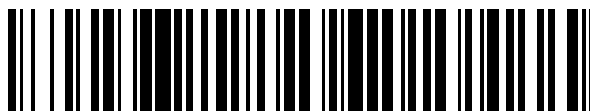


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 569**

51 Int. Cl.:

C07H 13/04 (2006.01)

C07H 13/12 (2006.01)

C07H 15/04 (2006.01)

B01D 11/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2015 PCT/EP2015/057544**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15158575**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2015 E 15716007 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3131913**

54 Título: **Síntesis de detergentes de glucósidos de calixareno anfífilos y uso de los mismos para extraer y estabilizar proteínas de membrana funcionales naturales**

30 Prioridad:

14.04.2014 GB 201406643

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.03.2020

73 Titular/es:

**CALIXAR (100.0%)
60 avenue Rockefeller
69008 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

DAUVERGNE, JULIEN

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 750 569 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Síntesis de detergentes de glucósidos de calixareno anfífilos y uso de los mismos para extraer y estabilizar proteínas de membrana funcionales naturales

5

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de glucósidos de calixareno anfífilos, a su preparación y a su uso para extraer, solubilizar y estabilizar selectivamente proteínas de membrana.

Técnica anterior

10 Las proteínas de membrana tales como el Receptor Acoplado a la Proteína G (RAPG), otras proteínas receptoras, enzimas, proteínas de transporte y canales iónicos u otras proteínas transmembrana o proteínas ancladas a la membrana biológica juegan una función importante en el funcionamiento de una célula, especialmente en relación con su control del crecimiento, la regulación de las funciones fisiológicas, la señalización y la mediación de la transferencia celular [Almen, M. S et al.: "*Mapping the*

15 *human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin*"; *BMC Biology*; 2009; 7; 50]. Las proteínas de membrana son macromoléculas anfífilas que presentan regiones hidrófilas e hidrófobas las cuales atraviesan una o varias veces la membrana biológica. Las regiones hidrófobas de determinados aminoácidos llevan cadenas laterales apolares las cuales se pliegan en forma de hélice α y barril β . Cada una de estas

20 estructuras secundarias que representan un Dominio TransMembrana (DTM) tienen las partes hidrófobas de sus aminoácidos dirigidas hacia el exterior de la hélice α y se contraen por interacciones hidrófobas no covalentes débiles con las cadenas alifáticas de los lípidos que constituyen la membrana biológica de la célula, bacteria o virus. La cohesión de las proteínas de membrana también es proporcionada por las cabezas polares cargadas de los lípidos que inducen fuerzas Coulómbicas con sus bucles hidrófilos localizados en las regiones extracelulares [Eva Pebay-Peyroula: *Biophysical Analysis of Membrane Proteins*, Wiley-VCH Books, 2008].

Se ha estimado que aproximadamente del 20 al 30 % del genoma humano codifica Proteínas Integrales de Membrana (PIM) [J. Nilsson et al., "*Proteins: Struct., Funct., Genet.*", 2005, 60, 606] y más del 50 % están implicadas en las vías de señalización en las formas más graves de enfermedades humanas tales como el cáncer, la enfermedad de Alzheimer, la diabetes o la malaria, lo que las convierte en dianas particularmente prometedoras para el desarrollo de fármacos [John P. Overington et al. : "*How many drug targets are there?*"; *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 993-996, 2006].

Sin embargo, a pesar de los progresos realizados durante los últimos años, la cantidad de estructuras resueltas tridimensionalmente de proteínas de membrana solamente representa aproximadamente el 2 % de las 92.000 estructuras que se han publicado en la base de datos de proteínas Protein Data Bank (PDB) en 2014. Las proteínas de membrana pueden incluir una o más subunidades junto con cofactores hidrófobos tales como lípidos, sacáridos, péptidos o proteínas. Para la mayoría de los estudios bioquímicos y biofísicos *in vitro*, las proteínas de membrana deben ser extraídas de la bicapa lipídica mediante el uso de compuestos sintéticos tales como los detergentes.

40 Los detergentes son compuestos anfífilos con una estructura que comprende distintos dominios tanto polares como apolares que les confieren una buena solubilidad en agua. Los detergentes tienen propiedades tensioactivas y son capaces de adsorberse en las superficies de contacto.

El autoensamblaje de detergentes es un fenómeno bien definido regido por el efecto hidrófobo [C. Tanford, "*The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*", 1ª ed., John Wiley & Son, Inc., Nueva York, 1973]. A bajas concentraciones, la presencia en solución de grupos no polares altera la red de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua, lo cual las obliga a organizarse alrededor de las partes apolares de los detergentes y permite su solubilización.

Para minimizar esta alteración desfavorable de las moléculas de agua, los detergentes se intercambian entre la solución y la superficie del agua donde forman una película compacta la cual disminuye la tensión superficial del agua. La superficie del líquido es saturada con moléculas de detergente a partir de una concentración umbral denominada Concentración Micelar Crítica (CMC). La adición adicional de moléculas de detergente induce un autoensamblaje espontáneo y forma ensamblajes agregados en solución denominados micelas los cuales se definen por un tamaño, una forma y un número de agregación.

55 La función de las micelas a base de detergente es alterar los lípidos constitutivos de las membranas que estabilizan las proteínas de membrana y solubilizarlas en Complejos de Proteínas/Detergentes (CPD) manteniendo al mismo tiempo sus estados en cierta medida conformacionales.

Los monómeros de detergente se insertan en la bicapa lipídica hasta conseguir su saturación, provocan fragmentación y formación de micelas mixtas de lípido/detergente por acción de interacciones cooperativas detergente/detergente. Cantidades suficientes de detergente disuelven completamente los lípidos de la bicapa, lo cual da como resultado una transición de fase de una fase laminar a una micelar que comprende micelas mixtas de lípido/detergente y CPD solubilizados donde sus dominios transmembrana interactúan con las colas hidrófobas de los detergentes [Le Maire et al.: "*Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents*", *Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2000, 1508, 86-111],

65 Por tanto, la solubilización de las proteínas de membrana requiere el uso de detergentes capaces de

extraerlas de la membrana biológica y capaces de mantenerlas en solución acuosa con una forma conformacional reproduciendo un entorno alrededor de la proteína similar al de las membranas biológicas con la ayuda de detergentes estructurantes. Este proceso de extracción presenta aún un desafío importante relacionado con las dificultades de manipulación durante un período prolongado de tiempo de las proteínas de membrana que tienden a formar agregados en solución acuosa [M. Caffrey, "Membrane protein crystallization", *J. Structural Biology*, 2003, 142, 108-132]. Durante este proceso, las propiedades de disociación de los detergentes tienden a alterar las interacciones esenciales proteína/proteína y proteína/lípido dentro de la estructura cuaternaria de las proteínas las cuales son esenciales para mantener un plegamiento específico responsable de sus funciones biológicas. La solubilización dentro de las micelas de las diferentes subunidades para proteínas oligoméricas, la retirada de cofactores lipídicos estabilizadores o una intrusión de colas de detergente en regiones transmembrana hidrófobas pueden provocar un plegamiento inadecuado y una desactivación de la proteína [J.U. Bowie, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001, 11, 397-402; C. Breyton et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 21892-21900].

En este contexto, muchos detergentes comercialmente disponibles conducen a la desnaturalización y la agregación de la proteína de membrana, lo cual con frecuencia es irreversible [G. Prive: "Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins", *Methods*, 2007, 41, 388-397]. Aunque hay disponible una amplia gama de detergentes para la investigación de proteínas de membrana, no existe un "detergente universal" adecuado para todos los estudios de las proteínas.

De acuerdo con la naturaleza de sus cabezas polares, los detergentes son clasificados habitualmente como iónicos, zwitteriónicos o neutros. La clase neutra con frecuencia se denomina detergentes suaves los cuales son menos desnaturalizantes contra las proteínas de membrana.

Los detergentes utilizados en la bioquímica de proteínas de membrana para extraer y purificar dianas de membrana son en su mayoría detergentes neutros que comprenden grupos glucosídicos en la parte polar de la estructura anfífila incluyéndose entre los más utilizados los Dodecil β -D-Maltopiranosido (DDM) y Octil β -D-Glucósido (OG).

Trabajando sobre esta base, la comunidad científica ha desarrollado un nuevo tipo de topologías anfífilas con restos de glucósido en la parte polar diferentes de los detergentes lineales convencionales de cabeza/cola [Popot, J.-L., *Annu. Rev. Biochem.* 2010, 79, 737-775] tales como los detergentes de maltósido de cadena ramificada [Qinghai Zhang, "Design, Synthesis, and Properties of Branch-Chained Maltoside Detergents for Stabilization and Crystallization of Integral Membrane Proteins: Human Connexin 26", *Langmuir*, 2010, 26, 11, 8690-8696], los anfipolos no iónicos [Bazzacco, P. et al., "Trapping and Stabilization of Integral Membrane Proteins by Hydrophobically Grafted Glucose-Based Telomers", *Biomacromolecules*, 2009, 10, 3317-3326], los tensioactivos fluorados [Breyton, C. et al., "Micellar and biochemical properties of (hemi)fluorinated surfactants are controlled by the size of the polar head", *Biophys. J.*, 2009, 97, 1077-1086], los tripodes anfífilos [Chae, P. Set al., *ChemBioChem*, 2008, 9, 1706-9], los anfífilos faciales esteroideos [Lee, S. C. et al., "Steroid-based facial amphiphiles for stabilization and crystallization of membrane proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2013, doi:10.1073/pnas. 1221442110], los anfífilos faciales en tándem [Chae, PS; et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 16750-16752], los anfífilos de maltosa neopentilglicol [Pil Seok Chae et al., "Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins", *Nature Methods*, 2010, 7, 1003-1008], los anfífilos de glucosa-neopentilglicol [Chae, P. S. et al. "Glucose-Neopentyl Glycol (GNG) amphiphiles for membrane protein study", *Chem. Commun.*, 2013, 49, 2287-2289], los detergentes Glyco-Triton de Chae [Chae, P. S. et al. "Carbohydrate-containing Triton X-100 analogues for membrane protein solubilization and stabilization", *Mol. BioSyst.*, 2013, 9, 626] y los anfífilos de glucodiosgenina esteroideos [Chae, P. S. et al., "A New Class of Amphiphiles Bearing Rigid Hydrophobic Groups for Solubilization and Stabilization of Membrane Proteins", *Eur. J. Chem.*, 2012, 18, 9485-9490]. Recientemente, se ha desarrollado una clase novedosa de detergentes aniónicos basados en una estructura rígida de calixareno la cual permite extraer, solubilizar, estabilizar y purificar una amplia gama de proteínas de membrana conservando al mismo tiempo su estructura tridimensional nativa y manteniéndolas en una forma activa funcional [Matar-Merheb, R. et al.: "Structuring Detergents for Extracting and Stabilizing Functional Membrane Proteins"; *Plos One*; 2011, 6]. Esta tecnología también se expone en la solicitud de Patente US 2011/0144314 A1.

Los calixarenos son compuestos macrocíclicos que comprenden unidades fenólicas conectadas por un puente de orto-orto metileno que forma una cavidad hidrófoba que es capaz de formar complejos de inclusión con una diversidad de moléculas [C.D. Gutsche; "Calixarenes"; *Accounts of Chemical Research*; 1983; 16; 161-170]. Algunos calixarenos ya se han caracterizado, en particular los tetrameros, hexámeros y octámeros, así como varios calixarenos que tienen un número impar de anillos en su molécula. Se han encontrado varias aplicaciones para los calixarenos en la industria y se aplican, por ejemplo, en miméticos de enzimas, ópticas no lineales, electrodos o sensores sensibles a iones y, más particularmente, en la extracción selectiva de proteínas de membrana. En este último caso, se han descrito calixarenos en las solicitudes de patente US 2011/144 314 A1 y US 2012/123088 A1.

Estas moléculas tienen una plataforma cíclica que comprende cuatro unidades de fenol sobre las cuales se injerta una parte hidrófoba en el borde inferior y partes hidrófilas en el borde superior. La parte hidrófoba esta compuesta de una sola cadena alifática que varía en longitud desde unos dieciséis átomos de carbono. La parte hidrófila consiste en tres grupos carboxilato.

Está relativamente bien comprobado que las proteínas de membrana muestran un mayor nivel de restos básicos en la superficie de contacto citosol-membrana, creando un enriquecimiento de cargas positivas en la superficie de contacto de la membrana intracelular [Von Heijne, G.: "*Membrane protein structure prediction: Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule*"; *J. Molecular Biology*, 1992, 225, 487-494]. Además, las proteínas de membrana tienen un mayor contenido de residuos aromáticos localizados en la superficie de contacto membrana-agua en sus segmentos transmembrana α -helicoidales, lo cual desempeña una función importante en el plegamiento y la estabilidad del conjunto [Hong, H. et al., "*Role of Aromatic Side Chains in the Folding and Thermodynamic Stability of Integral Membrane Proteins*"; *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 8320-8327].

Por tanto, estos detergentes de calixareno confieren un mejor empaquetamiento de los dominios transmembrana de las proteínas de membrana extraídas/purificadas y más próximo al impuesto por los lípidos en un entorno de membrana bicapa en comparación con el obtenido mediante los detergentes convencionales. Debido a su patrón estructural y a su mayor rigidez, estos detergentes mejoran significativamente la estabilización de las proteínas de membrana en varios niveles: (a) permitiendo una cobertura eficaz de dominios transmembrana hidrófobos con cadenas alifáticas; (b) estableciendo interacciones electrostáticas en la superficie de contacto del citosol intracelular entre aminoácidos cargados positivamente en bucles de proteínas de membrana y grupos carboxilato cargados negativamente de los detergentes y generando de este modo una red de puentes salinos muy próxima alrededor de la proteína, y (c) estableciendo un fuerte adsorción en dominios hidrófobos por medio de interacciones de apilado π entre componentes fenólicos del núcleo de calixareno y restos de aminoácidos aromáticos situados en las superficies de contacto.

Los detergentes calixarénicos han demostrado su utilidad para extraer y estabilizar una gama de proteínas de membrana tanto eucariotas como procariotas, tal como los transportadores ABC de *Bacillus subtilis* expresados en *Escherichia Coli*, RAPG de Clase I de levadura, Receptores Humanos de células HEK y proteínas víricas [A. Jawhari et al.: "*Native and full length membrane protein isolation for Drug Discovery*"; 12ª Conferencia Anual de Descubrimiento de Fármacos en Diana, Boston; Septiembre de 2013]. A pesar de la eficacia y el potencial de estos compuestos de calixareno, algunas de las proteínas de membrana diana no fueron completamente activas después de la solubilización y/o no pueden ser solubilizados. Es por eso que los actuales inventores querían diseñar otros compuestos que pudieran complementar los anteriores para mejorar la velocidad de solubilización y/o la conservación funcional de las proteínas de membrana.

Objetivos de la invención

El primer y principal objetivo de la presente invención es proporcionar una familia de compuestos de glucósidos de calixareno que permitan la solubilización selectiva de proteínas de membrana conservando, al mismo tiempo, su estructura tridimensional natural.

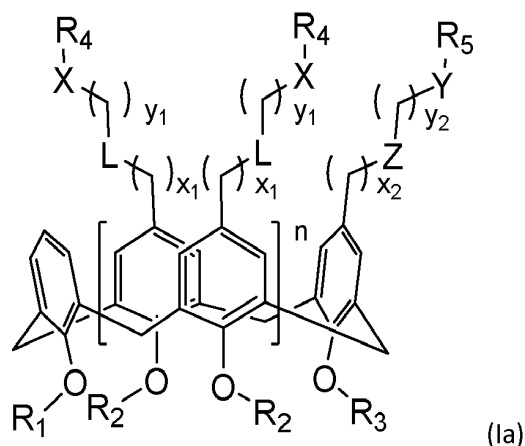
Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una familia de compuestos de glucósidos de calixareno que permitan la solubilización selectiva de proteínas de membrana conservando al mismo tiempo su función natural.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una familia de compuestos de glucósidos de calixareno que permitan la estabilización selectiva de proteínas de membrana solubilizadas y/o purificadas conservando al mismo tiempo su función natural.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una familia de compuestos de glucósidos de calixareno los cuales permitan la estabilización selectiva de proteínas de membrana solubilizadas y/o purificadas conservando, al mismo tiempo, su estructura tridimensional natural.

Otro objetivo de la presente invención es un método para extraer selectivamente proteínas de membrana que comprende una etapa que consiste en poner en contacto una solución acuosa de la proteína de membrana que se ha de extraer con al menos un calixareno de la presente invención.

Estos y otros objetivos se satisfacen mediante un compuesto de calixareno de acuerdo con la fórmula (Ia):

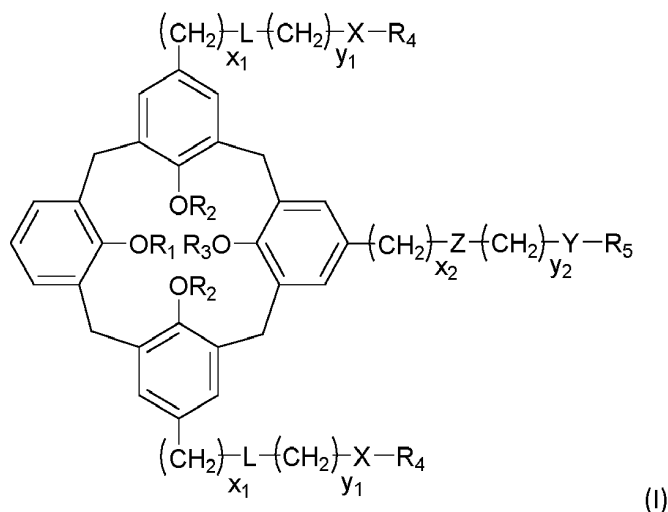


en la que:

- n es un número entero igual a 1;
- R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;
- R₃ es idéntico al grupo R₁ o R₂;
- 5 - R₄ representa un residuo de sacárido, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
- R₅ es idéntico a R₄ o está ausente;
- L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
- Z es idéntico a L o está ausente;
- 10 - $0 \leq x_1 \leq 3$, en el que x₁ es un número entero;
- $0 \leq y_1 \leq 3$, en el que y₁ es un número entero;
- x₂ es idéntico a x₁ o igual a 0;
- y₂ es idéntico a y₁ o igual a 0;
- X = O, S o ausente;
- 15 - Y es idéntico a X o está ausente.

Una representación equivalente de la fórmula (Ia) es la fórmula (I):

- R₁ representa un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;



20

en la que:

- R₁ representa un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
- R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;
- 25 - R₃ es idéntico al grupo R₁ o R₂;
- R₄ representa un residuo de sacárido, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
- R₅ es idéntico a R₄ o está ausente;
- L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
- Z es idéntico a L o está ausente;
- 30 - $0 \leq x_1 \leq 3$, en el que x₁ es un número entero;
- $0 \leq y_1 \leq 3$, en el que y₁ es un número entero;
- x₂ es idéntico a x₁ o igual a 0;
- y₂ es idéntico a y₁ o igual a 0;
- 35 - X = O, S o ausente;
- Y es idéntico a X o está ausente.

De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de calixareno corresponde a la fórmula (I), en la cual:

- R₁ representa un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
- 40 - R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;
- R₃ es idéntico al grupo R₁ o R₂;
- R₄ representa un residuo de sacárido, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos, los cuales están seleccionados del grupo de monosacáridos o disacáridos;
- R₅ es idéntico a R₄ o está ausente;
- 45 - L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
- Z es idéntico a L o está ausente;

ES 2 750 569 T3

- $0 \leq x_1 \leq 3$, en el que x_1 es un número entero;
 - $0 \leq y_1 \leq 3$, en el que y_1 es un número entero;
 - x_2 es idéntico a x_1 o igual a 0;
 - y_2 es idéntico a y_1 o igual a 0;
 - 5 - $X = O$, S o está ausente;
 - Y es idéntico a X o está ausente.
- De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de calixareno corresponde a la fórmula (I), en la cual:
- 10 - R_1 representa un grupo alquilo $C_{(1-16)}$ lineal o ramificado;
 - R_2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;
 - R_3 es idéntico al grupo R_1 o R_2 ;
 - R_4 representa un residuo de sacárido, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos, los cuales son seleccionados entre el grupo que consiste en glucosilo, manosilo, galactosilo, maltosilo, lactosilo;
 - 15 - R_5 es idéntico a R_4 o está ausente;
 - L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
 - Z es idéntico a L o está ausente;
 - 20 - $0 \leq x_1 \leq 3$, en el que x_1 es un número entero;
 - $0 \leq y_1 \leq 3$, en el que y_1 es un número entero
 - x_2 es idéntico a x_1 o igual a 0;
 - y_2 es idéntico a y_1 o igual a 0;
 - $X = O$, S o está ausente;
 - Y es idéntico a X o está ausente.
 - 25 De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de calixareno corresponde a la fórmula (I), en la cual:
 - R_1 representa un grupo alquilo $C_{(1-16)}$ lineal o ramificado;
 - R_2, R_3 representan un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;
 - R_4, R_5 representan un residuo de sacárido, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos, los cuales son seleccionados entre el grupo que consiste en glucosilo, manosilo, galactosilo, maltosilo, lactosilo;
 - 30 - L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
 - Z es idéntico a L o está ausente;
 - 35 - $0 \leq x_{1,2} \leq 3$, en el que $x_{1,2}$ son un número entero;
 - $0 \leq y_{1,2} \leq 3$, en el que $y_{1,2}$ son un número entero;
 - X representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente.
 - Y representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente.
 - 40 De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de calixareno corresponde a la fórmula (I), en la cual:
 - R_1 corresponde a un grupo alquilo $C_{(1-16)}$ lineal o ramificado;
 - R_2, R_3 son metilo;
 - R_4, R_5 representan un residuo de sacárido, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en glucosilo, manosilo, galactosilo, maltosilo, lactosilo;
 - 45 - L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
 - Z es idéntico a L o está ausente;
 - $0 \leq x_{1,2} \leq 3$, en el que $x_{1,2}$ son un número entero;
 - 50 - $0 \leq y_{1,2} \leq 3$, en el que y_1 son un número entero;
 - X representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente;
 - Y representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente.
 - De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de calixareno corresponde a la fórmula (I), en la cual:
 - 55 - R_1 corresponde a un grupo alquilo $C_{(1-16)}$ lineal o ramificado;
 - R_2, R_3 son metilo;
 - R_4, R_5 representan un grupo galactosilo, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
 - L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
 - 60 - Z es idéntico a L o está ausente;
 - $0 \leq X_{1,2} \leq 3$, en el que $x_{1,2}$ son un número entero;
 - $0 \leq y_{1,2} \leq 3$, en el que $y_{1,2}$ son un número entero;
 - X representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente;
 - Y representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente.
 - 65 De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de calixareno corresponde a la fórmula (I), en la cual:
 - R_1 corresponde a un grupo alquilo $C_{(1-16)}$ lineal o ramificado;

ES 2 750 569 T3

- R₂, R₃ son metilo;
 - R₄, R₅ representan un grupo galactosilo, en la cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
 - L, Z están ausentes;
 - $0 \leq x_{1,2} \leq 3$, en el que $x_{1,2}$ son un número entero;
 - 5 - $0 \leq y_{1,2} \leq 3$, en el que $y_{1,2}$ son un número entero;
 - X representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente;
 - Y representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente.
- De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de calixareno corresponde a la fórmula (I), en la cual:
- 10 - R₁ corresponde a un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
 - R₂, R₃ son metilo;
 - R₄, R₅ representan un grupo glucosilo, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
 - L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
 - 15 - Z es idéntico a L o está ausente;
 - $0 \leq x_{1,2} \leq 3$, en el que $x_{1,2}$ son un número entero;
 - $0 \leq y_{1,2} \leq 3$, en el que $y_{1,2}$ son un número entero;
 - X representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente;
 - Y representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente.
- 20 De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de calixareno corresponde a la fórmula (I), en la cual:
- R₁ corresponde a un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
 - R₂, R₃ son metilo;
 - 25 - R₄, R₅ representan un grupo glucosilo, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
 - L, Z son una función 1,2,3-triazol;
 - $0 \leq x_{1,2} \leq 3$, en el que $x_{1,2}$ son un número entero;
 - $0 \leq y_{1,2} \leq 3$, en el que $y_{1,2}$ son un número entero;
 - X representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente;
 - Y representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente.
- 30 De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de calixareno corresponde a la fórmula (I), en la cual:
- R₁, R₃ corresponden a un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
 - R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;
 - R₄ representa un grupo maltosilo, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
 - 35 - R₅ está ausente;
 - L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
 - Z está ausente;
 - $0 \leq x_1 \leq 3$, en el que x_1 son un número entero;
 - 40 - $0 \leq y_1 \leq 3$, en el que y_1 son un número entero;
 - x_2 e y_2 son iguales a 0
 - X = O, S o está ausente;
 - Y está ausente.
- De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de calixareno corresponde a la fórmula (I), en la cual:
- 45 - R₁, R₃ corresponden a un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
 - R₂ representa un metilo;
 - R₄ representa un grupo maltosilo, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
 - R₅ está ausente;
 - 50 - L es un enlazador, que es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
 - Z está ausente;
 - $0 \leq X_1 \leq 3$, en el que x_1 son un número entero;
 - $0 \leq y_1 \leq 3$, en el que y_1 son un número entero;
 - 55 - x_2 e y_2 son iguales a 0
 - X = O, S o está ausente;
 - Y está ausente.
- De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de calixareno corresponde a la fórmula (I), en la cual:
- 60 - R₁, R₃ corresponden a un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
 - R₂ representa un metilo;
 - R₄ representa un grupo maltosilo, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
 - R₅ está ausente;
 - L es un 1,2,3-triazol;
 - 65 - Z está ausente;
 - $0 \leq x_1 \leq 3$, en el que x_1 son un número entero;
 - $0 \leq y_1 \leq 3$, en el que y_1 son un número entero;

- x_2 e y_2 son iguales a 0
- $X = O$, S o está ausente;
- Y está ausente.

Otro objetivo de la presente invención es un método para extraer, solubilizar y/o estabilizar selectivamente proteínas de membrana, que comprende una etapa que consiste en poner en contacto gránulos de membrana que contienen una o más proteínas de membrana que se han de extraer con una solución acuosa que contiene al menos un compuesto de calixareno de acuerdo con la invención. La invención proporciona adicionalmente métodos para extraer selectivamente una proteína de membrana de una bicapa lipídica, por ejemplo, una membrana polar delgada que comprende dos capas de moléculas lipídicas, poniendo en contacto la bicapa lipídica con al menos un calixareno que se describe en el presente documento en una solución acuosa para formar una mezcla, opcionalmente en presencia de un tampón u otro detergente, formando de este modo un conjunto de los compuestos de calixareno y la proteína de membrana extraída de la bicapa lipídica. El conjunto puede entonces ser separada de la mezcla para proporcionar proteína de membrana aislada y/o purificada. La invención proporciona adicionalmente métodos para estabilizar selectivamente la proteína de membrana poniendo en contacto la proteína de membrana aislada y/o purificada con al menos un calixareno que se describe en el presente documento en una solución acuosa. Más particularmente, el método se caracteriza porque la proteína de membrana es una proteína seleccionada entre el grupo que comprende: (a) las proteínas de transporte, preferiblemente el transportador de eflujo de múltiples fármacos seleccionado entre el grupo que comprende la proteína de resistencia a Acridina B (AcrB) y una bomba de protones del grupo que comprende la bacteriorrodopsina (bR); (b) los canales iónicos, preferiblemente un canal de protones M2 seleccionado entre el grupo que comprende la proteína de matriz 2 del virus de la gripe (M2); o (c) receptores acoplados a la proteína G (RAPG), preferentemente receptor de adenosina A_{2A} ; o (d) enzimas; o (e) glucoproteínas.

De acuerdo con un modo de implementación particular de la invención, la etapa de poner en contacto gránulos de membrana que contienen una o más proteínas de membrana que se han de extraer con una solución acuosa que contiene al menos un calixareno de acuerdo con la invención es efectuado a un pH que varía de 6 a 9.

De acuerdo con un modo de implementación particular de la invención, la etapa de poner en contacto gránulos de membrana que contienen una o más proteínas de membrana que se han de extraer con una solución acuosa que contiene al menos un calixareno de acuerdo con la invención es efectuado a una temperatura que varía de 4 a 25 °C.

De acuerdo con un modo de implementación particular de la invención, la etapa de poner en contacto gránulos de membrana que contienen una o más proteínas de membrana que se han de extraer con una solución acuosa que contiene al menos un calixareno de acuerdo con la invención es realizado en una concentración de calixareno que varía de 10^{-6} a 10^{-3} M.

Otro objetivo de la presente invención es un método para producir una solución de proteínas de membrana que comprende la extracción de proteínas de membrana con al menos un compuesto de calixareno de acuerdo con la invención y la separación de dichas proteínas de membrana extraídas con dichos calixarenos, preferentemente por centrifugación.

De acuerdo con un modo de implementación particular de la invención, la etapa de poner en contacto proteínas de membrana solubilizadas o purificadas con una solución tampón que contiene al menos un calixareno de acuerdo con la invención se realiza a una concentración de calixareno que varía de 10^{-6} a 10^{-3} M.

Otro objetivo de la presente invención es un método para solubilizar y/o estabilizar una proteína de membrana, poniendo en contacto gránulos de membrana que contienen una o más proteínas de membrana que se han de extraer con una solución acuosa que contiene al menos un calixareno de acuerdo con la invención y opcionalmente calentando la proteína de membrana y los gránulos de membrana, formando de este modo una proteína de membrana solubilizada o estabilizada. Otro objetivo de la presente invención es un método para producir una solución de proteínas de membrana que comprende la extracción de proteínas de membrana con al menos un compuesto de calixareno de acuerdo con la invención y la separación de dichas proteínas de membrana extraídas con dichos calixarenos, preferentemente por centrifugación.

Descripción detallada de las figuras

Las Figuras 1a) a 1f) muestran realizaciones preferidas de compuestos de calixareno correspondientes a la fórmula (I) de acuerdo con la presente invención.

La Figura 1a) corresponde a un compuesto de calixareno de fórmula (I) en la que R_1 es un grupo heptilo; R_2 y R_3 son grupos metilo; R_4 y R_5 son iguales y representan un grupo galactosilo o glucosilo; X, Y están ausentes; L, Z son una función tiourea; $x_{1,2} = z = 1$ a 2, $y_{1,2} = 0$.

La Figura 1 b) corresponde a un compuesto de calixareno de fórmula (I) en la que R_1 es un grupo heptilo; R_2 y R_3 son grupos metilo; R_4 y R_5 son iguales y representan un grupo galactosilo o glucosilo; en la que X, Y = S; L, Z están ausentes; y $x_1 + y_1 = x_2 + y_2 = 3$.

La Figura 1c) corresponde a un compuesto de calixareno de fórmula (I) en la que R_1 es un grupo heptilo; R_2 y R_3 son grupos metilo; R_4 y R_5 son iguales y representan un grupo galactosilo o glucosilo; X, Y = O; L, Z son una función 1,2,3-triazol; $x_{1,2} = z = 1$ a 2, e $y_{1,2} = 1$.

La Figura 1d) corresponde a un compuesto de calixareno de fórmula (I) en la que R_1 es un grupo heptilo; R_2 y R_3 son grupos metilo; R_4 y R_5 son iguales y representan un grupo galactosilo

o glucosilo; X, Y están ausentes; L, Z son una función amida; y $xy_{1,2} = 1$, e $y_{1,2} = 0$.

La Figura 1e) corresponde a un compuesto de calixareno de fórmula (I) en la que: R₁ es un grupo heptilo; R₂ y R₃ son grupos metilo; R₄ y R₅ son iguales y representan un grupo galactosilo o glucosilo; en la que X, Y = O; L, Z están ausentes; y $x_1 + y_1 = x_2 + y_2 = z = 1$ a 2.

5 La Figura 1f) corresponde a un compuesto de calixareno de fórmula (I) en la que: R₁ es un grupo heptilo; R₂ y R₃ son grupos metilo; R₄ y R₅ son iguales y representan un grupo maltosilo; en la que X, Y = O; L, Z son una función 1,2,3-triazol; $x_{1,2} = 1$ e $y_{1,2} = 1$.

La Figura 2 muestra un sigmoide decreciente del tipo Boltzmann obtenido mediante el método espectrofluorimétrico usando pireno como sonda de fluorescencia para determinar la concentración crítica de micelas. El eje x representa la concentración "logarítmica" de calixarenos; el eje y representa la relación de intensidad del primer pico (I₁ a 373 nm) y el tercer pico (I₃ a 384 nm) de pireno. El sigmoide "A" está relacionado con el calixareno CALX173GALO disuelto en H₂O MilliQ® y el sigmoide "B" esta relacionado con el calixareno CALX173GLUK disuelto en H₂O MilliQ®.

15 Las Figuras 3a) y 3b) son dos diagramas que muestran el tamaño de partícula promedio obtenido mediante análisis por DLD (Dispersión de Luz Dinámica) del compuesto de CALX173GALO (figura 3a) y el compuesto de CALX173GLUK (figura 3b) a 0,47 y 0,08 mM respectivamente.

20 Las Figuras 4a) y 4b) muestran el ensayo de solubilización de la proteína de membrana A_{2A} con los calixarenos CALX173GALO y CALX173GLUK de la presente invención, y también detergentes conocidos, por ejemplo, n-dodecil-β-D-maltopiranosido (DDM, CMC (H₂O) = 0,17 mM [VanAken, T. et al, *Alkyl glycoside detergents: synthesis and applications to the study of membrane proteins*, 1986, *Meth. Enzymol.*, 125, 27-35]) y sal de sodio de 25-heptiloxi-26,27,28-tris(hidroxil)calix-[4]-areno-5,11,17-tris(ácido acético) (denominada "CALX173ACE", CMC (H₂O) = 2,5 mM).

25 La Figura 5 muestra el efecto de la estabilización de la proteína de membrana bR a lo largo del tiempo a temperatura ambiente y después a 37 °C en diversas condiciones de detergente (OG, CALX173ACE, CALX173GALO, CALX173GLUK, amphipol A8-35, FA-3 y MNG)

Descripción detallada de la invención

30 1. Definiciones

En el sentido de la presente invención, se entiende que "alquilo" significa un radical hidrocarbonado monovalente, saturado, lineal, ramificado o cíclico. Un "alquilo en C₁ a C₁₆" es un alquilo que comprende de 1 a 16 átomos de carbono; esto comprende en particular los grupos metilo y etilo, así como grupos propilo, butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo y hexadecilo lineales y ramificados. El grupo alquilo posiblemente puede estar sustituido por uno o más heteroátomos monovalentes seleccionados entre el grupo de átomos de O, S, N, P y, por tanto, puede llevar diversas funciones tales como -OH, -NO₂, -N₂, -SO₂(OH).

35 En el contexto de la presente invención, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" comprende las sales preparadas con ácidos o bases atóxicos, dependiendo de los sustituyentes presentes en los compuestos. Cuando los compuestos de la invención contienen funciones ácidas, las sales correspondientes pueden ser obtenidas mediante la adición de una base orgánica o inorgánica al compuesto en forma neutralizada, posiblemente en presencia de un disolvente preferiblemente inerte. Los ejemplos de sales de adición de una base pueden ser las sales de sodio, potasio, calcio, amonio, amino (orgánico) o magnesio. Cuando los compuestos de la invención contienen funciones básicas, las sales correspondientes pueden ser obtenidas mediante la adición de un ácido orgánico o inorgánico posiblemente en un disolvente preferentemente inerte. Los ejemplos de sales de adición de ácido inorgánico pueden ser las sales de clorhidrato, bromhidrato, nitrato, carbonato, monohidrógeno carbonato, fosfato, monohidrógeno fosfato, dihidrogenofosfato, sulfato, monohidrógeno sulfato o yodhidrato. Los ejemplos de sales de adición de ácido orgánico pueden ser las sales de acetato, propionato, isobutirato, maleato, malonato, benzoato, succinato, suberato, fumarato, lactato, mandelato, 50 eftalato, benzenosulfonato, p-tolilsulfonato, citrato, tartrato o metanosulfonato.

En el sentido de la presente invención, un resto de sacárido se refiere a un resto de azúcar, tal como un monosacárido, disacárido, oligosacárido o polisacárido. Los monosacáridos normales incluyen alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa o talosa. Los disacáridos normales incluyen galactosa, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa y celobiosa. Los disacáridos pueden tener cualquier enlace adecuado entre la primera y la segunda unidad del disacárido. Otros sacáridos adecuados incluyen ácido glucurónico, sorbasa, ribosa y similares. Los sacáridos pueden unirse a la fórmula (I) a través de su oxígeno anomérico o a cualquier otro grupo hidroxilo disponible. Dependiendo del contexto, como entendería un experto en la materia, el sacárido puede incluir el oxígeno que lo une a otro grupo o excluir el oxígeno que lo une a otro grupo.

60 En el sentido de la presente invención, se entiende que "proteína de membrana" significa una proteína asociada a membranas biológicas o membranas artificiales (tales como Partículas Similares a Virus o liposomas), en otras palabras, anclada, o integral, y no libre para la difusión en medios acuosos e inestable en esos medios, y también proteínas solubles las cuales son inestables en esos medios. Entre las proteínas de membrana, por ejemplo, pueden citarse las proteínas de las membranas plasmáticas y las proteínas de las membranas intracelulares (tales como, por ejemplo, las proteínas de las membranas mitocondriales, nucleares y lisosómicas). Las proteínas de membrana son a menudo clasificadas

basándose en las estructuras las cuales les permiten interactuar con las membranas y la manera en la cual estas estructuras son unidas entre sí. Las proteínas de membrana pueden ser proteínas politópicas o proteínas monotópicas.

- 5 En el sentido de la presente invención, se entiende que "solución acuosa de la proteína de membrana" significa una solución acuosa que comprende una o más proteínas de membrana. Por ejemplo, ésta puede ser una suspensión o una dispersión, en las que las proteínas pueden estar en una forma no disuelta o no difusa o pueden, por ejemplo, combinarse con una fracción de membrana biológica.

Se usan las siguientes abreviaturas:

Ac = Acetilo

Bz = Benzoilo

tBu = *terc*-Butilo

Me = Metilo

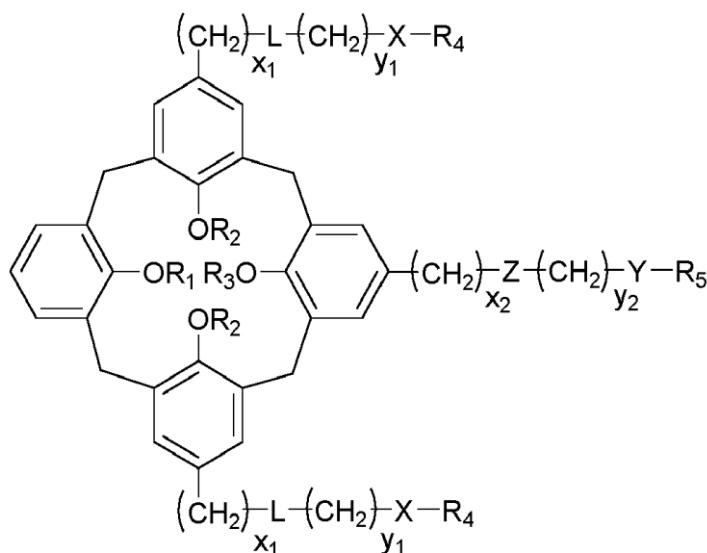
Et = Etilo

Ph = Fenilo

Tf = Triflato

2. Descripción

- 10 La presente invención proporciona una familia de compuestos de calixareno definidos por la fórmula (I):



Fórmula (I)

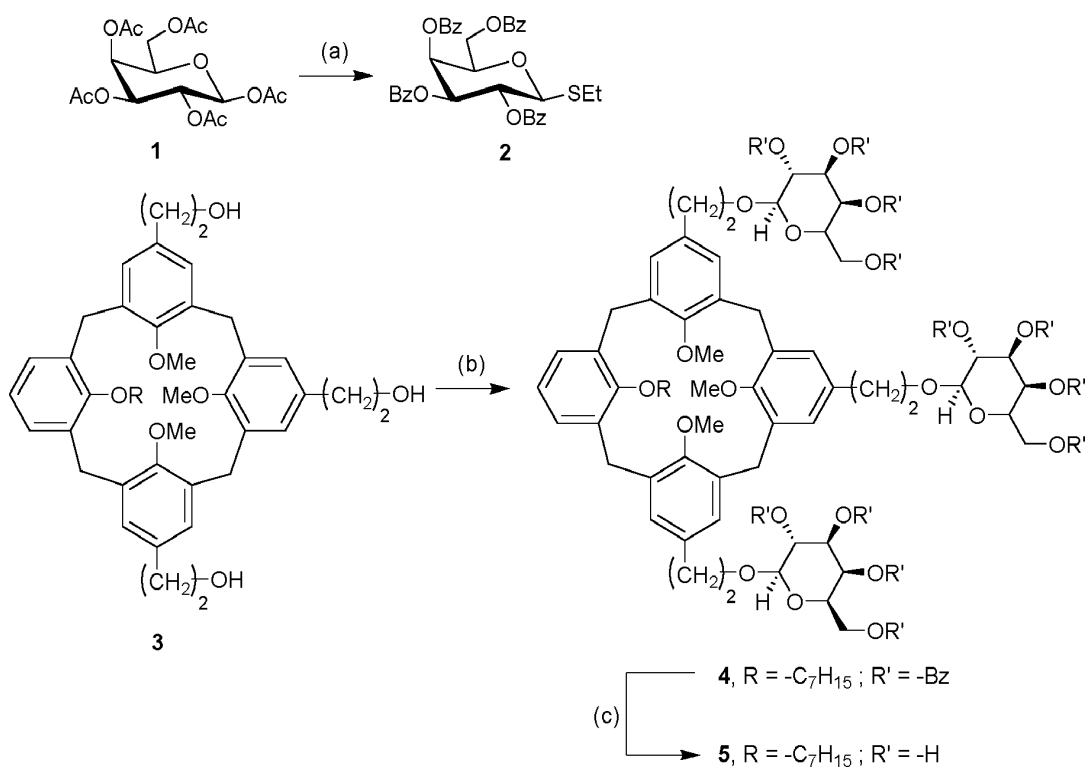
en la que:

- 15 - R₁ representa un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
 - R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;
 - R₃ es idéntico al grupo R₁ o R₂;
 - R₄ representa un residuo de sacárido, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
 20 - R₅ es idéntico a R₄ o está ausente;
 - L es un enlazador, que es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o puede estar ausente;
 - Z es idéntico a L o está ausente;
 - 0 ≤ x₁ ≤ 3, en el que x₁ es un número entero;
 25 - 0 ≤ y₁ ≤ 3, en el que y₁ es un número entero;
 - x₂ es idéntico a x₁ o igual a 0;
 - y₂ es idéntico a y₁ o igual a 0;
 - X = O, S o ausente;
 - Y es idéntico a X o está ausente.
 30 De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de calixareno corresponde a la fórmula (I), en la cual:
 - R₁ representa un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
 - R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;
 - R₃ es idéntico al grupo R₁ o R₂;
 35 - R₄ representa un residuo de sacárido, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos, los cuales están seleccionados entre el grupo de monosacáridos o disacáridos;
 - R₅ es idéntico a R₄ o está ausente;
 - L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o puede estar ausente;
 40 - Z es idéntico a L o está ausente;
 - 0 ≤ x₁ ≤ 3, en el que x₁ es un número entero;
 - 0 ≤ y₁ ≤ 3, en el que y₁ es un número entero;

- x_2 es idéntico a x_1 o igual a 0;
- y_2 es idéntico a y_1 o igual a 0;
- $X = O, S$ o ausente;
- Y es idéntico a X o está ausente.

5 Más precisamente, debido a su fórmula química, los calixarenos de fórmula (I) presentan una geometría molecular en forma de un cono o cono truncado, en la que la región ensanchada es hidrófila mientras que la cola es hidrófoba. Esta forma particular de los calixarenos de fórmula (I) permite la formación de micelas, lo cual facilita la transferencia de las proteínas desde un entorno de membrana hacia un medio acuoso, y lo cual también promueve la conservación de su estructura tridimensional y, por tanto, su actividad biológica. La introducción de unidades de sacárido en una molécula puede realizarse mediante una reacción de glucosilación a través de una función alcohol. Estos compuestos de calixareno como están ilustrados en la figura 1e (denominados en el presente documento "CALX1N3GALO" donde N es un número entero de 1 a 16 correspondiente a la longitud de la cadena alquílica) son accesibles a través de la reacción de glucosilación tal como se representa en detalle en el Esquema de Reacción 1. Se mencionan reactivos y condiciones de reacción como ejemplos, lo cual no limita el alcance de la invención.

Esquema de Reacción 1: Preparación de CALX173GALO (5)



Reactivos y condiciones en relación con el Esquema de Reacción 1:

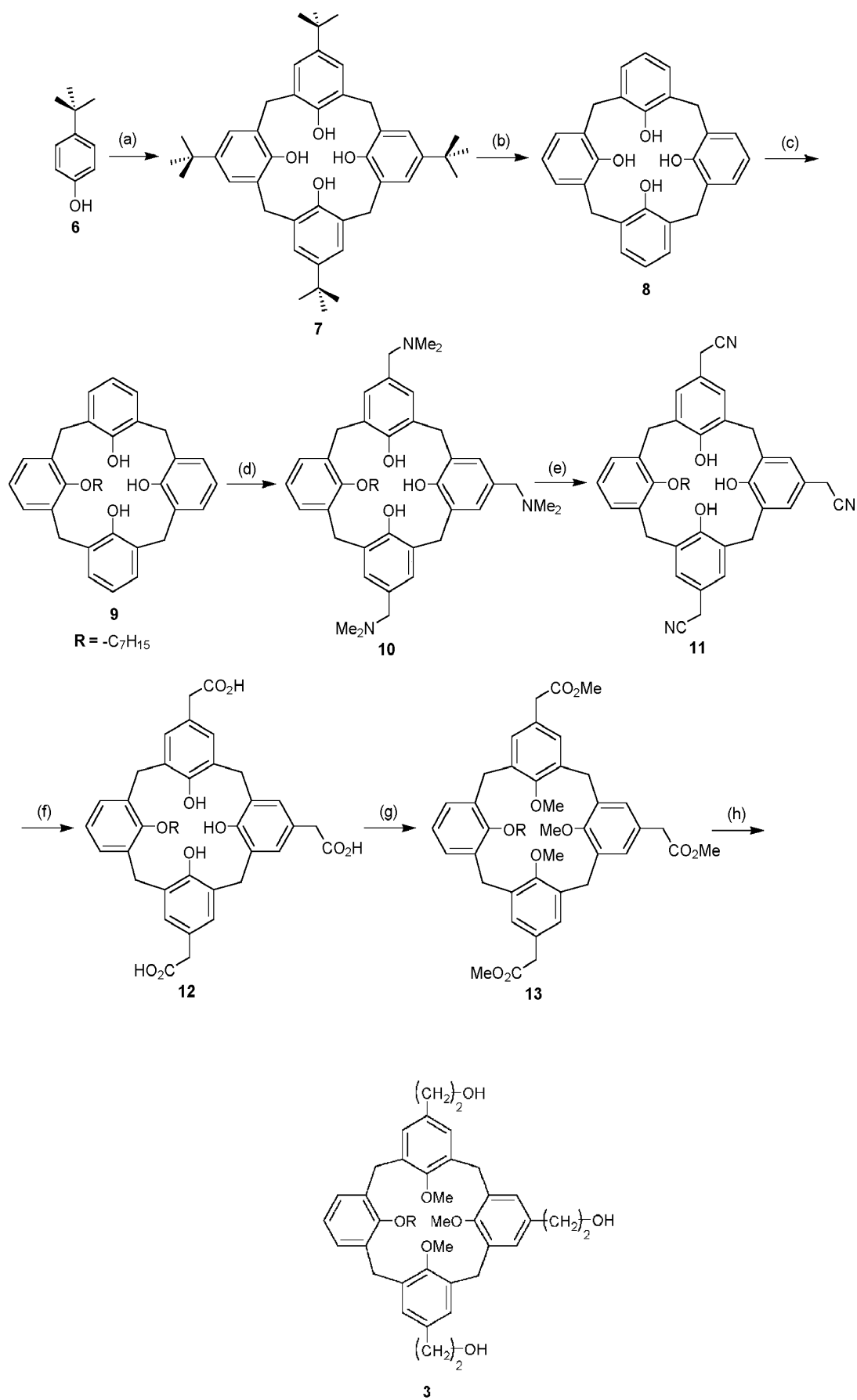
25 (a) CH₂Cl₂/BF₃·Et₂O, EtSH, 2 h a temperatura ambiente, después tBuOK/MeOH, 2 h, a temperatura ambiente, después BzCl/Piridina, 1 h a temperatura ambiente; Rendimiento = 87 %

(b) Cu(OTf)₂/MeCN, Argón/TM 3A (Tamiz Molecular), 2, 2 h a temperatura ambiente, después

(c) MeOH/CH₂Cl₂/MeONa, pH 12, Argón, 16 h a temperatura ambiente; Rendimiento = 20 %

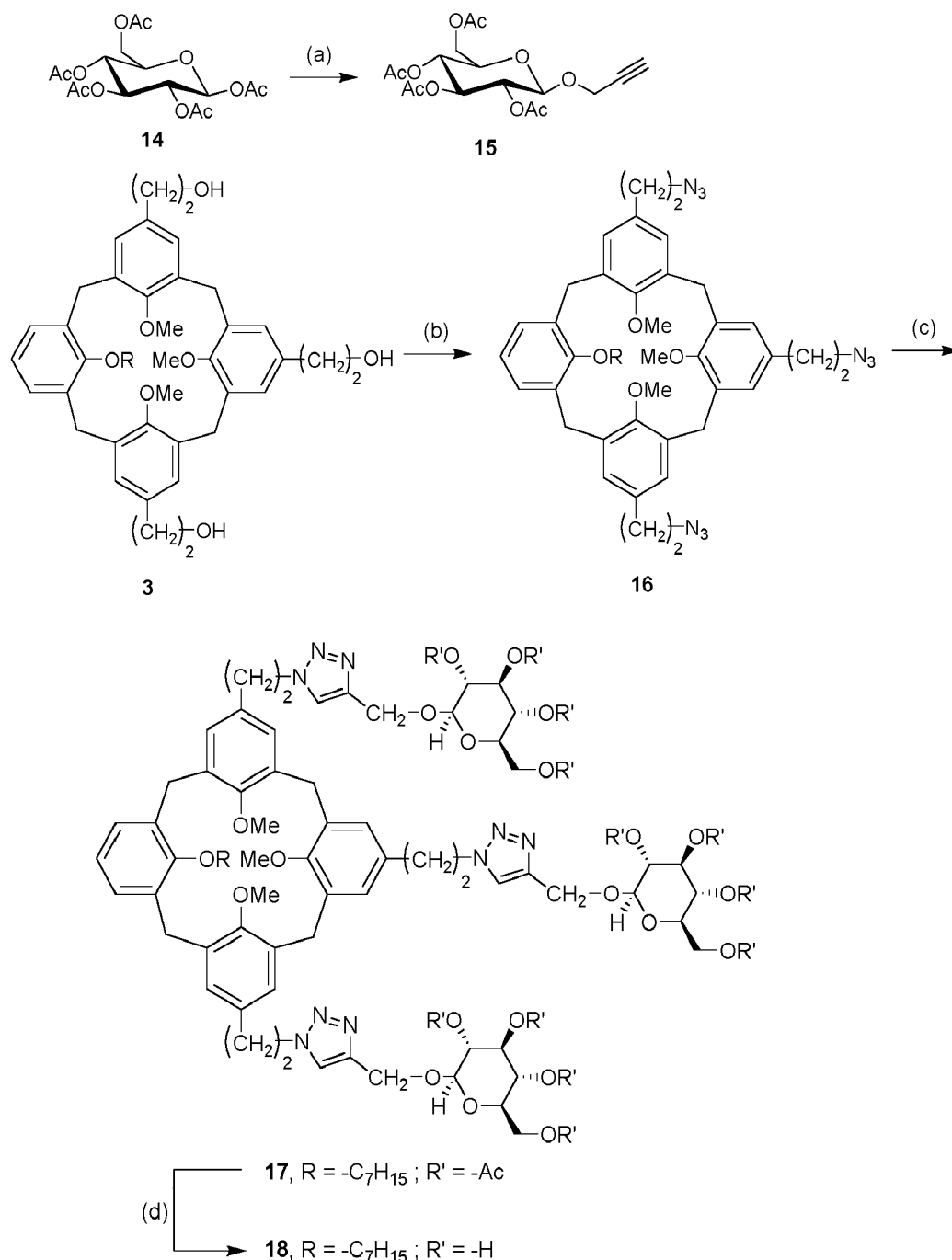
Puede sintetizarse CAL173GALO 5 mediante una reacción de glucosilación entre el intermedio de calix-[4]-areno triol 3 y el derivado etil 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-1-tio-β-D-galactopiranosido 2 seguida de la retirada de los grupos protectores de benzoilo mediante una reacción de transesterificación. El tioetil tetrabenzoil-β-D-galactopiranosido 2 fue sintetizado de acuerdo con la bibliografía [Dondoni, A. et al, *Synthesis and Properties of O-Glycosyl Calix[4]Arenes (Calixsugars)*, *Chem. Eur. J.*, 1997, 3, 1774-1782]. El calix-[4]-areno triol 3 puede ser sintetizado a partir de 4-terc-butilfenol 6 (Número de CAS 98-54-4) como se representa en el Esquema de Reacción 2. Se mencionan reactivos y condiciones de reacción como ejemplos, los cuales no limitan el alcance de la invención.

Esquema de Reacción 2: Preparación del intermedio calix-[4]-areno 3



Reactivos y condiciones en relación con el Esquema de Reacción 2:

- 5 (a) NaOH/HCHO, 2 h a 120 °C, después difenil éter, 3 h a 250 °C; Rendimiento = 52 %
 (b) AlCl₃/PhCH₃, PhOH, 3 h a temperatura ambiente; Rendimiento = 95 %
 (c) C₇H₁₅I/NaHCO₃, DMF, 5 días a 40 °C; Rendimiento = 75 %
 (d) AcOH/Me₂NH, HCHO/THF, 3 días a temperatura ambiente, cuantitativo
 (e) DMSO/Mel, argón, 30 min a 40 °C después NaCN, argón, 48 h a 80 °C; Rendimiento = 50 %
 (f) KOH/H₂O, EtOH, 3 días a 120 °C; Rendimiento = 75 %
 (g) NaH (60 %), DMF/Mel, 16 h a temperatura ambiente; Rendimiento = 80 %
 (h) LiAlH₄/THF, 2 h a temperatura ambiente; Rendimiento = 75 %
- 10 Sin embargo, dependiendo del número de unidades que se han de insertar en el compuesto de calixareno, de las condiciones experimentales y, más particularmente, de los efectos estéricos, resulta que puede ser difícil introducir eficazmente todas las unidades de sacárido, lo que inevitablemente da como resultado rendimientos globales bajos (véase el rendimiento del 20 % en la etapa de glucosilación para la síntesis de compuestos de CALX173GALO), una síntesis ineficiente y la formación de mezclas
- 15 en bruto donde es difícil purificar compuestos de interés a gran escala.
 Para resolver estos problemas, los inventores han desarrollado otra vía de síntesis para insertar unidades de sacárido en la plataforma a base de calixareno.
 Más particularmente, de acuerdo con la invención, una reacción 1,3-dipolar, catalizada por cobre (I), entre un alquino y una azida (cicloadición alquino-azida catalizada por cobre (I): CuAAC) representa un
- 20 método adecuado para insertar unidades de sacárido en la plataforma a base de calixareno. Estos compuestos de calixareno como se ilustran en la figura 1f (denominados en el presente documento "CALX1N3GLUK" donde N es un número entero de 1 a 16 correspondiente a la longitud de la cadena alquílica) son accesibles a través de la secuencia de reacción que se muestra en el Esquema de Reacción 3. Se mencionan reactivos y condiciones de reacción como ejemplos, los cuales no limitan el
- 25 alcance de la invención. Puede sintetizarse CALX173GLUK **18** a partir del calix-[4]-areno sustituido con tris-azidopropilo **16** y la propargil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranososa **15** preparados de acuerdo con la bibliografía [Mereyala, H.B. y Gurralla, S.R., *Carbohydr. Res.*, 1998, 307, 351-354].

Esquema de Reacción 3: Preparación de CALX173GLUK 18**Reactivos y condiciones en relación con el Esquema de Reacción 3:**

- 5 (a) Alcohol propargílico, BF₃.Et₂O/CH₂Cl₂, 2 h a temperatura ambiente; Rendimiento = 90 %
 (b) DMF/NaN₃, DBU/difenilfosforilazida, 14 h a 120 °C; Rendimiento = 84 %
 (c) DMF/iPrEt₂N, Argón, CuI/TM 3A, 15, 4 h30 a 90 °C, después
 (d) MeOH/CH₂Cl₂/MeONa; Rendimiento = 71 %

10 La unión entre las unidades de sacárido y la plataforma a base de calix-[4]-areno a través de anillos aromáticos de 1,2,3-triazol puede tener un efecto estabilizador, como los anillos fenólicos del calixareno. Este efecto puede explicarse por interacciones de "apilamiento π" con residuos aromáticos hidrófobos de proteínas de membrana. Además, la distancia de las unidades de sacárido desde la plataforma a base de calixareno proporciona más libertad de movimiento a los residuos de sacárido, lo cual les permite tomar la conformación más favorable para estabilizar una proteína de membrana.

15 El método de la invención permite la extracción de una proteína dada, selectivamente en relación con otras proteínas de membrana, en particular mediante la modulación de la longitud de la cola hidrófoba de los compuestos de calix-[4]-areno sintetizados. El método de la invención permite la extracción y la separación de fracciones solubles e insolubles de una amplia gama de proteínas de membrana,

dependiendo de los sustituyentes insertados en la plataforma a base de calix-[4]-areno.

De acuerdo con la invención, la proteína de membrana puede ser seleccionada entre el grupo que comprende las proteínas de transporte, los canales iónicos, los receptores acoplados a proteína G (RAPG), las enzimas o las glucoproteínas. En el sentido de la presente invención, se entiende que "proteína de transporte", significa una proteína de membrana cuya función es el transporte de diversas sustancias (iones, esteroides, macromoléculas, etc.) a ambos lados de la membrana.

La etapa de poner en contacto gránulos de membrana que contienen una o más proteínas de membrana que se han de extraer con una solución acuosa que contiene al menos un calixareno de fórmula (I) puede realizarse a un pH que varía de 5,5 a 10, preferentemente de 6 a 9.

El método de extracción puede realizarse a una temperatura que varía de 0 a 100 °C, preferiblemente de 4 a 25 °C.

Los métodos de extracción y estabilización utilizan una concentración de calixareno de fórmula (I) que varía de 10^{-6} a 10^{-2} M.

El método de extracción de acuerdo con la invención puede realizarse con calixarenos en solución o calixarenos en agregados coloidales por causa de su propiedad tensioactiva.

En el sentido de la presente invención, se entiende que agregado coloidal significa grupos de unas pocas moléculas a unos cientos de moléculas de calixareno que se organizan sobre la base de fuerzas de repulsión hacia el disolvente. Dada su naturaleza, los calixarenos de fórmula (I) son capaces de formar mezclas en un medio apropiado, tal como, por ejemplo, en agua, en una solución acuosa, en un medio isotónico o en un medio biológico.

La mezcla puede ser seleccionada entre el grupo que comprende micelas, liposomas y nanopartículas lipídicas. Preferiblemente, los calixarenos están en forma de micelas.

El término micela designa una mezcla esférica de moléculas de calixareno de fórmula (I) la cual se organiza en función del disolvente utilizado. Por ejemplo, en agua o en un disolvente acuoso, los extremos lipófilos son girados hacia el interior de la micela, mientras que los extremos hidrófilos forman la superficie de contacto de la micela con el disolvente. En un disolvente orgánico, por ejemplo, aceite, la disposición es invertida. El término liposoma designa vesículas pequeñas hechas artificialmente, en particular constituidas por láminas delgadas de fosfolípidos, separadas entre sí por compartimientos acuosos. Pueden tener una estructura muy próxima a la de las membranas biológicas.

En el contexto de la presente invención, el término nanopartícula significa un conjunto de unos pocos cientos a unos pocos miles de moléculas de calixareno de fórmula (I), dando como resultado un objeto de cuyas dimensiones al menos una es de tamaño nanométrico, por ejemplo, entre 1 y 300 nm.

Las proteínas de membrana que formaron complejos con los calixarenos de fórmula (I) y las proteínas de membrana que no formaron complejos pueden separarse por centrifugación, por ejemplo, durante 2 horas a 4 °C y a una velocidad de 100 000 g. Las condiciones de centrifugación dependerán de la naturaleza de la proteína. Los expertos en la materia sabrán cómo seleccionar las condiciones óptimas de centrifugación.

Se entenderá que dentro del alcance de la presente invención, pueden efectuarse diversas modificaciones a las realizaciones que se describen en el presente documento. Por ejemplo, debe garantizarse que los compuestos de calixareno tengan una solubilidad relativamente buena y se consideren aceptables para su uso en la extracción, solubilización y estabilización de proteínas de membrana.

Por tanto, la descripción anterior no debe interpretarse como limitativa, sino simplemente como ejemplificaciones de realizaciones preferidas. Por ejemplo, para modular la solubilidad y las propiedades físico-químicas de los compuestos de calixareno, los expertos en la materia tendrán la capacidad de modificar la naturaleza de las unidades de azúcar (es decir, monosacárido, por ejemplo, disacárido de galactosa, por ejemplo, maltosa) y la multiplicidad de las cabezas polares y/o la longitud de la cadena alifática hidrófoba. Los expertos en la materia preverán otras modificaciones dentro del ámbito y el espíritu de las reivindicaciones adjuntas.

3. Ejemplos

La invención es ilustrada mediante dos ejemplos de compuesto de calixareno los cuales, sin embargo, no limitan la invención. El ejemplo 1 se refiere a la preparación del compuesto de CALX173GALO específico con una cadena de heptilo que pertenece a la serie CALX1N3GALO y el ejemplo 2 se refiere a la preparación del compuesto de CALX173GLUK con una cadena de heptilo la cual pertenece a la serie CALX1N3GLUK.

3.1 Ejemplo 1 (CALX173GALO)

La siguiente síntesis de múltiples etapas están de acuerdo con los esquemas de reacción 1 y 2.

a) Síntesis de 5,11,17,23-Tetra-*terc*-butil-25,26,27,28-tetrahidroxicalix-[4]-areno (7)

La síntesis del compuesto 7 es realizado como se describe en la referencia de Gutsche CD et al., "Calixarenes. 4. The synthesis, characterization, and properties of the calixarenes from *p*-*tert*-butylphenol", *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 3782-3792 y las siguientes modificaciones: En un matraz Erlenmeyer de 5 L se calienta a 240 °C una mezcla de 4-*terc*-butilfenol (500 g, 3,33 mol), solución acuosa de formaldehído al 35 % p/v (300 mL, 3,78 mol) y gránulos de NaOH (2,4 g, 60 mmol) hasta la formación de una espuma de color amarillo. La mezcla es enfriada, después es recuperada y el sólido es triturado con un mortero para obtener un polvo fino de color amarillo de precursor lineal (540 g). En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 2 L son añadidos 200 g de precursor lineal y 1 L de difenil éter. Se adapta un montaje Dean-Stark y se envía un flujo de aire con una bomba, después la mezcla

es calentada a temperatura de reflujo durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción es enfriada a temperatura ambiente. La suspensión de color marrón oscuro es vertida en 1 L de acetato de etilo y se deja reposar durante la noche. La suspensión es filtrada, aclarada dos veces con AcOEt y después dos veces con metanol. El sólido es secado al aire libre y después mediante vacío a presión reducida. Se

obtienen 120 g de un sólido de color blanquecino como complejo de inclusión con una molécula de AcOEt con un rendimiento del 52 %.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 1,2 (s, 12H, tBu), 1,26 (t, 3H, $J = 10$ Hz, $-\text{CH}_3$ AcOEt), 2,04 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO}-\text{AcOEt}$), 3,5 (d, 4H, $J = 15$ Hz, puentes $-\text{CH}_2-$), 4,12 (c, 2H, $J = 5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-\text{AcOEt}$), 4,26 (d, 4H, $J = 15$ Hz, puentes $-\text{CH}_2-$), 7,05 (s, 8H, CH_{Ar}), 10,34 (s, 4H, ArOH).

RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 31,4 y 32,7 (puentes $-\text{CH}_2-$), 34,8 (fBu), 125,8, 127,7, 144,4, 146,6 (CH_{Ar}). Espectro de masas de ionización por electronebulización (IEN) para $\text{C}_{44}\text{H}_{55}\text{O}_4$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1, HCOOH al 1 %); Calculado: 648,4; Encontrado: $m/z = 671,5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ y $693,6$ $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$.

b) Síntesis de 25,26,27,28-Tetrahidroxicalix-[4]-areno (8)

La síntesis del compuesto **8** es realizado como se describe en la referencia de Gutsche, C. D. y Levine, J. A.: "Calixarenes. 6. *Synthesis of a functionalizable calix-[4]-arene in a conformational rigid cone conformation*", *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 2652-2653 y las siguientes modificaciones: En un reactor de 6 L se añaden 3 L de tolueno y 200 g de 5,11,17,23-Tetra-*terc*-butil-25,26,27,28-tetrahidroxicalix-[4]-areno **7** (0,27 mol) en complejo de inclusión con AcOEt. La mezcla es agitada con un agitador mecánico y el sistema es purgado con nitrógeno durante 15 minutos. Una vez que se ha disuelto el producto, se añaden 30,6 g de fenol (0,34 mol) y 162,8 g de AlCl_3 (1,22 mol) en este orden. La solución se vuelve rápidamente de color naranja y se forma un material viscoso de color rojo en las paredes del reactor. La mezcla de reacción es agitada vigorosamente durante 3 horas. Después, se añaden 2,5 L de agua destilada para neutralizar el exceso de AlCl_3 . La fase orgánica es separada y concentrada en un evaporador rotativo para obtener una solución heterogénea de color naranja. Después, es añadido 1 L de metanol y la solución es sometida a ultrasonidos durante 1 hora en un baño ultrasónico. La suspensión es filtrada; el sólido es lavado con MeOH (200 ml, 2 veces) y éter (200 ml). Después, el sólido es secado al aire libre y después al vacío a presión reducida para recuperar 105 g de un polvo de color crema con un rendimiento del 95 %.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 3,55 (s ancho, 4H, puentes $-\text{CH}_2-$), 4,26 (s ancho, 4H, puentes $-\text{CH}_2-$), 6,73 (t, 4H, $J = 9$ Hz, CH_{Ar}), 7,06 (d, 8H, $J = 9$ Hz, CH_{Ar}), 10,2 (s, 4H, ArOH).

RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 31,8 (puentes $-\text{CH}_2-$), 122,3, 128,3, 128,8, 148,9 (CH_{Ar}).

Espectro de masas de IEN para $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_4$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1, HCOOH al 1 %); Calculado: 424,2; Encontrado: $m/z = 447,0$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

c) Síntesis de 5,11,17-tris-[(ciano)metil]-25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno (11)

La síntesis del compuesto **11** se realiza como se describe en la referencia de Suwinska, K. et al., "Trianionic calix[4]arene monoalkoxy derivatives: synthesis, solid-state structures and self-assembly properties", *New J. Chem.*, 2008, 32, 1988-1998 y las siguientes modificaciones: En un matraz de dos bocas de 250 ml, se disuelven 30 g de 25,26,27,28-Tetrahidroxicalix-[4]-areno **8** (70,7 mmol) con 100 ml de dimetilformamida (DMF). El sistema es purgado con argón y la solución es calentada 40 °C. Después de 15 minutos, se añaden 6,3 g de NaHCO_3 (74,24 mmol) en la solución. La solución es agitada vigorosamente en una corriente de argón. Después de 15 minutos, se añaden 17 mL (106 mmol) de yodoheptano de una sola vez. Después, la mezcla de reacción es calentada a 40 °C sin flujo de argón. Después de 5 días, la solución de color verde es enfriada a temperatura ambiente y es vertida en 1 L de agua. La fase acuosa turbia es extraída con CH_2Cl_2 (200 mL, 3 veces). Las fases orgánicas son recogidas y lavadas con agua (200 mL, 2 veces) y después 200 mL de salmuera. La fase orgánica es secada sobre una solución de MgSO_4 y después la suspensión es filtrada y concentrada en un evaporador rotativo. Se obtiene un residuo de pasta de color amarillo después de secar al vacío reducido. Se realiza una cromatografía ultrarrápida con una cantidad de sílice veinte veces superior a la del residuo recuperado y un gradiente de elución de ciclohexano puro a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ciclohexano}$ (4:6) para obtener 35 g de un polvo de color blanco que contiene una mezcla de un 5 % p/p de 25,26,27,28-Tetrahidroxicalix-[4]-areno sin reaccionar, un 80 % p/p de 25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno y un 15 % p/p de 25,27-bisheptiloxi-26,28-bishidroxicalix-[4]-areno. Las proporciones en peso de la mezcla aislada son definidas mediante un experimento de RMN ^1H que ayuda a las integraciones de singuletes ubicados en el espectro a 10,3, 9,9 y 8,3 ppm que corresponden respectivamente a las conformaciones de cono de 25,26,27,28-Tetrahidroxicalix-[4]-areno, 25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno y 5,27-bisheptiloxi-26,28-bishidroxicalix-[4]-areno. Las proporciones en peso son también calculadas considerando las integraciones de singuletes a 9 y 8,1 ppm que corresponden respectivamente a las conformaciones 1,2-alternada y 1,3-alternada de 5,27-bisheptiloxi-26,28-bishidroxicalix-[4]-areno.

En un matraz de dos bocas de 2 L, la mezcla es añadida, purificada y disuelta en 700 mL de THF. El sistema es purgado con argón y son añadidos 115 mL de ácido acético glacial (1,99 mol), 75 mL de solución acuosa de dimetilamina al 40 % p/p (0,6 mol) y 56 mL de una solución acuosa de formaldehído al 35 % p/p (0,6 mol) en este orden. Se continúa burbujeando argón en la mezcla de reacción durante 1 hora y se agita adicionalmente a temperatura ambiente sin flujo de argón. Después de 5 días, la mezcla de reacción es concentrada en un evaporador rotativo y es añadida gota a gota 1 L de una solución acuosa de Na_2CO_3 al 10 % p/v al residuo de color blanco heterogéneo obtenido. Una vez que es completada la adición, se añaden 500 mL de agua al gel de color blanco formado, después se extrae

con CH_2Cl_2 (500 mL, 3 veces). Las fases orgánicas son recogidas, secadas sobre MgSO_4 , filtradas y la solución transparente es concentrada en un evaporador rotativo para proporcionar 44 g de un polvo fino de color blanco después de secar a presión reducida.

- 5 En un matraz de dos bocas de 1 L se introduce el residuo de polvo de color blanco que contiene predominantemente el 5,11,17-tris-[(dimetilamino)metil]-25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno, después se añaden 430 mL de DMSO. La solución heterogénea es purgada con argón y calentada a 40 °C. Después, se añaden gota a gota 10 mL de yodometano (161 mmol) lentamente durante un período de 5 minutos y la solución es agitada 1 hora a 40 °C. Después de que se completa la solubilización, son añadidos 15,8 g (322 mmol) de cianuro de sodio a la solución de color amarillo.
- 10 Después, la mezcla de reacción es calentada en flujo de argón a 80 °C. Después de 48 horas, la mezcla de reacción es enfriada a temperatura ambiente y la mezcla de reacción es vertida en un matraz Erlenmeyer de 5 L que contiene 2 L de agua helada y 400 mL de una solución acuosa de HCl 1 N para neutralizar el exceso de cianuro de sodio. La suspensión de color blanco es extraída con CH_2Cl_2 (500 mL, 3 veces). Las fases orgánicas son recogidas, lavadas con agua (500 mL, 2 veces) y después con salmuera (500 mL), después son secadas sobre MgSO_4 , filtradas y concentradas en un evaporador rotativo para proporcionar 33 g de un residuo sólido de color marrón. El residuo sólido es purificado con una cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con un gradiente de elución de AcOEt/ciclohexano de 3:7 a 1:1 para recuperar 21,4 g de un polvo de color amarillo con un rendimiento del 47 %.
- 15 RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 0,97 (t, 3H, $J = 6,2$ Hz, $-\text{CH}_3$), 1,45-1,76 (m, 8H, cadena de $-\text{CH}_2-$ heptilo), 2,19-2,26 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 3,5 (dd, 4H, $J = 6,2$ Hz y $J = 13,8$ Hz, puentes $-\text{CH}_2-$), 3,59 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{CN}$), 3,6 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CN}$), 4,2 (t, 2H, $J = 7$ Hz, OCH_2-), 4,28-4,44 (dd, 4H, $J = 13,2$ Hz y $J = 18,6$ Hz, puentes $-\text{CH}_2-$), 6,93-7,3 (m, 9H, CH_{Ar}), 9,5 (s, 2H, ArOH), 9,75 (s, 1H, ArOH).
- 20 RMN ^{13}C (CDCl_3); δ (ppm): 14,1 ($-\text{CH}_3$), 22,6 ($-\text{CH}_2-\text{CN}$), 22,8, 25,8, 29,1, 29,9 (cadena de $-\text{CH}_2-$ alquilo), 31,4, 32,0 (puentes $-\text{CH}_2-$), 77,5 (ArOCH_2-), 118,3 ($-\text{C}\equiv\text{N}$), 122,1, 123,2 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CH}_2-\text{CN}$), 126,4, 128,3, 128,5, 128,7, 129,4, 129,5, 133,9 (CH_{Ar}), 149,2, 150,6 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OH}$), 151,5 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OCH}_2-$).
- 25 Espectro de masas de IEN para $\text{C}_{41}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_4(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 1:1, \text{HCOOH al } 1 \%)$; Calculado: 424,2; Encontrado: $m/z = 662,1 [\text{M}+\text{Na}]^+$.

d) Síntesis de 5,11,17-tris-[(carboxilato)metil]-25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno (12)

- La síntesis del compuesto **12** se realiza como se ha descrito en la referencia de Suwinska, K. et al., "Trianionic calix[4]arene monoalkoxy derivatives: synthesis, solid-state structures and self-assembly properties", *New J. Chem.*, 2008, 32, 1988-1998 y las siguientes modificaciones: En un matraz PFA de 500 mL se introducen 21,4 g de 5,11,17-tris-[(ciano)metil]-25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno **11** (33,45 mmol) y son solubilizados con 300 mL de mezcla EtOH/THF (5:1); después se añaden 120 mL de una solución acuosa de KOH 3 M. La mezcla de reacción es calentada a reflujo con una agitación vigorosa. Después de 48 horas, la mezcla de reacción es enfriada a temperatura ambiente y la solución es vertida en un matraz Erlenmeyer de 2 L que contiene 800 mL de una solución acuosa helada de HCl 1 N. La suspensión de color amarillo es extraída con CH_2Cl_2 (200 mL, 3 veces). Las fases orgánicas son recogidas, secadas sobre MgSO_4 , filtradas y concentradas en un evaporador rotativo para recuperar 24,4 g de un polvo de color amarillo. El residuo es purificado mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con un gradiente de elución con AcOH/MeOH/ CH_2Cl_2 de 1:2:97 a 1:6:93 para producir 20,4 g de un polvo de color crema después de secar a presión reducida. El residuo es solubilizado con 1 L de éter y es lavado con agua (200 mL, 10 veces) para retirar las trazas de ácido acético. La fase orgánica es secada sobre MgSO_4 , es filtrada y se concentra en un evaporador rotativo. El residuo es secado durante la noche en un desecador a presión reducida para recuperar 17,9 g de un polvo de color blanco con un rendimiento del 77 %.
- 30 RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 0,97 (t, 3H, $J = 6,2$ Hz, $-\text{CH}_3$), 1,43-1,69 (m, 8H, cadena de $-\text{CH}_2-$ heptilo), 2,18 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 3,42 (m, 10H, puentes $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 4,16-4,37 (m, 6H, puentes OCH_2- y $-\text{CH}_2-$), 6,89-7,1 (m, 9H, CH_{Ar}), 9,44 (s, 2H, ArOH), 9,69 (s, 1H, ArOH).
- 35 RMN ^{13}C (CDCl_3); δ (ppm): 14,1 ($-\text{CH}_3$), 22,7, 25,9, 29,4, 29,9 (cadena de $-\text{CH}_2-$ alquilo), 31,5, 32,0 (puentes $-\text{CH}_2-$), 40,2 ($-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$), 76,7 (ArOCH_2-), 125,4, 126,2 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$), 126,5, 128,4, 128,5, 128,8, 129,5, 129,7, 134,0 (CH_{Ar}), 148,5, 150,1 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OH}$), 151,5 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OCH}_2-$), 177,9 ($-\text{CO}_2\text{H}$).
- 40 Espectro de masas de IEN para $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{O}_{10}(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 1:1, \text{HCOOH al } 1 \%)$; Calculado: 696,3; Encontrado: $m/z = 719,2 [\text{M}+\text{Na}]^+$, 741,2 $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$, 763,1 $[\text{M}+3\text{Na}-2\text{H}]^+$ y 785,0 $[\text{M}+4\text{Na}-3\text{H}]^+$.

e) Síntesis de éster de 25-heptiloxi-26,27,28-trismetoxicalix-[4]-areno-5,11,17-trisacetato de metilo (13)

- 55 En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 100 mL son introducidos 5 g de 5,11,17-tris-[(carboxilato)metil]-25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno **12** (7,18 mmol), después son disueltos con 50 mL de DMF. El sistema es purgado burbujeando nitrógeno a través de la mezcla de reacción y son añadidas pequeñas porciones de 2,07 g de hidruro de sodio al 60 % p/p en aceite mineral (51,7 mmol) durante un período de 5 minutos. Después, se añaden 9,8 mL de yodometano (157,4 mmol) a la solución de color amarillo durante un período de 10 minutos y la mezcla de reacción es agitada a temperatura ambiente en un flujo de nitrógeno. El progreso de la reacción es controlado mediante CCF con eluyente AcOEt/ciclohexano (3:7). Después de 16 horas de reacción, la mezcla de reacción es vertida en 500 mL de agua y la fase acuosa es extraída con CH_2Cl_2 (200 mL, 3 veces). Las fases orgánicas son recogidas y lavadas con agua (200 mL, 2 veces) y después con 200 mL de salmuera. La fase orgánica es secada sobre MgSO_4 , filtrada y concentrada en un evaporador rotativo para recuperar 15,5 g de un líquido de color amarillo. El residuo es purificado mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con un eluyente AcOEt/ciclohexano (2:8) para proporcionar 3,85 g de un polvo de color
- 60
- 65

amarillo con un rendimiento del 75 %.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 0,91 (t, 3H, J = 6,63 Hz, -CH₃), 1,25-1,56 (m, 8H, cadena de -CH₂-heptilo), 1,86-1,91 (m, 2H, -CH₂-CH₃), 3,0 (s, 2H, -CH₂-CO₂Me), 3,04-3,34 (m, 5H, puentes -CH₂-), 3,54-3,73 (m, 22H, 2x -CH₂-CO₂Me, 3x -CO₂CH₃, ArO-CH₂-, puentes -CH₂-, 2x 2x ArO-CH₃), 3,87 (s, 3H, ArO-CH₃), 4,04 (t, J = 15 Hz, 1H), 4,32 (t, J = 15 Hz, 1H, puentes -CH₂-), 6,05-6,53 (m, 3H, calixareno CH_{Ar}), 6,75-7,33 (m, 6H, calixareno CH_{Ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃); δ (ppm): 14,1 (-CH₃), 22,7, 26,4, 29,2, 29,3 (cadena de -CH₂- alquilo), 30,5 (puentes -CH₂-), 30,7, 31,9 (cadena de -CH₂- alquilo), 35,9, 40,6 (-CH₂-CO₂Me), 40,8 (puentes -CH₂-), 51,8, 52,0 (-CO₂CH₃), 59,5, 60,7 (ArO-CH₃), δ 74,2, 75,2 (ArO-CH₂-), 121,5, 126,4 (C_{Ar}-CH₂-), 127,2-137,0 (CH_{Ar}), 156,0-157,9 (C_{Ar}-OMe, C_{Ar}-OCH₂-), 172,5, 172,6 (-CO₂Me).

Espectro de masas de IEN para C₄₇H₅₆O₁₀ (CHCl₃/MeOH 1:1, HCOOH al 1 %); Calculado: 780,4; Encontrado: m/z = 781,4 [M+H]⁺, 803,3 [M+Na]⁺ y 819,4 [M+K]⁺.

f) Síntesis de 5,11,17-tris-(2-hidroxietil)-25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno (3)

En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL son introducidas 3,85 g de éster de 25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno-5,11,17-tris-(acetato de etilo) **13** (4,93 mmol), después son disueltos con 150 ml de THF. El sistema se purga burbujeando nitrógeno a través de la mezcla de reacción y se le añaden pequeñas porciones de 681 mg de LiAlH₄ (17,94 mmol). La suspensión resultante es agitada a temperatura ambiente en un flujo de nitrógeno. El progreso de la reacción es controlado mediante CCF con eluyente AcOEt/ciclohexano (3:7). Después de 2 horas de reacción, la mezcla de reacción es vertida en 200 mL de una solución helada de HCl 1 N y la suspensión es extraída con CH₂Cl₂ (150 mL, 3 veces). Las fases orgánicas son recogidas, secadas sobre MgSO₄, filtradas y concentradas en un evaporador rotativo para recuperar 4 g de un polvo de color blanco después de secar a presión reducida. El residuo es purificado mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente de elución con AcOEt/ciclohexano de 6:4 a 7:3 para proporcionar 2,63 g de un polvo de color blanco con un rendimiento del 76 %.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 0,91 (t, J = 6,2 Hz, 3H), 1,25-1,62 (m, 8H, cadena de -CH₂-heptilo), 1,71-2,04 (m, 5H, ArOCH₂-CH₂-, 3x -CH₂-OH), 2,36 (t, J = 15 Hz, 1H, puentes -CH₂-), 2,52 (t, J = 15 Hz, 1H, puentes -CH₂-), 2,68 (s a, 1H, puentes -CH₂-), 2,8-2,87 (m, 3H, puentes -CH₂-, -CH₂-OH), 3,01-3,19 (m, 6H, 2x-CH₂-OH, puentes -CH₂-), 3,44-3,95 (m, 17H, 3x ArCH₂-, 3x ArO-CH₃, ArO-CH₂-), 3,99-4,08 (m, 1H, puentes -CH₂-), 4,35 (d, J = 13,8 Hz, 1H, puentes -CH₂-), 6,17 (d, 1H, J = 5 Hz, calixareno CH_{Ar}), 6,36-6,58 (m, 2H, calixareno CH_{Ar}), 6,77-7,19 (m, 6H, calixareno CH_{Ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃); δ (ppm): 14,1 (-CH₃), 22,6, 26,3, 29,3 (cadena de -CH₂- alquilo), 30,2, 30,6, 30,8 (puentes -CH₂-), 31,9 (cadena de -CH₂- alquilo), 36,2, 36,5 (Ar-CH₂-), 38,1, 38,4, 38,7 (puentes -CH₂-), 59,0, 59,7, 61,2 (ArO-CH₃), 63,4, 63,6, 63,9 (-CH₂-OH), 73,2, 74,5 (ArO-CH₂-), 122,3 (C_{Ar}-CH₂-), 127,0-136,8 (CH_{Ar}), 155,7-156,8 (C_{Ar}-OMe, C_{Ar}-OCH₂-).

Espectro de masas de IEN para C₄₄H₅₅O₇ (CHCl₃/MeOH 1:1, HCOOH al 1 %); calculado: 696,4; Encontrado: m/z = 697,4 [M+H]⁺ y 719,2 [M+Na]⁺.

g) Síntesis de 5,11,17-Tris[2-(β-D-galactopiranosiloxi)etil]-25-heptoxi-26,27,28-trismetoxi-calix[4]areno (CALX173GALO = 5)

La síntesis del compuesto de CALX173GALO es realizada mediante un procedimiento de glucosilación descrito en la referencia "Dondoni, A. et al, "Synthesis and Properties of O-Glycosyl Calix[4]Arenes (Calixsugars)", *Chem. Eur. J.*, 1997, 3, 1774-1782 y las siguientes modificaciones: En un matraz de fondo redondo de 100 mL, son introducidos 372 mg de 5,11,17-Tris-(2-hidroxietil)-25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno **3** (0,534 mmol) y se destilan azeotrópicamente en tolueno (10 mL, 3 veces) en un evaporador rotativo. De la misma manera, se pesan 2,05 g de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-1-tio-β-D-galactopiranosido **2** (3,3 mmol) en otro matraz y se destilan azeotrópicamente en tolueno (20 mL, 3 veces) en un evaporador rotativo. Los polvos residuales se secan en un desecador durante la noche. La cantidad de compuesto seco **2** es dividida en tres fracciones iguales (aproximadamente 685 mg, 1,1 mmol). En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 25 mL es introducido el compuesto **3** seco y el sistema es purgado con argón. El compuesto seco **3** es disuelto con 8 mL de acetonitrilo recién destilado y son añadidos tamices moleculares 3A activados mientras se burbujea argón a través de la suspensión. La mezcla de reacción es agitada durante 15 minutos en una corriente de argón y después es añadida una fracción de compuesto **2**. El medio heterogéneo es sometido a ultrasonidos 1 minuto en un baño ultrasónico con el flujo de argón. Después de 15 minutos, son añadidos 401 mg de triflato de cobre (II) (1,1 mmol) y tamiz molecular 3A. El medio heterogéneo de color verde es sometido a ultrasonidos durante 1 minuto en un baño ultrasónico y es continuado el flujo con argón. Cada 15 minutos, sucesivamente son añadidos 1,1 mmol de **2**, 1,1 mmol de triflato de cobre (II) y tamiz molecular 3A, y la mezcla de reacción es sometida a ultrasonidos durante 1 minuto en un baño ultrasónico. Esta operación se repite dos veces y la reacción continúa a temperatura ambiente en un flujo de argón.

Después de 30 minutos, la reacción se completa de acuerdo con el control por CCF con eluyente AcOEt/ciclohexano (3:7). Después, son añadidos 10 mL de TEA a la mezcla de reacción, después la suspensión de color marrón oscuro es filtrada a través de Celite y es lavada varias veces con AcOEt, y es concentrada en un evaporador rotativo, después es secada al vacío reducido para recuperar 6,28 g de un residuo de color marrón. El residuo se disuelve con una cantidad mínima de AcOEt y se hace pasar a través de una capa de gel de sílice (dxh, 10x5 cm²) y se eluye con AcOEt (150 mL, 3 veces). El filtrado es concentrado en un evaporador rotativo para proporcionar 3,42 g un residuo de polvo de color amarillo. El residuo es purificado mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con un

gradiente de elución de AcOEt/ciclohexano de 25:75 a 3:7 y produce 729 mg de un polvo de color amarillo. El residuo se purifica mediante cromatografía de exclusión por tamaño en Sephadex LH-20 con una mezcla de MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) para proporcionar 341 mg de un polvo de color amarillo. El polvo es disuelto en 10 mL de una mezcla de disolventes destilados MeOH/CH₂Cl₂ (1:1). La mezcla de reacción es purgada con argón y añadida una cantidad catalítica de metóxido de sodio para obtener un pH de 10-12 en la mezcla de reacción. La reacción es controlada mediante CCF con un eluyente AcOEt/iPrOH/H₂O (5:3:2). Después de 20 h, el medio es neutralizado con Amberlite IR-120 (H⁺) y después la solución de color rosa es filtrada y concentrada en un evaporador rotativo. El residuo es purificado mediante cromatografía de exclusión por tamaño en Sephadex LH-20 con una mezcla de MeOH/CH₂Cl₂ (1:1). El residuo purificado es disuelto en 5 mL de agua MilliQ® y la muestra congelada es liofilizada. Después de 4 días de liofilización, se recuperan 123 mg de un polvo de color marrón claro (0,104 mmol) con un rendimiento del 20 %.

Espectro de masas por espectrometría de masas de desorción-ionización por láser asistida por matriz/ tiempo de vuelo (MALDI/TOF) para C₆₂H₈₆O₂₂ (matriz DTCH + NaI): Calculado: 1182,6; Encontrado: m/z = 1206,7 [M+Na]⁺.

3.2 Ejemplo 2 (CALX173GLUK)

La siguiente síntesis de múltiples etapas está de acuerdo con la reacción del esquema 3.

a) Síntesis de 5,11,17-tris-(2-azidoetil)-25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno (16)

La síntesis del compuesto **16** es realizado como el procedimiento de Mitsunobu descrito en la Publicación de Dondoni, A. y Marra, A: "*C-Glycoside Clustering on Calix[4]arene, Adamantane, and Benzene Scaffolds through 1,2,3-Triazole Linkers*", *The Journal of Organic Chemistry*, 2006, 71, 7546-7557 y las siguientes modificaciones: En un matraz de fondo redondo de 50 mL con dos bocas son introducidos 3,1 g de 5,11,17-tris-(2-hidroxietil)-25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno **3** (4,45 mmol) y son disueltos con 20 mL de DMF. El sistema es purgado burbujeando nitrógeno a través de la mezcla de reacción, después se añaden 1,78 g de azida de sodio (27,4 mmol), 6 mL de difenilfosforilazida (26,5 mmol) y 2 mL de 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-eno (13,4 mmol). La mezcla de reacción es agitada vigorosamente a 120 °C en un flujo de nitrógeno durante 22 horas. El progreso de la reacción es controlada mediante CCF con eluyente AcOEt/ciclohexano (7:3). La reacción de color marrón es enfriada a temperatura ambiente y después la mezcla es vertida en 200 mL de agua helada. La mezcla de reacción es extraída con CH₂Cl₂ (100 mL, 3 veces). Las fases orgánicas son recogidas, lavadas con H₂O (100 mL, 2 veces) y salmuera (100 mL), secadas sobre MgSO₄, filtradas y concentradas en un evaporador rotativo para recuperar un líquido de color marrón después de secar a presión reducida. El residuo es purificado mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con un eluyente AcOEt/ciclohexano 5:95 para proporcionar 2,73 g de un aceite incoloro con un rendimiento del 80 %.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 0,92 (t, J = 6,4 Hz, 3H, -CH₃), 1,12-1,72 (m, 8H, cadena de -CH₂-heptilo), 1,87-1,90 (m, 2H, ArOCH₂-CH₂-), 2,29 (t, J = 10 Hz, 1H, puentes -CH₂-), 2,42-2,61 (m, 1H, puentes -CH₂-), 2,79 (t, J = 10 Hz, 1H, puentes -CH₂-), 2,83-3,21 (m, 9H, 3x -CH₂-N₃, puentes -CH₂-), 3,46-3,94 (m, 17H, 3x ArO-CH₃, ArO-CH₂-, 3x Ar-CH₂-), 4,05 (d, J = 10 Hz, 1H, puentes -CH₂-), 4,28-4,4 (m, 1H, puentes -CH₂-), 6,02-6,56 (m, 3H, calixareno CH_{Ar}), 6,72-7,18 (m, 6H, calixareno CH_{Ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃); δ (ppm): 14,1 (-CH₃), 22,6, 26,3, 29,3 (cadena de -CH₂- alquilo), 30,5, 30,6, 30,8 (puentes -CH₂-), 31,9 (cadena de -CH₂- alquilo), 34,2, 34,4, 34,7 (puentes -CH₂-), 35,8, 36,0 (Ar-CH₂-), 52,8, 52,9, 53,0 (-CH₂-N₃), 58,9, 59,6 (puentes -CH₂-), 60,8, 61,0, 62,4 (ArO-CH₃), 74,2, 75,3 (ArO-CH₂-), 121,6, 121,9 (C_{Ar}-CH₂-), 127,2-137,0 (CH_{Ar}), 155,9-157,7 (C_{Ar}-OMe, C_{Ar}-OCH₂-).

Espectro de masas de IEN para C₄₄H₅₃NgO₄ (CHCl₃/MeOH 1:1, HCOOH al 1 %); Calculado: 771,4; Observado: m/z = 794,5 [M+Na]⁺.

b) Síntesis de 5,11,17-Tris[2-[4-(β-D-glucopiranosil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-etil]-25-heptoxi-26,27,28-trismetoxicalix[4]areno (CAL173GLUK = 18)

La síntesis del compuesto de CALX173GLUK es realizado como el procedimiento CuAAC descrito en la publicación de Dondoni, A. y Marra, A: "*C-Glycoside Clustering on Calix[4]arene, Adamantane, and Benzene Scaffolds through 1,2,3-Triazole Linkers*", *The Journal of Organic Chemistry*, 2006, 71, 7546-7557 y las siguientes modificaciones: En un fondo redondo de 100 mL son introducidos 2,73 g de 5,11,17-tris-(2-azidoetil)-25-heptiloxi-26,27,28-trishidroxicalix-[4]-areno **16** (3,54 mmol) y son disueltos con 50 mL de DMF anhidro. El sistema es purgado burbujeando nitrógeno a través de la mezcla de reacción y son añadidos tamices moleculares 4A activados. Después, la suspensión es agitado 5 minutos en un flujo de argón, después son añadidos 6,13 g de propargil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranososa **15** (15,87 mmol), 4,8 mL de DIEA destilada (27,56 mmol) y 498 mg de CuI (2,61 mmol) en este orden. La mezcla de reacción es sometida a ultrasonidos durante un minuto. La mezcla de reacción es protegida de la luz y es agitada a temperatura ambiente en un flujo de argón. El progreso de la reacción es controlado mediante CCF con eluyente AcOEt/ciclohexano (5:95). Después de 24 h, la suspensión de color naranja se filtra a través de Celite y es lavada con AcOEt (100 mL, 3 veces). El filtrado es lavado con agua destilada (500 mL), una solución de fosfato de sodio 1 M pH 7 (100 mL, 2 veces) y salmuera (100 mL). La fase orgánica es secada sobre MgSO₄, filtrada y concentrada en un evaporador rotativo para recuperar 9,27 g de un polvo de color marrón después de secar a presión reducida. El residuo es purificado mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con una elución en gradiente de AcOEt/ciclohexano de 95:5 a AcOEt puro y es obtenido 6,76 g de un polvo de color

amarillo. El residuo es purificado mediante cromatografía de exclusión por tamaño en Sephadex LH-20 con una mezcla de MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) para proporcionar 5,35 g de un polvo de color marrón claro. El residuo es disuelto en 50 mL de MeOH recién destilado. La mezcla de reacción es purgada con argón y se le añade una cantidad catalítica de metóxido de sodio para obtener un pH de 10-12 en la mezcla de reacción. La reacción se es controlada mediante CCF con un eluyente AcOEt/MeOH/H₂O (7:2:1). Después de 16 h, el medio es neutralizado con Amberlite IR-120 (H⁺), la solución de color amarillo es filtrada y concentrada en un evaporador rotativo para recuperar 4,73 g de un polvo de color amarillo después de secar a presión reducida. El residuo es purificado mediante cromatografía de exclusión por tamaño en Sephadex LH-20 con una mezcla de MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) para proporcionar 4,64 g de un polvo de color marrón claro. El residuo es disuelto en 60 mL de agua MilliQ® y la muestra congelada es liofilizada. Después de 4 días de liofilización, se recuperan 3,61 g de un polvo de color blanco (2,53 mmol) con un rendimiento del 71 %. Espectro de masas MALDI/TOF para C₇₁H₉₅N₉O₂₂ (matriz DTCB + NaI); Calculado: 1426,6; Encontrado: m/z = 1448,1 [M+Na]⁺ y [M+K] 1464,7.

3.3 Propiedades de CALX173GALO y CALX173GLUK

a) Propiedades tensioactivas de CALX173GALO y CALX173GLUK

Como muestra la Figura 2, CALX173GALO y CALX173GLUK se comportan como detergentes con una Concentración Micelar Crítica (CMC) la cual puede variar de 0,02 mM a 0,15 mM. Se entiende que la Concentración Micelar Crítica (CMC) significa la concentración más allá de la cual la concentración de las moléculas de detergente ya no aumenta puesto que dichas moléculas están implicadas en las micelas.

b) Tamaño de los agregados (Figuras 3a y 3b)

Las Figuras 3a y 3b muestran el estado de agregación de CALX173GALO y CALX173GLUK. Como se ilustra, todos los sistemas observados forman agregados del tipo micelar.

$d_{partículas}$ (CALX173GALO) = 5,46 nm

$d_{partículas}$ (CALX173GLUK) = 5,53 nm

c) Mediciones de fluorescencia

Se registraron espectros de emisión de fluorescencia de compuestos de calixareno sintetizados que contenían 20 µM de pireno usando una longitud de onda de excitación de 335 nm y las intensidades I₁ e I₃ se midieron a las longitudes de onda que correspondían a las bandas vibratorias primera y tercera ubicadas cerca de 373 y 384 nm. La relación I₁/I₃ es la denominada relación 1:3 de pireno.

d) Capacidad de Solubilización de Membranas Biológicas de CALX173GALO y CALX173GLUK

- Ensayo de solubilidad de proteína de interés: Adenosina A_{2A}.

El contenido de proteína se ajustó a 20 mg/ml (Tris-Cl 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, glicerol al 10 %). La solubilización es efectuada a 4 °C. Las fracciones proteínicas solubilizadas o no solubilizadas son separadas mediante una etapa de centrifugación de 100 000 g durante 1 hora a 4 °C.

Las Figuras 4a) y 4b) muestran el ensayo de solubilización de proteínas de membrana enriquecidas en proteína de adenosina A_{2A} con calixarenos CALX173GALO (Transferencia Western "C") y CALX173GLUK (Transferencia Western "D" y "E") de la presente invención, y también detergentes conocidos, por ejemplo, n-dodecil-β-D-maltopiranosido (denominado DDM, Transferencia Western "A") y sal de sodio de 25-heptiloxi-26,27,28-tris(hidroxil)calix-[4]-areno-5,11,17-tris(ácido acético) (denominada en el presente documento "CALX173ACE", Transferencia Western "B").

La solubilidad de la proteína de adenosina A_{2A} es parcial con DDM, CALX173GALO y CALX173ACE a 20 CMC y no existe con CALX173GLUK a 8 CMC. Parece que la solubilización de la proteína A_{2A} es mejor con CALX173GALO que los compuestos de referencia, es decir, DDM y CALX173ACE (aproximadamente el 20 %). El uso de CALX173GLUK a 20 CMC potencia la solubilización de la proteína A_{2A}.

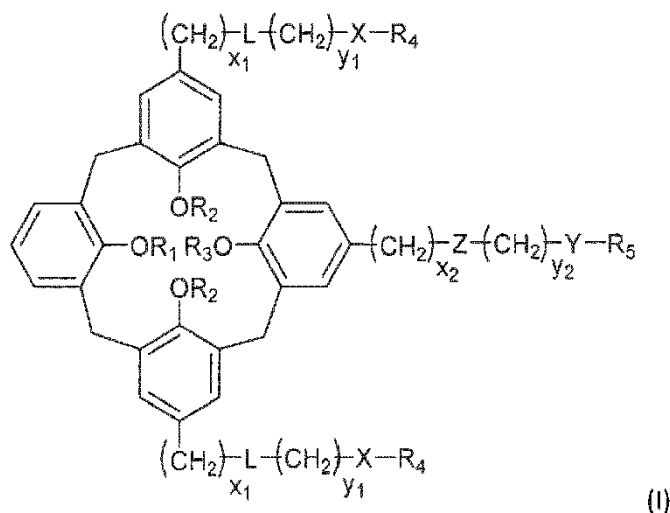
- Ensayo de estabilidad de la proteína de interés: Proteína bacteriorrodopsina (bR).

El estudio de estabilización de la proteína bR fue realizado durante varios meses, a temperatura ambiente y a 37 °C, con siete condiciones de estabilización para la proteína bR mediante el uso de diferentes estabilizadores anfífilos que han demostrado su interés en la bibliografía; La Figura 5 muestra el efecto de la estabilización de la proteína de membrana bR a lo largo del tiempo a temperatura ambiente y después a 37 °C en diversas condiciones de detergente: Octil glucósido (OG), CALX173ACE, CALX173GALO, CALX173GLUK, Amphipol A8-35, Anfífilico facial FA-3 y Maltosa-Neopentil Glicol (MNG). El control de la conformación de la proteína mediante la medición característica de la absorbancia a 550 nm muestra que después de 1 mes y medio de exposición de la proteína a 37 °C en la oscuridad (véase la Figura 5):

- CALX173GLUK mantiene la proteína bR en solución en una forma conformacional no agregada a con una absorbancia alta de 0,75;
- los estabilizadores CALX173GALO, A8-35 y MNG-12 tienen un valor de absorbancia de aproximadamente 0,4;
- la estabilidad de la proteína bR es inexistente mediante el uso de los estabilizadores OG y FA-3.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de calixareno de acuerdo con la fórmula (I):



5 en la que:

- R₁ representa un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
- R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;
- R₃ es idéntico al grupo R₁ o R₂;
- R₄ representa un residuo de sacárido, en el que los grupos hidroxilo no están protegidos;
- R₅ es idéntico a R₄ o está ausente;
- L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
- Z es idéntico a L o está ausente;
- 0 ≤ x₁ ≤ 3, en el que x₁ es un número entero;
- 0 ≤ y₁ ≤ 3, en el que y₁ es un número entero;
- x₂ es idéntico a x₁ o igual a 0;
- y₂ es idéntico a y₁ o igual a 0;
- X = O, S o está ausente;
- Y es idéntico a X o está ausente.

20

2. Compuesto de calixareno de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque:**

- R₁ representa un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
- R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;
- R₃ es idéntico al grupo R₁ o R₂;
- R₄ representa un residuo de sacárido, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos, el cual es seleccionado entre el grupo de monosacáridos o disacáridos, y preferiblemente es seleccionado entre el grupo que consiste en glucosilo, manosilo, galactosilo, maltosilo, lactosilo;
- R₅ es idéntico a R₄ o está ausente;
- L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
- Z es idéntico a L o está ausente;
- 0 ≤ x₁ ≤ 3, en el que x₁ es un número entero;
- 0 ≤ y₁ ≤ 3, en el que y₁ es un número entero;
- x₂ es idéntico a x₁ o igual a 0;
- y₂ es idéntico a y₁ o igual a 0;
- X = O, S o está ausente;
- Y es idéntico a X o está ausente.

35

40 3. Compuesto de calixareno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado porque:**

- R₁ representa un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
- R₂, R₃ representan un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;
- R₄, R₅ representan un residuo de sacárido, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos, que se selecciona entre el grupo que consiste en glucosilo, manosilo, galactosilo, maltosilo, lactosilo;

45

ES 2 750 569 T3

- 5
- L, Z son un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
 - $0 \leq x_{1,2} \leq 3$, en el que $x_{1,2}$ son un número entero;
 - $0 \leq y_{1,2} \leq 3$, en el que $y_{1,2}$ son un número entero;
 - X representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente;
 - Y es idéntico a X o está ausente.

4. Compuesto de calixareno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque:

- 10 - R₁ corresponde a un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
- R₂, R₃ son metilo;
- R₄, R₅ representan un residuo de sacárido, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos, que se selecciona entre el grupo que consiste en glucosilo, manosilo, galactosilo, maltosilo, lactosilo;
- 15 - L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;
- Z es idéntico a L o está ausente;
- $0 \leq x_{1,2} \leq 3$, en el que $x_{1,2}$ son un número entero;
- $0 \leq y_{1,2} \leq 3$, en el que $y_{1,2}$ son un número entero;
- 20 - X representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente;
- Y es idéntico a X o está ausente.

5. Compuesto de calixareno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque**

- 25 - R₁ corresponde a un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
 - R₂, R₃ son metilo;
 - R₄, R₅ representan un grupo galactosilo, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
 - L, Z están ausentes;
 - 0 ≤ x_{1,2} ≤ 3, en el que x_{1,2} son un número entero;
 30 - 0 ≤ y_{1,2} ≤ 3, en el que y_{1,2} son un número entero;
 - X representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente;
 - Y es idéntico a X o está ausente.

6. Compuesto de calixareno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque:

- 40
- R₁ corresponde a un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
 - R₂, R₃ son metilo;
 - R₄, R₅ representan un grupo glucosilo, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
 - L, Z son una función 1,2,3-triazol;
 - $0 \leq X_{1,2} \leq 3$, en el que $x_{1,2}$ son un número entero;
 - $0 \leq y_{1,2} \leq 3$, en el que $y_{1,2}$ son un número entero;
 - X representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o está ausente;
 - Y es idéntico a X o está ausente.

7. Compuesto de calixareno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado porque:**

- 50 R₁, R₃ corresponden a un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
- R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;
- R₄ representa un grupo maltosilo, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
- R₅ está ausente;
- L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol,
función amida, función tiourea o está ausente;
- Z está ausente;
- $0 \leq X_1 \leq 3$, en el que x_1 es un número entero;
55 - $0 \leq y_1 \leq 3$, en el que y_1 es un número entero;
- x_2 e y_2 son iguales a 0
- X = O, S o está ausente;
- Y está ausente.

8. Compuesto de calixareno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 7, **caracterizado porque:**

- 65
- R₁, R₃ corresponden a un grupo alquilo C₍₁₋₁₆₎ lineal o ramificado;
 - R₂ representa un metilo;
 - R₄ representa un grupo maltosilo, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
 - R₅ está ausente;
 - L es un enlazador, el cual es seleccionado entre el grupo que consiste en función 1,2,3-triazol, función amida, función tiourea o está ausente;

- Z está ausente;
- $0 \leq x_1 \leq 3$, en el que x_1 es un número entero;
- $0 \leq y_1 \leq 3$, en el que y_1 es un número entero;
- x_2 e y_2 son iguales a 0
- X = O, S o está ausente;
- Y está ausente.

9. Compuesto de calixareno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 7 u 8, **caracterizado porque:**

- R_1, R_3 corresponden a un grupo alquilo $C_{(1-16)}$ lineal o ramificado;
- R_2 representa un metilo;
- R_4 representa un grupo maltosilo, en el cual los grupos hidroxilo no están protegidos;
- R_5 está ausente;
- L es una función 1,2,3-triazol;
- Z está ausente;
- $0 \leq x_1 \leq 3$, en el que x_1 es un número entero;
- $0 \leq y_1 \leq 3$, en el que y_1 es un número entero;
- x_2 e y_2 son iguales a 0
- X = O, S o está ausente;
- Y está ausente.

10. Un método para extraer, solubilizar y/o estabilizar selectivamente proteínas de membrana, que comprende una etapa que consiste en poner en contacto gránulos de membrana que contienen una o más proteínas de membrana que se han de extraer con una solución acuosa que contiene al menos un compuesto de calixareno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9, seleccionándose dicha proteína de membrana preferiblemente entre el grupo que comprende: (a) las proteínas de transporte, preferentemente el transportador de flujo de salida de múltiples fármacos seleccionado entre el grupo que comprende la proteína de resistencia a Acridina B (AcrB) y una bomba de protones del grupo que comprende la bacteriorrodopsina (bR); (b) los canales iónicos, preferiblemente un canal de protones M2 seleccionado entre el grupo que comprende la proteína de matriz 2 del virus de la gripe (M2); o (c) receptores acoplados a proteína G (RAG), preferiblemente receptor de adenosina A_{2A} ; o (d) enzimas; o (e) glucoproteínas.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la etapa de poner en contacto gránulos de membrana que contienen una o más proteínas de membrana que se han de extraer con una solución acuosa que contiene al menos un calixareno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 se efectúa a un pH que varía de 6 a 9 y/o a una temperatura que varía de 4 a 25 °C.

12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que la etapa de poner en contacto gránulos de membrana que contienen una o más proteínas de membrana que se han de extraer con una solución acuosa que contiene al menos un calixareno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 es realizada a una concentración de calixareno que varía de 10^{-6} a 10^{-3} M.

13. Un método para solubilizar y/o estabilizar una proteína de membrana, poniendo en contacto gránulos de membrana que contienen una o más proteínas de membrana que se han de extraer con una solución acuosa que contiene al menos un calixareno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y opcionalmente calentando la proteína de membrana y los gránulos de membrana, formando de este modo una proteína de membrana solubilizada o estabilizada, y preferiblemente un método en el que se usa el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.

14. Un método para estabilizar una proteína de membrana, poniendo en contacto proteínas de membrana solubilizadas o purificadas en solución con una solución acuosa que contiene al menos un calixareno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, formando de este modo una proteína de membrana estabilizada.

15. Un método para producir una solución de proteínas de membrana que comprende la extracción de proteínas de membrana con al menos un compuesto de calixareno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y la separación de dichas proteínas de membrana extraídas con dichos calixarenos, preferiblemente por centrifugación.

Figura 1a)

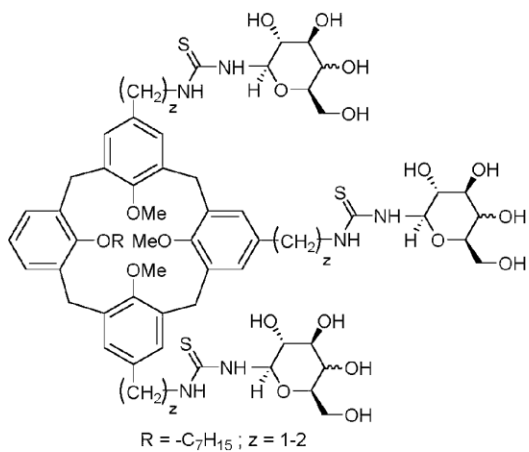


Figura 1b)

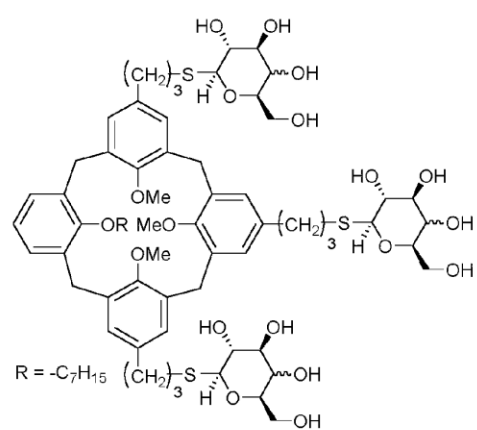


Figura 1c)

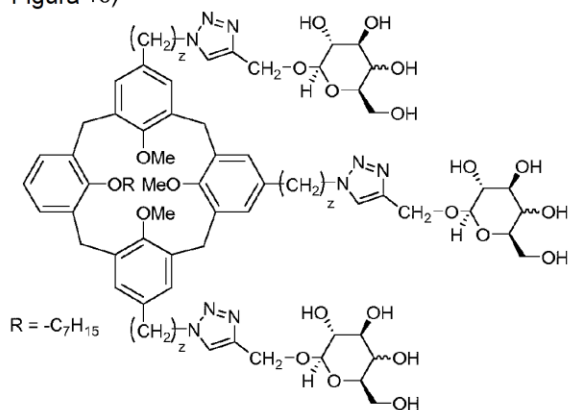


Figura 1d)

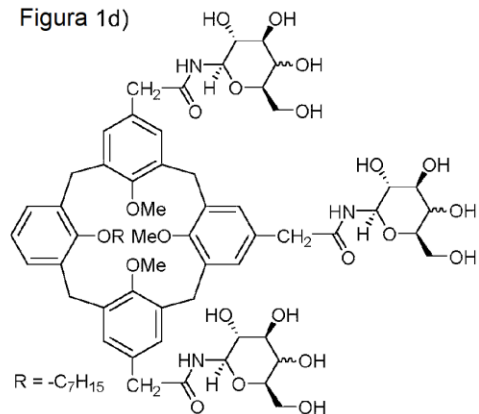


Figura 1e)

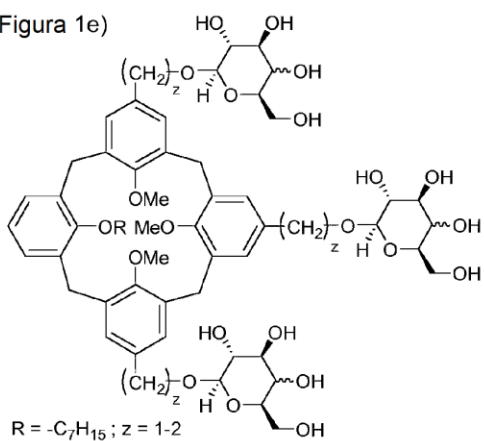
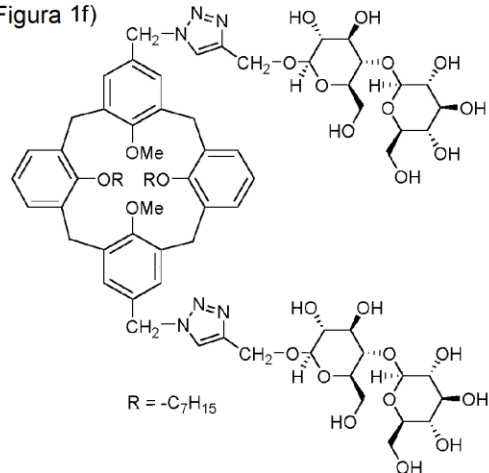


Figura 1f)



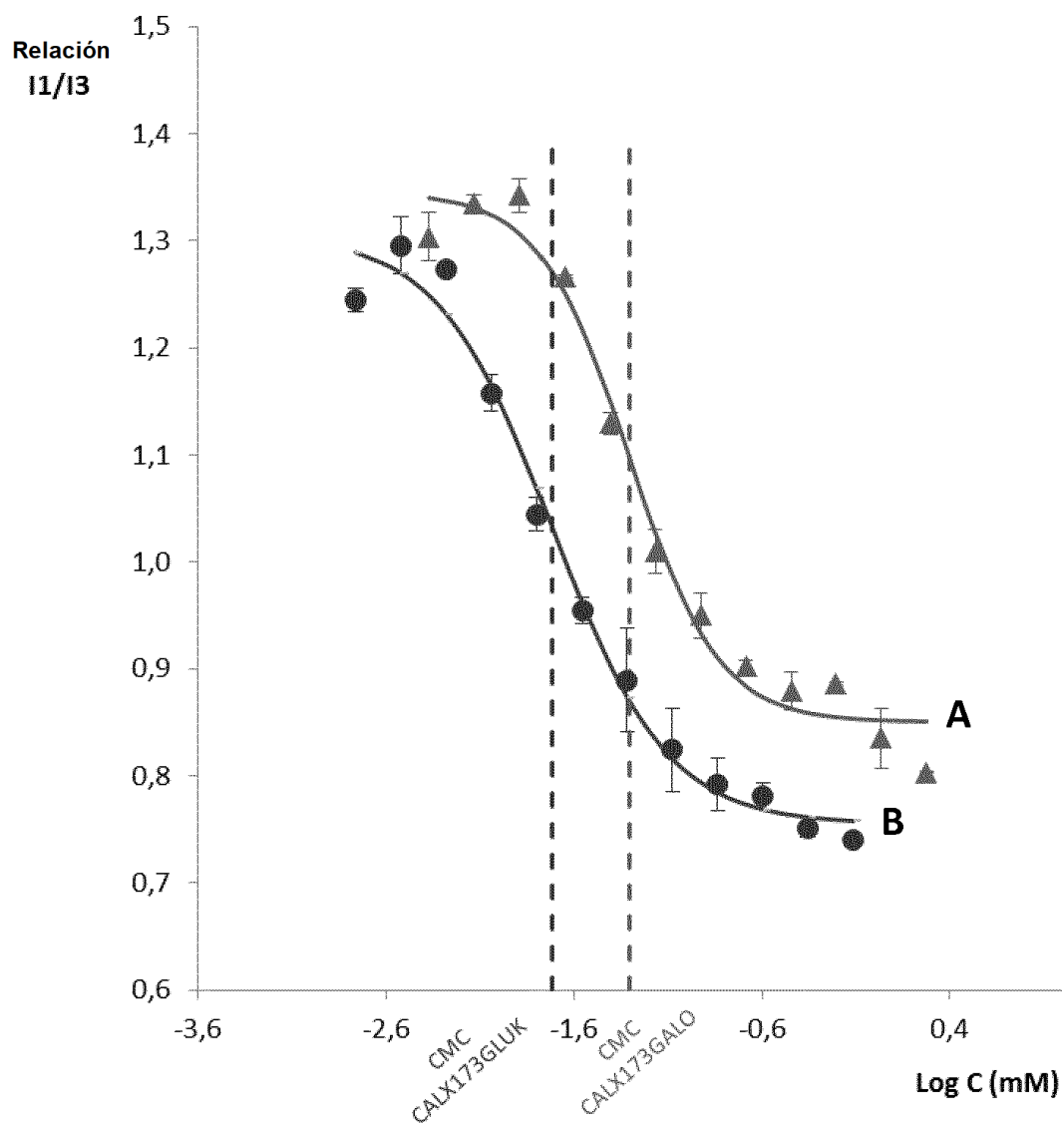


Figura 2

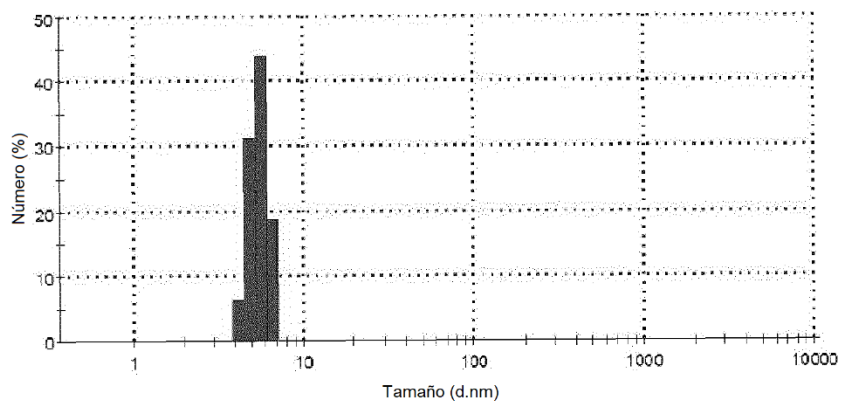


Figura 3a

Gráfico estadístico (1 medición)

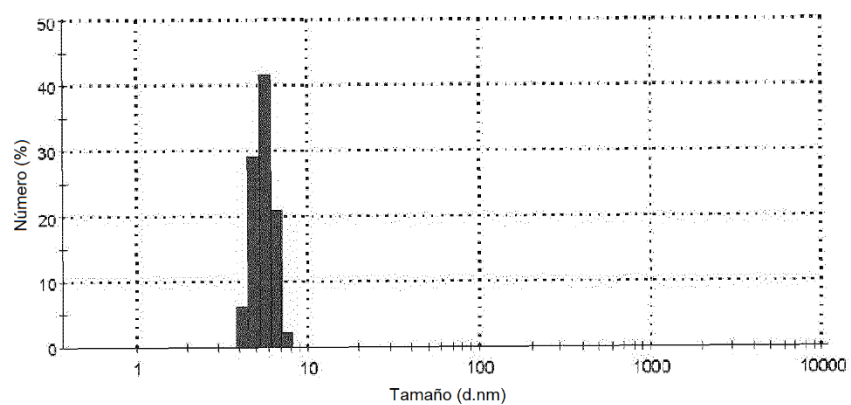
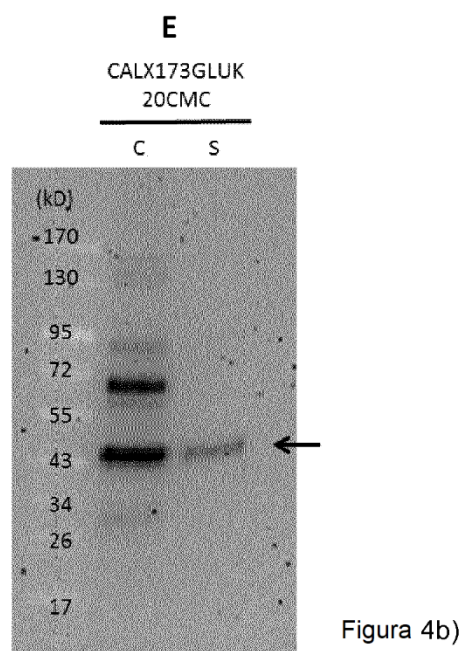
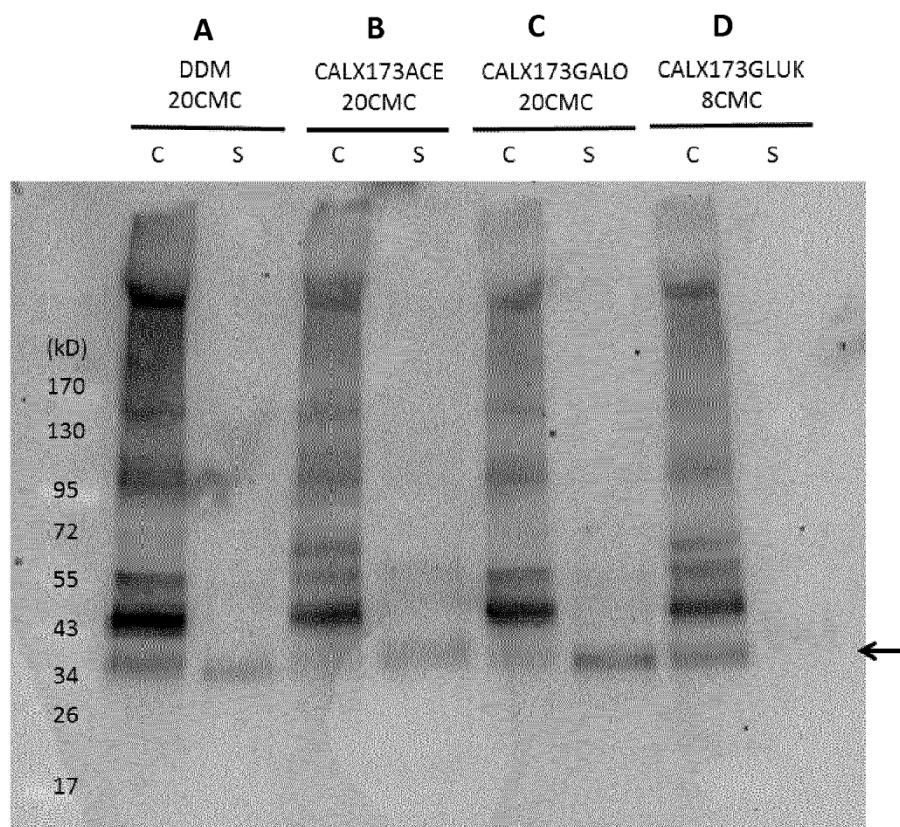


Figura 3b

ES 2 750 569 T3



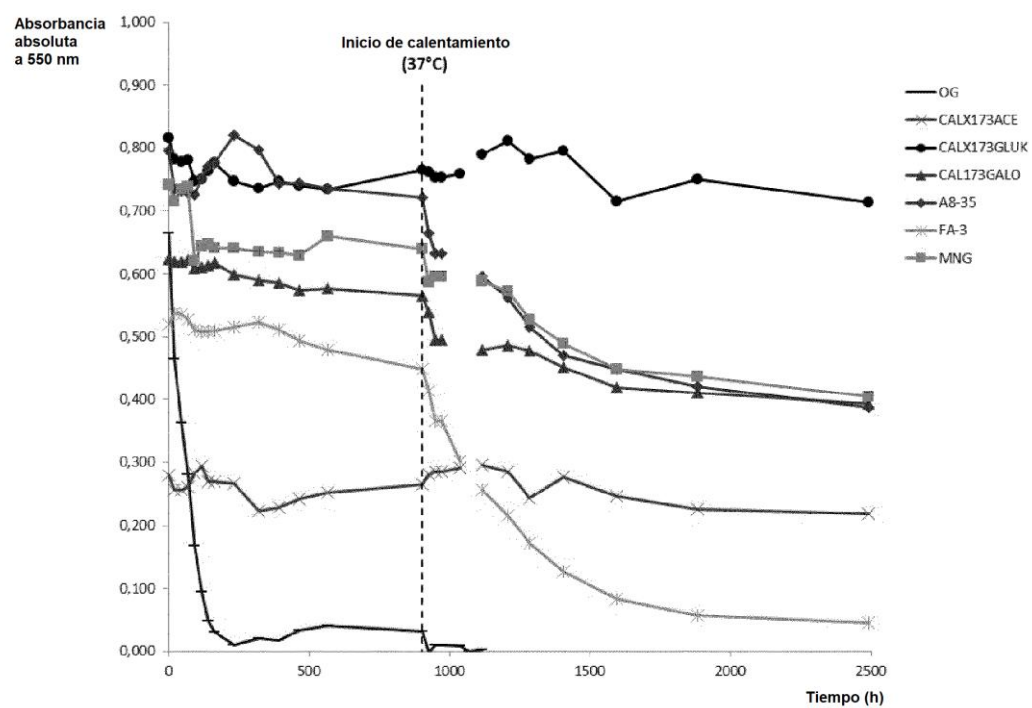


Figura 5

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 20110144314 A1 [0013]
- US 2011144314 A1 [0014]
- US 2012123088 A1 [0014]

Bibliografía no especificada en la descripción de la patente

- **ALMEN, M. S et al.** Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biology*, 2009, vol. 7, 50 [0002]
- **EVA PEBAY-PEYROULA.** Biophysical Analysis of Membrane Proteins. Wiley-VCH Books, 2008 [0002]
- **J. NILSSON et al.** *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, 2005, vol. 60, 606 [0003]
- **JOHN P. OVERINGTON et al.** How many drug targets are there ?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, vol. 5, 993-996 [0003]
- **C. TANFORD.** The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. John Wiley & Sons, Inc, 1973 [0005]
- **LE MAIRE et al.** Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2000, vol. 1508, 86-111 [0008]
- **M. CAFFREY.** Membrane protein crystallization. *J. Structural Biology*, 2003, vol. 142, 108-132 [0009]
- **J.U. BOWIE.** *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001, vol. 11, 397-402 [0009]
- **C. BREYTON et al.** *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 21892-21900 [0009]
- **G.PRIVE.** Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods*, 2007, vol. 41, 388-397 [0010]
- **POPOT, J.-L.** *Annu. Rev Biochem.*, 2010, vol. 79, 737-775 [0013]
- **QINGHAI ZHANG.** Design, Synthesis, and Properties of Branch-Chained Maltoside Detergents for Stabilization and Crystallization of Integral Membrane Proteins: Human Connexin 26. *Langmuir*, 2010, vol. 26 (11), 8690-8696 [0013]
- **BAZZACCO, P. et al.** Trapping and Stabilization of Integral Membrane Proteins by Hydrophobically Grafted Glucose-Based Telomers. *Biomacromolecules*, 2009, vol. 10, 3317-3326 [0013]
- **BREYTON, C. et al.** Micellar and biochemical properties of (hemi)fluorinated surfactants are controlled by the size of the polar head. *Biophys. J.*, 2009, vol. 97, 1077-1086 [0013]
- **CHAE, P. S et al.** *ChemBioChem*, 2008, vol. 9, 1706-9 [0013]
- **LEE, S. C. et al.** Steroid-based facial amphiphiles for stabilization and crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2013 [0013]
- **CHAE, PS et al.** *J Am. Chem. Soc.*, 2010, vol. 132, 16750-16752 [0013]
- **PIL SEOK CHAE et al.** Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nature Methods*, 2010, vol. 7, 1003-1008 [0013]
- **CHAE, P. S. et al.** Glucose-Neopentyl Glycol (GNG) amphiphiles for membrane protein study. *Chem. Commun.*, 2013, vol. 49, 2287-2289 [0013]
- **CHAE, P. S. et al.** Carbohydrate-containing Triton X-100 analogues for membrane protein solubilization and stabilization. *Mol. BioSyst.*, 2013, vol. 9, 626 [0013]
- **CHAE, P. S. et al.** A New Class of Amphiphiles Bearing Rigid Hydrophobic Groups for Solubilization and Stabilization of Membrane Proteins. *Eur. J. Chem.*, 2012, vol. 18, 9485-9490 [0013]
- **MATAR-MERHEB, R. et al.** Structuring Detergents for Extracting and Stabilizing Functional Membrane Proteins. *Plos One*, 2011, 6 [0013]
- **C.D. GUTSCHE.** Calixarenes. *Accounts of Chemical Research*, 1983, vol. 16, 161-170 [0014]
- **VON HEIJNE, G.** Membrane protein structure prediction: Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Molecular Biology*, 1992, vol. 225, 487-494 [0015]
- **HONG, H. et al.** Role of Aromatic Side Chains in the Folding and Thermodynamic Stability of Integral Membrane Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, vol. 129, 8320-8327 [0015]
- **A. JAWHARI. et al.** Native and full length membrane protein isolation for Drug Discovery. *12th annual Drug Discovery on Target Conference*, September 2013 [0017]
- **VANAKEN, T. et al.** Alkyl glycoside detergents: synthesis and applications to the study of membrane proteins. *Meth. Enzymol.*, 1986, vol. 125, 27-35 [0043]

- **DONDONI, A. et al.**, Synthesis and Properties of O-Glycosyl Calix[4]Arenes (Calixsugars). *Chem. Eur. J.*, 1997, vol. 3, 1774-1782 [0054]
- **CHEMICAL ABSTRACTS**, 98-54-4 [0054]
- **MEREYALA, H.B. ; GURRALA, S.R.** *Carbohydr. Res.*, 1998, vol. 307, 351-354 [0058]
- **GUTSCHE CD et al.** Calixarenes. 4. The synthesis, characterization, and properties of the calixarenes from p-tert-butylphenol. *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, vol. 103, 3782-3792 [0076]
- **GUTSCHE, C. D. ; LEVINE, J. A.** Calixarenes. 6. Synthesis of a functionalizable calix-[4]-arene in a conformational rigid cone conformation. *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, vol. 104, 2652-2653 [0077]
- **SUWINSKA, K. et al.** Trianionic calix[4]arene monoalkoxy derivatives: synthesis, solid-state structures and self-assembly properties. *New J. Chem.*, 2008, vol. 32, 1988-1998 [0078] [0081]
- **DONDONI, A. et al.** Synthesis and Properties of O-Glycosyl Calix[4]Arenes (Calixsugars). *Chem. Eur. J.*, 1997, vol. 3, 1774-1782 [0084]
- **DONDONI, A. ; MARRA, A.** C-Glycoside Clustering on Calix[4]arene, Adamantane, and Benzene Scaffolds through 1,2,3-Triazole Linkers. *The Journal of Organic Chemistry*, 2006, vol. 71, 7546-7557 [0086]
- **DONDONI, A. ; MARRA, A.** C-Glycoside Clustering on Calix[4]arene, Adamantane, and Benzene Scaffolds through 1,2,3-Triazole Linkers. *The Journal of Organic Chemistry*, 2006, 7546-7557 [0087]