



GLICOSISTEMAS CON APLICACIONES ANTIVIRALES, ANTITUMORALES Y EN INMUNOTERAPIA A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN CON LECTINAS

Noelia de la Cruz Ruiz

Sevilla, 2020

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc



Instituto de Investigaciones
Químicas



Departamento
de Química Orgánica



cicCartuja

Centro de Investigaciones Científicas
Isla de la Cartuja

GLICOSISTEMAS CON APLICACIONES ANTIVIRALES, ANTITUMORALES Y EN INMUNOTERAPIA A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN CON LECTINAS

Memoria presentada por la
Graduada Noelia de la Cruz Ruiz
para optar al grado de Doctora en Química

Sevilla, 2020

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

Dr. Francisco Javier Rojo Marcos, Investigador Científico (CSIC), y Dra. Ana Sousa Hervés, Investigadora Postdoctoral

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado “Glicosistemas con aplicaciones antivirales, antitumorales y en inmunoterapia a través de la interacción con lectinas” ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC-Universidad de Sevilla) del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja Sevilla constituyendo la Memoria que presenta la Graduada Noelia de la Cruz para optar al grado de Doctora en Química.

Fdo.: Francisco Javier Rojo Marcos
Director del trabajo

Fdo.: Ana Sousa Hervés
Directora del trabajo

Sevilla, 2020

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

El presente trabajo ha sido realizado por Noelia de la Cruz Ruiz con una beca FPI asociada al proyecto CTQ2014-52328-P del MINECO, en el Laboratorio de Glicosistemas del Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC-Universidad de Sevilla) bajo la dirección de los Drs. Francisco Javier Rojo Marcos y Ana Sousa Hervés. El trabajo ha sido tutelado por la Profesora Inmaculada Robina Ramírez en el marco del Programa de Doctorado en Química de la Universidad de Sevilla.

Fdo. Noelia de la Cruz Ruiz

Fdo.: Francisco Javier Rojo Marcos
Director del trabajo

Fdo.: Ana Sousa Hervés
Directora del trabajo

Fdo.: Inmaculada Robina Ramírez
Tutora del trabajo

Sevilla, 2020

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

AGRADECIMIENTOS

Plasmar en un papel todo lo que estos cuatro años han representado para mí es una tarea difícil o más bien, imposible. Pero considero que es importante agradecer a todas las personas que han puesto su pequeñito granito de arena para que alcance mi título de doctora. Personas que de una u otra manera me han ayudado y me han animado. En mi cabeza, se agolpan millones de recuerdos de estos cuatro maravillosos años con personas increíbles.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis. Al doctor Javier Rojo por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y depositar toda su confianza en mí. Has permitido que me desarrolle no sólo profesionalmente si no como persona. Gracias por tus consejos y todos los momentos compartidos. A la doctora Ana Sousa por abrirme las puertas de un mundo totalmente desconocido para mí, los nanogeles y su colaboración en este trabajo.

A la profesora Inmaculada Robina por aceptar ser tutora de esta tesis doctoral.

A las doctoras María Jesús Vicent, Ana Armiñan y su excepcional grupo de investigación por ayudarme durante mi estancia en su laboratorio y descubrirme el mundo de la biología.

A la doctora Salomé Pinho por dejarme hacer una estancia en su grupo de investigación. En especial a Inês, por su esfuerzo y abrirme las puertas de su casa. Muito obrigada.

Al profesor Franck Fieschi por facilitarme la proteína DC-SIGN para llevar a cabo los estudios de polarización de fluorescencia.

A los doctores José Juan Reina, José Luis de Paz y Pedro Ramírez por su ayuda prestrada. Gracias por enseñarme que para ser un buen profesional no sólo es necesario tener muchos conocimientos, sino querer compartirlos y transmitirlos. En especial, me gustaría agradecer al doctor Javier Ramos por su contribución a nivel científico a esta tesis doctoral, enseñarme, aconsejarme y ayudarme durante toda esta etapa cuando más lo necesitaba.

A mi grupo de investigación con el que he compartido muchas horas de laboratorio. A Pedro Domínguez, un compañero y un amigo único, gracias por preocuparte por mí y hacer el día más ameno. A Jorge, por ayudarme a ver el lado positivo de las cosas y tu apoyo. A Leonardo, por compartir muchas risas y buenos momentos. A Carmen, por tu enorme corazón. A Myriam, por tus mil y una historias. A Antonio, por los últimos momentos compartidos. A Adrián le deseo mucha suerte en esta nueva etapa que comienza. Al doctor Pedro Nieto, Noel, Ainhoa, Ruiyi, Teresa, Rute, Susana, Rossana, Alice, Sergi, Jon...

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



Sin duda, la frase más excitante que se puede oír en el IIQ, la que anuncia nuevos descubrimientos, Sí es Eureka. Lugar de reuniones donde he compartido buenos ratos con Alberto, Antonio Romero, Carmen, Christian, Elena, Juanje, Patri y Praxedes. A la familia de organometálica, Nereida, Marina, Elena, Tomás, Juanín, Carlos, Pablo... Gracias por las risas y los momentos compartidos que me han dado vida.

Al personal del cicCartuja, en especial a la doctora Gloria Gutiérrez por su amabilidad, su disposición y su eficiencia. A Marga por estar siempre dispuesta a ayudarnos y tener siempre una palabra de ánimo y positividad. A Guadalupe por su paciencia y preocupación. A Fran por buscar solución a todos los problemas que tenemos. A José Manuel por su simpatía.

De esta etapa, me llevó a muchas personas en mi corazón pero sobre todo a mis niñas. A Laura, porque podría escribir otra tesis agradeciéndote todo lo que has hecho por mí, por tus consejos y tu apoyo. A María José, porque hiciste mis inicios en Cartuja y en Sevilla inolvidables y muy confortables. Aunque te me fuiste muy pronto pero me quedo con los momentos que seguimos y seguiremos compartiendo. A Tania, porque aunque no seamos de *Cai Cai* nuestra flamencura no tiene cura y lo que un día en sueños te dije es lo que realmente siento hacia ti.

A mi nueva familia, Antonio y Rosario, Antonio y Rocío, y a los pequeños Marta y Antonio, que han abierto las puertas de su casa y de su corazón de par en par para mí. Me habéis hecho sentirme una más en vuestro hogar y no tengo palabras para mostrar mi agradecimiento.

Fue difícil irme de mi Palencia pero nunca me aleje de mi gente. Mis amigas, las de siempre, Alba, Ana Laura, Isabel, Lorena, Nuria y Rebeca las que estuvieron, están y estarán siempre dispuestas para ir a nuestros pequeños paraísos, el edén o el sol. Allí, dónde simplemente recordaremos historias que me demuestran que no podía ser más feliz y afortunada a vuestro lado. Aún nos quedan muchos momentos que celebrar juntas y simplemente os quiero a cada una de vosotras.

A los niños que me acompañaron, desde el principio, en mi andadura por la química e hicieron esos cuatro años más livianos y no podían ser de mejor tierra, Alfonso, Ana, Ángel, Carmen, Elena, Irene, Lara y Quique. La vida puso distancia física entre nosotros pero no química. A mi Alfonso, por alegrarme con su forma de ser y simplemente por ser como es. A mi Ana y a mi Elena, por demostrarme que la amistad no es hablar ni verse todos los días, sino alegrarse por los triunfos de la otra persona como si fuesen tuyos y sobre todo, por estar ahí en los momentos no tan buenos, cuando realmente esa persona te necesita.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



A mis tíos, Carmina, Luci y Manolo, y Gloria y Fe, a mis primos Elena, José Manuel, María José, Mari Luz y Virginia, y a sus hijos. Gracias por preocuparos por mí y porque mi mayor ilusión es veros bien. A mis abuelos, en especial a ti, abuelo, que me dejaste hace años pero creo que me sigues guiando y te sigo queriendo y extrañando cada día.

A mis hermanas, Encarna, María José y Virginia, mis pilares fundamentales, la razón de la mayoría de mis sonrisas en mi infancia. No sería la misma persona si vosotras no estuvieseis en mi vida. No tengo duda de que no hay nada que no haría por vosotras. Cada una sois únicas pero especiales y aunque no os lo diga a menudo, os admiro y os quiero.

A los mejores padres que se pueden tener, Encarna y José Luis. Gracias por darme la vida, por todo lo que me habéis dado y sobre todo, por darme el cariño que toda niña desea. Por educarme y enseñarme a ser una buena persona. A pesar de que las despedidas en la estación son amargas, están llenas de abrazos que me llenan de vida y energía. Gracias por enseñarme a amar el trabajo y entregar la máxima energía para hacerlo lo mejor posible. Y sobre todo, me gustaría deciros que estoy muy orgullosa de vosotros por todo lo que habéis luchado. Si volviese a nacer, no quiero otros padres, os quiero a vosotros.

A mi compañero de vida, Javier, el regalo que el destino tenía guardado para mí. Cada día que pasa me siento más afortunada de poder tenerte en mi vida y estoy segura de que juntos escribiremos una bonita historia de amor. Eres capaz de sacarme una sonrisa en cualquier momento y alegrarme los días. Cada día me demuestras que a tu lado no puedo ser más feliz y no existe amor que pueda darte para agradecértelo.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

*A mis padres
A mis hermanas
A Javier*

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

*La vida no es fácil para ninguno de nosotros.
Pero... ¡qué importa!
Debemos perseverar y, sobre todo,
tener confianza en nosotros mismos.*

MARIE CURIE

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ABC	Complejo de avidina/biotina (del inglés <i>avidin/biotin complex</i>)
Ac	Acetilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
All	Alilo (del inglés <i>allyl</i>)
AmCyan	<i>Anemonia Majano Cyan</i>
Anh.	Anhidro
APC	Célula presentadora de antígeno (del inglés <i>antigen presenting cell</i>)
APC	Aloficocianina (del inglés <i>allophycocyaninin</i>)
APS	Persulfato de amonio (del inglés <i>ammonium persulfate</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ASGP-R	Receptor de asialoglicoproteínas (del inglés <i>asialoglycoprotein receptor</i>)
Asn	Asparagina
Células B	Células B específicas derivadas de la médula ósea (del inglés <i>bone-marrow derived lymphocytes</i>)
BCR	Receptores de células B (del inglés <i>B-cell receptors</i>)
Bn	Bencilo
bNAbs	Anticuerpos ampliamente neutralizantes (del inglés <i>broadly neutralizing antibodies</i>)
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonilo
BODIPY	Boro-dipirrometeno (del inglés <i>boron-dipyrrromethene</i>)
BSA	Albúmina del suero bovino (del inglés <i>bovine serum albumin</i>)
BSP	1-Bencenosulfinil piperidina
Bu	Butilo
Bz	Benzofilo
C ₆₀	Fullereno de 60 átomos de carbono
c.c.f	Cromatografía en capa fina

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



CD	Clúster de diferenciación (del inglés <i>cluster of differentiation</i>)
CDA	Ciclohexano-1,2-diacetal
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (del inglés <i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)
CLR	Lectina tipo C (del inglés <i>C-type lectin receptor</i>)
col.	Colaboradores
ConA	Concanavalina A
COSY	Espectroscopía de correlación (del inglés <i>correlation spectroscopy</i>)
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos (del inglés <i>carbohydrate recognition domain</i>)
CSA	Ácido (10)-(R)-alcanforsulfónico (del inglés <i>10-(R)-camphorsulfonic acid</i>)
CSF	Factor estimulador de colonias (del inglés <i>colony-stimulating factor</i>)
CTLD	Dominio de lectina de tipo C (del inglés <i>C-type lectin-like domain</i>)
CuAAC	Cicloaddición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas catalizada por cobre I (del inglés <i>Cu(I)-catalyzed alkyne azide cycloaddition</i>)
cuant.	cuantitativo
Cy	Cianina (del inglés <i>cyanine</i>)
Cy8	Ciclooctino (del inglés <i>Cyclooctine</i>)
Cys	Cisteína (del inglés <i>cysteine</i>)
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DC	Célula dendrítica (del inglés <i>dendritic cell</i>)
DCC	Diciclohexil carbodiimida
DCM	Diclorometano
DC-SIGN	Lectina no integrina presente en células dendríticas que reconoce ICAM-3 selectivamente (del inglés <i>dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin</i>)
DCTB	2-[(2E)-3-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-2-metilprop-2-enilideno]malononitrilo
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-dicianobenzoquinona
DENV	Virus del Dengue (del inglés <i>Dengue virus</i>)
DIPEA	<i>N, N'</i> -Diisopropiletilamina
DLS	Dispersión dinámica de la luz (del inglés <i>dynamic light scattering</i>)
DMAP	4-Dimetilaminopiridina

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



DEMEM	<i>Dubelcco's modified eagle medium</i>
DMF	<i>N,N'-Dimetilformamida</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EBOV	Virus del Ébola (del inglés <i>Ebola virus</i>)
ECD	Dominio extracelular (del inglés <i>extracellular domain</i>)
ECL	Quimioluminiscencia electrogenerada (del inglés <i>electrogenerated chemiluminescence</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>)
EPR	Aumento de permeabilidad y retención (del inglés <i>enhanced permeability and retention</i>)
eq	Equivalente
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electrospray (del inglés <i>electrospray ionization-mass spectrometry</i>)
Et	Etilo
F _{ab}	Región de unión del anticuerpo (del inglés <i>fragment antigen-binding</i>)
FACS	Citometría de flujo (del inglés <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FBS	Suero bovino fetal (del inglés <i>fetal bovine serum</i>)
F _c	Región cristalizable del anticuerpo
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (del inglés <i>food and drug Administration</i>)
FITC	Fluoresceína isotiocianato.
FSC	Dispersión frontal (del inglés <i>forward scatter</i>)
FVD	Marcador de viabilidad flexible (del inglés <i>fixable viability dye</i>)
GDP	Glicodendropéptido
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina
GM	Macrófago de granulocitos (del inglés <i>granulocyte macrophage</i>)
G _n	Generación n
GNP	Gliconanopartícula
gp	Glicoproteína
h	hora

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



HABA	Ácido 2-(4-hidroxifenilazo)benzoico (del inglés <i>2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid</i>)
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (del inglés <i>hexafluorophosphate azabenzotriazole tetramethyl uronium</i>)
HCV	Virus de la Hepatitis C (del inglés <i>Hepatitis C virus</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento (del inglés <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución (del inglés <i>high resolution mass spectrometry</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>)
HSQC	Correlación heteronuclear de nivel cuántico individual (del inglés <i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
IC ₅₀	Concentración para una inhibición del 50%
ICAM-3	Molécula de adhesión intercelular-3 (del inglés <i>intercellular adhesion molecule 3</i>)
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
ⁱ Pr	<i>iso</i> -propilo
K _D	Constante de disociación
KLH	Hemocianina de lapa de ojo de cerradura (del inglés <i>keyhole limpet hemocyan</i>)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LCST	Valor bajo crítico de la temperatura de disolución (del inglés <i>low critical solution temperature</i>)
Le	Lewis
Lev	Levulino
LPS	Lipopolisacárido
Lys	Lisina (del inglés <i>lysine</i>)
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
mAb	Anticuerpo monoclonal (del inglés <i>monoclonal antibody</i>)
MALDI-TOF	Espectrometría de masas por ionización mediante desorción por láser asistida

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



	por una matriz con detección por tiempo de vuelo (del inglés <i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i>).
Man	D-Manosa
Me	Metilo
MFI	Intensidad de fluorescencia media (del inglés <i>mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i>major histocompatibility complex</i>)
min	minuto
mM	Milimolar
MO	Microondas
MR	Receptor de manosa (del inglés <i>mannose receptor</i>)
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (del inglés <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium</i>)
MWCO	Límite de peso molecular (del inglés <i>molecular weight cut-off</i>)
NaAsc	Ascorbato sódico
nab	Nanopartícula de albumina conjugada
NADPH	Fosfato del dinucleótido de nicotinamida-adenina (del inglés <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NBS	N-bromosuccinimida
NG	Nanogel
NHS	N-hidroxisuccinimida
NIS	N-iodosuccinimida
NIPAM	N-isopropilacrilamida
Células NK	Células naturales asesinas (del inglés <i>natural killer</i>)
NLR	Receptores de tipo NOD (del inglés <i>NOD-like receptors</i>)
nM	Nanomolar
NMNO	N-óxido de la N-metilmorfolina (del inglés <i>N-methylmorpholine N-oxide</i>)
NOD	Dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (del inglés <i>nucleotide-binding oligomerization domains</i>)
NPhth	N-ftalimido (del inglés <i>N-phthalimide</i>)
OG	Oregon-Green

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



on	overnight
OT	Línea celular transgénica con TCR específicos de OVA (del inglés <i>ovalbumin-specific TCR transgenic cell line</i>)
OVA	Ovoalbúmina
P	Polarización
PAMAM	Poli(amidoamina)
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>phosphate buffer saline</i>)
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica (del inglés <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PDI	Índice de polidispersión (del inglés <i>polydispersity index</i>)
PE	Ficoeritrina (del inglés <i>phycoerythrin</i>)
PEG	Poli(etilenglicol)
PerCP	Complejo proteico de peridina-clorofila (del inglés <i>peridinin-chlorophyll-protein-complex</i>)
Ph	Fenilo (del inglés <i>phenyl</i>)
PI	Yoduro de propidio (del inglés <i>propidium iodide</i>)
PLA ₂ R	Receptor de la fosfolipasa A ₂ (del inglés <i>phospholipase A₂ receptor</i>)
PLL	Polilisinas
PMB	<i>p</i> -metoxibencilo
PMS	Metosulfato de fenazina (del inglés <i>phenazine methosulfate</i>)
PPI	Poli(propilenoimina)
ppm	Partes por millón
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés <i>pattern recognition receptors</i>)
<i>p</i> -TsOH	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
PTX	Paclitaxel
PVDF	Difluoruro de polivinilideno (del inglés <i>polyvinylidenedifluoride</i>)
RAFT	Polimerización por adición, fragmentación de cadena y transferencia reversible (del inglés <i>reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization</i>)

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e200018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



RE	Retículo endoplasmático
Rf	Factor de retención (del inglés <i>retention factor</i>)
RIG-1	Gen inducible por ácido retinoico I (del inglés <i>retinoic acid-inducible gene-I</i>)
RLR	Receptores de tipo RIG-1 (del inglés <i>RIG-1-like-receptors</i>)
rt	room temperature
RMN	Resonancia magnética nuclear
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico (del inglés <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Microscopia electrónica de barrido (del inglés <i>scanning electron microscopy</i>)
SPAAC	Cicloadiición 1,3-dipolar entre ciclooctinos y azidas (del inglés <i>strain-promoted alkyne-azide cycloaddition</i>)
SPR	Resonancia del plasmón de superficie (del inglés <i>surface plasmon resonance</i>)
SSC	Dispersión lateral (del inglés <i>side scatter</i>)
STD-NMR	Diferencia de la transferencia de saturación-resonancia magnética nuclear (del inglés <i>saturation transfer difference-Nuclear Magnetic Resonance</i>)
Células T	Células T derivadas del timo (del inglés <i>thymus-derived lymphocytes</i>)
t.a.	Temperatura ambiente
TBAI	Ioduro de tetrabutilamonio (del inglés <i>tetrabutylammonium iodide</i>)
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsililo (del inglés <i>tert-butyldimethylsilyl</i>)
TBDPS	<i>tert</i> -butildifenilsililo (del inglés <i>tert-butyl-diphenylsilyl</i>)
TBTA	Tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina
^t Bu	<i>tert</i> -butilo
TCA	Tricloroacetimidato
T _c	Linfocitos T citotóxicos
TCR	Receptores de células T (del inglés <i>T-cell receptors</i>)
TEM	Microscopia electrónica de transmisión (del inglés <i>transmission electron microscopy</i>)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametiletilediamina
TFA	Ácido trifluoroacético (del inglés <i>trifluoroacetic acid</i>)
Tf ₂ O	Anhídrido tríflico
TfOH	Ácido tríflico
TGF	Factor de crecimiento transformador (del inglés <i>transforming growth factor</i>)

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



T _H	Linfocitos T colaboradores (del inglés <i>T helper cell</i>)
THF	Tetrahidrofurano
TIPS	Triisopropilsililo
TLR	Receptor de tipo Toll (del inglés <i>Toll-like receptor</i>)
TMSOTf	Triflato de trimetilsililo
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés <i>tumor necrosis factor</i>)
Tol	Tolilo (4-metilfenilo)
T _{reg}	Linfocito T regulador
TT	Toxide del Tétanos (del inglés <i>Tetanus Toxoid</i>)
TTBP	2,4,6-Tri- <i>tert</i> -butilpirimidina
UV	Ultravioleta
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana-1
WGA	Aglutinina del germen del trigo (del inglés <i>wheat germen agglutinin</i>)
ZIKV	Virus del Zika (del inglés <i>Zika virus</i>)

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Carbohidratos	1
1.2 Multivalencia	5
1.2.1 <i>Dendrímeros</i>	14
1.2.2 <i>Química click</i>	19
2. Antecedentes y objetivos	25
2.1 Antecedentes	25
2.2 Objetivos	36
3. Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas	39
3.1 Introducción	39
3.1.1 Glicoproteínas virales	39
3.1.1.1 <i>Man₉GlcNAc₂</i>	45
3.1.1.2 <i>Sistemas multivalentes del epítipo Man₉</i>	57
3.2 Objetivos	60
3.3 Exposición y discusión de los resultados	61
3.3.1 Preparación del epítipo Man ₉ funcionalizado en el extremo reductor con un espaciador de mayor longitud con configuración β	61
3.3.2 Preparación del epítipo Man ₉ funcionalizado en su extremo reductor con espaciadores de diferente longitud con configuración α	72
3.3.3 Presentación multivalente de los epítipos de Man ₉	83

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



3.3.4	Evaluación del efecto de la configuración del extremo reductor del Man ₉ en la interacción con DC-SIGN mediante polarización de fluorescencia	88
3.3.5	Síntesis de oligomanosas de hasta 5 unidades como partes constituyentes de Man ₉	106
4	Evaluación de la respuesta inmune de glicodendrones y neoglicoproteínas	125
4.1	Introducción	125
4.1.1	El sistema inmune	125
4.1.2	Activación de las células dendríticas y de los linfocitos T y B mediante neoglicoproteínas	130
4.1.2.1	<i>Métodos de preparación de neoglicoproteínas</i>	133
4.2	Objetivos	136
4.3	Exposición y discusión de resultados	136
4.3.1	Evaluación del papel de los glicodendrones en la activación del sistema inmune innato	136
4.3.2	Efecto de los glicodendrones en la producción de citocinas por DCs	146
4.3.3	Funcionalización de OVA mediante SPAAC	149
4.3.4	Efecto de las neoglicoproteínas 103 y 104 en la activación de las DCs	156
5	Preparación de gliconanogeles. Determinación de su afinidad por Concanavalina A	163
5.1	Introducción y antecedentes	163
5.1.1	Nanogeles	163
5.1.2	Métodos de preparación de nanogeles	164
5.1.2.1	<i>Polimerización por precipitación</i>	166



5.1.2.2	<i>Polimerización en emulsión</i>	167
5.1.3	Aplicaciones de los nanogeles en biomedicina	169
5.2	Objetivos	172
5.3	Exposición y discusión de resultados	172
5.3.1	Funcionalización del polímero precursor.	173
5.3.2	Conjugación del polímero precursor 105 con diferentes ligandos mediante acoplamiento CuAAC	180
5.3.3	Caracterización de los intermedios polimerizables mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	186
5.3.4	Preparación de los gliconanogeles	189
5.3.5	Caracterización de los gliconanogeles	193
5.3.6	Determinación de la cantidad de carbohidratos en los gliconanogeles	195
5.3.7	Interacción de los gliconanogeles con Concanavalina A	197
5.3.7.1	<i>Ensayos de agregación usando espectrometría UV-visible</i>	198
5.3.7.2	<i>Medida del tamaño de los agregados formados mediante DLS</i>	201
6	Evaluación de la capacidad de los gliconanogeles para interanalizar en células tumorales	205
6.1	Introducción y antecedentes	205
6.1.1	La nanomedicina en el transporte y liberación de fármacos	205
6.1.1.1	<i>Liberación de fármacos presentes en nanogeles</i>	210
6.2	Objetivos	214
6.3	Exposición y discusión de resultados	215
6.3.1	Búsqueda de receptores de manosa sobreexpresados en líneas celulares de	215



mama	
6.3.2 Construcción de gliconanogel capaces de interactuar con el receptor Endo180	220
6.3.3 Evaluación de la citotoxicidad de los gliconanogel	223
6.3.4 Evaluación de la capacidad de internalización de los gliconanogel en células mamarias	225
6.3.5 Aumento de la multivalencia del gliconanogel de manosa	232
6.3.6 Conjugación del fármaco paclitaxel	238
7 Conclusiones	255
8 Parte experimental	259
8.1 Material and methods	259
8.2 Synthetic procedures, structural characterization and biological assays	260
8.2.1 Synthesis and multivalent presentation of oligomannoses. Studies of their affinity for lectins	260
8.2.2 Evaluation of immune response of glycodendrons and neoglycoproteins	301
8.2.3 Preparation of gliconanogel. Determination of their affinity for Concanavalin A	304
8.2.4 Evaluation of uptake capacity of glyconogel in tumor cells	310
Anexo I. Selección de espectros de RMN y ESI-MS	319



CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

1.1 Carbohidratos

Hoy en día, la glicobiología es un campo que se encuentra en continuo crecimiento y presenta una elevada relevancia en biomedicina y biotecnología. La glicobiología se ocupa del estudio de la estructura, la biosíntesis, la biología y la evolución de los carbohidratos que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y que se encuentran presentes en todos los organismos vivos. Este estudio incluye la química de los carbohidratos, la formación y la degradación enzimática de éstos, el reconocimiento de glicanos mediante proteínas específicas, el papel de los glicanos en sistemas biológicos complejos, el análisis de éstos y su manipulación mediante una gran variedad de técnicas instrumentales y analíticas.¹

Los carbohidratos no son únicamente una importante fuente de energía metabólica y estructural, sino que también juegan un papel fundamental en muchos procesos biológicos.² La mayoría de estos carbohidratos se encuentran en forma de glicoconjugados, glicolípidos o glicoproteínas. La mayoría de las células de mamíferos se encuentran recubiertas por una densa capa de glicoconjugados denominada, glicocálix. (Figura 1.1) Los carbohidratos son capaces de almacenar una gran cantidad de información molecular que es leída a través de su interacción con receptores como las lectinas. Presentan una gran diversidad estructural que se consigue mediante la participación de numerosas enzimas que dan lugar a la glicosilación de las proteínas y los lípidos, produciendo un repertorio abundante y variado de glicanos complejos. Este proceso se lleva a cabo gracias a la acción de glicosiltransferasas y glicosidasas que están presentes en el retículo endoplasmático (RE) y en el aparato de Golgi.³ Se pueden formar dos tipos de enlaces glicosídicos con las proteínas: a través de un átomo de nitrógeno del aminoácido asparagina (*N*-Glicosilación), o bien a través de un átomo de oxígeno de una serina o treonina (*O*-Glicosilación).⁴

¹ Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, USA **2015-2017**.

² a) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97. b) Seeberger, P. H.; Werz, D. B. *Nature* **2007**, *446*, 1046. c) Varki, A. *Glycobiology* **2017**, *27*, 3.

³ a) Varki, A. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 34. b) Varki, A. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a005462.

⁴ Taylor, M. E.; Drickamer, K. *Introduction to Glycobiology*. Oxford University Press. New York, USA. **2011**.



Capítulo 1

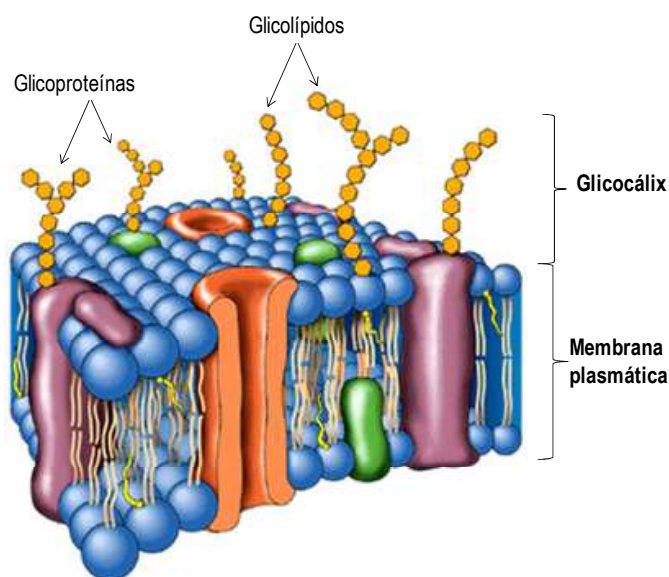


Figura 1.1 Representación de la membrana plasmática.

La complejidad estructural de los carbohidratos en la naturaleza, su heterogeneidad, y la dificultad sintética para poder obtenerlos en grandes cantidades, son algunos de los obstáculos que impiden conocer la relación entre su estructura y su actividad.⁵ La consecuencia directa de este hecho es que las terapias basadas en carbohidratos no se han desarrollado lo suficiente. Desde la década de los años 70, se han producido numerosos avances tanto en técnicas analíticas como en métodos sintéticos (en disolución, enzimáticos o en fase sólida, manual o automática) que han permitido acceder a carbohidratos complejos puros, lo que facilita su estudio para poder entender su función y su actividad en la naturaleza. Este desarrollo ha abierto nuevas puertas en química biológica y química médica, sobre todo en el desarrollo de terapias y métodos de diagnóstico basados en carbohidratos. De hecho, existen algunos ejemplos importantes de compuestos comercializados que demuestran que este tipo de moléculas pueden

⁵ a) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science* **2001**, *291*, 2357. b) Kamerling, J. P. *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology*. Elsevier Sci. Technol. U.K., **2007**. c) Fraser-Reid, B. O.; Tatsuta, K.; Thiem, J. *Glycoscience Chemistry and Chemical Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Berlin*, **2008**.



funcionar de manera efectiva. Más de 130 fármacos basados en carbohidratos naturales han sido desarrollados como fármacos o excipientes.⁶ Entre estos fármacos se incluyen compuestos naturales, desde monosacáridos simples como la glucosa hasta polisacáridos complejos como la heparina. En algunos casos, la diana biológica no se ha identificado, aunque el fármaco sea activo contra una enfermedad en particular.

Se sabe que los carbohidratos están involucrados en numerosos procesos biológicos, tales como el desarrollo embrionario, la interacción huésped-patógeno durante la infección, procesos de señalización, diferenciación y reconocimiento celular, procesos de inflamación, el desarrollo de la respuesta inmune, el desarrollo de enfermedades o la progresión tumoral o la metástasis, entre otros.^{2, 7}

Sin duda, los carbohidratos juegan un papel fundamental en el proceso de infección por patógenos y en la modulación de la respuesta inmune. El primer paso en el proceso de infección consiste en el reconocimiento de las unidades sacarídicas, presentes en la superficie de los patógenos invasores, por parte de una gran variedad de receptores expresados en la membrana de las células dendríticas (DCs, del inglés *Dendritic Cells*).⁸ En concreto, las DCs constituyen uno de los principales componentes del sistema inmune innato, capaz de detectar y prevenir la entrada de agentes exógenos en el organismo.⁹ Este tipo de células presentan una serie de receptores en su superficie, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *Pattern Recognition Receptors*). Los PRRs se clasifican en cuatro familias: lectinas de

⁶ a) Wong, C.-H. *Carbohydrate-Based Drug Discovery*. Wiley-VCH. Weinheim, Germany, 2003. b) Osborn, H. M.I.; Evans, P. G.; Gemmill, N.; Osborne, S. D. *J. Pharm. Pharmacol.* 2004, 56, 691. c) Ernst, B.; Magnani, J. L. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009, 8, 661. d) Klysov, A. A. *Glycobiology and Drug Design*. ACS. Washington DC. 2012. e) Fernández-Tejada, A.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *Chem. Eur. J.* 2015, 21, 10616. f) Zhang, Y.; Wang, F. *Drug Discov. Ther.* 2015, 9, 79. g) Jimenez-Barbero, J.; Cañada, F. J.; Martin-Santamaria, S. *Carbohydrates in Drug Design and Discovery*. RSC. London, UK. 2015. h) Chackalamannil, S.; Rotella, D.; Ward, S. E. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. Elsevier Ltd. New York, USA. 2017.

⁷ a) Mody, R.; Joshi, S.; Chaney, W. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 1995, 33, 1. b) Haltiwanger, R. S.; Lowe, J. B. *Ann. Rev. Biochem.* 2004, 73, 491. c) Zachara, N. E.; Hart, G. W. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1761, 599. d) Seeberger, P. H.; Werz, D. B. *Nature* 2007, 446, 1046. e) Zhao, Y. Y.; Takahashi, M.; Gu, J. G.; Miyoshi, E.; Matsumoto, A.; Kitazume, S.; Taniguchi, N. *Cancer Sci.* 2008, 99, 1304. f) Slipo, A.; Erbs, G.; Shinya, T.; Dow, J. M.; Parrilli, M.; Lanzetta, R.; Shibuya, N.; Newman, M. A.; Molinaro, A. *Glycobiology* 2010, 20, 406. g) Pinho, S. S.; Reis, C. A. *Nat. Rev. Cancer* 2015, 15, 540. h) Sun, L.; Middleton, D. R.; Wantuch, P. L.; Ozdilek, A.; Avci, F. Y. *Glycobiology* 2016, 26, 1029. i) Raman, R.; Tharakaraman, K.; Sasisekharan, V.; Sasisekharan, R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2016, 40, 153. j) Pereira, M. S.; Alves, I.; Vicente, M.; Campar, A.; Silva, M. C.; Padrão, N. A.; Pinto, V.; Fernandes, Á; Dias, A. M.; Pinho, S. S. *Front. Immunol.* 2018, 9, 2754.

⁸ van Kooyk, Y.; Rabinovich, G. A. *Nat. Immunol.* 2008, 9, 593.

⁹ a) Osada, T.; Clay, T. M.; Woo, C. Y.; Morse, M. A.; Lysterly H. K. *Int. Rev. Immunol.* 2006, 25, 377. b) Patente, T. A.; Pinho, M. P.; Oliveira, A. A.; Evangelista, G. C. M.; Bergami-Santos, P. C.; Barbuto, J. A. M. *Front. Immunol.* 2019, 9, 3176.



Capítulo 1

tipo C (CLR, del inglés *C-type lectin receptors*), receptores de tipo Toll (TLR, del inglés *Toll-like receptors*), receptores de tipo NOD (NLR, del inglés *nucleotide-binding oligomerization domains-like-receptors*), y receptores de tipo RIG-1 (RLR, del inglés *retinoic acid-inducible gene-1-like receptors*).¹⁰ Estos receptores se localizan de forma estratégica por toda la célula: en las membranas celulares, donde median el reconocimiento de patógenos extracelulares (bacterias u hongos), en los endosomas, donde detectan invasores intracelulares como virus, y en el citoplasma. (Figura 1.2) Todos ellos, son capaces de reconocer estructuras moleculares conservadas y distinguir entre los diferentes tipos de patógenos o los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*).¹¹ Dentro de los PAMPs, se incluyen carbohidratos bacterianos, como los lipopolisacáridos; ácidos nucleicos, como ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico) bacteriano o viral; peptidoglicanos o ácido lipoteicoico que proceden de bacterias Gram-positivas; formilmetionina y lipoproteínas presentes en la superficie de bacterias Gram-negativas. Además, las DCs son consideradas como las células inmunes de conexión entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adquirido, modulando la respuesta inmune.¹² Las DCs, también conocidas como células presentadoras de antígenos, (APC, del inglés *antigen-presenting cells*), se ocupan de detectar patógenos, capturar, procesar y presentar antígenos en forma de complejos MHC (del inglés *Major Histocompatibility Complex*) a las células T. De esta manera, provocan la activación y la diferenciación de las células T y la liberación de citocinas y quimiocinas.¹³

¹⁰ a) Medzhitov, R.; Janeway, C. Jr. *New Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 338. b) Medzhitov, R.; Janeway, C. Jr. *Immunol Rev.* **2000**, *173*, 89. c) Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. *Cell* **2006**, *124*, 783. d) Takeuchi, O.; Akira, S. *Cell* **2010**, *140*, 805.

¹¹ a) Janeway, C. A. Jr.; Medzhitov R. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 197. b) Iwasaki, A.; Medzhitov, R. *Science* **2010**, *327*, 291.

¹² van Vliet, S.J.; Garcia-Vallejo, J.J.; van Kooyk, Y. *Immunol. Cell Biol.* **2008**, *86*, 580.

¹³ Banchereau, J.; Steinman, R. M. *Nature* **1998**, *392*, 245.



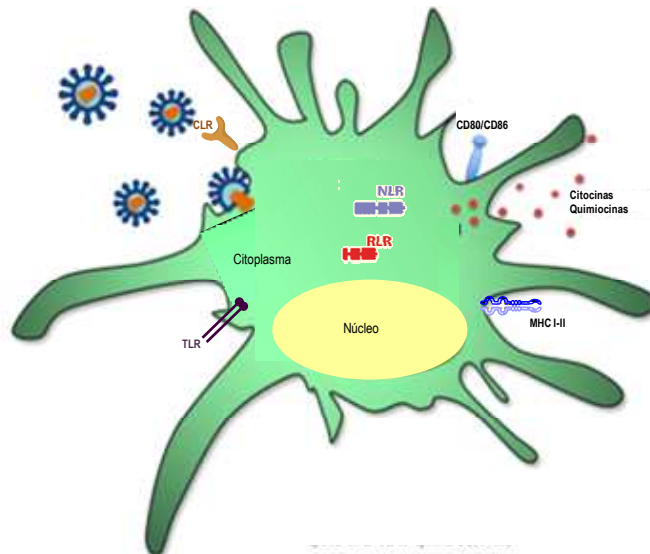


Figura 1.2 Reconocimiento de los patógenos por parte de los receptores de las DCs.

1.2 Multivalencia

Los procesos infecciosos causados por bacterias, virus y parásitos involucran, en los primeros estadios del proceso, el reconocimiento de los carbohidratos presentes en la superficie del patógeno.¹⁴ La habilidad de controlar estos eventos con pequeños carbohidratos sería muy deseable; sin embargo, una única unidad de ligando sacarídico interactúa de manera selectiva pero débil con los receptores, mostrando una constante de asociación del orden de 10^3 M^{-1} . Para lograr un control efectivo de las interacciones se requiere una afinidad significativamente mayor. En la naturaleza, la baja afinidad en las interacciones carbohidrato-proteína se compensa mediante la multivalencia. En este sentido, múltiples copias de carbohidratos en una superficie, es decir, sistemas o plataformas multivalentes, interactúan fuertemente con los receptores celulares, también multivalentes. Este fenómeno fue denominado como *cluster glycoside effect* en 1995 por Lee y col. e implica la unión simultánea de dos o más ligandos idénticos que descansan sobre un mismo soporte a un receptor múltiple, que a su vez se encuentra sobre una

¹⁴ Sharon, N.; Ofek, I. *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 659.



Capítulo 1

misma entidad.¹⁵ De esta manera, se consigue que la interacción sea varios órdenes de magnitud mayor que la correspondiente a la interacción monovalente. Los sistemas multivalentes son capaces de interactuar con más de un sitio de reconocimiento de una entidad biológica simultáneamente y actuar así como potentes inhibidores de la interacción.¹⁶ Es de destacar que no sólo se aumenta de manera significativa la afinidad, sino que aumenta también la especificidad de la interacción y, por lo tanto, del proceso de reconocimiento molecular.

Los ligandos monovalentes presentan un número limitado de mecanismos de interacción. Sin embargo, existen varias estrategias que permiten potenciar las interacciones multivalentes. El aumento de afinidad en procesos multivalentes, en comparación con los monovalentes, depende de un gran número de factores entre los que cabe destacar: la afinidad del ligando monomérico por el receptor, el número y la correcta disposición espacial de los ligandos y la flexibilidad de la estructura. Además, dicho incremento en la afinidad se puede atribuir a una acción cooperativa, que resulta en un mayor efecto respecto al que correspondería si se atendiese únicamente a la valencia del sistema (efecto aditivo).¹⁷ A su vez, la efectividad puede depender de la capacidad que posee el sistema multivalente para ocupar múltiples sitios de reconocimiento de forma simultánea.

Los mecanismos de interacción de un sistema multivalente guardan relación con su arquitectura debido a que su complejidad estructural es elevada.¹⁸ Por ello, si se altera alguna característica sencilla del sistema multivalente, se puede modificar la preferencia por un determinado mecanismo de interacción y, por tanto, se puede ver afectada su actividad. Principalmente, los mecanismos de interacción de un sistema multivalente son el efecto quelato, las interacciones de tipo secundario, la re-asociación estadística, la agregación y la estabilización estérica.¹⁹ (Figura 1.3)

¹⁵ a) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321. b) Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755. c) Dimick, S. M.; Powell, S. C.; McMahon, S. A.; Moothoo, D. N.; Naismith, J. H.; Toone, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10286. d) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555. e) Pieters, R. J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2013. f) Jayaraman, N. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3463.

¹⁶ a) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696. b) Bhatia, S.; Cuellar Camacho, L.; Haag, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 8654.

¹⁷ Badjic, J. D.; Nelson, A.; Cantrill, S. J.; Turnbull, W. C.; Stoddart, J. F. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 723.

¹⁸ a) Kiessling, L. L.; Strong, L. E.; Gestwicki, J. E. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2000**, *35*, 321. b) Tjandra, K. C.; Thordarson, P. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 503.

¹⁹ a) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922. b) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348.



Una disminución en las barreras entrópicas favorece la interacción entre los ligandos y el receptor, lo que provoca una mayor afinidad y un aumento de su potencia inhibitoria.²⁰ Cuando un ligando de un sistema multivalente se une a un centro activo del receptor, la unión de un segundo ligando al mismo receptor se ve favorecida. El reconocimiento del primer ligando supone el mayor coste energético; sin embargo, el resto de los ligandos se unen con bajos costes entrópicos al receptor, siendo el coste total entrópico bajo, lo que hace que la interacción esté favorecida. El mecanismo que provoca que dos o más ligandos de un sistema multivalente interactúen con varios sitios activos del receptor se conoce como efecto quelato.²¹ (Figura 1.3a) También se pueden producir interacciones de tipo secundario con otro sitio de unión, diferente al sitio primario de la interacción. Con este evento de interacción adicional, los sistemas multivalentes pueden llegar a ser más efectivos.²² (Figura 1.3b)

Así mismo, la velocidad de disociación de un ligando presente en una estructura multivalente es mucho menor que la de un ligando monovalente libre. Este hecho se debe a la proximidad entre los ligandos en el sistema multivalente, que permite que uno de los ligandos ocupe un lugar de unión inmediatamente después de que otro lo abandone, lo que se traduce en un incremento neto en la afinidad. Este mecanismo se denomina re-asociación estadística (del inglés *statistical rebinding*).^{15e} (Figura 1.3c) En lugar de la asociación intramolecular, algunas veces se produce la interacción intermolecular o agregación.²³ (Figura 1.3d) Este efecto depende de factores como la concentración, la valencia, la afinidad, los diferentes tipos de interacción, etc. Por otro lado, el tamaño del sistema multivalente puede impedir estéricamente las interacciones del receptor con otros sistemas, dando lugar a una estabilización estérica.²⁴ (Figura 1.3e)

Sin duda, estos modos de interacción dan una información única sobre la interacción entre los carbohidratos y sus receptores.

²⁰ Jencks, W. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 4046.

²¹ Pieters, R. J. *Drug Discov. Today Technol.* **2009**, 6, e27.

²² a) Howorka, S.; Nam, J.; Bayley, H.; Kahne, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 842. b) Banerjee, A. L.; Eiler, D.; Roy, B. C.; Jia, X.; Haldar, M. K.; Mallik, S.; Srivastava, D. K. *Biochemistry* **2005**, 44, 3211.

²³ Brewer, C. F.; Miceli, M. C.; Baum, L. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 616.

²⁴ Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G. M. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4179.



Capítulo 1

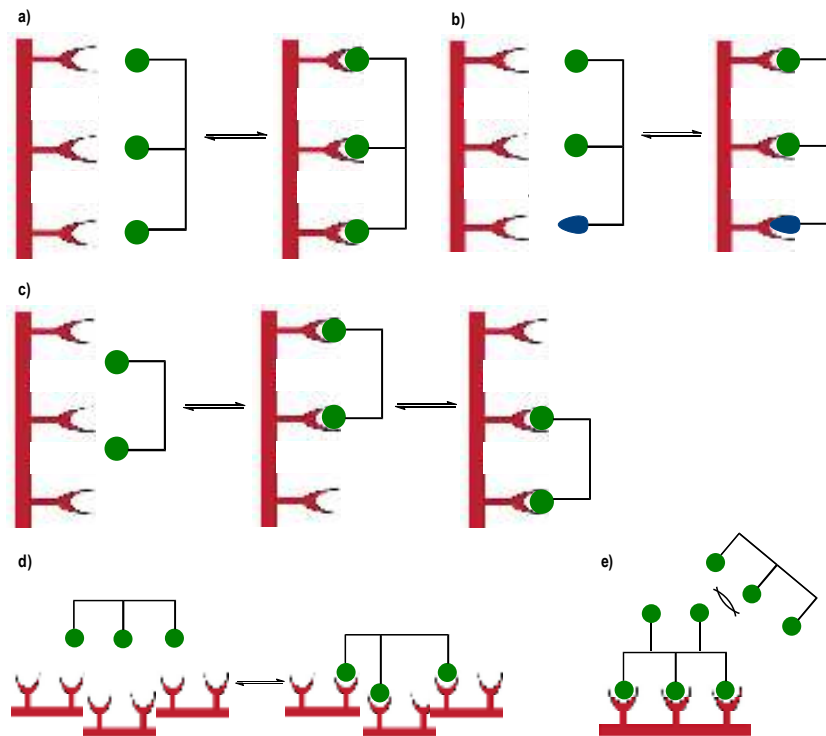


Figura 1.3 Mecanismos de interacción multivalente: a) efecto quelato, b) unión secundaria, c) re-asociación estadística, d) agregación (entrecruzamiento) y e) efecto estérico.

Entender las interacciones multivalentes es un aspecto crítico a la hora de modular muchos procesos biológicos. La complejidad estructural de los carbohidratos presentes en la superficie celular les permite almacenar una gran cantidad de información molecular. Dicha información es procesada a través del reconocimiento molecular con CLR, fundamentalmente.²⁵ Este tipo

²⁵ a) Sharon, N.; Lis, H. *Sci. Am.* **1993**, 268, 82. b) Ofek, I.; Hasty, D. L.; Doyle, R. J. *Bacterial Adhesion to Animal Cells and Tissues*. ASM Press, Washington, **2003**. c) Sharon, N.; Lis, H. *Glycobiology* **2004**, 14, 53. d) Zelensky, A. N.; Gready, J. E. *FEBS J.* **2005**, 272, 6179. e) Dam, T. K.; Fred Brewer, C. *Glycobiology* **2009**, 20, 270. f) Dambuzza, I.M.; Brown, G.D. *Curr. Opin. Immunol.* **2015**, 32, 21. g) Roy, R.; Murphy, P. V.; Gabius, H.-J. *Molecules* **2016**, 21, 629. h) Monteiro, J. T.; Lepenies, B. *Viruses* **2017**, 9, 59. i) Bermejo-Jambrina, M.; Eder, J.; Helgers, L. C.; Hertoghs, N.; Nijmeijer, B. M.; Stunnenberg, M.; Geijtenbeek, T. B. H. *Front. Immunol.* **2018**, 9, 590.



de receptores son capaces de reconocer carbohidratos de manera dependiente de Ca^{2+} . Estudios estructurales han demostrado que únicamente una pequeña proporción de los aminoácidos de las lectinas están implicados en el reconocimiento de los carbohidratos, en concreto aquellos que se encuentran dentro de lo que se denomina dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD, del inglés *Carbohydrate Recognition Domain*).²⁶ Los CRDs presentan dos bucles estabilizados por dos enlaces disulfuro altamente conservados y hasta 4 sitios activos, dependiendo de la lectina.^{25d}

Los residuos de aminoácidos del CRD que presentan en sus cadenas laterales grupos carboxilo terminales se coordinan habitualmente con iones Ca^{2+} . Los CRDs reconocen los grupos hidroxilo de los carbohidratos con una determinada configuración, por lo que pequeñas variaciones en los aminoácidos dentro de los CRDs pueden alterar la especificidad por los carbohidratos. El CRD reconoce fundamentalmente los residuos terminales de los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas de los patógenos. Los CRDs presentan diferente afinidad para cada uno de los isómeros anoméricos. Además, la pérdida de Ca^{2+} puede provocar la desestabilización de los bucles y la pérdida de la afinidad por los ligandos, incluso cuando los iones Ca^{2+} no están implicados directamente en la complejación de los carbohidratos. Esta desestabilización puede tener lugar también cuando se producen cambios en el pH.²⁷ A parte de las propiedades del medio donde tiene lugar la interacción entre el receptor y el carbohidrato; el grado de oligomerización del receptor puede ser un factor determinante en la velocidad de interacción, la afinidad y la preferencia de la lectina por un tipo de ligando específico. Las propiedades de solvatación de los CRDs, la reorganización o el desplazamiento de la esfera de solvatación y la aparición de interacciones entre el ligando o la proteína con el agua, pueden afectar a aspectos termodinámicos del reconocimiento y a la estabilidad de las interacciones carbohidrato-proteína.²⁸ Cuando la concentración de lectina es alta, la agregación es mayor. Además, la densidad de ligando en la superficie celular puede provocar la oligomerización de las subunidades de las lectinas.²⁹

²⁶ Weis, W. I.; Kahn, R.; Fourme, R.; Drickamer, K.; Hendrickson, W. A. *Science* **1991**, 254, 1608.

²⁷ a) Loeb, J. A.; Drickamer, K. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 9752. b) Wragg, S.; Drickamer, K. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 35400.

²⁸ Gauto, D. F.; Petruk, A. A.; Modenutti, C. P.; Blanco, J. I.; Di Lella, S.; Martí, M. A. *Glycobiology* **2013**, 23, 241.

²⁹ Dam, T. K.; Gerken, T. A.; Brewer, C. F. *Biochemistry* **2009**, 48, 3822.



Capítulo 1

Los CLRs están agrupados dentro de una superfamilia dividida en 17 grupos (I-XVII) en función de su filogenia, estructura y propiedades funcionales.³⁰ El receptor de manosa (MR, del inglés *mannose receptor*) o el receptor Endo180 (CD280) pertenecen al grupo VI de CLRs, son receptores transmembrana de tipo I que poseen entre 8 y 10 dominios lectina de tipo C (CTLDs, del inglés *C-type Lectin Domains*) capaces de reconocer manosas.³¹ (Figura 1.4) Dentro del grupo II se encuentran los receptores transmembrana de tipo II, tales como DC-SIGN (del inglés *dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*).³² Este receptor presenta una pequeña región citoplasmática, un segmento transmembrana y un dominio extracelular (ECD, del inglés *extracellular domain*) constituido por dos regiones diferentes desde el punto de vista estructural y funcional. Por un lado, un cuello flexible que facilita la oligomerización del receptor y un CRD dependiente de Ca^{2+} encargado de los procesos de reconocimiento de carbohidratos.

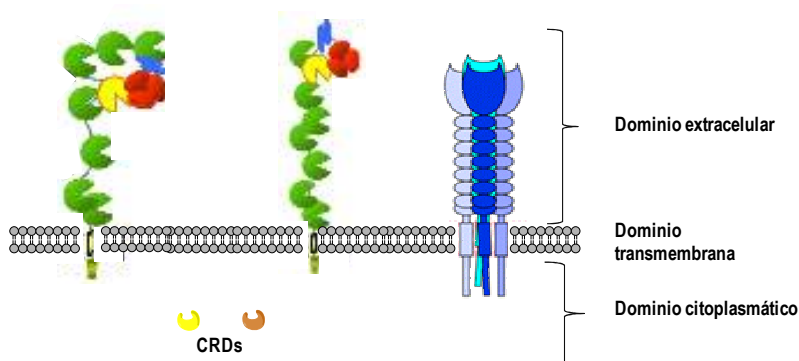


Figura 1.4 Estructura de los receptores MR, Endo180 y DC-SIGN, de izquierda a derecha.

³⁰ a) Sancho, D.; Reis e Sousa, C. *Annu. Rev. Immunol.* **2012**, *30*, 491. b) Mayer, S.; Raulf, M.-K.; Lepenies, B. *Histochem. Cell Biol.* **2017**, *147*, 223.

³¹ Boskovic, J.; Arnold, J. N.; Stilion, R.; Gordon, S.; Sim, R. B.; Rivera-Calzada, A.; Wienke, D.; Isacke, C. M.; Martínez-Pomares, L.; Llorca, O. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8780.

³² a) van Kooyk, Y.; Geijtenbeek, T. B. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 697. b) Den Dunnen, J.; Gringhuis, S. I.; Geijtenbeek, T. B. *Cancer Immunol. Immunother.* **2009**, *58*, 1149. c) da Silva, R. C.; Segat, L.; Crovella, S. *Hum. Immunol.* **2011**, *72*, 305.



DC-SIGN se encuentra altamente expresada en DCs inmaduras y juega un papel relevante en la interacción con patógenos y en su internalización. Esta lectina contribuye a la maduración de las DCs y su posterior migración a los órganos linfoides donde tiene lugar la presentación de los antígenos a las células T.³³ Este receptor reconoce virus, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1),³⁴ del Ébola (EBOV),³⁵ del Dengue (DENV, del inglés *Dengue Virus*),³⁶ de la Hepatitis C (HCV),³⁷ etc. El nivel de expresión de DC-SIGN determina la captura del virus. Así, cuando DC-SIGN está sobreexpresada en las células provoca una mayor interacción con el VIH-1 que cuando la expresión de esta proteína es menor.³⁸ DC-SIGN es capaz de reconocer estructuras oligosacáridicas que contienen fucosa o manosa. En concreto, DC-SIGN reconoce oligosacáridos de tipo *high-mannose* unidos a asparagina (Asn), presentes en la glicoproteína gp120 de la superficie del VIH-1. Esta proteína es una de las más glicosidadas ya que en su estructura existen más de 20 *N*-glicanos.³⁹ *High mannose* es un undecasacárido ramificado, Man₉GlcNAc₂, considerado como uno de los ligandos que interacciona de forma más fuerte con esta lectina. (Figura 1.5)

³³ a) Geijtenbeek, T. B.; Torensma, R.; van Vliet, S. J.; van Duijnhoven, G. C. F.; Adema, G. J.; van Kooyk, Y.; Figdor, C. G. *Cell* **2000**, *100*, 575. b) Mitchell, D. A.; Fadden, A. J.; Drickamer, K. A. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 28939.

³⁴ Geijtenbeek, T. B.; Kwon, D. S.; Torensma, R.; van Vliet, S. J.; van Duijnhoven, G. C.; Middel, J.; Cornelissen, I. L.; Nottet, H. S.; KewalRamani, V. N.; Littman, D. R.; Figdor, C. G.; van Kooyk, Y. *Cell* **2000**, *100*, 587.

³⁵ Alvarez, C. P.; Lasala, F.; Carrillo, J.; Muñoz, O.; Corbí, A. L.; Delgado, R. *J. Virol.* **2002**, *76*, 6841.

³⁶ Navarro-Sanchez, E.; Altmeyer, R.; Amara, A.; Schwartz, O.; Fieschi, F.; Virelizier, J. L.; Arenzana-Seisdedos, F.; Desprès, P. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 723.

³⁷ a) Lozach, P. Y.; Lortat-Jacob, H.; de Lacroix de Lavalette, A.; Staropoli, I.; Foug, S.; Amara, A.; Houles, C.; Fieschi, F.; Schwartz, O.; Virelizier, J. L.; Arenzana-Seisdedos, F.; Altmeyer, R. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20358. b) Pöhlmann, S.; Zhang, J.; Baribaud, F.; Chen, Z.; Leslie, G. J.; Lin, G.; Granelli-Piperno, A.; Doms, R. W.; Rice, C. M.; McKeating, J. A. *J. Virol.* **2003**, *77*, 4070.

³⁸ Baribaud, F.; Pöhlmann, S.; Leslie, G.; Mortari, F.; Doms, R.W. *J. Virol.* **2002**, *76*, 9135.

³⁹ Geyer, H.; Holschbach, C.; Hunsmann, G.; Schneider, J. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11760.



Capítulo 1

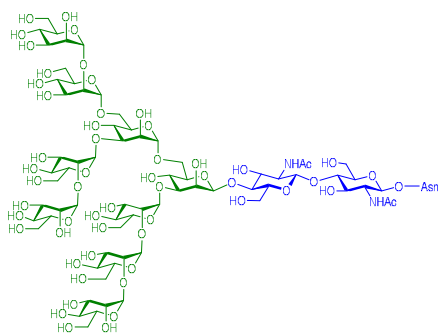


Figura 1.5 Estructura del Man₉GlcNAc₂.

Con el objetivo de mimetizar la estructura *high-mannose*, se han desarrollado diversas plataformas multivalentes de carbohidratos capaces de interactuar y bloquear los receptores presentes en la superficie de las DCs. El diseño racional de glicosistemas multivalentes con estructuras bien definidas permite aumentar la afinidad de los ligandos por la proteína. Para lograr una alta afinidad es imprescindible tener en cuenta algunos aspectos como la densidad de ligandos, la proximidad espacial entre los mismos, las características moleculares y la rigidez del soporte, la inmunogenicidad, etc.

En este sentido, muchos grupos de investigación han desarrollado plataformas multivalentes de diferentes tipos de ligandos atendiendo al patrón existente en la naturaleza, es decir, desarrollando estructuras de valencia elevada para aumentar la afinidad por los correspondientes receptores. Muchos de los sistemas diseñados han mostrado una mejora sustancial en la afinidad en comparación con el ligando monovalente.^{40, 16b, 25g} Entre las plataformas multivalentes

⁴⁰ a) Wang, B.; Boons, G.-J. *Carbohydrate Recognition* John Wiley & Sons, Inc., **2011**. b) Narain, R. *Engineered Carbohydrate-Based Materials for Biomedical Applications: Polymers, Surfaces, Dendrimers, Nanoparticles, and Hydrogels* John Wiley & Sons, Inc., **2011**. c) Fernández-Bolaños, J. G.; Maya, I.; Oliete, A. *Carbohydr. Chem.* **2012**, *38*, 303. d) Reichardt, N. C.; Martín-Lomas, M.; Penadés, S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4358. e) Bernardi, A.; Jiménez-Barbero, J.; Casnati, A.; De Castro, C.; Darbre, T.; Fieschi, F.; Finne, J.; Funken, H.; Jaeger, K. H.; Lahmann, M.; Lindhorst, T. K.; Marradi, M.; Messner, P.; Molinaro, A.; Murphy, P. V.; Nativi, C.; Oscarson, S.; Penadés, S.; Peri, F.; Pieters, R. J.; Renaudet, O.; Reymond, J.-L.; Richichi, B.; Rojo, J.; Sansone, F.; Schäffer, C.; Turnbull, W. B.; Velasco-Torrijos, T.; Vidal, S.; Vincent, S.; Wennekes, T.; Zuilhofxyand, H.; Imberty, A. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4709. f) Jayaraman, N.; Maiti, K.; Naresh, K. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4640. g) Chabre, Y. M.; Roy, R. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4657. h) Renaudet, O.; Roy, R. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4515. i) Marradi, M.; Chiodo, F.; Garcia, I.; Penades, S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4728. j) Jimenez Blanco, J. L.; Ortiz Mellet, C.; Garcia Fernandez, J. M. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4518. k) Wittmann, V. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 982. l) Lepenies, B.; Lee, J.; Sonkaria, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1271. m) Kang, B.; Opatz, T.; Landfester, K.



funcionalizadas con carbohidratos, cabe señalar por sus propiedades, las siguientes estructuras: dendrímeros,⁴¹ nanopartículas,⁴² fullerenos,⁴³ y otras nanoformas de carbono,⁴⁴ ciclodextrinas,⁴⁵ liposomas,⁴⁶ polímeros,⁴⁷ nanogeles,⁴⁸ péptidos,⁴⁹ proteínas.⁵⁰ (Figura 1.6)

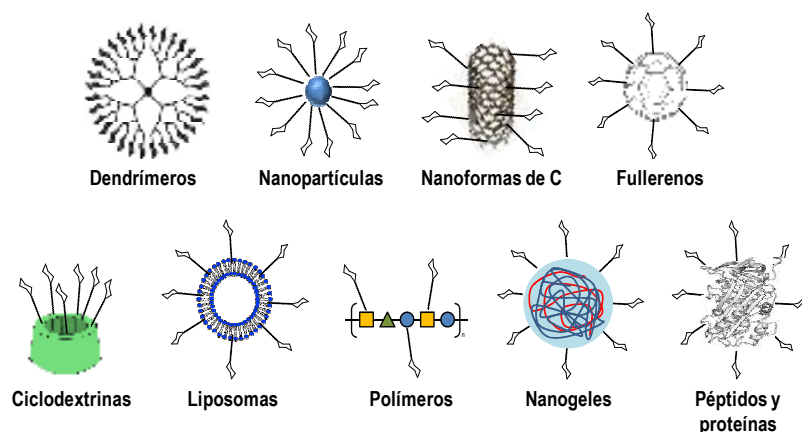


Figura 1.6 Representación de algunas plataformas multivalentes funcionalizadas con carbohidratos.

Wurm, F. R. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8301. n) Restuccia, A.; Fettisa, M. M.; Hudalla, G. A. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 1569. o) Poupot, R.; Goursat, C.; Séverine, F. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 5511. p) Zhang, X.; Huang, G.; Huang, H. *Drug Deliv.* **2018**, *25*, 1840.

⁴¹ Varga, N.; Sutkeviciute, I.; Ribeiro-Viana, R.; Berzi, A.; Ramdasi, R.; Daggetti, A.; Vettoretti, G.; Amara, A.; Clerici, M.; Rojo, J.; Fieschi, F.; Bernardi, A. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4175.

⁴² Arñáiz, B.; Martínez-Ávila, O.; Falcon-Perez, J. M.; Penadés, S. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 814.

⁴³ Muñoz, A.; Sigwalt, D.; Illescas, B. M.; Luczkowiak, J.; Rodríguez-Pérez, L.; Nierengarten, I.; Holler, M.; Remy, J. S.; Buffet, K.; Vincent, S. P.; Rojo, J.; Delgado, R.; Nierengarten, J. F.; Martín, N. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 50.

⁴⁴ Illescas, B. M.; Rojo, J.; Delgado, R.; Martín, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6018.

⁴⁵ Zhang, Q.; Su, L.; Collins, J.; Chen, G.; Wallis, R.; Mitchell, D. A.; Haddleton, D. M.; Becer, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4325.

⁴⁶ Goyard, D.; Shiao, T. C.; Fraleigh, N. L.; Vu, H.-Y.; Lee, H.; Diaz-Mitoma, F.; Le, H.-T.; Roy, R. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 4227.

⁴⁷ Yilmaz, G.; Uzunova, V.; Napier, R.; Becer, C. R. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 3040.

⁴⁸ De Coen, R.; Vanparijs, N.; Risseeuw, M. D. P.; Lybaert, L.; Louage, B.; De Koker, S.; Kumar, V.; Grooten, J.; Taylor, L.; Ayres, N.; Van Calenbergh, S.; Nuhn, L.; De Geest, B. G. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 2479.

⁴⁹ Ng, S.; Bennett, N. J.; Schulze, J.; Gao, N.; Rademacher, C.; Derda, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 5368.

⁵⁰ Adams, E. W.; Ratner, D. M.; Seeberger, P. H.; Hachohen, N. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 294.



Capítulo 1

1.2.1 Dendrimeros

En 1978, Vögtle y col.⁵¹ describieron la preparación de un nuevo tipo de moléculas, también conocidas como “moléculas cascada” basadas en polipropileniminas (PPI). Estas moléculas ramificadas pueden ser consideradas como el primer ejemplo de estructura dendrítica sintética y el punto de partida en la química de los dendrímeros. Sin embargo, hasta 1985 no se produjo su mayor desarrollo con la aparición del trabajo de Tomalia y col. que recoge la síntesis de dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), los cuales han llegado a ser comercializados.⁵² (Figura 1.7)

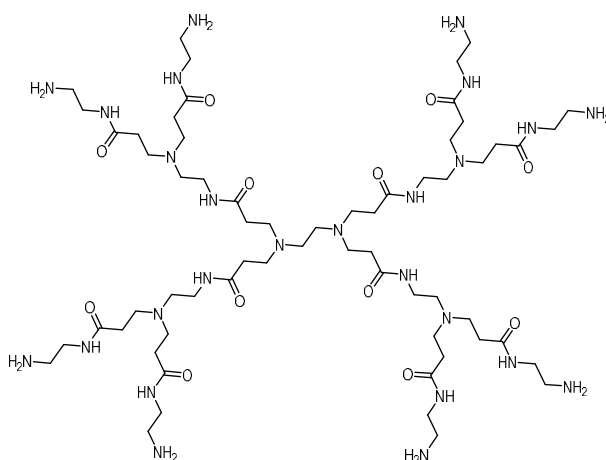


Figura 1.7 Estructura de dendrímero PAMAM.

Los dendrímeros se definen como macromoléculas monodispersas que presentan una arquitectura tridimensional altamente ramificada alrededor de un núcleo interno. Los dendrímeros son moléculas multivalentes con un tamaño nanométrico, alrededor de 1-10 nm, y que pueden presentar, dependiendo de su tamaño, una estructura globular. Se caracterizan por su baja polidispersidad y su estructura bien definida.

⁵¹ Vögtle, F.; Buhleier, E.; Wehner, W. *Synthesis* **1978**, 2, 155.

⁵² Tomalia, D.A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym. J.* **1985**, 17, 117.



Las partes que conforman la estructura de los dendrímeros, recogidas en la Figura 1.8, son:

- El núcleo de crecimiento, a partir del cual comienzan a aparecer las ramificaciones.
- La capa interior, compuesta por diferentes ramificaciones o bloques de construcción. Cada etapa de crecimiento del dendrímero se conoce como generación (G_n), siendo n el número de generación.
- El armazón externo en la periferia, que comprende un gran número de grupos funcionales fácilmente modificables. El número de estos grupos está determinado por el grado de ramificación del núcleo y por la generación del dendrímero.

Cada uno de los brazos de un dendrímero se conoce como dendrón. Los dendrones se caracterizan por poseer en el núcleo de crecimiento un grupo funcional, denominado posición focal.⁵³

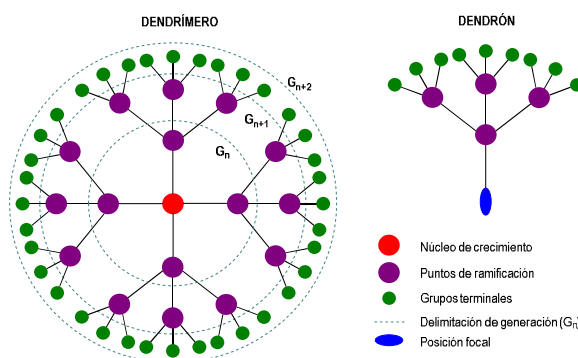


Figura 1.8. Representación esquemática de un dendrímero y un dendrón.

La preparación de dendrímeros de tamaño y estructura bien definidos con un bajo índice de polidispersidad se puede llevar a cabo mediante una síntesis por etapas. Los dendrímeros se pueden sintetizar mediante dos estrategias diferentes, bien mediante una síntesis divergente, o

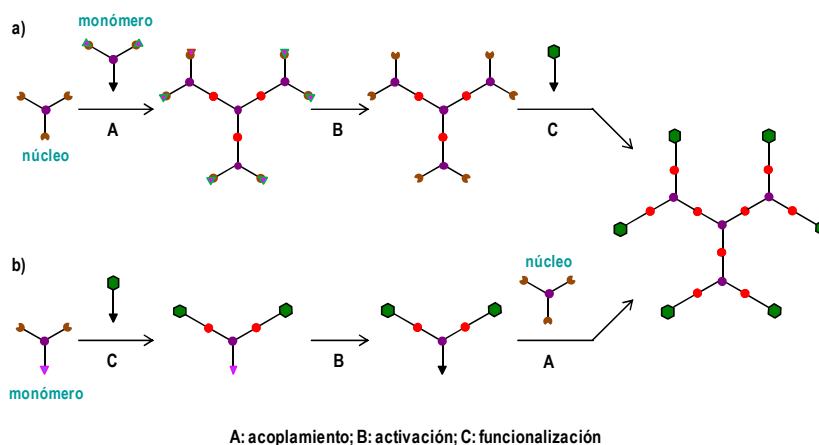
⁵³ a) Fréchet, J. M. J.; Tomalia, D. A. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*. Wiley, **2001**. b) Newkome, G. R.; Moorefield, C. N.; Vögtle, F. *Dendrimers and dendrons: Concepts, Syntheses, Applications*. Wiley-VCH, **2001**. c) Marcos, M.; Serrano, J. L. *An. Quím.* **2009**, *105*, 111.



Capítulo 1

bien mediante una síntesis convergente. Ambas consisten en la repetición secuencial de reacciones para dar lugar a cada una de las generaciones.⁵⁴

En la síntesis divergente, el crecimiento del dendrímero tiene lugar desde el núcleo hacia la periferia, mediante etapas sucesivas de acoplamiento y activación. (Esquema 1.1a) La primera etapa suele conllevar la activación o la desprotección del núcleo. Estas etapas suelen ser intercambios de grupos funcionales, acoplamientos con moléculas ya funcionalizadas o eliminaciones de los grupos protectores. La segunda etapa conlleva el acoplamiento con el monómero ramificado, dando lugar a un dendrímero de primera generación G_1 . Si se repiten de nuevo la etapa de activación y de acoplamiento, se obtendría el correspondiente dendrímero de G_2 . Este proceso se puede llevar a cabo muchas más veces, aumentando sucesivamente el número de generaciones y, por tanto, el número de enlaces formados y el número de grupos funcionales que se originan en cada generación.



Esquema 1.1 Síntesis de dendrímeros: a) divergente y b) convergente.

Esta estrategia permite obtener dendrímeros de generaciones elevadas. Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes, ya que a medida que aumenta la generación, el número de

⁵⁴ a) Rosen, B. M.; Wilson, C. J.; Wilson, D. A.; Peterca, M.; Imam, M. R.; Percec, V. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6275.
 b) Walter, M. V.; Malkoch, M. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4593.



reacciones que se tienen que dar simultáneamente en cada etapa aumenta significativamente. Esto conlleva la posible aparición de defectos estructurales en el dendrímero, presentando éste una estructura incompleta de modo que se obtiene un dendrímero que no es completamente monodisperso.⁵⁵

Al contrario que en la anterior estrategia, en la síntesis convergente se avanza desde lo que será la superficie funcionalizada del dendrímero hacia el punto focal interior reactivo, formándose en primer lugar cada uno de los brazos o dendrones. (Esquema 1.1b) Para ello, se hace reaccionar un grupo periférico con un monómero ramificado para obtener el primer dendrón. Éste deberá ser activado o desprotegido en su posición focal para que se pueda volver a dar la reacción de acoplamiento con el monómero ramificado y así sucesivamente hasta alcanzar la generación deseada G_n . El último paso consiste en la activación del punto focal del dendrón de G_n , a partir del cual se llevará a cabo la unión al núcleo de crecimiento, obteniéndose el dendrímero de G_n .⁵⁶

En la aproximación convergente disminuye la posibilidad de que se produzcan reacciones incompletas, ya que requiere la formación de un número menor de enlaces en cada etapa del proceso de crecimiento, en comparación con la síntesis divergente. Además, esta síntesis permite usar cantidades equimolares o un ligero exceso del monómero de crecimiento, simplificándose la purificación en cada etapa sintética. Sin embargo, la estrategia convergente no permite la construcción de dendrímeros de generaciones elevadas debido a los impedimentos estéricos que dificultan el acoplamiento final entre los dendrones y el núcleo de crecimiento.

En la estrategia divergente, la introducción de los grupos funcionales en la periferia de los dendrímeros se lleva a cabo tras la preparación del sistema. Las modificaciones de dendrímeros posteriores a su construcción permiten la incorporación de moléculas que puedan ser incompatibles con las condiciones de construcción del dendrímero o degradarse durante la misma. Sin embargo, se debe emplear un gran exceso del ligando, es necesario optimizar la conjugación para evitar la polidispersidad y la dificultad de la etapa de purificación es mayor, especialmente cuando se trata de generaciones grandes. Aun así, en la bibliografía existen un gran número de ejemplos de modificaciones periféricas de dendrímeros usando la estrategia

⁵⁵ a) Newkome, G. R.; Weis, C. D.; Moorefield, C. N.; Weis, I. *Macromolecules* **1997**, *30*, 2300. b) Bu, L.; Nonidez, W. K.; Mays, J. W.; Tan, N. B. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4445. c) Schluter, A. D.; Hawker, C. J.; Sakamoto, J. *Synthesis of polymers: new structures and methods*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2012**.

⁵⁶ a) Matthews, O. A.; Shipway, A. N.; Stoddart, J. F. *Prog. Polym. Sci.* **1998**, *23*, 1. b) Grayson, S. M.; Fréchet, J. M. J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819.



Capítulo 1

divergente.⁵⁷ Por el contrario, en la aproximación convergente, los grupos o moléculas seleccionados se acoplan en el extremo del monómero inicial antes del crecimiento del dendrón. El número de enlaces covalentes involucrados son pocos, lo que conduce a una fácil y completa funcionalización de la molécula. Sin embargo, los grupos de interés unidos al dendrón deben presentar una estabilidad y solubilidad adecuada, que permitan el crecimiento de la estructura a través de los pasos repetitivos de activación y acoplamiento sin sufrir degradación o reacciones secundarias. Si no fueran inertes en las condiciones de reacción de dichas etapas de crecimiento, sería necesaria su protección lo que conllevaría una etapa adicional de desprotección al final de la síntesis del dendrímero.⁵⁸

Los dendrones y los dendrímeros son excelentes soportes para la presentación multivalente de moléculas de interés. En el caso de los dendrones, al presentar grupos reactivos en la posición focal, pueden ser conjugados a diferentes moléculas o soportes. Este hecho les confiere un carácter bifuncional interesante desde el punto de vista del diseño y desarrollo de nuevos sistemas multivalentes. Los dendrímeros gracias a su estructura bien definida, a sus grupos fácilmente modificables en la superficie y a las cavidades que presentan en su interior, son idóneos para ser utilizados no sólo en el campo de la química sino también en campos como la biología, la medicina y la ciencia de los materiales, entre otros.⁵⁹ Desde el punto de vista biomédico, estas arquitecturas moleculares pueden diseñarse de tal modo que presenten una baja toxicidad y una baja respuesta inmunogénica, propiedades interesantes para su aplicación en este campo.⁶⁰ Teniendo en cuenta el gran número de cavidades internas que presentan los dendrímeros, éstos pueden ser unos buenos candidatos para el transporte de fármacos u otras moléculas de interés, así como soportes para la síntesis de nanopartículas metálicas, etc.⁶¹

⁵⁷ Leon, J. W.; Kawa, M.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8847.

⁵⁸ a) Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules* **1990**, *23*, 4726. b) Piotti, M. E.; Rivera, F.; Bond, R.; Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9471.

⁵⁹ a) Fréchet, J. M. *Science* **1994**, *263*, 1710. b) Bossman, A. W.; Janssen, H. M.; Meijer, E. W. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665. c) Inoue, K. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 453. d) Vögtle, F.; Gestermann, S.; Hesse, R.; Schwierz, H.; Windisch, B. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 987. e) Esfand, R.; Tomalia, D. A. *Drug Discov. Today*, **2001**, *8*, 427. f) Cloninger, M. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 742. g) Lee, C. C.; MacKay, J. A.; Fréchet, J. M. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1517. h) Astruc, D.; Boisselier, E.; Ornelas, C. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1857. i) Rauter, A.P.; Lindhorst, T.K.; Albertina, C.; Queneau, Y. *Carbohydrate chemistry, Chemical and Biological Approaches*. The Royal Society of Chemistry, **2015**. j) Müller, C.; Despras, G.; Lindhorst, T.K. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 3275.

⁶⁰ Boas, U.; Heegaard, P. M. H. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43.

⁶¹ a) Majoros, I. J.; Thomas, T. P.; Mehta, C. B.; Baker, J. R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5892. b) Nanjwade, B. K.; Bechra, H. M.; Derkar, G. K.; Manvi, F. V.; Nanjwade, V. K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *38*, 185.



Siguiendo tanto aproximaciones sintéticas divergentes como convergentes se han conjugado a este tipo de estructuras una gran variedad de biomoléculas, como por ejemplo carbohidratos, dando lugar a los denominados glicodendrimeros. Los glicodendrimeros han resultado ser excelentes herramientas para intervenir en aquellos procesos biológicos que implican el reconocimiento de los carbohidratos por las lectinas.⁶² La primera síntesis de un glicodendrón fue descrita por Roy y col. en 1993, siguiendo una estrategia divergente en fase sólida. La estructura del primer glicodendrón estaba basada en un esqueleto de polilisinas (PLL) y funcionalizado con varias copias de ácido siálico. Este glicodendrón era capaz de inhibir la hemoaglutinación promovida por el virus de la gripe.⁶³

Para conjugar los carbohidratos a este tipo de estructuras, se han empleado una gran variedad de estrategias sintéticas que se basan, por ejemplo, en la formación de tioureas,⁶⁴ tioéteres, carbamatos,⁶⁵ en el empleo de la aminación reductora,⁶⁶ en la apertura de anillos de lactonas,⁶⁷ en cicloadiciones 1,3-dipolares,⁶⁸ etc. Sin embargo, muchas de estas estrategias impiden la funcionalización completa, o no se disponen de procedimientos de purificación que permitan obtener las estructuras finales de forma pura y monodispersa. En este sentido, las reacciones de química click han permitido superar algunos de estos impedimentos, facilitando sustancialmente el modo de preparación de estas estructuras.

1.2.2 Química click

La química click abarca un conjunto de reacciones caracterizadas por unas condiciones de reacción sencillas (idealmente debe ser un proceso insensible al oxígeno molecular, al agua y a variaciones en el pH o la temperatura), y compatibles con una amplia variedad de grupos funcionales. Habitualmente este tipo de reacciones tienen lugar en agua. Además, deben ser

⁶² Cecioni, S.; Imberty, A.; Vidal, S. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 525.

⁶³ Roy, R.; Zanini, D.; Meunier, S. J.; Romanowska, A. *Chem. Commun.* **1993**, 1869.

⁶⁴ Pagé, D.; Roy, R. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 714. b) Zanini, D.; Roy, R. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3486.

⁶⁵ a) Kitov, P. I.; Sadowska, J. M.; Mulvey, G.; Armstrong, G. D.; Ling, H.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Bundle, D. R. *Nature* **2000**, *403*, 669. b) Wittmann, V.; Seeberger, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4348.

⁶⁶ Kalovidouris, S. A.; Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F. *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 983.

⁶⁷ Aoi, K.; Itoh, K.; Okada, M. *Macromolecules* **1995**, *28*, 5391.

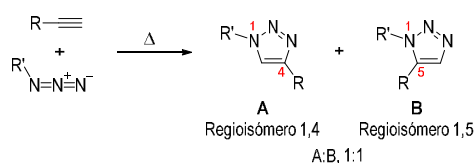
⁶⁸ Pérez-Balderas, F.; Ortega-Muñoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernández-Mateo, F.; Calvo-Flores, F. G.; Calvo-Asín, J. A.; Isac-García, J.; Santoyo-González, F. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1951.



Capítulo 1

estereoespecíficas y poseer una elevada economía atómica que permita obtener rendimientos elevados. Los productos de partida deben ser accesibles, y se deben generar sólo subproductos inofensivos que puedan ser eliminados por métodos no cromatográficos.⁶⁹ Se trata de reacciones totalmente biocompatibles, rápidas y altamente específicas. Se pueden enumerar varios tipos de reacciones que cumplen estos criterios, tales como reacciones de apertura de anillo nucleofílico de epóxidos y aziridinas, reacciones con carbonilos de tipo no aldólico, tales como reacciones de formación de hidrazonas y heterociclos, adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono, tales como formación oxidativa de epóxidos y adiciones de Michael, y reacciones de cicloadición.

Pero sin duda, una de las reacciones click que han cobrado mayor relevancia en los últimos años es la reacción de cicloadición 1, 3-dipolar de tipo [3+2] entre azidas y alquinos catalizada por cobre (I) (CuAAC, del inglés *copper (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*). Esta reacción, descrita por primera vez por Sharpless en 2002,⁷⁰ consiste en una versión mejorada de la reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] descrita en 1968.⁷¹ La reacción de Huisgen suponía el empleo de altas temperaturas, conllevaba bajos rendimientos de reacción y la obtención de una mezcla prácticamente equimolar de los dos posibles triazoles regioisoméricos, 1,4 y 1,5-disustituidos. (Esquema 1.2)



Esquema 1.2 Reacción de Huisgen: cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos bajo condiciones térmicas.

Entre las mejoras que supuso el uso de cobre como catalizador de la reacción, cabe mencionar el incremento drástico en la velocidad de reacción de cicloadición, el transcurso de la reacción a temperatura ambiente y la completa regioselectividad. El proceso catalizado por cobre da lugar a la formación exclusiva del regioisómero 1,4. Para ello, el cobre debe de estar como Cu(I) en el medio de reacción. Si se emplea como fuente de cobre Cu (II), es necesario añadir ascorbato de sodio para reducir el estado de oxidación del metal. A veces, es preciso

⁶⁹ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.

⁷⁰ Demko, Z. P.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2113.

⁷¹ Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, *7*, 321.



Introducción

añadir algún ligando que estabilice el Cu (I), como el TBTA (del inglés *Tris(benzyltriazolylmethyl)amine*) ya que el Cu(I) tiene una gran facilidad para oxidarse a Cu(II).⁷²

Se han descrito dos posibles mecanismos de reacción: el mecanismo de Sharpless⁷³ (alternativa 1, Esquema 1.3) y el de Maarseveen.⁷⁴ (alternativa 2, Esquema 1.3) En ambos casos, se propone que el ciclo catalítico comienza con la formación de especies de Cu^I-acetileno [A] y [A'] a través del complejo π . Cálculos teóricos indican que la coordinación del cobre disminuye el pK_a del enlace C-H del alquino, por lo que es posible la desprotonación en sistemas acuosos incluso sin adición de base (el complejo Cu-acetileno ha sido encontrado en solución acuosa incluso a pH ácido). La complejación alquino- π es endotérmica, pero la formación de las especies [B] y [B'] es exotérmica (11.7 kcal/mol), lo cual apoya que este tipo de reacciones aumenten su velocidad en presencia del metal.

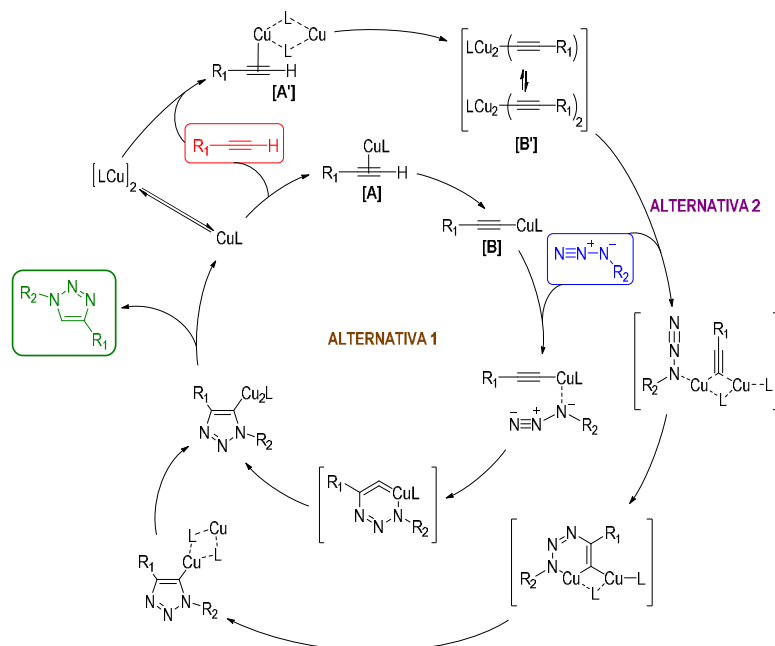
⁷² Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853.

⁷³ Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210.

⁷⁴ Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51.



Capítulo 1



Esquema 1.3 Mecanismos propuestos por Sharpless (Alternativa 1) y Maarseveen (Alternativa 2) para el ciclo catalítico de la reacción CuAAC.

La gran utilidad de esta reacción radica en su eficiencia en procesos de bioconjugación. La reacción es rápida y eficiente, lo que permite la completa modificación de múltiples grupos funcionales de forma simultánea. Por otra parte, es una reacción bioortogonal, ya que tanto las azidas como los alquinos son prácticamente inertes en condiciones biológicas, donde existen multitud de moléculas con un alto grado de funcionalización. Este hecho, junto con la facilidad con la que los grupos alquino y azida pueden ser introducidos en una molécula, y su estabilidad relativa bajo una amplia variedad de condiciones hacen que esta reacción sea una excelente alternativa en procesos de bioconjugación.

Sin embargo, la desventaja fundamental que presenta la reacción CuAAC es el uso de cobre como catalizador, el cual puede tener efectos tóxicos si no se elimina de forma apropiada.⁷⁵

⁷⁵ Gaetke, L. M.; Chow, C. K. *Toxicology* **2003**, *189*, 147.



Además, si la estructura del compuesto final contiene grupos funcionales capaces de quelatar iones cobre, la eliminación completa del metal puede ser complicada, limitando así el uso terapéutico de los compuestos obtenidos mediante esta estrategia sintética. Por este motivo, Bertozzi y *col.* desarrollaron como alternativa la cicloadición [3+2] de azidas y ciclooctinos promovida por la tensión del anillo, también conocida como reacción SPAAC (del inglés *Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*), que no necesita el uso de ningún catalizador.⁷⁶

Una de las principales ventajas de la SPAAC frente a la CuAAC es que la SPAAC se puede emplear directamente en organismos vivos para unir diferentes tipos de biomoléculas, entre ellas carbohidratos.⁷⁷ Además, la reacción SPAAC no genera productos colaterales ni es necesaria la presencia de aditivos como el ascorbato sódico o el TBTA, que dificultan la purificación del producto final. Otra ventaja de la reacción SPAAC es que no requiere una optimización extensiva de las condiciones de reacción. Se trata de una reacción experimentalmente sencilla, siendo determinante únicamente la elección del disolvente donde tanto el ciclooctino como el azido derivado deben ser solubles.⁷⁸

A pesar de ser una versión mejorada de la reacción CuAAC, la reacción SPAAC presenta varias desventajas frente a la primera, entre las que cabe destacar la falta de regioselectividad y la necesidad de funcionalización del anillo de ciclooctino para su conjugación con otras moléculas o plataformas. La reacción CuAAC es regioespecífica, genera un único producto 1,4-disustituido mientras que la reacción SPAAC da lugar a los dos posibles regioisómeros.

La reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre ciclooctinos y azidas ha sido ampliamente utilizada desde su desarrollo en diferentes áreas de la química, y ha resultado ser una herramienta de gran utilidad en química biológica o en el diseño de nuevos materiales. Por este motivo, la reacción SPAAC ha adquirido un enorme interés en la comunidad científica gracias a su gran versatilidad, pudiéndose utilizar tanto en procesos de imagen *in vivo* como en la obtención de nuevos fármacos o materiales con aplicaciones prometedoras.⁷⁹

Dentro del área de la glicobiología, las reacciones de química click han sido ampliamente utilizadas en ingeniería metabólica de glicanos, que incluye la imagen de ligandos carbohidrato

⁷⁶ Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046.

⁷⁷ Chang, P. V.; Prescher, J. A.; Sletten, E. M.; Baskin, J. M.; Miller, I. A.; Agard, N. J.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **2010**, *107*, 1821.

⁷⁸ Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, A. T.; Rutjes, F. P.; van Delft, F. L. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805.

⁷⁹ Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. *Science* **2008**, *320*, 664.



Capítulo 1

no invasiva, estudios de glicómica y manipulación de la superficie de virus para el descubrimiento de fármacos, y en otras aplicaciones como en el estudio del perfil de proteínas basado en la actividad y en los microarrays con carbohidratos.⁸⁰

⁸⁰ Zhang, X.; Zhang, Y. *Molecules* **2013**, *18*, 7145.



CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

2.1 Antecedentes

Desde sus inicios, el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis doctoral se ha centrado en la búsqueda de herramientas basadas en carbohidratos que permitan esclarecer el papel de éstos en procesos infecciosos o procesos moduladores de la respuesta inmune. Para ello, empleando una variedad de plataformas multivalentes, se ha logrado preparar diferentes miméticos de conjugados de carbohidratos capaces de interactuar y bloquear el receptor DC-SIGN, involucrado en numerosos procesos biológicos.⁸¹

En nuestro grupo de investigación, los dendrímeros han suscitado un gran interés por las innumerables propiedades que presentan, y que han sido descritas en la introducción. Estos sistemas han sido convenientemente funcionalizados en su periferia con múltiples copias de los carbohidratos seleccionados. Inicialmente y como prueba de concepto se llevó a cabo la funcionalización con manosas de polímeros hiperramificados Boltorn **I**, compuestos comerciales basados en 2,2'-bis-hidroximetil propiónico, empleando una estrategia divergente.⁸² (Figura 2.1) Mediante ensayos de precipitación cuantitativa, se comprobó que estos glicodendrímeros eran capaces de interactuar con la lectina *Lens Culinaris* (LCA). Sin embargo, no se observó una mayor afinidad al aumentar la valencia de los sistemas, pasando de 16 a 32 unidades de manosa.

⁸¹ a) J. J. Reina Martín, *Diseño y síntesis de ligandos basados en carbohidratos y estudio de la interacción con la lectina DC-SIGN*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla, **2008**. b) M. Sánchez-Navarro, *Síntesis de sistemas multivalentes de carbohidratos basados en glicodendrones*, Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla, **2009**. c) R. Ribeiro-Viana, *Síntesis y evaluación biológica de sistemas glicodendríticos basados en la reacción de cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu (I)*, Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla, **2012**. d) J. Ramos-Soriano, *Sistemas Glicodendríticos como Herramientas en Biomedicina*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla, **2017**. e) di Maio, A. *Carbohydrate Multivalent Systems to functionalize proteins and surfaces for lectin interaction studies*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla, **2019**.

⁸² Arce, E.; Nieto, P. M.; Díaz, V.; Castro, R. G.; Bernad, A.; Rojo, J. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 817.



Capítulo 2

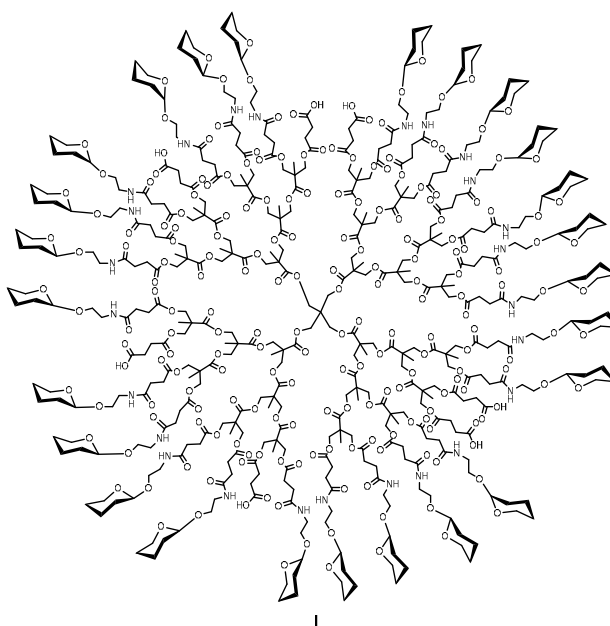


Figura 2.1 Estructura del Boltorn H30 (segunda generación) funcionalizado con 32 azúcares (I).

Sin embargo, esta estrategia sintética no permitía la obtención de estructuras glicodendríticas de tercera generación de manera monodispersa, si no que conducía a una mezcla de compuestos que contaban con entre 30 y 32 manosas.

Teniendo en cuenta estos resultados, la atención se centró en nuevas aproximaciones que solventarían el problema de la polidispersidad. En este sentido, se decidió cambiar de estrategia y sintetizar glicodendrimeros y glicodendrones con estructuras monodispersas siguiendo una aproximación convergente, funcionalizando la primera generación con las unidades sacarídicas mediante CuAAC.⁸³

Las condiciones de reacción se basaron en el empleo de pentaeritritol propargilado (trivalente), como núcleo de crecimiento y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como fuente de cobre, TBTA como ligando estabilizante de Cu(I), ascorbato sódico como agente reductor *in situ* de Cu(II) a Cu(I) y

⁸³ Ribeiro-Viana, R.; García-Vallejo, J. J.; Collado, D.; Pérez-Inestrosa, E.; Bloem, K.; van Kooyk, Y.; Rojo, J. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3209.



una mezcla de THF/H₂O (1:1), como disolventes. Siguiendo estas condiciones de reacción, se prepararon glicodendrones de hasta segunda generación, decorados con nueve unidades de carbohidratos. A modo de ejemplo, en la Figura 2.2, se muestra la estructura del glicodendró de manosas (**II**) convenientemente funcionalizado con un grupo azido en su posición focal.

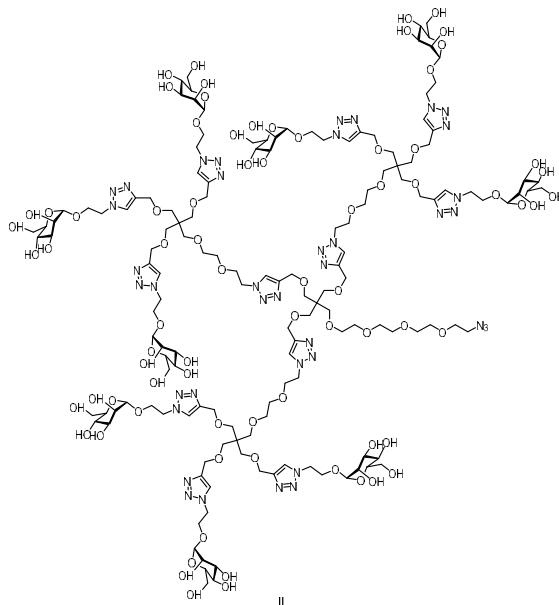


Figura 2.2 Estructura del glicodendró de 9 unidades de manosa (**II**).

Esta metodología ha permitido la preparación de glicodendrones en gran escala, posibilitando el uso de estos sistemas glicodendríticos en diferentes aplicaciones biológicas.

La presencia de un grupo azido en la posición focal de estos glicodendrones ha permitido la conjugación con otras moléculas de interés biológico, obteniéndose estructuras híbridas. En este sentido, con el fin de estudiar la capacidad de internalización del glicodendró **II** en DCs, éste se marcó fluorescentemente en su posición focal con un derivado del fluoróforo borodipirrometano BODIPY (**III**) funcionalizado con un grupo alquino. (Figura 2.3)



Capítulo 2

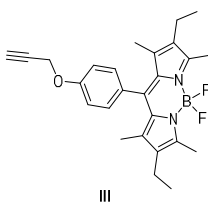


Figura 2.3 Estructura de BODIPY (III) funcionalizado con un grupo alquino.

En colaboración con el grupo de la Dra. Yvette van Kooyk, se comprobó que estas estructuras eran capaces de interactuar con DC-SIGN, mediante ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). A través de citometría de flujo a 37°C, se observó que el glicodendrón II se internalizaba en las DCs vía el receptor DC-SIGN. (Figura 2.4) Por lo que, el glicodendrón II podría ser utilizado para transportar agentes terapéuticos al interior de las DCs y modular así la respuesta inmune.

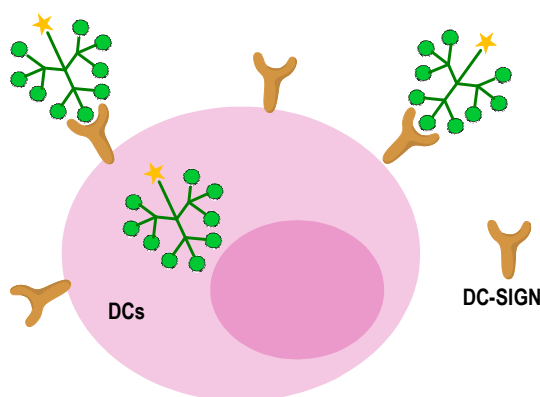


Figura 2.4 Interacción del glicodendrón II marcado fluorescentemente con DC-SIGN e internalización de éstos en DCs.



Además, esta metodología convergente ha permitido preparar glicodendrones empleando diferentes esqueletos, como estructuras basadas en enlaces tipo éster.⁸⁴ Estos sistemas se han conjugado con una o varias secuencias peptídicas que contenían el epítipo de un antígeno seleccionado, dando lugar a glicodendropéptidos GDPs. (Figura 2.5a) La función de la parte sacarídica consistía en dirigir y facilitar la internalización de la parte peptídica. De nuevo, estudios *in vitro* mostraron que los sistemas glicodendríticos con 9 copias de carbohidrato en su periferia, interaccionaban con la lectina DC-SIGN. Por un lado, los GDPs basados en NP₃₆₆₋₃₇₄ estimularon la maduración de células dendríticas y la proliferación de células T en los ensayos *in vitro*. Por otro lado, se ha conseguido modular la respuesta inmune, revirtiendo respuestas alérgicas en no alérgicas, contra diferentes alérgenos empleándose estos GDPs conjugados a diferentes secuencias peptídicas.⁸⁵ Estos nuevos sistemas, conjugados con el alérgeno Pru p 3 (responsable de la alergia del melocotón) han inducido tolerancia en un modelo de ratón. (Figura 2.5b)

⁸⁴ a) Kowalczyk, W.; Mascaraque, A.; Sánchez-Navarro, M.; Rojo, J.; Andreu, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 4565. b) Mascaraque, A.; Kowalczyk, W.; Fernández, T.; Palomares, F.; Mayorga, C.; Andreu, D.; Rojo, J. *Med. Chem. Commun.* **2015**, 6, 1755.

⁸⁵ a) Rodríguez, M. J.; Ramos-Soriano, J.; Perkins, J. R.; Mascaraque, A.; Torres, M. J.; Gomez, F.; Diaz-Perales, A.; Rojo, J.; Mayorga, C. *Sci. Rep.* **2019**, 9, 4043. b) Palomares, F.; Ramos-Soriano, J.; Gomez, F.; Mascaraque, A.; Bogas, G.; Perkins, J. R.; Gonzalez, M.; Torres, M. J.; Diaz-Perales, A.; Rojo, J.; Mayorga, C. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, 63, 1900553. c) Benedé, S.; Ramos-Soriano, J.; Palomares, F.; Losada, J.; Mascaraque, A.; López-Rodríguez, J. C.; Rojo, J.; Mayorga, C.; Villalba, M.; Batanero, E. *Mol. Pharm.* **2020**, 17, 827.



Capítulo 2

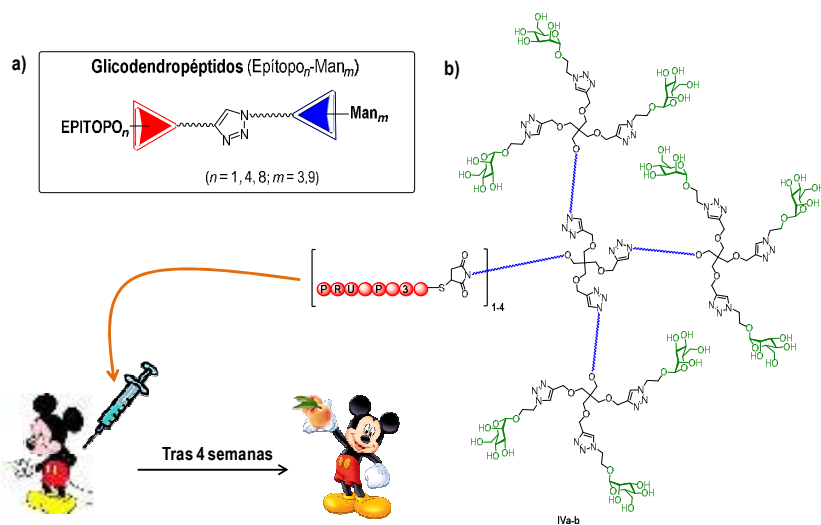
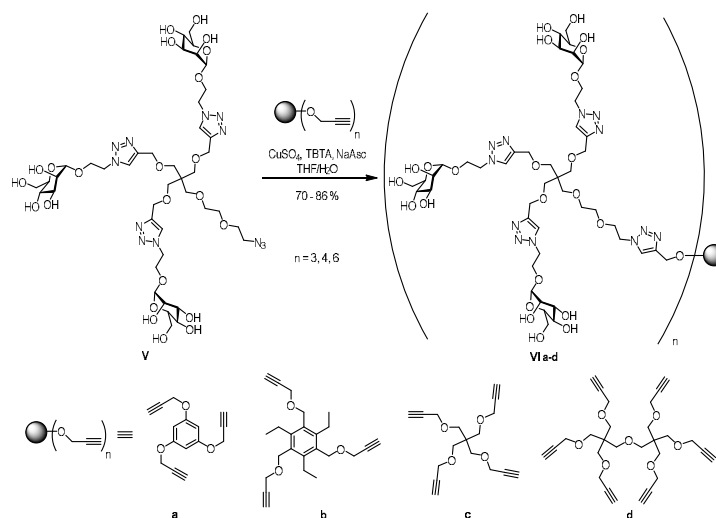


Figura 2.5 a) Estructura simplificada de los GDPs, b) Estructura de los GDPs **IVa-b** conjugados con el alérgeno Pru p 3 que han sido capaces de inducir tolerancia al melocotón en un modelo de ratón.

A partir de estos estudios, se dedujo que, seleccionando el tipo de carbohidrato y la naturaleza del epítipo y variando su valencia de acuerdo con las características de la diana terapéutica objeto de estudio, se podría lograr construir sistemas con gran potencial en el campo de la inmunoterapia.

Dado el enorme éxito de esta estrategia sintética puesta a punto en nuestro grupo de investigación, se llevó a cabo la construcción de dendrímeros de diferente valencia (de 9 a 18 unidades) con una estructura bien definida, variando únicamente los núcleos de crecimiento y utilizando condiciones de síntesis similares.⁴¹ (Esquema 2.1)





Esquema 2.1 Síntesis de los glicodendrimeros **VIa-d** empleando el glicodendrón trivalente de manosa con diferentes núcleos.

Diferentes estudios *in vitro* demostraron que estos glicodendrimeros **VIa-d** interactuaban con la lectina DC-SIGN, encontrándose valores de IC_{50} s en el orden del bajo μM en estudios de competición usando biosensores con detección por resonancia del plasmón de superficie (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*) y un chip funcionalizado con la albúmina de suero bovino BSA (del inglés *bovine serum albumin*) altamente manosilada. En concreto, cuando el carbohidrato utilizado era manosa, estas medidas permitieron concluir que sistemas con una valencia superior a seis eran reconocidos por DC-SIGN con una afinidad razonable (en el rango medio μM).

Con el fin de explorar otras plataformas para la presentación multivalente de carbohidratos, se utilizó la envuelta de una partícula viral como soporte para conjugar los glicodendrones tri- y nonavalentes **II** y **VII**. Estos nuevos sistemas, denominados glicodendriproteínas, presentan una estructura más parecida a la de los sistemas encontrados en la naturaleza. Para ello, se empleó la proteína de la cápside del virus bacteriófago Q β , en la cual, mediante mutagénesis dirigida se había eliminado una metionina para introducir en su lugar un aminoácido no natural que presentaba un grupo alquino (homopropargil glicina), dando lugar a estructuras globulares con



Capítulo 2

180 grupos alquino en su superficie. Estos grupos se funcionalizaron posteriormente con los glicodendrones anteriormente mencionados, vía reacción de CuAAC, obteniéndose los sistemas **VIIIa** con 540 (a partir del dendrón trivalente **VII**) y **VIIIb** con 1620 (a partir del dendrón nonavalente **II**) copias de manosa en su superficie.⁸⁶ (Figura 2.6)

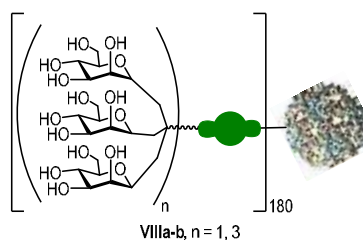


Figura 2.6. Estructura de las glicodendriproteínas **VIIIa-b** de Q β y manosas.

Ambas estructuras, que mimetizan a los patógenos tanto en tamaño como en su superficie altamente glicosidada, presentaron una elevada capacidad para bloquear la infección de células dendríticas mediada por el receptor DC-SIGN causada por un modelo pseudotipado del virus del Ébola. En concreto, la glicodendriproteína con 1620 copias de manosa en su superficie presentó un IC₅₀ en el rango bajo nanomolar.

Nuestro grupo de investigación en colaboración con el grupo del Prof. Nazario Martín de la Universidad Complutense de Madrid, ha desarrollado nuevos sistemas nanométricos basados en fullerenos decorados con manosa, desde 12 hasta 120 unidades (Figura 2.7), mostrando excelentes resultados de actividad inhibitoria frente a virus como el Ébola.⁴³

⁸⁶ Ribeiro-Viana, R.; Sánchez-Navarro, M.; Luczkowiak, J.; Koeppel, J. R.; Delgado, R.; Rojo, J.; Davis, B. G. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1303.



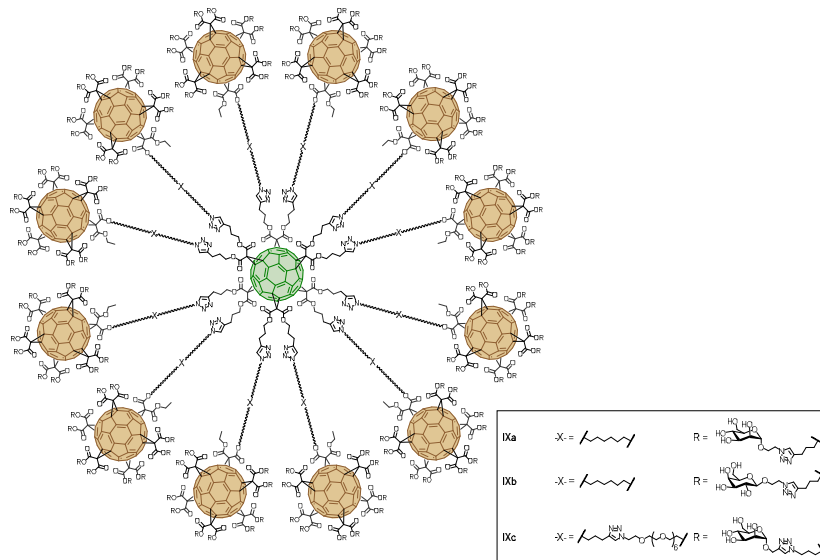


Figura 2.7 Estructura general de tridecafullerenos IXa-b.

Especial interés han suscitado los tridecafullerenos por su estructura globular, su tamaño y el número de carbohidratos. Estas superestructuras **IX** están constituidas por un núcleo C_{60} unido covalentemente a 12 hexaductos C_{60} funcionalizados con 10 unidades de manosa cada uno, resultando en un total de 120 unidades de carbohidrato. Estos sistemas fueron capaces de bloquear la infección en un modelo pseudotipado del virus del Ébola, con un IC_{50} en el rango bajo nM, empleándose como control negativo la estructura equivalente decorada con galactosas.

Sin duda, con todas estas plataformas se ha demostrado que el uso de estructuras multivalentes genera innumerables ventajas y permite bloquear los receptores celulares e intervenir en numerosos procesos biológicos. Además, muestran la versatilidad química que ofrecen los glicodendrones como bloques de construcción para la obtención de sistemas multivalentes complejos totalmente monodispersos.

A la vista de estos precedentes, parece necesario explorar nuevas plataformas sencillas y accesibles que aporten propiedades beneficiosas que guarden relación, no sólo con el proceso de interacción, sino que también mejoren la circulación y la acumulación de estos sistemas en el organismo para que lleguen a los puntos de acción. En este sentido, es importante controlar



Capítulo 2

aspectos como la biocompatibilidad y el tamaño. Además, las estrategias de síntesis deben permitir la conjugación de unidades sacarídicas más grandes para que se asemejen más a los fragmentos oligosacáridicos que existen en la superficie de los patógenos.

Otro aspecto en el que nuestro grupo de investigación ha centrado su atención ha sido en el desarrollo de nuevas estrategias sintéticas que permitan la construcción de oligosacáridos naturales como el epítipo Man_9 presente en la superficie de muchos virus. Teniendo en cuenta que DC-SIGN presenta una gran afinidad por este ligando, para poder bloquear este receptor es preciso disponer de rutas sintéticas que permitan obtenerlo en grandes cantidades y de manera sencilla, minimizando el número de etapas sintéticas. En este sentido, el grupo de investigación abordó una estrategia convergente para la obtención del oligosacárido Man_9 ,⁸⁷ reduciendo notablemente el número de etapas de purificación, el tiempo y aumentando el rendimiento global en comparación con el resto de las estrategias existentes hasta el momento.^{88, 89} La síntesis del nonasacárido **X** (epítipo fundamental de la estructura *high-mannose*) se llevó a cabo siguiendo una estrategia convergente a partir de tres intermedios: un monosacárido aceptor **XVII**, un pentasacárido **XI** y un trisacárido **XIV**. (Esquema 2.2) El mayor reto sintético de la síntesis de este epítipo natural era la obtención del derivado β -manósido **XVII** ya que la configuración anomérica mayoritaria de la manosa es α . En la bibliografía, existen pocos ejemplos en los que se recoja la síntesis de este epítipo con configuración β en su extremo reductor. De forma resumida, nuestro grupo de investigación preparó el monosacárido aceptor **XVII** con configuración β siguiendo las condiciones descritas por Crich y *col.* que facilita la preparación de β -manósidos a partir de derivados en los que el hidroxilo en posición 2 está protegido en forma de propargilo.⁹⁰ Para construir el pentasacárido **XI**, fue necesario emplear como dador de glicosilo un disacárido **XIII** y como aceptor de glicosilo, el monosacárido **XII**. Tanto este disacárido **XIII** como el trisacárido **XIV**, se obtuvieron mediante dos estrategias diferentes. Por un lado, una de las estrategias consistía en la acetólisis de la levadura del pan, a través de la cual se lograron obtener ambos bloques de construcción en tan sólo 10 h y en una escala de gramos. Por otro lado, siguiendo una ruta consecutiva se llevaron a cabo las

⁸⁷ Ramos-Soriano, J.; de la Fuente, M. C.; de la Cruz, N.; Figueiredo, R. C.; Rojo, J.; Reina, J. J. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8877.

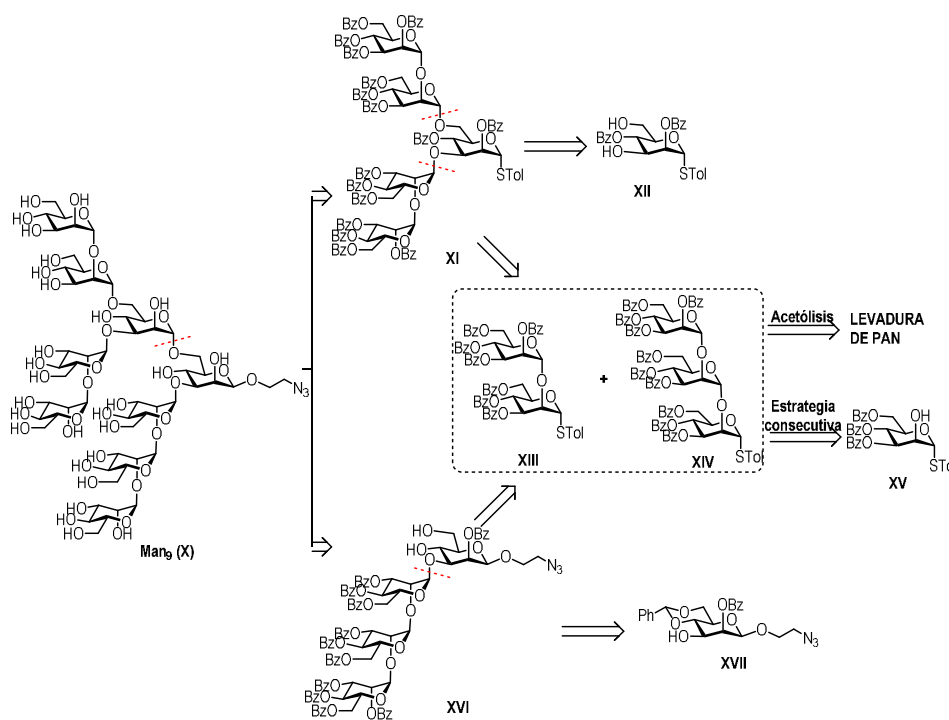
⁸⁸ Grice, P.; Ley, S. V.; Pietruszka, J.; Osborn, H. M. I.; Pripke, H. W. M.; Warriner, S. L. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 431.

⁸⁹ Ratner, D. M.; Plante, O. J.; Seeberger, P. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 826.

⁹⁰ Crich, D.; Jayalath, P. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2277.



funcionalizaciones pertinentes del monosacárido aceptor **XV**. A continuación, la autoglicosidación de este monosacárido **XV** condujo a la formación de los bloques disacárido **XIII** y trisacárido **XIV**, necesarios para preparar el pentasacárido **XI** y el nonasacárido **X**, respectivamente.



Esquema 2.2 Análisis retrosintético de la preparación del nonasacárido **X**.

Los bloques de construcción fueron funcionalizados en la posición anomérica del extremo reductor con el grupo *S*-tolilo. No es muy frecuente el uso de tioglicosidos como donadores de glicosilo en síntesis de oligosacáridos, pero se demostró que esta estrategia era totalmente viable, al igual que los donadores funcionalizados con tricloroacetimidato o con flúor, frecuentemente utilizados para este tipo de reacciones de glicosilación. Como grupos protectores se seleccionaron grupos benzoilo o grupos acetilo para que fuera viable la síntesis de



Capítulo 2

los correspondientes derivados con grupos azido, así como grupos alquino, alqueno o aldehído. Además, se evita la pérdida sustancial de rendimiento tras el último paso de desprotección de los grupos hidroxilo.

El nonasacárido fue funcionalizado en la posición anomérica del extremo reductor con un grupo azido que permite la conjugación posterior con otras moléculas, mediante química click o enlaces amidas, previa reducción del grupo azido a amino.

De acuerdo con estos resultados, cabe pensar que esta estrategia sintética convergente podría permitir acceder a otras muchas oligomanosas intermedias lineales o ramificadas con gran interés biológico. Si estas moléculas se funcionalizan convenientemente, se podrían conjugar a estructuras multivalentes, empleándose la estrategia comentada con anterioridad desarrollada en nuestro grupo de investigación. Estos sistemas multivalentes podrían ser utilizados en aplicaciones biológicas para el estudio de la interacción con lectinas o como vehículos en el transporte selectivo de moléculas de interés biológico hacia dianas celulares.

A la vista de estos antecedentes del grupo de investigación, se han propuesto los siguientes objetivos que constituyen la base de esta tesis doctoral.

2.2 Objetivos

El objetivo fundamental del trabajo que se presenta en esta Memoria es la construcción de nuevas plataformas para la presentación multivalente de carbohidratos (monosacáridos, oligosacáridos y sistemas glicodendríticos) orientados a diferentes aplicaciones terapéuticas. Como ya se ha mencionado anteriormente, es fundamental disponer de estrategias sintéticas que permitan obtener glicoconjugados capaces de interactuar con los receptores presentes en la superficie celular para comprender el papel fundamental que los carbohidratos juegan en numerosos procesos biológicos. Esta tesis doctoral se ha centrado principalmente en el estudio de la actividad que muestran los glicoconjugados preparados en procesos de infección viral, en procesos moduladores de la respuesta inmune o en cáncer. Para ello, se ha intentado aumentar la afinidad de los diferentes sistemas multivalentes sintetizados por las correspondientes lectinas. Para obtener una primera aproximación de cómo podría ser la efectividad de estos sistemas en la inhibición de procesos de infección, se han llevado a cabo estudios de interacción con otras lectinas. Para alcanzar este objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos:



Antecedentes y objetivos

- Síntesis de oligosacáridos de manosa complejos convenientemente funcionalizados para que puedan ser conjugados a diversas plataformas multivalentes y determinación de su afinidad por lectinas específicas.
- Construcción de neoglicoproteínas a partir de glicodendrones y evaluación de la respuesta inmune que desencadenan en células dendríticas o similares.
- Preparación de plataformas multivalentes biocompatibles de carbohidratos basadas en nanogeles (gliconogeles), cuya morfología y tamaño mimetizan a los virus. Determinación de la capacidad que poseen estos sistemas para interactuar con lectinas.
- Empleo de los gliconogeles multivalentes como transportadores direccionales de fármacos antitumorales. Evaluación de la capacidad de estos sistemas para ser internalizados en células tumorales específicas.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



Capítulo 2

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



CAPÍTULO 3
SÍNTESIS Y PRESENTACIÓN MULTIVALENTE DE
OLIGOMANOSAS.
ESTUDIOS DE AFINIDAD CON LECTINAS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

3.1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

3.1.1 Glicoproteínas virales

La glicosilación de las proteínas presentes en la superficie de los virus ocurre durante la replicación dentro de las células huéspedes. (Figura 3.1) Las unidades de glicanos en las glicoproteínas virales son responsables de las interacciones con lectinas u otros receptores presentes en la superficie de las células, constituyendo el primer paso en el proceso de infección tras el cual se produce la internalización de los virus dentro de las células diana.⁹¹

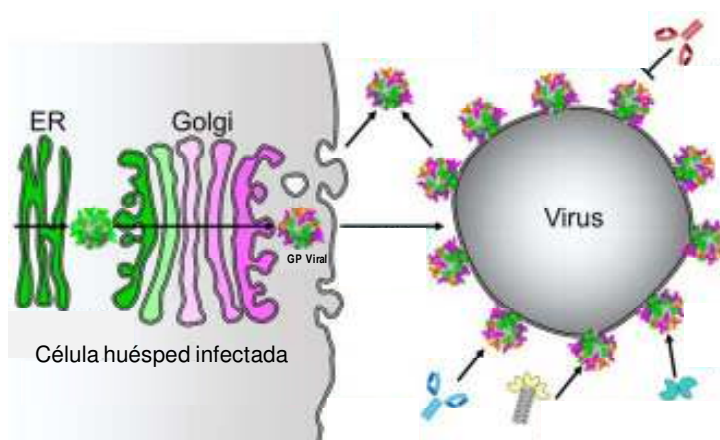


Figura 3.1 Pasos más relevantes en la patogénesis vírica.

De manera general, la *N*-glicosilación de las proteínas ocurre cuando éstas alcanzan el RE de las células eucariotas. Una vez dentro, sufren la primera modificación, que consiste en la transferencia de un oligosacárido precursor en el extremo amino terminal de un residuo de Asparagina (Asn) de la proteína. Este precursor está constituido por tres glucosas, nueve manosas y dos *N*-acetilglucosaminas (Glc₃Man₉GlcNAc₂).⁹²

⁹¹Watanabe, Y.; Bowden, T. A.; Wilson, I. A.; Crispin, M. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2019**, 1863, 1480.

⁹²Aebi, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1883, 2430.



Capítulo 3

El precursor posteriormente va a ser modificado mediante la acción de glicosidasas y glicosiltransferasas localizadas en el RE y en el aparato Golgi durante su transporte.⁹³ En primer lugar, los tres residuos de glucosa son eliminados del *N*-oligosacárido precursor unido a la correspondiente proteína plegada, mediante la acción de las glucosidasas de tipo I o II. Este proceso produce un *N*-glicano rico en manosa ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) característico del RE.⁹⁴ A continuación, la glicoproteína es transportada desde el RE al aparato de Golgi donde tiene lugar un remodelamiento de los *N*-glicanos.⁹⁵ Algunos de los residuos de manosa unidos mediante enlaces α 1,2 pueden ser eliminados, o incluso los 4 residuos, bajo la acción de manosidasas. A su vez, otros monosacáridos pueden ser añadidos en su lugar gracias a la acción de una serie de glicosiltransferasas para hacer más largos los *N*-oligosacáridos. De esta manera, se genera una gran diversidad de oligomanósidos y glicanos complejos e híbridos. (Figura 3.2)

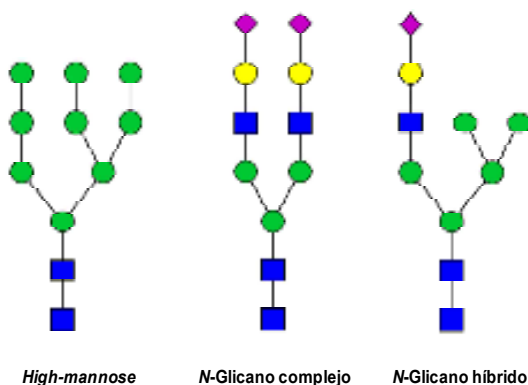


Figura 3.2 Diferentes tipos de *N*-glicanos generados en el aparato de Golgi.

El orden de adición de las unidades monosacáridicas a la cadena en crecimiento viene determinado por la especificidad por el sustrato de las enzimas y su acceso al sustrato. Todos los subtipos generados comparten el mismo núcleo, un trisacárido Man_3 . Junto con este núcleo, cuando se trata de glicanos complejos, estos oligosacáridos presentan en su estructura residuos

⁹³ Schwarz, F.; Aebi, M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 576.

⁹⁴ a) Helenius A.; Aebi M. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 1019. b) Ruddock L.W.; Molinari M. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 4373.

⁹⁵ Stanley, P. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a005199.



de GlcNAc, Gal o ácido siálico. En el caso de glicanos híbridos, en uno de los brazos existe un residuo de GlcNAc unido a las unidades de manosa, mientras que en el otro brazo sólo hay residuos de manosa.

Por otro lado, la *O*-glicosilación de las proteínas tiene lugar una vez que la proteína ha alcanzado el aparato de Golgi y los carbohidratos se unen covalentemente a los residuos de serina o treonina de la proteína. De esta manera, se consiguen glicanos con estructuras altamente ramificadas. Cada monosacárido tiene varios grupos hidroxilo para formar enlaces glicosídicos y a su vez, la configuración de estos enlaces puede ser α o β , lo que da lugar a una gran variedad de estructuras posibles.⁹⁶

En este sentido, las glicoproteínas presentes en la cubierta de los virus presentan *N*-glicanos que posibilitan, por un lado, la interacción selectiva con células diana como primer paso del proceso de infección viral y por otro lado, conducen al enmascaramiento de partes inmunogénicas de la proteína con la consiguiente pérdida de respuesta inmune.⁹⁷ Pequeños cambios en los patrones de glicosilación de las proteínas pueden afectar a la interacción con los receptores o con anticuerpos.

A diferencia de las glicoproteínas de mamíferos, la glicoproteína viral gp120 presente en la superficie del VIH-1 está constituida por un gran número de derivados de *high-mannose* unidos a asparaginas (Asn295, 332, 339, 386, 392) como consecuencia de un gran procesado, gracias a la acción de las enzimas que se encuentran en el RE y en el aparato de Golgi.^{39, 98} En el caso del VIH-1 se han podido aislar un número bajo de anticuerpos. En concreto, se sabe que el anticuerpo 2G12 es capaz de reconocer e interactuar con los glicanos que se encuentran en una región determinada de gp120, pudiendo generar una respuesta inmune adaptativa.^{99, 100} Calarese y *col.*¹⁰¹ fueron capaces de co-cristalizar el anticuerpo 2G12 con el oligosacárido Man₉GlcNAc₂. De acuerdo con esta estructura cristalina, demostraron que el anticuerpo 2G12

⁹⁶ Wopereis, S.; Lefeber, D. J.; Morava, É.; Wevers, R. A. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 574.

⁹⁷ Vigerust, D. J.; Shepherd, V. L. *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 211.

⁹⁸ Doores, K. J. *FEBS J.* **2015**, *282*, 4679.

⁹⁹ Binley, J. M.; Sanders, R. W.; Clas, B.; Schuelke, N.; Master, A.; Guo, Y.; Kajumo, F.; Anselma, D. J.; Maddon, P. J.; Olson W. C.; Moore, J. P. *J. Virol.* **2000**, *74*, 627.

¹⁰⁰ Calarese, D. A.; Lee, H.-K.; Huang, C.-Y.; Best, M. D.; Astronomo, R. D.; Stanfield, R. L.; Katinger, H.; Burton, D. R.; Wong, C.-H.; Wilson, I. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2005**, *102*, 13372.

¹⁰¹ Calarese, D. A.; Scanlan, C. N.; Zwick, M. B.; Deechongkit, S.; Mimura, Y.; Kunert, R.; Zhu, P.; Wormald, M. R.; Stanfield, R. L.; Roux, K. H.; Kelly, J. W.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Katinger, H.; Burton, D. R.; Wilson, I. A. *Science* **2003**, *300*, 2065.



Capítulo 3

era capaz de interactuar con cuatro residuos de *high-mannose* a la vez, favoreciendo un aumento notable en la afinidad.

De la estructura cristalina constituida por la región de unión del anticuerpo 2G12 (F_{ab} , del inglés *Fragment antigen-binding*) y el oligosacárido $Man_9GlcNAc_2$ se pudo concluir que los sitios de interacción convencionales del anticuerpo eran ocupados principalmente por el brazo D_1 del oligosacárido (Figura 3.3). Los residuos $Man\alpha 1,2Man$ de la ramificación D_1 de $Man_9GlcNAc_2$ representan el 85 % de los contactos con la región F_{ab} . Cabe señalar que el disacárido por sí solo presenta una afinidad 50 veces menor por el anticuerpo 2G12 que el oligosacárido completo $Man_9GlcNAc_2$.¹⁰²

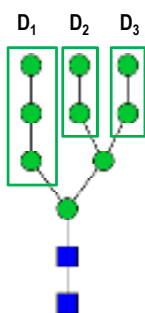


Figura 3.3 Brazos D1-D3 del ligando *high-mannose*.

Catasti y *col.*¹⁰³ observaron mediante RMN que diferentes oligomanósidos (Figura 3.4) que contienen el disacárido $Man\alpha 1,2Man$ en su estructura son capaces de inhibir la interacción de la proteína gp120 con el anticuerpo 2G12 de la misma manera o incluso mejor que el oligosacárido $Man_9GlcNAc_2$. Del mismo modo, Calarese y *col.*¹⁰⁰ realizaron ensayos ELISA y co-cristalizaron los derivados de oligomanosa (Man_4 , Man_5 , Man_7 , Man_8) con la región F_{ab} del anticuerpo 2G12. Con estos experimentos confirmaron que 2G12 interactuaba con los brazos D_1 y D_3 del oligosacárido $Man_9GlcNAc_2$.

¹⁰² a) Binley, J. M.; Wyatt, R.; Desjardins, E.; Kwong, P. D.; Hendrickson, W.; Moore, J. P.; Sodroski, J. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1998**, *14*, 191. b) Scanlan, C. N.; Pantophlet, R.; Wormald, M. R.; Ollmann Saphire, E.; Stanfield, R.; Wilson, I. A.; Katinger, H.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M.; Burton, D. R. *J. Virol.* **2002**, *76*, 7306.

¹⁰³ Catasti, P.; Fontenot, J. D.; Brandbury, E. M.; Gupta, G. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2224.



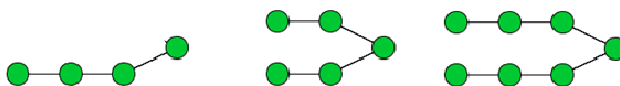


Figura 3.4 Estructura de las oligomanosas evaluadas por RMN por Catasti y col.¹⁰³

Al igual que el resto de glicoproteínas, durante el transporte de la proteína gp120 a través del RE y el complejo de Golgi, los glicanos se transforman en estructuras más complejas, como consecuencia de procesos de glicosilación. Como ya se ha mencionado, el anticuerpo 2G12 es capaz de reconocer al VIH-1 pero debido a las modificaciones que tienen lugar, no es capaz de neutralizar todas las variantes del VIH-1 de la misma manera. Sin embargo, se ha observado que algunos bNAbs (del inglés *broadly neutralizing antibodies*) son capaces de neutralizar algunas cepas del VIH-1. Entre ellos, los anticuerpos PG9 y PG16 reconocen dos heteroglicanos adyacentes.¹⁰⁴ Generalmente, se trata de sialilglicanos¹⁰⁵ o el glicano Man₅GlcNAc₂.¹⁰⁶ (Figura 3.5)

¹⁰⁴ a) Doores, K. J.; Burton, D. R. *J. Virol.* **2010**, *84*, 10510. b) Pancera, M.; McLellan, J. S.; Wu, X.; Zhu, J.; Changela, A.; Schmidt, S. D.; Yang, Y.; Zhou, T.; Phogat, S.; Mascola, J. R.; Kwong, P. D. *J. Virol.* **2010**, *84*, 8098. c) Pancera, M.; Shahzad-UI-Hussan, S.; Doria-Rose, N. A.; McLellan, J. S.; Bailer, R. T.; Dai, K.; Loesgen, S.; Louder, M. K.; Staupe, R. P.; Yang, Y.; Zhang, B.; Parks, R.; Eudailey, J.; Lloyd K. E.; Blinn, J.; Alam, S. M.; Haynes, B. F.; Amin, M. N.; Wang, L. X.; Burton, D. R.; Koff, W. C.; Nabel, G. J.; Mascola, J. R.; Bewley, C. A.; Kwong, P. D. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 804.

¹⁰⁵ Shivatare, S. S.; Chang, S.-H.; Tsai, T.-I.; Tseng, S.Y.; Shivatare, V. S.; Lin, Y.-S.; Cheng, Y.-Y.; Ren, C.-T.; Lee, C.-C. D.; Pawar, S.; Tsai, C.-S.; Shih, H.-W.; Zeng, Y.-F.; Liang, C.-H.; Kwong, P. D.; Burton, D. R.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 338.

¹⁰⁶ Yang, W.; Shah, P.; Eshghi, S. T.; Yang, S.; Sun, S.; Ao, M.; Rubin, A.; Jackson, J. B.; Zhang, H. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 6959.



Capítulo 3

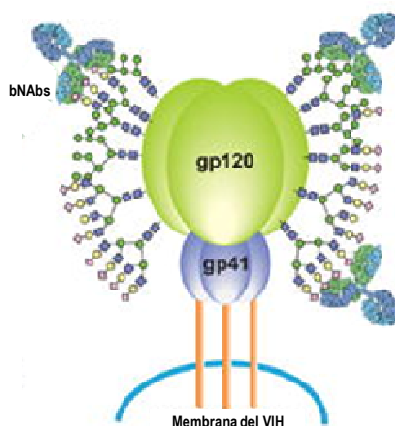


Figura 3.5 Reconocimiento de varios glicanos por los anticuerpos bNAbs.

Junto con los anticuerpos, también muchos CLR presentes en la superficie de las células dendríticas o macrófagos son capaces de reconocer a la gp120, previniendo la infección viral o la transmisión.¹⁰⁷ En este sentido, la interacción de las glicoproteínas de las envueltas virales con los CLR provoca la internalización de los patógenos. El resultado del reconocimiento de patógenos a través de los CLR depende del tipo de receptor y del tipo de célula en el que está expresado. En concreto, DC-SIGN presenta una alta especificidad por glicanos derivados de *high-mannose* y también por aquellos que contienen fucosa como los antígenos de Lewis (Le^x , Le^y , Le^a y Le^b).¹⁰⁸ El dominio cuello de esta lectina permite su homooligomerización dando lugar a la formación de tetrámeros y a interacciones multivalentes con sus ligandos, lo que conduce a un aumento de su afinidad por los glicoconjugados presentes en los patógenos. En el caso de las células dendríticas, DC-SIGN está sobreexpresada en comparación con otro tipo de células.³⁸ De este modo, DC-SIGN es capaz de reconocer los oligosacáridos de tipo *high-mannose* presentes en la gp120 del VIH-1 y facilitar el transporte de las partículas de VIH-1 a los órganos linfoides que son ricos en células T. Así, se promueve la *trans*-infección de las

¹⁰⁷ Balzarini, J.; Van Herrewege, Y.; Vermeire, K.; Vanham, G.; Schols, D. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 3.

¹⁰⁸ van Liempt, E.; Bank, C. M. C.; Mehta, P.; García-Vallejo, J. J.; Kawar, Z. S.; Geyer, R.; Alvarez, R. A.; Cummings, R. D.; Kooyk, Y.; van Die, I. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6123.



células T que poseen receptores tipo CD4⁺ y receptores de quimiocinas utilizados por el VIH-1 para infectar las células T.¹⁰⁹

Teniendo en cuenta el papel que los oligomanósidos juegan durante el proceso de infección viral, es fundamental disponer de estrategias sintéticas que permitan la obtención de estos ligandos naturales de una manera sencilla. No obstante, la enorme complejidad de este tipo de estructuras dificulta la obtención de las cantidades necesarias para llevar a cabo la preparación de conjugados y los estudios biológicos correspondientes.

3.1.1.1. *Man₉GlcNAc₂*

Man₉GlcNAc₂ es el ligando natural de DC-SIGN. Este oligosacárido está constituido por un nonasacárido de manosa (unidad de reconocimiento) que se encuentra unido a un disacárido de GlcNAc (fragmento estructural), mediante una unión β1,4. No obstante, DC-SIGN es capaz de reconocer también estructuras ramificadas con cinco (pentasacáridos del tipo $\text{Man}\alpha(1,3)[\text{Man}\alpha(1,3)(\text{Man}\alpha(1,6)\text{Man}\alpha(1,6)]\text{Man}\alpha$) o tres unidades de manosa (trisacáridos del tipo $\text{Man}\alpha(1-3)[\text{Man}\alpha(1-6)]\text{Man}\alpha$), así como estructuras con dos unidades de manosa (disacáridos $\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}\alpha$).

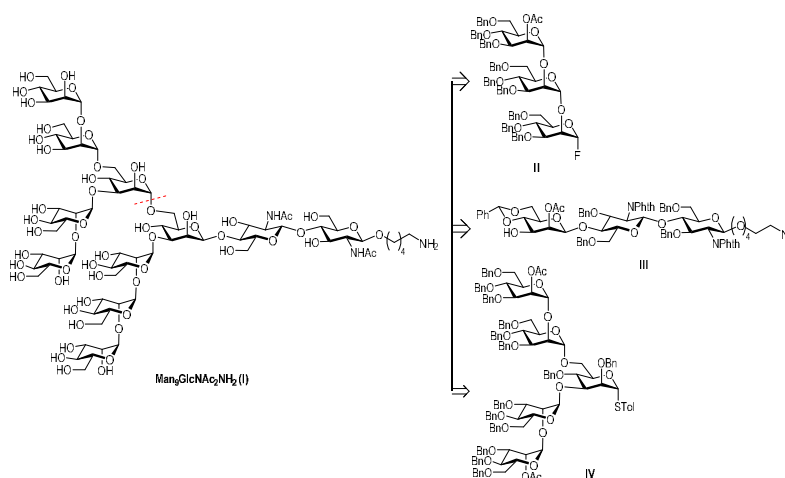
La estrategia de síntesis de este tipo de oligomanosas implica la preparación de diferentes bloques de construcción debidamente protegidos para poder unirlos mediante reacciones de glicosidación selectivas. En la bibliografía existen diversas estrategias sintéticas para obtener el ligando *Man₉GlcNAc₂*.^{105, 110} En la estrategia descrita en la referencia 105, se obtuvo el undecasacárido funcionalizado con un grupo amino en la posición anomérica del residuo terminal de GlcNAc **Man₉GlcNAc₂NH₂ (I)**, a partir de tres bloques de construcción; un trisacárido **II** y un pentasacárido **IV** que actuaban como dadores de glicosilo. Como aceptor de glicosilo, se empleó el trisacárido **III** formado por una unidad de manosa unida mediante enlace β a un disacárido que contenía dos unidades de GlcNAc. (Esquema 3.1)

¹⁰⁹ a) Figdor, C. G.; van Kooyk, Y.; Adema, G. J. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 77. b) Kwon, D. S.; Gregorio, G.; Bitton, N.; Hendrickson, W. A.; Littman, D. R. *Immunity* **2002**, *16*, 135. c) Wu, L.; KewalRamani, V. N. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 859.

¹¹⁰ Geng, X.; Dudkin, V. Y.; Mandal, M.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2562.



Capítulo 3

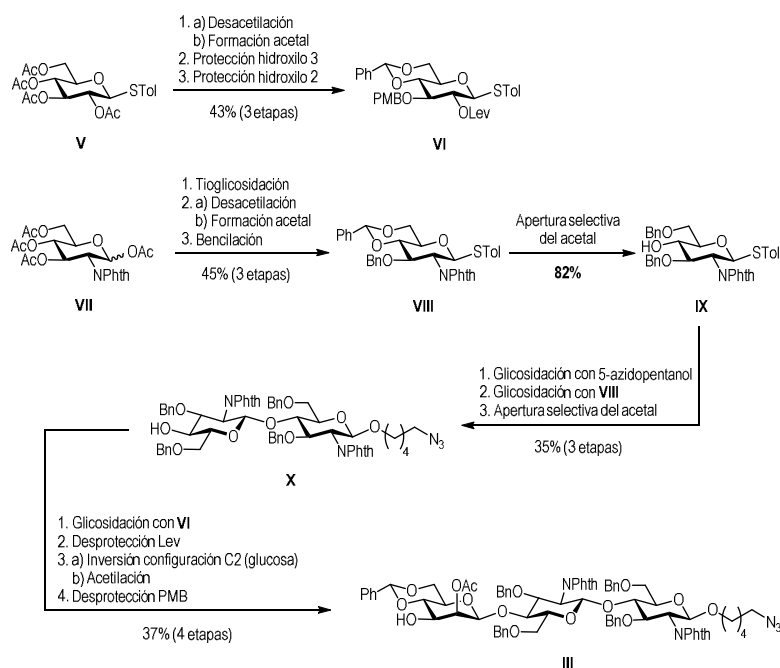


Esquema 3.1 Análisis retrosintético de la preparación del undecasacárido **Man₉GlcNAc₂NH₂ (I)**. (NPhth: grupo N-ftalimido)

El mayor reto sintético que supone la preparación de este ligando es la obtención del derivado β-manósido, ya que los derivados de manosa, tras la reacción de glicosidación, proporcionan exclusivamente el derivado α-manosa, favorecido por el efecto anomérico. La síntesis del trisacárido aceptor **III** se llevó a cabo a partir de dos monosacáridos diferentes **V** y **VII**. Esta síntesis implica un gran número de etapas de enorme dificultad, tanto de reacciones de glicosidación, de desprotección como reacciones de inversión de la configuración del C-2 de la glucosa que dan como resultado el derivado de manosa con configuración β con bajo rendimiento. (Esquema 3.2). Fueron necesarias un total de 11 etapas sintéticas para obtener este compuesto con un rendimiento global del 5%. Esto pone de manifiesto, no sólo la enorme complejidad de la síntesis, sino que además se hace necesaria una nueva estrategia más simple que aumente considerablemente el rendimiento global del trisacárido **III**.



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas

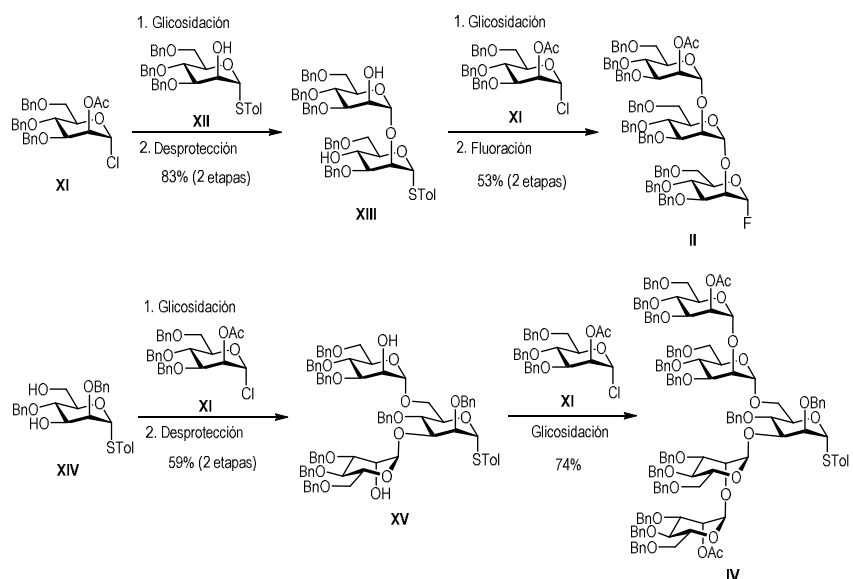


Esquema 3.2 Síntesis del trisacárido III aceptor.

Por otro lado, el trisacárido lineal II funcionalizado con un átomo de flúor en la posición anomérica del extremo reductor y del pentasacárido IV funcionalizado con un grupo *S*-tolilo en el extremo reductor fueron preparados mediante una síntesis lineal. Emplearon los monosacáridos XI y XII para obtener el trisacárido II y los monosacáridos XI y XIV para sintetizar el pentasacárido IV con rendimientos del 44% (4 etapas de síntesis) y 42% (3 etapas de síntesis), respectivamente. (Esquema 3.3)



Capítulo 3

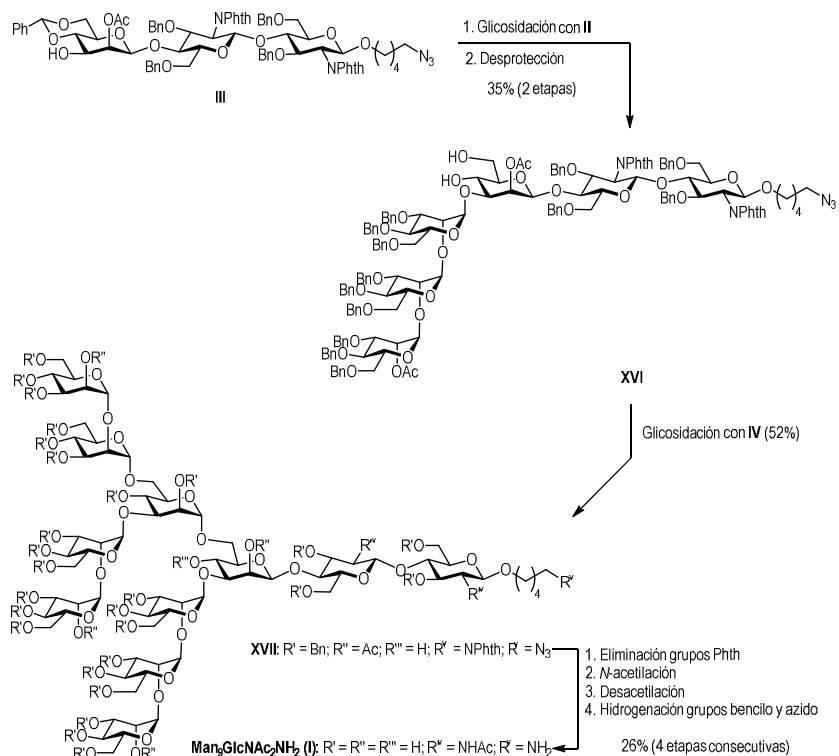


Esquema 3.3 Etapas sintéticas para la preparación del trisacárido lineal **II** y del pentasacárido **IV**.

Una vez obtenidos los tres bloques de construcción **II**, **III** y **IV**, se unieron mediante dos reacciones de glicosidación con una etapa intermedia de desprotección, para obtener el correspondiente oligosacárido protegido **I**. (Esquema 3.4).



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas



Esquema 3.4 Preparación del oligosacárido **Man₉GlcNAc₂NH₂ (I)**.

Por último, se llevó a cabo la desprotección de los grupos amino que posteriormente fueron protegidos mediante *N*-acetilación. A continuación, se desprotegeron los grupos hidroxilo protegidos como acetatos, se eliminaron los grupos bencilo mediante hidrogenación y finalmente se redujo el grupo azido presente en el extremo reductor. En esta síntesis, la hidrogenación requería presiones altas para que la conversión fuera completa, esto daba lugar a la obtención de subproductos procedentes de la reducción de los anillos aromáticos. El rendimiento global de las etapas de desprotección del compuesto **XVII** fue del 26%.

Como ya se ha mencionado anteriormente, mediante estudios de cristalización se demostró que la parte manosilada del oligosacárido **Man₉GlcNAc₂** es la parte fundamental en la interacción. La función del disacárido de **GlcNAc** es meramente estructural, es la parte más



Capítulo 3

próxima al residuo de Asn de la proteína del patógeno. Por esta razón, en numerosas ocasiones se ha planteado únicamente la preparación del epítipo Man₉ para reducir la complejidad de la síntesis de este oligosacárido, esperando que el nivel de reconocimiento no se vea afectado. En este caso, la configuración del extremo reductor podría ser α o β .

En la bibliografía existen varias aproximaciones para la preparación de este nonasacárido de manosas de manera regio- y estereoselectiva, funcionalizado en su extremo reductor con diferentes sustituyentes y con configuración α .^{100, 111}

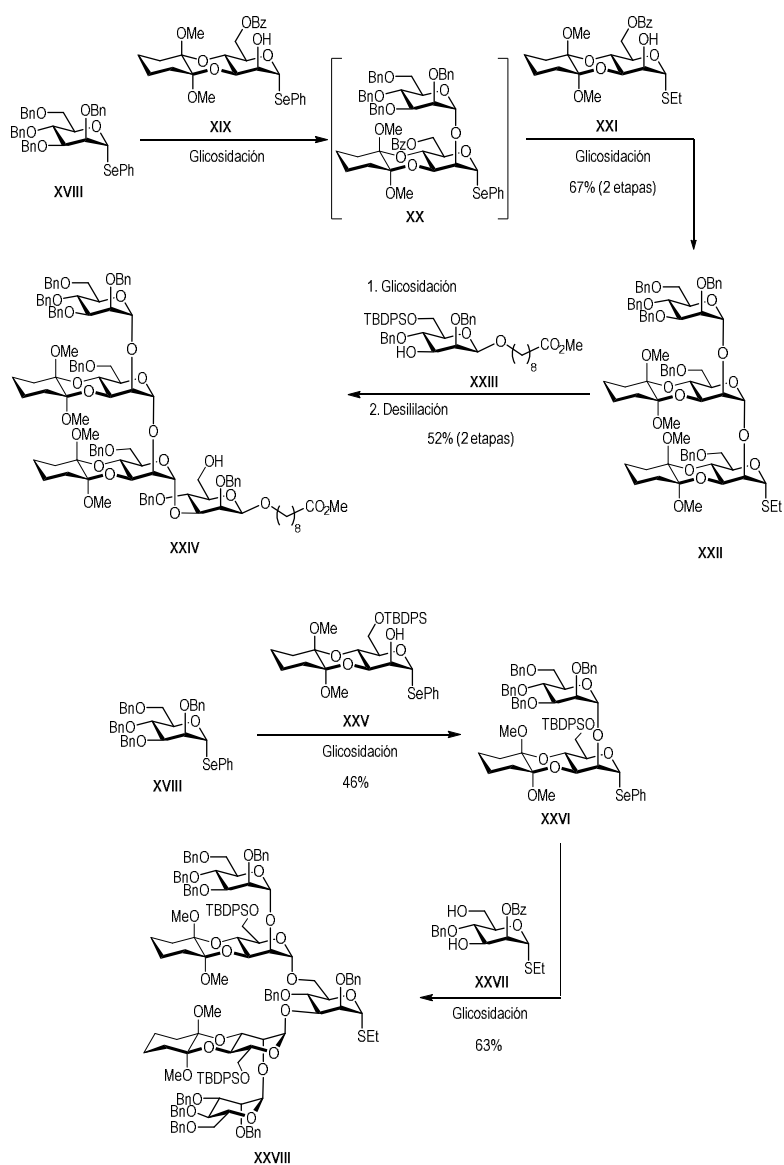
Sin embargo, para preparar el derivado con configuración β , existen menos estrategias descritas ya que supone una mayor dificultad. Por un lado, Grice y *col.*⁸⁸ siguieron una aproximación convergente mientras que Ratner y *col.*⁸⁹ usaron una estrategia lineal. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito una estrategia sintética convergente para la obtención de este epítipo.⁸⁷

En la estrategia descrita por Grice,⁸⁸ se optó por seleno- y tioglicósidos como donadores de glicosilo, siendo mucho más reactivo el primer grupo. Esta diferencia de reactividad permitió llevar a cabo la síntesis de bloques de construcción **XXIV** y **XXVIII** para la obtención del Man₉ funcionalizado con el grupo 8-(metoxicarbonil)octilo en una única etapa. (Esquema 3.5) Como grupo protector, se utilizó el ciclohexano-1,2-diacetal (CDA) que permite la protección de hidroxilos vecinos, en concreto, los grupos hidroxilo 3 y 4.

¹¹¹ a) Merritt, J. R.; Naisang, E.; Fraser-Reid, B. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4443. b) Grice, P.; Ley, S. V.; Pietruszka, J.; Priepeke, H. W. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 197. c) Zhu, Y.; Kong, F. *Synlett* **2001**, 8, 1217.



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas

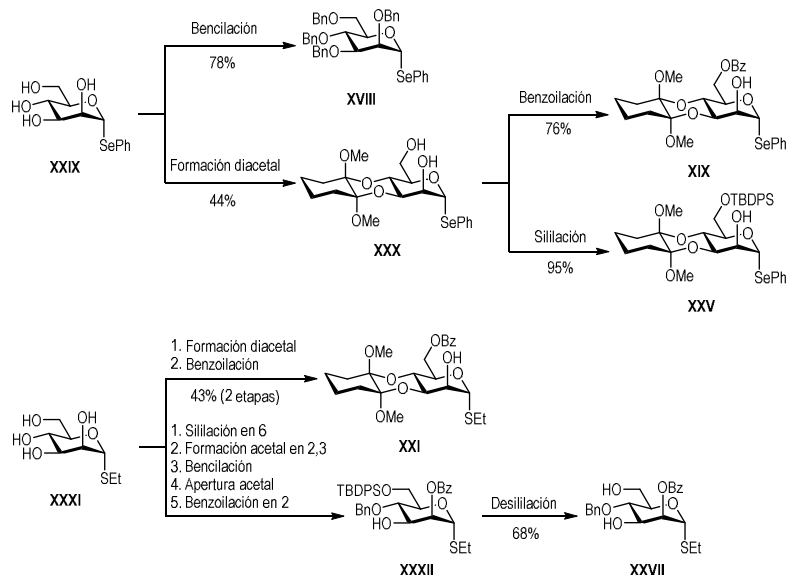


Esquema 3.5 Síntesis de los bloques de construcción XXIV y XXVIII.



Capítulo 3

Previamente, fue necesaria la síntesis de los precursores, **XXVIII**, **XIX**, **XXV**, **XXI** y **XXVII**, a partir de los monosacáridos **XXIX** y **XXXI**. (Esquema 3.6)



Esquema 3.6 Síntesis de los precursores **XXVIII**, **XIX**, **XXV**, **XXI** y **XXVII**.

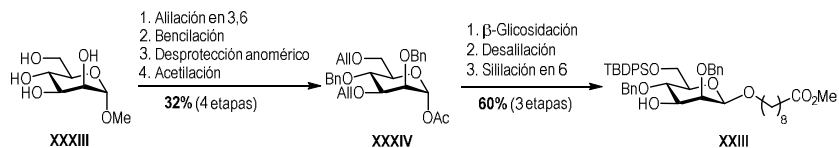
La síntesis del monosacárido aceptor o núcleo con configuración β **XXIII** se llevó a cabo a partir del derivado metil- α -D-manopiranosido **XXXIII**. Este monosacárido fue protegido regioselectivamente para obtener el derivado **XXXIV**, de acuerdo con el procedimiento descrito en la literatura.¹¹² A continuación, mediante β -glicosidación con 8-(metoxicarbonil)oct-1-ol, siguiendo el método descrito por Paulsen,¹¹³ obtuvieron mayoritariamente el derivado β -manósido (β : α >13:1). (Esquema 3.7) Posteriormente, los grupos alilo fueron eliminados y la posición 6 fue protegida selectivamente con cloruro de *tert*-butildifenilsililo para obtener el aceptor de glicosilo **XXIII** y así, poder construir el correspondiente tetrasacárido **XXIV**.

¹¹² a) Ogawa, T.; Katano, K.; Sasajima, K.; Matsui, M. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2779. b) Ogawa, T.; Nakahayashi, S.; Kitajima, T. *Carbohydr. Res.* **1983**, *114*, 225.

¹¹³ a) Paulsen, H.; Lockhoff, O. *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 3102. b) Paulsen; H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 155.

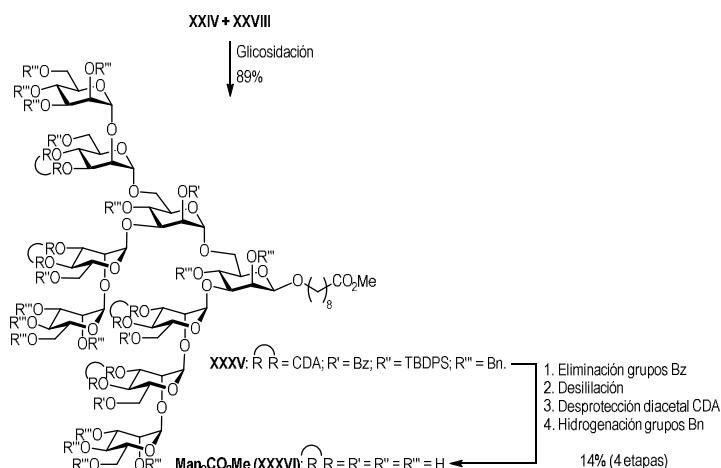


Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas



Esquema 3.7 Síntesis del β -manósido XXIII.

Tras una etapa de glicosidación de los bloques XXIV y XXVIII se obtuvo el correspondiente nonasacárido protegido XXXV con un rendimiento del 89% (Esquema 3.8). Tras realizar las pertinentes reacciones de desprotección se obtuvo el producto final $\text{Man}_9\text{CO}_2\text{Me}$ (XXXVI) con un rendimiento global bajo, del 14%.



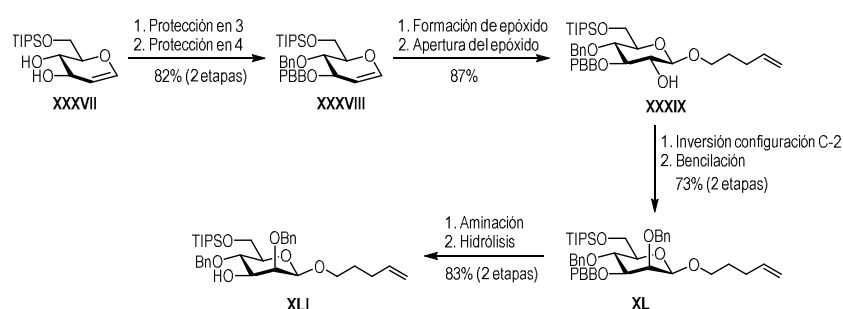
Esquema 3.8 Síntesis y etapas de desprotección necesarias para obtener el nonasacárido $\text{Man}_9\text{CO}_2\text{Me}$ (XXXVI).

Por otro lado, Ratner y *col.*⁸⁹ emplearon una estrategia lineal para obtener el nonasacárido funcionalizado en la posición anomérica del extremo reductor con el grupo pentenilo. Este derivado se asemeja al que se podría obtener tras el desanclaje del correspondiente oligosacárido de la resina Merrifield que se emplea en la síntesis de los carbohidratos en fase sólida. Al igual que en el resto de estrategias, el mayor reto lo constituía la síntesis del residuo



Capítulo 3

β -manósido **XLI**. La ruta sintética para preparar este residuo comenzaba con la protección selectiva del hidroxilo en la posición 3 del derivado **XXXVII** y la reacción de bencilación del hidroxilo en la posición 4, generándose el glucal **XXXVIII**. (Esquema 3.9) Tras la epoxidación del doble enlace, se llevó a cabo la apertura de este epóxido en *trans* con 4-penten-1-ol, dando lugar de manera exclusiva al derivado β -glucósido **XXXIX**. En este punto, la inversión de la configuración de la posición 2 se realizó mediante un proceso de oxidación-reducción, seguida de una reacción de bencilación del hidroxilo en posición 2, formándose el derivado **XL**. Por último, se llevó a cabo la desprotección selectiva de la posición 3, obteniéndose el aceptor glicosídico **XLI**. El rendimiento global fue del 43% en ocho etapas de síntesis.



Esquema 3.9 Ruta sintética para obtener el monosacárido **XLI** aceptor de glicosilo.

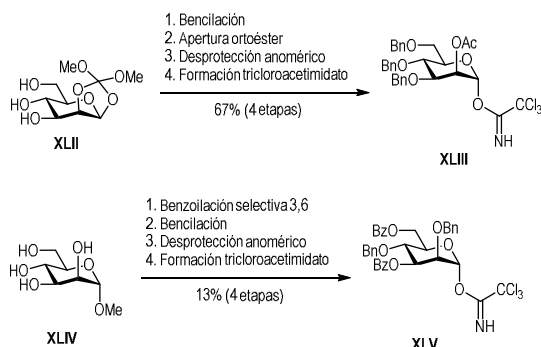
El resto de bloques de construcción se obtuvieron usando los monosacáridos **XLIII** y **XLV**, preparados a partir de los compuestos comerciales **XLII** y **XLIV**, respectivamente. Para ello, se siguieron los métodos descritos en la bibliografía.^{114, 115} (Esquema 3.10)

¹¹⁴ Mayer, T. G.; Kratzer, B.; Schmidt, R. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 2177.

¹¹⁵ Rademan, J.; Geyer, A.; Schmidt, R. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1241.



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas

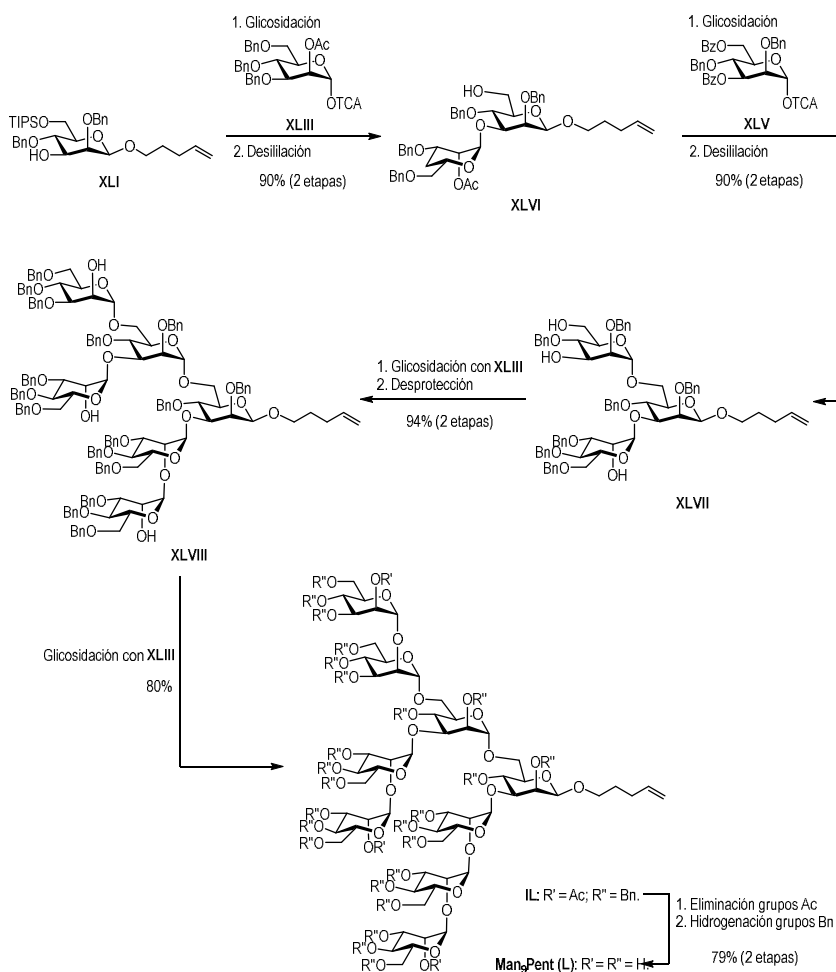


Esquema 3.10 Preparación de los monosacáridos **XLIII** y **XLV**.

A continuación, se llevaron a cabo una serie de reacciones de glicosidación y desprotección para obtener el nonasacárido **Man₉Pent (L)**, tal y como se detalla en el esquema 3.11.



Capítulo 3



Esquema 3.11 Preparación del nonasacárido Man₉Pent(L).

Tanto la estrategia descrita por Grice, como la descrita por Ratner, suponen un gran número de etapas de reacción con un rendimiento global bajo. Sin embargo, la ruta sintética descrita en nuestro grupo de investigación permite la obtención del nonasacárido Man₉ en un número relativamente pequeño de etapas y con buenos rendimientos, posibilitando la preparación de



cantidades elevadas de este oligosacárido.⁸⁷ Además, el nonasacárido fue funcionalizado en la posición anomérica del extremo reductor con un grupo azido que permite su conjugación posterior con otras biomoléculas o la construcción de sistemas multivalentes de este ligando.

3.1.1.2 Sistemas multivalentes del epítipo Man_9

Al igual que con otros carbohidratos, en el caso de *high-mannose* también se ha llevado a cabo la preparación de sistemas multivalentes para aumentar la afinidad de este ligando por su receptor. Se sabe que $Man_9GlcNAc_2$ interacciona con el anticuerpo 2G12,¹¹⁶ pero su afinidad es menor si se compara con un dímero de este oligosacárido.¹¹⁷ Sin embargo, estos estudios pusieron de manifiesto que la disminución de la flexibilidad interna de este dímero reducía su afinidad por el anticuerpo 2G12.

L. X. Wang y col.¹¹⁸ prepararon un clúster de 4 unidades de $Man_9GlcNAc_2$ sobre un esqueleto de galactosa que era capaz de inhibir la interacción entre 2G12 y gp120 mejor que una única unidad del oligosacárido (73 veces más efectivo). Sin embargo, tras conocer la estructura cristalina del fragmento F_{ab} del anticuerpo 2G12 y $Man_9GlcNAc_2$,¹⁰¹ se dieron cuenta de que era necesario modificar la rigidez, la longitud y la configuración del esqueleto para aumentar la afinidad de 2G12 por el cluster. Además, la respuesta inmune de este clúster era baja cuando se conjugaba con la proteína KLH (del inglés *Keyhole limpet hemocyan*) o el péptido TT (del inglés *Tetanus Toxoid*).¹¹⁹

Por otro lado, S. K. Wang y col.¹²⁰ llevaron a cabo el acoplamiento entre Man_4 y Man_9 funcionalizados con grupos azido y esqueletos dendríticos de diferentes generaciones con grupos alquino mediante la reacción CuAAC siguiendo una estrategia convergente. De esta manera, obtuvieron glicodendrones de tipo AB_3 de primera, segunda y tercera generación con 3, 9 y 25 unidades de Man_4 y Man_9 . A continuación, para determinar la capacidad inhibitoria, inmovilizaron Man_4 sobre una superficie y llevaron a cabo ensayos de competición con un

¹¹⁶ Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I. *Science* **2001**, *294*, 2163.

¹¹⁷ Dudkin, V. Y.; Orlova, M.; Geng, X.; Mandal, M.; Olson, W. C.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9560.

¹¹⁸ Wang, L. X.; Ni, J.; Singh, S.; Li, H. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 127.

¹¹⁹ Ni, J.; Song, H.; Wang, Y.; Stamatos, N. M.; Wang, L.-X. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 493.

¹²⁰ Wang, S.-K.; Liang, P.-H.; Astronomo, R. D.; Hsu, T.-L.; Hsieh, S.-L.; Burton, D. R.; Wong, C.-H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3690.



Capítulo 3

anticuerpo marcado fluorescentemente, junto con 2G12 y los glicodendrones de ambas oligomanosas. (Figura 3.6)

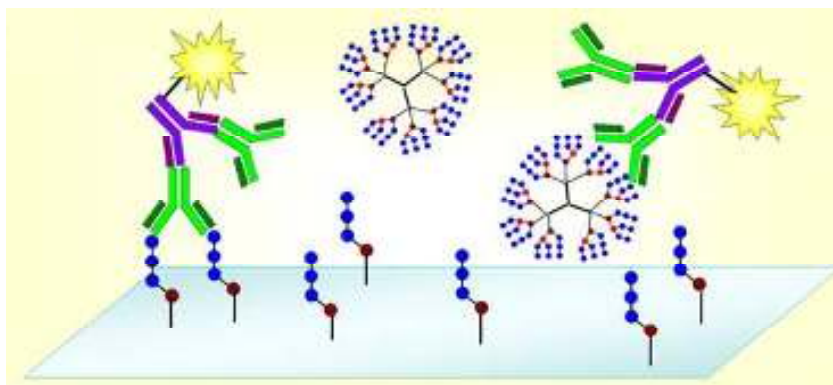


Figura 3.6 Representación gráfica del experimento de competición llevado a cabo con los diferentes glicodendrones por S. K. Wang y *col.* Imagen extraída de la referencia 120. El anticuerpo fluorescente está representado en azul y el anticuerpo verde corresponde con 2G12.

Con este experimento comprobaron que la afinidad de los glicodendrones por 2G12 era mucho mayor respecto a las oligomanosas monoméricas. Los glicodendrones de segunda (G_2) y tercera (G_3) generación presentaban valores similares de IC_{50} ($0.18 \mu M$ por Man_9 (G_2)/ $0.46 \mu M$ por Man_9 (G_3)). Sin embargo, estos valores eran mejores en comparación con el valor obtenido de IC_{50} para el glicodendron de primera generación ($11 \mu M$ por Man_9) que a su vez presentaba diferencias significativas con la oligomanosa monomérica ($1000 \mu M$). También, observaron esta tendencia mediante estudios de competición ELISA gp120/2G12. En este caso, los analitos competían por unirse al anticuerpo 2G12 con la gp120 anclada a la superficie.

Del mismo modo, se llevaron a cabo los mismos experimentos de competición ELISA pero con la lectina DC-SIGN. De esta manera, se pudo comprobar que los glicodendrones de segunda generación presentaban valores de IC_{50} en el rango nanomolar. Además, los glicodendrones de segunda generación marcados fluorescentemente eran capaces de interactuar con el receptor DC-SIGN expresado en células Jurkat y con otros receptores presentes en células dendríticas inmaduras.



De manera similar, se han preparado sistemas multivalentes con oligomanosas del tipo $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ utilizando otras plataformas. Penadés y col.,¹²¹ prepararon varias gliconanopartículas (GNPs) de oro funcionalizadas con diferentes fragmentos del $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ con espaciadores de diferente longitud, mimetizando la estructura de la glicoproteína gp120. Mediante SPR evaluaron la capacidad de (di-, tri-, tetra-, penta- y hepta-) oligomanosas tanto conjugadas a la nanopartícula de oro como sin conjugar para inhibir la interacción entre la gp120 y DC-SIGN. En estos estudios se comprobó que, tras la presentación multivalente de los diferentes oligosacáridos, se aumentaba el poder inhibitorio. En el caso del disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha$, la actividad inhibitoria de la correspondiente GNP era 20000 veces mayor respecto a la del oligosacárido libre. Todas las oligomanosas estudiadas y sus correspondientes GNPs eran capaces de inhibir completamente la interacción entre gp120 y DC-SIGN, exceptuando el trisacárido $\text{Man}\alpha 1,3(\text{Man}\alpha 1,6)\text{Man}\alpha$ y el disacárido $\text{Man}\alpha 1,4\text{Man}\alpha$. A partir de estos estudios, se pudo determinar que DC-SIGN presentaba mayor afinidad por oligomanosas que contenían enlaces terminales $\alpha 1,2$.

Por otro lado, también se observó que estas GNPs eran capaces de inhibir la *trans*-infección de células T por el virus VIH-1, con un IC_{50} en el rango nanomolar.¹²² En este caso, las GNPs funcionalizadas con el tetrasacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3\text{Man}\alpha$ mostraron mayor capacidad inhibitoria frente al resto de GNPs.

Por otro lado, las nanopartículas fueron marcadas con fluoresceína, lo que permitió comprobar a través de qué mecanismo se internalizaban dichas partículas en las células.¹²² Se observó que sólo el 50% del total de GNPs que se internalizaban lo hacían vía CLR (DC-SIGN), mientras que el resto de GNPs se internalizaban por otro mecanismo. Penadés y col. observaron mediante STD-NMR (del inglés *Saturation Transfer Difference-Nuclear Magnetic Resonance*) y SPR un efecto sinérgico con GNPs de Au funcionalizadas simultáneamente con el tetrasacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3\text{Man}\alpha$ y con el pentasacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3(\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,6)\text{Man}\alpha$.¹²³ La capacidad inhibitoria de esta GNP era superior a la que presenta la GNP funcionalizada sólo con el tetrasacárido.

¹²¹ Martínez-Ávila, O.; Hijazi, K.; Marradi, M.; Clavel, C.; Campion, C.; Kelly, C.; Penadés, S. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9874.

¹²² Martínez-Ávila, O.; Bedoya, L. M.; Marradi, M.; Clavel, C.; Alcamí, J.; Penadés, S. *ChemBioChem.* **2009**, *10*, 1806.

¹²³ Chiodo, F.; Enríquez-Navas, P. M.; Angulo, J.; Marradi, M.; Penadés, S. *Carbohydr. Res.* **2015**, *405*, 102.



Capítulo 3

Sin duda, los ejemplos anteriores pondrán de manifiesto que el diseño de nuevas plataformas multivalentes de oligomanosas es una buena estrategia para inhibir la interacción entre virus y CLR's y, por tanto, la infección de las células.

3.2 OBJETIVOS

De acuerdo con la estrategia sintética puesta a punto en nuestro laboratorio y, con el objetivo de mimetizar las glicoproteínas virales y construir sistemas multivalentes, es importante elegir un buen espaciador ya que éste influye directamente en la accesibilidad del ligando y, por lo tanto, en la afinidad por el receptor.

También, se pretende evaluar si la configuración del extremo reductor influye en el proceso de reconocimiento por parte de los receptores celulares. De esta manera, se reduciría el esfuerzo sintético que supone obtener el derivado con configuración β .

Por otro lado, teniendo en cuenta que las modificaciones post-transduccionales que sufren las glicoproteínas en el interior de las células huéspedes dan lugar a diferentes ligandos oligosacáridicos, es importante la preparación de nuevos ligandos.

Para abordar todos estos objetivos, se han propuesto los siguientes objetivos concretos:

- La síntesis del epítipo Man_9 funcionalizado en la posición anomérica del extremo reductor con un espaciador de mayor longitud con configuración β .
- La síntesis del epítipo Man_9 funcionalizado en su extremo reductor con espaciadores de menor y mayor longitud con configuración α .
- La preparación de sistemas multivalentes de los epítipos anteriormente sintetizados.
- La evaluación del efecto de la configuración del extremo reductor del ligando en la afinidad por DC-SIGN mediante polarización de fluorescencia.
- La síntesis de oligomanosas estructuralmente más sencillas y que forman parte del epítipo Man_9 .



3.3 EXPOSICIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.3.1 Preparación del epítipo Man₉ funcionalizado en el extremo reductor con un espaciador de mayor longitud con configuración β

Siguiendo el mismo procedimiento descrito por nuestro grupo de investigación,⁸⁷ se planteó la funcionalización del extremo reductor del ligando Man₉ con un espaciador de mayor longitud respecto al descrito anteriormente, provisto de un grupo azido, **Man₉N₃ (1)**. (Figura 3.7) Desde un punto de vista entrópico, a la hora de construir sistemas multivalentes es importante seleccionar un espaciador con la longitud adecuada y con determinada flexibilidad, buscando una mayor accesibilidad de los ligandos para el receptor sin un coste entrópico importante.¹²⁴

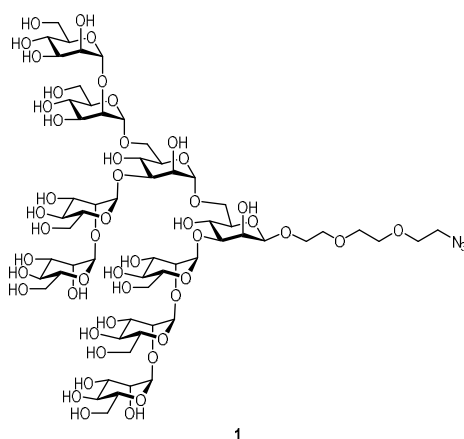


Figura 3.7 Estructura del nonasacárido Man₉ funcionalizado con un grupo azido, **Man₉N₃ (1)**.

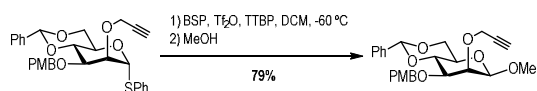
En primer lugar, se llevó a cabo la reacción de β-glicosidación para preparar el monosacárido aceptor, siguiendo las condiciones descritas por Crich *col.*⁹⁰ Estos autores describieron un procedimiento basado en tioglicósidos ortogonalmente protegidos como 4,6-*O*-bencilidenacetal, 3-*O*-*p*-metoxibencilo (OPMB) y 2-*O*-propagil éter para la obtención de β-

¹²⁴ Ordanini, S.; Varga, N.; Porkolab, V.; Thépaut, M.; Belvisi, L.; Bertaglia, A.; Palmioli, A.; Berzi, A.; Trabattoni, D.; Clerici, M. Fieschi, F.; Bernardi, A. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3816.



Capítulo 3

manósidos vía la formación de un intermedio triflato en su posición anomérica. En esta estrategia, emplearon como promotor el anhídrido triflico (Tf_2O) en presencia de 1-bencenosulfinil piperidina (BSP) y 2,4,6-tri-*tert*-butilpirimidina (TTBP) como agentes activantes. (Esquema 3.12)



Esquema 3.12 Ejemplo representativo de la reacción de β -glicosidación de manosas de Crich.

Los grupos protectores de las posiciones 2 y 3 deben ser grupos activantes y no orientadores, como éteres. Para aumentar la estereoselectividad de la reacción de glicosidación y evitar que se desestabilice la conformación que permite el ataque por la cara β (Figura 3.8), es necesario que al menos uno de los sustituyentes de las posiciones 2 y 3 del dador de glicosilo no sea voluminoso. En concreto, si el hidroxilo en la posición 2 del tiomanósido está protegido en forma de éter propargílico, se favorece el ataque por la cara β , mientras que la posición 3 debe funcionalizarse con un grupo voluminoso, como por ejemplo el PMB para asegurar la estereoselectividad deseada. La presencia de un grupo voluminoso en la posición 2, como un grupo bencilo, dificulta el ataque por la cara β ya que impide su giro y conduce a mezclas de anómeros α/β . Adicionalmente, la presencia del bencilidenacetil en las posiciones 4 y 6 genera una distorsión conformacional del anillo de piranosa adoptando una disposición espacial que favorece el ataque por la cara β . El grupo voluminoso de la posición 3 provoca que la orientación del bencilidenacetil sea hacia la cara α , por lo que impide el ataque por esta cara.

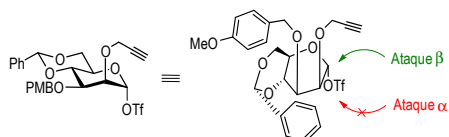


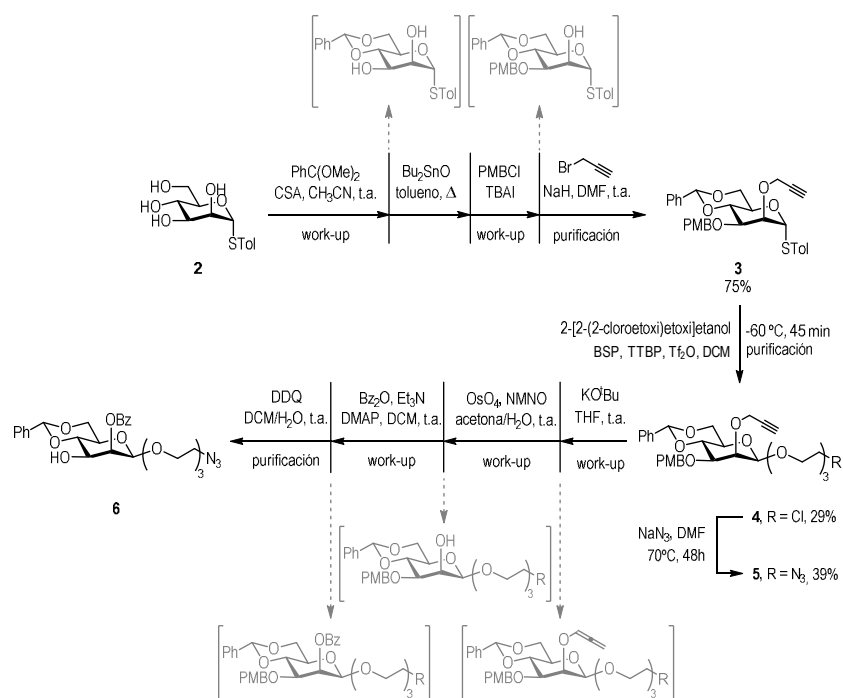
Figura 3.8 Conformación del intermedio de la reacción de β -glicosidación.

Por otro lado, la protección ortogonal de la posición 3 con PMB empleada en la aproximación de Crich permite la desprotección selectiva de esta posición. Posteriormente, esta



posición se glicosidará con un trisacárido de manosa para obtener el correspondiente tetrasacárido.

Teniendo en cuenta todo esto, la síntesis del derivado β -manósido aceptor **6** se planteó a partir del *p*-tolil-1-tio- α -D-manopiranosido (**2**) según se describe en el Esquema 3.13.



Esquema 3.13 Síntesis del derivado β -manósido aceptor **6**. Entre corchetes y de color gris se indican los intermedios que se generan en cada reacción.

De acuerdo con la estrategia sintética descrita en la referencia 87, antes de llevar a cabo la reacción de glicosidación es preciso proteger ortogonalmente todos los grupos hidroxilo del derivado tiomanósido **2**. De manera consecutiva, sin precisar etapas intermedias de purificación, se preparó el derivado tiomanósido **3** o dador de la reacción de glicosidación.



Capítulo 3

En primer lugar, se preparó el derivado tiomanósido **2** siguiendo el procedimiento descrito en la literatura.¹²⁵ Brevemente, este procedimiento consiste en la glicosidación de la manosa peracetilada con el 4-metilbencenotiol en presencia de BF₃OEt₂. Una vez desprotegido siguiendo las condiciones de Zemplén, se realizó la protección simultánea y regioselectiva de las posiciones 4 y 6, en forma de bencilidenacetil. Normalmente, para la protección de dioles en carbohidratos se suelen utilizar grupos acetales¹²⁶ que son muy accesibles y dan lugar a buenos rendimientos. La regioselectividad de esta reacción se debe a la mayor reactividad del alcohol primario en posición 6 con respecto al resto de grupos hidroxilo. Además, la formación de un acetal cíclico de seis átomos está más favorecida termodinámicamente que el correspondiente acetal de cinco átomos generado por los dioles vecinales 2-3 o 3-4.¹²⁷ La reacción entre el tiomanósido **2** y el benzaldehído dimetilacetil está catalizada por el ácido (10)-(R)-alcanforsulfónico (CSA, del inglés *10-(R)-CamphorSulfonicAcid*).¹²⁸

Tras la elaboración de la reacción y la eliminación del disolvente, se llevó a cabo la protección regioselectiva del grupo hidroxilo de la posición 3. Como los grupos hidroxilo secundarios de las posiciones 2 y 3 presentan una reactividad parecida es necesaria una estrategia que evite la obtención de una mezcla de productos procedentes de la monoprotección en 2 o 3 y la diprotección del derivado tiomanósido. Para diferenciar entre estos dos grupos hidroxilo, se formó un acetal de estaño.¹²⁹ Este tipo de acetales derivados de alcoholes de la misma naturaleza que presentan orientaciones diferentes (axial y ecuatorial), son alquilados selectivamente en la posición ecuatorial. En este caso, el grupo hidroxilo de la posición 2 se encuentra en disposición axial, mientras que el correspondiente a la posición 3 posee una disposición ecuatorial, lo que implica que se va a producir su protección de manera regioselectiva. Para llevar a cabo la formación del acetal de estaño se empleó Bu₂SnO en tolueno a reflujo. Los acetales de estaño son muy inestables, se hidrolizan con facilidad y no se puede seguir su formación por cromatografía en capa fina (c.c.f.). La reacción se dio por

¹²⁵ a) Franzyk, H.; Meldal, M.; Paulsen, H.; Bock, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1995**, 2883. b) Tai, C.-A.; Kulkarni, S. S.; Hung, S.-C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8719. c) Watt, J. A.; Williams, S. J. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1982. d) Blatter, R.; Furneaux, R. H.; Ludewig, M. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 299. e) Patil, P. S.; Lee, C.-C.; Huang, Y.-W.; Zulueta, M. M. L.; Hung, S.-C. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2605.

¹²⁶ Calinaud, P.; Gelas, J. *Preparative Carbohydrate Chemistry*; Hannesian, S., Ed.; Marcel: New York, **1997**.

¹²⁷ Pétursson, S. *J. Chem. Edu.* **1997**, *74*, 1297.

¹²⁸ Sanapala, S. R.; Kulkarni, S. S. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3578.

¹²⁹ a) Hanessian, S. *Preparative Carbohydrate Chemistry*, Taylor and Francis CRC Press, New York, **1997**. b) Grindley, T. B. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1998**, *53*, 17. c) Cherif, S.; Clavel, J.-M.; Monneret, C. *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, *17*, 1203.



finalizada cuando se observó la desaparición de un precipitado blanco generado al añadir el Bu_2SnO en la disolución que contenía el carbohidrato. A continuación, se añadió el cloruro de *p*-metoxibencilo (PMB-Cl) y Bu_4NI , obteniendo exclusivamente el derivado protegido en la posición 3.¹³⁰

El último paso de esta síntesis consecutiva para obtener el intermedio de manosa **3** ortogonalmente protegido, conlleva la protección del grupo axial de la posición 2. Como se ha mencionado anteriormente, la elección del grupo protector de esta posición es crucial para obtener el anómero β de forma exclusiva. La propargilación del hidroxilo de la posición 2, se realizó por tratamiento con bromuro de propargilo y NaH en DMF. Tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se obtuvo el derivado **3** ortogonalmente protegido con un rendimiento del 75%. En el espectro de ^1H -RMN del derivado **3** aparece la señal característica del protón del metino del acetal como singlete a 5.64 ppm y las señales características del grupo propargilo a 4.42 y 2.46 ppm correspondientes a los protones del grupo metilénico próximos al alquino y al protón del metino del alquino, respectivamente. Además, a 3.82 ppm se aprecia un singlete que corresponde a los protones del grupo metilo del grupo protector PMB.

Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de glicosidación entre el derivado tiomanósido **3** totalmente protegido y el 2-[2-(2-cloroetoxi)etoxi]etanol, que actúa como aceptor de glicosilo, siguiendo las condiciones de reacción empleadas por Crich y *col.*⁹⁴ Para ello, se empleó una mezcla de BSP/ Tf_2O /TTBP. Mediante c.c.f. del crudo de esta reacción, se observó la aparición de varios productos. Uno de ellos aparece en la línea base de la c.c.f, por otro lado, tras cromatografía en columna de gel de sílice se aisló el compuesto **4** con un rendimiento bajo, en torno al 29% y otro producto que se encontraba a mayor R_f respecto al derivado β , que correspondía con el derivado α , tal y como se observó mediante análisis por ^1H -RMN. Con la ayuda del experimento bidimensional de correlación ^1H - ^{13}C (HSQC), se pudo asignar la señal correspondiente al protón β -anomérico a un desplazamiento químico de 4.57 ppm, (Figura 3.9) en concordancia con lo descrito en la bibliografía para β -manósidos. Por el contrario, los valores para los protones anoméricos con configuración α generalmente se ubican en torno a 5 ppm.⁹⁰

¹³⁰ Sun, B.; Srinivasan, B.; Huang, X. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7072.



Capítulo 3

¹³¹ Mediante experimentos HSQC se pudo confirmar la configuración del centro anomérico a través del análisis de los valores de $J_{C,H}$. Generalmente, para los anómeros α se encuentran valores de $J_{C,H}$ en el rango de 170-175 Hz, mientras que para los β los valores oscilan entre 150 y 156 Hz.¹³² En la figura 3.9, se muestra el espectro bidimensional HSQC para el compuesto **4**, donde se observa la señal de cruce entre el protón-carbono anomérico del extremo reductor con configuración β con una $J_{C,H} = 157.3$ Hz.

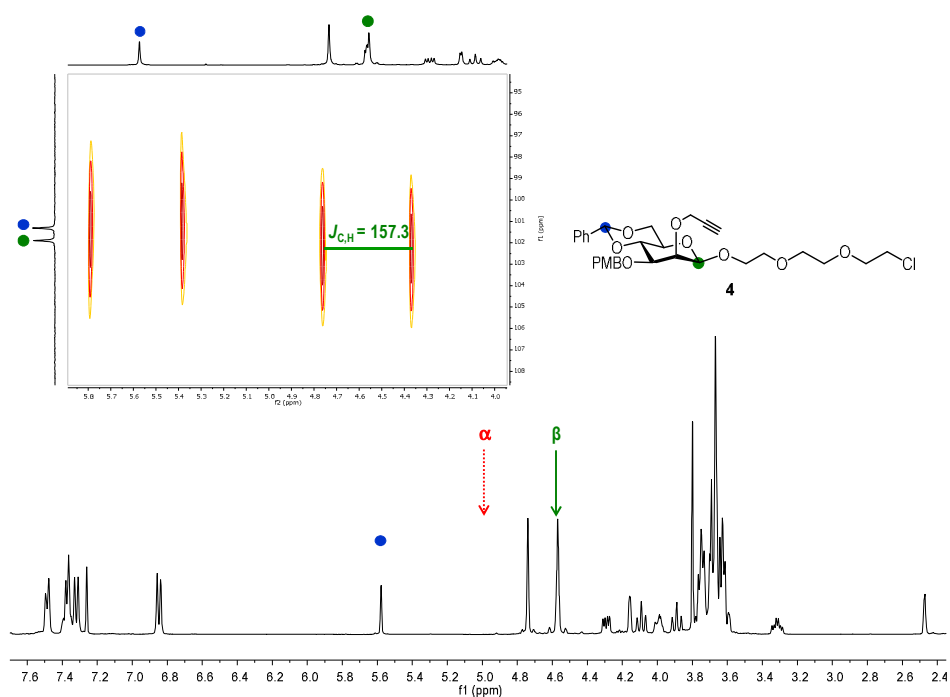


Figura 3.9 Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) del β-manósido **4**. Ampliación del experimento HSQC-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K).

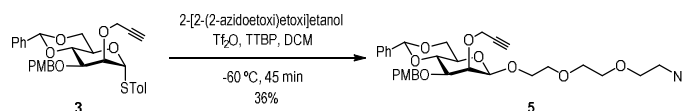
¹³¹ a) Doores, K. J.; Davis, B. G. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2692. b) Ardá, A.; Venturi, C.; Nativi, C.; Francesconi, O.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Roelens, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 64. c) Mukjerjee, C.; Mäkinen, K.; Savolainen, J.; Leino, R. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 7961.

¹³² Bock, K.; Pedersen, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1974**, 293.



A continuación, se llevó a cabo la sustitución del átomo de cloro del extremo terminal del espaciador del derivado de β -manosa por un grupo azido, usando NaN_3 y DMF como disolvente. El rendimiento de esta reacción fue más bajo de lo esperado (39%), observándose la aparición de subproductos que quedan retenidos en la línea base por c.c.f. Teniendo en cuenta que la temperatura de la reacción es elevada, se pueden producir reacciones de química click vía térmica inter- o intramoleculares entre el grupo azido del espaciador en la posición anomérica y el grupo alquino en la posición 2 de la manosa.

Para evitar la formación de estos subproductos, se decidió cambiar el espaciador empleado en la reacción de glicosidación y se utilizó como dador de glicosilo el 2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etanol. Para ello, se llevó a cabo la reacción de sustitución del átomo de cloro de este espaciador por el grupo azido en la etapa previa a la reacción de glicosidación.¹³³ Las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción de glicosidación son idénticas a las condiciones empleadas previamente. (Esquema 3.14)



Esquema 3.14 Reacción de β -glicosidación para obtener el derivado **5** en un solo paso.

Al igual que en la reacción de glicosidación previamente mencionada, se observó la aparición de varios compuestos por c.c.f., lo que provocó que el rendimiento fuese bajo en torno al 36% en los dos ensayos realizados.

Una vez obtenido el derivado β -manósido **5**, es preciso eliminar el grupo protector presente en la posición 2. Para llevar a cabo la formación del tetrasacárido precursor del nonasacárido no sería necesaria la desprotección selectiva de esta posición. El hidroxilo en posición 2 se podría mantener protegido con el grupo propargil éter incluso hasta el final de la síntesis del nonasacárido. Sin embargo, se comprobó que era inviable la eliminación de este grupo una vez formado el nonasacárido final.

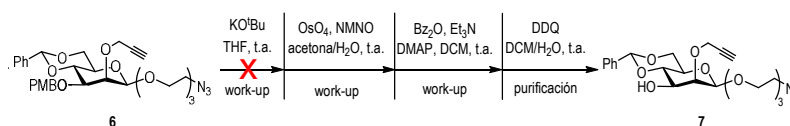
Por ello, tal y como se describe en la bibliografía, en primer lugar, se llevó a cabo la desprotección del grupo alquino. Esta desprotección conlleva en primer lugar la isomerización

¹³³ Li, J.; Zacharek, S.; Chen, X.; Wang, J.; Zhang, W.; Janczuk, A.; Wang, P. G. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 1549.



Capítulo 3

al correspondiente aleno en presencia de un ligero exceso de KO^tBu en THF y su rotura en presencia de OsO₄ y *N*-óxido de la *N*-metilmorfolina (NMNO, del inglés *N-methylmorpholine N-oxide*). Tras el tratamiento con KO^tBu, en las mismas condiciones de reacción que las descritas previamente en nuestro grupo de investigación no se observaron cambios en el R_f por c.c.f., pero se decidió continuar y se realizó la adición de OsO₄ en cantidad catalítica y un exceso de NMNO en una mezcla de acetona/H₂O (4:1) durante 1 h. A continuación, se llevó a cabo la benzoilación de la posición 2 sin apreciar cambios por c.c.f. Únicamente se observó algún cambio de R_f al añadir 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ), indicativo de que se había producido la desprotección de la posición 3. (Esquema 3.15) El espectro de ¹H-RMN del producto de reacción coincidía con el derivado β-manósido **7**, protegido en la posición 2 y desprotegido en la posición 3. En este espectro, no se observó la señal singlete de los protones del metileno unido al bencilo del grupo protector PMB (4.73 ppm) pero se seguía viendo la señal del metino del alquino (2.47 ppm) y la señal de los protones del metileno unido al alquino (4.63 ppm). Estos resultados indicaban claramente que no se había producido la eliminación del éter propargílico.

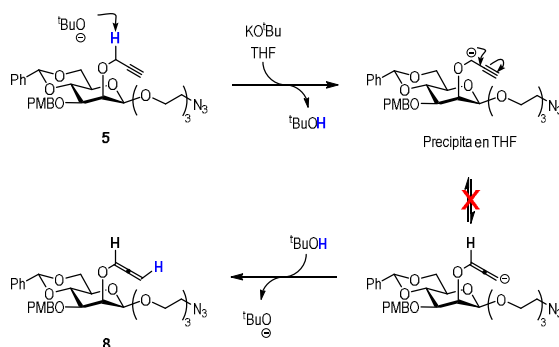


Esquema 3.15 Últimas etapas de la síntesis del aceptor β-manósido **7**.

Se llegó a la conclusión de que la etapa que no había tenido lugar era la formación del aleno **8**. Por ello, se decidió repetir de nuevo el proceso de isomerización del grupo alquino del derivado **5** aumentando el número de equivalentes de KO^tBu hasta 3 equivalentes y la dilución de la reacción, para poder disolver el sólido blanco que aparecía en el fondo del matraz de reacción tras añadir el exceso de KO^tBu. Una vez transcurridas 2 h tras la adición de la primera porción de KO^tBu, se decidió añadir otros 3 equivalentes más para ver si la reacción evolucionaba. Sin embargo, el sólido blanco no desapareció tras la adición de esta cantidad. Puede ocurrir que se produzca la precipitación del anión intermedio y que éste no se pueda protonar ni evolucionar al aleno **8**. (Esquema 3.16)



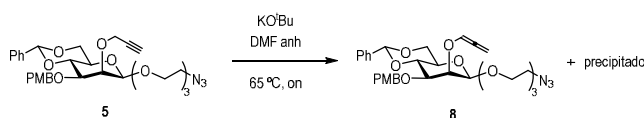
Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas



Esquema 3.16 Formación del aleno **8** a partir del alquino **5**.

Para que no se formasen precipitados, se aumentó únicamente el volumen de THF anhidro añadido, sin modificar el número de equivalentes. Sin embargo, la reacción no evolucionó hacia la formación del correspondiente aleno **8**.

Por ello, se decidió forzar las condiciones de reacción, aumentando la temperatura y utilizando un disolvente polar aprótico como la DMF que permitiese disolver el intermedio aniónico formado.¹³⁴ (Esquema 3.17) De esta manera, se logró la formación parcial del aleno **8**. Sin embargo, tras el tratamiento con agua y extracción con éter dietílico, se observó la aparición de un sólido blanquecino insoluble en DCM. En este caso, el sólido no podía corresponder con la precipitación del anión intermedio ya que éste se disolvería en presencia de agua. Se pensó entonces que este sólido podría provenir de alguna reacción que se produjera por vía térmica. En el espectro de ¹H-RMN del crudo de reacción, se observó que la integral de algunas señales del monosacárido era superior respecto a las integrales de las señales del alquino (triplete a 2.47 ppm) y el aleno (triplete a 6.94 ppm), indicativo de la presencia de algún subproducto.



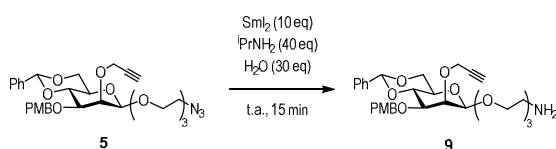
Esquema 3.17 Isomerización en DMF y a 65°C del grupo propargilo en posición 2 del derivado β-manósido **5** para dar lugar al aleno **8**.

¹³⁴ Attolino, E.; Rising, T. W. D. F.; Heideckeand, C. D.; Fairbanks, A. J. *Tetrahedron Asymm.* **2007**, *18*, 1721.



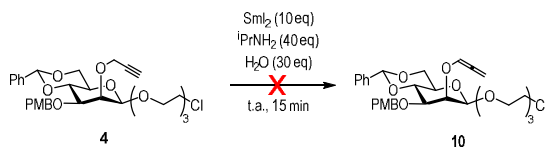
Capítulo 3

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió llevar a cabo la eliminación del grupo propargilo utilizando otras alternativas. Una de las opciones empleadas más frecuentemente se basa en la desprotección reductora en un único paso de síntesis. Para ello, se empleó SmI_2 en presencia de una amina y agua, tal y como se describe en la bibliografía.¹³⁵ (Esquema 3.18) De esta manera, tras la adición secuencial de estos reactivos, se observó por c.c.f. un único producto en la línea base. El espectro de $^1\text{H-RMN}$ reveló la presencia de una pequeña proporción de alquino; sin embargo, mediante espectrometría de masas ESI no se observó señal correspondiente al producto de partida. El valor de m/z observado corresponde a la reducción del grupo azido a amina. De hecho, en presencia del derivado de Samario (II), las azidas pueden reducirse de manera efectiva a aminas.¹³⁶



Esquema 3.18 Tratamiento del derivado 5 con SmI_2 en presencia de *N*-isopropil amina.

Para evitar que se produzca la reducción del grupo azido, se decidió llevar a cabo la reducción del correspondiente alquino a partir del derivado β -manósido 4 que presentaba un átomo de cloro en el extremo terminal del espaciador. (Esquema 3.19) Sin embargo, no se produjo la desprotección del grupo propargil éter en presencia de SmI_2 a temperatura ambiente y empleando las mismas condiciones utilizadas anteriormente.



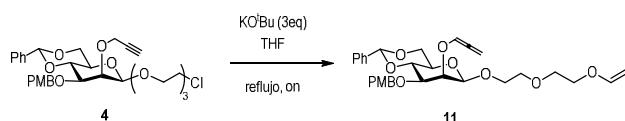
Esquema 3.19 Tratamiento del derivado 4 con SmI_2 en presencia de *N*-isopropil amina.

¹³⁵ Manabe, S.; Ueki, A.; Ito, Y. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5159.

¹³⁶ Goulaouic-Dubois, C.; Hesse, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7427.



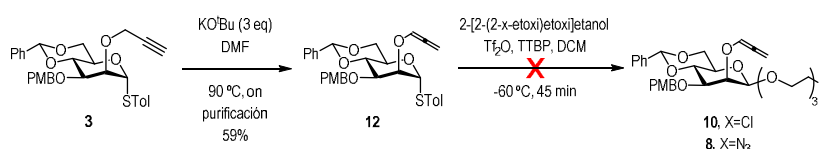
Por otro lado, se decidió forzar las condiciones de isomerización del alquino del derivado **4**, empleando exceso de KO^tBu en THF, a reflujo. De esta manera, se logró la formación del correspondiente aleno; sin embargo, también se produjo la β-eliminación del átomo de cloro del extremo reductor, obteniendo el compuesto **11**. (Esquema 3.20) En el espectro de ¹H-RMN del crudo de reacción, se observó la aparición de la señal triplete correspondiente al protón del metino del aleno a 6.93 ppm y de un nuevo doblete de dobletes a un desplazamiento de 6.48 ppm correspondiente al nuevo alqueno formado.



Esquema 3.20 Isomerización del alquino del derivado **4** a reflujo.

Teniendo en cuenta que la isomerización del grupo alquino en los derivados de β-manosa **4** y **5** conducen a subproductos no deseados cuando se fuerzan las condiciones de reacción, se decidió modificar el grupo propargil éter en el derivado tiomanosido **2** antes de llevar a cabo la reacción de β-glicosidación. (Esquema 3.21) Crich y *col.*,⁸⁷ únicamente observaron una ligera pérdida de la selectividad hacia el derivado β-manosa cuando el hidroxilo en la posición 2 de la manosa se encontraba protegido con un grupo alilo; sin embargo, el éter del aleno sigue siendo un grupo no voluminoso, no orientador y activante.

La isomerización del grupo propargil éter se llevó a cabo a partir del derivado **3** en presencia de un exceso de KO^tBu, en THF a reflujo, no observándose evolución de la reacción. Sin embargo, en DMF anhidra y en presencia de un exceso de KO^tBu a 90°C, se logró obtener el correspondiente aleno en la posición 2, compuesto **12**. (Esquema 3.21)



Esquema 3.21 Formación de los derivados **8** y **10** a partir del derivado **3**.



Capítulo 3

A continuación, se llevó a cabo la reacción de glicosidación del derivado **3** con 2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etanol empleando las condiciones usadas previamente con los derivados **4** y **5**. Tras 30 minutos de reacción, no se observó la formación del compuesto deseado, únicamente un precipitado blanco.

Por ello, se decidió llevar a cabo la reacción de glicosidación del tiomanósido **12** con el 2-[2-(2-cloroetoxi)etoxi]etanol. (Esquema 3.21) Del mismo modo, no se observó la presencia del compuesto glicosidado en el crudo de reacción por c.c.f., ni tampoco en el espectro de $^1\text{H-RMN}$.

Teniendo en cuenta todos los problemas que surgieron durante la desprotección del hidroxilo en la posición 2 y ante la imposibilidad de proteger esta posición con otro grupo, ya que no conduciría a la formación del derivado de β -manosa, se decidió llevar a cabo la preparación del anómero α .

3.3.2 Preparación del epítipo Man₉ funcionalizado en su extremo reductor con espaciadores de diferente longitud con configuración α

En el ligando natural *high-mannose*, el extremo reductor del epítipo Man₉ está unido mediante un enlace $\beta_{1,4}$ al disacárido de GlcNAc. Se ha demostrado que la parte del ligando natural que es la responsable de la interacción entre dicho ligando y la lectina DC-SIGN corresponde a la parte manosilada. El disacárido de GlcNAc puede considerarse como un componente meramente estructural. Además, teniendo en cuenta que los residuos reconocidos por diferentes lectinas o anticuerpos son principalmente el trisacárido lineal Man α 1,2Man α 1,2Man α , así como el disacárido Man α 1,2Man α , se puede pensar que la unidad de manosa presente en el extremo reductor no interviene de forma significativa en el proceso de reconocimiento y, por tanto no es crucial la configuración de su posición anomérica.

Tal y como se ha descrito, una de las principales dificultades en la obtención de este epítipo natural es la obtención del derivado β -manósido. Por ello, se planteó la síntesis del epítipo funcionalizado con configuración α en su extremo reductor. Además, para elucidar la importancia de la configuración de ese anómero, se evaluará posteriormente, mediante técnicas sencillas, el efecto de ambas configuraciones en el proceso de reconocimiento ligando-proteína.

Otro de nuestros objetivos era aumentar la longitud y la flexibilidad del espaciador, ya que estos parámetros pueden influir en la afinidad por la proteína. Por ello, se funcionalizó este



ligando en el extremo reductor con el 2-[2-(2-azidoeto)eto]etanol (espaciador de mayor longitud) **14** y con el 2-azido etanol (espaciador de menor longitud) **13**. (Figura 3.10)

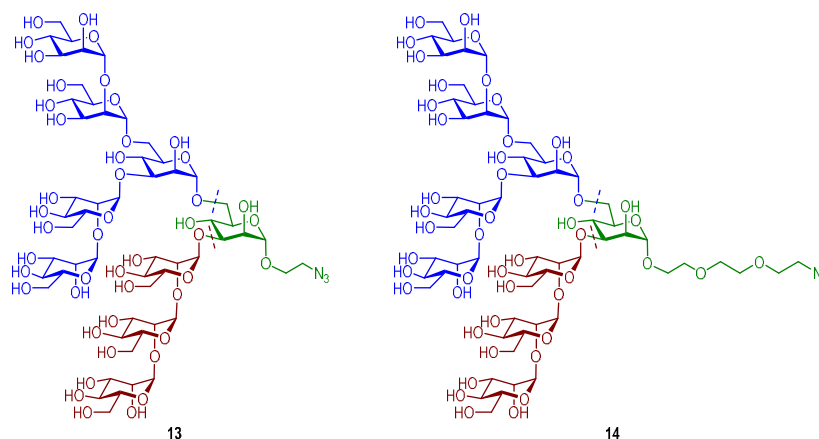


Figura 3.10 Estructura de los nonasacáridos Man₉ funcionalizados en el extremo reductor con un grupo azido con configuración α Man₉N₃ **13** y **14**.

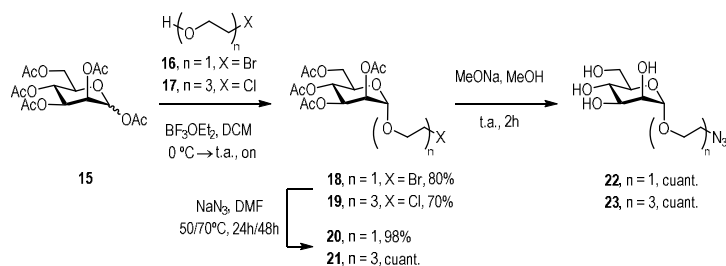
Ambos ligandos se prepararon siguiendo la estrategia sintética puesta a punto en nuestro grupo de investigación.⁸⁷ En primer lugar, fue necesario sintetizar los correspondientes α -manósidos aceptores de glicosilo funcionalizados con los espaciadores anteriormente mencionados. Para ello, se partió de los monosacáridos **22** y **23** convenientemente funcionalizados, siguiendo las condiciones descritas en la bibliografía.^{82, 137} (Esquema 3.22) Brevemente, la manosa peracetilada **15** fue glicosidada con el 2-bromoetanol (**16**) o el 2-[2-(2-azidoeto)eto]etanol (**17**), empleando un exceso de BF₃OEt₂ que actúa como promotor de las reacciones. Tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice, el derivado bromado **18** y el derivado clorado **19** se transformaron en los derivados que contienen el grupo azida **20** y **21**, respectivamente, mediante la sustitución del halógeno usando azida sódica en DMF. Por último, los derivados de manosa **20** y **21** se desprotegieron usando las condiciones de

¹³⁷ Lindhorst, T. K.; Kötter, S.; Krallmann-Wenzel, U.; Ehlers, S.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**, *1*, 823.



Capítulo 3

Zemplen,¹³⁸ en presencia de una disolución de metóxido sódico en metanol, obteniéndose los derivados de α -manosa **22** y **23** cuantitativamente.



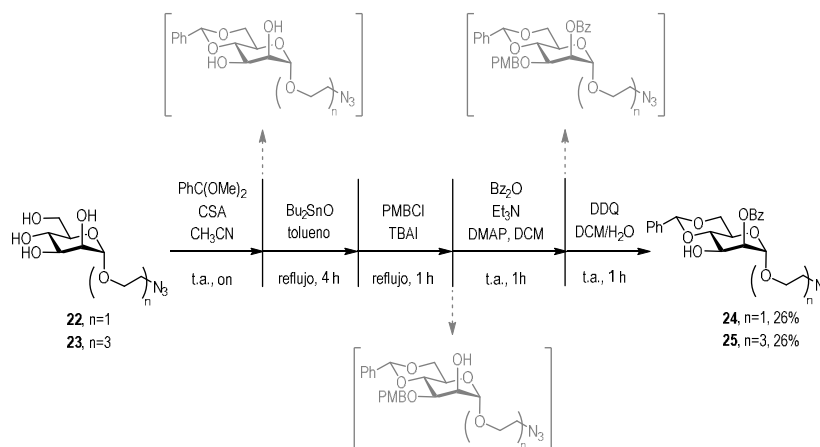
Esquema 3.22 Preparación de los derivados α -manosilados **22** y **23**.

Los aceptores **22** y **23** deben funcionalizarse convenientemente para poder desproteger cada uno de sus grupos hidroxilo de manera selectiva, manteniendo inalteradas el resto de las posiciones y así poder llevar a cabo las correspondientes reacciones de glicosidación. (Esquema 3.23) Al igual que en el caso del derivado de β -manósido **6**, interesa que el grupo hidroxilo en la posición 3 se encuentre desprotegido para que se forme selectivamente el correspondiente tetrasacárido mediante la formación del enlace $\alpha(1\rightarrow3)$. Por ello, se protegieron los hidroxilos en posición 3 con el grupo PMB y las posiciones 4 y 6 en forma de bencilidenacetal para que se pudiesen desproteger selectivamente tras la glicosidación de la posición 3. En este caso, ya no es necesario proteger la posición 2 con un éter propargílico. El grupo hidroxilo de dicha posición se protegió con un grupo benzoilo, para que pudiese ser desprotegido al final fácilmente junto con el resto de hidroxilos del nonasacárido, empleando las condiciones suaves de metanolisis de Zemplen.

¹³⁸ Zemplen, G. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1927**, *60*, 1555.



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas



Esquema 3.23 Síntesis de los derivados α -manósidos **24** y **25**.

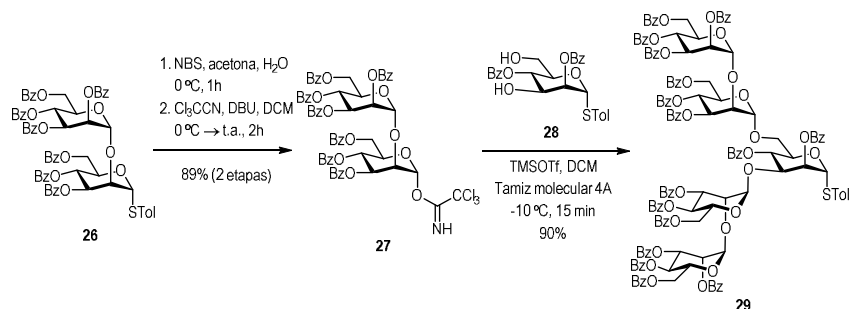
Teniendo en cuenta estas consideraciones, la ruta sintética para la obtención de cada uno de los derivados α -manósidos consta de cuatro etapas, que se llevaron a cabo de manera consecutiva. Las tres primeras etapas sintéticas son comunes a la formación del β -manósido **6**. De forma breve, primero se formó el bencilidenacetal entre las posiciones 4 y 6. A continuación, se formó un acetal de estaño entre las posiciones que quedaban libres. Posteriormente, se protegió de manera selectiva la posición 3 con disposición ecuatorial tras añadir PMBCl. La última posición que se protegió fue el hidroxilo en 2, en presencia de anhídrido benzoico (Bz_2O), Et_3N y DMAP (en cantidades catalíticas). Una vez protegidas todas las posiciones del carbohidrato, se llevó a cabo la desprotección selectiva del hidroxilo en la posición 3 con DDQ, para poder llevar a cabo posteriormente la reacción de glicosidación en esta posición. Tras el correspondiente tratamiento y purificación por columna cromatográfica en gel de sílice, se obtuvieron cada uno de los monosacáridos aceptores **24** y **25**, con un rendimiento global en ambos casos del 26%.

Una vez sintetizados los monosacáridos aceptores, fue necesario preparar los dadores de glicosilo para formar los nonasacáridos **13** y **14**. Estos bloques de síntesis, es decir, el pentasacárido y el trisacárido, se obtuvieron mediante la estrategia convergente diseñada en nuestro grupo de investigación.⁸⁷ De forma resumida, la síntesis del pentasacárido **29**, se llevó a cabo mediante una reacción de glicosidación 2+1 entre el disacárido **27** y el tiomanósido **28**



Capítulo 3

desprotegido en las posiciones 4 y 6, empleando trifluorometano sulfonato de trimetilsilo (TMSOTf) como promotor a -10°C. (Esquema 3.24)



Esquema 3.24 Análisis retrosintético de la síntesis del pentasacárido 29.

La síntesis del pentasacárido no se puede llevar a cabo con el dador o disacárido **26** funcionalizado con un grupo *S*-tolilo en la posición anomérica, ya que se pueden obtener subproductos no deseados. En las condiciones en las que se llevaría a cabo esta reacción, el monosacárido aceptor **28** que presenta un grupo *S*-tolilo en la posición anomérica puede dar reacciones de autoglicosidación. Por ello, la reacción de glicosidación se llevó a cabo con el disacárido **27** con la posición anomérica activada como tricloroacetimidato. El disacárido **27** se obtuvo a partir del derivado **26** funcionalizado con el grupo *S*-tolilo tras dos sencillos pasos de síntesis.¹³⁹ La primera etapa consistió en la desprotección selectiva del carbono anomérico del disacárido **26**. Para ello, se llevó a cabo la formación del correspondiente bromuro e hidrólisis *in situ*, usando *N*-bromosuccinimida (NBS) como agente de bromación en una mezcla de acetona/H₂O (9:1). Tras purificación cromatográfica, se trató el intermedio con tricloroacetitrilo usando DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno) como base, siguiendo el procedimiento descrito por Schmidt.¹⁴⁰ El compuesto **27** se aisló por cromatografía en columna gel de sílice con un rendimiento global de ambos pasos sintéticos del 89%.

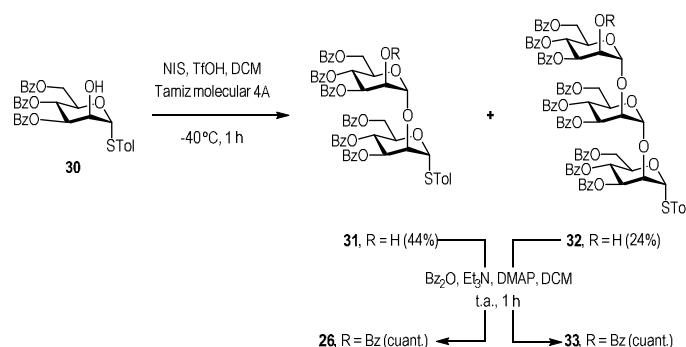
Tanto el disacárido **26**, necesario en la síntesis del pentasacárido **29**, como el trisacárido **33**, dador de glicosilo necesario en la síntesis de los nonasacáridos, se obtuvieron mediante autoglicosidación del derivado tiomanósido **30** con el grupo hidroxilo desprotegido en la

¹³⁹ Amin, M. N.; Huang, W.; Mizanur, R. M.; Wang, L.-X. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14404.

¹⁴⁰ Schmidt, R. R. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21.



posición 2. (Esquema 3.25) El monosacárido **30** actúa como ligando aceptor y dador de forma simultánea, siguiendo la estrategia sintética descrita previamente por Wong y *col.*¹⁴¹ Esta aproximación fue modificada convenientemente para obtener el disacárido **31** y el trisacárido **32** en una relación aproximada 2:1. Teniendo en cuenta que el disacárido **26** va a ser empleado en una glicosidación tipo 2+1, mientras que el trisacárido **33** se utilizará en una reacción de glicosidación 1+1 con los correspondientes aceptores, se necesita el doble de cantidad de disacárido **26** frente al trisacárido **33**. Esta proporción se consigue variando las cantidades añadidas de *N*-Iodosuccinimida (NIS) y ácido triflúrico (TfOH).



Esquema 3.25 Autoglicosidación del monosacárido **30**.

Antes de llevar a cabo la reacción de glicosidación con los correspondientes aceptores para dar lugar al pentasacárido **29** y a los tetrasacáridos **36** y **37**, es necesario proteger los grupos hidroxilo de la posición 2 de los extremos no reductores del disacárido **31** y del trisacárido **32** obtenidos en la autoglicosidación de Wong. Estas posiciones se benzoilaron con Bz_2O , Et_3N y DMAP en DCM.

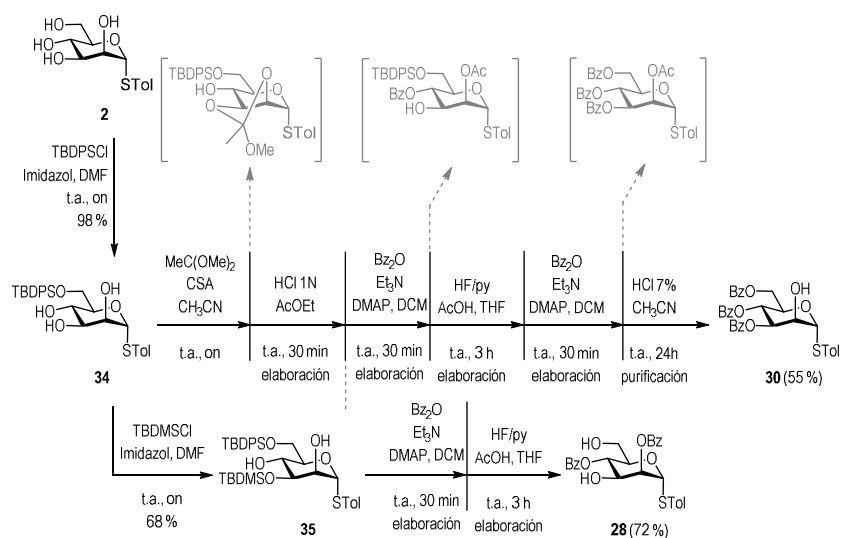
La preparación de los intermedios **28** y **30** se llevó a cabo a partir del derivado **34**, que posee en la posición 6 el grupo protector voluminoso, *tert*-butildifenilsilil éter (TBDPS). (Esquema 3.26) La protección de este grupo hidroxilo se llevó a cabo mediante reacción del tiomanósido **2** con el cloruro de *tert*-butildifenilsililo (TBDPSCI), en presencia de imidazol. Tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se hizo reaccionar el tiomanósido **34** con el

¹⁴¹ Lee, H.-K.; Scanlan, C. N.; Huang, C.-Y.; Chang, A. Y.; Calarese, D. A.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M.; Burton, D. R.; Wilson, I. A.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1000.



Capítulo 3

cloruro de *tert*-butildimetilsililo (TBDMSCl), protegiéndose la posición 3 más reactiva y menos impedida estéricamente. El intermedio **35** se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, y tras dos etapas consecutivas se obtuvo el derivado deseado **28**. En primer lugar, fue necesario benzoilar el resto de las posiciones libres del derivado **35** y, por último, en condiciones ácidas, se llevó a cabo la desprotección selectiva de las posiciones sililadas en una disolución del complejo HF/piridina y en presencia de AcOH. El rendimiento de estas reacciones consecutivas fue del 72%.



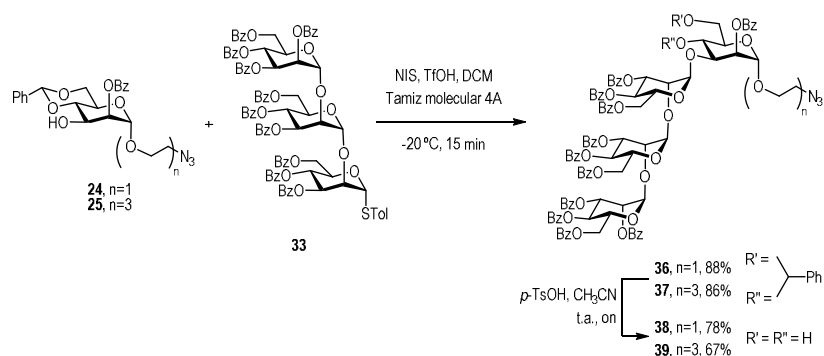
Esquema 3.26 Síntesis de los aceptores de glicosilo **28** y **30**.

El otro bloque de construcción, el aceptor **30** se preparó en 4 etapas consecutivas de reacción, obviando la síntesis por etapas y empleando como producto de partida nuevamente el derivado **34**. La estrategia se inició con la formación de un ortoéster entre los hidroxilos de las posiciones 2 y 3 del derivado **34**, mediante reacción con el trimetil ortoacetato y CSA (como catalizador). El tratamiento del ortoéster con una disolución de HCl 1M dio lugar a la hidrólisis parcial, desprotegiéndose únicamente la posición 3. Tras benzoilar las posiciones 3 y 4 libres, con Bz₂O, Et₃N y DMAP, se desprotegió la posición 6, en una disolución del complejo HF/piridina y en presencia de AcOH, manteniéndose inalteradas el resto de las posiciones. Tras



benzoilar la posición 6, se llevó a cabo la desprotección selectiva del grupo acetilo de la posición 2 usando una disolución de HCl al 7% en MeOH en 24h. El rendimiento global de todas las etapas consecutivas llevadas a cabo para obtener el derivado **30** fue del 55%.

Por otro lado, se llevó a cabo la reacción de glicosidación entre el trisacárido **33** y cada uno de los aceptores **24** o **25**, empleando 1.5 eq de NIS y 0.2 eq de TfOH, a -20°C. (Esquema 3.27) De esta manera, se obtuvieron los correspondientes tetrasacáridos **36** y **37** con buenos rendimientos del 88% y del 86%, respectivamente.



Esquema 3.27 Síntesis de los tetrasacáridos **36** y **37**.

En el espectro de ^1H -RMN del tetrasacárido **36**, las señales de los protones anoméricos del extremo reductor con configuración α aparecían a 5.57, 5.35, 5.05 y 4.91 ppm. (Figura 3.11) También se observa la señal característica del -CH- del grupo bencilidenacetil a 5.49 ppm como un singlete ancho. De forma análoga, se observaron estas mismas señales en el espectro de ^1H -RMN del tetrasacárido **37**.



Capítulo 3

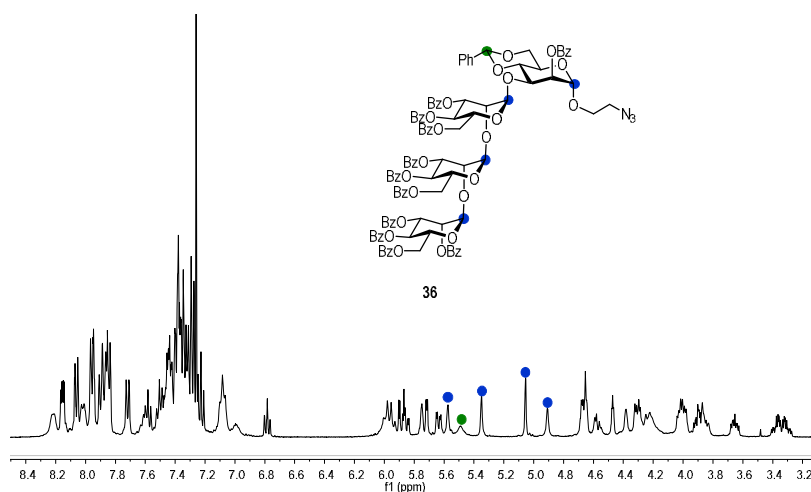


Figura 3.11 Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) del tetrasacárido **36**.

El último paso de la síntesis de los tetrasacáridos aceptores de glicosilo consistió en la desprotección del grupo bencilidenacetal de los compuestos **36** y **37**, usando un exceso de ácido *p*-toluenosulfónico (TsOH) en CH₃CN. (Esquema 3.27) Tras purificación por cromatografía en columna de gel de sílice se obtuvieron los correspondientes tetrasacáridos **38** y **39** convenientemente desprotegidos con rendimientos del 78% y del 67%, respectivamente. En los espectros de ¹H-RMN se pudo observar la desaparición de la señal del protón del metino del acetal y la reducción del número de protones aromáticos. Además, la estructura de estos compuestos se analizó por espectrometría de masas. En el espectro de masas ESI del tetrasacárido **39**, se observó la señal correspondiente a los iones [M+Na]⁺: *m/z* 1991.2 y [M+2Na]²⁺: *m/z* 1006.5. (Figura 3.12) Así mismo, en el espectro de masas ESI del tetrasacárido **38** se observaron las señales correspondientes a los iones [M+Na]⁺: *m/z* 1903.2 y [M+2Na]²⁺: *m/z* 962.5.



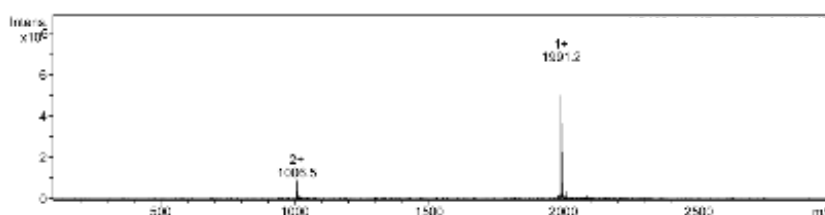
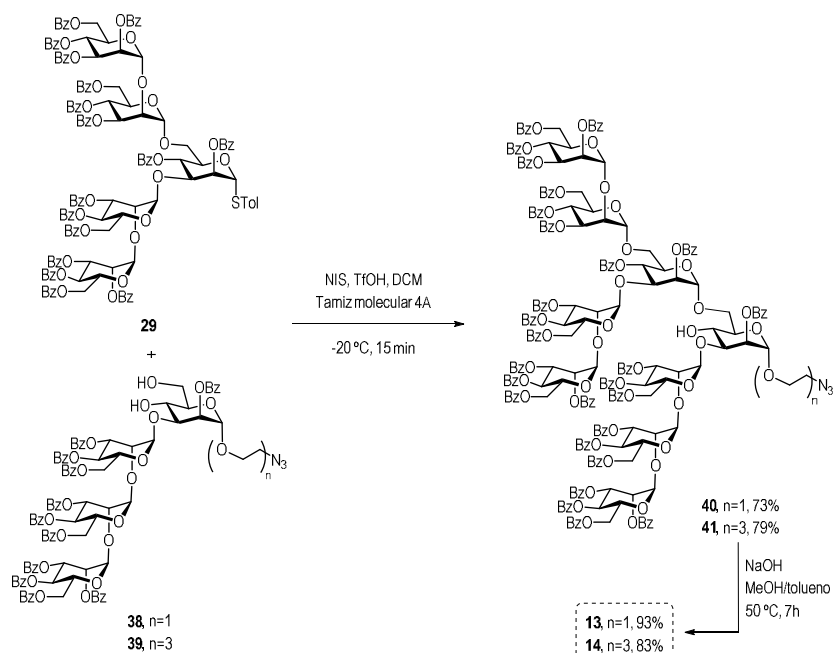


Figura 3.12 Espectro de masas ESI del tetrasacárido **39**.

La siguiente etapa de la ruta sintética consistió en la reacción de glicosidación entre los tetrasacáridos **38** y **39** como aceptores glicosídicos y el pentasacárido **29** como dador de glicosilo, para obtener los correspondientes nonasacáridos protegidos **40** y **41**. (Esquema 3.28) Las condiciones de reacción empleadas fueron las mismas que se usaron para la obtención de los tetrasacáridos, NIS y TfOH. Tras purificación cromatográfica en columna de gel de sílice se obtuvo el producto **40** con un rendimiento del 73%, mientras que el producto **41** se obtuvo con un rendimiento del 79%.



Capítulo 3



Esquema 3.28 Síntesis de los nonasacáridos **13** y **14**.

A pesar de que existen dos posiciones libres en el tetrasacárido, la reacción de glicosidación tiene lugar exclusivamente en la posición 6, ya que esta posición es mucho más reactiva. Además, una vez funcionalizada esta posición, es muy complicado que se produzca una segunda reacción de glicosidación en la posición 4 debido al impedimento estérico.

La estructura de estos compuestos fue confirmada por RMN y espectrometría de masas, observándose las señales correspondientes al ión $[M+2Na]^{2+}$: m/z 2200.1 del compuesto **40** y a los iones $[M+2Na]^{2+}$: m/z 2244.7 y $[M+3Na]^{3+}$: m/z 1503.9 del compuesto **41**.

Por último, se llevó a cabo la desprotección de los grupos benzoilo del nonasacárido con una disolución de NaOH 2M, en MeOH y tolueno (4:1). (Esquema 3.28) De esta manera, se obtuvieron los oligosacáridos desprotegidos **13** y **14**, con un rendimiento del 93% y del 83%, respectivamente. Mediante RMN se comprobó que se habían desprotegido todos los grupos hidroxilo, hecho que se confirmó mediante espectrometría de masas, observándose las señales



correspondientes a los iones $[M+Na]^+$: m/z 1568.2 y $[M+2Na]^{2+}$: m/z 795.5 del compuesto **13** y a los iones $[M+Na]^+$: m/z 1656.2 y $[M+2Na]^{2+}$: m/z 839.5 del compuesto **14** (Figura 3.13).

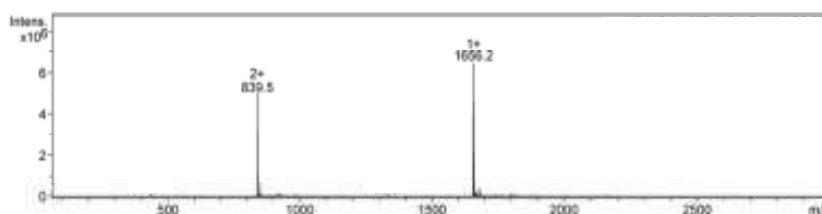


Figura 3.13 Espectro de masas ESI del nonasacárido **14**.

Los oligosacáridos totalmente desprotegidos **13** y **14** funcionalizados con un grupo azido pueden ser acoplados mediante reacción CuAAC o SPAAC a otras biomoléculas o estructuras de interés. En la presente tesis doctoral, se han construido sistemas multivalentes con estas moléculas, que se describirán en detalle en las siguientes secciones.

3.3.3 Presentación multivalente de los epítomos de Man₉

La presentación multivalente de carbohidratos es una de las estrategias más importantes para conseguir mejorar sustancialmente la afinidad de estos ligandos por las lectinas. Por ello, se planteó la preparación de sistemas multivalentes con los oligosacáridos cuya síntesis se ha descrito previamente. Las estructuras dendríticas son una de las plataformas más adecuadas para este fin. En concreto, se ha llevado a cabo la síntesis de glicodendrones trivalentes con un grupo azido en el punto de ramificación y/o focal, empleando la estrategia convergente diseñada en nuestro grupo de investigación, basada en la química de acoplamiento CuAAC. De esta manera, existe la posibilidad de conjugar estas moléculas a otros sistemas, biomoléculas o marcadores fluorescentes que presenten un grupo alquino en su estructura.

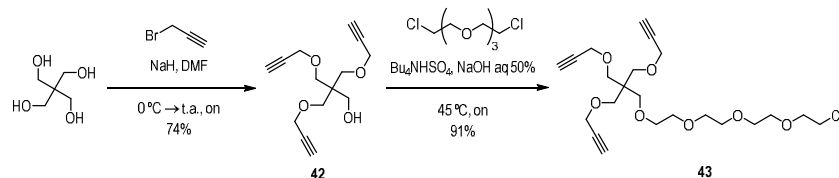
Brevemente, para la preparación del núcleo crecimiento **43** fue necesario la alquilación de tres de los cuatro grupos hidroxilo del pentaeritritol comercial, en condiciones de eterificación de Williamson, utilizando hidruro sódico en DMF y bromuro de propargilo como agente alquilante.¹⁴² (Esquema 3.29) A continuación, se funcionalizó el grupo hidroxilo libre del núcleo

¹⁴² Mollard, A.; Zharov, I. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 10172.



Capítulo 3

42 con un espaciador que presentaba un haluro terminal que será más tarde sustituido por un grupo azido. En concreto, se utilizó un derivado de tetraetilenglicol diclorado, disponible comercialmente, usando condiciones de catálisis de transferencia de fase, en presencia de hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio y una disolución acuosa de NaOH al 50% p/v.¹⁴³



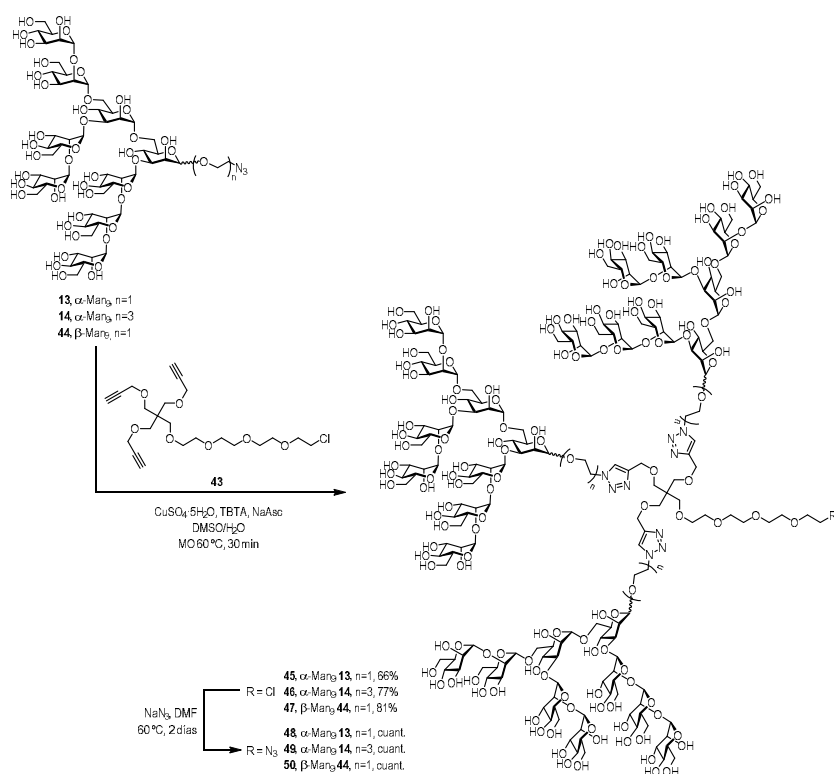
Esquema 3.29 Síntesis del núcleo de crecimiento **43**.

Una vez preparado el esqueleto **43** se llevó a cabo la reacción CuAAC con los nonasacáridos **13** y **14** funcionalizados con un grupo azido en su extremo reductor, así como con el oligosacárido de configuración β en el extremo reductor, **44**. (Esquema 3.30) De esta manera, se obtuvieron los compuestos multivalentes que permitirán estudiar la influencia de la configuración de la unidad sacarídica situada en el extremo reductor y de la longitud del espaciador unido al nonasacárido, en la afinidad por los receptores celulares o lectinas. En la reacción de acoplamiento, se añadió un ligero exceso de cada uno de los ligandos para favorecer la funcionalización de todos los grupos alquino presentes en el esqueleto. Se utilizó $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como fuente de Cu (II), NaAsc como agente reductor *in situ* de Cu (II) a Cu (I) y TBTA como agente estabilizador de Cu (I). Esta reacción se llevó a cabo bajo irradiación de microondas (MO) a 60°C durante 30 minutos, en una mezcla de DMSO/ H_2O (1:1). Transcurrido este período, fue necesario eliminar las sales de cobre ya que este metal podría causar problemas de citotoxicidad, añadiendo una pequeña proporción de resina QuadraSil[®] MP. A continuación, se purificaron cada uno de los glicodendrones mediante cromatografía de exclusión de tamaño Sephadex G-50 en $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 9:1.

¹⁴³ Ortega-Muñoz, M.; Lopez-Jaramillo, J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 2410.



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas



Esquema 3.30 Síntesis de los dendrones trivalentes de Man₉ **48**, **49** y **50**.

En los espectros de ¹H-RMN de los compuestos **45**, **46** (Figura 3.14) y **47**, se observó la aparición de la señal del metino del nuevo triazol, a 8.04 ppm, así como una señal a 4.63 ppm correspondiente al metileno en posición α al triazol. La relación entre los protones anoméricos del Man₉ y la señal del triazol es 9:1, lo que demuestra la funcionalización completa.



Capítulo 3

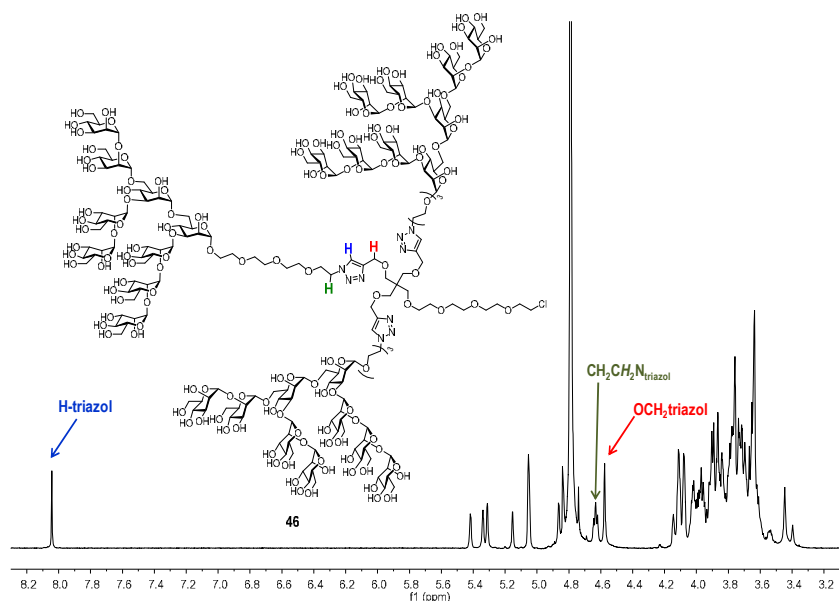


Figura 3.14 Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , 298 K) del dendrón trivalente **46**.

Mediante espectrometría de masas, se confirmó la estructura de los compuestos deseados, así como la ausencia de los nonasacáridos de partida. A modo representativo, en el espectro de masas (ESI) del compuesto **46** (Figura 3.15), se observaron únicamente las señales correspondientes a los iones $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$: m/z 2692.8, $[\text{M}+3\text{Na}]^{3+}$: m/z 1803.1 y $[\text{M}+4\text{Na}]^{4+}$: m/z 1357.2.

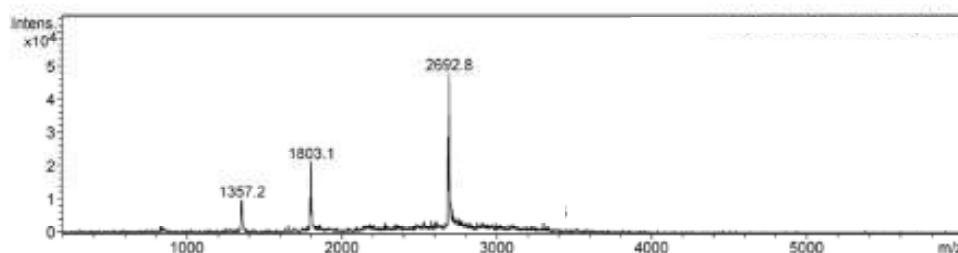


Figura 3.15 Espectro de masas ESI del dendrón trivalente **46**.



Por último, se procedió a la sustitución del átomo de cloro presente en la posición focal por un grupo azido. (Esquema 3.30) Para ello, la reacción se llevó a cabo con un exceso de azida sódica en DMF a 70°C durante dos días. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía por exclusión por tamaños Sephadex G-50 en H₂O/MeOH 9:1, obteniéndose los correspondientes glicodendrones **48**, **49** y **50**.

La sustitución completa del átomo de cloro por azida se confirmó mediante espectrometría de masas ESI y RMN, observándose en el espectro de ¹³C-RMN del glicodendrón **49** la desaparición de la señal a 43.2 ppm correspondiente al metileno en posición alfa respecto al átomo de cloro. (Figura 3.16) Además, en este espectro apareció una nueva señal a 50.1 ppm que corresponde con el átomo de carbono del metileno unido al grupo azido próxima a la señal de los carbonos en α unidos a los átomos de nitrógeno de los triazoles.

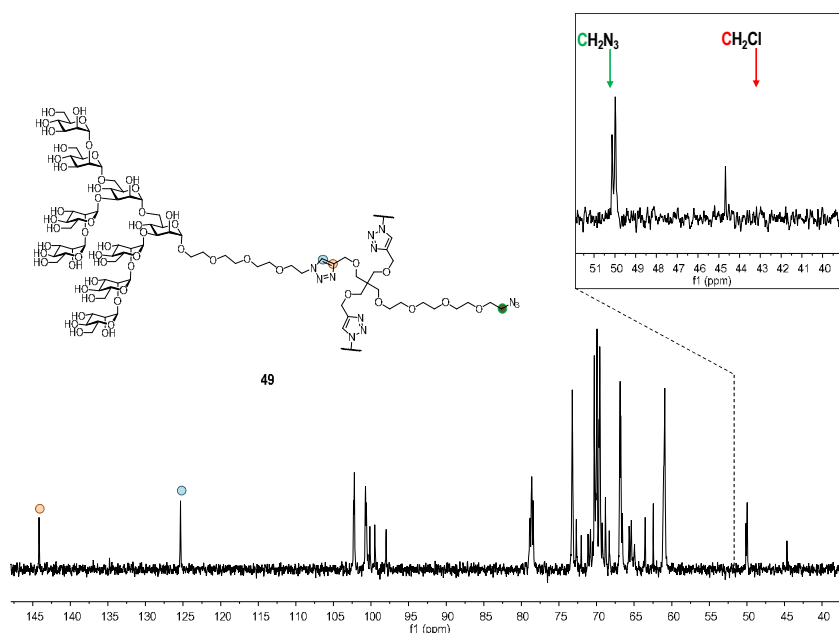


Figura 3.16 Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O, 298 K) del dendrón trivalente **49**.



Capítulo 3

Por otro lado, tal y como se describe en el capítulo 4 y en el capítulo 5 de esta tesis doctoral, se ha explorado la presentación multivalente de estos oligosacáridos construyendo neoglicoproteínas y nanogeles poliméricos, respectivamente.

3.3.4 Evaluación del efecto de la configuración del extremo reductor del Man₉ en la interacción con DC-SIGN mediante polarización de fluorescencia

La polarización de fluorescencia es una técnica que puede ser utilizada para el análisis del proceso de interacción entre una sustancia con una masa molecular baja y un receptor de elevada masa molecular.¹⁴⁴

Cuando una molécula fluorescente se excita con luz polarizada en una dirección del plano, la luz emitida por ella está despolarizada debido a su movimiento molecular en disolución. (Figura 3.17) La despolarización de la luz depende de la velocidad de rotación de la molécula fluorescente en la disolución, que está inversamente relacionada con su peso molecular. Por ello, la luz emitida por una molécula de bajo peso molecular que puede moverse con rapidez en disolución está altamente despolarizada, siendo el valor de polarización bajo. Sin embargo, si la molécula interacciona con una molécula de elevado peso molecular, como puede ser una proteína, el movimiento del complejo ligando-proteína será más lento y la luz emitida está polarizada, por lo que el valor de polarización es elevado. El incremento del valor de polarización entre los dos estados depende de la interacción (número de enlaces) y de la constante de afinidad entre receptor y ligando.

¹⁴⁴ Kakehi, K.; Oda, Y.; Kinoshita, M. *Anal. Biochem.* **2001**, 297, 111.



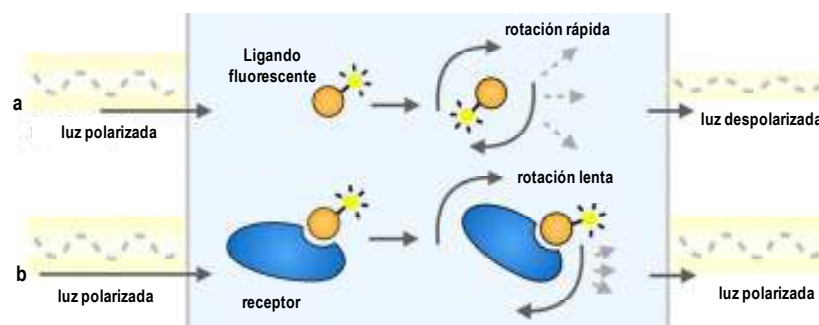


Figura 3.17 Representación gráfica de la polarización de fluorescencia.

Para llevar a cabo estos estudios, se utiliza un espectrofotómetro fluorescente que presenta dos filtros de polarización en las dos direcciones de la luz (excitación y emisión) colocados perpendicularmente. La polarización de fluorescencia se observa usando luz visible, ya que la luz ultravioleta no es capaz de atravesar los filtros de polarización. La polarización de fluorescencia se calcula a partir de la intensidad de fluorescencia, en ambos planos de la luz, que es capaz de atravesar cada uno de los filtros. Para realizar estos estudios se pueden utilizar placas de microtitulación con diferente número de pocillos, desde 96 pocillos, pasando por 384 y hasta 1536 pocillos.

Este experimento se basa en la medición del valor de polarización de fluorescencia de diferentes disoluciones que presentan, a una misma concentración de ligando fluorescente, cantidades crecientes de la proteína. Representando los valores obtenidos experimentalmente de polarización de fluorescencia (y) frente a la concentración de receptor añadida (x), se puede construir una isoterma de afinidad. A continuación, mediante un análisis de regresión no lineal, se obtiene el valor de la constante de disociación (K_D) de la interacción entre el ligando fluorescente y el receptor a partir de la siguiente ecuación:

$$y = \frac{\Delta P_{\text{máx}} x}{K_D + x}$$

Una de las ventajas que presenta esta técnica es que, a diferencia de otros métodos, no requiere la inmovilización de la proteína o el ligando en una superficie para estudiar el proceso



Capítulo 3

de interacción, por lo que se evitan efectos derivados del anclaje de la biomolécula a una superficie. Otra gran ventaja que presenta esta técnica es que permite realizar varias medidas empleando una cantidad muy pequeña de muestra. Además, se pueden llevar a cabo ensayos de competición con ligandos no fluorescentes para evaluar la afinidad que presentan frente a un receptor en concreto, mediante experimentos de competición.

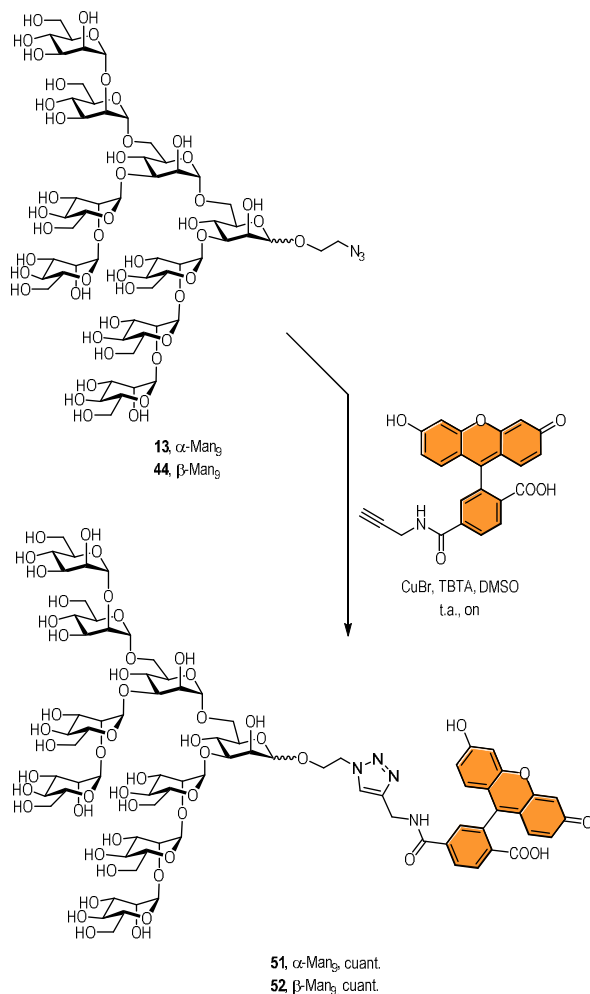
En esta tesis doctoral, se han llevado a cabo experimentos de polarización de fluorescencia para evaluar la afinidad de los epítomos de Man₉ **13** y **14** por DC-SIGN. En la bibliografía no se ha estudiado la interacción entre este ligando y DC-SIGN mediante esta técnica. Sin embargo, utilizando ensayos de competición en fase sólida, se ha descrito que *high-mannose* presenta una alta afinidad por DC-SIGN CRD, siendo el valor de la constante de inhibición de 16 μM .^{33b} En estos experimentos, Mitchell y *col.* llevaron a cabo la inmovilización de la proteína y añadieron los ligandos objeto de estudio en presencia de ¹²⁵I-Man₃₀-BSA. Años más tarde, se confirmaron los valores obtenidos en esos experimentos mediante el uso de Magic Tag[®].¹⁴⁵ Para ello, se inmovilizaron el oligosacárido Man₉(GlcNAc)₂ y otros monosacáridos en una superficie modificada químicamente con diferentes espaciadores y se expusieron a la lectina DC-SIGN conjugada con biotina. A partir de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo de la biotina conjugado con el isotiocianato de fluoresceína, verificaron la gran afinidad que presenta este ligando por DC-SIGN.

Los estudios de interacción entre los epítomos **13** y **14** con diferente configuración en el extremo reductor se llevaron a cabo en presencia del dominio extracelular (ECD) de DC-SIGN proporcionado por el grupo de investigación del profesor Frank Fieschi, del *Institute of Structural Biology* en Grenoble, Francia. Para ello, en primer lugar, fue necesario marcar fluorescentemente los ligandos. Actualmente, existe un amplio abanico de moléculas fluorescentes disponibles comercialmente, pero a la hora de elegir la más adecuada para estos experimentos, es importante considerar que sus máximos de absorción y de emisión deben aproximarse a las longitudes de onda de los filtros de polarización que tiene el equipo que se va a usar. En este caso, se decidió utilizar fluoresceína, cuyo máximo de emisión se encuentra a una longitud de onda (λ_{em}) de 513 nm. En concreto, se empleó una fluoresceína disponible comercialmente que está modificada con un grupo alquino, lo que permite su posterior acoplamiento a los diferentes ligandos mediante reacciones CuAAC.

¹⁴⁵ Dilly, S. J.; Clark, A. J.; Mitchell, D. A.; Marsh, A.; Taylor, P. C. *Mol. BioSyst.* **2011**, 7, 116.



La reacción de acoplamiento CuAAC con cada uno de los ligandos **13** y **44**, se llevó a cabo en presencia de CuBr (I) y TBTA en DMSO. (Esquema 3.31)



Esquema 3.31 Reacción de acoplamiento click para sintetizar los nonasacáridos marcados fluorescentemente **51** y **52**.



Capítulo 3

A continuación, se añadió la resina QuadraSil® MP para eliminar las sales de cobre. Los compuestos fluorescentes fueron purificados por cromatografía de exclusión por tamaños mediante Sephadex LH20 en H₂O/MeOH 9:1.

En cada uno de los espectros de ¹H-RMN de los compuestos fluorescentes **51** y **52**, se pudo observar la aparición de las señales características de la fluoresceína, así como la aparición de la señal del protón del metino del triazol formado entorno a 8 ppm. También, se observan las señales correspondientes a los protones próximos al triazol (OCH₂CH₂Ntriazol) como multiplete a 4.59 ppm. (Figura 3.18)

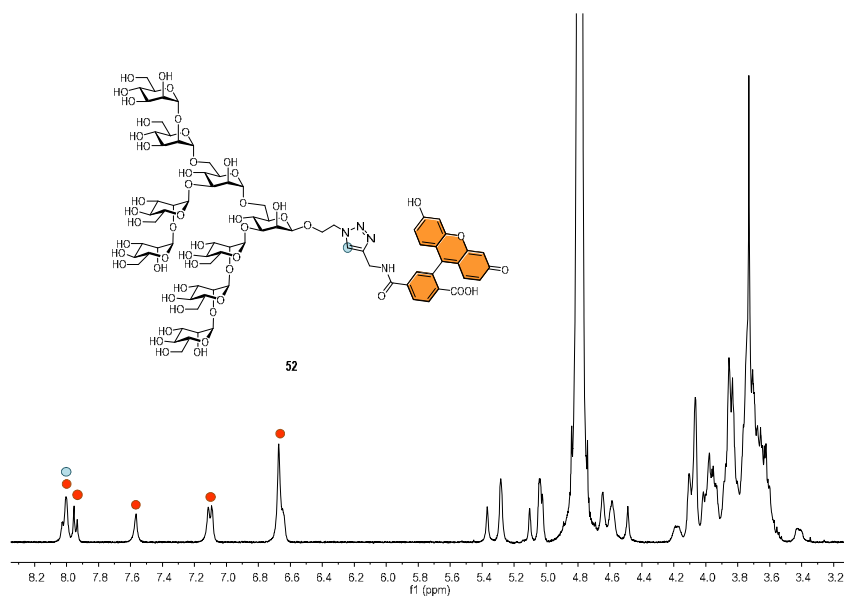


Figura 3.18 Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, 298 K) del nonasacárido marcado **52**. Las bolas de color naranja señalan los protones de la molécula de fluoresceína. La bola azul corresponde con el protón del metino del triazol.

Con el espectro de HSQC, se pudieron asignar las señales más representativas de los átomos de carbono de los compuestos fluorescentes. (Figura 3.19) En el espectro de HSQC, se observó que las señales de los protones comprendidas entre 6.5 ppm y 8.0 ppm, que corresponden con las señales de la fluoresceína y del triazol nuevo formado, correlacionaban con átomos de



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas

carbono cuyo desplazamiento químico se encontraba en la zona del espectro de carbono entre 100 ppm y 140 ppm. Además, se pudo asignar las señales correspondientes a los protones del metileno situado en alfa al grupo amino de la amida unida a la fluoresceína (triazolCH₂NHCO) y del metileno en alfa al triazol formado (OCH₂CH₂N_{triazol}), a 4.65 ppm y 4.59 ppm, respectivamente debido a que estas señales correlacionan con las señales de los átomos de carbono a 35.6 ppm y 50.4 ppm.

Bajo condiciones normales de fase, en el espectro de ¹³C-RMN no se observaron las señales de carbono de la molécula de fluoresceína, independientemente del disolvente deuterado empleado. Este hecho puede deberse a la naturaleza hidrófoba de la molécula de fluoresceína que puede dar lugar a interacciones de tipo π, con el consiguiente ensanchamiento de las señales.

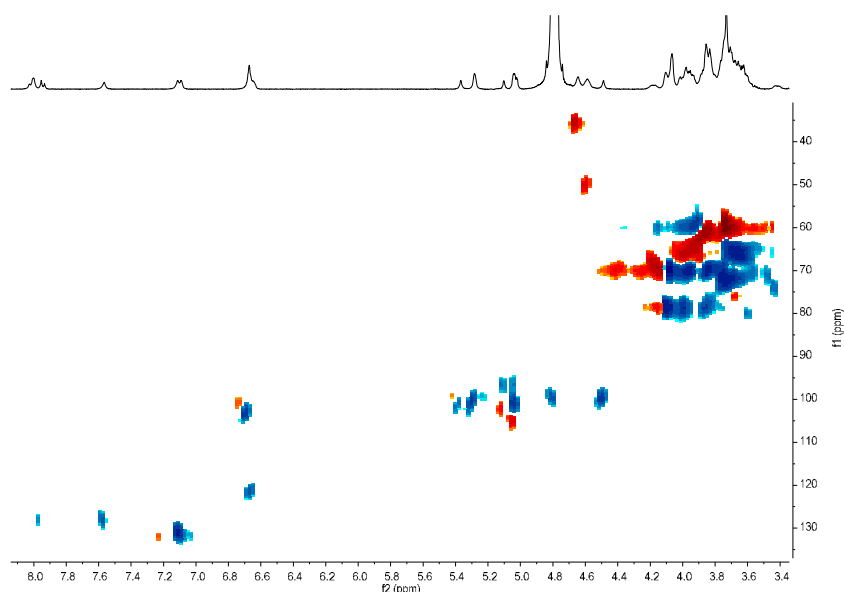


Figura 3.19 Espectro HSQC (400 MHz, D₂O, 298 K) del compuesto **52**.

Además, los compuestos **51** y **52** fueron analizados por espectrometría de masas, observándose únicamente las señales correspondientes a los iones moleculares de los productos



Capítulo 3

finales con varias cargas, lo que verifica que no quedaba ligando sin conjugar con fluoresceína, ni fluoresceína sin reaccionar. En el espectro de masas ESI del compuesto **51** en modo negativo (Figura 3.20), se observó únicamente la señal del ión $[M+2H]^{2-}$: m/z 977.8 y del compuesto **52**, se observaron las señales de los iones $[M+H]^{-}$: m/z 1957.0 y $[M+2H]^{2-}$: m/z 977.7.

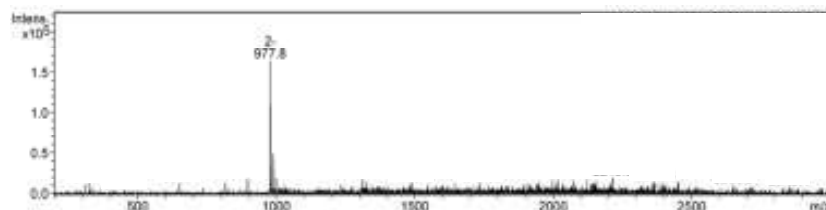


Figura 3.20 Espectro masas ESI del compuesto **51**.

A continuación, se realizaron los ensayos de unión directa, entre los compuestos **51** y **52** y DC-SIGN ECD. Las medidas de polarización de fluorescencia fueron llevadas a cabo en placas de microtitulación de 384 pocillos (poliestireno negro, no tratado, Corning), minimizando el volumen y, por tanto, la cantidad de muestra necesaria para el análisis. Las medidas de polarización se registraron utilizando un lector de multiplacas y empleando filtros de polarización con longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 535 nm, respectivamente. Pequeños volúmenes de disoluciones de cada uno de los ligandos fluorescentes de concentración 20 nM fueron añadidas sobre varias disoluciones de proteína de concentración comprendida entre 28 μ M y 75 nM, siendo la concentración final de ligando fluorescente 10 nM. Las medidas a cada concentración de proteína se realizaron por triplicado y se utilizó como blanco una disolución de la proteína de concentración 14 μ M en el mismo tampón. Además, se midió el valor de polarización del compuesto fluorescente en ausencia de proteína y su valor se restó de los valores de polarización de fluorescencia del resto de medidas en presencia de la proteína. Esa variación de polarización se representó frente a la concentración de proteína, obteniendo las correspondientes isothermas de Langmuir. (Figura 3.21)



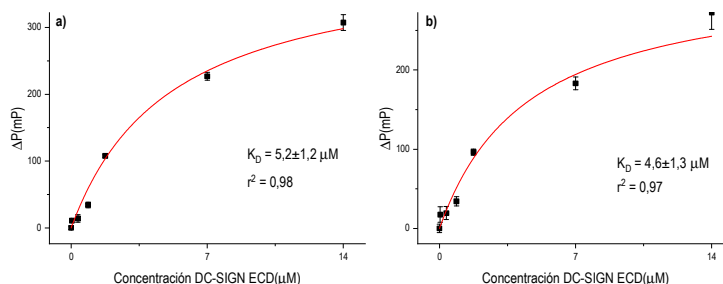


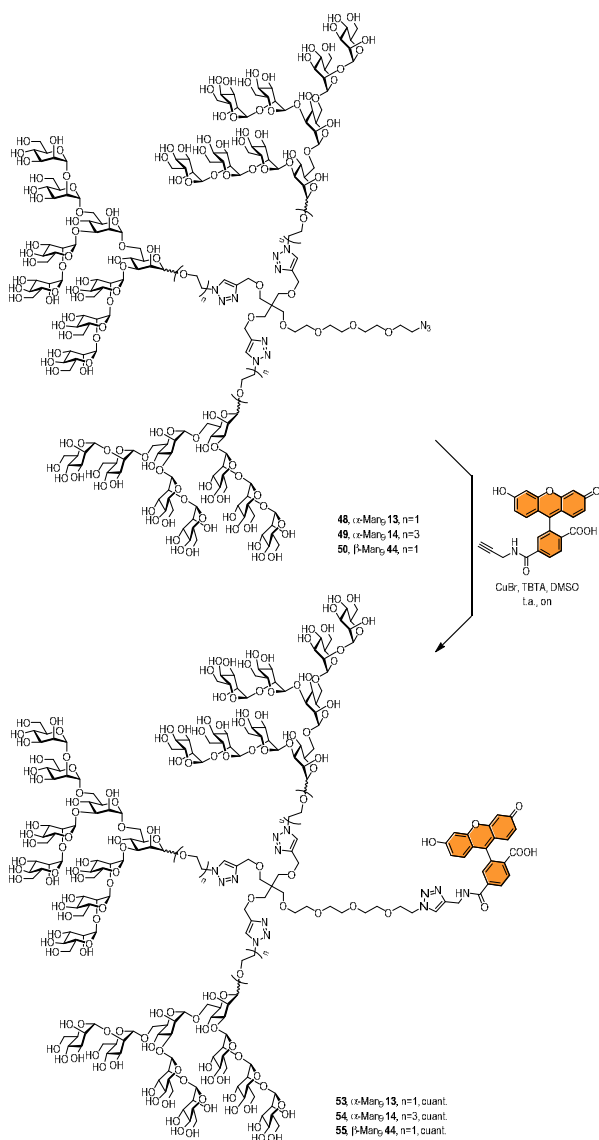
Figura 3.21 Isotermas de Langmuir de los compuestos fluorescentes: a) α -Man₉ (51) y b) β -Man₉ (52).

Analizando cada una de las isotermas de Langmuir, se obtuvieron valores de K_D similares para ambos compuestos: $5.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$ (51) y $4.6 \pm 1.3 \mu\text{M}$ (52). A partir de estos resultados, se puede concluir que la configuración del extremo reductor no afecta a la interacción entre DC-SIGN y el epítipo Man₉.

Por otro lado, con el objetivo de analizar el efecto multivalente de los dendrones de Man₉ sintetizados a partir de los nonasacáridos 13, 14 y 44, se sintetizaron los correspondientes dendrones marcados fluorescentemente 53, 54 y 55. Estos compuestos se obtuvieron empleando las mismas condiciones de reacción que en el marcaje de los correspondientes nonasacáridos. (Esquema 3.32) Con el dendrón 54, se pretende ver si influye la longitud del espaciador en la afinidad por el receptor.



Capítulo 3



Esquema 3.32 Reacción de acoplamiento CuAAC para sintetizar los dendrones trivalentes marcados fluorescentemente **53**, **54** y **55** de los nonasacáridos **13**, **14** y **44**, respectivamente.



Los compuestos **53**, **54** y **55** fueron caracterizados por RMN y espectrometría de masas ESI. A modo de ejemplo, en la Figura 3.22 se muestra el espectro de masas del compuesto fluorescente **54** en modo negativo donde se observa únicamente las señales correspondientes a los iones $[M-2H]^{-2}$: m/z 2880.2, $[M-3H]^{-3}$: m/z 1918.7 y $[M-4H]^{-4}$: m/z 1438.3.

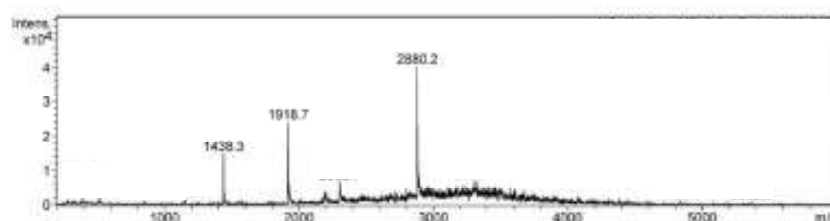


Figura 3.22 Espectro de masas ESI del dendrón trivalente del epítipo Man₉ marcado fluorescentemente **54**.

De nuevo, se estudió mediante polarización de fluorescencia la interacción entre los compuestos fluorescentes **53**, **55** y DC-SIGN ECD. Las constantes de disociación obtenidas para los compuestos fluorescentes trivalentes **53** ($K_D = 0.53 \pm 0.09 \mu M$), **54** ($K_D = 0.24 \pm 0.11 \mu M$) y **55** ($K_D = 0.37 \pm 0.04 \mu M$) (Figura 3.23) son un orden de magnitud mayor que la de los compuestos **51** y **52**, lo que indica un claro efecto multivalente. Además, los resultados obtenidos para todos estos glicodendrones fluorescentes **53**, **54** y **55** corroboraron que la configuración del extremo reductor no afecta en la interacción con DC-SIGN.



Capítulo 3

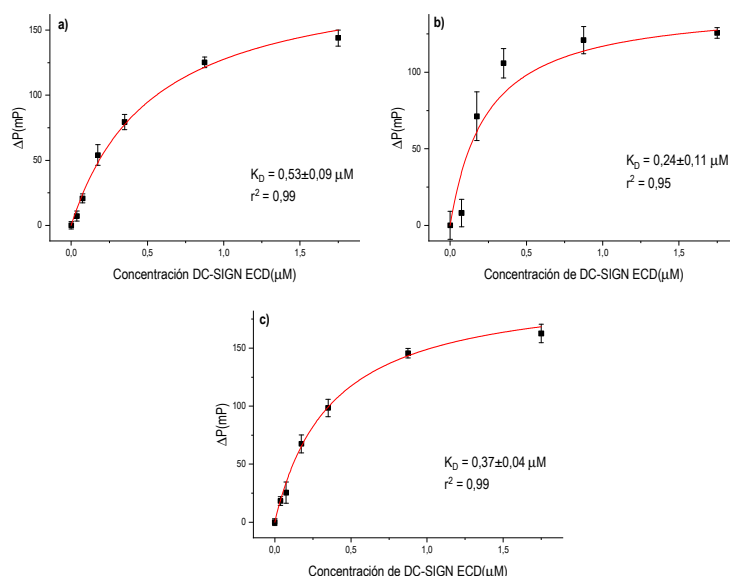


Figura 3.23 Isothermas de Langmuir de los compuestos fluorescentes: a) 53, b) 54 y c) 55.

Por otro lado, se decidió evaluar también la afinidad por la lectina Concanavalina A (ConA) que presentan los dendrones funcionalizados con carbohidratos más sencillos, y que son utilizados comúnmente en nuestro grupo de investigación como sistemas multivalentes. Estos sistemas son más fácilmente sintetizables si se compara con el epítipo Man_9 . En concreto, se decidió preparar el dendrón de 9 unidades de manosa marcado fluorescentemente 57, ya que contiene el mismo número de unidades de manosa que el epítipo Man_9 , pero presenta una distribución espacial diferente. Por otro lado, también se prepararon el dendrón de tres unidades del disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha$ marcado fluorescentemente 56, que mimetiza la estructura de los tres brazos terminales D1-D3 del nonasacárido, así como el dendrón de 9 unidades del disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha$ marcado fluorescentemente 58, comparable con el dendrón trivalente del epítipo Man_9 , 55. (Figura 3.24)



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas

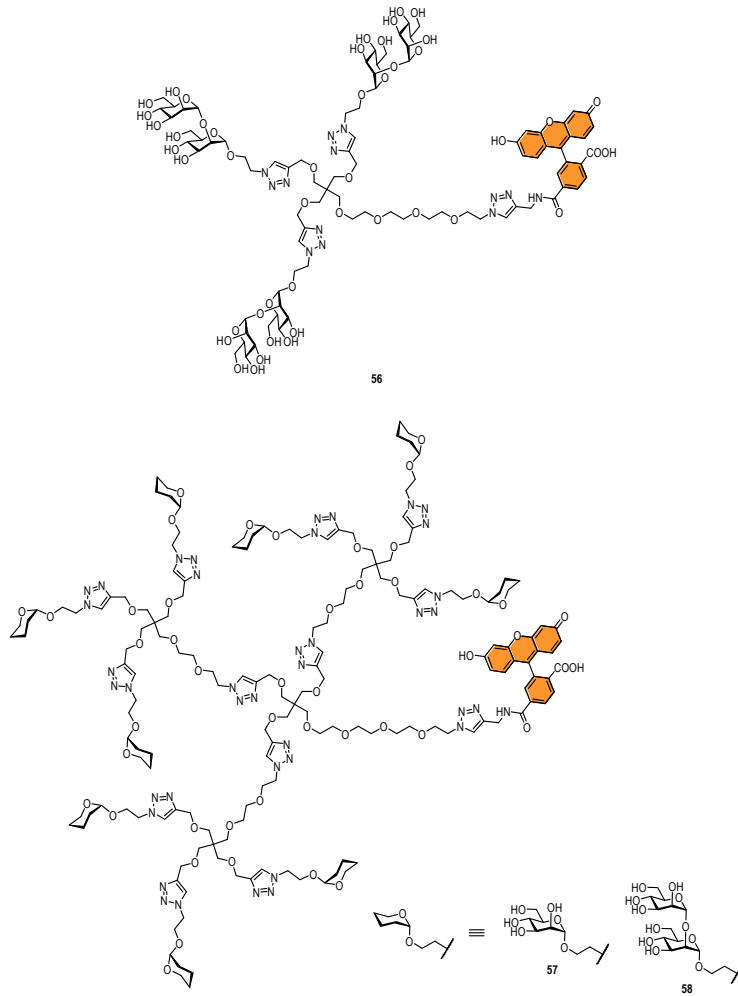


Figura 3.24 Estructuras de los ligandos 56, 57 y 58 marcados fluorescentemente.

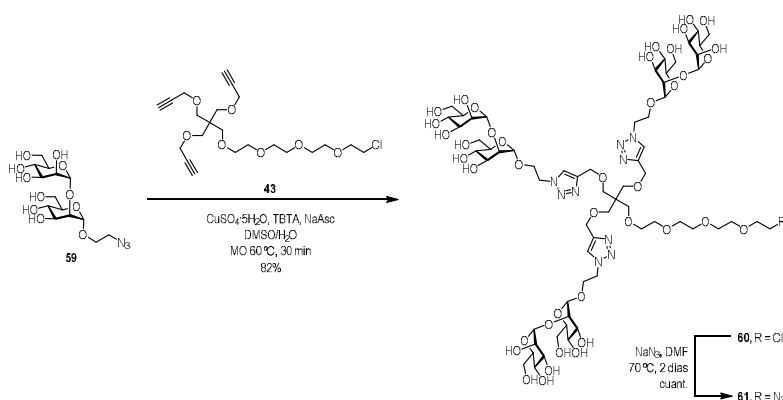
ConA es una lectina que se extrae de la planta *Canavalia ensiformis* y presenta una alta especificidad por conjugados que poseen unidades de α -manosa y α -glucosa en su estructura. Esta proteína es un homotetrámero donde cada una de las subunidades está unida a iones Mg^{2+} y



Capítulo 3

Ca²⁺. Cada subunidad constituye un sitio activo, por lo que posee 4 centros de reconocimiento. El pH es un factor clave para el proceso de oligomerización de esta proteína. Se sabe que a pH=7.2, la proteína se encuentra en su forma tetramérica, mientras que a valores de pH inferiores aparece fundamentalmente como un dímero.¹⁴⁶ La ConA es ampliamente utilizada en bioquímica para caracterizar y purificar glicoproteínas y otras glicomoléculas. Además, se emplea en estudios inmunológicos y de afinidad.

De manera resumida, el dendrón **61** de primera generación del disacárido de manosa se sintetizó a partir del núcleo de crecimiento **43** y el disacárido **59** funcionalizado en el extremo no reductor con el espaciador 2-azido etanol, siguiendo un procedimiento similar al descrito para la obtención de dendrones trivalentes de los epítomos de Man₉ **45-47**. (Esquema 3.33) La reacción se llevó a cabo en MO a 60°C, en presencia de CuSO₄ · 5H₂O, TBTA y NaAsc. Tras eliminar los restos de cobre y purificar por Sephadex LH20 MeOH, se obtuvo el producto **60**, que se hizo reaccionar con azida sódica a 70°C con el objetivo de sustituir el átomo de cloro por azida.



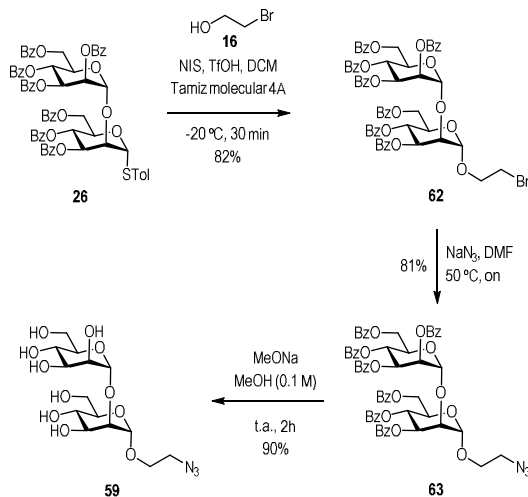
Esquema 3.33 Síntesis del dendrón trivalente **61** de Man α 1,2Man α .

El disacárido **59** se obtuvo a partir de la reacción de glicosidación entre el 2-bromoetanol **16** y el derivado tiomanósido **26**, en presencia de NIS y TfOH a -20°C. (Esquema 3.34)

¹⁴⁶ Reeke, G. N. Jr.; Becker, J. W.; Cunningham, B. A.; Wang, J. L.; Yahara, I.; Edelman, G. M. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1975**, 55, 13.



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas



Esquema 3.34 Síntesis del disacárido **59**.

Tras la purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se aisló el compuesto **62** con un 82% de rendimiento. Este compuesto se analizó por espectrometría de masas. La distribución isotópica del pico era fundamental para corroborar la obtención del producto **62** debido a que su masa molecular coincide con la masa del producto de partida **26**. En la figura 3.25 se muestra el espectro de masas ESI del producto **62** aislado, en la ampliación del pico $[M+Na]^+$ se observa una distribución isotópica que coincide con la presencia Br (isótopos 79 y 81 al 50%).

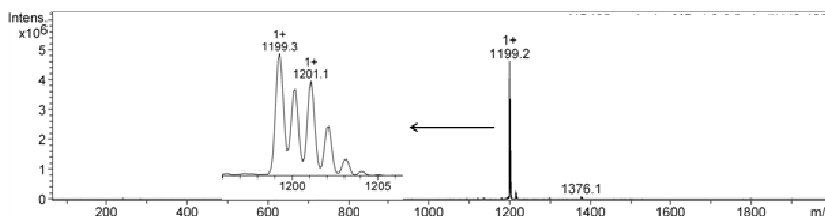


Figura 3.25 Espectro de masas ESI del producto **62**, ampliación de la distribución isotópica del pico $[M+Na]^+$.



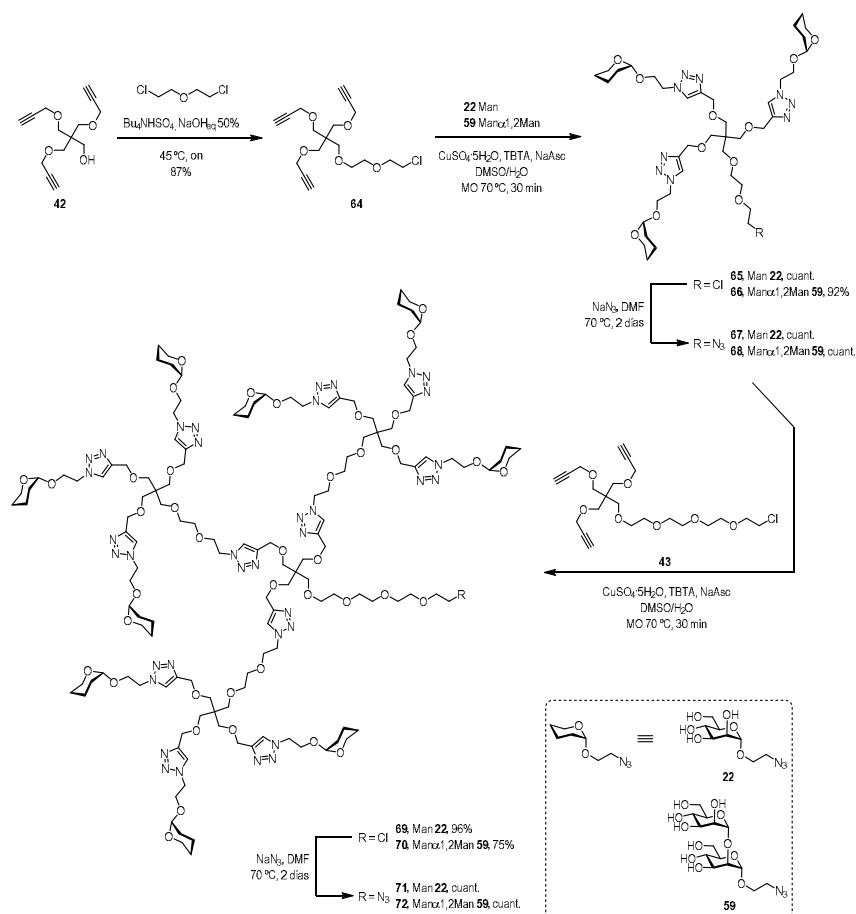
Capítulo 3

A continuación, se llevó a cabo la sustitución del átomo de bromo para obtener el derivado **62**, usando azida sódica en DMF a 50°C. La completa transformación se confirmó con el desplazamiento de la señal de 35 ppm a 50 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN. Por último, el disacárido **63** se desprotegió completamente usando las condiciones de Zemplén con metóxido sódico en metanol, obteniéndose el derivado **59** deseado con un 90 % de rendimiento.

Por otro lado, el dendrón de segunda generación de manosa **22** y el del disacárido **59** se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en nuestro grupo de investigación,⁸³ modificado posteriormente en el grupo^{81d}. De forma resumida, en primer lugar, es necesario preparar el dendrón de 3 unidades de carbohidrato que se acoplará al núcleo de crecimiento **43** mediante reacción de CuAAC. (Esquema 3.35) Para ello, se preparó el núcleo de crecimiento **64** a partir del derivado **42** y el 2-cloroetil éter comercial, empleando las condiciones descritas en la bibliografía. El núcleo de crecimiento **64** se funcionalizó mediante reacción de acoplamiento CuAAC con los correspondientes carbohidratos modificados con un grupo azido (**22** o **59**). En este caso, la reacción de acoplamiento se llevó a cabo en presencia de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato sódico y TBTA en una mezcla de DMSO/ H_2O (1:1) y bajo irradiación de microondas a 60°C. Tras purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH, se realizó la sustitución del cloruro por azida de los glicodendrones **65** y **66**, usando azida sódica en DMF a 70°C. De esta manera, tras purificación por cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH, se obtuvieron los glicodendrones trivalentes **67** y **68** listos para ser conjugados al núcleo de crecimiento **43**, con un espaciador más largo en la posición focal que permite aumentar la separación entre los ligandos unidos al dendrón y el centro de conjugación en la posición focal. Se siguió la misma estrategia de acoplamiento CuAAC y condiciones de purificación para obtener los glicodendrones de nueve unidades **69** y **70**. Finalmente, se sustituyó el átomo de cloro por un grupo azido, dando lugar a los glicodendrones **71** y **72**.



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas



Esquema 3.35 Síntesis de los glicodendrones de segunda generación **71** y **72**.

Una vez obtenidos los glicodendrones de 3 unidades de disacárido **61**, de 9 unidades de manosa **71** y de 9 unidades de disacárido **72**, éstos se conjugaron con la fluoresceína-alquino comercial. Las condiciones de la reacción de acoplamiento CuAAC fueron exactamente las mismas que las utilizadas en la preparación del resto de compuestos fluorescentes, es decir, empleando CuBr (I) y TBTA.



Capítulo 3

Una vez purificados los glicodendrones marcados fluorescentemente **56** (dendrón de 3 disacáridos), **57** (dendrón de 9 manosas) y **58** (dendrón de 9 disacáridos), mediante cromatografía por exclusión de tamaños Sephadex LH20 en H₂O/MeOH 9:1, se comprobó que la funcionalización había sido completa mediante RMN y espectrometría de masas ESI. A modo de ejemplo, en la Figura 3.26 se muestra el espectro de masas del compuesto fluorescente **58**, donde se observan únicamente las señales correspondientes a los iones $[M+2H]^{2+}$: m/z 2824.4, $[M+3H]^{3+}$: m/z 1881.4 y $[M+3H]^{3+}$: m/z 1410.4.

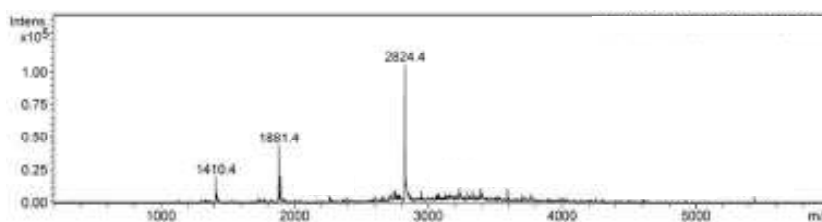


Figura 3.26 Espectro de masas ESI del glicodendrón **58** marcado fluorescentemente.

Como prueba de concepto, se llevaron a cabo ensayos de polarización de fluorescencia con la lectina vegetal ConA para comparar la afinidad que presentan los glicodendrones **56** y **57** frente al epítipo Man₉ **52**. Para ello, sobre pequeños volúmenes de disoluciones de ConA de concentración comprendida entre 75 nM y 28 μM, se añadieron pequeños volúmenes de una disolución de cada uno de los compuestos cuya concentración era 100 nM. De esta manera, se pudo construir las isothermas de Langmuir para cada uno de los mismos, (Figura 3.27) de las que se extrajo el valor de K_D para **56** (K_D = 0.31±0.04 μM), **57** (K_D = 0.29±0.06 μM) y **52** (K_D = 0.24±0.04 μM). Se observó que los valores de las K_D de los glicodendrones **56** y **57** son muy similares al valor que presenta el ligando natural Man₉ **52**. Teniendo en cuenta el esfuerzo sintético que supone este último ligando, estos resultados demostraron que se pueden emplear otros ligandos más sencillos de obtener en procesos de interacción con ConA.



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas

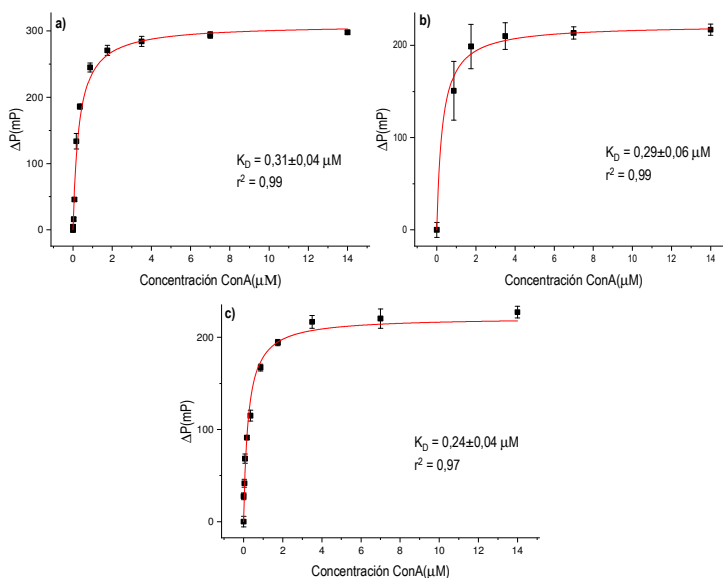


Figura 3.27 Isotermas de Langmuir de los compuestos fluorescentes: a) 56 b) 57 y c) 52.

Del mismo modo, se llevaron a cabo experimentos para detectar si había diferencias de afinidad entre el glicodendrón de 9 unidades de disacárido $Man\alpha 1,2Man\alpha$ 58 marcado fluorescentemente y ConA frente al dendrón de 3 unidades del epítipo de Man_3 55 marcado fluorescentemente y ConA. A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de polarización de fluorescencia, se puede concluir nuevamente que no se aprecian diferencias significativas en la K_D del dendrón de segunda generación del disacárido 58 ($K_D = 0.042 \pm 0.010 \mu M$) frente al dendrón trivalente del ligando natural 55 ($K_D = 0.049 \pm 0.009 \mu M$). (Figura 3.28)



Capítulo 3

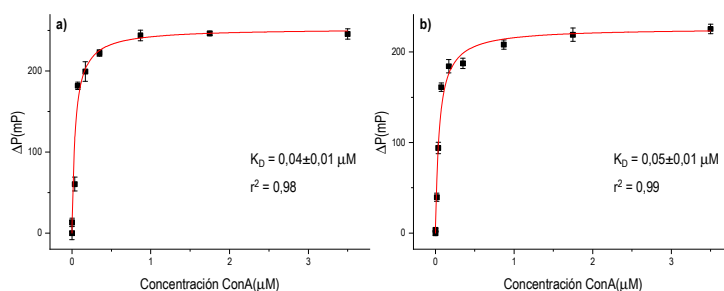


Figura 3.28 Isotermas de Langmuir de los compuestos fluorescentes: a) **58** y b) **55**.

En el futuro, se plantea llevar a cabo estos experimentos con DC-SIGN ECD, para comprobar si existen diferencias significativas en la afinidad. En caso negativo, se confirmaría que los glicodendrones **56-58** son excelentes glicomiméticos de los ligandos naturales, capaces de interferir en procesos biológicos. Además, teniendo en cuenta que son sistemas de menor complejidad sintética, se podrían obtener en gran cantidad más fácilmente.

3.3.5 Síntesis de oligomanosas de hasta 5 unidades como partes constituyentes de Man₉

Existe una gran variedad de oligomanosas unidas a los residuos de Asn de una gran diversidad de glicoproteínas virales. Estos residuos pueden ser reconocidos por los receptores específicos y facilitar la infección. En este sentido, si se desea inhibir este tipo de procesos es igualmente importante mimetizar estas estructuras y construir a partir de ellas sistemas multivalentes. En este sentido, se ha llevado a cabo la síntesis de varias oligomanosas funcionalizadas en su extremo reductor con un espaciador provisto de un grupo azido, que permite la unión posterior de estos ligandos a sistemas multivalentes u otras moléculas de interés biológico.

Siguiendo la estrategia de síntesis puesta a punto en nuestro grupo de investigación, se sintetizaron la unidad disacarídica Man α 1,2Man α **73**¹⁴⁷ y el brazo D1 Man α 1,2Man α 1,2Man α **74** del epítipo Man₉ que presentan una elevada afinidad por el anticuerpo 2G12¹⁰¹ o DC-

¹⁴⁷ Ramos-Soriano, J.; Reina, J. J.; Illescas, B. M.; de la Cruz, N.; Rodríguez-Pérez, L.; Lasala, F.; Rojo, J.; Delgado, R.; Martín, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 15403.



SIGN⁵⁰, así como el otro bloque pentasacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3(\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,6)\text{Man}\alpha 75$ y el trisacárido ramificado $\text{Man}\alpha 1,3(\text{Man}\alpha 1,6)\text{Man}\alpha 76$ a partir del cual se pueden construir muchos glicanos complejos presentes en las glicoproteínas virales. (Figura 3.29) A su vez, se sintetizó la oligomanosa ramificada Man_5 (77) que forma parte del esqueleto de los glicanos híbridos. Todas estas estructuras fueron funcionalizadas con el espaciador 17, que presenta mayor longitud, con el objetivo de aumentar la distancia entre el ligando y el punto focal donde se puede conjugar diferentes moléculas de interés biológico.

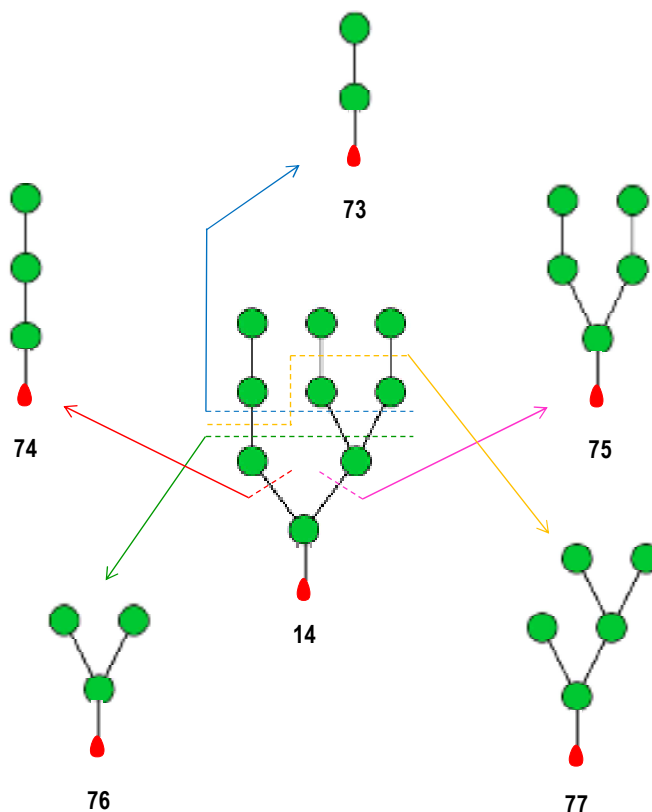
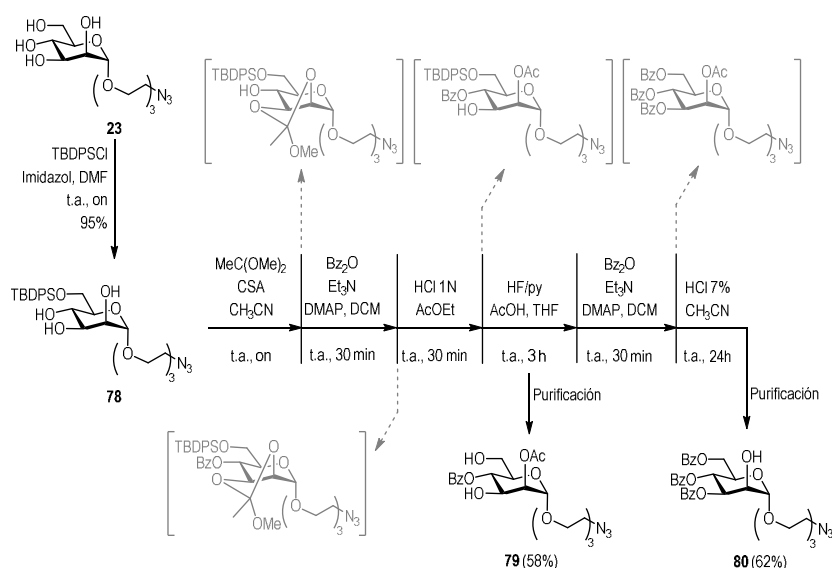


Figura 3.29 Estructuras de las oligomanosas constituyentes del epítopo Man_9 preparadas (73-77).



Capítulo 3

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de los monosacáridos aceptores de glicosilo necesarios para obtener todas estas estructuras. (Esquema 3.36) Para obtener las estructuras **73-74**, se necesitó el monosacárido **80** con la posición 2 libre. El monosacárido **79** con las posiciones 3 y 6 libres se empleó como aceptor de glicosilo para formar los oligosacáridos **75** y **76**, mediante uniones α 1,3 y α 1,6. Por otro lado, el monosacárido **25**, empleado en la síntesis de los epítomos Man₉, se utilizó como aceptor de glicósilo para preparar el epítopo Man₅. Los aceptores **79** y **80** fueron preparados de manera consecutiva con pasos comunes de síntesis, a partir del monosacárido **23**, tal y como se describe en el siguiente esquema. Esta estrategia de síntesis no implicaba pasos intermedios de purificación, disminuía el tiempo de preparación y suponía un gran ahorro económico.



Esquema 3.36 Síntesis consecutiva de los monosacáridos aceptores de glicosilo **79** y **80**.

La ruta sintética comenzó con la protección selectiva del hidroxilo primario o de la posición C-6 del monosacárido **23**. Este grupo se protegió como silil éter, debido a que este grupo protector se elimina fácilmente de manera selectiva en condiciones ácidas. Para ello, se empleó un ligero exceso de TBDPSCI como agente sililante, en presencia de imidazol, tal y como se



describe en la bibliografía.¹⁴⁸ A continuación, el intermedio **78** se hizo reaccionar con el trimetil ortoacetato y CSA para generar el correspondiente ortoéster con los hidroxilos de las posiciones 2 y 3. De esta manera, se formó un ciclo de 5 unidades, estable desde el punto de vista termodinámico, entre las posiciones del azúcar menos impedidas estéricamente. Posteriormente, se llevó a cabo la protección del hidroxilo libre en la posición 4 del carbohidrato con anhídrido benzoico, Et₃N y DMAP. Una vez protegidas todas las posiciones del azúcar, se trató el ortoéster con una disolución de HCl 1M que provocó la hidrólisis parcial del ortoéster. En estas condiciones, se produjo la desprotección del hidroxilo en posición 3. Para obtener el aceptor **79** fue necesario desproteger selectivamente la posición 6 sililada usando una disolución del complejo HF-piridina en presencia de AcOH, sin observarse por c.c.f. la formación de un subproducto procedente de la desprotección del acetato presente en la posición 2. Tras la purificación por cromatografía en columna de gel de sílice, se obtuvo el compuesto **79**, con un rendimiento del 58%. Su estructura se confirmó mediante RMN y espectrometría de masas ESI. En el espectro de ¹H-RMN del producto **79** se observaron las señales correspondientes a los protones H-3, H-5 y H-6 a campo alto, lo que indica que se encuentran desprotegidas. También se pudo asignar el singlete correspondiente al metilo de grupo acetato a 2.16 ppm y los protones del grupo benzoilo a mayor desplazamiento químico.

Por otro lado, para obtener el otro aceptor de glicosilo **80**, fueron necesarias dos etapas sintéticas adicionales en un proceso también consecutivo, con respecto al derivado **79**. Para ello, se benzoilaron las posiciones libres 3 y 6. Tras este paso de síntesis sólo quedaría por desproteger selectivamente la posición 2, que se encuentra acetilada. Se utilizaron dos métodos: HCl 7% en MeOH y CH₃CN durante un día,¹⁴⁹ o AcCl en MeOH y CHCl₃ durante 12 h.¹⁵⁰ Sin embargo, el rendimiento obtenido con el primer método fue del 90% frente al 68% obtenido con el segundo procedimiento. Este intermedio se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, siendo el rendimiento global a partir del derivado **78** del 62%. El compuesto se caracterizó mediante RMN y espectrometría de masas ESI. En el espectro de ¹H-RMN, se observó el desplazamiento de la señal del protón de la posición 2 a campo más alto, en concreto a 4.35 ppm como un doblete de dobletes, lo que indica que dicha posición se encuentra

¹⁴⁸ a) Reina, J. J.; Rojo J. *Tetrahedron. Lett.* **2006**, *47*, 2475; b) Reina, J. J.; Díaz, I.; Nieto, P. M.; Campillo, N. E.; Páez, J. A.; Tabarani, G.; Fieschi, F.; Rojo, J. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2743.

¹⁴⁹ A. K. Pathak , V. Pathak , J. M. Riordan , S. S. Gurcha , G. S. Besra and R. C. Reynolds , *Carbohydr. Res.*, **2004**, *339*, 683.

¹⁵⁰ Byramova, N. E.; Ovchinnikov, M. V.; Backinowsky, L. V.; Kochetkov, N. K. *Carbohydr. Res.*, **1983**, *124*, C8.



Capítulo 3

desprotegida, mientras que el resto de protones correspondientes a las posiciones protegidas aparecen a campo más bajo. (Figura 3.30)

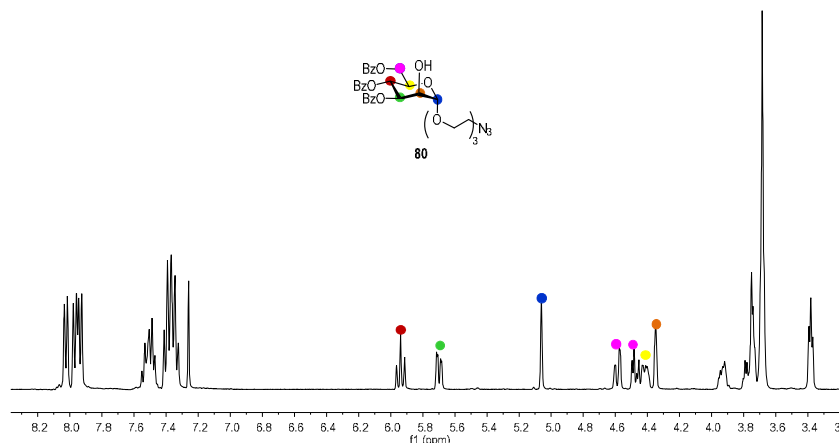


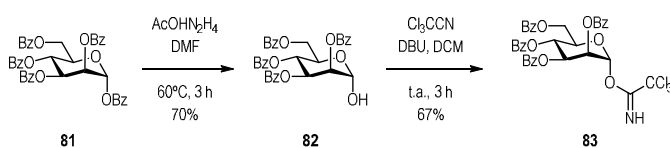
Figura 3.30 Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , 298 K) del monosacárido aceptor **80**.

Estos aceptores de glicosilo **79** y **80** fueron sometidos a reacciones de glicosidación, siguiendo el método de tioglicosidos y tricloroacetimidatos. Se utilizaron como donadores de glicosilo, la manosa perbenzoilada funcionalizada con un grupo tricloroacetimidato en la posición anomérica, **83**, el tiodisacárido **26**, protegido con grupos benzoilo y el disacárido **27**, funcionalizado con un grupo tricloroacetimidato en el extremo reductor. El donador de glicosilo **83** fue obtenido siguiendo la estrategia descrita en la bibliografía.¹⁵¹ A partir de la manosa perbenzoilada **81**, se desprotegió selectivamente la posición anomérica del monosacárido en presencia de acetato de hidracina en DMF a 60°C. (Esquema 3.37) Tras purificar este intermedio **82** por cromatografía en columna de gel de sílice, se llevó a cabo la protección de su posición anomérica con tricloroacetinitrilo y DBU en diclorometano seco, obteniéndose el donador de glicosilo **83** en dos etapas de síntesis con un rendimiento global del 69%.

¹⁵¹ Lee, D. J.; Kowalczyk, R.; Muir, V. J.; Rendle, P. M.; Brimble, M. A. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 2628.

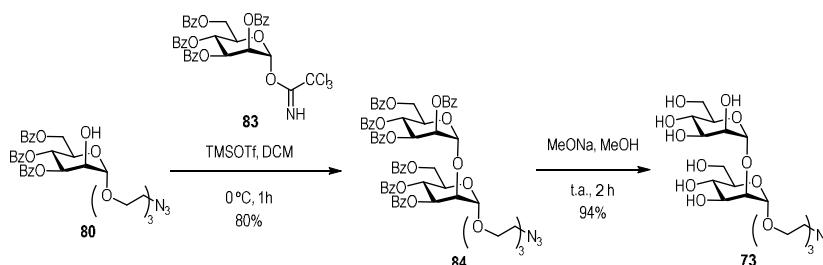


Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas



Esquema 3.37 Síntesis del donador de glicosilo **83**.

A continuación, se llevó a cabo la reacción de glicosidación entre el aceptor de glicosilo **80** y el donador de glicosilo **83**, en presencia de TMSOTf a 0°C, (Esquema 3.38) obteniéndose el disacárido **84** con un rendimiento del 80% tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice.



Esquema 3.38 Síntesis del disacárido **73**.

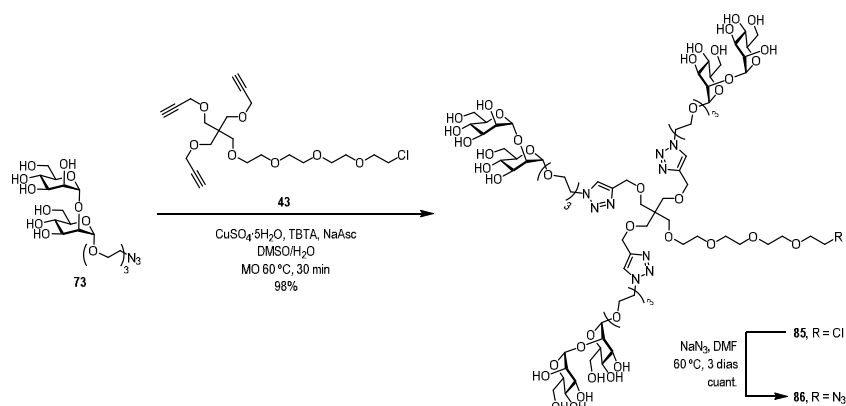
La desprotección de todos los grupos hidroxilo de este disacárido se llevó a cabo empleando las condiciones de Zemplén, dando lugar al producto **73** con un rendimiento del 94%.

En el espectro de ¹H-RMN de **73** se observó únicamente dos señales de protones anoméricos, confirmando la formación del disacárido deseado. El compuesto también fue caracterizado mediante espectrometría de masas ESI.

Posteriormente, se preparó el glicodendrón trivalente **86** del disacárido **73**. Se utilizó como núcleo de crecimiento el compuesto **43** y las mismas condiciones de reacción empleadas para la formación de otros glicodendrones. (Esquema 3.39) De esta manera, se obtuvo el glicodendrón trivalente de disacáridos **85** con un rendimiento del 98%. Su estructura fue analizada por ¹H-RMN, observándose la aparición del protón del metino del triazol a 7.99 ppm. (Figura 3.31)



Capítulo 3



Esquema 3.39 Síntesis del glicodendrón **86**.

Posteriormente, el átomo de cloro presente en la posición focal fue sustituido por un grupo azido, en presencia de azida sódica a 70°C , obteniéndose el glicodendrón **86** de forma cuantitativa. Mediante ^{13}C -RMN, se observó la desaparición de la señal del metileno unido al átomo de cloro a 44.0 ppm y la aparición de una nueva señal a 51.6 ppm, que se corresponde con el metileno unido al grupo azido, confirmándose así la completa sustitución.

En el grupo del profesor Nazario Martín,¹⁴⁷ llevaron a cabo la conjugación de los compuestos **73** y **86** sobre derivados de fullereno para la obtención de glicofullerenos con 12 y 36 unidades del disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha$ y tridecafullerenos con 120 y 360 unidades del mismo. (Figura 3.31) La capacidad que poseen estos sistemas para bloquear la entrada celular de los virus Zika (ZIKV) y Dengue (DENV) se evaluó en el grupo del doctor Rafael Delgado, del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Para ello, utilizaron un modelo de células Jurkat que expresan el receptor DC-SIGN en su superficie y que fueron infectadas con los virus ZIKV y DENV. Todos los compuestos presentaron excelentes valores de inhibición, con valores de IC_{50} en el rango nano- y picomolar. En concreto, el tridecafullereno con 360 unidades del disacárido presentaba un mayor poder inhibitorio para ambos virus, ZIKV ($\text{IC}_{50} = 67 \text{ pM}$, 95% CI= 39 pM-116 pM) y DENV ($\text{IC}_{50} = 35 \text{ pM}$, 95% CI= 18 pM-68 pM).



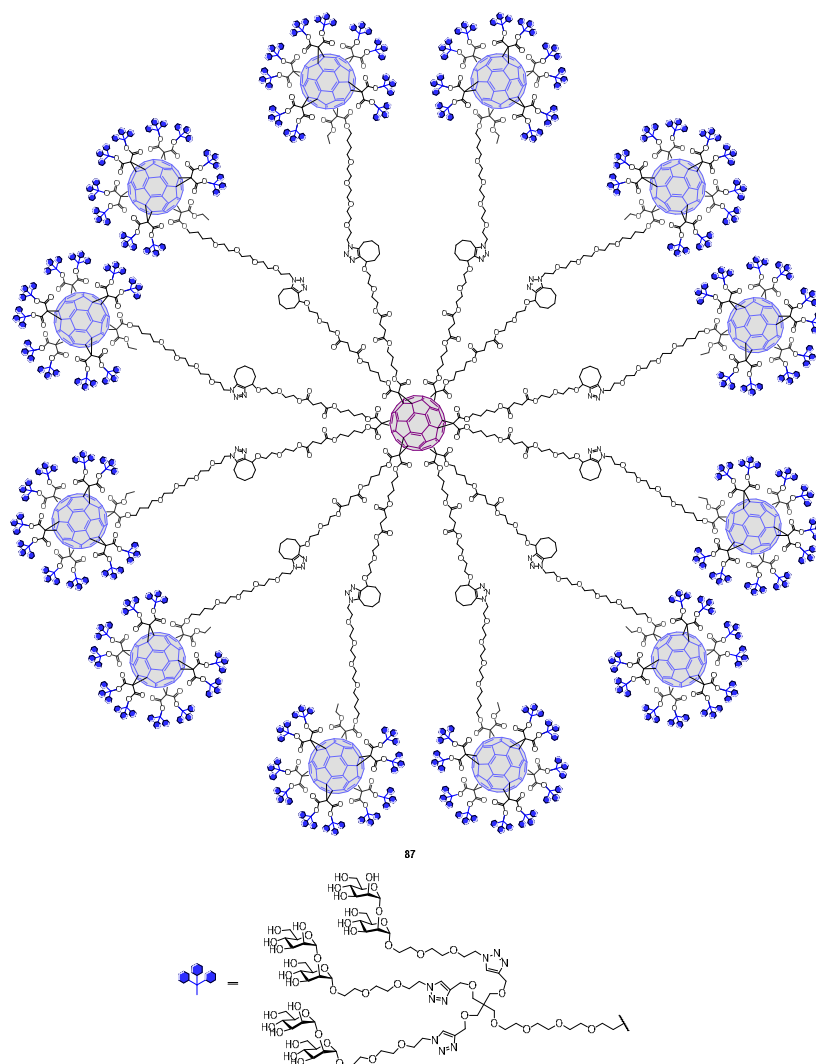


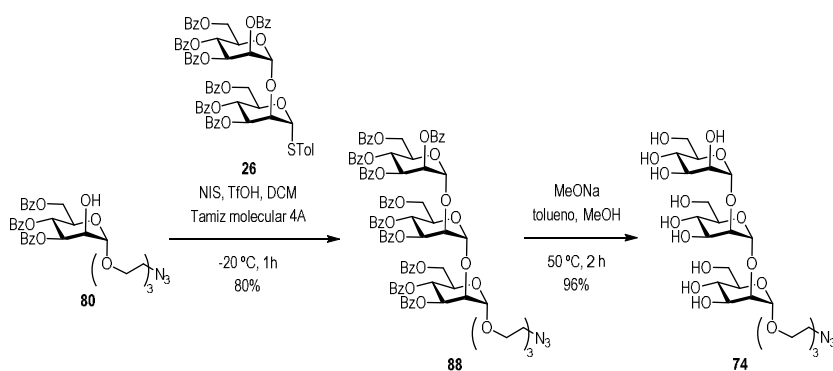
Figura 3.31 Estructura del tridecafullereno 87 decorado con 360 unidades del disacárido 73.

A partir de estos resultados tan prometedores, se está evaluando la posibilidad de funcionalizar estos sistemas con oligosacáridos más complejos que puedan bloquear la entrada



Capítulo 3

de virus de una manera más efectiva. Se sabe que el brazo D1 del epítipo Man₉ (Man α 1,2Man α 1,2Man α) presenta una afinidad muy parecida a Man₉, por los receptores. Por ello, se llevó a cabo su síntesis mediante una reacción de glicosidación entre el monosacárido aceptor de glicosilo **80** y el disacárido donador de glicosilo **26**. (Esquema 3.40) Para dicha reacción, se empleó NIS y TfOH, obteniéndose el trisacárido **88** con un rendimiento del 80% tras purificación por cromatografía en columna de gel de sílice. Bajo las condiciones de Zemplen, el producto se mantenía parcialmente protegido. Quizás esto fuera debido a la solubilidad parcial del compuesto de partida en MeOH. Por ello, fue necesario forzar las condiciones de reacción, calentando a 50°C y añadiendo tolueno para disolver completamente el compuesto de partida.¹⁵² De esta manera, se consiguió obtener el derivado **74** con un rendimiento del 96%.



Esquema 3.40 Síntesis del trisacárido lineal **74**.

La estructura del compuesto **58** fue confirmada por RMN (Figura 3.32) y espectrometría de masas.

¹⁵² Amin, M. N.; Huang, W.; Mizanur, R. M.; Wang, L.-X. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14404.



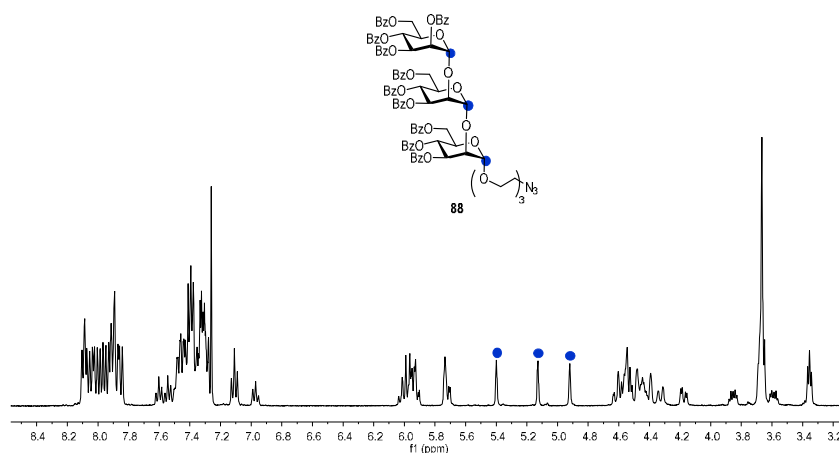
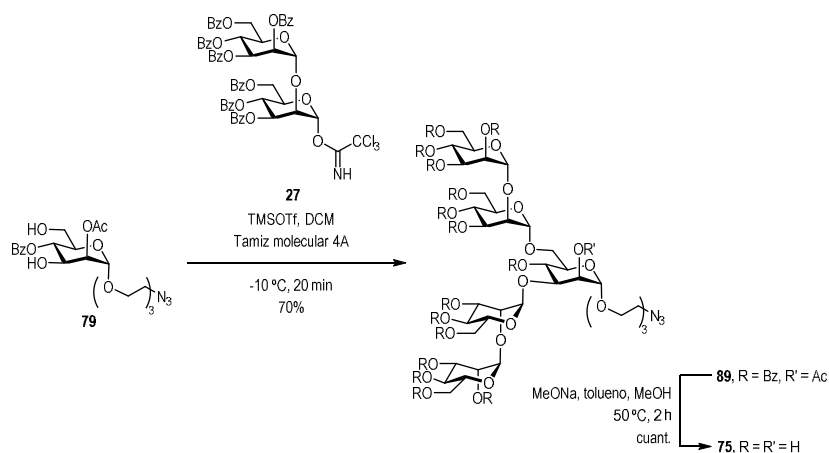


Figura 3.32 Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , 298 K) del trisacárido **88**.

Del mismo modo, se preparó el otro bloque estructural del epítipo Man_9 , el pentasacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3(\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,6)\text{Man}\alpha$ **75**. Mediante la reacción de glicosidación tipo 2+1 entre el monosacárido aceptor de glicosilo **79** y el disacárido donador de glicosilo **27**, se obtuvo el correspondiente pentasacárido **89**. (Esquema 3.41) Cabe señalar que la reacción de glicosidación no funcionaba cuando se utilizaba como donador de glicosilo el tiodisacárido **26**. Por tanto, fue necesaria la sustitución previa del grupo *S*-tolilo por el tricloroacetimidato, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. La reacción de glicosidación se llevó a cabo en presencia de 2.6 eq del donador de glicosilo **27** y TMSOTf, a -10°C . En estas condiciones, se obtuvo el pentasacárido **89** con un rendimiento del 70%. A continuación, se procedió a desproteger el pentasacárido **89** en las mismas condiciones que el trisacárido lineal **88** a 50°C , obteniéndose el pentasacárido **75** desprotegido de manera cuantitativa tras purificación mediante cromatografía por exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH.



Capítulo 3



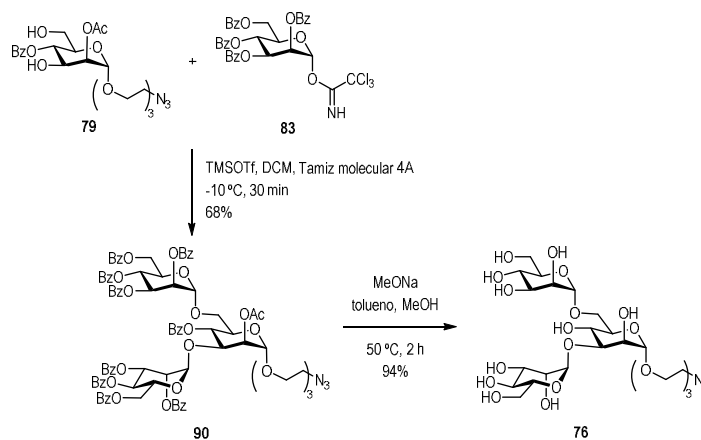
Esquema 3.41 Síntesis del pentasacárido **75**.

Las estructuras de los compuestos **89** y **75** fueron caracterizadas mediante RMN y espectrometría de masas.

A partir del mismo monosacárido aceptor **79**, se sintetizó el trisacárido ramificado $\text{Man}\alpha 1,3(\text{Man}\alpha 1,6)\text{Man}\alpha$ **90**, mediante reacción de glicosidación 2+1 con el donador de glicosilo **83** y posterior reacción de desprotección de manera análoga a los compuestos anteriores, dando lugar al producto **76**. (Esquema 3.42) La reacción de glicosidación se llevó a cabo en presencia de TMSOTf a -10°C , obteniéndose el producto **90** con un rendimiento del 68% tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice. Los grupos hidroxilo del producto **90** se desprotegeron en presencia de NaOMe a 50°C . Las estructuras de los compuestos **90** y **76** fueron confirmadas por RMN y espectrometría de masas.



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas



Esquema 3.42 Síntesis del trisacárido ramificado 76.

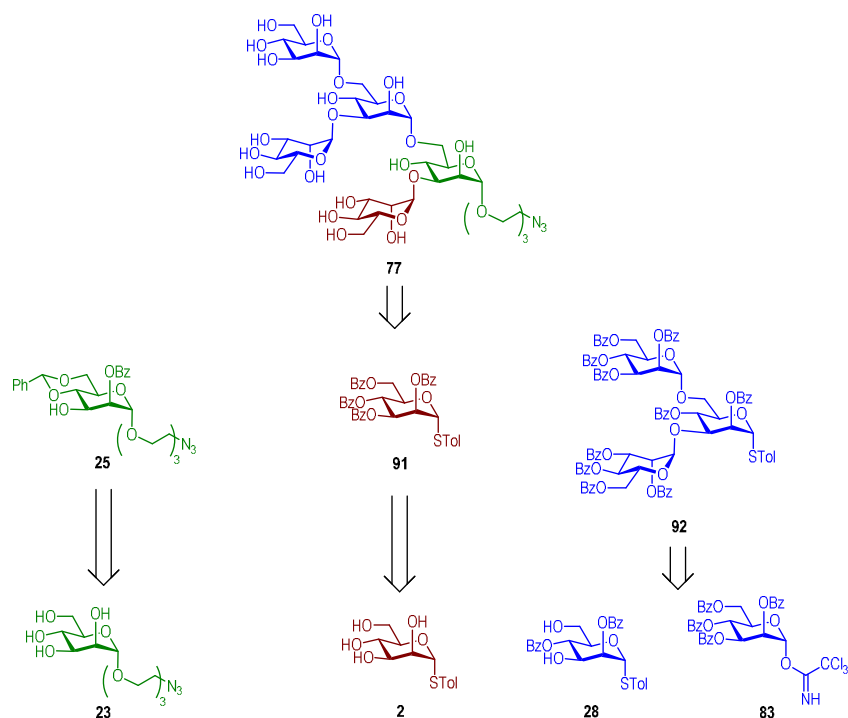
Siguiendo esta estrategia de síntesis se pueden sintetizar otros oligosacáridos, como la oligomanosa ramificada $\text{Man}_5 \text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,3(\text{Man}\alpha 1,3)\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}\alpha$. Esta estructura está presente en muchas glicoproteínas y se genera en el aparato de Golgi a partir de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ tras la acción de las manosidasas I, por lo que es reconocida por una gran variedad de receptores e interviene en numerosos procesos biológicos.¹⁵³

Assumiendo su importancia biológica, se planteó la síntesis del epítipo 77 siguiendo la misma aproximación sintética convergente a partir de tres bloques de construcción. (Esquema 3.43) Estos bloques corresponden con el monosacárido aceptor 25, el donador tiomonosacárido 91 y el trisacárido donador de glicosilo 92.

¹⁵³ a) Bewley, C. A.; Clore, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6909. b) Briken, V.; Porcelli, S. A.; Besra, G. S.; Kremer, L. *Mol. Microbiol.* **2004**, *53*, 391. c) Ritchie, G.; Harvey, D. J.; Feldmann, F.; Stroehner, U.; Feldmann, H.; Royle, L.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. *Virology* **2010**, *399*, 257. d) Song, E.-H.; Osanya, A. O.; Petersen, C. A.; Pohl, N. L. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11428. e) Fujimoto, Y. K.; Green, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19639.



Capítulo 3



Esquema 3.43 Análisis retrosintético de la preparación del epítipo Man₅ 77.

El epítipo Man₅ se preparó a partir del monosacárido aceptor de glicosilo **25** utilizado en la síntesis del epítipo Man₉ que presenta únicamente la posición 3 desprotegida. En primer lugar, se llevó a cabo la reacción de glicosidación con el donador de glicosilo **91**. (Esquema 3.44) Una vez purificado el intermedio formado **93**, mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se eliminó el bencilidendacetal entre las posiciones 4 y 6 en condiciones ácidas, conduciendo al derivado **94** con un rendimiento del 83%. Por último, mediante una segunda reacción de glicosidación se formó el enlace α1,6 con el tiotrisacárido **92**, en presencia nuevamente de NIS y TfOH. De nuevo, aunque hay dos posiciones libres susceptibles de ser glicosidadas, debido a la mayor reactividad del hidroxilo primario en 6 y el impedimento estérico de la posición 4, se glicosila exclusivamente en la posición 6. Tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se obtuvo el pentasacárido **95** con un rendimiento del 70%. El último paso



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas

consistió en la desprotección de los grupos hidroxilo con un exceso de MeONa en una mezcla MeOH/tolueno a 50°C, durante 2 h. Tras purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH se obtuvo el epítipo Man₅ (77) funcionalizado con un espaciador que posee en el punto focal un grupo azido, que permite su posterior conjugación a otras estructuras.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

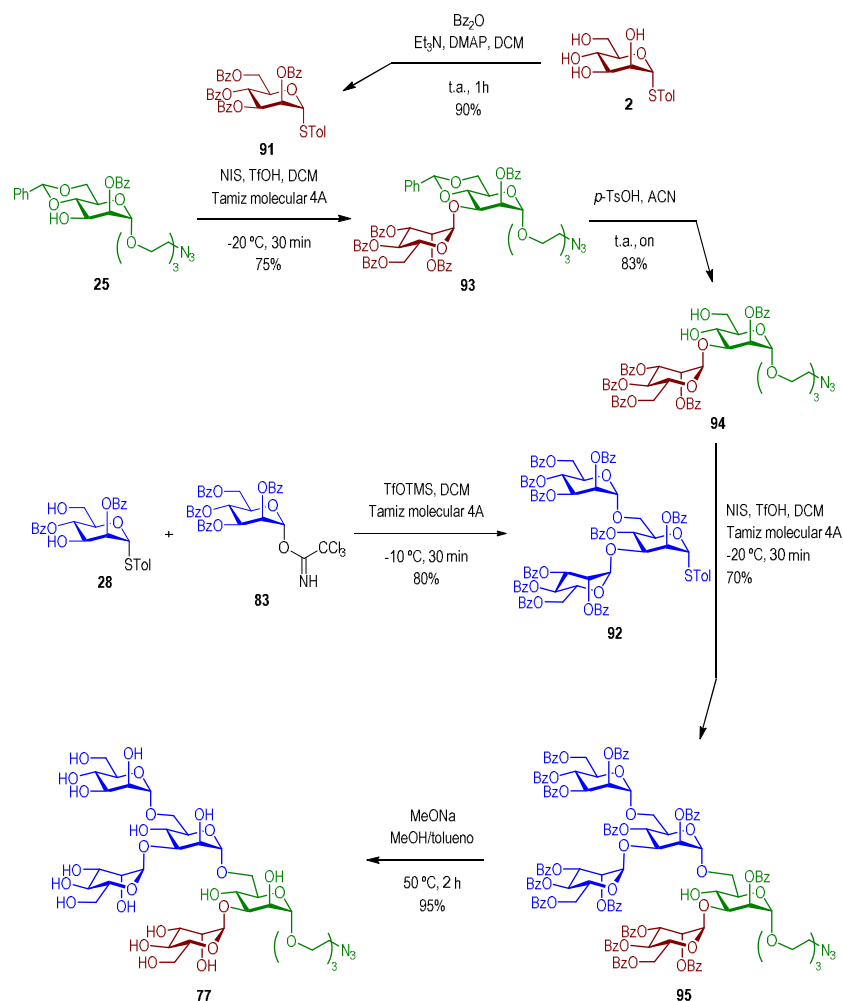
<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



Capítulo 3



Esquema 3.44 Síntesis del derivado 77.

Como donadores de glicosilo se emplearon los bloques de construcción **91** y **92**. Por un lado, se preparó el monosacárido donador de glicosilo **91**, benzoilando todas las posiciones del monosacárido **2**, con Bz_2O , Et_3N y DMAP.



Por otro lado, fue necesario sintetizar el trisacárido ramificado **92** con un grupo *S*-tolilo mediante una reacción de glicosidación 2+1. (Esquema 3.44) En este caso, se empleó como aceptor de glicosilo el derivado *S*-tolilo **28**, el mismo aceptor que se empleó para la síntesis del bloque pentasacárido **29** del Man₉. Como dador de glicosilo, se empleó el monosacárido **83** con un grupo tricloroacetimidato en la posición anomérica. No se utilizó el derivado **91** que posee un grupo *S*-tolilo, ya que las condiciones de reacción serían diferentes y podría propiciar la autoglicosidación del derivado **28**. La reacción de glicosidación 2+1 se llevó a cabo en presencia de TMSOTf a -10°C, obteniéndose el derivado **92** con un rendimiento del 80% tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

Mediante RMN y espectrometría de masas fueron caracterizados los derivados **95** y **77** (Figura 3.33), así como los intermedios **93** y **94**.

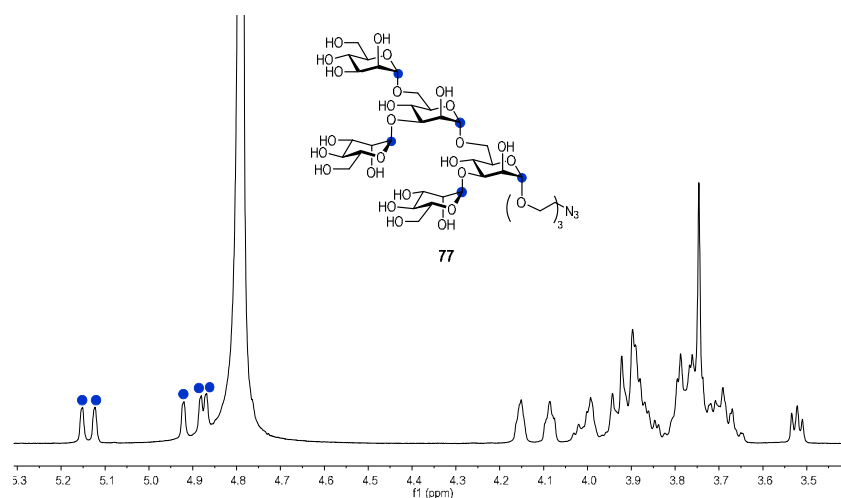


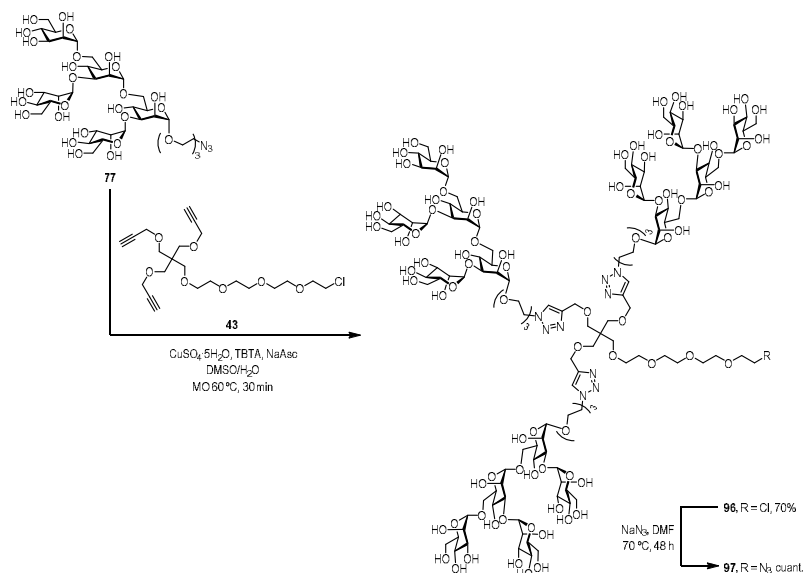
Figura 3.33 Espectro de ¹H-RMN (400MHz, D₂O, 298 K) del compuesto **77**.

A partir del derivado **77**, se sintetizó el glicodendrón **97** de primera generación, usando el núcleo de crecimiento **43**. (Esquema 3.45) Para ello, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento CuAAC, con CuSO₄ 5H₂O, TBTA y NaAsc bajo irradiación de microondas, para obtener el glicodendrón **96** con tres unidades de Man₅, tras purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH. En el punto focal de esta estructura había un



Capítulo 3

átomo de cloro, que se sustituyó por un grupo azido con un exceso de azida sódica a 70°C. De manera cuantitativa, se obtuvo el glicodendrón **97** que puede ser acoplado a otras biomoléculas.



La estructura de ambos glicodendrones fue caracterizada por RMN y espectrometría de masas. En el espectro de masas del glicodendrón **96**, (Figura 3.34) se observaron únicamente las señales correspondientes a los iones $[M+2Na]^{2+}$: m/z 1723.7, $[M+3Na]^{3+}$: m/z 1156.7.

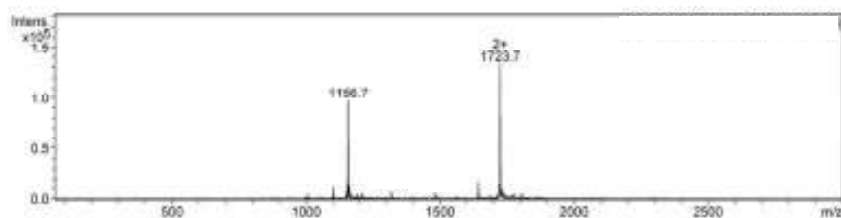


Figura 3.34 Espectro ESI del compuesto **96**.



Síntesis y presentación multivalente de oligomanosas. Estudios de afinidad con lectinas

Las oligomanosas **73-77** preparadas siguiendo nuestra estrategia convergente, así como los glicodendrones **86** y **97**, están convenientemente funcionalizados para que puedan ser conjugados a diferentes soportes y así, obtener sistemas multivalentes con gran afinidad por los receptores celulares.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



Capítulo 3

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



CAPÍTULO 4

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE GLICODENDRONES Y NEOGLICOPROTEÍNAS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

4.1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

4.1.1 El sistema inmune

El sistema inmune es la defensa natural del organismo frente a las infecciones causadas por patógenos como las bacterias y los virus y se encarga del mantenimiento de la homeostasis de las células huéspedes. Esta barrera protectora es capaz de detectar y destruir a los agentes infecciosos que entran en el organismo.¹⁵⁴

La primera defensa contra los patógenos son las barreras anatómicas y fisiológicas que incluyen la piel, las mucosas, el pH ácido del estómago y las lisozimas bacteriolíticas, la saliva y otras secreciones.

Existen dos tipos de respuesta inmune frente a organismos invasores: la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adquirida. Los componentes del sistema inmune capaces de generar una respuesta inmune innata son células de origen mieloide; dentro de las cuales se encuentran los basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos o células dendríticas DCs y, por otro lado, las células asesinas naturales (NK, del inglés *Natural Killer*) de origen linfoide. (Figura 4.1) Entre las moléculas del sistema inmune que regulan la respuesta inmune innata se encuentran las proteínas circulantes y las citocinas. Este tipo de defensa incluye una variedad de reacciones rápidas en respuesta a agentes infecciosos a través de un pequeño número de receptores que no varían. Si esta respuesta es excesiva provoca procesos inflamatorios.¹⁵⁵

¹⁵⁴ Delves, P. J.; Roitt, I. M. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 37.

¹⁵⁵ a) Beutler, B. *Mol. Immunol.* **2004**, *40*, 845. b) Turvey, S. E.; Broide, D. H. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S24.



Capítulo 4

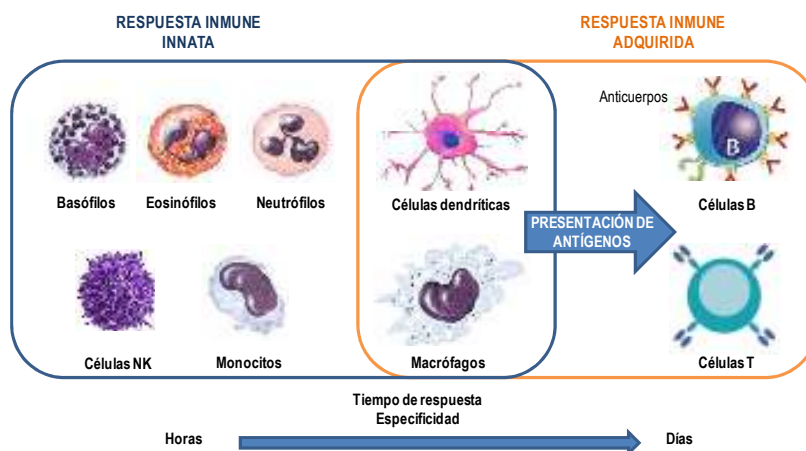


Figura 4.1 Componentes del sistema inmune.

La respuesta inmune adquirida involucra la proliferación de células B específicas derivadas de la médula ósea (del inglés *bone-marrow derived lymphocytes*) o células T derivadas del timo (del inglés *thymus-derived lymphocytes*), todas ellas de origen linfoide.¹⁵⁶ (Figura 4.1) Los linfocitos T intervienen en la inmunidad celular mientras que los linfocitos B son los responsables de la inmunidad humoral. Las moléculas que son reconocidas por los receptores de los linfocitos, se conocen como antígenos. Una vez que la célula B reconoce a su antígeno, se multiplica y se diferencia, generando células plasmáticas capaces de producir grandes cantidades de una forma soluble de dicho receptor, que puede ser secretada. Estas moléculas se denominan anticuerpos y son grandes glicoproteínas que se encuentran en la sangre y en los líquidos tisulares. Al ser prácticamente idénticas al receptor original, son capaces de unirse al antígeno que activó inicialmente a las células B, desencadenando una respuesta inmune concreta frente a ese antígeno.

Cabe señalar que no todos los antígenos son inmunogénicos. En este sentido, los antígenos deben estar unidos a moléculas inmunogénicas para estimular una respuesta determinada, las cuales son denominadas adyuvantes. La estructura de los antígenos puede variar desde estructuras químicas sencillas hasta moléculas de alta complejidad estructural. Tanto los

¹⁵⁶ Bonilla, F. A.; Oettgen, H. C. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S33.



receptores de las células T (TCR, del inglés *T-cell receptors*) como los anticuerpos incorporados en la membrana de las células B o receptores de las células B (BCR, del inglés *B-cell receptors*) presentan sitios de unión de pequeño tamaño. Por ello, estos receptores son capaces de reconocer una pequeña parte de un antígeno complejo (epítipo).

La respuesta adquirida es mucho más lenta que la respuesta innata del cuerpo porque sus células son muy específicas y requieren ser activadas antes de que puedan actuar. Se caracteriza por una alta especificidad por un determinado tipo de antígeno y presenta una alta capacidad de memoria. Este tipo de respuesta mejora ante la exposición repetida a una determinada infección, al contrario que las respuestas innatas que ocurren siempre con la misma intensidad independientemente del número de veces que se encuentren con el mismo agente infeccioso.

En general, las respuestas inmunes innatas y adquiridas trabajan juntas para eliminar los patógenos y proteger al organismo contra infecciones. La falta de alguno de los componentes de la respuesta inmune causa una mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas, cuya gravedad depende del tipo de célula afectada y de cuál sea el efecto.

El sistema inmune innato es capaz de generar respuestas inflamatorias de protección casi inmediatas tras la exposición a antígenos microbianos. Además, este sistema es capaz de generar la activación de la respuesta inmune adquirida gracias a las DCs.¹⁵⁷ Este tipo de células se encargan de capturar, procesar y presentar los antígenos a las células T. Las DCs se comportan como células presentadoras de antígenos (APCs, del inglés *antigen-presenting cells*) cuando algún receptor de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *pattern recognition receptor*) presente en su superficie reconoce cualquier patrón molecular asociado a patógenos (PAMP, del inglés *pathogen-associated molecular pattern*) existente en la superficie de los microorganismos que provoca su activación.^{13, 158} La activación de las DCs provoca la sobreexpresión de las moléculas del Complejo de Histocompatibilidad Mayor (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*), de clase I y II y de las moléculas co-estimuladoras de la familia B7, conocidas como CD80 y CD86 (del inglés *cluster of differentiation 80* y *86*, respectivamente). Estas moléculas generan las señales necesarias que conducen a la activación de los linfocitos. Para ello, las DCs activadas migran hacia el sistema linfoide, donde se lleva a cabo la presentación de los antígenos a las células T. (Figura 4.2)

¹⁵⁷ Bell, D.; Young, J. W.; Banchereau, J. *Adv. Immunol.* **1999**, 72, 255.

¹⁵⁸ Medzhitov, R.; Janeway, C. A. Jr. *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, 9, 4.



Capítulo 4

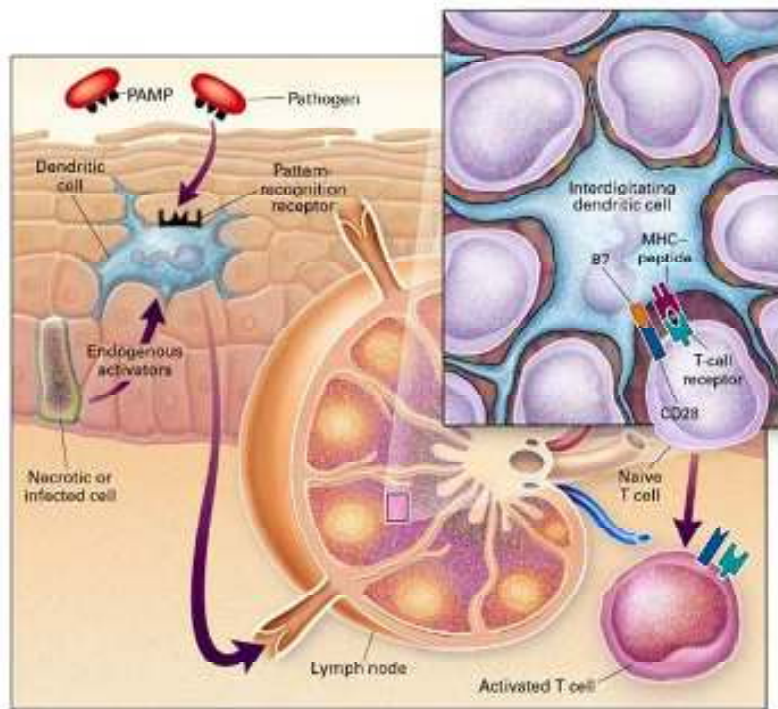


Figura 4.2 Activación de células dendríticas. Imagen extraída de la referencia 154.

Antes de que los antígenos se presenten en la superficie de las APC en forma de pequeños fragmentos polipeptídicos, ha tenido lugar un procesamiento intracelular, que provoca que se asocien a moléculas MHC de clase I y II. Únicamente los timocitos que expresan receptores celulares de tipo TCR (del inglés *T-cell receptors*) presentan afinidad por las moléculas MHC y se diferencian en linfocitos T maduros.¹⁵⁹ También se puede producir la asociación de los factores co-estimuladores CD86 y CD80 con el receptor CD28 presente en las células T.

Los TCRs presentan cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ unidas con 5 subunidades CD3 y se encargan de interactuar con los complejos MHC, mientras que CD3 interviene en las señales de activación de las células T. Según la teoría de la selección clonal, cada antígeno estimulará a aquel

¹⁵⁹ Rudolph, M. G.; Stanfield, R. L.; Wilson, I. A. *Annu. Rev. Immunol.* **2006**, *24*, 419.



linfocito o grupo de linfocitos que en su membrana disponga de receptores capaces de unirse a él específicamente. En consecuencia, se producirá la proliferación y diferenciación en células con las mismas características de reconocimiento que los linfocitos originales.¹⁶⁰

En función del complejo MHC con el que interaccionan, se distinguen dos tipos de células T: CD4⁺ si interaccionan con las moléculas MHC II y CD8⁺ si reconocen moléculas MHC I. Para que se produzca esta interacción, las DCs deben migrar a los órganos linfoides secundarios. Tras el proceso de reconocimiento, los linfocitos se activan y se diferencian en linfocitos cooperadores (T_H, del inglés *helper T cells*) y linfocitos T citotóxicos (T_c).

Los linfocitos T_c, tras ser activados por las moléculas MHC I, provocan la apoptosis celular de las células infectadas sin afectar al resto de células que se encuentran próximas.

Los linfocitos T_H o linfocitos CD4⁺ llevan a cabo la activación de las células del sistema inmune innato; linfocitos B, células T_c o células no inmunes, mediante contacto directo, o la liberación de citocinas, desempeñando así un papel importante en la activación o supresión de la respuesta inmune.

Las citocinas son pequeñas proteínas no estructurales que regulan las funciones de las células que las producen. Se trata de factores solubles que se encargan de la transmisión de las señales entre los linfocitos, los fagocitos y otras células del organismo. Existen numerosas familias de citocinas con capacidad anti- o pro-inflamatoria.¹⁶¹ Entre las principales clases de citocinas se encuentran: interferones (IFN), interleucinas (IL), factores de crecimiento de colonias CSF (del inglés *Colony-Stimulating Factor*), factores de necrosis tumoral TNF (del inglés *Tumor necrosis factor*), etc.

Las células T_{H0} se diferencian en varios subtipos celulares (T_{H1}, T_{H2}, T_{H9}, T_{H17}, etc.), en función de las citocinas y factores de transcripción presentes en el medio.¹⁶² Las fuentes iniciales de citocinas son las APCs y otras células del sistema inmune innato. Tras la diferenciación de las células T_H, cada subtipo secreta diferentes citocinas, que a su vez pueden provocar y/o mejorar la diferenciación de las células T_H. En la figura 4.3 se muestran algunos subtipos de células T_H junto con las citocinas que son capaces de liberar.

¹⁶⁰ Randolph, G. J.; Angeli, V.; Swartz, M. A. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 617.

¹⁶¹ Blanco, P.; Palucka, A. K.; Pascual, V.; Banchereau, J. *Cytokine Growth F. R.* **2008**, *19*, 41.

¹⁶² Luckheeram, R. V.; Zhou, R.; Verma, A. D.; Xia, B. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, ID 925135.



Capítulo 4

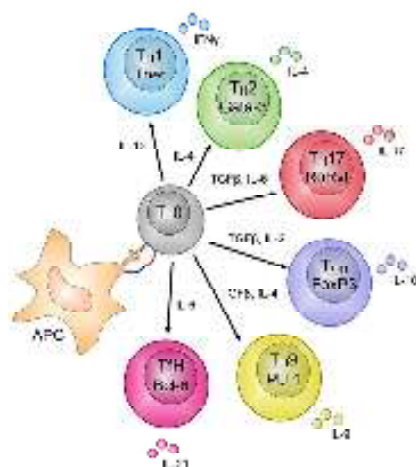


Figura 4.3 Diferenciación de las células T_{H0} a través de las correspondientes citocinas y factores de transcripción. Imagen extraída de la referencia 163.¹⁶³

Las células T_{H1} generan respuestas celulares, activan los fagocitos mononucleares, las células NK y las células T_c con el objetivo de eliminar organismos intracelulares y partículas virales. Por otro lado, las células T_{H2} interactúan con las células B promoviendo su multiplicación y diferenciación, que provoca a su vez la producción de anticuerpos. Además, los linfocitos T_{H17} inducen la inflamación por los leucocitos circulantes (fundamentalmente neutrófilos y monocitos).

Existen numerosos mecanismos para activar las células especializadas del sistema inmune, como por ejemplo la construcción de neoglicoproteínas, cuya estructura mimetiza los antígenos naturales.

4.1.2 Activación de las células dendríticas y de los linfocitos T y B mediante neoglicoproteínas

Para que se desencadene una respuesta inmune frente a un determinado patógeno de manera adecuada, es necesario que se produzca la detección y captura de un antígeno por medio de las

¹⁶³ Russ, B. E.; Prier, J. E.; Rao, S.; Turner, S. J. *Front. Genet.* **2013**, 4, 218.



APCs. A continuación, este antígeno debe procesarse para que se produzca la activación de los linfocitos T y B en los órganos linfoides secundarios. Las APCs pueden captar los antígenos mediante mecanismos no específicos o utilizando mecanismos específicos como la endocitosis mediada por un determinado receptor.

Una estrategia empleada ampliamente en glicobiología, en procesos de inhibición y regulación de la respuesta inmune consiste en la construcción de neoglicoproteínas.¹⁶⁴ Se trata de proteínas, bien globulinas o albúminas, tales como la albúmina de suero bovino BSA¹⁶⁵ o la ovoalbúmina OVA,¹⁶⁶ modificadas mediante la unión covalente de carbohidratos. Los carbohidratos pueden ser monosacáridos, oligosacáridos o incluso polisacáridos. El número de unidades de carbohidrato que pueden conjugarse en estas neoglicoproteínas puede variar desde unas pocas hasta aproximadamente 40 unidades, lo que tiene un efecto importante en la fortaleza de la interacción con los receptores. Las unidades de carbohidrato pueden ser reconocidas por los receptores de las APCs facilitando la internalización de estos glicoconjugados. A continuación, los antígenos son procesados y presentados como moléculas MHCI/II a las células T, tras inducirse la maduración de las DCs.

Existen muchos ejemplos descritos en la bibliografía en los que se emplea OVA para preparar neoglicoproteínas mediante conjugación con una gran variedad de glicanos.¹⁶⁷ Esta proteína se encuentra en la clara de huevo y tiene la capacidad de desencadenar respuestas inmunes en mamíferos. Se sabe que sus residuos peptídicos están presentes en las moléculas 2K^b MHC clase I y en moléculas I-A^b MHC clase II reconocidas por las células transgénicas OT-I y OT-II de ratones.

Aunque esta proteína presenta varias copias de carbohidratos en su estructura que pueden ser reconocidos por los PRRs presentes en las células dendríticas, se necesita una alta concentración de la misma para desencadenar una respuesta inmune lo suficientemente importante en ratones. La mayoría de los glicanos existentes en la proteína OVA corresponden a glicanos complejos (54.9%), mientras que aquellos ricos en manosa, tales como Man₅ o Man₆ representan sólo un 23% del total de las glicoformas presentes. El resto de glicoformas son glicanos híbridos (16.2%) y otras oligomanosas (3%). Los residuos manosilados de OVA

¹⁶⁴ Nilsson, C. L. *Lectins: Analytical Technologies* Elsevier, 2007.

¹⁶⁵ Peters, T. *Jr. Adv. Protein Chem.* 1985, 37, 161.

¹⁶⁶ Avci, F. Y.; Li, X.; Tsuji, M.; Kasper, D. L. *Nat. Med.* 2011, 17, 1602.

¹⁶⁷ Streng-Ouwehand, I.; Ho, N. I.; Litjens, M.; Kalay, H.; Boks, M. A.; Cornelissen, L. A. M.; Singh, S. K.; Saeland, E.; Garcia-Vallejo, J. J.; Ossendorp, F. A.; Unger, W. W. J.; van Kooyk, Y. *ELife* 2016, 5, e11765.



Capítulo 4

provocan la interacción de esta proteína con el MR, entre otros, y da lugar a la presentación de OVA a células T.¹⁶⁸ Teniendo en cuenta que la internalización de esta glicoproteína tiene lugar a través de diversos PRRs, si se conjuga con un mayor número de unidades de carbohidrato, este proceso estará más favorecido y, por lo tanto, desencadenará una respuesta inmune mayor respecto a la proteína OVA natural. Algunos de los residuos de OVA son imprescindibles en la activación del MHC y, por tanto, en la inducción de la proliferación de células T.¹⁶⁹

Ejemplos recientes de neoglicoproteínas funcionalizadas con restos manosilados demuestran que este tipo de biomoléculas son capaces de promover la proliferación de células T tras la activación de las DCs.^{50, 170} Uno de los primeros ejemplos relacionados es el trabajo descrito por Sheng y col.,¹⁷⁰ en el que demostraron que OVA conjugada con dendrímeros tipo PAMAM manosilados inducían una mayor respuesta inmune que una molécula de OVA no modificada. Estos glicoconjugados causaban la maduración de las DCs y daban lugar a la proliferación de células T *in vitro*. Además, con estos sistemas consiguieron inhibir el crecimiento de las células tumorales B16 al tratarlas con la neoglicoproteína y vieron además que ésta provocaba la proliferación de células T CD8⁺, lo que facilitaba la protección frente a tumores en ratones. Sin embargo, estas neoglicoproteínas presentaban algunas desventajas, como son su polidispersidad y su citotoxicidad debido al carácter catiónico de los glicodendrímeros empleados.

En otro trabajo, Hacoen y col.⁵⁰ comprobaron que el conjugado de OVA con el oligosacárido Man₉ internalizaba mejor en las DCs que la propia OVA no modificada y provocaba una mayor proliferación de células T. Los experimentos consistieron en la incubación de esta neoglicoproteína con células T, células B, DCs y macrófagos aislados de células transgénicas OT-II de ratones. También observaron que el conjugado BSA-Man₉ inhibía la internalización de OVA-Man₉ y, por consiguiente, la proliferación de células T debido a que los residuos peptídicos derivados de BSA no son reconocidos por las células OT-II. Estos hechos ponían de manifiesto que la internalización de OVA-Man₉ se debía al oligosacárido conjugado a la glicoproteína. Además, cuando incubaron OVA-Man₉ únicamente con células T, en ausencia de las APCs, no observaron la proliferación de células, lo que demostraba que los

¹⁶⁸ a) Burgdorf, S.; Lukacs-Kornek, V.; Kurts, C. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 6770. b) Burgdorf, S.; Kurts, C. *Curr. Opin. Immunol.* **2008**, *20*, 89.

¹⁶⁹ a) Ishioka, G. Y.; Lamont, A. G.; Thomson, D.; Bulbow, N.; Gaeta, F. C. A.; Sette, A.; Grey, H. M. *J. Immunol.* **1992**, *148*, 2446. b) Mao, X.; Wang, K.; Du, Y.; Lin, B. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3273.

¹⁷⁰ Sheng, K.-C.; Kalkanidis, M.; Pouniotis, D. S.; Esparon, S.; Tang, C. K.; Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. A. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 424.



antígenos tenían que ser presentados a través de las APCs. Del mismo modo, con células T OT-I de ratón, observaron un incremento moderado en la presentación de moléculas MHC I con la neoglicoproteína OVA-Man₉ respecto a OVA no modificada. Teniendo en cuenta que DC-SIGN puede reconocer antígenos tipo Lewis no-sialilados, éstos se incubaron junto con OVA-Man₉, sin que se observara una disminución en la proliferación de células T, lo que demuestra que OVA-Man₉ puede ser reconocida por otros receptores presentes en las DCs además de DC-SIGN. Sin embargo, en este caso, observaron que la neoglicoproteína OVA-Man₉ no era capaz de provocar la producción de citocinas.

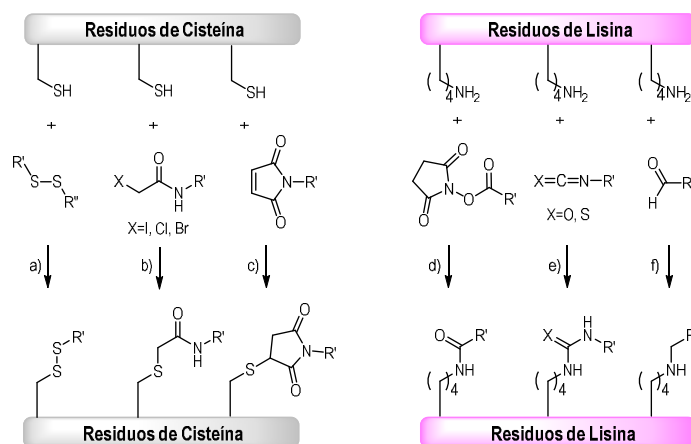
4.1.2.1 Métodos de preparación de neoglicoproteínas

Existe una gran variedad de métodos químicos para llevar a cabo la modificación de proteínas.¹⁷¹ Sin embargo, no todos son adecuados para trabajar con sistemas biológicos. Se deben considerar una serie de criterios para diseñar el procedimiento químico que permita llevar a cabo la modificación sobre una proteína biológicamente activa. Este proceso no sólo debe ser eficiente desde el punto de vista químico, sino que además debe ser suave para preservar la estructura nativa y la actividad de la proteína. En este sentido, no se debe modificar ni la carga ni la conformación de la proteína ni tampoco modificar residuos críticos de ésta. El carbohidrato y el resto de reactivos deben ser estables y solubles tanto en las condiciones de reacción, como en condiciones fisiológicas. Idealmente, la preparación tiene que ser versátil, para poder utilizarla con una gran variedad de azúcares, y debe ser rápida. La elección de la metodología sintética dependerá de la naturaleza del residuo que se pretende incorporar y la finalidad de la nueva glicoproteína. Una estrategia habitual es la modificación quimioselectiva de uno o varios aminoácidos manteniéndose inalterados el resto de residuos presentes en la proteína. Se suele tratar de la modificación de los residuos de cisteína (Cys) o de lisina (Lys). (Esquema 4.1) Además, la transformación puede ser regioselectiva si dentro de un mismo tipo de aminoácidos se puede discriminar entre residuos con características particulares, como por ejemplo entre lisinas dispuestas hacia el exterior de la proteína frente a lisinas que se encuentran en el interior de la proteína.

¹⁷¹ a) Stowell, C. P.; Lee, Y. C. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1980**, 37, 225. b) Hackenberger, C. P.; Schwarzer, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 10030. c) Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 2174.



Capítulo 4



Esquema 4.1 Métodos de modificación de proteínas. Modificación de residuos de Cys: a) formación de enlaces disulfuro; b) alquilación; c) reacción tiol-eno. Modificación de residuos de Lys: d) reacción de acoplamiento con ésteres activados; e) reacción de acoplamiento con iso(tio)cianatos; f) aminación reductora con aldehídos.

El grupo SH del aminoácido Cys permite formar enlaces disulfuro¹⁷² (Esquema 4.1a) o llevar a cabo reacciones de alquilación, empleando como electrófilos α -halocarbonilos¹⁷² (Esquema 4.1b) o aceptores de Michael (Esquema 4.1c), como maleimidas.¹⁷³ Sin embargo, la modificación del residuo Cys implica condiciones específicas de pH y, por otra parte, este aminoácido es menos abundante que la Lys. La modificación de la amina primaria del residuo Lys se puede llevar a cabo con ácidos carboxílicos activados¹⁷⁴ (Esquema 4.1d) o con iso(tio)cianatos,¹⁷⁵ (Esquema 4.1e) entre otros, o mediante aminación reductora de aldehídos (Esquema 4.1f). En algunos casos, tras la modificación de la proteína, puede tener lugar una segunda reacción. En este sentido, se han desarrollado diversos métodos para introducir grupos bioortogonales, como azidas, alquinos o alquenos. Así, por ejemplo, se puede introducir un grupo azido para llevar a cabo una reacción de Staudinger, entre una azida y una fosfina o un

¹⁷² Hemantha, H. P.; Bavikar, S. N.; Herman-Bachinsky, Y.; Haj-Yahya, N.; Bondalapati, S.; Ciechanover, A.; Brik, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2665.

¹⁷³ Massa, S.; Xavier, C.; De Vos, J.; Caveliers, V.; Lahoutte, T.; Muyldermans, S.; Devoogdt, N. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 979.

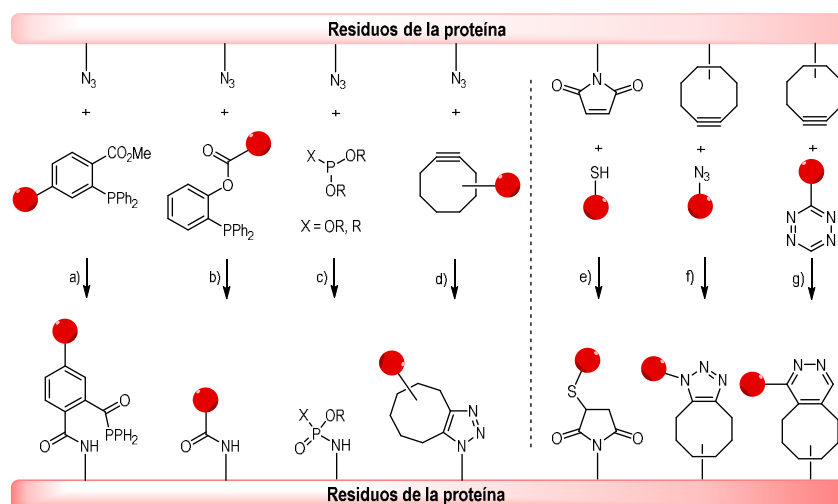
¹⁷⁴ a) Chen, X.; Muthoosamy, K.; Pfisterer, A.; Neumann, B.; Weil, T. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 500. b) Bailey, J. J.; Bundle, D. R. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2193.

¹⁷⁵ Patel, M. K.; Vijayakrishnan, B.; Koeppel, J. R.; Chalker, J. M.; Doores, K. J.; Davis, B. G. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 9119.



fosfito, generándose un iminofosforano que tras una etapa de hidrólisis conduce a la obtención de una amina¹⁷⁶ o la reacción de Staudinger “sin rastro” para generar amidas.¹⁷⁷ (Esquema 4.2a/b) También se puede llevar a cabo esta reacción con fosfitos¹⁷⁸ o fosfonitos, dando lugar a enlaces de tipo fosforamidato o fosfonamidato. (Esquema 4.2c) Además, el grupo azido puede participar en cicloadiciones [3+2] con alquinos tensionados sin la necesidad de tener que añadir catalizadores metálicos que pueden resultar tóxicos o dañar las proteínas.⁷⁸ (Esquema 4.2d)

Por otro lado, alquenos o ciclooctinos pueden ser incorporados a las proteínas y más tarde, pueden ser modificados sin la presencia de catalizadores metálicos, usando un acoplamiento tiol-eno.¹⁷⁹ (Esquema 4.2e) Además, los ciclooctinos se pueden hacer reaccionar con azidas o tetrazinas. (Esquema 4.2f/g)



Esquema 4.2 Reacciones bioortogonales de proteínas con azidas, libres de catalizadores metálicos: a) reacción de Staudinger, b) reacción de Staudinger “sin trazas”, c) reacción con fosfitos y fosfonitos y d) cicloadición [3+2] con ciclooctinos (SPAAC). Reacciones bioortogonales en proteínas con maleimidas o ciclooctinos, libres de catalizadores metálicos: e) reacción Tiol-eno, f) SPAAC con azidas y g) SPAAC con tetrazinas.

¹⁷⁶ Bernades, G. J. L.; Linderoth, L.; Doores, K. J.; Boutureira, O.; Davis, B. G. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1383.

¹⁷⁷ Tam, A.; Raines, R. T. *Methods Enzymol.* **2009**, *462*, 25.

¹⁷⁸ Serwa, R.; Majkut, P.; Horstmann, B.; Swiecicki, J.-M.; Gerrits, M.; Krause, E.; Hackenberger, C. P. R. *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 596.

¹⁷⁹ Li, Y.; Pan, M.; Li, Y.; Huang, Y.; Guo, Q. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2624.



Capítulo 4

4.2 OBJETIVOS

En el proceso de internalización de neoglicoproteínas, las interacciones entre las lectinas presentes en la superficie de las DCs y los carbohidratos son de gran importancia. Por ello, con el objetivo de aumentar la afinidad de las neoglicoproteínas por los receptores presentes en la superficie de las DCs y mejorar su internalización, se deben diseñar cuidadosamente las estructuras glicosídicas que se van a conjugar a las proteínas. Empleando estructuras dendríticas que permitan la presentación multivalente de los carbohidratos, se pretende facilitar el proceso de internalización de las neoglicoproteínas y, por tanto, inducir una mayor respuesta inmune. Para alcanzar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación de la respuesta inmune que generan glicodendrones de carbohidratos de diferente naturaleza.
- Construcción de neoglicoproteínas con estructuras dendríticas de monosacáridos u oligosacáridos naturales.
- Estudio de la mejora en la respuesta inmune que desencadenan los glicoconjugados preparados.

4.3 EXPOSICIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

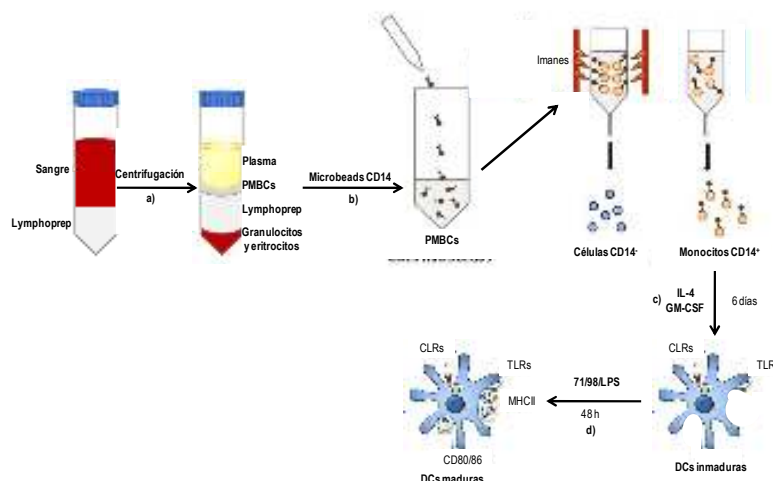
4.3.1 Evaluación del papel de los glicodendrones en la activación del sistema inmune innato

El trabajo que se presenta en este capítulo ha sido desarrollado en colaboración con el grupo de la Doctora Salomé S. Pinho del Instituto de Patología Molecular e Inmunología de la Universidad de Oporto durante una estancia breve llevada a cabo en su laboratorio.

Los trabajos desarrollados en esta colaboración pretenden evaluar el papel de la unidad glicosídica en la activación de las células dendríticas. Para ello, se llevaron a cabo estudios preliminares para determinar la influencia de la naturaleza del carbohidrato a la hora de desencadenar respuestas inmunes.



En este estudio, se emplearon DCs provenientes de sangre humana que se aislaron siguiendo un protocolo comúnmente utilizado.¹⁸⁰ (Esquema 4.3)



Esquema 4.3 Etapas necesarias para aislar las células dendríticas a partir de sangre humana: a) aislamiento de PMBCs; b) separación inmunomagnética de los monocitos CD14⁺; c) diferenciación de las DCs; d) maduración de las DCs.

De manera resumida, en primer lugar, se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PMBCs, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) provenientes de sangre humana de un donante sano, mediante centrifugación con un medio de gradiente de densidad (Lymphoprep). (Esquema 4.3a) A continuación, se aislaron los monocitos CD14⁺, mediante separación celular inmunomagnética. (Esquema 4.3b) Durante 6 días, en presencia de la interleucina 4 (IL-4) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, del inglés *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) se diferenciaron las DCs. (Esquema 4.3c/Figura 4.4)

¹⁸⁰ Posch, W.; Lass-Flörl, C.; Wilflingseder, D. *J. Vis. Exp.* **2016**, 118, 1.



Capítulo 4



Figura 4.4 Imagen de las DCs inmaduras a través del microscopio óptico.

A continuación, se incubaron las DCs aisladas con el glicodendrón de 9 unidades de manosa **71** y el glicodendrón de 9 unidades de GlcNAc **98**. (Figura 4.5) (Esquema 4.3d) La síntesis del derivado **98** fue descrita en una tesis doctoral anterior de nuestro grupo de investigación.^{81d} Se sabe que el glicodendrón **71** es capaz de internalizarse en las DCs tras la interacción con el receptor DC-SIGN, pero se desconoce si es capaz de generar la activación de los complejos MHC o de las moléculas co-estimuladoras CD-80 y CD-86.⁸³



Evaluación de la respuesta inmune de glicodendrones y neoglicoproteínas

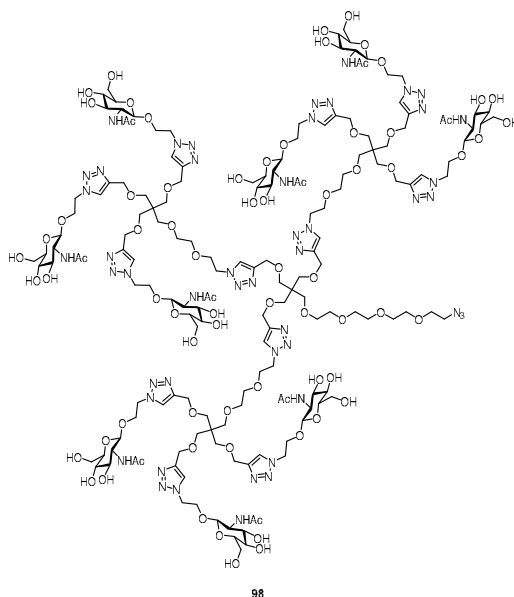


Figura 4.5 Estructura del glicodendrón 98.

Como control positivo, se utilizaron lipopolisacáridos (LPS) presentes en la membrana externa de las bacterias Gram-Negativas. Se probaron 3 concentraciones diferentes de cada uno de los glicodendrones 71 y 98, para encontrar posibles diferencias. Tras 48h de cultivo, se aislaron las células para estudiar la expresión de moléculas mediante citometría de flujo o FACS (del inglés *Fluorescence-activated cell sorting*).

La técnica FACS permite medir de manera cuantitativa y simultánea varios parámetros que determinan las propiedades de un número de células concreto y poder extrapolar estos resultados a la población celular completa.¹⁸¹ De esta manera, se pueden clasificar las células según su tamaño, granularidad o intensidad de fluorescencia. La suspensión de células se hace pasar por un capilar para que las células puedan salir de manera aislada y se hace incidir sobre ellas un rayo de luz monocromático, generalmente luz láser. Cuando el rayo incide en una célula, la luz se dispersa en varias direcciones y se recoge en varios detectores. Por un lado, se coloca un detector en línea con el rayo de luz, conocido como detector de Dispersión Frontal

¹⁸¹ Bonner, W. A.; Hulett, H. R.; Sweet, R. G.; Herzenberg, L. A. *Rev. Sci. Instrum.* **1972**, *43*, 404.



Capítulo 4

(FSC, del inglés *Forward Scatter*). (Figura 4.6) A su vez, se utilizan otros detectores posicionados angularmente a la trayectoria del rayo, denominados como detectores de Dispersión Lateral o SSC (del inglés *SideScatter*). El detector frontal da información sobre el tamaño de la célula, mientras que los detectores laterales proporcionan datos sobre la granularidad y la morfología de la célula.

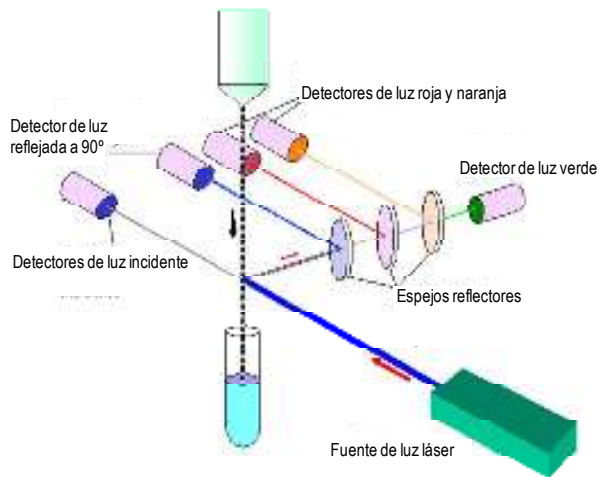


Figura 4.6 Esquema general de los componentes de un citómetro de flujo.

En función de la luz dispersada de manera frontal y lateral, se pudieron diferenciar las poblaciones. Los monocitos se pueden distinguir de los granulocitos ya que son células grandes, pero no granulares (menor SSC). Por otro lado, los linfocitos de menor tamaño se encuentran a valores menores de FSC y SSC. De esta manera se pudo definir la zona donde se encuentra la población de monocitos. (Figura 4.7)



Evaluación de la respuesta inmune de glicodendrones y neoglicoproteínas

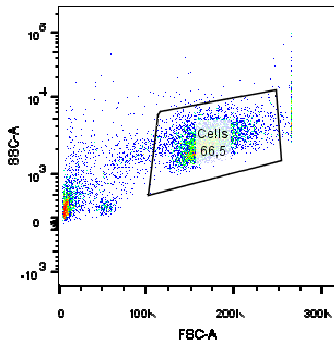


Figura 4.7 Gráfico de puntos (*dot-plot*) de dos dimensiones SSC-A vs FSC-A.

A continuación, con el gráfico de luz dispersada frontal-altura frente a luz dispersada frontal-área, se seleccionaron las células sencillas y se discriminaron los dímeros o aglomerados.

Con esta técnica, también se pueden distinguir algunas de las proteínas extracelulares. En este caso, se utilizan anticuerpos monoclonales marcados fluorescentemente que reconocen antígenos específicos presentes en la superficie de las células. Para ello, se usaron espejos que reflejan la luz emitida hasta una determinada longitud de onda (λ) y dejan pasar la luz con valores superiores de λ . Si se colocan varios espejos, se puede descomponer la luz en varios rangos de λ y detectar diferentes fluoróforos. Con este fin, se pueden utilizar anticuerpos directos que son específicos contra antígenos concretos presentes en la superficie celular, y que se encuentran disponibles comercialmente ya conjugados a un fluoróforo. (Figura 4.8a) Por otro lado, cuando no existe ningún anticuerpo fluorescente para un determinado marcador de la superficie celular, se emplea el anticuerpo sin conjugar contra el antígeno buscado y, posteriormente, se añade un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente que reconoce como antígeno al primer anticuerpo. (Figura 4.8b) En este caso, se habla de marcaje indirecto.



Capítulo 4

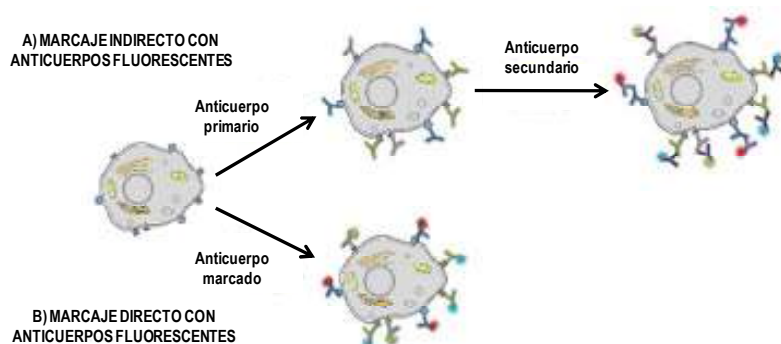


Figura 4.8 Marcaje de las células con anticuerpos conjugados a fluoróforos, de manera: A) indirecta y B) directa.

Tras 48 h de incubación de las DCs con disoluciones de diferente concentración de los glicodendrones **71** y **98**, las células se trataron con el marcador de viabilidad flexible (FVD, del inglés *Fixable Viability Dyes*) para seleccionar únicamente las células vivas. Este compuesto se encontraba marcado con la mezcla de los fluoróforos Aloficocianina-Cianina 7 (APC-Cy7, del inglés *Allophycocyanin-Cyanine7*), cuyos máximos de excitación y emisión se sitúan aproximadamente en 650 nm y 785 nm, respectivamente. FVD es capaz de reaccionar con las aminas de las proteínas situadas en el exterior de las células vivas. Sin embargo, este reactivo es capaz de atravesar la membrana dañada de las células muertas y marcar fluorescentemente tanto las aminas de las proteínas situadas en el interior como las del exterior, siendo la intensidad de fluorescencia mayor en este tipo de células. (Figura 4.9a) Por otro lado, se trataron las células con el anticuerpo del receptor CD11c (del inglés *Cluster of Differentiation 11c*) presente en la superficie de las DCs, conjugado con fluoresceína (FITC, del inglés *Fluorescein isothiocyanate*). Teniendo en cuenta el número total de monocitos marcados con el anticuerpo CD14 conjugado con el fluoróforo aloficocianina (APC, del inglés *allophycocyanin*) (que puede ser excitado con un láser entre 594 y 633 nm y cuyo máximo de emisión de fluorescencia se sitúa en 650 nm), se pueden distinguir las células dendríticas del conjunto total de estos monocitos ya que el anticuerpo unido al receptor CD11c de DCs emite alrededor de 518 nm. (Figura 4.9b)



Evaluación de la respuesta inmune de glicodendrones y neoglicoproteínas

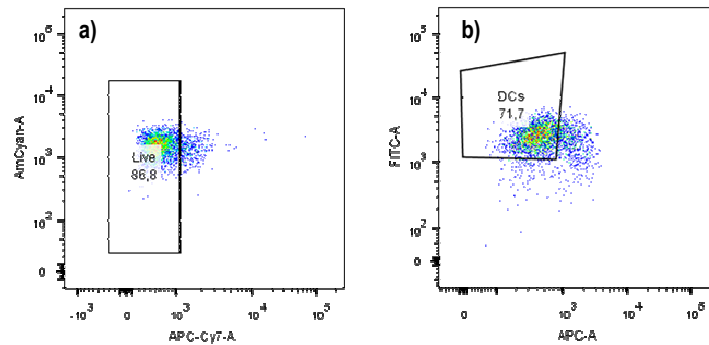


Figura 4.9 Gráficos de puntos (*dot-plot*) que muestran la población de: a) células vivas y b) DCs.

Por último, las células sin tratar (control) y las tratadas con disoluciones 26µM de los glicodendrones **71** y **98** y de LPS, fueron incubadas con anticuerpos fluorescentes específicos para las moléculas MHC de clase II, CD86 y CD80. Los anticuerpos de cada una de estas moléculas están marcados con los fluoróforos: PerCP-Cy5.5 (CD86), AmCyan (CD80) y PE-Cy7 (MHCII), siendo su longitud de onda máxima de emisión diferente.

Para comparar los resultados obtenidos, se calculó el valor de intensidad de fluorescencia media (MFI, del inglés *Mean Fluorescence Intensity*) que se corresponde con la relación entre la intensidad de fluorescencia en una determinada zona del espectro de fluorescencia y el número total de células. Da idea del número de receptores marcados con un determinado anticuerpo que están presentes en las células. (Figura 4.10)



Capítulo 4

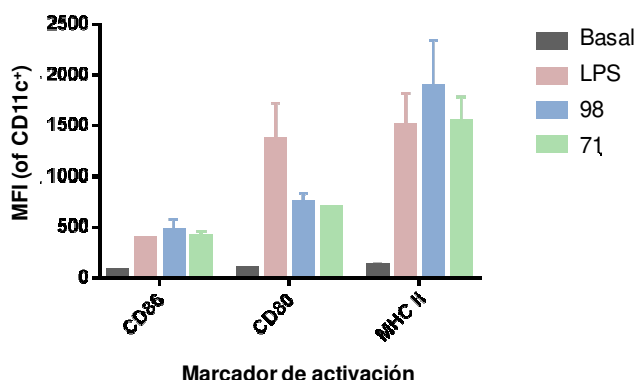


Figura 4.10 Valores de MFI para las células tratadas con disoluciones de los glicodendrones **71** y **98** a una concentración fija 26µM y LPS (50 ng/mL).

Cuando se comparó el valor de MFI para las células sin tratar (valor basal) frente al valor obtenido para las células cultivadas con disoluciones 26 µM de los glicodendrones o de LPS, se observó que los dos glicodendrones inducían una respuesta inmune o una ligera activación de las moléculas. Esta activación era más fuerte para el complejo MHC de tipo II. Todos los valores observados para las células tratadas con glicodendrones eran comparables a los de las células cultivadas con LPS, exceptuando el caso del co-estimulador CD80. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los dos glicodendrones **71** y **98**, en ningún caso.

A la vista de estos resultados, se decidió repetir los experimentos pero tratando las DCs con disoluciones de los glicodendrones **71** y **98** a una mayor concentración, 52 µM, manteniendo constante el número de células y el tiempo de incubación. En los histogramas de las células tanto tratadas como sin tratar con disoluciones de cada uno de los glicodendrones, se pudo observar una diferencia de desplazamiento en el caso de las células incubadas con el glicodendrón **71** y LPS. (Figura 4.11) El desplazamiento hacia una zona de mayor intensidad de fluorescencia demuestra que las células presentan estas moléculas.



Evaluación de la respuesta inmune de glicodendrones y neoglicoproteínas

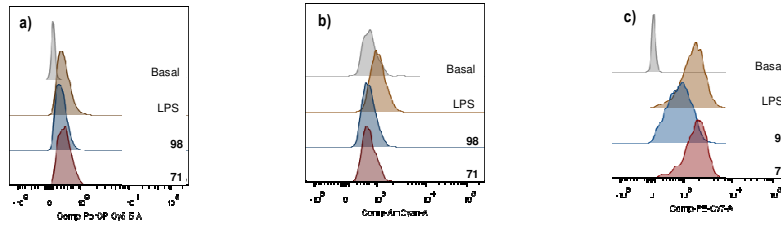


Figura 4.11 Histogramas de las moléculas de activación de DCs no tratadas y tratadas con disoluciones de los glicodendrones **71** y **98** de concentración 52 μ M y LPS (50 ng/mL): a) CD86, b) CD80 y c) MHCII.

En la figura anterior, se puede observar únicamente un efecto positivo para el complejo MHC de clase II al cultivar las DCs en presencia del glicodendron de 9 unidades de manosa **71** y de LPS, ya que el valor de la intensidad de fluorescencia es mayor. También, se observa que el glicodendron **98** es menos potente desde el punto de vista inmunogénico.

Del mismo modo, esta tendencia se mantuvo al representar los valores de MFI para cada una de las moléculas. Usando un t-test múltiple se pudo determinar si las diferencias eran o no significativas. (Figura 4.12) Tras analizar los resultados, se concluyó que el valor de MFI del complejo MHC de clase II de las DCs tratadas con una disolución 52 μ M del glicodendron **71** era significativamente diferente al valor basal. Además, el valor MFI del complejo MHC II de las DCs incubadas con el glicodendron **98** también era significativamente diferente al de las células cultivadas con el glicodendron **71**.



Capítulo 4

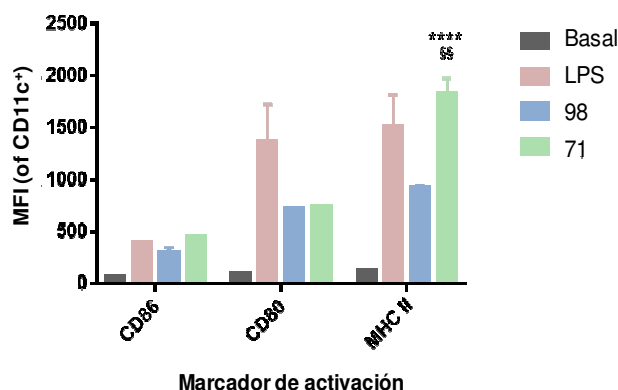


Figura 4.12 Valores de MFI para las células tratadas con disoluciones de los glicodendrones 71 y 98, de una concentración fija de 52 μ M y LPS (50 ng/mL).

Para el resto de moléculas co-estimuladoras CD86 y CD80, los resultados fueron similares, sin que se observara una mayor activación de las DCs al tratarlas con una concentración mayor de los glicodendrones. Es de destacar que, al igual que lo observado para las concentraciones más bajas de glicodendrones, la activación de la molécula co-estimuladora CD86 por incubación con los glicodendrones 71 y 98, fue similar a la obtenida por tratamiento con LPS.

Cuando se incubaron las DCs inmaduras con disoluciones de mayor concentración (104 μ M) de los glicodendrones 71 y 98, se observaron tendencias similares a las que se acaban de describir para cada una de las moléculas. Al aumentar la concentración de los glicodendrones 71 y 98 no se observa mayor activación de las DCs, lo que tal vez se deba a un efecto de saturación.

4.3.2 Efecto de los glicodendrones en la producción de citocinas por DCs

Como ya se mencionó anteriormente, el tratamiento de las DCs con los glicodendrones puede provocar su activación y maduración. Además, en este punto, las DCs pueden liberar citocinas. Tras 48 h de incubación de las DCs con disoluciones 52 μ M de los glicodendrones, se estudió el perfil de expresión de algunas de las citocinas o factores solubles que se podrían encontrar en el medio celular o en el sobrenadante. Para ello, se utilizó el Kit de Citocinas



Inflamatorias Humanas BD™ CBA. Este Kit es empleado para medir cuantitativamente, en una única muestra, las siguientes citocinas: IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF y IL-12p70. Para ello, se captura un analito o conjunto de analitos solubles (citocinas) con partículas individuales esféricas de material de resina o *beads* de diferente tamaño. Cada *bead* está conjugado con un anticuerpo específico. El reactivo de detección es una mezcla de picroeritrina (PE) y los correspondientes anticuerpos, que proporcionan una señal de fluorescencia cuya intensidad depende de la cantidad de analito presente. (Figura 4.13)

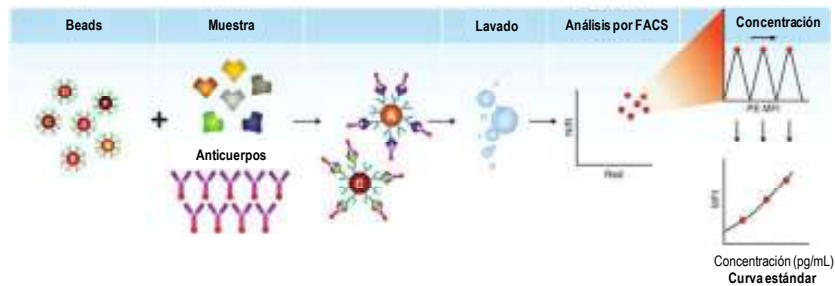


Figura 4.13 Mecanismo de funcionamiento del Kit de Citocinas Inflamatorias Humanas BD™ CBA.

Mediante citometría de flujo, se analizaron cada uno de los complejos formados entre las citocinas presentes en el medio, sus correspondientes *beads* y los reactivos de detección. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 4.14.



Capítulo 4

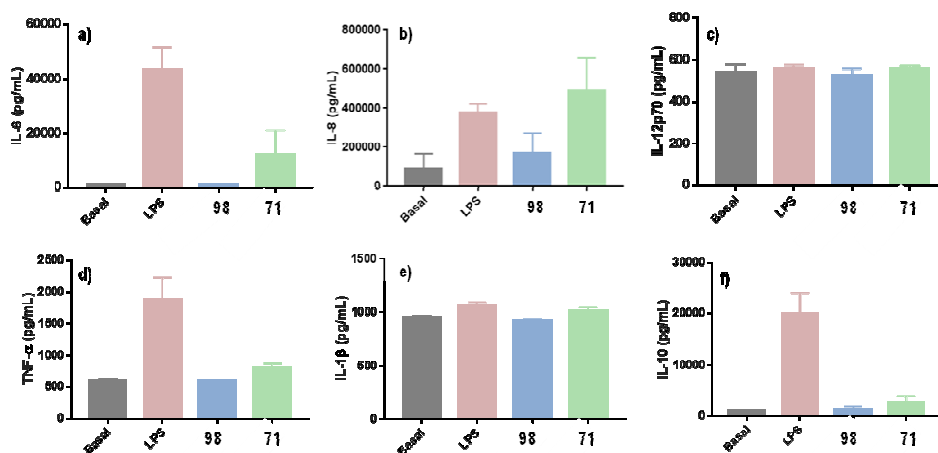


Figura 4.14 Producción de citocinas por las DCs después de 48 h de incubación con disoluciones 52 μ M de los glicodendrones **71** y **98** y de LPS (50 ng/mL) mediante FACS: a) IL-6; b) IL-8; c) IL-12p70; d) TNF- α ; e) IL-1 β ; f) IL-10. Resultados obtenidos en dos experimentos independientes.

Si bien para la mayoría de citocinas no se observaron diferencias significativas entre las células tratadas con los glicodendrones **71** y **98**; en el caso de la citocina IL-6 sí se observó una liberación provocada por el glicodendrón **71** que no se producía con el glicodendrón **98**. Este resultado indica que el glicodendrón de manosa **71** induce una respuesta pro-inflamatoria y es más inmunogénico que el dendrón de GlcNAc **98**. En concreto, la IL-6 induce la proliferación de células T_H17 a partir de las células T *naïve*, por lo que juega un papel importante contra infecciones celulares causadas por bacterias. A su vez, la citocina IL6 producida por las APCs juega un doble papel en la diferenciación de células T_H2. IL6 provoca simultáneamente la diferenciación de T_H2 y la inhibición de la línea T_H1.¹⁸² Además, la IL-6 provoca la diferenciación de los linfocitos B en las células plasmáticas, así como la proliferación de los linfocitos T, la diferenciación de las células T_C y la producción de IL-2.

También es importante señalar que los niveles de citocina IL-8 liberados en presencia del glicodendrón **71** son superiores a los liberados en presencia del glicodendrón **98**, e incluso

¹⁸² Diehl, S.; Rincón, M. *Mol. Immunol.* **2002**, *39*, 531.



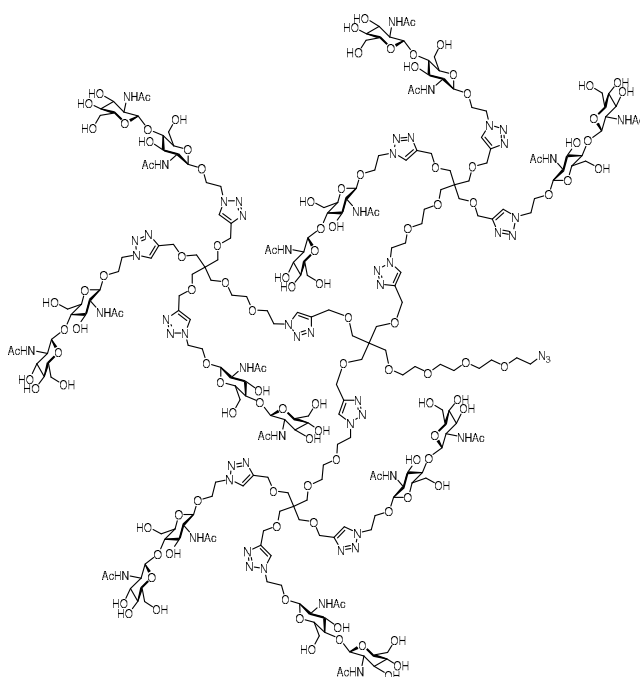
respecto a los obtenidos tras el tratamiento con LPS, por lo que el glicodendrón **71** producirá una mayor amplificación de la respuesta inflamatoria. Estos resultados corroboran el carácter no inmunogénico del glicodendrón **98**, por lo que se decidió utilizar los derivados de GlcNAc como controles.

4.3.3 Funcionalización de OVA mediante SPAAC

A partir de los resultados de activación de las DCs obtenidos anteriormente con los glicodendrones **71** y **98**, se decidió llevar a cabo la formación de neoglicoproteínas basadas en OVA. Estos nuevos compuestos permitirán la activación de las DCs y su presentación a células T. Para ello, se decidió conjugar como unidad manosilada el glicodendrón de 3 unidades de Man₉ (**49**), epítipo del ligando natural que presenta gran afinidad por el receptor DC-SIGN, presente en las DCs. En este mismo sentido, teniendo en cuenta el carácter no inmunogénico observado para el dendrón de 9 unidades de GlcNAc **98**, se decidió usar como control el glicodendrón de 9 unidades del disacárido de GlcNAc (GlcNAc β 1,4GlcNAc) **99**. (Figura 4.15) La síntesis del derivado **99** fue descrita en una tesis doctoral anterior de nuestro grupo de investigación.^{81d} Tras la funcionalización de OVA, se espera una mayor sobreexpresión de las moléculas de activación de las DCs, una mayor proliferación de las células T y la liberación de citocinas.



Capítulo 4



99

Figura 4.15 Estructura del glicodendrón 99.

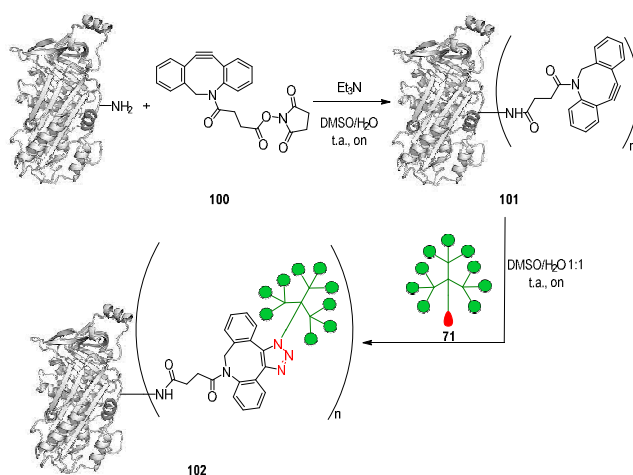
La construcción de neoglicoproteínas se llevó a cabo con los glicosistemas funcionalizados con grupos azido en su posición focal, mediante una reacción de tipo click. Con el fin de evitar la toxicidad que puedan causar los posibles restos de cobre en medios biológicos, se decidió llevar a cabo la conjugación empleando la reacción de acoplamiento sin catalizador SPAAC. Previamente, para poder llevar a cabo esta reacción, fue necesaria la funcionalización de la proteína OVA con ciclooctinos. Para ello, se hicieron reaccionar los 20 grupos amino libres de las lisinas presentes en la estructura de la proteína con un éster activado unido al ciclooctino tensionado, el éster *N*-hidroxisuccinimidildibenzociclooctino (**100**) disponible comercialmente. (Esquema 4.4) Se empleó un exceso de 5 eq. del derivado **100** por cada uno de los residuos de Lys para lograr funcionalizar el mayor número de aminoácidos, en presencia del mismo exceso

150



de Et₃N, en una mezcla DMSO/H₂O debido a la baja solubilidad de la proteína en DMSO.¹⁸³ Tras la eliminación del exceso de ciclooctino añadido mediante técnicas de exclusión por tamaños con filtros para centrifuga Amicon Ultra-4 (MWCO 10KDa), se obtuvo el derivado **101** funcionalizado con grupos ciclooctino.

Las condiciones de la reacción SPAAC para la obtención de las neoglicoproteínas deseadas fueron optimizadas usando el glicodendrón de 9 manosas **71**. Suponiendo que sólo una pequeña porción de los residuos habían sido funcionalizados con el ciclooctino, se añadieron 24 eq. del derivado **71**. Como disolvente se utilizó una mezcla DMSO/H₂O 1:1 ya que el derivado **101** es parcialmente soluble en H₂O. Tras una noche de reacción, se purificó el derivado **102** mediante técnicas de exclusión por tamaños con filtros para centrifuga Amicon Ultra-4 (MWCO 10KDa).



Esquema 4.4 Funcionalización de OVA con el glicodendrón 71.

La masa molecular de la glicoproteína fue analizada mediante Western-Blot. El Western-Blot o electrotransferencia es una técnica ampliamente utilizada en biología para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, atendiendo a su peso molecular, estructura o hidrofobicidad, etc. Esta técnica implica principalmente, tres etapas. El primer paso

¹⁸³ Martin, C. E.; Broecker, F.; Oberli, M. A.; Komor, J.; Mattner, J.; Anish, C.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9713.



Capítulo 4

de este procedimiento conlleva la separación de las macromoléculas de la muestra mediante electroforesis en gel. (Figura 4.16a) Este tipo de técnica de electroforesis permite separar moléculas cargadas (proteínas o ADN) que son forzadas a atravesar un gel mediante la aplicación de una corriente eléctrica. Comúnmente, las proteínas se separan empleando un gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*) que permite separar las proteínas en función de su masa debido a la desnaturalización de las proteínas y a la carga negativa que se genera cuando las proteínas se unen al detergente iónico SDS.

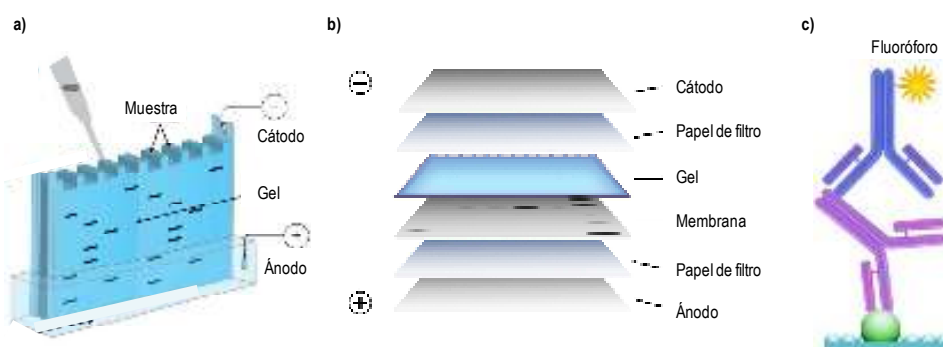


Figura 4.16 Etapas del experimento Western-Blot: a) separación electroforética de las proteínas; b) transferencia de las proteínas a la membrana y c) incubación con anticuerpos primarios y secundarios.

Tras separar las proteínas por electroforesis, éstas se transfieren desde el gel a una membrana, generalmente de nitrocelulosa o difluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés *polyvinylidenedifluoride*). (Figura 4.16b) Existen numerosos métodos para llevar a cabo este proceso, mediante transferencia por difusión, transferencia por capilaridad, transferencia al vacío o electroelución. Normalmente, se transfieren mediante electroelución o transferencia electroforética debido a que la velocidad y la eficiencia de la transferencia de estas técnicas son mayores. Se coloca el gel de poliacrilamida en contacto directo con una membrana de PVDF de tal manera que se encuentren formando un sándwich que se sumerge en una solución conductora entre dos electrodos. Cuando se aplica un campo eléctrico, las proteínas migran del gel y se dirigen a la superficie de la membrana, quedando las proteínas pegadas a la misma. Antes de



Evaluación de la respuesta inmune de glicodendrones y neoglicoproteínas

continuar, tras transferir las proteínas, se debe comprobar la eficacia de la transferencia tiñendo de forma reversible las proteínas con Ponceau S.

Además, se debe bloquear la membrana para evitar cualquier unión no específica de anticuerpos. Existen una gran variedad de tampones de bloqueo, se puede emplear desde leche hasta suero normal. Los tampones de bloqueo mejoran la sensibilidad, reduciendo las interferencias de fondo y mejorando la relación señal ruido.

Normalmente, las proteínas transferidas se examinan con una combinación de anticuerpos. Se llevan a cabo una serie de incubaciones, con diferentes anticuerpos, separadas por etapas de lavado. Las etapas de lavado son necesarias para eliminar los reactivos que no se han unido y reducir el ruido de fondo. En primer lugar, como anticuerpo primario se emplea un anticuerpo específico que reconoce la proteína de interés o un epítipo de proteínas específicas. En general, los anticuerpos primarios no pueden ser detectables directamente, por lo que es necesario añadir anticuerpos secundarios para detectar el correspondiente antígeno. La elección del anticuerpo secundario depende de la especie animal de la que provenga el anticuerpo primario o del marcador que posea el anticuerpo primario (biotina, histidina, hemaglutinina).

Existen numerosos métodos de detección que conllevan la conjugación de diferentes marcadores a los anticuerpos primarios o secundarios. (Figura 4.16c) Normalmente, se utilizan enzimas o fluoróforos como marcadores. Con frecuencia, el anticuerpo secundario se compleja con una enzima capaz de catalizar la transformación de un sustrato soluble en un producto insoluble (en algunos casos el color puede ser diferente y teñir la membrana) o también puede ser una enzima que cataliza una reacción quimioluminiscente. En este último caso, si se coloca una película fotográfica sobre la membrana, la exposición a la luz que se desprende en la reacción permite detectar la actividad enzimática. En ambos casos, se evalúa la cantidad relativa de señal y se cuantifica en términos de densidad óptica por densitometría. Otro método basado en el mismo principio emplea anticuerpos unidos a fluoróforos. Estos compuestos emiten una cantidad de luz constante cuando se excitan de manera constante, permitiendo una detección muy precisa y una cuantificación del antígeno más exacta que mediante quimioluminiscencia. Por otro lado, los marcadores radioactivos no requieren sustratos enzimáticos; en su lugar se coloca una película fotográfica contra el Western blot y la actividad radiactiva del marcador provoca la aparición en ella de regiones oscuras. Estas se corresponderán con las bandas de las proteínas de interés. Su alto precio y su riesgo para la salud y la seguridad han provocado que estén en desuso en los últimos años.



Capítulo 4

Para evaluar la masa de la neoglicoproteína **102**, tras realizar la separación electroforética, se llevó a cabo la transferencia a la membrana la cual fue bloqueada más tarde e incubada con la aglutinina del germen de trigo WGA (del inglés *Wheat germ agglutinin*) y su correspondiente anticuerpo secundario.¹⁸⁴ Esta lectina fue seleccionada porque era capaz de reconocer los residuos de GlcNAc de la glicoproteína OVA. Por último, se incubó la membrana con el kit de detección ECL (enhanced chemiluminescence) La luz emitida se capturó en una película fotográfica. Una porción de la película se muestra en la Figura 4.17 donde se puede ver a la izquierda la mancha correspondiente a la proteína OVA sin funcionalizar que corresponde con una masa molecular próxima a 50 KDa. A la derecha se observa la mancha de la neoglicoproteína **102** funcionalizada con el dendrón de nueve unidades de manosa **71**, cuya masa molecular se aproxima a 70 KDa.

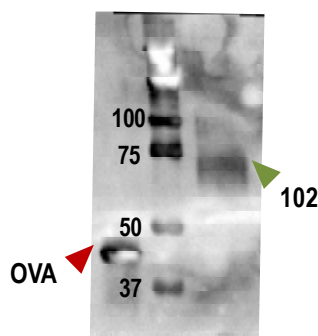


Figura 4.17 Western-Blot de OVA y OVA-71 (**102**).

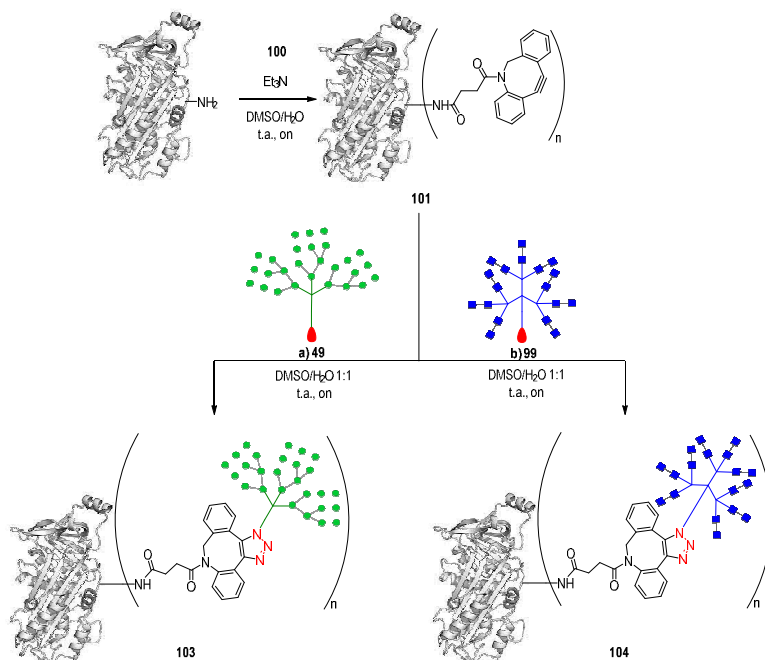
En la figura 4.17 se pudo observar claramente la desaparición completa de la proteína de partida OVA. El desplazamiento de la masa molecular de la nueva glicoproteína **102** corresponde aproximadamente con la funcionalización de 7 grupos amino o residuos de Lys. Por lo tanto, se puede considerar la neoglicoproteína como una plataforma multivalente de valencia 7.

Una vez puesta a punto la funcionalización de la proteína OVA y su posterior conjugación con el glicodendrón **71**, se prepararon las neoglicoproteínas deseadas **103** y **104** a partir del derivado **101**, en las mismas condiciones. (Esquema 4.5)

¹⁸⁴ Kubota, Y.; Fujjoka, K.; Takekawa, M. *Plos ONE* **2017**, *12*, 1.



Evaluación de la respuesta inmune de glicodendrones y neoglicoproteínas



Esquema 4.5 Preparación de las neoglicoproteínas: a) 103 y b) 104.

La masa molecular de estas glicoproteínas fue estudiada del mismo modo que para el derivado **102** mediante Western-Blot, observándose de nuevo la desaparición de la proteína OVA de partida. (Figura 4.18) El aumento de masa molecular para las glicoproteínas **103** y **104** correspondía aproximadamente a la funcionalización de 10 Lys con cada uno de los glicodendrones. En el Western-Blot, se observó una sombra en la parte de arriba, quizás debido a la conformación de los glicodendrones conjugados que impide que tenga lugar la difusión de forma adecuada de las neoglicoproteínas **103** y **104**.



Capítulo 4

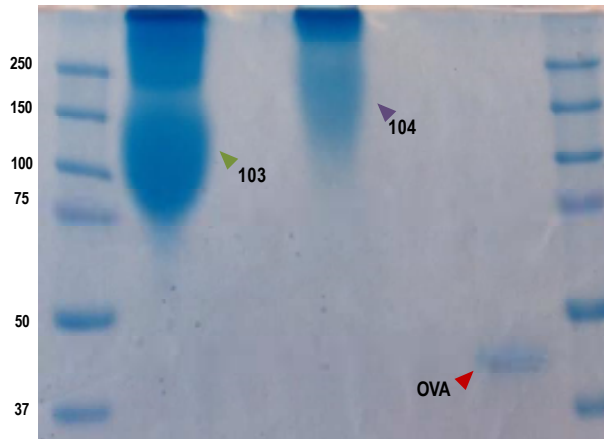


Figura 4.18 Western-blot de OVA, OVA-49 (103) y OVA-99 (104).

A continuación, se llevó a cabo la evaluación de la capacidad de estos nuevos sistemas en la activación de las DCs con el fin de facilitar la presentación de estas nuevas glicoproteínas a las células T.

4.3.4 Efecto de las neoglicoproteínas 103 y 104 en la activación de las DCs

Del mismo modo que en el apartado 4.3.1, se estudió la activación de las moléculas CD80 y CD86 y la expresión de MR, mediante FACS. En este caso, las DCs se cultivaron durante 48 h con las neoglicoproteínas **103** y **104**, variando su concentración entre 0.1 µg/mL y 1000 µg/mL. (Figura 4.19)

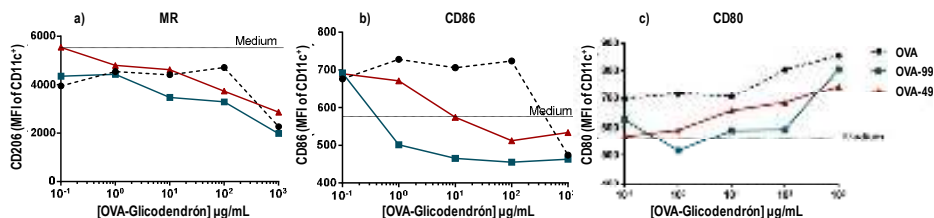


Figura 4.19 Perfiles de a) MR y de los co-estimuladores de DCs: b) CD86 y c) CD80, en presencia de las neoglicoproteínas **103** y **104**.



Los valores MFI observados para MR, CD86 y CD80 para cada una de las concentraciones estudiadas de cada molécula son más o menos constantes excepto en las concentraciones extremas, 1000 µg/mL y 0.1 µg/mL. Al incubar las DCs con **104**, la expresión de CD86 disminuye a medida que aumenta la concentración de neoglicoproteína debido a algún efecto de saturación.

El MR está sobreexpresado, cuando se tratan las DCs con la neoglicoproteína **103**, en comparación con la neoglicoproteína **104** u OVA sin funcionalizar. Sin embargo, esta tendencia no se observa al estudiar la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86. En estos casos, la sobreexpresión de estas moléculas era mayor en las células tratadas con OVA sin modificar. Era de esperar que se produjese una activación mayor en el caso de la neoglicoproteína **103** debido a que las unidades del epítipo Man₉ serían reconocidas por los receptores de las DCs y facilitarían su internalización en DCs. Sin embargo, quizás se hayan realizado las medidas antes o mucho más tarde de producirse la activación, por lo que no fueron representativas. Se ha podido producir la activación mucho antes y en el caso de la neoglicoproteína **103** las moléculas co-estimuladoras ya no están activadas, pero lo han estado previamente. Este problema podría solventarse midiendo a otro tiempo diferente. Puede que se haya producido la activación de las DCs e incluso la diferenciación de las células T, pero con este experimento no se puede demostrar de manera concluyente. También, se puede deber a los cambios químicos que se han realizado en las neoglicoproteínas **103** y **104**, que han podido afectar a la proteína. Sin embargo, estos resultados sí demostraron que la neoglicoproteína **103** inducía una mayor activación de las DCs respecto a la neoglicoproteína **104**. Estos hallazgos están en concordancia con los datos obtenidos en la activación de DCs con los glicodendrones **71** y **98**. Por tanto, se puede concluir que la OVA conjugada a GlcNAc es menos inmunogénica que cuando se conjuga a residuos manosilados.

Para evitar la interacción de las neoglicoproteínas con los receptores expresados en la superficie de las DCs, se incubaron las neoglicoproteínas con las DCs en presencia de los anticuerpos de los receptores correspondientes durante 24 h. Se llevó a cabo el tratamiento de las DCs con disoluciones 10 µg/ml de OVA y las neoglicoproteínas **103** y **104** y los anticuerpos del receptor de manosa MR (α -CD206), de DC-SIGN (α -CD209) y del isotipo IgG (100 µg/mL), para comprobar si la internalización de las neoglicoproteínas y por tanto, la activación de las DCs, se debía a las unidades sacarídicas que presentaban en su estructura. (Figura 4.20)



Capítulo 4

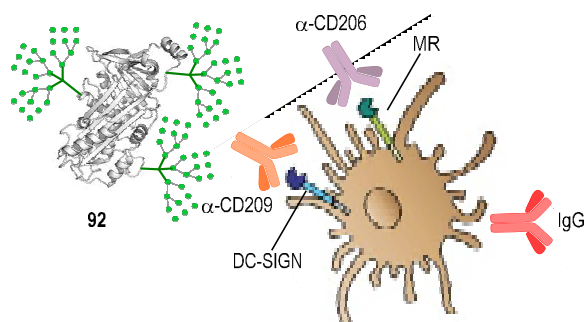


Figura 4.20 Representación de la interacción entre los receptores de DCs, DC-SIGN (azul) y MR (verde), y sus anticuerpos α -CD209 (naranja) y α -CD206 (morado). IgG (rojo) puede interaccionar con proteínas o moléculas celulares.

Los anticuerpos, denominados también inmunoglobulinas (Ig), presentan una estructura básica similar pero la región por la que se unen al antígeno es propia de cada uno de ellos. La parte de la molécula del anticuerpo que se une al antígeno se conoce como región F_{ab} , mientras que la otra región interacciona con diversos elementos del sistema inmunitario (región F_c , región cristalizante del fragmento).¹⁸⁵ (Figura 4.21) Cada uno de los isotipos de inmunoglobulina está codificado por los segmentos de la región constante del gen de inmunoglobulina que forman la porción F_c de un anticuerpo.

¹⁸⁵ Stavnezer, J. *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, 8, 199.



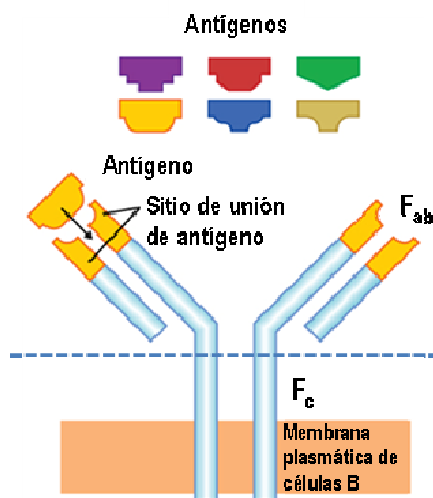


Figura 4.21 Estructura general de los anticuerpos que incluye la región F_{ab} y la región F_c.

Hay diferentes tipos de receptores en las células, reconocibles específicamente por cada isotipo de anticuerpo, permitiendo activar diferentes partes del sistema inmune. En humanos, las células B nativas producen IgM e IgD, mientras que una célula B madura puede producir los isotipos IgG, o IgA o IgE.¹⁸⁶ La expresión de un isotipo específico determina la función de un anticuerpo a través de la unión específica a las moléculas del receptor de F_c en diferentes células efectoras inmunes. El isotipo más abundante en el cuerpo es IgG, hasta el 75% de los anticuerpos en la sangre son de este tipo. La función principal de la IgG es proporcionar protección contra la reinfección con los microorganismos que el sistema inmune se ha encontrado previamente. Los anticuerpos de control de isotipo pueden actuar como controles negativos para ayudar a diferenciar la señal de fondo no específica de la señal de anticuerpo específica porque no tienen especificidad relevante por un antígeno objetivo. Dependiendo del isotipo del anticuerpo primario utilizado para la detección y los tipos de células objetivo involucrados, la señal de fondo puede ser un problema importante en varios experimentos. Puede suceder que se unan los receptores F_c en las células objetivo o se produzcan interacciones

¹⁸⁶ Vieira, P.; Rajewsky, K. *Eur J Immunol.* **1988**, *18*, 313.



Capítulo 4

inespecíficas de anticuerpos con proteínas celulares, carbohidratos o lípidos que alteren los resultados de fluorescencia.

Al igual que en los casos anteriores, se estudió la sobreexpresión de moléculas co-estimuladoras CD86 y CD80, mediante FACS. Se trataron las células con OVA y con cada una de las neoglicoproteínas, en presencia del anticuerpo control IgG (+). Por otro lado, se realizó también el experimento en presencia de cada uno de los anticuerpos de DC-SIGN (+) y MR (+) por separado y, por último, de los dos anticuerpos de los receptores juntos (DC-SIGN (+) y MR (+)). (Figura 4.22)

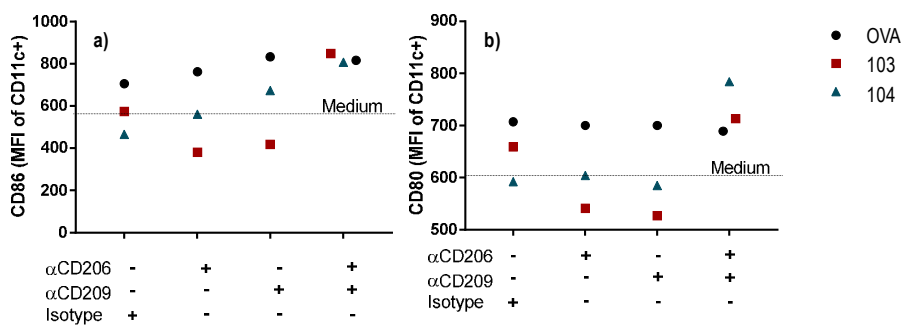


Figura 4.22 Perfil de los co-estimuladores de las DCs: a) CD86 y b) CD80, en presencia de 10 µg/mL de OVA y de las neoglicoproteínas **103** y **104** y 100 µg/mL de los anticuerpos de los receptores de DCs, MR (α-206), DC-SIGN (α-209) e IgG.

La incubación de las DCs con cada una de las neoglicoproteínas **103** y **104** y el isotipo control IgG, (1ª columna de las figuras 4.22a y 4.22b) puso de manifiesto que no existe una interacción inespecífica con la inmunoglobulina del anticuerpo ya que los resultados están en concordancia con el experimento anterior. (Figura 4.19) Del mismo modo, se observó una mayor activación de las moléculas CD80 y CD86 en presencia de la proteína OVA sin modificar, igual que en el experimento anterior. Además, la neoglicoproteína **103** provocó una mayor activación de las DCs si se compara con el efecto que ejerce la neoglicoproteína **104**, por lo que el poder inmunológico de esta última neoglicoproteína es inferior.

Al tratar las DCs con los anticuerpos del MR y DC-SIGN por separado (2ª y 3ª columna de las figuras 4.22a y 4.22b), la activación de las moléculas CD86 y CD80 fue menor en presencia



Evaluación de la respuesta inmune de glicodendrones y neoglicoproteínas

de la neoglicoproteína **103**. En ambos casos, la OVA no funcionalizada provocaba mayor activación de las moléculas co-estimuladoras pero su perfil inmunológico no se modificó al añadir los anticuerpos de DC-SIGN y MR por separado. El perfil inmunogénico de la neoglicoproteína **103** desapareció tras la adición de los anticuerpos de los receptores DC-SIGN y MR. Por tanto, la activación de las DCs se debe al reconocimiento de **103** por los receptores DC-SIGN y MR localizados en la superficie de DCs. Sin embargo, el perfil de **104** no se vio alterado, por lo que esta neoglicoproteína no es reconocida por estos receptores.

Al tratar las DCs con las neoglicoproteínas y los anticuerpos de los dos receptores de las DCs se produjo un efecto sinérgico, (4ª columna de las figuras 4.22a y 4.22b), observándose la activación de ambas moléculas co-estimuladoras con todas las glicoproteínas estudiadas. Se observó también que había una mayor activación de la molécula co-estimuladora CD80, en las células tratadas con la neoglicoproteína **103** respecto a aquellas que fueron tratadas con la neoglicoproteína **104** y OVA. La unión de ambos receptores pudo inducir algún tipo de señal en el interior de la célula o pudo suceder que cada uno de los anticuerpos se uniera de manera inespecífica al otro o a la región F_c impidiendo la unión al receptor, lo que provocó que las glicoproteínas indujesen una mayor respuesta.

En la actualidad, se están llevando a cabo estudios con células transgénicas OT-II de ratón para estudiar el efecto de estas neoglicoproteínas en la proliferación de células T. Se espera que la funcionalización de OVA con el glicodendron **49** se traduzca en un aumento de la proliferación de células T y en una mayor respuesta inmune.

ÁMBITO- PREFIJO**GEISER****Nº registro****00008745e2000018397****CSV****GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc****DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN****<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>****FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO****28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular**

Capítulo 4

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



CAPÍTULO 5
PREPARACIÓN DE GLICONANOGELES.
DETERMINACIÓN DE SU AFINIDAD POR CONCANAVALINA A

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

5.1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

5.1.1 Nanogeles

Los nanogeles (NGs) son redes tridimensionales de tamaño nanométrico compuestas por cadenas poliméricas hidrófilas o anfífilas entrecruzadas.¹⁸⁷

Según el tipo de entrecruzamiento, se puede distinguir entre nanogeles reticulados físicamente y nanogeles reticulados químicamente. En la presente tesis doctoral, se considerarán únicamente estos últimos, ya que presentan un mayor interés desde el punto de vista biomédico debido a su capacidad de absorber y liberar grandes cantidades de agua, manteniendo intacta su estructura molecular. Por el contrario, los nanogeles reticulados físicamente son sensibles a factores, como la fuerza iónica y la dilución, disociándose generalmente a concentraciones salinas como las encontradas en condiciones fisiológicas, lo que limita sus aplicaciones en biomedicina.

El grado de hidratación de los nanogeles reticulados químicamente depende principalmente de los polímeros que componen dichos sistemas. Los nanogeles que presentan grupos hidrófilos en su estructura, como por ejemplo grupos -OH, -CONH-, -CONH₂, -SO₃H, se hinchan en mayor medida que aquellos que presentan grupos hidrófobos. Estos últimos colapsan en presencia de agua, disminuyendo su grado de hinchamiento.¹⁸⁸ Además, tanto la citotoxicidad como la biocompatibilidad del nanogel dependen de los polímeros empleados en su síntesis.

Además, estos sistemas muestran otras muchas singularidades que les confieren numerosas ventajas con respecto a otras arquitecturas. Entre dichas ventajas cabe destacar las siguientes propiedades:

- Alto contenido acuoso y excelente dispersabilidad/solubilidad en agua.
- Facilidad de preparación y posibilidad de modular su composición química, grado de entrecruzamiento, tamaño, etc. en función de cuál sea su aplicación posterior. Disminuyendo el

¹⁸⁷ a) Kabanov, A. V.; Vinogradov, S. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 54. b) Yadav, H. KS; Al Halabi, N. A.; Alsalloum, G. A. *J. Pharm. Sci.* **2017**, *1*, 1. c) Vashist, A.; Kaushik, A. K.; Ahmad, S.; Nair, M. *Nanogels for Biomedical Applications*. RSC Smart Mater. Cambridge, UK, **2018**. d) Kaur, M.; Sudhakar, K.; Mishra, V. *Int. J. Polym. Mater.* **2019**, *68*, 287.

¹⁸⁸ a) Peppas, N. A.; Khare, A. R. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1993**, *11*, 1. b) Hamidi, M.; Azadi, A.; Rafiei, P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1638.



porcentaje de agente entrecruzante o variando la naturaleza del monómero hidrófilo de partida se puede aumentar la elasticidad del nanogel.

- Alta flexibilidad y versatilidad.
- Elevada biocompatibilidad y altos tiempos de circulación en sangre, aunque estas características dependen en gran medida de la elección de los polímeros empleados en su preparación.
- El tamaño de sus poros hace que los nanogeles sean excelentes candidatos para ser utilizados como vehículos transportadores de fármacos. Son capaces de liberar selectivamente el fármaco bajo la acción de estímulos externos o por determinados cambios en el medio en el que se encuentran, como pueden ser variaciones en el pH o en la temperatura.
- Su elevado contenido en agua, su porosidad y su consistencia esponjosa les asemejan a tejidos vivos, a diferencia de otro tipo de biomateriales sintéticos.
- Su morfología les confiere una gran superficie para la bioconjugación, lo que conlleva que se puedan conjugar a una gran variedad de moléculas biológicas. Además, su estructura tridimensional facilita las interacciones biológicas con proteínas.
- Su tamaño nanométrico les permite atravesar la mayoría de las barreras biológicas y llegar a zonas que hidrogeles con mayor tamaño no pueden alcanzar.

Muchas de las propiedades de los nanogeles pueden modificarse en función de los polímeros seleccionados y del modo de preparación utilizado.

5.1.2 Métodos de preparación de nanogeles

Las cadenas poliméricas de los nanogeles químicos se encuentran unidas por enlaces covalentes, uniones permanentes que dificultan la destrucción de la red tridimensional. Existen dos métodos generales para obtener nanogeles formados por cadenas poliméricas unidas covalentemente.¹⁸⁹ El primero de ellos consiste en el autoensamblaje o entrecruzamiento entre polímeros anfifílicos. (Figura 5.1a) En función de la naturaleza de los polímeros pueden tener lugar diferentes tipos de entrecruzamiento. Este tipo de nanogeles se pueden preparar mediante

¹⁸⁹ Chacko, R. T.; Ventura, J.; Zhuang, J., Thayumanavan, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 835.



Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A

formación de enlaces disulfuro,¹⁹⁰ empleando grupos amina para que reaccionen con ácidos carboxílicos, ésteres, isocianatos, etc.¹⁹¹ o mediante reacciones de química click entre los polímeros.¹⁹²

Por otro lado, los nanogeles pueden prepararse mediante polimerización tridimensional entre varios monómeros en presencia de un agente entrecruzante bi- o multifuncional en el medio de reacción.¹⁹³ (Figura 5.1b) La polimerización suele iniciarse con la formación de radicales libres en los monómeros, gracias a un compuesto con capacidad redox o por radiación de luz UV, rayos gamma o haces de electrones.

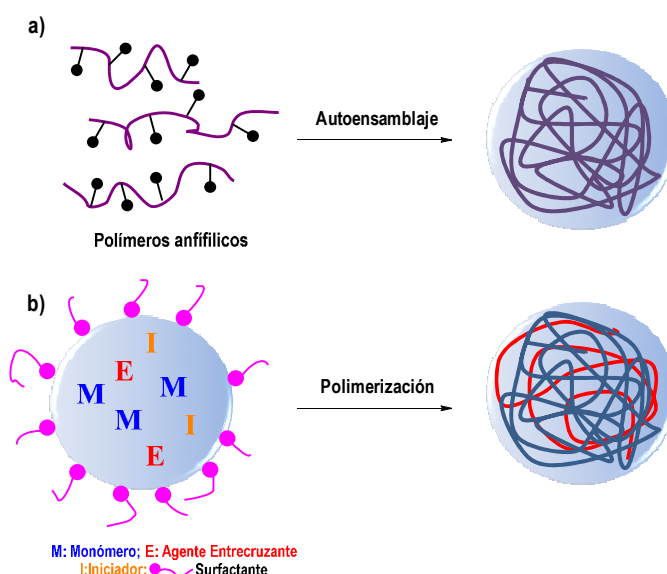


Figura 5.1 Métodos de preparación de nanogeles: a) autoensamblaje de polímeros anfifílicos y b) polimerización empleando un agente entrecruzante.

¹⁹⁰ Ryu, J. H.; Chacko, R. T.; Jiwpanich, S.; Bickerton, S.; Babu, R. P.; Thayumanavan, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17227.

¹⁹¹ Li, Y.; Du, W.; Sun, G.; Wooley, K. L. *Macromolecules* **2008**, *41*, 6605.

¹⁹² a) Heller, D. A.; Levi, Y.; Pelet, J. M.; Doloff, J. C.; Wallas, J.; Pratt, G. W.; Jiang, S.; Sahay, G.; Schroeder, A.; Schroeder, J. E.; Chyan, Y.; Zurenko, C.; Querbess, W.; Manzano, M.; Kohane, D. S.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 1449. b) Nagel, G.; Sousa-Herves, A.; Wedephol, S.; Calderón, M. *Theranostics* **2020**, *10*, 91.

¹⁹³ Asadian-Birjand, M.; Sousa-Herves, A.; Steinhilber, D.; Cuggino, J.; Calderón, M. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 5029.



El agente entrecruzante (o reticulante) juega un papel muy importante en las propiedades de los NGs, concretamente en el grado de hinchamiento y el tamaño de poro, lo cual es fundamental para su aplicación como vehículos para el transporte de fármacos.¹⁹⁴ Un aumento en la proporción del agente reticulante incorporado a la estructura del nanogel, supone un mayor número de uniones químicas entre las cadenas poliméricas, lo que conlleva una estructura más densa y compacta. El nanogel con mayor grado de entrecruzamiento se hincha en menor medida y la capacidad de recuperación de la estructura original es mayor que en el caso de nanogeles con menor entrecruzamiento. Sin embargo, una proporción alta de agente entrecruzante en el nanogel, dificulta la movilidad de las cadenas del polímero y la difusión de las sustancias atrapadas en su estructura. Por tanto, el grado de entrecruzamiento tiene que elegirse en función de la aplicación deseada.

A su vez, existen diferentes procesos para llevar a cabo la polimerización de las cadenas y obtener los nanogeles con una estructura bien definida que se pueden clasificar en dos grupos mayoritarios: la polimerización-precipitación y la polimerización en emulsión.¹⁹⁵

5.1.2.1 Polimerización-precipitación

El proceso de polimerización comienza con una mezcla homogénea de todos los componentes; sin embargo, a medida que las cadenas poliméricas crecen se vuelven más insolubles hasta que alcanzan una longitud crítica y precipitan. En este punto, tiene lugar la nucleación del nanogel precursor. El tamaño de las partículas obtenidas por esta técnica varía entre 100 y 600 nm, dependiendo de las condiciones de reacción. Este método permite elevadas conversiones de monómeros, como consecuencia de la precipitación del polímero. Sin embargo, en algunos casos, las partículas pueden presentar una forma irregular y una alta polidispersidad.

Uno de los tipos de polimerización por precipitación es la *polimerización por dispersión*. Al igual que en el proceso por precipitación, al inicio del proceso de polimerización, la mezcla es homogénea. (Figura 5.2) La diferencia principal es la presencia de estabilizadores coloidales. Normalmente, se trata de surfactantes capaces de inhibir estéricamente la agregación de los

¹⁹⁴ Flory, P.J.; Rehner Jr., J. J. *Chem. Phys.* **1943**, *11*, 521.

¹⁹⁵ a) Arshady, R. *Colloid. Polym. Sci.* **1992**, *270*, 717. b) Oh, J. K.; Drumright, R.; Siegwart, D.J.; Matyjaszewski, K. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 448.



núcleos durante la polimerización y, por tanto, estabilizar la dispersión coloidal de las partículas. Esta técnica permite la obtención de partículas con menor dispersión respecto a aquellas que se obtienen mediante polimerización por precipitación. El tamaño de las partículas se encuentra dentro de un rango muy amplio.¹⁹⁶

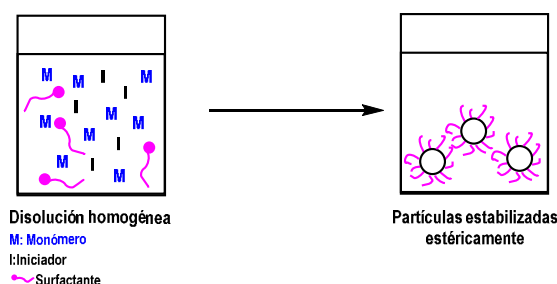


Figura 5.2 Representación gráfica de la preparación de nanogeles mediante polimerización por dispersión.

5.1.2.2 Polimerización en emulsión

La polimerización en emulsión se caracteriza por la presencia de dos fases líquidas inmiscibles. Una de las fases, conocida como fase dispersa se encuentra en forma de pequeñas gotas distribuidas en la fase continua.

En función de cuál sea la naturaleza de los monómeros, la distribución de las fases es diferente. En particular, se habla de emulsión cuando la fase dispersa es orgánica y de emulsión inversa cuando una disolución acuosa es dispersada en una fase continua orgánica.¹⁹⁷

En la actualidad existen algunas variantes de emulsión inversa, como son la miniemulsión inversa o microemulsión inversa. En ambos tipos de emulsión, la polimerización tiene lugar en el interior de las nanogotas. Cada gota, también conocida como nanoreactor, se convierte en una partícula polimérica tras el proceso de polimerización.

- Miniemulsión inversa: las miniemulsiones tienen que ser estabilizadas mediante algún efecto que retarde o inhiba la coalescencia de las gotas. Varios factores afectan a la estabilidad, entre los cuales destacan la composición y el tamaño promedio de gota y el surfactante. Por este

¹⁹⁶ Okubo M. *Polymer Particles. Advances in Polymer Science*, 175. Springer, Germany, 2005.

¹⁹⁷ Gilbert, R. G. *Emulsion Polymerization: A Mechanistic Approach*, Academic Press, UK, 1995.



motivo, se utiliza un co-estabilizador soluble en la fase dispersa junto con un surfactante soluble en la fase continua. Como co-estabilizadores se utilizan normalmente sales iónicas y como surfactantes cabe destacar el SDS o sales cuaternarias de amonio. Además, es necesario emplear dispositivos con una elevada capacidad de disgregación como ultrasonificadores. Esta técnica permite obtener partículas de un tamaño nanométrico.¹⁹⁸

- Microemulsión inversa: en este caso, las nanogotas se forman con la ayuda de un estabilizador que es soluble en la fase continua, pero sin la necesidad de utilizar ultrasonificadores que provoquen vibraciones en la disolución. La microemulsión se forma de manera espontánea al poner en contacto sus componentes, en condiciones específicas de concentración y temperatura, debido a su estabilidad termodinámica. Para que tenga lugar la formación de la emulsión es necesario disminuir la tensión interfacial mediante la adsorción en la interfase de moléculas tensioactivas. Cuando la tensión interfacial decrece hasta casi cero, el sistema se emulsiona espontáneamente creando una microemulsión.¹⁹⁹ (Figura 5.3)

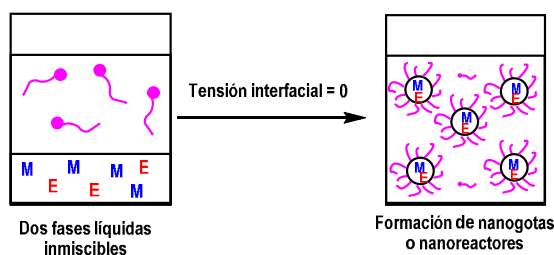


Figura 5.3 Representación esquemática de la preparación de nanogeles mediante polimerización en microemulsión inversa.

5.1.3 Aplicaciones de los nanogeles en biomedicina

En el área de la biomedicina, los nanogeles presentan un gran interés debido a sus excelentes propiedades, tales como su estructura tridimensional, sus propiedades mecánicas, su solubilidad, su alto contenido de agua y su biocompatibilidad. Dentro del uso de nanogeles en

¹⁹⁸ Landfester, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4488.

¹⁹⁹ McAllister, K.; Sazani, P.; Adam, M.; Cho, M. J.; Rubinstein, M.; Samulski, R. J.; DeSimone, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 15198-15207.



Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A

biomedicina destacan sus aplicaciones en la bioconjugación y el transporte y la liberación de fármacos (*drug delivery*).¹⁹³ Sin duda, una de las propiedades que más interés suscita cuando se emplean como vehículos para el transporte de fármacos, es su capacidad de respuesta a estímulos externos, como por ejemplo el pH, la temperatura, los ambientes redox, etc. Por lo general, ante un estímulo externo responden cambiando sus propiedades físico-químicas, por ejemplo, variando su permeabilidad y volumen, bien hinchándose y alcanzando su tamaño original o compactándose. Además, estos sistemas ofrecen la posibilidad de proteger y transportar el fármaco hasta el órgano o tejido diana y, una vez allí, liberarlo de manera controlada. Esto facilita la llegada del agente terapéutico a los tejidos u órganos y reduce los efectos secundarios.²⁰⁰

Por otro lado, los nanogeles presentan una alta densidad de grupos terminales funcionalizables que pueden ser utilizados para la conjugación de otras biomoléculas, tales como anticuerpos, proteínas, péptidos, aptámeros, etc.²⁰¹ Algunas de estas moléculas actúan como ligandos para determinados biomarcadores sobreexpresados en las células tumorales. Por lo tanto, facilitan la internalización del nanosistema en dichas células mediante endocitosis mediada por receptor. Además, la naturaleza multivalente de los nanogeles puede permitir la presentación de un elevado número de copias del ligando, aumentando su afinidad por el correspondiente receptor en varios órdenes de magnitud. Así, por ejemplo, estos sistemas han sido funcionalizados con carbohidratos ya que estos ligandos son capaces de dirigir estas partículas a células o tejidos específicos que expresan lectinas (receptores de carbohidratos) en su superficie y por tanto, permiten el transporte activo de fármacos.²⁰²

En este sentido, se ha descrito el uso de gliconogeles en el tratamiento del cáncer. Lou y *col.*²⁰³ prepararon gliconogeles de galactosa con una alta afinidad por receptores de células hepáticas ASGP-Rs (del inglés *asialoglycoprotein receptors*) que reconocen de forma selectiva este carbohidrato. De esta manera, lograron la liberación de doxorubicina (DOX) en este tipo de células y aumentaron la eficacia de dicho fármaco, disminuyendo la proliferación de las células tumorales. (Figura 5.4)

²⁰⁰ a) Zha, L.; Banik, B.; Alexis, F. *Soft Matter* **2011**, *7*, 5908. b) Maya, S.; Sarmiento, B.; Nair, A.; Rejinold, N. S.; Nair, S. V.; Jayakumar, R. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 7203. c) Neamtu, I.; Rusu, A. G.; Diaconu, A.; Nita, L. E.; Chiriac, A. P. *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 539. d) Makhlof, A. S. H.; Abu-Thabit, N. Y. *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications*, Elsevier, UK, **2018**.

²⁰¹ Bertranda, N.; Wub, J.; Xua, X.; Kamalyb, N.; Farokhzad, O. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 2.

²⁰² Zhang, H.; Ma, Y.; Sun, X.-L. *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 270.

²⁰³ Lou, S.; Gao, S.; Wang, W.; Zhang, M.; Zhang, J.; Wang, C.; Li, C.; Kong, D.; Zhao, Q. *Nanoscale* **2015**, *7*, 3137.



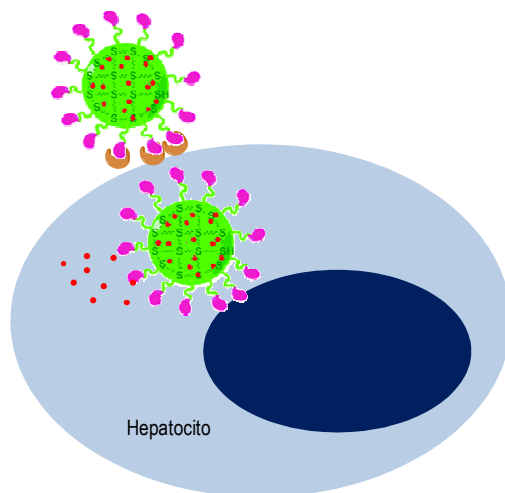


Figura 5.4 Representación gráfica del proceso de liberación de DOX en los hepatocitos.

Sin embargo, a pesar del amplio abanico de ventajas que ofrecen los gliconogeles para establecer interacciones multivalentes con receptores celulares que intervienen en procesos biológicos, existen pocos trabajos descritos en la bibliografía. Por un lado, Papp y *col.*²⁰⁴ demostraron que nanogeles de poliglicerol decorados con ácido siálico en su superficie eran capaces de inhibir el reconocimiento del virus Influenza A por la célula y, por tanto inhibían el proceso de infección en un alto porcentaje (80%). Estos sistemas competían con los ligandos naturales de las células por los receptores superficiales de los virus, en concreto la hemaglutinina y la neuraminidasa. (Figura 5.5) En estos sistemas, la densidad de ligandos en la superficie era mucho mayor que en el resto de plataformas usadas anteriormente para este fin, por lo que la capacidad de inhibición fue superior. Además, demostraron que un aumento de la funcionalización no implicaba una mayor inhibición. Sin embargo, observaron un aumento drástico de la actividad inhibitoria con el tamaño de la nanopartícula, encontrando que el tamaño óptimo era aquel que se asemeja a las dimensiones del virus.

²⁰⁴ Papp, I.; Sieben, C.; Sisson, A. L.; Kostka, J.; Böttcher, C.; Ludwig, K.; Herrmann, A.; Haag, R. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 887.



Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A

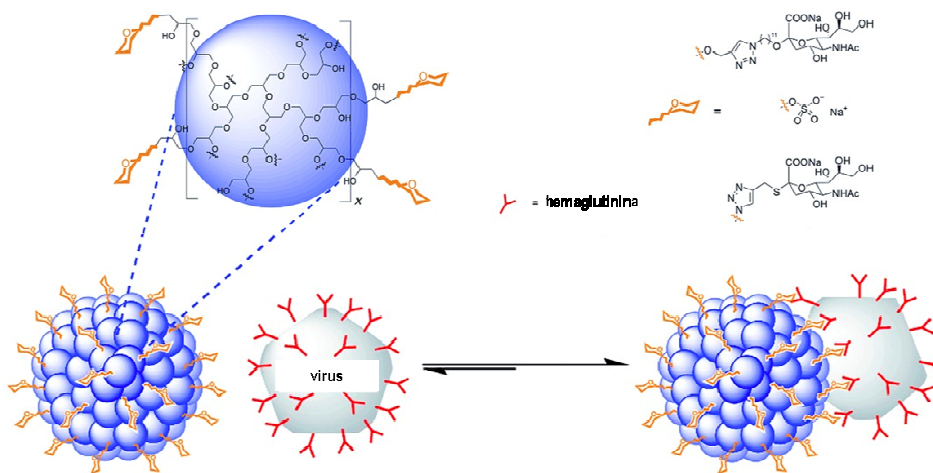


Figura 5.5 Representación esquemática de la interacción entre los nanogeles de ácido siálico y los virus.

Por otro lado, De Coen y *col.*⁴⁸ han preparado nanogeles de manosa a partir de copolímeros de bloque anfifílicos mediante polimerización por adición reversible-fragmentación de cadena-transferencia, RAFT (del inglés *Reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization*). Estos sistemas son capaces de interactuar con el MR que se encuentra en la superficie de las DCs. Además, comprobaron que estos sistemas eran internalizados por dichas células. Por ello, teniendo en cuenta que el interior de estos sistemas podría incluir antígenos u otras moléculas con capacidad para estimular el sistema inmune, estos sistemas se podrían considerar como una nueva alternativa en el tratamiento de infecciones mediante inmunoterapia.

Sin duda, los gliconogeles son plataformas muy apropiadas en el campo de la biomedicina por las características mencionadas anteriormente y, especialmente, por su versatilidad y su biocompatibilidad. Estos sistemas pueden presentar una alta multivalencia y una arquitectura globular con diámetros en la escala nanométrica, similar al diámetro de los virus, lo que los convierte en candidatos ideales para procesos de inhibición viral, interacción con lectinas o para el transporte de fármacos.



5.2 OBJETIVOS

El interés de nuestro grupo de investigación se centra en el desarrollo de plataformas multivalentes para la presentación de ligandos específicos, fundamentalmente carbohidratos, para interactuar selectivamente con receptores celulares. En este contexto, y con idea de explorar nuevas plataformas de presentación multivalente versátiles y fácilmente accesibles, se decidió abordar la preparación de nanogeles. Algunas de sus propiedades, como su gran flexibilidad, tamaño y geometría, además de su accesibilidad sintética y su alta estabilidad, hacen de ellos unos sistemas muy interesantes.

Por ello, se plantea como objetivo general el diseño de un método sencillo, versátil y reproducible que permita la preparación de nanogeles con diferentes unidades de carbohidrato en su superficie. Estos sistemas serían miméticos de los glicoconjugados naturales capaces de interactuar selectivamente con receptores celulares como las lectinas.

Para alcanzar este objetivo general, se proponen los siguientes objetivos particulares:

- Funcionalización de un intermedio polimerizable con un grupo alquino, que permita la introducción de diferentes ligandos mediante química click en un único paso.
- Aumentar el grado de multivalencia de los nanogeles, introduciendo desde unidades sencillas de carbohidrato, hasta estructuras dendríméricas con mayor número de unidades de carbohidratos y/o oligosacáridos.
- Formación de gliconanogeles a partir de cada uno de los intermedios polimerizables, mediante polimerización por radicales libres en miniemulsión.
- Evaluación de la capacidad de interacción de estas gliconanoestructuras con lectinas, usando como modelo la lectina de origen vegetal ConA.

5.3 EXPOSICIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Con el objetivo de obtener estructuras multivalentes de carbohidrato, se ha llevado a cabo la conjugación de dichas biomoléculas a nanogeles. Existen dos estrategias sintéticas en función de cuándo se produzca la funcionalización del sistema; antes o después de la formación del nanogel. Teniendo en cuenta que se quieren conjugar no sólo unidades monoméricas de carbohidrato, sino también estructuras glicodendríticas u oligoméricas de los mismos, se ha



decidido llevar a cabo la funcionalización de la correspondiente unidad polimerizable, en lugar de la funcionalización del nanogel una vez formado. De esta manera, se evitan efectos estéricos y se aumenta la accesibilidad de los grupos funcionales dentro del nanogel que tienen que reaccionar con cada uno de los ligandos sacarídicos. Además, se reduce la cantidad de reactivos que se deben añadir para que tenga lugar dicha funcionalización y que pueden dificultar la purificación final de los sistemas. En este sentido, en trabajos descritos en la bibliografía, se ha puesto de manifiesto que la conjugación de péptidos a nanopartículas es más efectiva cuando se lleva a cabo antes de la formación de la nanopartícula.²⁰⁵

Por otro lado, para conseguir que el tiempo de circulación de los nanosistemas en el torrente sanguíneo sea óptimo, una de las estrategias más utilizadas consiste en usar polietilenglicol (PEG). El PEG es un polímero hidrófilo y biocompatible ampliamente utilizado en biomedicina, debido a su capacidad de conferir una baja toxicidad e inmunogenicidad, así como una mejor biodistribución a moléculas o partículas a los que se encuentre unido covalentemente. Este polímero, aprobado por la FDA (del inglés *the Food and Drug Administration*), presenta innumerables ventajas debido a sus propiedades físicas y químicas. Entre ellas, cabe destacar su alta solubilidad en agua que, junto con su baja toxicidad intrínseca, le hacen totalmente adecuado para aplicaciones biomédicas. Además, su naturaleza hidrófila dificulta la opsonización por impedimento estérico y el secuestro de los nanosistemas por el RE.²⁰⁶

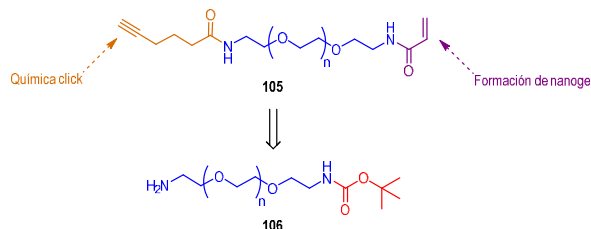
5.3.1 Funcionalización del polímero precursor

El PEG presenta una alta solubilidad, tanto en agua como en disolventes orgánicos, lo que facilita la realización de modificaciones químicas en sus dos extremos terminales. En este caso, se necesita llevar a cabo la funcionalización selectiva de cada uno de los grupos terminales del polímero. Uno de los extremos tiene que funcionalizarse con un grupo alquino para poder introducir más tarde, mediante una reacción CuAAC, el correspondiente ligando carbohidrato que contiene una azida. Por otro lado, para poder llevar a cabo la polimerización de este intermedio, que conducirá a la formación del nanogel, debe introducirse en el otro extremo una unidad polimerizable, en este caso un acrilato. (Esquema 5.1)

²⁰⁵ Valetti, S.; Mura, S.; Noiray, M.; Arpicco, S.; Dosio, F.; Vergnaud, J.; Desmaele, D.; Stella, B.; Couvreur, P. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1971.

²⁰⁶ Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schurbert, U. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288.





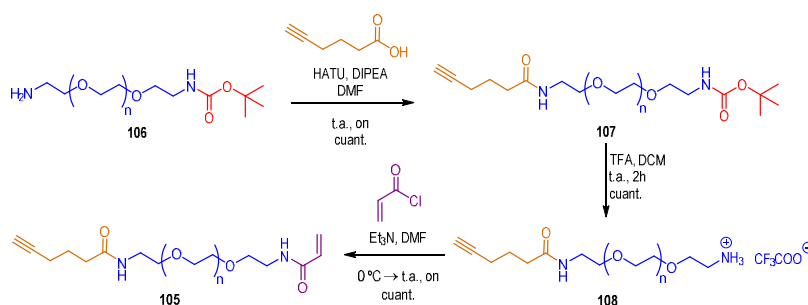
Esquema 5.1 Esquema retrosintético para la preparación del polímero precursor **105** para la formación de nanogeles.

Con idea de formar enlaces estables y no sensibles al pH, se ha decidido emplear PEG modificado con dos grupos amina en los extremos de la cadena para funcionalizarlos utilizando la formación de enlaces amida. Por otro lado, si ambos grupos terminales están desprotegidos, es difícil llevar a cabo la monosustitución selectiva de uno de los grupos. Normalmente, este proceso conduce a mezclas de productos ya que se obtiene, junto al producto monosustituido, el producto con ambos grupos funcionalizados aunque en menor proporción. Teniendo en cuenta la elevada masa molecular del polímero de partida que no se modifica significativamente tras la introducción de grupos funcionales de baja masa molecular, el uso clásico de técnicas de purificación mediante exclusión por tamaños, no permitiría separar los productos mono- y disustituidos.

Para evitar este problema, se ha decidido emplear un polímero comercial **106** ($M_p = 3271$ g/mol) con dos grupos amina en los extremos de la cadena, uno de ellos protegido con el grupo *tert*-butiloxicarbonilo (Boc). Con este PEG amino monoprotegido, mediante tres etapas sencillas, se puede obtener el polímero funcionalizado convenientemente **105**. (Esquema 5.2) En primer lugar, se llevó a cabo la introducción del grupo alquino. Se ha decidido introducir el grupo acrilato o grupo polimerizable lo más tarde posible en la secuencia sintética, debido a su alta reactividad. Las condiciones clásicas de desprotección del grupo protector Boc, son en medio fuertemente ácido y en estas condiciones, se pueden generar cationes en el grupo acrilato, lo que puede provocar la polimerización del intermedio.



Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A



Esquema 5.2 Ruta sintética para la obtención del intermedio polimerizable **105**.

La ruta sintética comienza con la introducción del grupo alquino en el polímero **106**, mediante acoplamiento del grupo amino libre y el ácido hexinoico. Este acoplamiento se llevó a cabo en presencia de HATU (del inglés *(1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate, Hexafluorophosphate Azabenzotriazole Tetramethyl Uronium)*), capaz de transformar el ácido en un éster activado facilitando la reacción con el grupo amino libre del polímero, formándose la amida correspondiente **107** con un rendimiento excelente. Tras la purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH-20 en MeOH, se llevó a cabo un análisis por RMN para confirmar que la conjugación había sido completa. En el espectro de ¹H-RMN, aparece una señal en forma de triplete a 1.94 ppm que corresponde al protón del metino del grupo alquino. (Figura 5.6) Además, se observan un multiplete, un triplete de dobletes y un triplete a 1.80, 2.19 y 2.26 ppm, respectivamente, correspondientes a los protones de los metilenos del ácido hexinoico. A campo más bajo, aparece un singlete ancho que corresponde al protón de la nueva amida formada.



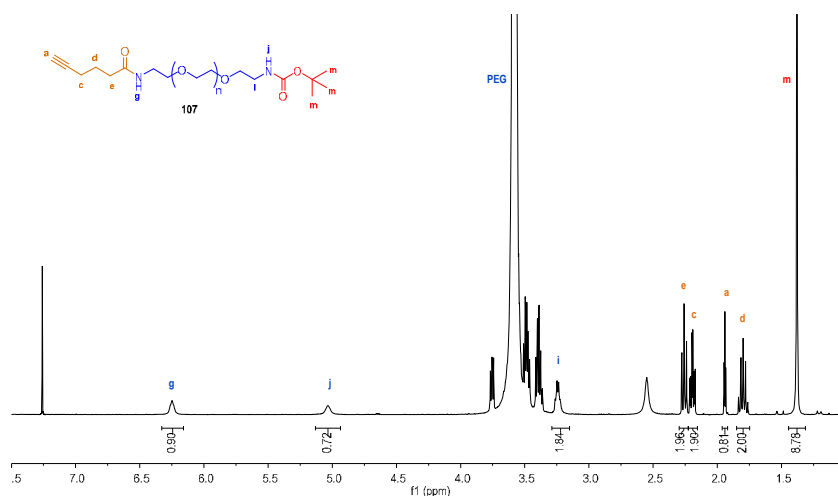


Figura 5.6 Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , 298 K) del intermedio **107**.

Cabe señalar que, tras la formación de la amida, desaparecen los protones del metileno en α al grupo amino a 2.82 ppm, indicativo de que la reacción ha transcurrido de forma completa.

Por otro lado, el espectro de ^{13}C -RMN muestra una nueva señal a 172.2 ppm correspondiente al carbono del carbonilo de la amida formada. (Figura 5.7) A campo más alto, aparecen las señales del carbono del metileno en α al grupo amino de la amida (39.1 ppm) y de los carbonos de los metilenos del ácido hexanoico (34.9 ppm-17.9 ppm), junto con la señal de los carbonos de los metilos del grupo protector Boc de mayor intensidad (28.4 ppm).



Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A

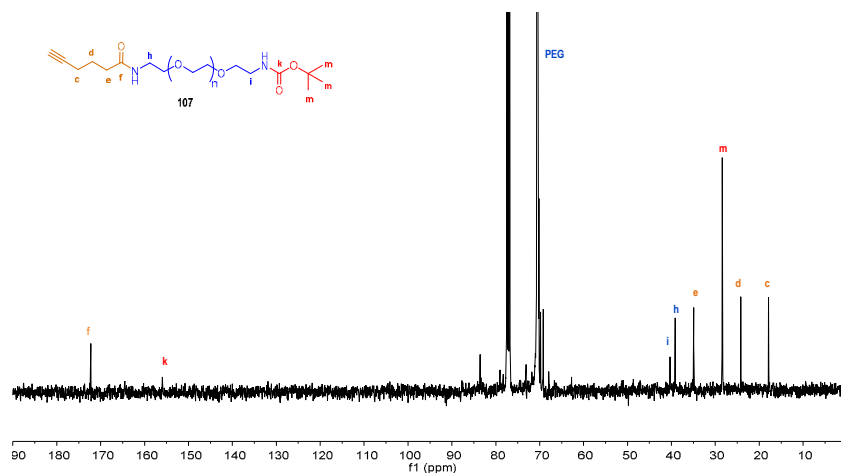


Figura 5.7 Espectro ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) del intermedio 107.

El siguiente paso fue la desprotección del otro grupo amino en presencia de ácido trifluoroacético a temperatura ambiente durante 2 h, obteniéndose la amina correspondiente en forma de sal de manera cuantitativa. En el espectro de ¹H-RMN, se observa la desaparición de la señal de 1.38 ppm de los 9 protones de los metilos del grupo Boc y la ausencia de la señal del protón del carbamato a 5.03 ppm. (Figura 5.8) Además, aparece una nueva señal ancha a 7.83 ppm que corresponde al grupo amonio.



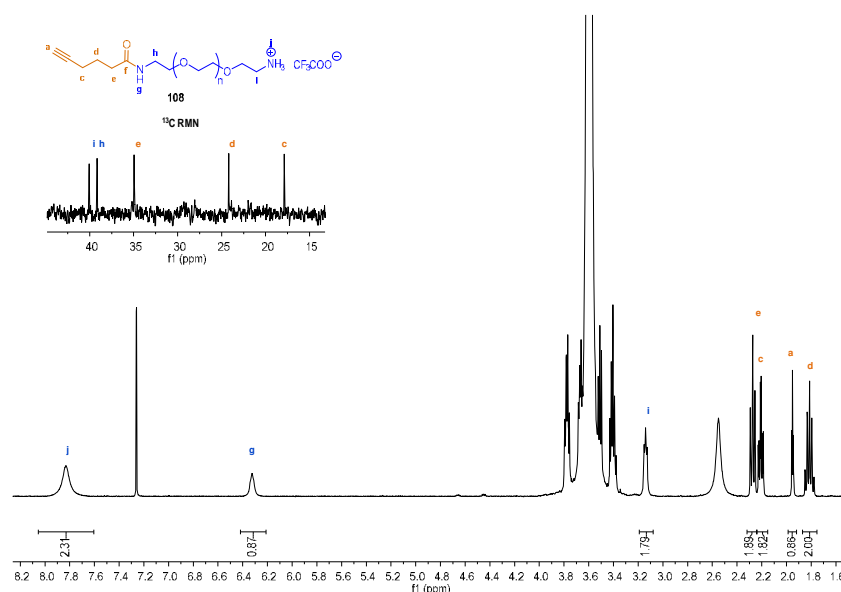


Figura 5.8 Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , 298 K) y zona del espectro de ^{13}C -RMN comprendida entre 45-13 ppm (100 MHz, CDCl_3 , 298 K) del intermedio **108**.

De manera análoga, en el espectro de ^{13}C -RMN se aprecia la desaparición de la señal de los carbonos de los metilos del grupo protector a 28.4 ppm y la señal del carbono carbonílico del carbamato (155.0 ppm).

El derivado de PEG **105**, funcionalizado con un acrilato en uno de los extremos, se preparó fácilmente mediante reacción del derivado **108** y cloruro de acrililoilo, en presencia de Et_3N a temperatura ambiente, durante una noche. Tras purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño Sephadex LH20 en MeOH, el compuesto deseado **105** se obtuvo de manera cuantitativa. La integración, en el espectro de ^1H -RMN, de las señales correspondientes a los protones del doble enlace de la acrilamida formada (a campo bajo) respecto a los protones de los tres metilenos o el metino del grupo hexinoico (a campo alto) da lugar a la relación esperada, demostrándose la completa funcionalización del polímero. (Figura 5.9)



Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A

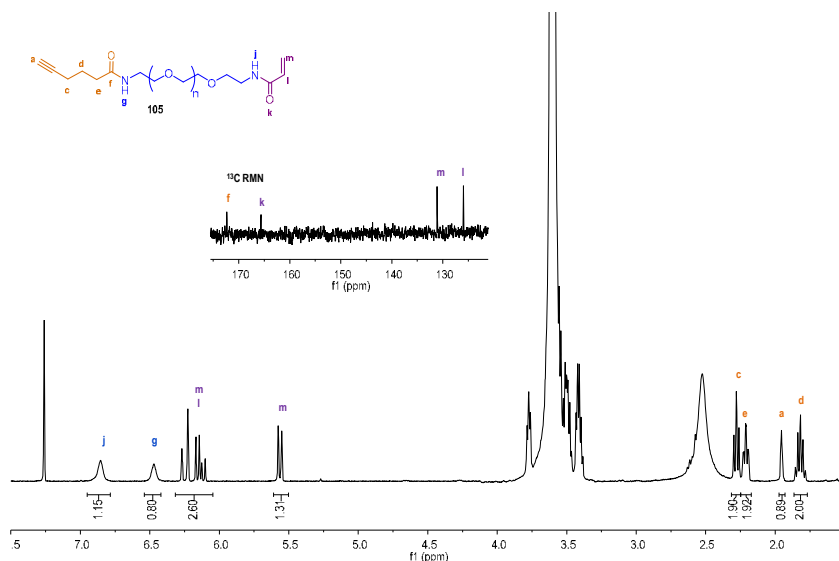


Figura 5.9 Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , 298 K) y zona del espectro de ^{13}C -RMN comprendida entre 175-123 ppm (100 MHz, CDCl_3 , 298 K) del intermedio **105**.

Además, en este espectro se puede observar la ausencia de la señal de los protones del metileno en α a la amina (3.14 ppm) y la aparición de una nueva señal del protón del grupo amino de la acrilamida (6.86 ppm).

Así mismo, se ha llevado a cabo la caracterización mediante ^{13}C -RMN y MALDI-TOF (del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight*), confirmándose la completa conjugación. En el espectro de ^{13}C -RMN del derivado **105**, (Figura 5.9) se observa la aparición del carbono carbonílico de la acrilamida (165.6 ppm) y las señales de los carbonos del doble enlace (131.1 y 125.9 ppm). En el espectro de MALDI-TOF (Figura 5.10) se observó una única campanada de Gauss, siendo el incremento de masa entre cada uno de los picos de 44 Da, correspondiente a la masa de una unidad de $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$.



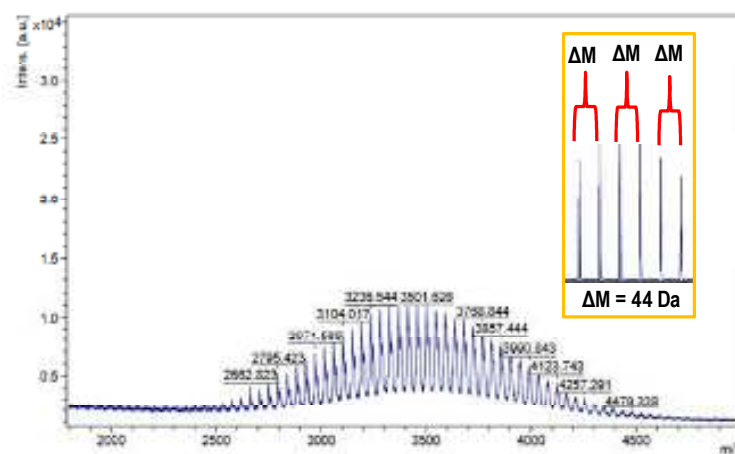


Figura 5.10 Espectro MALDI-TOF del derivado **105**.

5.3.2 Conjugación del polímero precursor **105** con diferentes ligandos mediante acoplamiento CuAAC

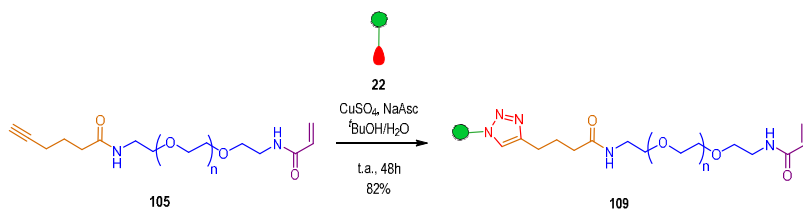
Como ya se ha indicado, la conjugación del polímero modificado **105** se llevará a cabo con ligandos de diferente naturaleza mediante reacción de CuAAC. Con ello, se pretende desarrollar un procedimiento eficaz para funcionalizar este intermedio en un solo paso con una conversión completa.²⁰⁷

En primer lugar, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento mediante CuAAC entre la unidad de alquino del intermedio polimerizable **105** y el grupo azido de la manosa **22**. (Esquema 5.3) Esta reacción tuvo lugar en una mezcla de disolventes *tert*-butanol (*t*BuOH) y agua (1:1), siendo la concentración de PEG-alquino 0.05 M. La reacción transcurrió a temperatura ambiente durante 48 h para asegurar la completa funcionalización del polímero.

²⁰⁷ a) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2595. b) Lallana, E.; Fernandez-Trillo, F.; Sousa-Herves, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Pharm. Res.*, **2012**, *29*, 902.



Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A



Esquema 5.3 Reacción de conjugación mediante reacción CuAAC entre el intermedio polimerizable **105** y el derivado de manosa **22**.

Tras la purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaños LH-20 en MeOH, se obtuvo el glicopolímero correspondiente **109** con un buen rendimiento, siendo caracterizado tanto por MALDI-TOF (ver apartado 5.3.3) como por espectroscopía de RMN.

En el espectro de ^1H -RMN del glicopolímero de manosa **109** en D_2O puede observarse la aparición de un singlete nuevo a 7.9 ppm, que se corresponde con el protón del metino del triazol formado tras la reacción CuAAC. (Figura 5.11) También, aparecen las señales correspondientes a los protones próximos al triazol ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ntriazol}$) como multiplete entre 4.69 y 4.61 ppm. Por otro lado, se produce un desplazamiento de la señal de los protones en α respecto al alquino, ahora triazol, desde 1.94 ppm hasta 2.75 ppm. La señal del protón anomérico de la manosa queda oculta debajo de la señal residual del disolvente no deuterado. Este hecho se confirma en el espectro bidimensional HSQC, donde la señal asignada al agua correlaciona con una señal de carbono a 100 ppm.



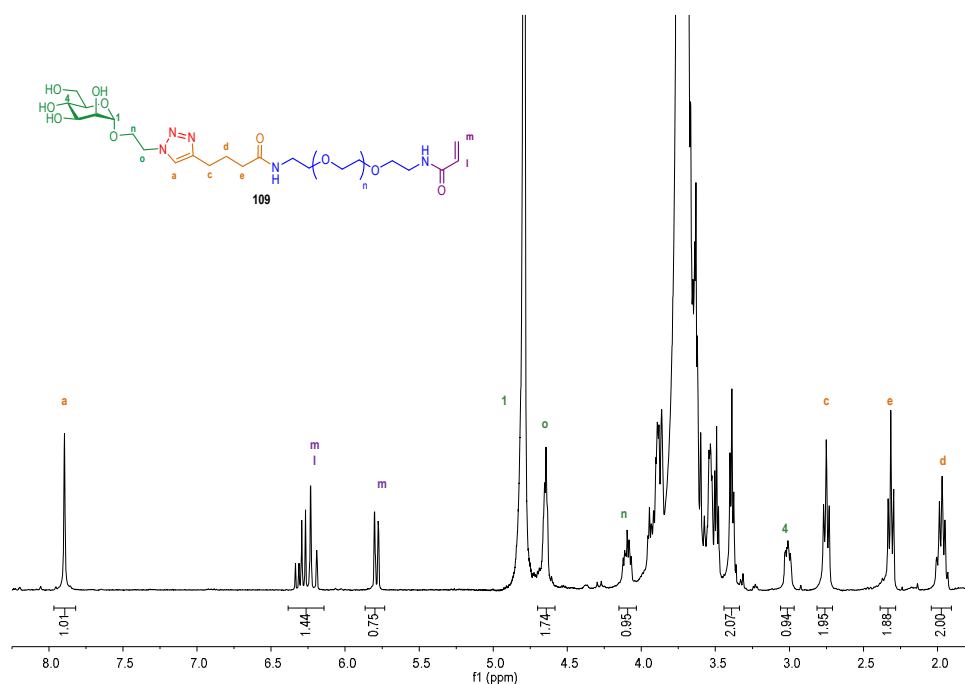


Figura 5.11 Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) del intermedio **109**.

Estas observaciones son extrapolables a todos los glicopolímeros obtenidos tras la reacción click de acoplamiento entre el intermedio polimerizable y los correspondientes carbohidratos.

En el espectro de ^{13}C -RMN, una prueba que demuestra que la reacción ha transcurrido con éxito es la aparición de la señal del carbono del metino del triazol (123.6 ppm), (Figura 5.12) así como la aparición de las señales de los carbonos correspondientes a los metilenos en α al triazol (o, 49.9 ppm y c, 23.9 ppm) y la desaparición de la señal del carbono del metileno en α al triple enlace (17.9 ppm).



Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A

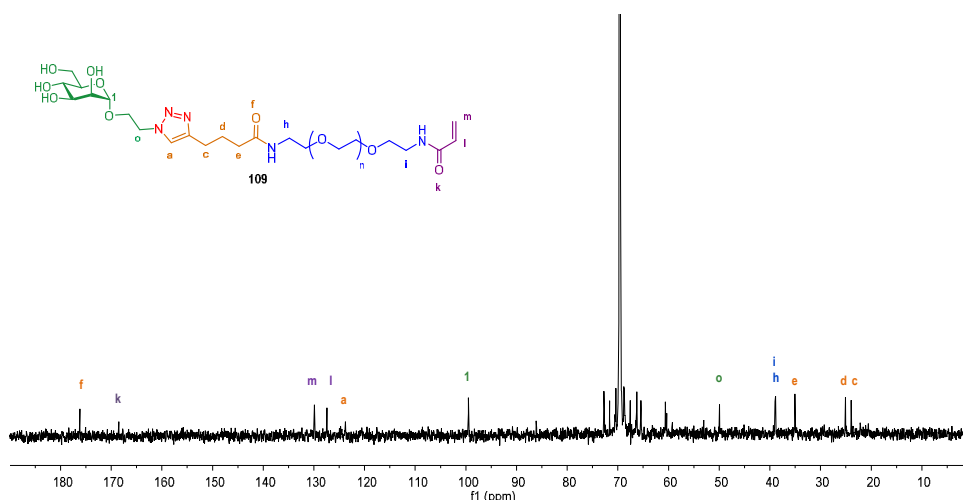


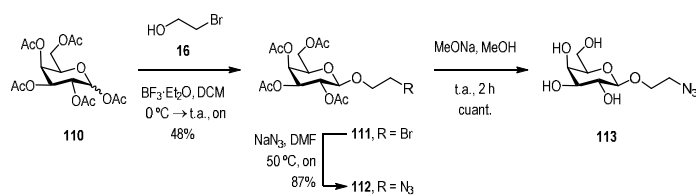
Figura 5.12 Espectro ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O , 298 K) del intermedio **109**.

Como control negativo para los experimentos biológicos, se utilizó el monosacárido galactosa **113** que también se conjugó al intermedio **105**. Se utiliza este carbohidrato ya que no presenta afinidad por la lectina objeto de estudio en la presente tesis doctoral, ConA.

Para llevar a cabo la reacción de acoplamiento, se empleó el derivado de galactosa **113** que contiene un grupo azido en su estructura. El derivado de β -galactosa se ha preparado a partir de la galactosa peracetilada comercial (**110**) siguiendo la ruta descrita en el siguiente esquema.²⁰⁸ (Esquema 5.4) La ruta sintética para la obtención de este derivado es análoga a la empleada para el caso del derivado de manosa **22**. En primer lugar, se hizo reaccionar el derivado acetilado **110** con el espaciador **16**, en presencia del ácido de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Tras purificar el producto de la reacción mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se sustituyó el átomo de bromo por el grupo azido, en presencia de azida sódica a 50°C , dando lugar al derivado **112**. Por último, los grupos hidroxilo fueron desprotegidos bajo las condiciones de Zemplén, obteniéndose el derivado **113** cuantitativamente.

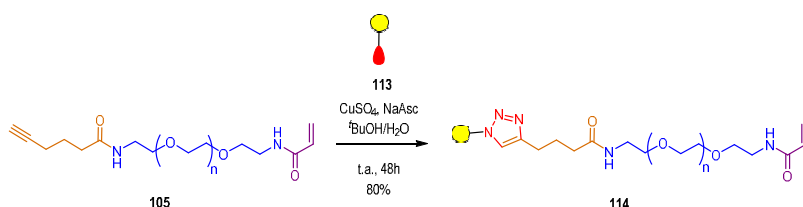
²⁰⁸ Chernyak, A. Y.; Sharma, G. V. M.; Kononov, L. O.; Krishna, P. R.; Levinskii, A. B.; Kochetkov, N. K.; Rao, A. V. R. *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 303.





Esquema 5.4 Ruta sintética para obtener el derivado de β -galactosa **113**.

A partir del derivado **113**, se llevó a cabo la reacción click con el derivado **105**, para obtener el glicopolímero **114** funcionalizado con galactosa con un rendimiento del 80%, en las condiciones empleadas para obtener el glicopolímero de manosa **109**. (Esquema 5.5)



Esquema 5.5 Reacción de conjugación mediante reacción CuAAC entre el intermedio polimerizable **105** y el derivado de galactosa **113**.

Del mismo modo, se ha realizado la conjugación entre el intermedio polimerizable **105** y los ligandos recogidos en la figura 5.13, siguiendo el procedimiento detallado anteriormente.

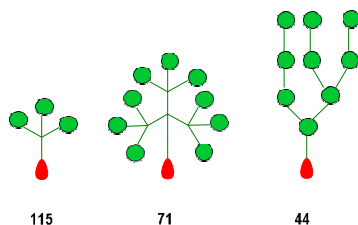


Figura 5.13 Ligandos incorporados al intermedio polimerizable **105**. Glicodendrón de 3 unidades de manosas **115**, de 9 unidades de manosa **71** y Man₉ **44**, de izquierda a derecha.

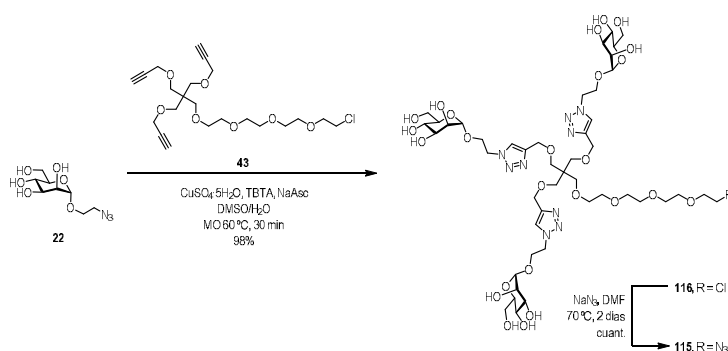


Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A

Con el objetivo de incrementar la multivalencia de los sistemas, se incorporaron diferentes estructuras dendríticas, aumentando de esta manera el número de unidades de manosa por nanogel. Así, se pretende aumentar la afinidad de estos sustratos por las lectinas que reconocen manosas.

En concreto, se han incorporado glicodendrones de 3 y 9 unidades de manosa (**115** y **71**) que poseen en la posición focal un grupo azido, cuya síntesis fue descrita por nuestro grupo de investigación anteriormente.⁸³

El glicodendrón con tres unidades de manosa se preparó a partir del derivado de manosa con un grupo azido **22** y el núcleo de crecimiento **43** (pentaeritritol tripropargilado). (Esquema 5.6)



Esquema 5.6 Síntesis del glicodendrón trivalente de manosa **115**.

Para llevar a cabo la reacción CuAAC entre el núcleo trivalente **43** y el derivado de manosa **22**, se empleó $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como fuente de cobre y ascorbato sódico como agente reductor *in situ* de Cu(II) a Cu(I) . Además, se utilizó TBTA como ligando estabilizante de Cu(I) . La reacción de acoplamiento se llevó a cabo bajo irradiación de microondas (MO) a 60°C durante 30 minutos usando una mezcla de $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Transcurrido este periodo se eliminó el cobre, añadiendo una pequeña proporción de la resina Quadrasil® MP, y el crudo de reacción se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño Sephadex LH20 en MeOH . La última etapa para la preparación del glicodendrón trivalente **115** consistió en la sustitución del grupo funcional cloruro por azida, usando azida sódica en DMF a 70°C .

A continuación, se llevó a cabo la reacción de conjugación del intermedio polimerizable **105** y los glicodendrones de primera y de segunda generación de manosa **115** y **71**, respectivamente,



en las mismas condiciones que en el caso de la reacción de preparación del glicopolímero **109** descrito previamente. El glicopolímero **118** que presenta el glicodendrón de 9 unidades de manosa **71** posee una masa molecular elevada y superior al resto de glicopolímeros. Esto hace que no sea posible separar el glicopolímero **118** del glicodendrón precursor **71** (de elevada masa molecular) mediante cromatografía Sephadex LH20 en MeOH. En este caso, la separación de estas dos especies, con masas moleculares similares, se llevó a cabo mediante ultrafiltración con una membrana de MWCO de 5000 Da.

Una vez purificados los glicopolímeros **117** y **118**, éstos fueron caracterizados mediante MALDI-TOF (ver apartado 5.3.3) y RMN. En estos últimos espectros, se puede observar el mismo desplazamiento de las señales respecto al intermedio precursor, tal y como se observa en el espectro del glicopolímero de manosa **109**. Se observó la aparición de las señales de las glicoestructuras conjugadas al polímero y del protón y los carbonos del nuevo triazol formado, así como las señales de los metilenos en α al triazol.

Por último, se llevó a cabo la conjugación del epítipo Man₉ del ligando natural *high-mannose* **44**,⁸⁷ convenientemente funcionalizado con un grupo azida en el extremo reductor con configuración β . Las condiciones de reacción, así como el modo de purificación del glicopolímero correspondiente **119** fueron idénticos a los empleados para el resto de ligandos.

A modo de resumen, en la siguiente tabla se detalla el rendimiento obtenido en los acoplamientos con cada uno de los ligandos.

Tabla 5.1. Tabla resumen de las reacciones de formación de los glicopolímeros **109**, **114**, **117-119**.

Glicopolímero	Ligando	Rendimiento (%)
109	22 (Manosa)	82
114	113 (Galactosa)	80
117	115 (Dendrón de 3 Man)	67
118	71 (Dendrón de 9 Man)	62
119	44 (Epítipo Man ₉)	87



5.3.3 Caracterización de los intermedios polimerizables mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

La estructura del polímero comercial de partida **106**, del intermedio polimerizable **105**, así como de todos los glicopolímeros polimerizables descritos en la tabla 5.1, se ha confirmado mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Esta técnica consiste en la ionización suave del analito. Permite la vaporización de moléculas termolábiles, no volátiles, de peso molecular hasta 20 kDa. Para ello, es preciso un analizador que mide de forma precisa el tiempo de vuelo de los iones desde que son acelerados por la fuente hasta que impactan en el detector. Esta técnica requiere que las biomoléculas se co-cristalicen con moléculas orgánicas que absorben en el ultravioleta, denominadas matrices. Es importante elegir la matriz más adecuada que permita el análisis de cada uno de los compuestos. En función de las características del compuesto que se quiere analizar mediante esta técnica, se elige el tipo de matriz que permita la ionización del compuesto. Un factor importante que se debe tener en cuenta a la hora de elegir la matriz es su peso molecular, este valor debe ser bajo para que sea posible la evaporación, pero no demasiado, para evitar que se evapore durante la preparación de la muestra.

La distribución del peso molecular de un polímero es una campana de Gauss, por lo que el peso molecular de un polímero debe describirse como un peso molecular promedio, calculado a partir de los pesos moleculares de todas las cadenas en la muestra. También se suele utilizar el valor de M_p (del inglés *Molecular weight at peak top*), que se corresponde con la masa molecular del pico de mayor intensidad en el espectro de MALDI-TOF.

A la hora de analizar los intermedios polimerizables funcionalizados con azúcares desprotegidos, se han utilizado principalmente las matrices CHCA (del inglés *α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid*), HABA (del inglés *2-(4-Hydroxyphenylazo) benzoic acid*) y la matriz DCTB (del inglés *2-[(2E)-3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile*). Esta última matriz, a pesar de ser una molécula apolar, permite la ionización de glicopolímeros, tal y como se recoge en la bibliografía.²⁰⁹

Para adquirir los espectros de masas de los polímeros mediante la técnica MALDI-TOF, es necesario generalmente añadir agentes de cationización para mejorar la ionización del polímero. Por ello, en la preparación de algunas muestras se utilizó 0.1% de ácido trifluoroacético, NaCl o una disolución de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 4 mM.

²⁰⁹ Crotty, S.; von der Ehe, C.; Weber, C.; Schubert, U. S. *Eur. Polym. J.* **2015**, *71*, 325.



En la tabla 5.2 se muestran los valores de masa molecular del pico de mayor intensidad M_p del espectro de MALDI-TOF de cada uno de los intermedios polimerizables. Además, se detalla la matriz y las condiciones en las que se ha adquirido cada uno de los espectros de masas de los intermedios polimerizables.

Tabla 5.2 Valores teóricos y experimentales de M_p de los intermedios polimerizables y condiciones de MALDI-TOF.

Polímero	M_p calculado	M_p encontrado	Matriz	Agentes cationizantes
106	3000	3271	HABA	NaCl 0.02 M
105	3319	3313	CHCA	
109	3568	3740	CHCA	0.5% TFA
114	3568	3481	DCTB	
117	4517	4505	CHCA	0.1% TFA
118	7101	7137	CHCA	0.1% TFA
119	4865	5016	CHCA	0.1% TFA 4 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

En todos y cada uno de los espectros de los intermedios polimerizables, se ha observado una única distribución de masa molecular que se desplaza a mayores o menores relaciones m/z en función de los distintos grupos funcionales o ligandos terminales presentes en el polímero. La distancia entre los diferentes picos que conforman cada una de las campanas de Gauss es 44 Da, que se corresponde con la masa de una unidad de etilenglicol ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$). (Figura 5.14)



Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A

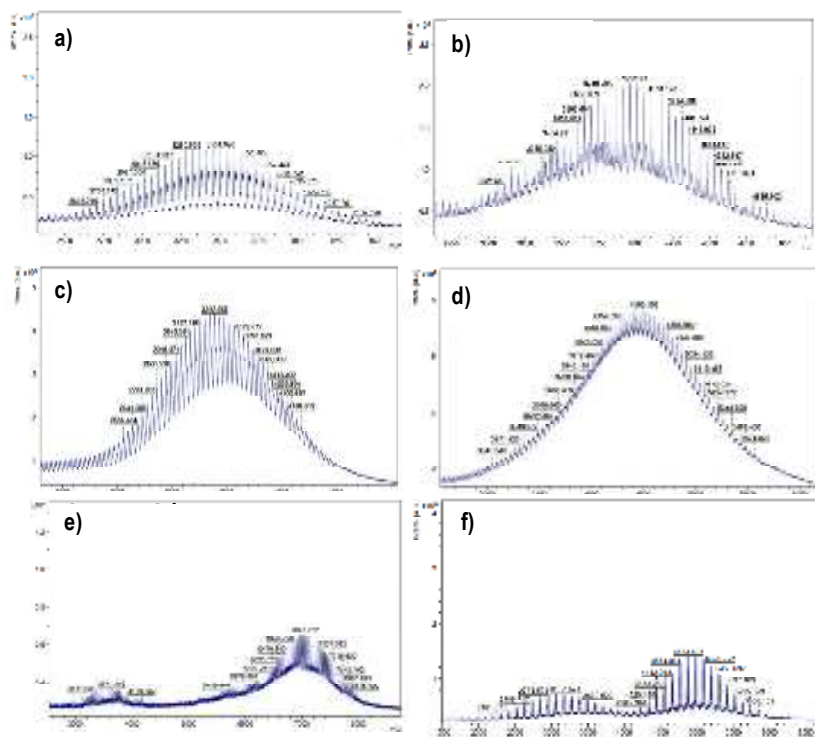


Figura 5.14 Espectros de MALDI-TOF de los intermedios polimerizables: a) 106, b) 109, c) 114, d) 117, e) 118 y f) 119.

Los compuestos de mayor masa molecular, 118 y 119, volaron con mayor dificultad, por ello fue necesario aplicar mayor potencia de láser, lo que provocó la fragmentación de estos glicopolímeros durante el experimento.

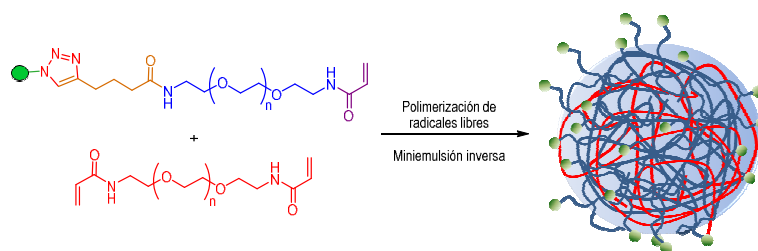
5.3.4 Preparación de los gliconogeles

Una vez funcionalizado convenientemente el intermedio polimerizable, caracterizado mediante RMN y espectrometría de masas MALDI-TOF, se procedió a la preparación de los correspondientes nanogeles.



La formación de nanogeles se llevó a cabo mediante polimerización de radicales libres, en presencia de un agente entrecruzante y en miniemulsión inversa. De esta manera, la preparación de los nanogeles tiene lugar en un solo paso y de forma sencilla.

Los nanogeles se formaron mediante co-polimerización del polietilenglicol acrilado previamente sintetizado, y un polietilenglicol diacrilado comercial de bajo peso molecular (M_n 575) que actúa como agente entrecruzante. (Esquema 5.7)

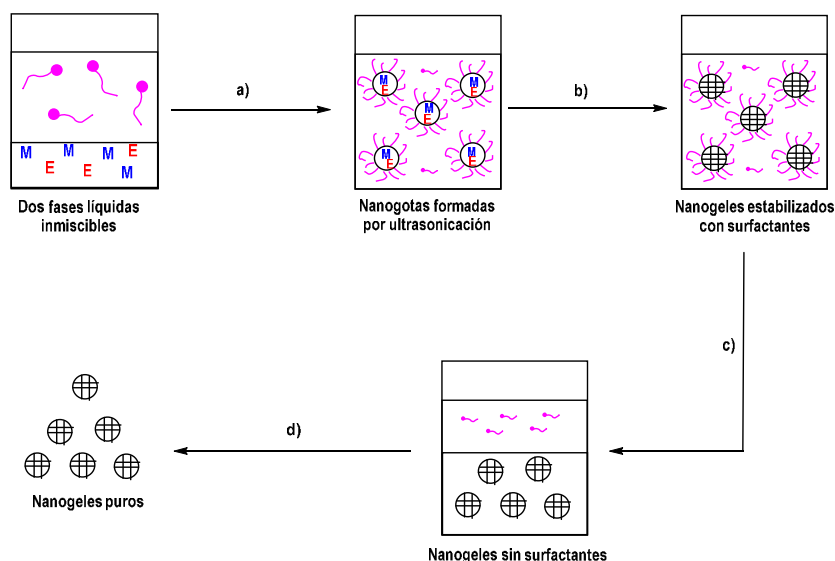


Esquema 5.7 Preparación de los gliconanogeles con diferentes unidades de carbohidratos.

De manera esquemática, la preparación de los nanogeles conlleva las siguientes etapas (Esquema 5.8):



Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A



Esquema 5.8 Etapas de la preparación de los nanogeles: a) miniemulsión inversa, b) polimerización de radicales libres tras la adición del iniciador radicalario, c) extracción de los surfactantes mediante centrifugación y lavado con ciclohexano y d) eliminación de los polímeros que no han reaccionado mediante cromatografía por exclusión de tamaños en agua.

El proceso de preparación de los nanogeles se inició disolviendo los polímeros en una pequeña cantidad de agua milliQ junto con persulfato de amonio (APS). De manera separada, los surfactantes seleccionados (Tween@80 y Span@80) se disolvieron en ciclohexano. A continuación, la fase acuosa que contenía los polímeros se adicionó sobre la fase orgánica. A partir de esta mezcla se formó la correspondiente miniemulsión mediante ultrasonificación con una punta sónica, de manera discontinua (5 ciclos de 30 segundos) a potencia media. (Esquema 5.8a) Es importante que la superficie de la punta sónica del ultrasonicador se encuentre lo más lisa posible, para conseguir nanogotas con un tamaño uniforme. La presencia de los surfactantes aseguró la estabilidad de las gotas formadas. Además, el APS actúa como ultralipófilo, aumentando la presión osmótica dentro de las gotas. Para comprobar que se había formado una distribución de gotas de tamaño similar, se tomó una pequeña fracción del volumen total y se analizó mediante DLS (del inglés *Dynamic Light*



Scattering). El tamaño de estas partículas, en ciclohexano, fue aproximadamente de 170 nm con un índice de polidispersión (PDI) de 0.19. (Figura 5.15)

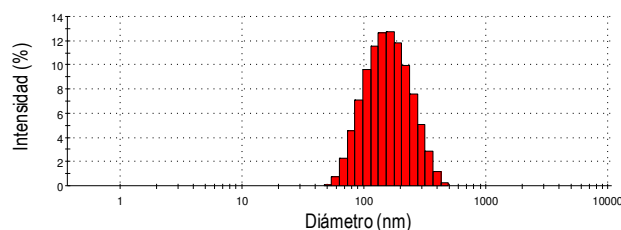


Figura 5.15 Histograma de DLS (diámetro hidrodinámico, nm) de la miniemulsión formada durante la preparación del nanogel de Galactosa **121**.

Por último, tras pasar un flujo de Ar sobre la miniemulsión, se añadió *N,N,N',N'*-tetrametilendiamina (TEMED), dando comienzo el proceso de polimerización (gelación de las gotas). Este proceso tiene lugar en el interior de cada una de las gotas formadas una vez que el TEMED alcanza las gotas y cataliza la descomposición del APS. Esto provoca la creación de radicales en algunos grupos acrilato, capaces de reaccionar con otros grupos acrilato no activados, comenzando de esta forma la reacción de polimerización por radicales libres. (Esquema 5.8b)

Tras llevarse a cabo la polimerización durante toda la noche a temperatura ambiente, fue necesario un último paso de purificación. En primer lugar, se eliminaron los surfactantes mediante centrifugación en ciclohexano. (Esquema 5.8c) Los nanogeles ya formados se deben purificar mediante exclusión por tamaños con filtros para centrifuga Amicon Ultra-15 (MWCO 30 KDa) ya que parte de los polímeros añadidos no son capaces de reaccionar. (Esquema 5.8d) Esto supone un problema adicional ya que las cadenas que no han reaccionado podrían atravesar la red polimérica del nanogel, generando una toxicidad no deseada. Por ello, la purificación de los nanogeles es un proceso largo y se realiza en un medio acuoso.

De esta manera, se lograron preparar los nanogeles de manosa **120**, de galactosa **121**, de dendrón de 3 manosas **122**, de dendrón de 9 manosas **123** y de Man₉ **124**. Su tamaño e índice de polidispersión (PDI) fueron analizados mediante DLS en agua (ver apartado 5.3.5).



Todos los nanogeles así formados, se pueden almacenar en disolución durante más de un año, tal y como se ha comprobado mediante DLS. Además, se pueden liofilizar eliminando completamente el agua y redisolverse en agua o buffer recuperando su forma y tamaño.

Además, el método de síntesis puede ser escalado para obtener mayor cantidad (hasta 30 mg) del nanogel correspondiente, tal y como se describe en el capítulo 6.

5.3.5 Caracterización de los gliconogeles

La morfología y el tamaño de los distintos nanogeles preparados fue estudiada por microscopía de transmisión electrónica TEM (del inglés *transmission electron microscopy*), microscopía electrónica de barrido SEM (del inglés *scanning electronic microscopy*) y por DLS. Estas partículas presentan una distribución estrecha de tamaño, que viene definido por el tamaño de la gota generada durante la miniemulsión, tal y como se observa mediante DLS. (Figura 5.16) Esta técnica revela que el diámetro hidrodinámico de estas partículas se encuentra entre 150-190 nm y presentan una baja polidispersidad. (Tabla 5.3)

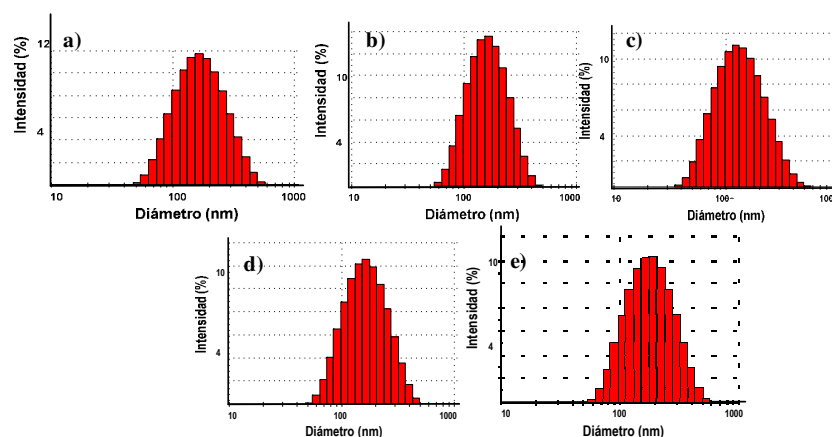


Figura 5.16 Histogramas de DLS (diámetro, nm) de los nanogeles de: a) manosa **120**, b) galactosa **121**, c) dendrón de 3 manosas **122**, d) dendrón de 9 manosas **123** y e) Man₉ **124**.

Tabla 5.3 Tamaño y PDI de los diferentes gliconogeles obtenidos mediante DLS.



NANOGELO	LIGANDO	TAMAÑO (nm)	PDI
120	22 (Manosa)	172.2±1.5	0.19
121	113 (Galactosa)	178.4±7.4	0.20
122	115 (Dendrón de 3 Man)	151.0±2.6	0.29
123	71 (Dendrón de 9 Man)	177.0±1.0	0.33
124	44 (Epítipo Man ₉)	195.2±2.3	0.21

Para poder medir el tamaño de los nanogelos, fue necesario preparar disoluciones en H₂O milliQ de cada uno de ellos, a una concentración de 2 mg/mL. Con esta concentración, se conseguía que el número de partículas y la calidad de la medida fuera buena. Previamente, antes de colocar un volumen de muestra de 700 µL en la cubeta de cuarzo es necesario filtrar la disolución con filtros 0.45 µm de nylon para eliminar partículas de polvo que podrían detectarse en el DLS e interferir en la medida.

Mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido se caracterizaron el nanogel de manosa **120** y el nanogel del glicodendrón de 9 manosas **123**. A pesar de que la composición de los nanogeles que se van a analizar es orgánica, no fue necesaria la tinción de las muestras para aumentar el contraste de las mismas, ya que el equipo empleado permite observar los nanogeles.

Las imágenes de TEM y SEM revelan que los gliconanogeles presentan morfología esférica. (Figura 5.17) Tras el correspondiente análisis estadístico, se observa que el diámetro del nanogel de manosa **120** es de 165±45 nm mientras que el diámetro del nanogel del dendrón de 9 manosas **123** corresponde con 275±111 nm y el diámetro del nanogel del epítipo de Man₉ **124** coincide con 70±22 nm.

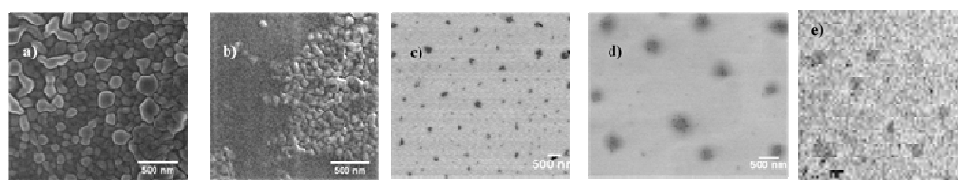


Figura 5.17 Imágenes de SEM de: a) **120** y b) **123**. Imágenes de TEM: c) **120**, d) **123** y e) **124**.



5.3.6 Determinación de la cantidad de carbohidratos en los gliconanogeles

Uno de los métodos más utilizados para determinar la concentración de carbohidratos en disolución es el método del ácido sulfúrico-UV. Éste es un método basado en la medida de la absorbancia a una longitud de onda determinada (315 nm) de los subproductos (furfurales) formados tras la reacción de los carbohidratos con ácido sulfúrico concentrado.²¹⁰ Previamente, para cuantificar la cantidad de cualquier ligando es necesario construir una recta de calibrado a diferentes concentraciones del ligando libre. (Figura 5.18) De esta forma, a partir de la ecuación de la recta, y conociendo el valor de la absorbancia, tras el tratamiento con el ácido sulfúrico, del nanogel que posee dicho ligando, se puede calcular el contenido de ese ligando en el nanogel.

De esta manera, se ha podido cuantificar el porcentaje en peso de cada uno de los monosacáridos presentes en los correspondientes nanogeles **120-121**, encontrándose un 3.7% y 4.0% de azúcar en el caso de manosa y galactosa, respectivamente. Estos valores representan aproximadamente el 60% (teórico: 6.4%) de la cantidad teórica esperada.

²¹⁰ Albalasmeh, A. A.; Berhe, A. A.; Ghezzehei, T. A. *Carbohydr. Polym.*, **2013**, *97*, 253.



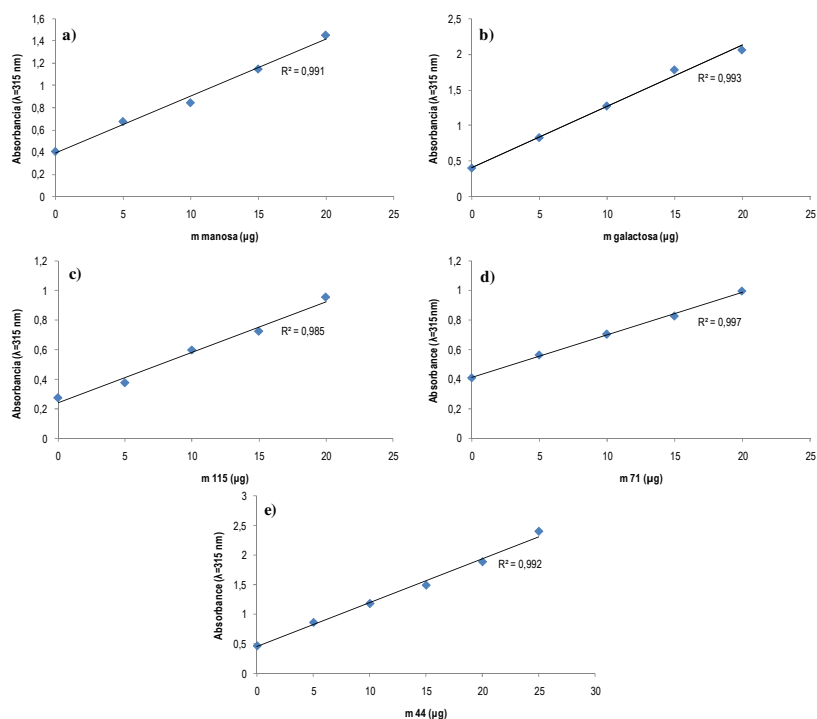


Figura 5.18 Rectas de calibrado de los ligandos: a) manosa, b) galactosa, c) glicodendrón de 3 manosas **115**, d) Glicodendrón de 9 manosas **71** y e) epítipo Man₉ **44**.

Por otro lado, se ha determinado la proporción en peso de los dendrones de 3 y 9 unidades de manosas y del epítipo Man₉, en cada uno de los nanogeles correspondientes **122-124**. (Figura 5.18c-e). Al igual que en los casos anteriores, los valores obtenidos experimentalmente para cada uno de los ligandos son aproximadamente la mitad del valor esperado teóricamente (asumiendo que el 100% de las cadenas del glicopolímero hubieran reaccionado). Los porcentajes en peso de los ligandos para cada uno de los nanogeles son los siguientes: **122** (experimental: 11.4% vs teórico: 22.1% de dendrón de 3 manosas), **123** (experimental: 27.7% vs teórico: 54.8% de dendrón de 9 manosas) y **124** (experimental: 14.7% vs teórico: 33.1% del epítipo Man₉).

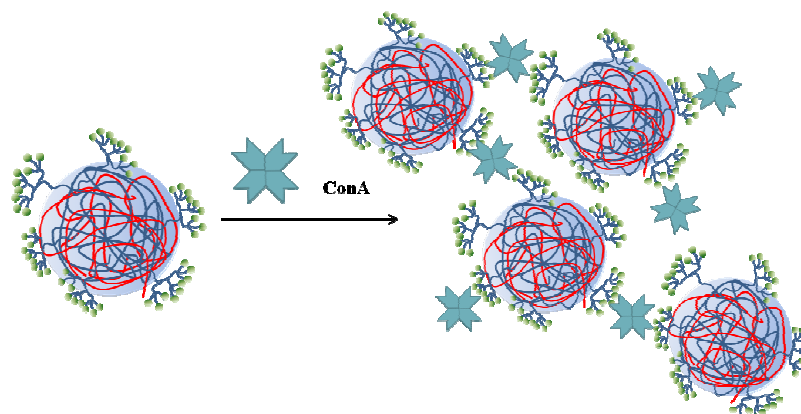


Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A

Estos resultados indican que, en las condiciones de reacción utilizadas, la mitad de los equivalentes añadidos de los glicopolímeros son capaces de reaccionar y formar parte del nanogel, en todos los casos. En este sentido, se puede concluir que el método de preparación de estos sistemas es reproducible y robusto.

5.3.7 Interacción de los gliconogeles con ConA

Como ya se ha mencionado en el apartado de introducción de este capítulo, los gliconogeles pueden considerarse plataformas multivalentes para la presentación de carbohidratos. Como prueba de concepto, y de forma preliminar, para determinar su capacidad de interacción con lectinas se han llevado a cabo estudios de interacción con la lectina modelo de origen vegetal ConA. (Esquema 5.9)



Esquema 5.9 Representación de la interacción entre ConA y los gliconogeles.

La interacción de esta lectina con los gliconogeles preparados se ha estudiado mediante ensayos de agregación por UV²¹¹ y DLS²¹².

²¹¹ Vico, V.; Voskuhl, J.; Ravoo, B. J. *Langmuir* **2011**, *27*, 1391.

²¹² Wang, X.; Ramström, O.; Yan, M. *Analyst* **2011**, *136*, 4174.



5.3.7.1 Ensayos de agregación usando espectrometría UV-visible

Mediante espectrofotometría UV-visible es posible determinar la concentración de un compuesto en disolución. Esta técnica se basa en la capacidad de algunas moléculas para absorber las radiaciones electromagnéticas. La cantidad de luz absorbida depende, de forma lineal, de la concentración de las moléculas en disolución, según la ley de Beer-Lambert. Por tanto, para calcular la concentración de un determinado analito, se selecciona la longitud de onda de la luz que pasa por una disolución y se mide la cantidad de luz absorbida por la misma. En este caso, se va a utilizar para determinar la aparición de agregados tras la adición de los gliconanogeles sobre ConA.

En primer lugar, para el estudio de la capacidad de interacción de los gliconanogeles con ConA, se adquirió un espectro de absorción completo, determinando la longitud de onda a la que absorbe el agregado formado entre la lectina y el ligando. En este caso, se observó que la longitud de onda a la que absorbía este complejo era 340 nm, en lugar de 280 nm, longitud de onda a la que absorbe la lectina sola.

De forma genérica, el experimento consistió en realizar adiciones sucesivas de 5 µg de cada uno de los nanogeles sobre una disolución de ConA de concentración conocida (0.45 mg/mL). El registro del valor de absorbancia y las adiciones se realizaron separadas cada una de ellas en intervalos de 5 minutos.

A medida que los nanogeles interactuaban con la proteína, el valor de absorbancia era mayor, ya que la turbidez de la disolución aumentaba debido a la formación de agregados. (Figura 5.19) A mayores concentraciones de nanogel, se llegaba a alcanzar el máximo de saturación. En este punto, se observó un valor constante de absorbancia que no variaba, aunque se realizaran más adiciones de gliconanogel. Esta tendencia se observó para los nanogeles **122** y **123** decorados con el dendrón de 3 y 9 manosas, así como con el nanogel de Man₉ **124**. En el caso del nanogel de dendrón de nueve manosas **123**, tras alcanzar el punto de saturación, el valor de la absorbancia disminuyó, ya que se observó la formación de precipitados en el fondo de la cubeta. En el caso del nanogel del epítipo Man₉ **124**, el valor de absorbancia máxima se alcanzó aproximadamente a la misma concentración de nanogel que se alcanzaba con el nanogel de dendrón de 9 manosas **123**, siendo ligeramente menor que el valor de absorbancia máximo alcanzado para éste. Además, se observó que era necesario añadir mayor cantidad de nanogel de dendrón de 3 manosas **122** para alcanzar el valor máximo de absorbancia, es decir, para que la



Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A

turbidez de la muestra aumentase. Por otro lado, no se observó un incremento en el valor de absorbancia, ni turbidez, con el nanogel de manosa **120** y con el nanogel de galactosa **121**. Esto no quiere decir que no haya interacción, más bien, implica que se necesitaría añadir mayor cantidad de nanogel para que se formasen agregados.

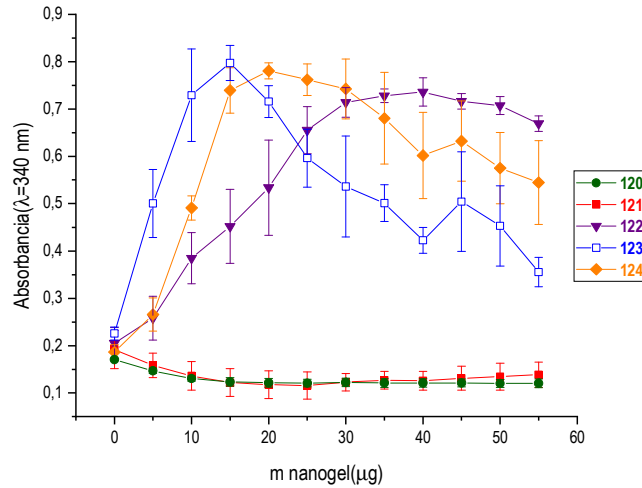


Figura 5.19 Representación gráfica de la variación de la absorbancia de las disoluciones ($\lambda=340$ nm) frente a la masa añadida de cada uno de los nanogeles.

Para corroborar si hay un efecto multivalente, en lugar de representar la absorbancia frente a la cantidad de cada nanogel añadida, se puede calcular la cantidad de manosa que hay en cada uno de los nanogeles y relacionarla con el aumento de la absorbancia. A partir de la masa de nanogel añadida se pudo calcular la masa de manosa que contiene cada nanogel teniendo en cuenta en primer lugar el porcentaje de ligando que había en cada nanogel obtenido mediante el método del ácido sulfúrico-UV. Además, se debe relacionar la masa de manosa en cada uno de los ligandos, con la masa de éstos.



Tabla 5.4 Cantidad de manosa en los nanogel **120-124** (Ligando: **22, 113, 115, 71 y 44**). (*galactosa)

Nanogel	Ligando (%)	$\frac{m_{manosa}}{m_{ligando}}$ (%)	$\mu\text{g manosa (en } 5\mu\text{gNG)}$
120	3.7%	100%	0.18
121	4.0%	100%*	0.20*
122	11.4%	45.1%	0.26
123	27.4%	42.8%	0.59
124	14.7%	100%	0.74

A continuación, representando la absorbancia medida tras cada adición frente a la masa de manosa añadida al adicionar una determinada cantidad de NG, se obtuvo la gráfica recogida en la figura 5.20.

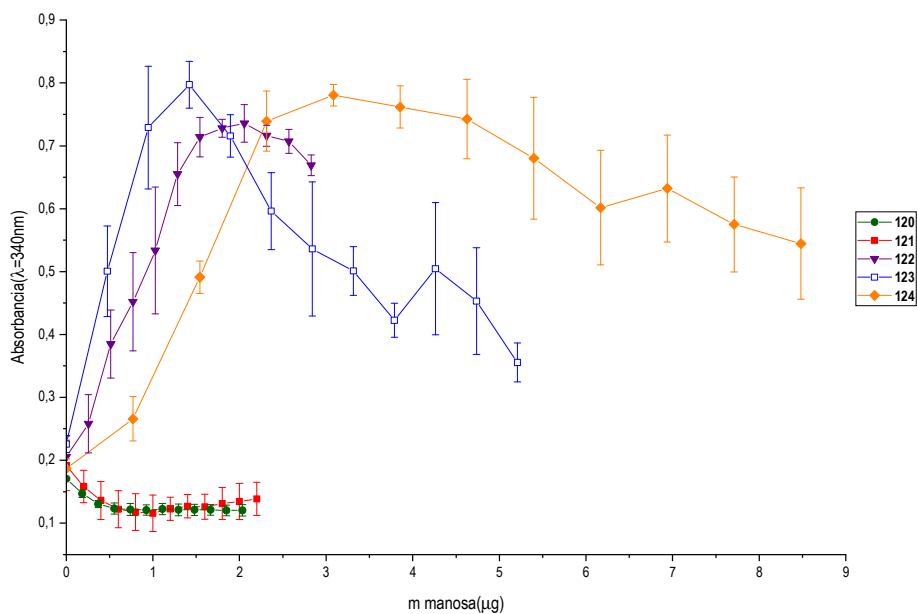


Figura 5.20 Representación gráfica de la variación de la absorbancia de las disoluciones ($\lambda=340$ nm) frente a la masa añadida de manosa/nanogel.



Preparación de gliconanogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A

En esta gráfica, se observa un efecto multivalente, ya que tras añadir la misma cantidad de manosa, la turbidez no era la misma. En el caso del del nanogel de manosa **120**, no se observó turbidez en la disolución ya que la concentración de manosa en el nanogel es inferior, se debería añadir una cantidad alta de nanogel para que hubiese interacción con la lectina. Sin embargo, con los gliconanogeles funcionalizados con dendrones con diferente valencia se alcanzó mayor turbidez. En concreto, la turbidez era superior con el nanogel del glicodendrón de 9 manosas **123** a los nanogeles **122 y 124**.

Por último, se comprobó que el proceso de interacción entre los nanogeles y la lectina era reversible. Tras añadir una gran cantidad de manosa monovalente sobre el precipitado generado tras la formación del complejo entre la lectina y el nanogel del dendrón de 9 manosas **123**, se observó la disolución completa del precipitado.

5.3.7.2 Medida del tamaño de los agregados formados mediante DLS

La técnica de DLS se emplea para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución, tal y como se ha descrito en el apartado 5.3.5. Cuando la luz láser alcanza las partículas que hay en una suspensión, ésta es dispersada en todas las direcciones posibles. Como consecuencia del movimiento *browniano* de las partículas, las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, provocando cambios en la intensidad de dispersión de la luz. En concreto, las partículas pequeñas se mueven rápidamente y la variación de la intensidad de dispersión es mayor. Sin embargo, las partículas grandes provocan variaciones menores de intensidad. A partir de las fluctuaciones que se producen en la intensidad, se puede calcular el diámetro hidrodinámico de las partículas.

En los últimos años, la dispersión de la luz dinámica se ha convertido en un método eficaz para evaluar las interacciones macromoleculares y para detectar la formación de agregados en disolución. Entre las ventajas que esta técnica ofrece, cabe destacar la alta sensibilidad, la facilidad de preparación de la muestra y la rapidez a la hora de realizar las medidas, ya que en pocos minutos se obtienen los resultados.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, los gliconanogeles funcionalizados con unidades de manosa, estructuras dendríticas de manosa o el oligosacárido Man₉, al interactuar con la lectina ConA, forman agregados. Mediante DLS, se ha llevado a cabo un estudio de la



interacción entre los gliconogeles y la ConA, midiendo el diámetro hidrodinámico de los agregados. Al adicionar una determinada cantidad de nanogel sobre una disolución de ConA (0.5 mg/mL), se espera que se produzca un aumento del tamaño del agregado formado.

Previamente, antes de estudiar la formación de agregados con cada uno de los gliconogeles, se determinó que el diámetro hidrodinámico de la lectina, que se encuentra como tetrámero al pH del experimento, era 8.6 nm (Figura 5.21a). A continuación, se adicionaron cada uno de los gliconogeles, observándose cambios inmediatos en el tamaño. De hecho, para algunos de ellos, este cambio fue observable al añadir la primera porción de 10 µg nanogel.

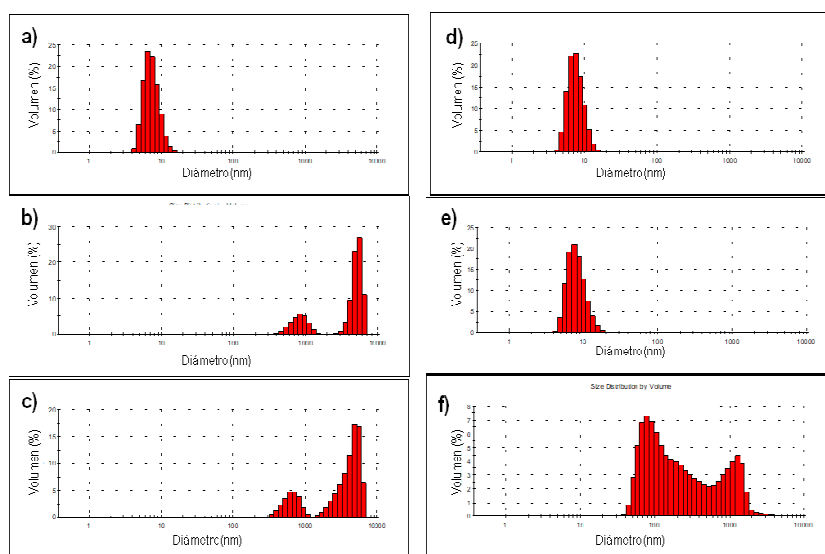


Figura 5.21 Diámetro hidrodinámico (nm): a) ConA, b) ConA+10 µg **123**, c) ConA+10 µg **122**, d) ConA+10 µg **121**, e) ConA+10 µg **120** y f) ConA+10 µg **124**.

Además, al contrario de lo que sucedía con el ensayo de agregación mediante espectrometría de UV-visible, la medida del tamaño de los agregados por DLS es más sensible, ya que se precisa menor cantidad de nanogel para ver cambios significativos en el tamaño de los agregados.



Preparación de gliconogeles. Determinación de su afinidad por Concalavalina A

En la figura 5.21 c y b se observa la formación de agregados tras la adición de 10 μg de los nanogeles del dendrón de 3 manosas **122** y de 9 manosas **123**. Aparecen dos distribuciones a mayor tamaño que se corresponden con los agregados formados. A esa concentración no se aprecia que haya ConA libre sin interactuar con estos nanogeles. Del mismo modo, cuando se añadió el nanogel de Man₉ **124**, se produjo la aparición de una nueva distribución a mayor tamaño, y no se observa ConA sin interactuar. (Figura 5.21f)

Añadiendo 10 μg del gliconogel de manosa **120** (Figura 5.21e), no fue posible observar un incremento en el tamaño de los agregados o la aparición de una nueva distribución. Sin embargo, esto no significa que este nanogel de manosa **120** no pueda ser capaz de formar agregados con ConA a concentraciones mucho mayores. Por otro lado, es de esperar que no se formen agregados al añadir el nanogel de galactosa **121** sobre la disolución de ConA (Figura 5.21d), ya que esta lectina no es capaz de reconocer a este carbohidrato. Para confirmar estas premisas, se realizó el mismo experimento, pero añadiendo mayor cantidad (900 μg) de los nanogeles de manosa **120** y de galactosa **121**, es decir, una cantidad 90 veces superior a la cantidad necesaria para observar formación de agregados con el resto de NGs. De esta manera, se pudo comprobar que los nanogeles de manosa **120** son capaces de interactuar débilmente con la lectina y que, además, estas interacciones son selectivas, ya que nunca se llegan a observar para los nanogeles control de galactosa **121**. (Figura 5.22)

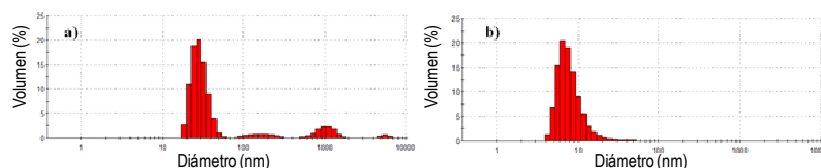


Figura 5.22 Diámetro hidrodinámico (nm): a) ConA+900 μg de **120** y b) ConA+900 μg de **121**.

Por último, se comprobó que la interacción que se establece entre ConA y los gliconogeles es reversible. Para ello, se añadió una disolución saturada de manosa sobre el agregado formado entre el dendrón de 9 manosas **123** y la ConA. En estas condiciones se produjo la disolución total del precipitado, los agregados se disgregaron en presencia de α -D-manosa y únicamente se detectó el pico correspondiente a la lectina, tal y como puede observarse en la distribución por DLS. (Figura 5.23)



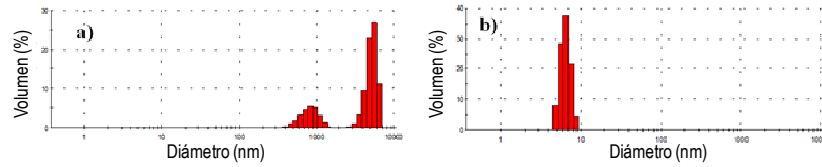


Figura 5.23 Diámetro hidrodinámico (nm): a) ConA+10 µg de **123** y b) ConA+10 µg de **123**+α-D-Man.

A partir de estos resultados preliminares, se demuestra que los glicanogeles preparados mediante polimerización de radicales libres en miniemulsión inversa son plataformas adecuadas para la interacción multivalente con lectinas. Esto abre las puertas para llevar a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* con otros receptores celulares. Además, la metodología seguida para preparar estos sistemas permite la presentación no sólo de carbohidratos, si no de cualquier tipo de biomoléculas para otros fines terapéuticos.



CAPÍTULO 6

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS GLICONANOGELES PARA INTERNALIZAR EN CÉLULAS TUMORALES

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

6.1 INTRODUCCIÓN

6.1.1 La nanomedicina en el transporte y liberación de fármacos

El objetivo principal de la nanomedicina es el desarrollo de herramientas de tamaño nanométrico para diagnosticar y tratar enfermedades.²¹³ Entre otras aplicaciones, la nanomedicina aborda lo que se conoce como *drug delivery* o administración de fármacos.²¹⁴ La administración selectiva de fármacos consiste en el desarrollo de “nanoterapias”, dirigidas específicamente a los tejidos y órganos enfermos, evitando así dañar a las células sanas y disminuyendo los efectos secundarios.

Durante más de cincuenta años, se han desarrollado sistemas capaces de transportar intracelularmente fármacos, especialmente para el tratamiento de tumores.²¹⁵ A pesar de las ventajas que ofrecen los nanosistemas, hoy en día existen sólo unos pocos ejemplos de nanotransportadores de fármacos aprobados por la FDA para uso humano.²¹⁶ En 1964, se emplearon por primera vez los liposomas como transportadores de proteínas y fármacos en el tratamiento de diversas enfermedades.²¹⁷ En 1995, se aprobó clínicamente el liposoma conjugado con DOX para el tratamiento del cáncer.²¹⁸ La encapsulación de fármacos en este tipo de sistemas mejora la farmacocinética y la biodistribución; sin embargo, no siempre provoca una mejora sustancial en la supervivencia promedio de los agentes terapéuticos. Muchos otros ejemplos de liposomas han sido descritos; sin embargo, estos sistemas nanométricos no han alcanzado el impacto que se esperaba, ya que algunos presentaban bajos tiempos de vida útil y problemas de estabilidad.²¹⁹ Las nanopartículas de albumina conjugadas con paclitaxel (nab-paclitaxel, Abraxane) comercializadas, permiten la formulación de fármacos hidrofóbicos, evitando el uso de excipientes tóxicos, aumentando además la tolerancia a altas

²¹³ Duncan, R.; Gaspar, R. *Mol Pharm.* **2011**, *8*, 2101.

²¹⁴ a) Farokhzad, O. C.; Langer, R. *ACS Nano* **2009**, *3*, 16. b) Shi, J.; Votruba, A. R.; Farokhzad, O. C.; Langer, R. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3223.

²¹⁵ Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751.

²¹⁶ a) Shi, J.; Kantoff, P. W.; Wooster, R.; Farokhzad, O. C. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 20. b) Flühhanna, B.; Ntai, I.; Borchard, G.; Simoens, S.; Mühlebach, S. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *128*, 73.

²¹⁷ Bangham, A. D.; Horne, R. W. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 660.

²¹⁸ Barenholz, Y. *J. Control. Release* **2012**, *160*, 117.

²¹⁹ Yadav, D.; Sandeep, K.; Pandey, D.; Dutta, R. K. *J. Biotechnol. Biomater.* **2017**, *7*, 276.



Capítulo 6

concentraciones del fármaco y la velocidad de administración;²²⁰ sin embargo, no modificaba la farmacocinética ni la biodistribución del paclitaxel. Otros muchos sistemas más efectivos y seguros, principalmente basados en polímeros, se han desarrollado para la administración de fármacos con diversos fines terapéuticos.²²¹ Algunos de estos ejemplos son las micelas poliméricas Genexol-PM²²² y NK105²²³ o las nanopartículas poliméricas CRLX101²²⁴, BIND-014²²⁵ y AZD-2811Accurin,²²⁶ cuyos resultados clínicos no han sido del todo satisfactorios.

Algunos nanomateriales inorgánicos, como las nanoesferas de oro,²²⁷ nanopartículas de óxido de hierro,²²⁸ nanopartículas de óxido de hafnio,²²⁹ están siendo evaluados en pacientes con cáncer. Además, algunas nanopartículas han sido empleadas para el transporte de oligonucleótidos ARN^{230, 231} y ADN.²³²

En general, estos sistemas están diseñados para albergar un gran número de agentes terapéuticos en su interior. La superficie de estos sistemas puede funcionalizarse con diferentes

²²⁰ Gradishar, W. J.; Tjulandin, S.; Davidson, N.; Shaw, H.; Desai, N.; Bhar, P.; Hawkins, M.; O'Shaughnessy, J. J. *Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 7794.

²²¹ a) Duncan, R.; Vicent, M. J. *Adv Drug Deliv Rev.* **2013**, *65*, 60. b) Salvioni, L.; Rizzuto, M. A.; Bertolini, J. A.; Pandolfi, L.; Colombo, M.; Prosperi, D. *Cancers* **2019**, *11*, 1985.

²²² Ahn, H. K.; Jung, M.; Sym, S. J.; Shin, D. B.; Kang, S. M.; Kyung, S. Y.; Park, J.-W.; Jeong, S. H.; Cho, E. K. *Cancer Chemoter. Pharmacol.* **2014**, *74*, 277.

²²³ Kato, K.; Chin, K.; Yoshikawa, T.; Yamaguchi, K.; Tsuji, Y.; Esaki, T.; Sakai, K.; Kimura, M.; Hamaguchi, T.; Shimada, Y.; Matsumura, Y.; Ikeda, R. *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 1621.

²²⁴ Clark, A. J.; Wiley, D. T.; Zuckerman, J. E.; Webster, P.; Chao, J.; Lin, J.; Yen, Y.; Davis, M. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 3850.

²²⁵ Hrkach, J.; Von Hoff, D.; Ali, M. M.; Andrianova, E.; Auer, J.; Campbell, T.; De Witt, D.; Figa, M.; Figueiredo, M.; Horhota, A.; Low, S.; McDonnell, K.; Peeke, E.; Retnarajan, B.; Sabnis, A.; Schnipper, E.; Song, J. J.; Song, Y. H.; Summa, J.; Tompsett, D.; Troiano, G.; Van Geen Hoven, T.; Wright, J.; LoRusso, P.; Kantoff, P. W.; Bander, N. H.; Sweeney, C.; Farokhzad, O. C.; Langer, R.; Zale, S. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 128ra39.

²²⁶ Ashton, S.; Song, Y. H.; Nolan, J.; Cadogan, E.; Murray, J.; Odedra, R.; Foster, J.; Hall, P. A.; Low, S.; Taylor, P.; Ellston, R.; Polanska, U. M.; Wilson, J.; Howes, C.; Smith, A.; Goodwin, R. J. A.; Swales, J. G.; Strittmatter, N.; Takáts, Z.; Nilsson, A.; Andren, P.; Trueman, D.; Walker, M.; Reimer, C. L.; Troiano, G.; Parsons, D.; De Witt, D.; Ashford, M.; Hrkach, J.; Zale, S.; Jewsbury, P. J.; Barry, S. T. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 325ra17.

²²⁷ Hirsch, L. R.; Stafford, R. J.; Bankson, J. A.; Sershen, S. R.; Rivera, B.; Price, R. E.; Hazle, J. D.; Halas, N. J.; West, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13549.

²²⁸ Maier-Hauff, K.; Ulrich, F.; Nestler, D.; Niehoff, H.; Wust, P.; Thiesen, B.; Orawa, H.; Budach, V.; Jordan, A. J. *Neurooncol.* **2011**, *103*, 317.

²²⁹ Maggiorella, L.; Barouch, G.; Devaux, C.; Pottier, A.; Deutsch, E.; Bourhis, J.; Borghi, E.; Levy, L. *Future Oncol.* **2012**, *8*, 1167.

²³⁰ Davis, M. E.; Zuckerman, J. E.; Choi, C. H.; Seligson, D.; Tolcher, A.; Alabi, C. A.; Yen, Y.; Heidel, J. D.; Ribas, A. *Nature* **2010**, *464*, 1067.

²³¹ Islam, M. A.; Reesor, E. K.; Xu, Y.; Zope, H. R.; Zetter, B. R.; Shi, J. *Biomater. Sci.* **2015**, *3*, 1519.

²³² Tolcher, A. W.; Rodriguez, W. V.; Rasco, D. W.; Patnaik, A.; Papadopoulos, K. P.; Amaya, A.; Moore, T. D.; Gaylor, S. K.; Bisgaier, C. L.; Souch, M. P.; Woollicroft, M. J.; Messmann, R. A. *Cancer Chemoter. Pharmacol.* **2014**, *73*, 363.



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

ligandos para que puedan ser reconocidos por receptores biológicos específicos o con cadenas poliméricas de diferente longitud para evitar que sean eliminados por el RE. (Figura 6.1) La efectividad de estos sistemas está influenciada por su composición química y sus características estructurales, como son las propiedades de su superficie (carga y relación hidrofobia/hidrofilia). Además, sus características físicas, como el tamaño, forma y rigidez, son parámetros importantes que se deben tener en cuenta a la hora de diseñar estos sistemas, ya que todos ellos determinan el tiempo de vida media de circulación de los nanosistemas en la sangre y su biodistribución.²³³

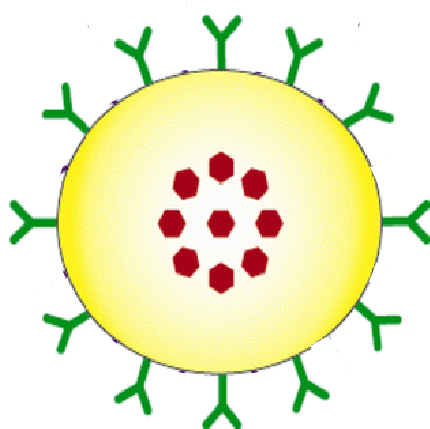


Figura 6.1 Ejemplo representativo de un nanotransportador. Se muestran los agentes terapéuticos en rojo, los ligandos que decoran la superficie en verde.

El transporte de agentes terapéuticos presenta numerosas ventajas. En concreto, el transporte de fármacos poco solubles en medios acuosos es muy interesante ya que facilita su absorción y aumenta su biodisponibilidad. Por otra parte, este transporte facilita la transcitosis o el transporte transcelular de los fármacos a través de las barreras epiteliales y endoteliales, aumenta la estabilidad del fármaco e impide su degradación. Además, evita la liberación del fármaco durante el transporte, permitiendo su liberación únicamente en el sitio de acción, y

²³³ Gratton, S. E.; Ropp, P. A.; Pohlhaus, P. D.; Luft, J. C.; Madden, V. J.; Napier, M. E.; De Simone, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11613.



Capítulo 6

mejora la internalización y la liberación intracelular. Todo ello conlleva una mejora sustancial en el tiempo de vida media del fármaco que se traduce en una mejora en la actividad terapéutica del mismo, reduciendo al mismo tiempo los efectos colaterales de toxicidad, así como la frecuencia de administración.

Normalmente, las partículas tienden a atravesar los poros (200-800 nm) que presenta la vasculatura anormal, típica de los tumores sólidos y tejidos inflamados caracterizada por su elevada permeabilidad.²³⁴ (Figura 6.2a) A continuación, se acumulan preferentemente debido al efecto EPR (del inglés *Enhanced Permeability and Retention*).²³⁵ Este efecto se basa en el aumento de la permeabilidad y la acumulación pasiva de moléculas (*passive targeting*) cuyo tamaño es suficientemente pequeño y se encuentra entre 20 y 200 nm.²³⁶ El tamaño de los nanosistemas no puede ser inferior de 6 nm o superior a 500 nm para evitar su filtración por los riñones o a través del RE, respectivamente.

Una vez que los sistemas atraviesan el tejido, la presencia de ligandos en la superficie del nanosistema permite la dirección de los sistemas o *active targeting* hacia los receptores que están presentes en el sitio de acción.²³⁷ (Figura 6.2b) Este fenómeno mejora la retención específica y la internalización celular de los nanosistemas mediante endocitosis mediada por un receptor. Para ello, se deben seleccionar aquellos ligandos con afinidad por los receptores sobreexpresados en la superficie de órganos, tejidos o células enfermos.²³⁸ De esta manera, se aumenta la concentración de los fármacos en el interior de las células y su eficacia terapéutica, ya que se facilita que alcancen el correspondiente sitio de acción intracelular.

²³⁴ a) Torchilin, V. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 131. b) Attia, M. F.; Anton, N.; Wallyn, J.; Omran, Z.; Vandamme, T. F. *J. Pharm. Pharmacol.* **2019**, *71*, 1185.

²³⁵ a) Matsumura, Y.; Maeda, H. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387. b) Maeda, H.; Sawa, T.; Konno, T. *J. Control. Release* **2001**, *74*, 47.

²³⁶ Kobayashi, H.; Watanabe, R.; Choyke, P. L. *Theranostics* **2013**, *4*, 81.

²³⁷ Maso, K.; Grigoletto, A.; Vicent, M. J.; Pasut, G. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2019**, *346*, 1.

²³⁸ Bartlett, D. W.; Hildebrandt, I. J.; Weber, W. A.; Davis, M. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15549.



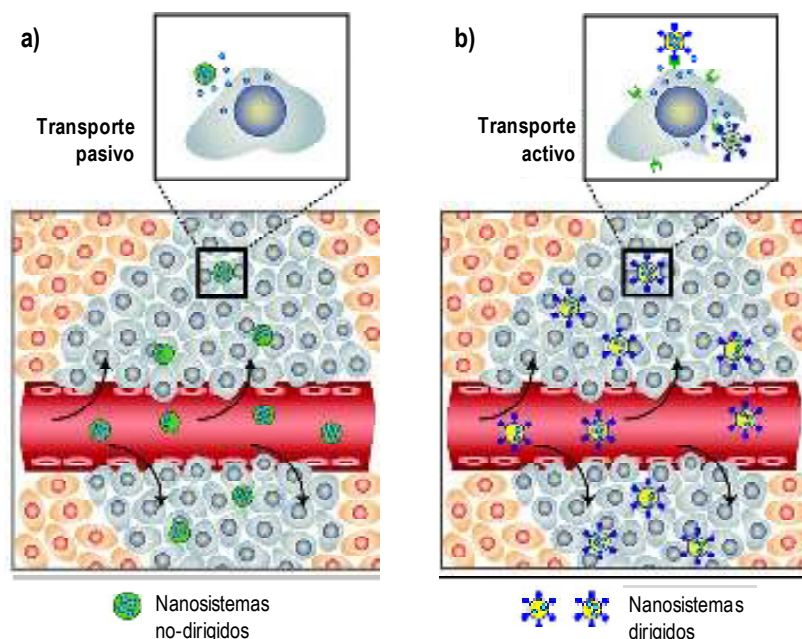


Figura 6.2 Mecanismos de transporte de fármacos: a) pasivo y b) activo.

Entre los ligandos más representativos utilizados para la administración direccional de fármacos, se encuentran anticuerpos, proteínas, carbohidratos y vitaminas.²³⁹ Entre las moléculas que se encuentran sobreexpresadas en los órganos dañados o en la superficie de las células malignas destacan proteínas, receptores de carbohidratos (lectinas) o receptores de lipoproteínas.²⁴⁰ La interacción entre los ligandos presentes en los nanotransportadores con los receptores se ve mejorada por la presentación multivalente de los ligandos en el sistema.

A la hora de seleccionar los ligandos direccionales, se deben tener en cuenta una serie de variables, como son su estabilidad, biocompatibilidad, especificidad celular, afinidad, facilidad de preparación y pureza.²⁴¹ Se debe también considerar la densidad superficial de ligandos y su disposición en el nanotransportador.

²³⁹ Schäfer-Korting, M. *Drug Delivery. Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin **2010**.

²⁴⁰ Yu, B.; Tai, H. C.; Xue, W.; Lee, L. J.; Lee, R. J. *Mol. Membr. Biol.* **2010**, 27, 286.

²⁴¹ Allen, T. M. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 750.



Capítulo 6

La síntesis de nanogeles funcionalizados con moléculas en un único paso para el transporte dirigido puede suponer una estrategia sencilla y escalable. Una de las ventajas que ofrecen los nanogeles frente a otros tipos de nanosistemas poliméricos como las micelas, es su mayor estabilidad en condiciones fisiológicas debido al entrecruzamiento covalente entre sus componentes. Por otra parte, los nanogeles, al igual que muchos sistemas de transporte de fármacos, proporcionan una mayor estabilidad del agente terapéutico, protegido de la degradación enzimática por la red polimérica.²⁴² Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de utilizar estos sistemas en el transporte de fármacos es su tamaño.

6.1.1.1 Liberación de fármacos presentes en nanogeles

Como ya se mencionó anteriormente, los nanogeles pueden responder de diferentes maneras frente a variables externas como cambios en la temperatura, fuerza iónica, pH, campos eléctricos o magnéticos o luz.^{189, 193, 200} El grado de respuesta de los nanogeles puede estar controlado por la intensidad del estímulo aplicado. Los agentes terapéuticos que transportan se pueden liberar a través de difusión simple o degradación del nanogel. (Figura 6.3) Algunas características del nanogel, tales como el grado de entrecruzamiento, la masa molecular del polímero, la velocidad de degradación del gel y los modos de interacción del fármaco con las cadenas poliméricas (interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, etc.), controlan el perfil de liberación del fármaco.

²⁴² Vinogradov, S. V.; Kohli, E.; Zeman, A. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 920.



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

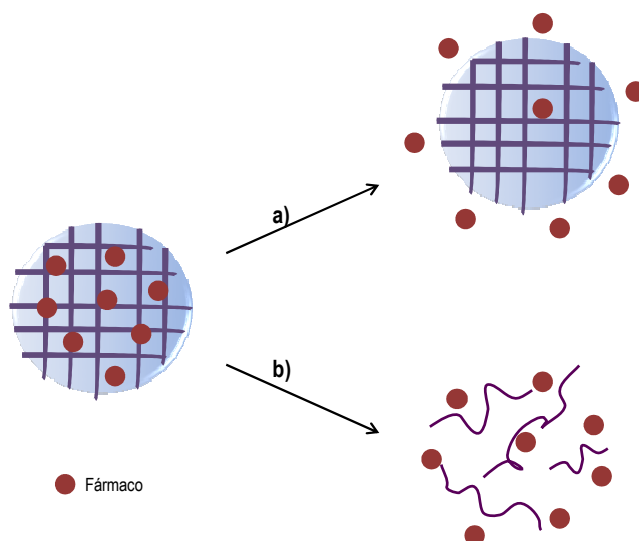


Figura 6.3 Liberación de fármacos mediante: a) difusión y b) degradación del nanogel.

Los nanogeles sensibles a cambios de pH son sistemas muy interesantes desde el punto de vista biomédico. Se sabe que el pH en los tejidos o medios biológicos no es uniforme. En la sangre el pH es neutro, mientras que en el estómago y en varios tejidos el pH es ácido. A la vez, en zonas con patologías, como tejidos isquémicos, heridas, sitios de inflamación o tumores, el pH es ligeramente más bajo.²⁴³ El pH en tejidos normales es 7.4, mientras que el pH extracelular de muchos tumores se encuentra entre 5.8 y 7.2.²⁴⁴ Además, el pH de algunos compartimentos intracelulares, tales como los endosomas y los lisosomas, varía entre 5.0 y 5.5. Estas diferencias de pH pueden usarse para inducir transformaciones en el nanotransportador. En este contexto, los nanogeles capaces de responder al pH se diseñan de tal manera que su grado de entrecruzamiento o hinchamiento se vea alterado cuando se expongan a un valor crítico de pH, permitiendo la liberación del fármaco en el tejido específico.²⁴⁵ Se trata de conseguir que se

²⁴³ Vaupel, P.; Kallinowski, F.; Okunieff, P. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 6449.

²⁴⁴ Ojugo, A. S. E.; McSheehy, P. M. J.; McIntyre, D. J. O.; McCoy, C.; Stubbs, M.; Leach, M. O.; Judson, I. R.; Griffiths, J. R. *NMR Biomed.* **1999**, *12*, 495.

²⁴⁵ a) Wu, W.; Aiello, M.; Zhou, T.; Berliner, A.; Banerjee, P.; Zhou, S. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8371. b) Oh, N. M.; Oh, K. T.; Baik, H. J.; Lee, B. R.; Lee, H.; Youn, Y. S.; Lee, E. S. *Colloid Surf. B* **2010**, *78*, 120. c) Pujana, M. A.; Pérez-Álvarez, L.; Iturbe, L. C. C.; Katime, I. *Eur. Polym. J.* **2014**, *61*, 215. d) Jaiswal, M. K.; Pradhan, A.; Banerjee,



Capítulo 6

produzca un cambio químico o conformacional específico al pH del tejido donde se quiere liberar el fármaco. Incluso puede producirse la desintegración del propio nanogel si éste está formado por polímeros unidos por enlaces sensibles al pH. En función de las propiedades del nanogel, el fármaco se puede liberar en el tejido extracelular²⁴⁶ o intracelular, como por ejemplo en endosomas o lisosomas, y provocar la internalización celular.²⁴⁷

Los nanogeles que contienen unidades o redes hidrofóbicas o hidrofílicas dependientes del pH, se consideran buenos sistemas para el transporte y liberación de fármacos. Este tipo de nanogeles presentan grupos funcionales ionizables que pueden absorber fármacos cargados positivamente a pH básico a través de atracciones electrostáticas y que pueden ser liberados a pH ácido. Así mismo, los nanogeles pueden absorber biomoléculas con baja polaridad a pH ácido si las cadenas son relativamente hidrofóbicas y liberarlas posteriormente a pH neutro cuando los nanogeles se hacen más hidrofílicos.

En la estructura de los nanogeles sensibles a la temperatura existen moléculas de agua que interactúan con los grupos hidrófilos del polímero que ayudan a mantener hinchada la estructura original del nanogel. Cuando la temperatura se aproxima al valor bajo crítico de la temperatura de disolución LCST (del inglés *low critical solution temperature*), el polímero se vuelve hidrofóbico, por lo que se elimina el agua, disminuyendo el tamaño del nanogel y liberándose el agente terapéutico. Uno de los polímeros termosensibles más empleado es la poli(*N*-isopropilacrilamida) NIPAM, ya que su LCST está sobre 32-34°C, una temperatura muy cercana a la temperatura corporal. Cuando se alcanza la LCST, ocurren cambios en su estructura y se vuelve globular, como consecuencia de la formación y rotura de enlaces de hidrógeno entre el polímero y las moléculas de agua.²⁴⁸

Además, los nanogeles pueden ser sensibles al ambiente redox, pueden permanecer inalterados en el medio extracelular, donde la concentración de agentes reductores es baja. Sin

R.; Bahadur, D. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 4082. e) Sousa-Herves, A.; Wedepohla, S.; Calderón, M. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5264. f) Asadi, H.; Khoee, S. *Int. J. Pharm.* **2016**, *511*, 424. g) Zeng, Z.; Yingqi, S.; Peng, Z.; Wei, J.; He, X. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 8032.

²⁴⁶ Na, K.; Lee, E. S.; Bae, Y. H. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1568.

²⁴⁷ a) Oishi, M.; Hayashi, H.; Iijima, M.; Nagasaki, Y. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 3720. b) Li, D.; van Nostrum, C. F.; Mastrobattista, E.; Vermonden, T.; Hennink, W. E. *J. Control. Release*, **2017**, *259*, 16.

²⁴⁸ a) Cuggino, J. C.; Alvarez, I. C. I.; Strumia, M. C. *Soft Matter*. **2011**, *7*, 11259. b) Culver, H. R.; Sharma, I.; Wechsler, M. E.; Anslin, E. V.; Peppas, N. A. *Analyst* **2017**, *142*, 3183. c) Singh, A.; Vaishagya, K.; K. Verma, R.; Shukla, R. *AAPS PharmSciTech.* **2019**, *20*, 213.



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

embargo, si el nanogel está formado mediante enlaces disulfuro, éstos se pueden romper en el ambiente reductor intracelular.^{248e}

Los nanogeles fotosensibles cambian sus propiedades cuando sobre ellos se irradia con luz. En este sentido, se han descrito varios ejemplos en los que una fuente de luz en el infrarrojo cercano, que tiene la ventaja de ser mínimamente absorbida por la piel y los tejidos, es utilizada para provocar termoablación de tumores o bien un incremento en la temperatura y la posterior liberación del fármaco.²⁴⁹

Por otro lado, los nanogeles se pueden combinar con complejos metálicos capaces de responder a campos magnéticos.²⁵⁰

Las propiedades intrínsecas del fármaco también determinan la manera en la que éste se puede liberar de forma controlada. Algunas de las propiedades más importantes son la solubilidad, el peso molecular, el pKa, etc. A su vez, también influye de manera notable la forma en la que se ha conjugado el fármaco al nanotransportador. Existen principalmente dos métodos para incorporar agentes terapéuticos en los nanogeles, bien mediante enlaces químicos covalentes o mediante enlaces débiles (interacciones hidrófobas o electrostáticas). La conjugación covalente se puede llevar a cabo en los nanogeles ya formados o durante la síntesis de los mismos. Sin embargo, el atrapamiento físico de los fármacos es el método más utilizado comúnmente. La estrategia más conveniente para la incorporación de los fármacos se debe seleccionar teniendo en cuenta tanto las características del fármaco como las del transportador. Actualmente, se utilizan diversos métodos para la carga del fármaco, entre otros cabe señalar la diálisis, la nanoprecipitación, la eliminación de disolvente, la desolvatación o la disolución directa. La eficiencia de la encapsulación es diferente para cada nanosistema específico.

Ambos métodos permiten la encapsulación de diferentes tipos de fármacos en un mismo nanogel, sin la necesidad de realizar transformaciones químicas en el fármaco que puedan afectar a su actividad terapéutica. Sin embargo, la unión covalente genera una mayor estabilidad comparada con las técnicas de encapsulación. En este caso, el fármaco puede ser liberado antes de lo previsto si se encuentra unido a través de enlaces fácilmente hidrolizables por las enzimas, tales como esterasas. Los enlaces amida presentan ventajas derivadas de su estabilidad durante la circulación, pero son difíciles de romper, por lo que esto supone una limitación en la

²⁴⁹ Molina, M.; Wedepohla, S.; Calderón, M. *Nanoscale* **2016**, *8*, 5852.

²⁵⁰ Tabatabaei Rezaei, S. J.; Norouzi, K.; Hesami, A.; Malekzadeh, A. M.; Ramazani, A.; Amani, V.; Ahmadi, R. *Appl. Organomet. Chem.* **2018**, *32*, e4303.



Capítulo 6

liberación del fármaco. Otros enlaces, sensibles al medio ácido intracelular o de endosomas, pueden provocar la liberación del fármaco tras la internalización del nanogel en compartimentos celulares con pH ácidos. Los enlaces basados en carbamatos, ésteres,²⁵¹ acetales o hidrazonas²⁵² permiten la liberación del fármaco a pH ácido.

6.2 OBJETIVOS

La construcción de nanosistemas transportadores de fármacos es una estrategia muy empleada en los últimos años, especialmente para el transporte de fármacos antitumorales. Algunas propiedades de estos fármacos, como su baja solubilidad, estabilidad y permanencia en circulación sanguínea, así como su alta toxicidad, reducen su actividad terapéutica o provocan diferentes efectos secundarios no deseados. En este sentido, la nanotecnología ofrece la posibilidad de transportar y dirigir selectivamente estas moléculas a los puntos de acción, reduciendo sus efectos adversos. Es importante elegir adecuadamente los nanosistemas para alcanzar este fin, ya que de sus propiedades dependerá este proceso. Además, es importante seleccionar receptores adecuados en las células tumorales con el objetivo de dirigir estos vehículos específicamente hacia dichas dianas. Para alcanzar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Cribado de diferentes líneas celulares que sobreexpresen receptores de carbohidratos sencillos, como el receptor de manosa Endo180.
- Construcción de nanogeles modificados con ligandos específicos para que sean reconocidos por este receptor.
- Evaluación de la citotoxicidad de estos sistemas en las células objeto de estudio.
- Estudio del proceso de internalización de los nanogeles en las células tumorales y no tumorales.
- Aumento de la multivalencia de estos sistemas, introduciendo estructuras dendríticas para favorecer el proceso de internalización.

²⁵¹ Sousa-Herves, A.; Würfel, P.; Wegner, N.; Khandare, J.; Licha, K.; Haag, R.; Welker, P.; Calderón, M. *Nanoscale* **2015**, *7*, 3923.

²⁵² Ferber, S.; Tiram, G.; Sousa-Herves, A.; Eldar-Boock, A.; Krivitsky, A.; Scomparin, A.; Yeini, E.; Ofek, P.; Ben-Shushan, D.; Vossen, L. I.; Licha, K.; Grossman, R.; Ram, Z.; Henkin, J.; Ruppín, E.; Auslander, N.; Haag, R.; Calderón, M.; Satchi-Fainaro, R. *eLife*. **2017**, *6*, e25281.



- Conjugación de un fármaco antitumoral mediante enlaces sensibles al pH.

6.3 EXPOSICIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

6.3.1 Búsqueda de receptores de manosa sobreexpresados en líneas celulares de mama

El trabajo que se presenta en este capítulo ha sido desarrollado durante una estancia breve en el grupo *Polymer Therapeutics* que dirige la Doctora María Jesús Vicent, en el Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia.

Los trabajos desarrollados en esta colaboración están encaminados a evaluar el papel de los gliconogeles de manosa en la administración de fármacos antitumorales dirigida a células tumorales de cáncer de mama.

Para ello, se eligió el receptor Endo180 (CD280), receptor endocítico transmembrana de tipo I de 180 KDa que interacciona con el colágeno extra- e intracelular²⁵³. Junto con los receptores DEC-205 (CD205), fosfolipasa A₂ (PLA₂R) y MR (CD206)²⁵⁴ conforman la familia de los receptores de manosa en mamíferos. La selectividad por el ligando depende de la conformación del receptor.²⁵⁵ El receptor Endo180 interviene en diversas funciones que van desde la internalización de colágeno hasta la homeostasis y procesos inmunes basados en el reconocimiento de carbohidratos. Al igual que el MR, Endo180 es un receptor multivalente dependiente de Ca²⁺ capaz de interactuar con ligandos multivalentes.²⁵⁶

Endo180 no se encuentra regulado en tumores primarios y en metástasis óseas. La expresión de Endo180 se encuentra relacionada con el grado del tumor, la progresión de la enfermedad y el mal pronóstico en cáncer de mama,²⁵⁷ cáncer de cabeza y cuello,²⁵⁸ cáncer de próstata²⁵⁹ y en

²⁵³ Wienke, D.; MacFadyen, J. R.; Isacke, C. M. *Mol. Biol. Cell.* **2003**, *14*, 3592.

²⁵⁴ Weis, W.; Taylor, M. E.; Drickamer, K. *Immunol. Rev.* **1998**, *163*, 19.

²⁵⁵ Rivera-Calzada, A.; Robertson, D.; MacFadyen, J. R.; Boskovic, J.; Isacke, C. M., Llorca, O. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 807.

²⁵⁶ East, L.; Isacke, C. M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 364.

²⁵⁷ Wienke, D.; Davies, G. C.; Johnson, D. A.; Sturge, J.; Lambros, M. B.; Savage, K.; Elsheikh, S. E.; Green, A. R.; Ellis, I. O.; Robertson, D.; Reis-Filho, J. S.; Isacke, C. M. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10230.

²⁵⁸ Sulek, J.; Wagenaar-Miller, R. A.; Shireman, J.; Molinolo, A.; Madsen, D. H.; Engelholm, L. H.; Behrendt, N.; Bugge, T. H. *J. Histochem. Cytochem.* **2007**, *55*, 347.

²⁵⁹ Kogianni, G.; Walker, M. M.; Waxman, J.; Sturge, J. *Eur. J. Cancer* **2009**, *45*, 685.



Capítulo 6

glioblastoma multiforme.²⁶⁰ El receptor Endo180 sirve para el diagnóstico del cáncer de mama en fase metastásica, ya que estudios con humanos revelan que los niveles de este receptor son mayores en pacientes que se encuentran en esta fase frente a aquellos que se encuentran en fases tempranas de la enfermedad.²⁶¹

La línea celular MDA-MB-231, de origen embriogénico, expresa alto niveles de Endo180.^{253, 257} En contraste, las líneas celulares MCF7, T47D y MCF10A de morfología epiteloide con uniones intercelulares fuertes, no lo expresan.

Sin duda, los nanogel funcionalizados con ligandos que pueden ser reconocidos por el receptor Endo180 pueden constituir una excelente estrategia para el transporte activo de fármacos antitumorales hacia células tumorales que sobreexpresan este receptor.

En primer lugar, se evaluó la diferencia en los niveles de sobreexpresión del receptor de manosa Endo180 en células mamarias tumorales y no tumorales. Para ello, se eligieron las células mamarias tumorales 4T1, MDA-MB-231 y MCF7 y no tumorales MCF10A. Tras extraer las proteínas de cada una de las muestras de células, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel. Posteriormente, fueron transferidas a una membrana de PVDF e incubadas con el anticuerpo primario de Endo180 (sc-271148), capaz de unirse al fragmento peptídico que incluye los aminoácidos 1051-1350 del dominio extracelular de Endo180. A continuación, se incubó la membrana con un anticuerpo secundario marcado, capaz de reconocer el anticuerpo primario de ratón. Por último, se incubó la membrana con el sistema electroquimioluminiscente ECL, uno de los métodos más usados en Western-Blots. La luz emitida se capturó en una película fotográfica donde se pudo apreciar la diferencia en la expresión de Endo180 de las líneas celulares estudiadas. En la figura 6.4, se observa únicamente una mancha que coincide con la masa molecular del receptor Endo180 en la línea correspondiente con las células mamarias tumorales de tipo MDA-MB-231.

²⁶⁰ Huijbers, I. J.; Iravani, M.; Popov, S.; Robertson, D.; Al-Sarraj, S.; Jones, C.; Isacke, C. M. *PLoS One* **2010**, *5*, e9808.

²⁶¹ Palmieri, C.; Caley, M. P.; Purshouse, K.; Fonseca, A.-V.; Rodriguez-Teja, M.; Kogianni, G.; Woodley, L.; Odendaal, J.; Elliott, K.; Waxman, J.; Sturge, J. *Br. J. Cancer* **2013**, *108*, 163.



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

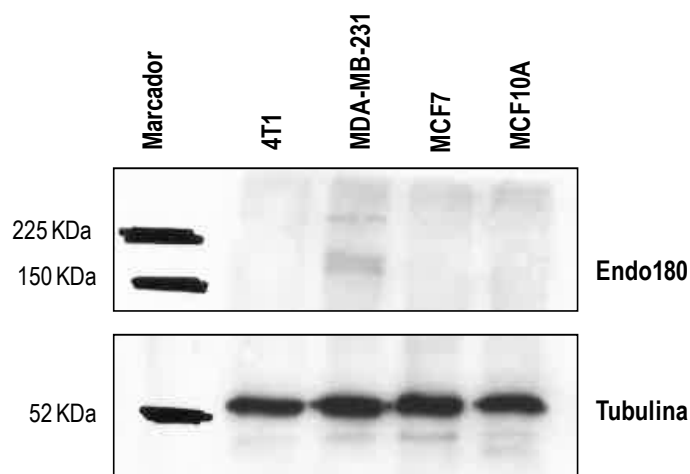


Figura 6.4 Análisis de Western Blot de la expresión de Endo180 en las células 4T1, MDA-MB-231, MCF7 y MCF10A.

Como control se utilizó tubulina, para confirmar que la cantidad de proteína cargada en el gel en cada línea era similar. Además, de esta manera se comprobó que la eficacia de la transferencia del gel a la membrana y la incubación de los anticuerpos en las diferentes líneas eran correctas. Para cargar la misma concentración de proteínas, previamente se midió esta concentración al extraer las proteínas de las muestras de células mediante el método Bradford. La determinación de proteínas por el método de Bradford consiste en la cuantificación de la unión del colorante Azul de Coomassie G-250 a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar BSA.²⁶² El colorante libre existe en cuatro formas iónicas. La forma azul más aniónica se une a proteínas y absorbe a 595 nm. (Figura 6.5) La concentración de proteínas puede ser evaluada determinando la cantidad de colorante en su forma iónica azul y midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm utilizando un espectrofotómetro. El colorante se une principalmente a residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina.

²⁶² Kruger N. *Methods Mol. Biol.* **1994**, 32, 9.



Capítulo 6

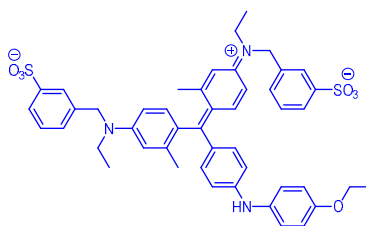


Figura 6.5 Estructura del colorante Azul de Coomassie G-250.

Representando la absorbancia frente a la concentración de proteínas, se construye la correspondiente recta de calibrado de la proteína estándar (BSA). Con la ecuación de la recta de calibrado obtenida para muestras de BSA, se pudo calcular la concentración de proteínas en una determinada muestra al medir su absorbancia a 595 nm. De esta manera se obtuvo la concentración de cada una de las muestras de proteínas a partir del valor de absorbancia. (Figura 6.6) Para llevar a cabo el análisis por Western-Blot, se tomó el volumen necesario para que la concentración de proteína a medir fuese la misma (1.33 mg/mL).

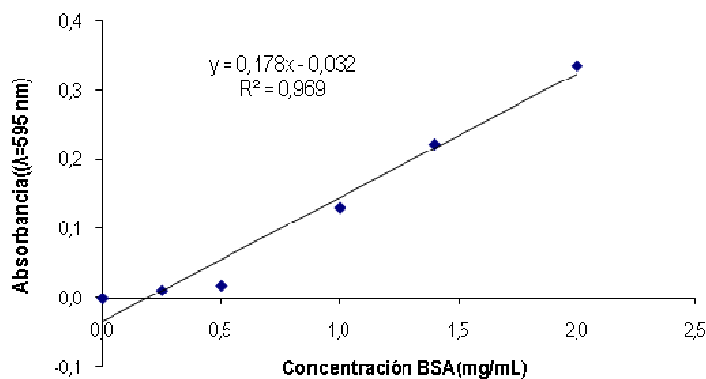


Figura 6.6 Recta de calibrado de BSA.

Teniendo en cuenta la relación de intensidad del receptor Endo180 frente a la intensidad de tubulina (Figura 6.4) en cada una de las líneas celulares, se pudo evaluar la expresión de este



receptor. El mayor valor de intensidad se obtuvo en el caso de las células MDA-MB-231, indicativo de una mayor expresión de este receptor en esta línea. (Figura 6.7)

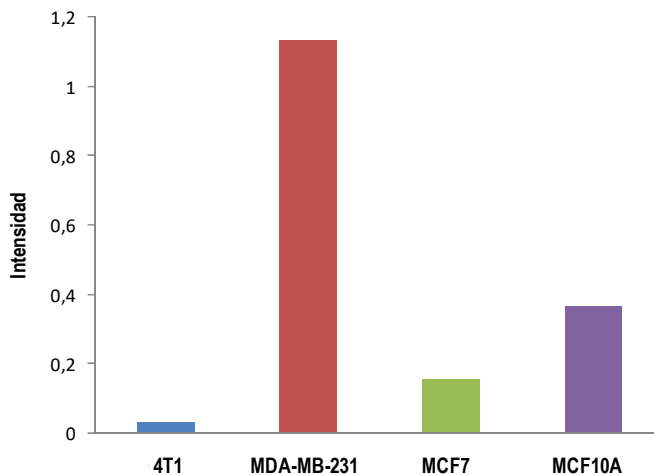


Figura 6.7 Expresión del receptor Endo180 en las líneas celulares 4T1, MDA-MB-231, MCF7 y MCF10A.

A partir de estos resultados, se planteó la posibilidad de dirigir selectivamente hacia las células mamarias tumorales MDA-MB-231 agentes terapéuticos, empleando para ello, sistemas funcionalizados con ligandos selectivos de Endo180 que poseen unidades de manosa. Tras el reconocimiento del sistema por este receptor, tendría lugar la internalización del sistema, lo que permitiría la liberación intracelular de los fármacos contenidos en el sistema. Para comprobar la selectividad de los sistemas de manosa por este tipo células tumorales, se utilizó como control células mamarias no tumorales MCF10A.

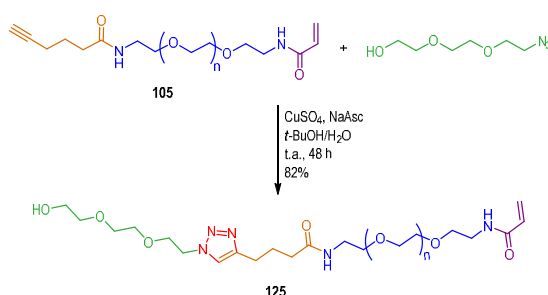
6.3.2 Construcción de gliconogeles capaces de interactuar con el receptor Endo180

Teniendo en cuenta las propiedades excelentes que presentan los nanogeles para el transporte y liberación de fármacos, se decidió usar los nanogeles de manosa para este fin.



Capítulo 6

Como control, teniendo en cuenta la complejidad de las células tumorales que presentan numerosos receptores en su superficie, se decidió construir nanogeles sin carbohidratos, empleando solamente unidades de etilenglicol como ligando. Antes de preparar los nanogeles, se llevó a cabo la funcionalización del polímero, tal y como se realizó con las unidades sacarídicas. Mediante CuAAC se unió la molécula 2-[2-(2-azidoeto)eto]etanol disponible comercialmente. De esta manera, se mantiene el triazol en la cadena polimérica, y la única diferencia con el polímero empleado para la preparación de los gliconanogeles de manosa es la ausencia de carbohidratos. (Esquema 6.1)



Esquema 6.1 Preparación del polímero control **125**.

Tras 48 h de reacción en presencia de CuSO₄ y NaAsc, el cobre presente en el medio de reacción se eliminó por adición de la resina QuadraSil[®]MP. A continuación, se purificó mediante cromatografía en columna por exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH. En el espectro de ¹H-RMN del polímero control **125** puede observarse la aparición de un singlete a 7.87 ppm que se corresponde con el protón del metino del triazol formado tras la reacción CuAAC entre el alquino del derivado **105** y la azida de la molécula 2-[2-(2-azidoeto)eto]etanol. (Figura 6.8) También aparece la señal correspondiente a los protones del metileno unido al átomo de nitrógeno del triazol (OCH₂CH₂Ntriazol) como multiplete a 4.60 ppm. Por otro lado, se observa un desplazamiento de la señal de los protones en α al grupo alquino, ahora triazol, desde 1.94 ppm hasta 2.75 ppm.



Evaluación de la capacidad de los glicanogeles para internalizar en células tumorales

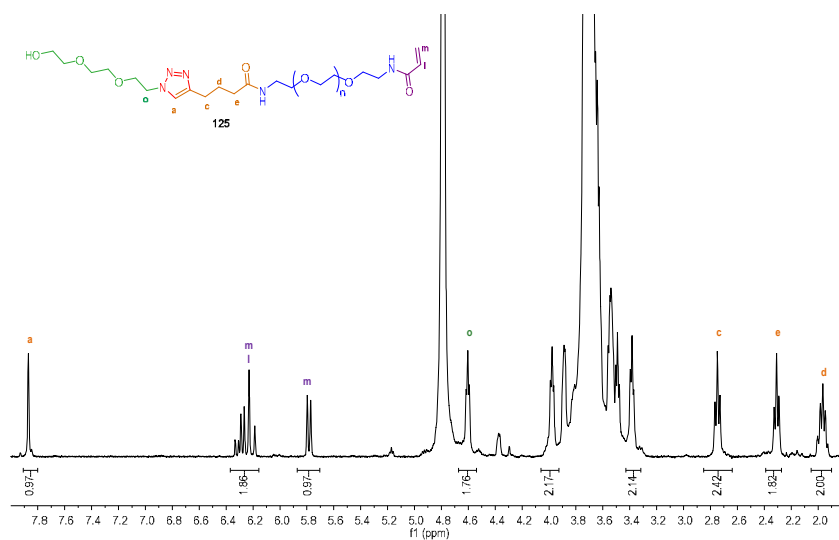


Figura 6.8 Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) del polímero **125**.

En el espectro de ^{13}C -RMN del derivado **125**, se observó la aparición de la señal de carbono del metino del triazol (126.4 ppm), la señal de los carbonos correspondiente a los metilenos unidos en α al triazol (o, 52.5 ppm y c, 26.7 ppm), así como la desaparición de la señal del carbono del metileno en α al tripe enlace (17.9 ppm). (Figura 6.9)



Capítulo 6

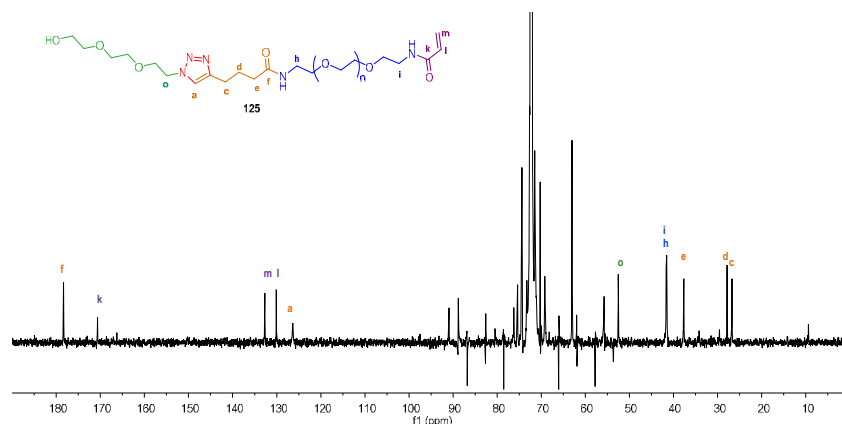
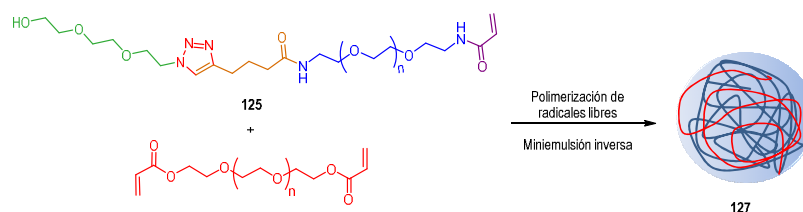


Figura 6.9 Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O , 298 K) del polímero **125**.

Con el objetivo de llevar a cabo diferentes estudios biológicos, se prepararon los diferentes nanogel a una escala mayor que la descrita anteriormente (10 veces mayor). En este caso, no fue necesario modificar las condiciones de preparación, simplemente se escalaron los tiempos y las cantidades de los reactivos y disolventes. Mediante polimerización de radicales libres en miniemulsión inversa se obtuvieron el nanogel funcionalizado con manosa **126** y el nanogel control **127**. (Esquema 6.2)



Esquema 6.2 Preparación del nanogel control **127**.

Las medidas de DLS demostraron que no había diferencias significativas en el tamaño de los nanogel sintetizados a mayor escala. (Figura 6.10) El tamaño del nanogel de manosa **126** era 130.1 ± 0.7 nm y el tamaño del nanogel control **127** era 117.2 ± 0.7 nm



Evaluación de la capacidad de los glicanogeles para internalizar en células tumorales

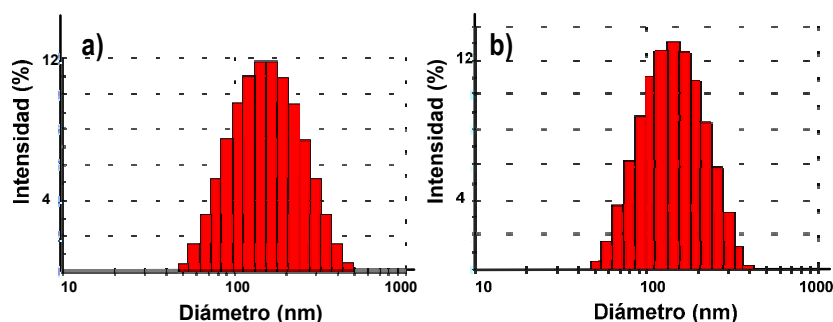


Figura 6.10 Histogramas de DLS de los nanogeles: a) 126 y b) 127.

6.3.3 Evaluación de la citotoxicidad de los glicanogeles

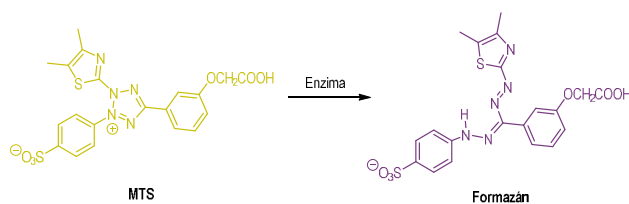
En primer lugar, se evaluó la concentración a la que estos sistemas son citotóxicos con células mamarias tumorales (MDA-MB-231) y no tumorales (MCF10A).

El método MTS es un método colorimétrico utilizado para medir la viabilidad celular, la proliferación celular y la citotoxicidad *in vitro*.²⁶³ Consiste en la reducción enzimática del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) en presencia de metosulfato de fenazina (PMS, del inglés *phenazine methosulfate*) a formazán, soluble en agua. (Esquema 6.3) Este proceso está catalizado por enzimas deshidrogenasas, como el fosfato del dinucleótido de nicotinamida-adenina (NADPH) presente en las células metabólicamente activas. Cuando se produce dicha reacción, se produce un cambio colorimétrico, pasando de amarillo a morado. El producto formazán se analiza espectroscópicamente a 490 nm. La cantidad de formazán generado es proporcional al número de células y al tiempo de incubación de las mismas.

²⁶³ Cory, A. H.; Owen, T. C.; Bartrop, J. A.; Cory, J. G. *Cancer Commun.* **1991**, 3, 207.



Capítulo 6



Esquema 6.3 Reducción enzimática de MTS.

El ensayo MTS se utilizó para evaluar el efecto de los nanogel de manosa y control en las células MDA-MB-231 y MCF10A. La supervivencia de las células se midió tras 72 h de tratamiento con disoluciones de los nanogel **126** y **127** a diferentes concentraciones, añadiendo una disolución MTS/PMS (20:1) e incubando durante 3 h más. De esta manera, se comprobó que el nanogel de manosa **126**, respecto al nanogel control **127**, presentaba menor toxicidad frente a las células MDA-MB-231. Se observaron valores bajos de viabilidad celular para el nanogel de manosa **126** a 1 mg/mL y para el nanogel control **127** a 0.5 mg/mL. (Figura 6.11) Sin embargo, valores inferiores de nanogel no presentaban citotoxicidad en esta línea celular.

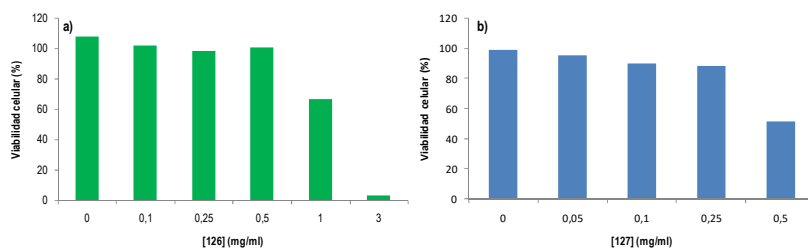


Figura 6.11 Viabilidad de las células MDA-MB-231 en presencia del nanogel: a) **126** y b) **127**.

Por otro lado, el nanogel de manosa **126** presentan niveles tóxicos en las células mamarias MCF10A a concentraciones superiores a 0.3 mg/mL, mientras que en el caso de el nanogel control **127** se observaba toxicidad a concentraciones superiores a 0.15 mg/mL. (Figura 6.12)



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

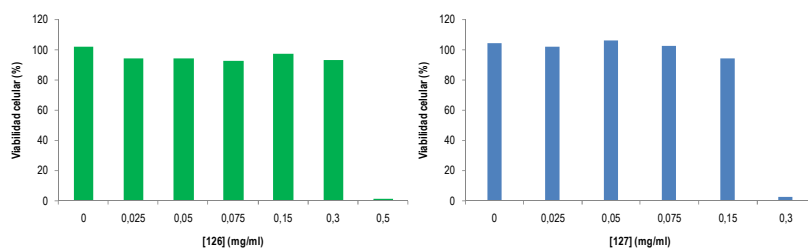


Figura 6.12 Viabilidad de las células MCF10A en presencia del nanogel: a) 126 y b) 127.

Conocido el intervalo en el que los nanogeles son inocuos para este tipo de células se plantearon el resto de estudios biológicos.

6.3.4 Evaluación de la capacidad de internalización de los gliconogeles en células mamarias

Para estudiar el proceso de internalización, es necesario que los nanogeles estén marcados de alguna forma, como por ejemplo con agentes fluorescentes. Se utilizó para ello, el marcador fluorescente Oregon-Green (OG), cuya longitud de onda máxima de excitación se encuentra en 492 nm, mientras que su longitud de onda máxima de emisión corresponde a 524 nm (zona verde del espectro visible), próximas a la fluoresceína. Sin embargo, la forma monoaniónica de la fluoresceína aparece a un pKa relativamente alto de 6.5, lo que hace que este fluoróforo sea mucho menos fluorescente en disoluciones ácidas. Además, la fluorescencia de la fluoresceína varía con el pH y es relativamente susceptible al foto-blanqueo, que involucra reacciones con oxígeno molecular y reacciones inducidas. El OG es el derivado 2',7'-difluoro de la fluoresceína, menos sensible al pH. Los átomos de flúor agregados reducen el pKa de este fluoróforo a 4.8, mejorando sustancialmente la fluorescencia a pH bajo. Este compuesto también es significativamente más fotoestable que la fluoresceína, por lo que es idóneo para aplicaciones como citometría de flujo o confocal.²⁶⁴

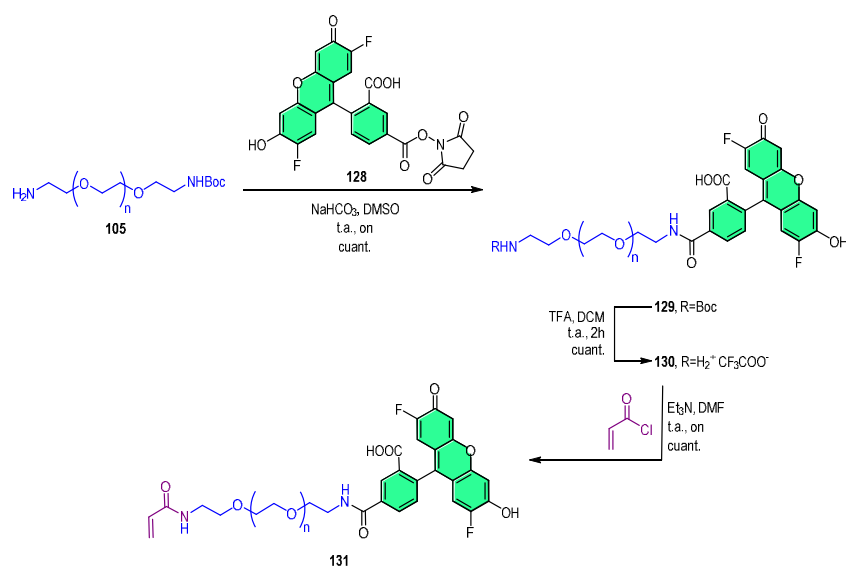
En primer lugar, se conjugó el marcador fluorescente al polímero, formándose un enlace amida. Para facilitar esta reacción se utilizó un derivado de OG, disponible comercialmente, que posee un grupo éster activado en forma de *N*-hidroxisuccinimida 128. La reacción se llevó a

²⁶⁴ Mottram, L.; Boonyarattanakalin, S.; Kovel, R. E.; Peterson, B. R. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 581.



Capítulo 6

cabo siguiendo las condiciones descritas en el protocolo habitual para marcar proteínas u oligonucleótidos con compuestos con aminas, proporcionadas por la casa comercial (*life technologies*). (Esquema 6.4) Para la conjugación, se disolvió el polímero en un tampón de NaHCO_3 (pH 8.3), mientras que el marcador se disolvió en DMSO y se añadió sobre la disolución del polímero. Tras purificar el polímero **129** por cromatografía en exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH se comprobó por UV si se había funcionalizado completamente.



Esquema 6.4 Funcionalización del polímero con OG.

Para calcular el grado de marcaje del intermedio **129**, se construyó previamente una recta de calibrado con el OG comercial sin conjugar. (Figura 6.13)



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

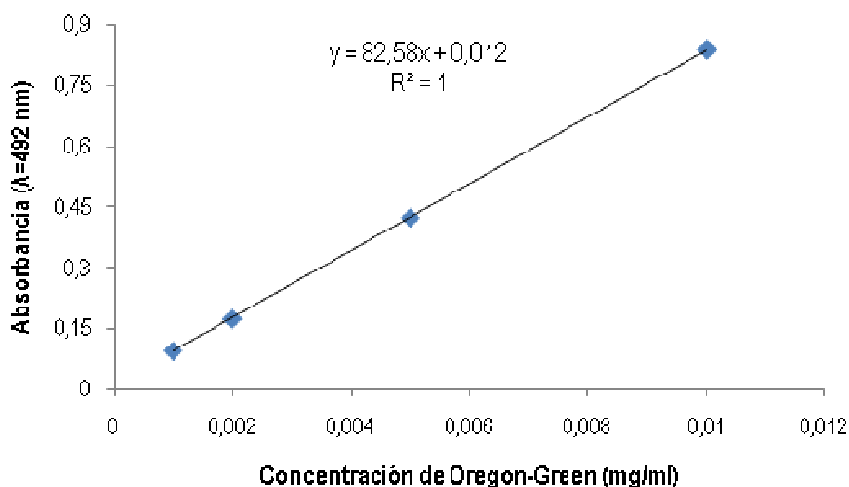


Figura 6.13 Recta de calibrado de OG.

Interpolando el valor de absorbancia de una disolución de **129** de concentración 0.05 mg/mL, se corroboró que la funcionalización del derivado **105** había sido completa.

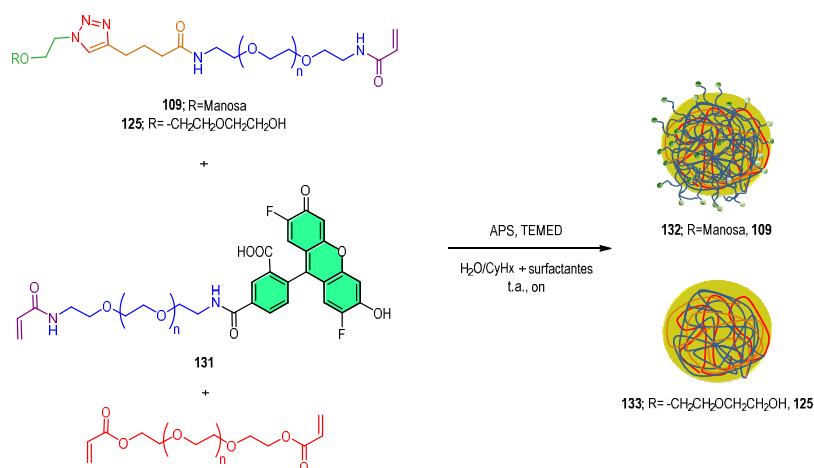
A continuación, se llevó a cabo la reacción de desprotección del grupo amino funcionalizado con el grupo Boc del intermedio **129**, mediante tratamiento ácido. Tras purificación por cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH, se obtuvo el producto **130**. En el espectro de ¹H-RMN, se observó la desaparición de la señal de los metilos del grupo Boc. Por último, se hizo reaccionar con cloruro de acrililoilo, en presencia de Et₃N y en DMF anhidra durante toda la noche. Tras purificación por cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH, se obtuvo el producto **131** puro cuyo espectro de ¹H-RMN mostró la aparición de nuevas señales que corresponden con el grupo acrilato.

Una vez funcionalizado el polímero **131**, se llevó a cabo la polimerización radicalaria en miniemulsión inversa, por un lado con el polímero funcionalizado con manosa **109** y por otro lado, con el polímero control **125**, para obtener cada uno de los nanogeles. (Esquema 6.5) Para ello, se utilizó la misma proporción de agente entrecruzante, el polietilenglicol diacrilado, que en el caso de los nanogeles sin marcador, es decir, 0.15 eq por cada eq del intermedio polimerizable **109** o **125**. Sin embargo, se añadió únicamente 0.07 eq del derivado polimérico



Capítulo 6

131 por cada eq de los intermedios polimerizables **109** o **125**, para alcanzar una proporción de OG en el nanogel entre 0.1-0.5% en masa. No se cambió la proporción de iniciadores capaces de crear radicales en los grupos acrilatos para que reaccionaran más tarde con los grupos acrilatos no activados. Tampoco se variaron los volúmenes de las fases orgánica ni acuosa, ni los tiempos de ultrasonificación para no variar ni el tamaño ni la morfología de los nanogeles. Del mismo modo, tras llevar a cabo la polimerización durante toda la noche a temperatura ambiente, fue necesaria una etapa de purificación. Los surfactantes fueron eliminados por centrifugación en ciclohexano y los nanogeles se purificaron mediante exclusión por tamaños con filtros para centrifuga Amicon Ultra-15 (MWCO 30 KDa) en agua, eliminando los polímeros que no habían reaccionado.



Esquema 6.5 Preparación de los nanogeles marcados fluorescentemente de manosa **132** y control **133**.

A continuación, se midió su tamaño por DLS. (Figura 6.14 /Tabla 6.1)



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

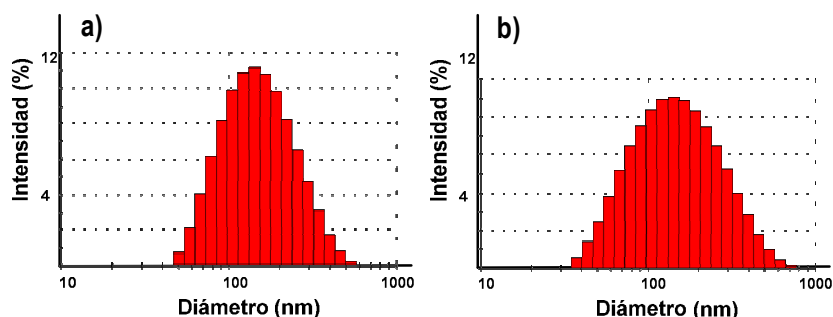


Figura 6.14 Histogramas de DLS de los nanogeles fluorescentes: a) de manosa **132** y b) control **133**.

A partir de una recta de calibrado de OG sin conjugar a diferentes concentraciones, conocida la absorbancia a 492 nm de disoluciones de los nanogeles de concentraciones conocidas, se calculó el porcentaje en masa del marcador fluorescente en el nanogel. (Tabla 6.1) Además, se calculó el porcentaje de manosa en el nanogel de manosa, siguiendo el método del ácido sulfúrico-UV.

Tabla 6.1 Características de los nanogeles marcados con OG **132** y **133**.

Nanogel	OG (%)	Manosa (%)	Tamaño (nm)
132	0.27%	3.9%	107.6±6.1
133	0.16%		105.1±0.7

Mediante citometría de flujo, teniendo en cuenta que los compuestos son fluorescentes, si éstos se internalizan dentro de la célula, las correspondientes células emitirán luz en la región verde del espectro visible que se podrá detectar y permitirá estudiar el grado de internalización de los nanogeles **132** y **133**. Disoluciones de concentración 0.5 mg/mL de estos nanogeles se incubaron durante 3 h con las células mamarias tumorales MDA-MB-231 y con las células mamarias no tumorales MCF10A. Transcurrido este tiempo, las células fueron levantadas con tripsina.

Con el gráfico de la luz dispersada de manera frontal y lateral, se distinguió la zona donde se encontraban las células y con ayuda del gráfico de luz dispersada frontal-altura frente a luz



Capítulo 6

dispersada frontal-área, se seleccionaron las células sencillas y se discriminaron los dímeros o aglomerados. Para analizar la viabilidad de las células, se añadió yoduro de propidio (PI del inglés *propidium iodide*) a las células antes de llevar a cabo la medida. Por su elevado peso molecular y su carácter hidrofílico, esta molécula sólo puede entrar en las células cuando sus membranas se rompen y presentan poros. Una vez en el interior, se une a los ácidos nucleicos y se puede intercalar entre las dos cadenas de ADN, emitiendo luz roja. (Figura 6.15) Únicamente, este compuesto entra en células que se encuentran en procesos de necrosis y apoptosis tardía.²⁶⁵

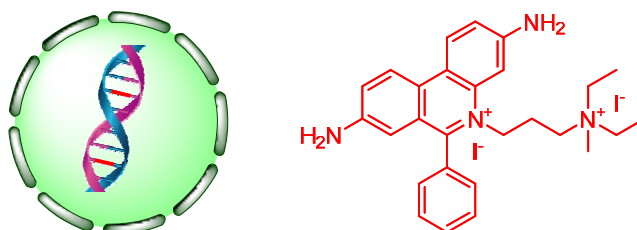


Figura 6.15 Proceso de marcate de células muertas con PI y estructura de PI.

Para cada una de las líneas celulares se estudió el proceso de internalización de cada nanogel. Si el nanogel internalizaba dentro de las células se esperaba que la densidad de puntos en la zona verde del espectro visible fuese mayor (FITC). (Figura 6.16)

²⁶⁵ a) Manini, E.; Danovaro, R. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, 55, 416. b) Müller, S.; Nebe-von-Caron, G. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, 34, 554.



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

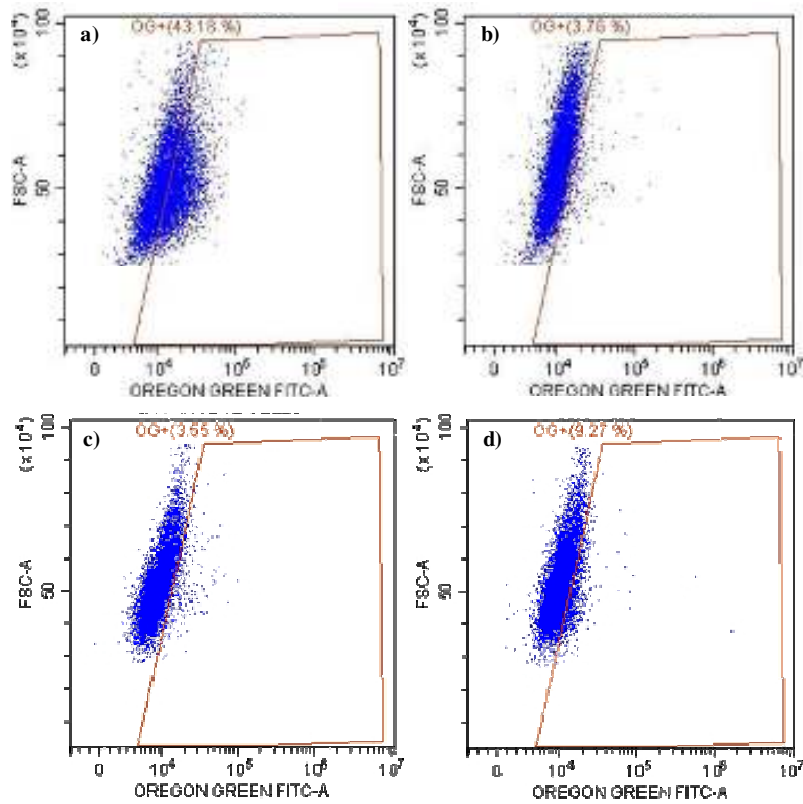


Figura 6.16 Gráficos dot-plot de citometría de flujo de células MDA-MB-231 tras el tratamiento con los nanogeles de: a) manosa **132** y b) control **133**. Gráficos dot-plot de citometría de flujo de células MCF10A tras el tratamiento con los nanogeles de: c) manosa **132** y d) control **133**. El recuadro naranja delimita la zona donde las células marcadas con OG emiten luz.

Analizando los gráficos de puntos (dot-plot), se calculó el porcentaje de células vivas y el porcentaje de células marcadas con OG o en las que el nanogel fluorescente se había internalizado. (Tablas 6.2-6.3)



Capítulo 6

Tabla 6.2 Porcentaje de células vivas MDA-MB-231 y que emiten en la zona verde tras el tratamiento con los nanogeles **132** y **133**.

Células mamarias tumorales MDA-MB-231		
Nanogel	Viabilidad celular	Células marcadas
132	90.9%	43.2%
133	86.6%	3.8%

Tabla 6.3 Porcentaje de células vivas MCF10A y que emiten en la zona verde tras el tratamiento con los nanogeles **132** y **133**.

Células mamarias no tumorales MCF10A		
Nanogel	Viabilidad celular	Células marcadas
132	72.2%	3.5%
133	41.2%	9.3%

Atendiendo a los porcentajes de células vivas que emiten en la zona verde, se observó que el nanogel de manosa **132** marcado fluorescentemente internalizaba en casi el 50% de células mamarias tumorales vivas. Sin embargo, el nanogel control **133**, que no posee unidades de manosa en su superficie, no fue capaz de internalizarse de forma efectiva en estas células tumorales. Este hecho puso de manifiesto que el nanogel **132** fue capaz de internalizarse en las células tumorales MDA-MB-231 vía receptor Endo180. Como era de esperar, el nanogel de manosa **132** no fue internalizado por las células no tumorales MCF10A, ya que este tipo de células no presentan receptores específicos de manosa. Además, los porcentajes de viabilidad concuerdan con los resultados obtenidos en los experimentos MTS realizados, siendo la viabilidad celular menor para las células no tumorales en presencia de 0.5 mg/mL del nanogel control **133**. Los bajos porcentajes de internalización mostrados en las tablas para las células MCF10A y para las células MDA-MB-231 (tras el tratamiento con el nanogel **133**, se deben a la zona seleccionada en el gráfico dot-plot).

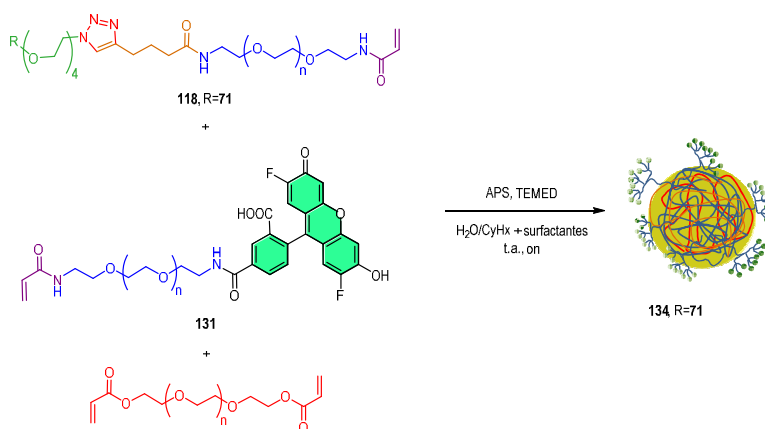
6.3.5 Aumento de la multivalencia del gliconanogel de manosa

Teniendo en cuenta los resultados de afinidad de los nanogeles con la ConA descritos en el capítulo 5, se decidió aumentar la multivalencia del sistema utilizando glicodendrones para



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

conjugar al polímero que forma el gliconanogel. De esta manera, se pretende mejorar la internalización de los nanogeles en las células tumorales. Para ello, se decidió preparar como vehículos para el transporte de fármacos antitumorales, el nanogel del dendrón de 9 unidades de manosa. En primer lugar, antes de preparar el sistema más complejo conjugado al fármaco, se decidió evaluar el proceso de internalización con el nanogel marcado fluorescentemente **134** que presenta solamente el glicodendrón de 9 unidades de manosa. El nanogel **134** se preparó siguiendo el mismo procedimiento utilizado para el nanogel de manosa **132** pero empleando 25% en moles del polímero **131** funcionalizado con el marcador fluorescente, con el objetivo de aumentar la proporción de OG en el nanogel. (Esquema 6.6)



Esquema 6.6 Preparación del nanogel funcionalizado con el glicodendrón de 9 manosas **134** marcado fluorescentemente con OG.

Así, se consiguió aumentar el grado de marcaje del nanogel en masa a 0.36% (calculado con la recta de calibrado Figura 6.13). Mediante el método del ácido sulfúrico UV, se calculó el porcentaje del ligando **71** en el nanogel **134**, siendo del 8.6% en masa. Al igual que para el resto de nanogeles, se determinó el tamaño del nanogel **134** por DLS (102.0 ± 2.3 nm). (Figura 6.17)



Capítulo 6

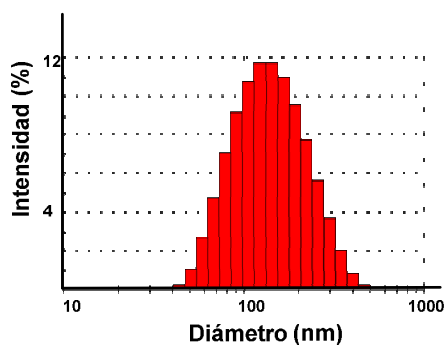
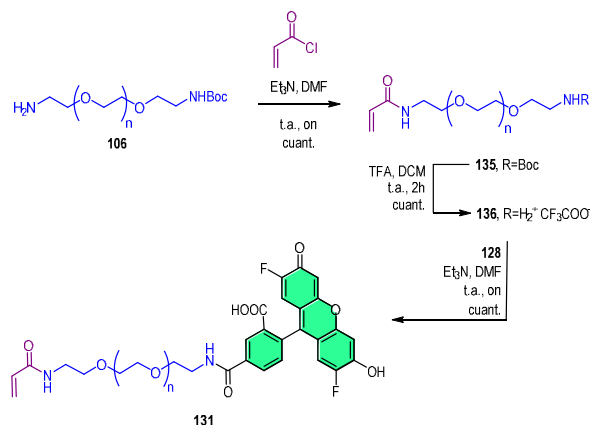


Figura 6.17 Histograma de DLS del nanogel **134** del glicodendrón de 9 manosas marcado fluorescentemente.

Con el nanogel **134**, se están llevando a cabo actualmente los estudios de internalización en células MDA-MB-231 y células MCF10A.

Para la obtención del PEG funcionalizado con el OG, se cambió el orden de etapas, introduciendo al final el marcador fluorescente para evitar que pueda sufrir transformaciones durante la funcionalización del otro extremo del polímero. A partir del polímero ya funcionalizado con el grupo acrilato **136** con un grupo amino libre, se llevó a cabo la reacción con el marcador fluorescente OG (**128**). (Esquema 6.7)



Esquema 6.7 Preparación del polímero **131**.



Se hizo reaccionar el polímero **106** con cloruro de acrililoilo, en presencia de Et₃N a temperatura ambiente durante una noche. Tras purificar el intermedio **135** mediante cromatografía de exclusión por tamaño Sephadex LH20 en MeOH, se obtuvo el producto de manera cuantitativa. En el espectro de ¹H-RMN, se observó la aparición de las señales de los protones del doble enlace CH-CH₂ de la acrilamida formada (a campo bajo). (Figura 6.18) La integral de estas señales respecto a la integral de la señal singlete de los protones de los metilos del grupo Boc y al multiplete que corresponde con los protones del metileno unido al grupo amino unido a su vez al grupo protector Boc, guarda la relación esperada, demostrándose la completa funcionalización del grupo amino libre del polímero de partida. Además, se observó una nueva señal ancha a 6.71 ppm del protón unido al nitrógeno de la amida formada.

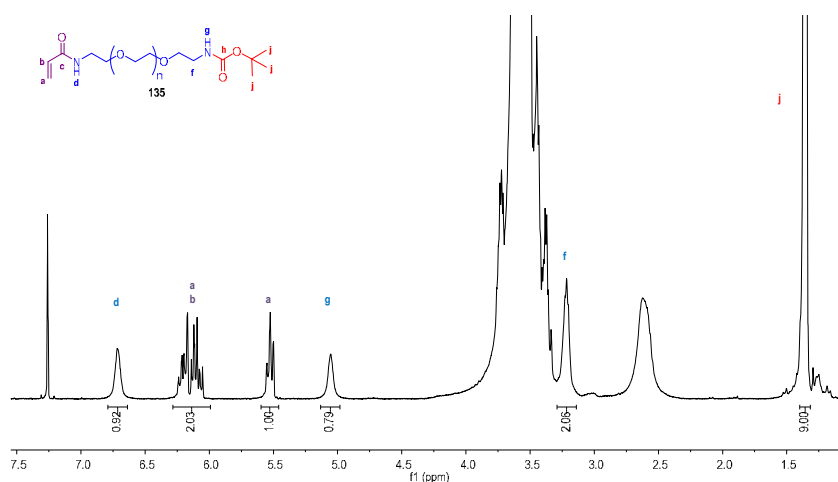


Figura 6.18 Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) del polímero **135**.

En el espectro de ¹³C-RMN, se observaron las señales de los carbonos del doble enlace C-C, a 131.0 ppm y 125.9 ppm. El carbono del metileno en α al grupo amino del polímero previamente se encontraba a 41.7, al formarse la correspondiente amida, el desplazamiento del carbono metilénico se mueve a 39.2 ppm.



Capítulo 6

A continuación, el intermedio **135** fue tratado con TFA en DCM para desproteger el grupo amino. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 h, no observándose reacciones colaterales ni polimerizaciones en medio ácido. Tras purificación mediante cromatografía mediante exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH el compuesto **136** se obtuvo de manera cuantitativa. En el espectro de ^1H -RMN, se observó la desaparición de la señal singlete de los metilos del grupo Boc y de la señal ancha correspondiente al protón del grupo carbamato (5.05 ppm). A campo más bajo apareció una nueva señal ancha cuya integral coincidía con 3 protones, que corresponden con los protones del grupo amonio generado en la reacción.

En el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **136**, el cambio más significativo que se observó respecto al espectro de ^{13}C -RMN del producto **135**, fue la desaparición de las señales de carbono a 28.3 ppm y a 156.0 ppm, correspondientes al carbono del metilo y al carbono cuaternario del grupo Boc, respectivamente. (Figura 6.19)

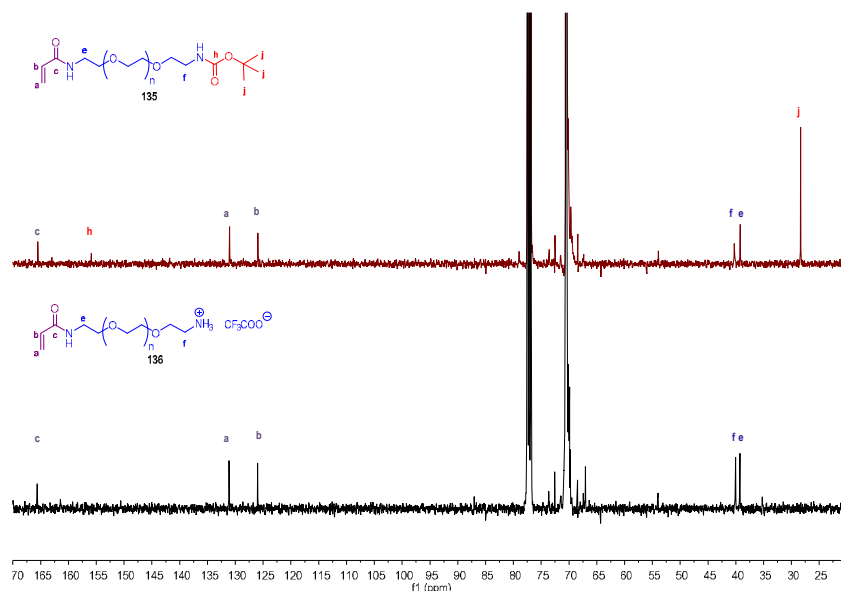


Figura 6.19 Espectros de ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3 , 298 K) de los intermedios **135** y **136**



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

Por último, se hizo reaccionar el grupo amino del polímero **136** con el éster activado presente en la molécula del marcador fluorescente comercial **128**, en presencia de Et₃N, en DMF anhidra. Tras una noche de reacción, se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaños LH-20 en MeOH para eliminar el ligero exceso añadido del compuesto **128**, obteniéndose el producto **131** de manera cuantitativa. En el espectro de ¹H-RMN del producto aislado, se observó la desaparición de la señal del metileno unido al grupo amonio libre del polímero precursor **136** y la aparición de las señales de los 7 protones aromáticos de la molécula de OG en la zona del espectro comprendida entre 8.46 ppm y 6.30 ppm. (Figura 6.20)

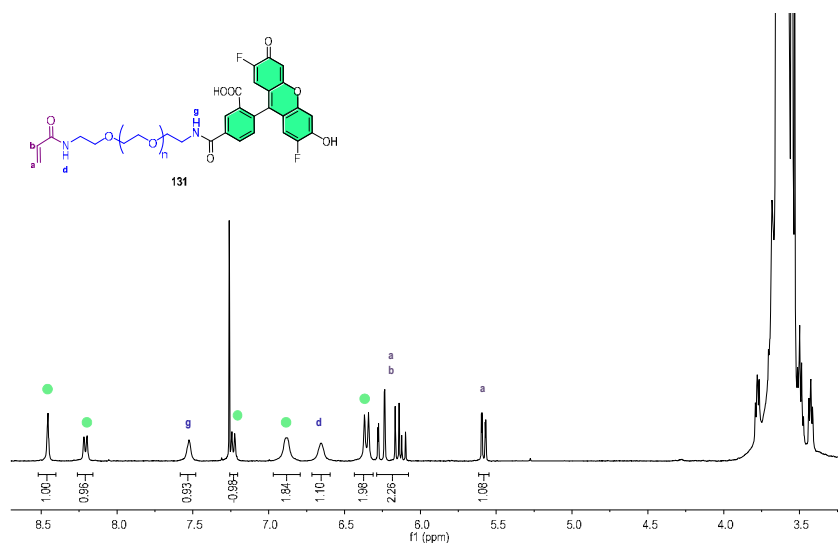


Figura 6.20 Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) del producto **131**.

Del mismo modo, en el espectro de ¹³C-RMN se observó la aparición de los carbonos de los metinos de los anillos aromáticos de la fluoresceína a campo bajo. Además, se determinó el valor de la absorbancia de una disolución de concentración 0.05 mg/mL (1.49 10⁻⁵ M) de **131** a 492 nm. De acuerdo con la ecuación de la recta construida a diferentes concentraciones de OG comercial (similar a la recta de calibrado de la Figura 6.13), se calculó la concentración de OG en dicha disolución del polímero **131**, obteniéndose un valor similar en mol/L de OG. De esta manera, se demostró que el polímero **131** estaba completamente funcionalizado con OG.



Capítulo 6

6.3.6 Conjugación del fármaco paclitaxel

Una vez estudiado el proceso de internalización, se analizará la capacidad de los gliconanos en el transporte de fármacos. Como agente antitumoral se ha elegido el paclitaxel (PTX, **137**), capaz de promover la unión de microtúbulos e inhibir la despolimerización de los mismos ($IC_{50} = 4nM$),²⁶⁶ (Figura 6.21) inhibiendo la mitosis y la proliferación celular. Este fármaco presenta una gran actividad antitumoral frente al cáncer de ovario, de mama y pulmonar.²⁶⁷

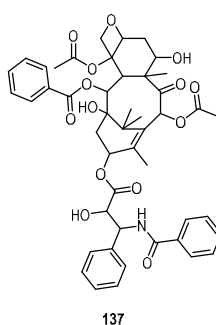


Figura 6.21 Estructura del PTX (**137**).

El PTX presenta una baja solubilidad en agua, por lo que se suele formular como una disolución concentrada de Cremophor EL y etanol.²⁶⁸ Desafortunadamente, el Cremophor es un aceite de ricino polioxiethylado con numerosos efectos colaterales, como hipersensibilidad y

²⁶⁶ a) Schiff, P. B.; Fant, J.; Horwitz, S. B. *Nature* **1979**, *277*, 665. b) Singla, A. K.; Garg, A.; Aggarwal, D. *Int. J. Pharm.* **2002**, *235*, 179. c) Jiang, P.; Mukthavaram, R.; Mukthavavam, R.; Chao, Y.; Bharati, I. S.; Fogal, V.; Pastorino, S.; Cong, X.; Nomura, N.; Gallagher, M.; Abbasi, T.; Vali, S.; Pingle, S. C.; Makale, M.; Kesari, S. *J. Transl. Med.* **2014**, *12*, 13.

²⁶⁷ a) McGuire, W. P.; Rowinsky, E. K.; Rosenshein, N. B.; Grumbine, F. C.; Ettinger, D. S.; Armstrong, D. K.; Donehower, R. C. *Ann. Intern. Med.* **1989**, *111*, 273. b) Nicolaou, K. C.; Yang, Z.; Liu, J. J.; Ueno, H.; Nantermet, P. C.; Guy, R. K.; Claiborne, C. F.; Renaud, J.; Couladouros, E. A.; Paulvannan, K.; Sorensen, E. J. *Nature* **1994**, *367*, 630. c) Spencer, C. M.; Faulds, D. *Drugs* **1994**, *48*, 794. d) Crown, J.; O'Leary, M. *Lancet* **2000**, *355*, 1176.

²⁶⁸ Weiss, R. B.; Donehower, R. V.; Wiernik, P. H.; Ohnuma, T.; Gralla, R. J.; Trump, D. L.; Baker, J. R.; Van Echo, D. A.; Von Hoff, D. D.; Leyland-Jones, B. *J. Clin. Oncol.* **1991**, *9*, 1261.



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

neurotoxicidad.²⁶⁹ Además, como el resto de agentes antitumorales, el PTX presenta una falta de selectividad hacia las células tumorales dando lugar a severos efectos secundarios.²⁷⁰ Por ello, encontrar métodos para vehicular selectivamente este fármaco es un tema de gran interés.

Para conjugar el fármaco al polímero, se decidió utilizar enlaces que no fueran sensibles a las enzimas hidrolíticas o esterasas, para que dicho fármaco pudiera alcanzar los compartimentos intracelulares. El objetivo es conseguir que la liberación del fármaco se produzca en el medio ácido de los endosomas o lisosomas, una vez que el nanogel se haya internalizado en las células diana, impidiendo que se hidrolice a pH fisiológico.

Para alcanzar este objetivo, una de las opciones es la formación de enlaces hidrazona entre el polímero y el fármaco. Para ello, se utilizó el método descrito por Willner y *col.*²⁷¹ para conjugar el agente antitumoral DOX a anticuerpos monoclonales mAb (del inglés *monoclonal antibodies*). Posteriormente, este método fue empleado por Rodrigues y *col.*²⁷² para conjugar PEG y PTX. El método consiste en la introducción de un espaciador en la molécula de PTX provisto de una maleimida y del enlace hidrazona. A continuación, se conjuga con el polímero mediante la reacción entre la maleimida y el grupo tiol existentes en el polímero. En nuestro caso, siguiendo este método se propuso la conjugación de PTX al PEG tal y como se encuentra recogido en el Esquema 6.8.

²⁶⁹ Brown, T.; Havlin, K.; Cagnola, J.; Koeller, J.; Kuhn, J.; Rizzo, J.; Craig, J.; Philips, J.; Von Hoff, D. *J. Clin. Oncol.* **1991**, *9*, 1261.

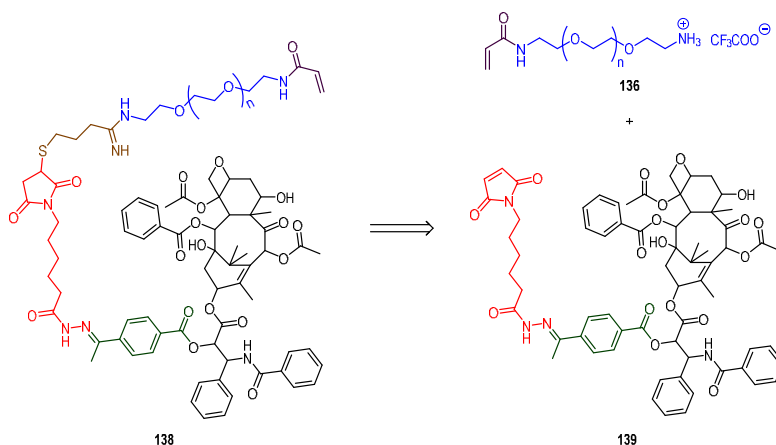
²⁷⁰ McGuire, W. P.; Rowinsky, E. K. *Paclitaxel in Cancer Treatment*. Marcel Dekker. Bethesda, MD, **1995**.

²⁷¹ Willner, D.; Trail, P. A.; Hofstead, S. J.; King, H. D.; Lasch, S. J.; Braslawsky, G. R.; Greenfield, R. S.; Kaneko, T.; Firestone, R. A. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 521.

²⁷² Rodrigues, P. C. A.; Scheuermann, K.; Stockmar, C.; Maier, G.; Fiebig, H. H.; Unger, C.; Mülhaupt, R.; Kratz, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 355.



Capítulo 6

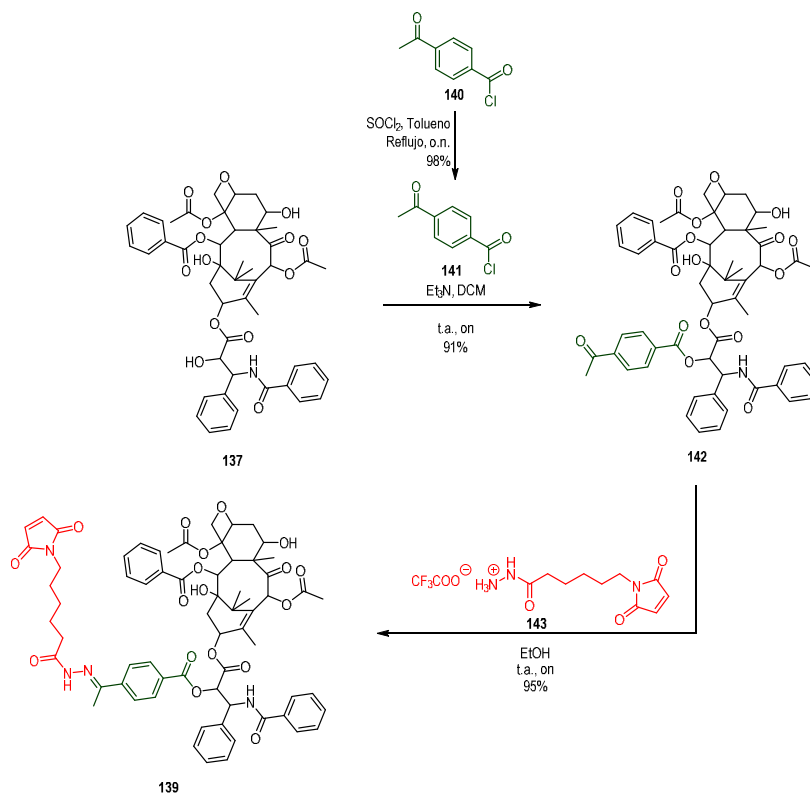


Esquema 6.8 Análisis retrosintético de la preparación de PEG-PTX (**138**).

Para obtener el derivado **139**, fue necesaria la sustitución del alcohol alifático secundario presente en la estructura de PTX. (Esquema 6.9) A pesar de que en la molécula de PTX existe una cetona que puede dar lugar a una hidrazona, ésta se encuentra impedida estéricamente. Por ello, fue necesario introducir una cetona mediante tratamiento con un ligero exceso del cloruro del ácido 4-acetilbenzoico (**141**), en presencia de Et_3N y diclorometano como disolvente anhidro. La reacción transcurrió a temperatura ambiente durante toda la noche para asegurar la completa funcionalización. Tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se obtuvo el intermedio **142** con un rendimiento del 91%.²⁷² A continuación, el producto **142** se hizo reaccionar con un exceso del espaciador **143** que posee la sal de hidrazonio y la maleimida en la misma estructura.²⁵² Tras una noche de reacción a temperatura ambiente, se formó un precipitado que correspondía con el derivado de PTX **139** sustituido con la maleimida y que contenía la hidrazona en su estructura. Tras lavados con Et_2O , se obtuvo un sólido blanquecino con un rendimiento del 95%.



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales



Esquema 6.9 Síntesis del derivado de PTX-maleimida **139**.

En el espectro de masas ESI del producto **139**, se observa la señal correspondiente a los iones $[M+Na]^+$: m/z 1229.37 y $[M+K]^+$: m/z 1245.31. (Figura 6.22)



Capítulo 6

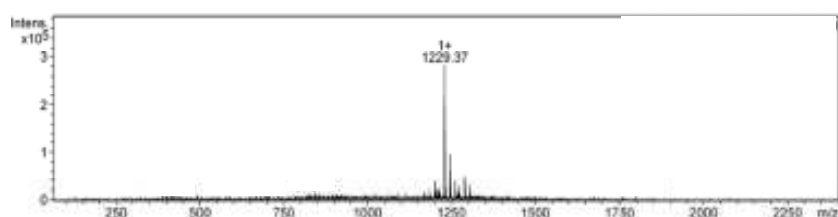


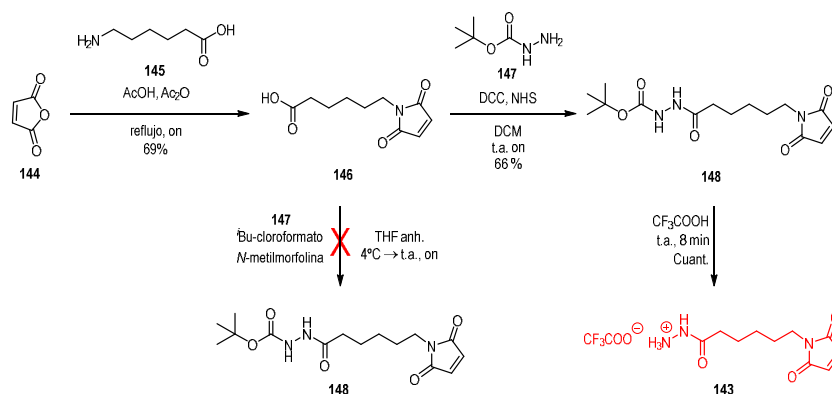
Figura 6.22 Espectro de masas ESI del derivado **139**.

Previamente, fue necesario preparar el cloruro del ácido 4-acetilbenzoico (**141**) a partir del ácido 4-acetilbenzoico (**140**) en presencia de SOCl_2 y en tolueno a reflujo, durante 1 h.²⁷² Transcurrido este tiempo, se cristalizó con éter dietílico, obteniendo un sólido naranja con un rendimiento del 98%. (Esquema 6.9) En el espectro de ^{13}C -RMN, se observó un ligero desplazamiento a campo alto de la señal del carbonilo desde 172 ppm hasta 168 ppm.

Por otro lado, el espaciador 6-maleimidocaproico **143** se preparó a partir del anhídrido maleico (**144**) y el ácido 6-aminocaproico (**145**), a reflujo en presencia de ácido acético glacial durante una noche. (Esquema 6.10) Al día siguiente, se añadió anhídrido acético y tras 1 h de reacción, el compuesto fue purificado mediante cromatografía en columna de gel de sílice, dando lugar al producto **146** con un rendimiento del 69%. En el espectro de ^1H -RMN, se observó la completa funcionalización del anhídrido maleico. Para obtener la hidracina, se siguieron las condiciones descritas en la bibliografía,²⁷¹ empleando carbazato de *tert*-butilo (**147**) e clorformato de isobutilo como agente de acoplamiento. (Esquema 6.10) Sin embargo, la reacción no evolucionó y por ello, se decidió cambiar el agente de acoplamiento por *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) ampliamente utilizados en síntesis orgánica para acoplar ácidos carboxílicos y aminas. De esta manera, se logró obtener el espaciador **148** funcionalizado con la maleimida y la hidracida protegida, durante una noche de reacción y purificación en cromatografía por columna de gel de sílice, con un rendimiento del 66%. Mediante RMN y espectrometría de masas, se comprobó la pureza del producto. Antes de llevar a cabo la reacción de acoplamiento maleimida-tiol, fue necesario desproteger la hidracida en presencia de TFA, durante 8 min, obteniéndose el producto **143** de manera cuantitativa, tras precipitación con Et_2O .



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

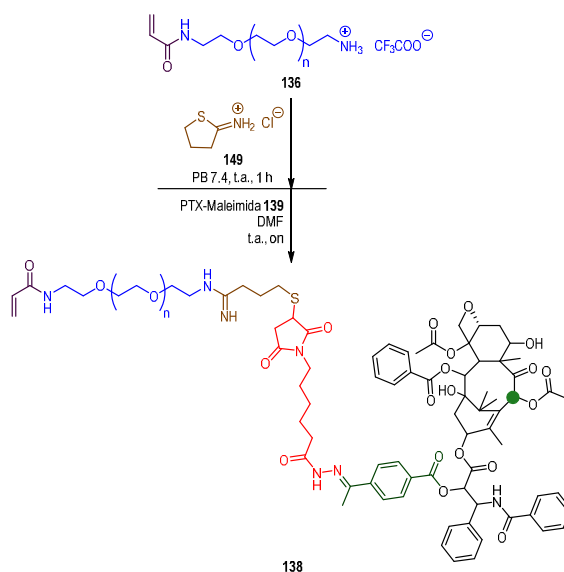


Esquema 6.10 Síntesis del espaciador 143.

En el trabajo posterior de Ferber y *col.*,²⁵² se describe un procedimiento para introducir el grupo tiol en poliglicerol dendrítico sulfatado, que consistía en hacer reaccionar los grupos aminos del polímero ramificado con 2-iminotiolano (**149**). Tras esta modificación, se podía llevar a cabo reacciones tiol-eno para conseguir introducir diferentes unidades del derivado de PTX **139**. Antes de llevar a cabo la conjugación del fármaco, se consideró oportuno funcionalizar el otro extremo de la cadena del polímero con el grupo acrilato. No se puede invertir el orden de las etapas, es decir, no se puede formar en primer lugar la hidrazona y a continuación desproteger el otro grupo amino mediante tratamiento ácido, ya que la hidrazona no soportaría estas condiciones. Siguiendo las condiciones de Ferber y *col.*,²⁵² se llevó a cabo la reacción entre el derivado de PEG **136** y el 2-iminotiolano (**149**), en tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.4). (Esquema 6.11) Tras 1 h de reacción, se añadió el derivado de PTX **139** funcionalizado con el espaciador disuelto en DMF, dejándose en agitación durante toda la noche. Transcurrido este periodo de tiempo, se purificó mediante cromatografía por exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH; sin embargo, en estas condiciones no se observó la funcionalización completa del polímero por RMN.



Capítulo 6



Esquema 6.11 Síntesis del polímero PEG-PTX (138).

Inicialmente, se pensó que la reacción no había funcionado porque el polímero no se había funcionalizado correctamente con el grupo tiol. Se decidió añadir un exceso de 2-iminothiolano (149) para forzar las condiciones. Sin embargo, no se observó la funcionalización completa correspondiente a la reacción de acoplamiento tiol-eno. Además, con el producto no funcionalizado completamente, se repitió la reacción añadiendo más equivalentes de los reactivos sin observarse evolución.

A la vista de estos resultados, se decidió disolver el derivado de PTX 139 en MeOH y añadir un mayor número de eq, no observándose, de nuevo, la funcionalización completa.

Teniendo en cuenta que la única posibilidad de analizar el grado de funcionalización del polímero era mediante RMN y con la complejidad tanto del polímero como del derivado de PTX 139, se decidió comparar la integral de los protones del doble enlace del grupo acrilato del polímero 136 frente a la señal singlete del protón derivado de PTX 139 del ciclooctano unido al éster metílico que aparece en el espectro de ¹H-RMN a 6.32 ppm. En la figura 6.23 se muestra el espectro de ¹H-RMN del PTX 139 y un ejemplo representativo de los intentos de conjugación llevados a cabo en las condiciones anteriormente detalladas en la que se consiguió un 26% de



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

funcionalización (de acuerdo con la relación de integrales de las señales de la zona ampliada). Se eligieron estas dos señales ya que se encuentran en una zona próxima del espectro.

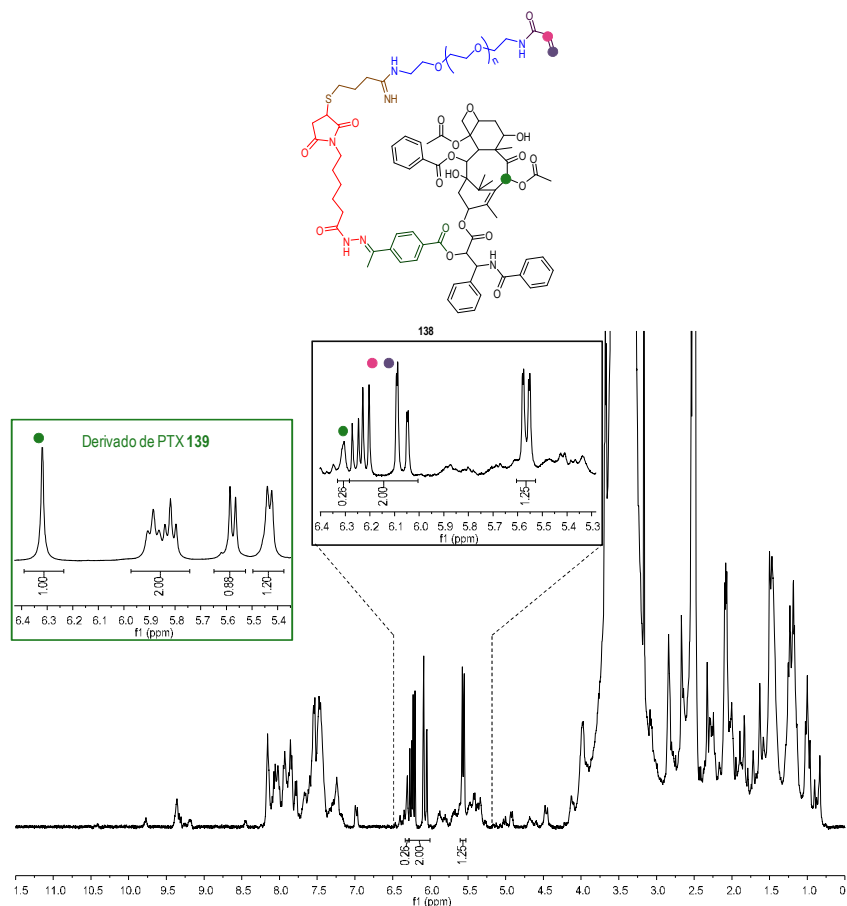


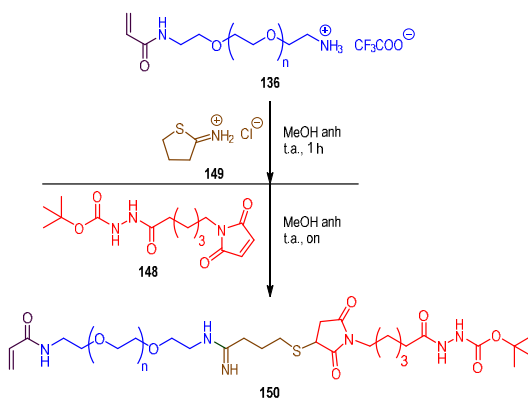
Figura 6.23 Espectros de ^1H -RMN (400MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 298 K) del polímero **138** no funcionalizado completamente. Ampliación de las señales comprendidas entre 6.4 ppm y 5.3 ppm del derivado de PTX **139**.

Como alternativa, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento con el espaciador **148** no conjugado con el PTX, en lugar del compuesto **139**. (Esquema 6.12) De la misma manera, no se



Capítulo 6

produjo el acoplamiento tiol-maleimida al 100%, ni la reacción evolucionó al añadir mayor número de equivalentes.



Esquema 6.12 Síntesis del derivado 150.

En lugar de utilizar MeOH como disolvente, se disolvió por un lado el polímero **136** y el 2-iminotiolano (**149**) en el tampón, mientras que el espaciador se disolvió en DMF. Aumentando el número de equivalentes de **149** y **148**, se consiguió la completa funcionalización del polímero. Tal y como se observó en el espectro de ¹H-RMN (DMSO-*d*₆) tras analizar las integrales de las señales, aparece la señal a 1.38 ppm correspondiente a los 9 protones de los metilos del grupo Boc (Figura 6.24) Además, aparecen 4 nuevas señales anchas a campo más bajo que corresponde a los grupos amino de la hidracida y de la imidamida formadas. La integral de todas estas señales correlaciona con la señal de los protones del acrilato.



Evaluación de la capacidad de los glicanogeles para internalizar en células tumorales

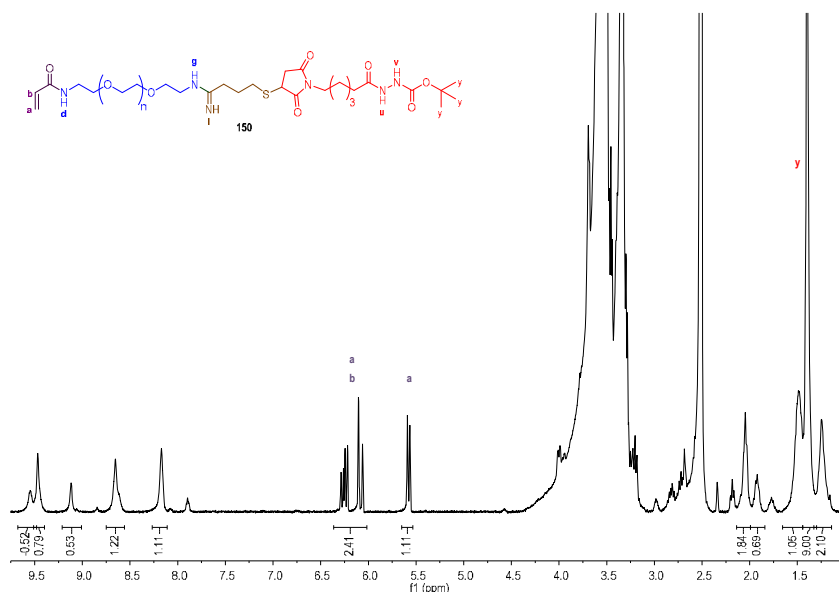


Figura 6.24 Espectro de ^1H -RMN (400MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 298 K) del derivado **150**.

A continuación, se formó la sal de hidrazonio en presencia de TFA y tras eliminar el exceso de TFA añadido a vacío, se hizo reaccionar con el derivado de PTX **142** funcionalizado con la cetona, en EtOH durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se purificó mediante cromatografía en columna de exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH. En el espectro de ^1H -RMN se observó una funcionalización del 44% del polímero, comparando de nuevo la integral del multiplete, que aparece en la zona del espectro comprendida entre 6.29 y 6.02 ppm, asociado a los protones del doble enlace del acrilato frente a la integral del protón del ciclooctano del PTX unido al éster metílico que aparece a 6.3 ppm. (Figura 6.25) Tras añadir más equivalentes del derivado de PTX **142**, la reacción no evolucionó más.



Capítulo 6

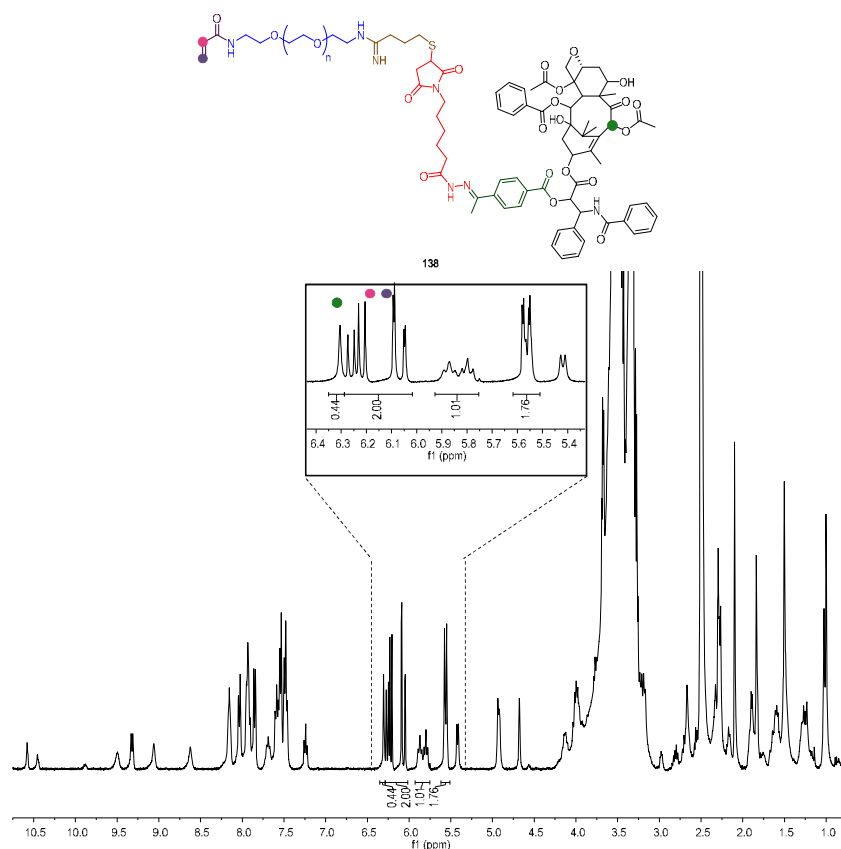


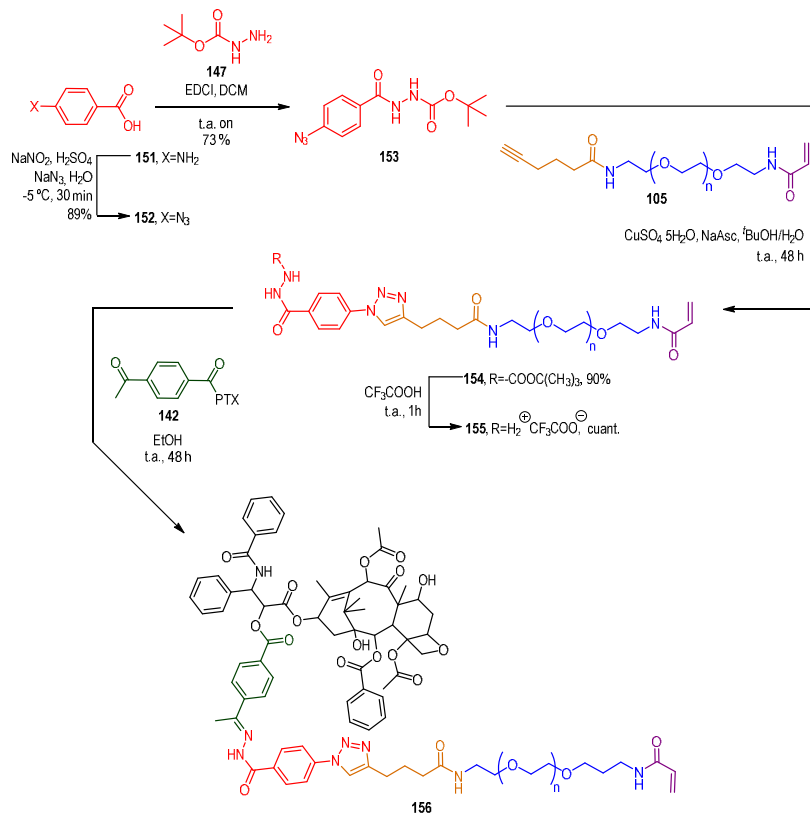
Figura 6.25 Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 298 K) del producto obtenido **138** no funcionalizado completamente.

Teniendo en cuenta los problemas observados a la hora de acoplar la maleimida y el tiol, se decidió cambiar la estrategia. Se decidió utilizar un espaciador funcionalizado con un grupo azido, para llevar a cabo la reacción de acoplamiento, tal y como se había llevado a cabo con los azúcares. Una de las posibles razones que podría explicar por qué la reacción no se completaba, podría ser la inestabilidad de la hidrazona formada o bien las posibles reacciones intramoleculares que pudieran darse. Por ello, se creyó conveniente utilizar otra sal de



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

hidrazonio, para la formación del conjugado PEG-PTX. En concreto, se eligió como producto de partida para preparar la sal de hidrazonio, el ácido 4-azidobenzoico (**152**). De esta forma, la nueva hidrazona se encontraría estabilizada por resonancia. (Esquema 6.13)



Esquema 6.13 Síntesis del conjugado PEG-PTX 156.

En primer lugar, el ácido 4-azido benzoico (**152**) se preparó a partir del 4-aminobenzoico (**151**) siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía, que consistía en la adición del catión nitrosilo al carbono unido al grupo amino del anillo, formándose el correspondiente



Capítulo 6

cación arilo.²⁷³ Tras la adición de azida sódica se forma un aducto entre el núcleo y el ión diazonio y posteriormente se elimina el nitrógeno, dando lugar al compuesto **152**. A continuación, se llevó a cabo la introducción de la hidracina en este anillo mediante reacción con carbazato de *tert*-butilo (**147**), en presencia de EDCI.²⁷⁴ Se comprobó que usando DCC y NHS, la reacción no evolucionaba hacia la formación de la hidracina deseada, se quedaba en forma del éster de la N-hidroxisuccinimida (2,5-dioxopirrolidin-1-il 4-azidobenzoato). El acoplamiento con el polímero **105** se llevó a cabo mediante reacción CuAAC siguiendo las condiciones habituales, en una mezcla de disolventes ¹BuOH y agua (1:1), siendo la concentración del polímero **105** 0.05 M, a temperatura ambiente durante 48 h. A continuación, los restos de cobre se eliminaron por adición de la resina QuadraSil[®]MP y el compuesto se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH-20 en MeOH. Se confirmó la completa funcionalización por RMN. En el espectro de ¹H-RMN se observó la aparición de la señal del protón del metino del triazol (7.95 ppm), las señales aromáticas del anillo (sistema AB) y el singlete de los protones de los metilos del grupo Boc (1.50 ppm), correspondientes al compuesto **154**. (Figura 6.26) La relación de las integrales de las señales nuevas estaba en concordancia con las integrales de las señales del polímero **105**, como las señales de los protones del doble enlace C-C del grupo acrilato. Además, se observó el desplazamiento de la señal de los protones del metileno unido al alquino, ahora triazol desde 1.94 ppm hasta 2.86 ppm.

²⁷³ Raiguel, S.; Thomas, J.; Binnemans, K.; Dehaen, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 4850.

²⁷⁴ Braslau, R.; Anderson, M. O.; Rivera, F.; Jimenez, A.; Haddad, T.; Axon, J. R. *Tetrahedron* **2002**, 58, 5513.



Evaluación de la capacidad de los glicanogeles para internalizar en células tumorales

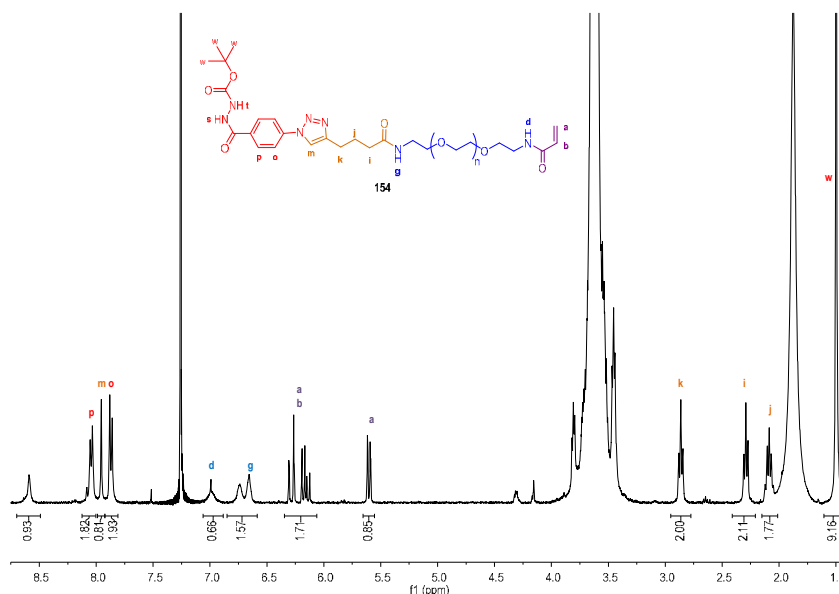


Figura 6.26 Espectro de ^1H -RMN (400MHz, CDCl_3 , 298 K) del derivado **154**.

Así mismo, en el espectro de ^{13}C -RMN del producto **154** se observó la aparición de las señales de los carbonos aromáticos, así como el carbono del carbonilo del carbamato, en la zona del espectro comprendida entre 172.6 ppm y 119.3 ppm y los carbonos de los metilos del grupo protector Boc (28.2 ppm).

A continuación, la hidracina del polímero **154** se desprotegió en presencia de TFA durante 1h de reacción. Transcurrido este tiempo, se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH20 en MeOH, obteniéndose el producto **155** cuantitativamente. La completa eliminación del grupo protector se confirmó por ^1H -RMN, ya que se observó la desaparición de la señal de los protones de los metilos del grupo protector Boc y el desplazamiento de la señal del protón del grupo amino unido al grupo protector que ahora se encuentra en forma de amonio. Del mismo modo, en el espectro de ^{13}C -RMN del intermedio **155** se observó la desaparición de la señal de los carbonos de los metilos a 30 ppm. Por último, con el objetivo de formar la correspondiente hidrazona, se hizo reaccionar el derivado **155** que presenta la sal de hidrazonio con un ligero exceso del derivado de PTX **142**, en EtOH durante



Capítulo 6

dos días. Tras purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH-20 en MeOH, se analizó por ¹H-RMN el grado de funcionalización del polímero **156**, estudiando nuevamente la integral de las señales mencionadas anteriormente. La primera vez que se llevó a cabo esta reacción se consiguió funcionalizar un 84% el polímero **156**. (Figura 6.27) A pesar de que se han empleado exactamente las mismas condiciones de reacción, sin alterar ninguna condición, no se ha podido reproducir este resultado.

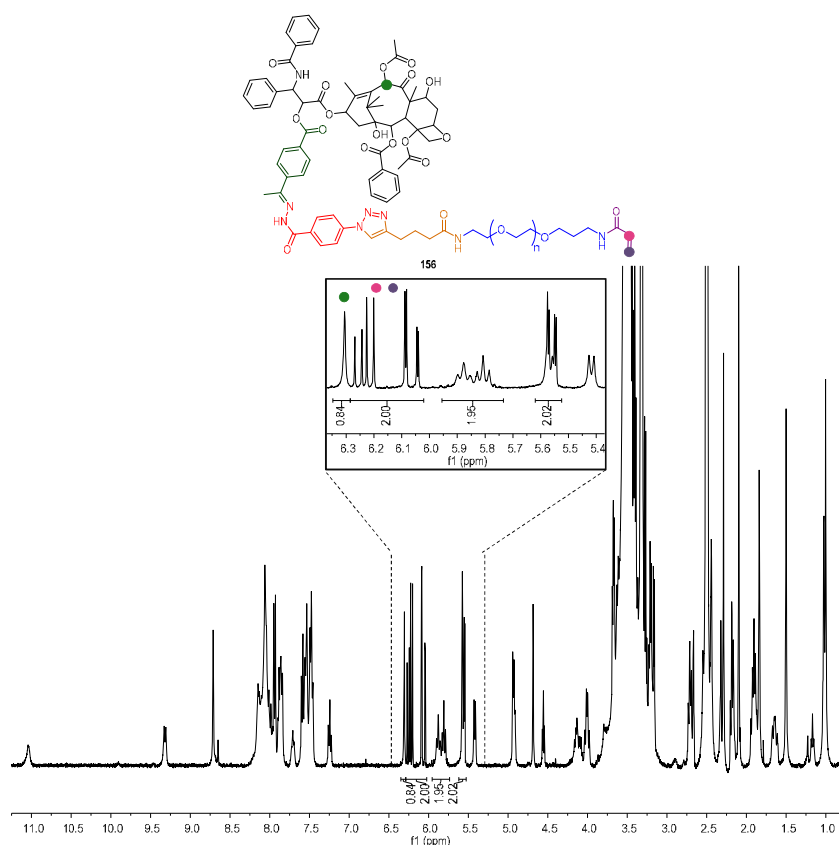


Figura 6.27 Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 298 K) del producto **156** funcionalizado al 84% con PTX.



Evaluación de la capacidad de los gliconogeles para internalizar en células tumorales

Cuando la funcionalización del polímero **156** no era completa, se optaba por poner de nuevo la reacción, añadiendo mayor número de equivalentes del derivado **142** pero esto no producía ningún cambio en la proporción de PTX en el polímero. Por ello, se probó partir de mayor proporción de PTX, sin observar nuevamente la funcionalización completa del polímero **156**. Se probó añadir TFA como catalizador de la reacción, e incluso, ácidos de Lewis, como $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sin observar la funcionalización completa. También, se partió de la correspondiente hidrazida, no observándose que la reacción funcionase. Incluso se cambió de disolvente, usando MeOH anhidro, sin mejoras en el grado de funcionalización.

Actualmente, se están llevando a cabo nuevas aproximaciones para la conjugación del polímero con el fármaco PTX. Una vez que se consiga dicho polímero junto con el glicopolímero de dendrón de 9 manos se formará el correspondiente gliconogel con PTX incorporado de manera covalente. Este nanogel será estudiado como transportador de PTX en células tumorales que sobreexpresan el receptor Endo180, es decir, las células mamarias tumorales MDA-MB-231. De esta manera, se pretenden reducir los efectos secundarios de la quimioterapia, como problemas neurotóxicos y aumentar la eficacia terapéutica del PTX.

ÁMBITO- PREFIJO**GEISER**

Nº registro

00008745e2000018397**CSV****GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO****28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular**

Capítulo 6

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

Conclusiones

- Se ha preparado el epítopo Man₉ con configuración α en el extremo reductor funcionalizado con espaciadores de diferente longitud, siguiendo una estrategia convergente, tal y como ha descrito recientemente nuestro grupo de investigación. Se han sintetizado los derivados con configuración α para reducir el esfuerzo sintético que supone obtener el otro anómero. La ruta sintética empleada permite obtener de forma eficiente, en pocos pasos de síntesis y con un elevado ahorro económico el ligando Man₉.
- Se ha seguido una estrategia sintética convergente para preparar dendrones trivalentes que presentan ligandos Man₉ con diferente configuración en el extremo reductor. Para ello, se ha llevado a cabo el acoplamiento entre un núcleo que presenta tres grupos alquinos y los correspondientes ligandos desprotegidos, funcionalizados en su extremo reductor con espaciadores de diferente longitud que presentan grupos azida, obteniéndose las correspondientes estructuras dendríticas con buenos rendimientos.
- Se han llevado a cabo experimentos de afinidad entre DC-SIGN ECD y los ligandos con diferente configuración en el extremo reductor, así como sus correspondientes dendrones, usando la técnica de polarización de fluorescencia. En estos experimentos, se ha demostrado que la configuración del extremo reductor del epítopo Man₉ no influye en la afinidad por el receptor DC-SIGN, implicado en numerosos procesos de infección e inmunológicos. Además, los resultados indican que la afinidad relativa de la interacción con estas estructuras está en el rango bajo micromolar y los valores de afinidad obtenidos con las estructuras dendríticas son muy superiores a los mostrados para los ligandos monovalentes.
- Se ha estudiado la afinidad que presentan ligandos dendríticos de manosa y del disacárido Man α 1,2Man, ampliamente utilizados en nuestro grupo de investigación, por la lectina ConA, mediante polarización de fluorescencia. En comparación con el ligando natural Man₉, el dendrón que presenta 9 unidades de manosa y el dendrón de 3 unidades del disacárido muestran valores de K_D similares. Del mismo modo, los valores de afinidad del glicodendrón de 9 unidades del disacárido y del glicodendrón trivalente de Man₉ por ConA demuestran que no es necesario la preparación de los ligandos oligosacáridos complejos como el Man₉, pudiéndose utilizar ligandos de menor complejidad desde el punto sintético para interaccionar de forma efectiva con esta lectina.
- Se ha empleado el método convergente puesto a punto en nuestro grupo de investigación para la síntesis del epítopo natural Man₉, para obtener oligomanosas de igual o menor complejidad estructural, tanto lineales como ramificadas. En concreto, se han preparado



Capítulo 7

disacáridos, trisacáridos lineales y ramificados y pentasacáridos convenientemente funcionalizados en el extremo reductor que presentan interés desde el punto biológico. Además, esta funcionalización ha permitido la construcción de sistemas multivalentes de estas oligomanosas con la finalidad de aumentar la afinidad por los receptores correspondientes. Estas nuevas plataformas multivalentes están a su vez convenientemente funcionalizadas para ser ancladas a otros soportes, pudiéndose aumentar así la multivalencia.

- Se ha evaluado la respuesta inmune que desencadenan glicodendrones de 9 unidades de Man y GlcNAc, mediante ensayos *in vitro* con células dendríticas humanas. Se ha estudiado la activación de las moléculas MHC-II y las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 de las DCs. Se ha observado que el glicodendrón de manosas presenta mayor capacidad de activar estas células que aquel que posee unidades de GlcNAc.
- Se han construido neoglicoproteínas mediante la funcionalización de OVA con el glicodendrón trivalente del ligando Man₉ y el glicodendrón nonavalente del disacárido GlcNAc. La reacción SPAAC ha demostrado ser una buena estrategia para conseguir la funcionalización de 8 residuos de Lys de la OVA. Se ha estudiado la mejora que supone la conjugación de OVA con estos glicodendrones, observándose de nuevo la capacidad de activación de las DCs por parte del ligando Man₉ mediante estudios *in vitro*. Se ha estudiado la sobreexpresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86. Se ha demostrado que la neoglicoproteína con manosas es reconocida por los receptores MR y DC-SIGN de las DCs mediante experimentos de competición con los anticuerpos de estos receptores. Actualmente, se está evaluando la capacidad que poseen estas neoglicoproteínas para provocar la activación de las células T con células OT-II.
- Se ha abordado la preparación de gliconanogeles biocompatibles y flexibles funcionalizados con unidades de manosa, estructuras dendríticas de este carbohidrato e incluso con el epítipo Man₉ del ligando natural *high-mannose*. La reacción CuAAC ha demostrado ser eficiente para la conjugación de todas las moléculas sacarídicas sobre el polímero precursor PEG. Tras la polimerización de radicales libres en miniemulsión inversa se ha logrado obtener cada uno de los gliconanogeles seleccionados. Su morfología y tamaño han sido estudiados mediante DLS, TEM y SEM, observando que su tamaño se encuentra próximo a 150 nm.
- Mediante ensayos de aglutinación por DLS y espectrometría UV-visible empleando un modelo de lectina (ConA), se ha demostrado que los gliconanogeles presentan afinidad por dicha lectina. Además, se ha observado un efecto multivalente con los gliconanogeles



Conclusiones

funcionalizados con las estructuras dendríticas y el nonasacárido Man₉, si se compara con los gliconanogeles preparados con la unidad simple de carbohidrato. Como nanogeles control, se han utilizado nanogeles funcionalizados con galactosa que no han mostrado afinidad por la lectina. Estas nuevas plataformas pueden considerarse estructuras muy interesantes y prometedoras para la presentación multivalente de carbohidratos de alta complejidad.

- Estudios *in vitro* de internalización en células mamarias mediante citometría de flujo han demostrado que los gliconanogeles de manosa son capaces de internalizarse en células mamarias tumorales MDA-MB-231, que sobreexpresan el receptor de manosa Endo180. Sin embargo, no se internalizan en células mamarias no tumorales MCF10A, que no sobreexpresan dicho receptor. Como control, se emplearon nanogeles que no presentaban carbohidratos, los cuales no son capaces de internalizarse en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Actualmente, se están llevando a cabo ensayos de internalización con los gliconanogeles decorados con el dendrón de nueve manosas, con el objetivo de aumentar la afinidad por los receptores celulares y, consecuentemente, el grado de internalización en las células tumorales.
- Se ha abordado la conjugación covalente del fármaco PTX mediante formación de un enlace hidrazona entre el fármaco y el polímero precursor PEG del nanogel. Este tipo de construcción permitirá el transporte del fármaco hasta el interior de las células tumorales, evitando roturas antes de que alcanzase este punto ya que el enlace hidrazona no es sensible al pH extracelular. Sin embargo, los ensayos realizados para conjugar este fármaco han sido hasta el momento infructuosos. Por ello, actualmente se están llevando a cabo nuevos intentos para conseguir sintetizar el compuesto buscado y poder preparar el correspondiente nanogel.



Capítulo 7

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



CAPÍTULO 8 PARTE EXPERIMENTAL

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

8.1 MATERIAL AND METHODS

All reagents and starting materials were purchased from Sigma-Aldrich and were used directly without previous purification. BocNH-PEG-NH₂ (MW 3000, PDI 1.03. *M_p* 3271 by MALDI-TOF, HABA) was obtained from Iris Biotech.

All solvents, including HPLC-grade CH₃CN, were purchased from Carlo Erba-SDS, ScharLab and Fischer (Sabadell, Spain). H₂O was purified with a Milli-Q purification system from Millipore (18.3 Ω). When anh. solvents were employed, reactions were performed under Ar atmosphere.

Column chromatography was performed with 70-230 (fine) and 230-400 (medium) mesh silica gel (Macherey-Nagel, Düren, Germany) or by Sephadex LH20, G25 or G50 (GE Healthcare, Barcelona, Spain) gel filtration. TLC was performed on silica gel 600 HF₂₅₄ (Merck), with detection by UV light ($\lambda = 254$ nm/365nm) or stained with potassium permanganate, moustain or anisaldehyde. Amicon Ultra-15 centrifugal filters (MWCO 3, 10, 30 and 50 KDa) were obtained from Millipore. Ultrafiltration was performed on stirred cells with Amicon® YM5 membranes (MWCO 5 KDa, Millipore).

Microwave reactions were performed on a Biotage® Initiator EXP US Microwave Reactor System w Robot Sixty/Eight.

Optical rotations were measured in a 1.0 cm or 1 dm tube with a Jasco P-2000 spectropolarimeter.

The NMR instrument was Bruker AdvanceIII-400/R spectrometer. Spectral assignments were made by routine one- and two-dimensional NMR experiments (¹H, ¹³C, COSY and HSQC) where appropriate. NMR chemical shifts are reported in ppm (δ units) using the residual proton solvent peaks as internal standards (¹H-NMR experiments), or the characteristic resonances of the solvent nuclei (¹³C-NMR experiments). Coupling constants (*J*) are reported in Hz and all experiments were performed at 298 K. Deuterated solvents for NMR are indicated in each case. NMR spectra were analyzed with MestReNova software.

ESI Mass spectra were obtained by electrospray ionization with Esquire 6000 (Bruker Daltonics) and ESI HRMS Mass spectra were obtained with a Q Exactive MS/MS (Thermo Scientific). MALDI-TOF MS experiments were carried out in a bench-top Microflex LRF (Bruker Daltonics, Inc.). MALDI-TOF MS instrument operates in linear mode. Different matrixes were employed, depending on the sample. For the polymers, the matrix employed were



Capítulo 8

2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid (HABA), trans-2-[3-(4-*tert*-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile (DCTB) and α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) and NaCl and trifluoroacetic acid (TFA) were used as cationization agents.

UV measurements were carried out with a JASCO V-650 Spectrometer.

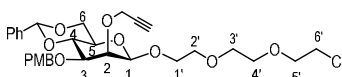
DLS measurements were performed on a Malvern Nano ZS (Malvern Instruments, U.K.) operating at 633 nm with a 173° scattering angle. Nanogels were dissolved in MilliQ water and the solutions were filtered through a 0.45 μ m nylon filter before the measurements. The stated mean values resulted from at least 3 measurements.

8.2 SYNTHETIC PROCEDURES, STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ASSAYS

Please note that only non-previously described compounds, or those whose synthesis have been improved, are included in the following sections. The rest of compounds in this PhD Thesis have been synthesized following literature procedures.

8.2.1 Synthesis and multivalent presentation of oligomannoses. Studies of their affinity for lectins

2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethyl 4,6-O-benzylidene-2-O-(prop-2-ynyl)-3-O-p-methoxybenzyl- β -D-mannopyranoside (**4**).



To a solution of donor **3**¹²⁵ (2.28 g, 4.29 mmol), BSP (1.11 g, 5.15 mmol), TTBP (1.65 g, 6.43 mmol), and 4 Å molecular sieves in anh. CH₂Cl₂ (40 mL), at -60°C, Tf₂O (940 μ L, 5.58 mmol) were added. After 30 min of stirring at -60°C, 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol (**17**) (1.95 mL, 12.87 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for further 1 more h at -60°C, and allowed to reach room temperature (rt). Then, the reaction mixture was filtered through celite and washed with CH₂Cl₂ and NaHCO₃ sat. aq. soln. The organic layer was separated,

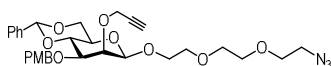
260



dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/*n*-hexane 1:7 → 1:2) to give the compound **4** (717 mg, 1.24 mmol, 29%) as a yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.49 (m, 2H, H-Ar), 7.42-7.30 (m, 5H, H-Ar), 6.85 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-Ar), 5.58 (s, 1H, H_{acetal}), 4.74 (AB system, 2H, CH_{2,PMB}), 4.60-4.54 (m, 3H, H-1, CH₂CCH), 4.29 (dd, 1H, *J* = 10.4 and 4.8 Hz, H-6a), 4.16 (m, 1H, H-2), 4.09 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-4), 3.99 (m, 1H, H-1'a), 3.89 (t, *J* = 10.3 Hz, 1H, H-6b), 3.80 (s, 3H, CH_{3,PMB}), 3.77-3.56 (m, 12H, H-1'b, CH₂O), 3.31 (td, *J* = 9.7 and 4.9 Hz, 1H, H-5), 2.48 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, CCH); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 158.8 (C_{ipso}-Ar), 137.3 (C_{ipso}-Ar), 129.9 (C_{ipso}-Ar), 128.9 (C-Ar), 128.4 (C_{ipso}-Ar), 127.8 (C-Ar), 125.7 (C-Ar), 113.3 (C-Ar), 101.5 (C-1), 100.9 (CH_{acetal}), 80.0 (CCH), 77.9 (C-4), 76.5 (C-3), 74.9 (CCH), 74.7 (C-2), 72.1 (CH_{2,PMB}), 71.5 (CH₂O), 70.9 (CH₂O), 70.2-69.9 (CH₂O), 68.7 (CH₂O), 68.1 (C-6), 67.0 (C-5), 61.2 (CH₂O), 59.6 (CH₂CCH), 54.8 (CH_{3,PMB}), 42.5 (CH₂Cl); ESI-MS: *m/z* calcd. for C₃₀H₃₇ClO₉: 576.2; found: 599.3 [M+Na]⁺.

**2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl
methoxybenzyl-β-D-mannopyranoside (5).**

4,6-O-benzylidene-2-O-(prop-2-ynyl)-3-O-*p*-



Method A: To a solution of chloro derivative **4** (715 mg, 1.24 mmol) in DMF (10 mL), NaN₃ (807 mg, 12.41 mmol) was added, and the mixture was stirred at 70°C for 48 h. After evaporation of the solvent, the residue was diluted with CH₂Cl₂, and washed with water. The organic phase was dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/*n*-hexane 1:1), to give the compound **5** (282 mg, 0.48 mmol, 39%) as a yellow oil.

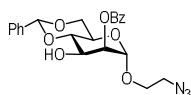
Method B: To a solution of donor **3** (568 mg, 1.07 mmol), BSP (276 mg, 1.28 mmol), TTBP (410 mg, 1.60 mmol), and 4 Å molecular sieves in anh. CH₂Cl₂ (12 mL), at -60°C, Tf₂O (233 μL, 1.39 mmol) were added. After 30 min of stirring at -60°C, 2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethanol (1.95 mL, 12.87 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for further 1 more h at -60°C, and allowed to reach rt. Then, the reaction mixture was filtered through celite and washed with CH₂Cl₂ and NaHCO₃ sat. aq. soln. The organic layer



Capítulo 8

was separated, dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/*n*-hexane 1:3) to give the compound **5** (222 mg, 0.38 mmol, 36%) as a yellow oil. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.48 (m, 2H, H-Ar), 7.44-7.27 (m, 5H, H-Ar), 6.84 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-Ar), 5.57 (s, 1H, H_{acetal}), 4.73 (AB system, 2H, CH_{2,PMB}), 4.63-4.50 (m, 3H, H-1, CH₂CCH), 4.29 (dd, 1H, *J* = 10.4 and 4.9 Hz, H-6a), 4.15 (m, 1H, H-2), 4.09 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-4), 3.99 (m, 1H, H-1'a), 3.88 (t, *J* = 10.3 Hz, 1H, H-6b), 3.79 (s, 3H, CH_{3,PMB}), 3.75-3.56 (m, 10H, H-1'b, CH₂O), 3.37 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-6'), 3.31 (td, *J* = 9.7 and 4.9 Hz, 1H, H-5), 2.47 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, CCH); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 159.2 (C_{ipso}-Ar), 137.6 (C_{ipso}-Ar), 130.3 (C_{ipso}-Ar), 129.4 (C-Ar), 128.9 (C_{ipso}-Ar), 128.2 (C-Ar), 126.1 (C-Ar), 113.8 (C-Ar), 102.0 (C-1), 101.4 (CH_{acetal}), 80.4 (CCH), 78.4 (C-4), 76.7 (C-3), 75.4 (CCH), 74.8 (C-2), 72.1 (CH_{2,PMB}), 70.8 (CH₂O), 70.5 (CH₂O), 70.1 (CH₂O), 69.2 (CH₂O), 68.6 (C-6), 67.5 (C-5), 60.1 (CH₂CCH), 55.3 (CH_{3,PMB}), 50.7 (CH₂N₃); ESI-MS: *m/z* calcd. for C₃₀H₃₇N₃O₉: 583.3; found: 606.3 [M+Na]⁺ and 622.2 [M+K]⁺.

2-azidoethyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-mannopyranoside (**24**).

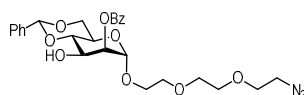


To a solution of 2-azidoethoxy α -D-mannopyranose (**22**)⁸² (800 mg, 3.21 mmol) in CH₃CN (8 mL), CSA (186 mg, 0.8 mmol) and benzaldehyde dimethyl acetal (0.5 mL, 3.55 mmol) were added at rt. The reaction mixture was stirred on and the mixing became solidified during addition of the reagent, which indicates the progress of the reaction. The reaction mixture was quenched with Et₃N (250 μ L) and dissolved in excess of EtOAc and water. The reaction mixture was extracted twice with EtOAc and the combined organic layers were dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. After being dissolved in anh. toluene (29 mL), dibutyltin oxide (879 mg, 3.55 mmol) was added to the resulting mixture containing the 4,6-*O*-benzylidene derivative. The reaction mixture was kept under reflux at 110 °C for 4 h, cooled to rt and PMBCl (0.5 mL, 3.55 mmol) and TBAI (370 mg, 3.55 mmol) were added to it under Ar atmosphere. The reaction mixture was kept under reflux at 110 °C for 1 h. After removal the solvent, the crude was diluted with CH₂Cl₂ and washed with water. The organic layer was dried



over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. To the resulting mixture containing 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-*p*-methoxybenzyl derivative in CH₂Cl₂ (15 mL), Bz₂O (1.5 g, 6.42 mmol), Et₃N (1.3 mL, 9.63 mmol) and a catalytic amount of DMAP were subsequently added and the reaction was stirred at rt for 1 h. The reaction mixture was washed with NaHCO₃ sat. aq. soln. The organic phase was dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. Finally, to a stirred solution of the α-D-mannoside derivative in CH₂Cl₂ (70 mL) and water (2.7 mL), DDQ (2.23 g, 9.63 mmol) was added at rt. After 1 h, NaHCO₃ sat. aq. soln. was added, and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The extract was washed several times with NaHCO₃ sat. aq. soln. and then dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/*n*-hexane 1:3) to give the compound **24** (320 mg, 0.72 mmol, 26%) as a colourless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37$ (*c* 1.00, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.11 (m, 2H, H-Ar), 7.60 (m, 1H, H-Ar), 7.56-7.45 (m, 4H, H-Ar), 7.43-7.35 (m, 3H, H-Ar), 5.67 (s, 1H, H_{acetal}), 5.52 (dd, *J* = 3.6 and 1.6 Hz, 1H, H-2), 5.01 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-1), 4.41 (dt, *J* = 9.6 and 3.9 Hz, 1H, H-3), 4.33 (dd, *J* = 9.9 and 4.4 Hz, 1H, H-6a), 4.06 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-4), 4.03-3.84 (m, 3H, H-5, H-6b, H-1'a), 3.73-3.63 (m, 1H, H-1'b), 3.55-3.40 (m, 2H, H-2'), 2.32 (d, *J*_{OH,3} = 4.2 Hz, 1H, OH). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.0 (CO), 137.1 (C_{ipso}-Ar), 133.5 (C-Ar), 129.9 (C-Ar), 129.5 (C_{ipso}-Ar), 129.3 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.3 (C-Ar), 126.3 (C-Ar), 102.2 (C_{acetal}), 98.7 (C-1), 79.2 (C-4), 72.5 (C-2), 68.7 (C-6), 67.1 (C-3), 66.9 (CH₂O), 63.8 (C-5), 50.4 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₃N₃O₇: 441.2; found: 464.2 [M+Na]⁺ and 905.4 [2M+Na]⁺.

2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-α-D-mannopyranoside (25).



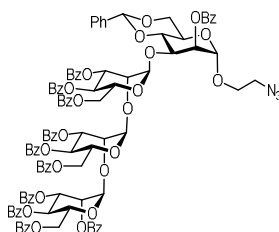
To a solution of 2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl-α-D-mannopyranose (**23**)¹³⁷ (4.74 g, 14.1 mmol) in CH₃CN (40 mL), CSA (833 mg, 3.5 mmol) and benzaldehyde dimethyl acetal (2.3 mL, 15.5 mmol) were added at rt. The reaction mixture was stirred on and the mixing became solidified during addition of the reagent, which indicates the progress of the reaction. The



Capítulo 8

reaction mixture was quenched with Et₃N (1.5 mL) and dissolved in an excess of EtOAc and water. The reaction mixture was extracted twice with EtOAc and the combined organic layers were dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. After being dissolved in anh. toluene (100 mL), dibutyltin oxide (3.85 g, 15.5 mmol) was added to the resulting mixture containing the 4, 6-*O*-benzylidene derivative. The reaction mixture was kept under reflux at 110 °C for 4 h, cooled to rt and then PMBCl (2.1 mL, 15.5 mmol) and TBAI (5.83 g, 15.5 mmol) were added under Ar atmosphere. The reaction mixture was kept under reflux at 110 °C for 1 h. After removal the solvent, the crude was diluted with CH₂Cl₂ and washed with water. The organic layer was dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. To the resulting mixture containing 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-*p*-methoxybenzyl derivative in CH₂Cl₂ (100 mL), Bz₂O (6.4 g, 28.1 mmol), Et₃N (5.9 mL, 42.2 mmol) and a catalytic amount of DMAP were subsequently added and the reaction was stirred at rt for 1 h. The reaction mixture was washed with NaHCO₃ sat. aq. soln. The organic phase was dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. Finally, to a stirred solution of the α-D-mannoside derivative in CH₂Cl₂ (100 mL) and water (4 mL), DDQ (9.8 g, 42.2 mmol) was added at rt. After 1 h, NaHCO₃ sat. aq. soln. was added, and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The extract was washed several times with NaHCO₃ sat. aq. soln. and then dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/*n*-hexane 1:3) to give the compound **25** (1.92 g, 3.62 mmol, 26%) as a colourless oil. $[\alpha]_D^{20} = -17$ (c 1.00, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.10 (m, 2H, H-Ar), 7.58 (m, 1H, H-Ar), 7.55-7.43 (m, 4H, H-Ar), 7.43-7.32 (m, 3H, H-Ar), 5.64 (s, 1H, H_{acetal}), 5.48 (dd, *J* = 3.6, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-2), 4.97 (d, *J* = 1.6, 1H, H-1), 4.42-4.24 (m, 2H, H-3, H-6a), 4.08-3.92 (m, 2H, H-4, H-5), 3.92-3.79 (m, 2H, H-6b, H-1'a), 3.73-3.61 (m, 9H, CH₂O), 3.34 (t, *J* = 5, 1 Hz, CH₂N₃), 2.68 (br s, 1H, OH). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.1 (CO), 137.3 (C_{ipso}-Ar), 133.5 (C-Ar), 129.9 (C-Ar), 129.6 (C_{ipso}-Ar), 129.2 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.3 (C-Ar), 126.3 (C-Ar), 100.2 (C_{acetal}), 98.6 (C-1), 79.5 (C-4), 72.7 (C-2), 70.9, 70.7, 70.2, 70.1, 68.9 (CH₂O), 67.4 (C-6), 67.2 (C-3), 63.5 (C-5), 50.7 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₂₆H₃₁N₃O₉: 529.2; found: 552.3 [M+Na]⁺ y 1081.5 [2M+Na]⁺.



Tetrasaccharide 36.

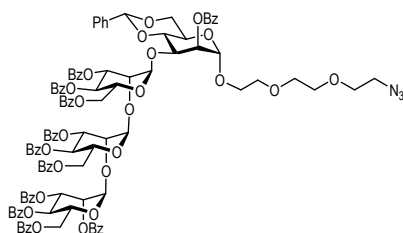
To a solution of acceptor **24** (49 mg, 0.11 mmol), donor **33**⁸⁷ (275 mg, 0.17 mmol) and 4 Å molecular sieves in anh. CH₂Cl₂ (5.8 mL) were added and the mixture was stirred at -20°C for 30 min. Then, NIS (39 mg, 0.17 mmol) and TfOH (2.9 μL, 0.03 mmol) were added and the reaction was stirred at -20°C for 15 min. The reaction was quenched with NaHCO₃ sat. aq. soln. The reaction mixture was filtered through Celite and washed several times with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with Na₂S₂O₃ sat. aq. soln. and then dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/*n*-hexane 1:2 1:1.25) to give the tetrasaccharide **36** (193 mg, 0.10 mmol, 88%) as a white solid. $[\alpha]_D^{20} = -22$ (c 1.00, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.22 (m, 1H, HAr), 8.19-8.12 (m, 2H, HAr), 8.09-7.92 (m, 7H, HAr), 7.92-7.81 (m, 7H, HAr), 7.76-7.68 (m, 2H, HAr), 7.64-7.19 under CDCl₃ (m, 36H, HAr), 7.14-6.95 (m, 4H), 6.78 (m, 1H), 6.05-5.81 (m, 5H), 5.79-5.69 (m, 2H), 5.64 (dd, *J* = 9.2, *J* = 3.1 Hz, 1H), 5.57 (s, 1H, H-1), 5.49 (br s, 1H, H-acetal), 5.35 (s, 1H, H-1), 5.05 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-1), 4.91 (s, 1H, H-1), 4.72-4.50 (m, 4H), 4.47 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H), 4.38 (m, 1H), 4.35-4.13 (m, 4H), 4.07-3.94 (m, 3H), 3.94-3.79 (m, 3H), 3.65 (m, 1H), 3.35 (m, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.4 (CO), 166.0 (CO), 165.9 (CO), 165.8 (CO), 165.5 (CO), 165.3 (CO), 165.3 (CO), 165.2 (CO), 165.2 (CO), 165.0 (CO), 164.8 (CO), 137.0 (C-Ar), 133.7 (C-Ar), 133.5 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 133.2 (C-Ar), 133.1 (C-Ar), 133.1 (C-Ar), 133.1 (C-Ar), 133.0 (C-Ar), 132.8 (C-Ar), 130.1-129.6 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 129.2 (2C-Ar), 129.1 (2C-Ar), 128.9-128.3 (C-Ar) 101.9 (C-1), 99.8 (C-1, C-1), 90.1 (C-1), 79.1, under CDCl₃ (1C), 71.9, 71.4, 70.4, 70.1, 69.8, 69.7, 69.5 (2C), 68.8, 67.6, 67.2, 67.0, 66.3, 64.1, 63.6, 63.5, 62.9 (2C), 62.5, 50.4 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for



Capítulo 8

$C_{110}H_{93}N_3O_{32}$: 1967.6; found: 1990.4 $[M+Na]^+$ and 1006.5 $[M+2Na]^{2+}$. ESI-HRMS: m/z calcd. for $C_{110}H_{93}N_3O_{32}Na$ $[M+Na]^+$: 1990.5634; found: 1990.5609.

Tetrasaccharide 37.

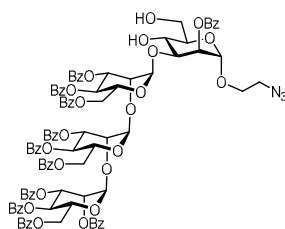


To a solution of acceptor **25** (132 mg, 0.25 mmol), donor **33**⁸⁷ (535 mg, 0.32 mmol) and 4 Å molecular sieves in anh. CH_2Cl_2 (13 mL) were added and the mixture was stirred at $-20^\circ C$ for 30 min. Then, NIS (77 mg, 0.32 mmol) and TfOH (4.4 μL , 0.05 mmol) were added and the reaction was stirred at $-20^\circ C$ for 15 min. The reaction was quenched with $NaHCO_3$ sat. aq. soln. The reaction mixture was filtered through Celite and washed several times with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with $Na_2S_2O_3$ sat. aq. soln. and then dried over anh. $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Toluene/Acetone 4:1) to give the tetrasaccharide **37** (440 mg, 0.21 mmol, 86%) as a white solid. $[\alpha]_D^{20} = -11$ (c 1.00, $CHCl_3$). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.28-8.13 (m, 4H, H-Ar), 8.09-7.81 (m, 17H, H-Ar), 7.72 (m, 2H, H-Ar), 7.64-7.54 (m, 2H, H-Ar), 7.53-7.20 (m, 29H, H-Ar), 7.16-6.95 (m, 5H, H-Ar), 6.79 (m, 1H, H-Ar), 6.06-5.82 (m, 5H), 5.76 (m, 1H), 5.71 (dd, $J = 3.8$, $J = 1.5$ Hz, 1H), 5.63 (dd, $J = 9.2$, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.57 (s, 1H, H-1), 5.46 (br s, 1H, H_{acetal}), 5.35 (s, 1H, H-1), 5.06 (s, 1H, H-1), 4.91 (s, 1H, H-1), 4.75-4.52 (m, 4H), 4.47 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-2), 4.41-4.12 (m, 5H), 4.09-3.94 (m, 3H), 3.91-3.77 (m, 3H), 3.75-3.57 (m, 10H), 3.35-3.28 (m, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.5 (CO), 166.1 (CO), 166.0 (CO), 165.8 (CO), 165.7 (CO), 165.5 (2CO), 165.3 (CO), 165.2 (2CO), 165.0 (CO), 164.8 (CO), 137.1 (C-Ar), 133.8 (C-Ar), 133.6 (C-Ar), 133.5 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 133.2 (C-Ar), 133.0 (C-Ar), 132.9 (C-Ar), 130.1-129.7 (C-Ar), 129.4 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.2 (2C-Ar), 129.1 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 128.7-128.3 (C-Ar), 125.8 (C-Ar),



101.7 (C-1), 99.8 (C-1), 99.7 (2C-1), 98.9 (C-1), 79.2, 72.1, 71.8, 70.9-70.8, 70.4-70.1, 69.8, 69.7, 69.6, 69.4, 69.0, 68.9, 67.1, 67.0, 66.4, 63.7, 63.0, 62.6, 50.7 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₁₁₄H₁₀₁N₃O₃₄: 2055.6; found: 2094.4 [M+K]⁺, 2078.6 [M+Na]⁺, 1050.7 [M+Na]⁺. ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₁₁₄H₁₀₁N₃O₃₄Na [M+Na]⁺: 2078.6159; found: 2078.6139.

Tetrasaccharide 38.

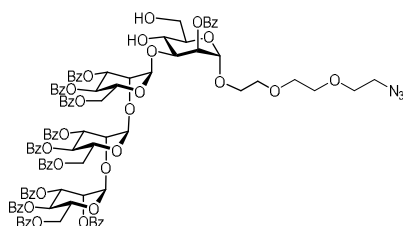


p-Toluenesulfonic acid monohydrate (25 mg, 0.13 mmol) was added to a stirred solution of tetrasaccharide **36** (173 mg, 0.09 mmol) in CH₃CN (4.4 mL) at rt. After 24 h, the reaction mixture was quenched with Et₃N (30 μL) and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography on silica gel (acetone/toluene 1:5) to give the tetrasaccharide **38** (130 mg, 0.07 mmol, 78%) as a white amorphous solid. $[\alpha]_D^{20} = -15$ (c 1.00, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.14 (m, 2H, HBz), 8.07-7.93 (m, 13H, HBz), 7.90-7.82 (m, 4H, HBz), 7.70 (m, 2H, HBz), 7.61-7.18 (m, 34H, HBz), 6.13 (t, *J* = 10.2 Hz, 1H), 6.03-5.90 (m, 3H), 5.84-5.72 (m, 2H), 5.67-5.57 (m, 3H, H-1), 5.52 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-1), 5.09 (br s, 1H, H-1), 5.00 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H-1), 4.73-4.31 (m, 12H), 4.31-4.15 (m, 2H), 4.01 (m, 2H), 3.95-3.78 (m, 3H), 3.59 (dt, *J* = 10.4 and 4.8 Hz, 1H), 2.34 (m, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.4 (2CO), 166.3 (CO), 166.0 (CO), 165.9 (CO), 165.7 (2CO), 165.5 (CO), 165.2 (2CO), 164.9 (CO), 133.6 (C-Ar), 133.5 (C-Ar), 133.4 (2C-Ar), 133.3 (C-Ar), 133.2 (2C-Ar), 133.0 (C-Ar), 130.2-129.8 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.5 (C-Ar), 129.4 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 129.0 (2C-Ar), 128.9 (C-Ar), 128.6-128.4 (C-Ar), 100.8 (C-1), 99.4 (C-1), 98.1 (2C-1), 76.4, 73.3, 72.4, 70.5, 70.3, 69.9, 69.7-69.6, 69.4, 68.2, 67.8, 67.0, 66.6, 63.9-63.8, 62.6, 62.3, 50.4 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₁₀₃H₈₉N₃O₃₂: 1879.5; found:



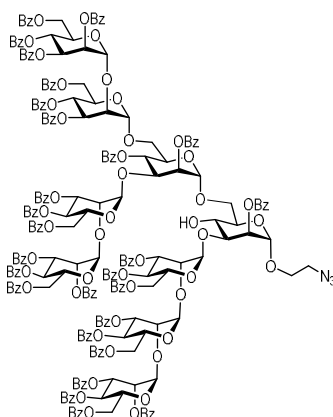
Capítulo 8

1902.4 [M+Na]⁺ and 962.5 [M+2Na]²⁺. ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₁₀₃H₈₉N₃O₃₂Na [M+Na]⁺: 1902.5321; found: 1902.5307.

Tetrasaccharide 39.

p-Toluenesulfonic acid monohydrate (57 mg, 0.29 mmol) was added to a stirred solution of tetrasaccharide **37** (402 mg, 0.19 mmol) in CH₃CN (10 mL) at rt. After 24 h, the reaction mixture was quenched with Et₃N (60 μL) and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/toluene 1:5) to give the tetrasaccharide **39** (257 mg, 0.13 mmol, 67%) as a white amorphous solid. $[\alpha]_D^{20} = -12$ (*c* 1.00, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.13 (m, 2H, HBz), 8.07-7.93 (m, 15H, HBz), 7.91-7.82 (m, 4H, HBz), 7.71 (dd, *J* = 8.4, *J* = 1.4 Hz, 2H, HBz), 7.61-7.18 (m, 32H, HBz), 6.13 (t, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.00-5.89 (m, 3H), 5.85-5.72 (m, 2H), 5.66-5.56 (m, 3H, H-1), 5.52 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-1), 5.09 (br s, 1H, H-1), 5.00 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-1), 4.66-4.15 (m, 12H), 4.06-3.93 (m, 2H), 3.93-3.78 (m, 3H), 3.74-3.56 (m, 11H), 3.37 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH₂N₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.4 (CO), 166.2 (CO), 165.9 (CO), 165.9 (CO), 165.6 (CO), 165.6 (CO), 165.4 (CO), 165.1 (CO), 165.1 (CO), 164.9 (CO), 133.5 (C-Ar), 133.4 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 133.1 (C-Ar), 133.0 (C-Ar), 130.1 (C-Ar), 130.0 (C-Ar), 129.9 (C-Ar), 129.9 (C-Ar), 129.8 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 128.8 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 100.8 (C-1), 99.4 (C-1), 97.9 (C-1), under CDCl₃ (1C), 72.8, 72.4, 70.7, 70.7, 70.5, 70.3, 70.2, 70.1, 69.8, 69.7, 69.6, 69.2, 68.5, 67.7, 67.1, 66.5, 63.7, 62.6, 62.4, 50.7 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₁₀₇H₉₇N₃O₃₄: 1967.6; found: 1990.4 [M+Na]⁺ and 1006.5 [M+2Na]²⁺. ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₁₀₇H₉₇N₃O₃₄Na [M+Na]⁺: 1990.5846; found: 1990.5808.



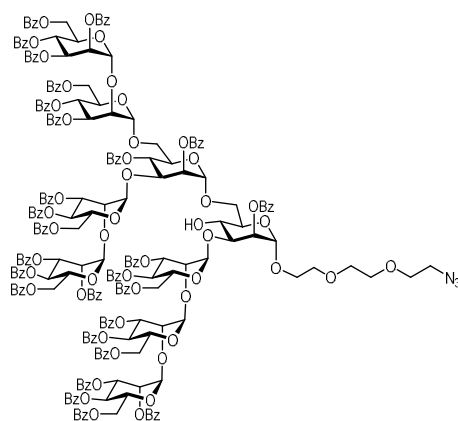
Nonasaccharide 40.

To a solution of acceptor **38** (110 mg, 0.06 mmol), donor **29**⁸⁷ (228 mg, 0.09 mmol) and 4 Å molecular sieves in anh. CH₂Cl₂ (4.1 mL) were added and the mixture was stirred at -20°C for 30 min. Then, NIS (42 mg, 0.09 mmol) and TfOH (3.1 µL, 17.55 µmol) were added and the reaction was stirred at -20°C for 15 min. The reaction was quenched with NaHCO₃ sat. aq. soln. The reaction mixture was filtered through Celite and washed several times with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with Na₂S₂O₃ sat. aq. soln. and then dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/*n*-hexane 4:5 → 1:1) to give the nonasaccharide **40** (185 mg, 0.04 mmol, 73%) as a white solid. $[\alpha]_D^{20} = -19$ (c 1.00, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.30-7.67 (m, 52H, HBz), 7.56-7.18 (m, 80H, HBz), 6.99 (m, 2H, HBz), 6.81 (t, *J* = 7.5, 1H, HBz), 6.22-5.64 (m, 18H, H-1), 5.55 (s, 1H, H-1), 5.46 (m, 2H, 2H-1), 5.32 (s, 1H, H-1), 5.18 (s, 1H, H-1), 5.05 (m, 2H, 2H-1), 4.74-4.02 (m, 37H, H-1), 3.84-3.72 (m, 2H), 3.49-3.32 (m, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.5 (CO), 166.4 (CO), 166.4 (CO), 166.3 (CO), 166.1 (CO), 166.0 (CO), 165.8 (CO), 165.6 (CO), 165.6 (CO), 165.4 (CO), 165.4 (CO), 165.3 (CO), 165.0 (CO), 165.0 (CO), 164.8 (CO), 164.8 (CO), 164.6 (CO), 133.5 (CBz), 133.4 (CBz), 133.4 (CBz), 133.2 (CBz), 133.2 (CBz), 133.1 (CBz), 130.2-129.5 (CBz), 129.5 (CBz), 129.5 (CBz), 129.3 (CBz), 129.2 (CBz), 129.2 (CBz), 129.0 (CBz), 129.0 (CBz), 128.9 (CBz), 128.9 (CBz), 128.7-128.3



Capítulo 8

(CBz), 101.1 (C-1), 100.9 (C-1), 100.3 (C-1), 99.9 (C-1), 99.5 (2C-1), 98.5 (C-1), 97.7 (C-1), 97.5 (C-1), 78.2, 77.9, under CDCl₃ (C), 75.6, 72.4, 72.2, 71.9, 71.1, 70.8, 70.5, 70.1-69.4, 68.9, 68.1, 68.0, 67.7, 67.3-67.0, 66.6, 66.4, 66.1, 63.7, 63.5, 63.1, 62.6, 62.4, 50.4 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₂₄₅H₂₀₃N₃O₇₃: 4354.2; found: 2200.1 [M+2Na]⁺² and 1473.5 [M+3Na]⁺³. ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₂₄₅H₂₀₃N₃O₇₃Na [M+Na]⁺²: 2189.1115; found: 2189.1088.

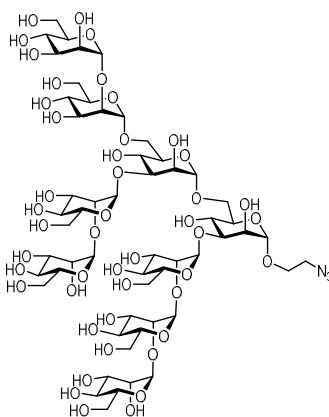
Nonasaccharide 41.

To a solution of acceptor **39** (233 mg, 0.12 mmol), donor **29**⁸⁷ (461 mg, 0.18 mmol) and 4 Å molecular sieves in anh. CH₂Cl₂ (8.5 mL) were added and the mixture was stirred at -20°C for 30 min. Then, NIS (42 mg, 0.18 mmol) and TfOH (3.1 μL, 35.50 μmol) were added and the reaction was stirred at -20°C for 15 min. The reaction was quenched with NaHCO₃ sat. aq. soln. The reaction mixture was filtered through Celite and washed several times with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with Na₂S₂O₃ sat. aq. soln. and then dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/*n*-hexane 4:5 → 1:1) to give the nonasaccharide **41** (415 mg, 0.09 mmol, 79%) as a white solid. $[\alpha]_D^{20} = -23$ (c 1.00, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.25-7.72 (m, 52H, HBz), 7.66-7.10 (m, 80H, HBz), 6.95 (t, *J* = 7.7, 2H, HBz), 6.80 (t, *J* = 7.5, 1H, HBz), 6.15-5.76 (m, 16H), 5.72 (dd, *J* = 9.9, *J* = 3.3, 1H), 5.69-5.59 (m, 3H, H-1), 5.50 (s, 1H, H-1), 5.45-5.41



(m, 2H, 2H-1), 5.28 (s, 1H, H-1), 5.12 (s, 1H, H-1), 5.06-4.99 (m, 2H, 2H-1), 4.78-3.89 (m, 36H, H-1), 3.81-3.44 (m, 11H), 3.31-3.21 (m, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 166.5 (CO), 166.4 (CO), 166.3 (CO), 166.0 (CO), 166.0 (CO), 165.8 (CO), 165.6 (CO), 165.6 (CO), 165.5 (CO), 165.4 (CO), 165.3 (CO), 165.1 (CO), 164.9 (CO), 164.8 (CO), 164.8 (CO), 164.6 (CO), 133.5-132.9 (CBz), 130.2-129.5 (CBz), 129.3 (CBz), 129.3 (CBz), 129.2 (CBz), 129.1 (CBz), 129.0 (CBz), 128.9 (CBz), 128.9 (CBz), 128.7-128.2 (CBz), 101.1 (C-1), 100.3 (C-1), 99.9 (C-1), 99.5 (C-1), 99.4 (2C-1), 98.6 (C-1), 97.5 (C-1), 97.4 (C-1), 78.2, 77.9, under CDCl_3 (1C), 72.5, 71.8, 71.5, 70.9, 70.7, 70.6, 70.5, 70.3, 70.2, 70.1, 70.0, 69.8, 69.7, 69.6, 69.5, 69.4, 69.3, 69.2, 68.9, 68.3, 67.7, 67.2, 67.1, 67.0, 66.6, 66.4, 66.0, 63.6, 63.5, 63.1, 62.6, 62.5, 62.4, 50.6 (CH_2N_3). ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{249}\text{H}_{211}\text{N}_3\text{O}_{75}$: 4442.3; found: 2244.7 $[\text{M}+2\text{Na}]^{+2}$ and 1503.9 $[\text{M}+3\text{Na}]^{+3}$. ESI-HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{249}\text{H}_{212}\text{N}_3\text{O}_{75}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^{+2}$: 2233.1364; found: 2233.1364.

Nonasaccharide 13.



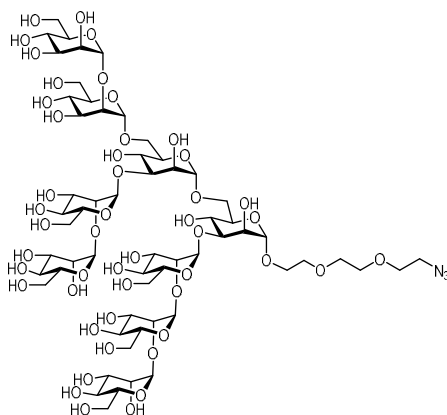
To a solution of compound **40** (166 mg, 0.04 mmol) in MeOH/Toluene (4:1, 1.7 mL), NaOMe (11 mg, 0.20 mmol) and a NaOH 2M solution (0.7 mL) were added and the reaction was stirred at 50°C for 5 h. After neutralization with Amberlite IR-120H⁺, the solution was filtered and concentrated. The crude was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex G-25, H₂O/MeOH 9/1), giving Man₉ (**13**) (55 mg, 0.04 mmol, 93%) as a white amorphous solid. ^1H -



Capítulo 8

NMR (400 MHz, D₂O) δ: 5.40 (s, 1H, H-1), 5.33 (s, 1H, H-1), 5.30 (s, 1H, H-1), 5.15 (s, 1H, H-1), 5.08-5.01 (m, 3H, 3H-1), 4.88 (s, 1H, H-1), under D₂O (1H, H-1), 4.19-3.60 (m, 58H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ: 102.2 (2C-1), 100.8 (2C-1), 100.6 (2C-1), 100.0 (C-1), 99.5 (C-1), 98.0 (C-1), 78.8-78.5, 73.2, 73.2, 72.7, 71.1, 71.1, 70.3-70.0, 69.6, 66.9, 66.8, 66.6, 65.7, 65.5, 65.2, 61.2-61.0, 50.2 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₅₆H₉₅N₃O₄₆: 1545.5; found: 1568.2 [M+Na]⁺, 795.5 [M+2Na]⁺².

Nonasaccharide 14.



To a solution of compound **41** (395 mg, 0.09 mmol) in MeOH/Toluene (4:1, 3.85 mL), NaOMe (26 mg, 0.48 mmol) and a NaOH 2M solution (1.6 mL) were added and the reaction was stirred at 50°C for 5 h. After neutralization with Amberlite IR-120H⁺, the solution was filtered and concentrated. The crude was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex G-25, H₂O/MeOH 9/1), giving Man₉ (**14**) (120 mg, 0.07 mmol, 83%) as a white amorphous solid. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ: 5.41 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H-1), 5.35 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H-1), 5.31 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-1), 5.15 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H-1), 5.05-5.01 (m, 3H, 3H-1), 4.84 (s, 1H, H-1), 4.74 (s, 1H, H-1), 4.18-3.60 (m, 64H), 3.52 (t, *J* = 4.3 Hz, 2H, H-6'). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ: 102.3 (C-1), 102.2 (2C-1), 100.7 (2C-1), 100.6 (C-1), 100.1 (C-1), 99.5 (C-1), 98.0 (C-1), 78.9, 78.9, 78.6, 78.4, 73.3-73.2, 72.7, 71.1, 70.8, 70.3-69.9, 69.7, 69.6, 69.3, 66.9-66.7, 65.6, 65.4, 65.1, 61.1-60.9, 50.1 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₆₀H₁₀₃N₃O₄₈: 1633.6; found:



1656.2 [M+Na]⁺, 839.5 [M+2Na]²⁺. ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₆₀H₁₀₃N₃O₄₈Na [M+Na]⁺: 1656.5603; found: 1656.5603

Glycodendron 45.

Nonasaccharide **13** (22.0 mg, 14.23 μmol) and [2-[2-(2-Chloroethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxymethyl trikis(2-propyniloxymethyl)-methane (**43**) (1.6 mg, 3.59 μmol) were dissolved in H₂O/DMSO (1:1, 0.5 mL). Fresh solutions of CuSO₄·5H₂O (1.80 μmol), tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA) (3.59 μmol) and sodium ascorbate (5.39 μmol) were added to a sealed microwave vial. The solution was heated at 60°C in a microwave oven for 30 min. A metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 20 min at rt. After that, the mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex G-50, H₂O/MeOH 9:1) yielding the glycodendron **45** (12 mg, 2.37 μmol, 66%) as a white amorphous solid. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ: 8.06 (s, 3H, H_{triazole}), 5.41 (br s, 3H, 3H-1), 5.37-5.27 (m, 6H, 6H-1), 5.15 (br s, 3H, 3H-1), 5.09-5.02 (m, 9H, 9H-1), under D₂O (6H, 6H-1), 4.67 (m, 3H, OCH₂CHHN), 4.57 (br s, 3H, OCHHC_{triazole}), 4.14-3.62 (m, 198H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ: 144.2, (C_{triazole}), 125.4 (CH_{triazole}), 102.2 (9C-1), 100.7 (9C-1), 99.8 (3C-1), 99.5 (3C-1), 98.0 (3C-1), 78.8-78.4, 73.3-73.2, 72.7, 72.0, 71.1-71.0, 70.8, 70.3, 70.0, 70.0, 69.7, 69.6, 69.5, 66.9, 66.8, 65.9, 65.8, 65.6, 65.4, 65.2, 64.8, 63.4 (OCH₂C_{triazole}), 62.5, 61.0, 50.1 (OCH₂CH₂N), 43.2 (OCH₂CH₂Cl). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₁₉₁H₃₂₀N₉O₁₄₅Cl: 5080.7; found: 2562.9 [M+2Na]²⁺, 1715.5 [M+3Na]³⁺ and 1295.7 [M+4Na]⁴⁺.

Glycodendron 46.

Nonasaccharide **14** (31.2 mg, 19.10 μmol) and **43** (2.1 mg, 4.77 μmol) were dissolved in H₂O/DMSO (1:1, 0.5 mL). Fresh solutions of CuSO₄·5H₂O (2.39 μmol), tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA) (4.77 μmol) and sodium ascorbate (7.16 μmol) were added to a sealed microwave vial. The solution was heated at 60°C in a microwave oven for 30 min. A metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 20 min at rt. After that, the mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex G-50, H₂O/MeOH 9:1) yielding the glycodendron **46** (20



Capítulo 8

mg, 3.67 μmol , 77%) as a white amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 8.04 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{triazole}}$), 5.42 (br s, 3H, 3H-1), 5.36-5.29 (m, 6H, 6H-1), 5.15 (br s, 3H, 3H-1), 5.08-5.02 (m, 9H, 9H-1), 4.86 (br s, 3H, 3H-1), 4.84 (br s, 3H, 3H-1), 4.63 (t, $J = 5.0$ Hz, 3H, O CH_2CHHN), 4.58 (m, 3H, $\text{OCHHC}_{\text{triazole}}$), 4.17-3.59 (m, 222H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ : 144.2, ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 125.3 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 102.3 (3C-1), 102.2 (6C-1), 100.7 (6C-1), 100.6 (3C-1), 100.1 (3C-1), 99.5 (3C-1), 98.0 (3C-1), 79.0-78.4, 73.2, 72.7, 71.1, 70.8, 70.3-69.5, 68.8, 68.3, 66.9-66.8, 66.6, 65.6, 65.4, 64.9, 63.6 ($\text{OCH}_2\text{C}_{\text{triazole}}$), 61.1-60.9, 50.0 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 44.7 (CCH_2O), 43.2 (CH_2Cl). ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{202}\text{H}_{342}\text{N}_9\text{O}_{151}\text{Cl}$: 5344.9; found: 2692.8 $[\text{M}+2\text{Na}]^{+2}$, 1803.1 $[\text{M}+3\text{Na}]^{+3}$ and 1357.2 $[\text{M}+4\text{Na}]^{+4}$.

Glycodendron 47.

Nonasaccharide **44**⁸⁷ (22.0 mg, 14.23 μmol) and **43** (1.6 mg, 3.59 μmol) were dissolved in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (1:1, 0.5 mL). Fresh solutions of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1.80 μmol), TBTA (3.59 μmol) and sodium ascorbate (5.39 μmol) were added to a sealed microwave vial. The solution was heated at 60°C in a microwave oven for 30 min. A metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 20 min at rt. After that, the mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex G-50, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 9:1) yielding the glycodendron **47** (14.8 mg, 2.91 μmol , 81%) as a white amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 8.05 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{triazole}}$), 5.42 (br s, 1H, 3H-1), 5.34-5.28 (m, 6H, 6H-1), 5.15 (br s, 3H, 3H-1), 5.09-5.03 (m, 9H, 9H-1), 4.87 (br s, 3H, 3H-1), 4.67 (m, 3H, OCH_2CHHN), 4.61-4.56 (br s, 6H, H-1, $\text{OCHHC}_{\text{triazole}}$), 4.18-3.56 (m, 198H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ : 144.1, ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 125.5 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 102.3 (3C-1), 102.2 (6C-1), 100.8 (3C-1), 100.7 (3C-1), 100.6 (3C-1), 99.9 (3C-1), 99.5 (3C-1), 98.0 (3C-1), 80.9, 78.9-78.5, 74.0, 73.3-73.2, 72.7, 71.1, 70.8, 70.3-69.9, 69.7-69.5, 68.3-67.7, 66.9-66.8, 65.6-65.2, 63.5 ($\text{OCH}_2\text{C}_{\text{triazole}}$), 62.5, 61.1-61.0, 50.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 44.7 (CCH_2O), 43.2 (CH_2Cl). ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{191}\text{H}_{320}\text{N}_9\text{O}_{145}\text{Cl}$: 5080.7; found: 2562.8 $[\text{M}+2\text{Na}]^{+2}$, 1715.5 $[\text{M}+3\text{Na}]^{+3}$ and 1290.5 $[\text{M}+4\text{Na}]^{+4}$.



Glycodendron 48.

To a solution of glycodendron **45** (9.0 mg, 1.77 μmol) in DMF (1 mL) sodium azide (1.2 mg, 17.71 μmol) was added. The mixture was stirred at 70°C for 2 days. After that time, the solvent was evaporated under vacuum and the crude was purified using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (MWCO 3 KDa), yielding the glycodendron **48** (9 mg, 1.77 μmol , quant.) as a white amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 8.06 (s, 3H, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 5.41 (br s, 3H, 3H-1), 5.35-5.29 (m, 6H, 6H-1), 5.15 (br s, 3H, 3H-1), 5.07-5.03 (m, 9H, 9H-1), under D_2O (6H, 6H-1), 4.67 (m, 3H, OCHHCH_2N), 4.58 (br s, 3H, $\text{OCHHC}_{\text{triazole}}$), 4.14-3.60 (m, 198H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ : 144.2, ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 125.5 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 102.3 (9C-1), 100.7 (9C-1), 99.8 (3C-1), 99.5 (3C-1), 98.0 (3C-1), 78.8-78.4, 73.3-73.2, 72.0, 71.1-71.0, 70.3-69.9, 69.7-69.5, 66.9-66.8, 65.9, 65.6, 65.4, 65.2, 63.4 ($\text{OCH}_2\text{C}_{\text{triazole}}$), 62.5, 61.1-61.0, 50.1 (CH_2N_3), 50.1 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 44.6 (CCH_2O). ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{191}\text{H}_{320}\text{N}_{12}\text{O}_{145}\text{Cl}$: 5087.2; found: 2567.0 $[\text{M}+2\text{Na}]^{+2}$, 1718.1 $[\text{M}+3\text{Na}]^{+3}$ and 1294.6 $[\text{M}+4\text{Na}]^{+4}$.

Glycodendron 49.

To a solution of glycodendron **46** (20.0 mg, 3.74 μmol) in DMF (1 mL) sodium azide (2.4 mg, 37.41 μmol) was added. The mixture was stirred at 70°C for 2 days. After that time, the solvent was evaporated under vacuum and the crude was purified using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (MWCO 3 KDa), yielding the glycodendron **49** (20 mg, 3.74 μmol , quant.) as a white amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 8.04 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{triazole}}$), 5.46 (br s, 3H, 3H-1), 5.35-5.28 (m, 6H, 6H-1), 5.15 (br s, 3H, 3H-1), 5.08-5.01 (m, 9H, 9H-1), 4.86 (br s, 3H, 3H-1), under D_2O (3H, 3H-1), 4.63 (t, $J = 5.0$ Hz, 3H, OCH_2CHHN), 4.57 (br s, 3H, $\text{OCHHC}_{\text{triazole}}$), 4.16-3.59 (m, 222H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ : 144.2, ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 125.3 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 102.3 (3C-1), 102.2 (6C-1), 100.7 (6C-1), 100.6 (3C-1), 100.1 (3C-1), 99.5 (3C-1), 98.0 (3C-1), 78.9-78.4, 73.2, 72.7, 72.0, 71.1, 70.8, 70.5, 70.3-70.0, 69.7-69.6, 69.2, 68.8, 68.3, 66.9-66.6, 65.7, 65.4, 65.0, 63.5 ($\text{OCH}_2\text{C}_{\text{triazole}}$), 62.5, 61.1-60.9, 50.1 (CH_2N_3), 50.0 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 44.7 (CCH_2O). ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{202}\text{H}_{342}\text{N}_{12}\text{O}_{151}$: 5351.4; found: 2697.9 $[\text{M}+2\text{Na}]^{+2}$, 1805.8 $[\text{M}+3\text{Na}]^{+3}$ and 1360.2 $[\text{M}+4\text{Na}]^{+4}$.



Capítulo 8

Glycodendron 50.

To a solution of glycodendron **47** (20.0 mg, 3.94 μmol) in DMF (1 mL) sodium azide (2.6 mg, 39.36 μmol) was added. The mixture was stirred at 70°C for 2 days. After that time, the solvent was evaporated under vacuum and the crude was purified using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (MWCO 3 KDa), yielding the glycodendron **50** (20 mg, 3.94 μmol , quant.) as a white amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 8.05 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{triazole}}$), 5.41 (br s, 1H, 3H-1), 5.34-5.29 (m, 6H, 6H-1), 5.15 (br s, 3H, 3H-1), 5.07-5.03 (m, 9H, 9H-1), under D_2O (3H, 3H-1), 4.68 (m, 3H, $\text{OCHHC}_{\text{triazole}}$), 4.60-4.55 (m, 6H, H-1, OCH_2CHHN), 4.12-3.46 (m, 198H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ : 144.1, ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 125.5 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 102.3 (C-1), 102.2 (2C-1), 100.8 (C-1), 100.7 (C-1), 100.6 (C-1), 99.9 (C-1), 99.5 (C-1), 98.0 (C-1), 80.9, 78.9-78.4, 74.0, 73.3-73.2, 72.7, 72.0, 71.1, 70.3-69.9, 69.7-69.5, 69.2, 68.3, 67.7, 66.9-66.8, 65.6-65.2, 63.5 ($\text{OCH}_2\text{C}_{\text{triazole}}$), 62.4, 61.1-61.0, 50.2 (CH_2N_3), 50.1 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 44.7 (CCH_2O). ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{191}\text{H}_{320}\text{N}_{12}\text{O}_{145}$: 5087.2; found: 2566.5 $[\text{M}+2\text{Na}]^{+2}$, 1717.9 $[\text{M}+3\text{Na}]^{+3}$ and 1293.9 $[\text{M}+4\text{Na}]^{+4}$.

 α -Man₉-fluorescein (51).

To a solution of the FAM-alkyne 6-isomer (2.67 mg, 6.48 μmol) and the epitope α -Man₉ **13** (5 mg, 3.24 μmol) in DMSO (300 μL), another solution of CuBr (3.24 μmol) and TBTA (6.48 μmol) in the same solvent (150 μL) was added. The reaction mixture was stirred on at rt. Thereafter, a metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 20 min at rt. After that, the mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 9:1), yielding the fluorescent probe **51** (6.3 mg, quant.) as an orange amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 8.22-7.87 (m, 3H), 7.68 (br s, 1H), 7.30-7.07 (m, 2H), 6.87-6.54 (m, 4H), 5.40-5.24 (m, 3H, 3H-1), 5.11 (br s, 1H, 1H-1), 5.04 (br s, 3H, 3H-1), under D_2O (2H, 2H-1), 4.64 (m, 2H), 4.12-3.57 (m, 58H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, selected data obtained from HSQC, D_2O) δ : 131.2 (C-Ar), 128.2 (C-Ar), 128.2 (C-Ar), 127.9 (C-Ar), 121.7 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 103.0 (C-Ar), 102.2 (2C-1), 100.8 (2C-1), 100.6 (2C-1), 100.0 (C-1), 99.5 (C-1), 98.0 (C-1), 78.8-78.5, 73.2, 73.2, 72.7, 71.1, 71.1, 70.3-



70.0, 69.6, 66.9, 66.8, 66.6, 65.7, 65.5, 65.2, 61.2-61.0, 50.3, 43.8. ESI-MS: m/z calcd. for $C_{80}H_{110}N_4O_{52}$: 1958.6; found: 978.1 $[M - 2H]^{-2}$.

β -Man₉-fluorescein (52).

To a solution of the FAM-alkyne 6-isomer (6.6 mg, 10.36 μ mol) and the epitope β -Man₉ **44**⁸⁷ (8 mg, 5.18 μ mol) in DMSO (300 μ L), another solution of CuBr (5.18 μ mol) and TBTA (10.36 μ mol) in the same solvent (150 μ L) was added. The reaction mixture was stirred on at rt. Thereafter, a metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 20 min at rt. After that, the mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, H₂O/MeOH 9:1), yielding the fluorescent probe **52** (10.1 mg, quant.) as an orange amorphous solid. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ : 8.05-7.98 (m, 2H), 7.94 (m, 1H), 7.57 (br s, 1H), 7.15-7.07 (m, 2H), 6.69-6.63 (m, 4H), 5.37 (br s, 1H, H-1), 5.31-5.26 (m, 2H, 2H-1), 5.10 (br s, 1H, H-1), 5.06-5.00 (m, 4H, 4H-1), 4.65 (m, 2H, CH₂C_{triazole}), 4.59 (m, 2H, CH₂CH₂N), 4.49 (br s, 1H, H-1), 4.21 (m, 1H), 4.12-4.05 (m, 6H), 4.03-3.92 (m, 6H), 3.90-3.60 (m, 42H), 3.41 (m, 1H). ¹³C-NMR (100 MHz, selected data obtained from HSQC, D₂O) δ : 131.0 (C-Ar), 128.2 (C-Ar), 128.2 (C-Ar), 127.9 (C-Ar), 121.7 (CH_{triazole}), 103.0 (C-Ar), 102.3 (C-1), 102.1 (2xC-1), 100.7 (2xC-1), 100.5 (C-1), 99.9 (C-1), 99.5 (C-1), 97.9 (C-1), 81.0, 78.9, 78.6, 78.5, 78.4, 74.0, 73.2-73.1, 72.6, 71.1, 70.3-69.9, 69.4, 68.4, 66.9-66.8, 65.6-65.4, 61.1-60.9, 50.4, 35.6. ESI-MS: m/z calcd. for $C_{80}H_{110}N_4O_{52}$: 1958.6; found: 1957.0 $[M - H]^{-}$ and 977.7 $[M - 2H]^{-2}$.

α -Man₉-fluorescein (53).

To a solution of the FAM-alkyne 6-isomer (1.3 mg, 3.14 μ mol) and the trivalent glycodendron of α -Man₉ **48** (8 mg, 1.57 μ mol) in DMSO (400 μ L), another solution of CuBr (1.57 μ mol) and TBTA (3.14 μ mol) in the same solvent (200 μ L) was added. The reaction mixture was stirred on at rt. Thereafter, a metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 20 min at rt. After that, the mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, H₂O/MeOH 9:1), yielding the fluorescent probe **53** (8.7 mg, quant.) as an orange amorphous solid. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O)



Capítulo 8

δ : 8.06-7.78 (m, 6H), 7.57 (br s, 1H), 7.07-6.88 (m, 2H), 6.62-6.42 (m, 4H), 5.35-5.16 (m, 9H, 9H-1), 5.06 (br s, 3H, 3H-1), 4.96 (br s, 9H, 9H-1), under D₂O (6H, 6H-1), 4.55-4.29 (m, 6H), 4.07-3.11 (m, 213H). ¹³C-NMR (100 MHz, selected data obtained from HSQC, D₂O) δ : 126.8 (C-Ar), 122.9 (CH_{triazole}), 102.9 (C-Ar), 102.3 (3C-1), 100.7 (3C-1), 99.8 (C-1), 99.5 (C-1), 98.0 (C-1), 78.8-78.4, 73.3-73.2, 72.0, 71.1-71.0, 70.3-69.9, 69.7-69.5, 66.9-66.8, 65.9, 65.6, 65.4, 65.2, 63.4, 62.5, 61.1-61.0, 50.5 (OCH₂CH₂N_{triazole}), 35.4 (triazoleCH₂NHCO). ESI-MS: m/z calcd. for C₂₁₅H₃₃₅N₁₃O₁₅₁: 5500.9; found: 2747.8 [M - 2H]²⁻ and 1830.6 [M - 3H]³⁻.

(α -Man)₃-fluorescein (54).

To a solution of the FAM-alkyne 6-isomer (1.2 mg, 2.84 μ mol) and the trivalent glycodendron of α -Man₉ **49** (7.6 mg, 1.42 μ mol) in DMSO (100 μ L), another solution of CuBr (1.42 μ mol) and TBTA (2.84 μ mol) in the same solvent (50 μ L) was added. The reaction mixture was stirred on at rt. Thereafter, a metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 20 min at rt. After that, the mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, H₂O/MeOH 9:1), yielding the fluorescent probe **54** (8.2 mg, quant.) as an orange amorphous solid. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ : 8.14-7.90 (m, 6H), 7.67 (br s, 1H), 7.20-7.02 (m, 2H), 6.85-6.57 (m, 4H), 5.46-5.28 (m, 9H, 9H-1), 5.16 (br s, 3H, 3H-1), 5.06 (br s, 9H, 9H-1), under D₂O (6H, 6H-1), 4.66 (m, 2H, CH₂C_{triazole}), 4.61-4.48 (m, 9H), 4.42 (br s, 3H), 4.15-3.04 (m, 216H). ¹³C-NMR (100 MHz, selected data obtained from HSQC, D₂O): δ 131.4 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.2 (C-Ar), 124.6 (CH_{triazole}), 122.6 (CH_{triazole}), 103.4 (C-Ar), 102.3 (C-1), 102.2 (2C-1), 100.7 (2C-1), 100.6 (C-1), 100.1 (C-1), 99.5 (C-1), 98.0 (C-1), 78.9-78.4, 73.2, 72.7, 72.0, 71.1, 70.8, 70.5, 70.3-70.0, 69.7-69.6, 69.2, 68.8, 68.3, 66.9-66.6, 65.7, 65.4, 65.0, 63.5, 62.5, 61.1-60.9, 50.5 (OCH₂CH₂N_{triazole}), 35.1 (triazoleCH₂NHCO). ESI-MS: m/z calcd. for C₂₂₆H₃₅₇N₁₃O₁₅₇: 5765.0; found: 2880.2 [M - 2H]²⁻, 1918.7 [M - 3H]³⁻ and 1438.3 [M - 4H]⁴⁻.

(β -Man)₃-fluorescein (55).

To a solution of the FAM-alkyne 6-isomer (2.3 mg, 5.5 μ mol) and the trivalent glycodendron of β -Man₉ ⁸⁷ **50** (14 mg, 2.75 μ mol) in DMSO (180 μ L), another solution of CuBr (2.75 μ mol) and

278



TBTA (5.5 μmol) in the same solvent (90 μL) was added. The reaction mixture was stirred on at rt. Thereafter, a metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 20 min at rt. After that, the mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 9:1), yielding the fluorescent probe **55** (15.0 mg, quant.) as an orange amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 8.02-7.80 (m, 6H), 7.54 (br s, 1H), 7.01-6.87 (m, 2H), 6.58-6.46 (m, 4H), 5.40-5.30 (m, 6H, 6H-1), 5.21 (m, 6H, 6H-1), 5.06 (br s, 3H, 3H-1), 4.96 (m, 9H, 9H-1), 4.53-4.41 (m, 12H, 3H-1), 4.29 (br s, 6H), 4.07-3.05 (m, 204H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, selected data obtained from HSQC, D_2O) δ : 131.0 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 124.0 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 122.4 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 103.8 (C-Ar), 102.3 (C-1), 102.2 (2C-1), 100.8 (C-1), 100.7 (C-1), 100.6 (C-1), 99.9 (C-1), 99.5 (C-1), 98.0 (C-1), 80.9, 78.9-78.4, 74.0, 73.3-73.2, 72.7, 72.0, 71.1, 70.3-69.9, 69.7-69.5, 69.2, 68.3, 67.7, 66.9-66.8, 65.6-65.2, 63.5, 62.4, 61.1-61.0, 50.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_{\text{triazole}}$), 35.3 ($\text{triazoleCH}_2\text{NHCO}$). ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{215}\text{H}_{335}\text{N}_{13}\text{O}_{151}$: 5500.9; found: 2748.5 $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-}$, 1830.8 $[\text{M} - 3\text{H}]^{3-}$ and 1372.5 $[\text{M} - 4\text{H}]^{4-}$.

(Man α 1,2Man)₃-fluorescein (**56**).

To a solution of the FAM-alkyne 6-isomer (10.8 mg, 0.026 mmol) and the trivalent glycodendron of Man α 1,2Man α **61**^{81e} (22 mg, 0.013 mmol) in DMSO (844 μL), another solution of CuBr (0.013 mmol) and TBTA (0.026 mmol) in the same solvent (422 μL) was added. The reaction mixture was stirred on at rt. Thereafter, a metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 20 min at rt. After that, the mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 9:1), yielding the fluorescent probe **56** (27.4 mg, quant.) as an orange amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 8.07 (m, 1H), 7.94-7.89 (m, 2H), 7.92 (br s, 3H), 7.64 (br s, 1H), 7.12-7.02 (m, 2H), 6.65-6.54 (m, 4H), 5.03 (br s, 3H, 3H-1), 4.94 (br s, 3H, 3H-1), 4.68-4.54 (m, 10H), 4.39 (br s, 6H, $\text{CH}_{2\text{triazole}}$), 4.10-3.99 (m, 6H), 3.95-3.78 (m, 14H), 3.78-3.50 (m, 27H), 3.46-3.27 (m, 9H), 3.24 (br s, 4H), 3.16 (br s, 1H), 3.03 (m, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, selected data obtained from HSQC, D_2O) δ : 131.0 (C-Ar), 128.7 (C-Ar), 128.2 (C-Ar), 128.2 (C-Ar), 124.6 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 123.2 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 119.0 (C-Ar), 103.2 (C-Ar), 102.2 (C-1), 97.9 (C-1), 78.6, 73.2, 72.7, 70.5, 70.2, 70.0, 69.9, 69.5, 69.2, 66.8, 66.5, 65.6,



Capítulo 8

63.5, 61.1, 60.6, 50.2 (OCH₂CH₂N_{triazol}), 35.4 (triazoleCH₂NHCO). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₈₈H₁₂₃N₁₃O₄₆: 2097.8; found: 2097.0 [M - H]⁻ and 1047.7 [M - 2H]²⁻.

Dendron of 9 mannoses-fluorescein (57).

To a solution of the FAM-alkyne 6-isomer (8.7 mg, 0.022 mmol) and the nonavalent glycodendron of α-D-Mannose **71**^{81d} (40 mg, 0.011 mmol) in DMSO (690 μL), another solution of CuBr (0.011 mmol) and TBTA (0.022 mmol) in the same solvent (345 μL) was added. The reaction mixture was stirred on at rt. Thereafter, a metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 20 min at rt. After that, the mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, H₂O/MeOH 9:1), yielding the fluorescent probe **57** (44.4 mg, quant.) as an orange amorphous solid. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ: 8.09-7.93 (m, 12H), 7.89 (br s, 3H), 7.64 (br s, 1H), 7.07-6.95 (m, 2H), 6.69-6.51 (m, 4H), under D₂O (9H, 9H-1), 4.67-4.43 (m, 45H), 4.38 (br s, 4H), 4.05 (m, 9H), 3.93-3.78 (m, 27H), 3.76-3.55 (m, 36H), 3.55-3.19 (m, 58H), 3.07 (m, 9H). ¹³C-NMR (100 MHz, selected data obtained from HSQC, D₂O) δ: 131.2 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 125.7 (C-Ar), 124.0 (C-Ar), 124.0 (CH_{triazole}), 122.9 (CH_{triazole}), 103.5 (C-Ar), 99.5 (C-1), 72.7, 70.4, 69.9, 69.6, 68.7, 68.2, 66.3, 65.4, 63.5, 60.6, 50.3 (OCH₂CH₂N_{triazole}), 50.1 (OCH₂CH₂N_{triazole}), 35.3 (triazoleCH₂NHCO). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₁₇₂H₂₅₈N₄₀O₈₂: 4195.7; found: 2095.0 [M - 2H]²⁻.

(Manα1,2Man)₉-fluorescein (58).

To a solution of the FAM-alkyne 6-isomer (3.9 mg, 9.54 μmol) and the nonavalent glycodendron of Manα1,2Man **72**^{81e} (25 mg, 4.77 μmol) in DMSO (400 μL), another solution of CuBr (4.77 μmol) and TBTA (9.54 μmol) in the same solvent (200 μL) was added. The reaction mixture was stirred on at rt. Thereafter, a metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 20 min at rt. After that, the mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, H₂O/MeOH 9:1), yielding the fluorescent probe **58** (27.0 mg, quant.) as an orange amorphous solid. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ: 8.18-7.89 (m, 15H), 7.67 (br s, 1H), 7.14-6.93 (m, 2H),



6.79-6.44 (m, 4H), 5.06 (br s, 9H, 9H-1), 4.98 (br s, 9H, 9H-1), 4.70-4.58 (m, 15H), 4.58-4.45 (m, 18H), 4.15-4.01 (m, 21H), 3.96-3.59 (m, 121H), 3.57-3.20 (m, 58H), 3.06 (m, 9H). ^{13}C -NMR (100 MHz, selected data obtained from HSQC, D_2O) δ : 130.1 (C-Ar), 124.6 (C-Ar), 124.3 (C-Ar), 123.7 (C-Ar), 123.5 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 123.3 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 121.8 (C-Ar), 102.7 (C-Ar), 102.2 (C-1), 97.9 (C-1), 78.6, 73.2, 72.8, 70.4, 70.2, 70.0, 69.9, 69.6, 69.2, 68.7, 68.2, 66.8, 66.5, 65.5, 63.6, 61.1, 60.6, , 49.6 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_{\text{triazole}}$), 49.4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_{\text{triazole}}$), 34.8 ($\text{triazoleCH}_2\text{NHCO}$). ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{226}\text{H}_{348}\text{N}_{40}\text{O}_{127}$: 5654.2; found: 2824.4 $[\text{M} - 2\text{H}]^2$, 1881.4 $[\text{M} - 3\text{H}]^3$ and 1410.4 $[\text{M} - 4\text{H}]^4$.

Fluorescence polarization measurements.

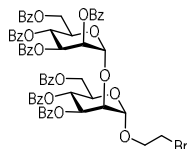
The measurements were performed in 384-well microplates (black polystyrene, non-treated, Corning). The fluorescence polarization was recorded using a TRIAD multimode microplate reader (from Dynex) with excitation and emission wavelengths of 485 and 535 nm, respectively. Fluorescent probes **51-55**, DC-SIGN-ECD, and inhibitors were dissolved in Tris buffer (25 mM, pH 8, NaCl 150 mM, 4 mM CaCl_2). For direct binding, 15 μL of a fluorescent probe solution (20 nM) were transferred to each well. Then, 15 μL of protein (concentration ranging from 75 nM to 28 μM) were added and the microplate was shaken in the dark for 5 min, before reading. The total sample volume in each well was 30 μL . Control wells contained 15 μL of the fluorescent probe solution and 15 μL of buffer. Blank wells contained 15 μL of the DC-SIGN-ECD solution and 15 μL of buffer and their measurements were subtracted from all values. All experiments on samples were performed in replicates of three.

The experiments with ConA and fluorescent probes **52**, **55-58** were performed identically. The concentration of protein solutions ranging 28 μM to 75 nM.

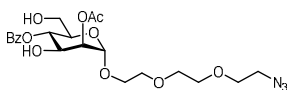
The average polarization values of three replicate wells were plotted against the concentration of the protein, and the curve was fitted to the equation for a one-site binding: $y = B_{\text{máx}} x / [k_D + x]$ where $B_{\text{máx}}$ is the maximal value of polarization, respectively, and k_D is the dissociation constant.



Capítulo 8

(2-bromoethoxy) O-(3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (62)

A solution of **26**⁸⁷ (427 mg, 0.36 mmol), 2-bromo ethanol **16** (81 μ L, 1.09 mmol) and 4 Å molecular sieves in anh. CH₂Cl₂ (10 mL) was stirred at -20°C for 30 min. Then, NIS (233 mg, 1.09 mmol) and TfOH (9.6 μ L, 0.11 mmol) were added and the resulting mixture was stirred for 30 min at -20°C. The reaction was quenched with NaHCO₃ sat. aq. soln. (150 μ L), and the mixture was diluted with CH₂Cl₂ and filtered through Celite. The filtrate was washed with Na₂S₂O₃ sat. aq. soln. and NaHCO₃ sat. aq. soln. The organic layer was dried over anh. MgSO₄, concentrated and purified by column chromatography on silica gel (Acetone/toluene, 1:20) to obtain the disaccharide **62** (350 mg, 0.29 mmol, 82%) as a white amorphous solid. ESI-MS: *m/z* calcd. for C₆₃H₅₃N₃O₁₁: 1176.2; found: 1199.2 [M + Na]⁺.

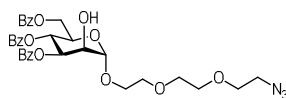
2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl-2-O-acetyl-4-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (79)

To a solution of **78**¹⁴⁸ (860 mg, 1.5 mmol) and CSA (35 mg, 0.15 mmol) in CH₃CN (7.5 mL), trimethyl orthoacetate (0.6 mL, 4.5 mmol) was added. The mixture was stirred at rt for 30 min. After that, the reaction mixture was quenched with Et₃N and the solvent was evaporated. Then, the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (11 mL), Bz₂O (676 mg, 3.0 mmol), Et₃N (0.6 mL, 4.5 mmol) and DMAP (18 mg, 0.15 mmol) were subsequently added. The reaction mixture was stirred at rt for 1 h and the solvent was removed under vacuum. To a solution of the resulting residue in EtOAc (20 mL), 1M HCl (20 mL) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 1 h. Then, the organic phase was separated and dried over anh. MgSO₄, filtered and



concentrated under vacuum. To a mixture of the resulting residue and acetic acid (0.3 mL, 4.7 mmol) in anh. THF (11 mL), a cold solution of HF-pyridine complex (1.8 mL, 20.0 mmol) was slowly added. The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. Then, the residue was dissolved with EtOAc and washed with NaHCO₃ sat. aq. soln. The organic phase was dried over anh. MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/*n*-hexane, 1:1) to obtain the product **79** (418 mg, 0.86 mmol, 58%) as a colorless oil. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.04 (m, 2H, H-Ar), 7.58 (m, 1H, H-Ar), 7.45 (m, 2H, H-Ar), 5.31 (t, 1H, *J* = 9.9, H-4), 5.17 (dd, 1H, *J* = 3.6, *J* = 1.7, H-2), 4.96 (d, 1H, *J* = 1.7, H-1), 4.32 (dd, 1H, *J* = 9.8, *J* = 3.6, H-3), 3.94 (m, 1H, H-5), 3.83 (m, 1H, CHHO), 3.79-3.56 (m, 11H, H-6 CH₂CH₂N₃, CH₂O), 3.37 (m, 2H, CH₂N₃), 2.16 (s, 3H, OCOCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 170.8 (CO), 167.0 (CO), 133.5 (C_{ipso}-Ar), 129.8 (2C-Ar), 129.2 (C_{ipso}-Ar), 128.5 (2C-Ar), 97.5 (C-1), 72.4 (C-2), 70.6 (CH₂O, C-4, C-5), 70.2 (CH₂O), 70.1 (CH₂O), 70.0 (CH₂O), 67.9 (C-3), 67.1 (CH₂O), 61.3 (CH₂O), 50.5 (CH₂N₃), 20.9 (COCH₃); ESI-MS: *m/z* calcd. for C₃₃H₃₅N₃O₁₁: 483.2; found: 522.4 [M + K]⁺. ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₂₁H₂₉N₃O₁₀Na [M + Na]⁺: 506.1745; found: 506.1745.

2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl *O*-3,4,6-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranoside (**80**)¹⁴⁷



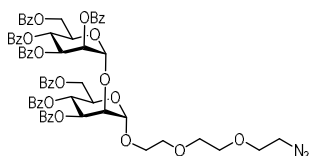
To a solution of **78** (1.16 g, 2.01 mmol) and CSA (47 mg, 0.20 mmol) in CH₃CN (10 mL), trimethyl orthoacetate (0.76 mL, 6.03 mmol) was added. The mixture was stirred at rt for 30 min. After that, the reaction mixture was quenched with Et₃N and the solvent was evaporated. Then, the residue was dissolved in EtOAc and 1M HCl and the reaction was stirred at rt for 1 h. The organic phase was separated and dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. To a solution of the resulting residue in CH₂Cl₂ (15 mL), Bz₂O (1.82 g, 8.04 mmol), Et₃N (1.7 mL, 12.06 mmol) and DMAP (49 mg, 0.40 mmol) were subsequently added. The reaction mixture was stirred at rt for 1 h and the solvent was removed. To a mixture of the resulting residue and acetic acid (0.36 mL, 6.29 mmol) in anh. THF (15 mL), a cold solution of HF-pyridine complex (2.4 mL, 26.63 mmol) was slowly added. The reaction mixture was stirred



Capítulo 8

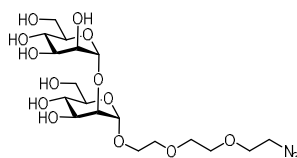
at rt for 3 h. Then, the solvent was evaporated and the residue was dissolved with EtOAc and washed with NaHCO₃ sat. aq. soln. The organic phase was dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. To a solution of the crude in CH₂Cl₂ (15 mL), Bz₂O (909 mg, 4.02 mmol), Et₃N (0.8 mL, 6.03 mmol) and DMAP (24 mg, 0.20 mmol) were subsequently added. The reaction mixture was stirred at rt for 1 h. Then, the crude was washed with NaHCO₃ sat. aq. soln. and the organic phase was dried over anh. MgSO₄, filtered and concentrated. Finally, to the resulting residue in CH₃CN (8 mL), a solution of HCl 7% in MeOH (40 mL) was added and the reaction was stirred at rt for 24 h. Then, the solvent was removed, the residue was dissolved in EtOAc and washed with NaHCO₃ sat. aq. soln. The organic phase was dried over anh. MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/*n*-hexane, 1:1) to obtain the product **80** (809 mg, 1.25 mmol, 62%) as a white solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.02 (m, 2H, H-Ar), 7.95 (m, 4H, H-Ar), 7.51 (m, 3H, H-Ar), 7.37 (m, 6H, H-Ar), 5.94 (t, 1H, *J* = 10.0, H-4), 5.70 (dd, 1H, *J* = 10.0, *J* = 2.8, H-3), 5.06 (br s, 1H, H-1), 4.59 (dd, 1H, *J* = 11.9, *J* = 2.3, H-6a), 4.47 (m, 1H, H-6b), 4.41 (m, 1H, H-5), 4.35 (m, 1H, H-2), 3.93 (m, 1H, CHHO), 3.82-3.72 (m, 3H, CHHO, CH₂O), 3.72-3.65 (m, 6H, CH₂CH₂N₃, CH₂O), 3.38 (t, 2H, *J* = 4.9, CH₂N₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.3 (CO), 165.7 (CO), 165.4 (CO), 133.3 (2 x C-Ar), 133.0 (C-Ar), 129.9 (C-Ar), 129.8 (C-Ar), 129.7 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 100.0 (C-1), 72.7 (C-3), 70.8 (CH₂O), 70.7 (CH₂O), 70.2 (CH₂O), 70.1 (CH₂O), 69.3 (C-2), 68.7 (C-5), 67.2 (C-4, CH₂O), 63.6 (C-6), 50.7 (CH₂N₃); ESI-MS: *m/z* calcd. for C₃₃H₃₅N₃O₁₁: 649.2; found: 672.4 [M + Na]⁺; ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₃₃H₃₅N₃O₁₁Na [M + Na]⁺: 672.2164; found: 672.2155.

2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl O-(3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (84**)¹⁴⁷**



A solution of **80** (361 mg, 0.56 mmol), 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl trichloroacetimidate **83**¹⁵¹ (617 mg, 0.83 mmol) and 4 Å molecular sieves in anh. CH₂Cl₂ (8 mL) was stirred at 0°C for 30 min. Then, TMSOTf (20 μ l, 0.11 mmol) was added and the resulting mixture was stirred for 1 h at 0°C. The reaction was quenched with Et₃N (150 μ l), and the mixture was diluted with CH₂Cl₂, filtered through Celite and washed with CH₂Cl₂. After removal of the solvent, the crude was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/*n*-hexane, 1:2 \rightarrow 1:1) to obtain the disaccharide **84** (546 mg, 0.44 mmol, 80%) as a white amorphous solid. ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 8.08 (m, 4H, H-Ar), 8.03 (m, 2H, H-Ar), 7.95 (m, 6H, H-Ar), 7.87 (m, 2H, H-Ar), 7.51 (m, 5H, H-Ar), 7.35 (m, 16H, H-Ar), 6.10 (t, 1H, $J = 9.9$, $J = 6.1$, H-4_{manB}), 6.06-5.99 (m, 2H, H-3_{manB}, H-4_{manA}), 5.94-5.89 (m, 2H, H-2_{manB}, H-3_{manA}), 5.27 (d, 1H, $J = 1.7$, H-1_{manB}), 5.22 (s, 1H, $J = 1.6$, H-1_{manA}), 4.69-4.52 (m, 4H, H-5_{manB}, H-6_{manA}, H-6_{manB,a}), 4.50-4.43 (m, 2H, H-5_{manA}, H-6_{manB,b}), 4.41 (dd, 1H, $J = 3.2$, $J = 1.8$, H-2_{manA}), 3.87 (m, 1H, CHHO), 3.70-3.59 (m, 9H, CHHO, CH₂O, CH₂CH₂N₃), 3.35 (m, 2H, $J = 5.0$, CH₂N₃). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 166.5 (CO), 166.2 (CO), 165.8 (CO), 165.7 (CO), 165.4 (CO), 165.2 (CO), 165.0 (CO), 133.5 (C-Ar), 133.4 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 133.2 (C-Ar), 133.2 (C-Ar), 133.1 (C-Ar), 130.1 (C-Ar), 130.0 (C-Ar), 129.9 (C-Ar), 129.8 (C-Ar), 129.7 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 99.7 (C-1_{manB}), 98.8 (C-1_{manA}), 77.3 (C-2_{manA}), 70.9 (CH₂O), 70.8 (CH₂O), 70.3 (CH₂O), 70.2 (C-2_{manB}, C-3_{manA}), 69.9 (C-3_{manB}, C-5_{manB}), 68.9 (C-5_{manA}), 67.7 (C-4_{manA}), 67.4 (CH₂O), 66.9 (C-4_{manB}), 63.8 (C-6_{manA}), 63.0 (C-6_{manB}), 50.7 (CH₂N₃). ESI-MS: m/z calcd. for C₆₇H₆₁N₃O₂₀: 1227.4; found: 1250.4 [M + Na]⁺; ESI-HRMS: m/z calcd. for C₆₇H₆₁N₃O₂₀Na [M + Na]⁺: 1250.3741; found: 1250.3725.

2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl α -D-mannopyranosyl)-(1-2)- α -D-mannopyranoside (73**)¹⁴⁷**

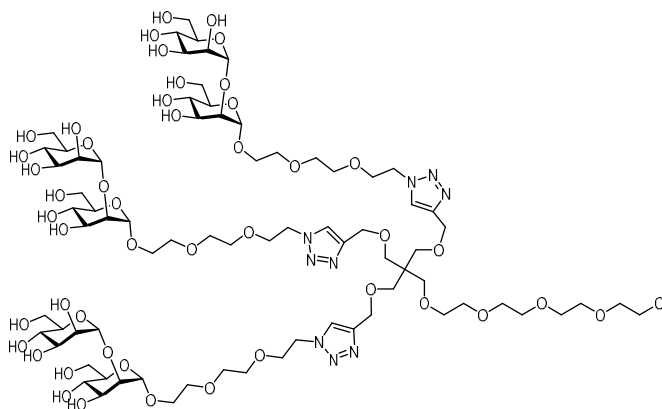


To a solution of **84** (869 mg, 0.71 mmol) in anh. MeOH (7.5 mL), a solution of sodium methoxide (76 mg, 1.42 mmol) in anh. MeOH (7.5 mL) was added. The reaction was stirred at



Capítulo 8

rt for 2 h. Then, the reaction mixture was neutralized with Amberlite IRA 120-H⁺ resin, filtered and concentrated, to obtain the deprotected disaccharide **73** (332 mg, 0.67 mmol, 94%) as a white solid. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 5.11 (d, 1H, *J* = 1.3, H-1), 4.96 (d, 1H, *J* = 1.5, H-1), 3.98 (dd, 1H, *J* = 3.2, *J* = 1.8, H-2), 3.87-3.80 (m, 5H, H-2, H-3, H-6, CHHO), 3.74-3.44 (m, 12H, H-3, H-5, H-6, CH₂CH₂N₃, CH₂O), 3.62 (m, 1H, CHHO), 3.61-3.52 (m, 3H, 2 x H-4, H-5), 3.38 (t, 2H, *J* = 5.0, CH₂N₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 104.0 (C-1), 100.0 (C-1), 80.3 (C-2), 74.8 (C-5), 74.4 (C-5), 72.3 (C-3), 71.9 (C-3), 71.7 (C-2), 71.5 (CH₂O), 71.4 (CH₂O), 71.2 (CH₂O), 71.0 (CH₂O), 68.8 (C-4), 68.6 (C-4), 67.8 (CH₂O), 62.9 (C-6), 62.8 (C-6), 51.6 (CH₂N₃); ESI-MS: *m/z* calcd. for C₁₈H₃₃N₃O₁₃: 499.2; found: 522.4 [M + Na]⁺; ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₁₈H₃₃N₃O₁₃Na [M + Na]⁺: 522.1898; found: 522.1906.

Glycodendron **85**¹⁴⁷

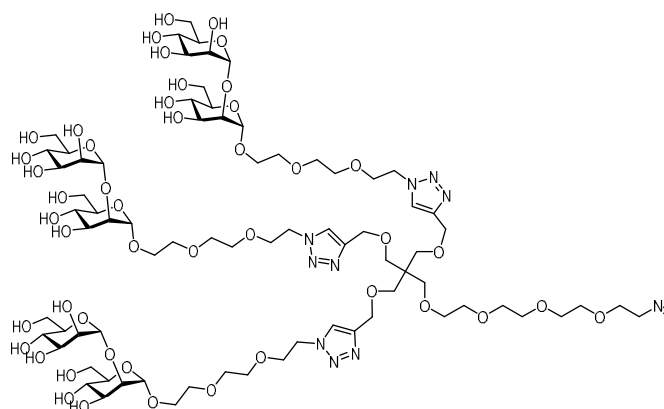
To a solution of disaccharide **73** (336 mg, 0.67 mmol) and [2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxymethyl trikis(2-propyniloxy-methyl)methane (**43**) (83 mg, 0.19 mmol) in H₂O/DMSO (1:1, 3 mL) in a sealed microwave vial, CuSO₄·5H₂O (14 mg, 56.04 μmol), TBTA (61 mg, 11.21 μmol) and sodium ascorbate (34 mg, 16.81 μmol) were added. The solution was heated at 60°C in a microwave oven for 30 min. After that, CuSO₄·5H₂O (14 mg, 56.04 μmol), TBTA (61 mg, 11.21 μmol) and sodium ascorbate (34 mg, 16.81 μmol) were added and the solution was heated at 60°C in a microwave oven for 30 min in a second cycle. A

286



metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 15 min at rt. The mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH 100%), yielding the glycodendron **85** (355 mg, 18.28 μmol , 98%) as a white amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.99 (s, 3H, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 5.11 (s, 3H, H-1), 4.97 (s, 3H, H-1), 4.59 (t, 6H, $J = 4.9$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.54 (s, 6H, $\text{OCH}_2\text{C}_{\text{triazole}}$), 3.98 (m, 3H, H-2), 3.91 (t, 6H, $J = 5.0$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.88-3.76 (m, 15H, H-2, H-3, H-6, CHHO), 3.76-3.54 (m, 55H, H-3, H-4, H-4, H-5, H-5, H-6, CH_2Cl , CH_2O), 3.52 (m, 3H, CHHO), 3.47 (s, 6H, CCH_2O), 3.42 (s, 2H, $\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 145.9 ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 125.7 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 104.0 (C-1), 100.0 (C-1), 80.3 (C-2), 74.9 (C-5), 74.5 (C-5), 72.3 (C-3, CH_2O), 72.0 (C-3), 71.7 (C-2), 71.4-71.2 (CH_2O), 70.6 ($\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 70.0 (CCH_2O), 68.8 (C-4), 68.6 (C-4), 67.7 (CH_2O), 65.3 ($\text{OCH}_2\text{C}_{\text{triazole}}$), 62.9 (C-6), 62.8 (C-6), 51.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 46.4 (CCH_2O), 44.0 (CH_2Cl); ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{76}\text{H}_{132}\text{ClN}_9\text{O}_{46}$: 1941.8; found: 1940.5 $[\text{M-H}]^-$ and 969.6 $[\text{M-2H}]^{2-}$.

Glycodendron **86**¹⁴⁷



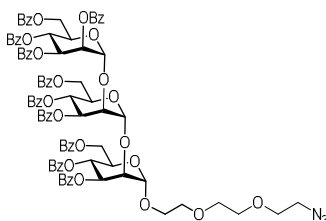
To a solution of glycodendron **85** (350 mg, 0.18 mmol) in DMF (5 mL) sodium azide (59 mg, 0.90 mmol) was added. The mixture was stirred at 70°C for 2 days. Then, the solvent was concentrated and the crude was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH 100%), yielding the glycodendron **86** (350 mg, 0.18 mmol, quant.) as a white amorphous



Capítulo 8

solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.99 (s, 3H, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 5.11 (d, 3H, $J = 1.2$, H-1), 4.97 (d, 3H, $J = 1.6$, H-1), 4.59 (t, 6H, $J = 5.0$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.54 (s, 6H, $\text{OCH}_2\text{C}_{\text{triazole}}$), 3.99 (dd, 3H, $J = 3.2$, $J = 1.7$, H-2), 3.91 (t, 6H, $J = 5.1$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.88-3.77 (m, 15H, H-2, H-3, H-6, CHHO), 3.74-3.56 (m, 53H, H-3, H-4, H-4, H-5, H-5, H-6, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$, CH_2O), 3.52 (m, 3H, CHHO), 3.47 (s, 6H, CCH_2O), 3.42 (s, 2H, $\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.36 (m, 2H, CH_2N_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 145.9 ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 125.7 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 103.9 (C-1), 99.9 (C-1), 80.3 (C-2), 74.8 (C-5), 74.5 (C-5), 72.3 (C-3), 72.0 (C-3), 71.7 (C-2), 71.5-71.1 (CH_2O), 70.6 ($\text{CCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 70.0 (CCH_2O), 68.8 (C-4), 68.6 (C-4), 67.7 (CH_2O), 65.2 ($\text{OCH}_2\text{C}_{\text{triazole}}$), 63.0 (C-6), 62.9 (C-6), 51.6 (CH_2N_3), 51.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 46.4 (CCH_2O); ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{76}\text{H}_{132}\text{N}_{12}\text{O}_{46}$: 1948.8; found: 1947.7 $[\text{M-H}]^-$ and 973.7 $[\text{M-2H}]^{2-}$.

2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl O-(2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl) (1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (88)

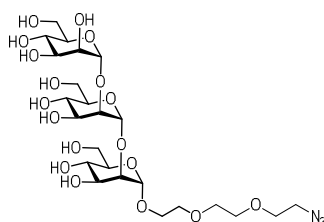


A solution of **80**¹⁴⁷ (93 mg, 0.14 mmol), S-Tolyl (2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (**26**)⁸⁷ (226 mg, 0.19 mmol) and 4 Å molecular sieves in anh. CH_2Cl_2 (6 mL) was stirred at -20°C for 30 min. Then, NIS (51 mg, 0.21 mmol) and TfOH (2.6 μL , 0.029 mmol) were added and the resulting mixture was stirred for 20 min at -20°C . The reaction was quenched with NaHCO_3 sat. aq. soln. (150 μL), and the mixture was diluted with CH_2Cl_2 and filtered through Celite. The filtrate was washed with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ sat. aq. soln. and NaHCO_3 sat. aq. soln. The organic layer was dried over anh. MgSO_4 , concentrated and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/n-hexane, 4:5) to obtain the trisaccharide **88** (195 mg, 0.11 mmol, 80%) as a white amorphous



solid. $[\alpha]_D^{20} = -23$ (c 1.00, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.12-7.82 (m, 22H, H-Ar), 7.60 (m, 1H, H-Ar), 7.54 (m, 1H, H-Ar), 7.51-7.27 (m, 24H, H-Ar), 7.11 (t, 1H, $J = 7.8$, H-Ar), 6.97 (t, 1H, $J = 7.3$, H-Ar), 6.06-5.88 (m, 5H, H-3, H-3, H-4, H-4, H-5), 5.76-5.67 (m, 2H, H-2, H-3), 5.40 (d, 1H, $J = 1.8$, H-1), 5.13 (d, 1H, $J = 2.0$, H-1), 4.92 (d, 1H, $J = 1.9$, H-1), 4.65-4.41 (m, 8H, H-2, H-4, H-5, H-5, H-6, H-6), 4.39 (m, 1H, H-2), 4.33 (m, 1H, H-6_a), 4.18 (dd, 1H, $J = 12.3$, $J = 4.1$, H-6_b), 3.85 (m, 1H, CHHO), 3.71-3.63 (m, 8H, CH_2O , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.59 (m, 1H, CHHO), 3.35 (t, 2H, $J = 5.1$, CH_2N_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 166.3 (CO), 166.2 (CO), 165.9 (CO), 165.6 (CO), 165.6 (CO), 165.4 (2CO), 165.3 (CO), 165.0 (CO), 164.8 (CO), 133.5 (C-Ar), 133.4 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 133.2 (C-Ar), 133.1 (C-Ar), 133.0 (C-Ar), 130.1 (C-Ar), 130.0 (C-Ar), 129.9 (C-Ar), 129.8 (C-Ar), 129.7 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 128.3 (C-Ar), 100.1 (C-1), 99.7 (C-1), 98.9 (C-1), 78.0 (C-2), 76.6 (C-2), 71.3, 70.8 (CH_2O), 70.3, 70.2, 70.1, 70.1, 69.8, 69.7, 68.7, 67.5, 67.3, 66.5, 63.9, 63.6, 62.9 (C-6), 50.7 (CH_2N_3); ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{94}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{28}$: 1701.5; found: 1724.5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; ESI-HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{94}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{28}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 1724.5055; found: 1724.5037.

2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl *O* - α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-(α -D-mannopyranosyl) (1 \rightarrow 2)- α -D-mannopyranoside (74)



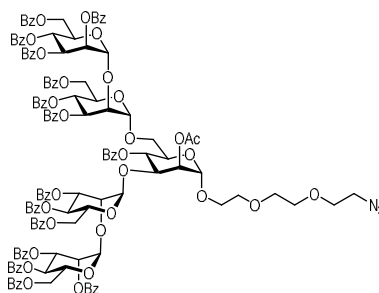
To a solution of protected trisaccharide **88** (127 mg, 0.07 mmol) in anh. MeOH/anh. toluene (2:1 2.2 mL), NaOMe (8 mg, 0.15 mmol). The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. Then, the mixture was neutralized with Amberlite IR 120 H^+ resin, filtered and the solvent was removed under vacuum. The crude was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20 MeOH), to give trisaccharide **74** as a white amorphous solid (49 mg, 96%). $^1\text{H-NMR}$



Capítulo 8

(400 MHz, CD₃OD) δ : 5.30 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-1), 5.13 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-1), 5.02 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-1), 4.07 (dd, J = 3.3, J = 1.8 Hz, 1H, H-2), 4.00 (dd, J = 3.3, J = 1.8 Hz, 1H, H-2), 3.94 – 3.82 (m, 7H, H-2), 3.79–3.55 (m, 19H), 3.41 (m, 2H, CH₂N₃). ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 104.1 (C-1), 102.5 (C-1), 100.1 (C-1), 80.7, 80.2, 75.0, 74.6, 72.4, 72.1, 71.9, 71.9, 71.6, 71.5, 71.4, 71.2, 69.2, 69.0, 68.8, 67.9, 51.7 (CH₂N₃). ESI-MS: m/z calcd. for C₂₄H₄₃N₃O₁₈: 661.3; found: 684.3 [M +Na]⁺; ESI-HRMS: m/z calcd. for C₂₄H₄₃N₃O₁₈Na [M +Na]⁺: 684.2434; found: 684.2427.

2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl O-{2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)}-[2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-2-O-acetyl-4-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (89**).**

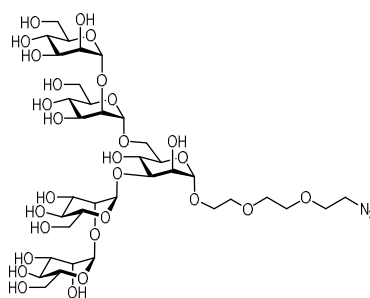


The solution of disaccharide donor **27**⁸⁷ (522 mg, 0.43 mmol), diol acceptor **79** (80 mg, 0.17 mmol) and 4Å molecular sieves in anh. CH₂Cl₂ (5.0 mL) was stirred at -10°C for 30 min. Then, TMSOTf (9 μ L, 0.05 mmol) was added. The reaction was stirred for 30 min and then, quenched with Et₃N (70 μ L) and filtered through Celite. The filtrate was concentrated to dryness. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/*n*-hexane 2:3) to obtain the pentasaccharide **89** (303 mg, 0.12 mmol, 70%) as a white amorphous solid. $[\alpha]_D^{20}$ = -16 (c 1.00, CHCl₃). ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 8.17-8.08 (m, 5H, H-Ar), 8.08-7.80 (m, 31H, H-Ar), 7.64-7.23 (m, 36H, H-Ar), 6.92 (t, 2H, J = 7.8, H-Ar), 6.72 (t, 1H, J = 7.4, H-Ar), 6.12 (t, 1H, J = 10.1), 6.03-5.92 (m, 4H), 5.91-5.82 (m, 3H), 5.79 (dd, 1H, J = 10.1, J = 3.2), 5.69 (t, 1H, J = 10.0), 5.62-5.55 (m, 2H), 5.46 (d, 1H, J = 1.8, H-1), 5.20 - 5.14 (m, 2H, H-1, H-1), 5.02



(d, 1H, H-1), 4.68-4.50 (m, 8H, H-1), 4.46-4.33 (m, 4H), 4.33-4.25 (m, 2H), 4.20-4.05 (m, 3H), 4.03-3.92 (m, 2H), 3.84-3.72 (m, 3H), 3.71-3.56 (m, 7H, CH₂O), 3.30 (t, 2H, *J* = 5.0, CH₂N₃), 2.31 (s, 3H, CH₃COO); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 170.8 (CO), 166.4 (CO), 166.3 (CO), 166.1 (CO), 166.0 (CO), 165.6 (CO), 165.6 (CO), 165.4 (CO), 165.4 (CO), 165.4 (CO), 165.3 (CO), 165.1 (CO), 165.0 (CO), 165.0 (CO), 164.7 (CO), 133.5 (C-Ar), 133.5 (C-Ar), 133.4-133.0 (C-Ar), 133.0 (C-Ar), 130.1 (C-Ar), 130.0 (C-Ar), 129.8 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 99.8 (C-1), 99.6 (C-1), 99.4 (C-1), 98.3 (C-1), 98.0 (C-1), 78.7, 73.9, 71.0, 70.7, 70.6, 70.2, 70.1, 69.9, 69.8, 69.7, 69.6, 69.4, 68.9, 67.4, 67.3, 66.7, 66.4, 66.3, 63.6, 63.6, 62.7, 62.7, 50.6 (CH₂N₃), 21.0 (OCOCH₃); ESI-MS: *m/z* calcd. for C₁₄₃H₁₂₅N₃O₄₄: 2587.8; found: 2627.6 [M + K]⁺, 2610.7 [M + Na]⁺ and 1316.7 [M + 2Na]⁺²; ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₁₄₃H₁₂₅N₃O₄₄Na [M + Na]⁺: 2610.7528; found: 2610.7455.

2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl O-{(α-D-mannopyranosyl)-(1→2)-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)}-[(α-D-mannopyranosyl)-(1→2)-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-O-α-D-mannopyranoside (75).



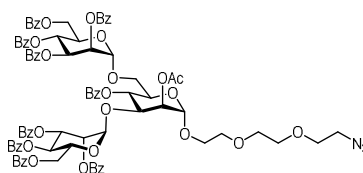
To a solution of protected pentasaccharide **89** (227 mg, 0.09 mmol) in anh. MeOH/anh. toluene (2:1 2.7 mL), NaOMe (15.2 mg, 0.28 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. Then, the mixture was neutralized with Amberlite IR 120 H⁺ resin, filtered and the solvent was removed under vacuum. The crude was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20 MeOH), to give the pentasaccharide **75** as a white amorphous solid (86 mg, quantitative). ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 5.39 (br s, 1H, H-1), 5.16 (br s, 1H, H-1), 5.08-4.99 (m, 2H, 2H-1), 4.80 (br s, 1H, H-1), 4.11-4.04 (m, 2H), 4.04-4.00 (m, 2H), 4.00-3.93 (m,



Capítulo 8

2H), 3.93-3.81 (m, 7H), 3.79-3.58 (m, 26H), 3.42 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, CH_2N_3), 3.38 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 104.1, 103.9, 102.2, 101.8, 99.9, 80.5, 80.4, 79.9, 75.0-74.8, 74.4, 73.4, 72.4, 72.1, 72.0, 71.8, 71.6, 71.5, 71.3, 71.2, 69.1, 68.9, 68.7-68.6, 67.9, 67.5, 67.3, 63.0-62.9, 51.7 (CH_2N_3). ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_{28}$: 985.4; found: 1008.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; ESI-HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_{28}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 1008.3490; found: 1008.3482.

2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl O-(2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-(2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-2-O-acetyl-4-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (90)

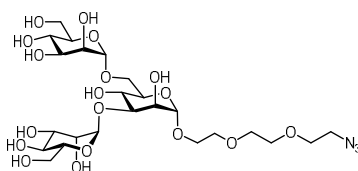


The mixture of diol acceptor **79** (97 mg, 0.20 mmol), 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl trichloroacetimidate **83**¹⁵¹ (445 mg, 0.60 mmol) and 4 Å molecular sieves in anhydrous CH_2Cl_2 (5 mL) was stirred at -10°C for 30 min. Then, TMSOTf (11 μL , 0.06 mmol) was added. After 45 min, the reaction mixture was neutralized with Et_3N (88 μL), filtered through Celite and washed several times with CH_2Cl_2 . After removal of solvent, the crude was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/n -hexane 2:3) to afford the trisaccharide **90** (224 mg, 0.14 mmol, 68%) as a white amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17$ (c 1.00, CHCl_3). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.14 (dd, 2H, $J = 8.3$, $J = 1.4$, H-Ar), 8.10-8.00 (m, 8H, H-Ar), 7.97 (dd, 2H, $J = 8.3$, $J = 1.4$, H-Ar), 7.85-7.73 (m, 6H, H-Ar), 7.62-7.47 (m, 6H, H-Ar), 7.47-7.33 (m, 13H, H-Ar), 7.33-7.20 (m, 8H, H-Ar), 6.14-6.04 (m, 2H, H-4, H-4), 5.95 (dd, 1H, $J = 10.1$, $J = 3.3$, H-3), 5.81-5.71 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 5.54 (dd, 1H, $J = 3.5$, $J = 1.7$, H-2), 5.39 (dd, 1H, $J = 3.3$, $J = 1.8$, H-2), 5.30 (d, 1H, $J = 1.9$, H-1), 5.13 (d, 1H, $J = 1.8$, H-1), 5.01 (d, 1H, $J = 1.7$, H-1), 4.72 (dd, 1H, $J = 12.3$, $J = 2.4$, H-6), 4.64-4.45 (m, 5H, H-3, H-5, H-5, H-6, H-6), 4.39 (dd, 1H, $J = 12.2$, $J = 4.3$, H-6), 4.26 (ddd, 1H, $J = 9.6$, $J = 6.2$, $J = 2.1$, H-5), 4.09 (dd, 1H, $J = 10.9$, $J = 6.3$, H-6_a), 4.00 (m, 1H, H-6_b), 3.80-3.59 (m, 11H, H-5, CH_2O , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.32 (t, 2H, $J = 5.1$, CH_2N_3), 2.37 (s, 3H, CH_3COO); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 170.1 (CO),



166.2 (CO), 166.2 (CO), 165.6 (2CO), 165.5 (CO), 165.3 (CO), 165.3 (CO), 165.1 (CO), 164.5 (CO), 133.4 (C-Ar), 133.4 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 133.1 (C-Ar), 133.0 (C-Ar), 130.0 (C-Ar), 129.9 (C-Ar), 129.9 (C-Ar), 129.8 (C-Ar), 129.7 (C-Ar), 129.7 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 128.3 (C-Ar), 128.2 (C-Ar), 99.4 (C-1), 97.7 (C-1), 97.5 (C-1), 74.8 (C-2), 71.1, 70.7 (CH₂O), 70.4, 70.3, 70.2, 70.1, 69.7, 69.6, 69.3, 69.1, 68.9, 67.2, 66.8, 66.8, 66.5, 62.8 (C-6), 62.6 (C-6), 50.6 (CH₂N₃), 21.1 (OCOCH₃); ESI-MS: *m/z* calcd. for C₈₉H₈₁N₃O₂₈: 1639.5; found: 1662.4 [M + Na]⁺ and 1678.3 [M + K]⁺.

2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl *O*- α -D-mannopyranosyl(1 \rightarrow 3)]*O*- α -D-mannopyranosyl(1 \rightarrow 6)]- α -D-mannopyranoside (76).

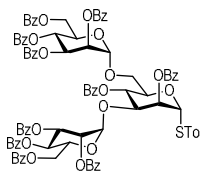


To a solution of protected trisaccharide **90** (130 mg, 0.08 mmol) in anh. MeOH/anh. toluene (3:1 2.7 mL), NaOMe (8.5 mg, 0.16 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. Then, the mixture was neutralized with Amberlite IR 120 H⁺ resin, filtered and the solvent was removed under vacuum. The crude was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20 MeOH), to give the trisaccharide **76** as a white amorphous solid (49 mg, 94%). ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 5.10 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-1), under D₂O (1H, H-1), 4.79 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-1), 4.09 (m, 1H, H-2), 4.01 (dd, *J* = 3.4 and 1.8 Hz, 1H, H-2), 3.92-3.81 (m, 7H), 3.81-3.58 (m, 19H), 3.42 (m, 2H, CH₂N₃). ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 102.6 (C-1), 100.5 (C-1), 100.0 (C-1), 79.5, 73.5, 73.0, 71.9, 71.2, 71.1, 70.7-70.7, 70.3, 70.2, 70.0-70.0, 69.8, 67.4, 67.2, 66.5, 66.1, 65.9, 61.5, 50.4 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₂₄H₄₃N₃O₁₈: 661.3; found: 684.4 [M + Na]⁺; ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₂₄H₄₃N₃O₁₈Na [M + Na]⁺: 684.2434; found: 684.2431.

***S*-Tolyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2,4-di-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranoside (92).**



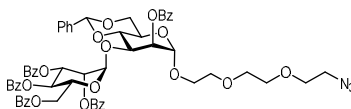
Capítulo 8



The mixture of diol acceptor **28** (168 mg, 0.34 mmol), 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranosyl trichloroacetimidate (**83**)¹⁵¹ (752 mg, 1.02 mmol) and 4 Å molecular sieves in anhydrous CH_2Cl_2 (5 mL) was stirred at -10°C for 30 min. Then, TMSOTf (20 μL , 0.10 mmol) was added. After 30 min, the reaction mixture was neutralized with Et_3N (160 μL), filtered through Celite and washed several times with CH_2Cl_2 . After removal of solvent, the crude was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/toluene 1:10) to afford the trisaccharide **92** (449 mg, 0.27 mmol, 80%) as a white solid. $[\alpha]_D^{20} = -25$ (c 1.00, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.30 (dd, 2H, $J = 7.5$ and $J = 2.1$ Hz, H-Ar), 8.19-8.10 (m, 4H, H-Ar), 8.07-7.98 (m, 6H, H-Ar), 7.90-7.83 (m, 4H, H-Ar), 7.80 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H-Ar), 7.72 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-Ar), 7.62-7.24 (m, 30H, H-Ar), 7.24-7.15 (m, 4H), 6.12 (t, 1H, $J = 10.1$ Hz, H-4), 6.07-5.92 (m, 4H, H-2, 3H-3), 5.81 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-2), 5.78-5.69 (m, 2H, H-1, H-2), 5.42-5.34 (m, 2H, H-1), 5.13 (s, 1H, H-1), 4.85 (m, 1H, H-5), 4.67-4.28 (m, 7H, 4H-6), 4.21 (m, 1H, H-6), 3.80 (d, 1H, H-6), 2.21 (s, 3H, CH_3Ph); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 166.3 (CO), 166.3 (CO), 166.2 (CO), 165.7 (CO), 165.6 (CO), 165.4 (CO), 165.3 (CO), 164.8 (CO), 138.7 (C-Ar), 133.8 (C-Ar), 133.6 (C-Ar), 133.5 (C-Ar), 133.4 (C-Ar), 133.4 (C-Ar), 133.2-133.1 (C-Ar), 132.9 (C-Ar), 130.3 (C-Ar), 130.2 (C-Ar), 130.1 (C-Ar), 130.0 (C-Ar), 130.0 (C-Ar), 129.8 (C-Ar), 129.7 (C-Ar), 129.4 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 128.7 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 128.3 (C-Ar), 99.7 (C-1), 98.1 (C-1), 86.7 (C-1), 73.4, 70.8, 70.5, 70.3 (CH_2O), 69.9, 69.5, 69.0, 68.8, 67.3, 66.7, 66.6, 62.8, 62.7, 21.2 (CH_3Ph); ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{95}\text{H}_{78}\text{O}_{25}\text{S}$: 1651.5; found: 1674.0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; ESI-HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{95}\text{H}_{78}\text{O}_{25}\text{SNa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 1550.4177; found: 1673.4457.

2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl *O*-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-mannopyranoside (93**).**



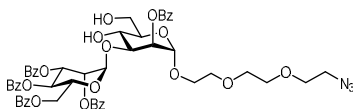


The solution of monosaccharide donor **91** (342 mg, 0.49 mmol), acceptor **25** (172 mg, 0.32 mmol) and 4Å molecular sieves in anh. CH₂Cl₂ (8.0 mL) was stirred at -20°C for 30 min. Then, NIS (115 mg, 0.49 mmol) and TfOH (8.6 µL, 0.10 mmol) were added. The mixture was filtered through Celite and the filtrate was washed successively with Na₂S₂O₃ sat. aq. soln., NaHCO₃ sat. aq. soln. The organic layer was dried over anh. MgSO₄, concentrated and purified by column chromatography on silica gel (acetone/toluene 1:8) to obtain the disaccharide **93** (271 mg, 0.24 mmol, 75%) as a white amorphous solid. $[\alpha]_D^{20} = -52$ (c 1.00, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.31 (m, 2H, H-Ar), 8.18 (m, 2H, H-Ar), 8.03 (m, 2H, H-Ar), 7.92 (m, 2H, H-Ar), 7.82 (m, 2H, H-Ar), 7.68 (m, 1H, H-Ar), 7.65-7.49 (m, 7H), 7.48-7.23 (m, 12H), 6.17 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-4_{manB}), 5.85 (dd, *J* = 3.3 and 1.9 Hz, 1H, H-2_{manB}), 5.83-5.77 (m, 2H, H-3_{manB}, H_{acetal}), 5.73 (dd, *J* = 3.7 and 1.5 Hz, 1H, H-2_{manA}), 5.55 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-1_{manB}), 5.13 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-1_{manA}), 4.79 (dd, *J* = 12.3 and 2.4 Hz, 1H, H-6_{manB,a}), 4.69-4.58 (m, 2H, H-3_{manA}, H-5_{manB}), 4.48 (dd, *J* = 12.4 and 3.5 Hz, 1H, H-6_{manB,b}), 4.40 (dd, *J* = 10.1 and 4.7 Hz, 1H, H-6_{manA,a}), 4.33 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H-4_{manA}), 4.11 (td, *J* = 9.8 and 4.7 Hz, 1H, H-5_{manA}), 3.97 (t, *J* = 10.2 Hz, 1H, H-6_{manA,b}), 3.90 (m, 1H, CHHO), 3.79-3.65 (m, 9H, CH₂O, CH₂CH₂N₃), 3.35 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂N₃). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.3 (CO), 166.2 (CO), 165.3 (CO), 165.2 (CO), 165.0 (CO), 137.1 (C-Ar), 133.6 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 133.1 (C-Ar), 133.0 (C-Ar), 130.1 (C-Ar), 130.1 (C-Ar), 129.9 (C-Ar), 129.8 (C-Ar), 129.7 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.4 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 128.8 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 128.3 (C-Ar), 128.2 (C-Ar), 126.0 (C-Ar), 101.4 (C_{acetal}), 99.1 (C-1_{manB}), 98.7 (C-1_{manA}), 78.9 (C-4_{manA}), 73.3 (C-3_{manA}), 72.2 (C-2_{manA}), 70.9, 70.7, 70.2-70.0 (CH₂O, C-2_{manB}, C-3_{manB}), 69.4 (C-5_{manB}), 68.7 (C-6_{manA}), 67.1 (CH₂O), 66.6 (C-4_{manB}), 63.6 (C-5_{manA}), 62.6 (C-6_{manB}), 50.6 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₆₀H₅₇N₃O₁₈: 1107.4; found: 1130.3 [M + Na]⁺. ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₆₀H₅₇N₃O₁₈Na [M + Na]⁺: 1130.3529; found: 1130.3525.

2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl O-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-2-O-benzoyl-α-D-mannopyranoside (94).



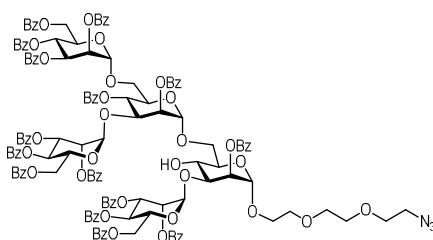
Capítulo 8



p-Toluenesulfonic acid monohydrate (62 mg, 0.32 mmol) was added to a stirred solution of the disaccharide **93** (236 mg, 0.21 mmol) in CH₃CN (10 mL) at rt. After 24 h, the reaction mixture was quenched with Et₃N (30 μL) and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography on silica gel (acetone/toluene 1:4) to give the disaccharide **94** (180 mg, 0.18 mmol, 83%) as a white amorphous solid. $[\alpha]_D^{20} = -27$ (c 1.00, CHCl₃). ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ: 8.21 (m, 2H, H-Ar), 8.12 (m, 2H, H-Ar), 7.96 (m, 2H, H-Ar), 7.80 (m, 2H, H-Ar), 7.70 (m, 2H, H-Ar), 7.60-7.36 (m, 9H, H-Ar), 7.33-7.20 (m, 6H), 6.13 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-4_{man,B}), 5.86 (dd, *J* = 3.2 and 1.9 Hz, 1H, H-2_{man,B}), 5.75 (dd, *J* = 10.1 and 3.2 Hz, 1H, H-3_{manB}), 5.62 (dd, *J* = 3.2 and 1.7 Hz, 1H, H-2_{manA}), 5.50 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-1_{manB}), 5.10 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H-1_{manA}), 4.67 (dd, 1H, *J* = 12.5 and 2.5 Hz, H-6_{manB,a}), 4.49-4.30 (m, 4H, H-3_{manA}, H-4_{manA}, H-5_{manB}, H-6_{manB,b}), 4.07-4.00 (m, 2H, 2H-6_{manA}), 3.94-3.82 (m, 2H, H-5_{manA}, CHHO), 3.73-3.61 (m, 9H, CH₂O, CH₂CH₂N₃), 3.37 (m, 2H, CH₂N₃). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.1 (CO), 166.1 (CO), 165.7 (CO), 165.4 (CO), 165.1 (CO), 133.5 (C-Ar), 133.4 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 133.2 (C-Ar), 133.0 (C-Ar), 130.0-129.6 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 128.7-128.3 (C-Ar), 99.9 (C-1_{manB}), 97.7 (C-1_{manA}), 79.2 (C-4_{manA}), 77.4, 72.3-72.3, 70.8-70.7, 70.5, 70.2-70.1 (CH₂O, C-2_{manA}, C-2_{manB}, C-3_{manA}, C-3_{manB}, C-5_{manA}), 69.5 (C-5_{manB}), 67.1 (CH₂O), 66.2 (C-4_{manB}), 62.4 (C-6_{manB}), 62.2 (C-6_{manA}), 50.6 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₅₃H₅₃N₃O₁₈: 1019.3; found: 1042.2 [M + Na]⁺. ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₅₃H₅₃N₃O₁₈Na [M + Na]⁺: 1042.3216; found: 1042.3209.



2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl O-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)}-2-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (95).



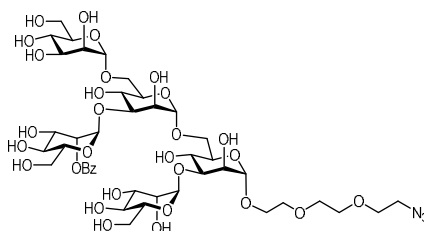
The solution of trisaccharide donor **92** (387 mg, 0.23 mmol), acceptor **94** (159 mg, 0.16 mmol) and 4 Å molecular sieves in anh. CH₂Cl₂ (8.0 mL) was stirred at -20°C for 30 min. Then, NIS (55 mg, 0.23 mmol) and TfOH (4 μL, 0.046 mmol) were added. The mixture was filtered through Celite and the filtrate was washed successively with Na₂S₂O₃ sat. aq. soln., NaHCO₃ sat. aq. soln. The organic layer was dried over anh. MgSO₄, concentrated and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/*n*-hexane 2:3) to obtain the pentasaccharide **95** (316 mg, 0.12 mmol, 70%) as a white solid. $[\alpha]_D^{20} = -30$ (c 1.00, CHCl₃). ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ: 8.27 (d, 2H, *J* = 7.1, H-Ar), 8.20-8.03 (m, 10H, H-Ar), 8.01-7.96 (m, 4H, H-Ar), 7.88-7.81 (m, 6H, H-Ar), 7.73-7.66 (m, 8H, H-Ar), 7.64-7.49 (m, 10H, H-Ar), 7.48-7.16 (m, 33H, H-Ar), 7.14 (t, 2H, *J* = 7.6, H-Ar), 6.14 (t, 1H, *J* = 10.0, H-Ar), 6.10-6.01 (m, 3H), 5.88 (t, 1H, *J* = 10.0), 5.83 (dd, *J* = 3.5, *J* = 1.6, 1H), 5.75 (dd, 1H, *J* = 3.2, *J* = 1.8), 5.73-5.67 (m, 3H), 5.63 (m, 1H), 5.43 (d, 1H, *J* = 1.5, H-1), 5.39 (dd, 1H, *J* = 3.2, *J* = 1.9), 5.36 (m, 2H, H-1, H-1), 5.19 (d, 1H, *J* = 1.8, H-1), 5.12 (d, 1H, *J* = 1.6, H-1), 4.72 (dd, 1H, *J* = 9.7, *J* = 3.5), 4.66-4.11 (m, 17H), 3.95 (m, 1H), 3.82 (dd, 1H, *J* = 10.9, *J* = 2.0), 3.78-3.51 (m, 9H), 3.29 (m, 2H, CH₂N₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.3 (CO), 166.2 (3CO), 166.1 (2CO), 166.0 (CO), 165.6 (CO), 165.4 (CO), 165.2 (3CO), 165.0 (CO), 164.8 (CO), 164.8 (CO), 133.7 (C-Ar), 133.5 (C-Ar), 133.4 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 133.2 (C-Ar), 133.0 (C-Ar), 130.3-129.5 (C-Ar), 129.4 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 128.8-128.0 (C-Ar), 99.9 (C-1), 99.9 (C-1), 97.5 (C-1), 97.5 (C-1), 96.7 (C-1), 79.0, under CDCl₃



Capítulo 8

(2C), 72.4, 72.1, 70.8, 70.6, 70.4, 70.4, 70.3, 70.2, 70.1, 69.8, 69.7, 69.7, 69.5, 69.0, 68.8, 67.7, 67.0, 66.7, 66.4, 66.3, 62.8, 62.6, 62.3, 50.7 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₁₄₃H₁₂₃N₃O₄₃: 2546.7; found: 2569.5 [M + Na]⁺ and 1296.2 [M + 2Na]²⁺; ESI-HRMS *m/z* calcd. for C₁₄₃H₁₂₃N₃O₄₃Na [M + Na]⁺: 2568.7423; found: 2568.7351.

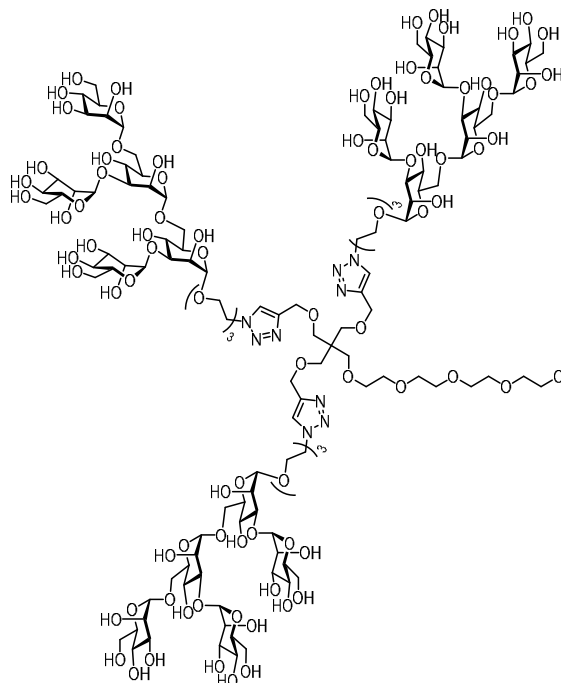
2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{ α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)}-O- α -D-mannopyranoside (77).



To a solution of protected pentasaccharide **95** (300 mg, 0.12 mmol) in anh. MeOH/anh. toluene (2:1 2.7 mL), NaOMe (19 mg, 0.35 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. Then, the mixture was neutralized with Amberlite IR 120 H⁺ resin, filtered and the solvent was removed under vacuum. The crude was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20 MeOH), to give the pentasaccharide **77** as a white amorphous solid (110 mg, 95%). ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ : 5.15 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-1), 5.13 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-1), 4.92 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-1), 4.91-4.85 (m, 2H, 2H-1), 4.19-4.13 (m, 2H, 2H-2), 4.13-4.06 (m, 2H, 2H-2), 4.03-3.98 (m, 2H, H-2), 3.96-3.83 (m, 12H), 3.82-3.64 (m, 22H), 3.52 (m, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ : 102.4, 102.3, 100.2, 99.4, 99.3, 78.7-78.5, 73.3-73.3, 72.7, 70.9-70.9, 70.6, 70.4, 70.1-70.0, 69.7-69.6, 69.3, 66.7, 65.8-65.6, 65.3, 61.0-60.9, 50.1 (CH₂N₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₃₆H₆₃N₃O₂₈: 985.4; found: 1008.1 [M + Na]⁺; ESI-HRMS: *m/z* calcd. for C₃₆H₆₃N₃O₂₈Na [M + Na]⁺: 1008.3490; found: 1008.3478.



Glycodendron 96.



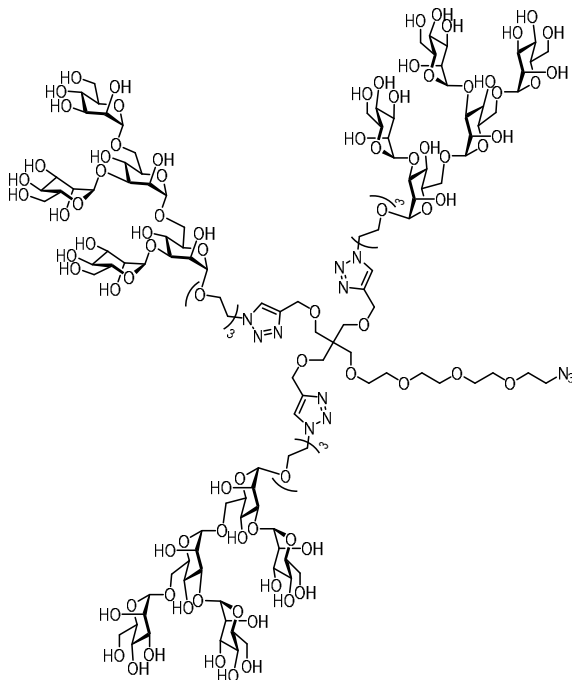
The pentasaccharide **77** (50 mg, 50.74 μmol) and [2-[2-(2-Chloroethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxymethyl trikis(2-propyniloxymethyl)-methane (**43**) (5.6 mg, 12.68 μmol) were dissolved in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (1:1, 0.8 mL). Fresh solutions of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (6.74 μmol), tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA) (12.68 μmol) and sodium ascorbate (19.03 μmol) were added to a sealed microwave vial. The solution was heated at 60°C in a microwave oven for 30 min. A metal scavenger resin, QuadrasilMP, was added to the reaction solution and stirred for 20 min at rt. After that, the mixture was filtered and the resulting solution was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH20 MeOH) yielding the glycodendron **96** (30 mg, 8.88 μmol , 70%) as a white amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 8.04 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{triazole}}$), 5.14 (br s, 3H, 3H-1), 5.10 (br s, 3H, 3H-1), 4.91 (br



Capítulo 8

s, 3H, 3H-1), 4.86 (br s, 3H, 3H-1), 4.84 (br s, 3H, 3H-1), 4.63 (t, $J = 5.0$ Hz, 6H, OCH_2CHHN), 4.57 (br s, 6H, $\text{OCHHC}_{\text{triazole}}$), 4.20-4.11 (m, 6H), 4.11-4.05 (m, 6H), 4.03-3.61 (m, 128H), 3.54 (m, 1H), 3.44 (br s, 2H), 3.39 (br s, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ : 144.2, ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 125.3 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 102.4 (C-1), 102.3 (C-1), 100.2 (C-1), 99.4 (C-1), 99.2 (C-1), 78.7, 78.5, 73.3-73.3, 72.7, 70.9-70.8, 70.6, 70.4, 70.1-70.0, 69.7-69.5, 68.8, 68.3, 66.7-66.6, 65.7, 65.5, 65.2-65.1, 63.5 ($\text{OCH}_2\text{C}_{\text{triazole}}$), 61.0-60.9, 50.0 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 44.7 (CCH_2O), 43.2 (CH_2Cl). ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{130}\text{H}_{222}\text{N}_9\text{O}_{91}\text{Cl}$: 3401.3; found: 1723.7 $[\text{M}+2\text{Na}]^{+2}$ and 1156.7 $[\text{M}+3\text{Na}]^{+3}$.

Glycodendron 97.



To a solution of glycodendron **96** (27.0 mg, 7.94 μmol) in DMF (1.5 mL) sodium azide (5.2 mg, 79.38 μmol) was added. The mixture was stirred at 70°C for 2 days. After that time, the solvent was concentrated and the crude was purified using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (MWCO 3 KDa), yielding the glycodendron **97** (27 mg, quantitative) as a white amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 8.04 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{triazole}}$), 5.14 (br s, 3H, 3H-1), 5.10 (br s, 3H, 3H-1), 4.91 (br s, 3H, 3H-1), 4.86 (br s, 3H, 3H-1), 4.84 (br s, 3H, 3H-1), 4.63 (t, $J = 5.0$ Hz, 6H, OCH_2CHHN), 4.57 (br s, 6H, $\text{OCHHC}_{\text{triazole}}$), 4.20-4.11 (m, 6H), 4.11-4.05 (m, 6H), 4.03-3.61 (m, 128H), 3.54 (m, 1H), 3.44 (br s, 2H), 3.39 (br s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ : 144.1, ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 125.3 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 102.4 (C-1), 102.3 (C-1), 100.2 (C-1), 99.4 (C-1), 99.2 (C-1), 78.7-78.5, 73.3-73.3, 72.7, 70.9-70.8, 70.6, 70.4, 70.1-70.0, 69.7-69.5, 69.2, 68.8, 68.3, 66.7-66.6, 65.7, 65.5, 65.2-65.1, 63.5 ($\text{OCH}_2\text{C}_{\text{triazole}}$), 61.0-60.9, 50.1 (CH_2N_3), 50.0 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 44.7 (CCH_2O). ESI-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{130}\text{H}_{222}\text{N}_{12}\text{O}_{91}$: 3407.8; found: 1726.9 $[\text{M}+2\text{Na}]^{+2}$, 1158.9 $[\text{M}+3\text{Na}]^{+3}$.

8.2.2 Evaluation of immune response of glycodendrons and neoglycoproteins

Monocytes CD14^+ isolation.

Peripheral blood was obtained from healthy donors in Hospital São João (Porto, Portugal) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation using Lymphoprep™ (STEMCELL Technologies). The interface of PBMCs was collected and washed with PBS by centrifugation. The pellet was resuspended in MACS buffer (PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA) to get a final concentration of 10^7 cells in 80 μL of buffer. 15 μL of microbeads CD14^+ (Miltenyi Biotec) were added to 10^7 cells and incubated 15 min at 4°C. Then, the cell suspension was added in the LS column (Miltenyi Biotec) placed in the magnetic field and the CD14^+ fraction was collected. After washing, the magnetic field was removed and MACS buffer was added to flush out the fraction with the magnetically labeled cells. After centrifugation the pellet was resuspended in complete RPMI media supplemented with 50 ng/mL of recombinant IL-4 and GM-CSF (Peprotech) in the concentration of 10^6 cells/mL. In 6 well plates, 5 mL of supplemented media was added in each well and change the medium after 3 days. At 6th day, the dendritic cells were collected and were counted. In 96 well plate, 5×10^4



Capítulo 8

cells placed in each well and solutions of glycodendrons **71** and **98** (concentration ranging from 26 μ M to 104 μ M) and LPS (50 ng/mL) were added.

Study of the activation molecules on DCs by FACS.

After 48 h of co-culture, after washing the cells with PBS, 30 μ L of Fixable viability dye (eBiosciences) was added to each well and place at 4°C for 30 minutes. Then, unspecific binding was blocked with 2% mouse serum in FACS for 10 min and cells were incubated with different mixings of antibodies 30 minutes at 4°C. The antibodies of CD11c (clone BU15, Immunotools), CD14 (clone M5E2, Biolegend), CD80 (2D10, Biolegend), CD86 (GL-1, Biolegend) and MHCII (L243, Biolegend) were conjugated with the fluorophores FITC, APC, BV510, PerCP and PE-Cy7, respectively. After, washing cells with FACS buffer (PBS with 1% FBS), and finally fixed with 2% *p*-formaldehyde.

In all flow cytometry experiments, dead cells were excluded with Fixable Viability Dye APC-eFluor® 780-conjugated (eBioscience). Data acquisition was performed on a FACSCanto™ II system (BD Biosciences, San Jose, CA) using the FACS Diva™ software (BD) and compensated and analyzed in FlowJo version 10.4. (TreeStar, Inc., Ashland, OR). Doublets were excluded from the analysis based on FSC-A versus FSC-H parameters. Fluorescence Minus one gating was used to define the gates for cytokine-producing cells. Isotype controls were used to evaluate unspecific staining.

Detection of human inflammatory cytokines.

After 48 h of co-culture, DCs were isolated and the supernatant was stored at -80°C for cytokine analysis. The quantification of cytokines from the supernatants was performed using a commercial kit available, BD™ CBA Human Inflammatory Cytokines Kit (BDBiosciences). According to manufacturer, briefly, a mix of captures beads was added to all assay tubes, proceeded by the standards or the samples. Then, the Human Inflammatory Cytokine PE Detection Reagent was added to all assay tubes. These tubes were incubated for 3 h at rt, protected from light. After washing, the supernatant was removed and the bead pellet was resuspended. Finally, the samples were acquired on the flow cytometer (BD Accuri C6, BD Biosciences) and the data analysis was performed with FCAP Array (BDBiosciences).



Cy8-OVA 101.

To a solution of endotoxin free-OVA (EndoFit, Invivogen) (25 mg, 0.55 μmol) in DMSO/H₂O (7:3), Dibenzocyclooctyne-N-hydroxysuccinimidyl ester (22 mg, 5.5 μmol) and Et₃N (8 μL) were added. The mixing was stirred on at rt. Then, the crude mixture was purified using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (MWCO 10 KDa).

Neoglycoprotein 102.

To a solution of OVA-Cy8 (0.8 mg, 1.8 10^{-5} mmol) in DMSO (60 μL), a solution of glycodendron **71** (1.5 mg, 3.9 10^{-4} mmol) in milliQ H₂O (60 μL) was added. The reaction mixture was stirred on at rt. Then, the mixture was purified in milliQ water using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (MWCO 10 KDa). Western-Blot: M ~ 70 KDa

Neoglycoprotein 103.

To a solution of OVA-Cy8 (2 mg, 4.3 10^{-5} mmol) in DMSO (140 μL), a solution of glycodendron **49** (4.8 mg, 9.0 10^{-4} mmol) in milliQ H₂O (140 μL) was added. The reaction mixture was stirred on at rt. Then, the mixture was purified in milliQ water using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (MWCO 10 KDa). Western-Blot: M ~ 100 KDa

Neoglycoprotein 104.

To a solution of OVA-Cy8 (2 mg, 4.3 10^{-5} mmol) in DMSO (140 μL), a solution of glycodendron **99** (5.4 mg, 9.0 10^{-4} mmol) in milliQ H₂O (140 μL) was added. The reaction mixture was stirred on at rt. Then, the mixture was purified in milliQ water using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (MWCO 10 KDa). Western-Blot: M ~ 120 KDa



Capítulo 8

Western-Blotting.

The same amount of proteins were mixed with milliQ H₂O and elution buffer (Laemmli 4x, 4.5% blue bromophenol, 4.5% β-mercaptoethanol) and denatured at 95°C. Samples were analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions and then blotted onto nitrocellulose membrane. Membrane was blocked with BSA 4% in PBS Tween20 0.05% on. Thereafter, membrane was probed with 0.5 μg/μL WGA lectin (in BSA 1% in PBS Tween 20 0.05% solution) at rt for 1h and then incubated with secondary HRP-conjugated antibodies (ABC Kit, Vector Laboratories) for 1 h at rt. Total protein content was assessed with ECL Substrate Kit. The membrane was covered with a mixing of equal parts of the Peroxide Solution and the Luminol Enhancer Solution. The covered membrane was placed in a film cassette with protein side facing up. The proteins were visualized by chemiluminescence in a X ray film (GE Healthcare).

Effect of neoglycoproteins in the activation of DCs.

In a 96 well plate, 5 × 10⁴ immature dendritic cells (differentiated as previously described) were placed in each well in 96 well plate. Solutions of neoglycoproteins **103** and **104**, (concentration ranging from 10⁻¹ μg/mL to 10³ μg/mL) were added to different wells. After 48 h, the cells were isolated. Then, cells were stained for FACS analyses as previously described.

Inhibition studies were performed similarly. Cells were preincubated for 20 min at 37 °C with 100 μg/mL of rabbit anti-human α-CD209 (clone MR-1, AbDSerotec) or/and mouse anti-human α-CD206 (clone 15-2AbDSerotec) or isotype control antibody (Dako Agilent). Subsequently, 10 μg/mL of neoglycoproteins **103** or **104** was added to the cells and incubated for 24h at 37 °C. These cells were then washed with PBS and analyzed via flow cytometry.



8.2.3 Preparation of glyconanogels. Determination of their affinity for Concanavalin A

Polymer 107.

NH₂-PEG-NHBoc **106** (100 mg, 0.032 mmol) was dissolved in anh. DMF (2 mL) under Ar. Anh. *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA, 17 μL, 0.098 mmol) was added to the solution. Separately, 5-hexynoic acid (11 μL, 0.098 mmol) and HATU (37 mg, 0.098 mmol) were dissolved in anh. DMF (2 mL) and stirred for 10 min. Subsequently, this solution was added to the NH₂-PEG-NHBoc solution and the reaction mixture was stirred on at rt. After that time, the solvent was evaporated under vacuum and purification was performed in a Sephadex LH20 column in MeOH. The compound **107** was obtained as a white solid (101 mg, quantitative). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.25 (br s, 1H), 5.03 (br s, 1H), 3.82-3.34 (m, ~ 315H), 3.29-3.17 (m, 2H), 2.26 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.19 (td, *J* = 7.4 Hz, *J* = 2.6 Hz, 2H), 1.94 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.80 (m, 2H), 1.38 (s, 9H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 172.2, 156.0, 83.6, 79.1, 78.4, 73.1, 70.5, 70.2, 69.8, 69.2, 67.9, 62.8, 40.3, 39.1, 34.9, 28.4, 24.2, 17.9.

Polymer 108.

The polymer **107** (101 mg, 0.032 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (2.5 mL) and TFA (0.5 mL). After 2 h stirring at rt, the solvent was evaporated under vacuum and the crude product was purified by Sephadex LH20 column in MeOH. The unprotected intermediate **108** was obtained as a white solid (98 mg, quantitative). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.83 (br s, 3H), 6.32 (br s, 1H), 4.02-3.28 (m, ~ 300H), 3.14 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 2.27 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.21 (td, *J* = 6.9 Hz, *J* = 2.6 Hz, 2 H), 1.95 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.81 (m, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 172.3, 83.6, 70.5, 70.3-69.9, 69.9, 69.1, 67.1, 40.1, 39.1, 34.9, 24.2, 17.9.

Polymer 105.

The intermediate **108** (98 mg, 0.032 mmol) was dissolved in anh. DMF (5 mL) under Ar and Et₃N (24 μL, 0.175 mmol) was added. The solution was cooled down to 0°C and after 10 min acryloyl chloride (13 μL, 0.160 mmol) was slowly added. The mixing was stirred on at rt,



Capítulo 8

protected from light. After that time, DMF was removed under vacuum and the reaction mixture was purified by Sephadex LH20 in MeOH. The polymerizable building block **105** was obtained as a white solid (100 mg, quantitative). After NMR characterization, the product was immediately dissolved in MeOH and stored at rt protected from light. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.86 (br s, 1H), 6.47 (br s, 1H), 6.30-6.07 (m, 2H), 5.58 (dd, *J* = 10.1 Hz, 1.8 Hz, 1H), 3.86-3.30 (m, ~ 315H), 2.29 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.22 (td, *J* = 7.4 Hz, *J* = 2.6 Hz, 2H), 1.96 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.82 (m, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 172.3, 165.6, 131.1, 125.9, 83.6, 70.5, 70.2, 70.1, 69.9, 69.8, 69.1, 39.3, 39.2, 34.9, 24.2, 17.9. MALDI-TOF MS (DCTB): *m/z* calcd: *M_p* 3319; found: *M_p* 3313.

Glycopolymer 109.

The building block **105** (122 mg, 0.039 mmol) and 2-azidoethyl α-D-mannopyranoside **22**⁸² (24 mg, 0.098 mmol) were dissolved in ^tBuOH/H₂O (1:1, 0.05 M final concentration of polymer). Fresh solutions of CuSO₄ pentahydrate (0.026 mmol) and sodium ascorbate (0.129 mmol) were added and the mixture was stirred at rt for 48 h protected from light. A small amount of Quadrasil® MP was added to the crude product and the mixture was shaken for 20 min to remove the copper catalyst. After filtration, the crude was purified by Sephadex LH20 in MeOH, the compound **109** was obtained (108 mg, 82% yield). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) δ: 7.89 (s, 1H), 6.36-6.16 (m, 2H), 5.79 (dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.79 (under D₂O, 1H), 4.69-4.61 (m, 2H), 4.17-4.05 (m, 1H), 4.02-3.46 (m, ~ 380H), 3.39 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.06-2.96 (m, 1H), 2.75 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.97 (m, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ: 176.2, 168.6, 129.9, 127.4, 123.6, 99.5, 85.2, 72.8, 71.6, 70.4, 69.6, 68.8, 68.7, 67.5, 66.3, 65.5, 60.6, 60.4, 49.9, 39.0, 38.9, 35.0, 25.1, 23.9. MALDI-TOF MS: MS (CHCA): *m/z* calcd: *M_p* 3568; found: *M_p* 3740.

Glycopolymer 114.

The building block **105** (53 mg, 0.017 mmol) and 2-azidoethyl β-D-galactopyranoside **113**²⁰⁸ (11 mg, 0.043 mmol) were dissolved in ^tBuOH/H₂O (1:1, 0.05 M final concentration of polymer). Fresh solutions of CuSO₄ pentahydrate (0.011 mmol) and sodium ascorbate (0.056 mmol) were added and the mixture was stirred at rt for 48 h protected from light. A small



amount of Quadrasil® MP was added to the crude product and the mixture was shaken for 20 min to remove the copper catalyst. After filtration, the crude product was purified by Sephadex LH20 in MeOH to yield **114** (46 mg, 80% yield). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) δ: 7.91 (s, 1H), 6.36-6.15 (m, 2H), 5.79 (dd, *J* = 9.9 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.66 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 4.36 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.34-4.25 (m, 1H), 4.17-4.06 (m, 1H), 3.96-3.45 (m, ~ 436H), 3.42-3.31 (m, 2H), 2.75 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.98 (m, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ: 176.3, 168.4, 147.3, 129.9, 127.4, 123.6, 103.0, 75.1, 72.6, 70.8, 70.7, 70.5, 69.6, 68.8, 68.7, 68.5, 68.1, 67.0, 60.9, 50.2, 39.0, 38.9, 35.0, 25.0, 24.0. MALDI-TOF MS: MS (DCTB): *m/z* calcd: *M_p* 3568; found: *M_p* 3481.

Glycopolymer 117.

The building block **105** (97 mg, 0.031 mmol) and glycodendron of 3 mannoses **115**⁸⁶ (93 mg, 0.078 mmol) were dissolved in ^tBuOH/H₂O (1:1, 0.05 M final concentration of polymer). Fresh solutions of CuSO₄ pentahydrate (0.021 mmol) and sodium ascorbate (0.102 mmol) were added and the mixture was stirred at rt for 48 h protected from light. A small amount of Quadrasil® MP was added to the crude product and the mixture was shaken for 20 min to remove the copper catalyst. After filtration, the crude was purified by Sephadex LH20 in MeOH to obtain the compound **117** (90 mg, 67% yield). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) δ: 8.05 (s, 3H), 7.85 (s, 1H), 6.36-6.16 (m, 2H), 5.79 (dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.79 (under D₂O, 3H), 4.71-4.63 (m, 4H), 4.62-4.54 (m, 7H), 4.16-3.33 (m, 374H), 3.15-3.03 (m, 3H), 2.72 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.95 (m, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ: 176.1, 168.5, 147.4, 144.3, 129.9, 127.4, 125.4, 123.7, 99.6, 86.2, 72.8, 71.7, 70.5, 69.9, 69.6, 68.8, 68.7, 68.3, 67.5, 66.4, 65.5, 63.6, 60.7, 50.0, 49.9, 44.8, 39.0, 38.9, 35.0, 25.1, 24.0. MALDI-TOF MS: MS (CHCA): *m/z* calcd: *M_p* 4517; found: *M_p* 4505.

Glycopolymer 118.

The building block **105** (66 mg, 0.021 mmol) and glycodendron of 9 mannoses **71**⁸³ (200 mg, 0.053 mmol) were dissolved in ^tBuOH/H₂O (1:1, 0.05 M final concentration of polymer). Fresh solutions of CuSO₄ pentahydrate (0.014 mmol) and sodium ascorbate (0.069 mmol) were added and the mixture was stirred at rt for 48 h protected from light. A small amount of Quadrasil®



Capítulo 8

MP was added to the crude product and the mixture was shaken for 20 min to remove the copper catalyst. After filtration, the crude was purified by ultrafiltration in H₂O with YM5 membranes to obtain the compound **118** (90 mg, 62% yield). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) δ: 8.02 (s, 9H), 7.97 (s, 3H), 7.83 (s, 1H), 6.36-6.15 (m, 2H), 5.78 (dd, *J* = 9.9 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.79 (under D₂O, 9H), 4.67-4.60 (m, 12H), 4.58-4.50 (m, 20H), 4.50-4.46 (m, 3H), 4.15-4.01 (m, 9H), 3.96-3.27 (m, 450H), 3.15-3.03 (m, 9H), 2.70 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.93 (m, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ: 176.2, 168.4, 144.3, 144.2, 129.9, 127.4, 125.3, 125.1, 123.6, 99.6, 72.8, 70.5, 69.9, 69.6, 68.9, 68.8-68.7, 68.2, 67.5, 66.4, 65.4, 63.6, 60.7, 50.0, 49.8, 44.8, 39.0, 38.9, 35.0, 25.1, 24.0. MALDI-TOF MS: MS (CHCA): *m/z* calcd: *M*_p 7101; found: *M*_p 7137.

Glycopolymer 119.

The building block **105** (27 mg, 0.009 mmol) and mannosyl nonasaccharide Man₉ **44**⁸⁷ (33 mg, 0.022 mmol) were dissolved in ^tBuOH/H₂O (1:1, 0.05 M final concentration of polymer). Fresh solutions of CuSO₄ pentahydrate (0.006 mmol) and sodium ascorbate (0.028 mmol) were added and the mixture was stirred at rt for 48 h protected from light. A small amount of Quadrasil® MP was added to the crude product and the mixture was shaken for 20 min to remove the copper catalyst. After filtration, the crude was purified by Sephadex LH20 in MeOH to obtain the compound **119** (35 mg, 87% yield). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) δ: 7.88 (s, 1H), 6.36-6.16 (m, 2H), 5.79 (dd, *J* = 9.9 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H) 5.41 (br s, 1H), 5.35-5.28 (m, 2H), 5.15 (br s, 1H), 5.09-5.02 (m, 3H), 4.87 (br s, 1H), 4.67-4.60 (m, 2H), 4.57 (br s, 1H), 4.31-4.20 (m, 1H), 4.18-3.46 (m, 491H), 3.40-3.36 (m, 2H), 2.75 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.98 (m, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ: 176.2, 168.5, 129.9, 127.4, 123.6, 102.3, 102.2 (2C), 100.7, 100.6 (2C), 99.6, 99.5, 98.0, 86.0, 78.9, 78.6, 78.5, 73.2-73.1, 72.7, 71.6, 70.3, 70.1, 70.0, 69.6, 68.8, 68.7, 67.5, 66.9-66.8, 61.2-60.9, 53.0, 39.0, 38.9, 34.9, 25.1, 24.0. MALDI-TOF MS: MS (CHCA): *m/z* calcd: *M*_p 4865; found: *M*_p 5016.

General procedure for the preparation of nanogels 120-124.

Nanogels were synthesized by free radical polymerization using a miniemulsion technique to template the nanogels formation. In a representative example, mannose-polymer **109** (23 mg,



6.8 μmol , 1 eq), PEG-diacrylate (0.5 μL , 0.97 μmol , 0.15 eq) and APS (1.79 mg, 7.8 μmol , 1.15 eq) were dissolved in 250 μL of MilliQ water and mixed with 15 mL of cyclohexane containing Tween[®] 80 (100 mg) and Span[®] 80 (300 mg). The mixture was then ultrasonicated with a Branson Digital Sonifier (5 \times 30 seconds) yielding a stable emulsion. DLS measurements were performed right after ultrasonication to check the size and dispersity of the nanodroplets. Next, the solution was flushed with Ar and TEMED (1.15 μL , 7.8 μmol , 1.15 eq) was added. The resulting solution was stirred on under Ar atmosphere. Afterwards, 30 mL of cyclohexane were added and the solution was centrifuged (1 h, 6000 rpm). A gel-like precipitate could be observed. The supernatant was removed and 15 mL more of cyclohexane were added. The solution was centrifuged again (30 min, 6000 rpm, the procedure was done twice). After complete solvent drying, MilliQ water was added and the resulting solution was washed extensively using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (MWCO 30 KDa). The resulting nanogels (3.8 mg) were either freeze-dried or kept in solution at 4°C for their storage. The other glyconanogels were prepared following this methodology.

SEM and TEM analyses.

SEM and TEM analyses were performed on a Hitachi S4800 SEM-FEG microscope of high resolution. The microscope was equipped with a Bruker-X Flash-4010 EDX detector with a resolution of 133 eV (at the MnK α line), and a detector with sample holder to work in transmission mode (STEM-in- SEM). A Leica EM ACE600 sputter coater (Cr) was employed. For TEM and SEM studies a drop of the nanogels solution in MilliQ water (0.02-0.04 mg/mL) was settled on a Formvar precoated copper grid (400 mesh; Aname S. L.) and allowed to dry at rt for 12 h. Statistical analysis was performed using Image J software.

Determination of the amount of carbohydrates in the nanogels.

The amount of carbohydrates in the nanogels was measured following a procedure described elsewhere.²¹⁰ In brief, the amount of carbohydrate could be determined by UV-Vis spectroscopy in H₂SO₄/H₂O ($\lambda = 315$ nm) after performing a calibration curve for each glycosystem, namely galactose, mannose, dendron of 3 mannoses, dendron of 9 mannoses and epitope Man₉. The weight percentage of each glycosystem could be estimated by the following equation, where



Capítulo 8

$W_{\text{glycosystem}}$ and W_{NG} stand for the glycosystem weight and the weight of the nanogels respectively:

$$\text{Glycosystem loading (wt. \%)} = (W_{\text{glycosystem}} / W_{\text{NG}}) \times 100$$

Lectin binding by turbidimetry assays.

A solution of each glyconanogel (142.8 µg/mL in 0.1 M Tris-HCl, 0.9 M KCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, pH=7.2) was sequentially added, in 35 µL portions, to a solution of ConA (350 µL, 0.45 mg/mL in the same buffer). After each addition, the resulting mixture was allowed to stand for 5 min before the absorbance was measured at 340 nm and the next nanogel addition was performed. The values correspond to 3 independent experiments with error bars corresponding to the standard errors of the mean. NG-Man did not show any sign of aggregation, even after the addition of 1.25 mg of the NG. Higher concentrations could not be analyzed by this method due to precipitation of the ConA-nanogels aggregates. In accordance with the reversible nature of the interaction, the addition of a saturated solution of α-D-mannose completely removed turbidity.

Lectin binding assays by DLS.

ConA agglutination assays were used to investigate the ability of the glyconanogels to bind mannose-binding lectins by DLS. ConA was dissolved at 0.5 mg/mL in 0.1 M Tris-HCl pH 7.2 containing 0.9 M KCl, 1 mM MnCl₂ and 1 mM CaCl₂. 500 µL of ConA were placed into a DLS microcuvet, and DLS measurements for the lectin alone were performed. Afterwards, increasing amounts (starting from 5 µL) of a solution of nanogel at 0.1 mg/mL were added and DLS measurements were recorded 5 min after mixing.



8.2.4 Evaluation of uptake capacity of glyconanogels in tumor cells

Cell culture conditions.

The MCF7 breast adenocarcinoma cell line was grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 4500 mg glucose /L (Sigma Aldrich) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS) at 37°C in 5% carbon dioxide and 95% air. Cells underwent passage once weekly. The 4T1 cell line was grown in RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher) supplemented with 10% v/v FBS at 37°C in 5% carbon dioxide and 95% air. Cells underwent passage twice a week. MCF-10A was cultured in complete MCF-10A growth medium composed of DMEM/F12 media supplemented with 5% FBS (penicillin, streptomycin). The MCF10A cell line was grown in a 5% CO₂-humidified incubator at 37°C. The MDA-MB-231 cell line were maintained in DMEM/F12 media (Gibco, Waltham, MA) with 10% FBS under standard tissue culture conditions. Media was replaced every 3 days.

Western-Blotting.

Total cellular proteins were extracted with TrypLE™ buffer (Thermo Fisher) and 1x protease inhibitor cocktail. Protein content was quantified by the Bradford assay and 40 µg of protein extract was used to study the expression of Endo180 receptor by western blotting. Proteins were separated by SDS-PAGE under reducing conditions and then blotted onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% defatted milk in TBS-T (0.05 mol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.8) for 1h. Thereafter, membranes were probed on at 4 °C with primary antibodies in the same blocking solution and then incubated with secondary HRP-conjugated antibodies (1:5000) for 1 h at rt. The primary antibodies Endo180 (B-10): sc-271148. (1:500) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. and α-tubulin (1:5000) as loading control from Sigma Aldrich. Total protein content was assessed with ECL Substrate Kit. The membrane was covered with a mixing of equal parts of the Peroxide Solution and the Luminol Enhancer Solution. The covered membrane was placed in a film cassette with protein side facing up. Then, a X-ray film was placed on top of membrane, and expose for 20 seconds. The proteins were visualized by quimioluminescence in a Fujifilm LAS-300 imager and the bands were quantified by densitometry using the program ImageJ (NIH).



Capítulo 8

Control polymer 125.

The building block **105** (900 mg, 0.288 mmol) and 2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethanol (1.4 mL of a commercial solution 0.5M in ^tBuOH, 0.72 mmol) was dissolved in H₂O (1.4 mL, 0.05 M final concentration of polymer). Fresh solutions of CuSO₄ pentahydrate (0.19 mmol) and sodium ascorbate (0.95 mmol) were added and the mixture was stirred at rt for 48 h protected from light. A small amount of Quadrasil® MP was added to the crude product and the mixture was shaken for 20 min to remove the copper catalyst. After filtration, the crude product was purified by Sephadex LH20 in MeOH to yield **125** (1.118 g, 85% yield). ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ: 7.87 (s, 1H), 6.37-6.16 (m, 2H), 5.78 (dd, *J* = 9.9 Hz and 1.8 Hz, 1H), 4.60 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.98 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.93-3.46 (m, ~ 374H), 3.39 (m, 2H), 2.75 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.97 (m, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 178.4, 170.7, 132.7, 130.1, 126.4, 90.9, 88.8, 86.8, 82.7, 78.6, 76.2, 75.4, 74.4, 74.3 73.3-71.0, 70.2, 70.0, 69.2, 66.0, 63.0, 62.0, 57.8, 55.7, 52.5, 41.7, 41.5, 37.7, 27.8, 26.7.

General procedure for the preparation of nanogels 126-127 on high scale

Nanogels were synthesized by free radical polymerization using a miniemulsion technique to template nanogels formation. In a representative example, control-polymer **125** (336 mg, 102 μmol, 1 eq), PEG-diacrylate (7.5 μL, 15 μmol, 0.15 eq) and APS (26.8 mg, 118 μmol, 1.15 eq) were dissolved in 3.75 mL of MilliQ water and mixed with 225 mL of cyclohexane containing Tween® 80 (1.5 g) and Span® 80 (4.5 g). The mixture was then ultrasonicated with a Branson Digital Sonifier (5 × 8 minutes) yielding a stable emulsion. DLS measurements were performed right after ultrasonication to check the size and dispersity of the nanodroplets. Next, the solution was flushed with Ar and TEMED (17.3 μL, 118 μmol, 1.15 eq) was added. The resulting solution was stirred on under Ar atmosphere. Afterwards, 450 mL of cyclohexane were added and the solution was centrifuged (1 h, 6000 rpm). A gel-like precipitate could be observed. The supernatant was removed and 225 mL more of cyclohexane were added. The solution was centrifuged again (30 min, 6000 rpm, the procedure was done twice). After complete solvent drying, MilliQ water was added and the resulting solution was washed extensively using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (MWCO 30 KDa). The resulting nanogel **127** (20 mg) were



either freeze-dried or kept in solution at 4°C for their storage. The other nanogel **126** was prepared following this methodology.

Cell viability assays.

Cell lines were seeded in sterile 96-wells microtiter plates at the concentration of 7500 cells cm^{-2} for MDA-MB-231 and 1000 cells cm^{-2} for MCF10A. Plates were incubated for 24 h and then control and mannose nanogels were tested at the final concentrations ranging from 0 to 3 mg mL^{-1} of nanogel. After 72 h of treatment cell viability was measured using the Cell Titer 96 Aqueous nonradioactive cell proliferation assay (Promega, Corporation, Spain, UE) in accordance with the manufacturer's instructions. The optical density of each well was measured at 490 nm using a Wallac 1420 Workstation (PerkinElmer, MA, USA). Cell viability was expressed as a percentage of the viability of untreated control cells.

General procedure for the preparation of fluorescent nanogels 132-133

Nanogels were synthesized by free radical polymerization using a miniemulsion technique to template nanogels formation. In a representative example, mannose-polymer **109** (230 mg, 68 μmol , 1 eq), polymer **131** (17 mg, 5 μmol , 0.07 eq), PEG-diacrylate (5 μL , 10 μmol , 0.15 eq) and APS (17.9 mg, 78 μmol , 1.15 eq) were dissolved in 2.5 mL of MilliQ water and mixed with 150 mL of cyclohexane containing Tween[®] 80 (1 g) and Span[®] 80 (3 g). The mixture was then ultrasonicated with a Branson Digital Sonifier (5 \times 5 minutes) yielding a stable emulsion. DLS measurements were performed right after ultrasonication to check the size and dispersity of the nanodroplets. Next, the solution was flushed with Ar and TEMED (11.5 μL , 78 μmol , 1.15 eq) was added. The resulting solution was stirred on under Ar atmosphere. Afterwards, 300 mL of cyclohexane were added and the solution was centrifuged (1 h, 6000 rpm). A gel-like precipitate could be observed. The supernatant was removed and 150 mL more of cyclohexane were added. The solution was centrifuged again (30 min, 6000 rpm, the procedure was done twice). After complete solvent drying, MilliQ water was added and the resulting solution was washed extensively using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (MWCO 30 KDa). The resulting nanogels **132** (21 mg) were either freeze-dried or kept in solution at 4°C for their storage. The other fluorescent nanogel **133** was prepared following this methodology.



Capítulo 8

Cellular uptake studies.

Uptake assay was performed in MDA-MB-231 cell line at 37°C. Cells were seeded in sterile six-wells plates at concentration of 257143 cells cm⁻² for MDA-MB-231 and 411428 cells cm⁻² for MCF10A and incubated for 24 h. To perform the 37 °C uptake experiment, cells were incubated during 3 h with 0.5 mg mL⁻¹ of each nanogel. After that, medium was removed and two washes with PBS 0.1 wt% BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, Spain, UE) were performed and finally cells were dissociated with trypsin and collected in 200 µL of PBS 0.1 wt% BSA. In order to detect the fluorescence into the cells, a FC500 MCL Flow Cytometer (Beckman-Coulter, CA, USA) was used.

Preparation of fluorescent nanogel 134.

NG **134** was synthesized following the procedure previously described. In brief, glycopolymer **118** (533 mg, 77 µmol, 1 eq), polymer **131** (66 mg, 19 µmol, 0.25 eq), PEG-diacrylate (6 µL, 11 µmol, 0.15 eq) and APS (20.3 mg, 89 µmol, 1.15 eq) were dissolved in 2.8 mL of MilliQ water and mixed with 170 mL of cyclohexane containing Tween[®] 80 (1.1 g) and Span[®] 80 (3.3 g). The mixture was then ultrasonicated with a Branson Digital Sonifier (5 × 6 minutes) yielding a stable emulsion. DLS measurements were performed right after ultrasonication to check the size and dispersity of the nanodroplets. Next, the solution was flushed with Ar and TEMED (13.3 µL, 89 µmol, 1.15 eq) was added. The resulting solution was stirred on under Ar atmosphere. Afterwards, the nanogels were purified as described. The resulting nanogel **134** (28 mg) was either freeze-dried or kept in solution at 4°C for their storage.

Polymer 135.

BocHN-PEG-NH₂ **106** (100 mg, 0.032 mmol) was dissolved in anh. DMF (3.0 mL) under Ar and Et₃N (25 µL, 0.176 mmol) was added. The solution was cooled down to 0°C and after 10 min acryloyl chloride (13 µL, 0.160 mmol) was added. The mixing was stirred on at rt protected from light. After that time, DMF was removed under vacuum and the reaction mixture was purified by Sephadex LH20 in MeOH. The pure compound **135** was obtained as a yellow oil (101 mg, quantitative). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.71 (br s, 1H), 6.28-5.99 (m, 2H), 5.53



(m, 1H), 5.05 (br s, 1H), 3.91-3.30 (m, ~ 374H), 3.22 (m, 2H), 1.37 (s, 9H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.5, 155.8, 131.0, 125.9, 79.1, 73.6, 72.5, 71.5, 70.5, 70.1, 69.7-69.4, 68.4, 40.3, 39.2, 28.3.

Polymer 136.

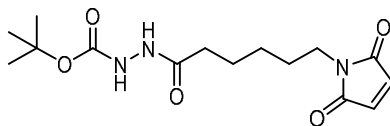
Polymer **135** (101 mg, 0.032 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (2.5 mL) and TFA (0.5 mL). After 2 h stirring at rt, the solvent was evaporated under vacuum and the crude product was purified by Sephadex LH20 column in MeOH. The unprotected derivate **136** was obtained as a yellow oil (98 mg, quantitative). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.88 (br s, 3H), 6.76 (br s, 1H), 6.36-6.02 (m, 2H), 5.55 (dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H), 3.93-3.30 (m, ~ 385H), 3.13 (m, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.6, 131.1, 126.0, 73.6, 72.6, 70.5, 70.4, 70.3, 70.1-69.9, 69.8, 68.5, 67.1, 40.0, 39.3.

Labeled polymer 131.

The building block **136** (55.8 mg, 0.018 mmol) was dissolved in anh. DMF (6.0 mL) under Ar. Then, anh. Et_3N (7 μL) was added to the solution and stirred 10 min. Separately, Oregon GreenTM 488 carboxylic acid, succinimidyl ester, 5-isomer (**128**) (12.2 mg, 0.024 mmol) was dissolved in anh. DMF under Ar. Subsequently, this mixing was added to the solution of the intermediate **136** and the reaction mixture was stirred on at rt. After that time, the solvent was evaporated under vacuum and purification was performed in Sephadex LH20 column in MeOH. The compound **131** was obtained as an orange solid (63 mg, quantitative). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.46 (s, 1H), 8.21 (dd, $J = 7.9$, 1.6 Hz, 1H), 7.53 (br s, 1H, NH), 7.23 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.97-6.79 (m, 2H), 6.65 (br s, 1H, NH), 6.43-6.30 (m, 2H), 6.29-6.08 (m, 2H), 5.58 (dd, $J = 10.1$, 1.8 Hz, 1H), 3.89-3.35 (m, ~ 325 H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.7, 137.1, 134.6, 131.0, 126.2, 124.0, 113.4 (2C), 105.6 (2C), 73.7, 72.6, 70.5, 70.2, 69.7, 68.5, 67.4, 40.2, 39.3.



Capítulo 8

tert-Butyl 2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl)hydrazine-1-carboxylate (148).

6-Maleimidocaproic acid **146** (210 mg, 0.99 mmol) in anh. CH_2Cl_2 (10.0 mL) was stirred under Ar at rt for 3h with DCC (151.8 mg, 0.74 mmol) and NHS (86.4 mg, 0.74 mmol). After, *tert*-butylcarbazate **147** (99.2 mg, 0.74 mmol) was added. The reaction mixture was kept on at rt. Then, the reaction mixture was filtered and the crude was purified by silica gel column chromatography (CH_2Cl_2 / MeOH 100:2). The protected hydrazide **148** was obtained in 70% yield (215 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.03 (br s, 1H, NH), 6.82 (br s, 1H, NH), 6.65 (s, 2H, 2xH_{maleimido}), 3.46 (m, 2H), 2.17 (t, 2H), 1.68-1.49 (m, 4H), 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.29 (m, 2H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 172.6 (CONH), 170.9 (CO_{maleimido}), 155.8 (OCONH), 134.0 (CH_{maleimido}), 81.4 (C(CH₃)₃), 53.5, 37.5, 33.5, 28.1 (C(CH₃)₃), 26.1, 24.6.

Polymer 138.

Polymer **136** (388 mg, 0.13 mmol) was dissolved in 30 mL phosphate buffer (PB) 10 mM (pH 7.4). 2-iminothiolane (27 mg, 0.19 mmol) was added in 14 mL of PB (pH 7.4) and the reaction mixture was stirred for 1 hr at rt. Then, **139**²⁵² (232 mg, 0.19 mmol) was added in 171 mL DMF and the mixture was stirred on at rt. After that time, the crude product was purified by Sephadex in MeOH. The NMR spectrum showed a complex mixture of signals where the incomplete reaction is observed.

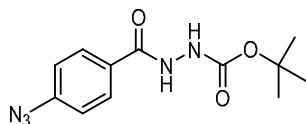
Polymer 150.

Polymer **136** (50 mg, 0.016 mmol) and 2-Iminothiolane (7 mg, 0.049 mmol) were dissolved in 0,5 mL phosphate buffer (PB) 10 mM (pH 7.4) and the reaction mixture was stirred for 1 hr at rt. Then, **148** (32 mg, 0.10 mmol) was added in 0.5 mL DMF and the mixture was stirred on at



rt. After that time, the crude product was purified by Sephadex in MeOH. The NMR spectrum showed a complex mixture of signals where the incomplete reaction is observed.

***tert*-Butyl 2-(4-azidobenzoyl)hydrazine-1-carboxylate (**153**).**



4-azidobenzoic acid **152** (250 mg, 1.53 mmol) and *tert*-butylcarbazate **147** (210.8 mg, 1.56 mmol) were dissolved in anh. CH₂Cl₂ (15.0 mL) under Ar. Then, EDCI (309 mg, 1.58 mmol) was added to the previous solution and the mixing was stirred on. Then, the residue was dissolved with DCM and washed with NaHCO₃ sat. aq. soln. The organic phase was dried over anh. MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated to obtain the product **153** (308 mg, 1.11 mmol, 73%) as a yellow amorphous solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.35 (br s, 1H, NH), 7.89-7.70 (m, 2H, 2xH-Ar), 7.12-6.92 (m, 2H, 2xH-Ar), 6.76 (br s, 1H, NH), 1.49 (s, 9H, C(CH₃)₃). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.0 (CO), 156.3 (CO), 144.1 (C_{ipso}Ar), 129.3 (C-Ar), 128.1 (C_{ipso}Ar), 119.1 (C-Ar), 82.3 (C(CH₃)₃), 28.3 (C(CH₃)₃). ESI-MS: *m/z* calcd. for C₁₂H₁₅N₅O₃: 277.1; found: 300.0 [M+Na]⁺,

Polymer 154.

Polymer **105** (196 mg, 0.063 mmol) and *tert*-butyl 2-(4-azidobenzoyl)hydrazine-1-carboxylate **153** (52.2 mg, 0.188 mmol) were dissolved in ^tBuOH/H₂O (1:1, 0.05 M final concentration of polymer). Fresh solutions of CuSO₄ pentahydrate (0.041 mmol) and sodium ascorbate (0.207 mmol) were added and the mixture was stirred at rt for 48 h protected from light. A small amount of Quadrasil® MP was added to the crude product and the mixture was shaken for 20 min to remove the copper catalyst. After filtration, the crude product was purified by Sephadex LH20 in MeOH to yield the intermediate **154** (192 mg, 90% yield). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.59 (br s, 1H), 8.07-8.01 (m, 2H), 7.95 (s, 1H), 7.90-7.84 (m, 2H), 6.99 (br s, 1H), 6.74 (br s, 1H), 6.66 (br s, 1H), 6.35-6.09 (m, 2H), 5.60 (dd, *J* = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 3.88-3.39



Capítulo 8

(m, ~ 387H), 2.86 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.29 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.09 (m, 2H), 1.50 (s, 9H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 172.6, 165.7, 165.6, 155.6, 148.4, 139.4, 132.0, 131.1, 129.3, 126.1, 119.7, 119.3, 87.1, 81.2, 73.6, 72.6, 70.9-70.2, 69.9, 69.7, 68.5, 67.4, 54.0, 39.3, 39.2, 35.3, 28.2, 25.1, 24.7.

Polymer 155.

Protected polymer **154** (192 mg, 0.056 mmol) was dissolved TFA (0.23 mL). After 1 h stirring at rt, the solvent was evaporated under vacuum and the crude product was purified by Sephadex LH20 column in MeOH. The unprotected polymer **155** was obtained as a yellow oil (191 mg, quantitative). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.49-7.62 (m, 10H), 6.78 (br s, 1H), 6.65 (br s, 1H), 6.31-6.06 (m, 2H), 5.60 (dd, $J = 10.0, 1.8$ Hz, 1H), 4.09-3.18 (m, ~ 387H), 2.82 (m, 2H), 2.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.03 (m, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 172.6, 165.7, 131.1, 126.2, 119.7, 119.4, 87.1, 81.2, 73.7, 72.7, 72.6, 71.6, 70.6, 70.3, 69.9, 69.8, 68.5, 67.5, 61.7, 54.0, 45.6, 39.4, 39.3, 35.4, 29.7, 25.2, 24.8.

Polymer 156.

The building block **155** (48 mg, 0.014 mmol) were dissolved in absolute EtOH (0.35 mL) under Ar. Separately, the compound **142** was dissolved in absolute EtOH (0.7 mL) under Ar. Subsequently, the solutions were mixed and the reaction was stirred at rt for 48 h. After that time, the crude product was purified by Sephadex LH20 in MeOH. The NMR spectrum showed a complex mixture of signals where the incomplete reaction is observed.



ANEXO I
SELECCIÓN DE ESPECTROS DE RMN Y ESI-MS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

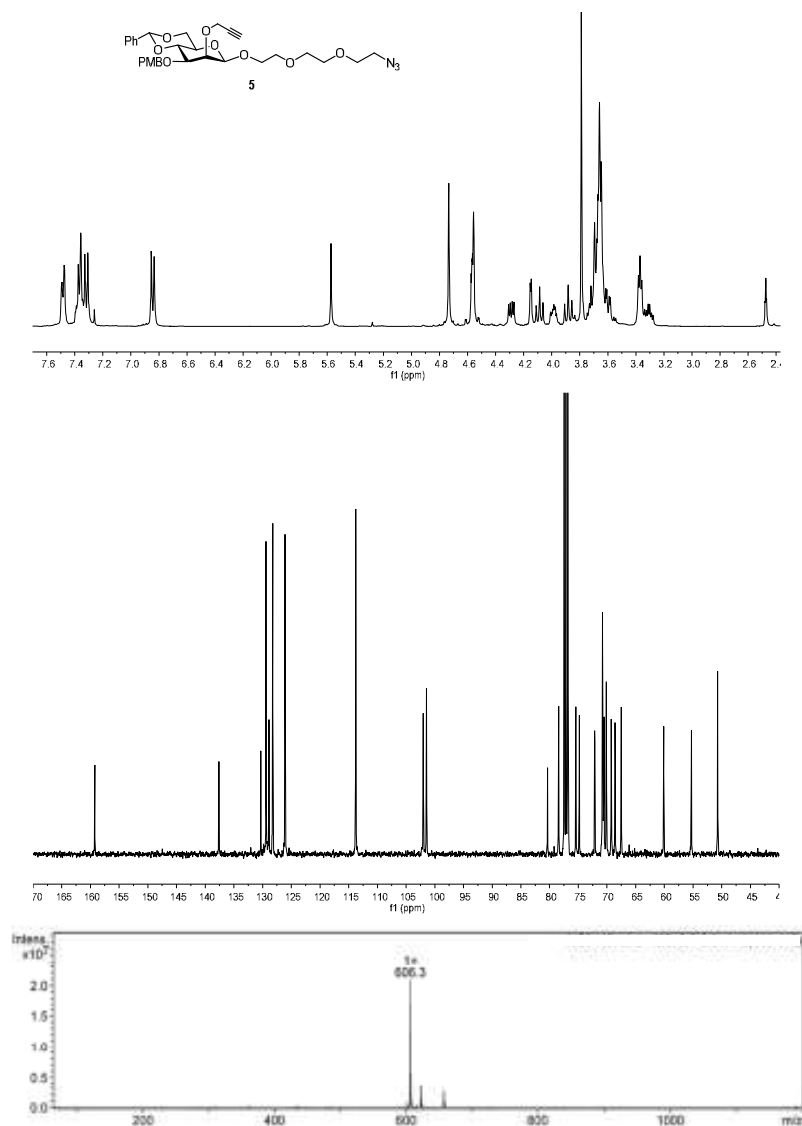
FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

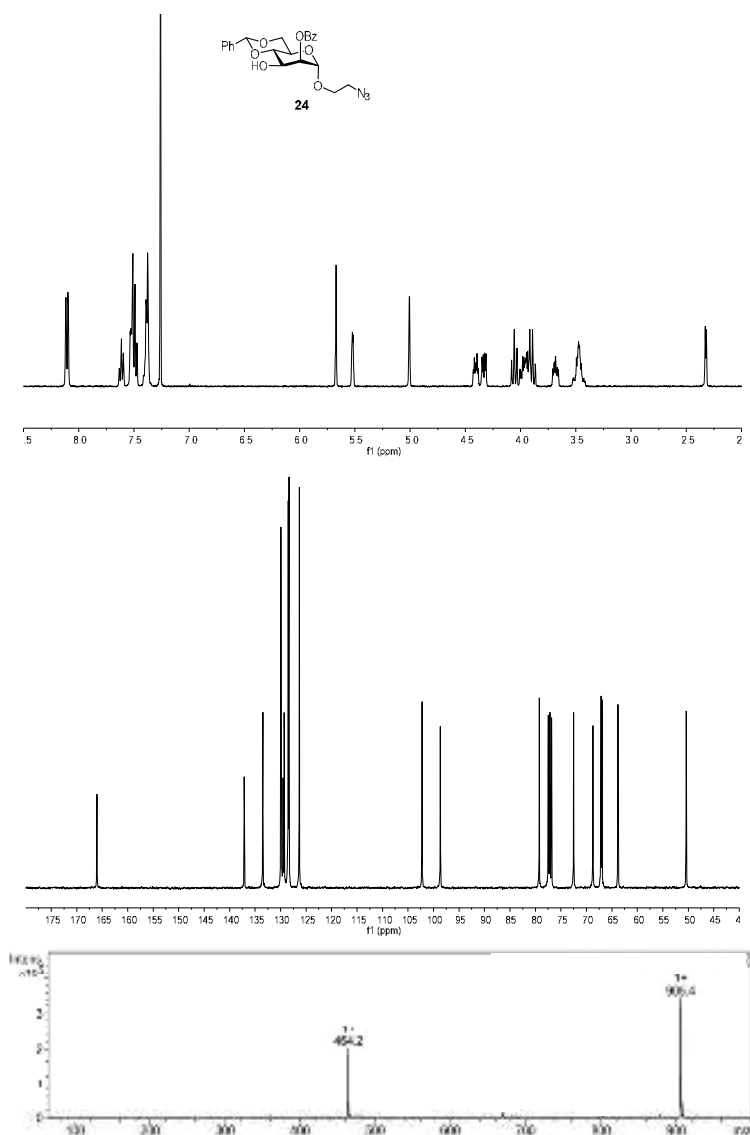
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto 5, según orden de aparición.



Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **24**, según orden de aparición.

320

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

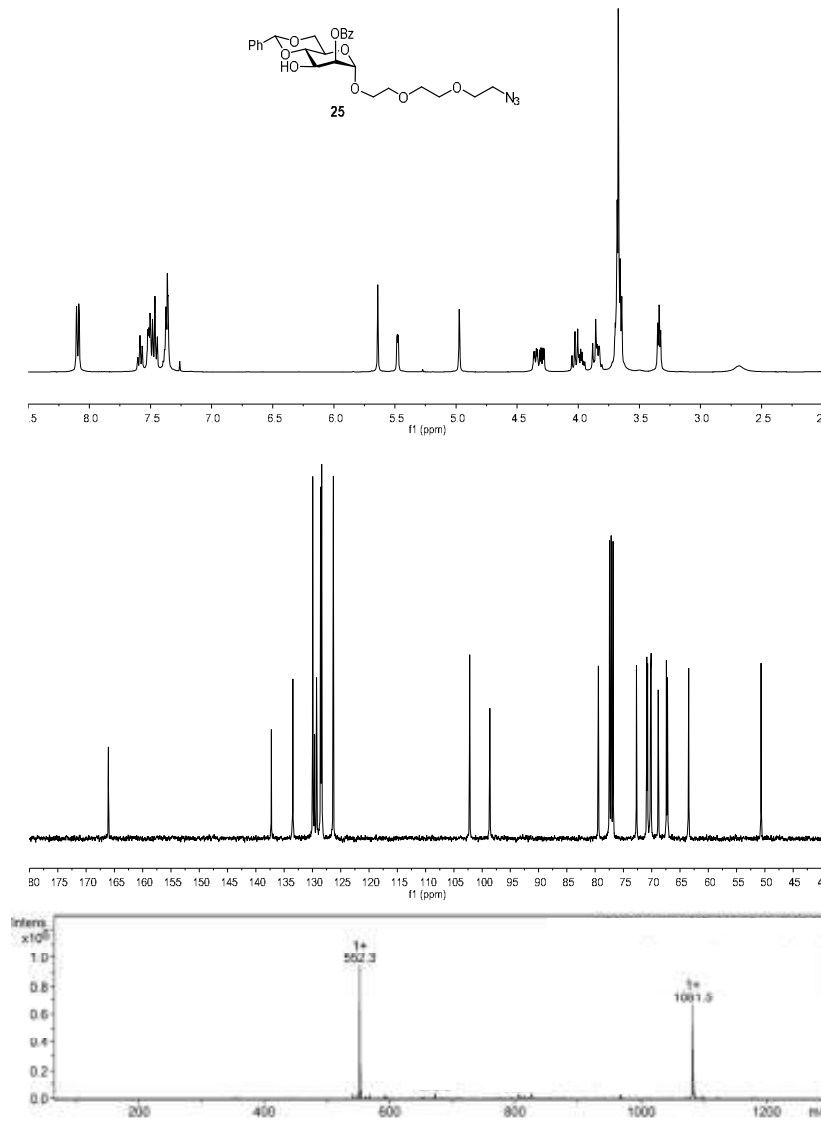
FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

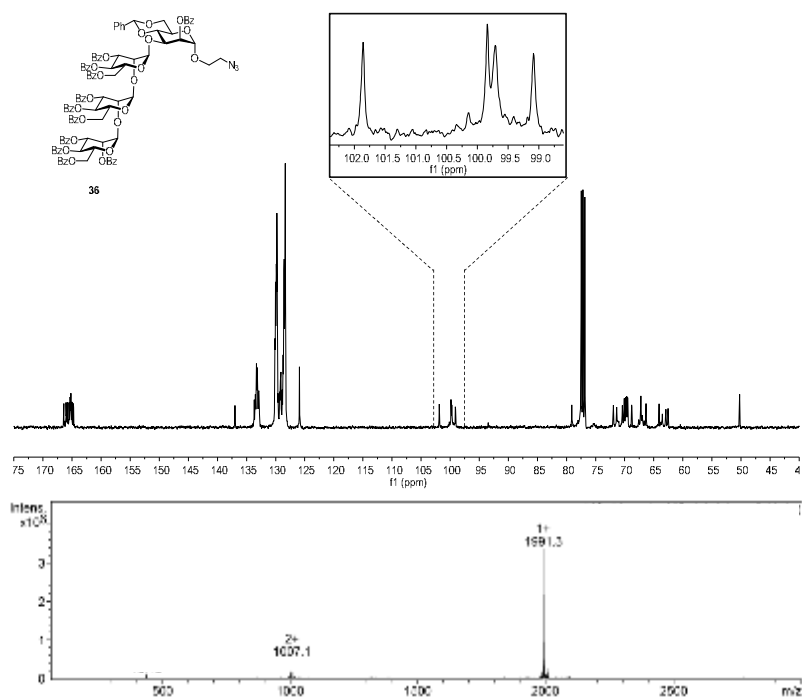
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **25**, según orden de aparición.



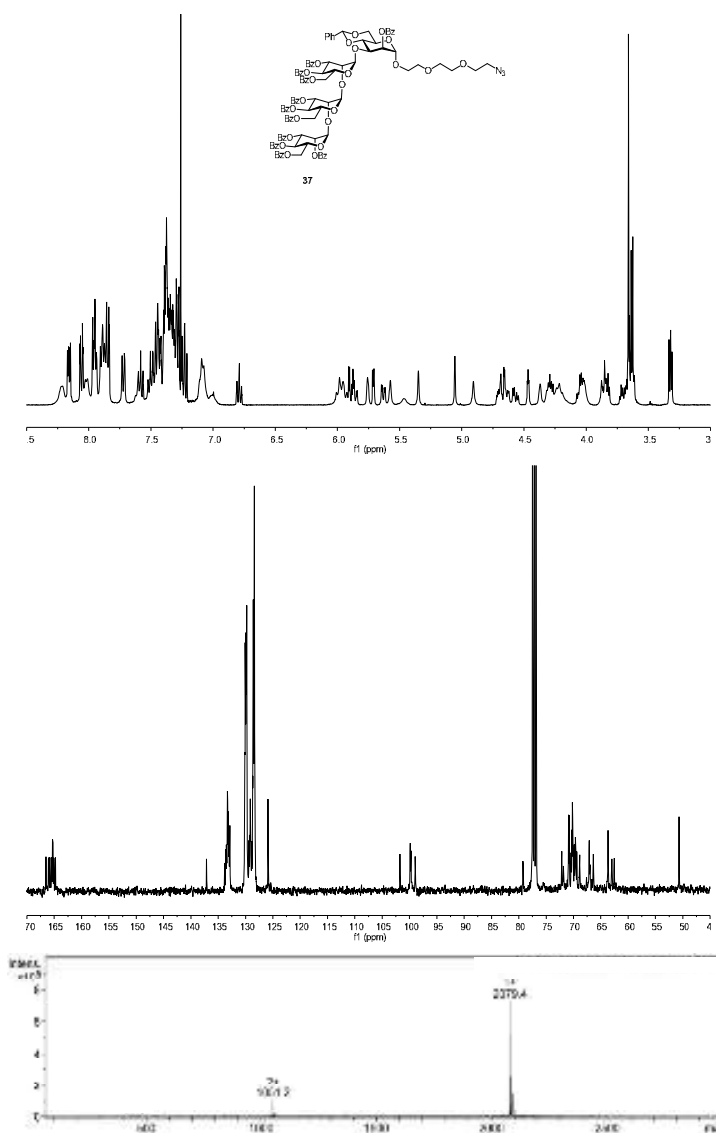
Anexo I



Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3 , 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **36**, según orden de aparición.



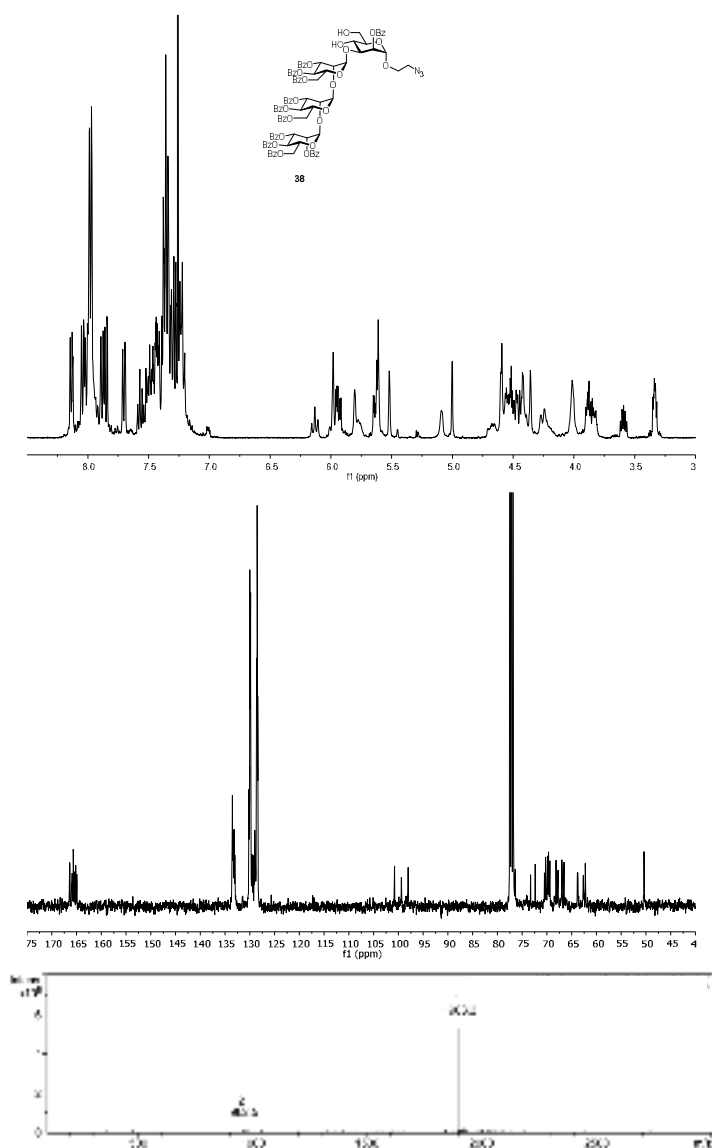
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto 37, según orden de aparición.



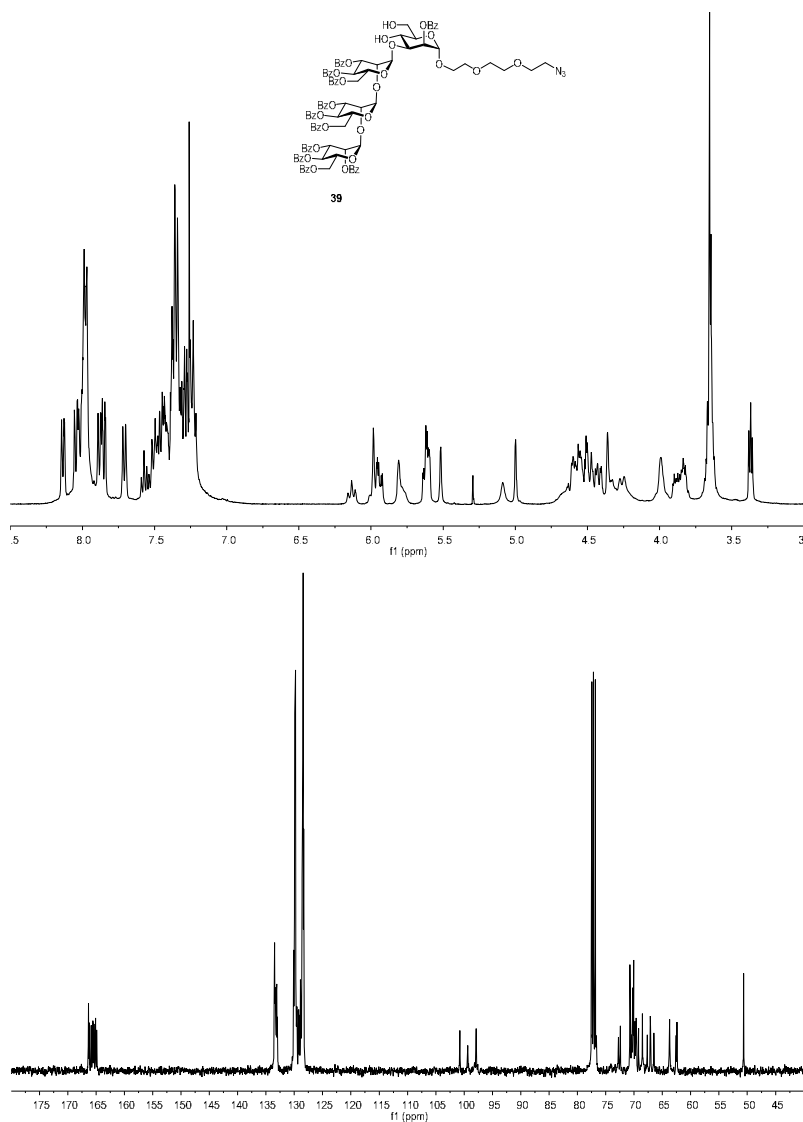
Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto 38, según orden de aparición.



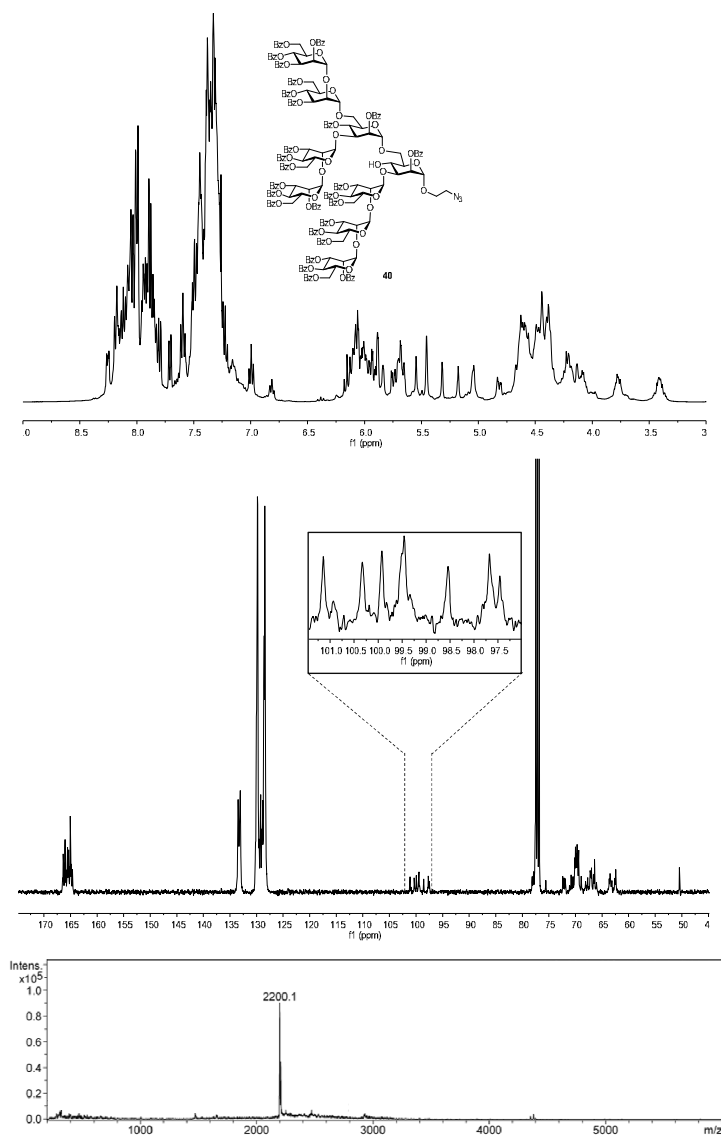
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) del compuesto **39**, según orden de aparición.



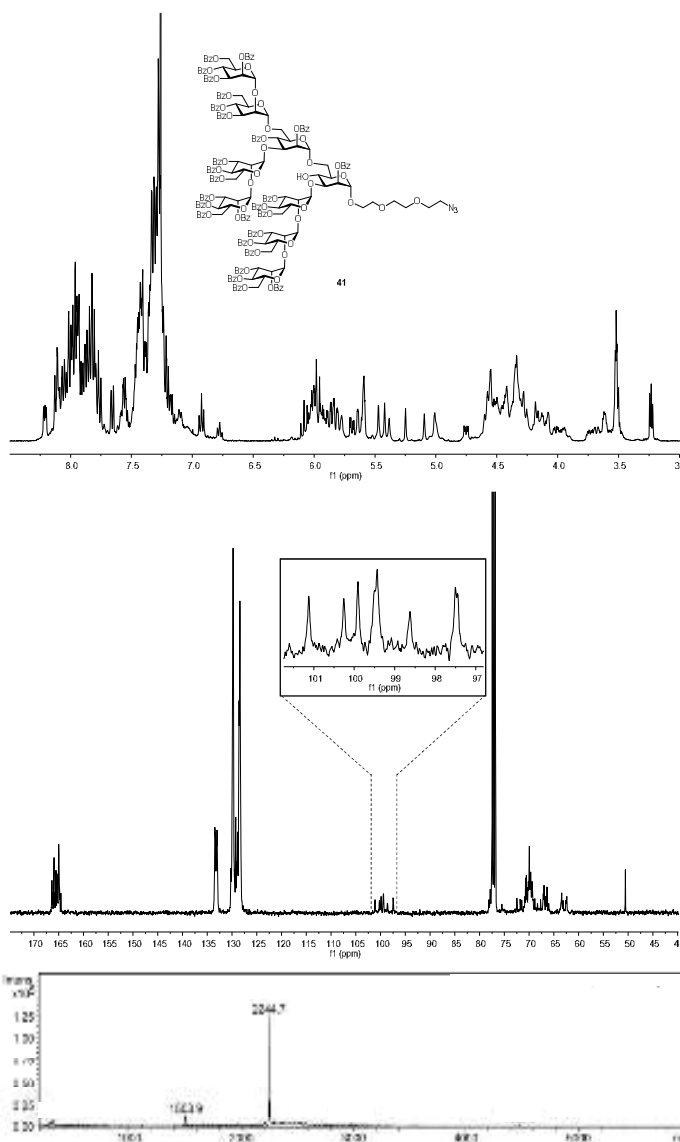
Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **40**, según orden de aparición.



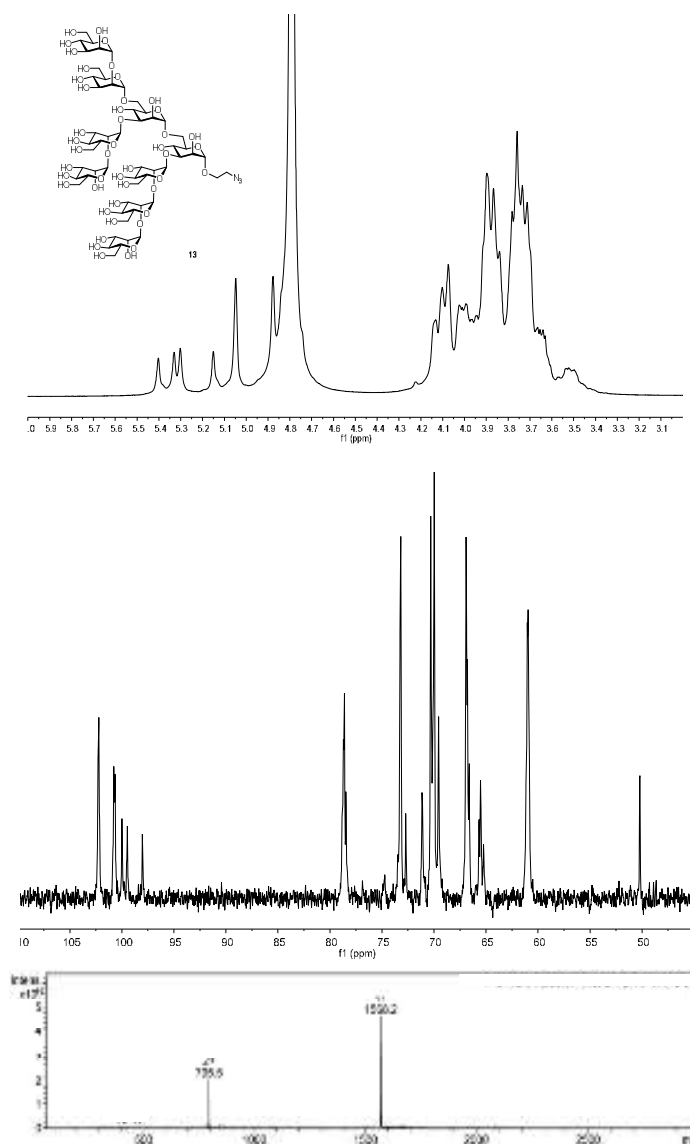
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **41**, según orden de aparición.



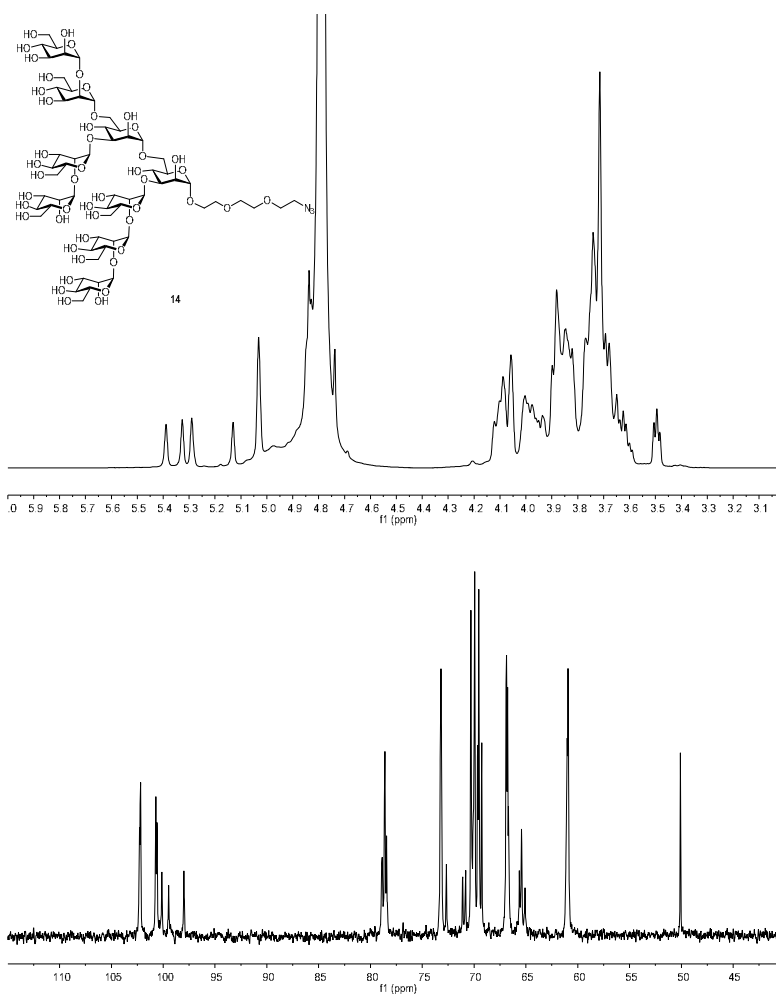
Anexo I



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K), espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O , 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **13**, según orden de aparición.



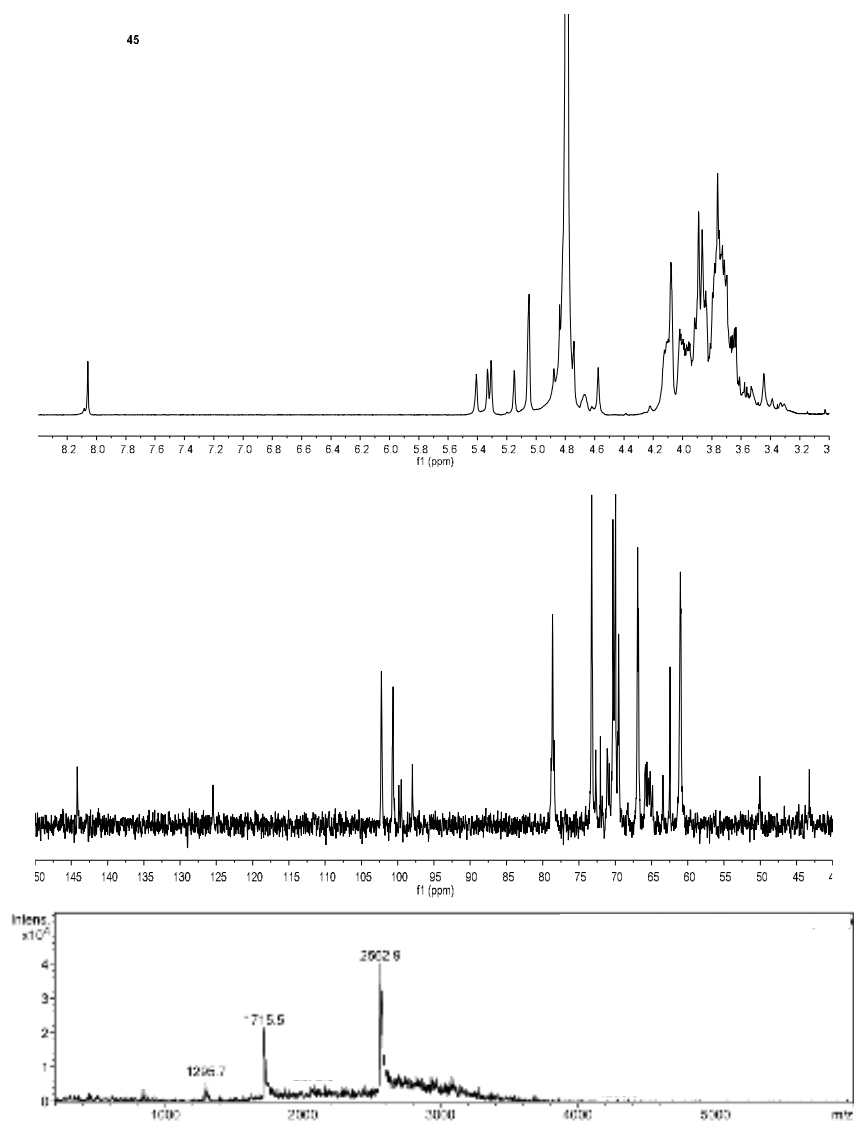
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) y espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O , 298 K) del compuesto **14**, según orden de aparición.



Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **45**, según orden de aparición.

330

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

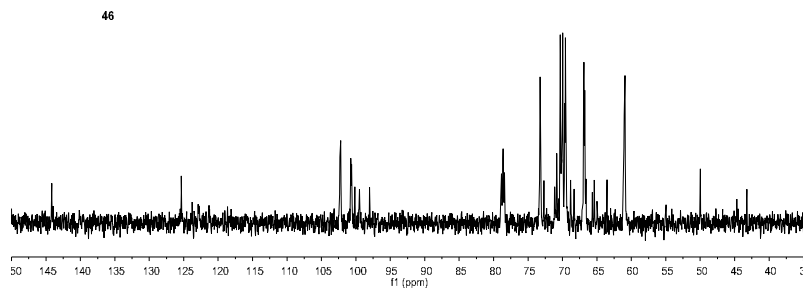
FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O , 298 K) del compuesto **46**.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

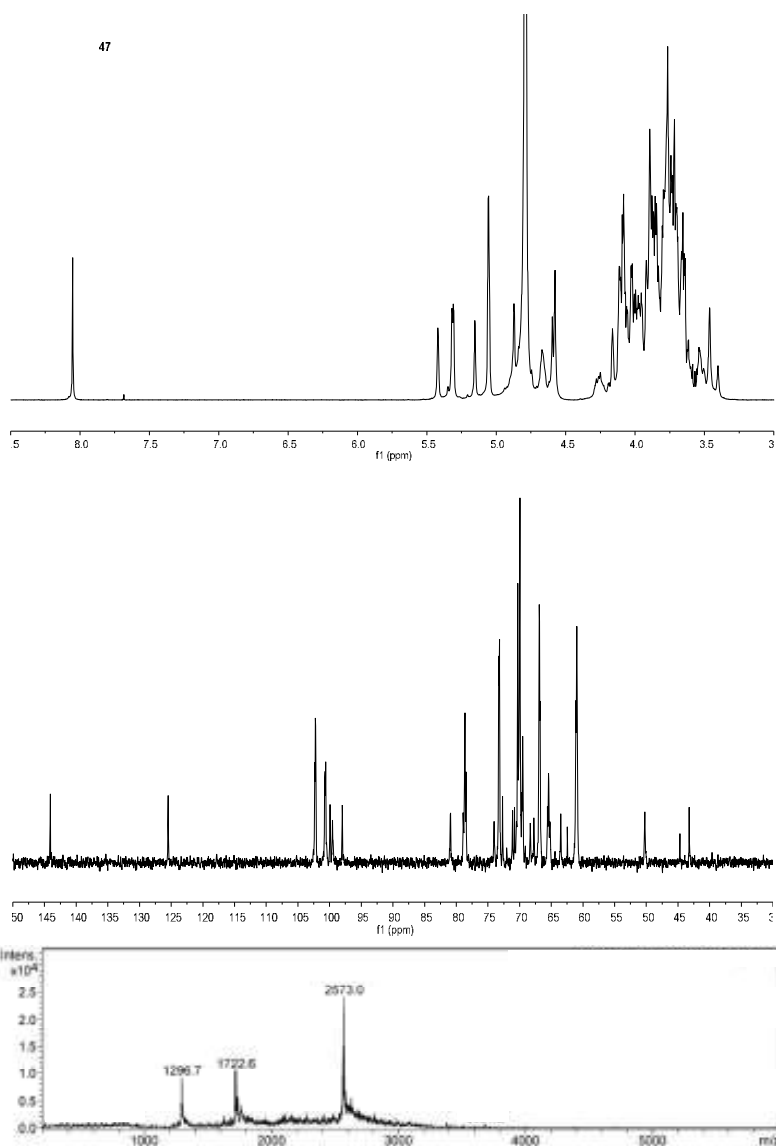
<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



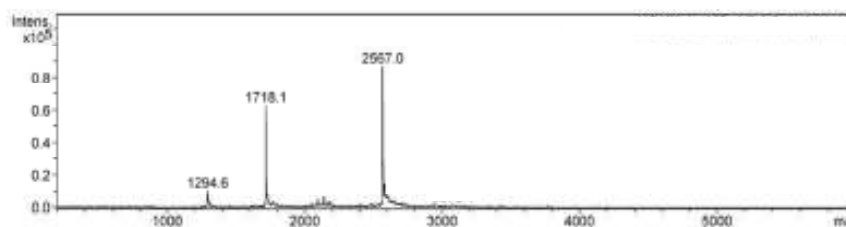
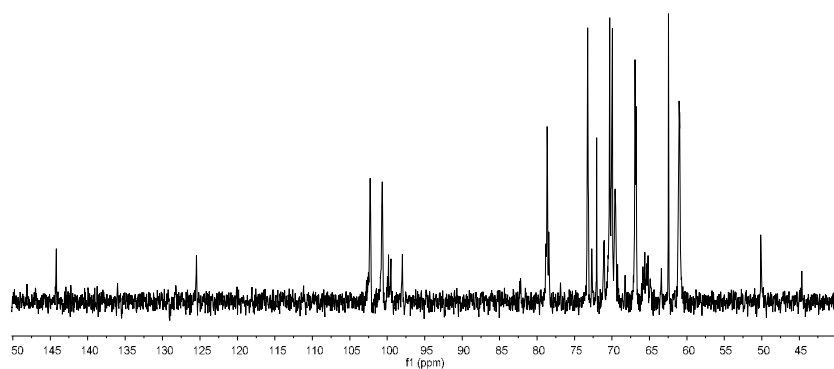
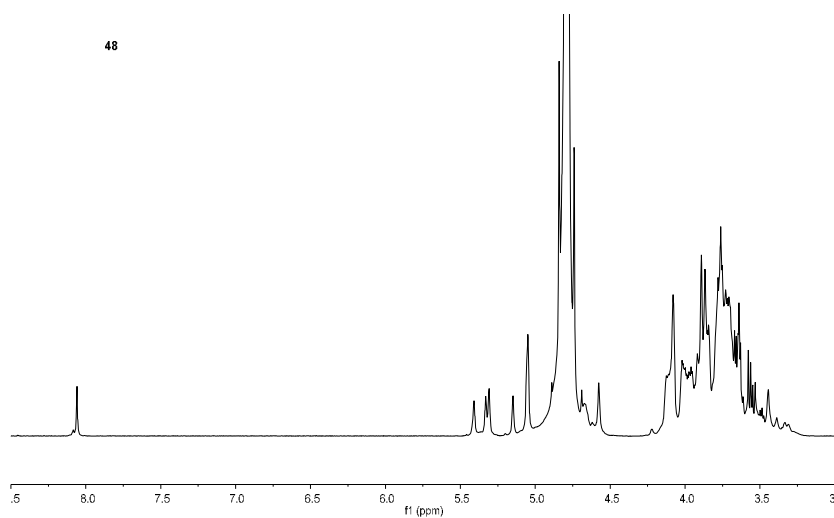
Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **47**, según orden de aparición.



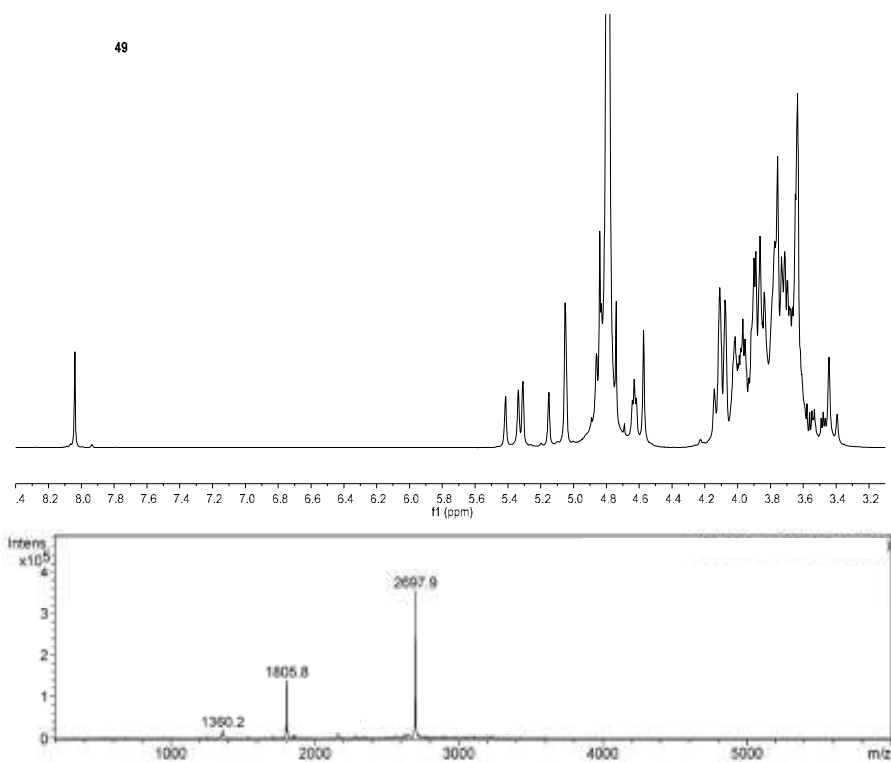
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **48**, según orden de aparición.



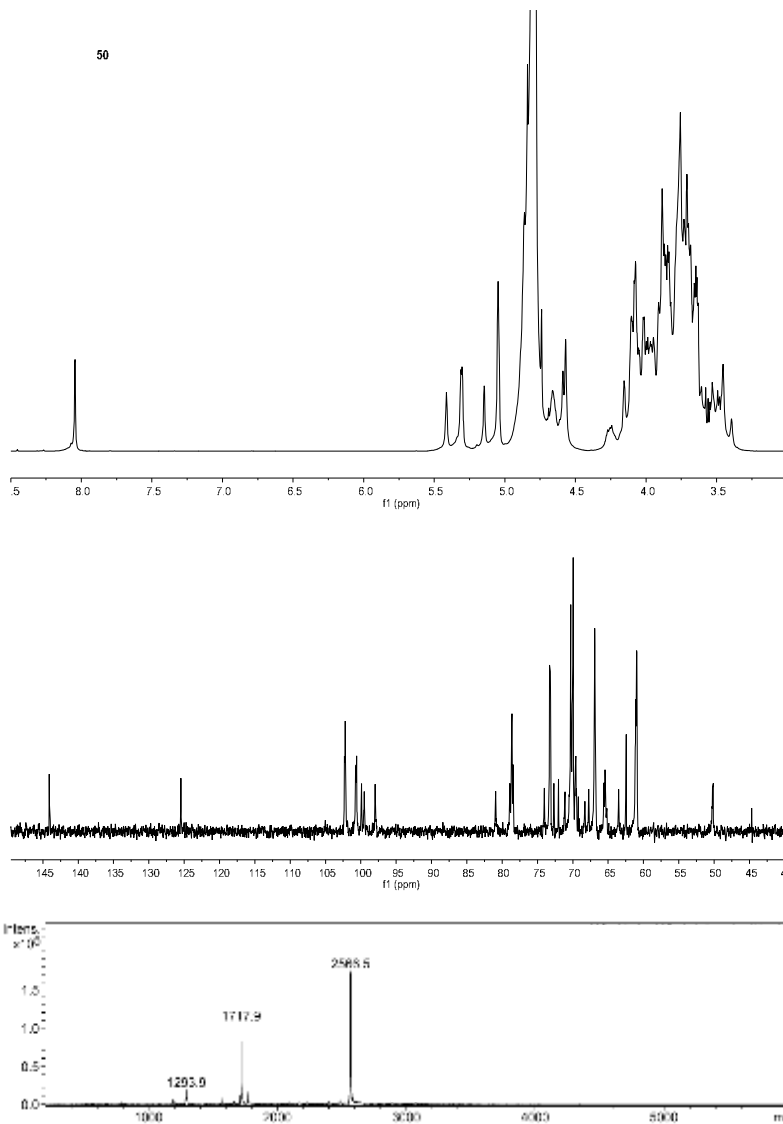
Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (D₂O, 400 MHz, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **49**, según orden de aparición.



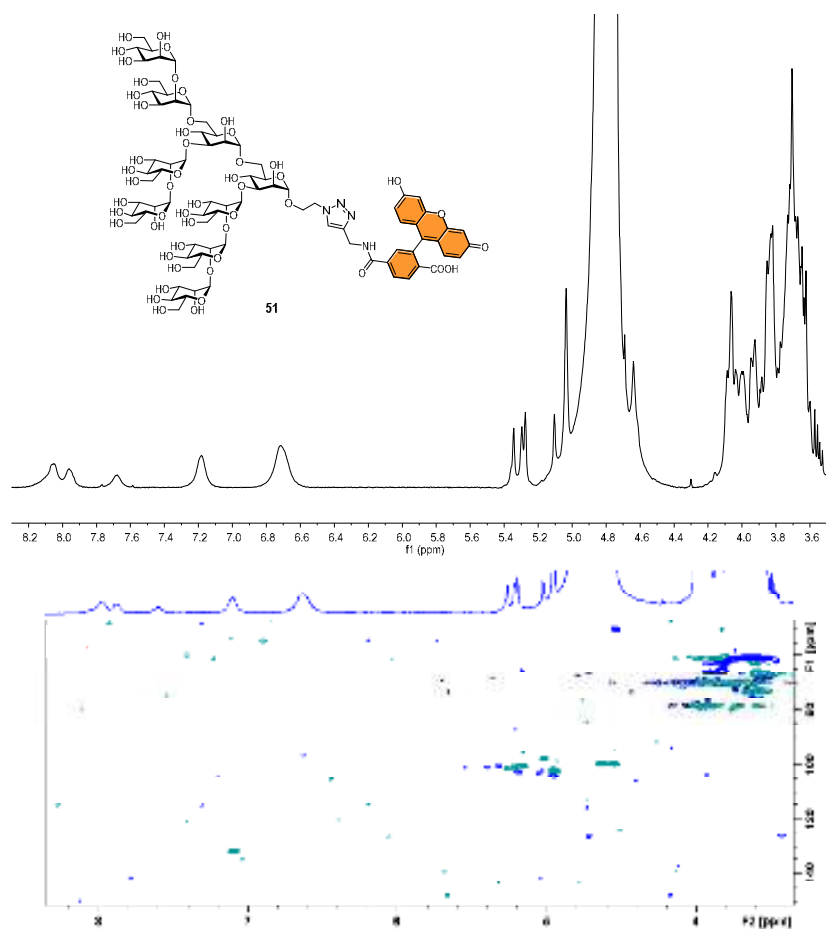
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **50**, según orden de aparición.



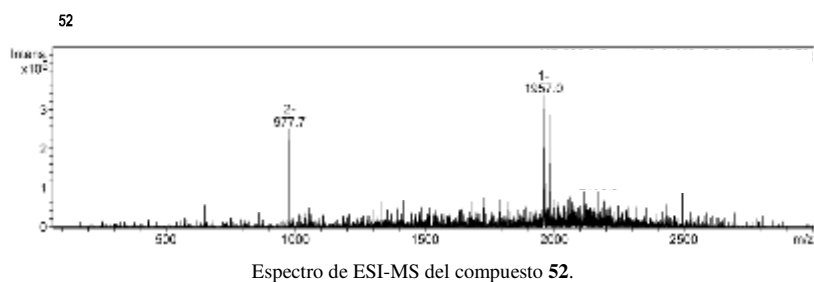
Anexo I



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) y espectro de HSQC-RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) del compuesto 51, según orden de aparición.



Selección de espectros de RMN y ESI-MS



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

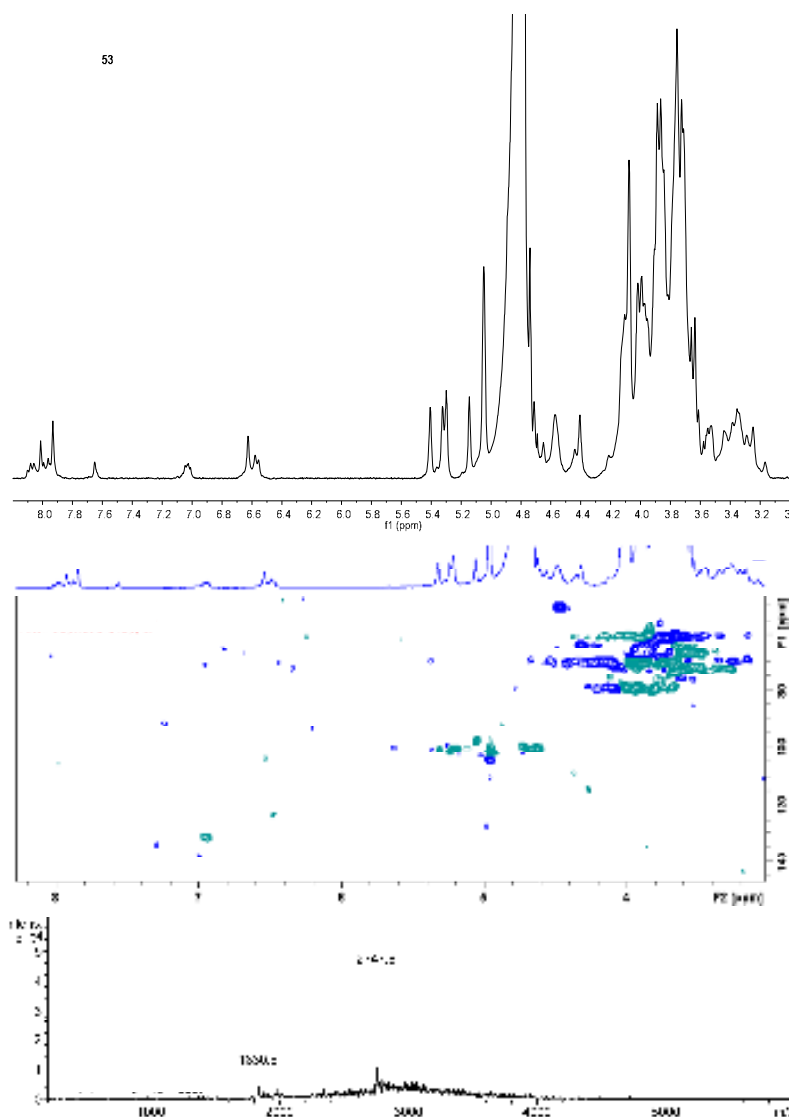
<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



Anexo I



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K), espectro de HSQC-RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **53**, según orden de aparición.

338

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

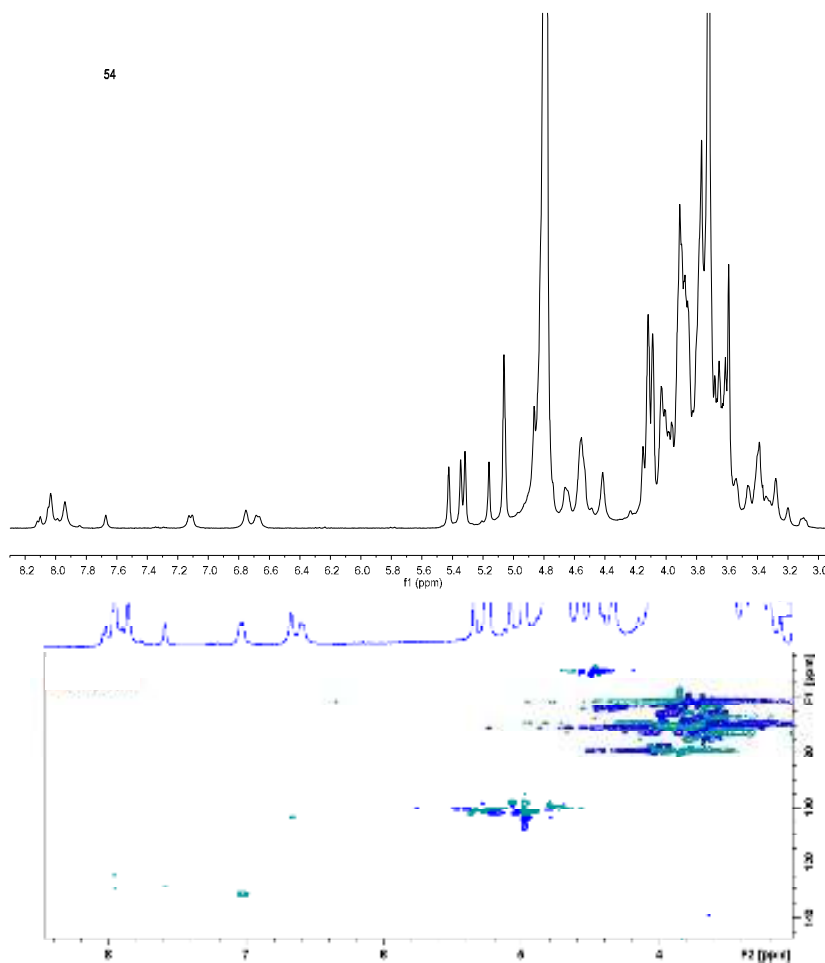
FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

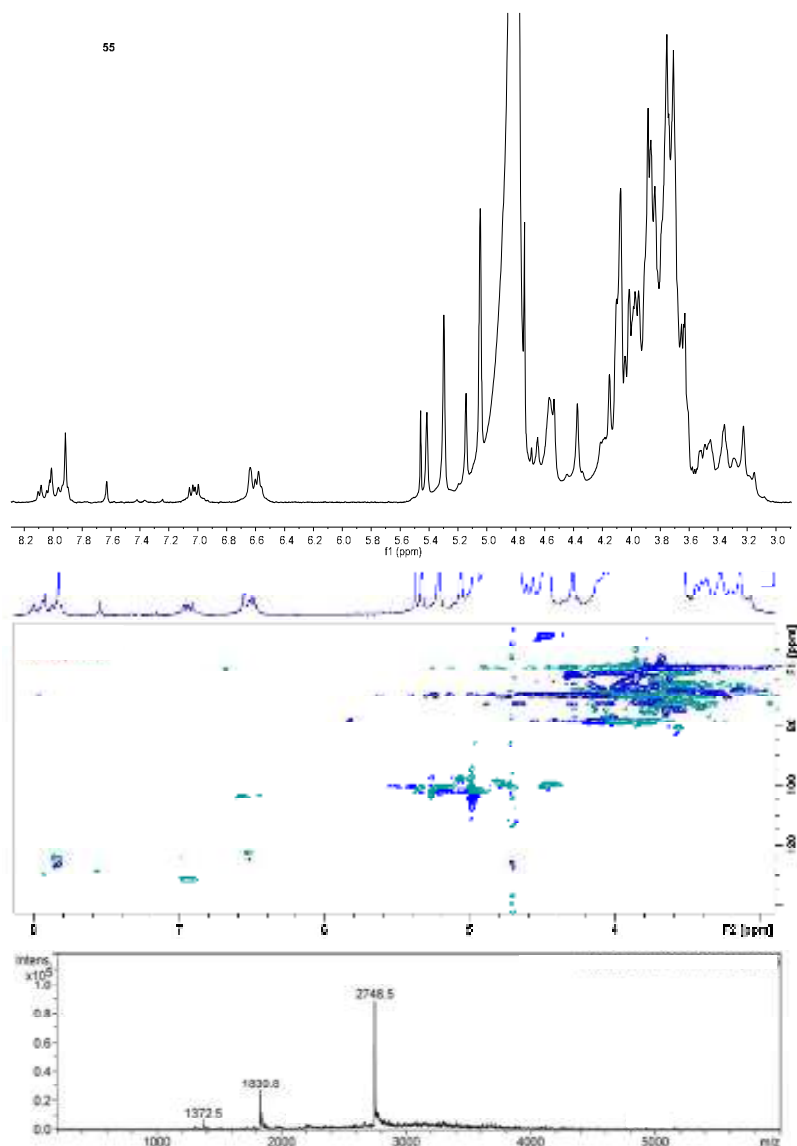
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, 298 K) y espectro de HSQC-RMN (400 MHz, D₂O, 298 K) del compuesto 54, según orden de aparición.



Anexo I



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K), espectro de HSQC-RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **55**, según orden de aparición.

340

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

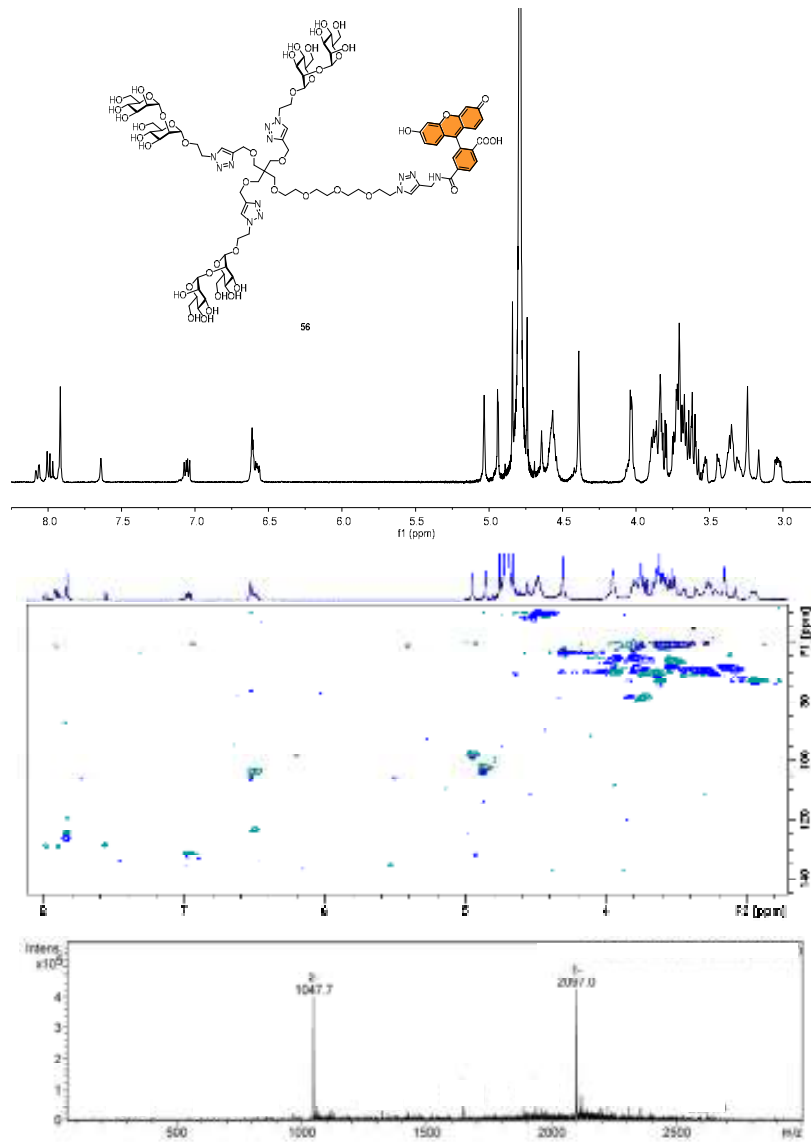
<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



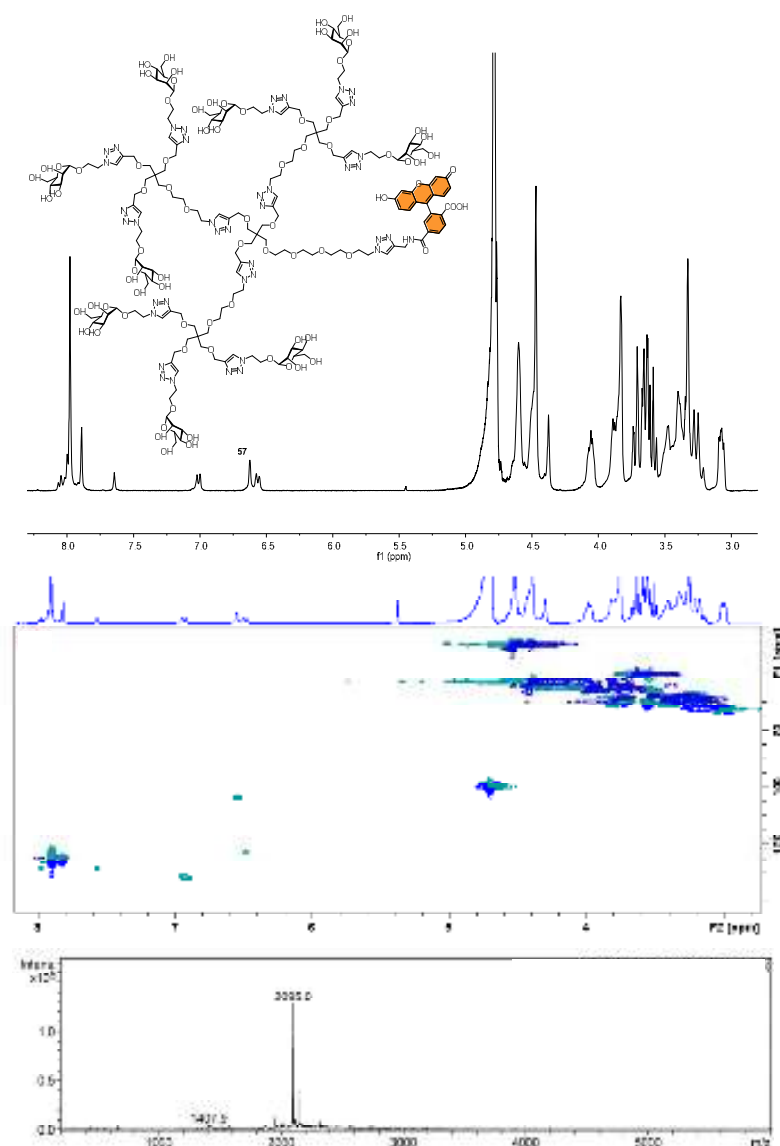
GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, 298 K), espectro de HSQC-RMN (400 MHz, D₂O, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto 56, según orden de aparición.



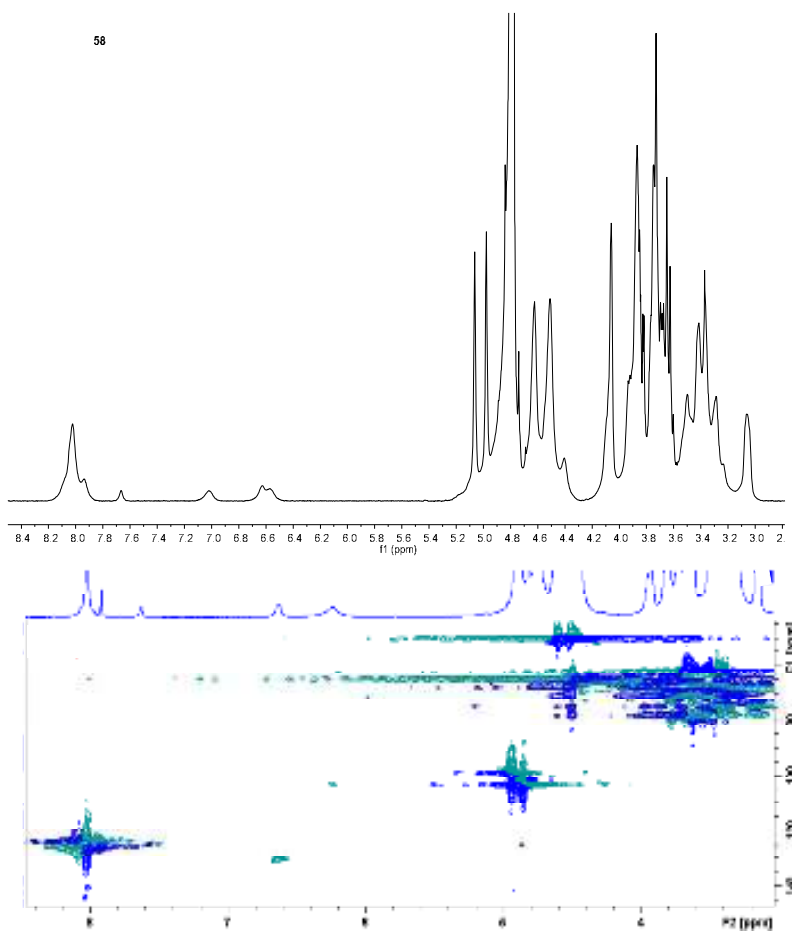
Anexo I



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K), espectro de HSQC-RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **57**, según orden de aparición.



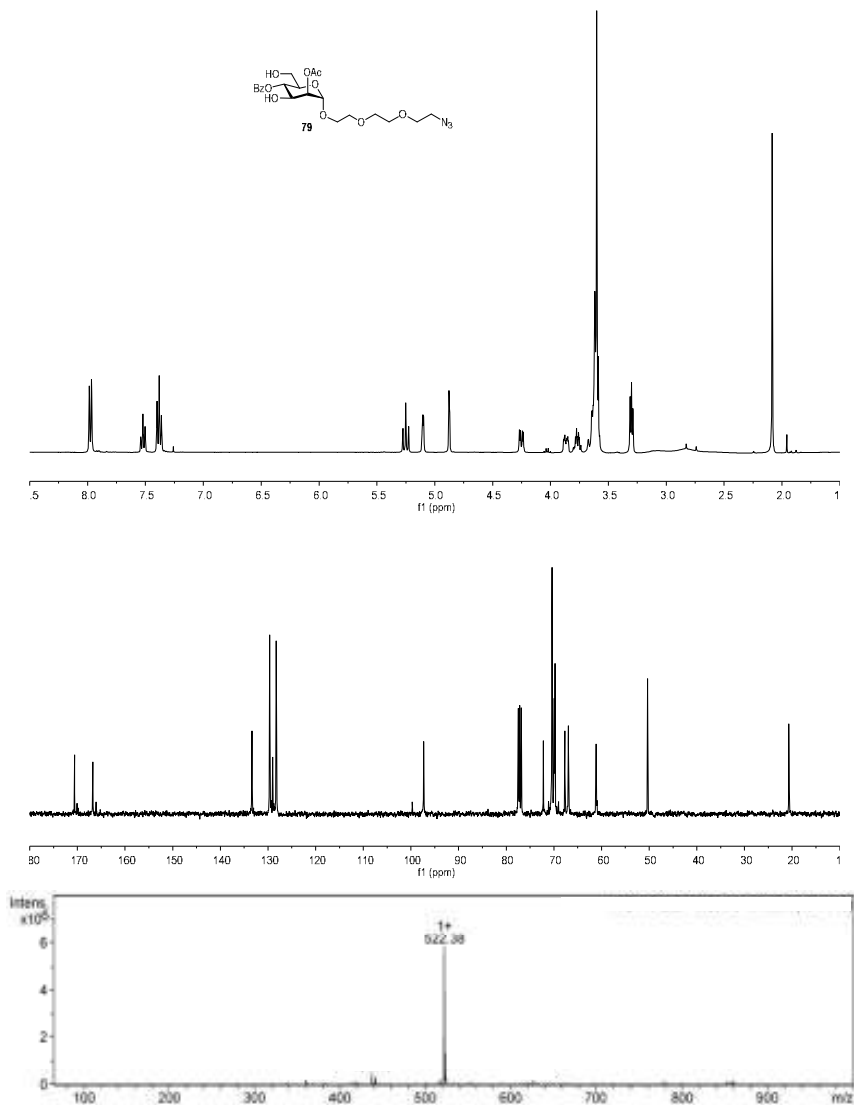
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) y espectro de HSQC-RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) del compuesto **58**, según orden de aparición.



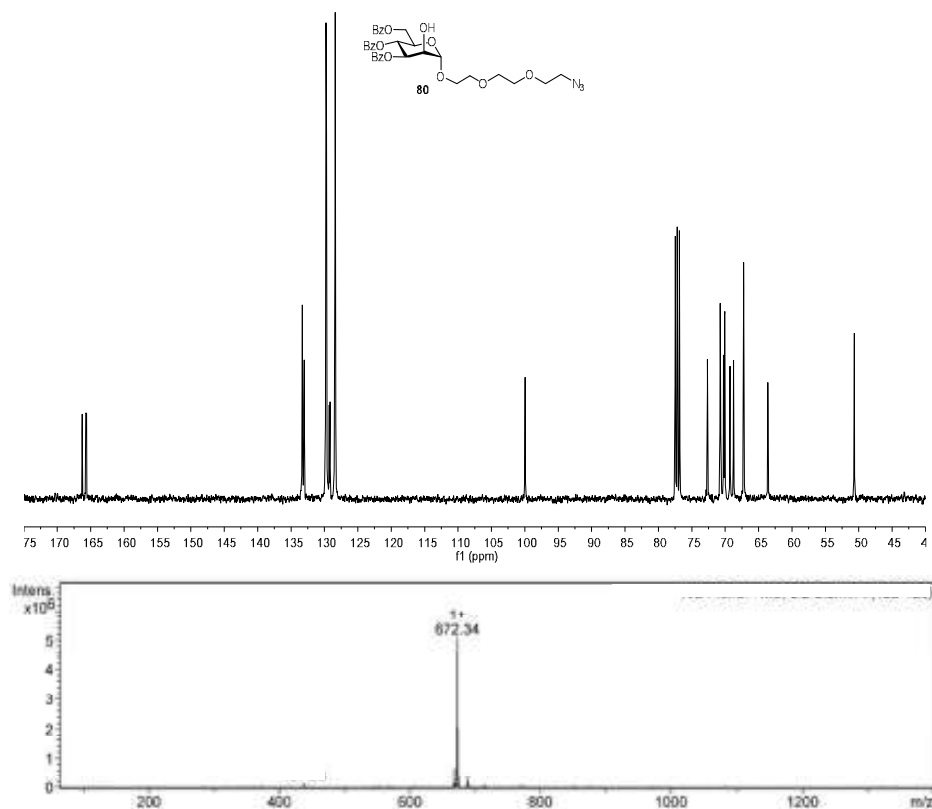
Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **79**, según orden de aparición.



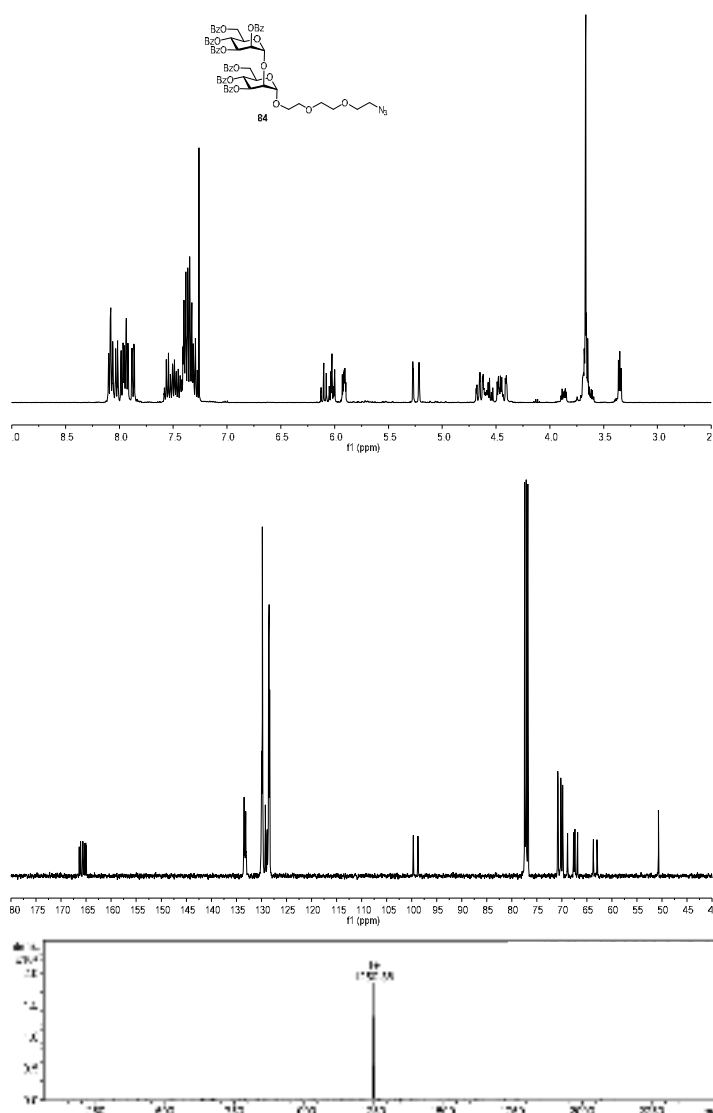
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **80**, según orden de aparición.



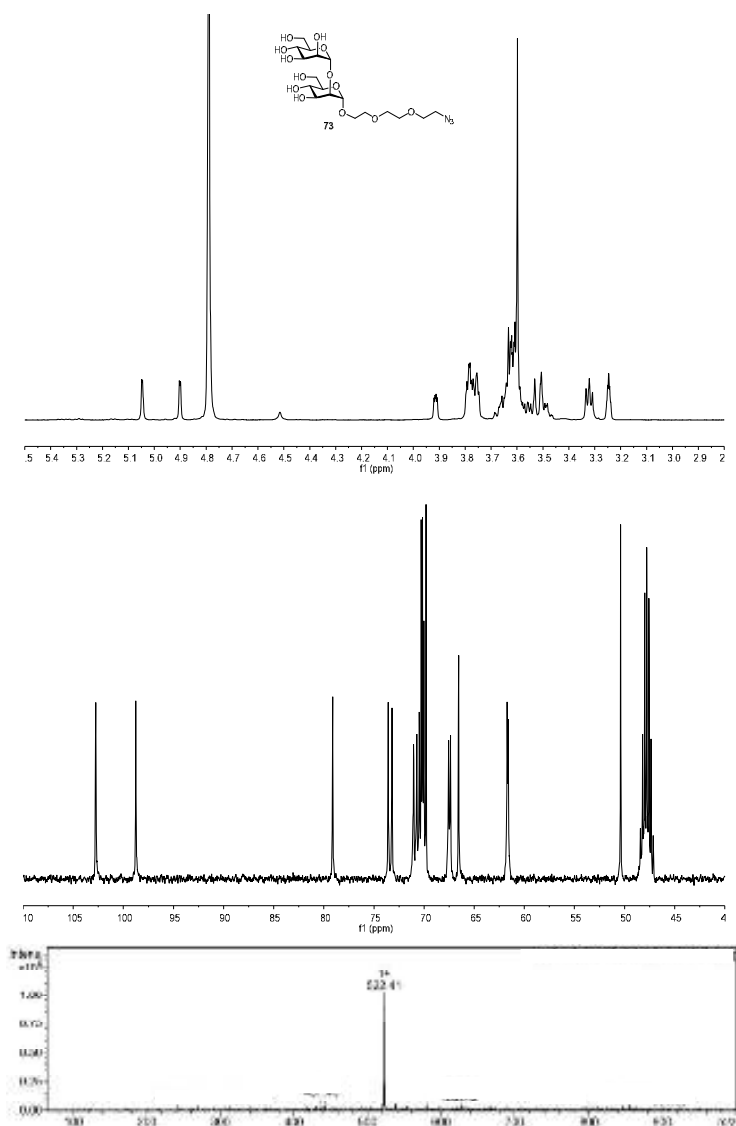
Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **84**, según orden de aparición.



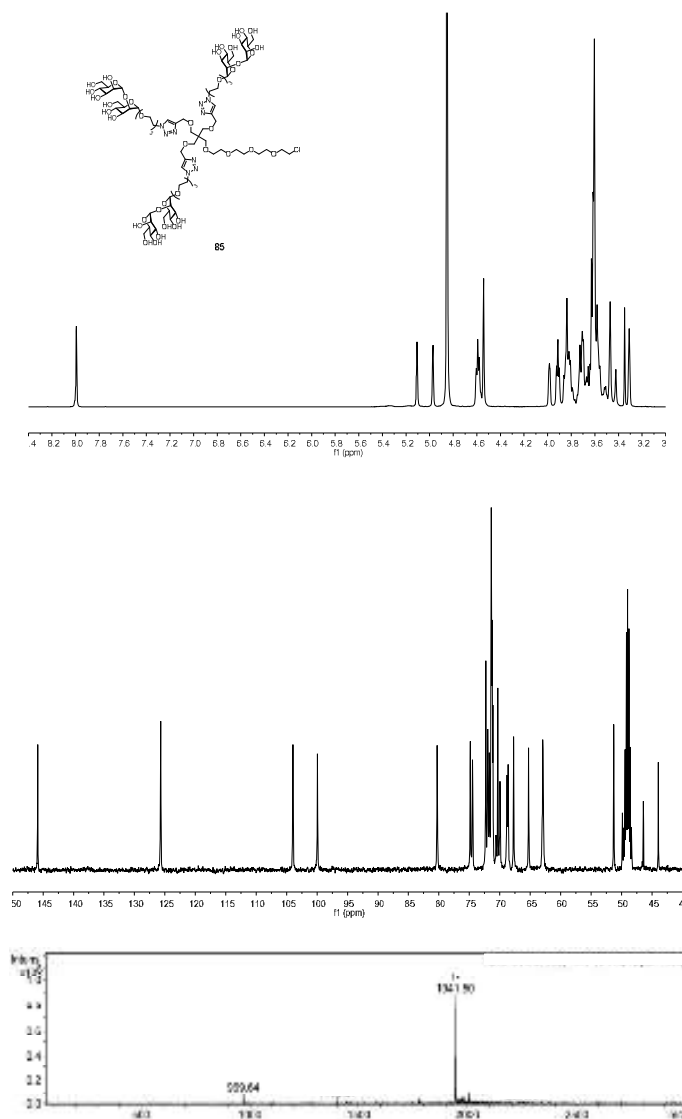
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **73**, según orden de aparición.



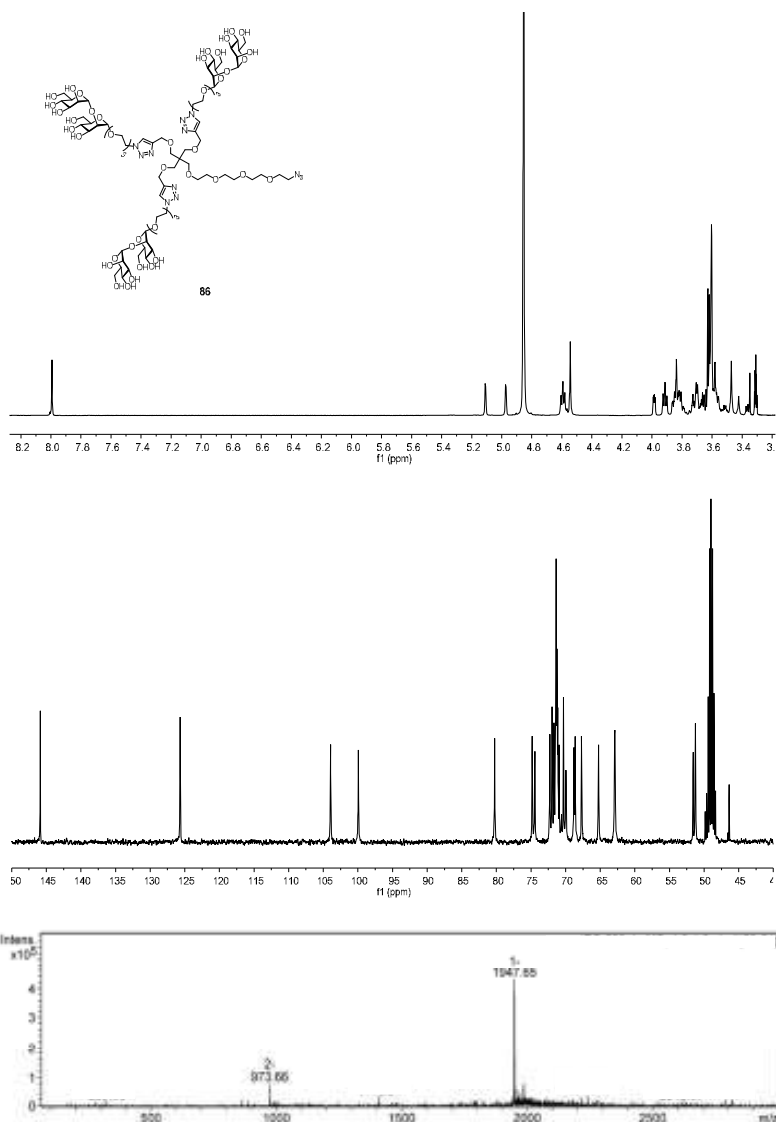
Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **85**, según orden de aparición.



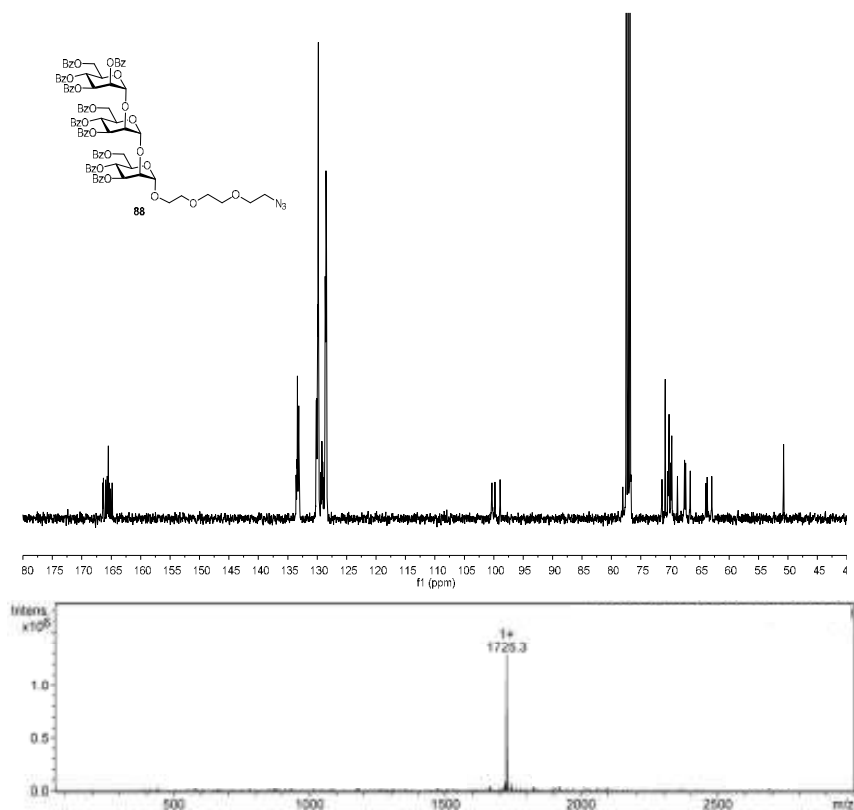
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **86**, según orden de aparición.



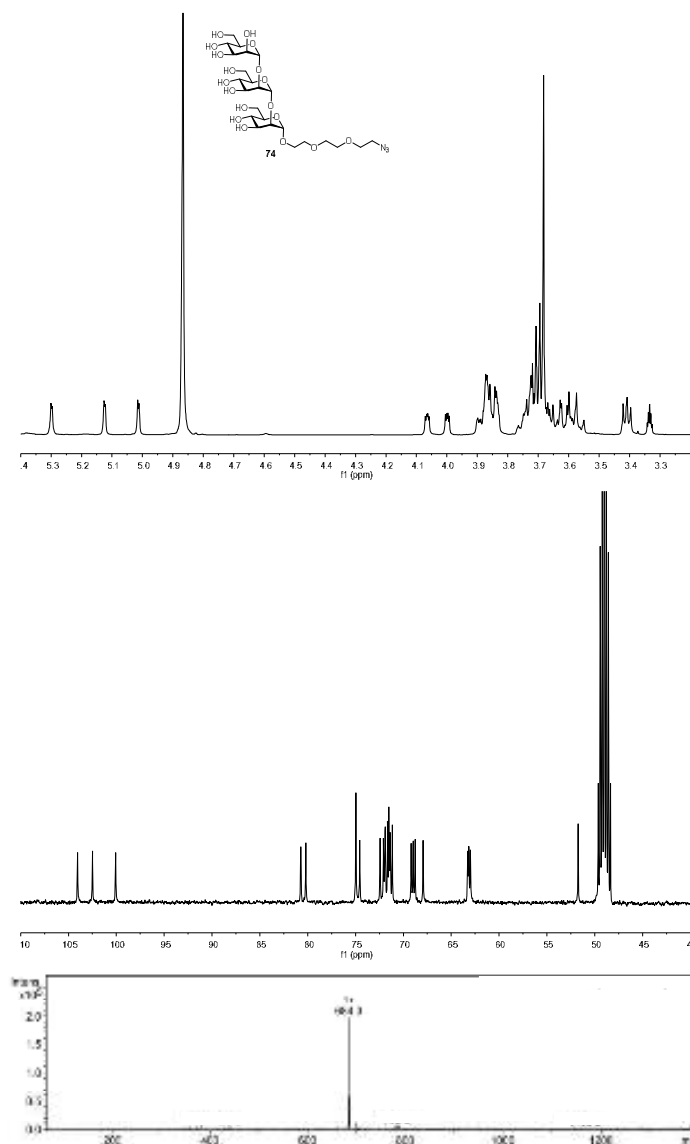
Anexo I



Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **88**, según orden de aparición.



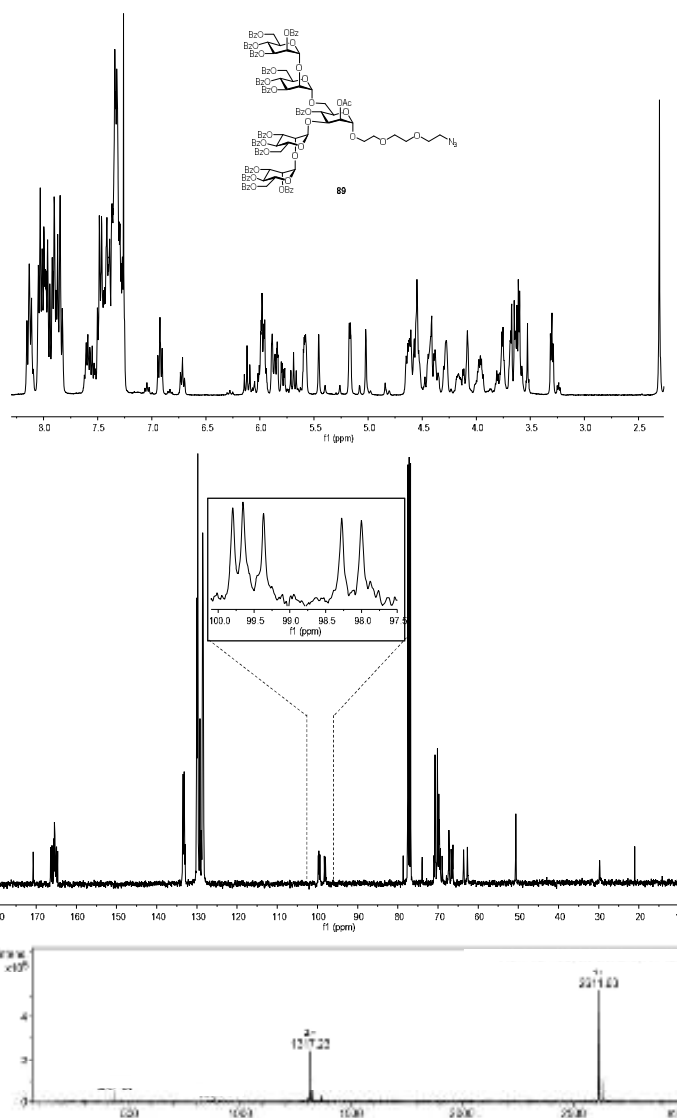
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **74**, según orden de aparición.



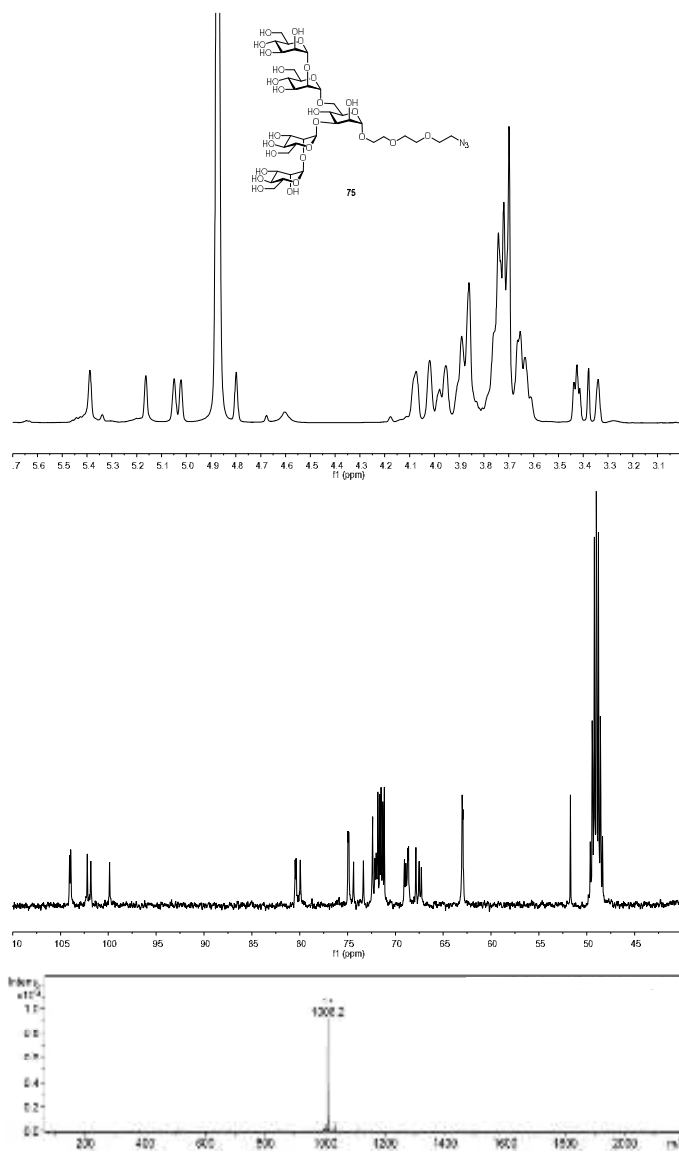
Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **89**, según orden de aparición.



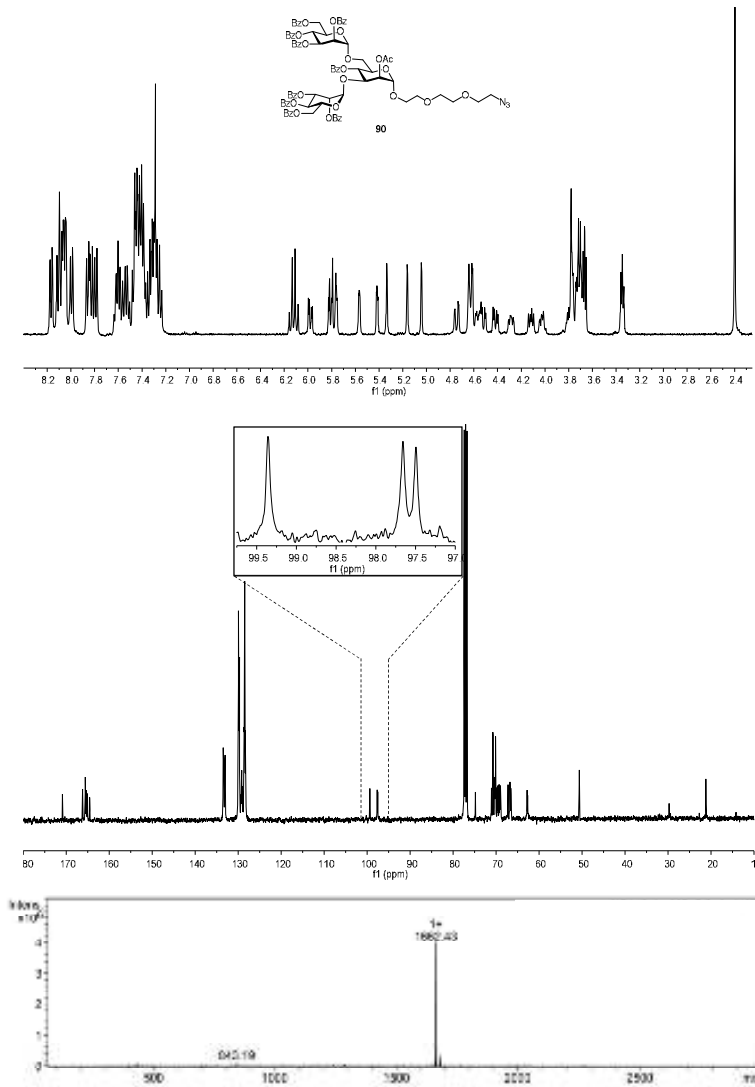
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **75**, según orden de aparición.



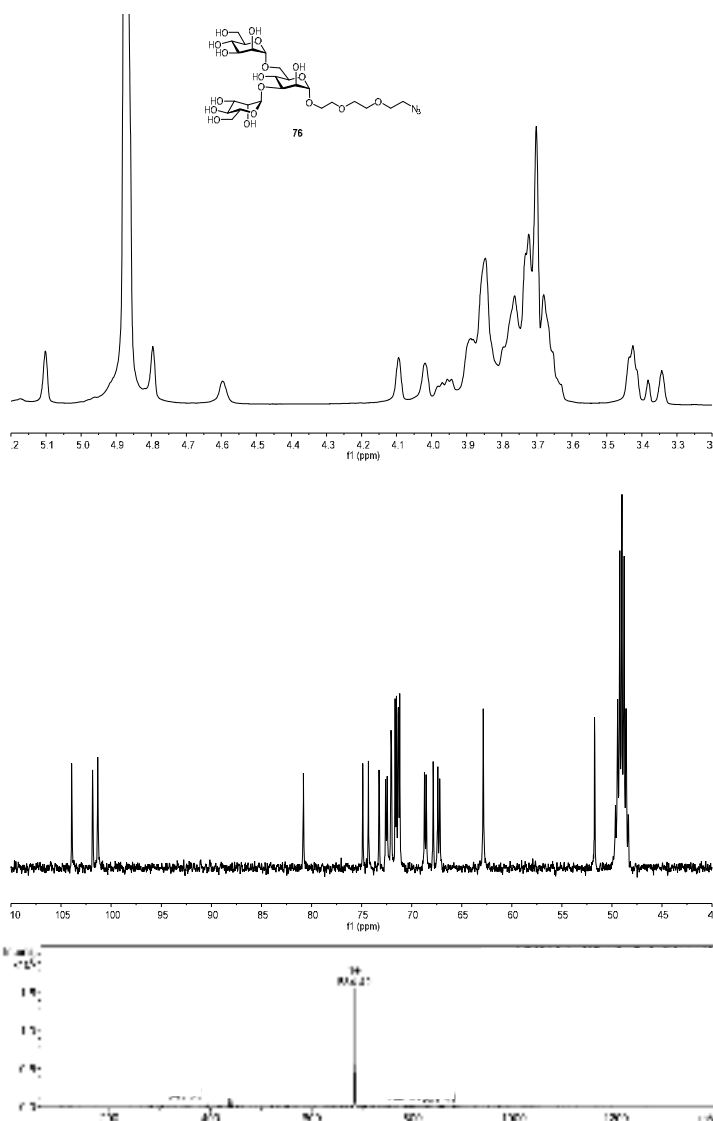
Anexo I



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , 298 K), espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3 , 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **90**, según orden de aparición.



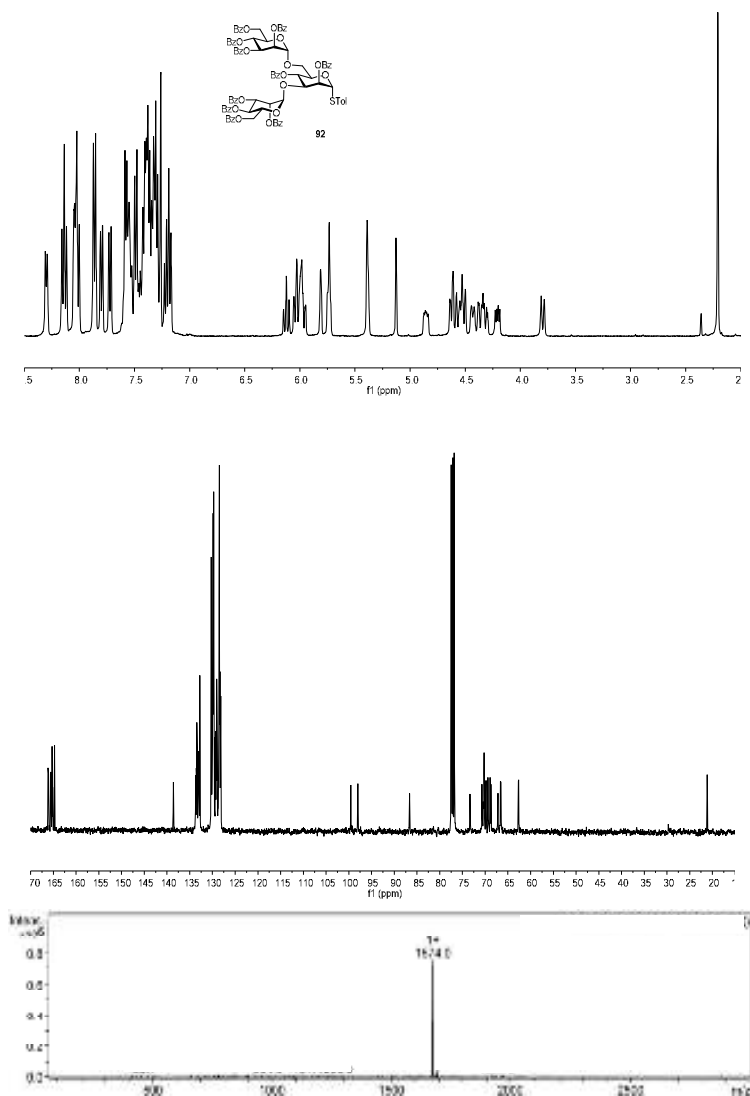
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **76**, según orden de aparición.



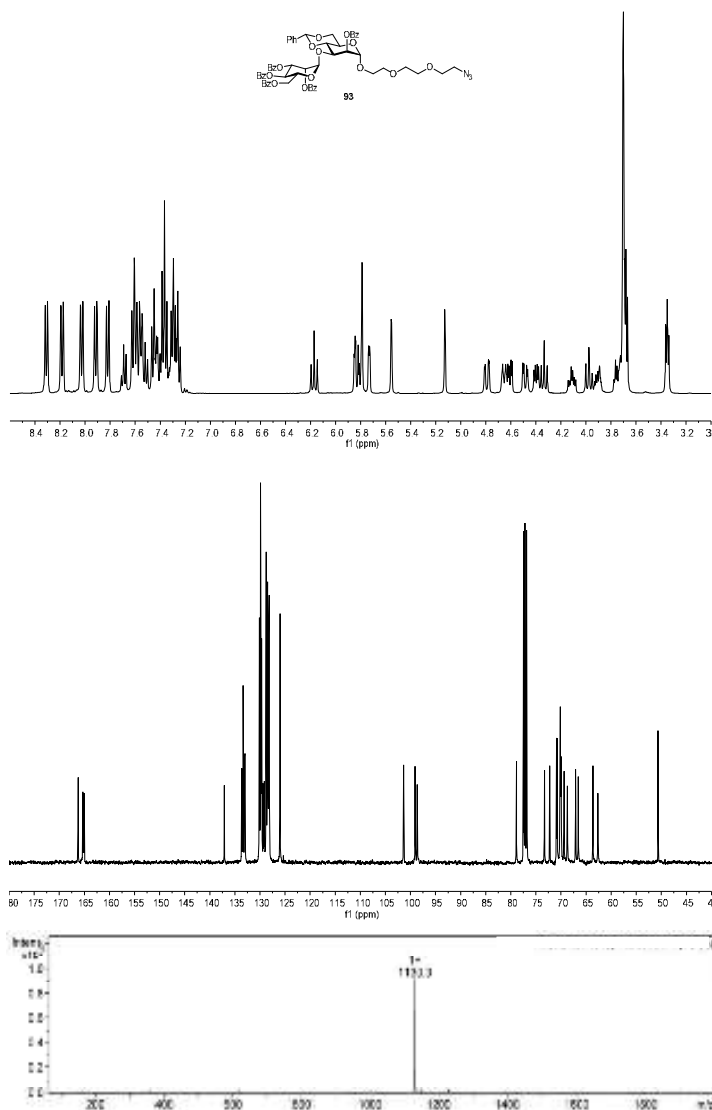
Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **92**, según orden de aparición.



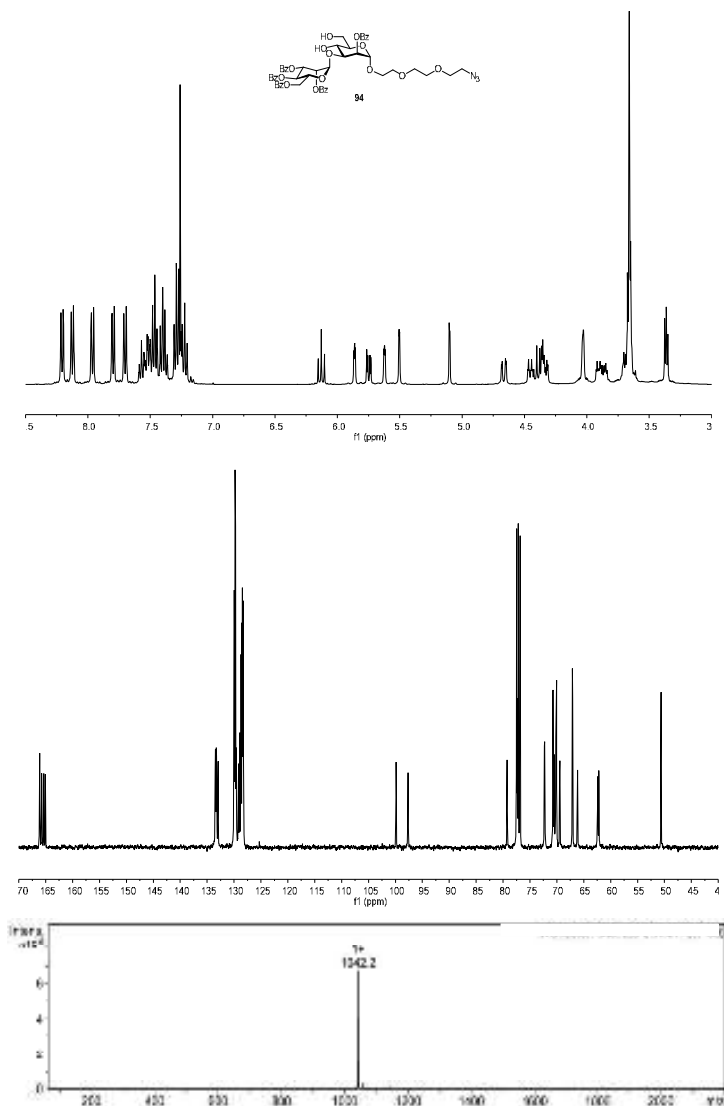
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **93**, según orden de aparición.



Anexo I

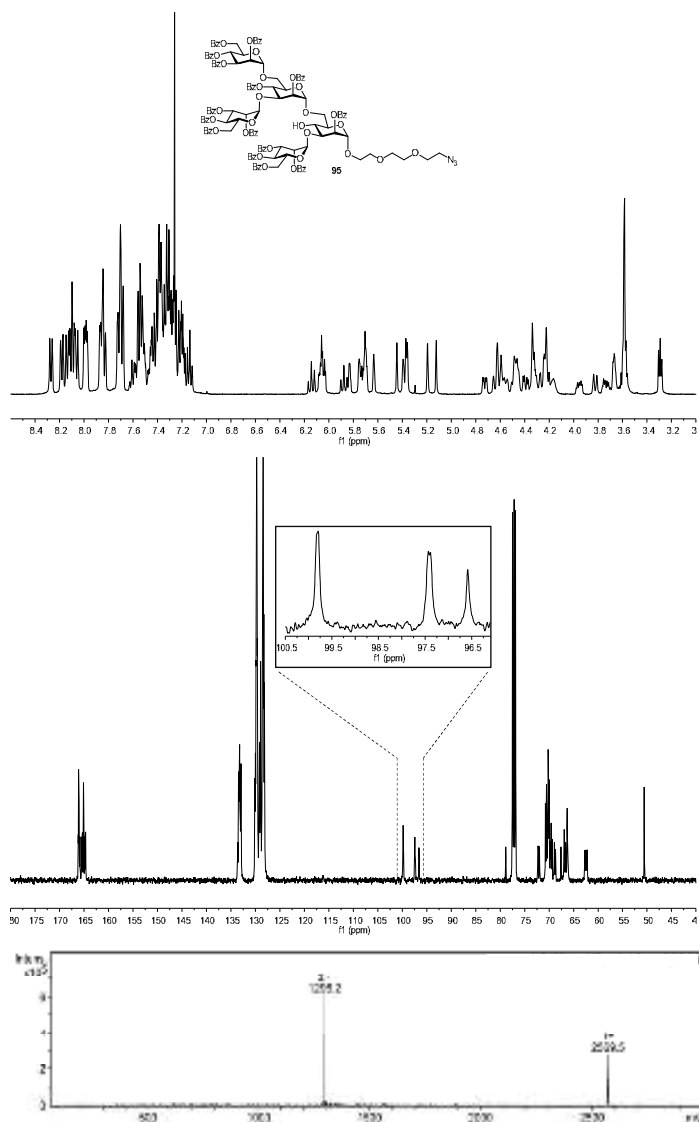


Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **94**, según orden de aparición.

358



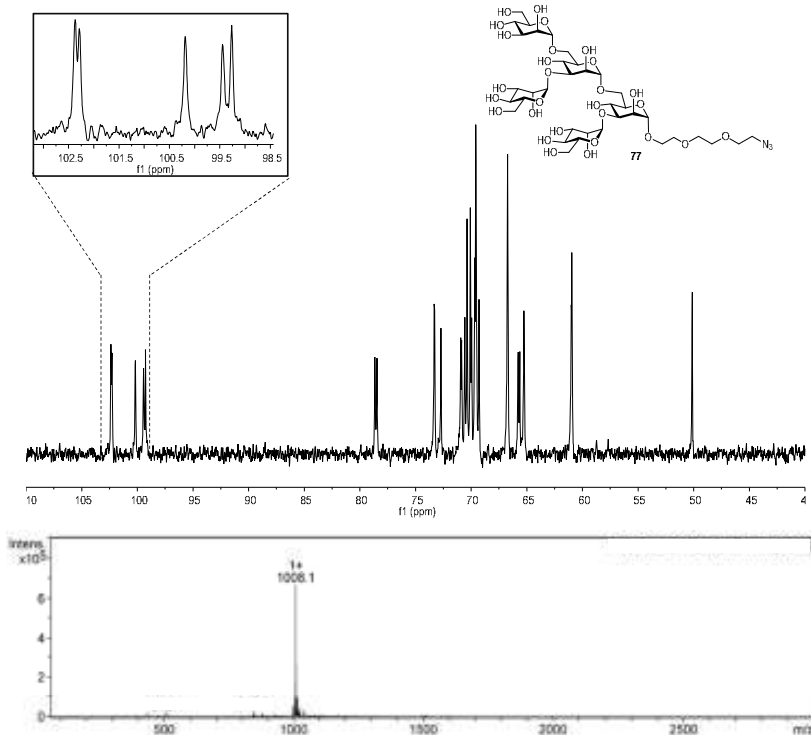
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K), espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **95**, según orden de aparición.



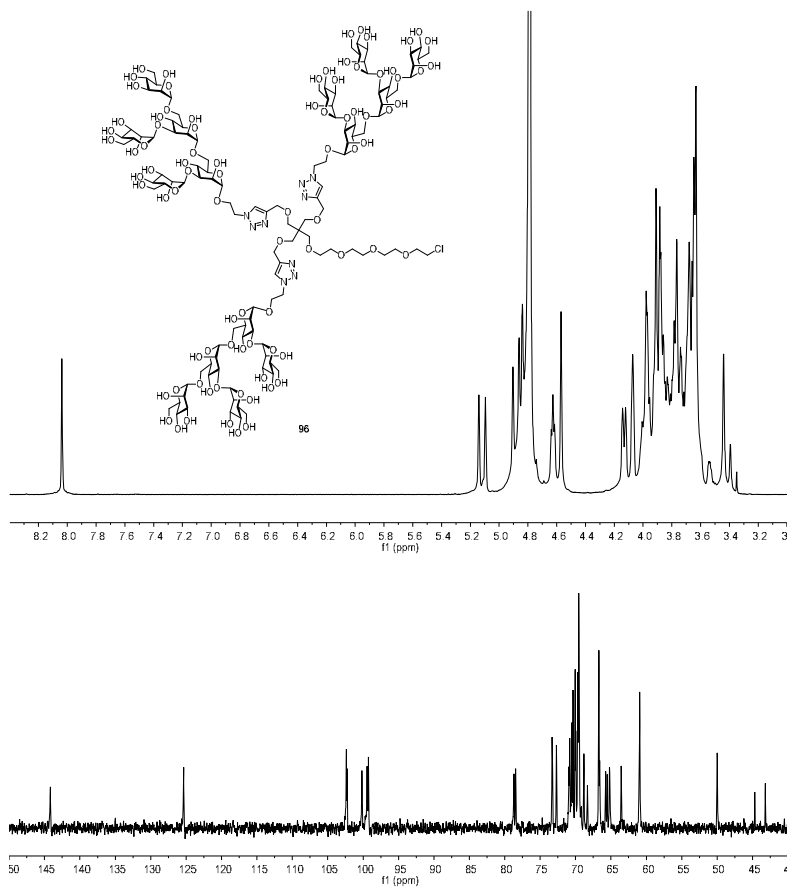
Anexo I



Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O, 298 K) y espectro de ESI-MS del compuesto **77**, según orden de aparición.



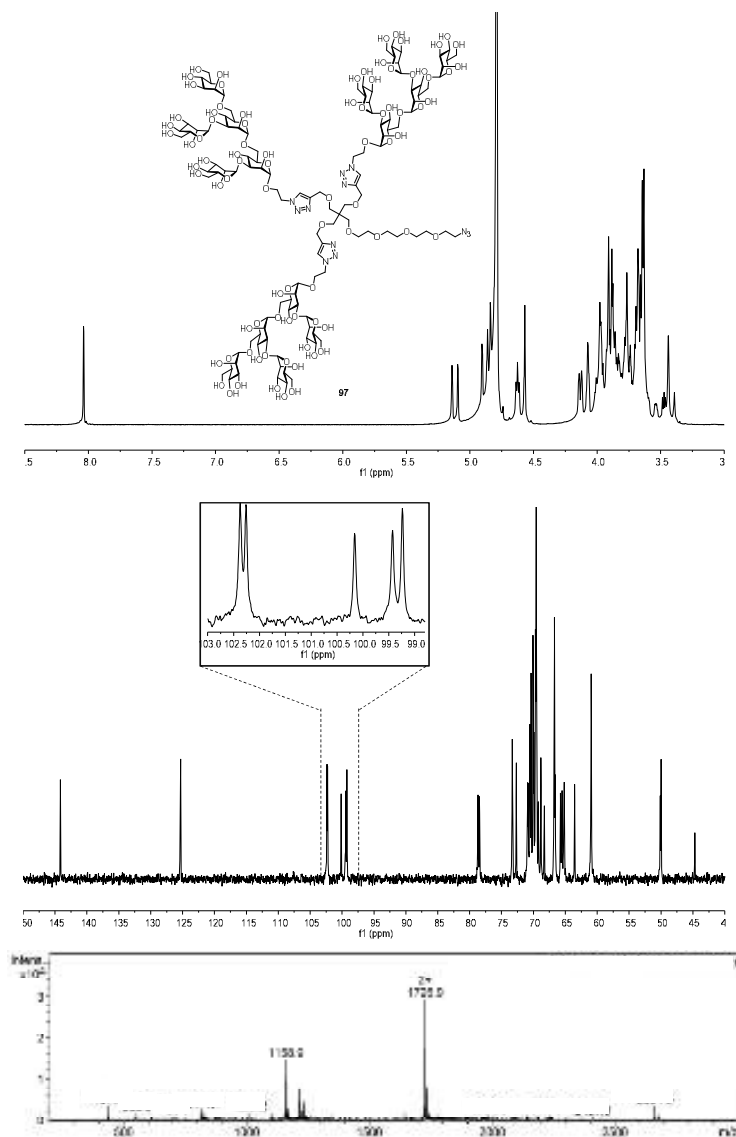
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, 298 K) y espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O, 298 K) del compuesto 96, según orden de aparición.



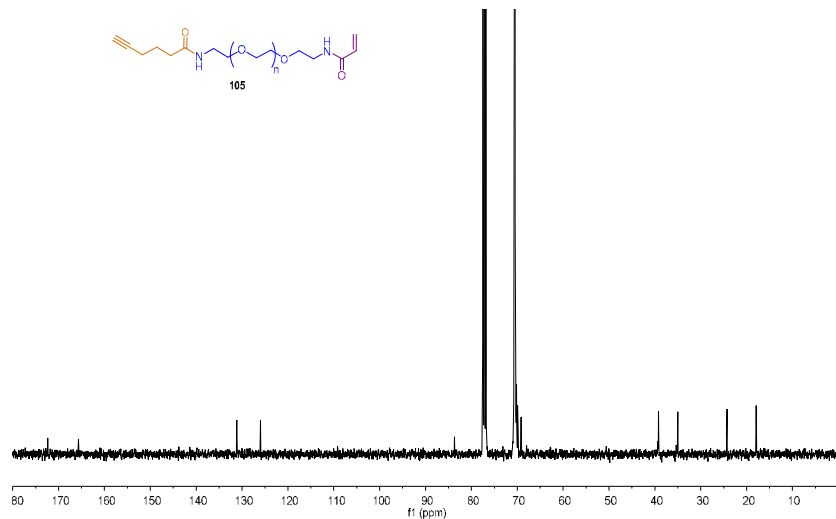
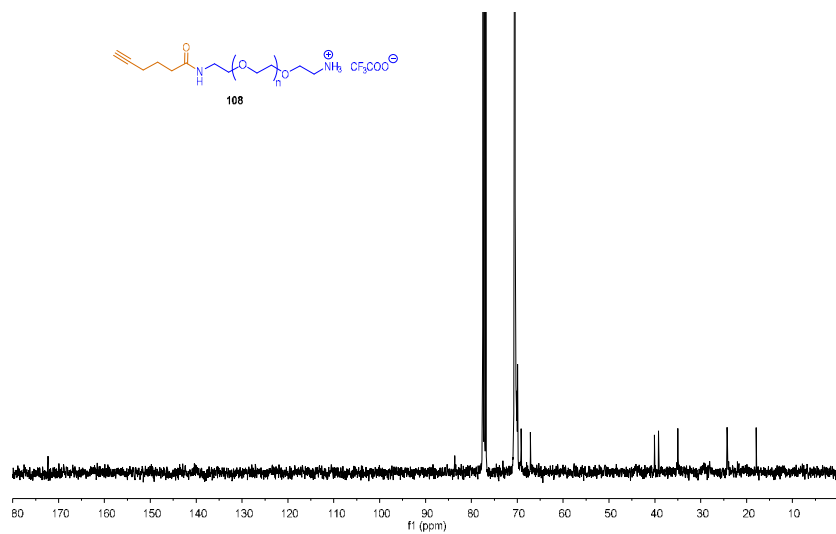
Anexo I



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K), espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O , 298 K) y espectro ESI-MS del compuesto **97**, según orden de aparición.



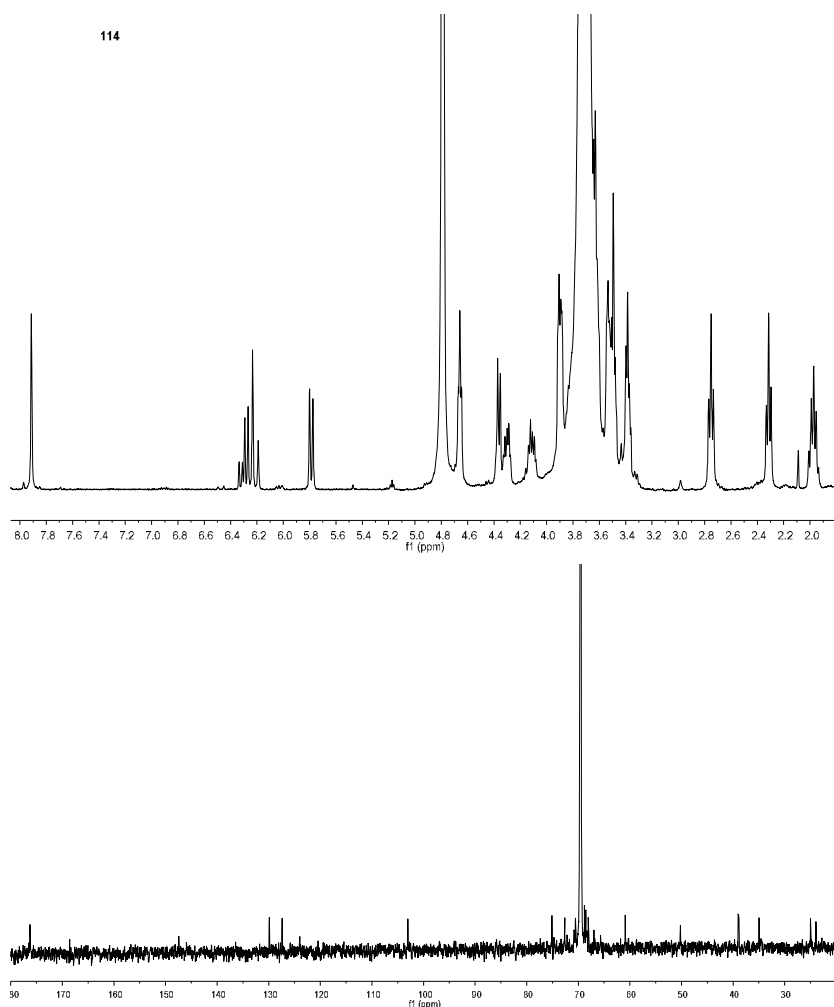
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) del compuesto **108** y espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) del compuesto **105**, según orden de aparición.



Anexo I



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) y espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O , 298 K) del compuesto **114**, según orden de aparición.

364

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

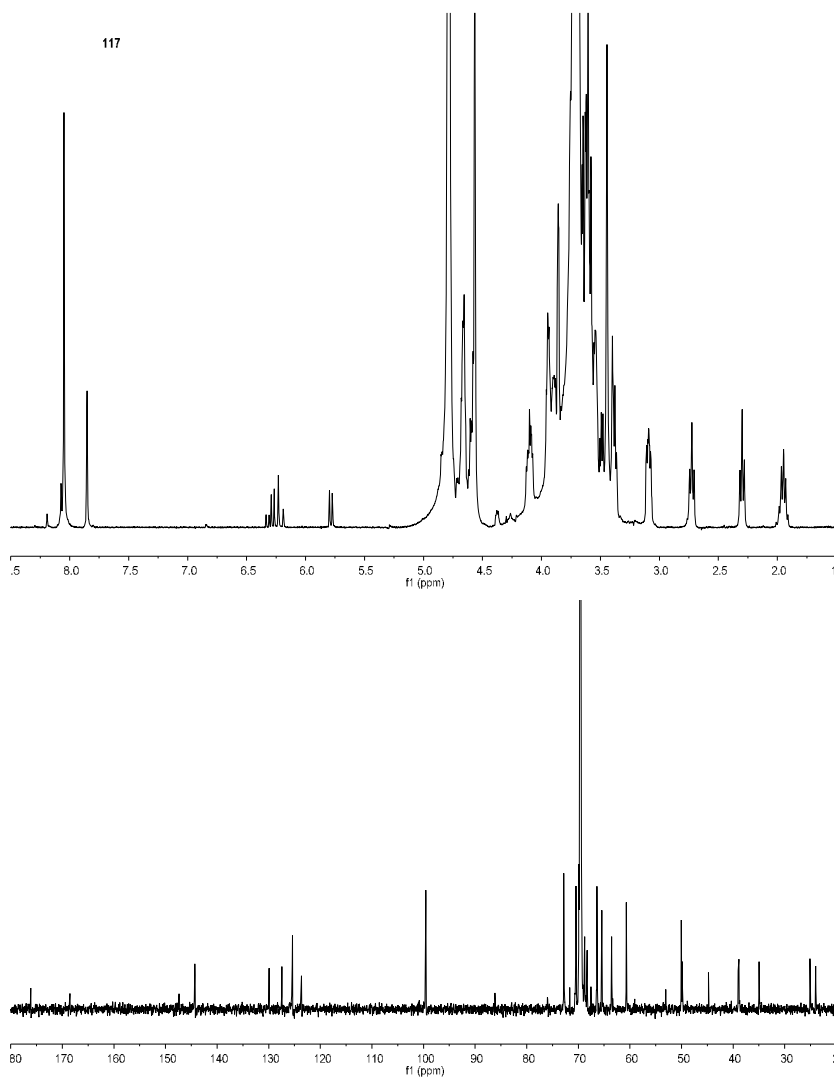
FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

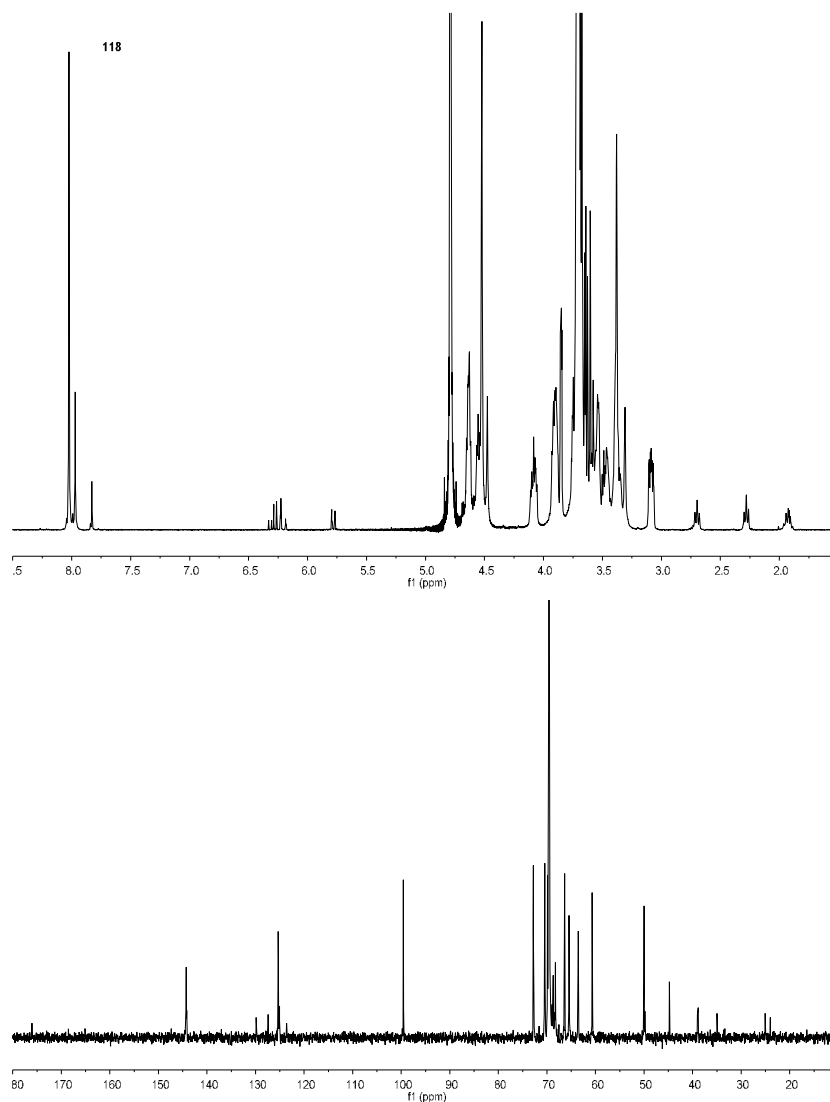
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, 298 K) y espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O, 298 K) del compuesto **117**, según orden de aparición.



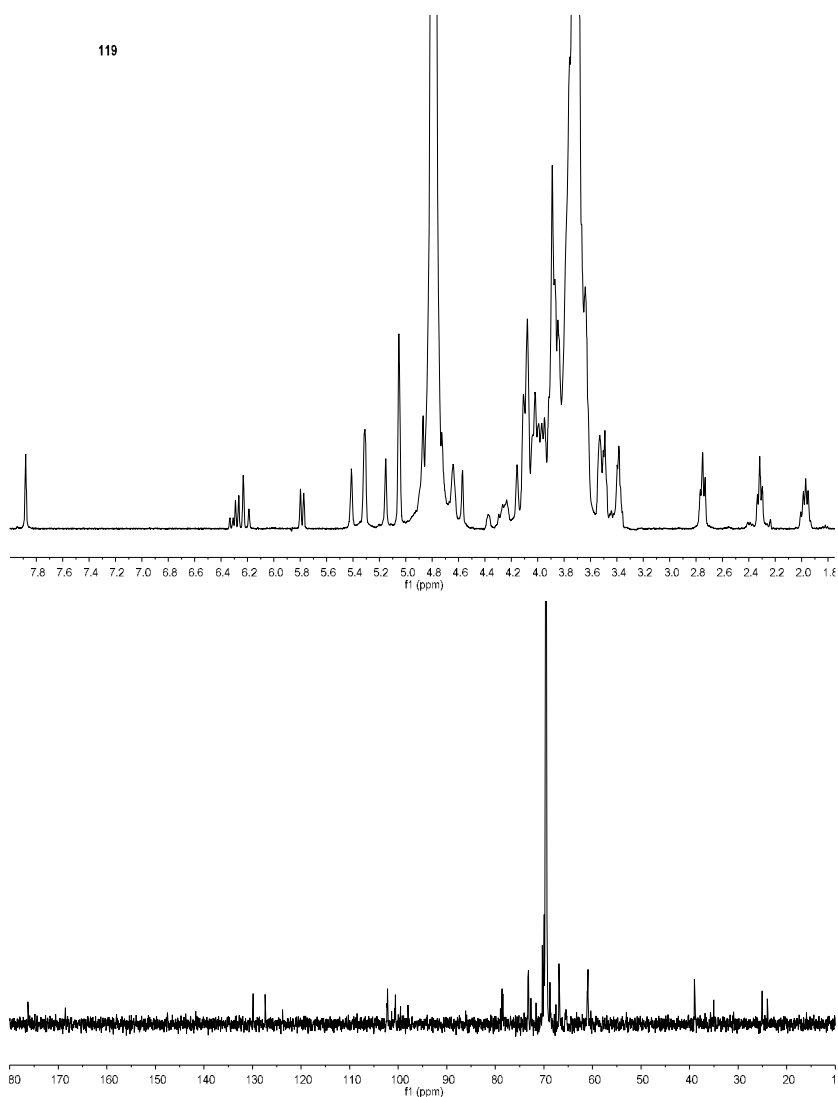
Anexo I



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) y espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O , 298 K) del compuesto **118**, según orden de aparición.



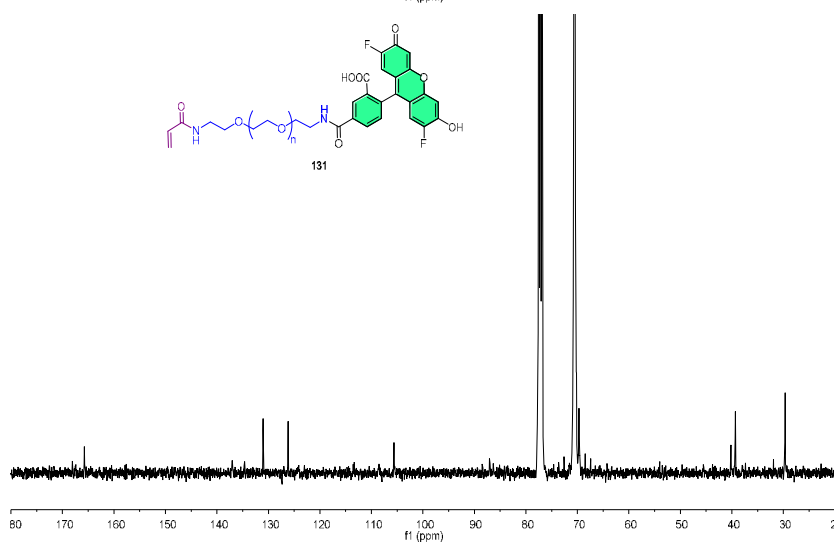
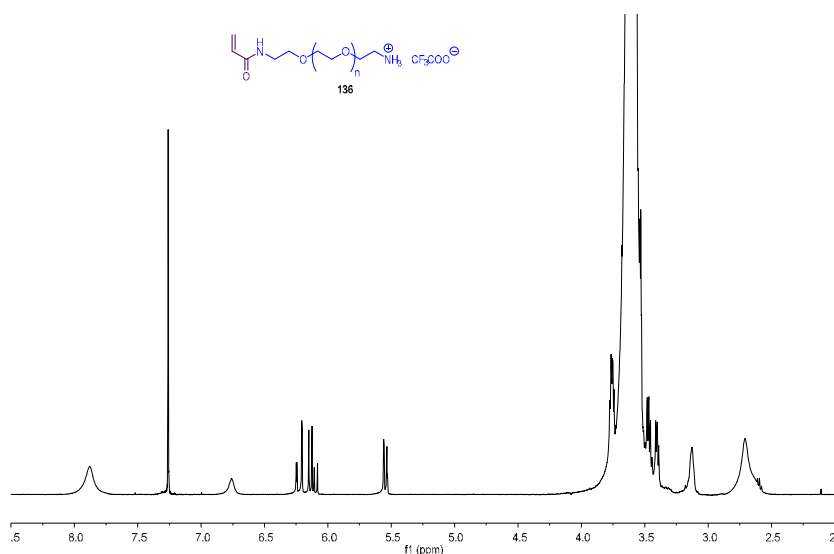
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) y espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O , 298 K) del compuesto **119**, según orden de aparición.



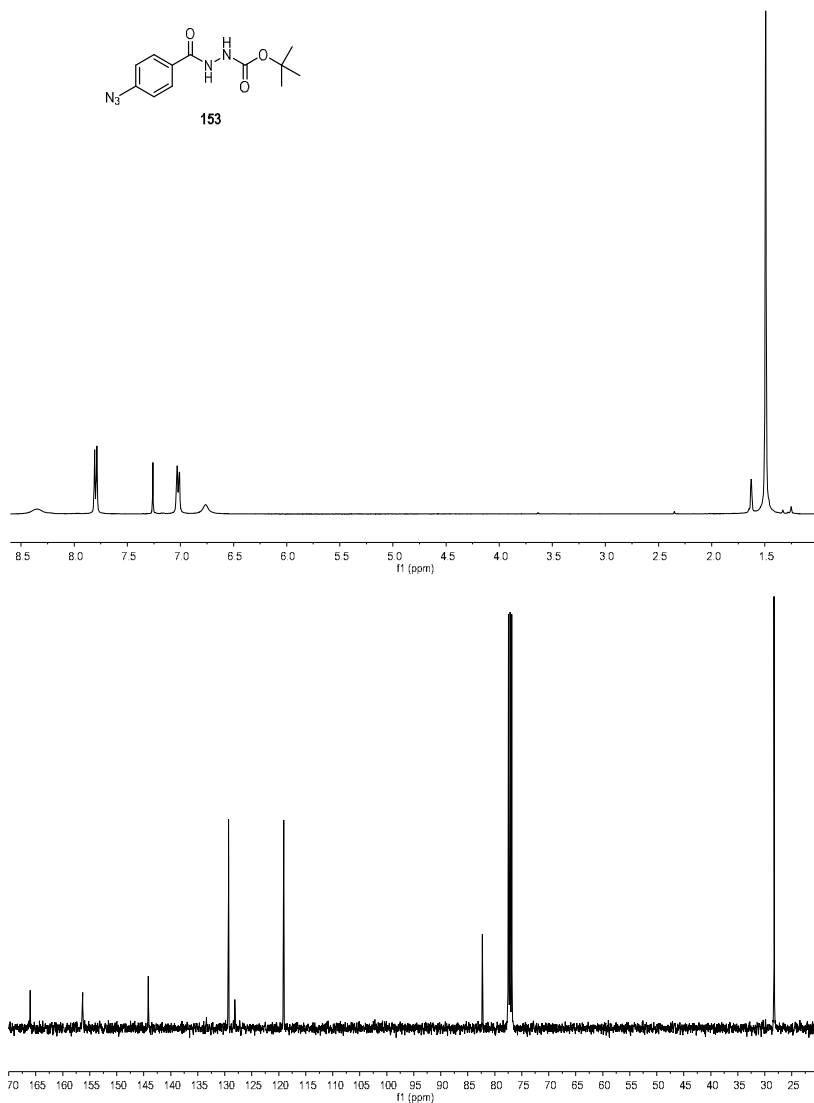
Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) del compuesto **136** y espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) del compuesto **131**, según orden de aparición.



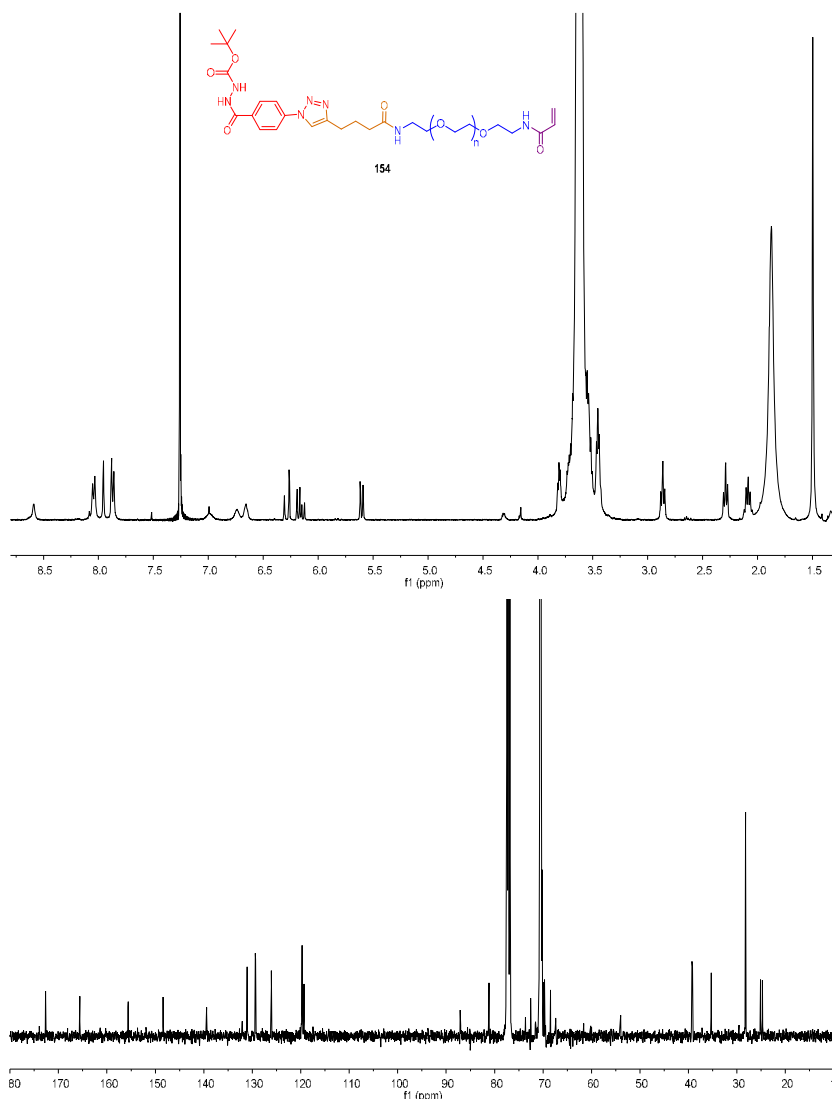
Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) del compuesto **153**, según orden de aparición.



Anexo I



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) del compuesto **154**, según orden de aparición.

370

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

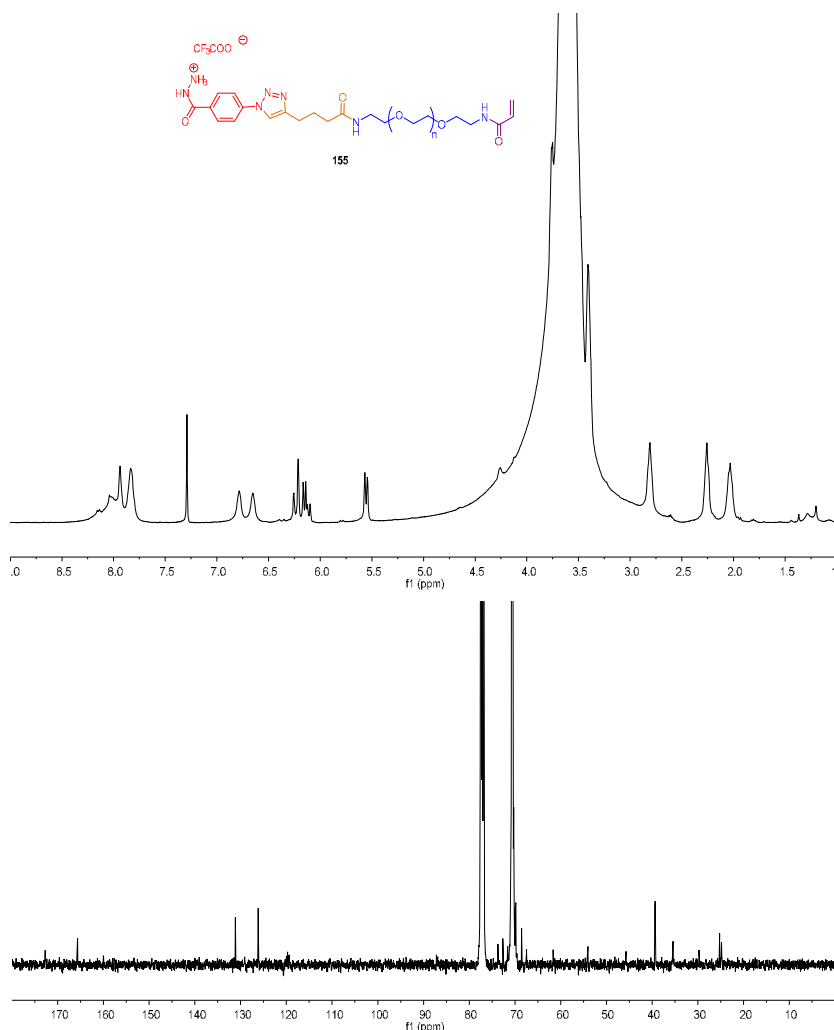
<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



Selección de espectros de RMN y ESI-MS



Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) y espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) del compuesto **155**, según orden de aparición.



Anexo I

372

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018397

CSV

GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/04/2020 08:56:31 Horario peninsular



GEISER-28b5-113d-b76a-4932-83f3-4bdf-82d4-e8bc