 g, 80 %) p.f. 154-156 °C. IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3399, 2929, 2865, 2162, 2029, 1978, 1602, 1552, 1496, 1454, 1376, 1285, 1231, 1156, 1100, 1033, 968, 940, 844, 784, 665, 609. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.20 (4H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-1'), 7.04 (2H, señal ancha, H-6), 6.92 (4H, señal ancha, H-4), 6.75 (4H, dd,  $J = 8.6, 2.6$  Hz, H-2'), 6.70 (4H, d,  $J = 2.6$  Hz, H-4'), 4.99 (8H, s, H-7), 4.05 (4H, señal ancha, H-2), 0.70 (12H, s, Me-18'). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.5 (C-3), 156.7 (C-3'), 139.2 (C-5), 138.1 (C-5'), 133.1 (C-10'), 126.4 (C-1'), 118.4 (C-4), 114.9 (C-4'), 112.9 (C-6), 112.3 (C-2'), 80.1 (C-17'), 69.8 (C-7), 67.5 (C-2), 47.8 (C-14'), 45.6 (C-13'), 43.7 (C-9'), 39.1 (C-8'), 32.5 (C-12'), 31.5 (C-16'), 30.0 (C-6'), 28.1 (C-7'), 26.3 (C-11'), 26.0 (C-1), 24.3 (C-15'), 17.1 (C-18'). HRMS (APCI) (m/z): calculada para C<sub>92</sub>H<sub>114</sub>O<sub>10</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup> 1401.8304, encontrada 1401.8315 [M + Na]<sup>+</sup>.

7.5.3. Conjugado dendrimérico esteroidal G2 derivado del 17 $\alpha$ -etinilestradiol (**22**)

En un matraz balón se colocaron 0.56 g (1.90 mmol) de 17 $\alpha$ -etinilestradiol, 0.86 g (6.3 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 1 mg de FTBA en acetonitrilo, bajo agitación magnética. Una vez disueltos los componentes se adicionó 0.25 g (0.24 mmol) de **18** y la reacción se mantuvo bajo agitación magnética a 70 °C por 72 h. Al término de la reacción se observó la

formación de un sólido amarillo, se decantó el líquido de la reacción y el sólido se lavó con H<sub>2</sub>O y hexano obteniendo a **22** como un sólido beige (0.56 g, 75 %) p.f. 175-177 °C. IR (vmax/cm<sup>-1</sup>): 3285, 2930, 2868, 1598, 1496, 1454, 1291, 1231, 1145, 1050, 1020, 843, 786, 571. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta_H$ : 7.18 (8H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-1'), 7.06 (4H, señal ancha, H-11), 7.05 (2H, señal ancha, H-6), 6.99 (8H, señal ancha, H-9), 6.93 (4H, señal ancha, H-4), 6.75 (8H, dd,  $J = 8.6, 2.5$  Hz, H-2'), 6.68 (8H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-4'), 5.01 (8H, s, H-7), 4.97 (16H, s, H-12), 4.05 (4H, señal ancha, H-2), 2.85 (16H, m, H-6'), 2.59 (8H, s, H-20'), 0.86 (24H, s, H-18'). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta_C$ : 159.6 (C-3), 159.2 (C-8), 156.7 (C-3'), 139.3 (C-10), 138.8 (C-5), 138.1 (C-5'), 132.9 (C-10'), 126.5 (C-1'), 118.8 (C-11), 114.9 (C-4'), 113.23 (C-9), 113.16 (C-4), 112.4 (C-2'), 87.6 (C-19'), 79.9 (C-17'), 74.2 (C-20'), 69.9 (C-7), 69.7 (C-12), 67.6 (C-2), 49.5 (C-14'), 47.2 (C-13'), 43.6 (C-9'), 39.4 (C-8'), 39.0 (C-16'), 32.8 (C-12'), 29.9 (C-6'), 27.3 (C-7'), 26.4 (C-11'), 26.0 (C-1), 22.9 (C-15'), 12.8 (C-18'). MALDI-MS TOF calculada para C<sub>212</sub>H<sub>237</sub>O<sub>22</sub>NNa [M + Na + NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 3171.7355, encontrada 3171.7646 [M + Na + NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>.

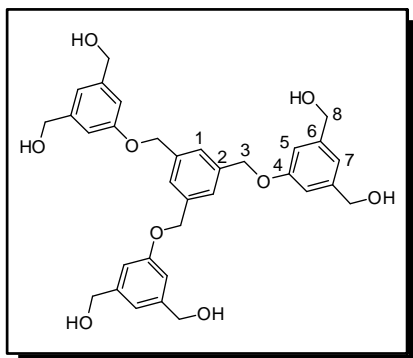
7.5.4 Conjugado dendrimerico esteroideo G2 derivado del 17 $\alpha$ -estradiol (**23**).

En un matraz balón se colocaron 0.045 g (0.17 mmol) de 17 $\alpha$  estradiol, 0.07 g (0.50 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 1 mg de FTBA en acetonitrilo, bajo agitación magnética. A la suspensión formada se adicionaron 0.02 g (0.02 mmol) de **18**, la reacción se mantuvo a reflujo durante 48 horas monitoreando por TLC. Al término de la reacción se observó

la formación de un sólido amarillo, se decantó el líquido de la reacción y el sólido se lavó con H<sub>2</sub>O y hexano obteniendo a **23** como un sólido beige (0.05 g, 89 %) p.f. 169-171 °C. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3451(OH), 2928, 2864 (CH), 1598 (C=C), 1496, 1453, 1376, 1295, 1233, 1155, 1036, 846, 788, 710, 573. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.19 (8H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-1'), 7.07 (4H, señal ancha, H-11), 7.03 (2H, señal ancha, H-6), 6.99 (8H, señal ancha, H-9), 6.94 (4H, señal ancha, H-4), 6.75 (8H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-2'), 6.69 (8H, s, H-4'), 5.02 (8H, s, H-7), 4.05 (4H, señal ancha, H-2), 2.82 (16H, m, H-6'), 0.68 (24H, s, H-18'). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.5 (C-3), 156.7 (C-3'), 139.2 (C-5), 138.1 (C-5'), 133.1 (C-10'), 126.4 (C-1'), 118.8 (C-11), 118.4 (C-4), 114.9 (C-4'), 112.9 (C-6), 112.3 (C-2'), 80.1 (C-17'), 69.9 (C-7), 69.8 (C-12), 67.6 (C-2), 47.8 (C-14'), 45.6 (C-13'), 43.7 (C-9'), 39.1 (C-8'), 32.5 (C-12'), 31.5 (C-16'), 30.0 (C-6'), 28.1 (C-7'), 26.3 (C-11'), 26.0 (C-1), 24.3 (C-15'), 17.1 (C-18'). MALDI-MS TOF: calculada para C<sub>196</sub>H<sub>234</sub>O<sub>22</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup> 2962.7089, encontrada 2962.8896 [M + Na]<sup>+</sup>.

## 7.6 Síntesis de los conjugados dendriméricos con núcleo bencénico trisustituido.

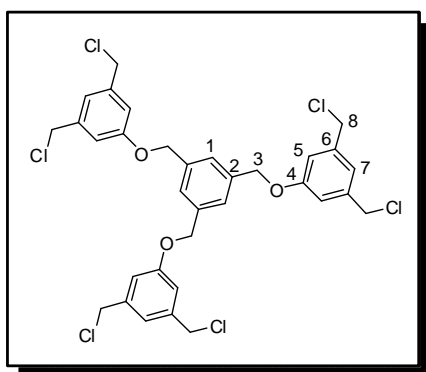
### 7.6.1 Dendrímero 1,3,5-tri (3,5-bis(hidroximetil)fenoxi)benceno (**25**).



En un matraz balón de 100 mL se adicionó 1 g (2.80 mmol) de **6**, 2.32 g (1.68 mmol) de  $K_2CO_3$  y 1 mg de FTBA en acetonitrilo como disolvente, al paso de 15 minutos se adicionó 1.29 g (8.4 mmol) de 1,3,5-tri(bromometil)benceno (**24**) y la reacción se mantuvo a 70 °C durante 48 h. Al término de la reacción se filtraron las sales y se concentró a presión reducida obteniendo una miel ámbar la cual se purificó por columna

cromatográfica con una fase móvil de  $CH_2Cl_2:MeOH$  (95:5) para obtener a **25** como un sólido blanco (0.926 g, 58 %) p.f. 136-139 °C. IR ( $\nu_{max}/cm^{-1}$ ): 3305 (OH), 2919, 2875, 1595, 1453, 1428, 1401, 1374, 1327, 1290, 1238, 1154, 1016 (C-O), 977, 956, 928, 860, 824, 711, 638, 606, 582. RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 500 MHz)  $\delta_H$ : 7.45 (3H, s, H-1), 6.90 (3H, señal ancha, H-7), 6.88 (6H, señal ancha, H-5), 5.07 (6H, s, H-3), 4.53 (12H, s, H-8). RMN  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 125 MHz)  $\delta_C$ : 159.0 (C-4), 143.1 (C-6), 138.1 (C-2), 125.6 (C-1), 117.6 (C-7), 111.8 (C-5), 69.2 (C-3), 63.7 (C-8).

### 7.6.2 Dendrímero 1,3,5-tri (3,5-bis(clorometil)fenoxi)benceno (**26**).



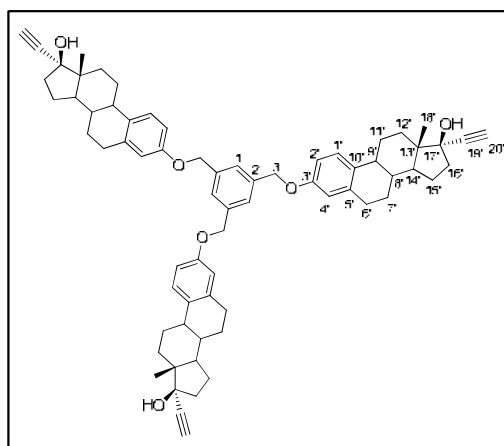
En un matraz balón de 50 mL se disolvieron 0.30 g (0.52 mmol) de **25** en 60 mL de  $CH_2Cl_2$  anhidro en atmosfera de  $N_2$ , posteriormente se adicionó 0.45 mL (6.24 mmol) de piridina seca, seguido de la adición lenta de 0.505 mL (6.24 mmol) de  $SOCl_2$ . La mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 48 h monitoreando por TLC. Al término de la reacción se agregó agua para detener la

reacción, se realizaron extracciones con  $CH_2Cl_2$ , se secó sobre  $Na_2SO_4$  y se concentró a presión reducida obteniendo una miel ámbar la cual se purificó por columna cromatográfica con una mezcla hexano:EtOAc (85:15) para obtener a **26** como un sólido amarillo tenue

(0.290 g, 38 %) p. f. 124-126 °C. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 2921,2867(C-H), 1596(C=C aromático), 1446, 1330, 1301, 1259(C-O éter), 1177, 1045, 959, 858, 709 (C-Cl), 669, 594, 569. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.48 (3H, s, H-1), 7.02 (3H, señal ancha, H-7), 6.97 (6H, señal ancha, H-5), 5.11 (6H, s, H-3), 4.54 (12H, s, H-8). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.1 (C-4), 139.5 (C-6), 137.6 (C-2), 126.2 (C-1), 121.3 (C-7), 115.0 (C-5), 69.8 (C-3), 45.8 (C-8).

## 7.7. Síntesis de los conjugados esteroidales dendriméricos G0 y G1 con núcleo bencénico trisustituido

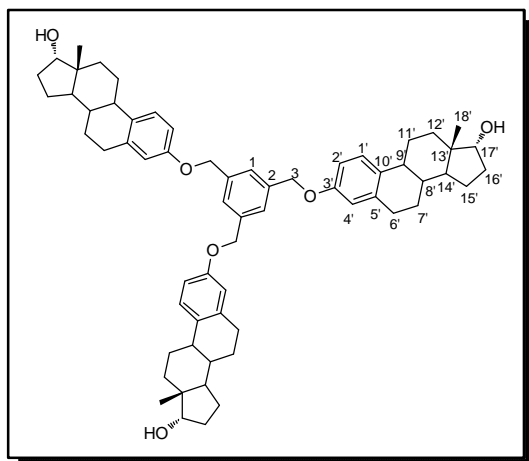
### 7.7.1 Conjugado dendrimérico esteroidal G0 con núcleo aromático trisustituido derivado del 17 $\alpha$ -etinilestradiol (**27**).



En un matraz balón de 25 mL se adicionaron 0.49 g (1.68 mmol) de 17 $\alpha$ -etinilestradiol, 0.77 g (5.54 mmol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y 1 mg de FTBA en acetonitrilo, posteriormente se adicionaron 0.2 g (0.56 mmol) de 1,3,5-tris(bromometil) benceno (**24**). La reacción se mantuvo bajo agitación magnética a 70 °C durante 48 h. Al término de la reacción se filtraron las sales y se lavaron con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se evaporaron los disolventes a presión reducida

obteniendo a **27** como un sólido beige (0.51 g, 91 %) p.f. 142-145 °C. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3287, 2927, 2867, 2360, 2341, 1667, 1607, 1574, 1496, 1455, 1378, 1279, 1251, 1230, 1160, 1101, 1059, 1012, 968, 861, 816, 785, 749, 654, 607, 574. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.44 (3H, s, H-1), 7.21 (3H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-1'), 6.77 (3H, dd,  $J = 8.6, 2.8$  Hz, H-2'), 6.71 (3H, d,  $J = 2.8$  Hz, H-4'), 5.04 (H, s, H-3), 2.83 (6H, m, H-6'), 2.60 (H, s, H-20'), 0.88 (9H, s, H-18'). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 156.7 (C-3'), 138.2 (C-2), 138.1 (C-5'), 133.0 (C-10'), 126.5 (C-1'), 125.9 (C-1), 114.9 (C-4'), 112.4 (C-2'), 87.6 (C-19'), 77.4 (C-17'), 74.1 (C-20'), 69.8 (C-3), 49.5 (C-14'), 47.2 (C-13'), 43.6 (C-9'), 39.5 (C-8'), 39.0 (C-16'), 32.8 (C-12'), 29.9 (C-6'), 27.3(C-7'), 26.5 (C-11'), 22.9 (C-15'), 12.8 (C-18'). HRMS (APCI) (m/z): calculada para  $\text{C}_{69}\text{H}_{78}\text{O}_6$   $[\text{M}]^+$  1002.5798, encontrada 1002.5728  $[\text{M}]^+$

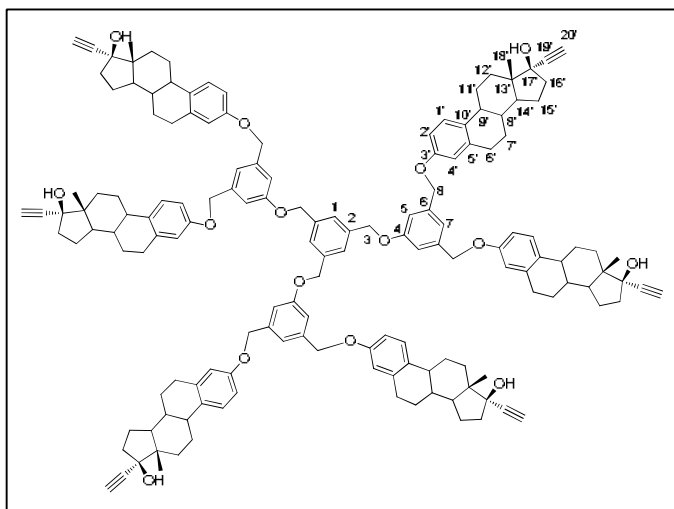
7.7.2 Conjugado esteroidal G0 con núcleo bencénico trisustituido derivado del 17 $\alpha$ -estradiol  
(28)



En un matraz balón de 25 mL se adicionaron 0.25 g (0.93 mmol) de 17 $\alpha$ -estradiol, 0.38 g (2.78 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 1 mg de FTBA en acetonitrilo, posteriormente se adicionaron 0.05 g (0.14 mmol) de 1,3,5-tris(bromometil)benzeno (24). La reacción se mantuvo bajo agitación magnética a 70 °C durante 48 h. Al término de la reacción se filtraron las sales y se lavaron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se evaporaron los disolventes a vacío

obteniendo a **28** como un sólido beige (0.120 g, 92 %) p.f. 140-143 °C. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3320 (OH), 2928, 2864, 2162, 2021, 1606, 1575, 1496, 1454, 1432, 1378, 1279, 1230, 1157, 1100, 1075, 1036, 1011, 970, 943, 918, 856, 818, 786, 707, 634, 580. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.44 (3H, s, H-1), 7.21 (3H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-1'), 6.77 (3H, dd,  $J = 8.5, 2.4$  Hz, H-2'), 6.71 (3H, d,  $J = 2.4$ , H-4'), 5.04 (6H, s, H-3), 3.81 (3H, t,  $J = 3.15$  Hz, H-17'), 2.85 (6H, m, H-6'), 0.69 (9H, s, H-18'). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 156.6 (C-3'), 138.2 (C-2), 138.2 (C-5'), 133.2 (C-10'), 126.5 (C-1'), 125.9 (C-1), 114.9 (C-4'), 112.3 (C-2'), 80.1 (C-7'), 69.8 (C-3), 47.8 (C-14'), 45.6 (C-13'), 43.7 (C-9'), 39.1 (C-8'), 32.5 (C-12'), 31.6 (C-16'), 30.0 (C-6'), 28.1 (C-7'), 26.3 (C-11'), 24.3 (C-15'), 17.1 (C-18'). HRMS (APCI) (m/z): calculada para C<sub>63</sub>H<sub>77</sub>O<sub>5</sub> [M - OH]<sup>+</sup> 913.5849, encontrada 913.5766 [M - OH]<sup>+</sup>.

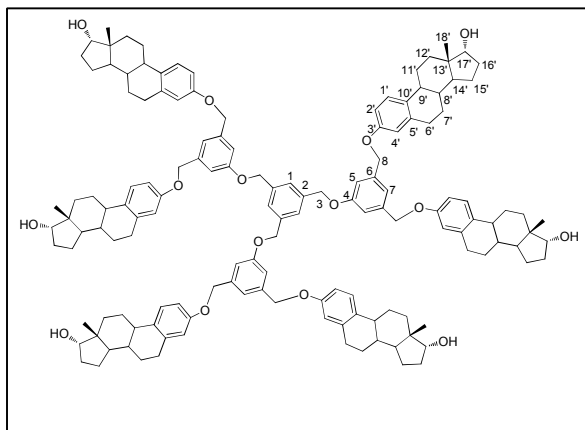
### 7.7.3 Conjugado esteroidal G1 con núcleo bencénico trisustituido derivado del 17 $\alpha$ -etinilestradiol (**29**).



En un matraz de 25 mL se adicionaron 0.26 g (0.88 mmol) de etinilestradiol, 0.20 g (1.40 mmol) de  $K_2CO_3$  y 1 mg de FTBA en acetonitrilo. Posteriormente se adicionaron 0.05 g (0.07 mmol) de **26**, la reacción se mantuvo bajo agitación magnética a 70 °C durante 48 h, observando la formación de un sólido amarillo, se decanto el líquido

de la reacción y el sólido se lavó con  $H_2O$  y hexano obteniendo a **29** como un sólido beige (0.11 g, 89 %) p.f. 178-180 °C. IR ( $\nu_{max}/cm^{-1}$ ): 3477(O-H), 3293 (C $\equiv$ C-H), 2928, 2867(C-H) 2162, 2107, 2040, 1600, 1576(C=C aromático), 1496, 1453, 1379(C-O éter), 1330, 1290, 1245, 1231, 1158, 1146, 1046, 1019, 969, 860, 848, 818, 783, 648, 622, 573, 556. RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta_H$ : 7.48 (3H, s, H-1), 7.19 (6H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-1'), 7.08 (3H, señal ancha, H-7), 7.02 (6H, señal ancha, H-5), 6.76 (6H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-2'), 6.70 (6H, s, H-4'), 5.10 (6H, s, H-3), 4.99 (12H, s, H-8), 2.82 (12H, señal ancha, H-6'), 2.60 (6H, s, C-20'), 0.87 (18H, s, H-18'). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz)  $\delta_C$ : 159.2(C-4), 156.7 (C-3'), 139.4 (C-6), 138.1 (C-5'), 137.8 (C-2), 133.0(C-10'), 126.5 (C-1'), 125.2 (C-1) 118.9 (C-7), 114.9 (C-4'), 113.2 (C-5), 112.4 (C-2'), 87.6 (C-19'), 79.9 (C-17'), 74.2 (C-20'), 69.7 (C-8, C-3), 49.5 (C-14'), 47.2 (C-13'), 43.6 (C-9'), 39.5 (C-8'), 39.0 (C-16'), 32.8 (C-12'), 29.9 (C-6'), 27.3 (C-7'), 26.5 (C-11'), 22.9 (C-15'), 12.8 (C-18'). MALDI-MS TOF: calculada para  $C_{153}H_{168}O_{15}Na$  [ $M + Na$ ] $^+$  2268.2281, encontrada 2268.3494 [ $M + Na$ ] $^+$ .



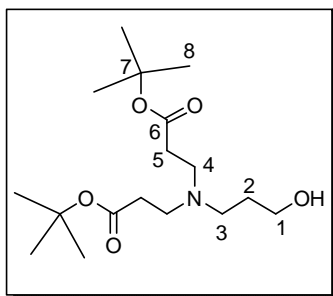
7.7.4 Conjugado esteroidal G1 con núcleo bencénico trisustituido derivado del estradiol (**30**).

En un matraz balón de 25 mL se adicionaron 0.50 g (1.68 mmol) de 17 $\alpha$ -estradiol, 0.76 g (5.54 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 1 mg de FTBA en acetonitrilo. Una vez disueltos los componentes se adicionó 0.05 g (0.07 mmol) de **26** manteniendo la reacción bajo agitación magnética a 70 °C durante 48 h, observando la formación de un sólido amarillo, se decantó el líquido de la reacción

y se lavó con H<sub>2</sub>O y hexano obteniendo a **30** como un sólido beige (0.120 g, 88 %) p.f. 171-173 °C. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3438 (O-H), 2930, 2863(C-H), 2166, 1599(C=C-aromático), 1496, 1453, 1376(C-O éter), 1286, 1231, 1155, 1100, 1036, 968, 941, 845, 784, 721, 691, 647, 590. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.48 (3H, s, H-1), 7.19 (6H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-1'), 7.08 (3H, señal ancha, H-7), 7.01 (6H, señal ancha, H-5), 6.75 (6H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-2'), 6.69 (6H, señal ancha, H-4'), 5.09 (6H, s, H-3), 5.01 (12H, s, H-8), 3.80 (6H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-17'), 2.83 (12H, señal ancha, H-6'), 0.68 (18H, s, H-18'). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 159.2 (C-4), 156.7 (C-3'), 139.4 (C-6), 138.2 (C-5'), 137.8 (C-2), 133.2 (C-10'), 126.5 (C-1'), 126.1 (C-1), 118.8 (C-7), 114.9 (C-4'), 113.2 (C-5), 112.3 (C-2'), 80.1 (C-17'), 69.8 (C-8, C-3), 47.8 (C-14'), 45.6 (C-13'), 43.7 (C-9'), 39.1 (C-8'), 32.5 (C-12'), 31.6 (C-16'), 30.0 (C-6'), 28.2 (C-7'), 26.3 (C-11'), 24.4 (C-15'), 17.2 (C-18'). MALDI-MS TOF: calculada para C<sub>141</sub>H<sub>168</sub>O<sub>15</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup> 2124.2481, encontrada 2124.3460 [M + Na]<sup>+</sup>.

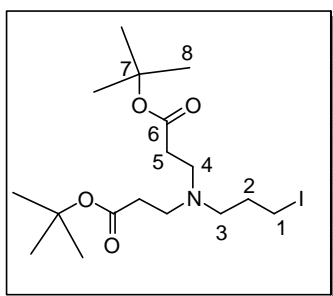
## 7.8 Síntesis de los dendrímeros híbridos

### 7.8.1 *Tert*-butyl 3-[(2-*tert*-butoxicarbonil-etil)-(3-hidroxi-propil)-amino]-propionato (**33**)

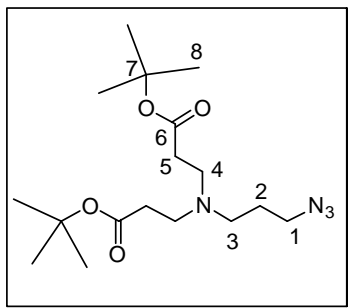


El compuesto **33** fue sintetizado de acuerdo al procedimiento reportado en la literatura<sup>105</sup>. FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3442 (OH), 2976, 2933, 2825 (C-H), 1724 (C=O); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 4.14 (-OH), 3.72 (2H, t,  $J = 5.6$  Hz, H-1), 2.73 (4H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-4), 2.61 (2H, t,  $J = 5.6$  Hz, H-3), 2.38 (4H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-5), 1.67 (2H, dt,  $J = 10.7, 5.6$  Hz, H-2), 1.43 (18H, s, H-8). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 171.8 (C-6), 80.6 (C-7), 63.1 (C-1), 53.0 (C-3), 49.3 (C-4), 33.3 (C-5), 28.4 (C-2), 28.1 (C-8). HRMS (ESI) (m/z): calculada para C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>N<sub>1</sub>O<sub>5</sub>+H<sup>+</sup>, 332.2432; encontrada 332.2438.

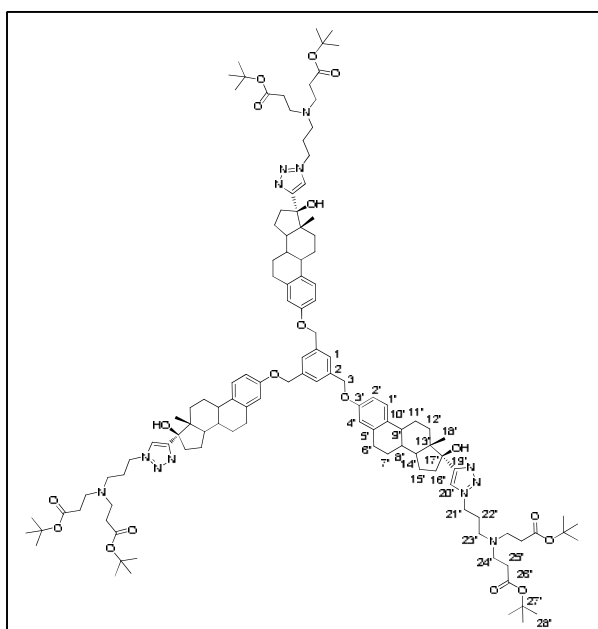
### 7.8.2 *tert*-Butyl 3-[(2-*tert*-butoxicarbonil-etil)-(3-iodo-propil)-amino]-propionato (**34**). En un



matraz balón con 4 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro bajo atmosfera de N<sub>2</sub>, se adicionaron 0.39 g (1.50 mmol) de Ph<sub>3</sub>P, 0.10 g (1.5 mmol) de imidazol y al paso de 5 min se adicionaron 0.38 g (1.50 mmol) de yodo. Posteriormente se adicionó una solución de 0.33 g (1 mmol) de **33** en 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro. La reacción se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 1 h. Al término de la reacción el óxido de trifenilfosfina se filtró del crudo de reacción y el producto se purificó por columna cromatográfica empleando una mezcla hexano:EtOAc (70:30) para obtener a **34** (0.35 g, 80.01 %) como una miel amarilla. IR ( $\nu_{\text{max}}$ /cm<sup>-1</sup>): 2975, 2930, 2817 (C-H), 1724 (C=O). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 3.20 (2H, t,  $J = 6.7$  Hz, H-1), 2.68 (4H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-4), 2.47 (2H, t,  $J = 6.4$  Hz, H-3), 2.34 (4H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-5), 1.91 (2H, q,  $J = 6.4$  Hz, H-2), 1.42 (18H, s, H-8). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 172.0 (C-6), 80.4 (C-7), 53.5 (C-3), 49.5 (C-4), 33.9 (C-5), 31.2 (C-2), 28.2 (C-8), 5.3 (C-1). HRMS (ESI) (m/z): calculada para C<sub>17</sub>H<sub>32</sub>N<sub>1</sub>O<sub>4</sub>I<sub>1</sub> [M]<sup>+</sup> 442.1448, encontrada 442.1454 [M]<sup>+</sup>.

7.8.3 Tert-butil-3-[(2-tert-butoxicarbonil-etil)-(3-azido-propil)-amino]-propionato (**35**).

En un matraz balón se adicionaron 0.29 g (0.68 mmol) de **34** en 10 mL de DMF anhidro, seguido de 0.09 g (1.35 mmol,) de NaN<sub>3</sub>. La suspensión resultante se mantuvo bajo agitación magnética, en atmósfera de N<sub>2</sub> a 60 °C durante 20 h. La suspensión se concentró bajo presión reducida y el producto se extrajo en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con H<sub>2</sub>O hasta lograr la eliminación del DMF. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró para obtener a **35** (0.20 g, 85 %) como una miel amarilla. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 2976, 2932, 2819 (C-H), 2094 (N<sub>3</sub>), 1725 (C=O). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 3.30 (2H, t,  $J = 6.7$  Hz, H-1), 2.68 (4H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-4), 2.44 (2H, t,  $J = 6.7$  Hz, H-3), 2.32 (4H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-5), 1.68 (2H, quint,  $J = 6.7$  Hz, H-2), 1.42 (18H, s, H-8). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 172.0 (C-6), 80.4 (C-7), 50.5 (C-3), 49.4 (C-4), 49.3 (C-1), 33.7 (C-5), 28.1 (C-8), 26.8 (C-2). HRMS (ESI) (m/z): calculada para C<sub>17</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup> 357.2496, encontrada 357.2497 [M]<sup>+</sup>.

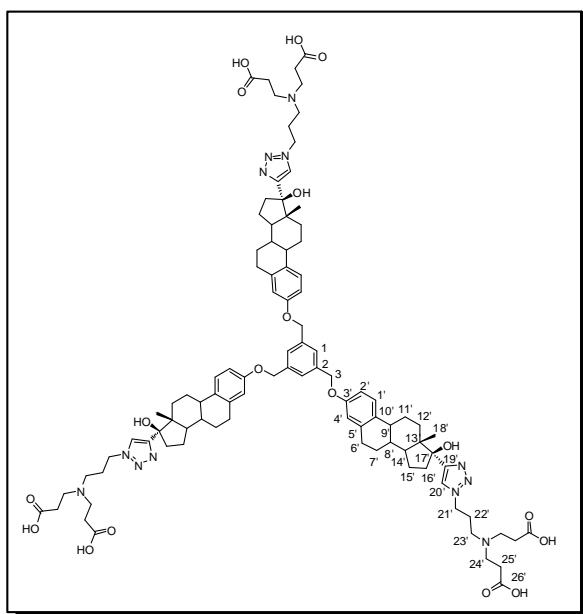
7.8.4 Dendrímtero híbrido **36**

En un matraz balón se adicionaron 0.02 g (0.10 mmol ) de ascorbato de sodio, 0.06 g (0.48 mmol) de ácido benzoico y 0.008 g (0.05 mmol,) de CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O a una solución de tert-butil alcohol: H<sub>2</sub>O (6 mL, 2:1 v/v). Posteriormente se adicionaron 0.07 g (0.07 mmol,) de **27** y 0.09 g (0.24 mmol,) de **35**. La reacción se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 48 h. Al término de la reacción se adicionaron 10 mL de H<sub>2</sub>O y 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x

15 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (mínima cantidad) y se precipitó con hexano hasta la desaparición de la

azida. El sólido obtenido se secó a presión reducida para obtener a **36** (0.1119 g, 75 %) como un sólido amarillo, p.f. 76-78 °C. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 2974, 2928, 2866 (C-H aliph.), 1722 (C=O). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.62 (3H, s, H-20'), 7.42 (3H, s, H-1), 7.11 (3H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-1'), 6.72 (3H, dd,  $J = 8.6, 2.2$  Hz, H-2'), 6.68 (3H, d,  $J = 2.2$ , H-4'), 5.01 (6H, s, H-3), 4.39 (6H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-21'). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 172.1 (C-26'), 156.6 (C-3'), 153.5 (C-19'), 138.1 (C-2), 138.1 (C-5'), 133.1 (C-10'), 126.4 (C-1'), 125.9 (C-1), 122.0 (C-20'), 114.8 (C-4'), 112.2 (C-2'), 82.3 (C-17'), 80.6 (C-27'), 69.7 (C-3), 50.1 (C-23'), 49.1 (C-24'), 48.5 (C-14'), 47.8 (C-21'), 47.3 (C-13'), 43.5 (C-9'), 39.5 (C-8'), 37.8 (C-16'), 33.5 (C-25'), 30.0 (C-12'), 29.9 (C-6'), 27.4 (C-11'), 26.3 (C-15'), 23.4 (C-22'), 14.3 (C-18'). HRMS (ESI) (m/z): calculada para  $\text{C}_{120}\text{H}_{174}\text{N}_{12}\text{O}_{18}+\text{H}^+$ , 2072.3142, encontrada 2072.2956. Calculada para  $\text{C}_{120}\text{H}_{174}\text{N}_{12}\text{O}_{18}+2\text{H}^{+2}$ , 1036.6607, encontrada 1036.6588. Calculada para  $\text{C}_{120}\text{H}_{174}\text{N}_{12}\text{O}_{18}+3\text{H}^{+3}$ , 691.4429, encontrada 691.4423.

### 7.8.5 Dendrímero híbrido **37**.



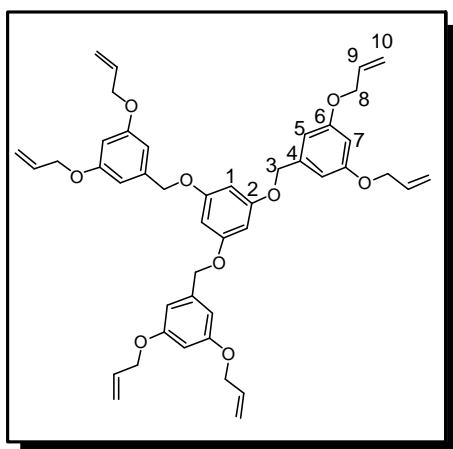
En un matraz balón se agregaron 0.08 g (0.037 mmol) de **36**, en 2 mL de TFA y 3 gotas de agua. Al término de la reacción se evapora el TFA a presión reducida para obtener un aceite café, el cual fue triturado con DCM;hexane (50:50) hasta la eliminación de TFA. El sólido obtenido se secó al vacío para obtener a **37** (0.0620 g, 93 %) como un sólido beige con punto de descomposición a 330 °C. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3,600 a 2,220 (COOH), 2928, 2871 (C-H), 1715, 1667 (C=O). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500

MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.88 (3H, s, H-20'), 7.38 (3H, s, H-1), 7.04 (3H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-1'), 6.65 (3H, s, H-4'), 5.00 (6H, s, H-3), 4.38 (6H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-21'). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 172.3 (C-26'), 156.5 (C-3'), 154.7 (C-19'), 138.3 (C-2), 138.0 (C-5'), 133.0 (C-10'), 126.7 (C-1'), 126.4 (C-1), 123.1 (C-20'), 114.9 (C-4'), 112.7 (C-2'), 81.6 (C-17'), 69.3 (C-3), 50.2 (C-23'), 49.0 (C-24'), 48.0 (C-14'), 47.3 (C-21'), 47.2 (C-13'), 43.6 (C-9'), 39.7 (C-8'), 37.7 (C-16'), 33.2 (C-12'), 30.7 (C-25'), 29.9 (C-6'), 27.6 (C-7'), 26.5 (C-11'), 26.4 (C-15'), 24.0 (C-

22'), 14.8 (C-18'). HRMS (ESI) (m/z): calculada para  $C_{120}H_{174}N_{12}O_{18}+H^+$ , 2072.3142, encontrada 2072.2956. Calculada para  $C_{120}H_{174}N_{12}O_{18}+2H^{+2}$ , 1036.6607, encontrada 1036.6588. Calculada para  $C_{120}H_{174}N_{12}O_{18}+3H^{+3}$ , 691.4429, encontrada 691.4423.

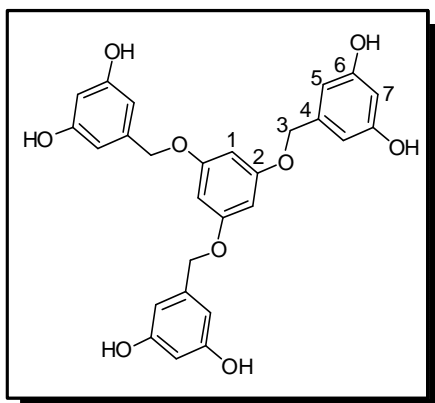
## 7.9 Síntesis de los dendrímeros tipo fenilaliléter (APE) de primera (47) y segunda (49) generación con núcleo de fluoroglucinol

### 7.9.1 Dendrímero 1,3,5-Tri(3,5 Bis(aliloxi)benciloxi)benceno (47).



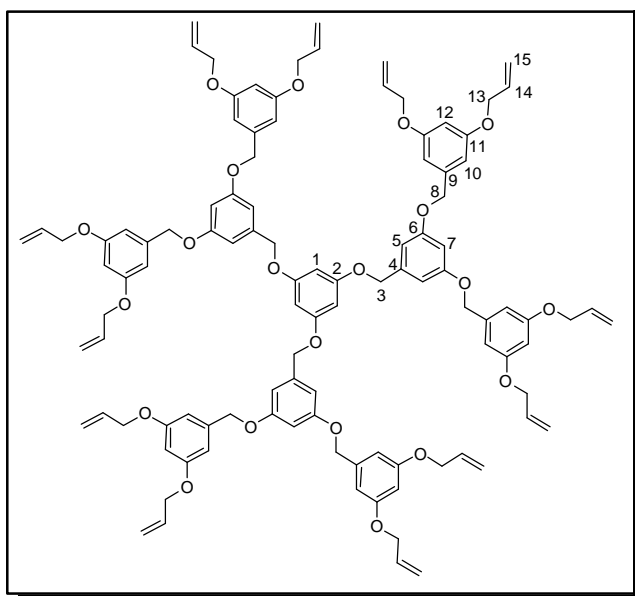
En un matraz balón se colocaron 1.53 g (11.10 mmol) de  $K_2CO_3$  en 60 mL de DMF y 12 mL de THF. La suspensión se desgasificó durante 1 h con  $N_2$ , se adicionaron 0.20 g (1.23 mmol) de fluoroglucinol (45). La reacción se calentó a 70 °C, enseguida se adicionaron 0.88 g (3.69 mmol) de cloruro de 3,5-dialiloxibencilo manteniéndose en calentamiento durante 24 h. Al término de la reacción, se enfrió, se vertió en hielo y se dejó bajo agitación durante 1 h. la

fase orgánica se extrajo con  $CH_2Cl_2/H_2O$  obteniendo al compuesto como una miel ámbar, que se purificó por placa cromatográfica (25x25 cm) empleando como fase móvil hexano:acetato de etilo (8:2), para obtener 0.71 g (1.13 mmol) del compuesto como una miel amarilla en un rendimiento del 79 %. IR ( $\nu_{max}/cm^{-1}$ ): 3384, 2966, 2932, 1715, 1595, 1446, 1376, 1295, 1242, 1149, 1045, 927, 829, 750, 684. RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta_H$ : 6.59 (6H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-5), 6.24 (3H, s, H-1), 6.46 (3H, t,  $J = 2.2$  Hz, H-7), 6.05 (6H, ddt,  $J = 17.3, 10.6, 5.3$  Hz, H-9), 5.42 (6H, dt,  $J = 17.3, 1.3$  Hz, H-10a), 5.29 (6H, dt,  $J = 10.5, 1.3$  Hz, H-10b), 4.92 (6H, s, H-3), 4.52 (12H, dt,  $J = 5.3$  Hz, H-8). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz)  $\delta_C$ : 160.8 (C-2), 160.2 (C-6), 139.4 (C-4), 133.4 (C-9), 118.4 (C-10), 106.4 (C-5), 101.6 (C-7), 95.1 (C-1), 70.2 (C-3), 69.1 (C-8). MS, m/z (%): 732 (M+), 513 (47), 363 (100), 297 (38), 242 (97), 203 (100), 121 (46), 81 (27), 41 (47).

7.9.2 Dendrímtero 1,3,5-Tri(3,5 Bis(feniloxi)benciloxi)benceno (**48**).

En un matraz balón se adicionaron 0.10 g (1.36 mmol) de **9**, 0.01 g (0.034 mmol) de trifenilfosfina ( $\text{Ph}_3\text{P}$ ) y 5 gotas (0.41 mmol:0.41 mmol) de una mezcla de ácido fórmico-trietilamina (1:1) en etanol como disolvente, la mezcla de reacción se desgasificó por 30 min con  $\text{N}_2$ , y se agregó 1 mg de acetato de paladio (II) obteniendo 0.063 g (0.136 mmol) de **48** como una miel café. El crudo de reacción se utilizó sin purificar para la siguiente

reacción de acoplamiento. IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3322, 2930, 1596, 1434, 1370, 1144, 1047, 997, 919, 842, 723, 682, 594. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 6.44 (6H, señal ancha, H-5), 6.31 (3H, señal ancha, H-7), 6.23 (3H, s, H-1), 4.92 (6H, s, H-3). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 161.1 (C-2), 159.0 (C-6), 140.0 (C-4), 106.0 (C-5), 95 (C-1), 71.4 (C-3).

7.9.3 Dendrímtero 1,3,5-Tri(3,5-Bis(3,5Bis(aliloxi)benciloxi) benciloxi)benceno (**49**)

El compuesto **49** se obtuvo por las dos rutas sintéticas. Por la ruta divergente, en un matraz balón se colocaron 0.589 g (4.26 mmol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en 30 mL de DMF y 6 mL de THF. La suspensión se desgasificó durante 1 h con  $\text{N}_2$ , se adicionaron 0.10 g (0.203 mmol) de **48**. La reacción se calentó a 70 °C, enseguida se adicionaron 0.145 g (0.609 mmol) de cloruro de 3,5-dialiloxibencilo (**5**) manteniéndose en calentamiento durante 72 h. Al término de la reacción,

se dejó enfriar, se vertió en hielo y se mantuvo bajo agitación magnética durante 1 h. La fase orgánica se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  obteniendo al compuesto como una miel ámbar, que se purificó por placa cromatográfica (25x25cm) empleando como fase móvil hexano:EtOAc

(7:3), para obtener a **49** (0.210 g, 30 %) como una miel amarilla. Método B (ruta convergente) en un matraz se agregaron 0.118 g (0.72 mmol) de fluoroglucinol, 1.23 g (2.18 mmol) de la dendrona (**44**),  $K_2CO_3$  y FTBA en DMF. La reacción se mantuvo a reflujo durante 36 h, al término de la reacción el producto se extrajo con  $CH_2Cl_2:H_2O$  y se secó sobre  $Na_2SO_4$  el solvente se evaporo a presión reducida y se purificó por columna cromatográfica con una mezcla de hexano:EtOAc (7:3) para obtener a **49** (0.505 g, 40 %) como una miel ámbar. IR ( $\nu_{max}/cm^{-1}$ ): 3080, 2867, 1591, 1447, 1372, 1295, 1142, 1042, 991, 923, 829, 681  $^1H$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta_H$ : 6.66 (6H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-5), 6.58(12H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-10), 6.54 (3H, t,  $J = 2.2$  Hz, H-7), 6.44 (6H, t,  $J = 2.2$  Hz, H-12), 6.25 (3H, s, H-1), 5.99-6.07 (12H, m, H-14), 5.40 (12H, dt,  $J = 17.3, 1.5$  Hz, H-15a), 5.27 (12H, dt,  $J = 10.5, 1.5$  Hz, H-15b), 4.96(12H, s, H-8), 4.93 (6H, s, H-3), 4.50 (24H, dt,  $J = 5.3, 1.5$  Hz, H-13).  $^{13}C$  (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta_C$ : 160.6 (C-2), 160.1 (C-6), 160.0 (C-11), 139.2 (C-4), 139.1 (C-9), 133.1 (C-14), 117.9 (C-15), 106.5 (C-5), 106.2 (C-10), 101.7 (C-7), 101.45 (C-12), 94.1 (C-1), 70.1 (C-3), 68.9 (C-8). HRMS (ESI) (m/z): calculada para  $C_{105}H_{109}O_{21}$   $[M + H]^+$  1705.7417, encontrada 1705.7412  $[M + H]^+$ .

## 7.10 Evaluación anticancerígena de los conjugados esteroidales dendriméricos.

### 7.10.1 Materiales.

Se prepararon soluciones Stock (10 mM) de los conjugados esteroidales dendriméricos, disolviendo las cantidades adecuadas de cada compuesto en DMSO. Los medios *F-12*, *DMEM* (medio modificado Dulbecco Eagle), el suero fetal de bovino, L-glutamina, penicilina y estreptomina fueron adquiridos en la casa comercial Sigma, a su vez la calceína AM fue adquirida en los Laboratorios PAA GmbH (Austria).

### 7.10.2 Cultivos celulares.

Las líneas celulares cancerígenas empleadas: *CEM* (leucemia crónica linfoblástica T), *MCF-7* (adenocarcinoma de seno), *HeLa* (adenocarcinoma cervical) y *BJ* (linfoblastos

epiteliales normales) fueron obtenidos de la *American Type Culture Collection* (Virginia, Estados Unidos).

Las células de MCF-7 fueron cultivadas en medio F-12, mientras que el resto de las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM. A todos los cultivos se les adicionó 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM de L-glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina. Los cultivos celulares fueron incubados a 37° C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 5.10.3 Evaluación de citotoxicidad celular mediante el ensayo de Calceína AM.

Suspensiones de aproximadamente  $1.25 \times 10^5$ /mL células de cada línea celular cancerígena (*CEM*, *MCF-7* y *HeLa*) y células control (*BJ*) fueron depositadas en 96 pozos de las placas de cultivo y después de 12 horas de incubación se añadieron las concentraciones deseadas de los conjugados esteroidales, esteroides y dendrímeros de partida disueltos en DMSO en concentraciones de 1 a 50  $\mu$ M realizando el análisis por triplicado. Los cultivos control (*BJ*) fueron tratados únicamente con DMSO. Después de 72 horas de incubación se les añadió a cada pozo de las placas de cultivo solución (2  $\mu$ M) de calceína AM y enseguida las placas de cultivo fueron incubadas por una hora adicional. Al término de la hora extra de incubación se procedió a la cuantificación de la fluorescencia de las células viables, empleando un fluorómetro Fluoroskan Ascent (Labsystems) y las concentraciones citotóxicas efectivas fueron calculadas y expresadas como IC<sub>50</sub> a partir de curvas dosis-respuesta. El estudio de citotoxicidad fue realizado por triplicado.

Las pruebas de citotoxicidad se realizaron en el grupo de investigación del Dr. Miroslav Strnad en la Facultad de ciencias de la Universidad de Palacký, Republica Checa.



---

---

## CAPITULO 8. BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Organización Mundial de la salud: Cancer. /<http://www.who.int/cancer/en>. (16/07/2013), <http://www.who.int/cancer/es/index.html> (12/11/2013)
- <sup>2</sup> Majoros, I. J., Williams, C. R., Baker, J. R. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8, 1165-1179.
- <sup>3</sup> Tomalia, D. A., Fréchet, J. M. J. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2002**, 40, 2719-2728.
- <sup>4</sup> Buhleier, E., Wehner, W., Vögtle, F. *Synthesis* **1978**, 2, 155-158.
- <sup>5</sup> Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P. *Macromolecules* **1986**, 19, 2466-2468.
- <sup>6</sup> Grayson, S., Fréchet, J. M. J. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3819-3867.
- <sup>7</sup> Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J. R., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P. *Polym. J.* **1985**, 17, 117-132.
- <sup>8</sup> Newkome, G. R., Yao, Z., Baker, G. R., Gupta, V. K. *J Org Chem.* **1985**, 50, 2003-2004.
- <sup>9</sup> Hawker, C. J., Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7638-7647.
- <sup>10</sup> Tomalia, D. A., Berry, V., Hall, M., Hedstrand, D.M. *Macromolecules*, **1987**, 20, 1164-1167.
- <sup>11</sup> Hawker, C. J., Wooley, K. L., Fréchet, J. M. J. *J Chem Soc Perkin Trans*, **1993**, 1, 1287-1297.
- <sup>12</sup> Liu, M., Kono, K., Fréchet, J. M. J. *J Control Release*, **2000**, 65, 121-131.
- <sup>13</sup> Moorefield, C. N., Newkome, G. R. *C. R. Chimie* **2003**, 6, 715-724.
- <sup>14</sup> Cheng, Y., Xu, Z., Ma, M., Xu, T. *J. Phar. Sci.* **2008**, 97, 123-141.
- <sup>15</sup> Boas, U., Heegaard, M. H. P. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 43-63.
- <sup>16</sup> Bosman, A. W., Janssen, H. M., Meijer, E. W. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 1665-1688.
- <sup>17</sup> Caminade, A. M., Laurent, R., Majoral, J. P. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2005**, 57, 2130-2146.
- <sup>18</sup> Astruc, D., Boisselier, E., Ornelas, C. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 1857-1959.
- <sup>19</sup> Knapen, J. W. J., Van der Made, A. W., De Wilde, J. C., Van Leeuwen, P. W. N. M., Wijkens, P., Grove, D. M., Van Koten, G. *Nature* **1994**, 372, 659-663.
- <sup>20</sup> Astruc, D. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 1884-1894.
- <sup>21</sup> Al-Jamal, K. T., Ramaswamy, C., Florence, A. T. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2005**, 57, 2238-2270.
- <sup>22</sup> Igarashi, E. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, 229, 121-134.

- 
- 
- <sup>23</sup> Lee, C. C., MacKay, J. A., Fréchet, J. M. J., Szoka, F. C. *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 1517-1526.
- <sup>24</sup> Szymański, P., Markowicz, M., Olasik, E. M. *Nano* **2011**, 6, 509–539.
- <sup>25</sup> Braun, C. S., Vetro, J. A., Tomalia, D. A., Koe, G. S., Koe J. G., Middaugh R. *J. Pharm. Sci.* **2005**, 94, 423-436.
- <sup>26</sup> Svenson, S., Tomalia, D. A. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2005**, 57, 2106– 2129.
- <sup>27</sup> Nanjwade, B. K., Bechra, H. M., Derkar, G. K., Manvi, F. V., Nanjwade, V. K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, 38, 185–196.
- <sup>28</sup> Jang, W. D., Selim, K. M. K., Lee, C. H., Kang, I. K. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, 34, 1–23.
- <sup>29</sup> Yang, H., Kao, W. J. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, **2006**, 17, 3–19.
- <sup>30</sup> Kobayashi, H., Sato, N., Hiraga, A., Saga, T., Nakamoto, Y., Ueda, H., Konishi, J., Togashi, K., Brechbiel, M. W. *Magn. Reson. Med.* **2001**, 45, 454–460.
- <sup>31</sup> Kobayashi, H., Kawamoto, S., Saga, T., Sato, N., Hiraga, A., Ishimori, T., Konishi, J., Togashi, K., Brechbiel, M. W. *Magn. Reson. Med.* **2001**, 46, 781–788.
- <sup>32</sup> Villaraza, A. J. L., Bumb, A., Brechbiel, M. W. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2921–2959.
- <sup>33</sup> Hoste, K., De Winne, K. *Int. J. Pharm.* **2004**, 277, 119–131.
- <sup>34</sup> Faraji, H. A., Wipf, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 2950–2962.
- <sup>35</sup> Wijagkanalan, W., Kawakami, S., Hashida, M. *Pharm. Res.* **2011**, 28, 1500–1519.
- <sup>36</sup> El-Sayed, M., Rhodes, C. A., Ginski, M., Ghandehari, H. *Int. J. Pharmaceut.* **2003**, 265, 151–157.
- <sup>37</sup> Najlah, M., D’Emanuele, A. *Curr. Opin Pharmacol.* **2006**, 6, 522–527.
- <sup>38</sup> Kitchens, K. M., Kolhatkar, R. B., Swaan, P. W., Eddington, N. D., Ghandehari, H. *Pharm. Res.* **2006**, 23, 2818-2826.
- <sup>39</sup> Sadekar, S., Ghandehari, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64, 571-588.
- <sup>40</sup> Zhang, S., Li, J., Lykotrafitis, G., Bao, G., Suresh, S. *Adv. Mater.* **2009**, 21, 419–424.
- <sup>41</sup> Plank, C., Mechtler, K., Szoka, F. C. Jr., Wagner, E. *Hum. Gene Ther.* **1996**, 7, 1437-1446.
- <sup>42</sup> Roessler, B. J., Bielinska, A. U., Janczak, K., Lee, I., Baker Jr., J. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 283, 124 –129.
- <sup>43</sup> Ihre, H. R., Omayra, L., Padilla De Jesus, Szoka, F. C. Jr., Frechet J. M. J. *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 443–45.
- 
-

- 
- 
- <sup>44</sup> Lee, C. C., Grayson, S. M., Frechet, J. M. J. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2004**, 42, 3563–3578.
- <sup>45</sup> Zhang, W., Tichy, S. E., Pérez, L. M., Maria, G. C., Lindah, P. A., Simanek, E. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5086-5094.
- <sup>46</sup> Rendle, P. M., Seger, A., Rodrigues, J., Oldham, N. J., Bott, R. R., Jones, J. B., Cowan, M. M., Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4750-4751.
- <sup>47</sup> Tang, M. X., Redemann, C. T., Szoka, F. C. Jr. *Bioconjugate Chem.* **1996**, 7, 703–714.
- <sup>48</sup> Cloninger, M. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 742–748.
- <sup>49</sup> D’Emanuele, A., Attwood, D. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2005**, 57, 2147–2162.
- <sup>50</sup> Cheng, Y., Xu, T. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 2291-2297.
- <sup>51</sup> Yiyun, C., Tongwen, X. *Eur. J. Med Chem.* **2005**, 40, 1188–1192.
- <sup>52</sup> Yiyun, C., Tongwen, X., Rongqiang, F. *Eur. J. Med Chem.* **2005**, 40, 1390–1393.
- <sup>53</sup> Potluri, S. K., Ramulu A. R., Pardhasaradhi, M. *Tetrahedron* **2004**, 60, 10915–10920.
- <sup>54</sup> Ma, M., Cheng, Y., Xu, Z., Xu, P., Qu, H., Fang, Y., Xu, T., Wen, L. *Eur. J. Med Chem.* **2007**, 42, 93-98.
- <sup>55</sup> Park, J. H., Leeb, S., Kimb, J. H., Park, K., Kimb, K., Kwonb, I. C. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, 33, 113–137.
- <sup>56</sup> Medina, S. H., El-Sayed, M. E. H. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 3141–3157.
- <sup>57</sup> Choi, M. R., Maxey, K. J. S., Stanley, J. K., Levin, C. S., Bardhan, R., Akin, D., Badve, S., Sturgis, J., Robinson, J. P., Bashir, R. Halas, N. J., Clare, S. E. *Nano Lett.* **2007**, 7, 3759-3765.
- <sup>58</sup> Wolinsky, J. B., Grinstaff, M. K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, 1037–1055.
- <sup>59</sup> Lim, J., Tang Lo, S., Hill, S., Pavan, M. G., Sun, X., Simanek, E. E. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, 9, 404–412.
- <sup>60</sup> Lee, S., LaCour, T. G., Fuchs, P. L. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2275-2314.
- <sup>61</sup> Lecanu, L., Yao, W., Teper, G. L., Yao, Z. X., Greson, J., Papadopoulos, V. *Steroids* **2004**, 69, 1-16.
- <sup>62</sup> Feigel, M., Ladberg, R., Engels, S., Herbst-Irmer, R., Frölich, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5698-5702.
- <sup>63</sup> Moos, W. H., Dykens, J. A., Nohynek, D., Rubinchik, E., Howell, N. *Drug Dev. Res.* **2009**, 70, 1–21.
- 
-

- 
- 
- <sup>64</sup> Malíková, J., Swaczynová, J., Kolář, Z., Strnad, M. *Phytochem.* **2008**, 69, 418-426.
- <sup>65</sup> Jun, D. Y., Park, H. S., Kim, J. S., Kim, J. S., Park, W., Song, B. H., Kim, H. S., Taub, D., Kim, Y. H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, 231, 401-412.
- <sup>66</sup> Izumi, K., Kadono, Y., Shima, T., Konaka, H., Mizokami, A., Koh, E., Namiki, M. *Anticancer res.* **2010**, 30, 5201-5206.
- <sup>67</sup> Lointier, P., Wildrick, D. M., Boman, B. M. *Anticancer Res.* **1992**, 12, 1327-1330.
- <sup>68</sup> Wolinsky, J. B., Grinstaff, M. K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, 1037-1055.
- <sup>69</sup> Khandare, J., Kolhe, P., Pillai, O., Kannan, S., Lai, M. L., Kannan, R. M. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 330-337.
- <sup>70</sup> Kim, Y., Klutz, A. M., Jacobson, K. A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1660-1672.
- <sup>71</sup> Ropponen, J., Tamminen, J., Lahtinen, M., Linnanto, J., Rissanen, K., Kolehmainen, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1, 73-84.
- <sup>72</sup> Harrington, W. R., Kim, S. H., Funk, C. C., Erdogan, Z. M., Schiff, R., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S. *Mol. Endocrinol.* **2006**, 20, 491-502.
- <sup>73</sup> Kim, S. H., Katzenellenbogen, J. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7243-7248.
- <sup>74</sup> Kop, T., Pocsfalvi, G., Šolaja, B. A. *J. Serb. Chem. Soc.* **2004**, 10, 769-775.
- <sup>75</sup> Ooya, T., Lee, J., Park, K. *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 1221-1229.
- <sup>76</sup> Morgan, M. T., Carnahan, M. A., Immoos, C. E., Ribeiro, A. A., Finkelstein, S., Lee, S. J., Grinstaff, M. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15485-15489.
- <sup>77</sup> Patel, H. N., Patel, P. M. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **2013**, 4, 454-463.
- <sup>78</sup> Morgan, M. T., Nakanishi, Y., Kroll, D. J., Griset, A. P., Carnahan, M. A., Wathier, M., Oberlies, N. H., Manikumar, G., Wani, M. C., Grinstaff, M. W. *Cancer Res.* **2006**, 66, 11913-11921.
- <sup>79</sup> Torchilin, V. P. *J. Control. Release.* **2001**, 73, 137-172.
- <sup>80</sup> Zhang, K., Wang, Y., Zhang, A., Yu, Y., Tang, H., Zhu, X. X. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 1596-1601.
- <sup>81</sup> Valliant, J. F., Guenther, K. J., King, A. S., Morel, P., Schaffer, P., Sogbein, O. O., Stephenson, K. A. *Chem. Rev.* **2002**, 232, 173-230.
- <sup>82</sup> Dash, B. P., Satapathy, R., Maguireb, J. A., Hosmane, N. S. *Chem. Commun.* **2009**, 3267-3269.
- 
-

- 
- <sup>83</sup> Hosmane, N. S., Yinghuai, Z., Maguire, J. A., Kaim, W., Nano M. T. *J. Organomet. Chem.* **2009**, 694, 1690–1697.
- <sup>84</sup> Wittig, A., Altieri, S., Hilger, R., Salvadori, P. A., Menichetti, L., Zamenhofk, R., Sauerwein W. A. G. *Crit. Rev Oncol Hematol.* **2008**, 68, 66–90.
- <sup>85</sup> Wu, J., Chang, S. J., Chuang, K. S., Hsueh, Y. W., Yeh, K. C., Wang J. N., Tsai, W. P. *Phys. Med. Biol.* **2007**, 52, 1747–1756.
- <sup>86</sup> Elschenbroich, C. *Organometallics* **2006**, Wiley-VCH Verlag GmbH. Weinheim.
- <sup>87</sup> Lerouge F., Viñas C., Teixidor F., Núñez R., Abreu A., Xochitiotzi E., Santillan R., Farfán N., *Dalton Trans.* **2007**, 1898–1903.
- <sup>88</sup> Perez, E. J. J., Viñas, C., Teixidor, F., Santillan, R., Farfán, N., Abreu, A., Yépez, R., Núñez, R. *Macromolecules* **2010**, 43, 150–159.
- <sup>89</sup> Nuñez, R., Pérez, E. J. J., Teixidor, F., Santillan, R., Farfán, N., Abreu, A., Yépez, R., Viñas, C. *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 9993–10000.
- <sup>90</sup> Bodwell, G. J., Bridson, J. N., Houghton, T. J., Kennedy, J. W. J., Mannion, M. R. *Chem. Eur. J.* **1999**, 6, 1823-1827.
- <sup>91</sup> Xin, B. W. *J. Korean Chem. Soc.* **2008**, 52, 445-449.
- <sup>92</sup> Steiner, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 48-76.
- <sup>93</sup> Desiraju, G. R. *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 441-449.
- <sup>94</sup> Zhu, X. X., Nichifor, M. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 539-546.
- <sup>95</sup> Lee, K. Y., Jo, W.J., Kwon, J. C., Kim, J. H., Jeong, S. Y. *Macromolecules* **1998**, 31, 378-383.
- <sup>96</sup> Zhag, J. H., Bazuin, C. G., Freiberg, S., Brisse, F., Zhu, W. *Polymer.* **2005**, 46, 7266-7272.
- <sup>97</sup> Du, B. G., Hu, J. S., Zhang, B. Y., Xiao, L. J., Wei, K.Q. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, 102, 5559-5565.
- <sup>98</sup> Ciuffreda, P., Casati, S., Manzocchi, A. *Magn. Reson. Chem.* **2004**, 42, 360-363.
- <sup>99</sup> Dionne, P., Poirier, D. *Steroids* **1995**, 60, 830-836.
- <sup>100</sup> Bodwell, G. J., Bridson, J. N., Cyrański, M. K., Kennedy, J. W. J., Krygowski, T. M., Mannion, M. R., Miller, D. O. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 2089-2098.
- <sup>101</sup> Hawxwell, S. M., Espallargas, G. M., Bradshaw, D., Rosseinsky, M. J., Prior, T. J., Florence, A. J., Van de Streek, J., Brammer, L. *Chem. Commun.* **2007**, 15, 1532-1534.
-

- 
- 
- <sup>102</sup> Kim, H. Y., Sohn, J., Wijewickrama, G. T., Edirisinghe, P., Gherezghiher, T., Hemachandra, M., Lu, P. Y., Chandrasena, R. E., Molloy, M. E., Tonetti, D. A., Thatcher, G. *R. J. Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 809-821.
- <sup>103</sup> Allen, R. T., Cluck, M. W., Agrawal, D. K. *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, 54, 427-445.
- <sup>104</sup> Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1999**, 15, 269-290.
- <sup>105</sup> Soto, C. D., Cruz, M. J.A., Ramírez, M. T., Guadarrama, P. *Molecules* **2010**, 15, 8082-8097.
- <sup>106</sup> Fuchs, S., Kapp, T., Otto, H., Schoneberg, T., Franke, P., Gust, R., Schluter, A.D. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 1167-1192.
- <sup>107</sup> Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J. W., Meijer, E. W., Paulus, W., Duncan, R. *J. Control. Rel.* **2000**, 65, 133-148.
- <sup>108</sup> Jevprasesphant, R., Penny, J., Jalal, R., Attwood, D., McKeown, N. B., D'Emanuele, A. *Int J Pharm.* **2003**, 252, 263-266.
- <sup>109</sup> Shao, C., Wang, X., Xu, J., Zhao, J., Zhang, Q., Hu, Y. *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 7002-7005.
- <sup>110</sup> Percec V., Dulcey A., Peterca M., Ilies M., Miura Y., Edlund U., Heiney, P. A. *Aust. J. Chem.* **2005**, 58, 472-482.
- <sup>111</sup> Twibanire, J. K., Al-Mughaid, H., Grindley, T. B. *Tetrahedron* **2010**, 66, 9602-9609.
- <sup>112</sup> Balzani, V., Ceroni, P., Maestri, M., Saudan, C., Vicinelli, V. *Top. Curr. Chem.* **2003**, 228, 159-191.
- <sup>113</sup> Rohatgi-Mukherjee, K. K. In *Fundamentals of Photochemistry*; New Age International (P) Limited, Publishers, Ed., Calcutta, 1972, 1-6.

---

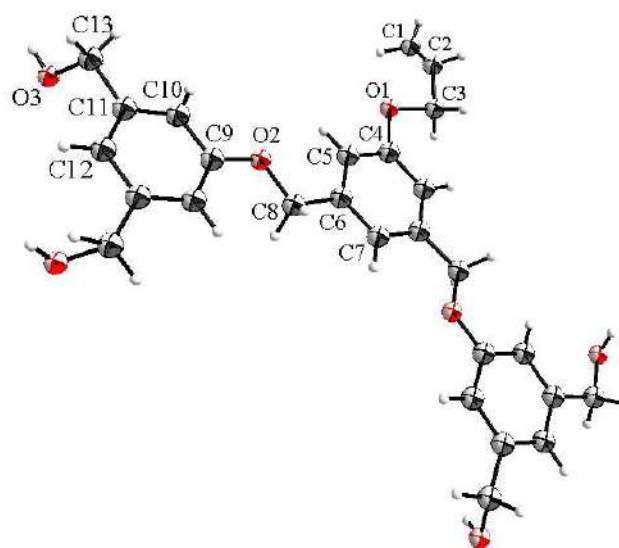
---

# Apendice I

**Tabla 9.** Datos cristalográficos de rayos-X de las dendronas **7**, **8** y **9**.

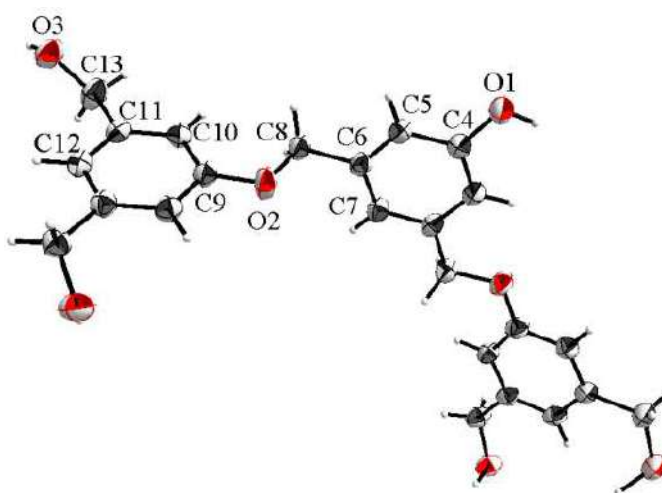
<b>Compuesto</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>Datos del Cristal</b>			
Formula condensada	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	466.5	458.5	540.28
Tamaño del cristal (mm)			0.25 × 0.2 × 0.1
Sistema cristalino	Triclinico	Monoclinico	Monoclinic
Grupo espacial	<i>P-1</i>	<i>P2<sub>1</sub>/n</i>	<i>P2<sub>1</sub>/c</i>
<b>Parametros de la celda</b>			
a/Å	8.2400 (3)	17.0350 (7)	23.1300 (7)
b/Å	9.0790(3)	4.7190(3)	= 13.3520 (5)
c/Å	16.4280 (5)	33.3975(9)	8.5090 (2)
α(°)	85.006 (2)	90.0(0)	90.0
β(°)	75.689 (2)	119.516(2)	99.441 (2) <sup>o</sup>
γ(°)	84.693 (2)	90.0(0)	90.0000
V/Å <sup>3</sup>	1183.12 (7)	2336.33(30)	2592.26 (14)
Z	2	4	4
Densidad calculada (g cm <sup>-3</sup> )	1.31	1.30	1.38
Coefficiente de absorción mm <sup>-1</sup>	0.094	0.097	0.484
F(000)	496	976	1120
<b>Parametros de colección</b>			
Longitud de onda (λ) Å	0.71073	0.71073	0.71073
Temperatura (K)	293	293	293
Reflecciones colectadas	17820	10912	15807
Ref. Ind. (Rint)	5361 (0.059)	4949(0.059)	5868 (0.046)
Ref Observadas	3347	2775	3842
<b>Refinamiento</b>			
GoF	1.019	1.023	1.064
R <sub>w</sub> (todos los datos))	0.191	0.206	0.174
Δρmax/e Å <sup>3</sup>	0.351	0.399	0.54
Δρmin/e Å <sup>3</sup>	-0.338	-0.358	-0.50





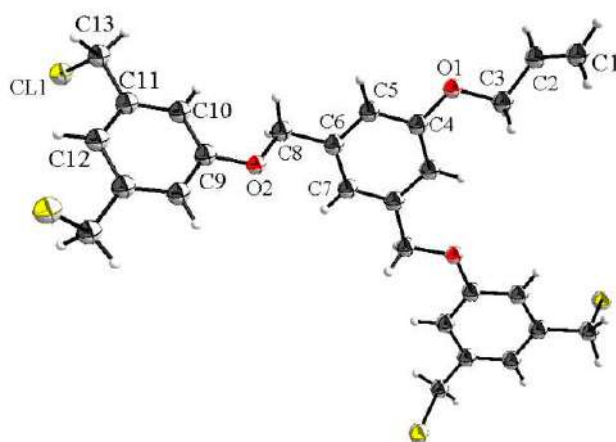
**Tabla 10.** Distancias de enlace, ángulos de enlace y dihedrales selectos de la dendrona 7.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
C2—C1	0.932 (16)	C1—C2—C3	138 (2)
C3—C2	1.51(3)	O1—C3—C2	106.0 (19)
C3—O1	1.57 (3)	C4—O1—C3	109 (2)
C4—O1	1.48 (3)	O1—C4—C5	112.9 (10)
C5—C4	1.385 (3)	C6—C5—C4	119.1 (2)
C5—C6	1.373 (3)	C5—C6—C7	119.98 (19)
C6—C7	1.395 (3)	C5—C6—C8	116.96 (19)
C6—C8	1.507 (3)	C7—C6—C8	123.1 (2) C13
C8—O2	1.416 (3)	O2—C8—C6	109.98 (18)
C9—O2	1.373 (2)	C9—O2—C8	117.70 (16)
C10—C9	1.384 (3)	O2—C9—C10	115.23 (18)
C11—C10	1.383 (3)	C12—C11—C13	120.4 (2)
C11—C12	1.392 (3)	C10—C11—C13	120.8 (2)
C11—C13	1.507 (3)	C11—C13—O3	112.5 (2)
C13—O3	1.419 (3)		
Ángulos de torsión (°)			
O1—C3—C2—C1	-29 (4)		
C2—C3—O1—C4	-178.1 (16)		
C5—C4—O1—C3	-2 (2)		
C5—C6—C8—O2	173.4 (2)		
C7—C6—C8—O2	-6.9 (3)		
C6—C8—O2—C9	176.2 (2)		
C10—C9—O2—C8	-172.4 (2)		
C10—C11—C13—O3	121.9 (2)		
C12—C11—C13—O3	-56.7 (3)		



**Tabla 11.** Distancias de enlace, ángulos de enlace y dihedrales selectos de la dendrona **8**.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
C4—O1	1.368 (4)	O1—C4—C5	122.4 (3)
C8—O2	1.422 (3)	O2—C8—C6	109.3 (2)
C9—O2	1.370 (3)	C9—O2—C8	117.7 (2)
C11—C13	1.511 (4)	O2—C9—C10	114.7 (3)
C13—O3	1.410 (4)	C12—C11—C13	122.1 (3)
		C10—C11—C13	118.6 (3)
		C11—C13—O3	114.3 (3)
Ángulos de torsión (°)			
C6—C8—O2—C9	167.0 (2)		
C5—C6—C8—O2	9.4 (4)		
C7—C6—C8—O2	-172.1 (3)		
C10—C9—O2—C8	-161.0 (3)		
C10—C11—C13—O3	164.1 (3)		
C12—C11—C13—O3	-15.1 (5)		

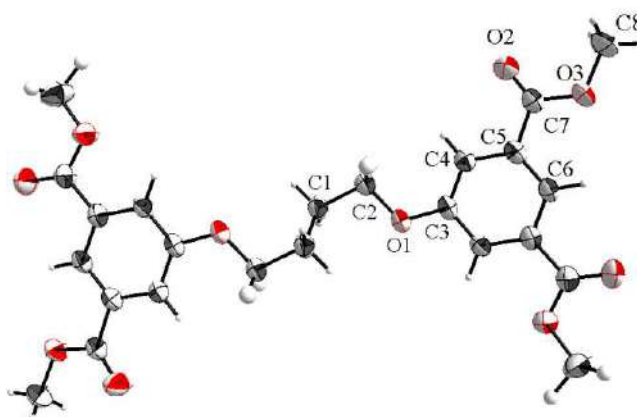


**Tabla 12.** Distancias de enlace, ángulos de enlace y dihedrales selectos de la dendrona **9**.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
C2—C1	1.280 (6)	C1—C2—C3	125.5 (5)
C3—C2	1.465 (5)	O1—C3—C2	108.8 (3)
C3—O1	1.421 (4)	C4—O1—C3	116.9 (2)
C4—O1	1.380 (4)	O1—C4—C5	116.0 (3)
C5—C4	1.390 (4)	O1—C4—C5A	123.5 (3)
C5—C6	1.383 (4)	C6—C5—C4	120.0 (3)
C6—C7	1.386 (4)	C5—C6—C7	119.2 (3)
C6—C8	1.506 (4)	C5—C6—C8	120.0 (3)
C8—O2	1.428 (3)	C7—C6—C8	120.8 (3)
C9—O2	1.376 (3)	O2—C8—C6	107.2 (2)
C10—C9	1.390 (3)	C9—O2—C8	118.2 (2)
C11—C10	1.388 (3)	O2—C9—C10	124.4 (2)
C11—C12	1.378 (3)	C12—C11—C13	119.8 (2)
C11—C13	1.500 (3)	C10—C11—C13	119.9 (2)
C13—Cl	1.803 (3)	C11—C13—Cl1	109.76 (19)
Ángulos de torsión (°)			
O1—C3—C2—C1	127.3 (5)		
C2—C3—O1—C4	179.6 (3)		
C5—C4—O1—C3	178.0 (3)		
C6—C8—O2—C9	169.3 (2)		
C5—C6—C8—O2	-120.3 (3)		
C7—C6—C8—O2	58.8 (4)		
C10—C9—O2—C8	-4.1 (4)		
C10—C11—C13—Cl1	105.4 (2)		
C12—C11—C13—Cl1	-74.1 (3)		

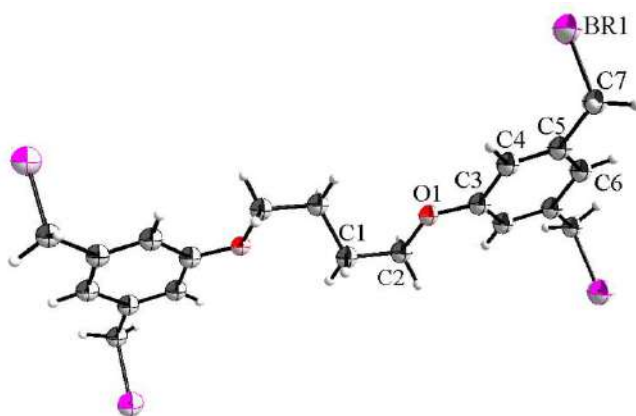
**Tabla 13.** Datos cristalográficos de rayos-X de las dendronas **13** y **15**.

Compuesto	<b>13</b>	<b>15</b>
<b>Datos del Cristal</b>		
Formula condensada	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>2</sub> 2(CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )
Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	474.45	= 783.87
Tamaño del cristal (mm)	0.5 × 0.31 × 0.12	0.13 × 0.1 × 0.05
Sistema cristalino	Monoclinico	Monoclinico
Grupo espacial	P21/c	P21/c
<b>Parametros de la celda</b>		
a/Å	4.2921 (10)	17.5380 (12)
b/Å	16.043 (4)	= 4.4910(4)
c/Å	17.167 (4)	20.795(1)
α(°)	90.0	
β(°)	96.107 (8)°	= 113.360(4)°
γ(°)	90.0	90.0
V/Å <sup>3</sup>	1175.4 (5)	1503.63(18)
Z	2	2
Densidad calculada (g cm <sup>-3</sup> )	1.341	= 1.731
Coefficiente de absorción (mm <sup>-1</sup> )	0.105	5.726
F(000)	= 500	764
<b>Parametros de colección</b>		
Longitud de onda (λ) Å	0.71073	0.7103
Temperatura (K)	293	293
Reflecciones colectadas	7453	16012
Ref. Ind. (Rint)	2053 (0.056)	3392 (0.073)
Ref Observadas	1548	1779
<b>Refinamiento</b>		
GoF	1.117	1.049
R <sub>w</sub> (todos los datos)	= 0.163	= 0.320
Δρ <sub>max</sub> /e Å <sup>-3</sup>	= 0.28	1.17
Δρ <sub>min</sub> /e Å <sup>-3</sup>	-0.28	= -0.66 e



**Tabla 14.** Distancias de enlace, ángulos de enlace y dihedrales selectos del dendrímoro **13**.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
C1—C1i	1.521 (4)	C2—C1—C1i	114.1 (2)
C1—C2	1.511 (2)	O1—C2—C1	107.45 (15)
C2—O1	1.440 (2)	O1—C3—C4	115.06 (15)
C3—O1	1.367 (2)	O2—C7—C5	124.12 (19)
C5—C7	1.491 (3)	O3—C7—C5	112.27 (16)
C7—O2	1.201 (2)	O2—C7—O3	123.6 (2)
C7—O3	1.330 (2)	C7—O3—C8	116.77 (16)
C8—O3	1.447 (3)		
Ángulos de torsión (°)			
C1i—C1—C2—O1	59.8 (3)		
C1—C2—O1—C3	-179.96 (15)		
C4—C3—O1—C2	-172.62 (16)		
O1—C3—C4—C5	179.62 (16)		
C4—C5—C7—O2	-178.4 (2)		
C4—C5—C7—O3	2.8 (3)		
C6—C5—C7—O3	-177.05 (16)		
C5—C7—O3—C10	-179.88 (19)		
O2—C7—O3—C10	1.3 (3)		

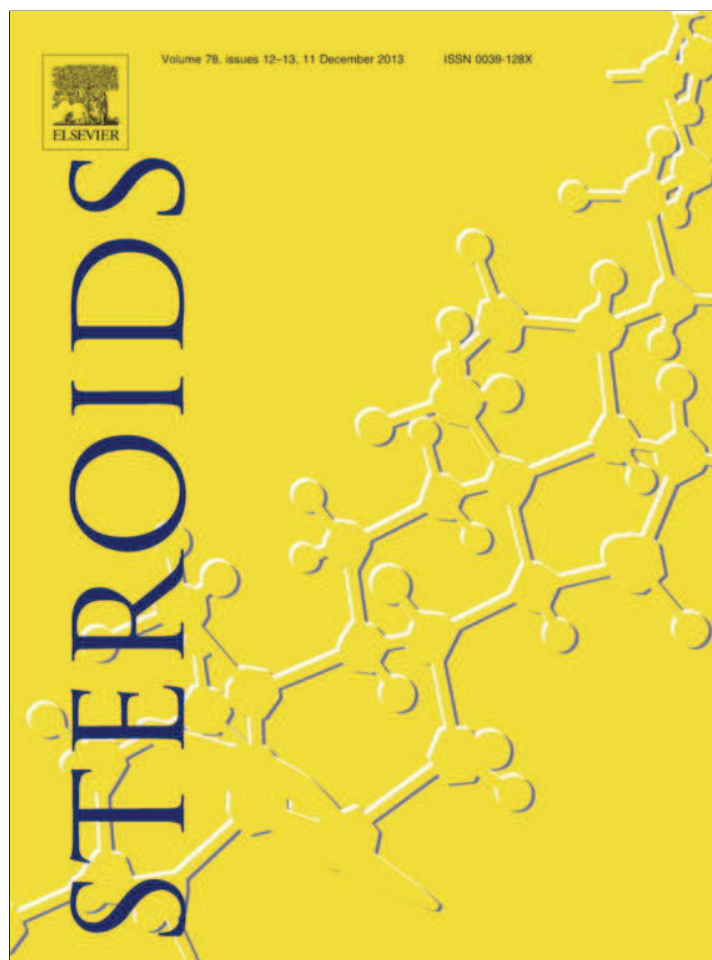


**Tabla 15.** Distancias de enlace, ángulos de enlace y dihedrales selectos del dendrímtero **15**.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
C1—Cl1	1.56 (2)	C2—C1—Cl1	111.7 (11)
C1—C2	1.507 (14)	O1—C2—C1	106.7 (9)
C2—O1	1.472 (12)	O1—C3—C4	115.9 (9)
C3—O1	1.361 (11)	C6—C5—C7	118.8 (8)
C5—C7	1.504 (13)	C5—C7—Br1	110.4 (6)
C7—Br1	1.960 (9)		
Ángulos de torsión (°)			
C1i—C1—C2—O1		-60.5 (15)	
C1—C2—O1—C3		178.8 (9)	
C4—C3—O1—C2		-178.3 (9)	
O1—C3—C4—C5		179.1 (9)	
C4—C5—C7—Br1		80.2 (10)	
C6—C5—C7—Br1		-98.1 (9)	



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>





Contents lists available at ScienceDirect

## Steroids

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/steroids](http://www.elsevier.com/locate/steroids)

## Synthesis and antiproliferative activity of novel steroidal dendrimer conjugates



Nancy E. Magaña-Vergara<sup>a</sup>, Lucie Rárová<sup>b</sup>, Delia Soto-Castro<sup>a</sup>, Norberto Farfán<sup>c</sup>, Miroslav Strnad<sup>b,\*</sup>, Rosa Santillan<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo. Postal 14-740, México D.F. 07000, Mexico

<sup>b</sup>Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic

<sup>c</sup>Facultad de Química, Departamento de Química Orgánica, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 May 2013

Received in revised form 1 August 2013

Accepted 1 September 2013

Available online 21 September 2013

#### Keywords:

Steroidal dendrimer conjugates

Antiproliferative activity

Ethynylestradiol

### ABSTRACT

We describe the synthesis of steroidal dendrimer conjugates of first and second generation with tetramethylene core and 5-hydroxy-isophthalic acid dimethyl ester as branching unit modified to incorporate ethynylestradiol or 17 $\alpha$ -estradiol as terminal units. The steroidal dendrimer conjugates, the free drug (steroids) and dendrimer were tested against a panel of cancer cell lines (CEM, MCF7, HeLa) and normal human fibroblast (BJ). The steroidal dendrimer conjugates of first generation exhibited cytotoxic activity and induced apoptosis in chronic leukemia (CEM) as resultant activation of caspase cascade which is mainly provoked in G2/M arrested cells.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

More than 11 million people are diagnosed with cancer each year and the incidence of this disease is projected to rise continuously to 16 million by 2020 [1]. For this reason, the discovery of new active drugs and the development of delivery devices capable of improving the therapeutic index of biologically active molecules and decreasing unwanted side effects [2] are of crucial importance.

Dendrimers are synthetic macromolecules possessing well defined branching architectures in nanometric size that can be easily tailored to endow specific properties [3–7]. They have attracted great attention due to their potential in the delivery of anticancer drugs because their high multivalency enhances cellular interactions and promotes a faster endocytosis [8–11]. As drug delivery systems, three strategies [12–14] have been employed: (i) formation of dendrimer networks around the drug; (ii) drug encapsulation inside the dendrimer mediated by electrostatic and van der Waals interactions; (iii) drug “conjugation” by covalent attachment or electrostatic binding at the periphery. However, several reports suggest [13,14] that, when a drug is encapsulated or electrostatically attached to a dendrimer, it may be released prematurely in the body as a result of a small pH change. Consequently, the observed therapeutic effect is lower than one would expect. On the

contrary, the covalent conjugation, with or without the assistance of target moieties, improves the selective drug accumulation, increases the circulation time in the body, favoring a sustained liberation [2,12,14] and inducing apoptosis [15–17].

Synthetic estrogens, such as 17 $\alpha$ -ethynylestradiol and 17 $\alpha$ -estradiol have been used to prevent or reduce menopause symptoms, as oral contraceptives, in the treatment of alopecia, and in neurodegenerative disorders such as Alzheimer and Parkinson diseases [18]. Interestingly steroidal compounds have also shown antiproliferative activity and the ability to induce apoptosis [19]. In particular, the cytotoxicity of 17 $\alpha$ -estradiol toward human leukemia Jurkat T cells has been attributed to apoptosis, mainly induced in G2/M-arrested cells [20], while 17 $\alpha$ -ethynylestradiol has been evaluated with promising results as inhibitor of human prostate [21] and colon cancer [22]. The combination of dendritic compounds with steroidal derivatives has given rise to new architectures with a wide-range of biological effects when used as drug delivery systems [23–26], including the treatment of malaria [27] and in vitro in the lung inflammatory process [28].

With the aim to exploit the high drug payload of dendrimers without loss of monodispersity and well defined structure, to explore the possibility to enhance the cytotoxic activity of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol and 17 $\alpha$ -estradiol, and bearing in mind the advantages of covalent conjugation in drug delivery, four new steroidal dendrimer conjugates were synthesized in this work. The dendrimers were prepared using a flexible tetramethylene core, and 5-hydroxy-isophthalic acid dimethyl ester as branching unit modified to incorporate 4 units of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol or

\* Corresponding authors. Tel.: +52 555 747 3725; fax: +52 555 747 3389 (R. Santillan). Tel.: +420 585 634 850; fax: +420 585 634 870 (M. Strnad).

E-mail addresses: [miroslav.strnad@upol.cz](mailto:miroslav.strnad@upol.cz) (M. Strnad), [rsantill@cinvestav.mx](mailto:rsantill@cinvestav.mx) (R. Santillan).

17 $\alpha$ -estradiol for first generation (**8** and **9**) and 8 units for the second (**10** and **11**). Their preliminary biological assays show that all new dendrimers and dendrimeric conjugates of G1 are noncytotoxic against normal fibroblastic cells (BJ), but the conjugates of first generation are able to induce apoptosis in leukemia cancer cells (CEM) displaying a higher cytotoxic activity than the free drug.

## 2. Experimental

### 2.1. General

The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on JEOL 400 and 500, and Bruker 300 using  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$  as solvent. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to internal TMS. Mass spectra were recorded with an Agilent Technologies MS TOF using the ESI(+) technique. IR spectra were recorded using a Perkin-Elmer Spectrum GX FTIR spectrometer.

All reagents were commercially available. THF was refluxed over sodium/benzophenone and distilled under reduced pressure in a nitrogen atmosphere prior to use. Column chromatography was carried out with silica gel (70–230 mesh). 5-Hydroxy-isophthalic acid dimethyl ester (**1**) was synthesized following the literature [29]. Compounds **2** and **4** have been reported in the literature, however, using the method described herein the yields were optimized [30,31]. Unambiguous NMR spectral assignment was attained using one and two dimensional spectra.

### 2.2. Synthesis of compounds

#### 2.2.1. 1,4-Bis(3,5-bis(carboxymethyl)phenoxy)butane (**2**)

5-Hydroxy-isophthalic acid dimethyl ester (**1**) (4.29 g, 20.41 mmol) and potassium carbonate (8.29 g, 59.98 mmol) were stirred in acetonitrile, followed by slow addition of 1,4-dibromobutane (1.1 mL, 9.26 mmol) and 18-crown-6 (1 mg). The mixture was heated at 60 °C during 48 h, filtered and rinsed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The solvent was removed under reduced pressure to obtain 4.30 g (9.06 mmol, 98%) of compound **2** as beige solid. M.p. 152–153 °C, in agreement with the literature [24].

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ (ppm): 8.24 (2H, t,  $J = 1.5$  Hz, H-6), 7.71 (4H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-4), 4.11 (4H, m, H-2), 3.91 (12H, s, H-8), 2.01 (4H, m, H-1).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ (ppm): 166.2 (C-7), 159.0 (C-3), 131.8 (C-5), 123.0 (C-6), 119.8 (C-4), 68.0 (C-2), 52.4 (C-8), 25.8 (C-1). IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 2951, 2852, 2360, 1725 (O=C=O), 1596, 1453, 1433, 1337, 1312, 1238 (C-O), 1111 (C-O), 1050, 1018, 1000, 902, 875, 753, 671, 628. HR-ESI-TOF-MS ( $m/z$ ): calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_{10}[\text{M}+\text{H}]^+$ : 475.1604; found: 475.1583.

#### 2.2.2. 1,4-Bis(3,5-bis(hydroxymethyl)phenoxy)butane (**3**)

A solution of tetraester **2** (1.52 g, 40.00 mmol) in dry THF was added dropwise to a magnetically stirred suspension of  $\text{LiAlH}_4$  (3.00 g, 6.32 mmol) in dry THF under  $\text{N}_2$ . The reaction was stirred 24 h at room temperature, and quenched by the slow addition of a solution of ammonium chloride (10 mL) and ethyl acetate (40 mL) with cooling. The aluminum salts were filtered and the solvents were then removed under reduced pressure to give 1.52 g (4.19 mmol, 56%) of compound **3** as a white solid. M.p. 147–149 °C.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz)  $\delta$ (ppm): 6.82 (2H, s, H-6), 6.73 (4H, s, H-4), 4.42 (8H, s, H-7), 3.99 (4H, brs, H-2), 3.35 (OH), 1.84 (4H, brs, H-1).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 75 MHz)  $\delta$ (ppm): 159.0 (C-3), 144.3 (C-5), 116.9 (C-6), 111.0 (C-4), 67.4 (C-2), 63.2 (C-7), 25.9 (C-1). IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3291, 3170, 2943, 2873, 2853, 1595, 1449, 1297, 1265, 1168, 1064, 1027, 979, 918, 841, 701, 677, 607. HR-ESI-MS ( $m/z$ ) calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 385.1627; found: 385.1609.

#### 2.2.3. 1,4-Bis(3,5-bis(bromomethyl)phenoxy)butane (**4**)

Compound **3** (1.28 g, 3.53 mmol) was dissolved in a 2:1 solution of HBr:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (100 mL). The mixture was heated at 100–110 °C for 1 h, allowed to cool and diluted with  $\text{H}_2\text{O}$  (100 mL). The aqueous solution was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 150$  mL) and the combined organic layers were washed with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution (100 mL), dried ( $\text{MgSO}_4$ ), filtered and concentrated to yield a brown solid. The crude product was purified by column chromatography using hexane to obtain 1.84 g (3.01 mmol, 84%) of **4** as a white crystalline solid. M.p. 126–128 °C.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ (ppm): 6.99 (2H, brs, H-6), 6.85 (4H, brs, H-4), 4.42 (8H, s, H-7), 4.04 (4H, m, H-2), 1.98 (4H, m, H-1).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$ (ppm): 159.3 (C-3), 139.6 (C-5), 121.8 (C-6), 115.2 (C-4), 67.5 (C-2), 32.9 (C-7), 25.8 (C-1). IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 2928, 2871, 1593, 1452, 1388, 1328, 1296 (C-O), 1166 (C-O-C), 1055, 1019, 940, 870, 848, 732, 697, 671, 648 y 633 (C-Br).

#### 2.2.4. 1,4-Bis(3,5-bis(3,5-bis(carboxymethyl)phenoxy)methyl)phenoxy)butane (**5**)

5-Hydroxy-isophthalic acid dimethyl ester (**1**) (0.13 g, 0.62 mmol) and potassium carbonate (0.30 g, 2.17 mmol) were stirred in acetonitrile, followed by slow addition of 1,4-bis(3,5-bis(bromomethyl)phenoxy)butane (0.10 g, 0.16 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1 mg) of. The mixture was refluxed 72 h, filtered and rinsed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The solvent was removed under reduced pressure to obtain 0.15 g (0.13 mmol, 82%) of compound **5** as a beige solid. M.p. 176–177 °C.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ (ppm): 8.27 (4H, s, H-11), 7.81 (8H, s, H-9), 7.08 (8H, s, H-7), 6.96 (4H, s, H-4), 5.10 (2H, s, H-6), 4.08 (4H, brs, H-2), 3.92 (24H, s, COOMe), 2.00 (4H, brs, H-1).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ (ppm): 166.1 (O=COME), 159.7 (C-3), 158.7 (C-8), 138.1 (C-5), 131.9 (C-10), 123.4 (C-11), 120.1 (C-9), 118.5 (C-6), 113.3 (C-4), 70.2 (C-7), 67.6 (C-2), 52.5 (COOMe), 26.0 (C-1). IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 2954, 1721 (O=C=O), 1597, 1431, 1339, 1311, 1239 (C-O), 1170, 1113, 1064, 1043, 1000, 907, 875, 836, 792, 752, 721, 682, 564. HR-ESI-TOF-MS ( $m/z$ ): calcd for  $\text{C}_{60}\text{H}_{58}\text{O}_{22}[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 1153.3317; found: 1153.3315.

#### 2.2.5. 1,4-Bis(3,5-bis(3,5-bis(hydroxymethyl)phenoxy)methyl)phenoxybutane (**6**)

A solution of **5** (0.10 g, 0.09 mmol) in dry THF was added dropwise to a magnetically stirred suspension of  $\text{LiAlH}_4$  (0.04 g, 1.05 mmol) in dry THF under  $\text{N}_2$ . The reaction was stirred 24 h at room temperature, and quenched by the slow addition of a solution of ammonium chloride (10 mL) and ethyl acetate (40 mL) with cooling. The aluminum salts were filtered and the solvents were then removed under reduced pressure to give 0.04 g (0.05 mmol, 53%) of compound **6** as a white solid. M.p. 146–147 °C.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz)  $\delta$ (ppm): 7.18 (2H, brs, H-6), 7.08 (4H, brs, H-11), 6.85 (4H, brs, H-4), 6.82 (8H, brs, H-9), 5.04 (8H, brs, H-7), 4.44 (16H, brs, H-12), 4.05 (4H, brs, H-2), 2.48 (8H, brs, OH), 1.87 (4H, brs, H-1).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 75 MHz)  $\delta$ (ppm): 159.2 (C-3), 158.7 (C-8), 144.4 (C-10), 139.4 (C-5), 118.9 (C-6), 117.3 (C-11), 113.2 (C-4), 111.3 (C-9), 69.3 (C-7), 67.6 (C-2), 63.3 (C-12), 25.8 (C-1). IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3317 (OH), 2918, 2850, 2359, 1720, 1595, 1451, 1375, 1294, 1256, 1154, 1110, 1021 (C-O), 843, 801, 752, 684. HR-APCI-TOF-MS ( $m/z$ ): calcd for  $\text{C}_{52}\text{H}_{58}\text{O}_{14}[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 929.3724; found: 929.3720.

#### 2.2.6. 1,4-Bis(3,5-bis(3,5-bis(chloromethyl)phenoxy)methyl)phenoxybutane (**7**)

To a magnetically stirred solution of **6** (0.75 g, 0.83 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added dry pyridine (0.59 mL, 7.28 mmol), followed by dropwise addition of  $\text{SOCl}_2$  (0.52 mL, 7.28 mmol) under  $\text{N}_2$ . The reaction was stirred 48 h at room temperature, and quenched by the slow addition of water. The organic phase was extracted with

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The product was purified by column chromatography using hexane:ethyl acetate (85:15) to give 0.58 g (0.55 mmol, 67%) of **7**, as a white solid. M.p. 107–109 °C.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ(ppm): 7.06 (2H, brs, H-6), 7.01 (4H, brs, H-11), 6.95 (8H, brs, H-9), 6.94 (4H, brs, H-4), 5.04 (8H, brs, H-7), 4.53 (16H, brs, H-12), 4.07 (4H, brs, H-2), 1.99 (4H, brs, H-1). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ(ppm): 159.6 (C-3), 159.2 (C-8), 139.4 (C-10), 138.5 (C-5), 121.3 (C-11), 118.5 (C-6), 115.0 (C-9), 113.2 (C-4), 69.9 (C-7), 67.6 (C-2), 45.8 (C-12), 26.0 (C-1). IR (ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>): 2957, 2876 (C-H), 1729, 1594(C=C), 1259 (C-O eter), 1454, 1326, 1300, 1259, 1158, 1043, 958, 842, 708 (C-Cl), 674, 583. MALDI TOF MS (*m/z*) calcd for C<sub>52</sub>H<sub>50</sub>Cl<sub>8</sub>O<sub>6</sub>[M+H]<sup>+</sup>: 1051.1194; found: 1050.1887.

### 2.2.7. 17α-Ethynylestradiol-dendrimer conjugate of first generation (**8**)

17α-Ethynylestradiol (0.19 g, 0.64 mmol) and potassium carbonate (0.30, 2.17 mmol) were stirred in acetonitrile. To this solution were added **4** (0.10 g, 0.16 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1 mg). The reaction was refluxed 3 days, and rinsed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using EtOAc in hexane to give 0.18 g (0.12 mmol, 74%) of **8** as a pale yellow solid. M.p. 153–155 °C.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ(ppm): 7.20 (4H, d, *J* = 8.6 Hz, H-1'), 7.05 (2H, s, H-6), 6.92 (4H, s, H-4), 6.76 (4H, dd, *J*<sub>o</sub> = 8.6 Hz, *J*<sub>m</sub> = 2.7 Hz, H-2'), 6.70 (4H, d, *J* = 2.7 Hz, H-4'), 4.98 (8H, s, H-7), 4.05 (4H, brs, H-2), 2.60 (4H, brs, H-20'), 0.87 (12H, s, Me-18'). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ(ppm): 159.5 (C-3), 156.7 (C-3'), 139.2 (C-5), 138.1 (C-5'), 132.9 (C-10'), 126.5 (C-1'), 118.5 (C-4), 114.9 (C-4'), 112.9 (C-6), 112.4 (C-2'), 87.6 (C-19'), 79.9 (C-17'), 74.2 (C-20'), 69.9 (C-7), 67.6 (C-2), 49.5 (C-14'), 47.2 (C-13'), 43.6 (C-9'), 39.4 (C-8'), 39.0 (C-16'), 32.8 (C-12') 29.9 (C-6'), 27.3 (C-7'), 26.4 (C-11'), 26.0 (C-1), 22.9 (C-15'), 12.8 (Me-18'). IR (ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>): 3282 (≡C-H), 2923, 2855, 2161 (C≡C), 1716, 1662, 1601, 1496, 1456, 1377, 1289, 1231, 1159, 1058, 1021, 844, 734, 624. HR-APCI-TOF-MS (*m/z*): calc for C<sub>100</sub>H<sub>114</sub>O<sub>10</sub>[M+Na]<sup>+</sup>: 1497.8309; found: 1497.8284.

### 2.2.8. 17α-Estradiol-dendrimer conjugate of first generation (**9**)

To a mixture of 17α-estradiol (0.18 g, 0.66 mmol), and potassium carbonate (0.30 g, 2.17 mmol) in acetonitrile was added **4** (0.10 g, 0.16 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1 mg). The reaction was refluxed 3 days, the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography using methanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to give 0.18 g (0.13 mmol, 80%) of **9** as a pale yellow solid. M.p. 154–156 °C.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ(ppm): 7.20 (4H, d, *J* = 8.6 Hz, H-1'), 7.04 (2H, s, H-6), 6.92 (4H, s, H-4), 6.75 (4H, dd, *J*<sub>o</sub> = 8.6 Hz, *J*<sub>m</sub> = 2.6 Hz, H-2'), 6.70 (4H, d, *J* = 2.6 Hz, H-4'), 4.99 (8H, s, H-7), 4.05 (4H, brs, H-2), 0.70 (12H, s, Me-18'). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ(ppm): 159.5 (C-3), 156.7 (C-3'), 139.2 (C-5), 138.1 (C-5'), 133.1 (C-10'), 126.4 (C-1'), 118.4 (C-4), 114.9 (C-4'), 112.9 (C-6), 112.3 (C-2'), 80.1 (C-17'), 69.8 (C-7), 67.5(C-2), 47.8 (C-14'), 45.6 (C-13'), 43.7 (C-9'), 39.1 (C-8'), 32.5 (C-12'), 31.5 (C-16'), 30.0 (C-6'), 28.1 (C-7'), 26.3 (C-11'), 26.0 (C-1), 24.3 (C-15'), 17.1 (C-18'). IR (ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>): 3399 (OH), 2929, 2865, 1602, 1496, 1231, 1156, 1033, 609. HR-APCI-TOF MS (*m/z*): calcd for C<sub>92</sub>H<sub>114</sub>O<sub>10</sub>[M+Na]<sup>+</sup>: 1401.8304; found: 1401.8315.

### 2.2.9. 17α-Ethynylestradiol-dendrimer conjugate of second generation (**10**)

17α-Ethynylestradiol (0.56 g, 1.90 mmol) and potassium carbonate (0.86 g, 6.3 mmol) were stirred in acetonitrile. To this solution was added **7** (0.25 g, 0.24 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1 mg). The reaction was refluxed 3 days, the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was

purified by column chromatography using EtOAc/hexane to give 0.56 g (0.18 mmol, 75%) of **10** as a pale yellow solid. M.p. 175–177 °C.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ(ppm): 7.18 (8H, d, *J* = 8.6 Hz, H-1'), 7.06 (4H, s, H-11), 7.05 (2H, s, H-6), 6.99 (8H, s, H-9), 6.93 (4H, s, H-4), 6.75 (8H, dd, *J*<sub>o</sub> = 8.6, *J*<sub>m</sub> = 2.5 Hz, H-2'), 6.68 (8H, d, *J* = 2.5 Hz, H-4'), 5.01 (8H, s, H-7), 4.97 (16H, s, H-12), 4.05 (4H, brs, H-2), 2.85 (16H, m, H-6'), 2.59 (8H, s, H-20'), 0.86 (24H, s, Me-18'). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ(ppm): 159.6 (C-3), 159.2 (C-8), 156.7 (C-3'), 139.3 (C-10), 138.8 (C-5), 138.1 (C-5'), 132.9 (C-10'), 126.5 (C-1'), 118.8 (C-11), 114.9 (C-4'), 113.23 (C-9), 113.16 (C-4), 112.4 (C-2'), 87.6 (C-19'), 79.9 (C-17'), 74.2 (C-20'), 69.9 (C-7), 69.7 (C-12), 67.6 (C-2), 49.5 (C-14'), 47.2 (C-13'), 43.6 (C-9'), 39.4 (C-8'), 39.0 (C-16'), 32.8 (C-12') 29.9 (C-6'), 27.3 (C-7'), 26.4 (C-11'), 26.0 (C-1), 22.9 (C-15'), 12.8 (Me-18'). IR (ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>): 3285, 2930, 2868, 1598, 1496, 1454, 1291, 1231, 1145, 1050, 1020, 843, 786, 571. MALDI TOF MS (*m/z*): calcd for C<sub>212</sub>H<sub>234</sub>O<sub>22</sub>[M+Na+NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>: 3171.7355; found: 3171.7646.

### 2.2.10. 17α-Estradiol-dendrimer conjugate of second generation (**11**)

17α-estradiol (0.045 g, 0.17 mmol) and potassium carbonate (0.07 g, 0.50 mmol) were stirred in acetonitrile. To this solution were added the compound **7** (0.02 g, 0.019 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1 mg). The reaction was refluxed 48 h, filtered and rinsed with water and hexane to obtain 0.05 g (0.017 mmol, 89%) of **11** as a pale yellow solid. M.p. 169–171 °C.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ(ppm): 7.19 (8H, d, *J* = 6.9 Hz, H-1'), 7.07 (4H, s, H-11), 7.03 (2H, s, H-6), 6.99 (8H, s, H-9), 6.94 (4H, s, H-4), 6.75 (8H, d, *J* = 6.9 Hz, H-2'), 6.69 (8H, s, H-4'), 5.02 (8H, s, H-7), 4.05 (4H, brs, H-2), 2.82 (16H, m, H-6'), 0.68 (24H, s, Me-18'). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ(ppm): 159.5 (C-3), 156.7 (C-3'), 139.2 (C-5), 138.1 (C-5'), 133.1 (C-10'), 126.4 (C-1'), 118.4 (C-4), 114.9 (C-4'), 112.9 (C-6), 112.3 (C-2'), 80.1 (C-17'), 69.8 (C-7), 67.5(C-2), 47.8 (C-14'), 45.6 (C-13'), 43.7 (C-9'), 39.1 (C-8'), 32.5 (C-12'), 31.5 (C-16'), 30.0 (C-6'), 28.1 (C-7'), 26.3 (C-11'), 26.0 (C-1), 24.3 (C-15'), 17.1 (C-18'). IR (ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>): 3451(O-H), 2928, 2864 (C-H), 1598 (C=C), 1496, 1453, 1376, 1295, 1233, 1155, 1036, 846, 788, 710, 573. MALDI TOF MS (*m/z*): calcd for C<sub>196</sub>H<sub>234</sub>O<sub>22</sub>[M+Na]<sup>+</sup>: 2962.7089; found: 2962.8896.

## 2.3. Biological tests

### 2.3.1. Cell culture

Stock solutions (10 mmol/L) of dendrimer conjugate derivatives were prepared by dissolving an appropriate quantity of each substance in DMF. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin, L-glutamine, penicillin and streptomycin were purchased from Sigma (MO, USA). Calcein AM was obtained from Molecular Probes (Invitrogen Corporation, CA, USA).

The cell lines for screening (T-lymphoblastic leukemia cell line CEM, breast carcinoma cell line MCF-7, cervical carcinoma cell line HeLa, and human fibroblasts BJ) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). All cell lines were cultured in DMEM medium (Sigma, MO, USA), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mmol/L L-glutamine, 10,000 U penicillin and 10 mg/mL streptomycin. The cell lines were maintained under standard cell culture conditions at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humid environment. Cells were subcultured twice or three times a week using the standard trypsinization procedure.

### 2.3.2. Calcein AM assay

Suspensions of the tested cell lines (ca. 1.0 × 10<sup>5</sup> cells/mL) were placed in 96-well microtiter plates and after 3 h of stabilization (time zero) the compounds to be tested were added (in four 20 μL aliquots) in serially diluted concentrations in dimethylformamide (DMF). Control cultures were treated with DMF alone, and



the final concentration of DMF in the incubation mixtures never exceeded 0.6%. The test compounds were typically evaluated at six 3-fold dilutions and the highest final concentration was generally 50  $\mu$ M. After 72 h incubation, 100  $\mu$ L Calcein AM solution (Molecular Probes, Invitrogen, CA, USA) was added, and incubation was continued for a further hour. The fluorescence of viable cells was then quantified using a Fluoroskan Ascent instrument (Labsystems, Finland). The percentage of surviving cells in each well was calculated by dividing the intensity of the fluorescence signals from the exposed wells by the intensity of signals from control wells and multiplying by 100. These ratios were then used to construct dose–response curves from which IC<sub>50</sub> values, the concentrations of the respective compounds that were lethal to 50% of the tumor cells, were calculated. The results obtained for selected compounds are shown in Table 1.

### 2.3.3. Flow cytometric analysis of the cell cycle and apoptosis

CEM leukemia cancer cells were seeded in 100-mm culture dishes, and immediately incubated with the test compounds. After 24 h, the cells were washed, fixed and stained in 0.1% [m/v] sodium citrate, 0.1% [v/v] Triton X-100, 0.2 mg/mL RNase A and 10  $\mu$ g/mL propidium iodide in PBS. Their DNA contents were then assessed with a flow cytometer (Cell Lab Quanta SC – MPL, Beckman Coulter, CA USA), and the distribution of cells in subG<sub>1</sub> (“apoptotic cells”), G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S and G<sub>2</sub>/M peaks were quantified, by histogram analysis, using MultiCycle AV software (Phoenix Flow Systems, CA, USA).

### 2.3.4. Activities of caspases 3 and 7 (3/7)

Treated CEM cells were harvested by centrifugation and homogenized in an extraction buffer (10 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2% CHAPS, plus protease inhibitors: aprotinin, leupeptin, PMSF; pH 7.4) on ice for 20 min. The resulting homogenates were clarified by centrifugation at 10000  $\times$  g for 20 min at 4 °C. The protein contents of the samples were quantified by the Bradford method and they were diluted to the equivalent protein concentrations. Lysates were then incubated for 1 h with 100 mM Ac-DEVD-AMC as a substrate (Sigma–Aldrich) in an assay buffer (25 mM PIPES, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, pH 7.3). For negative controls, the lysates were supplemented with 100 mM Ac-DEVD-CHO (Sigma–Aldrich) as a caspase 3/7 inhibitor. The fluorescence of the product was measured using a Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems, Finland) at 346/442 nm (ex/em).

**Table 1**

IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M) values obtained from the calcein AM assays with the tested cancer and normal cell lines.

Compound	Cell line <sup>a</sup>			
	CEM	MCF7	HeLa	BJ
17 $\alpha$ -ethynylestradiol	19.1 $\pm$ 1.7	>50	1.4 $\pm$ 0.1	>50
17 $\alpha$ -estradiol	25.2 $\pm$ 6.4	>50	>50	>50
G1				
3	>50	>50	>50	>50
8	3.5 $\pm$ 1.3	>50	>50	>50
9	2.1 $\pm$ 0.2	>50	>50	>50
G2				
6	>50	>50	>50	3.3 $\pm$ 1.2
10	26.8 $\pm$ 4.6	34.6 $\pm$ 4.9	5.5 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 1.3
11	>50	>50	>50	>50

<sup>a</sup> The cells were treated for 72 h with serial concentrations of the tested compounds. The values quoted represent means  $\pm$  SD, these were obtained from three independent experiments performed in triplicate using 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, 17 $\alpha$ -estradiol, 3 and 6 as a control in chronic leukemia (CEM), breast adenocarcinoma (MCF7) and, cervical carcinoma (HeLa) tumor cell lines and against normal human fibroblasted cells (BJ).

### 2.3.5. Western blotting

The cells were seeded into culture medium in 100-mm culture dishes at a density of 1.5  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL and treated immediately with dendrimer conjugate derivatives. DMF was used as a vehicle for controls. After 24 h of treatment, the cells were washed three times with cold PBS (10 mM, pH 7.4) and lysed in ice-cold RIPA protein extraction buffer (20 mM Tris–HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 100 mM NaCl, 2 mM NaF, 0.2% Nonidet P-40, 30 mM PMSF, 1 mM DTT, 10 mg/mL of aprotinin and leupeptin). The lysate was collected into a microfuge tube and incubated on ice for 1 h. It was then cleared by centrifugation at 10,000g for 30 min at 4 °C and the supernatant was collected. Proteins in lysates were quantified by the Bradford method and diluted with Laemmli electrophoresis buffer. The proteins were then separated on 10% or 12% SDS–polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) and stained with Ponceau S to check equal protein loading. The membranes were blocked with 5% (w/v) non-fat dry milk and 0.1% Tween-20 in PBS for 2 h and probed overnight with specific primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). After washing in PBS and PBS with 0.1% Tween-20, the membranes were probed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and visualized with West Pico Supersignal chemiluminescent detection reagent (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). To confirm equal protein loading, immunodetection was performed with anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). The experiments were repeated three times. The protein expression in treated cells was compared to untreated controls.

## 3. Results and discussion

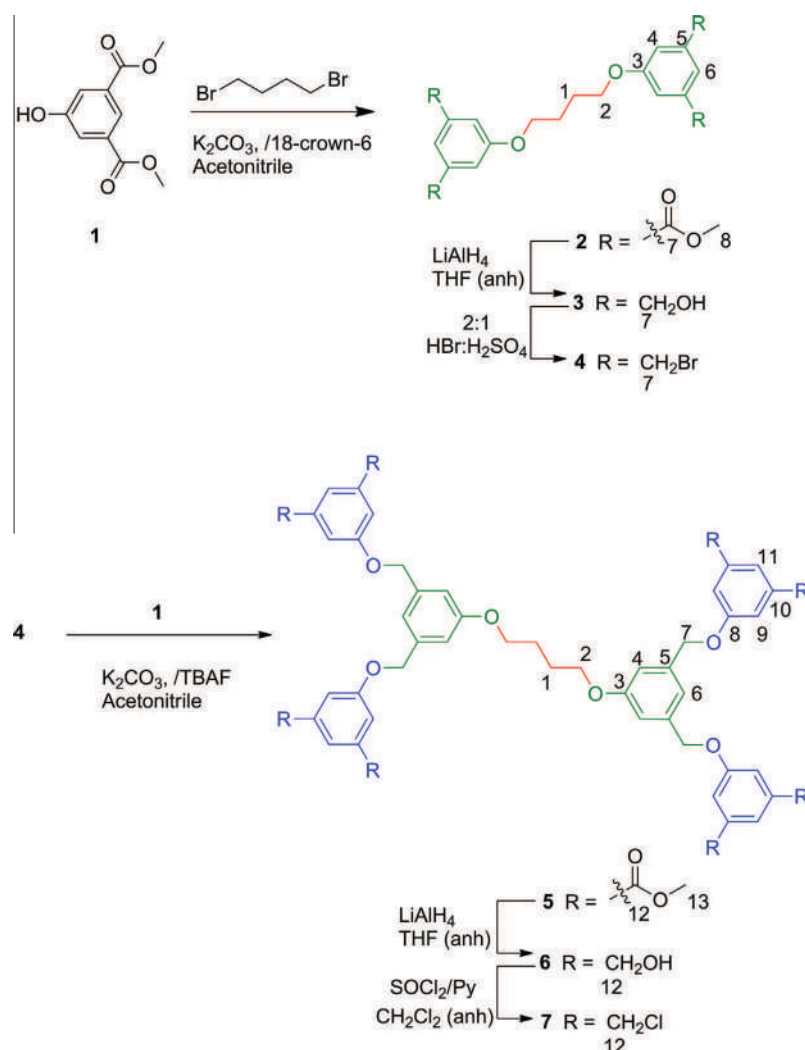
### 3.1. Chemical synthesis and characterization

The dendrimeric structure consists of a core that determines the shape and steric hindrance in the structure, promoting a spherically or ellipsoidal shape as function of generation. Noteworthy, the PAMAM dendrimer at G1 with 8 NH<sub>2</sub> groups (1.430 kDa and 22 Å) presents an irregular geometry and adopts a spherical shape that increases the steric hindrance and the molecular rigidity in the higher generations, complicating the drug payload at the periphery [33]. Hence, we focused in the synthesis of dendrimeric structures with tetramethylene core in order to promote an ellipsoidal shape and minimize steric hindrance. We used dimethyl 5-hydroxyisophthalate as branching unit which undergoes modification of the functional groups at the periphery via nucleophilic reactions with the steroids.

Following the synthetic route shown in Scheme 1, the dendrimer of first generation (tetramethyl ester **2**) was obtained in high yield (98%) by reaction of dimethyl 5-hydroxyisophthalate (**1**) with 1,4-dibromobutane in the presence of potassium carbonate, and 18-crown-6 as the phase transfer catalyst. Subsequent reduction of **2** with LiAlH<sub>4</sub> afforded tetraol **3** (56% yield) which was treated with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HBr to give tetrabromo derivative **4** (84% yield) as a solid ready for coupling with the steroids or to the second iteration of analogous transformations for the preparation of the second dendrimer generation.

Dendrimers of second generation (**5**, **6** and **7**) were prepared by repeating the synthetic procedures described for the first generation, to give the methyl ester **5** in high yield (82%). The ester was reduced to give hydroxyl derivative **6**, which was converted into benzylic chlorides to give **7**.

The structures of all compounds obtained in this work were unambiguously established using 2D NMR experiments (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C, COSY, HETCOR, DEPT 90° and 135°), in conjunction with IR and high resolution mass spectrometry.



**Scheme 1.** Synthesis of the dendrimeric structures of first and second generation.

The symmetry present in the molecules simplifies their NMR characterization. The structures were assigned based on the multiplicity, chemical shift and integration of the signals. Because the dendrimers of G1 and G2 consist of a tetramethylene core and dimethyl 5-hydroxyisophthalate as branching units, they have similar <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra. Nonetheless, there are characteristic signals like the new methylene at 5.04 ppm in G2 dendrimers that allow distinguishing one from the other.

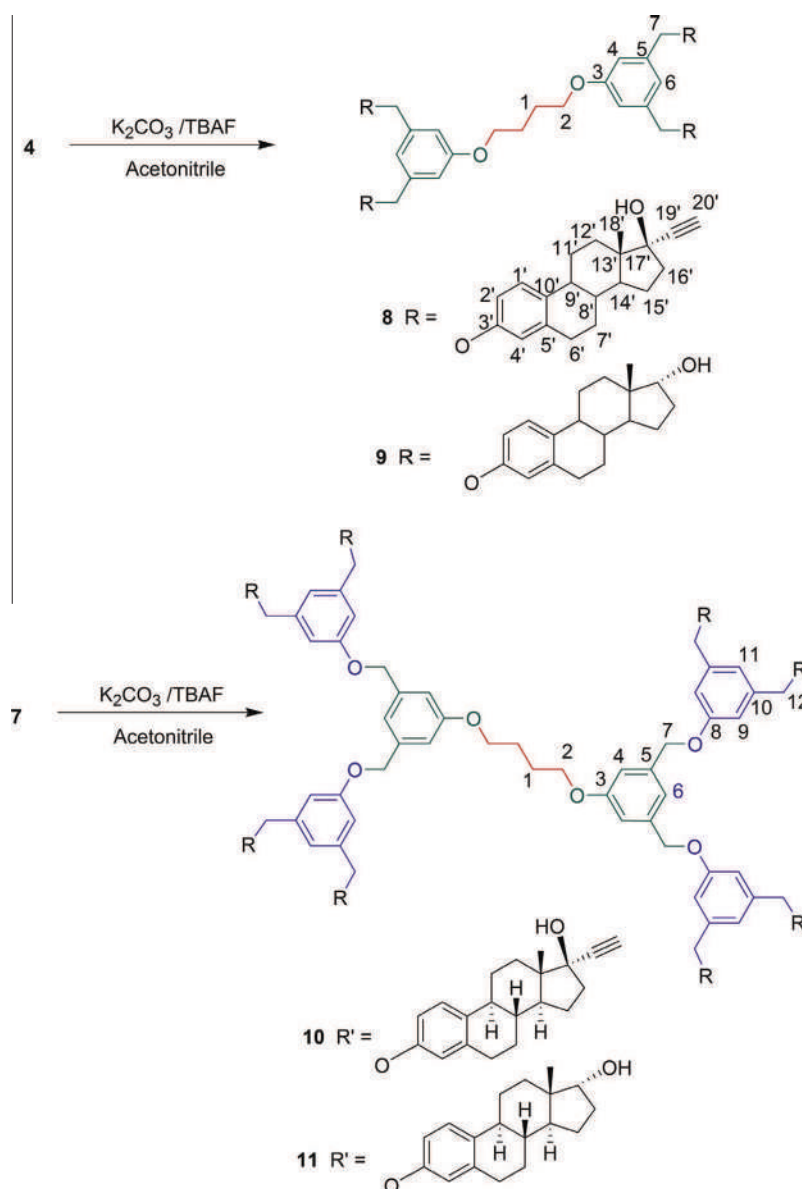
The main difference between the two generations is the coupling of one additional branching unit that results in a spectrum with twice the intensity of the signals compared with the precursor of G1.

Reduction of the ester groups to give G2 dendrimer with 8 OH terminal groups (**6**) was corroborated by the signal at 4.44 (H-12) ppm attributed to new methylene groups and the absence of the carbonyl group in the <sup>13</sup>C NMR spectrum. The presence of the hydroxyl group in dendrimers **3** and **6** was demonstrated by IR spectra which showed broad absorption bands at 3291 and 3317, respectively. Substitution of the hydroxyl group in **6** by chlorine (**7**) induced a  $\Delta\delta$  of approximately 0.09 for the directly bonded methylene.

Once dendrimers of first and second generation with halogenated surface functionality were obtained, and considering the advantages of steroidal payload in covalent conjugation, they were coupled with the 17 $\alpha$ -ethynylestradiol or 17 $\alpha$ -estradiol using the

hydroxyl group at positions 3 of both steroids for conjugation with the dendrimer, without compromising binding affinity of the estrogen [34]. The covalently bound conjugates of first (**8** and **9**) and second generation (**10** and **11**) were synthesized from estrogens 17 $\alpha$ -ethynylestradiol and 17 $\alpha$ -estradiol and the corresponding halogenated compound **4** or **7** which were linked via ether functionalities, giving first and second generation conjugates in yields of 74% and 86% (Scheme 2). It should be mentioned that a previous publication has reported the synthesis of a dendrimeric conjugate in which 12 molecules of the corticosteroid, methylprednisolone (MP), were linked via ester to the PAMAM G4-OH dendrimer. In order to obtain this conjugate, it was necessary to couple previously glutaric acid to the steroid as spacer since the alternative route incorporating the spacer to the dendrimer afforded lower conjugation ratio of MP, presumably due to steric hindrance at the periphery [28]. In contrast, the steroidal conjugates **8**, **9**, **10** and **11**, synthesized in this work, are relatively non-hindered molecules with high payload of steroid in the dendrimer.

The formation of the steroidal dendrimer conjugates containing 4 and 8 units of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (**8**, **10**), or 17 $\alpha$ -estradiol (**9**, **11**) at the periphery was confirmed by the appearance of the steroidal signals in the <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra which were unambiguously assigned using 2D experiments and are in agreement with the shifts reported for the parent steroid [35,36]. The aromatic protons of the dendrimer were assigned according to



**Scheme 2.** Synthesis of two steroidal dendrimer conjugates derivatives of  $17\alpha$ -ethynylestradiol and  $17\alpha$ -estradiol of first (**8** and **9**) and second generation (**10** and **11**).

the integral and the coupling constants, and the signal shifted to high frequencies at 4.98 (H-7) ppm in **8** and, at 5.02 (H-12) ppm in **10** provided evidence for the formation of the conjugates.

The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **8** showed 27 different carbons which were assigned using COSY, HETCOR and DEPT experiments. The signal corresponding to the benzyl ether C-7 ( $-\text{OCH}_2-$ ) at 69.8 ppm confirms the formation of G1 steroidal dendrimer conjugates. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of G2 conjugate derivative of  $17\alpha$ -ethynylestradiol exhibits 32 different carbons and were assigned as previously described.

For compounds **9** and **11** the expected 25 and 30 different carbons are observed in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum and the signals for both steroidal fragments were in agreement with the data reported in the literature [31,32] and showed very slight variations. The signals corresponding to the aromatic ring of the dendrimer and the newly formed ether linkage were also in agreement with those of conjugates **8** and **10** previously discussed.

Additionally to NMR, the structure of the new dendrimeric conjugates was corroborated by using HRMS for **8** and **9** and MALDI TOFF for **10** and **11** since their molecular weights fall in the upper detection limit of the equipment used in HRMS.

### 3.2. Biological evaluation

In order to evaluate the potential enhancement in cytotoxic activity of  $17\alpha$ -ethynylestradiol and  $17\alpha$ -estradiol when they are anchored to dendrimers of first and second generation, the steroidal dendrimer conjugates of first (**8** and **9**) and second generation (**10** and **11**), steroidal precursors, and hydroxyl terminated dendrimers (**3** and **6**) were screened against chronic leukemia (CEM), breast adenocarcinoma (MCF7) and cervical carcinoma (HeLa) tumor cell lines and against normal human fibroblast (BJ) as control cells. The results are summarized in Table 1.

These results show the innocuity of all dendrimers, except for dendrimer **6**, against normal BJ cells. Also, the highest sensitivity of CEM cell line to the tested compounds, allow us determine that the cytotoxic activity in dendrimer conjugates is due to the steroidal moiety, since dendrimers are non-cytotoxic. Compounds **8** and **9** were more effective against CEM at micromolar concentrations as compared with their steroidal precursors. However, in contrast to expectations, when the generation is increased, the higher payload of steroidal residues does not have a favorable impact in cytotoxic activity, as can be seen in Table 1.

With the aim to have an illustrative 3D image of conjugates than can help to explain the decrease of activity as a consequence of generation increase, possible conformations of steroidal dendrimer conjugates were explored by conformational search calculations in aqueous medium. The Monte-Carlo [37,38] algorithm in Spartan 08 was used, where random changes were made in torsion angles, respecting the steroidal stereochemistry during the search. The conformers of minimum energy of **8**, **9**, **10** and **11** were optimized at MMFFaq level [39]. Fig. 1 shows that the steroids are more exposed in the first generation (**8**) than in the second (**11**), whereby the steroids interact by  $\pi$ - $\pi$  stacking with the dendrimer forming a very compact structure that precludes interaction with cellular receptors.

These results suggest that our steroidal dendrimer conjugate of first generation could potentially have therapeutic anticancer applications against chronic leukemia and the second generation does not show advantage due to the fact that the increase of dendrimer size promotes hydrophobic and  $\pi$ - $\pi$  interactions with the steroidal moieties, inhibiting the interaction with cells.

In the context of the results reported herein (Table 1), we decided to test G1 conjugates **8** and **9** to determine how these conjugates disturbed the cell cycle and the possible pathway to induce apoptosis in CEM cells by activities of caspase 3/7 and the Western blot analysis.

To determine the phase in which the dendrimeric conjugates induce apoptosis, CEM cells were incubated with steroidal dendrimer conjugates **8** and **9**, flow cytometric analysis was used to quantify the distribution of CEM cells in the different phases of the cell cycle, and to determine the sub-G<sub>1</sub> fraction as a marker of the proportion of apoptotic cells. The results show that treatment with **8** and **9** increased the proportions of S-phase cells in all concentrations, along with reductions in proportions of G<sub>2</sub>/M cells. In addition, the proportion of cells with sub-G<sub>1</sub> amounts of DNA (apoptotic cells) increased following treatment with the tested conjugates **8** and **9**, showing a threefold increase when treated with **9** 50  $\mu$ M relative to the untreated controls after 24 h (Fig. 2). Thus, the tested steroidal dendrimer conjugate derivatives of first generation effectively disturbed cell cycle and induced apoptosis in CEM cells, via mitochondrial cytochrome c release and resultant activation of caspase cascade, as evidenced by the activities of caspases 3 and 7, which is mainly provoked in G<sub>2</sub>/M-arrested cells [20].

The action of caspase 3 that cleaves and inactivates the poly ADP-ribose polymerase-1 (PARP) that is a nuclear enzyme involved in DNA repair, led to increased DNA damage, followed by the DNA fragmentation through uncontrolled endonuclease activity resulting in apoptosis [40,41]. We determined the activities of effector caspases 3 and 7 (3/7) in CEM cells exposed to **8** or **9** using a fluorogenic substrate, Ac-DEVD-AMC, and/or the caspase 3/7 inhibitor Ac-DEVD-CHO. Cells were treated with a series of concentrations of the compounds exceeding their IC<sub>50</sub> values: 5, 25 and 50  $\mu$ M for 24 h. Conjugate **9** induced a ca. 3.7- and 4.3-fold increase in the activity of caspase-3/7 after 24 h at 25 and 50  $\mu$ M compared with untreated controls. Compound **8** induced a ca. 2.5-fold increase after 24 h at the highest tested concentration (Fig. 3). The observed increase in the expression of caspase 3/7 (Fig. 3) in conjunction with the DNA fragmentation data (Fig. 4) confirmed that both conjugates of first generation are able to induce apoptosis in leukemia cancer cells (CEM) increasing the cytotoxic activity compared to the free drug [20] suggesting that both conjugates have a common mechanism of action in tumor cells.

Finally Western blot analyses were used to detect changes in expression of apoptosis-related proteins in the CEM leukemia cancer cell line 24 h after treatment with steroidal dendrimer conjugate derivatives **8** and **9** (5, 25 and 50  $\mu$ M). As shown in Fig. 4, 25 and 50  $\mu$ M treatments with **8** and **9** induced cleavage of PARP after 24 h correlated with decreased levels of procaspase 3. In addition increased activity of caspase 3 was observed over the same treatment time and concentrations for both compounds (Fig. 3). Expression of a tumor suppressor protein p53 was observed in controls of leukemia cancer cell line CEM and **8** caused its enhanced expression after 24 h. The protein expression of p53 and Mdm2 increased strongly following treatment with 25  $\mu$ M of **8**, but at 50  $\mu$ M protein expression decreased. For both conjugates (**8** and **9**) at 50  $\mu$ M, after 24 h, a decreased expression of antiapoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2 was observed, indicating the commencement of apoptosis. As reported previously, Mcl-1 is necessary for cell viability and its decrease could be the cause of cell death in CEM cells [32]. This antiapoptotic protein Mcl-1 has a crucial role in regulating the apoptosis of T-cells [42]. It is known that apoptosis is mediated by caspase cascade activation and that caspase-3 is an executioner protease that cleaves PARP, resulting in DNA degradation and apoptotic death [32]. Our Western blot analysis demonstrated the dose-dependent decrease of procaspase-3 and cleavage

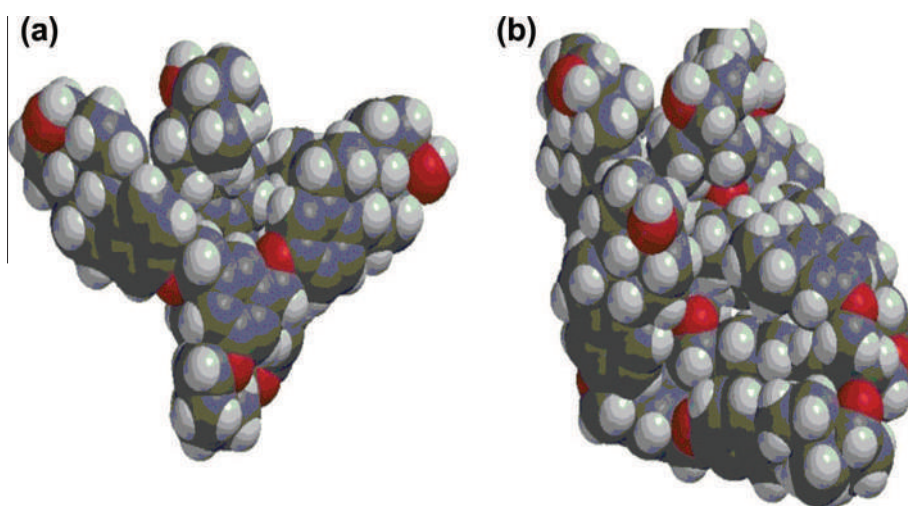
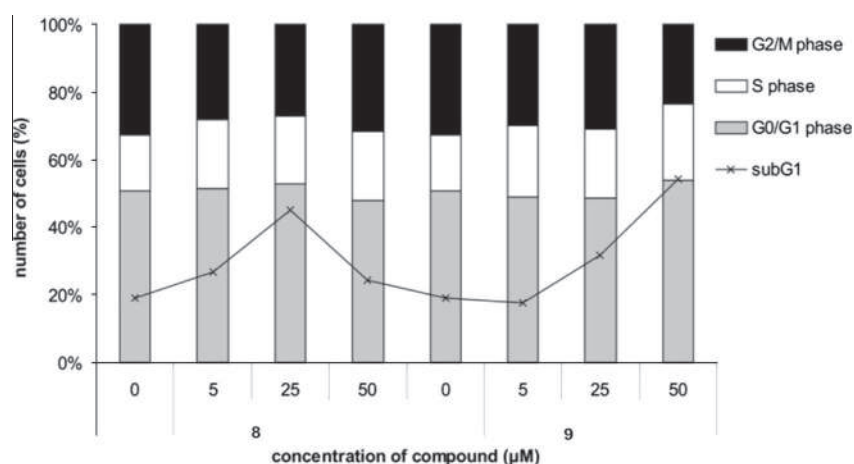
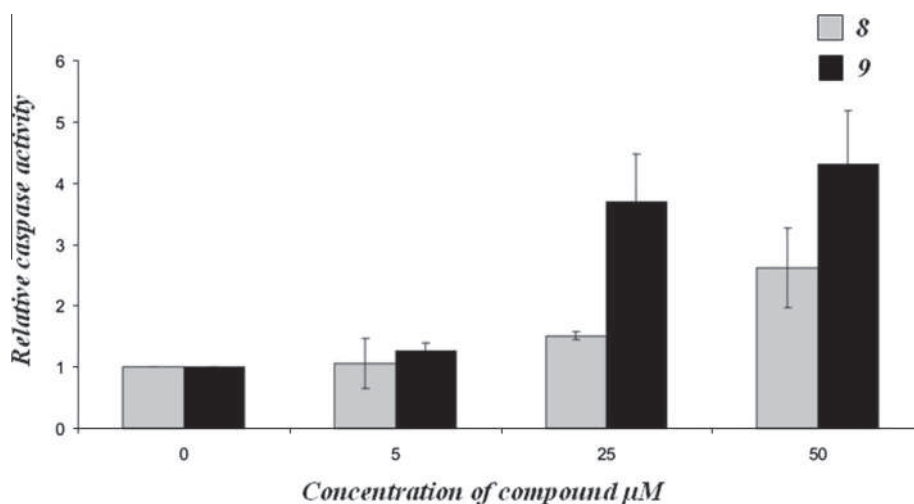


Fig. 1. Minimum energy conformer optimized at the MMFFaq level in Spartan 08 (wavefunction Inc., CA) of 17- $\alpha$  estradiol dendrimer conjugate; a) first generation (**9**) and b) second generation (**11**).

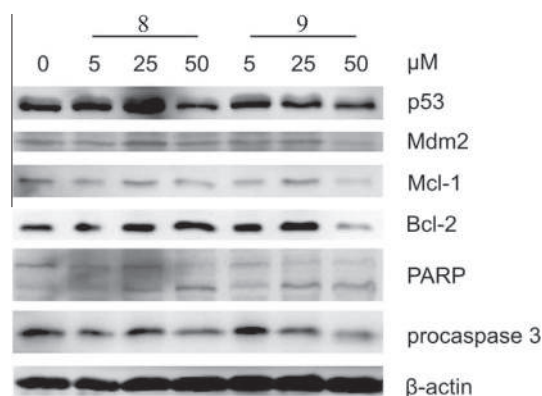




**Fig. 2.** Histograms, obtained by flow cytometric analysis, showing the distributions of CEM cells across the G0/G1, S, and G2/M phases of the cell cycle after 24 h treatment with **8** and **9** and the sub-G1 fraction of cells (relative to untreated controls). The bars show the percentage of cells (%) in the corresponding phase.



**Fig. 3.** Increases in the activities of caspase 3 and 7 in CEM cells treated with **8** and **9** for 24 h, relative to untreated controls. The data shown represent averages from experiments performed in triplicate.



**Fig. 4.** Western blot analysis of apoptosis-related proteins (PARP and procaspase-3) in leukemia CEM cells treated with steroidal derivatives **8** and **9** compared to their expression in untreated control cells. The expression of β-actin was monitored as a protein loading control.

of PARP after 24 h treatment with steroidal dendrimer conjugates **8** and **9** in the leukemia cancer cell line CEM (Fig. 4).

Thus, the results confirm that these conjugates can induce caspase-3 activated apoptosis (Fig. 3).

In summary, we have prepared two generations of novel dendrimers with flexible tetramethylene core and rigid dimethyl 5-hydroxyisophthalate branching units. In order to test the utility of these compounds, as platforms for improving the therapeutic index of biologically active molecules, we modified the surface of the dendrimer with 17α-ethynylestradiol and 17α-estradiol to obtain four novel steroidal dendrimer conjugates **8**, **9**, **10** and **11**. The steroidal dendrimer conjugates, the free drug and dendrimer were tested against CEM, MCF7, HeLa cancer cell lines and BJ as normal cells. Conjugates **8** and **9** confirmed the enhancement of the steroids activity against CEM when they are conjugated to first generation of dendrimer. However in the case of second generation a decrease in cytotoxic activity was observed. This could be attributed to unfavorable conformations in the steroidal moieties which in the case of G2 lead to a folded structure while the four steroidal fragments are available for cell interaction in G1, as determined by conformational search.

The observation that conjugates of first generation (**8**, **9**) are able to induce apoptosis in leukemia cancer cells (CEM) and show increased cytotoxic activity compared to the free drug, suggests that both conjugates have a common mechanism of action in CEM cells. The interesting anti-cancer activity of the prepared conjugates, suggest that the steroidal dendrimer conjugates **8** and **9** could be of potential use as new anticancer drugs.



## Acknowledgments

The authors thank ICyT for the scholarship to N.-E. Magaña-Vergara. Thanks are given to Ma. T. Cortez for NMR spectra, G. Cuéllar for mass spectra and Prof. Igor Alabugin for his suggestions and critical reading of the manuscript. The Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant No. MSM 6198959216) and the Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research (grant No. ED0007/01/01). Financial support from CONACYT is gratefully acknowledged.

## Appendix A. Supplementary data

The spectroscopic characterization of all compounds  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS (ESI) data are given. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2013.09.001>.

## References

- [1] World Health Organization: Cancer. <http://www.who.int/cancer/en>. (16-July-2013).
- [2] Park JH, Lee S, Kim J-H, Park K, Kim K, Kwon IC. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Prog Polym Sci* 2008;33:113–37.
- [3] Bosman AW, Janssen HM, Meijer EW. About dendrimers: structure, physical properties, and applications. *Chem Rev* 1999;99:1665–88.
- [4] Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J, Smith P. Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules* 1986;19:2466–8.
- [5] Hawker CJ, Fréchet JM. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J Am Chem Soc* 1990;112:7638–47.
- [6] Buhleier E, Wehner W, Vögtle V. Cascade and Nonskid-chain-like syntheses of molecular cavity topologies. *Synthesis* 1978;2:155–8.
- [7] Tomalia DA, Fréchet JM. Discovery of dendrimers and dendritic polymers: a brief historical perspective. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 2002;40:2719–28.
- [8] Tekade RK, Kumar PV, Jain NK. Dendrimers in oncology: an expanding horizon. *Chem Rev* 2009;109:49–87.
- [9] Bharali DJ, Khalil M, Gurbuz M, Simone TM, Mousa SA. Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers. *Int J Nanomed* 2009;4:1–7.
- [10] Lee CC, MacKay JA, Fréchet JM, Szoka FC. Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* 2005;23:1517–26.
- [11] Nanjwade BK, Bechra HM, Derkar GK, Manvi FV, Nanjwade VK. Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems. *Eur J Pharm Sci* 2009;38:185–96.
- [12] D'Emanuele A, Attwood D. Dendrimer–drug interactions. *Adv Drug Delivery Rev* 2005;57:2147–62.
- [13] Boas U, Heegaard PMH. Dendrimers in drug research. *Chem Soc Rev* 2004;33:43–63.
- [14] Medina SH, El-Sayed MEH. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents. *Chem Rev* 2009;109:3141–57.
- [15] Choi MR, Maxey KJS, Stanley JK, Levin CS, Bardhan R, Akin D, Badve S, Sturgis J, Robinson JP, Bashir R, Halas NJ, Clare SE. A cellular Trojan horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. *Nano Lett* 2007;7:3759–65.
- [16] Majoros IJ, Williams CR, Baker JR. Current dendrimer applications in cancer diagnosis and therapy. *Curr Top Med Chem* 2008;8:1165–79.
- [17] Wolinsky JB, Grinstaff MK. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment. *Drug Delivery Rev* 2008;60:1037–55.
- [18] Moos WH, Dykens JA, Nohynek D, Rubinchik E, Howell N. Review of the effects of  $17\alpha$ -estradiol in humans: a less feminizing estrogen with neuroprotective potential. *Drug Dev Res* 2009;70:1–21.
- [19] Malíková J, Swaczynová J, Kolář Z, Strnad M. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* 2008;69:418–26.
- [20] Jun DY, Park HS, Kim JS, Kim JS, Park W, Song BH, Kim HS, Taub D, Kim YH.  $17\alpha$ -Estradiol arrests cell cycle progression at G2/M and induces apoptotic cell death in human acute leukemia Jurkat T cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;231:401–12.
- [21] Izumi K, Kadono Y, Shima T, Konaka H, Mizokami A, Koh E, Namiki M. Ethinylestradiol improves prostate-specific antigen levels in pre-treated castration-resistant prostate cancer patients. *Anticancer Res* 2010;30:5201–6.
- [22] Lointier P, Wildrick DM, Boman BM. The effects of steroid hormones on a human colon cancer cell line in vitro. *Anticancer Res* 1992;12:1327–30.
- [23] Zhang K, Wang Y, Yu A, Zhang Y, Tang H, Zhu XX. Cholic acid-modified dendritic multimolecular micelles and enhancement of anticancer drug therapeutic efficacy. *Bioconjugate Chem* 2010;21:1596–601.
- [24] Ropponen J, Tamminen J, Lahtinen M, Linnanto J, Rissanen K, Kolehmainen E. Synthesis, characterization, and thermal behavior of steroidal dendrons. *Eur J Org Chem* 2005;1:73–84.
- [25] Harrington WR, Kim SH, Funk CC, Erdogan ZM, Schiff R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Estrogen dendrimer conjugates that preferentially activate extranuclear, nongenomic versus genomic pathways of estrogen action. *Mol Endocrinol* 2006;20:491–502.
- [26] Kim SH, Katzenellenbogen JA. Hormone–PAMAM dendrimer conjugates: polymer dynamics and tether structure affect ligand access to receptors. *Angew Chem Int Ed* 2006;45:7243–8.
- [27] Kop T, Pocsfalvi G, Šolaja BA. Synthesis of a steroidal dendrimer core. *J Serb Chem Soc* 2004;10:769–75.
- [28] Khandare J, Kolhe P, Pillai O, Kannan S, Lai ML, Kannan RM. Synthesis, cellular transport, and activity of polyamidoamine dendrimer–methylprednisolone conjugates. *Bioconjugate Chem* 2005;16:330–7.
- [29] Bodwell GJ, Bridson JN, Houghton TJ, Kennedy JWJ, Mannion MR. 1,7-Dioxo [7] (2,7)pyrenophane: the pyrene moiety is more bent than that of C70. *Chem Eur J* 1999;6:1823–7.
- [30] Bodwell GJ, Bridson JN, Cyraski MK, Kennedy JWJ, Krygowski TM, Mannion MR, Miller DO. Nonplanar aromatic compounds. 8.1 Synthesis, crystal structures, and aromaticity investigations of the 1, *n*-Dioxo[*n*](2,7) pyrenophanes. How does bending affect the cyclic  $\pi$ -electron delocalization of the pyrene system? *J Org Chem* 2003;68:2089–98.
- [31] Hawxwell SM, Espallargas GM, Bradshaw D, Rosseinsky MJ, Prior TJ, Florence AJ, Van de Streek J, Brammer L. Ligand flexibility and framework rearrangement in a new family of porous metal–organic frameworks. *Chem Commun* 2007;15:1532.
- [32] Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 2003;426:671–6.
- [33] Tomalia DA. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. *Prog Polym Sci* 2005;30:294–324.
- [34] Anstead GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. The estradiol pharmacophore: ligand structure–estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 1997;62:268–303.
- [35] Ciuffreda P, Casati S, Manzocchi A. Complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral assignment of 17-hydroxy epimeric sterols with planar A or A and B rings. *Magn Reson Chem* 2004;42:360–3.
- [36] Dionne P, Poirier D.  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance study of 17 alpha-substituted estradiols. *Steroids* 1995;60:830–6.
- [37] Chang G, Guida WC, Still WC. An internal-coordinate Monte Carlo method for searching conformational space. *J Am Chem Soc* 1989;111:4379–86.
- [38] Saunders M, Houk KN, Wu YD, Still WC, Lipton M, Chang G, Guida WC. Conformations of cycloheptadecane. A comparison of methods for conformational searching. *J Am Chem Soc* 1990;112:1419–27.
- [39] Kim HY, Sohn J, Wijewickrama GT, Edirisinghe P, Gherezghiher T, Hemachandra M, Lu PY, Chandrasena RE, Molloy ME, Tonetti DA, Thatcher GRJ. Click synthesis of estradiol–cyclodextrin conjugates as cell compartment selective estrogens. *Bioorg Med Chem* 2010;8:809–21.
- [40] Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:427–45.
- [41] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269–90.
- [42] Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I, Gao D, Tseng A, Maser RS, Zhai B, Wan L, Gutierrez A, Lau AW, Xiao Y, Christie AL, Aster J, Settleman J, Gygi SP, Kung AL, Look T, Nakayama KI, DePinho RA, Wei W. SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* 2011;471:104–9.



## Synthesis of steroidal dendrimers modified by 'click' chemistry with PAMAM dendrons as unimolecular micelles



Delia Soto-Castro<sup>a</sup>, Nancy E. Magaña-Vergara<sup>a</sup>, Norberto Farfán<sup>b</sup>, Rosa Santillan<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, D.F., Apdo. Postal 14-740, 07000, Mexico

<sup>b</sup>Facultad de Química, Departamento de Química Orgánica, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 November 2013

Revised 13 December 2013

Accepted 17 December 2013

Available online 27 December 2013

#### Keywords:

Unimolecular micelles

Ethynylestradiol

Triazole

Click chemistry

### ABSTRACT

Novel Fréchet–PAMAM hybrid dendrimers linked by triazole units as unimolecular micelles with a hydrophobic core surrounded by a hydrophilic shell were prepared. The dendritic cores with 3 and 6 alkyne terminal groups were synthesized from 1,3,5-tribromomethyl-benzene (*t*BrMeB), in one case by direct coupling with 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE); in the second one the *t*BrMeB was reacted with bis(hydroxymethyl) phenol followed by chlorination of the hydroxyl groups and subsequent coupling to EE. With this strategy, the core can be grown by further substitutions of bis(hydroxymethyl) phenol over the halogenated terminals as Fréchet dendrimer. The hydrophilic shells used were PAMAM type dendrons of 0.5 and 1.5 generations with azide as focal point and *tert*-butyl ester as end groups. The unimolecular micelles were obtained by cycloaddition between an azide in the selected dendron and the alkyne terminal in the hydrophobic core to obtain a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole. Once the coupling was achieved, the *tert*-butyl ester groups were hydrolyzed in trifluoroacetic acid and the corresponding dendrimers with carboxylic acid as end groups were completely soluble in phosphate buffer solutions of pH 7.0, 7.4, and 8.0. All hybrid dendrimers were characterized by High Resolution Mass Spectrometry, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and FTIR.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

Nowadays, dendrimers have been gathering much attention as interesting functional and high-performance materials. Due to their molecular structure, they have been considered as unimolecular micelles<sup>1–5</sup> comprising a hydrophobic core and a polar surface since their structural parameters are comparable to those of normal or traditional micelles.<sup>6</sup> From the architectural point of view, they have a covalent monomer connectivity that provides better stability toward pH, temperature, and ionic strength changes. Additionally, the possibility to tailor the internal core provides the opportunity to apply them in aqueous solubilization of inherently water insoluble species.<sup>7–9</sup> They are an attractive and promising alternative to carry and deliver drugs since the hydrophobic interior can encapsulate drug molecules<sup>10–13</sup> to solve problems such as the low aqueous solubility, lack of permeability, and in some cases enhance the activity of bioactive molecules.<sup>14</sup>

It is well known that dendrimers possess a well-defined structure and high number of terminal groups which can undergo further modifications in order to obtain new properties or manipulate the existing ones, this fact makes them very promising raw materials even at low generations.<sup>15,16</sup> In this paper we present a

new proposal for hybrid dendrimers as unimolecular micelles consisting of a hydrophobic interior (Fréchet type) functionalized with ethynylestradiol and hydrophilic exterior (PAMAM type). This type of dendrimers would make good candidates for carrying bioactive compounds in two scenarios: (i) encapsulation mediated by hydrophobic interactions, for example steroids<sup>17</sup> and (ii) conjugation where drug molecules are covalently attached at the peripheral groups.<sup>18</sup>

### Results and discussion

Taking into account the key features of unimolecular micelles, we designed and synthesized dendritic compounds addressing three important elements: (i) hydrophobic core that can be progressively enlarged to favor the encapsulation events; (ii) ethynylestradiol as linker because it can promote the affinity to other biological steroid; and envisaging possible biological applications and (iii) PAMAM type hydrophilic surface with carboxylic acids as end groups mainly because it has been reported that dendrimers with anionic components are less toxic and less hemolytic than their cationic counterparts.<sup>19–22</sup> The carboxylic end groups can undergo an acid–base reaction with NaOH to produce the corresponding carboxylates leading to the formation of anionic entities that prevent adhesion to the walls of blood vessels by electrostatic repulsions and to avoid acidic solutions.<sup>23</sup>

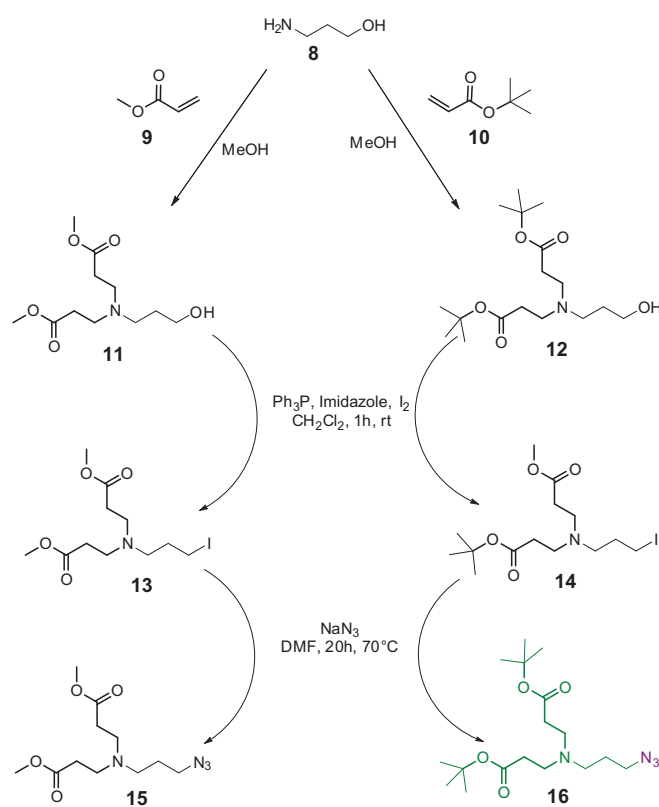
\* Corresponding author. Tel.: +52 555 747 3725.

E-mail address: [rsantill@cinvestav.mx](mailto:rsantill@cinvestav.mx) (R. Santillan).

With the aim to evaluate different sizes of hydrophobic zones, two steroidal cores were synthesized as hydrophobic part, taking in mind that with a larger core the encapsulating process will be more efficient. For the first core, 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (**2**) was directly coupled by ether linkage to 1,3,5-tribromomethyl-benzene (**1**) to give core **3** as a pale yellow solid in high yield (91%). As the second core, a Fréchet type dendrimer was prepared by reaction of compound **1** with bis(hydroxymethyl) phenol (**4**) to give 1,3,5-tri(3,5-bis((hydroxymethyl)phenoxy)benzyl)benzene (dendrimer **5**), followed by chlorination using thionyl chloride to achieve the coupling of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and obtain **7** as a pale yellow solid (Scheme 1). The cores **3** and **7** were completely insoluble in water, ethanol or methanol and very soluble in chloroform or DMSO.

Along with the synthesis of the cores **3** and **7** and with the aim to synthesize the hydrophilic part, dendrons of half-generation were obtained by the Michael addition between 3-aminopropan-1-ol (**8**) and methyl acrylate (**9**), to give **11**, as well as aminopropanol and *tert*-butyl acrylate (**10**) to obtain **12** under the conditions previously described.<sup>24</sup> The reason to use these acrylates was firstly, to have the possibility to obtain higher generations by successive reactions with ethylenediamine and then with acrylate. Secondly, the *tert*-butyl ester terminal obtained opens the possibility to hydrolyze them and obtain carboxylic acids as non-cytotoxic peripheral groups.<sup>19–22</sup> Once dendrons **11** and **12** were synthesized, the focal point –OH was transformed into the iodide (compounds **13** and **14**) with I<sub>2</sub> in the presence of imidazole and triphenylphosphine<sup>25</sup> and subsequently into the corresponding azide derivative (**15**, **16**) with NaN<sub>3</sub> in DMF at 70 °C (Scheme 2).<sup>26</sup> The structures were corroborated by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR as well as high resolution mass spectroscopy.

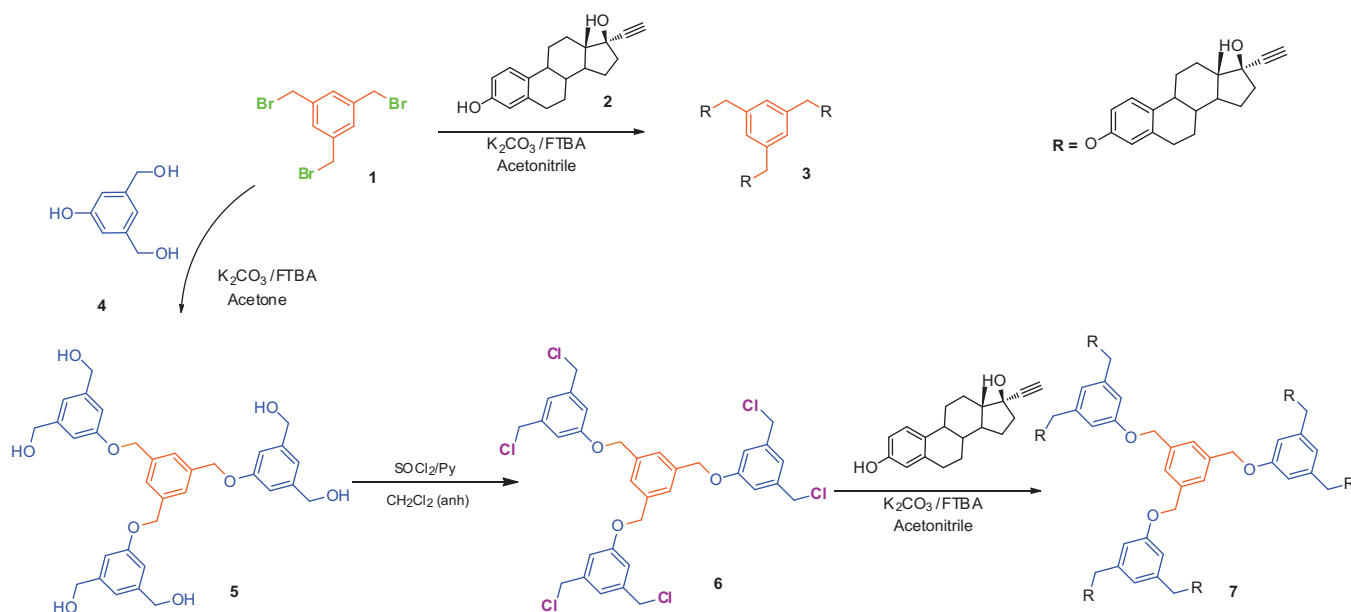
The subsequent cycloaddition reaction between the alkyne terminal on ethynylestradiol of hydrophobic cores **3** and **7** and the azide group of dendron **16** led to novel Fréchet–PAMAM dendrimers linked by steroids (Scheme 3). In order to obtain only a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole we used an adapted protocol established by Shao et al.,<sup>27</sup> where CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, sodium ascorbate, and PhCO<sub>2</sub>H were dissolved in a mixture of *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O, for core **3**, and EtOH/H<sub>2</sub>O for core **7**, until the color associated with the copper reduction was observed. Then the alkyne (**3** or **7**) and the azide (**16**) derivatives were added and the reaction was allowed to proceed



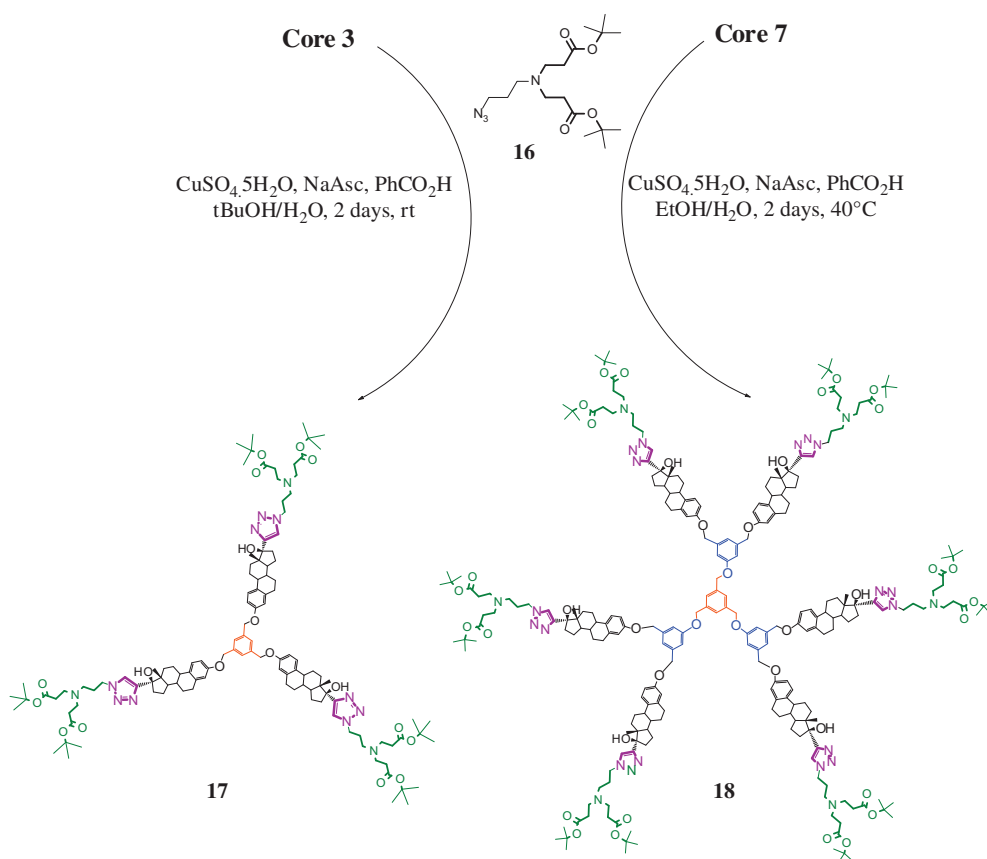
Scheme 2. Synthesis of dendrons with the azide group as focal point.

for 2 days to give the desired tri- and hexatriazoles in yields of 80% after a simple purification procedure which involves extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NaHCO<sub>3</sub> solution, evaporation of the solvents under vacuum and washings with hexane to remove the unreacted azide. The structure of these new dendrimers, **17** and **18**, was unambiguously established by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and HRMS.

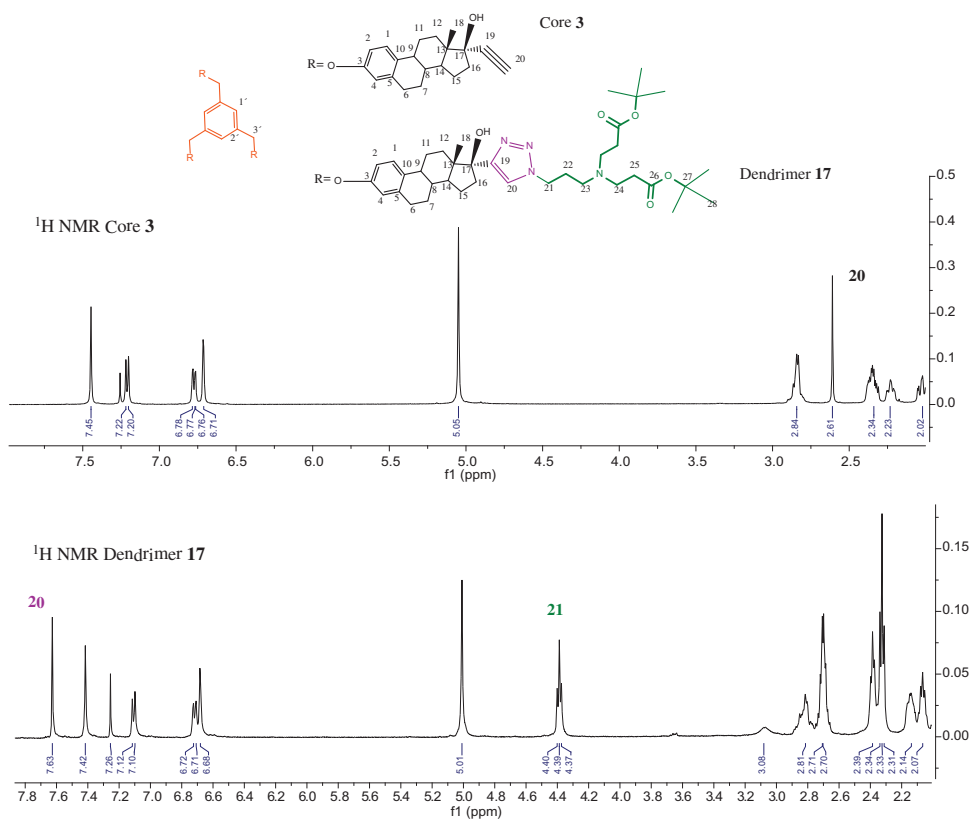
Formation of dendrimer **17** was confirmed by comparison with the <sup>1</sup>H NMR spectra of **3**. As seen in Figure 1, the singlet at



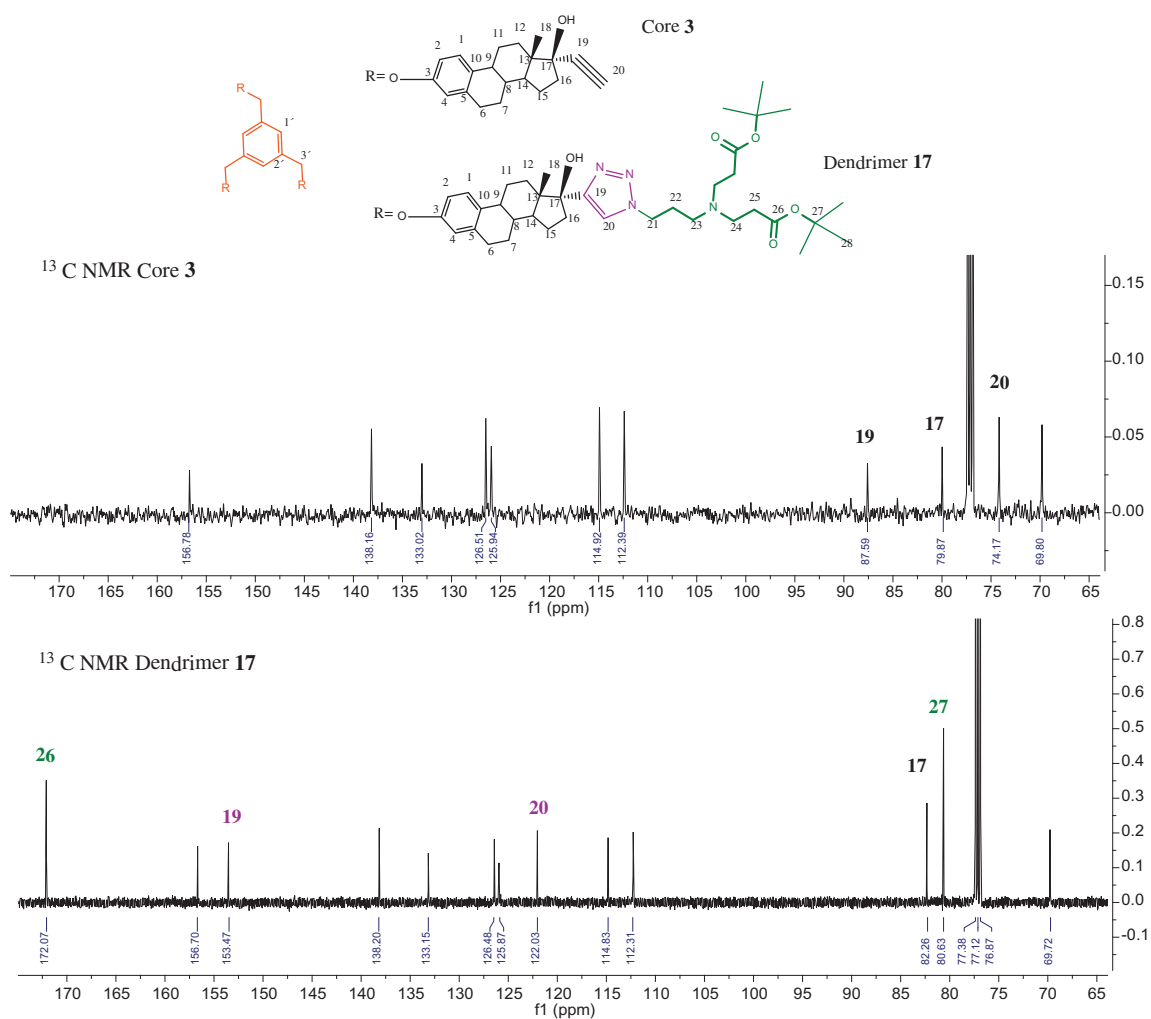
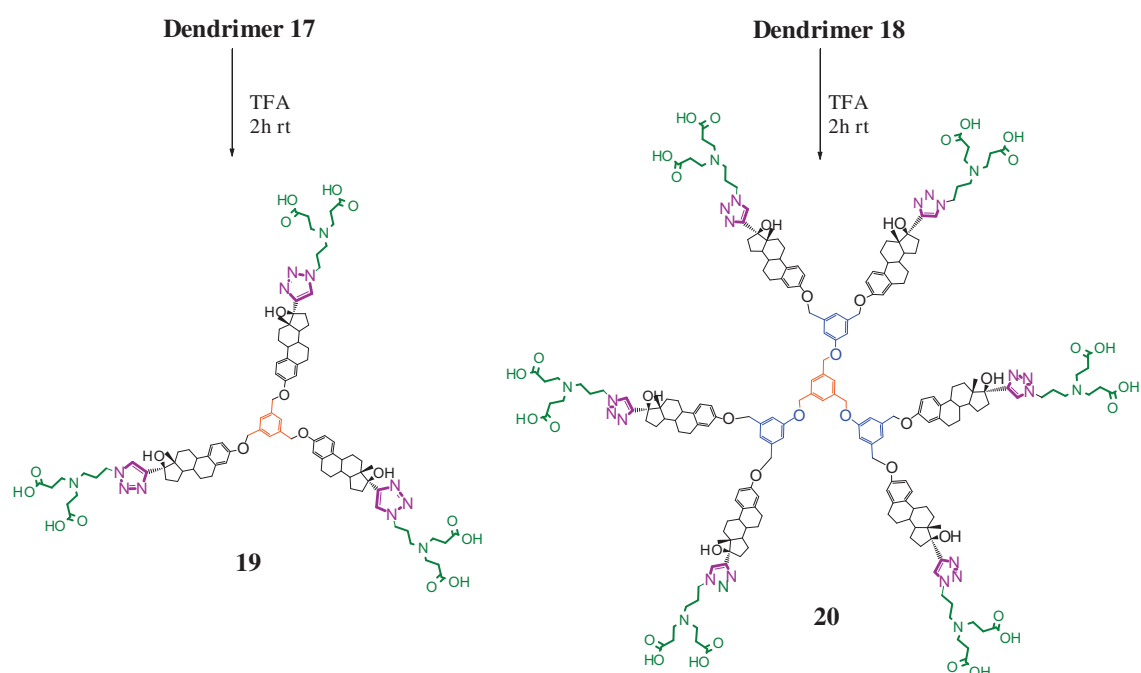
Scheme 1. Synthesis of hydrophobic cores with 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol as end groups.

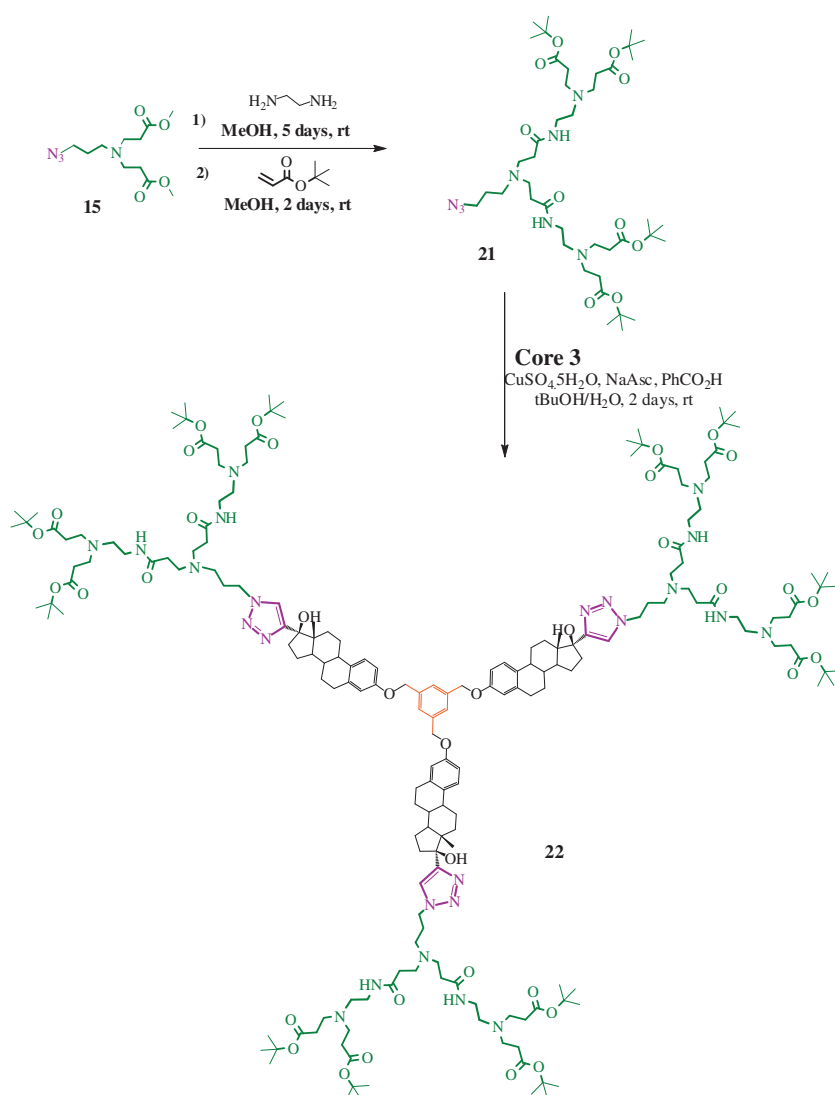


**Scheme 3.** Synthesis of hybrid Fréchet–PAMAM dendrimers linked via triazole units.



**Figure 1.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of core 3 and dendrimer 17.

Figure 2. <sup>13</sup>C NMR spectra of core 3 and dendrimer 17.Scheme 4. Hydrolysis of *tert*-butyl ester dendrimers to obtain unimolecular micelles with carboxylic acids as end groups.



**Scheme 5.** Synthesis of hybrid dendrimer with dendron of G 1.5.

2.61 ppm corresponding to the alkyne proton is absent in **17** and a new signal at 7.63 ppm assigned to H-20 from the triazole ring was evident, along with the signals assigned to the dendron which are overlapped with those of the steroid. Additionally in  $^{13}\text{C}$  NMR, (Fig. 2) the signals corresponding to C-17, C-19, and C-20 are shifted due to the new chemical environment.

Finally for compound **17**, HRMS provides the  $m/z$  values at 2073.2785, 1037.1602, and 691.7754 attributed to  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}+2\text{H}]^{+2}$ , and  $[\text{M}+3\text{H}]^{+3}$ , respectively, being the latter the most abundant peak due to the high symmetry of the molecule. A similar procedure was used to characterize dendrimer **18**.

Hydrolysis of **17** and **18** was carried out in trifluoroacetic acid (TFA) to obtain dendrimers **19** and **20**, respectively, in yields >90% bearing carboxylic acids as terminal groups (see Scheme 4). The structure of these compounds was corroborated by NMR. The  $^1\text{H}$  NMR spectra (Supporting information) show a shift of the peak of the triazole ring proton from 7.62 to 7.83 ppm, and the disappearance of the *tert*-butyl at 1.46 ppm which indicates that the hydrolysis of the ester groups was successfully achieved. Additionally, a broadening in all signals could be attributed to the formation of a salt between the tertiary amine and the carboxylic acid in the dendrimer, promoting very short relaxation times.<sup>28</sup> In the  $^{13}\text{C}$

NMR spectra the quaternary carbon and methylenes of the *tert*-butyl group are absent.

The new dendrimers **19** and **20** show complete solubility in DMSO and in phosphate buffer solutions of pH 7.0, 7.4, and 8.0. This characteristic is favorable taking in consideration that the pH of blood is 7.4 and in this environment these compounds could find application as drug carriers by forming inclusion compounds. Additionally, in order to obtain a unimolecular micelle, the solubility in water can be improved by the acid–base reaction between carboxylic acids and NaOH to obtain a Fréchet–PAMAM type micelle. The hydrophobic core and hydrophilic terminals place these new materials as potential drug carriers for inclusion tentatively with high affinity toward steroids with biological importance.

In order to evidence the possibility to grow the hydrophilic shell, a dendron of 1.5 generation was synthesized. Thus compound **15** was reacted with ethylenediamine, thereafter with *tert*-butyl acrylate to give **21**, as amber oil, see Scheme 5. The cycloaddition between the core **3** and dendron **21** provided the corresponding tri-triazole as a green light solid in 68% yield, Scheme 5. The structure of **22** was corroborated by NMR and HRMS and demonstrates the feasibility of this approach for the synthesis of unimolecular micelles where growth in both zones is possible.



In summary we present an efficient methodology to synthesize unimolecular micelles that are designed to tailor both, the hydrophobic core and the hydrophilic shell in order to reach the desired necessities. The evaluation of encapsulating properties is currently under investigation.

### Acknowledgments

The authors thank CONACyT and PAPIIT IN 214513 for financial support, Ma. T. Cortez for NMR spectra and Cuéllar Rivera Geiser for HRMS. A postdoctoral fellowship to D. Soto from CONACyT are gratefully acknowledged. N. Magaña thanks to ICyt for a Ph. D fellowship.

### Supplementary data

Supplementary data (The experimental details and spectroscopic characterization of all compounds  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR data are given.) associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.12.066>.

### References and notes

1. Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003.
2. Tomalia, D. A.; Berry, V.; Hall, M.; Hedstrand, D. M. *Macromolecules* **1987**, *20*, 1164.
3. Hawker, C. J.; Wooley, K. L.; Fréchet, J. M. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 1287.
4. Liu, M.; Kono, K.; Fréchet, J. M. J. *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 121.
5. Guerra, J.; Rodrigo, A. C.; Merino, S.; Tejada, J.; García-Martínez, J. C.; Sánchez-Verdú, P.; Ceñas, V.; Rodríguez-López, J. *Macromolecules* **2013**, *46*, 7316.
6. C.N. Moorefield, G.R. Newkome, C. R. *Chimie* **6** (2003).
7. Yang, H.; Morris, J. J.; Lopina, S. T. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *273*, 148.
8. Pistolis, G.; Malliaris, A. *Langmuir* **2002**, *18*, 246.
9. Cao, W.; Zhu, L. *Macromolecules* **2011**, *44*, 1500.1.
10. Bosman, A. W.; Janssen, H. M.; Meijer, E. W. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665.
11. Ooya, T.; Lee, J.; Park, K. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1221.
12. Morgan, M. T.; Carnahan, M. A.; Immoos, C. E.; Ribeiro, A. A.; Finkelstein, S.; Lee, S. J.; Grinstaff, M. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15485.
13. Patel, H. N.; Patel, P. M. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **2013**, *4*, 454.
14. Morgan, M. T.; Nakanishi, Y.; Kroll, D. J.; Griset, A. P.; Carnahan, M. A.; Wathier, M.; Oberlies, N. H.; Manikumar, G.; Wani, M. C.; Grinstaff, M. W. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11913.
15. Soto-Castro, D.; Cruz-Morales, J. A.; Ramírez, M. T.; Guadarrama, P. *Bioorg. Chem.* **2012**, *41–42*, 13.
16. Najlah, M.; Freeman, S.; Attwood, D.; D'Emanuele *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 937.
17. Wallimann, P.; Seiler, P.; Diederich, F. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 779.
18. Zhang, Y.; Thomas, T. P.; Lee, K.; Li, M.; Zong, H.; Desai, A. M.; Kotlyar, A.; Huang, B.; Holl, M. M. B.; Baker, J. R., Jr. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2557–2564.
19. Padilla De Jesús, O. L.; Ihre, H. R.; Gagne, L.; Fréchet, J. M.; Szoka, F. C., Jr. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 453.
20. Fuchs, S.; Kapp, T.; Otto, H.; Schoneberg, T.; Franke, P.; Gust, R.; Schluter, A. D. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1167.
21. Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J. W.; Meijer, E. W.; Paulus, W.; Duncan, R. J. *Controlled Release* **2000**, *65*, 133.
22. Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; Mckeown, N. B.; D'Emanuele, A. *Int. J. Pharm.* **2003**, *252*, 263.
23. Fernandez, L.; Calderón, M.; Martinelli, M.; Strumia, M.; Cerecetto, H.; González, M.; Silber, J. J.; Santo, M. J. *Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 1079.
24. Soto-Castro, D.; Cruz-Morales, J. A.; Ramírez, M. T.; Guadarrama, P. *Molecules* **2010**, *15*, 8082.
25. Lange, G. L.; Gottardo, C. *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 1473.
26. Kim, H. Y.; Sohn, J.; Wijewickrama, G. T.; Edirisinghe, P.; Gherezghiher, T.; Hemachandra, M.; Lu, P. Y.; Chandrasena, R. E.; Molloy, M. E.; Tonetti, D. A.; Thatcher, G. R. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 809.
27. Shao, C.; Wang, X.; Xu, J.; Zhao, J.; Zhang, Q.; Hu, Y. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7002.
28. Kano, K.; Takei, M.; Hashimoto, S. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 2181.