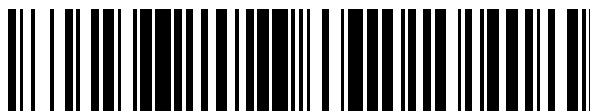


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 339**

51 Int. Cl.:

C07D 311/62 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2005 PCT/CN2005/001262**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2006 WO06017981**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2005 E 05779886 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 1778663**

54 Título: **Derivados de galato de (-)-epigallocatequina para inhibir el proteasoma**

30 Prioridad:

19.08.2004 US 921332
04.02.2005 US 649569 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2018

73 Titular/es:

THE HONG KONG POLYTECHNIC UNIVERSITY (25.0%)
HUNG HOM, KOWLOON
HONG KONG, CN;
WAYNE STATE UNIVERSITY (25.0%);
UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA (25.0%) y
MCGILL UNIVERSITY (25.0%)

72 Inventor/es:

CHAN, TAK-HANG;
LAM, WAI-HAR;
CHOW, LARRY MING-CHEUNG;
DOU, QING PING,;
KUHN, DEBORAH, JOYCE;
KAZI, ASLAMUZZAMAN,;
WAN, SHENG BIAO y
LANDIS-PIWOWAR, KRISTIN, R.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 660 339 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

Derivados de galato de (-)-epigallocatequina para inhibir el proteasoma

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a derivados de galato de (-)-epigallocatequina, particularmente para uso como inhibidores del proteasoma y/o para la inhibición del crecimiento de células cancerosas.

Antecedentes de la invención

10 Los polifenoles que se encuentran en los extractos de té verde son (-)-epicatequina (EC), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina-3-galato (ECG) y (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG). En particular, (-)-EGCG, la catequina más abundante, se encontró que era un agente quimiopreventivo y anticancerígeno entre las catequinas del té verde (del inglés, "green tea catechins", GTCs) (4. Fujiki, H. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1999, 125, 589-97).

15 El proteasoma es un complejo proteico grande con actividades multicatalíticas que son responsables de la degradación de proteínas no solo obsoletas y mal plegadas, sino también proteínas reguladoras que intervienen en el ciclo celular y la apoptosis. En la proteólisis dependiente del proteasoma, la ubiquitina se conjuga primero con el sustrato, seguido de una degradación del sustrato y el reciclado de los aminoácidos y la ubiquitina. La vía de degradación de la ubiquitina/dependiente de proteasoma tiene un papel esencial en la regulación al alza de la proliferación celular, la regulación a la baja de la muerte celular y el desarrollo de resistencia frente a fármacos en las células tumorales humanas. Por lo tanto, los inhibidores del proteasoma muestran un gran potencial como nuevos fármacos contra el cáncer (Dou, Q. P.; Li, B. *Drug Resist Update* 1999, 2, 215-23). Se ha mostrado que la (-)-EGCG natural y la (+)-EGCG obtenida de modo sintético son potentes inhibidores de la actividad proteasómica de la quimotripsina, que conduce a una detención del crecimiento y/o a la apoptosis (Smith, D. M.; Wang, Z.; Kazi, A.; Li, L.; Chan, T. H.; Dou, Q. P. *Mol Med* 2002, 8: 382-92). El documento de publicación de patente de EE.UU. n° 20040110790 (Zaveri et al.) describe análogos sintéticos de los polifenoles de té verde como agentes quimioterapéuticos y quimiopreventivos, pero la síntesis proporcionaba solamente compuestos racémicos y no se utilizaban catequinas de origen natural obtenidas a partir del té verde.

25 La señalización de P13K/Akt es una ruta ampliamente conocida de supervivencia de las células tumorales (Vanhaesebroeck, B.; Alessi, D. R. *Biochem J* 2000, 346, 561-76). El bloqueo de esta ruta se considera un importante mecanismo para inhibir el crecimiento tumoral. Akt fosforilada (p-Akt) es la forma activada de Akt. Una vez que se activa Akt, puede mediar en el progreso del ciclo celular mediante fosforilación y la consiguiente inhibición del inhibidor de la cinasa p27.24 dependiente de ciclina. Recientemente, se ha encontrado que (-)-EGCG inhibe la actividad de la cinasa Akt a través de la reducción de las señales de la fosfatidilinositol 3-cinasa en células NF639 de tumor de mama MMTV-Her-2/neu, lo que lleva a un crecimiento reducido de las células tumorales (Pianetti, S.; Guo, S.; Kavanagh, K. T.; Sonenshein, G. E. *Cancer Res* 2002, 62, 652-5).

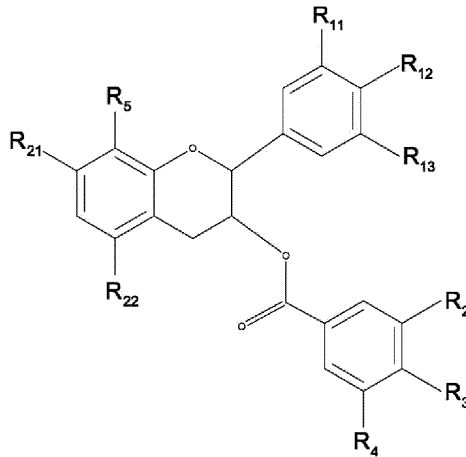
35 Sin embargo, (-)-EGCG tiene al menos una limitación: proporciona una disponibilidad reducida. Un estudio de Nakagawa et al. mostraba que solo el 0,012% de (-)-EGCG podía ser absorbido en ratas que habían recibido 56 mg de (-)-EGCG por vía oral (Nakagawa, K.; Miyazawa, T. *Anal Biochem.* 1997, 248, 41-9). Esta baja absorción se pensaba que era debida a la mala estabilidad de (-)-EGCG en soluciones neutras o alcalinas. Ya que el valor del pH del intestino y del fluido corporal es neutro o ligeramente alcalino, las GTCs serán inestables dentro del cuerpo humano, lo que conduce a una reducción de la biodisponibilidad.

Objetos de la invención

40 Por lo tanto, es un objeto de esta invención proporcionar un derivado de (-)-EGCG que sea capaz de resolver al menos uno o varios de los problemas, tal como se exponen en la técnica anterior. Como mínimo, un objeto de esta invención es proporcionar al público una opción útil.

Compendio de la invención

De acuerdo con ello, esta invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula:

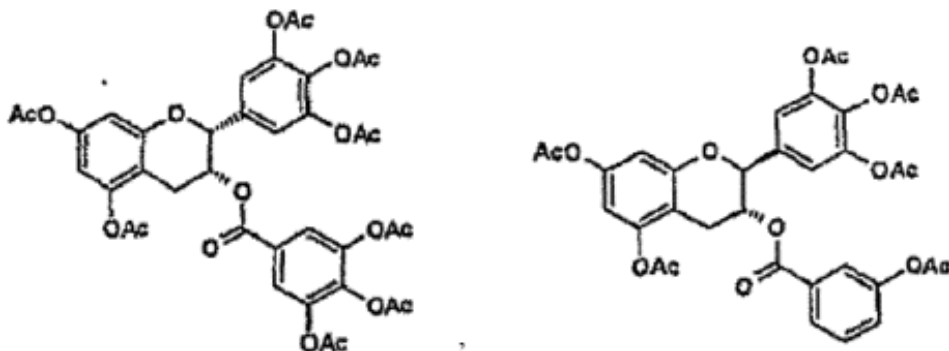


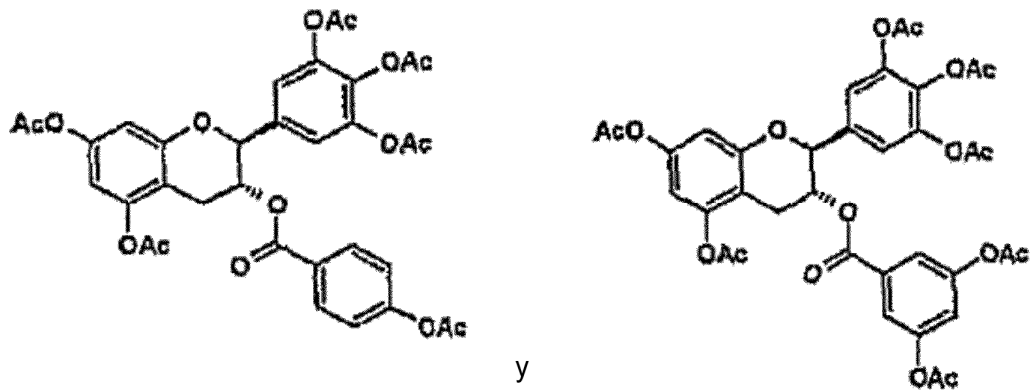
en donde

- R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{21} , R_{22} , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en -H y grupo aciloxilo C_1 a C_{10} ;
- 5 • R_5 es -H, y en donde se aplica una de las siguientes condiciones:
 - (i) cada uno de R_{11} , R_2 y R_4 es -H y cada uno de R_{12} , R_{13} , R_{21} , R_{22} y R_3 es un grupo acetato; o
 - (ii) cada uno de R_{11} , R_{13} , R_2 y R_4 es -H y cada uno de R_{12} , R_{21} , R_{22} y R_3 es un grupo acetato; o
 - (iii) cada uno de R_{11} y R_{13} es -H y cada uno de R_{12} , R_{21} , R_{22} , R_2 , R_3 y R_4 es un grupo acetato; o
 - (iv) R_{11} es -H y cada uno de R_{12} , R_{13} , R_{21} , R_{22} , R_2 , R_3 y R_4 es un grupo acetato; o
 - 10 (v) cada uno de R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{21} y R_{22} es un grupo acetato, R_2 es un grupo acetato y cada uno de R_3 y R_4 es -H; o
 - (vi) cada uno de R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{21} y R_{22} es un grupo acetato, R_3 es un grupo acetato y R_2 y R_4 es -H; o
 - (vii) cada uno de R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{21} , R_{22} , R_2 y R_4 es un grupo acetato y R_3 es -H,

para uso en la inhibición del proteasoma.

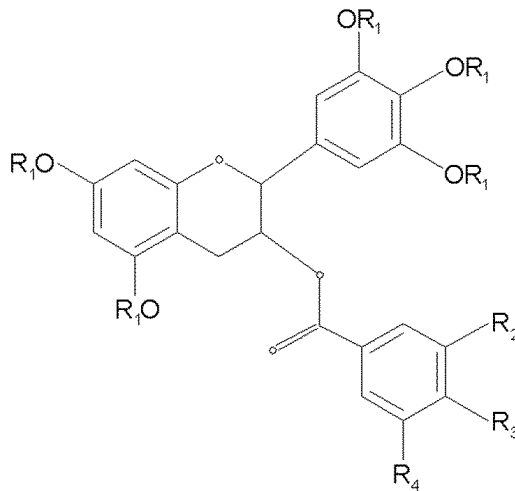
- 15 La invención también proporciona un compuesto que tiene la fórmula seleccionada a partir del grupo que consiste en:





para uso en la inhibición del proteasoma.

Esta invención también proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



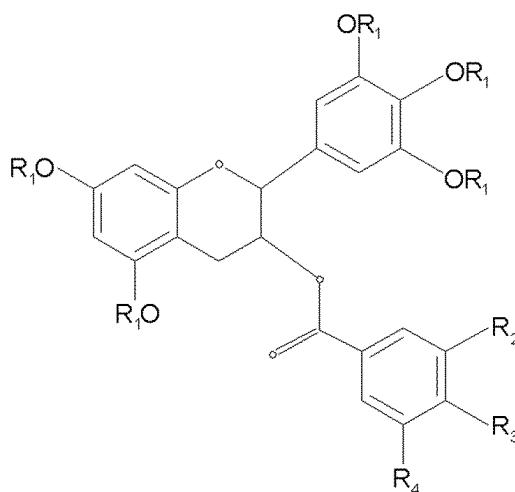
5 en donde

- R_1 es -H;
- R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en -H y -OH; y
- al menos uno de R_2 , R_3 y R_4 es -H,

para uso en la inhibición del proteasoma.

10 En algunas realizaciones, R_2 es -OH y $R_3 = R_4 = -H$. En algunas realizaciones, R_3 es -OH y $R_2 = R_4 = -H$. En algunas realizaciones, R_3 es -H y $R_2 = R_4 = -OH$.

Esta invención también proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



en donde

- R₁ es -H;
- R₂, R₃ y R₄ se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en -H y -OH; y
- si R₂ = R₃ = R₄, entonces R₂ no es -OH,

para uso en la reducción del crecimiento de células tumorales.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones preferidas de la presente invención se explicarán ahora a modo de ejemplo y haciendo referencia a los dibujos adjuntos en los que:

10 La Figura 1 muestra las estructuras de la (-)-EGCG y ejemplos de los derivados de (-)-EGCG de esta invención;

La Figura 2 muestra la curva de degradación de (-)-EGCG y **1**;

La Figura 3 muestra los resultados a lo largo del curso temporal de peracetato de EGCG (**1**) en medio de cultivo con la presencia de vitamina C (área frente a tiempo). Compuesto **1**: ◆; compuesto A (diacetato): x; compuesto B (monoacetato): ▲; EGCG: ■;

15 La Figura 4 muestra los resultados a lo largo del curso temporal de peracetato de EGCG (**1**) en medio de cultivo con la presencia de vitamina C con la adición de material lisado (área frente a tiempo). Compuesto **1**: ◆; compuesto A (diacetato): x; compuesto B (monoacetato): ▲; EGCG: ■;

La Figura 5 muestra la inhibición de la actividad similar a quimotripsina del proteasoma 20S purificado mediante **1** y (-)-EGCG;

20 La Figura 6 muestra (a) la inhibición de la actividad del proteasoma mediante **1** y (-)-EGCG *in vivo*; (b) un ensayo de transferencia Western de la ubiquitina después de un tratamiento con **1** y (-)-EGCG;

La Figura 7 muestra la cantidad de los niveles de P-Akt con tratamiento con **1** y (-)-EGCG;

La Figura 8 muestra la viabilidad celular en células Jurkat tratadas con **1** y (-)-EGCG;

25 La Figura 9 muestra los resultados del tratamiento de las células Jurkat con 25 μM de cada polifenol indicado durante 4 h (A), hasta 8 h (C), o 24 h (B), o de las células LNCaP tratadas con 25 μM del compuesto indicado durante 24 h (D), seguido por un análisis de transferencia Western usando anticuerpos específicos de ubiquitina, Bax, IκBα, p27 y actina. Las bandas indicadas por una flecha son posibles formas ubiquitinadas de Bax y IκBα. A, carril 4, la banda Ub- IκBα puede ser el resultado de derrames del carril 5. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes;

30 La Figura 10 muestra los resultados del tratamiento de células T Jurkat (A y B) o células VA-13 (C y D) con 25 μM de los polifenoles indicados durante 24 h. A, ensayo de incorporación de azul tripán. Los datos representados son el número medio de células muertas sobre la población celular total ± DS. B, transferencia Western para la escisión de PARP. C, estudios con microscopía de fluorescencia de la apoptosis de fase tardía utilizando un anticuerpo específico para el fragmento de PARP escindido con p85 conjugado con FITC. La tinción de contraste con DAPI se

utiliza como un control para las células no apoptóticas. Las imágenes se obtuvieron con el programa informático AxioVision utilizando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss, Alemania). D, cuantificación de células apoptóticas en C contando el número de células apoptóticas sobre el número total de células en el mismo campo. Los datos son la media de experimentos duplicados \pm DS;

- 5 La Figura 11 muestra los efectos de los polifenoles acetilados sintéticos sobre células de cáncer de mama y de próstata. A, ensayo con MTT. Células de cáncer de mama MCF-7 fueron tratadas con cada compuesto indicado 5 o 25 μ M durante 24 h. B, cambios morfológicos. Células LNCaP de cáncer de próstata fueron tratadas con 25 μ M de (-)-EGCG o un análogo protegido durante 24 h, seguido de una evaluación morfológica. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de contraste de fase con un aumento de 40X (Leica, Alemania). C, ensayo en agar blando.
- 10 Las células LNCaP se sembraron sobre agar blando con disolvente DMSO o 25 μ M de (-)-EGCG o análogos protegidos. Las células se cultivaron durante 21 días sin más adición de fármaco. Los datos mostrados son pocillos escaneados representativos, procedentes de experimentos por triplicado. D, las colonias en C se cuantificaron haciendo un recuento automatizado y se presentaron como valores medios \pm DS;

- 15 La Figura 12 muestra los resultados del tratamiento de células WI-38 normales y VA-13 transformadas con SV-40 con 25 μ M de los compuestos indicados durante 24 h (A y B) o 36 h (C), o células T Jurkat leucémicas e YT no transformadas se trataron con cada compuesto 25 μ M durante 24 h (D). A, actividad similar a quimotripsina del proteasoma en células intactas. B y C, tinción nuclear para la morfología apoptótica de las células desprendidas y fijadas con un aumento de 10X (B) o de 40X (C). Los paneles que faltan indican que no se produjo un desprendimiento de las células. D, análisis con transferencia Western utilizando anticuerpo específico de PARP;

- 20 La Figura 13 muestra las estructuras de la (-)-EGCG y ejemplos de derivados de peraciloxil (-)-EGCG. Las Figuras 13a y 13b muestran los productos intermedios cuando se sintetizan derivados de peraciloxil (-)-EGCG;

La Figura 14 muestra la actividad de tipo quimotripsina cuando se preincubaron células T Jurkat con el disolvente (DMSO), 25 μ M de los compuestos en la Figura 13;

- 25 La Figura 15 muestra la acumulación de diana de proteasoma y proteínas ubiquitinadas cuando las células T Jurkat se trataron con el disolvente (DMSO) y 25 μ M de los compuestos en la Figura 13;

La Figura 16 muestra el porcentaje de muerte celular cuando las células T Jurkat se trataron con el disolvente (DMSO) y 25 μ M de los compuestos en la Figura 13;

La Figura 17 muestra la activación de la caspasa-3 cuando las células T Jurkat se trataron con el disolvente (DMSO) y 25 μ M de los compuestos en la Figura 13; y

- 30 La Figura 18 muestra la inducción de la apoptosis en células tumorales cuando las células T Jurkat y los linfocitos citolíticos naturales humanos no transformados (YT) fueron tratados durante 4 h con **19*** 10 y 25 μ M, seguido por análisis con transferencia Western usando anticuerpos específicos para I κ B α , PARP y actina.

Descripción detallada de la realización preferida

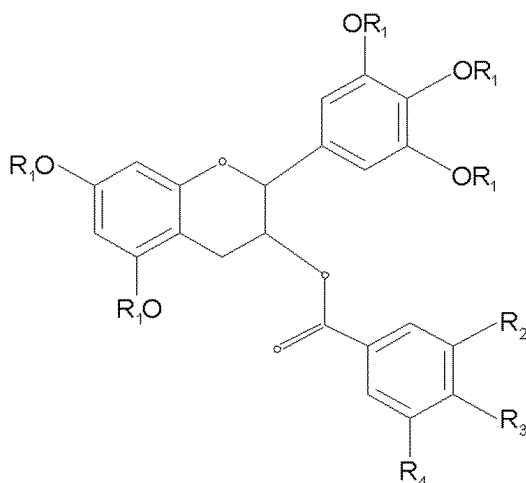
Esta invención se describe ahora a modo de ejemplo haciendo referencia a las figuras en los párrafos siguientes.

- 35 Los objetos, características y aspectos de la presente invención se describen o son evidentes a partir de la siguiente descripción. Un experto ordinario en la técnica entiende que la presente exposición es solo una descripción de realizaciones ejemplares y no pretende limitar los aspectos más amplios de la presente invención, cuyos aspectos más amplios se incluyen en las construcciones ejemplares.

- 40 En esta invención, la forma de profármaco de (-)-EGCG se sintetiza de modo que mejora su biodisponibilidad. Los profármacos muestran: [i] una estabilidad mejorada en condiciones fisiológicas a pH neutro; [ii] siguen siendo biológicamente inactivos hasta la hidrólisis enzimática *in vivo*, que conduce a la liberación del fármaco original; [iii] y, por último, los grupos proresto poseen una toxicidad sistémica baja

Además, se sintetizan tres derivados de (-)-EGCG y sus formas de profármaco y sorprendentemente, se encontró que tienen mayor potencia que la propia forma natural de (-)-EGCG.

- 45 La fórmula general de los derivados descritos de (-)-EGCG en forma de alcohol, tiene la fórmula:

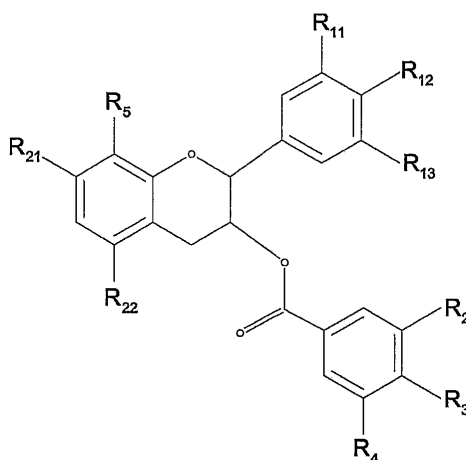


en donde

- R_1 es -H; y
- R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en -H y -OH.

5 Por supuesto, cuando $R_2 = R_3 = R_4$, R_2 es -OH, el compuesto se convierte en (-)-EGCG y, por lo tanto, no es objeto de esta invención.

La fórmula general de los derivados descritos de (-)-EGCG en forma de éster tiene la fórmula:



en donde

- 10
- R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{21} , R_{22} , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en -H y grupo aciloxilo C_1 a C_{10} ; y
 - R_5 se selecciona entre el grupo que consiste en -H, alquilo C_1 - C_{10} , alqueno C_2 - C_{10} , alquino C_2 - C_{10} , cicloalquilo C_3 - C_7 , fenilo, bencilo y cicloalqueno C_3 - C_7 , aunque cada uno de los últimos 7 grupos mencionados puede estar sustituido con cualquier combinación de uno a seis átomos de halógeno;
- 15
- al menos uno de R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{21} , R_{22} , R_2 , R_3 y R_4 es un grupo aciloxilo C_1 a C_{10} ; y
 - al menos uno de R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{21} , R_{22} , R_2 , R_3 y R_4 es -H.

En las definiciones de los compuestos anteriores, se utilizaron términos colectivos que generalmente representan los siguientes grupos:

acilo C_1 - C_6 : que tiene la estructura $-(CO)-R$, en donde R es hidrógeno o grupos alquilo de cadena lineal o

ramificada que tienen de 1 a 5 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, pentilo, 2-metilbutilo. El grupo alquilo R puede estar parcial o totalmente halogenado. La expresión 'parcial o totalmente halogenado' se entiende que expresa que en los grupos caracterizados de este modo, los átomos de hidrógeno pueden estar reemplazados parcial o totalmente por átomos de halógeno iguales o diferentes, por ejemplo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorofluorometilo, diclorofluorometilo, clorodifluorometilo, 1-fluoroetilo, 2-fluoroetilo, 2,2-difluoroetilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 2-cloro-2-fluoroetilo, 2-cloro-2,2-difluoroetilo, 2,2-dicloro-2-fluoroetilo, 2,2,2-tricloroetilo y pentafluoroetilo;

aciloxilo C₁-C₁₀: que tiene la estructura -O-(CO)-R, en donde R puede ser uno cualquiera entre -H, alquilo C₁-C₉, alqueno C₂-C₉, alquino C₂-C₉, cicloalquilo C₃-C₇, fenilo, bencilo y cicloalqueno C₃-C₇, mientras que cada uno de los 7 últimos grupos mencionados puede estar sustituido con cualquier grupo alquilo de cadena lineal o ramificado, tal como metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, pentilo, 2-metilbutilo. El grupo alquilo R puede estar parcial o totalmente halogenado. La expresión 'parcial o totalmente halogenado' se entiende que expresa que en los grupos caracterizados de este modo, los átomos de hidrógeno pueden estar reemplazados parcial o totalmente por átomos de halógeno iguales o diferentes, por ejemplo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorofluorometilo, diclorofluorometilo, clorodifluorometilo, 1-fluoroetilo, 2-fluoroetilo, 2,2-difluoroetilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 2-cloro-2-fluoroetilo, 2-cloro-2,2-difluoroetilo, 2,2-dicloro-2-fluoroetilo, 2,2,2-tricloroetilo y pentafluoroetilo. El grupo alquilo R puede estar parcial o totalmente sustituido por grupos hidroxilo o alcoxi o amino, por ejemplo, grupos hidroximetilo, 2-aminoetilo o 3-metoxipropilo.

De acuerdo con esta invención, el peracetato de (-)-EGCG, **1** se sintetizó (Figura 1). **1** se encontró que era más estable que (-)-EGCG. El profármaco era biológicamente inactivo frente a un proteasoma 20S purificado, pero inhibía potently el proteasoma en células tumorales intactas. Además, la administración del profármaco, pero no su compuesto original, a células tumorales intactas daba como resultado la pérdida de Akt fosforilada (p-Akt), indicando una inactivación de esta cinasa asociada al cáncer. Finalmente, el tratamiento de células T Jurkat de leucemia con **1** inducía la muerte celular.

Para evaluar si otros polifenoles de té protegidos con peracetato poseían una mayor bioactividad que su compuesto original sin protección, se sintetizaron varios análogos sintéticos de (-)-EGCG que poseían deleciones de los grupos hidroxilo en el anillo de galato. Además, para mejorar la estabilidad de las moléculas, los grupos hidroxilo se convirtieron a grupos acetato o benzoato para crear un profármaco. Sorprendentemente, se encontró que los análogos protegidos eran inhibidores más potentes del proteasoma en células tumorales intactas que sus homólogos no protegidos.

La síntesis y la caracterización de los compuestos de esta invención se detallarán en las secciones siguientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El suero bovino fetal se adquirió a partir de Tissue Culture Biologicals (Tulare, CA). La mezcla de penicilina-estreptomicina-1-glutaxina, RPMI y DMEM son de Invitrogen (Carlsbad, CA). El dimetil sulfoxido (DMSO), N-acetil-L-cisteína (NAC), Hoechst 33342, bromuro de 3-((4,5)-dimetilazol-2-il)-2,5-difenilteolio (MTT), albúmina de suero bovino (BSA) y (-)-EGCG se compraron en Sigma (St. Louis, MO). Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (para la actividad similar a quimotripsina del proteasoma) se obtuvo de Biomol (Plymouth Meeting, PA). El proteasoma 20s purificado de conejo fue adquirido en Boston Biochem (Cambridge, MA). El kit de ensayo Amplex Red H202 se adquirió en Molecular Probes (Eugene, OR). Los anticuerpos monoclonales para Bax (H280) y ubiquitina (P4D1) y los anticuerpos policlonales para IKB-a (C15) y actina (C11), así como IgG anti-cabra, anti-conejo y anti-ratón-peroxidasa de rábano picante se compraron en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El anticuerpo monoclonal para p27 (554069) se adquirió en BD Biosciences (San Diego, CA). El medio Vectashield Mounting Medium con DAPI se adquirió en Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA). El anticuerpo policlonal, específico del sitio de escisión de PARP y conjugado con FITC, fue adquirido en Biosource (Camarillo, CA). El marcador CaspACE FITC-VAD-FMK se compró en Promega (Madison, WI).

Síntesis de análogos sintéticos de polifenol de té. Síntesis de **1**, **2**, **2a**, **3**, **3a**, **4** y **4a** (Figura 1)

1 se preparó según procedimientos publicados (Kohri, T.; Nanjo, F.; Suzuki, M.; Seto, R.; Matsumoto, N.; Yamakawa, M.; Hojo, H.; Hara, Y.; Desai, D.; Amin, S.; Conaway, C. C.; Chung, F. L. *J Agric Food Chem* 2001, 49: 1042-8), pero la síntesis de **1** se ilustra en esta memoria. Para la síntesis de **1**, se empleó (-)-EGCG comercialmente disponible como material de partida. El tratamiento de (-)-EGCG con anhídrido acético y piridina durante una noche proporcionaba el producto **1** deseado con un rendimiento del 82% (Fig. 1). La estructura de **1** fue confirmada por ¹H y ¹³C RMN, LRMS y HRMS.

Pf 157,1°C

LRMS m/z (ESI) 817 (MNa⁺)

HRMS encontrada, 817,1544; C₃₈H₃₄O₁₉Na requiere 817,1592.

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,62 (s, 2H), 7,24 (s, 2H), 6,73 (s, 1H), 6,61 (s, 1H), 5,64 (br s, 1H), 5,18 (s, 1H), 3,02 (m, 2H), 2,29 (s, 3H), 2,28 (s, 9H), 2,27 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 2,23 (s, 6H).

5 ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 168,89, 168,40, 167,59, 167,43, 166,72, 166,20, 163,51, 154,71, 149,72, 149,64, 143,38, 143,29, 138,93, 135,06, 134,34, 127,41, 122,34, 118,79, 109,42, 109,00, 108,06, 76,46, 67,98, 25,85, 21,06, 20,75, 20,54, 20,11.

(2S*,3R*)-trans-5,7-bis(benciloxi)-2-[3,4,5-tris(benciloxi)fenil]croman-3-ol (5)

10 Este compuesto se sintetizó de acuerdo con procedimientos de la bibliografía (Li, L.H.; Chan, T.H. *Org. Lett.* 2001, 3, 739-741).

3-(Benciloxi)benzoato de (2S*,3R*)-trans-5,7-bis(benciloxi)-2-[3,4,5-tris(benciloxi)fenil]croman-3-ilo (2b)

15 Se añadió una cantidad de (COCl)₂ (0,68 ml) a una solución de ácido 3-(benciloxi)benzoico (0,12 g, 0,53 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml). La mezcla se sometió a reflujo durante 2 horas. Después de lo cual el exceso de (COCl)₂ y el disolvente se eliminaron por destilación y el residuo resultante se secó a vacío durante una noche. El residuo se volvió a disolver en CH₂Cl₂ (5 ml) y se añadió a una solución de **5** (0,20 g, 0,26 mmol) y DMAP (0,08 g, 0,64 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml) a 0°C. La mezcla se agitó después a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió NaHCO₃ saturado. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (Na₂SO₄) y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano: acetato de etilo 4:1) para proporcionar el compuesto **2b** como un sólido blanco (0,22 g, 88%).

20 LRMS m/z (ESI) 989 (MNa⁺)

HRMS encontrada, 989,3657; C₆₄H₅₄O₉Na requiere 989,3666.

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,54-7,12 (m, 30H), 6,72 (s, 2H), 6,29 (d, J=4,5 Hz, 2H), 5,50 (q, J=7,0 Hz, 1H), 5,10 (d, J=6,5 Hz, 1H), 5,05-4,95 (m, 12H), 3,04 (dd, J=16,5, 6,0 Hz, 1H), 2,89 (dd, J=16,5, 6,5 Hz, 1H).

25 ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 165,20, 158,81, 158,51, 157,53, 154,68, 152,73, 138,20, 137,60, 136,76, 136,64, 136,25, 133,24, 131,14, 129,32, 128,49, 128,42, 128,40, 128,29, 128,00, 127,96, 127,91, 127,80, 127,69, 127,62, 127,51, 127,43, 127,38, 127,10, 122,13, 119,93, 115,29, 106,13, 101,23, 94,25, 93,74, 78,38, 74,98, 71,07, 70,02, 69,81, 24,18.

3-(Hidroxi)benzoato de (2S*,3R*)-trans-5,7-bis(hidroxi)-2-[3,4,5-tris(hidroxi)fenil]croman-3-ilo (2)

30 La suspensión de **2b** (0,23 g, 0,24 mmol) en THF/MeOH (28 ml/28 ml) y Pd(OH)₂ (0,19 g, 20% sobre carbono) se colocó bajo una atmósfera de H₂. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que la TLC mostró que la reacción se había completado. Después, la mezcla de reacción se filtró a través de algodón para eliminar el catalizador. Después de la evaporación, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (acetato de etilo: CH₂Cl₂ 2:1) para proporcionar el producto **2** como un sólido blanco (80 mg, 79%).

LRMS m/z (ESI) 449 (MNa⁺)

35 HRMS encontrada, 449,0887; C₂₂H₁₈O₉Na requiere 449,0849.

¹H RMN (CD₃OD, 500 MHz) δ 7,38-6,97 (m, 4H), 6,42 (s, 2H), 5,97 (q, J=2,5 Hz, 2H), 5,40 (q, J=6,0 Hz, 1H), 5,03 (d, J=6,0 Hz, 1H), 2,85 (dd, J=16,5, 5,0 Hz, 1H), 2,74 (dd, J=16,5, 6,0 Hz, 1H).

¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz) δ 165,87, 157,00, 156,52, 156,03, 154,88, 145,42, 132,50, 130,91, 129,17, 120,29, 119,90, 115,45, 105,00, 98,07, 95,00, 94,12, 77,78, 70,15, 22,71.

40 **3-Acetiloxibenzoato de (2S*,3R*)-trans-5,7-bis(acetiloxi)-2-[3,4,5-tris(acetiloxi)fenil]croman-3-ilo (2a)**

45 Una suspensión de **2b** (0,1 g, 0,1 mmol) en THF/MeOH (12 ml/12 ml) y Pd(OH)₂ (0,08 g, 20% sobre carbono) se colocó bajo una atmósfera de H₂. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que la TLC mostró que la reacción se había completado. Después, la mezcla de reacción se filtró a través de algodón para eliminar el catalizador. El material filtrado se evaporó para proporcionar el compuesto desbencilado (**2**) que se usó inmediatamente en la siguiente etapa sin purificar. El compuesto desbencilado obtenido se disolvió en piridina (4 ml) y anhídrido acético (2 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después de lo cual, el anhídrido acético y la piridina se eliminaron a vacío. El residuo resultante se recogió en 20 ml de CH₂Cl₂ y la solución se lavó con 5 x 5 ml de H₂O y 5 ml de salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó. El producto sin purificar se purificó mediante cromatografía en columna (hexano: acetato de etilo 1:1) para proporcionar el compuesto **2a** como un polvo blanco (0,061 g, 85%).

Pf 71,6°C

LRMS m/z (ESI) 701 (MNa⁺)

HRMS encontrada, 701,1541 C₃₄H₃₀O₁₅Na requiere 701,1482.

5 ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,79 (d, J=8,0 Hz, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,42 (t, J=8,0 Hz, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,17 (s, 2H), 6,69 (s, 1H), 6,64 (s, 1H), 5,46 (q, J=5,5 Hz, 1H), 5,32 (d, J=5,5 Hz, 1H), 3,02 (dd, J=17,0, 5,0 Hz, 1H), 2,80 (dd, J=17,0, 6,0 Hz, 1H), 2,32 (s, 3H), 2,29 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,26 (s, 9H).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 169,10, 168,81, 168,24, 167,47, 166,61, 164,61, 154,00, 150,42, 149,76, 149,28, 143,47, 135,74, 134,48, 130,72, 129,42, 127,18, 126,68, 122,79, 118,58, 109,84, 108,81, 107,54, 69,17, 23,65, 20,96, 20,92, 20,65, 20,47, 20,10.

10 **4-(Benciloxi)benzoato de (2S*,3R*)-trans-5,7-bis(benciloxi)-2-[3,4,5-tris(benciloxi)fenil]croman-3-ilo (3b)**

El compuesto del título se preparó de una manera similar a la descrita para **2b**, usando **5** (0,08 g, 0,1 mmol) y ácido 4-(benciloxi)benzoico (0,049 g, 0,22 mmol) proporcionando **3b** como un sólido blanco (0,087 g, 90%).

LRMS m/z (ESI) 989 (MNa⁺)

HRMS encontrada, 989,3666 C₆₄H₅₄O₉Na requiere 989,3666.

15 ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,91 (d, J=9,0 Hz, 2H), 7,47-7,22 (m, 30H), 6,95 (d, J=9,0 Hz, 2H), 6,74 (s, 2H), 6,31 (dd, J=5,5, 2,5 Hz, 2H), 5,52 (q, J=6,5 Hz, 1H), 5,14 (d, J=6,5 Hz, 1H), 5,07-4,97 (m, 12H), 3,02 (dd, J=17,0, 5,5 Hz, 1H), 2,87 (dd, J=16,5, 7,0 Hz, 1H).

20 ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 165,08, 162,49, 158,76, 157,53, 154,65, 152,69, 138,09, 137,63, 136,79, 136,70, 136,66, 136,00, 133,38, 131,61, 128,55, 128,49, 128,40, 128,29, 128,09, 127,96, 127,91, 127,78, 127,69, 127,62, 127,43, 127,38, 127,30, 127,09, 122,40, 114,33, 106,08, 101,30, 94,22, 93,67, 78,37, 74,98, 71,05, 69,95, 69,79, 69,26, 24,01.

4-(Hidroxiloxi)benzoato de (2S*,3R*)-trans-5,7-bis(hidroxiloxi)-2-[3,4,5-tris(hidroxiloxi)fenil]croman-3-ilo (3)

El compuesto del título se preparó de una manera similar a la descrita para **2** utilizando **3b** (0,24 g, 0,25 mmol) para proporcionar **3** como un sólido blanco (79 mg, 75%).

25 LRMS m/z (ESI) 449 (MNa⁺)

HRMS encontrada, 449,0840; C₂₂H₁₈O₉Na requiere 449,0849.

¹H RMN (CD₃OD, 500 MHz) δ 7,75 (d, J=8,5 Hz, 2H), 6,77 (d, J=8,5 Hz, 2H), 6,42 (s, 2H), 5,95 (dd, J=8,0, 2,5 Hz, 2H), 5,35 (q, J=6,0 Hz, 1H), 5,00 (d, J=6,0 Hz, 1H), 2,85 (dd, J=16,5, 5,0 Hz, 1H), 2,71 (dd, J=16,5, 6,5 Hz, 1H).

30 ¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz) δ 165,88, 161,99, 156,54, 156,05, 154,95, 145,41, 132,46, 131,31, 129,25, 120,61, 114,57, 104,98, 98,14, 94,91, 94,04, 78,00, 69,81, 22,98.

4-(Acetiloxiloxi)benzoato de (2S*,3R*)-trans-5,7-bis(acetiloxiloxi)-2-[3,4,5-tris(acetiloxiloxi)fenil]croman-3-ilo (3a)

El compuesto del título se preparó de una manera similar al descrito para **2a**, utilizando **3b** (0,15 g, 0,16 mmol) para proporcionar **3a** como un sólido blanco (92,6 mg, 88%).

35 Pf 189,4°C

LRMS m/z (ESI) 701 (MNa⁺)

HRMS encontrada, 701,1467; C₃₄H₃₀O₁₅Na requiere 701,1482.

40 ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,94 (d, J=9,0 Hz, 2H), 7,17 (s, 2H), 7,13 (d, J=9,0 Hz, 2H), 6,69 (d, J=2,0 Hz, 1H), 6,63 (d, J=2,0 Hz, 1H), 5,45 (q, J=6,0 Hz, 1H), 5,32 (d, J=6,0 Hz, 1H), 3,01 (dd, J=16,5, 5,0 Hz, 1H), 2,79 (dd, J=16,5, 6,0 Hz, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,29 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,26 (s, 9H).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 168,81, 168,64, 168,26, 167,49, 166,62, 164,74, 154,48, 154,02, 149,76, 149,30, 143,49, 135,82, 134,50, 131,28, 126,76, 121,60, 118,59, 109,90, 108,80, 107,51, 69,01, 23,64, 20,97, 20,63, 20,46, 20,00.

3,5-Bis(benciloxi)benzoato de (2S*,3R*)-trans-5,7-bis(benciloxi)-2-[3,4,5-tris(benciloxi)fenil]croman-3-ilo (4b)

45 El compuesto del título se preparó de una manera similar a la descrita para **2b**, usando **5** (0,3 g, 0,4 mmol) y ácido

3,5-bis(benciloxi)benzoico (0,27 g, 0,81 mmol) proporcionando **4b** como un sólido blanco (0,36 g, 85%).

LRMS m/z (ESI) 1095 (MNa⁺)

HRMS encontrada, 1095,4059; C₇₁H₆₀O₁₀Na requiere 1095,4084.

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,47-7,17 (m, 35H), 6,76 (s, 1H), 6,73 (s, 1H), 6,30 (d, J=4,5 Hz, 2H), 5,48 (q, J=7,0 Hz, 1H), 5,08 (d, J=7,0 Hz, 1H), 5,04-4,92 (m, 14H), 3,07 (dd, J=17,0, 5,5 Hz, 1H), 2,85 (dd, J=17,0, 7,0 Hz, 1H).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 165,14, 159,73, 158,98, 157,67, 154,88, 152,87, 137,77, 136,91, 136,82, 136,78, 136,29, 133,35, 131,86, 128,61, 128,56, 128,52, 128,41, 128,15, 128,10, 128,02, 127,94, 127,81, 127,76, 127,67, 127,51, 127,24, 108,52, 106,93, 106,30, 101,38, 94,43, 93,93, 78,57, 75,12, 71,17, 70,26, 70,15, 70,11, 69,92, 24,58.

3,5-Bis(hidroxi)benzoato de (2S*,3R*)-trans-5,7-bis(hidroxi)-2-[3,4,5-tris(hidroxi)fenil]croman-3-ilo (**4**)

El compuesto del título se preparó de una manera similar a la descrita para **2** usando **4b** (0,17 g, 0,16 mmol) para proporcionar **4** como un sólido blanco (50 mg, 71%).

LRMS m/z (ESI) 465 (MNa⁺)

HRMS encontrada, 465,0844; C₂₂H₁₈O₉Na requiere 465,0798.

¹H RMN (CD₃OD, 500 MHz) δ 6,85 (d, J=2,0 Hz, 2H), 6,44 (t, J=2,0 Hz, 1H), 6,41 (s, 2H), 5,96 (s, 2H), 5,40 (dd, J=10,5, 5,0 Hz, 1H), 5,05 (d, J=5,0 Hz, 1H), 2,80 (dd, J=16,5, 5,0 Hz, 1H), 2,73 (dd, J=16,5, 5,0 Hz, 1H).

¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz) δ 165,81, 158,10, 156,56, 156,06, 154,83, 145,43, 132,44, 131,49, 129,28, 107,34, 106,86, 104,81, 97,93, 94,88, 94,06, 77,60, 69,95, 22,28.

20 3,5-Bis(acetiloxi)benzoato de (2S*,3R*)-trans-5,7-bis(acetiloxi)-2-[3,4,5-tris(acetiloxi)fenil]croman-3-ilo (**4a**)

El compuesto del título se preparó de una manera similar a la descrita para el compuesto **2a** usando **4b** (0,15 g, 0,14 mmol) para proporcionar **4a** como un sólido blanco (72 mg, 70%).

Pf 105,5°C

LRMS m/z (ESI) 759 (MNa⁺)

HRMS encontrada, 759,1530; C₃₆H₃₂O₁₇Na requiere 759,1537.

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,54 (d, J=2,0 Hz, 2H), 7,17 (s, 2H), 7,13 (t, J=2,0 Hz, 1H), 6,69 (d, J=2,0 Hz, 1H), 6,64 (d, J=2,0 Hz, 1H), 5,45 (q, J=6,0 Hz, 1H), 5,29 (d, J=6,5 Hz, 1H), 3,01 (dd, J=17,0, 5,0 Hz, 1H), 2,79 (dd, J=17,0, 6,5 Hz, 1H), 2,30 (s, 6H), 2,28 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,26 (s, 3H), 2,25 (s, 6H).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 168,80, 168,62, 168,21, 167,45, 166,60, 163,78, 153,96, 150,78, 149,77, 149,27, 143,46, 135,55, 134,48, 131,26, 120,57, 120,29, 118,56, 109,79, 108,86, 107,57, 69,48, 23,77, 20,94, 20,86, 20,64, 20,45, 19,99.

Ya que los grupos carboxilato o los grupos -OH del compuesto **1**, **2**, **3** y **4** se pueden someter fácilmente a un intercambio de acilo, un experto en la técnica será capaz de reemplazar los grupos acilo sobre los grupos carboxilato de estos compuestos.

35 Síntesis de análogos sintéticos de polifenol de té

General

Los materiales y reactivos de partida, adquiridos a partir de proveedores comerciales, se utilizaron sin una purificación adicional. Los procedimientos de la bibliografía se utilizaron para la preparación de (2R, 3S) trans y (2R, 3R)-cis-5,7-bis(benciloxi)-2-(4-benciloxifenil)croman-3-ol, (2R, 3S) trans y (2R, 3R)-cis-5,7-bis(benciloxi)-2-[3,4-bis(benciloxi)-fenil]croman-3-ol, 3,4,5-trihidroxibenzoato de (2R, 3R)-cis-5,7-bis(hidroxi)-2-(4-hidroxifenil)croman-3-ilo (Sheng Biao Wan; Tak Hang Chan. *Tetrahedron*, 2004, 60, 8207).

El THF anhidro se separó por destilación en atmósfera de nitrógeno de cetil benzofenona de sodio. El cloruro de metileno anhidro se separó por destilación en atmósfera de nitrógeno de CaH₂. El DMF anhidro se separó por destilación al vacío de CaH₂. Los matraces de reacción se secaron con una llama bajo una corriente de N₂. Todas las reacciones sensibles a la humedad se llevaron a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno. La cromatografía ultrarrápida se realizó usando gel de sílice 60 (malla 70-230). Los puntos de fusión estaban sin corregir. Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C RMN (400 MHz) se midieron con TMS como patrón interno cuando CDCl₃ y acetona-d₆ se utilizaron como disolvente. Los espectros MS de alta resolución (ESI) se registraron usando un espectrómetro

QTOF-2 Micromass.

4-Benciloxibenzoato de (+)-(2R, 3S)-5,7-bis(benciloxi)-2-[3,4-bis(benciloxi)fenil]croman-3-ilo (102)

Bajo una atmósfera de N₂, una solución de ácido 4-benciloxibenzoico (140 mg, 0,61 mmol) se sometió a reflujo con cloruro de oxalilo (1 ml) en CH₂Cl₂ seco (10 ml) y una gota de DMF durante 3 h. El exceso de cloruro de oxalilo y el disolvente se eliminaron mediante destilación y el residuo se secó a vacío durante 3 h y se disolvió en CH₂Cl₂ (2 ml). Esta solución se añadió gota a gota a una solución de (2R, 3S)-trans-5,7-bis(benciloxi)-2-[3,4-bis(benciloxi)fenil]croman-3-ol (195 mg, 0,3 mmol) y DMAP (75 mg, 0,62 mmol) en CH₂Cl₂ (15 ml) a 0°C. La mezcla se agitó a ta durante una noche, después se añadió una solución acuosa de NaHCO₃ saturado. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (EtOAc/n-hexano = 1/4 v/v) para proporcionar el compuesto deseado (220 mg, 85,0%). La recristalización en EtOAc y n-hexano proporcionó un polvo blanco: pf 148-150°C; [α]_D = +18,3 (c=1, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,88 (d, J=8,6 Hz, 2 H), 7,43-7,28 (m, 25 H), 7,01 (s, 1 H), 6,93-6,88 (m, 4 H), 6,28 (s, 2H), 5,53-5,50 (m, 1 H), 5,14 (d, J=6,4 Hz, 1 H), 5,11 (s, 2 H), 5,07 (s, 2 H), 5,04 (s, 2 H), 5,02 (s, 2 H), 5,01 (s, 2 H), 3,04 (A de ABq, J=16,8, 4,6 Hz, 1 H), 2,87 (B de ABq, J=16,8, 6,3 Hz, 1 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 165,0, 162,3, 158,6, 157,4, 154,6, 148,5, 136,9, 136,6, 136,5, 135,9, 131,4, 130,9, 128,4, 128,3, 128,2, 128,1, 127,9, 127,7, 127,6, 127,5, 127,3, 127,1, 126,9, 122,3, 119,5, 114,6, 114,1, 113,1, 101,1, 94,1, 93,4, 78,0, 71,0, 70,9, 69,9, 69,8, 69,6, 69,1, 23,8; HRMS (ESI) calculada para C₅₇H₄₈O₈Na (M+Na) 883,3247, encontrada 883,3241.

4-Benciloxibenzoato de (-)-(2R, 3R)-5,7-bis(benciloxi)-2-[3,4-bis(benciloxi)fenil]croman-3-ilo (104)

Siguiendo el procedimiento de preparación de **102**, la esterificación de (2R, 3R)-cis-5,7-bis(benciloxi)-2-[3,4-bis(benciloxi)fenil]croman-3-ol con ácido 4-benciloxibenzoico proporcionó **104** con un rendimiento del 86%. Pf 149-151°C; [α]_D = -3,1 (c=1,5, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,92 (d, J=8,8 Hz, 2 H), 7,44-7,26 (m, 25 H), 7,15 (d, J=1,6 Hz, 1 H), 6,91-6,87 (m, 4 H), 6,32 (d, J=2,1 Hz, 1 H), 6,28 (d, J=2,1 Hz, 1 H), 5,63 (bs, 1 H), 5,08 9s, 2 H), 5,06 (s, 1 H), 5,03-5,00 (m, 6 H), 4,92 (AB, J=11,6 Hz, 2 H), 3,08 (bs, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 165,1, 162,5, 158,6, 157,9, 155,6, 148,9, 148,7, 137,1, 137,0, 136,8, 136,7, 136,0, 131,8, 131,1, 128,6, 128,5, 128,4, 128,3, 128,1, 127,9, 127,8, 127,6, 127,5, 127,4, 127,3, 127,2, 127,1, 122,5, 119,9, 114,6, 114,3, 113,5, 100,9, 94,6, 93,7, HRMS (ESI) calculada para C₅₇H₄₈O₈Na (M+Na) 883,3244, encontrada 883,3241.

4-Benciloxibenzoato de (+)-(2R, 3S)-5,7-bis(benciloxi)-2-(4-benciloxifenil)croman-3-ilo (110)

Siguiendo el procedimiento de preparación de **102**, la esterificación de (2R, 3S)-5,7-bis(benciloxi)-2-(4-benciloxifenil)croman-3-ol con ácido 4-benciloxibenzoico proporcionó **110** con 86% de rendimiento. Pf 117-119°C; [α]_D = +24,5 (c=1,2, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,86 (d, J=8,8 Hz, 2 H), 7,42-7,26 (m, 22 H), 6,92 (AB, J=2,6 Hz, 4 H), 6,29 (AB, J=1,9 Hz, 2 H), 5,56-5,51 (m, 1 H), 5,17 (d, J=6,5 Hz, 1 H), 5,05 (s, 2 H), 4,98 (s, 4 H), 4,97 (s, 2 H), 3,10 (A de ABq, J=16,8, 5,4 Hz, 1 H), 2,88 (B de ABq, J=16,8, 6,6 Hz, 1 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 165,2, 162,4, 158,8, 158,6, 157,6, 155,0, 136,8, 136,7, 136,1, 131,6, 130,3, 128,6, 128,5, 128,4, 128,1, 127,9, 127,8, 127,5, 127,3, 127,1, 122,5, 114,8, 114,3, 101,4, 94,3, 93,6, 78,3, 70,0, 69,9, 69,8, 69,4, 24,2; HRMS (ESI) calculada para C₅₀H₄₂O₇Na (M+Na) 777,2828, encontrada 777,2840.

4-Benciloxibenzoato de (-)-(2R, 3R)-5,7-bis(benciloxi)-2-(4-benciloxifenil)croman-3-ilo (111)

Siguiendo el procedimiento de preparación de **102**, la esterificación de (2R, 3R)-5,7-bis(benciloxi)-2-(4-benciloxifenil)croman-3-ol con ácido 4-benciloxibenzoico proporcionó **111** con 88% de rendimiento. Pf 129-131°C; [α]_D = -51,8 (c=3,9, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,88 (d, J=8,8 Hz, 2 H), 7,43-7,27 (m, 22 H), 6,91 (s, 2 H), 6,89 (s, 2 H), 6,33 (d, J=2,0 Hz, 1 H), 6,27 (d, J=2,0 Hz, 1 H), 5,62 (bs, 1 H), 5,11 (bs, 1 H), 5,05 (s, 2 H), 5,01 (s, 2 H), 4,98 (s, 4 H), 3,09 (d, J=2,9 Hz, 2 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 165,3, 162,4, 158,6, 158,4, 157,9, 155,6, 136,8, 136,7, 136,1, 131,7, 130,1, 128,6, 128,5, 128,4, 128,1, 127,9, 127,8, 127,7, 127,5, 127,4, 127,3, 127,1, 122,5, 114,5, 114,3, 100,9, 94,6, 93,7, 77,4, 70,0, 69,9, 69,8, 68,1, 26,0; HRMS (ESI) calculada para C₅₀H₄₂O₇Na (M+Na) 777,2828, encontrada 777,2815.

4-Hidroxibenzoato de (+)-(2R, 3S)-5,7-dihidroxi-2-(3,4-dihidroxifenil)croman-3-ilo (11)

Bajo una atmósfera de H₂, Pd(OH)₂/C (20%, 100 mg) se añadió a una solución de **102** (200 mg, 0,23 mmol) en una mezcla de disolventes de THF/MeOH (1:1 v/v, 20 ml). La mezcla de reacción resultante se agitó a ta bajo una atmósfera de H₂ durante 6 h, la TLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se filtró para eliminar el catalizador. El material filtrado se evaporó y el residuo se purificó rápidamente mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (10% de MeOH/CH₂Cl₂, a continuación, 20% de MeOH/CH₂Cl₂) para proporcionar **11** (82 mg, 87% de rendimiento): pf 220-222°C (descompuesto); [α]_D = +87,2 (c=2,0, EtOH); ¹H RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 7,98 (d, J=8,8 Hz, 2 H), 7,13 (s, 1 H), 7,04 (d, J=8,8 Hz, 2 H), 6,99-6,96 (m, 2 H), 6,27 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 6,19 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 5,62 (dd, J=11,8, 6,3 Hz, 1 H), 5,34 (d, J=6,3 Hz), 3,15 (A de ABq, J=16,5, 5,2 Hz, 1 H), 3,00 (B de ABq, J=16,5, 6,4 Hz, 1 H); ¹³C RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 163,3, 160,0, 155,2, 154,5, 153,6, 143,1, 129,9, 128,7, 119,6, 116,6, 113,4, 113,3, 111,8, 111,7, 96,7, 93,8, 93,0, 76,2, 67,9, 21,9; HRMS (ESI) calculada para C₂₂H₁₈O₈Na (M+Na) 433,0899, encontrada 433,0909.

4-Hidroxibenzoato de (-)-(2R, 3R)-5,7-dihidroxi-2-(3,4-dihidroxifenil)croman-3-ilo (12)

5 Siguiendo el procedimiento de preparación de **11**, la hidrogenolisis de **104** proporcionó **12** con un rendimiento del 85%. Pf 241-243°C (descompuesto); $[\alpha]_D^{25} = -145,2$ (c=0,5, EtOH), (Lit -144,4, c=1 en Me₂CO); ¹H RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 7,89 (d, J=8,8 Hz, 2 H), 7,19 (d, J=1,9 Hz, 1 H), 7,01 (A de ABq, J=8,2, 1,9 Hz, 1 H), 6,97 (d, J=8,8 Hz, 2 H), 6,89 (B de AB, J=8,2 Hz, 1 H), 6,17 (d, J=2,3 Hz, 1 H), 6,14 (d, J=2,3 Hz, 1 H), 5,65 (m, 1 H), 5,24 (bs, 1 H), 3,19 (A de ABq, J=17,4, 4,5 Hz, 1 H), 3,07 (B de AB, J=17,4, 2,0 Hz, 1 H); ¹³C RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 164,8, 161,6, 156,8, 156,4, 156,0, 144,6, 144,5, 131,5, 130,3, 121,4, 118,0, 114,9, 114,6, 113,8, 97,8, 95,4, 94,7, 76,9, 68,5, 25,5; HRMS (ESI) calculada para C₂₂H₁₈O₈Na (M+Na) 433,0899, encontrada 433,0895.

4-Hidroxibenzoato (+)-(2R, 3S)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)croman-3-ilo (112)

10 Siguiendo el procedimiento de preparación de **11**, la hidrogenolisis de **110** proporcionó **112** con un rendimiento del 90%. Pf 253-255°C (descompuesto); $[\alpha]_D^{25} = +45,9$ (c=3,5, EtOH); ¹H RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 7,74 (d, J=8,7 Hz, 2 H), 7,26 (d, J=8,5 Hz, 2 H), 6,81 (d, J=8,7 Hz, 2 H), 6,76 (d, J=8,5 Hz, 2 H), 6,04 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 5,95 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 5,39 (dd, J=12,4, 6,9 Hz, 1 H), 5,11 (d, J=6,9 Hz, 1 H), 3,21 (A de ABq, J=16,3, 5,3 Hz, 1 H), 2,98 (B de ABq, J=16,3, 7,0 Hz, 1 H); ¹³C RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 163,7, 160,6, 156,0, 155,9, 155,1, 154,3, 130,4, 128,3, 126,8, 120,1, 113,9, 97,3, 94,4, 93,5, 77,0, 68,5, 23,0; HRMS (ESI) calculada para C₂₂H₁₈O₇Na (M+Na) 417,0950, encontrada 417,0946.

4-Hidroxibenzoato de (-)-(2R, 3R)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)croman-3-ilo (10)

20 Siguiendo el procedimiento de preparación de **11**, la hidrogenolisis de **111** proporcionó **10** con un rendimiento del 89%. Pf 214-216°C (descompuesto); $[\alpha]_D^{25} = -116,1$ (c=2,0, EtOH); ¹H RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 7,94 (d, J=8,6 Hz, 2 H), 7,56 (d, J=8,6 Hz, 2 H), 7,01 (d, J=6,8 Hz, 2 H), 6,95 (d, J=6,8 Hz, 2 H), 6,22 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 6,20 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 5,73 (bs, 1 H), 5,37 (bs, 1 H), 3,26 (A de ABq, J=17,4, 4,5 Hz, 1 H), 3,14 (B de ABq, J=17,4, 2,2 Hz, 1 H); ¹³C RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 164,5, 161,3, 156,6, 156,5, 156,1, 155,8, 131,2, 129,3, 127,5, 121,1, 114,7, 114,4, 97,5, 95,2, 94,5, 76,7, 68,2, 25,2; HRMS (ESI) calculada para C₂₂H₁₈O₇Na (M+Na) 417,0950, encontrada 417,0946.

25 Pentaacetato de 4-hidroxibenzoato de (+)-(2R, 3S)-5,7-dihidroxi-2-(3,4-dihidroxifenil)croman-3-ilo (22*)

Bajo una atmósfera de N₂, a una solución de 4-hidroxibenzoato de (+)-(2R, 3S)-5,7-dihidroxi-2-(3,4-dihidroxifenil)croman-3-ilo **11** (20 mg, 0,048 mmol) en piridina (1 ml), se añadió anhídrido acético (0,2 ml) gota a gota a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a ta durante una noche. El exceso de piridina se eliminó por destilación a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (EtOAc/n-hexano, 1/1 en v/v) para proporcionar **22*** (34 mg, 95% de rendimiento), pf: 149-151°C; $[\alpha]_D^{25} = +42,5$ (c=1,2, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,96 (d, J=8,7 Hz, 2 H), 7,31 (A de ABq, J=8,4, 1,8 Hz, 1 H), 7,26 (d, J=1,8 Hz, 1 H), 7,21 (B de AB, J=8,4 Hz, 1 H), 7,15 (d, J=8,7 Hz, 2 H), 6,70 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 6,63 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 5,51 (dd, J=11,2, 6,0 Hz, 1 H), 5,33 (d, J=6,0 Hz, 1 H), 3,04 (A de ABq, J=16,8, 5,0 Hz, 1 H), 2,83 (B de ABq, J=16,8, 6,0 Hz, 1 H), 2,31 (s, 3 H), 2,29 (s, 3 H), 2,28 (s, 3 H), 2,27 (s, 6 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 168,8, 168,7, 168,3, 167,9, 164,8, 154,5, 154,3, 149,8, 149,4, 142,2, 142,1, 136,1, 131,3, 126,9, 124,3, 123,7, 122,0, 121,6, 121,3, 110,0, 108,7, 107,6, 77,7, 69,1, 23,9, 21,0, 20,7, 20,5; HRMS (ESI) calculada para C₃₂H₂₈O₁₃Na (M+Na) 643,1428; encontrada 643,1437.

Pentaacetato de 4-hidroxibenzoato de (-)-(2R, 3R)-5,7-dihidroxi-2-(3,4-dihidroxifenil)croman-3-ilo (23*)

40 Siguiendo el procedimiento de preparación de **22***, la acetilación de **12** proporcionó **23*** con un rendimiento del 96%. Pf 91-93°C; $[\alpha]_D^{25} = -26,5$ (c=0,5, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,89 (d, J=8,7 Hz, 2 H), 7,37 (d, J=1,9 Hz, 1 H), 7,34 (A de ABq, J=8,4, 1,9 Hz, 1 H), 7,21 (B de AB, J=8,4 Hz, 1 H), 7,10 (d, J=8,7 Hz, 2 H), 6,74 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 6,59 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 5,64 (bs, 1 H), 5,22 (bs, 1 H), 3,11 (A de ABq, J=18,0, 4,5 Hz, 1 H), 3,04 (B de ABq, J=18,0, 2,4 Hz, 1 H), 2,29 (s, 3 H), 2,28 (s, 6 H), 2,26 (s, 3H), 2,25 (s, 3 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 168,8, 168,6, 168,3, 167,9, 167,8, 164,9, 154,9, 154,4, 149,7, 142,0, 141,8, 135,7, 131,3, 126,9, 124,2, 123,4, 121,7, 121,5, 109,5, 108,8, 108,0, 67,5, 26,0, 21,0, 20,7, 20,5; HRMS (ESI) calculada para C₃₂H₂₈O₁₃Na (M+Na) 643,1428; encontrada 643,1420.

Heptaacetato de 3,4,5-trihidroxibenzoato de (+)-(2R, 3S)-5,7-dihidroxi-2-(3,4-dihidroxifenil)croman-3-ilo (24*)

50 Siguiendo el procedimiento de preparación de **22***, la acetilación de 3,4,5 trihidroxibenzoato de (+)-(2R, 3S)-5,7-dihidroxi-2-(3,4-dihidroxifenil)croman-3-ilo (Sheng Biao Wan; Di Chen;. Q. Ping Dou y Tak Hang Chan. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004, 12, 3521) proporcionó **24*** con un rendimiento del 95%. Pf 140-142°C; $[\alpha]_D^{25} = +35,3$ (c=3,0, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,67 (s, 2 H), 7,28-7,26 (m, 2 H), 7,20 (d, J=8,3 Hz, 1 H), 6,68 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 6,62 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 5,47 (dd, J=11,8, 6,2 Hz, 1 H), 5,27 (d, J=6,2 Hz, 1 H), 3,02 (A de ABq, J=16,8, 5,2 Hz, 1 H), 2,81 (B de ABq, J=16,8, 6,6 Hz, 1 H), 2,29 (m, 9 H), 2,27 (s, 3 H), 2,26 (s, 3 H), 2,25 (s, 6 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 168,8, 168,2, 167,8, 167,5, 166,2, 163,3, 154,2, 149,8, 149,3, 143,3, 142,1, 138,9, 135,7, 127,5, 124,2, 123,7, 122,2, 121,6, 109,9, 108,8, 107,6, 77,5, 69,7, 24,0, 21,0, 20,7, 20,5, 20,0; HRMS (ESI) calculada para C₃₆H₃₂O₁₇Na (M+Na) 759,1537; encontrada 759,1552.

Heptaacetato de 3,4,5-trihidroxibenzoato de (-)-(2R, 3R)-5,7-dihidroxi-2-(3,4-dihidroxifenil)croman-3-ilo (25*)

5 Siguiendo el procedimiento de preparación de **22***, la acetilación de 3,4,5 trihidroxibenzoato de (-)-(2R, 3R)-5,7-dihidroxi-2-(3,4-dihidroxifenil)croman-3-ilo (Sheng Biao Wan; Di Chen; Q. Ping Dou y Tak Hang Chan. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004, 12, 3521) proporcionó **25*** con un rendimiento del 93%. Pf 105-107°C; $[\alpha]_D^{25} = -14,5$ (c=1,2, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,62 (s, 2 H), 7,33 (d, J=1,2 Hz, 1 H), 7,31 (A de AB, J=8,4 Hz, 1 H), 7,20 (B de AB, J=8,4 Hz, 1 H), 6,73 (d, J= 2,0 Hz, 1 H), 6,60 (d, J=2,0 Hz, 1 H), 5,63 (bs, 1 H), 5,20 (bs, 1 H), 3,10 (A de ABq, J=18,0, 4,5 Hz, 1 H), 3,00 (B de AB, J=18,0 Hz, 1 H), 2,28-2,27 (m, 15 H), 2,25 (s, 3 H), 2,23 (s, 3 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 168,8, 168,3, 167,9, 167,4, 166,2, 163,5, 154,9, 149,7, 143,3, 142,0, 141,9, 138,9, 135,3, 127,4, 124,3, 123,5, 122,2, 121,8, 109,4, 108,9, 108,0, 68,1, 25,9, 21,0, 20,7, 20,5, 20,1; HRMS (ESI) calculada para C₃₆H₃₂O₁₇Na (M+Na) 759,1537; encontrada 759,1571.

Tetraacetato de 4-hidroxibenzoato de (+)-(2R, 3S)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)croman-3-ilo (114)

15 Siguiendo el procedimiento de preparación de **22***, la acetilación de **112** proporcionó **114** con un rendimiento del 91%. Pf 167-169°C; $[\alpha]_D^{25} = +3,2$ (c=1,0, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,94 (d, J=8,7 Hz, 2 H), 7,42 (d, J=8,5 Hz, 2 H), 7,14 (d, J=8,7 Hz, 2 H), 7,09 (d, J=8,5 Hz, 2 H), 6,69 (d, J=2,2 Hz, 2 H), 6,61 (d, J=2,2 Hz, 2 H), 5,53 (dd, J=11,5, 6,3 Hz, 1 H), 5,31 (d, J=6,3 Hz, 2 H), 3,01 (A de ABq, J=16,7, 5,1 Hz, 1 H), 2,81 (B de ABq, J=16,7, 6,3 Hz, 1 H), 2,30 (s, 3 H), 2,28 (s, 3 H), 2,27 (s, 3 H), 2,25 (s, 3 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 169,1, 168,8, 168,7, 168,3, 164,7, 154,6, 154,5, 150,7, 149,8, 149,4, 134,8, 131,2, 127,5, 127,0, 121,8, 121,6, 110,2, 108,6, 107,6, 78,1, 69,1, 24,1, 21,0, 20,7; HRMS (ESI) calculada para C₃₀H₂₇O₁₁ (M+H) 563,1553; encontrada 563,1567; y calculada para C₃₀H₂₆O₁₁Na (M+Na) 585,1373; encontrada 585,1387.

20 Tetraacetato de 4-hidroxibenzoato de (-)-(2R, 3R)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)croman-3-ilo (21*)

25 Siguiendo el procedimiento de preparación de **22***, la acetilación de **10** proporcionó **21*** con un rendimiento del 89%. Pf 144-145°C; $[\alpha]_D^{25} = -30,7$ (c=2,5, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,90 (d, J=8,7 Hz, 2 H), 7,49 (d, J=8,5 Hz, 2 H), 7,10 (d, J=8,5 Hz, 2 H), 7,08 (d, J=8,7 Hz, 2 H), 6,74 (d, J=2,2 Hz, 2 H), 6,59 (d, J=2,2 Hz, 2 H), 5,64 (bs, 1 H), 5,22 (s, 1 H), 3,12 (A de ABq, J=17,7, 4,4 Hz, 1 H), 3,02 (B de ABq, J=17,7, 1,8 Hz, 1 H), 2,28 (s, 6 H), 2,27 (s, 3 H), 2,25 (s, 3 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 169,1, 168,9, 168,7, 168,4, 164,8, 155,2, 154,4, 150,5, 149,7, 134,5, 131,2, 127,4, 126,9, 121,6, 109,7, 108,7, 108,0, 67,7, 26,2, 21,0, 20,7; HRMS (ESI) calculada para C₃₀H₂₆O₁₁Na (M+Na) 585,1373; encontrada 585,1371.

Hexaacetato de 3,4,5-trihidroxibenzoato de (+)-(2R, 3S)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)croman-3-ilo (16*)

30 Siguiendo el procedimiento de preparación de **22***, la acetilación de 3,4,5 trihidroxibenzoato de (+)-(2R, 3S)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)croman-3-ilo (Sheng Biao Wan; Tak Hang Chan. *Tetrahedron*, 2004, 60, 8207) proporcionó **16*** con un rendimiento del 93%. Pf 96-98°C; $[\alpha]_D^{25} = +17,7$ (c=1,0, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,66 (s, 2 H), 7,41 (d, J=8,5 Hz, 2 H), 7,10 (d, J=8,5 Hz, 2 H), 6,68 (d, J=2,2 Hz, 2 H), 6,62 (d, J=2,2 Hz, 2 H), 5,51 (dd, J=12,2, 6,7 Hz, 1 H), 5,26 (d, J=6,7 Hz, 1 H), 3,02 (A de ABq, J=16,7, 5,3 Hz, 1 H), 2,81 (B de ABq, J=16,7, 6,6 Hz, 1 H), 2,30 (s, 6 H), 2,29 (s, 3 H), 2,28 (s, 3 H), 2,27 (s, 6 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 169,1, 168,8, 168,3, 167,5, 166,2, 163,3, 154,5, 150,7, 149,9, 149,4, 143,4, 138,9, 134,5, 127,5, 122,2, 121,8, 121,6, 110,1, 108,7, 78,0, 69,8, 24,3, 21,0, 20,7, 20,5, 20,1; HRMS (ESI) calculada para C₃₄H₃₀O₁₅Na (M+Na) 701,1482; encontrada 701,1490.

Hexaacetato de 3,4,5-trihidroxibenzoato de (-)-(2R, 3R)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)croman-3-ilo (19*)

40 Siguiendo el procedimiento de preparación de **22***, la acetilación de 3,4,5 trihidroxibenzoato de (-)-(2R, 3R)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)croman-3-ilo (Sheng Biao Wan; Tak Hang Chan. *Tetrahedron*, 2004, 60, 8207) proporcionó **19*** con un rendimiento del 91%. Pf 152-154°C; $[\alpha]_D^{25} = -35,5$ (c=2,5, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,62 (s, 2 H), 7,46 (d, J=8,5 Hz, 2 H), 7,11 (d, J=8,5 Hz, 2 H), 6,73 (d, J=2,1 Hz, 1 H), 6,60 (d, J=2,1 Hz, 1 H), 5,60 (bs, 1 H), 5,21 (s, 1 H), 3,10 (A de ABq, J=17,8, 4,5 Hz, 1 H), 3,00 (B de ABq, J=17,8, 1,8 Hz, 1 H), 2,28-2,26 (m, 18 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 169,1, 168,8, 168,3, 167,4, 166,2, 163,5, 155,1, 150,6, 149,7, 143,3, 138,8, 134,2, 127,5, 127,4, 122,2, 121,7, 109,5, 108,8, 108,0, 77,2, 68,3, 26,0, 21,0, 20,7, 20,5, 20,1; HRMS (ESI) calculada para C₃₄H₃₀O₁₅Na (M+Na) 701,1482; encontrada 701,1452.

(E)-3-[2,4-bis(benciloxi)-6-hidroxifenil]-1-fenil-propeno (#a)

50 Siguiendo el procedimiento de la bibliografía (Li, L.; Chan, T. H. *Org. Lett.* 2001, 5, 739), alcohol cinámico se hizo reaccionar con 3,5-dibenciloxifenol para producir (#a) como un sólido blanco (62% de rendimiento); pf 76-78°C; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,40-7,24 (m, 15 H), 6,48 (A de AB, J=15,9 Hz, 1 H), 6,35 (B de ABt, J=15,9, 5,5 Hz, 1 H), 6,27 (d, J=2,1 Hz, 1 H), 6,16 (d, J=2,1 Hz, 1 H), 5,07 (s, 1 H), 5,02 (s, 2 H), 4,99 (s, 2 H), 3,59-3,57 (d, J=5,5 Hz, 2 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 158,5, 157,6, 155,4, 137,0, 136,8, 136,6, 130,2, 128,3, 128,2, 128,1, 128,0, 127,8, 127,6, 127,3, 127,0, 126,8, 125,8, 106,6, 94,8, 93,4, 70,1, 69,9, 26,2; HRMS (ESI) calculada para C₂₉H₂₆O₃Na (M+Na) 445,1780, encontrada 445,1793.

(+)-(1S, 2S)-3-[2,4-bis(benciloxi)-6-hidroxi-fenil]-1-fenilpropano-1,2-diol ((+)-#b)

5 Siguiendo el procedimiento de la bibliografía (Li, L.; Chan, T. H. *Org. Lett.* 2001, 5, 739), pero con (#a) como material de partida y AD-mix- α como reactivo de dihidroxilación, se obtuvo (+)-#b (47% de rendimiento) como un sólido blanco; pf 121-123°C; $[\alpha]_D^{25} = +4,7$ (c=0,6, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,38-7,19 (m, 13 H), 7,10 (m, 2 H), 6,23 (d, J=2,3 Hz, 1 H), 6,17 (d, J=2,3 Hz, 1 H), 4,94 (s, 2 H), 4,82 (AB, J=11,7 Hz, 2 H), 4,47 (d, J=6,6 Hz, 1 H), 3,97 (m, 1 H), 2,88 (A de ABt, J=14,6, 3,6 Hz, 1 H), 2,72 (B de ABt, J=14,6, 8,6 Hz, 1 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 158,8, 157,6, 157,0, 140,0, 136,6, 136,5, 128,3, 128,2, 128,1, 128,0, 127,7, 127,4, 127,3, 126,8, 126,5, 105,9, 95,6, 93,2, 76,6, 69,8, 69,7, 26,2; HRMS (ESI) calculada para C₂₉H₂₈O₅Na (M+Na) 479,1834, encontrada 479,1841.

(+)-(2S, 3S)-cis-5,7-bis(benciloxi)-2-fenilcroman-3-ol ((+)-#c)

10 Siguiendo el procedimiento de la bibliografía (Li, L.; Chan, T. H. *Org. Lett.* 2001, 5, 739), pero con (+)-#b como material de partida, se obtuvo (+)-#c (rendimiento del 47%) como un sólido blanco; pf 60-62°C; $[\alpha]_D^{25} = +0,9$ (c=1,0, acetato de etilo); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,49-7,30 (m, 15 H), 6,29 d, J=2,2 Hz, 1 H), 6,27 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 5,02 (bs, 1 H), 4,99 (s, 4 H), 4,25 (bs, 1 H), 3,03 (A de ABt, J=17,2, 1,4 Hz, 1 H), 2,96 (B de ABt, J=17,2, 4,2 Hz, 1 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 158,7, 158,2, 155,2, 138,1, 136,9, 136,8, 128,5, 128,4, 128,0, 127,9, 127,8, 127,4, 127,1, 126,2, 100,9, 94,6, 94,0, 78,6, 70,0, 69,8, 66,2, 28,2; HRMS (ESI) calculada para C₂₉H₂₆O₄Na (M+Na) 461,1729, encontrada 461,1741.

3,4,5-Trihidroxibenzoato de (+)-(2S, 3S)-5,7-dihidroxi-2-fenilcroman-3-ilo ((+)-15)

20 Siguiendo el procedimiento de la bibliografía (Li, L.; Chan, T. H. *Org. Lett.* 2001, 5, 739), pero con (+)-#c como material de partida, se obtuvo el compuesto (+)-15 (90% de rendimiento): pf 258-260°C (descompuesto); $[\alpha]_D^{25} = +13,9$ (c=3,5, etanol); ¹H RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 7,73-7,71 (m, 2 H), 7,49-7,45 (m, 2 H), 7,41-7,38 (m, 1 H), 7,17 (s, 2 H), 6,24 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 6,23 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 5,76 (bs, 1 H), 5,44 (bs, 1 H), 3,27 (A de ABt, J=17,4, 4,5 Hz, 1 H), 3,14 (B de ABt, J=17,4, 1,4 Hz, 1 H); ¹³C RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 164,7, 156,6, 156,3, 155,7, 144,7, 138,5, 137,6, 127,6, 127,3, 126,3, 120,4, 108,7, 97,7, 95,4, 94,6, 77,0, 68,1, 25,3; HRMS (ESI) calculada para C₂₂H₁₈O₈Na (M+Na) 433,0899, encontrada 433,0904.

25 2-Bencil-3,5-bis(benciloxi)fenol (#d)

30 Se añadió etanotiol (10 g, 216 mmol) gota a gota a una suspensión agitada de hidruro de sodio (dispersión al 60% en aceite mineral, 2,4 g, 100 mmol) en DMF seca (120 ml) a 0°C. Después de 1 h, se añadió 1,3,5-tribenciloxibenceno (24 g, 60 mmol) en 10 lotes y la mezcla se calentó a 150°C durante 1,5 h. Después se enfrió la reacción, se añadió agua (500 ml) y la mezcla se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄) y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (benceno) para proporcionar 3,5-dibenciloxifenol como un sólido blanco (11%) después de recristalizar en tetracloruro de carbono, y el producto #d como un sólido blanco (56%) después de recristalizar en EtOAc y hexano. El compuesto #d fue identificado mediante el pf 107-109°C; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,36-7,23 (m, 15 H), 6,25 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 6,07 (d, J=2,2 Hz, 1 H), 4,96 (s, 2 H), 4,92 (s, 2 H), 3,99 (s, 2 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 158,4, 157,9, 154,9, 140,7, 136,7, 136,6, 128,4, 128,2, 128,1, 127,8, 127,5, 127,3, 127,0, 125,6, 108,5, 94,7, 93,3, 70,2, 69,9, 28,3; HRMS (ESI) calculada para C₂₇H₂₄O₃Na (M+Na) 419,1623, encontrada 419,1645.

(E)-3-[2,4-bis(benciloxi)-5-bencil-6-hidroxi-fenil]-1-[3,4-bis(benciloxi)fenil]propeno (#e)

40 A ta bajo una atmósfera de N₂, se añadió H₂SO₄/SiO₂ al 25% (1,6 g, 4 mmol) en un lote a la mezcla agitada de 2-bencil-3,5-bis(benciloxi)fenol (3,96 g, 10 mmol) y alcohol (E)-3,4-bis(benciloxi)cinámico (3,46 g, 10 mmol) en CH₂Cl₂ (80 ml). La mezcla resultante se agitó a ta durante una noche. Después de la filtración y evaporación, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc/n-hexano = 1/7 v/v) y recristalizó en EtOAc y n-hexano para proporcionar un sólido blanco, (3,4 g, 46,0% de rendimiento): pf 93-95°C; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,41-7,22 (m, 30 H), 6,92 (s, 1 H), 6,79 (s, 1 H), 6,78 (d, J=4,0 Hz, 1 H), 6,35 (A de AB, J=15,8 Hz, 1 H), 6,26 (s, 1 H), 6,13-6,07 (B de ABt, J=15,8, 5,0 Hz, 1 H), 5,08 (s, 2 H), 5,07 (s, 2 H), 4,99 (s, 4 H), 4,02 (s, 2 H), 3,55 (d, J=5,0 Hz, 2 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 156,1, 155,6, 154,0, 148,9, 148,2, 141,1, 137,2, 137,1, 131,0, 130,1, 128,5, 128,4, 128,2, 127,8, 127,7, 127,6, 127,3, 127,2, 127,1, 126,5, 125,7, 119,7, 114,9, 112,4, 109,6, 107,3, 91,4, 71,1, 70,5, 70,3, 28,8, 26,6; HRMS (ESI): calculada para C₅₀H₄₄O₅Na (M+Na) 747,3086, encontrada 747,3096.

(-)-(1R, 2R)-3-[2,4-bis(benciloxi)-5-bencil-6-hidroxi-fenil]-1-[3,4-bis(benciloxi)fenil]propano-1,2-diol ((-)-#f)

50 El propeno (#e) (3,4 g, 4,6 mmol) se disolvió en DMF seco (30 ml) y a esta solución se añadieron sucesivamente imidazol (1,03 g, 15,2 mmol) y TBSCl (1,2 g, 7,8 mmol). La mezcla resultante se agitó a ta durante 3 días y después se añadió una solución de Na₂CO₃ saturado para detener la reacción. La mezcla se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (n-hexano y EtOAc = 9/1 v/v) para proporcionar [3,5-bis(benciloxi)-6-bencil-2-[3-[3,4-bis(benciloxi)fenil]alil]fenoxi]-terc-butildimetilsilano. Este material se utilizó en la siguiente etapa sin una purificación adicional.

55

AD-mix- β (13,0 g) y metanosulfonamida (0,87 g) se disolvieron en una mezcla de disolvente de *t*-BuOH (50 ml) y H₂O (50 ml). La mezcla resultante se agitó a ta durante 5 min, después la mezcla se enfrió a 0°C y se añadió una solución de [3,5-bis(benciloxi)-6-bencil-2-[3-[3,4-bis(benciloxi)fenil]alil]fenoxi]-*terc*-butildimetilsilano en diclorometano (50 ml). Después de agitar la mezcla durante una noche, se añadieron dos lotes más de AD-mix- β (13,0 g cada uno) y metanosulfonamida (0,87 g cada uno) cada uno a intervalos de 24 h. Después de otras 24 h de agitación a 0°C, la TLC mostró que la reacción se había completado. A continuación, una solución de Na₂S₂O₃ al 10% se añadió para detener la reacción. La mezcla se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (*n*-hexano y EtOAc = 4/1 v/v) para proporcionar [3,5-bis(benciloxi)-6-bencil-2-[3-[3,4-bis(benciloxi)fenil]-1,2-dihidroxi-propil]fenoxi]-*terc*-butildimetilsilano. El compuesto resultante se disolvió en THF (75 ml) y se añadió TBAF (10 ml, 1 M en THF). La mezcla resultante se agitó a ta durante 4 h y se añadió solución de NaHCO₃ saturado. La mezcla se extrajo con EtOAc y las capas orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (EtOAc/hexano = 1/2 v/v) y después recristalizó en EtOAc y hexano para proporcionar un sólido (2,4 g, 67% de rendimiento) de color blanco (-)-**#f**: pf 157-159°C; [α]_D = -5,5 (*c* = 1,1, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,41-7,09 (m, 25 H), 6,91 (d, *J* = 1,6 Hz, 1 H), 6,77 (m, 2 H), 6,17 (s, 1 H), 5,06 (s, 4 H), 4,98 (s, 2 H), 4,82 (AB, *J* = 11,9 Hz, 2 H), 4,42 (d, *J* = 6,6 Hz, 1 H), 4,05 (s, 2 H), 3,91 (b, 1 H), 2,93 (A de ABt, *J* = 14,5, 3,2 Hz, 1 H), 2,72 (B de ABt, 14,5, 8,5 Hz, 1 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 156,4, 155,6, 155,3, 148,9, 148,8, 142,1, 137,2, 137,1, 137,0, 133,5, 128,6, 128,5, 128,4, 128,0, 127,8, 127,7, 127,6, 127,3, 127,2, 127,1, 126,7, 125,3, 119,9, 114,5, 113,6, 112,1, 111,2, 106,7, 90,9, 77,2, 76,7, 71,1, 70,9, 70,3, 70,2, 29,1, 26,8; HRMS (ESI) calculada para C₅₀H₄₆O₇Na (M+Na) 781,3141, encontrada 781,3110.

(-)-(2S, 3R)-trans-5,7-bis(benciloxi)-8-bencil-2-[3,4-bis(benciloxi)fenil]croman-3-ol ((-)-#g).

A una suspensión de (-)-**#f** (2,4 g, 3,1 mmol) en 1,2-dicloroetano (50 ml) se añadió ortoformiato de trietilo (1 ml), seguido de PPTS (450 mg, 1,8 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 20 min hasta que el sólido se disolvió. La mezcla se calentó después a 55°C durante 5 h hasta que la TLC mostró que la reacción se había completado. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se disolvió en DME (30 ml) y se añadió MeOH (30 ml), K₂CO₃ (450 mg). La mezcla se agitó a ta durante una noche. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (EtOAc/hexano, 1/3 v/v) para proporcionar el producto deseado como un sólido blanco (1,8 g, rendimiento del 77%): pf 145-146°C; [α]_D = -20,1 (*c* = 1,3, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,42-7,15 (m, 25 H), 6,93 (d, *J* = 1,6 Hz, 1 H), 6,88 (A de AB, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 6,82 (B de ABt, *J* = 8,3, 1,6 Hz, 1 H), 6,24 (s, 1 H), 5,13 (s, 2 H), 5,02 (s, 2 H), 5,00 (s, 2 H), 4,98 (s, 2 H), 4,63 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 4,04 (AB, *J* = 14,2 Hz, 2 H), 3,86 (m, 1 H), 3,10 (A de ABt, *J* = 5,6, 16,4 Hz, 1 H), 2,67 (B de ABt, *J* = 9,0, 16,4 Hz, 1 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 155,8, 155,5, 152,9, 148,9, 148,8, 142,2, 137,2, 137,1, 137,0, 136,9, 136,8, 131,2, 128,7, 128,5, 128,4, 128,3, 127,9, 127,8, 127,7, 127,4, 127,2, 127,1, 127,0, 125,2, 120,2, 114,5, 113,2, 110,2, 102,4, 91,1, 81,2, 71,1, 70,9, 70,4, 69,9, 68,2, 28,6, 27,6. HRMS (ESI) calculada para C₅₀H₄₄O₆Na (M+Na) 763,3036, encontrada 763,3032.

(+)-(2R)-5,7-bis(benciloxi)-8-bencil-2-[3,4-bis(benciloxi)fenil]croman-3-ona ((-)-#h).

Periodinano de Dess-Martin (6,3 ml, 15% g/ml en CH₂Cl₂, 2,2 mmol) se añadió en un lote a una solución agitada de (-)-**#g** (900 mg, 1,2 mmol) en CH₂Cl₂ (30 ml) bajo atmósfera de N₂. La mezcla se agitó a ta durante aproximadamente 2 h hasta que la TLC mostró la ausencia de material de partida. Posteriormente, se añadió una solución saturada de NaHCO₃ (15 ml) y 10% de solución acuosa de Na₂S₂O₃ (15 ml) para detener la reacción. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄) y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (benceno) y después recristalizó en CHCl₃ y éter para proporcionar el compuesto deseado (770 mg, 86%): pf 143-145°C, [α]_D = -17,1 (*c* = 1,1, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,43-7,07 (m, 25 H), 6,89 (s, 1 H), 6,84 (AB, *J* = 8,5 Hz, 2 H), 6,33 (s, 1 H), 5,13-5,04 (m, 6 H), 5,02 (s, 1 H), 4,99 (s, 2 H), 4,05 (AB *J* = 14,2 Hz, 2 H), 3,67 (AB, *J* = 20,8 Hz, 2 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 205,8, 156,5, 154,8, 152,5, 149,0, 148,7, 141,7, 137,1, 136,9, 136,8, 136,5, 128,6, 128,5, 128,4, 128,1, 128,0, 127,8, 127,7, 127,3, 127,1, 125,4, 120,0, 114,5, 113,2, 111,9, 102,4, 92,6, 82,9, 71,0, 70,5, 70,2, 34,0, 28,8; HRMS (ESI) calculada para C₅₀H₄₂O₆Na (M+Na) 761,2879, encontrada 761,2843.

(+)-(2S, 3S)-cis-5,7-bis(benciloxi)-8-bencil-2-[3,4-bis(benciloxi)fenil]croman-3-ol ((+)-#i).

Bajo una atmósfera de N₂, la cetona (-)-**#h** (700 mg, 0,95 mmol) se disolvió en THF seco (15 ml) y la solución se enfrió a -78°C. Después se añadió gota a gota L-selectrida (1,5 ml, solución 1 M en THF, 1,5 mmol). La solución resultante se agitó a -78°C durante 8 h. Cuando la TLC mostró que la reacción se había completado, se añadió solución acuosa saturada de NaHCO₃ (10 ml) para detener la reacción. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄) y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (5% de EtOAc/benceno) y después recristalizó con etanol y EtOAc para proporcionar el producto deseado (630 mg, 90%) como un sólido blanco: pf 129-131°C, [α]_D = +5,3 (*c* = 1,2, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,44-7,07 (m, 25 H), 7,05 (s, 1 H), 6,93 (AB, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 6,26 (s, 1 H), 5,15 (s, 2 H), 5,02 (s, 2 H), 5,00 (s, 4 H), 4,92 (bs, 1 H), 4,20 (bs, 1 H), 4,10 (AB, *J* = 14,5 Hz, 2 H), 3,07 (A de AB, *J* = 17,2 Hz, 1 H), 2,92 (B de ABt, *J* = 17,2, 4,2 Hz, 1 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 156,2, 155,9, 152,8, 148,9, 148,5, 142,1, 137,2, 137,1, 137,0, 131,6, 128,5, 128,4, 128,0, 127,8, 127,7, 127,4, 127,2, 125,2, 118,9, 114,9, 112,9, 110,2, 101,1, 91,4, 78,0, 71,2, 71,0, 70,5, 70,0, 66,1, 28,6, 28,2; HRMS (ESI) calculada para C₅₀H₄₄O₆Na (M+Na)

763,3036 encontrada 763,3024.

3,4,5-Tris(benciloxi)benzoato de (+)-(2S, 3S)-5,7-bis(benciloxi)-8-bencil-2-[3,4-bis(benciloxi)-fenil]croman-3-ilo ((+)-#j).

5 Bajo una atmósfera de N₂, una solución de ácido 3,4,5-tris(benciloxi)benzoico (170 mg, 0,39 mmol) se sometió a reflujo con cloruro de oxalilo (1 ml) en CH₂Cl₂ seco (10 ml) y una gota de DMF durante 3 h. El exceso de cloruro de oxalilo y el disolvente se eliminaron mediante destilación y el residuo se secó a vacío durante 3 h y se disolvió en CH₂Cl₂ (2 ml). Esta solución se añadió gota a gota a una solución de (+)-#i (150 mg, 0,20 mmol) y DMAP (75 mg, 0,62 mmol) en CH₂Cl₂ (15 ml) a 0°C. La mezcla se agitó a ta durante una noche, después se añadió solución acuosa saturada de NaHCO₃. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (EtOAc al 5%/benceno) para proporcionar el compuesto deseado (215 mg, 91%). La recristalización en CHCl₃ y éter proporcionó un polvo blanco: pf 52-54°C; [α]_D²⁰ = +37,5 (c=1,0, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,39-7,10 (m, 42 H), 6,99 (t, J=7,4 Hz, 1 H), 6,93 (AB, J=8,3 Hz, 2 H), 6,31 (s, 1 H) <5,65 (bs, 1 H), 5,13 (bs, 1 H), 5,07 (s, 2 H), 5,02 (s, 4 H), 5,00 (s, 2 H), 4,92 (s, 4 H), 4,83 (AB, J=11,8 Hz, 2 H), 4,11 (s, 1 H), 3,15 (bs, 1 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 165,2, 156,0, 155,9, 153,2, 152,3, 148,8, 148,6, 142,6, 142,2, 137,4, 137,2, 137,0, 136,5, 131,4, 128,7, 128,6, 128,5, 128,4, 128,2, 128,0, 127,9, 127,7, 127,3, 127,2, 125,4, 125,1, 119,4, 114,6, 113,2, 110,3, 109,2, 101,0, 91,2, 75,1, 71,1, 70,5, 70,0, 68,6, 28,7, 26,2; HRMS (ESI) calculada para C₇₈H₆₆O₁₀Na (M+Na) 1185,4554, encontrada 1185,4542.

3,4,5-Tris(benciloxi)benzoato de (-)-(2S, 3R)-5,7-bis(benciloxi)-8-bencil-2-[3,4-bis(benciloxi)-fenil]croman-3-ilo ((-)-#k).

20 Siguiendo el procedimiento usado para la preparación de (-)-#j pero con (-)-#g como material de partida, se obtuvo 3,4,5-tris(benciloxi)benzoato de (-)-(2S, 3R)-5,7-bis(benciloxi)-8-bencil-2-[3,4-bis(benciloxi)fenil]croman-3-ilo (rendimiento del 90%) como un sólido blanco: pf 103-105°C, [α]_D²⁰ = -9,8 (c=1,3, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,37-7,11 (m, 42 H), 6,90 (s, 1 H), 6,77 (m, 2 H), 6,27 (s, 1 H), 5,42 (m, 1 H), 5,18 (d, J=6,3 Hz, 1 H), 5,06 (s, 4 H), 5,05-4,99 (m, 4 H), 4,97 (s, 4 H), 4,88 (s, 2 H), 4,12 (AB, J=14,1 Hz, 2 H), 3,01 (A de ABt, J=16,8, 5,0 Hz, 1 H), 2,89 (B de ABt, J=16,8, 6,4 Hz, 1 H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 156,0, 155,9, 155,4, 152,5, 152,3, 148,8, 148,6, 142,3, 142,1, 137,3, 137,1, 137,0, 136,9, 136,5, 131,3, 128,7, 128,5, 128,4, 128,3, 128,1, 128,0, 127,9, 127,8, 127,7, 127,5, 127,3, 127,2, 127,1, 125,3, 124,9, 114,6, 112,8, 110,2, 108,9, 101,5, 91,0, 78,0, 75,0, 71,2, 71,1, 71,0, 70,4, 70,0, 69,9, 28,6, 24,0; HRMS (ESI) calculada para C₇₈H₆₆O₁₀Na (M+Na) 1185,4554, encontrada 1185,4573.

3,4,5-Trihidroxibenzoato de (+)-(2S, 3S)-5,7-dihidroxi-8-bencil-2-[3,4-dihidroxi-fenil]croman-3-ilo ((+)-#l).

35 Bajo una atmósfera de H₂, se añadió Pd(OH)₂/C (20%, 400 mg) a una solución de (+)-#j (200 mg, 0,17 mmol) en una mezcla de disolvente de THF/MeOH (1:1 v/v, 20 ml). La mezcla de reacción se agitó a ta bajo atmósfera de H₂ durante 6 h hasta que la TLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se filtró para eliminar el catalizador. El material filtrado se evaporó y el residuo se purificó rápidamente mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (10% de MeOH/CH₂Cl₂, a continuación, 20% de MeOH/CH₂Cl₂) para proporcionar galato de (+)-8-bencilcatequina ((+)-#1) (82 mg, 90% de rendimiento): pf 243-245°C (descompuesto); [α]_D²⁰ = +123 (c=1,8, acetona); ¹H RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 7,53 (d, J=7,4 Hz, 2 H), 7,42 (t, J=7,6 Hz, 2 H), 7,26-7,21 (m, 4 H), 7,04 (AB, J=8,2 Hz, 2 H), 6,31 (s, 1 H), 5,75 (bs, 1 H), 5,32 (bs, 1 H), 4,22 (AB, J=14,3 Hz, 2 H), 3,29 (A de ABt, J=17,4, 4,4 Hz, 1 H), 3,17 (B de AB, J=17,4 Hz, 1 H); ¹³C RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 165,2, 154,2, 154,1, 153,6, 144,9, 144,6, 144,3, 142,6, 137,9, 130,6, 128,4, 127,8, 125,0, 120,9, 118,1, 114,7, 113,7, 109,1, 106,7, 98,0, 95,3, 77,1, 68,3, 25,9; HRMS (ESI) calculada para C₂₉H₂₄O₁₀Na (M+Na) 555,1267, encontrada 555,1279.

3,4,5-Trihidroxibenzoato de (-)-(2S, 3R)-5,7-dihidroxi-8-bencil-2-[3,4-dihidroxi-fenil]croman-3-ilo ((-)-16)

45 Siguiendo el procedimiento para la preparación (+)-#1, pero con (-)-#k como material de partida, se obtuvo galato de (-)-8-bencilcatequina ((-)-16) (91% de rendimiento): pf 239-241°C (descompuesto); [α]_D²⁰ = -35 (c=2,0, acetona); ¹H RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 7,44 (d, J=7,1 Hz, 2 H), 7,33 (t, J=7,5 Hz, 2 H), 7,23 (s, 2 H), 7,21 (t, J=7,3 Hz, 1 H), 6,92-6,86 (m, 2 H), 6,34 (s, 1 H), 5,56 (m, 1 H), 5,35 (d, J=6,2 Hz, 1 H), 4,17 (AB, J=14,3 Hz, 2 H), 3,12 (A de ABt, J=16,5, 5,2 Hz, 1 H), 2,98 (B de ABt, J=16,5 6,2 Hz, 1 H); ¹³C RMN (acetona-d₆, 400 MHz): δ 165,0, 154,1, 153,7, 152,8, 144,9, 144,7, 144,6, 142,2, 137,8, 130,2, 128,3, 127,5, 124,8, 120,5, 117,9, 114,8, 113,2, 108,8, 106,2, 98,2, 95,1, 77,7, 69,4, 23,5; HRMS (ESI) calculada para C₂₉H₂₄O₁₀Na 555,1267, encontrada 555,1285.

50 Pruebas de estabilidad de (-)-EGCG y 1

55 (-)-EGCG o 1 (0,1 mM) se incubó con medio de cultivo RPMI 1640 a 37°C. En diferentes puntos de tiempo, se inyectaron 15 µl del medio en una HPLC equipada con una columna de fase inversa C-18 (CAPCELL PAK C18 UG 120, Shiseido Co., Ltd., 4,6 mm i.d. x 250 mm); caudal de 1 mL/min; detección, UV 280 nm; para (-)-EGCG, los puntos de tiempo fueron 0, 10, 20, 40, 60, 90, 120 minutos y la fase móvil, 20% de acetonitrilo acuoso y 0,01% de TFA; para el profármaco 1, los puntos de tiempo fueron 0, 30, 60, 90, 120 minutos y la fase móvil, 50% de acetonitrilo acuoso y 0,01% de TFA.

Hidrólisis enzimática de 1

Se añadió tampón de lisis (pH 5) (0,25 ml) a 2×10^6 células T Jurkat. Este podía romper la membrana celular de las células y liberar las enzimas citoplasmáticas. Se añadió PBS (0,75 ml), que neutralizaba el medio hasta el valor de pH óptimo (pH 7) para las enzimas. El profármaco **1** (0,25 mM) se añadió a la mezcla de reacción y se incubó a 37°C. En diferentes puntos de tiempo (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 y 360 minutos), se tomó una parte alícuota (0,06 ml) de la mezcla de reacción, se filtró y se inyectó en la HPLC y se analizó como se ha descrito anteriormente.

Hidrólisis de 1 en presencia de vitamina C en medio de cultivo con o sin material lisado

El compuesto **1** (35 μ M) se incubó con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (1 ml que contenía 1,67 mg/ml de vitamina C) a 37°C. En diferentes puntos de tiempo, se inyectaron 10 μ l de la solución en una HPLC equipada con una columna C-18 de fase inversa; caudal de 1 mL/min; detección, UV 280 nm; fase móvil, 0-8 minutos (20% de acetonitrilo acuoso y 0,016% de TFA), 8-13 minutos (variando desde 20% de acetonitrilo acuoso con 0,016% de TFA a 60% de acetonitrilo acuoso con 0,008% de TFA).

Para la investigación de la hidrólisis de **1** en presencia de material lisado, se incubó la misma concentración de **1** con DMEM (2 ml que contenían 1,67 mg/ml de vitamina C) en presencia del material lisado (5×10^5 células de cáncer de mama con 0,15 ml de tampón de lisis). En diferentes puntos de tiempo, se tomó una parte alícuota (0,06 ml) de la mezcla de reacción, se filtró, se inyectó en la HPLC y se analizó como se ha descrito anteriormente.

Cultivos celulares

Las células T Jurkat humanas y LNCaP se cultivaron en RPMI complementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Los linfocitos citotóxicos naturales no transformados (línea YT) se cultivaron en medio RPMI que contenía con 10% (v/v) de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, piruvato de sodio MEM 1 mM y solución de aminoácidos no esenciales MEM 0,1 mM. Células de cáncer de mama humano MCF-7, células de fibroblastos humanos normales (WI-38) y transformadas con virus de simio (VA-13) se cultivaron en medio de Eagle modificado con Dulbecco complementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina. Todos los cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C.

Preparación del extracto celular y transferencia Western

Los extractos de células enteras se prepararon como se ha descrito previamente (An B, Goldfarb RH, Siman R, Dou QP. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. *Cell Death Differ* 1998; 5: 1062-75). Se realizó un análisis de la expresión de Bax, IKBa, p27, PAW y la proteína ubiquitinada usando anticuerpos monoclonales o policlonales de acuerdo con protocolos descritos previamente (An B et al.).

Inhibición de la actividad del proteasoma 20s purificado mediante (-)-EGCG o polifenoles de té sintéticos

La medición de la actividad similar a quimotripsina del proteasoma 20s se llevó a cabo mediante la incubación de 0,5 μ g de proteasoma 20s purificado de conejo con sustrato peptídico fluorogénico 40 μ M, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, con o sin varias concentraciones de polifenoles naturales y sintéticos de té como se ha descrito previamente (Nam S et. al.).

Inhibición de la actividad del proteasoma en células intactas mediante polifenoles naturales/sintéticos de té

Las células VA-13 o WI-38 se cultivaron en placas de 24 pocillos (2 ml/pocillo) hasta una confluencia del 70-80%, seguido de 24 h de tratamiento con (-)-EGCG, **2** o **2a** 25 μ M. Después se añadió el sustrato Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC 40 μ M durante 2,5 horas a 37°C y se midió la actividad de tipo quimotripsina como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, las células se trataron con cada compuesto a 25 μ M durante 4 o 24 h, se recogieron y se lisaron. A continuación se incubó Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (40 μ M) con el material lisado celular preparado durante 2,5 h y la actividad similar a quimotripsina se midió como se ha descrito anteriormente.

Inmunotinción de células apoptóticas con anti-PARP escindida conjugado con FITC

La inmunotinción de células apoptóticas se realizó mediante la adición de un anticuerpo policlonal conjugado con FITC que reconoce la polimerasa de poli(ADP-ribosa) escindida (PARP) y se visualizó en un microscopio Axiovert 2 5 (Zeiss; Thornwood, NY). Las células se cultivaron hasta aproximadamente un 80% de confluencia en placas de 60 mm. Las células VA-13 se trataron después con VP-16, **2** o **2a** (25 μ M) durante 24 h. Después del tratamiento, tanto la suspensión como las células adherentes se recogieron y se lavaron dos veces en PBS pH 7,4. Las células se lavaron entre todas las etapas enumeradas a continuación y todos los lavados tuvieron 1 min de duración con PBS. A continuación, las células se fijaron en etanol helado al 70%, se permeabilizaron en 0,1% de Triton-X-100 y se bloquearon durante 30 min en 1% de albúmina de suero bovino (BSA) a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo de p85/PARP primario conjugado con FITC fue durante 30 min a 4°C en la oscuridad, con agitación

suave. A continuación, la suspensión celular se transfirió a portaobjetos de vidrio en presencia de medio de montaje Vector Shield con DAPI. Las imágenes fueron capturadas utilizando AxioVision 4.1 y se ajustaron utilizando el programa informático Adobe Photoshop 6.0. La muerte celular se cuantificó contando el número de células apoptóticas sobre el número total de células en el mismo campo. Los datos son la media de experimentos por duplicado \pm DS.

Ensayo con azul tripán

El ensayo con azul tripán se utilizó para determinar la muerte celular en células T Jurkat tratadas con polifenoles naturales y sintéticos como se indica. La morfología apoptótica se evaluó utilizando microscopía de contraste de fase como se ha descrito previamente (Kazi A, Hill R, Long TE, Kuhn DJ, Twos E, Dou QP. Novel N-thiolated beta-lactam antibiotics selectively induce apoptosis in human tumor and transformed, but not normal or nontransformed, cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67:365-74; Kuhn DJ, Smith DM, Pross S, Whiteside TL, Dou QP. Overexpression of interleukin-2 receptor alpha in a human squamous cell carcinoma of the head and neck cell line is associated with increased proliferation, drug resistance, and transforming ability. *J Cell Biochem* 2003; 89:824-36).

Ensayo de MTT

Se utilizó MTT para determinar los efectos de los polifenoles sobre la proliferación general de las células tumorales. Células MCF-7 de mama humana se sembraron en una placa de 96 pocillos y se cultivaron hasta una confluencia del 70-80%, seguido de la adición de análogos durante 24 h. A continuación, se añadió el MTT (1 mg/ml) en PBS a los pocillos y se incubó a 37°C durante 4 horas para permitir la escisión completa de la sal de tetrazolio a través de células metabólicamente activas. A continuación, el MTT se eliminó y se añadieron 100 μ l de DMSO y se realizó el análisis colorimétrico usando un lector de placas multietiqueta a 560 nm (Victor³; Perkin Elmer). Los valores de la absorbancia representados son la media de los experimentos por triplicado.

Ensayo sobre agar blando

Las células LNCaP (2×10^4) se sembraron sobre agar blando en placas de 6 pocillos en presencia de (-)-EGCG o análogos de té protegidos (25 μ M) o en DMSO (control), para determinar la actividad de transformación celular, tal como se ha descrito previamente (Kazi A et al).

Tinción nuclear

Después de cada tratamiento con fármaco, las células VA-13 y WI-38 tanto desprendidas como fijadas, se tiñeron con Hoechst 33342 para evaluar la apoptosis. Brevemente, las células se lavaron 2X en PBS, se fijaron durante 1 h con etanol al 70% a 4°C, se lavaron 3X en PBS y se tiñeron con Hoechst 50 μ M durante 30 min en la oscuridad, a temperatura ambiente. Las células desprendidas se sembraron sobre un portaobjetos y las células fijadas se visualizaron sobre la placa con un microscopio de fluorescencia con una resolución de 10X o 40X (Zeiss, Alemania). Digital Scientific obtuvo las imágenes con AxioVision 4.1 y se ajustaron usando Adobe Photoshop 6.0.

Inducción de la actividad caspasa-3 a través de los polifenoles de té sintéticos

Las células se trataron con cada compuesto a 25 μ M durante 4 o 24 h y luego se recogieron y se lisaron. Se añadió Ac-DEVD-AMC (40 μ M) al material lisado celular durante 2,5 h y la actividad caspasa-3.

RESULTADOS

Estabilidad química e hidrólisis enzimática de peracetato de (-)-EGCG, 1

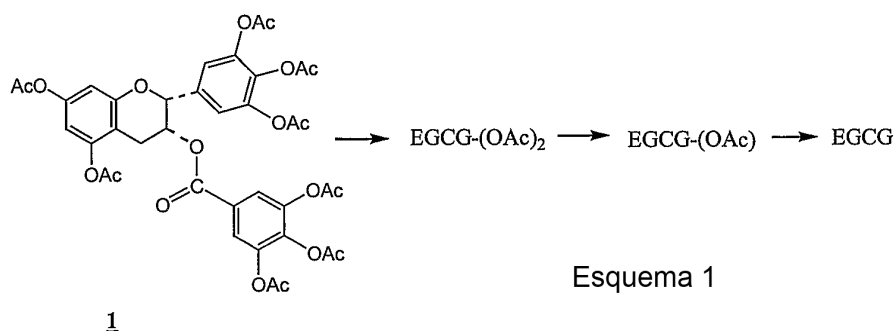
Se compara la estabilidad de **1** con (-)-EGCG en un medio de cultivo (RMPI), que imita el fluido corporal con un valor de pH alrededor de 8. (-)-EGCG o **1** a 0,1 mM se incubó en 1 ml de RMPI a 37°C en los tiempos indicados. En diferentes puntos de tiempo, el medio se analizó mediante HPLC para estudiar la cantidad de compuesto sometido a ensayo restante. Las curvas de degradación se muestran en la Figura 2.

Cuando (-)-EGCG se disolvió en el medio de cultivo, se encontró que se degradaba rápidamente al cabo de 20 minutos, lo que demostraba una estabilidad baja de (-)-EGCG en el medio. Aunque **1** también se degradaba en el medio, como se observa en la Figura 2, la tasa de su degradación era mucho más lenta cuando se comparaba con (-)-EGCG. **1** desapareció completamente después de 2 horas, lo que indicaba que es 6 veces más estable que (-)-EGCG en este medio. Por lo tanto, la protección con peracetato de los grupos fenol de (-)-EGCG contribuye a la estabilización de **1** en condiciones de cultivo (presumiblemente fisiológicas).

Con el fin de determinar si **1** se hidrolizaba a EGCG en las condiciones del medio de cultivo, el experimento se repitió, pero ahora con la adición de vitamina C (a 1,67 mg/ml) para evitar la degradación rápida de la EGCG generada. Cuando desaparecía **1**, se observó mediante HPLC que un nuevo pico A se incrementaba y luego disminuía la intensidad a lo largo del tiempo. A esto siguió la aparición de otro pico B en la HPLC que también disminuía eventualmente. Finalmente, se observó que se formaba un pico en la HPLC idéntico en el tiempo de retención al de EGCG. Los resultados del curso temporal de estos componentes se muestran en la Figura 3. La

identidad de EGCG fue confirmada por espectroscopia UV, así como espectrometría de masas. Además, los análisis por espectrometría de masas de los picos A y B mostraron que eran el diacetato y el monoacetato de EGCG, respectivamente. Estos resultados sugerían que el compuesto **1** se hidrolizaba primero al diacetato, a continuación, al monoacetato y, eventualmente, a EGCG en las condiciones de medio de cultivo.

- 5 La generación de (-)-EGCG a partir del compuesto **1** en condiciones celulares se pudo demostrar más claramente mediante la adición de vitamina C para prevenir la desaparición rápida de (-)-EGCG. En este caso, se realizó el experimento en medio con material lisado de células de cáncer de mama. Los análisis de la HPLC mostraron la desaparición de **1**, junto con la formación transitoria de A (el diacetato), B (el monoacetato) y después (-)-EGCG con unos resultados a lo largo del tiempo (Figura 4) similares a los de la Figura 3. Por lo tanto, se cree que en un medio con la adición de material lisado, el compuesto **1** sufre una hidrólisis que lleva a la formación del diacetato de EGCG, después el monoacetato, después EGCG y eventualmente ácido gálico. (Esquema 1)



Inhibición de la actividad proteasómica *in vitro* e *in vivo* a través de **1** y (-)-EGCG

- Si **1** tiene que actuar como el profármaco de (-)-EGCG, debe permanecer biológicamente inactivo hasta la desacetilación dentro de la célula en la que se convierte en su compuesto original. Con el fin de someter a ensayo esta hipótesis, la actividad del proteasoma se analizó tanto *in vitro* como en células T Jurkat intactas, ya sea con **1** o (-)-EGCG (como control positivo). En primer lugar, **1** y (-)-EGCG comercial se disolvieron en DMSO y se midieron sus efectos sobre la actividad similar a quimotripsina de proteasoma 20S purificado. Con 10 μM , **1** era completamente inactivo para inhibir la actividad similar a quimotripsina del proteasomas 20S purificados (Figura 5). Por el contrario, la (-)-EGCG 10 μM inhibía un 80-90% de la actividad de tipo quimotripsina proteasómica. Por lo tanto, como se había previsto, fuera de un sistema celular, **1** no es un inhibidor del proteasoma.

- Si **1** se convierte en (-)-EGCG dentro de las células, la inhibición del proteasoma *in vivo* se tiene que detectar. Para examinar esta posibilidad, las células Jurkat humanas se trataron con 25 μM de **1** o (-)-EGCG durante 12 o 24 h, seguido por una medición de la actividad del proteasoma mediante el uso de un sustrato fluorogénico específico de tipo quimotripsina en las células intactas (Figura 6a) o una transferencia Western para proteínas ubiquitinadas (Figura 6b). El tratamiento de células T Jurkat con (-)-EGCG durante 24 h inhibía la actividad del proteasoma mediante una inhibición del 31% frente al 42% con **1** (Figura 6a). Para analizar el nivel intracelular de proteínas poliubiquitinadas, las células se lisaron después de 12 horas de incubación y se sometieron a transferencia Western. **1** mostraba niveles de proteínas ubiquitinadas comparables a los de (-)-EGCG natural (Figura 6b). Por lo tanto, **1** es igualmente potente, si no más potente que (-)-EGCG para inhibir la actividad del proteasoma en células intactas. Por otro lado, a pesar de que **1** es seis veces más estable en comparación con EGCG, la potencia de sus actividades biológicas en las células no aumentaba en un grado similar. Es posible que la cantidad de EGCG generada a partir de **1** y, por lo tanto, su actividad biológica dentro de las células dependa de una combinación de factores: la permeabilidad relativa de **1** en las células, la cantidad de enzimas esterasas y la cantidad de antioxidantes que pueden estar presentes en las células en cualquier momento.

Desfosforilación de Akt en células Jurkat mediante **1** y (-)-EGCG

- (-)-EGCG y **1** se incubaron con células T Jurkat durante 24 horas a 5, 10 y 25 μM , seguido por análisis de transferencia Western usando un anticuerpo específico para Akt fosforilada (Figura 7). Se encontró que (-)-EGCG 25 μM reducía el nivel de p-Akt en un 32% en comparación con el tratamiento con **1**, que conducen a una disminución del 73% en Akt activada 25 μM como se indicaba por análisis densitométrico (Figura 7). La actina se utilizó como control de carga.

Muerte celular inducida por **1** y (-)-EGCG

- También se tiene acceso a las capacidades de (-)-EGCG y **1** para inducir muerte celular en células T Jurkat tratadas con 10 μM durante 24 h. Aunque (-)-EGCG tenía un efecto mínimo sobre la muerte celular (5%), **1** era capaz de inducir hasta un 15% de muerte celular con esa concentración (Figura 8). Por lo tanto, las capacidades mayores de **1** para inhibir la actividad del proteasoma celular (Figura 6) y para inactivar Akt (Figura 7) están asociadas con el

aumento de su actividad inductora de la muerte celular (Figura 8).

Polifenoles de té sintéticos acetilados no inhiben la actividad del proteasoma 20s purificado

Se incubaron hasta 25 μM de todos los compuestos protegidos y no protegidos con un proteasoma 20s purificado y un sustrato fluorogénico para estudiar la actividad de la quimotripsina durante 30 min. La concentración inhibitoria semimáxima o CI_{50} se determinó entonces. (-)-EGCG mostraba ser la más potente con una CI_{50} de 0,2 μM , seguida de **2** (CI_{50} de aproximadamente 9,9 μM). Se encontró que los valores de CI_{50} de los compuestos **3** y **4** eran de 14-15 μM . Por el contrario, los análogos protegidos eran mucho menos activos: <35% de inhibición a 25 μM . Esto es compatible con los resultados anteriores.

Análogos de té protegidos muestran una mayor potencia inhibitoria del proteasoma en células tumorales intactas

Para determinar qué efectos tienen los análogos de té sintéticos sobre el proteasoma *in vivo*, las células Jurkat se trataron con 25 μM de cada compuesto sintético, durante 4 o 24 h, con (-)-EGCG como control (Figuras 9A y 9B). Después de 4 h de tratamiento, el análisis mediante transferencia Western muestra que los análogos protegidos con acetato inducían una mayor cantidad de proteínas ubiquitinadas (Figura 9A, carriles 5, 7 y 9), indicando que se suprime la actividad del proteasoma. **1** se usó como un control basándose en los datos anteriores previos que muestran que (-)-EGCG protegida con peracetato es más potente que (-)-EGCG natural (Figura 9A, carriles 3 frente a 2). Además, las transferencias Western para Bax e I κ B α , conocidas como dos dianas del proteasoma, revelaron una desaparición de estas proteínas y la aparición de una banda de mayor peso molecular, que se especula que son las formas multiubiquitinadas de las proteínas (Figura 9A, carriles 3, 5, 7 y 9). Sin embargo, después de 24 h de tratamiento, (-)-EGCG y sus análogos desprotegidos mostraban una mayor cantidad de proteínas ubiquitinadas (Figura 9B, carriles 2, 4, 6 y 8). Esto es consistente con la idea de que los análogos protegidos son potentes inhibidores del proteasoma en un punto de tiempo anterior y que después de 24 h de tratamiento, las proteínas ubiquitinadas se están agotando mediante enzimas desubiquitinantes. La acumulación de p27, otra diana del proteasoma, también se encuentra en las células Jurkat tratadas con los análogos protegidos **2a**, **3a** y **4a** (Figura 9B, carriles 9, 5, 7). La banda de I κ B α ubiquitinada putativa todavía se encuentra en las células tratadas con **2a**, **3a** y **4a** (Figura 9B, carriles 9, 5, 7). La banda de I κ B α presuntamente ubiquitinada ahora está ausente en el tratamiento de 24 h, debido posiblemente a una desubiquitinación (Figura 9B). La actina se utilizó como control de carga en este experimento.

Análogos protegidos inducen una mayor muerte celular en células leucémicas

En un experimento de cinética que empleaba una pareja de análogos, **4** y **4a**, se encontró que el análogo **4** desprotegido inducía una acumulación de proteínas ubiquitinadas, en donde la expresión era más alta después de 8 horas de tratamiento con polifenol (Figura 9C). A la inversa, **4a** protegido mostraba un aumento de la acumulación de proteínas ubiquitinadas ya a las 2 h y una duración de hasta 8 h (Figura 9C). Para determinar si los análogos protegidos con acetato son potentes inhibidores del proteasoma en otros sistemas de células de cáncer, las células LNCaP de cáncer de próstata se trataron durante 24 h con 25 μM de (-)-EGCG, **1**, **2a** o **3a**, con DMSO como control. De hecho, se observaron proteínas conjugadas con ubiquitina, en donde el mayor aumento se encontraba en las células tratadas con **2a** y **3a** (Figura 9D).

Análogos protegidos son inductores de la apoptosis más potentes

Se ha observado que la inhibición del proteasoma puede inducir la apoptosis en una amplia variedad de células cancerosas, pero no en las células normales, no transformadas (An B et al). Las células T Jurkat se trataron con 25 μM de cada uno de los polifenoles seleccionados y sus análogos protegidos durante 24 h para investigar su capacidad para inducir la muerte celular apoptótica. El ensayo de incorporación de azul tripán reveló que en **2a**, **3a** y **4a**, pero no en otros, se inducía la muerte en 99, 57 y 83% de las células Jurkat, respectivamente (Figura 10A). Del mismo modo, el análisis de transferencia Western mostraba que solo **2a**, **3a** y **4a** inducían una escisión de PARP específica de la apoptosis después de 24 h (Figura 10B). Una tinción inmunofluorescente que detecta solo el fragmento de escisión de PARP (p85; verde) mostraba que las células VA-13 transformadas con SV40 son muy sensibles a la apoptosis inducida por **2a**, con un 73% de células apoptóticas después de 24 h de tratamiento (Figuras 10C y 10D). **2** no protegido inducía mucha menos apoptosis (21%), mientras que VP-16 25 μM , utilizado como control positivo, inducían un 92% de apoptosis (Figuras 10C y 10D). Una tinción de contraste con DAPI, que se une al surco menor en regiones del ADN ricas en A-T, se redujo drásticamente en las células apoptóticas (Figura 10C), lo que es consistente con una fragmentación del ADN en una etapa tardía de la apoptosis.

Inhibición de la proliferación de células tumorales mediante polifenoles protegidos

Células (MCF-7) de cáncer de mama tratadas se trataron después con 5 o 25 μM de análogos protegidos con peracetato durante 24 h, seguido por un análisis con MTT para determinar sus efectos sobre la proliferación celular. El compuesto **1** 25 μM inhibía la proliferación celular en un 40% (Figura 11A). Los compuestos protegidos **2a**, **3a** y **4a** causaron una inhibición del 50% a 5 μM y del 70% a 25 μM , respectivamente (Figura 11A).

Las células LNCaP de cáncer de próstata humano se trataron a continuación durante 24 h con cada análogo

protegido de polifenol de té seleccionado **1**, **2a**, **3a**, **4a** 25 μM , seguido por la determinación de los cambios morfológicos apoptóticos. Una vez más, los análogos protegidos **2a**, **3a** y **4a** causaban un redondeo drástico, desprendimiento y fragmentación celular (Figura 11B). **1** inducía cambios morfológicos leves, mientras que el tratamiento con (-)-EGCG conducía a células aplanadas, alargadas, lo que indicaba una detención del crecimiento.

5 El ensayo con agar blando se utiliza para determinar la actividad transformante de las células tumorales. La anulación de la formación de colonias está ligada a la detención del GI y/o a la apoptosis. Se añadieron células LNCaP a agar blando en placas de 6 pocillos y se trataron después una vez al extenderlas en placas inicialmente con 25 μM de (-)-EGCG o un análogo protegido (Figura 11C). Después de 21 días, se evaluó la formación de colonias. Las células tratadas con (-)-EGCG mostraron una disminución significativa de la formación de colonias en comparación con las células de control tratadas con DMSO (Figuras 11C y 11D). Los polifenoles protegidos también inhibían la actividad transformadora de las células tumorales inhibidas, siendo **2a** y **4a** los inhibidores más potentes de la formación de colonias (Figura 11D).

Inducción preferencial de la apoptosis en las células tumorales a través de análogos protegidos

15 La capacidad para inducir la apoptosis en las células tumorales, pero no en las células normales es una medida importante para los nuevos fármacos contra el cáncer. Para determinar si los compuestos protegidos también afectan a las células normales, las células VA-13 y WI-38 se trataron con 25 μM de (-)-EGCG, **2**, o **2a** durante 24 h y se examinó la actividad del proteasoma, los cambios morfológicos nucleares y el desprendimiento. Se encontró una disminución diferencial en la actividad similar a quimotripsina del proteasoma en las células VA-13, sobre las células WI-38 normales (Figura 12A). Se observó una disminución del 42-48% en la actividad del proteasoma en las células VA-13 tratadas con (-)-EGCG y **2**, mientras que **2a** inhibía el 92% de la actividad del proteasoma. Por el contrario, la actividad del proteasoma en las células WI-38 se redujo solamente un -5% con los tres tratamientos con polifenoles.

20 A continuación, se examinó la morfología nuclear apoptótica después del tratamiento con (-)-EGCG natural, **2** y **2a** (Figura 12B). Mientras que (-)-EGCG y **2** mostraron poca o ninguna apoptosis, **2a** inducía de forma notable una apoptosis inducida en células VA-13 transformadas con SV-40. Por el contrario, fibroblastos WI-38 normales tratados con todos los compuestos, no sufrieron apoptosis y era visible muy poco desprendimiento. Una comparación entre todos los análogos protegidos se realizó después utilizando 25 μM durante 24 h. Después de 36 h, (-)-EGCG no iniciaba la apoptosis en las células VA-13 (Figura 12C). Todos los análogos protegidos inducían la apoptosis en las células transformada (VA-13), pero no en las normales (WI-38) (Figuras 12B y 12C). Del mismo modo, cuando las células leucémicas (T Jurkat) y los linfocitos citolíticos naturales normales, no transformados (YT) se trataron con (-)-EGCG y **2a** durante 24 h, solo las células Jurkat se sometieron a apoptosis, como se evidenciaba mediante escisión con PAW (Figura 12D).

Inhibición de la actividad del proteasoma 20S purificado a través de los nuevos análogos de polifenol de té sintéticos.

35 El polifenol de té verde (-)-EGCG contiene un anillo B con tres grupos -OH (Figura 1) y tiene un valor de CI_{50} de 0,3 μM para un proteasoma 20S purificado (Tabla 1).

Tabla 1. Inhibición de la actividad del proteasoma para polifenoles de té sintéticos^{1,2}

Desprotegido	CI_{50} (μM)	Protegido	CI_{50} (μM)
(-)-EGCG	0,30 \pm 0,02		
Nº 16	0,59 \pm 0,17	Nº 24*	<i>n.a.</i> ³
Nº 6	2,69 \pm 1,07	Nº 19*	<i>n.a.</i> ³
Nº 15	4,56 \pm 1,20		
Nº 12	5,99 \pm 0,13	Nº 23*	<i>n.a.</i> ³
Nº 11	7,70 \pm 0,14	Nº 22*	<i>n.a.</i> ³
Nº 10	8,51 \pm 0,47	Nº 21*	<i>n.a.</i> ³

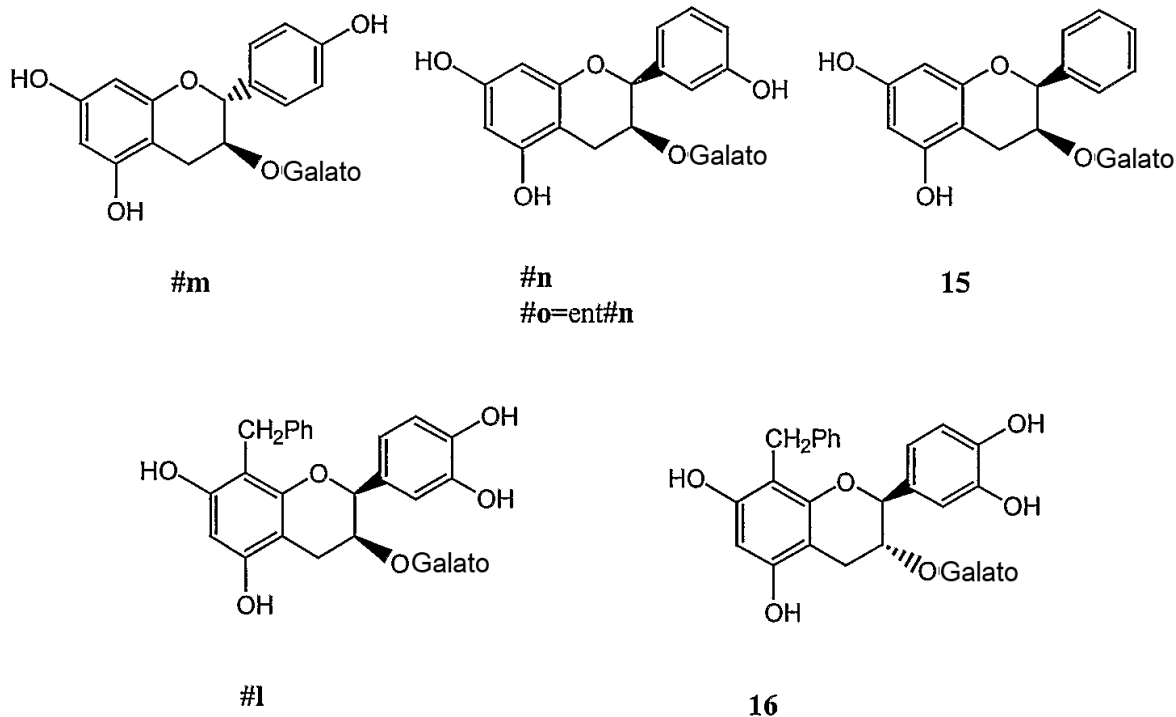
¹ La inhibición del proteasoma 20S purificado se evaluó utilizando un sustrato fluorogénico específico de tipo quimotripsina (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC). Los proteasomas 20S se incubaron con polifenoles durante 2 h.

² Resultados obtenidos a partir de 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

³ *n.a.* indica que la actividad inhibidora del proteasoma 20S purificado 25 μM era <20%.

40 La eliminación de un grupo -OH del anillo B de (-)-EGCG genera (-)-EGC que tiene una potencia inhibidora del proteasoma disminuida *in vitro* (0,58 μM). Para examinar adicionalmente los efectos de la delección del grupo -OH del anillo B sobre las capacidades de inhibición del proteasoma y de inducción de muerte celular, se sintetizaron varios análogos nuevos de EGCG con grupos -OH eliminados en el anillo B, así como sus profármacos putativos, los

homólogos protegidos con peracetato. Mediante el uso de un proteasoma 20S purificado y un sustrato fluorogénico de tipo quimotripsina, se determinan los efectos inhibitorios del proteasoma de los siguientes análogos de polifenol no protegidos:



- 5 Tabla 2. Efectos de los polifenoles de té naturales y sintéticos sobre las actividades del proteasoma procariota 20S. La referencia a es: Smith, D. M.; Daniel, K. G.; Wang, Z.; Guida, W. C.; Chan, T. H.; Dou, Q. P. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **2004**, 54, 58

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	Referencia
(-)-EGCG	0,30	Este trabajo
(-)-ECG, 8	0,58	Referencia a
(+)-CG, 7	0,73	Referencia a
(-)-EZG, 6	2,69	Este trabajo
(+)-ZG, #m	4,56	Este trabajo
#n	0,84	Este trabajo
#o	1,22	Este trabajo
15	4,56	Este trabajo
(+)-ECG	0,73	Referencia a
#1	0,39	Este trabajo
(-)-CG	0,75	Referencia a
16	0,59	Este trabajo

- 10 Se observa una buena correlación entre la actividad inhibitoria del proteasoma y el número de grupos -OH en el anillo B y en el anillo D. Ya que los grupos -OH individuales fueron eliminados del anillo B, los valores de CI₅₀ aumentaron gradualmente y el orden de la potencia observada era: (-)-EGCG (CI₅₀ 0,30 μM) > (-)-ECG (0,58 μM) > **6** (2,69 μM) > **#m** (4,56 μM) (Figura 13 y Tabla 1). De forma constante, en la serie de compuestos **12**, **11** (un epímero de **12**) y **10** que contienen un grupo -OH en el anillo D (Figura 13), **12** y **11** con dos grupos -OH en el anillo B, son más potentes que **10** con un solo grupo -OH en el anillo B (5,99, 7,70 y 8,51 μM, respectivamente; Tabla 1).

Un análisis adicional mediante SAR también reveló que cuando se eliminaban varios grupos -OH del anillo D, la potencia inhibidora se reducía aún más en comparación con eliminaciones de grupos -OH solo en el anillo D. Por ejemplo, **6** es más potente que **10** (2,69 frente a 8,51 μ M), y (-)-ECG así como (-)-CG son más potentes que el N° **12** [0,58 y 0,75 frente a 5,99 μ M]. Por último, hemos incluido el compuesto **16** para investigar el efecto hidrófobo alrededor del anillo A. De hecho, se encontró que el compuesto **16** era más activo que el homólogo (-)-CG [0,59 frente a 0,75 μ M; Figura 13; Tabla 1 y 2].

A modo de comparación, también se determinan las actividades inhibidoras de los análogos de polifenol protegidos frente al proteasoma purificado. Como era de esperar, los análogos protegidos con peracetato (indicados con *) no eran potentes inhibidores de la actividad similar a quimotripsina del proteasoma 20S purificado, en comparación con sus análogos no protegidos, tal vez debido a la falta de esterasas celulares requeridas para la conversión. Todos los análogos protegidos 25 μ M inhibían <20% de la actividad del proteasoma 20S purificado (Tabla 1).

Inhibición de la actividad del proteasoma celular a través de polifenoles de té sintéticos

Para determinar si los análogos de polifenol no protegidos y protegidos podían inhibir la actividad del proteasoma en células intactas, células T Jurkat de leucemia se trataron con cada uno de los compuestos 25 μ M durante 4 y 24 h, seguido por la recogida de los sedimentos celulares y la medición de la actividad similar a la quimotripsina proteasómica en el material lisado preparado. Los compuestos no protegidos muestran una inhibición limitada del proteasoma en las células T Jurkat intactas aunque **10** y **15** mostraron una potencia moderada (Figura 14). Estos datos sugieren que la mayoría, si no todos, los compuestos no protegidos son solo moderadamente activos en el entorno celular, de forma similar a (-)-EGCG, presumiblemente debido a su inestabilidad celular.

Es importante destacar que todos los polifenoles protegidos con peracetato, particularmente protegidos con peraciloxilo, sometidos a ensayo eran inhibidores mucho más potentes de la actividad de tipo quimotripsina proteasómica que sus homólogos sin protección, después de un tratamiento de 24 h (Figura 14). Especialmente, **19*** inhibía el 97% de la actividad de tipo quimotripsina mientras que su homólogo de polifenol no protegido, **6**, inhibía solo el 30% de la actividad de tipo quimotripsina después de un tratamiento de 24 h.

La proteína proapoptótica Bax y el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p27 son dianas del proteasoma naturales. Si los polifenoles protegidos con peracetato inhiben la actividad del proteasoma intacto, esperaríamos una acumulación de Bax y p27 en estas células. Para someter a ensayo esta idea, las células T Jurkat se trataron con ambos compuestos protegidos y no protegidos y el material lisado se analizó mediante una transferencia Western usando anticuerpos específicos para Bax y p27 (Figura 15). Después de 4 h de tratamiento, los análogos protegidos con peracetato **24*** y **19***, pero no sus análogos no protegidos, eran capaces de aumentar la acumulación de Bax (3 y 2,5 veces, respectivamente) y de p27 (6 y 11 veces, respectivamente) (Figura 15A). Después de 24 h de tratamiento, los niveles de Bax se incrementaron en las células tratadas con todos los compuestos protegidos con peracetato (13, 12, 40 y 36 veces, respectivamente, a través de **24***, **19***, **21*** y **23***). Sin embargo, no se observó un aumento de p27 con el tratamiento de principalmente **21*** (2 veces) y **23*** (2 veces) después de 24 h (Figura 15B). Además, los niveles de las proteínas ubicuitinadas, un indicador de la inhibición del proteasoma, se incrementaron significativamente con el **22*** protegido, pero no su **11** correspondiente, sin protección, después de 4 h de tratamiento (Figura 15C). Estos datos son consistentes con el perfil de las actividades inhibidoras del proteasoma de estos compuestos (Figura 14). Se sugiere los análogos protegidos se pueden convertir en inhibidores activos del proteasoma en células tumorales cultivadas.

Inducción de la muerte celular por apoptosis a través de análogos de polifenol de té sintéticos.

Previamente se había observado que la inhibición del proteasoma está asociada con la inducción de la apoptosis. Para determinar si los análogos protegidos en el anillo D/anillo B eran capaces de inducir la muerte celular, las células T Jurkat se trataron primero con todos los análogos protegidos y no protegidos 25 μ M durante 24 h, seguido por el ensayo de exclusión con azul de tripán (Figura 16). Se observaron cambios en la morfología celular (células encogidas y formación de ampollas características de la apoptosis) después de 4 h de tratamiento con análogos protegidos y no protegidos, y estos cambios se incrementaron en gran medida después de 24 h de tratamiento, con los análogos protegidos (datos no mostrados). Además, los análogos protegidos con peracetato inducían un aumento de 5 a 10 veces en la muerte celular después de 4 h de incubación y un aumento de hasta 20 veces a las 24 h (Figura 16). Por el contrario, los polifenoles sin protección causaban mucha menos muerte celular, solamente un incremento de 3 a 5 veces después de incluso 24 h de tratamiento (Figura 16).

Para determinar si la muerte celular observada (Figura 16) era debida a la inducción de la apoptosis, se realizó un experimento similar en células T Jurkat, seguido por la medición de una activación de la caspasa-3 y la escisión de PARP. Los polifenoles protegidos con peracetato inducían los más altos niveles de actividad de la caspasa-3 (Figura 17A): el tratamiento con **24*** durante 4 h dio como resultado un aumento de ~16 veces, mientras que **16** no protegido solo dio lugar a un aumento de 4 veces. Además, el tratamiento con **19*** protegido aumentó 16 veces la actividad de la caspasa-3, mientras que el homólogo sin protección, **6**, tenía un efecto mucho menor (4 veces). Consistentemente, se detectó una escisión de PARP en las células tratadas con **24*** y **19***, pero no en los homólogos no protegidos **16** y **6** (Figura 17B). Además, el compuesto **22*** protegido, pero no su homólogo **11** protegido, era capaz de inducir la escisión de PARP en las células después de 4 h de tratamiento (Figura 17C).

Inducción preferencial de la apoptosis en células tumorales a través de análogos de (-)-EGCG protegidos con peracetato.

La inducción de la apoptosis en las células tumorales pero no en las células normales es un aspecto importante de los fármacos contra el cáncer. Para determinar si los análogos protegidos con peracetato afectan a las células normales, se trataron las células T Jurkat leucémicas y los linfocitos citolíticos naturales inmortalizados no transformados (YT) con el análogo protegido con peracetato aparentemente más potente, **19***. Una vez más, los niveles de proteínas diana del proteasoma Bax, p27 (datos no mostrados) e IκB-α (Figura 18) se incrementaron en las células T Jurkat de leucemia. Sin embargo, los niveles de estas proteínas no se incrementaron en las células YT inmortalizadas no transformadas. Además, los niveles de las proteínas ubiquitinadas se acumularon en una forma dependiente de la dosis en las células T Jurkat. Por el contrario, solo se detectó un ligero aumento, transitorio de los niveles de proteínas ubiquitinadas en las células YT. En consonancia con la inhibición selectiva de la actividad del proteasoma, la escisión de PARP específica de la apoptosis se encontró solo en las células T Jurkat, pero no en las YT. Por lo tanto, los polifenoles protegidos con peracetato, potentes aparentemente no inducen la inhibición del proteasoma y la posterior apoptosis en las células YT no transformadas.

DISCUSIÓN

(-)-EGCG natural procedente del té verde se ha convertido a su compuesto **1** con peracetato. Además, se sintetizan varios análogos sintéticos de (-)-EGCG que poseen deleciones de los grupos hidroxilo en el anillo de galato. Además, los grupos hidroxilo se convirtieron en grupos acetato para crear un profármaco, el cual se podía escindir por medio de esterases dentro de la célula y se convertía en el fármaco original. Sorprendentemente, los análogos protegidos eran inhibidores del proteasoma mucho más potentes en las células tumorales intactas que sus homólogos no protegidos. Consistentemente, los análogos protegidos eran también inductores más potentes de la apoptosis que los homólogos sin protección, cuando se sometieron a ensayo en líneas celulares leucémicas (Jurkat), de tumor sólido y transformadas. Un análisis mediante SAR de los análogos protegidos, reveló que el orden según su potencia era del modo siguiente: **2a = 4a > 3a > 1 > (-)-EGCG**.

Los análogos protegidos de (-)-EGCG fueron diseñados y sintetizados. Inesperadamente, estos compuestos parecen tener una actividad inhibidora del proteasoma *in vivo*.

Los análogos protegidos con peracetato, particularmente con peraciloxilo, también se ha encontrado que son inhibidores del proteasoma más potentes que sus homólogos no protegidos, hidroxilados. Se sugirió que la Thr N-terminal de la subunidad similar a la quimotripsina ($\beta 5$) del proteasoma, realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono unido a éster de (-)-EGCG, el cual inicia una acilación irreversible de la subunidad $\beta 5$ e inhibe su actividad proteasa (Nam S, Smith DM y Dou QP: *J Biol Chem* 276: 13322-13330, 2001). Sin embargo, la adición de los restos peracetato reduce el carácter electrófilo del carbono unido a éster, dando lugar a una inhibición mucho más reducida del proteasoma 20S purificado. Como era de esperar, los polifenoles protegidos examinados en esta memoria, también mostraron una inhibición limitada de la actividad similar a quimotripsina del proteasoma 20S purificado (Tabla 1).

Se observa una correlación entre la actividad de inhibición del proteasoma y el número de grupos -OH en el anillo B (Tabla 2). Los valores de CI_{50} de los análogos desprotegidos aumentaba gradualmente a medida que los grupos -OH individuales eran eliminados (Tabla 1). Aunque **16** contiene un anillo de benceno adicional en el carbono C_8 en el anillo A de (-)-CG, solo se ha aumentado ligeramente la potencia inhibidora del proteasoma para (-)-CG (0,59 frente a 0,75 μM).

Otra relación SAR importante encontrada es que una eliminación adicional de los grupos -OH del anillo D, conduce a una disminución adicional de la potencia inhibidora del proteasoma *in vitro* (Tabla 1).

Como se muestra en la Figura 14, los polifenoles protegidos con peracetato eran inhibidores mucho más potentes de la actividad de tipo quimotripsina del proteasoma que los polifenoles no protegidos. Los análogos protegidos con peracetato parecen ser estables en los puntos de tiempo prolongados, lo que se evidenciaba por la disminución de la actividad de tipo quimotripsina celular del proteasoma a las 24 h. Por el contrario, los análogos desprotegidos parecen perder estabilidad después de 24 h de tratamiento. La actividad de tipo quimotripsina celular del proteasoma se inhibió en un 97% con el análogo **19*** después de 24 h, mientras que su homólogo sin protección, **6**, inhibía solo el 30% de la actividad. En comparación con otras parejas de compuestos protegidos frente a no protegidos, **22*** mostraba un aumento relativamente más bajo de la potencia inhibidora de la quimotripsina que su homólogo **11**, lo que indica una posible conversión de **22*** al fármaco original en las células. Aunque el mecanismo no se entiende completamente, otros análogos del té verde protegidos con peracetato parece que se convierten en compuestos potentes distintos en un entorno celular.

Varias proteínas diana del proteasoma también se evaluaron después de la inhibición del proteasoma con los polifenoles de té sintéticos (Figura 15). Los datos proporcionaron otra prueba de que los análogos protegidos con peracetato requieren el medio celular y/o el extracto celular para ser convertidos en inhibidores eficaces del proteasoma, lo que se representa por una acumulación de Bax, p27 y proteínas ubiquitinadas. Los análogos protegidos eran capaces de acumular proteínas diana con mayor eficacia que sus homólogos sin protección en un

5 modelo celular, en comparación con el modelo *in vitro*. En contraste, los análogos desprotegidos no parecían acumular proteínas diana en la misma medida que los análogos protegidos, lo que puede ser una consecuencia de la donación de protones desde los grupos -OH y una degradación posterior. Los datos indican además que los análogos protegidos con peracetato se someten a una conversión a un nuevo compuesto y actúan como profármacos *in vivo*.

10 El análisis con azul tripán confirmó la aparición de muerte celular y los cambios morfológicos apoptóticos característicos, inducidos después del tratamiento con análogos principalmente protegidos (Figura 16). Los análogos protegidos de nuevo, parecían más estables a las 24 h (muerte celular mayor del 50% en total) que los análogos desprotegidos. La actividad caspasa-3 confirma que la apoptosis se producía después de 4 h de incubación con los compuestos protegidos; la actividad caspasa-3 aumentó hasta 16 veces en comparación con el control (Figura 17). El análisis de transferencia Western para la escisión de PARP mostró además su aparición después de un tratamiento durante 4 h con los análogos protegidos, tales como **19***, **24*** y **22***. Lo más importante, el análogo de (-)-EGCG protegido con peracetato, **19***, inducía preferentemente la apoptosis en las células T Jurkat, mientras que las células YT no transformadas permanecieron menos afectadas (Fig. 18), lo que sugiere que los análogos protegidos tienen un potencial para ser desarrollados en nuevos agentes contra el cáncer.

15 En resumen, los estudios epidemiológicos han sugerido los beneficios anticancerígenos del consumo de té verde. El proteasoma se ha indicado en el estado patológico de cáncer (Ciechanover A: *Embo J* 17: 7151-7160, 1998) y los polifenoles de té verde como inhibidores del proteasoma pueden ser un tratamiento viable para algunos tipos de cáncer. Nuestro estudio actual sugiere además que los polifenoles de té verde sintéticos que contienen grupos -OH protegidos con peracetato son potentes inhibidores del proteasoma y que un examen adicional de estos compuestos puede dilucidar beneficios adicionales a partir de esta forma de agentes terapéuticos.

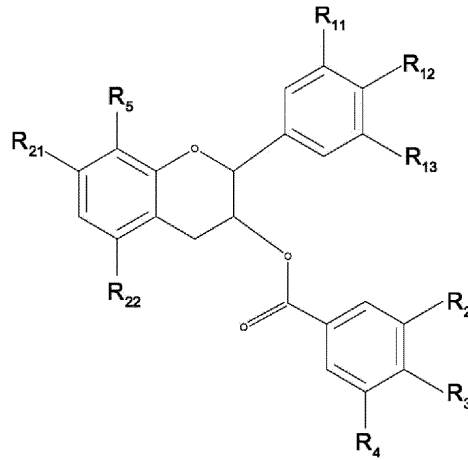
20 Esta invención proporciona una variedad de derivados de (-)-EGCG que son al menos tan potentes como (-)-EGCG. Se ha encontrado que las formas protegidas con carboxilato de (-)-EGCG y sus derivados son más estables que las formas no protegidas, las cuales se pueden utilizar como inhibidores del proteasoma para reducir el crecimiento de células tumorales. Además, a partir de las estructuras de **1**, **2**, **3**, **4**, **19***, **21***, **22*** y **23*** se puede observar que algunos de los grupos hidroxilo del anillo de galato de (-)-EGCG puede que no sean importantes para la potencia.

25 Aunque la realización preferida de la presente invención se ha descrito en detalle con los ejemplos, es evidente que a los expertos en la técnica se les pueden ocurrir modificaciones y adaptaciones de la presente invención. Además, no se debe interpretar que las realizaciones de la presente invención están restringidas por los ejemplos o la figuras solamente. Expresamente se entiende, sin embargo, que tales modificaciones y adaptaciones están dentro del alcance de la presente invención, tal y como se establece en las siguientes reivindicaciones. Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de una realización, se pueden utilizar en otra realización para obtener otra realización adicional. Por lo tanto, se entiende que la presente invención incluye tales modificaciones y variaciones tal y como entran dentro del alcance de las reivindicaciones.

35

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:

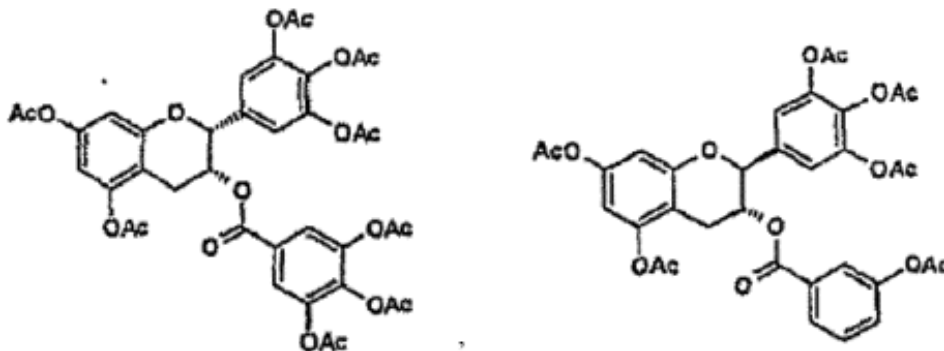


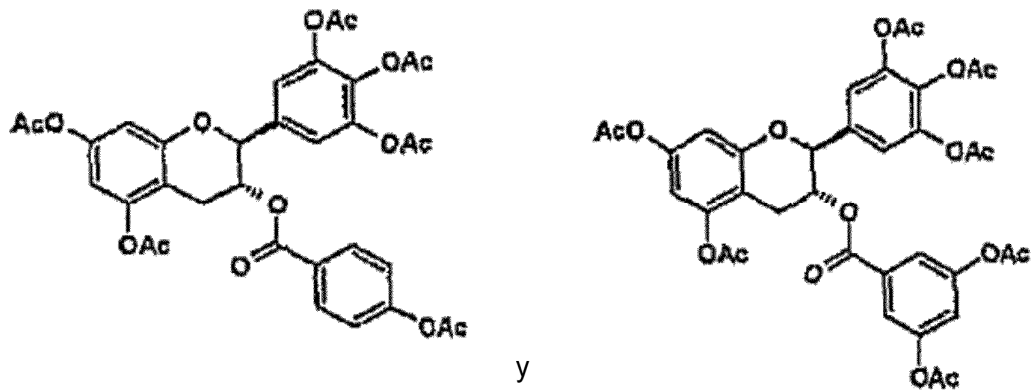
en donde

- 5 • R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₂₁, R₂₂, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en -H y grupo aciloxi C₁ a C₁₀;
- R₅ es -H, y en donde se aplica una de las siguientes condiciones:
 - (i) cada uno de R₁₁, R₂ y R₄ es -H y cada uno de R₁₂, R₁₃, R₂₁, R₂₂ y R₃ es un grupo acetato; o
 - (ii) cada uno de R₁₁, R₁₃, R₂ y R₄ es -H y cada uno de R₁₂, R₂₁, R₂₂ y R₃ es un grupo acetato; o
 - 10 (iii) cada uno de R₁₁ y R₁₃ es -H y cada uno de R₁₂, R₂₁, R₂₂, R₂, R₃ y R₄ es un grupo acetato; o
 - (iv) R₁₁ es -H y cada uno de R₁₂, R₁₃, R₂₁, R₂₂, R₂, R₃ y R₄ es un grupo acetato; o
 - (v) cada uno de R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₂₁ y R₂₂ es un grupo acetato, R₂ es un grupo acetato y cada uno de R₃ y R₄ es -H; o
 - (vi) cada uno de R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₂₁ y R₂₂ es un grupo acetato, R₃ es un grupo acetato y R₂ y R₄ es -H; o
 - 15 (vii) cada uno de R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₂₁, R₂₂, R₂ y R₄ es un grupo acetato y R₃ es -H,

para uso en la inhibición del proteasoma.

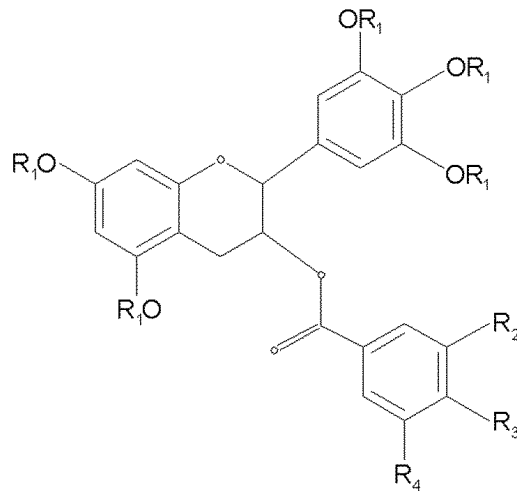
2. Un compuesto que tiene la fórmula seleccionada a partir del grupo que consiste en:





para uso en la inhibición del proteasoma.

3. Un compuesto que tiene la fórmula:



5 en donde

- R_1 es -H;
- R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en -H y -OH; y
- al menos uno de R_2 , R_3 y R_4 es -H,

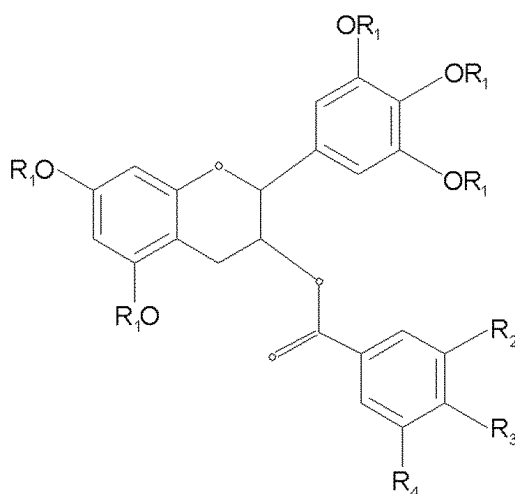
para uso en la inhibición del proteasoma.

10 4. El compuesto para uso según la reivindicación 3, en el que R_2 es -OH y cada uno de R_3 y R_4 es -H.

5. El compuesto para uso según la reivindicación 3, en el que R_3 es -OH y cada uno de R_2 y R_4 es -H.

6. El compuesto para uso según la reivindicación 3, en el que cada uno de R_2 y R_4 es -OH y R_3 es -H.

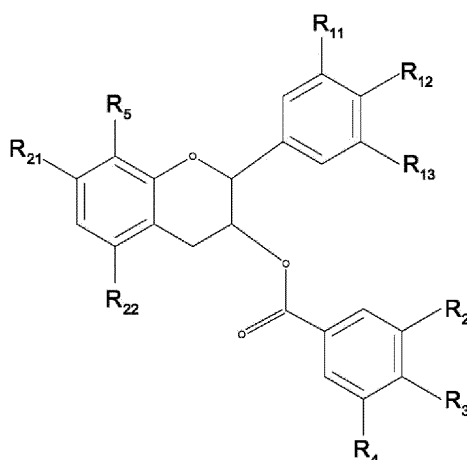
7. Un compuesto que tiene la fórmula:



en donde

- R₁ es -H;
 - R₂, R₃ y R₄ se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en -H y -OH; y
- 5
- Si R₂ = R₃ = R₄, entonces, R₂ no es -OH,
- para uso en la reducción del crecimiento de células tumorales.

8. Un compuesto que tiene la fórmula:



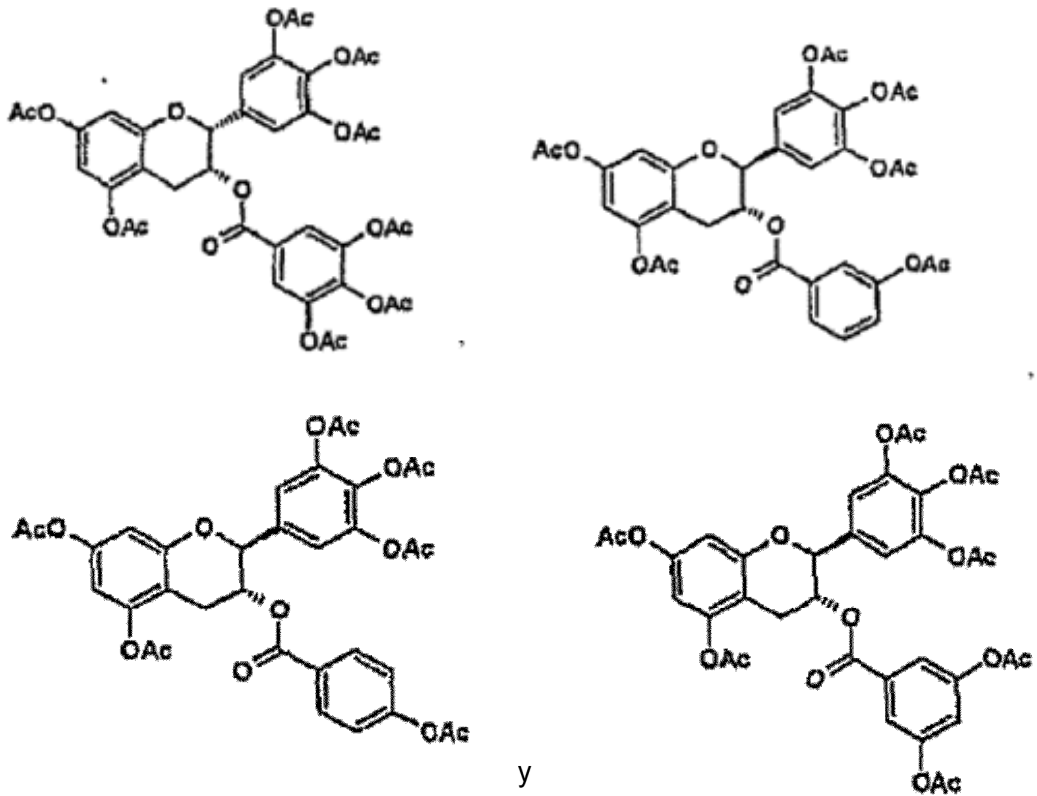
en donde

- 10
- R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₂₁, R₂₂, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en -H y grupo aciloxilo C₁ a C₁₀;
 - R₅ es H, y en donde se aplica una de las siguientes condiciones:
- 15
- (i) cada uno de R₁₁, R₂ y R₄ es -H y cada uno de R₁₂, R₁₃, R₂₁, R₂₂ y R₃ es un grupo acetato; o
 - (ii) cada uno de R₁₁, R₁₃, R₂ y R₄ es -H y cada uno de R₁₂, R₂₁, R₂₂ y R₃ es un grupo acetato; o
 - (iii) cada uno de R₁₁ y R₁₃ es -H y cada uno de R₁₂, R₂₁, R₂₂, R₃ y R₄ es un grupo acetato; o
 - (iv) R₁₁ es -H y cada uno de R₁₂, R₁₃, R₂₁, R₂₂, R₂, R₃ y R₄ es un grupo acetato; o
 - (v) cada uno de R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₂₁ y R₂₂ es un grupo acetato, R₂ es un grupo acetato y cada uno de R₃ y R₄ es -H; o

(vi) cada uno de R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{21} y R_{22} es un grupo acetato, cada uno de R_2 y R_4 es un grupo acetato y R_3 es -H,

para uso en la reducción del crecimiento de células tumorales.

9. Un compuesto que tiene la fórmula seleccionada a partir del grupo que consiste en:

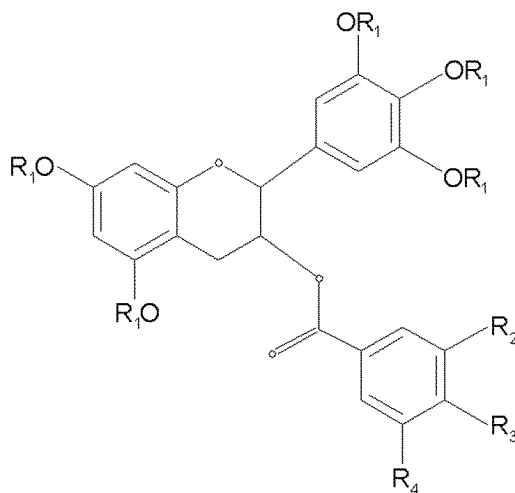


5

y

para uso en la reducción del crecimiento de células tumorales.

10. Un compuesto que tiene la fórmula:

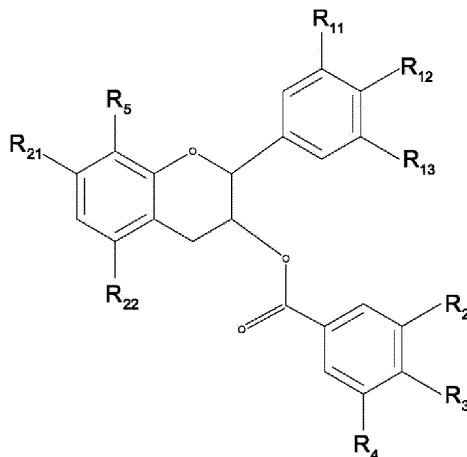


10 en donde

- R_1 es -H;
- R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en -H y -OH; y

- al menos uno de R₂, R₃ y R₄ es -H,
para uso en la reducción del crecimiento de células tumorales.

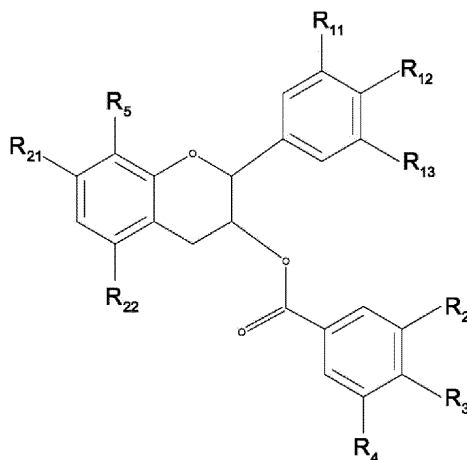
11. Un compuesto que tiene la fórmula:



5 en donde

- R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₂₁, R₂₂, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en -H y grupo aciloxi C₁ a C₁₀ pero al menos uno es H;
- R₅ es -H, y en donde se aplica una de las siguientes condiciones:
 - (i) cada uno de R₁₁, R₂ y R₄ es -H y cada uno de R₁₂, R₁₃, R₂₁, R₂₂ y R₃ es un grupo acetato; o
 - 10 (ii) cada uno de R₁₁, R₁₃, R₂ y R₄ es -H y cada uno de R₁₂, R₂₁, R₂₂ y R₃ es un grupo acetato;
 - (iii) cada uno de R₁₁ y R₁₃ es -H y cada uno de R₁₂, R₂₁, R₂₂, R₂, R₃ y R₄ es un grupo acetato;
 - (iv) R₁₁ es -H y cada uno de R₁₂, R₁₃, R₂₁, R₂₂, R₂, R₃ y R₄ es un grupo acetato; o
 - (v) cada uno de R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₂₁ y R₂₂ es un grupo acetato, R₂ es un grupo acetato y cada uno de R₃ y R₄ es -H; o
 - 15 (vi) cada uno de R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₂₁, R₂₂, R₂ y R₄ es un grupo acetato y R₃ es -H.

12. Un compuesto que tiene la fórmula:



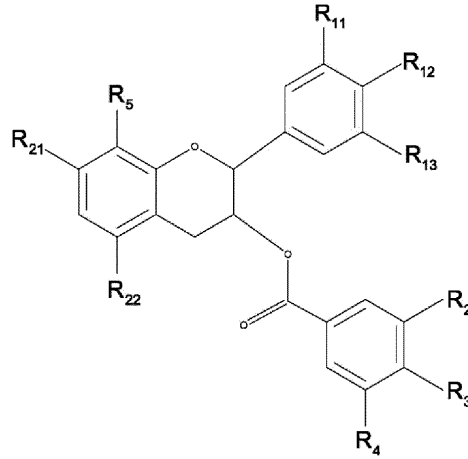
en la que:

- (i) R₅ es un metil-bencilo, R₁₁ es H y R₂₁, R₂₂, R₁₂, R₁₃, R₂, R₃ y R₄ son OH; o

(ii) R_5 , R_{11} , R_{12} y R_{13} son H y R_{21} , R_{22} , R_2 , R_3 y R_4 son OH; o

(iii) R_5 , R_{11} , R_{13} , R_2 y R_4 son H y R_{12} , R_{21} , R_{22} , R_3 son OH.

13. Un compuesto que tiene la fórmula:



5 en la que R_5 es H y en donde se aplica una de las siguientes condiciones:

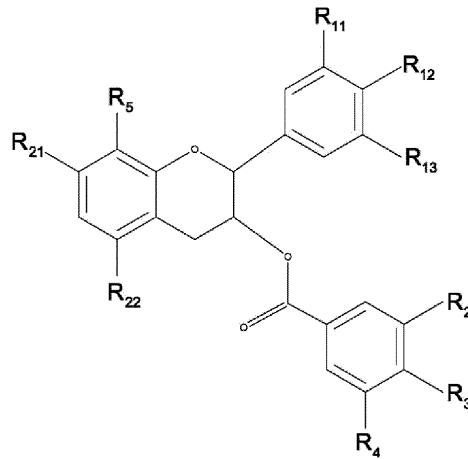
(i) R_{21} , R_{22} , R_{12} , R_2 , R_3 y R_4 son OH y R_{11} y R_{13} son H; o

(ii) R_{21} , R_{22} , R_{12} y R_3 son OH y R_{11} , R_{13} , R_2 y R_4 son H; o

(iii) R_{21} , R_{22} , R_{12} , R_{13} y R_3 son OH y R_{11} , R_2 y R_4 son H,

para uso en la inhibición del proteasoma.

10 14. Un compuesto que tiene la fórmula:



en la que R_5 es H y en donde se aplica una de las siguientes condiciones:

(i) R_{21} , R_{22} , R_{12} , R_2 , R_3 y R_4 son OH y R_{11} y R_{13} son H; o

(ii) R_{21} , R_{22} , R_{12} y R_3 son OH y R_{11} , R_{13} , R_2 y R_4 son H; o

15 (iii) R_{21} , R_{22} , R_{12} , R_{13} y R_3 son OH y R_{11} , R_2 y R_4 son H,

para uso en la reducción del crecimiento de células tumorales.

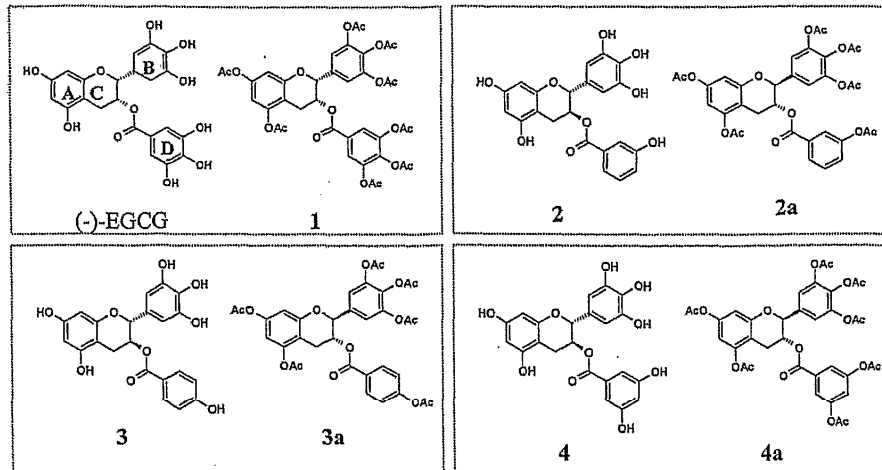


Figura 1

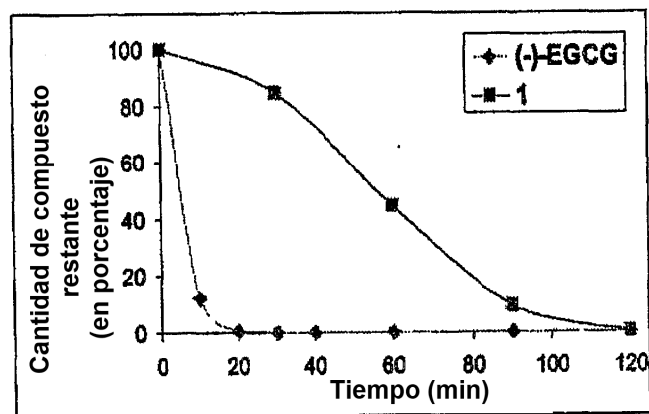


Figura 2

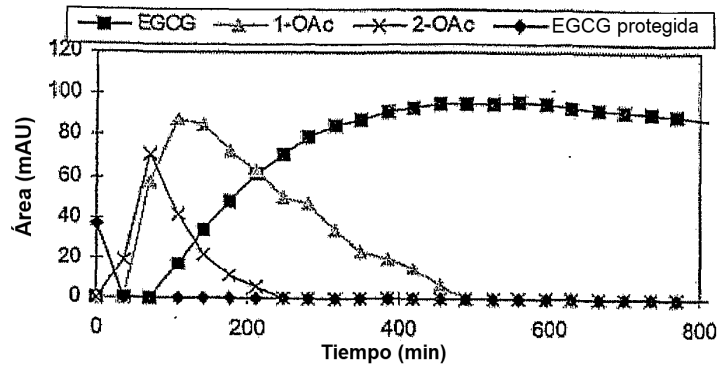


Figura 3

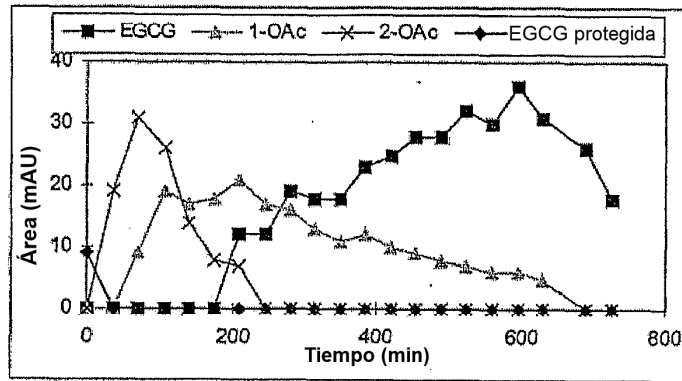


Figura 4

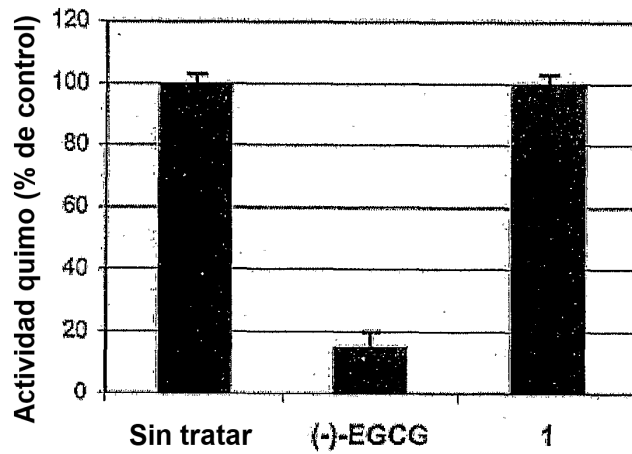


Figura 5

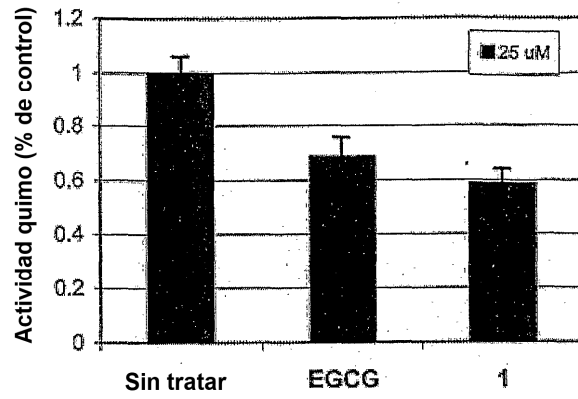


Figura 6a



DMSO (-)EGCG 1

Figura 6b

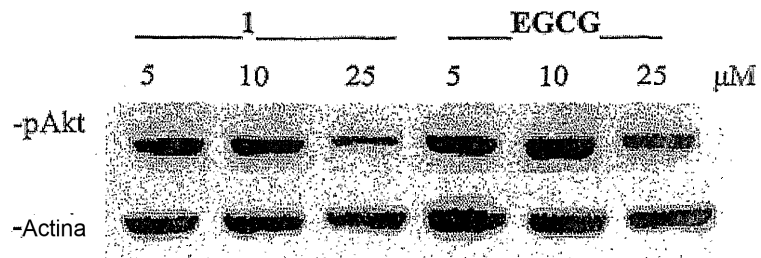


Figura 7

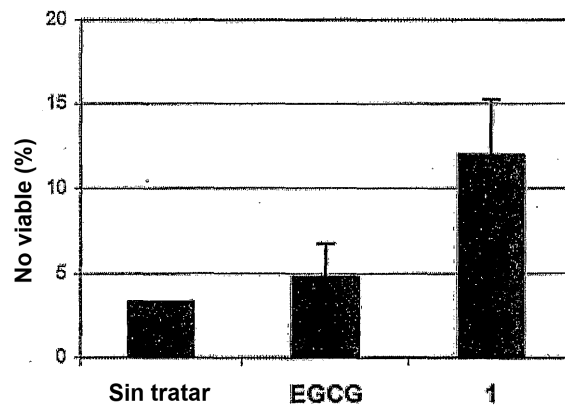


Figura 8

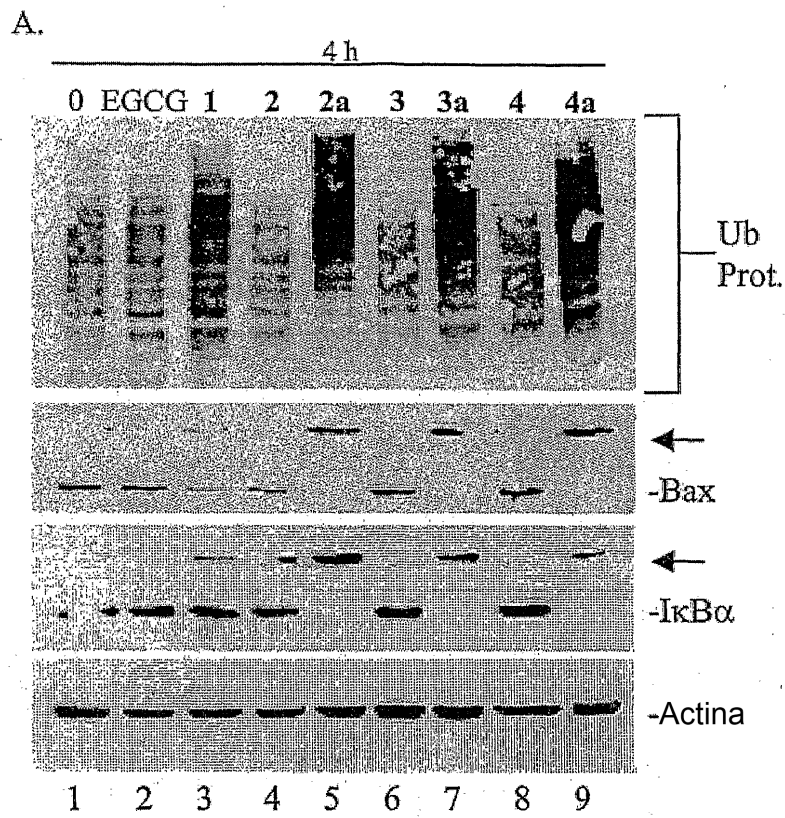


Figura 9a

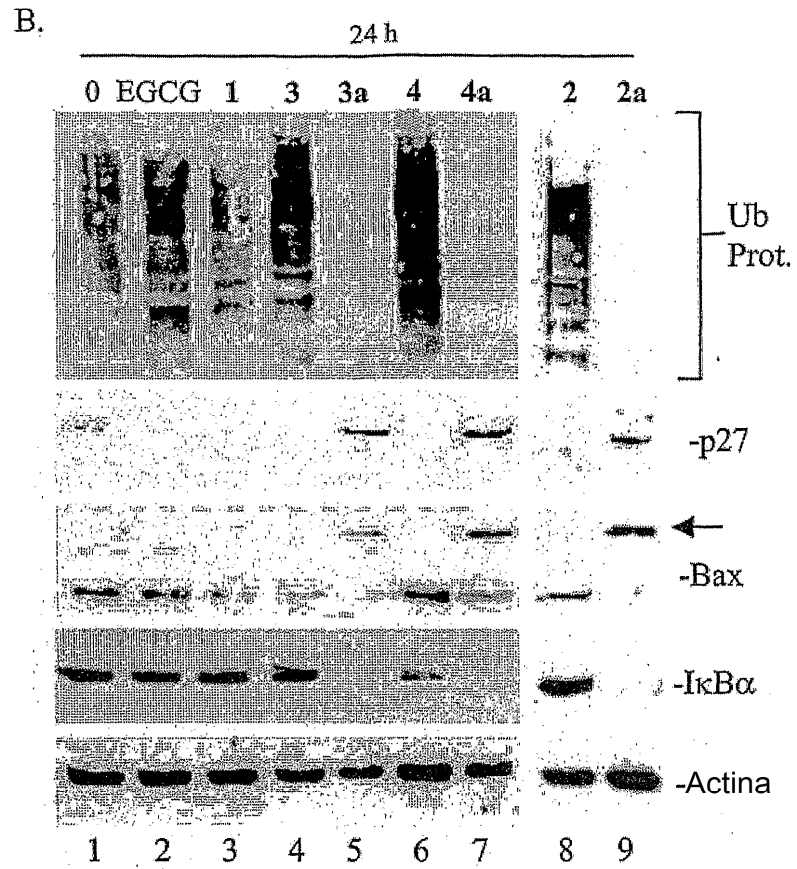


Figura 9b

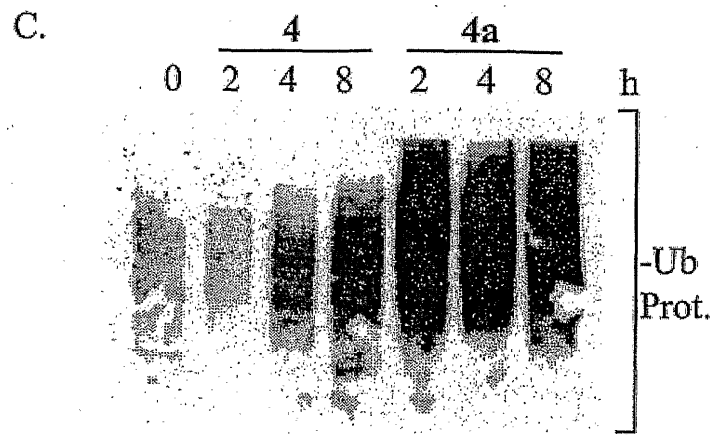


Figura 9c

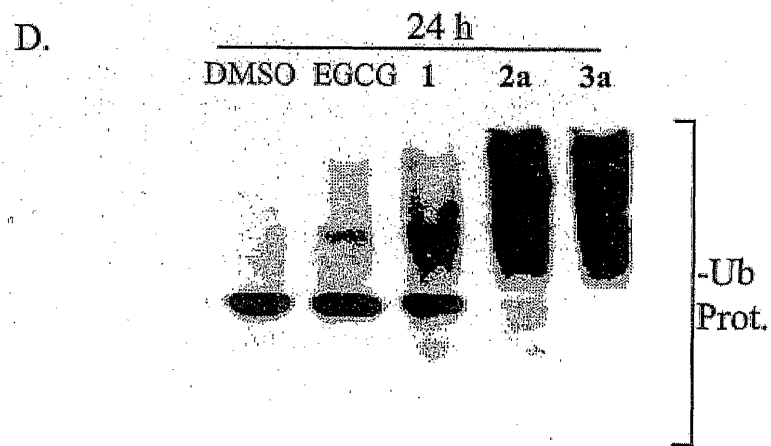


Figura 9d

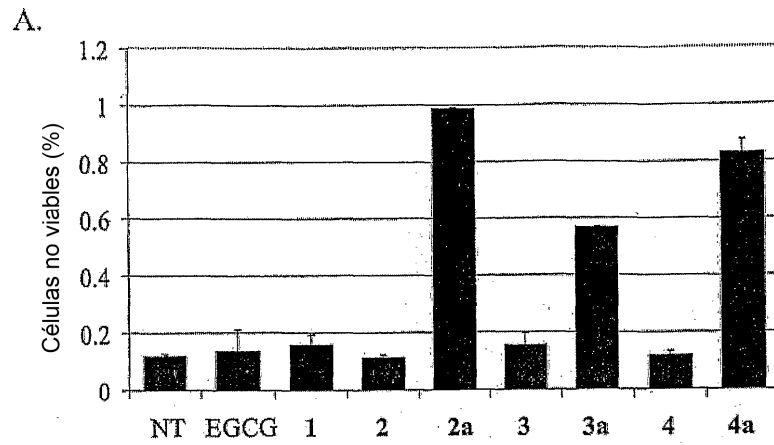


Figura 10a

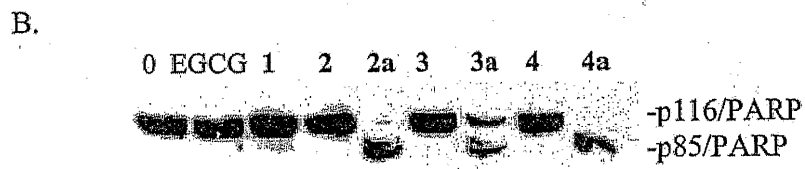


Figura 10b

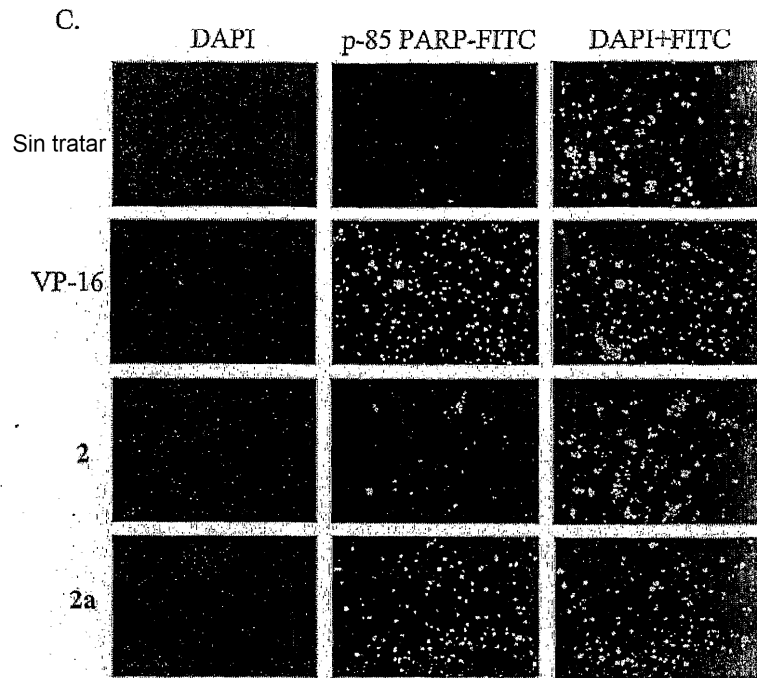


Figura 10c

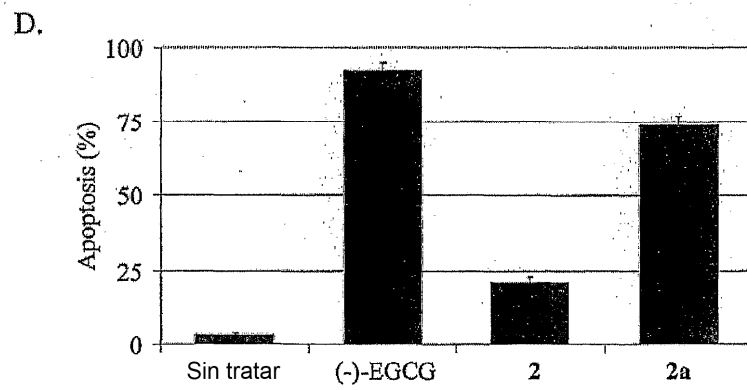


Figura 10d

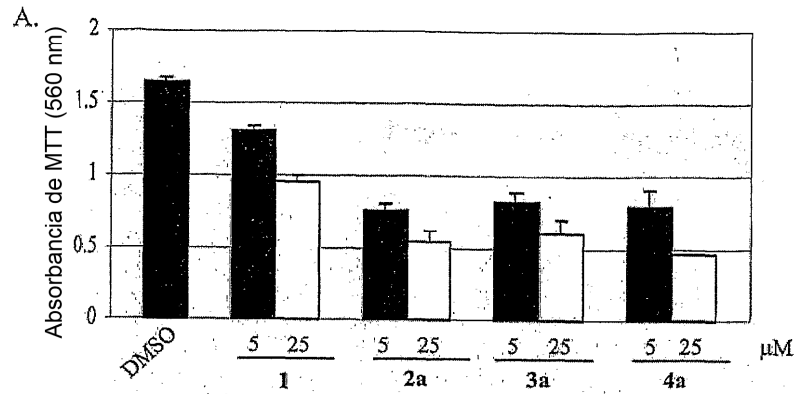


Figura 11a

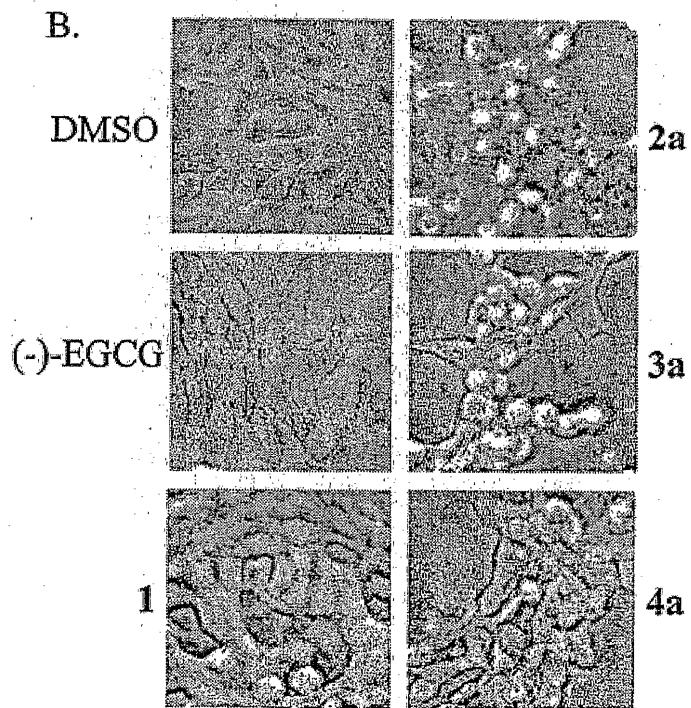


Figura 11b

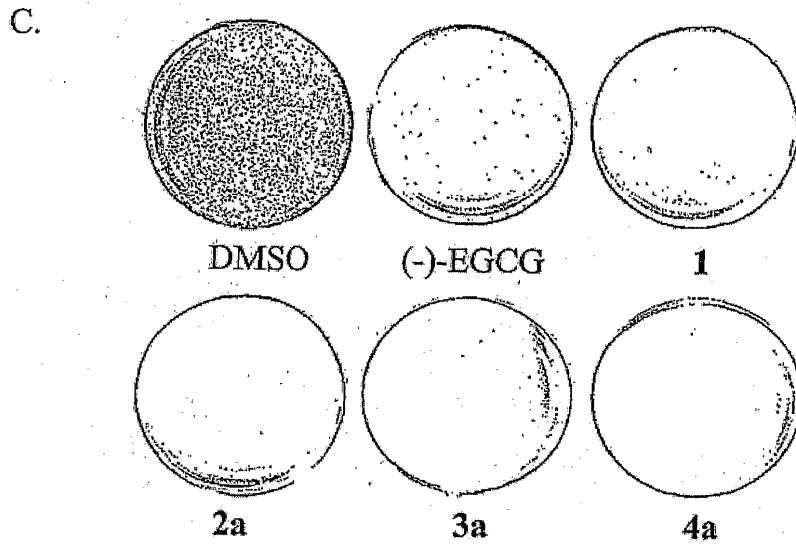


Figura 11c

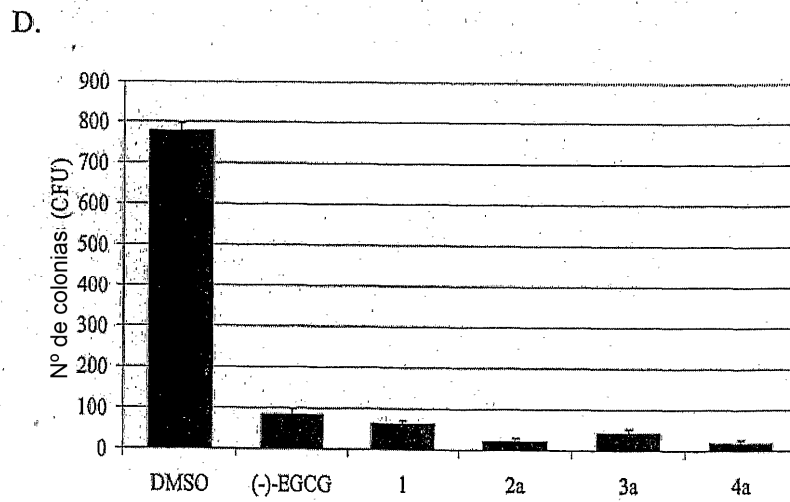


Figura 11d

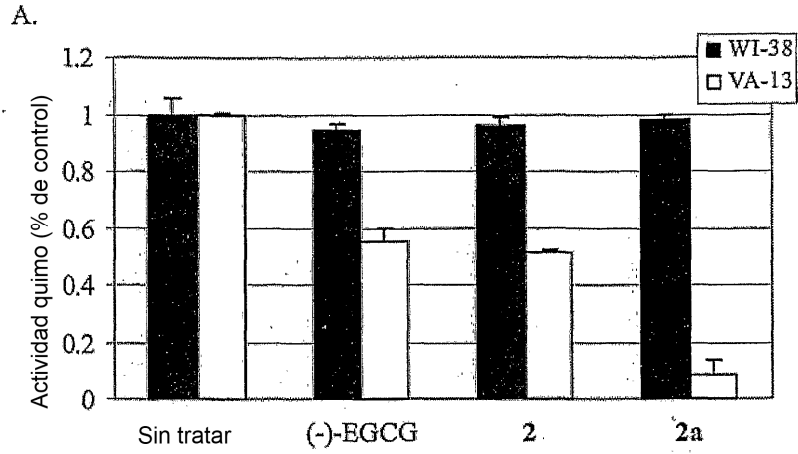


Figura 12a

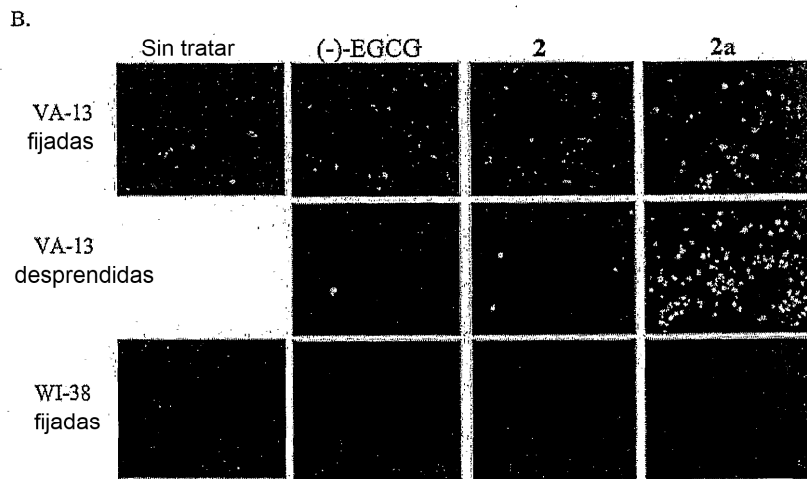


Figura 12b

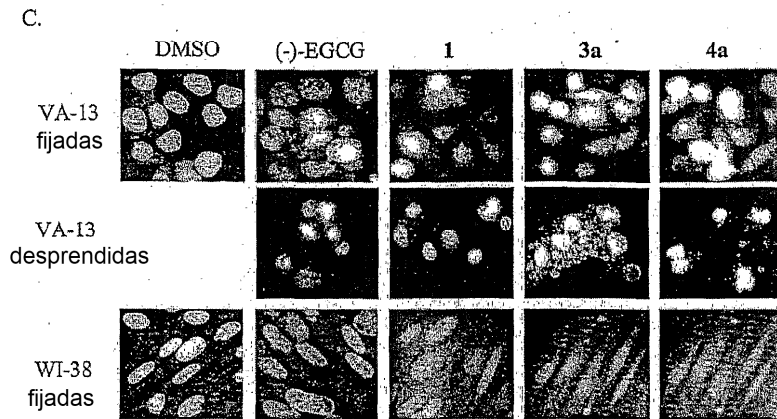


Figura 12c

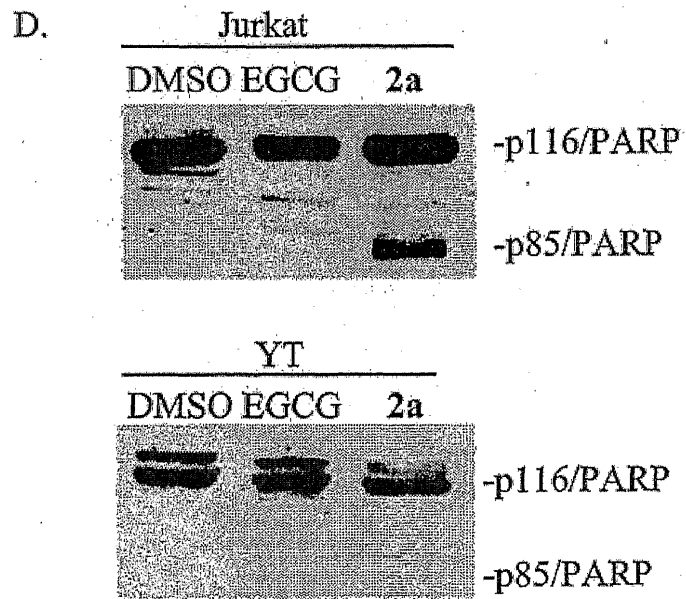


Figura 12d

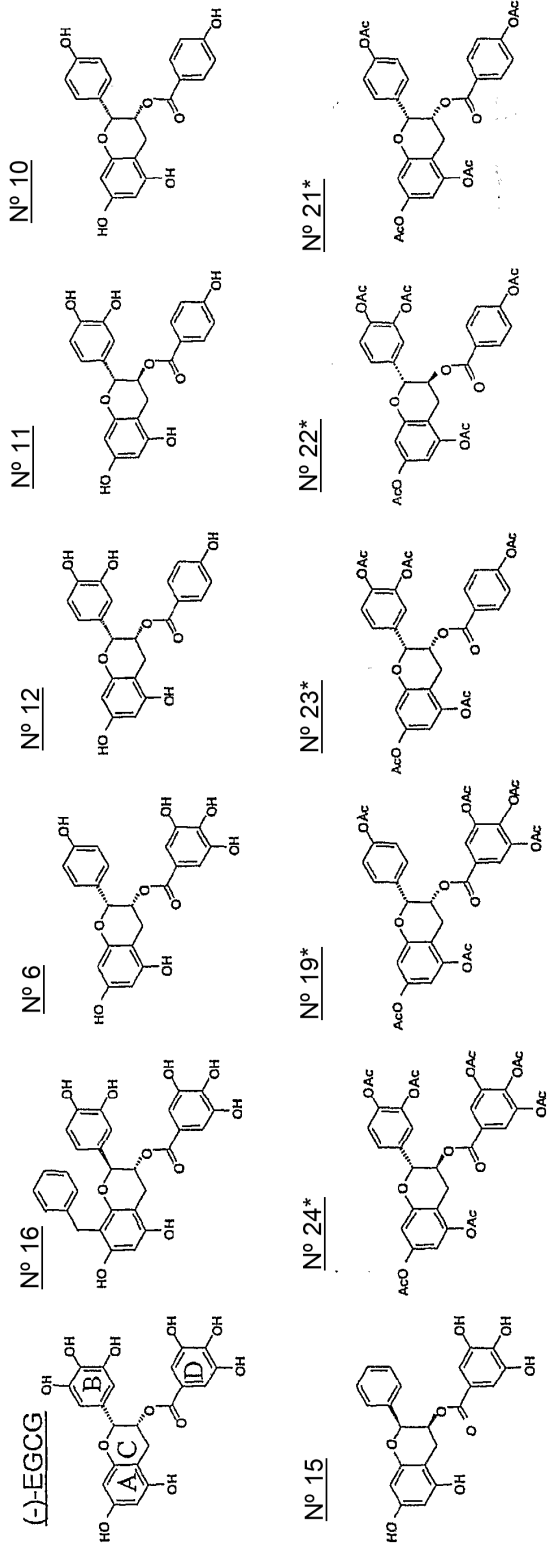


Figure 13

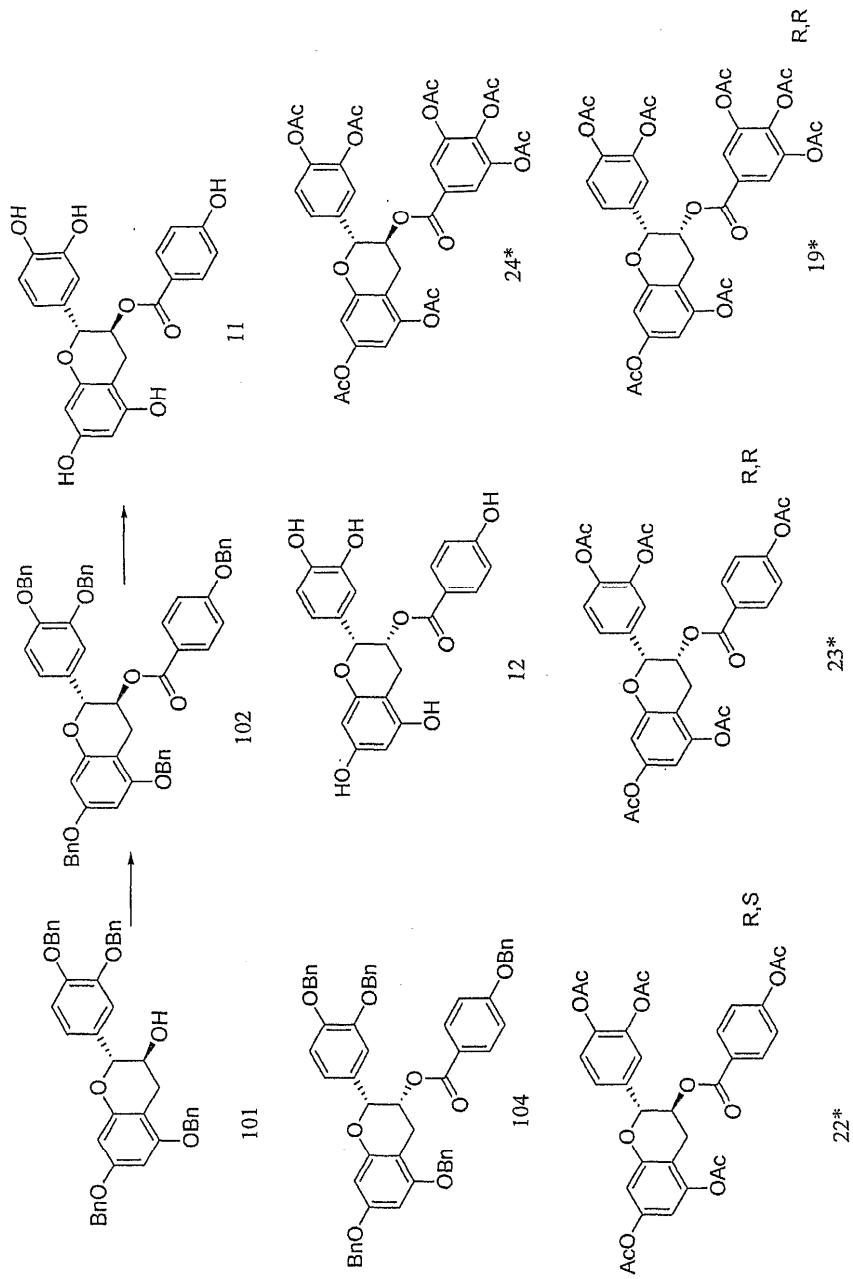


Figure 13a

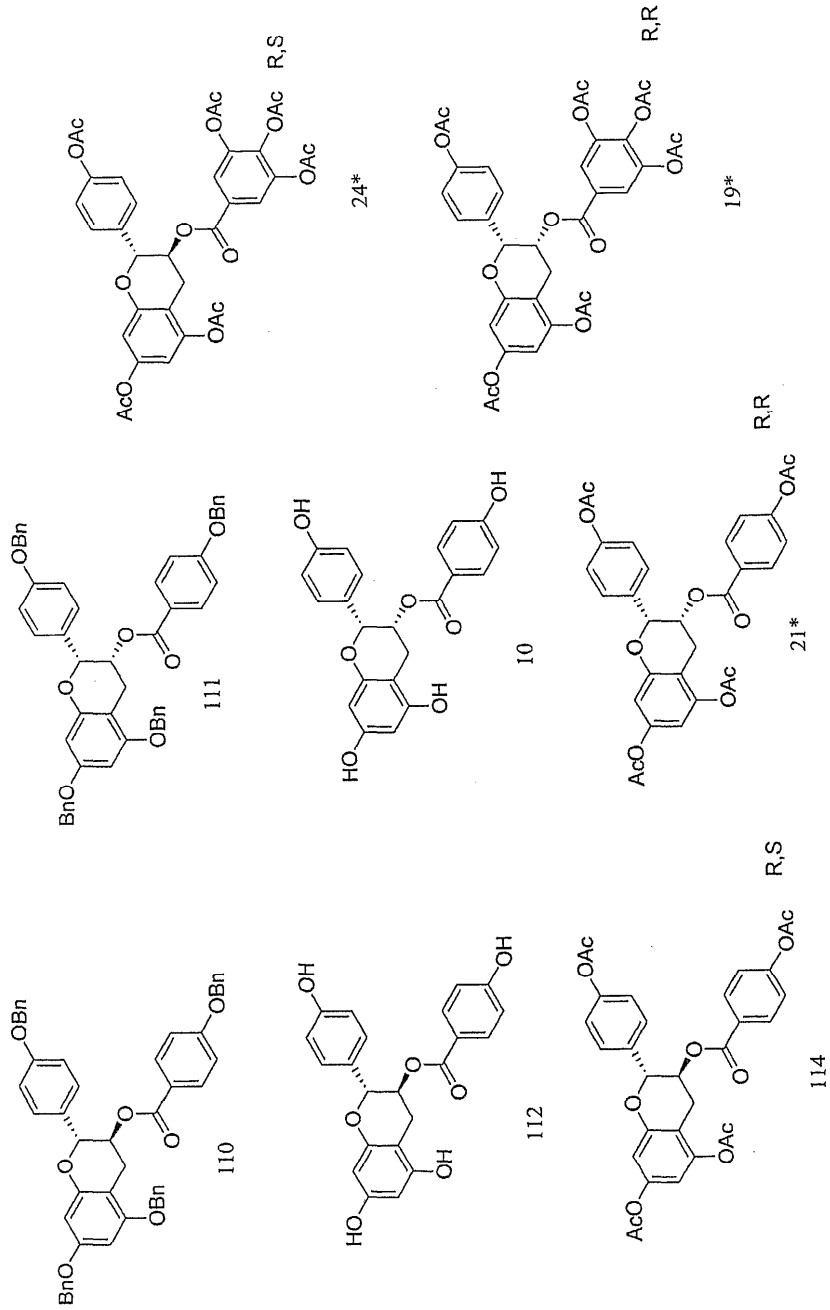


Figure 13b

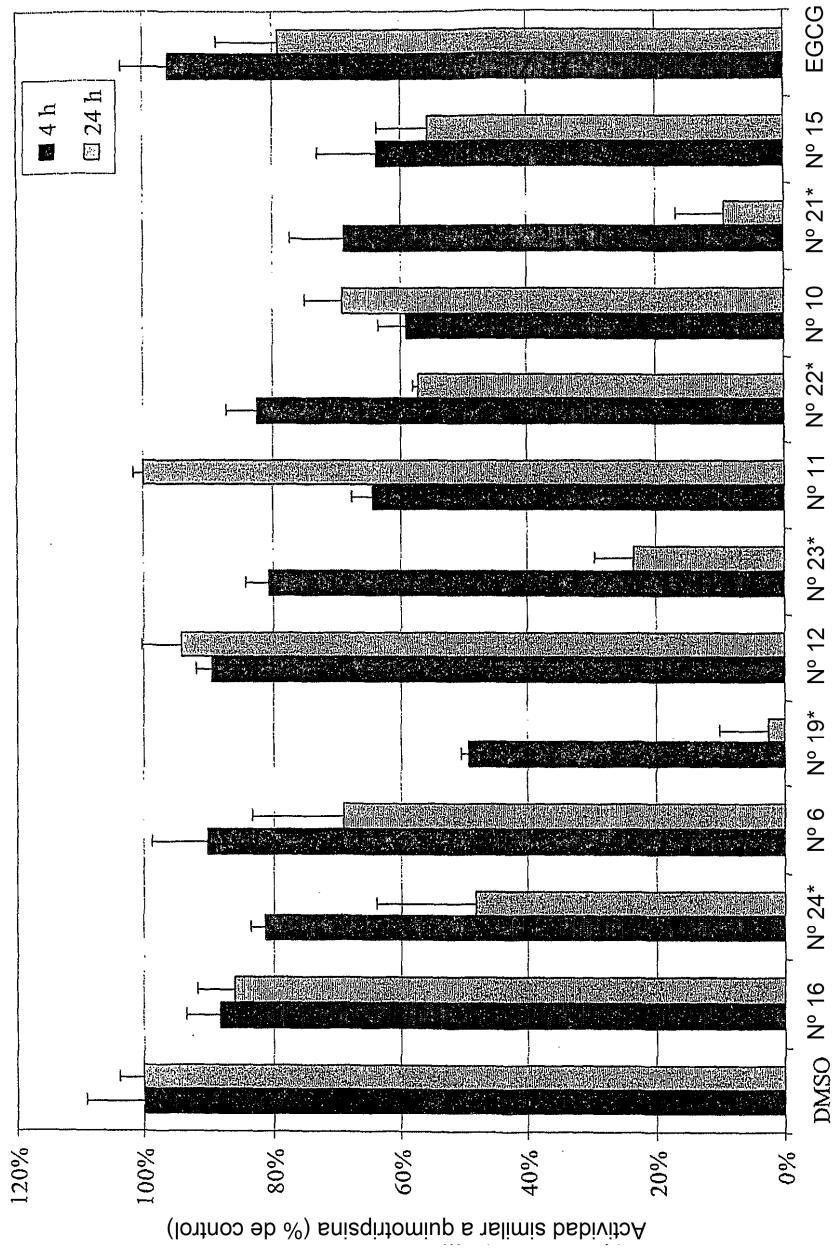


Figura 14

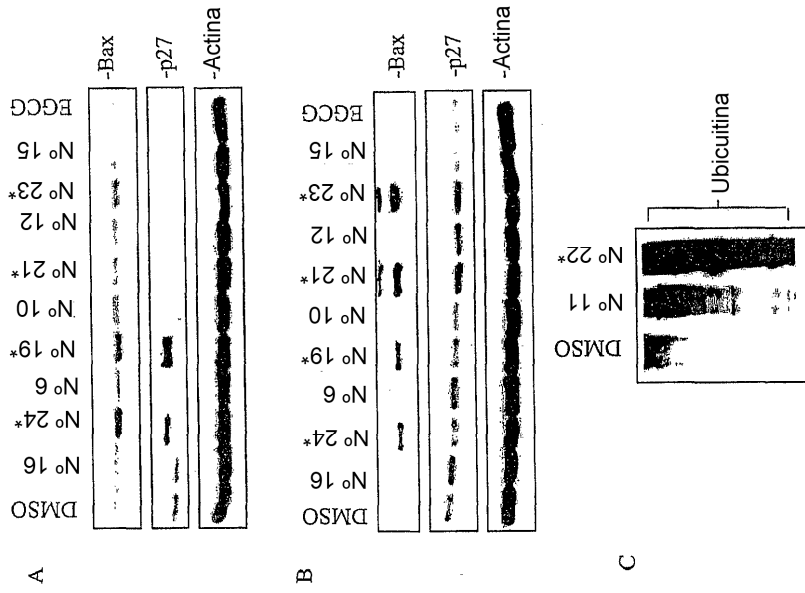


Figure 15

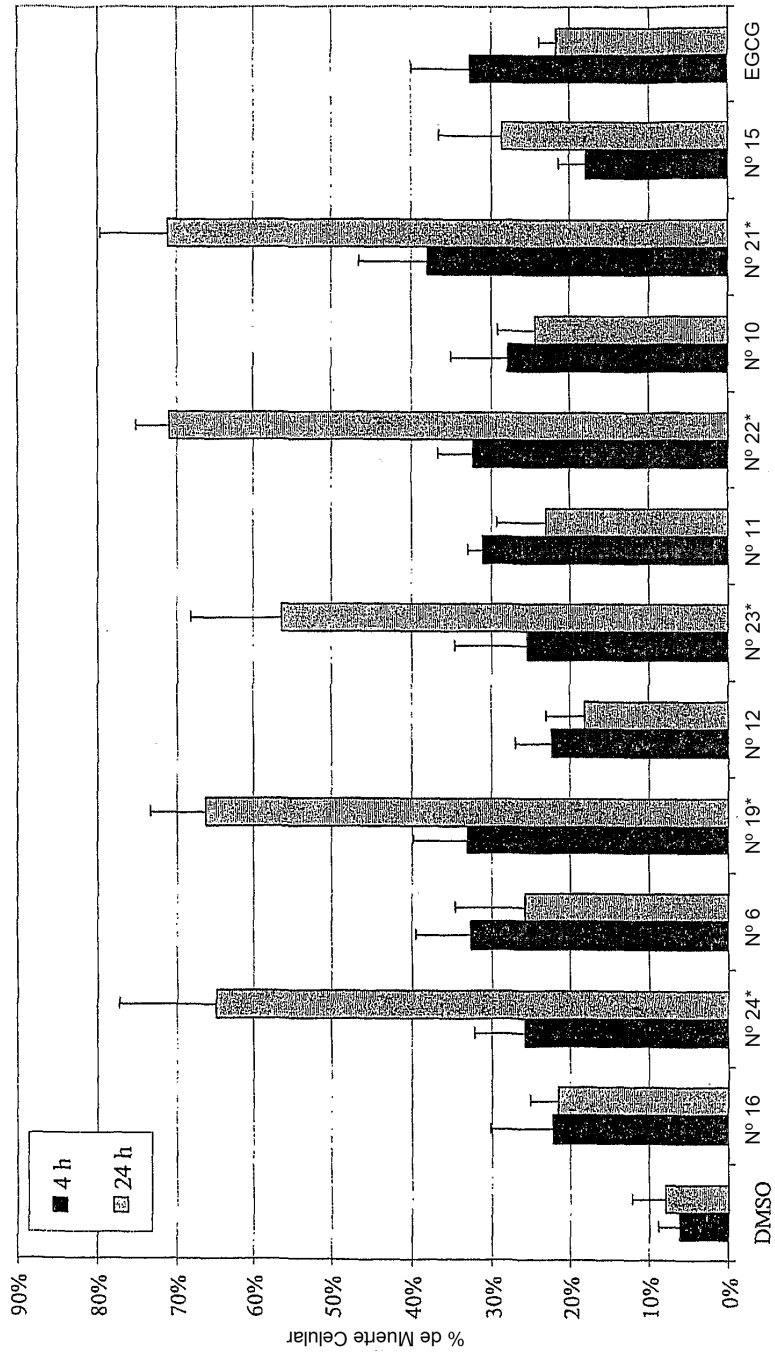


Figura 16

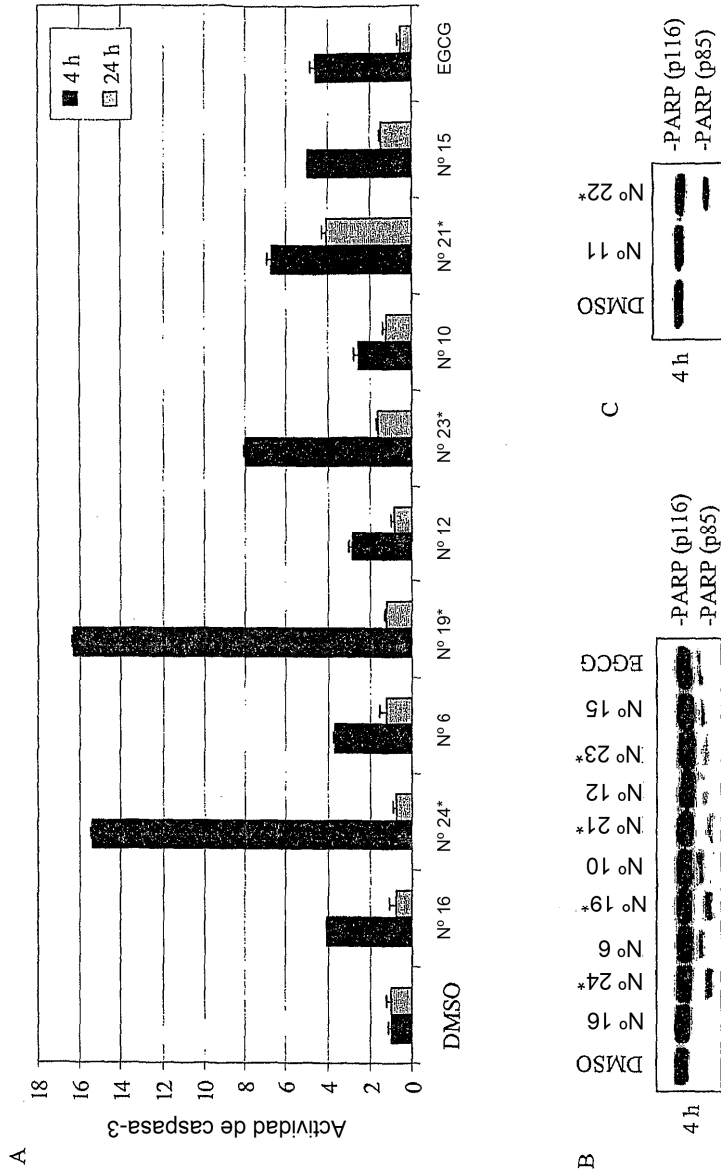


Figura 17

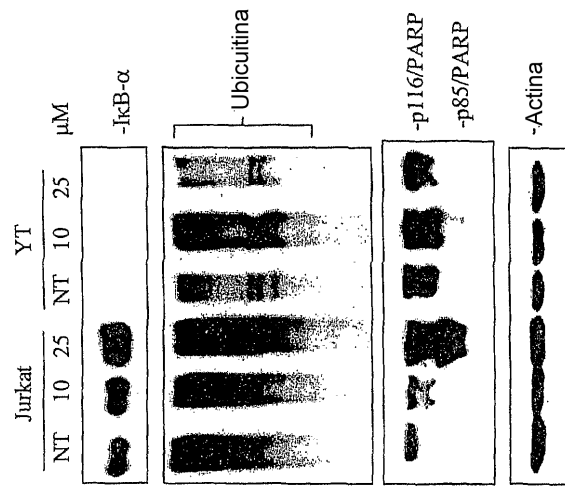


Figura 18