



PREPARACIÓN DE CONJUGADOS ALÉRGENO-ADYUVANTE PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS SINTÉTICAS

Jorge Losada Méndez

Sevilla, 2021



Instituto de Investigaciones
Químicas



Departamento de
Química Orgánica



cicCartuja centro de
investigaciones científicas
isla de la cartuja

Centro de Investigaciones Científicas
Isla de la Cartuja

PREPARACIÓN DE CONJUGADOS ALÉRGENO-ADYUVANTE PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS SINTÉTICAS

Memoria presentada por el
Graduado Jorge Losada Méndez
para optar al Grado de Doctor en Química

Sevilla, 2021

Dr. Francisco Javier Rojo Marcos, Investigador Científico (CSIC).

CERTIFICA: Que el presente trabajo titulado “Preparación de conjugados alérgeno-adyuvante para el desarrollo de vacunas sintéticas” ha sido realizado bajo mi dirección y asesoramiento en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC-Universidad de Sevilla) del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja, constituyendo la Memoria que presenta el Graduado Jorge Losada Méndez para optar al grado de Doctor en Química.

Sevilla, 2021

Fdo.: Francisco Javier Rojo Marcos

Director del trabajo

El presente trabajo ha sido realizado por Jorge Losada Méndez con un contrato asociado al proyecto RD16/0006/0011, Instituto de Salud Carlos III, Red ARADyAL, en el Laboratorio de Glicosistemas del Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC-Universidad de Sevilla) bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Rojo Marcos. El trabajo ha sido tutelado por la Profesora María del Carmen Ortiz Mellet en el marco del Programa de Doctorado en Química de la Universidad de Sevilla.

Fdo.: Jorge Losada Méndez

Fdo.: Francisco Javier Rojo Marcos
Director del trabajo

Fdo.: María del Carmen Ortiz Mellet
Tutora del trabajo

Agradecimientos

Atención, esta sección puede contener trazas de historias emotivas, leer con precaución.

Echar la vista atrás para recordar todo lo sucedido en estos últimos cuatro años en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral me hace recordar y agradecer a todos los miembros del grupo de investigación en el que se ha desarrollado y a la gente que realmente ha contribuido a llevarla a cabo, muchas veces de una forma no científica.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Francisco Javier Rojo Marcos la oportunidad que me brindó al permitir unirme a su grupo de investigación, así como la confianza depositada para poder desarrollar investigaciones por mí mismo y trabajar con autonomía. Sin olvidar tampoco, su gran hospitalidad en las barbacoas celebradas en su casa, dónde nunca faltaron las risas regadas con excelentes vinos.

A la profesora María del Carmen Ortiz por aceptar ser la tutora de esta Tesis Doctoral.

A la Red ARADyAL por la financiación, por todo lo aprendido en mis numerosos viajes a Madrid para asistir a sus reuniones y las colaboraciones realizadas en los ensayos biológicos, especialmente a la Dra. Cristobalina Mayorga y la Dra. Francisca Palomares.

A los miembros de mi grupo de investigación, con los que compartí una ingente cantidad de horas en el laboratorio. No puedo evitar destacar a mis dos principales compañeros de laboratorio que se convirtieron en grandes amigos (los Mosqueteros!), está claro que esto sólo pudo ser pura química. A Antonio Di Maio, por todo lo que aprendí de él, su voluntad inquebrantable hacia los amigos, nuestras numerosas conversaciones desde mecánica de bombas de vacío a historia clásica griega, compartimos buenos tiempos trabajando y estoy convencido que continuarán en el futuro, aunque nos separen países independizados de la UE o la Ronda de Triana. A Pedro Domínguez, por darme siempre calma, su gran corazón e instruirme sobre finanzas, gracias por estar siempre dispuesto a compartir una buena comida y una buena música. A ti pude disfrutarte algo más de tiempo, ya que volviste al laboratorio, renacido como post-doc. Adicionalmente, gracias por permitirme conocer a Anna e Inma, con las que compartimos buenos momentos juntos.

A Noelia, otra gran compañera, por mostrarme el sacrificio, la dedicación de un trabajo bien hecho y tu gran disponibilidad para ayudar siempre que fuera necesario. Está claro que solo podías venir de tierras palentinas.

A Adrián, pasamos juntos solo una parte de este período, pero fue suficiente para conocerte y formar una amistad. Gracias por todas nuestras conversaciones y tu fácil convivencia en el laboratorio, despliega tus alas y conseguirás grandes cosas.

Tampoco olvidar al Dr. Pedro Ramírez, gracias por la hora del té, todas nuestras conversaciones y tus voces, compartimos solo una parte, pero me quedo con todo lo bueno, gracias por todo. En la misma línea agradecer a los Dres. Pedro Nieto y José Luis de Paz por su amabilidad y su disposición para ayudar.

También a los compañeros con los que coincidí brevemente en el laboratorio, como Ainhoa por sus consejos, Noel, Susana, Tere, Javi y Rute. Así como a los compañeros de la sala de computación por los buenos tiempos vividos en el pasado como Sergi, Myriam o María José.

Por otro lado, también merecen una mención aquellas personas que realizaron una estancia en el laboratorio.

A Rossana (*Buongiorno principessa!!*), por tu entusiasmo infinito con una sonrisa, ese tiramisú increíble, tu disponibilidad para cualquier plan y por ser tan *bella* por dentro como por fuera, nunca olvidaré tu etapa por aquí.

A Alejandro (*Che mi arma!!*), gracias por tu amistad, tus buenas conversaciones y todos los cafés vividos, incluyendo la aventura de Lagos tan divertida. Siempre tendrás una casa en España.

A Jon (*do you like balconing?*), por tu personalidad única y tu gran corazón, gracias por los buenos momentos vividos y tus buenas conversaciones sobre política, incluso española. Te esperan grandes cosas, mucho ánimo!

Continuando con la gente del IIQ, a Carmen, gracias por todas nuestras conversaciones, tu amistad, tus plantas y botellas tuneadas con tanto arte. Espero que te mantengas firme en tu camino y sigas siendo tan *libre* como cuando te conocí.

A la gente de organometálica que tuve la oportunidad de conocer. A Juanín, por todas las cervezas, sus buenas conversaciones sobre cualquier tema, los planes por Sevilla y los buenos momentos pasados, gracias por todo. A Miquel, por ser el catalán más saleroso del centro de Sevilla, gracias por todas las cenas y las buenas conversaciones, fuiste un gran descubrimiento al final de este doctorado. A Macarena, por estar siempre dispuesta a ayudar, dejarme ser su psicólogo personal y enseñarme a filtrar a -40°C . A Marina y

Nere, por ser tan buenas compañeras, sus visitas al ultrasonidos, los carbonos de tres minutos y sus invitaciones a tomar un café de verdad en el IIQ. A Carlos por tomarse siempre la penúltima cerveza. A Rossie por su simpatía y su entusiasmo permanente.

Continuando con los vecinos de al lado, a Diego, por mostrarme la cultura gaditana y esa promesa de enseñarme a mariscar furtivamente. Llegaste al final de este doctorado, pero fue suficiente para forjar una amistad, muchas gracias por todas las risas y también por permitirme conocer a Nazaret en los planes por toda Sevilla en los que tan bien lo pasamos. A Tomás, por su simpatía, los momentos tan divertidos del viaje a Donosti para la Bienal de Química y su disposición a usar sus poderosos músculos para cualquier aparato siempre que fuera necesario.

A ese tándem maravilloso entre la espectrometría de masas y la cromatografía capitaneado por Gloria y Guada respectivamente. Muchas gracias por las largas horas pasadas con dudas y explicaciones, sois un gran ejemplo de la voluntad por un trabajo bien hecho.

Continuando con la gente del IIQ, al gran Fran, el Sabio, gracias por tu voluntad y tu inmensa eficiencia, este Instituto se caería a pedazos sin ti. Adicionalmente gracias por tu ayuda siempre que mi portátil lo requiera. A José Manuel, por llevar el crematorio como nadie (más madera!) y por su simpatía permanente. A Marga, nuestra súper secretaria, porque eres luz, la guerrera que siempre está dispuesta a ayudar contra el monstruo de la burocracia, es difícil encontrar a alguien más eficiente y amable.

Siguiendo con la gente del CicCartuja, a Rocío, por ser la mamá más guay que conozco, gracias por tu buen rollo desde el primer día y tu gran corazón, así como tus recomendaciones por el barrio de la Macarena. A Rafa, Ángeles (la mejor jardinera que he conocido!), Olga, José María, los Antonios y Quique por ayudar día a día simplemente con su cariño y sus buenas palabras. A Paula por ser la mejor organizadora que he conocido y su amabilidad.

Continuando con la gente que me ha acompañado en esta aventura sevillana fuera de los muros de la investigación. A María, mi primera amiga por aquí, gracias por los ratos en la Alameda, tu simpatía haciéndome las cosas más fáciles y por ayudarme a encontrar mi casa en Triana.

A Mila, uno de mis grandes descubrimientos, gracias por llevar con orgullo el apellido Losada por el centro de Sevilla. Me acogiste desde el primer día y me llevaste a muchos de tus planes con lo mejor de la burguesía sevillana, gracias por tu amabilidad, tu inmensa cultura y tu amor a las tierras castellanas. Adicionalmente por darme otra prima, Nieves, gracias por tu simpatía y todo tu saber sobre la idiosincrasia sevillana que tan interesante me resulta. Ojalá según pasen los años por mí, sepa retener ese espíritu joven que tan bien sabéis mantener.

No puedo evitar destacar a las personas del otro lado del Guadalquivir, a Álvaro, por ser el trianero menos trianero de todos, por tu confianza desde el primer día, gracias por tu simpatía y todas nuestras conversaciones, siempre tendrás una casa donde esté. En la misma línea agradecer al resto del grupo, con los que *trianear* fue algo maravilloso junto a Alba, Celia, Kat, el Capitán Triana y Almudena, muchas gracias por todo lo vivido.

A los conocidos en mis numerosos viajes, especialmente los valencianos, Adri e Isa, gracias por vuestro buen rollo, acogerme en vuestra casa y permitirme conocer las Fallas de primera mano.

A la gente de Málaga que siempre ha estado ahí, Antonio, Stephan y Juanda, gracias por todos los días de playa, cenas y snorkel por la Costa del Sol. También a mis primas favoritas Andrea y Mirian, por tener siempre un plan cuando voy y divertirme tanto en mis visitas, siempre es una alegría encontrarme con vosotras.

Fuera de Andalucía, también merecen una mención especial aquellas personas que me han acompañado desde antes de que empezara esta tesis. Desde Valladolid, al grupo tupper que siempre ha estado ahí desde hace tantos años, todas las fiestas, vivencias y viajes, a Marcos, Miguel, Fernando, Carlitos, Peñas, Ovi, Monge, Tamara y Sardon, estoy contento de saber que por mucho que pase el tiempo, siempre estáis ahí. También a la gente que me ha acompañado en mis primeros pasos de investigación en los laboratorios del Quifima, especialmente a mis compañeras Patri y Marta.

A la gente de Antigüedad, a la Peña La Rebeldía por todos los buenos tiempos vividos, especialmente a Alex e Ilde, siendo dos hermanos más para mí. Aún recuerdo mi primera visita a la Feria de Abril acompañado de vosotros dónde tan bien lo pasamos, gracias por los largos años de viajes, fiestas y planes que estoy convencido que continuarán en el futuro.

A María, por divertirme tanto sus historias y su forma de ser, a Elena por su eterna simpatía, a Beltrán por hacerme sonreír cada vez que lo veo y ser el futuro de los Losada. A la tía Marisa y al tío Jorge por acogerme tan bien siempre que visito su casa. A la tía Lupe, por su preocupación con sus sobrinos y las comidas en su casa. Al abuelo Marcelino, por ser un ejemplo a seguir, de simpatía, dignidad y trabajo, ojalá llegar a tus años la mitad de bien que tú. A la amoña, que ya no estás, gracias por sonreír siempre.

Siguiendo con la familia, a la tía Mertxe, por todos tus masajes, remedios y pócimas, y por esos bizcochos que haces que tanto me alegran, gracias por todo. A mi padre por enseñarme el valor del trabajo constante y el esfuerzo. A Luis por los viajes tan baratos y todos los descuentos que me ha encontrado. A mi madre, gracias por tu cariño, tu dedicación y tu esfuerzo, especialmente demostrado durante este último año tan duro, por no rendirte y servir de inspiración. Por todo esto, esta tesis te la dedico a ti.

Alameda de Hércules, Sevilla, Septiembre de 2021.

“...La ciencia nos enseña, en efecto, a someter nuestra razón a la verdad y a conocer y juzgar las cosas tal como son, es decir, como ellas mismas eligen ser y no como quisiéramos que fueran...”

Miguel de Unamuno

Abreviaturas, Siglas y Acrónimos

µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIT	Inmunoterapia específica con alérgenos
Anh.	Anhidro
APC	Célula presentadora de antígeno
Ar	Aromático
ARADyAL	Red de Asma, Reacciones Adversas y Alérgicas
ARN	Ácido ribonucleico
Asc	Ascorbato
Células B	Células B específicas derivadas de la médula ósea
BCR	Receptores de células B
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonilo
BODIPY	Boro-dipirrometeno
Bu	Butilo
CD	Clúster de diferenciación
CITIUS	Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla
CLR	Lectina tipo C
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
CuAAC	Cicloaddición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas catalizada por Cu(I)
Cuant.	Cuantitativo
CTL	Linfocito T citotóxico
CpG	Motivos citosina desmetilada-guanosina de ADN
DC	Célula dendrítica
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexil carbodiimida

DCM	Diclorometano
DC-SIGN	Lectina no integrina presente en células dendríticas que reconoce ICAM-3 selectivamente
DIPEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMEN	<i>N,N'</i> -dimetiletilendiamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
DTX	Docetaxel
DPTS	<i>p</i> -Toluensulfonato de (<i>N,N'</i> -dimetilamino)piridinio
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPIT	Inmunoterapia epicutánea
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electrospray
Et	Etilo
et. al.	<i>et alii</i> (locución latina, traducido como “y otros”)
EtOAc	Acetato de etilo
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
Fmoc	Fluorenilmetoxycarbonilo
g	Gramo
GDP	Glicodendropéptido
h	Hora
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HSQC	Correlación heteronuclear de nivel cuántico individual
HTS	Cribado de alta eficacia
IC ₅₀	Concentración para una inhibición del 50%
ICAM-3	Molécula de adhesión intercelular-3
IFN	Interferón

Ig	Inmunoglobulina
IgE	Inmunoglobulina específica
IL	Interleucina o interleuquina
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
L	Litro
LBP	Proteína de unión a lipopolisacáridos
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Repeticiones ricas en leucina
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
LTP	Proteína transportadora de lípidos
M	Molaridad
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz con detección por tiempo de vuelo
MAPS	Sistemas múltiples de péptidos antigénicos
MD-2	Factor de diferenciación mieloide 2
Me	Metilo
mg	Miligramo
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHz	Megahercio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
moDC	DCs derivadas de monocitos
MPL	Lípido A monofosforilado
MR	Receptor de manosa

MS	Espectrometría de masas
MW	Microondas
MWCO	Límite de peso molecular
MyD88	Factor de diferenciación mieloide 88
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
Células NK	Células naturales asesinas
nM	Nanomolar
ODN	Oligodesoxirribonucleótido
OIT	Inmunoterapia oral
OMS	Organización Mundial de la Salud
OVA	Ovoalbúmina
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Tampón fosfato salino
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PEG	Polietilenglicol
Ph	Fenilo
PI	Índice de proliferación
ppm	Partes por millón
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PTX	Paclitaxel
K_{eq}	Constante de equilibrio
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RP	Fase reversa
SAR	Relación estructura-actividad
SCIT	Inmunoterapia subcutánea
SFN	Sulforafano
SLIT	Inmunoterapia sublingual

rpm	Revoluciones por minuto
SPAAC	Cicloadición 1,3-dipolar entre ciclooctinos y azidas promovida por la tensión
S _N Ar	Sustitución nucleófila aromática
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida
t	Tiempo
Células T	Células T derivadas del timo
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBAI	Yoduro de tetrabutilamonio
TBTA	Tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]aminatert-butilo
TC	Linfocitos T citotóxicos
TCR	Receptores de células T
TES	Trietilsililo
TFA	Ácido trifluoroacético
T _H	Linfocitos T colaboradores
THF	Tetrahidrofurano
TIPS	Triisopropopilsililo
TLC	Cromatografía en capa fina
TLR	Receptor de tipo Toll
TMS	Trimetilsililo
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Linfocito T regulador
TRIF	Adaptador que contiene el domino TIR inductor de interferón-β
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta eficacia
UV	Ultravioleta
Vis.	Visible

Índice

1. Introducción	1
1.1. La Alergia	1
1.1.1. Alergia alimentaria	4
1.2. El sistema inmune	6
1.2.1. Leucocitos	8
1.2.1.1. Linfocitos	9
1.2.2. Células Dendríticas: Entre la Inmunidad Innata y la Inmunidad Adaptativa	15
1.2.2.1. DC-SIGN	17
1.2.2.2. Receptores de tipo Toll (TLRs)	19
1.3. Inmunoterapia	21
1.3.1. Péptidos sintéticos en el desarrollo de vacunas contra la alergia	25
1.3.2. El papel de los adyuvantes en las vacunas	27
2. Objetivos	33
3. Síntesis de conjugados alérgeno-pirimido[5,4-b]indol para el receptor TLR4	37
3.1. Introducción	37
3.2. TLR4 como diana terapéutica en alergia	38
3.2.1. Ligandos lipídicos de TLR4	39
3.2.2. Ligandos no lipídicos de TLR4	42
3.3. Objetivos	47
3.4. Síntesis del ligando de TLR4	47
3.5. Conjugación del ligando de TLR4 a distintos péptidos alérgicos	59
3.6. Evaluación biológica de los conjugados péptido-pirimido[5,4-b]indol	65
4. Síntesis de conjugados alérgeno-8-oxoadenina para el receptor TLR7	75
4.1. Introducción	75
4.2. TLR7 como diana terapéutica en alergia	78
4.2.1. Ligandos de TLR7	79
4.3. Objetivos	83

4.4. Síntesis del ligando de TLR7	84
4.5. Conjugación del ligando de TLR7 a distintos péptidos alergénicos	96
4.6. Evaluación biológica de los conjugados péptido-8-oxoadenina	104
5. Combinaciones de ligandos de TLR4 y TLR7 conjugados con alérgenos y estudio de su actividad biológica	117
5.1. Introducción	117
5.2. Combinación covalente de agonistas de TLR	120
5.2.1. 1,3,5-Triazinas como plataformas	123
5.3. Objetivos	127
5.4. Síntesis de homodímeros de TLR4, TLR7 y del heterodímero (TLR7/TLR4) conjugados al péptido Pru p 3	128
5.4.1. Síntesis de homodímeros de ligandos de TLR4 y 7 a partir de triazinas bifuncionales	129
5.4.2. Síntesis del heterodímero de ligandos de TLR4 y TLR7 a partir de triazinas trifuncionales	149
5.5. Conjugación de los dímeros de ligandos de TLR con el péptido de Pru p 3	163
5.6. Evaluación biológica de los conjugados dímero-péptido	169
6. Síntesis de conjugados alérgeno-glicodendrón y estudio de su actividad biológica	177
6.1. Introducción y antecedentes	177
6.2. Objetivos	194
6.3. Estudios complementarios de glicodendrones conjugados	194
6.4. Presentación de moléculas de interés terapéutico o <i>drug delivery</i>	201
6.4.1. Espaciadores sensibles al medio ácido	205
6.5. Síntesis de glicodendrones con un espaciador sensible al medio ácido	208
6.6. Conjugación del péptido de Pru p 3 al glicodendrón con un espaciador de tipo hidrazona	230
6.7. Evaluación biológica del conjugado con un espaciador de tipo hidrazona	232
7. Conclusiones	237
7.1. Capítulo 3	237
7.2. Capítulo 4	237

7.3. Capítulo 5	238
7.4. Capítulo 6	238
8. Experimental section	243
8.1. Reagents, solvents and analytical techniques	243
8.2. Synthesis of TLR4 ligand conjugates	245
8.3. Synthesis of TLR7 ligand conjugates	253
8.4. Synthesis of TLR ligand dimer conjugates	262
8.5. Synthesis of conjugated glycodendrons	284
8.6. Evaluation of hydrazone 62 hydrolysis at different pH	293
8.7. Biological assays	294
8.7.1. Allergic patients and torelant controls	294
8.7.2. Generation of moDCs	294
8.7.3. Florescent labelling of Pru p 3 conjugates	295
8.7.4. Studies by flow cytometry and confocal microscopy	295
8.7.5. moDC maturation studies	296
8.7.6. Specific proliferative response of different cell subpopulations	296
8.7.7. Cytokine determination	297
8.7.8. Statistic	297
Appendix 1. Selection of spectra and chromatograms	301
Appendix 2. Structure and abbreviations of essential amino acids	323

Capítulo 1

Introducción

1. Introducción

1.1 La Alergia

El término alergia fue utilizado por primera vez por von Pirquet en el año 1906 para describir las respuestas inmunitarias dañinas para el huésped.¹ La palabra proviene del vocablo griego *alol* que significa *cambio en el estado original*. La alergia se define tradicionalmente como un tipo de hipersensibilidad que da lugar a una reacción inmunitaria exagerada y que produce un cuadro patológico. Concretamente, dentro de la clasificación de Gell y Coombs,² la alergia se considera como una hipersensibilidad de tipo 1 o inmediata, que es una reacción producida por la exposición a un agente externo inocuo llamado alérgeno.

La alergia es uno de los trastornos inmunológicos más importantes, ya que afecta casi al 30% de la población mundial y produce patologías en una gran variedad de órganos como el tracto respiratorio superior e inferior, la piel, el tracto gastrointestinal y el sistema cardiovascular.^{3,4} Además, la alergia tiene un impacto significativo en la salud emocional y social de los pacientes y sus familias. Este trastorno es cada vez más frecuente en nuestra sociedad, hasta el punto que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para 2050 el 50% de la población mundial se verá afectada por asma o algún tipo de alergia.⁵ Este hecho ha provocado un aumento muy significativo de las investigaciones encaminadas a mejorar el diagnóstico y el tratamiento de la alergia, como queda patente al buscar el término “Allergy” en el motor de búsqueda de artículos de investigación biomédica *PubMed*, con un claro crecimiento exponencial de artículos relacionados con este término, alcanzándose un máximo de 1572 artículos científicos publicados en 2020. (Figura 1.1.)

¹ von Pirquet, C.; *Munch. Med. Wochenschr.* **1906**, *30*, 1457-1461.

² Gell, P.G.H.; Coombs, R.R.A.; *Clinical aspects of immunology.* **1963**, *1th Edition*.

³ Anto, J.M.; *et al.*; *Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *139*, 388-399.

⁴ Bernstein, D.I.; Schwartz, G.; Bernstein, J.A.; *Immunol. Allergy Clin.* **2016**, *36*, 261-278.

⁵ World Meteorological Day, 23 March 2021 - Climate change: a profound impact on asthma and allergy sufferers, *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI)*, **2021**, *EAACI Articles*.

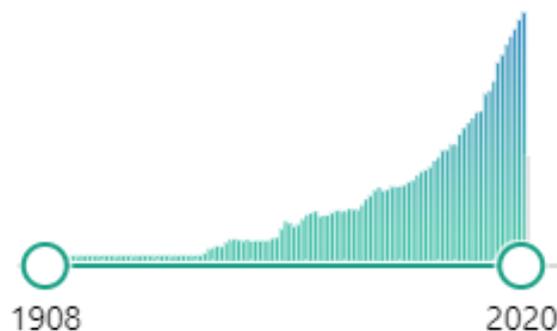


Figura 1.1. Gráfica que muestra la cantidad de artículos publicados por año relacionados con el término “Allergy” recogidos en *PubMed*.

Los alérgenos que dan lugar a estas alergias suelen ser generalmente proteínas presentes en una gran variedad de sustancias como polen (de gramíneas, abedul, olivo...), animales (gatos, ácaros, himenópteros...) o alimentos (frutas, pescados, frutos secos, huevo, etc.). Se han identificado más de 1000 secuencias de alérgenos de diversas fuentes.⁶ A estos alérgenos también se le une las múltiples variables que condicionan el sufrir reacciones alérgicas como es la predisposición hereditaria, el estilo de vida o las condiciones ambientales.⁷

A continuación, se describe brevemente el proceso alérgico que transcurre en dos fases.⁸ En la primera fase, los sujetos susceptibles son sensibilizados inmunológicamente a los alérgenos, lo que produce una sensibilización alérgica. Dicha sensibilización se puede adquirir después de la exposición dietética a proteínas alimentarias, o a través de otras vías de exposición (incluida la inhalación y el contacto con la piel). En la segunda fase, si estos sujetos sensibilizados son expuestos a niveles suficientemente altos del alérgeno o alérgenos inductores, entonces puede desencadenarse una reacción alérgica. En los siguientes apartados se detalla este proceso de sensibilización y reacción alérgica.

La alergia es un trastorno muy variable y difícil de diagnosticar y tratar debido a su gran heterogeneidad y multitud de patologías asociadas. Dentro de estas patologías destacan: asma, rinitis, conjuntivitis, urticaria, eczema, así como diversas alteraciones gastrointestinales (diarrea, hinchazón, náuseas, etc.).⁹ Sin embargo, la más importante y

⁶ Akdis, C.; *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, *18*, 718-726.

⁷ Stemeseder T.; *et al.*; *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2017**, *173*, 99-104.

⁸ Verhoeckx, K.; *et al.*; *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *80*, 223-240.

⁹ Johansson, S.G.; *et al.*; *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *113*, 832-836.

peligrosa de todo el espectro de reacciones alérgicas es la anafilaxia que consiste en una reacción inmunitaria severa, generalizada, rápida y potencialmente mortal.¹⁰ La anafilaxia se diferencia de una reacción alérgica común en que la extensión de la reacción inmunitaria es mucho mayor al comprometer al sistema respiratorio y cardiovascular. Si bien las manifestaciones clínicas de la anafilaxis varían, los síntomas más frecuentes son cutáneos, usualmente urticaria, eritema, prurito y angioedema;¹¹ seguido por las afecciones respiratorias, como resultado de la broncoconstricción, entre las que destacan la congestión nasal, rinorrea, estornudo, edema laríngeo, broncoespasmo y en tercer lugar; las cardiovasculares, por el aumento de la permeabilidad vascular como hipotensión y arritmias. Estos síntomas pueden aparecer en minutos u horas; sin embargo, la rapidez se correlaciona con la gravedad del ataque. Cuando en las manifestaciones de la anafilaxia se pone en riesgo inmediato y repentino la vida del paciente, se utiliza el término *choque o shock anafiláctico* que, de no ser tratado de forma inmediata, puede llegar a ser mortal.¹² El tratamiento consiste en la administración de epinefrina (o adrenalina) en disolución mediante inyección intramuscular, tan pronto como se sospeche de un episodio anafiláctico.¹³ La necesidad de recibir cuanto antes este tratamiento y las graves consecuencias que acarrea la privación del mismo obliga a los pacientes con antecedentes de anafilaxia a llevar con ellos un autoinyector de epinefrina y recibir asesoramiento médico,¹⁴ comprometiendo enormemente la calidad de vida de estos pacientes.

Todas estas complicaciones hacen que las reacciones alérgicas puedan ser potencialmente fatales, siendo fundamental la investigación y el desarrollo de terapias para su tratamiento.

¹⁰ Sampson, H.A.; *et al*; *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117*, 391-397.

¹¹ Kemp, S.F.; Lockey, R.F.; *J. Allergy Clin. Immunol.* **2002**, *110*, 341-348.

¹² James, L.P. Jr.; Austen, K.F.; *N. Engl. J. Med.* **1964**, *270*, 597-603.

¹³ Muraro, A.; *et al.*; *Allergy* **2014**, *69*, 1026-1045.

¹⁴ Martelli, A; *et al.*; *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *8*, 321-329.

1.1.1. Alergia alimentaria

Como se ha comentado previamente, una de las fuentes de origen de alérgenos son los alimentos. Se estima que del 4-8% de la población mundial tiene al menos algún tipo de alergia alimentaria.¹⁵ Las tasas de alergia alimentaria varían según la edad, la dieta, la región y muchos otros factores. Son más comunes en niños que en adultos y se observa un incremento en la frecuencia. Un informe de 2008 del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades señala un aumento del 18% en la alergia alimentaria infantil en el periodo de 1997 a 2007.¹⁶

Aunque una alergia puede ser provocada por prácticamente cualquier alimento, los responsables de las reacciones más importantes son la leche, el huevo, los frutos secos, el cacahuete (no es un fruto seco, sino una legumbre), los mariscos, los pescados, el trigo y la soja. A menudo, se hace referencia a ellos como “los ocho grandes alérgenos”. Por el contrario, la alergia a los aditivos y conservantes alimentarios es generalmente poco común.¹⁷

La alergia alimentaria puede ser confundida fácilmente con otros trastornos que también involucran alimentos y provocan síntomas iguales o parecidos. La intolerancia alimentaria y la intoxicación alimentaria son afecciones distintas, cuyo origen no se debe a una respuesta inmunitaria.¹⁸ En particular, la intolerancia alimentaria puede ser especialmente difícil de diferenciar de la alergia, que se distingue de ésta en que el tiempo de aparición de los síntomas desde la exposición al alimento suele ser mayor.¹⁹ Otra diferencia es que las intolerancias suelen estar ocasionadas por la ausencia de enzimas o mecanismos digestivos, por ejemplo, la intolerancia a la lactosa se debe a la ausencia de la enzima lactasa, lo que impide descomponer el disacárido de lactosa (el azúcar de la leche), provocando síntomas gastrointestinales.²⁰ Es importante no confundir con la alergia a la leche, que es ocasionada por una o varias proteínas presentes en la misma que actúan como alérgenos. La OMS recomienda denominar a las comúnmente llamadas intolerancias, como hipersensibilidad alimentaria no alérgica.²¹ (Esquema 1.1.)

¹⁵ Sicherer, S.H.; Sampson, H.A.; *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *133*, 291-307.

¹⁶ Branum, A.M.; Lukacs, S.L.; *NCHS. Data Brief* **2008**, *10*, 1-8.

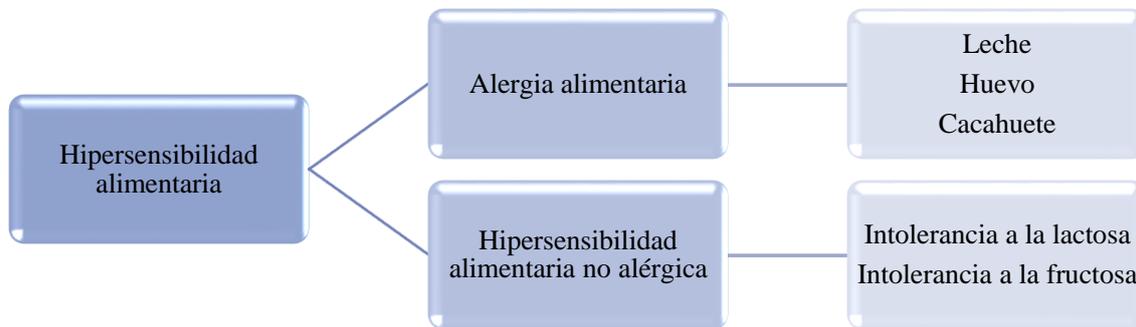
¹⁷ Randhawa, S.; Bahna, S.L.; *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *9*, 278-283.

¹⁸ Sicherer, S.H.; Sampson, H.A.; *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *133*, 291-307.

¹⁹ Ozdemir, O.; Mete, E.; Catal, F.; Ozol, D.; *Dig. Dis. Sci.* **2009**, *54*, 8-14.

²⁰ Heine, R.G.; *et al.*; *World Allergy Organ. J.* **2017**, *10*, 41-50.

²¹ Johansson, S.G.O.; *et al.*; *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *113*, 832-836.



Esquema 1.1. Representación de los tipos de hipersensibilidad alimentaria.

El proceso de desaparición de la alergia alimentaria ha sido estudiado recientemente.²² En general, las alergias alimentarias a la leche, el huevo, el trigo y la soja suelen resolverse por sí mismas durante la infancia, mientras que las alergias al cacahuete, los frutos secos, el pescado y los mariscos son persistentes.

Es importante destacar también que la alergia a los alimentos está influida por el grado de cocción de los mismos. Generalmente, una mayor cocción se relaciona con una mayor tolerancia a dicho alimento, ya que da lugar a la degradación de sus proteínas, entre las que se encuentran los alérgenos.²³ Por ejemplo, en un estudio del 2012 se observó que la mayoría de los niños con alergia al huevo pueden tolerar alimentos que contienen huevo en productos de panadería, entre otros, si son procesados térmicamente.²⁴ Sin embargo, hay que remarcar que los procesos térmicos no afectan por igual a todos los alérgenos alimentarios, ni eliminan por completo el riesgo de sufrir una reacción alérgica.

También se han realizado una gran cantidad de estudios relacionando diferentes alergias en un mismo paciente.²⁵ Por ejemplo, las reacciones alérgicas a frutas suelen estar asociadas con el síndrome polen-fruta-verdura, desencadenado por el consumo de verduras crudas o frutas frescas. Esto se atribuye comúnmente a proteínas homólogas de

²² Burks, A.W.; *et al.*; *J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, *129*, 906-920.

²³ Chandan, R.C.; Kilara, A.; *Dairy Ingredients for Food Processing*, **2011**, Wiley-Blackwell.

²⁴ Leonard, S.A.; *et al.*; *J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, *130*, 473-480.

²⁵ Hassan, A.K.G.; Venkatesh, Y.P.; *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *47*, 180-187.

reactividad cruzada que se encuentran en los alimentos vegetales y en el polen. Dado que los distintos epítomos de las proteínas se encuentran en todo el reino vegetal, la aparición de diferentes alérgenos vegetales con estructuras similares no es sorprendente. En un estudio llevado a cabo en Inglaterra en 274 adultos alérgicos al menos a un tipo de polen (abedul, hierba y/o artemisa), el 34% resultó también sensibles a la manzana, el 25% a la patata, el 23% a la zanahoria y el apio, el 22% al melocotón y el 16% al melón.²⁶ Además, se observó una gran variabilidad con la región geográfica, por ejemplo, el melocotón es la fruta más común que causa alergia en España.²⁷

En los países del área mediterránea se ha observado la incidencia en alergias a frutas de la familia de las rosáceas que incluyen, melocotón, manzana, pera y almendra, siendo las dos primeras las más mayoritarias. Sus alérgenos están relacionados con un grupo de proteínas vegetales conocidas como proteínas transportadoras de lípidos (LTPs, del inglés *Lipid Transfer Proteins*).²⁸ Concretamente, en una serie de estudios sobre esta familia, se ha demostrado que el melocotón es el primer alimento desencadenante que se asocia posteriormente con otras frutas de las rosáceas como la manzana, debido a la gran reactividad cruzada de sus alérgenos, denominados panalergenos.²⁹

1.2 El sistema inmune

En este apartado se hace una revisión de los aspectos más importantes relacionados con el sistema inmunitario, ya que resulta fundamental para poder comprender los mecanismos implicados en las reacciones alérgicas, así como los tratamientos terapéuticos de las mismas.

El sistema inmune humano agrupa una gran cantidad de células, tejidos y órganos repartidos por todo el organismo. Su función es el reconocimiento y la generación de la correspondiente respuesta frente agentes externos, llamados *antígenos*, que en el caso de la alergia son los denominados alérgenos. El término antígeno originalmente se atribuía a una molécula capaz de promover la producción de anticuerpos específicos, pero

²⁶ Bircher, A.J.; Van Melle. G.; Haller, E.; Curty, B.; Frei, P.C.; *Clin. Exp. Allergy* **1994**, *24*, 367-74.

²⁷ Cuesta-Herranz, J.; *et al.*; *J. Allergy Clin. Immunol.* **1999**, *104*, 688-694.

²⁸ García-Casado G.; *et al.*; *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *112*, 599-605.

²⁹ Asero R., Pravettoni V.; *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *13*, 379-385.

actualmente su significado es más completo y agrupa a cualquier molécula que pueda ser reconocida por el sistema inmune.

Las respuestas del sistema inmunitario pueden dividirse en dos grupos: las innatas o no específicas y las adaptativas o adquiridas.³⁰ (Figura 1.2.)

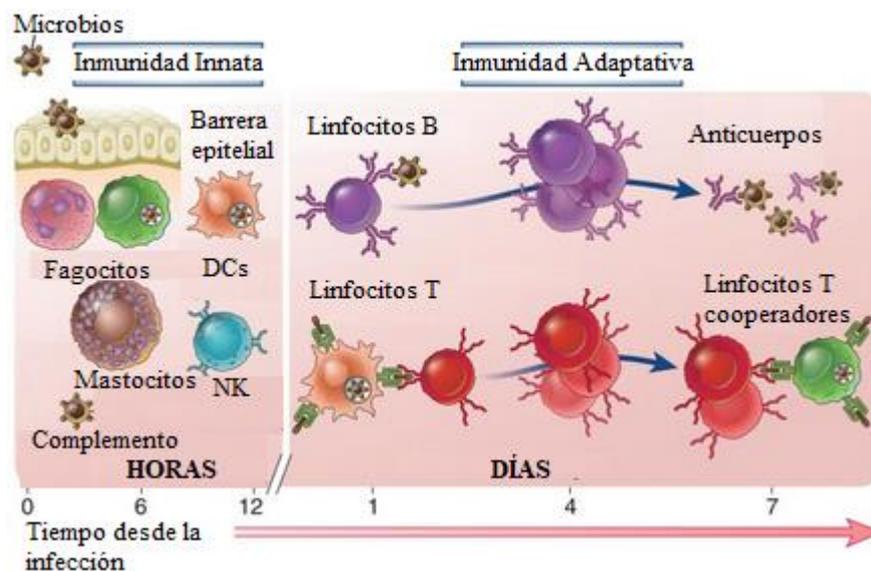


Figura 1.2. Inmunidad innata y adaptativa, en función de sus componentes y del tiempo. Abreviaturas: DCs (Células dendríticas) y NK (Células asesinas naturales). Imagen modificada de la referencia 30.

- La respuesta inmune innata proporciona la primera respuesta frente a los agentes externos o incluso antes de que exista este contacto. Se puede clasificar en función del tipo de barrera: mecánica (la piel y las mucosas), química (moléculas como las defensinas, lisosomas, pH y enzimas digestivas) y biológica (flora intestinal). Por tanto, esta respuesta frente a patógenos destaca por ser genérica.³¹
- La respuesta inmune adaptativa transcurre después de la anterior y destaca porque está mediada por linfocitos con receptores específicos para antígenos. Por lo tanto, es una respuesta altamente específica y es la parte que proporciona la adaptación.

³⁰ A. A. Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai; *Cellular and Molecular Immunology*, 2017, 9th Edition, Elsevier.

³¹ Alberts, B. et al.; *Molecular Biology of the Cell*, 2002, 4th Edition, Elsevier.

Esto se debe a que, tras sucesivas exposiciones al antígeno, las respuestas inmunes mejoran tanto en intensidad como en tiempo, es la llamada memoria inmunológica que es la base de la vacunación. Esta respuesta es posible debido a dos activaciones bien diferenciadas. Por un lado, la inmunidad humoral mediada por linfocitos B y anticuerpos y por otro, la inmunidad celular mediada por linfocitos T.³²

A pesar de que el sistema inmune da lugar a estas respuestas bien diferenciadas, existe una gran cooperación y modulación entre ellas para la protección del organismo.

1.2.1 Leucocitos

Los leucocitos, también denominados glóbulos blancos, nombre dado debido a la ausencia de pigmentos, son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas mediadoras de la respuesta inmunitaria y que, por tanto, participan en la defensa del organismo frente a los agentes patógenos. Formados en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas, tienen la característica de ser las únicas células sanguíneas que se encuentran tanto en la sangre como en el sistema linfático.³³ Su recuento suele encontrarse en valores entre 4.000-11.000 leucocitos por microlitro y un aumento de estos valores es un claro indicio de una infección en el organismo.³⁴

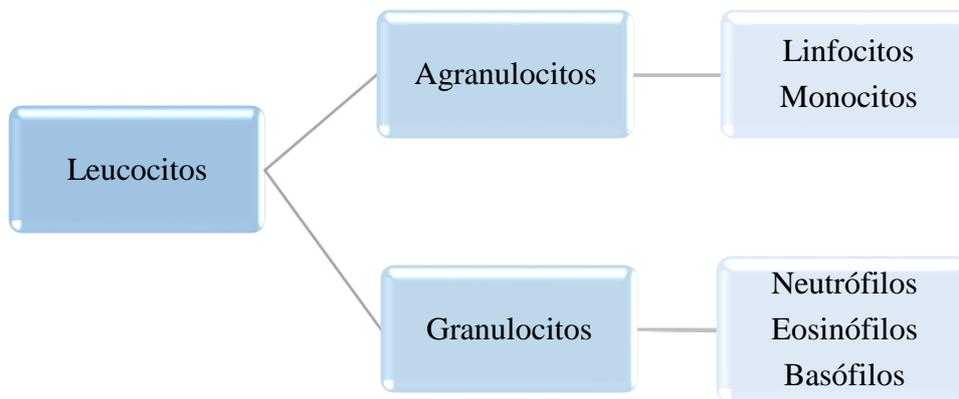
Existen cinco tipos de leucocitos, clasificados en dos grandes grupos: los agranulocitos (linfocitos y monocitos) que son aquellos que presentan orgánulos en su citoplasma y los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) que son aquellos que carecen de los mismos.³⁵ (Esquema 1.2.)

³² Cooper, M.D.; *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 191-195.

³³ Maton, D., *et al.*; *Human Biology and Health*, **1997**, Englewood Cliff, Prentice Hall.

³⁴ Hollowell, J.G.; *et al.*; *Vital and Health Statistics Series*, **2005**, *11*, 247-249.

³⁵ Orkin, S.H.; Zon, L.I.; *Cell* **2008**, *4*, 712.



Esquema 1.2. Clasificación de los diferentes tipos de leucocitos.

1.2.1.1 *Linfocitos*

Son el principal tipo de leucocitos, circulan por todo el organismo a través del aparato circulatorio y el sistema linfático, provienen de la diferenciación de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea y se desarrollan en diversos órganos linfáticos (timo, bazo, ganglios linfáticos y mucosas), dando lugar a diversos tipos, como se describe a continuación.

Células o linfocitos B

La activación de este tipo de linfocito tiene lugar en el bazo y los ganglios linfáticos. Destacan por poseer en su membrana celular receptores denominados BCR (del inglés *B-Cell Receptor*),³⁶ que poseen una alta especificidad por un único antígeno. Cada linfocito B tiene un solo tipo de BCR haciendo, por tanto, que cada una de las células reconozca un antígeno de forma exclusiva. Cuando se produce este reconocimiento, los linfocitos B se multiplican y secretan grandes cantidades de unas glicoproteínas denominadas anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig).³⁷ Estos anticuerpos no se unen de forma homogénea al agente externo. De hecho, pueden existir diversos anticuerpos frente a un mismo patógeno, cada uno de los cuales se unirá a un antígeno diferente que forma

³⁶ Owen, J.; Punt, J.; Stranford, S; Jones, P.; Kubly, J.; *Kubly Immunology*, 2013, 7th Edition, New York: W.H. Freeman and Company.

³⁷ Eisen, H.N.; Siskind, G.W.; *Biochemistry* 1964, 3, 996-1008.

parte de la superficie del mismo. (Figura 1.3) Como se mencionó previamente, la acción de este linfocito se corresponde con la respuesta humoral del sistema inmune.

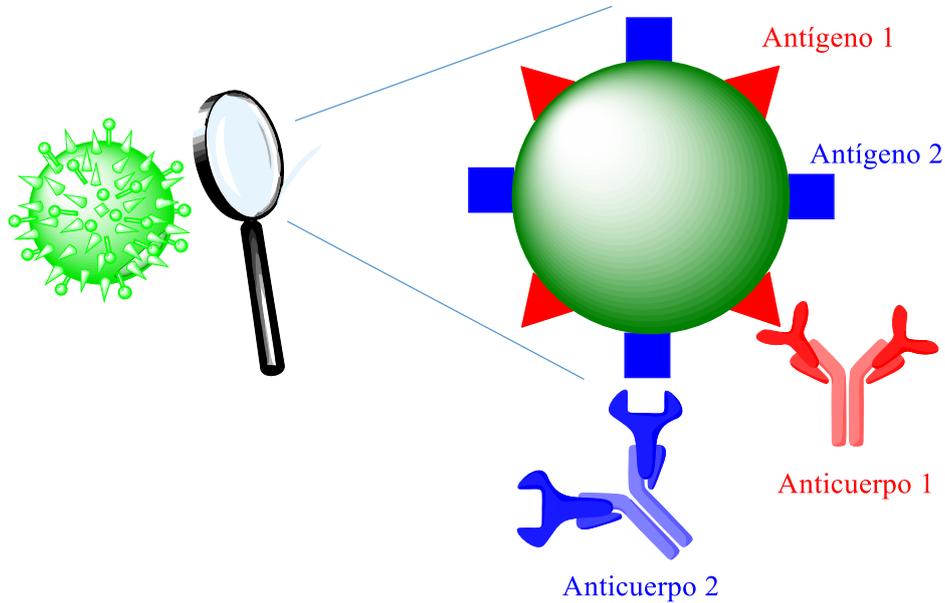


Figura 1.3. Representación de la especificidad de los anticuerpos por sus antígenos (rojo y azul) de un agente externo.

Dado que estos anticuerpos son específicos para un solo tipo de antígeno, se denominan monoclonales. Esta adhesión y reconocimiento del antígeno permite su neutralización con la ayuda de otros agentes como neutrófilos, macrófagos y otros fagocitos que se describirán más adelante. Por tanto, una vez eliminada la infección, una fracción de estos linfocitos B persisten como células de memoria, a veces durante el resto de la vida del organismo, y son importantes porque en caso de reinfección del mismo antígeno, la respuesta mediada por anticuerpos es más rápida y eficaz. Este proceso es conocido como memoria inmunológica³⁸ y es precisamente el proceso que se induce con la vacunación.

Células o linfocitos T

Estas células se denominan así porque su maduración tiene lugar en el timo.³⁹ Este proceso de maduración produce una diferenciación en la que se forman linfocitos T CD4⁺,

³⁸ Airoidi, I.; *et al.*; *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 144-154.

³⁹ Hivroz, C.; Saitakis, M.; *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 46.

también llamados linfocitos T cooperadores o linfocitos T_H (del inglés *T helper*). Este nombre es debido a que estas células por sí mismas no pueden aniquilar una célula infectada o un patógeno, sino que están involucradas en la activación de otras células inmunitarias, por lo tanto, su papel es fundamental en la defensa del organismo. Una vez activadas estas células, se distinguen tres subgrupos principales: las células T_{H1}, cooperan con los macrófagos, potenciando su actuación y las respuestas inflamatorias; las células T_{H2}, que colaboran con la activación de linfocitos B y en la secreción de anticuerpos y son particularmente importantes en el transcurso de reacciones alérgicas, como se hablará más adelante. Por último, las células T_{H17}, que fundamentalmente median en la respuesta de neutrófilos.

En el timo también se produce una diferenciación hacia otro tipo de células, los llamados linfocitos T CD8⁺ o linfocitos T citotóxicos (*CTL*, del inglés *Cytotoxic T Lymphocyte*), cuya función es el reconocimiento y eliminación de células infectadas por patógenos.

Cabe destacar que los linfocitos T solo reconocen a los antígenos por medio de las células presentadoras de antígeno o APCs (del inglés *Antigen-Presenting Cells*).⁴⁰ Estas células internalizan antígenos extraños por medio de endocitosis y los procesan para presentar moléculas antigénicas sobre su propia membrana en forma de péptidos a través de unas moléculas especializadas llamadas complejo principal de histocompatibilidad o MHC (del inglés *Major Histocompatibility Complex*).⁴¹ Estas APCs involucran diversos tipos de células del sistema inmunitario algunas de las cuales, así como el proceso de presentación de antígenos, se describirán más adelante. Por lo tanto, una vez presentados estos fragmentos peptídicos por parte de las APCs, estos son reconocidos por los linfocitos T a través de sus receptores específicos, denominados TCR (del inglés *T Cell Receptor*), iniciándose su activación (T_{H1}, T_{H2} y T_{H17}).

Adicionalmente, existe otra subpoblación de linfocitos T conocidos como células T reguladoras o Treg que tiene un papel fundamental en las enfermedades autoinmunes y en la alergia.⁴² Estos linfocitos suprimen la actividad del sistema inmune por medio de la actuación sobre los linfocitos T_H y las APCs siendo, por lo tanto, fundamentales para el

⁴⁰ Wang, J.-H.; Reinherz, E.L.; *Immunol. Rev.* **2012**, 250, 102-119.

⁴¹ Yokosuka, T.; Saito, T.; *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2010**, 340, 81-107.

⁴² Agarwal, A.; Singh, M.; Chatterjee, B.P.; Chauhan, A.; Chakraborti, A.; *Int. J. Pediatr.* **2014**, 636238.

mantenimiento de la homeostasis y la generación de tolerancia frente a antígenos.⁴³ De esta forma, se evita una respuesta exagerada del sistema inmune que podría dañar al propio organismo. Los procesos detallados de cómo se produce esta modulación del sistema inmune no son bien conocidos y continúan bajo una intensa investigación.⁴⁴

Células NK

Las células NK (del inglés *Natural Killer*) o células asesinas constituyen el tercer tipo de linfocitos. Su función es la destrucción de células infectadas por patógenos o de células cancerosas por medio de la lisis de las mismas, participando en la respuesta inmunitaria innata, dado que no precisan de antígenos sensibilizantes.⁴⁵ Las células NK presentan receptores en su superficie que detectan cambios en el MHC de las células dañadas. Este proceso de reconocimiento de células infectadas frente a células sanas es muy eficaz.

El gran control y modulación entre diferentes células del sistema inmune se produce gracias a la secreción por parte de las mismas de citocinas o citoquinas, que son proteínas o glicoproteínas de pequeño tamaño que desempeñan diversas funciones como la regulación de la proliferación y diferenciación celular, la quimiotaxis, la modulación de la secreción de Ig y la regulación del mecanismo de la inflamación. Existen citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Las secretadas por los leucocitos se denominan interleucinas o interleuquinas (IL), de las cuales se han identificado 33 (IL-1 a IL-33).⁴⁶

Dentro de esta familia de mediadores solubles como son las citoquinas, destaca también otro subgrupo por su importancia, los interferones (IFNs), dado que participan en el proceso de presentación de antígenos, así como en la activación de células NK y de macrófagos (ver a continuación).

Las citoquinas poseen características muy marcadas como es su *redundancia*, muchas citoquinas diferentes comparten funciones análogas; su pleiotropismo, una misma citoquina tiene efectos distintos sobre diferentes células diana; o su antagonismo, el efecto de una citoquina anula o revierte el efecto de otra. Sin embargo, una sobre-estimulación de citoquinas es contraproducente, dado que se puede originar un peligroso síndrome

⁴³ Chen, W.; *Immunotherapy* **2011**, 3, 911–914.

⁴⁴ Wiczorek G.; *et al.*; *Cancer Res.* **2009**, 69, 599-608.

⁴⁵ Xu, Y.; Zhou, S.; Wah Lam, Y.; Pang, S.W.; *Front. Immunol.* **2017**, 8, 998.

⁴⁶ Schmitz, J.; *et al.*; *Immunity* **2005**, 23, 479-490.

llamado tormenta de citoquinas,⁴⁷ ocasionado por una respuesta exagerada del sistema inmune que puede resultar mortal.

Una vez descritos estos linfocitos, es importante destacar el papel que juegan en las reacciones alérgicas, ya que estas están mediadas principalmente por inmunoglobulina específica o IgE, nombre que se debe a que son específicas para cada alérgeno. Como se mencionó anteriormente, las IgE son secretadas por las células B, que a su vez han sido estimuladas por las células T_{H2}, por eso la respuesta alérgica es conocida también como respuesta de tipo T_{H2}. El mecanismo mediado por la IgE consta de dos etapas diferenciadas. (Figura 1.4) Primeramente, al generarse la IgE, esta se adhiere a la superficie de los granulocitos como los mastocitos y los basófilos.^{48,49} Se dice entonces que los mastocitos y basófilos recubiertos por IgE desarrollan una sensibilización. Es importante remarcar que este proceso no provoca ningún tipo de reacción adversa en el organismo; sin embargo, la exposición posteriormente al mismo alérgeno da lugar a la unión de este a las IgE ya unidas a la superficie celular. Este reconocimiento provoca la ruptura de sus orgánulos, liberando su contenido al exterior, en un proceso que se conoce como desgranulación. Las moléculas liberadas son farmacológicamente activas como la histamina, leucotrienos (LTC₄ y LTD₄) y prostaglandinas, que actúan sobre los tejidos circundantes provocando la sintomatología clásica de las reacciones alérgicas.

⁴⁷ Lee, D.W.; *Blood* **2014**, *124*, 188-195.

⁴⁸ Muehling, L.M.; Lawrence, M.G.; Woodfolk, J.A.; *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *140*, 1523-1540.

⁴⁹ Noval, R.M.; Burton, O.T.; Oettgen, H.C.; Chatila, T.; *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *138*, 801-811.

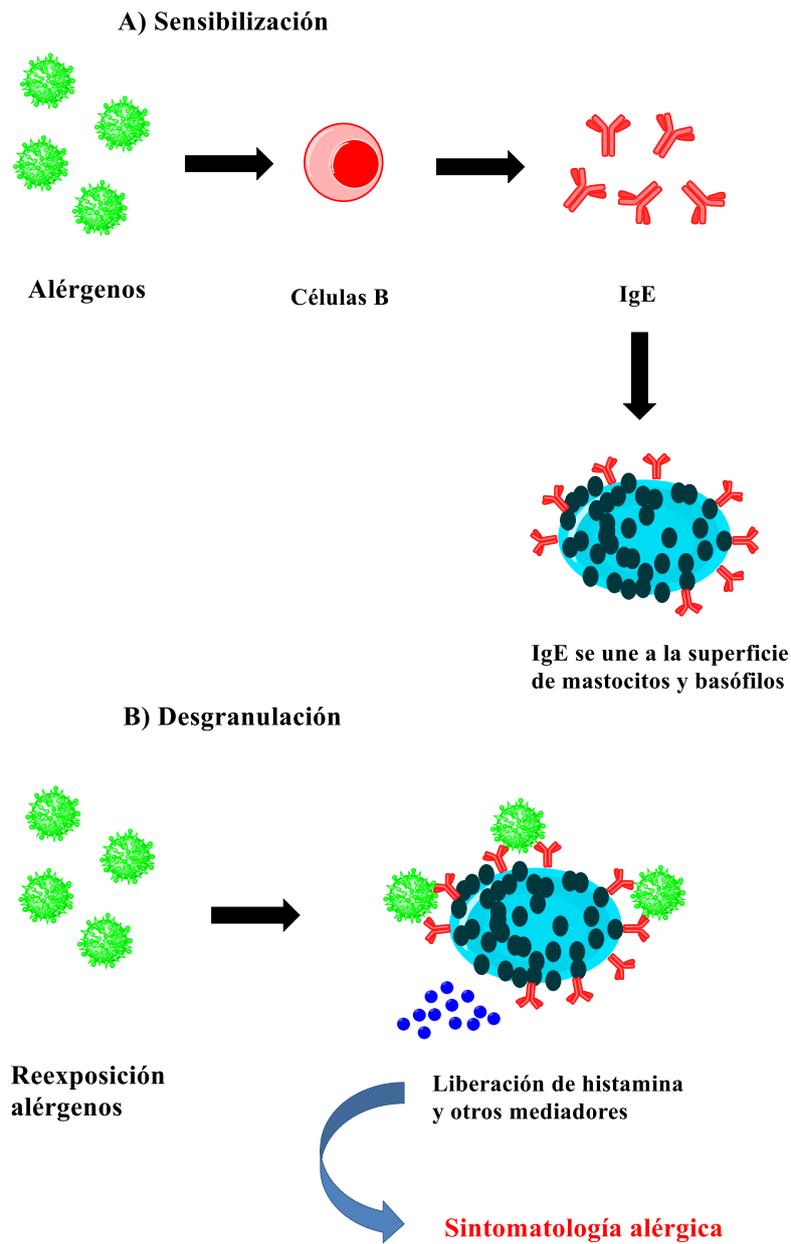


Figura 1.4. Representación del mecanismo de acción de las respuestas mediadas por IgE: **A)** Los alérgenos provocan la generación de IgE por parte de las células B. Esta IgE se une a la superficie de mastocitos y basófilos. **B)** Los alérgenos forman uniones multivalentes entre las IgE de la superficie, provocando la ruptura de sus orgánulos y la liberación de moléculas farmacológicamente activas.

1.2.2 Células Dendríticas: Entre la Inmunidad Innata y la Inmunidad Adaptativa

Otro grupo de células inmunitarias lo constituye la diversa familia de los fagocitos que, como su nombre indica, poseen capacidad fagocítica (del griego *phagein*, que significa comer), es decir, pueden captar agentes externos o restos celulares e introducirlos en su interior para procesarlos y posteriormente eliminarlos por medio de la fagocitosis.⁵⁰ Dentro de esta familia, un grupo muy importante son las células dendríticas o DCs (del inglés *Dendritic Cells*) ya que presentan una dualidad muy marcada.⁵¹ Aunque forman parte de la inmunidad innata al ser fagocitos y eliminar a los patógenos, su función principal es actuar como células presentadoras de antígenos (APCs), por lo tanto, también participan en la inmunidad adaptativa.

Las DCs desempeñan un papel fundamental en la activación de linfocitos T ya que capturan antígenos, los procesan y los presentan a estos a través de los fragmentos peptídicos del MHC. Por tanto, las células T vírgenes se diferencian en función del tipo de MHC. Este puede ser de tipo I (MHC-I), que estimula la diferenciación a células T citotóxicas (CD8+), o de tipo II (MHC-II) que promueven la diferenciación a células T_H.⁵²

Cómo el resto de glóbulos blancos y células sanguíneas, las DCs se originan en la médula ósea y entonces, son liberadas a la sangre en un estado inmaduro con la función de circular por el torrente sanguíneo en busca de antígenos. Existe otra clase de DCs inmaduras que se encuentran en la epidermis, denominadas células de Langerhans.⁵³

Una vez que las DCs encuentran un antígeno, se produce su reconocimiento y la correspondiente captura del mismo. Como se comentó previamente, al procesar el antígeno, las DCs exponen fragmentos del mismo por medio del MHC y se produce la maduración de las mismas. También, se inicia la migración de estas DCs maduras hacia los ganglios linfáticos. Una vez allí, las DCs presentan los fragmentos del antígeno a los linfocitos T CD4⁺ por medio de sus TCR. (Figura 1.5) Realizada la presentación del antígeno, estos linfocitos T son activados y a su vez, activan otros leucocitos como los linfocitos B y los macrófagos, produciéndose de esta manera la respuesta inmune.

⁵⁰ Schmalstieg, F.C.; Goldman, A.S.; *J. Med. Biogr.* **2008**, *16*, 99-103.

⁵¹ Banchereau, J.; Steinman, R.M.; *Nature* **1998**, *392*, 245-252.

⁵² Mellman, I.; Steinman, R.M.; *Cell* **2001**, *106*, 255-258.

⁵³ Valladeau, J. *et al*; *Immunity* **2000**, *12*, 71-81.

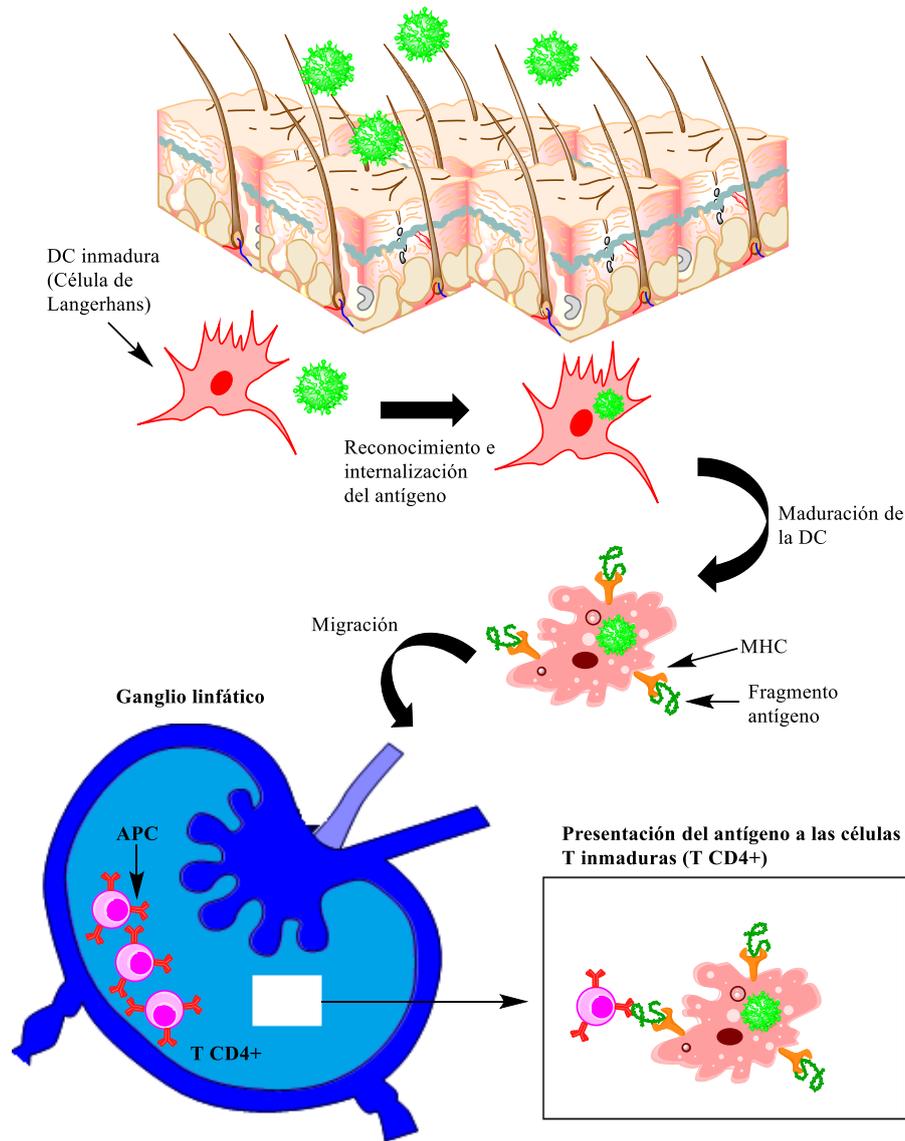


Figura 1.5. Representación esquemática de las etapas de la presentación del antígeno por parte de las DCs a los linfocitos T.

Esta presentación del antígeno es posible debido a que estos contienen patrones moleculares asociados a patógenos (*PAMPs*, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)⁵⁴ que son pequeñas secuencias de moléculas repetidas en su estructura celular. Estos *PAMPs* son reconocidos por las DCs a través de sus denominados receptores de reconocimiento de patrones (*PRRs*, del inglés *Pattern-Recognition Receptors*)⁵⁵ que se encuentran tanto en el interior, como en la superficie celular. De esta forma, las DCs que patrullan por el organismo pueden discernir entre las sustancias propias (endógenas) y los agentes externos (exógenos) que invaden el organismo e iniciar así la correspondiente

⁵⁴ Kumar, H.; Kawai, T.; Akira, S.; *Int. Rev. Immunol.* **2011**, *30*, 16-34.

⁵⁵ Suresh, R.; Mosser, D.M.; *Adv. Physiol. Educ.* **2013**, *37*, 284-291.

respuesta inmune. La activación de estos PRRs inicia una cascada de señalización, mediada fundamentalmente por citoquinas que tiene como objetivo la eliminación del antígeno así como la activación de las APCs, iniciándose la respuesta inmune. A continuación, se describen algunos de los PRRs destacados en el trabajo de la presente Tesis Doctoral.

1.2.2.1 DC-SIGN

Las lectinas tipo C (CLRs, del inglés *C-type Lectin Receptors*) son un grupo de receptores celulares que reconocen carbohidratos, entre los cuales se encuentran aquellos presentes en la superficie de patógenos. Uno de estos receptores, fundamentales en el sistema inmune, es DC-SIGN (del inglés *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3 Grabbing Non-integrin*). Esta lectina se expresa principalmente en la superficie de las DCs; sin embargo, también está presente en macrófagos.⁵⁶ En el año 2000,⁵⁷ la Prof. van Kooyk y el Prof. Littman demostraron el papel fundamental que juega este receptor en el proceso de infección del VIH-1. A raíz de este trabajo, numerosos grupos de investigación han centrado su interés en esta lectina, iniciándose una extensa investigación sobre este receptor.

DC-SIGN reconoce fundamentalmente unidades de manosa y fucosa, es decir, estos son sus PAMPS, que se encuentran presentes en la superficie de los patógenos.⁵⁸ Esta unión tiene lugar a través de los dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRDs, del inglés *Carbohydrate Recognition Domains*), altamente conservados, y es dependiente de calcio (Ca^{2+}).⁵⁹ Esta unión carbohidrato-receptor tiene una baja afinidad y, por ello, las lectinas de tipo C que funcionan como PRRs presentan múltiples copias del CRD dentro de una misma molécula, como ocurre por ejemplo con el Receptor de Manosa (MR) que posee ocho o con DC-SIGN que aparece como un homotetrámero conteniendo cuatro para permitir el reconocimiento multivalente. (Figura 1.6)

⁵⁶ Granelli-Piperno, A.; *et al.*; *J. Immunol.* **2005**, *175*, 4265-4273.

⁵⁷ Geijtenbeek, T. B. H.; *et al.*; *Cell* **2000**, *100*, 587-599.

⁵⁸ Lai, W.K.; *et al.*; *Am. J. Pathol.* **2006**, *169*, 200-208.

⁵⁹ Drickamer, K.; *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 585-590.

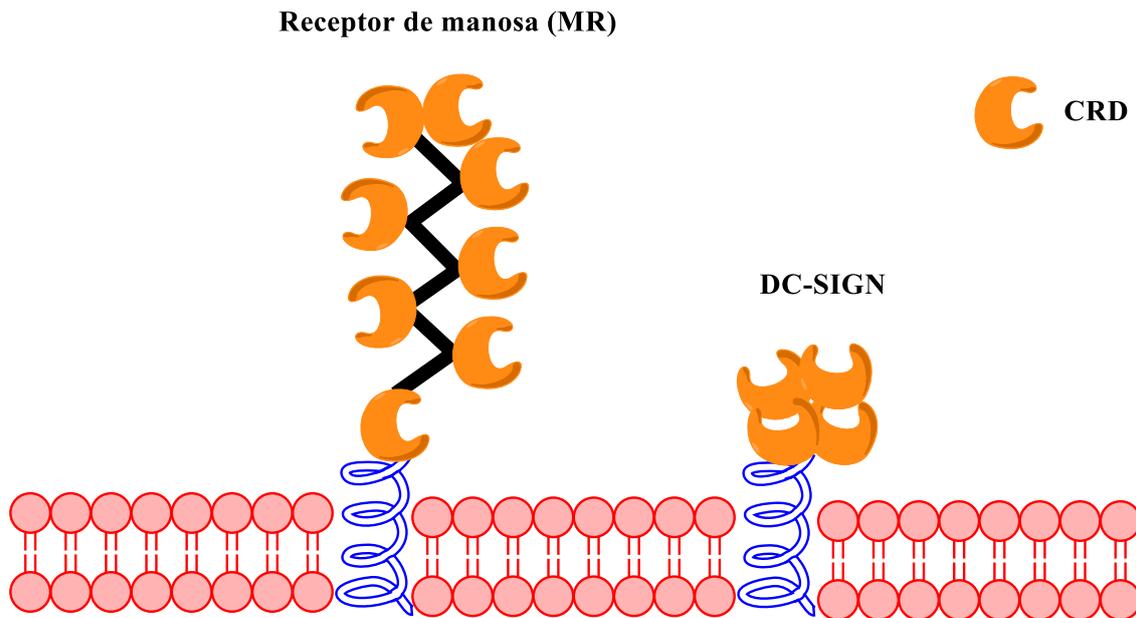


Figura 1.6. Representación de dos ejemplos de lectinas en una superficie celular. El receptor de manosa (MR) presenta ocho CRDs y DC-SIGN que posee cuatro CRDs.

DC-SIGN aparece como una estructura tetramérica, lo que le permite presentar 4 CRDs con una determinada orientación. Esto facilita una interacción multivalente con unidades de oligosacáridos repetidos, lo que conduce a un aumento no solo de la afinidad sino también de la selectividad. En este sentido, las glicoproteínas o los *clusters* de glicolípidos, que presentan numerosas copias de oligosacáridos de manosa o fucosa, se unen a DC-SIGN de manera multivalente, presentando una elevada afinidad.⁶⁰ Esto se conoce como efecto *cluster* o multivalente, lo que hace que la afinidad de la unión se incremente notablemente.^{61,62}

Este efecto y, por tanto, el reconocimiento de antígenos, es de vital importancia para comprender los mecanismos involucrados en los procesos inmunológicos asociados, como el de la alergia. En el caso de DC-SIGN, este reconocimiento permite la internalización de antígenos por parte de las APCs, como las DCs, y la secreción de citoquinas, iniciándose una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T (T_H1 , T_H2 o T_H17). Si el sistema inmune detecta que el antígeno en cuestión es inocuo, tras la internalización del antígeno y su presentación a células T, tiene lugar la diferenciación en

⁶⁰ Appelmek, B.J.; van Die, I.; van Vliet, S.J.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.; Geijtenbeek, T.B.; van Kooyk, Y.; *J. Immunol.* **2003**, *170*, 1635-1639.

⁶¹ Mammen, M.; Choi, S.K.; Whitesides, G.M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.

⁶² Dimick, S.M.; Powell, S.C.; McMahon, S.A.; Moothoo, D.N.; Naismith, J.H.; Toone, E.J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10286-10296.

células T reguladoras (Treg)⁶³ que producen una respuesta de tolerancia en la que se neutraliza (entre otros procesos) la producción de IgE y con ello los procesos inflamatorios típicos de las reacciones alérgicas. Por este motivo, el estudio de estos PRRs es un tema de enorme interés, ya que son potenciales dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos tratamientos que puedan modular el sistema inmunitario.

1.2.2.2 Receptores de tipo Toll (TLRs)

En 1985 un grupo de investigadores alemanes liderados por la Dra. Christiane Nüsslein-Vollhard publicaron un artículo en la revista *Cell*⁶⁴ en el que describían que la ausencia de una proteína en moscas de la fruta del género *Drosophila* provocaba que estas no desarrollaran su eje dorsoventral. Esta proteína fue llamada *Toll*, que en alemán significa “fantástico”.⁶⁵

Posteriormente, en 1996, se describió que moscas mutantes que carecían de la proteína Toll eran susceptibles a la infección por el hongo *Aspergillus fumigatus*,⁶⁶ que no supone ningún peligro para las moscas de tipo silvestre. Por lo tanto, este hallazgo puso de manifiesto una relación entre esta proteína y la respuesta inmunitaria. Al año siguiente, en 1997, Medzhitov y Janeway Jr. publicaron en la revista *Nature*⁶⁷ un estudio en el que se describía el homólogo de la proteína Toll en células humanas como un receptor transmembrana, lo que hoy en día se ha denominado receptor de tipo Toll o TLR (del inglés *Toll-Like Receptor*).

Con el tiempo se han ido identificando más receptores de este tipo que juegan un papel fundamental dentro del sistema inmune innato. Hasta la fecha, se han descubierto un total de diez tipos funcionales diferentes de TLRs en humanos, identificados como TLR1 a TLR10.⁶⁸ Estos TLRs, que son todas proteínas transmembrana que contienen repeticiones ricas en leucina (*LRR*, del inglés *Leucine-Rich Repeats*), pueden ser clasificados acorde con su localización celular. TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10 se expresan en la superficie celular,

⁶³ van Vliet, S. J.; Garcia-Vallejo, J. J.; van Kooyk, Y.; *Immunol. Cell Biol.* **2008**, *86*, 580-587.

⁶⁴ Anderson, K. V.; Jürgens, G.; Nüsslein-Vollhard, C.; *Cell* **1985**, *42*, 779-789.

⁶⁵ Eckle, T.; Eltzschig, H. K.; *Anesthesiology* **2011**, *114*, 490-492.

⁶⁶ Lemaitre, B.; Nicolas, E.; Michaut, L.; Reichhart, J.M.; Hoffmann, J.A.; *Cell* **1996**, *86*, 973-983.

⁶⁷ R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C.A. Janeway Jr.; *Nature* **1997**, *388*, 394-397.

⁶⁸ Medzhitov, R.; Janeway Jr., C.A.; *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 197-216.

mientras que TLR3, 7, 8 y 9 se expresan en orgánulos intracelulares, principalmente endosomas y en el retículo endoplasmático. Este tipo de receptores están expresados fundamentalmente en macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliales y células endoteliales.

Cada uno de estos receptores reconoce diversos PAMPs de microorganismos o derivados de estos. (Figura 1.7.) Por ejemplo, TLR3 reconoce ARN de doble cadena (dsARN) en virus, TLR4 reconoce lipopolisacáridos (LPS) presentes en bacterias Gram-negativas, TLR7 y TLR8 reconocen ARN monocatenario (ssARN), TLR9 reconoce exclusivamente ADN con motivos CpG no metilados, encontrados en procariontas y virus.⁶⁹ Aún no se ha encontrado el PAMP que reconoce el TLR10 humano aunque se sabe que es un receptor funcional.⁷⁰

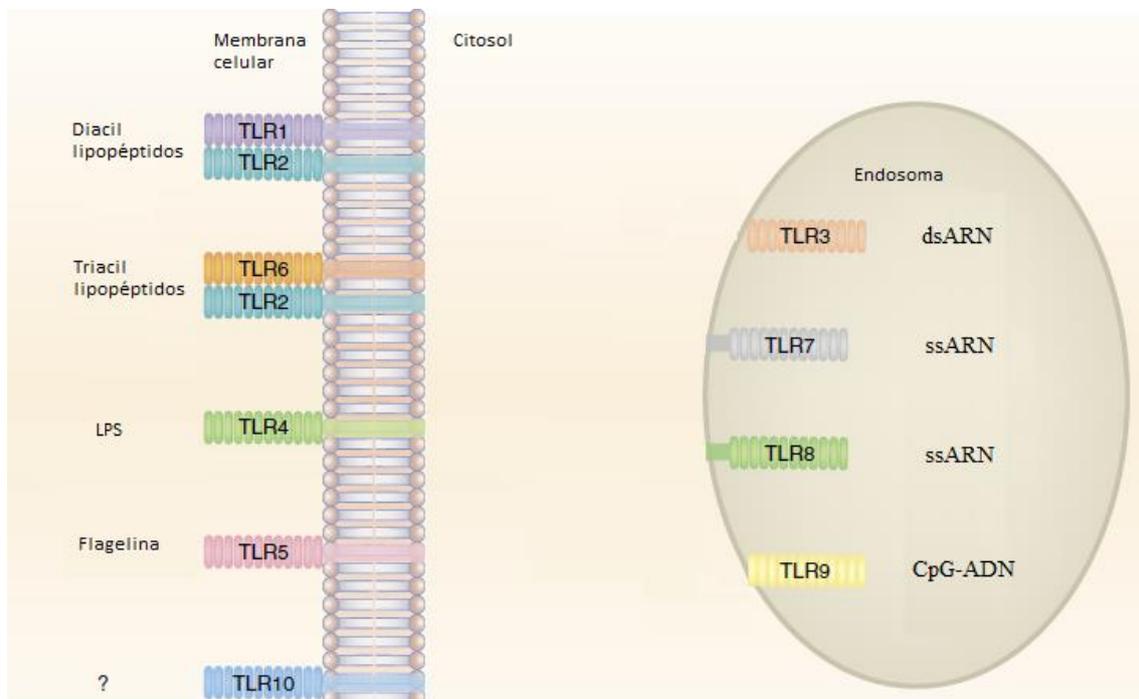


Figura 1.7. Representación de la localización celular de los TLRs humanos y sus PAMPs. Imagen modificada de la referencia 69.

Cuando se produce este reconocimiento, estos receptores homodimerizan o heterodimerizan entre ellos, provocando cascadas de señalización con efectos muy variados como la migración y maduración de las DCs y el aumento en la expresión de citoquinas, imprescindibles para la respuesta inmune adaptativa, como por ejemplo IL-10, IL-12 y las requeridas para la presentación de antígenos (moléculas MHC-II y

⁶⁹ Kanzler, H.; Barrat, F.J.; Hessel, E.M.; Coffman, R.L.; *Nat. Med.* **2007**, *13*, 552-559.

⁷⁰ Hasan, U. *et al.*; *J. Immunol.* **2005**, *174*, 2942-2950.

moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86).⁷¹ Como ya se ha comentado anteriormente, las células dendríticas son cruciales en el inicio de la respuesta inmune adaptativa, ya que conducen a la diferenciación de las CD4⁺ en diferentes fenotipos de células T efectoras (T_H1, T_H2 o T_H17) o reguladoras (Treg).⁷² Por lo tanto, la activación de los TLRs es fundamental en el control y modulación de las respuestas del sistema inmune, siendo de gran interés para el tratamiento de enfermedades inmunitarias como la alergia. Este concepto será ampliado más adelante.

1.3 Inmunoterapia

Si bien una de las formas de prevenir una reacción alérgica es evitar el contacto con el alérgeno en cuestión, muchas veces esto no es trivial. En el caso de alergias alimentarias es necesario llevar a cabo una dieta restrictiva que evite el alérgeno. Sin embargo, existen problemas asociados como la contaminación cruzada⁷³ y la presencia de trazas del alérgeno en cuestión suficientes para provocar una reacción. Por otro lado, no es posible evitar satisfactoriamente alérgenos estacionales (como el polen), ácaros o el veneno de himenópteros (abejas, avispas, etc.). Aunque pueden ser administrados antiinflamatorios y antihistamínicos, estos tratamientos únicamente consiguen aliviar temporalmente los síntomas de la alergia.

Actualmente, los esfuerzos en la búsqueda de un tratamiento contra las enfermedades alérgicas se centran en la inmunoterapia específica con alérgenos (*AIT*, del inglés *Allergen-specific ImmunoTherapy*), siendo este el único tratamiento eficaz hasta el momento.⁷⁴ La inmunoterapia consiste en la administración de dosis crecientes del alérgeno causante de la alergia con el objetivo de inducir un efecto protector de inmunidad es decir, generar *tolerancia* frente al alérgeno en cuestión.

El primer estudio sobre inmunoterapia específica se remonta a principios del siglo XX (1911), cuando Noon⁷⁵ inyectó un extracto de polen de gramíneas en un paciente cuyos síntomas alérgicos coincidían con la polinización de gramíneas. Noon observó que los

⁷¹ Rassa, J.C.; Ross, S.R.; *Microb. Infect.* **2003**, *5*, 961-968.

⁷² Gangloff, S.; Guenounou, M.; *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.* **2004**, *26*, 115-125.

⁷³ Silvester, J.A.; Graff, L.A.; Rigaux, L.; Walker, J.R.; Duerksen, D.R.; *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2016**, *44*, 612-619.

⁷⁴ Incorvaia, C.; Gritti, B.L.; Ridolo, E.; *Med. Econ.* **2018**, *21*, 553-555.

⁷⁵ Noon, L.; Cantab, B.C.; *Lancet* **1911**, *177*, 1572-1573.

pacientes inoculados presentaban una mayor resistencia al alérgeno, concluyendo que se generaba una respuesta protectora o inmunidad.

Por lo tanto, los tratamientos basados en AIT son considerados vacunas, ya que su finalidad es la generación de inmunidad y tienen un carácter profiláctico. El mecanismo de acción consiste en generar la tolerancia al alérgeno reduciendo la producción de IgE que, como se comentó previamente, es la responsable de la sintomatología alérgica al unirse a mastocitos y basófilos, provocando su desgranulación. Las personas se desensibilizan mediante la administración de dosis crecientes del alérgeno, disminuyendo gradualmente la respuesta dominada por IgE. El objetivo de la inmunoterapia es alejar la respuesta inmune de la inmunidad humoral (mediada por linfocitos B y anticuerpos) y dirigirla hacia la inmunidad celular (mediada por linfocitos T), disminuyendo la producción de anticuerpos IgE y produciendo más células Treg que secretan IFN- γ , IL-10 y TNF- β , contrarrestando así la producción de IgE.⁷⁶

Por lo tanto, esta modulación se puede resumir como un cambio de respuesta de tipo T_H2 (alérgica) hacia una respuesta de tipo T_H1 (no alérgica), ya que como se explicó previamente, la diferenciación de los linfocitos colaboradores T CD4⁺ en linfocitos T_H1 o T_H2 condicionan el mecanismo de la respuesta inmunitaria. (Figura 1.8)

⁷⁶ Murphy, K.; Weaver, C.; *Janeway's Immunobiology*, 2014, 8th Edition.

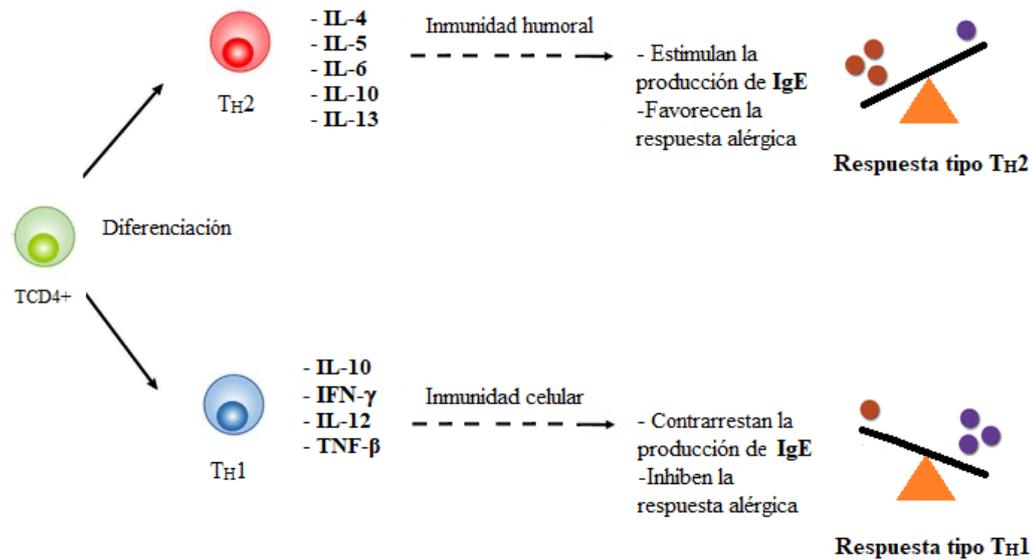


Figura 1.8. Representación de los tipos de diferenciación de linfocitos T_{H1} y T_{H2} y las citoquinas implicadas.

Es importante señalar que el descenso de IgE no implica que el organismo que desarrolla tolerancia (pacientes no alérgicos) no presente ningún anticuerpo específico a los alérgenos, sino que este es de otro tipo llamado IgG, que no da lugar a procesos de inflamación alérgicos al unirse a sus alérgenos.⁷⁷

La AIT se aplica usando distintas vías de administración del alérgeno. (Figura 1.9) Las más importantes son:

- Inmunoterapia oral (*OIT*, del inglés *Oral ImmunoTherapy*): el alérgeno es ingerido vía oral. Esta AIT se ha mostrado efectiva fundamentalmente en el caso de alérgenos ambientales.⁷⁸ Aunque esta es la vía de administración más sencilla; sin embargo, no resulta muy efectiva para alérgenos alimentarios, ya que muchos son resistentes a los procesos de digestión y pueden producir graves efectos secundarios. Por lo tanto, esta vía está muy limitada.
- Inmunoterapia sublingual (*SLIT*, del inglés *SubLingual ImmunoTherapy*): el alérgeno se administra en disolución como gotas que se mantienen debajo de la lengua durante unos minutos, produciéndose la absorción. Esta vía ha sido la más

⁷⁷ Huang, X.; *et al.*; *Allergy* **2018**, 73, 421-430.

⁷⁸ Möller, C.; Dreborg, S.; Lanner, A.; Björkstén, B.; *Allergy* **1986**, 41, 271-279.

estudiada de todas durante los últimos 30 años debido a sus escasos efectos secundarios y su éxito en el tratamiento de la rinitis alérgica.⁷⁹

- Inmunoterapia subcutánea (SCIT, del inglés *SubCutaneous ImmunoTherapy*): el alérgeno se inyecta bajo la piel. Esta vía, que fue de las primeras estudiadas, tiene la ventaja con respecto a las otras que puede usarse con una gran variedad de alérgenos, no indicados para las anteriores, como el veneno de himenópteros; sin embargo, se han detectado algunos efectos secundarios.⁸⁰
- Inmunoterapia epicutánea (EPIT, del inglés *EpiCutaneous ImmunoTherapy*): el alérgeno se administra por absorción a través de la piel, por ejemplo, con el uso de parches. Es una de las vías más recientes, estudiada desde hace 10 años. Su objetivo es ser una evolución de la SCIT, evitando el uso de la inyección. Sin embargo se han encontrado también efectos secundarios y de momento sus resultados no son significativamente mejores que los encontrados en el caso de la SCIT.⁸¹

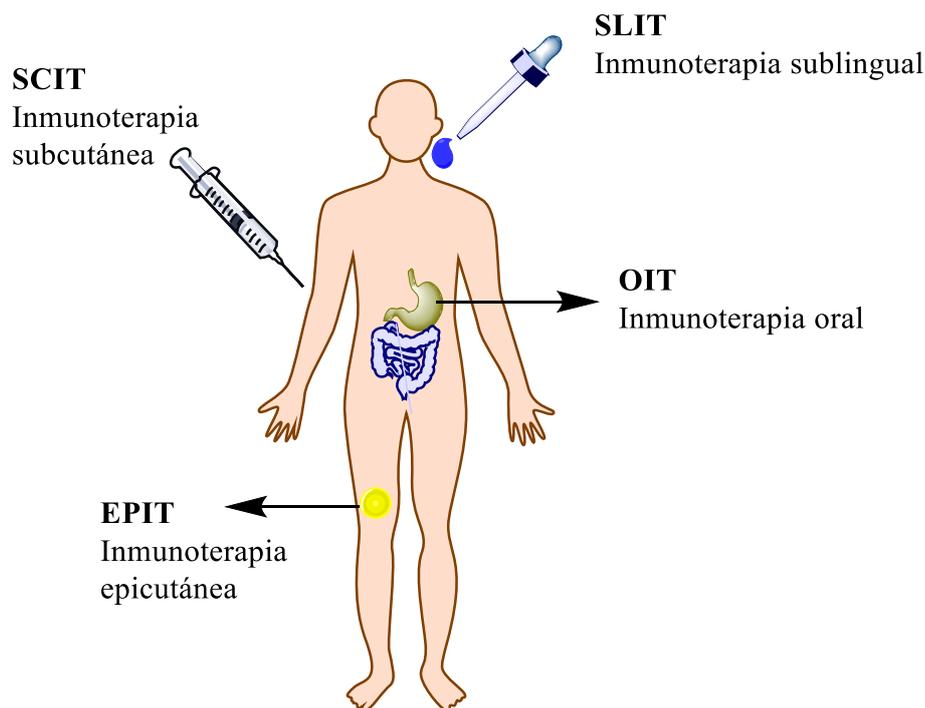


Figura 1.9. Representación de las diversas vías de administración de la AIT.

⁷⁹ Passalacqua, G.; Bagnasco, D.; Canonica, G.W.; *Allergy* **2020**, *75*, 1107-1120.

⁸⁰ Dorofeeva, Y.; *et al.*; *Allergy* **2021**, *76*, 131-149.

⁸¹ Kim, E.H.; Patel, C.; Burks, A.W.; *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2020**, *1*, 1-8.

1.3.1 Péptidos sintéticos en el desarrollo de vacunas contra la alergia

Todas las vacunas basadas en AIT utilizan extractos alergénicos, conteniendo las proteínas enteras, obtenidos de sus fuentes naturales. Esto provoca enormes diferencias entre las vacunas de las diferentes compañías farmacéuticas. Además, debido a la heterogeneidad de las fuentes naturales, también surgen problemas de reproducibilidad entre diferentes lotes de los extractos. Esta variabilidad de extractos, dependiendo de la pureza y calidad de las fuentes de partida, plantea serios inconvenientes.^{82,83}

En este contexto, el uso de péptidos sintéticos se posiciona como una alternativa eficaz y fiable.⁸⁴ Dentro de la estructura proteica del alérgeno se pueden definir diferentes regiones denominadas epítomos. Un mismo alérgeno puede tener diferentes epítomos o un conjunto de epítomos repetidos. La idea que subyace es el empleo de fragmentos sintéticos de estas regiones proteicas, lo que garantiza la reproducibilidad y la monodispersidad de los distintos lotes de vacunas, así como la reducción del riesgo de reacción alérgica, al ser el péptido menos inmunogénico que la proteína entera. Adicionalmente, la generación de estos péptidos de forma sintética abre nuevos e interesantes retos en el diseño racional de vacunas peptídicas, como es la presentación simultánea de diferentes epítomos de un mismo alérgeno o la introducción de aminoácidos no naturales que puedan, entre otras cosas, aumentar la estabilidad del péptido.⁸⁵

De los métodos establecidos para la síntesis de péptidos, destaca la síntesis en fase sólida (SPPS, del inglés *Solid-Phase Peptide Synthesis*), centrada en el trabajo pionero de Merrifield.⁸⁶ Este método consiste en el ensamblaje de una cadena peptídica, a través de sucesivas reacciones de derivados de aminoácidos, sobre una resina insoluble funcionalizada con grupos amino o hidroxilo. El procedimiento general de la SPPS consiste en sucesivos ciclos de reacciones alternas de desprotección y acoplamiento N-terminal. (Figura 1.10A) Primero se acopla un aminoácido a la resina, posteriormente, la

⁸² Focke, M.; Marth, K.; Flicker, S.; Valenta, R.; *Clin. Exp. Allergy* **2008**, *38*, 1400-1408.

⁸³ Curin, M.; Reininger, R.; Swoboda, I.; Focke, M.; Valenta, R.; Spitzauer, S.; *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2011**, *154*, 258-263.

⁸⁴ Purcell, A. W.; *et al.*; *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 255-281.

⁸⁵ Seebach, D.; Beck, A.K.; Bierbaum, D.J.; *Chem. Biodivers.* **2004**, *1*, 1111-1239.

⁸⁶ Merrifield, R.B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.

amina se desprotege y luego se acopla con el ácido libre del segundo aminoácido. Este ciclo se repite hasta que se sintetiza la secuencia deseada, creciendo la cadena del extremo C-terminal al N-terminal. Al final de la síntesis, el péptido se escinde del soporte sólido mientras que simultáneamente se eliminan todos los grupos protectores usando un ácido fuerte como el ácido trifluoroacético (TFA). El péptido obtenido de esta forma suele purificarse por medio de HPLC de fase reversa (RP-HPLC).⁸⁷ La SPPS permite la síntesis de péptidos de hasta 70 aminoácidos con buenos rendimientos. Esta síntesis se puede llevar a cabo de forma eficiente y en relativamente poco tiempo usando los sintetizadores de péptidos comerciales. (Figura 1.10B)

⁸⁷ Mant, C.T.; *et al.*; *Meth. Mol. Biol.* **2007**, 386, 3-55.

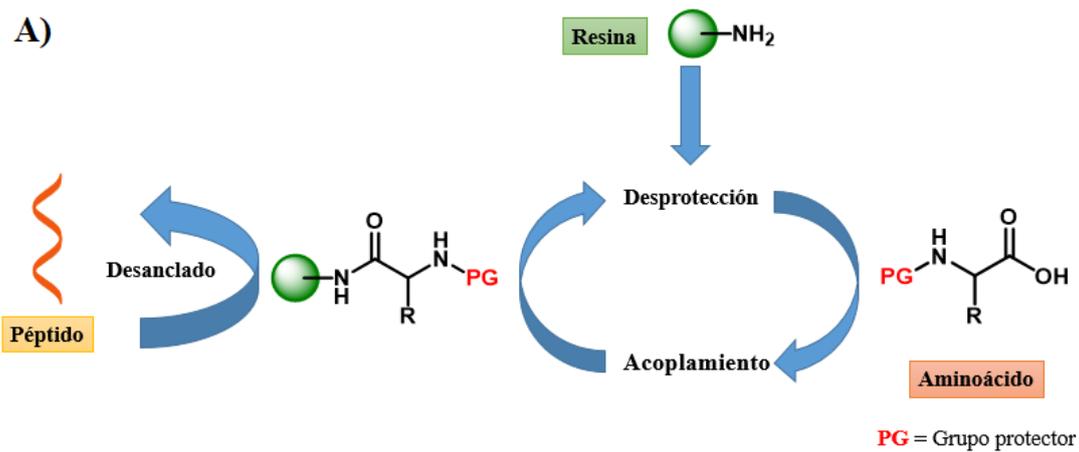


Figura 1.10. A) Representación esquemática de la SPPS. B) Imagen del sintetizador automático de péptidos Liberty Blue HT12™ (CEM Corporation), uno de los más avanzados del mercado.

Uno de los problemas del uso de péptidos sintéticos es su baja inmunogenicidad. Por ello, es necesario combinar su administración con adyuvantes que mejoren la respuesta inmune.

1.3.2 El papel de los adyuvantes en las vacunas

Los adyuvantes son todas aquellas sustancias que potencian, aceleran y prolongan la respuesta inmune frente a los antígenos de una vacuna.⁸⁸ Entre las ventajas del uso de los adyuvantes cabe destacar: la mejora de la inmunogenicidad de los antígenos; la reducción

⁸⁸ Sasaki, S.; Okuda, K.; *Meth. Mol. Biol.* **2000**, 29, 241-250.

de la cantidad de antígeno necesaria para alcanzar una inmunización exitosa; la reducción de la frecuencia de inmunización de refuerzo necesarias; y una mejor respuesta inmune en ancianos y pacientes inmunodeprimidos.

Los adyuvantes se han utilizado como aditivos en las vacunas durante décadas. Actualmente, solo hay cuatro compuestos aprobados que se usan como adyuvantes en la AIT: hidróxido de aluminio, fosfato cálcico, tirosina microcristalina y el Lípido A monofosforilado (MPL).⁸⁹ Los tres primeros tienen una función principalmente de liberación lenta y prolongada del antígeno, siendo el hidróxido de aluminio el más utilizado desde hace casi un siglo.⁹⁰ En cuanto al MPL, es considerado un adyuvante de “segunda generación”, ya que tiene una función inmunomoduladora. El MPL es un derivado de los LPS, que como se comentó previamente, es el PAMP natural del TLR4. Concretamente, el MPL es el primer adyuvante aprobado basado en un agonista de TLR.⁹¹ Además, desde 1999 los pacientes que han recibido una vacuna contra la alergia incorporan el MPL como adyuvante,⁹² ya que se ha demostrado que la interacción del MPL con TLR4 estimula la maduración de las DCs y estas activan a los linfocitos T, fomentando la producción de citoquinas, especialmente IL-12, dando una respuesta de tipo T_H1 (no alérgica).⁹³ Actualmente, existe una multitud de adyuvantes de segunda generación en diversas fases de desarrollo e investigación que están basados en ligandos de PRR. (Tabla 1.1.)

⁸⁹ Zubeldia, J.M.; Ferrer, M.; Dávila, I.; Justicia, J.L.; *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **2019**, *29*, 103-111.

⁹⁰ Gamazo, C.; D’Amelio, C.; Gastaminza, G.; Ferrer, M.; Irache, J.M.; *Hum. Vaccin. Immunother.* **2017**, *13*, 2416-2427.

⁹¹ Luchner, M.; Reinke, S.; Milicic, A.; *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 142.

⁹² Rosewich, M.; Lee, D.; Zielen, S.; *Hum. Vaccin. Immunother.* **2013**, *9*, 1523-1531.

⁹³ Ismaili, J.; *et al.*; *J. Immunol.* **2002**, *168*, 926-932.

Adyuvante	Descripción	Fase de desarrollo
Liposomas (AS01)	Vesículas lipídicas que contienen un ligando de TLR4 y saponina.	Fase III
Crema tópica w/TLR7	Ungüento tópico basado en un ligando de TLR7 (Aldara) en combinación con una vacunación intradérmica.	Fase III para Influenza
IC31	Péptido catiónico complejando a un ligando de TLR9 (CpG ssADN).	Fase II
Poly(I:C) (Ampligen)	Análogo de polímero de ARN bicatenario (PolyI:C12U), ligando de TLR3.	Fase II
Delta inulin (Advax)	Polisacárido derivado de plantas, microparticulado y cristalizado.	Fase II
CAF01	Liposoma catiónico que incluye un ligando sintético de CLR.	Fase I

Tabla 1.1. Ejemplos de adyuvantes basados en ligandos de PRR en diversas fases de desarrollo.

Por lo tanto, hay un creciente interés en la aplicación de estos adyuvantes combinados con alérgenos para su uso en la AIT, (Figura 1.11) debido a su capacidad de modular la respuesta inmune desde un patrón T_H2 hacia uno T_H1 .⁹⁴ Es importante destacar que ni todos los PRRs, ni todos sus ligandos, pueden fomentar esta modulación por lo tanto, es necesario una profunda investigación sobre los mecanismos que rigen estos procesos inmunológicos.

⁹⁴ Puggioni, F.; Durham, S.R.; Francis, J.N.; *Allergy* **2005**, *60*, 678-684.

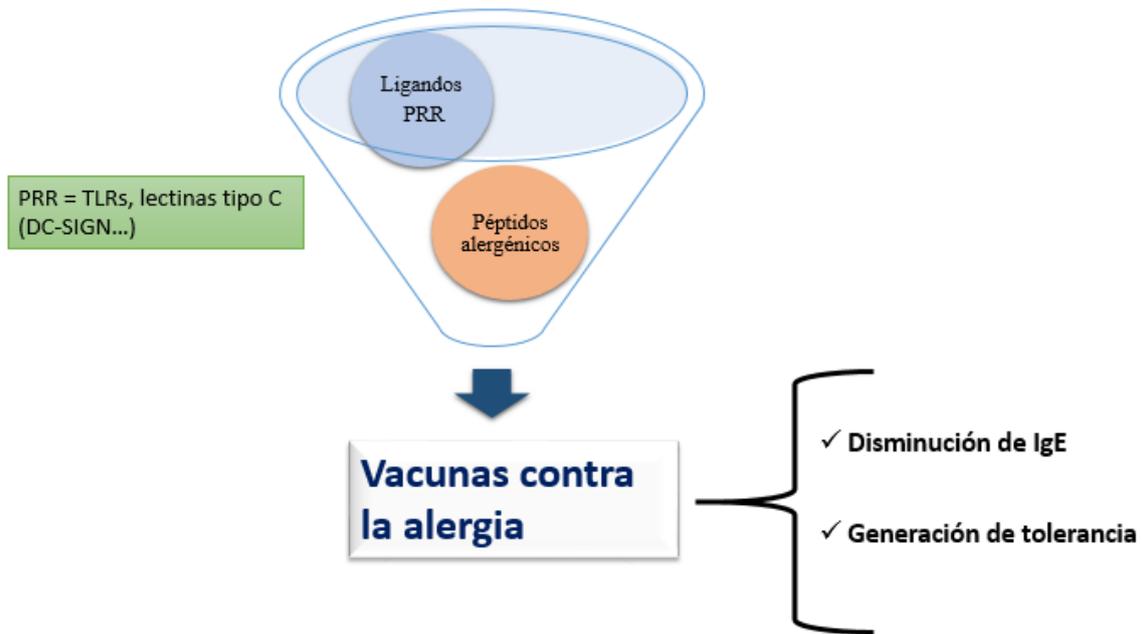


Figura 1.11. Representación de la combinación de elementos para la AIT.

Estos adyuvantes de segunda generación se pueden vincular a los alérgenos de las vacunas mediante una amplia variedad de formas que incluyen adsorción, encapsulación, conjugación, complejación, quelación, dispersión o simple co-administración. Desafortunadamente, la necesidad de la asociación física entre los componentes individuales debe determinarse empíricamente y sigue siendo dependiente tanto del antígeno como del inmunopotenciador. Por lo tanto, para cada nuevo adyuvante resulta fundamental estudiar su comportamiento y optimizar su actividad.⁹⁵

⁹⁵ O'Hagan, D.T.; Fox, C.B.; *Vaccine* **2015**, *33*, 14-20.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

El principal objetivo de esta tesis doctoral es la síntesis de conjugados adyuvante-alérgeno para el tratamiento de las enfermedades alérgicas. Estos adyuvantes deben ser capaces de activar diferentes PRRs (TLRs, DC-SIGN) y modular la respuesta inmunitaria hacia un patrón de tolerancia. Una vez sintetizados estos adyuvantes, deben ser fácilmente conjugados a diferentes péptidos alérgicos para el posible tratamiento de diferentes alergias en función del péptido seleccionado. Para alcanzar este objetivo principal, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Síntesis de un adyuvante basado en un ligando de TLR4 convenientemente funcionalizado para su conjugación a diferentes péptidos alérgicos.
- ✓ Síntesis de un adyuvante basado en un ligando de TLR7 convenientemente funcionalizado para su conjugación a diferentes péptidos alérgicos.
- ✓ Síntesis de homodímeros de ligandos de TLR 4 y 7, así como un heterodímero de ambos, usando como plataforma 1,3,5-triazinas. Conjugación de estas estructuras al péptido derivado del epítipo de Pru p 3.
- ✓ Síntesis de glicodendrones convenientemente funcionalizados para su conjugación a diferentes péptidos alérgicos para continuar los estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación. Síntesis de un nuevo glicodendrón que presente un espaciador sensible al medio ácido para estudiar mejoras en la presentación del péptido una vez es internalizado en las DCs.
- ✓ Evaluación biológica de todos estos conjugados.

Capítulo 3
**Síntesis de conjugados alérgeno-
pirimido[5,4-b]indol para el receptor
TLR4**

3. Síntesis de conjugados alérgeno-pirimido[5,4-b]indol para el receptor TLR4

3.1 Introducción

El primer trabajo relacionado con los receptores TLR fue el descubrimiento de la proteína transmembrana TLR4 en la mosca de la fruta, poniéndose de manifiesto que la mutación del gen que expresa dicha proteína se asociaba a una disminución de su respuesta inmunitaria frente a patógenos.⁶⁶ Por estos hallazgos, Bruce A. Beutler y Jules A. Hoffmann fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 2011.

El TLR4 es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 95 KDa que se encuentra en el exterior de la membrana celular, por lo tanto, se clasifica como un receptor extracelular. TLR4 reconoce diversos lipopolisacáridos (LPS), que son el componente mayoritario de la membrana de las bacterias Gram-negativas.⁹⁶ El mecanismo por el que tiene lugar el reconocimiento implica a una proteína accesoria, el *Myeloid Differentiation factor 2* (MD-2), formando un complejo heterodimérico.⁹⁷ Cabe destacar que este receptor es el único de todos los TLRs que necesita de una proteína accesoria para su activación. Sin embargo, en este reconocimiento también pueden participar otras proteínas como la proteína de unión a lipopolisacáridos (*LBP*, del inglés, *Lipopolysaccharide Binding Protein*),⁹⁸ que se une a LPS y lo transporta a una proteína CD14 (del inglés, *Cluster of Differentiation*), que a su vez lo presenta al MD-2, induciendo la formación del heterodímero TLR4 / MD-2 / TLR4* / MD-2*. (Figura 3.1)

Por lo tanto, por medio de este complejo se produce el reconocimiento de los LPS debido a que este se une a una proteína MD-2 provocando una dimerización de otro complejo TLR4/MD-2. Este proceso de dimerización (Figura 3.1) induce la activación de cascadas de señalización del sistema inmune innato.⁹⁹ Los estudios de los mecanismos de

⁹⁶ Brubaker, S.W.; Bonham, K.S.; Zanoni, I.; Kagan, J.C.; *Annu. Rev. Immunol.* **2015**, *33*, 257-290.

⁹⁷ Shimazu, R.; Akashi, S.; Ogata, H.; Nagai, Y.; Fukudome, K.; Miyake, K.; Kimoto, M.; *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1777-1782.

⁹⁸ Schumann, R.; Leong, S.; Flagg, G.; Gra, P.; Wright, S.; Mathison, J.; Tobias, P.; Ulevitch, R.; *Science* **1990**, *249*, 1429-1431.

⁹⁹ Beom, S. P.; Lee, J.; *Exp. Mol. Med.* **2013**, *45*, e66.

activación de este receptor son muy recientes y continúan en la actualidad. No fue hasta 2009 cuando se publicó la estructura cristalina del complejo heterodimérico TLR4/MD-2/LPS,¹⁰⁰ considerándose esta estructura como la conformación activa de TLR4.

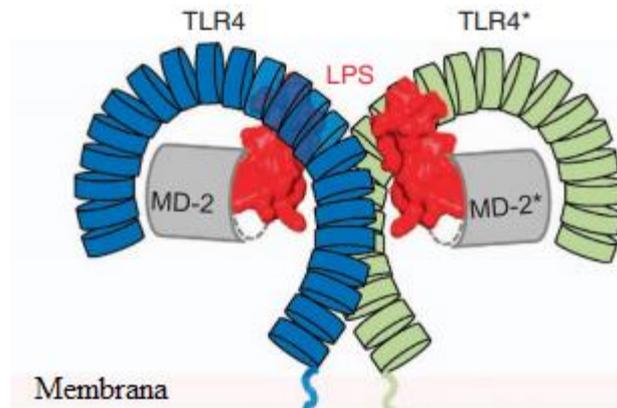


Figura 3.1. Representación del reconocimiento de LPS por TLR4/MD-2 originando una dimerización. Figura modificada de la referencia 99.

La activación de TLR4 desencadena la liberación de citoquinas pro-inflamatorias que provocan fuertes respuestas inmunes a través de la maduración de las células dendríticas y la secreción de IFN de tipo 1.¹⁰¹ Es importante destacar que TLR4 difiere del resto de la familia de los TLRs al tener dos vías de señalización intracelular distintas que dan lugar a estas respuestas. La vía dependiente de MyD88 (del inglés, *Myeloid Differentiation Factor 88*)¹⁰² que culmina con la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y, por otro lado, la vía dependiente de TRIF (del inglés, *TIR-domain-containing adapter inducing interferon- β*)¹⁰³ que genera IFN de tipo 1.

3.2 TLR4 como diana terapéutica en alergia

La activación de algunos TLRs puede modular la respuesta inmune desde una respuesta celular tipo T_{H2} (alérgica) a una de tipo T_{H1} (no alérgica), como se ha comentado anteriormente. En el caso concreto del receptor TLR4 se están llevando a cabo muchos esfuerzos para entender los mecanismos inmunitarios asociados a su activación. Los primeros estudios se centraron en la interacción con su PAMP original. A partir de estos

¹⁰⁰ Park, B.; Song, D.; Kim, H.; Choi, B.; Lee, H.; Lee, J.; *Nature* **2009**, *458*, 1191-1195.

¹⁰¹ Richez, C.; *et al.*; *J. Immunol.* **2009**, *182*, 820-828.

¹⁰² Medzhitov, R.; *et al.*; *Mol. Cell.* **1998**, *2*, 253-258.

¹⁰³ Yamamoto, M.; *et al.*; *J. Immunol.* **2002**, *169*, 6668-6672.

estudios se concluyó que los LPS son capaces de activar las DCs y la secreción de IL-12p70 e IL-10, que producen una diferenciación de las células CD4⁺, fundamentalmente a células T_H.¹⁰⁴ Estos resultados tan prometedores abrieron el camino al diseño de una gran variedad de vacunas basadas en la activación de TLR4.

Este creciente interés por parte de la comunidad científica se ha visto reflejado en la publicación de un gran número de estudios relacionados con TLR4 como diana terapéutica.¹⁰⁵ Tanto es así que actualmente existen algunos candidatos para vacuna basados en esta estrategia que se encuentran en diversas fases de investigación preclínica. La idea fundamental es el uso de agonistas de TLR4 como adyuvantes en AIT, debido al potencial de la activación de este receptor sobre el sistema inmune. Sin embargo, el uso de adyuvantes para vacunas sintéticas basados en LPS está muy limitado debido a la toxicidad asociada a estos compuestos. Por lo tanto, muchos de los estudios que se han comentado previamente se basan en la búsqueda de nuevos ligandos para TLR4 que sean eficaces y seguros. A continuación, se detallan estos nuevos ligandos y los estudios llevados a cabo para evaluar su actividad inmunológica.

3.2.1 Ligandos lipídicos de TLR4

Debido a la toxicidad de los LPS, se ha realizado una extensiva investigación sobre otros compuestos que también son reconocidos por TLR4. En una primera aproximación, se plantearon estructuras similares a las de los LPS. Los LPS son grandes moléculas constituidas por un polisacárido y una parte lipídica. Dentro de esta estructura, una de las regiones más conservadas y la responsable de la activación del sistema inmune es el llamado lípido A, si bien también lleva asociada la actividad tóxica. Este lípido A está formado por un disacárido de glucosamina que presenta dos ésteres fosfato cargados negativamente en los carbonos C1 y C4' y 6 cadenas de ácidos grasos unidos en las posiciones C2, C3, C2' y C3'. (Figura 3.2)

Se han realizado numerosas modificaciones sobre las distintas partes de la estructura del lípido A, evaluando si dichos cambios afectaban a su capacidad de interactuar con

¹⁰⁴ Re, F.; Strominger, J.L.; *J. Biol. Chem.* **2001**, *40*, 37692–37699.

¹⁰⁵ Kirtland, M.E.; Tsitoura, D.C.; Durham, S.R.; Shamji, M.H.; *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 599083.

TLR4, intentando reducir su toxicidad.¹⁰⁶ Estas investigaciones iniciales culminaron con el MPL, que cumple estas condiciones y que como se comentó en la Introducción de la presente Tesis Doctoral, es el único compuesto aprobado actualmente para AIT basado en un agonista de TLR. La estructura del MPL es la misma que la del lípido A pero sin un grupo fosfato y cambios en las cadenas lipídicas. Las modificaciones químicas de la estructura del lípido A se extendieron a más variantes (Figura 3.2). Por ejemplo, la eliminación de dos ácidos grasos lleva a la estructura Eritoran. La modificación en el número de ácidos grasos de estas variantes de lípidos A, naturales o sintéticas, pueden bloquear o inhibir la activación de TLR4, actuando así como antagonistas. Este hecho se confirmó al analizar la estructura cristalina del homodímero TLR4/MD-2 unido al Eritoran,¹⁰⁷ ya que se observa que este compuesto inserta todas las cadenas de ácidos grasos en el bolsillo hidrofóbico de MD-2; sin embargo, a diferencia del lípido A, el Eritoran no puede inducir la dimerización ni la activación de TLR4, por lo que actúa como un antagonista de TLR4. Curiosamente, otras variantes estructurales siguen encerrando sorpresas, por ejemplo, el lípido IVa, un precursor biosintético tetraacilado del lípido A, actúa como antagonista en humanos pero como un agonista en ratones. Este resultado se ha atribuido a las diferencias encontradas en la forma del bolsillo hidrofóbico del MD-2 de humano y ratón, así como a los efectos electrostáticos. Este hecho pone de manifiesto la crucial importancia de esta unión, dando unos resultados tan dispares incluso entre diferentes especies de mamíferos.¹⁰⁸ También, se ha investigado la influencia de la parte disacáridica encontrándose efectos antagonistas.

¹⁰⁶ Peri, F.; Calabrese, V.; *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3612-3622.

¹⁰⁷ Kim, H.; *et. al.*; *Cell* **2007**, *130*, 906-917.

¹⁰⁸ Ohto, U.; Fukase, K.; Miyake, K.; Shimizu, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 7421-7426.

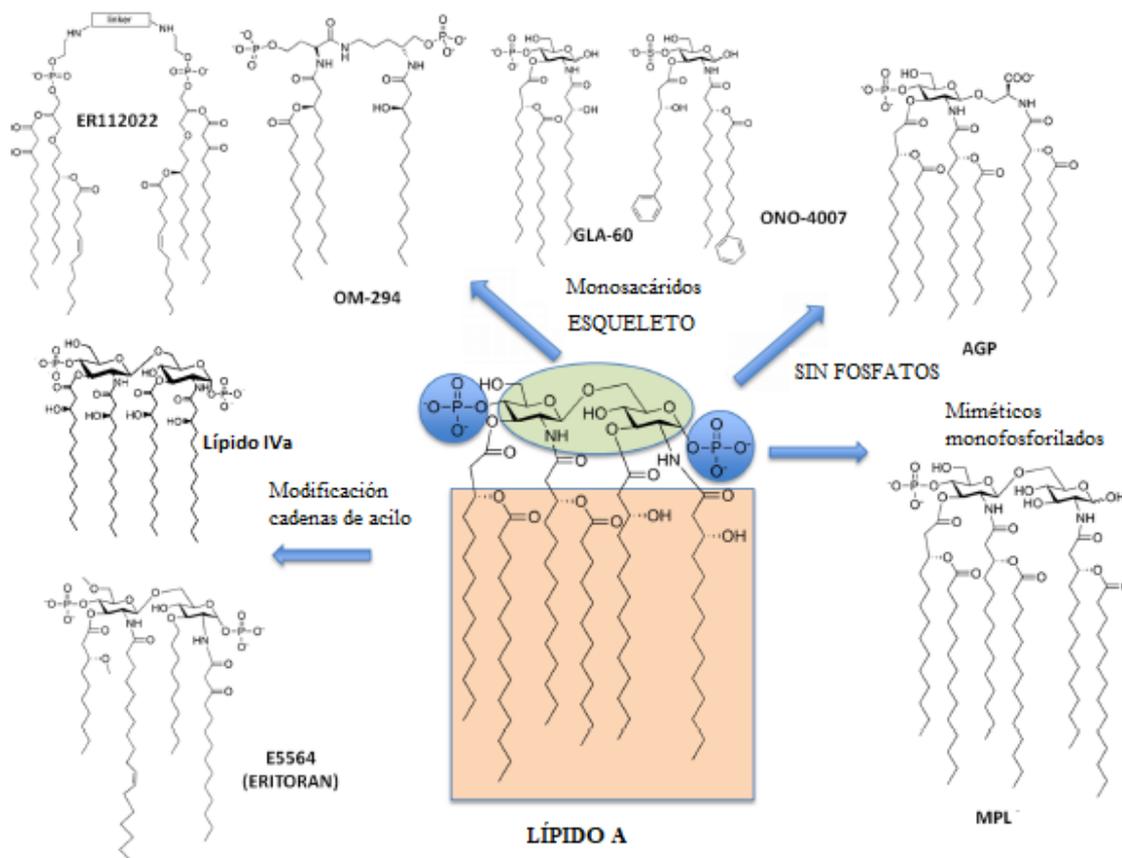


Figura 3.2. Estructura del lípido A y ejemplos de algunas de sus modificaciones estudiadas. Figura modificada de la referencia 106.

Estas estructuras derivadas del lípido A presentan algunos inconvenientes serios ya que, debido a sus regiones polares y apolares, son moléculas anfifílicas. Esto implica que en disolución forman agregados, produciendo también una baja solubilidad en agua, lo que a veces complica su manipulación tanto *in vitro* como *in vivo*, así como unas pobres propiedades farmacodinámicas. Por lo tanto, es fundamental el desarrollo de nuevas estructuras moleculares inspiradas por compuestos naturales activos para TLR4 con mejores propiedades como solubilidad, biodisponibilidad y toxicidad, en comparación con los compuestos basados en el lípido A. A continuación, se expondrá de forma resumida la búsqueda de estos nuevos ligandos que constituyen una de las vías más prometedoras en el uso de la AIT basadas en TLR4.

3.2.2 Ligandos no lipídicos de TLR4

La modelización computacional es una poderosa herramienta en la búsqueda de nuevos ligandos de TLR4 para el diseño racional de fármacos.¹⁰⁹ Por medio de estas técnicas, recientemente se han identificado algunas moléculas pequeñas que son ligandos para TLR4. Estos estudios se han centrado en el mecanismo de acción y en la interacción con proteínas específicas (TLR4, MD-2 y CD14). (Figura 3.3) La enorme variedad de estructuras basadas en estas pequeñas moléculas es sorprendente debido a su gran diferencia estructural con el ligando natural lipídico, los LPS. Además, estos compuestos interaccionan de distintas formas con TLR4 y/o a MD-2 y CD14. Por otro lado, algunas moléculas pequeñas que eran capaces de interaccionar con TLR4 provenían de fuentes naturales e incluso eran fármacos para el tratamiento de otras enfermedades. Uno de estos compuestos es el paclitaxel (PTX), (Figura 3.3) un potente agente anticancerígeno extraído del tejo del Pacífico, que actúa mediante la sobre-estabilización de los microtúbulos celulares. Aunque el mecanismo de acción del PTX contra el cáncer se ha atribuido durante mucho tiempo a los efectos a nivel de la β -tubulina, posiblemente la activación de una respuesta inmune innata y algunas de las propiedades antitumorales del PTX estén relacionadas con el complejo TLR4/MD-2. Esta afirmación se apoya en el hecho de que la unión del PTX a MD-2 se ha demostrado mediante experimentos *in vitro*.¹¹⁰ De forma análoga, también se ha identificado otro producto natural, la Laprocianidina B1, que se encuentra en el árbol de la canela. (Figura 3.3) Su capacidad de unirse a TLR4 se demostró por medio de estudios de docking.¹¹¹ En la misma línea, estas técnicas computacionales demostraron la capacidad de unión a TLR4 de moléculas tan diversas como el Xanthohumol (un tipo de Chalcona) o la Curcumina (el principio activo de la Cúrcuma), si bien todas estas moléculas presentan fundamentalmente propiedades antagonistas.¹¹² (Figura 3.3) Por otro lado, utilizando la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas se puso de manifiesto que el Sulforafano (SFN) forma un enlace covalente con el residuo Cys133 del MD-2. Los autores propusieron, apoyándose en estudios de docking, un modelo en el que el SFN, una vez

¹⁰⁹ Billod, J.M.; Lacetera, A.; Guzmán-Caldentey, J.; Martín-Santamaría, S.; *Molecules* **2016**, *21*, 994.

¹¹⁰ Resman, N.; Gradisar, H.; Vasl, J.; Keber, M.; Pristovsek, P.; Jerala, R.; *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 3929-3934.

¹¹¹ Xing, J.; *et al.*; *Mol. Cell. Biochem.* **2015**, *407*, 89-95.

¹¹² Fu, W.; *et al.*; *Drug Des. Dev. Ther.* **2016**, *10*, 455-463.

unido covalentemente a la Cys133, ocupa la misma posición que una de las cadenas lipídicas del LPS. Este modelo sugiere que el SFN evita estéricamente que otros LPS / lípido A se acerquen y se asienten dentro del bolsillo hidrofóbico del MD-2 y al competir con ellos presenta, por tanto, una propiedad antagonista.¹¹³

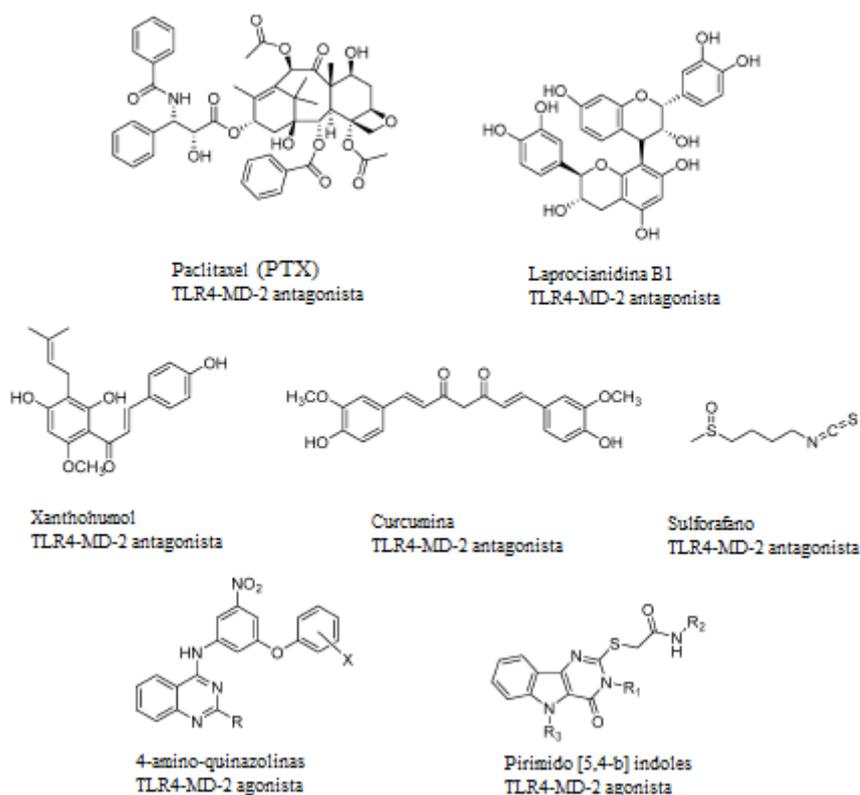


Figura 3.3. Ligandos no lipídicos del complejo TLR4/MD-2. Imagen modificada de la referencia 109.

Es necesario comentar que, una de las técnicas más recientes y poderosas en el descubrimiento de nuevos fármacos es el cribado de alta eficacia (*HTS*, del inglés *High-Throughput Screening*).¹¹⁴ Mediante una combinación de robótica, software de control / procesamiento de datos, dispositivos de manipulación de líquidos y detectores, la HTS permite realizar rápidamente millones de pruebas químicas, genéticas o farmacológicas. A través de este proceso, se pueden identificar rápidamente compuestos activos, anticuerpos o genes que modulan una vía biomolecular particular. Los resultados de estos experimentos proporcionan puntos de partida para el diseño de fármacos y para comprender la falta de interacción o el papel de un sitio de unión en particular. Debido al

¹¹³ Koo, J.E.; Park, Z.Y.; Kim, N.D.; Lee, J.Y.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *434*, 600-605.

¹¹⁴ Macarron, R.; *et al.*; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*,188-195.

elevado grado de automatización de todo el proceso, se pueden analizar hasta 100000 moléculas de una quimioteca al día.¹¹⁵ A pesar de ello, se siguen realizando avances para mejorar más aún este proceso, por ejemplo, desarrollando un HTS que permite un análisis 1.000 veces más rápido (100 millones de reacciones en 10 horas) a una millonésima parte del coste (utilizando 10^{-7} veces el volumen de reactivo) en comparación con las técnicas convencionales que utilizan microfluidos basados en gotas.¹¹⁶ La HTS necesita un laboratorio de detección altamente especializado y costoso para ejecutar una operación, por lo que su uso no está del todo extendido.

El grupo de investigación de Howard B. Cottam (Universidad de California), utilizando HTS, realizó un amplio análisis de una quimioteca de más de 170.000 compuestos, seleccionándose 225 compuestos para pruebas *in vitro* con células del sistema inmune. De estos 225 candidatos, 39 estimularon células humanas y de ratón mediante la expresión de citoquinas IL-6 y IL-8. De este análisis, las 4-aminoquinazolininas sustituidas aparecieron como la clase de compuestos más potentes para la activación de células humanas. Por medio de estudios *in vitro*, se identificó esta familia de compuestos como agonistas del receptor TLR4.¹¹⁷ Es necesario destacar que no hay muchos ejemplos en la literatura que describan moléculas pequeñas sintéticas no lipídicas que sean agonistas de TLR4. Otra familia de compuestos identificados, los pirimido[5,4-b]indoles, surgió del mismo estudio de HTS.¹¹⁸ La quimioteca primaria de HTS contenía una familia de 452 compuestos de la clase pirimido[5,4-b]indol. Por este motivo, se pudo identificar las características importantes de estas estructuras para la activación de NFκB, un complejo proteico que está implicado, entre otras funciones, en la expresión de citoquinas. Por lo tanto, para esta familia se realizó un estudio de relación estructura-actividad (SAR, del inglés *Structure-Activity Relationship*). En estos estudios, se identificaron los fragmentos de estas moléculas que estaban implicados en la interacción con TLR4 mediante el análisis de la inducción de citoquinas implicadas en su activación. (Figura 3.4) TLR4 envía señales a través de dos vías distintas que conducen a las citoquinas dependientes de NFκB y a la producción de IFN tipo I. Los ensayos anteriores se utilizaron para comparar la actividad de los derivados de pirimidoindol para activar TLR4 humano y de ratón. La

¹¹⁵ Caraus, I.; Alsuwailem, A. A.; Nadon, R.; Makarenkov, V.; *Brief. Bioinform.* **2015**, *16*, 974-986.

¹¹⁶ Inglese, J.; *et al.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11473-11478.

¹¹⁷ Nour, A.; *et al.*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4931-4938.

¹¹⁸ Chan, M.; *et al.*; *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4206-4223.

activación de TLR4 de ratón se evaluó por medio de la expresión de IL-6. Se realizaron modificaciones en las regiones de interés del pirimidoindol y se compararon todas estas modificaciones entre sí para observar el grado de interacción con TLR4 humano y de ratón mediante el análisis de las citoquinas liberadas.

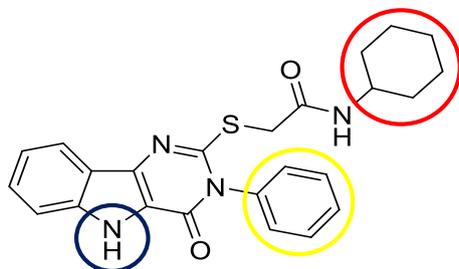


Figura 3.4. Representación de un derivado de pirimido[5,4-b]indol y regiones que influyen en la producción de citoquinas.

A partir de este estudio SAR, se extrajeron las siguientes conclusiones: la posición N-3 (región en amarillo) debe incluir un grupo hidrófobo, preferiblemente un anillo de fenilo no sustituido, para maximizar esa actividad; las sustituciones en la posición N-5 del indol (región en azul) dieron lugar a la pérdida de la actividad y finalmente, la amida terminal (región en rojo) requirió un sustituyente altamente hidrófobo para evitar la disminución de la actividad, siendo un residuo de ciclohexilo el sustituyente óptimo.

Es interesante destacar que, generalmente estas modificaciones estructurales de cada molécula mostraban una mayor actividad en células murinas que en células humanas. Aunque el sistema inmunológico innato está altamente conservado entre las especies, hay algunas pequeñas diferencias entre el TLR4 humano y de ratón, como se comentó previamente, que explica esta variabilidad.

Una vez identificado el ligando más adecuado, aunque ya había sido demostrada su actividad mediante estudios *in vitro*, se procedió a estudiar su interacción con TLR4 por medio de técnicas computacionales. Para ello, se examinaron los modos de unión del ligando al complejo TLR4/MD-2 murino por medio de docking. Se seleccionaron las configuraciones del ligando unidas a este complejo basándose en criterios de complementariedad de la forma de la superficie y la energía intermolecular de interacciones más favorable, generándose el modelo de acoplamiento óptimo. (Figura 3.5) En este modelo se observa que hay un conjunto de interacciones electrostáticas

favorables que dan como resultado enlaces de hidrógeno formados por los residuos Glu439 de TLR4 y Arg90 de MD-2 con el ligando sintético. También, se observó que la mejor posición de acoplamiento para el ligando se encontraba dentro del bolsillo hidrofóbico formado por la proteína, igual que ocurre con los LPS.

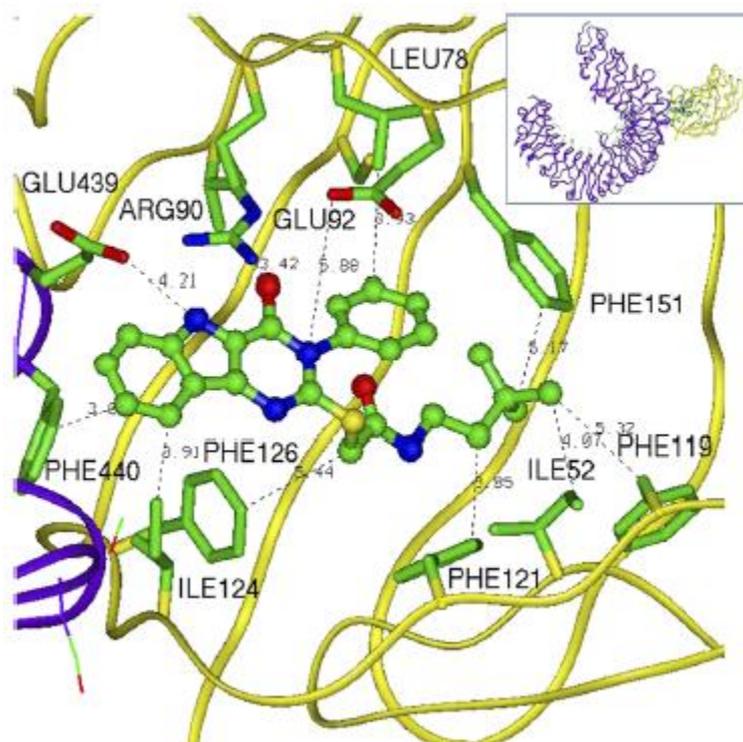


Figura 3.5. Modelización de las interacciones de unión del ligando con el complejo TLR4 / MD-2 de ratón. En el cuadro de arriba se representa el complejo TLR4/MD-2. Figura extraída de la referencia 118.

Por lo tanto, estos estudios indican que este compuesto es un prometedor candidato para su uso como adyuvante en la AIT. De esta forma, resulta de gran interés la síntesis y evaluación biológica de conjugados entre pequeños ligandos sintéticos de TLR4 y péptidos, debido a que este campo de investigación aún no ha sido explorado.¹¹⁹

¹¹⁹ Ignacio, B.J.; Albin, T.J.; Esser-Kahn, A.P.; Verdoes, M.; *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 587-603.

3.3 Objetivos

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se pretende preparar un derivado de pirimido[5,4-b]indol conjugado a diferentes péptidos alérgicos para su uso como vacunas en la AIT. El objetivo es demostrar si estas estructuras son capaces de modular la respuesta inmune desde una respuesta de tipo T_H2 (alérgica) a una de tipo T_H1 (no alérgica).

Para ello, en primer lugar, es necesario la síntesis de una estructura basada en un pirimido[5,4-b]indol convenientemente funcionalizado para permitir su conjugación con diferentes péptidos sintéticos, sin que con ello disminuya su capacidad de unión al receptor TLR4. Posteriormente, estos conjugados adyuvante-alérgeno serán evaluados en ensayos *in vitro* mediante colaboraciones con diferentes grupos de investigación biomédicos.

Para conseguir este objetivo general, se exponen a continuación una serie de objetivos específicos:

- Síntesis de una estructura basada en un pirimido[5,4-b]indol convenientemente funcionalizado para su conjugación.
- Conjugación de esta estructura con diferentes péptidos inmunogénicos sintéticos de forma rápida, sencilla y eficaz.
- Evaluación biológica de estos conjugados péptido-adyuvante.

3.4. Síntesis del ligando de TLR4

A la vista de los precedentes encontrados en la bibliografía de agonistas sintéticos de TLR4, se decidió trabajar con la familia de los pirimido[5,4-b]indoles. Además de su contrastada actividad biológica, el elevado grado de funcionalización de las estructuras identificadas permite múltiples opciones para la derivatización. Para ello, resulta fundamental la introducción de un grupo maleimido en el ligando para la posterior conjugación con los péptidos sintéticos, vía adición tio-Michael. Sin embargo, el lugar donde se va a introducir este grupo maleimido debe seleccionarse con sumo cuidado puesto que, como se ha comentado anteriormente, pequeños cambios estructurales en la

molécula de pirimido[5,4-b]indol pueden provocar una pérdida de la capacidad de unirse al TLR4.

En 2017, el grupo de Howard B. Cottam realizó otro estudio SAR sobre los pirimido[5,4-b]indoles, sintetizando y analizando la actividad de una amplia variedad de estructuras. A partir de estos estudios, concluyeron que era posible la derivatización en la posición C8 del anillo aromático fusionado al indol, sin una pérdida significativa de la actividad.¹²⁰ (Figura 3.6)

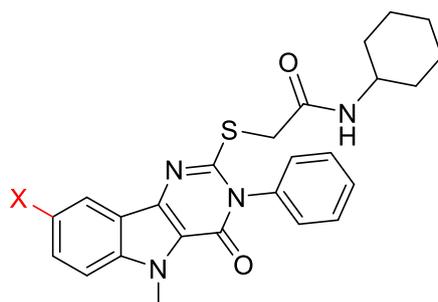
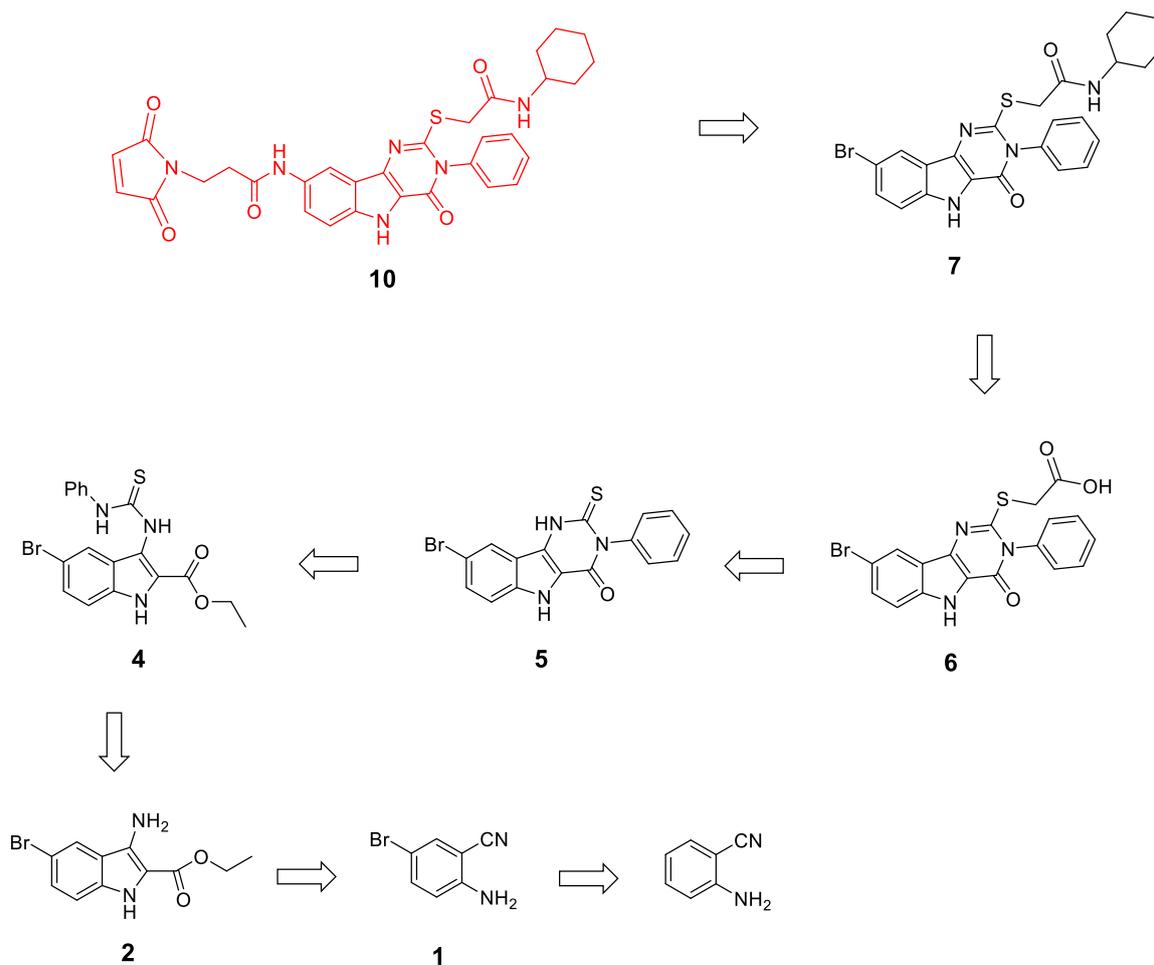


Figura 3.6. Estructura óptima de un pirimido[5,4-b]indol con la posición C8 marcada en rojo, donde es posible la derivatización sin pérdida de su actividad.

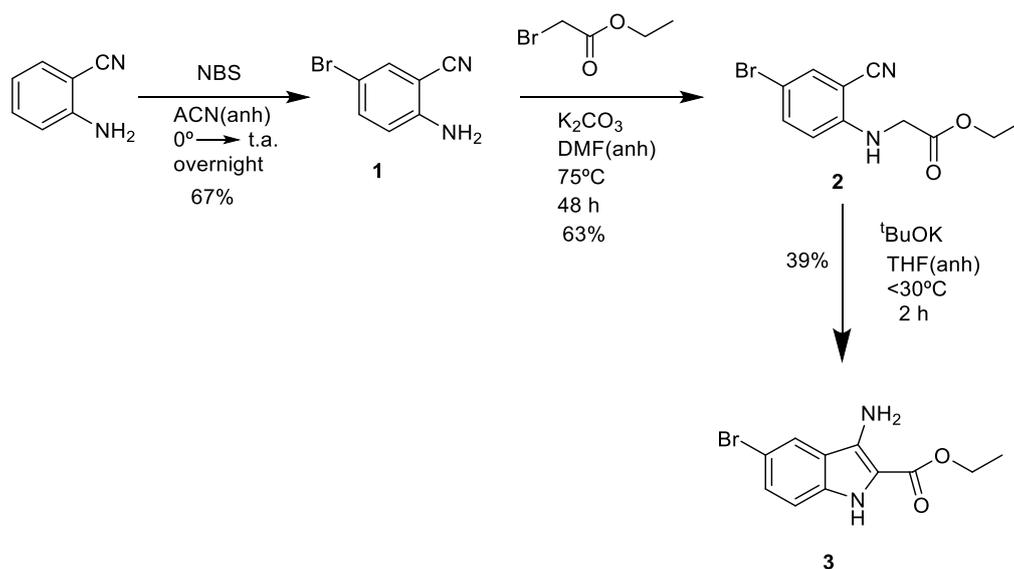
Siguiendo la secuencia sintética propuesta,¹²⁰ en la que se derivatiza esta posición desde el principio por introducción de un átomo de bromo en el anillo aromático, planteamos la introducción del grupo maleimido como último paso, para evitar posibles reacciones no deseadas del mismo. También, se incluyeron otras pequeñas modificaciones con respecto a la estrategia sintética descrita, como evitar la metilación del grupo indol, ya que los estudios anteriores de SAR demostraron que esta posición desprotegida no daba lugar a una variación significativa en la actividad biológica, facilitando la síntesis al evitar etapas de protección y desprotección. A continuación, se presenta el esquema retrosintético propuesto para la síntesis de este nuevo pirimido[5,4-b]indol incorporando un grupo maleimido. (Esquema 3.1)

¹²⁰ Chan, M.; *et al.*; *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 9142-9161.



Esquema 3.1. Ruta retrosintética del ligando objetivo (en rojo) con el grupo maleimido.

La ruta de síntesis se plantea de forma análoga a la descrita en el grupo de Cottam,¹²⁰ pero con optimizaciones en alguna de sus etapas. (Esquema 3.2)



Esquema 3.2. Optimizaciones de las primeras etapas de la ruta de síntesis.

La primera etapa consistió en la bromación del 2-aminobenzonitrilo comercial con un equivalente de *N*-bromosuccinimida (NBS) en acetonitrilo según las condiciones descritas en la bibliografía.¹²¹ De esta forma, se obtuvo el derivado bromado **1** con buen rendimiento de forma completamente regioselectiva en la posición *para*. Este hecho se corroboró por la relación de las tres señales de la región aromática en el espectro de ¹H-RMN, así como por ¹³C-RMN. La siguiente etapa consistió en la *N*-alquilación de la amina. En la bibliografía¹²⁰ está descrita esta reacción con 1.1 equivalentes de bromoacetato de etilo a reflujo en etanol en presencia de K₂CO₃ durante 48 horas, lo que da lugar al compuesto **2** con bajo rendimiento. Por ello, se decidió optimizar esta etapa usando unas condiciones de alquilación más energéticas. Debido a que las anilinas son mucho menos nucleófilas que sus aminas alifáticas homólogas, existe poco riesgo de formación de productos secundarios procedentes de la dialquilación. Las mejores condiciones se obtuvieron aumentando a 6 el número de equivalentes de bromoacetato de etilo y calentando la reacción a 75°C durante 48 horas en DMF anhidra, incrementando notablemente el rendimiento (63%) del compuesto **2**, cuyos datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la literatura para este compuesto. A continuación, se llevó a cabo la ciclación intramolecular para obtener el derivado de indol **3** en presencia de una base fuerte como el *tert*-butóxido de potasio (^tBuOK), siguiendo las condiciones descritas, que consisten en una adición lenta del mismo en THF anhidro, manteniendo la precaución de no superar los 30° C, mediante el uso de un baño de agua. En estas condiciones se obtuvo el indol **3** con un rendimiento bajo (39%), similar al descrito en la bibliografía, probablemente debido a reacciones secundarias de polimerización a través de reacciones intermoleculares, ya que durante el transcurso de la reacción se observa la aparición de un sólido insoluble de color rojo oscuro. Se probaron diversas modificaciones de las condiciones de reacción para mejorar el rendimiento y reducir estas reacciones secundarias, como bajar la temperatura durante la adición del ^tBuOK a 0°C, usar una mayor dilución o un tiempo más prolongado de adición para favorecer las reacciones intramoleculares. Ninguna de estas modificaciones tuvo éxito, siendo esta etapa un verdadero cuello de botella en la ruta sintética. El análisis por ¹H-RMN confirmó la formación del indol **3** debido a la aparición de un singulete ancho a campo bajo (7.99 ppm) y del singulete ancho a 4.70 ppm, correspondiente a la amina. (Figura 3.7)

¹²¹ Zysman-Colman, E.; Arias, K.; Siegel, J. S.; *Can. J. Chem.*, **2009**, *87*, 440-447.

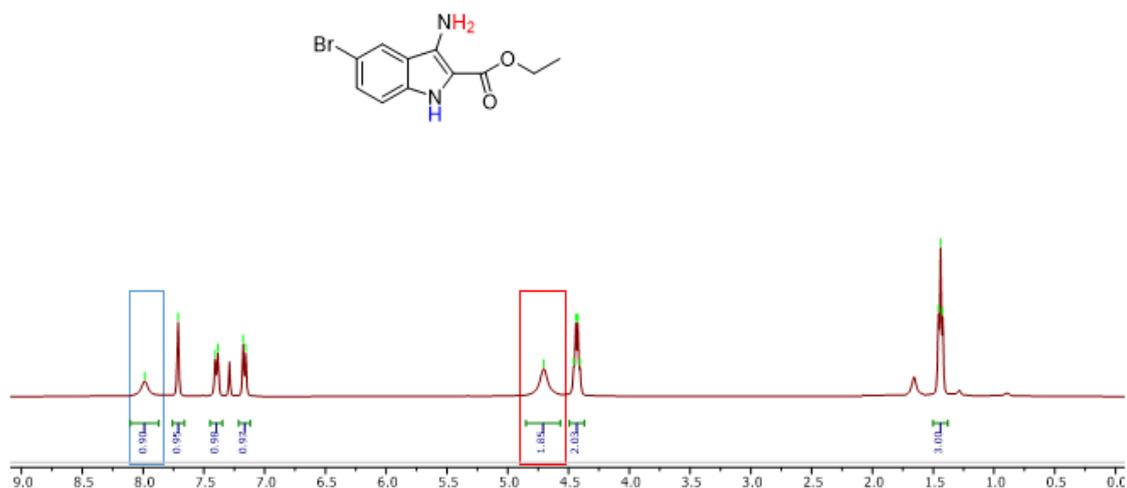
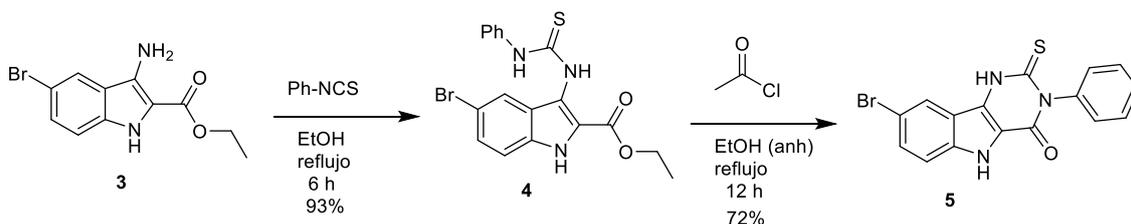


Figura 3.7. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , 298 K) del indol **3**.

Las siguientes etapas de reacción están encaminadas a la formación de una pirimidina fusionada al anillo de indol como se describe en el esquema 3.3.



Esquema 3.3 Formación de la estructura de pirimido[5,4-b]indol.

Siguiendo la metodología descrita, el indol **3** se hizo reaccionar, a través de la amina, con isotiocianato de fenilo a reflujo en etanol durante 6 h, obteniéndose la tiourea **4** con un rendimiento excelente del 93%. La siguiente etapa consistió en la reacción de **4** con cloruro de acetilo en etanol anhidro, formándose *in situ*, ácido clorhídrico que promueve la ciclación intramolecular para formar el derivado **5** con buen rendimiento. El número de equivalentes de cloruro de acetilo en esta síntesis se redujeron a la mitad de los descritos en la bibliografía (de 80 a 40 equivalentes), sin una disminución del rendimiento. El compuesto **5** fue identificado inequívocamente por ^1H -RMN a través de la relación de integrales correspondientes a los protones de la zona aromática y las señales a campo bajo del NH de la tiona y del indol, a 13.70 y 12.44 ppm, respectivamente. (Figura 3.8)

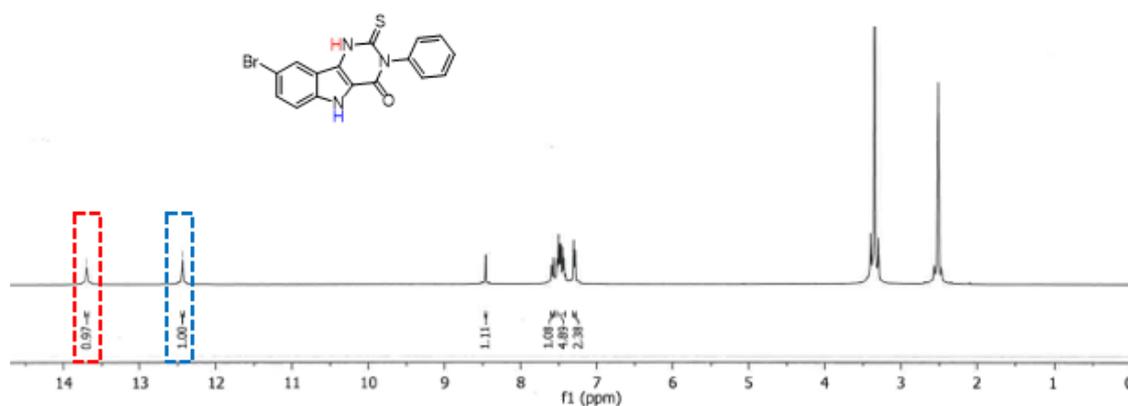
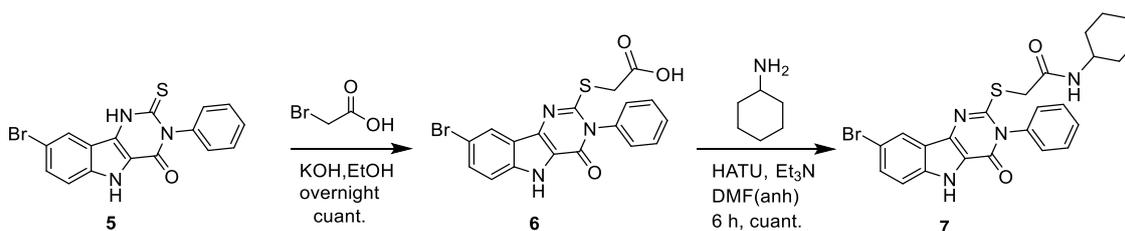


Figura 3.8. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , 298 K) del compuesto **5**.

A partir de este punto, se realiza una variación de la síntesis original planteada por el grupo de Cottam, ya que se continúa sin la metilación del nitrógeno del indol. (Esquema 3.4.) Como se comentó previamente, esta modificación no afecta a la capacidad de unión con TLR4 y de esta forma se evitan etapas de protección y desprotección siendo, por tanto, una ruta sintética más simple y adecuada.



Esquema 3.4. Estrategia para la síntesis del compuesto **7** sin metilación del nitrógeno del indol.

Así, el siguiente paso consistió en el tratamiento del bromo derivado **5** con ácido bromoacético en presencia de KOH a reflujo de etanol toda la noche para obtener el derivado de ácido carboxílico **6** de forma cuantitativa. Este compuesto fue satisfactoriamente caracterizado por espectroscopía de RMN y espectrometría de masas. (Figura 3.9) En el espectro de ^1H -RMN se observa claramente la desaparición del protón del NH de la tiona a campo bajo, así como la aparición de un singlete a 3.96 ppm, que corresponde al metileno del tioéter. Estos datos son consistentes con los datos de espectrometría de masas (ESI), observándose la señal correspondiente al ión molecular protonado ($[\text{M} + \text{H}]^+$: m/z 432.1) con la correspondiente distribución isotópica debido a la presencia del átomo de bromo.

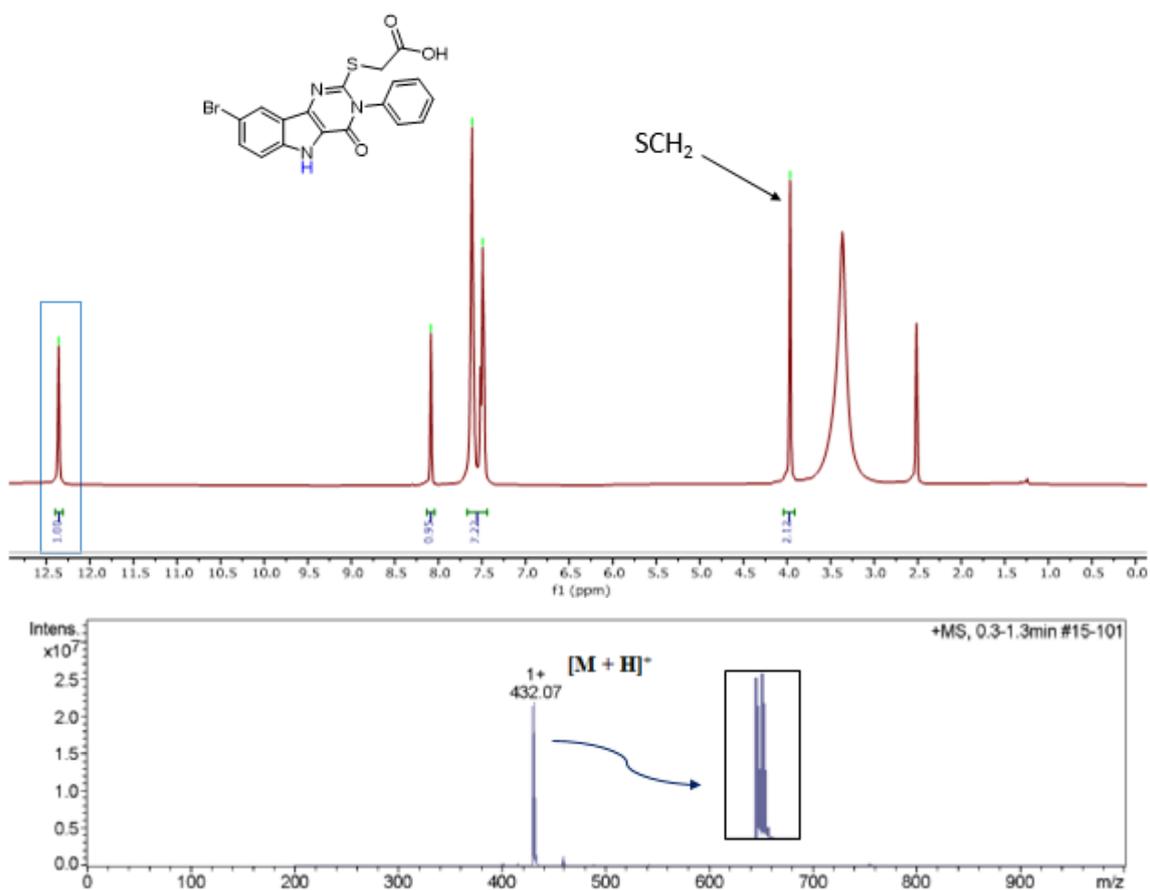


Figura 3.8. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 298 K) (arriba) y de ESI-MS (abajo) del compuesto **6**.

La amidación del ácido carboxílico **6** se llevó a cabo por medio del agente de acoplamiento hexafluorofosfato de 1-óxido-3-(bis(dimetilamino)metilen)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina (HATU) y ciclohexilamina, en condiciones anhidras, formándose el derivado **7** con rendimiento cuantitativo. La estructura del compuesto **7** pudo ser verificada mediante el análisis de su espectro de ¹H-RMN, por medio de las señales de los cinco metilenos de la ciclohexilo a campo alto entre 1.75-1.25 ppm, así como del metino a 3.54 ppm. Todas estas señales guardan la correcta relación de integración con el resto de protones del compuesto **7**. De la misma forma, en el espectro de ¹³C-RMN se corroboró la aparición de la señal del carbono de la amida a 166.3 ppm y las señales a campo alto correspondientes a los carbonos de la ciclohexilo. (Figura 3.10)

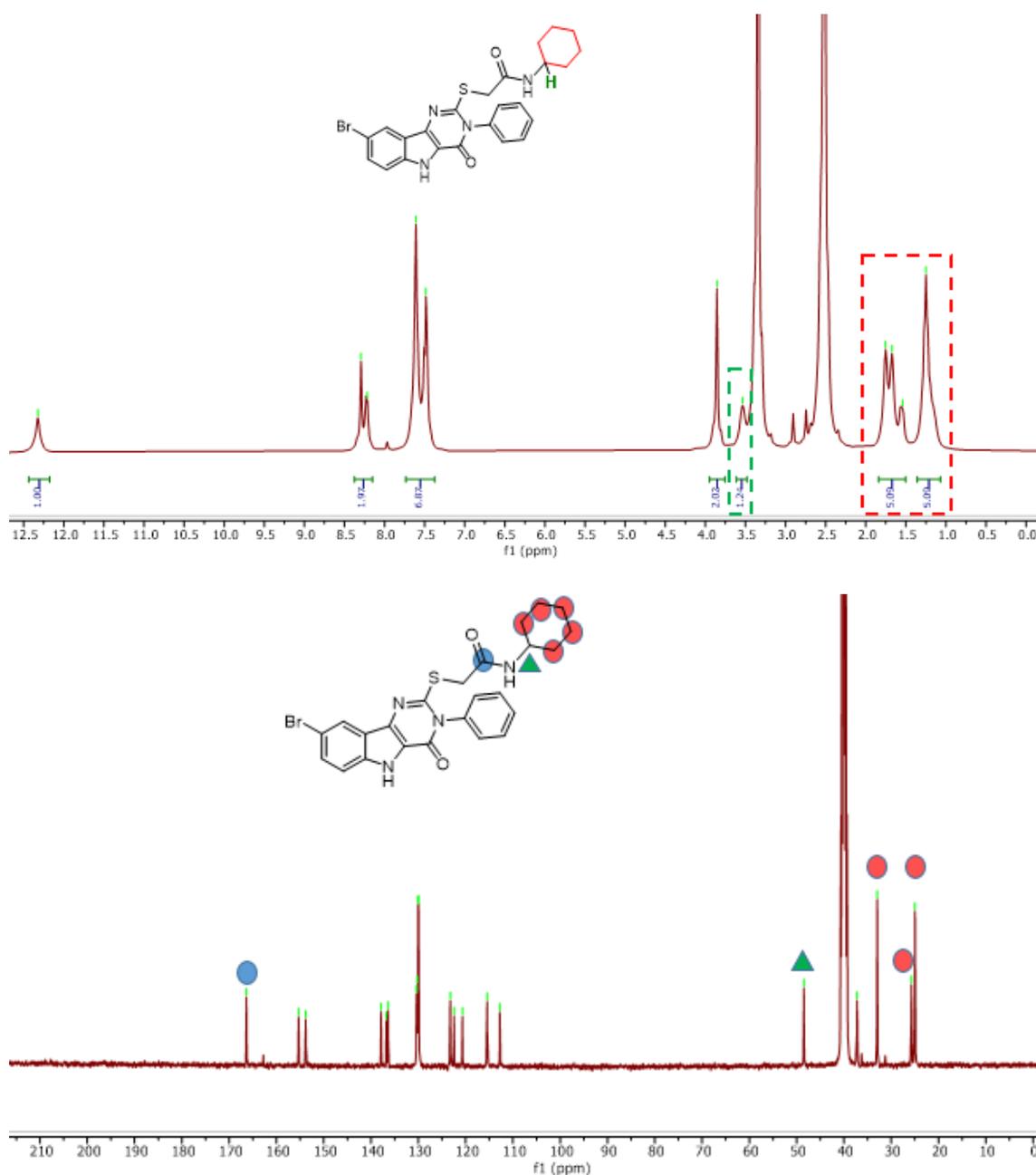


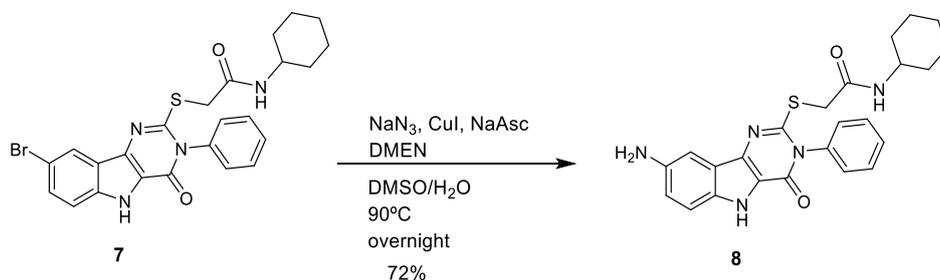
Figura 3.10. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) (arriba) y ^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) (abajo) del compuesto **7**.

En este punto de la síntesis, una vez formada completamente la estructura del pirimido[5,4-b]indol, es necesaria la derivatización a través del bromo de la posición C8. Para ello, la química organometálica exhibe una gran variedad de reacciones para halogenuros de arilo como las típicas reacciones de acoplamiento C-C (reacciones de cross-coupling) catalizadas por paladio, como son las reacciones de Heck,¹²² Suzuki,¹²³

¹²² Heck, R. F.; Nolley, Jr., J. P.; *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2320-2322.

¹²³ Miyaura, N.; Suzuki, A.; *Chem. Commun.* **1979**, 866-867.

Negishi,¹²⁴ y Sonogashira,¹²⁵ entre muchas otras. Una de las estrategias planteadas fue la transformación en un derivado de anilina, es decir, la conversión de Br-Ar a NH₂-Ar, a través de una variante de la reacción de tipo Ullmann catalizada por Cu(I). (Esquema 3.5)



Esquema 3.5. Síntesis del derivado de anilina **8**.

Por lo tanto, se hizo reaccionar el compuesto bromado **7** en presencia de CuI, azida sódica y ascorbato sódico como agente reductor, añadiendo también una diamina, la *N,N*-dimetiletilendiamina (DMEN), en una mezcla DMSO/H₂O y calentando a 90°C durante toda la noche. En estas condiciones, se obtuvo el derivado de anilina **8** con un rendimiento del 72%. Aunque aparentemente parezca un cambio pequeño de la estructura química del compuesto **8** con respecto al **7**, debido a este cambio, las señales aromáticas del anillo aparecen más separadas. Además, aparece un singulete ancho a 4.90 ppm correspondiente a los protones del nuevo grupo amino, que no presenta correlación con ninguna señal del espectro de carbono, como se puede observar en el espectro HSQC. (Figura 3.11)

¹²⁴ King, A.O.; Okukado, N.; Negishi, E.; *Chem. Commun.* **1977**, 683-684.

¹²⁵ Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N.; *Tetrahedron Lett.* **1975**, 50, 4467-4470.

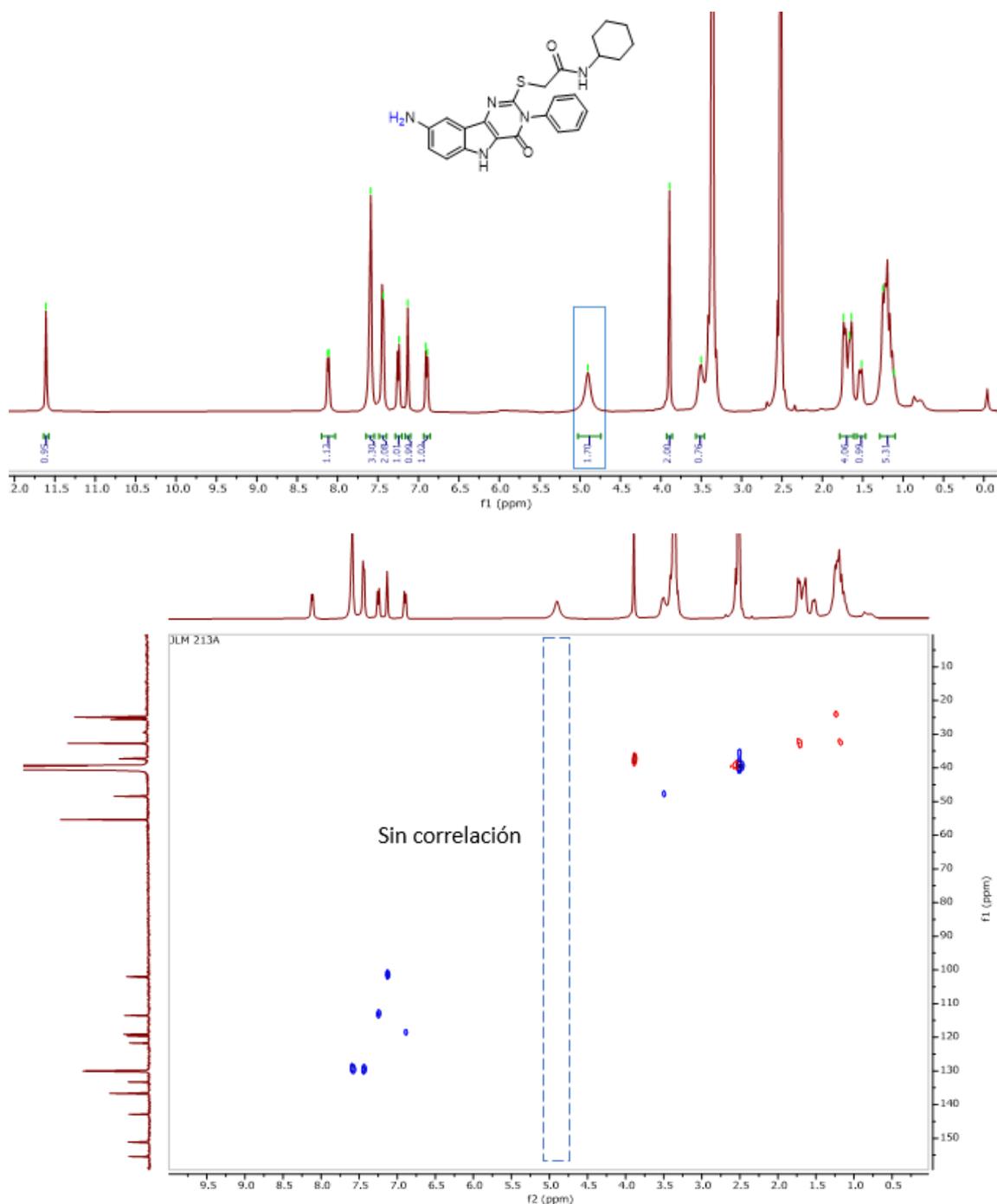


Figura 3.10. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) (arriba) y de HSQC (400 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) (abajo) del compuesto **8**.

Por espectrometría de masas ESI se observan las señales m/z correspondientes a la masa del compuesto **8**, así como la pérdida del perfil isotópico característico del átomo de bromo. (Figura 3.12)

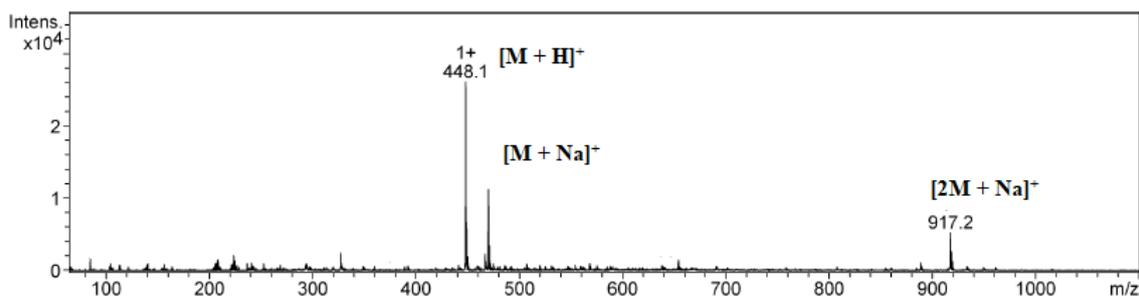
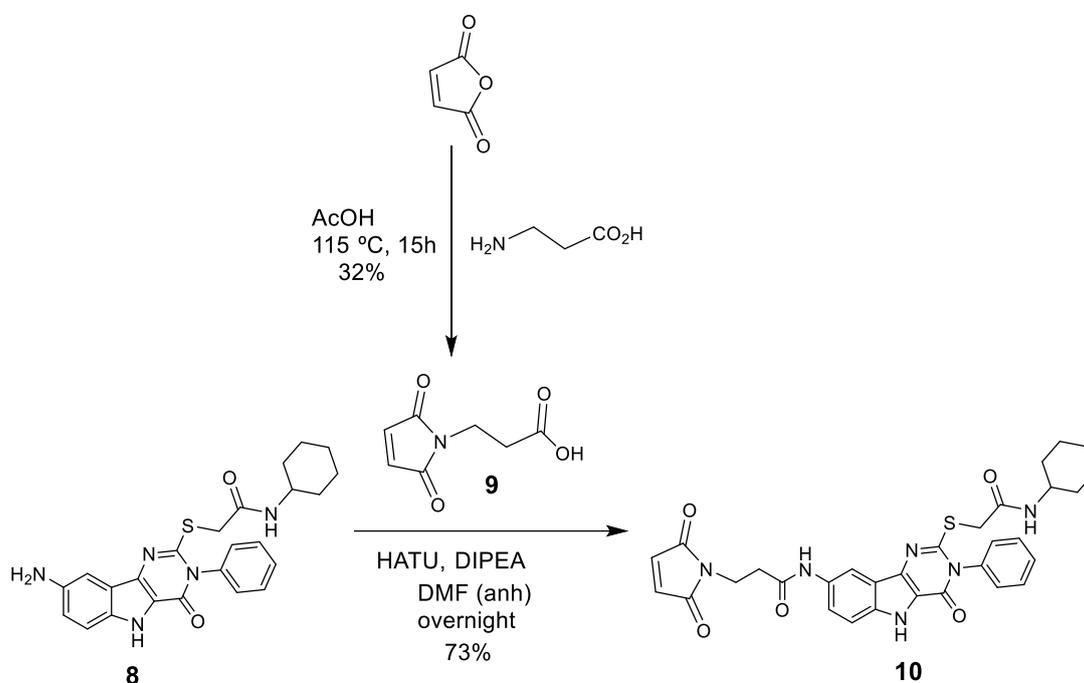


Figura 3.12. Espectro de ESI-MS del derivado **8**.

Una vez sintetizada la amina **8**, fue necesario la introducción del grupo maleimido para la conjugación de los péptidos. Para ello, se llevó a cabo la amidación con el ácido 3-maleimidopropiónico (**9**), sintetizado a partir de anhídrido maleico y β -alanina, siguiendo las condiciones descritas en la bibliografía.¹²⁶ (Esquema 3.6)



Esquema 3.6 Síntesis del derivado de maleimida **10**.

Para este acoplamiento, se usaron las condiciones ya establecidas para la reacción de amidación, como es el empleo de HATU como agente de acoplamiento, DIPEA (*N,N'*-diisopropiletilamina) como base y DMF en condiciones anhidras. De esta forma, se obtuvo el derivado de maleimida **10** con un buen rendimiento (73%). Para confirmar la completa amidación del compuesto **8**, dicho compuesto fue caracterizado por RMN y espectrometría de masas. En el espectro de ^1H -RMN, se observa la aparición de un

¹²⁶ Mantovani, G.; *et al.*; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2966-2973.

singlete a campo bajo a 10.06 ppm que corresponde al protón de la amida generada, así como un singlete a 7.05 ppm característico de los protones olefínicos de la maleimida. En el espectro de ESI-MS se detecta la señal correspondiente al ión molecular más sodio ($[M + Na]^+$: m/z 621.2). (Figura 3.12)

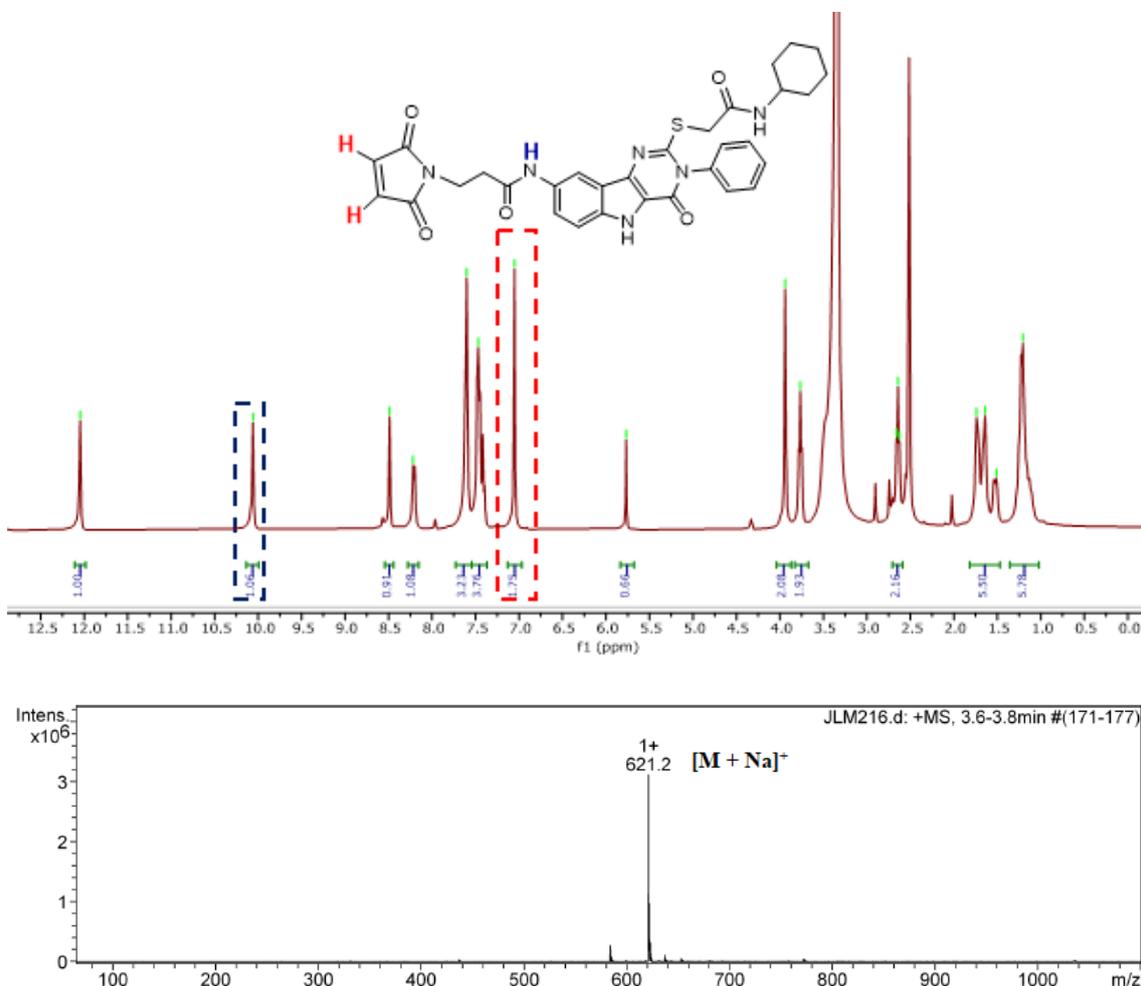


Figura 3.12. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) (arriba) y de ESI-MS (abajo) del compuesto **10**.

Una vez sintetizado el pirimido[5,4-b]indol **10**, funcionalizado con el grupo maleimido, se puede llevar a cabo la conjugación con diferentes péptidos alergénicos. Estas estructuras son muy interesantes dado que, a partir de un mismo intermedio sintético común, pueden conjugarse diferentes péptidos con aplicaciones como vacunas frente a diferentes alergias.

3.5. Conjugación del ligando de TLR4 a distintos péptidos alérgicos

Como se comentó en la Introducción de la presente tesis doctoral, el melocotón es la fruta que más alergia produce en España,²⁷ con una gran predominancia también en el resto del área mediterránea. Su alérgeno principal es una proteína LTP (del inglés *Lipid Transfer Protein*) llamada Pru p 3. Se ha demostrado que estas LTPs están ampliamente conservadas y presentan una gran similitud con otras LTPs del reino vegetal como las encontradas en otras frutas y en pólenes como la artemisa (*Artemisa vulgaris*, alérgeno *Pla a 3*)¹²⁷ y el plátano de sombra (*Platanus acerifolia*, alérgeno *Art v 3*),¹²⁸ ocasionando reacciones alérgicas cruzadas entre diferentes vegetales.

El único tratamiento actual para la alergia al melocotón consiste en una vacuna de AIT basada en el extracto de esta proteína (SLIT Melocotón Alk-Abelló Labs) con todos los problemas de reproducibilidad asociados al uso de estos extractos que se comentaron previamente.

En base a los estudios sobre alérgenos vegetales de la Prof. Díaz Perales (Universidad Politécnica de Madrid), se identificaron las regiones alérgicas de la proteína Pru p 3.^{129,130} De esta forma pudo desarrollarse un péptido sintético basado en uno de los epítomos seleccionados, concretamente la región que comprende desde el aminoácido 26 al 46. Se realizaron algunas modificaciones de esta estructura original como fue la sustitución de los aminoácidos cisteína (C) por serina (S) para evitar reacciones de *cross-linking*, teniendo como secuencia final ASSNGIRNVNNLARTPDRQA. Por último, se añadió a esta secuencia una cisteína terminal, para utilizar el grupo tiol de la cadena lateral en la conjugación a un grupo maleimido, a través de la reacción tiol-eno (un tipo de adición de Michael). En la bibliografía se pueden encontrar numerosos ejemplos de este tipo de conjugaciones de péptidos debido a sus múltiples ventajas como son: su gran selectividad, la ortogonalidad de los grupos implicados, la ausencia de formación de productos secundarios, la compatibilidad con medios acuosos, la ausencia de otros reactivos o catalizadores metálicos. Todas estas ventajas hacen que este tipo de

¹²⁷ Lombardero, M.; *et al.*; *Clin. Exp. Allergy* **2004**, *34*, 1415-1421.

¹²⁸ Lauer, I.; *et al.*; *Clin. Exp. Allergy* **2007**, *37*, 261-269.

¹²⁹ Tordesillas, L.; *et al.*; *Mol. Immunol.* **2009**, *46*, 722-728.

¹³⁰ Tordesillas, L.; *et al.*; *Mol. Immunol.* **2009**, *47*, 534-540.

conjugaciones estén consideradas como reacciones de tipo click.¹³¹ En primer lugar, se abordó la conjugación de la maleimida **10** con este péptido sintético (Pru p 3-SH) a través de la adición tiol-eno. Debido a la insolubilidad del ligando **10** y para evitar la precipitación de los reactivos durante la reacción, se realizó una cuidadosa optimización de los disolventes y las concentraciones que se debían utilizar, siendo una mezcla de DMSO y tampón fosfato (50 mM, pH= 7.4) como la más adecuada. (Esquema 3.7).



Esquema 3.7. Síntesis del conjugado **11** con el péptido Pru p 3-SH.

Siguiendo la metodología establecida para la conjugación de péptidos, la maleimida y el péptido Pru p 3-SH fueron disueltos en DMSO y tampón fosfato (50 mM, pH 7.4), respectivamente, en proporciones equimoleculares. Seguidamente, se mezclaron por medio de agitación orbital durante 25 min a temperatura ambiente. El avance de la reacción fue monitorizado por RP-HPLC, confirmando la desaparición de los productos de partida y formándose exclusivamente el conjugado **11**. Por lo tanto, solamente fue necesario una ultrafiltración a través de una membrana de corte molecular de 3 KDa para eliminar las sales presentes en la reacción, obteniéndose el conjugado **11** con un rendimiento excelente (85%). Este conjugado fue caracterizado satisfactoriamente por medio de RP-HPLC mostrando una única señal y por espectrometría de masas (ESI), donde se observó la presencia de dos señales correspondientes a la del conjugado con dos y tres cargas, demostrando su pureza y monodispersidad. (Figura 3.13)

¹³¹ Nolan, M.D.; Scanlan, E.M.; *Front. Chem.* **2020**, *8*, 583272.

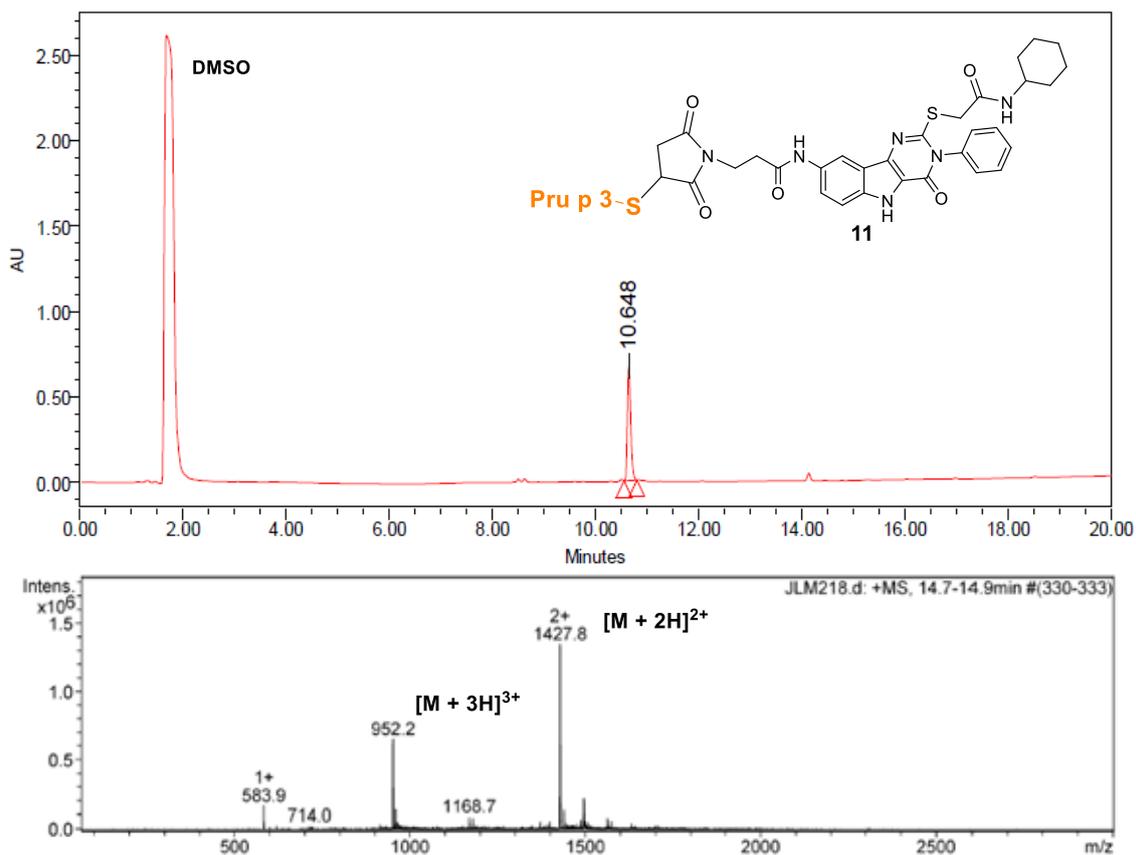


Figura 3.13. Caracterización del conjugado **11** por medio de su cromatograma de RP-HPLC (arriba) y su espectro de ESI-MS (abajo).

Una vez caracterizado este conjugado, se consideraron otros péptidos alérgicos con el objetivo de desarrollar vacunas frente a diferentes alergias a partir de un intermedio común. Como se comentó en la Introducción de la presente Tesis Doctoral, el pescado se corresponde con uno de los ocho alérgenos principales. Los alérgenos del pescado principalmente se relacionan con unas proteínas llamadas parvalbúminas, que se localizan en los músculos de dichos pescados. Dentro de esta familia existen dos tipos: α -parvalbúmina, encontrada en peces cartilagosos (cazón, raya, etc.) y β -parvalbúmina, asociada a peces óseos (bacalao, sardina, salmón, etc.). Sin embargo, los principales alérgenos alimentarios se corresponden con la β -parvalbúmina, cuya ingestión por parte de pacientes alérgicos provoca síntomas como dolor abdominal, rinitis, angioedema, asma y en algunos casos puede provocar síntomas mortales como anafilaxia.¹³² En un estudio publicado en 2019 por el grupo de la Dra. Carrera (Instituto de Investigaciones Marinas-CSIC), analizando quince especies de pescados y usando técnicas de proteómica,

¹³² Kuehn, A.; Swoboda, I.; Arumugam, K.; Hilger, C.; François, H.; *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 179.

identificaron diferentes péptidos antigénicos derivados de la β -parvalbúmina. Uno de los epítomos más relevantes identificado se encuentra en la región de la β -parvalbúmina entre los aminoácidos 65-71 de secuencia LKLFLQV.¹³³ (Figura 3.14)

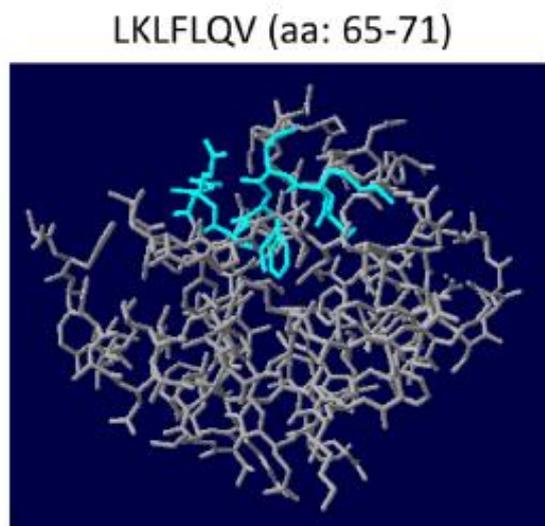
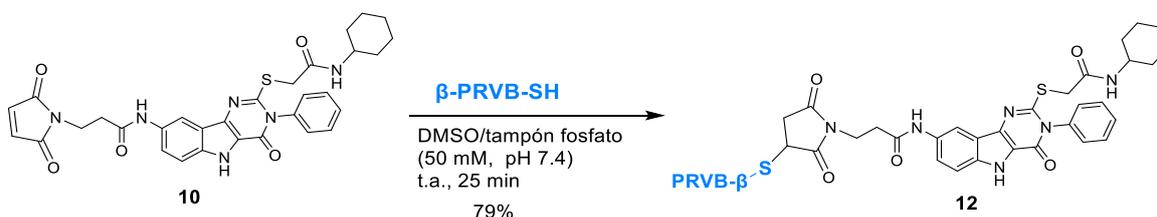


Figura 3.14. Representación 3D de la estructura de la β -parvalbúmina con el epítomo identificado (color azul). Figura extraída de la referencia 133.

En base a este estudio previo, se sintetizó un péptido con esta secuencia al que se le añadió una cisteína terminal para poder ser conjugado a través de la adición tiol-eno usando la misma estrategia que con el péptido anterior. Una vez sintetizado este péptido (β -PRVB-SH), fue conjugado a la maleimida **10** usando las mismas condiciones que en la conjugación anterior. (Esquema 3.8)



Esquema 3.8. Síntesis del conjugado **12** con el péptido β -PRVB-SH.

El avance de la reacción fue monitorizado por RP-HPLC, confirmando la total desaparición de los productos de partida; sin embargo, el análisis reveló la presencia de algunas pequeñas impurezas junto a la señal del conjugado **12**. Por ello, se realizó una

¹³³ Carrera, M.; *et al.*; *J. Proteom.* **2019**, *200*, 123-133.

rápida y sencilla purificación por RP-HPLC. Se recogieron las fracciones adecuadas y se liofilizaron, proporcionando el conjugado **12** como un sólido blanco con buen rendimiento (79%). Como en todas las síntesis de conjugados, el producto final fue caracterizado por RP-HPLC y espectrometría de masas para confirmar su pureza y monodispersidad. (Figura 3.15)

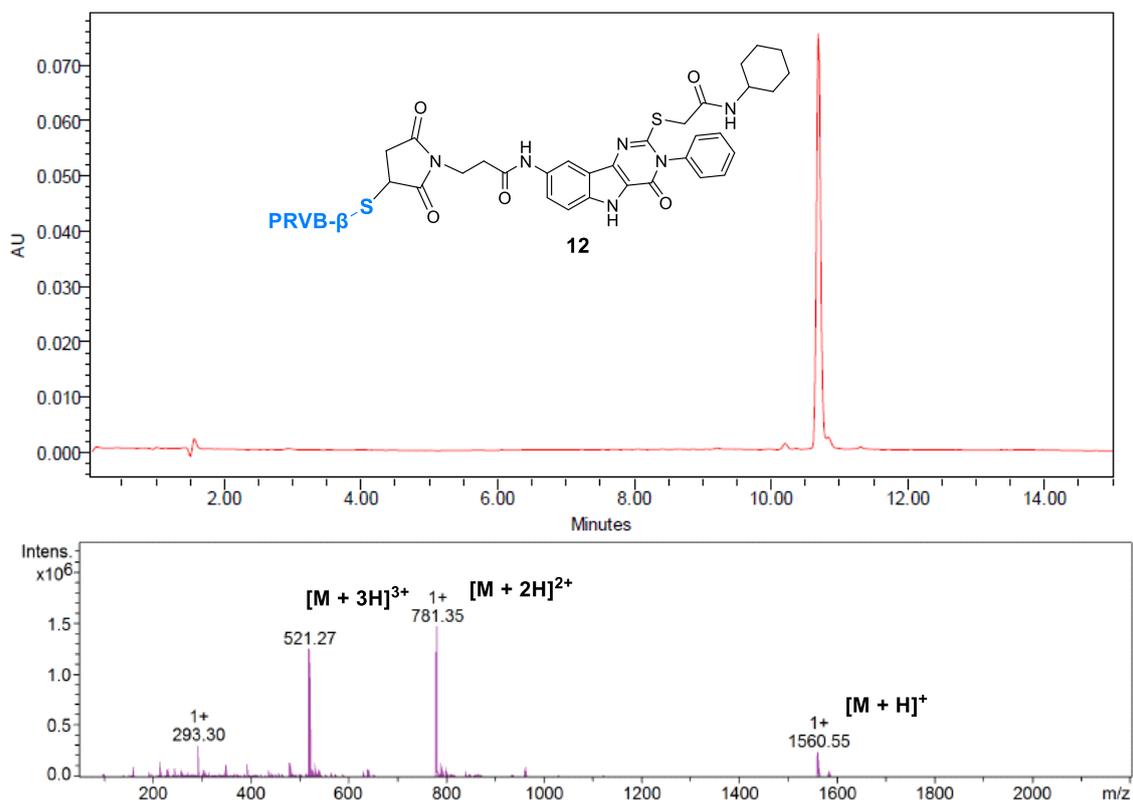


Figura 3.15. Cromatograma de RP-HPLC (arriba) y espectro de ESI-MS (abajo) del conjugado **12**.

Para demostrar la versatilidad de este derivado de maleimida **10**, se abordó la conjugación de esta estructura a un tercer péptido, un derivado del epítipo del Ole e 1. Este es el alérgeno mayoritario del polen del olivo (*olea europea*), que presenta hasta un 75% de prevalencia en pacientes alérgicos.¹³⁴ Este péptido se corresponde a la región comprendida entre los aminoácidos 109 y 130 de la proteína Ole e 1, de secuencia TVNGTTRTVNPLGFFKKEALPK. Al igual que con el resto de péptidos utilizados, se añadió una cisteína terminal para permitir la conjugación (Ole₁₀₉₋₁₃₀-SH). La conjugación de este péptido al derivado de maleimida **10** se realizó en las condiciones análogas descritas anteriormente usando una mezcla de DMSO/ tampón fosfato. (Esquema 3.9)

¹³⁴ Barber, D.; *et al.*; *Allergy* **2008**, *63*, 1550-558.



Esquema 3.9. Síntesis del conjugado **13** con el péptido Ole₁₀₉₋₁₃₀-SH.

Sorprendentemente, la monitorización por RP-HPLC reveló que la adición tiol-eno con este péptido no era tan eficiente como las anteriores. Se observó la presencia de varios productos secundarios no identificados y un menor avance de la reacción. Por ello, se llevaron a cabo algunas modificaciones en las condiciones de reacción como la proporción de los disolventes y una mayor cantidad de péptido añadido; sin embargo, ninguna de estos cambios contribuyó a una mejora significativa de la evolución de la reacción. Esto hizo que fuera necesaria una purificación por RP-HPLC del crudo de reacción. Se recogieron las fracciones correspondientes y se liofilizaron, obteniéndose un sólido blanco. El posterior análisis por RP-HPLC y espectrometría de masas confirmó la obtención del conjugado **13** (Figura 3.16); sin embargo, el rendimiento fue bastante más bajo que en los casos anteriores (34%).

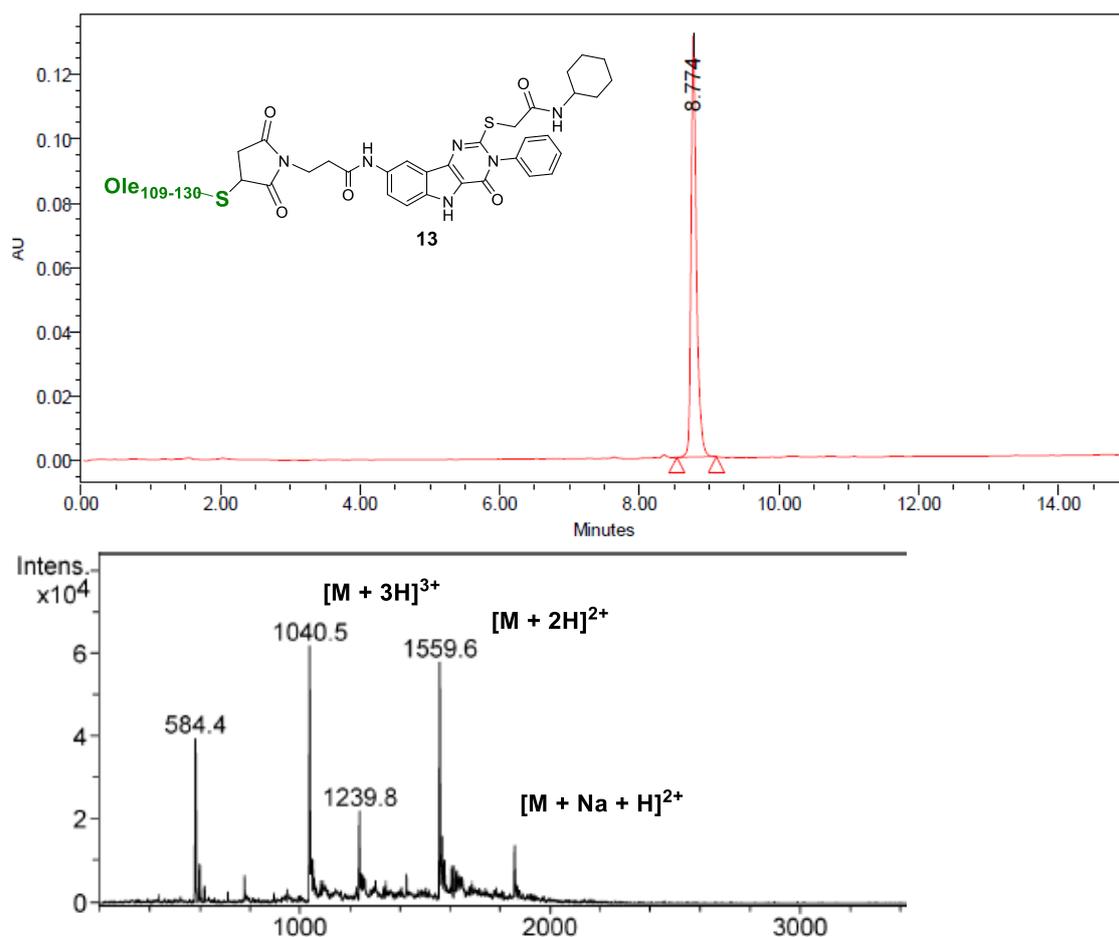


Figura 3.16. Caracterización del conjugado **13** por medio de su cromatograma de RP-HPLC (arriba) y su espectro de ESI-MS (abajo).

Con estas conjugaciones, se ha demostrado que este ligando sintético **10** es capaz de funcionalizarse con alérgenos diferentes, lo que abre un interesante camino en el diseño racional de vacunas que puedan aprovechar esta aproximación. Este hecho permitiría reducir sensiblemente los costes de producción al tener un intermedio común de síntesis, solamente diferenciándose para el tratamiento de una alergia u otra en el último paso sintético en el que se conjugaría el péptido correspondiente.

3.6 Evaluación biológica de los conjugados péptido-pirimido[5,4-b]indol

Una vez sintetizados y caracterizados los conjugados de los diferentes péptidos alérgicos, se procedió a su evaluación biológica para determinar su capacidad de mediar en el trastorno de enfermedades alérgicas a través de la modulación del sistema inmune.

Estas evaluaciones biológicas se realizaron mediante colaboraciones con distintos grupos de investigación.

La evaluación biológica de los conjugados del alérgeno del pescado (**12**) y del olivo (**13**), se está llevando a cabo actualmente. Los estudios más avanzados corresponden al conjugado del péptido del alérgeno de melocotón (Pru p 3), llevados a cabo en el grupo de alergología de la Dra. Cristobalina Mayorga del Hospital Regional Universitario de Málaga.

Con el fin de evaluar si la estructura era reconocida e internalizada por las DCs derivadas de monocitos (*moDC*, del inglés *Monocyte-Derived Dendritic Cells*), el conjugado **11** se marcó fluorescentemente en la región del péptido por medio del reactivo comercial Alexa fluor 647 y su interacción e internalización se analizó por medio de técnicas de citometría de flujo y microscopía confocal. Las mediciones de citometría de flujo indicaron que el conjugado **11** fue captado por las moDC de una manera dependiente del tiempo, teniendo ya un alto grado de internalización desde la primera hora de incubación. (Figura 3.17)

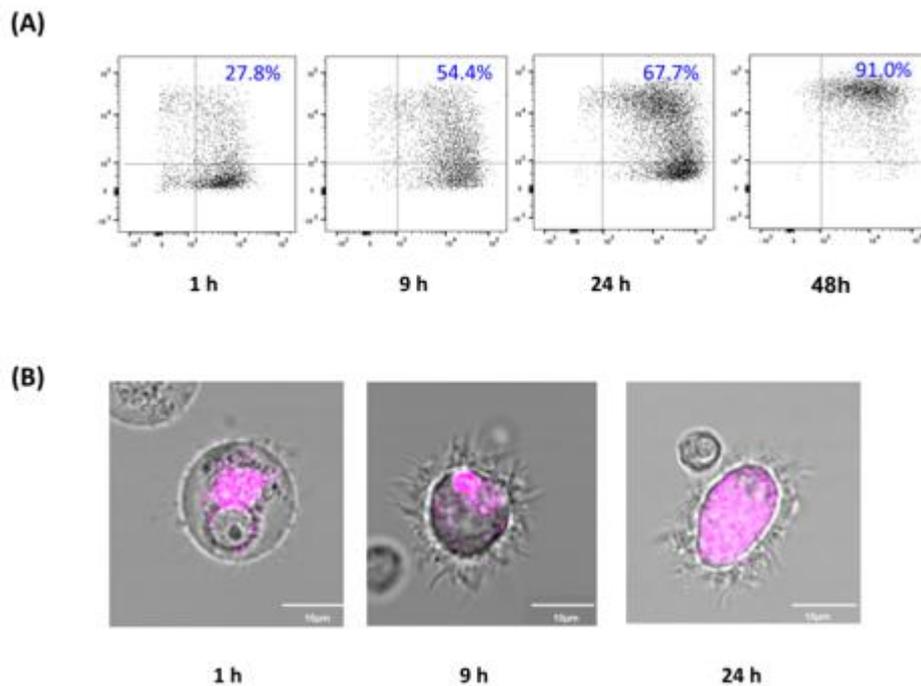


Figura 3.17. A) Gráficos de citometría de flujo a diferentes tiempos que muestran los porcentajes del conjugado **11** captado por las moDC CD86+. B) Imágenes confocales de moDC incubadas con el conjugado **11** (rosa) en diferentes tiempos (de 1h a 24h).

La captación continuó aumentando hasta las 48 horas, mediante microscopía confocal y la tinción de diferentes estructuras intracelulares se pudo visualizar el proceso de

internalización del compuesto **11** y su co-localización con dichas estructuras. (Figura 3.18)

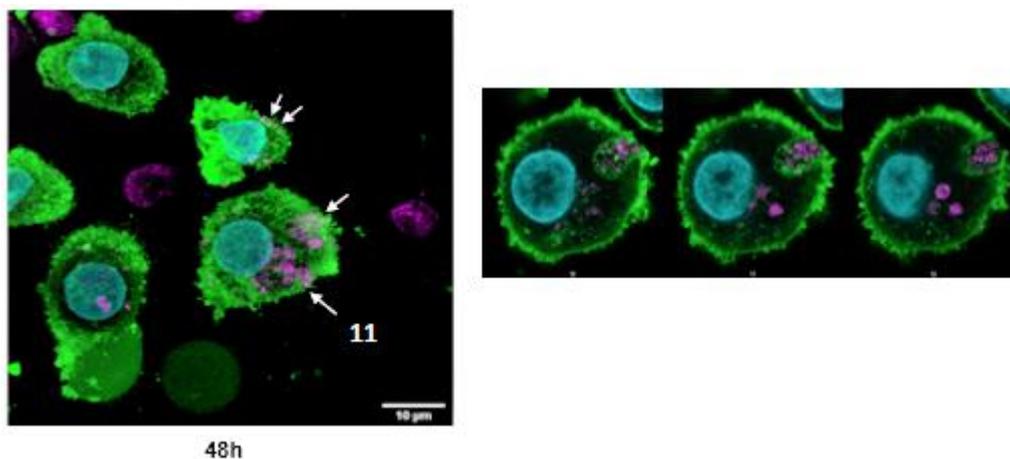


Figura 3.18. Diferentes imágenes confocales a las 48 h que muestran diversas regiones celulares y el conjugado **11** internalizado (rosa). La actina de la submembrana se tiñó con Atto 488-faloidina (verde) y los núcleos con Hoechst (azul).

Estos experimentos *in vitro* demuestran que se produce una internalización del conjugado **11** y que se localiza próximo a la membrana plasmática. Este hecho sugiere que la internalización ha estado mediada por el receptor TLR4, que se expresa en la membrana externa celular, como se comentó previamente.

A continuación, se analizó el efecto de este conjugado en el proceso de maduración de las DCs, a través de marcadores como son moléculas co-estimuladoras y citoquinas. Todos los ensayos se realizaron a partir de DCs provenientes de pacientes alérgicos al melocotón y de controles sanos no alérgicos, de acuerdo con la Declaración de Helsinki.¹³⁵

En estos ensayos se evaluaron el péptido alérgico (**Pp3**); la estructura del pirimido[5,4-b]indol sin péptido **8** (**TLR4_{lig}**); el conjugado **11** (**TLR4_{lig}-Pp3**); y la combinación del ligando **8** y el péptido **Pp3** sin estar unidos covalentemente (**TLR4_{lig}+Pp3**). Se utilizará esta nomenclatura de ahora en adelante ya que resulta más intuitiva y simple para referenciar. (Figura 3.19)

¹³⁵ Bošnjak, S.; *Arch. Oncology* **2011**, *9*, 179-84.

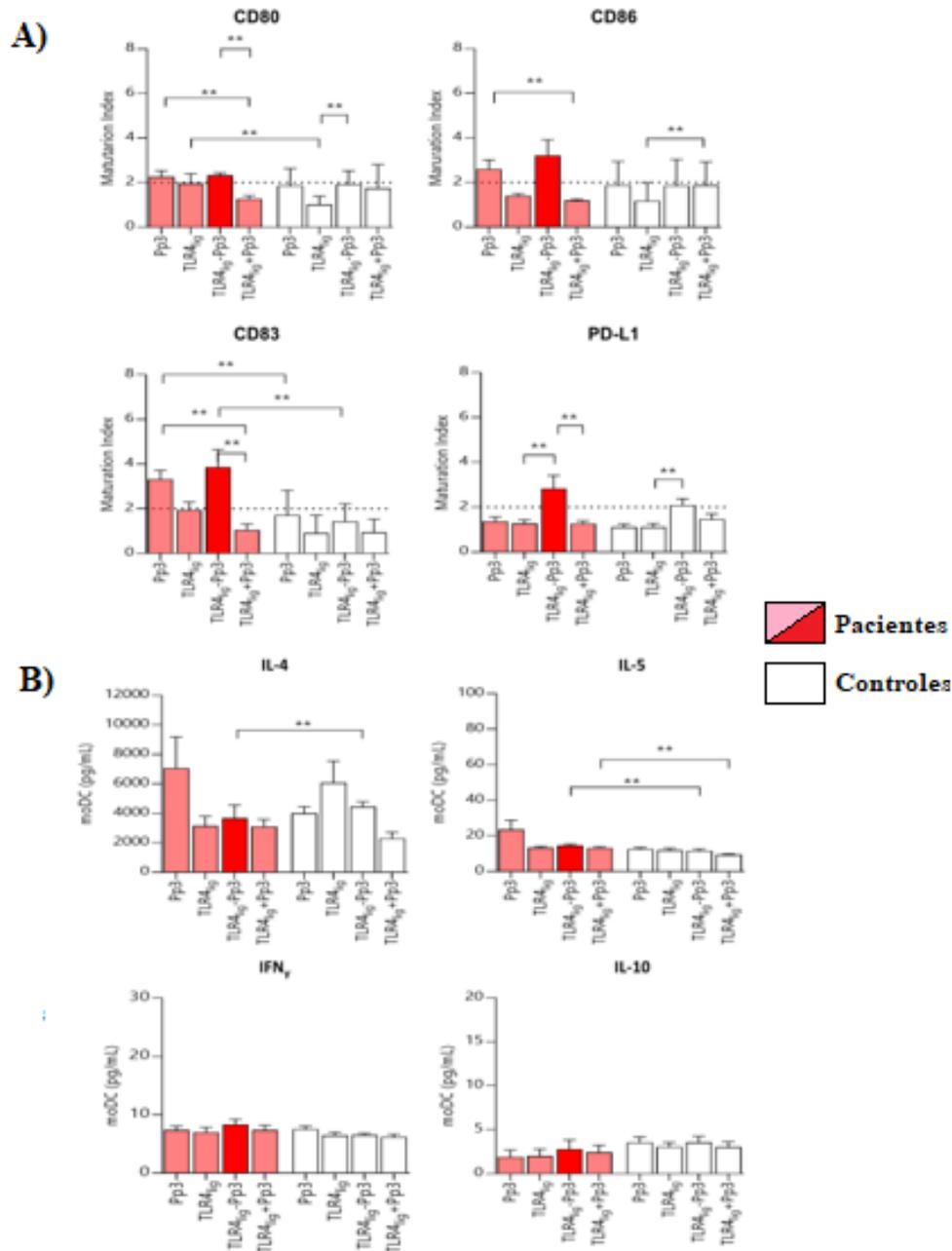


Figura 3.19. Las barras representan la mediana y el error estándar de la media del índice de maduración (A) para los diferentes marcadores de superficie en moDC (CD80, CD83, CD86 y PD-L1) (B) y de la producción de citoquinas (IL-4, IL-5, IL-10 and IFN γ) en los sobrenadantes de los ensayos de moDC para **Pp3**, **TLR4_{lig}**, **TLR4_{lig}-Pp3** y **TLR4_{lig}+Pp3** de pacientes alérgicos (n=9) y controles (n=9) a 10 nM. La prueba U de Mann-Whitney se usó para comparaciones por pares entre grupos no relacionados y la prueba de rango con signo de Wilcoxon se usó para comparaciones por pares en muestras relacionadas, mostrando diferencias significativas como **, (p < 0.0125, corrección de Bonferroni. La línea de puntos representa el índice de maduración > 2.

La evaluación de los cambios fenotípicos de maduración inducidos por **TLR4_{lig}-Pp3** en la expresión de marcadores de activación/regulación (CD83 y PD-L1) y marcadores de la superficie celular de maduración (CD80 y CD86) puso de manifiesto que, en comparación con los controles, tuvo lugar un aumento significativo de CD83 en pacientes alérgicos. (Figura 3.19A) El análisis del efecto provocado únicamente por el compuesto **TLR4_{lig}** (**8**) indicó que también era capaz de estimular CD80 en pacientes alérgicos en comparación con los controles. Este efecto ya ha sido reportado en estudios previos en los que se demostró que diferentes adyuvantes de TLR (sin alérgenos) eran capaces de modular la actividad y/o maduración de las moDC.¹³⁶

De este estudio, también se desprende el hecho de que los cambios en la expresión del marcador CD83 discriminan mejor la respuesta específica inducida por **TLR4_{lig}-Pp3**, hecho que no ocurre con el ligando TLR sin péptido. Además, esto se confirmó por el hecho de que el péptido **Pp3** incluido como control también indujo un aumento significativo de la expresión de CD83 en pacientes alérgicos en comparación con los controles.

Por otro lado, se estudió el efecto de la inserción del péptido **Pp3** conjugado covalentemente al ligando (**TLR4_{lig}-Pp3**) comparado con el efecto de usar estos elementos de forma conjunta pero no unidos covalentemente (**TLR4_{lig}+Pp3**). Los datos mostraron que **TLR4_{lig}-Pp3** condujo a un aumento significativo de los marcadores CD80, CD83 y PD-L1 en comparación con la estimulación provocada con **TLR4_{lig}+Pp3** (Figura 3.19A). Estos resultados demostraron que se produce una respuesta inmunológica más eficiente cuando tanto el alérgeno como el adyuvante interactúan conjuntamente con las DCs. La captación de **TLR4_{lig}-Pp3** se correlaciona con cambios funcionales en las moDC, por tanto, una presentación eficaz del antígeno requiere la activación de moléculas co-estimuladoras.¹³⁷ En este estudio, **TLR4_{lig}-Pp3** activa, regula y madura la expresión del marcador de superficie de las moDC, lo que demuestra que la activación de TLR4 es importante para iniciar la respuesta inmunitaria.

Para estudiar el patrón de respuesta durante la maduración de las moDCs después de la incubación con **TLR4_{lig}-Pp3**, se analizó la liberación de citoquinas en el sobrenadante del cultivo. (Figura 3.19B) El análisis en pacientes alérgicos, en comparación con los

¹³⁶ Kaisho, T. & Akira, S.; *Curr. Mol. Med.* **2003**, *3*, 373-385.

¹³⁷ Guermonprez, P.; Valladeau, J.; Zitvogel, L.; Thery, C; Amigorena, S.; *Ann. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 621-667.

controles, demostró aumentos significativos de IL-5 en los primeros, al estimular tanto con **TLR4_{lig}-Pp3** como con **TLR4_{lig}+Pp3**. Además, no se observaron diferencias en la inducción de la producción de IL-10 en pacientes alérgicos en comparación con los controles para cualquiera de las estructuras probadas. Tampoco se observaron diferencias en la producción de citoquinas después de la estimulación con **TLR4_{lig}-Pp3** y **TLR4_{lig}+Pp3**, mientras que los niveles de IFN γ fueron similares.

En resumen, **TLR4_{lig}-Pp3** (11) produjo una maduración diferencial de las moDCs (CD83) en pacientes alérgicos con una reducción de la expresión de citoquinas de tipo T_H2 en comparación con el péptido, aunque sin cambios en los niveles de IFN γ e IL-10. Esta leve respuesta en la producción de citoquinas (IFN γ e IL-10) podría estar asociada con la etapa de maduración de las moDCs, ya que los ligandos TLR pueden influir de diferente manera en la activación de las moDCs, en la presentación de antígenos, en la co-estimulación y también en la producción de citoquinas.¹³⁸

El conjugado **TLR4_{lig}-Pp3** fue captado por las moDCs, afectando a su activación y maduración, influyendo en los siguientes pasos de la respuesta inmunológica, donde las moDCs maduras presentan el alérgeno a los linfocitos T_H. Para evaluar este proceso, se determinó la proliferación de linfocitos utilizando moDCs homólogas pre-estimuladas con los ligandos y se analizó el perfil de la respuesta en términos de producción de citoquinas. Para ello, se analizaron diferentes subpoblaciones de linfocitos T (CD3+, CD4+ y CD8+), linfocitos B (CD19+) y linfocitos NK (CD56+) que dan forma a las respuestas inmunológicas de diferente manera. Estos resultados y su análisis se detallan a continuación. (Figura 3.20)

¹³⁸ Re, F.; Strominger, J. L.; *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 37692-37699.

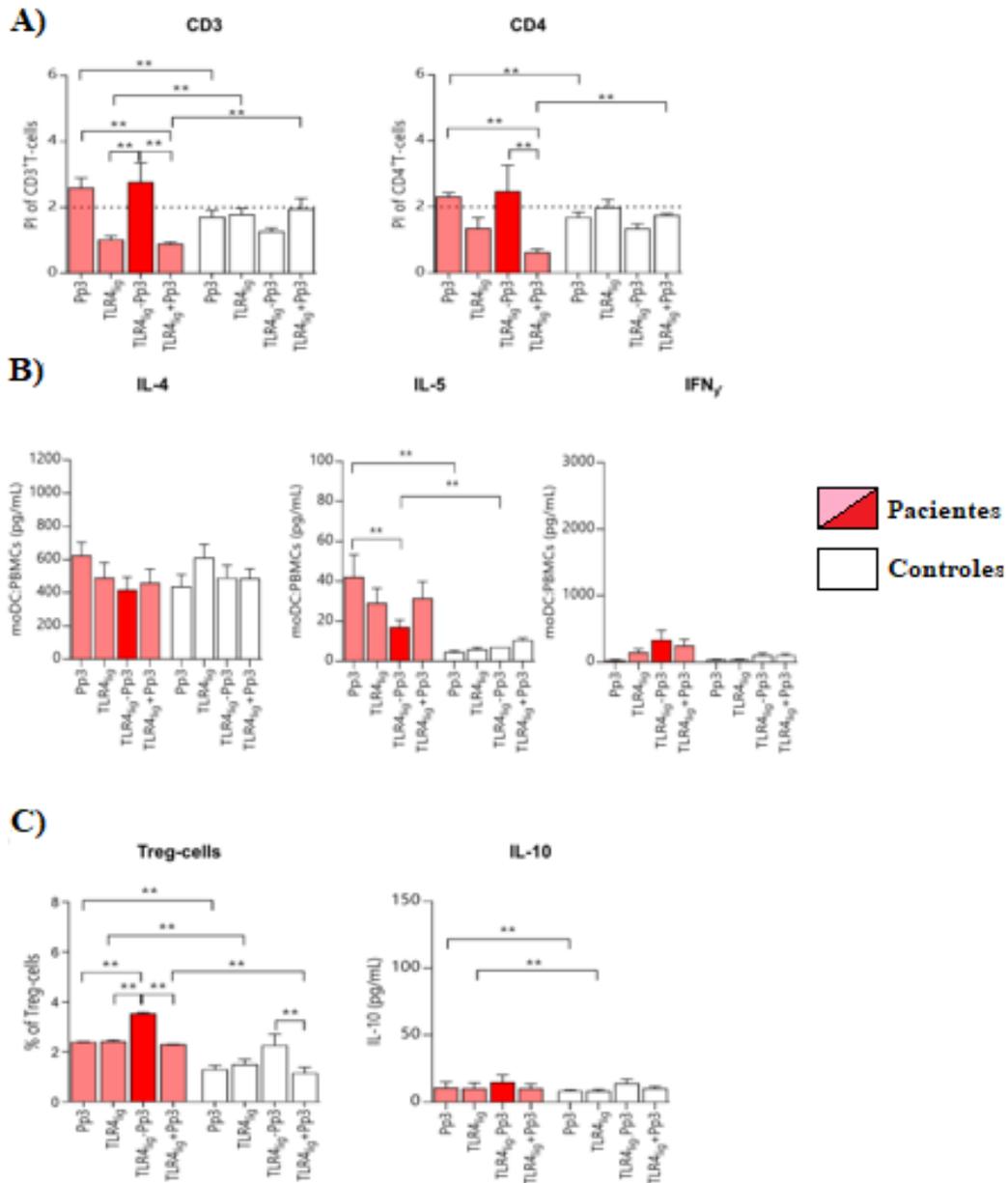


Figura 3.20. Las barras representan la mediana y el error estándar de la media de (A) índice de proliferación (PI) de las células T (CD3+ y CD4+), (B) de la producción de citoquinas en los sobrenadantes del ensayo de proliferación de linfocitos (IL-4, IL-5 e IFN_γ) y (C) de los porcentajes de células Treg y la producción de IL-10; para **Pp3**, **TLR4_{lig}**, **TLR4_{lig}-Pp3** y **TLR4_{lig}+Pp3** de pacientes alérgicos (n= 9) y controles (n= 9) a 10 nM. La prueba U de Mann-Whitney se usó para comparaciones por pares entre grupos no relacionados y la prueba de rango con signo de Wilcoxon se usó para comparaciones por pares en muestras relacionadas, mostrando diferencias significativas como **, (p <0.0125, corrección de Bonferroni). La línea de puntos representa el PI > 2.

Los resultados encontrados en estos estudios indicaron que **TLR4_{lig}-Pp3** parecía estimular la proliferación de células T sin inducir una diferencia significativa entre los distintos grupos de células. (Figura 3.20A) Es destacable que en pacientes alérgicos hubo un aumento significativo en la proliferación de células T CD3⁺ y CD4⁺ después de la estimulación con **TLR4_{lig}-Pp3** frente a **TLR4_{lig}** y frente a **TLR4_{lig}+ Pp3**. (Figura 3.20A) Estos resultados sugieren que **TLR4_{lig}-Pp3** (11) induce una respuesta proliferativa específica para Pru p 3 en los linfocitos T. No se encontró diferencia en la respuesta proliferativa para otras subpoblaciones como células B y células NK con **TLR4_{lig}-Pp3** entre pacientes alérgicos y controles, ya que la proliferación de esa subpoblación celular fue negativa (índice de proliferación <2).

En cuanto al perfil de citoquinas durante la respuesta proliferativa, los resultados señalaban que **TLR4_{lig}-Pp3** (11) producía una disminución del nivel de IL-5, en comparación con el péptido **Pp3** únicamente (Figura 3.20B). Estos cambios, que se observan solo en pacientes alérgicos, indicaron que este compuesto, que combina el péptido alérgico y el adyuvante, tenía la capacidad de modular la respuesta T_H2 de manera específica, siendo un resultado muy prometedor para el desarrollo de vacunas en alergia.

Por último, se estudió la capacidad de las moDCs tratadas con **TLR4_{lig}-Pp3** a la hora de inducir células Treg. Se realizaron experimentos de co-cultivo y se analizaron los porcentajes de células Treg producidas. Los resultados indicaron porcentajes significativamente más altos de células Treg; sin embargo, la producción de IL-10 no fue significativa en ningún caso (Figura 3.20C). Estos bajos niveles de IL-10 no deben ser considerados como una baja activación, ya que cada TLR produce señalizaciones diferentes.¹³⁹

Estos datos sugieren que las moDCs activadas por **TLR4_{lig}-Pp3** (11) promovieron la presentación del alérgeno y generaron una respuesta inmunológica específica con un patrón inmunológico de tipo T_H1 / Treg y la supresión de las células efectoras T_H2. Por lo tanto, es un resultado muy prometedor para el desarrollo y posteriores estudios *in vivo* usando este conjugado como vacuna frente a enfermedades alérgicas en el marco de la AIT.

¹³⁹ Deifl, S.; *et al.*; *Allergy* **2014**, *69*, 1602-1609.

Capítulo 4
Síntesis de conjugados alérgeno-8-oxoadenina para el receptor TLR7

4. Síntesis de conjugados alérgeno-8-oxoadenina para el receptor TLR7

4.1 Introducción

Dentro de la familia de los TLRs, TLR7 se clasifica como un receptor intracelular (junto a los TLR3, 8 y 9), ya que se expresa en la superficie de compartimentos celulares como los endosomas. TLR7 es uno de los receptores mejor estudiados, poniéndose de manifiesto su papel esencial en la activación del sistema inmune innato. Los principales esfuerzos por parte un gran número de grupos de investigación se han centrado fundamentalmente en el estudio de su papel en los procesos de infección viral, como los causados por el VIH o el virus influenza.¹⁴⁰

Desde el 2002, se han ido realizando de forma continuada numerosos avances para establecer los mecanismos moleculares de los procesos biológicos en los que está involucrado TLR7. En el año 2002, se demostró que algunas pequeñas moléculas antivirales eran capaces de activar TLR7;¹⁴¹ sin embargo, no fue hasta 2004 cuando se identificó el PAMP natural para TLR7, ARN monocatenario (una sola cadena de nucleótidos) rico en guanina y uridina.¹⁴² Sin embargo, el reconocimiento de ácidos nucleicos no es exclusivo de este receptor, TLR8 también reconoce ARN monocatenario y TLR9 reconoce ADN con motivos CpG no metilados.¹⁴³ Además, todos ellos son receptores intracelulares y se encuentran estrechamente relacionados, formando una subfamilia (TLR7-8-9). Para entender la estructura y actividad de TLR7 es necesario, por tanto, un conocimiento de TLR8 y 9 ya que, gracias a los estudios previos de esta subfamilia, se realizaron los descubrimientos de los mecanismos que involucran a TLR7.

¹⁴⁰ Barchet, W.; *et al.*; *Eur. J. Immunol.* **2005**, *35*, 236-242.

¹⁴¹ Hoshino, K.; Horiuchi, T.; Tomizawa, H.; Takeda, K.; Akira, S.; *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 196-200.

¹⁴² Diebold, S.S.; Kaisho, T.; Hemmi, H.; Akira, S.; Reis e Sousa, C.; *Science* **2004**, *303*, 1529-31.

¹⁴³ Martínez-Campos, C.; Burguete-García, A.I.; Madrid-Marina, V.; *Viral Immunol.* **2017**, *30*, 98-105.

La primera estructura cristalina del dominio extracelular de TLR8 fue obtenida en 2013 utilizando un sistema de expresión de *Drosophila*.¹⁴⁴ Posteriormente en 2015, se determinó la estructura cristalina de TLR9.¹⁴⁵

TLR7 está especialmente relacionado con TLR8, ya que ambos receptores reconocen ARN monocatenario. TLR8 reconoce productos degradados, tanto uridina como oligonucleótidos cortos derivados de ARN, a través de dos sitios de reconocimiento diferentes. Este hecho proporciona un contexto importante para comprender la estructura de TLR7.¹⁴⁶ Estudios preliminares demostraron que TLR7 es capaz de reconocer al nucleósido guanósina y sus derivados.¹⁴⁷ Por lo tanto, resulta muy interesante destacar que, aunque TLR7 y TLR8 poseen una estructura similar, pueden reconocer diferentes ligandos.

Una característica clave de TLR7 es el llamado bucle Z (o *Z-loop* en inglés), que se localiza en la región entre LRR14 y LRR15 de su estructura proteica. Esta porción se conserva dentro de la subfamilia TLR7-8-9 y se escinde proteolíticamente, provocando su activación. A través de un estudio del grupo de Shimizu en 2016,¹⁴⁸ se puso de manifiesto que TLR7 presentaba una conformación de monómero en ausencia de ligandos; sin embargo, la unión por medio de guanósina y motivos de uridina producía la dimerización. Así, TLR7 formaba un dímero activado de forma similar a los observados para TLR8 y TLR9. De manera análoga a la estructura de TLR8 que reconoce uridina y ARN monocatenario en distintos lugares, se encontró que TLR7 interactúa con guanósina y repeticiones de uridina en dos regiones diferentes siendo, por tanto, un receptor dual. (Figura 4.1)

¹⁴⁴ Tanji, H.; Ohto, U.; Shibata, T.; Miyake, K.; Shimizu, T.; *Science* **2013**, 339, 1426-1429.

¹⁴⁵ Ohto, U.; *et al.*; *Nature* **2015**, 520, 702-705.

¹⁴⁶ Kazuhiko, M.; Shizuo, A.; *Immunity* **2016**, 45, 705-707.

¹⁴⁷ Shibata, T.; *et al.*; *Int. Immunol.* **2016**, 28, 211-222.

¹⁴⁸ Zhang, Z.; *et al.*; *Immunity* **2016**, 45, 737-748.

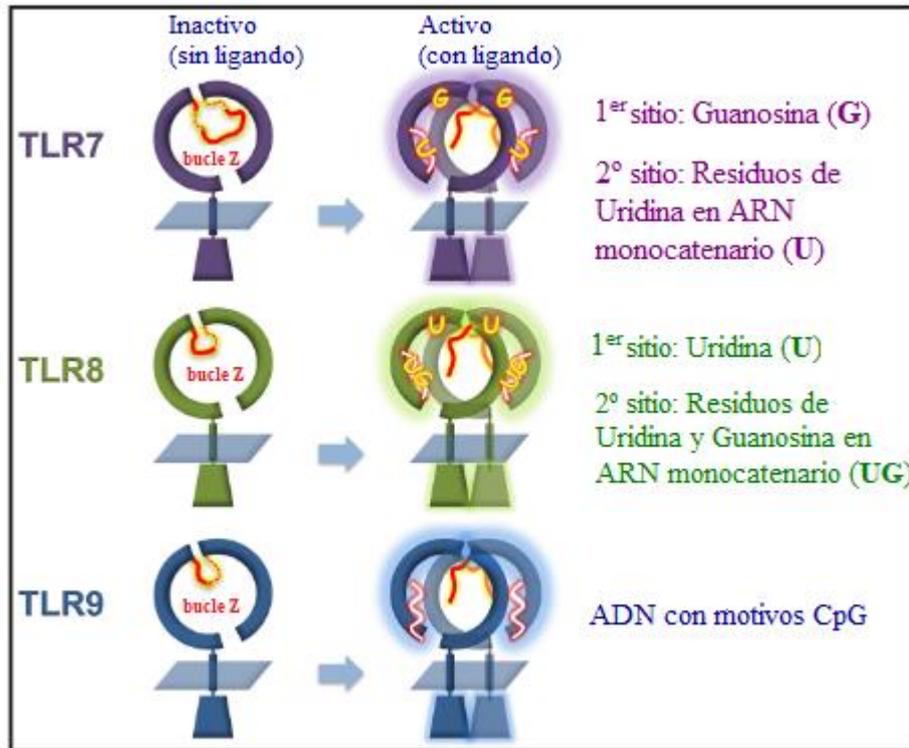


Figura 4.1. Representación esquemática de la subfamilia TLR7-8-9 que muestra la escisión de su región de bucle Z (en rojo), necesaria para la dimerización en su forma activa. Además, se representan sus correspondientes PAMPS y sus diferentes sitios de unión. Figura modificada de la referencia 146.

A través de este estudio del grupo de Shimizu, llegaron a la conclusión de que el segundo sitio de TLR7 se une a residuos de uridina truncados, con al menos tres bases. Estos resultados mostraban que TLR7 contiene dos sitios distintos de unión a ligandos, uno para ligandos pequeños y otro para ARN monocatenario. De estos dos sitios, el primero es fundamental para reconocer ligandos pequeños. Este hecho, fue confirmado a través de un estudio en el que se demostró que un pequeño ligando derivado de guanosina se unía al primer sitio de TLR7 y que esta unión era suficiente para inducir la formación de un dímero activo. Por tanto, la unión de ligandos al primer sitio de reconocimiento podría inducir la dimerización de TLR7 en ausencia de un ligando para el segundo sitio. Curiosamente, la estructura de bucle Z en el TLR7 es diferente a la presente en los otros dos miembros de la subfamilia. De hecho, los bucles Z de TLR7 y TLR8 están involucrados en el reconocimiento de ARN monocatenario, pero sus orientaciones son muy diferentes.¹⁴⁹

¹⁴⁹ Tanji, H.; *et al.*; *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, 22, 109-115.

La activación de TLR7 por parte de ligandos desemboca en cascadas de señalización a través de la proteína accesoria MyD88 (del inglés, *Myeloid Differentiation primary-response protein 88*), conocida como vía dependiente de MyD88, que también es una de las dos posibles vías de señalización de TLR4, como se comentó previamente en el capítulo 3. Se ha documentado que esta vía desencadena la producción de citoquinas proinflamatorias entre las que se incluyen TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 e IFN- α . Aunque las vías de señalización específicas desencadenadas por la activación de TLR7 se han descrito,^{150,151} los mecanismos subyacentes que controlan el tráfico de TLR7 en el endosoma continúan investigándose.¹⁵²

4.2 TLR7 como diana terapéutica en alergia

TLR7 desempeña un papel fundamental en la lucha contra infecciones víricas; sin embargo, cada vez existen más estudios que muestran su papel en las enfermedades alérgicas.

Una de las claves se encuentra en la activación de TLR7 y la subsecuente producción de interferones de tipo 1 como el IFN- α , una citoquina implicada en la inmunidad antiviral y en la prevención del desarrollo de respuestas de tipo T_H2 (respuesta alérgica).¹⁵³ Muchos estudios ya han demostrado la relación del receptor TLR7 con desórdenes alérgicos como la atopía y el asma.^{154,155} De hecho, se ha demostrado experimentalmente que la activación de TLR7 aumenta los niveles de IFN- γ e IL-12 y la inhibición de la respuesta tipo T_H2 en ratones sensibilizados con ovoalbúmina (OVA), la proteína alérgica del huevo.¹⁵⁶ Adicionalmente, esta activación promovió la secreción de IL-10, TGF- β y Treg, que como se ha comentado previamente, son fundamentales en la generación de tolerancia. Finalmente, también se han realizado estudios que demuestran que la activación de TLR7 puede modular la inmunidad humoral a través de la inhibición

¹⁵⁰ Honda, K.; *et al.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15416-15421.

¹⁵¹ Kawai, T.; *et al.*; *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 1061-1068.

¹⁵² Petes, C.; Odoardi, N.; Katrina, G.; *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 256.

¹⁵³ Huber, J.P.; Ramos, H.J.; Gill, M.A.; Farrar, J.D.; *J. Immunol.* **2010**, *185*, 813-817.

¹⁵⁴ Moller-Larsen, S.; Nyegaard, M.; Haagerup, A.; Vestbo, J.; Kruse, T.A.; Borglum, A.D.; *Thorax* **2008**, *63*, 1064-1069.

¹⁵⁵ Roponen, M.; Yerkovich, S.T.; Hollams, E.; Sly, P.D.; Holt, P.G.; Upham, J.W.; *Eur. Respir. J.* **2010**, *35*, 64-71.

¹⁵⁶ Quarcoo, D.; *et al.*; *Clin. Exp. Allergy* **2004**, *34*, 1314-1320.

de la síntesis de IgE de las células B,¹⁵⁷ siendo esta inmunoglobulina la principal que está relacionada con los procesos alérgicos.

Si bien la mayoría de los agonistas de TLR7 se utilizan en entornos clínicos fuera de la alergia, como se detallará más adelante, existe una amplia variedad de estudios que destacan sus efectos en las respuestas alérgicas humanas. Por ejemplo, estudios *in vitro* con células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) humanas han demostrado que estos agonistas son capaces de suprimir respuestas de citoquinas mediadas por alérgenos al mismo tiempo que promueven la producción de IFN- γ e IL-10.¹⁵⁸

Por tanto, todos estos estudios hacen del receptor TLR7 una atractiva diana terapéutica para el desarrollo de nuevas terapias frente a la alergia. En este sentido, es necesaria la selección racional de agonistas que permitan la activación de este receptor. Este hecho queda reflejado en la bibliografía, donde se han descrito extensos estudios en la búsqueda de ligandos eficaces. A continuación, se detallan los estudios más relevantes en este campo.

4.2.1 Ligandos de TLR7

Como se comentó previamente, el PAMP de TLR7 es ARN monocatenario; sin embargo, se han realizado un gran número de estudios encaminados a la búsqueda de pequeños ligandos sintéticos, mucho más eficientes y fáciles de derivatizar, para el desarrollo de adyuvantes de vacunas. La activación inmune crónica de TLR7 ha sido relacionada con varias enfermedades infecciosas y autoinmunes, como la artritis reumatoide¹⁵⁹ y el lupus eritematoso sistémico.¹⁶⁰ Para bloquear esta sobreactivación, se han desarrollado ligandos antagonistas;¹⁶¹ sin embargo, en esta sección, se detallan solamente aquellos ligandos sintéticos que activan TLR7 (agonistas), mucho más numerosos y de interés para el tratamiento de la alergia.

¹⁵⁷ Shen, E.; Lu, L.; Wu, C.; *J. Immunol.* **2008**, *67*, 560-568.

¹⁵⁸ Biggadike, K.; *et al.*; *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1711-1726.

¹⁵⁹ Roelofs, M.F.; *et al.*; *Arthritis Rheum.* **2005**, *52*, 2313-2322.

¹⁶⁰ Komatsuda, A.; *et al.*; *Clin. Exp. Immunol.* **2008**, *152*, 2008, 482-487.

¹⁶¹ Marshak-Rothstein, A.; *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 823-835.

En un análisis masivo se ha demostrado que muchos compuestos farmacológicos para el tratamiento de diversas enfermedades exhibían una actividad agonista frente a TLR7 (Figura 4.2). A partir de estos compuestos y mediante el empleo de estudios de SAR, estas estructuras han servido de base para el desarrollo de moléculas optimizadas con mejores características, como una mayor afinidad por el receptor TLR7, mejores propiedades farmacodinámicas y menor citotoxicidad, entre otras.

Una de estas primeras estructuras identificadas fue la Bromopirimina (**I**), (Figura 4.2) un agente antiviral y antineoplásico.¹⁶² Basándose en la estructura de 2,4-diamina pirimidina, el grupo de investigación de Beesu¹⁶³ llevó a cabo estudios de SAR centrándose en la modificación de sustituyentes en la posición C5. De esta forma, se encontró la estructura **II**, que resultó ser el mejor agonista para TLR7, presentando también la capacidad de activar las DCs.

Por otro lado, una familia de ligandos destacable son las imidazoquinolinas, dentro de ellas está el Imiquimod (**III**), un medicamento aprobado por la FDA en 1997 para el tratamiento de verrugas genitales causadas por el virus del papiloma humano,¹⁶⁴ ampliándose en 2006 su uso para el tratamiento del carcinoma basocelular.¹⁶⁵ En 2002, el grupo de investigación de Hemmi¹⁶⁶ demostró que el Imiquimod (**III**) y su derivado Resiquimod (**IV**) eran ligandos de TLR7. La activación de este receptor conducía a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12, así como IFN- α . Como consecuencia de este proceso, se produce una potente estimulación de la respuesta inmune; sin embargo, las diferentes estructuras de los ligandos producen variaciones de esta respuesta al interactuar con TLR7. Por ejemplo, se demostró que el Resiquimod es capaz de dar una respuesta inmunológica unas 100 veces más potente en comparación con el Imiquimod.^{167,168} Estos compuestos son utilizados como referencia en muchos estudios para comparar la actividad de los nuevos ligandos sintetizados.

¹⁶² Sidwell, R.; *et al.*; *Antivir. Res.* **1994**, 25, 105-122.

¹⁶³ Beesu, M.; Salyer, A.C.D.; Brush, M.J.H.; Trautman, K.L.; Hill, J.K.; David, S.A.; *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 2084-2098.

¹⁶⁴ Von Krogh, G.; Lacey, C.J.; Gross, G., Barrasso, R.; Schneider, A.; *Sex. Transm. Infect.* **2000**, 76, 162-168.

¹⁶⁵ Tyring, S.; *Skin Ther. Lett.* **2001**, 6, 1-4.

¹⁶⁶ Hemmi, H.; *et al.*; *Nat. Immunol.* **2002**, 3, 196-200.

¹⁶⁷ Tomai, M.A.; *et al.*; *Antivir. Res.* **1995**, 28, 253-264.

¹⁶⁸ Testerman, T.L.; *et al.*; *J. Leukoc. Biol.* **1995**, 58, 365-372.

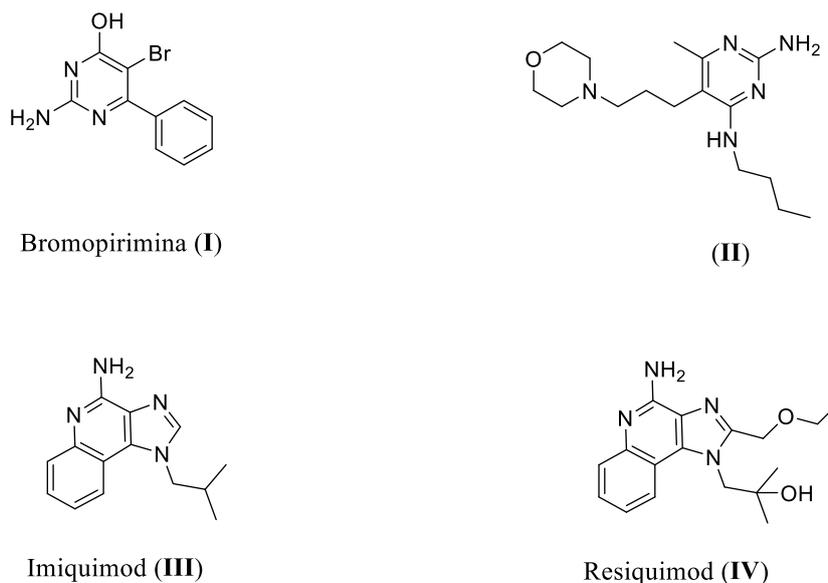


Figura 4.2. Ejemplos de fármacos y sus derivados que son agonistas de TLR7.

Otra familia muy estudiada ha sido sin duda los derivados de adenina. En 2002, Hirota¹⁶⁹ sintetizó una amplia variedad de compuestos basados en 8-oxoadenina para probar su capacidad para secretar IFN- α . (Figura 4.3) En este trabajo se realizaron estudios SAR que pusieron de manifiesto los siguientes hechos: la presencia de un grupo bencilo en la posición N9 (región verde), así como un grupo carbonilo en la posición C8 (región roja) de la estructura era esencial para inducir la secreción de IFN. La introducción en la posición C2 (región azul) de un sustituyente R en el derivado de 8-oxoadenina como alquilo, alquiltio, alquilamino y grupos alcoxi dieron como resultado un notable aumento de la actividad, encontrándose los mejores resultados para los sustituyentes 2-butilamino y 2-butoxi.

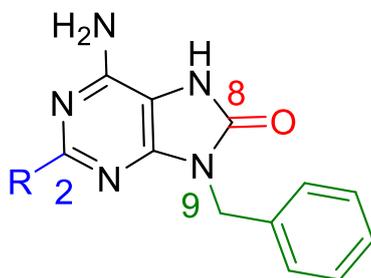


Figura 4.3. Estructura de un derivado de 8-oxoadenina con las regiones coloreadas que influyen en la unión a TLR7.

¹⁶⁹ Hirota, K.; *et al.*; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5419-5422.

Una vez definidos los sustituyentes óptimos o las modificaciones posibles sin pérdida de la capacidad de unión a TLR7, se ha propuesto una amplia variedad de ligandos como potenciales agonistas de TLR7.¹⁷⁰ Merece destacar un trabajo del grupo de Isobe en el que se demuestra la capacidad de unión a TLR7 de esta familia de compuestos, en estudios *in vitro*, así como sus buenas propiedades farmacocinéticas. Estudios *in vivo* demostraron la inducción de IFN- α en ratones usando una dosis de 0,1 mg/kg, así como la secreción de IFN- α de una forma dependiente con la dosis y con una potencia superior a la del Resiquimod, mediante administración por vía oral en monos (*macaca fascicularis*).¹⁷¹

La unión de estas 8-oxoadenininas al receptor TLR7 también ha sido puesta de manifiesto a través de estudios computacionales de docking. En un estudio publicado en 2015 por el grupo de Tuszynski,¹⁷² usando estas modelizaciones computacionales, se determinó la importancia de los residuos de aminoácidos en el bolsillo de unión del TLR7 en términos de contribución a la afinidad. (Figura 4.4)

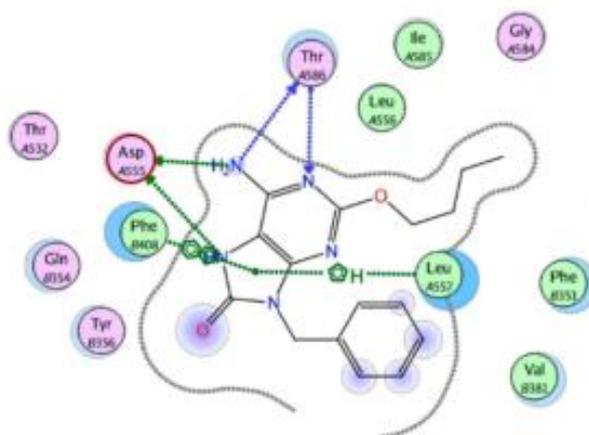


Figura 4.4. Modelización computacional de las interacciones de unión de los residuos de TLR7 (color rosa polares y color verde apolares) con un ligando derivado de 8-oxoadenina. Figura extraída de la referencia 172.

A través del cálculo de la energía libre, se determinó que los residuos, Asp⁵⁵⁵, Ile⁵⁸⁵, Thr⁵⁸⁶ y Phe⁴⁰⁸ eran los que contribuían de forma más importante al reconocimiento de agonistas. Además, la Leu⁵⁵⁷ era también importante en el reconocimiento de ligandos.

¹⁷⁰ Patinote, C.; *et al.*; *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *193*, 112238.

¹⁷¹ Kurimoto A.; *et al.*; *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2088-2095.

¹⁷² Gentile, F.; Deriu, M.A., Licandro, G.; Prunotto, A.; Danani, A.; Tuszynski, J.A.; *Molecules* **2015**, *20*, 8316-8340.

Esta última observación podría explicar la selectividad de los ligandos para TLR7 frente al TLR8, ya que este residuo no se conserva en este último.

La intensa investigación que desde hace casi dos décadas se ha desarrollado en torno al diseño de estos ligandos sintéticos ha proporcionado una gran variedad de estructuras. Por ejemplo, recientemente se ha descrito la inmovilización de un ligando basado en 8-oxoadenina sobre nanopartículas de sílica.¹⁷³ También muy recientemente se ha explorado el campo de la conjugación de ligandos de TLR7 a biomoléculas como polisacáridos y fosfolípidos;^{174,175} sin embargo, destaca el trabajo del grupo de Filippov publicado en 2019,¹⁷⁶ en el que se describe la primera conjugación de un ligando de TLR7 a un péptido derivado de OVA. En este estudio se sintetizaron varios conjugados mediante acoplamiento por medio de reacciones de tipo amida y CuAAC. Estos conjugados fueron capaces de inducir la maduración de las DCs, como lo demuestra tanto la producción de IL-12p4D y del marcador CD86. Todos los conjugados descritos en el trabajo eran funcionales; sin embargo, su actividad fue ligeramente menor en comparación con el ligando libre. Este estudio preliminar pone de manifiesto la necesidad de una mayor investigación de este tipo de conjugados, así como la realización de pruebas *in vitro* con muestras de pacientes alérgicos y pruebas *in vivo*, con el objetivo de conseguir tratamientos eficaces en la AIT. Por lo tanto, la capacidad de las 8-oxoadeninas como potentes agonistas de TLR7 las convierte en interesantes adyuvantes para su investigación en vacunas frente a la alergia.

4.3 Objetivos

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se pretende preparar un derivado de 8-oxoadenina conjugado a diferentes péptidos alergénicos para su uso en la AIT. La idea es determinar si estos conjugados son capaces de producir una modulación de la respuesta inmune desde una respuesta tipo T_H2 (alérgica) a una de tipo T_H1 (no alérgica). Para ello, es necesario la síntesis de una estructura basada en una 8-oxoadenina convenientemente funcionalizada para permitir su conjugación con péptidos sin que se reduzca la capacidad

¹⁷³ Huang, C.; *et al.*; *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2019**, *30*, 26637-26647.

¹⁷⁴ Wang, X.D.; *et al.*; *World J. Gastroentero.* **2015**, *21*, 8052-8060.

¹⁷⁵ Falke, J.; *et al.*; *World J. Urol.* **2018**, *36*, 1719-1725.

¹⁷⁶ Gentil, G.P.P.; *et al.*; *Bioorg, Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 1340-1344.

de unión al receptor TLR7. Posteriormente, estos conjugados adyuvante-alérgeno serán evaluados en ensayos *in vitro* mediante colaboraciones con diferentes grupos biomédicos.

Para conseguir este objetivo general, se definen a continuación una serie de objetivos específicos:

- Síntesis de una estructura basada en un derivado de 8-oxoadenina convenientemente funcionalizada para su conjugación.
- Conjugación de esta estructura con diferentes péptidos inmunogénicos sintéticos de forma rápida, sencilla y eficaz.
- Evaluación biológica de estos conjugados péptido-adyuvante.

4.4 Síntesis del ligando de TLR7

Atendiendo a los estudios SAR descritos en la bibliografía para estas estructuras, se decidió llevar a cabo la derivatización de la 8-oxoadenina en la posición *para* del anillo aromático presente en el N9 de la estructura. El grupo de Isobe había demostrado anteriormente que esta posición era adecuada para la derivatización sin una pérdida de la capacidad de unión al TLR7.¹⁷⁷ (Figura 4.5)

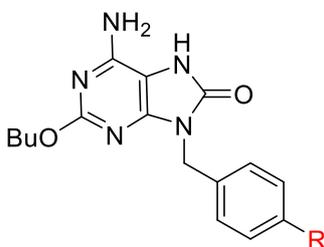


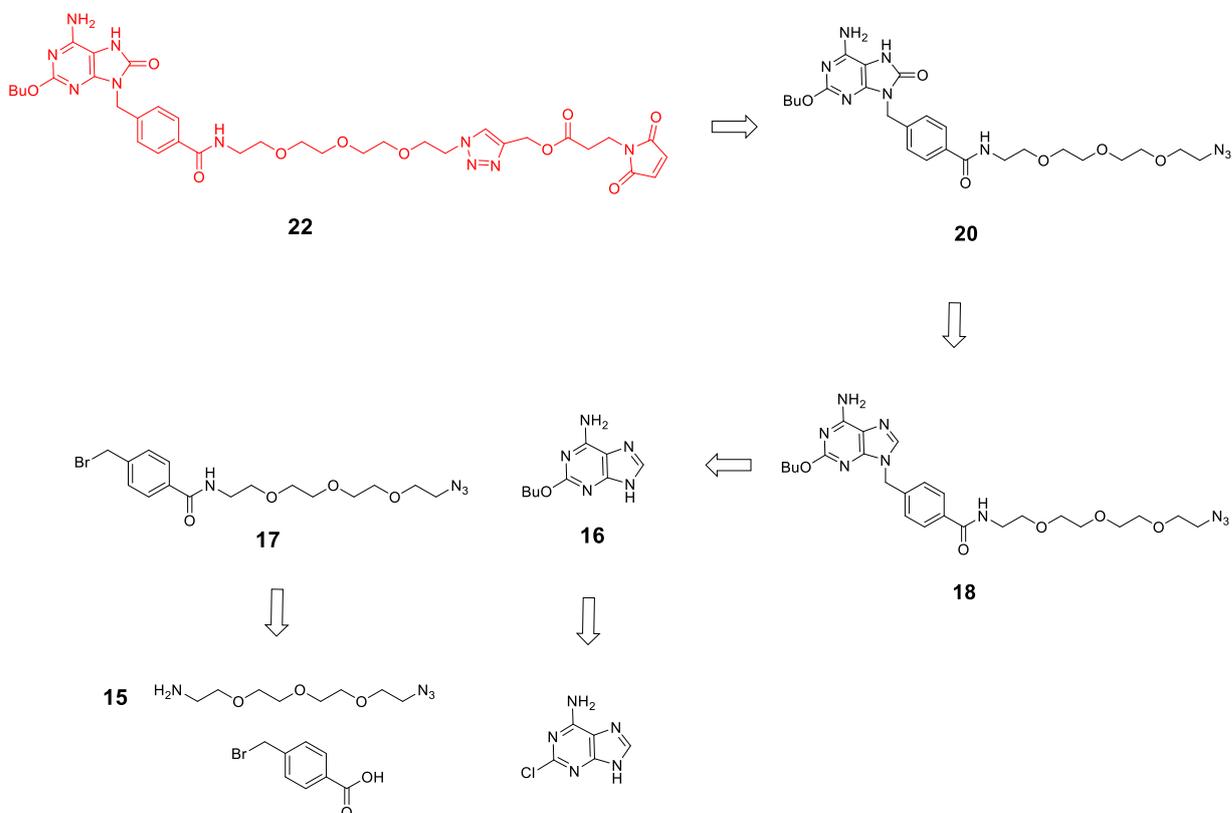
Figura 4.5. Estructura de un derivado de 8-oxoadenina con la posición *para* marcada (R), donde es posible la derivatización sin pérdida de su actividad.

El grupo maleimido, necesario para la conjugación del alérgeno vía reacción de tipo tioleno, como se ha visto a lo largo de la presente Tesis Doctoral, se unió a la posición indicada a través de un espaciador de etilenglicol. Esta elección se debe a que se ha demostrado que este espaciador ofrece un impedimento estérico mínimo, de tal forma que no influye negativamente en el reconocimiento del ligando por parte de TLR7, además de proporcionar una mejor solubilidad en medios acuosos.¹⁷⁸ En el Esquema 4.1 se

¹⁷⁷ Kurimoto, A.; *et al.*; *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2964–2972.

¹⁷⁸ Chan, M.; *et al.*; *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1194–1200.

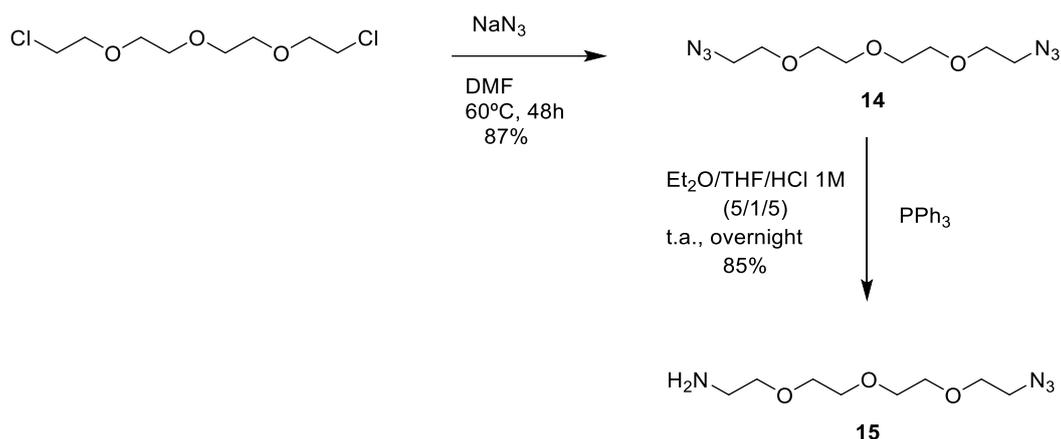
presenta el esquema retrosintético propuesto para la síntesis de este nuevo derivado de 8-oxoadenina, incorporando un grupo maleimido.



Esquema 4.1. Ruta retrosintética del derivado de 8-oxoadenina objetivo **22** (en rojo).

Una vez establecida una ruta retrosintética, se abordó la síntesis del compuesto objetivo. En primer lugar, se llevó a cabo la preparación del espaciador de etilenglicol funcionalizado en sus extremos con un grupo azido y otro amino, siguiendo las condiciones descritas en la bibliografía.¹⁷⁹ (Esquema 4.2)

¹⁷⁹ Bakleh, M.E. *et al.*; *Tetrahedron* **2009**, *36*, 7385-7392.



Esquema 4.2. Síntesis del espaciador aminoazida **15**.

Para ello, se llevó a cabo la azidación del espaciador comercial bis[2-(2-cloroetoxi)etil]eter en DMF a 60°C durante dos días, obteniéndose la diazida **14** con buen rendimiento (87%). El siguiente paso consistió en la reducción selectiva de una de las azidas mediante una reacción de Staudinger, en una mezcla de dietiléter, tetrahidrofurano y HCl 1M, usando como agente reductor trifenilfosfina, obteniéndose el espaciador aminoazida **15** con un rendimiento del 85%. El compuesto fue caracterizado fundamentalmente por su espectro de ^{13}C -RMN donde se observó la aparición de una señal a 41.7 ppm, característica del metileno unido a la amina formada, así como por espectrometría de masas (ESI-MS), donde se pudo detectar la señal correspondiente al ión molecular protonado (Figura 4.6).

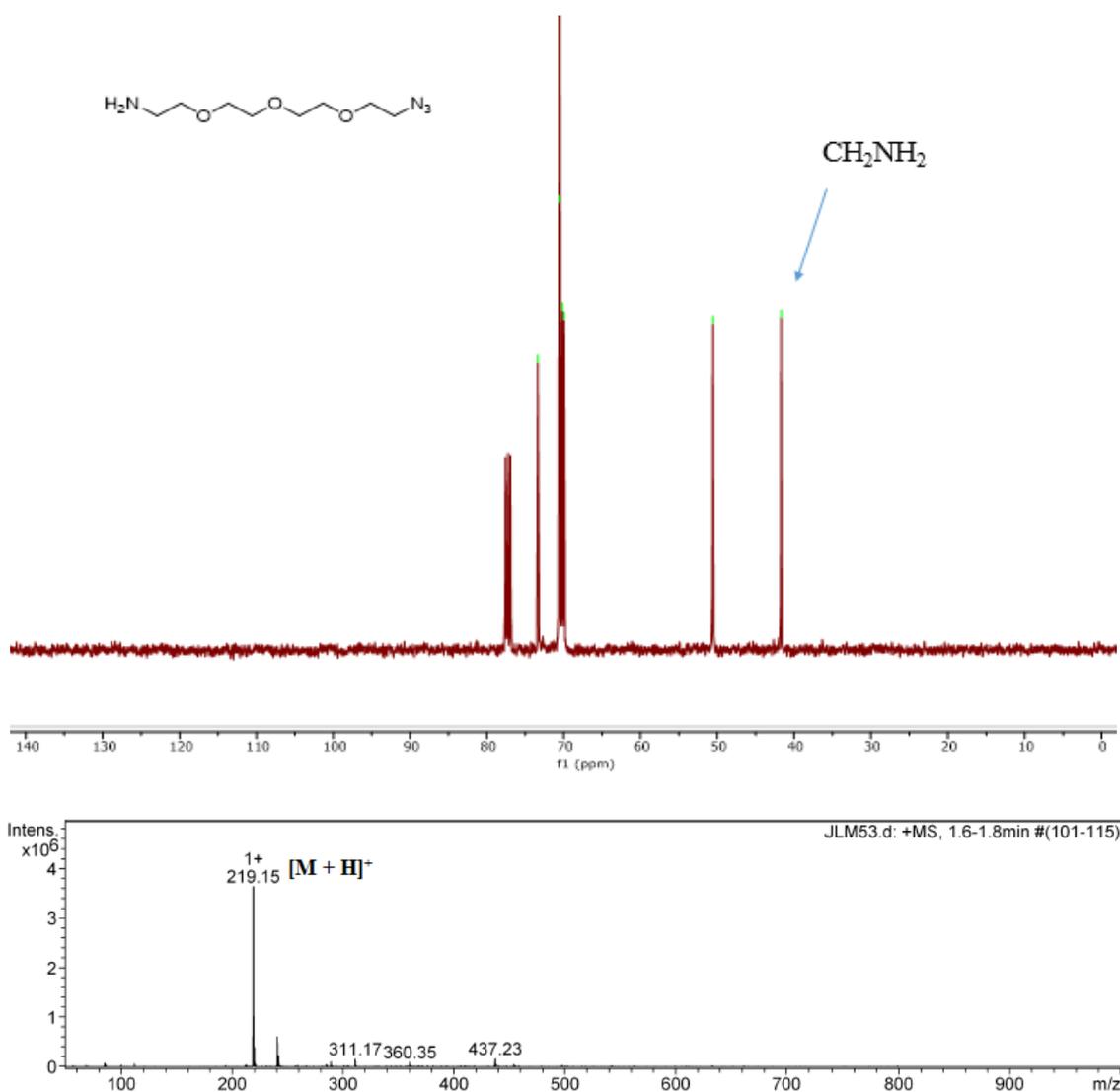
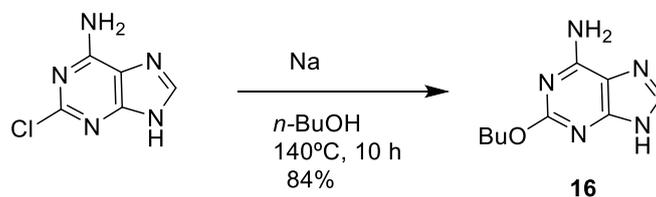


Figura 4.6. Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, 298 K) (arriba) y ESI-MS (abajo) del compuesto **15**.

La siguiente etapa consistió en la modificación de la estructura de la adenina, siguiendo las condiciones descritas en la bibliografía.¹⁷⁷ (Esquema 4.3)



Esquema 4.3. Síntesis del derivado de adenina **16**.

Para ello, se hizo reaccionar el compuesto comercial 2-amino-6-cloropurina con sodio metálico y butanol anhidro, calentado toda la noche a 140°C para generar la sal del butóxido *in situ* y desplazar el átomo de cloro de la estructura. Así se obtuvo el derivado

16 con buen rendimiento (84%) y se confirmó su estructura por medio de $^1\text{H-RMN}$, donde se observó la aparición de las señales características del grupo butóxido, así como su relación de integración con el resto de señales. (Figura 4.7)

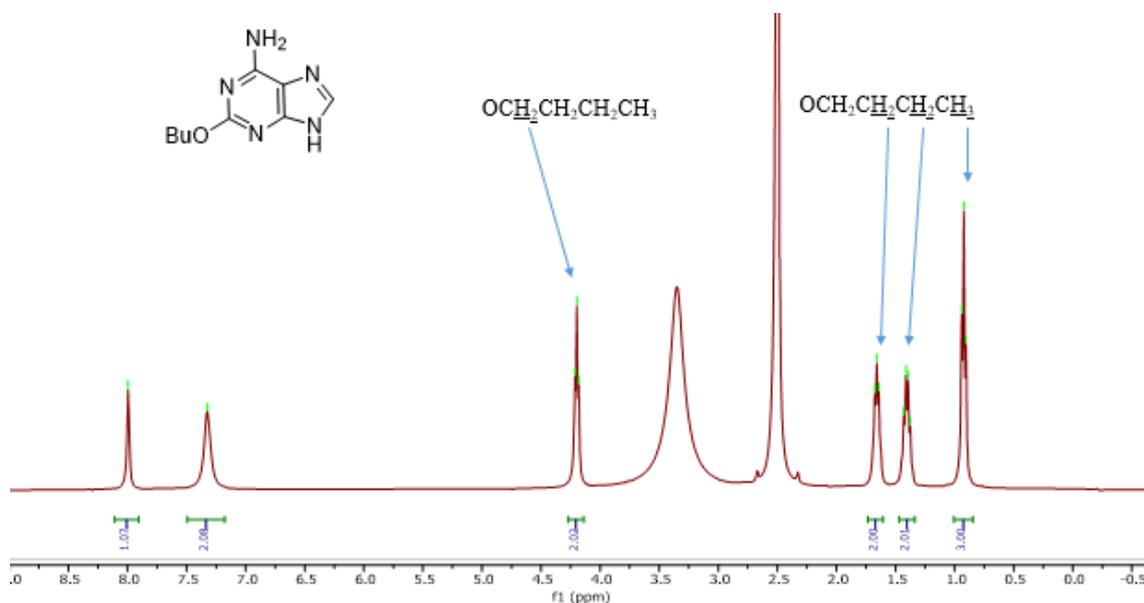
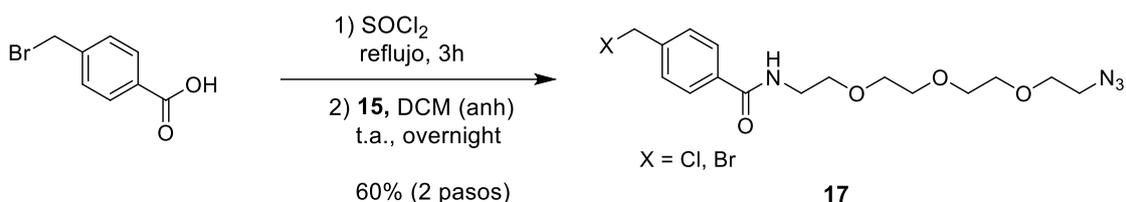


Figura 4.7. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) del compuesto **16**.

Según lo establecido en la ruta retrosintética, el siguiente paso consistió en la formación de una amida entre el espaciador **15** y el ácido 4-bromometilbenzoico comercial. (Esquema 4.4)



Esquema 4.4. Preparación del compuesto **17**.

En primer lugar, se hizo reaccionar el ácido 4-bromometilbenzoico con cloruro de tionilo a reflujo durante 3 horas para formar el correspondiente cloruro de acilo, que fue inmediatamente añadido a la amina **15** disuelta en diclorometano anhidro para formar la amida **17**. El análisis por espectroscopía de $^1\text{H-RMN}$ mostraba dos señales del metileno unido al halógeno, una a 4.63 y otra a 4.52 ppm, lo que indicaba la existencia de una mezcla de dos compuestos, uno con Cl y otro con Br, respectivamente, debido a una cloración parcial por el cloruro de tionilo. Esta mezcla con una relación aproximadamente (60:40, Br:Cl), que posee el mismo R_f , también fue identificada por medio de

espectrometría de masas (ESI) en el que se observa el ión molecular de cada uno con el patrón isotópico correspondiente. (Figura 4.8)

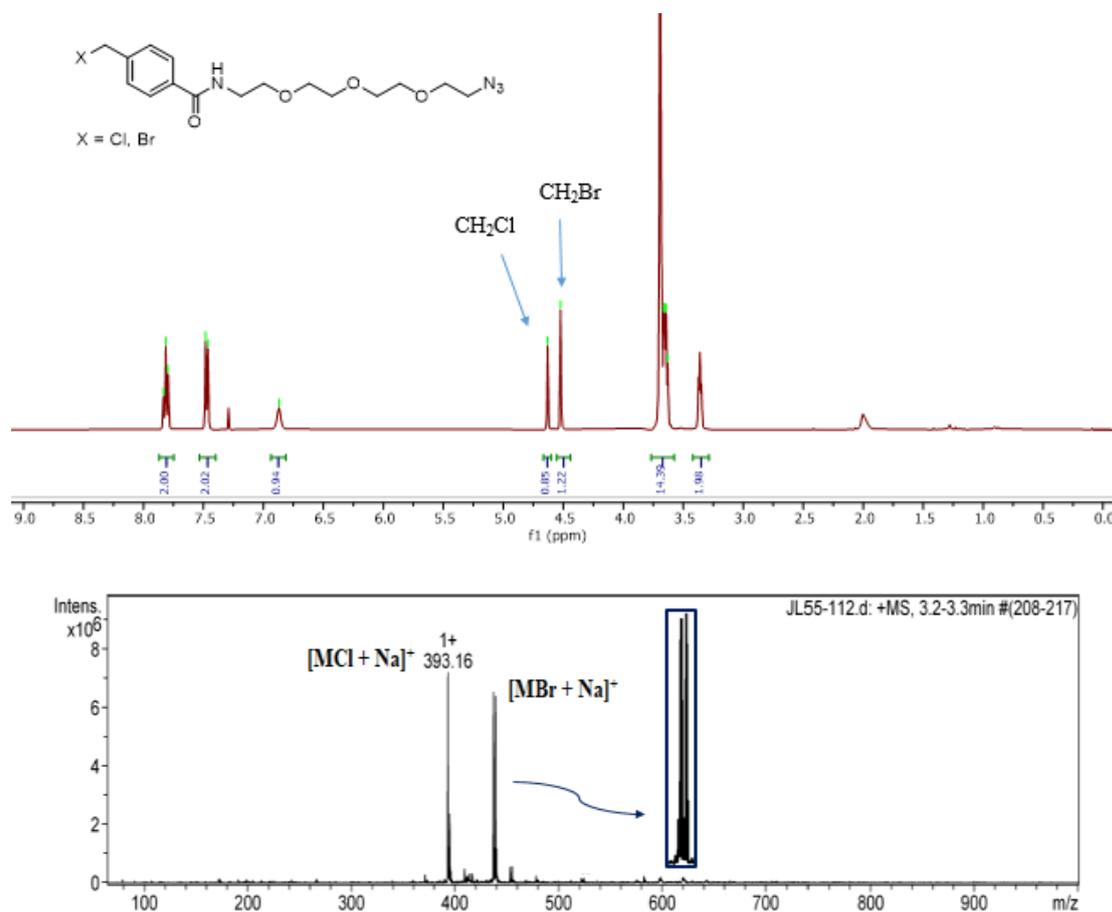
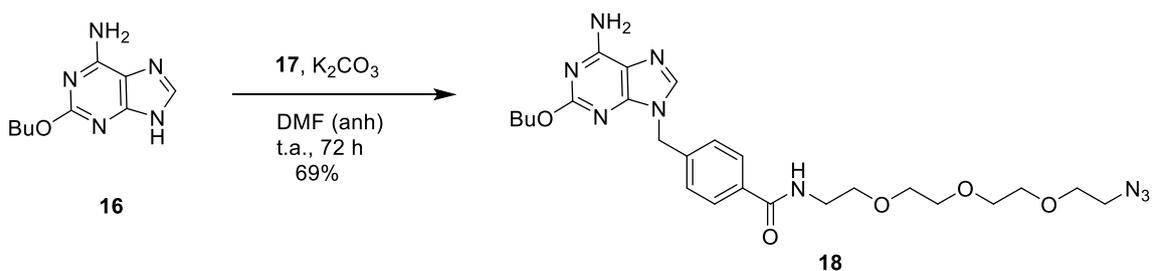


Figura 4.8. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) (arriba) y de ESI-MS (abajo) del compuesto **17**.

A la vista de este resultado, se intentaron otras alternativas de amidación que evitaran esta cloración parcial, como el uso de HATU como agente de acoplamiento; sin embargo, esta alternativa fue infructuosa, ya que no se formó el producto buscado. Por tanto, se decidió continuar con la síntesis, ya que la siguiente etapa, consistente en la N-alkilación del derivado de adenina **16**, era posible con los dos halogenuros **17**. (Esquema 4.5)



Esquema 4.5. N-alkilación para la formación del compuesto **18**.

Para ello, se usaron unas condiciones similares a las descritas para la N-alquilación de otras adeninas.¹⁸⁰ El compuesto **16** fue disuelto en DMF anhidra y tratado con K₂CO₃, seguidamente se añadió el espaciador **17** y la reacción se agitó a t.a. durante 72 h, obteniéndose el derivado **18** con buen rendimiento (69%). Este compuesto fue satisfactoriamente caracterizado por RMN, así como por espectrometría de masas (ESI). (Figura 4.9)

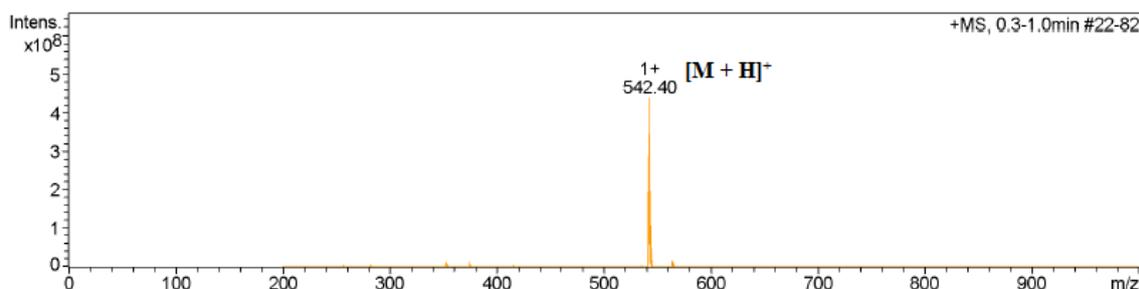
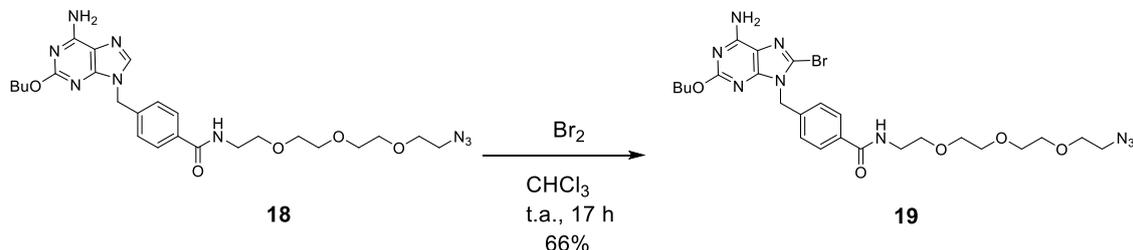


Figura 4.9. Espectro de ESI-MS del compuesto **18**.

Llegados a este punto, se abordó la síntesis de la estructura de la 8-oxoadenina, siendo necesario en primer lugar la bromación de la posición C8, usando las condiciones descritas para otros derivados similares.¹⁸¹ (Esquema 4.6)



Esquema 4.6. Síntesis del derivado bromado **19**.

Sobre el compuesto **18** en cloroformo, se adicionó bromo y la mezcla fue agitada protegida de la luz. Después de la purificación por medio de una cromatografía en columna de gel de sílice, se obtuvo el derivado bromado **19**. El compuesto fue identificado por medio de su espectro de ¹H-RMN, en el que se observa claramente la desaparición de la señal a 7.62 ppm correspondiente al protón en la posición C8. En su espectro de masas (ESI) se pudo observar la señal correspondiente al ion molecular más

¹⁸⁰ Siah, H.S.M.; Gundersen, L.L.; *Synth. Commun.* **2013**, *43*, 1469-1476.

¹⁸¹ Meszarosova, K.; Holy, A.; Masojidkova, M.; *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, *65*, 1109-1125.

sodio, el cual presenta el característico perfil isotópico de compuestos que contienen bromo. (Figura 4.10)

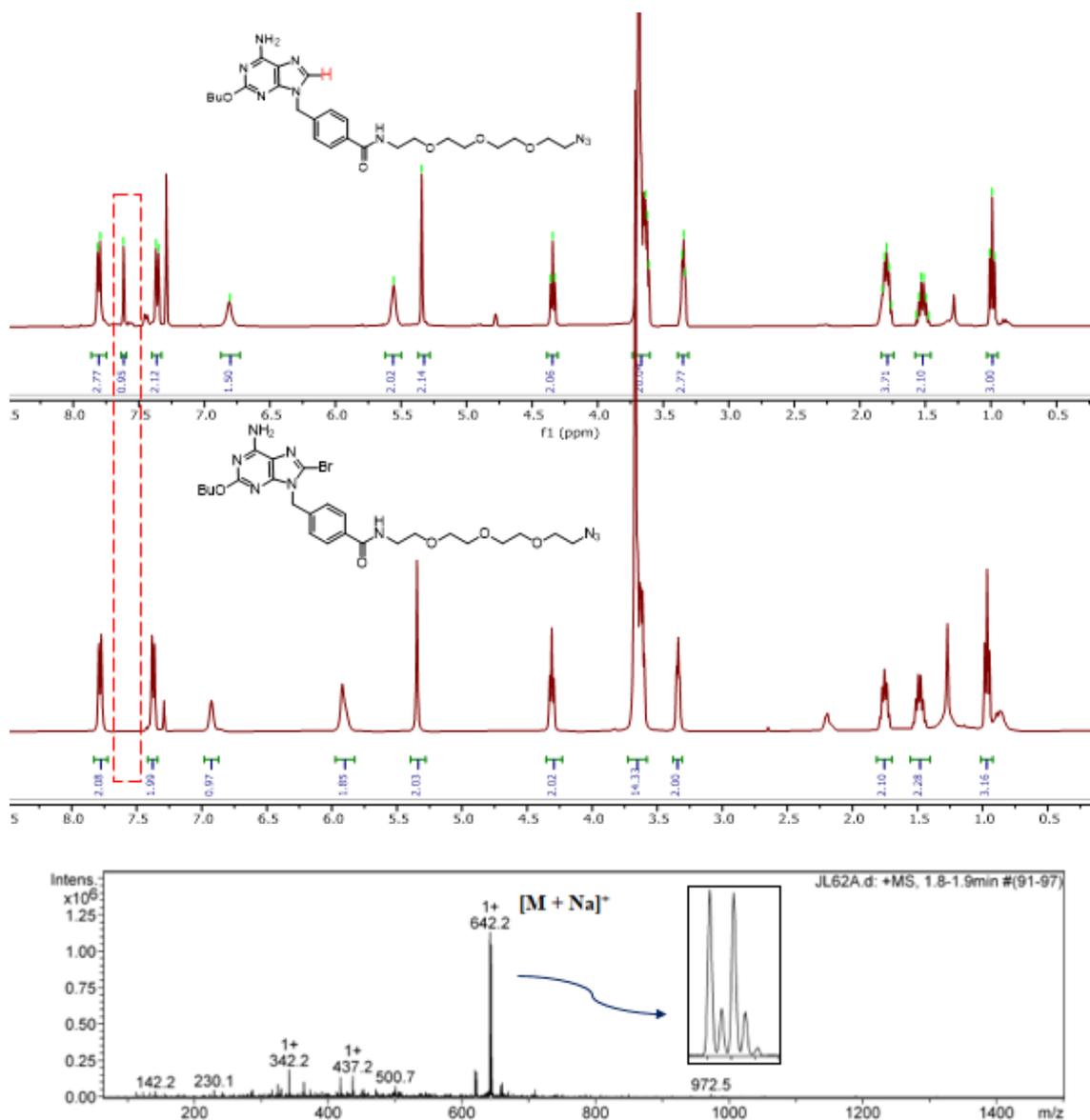
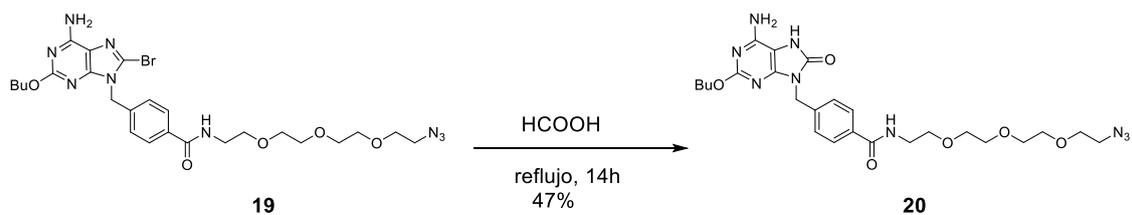


Figura 4.10 Comparación de espectros de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) de los compuestos **18** y **19** (arriba) y de ESI-MS (abajo) del compuesto **19**.

El siguiente paso para la formación de la estructura de la 8-oxoadenina consistió en la hidrólisis del bromo en la posición C8. (Esquema 4.7)



Esquema 4.7. Síntesis del derivado de 8-oxoadenina **20**.

Esta reacción requiere de condiciones muy energéticas como es el tratamiento con ácido fórmico a reflujo durante una noche. De esta forma se obtuvo el compuesto **20** con un rendimiento moderado (47%). Este compuesto fue satisfactoriamente caracterizado por ^1H -RMN, en el que se observa la aparición de una nueva señal a campo bajo (10.00 ppm) correspondiente a la formación del protón unido al nitrógeno de la imidazolina. En su espectro de ESI se observó la señal correspondiente al ion molecular con sodio del compuesto **20**. (Figura 4.11)

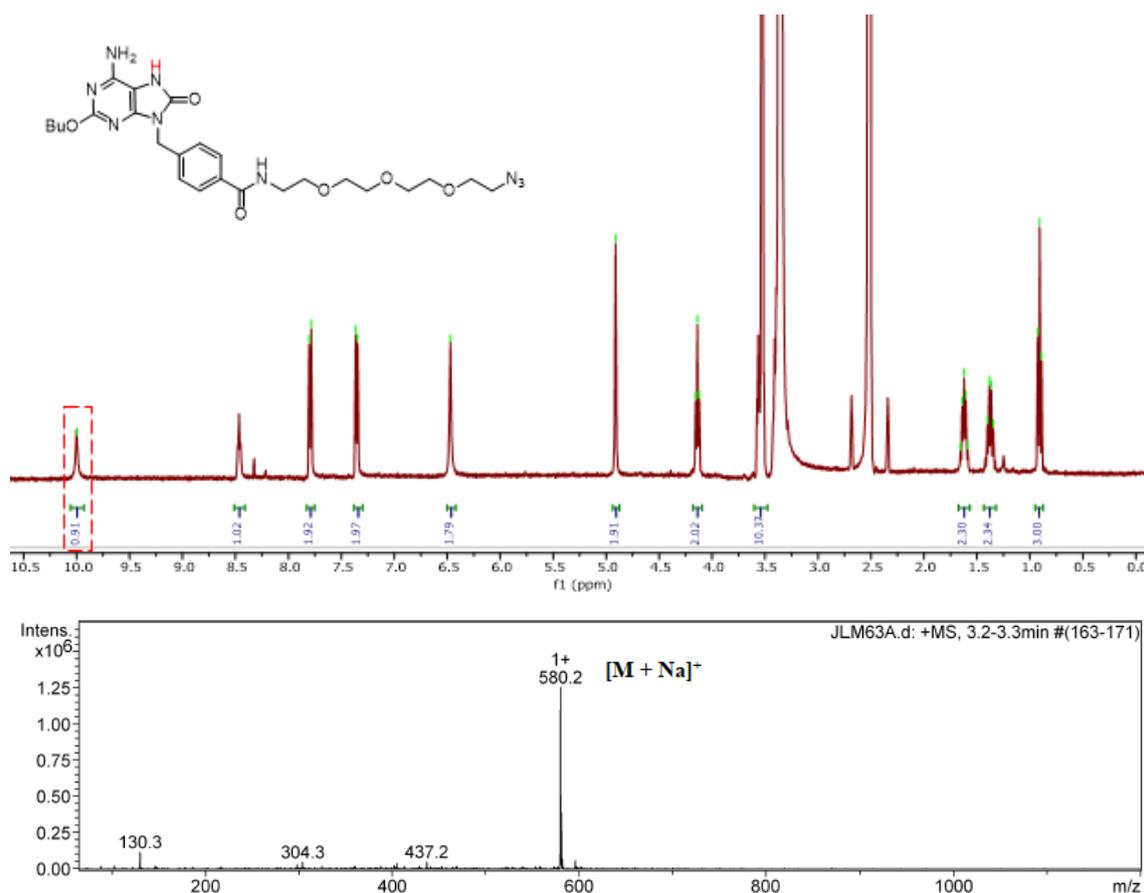


Figura 4.11. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) (arriba) y de ESI-MS (abajo) del compuesto **20**.

Una vez sintetizado el derivado **20**, fue necesaria la introducción del grupo maleimido para la conjugación de los péptidos. Para ello, la maleimida **9** (Capítulo 3) fue derivatizada para poder incorporar un grupo alquino mediante esterificación con el alcohol propargílico usando las condiciones descritas en la bibliografía.¹⁸² Una vez sintetizado este alquino-maleimida **21**, fue utilizado en la reacción click CuAAC junto a la azida **20**. Esta reacción click tuvo que ser optimizada debido a una serie de inconvenientes encontrados. En primer lugar, no se pudo usar el TBTA como estabilizante de Cu(I), ya que tenía un R_f idéntico al del producto de la reacción, a pesar de la gran variedad de eluyentes y/o condiciones de precipitación probadas. Tampoco fue posible el uso del ascorbato sódico, para reducir *in situ* el Cu(II) a Cu(I), ya que como se ha comentado previamente, este puede reaccionar con el grupo maleimido. Por lo tanto, la única alternativa plausible consistió en el uso de CuBr como fuente de Cu(I), añadido a lo largo de la reacción bajo condiciones anhidras. Se probaron distintas condiciones, variando el número de equivalentes, el tiempo entre cada adición e incluso el calentamiento mediante el uso de un reactor de microondas; sin embargo, todos estos esfuerzos fueron infructuosos. Otra dificultad añadida podría ser que la azida **20** y el alquino **21**, al ser insolubles en medios acuosos, tenían que ser disueltos en una mezcla acetonitrilo/DMSO y, por lo tanto, esto imposibilitaba el uso de disoluciones tampón ligeramente básicas, dificultando la desprotonación del alquino, imprescindible para iniciar el ciclo catalítico de la reacción CuAAC.

Debido a que este intermedio era el último de la síntesis del ligando objetivo, se buscaron otras posibles modificaciones de la reacción CuAAC. Dado que esta reacción click ha tenido una gran aplicabilidad, en la bibliografía se recoge una amplia variedad de condiciones de reacción. Por ejemplo, el grupo de Fokin fue el primero en inmovilizar el TBTA sobre una resina de TentaGel,¹⁸³ (Figura 4.12) demostrando que era capaz de quelar el Cu(I) y por lo tanto, de estabilizarlo frente a la oxidación de una forma más eficiente que el TBTA monomérico en disolución. Esto es debido a la gran concentración local de TBTA sobre la superficie de la resina, que ejerce un importante efecto estérico sobre el Cu(I), protegiéndolo más eficientemente contra la oxidación.

¹⁸² Rodríguez, M. J. *et al.*; *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *10*, 1700110.

¹⁸³ Chan, T.R.; Fokin, V.V.; *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1274-1279.

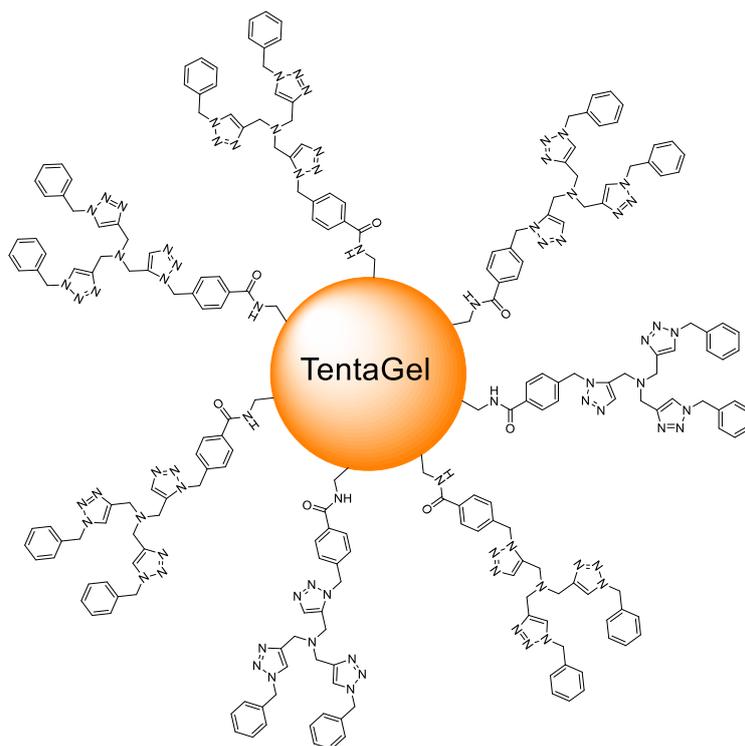
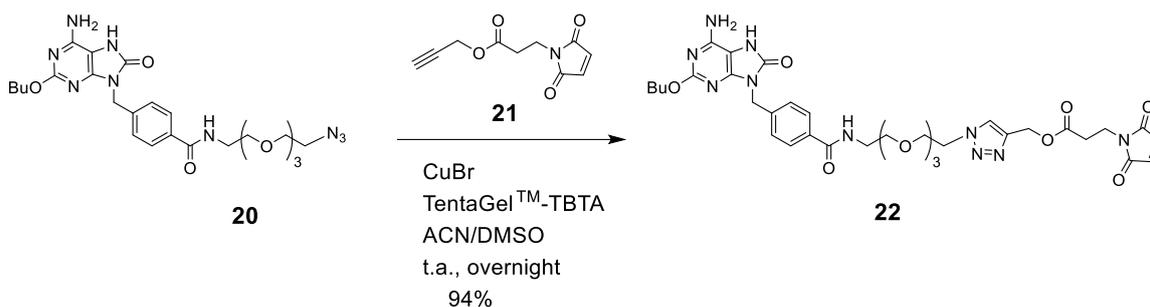


Figura 4.12. Representación de la resina TentaGel funcionalizada con TBTA en su superficie.

Esta resina cumple una triple función, por un lado, estabiliza el Cu(I) favoreciendo la catálisis, por otro lado, no es necesario añadir ninguna resina adicional para eliminar el cobre de la reacción ya que esta presenta una gran avidez por este metal y, por lo tanto, con una simple filtración se elimina tanto el cobre como el TBTA de la mezcla de reacción.

Esta resina TentaGelTM-TBTA, disponible comercialmente, se empleó siguiendo las condiciones descritas por el grupo de Fokin.¹⁸³ En primer lugar, esta resina precisa de una “pre-activación”, de tal forma que la resina se suspende en el disolvente apropiado, se añade una porción de CuBr y se agita protegida de la luz durante 10 minutos. Pasado este tiempo, ya está lista para la catálisis. Tras este tratamiento, una mezcla de la azida **20** y el alquino **21**, disueltos en acetonitrilo/DMSO fue añadida a la resina. Manteniendo la reacción protegida de la luz y bajo atmósfera de argón con agitación, se añadieron dos porciones adicionales de CuBr disueltas en la misma mezcla cada dos horas. Después se dejó evolucionar la reacción hasta el día siguiente a t.a. (Esquema 4.8)



Esquema 4.8. Síntesis de la maleimida **22**.

Usando estas condiciones, después de una purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se consiguió obtener finalmente la maleimida **22** con un rendimiento muy elevado (94%). El compuesto **22** fue caracterizado mediante ^1H -RMN, en cuyo espectro se pudo observar el singulete correspondiente al protón del anillo de triazol (8.08 ppm), también el singulete de los protones olefínicos de la maleimida (6.99 ppm), así como su correcta relación de integración con el resto de los protones de la molécula. Por espectrometría de masas (ESI) se observaron las señales m/z correspondientes a la masa molecular del compuesto **22**. (Figura 4.13).

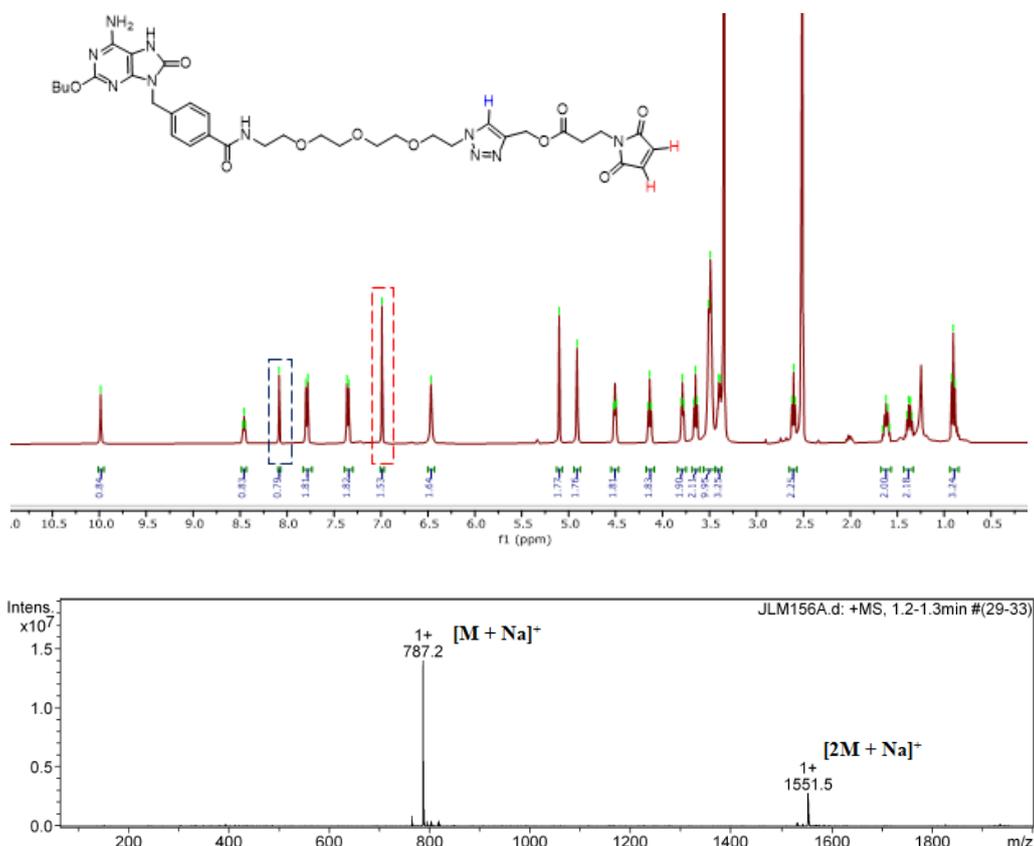


Figura 4.13. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , 298 K) (arriba) y de ESI-MS (abajo) del compuesto **22**.

Una vez sintetizado el derivado de 8-oxoadenina **22**, funcionalizado con el grupo maleimido, se puede llevar a cabo la conjugación con diferentes péptidos alergénicos a través de la reacción tiol-eno, usando la misma estrategia que en el capítulo anterior.

4.5 Conjugación del ligando de TLR7 a distintos péptidos alergénicos

En primer lugar, nos propusimos la conjugación del péptido Pru p 3 (alérgeno del melocotón) a la maleimida **22**. Basándonos en la experiencia adquirida en la conjugación del ligando de TLR4 (Capítulo 3), insoluble en medios acuosos, se utilizaron las mismas condiciones para esta maleimida **22**.

Para abordar esta conjugación, se realizó un pequeño ensayo en el que se puso de manifiesto la gran velocidad de esta adición de tipo tio-Michael. Se disolvieron la maleimida **22** y el péptido Pru p 3-SH en una mezcla DMSO/tampón fosfato y se analizó la reacción inmediatamente extrayendo una alícuota que se inyectó en el RP-HPLC. (Figura 4.14)

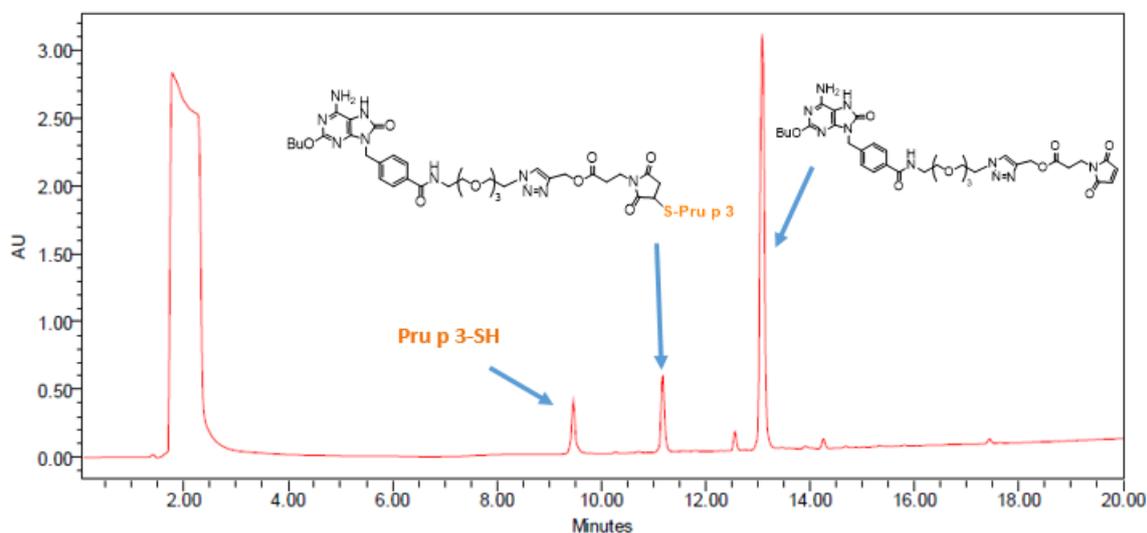
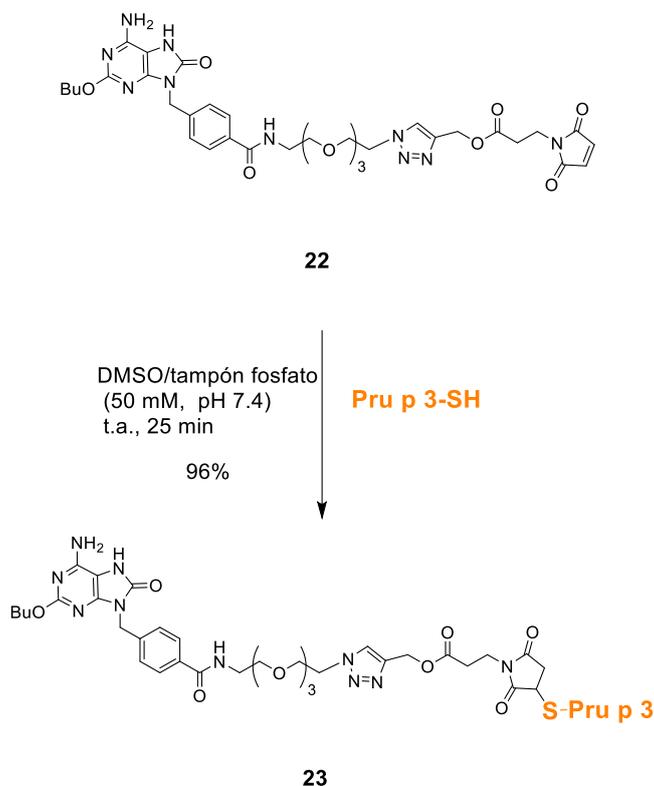


Figura 4.14. Cromatograma de seguimiento de la reacción a $t = 0$, mediante RP-HPLC analítico, entre la maleimida **22** y el péptido Pru p 3-SH.

Este análisis reveló que el conjugado **23** se empezaba a formar inmediatamente, demostrando de esta forma la gran eficiencia de esta reacción tiol-eno. Dado que esta

reacción resultó ser cuantitativa, se usaron las mismas condiciones que con la maleimida del ligando de TLR4 **10**. (Esquema 4.9)



Esquema 4.9. Síntesis del conjugado **23** con el péptido Pru p 3-SH.

Siguiendo la metodología establecida anteriormente para la conjugación de péptidos, la maleimida **22** y el péptido Pru p 3-SH fueron disueltos en DMSO y tampón fosfato (50 mM, pH 7.4), respectivamente, en proporciones equimoleculares. Seguidamente, se mezclaron por medio de agitación orbital durante 25 min a temperatura ambiente. El avance de la reacción fue monitorizado por RP-HPLC, confirmando la desaparición de los productos de partida de forma casi inmediata. Solamente fue necesario una ultrafiltración a través de una membrana de corte molecular de 3 KDa para eliminar las sales presentes en la reacción, obteniéndose el conjugado **23** con un rendimiento excelente (96%). Este conjugado fue caracterizado satisfactoriamente por medio de RP-HPLC, observándose una única señal y por espectrometría de masas (ESI), donde se detectó la presencia del conjugado con diferentes cargas, demostrándose la pureza y monodispersidad del conjugado **23**. (Figura 4.15)

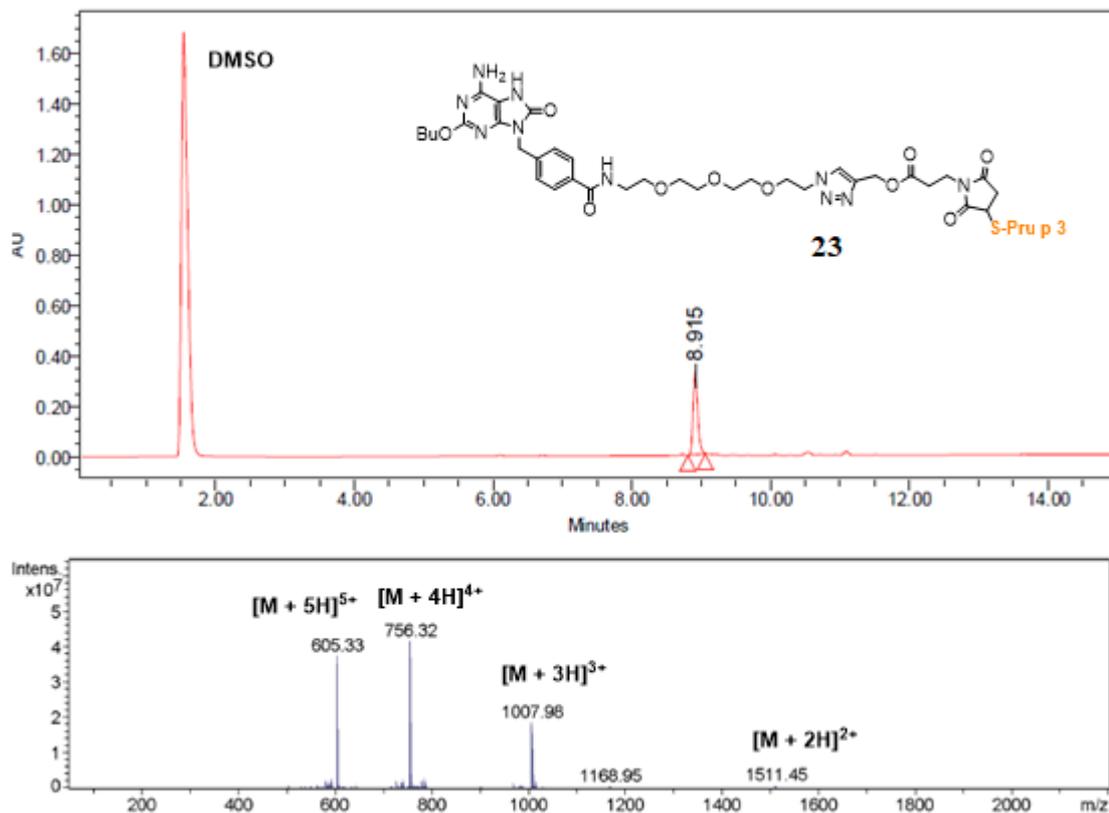
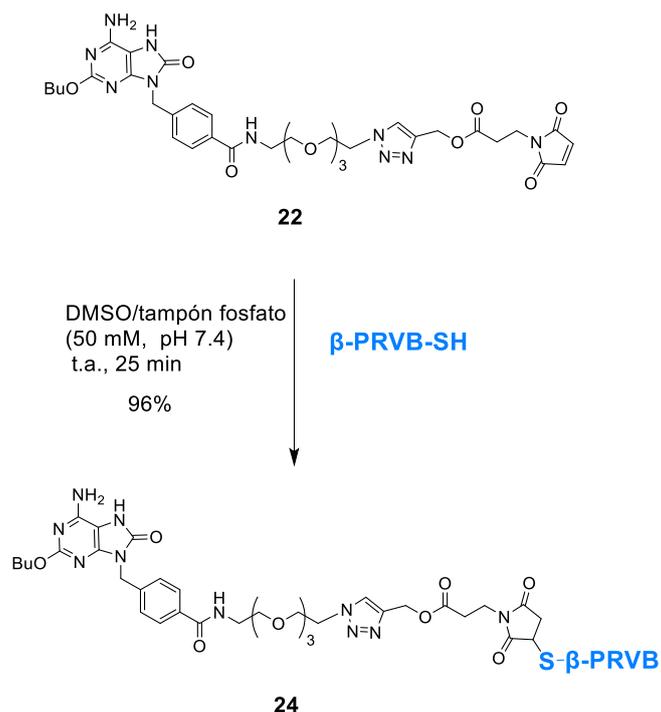


Figura 4.15. Cromatograma de RP-HPLC (arriba) y espectro de ESI-MS (abajo) del conjugado 23.

De forma análoga a como se hizo con el ligando de TLR4 (Capítulo 3), se exploró la conjugación de otros péptidos alérgicos. En concreto, para la conjugación del péptido β -PRVB-SH, el alérgeno mayoritario de pescado, se usó el mismo protocolo puesto a punto anteriormente. (Esquema 4.10)



Esquema 4.10. Síntesis del conjugado **24** con el péptido β -PRVB-SH.

Usando cantidades equimoleculares del péptido y de la maleimida **22**, se llevó a cabo la conjugación. Tras 25 minutos de agitación orbital a temperatura ambiente, se verificó por RP-HPLC la desaparición completa de los productos de partida, observándose una única señal nueva. Después de una simple filtración para eliminar sales se obtuvo el conjugado **24** con un rendimiento muy elevado (96%). De nuevo, el producto final fue caracterizado por RP-HPLC y espectrometría de masas para confirmar su pureza y monodispersidad. (Figura 4.16)

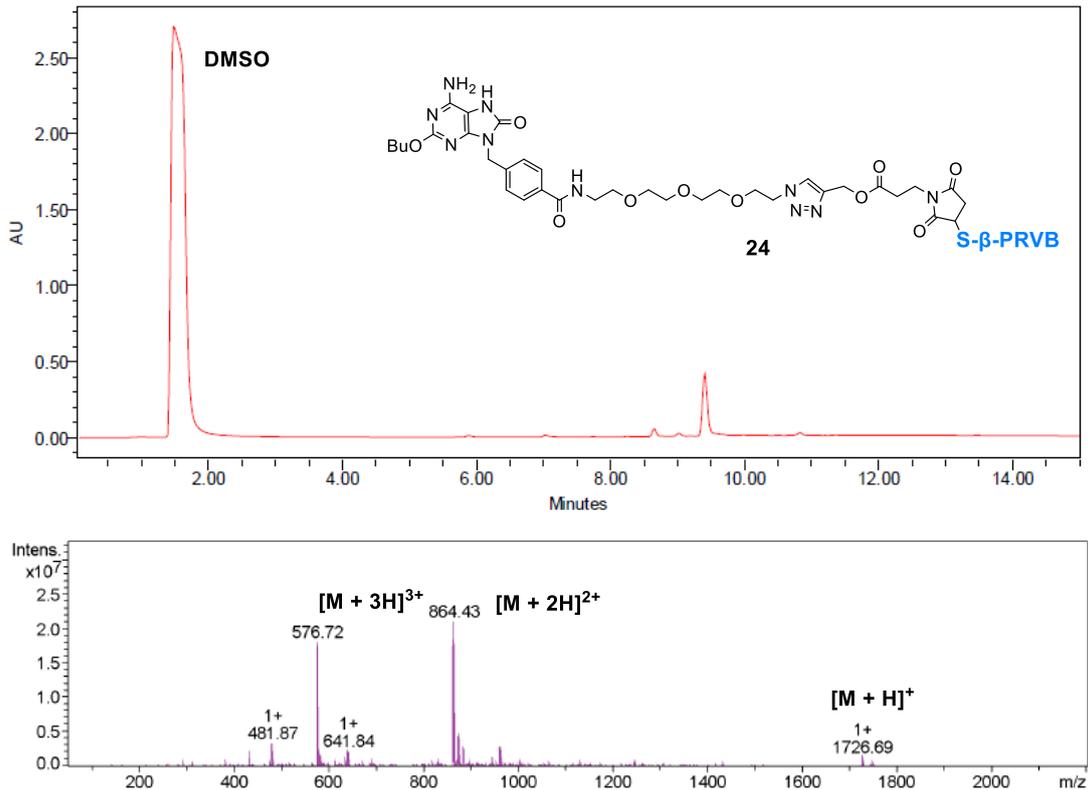
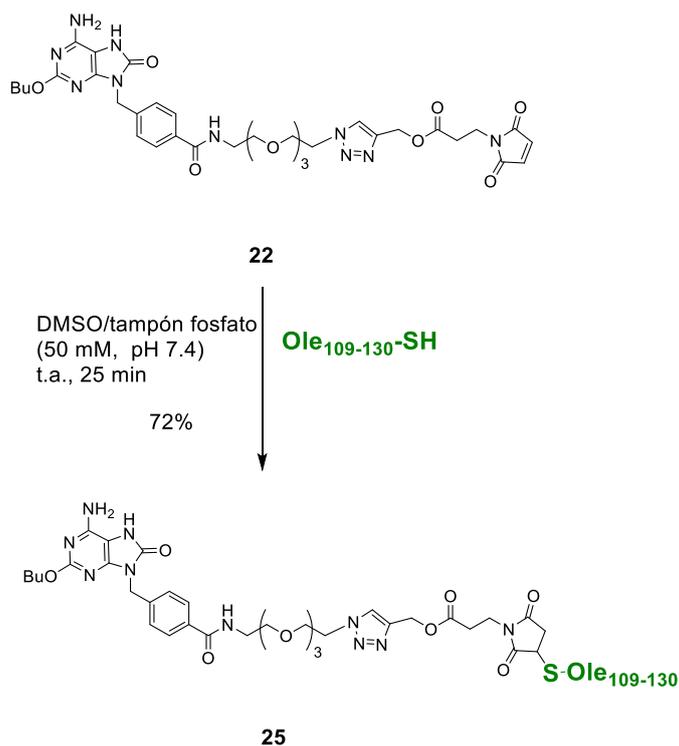


Figura 4.16. Cromatograma de RP-HPLC (arriba) y espectro de ESI-MS (abajo) del conjugado **24**.

También se llevó a cabo la conjugación de esta maleimida **22** con otro péptido, el Ole₁₀₉₋₁₃₀-SH, que como se ha comentado previamente corresponde a la proteína Ole e 1, el alérgeno más predominante en pacientes alérgicos al polen del olivo. (Esquema 4.11)



Esquema 4.11. Síntesis del conjugado **25** con el péptido Ole₁₀₉₋₁₃₀-SH.

En este caso, al realizarse la conjugación y monitorizarse por RP-HPLC, se observó la formación mayoritaria de dos señales con intensidades similares. Siguiendo el mismo protocolo establecido, se realizó una ultrafiltración a través de una membrana de corte molecular de 3 KDa, manteniéndose estas dos señales. Sorprendentemente, el análisis por espectrometría de masas reveló que ambas señales correspondían a compuestos con la misma masa correspondiente al conjugado **25**, no observándose señales de los productos de partida u otras impurezas. (Figura 4.17)

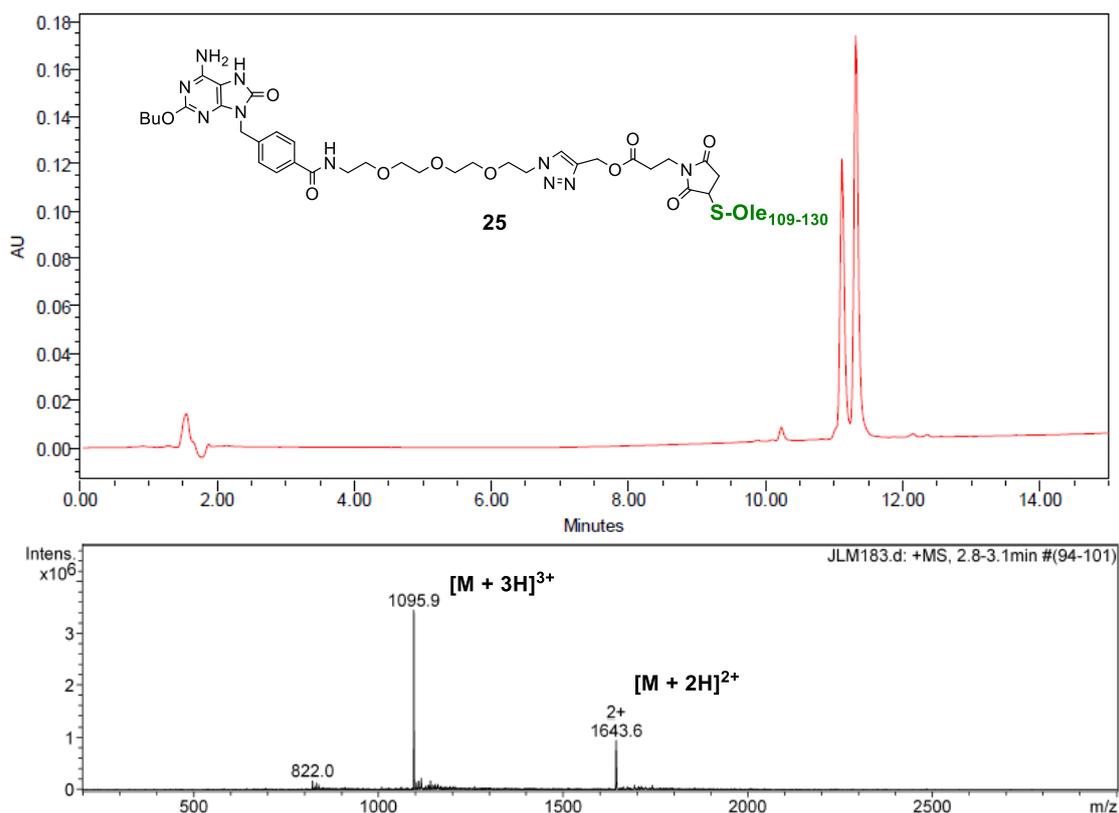


Figura 4.17. Cromatograma de RP-HPLC con la aparición de dos señales (arriba) y espectro de ESI-MS (abajo) del conjugado **25**.

Estos resultados ponen de manifiesto la formación de dos conjugados con el mismo peso molecular durante el transcurso de la reacción, así como idénticos espectros de absorción para ambas señales, lo que sugiere la formación de estereoisómeros. Como se comentó previamente, la reacción tiol-eno para la conjugación de tioles a maleimidias tiene lugar mediante una adición de tipo Michael, en la que se produce un ataque nucleófilo de un tiolato al doble enlace de la maleimida. Esta adición no es enantioselectiva ya que no hay ningún tipo de inducción asimétrica (como un catalizador quiral). Es decir, el tiolato se adiciona de forma inespecífica por ambas caras del doble enlace de la maleimida. Concretamente, debido a la estructura de la maleimida, en el carbono en el que se produce la adición, se genera un centro quiral. Los protones adyacentes a este punto son diastereotópicos. De esta forma se generarían dos enantiómeros en la misma proporción, lo que es conocido como mezcla racémica o racemato, (Figura 4.18) que resulta ópticamente inactivo.¹⁸⁴

¹⁸⁴ Jacques, J.; Collet, A.; Wilen, S.H.; *Enantiomers, racemates, and resolutions*. **1981**, New York: Wiley.

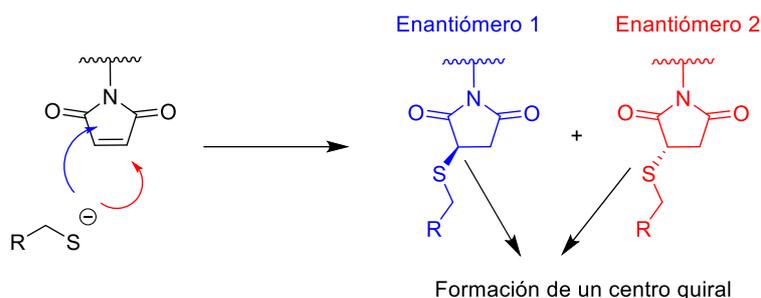


Figura 4.18 Representación del ataque nucleófilo de un tiolato al doble enlace de la maleimida, en la que se generan los dos enantiómeros equimolecularmente (racemato).

Sin embargo, en el caso de que el tiol sea quiral, como es el caso de un péptido con una cisteína terminal, no se formaría un racemato, sino una mezcla de epímeros que son diastereoisómeros.

Los diastereoisómeros, a priori,¹⁸⁵ pueden ser separados por cromatografía. De hecho, en un trabajo reciente del grupo de Geyer, se estudió la adición tiol-eno entre maleimidias y péptidos en el que demuestra la formación de estos epímeros. En este estudio, también proponen procesos mediados por equilibrios de epimerización, así como la separación de estos epímeros por RP-HPLC.¹⁸⁶ (Figura 4.20)

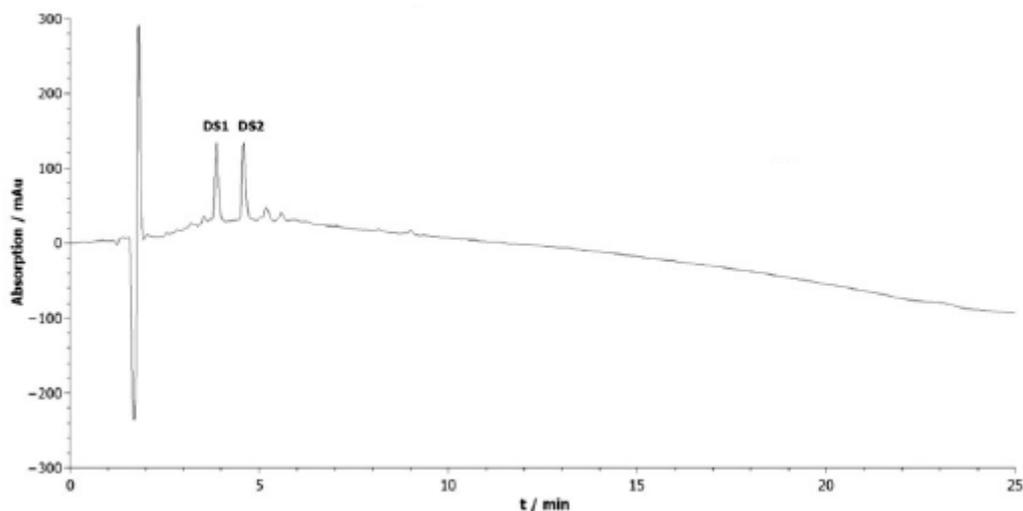


Figura 4.20. Cromatograma de RP-HPLC, en el que se observa la separación de los dos epímeros (DS1 y DS2). Figura extraída de la referencia 186.

¹⁸⁵ Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; *Organic Chemistry, 2th Edition*, **2012**, Oxford University Press, 1112.

¹⁸⁶ Lenz, S.; Horx, P.; Geyer, A.; *J. Pep. Sci.* **2018**, *24*, e3075.

A la vista de estos antecedentes y con los datos que disponíamos parecía claro que las dos señales observadas en el cromatograma de la Figura 4.17 se correspondían con los dos epímeros del conjugado **25**. Cabe destacar que este conjugado fue el único con el que se consiguió visualizar la separación de sus epímeros de toda la presente Tesis Doctoral. Este hecho se puede atribuir a la secuencia particular del péptido, que puede originar interacciones con el relleno de la columna cromatográfica, favoreciendo esta separación. Los epímeros de péptidos que solamente difieren en la disposición espacial de uno de sus centros quirales, no varían significativamente las propiedades físico-químicas del conjugado, aumentando así la dificultad de la separación cromatográfica.¹⁸⁷ Estos inconvenientes implican que la resolución de epímeros de péptidos constituye todo un desafío en el que actualmente se sigue realizando una intensa investigación.^{188,189}

En este estudio de conjugación del ligando derivado de la 8-oxoadenina **22** a tres péptidos diferentes, se ha demostrado la versatilidad de esta estrategia sintética y el potencial que tiene para el desarrollo de nuevas terapias basadas en AIT frente a diferentes alergias en función del tipo de péptido elegido.

4.6 Evaluación biológica de los conjugados péptido-8-oxoadenina

Una vez sintetizados y caracterizados los conjugados de los diferentes péptidos alérgicos, se procedió a su evaluación biológica para determinar su capacidad de mediar en el trastorno de enfermedades alérgicas a través de la modulación del sistema inmune. Estas evaluaciones biológicas se realizaron mediante colaboraciones con distintos grupos de investigación. Estos ensayos se realizaron siguiendo el mismo procedimiento que para los conjugados de TLR4 (Capítulo 3).

La evaluación biológica de los conjugados del alérgeno del pescado (**24**) y del olivo (**25**) se está llevando a cabo actualmente. Los estudios que están más avanzados se corresponden con el conjugado del péptido del alérgeno de melocotón (Pru p 3) **23**, que

¹⁸⁷ Zhang, B.; Soukup, R.; Armstrong, D.W.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1053*, 89-99.

¹⁸⁸ Li, G.; DeLaney, K.; Li, K.; *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5038.

¹⁸⁹ Du, S.; Readle, E.R.; Wey, M.; Armstrong, D.W.; *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 1537-1540.

se han realizado en el grupo de alergología de la Dra. Cristobalina Mayorga del Hospital Regional Universitario de Málaga.

En primer lugar, se llevaron a cabo experimentos de internalización del conjugado **23** en moDCs. Para ello, el conjugado **23** fue marcado fluorescentemente en la región del péptido por medio del reactivo comercial Alexa fluor 647. Con el compuesto marcado, se analizó la interacción e internalización con las moDCs usando citometría de flujo y microscopía confocal. Los resultados de los estudios de citometría de flujo indicaron que el conjugado **23** fue internalizado por las moDCs de una manera dependiente del tiempo (Figura 4.21)

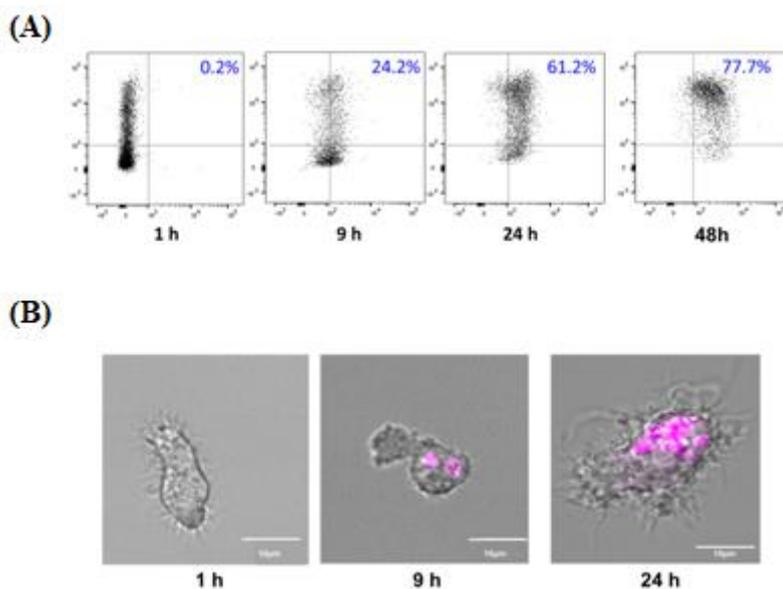
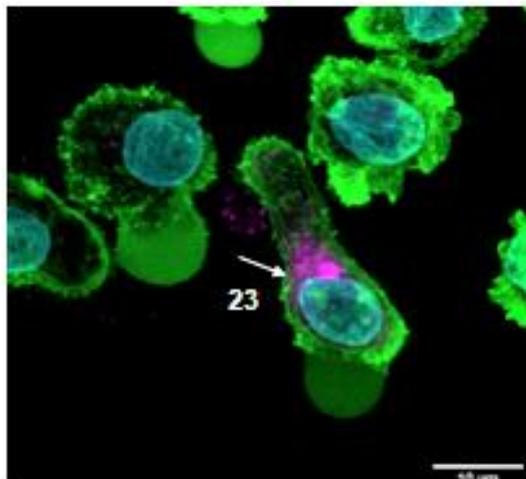


Figura 4.21. A) Gráficos de citometría de flujo a diferentes tiempos que muestran los porcentajes del conjugado **23** captado por las moDC CD86+. B) Imágenes confocales de las moDCs incubadas con el conjugado **23** (10 nM) a diferentes tiempos (de 1h a 24h). Los datos son consistentes con el análisis de citometría de flujo, que muestra el conjugado **23** marcado (en rosa) prácticamente sin internalización en la primera hora de la incubación, aumentando en las horas siguientes.

En estos estudios se observa que no hay internalización efectiva hasta las 9 h, esto se puede explicar debido a que como se ha comentado previamente, TLR7 es un receptor intracelular, por lo tanto, la internalización no es dependiente del receptor, como ocurría en el caso del TLR4, y tiene lugar mediante otros mecanismos como la endocitosis, siendo un proceso más lento.

La captación del conjugado continuó aumentando hasta las 48 horas. Mediante microscopía confocal y la tinción de diferentes estructuras intracelulares se pudo

visualizar el proceso de internalización del compuesto **23** y su co-localización con dichas estructuras. (Figura 4.22)



48 h

Figura 4.22. Imagen confocal a las 48 h que muestra diversas regiones celulares y el conjugado **23** internalizado (rosa). La actina de la submembrana se tiñó con Atto 488-faloidina (verde) y los núcleos con Hoechst (azul).

Estos estudios demuestran que el conjugado **23** es internalizado por parte de las moDCs y se localiza en la zona perinuclear, cerca del aparato de Golgi, ya que hay un alto tráfico de formación de vesículas, entre ellas los endosomas que es donde se expresa el TLR7.

A continuación, se analizó el efecto de este conjugado en el proceso de maduración de las DCs, a través de marcadores como son moléculas co-estimuladoras y citoquinas.

En estos ensayos se evaluaron el péptido alergénico (**Pp3**); la estructura de la 8-oxoadenina **20** (**TLR7_{lig}**); el conjugado **23** (**TLR7_{lig}-Pp3**); y la combinación del ligando **20** y el péptido **Pp3** sin estar unidos covalentemente (**TLR7_{lig}+Pp3**). Esta nomenclatura se utilizará de ahora en adelante para una mayor sencillez. (Figura 4.23)

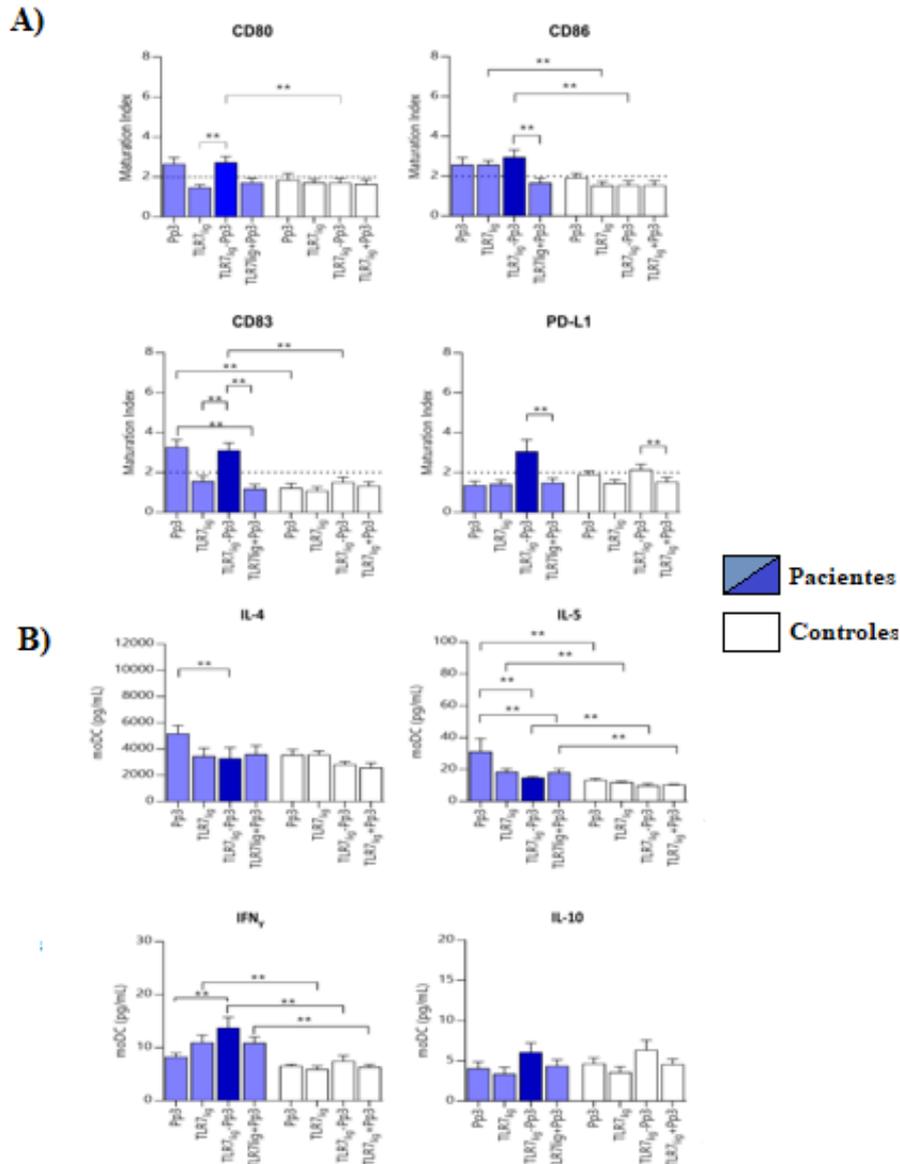


Figura 4.23. Las barras representan la mediana y el error estándar de la media del índice de maduración (A) para los diferentes marcadores de superficie en las moDCs (CD80 y CD86) y marcadores de expresión de activación/regulación (CD83 y PD-L1, respectivamente); (B) de la producción de citoquinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IFN γ), en los sobrenadantes de los ensayos de las moDCs para **Pp3**, **TLR7_{lig}**, **TLR7_{lig}-Pp3** y **TLR7_{lig}+Pp3** de pacientes alérgicos (n = 9) y controles (n = 9) a 10 nM. La prueba U de Mann-Whitney se usó para comparaciones por pares entre grupos no relacionados y la prueba de rango con signo de Wilcoxon se usó para comparaciones por pares en muestras relacionadas, mostrando diferencias significativas como **, (p < 0.0125, corrección de Bonferroni). La línea de puntos representa el índice de maduración > 2.

Para confirmar la maduración de las moDCs se analizaron los marcadores de superficie (CD80 y CD86). **TLR7_{lig}-Pp3** induce niveles significativos de estos marcadores en

pacientes alérgicos comparados con los controles. También se realizó esta comparación para los marcadores de expresión de activación/regulación (CD83 y PD-L1, respectivamente), en el que se refleja un aumento significativo de ambos por parte de **TLR7_{lig}-Pp3**. De este análisis también se concluye que la estructura de la 8-oxoadenina es capaz de inducir la maduración de las moDCs, ya que el compuesto **TLR7_{lig} (20)** estimula la secreción de CD86 únicamente en pacientes alérgicos. (Figura 4.23A) Este hecho, recogido en la bibliografía anteriormente, demuestra que es posible la activación de DCs provenientes de individuos alérgicos por medio de ligandos sintéticos de TLR sin llevar alérgenos conjugados.¹⁹⁰

Adicionalmente, también se demuestra que el péptido Pru p 3 conjugado estimula la expresión del marcador CD83 en pacientes alérgicos, según lo observado para **TLR7_{lig}-Pp3**, cosa que no ocurre con el ligando TLR sin péptido. Además, esto se confirmó por el hecho de que el péptido **Pp3**, incluido como control, también indujo un aumento significativo de la expresión de CD83 en pacientes alérgicos en comparación con los controles.

Por otro lado, se estudió el efecto de la unión entre el ligando y el péptido tanto unidos de forma covalente (**TLR7_{lig}-Pp3**) como administrados de forma conjunta pero no unidos covalentemente (**TLR7_{lig}+Pp3**). Los datos mostraron que **TLR7_{lig}-Pp3** condujo a un aumento significativo de los marcadores CD83, CD86 y PD-L1 en comparación con la estimulación provocada con **TLR7_{lig}+Pp3** (Figura 4.23A). Estos resultados indican que la unión covalente entre el ligando y el péptido es esencial para inducir una respuesta significativa. (Figura 4.24)

¹⁹⁰ Goff, P. H; *et al.*; *J. Virol.* **2015**, 89, 3221-3235.

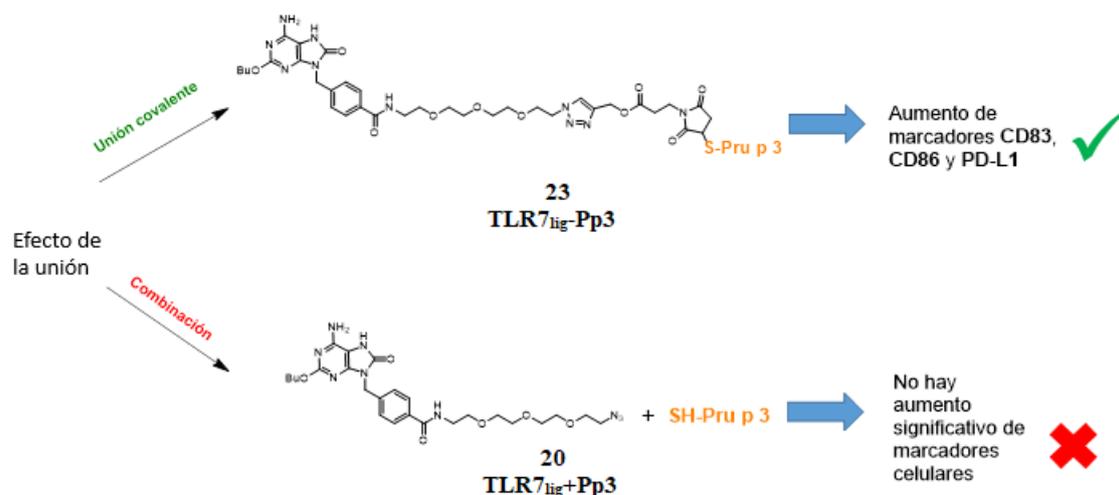


Figura 4.24. Representación de los efectos que inducen en las moDCs el ligando de 8-oxoadenina y el péptido Pru p 3 (unidos covalentemente o combinados) en la expresión de marcadores celulares.

Por lo tanto, este conjugado **23** activa, regula y madura la expresión de los marcadores de superficie de las moDCs, siendo estas células esenciales para iniciar la respuesta inmune, lo que demuestra la importancia de la activación de TLR7 en este proceso.

Para estudiar el patrón de respuesta durante la maduración de las moDCs después de la incubación con **TLR7_{lig}-Pp3**, se midió la liberación de citoquinas en el sobrenadante del cultivo. (Figura 4.23B) En el análisis de las células procedente de pacientes alérgicos, en comparación con los controles, se observó aumentos significativos de IL-5 e IFN γ para todas las estructuras que incorporaban la 8-oxoadenina (**TLR7_{lig}**, **TLR7_{lig}-Pp3** and **TLR7_{lig}+Pp3**). Además, no se observaron diferencias en la inducción de la producción de IL-10 en pacientes alérgicos en comparación con los controles para cualquiera de las estructuras probadas. Tampoco se observaron diferencias en la producción de citoquinas después de la estimulación con **TLR7_{lig}-Pp3** y **TLR7_{lig}+Pp3**.

Curiosamente, se observó que la estructura **TLR7_{lig}-Pp3** (**23**) indujo niveles significativamente más bajos de IL-4 e IL-5, y niveles más altos de IFN γ en comparación con **Pp3**, solo en pacientes alérgicos, lo que indica la capacidad inmunomoduladora específica de este compuesto. Estos resultados son consistentes con la bibliografía, ya que se ha relacionado la activación de TLR7 por parte de ligandos con un aumento de los niveles de IFN γ .¹⁹¹ Por lo tanto, estos datos indican que la estimulación con **TLR7_{lig}-Pp3**

¹⁹¹ Chan, M.; *et al.*; *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1194-1200.

(23) da lugar a la maduración de las moDCs (CD83) acompañada de una disminución del patrón T_H2 (IL-4 e IL-5) y un aumento del patrón T_H1 (producción de $IFN\gamma$). Estos resultados sobre la modulación de la respuesta inmune hacen de este conjugado **TLR7_{lig}-Pp3 (23)** un prometedor candidato para inmunoterapia AIT.

Una vez que el compuesto **TLR7_{lig}-Pp3** fue captado por las moDCs, afectando a su activación y maduración, se estudió la influencia en los siguientes pasos de la respuesta inmunológica, donde las moDCs maduras presentan el alérgeno a los linfocitos T_H . Para ello, se determinó la proliferación de linfocitos utilizando moDCs homólogas pre-estimuladas con los ligandos sintetizados y se analizó el perfil de la respuesta en términos de producción de citoquinas. Se estudiaron diferentes subpoblaciones de linfocitos T (CD3+, CD4+ y CD8+), linfocitos B (CD19+) y linfocitos NK (CD56+) implicados en dar forma a las respuestas inmunológicas de diferente manera.

En estos estudios se pudo observar que en el caso del conjugado **TLR7_{lig}-Pp3 (23)** se produjo un aumento significativo de la proliferación de células T CD3+ en pacientes alérgicos en comparación con los controles tolerantes. (Figura 4.25A) No se encontró diferencia en la respuesta proliferativa para otras subpoblaciones como células B y células NK entre las muestras de pacientes alérgicos y controles, ya que la proliferación de esa subpoblación celular fue negativa (índice de proliferación <2). En comparación con el resto de compuestos evaluados, se encontró que **TLR7_{lig}-Pp3** indujo una respuesta proliferativa específica de células T CD3+ frente a **TLR7_{lig}** y **TLR7_{lig}+Pp3** (Figura 4.25A). Estos resultados sugieren que **TLR7_{lig}-Pp3** induce una respuesta proliferativa específica de linfocitos T para **Pp3**.

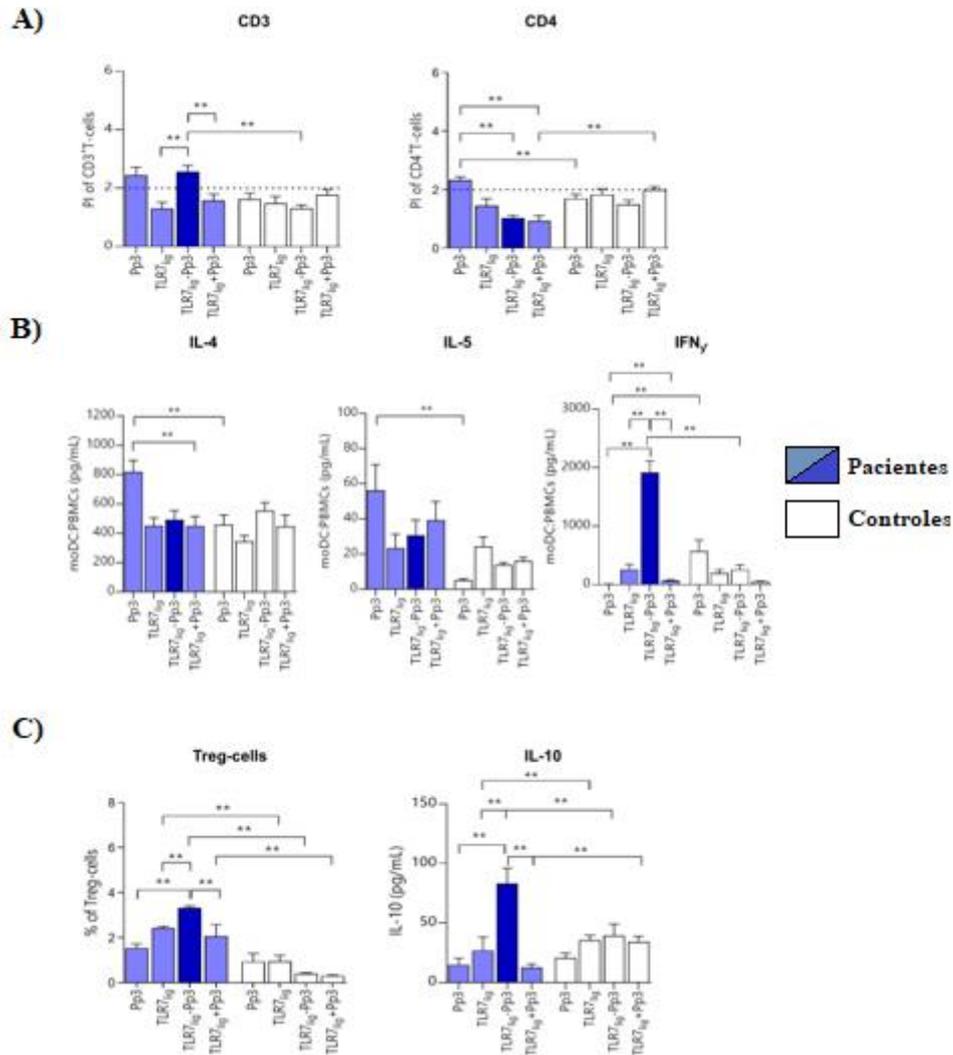


Figura 4.25. Las barras representan la mediana y el error estándar de la media de (A) índice de proliferación (PI) de las células T (CD3+ y CD4+), (B) producción de citoquinas (IL-4, IL-5 e IFN γ) en los sobrenadantes del ensayo de proliferación de linfocitos y (C) de los porcentajes de células Treg y la producción de IL-10 para **Pp3**, **TLR7_{lig}**, **TLR7_{lig}-Pp3** y **TLR7_{lig}+Pp3** de pacientes alérgicos (n= 9) y controles (n= 9) a 10 nM. La prueba U de Mann-Whitney se usó para comparaciones por pares entre grupos no relacionados y la prueba de rango con signo de Wilcoxon se usó para comparaciones por pares en muestras relacionadas, mostrando diferencias significativas como **, (p < 0.0125, corrección de Bonferroni). La línea de puntos representa el PI > 2.

En cuanto al perfil de citoquinas producido durante la respuesta proliferativa, los resultados mostraron que **TLR7_{lig}-Pp3** (23) daba lugar a una disminución del nivel de IL-4 e IL-5, en comparación con el péptido Pp3 únicamente, así como un aumento muy significativo de IFN γ (Figura 4.25B). Este resultado, como se ha comentado previamente, está relacionado con la activación de TLR7. Estas modificaciones, únicamente

encontradas para las muestras de pacientes alérgicos, indicaron que este compuesto que combina el péptido alergénico y el adyuvante, tenía la capacidad de modular la respuesta T_{H2} de manera específica, siendo un resultado muy prometedor para el desarrollo de vacunas en alergia.

Animados por estos interesantes resultados, se decidió investigar más a fondo la capacidad de las moDCs tratadas con **TLR7_{lig}-Pp3** a la hora de inducir células Treg. Para ello, se realizaron experimentos de co-cultivo y se analizaron los porcentajes de células Treg producidas. Tras el correspondiente análisis, estos resultados indicaron un aumento significativo en el porcentaje de células Treg, así como en la producción de IL-10. (Figura 4.25C) Estos resultados son de especial relevancia, ya que se ha descrito en modelos animales, que el uso de ligandos para TLR7, pueden reducir las respuestas alérgicas tipo T_{H2} por medio de la secreción de IL-10.^{192,193}

Todos estos ensayos sugieren que las moDCs activadas por **TLR7_{lig}-Pp3 (23)** promueven la presentación del alérgeno y generan una respuesta inmunológica específica con un patrón inmunológico de tipo T_{H1} / Treg y la supresión de las células efectoras T_{H2}. Por lo tanto, estos resultados tan prometedores son un buen punto de partida para estudios *in vivo* usando este compuesto conjugado en AIT como vacuna frente a enfermedades alérgicas.

Estos estudios se realizaron simultáneamente con el ligando de TLR4 (**11**) (ver Capítulo 3). En este sentido, parecía interesante evaluar si el efecto inmunológico encontrado para cada uno de estos compuestos, **TLR4_{lig}-Pp3 (11)** y **TLR7_{lig}-Pp3 (23)**, se potenciaría de forma sinérgica usando ambos compuestos de forma combinada para estimular simultáneamente TLR4 y 7. En la bibliografía ya existe algún ejemplo significativo de esta estimulación simultánea de dos receptores TLR. En concreto, se ha demostrado que la estimulación simultánea con agonistas de TLR2 y TLR4 podría ser crítica para la inducción de las respuestas inmunes específicas, aumentando la maduración de las moDCs y la proliferación de células T.¹⁹⁴

Para evaluar la posible existencia de un efecto sinérgico, se realizó un estudio adicional analizando los mismos marcadores, en el que se compararon los efectos producidos por

¹⁹² Quarcoo, D.; *et al.*; *Clin. Exp. Allergy*. **2004**, *34*, 1314-1320.

¹⁹³ Sel, S.; *et al.*; *J. Immunol.* **2007**, *178*, 7805-7813.

¹⁹⁴ Sanchez-Quintero, M. J.; *et al.*; *PLoS One*, **2013**, *8*, e74198.

TLR4_{lig}-Pp3 (11), TLR7_{lig}-Pp3 (23) y TLR4_{lig}-Pp3+TLR7_{lig}-Pp3 (la combinación de los dos anteriores). (Figura 4.26)

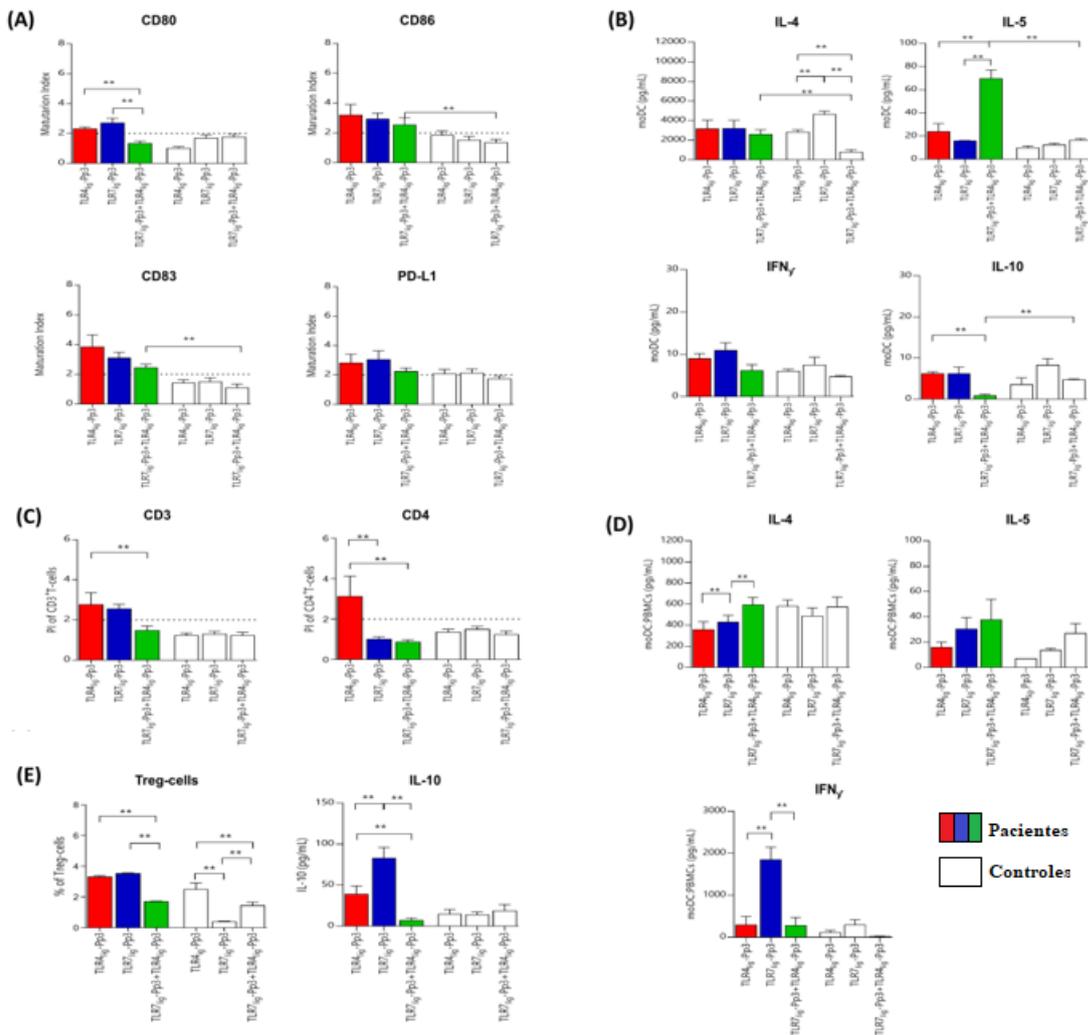


Figura 4.26. Las barras representan la mediana y el error estándar de la media del índice de maduración (A) para los diferentes marcadores de superficie en moDC (CD80 y CD86) y marcadores de expresión de activación/regulación (CD83 y PD-L1, respectivamente); (B) y de la producción de citoquinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IFN_γ) en los sobrenadantes de los ensayos de las moDCs; (C) índice de proliferación (PI) de las células T (CD3⁺ y CD4⁺), (D) de la producción de citoquinas (IL-4, IL-5 e IFN_γ) en los sobrenadantes del ensayo de proliferación de linfocitos (E) de los porcentajes de células Treg y la producción de IL-10 para las combinaciones de conjugados de pacientes alérgicos (n = 9) y controles (n = 9) a 10 nM. La prueba U de Mann-Whitney se usó para comparaciones por pares entre grupos no relacionados y la prueba de rango con signo de Wilcoxon se usó para comparaciones por pares en muestras relacionadas, mostrando diferencias significativas como **, (p < 0.016, corrección de Bonferroni). La línea de puntos representa el PI > 2.

Los resultados encontrados al estudiar esta combinación de conjugados indicaban claramente un efecto opuesto, ya que la combinación de **TLR7_{lig}-Pp3+TLR4_{lig}-Pp3** disminuyó la maduración de las moDCs con respecto a la producida por cada compuesto por separado, siendo significativa para CD80. Adicionalmente, se observó un aumento de la producción de IL-5 y la disminución de IL-10 solo en pacientes alérgicos (Figura 4.26A-B), así como también hubo una disminución significativa de la producción de IL-4 en los controles tolerantes.

En cuanto al efecto de estas interacciones con las moDCs sobre la respuesta proliferativa de las células T, B y NK (Figura 4.26C), los resultados son consistentes con los de maduración de las moDCs, ya que también hubo una disminución en comparación con la proliferación inducida por los ligandos cuando estos se incubaron por separado, con un aumento significativo de la producción de IL-4 y una disminución del nivel de IFN γ (Figuras 4.26C-D). En resumen, se observa que la combinación de ligandos TLR disminuye el perfil inmunológico asociado a la respuesta de tipo T_H1. De manera similar, cuando analizamos el patrón regulador (Figura 4.26E), observamos una disminución significativa de los porcentajes de Treg, así como de la producción de IL-10 en respuesta a la combinación de **TLR7_{lig}-Pp3+TLR4_{lig}-Pp3** en comparación con cada conjugado. Todos estos resultados demostraron inequívocamente que la combinación de los conjugados de TLR4 (**11**) y TLR7 (**23**) neutralizaron los efectos individuales de los mismos, siendo esta combinación poco efectiva. Una posible explicación a este resultado podría basarse en los diferentes mecanismos y tiempos de acción de ambos ligandos y que los efectos producidos a diferentes tiempos puedan influir negativamente uno sobre el otro, aunque es necesario hacer más estudios en este sentido para comprender las bases moleculares de estos procesos tan complejos.

Capítulo 5

Combinaciones de ligandos de TLR4 y TLR7 conjugados con alérgenos y estudio de su actividad biológica

5. Combinaciones de ligandos de TLR4 y TLR7 conjugados con alérgenos y estudio de su actividad biológica

5.1 Introducción

En las últimas dos décadas se ha desarrollado una gran actividad en torno a los TLRs. Durante estos años, las investigaciones han ido abordando diferentes aspectos: descubrimiento de nuevos TLRs y sus ligandos, determinación de sus estructuras moleculares, mecanismos de activación, cascadas de señalización, etc.¹⁹⁵ A medida que se conocía más información acerca de estos receptores, se generaban nuevas cuestiones, por ejemplo, qué ocurre cuando se activaban distintos receptores simultáneamente. Debido a la gran similitud estructural que tienen algunos TLRs, por ejemplo, TLR7 y TLR8 (Capítulo 4), estos receptores pueden compartir el mismo ligando, como es el caso del Resiquimod, un ligando tanto para TLR7 como TLR8. De esta forma, el mismo ligando puede activar de forma independiente dos receptores distintos, lo que apunta a una posible redundancia en la actividad de estos dos receptores.¹⁹⁶

En un estudio de 2008, se evaluó la exposición simultánea y secuencial de diferentes ligandos de TLRs, tanto *in vitro* como *in vivo* (en ratones). Ese estudio preliminar constató que, a pesar de las diferentes vías de activación de esta familia de receptores, se observaba incrementos en la expresión de citoquinas, dando lugar a un efecto sinérgico, es decir, la cooperación entre diferentes tipos de TLRs, potenciando sus efectos. Por otro lado, en la bibliografía hay descritos numerosos ejemplos en los que se observa el efecto contrario, la activación de varios TLRs que conlleva la secreción de citoquinas que se contrarrestan unas con otras, dando lugar a una inhibición en su actividad.¹⁹⁷

Sin embargo, es importante remarcar que todo el sistema de defensa basado en los TLRs está dirigido claramente a la lucha contra patógenos. La estimulación sinérgica de TLRs es probablemente lo que sucede realmente, ya que los patógenos pueden contener diversos PAMPs que interaccionan con los correspondientes TLRs que se encuentran en diferentes

¹⁹⁵ Jiménez-Dalmaroni, M.J.; Gerswhin, M.E.; Adamopoulos, I.E.; *Autoimmun. Rev.* **2016**, *15*, 1-8.

¹⁹⁶ Heil, F.; *et al.*; *Science* **2004**, *303*, 1526-1529.

¹⁹⁷ Theiner, G.; *et al.*; *Mol. Immunol.* **2008**, *45*, 244-252.

localizaciones celulares. Por ejemplo, se ha descrito que componentes del *virus herpes simplex* son reconocidos por TLR2 y 9, estimulando respuestas sinérgicas en la lucha contra este virus.¹⁹⁸ Estos componentes virales corresponden a glicoproteínas¹⁹⁹ de su envoltura viral que son PAMP de TLR2 y su ADN que es un PAMP de TLR9.

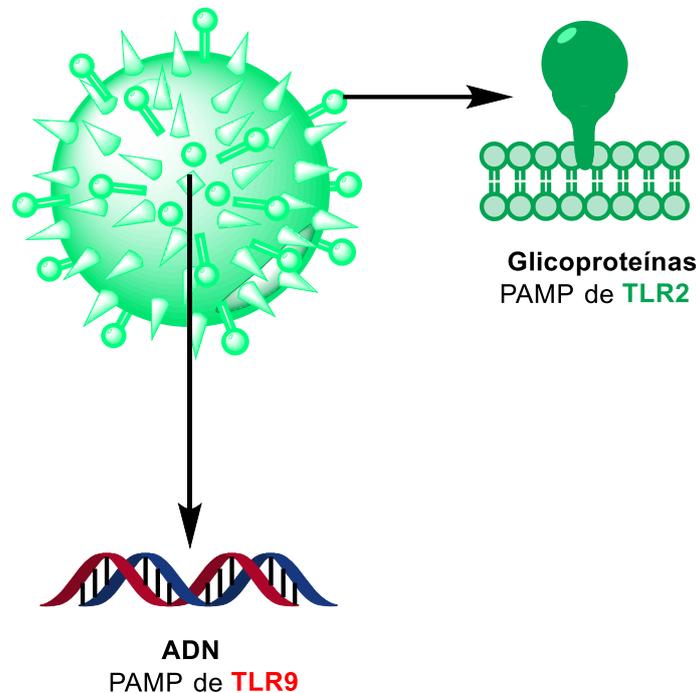


Figura 5.1 Representación del *virus herpes simplex* que contiene PAMPS reconocidos por TLR2 y 9.

Por otro lado, se ha estudiado el efecto de agonistas del receptor TLR2 con otros PAMPs, por ejemplo, con el ARN bicatenario (un intermedio en la replicación viral) como PAMP de TLR3. En un trabajo del grupo de Hirsch, se estudió el efecto de los agonistas de estos receptores en una línea celular de macrófagos de ratón. Se observó que, en comparación con la estimulación de los agonistas por separado, la estimulación de macrófagos con ambos ligandos (ya sea de forma simultánea o secuencial) dio lugar a la expresión sinérgica de mediadores inflamatorios.²⁰⁰

En la línea de estas investigaciones, se puso de manifiesto que, en función de las concentraciones de los agonistas individuales, estos tienen diferentes umbrales de inducción. Este descubrimiento tiene un claro sentido biológico ya que la presentación de

¹⁹⁸ Sørensen, L.N.; Reinert, L.S.; Malmgaard, L.; Bartholdy, L.; Thomsen, A.R.; Paludan, S.R.; *J. Immunol.* **2008**, *181*, 8604-8612.

¹⁹⁹ Leoni, V.; Gianni, T.; Salvioli, S.; Campadelli-Fiume, G.; *J. Virol.* **2012**, *86*, 6555-6562.

²⁰⁰ Ilijevski, V.; Hirsch, E.; *Biol. Reprod.* **2010**, *83*, 767-773.

antígenos promueve adicionalmente la generación de células efectoras potencialmente dañinas y, por lo tanto, este mecanismo debe ser mantenido bajo un estricto control. Por ello, la estimulación sinérgica de TLRs puede representar un “código de seguridad” combinatorio (dos productos microbianos presentes en diferentes compartimentos celulares) que asegura que una potente respuesta del sistema inmune solo se generará frente a una peligrosa invasión de un patógeno.²⁰¹

Como se ha comentado en capítulos anteriores, debido al tardío descubrimiento de los TLRs, muchos fármacos utilizados frente a una amplia gama de enfermedades resultaron tener interacción con dichos receptores sin conocerlo previamente. Algo parecido ocurrió con el efecto sinérgico entre los TLRs. Por ejemplo, la vacuna de la fiebre amarilla (YF-17D) es considerada una de las vacunas más eficaces de la historia, siendo ampliamente usada desde hace más de 65 años con una tasa de protección mayor del 98%. En muchos pacientes se han encontrado anticuerpos neutralizantes hasta 35 años después de haber recibido una sola dosis de la vacuna.²⁰² Esta protección no se genera únicamente mediante anticuerpos, también se ha demostrado que esta vacuna es un potente inductor de células T citotóxicas.²⁰³ Esta vacuna está basada en una cepa del propio virus atenuado;²⁰⁴ sin embargo, a pesar de la eficacia de esta vacuna para controlar la fiebre amarilla, los mecanismos moleculares y celulares involucrados en esta inmunización no estaban del todo claros. En un interesante estudio del grupo de Pulendran, publicado en 2006, se demuestra que esta vacuna YF-17D estimula a las DCs a través de la activación de 4 receptores, TLR2, 7, 8 y 9, provocando la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias, IL-12p40, IL-6 e IFN- α .²⁰⁵ Las respuestas inmunitarias adaptativas resultantes se caracterizaron por una mezcla del perfil de citoquinas de células colaboradoras TH1 y TH2, así como de células T CD8+ específicas de antígeno. El estudio se llevó a cabo con ratones con diversas modificaciones, entre ellas, un grupo que no presentaba la proteína accesoria MyD88, asociada a la activación de todos los TLRs excepto TLR3.²⁰⁶ También se utilizó un grupo de ratones que no expresaban el receptor TLR2. De esta forma y con

²⁰¹ Napolitani, G.; Rinaldi, A.; Bertoni, F.; Sallusto, F.; Lanzavecchia, A.; *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 769–776.

²⁰² Poland, J.D., C.H. Calisher, T.P. Monath, W.G. Downs, and K. Murphy; *Bull. World Health Organ.* **1981**, *59*, 895-900.

²⁰³ Co, M.D.; Terajima, M.; Cruz, J.; Ennis, F.A.; Rothman, A.L.; *Virology* **2002**, *293*, 151-163.

²⁰⁴ Norrby, E.; *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 2779-2784.

²⁰⁵ Querec, T.; *et al.*; *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 413-424.

²⁰⁶ Yamamoto, M.; *et al.*; *Science* **2003**, *301*, 640-643.

el conocimiento del perfil de citoquinas generado por la activación de un TLR en concreto, se consiguió realizar la identificación de los TLRs implicados. Además, distintos TLRs parecen controlar diferencialmente el equilibrio T_H1/T_H2 . Mientras ratones deficientes de la proteína MyD88 muestran un profundo deterioro de las citoquinas asociadas a T_H1 , los ratones deficientes de TLR2 muestran respuestas T_H1 muy mejoradas. Estos estudios demuestran el potencial de las estrategias de vacunación que utilizan combinaciones de diferentes ligandos TLR para estimular respuestas inmunes polivalentes.

5.2. Combinación covalente de agonistas de TLR

El efecto sinérgico en el ámbito de los receptores TLR aún sigue siendo un campo por explorar, en el que es necesario una profunda investigación. Muchas combinaciones de agonistas de TLR influyen en la señalización inmunitaria con una dependencia tanto del orden como del tiempo en el que se produce la adición.^{207,208}

La comprensión de cómo la disposición espacial de los agonistas presentes en una única estructura afecta la activación de los TLRs y al sistema inmunológico en general, es muy limitada, siendo un factor crítico en la bioconjugación.²⁰⁹ Esto es debido a que la búsqueda de sinergias entre distintos agonistas se ha limitado a la combinación de mezclas de agonistas de TLR en disolución. En la bibliografía se encuentran algunos ejemplos interesantes. Se ha descrito el encapsulamiento del Imiquimod (ligando de TLR7) y el GLA (ligando de TLR4) en un liposoma. Esta encapsulación dio lugar a una potente respuesta de tipo T_H1 , a través de la secreción de IL12p70 e IFN γ en células humanas. Estos marcadores aumentaban su expresión cuando eran activados con el liposoma conteniendo ambos ligandos, en comparación a cuando se probaban los ligandos por separado, demostrándose un claro efecto sinérgico.²¹⁰

Como se ha comentado previamente, la presentación más idónea sería una única molécula que contenga covalentemente unidos los agonistas de TLR. De esta forma, la separación

²⁰⁷ Honda, K.; *et al.*; *Nature* **2005**, *434*, 1035-1040.

²⁰⁸ Ghosh, T. K.; Mickelson, D. J.; Solberg, J. C.; Lipson, K. E.; Inglefield, J. R.; Alkan, S. S. *Int. Immunopharmacol.* **2007**, *7*, 1111-1121.

²⁰⁹ Liu, H.; Irvine, D. J.; *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 791-801.

²¹⁰ Goff, P. H.; *et al.*; *J. Virol.* **2015**, *89*, 3221-3235.

espacial entre ambos ligandos siempre sería constante y se conseguiría un mejor control y reproducibilidad de los efectos sinérgicos. Si los estudios sobre los efectos sinérgicos en la activación de TLRs son escasos, los ejemplos sobre estructuras que tengan dichos ligandos de TLR combinados por medio de enlaces covalentes, son aún más limitados, siendo fundamentalmente aquellos desarrollados por el grupo de Esser-Kahn.

En 2014, este grupo sintetizó una estructura que combinaba covalentemente un fragmento de ADN con motivos CpG no metilados (PAMP de TLR9) y un ácido lipoteicoico, que es uno de los principales componentes de la pared celular de bacterias gram-positivas (PAMP de TLR2), utilizándose un espaciador bifuncional de PEG.²¹¹ (Figura 5.2)

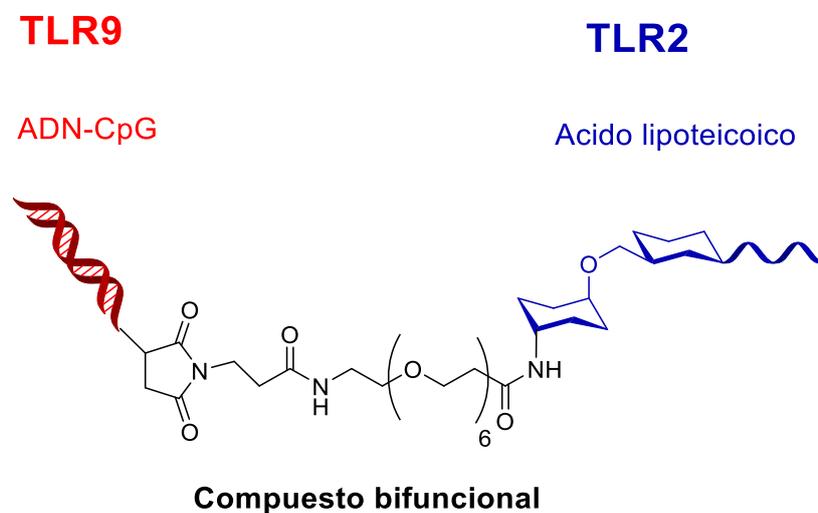


Figura 5.2. Representación de la estructura que combina de forma covalente un ligando de TLR9 y otro de TLR2, a través de un espaciador de tipo PEG.

Este compuesto fue capaz de inducir una producción de citoquinas implicadas en una respuesta de tipo T_H1 significativamente mayor que la simple combinación de los dos ligandos sin unión covalente. Como conclusión, los autores plantean la hipótesis de que una presentación espacial definida de los agonistas altera drásticamente la estimulación de las células dendríticas.

En 2021 se publicó una continuación de este trabajo, ampliando el estudio a más combinaciones de parejas de ligandos TLR, usando la misma estrategia de unión a través de un espaciador de tipo PEG. Con estos dímeros, se realizaron una serie de ensayos *in vitro*, comparando el marcador NF- κ B, así como la expresión del perfil de citoquinas y TNF- α . Estos estudios demostraron la existencia de múltiples factores que afectan en la

²¹¹ Mancini, R. J.; Tom, J. K.; Esser-Kahn, A. P; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 189-192.

actividad de estos sistemas duales, como la cinética de activación inicial, la especificidad del ligando, así como la dosis del agonista. Adicionalmente, también se realizaron estudios sobre el mecanismo de activación de los heterodímeros, sugiriendo que las interacciones ligando-receptor influyen en la cinética transcripcional inicial y, por lo tanto, en la secreción de citoquinas. La respuesta inmune depende de múltiples factores, como interacciones atribuidas a los ligandos que forman los dímeros, la potencia del par agonista, o la vía de señalización que se activa.²¹²

En 2019 se publicó un sistema en el que se combinó simultáneamente de forma covalente tres agonistas para los receptores TLR4, 7 y 9. Como núcleo de unión se escogió un derivado de 1,3,5-triazina.²¹³ (Figura 5.3)

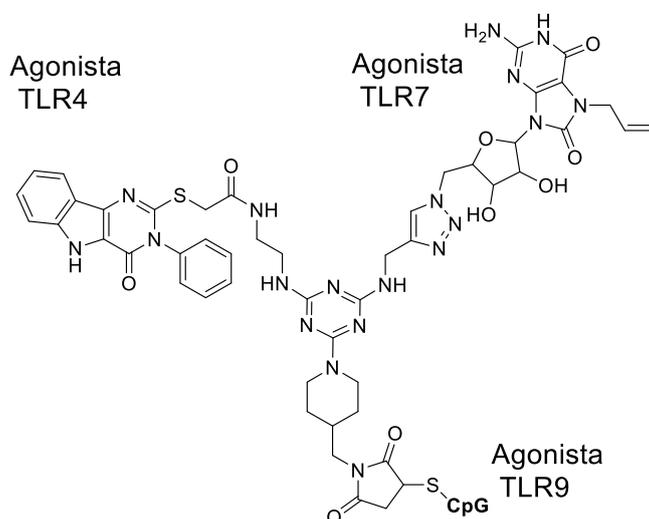


Figura 5.3. Representación del compuesto trifuncional conteniendo ligandos para los receptores TLR4, 7 y 9 en una única estructura.

Esta estructura con tres ligandos, en comparación con sus homólogos dimericos, proporciona una respuesta específica y más equilibrada en los ensayos *in vitro*, cambiando la polarización de la respuesta tipo T_H1 a una más equilibrada T_H1/T_H2 . Este compuesto aumentó la activación del factor de transcripción NF- κ B y dio lugar a una producción mejorada de citoquinas, en contraste con las células tratadas con una mezcla no conjugada de los mismos tres agonistas. El uso de inhibidores de la señalización de TLR y estudios *in vivo* con ratones knock-out confirmaron que esta molécula tri-agonista era capaz de activar múltiples vías de señalización que conducen a la mayor actividad. Para confirmar

²¹² Kimani, F.W.; *et al.*; *ACS Chem. Biol.* **2021**, *16*, 380-388.

²¹³ Albin, T.J.; *et al.*; *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5*, 1137-1145.

que se activaban realmente los TLR correspondientes a los ligandos seleccionados, se realizaron estudios mecanicistas con ratones knock-out de la proteína adaptadora y los correspondientes inhibidores y agonistas de TLRs, para mostrar los receptores específicos y las vías a través de las cuales actuaba el compuesto trifuncionalizado. Adicionalmente, estos autores realizaron estudios de inmunización en un modelo de ratón. Los ratones tratados con los agonistas unidos covalentemente mostraron un aumento en la producción de anticuerpos, en comparación con el tratamiento con estos mismos agonistas por separado. Estos estudios demuestran cómo la activación de múltiples TLRs a través de una estructura con una organización espacial bien definida ayuda a guiar las respuestas inmunes, proporcionando la base para el diseño y desarrollo de vacunas más eficaces.

5.2.1 1,3,5-Triazinas como plataformas

La necesidad de una disposición espacial bien definida de los agonistas de TLR en una estructura única ha demostrado ser un aspecto esencial para obtener una actividad sinérgica en estos compuestos. Para ello, resulta fundamental el estudio de plataformas que permitan la incorporación selectiva y sencilla de estos ligandos de forma controlada. Como se ha demostrado en el trabajo comentado anteriormente, las triazinas constituyen una alternativa muy atractiva para la conjugación de diversas estructuras. Diferentes derivados de triazinas han sido usados ampliamente como herbicidas,²¹⁴ aunque también han demostrado actividad farmacológica como agentes antimicrobianos,²¹⁵ anticancerosos²¹⁶ o antivíricos contra el VIH.²¹⁷

La estructura de la triazina es la de un anillo heterocíclico, análogo al anillo de benceno, pero con tres átomos de carbono reemplazados por átomos de nitrógeno. Los tres isómeros de la triazina se distinguen entre sí por la posición de sus átomos de nitrógeno, 1,2,3-triazina, 1,2,4-triazina y 1,3,5-triazina. (Figura 5.4)

²¹⁴ Ralebitso, T.K.; Senior, E.; van Verseveld, H.W.; *Biodegradation* **2002**, *13*, 11-19.

²¹⁵ Saleh, M.; Abbott, S.; Perron, V.; Lauzon, C.; Penney, C.; Zacharie, B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 945-949.

²¹⁶ Zheng, M.; *et al.*; *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1815-1827

²¹⁷ Xiong, Y.Z.; Chen, F.E.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Pannecouque, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1230-1236.

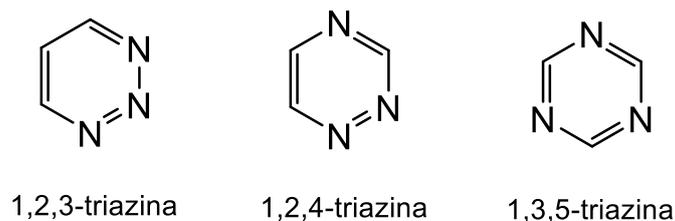
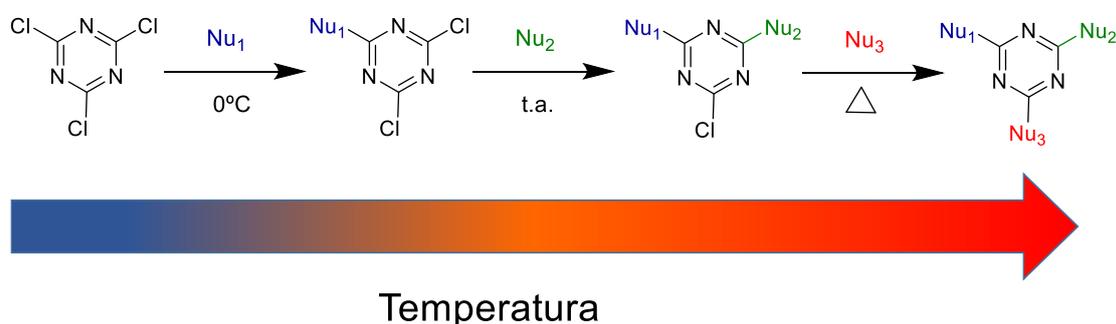


Figura 5.4 Isómeros de la triazina.

Este capítulo se centrará en la 1,3,5-triazina, que presenta átomos de carbono y de nitrógeno alternados en el anillo, siendo este isómero el más interesante desde el punto de vista de la conjugación.

El método más común para obtener derivados de 1,3,5-triazina es a partir de la 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina, también conocido como cloruro cianúrico, un producto de partida de bajo coste.²¹⁸ Esta triazina puede ser fácilmente funcionalizada de forma secuencial mediante el control de la temperatura de reacción. El primer ataque nucleófilo ocurre a 0°C, mientras que el segundo requiere de temperatura ambiente y el tercero necesita de calentamiento.²¹⁹(Esquema 5.1)



Esquema 5.1. Representación del orden de adición nucleófila a partir del cloruro cianúrico con dependencia de la temperatura en la formación de triazinas trisustituidas.

Este control tan marcado en la reactividad se debe a que esta decrece con cada sustitución nucleófila, ya que se produce una ganancia de densidad electrónica en el orbital π , lo que reduce la efectividad de las reacciones de sustitución nucleófila. Es decir, con cada nueva sustitución, el anillo de triazina está cada vez más desactivado y es necesario un incremento de la temperatura. Esto es debido a que las triazinas son funcionalizadas por

²¹⁸ Haval, K. P.; *Synlett*. **2006**, *13*, 2156-2157.

²¹⁹ Sharma, A.; Sheyi, R.; de la Torre, B.G.; El-Faham, A.; Albericio, F.; *Molecules* **2021**, *26*, 864.

medio de reacciones de sustitución nucleófila aromática (S_NAr).²²⁰ Este tipo de reacciones no ocurren en sus homólogos de benceno, debido a las diferentes zonas de densidad electrónica presentes entre estas dos estructuras.²²¹ Los anillos de benceno poseen una alta densidad electrónica distribuida homogéneamente en todos sus carbonos, sin embargo, debido a la estructura del cloruro cianúrico, los átomos de cloro retiran densidad de carga del anillo de triazina. Adicionalmente los átomos de nitrógeno atraen densidad electrónica. Estos efectos electrónicos permiten que las posiciones 2, 4 y 6 del cloruro cianúrico sean susceptibles de participar en reacciones de tipo S_NAr , al formarse regiones de baja densidad electrónica. A medida que se van intercambiando átomos de cloro en la estructura por diferentes sustituyentes, se incrementa la densidad de carga en el anillo de la triazina debido a la pérdida de estos efectos inductivos negativos.²²² (Figura 5.5) Estos efectos electrónicos explican el hecho de que la energía de activación aumente con cada sustitución en el cloruro cianúrico, requiriéndose cada vez mayores temperaturas en cada etapa.^{223,224}

²²⁰ Steffensen, M.B.; Hollink, E.; Kuschel, F.; Bauer, M.; Simanek, E.E.; *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.* **2006**, *44*, 3411-3433.

²²¹ Ugozzoli, F.; Massera, C.; *CrysEngComm* **2005**, *7*, 121-128.

²²² Ramakrishna, S.; Ma, Z.; Matsuura, T.; *Polymer Membranes in Biotechnology: Preparation, Functionalization and Application*, **2011**, London: Imperial College Press.

²²³ Sharma, A.; Sheyi, R.; Kumar, A.; El-Faham, A.; de la Torre, B.G.; Albericio, F.; *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7888-7892.

²²⁴ Blotny, G.; *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9507-9522.

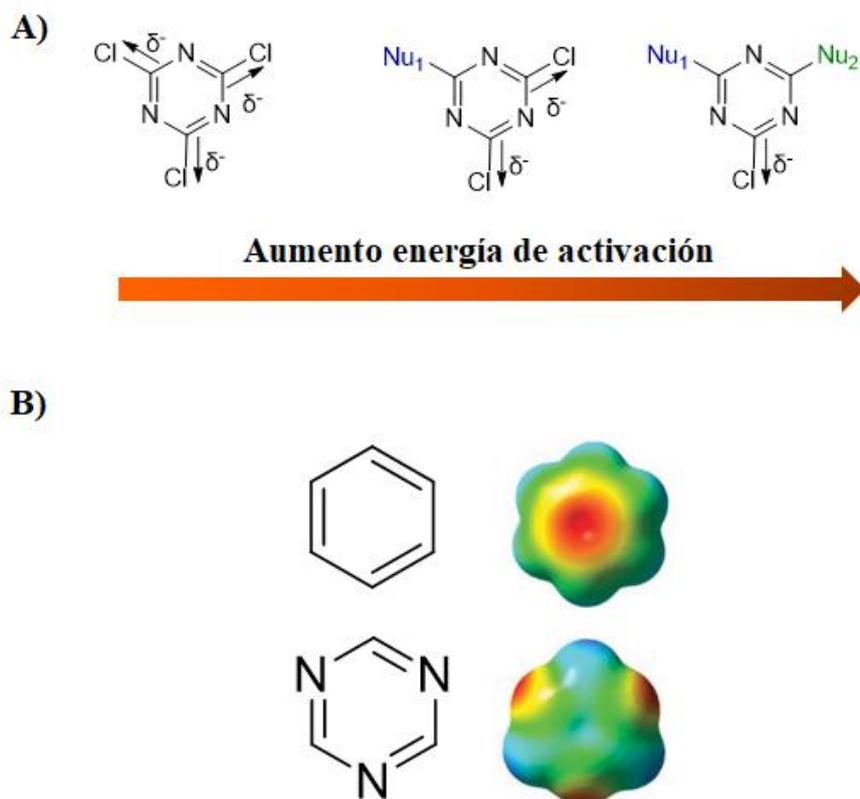


Figura 5.5. A) Efecto del intercambio de los átomos de cloro en la estructura de la tricloro triazina sobre la energía de activación para la S_NAr . **B)** Comparación de las densidades electrónicas del benceno y de la 1,3,5-triazina, a través de la generación de potenciales electrostáticos moleculares. Las regiones rojas corresponden a zonas de alta densidad electrónica y las azules a zonas de baja densidad. Figura modificada de la referencia 221.

Las tres posiciones con átomos de cloro pueden ser intercambiadas por una amplia variedad de nucleófilos ($R-NH_2$, $R-OH$ y $R-SH$); sin embargo, los mejores resultados se obtienen con aminas. Estas características únicas que presenta la triazina facilita la formación de combinaciones entre sustituyentes. De esta forma, el grupo de Albericio acuñó el término de quimioselectividad ortogonal para las triazinas, definida como “la discriminación entre sitios reactivos en cualquier orden”.²²⁵ (Figura 5.6)

²²⁵ Sharma, A.; El-Faham, A.; de la Torre, B.G.; Albericio, F.; *Front. Chem.* **2018**, *6*, 516.

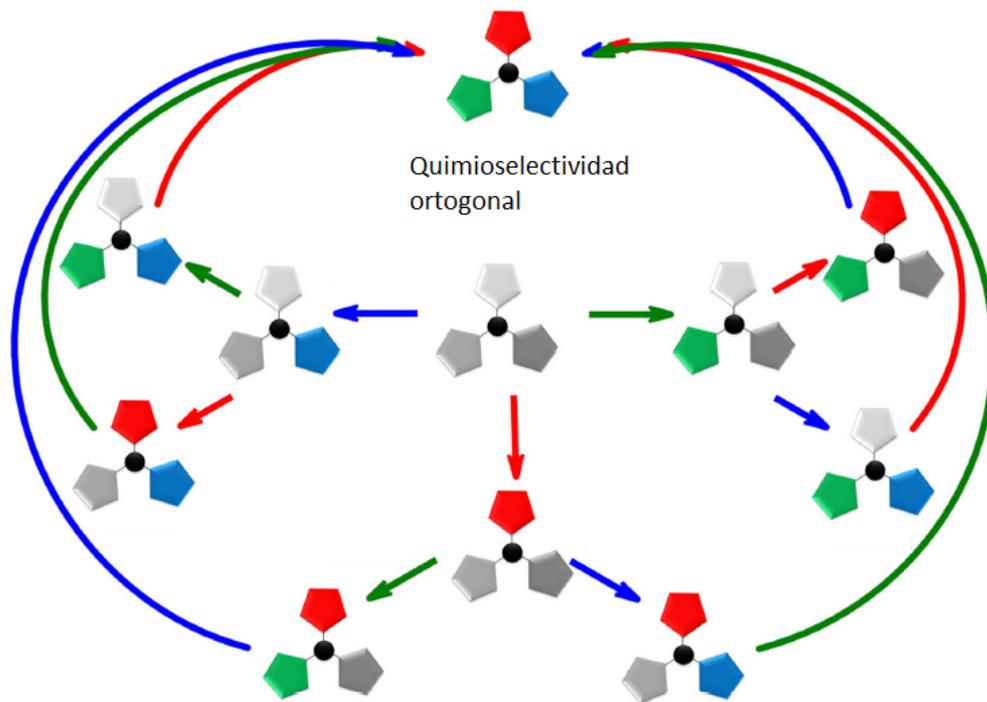


Figura 5.6. Diferentes secuencias posibles en la funcionalización de triazinas, donde el centro negro representa el núcleo de triazina y los pentágonos rojo, verde y azul los diferentes sustituyentes. Figura modificada de la referencia 225.

La versatilidad de estos compuestos los hace idóneos en el diseño de nuevas estructuras que combinen tres elementos distintos simultáneamente de una forma sencilla y elegante.

5.3 Objetivos

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se pretende estudiar los efectos sinérgicos de ligandos para los receptores TLR4 y 7. Para ello, se plantea usar una estructura de 1,3,5-triazina para combinar simultáneamente en un heterodímero ligandos de TLR4 y 7 sintetizados previamente (Capítulo 3 y Capítulo 4, respectivamente) junto al péptido alérgénico Pru p 3-SH (derivado del alérgeno del melocotón). De manera análoga, también se plantea la síntesis de dos estructuras homodiméricas, una con ligandos de TLR4 y la otra de TLR7, conjugados al mismo péptido, combinadas a través de un núcleo de triazina. Estos homodímeros conjugados cumplirían una doble función; por un lado, permitiría comparar si el heterodímero TLR4/7 induce una mejor respuesta a través de efectos sinérgicos; por otro lado, se podría comparar el efecto con respecto a los conjugados “monoméricos” sintetizados previamente y estudiar si esta presentación divalente mejora la respuesta a nivel celular. Estos conjugados diméricos adyuvante-

alérgeno serán evaluados en ensayos *in vitro* mediante colaboraciones con diferentes grupos biomédicos.

Para conseguir este objetivo general, se definen a continuación una serie de objetivos específicos:

- Síntesis de una estructura basada en 1,3,5-triazina para la formación de homodímeros de ligandos de TLR4 y TLR7 convenientemente funcionalizados para su conjugación.
- Síntesis de una estructura basada en 1,3,5-triazina para la formación de un heterodímero de ligandos TLR4/7 convenientemente funcionalizados para su conjugación.
- Conjugación de estos dímeros con el péptido sintético Pru p 3 del melocotón de forma rápida, sencilla y eficaz.
- Evaluación biológica de estos dímeros péptido-adyuvante.

5.4 Síntesis de homodímeros de TLR4, TLR7 y del heterodímero (TLR7/TLR4) conjugados al péptido Pru p 3

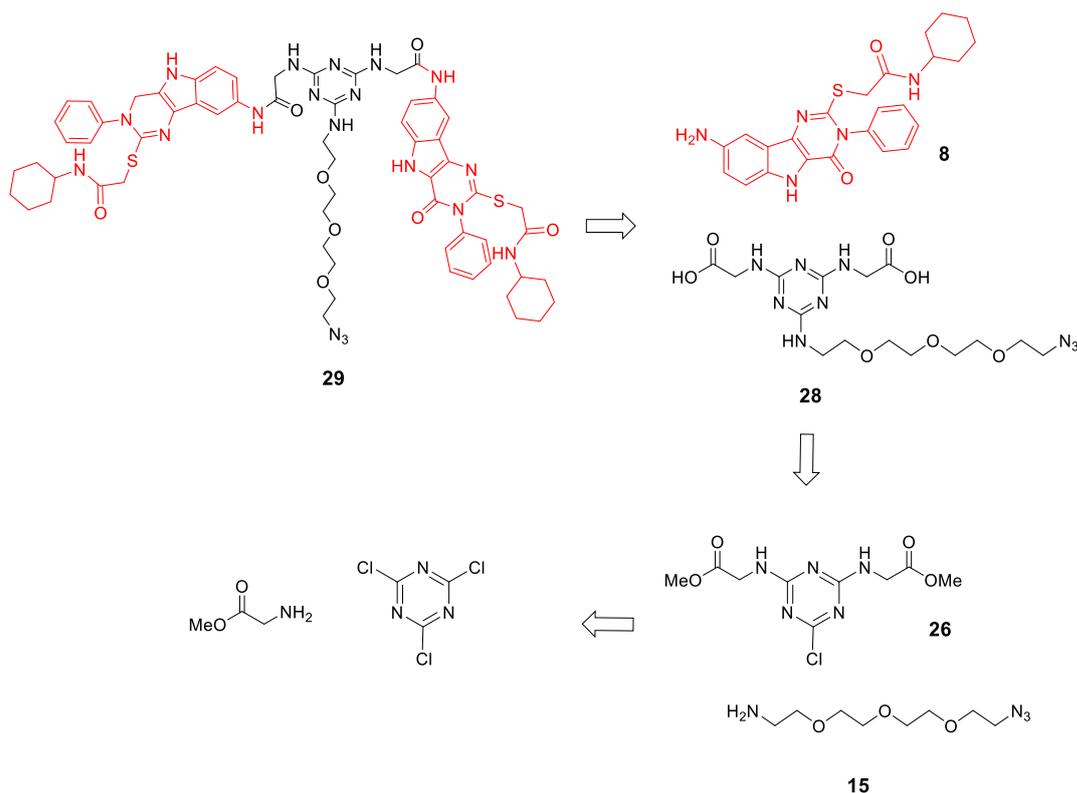
La preparación de estos conjugados se ha abordado en varias etapas: síntesis de las 1,3,5-triazinas convenientemente funcionalizadas que serán usadas como plataforma para la generación de los dímeros correspondientes, modificación de los ligandos de TLR, ya sintetizados previamente, para la formación de los dímeros correspondientes; y, por último, conjugación del péptido Pru p 3 a estas estructuras.

Para poner a punto esta estrategia nos planteamos, en primer lugar, la síntesis de las triazinas para la formación de los homodímeros de ligandos de TLR4 y de TLR7, ya que estas estructuras son más sencillas que la síntesis del heterodímero TLR4/7 que precisa de una estructura trifuncional.

5.4.1 Síntesis de homodímeros de ligandos de TLR4 y 7 a partir de triazinas bifuncionales

En primer lugar, se abordó la preparación de triazinas bifuncionales, es decir, de las tres posiciones de la 1,3,5-triazina, dos de ellas serían equivalentes para unirse a ligandos de TLR4 o de TLR7, mientras que la tercera posición se utilizaría para la introducción de un grupo maleimida que permitiría la conjugación del péptido.

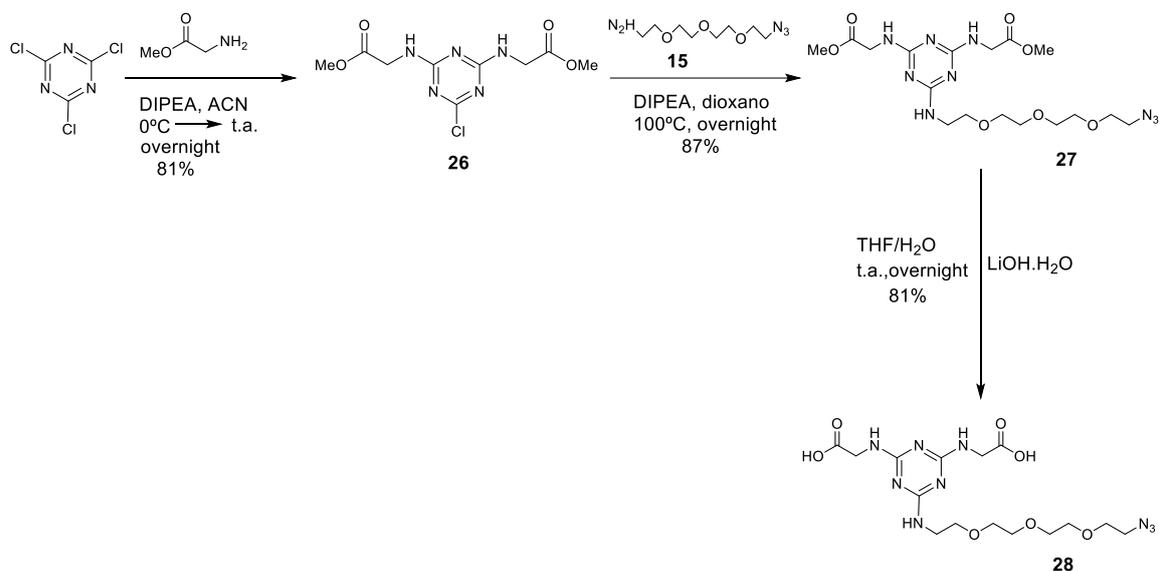
Para la síntesis del dímero del ligando de TLR4 se eligió como intermedio la amina del derivado de pirimidoindol **8**, sintetizada previamente (Capítulo 3). Utilizando una triazina funcionalizada con dos ácidos carboxílicos, se llevaría a cabo la conjugación de estos ligandos mediante una diamidación. Para la tercera posición, se eligió un espaciador aminoazida **15**, que podría ser posteriormente funcionalizado con un grupo maleimido a través de la reacción click CuAAC. En el Esquema 5.2 se describe la ruta retrosintética planteada.



Esquema 5.2. Ruta retrosintética para la preparación del dímero de TLR4 basado en una estrategia de amidación. En rojo se indica el ligando de TLR4.

Aunque la síntesis de triazinas trisustituidas está bien documentada,²²⁶ existe una gran variabilidad en las condiciones de reacción y métodos de purificación.^{227,228} Estas reacciones de sustitución generan cloruro de hidrógeno, por lo tanto, es necesario la presencia de una base en el medio de reacción para su neutralización. Esta base puede ser carbonato,²²⁹ aminas no nucleófilas (triethylamina, DIPEA, etc.) o un exceso de la amina de partida.²³⁰

El primer paso de la síntesis de la triazina objetivo consistió en la introducción de dos sustituyentes sobre el cloruro cianúrico comercial. (Esquema 5.3)



Esquema 5.3. Síntesis de la triazina trisustituida **28**.

Se probaron varias condiciones de reacción, encontrándose los mejores resultados cuando se usaron dos equivalentes del aminoácido glicina protegido como metilester, con una adición a 0°C en acetonitrilo y en presencia de DIPEA, obteniéndose el producto deseado **26** con un buen rendimiento (81%). (Esquema 5.3) El compuesto **26** fue caracterizado por ¹H-RMN, coincidiendo sus señales con lo descrito en la bibliografía,²³¹ mejorándose el rendimiento. El siguiente paso consistió en el intercambio del último átomo de cloro

²²⁶ Afonso, C.; Lourenco, N.; Rosatella, A.; *Molecules* **2006**, *11*, 81-102.

²²⁷ Uccello-Barretta, G.; Samaritani, S.; Menicagli, R.; Salvadori, P.; *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11*, 3901-3912.

²²⁸ Kamiński, Z. J.; *J. Pept. Sci.* **2000**, *55*, 140-164.

²²⁹ Uccello-Barretta, G.; Samaritani, S.; Menicagli, R.; Salvadori, P.; *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11*, 3901-3912.

²³⁰ Díaz-Ortiz, A.; Elguero, J.; De la Hoz, A.; Jiménez, A.; Moreno, A.; Moreno, S.; Sánchez-Migallón; *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*, 649-659.

²³¹ Vilela, S.M.F.; *et al.*; *CrystEngComm* **2014**, *16*, 8119-8137.

utilizando el espaciador aminoazida **15** y DIPEA, calentando la reacción a 100°C en dioxano toda la noche. De esta forma, se obtuvo la triazina trisustituida **27** con un rendimiento del 87%. Este compuesto fue satisfactoriamente caracterizado por ¹H-RMN, en el que se observa la correcta relación de integración con las señales correspondientes a la cadena de PEG, así como por espectrometría de masas. Por último, se abordó la desprotección de los ésteres metílicos para obtener los correspondientes ácidos carboxílicos. Para ello, se utilizaron unas condiciones de hidrólisis similares a las descritas por el grupo de la Dra. Pérez en sus estudios con triazinas.²³² La triazina **27** fue tratada con hidróxido de litio en una mezcla THF/H₂O a temperatura ambiente durante toda la noche, monitorizándose el avance de la reacción por TLC, obteniéndose la triazina **28** con un rendimiento del 81%. Su estructura fue verificada por ¹H-RMN, observándose claramente la desaparición del singulete asociado a los ésteres metílicos. En su espectro de MS, en modo negativo, se puede observar la señal correspondiente al ión molecular. (Figura 5.7)

²³² Lozano, V.; *et al.*; *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5335-5348.

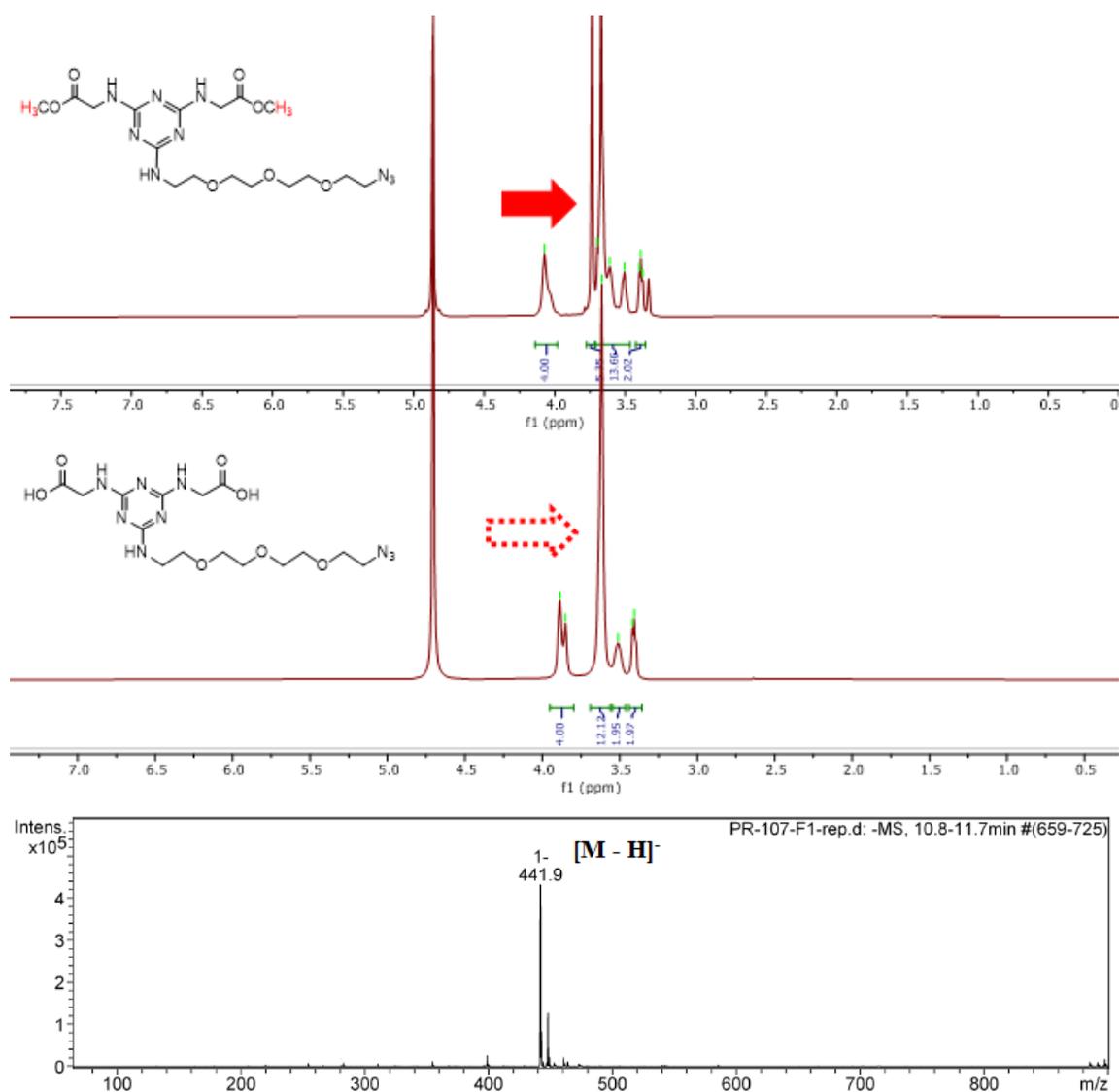
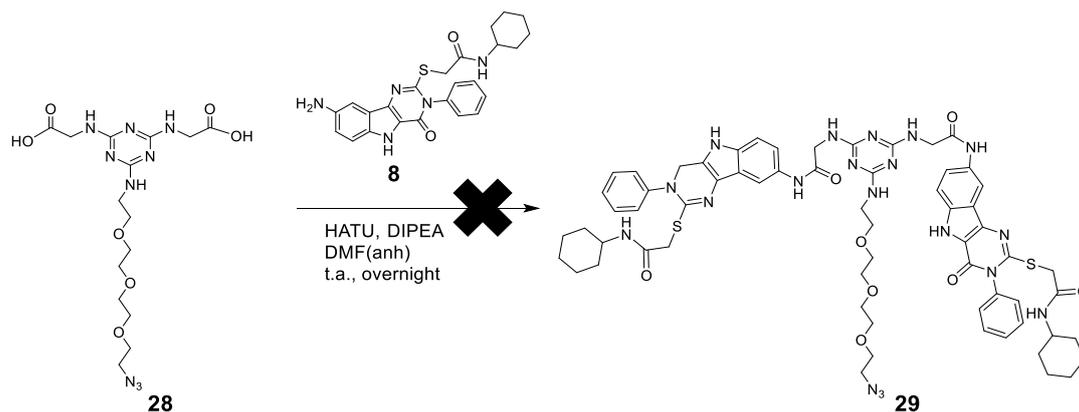


Figura 5.7. Comparación de espectros de $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , 298 K) de los compuestos **27** y **28** (arriba) y ESI-MS (abajo) del compuesto **28**.

Una vez sintetizada la triazina **28**, se abordó la formación del dímero de TLR4 mediante una amidación con la amina del derivado de pirimidoindol **8**. Esta conjugación se llevó a cabo usando las condiciones de amidación puestas a punto a lo largo de la presente Tesis Doctoral, usando HATU como agente de acoplamiento en presencia de DIPEA y DMF anhidra. (Esquema 5.4)

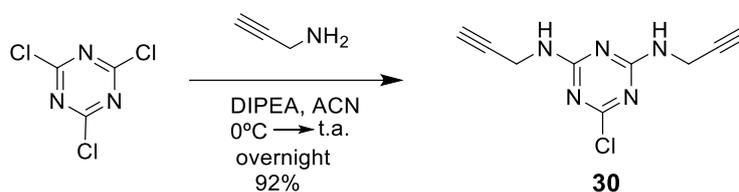


Esquema 5.4. Aproximación a la síntesis del dímero **29**.

Sin embargo, no fue posible la obtención del dímero **29**, obteniéndose mezclas complejas de reacción. Se intentó optimizar esta reacción modificando variables como el número de equivalentes, el orden de adición y el tiempo, pero todos estos esfuerzos resultaron infructuosos.

A la vista de estos resultados, se decidió cambiar la estrategia en la formación del dímero. Se diseñó una nueva plataforma de triazina bifuncional con grupos alquino para acoplar el ligando a través de la reacción CuAAC, basándonos en los buenos resultados de esta reacción que habíamos tenido anteriormente en el grupo usando distintos bloques de construcción.²³³ Se planteó la síntesis de una estructura de triazina análoga pero que en vez de contener dos ácidos carboxílicos como sustituyentes tuviera dos grupos alquino.

La primera etapa consistió en la reacción del cloruro cianúrico comercial con la propargilamina en las condiciones puestas a punto anteriormente para la formación del dímero **26**. (Esquema 5.5)



Esquema 5.5. Síntesis de la triazina dialquino **30**.

Estas estructuras presentan una gran insolubilidad en la mayoría de disolventes orgánicos y en agua. Esta insolubilidad se ha atribuido a diferentes factores que pueden estar

²³³ Ribeiro-Viana, R; Garcia-Vallejo, J.J.; Collado, D.; Perez-Inestrosa, E.; Bloem, K.; van Kooyk, Y.; Rojo, J.; *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3209-3219.

mediados por interacciones intramoleculares como enlaces de hidrógeno y apilamientos de tipo π -stacking.²³⁴ La purificación de este compuesto se abordó mediante un lavado con H₂O y MeOH, obteniéndose el derivado **30** como un sólido blanco con un excelente rendimiento del 92%. El análisis de su espectro de ¹H-RMN en DMSO-d₆ reveló la presencia de agrupaciones de señales cercanas con diferentes intensidades que debían corresponder a un único protón. Dentro de cada una de estas agrupaciones, todas las señales poseían la misma multiplicidad, lo que sugería la presencia de varios conformeros. Este hecho también se observa en el espectro de ¹³C-RMN. (Figura 5.8)

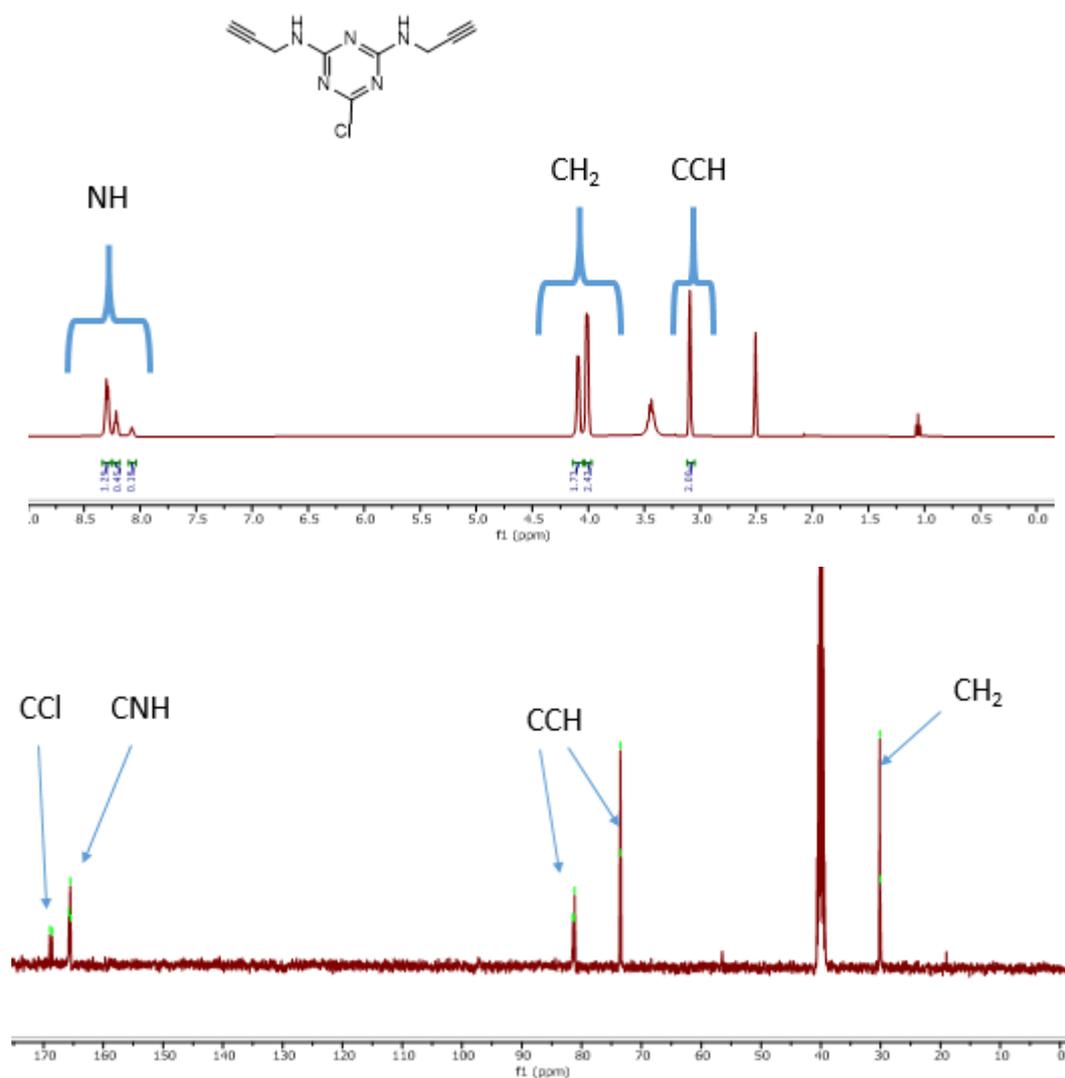
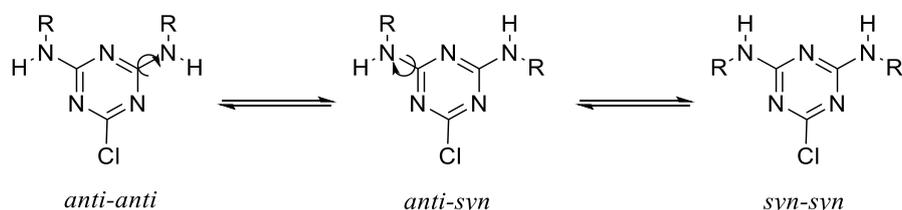


Figura 5.8. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 298 K) (arriba) y ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆, 298 K) (abajo) de la triazina **30**.

²³⁴ Birkett, H. E.; *et al.*; *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 324-336.

Todas estas señales de los espectros de protón y de carbono coinciden exactamente con lo descrito en la bibliografía.²³⁵ Este hecho no resulta sorprendente, ya que se ha descrito que las triazinas aminosustituidas pueden existir como mezcla de rotámeros, debido a una rotación restringida entre los enlaces de los sustituyentes amino y la triazina.²³⁶ Este efecto es atribuido a la conjugación del par de electrones sin compartir del nitrógeno exocíclico con el anillo de triazina deficiente en electrones, dando como resultado un alto carácter de doble enlace en los enlaces C_{triazina}-NH. Por medio de estudios de RMN y modelización computacional se ha demostrado la existencia de altas barreras de rotación, que provocan la aparición de diferentes poblaciones de rotámeros a temperatura ambiente y que son observados por RMN.²³⁷ El número de rotámeros dependerá del número de sustituyentes y su simetría, en el caso de aminotriazinas disustituidas simétricas, pueden existir hasta tres rotámeros simultáneamente en equilibrio conformacional, aumentando la complejidad de los espectros. Conforme a la nomenclatura establecida, estos rotámeros se pueden nombrar como *anti-anti*, *syn-syn* y *anti-syn*.²³⁸ (Esquema 5.6) Las poblaciones relativas de estos rotámeros en disolución están influidas por múltiples factores como puede ser la temperatura, el disolvente y los sustituyentes.²³⁹



Esquema 5.6. Equilibrios conformacionales de aminotriazinas disustituidas simétricas.

Para demostrar la presencia de estos rotámeros en equilibrio en la triazina **30**, se realizaron espectros de ¹H-RMN a distintas temperaturas en DMSO-d₆. (Figura 5.9)

²³⁵ Chioua, M.; *et al.*; *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 8334-8337.

²³⁶ Lim, J.; Simanek, E.E.; *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 273-277.

²³⁷ Amm, M.; Platzer, N.; Guilhem, J.; Bouchet, J.P.; Volland, J.P.; *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 587-596.

²³⁸ Ghiviriga, I.; Oniciu, D. C.; *Chem. Commun.* **2002**, *21*, 2718-2719.

²³⁹ Fazekas, M.; *et al.*; *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *14*, 2473-2494.

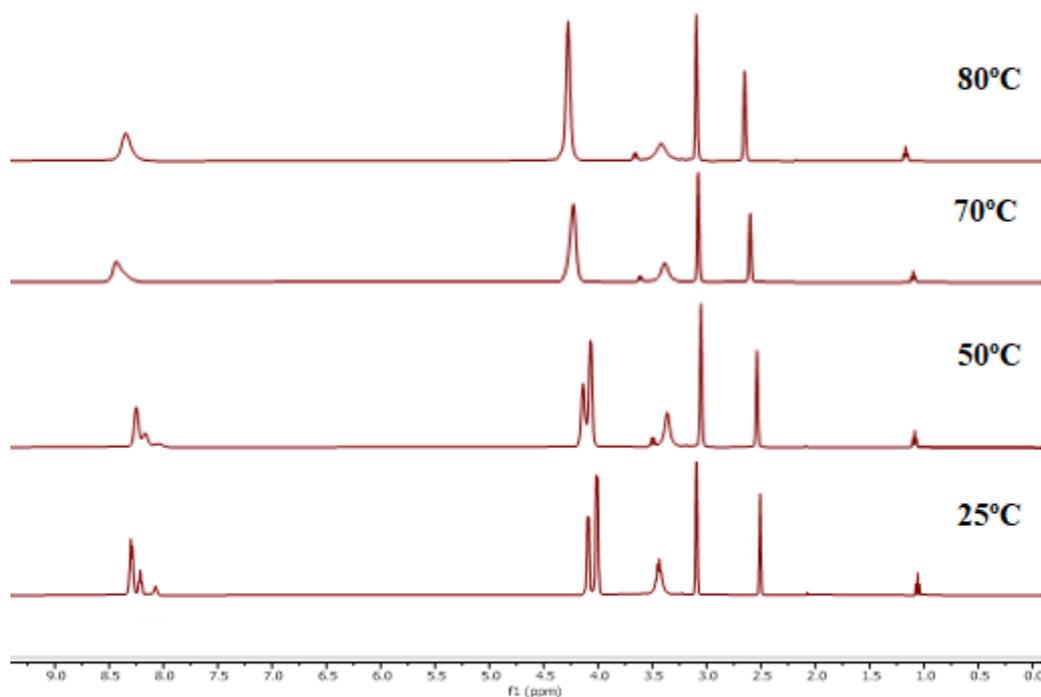
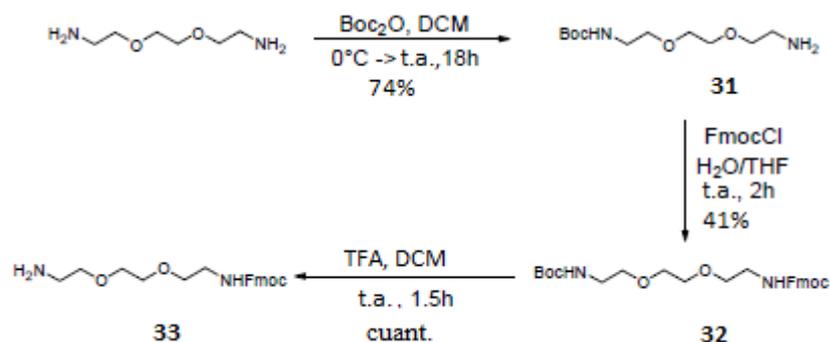


Figura 5.9. Espectros de ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆), a distintas temperaturas, de la triazina **30**.

Cuando se registraron los espectros aumentando cada vez más la temperatura, se observó que las señales se iban ensanchando y coalesciendo, lo que indica la rápida conversión entre rotámeros a altas temperaturas. Este efecto, comentado con esta triazina **30**, se ha observado en la gran mayoría de triazinas mono, di y trisustituidas sintetizadas en la presente Tesis Doctoral. En ocasiones, a temperatura ambiente, no se llegan a separar completamente las señales asociadas a los diferentes rotámeros, observándose un ensanchamiento de las mismas.

Una vez sintetizada la triazina **30**, fue necesaria la preparación de un espaciador que contuviera dos grupos amino diferenciados en sus extremos, uno libre y el otro protegido con un grupo Fmoc. Para ello, se partió de la 2,2'-(etilendioxi)dietilamina comercial y se sintetizó el compuesto **33** siguiendo la secuencia mostrada en el Esquema 5.7.



Esquema 5.7. Síntesis del espaciador **33**.

Para esta síntesis se siguieron las condiciones descritas en la bibliografía,²⁴⁰ usando una estrategia de protección/desprotección del grupo protector Boc (*tert*-butoxicarbonilo). El primer paso consistió en la monoprotección de la 2,2'-(etilendioxi)dietilamina usando anhídrido Boc a temperatura ambiente en diclorometano para obtener la amina **31** con un buen rendimiento (74%). Mediante la integración del espectro de ¹H-RMN del singulete a 1.45 ppm que representa los tres metilos del grupo Boc con el resto señales, se verificó la protección de un solo grupo amino. En el siguiente paso, el grupo amino libre del compuesto **31** fue protegido con el grupo Fmoc por medio del cloruro de fluorenilmetoxicarbonilo a temperatura ambiente durante dos horas, obteniéndose el derivado **32**, cuya estructura se confirmó por su espectro de ¹H-RMN en el que se observan las señales aromáticas correspondientes, así como su correcta integración con respecto al resto de señales de la molécula. (Figura 5.10)

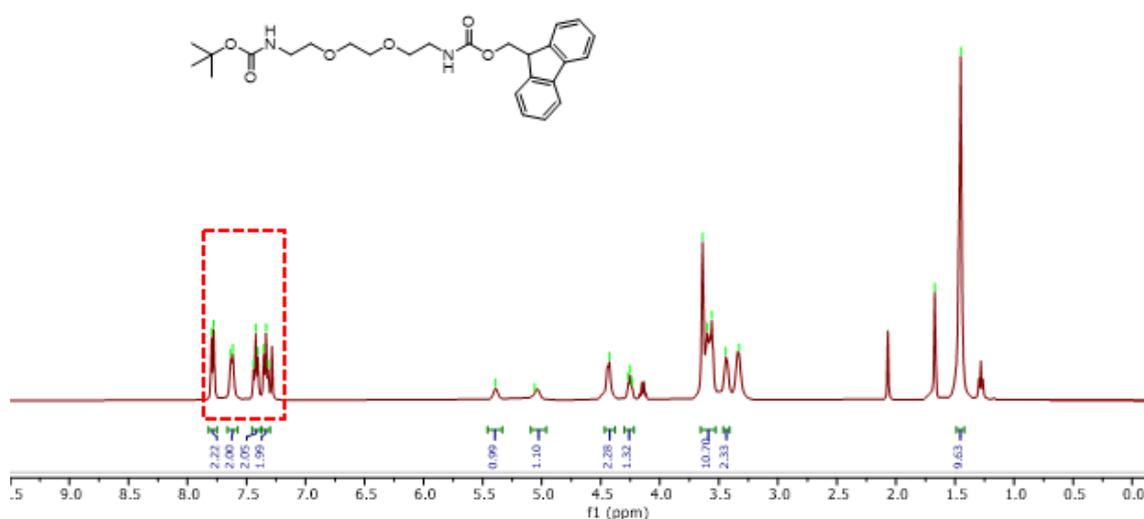


Figura 5.10. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) del compuesto **32**.

²⁴⁰ Keller, M.; *et al.*; *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2859-2878.

Por último, el grupo Boc fue eliminado mediante las condiciones clásicas de desprotección, tratamiento con ácido trifluoroacético en diclorometano,²⁴¹ obteniéndose la amina **33** de forma cuantitativa. La desprotección de este grupo fue confirmada por su espectro de ¹H-RMN, el que se observa la desaparición del singulete asociado a los metilos del grupo Boc en la región 1.75-1.0 ppm, así como por la señal del ion molecular protonado en el espectro de masas. (Figura 5.11)

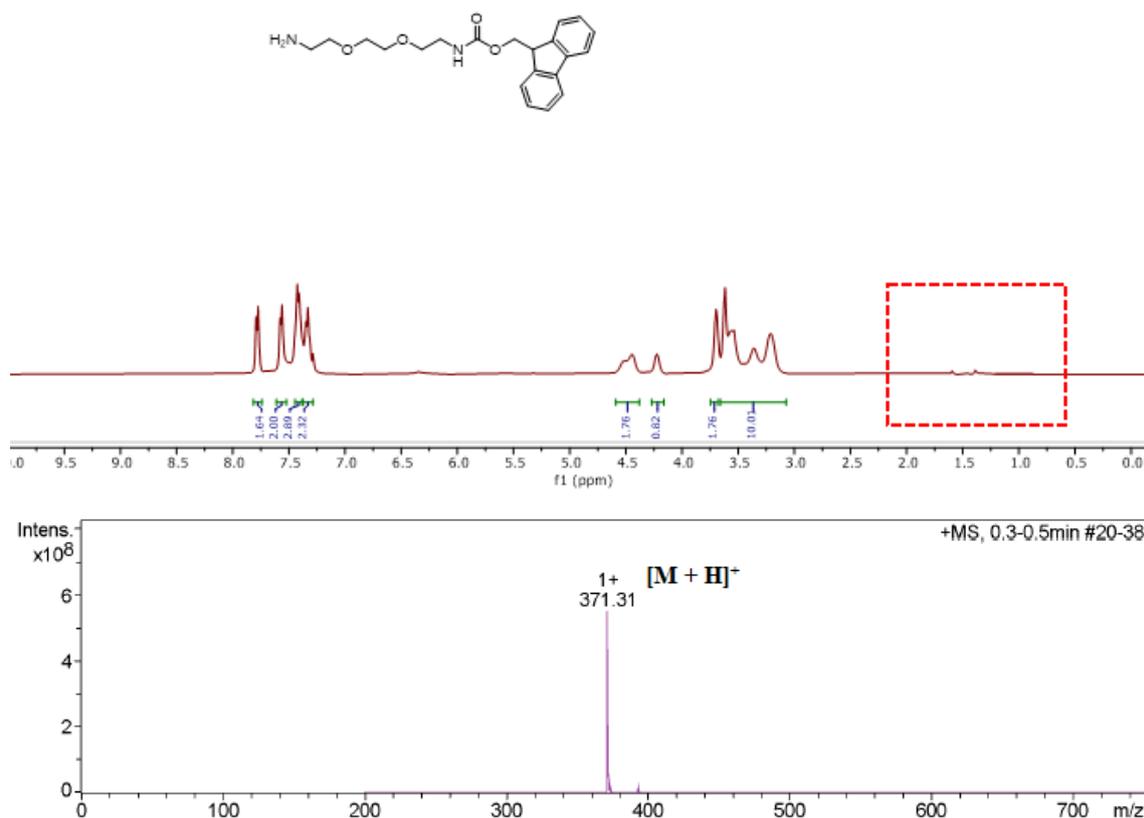


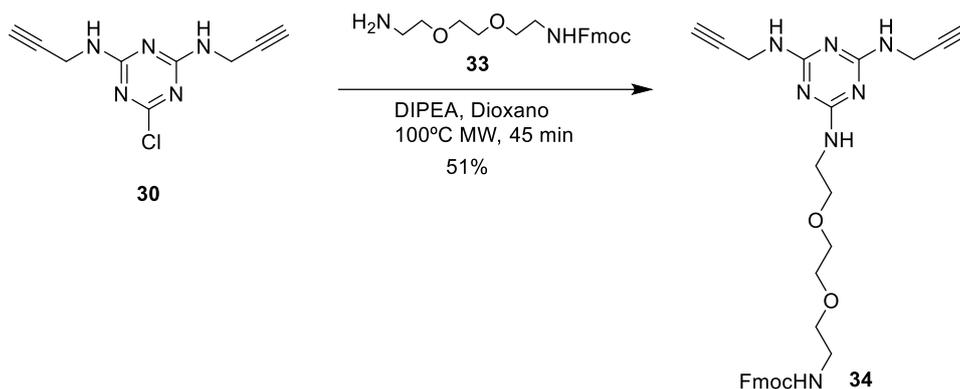
Figura 5.11. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 298 K) (arriba) y de ESI-MS (abajo) del compuesto **32**.

Una vez sintetizado este espaciador, se llevó a cabo la tercera sustitución sobre la triazina **30**. Como se ha comentado previamente, para realizar esta última sustitución del átomo de cloro es necesario una temperatura más alta; sin embargo, usando las condiciones puestas a punto para la formación de la triazina **27**, como es el calentamiento a 100°C toda la noche, no se consiguió un avance significativo de la reacción. En la bibliografía se ha descrito que, dependiendo tanto de los sustituyentes como del nucleófilo, esta tercera funcionalización de 1,3,5-triazinas puede llegar a requerir varios días de

²⁴¹ *Greene's Protective Groups In Organic Synthesis*, Greene, T.W., Wuts, P.G.M., Ed. John Wiley & Sons, **2006**.

calefacción mediante los métodos convencionales.²⁴² Sin embargo, los reactores microondas calientan directamente y de una forma mucho más eficiente y uniforme, debido al aumento de la energía rotacional de las moléculas de disolvente. Adicionalmente, el uso de recipientes sellados en reactores microondas permite que las mezclas de reacción se calienten muy rápidamente a temperaturas muy por encima del punto de ebullición del disolvente. El calentamiento muy rápido y a temperaturas extremas permite que reacciones que requieren de varias horas con un calentamiento tradicional a reflujo puedan llegar a completarse en unos minutos o incluso segundos gracias a disolventes sobrecalentados en un recipiente sellado.^{243,244} De hecho, el uso de calentamiento por medio de reactores microondas ha sido descrito para la introducción del tercer sustituyente en triazinas.²⁴⁵

En este contexto, se realizaron varias pruebas a diferentes tiempos y temperaturas para llevar a cabo esta sustitución por medio de un reactor microondas; sin embargo, fueron necesarias varias horas de calentamiento para observar la desaparición completa de la triazina **30** de partida. Después de la purificación por medio de una cromatografía en columna de gel de sílice, se obtuvo el compuesto con bajos rendimientos, probablemente debido a la descomposición parcial del producto debido al prolongado calentamiento. Por lo tanto, se hizo necesario buscar una situación intermedia entre la cantidad de producto obtenido y el avance de la reacción, obteniéndose las mejores condiciones con el calentamiento a 100°C durante 45 min. (Esquema 5.8)



Esquema 5.8. Síntesis de la triazina trisustituida **34**.

²⁴² Samaritani, S.; Peluso, P.; Malanga, C.; Menicagli, R.; *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1551-1555.

²⁴³ Kappe, C.O.; *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1127-1139.

²⁴⁴ Kappe, C.O.; Pieber, P.; Dallinger, D.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1088-1094.

²⁴⁵ Moral, M.; Ruiz, A.; Moreno, A.; Díaz-Ortiz, A.; López-Solera, I.; de la Hoz, A.; Sánchez-Migallón, A.; *Tetrahedron* **2010**, 66, 121-127.

Después de una purificación cromatográfica en columna de gel de sílice, se obtuvo la triazina **34** con un rendimiento del 51%. La formación de este compuesto fue confirmada por medio de su espectro de ^1H -RMN en el que se observa la presencia del espaciador por la aparición de las señales aromáticas del grupo Fmoc con una relación de integración correcta con el resto de señales. Para esta molécula, a 25°C no se observó la aparición de rotámeros. Adicionalmente, se confirmó la formación de un único compuesto por medio de UHPLC/MS, realizándose este análisis para el resto de triazinas sustituidas sintetizadas. (Figura 5.12)

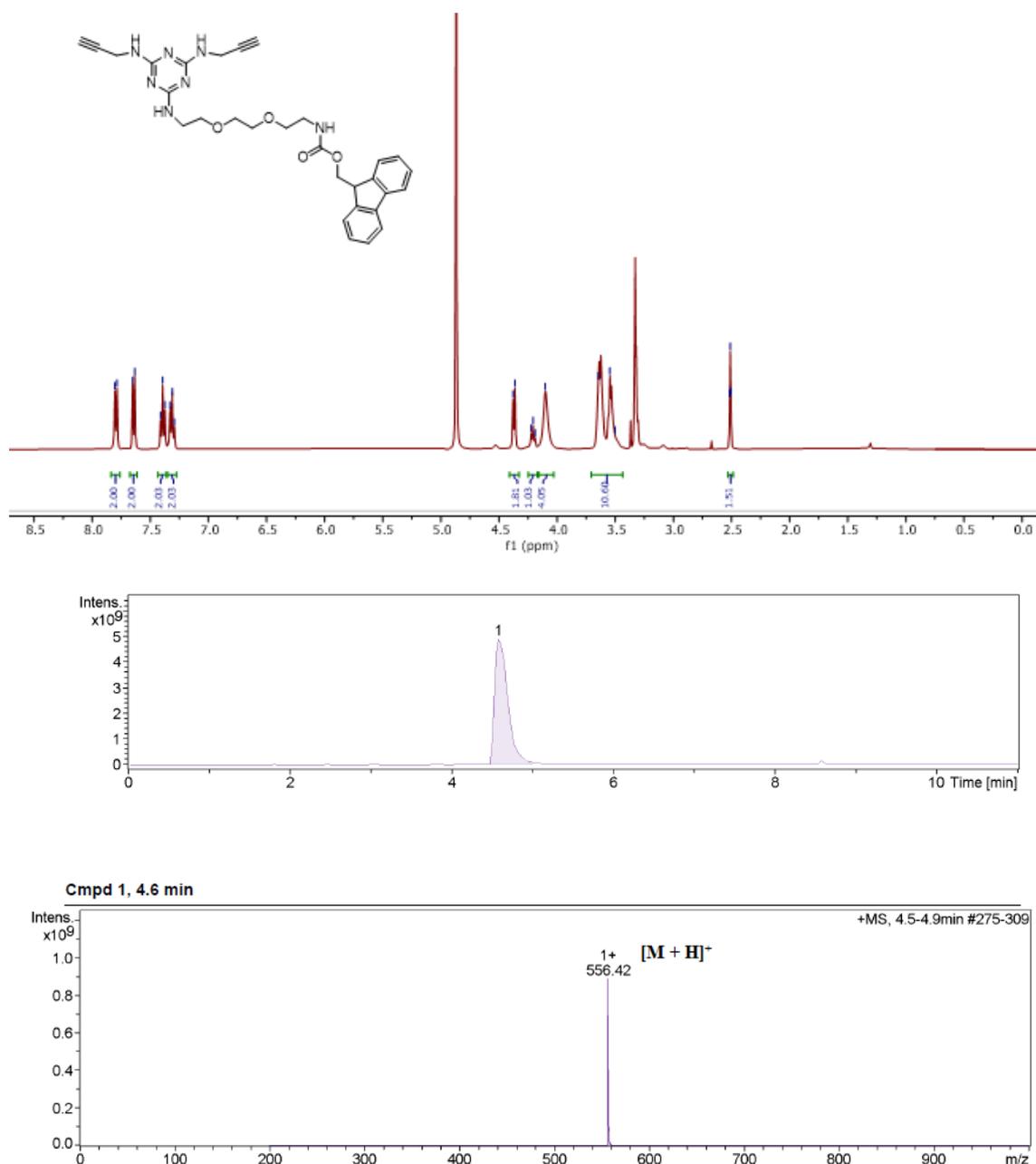
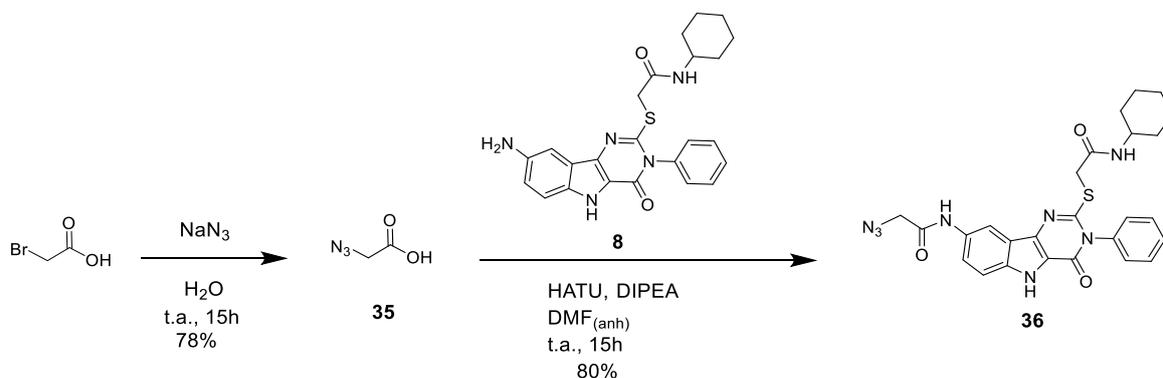


Figura 5.12. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, MeOH-d_4 , 298 K) (arriba) y cromatograma de UHPLC/MS (abajo) del compuesto **34**.

Esta triazina ya está completamente funcionalizada para la formación del dímero del ligando de TLR4 a través de la reacción CuAAC. Para ello, es necesario la incorporación de un grupo azida en el ligando de TLR4. En el Esquema 5.9 se describe la introducción de la azida en el ligando **8** mediante la amidación con el ácido 2-azidoacético, obtenido a partir de la azidación del correspondiente 2-bromoacético comercial.



Esquema 5.9. Ruta de síntesis del derivado azida **36**.

La azidación del ácido 2-bromoacético comercial se llevó a cabo usando las condiciones descritas en la bibliografía.²⁴⁶ Así, el tratamiento con azida sódica en agua destilada a temperatura ambiente durante 15 horas permitió la obtención del ácido 2-azidoacético **35** con un 78% de rendimiento. La formación de este compuesto fue verificada por medio de su espectro de ^{13}C -RMN, en el que observó la aparición de una señal a 49.9 ppm correspondiente al metileno unido al grupo azido. El siguiente paso consistió en la amidación de la amina presente en el compuesto **8**, usando HATU como agente de acoplamiento en presencia de DIPEA y dimetilformamida en condiciones anhidras. Después de agitación a temperatura ambiente durante 15 horas se obtuvo la azida **36** con un rendimiento del 80%. La formación del compuesto **36** se confirmó por medio de su espectro de ^1H -RMN, en el que se observa la señal a campo bajo correspondiente a la formación de la amida aromática (10.21 ppm), así como el metileno unido al grupo azido (4.07 ppm), guardando la correcta relación de integración con el resto de señales de la molécula. Adicionalmente, su espectro de masas demostró inequívocamente la formación del compuesto **36** ya que se observa el ion molecular con sodio y potasio. (Figura 5.13)

²⁴⁶ Schmitz, J.; Li, T.; Bartz, U.; Gütschow, M.; *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, 7, 211-216.

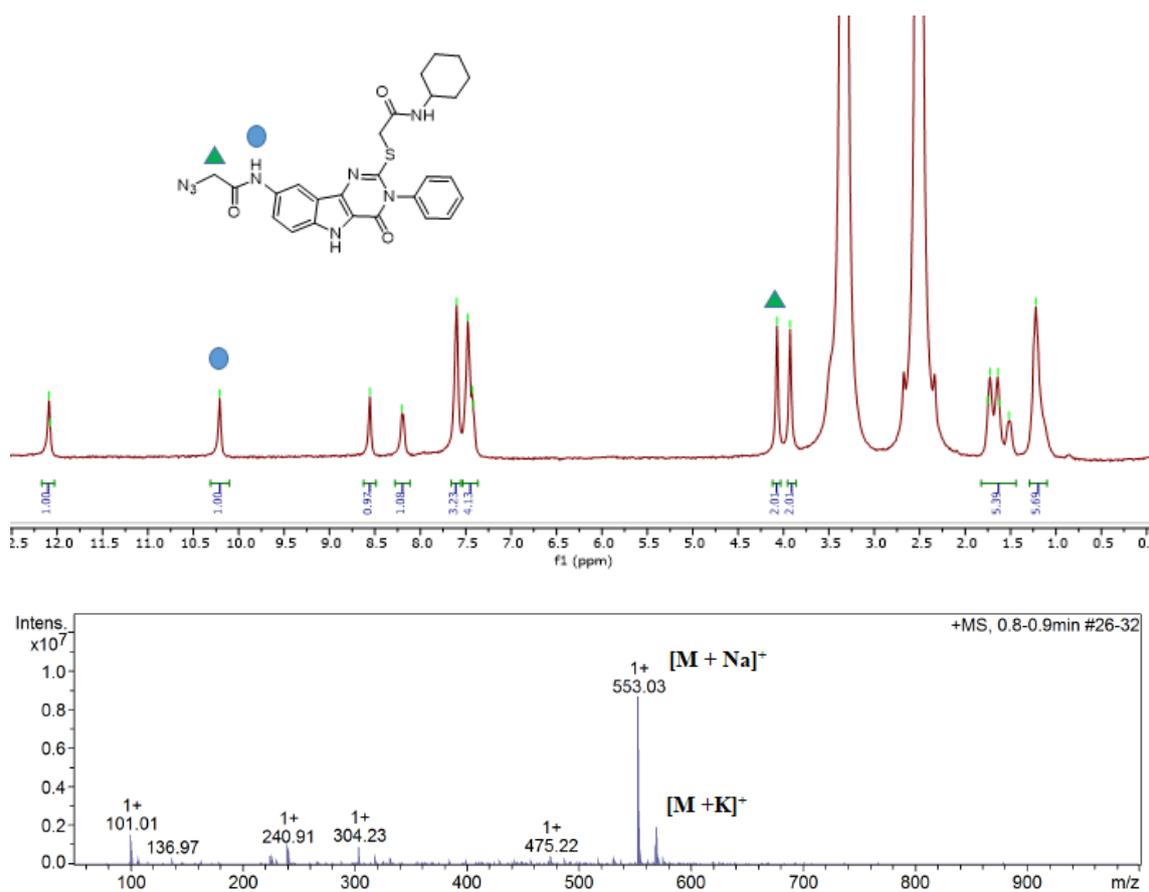
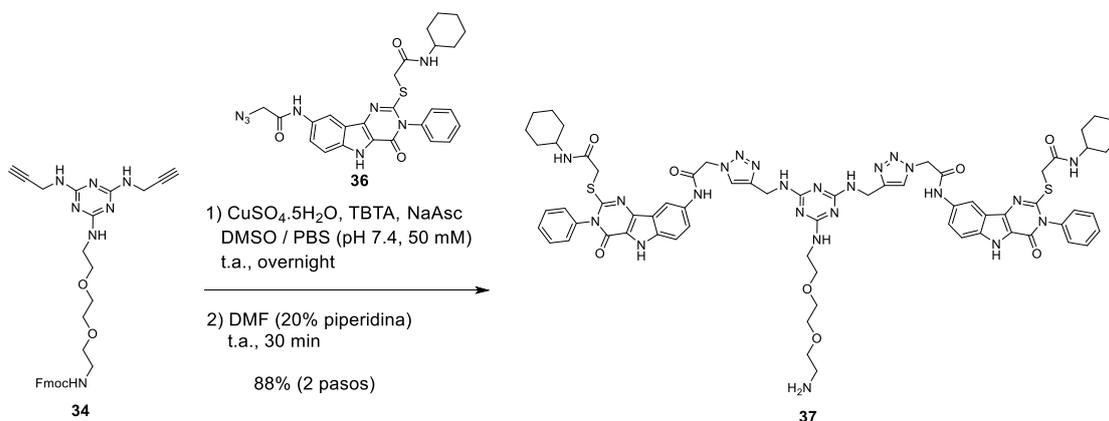


Figura 5.13. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) (arriba) y de ESI-MS (abajo) del compuesto **36**.

Una vez sintetizado el compuesto **36** con la funcionalización adecuada, se procedió a la formación del dímero de TLR4 **37** por medio de la reacción CuAAC, usando la triazina bifuncional **34** y la azida **36**. (Esquema 5.10)



Esquema 5.10. Síntesis del homodímero **37**.

El acoplamiento y la eliminación del grupo Fmoc se llevó a cabo de manera secuencial. A una mezcla de los compuestos **34** y **36**, disueltos en DMSO y tampón fosfato (50 mM,

pH 7.4), se adicionó sulfato de cobre, TBTA y ascorbato sódico. Tras una noche de reacción, se eliminó el disolvente y se añadió metanol hasta precipitación. Se filtró el sólido blanco que se redisolvió en una mezcla de piperidina al 20% en DMF con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos usando las condiciones clásicas para eliminar el grupo protector Fmoc.²⁴⁷ El compuesto final se aisló puro mediante precipitación de la misma forma que en la reacción anterior, obteniéndose el dímero del ligando de TLR4 **37** como un sólido blanco con un elevado rendimiento (88%, dos pasos). La introducción completa de los dos ligandos de TLR4 se pudo confirmar a partir de la integración de las señales de su espectro de ¹H-RMN, así como por la aparición de una señal correspondiente a los dos triazoles generados (7.97 ppm). Por otro lado, se confirmó la correcta eliminación del grupo Fmoc, ya que únicamente se encuentran las señales aromáticas características del ligando de TLR4. Adicionalmente, por medio de UHPLC/MS se confirmó la formación de un único producto con el peso molecular esperado. (Figura 5.14)

²⁴⁷ Zinieris, N.; Leondiadis, L.; Ferderigos, N.; *J. Comb. Chem.* **2005**, 7, 4-6.

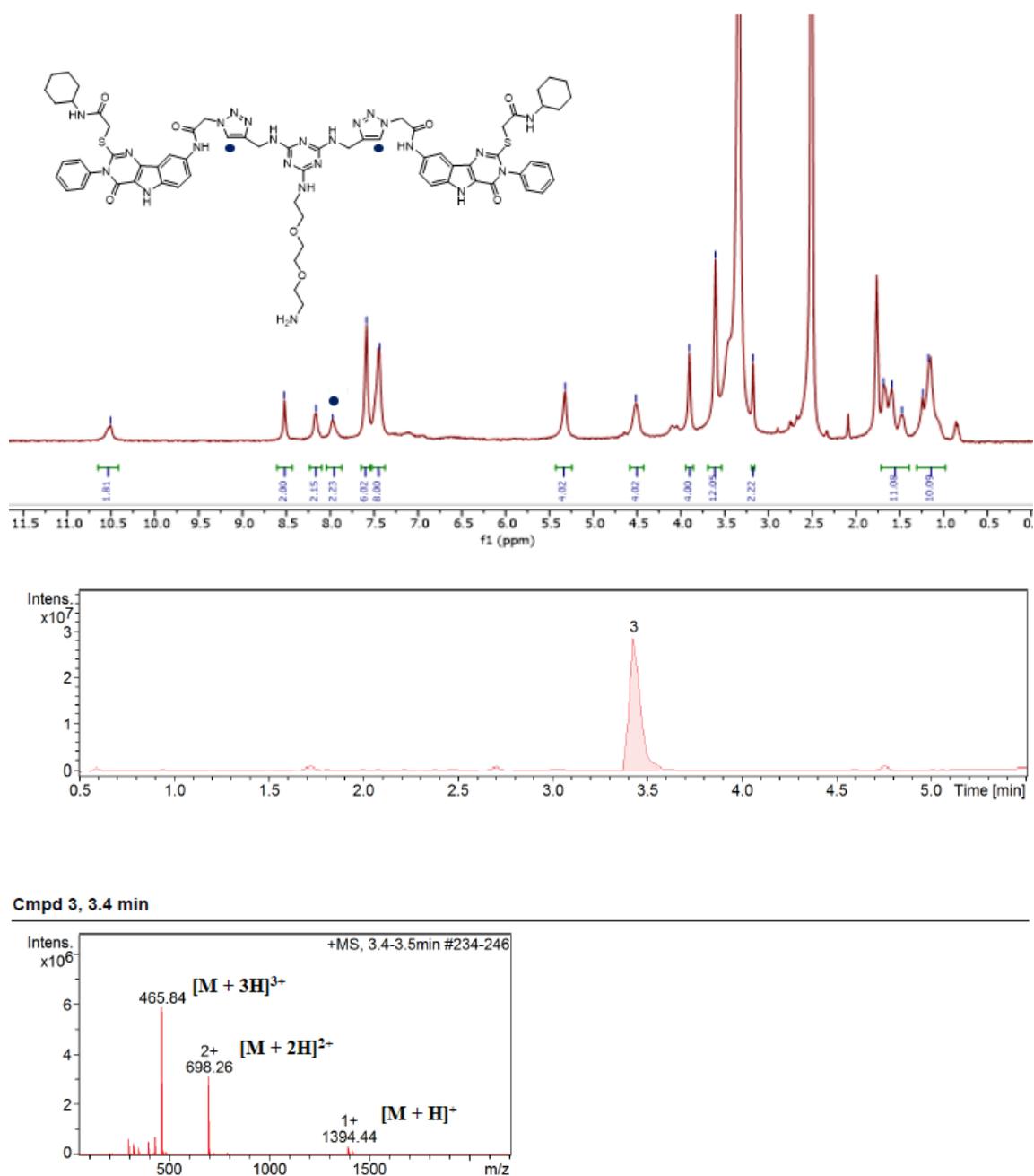
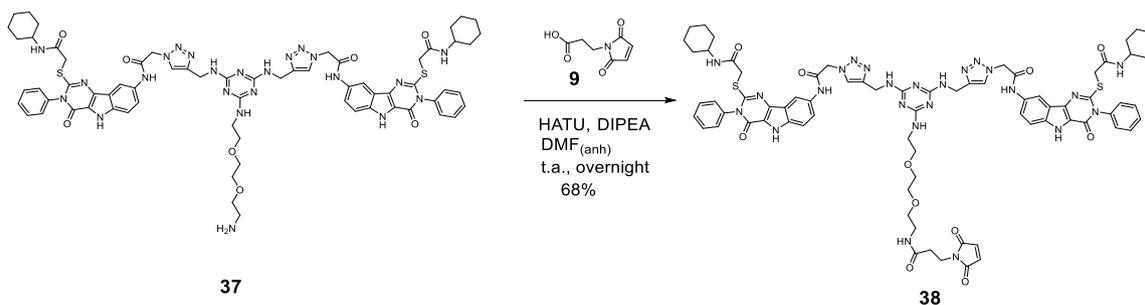


Figura 5.14. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 298 K) (arriba) y cromatograma de UHPLC/MS (abajo) del compuesto **37**.

Una vez sintetizado este intermedio, la última etapa consistió en la introducción del grupo maleimido a través de una reacción de amidación, usando la misma estrategia que en la síntesis de la maleimida del ligando de TLR4 **10** (Capítulo 3). (Esquema 5.11)

Combinaciones de ligandos de TLR4 y TLR7 conjugados con alérgenos
y estudio de su actividad biológica



Esquema 5.11. Síntesis del homodímero del ligando de TLR4 **38**.

Usando estas condiciones de amidación junto con el ácido-3-maleimidopropiónico (**9**), se obtuvo el dímero **38** con la maleimida. Para confirmar la completa amidación de la amina **37**, dicho compuesto fue caracterizado por las técnicas habituales de espectroscopía de RMN y espectrometría de masas. En el espectro de ^1H -RMN, se observa la aparición de un singulete a 6.98 ppm característico de los protones olefínicos de la maleimida. En el espectro de masas se observan las señales correspondientes al compuesto **38**. (Figura 5.15)

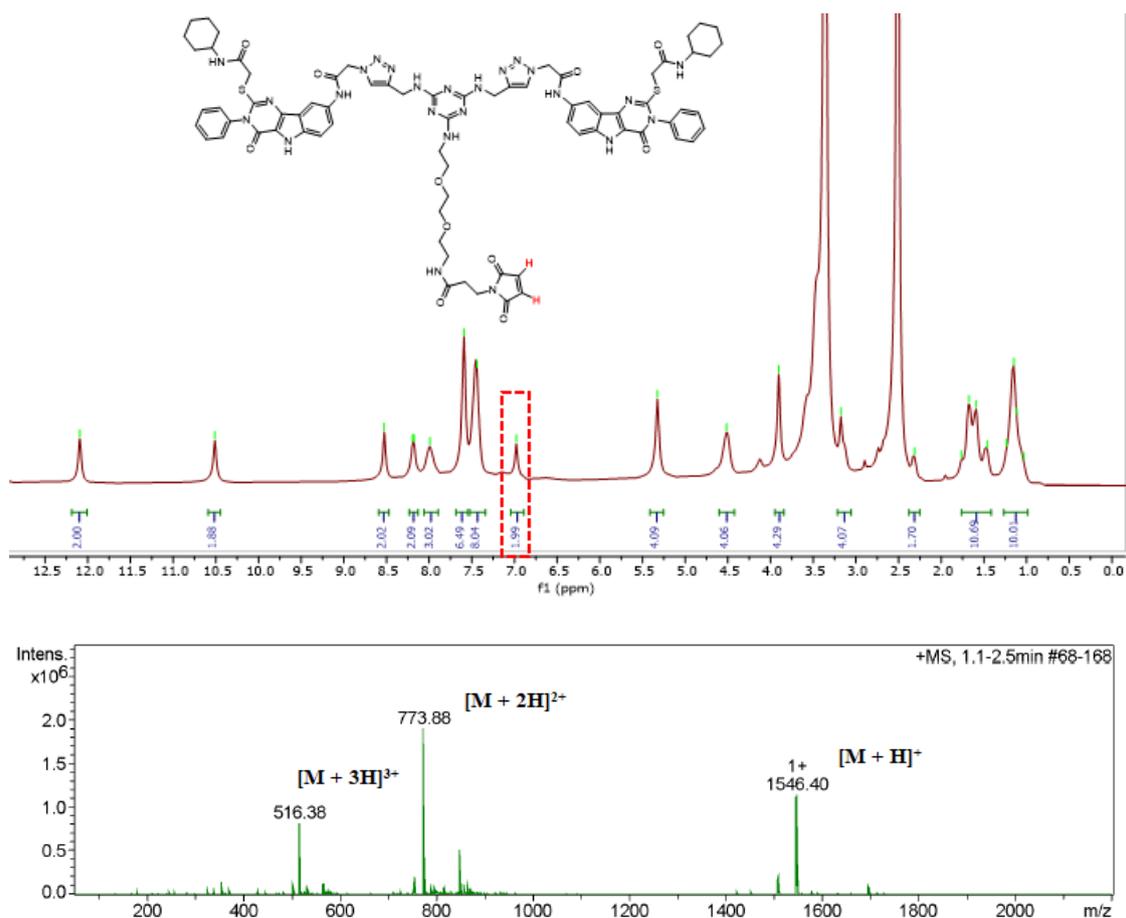
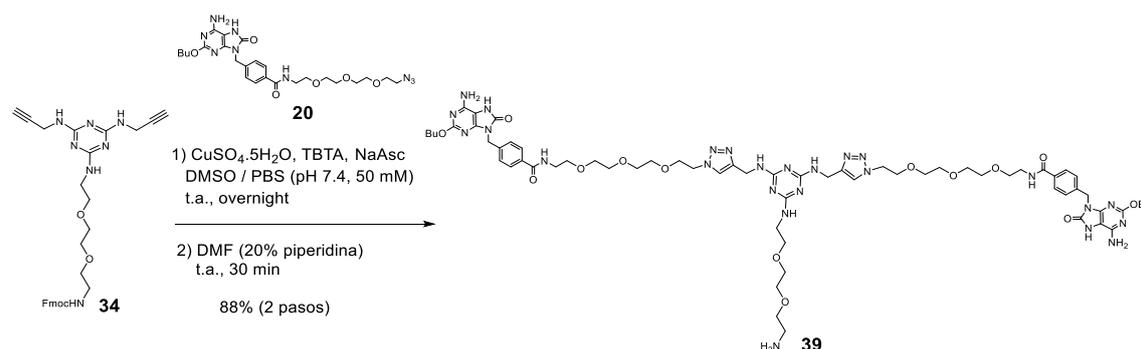


Figura 5.15. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , 298 K) (arriba) y de ESI-MS (abajo) del dímero **38**.

Este homodímero del ligando de TLR4 **38** ya está listo para poder conjugar el péptido Prup 3-SH. Esta parte será descrita con detalle en la siguiente sección.

A continuación, abordamos la síntesis del homodímero del ligando de TLR7 usando la misma estrategia utilizada para el dímero de TLR4. Para ello, se partió de la misma estructura de triazina bifuncional **34**, junto con el ligando TLR7 **20**, sintetizado en el Capítulo 4 de la presente Tesis Doctoral. De forma análoga, también se desprotegió el grupo protector Fmoc del espaciador. (Esquema 5.12)



Esquema 5.12. Síntesis del dímero del ligando de TLR7 **39**.

En primer lugar, se llevó a cabo la reacción CuAAC en las condiciones puestas a punto previamente. A continuación, se eliminó el grupo Fmoc con una disolución de piperidina al 20% en DMF, obteniéndose el homodímero **39** con un excelente rendimiento del 88% en dos pasos. Este compuesto fue satisfactoriamente caracterizado por medio de su espectro de ^1H -RMN en el que se observa la aparición de un singulete asociado a los dos triazoles formados, así como la correcta integración con el resto de señales de la molécula. Por otro lado, el cromatograma de UHPLC/MS demostró la formación de un solo compuesto con la relación de señales m/z correspondientes al dímero **39**. (Figura 5.16)

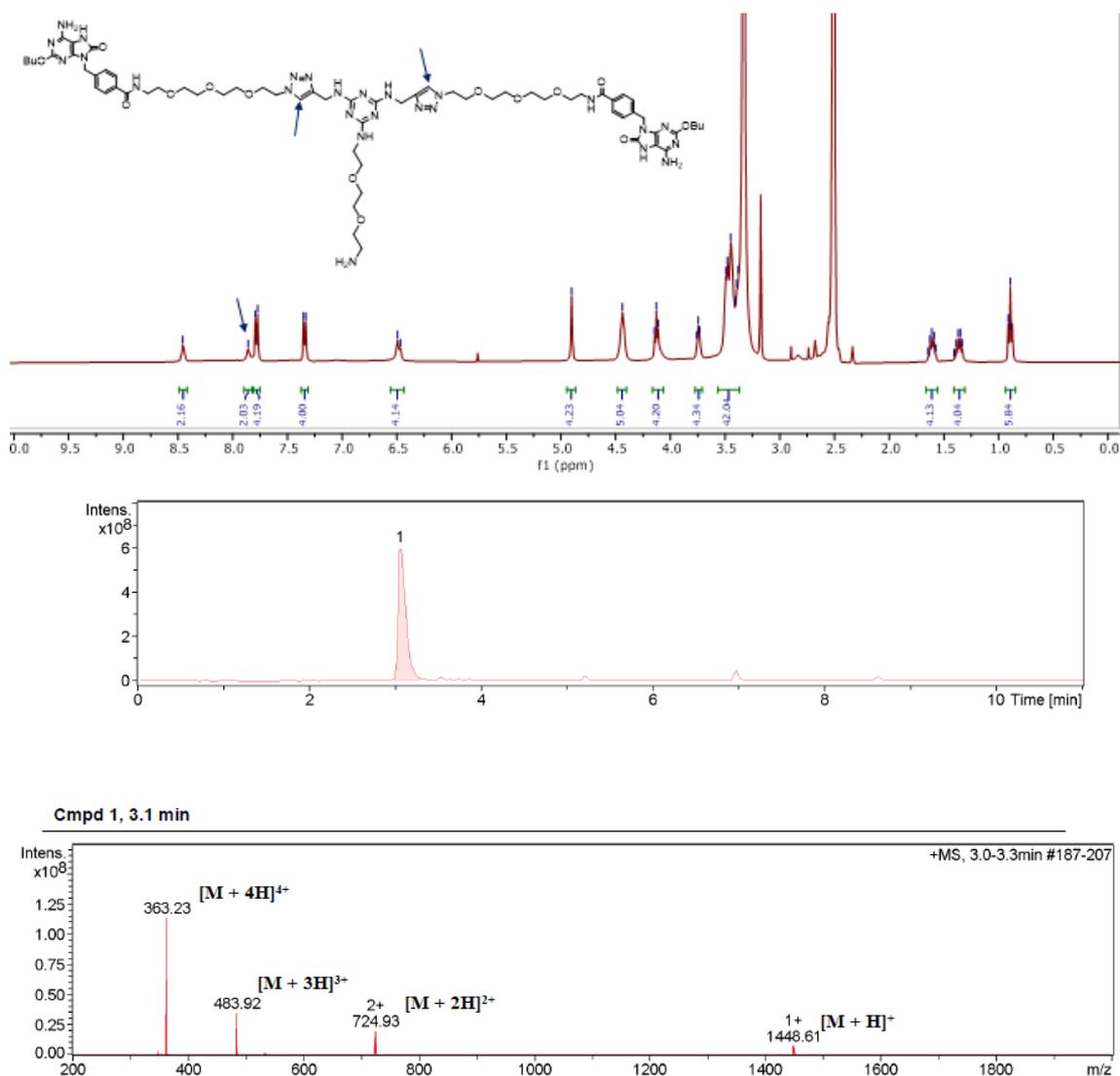
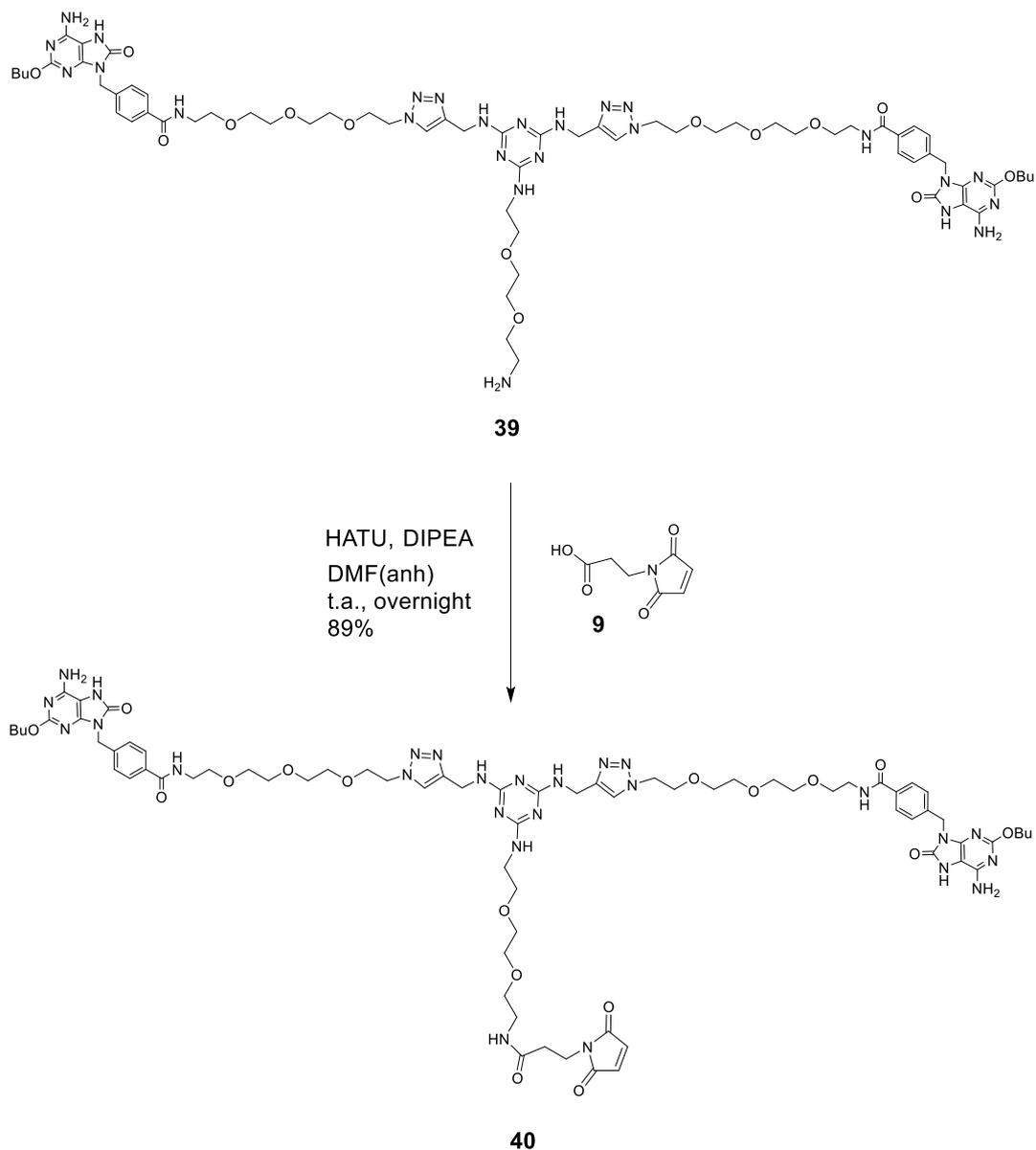


Figura 5.16. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 298 K) (arriba) y cromatograma de UHPLC/MS (abajo) del compuesto **39**.

La introducción de la maleimida se llevó a cabo de nuevo mediante una reacción de amidación usando el ácido-3-maleimidopropiónico (**9**), de la misma forma como se realizó en el caso del dímero anterior, obteniéndose el compuesto **40** con un excelente rendimiento (89%). (Esquema 5.13)



Esquema 5.13. Síntesis del dímero de ligando del TLR7 **40** con un grupo maleimida.

En el espectro de $^1\text{H-RMN}$, se observa la aparición de la señal correspondiente al protón de la amida generada a 8.01 ppm y la señal característica de los protones olefínicos de la maleimida a 7.00 ppm. En el espectro de masas se observan las señales correspondientes al compuesto **40**. (Figura 5.17)

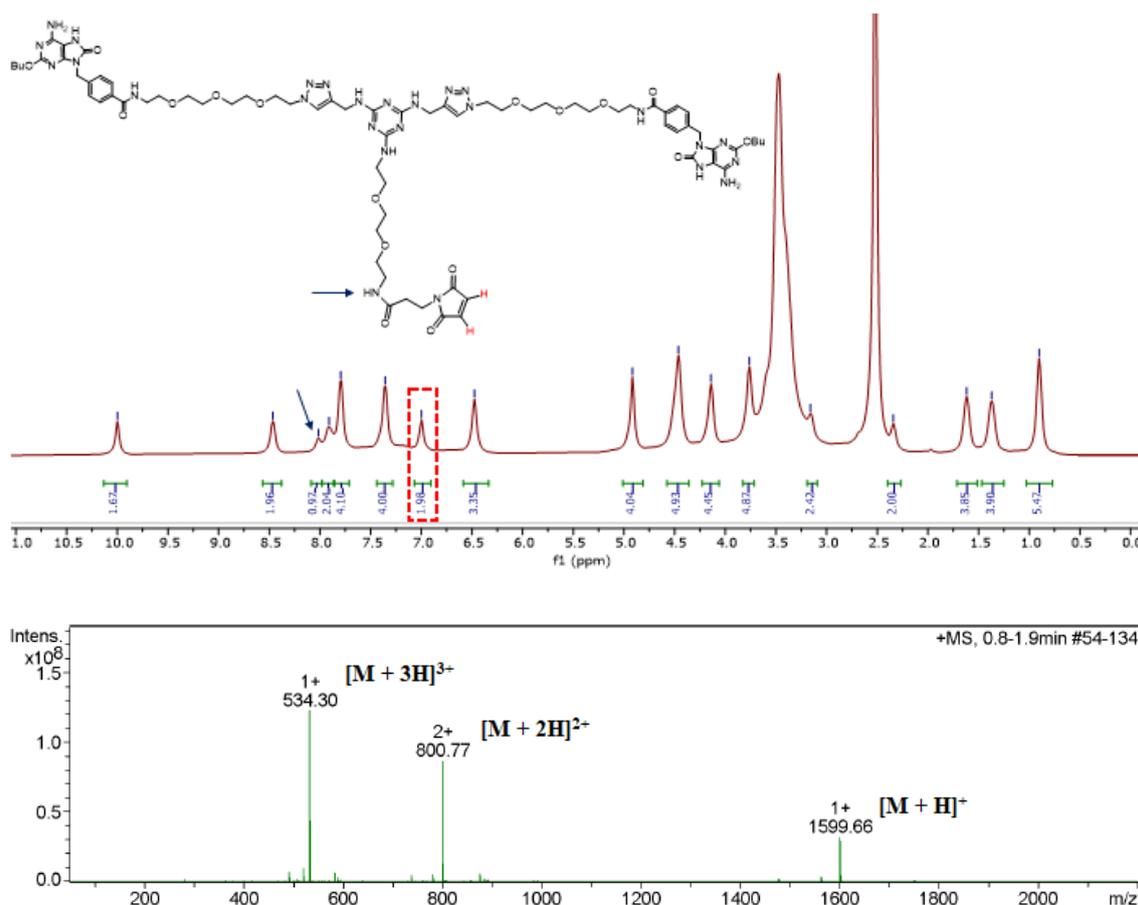


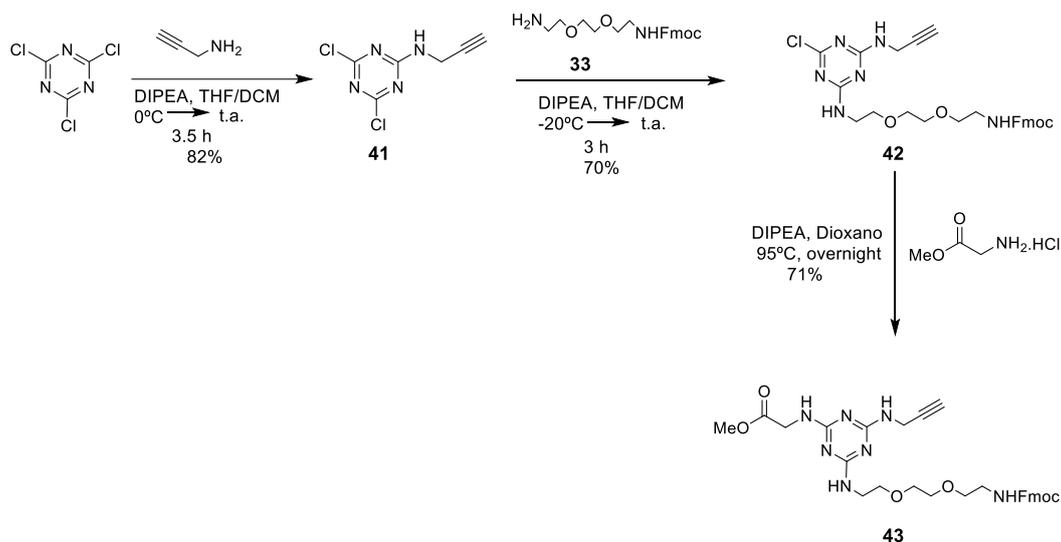
Figura 5.17. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 298 K) (arriba) y de ESI-MS (abajo) del dímero **40**.

Este homodímero del ligando de TLR7 **40** se encuentra funcionalizado para ser conjugado con el péptido de Pru p 3-SH. Como se ha comentado previamente, la conjugación de los dímeros será detallada en la siguiente sección.

5.4.2. Síntesis del heterodímero de ligandos de TLR4 y TLR7 a partir de triazinas trifuncionales

Para la síntesis del heterodímero, que combina simultáneamente un ligando de TLR4 y otro para el TLR7, junto con el péptido alérgico, es necesario la síntesis de una 1,3,5-triazina ortogonalmente trifuncionalizada. Este compuesto nos permitirá evaluar los posibles efectos sinérgicos de estos dos TLRs, a través de una estructura bien definida. Debido al éxito de la síntesis con los dímeros anteriores, se planteó seguir con la estrategia utilizada, es decir, la unión de estructuras a través de la reacción de tipo CuAAC y la amidación del linker una vez eliminado el grupo Fmoc. Como tercer elemento se planteó

la introducción de un ester metílico que pudiera ser posteriormente hidrolizado para permitir una conjugación vía reacción de amidación. La presencia simultánea de tres sustituyentes diferentes en una misma plataforma exige una cuidadosa planificación de las reacciones a utilizar, siendo fundamental que sean ortogonales entre sí. Para ello en primer lugar se realizó la preparación de la 1,3,5-triazina trifuncionalizada **43**. (Esquema 5.14)



Esquema 5.14. Ruta de síntesis de la triazina trisustituida **43**.

El primer paso de la síntesis de la triazina **43** consistió en la monofuncionalización del cloruro cianúrico usando propargilamina y las condiciones descritas por el grupo de Simanek.²⁴⁸ Para ello, se combinaron los reactivos a 0°C en presencia de DIPEA en una mezcla THF/DCM y se agitó durante 90 min. Posteriormente se dejó evolucionar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas adicionales. De esta forma, después de la purificación por medio de cromatografía en columna de gel de sílice, se obtuvo la triazina monosustituida **41** con buen rendimiento (82%). La siguiente etapa consistió en la introducción del espaciador **33**, para ello se utilizaron las mismas condiciones descritas en el trabajo de Simanek. Se adicionó la amina **33** a -20°C , en presencia de DIPEA, en una mezcla THF/DCM y se agitó durante una hora, dejando evolucionar la mezcla la reacción 2 horas adicionales a temperatura ambiente. Con estas condiciones se obtuvo la triazina disustituida **42** con un rendimiento del 70%. La formación de este compuesto fue confirmada por medio de su espectro de $^1\text{H-RMN}$ en el que se observa la introducción del espaciador por la aparición de las señales aromáticas del grupo Fmoc con una relación

²⁴⁸ Patra, S.; *et al.*; *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3808-3811.

de integración correcta con el resto de señales. Adicionalmente, por medio de UHPLC/MS se confirmó la formación de un único producto con el peso molecular esperado. (Figura 5.18)

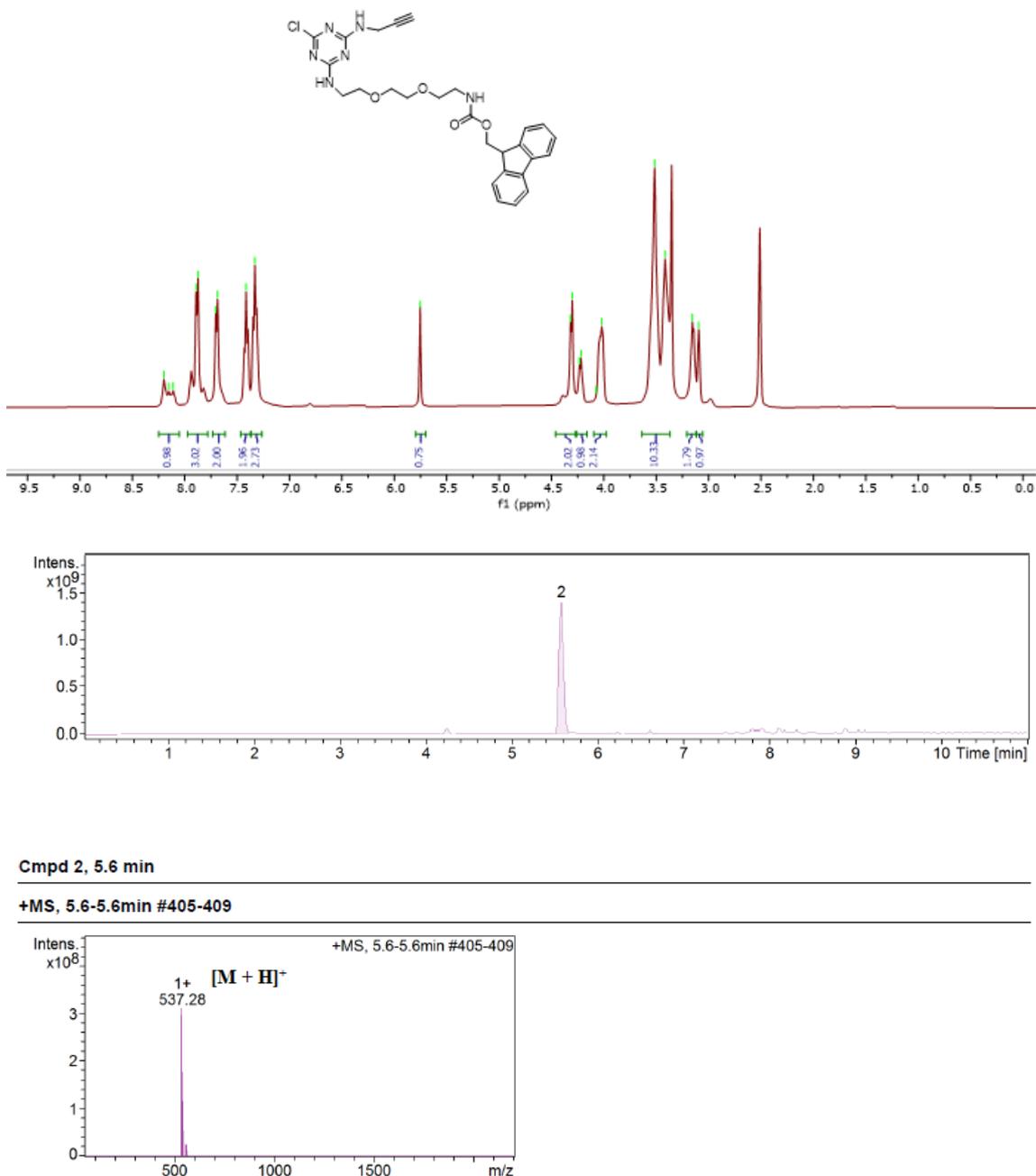


Figura 5.18. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , 298 K) (arriba) y cromatograma de UHPLC/MS (abajo) de la triazina **42**.

Posteriormente, se llevó a cabo la última sustitución del átomo de cloro de la triazina **42**, usando la glicina protegida como éster metílico. Para ello, se combinaron estos reactivos con DIPEA en dioxano, calentándose la mezcla a 95°C durante toda la noche. En estas

condiciones se obtuvo la triazina trisustituida **43** con un rendimiento el 71%. Mediante ^1H -RMN se verificó la formación del compuesto por la aparición de un singulete a 3.71 ppm) asociado al metilo del éster. También, el espectro de masas (ESI) mostró la señal correspondiente al ion molecular con sodio. (Figura 5.19)

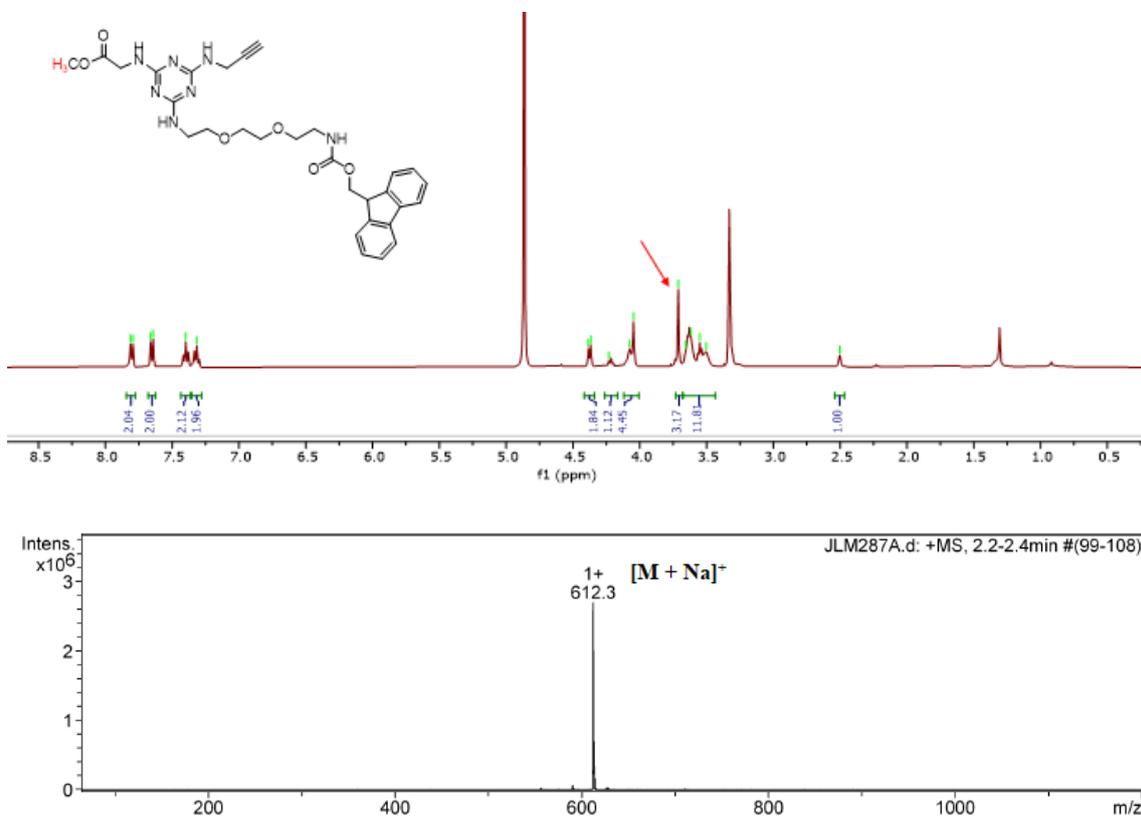
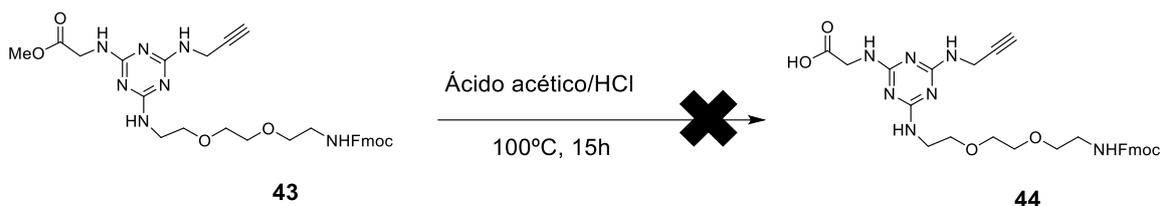


Figura 5.19. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, MeOH- d_4 , 298 K) (arriba) y de ESI-MS (abajo) del compuesto **43**.

Una vez formada la triazina trisustituida **43**, se abordó la desprotección del éster metílico. Debido a la presencia del grupo Fmoc, sensible a medios básicos, era necesario una hidrólisis del éster en medio ácido. Para ello, se usaron unas condiciones descritas en la bibliografía para la hidrólisis de ésteres metílicos en presencia de un grupo Fmoc usando una mezcla ácida de ácido acético/HCl calentada a 100°C.²⁴⁹ (Esquema 5.15)

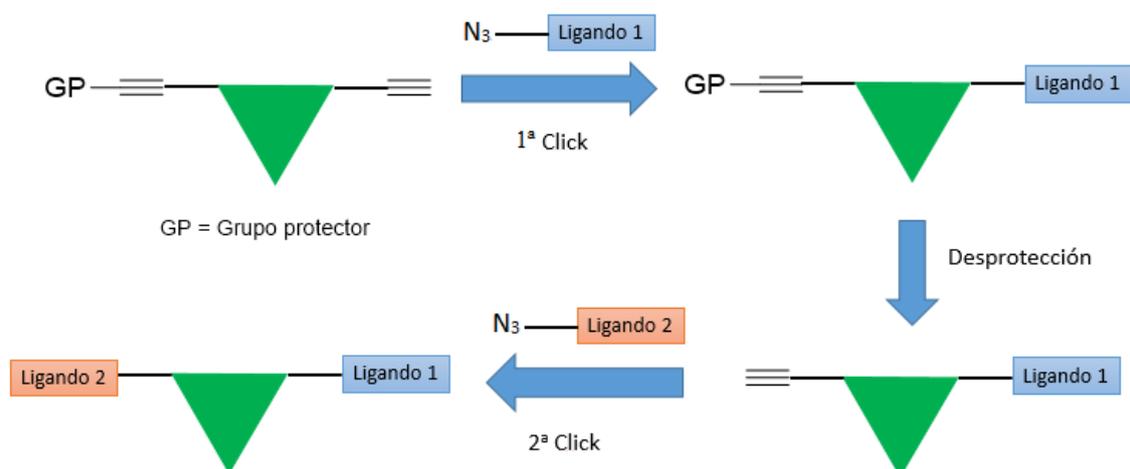
²⁴⁹ Oueis, E.; Stevenson, H.; Jaspars, M.; Westwoodand, N.J.; Naismith, J.H.; *Chem. Commun.* **2017**, 53, 12274-12277.



Esquema 5.15. Primera aproximación para la obtención de la triazina **44**.

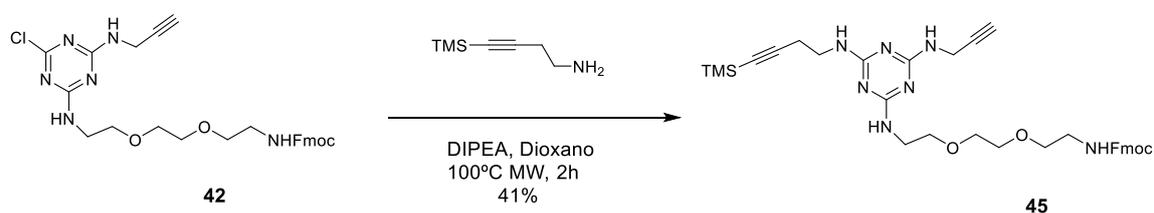
A pesar de estas condiciones tan enérgicas, no se consiguió desproteger completamente el éster **43**, obteniéndose mezclas de reacción y productos secundarios de difícil separación. A la vista de estos resultados, se decidió cambiar la estrategia de la síntesis, buscando otro sustituyente más adecuado para esta tercera sustitución.

Debido a los buenos resultados en la introducción de ligandos para la formación de dímeros usando la reacción CuACC, se decidió utilizar exclusivamente esta reacción. Sin embargo, la síntesis de este dímero mixto de TLR4/7 precisa de selectividad en la introducción de cada uno de los ligandos. Por ello, se planteó la introducción de un grupo alquino protegido para hacer dos reacciones click de forma secuencial. En primer lugar, se realizaría la primera reacción de acoplamiento sobre el alquino terminal desprotegido, después se desprotegería el segundo alquino y se conjugaría el otro ligando mediante otra reacción CuAAC. De esta forma sencilla y elegante sería posible la introducción selectiva de cada uno de los ligandos sobre una triazina trifuncional. (Esquema 5.16)



Esquema 5.16. Representación esquemática de la introducción selectiva de los ligandos vía reacciones CuAAC secuenciales. El triángulo verde representa una 1,3,5-triazina.

Existe una amplia variedad de éteres de silicio que pueden ser utilizados como grupos protectores para alquinos terminales.²⁵⁰ En concreto, se eligió el trimetilsililo (TMS) debido a que este es de los más sencillos y fáciles de desproteger posteriormente. Se partió de la amina comercial 4-(trimetilsilil)-3-butin-1-amina, que presenta este grupo protector y está lista para ser unida directamente a la triazina disustituida **42**. Sin embargo, la sustitución de este tercer átomo de cloro por esta amina no resultó trivial, usando las condiciones utilizadas para la introducción de la glicina en la síntesis de la triazina **43**, no se observó un avance apreciable de la reacción. A la vista de estos resultados, se usaron condiciones más enérgicas como el uso de calentamiento por medio de reactor microondas. Desafortunadamente, al igual que en el caso de la síntesis de la triazina **30**, fueron necesarios largos tiempos de calefacción para consumir completamente los reactivos de partida, a la vez que se producían descomposiciones del producto, lo que provocaba bajos rendimientos. Después de la optimización de los tiempos y las temperaturas de reacción, las mejores condiciones fueron una combinación de los reactivos en dioxano usando irradiación microondas a 100°C durante dos horas. (Esquema 5.17)



Esquema 5.17. Síntesis de la triazina trifuncional **45**.

Con estas condiciones, se obtuvo la triazina **45** con un rendimiento moderado del 41%. El espectro de ¹H-RMN reveló inequívocamente la presencia del grupo TMS por la aparición de un singulete a campo alto (0.12 ppm), correspondiente a sus tres metilos, además de la correcta relación de integración de estos con el resto de señales de la molécula. Por otro lado, el cromatograma de UHPLC/MS demostró la presencia de un solo compuesto correspondiente al ion molecular protonado de la triazina **45**. (Figura 5.20)

²⁵⁰ Larson, G.L.; *Synthesis* **2018**, *50*, 2433-2462.

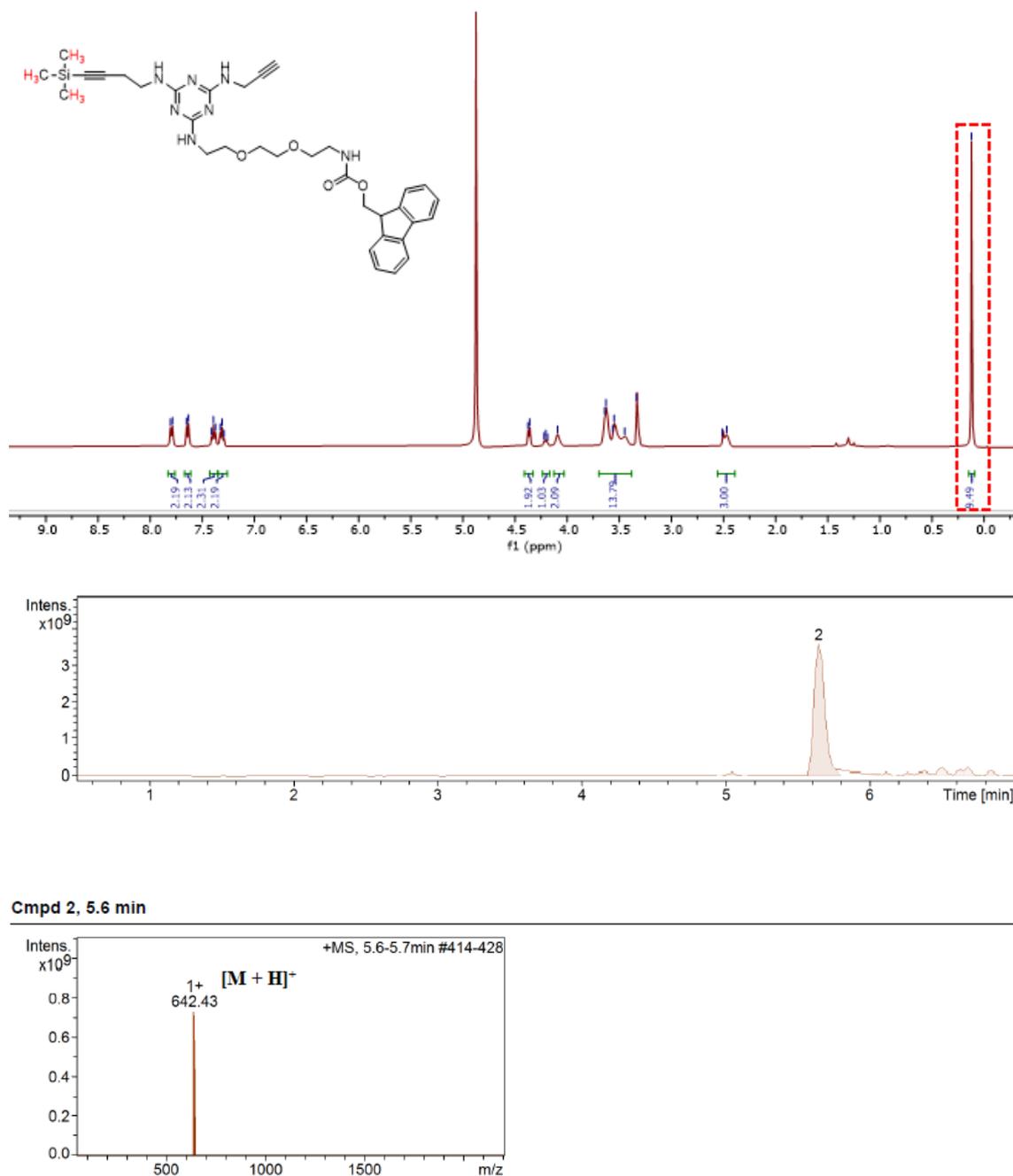
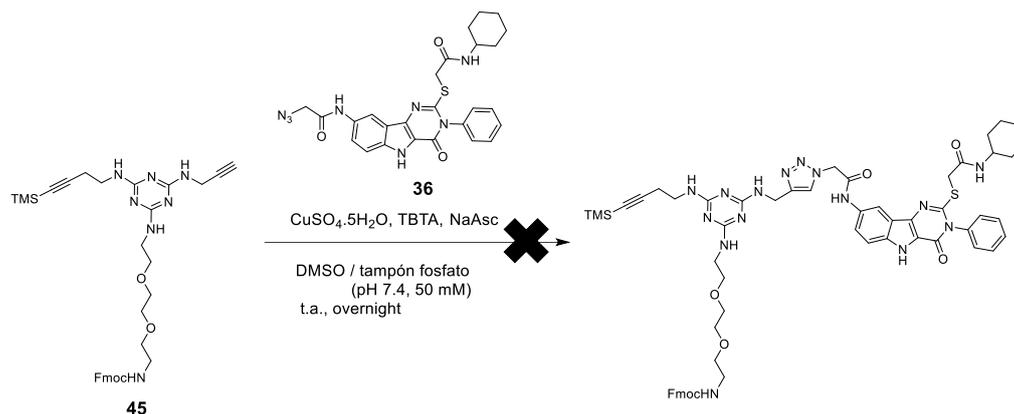


Figura 5.20. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH-d_4 , 298 K) (arriba) y cromatograma de UHPLC/MS (abajo) del compuesto **45**.

Esta triazina trifuncional **45** está lista para introducir un ligando de TLR en el alquino terminal sin proteger. La reacción con la azida del ligando de TLR4 **36** se realizó usando las condiciones de la reacción CuAAC usadas en la formación de los homodímeros anteriores. (Esquema 5.18)



Esquema 5.18. Primera reacción click sobre la triazina trifuncional **45**.

En estas condiciones de reacción no se consiguió obtener el producto deseado, sino que se obtuvo una mezcla de dos compuestos mayoritariamente. Mediante el análisis por UHPLC/MS, estos se identificaron como el compuesto resultado de una doble click del ligando de TLR4 sobre la triazina, así como el correspondiente a una mono click pero sin la presencia del grupo TMS sobre el otro alquino. (Figura 5.21)

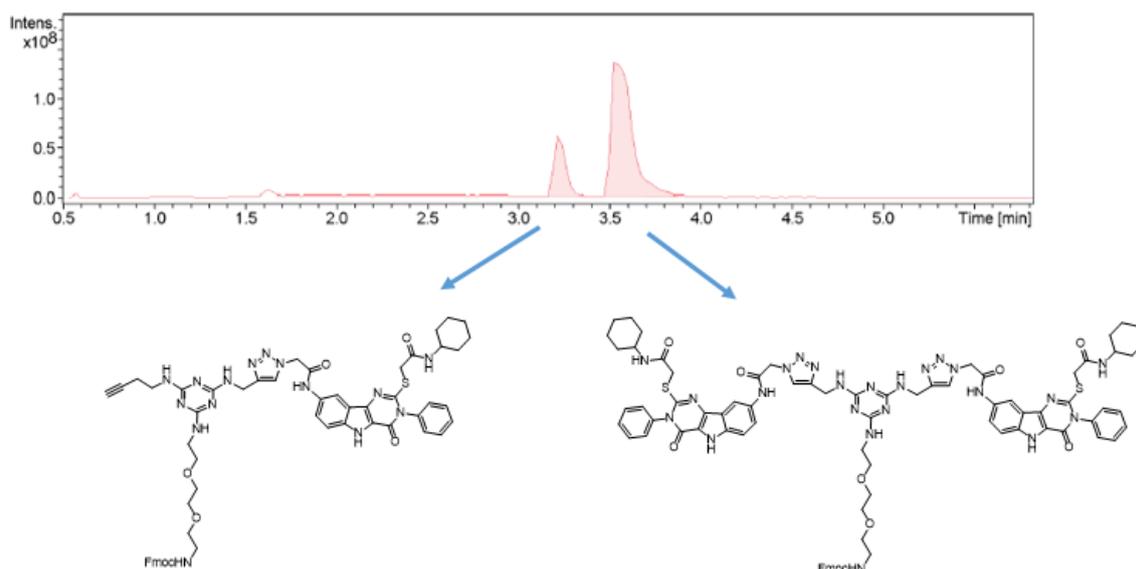


Figura 5.21. Cromatograma de UHPLC/MS de la reacción click con la triazina **45** en el que se identifican los productos generados.

Se observa claramente la desaparición del grupo TMS que deja libre al otro grupo alquino y, por tanto, susceptible de una segunda reacción click con la azida **36**. En un trabajo del grupo de investigación de Aucagne, estudiaron la ortogonalidad de distintos grupos protectores de alquinos frente a las condiciones clásicas de la reacción CuACC. Demostraron que el Cu(I) cataliza la eliminación lenta del grupo TMS, si bien el empleo

de cantidades estequiométricas de cobre o prolongados tiempos de reacción pueden incrementar notablemente este proceso.²⁵¹ De hecho, estos autores hablan del grupo protector TMS en las condiciones clásicas de la reacción CuAAC como un tipo de “semi-ortogonalidad”. Una posible solución a este problema sería el empleo de otros grupos protectores basados en éteres silílicos más resistentes que el TMS como el trietilsil (TES) o el triisopropilsilil (TIPS).²⁵²

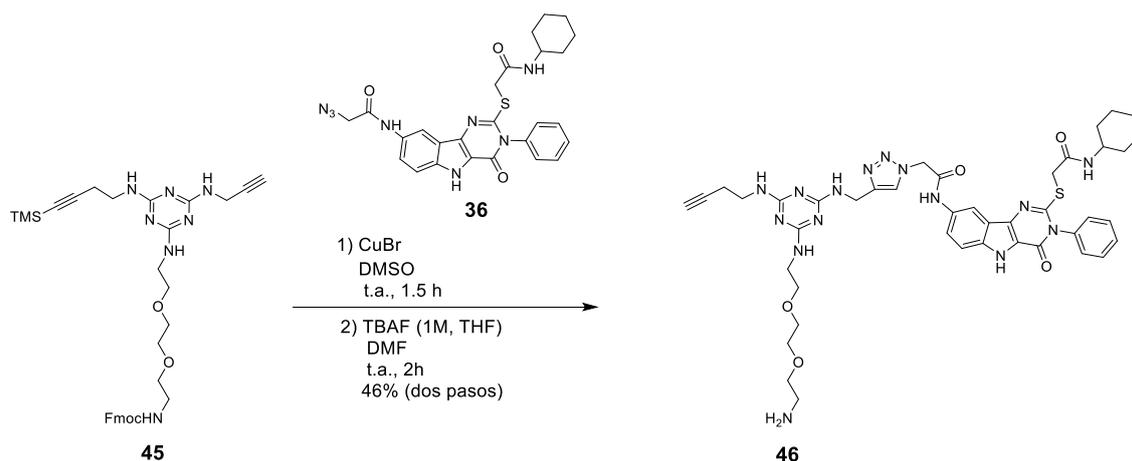
Antes de embarcarnos en la síntesis de triazinas con nuevos grupos protectores, decidimos explorar los límites de esta reacción CuAAC con el objetivo de realizar la reacción click sobre el alquino terminal manteniendo la integridad del grupo TMS. Debido a que la velocidad de la reacción click es mucho mayor que la eliminación del grupo TMS, nos planteamos la búsqueda de las condiciones óptimas para abordar esta reacción. Se realizó una cuidadosa selección de las condiciones de la reacción, limitando la cantidad de catalizador Cu(I) en el medio, suprimiendo el uso de ascorbato sódico y del TBTA. El avance de la reacción, así como la desprotección del grupo TMS, pudieron ser fácilmente monitorizadas por TLC. Las mejores condiciones se encontraron con la combinación de la triazina **45** y la azida **36** en DMSO, en presencia de 0.2 equivalentes de CuBr a temperatura ambiente. Tras una hora de reacción, se realizó otra adición de 0.2 equivalentes de CuBr, finalizando la misma a la media hora. Por lo tanto, en una hora y media es posible completar la reacción CuAAC sin la desprotección del grupo TMS. Una vez llevado a cabo el acoplamiento, se realizó la desprotección del grupo TMS usando TBAF.²⁵³ Se ha demostrado que este tratamiento con TBAF también es capaz de desproteger el grupo Fmoc,²⁵⁴ siendo por tanto un proceso sintéticamente mucho más eficiente, ya que es posible la desprotección de los dos grupos protectores simultáneamente. (Esquema 5.19)

²⁵¹ Valverde, I.E.; Delmas, A.F.; Aucagne, V.; *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7597-7602.

²⁵² Meudtner, R. M.; Ostermeier, M.; Goddard, R.; Limberg, C.; Hecht, S.; *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9834-9840.

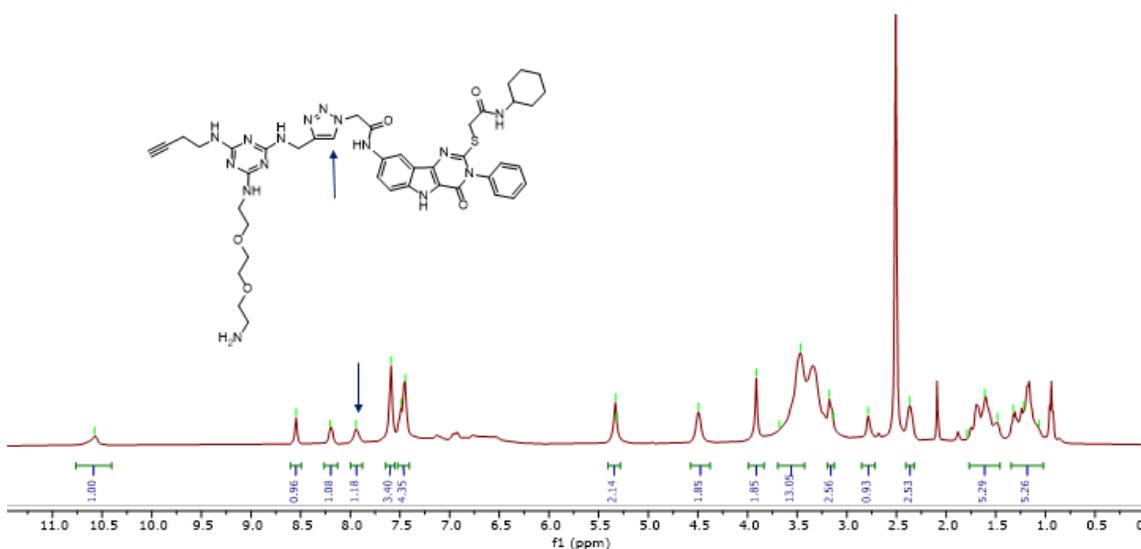
²⁵³ Cox, D.P.; Terpinski, J.; Lawrynowicz, W.; *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3216-3219.

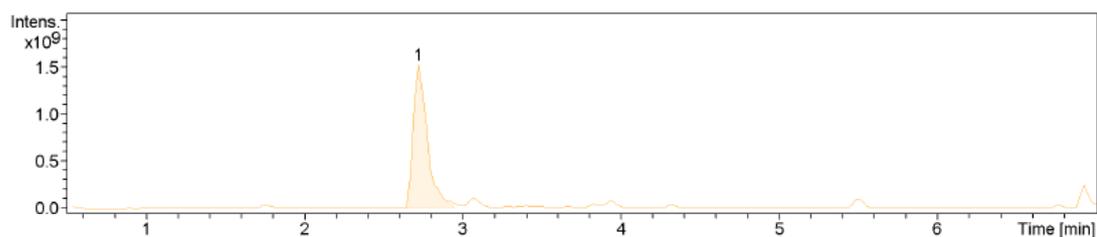
²⁵⁴ Ueki, M.; Amemiya, M.; *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6617-6620.



Esquema 5.19. Síntesis de la triazina **46**.

Por lo tanto, mediante la adición de TBAF en DMF a temperatura ambiente es posible la obtención del intermedio **46** con un rendimiento del 46%, realizándose una reacción de acoplamiento, así como la eliminación de los grupos protectores Fmoc y TMS. La triazina **46** fue caracterizada por ^1H -RMN, en cuyo espectro se observan las señales características del pirimidoindol así como la aparición de una señal a 7.94 ppm correspondiente al nuevo triazol generado. También, se confirma la desprotección de los grupos Fmoc y TMS debido a la desaparición de las señales características aromáticas y del singulete en torno a 0.12 ppm, respectivamente. Adicionalmente, el cromatograma de UHPLC/MS indica inequívocamente la presencia de un único compuesto con una relación m/z de señales correspondiente al compuesto **46**. (Figura 5.22)





Cmpd 1, 2.7 min

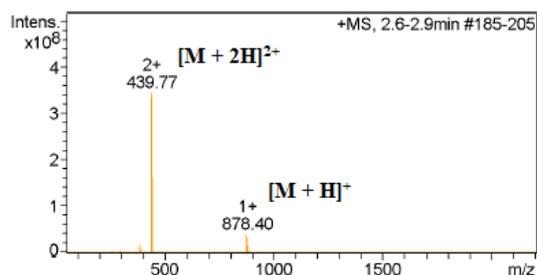
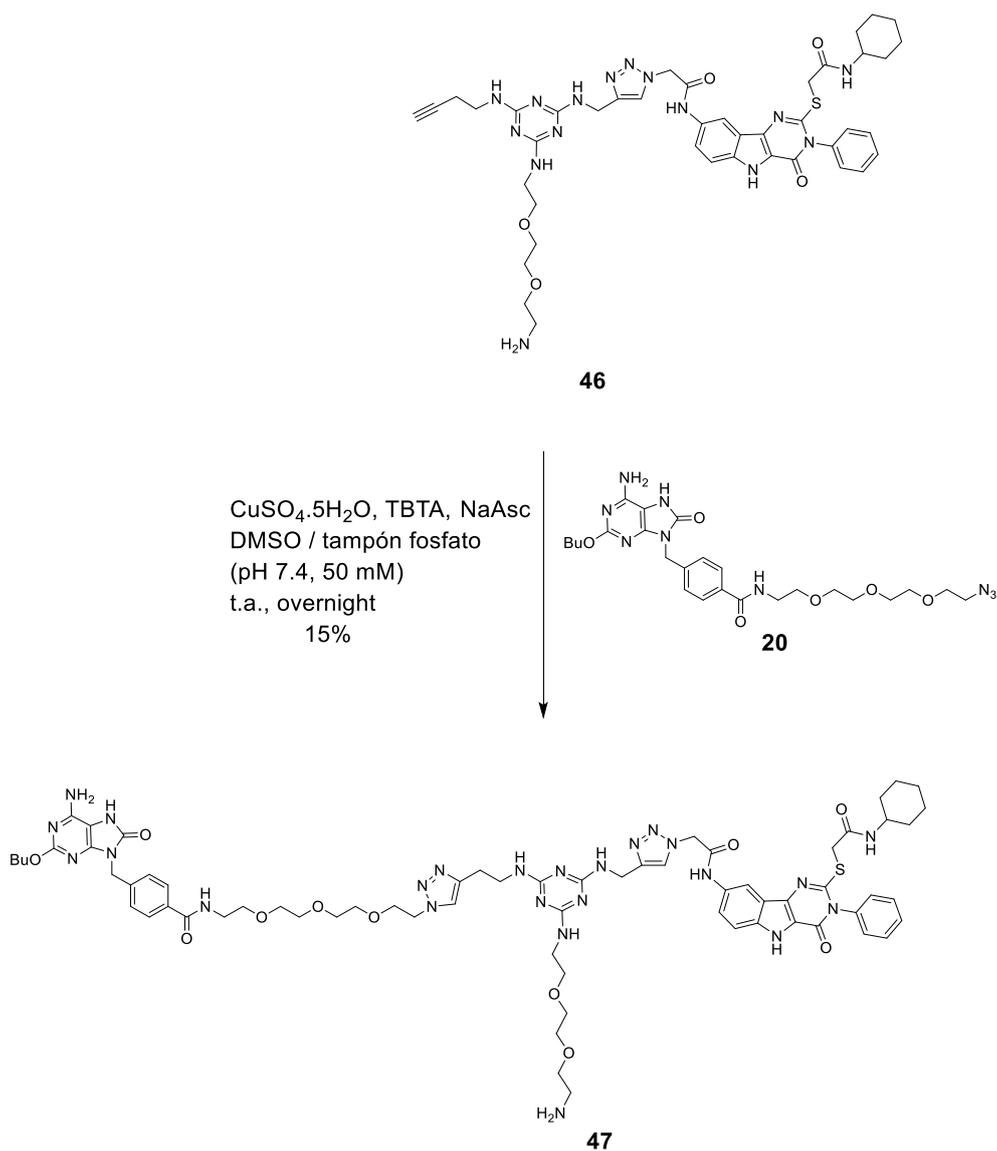


Figura 5.22. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , 298 K) (arriba) y cromatograma de UHPLC/MS (abajo) del compuesto **46**.

Este intermedio **46**, posee un gran valor sintético, puesto que contiene un ligando TLR4 y un extremo alquino libre para ser conjugado a cualquier otro ligando de interés.

Una vez sintetizada la triazina **46**, el siguiente paso consistió en la introducción del ligando de TLR7 a través de otra reacción de tipo CuAAC. Para ello, se utilizó la azida derivada de la 8-oxoadenina **20**, sintetizada previamente, usando las condiciones puestas a punto en la síntesis de los homodímeros anteriores. (Esquema 5.20)



Esquema 5.20. Síntesis del heterodímero con ligandos para TLR4 y TLR7, **47**.

Usando esta estrategia, pudo obtenerse el producto **47**; sin embargo, la presencia de impurezas generadas en el transcurso de la reacción, de difícil separación, hizo necesario una purificación de forma iterativa mediante RP-HPLC, obteniéndose el heterodímero **47** con un rendimiento del 15%. En el espectro de ^1H -RMN se observa claramente cada una de las señales asociadas a cada uno de los ligandos de TLR4 y TLR7. Por otro lado, el cromatograma de UHPLC/MS muestra las señales m/z correspondientes al heterodímero **47**. (Figura 5.23)

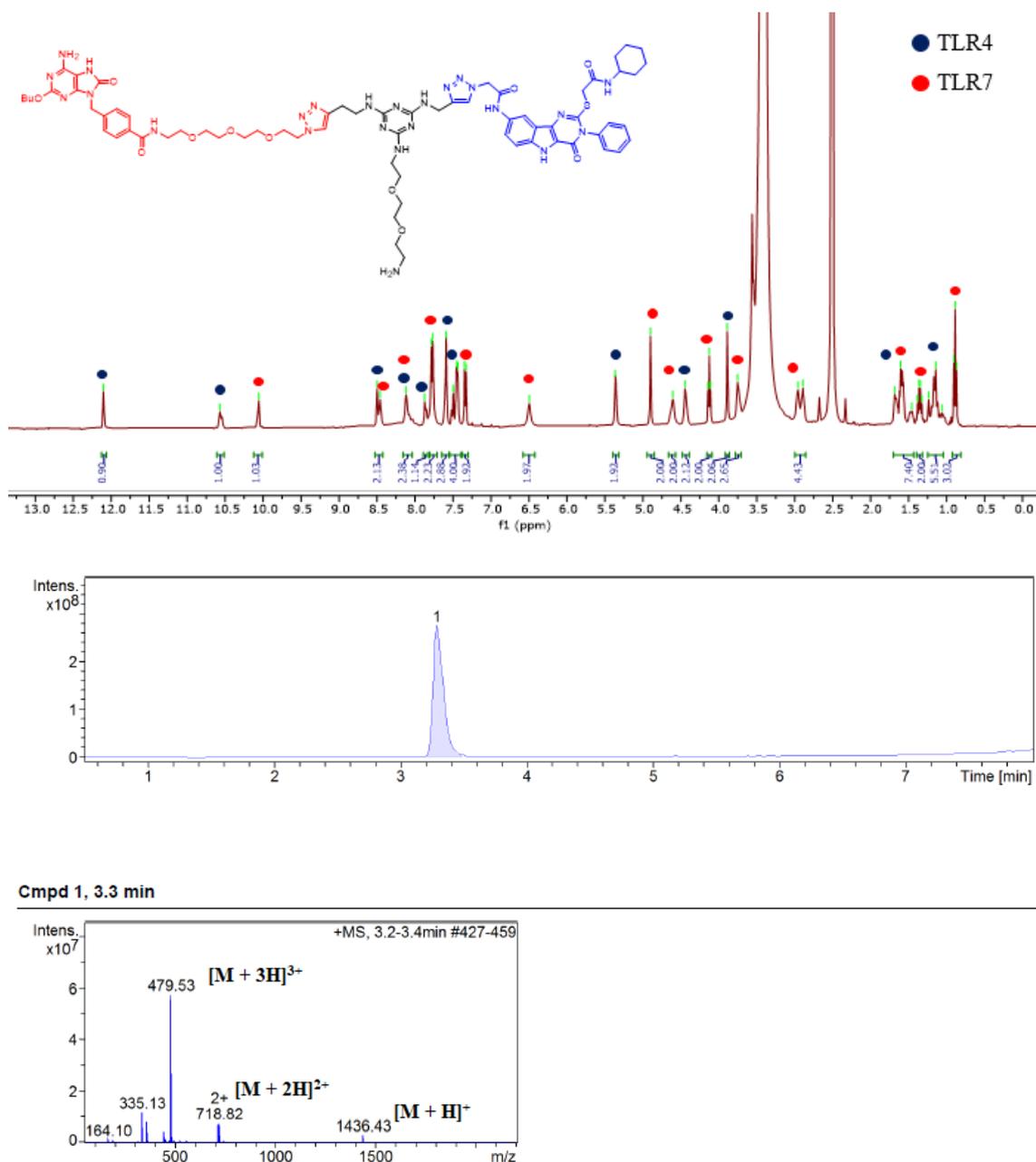
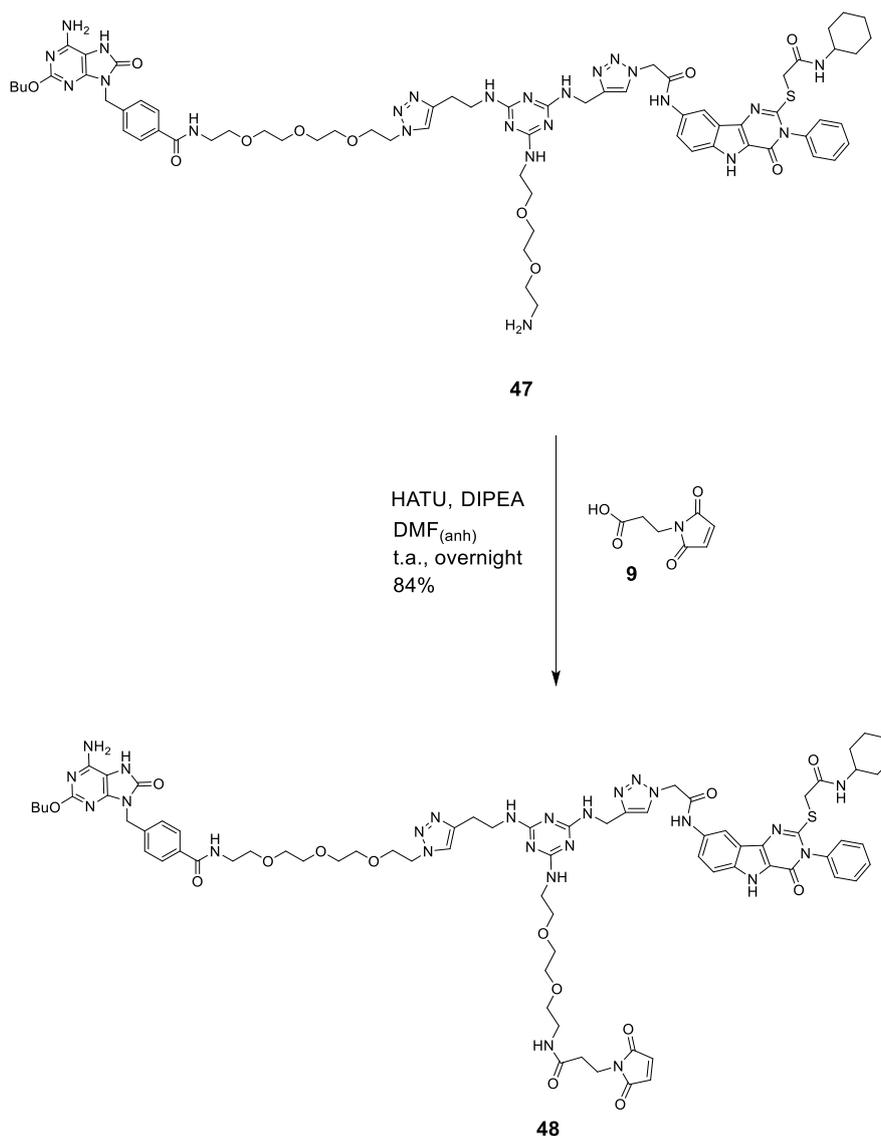


Figura 5.23. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 298 K) (arriba) y cromatograma de UHPLC/MS (abajo) del heterodímero **47**.

Al igual que con los otros dímeros, la última etapa consistió en la introducción de la maleimida **9**, a través de una reacción de amidación, mediante el uso del agente de acomplamiento HATU en las condiciones puestas a punto para esta reacción. (Esquema 5.21)



Esquema 5.21. Síntesis del dímero del ligando TLR4 y TLR7 con el grupo maleimido **48**.

De esta forma, se obtuvo el dímero del ligando de TLR4 y de TLR7 con el grupo maleimido, **48**, con un excelente rendimiento (84%). Para confirmar la completa amidación de la amina **47**, dicho compuesto fue caracterizado por espectroscopía de RMN y espectrometría de masas. En el espectro de ^1H -RMN, se observa la aparición de la señal característica de los protones olefínicos de la maleimida, desdoblada debido a la formación de rotámeros de la 1,3,5-triazina a 7.02 y 6.97 ppm, así como la correcta relación de integración de esta señal con el resto de señales de la molécula. En el espectro de masas (ESI) se observa inequívocamente las señales m/z correspondientes al dímero **48**. (Figura 5.24)

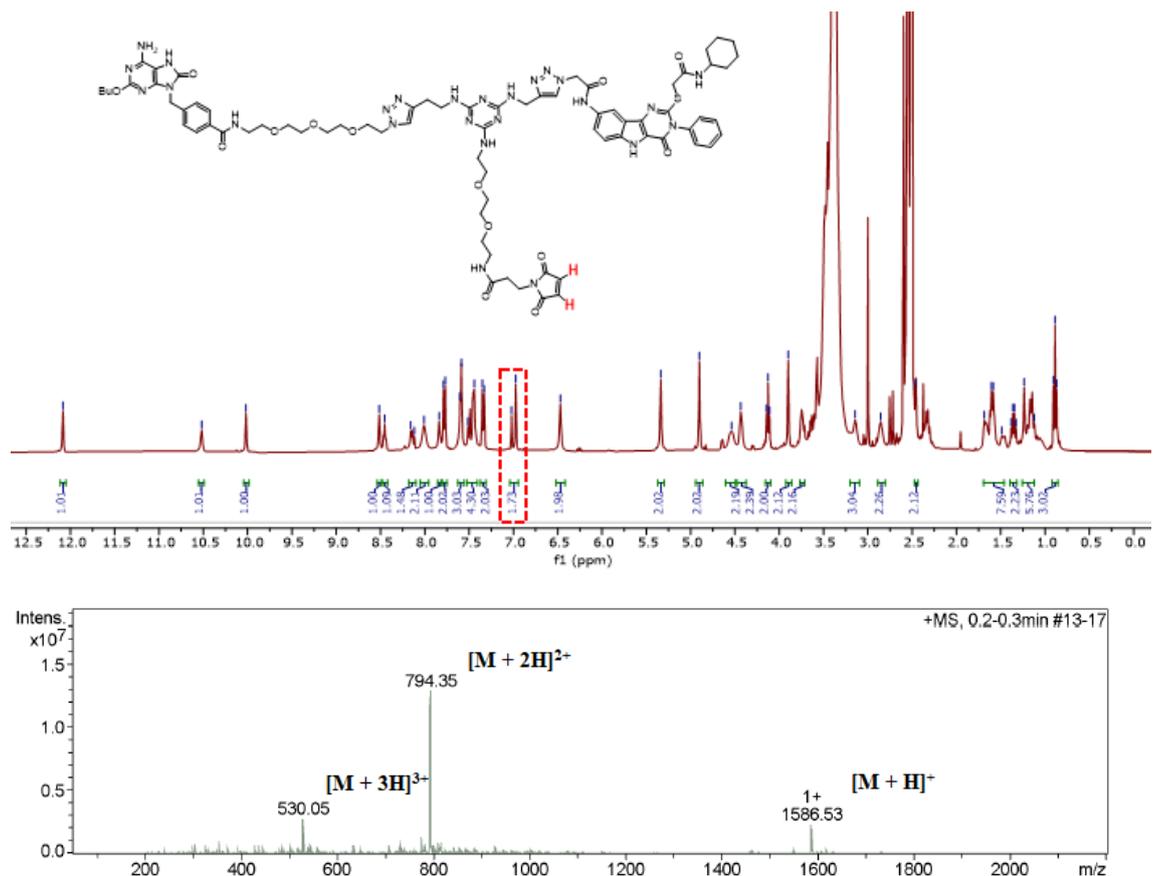


Figura 5.24. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) (arriba) y de ESI-MS (abajo) del dímero **48**.

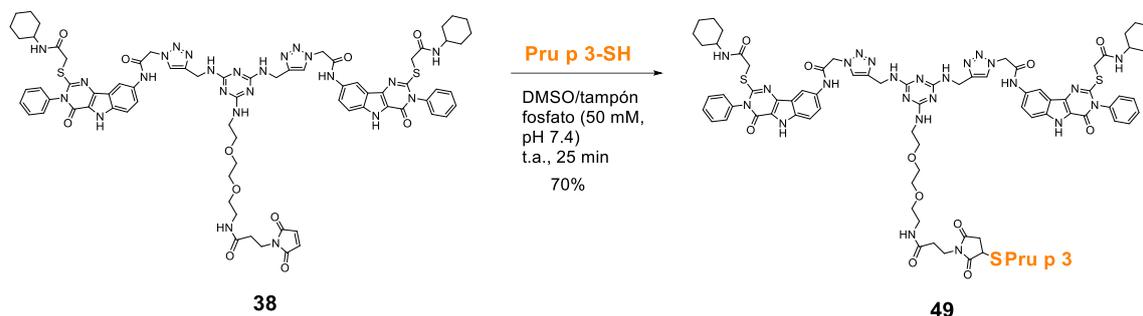
Una vez sintetizados este heterodímero **48**, así como los homodímeros **38** y **40**, se llevó a cabo las conjugaciones con el péptido del epítipo de Pru p 3 a través de la reacción tío-eno.

5.5 Conjugación de los dímeros de los ligandos de TLR con el péptido Pru p 3

Una vez sintetizados los diferentes dímeros funcionalizados con un grupo maleimido, abordamos la conjugación con el péptido Pru p 3-SH para realizar la comparación de su actividad biológica con los correspondientes conjugados monoméricos estudiados anteriormente.

Basándonos en la experiencia adquirida a lo largo de la presente Tesis Doctoral en la conjugación de ligandos insolubles en medios acuosos, se utilizaron las condiciones puestas a punto para este tipo de adiciones de tipo tío-Michael. Para ello, en primer lugar

se abordó la conjugación del homodímero de TLR4 **38** con el péptido Pru p 3-SH. (Esquema 5.22)



Esquema 5.22. Síntesis del conjugado **49** con el péptido Pru p 3-SH.

La maleimida **38** y el péptido Pru p 3-SH fueron disueltos en DMSO y tampón fosfato (50 mM, pH 7.4), respectivamente. Seguidamente, se mezclaron por medio de agitación orbital durante 25 min a temperatura ambiente. El avance de la reacción fue monitorizado por RP-HPLC observándose mayoritariamente el conjugado **49**. Sin embargo, también se observó la presencia de impurezas en la reacción. Debido a que estos dímeros presentan una mayor insolubilidad en medios acuosos que sus correspondientes homólogos monoméricos, se realizó una purificación mediante ciclos de lavado a través de centrifugación. De esta forma se obtuvo el conjugado **49** como un sólido blanco con buen rendimiento (70%). Este conjugado fue caracterizado satisfactoriamente por medio de RP-HPLC y por espectrometría de masas (ESI), donde se detectó la presencia del conjugado **49** con diferentes cargas. (Figura 5.25)

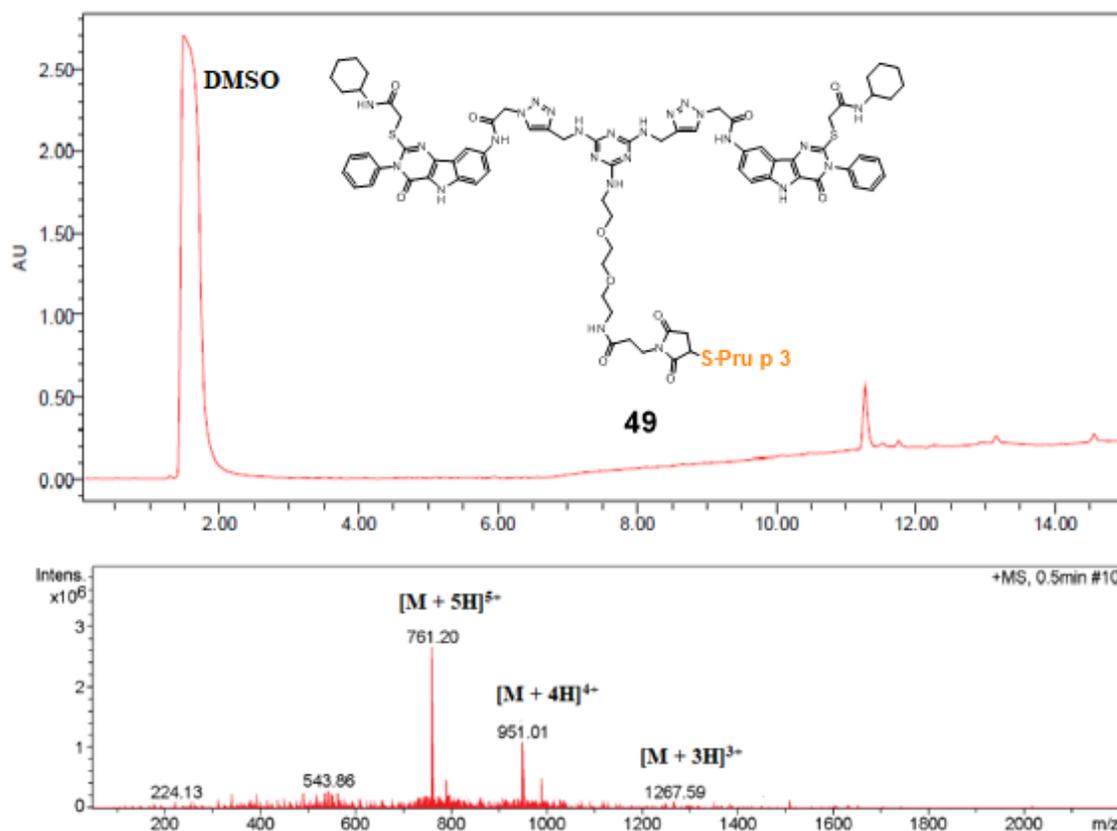
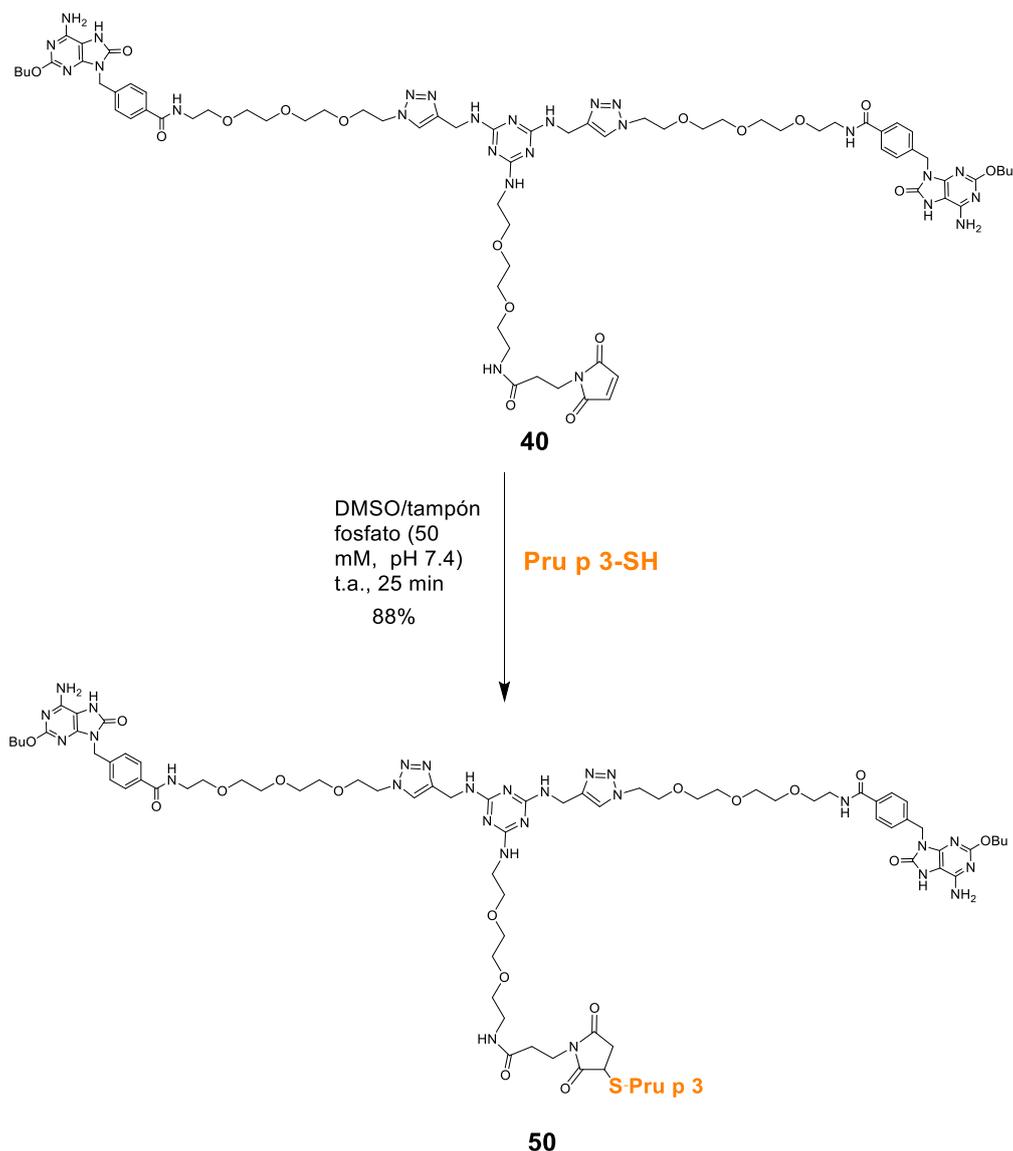


Figura 5.25. Cromatograma de RP-HPLC (arriba) y espectro de ESI-MS (abajo) del conjugado **49**.

A continuación, se llevó a cabo la conjugación sobre el homodímero de TLR7, **40**. (Esquema 5.23)



Esquema 5.23. Síntesis del conjugado **50** con el péptido Pru p 3-SH.

Para ello, la maleimida **40** y el péptido Pru p 3-SH fueron disueltos en DMSO y tampón fosfato (50 mM, pH 7.4), respectivamente, en proporciones equimoleculares. Seguidamente, se mezclaron por medio de agitación orbital durante 25 min a temperatura ambiente. El avance de la reacción fue monitorizado por RP-HPLC, confirmando la desaparición de los productos de partida de forma casi inmediata y observándose únicamente la señal correspondiente al conjugado. Solamente fue necesario un par de lavados con H₂O Milli-Q para eliminar las sales presentes en la reacción, obteniéndose el conjugado **50** con un excelente rendimiento (88%). De nuevo, el producto final fue caracterizado por RP-HPLC y espectrometría de masas para confirmar su pureza y monodispersidad. (Figura 5.26)

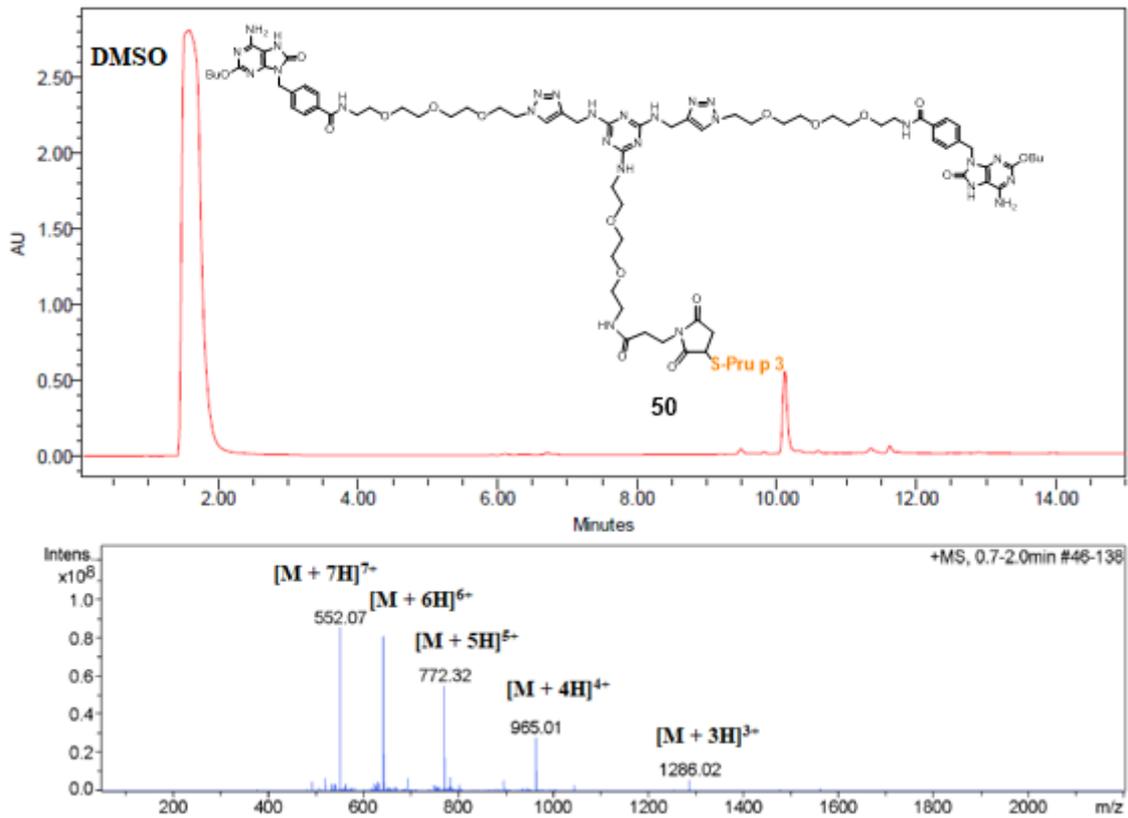
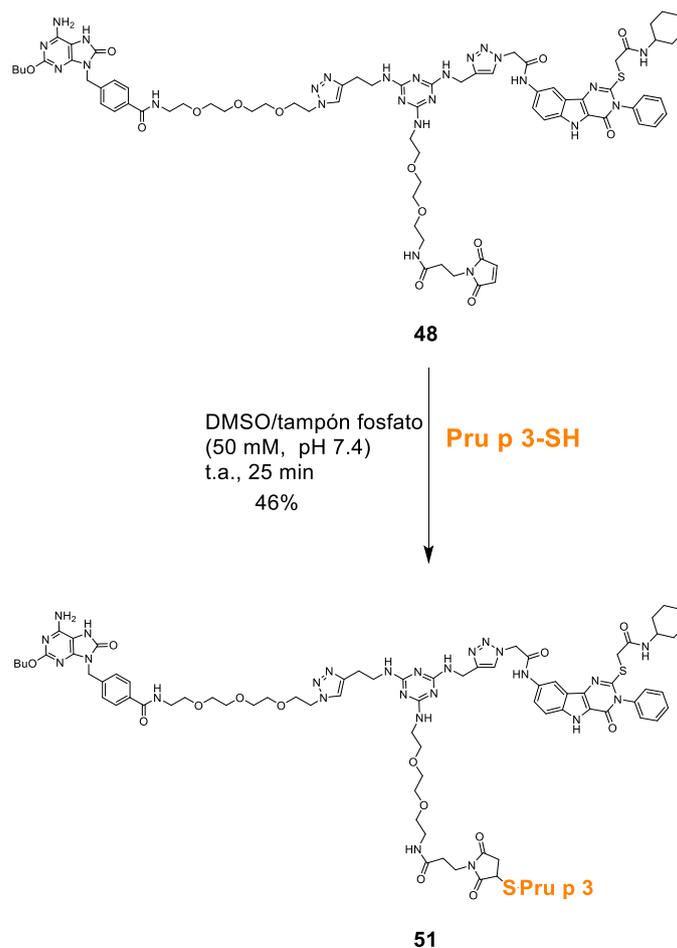


Figura 5.26. Cromatograma de RP-HPLC (arriba) y espectro de ESI-MS (abajo) del conjugado **50**.

Una vez sintetizado el conjugado **50**, se procedió a la conjugación del heterodímero **48** con el péptido Pru p 3-SH por medio del mismo protocolo. (Esquema 5.24)



Esquema 5.24. Síntesis del conjugado **51** con el péptido Pru p 3-SH.

El avance de la reacción fue monitorizado por RP-HPLC, confirmando la total desaparición de los productos de partida; sin embargo, el análisis reveló la presencia de algunas pequeñas impurezas junto a la señal del conjugado **51**. Por ello, se realizó una rápida y sencilla purificación por RP-HPLC, proporcionando el conjugado **51** como un sólido blanco con un rendimiento moderado del 46%. Como en todas las síntesis de conjugados, el producto final fue caracterizado por RP-HPLC y espectrometría de masas para confirmar su pureza y monodispersidad. (Figura 5.27)

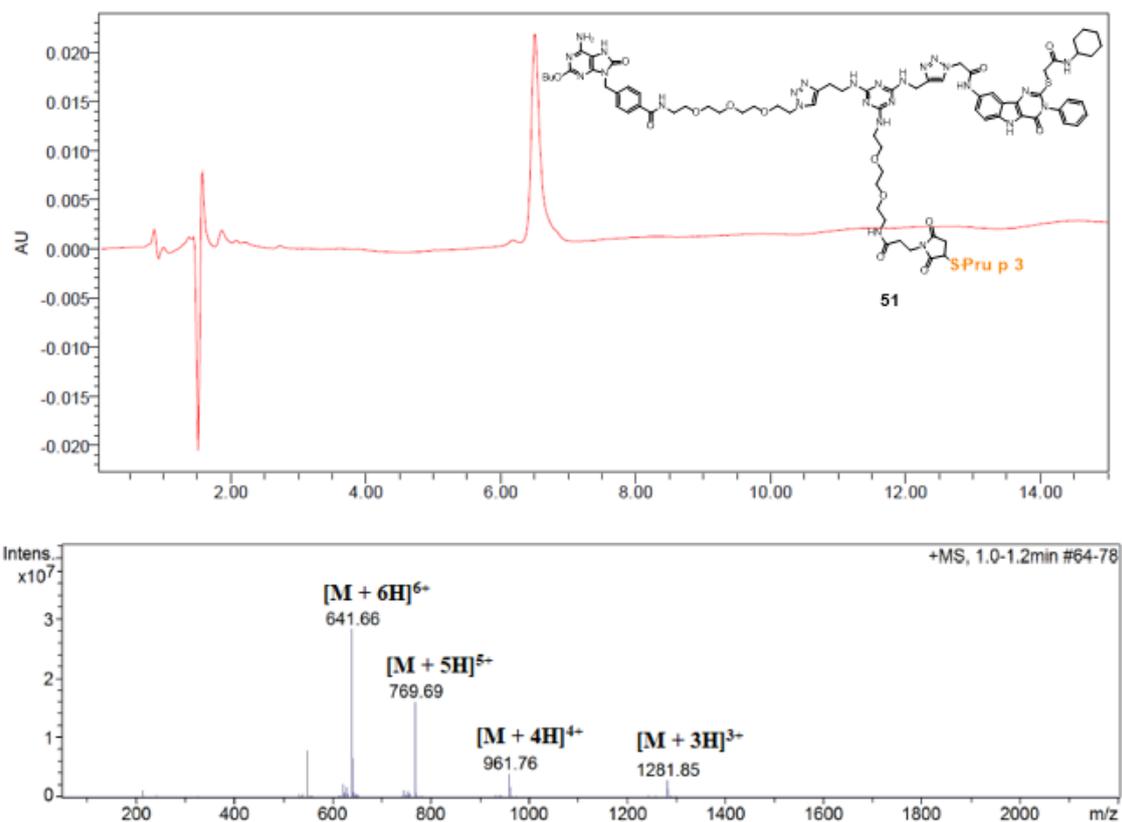


Figura 5.27. Cromatograma de RP-HPLC (arriba) y espectro de ESI-MS (abajo) del conjugado **51**.

De esta forma se ha demostrado la versatilidad de esta estrategia sintética de conjugación del péptido Pru p 3-SH a diferentes dímeros de ligandos de TLR de una forma rápida y eficiente.

5.6 Evaluación biológica de los conjugados dímero-péptido

Una vez sintetizados y caracterizados los conjugados de los diferentes dímeros de TLR, se procedió a su evaluación biológica para determinar si la presentación de dos ligandos idénticos o diferentes, produce una actividad inmunológica mejor en comparación con la producida por sus correspondientes compuestos monoméricos. Estos estudios *in vitro* se están realizando actualmente en el grupo de alergología de la Dra. Cristobalina Mayorga del Hospital Regional Universitario de Málaga. A continuación, se presentan los resultados preliminares que se han obtenido hasta el momento.

Lo primero que hemos analizado es el efecto de estos conjugados en el proceso de maduración de las DCs, a través de marcadores como son las moléculas co-estimuladoras.

Estos estudios *in vitro* se realizaron de forma similar a los realizados con los conjugados de Pru p 3 con el ligando de TLR4, **11 (4p)** y el ligando de TLR7, **23 (7p)**. Estos conjugados serán comparados junto a los dímeros preparados en este capítulo; dímero del ligando de TLR4, **49 (4p4)**; de TLR7, **50 (7p7)** y heterodímero del ligando TLR4/7, **51 (4p7)**. También, para comprobar si los posibles efectos sinérgicos del heterodímero están influenciados por la presentación de los ligandos en la misma molécula, se comparó su actividad con aquella obtenida de la mezcla de los conjugados “monoméricos” **11 y 23 (4p+7p)**. Por último, se incluyó también el péptido Pru p 3-SH (**Pp3**) como control. Se utilizará esta nomenclatura de ahora en adelante ya que resulta más intuitiva y simple para referenciar. (Figura 5.28)

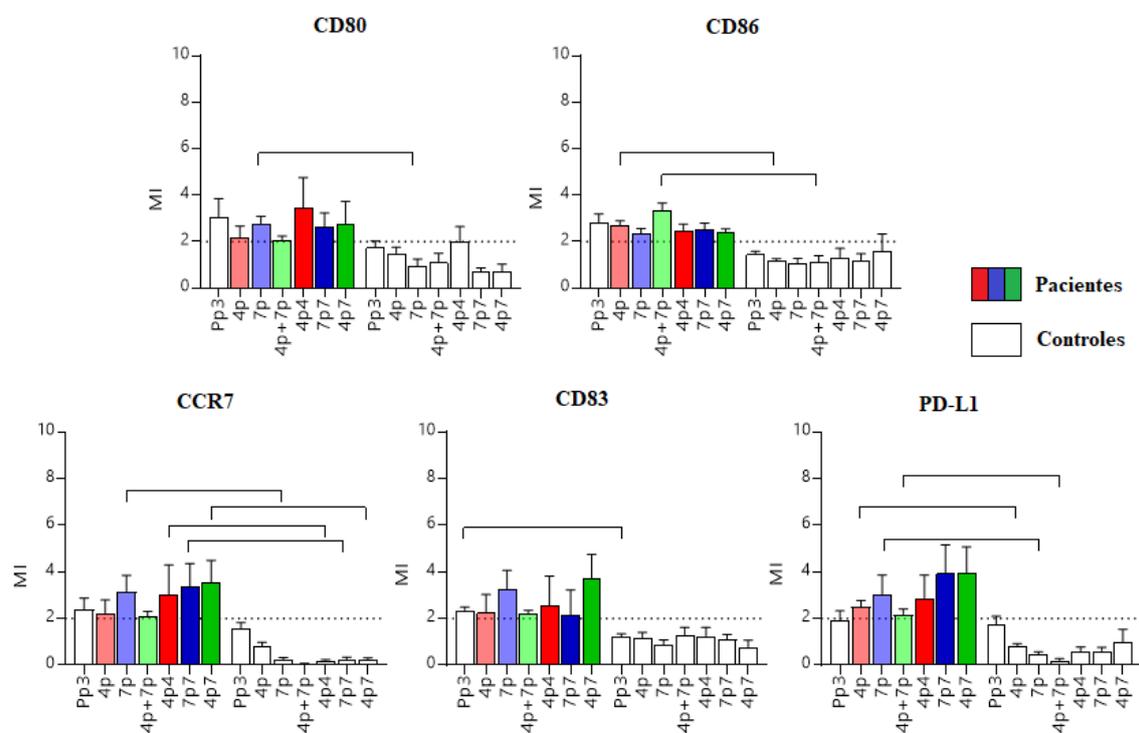


Figura 5.28. Las barras representan la mediana y el error estándar de la media del índice de maduración para los diferentes marcadores de superficie en las moDCs (CD80 y CD86) (arriba) y de la producción de marcadores (CCR7, CD83, PD-L1) (abajo) en los sobrenadantes de los ensayos de moDC para **Pp3**, **4p**, **7p**, **4p+7p**, **4p4**, **7p7** y **4p7** de pacientes alérgicos (n= 4) y controles (n= 5) a 10 nM. La prueba U de Mann-Whitney se usó para comparaciones por pares entre grupos no relacionados y la prueba de rango con signo de Wilcoxon se usó para comparaciones por pares en muestras relacionadas, mostrando diferencias significativas como barras horizontales (p<0.05). La línea de puntos representa el índice de maduración > 2.

A través de los marcadores de superficie y de expresión celulares se observó que el conjugado **4p** es capaz de estimular la migración (CCR7), la activación (CD83), la

regulación (PD-L1) y la maduración (CD80 y CD86) de las DCs en pacientes alérgicos, siendo estadísticamente significativa para el PD-L1 y CD86, cuando comparamos con los controles. Sin embargo, el dímero **4p4** mantuvo el mismo efecto, siendo significativo solo para el CCR7. En pacientes alérgicos, ambos tipos de estructuras con el ligando de TLR4 (**4p** y **4p4**) tuvieron la capacidad de estimular la migración, la activación, la regulación y la maduración de las DCs, aunque sin cambios significativos entre ambas.

También se observa que el conjugado **7p** es capaz de estimular la migración (CCR7), la activación (CD83), la regulación (PD-L1) y la maduración (CD80 y CD86) de las DCs en pacientes alérgicos, siendo estadísticamente significativa para el CCR7 y PD-L1, cuando comparamos con los controles. Sin embargo, el homodímero **7p7** mantuvo el mismo efecto, siendo significativo solo para el CCR7. En pacientes alérgicos, ambos tipos de estructuras con el ligando de TLR7 (**7p** y **7p7**) tuvieron la capacidad de estimular la migración, la activación, la regulación y la maduración de las DCs, aunque sin cambios significativos entre ambas.

Por último, la combinación de los dos conjugados **4p+7p** es capaz de estimular la migración (CCR7), la activación (CD83), (PD-L1) y la maduración (CD80 y CD86) de las DCs en pacientes alérgicos, siendo estadísticamente significativa para el CCR7, PD-L1 y CD86, cuando comparamos con los controles. Por otro lado, el heterodímero **4p7** mantuvo el mismo efecto, pero siendo significativo para el CCR7. En pacientes alérgicos, ambas combinaciones (**4p+7p** y **4p7**) tuvieron la capacidad de estimular la migración, la activación, la regulación y la maduración de las DCs, aunque sin cambios significativos entre ambas. Sin embargo, a pesar de ver un mayor incremento de los índices del CCR7, CD83 y PDL1 en presencia de **4p7**, no mostró diferencias significativas con respecto al efecto causado por la combinación **4p+7p**.

El siguiente estudio consistió en investigar cómo todas estas estructuras influían en la proliferación de células T_{H1} y T_{H2}. También se estudió la respuesta reguladora que ejercían estas estructuras sobre la proliferación de las Treg (ambos fenotipos FOXP3+IL10+ y FOXP3-IL10+). Estos resultados están recogidos en la figura 5.29.

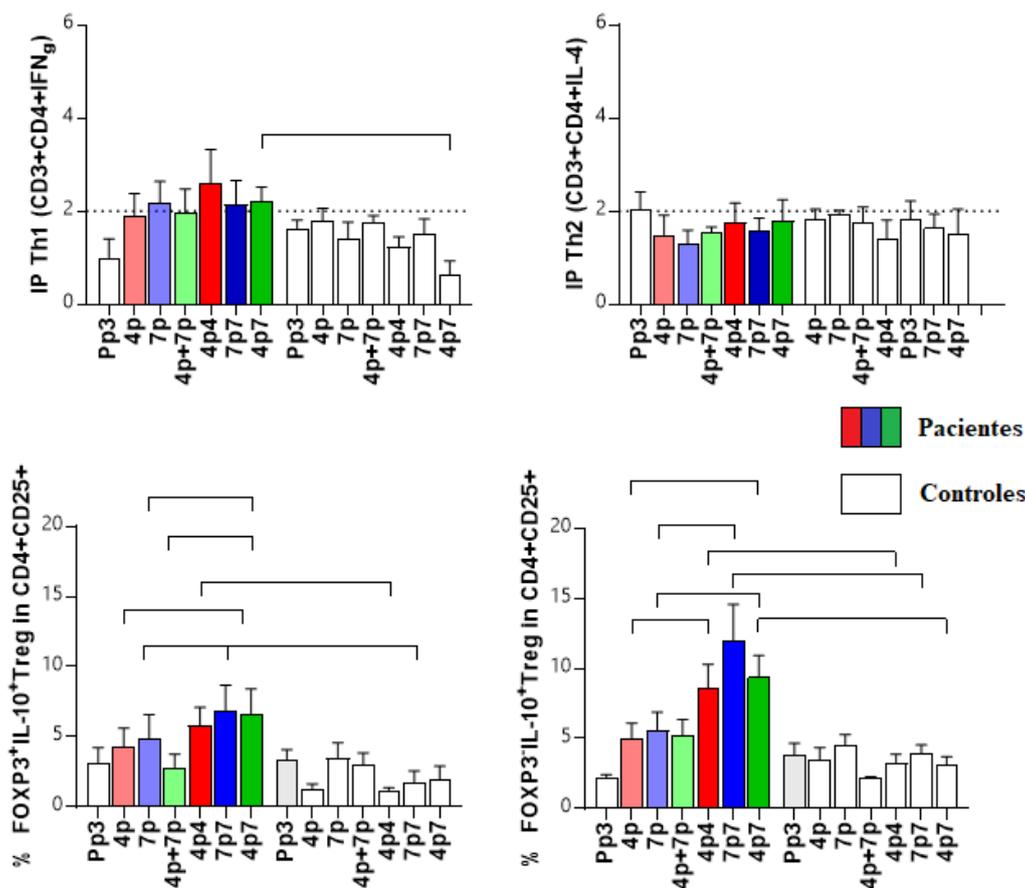


Figura 5.29. Las barras representan la mediana y el error estándar de la media del índice de proliferación de células T_H1 y T_H2 (arriba) y de los porcentajes de células Treg (abajo) para **Pp3**, **4p**, **7p**, **4p+7p**, **4p4**, **7p7** y **4p7** de pacientes alérgicos ($n=4$) y controles ($n=5$) a 10 nM. La prueba U de Mann-Whitney se usó para comparaciones por pares entre grupos no relacionados y la prueba de rango con signo de Wilcoxon se usó para comparaciones por pares en muestras relacionadas, mostrando diferencias significativas como barras horizontales ($p < 0.05$). La línea de puntos representa el índice de maduración > 2 .

Respecto a la proliferación de células T, se observó que **4p** no era capaz de estimular la proliferación de las células T_H1 ni T_H2 ($IP < 2$) en pacientes alérgicos ni en controles. Sin embargo, aunque no fue significativo, el homodímero **4p4** sí que estimuló la proliferación de las T_H1 y no la de las T_H2 en pacientes alérgicos con respecto a los controles. Solo la estructura **4p4** tuvo la capacidad de estimular la proliferación de las T_H1 en pacientes alérgicos, aunque sin cambios significativos cuando la comparáramos con **4p**.

Por otro lado, las estructuras **7p** y **7p7** fueron capaces de estimular proliferación de las células T_H1 en pacientes alérgicos cuando se compara con los controles, aunque sin ser significativa, ni observarse diferencias significativas entre ambas.

Por otro lado, la combinación de **4p+7p** no fue capaz de estimular la proliferación de las células T_{H1} ni T_{H2} (IP<2) en pacientes alérgicos, ni en controles. Sin embargo, el ligando mixto **4p7** sí que estimuló de forma significativa la proliferación de las T_{H1} y no de las T_{H2} en pacientes alérgicos con respecto a los controles. En pacientes alérgicos, a pesar de inducir la proliferación de las T_{H1} (**4p7**), esta no mostro diferencia significativas comparado con la combinación por separado (**4p+7p**) ni con los ligandos “monoméricos” (**4p** y **7p**).

Respecto a la influencia de estas estructuras en la respuesta regulatoria, se observa que el dímero **4p4** incrementó de forma significativa los porcentajes de las Treg (ambos fenotipos, FOXP3⁺IL10⁺ y FOXP3⁻IL10⁺) en pacientes alérgicos con respecto a los controles. En pacientes alérgicos, se observa que el homodímero **4p4** solo estimuló de forma significativa el fenotipo FOXP3⁻IL10⁺ con respecto al conjugado monovalente **4p**.

Por otro lado, el homodímero **7p7** incrementó significativamente los porcentajes de las Treg en ambos fenotipos, FOXP3⁺IL10⁺ y FOXP3⁻IL10⁺, en pacientes alérgicos respecto a los controles. En pacientes alérgicos, la comparación de **7p7** junto a **7p** fue significativa para ambos tipos de Treg.

Por último, el heterodímero **4p7** incrementó los porcentajes de las Treg, siendo significativos para el fenotipo FOXP3⁻IL10⁺ en pacientes alérgicos respecto a los controles. En pacientes alérgicos, esta estructura incremento significativamente los porcentajes de ambos fenotipos reguladores comparando con los conjugados individuales (**4p+7p**), sugiriendo un efecto sinérgico en la respuesta regulatoria.

Estos resultados indican un aumento del patrón de tolerancia, fundamental para el desarrollo de vacunas efectivas, con el empleo de las estructuras diméricas. Este hecho es muy significativo en el caso de la combinación de los ligandos de TLR4/7 en una misma estructura (**4p7**), siendo mucho más eficaz que la simple combinación de los conjugados en disolución (**4p+7p**). En el Capítulo 4 de la presente Tesis Doctoral ya se constató que la mezcla de estos conjugados resultó poco eficiente. Este hecho parece indicar que una disposición espacial definida de los ligandos, así como alcanzar la célula diana de forma conjunta involucra una respuesta mucho más eficaz, como se ha comentado previamente.

Actualmente, se continúan los estudios *in vitro* con todas estas estructuras. Con los datos disponibles hasta el momento, podemos concluir que la presentación de ligandos de TLR diferentes en una única estructura como heterodímeros resulta más eficiente. En el mismo

contexto, la combinación de otros ligandos de TLR o PPR por medio de esta estrategia abre nuevas e interesantes perspectivas en el ámbito de la inmunoterapia, así como en la búsqueda de nuevos efectos sinérgicos. La continuación de las investigaciones en este campo, así como el estudio de los mecanismos moleculares que gobiernan estos procesos inmunomodulares constituyen un gran atractivo en el diseño racional de vacunas contra la alergia.

Capítulo 6

**Síntesis de conjugados alérgeno-
glicodendrón y estudio de su actividad
biológica**

6. Síntesis de conjugados alérgeno-glicodendrón y estudio de su actividad biológica

6.1 Introducción y Antecedentes

Durante las últimas dos décadas, nuestro grupo de investigación ha desarrollado herramientas sintéticas basadas en sistemas multivalentes de carbohidratos para estudiar la interacción con receptores celulares implicados en la defensa del organismo por parte del sistema inmune, concretamente lectinas de tipo C como DC-SIGN. Estas lectinas reconocen específicamente carbohidratos de manera dependiente de calcio.

Esta interacción proteína-carbohidrato es muy débil, aunque la naturaleza utiliza una estrategia para aumentar no solo la afinidad sino también la selectividad de esta interacción. Así, varios centros de reconocimiento de carbohidratos interactúan simultáneamente con varias copias del mismo carbohidrato dando lugar a lo que se denomina efecto multivalente. En el caso de DC-SIGN, esta lectina se presenta como un homotetrámero que presenta cuatro CRDs. Además, la expresión de numerosas copias de esta lectina en una zona determinada de la superficie celular hace que exista una elevada concentración de centros de reconocimiento. Por otra parte, la repetición de unidades de oligosacáridos en glicoproteínas o glicolípidos en la superficie de patógenos permite esa interacción o reconocimiento multivalente.²⁵⁵

Para imitar esa presentación multivalente de carbohidratos se han descrito multitud de plataformas y sistemas que han sido ampliamente utilizados.^{256,257} Nuestro grupo de investigación se ha centrado en el uso de dendrones y dendrímeros²⁵⁸ como plataformas multivalentes de presentación de carbohidratos. Estas estructuras se caracterizan por poseer una estructura tridimensional de construcción arborescente o ramificada,^{259,260} lo que permite la presentación de diferentes unidades de repetición en su periferia.

²⁵⁵ Appelmelk, B.J.; van Die, I.; van Vliet, S.J.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.; Geijtenbeek, T.B.; van Kooyk, Y.; *J. Immunol.* **2003**, *170*, 1635-1639.

²⁵⁶ Chabre, Y. M.; Roy, R.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4657-4708.

²⁵⁷ Cecioni, S.; Imbert, A.; Vidal, S.; *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 525-561.

²⁵⁸ *Frontiers of Nanoscience, Vol 4*; Chapter 5, Sanchez-Navarro, M.; Rojo, J.; **2012**, 143-156.

²⁵⁹ *Dendrimer-Based Drug Delivery Systems: From Theory to Practice*, Eds. Cheng, Y.; Tomalia, D.A.; Wiley. **2012**.

²⁶⁰ *Dendrimers and Dendrons: Concepts, Syntheses, Applications*, Eds. Newcome, G.R.; Moorefield, C.N.; Vögtle, F., Wiley, **2001**.

Esquemáticamente, estas estructuras poseen tres partes bien diferenciadas. (Figura 6.1) En primer lugar, un núcleo que es generalmente una molécula pequeña con un número preciso de grupos funcionales y que define el número de brazos del dendrímero. En segundo lugar, las unidades de ramificación, cuyo número determina la generación de la estructura. Por último, el tercer elemento estructural está constituido por los grupos terminales presentes en la superficie. Cada uno de los brazos se denomina dendrón, que posee como elemento diferenciador un *punto focal*. Cuando varios dendrones se unen a un núcleo, a través de su punto focal, constituyen los dendrímeros.²⁶¹

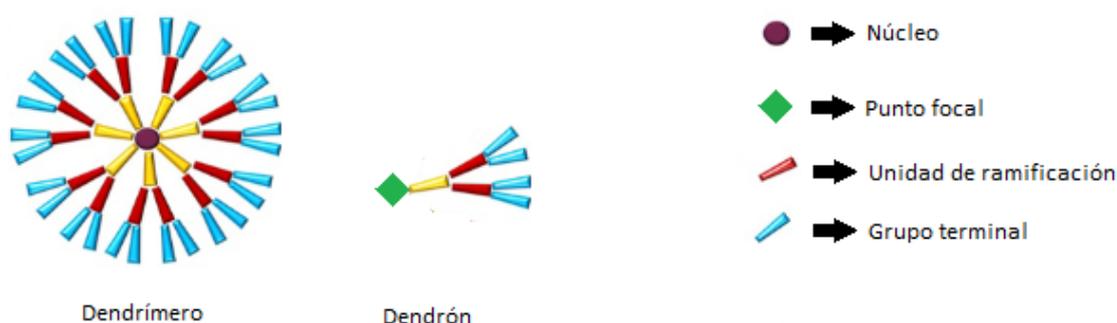


Figura 6.1. Representación esquemática de las diferentes partes que conforman los dendrímeros y dendrones. Figura modificada de la referencia 261.

Si estos sistemas multivalentes incorporan carbohidratos en su estructura, se denominan glicodendrímeros y glicodendrones.

Nuestro grupo de investigación ha diseñado una gran variedad de glicodendrímeros y glicodendrones para investigar el efecto multivalente de distintos tipos de carbohidratos sobre lectinas como DC-SIGN. Inicialmente, se diseñaron glicodendrímeros basados en el polímero comercial hiperramificado Boltorn de segunda y tercera generación, decorados con 16 y 32 manosas en su periferia, BoltornH20 y BoltornH30, respectivamente. (Figura 6.2) En particular, el glicodendrímero de 3ª generación (32 copias de manosa) demostró tener una elevada actividad antiviral. Este compuesto fue capaz de bloquear el receptor DC-SIGN inhibiendo con un $IC_{50} = 337$ nM el proceso de infección producido por un modelo del virus del Ébola.²⁶²

²⁶¹ Sherje, A.P.; Jadhav, M.; Dravyakar, B.R.; Darshana, K.; *Int. J. Pharm.* **2018**, *548*, 707-720.

²⁶² Lasala, F.; Arce, E.; Otero, J. R.; Rojo, J.; Delgado, R.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3970-3972.

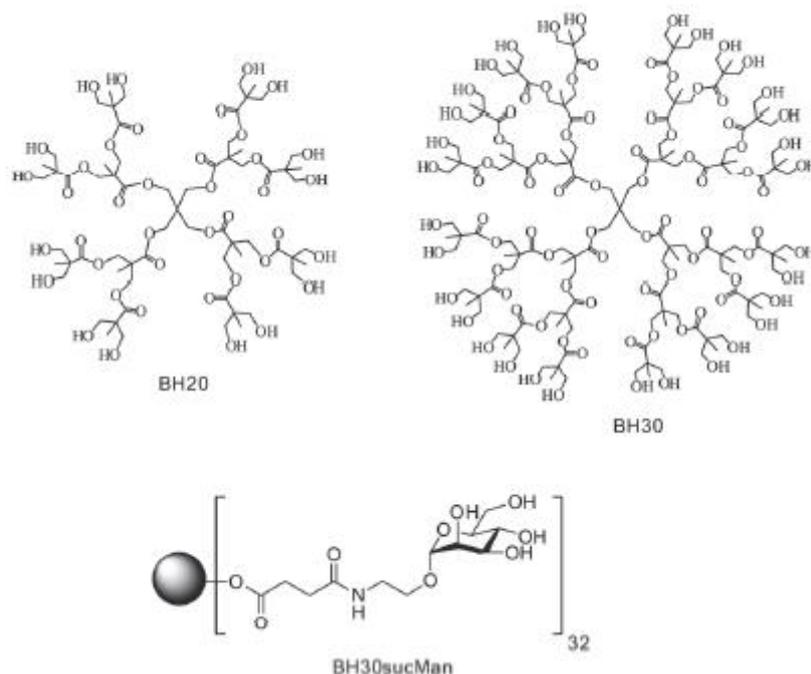


Figura 6.2. Estructuras tipo Boltorn hiperramificadas de segunda (BH20) y tercera (BH30) generación. Parte inferior, glicodendrímtero de tercera generación con 32 unidades de manosa (BH30sucMan).

Estas estructuras comerciales de tipo Boltorn son polidisperas, presentando defectos estructurales, lo que afecta a la funcionalización de las mismas y a la reproducibilidad de los resultados. Para evitar estos problemas, se desarrolló una nueva estrategia sintética por pasos de las estructuras glicodendríticas que garantizara la generación de estructuras monodispersas con una estructura única y bien definida.

La aplicación de la química click, concretamente de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas catalizada por Cu(I) (CuAAC)^{263,264} resultó ser una estrategia idónea. Gracias a ella y al desarrollo de una aproximación de síntesis convergente se pudo conseguir una conjugación completa dando lugar a estructuras monodispersas. La reacción CuAAC se estableció como nexo de unión de una estrategia convergente entre pequeños dendrones que presentaban grupos alquino y carbohidratos desprotegidos provistos de un grupo azida en la posición anomérica. De esta forma, se

²⁶³ Tiwari, V. K.; Mishra, B. B.; Mishra, K. B.; Mishra, N.; Singh, A. S.; Chen, X.; *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *116*, 3086-3240.

²⁶⁴ Tabacaru, A.; Furdul, B.; Ghinea, I.O.; Cârâc, G.; Dinicâ, R. M.; *Inorg. Chim. Acta* **2016**, *455*, 329-349.

han sintetizado una amplia variedad de sistemas glicodendríticos,²⁶⁵ con valencias desde tres a dieciocho manosas, empleando generalmente CuSO₄·5H₂O como fuente de Cu(II), ascorbato sódico como agente reductor *in situ* de Cu(II) a Cu(I) y tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (TBTA) para estabilizar el Cu(I) y reducir su oxidación, en una mezcla de THF/H₂O (1:1, v/v) como disolvente. Estas condiciones generales se fueron modificando ligeramente para optimizar las reacciones de acoplamiento para cada tipo de estructura y compuesto.

Usando estas condiciones previas, se abordó la síntesis de glicodendrones de tres y nueve copias de carbohidratos en su periferia, primera y segunda generación, respectivamente. Estos glicodendrones poseían un grupo funcional en la posición focal, accesible químicamente, permitiendo la conjugación de moléculas, incluyendo biomoléculas de interés terapéutico, como se detallará posteriormente. Con estos glicodendrones de primera generación es posible incrementar la generación de glicodendrones a partir de sucesivas reacciones click, siguiendo una estrategia convergente. De esta forma rápida y eficiente, se obtuvieron glicodendrones de segunda generación con nueve copias de carbohidratos. En función del tipo de enlaces utilizados para construir el esqueleto de estos dendrones, de tipo éster²⁶⁶ (**I** y **II**) y de tipo éter²⁶⁷ (**III** y **IV**) se obtuvieron diferentes estructuras. (Figura 6.3)

²⁶⁵ Varga, N.; *et al.*; *Biomaterials* **2014**, *35*, 4175-4184.

²⁶⁶ Kowalczyk, W.; Mascaraque, A.; Sánchez-Navarro, M.; Rojo, J.; Andreu, D.; *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *24*, 4565-4573.

²⁶⁷ Ribeiro-Viana, R.; Sánchez-Navarro, M.; Luczkowiak, J.; Koeppe, J. R.; Delgado, R.; Rojo, R.; Davis, B. G.; *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1303-1310.

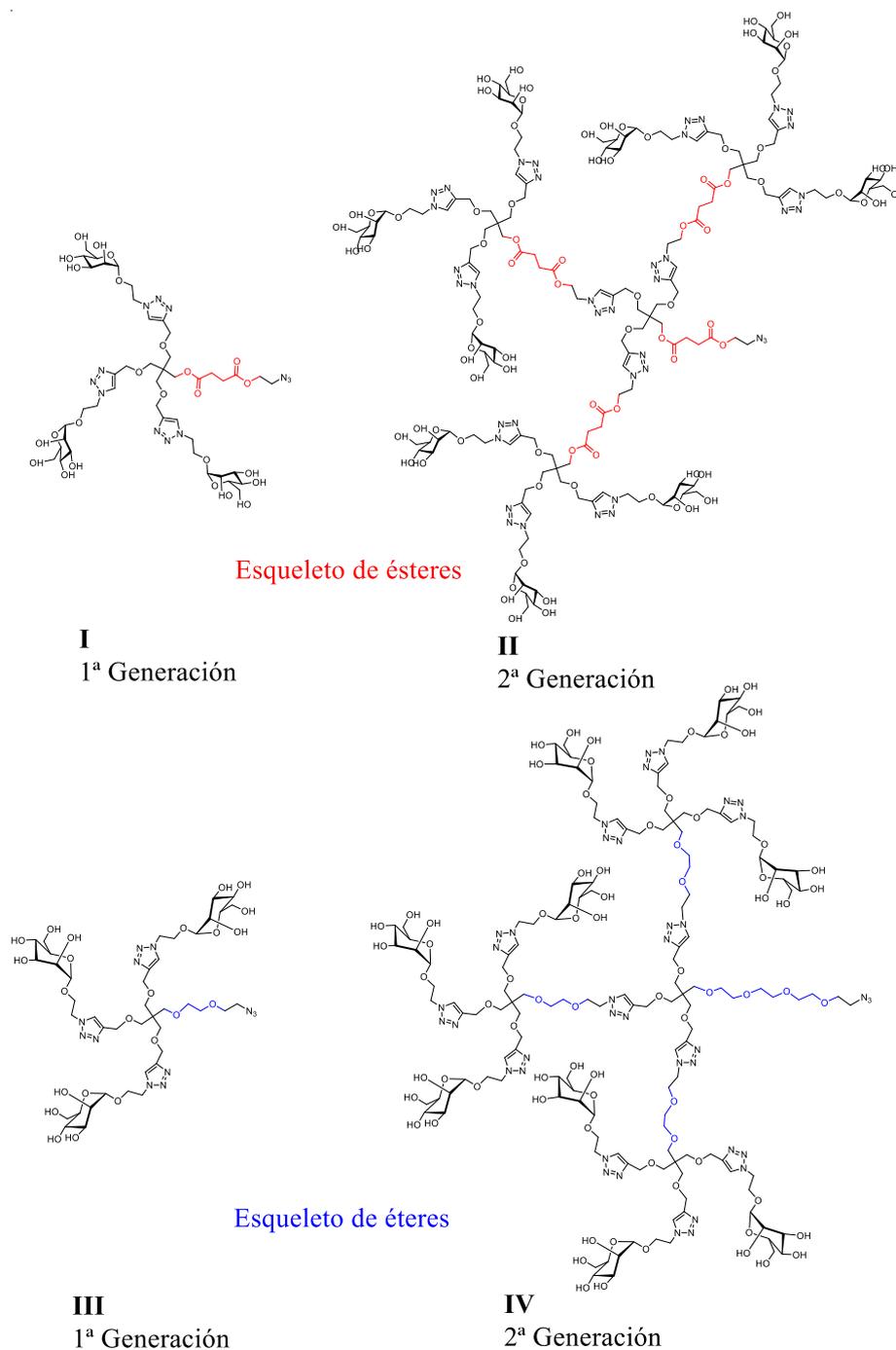


Figura 6.3. Glicodendrones de manosa de 1^a y 2^a generación sintetizados por nuestro grupo de investigación con esqueletos de ésteres **I** y **II** (en rojo) y de éteres **III** y **IV** (en azul).

La presencia de un grupo azida en el punto focal de estos glicodendrones ha posibilitado su conjugación a una amplia variedad de estructuras para preparar diferentes sistemas multivalentes que se han utilizado en distintos ensayos. (Figura 6.4)

- ✓ **Fullerenos:** Se ha llevado a cabo la funcionalización de fullerenos por medio de la reacción CuAAC introduciendo 12 y 24 manosas en su periferia. Se ha

demostrado que estas estructuras son reconocidas por lectinas como la Concanavalina A y son capaces de inhibir eficazmente (IC₅₀ en el rango sub-nanomolar) una infección causada por un modelo del virus del Ébola.²⁶⁸

- ✓ **Grafeno:** Se inmovilizó estos glicodendrones de manosa sobre grafeno, demostrando su interacción con Concanavalina A mediante estudios de UV-Vis y de fluorescencia.²⁶⁹ También, usando otras nanoformas de carbono como los nanotubos o nanocuernos de carbono, se ha demostrado su capacidad de bloquear eficientemente el receptor DC-SIGN frente a un modelo artificial del virus del Ébola.²⁷⁰
- ✓ **Nanoclusters de oro:** La manosilación de la superficie de nanoclusters de oro por medio de dendrones trivalentes de manosa incrementó hasta en un 250% la captación de estos nanoclusters por parte de las DCs derivadas de monocitos humanos.²⁷¹
- ✓ **Cápside de virus:** Sobre la proteína de la cápside del virus bacteriófago Q β , funcionalizada con grupos alquino, fue posible conjugar glicodendrones de manosa mediante la reacción CuAAC, obteniéndose conjugados con 540 (a partir del dendrón trivalente) y 1620 (a partir del dendrón nonavalente) copias de manosa en su superficie. Estas estructuras bloquearon eficazmente a la lectina DC-SIGN y la infección de un modelo del virus del Ébola con IC₅₀s en el rango nanomolar.²⁶⁷
- ✓ **Nanogeles:** La presentación de glicodendrones de valencias 3 y 9 en la superficie de nanogeles esféricos indujo mejoras en el efecto multivalente como se demostró mediante estudios de aglutinación por DLS y UV-Vis en su interacción con la Concanavalina A.²⁷²
- ✓ **Microarrays:** La inmovilización de glicodendrones de diferentes valencias sobre la superficie de chips usando la reacción click entre ciclooctinos y azidas sin necesidad de catalizador de cobre (reacción SPAAC, del inglés *Strain-Promoted*

²⁶⁸ Luczkowiak, J.; *et al.*; *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 431-437.

²⁶⁹ Ragoussi, M.E.; Casado, S.; Ribeiro-Viana, R.; de la Torre, G.; Rojo, J.; Torres, T.; *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 4035-4041.

²⁷⁰ Rodríguez-Pérez, L.; *et al.*; *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 9891-9898.

²⁷¹ Le Guével, X.; *et al.*; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 20945-20956.

²⁷² de la Cruz, N.; Sousa-Herves, A.; Rojo, J.; *Eur. Polym. J.* **2020**, *140*, 1100232.

Azide Alkyne Cycloaddition) ha permitido el estudio de las interacciones entre carbohidratos y lectinas.²⁷³

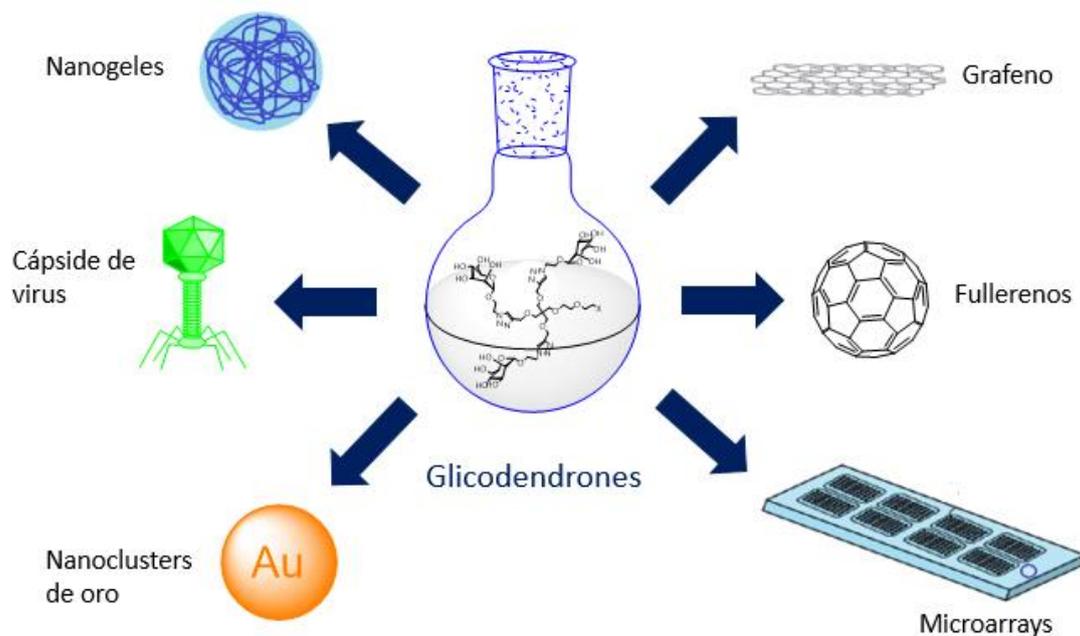


Figura 6.4. Conjugaciones de glicodendrones sobre diferentes estructuras realizadas por nuestro grupo de investigación.

Esta amplia gama de funcionalizaciones demuestra la gran versatilidad de estas estructuras glicodendríticas a partir de la conjugación selectiva a través de su punto focal.

Por otra parte, para estudiar la capacidad de internalización de estas estructuras multivalentes al interactuar con el receptor DC-SIGN, se derivatizó el glicodendrón **IV** en su posición focal con un marcador fluorescente. Para ello, en colaboración con el Prof. Pérez-Inestrosa (Universidad de Málaga), se incorporó un derivado de BODIPY (del inglés, *boron-dipyrrromethene*) mediante la reacción CuAAC. (Figura 6.5)

²⁷³ Di Maio, Antonio; *et al.*; *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 7357-7362.

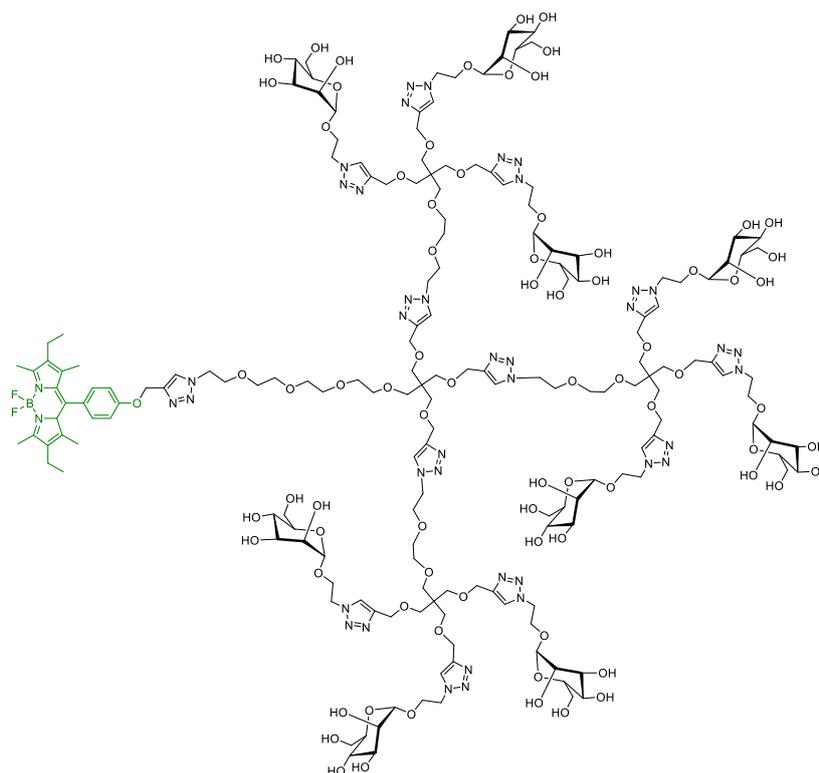


Figura 6.5. Estructura del glicodendrón de nueve manosas funcionalizado en su posición focal con un grupo BODIPY (en verde).

Con este glicodendrón marcado fluorescentemente, en colaboración con la Prof. Van Kooyk (Universidad de Ámsterdam), se demostró que el glicodendrón de nueve manosas tiene el tamaño y la valencia necesarios para interactuar de forma adecuada con la lectina DC-SIGN.²⁷⁴ En este estudio, se sintetizaron tres glicodendrones marcados fluorescentemente con diferentes carbohidratos en su periferia, uno con nueve manosas, otro con nueve fucosas y un tercero con nueve maltotriosas que se utilizó como control negativo, ya que la maltotriosa no es un ligando de DC-SIGN.

La capacidad de unión de estos sistemas a la lectina se cuantificó mediante estudios de afinidad de tipo ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Como resultado, se observó que los glicodendrones de manosa se unían más eficientemente que los de fucosa a DC-SIGN, teniendo una eficiencia similar a altas concentraciones, mientras que con el glicodendrón de maltotriosas, la interacción fue insignificante. (Figura 6.6A)

²⁷⁴ Ribeiro-Viana, R.; García-Vallejo, J. J.; Collado, D.; Pérez-Inestrosa, E.; Bloem, K.; van Kooyk, Y.; Rojo, J. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3209-3219.

Los estudios de los mecanismos de internalización de estos tres glicodendrones con las DCs se llevaron a cabo usando técnicas de citometría de flujo y microscopía confocal. (Figura 6.6B)

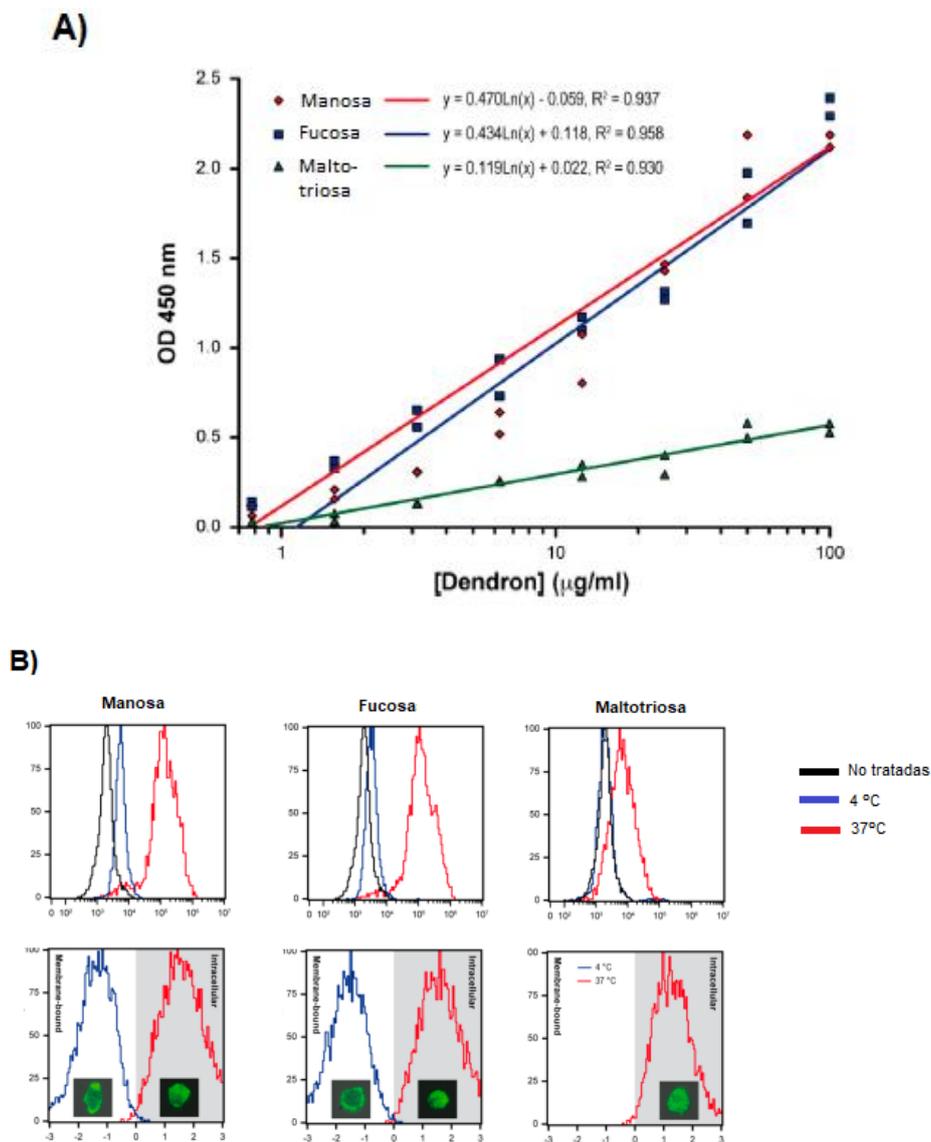


Figura 6.6. A) Gráfica obtenida a partir de los estudios de afinidad ELISA entre DC-SIGN y los glicodendrones de manosa (en rojo), fucosa (en azul) y maltotriosa (en verde). B) Histogramas de los ensayos de internalización, a 4°C y 37°C, de los tres glicodendrones marcados fluorescentemente, así como las correspondientes imágenes confocales.

Se observó que para los glicodendrones de manosa y fucosa, a 4°C (temperatura a la cual no tienen lugar los procesos de internalización), los compuestos se situaban próximos a la superficie de la membrana celular, lo que sugiere que podrían ser reconocidos por receptores de la membrana. Cuando se aumenta la temperatura hasta los 37°C (temperatura a la cual sí ocurren procesos de internalización) se observó inequívocamente

la internalización de estas estructuras multivalentes. Para el glicodendrón de maltotriosa (control negativo) se observó un pequeño incremento de la internalización a 37°C, lo que podría explicarse en base a procesos de endocitosis inespecíficos (independientes de DC-SIGN).

Para comprobar que estos procesos de internalización estaban mediados por DC-SIGN, se realizaron estudios de inhibición. La adición de manano (un ligando que interacciona de manera eficiente con DC-SIGN), EGTA (que elimina el calcio e inhibe el proceso de reconocimiento por esta lectina de tipo C), o de un anticuerpo específico que bloquea los CRDs de DC-SIGN, disminuyeron significativamente la capacidad de unión de los glicodendrones de manosa y fucosa; sin embargo, no tuvo efecto en la unión del glicodendrón de maltotriosa. Estos resultados confirman que estos dos glicodendrones son reconocidos específicamente a través de DC-SIGN de manera dependiente de calcio, a través de las manosas y fucosas presentes en su estructura.

A la vista de estos resultados, se planteó que estas estructuras fueran transportadores de moléculas de interés terapéutico al interior celular. Para ello, es importante conocer la ruta intracelular que siguen estas moléculas en el interior de las DCs. El procedimiento habitual para estos estudios consiste en investigar la co-localización de la molécula de interés terapéutico con anticuerpos monoclonales marcados fluorescentemente que reconocen distintos compartimentos o marcadores intracelulares específicos involucrados en el procesamiento y presentación de antígenos, así como también en la modulación de la respuesta inmune.

Con idea de analizar el mecanismo de entrada en la célula de estos sistemas, se usaron anticuerpos para los marcadores específicos del endosoma temprano (EEA1) y del lisosoma (LAMP1). En estos estudios de co-localización se demostró que un alto porcentaje de células presentan estos marcadores junto con los glicodendrones de manosa y de fucosa, indicando su localización en estos compartimentos intracelulares. Por el contrario, el glicodendrón de maltotriosa experimentó una pobre internalización. (Figura 6.7)

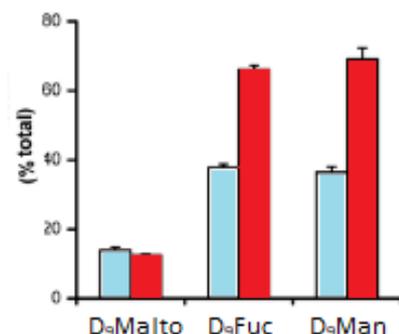


Figura 6.7. Gráfica que representa los porcentajes de co-localización de los marcadores de EEAI (en azul) y LAMP1 (en rojo) para los tres glicodendrones evaluados.

Estos resultados ponen de manifiesto que estos glicodendrones de manosa son internalizados por las DCs de forma eficiente y dirigidos hacia los lisosomas. Estos compartimentos intracelulares están implicados en el procesamiento de antígenos y su presentación, siendo fundamentales en la modulación de la respuesta inmune. Es importante señalar que los lisosomas presentan una notable disminución del pH en comparación con el pH intracelular y el extracelular.²⁷⁵ Este hecho será fundamental en el diseño de nuestra nueva estrategia, como se comentará más adelante.

A la vista de estos resultados, estos sistemas glicodendríticos de segunda generación se consideraron adecuados para la presentación de moléculas de interés terapéutico, a través de su interacción con DC-SIGN en la superficie de las células dendríticas. Usando este glicodendrón de manosas de segunda generación, se prepararon los denominados glicodendropéptidos (GDPs). Estos conjugados contenían dos partes bien diferenciadas; por un lado, la región de azúcares reconocida e internalizada por DC-SIGN; por otro lado, un péptido inmunogénico para inducir una respuesta inmune adecuada frente a un antígeno concreto.

En una primera aproximación, se conjugó el glicodendrón de nueve copias de manosa **II** con un número variable de copias de epítopos peptídicos. La síntesis de estos conjugados puso de manifiesto la capacidad de la química click para construir moléculas complejas. Por un lado, la formación de los glicodendrones se realizó por medio de la CuAAC, como se ha comentado previamente y por otro, la conjugación de estos epítopos se realizó también por medio de este tipo de reacción, así como a través de la reacción click tiol-

²⁷⁵ Trombetta, E.S.; *et al.*; *Science* **2003**, 299, 1400-1403.

eno. Inicialmente, se seleccionaron dos péptidos provenientes de diferentes proteínas inmunogénicas del virus de la gripe (*Influenza A*), concretamente, el sM2e (EVETPTRNEWES)²⁶⁶ y el NP₃₆₆₋₃₇₄ (ASNENMETM)²⁷⁶. El primero fue utilizado para poner a punto la estrategia sintética de los GDPs. Con el segundo péptido se prepararon compuestos que fueron evaluados *in vitro*. A través de dos estrategias alternativas, se sintetizaron los diferentes GDPs: en el Método A, la conjugación del glicodendrón **II** con los dendropéptidos (1, 4 y 8 copias, llamados MAPS (del inglés, *Multiple Antigen Peptide systems*)) se realizó a través de la reacción CuAAC; por otro lado, en el Método B, los péptidos funcionalizados con una cisteína terminal, tanto de forma monomérica como MAPS, fueron unidos a dendrones de maleimida (de dos y de cuatro valencias) a través de la reacción tiol-eno. Posteriormente, estas estructuras fueron conjugadas al dendrón **II** a través de la reacción CuAAC. (Figura 6.8)

²⁷⁶ Mascaraque, A.; Kowalczyk, W.; Fernández, T.; Palomares, F.; Mayorga, C.; Andreu, D.; Rojo, J. *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6*, 1755.

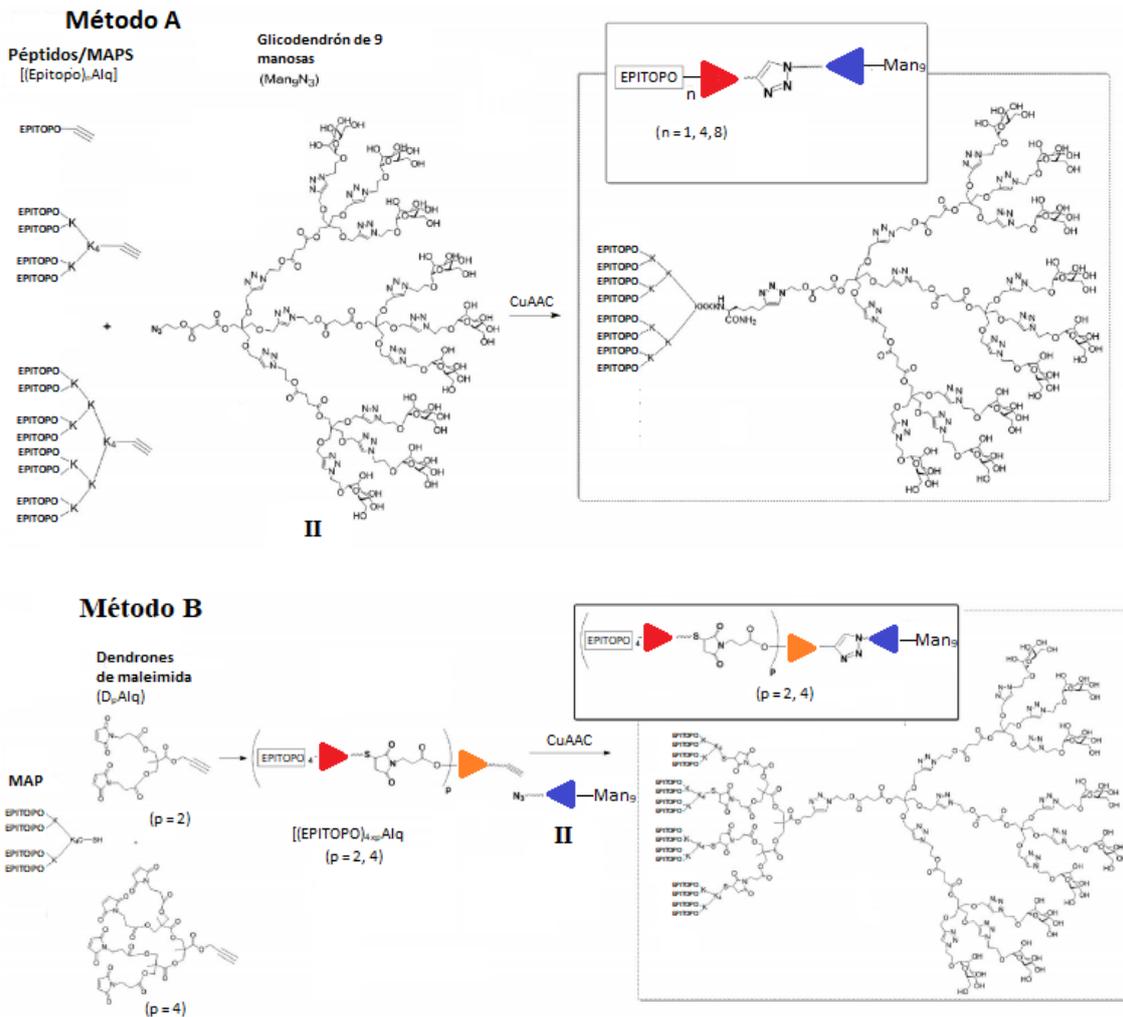


Figura 6.8. Síntesis de diferentes GDPs empleando las dos estrategias sintéticas, los métodos A y B.

Concretamente, los conjugados del epítipo NP₃₆₆₋₃₇₄ fueron reconocidos por las DCs, produciendo su maduración, así como la proliferación de células T. Estos primeros resultados animaron a continuar esta línea de investigación, modificando tanto la valencia como el tipo de péptido, para el estudio racional de nuevos compuestos en el campo del desarrollo de vacunas. En este contexto, se abordó el desarrollo de nuevos conjugados con potencial aplicación en la preparación de vacunas frente a la alergia, concretamente frente a la alergia al melocotón, de gran predominancia en las regiones del área mediterránea y cuyo alérgeno principal es Pru p 3. Para ello, se usó el péptido sintético basado en el epítipo de esta proteína ya indicado anteriormente en la presente Tesis Doctoral. Usando una estrategia sintética similar a la del método B, descrito anteriormente, y partiendo del glicodendrón de 9 manosas **II**, se sintetizaron GDPs de una

y cuatro valencias de péptido (**V** y **VI** respectivamente) cuyas estructuras se representan en la Figura 6.9.

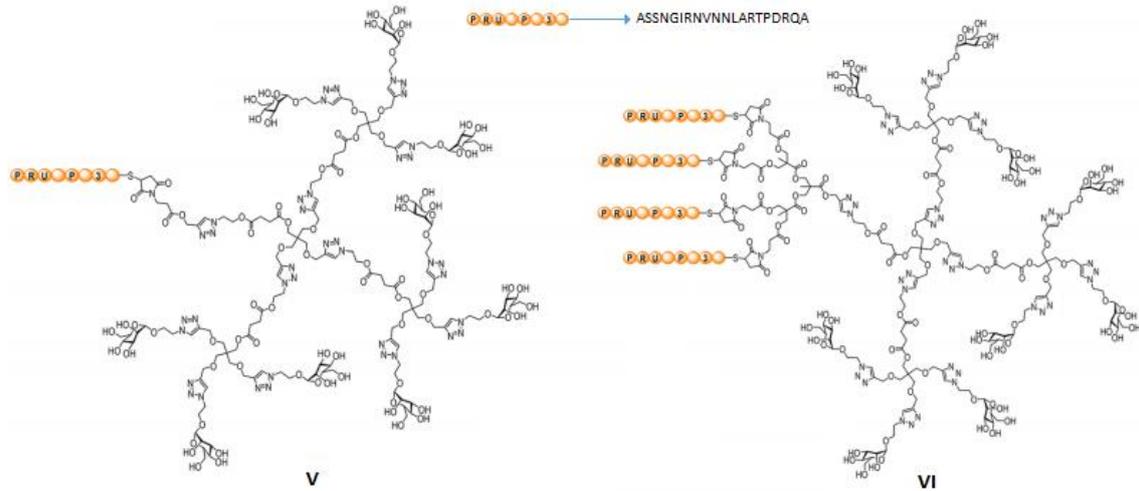


Figura 6.9. Representación de las estructuras de los GDPs con el péptido de Pru p 3 monovalente (**V**) y tetravalente (**VI**).

Estos conjugados fueron administrados vía SLIT en un modelo anafiláctico de ratón a Pru p 3, que fue previamente optimizado en colaboración con nuestro grupo de investigación.¹⁸² Para ello se usaron cuatro grupos de ratones; el primero (*naïve*), es un control con ratones no sensibilizados. Los otros tres grupos eran ratones anafilácticos a esta LTP, para lo cual fueron previamente sensibilizados por vía intranasal con la proteína Pru p 3 y LPS durante 5 semanas. A la sexta semana, el segundo grupo de ratones (no tratados) se mantuvo sin inmunoterapia específica, mientras que el tercer y cuarto grupo se trataron sublingualmente con estos dos GDPs (**V** y **VI**), con dosis de 1 nM, 2 nM y 5 nM durante ocho semanas. Pasado este tiempo, los ratones fueron inoculados mediante inyección peritoneal con el alérgeno Pru p 3. Los síntomas de la anafilaxia se monitorizaron en función de la disminución de la temperatura corporal de los ratones afectados, usando un termómetro rectal. De esta forma, se observó que los ratones con el conjugado con cuatro copias de péptido **VI** mostraron una mayor disminución de su temperatura corporal comparado con los que recibieron la estructura con una sola copia de péptido **V**; sin embargo, aquellos ratones que no fueron tratados con estos GDPs fueron los que registraron un mayor descenso de la temperatura, síntoma de anafilaxia.

Adicionalmente, se observó que el conjugado **V** inducía tolerancia hasta cinco semanas después de su administración; sin embargo, para el GDP tetravalente **VI**, aunque se observaron efectos protectores en la primera semana después del tratamiento, estos

desaparecieron después. Estos resultados indicaban que se producía un proceso de desensibilización en lugar de una respuesta inmune T_H1 sostenida. Este hecho es consistente con los resultados publicados previamente por el grupo^{277,278} en los que, mediante estudios *in vitro* con DCs, se estudió el efecto de dendrones de péptidos con diferentes valencias, añadiendo como adyuvante oligodesoxirribonucleótidos (ODNs) con motivos CpG, que son ligandos del receptor TLR9, descritos como inmunomoduladores de la respuesta tipo T_H1.¹⁸² En este estudio se observó también un efecto negativo con la estructura peptídica tetravalente, que se atribuyó a una capacidad de unión de al menos dos IgE en la superficie de los basófilos. Este proceso da lugar a la desgranulación de estas células, liberándose compuestos como la histamina, asociados a una respuesta alérgica tipo T_H2. Independientemente de la estructura del glicodendrón de partida, tanto de ésteres (**II**) como de éteres (**IV**), estas diferencias en la valencia del péptido se mantienen. Por otro lado, estos estudios *in vitro* también pusieron de manifiesto el perfil de citoquinas asociadas a las respuestas producidas por estos compuestos, tanto mono como tetravalentes. A la vista de estos resultados se pudo concluir que el conjugado de péptido monovalente **V** era el compuesto más prometedor como candidato para su uso en inmunoterapia frente a enfermedades alérgicas.

En base a estos resultados iniciales, se amplió el estudio de conjugaciones con otros péptidos alérgicos. En 2020, se publicó un estudio de nuestro grupo de investigación utilizando un péptido derivado de la proteína Ole e 1, que es el alérgeno mayoritario del polen del olivo,²⁷⁹ como ha sido comentado previamente. En este estudio solamente se optó por la preparación de conjugados con una sola copia de péptido, en base a los resultados previos con Pru p 3. Se sintetizaron cuatro conjugados con diferentes estructuras dendríticas: esqueleto de ésteres con 9 manosas (**VII**), esqueleto de éteres con 9 manosas (**VIII**), esqueleto de éteres con 9 *N*-acetilglucosaminas (**IX**) y un control negativo con esqueleto de éteres decorado con nueve unidades etilenglicol, en lugar de carbohidratos (**X**). (Figura 6.10)

²⁷⁷ 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.

²⁷⁸ Palomares, F.; *et al.*; *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63*, 1900553.

²⁷⁹ Benedé, S.; *et al.*; *Mol. Pharm.* **2020**, *17*, 827-836.

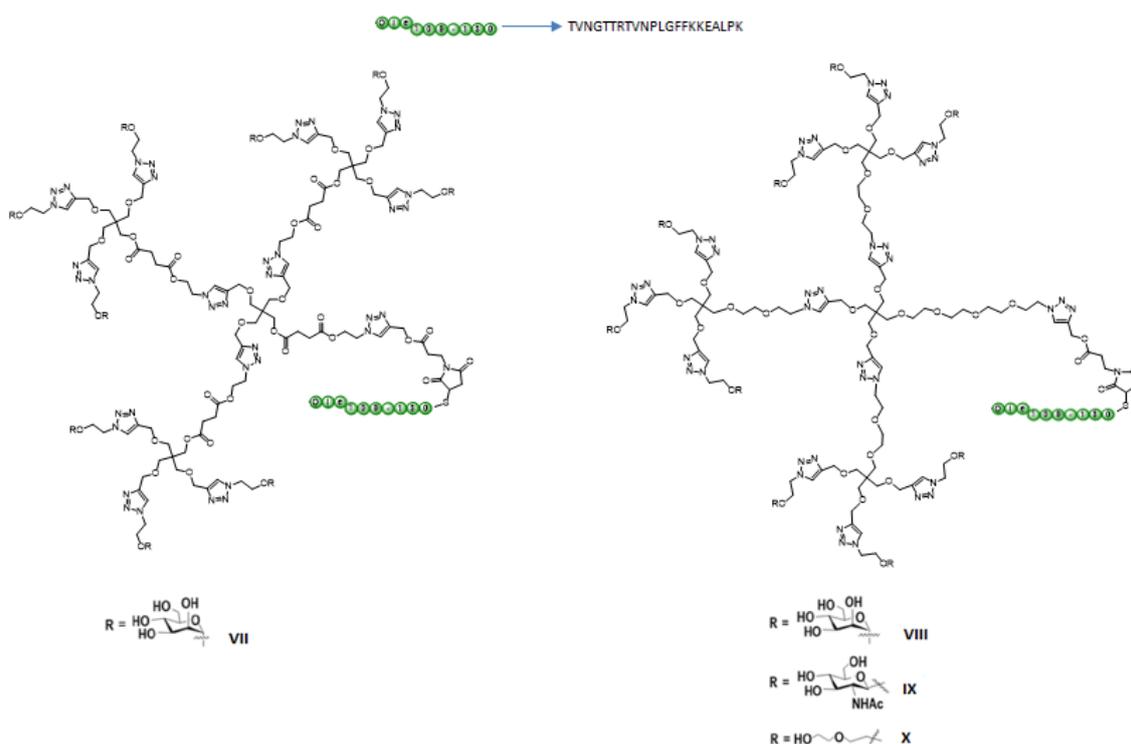


Figura 6.10. Dendrones conjugados con el péptido de Ole e 1 sintetizados por nuestro grupo de investigación.

En estudios *in vitro* se demostró la ausencia de citotoxicidad de estos conjugados en diferentes líneas celulares. También, se evaluó la capacidad de estos conjugados para atravesar un modelo de barrera epitelial, estudio previo necesario para confirmar que estos compuestos podrían aplicarse en una inmunoterapia sublingual. Estos estudios de transporte demostraron que los conjugados con manosas (**VII** y **VIII**) atravesaban fácilmente esta barrera, en comparación con el péptido Ole e 1 sin conjugar, la proteína completa o el conjugado con *N*-acetilglucosaminas. De la misma forma, el control negativo **X** (sin carbohidratos) registró unos valores similares de transporte al conjugado **VIII**, siendo el conjugado de manosas con esqueleto de ésteres **VII** el que más eficientemente atravesaba esta barrera. (Figura 6.11)

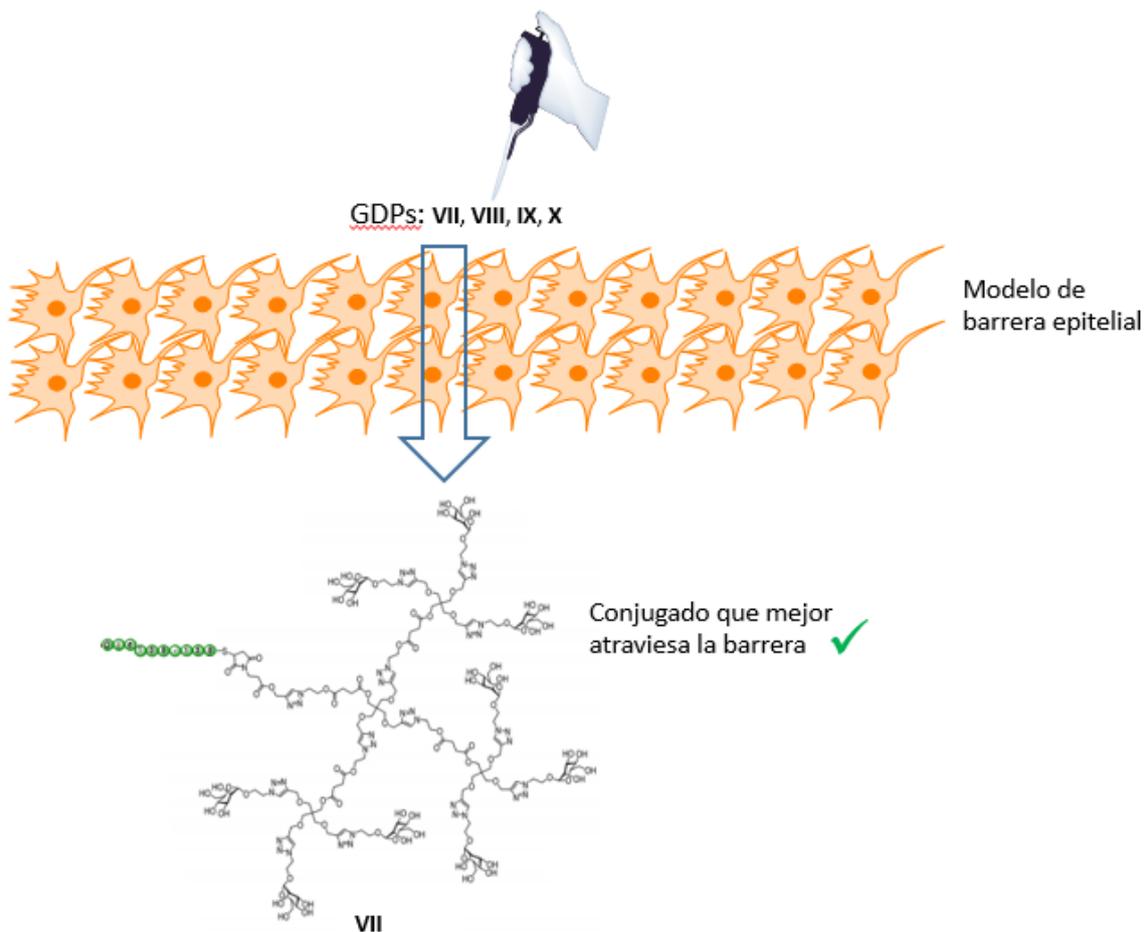


Figura 6.11. Representación esquemática del paso de los GDPs a través de un modelo de barrera epitelial, siendo la estructura **VII** la que atraviesa la barrera más eficientemente.

Esta diferencia de capacidad de transportarse con respecto a su homólogo de éteres **VIII** parece estar basada en procesos de interacción con dicha barrera, aún no bien entendidos. Por último, las estructuras con manosas demostraron ser capaces de estimular la producción de células Treg a partir de sangre de pacientes alérgicos al olivo, siendo estas Treg imprescindibles en el desarrollo de tolerancia frente al antígeno en cuestión. Estos prometedores resultados ponen de manifiesto que el uso de un adyuvante unido a un péptido alérgico capaz de generar una respuesta de tipo T_H1 , así como la generación de Treg, constituye una interesante estrategia para el desarrollo de candidatos a vacunas frente a enfermedades alérgicas en el ámbito de la AIT.

6.2 Objetivos

En base a los estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, se pretende profundizar en el potencial terapéutico de los conjugados de péptidos alergénicos a glicodendrones de manosa, tanto ampliando los estudios biológicos de estos conjugados para avanzar en el conocimiento de los mecanismos de acción, como con el desarrollo de nuevas estructuras con capacidades mejoradas.

Para conseguir este objetivo general, se definen a continuación una serie de objetivos específicos:

- Ampliación de los estudios biológicos del conjugado de glicodendrón de manosas con esqueleto de ésteres a Pru p 3 (**V**).
- Conjugación del glicodendrón de manosas con esqueleto de ésteres a nuevos péptidos alergénicos como la β -parválbumina (alergia a pescado) y estudios de su actividad biológica.
- Síntesis de un nuevo glicodendrón conjugado que presente un espaciador sensible a medios ácidos para estudiar mejoras en la presentación del péptido. Evaluación de su actividad biológica en ensayos *in vitro*.

6.3 Estudios complementarios de glicodendrones conjugados

Como se ha comentado previamente, los mejores resultados se obtuvieron con el glicodendrón de nueve manosas con esqueleto de ésteres, así como la presentación de una sola copia del péptido de Pru p 3. El conjugado **V** demostró generar una protección de hasta cinco semanas en ratones anafilácticos frente a la proteína Pru p 3. Sin embargo, a pesar de estos prometedores resultados, durante el largo proceso de la evaluación de un candidato a vacuna, son necesarios muchos estudios biológicos y también de viabilidad económica.²⁸⁰

Uno de estos estudios biológicos complementarios se corresponde a la biodistribución del fármaco en el organismo, una vez es administrado. Los seres humanos tienen

²⁸⁰ Plotkin, S.; Robinson, J.M.; Cunningham, G.; Iqbal, R.; Larsen, S.; *Vaccine* **2017**, *35*, 4064-4071.

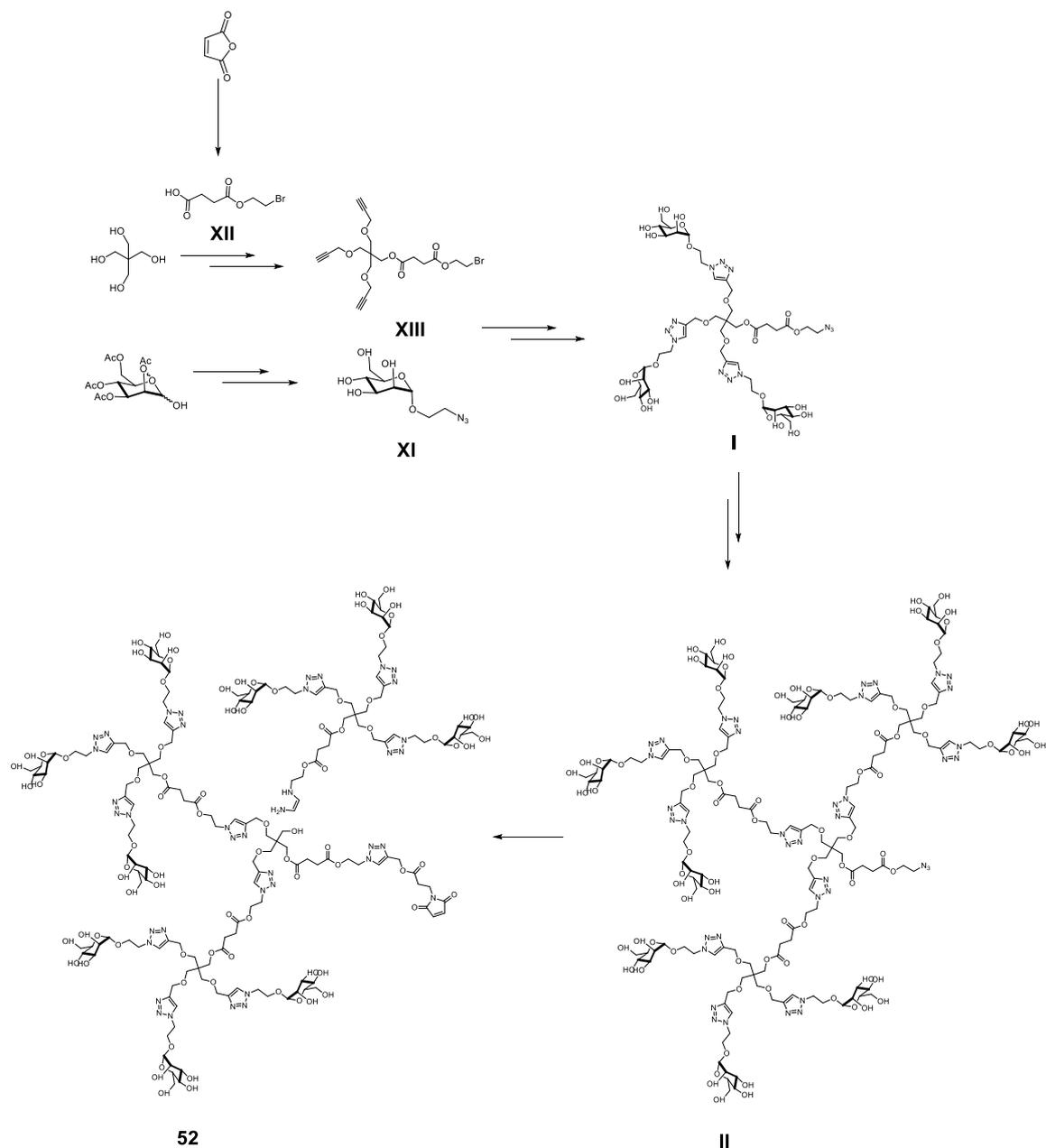
aproximadamente de 400 a 600 ganglios linfáticos distribuidos por todo el cuerpo. Estos se ubican a lo largo del trayecto de los vasos linfáticos formando cadenas o racimos (sistema linfático) que transportan la linfa a través del cuerpo. La AIT puede tener diversas vías de administración, como se comentó previamente en la Introducción, pero al entrar en el tejido, los compuestos empleados en AIT deben transportarse a los ganglios linfáticos donde se coordina la activación de los linfocitos T y B, iniciándose de esta forma la modulación del sistema inmune.²⁸¹ Este transporte resulta crucial en la actividad terapéutica de las vacunas, como se ha descrito en la bibliografía. Las APCs como los monocitos y las DCs pueden internalizar antígenos junto a adyuvantes y transportarlos a los ganglios linfáticos.²⁸²

En este contexto, nos propusimos evaluar la biodistribución del conjugado **V** en ensayos *in vivo* con ratones, a través de una colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Cristobalina Mayorga del Hospital Regional Universitario de Málaga. La vía de administración de este compuesto en estudios previos fue mediante SLIT. De esta forma, resulta fundamental analizar cómo la SLIT induce tolerancia a nivel sistémico, incluido el sistema gastrointestinal. Esta actividad puede estar mediada por dos procesos posibles: i) El conjugado de la SLIT puede entrar en el intestino y ser captado por macrófagos y/o DCs y ii) El compuesto es reconocido por las DCs de la mucosa sublingual que migran a los ganglios linfáticos, aumentando la respuesta reguladora.

Para la realización de estos estudios, fue necesario la preparación de este glicodendrón de nueve manosas con esqueleto de ésteres conjugado al Pru p 3 **V**. La síntesis del glicodendrón con un grupo maleimida **52** se llevó a cabo tal y como fue descrito previamente por nuestro grupo de investigación.¹⁸² Posteriormente, se realizó la conjugación al péptido de Pru p 3 para obtener el GDP **V**. En el esquema 6.1 se recoge la ruta sintética para la obtención de este glicodendrón **52**.

²⁸¹ Trevaskis, N.L.; Kaminskis, L.M.; Porter, C.J.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 781-803.

²⁸² Allan, R.S.; *et al.*; *Immunity* **2006**, *25*, 153-162.



Esquema 6.1. Esquema sintético para la preparación del glicodendrón **52**.

Partiendo de la manosa peracetilada comercial y siguiendo las condiciones puestas a punto por nuestro grupo de investigación,²⁸³ se obtuvo el monosacárido de manosa desprotegido y funcionalizado con un grupo azida en la posición anomérica **XI**.

La estructura con el esqueleto de ésteres está basada en el ácido 4-(2-bromoetoxi)-4-oxobutanoico (**XII**), sintetizado por apertura del anhídrido maleico con bromoetanol

²⁸³ Arce, E.; Nieto, P.M.; Diaz, V.; Castro, R.G.; Bernad, A.; Rojo, J.; *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 817-823.

usando las condiciones descritas.²⁸⁴ Posteriormente, se obtuvo el núcleo de crecimiento **XIII** por medio del intermedio **XII** y el pentaeritritol comercial, usando las condiciones descritas en la bibliografía.²⁸⁵

El siguiente paso consistió en la obtención del glicodendrón trivalente con bromo en el punto focal, a través de la reacción CuAAC con la manosa **XI**. Usando las condiciones puestas a punto por nuestro grupo de investigación para el acoplamiento tipo CuAAC, CuSO₄, TBTA y ascorbato sódico en una mezcla de THF/H₂O en la misma proporción, se obtuvo el correspondiente glicodendrón trivalente. Mediante una reacción de azidación se intercambió el bromo de su punto focal por azida, obteniéndose el glicodendrón de primera generación **I**. Posteriormente, se llevó a cabo el acoplamiento del núcleo **XIII** y el glicodendrón trivalente **I**, a través de la reacción click CuAAC usando las mismas condiciones, obteniéndose el correspondiente glicodendrón de nueve manosas. De nuevo, se sustituyó el bromo del punto focal por una azida, obteniéndose el glicodendrón de segunda generación **II**. El último paso consistió en la incorporación del grupo maleimido por medio de la reacción CuAAC entre el glicodendrón **II** y el alquino maleimida **21**, sintetizado previamente (Capítulo 4), para obtener el glicodendrón con un grupo maleimido en el punto focal **52**.

Una vez formado este compuesto, el correspondiente conjugado **V** pudo obtenerse mediante la reacción click tiol-eno entre la maleimida del glicodendrón **52** y el péptido Pru p 3. Su estructura fue confirmada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. (Figura 6.12)

²⁸⁴ Hansson, S.; *et al.*; *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 64-74.

²⁸⁵ Al-Mughaid, H.; Grindley, T. B.; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1390-1398.

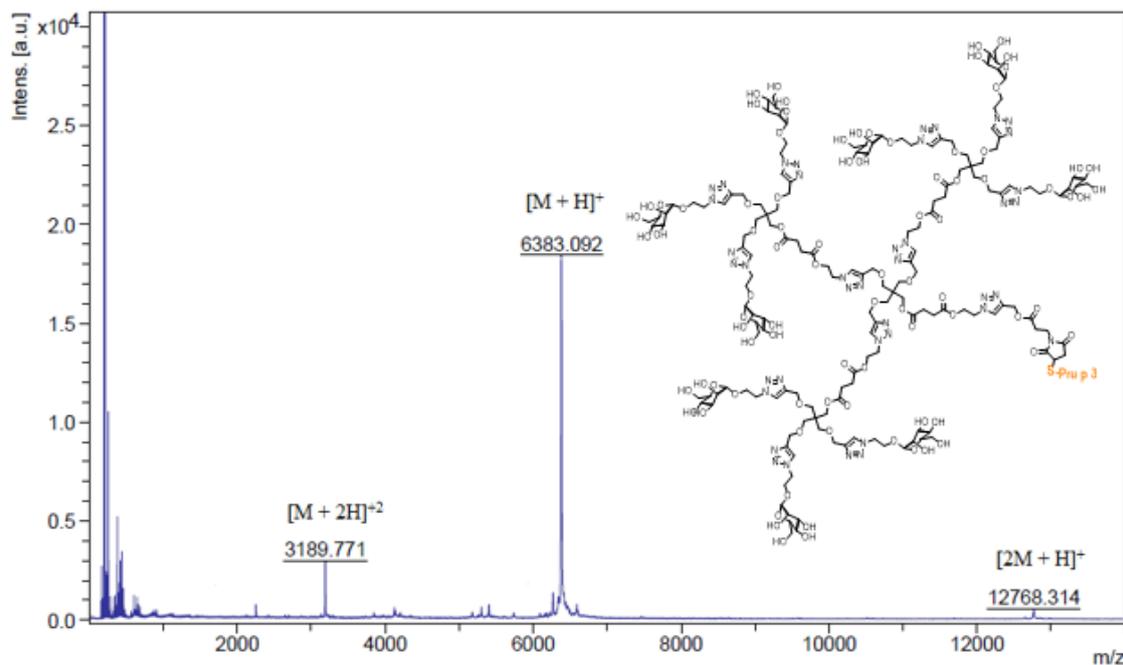


Figura 6.12. Espectro de masas MALDI-TOF del conjugado **V**.

Una vez sintetizado el conjugado **V**, se llevaron a cabo los ensayos de biodistribución *in vivo* utilizando ratones. Para ello, el conjugado **V** fue marcado fluorescentemente en la región del péptido por medio del reactivo comercial Alexa fluor. Este conjugado marcado se administró, a una concentración 20 mM, a los ratones por vía sublingual. La presencia del conjugado en diferentes órganos fue determinada a partir de las imágenes generadas usando un aparato Bruker In Vivo Xtreme (BIONAND, Málaga), en el que se introduce al ratón sedado. Se tomaron imágenes inmediatamente antes y después de la administración de **V**, así como también a la hora y a las 24 horas siguientes. (Figura 6.13)

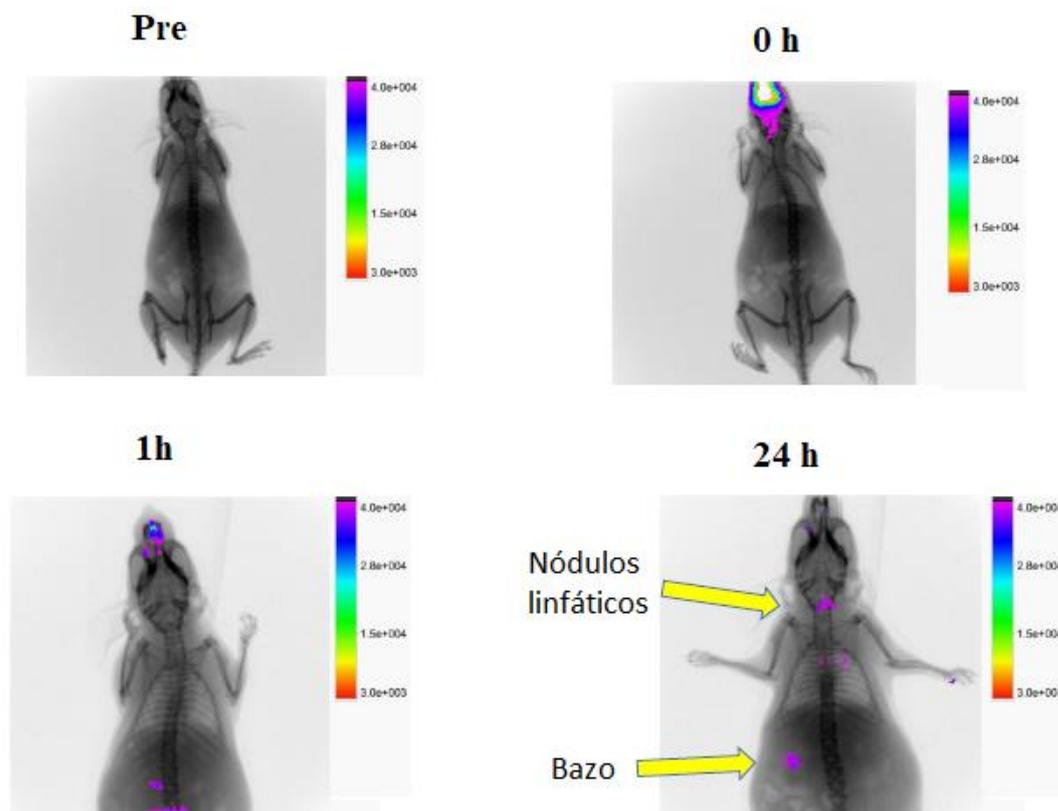
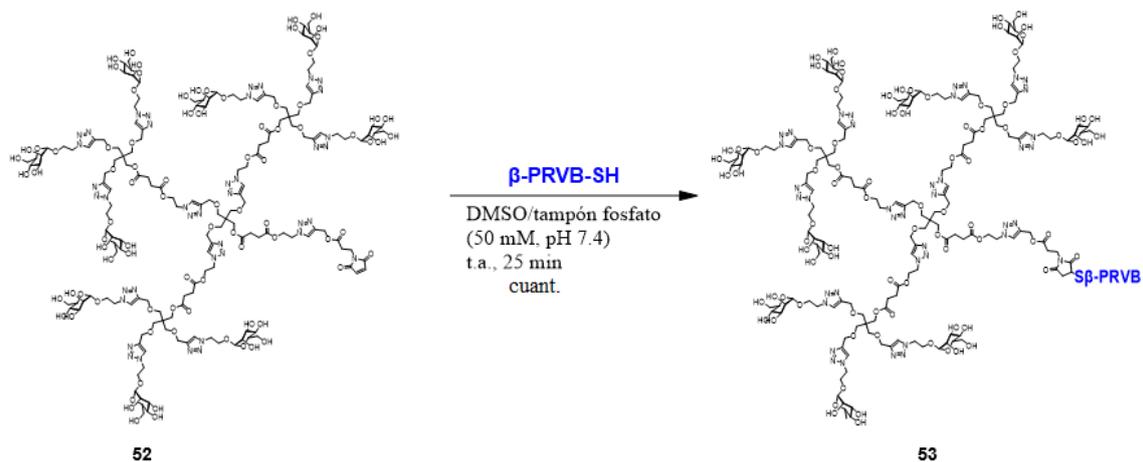


Figura 6.13. Imágenes *in vivo* en las que se observa la distribución del conjugado **V** marcado fluorescentemente, a diferentes tiempos.

Este estudio demostró que el conjugado **V** se distribuyó en 24 horas desde la región sublingual a diferentes ubicaciones, principalmente bazo, intestino y ganglios linfáticos.

Aunque son necesarios más estudios para identificar la ruta específica de entrada y el mecanismo, estos resultados revelan que el conjugado **V**, administrado por vía sublingual, se distribuye a órganos inmunocompetentes como el bazo o los ganglios linfáticos, así como a otros tejidos relevantes para la alergia alimentaria como la mucosa intestinal. Estos datos preliminares confirman la viabilidad del uso de estos conjugados en la SLIT.

En vista de los prometedores resultados obtenidos con el uso de este glicodendrón de nueve manosas con esqueleto de ésteres, nos propusimos estudiar el alcance de este adyuvante conjugando otros péptidos alérgicos. En concreto, se abordó la conjugación del péptido β -PRVB-SH, que como se ha comentado previamente en la presente Tesis Doctoral, corresponde a uno de los epítomos del alérgeno mayoritario del pescado (β -parvalbúmina). (Esquema 6.2)



Esquema 6.2. Síntesis del conjugado **53**.

El péptido β -PRVB-SH y la maleimida **52** fueron disueltos en DMSO y tampón fosfato (50 mM, pH 7.4), respectivamente, en proporciones equimoleculares. Seguidamente, se mezclaron por medio de agitación orbital durante 25 min a temperatura ambiente. El avance de la reacción fue monitorizado por RP-HPLC, confirmando la desaparición de los productos de partida de forma casi inmediata. Solamente fue necesario una ultrafiltración a través de una membrana de corte molecular de 3 KDa para eliminar las sales presentes en la reacción, obteniéndose el conjugado **53** con un rendimiento cuantitativo. Este conjugado fue caracterizado satisfactoriamente por medio de RP-HPLC y por espectrometría de masas (ESI), donde se detectó la presencia del conjugado **53** con diferentes cargas. (Figura 6.14)

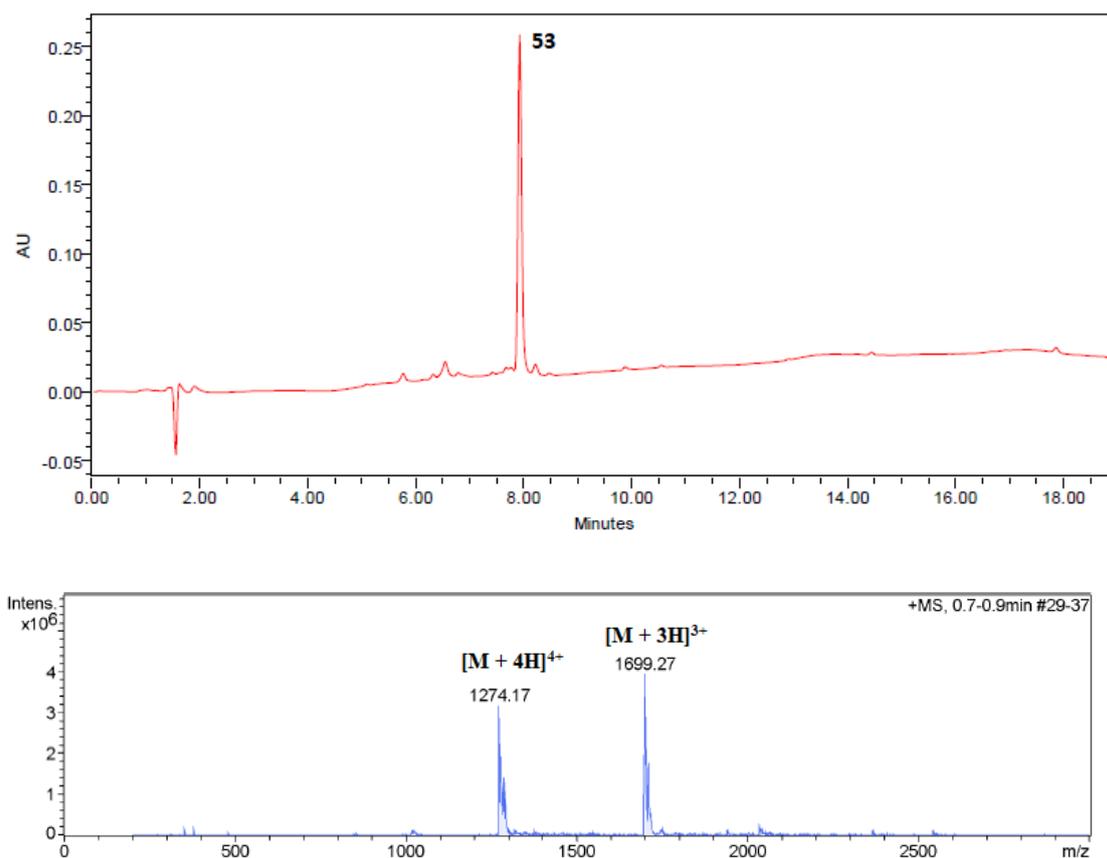


Figura 6.14. Cromatograma de RP-HPLC (arriba) y espectro de ESI-MS (abajo) del conjugado **53**.

Este conjugado **53** está siendo evaluado para el tratamiento de ratones anafilácticos a la β -parvalbúmina de pescado mediante AIT, por los grupos de la Dra. Carrera (Instituto de Investigaciones Marinas-CSIC) y la Dra. África González (Universidad de Vigo). Mediante estos estudios *in vivo*, se pretende demostrar si esta estructura proporciona tolerancia en ratones anafilácticos frente a la provocación con la proteína alérgica β -parvalbúmina.

6.4 Presentación de moléculas de interés terapéutico o *drug delivery*

Las formulaciones de dosificación convencionales de fármacos dan como resultado un suministro en un sitio no específico y un pico de los niveles de fármaco en plasma, seguido de una meseta y finalmente una disminución.²⁸⁶ Esto conduce a resultados terapéuticos subóptimos, efectos secundarios tóxicos y la necesidad de un aumento de la

²⁸⁶ Bawa, P.; Pillay, V.; Choonara, Y.E.; Du Toit, L.C.; *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, 1-15.

frecuencia de administración del fármaco. Por lo tanto, para superar estas desventajas, se está otorgando mayor importancia a las estrategias mediante las cuales estos medicamentos se administran dentro del cuerpo de forma controlada para mejorar las limitaciones de los sistemas convencionales.²⁸⁷

La conjugación para la presentación de moléculas farmacológicamente activas ha sido ampliamente estudiada. Existe una intensa investigación por parte de muchos grupos de investigación, tanto para optimizar el transporte a las dianas terapéuticas del organismo, así como para la presentación de estos fármacos. La investigación en este campo es conocida como *drug delivery* o administración de fármacos,²⁸⁸ que agrupa multitud de estrategias diferentes en función de la diana terapéutica, el tipo de fármaco, la forma de transporte o su activación. La idea que subyace es la de optimizar la dosis de fármaco necesaria que alcanza el tejido diana en cuestión, disminuyendo de esta forma los efectos secundarios al no interactuar con el tejido sano.²⁸⁹

Otra de las dificultades que se pretenden solventar con el uso de estas estrategias consiste en mejorar las propiedades farmacocinéticas y de biodistribución, como las asociadas a una baja solubilidad del fármaco en medios acuosos. El uso de estas estrategias ha demostrado su éxito en el transporte de una amplia variedad de productos de interés farmacológico como péptidos, proteínas y fármacos de bajo peso molecular.^{290,291}

La mayoría de estrategias desarrolladas para llevar a cabo la unión del fármaco se basan en tres aproximaciones bien diferenciadas.²⁹² La aproximación más estudiada consiste en la encapsulación de fármacos por medio del uso de micro/nanocápsulas que contienen una cavidad hidrofílica rodeada por una membrana hidrofóbica formada por lípidos o polímeros.²⁹³ (Figura 6.15A) Existen una gran variedad de estructuras como liposomas,²⁹⁴

²⁸⁷ Omolo, C.A.; *et al.*; *J. Control. Release* **2018**, *290*, 112-128.

²⁸⁸ Rayaprolu, B. M.; Strawser, J.J.; Anyarambhatla, G.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2018**, *44*, 1565-1571.

²⁸⁹ Tekade, R.K.; Maheshwari, R.; Soni, N.; Tekade, M.; Chougule, M.B.; *Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes*, **2017**, Elsevier, 3-61.

²⁹⁰ Omolo, C.A.; *et al.*; *J. Liposome Res.* **2021**, *31*, 45-63.

²⁹¹ Ulbrich, K.; Hola, K.; Subr, V.; Bakandritsos, A.; Tucek, J.; Zboril, R.; *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 5338-5431.

²⁹² Li, Q.; Li, K.; Zhao, C.; *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 437.

²⁹³ Couvreur, P.; Barratt, G.; Fattal, E.; Vauthier, C.; *Therap. Drug Carrier Syst.* **2002**, *19*, 99-134.

²⁹⁴ Bangham, A. D.; Horne, R. W.; *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 660-668.

micelas,²⁹⁵ hidrogeles²⁹⁶ o nanogeles.²⁹⁷ Esta encapsulación no se basa en uniones covalentes entre el fármaco y el transportador, sino que está mediada por interacciones hidrofóbicas. Otro tipo de estrategia se basa en la adsorción física que está mediada por interacciones intermoleculares como las de tipo van der Waals, interacciones dipolo-dipolo e interacciones iónicas entre otras. (Figura 6.15B) En este tipo de estrategias es común el uso de nanopartículas de distintos materiales inorgánicos como gel de sílice,²⁹⁸ oro²⁹⁹ u óxido de hierro.³⁰⁰ La última estrategia está basada en la conjugación covalente entre el fármaco y la estructura transportadora. (Figura 6.16C) Esta estrategia consiste en el uso de un enlace lábil que une el transportador y el fármaco para que después del transporte al tejido diana, dicho enlace se escinda, liberándose el fármaco para realizar su actividad terapéutica en el lugar y momento oportunos. Se han identificado diversos tipos de enlaces químicos para llevar a cabo estos procesos como amidas, ésteres, hidrazonas o disulfuros que han demostrado su éxito en diferentes modelos.³⁰¹

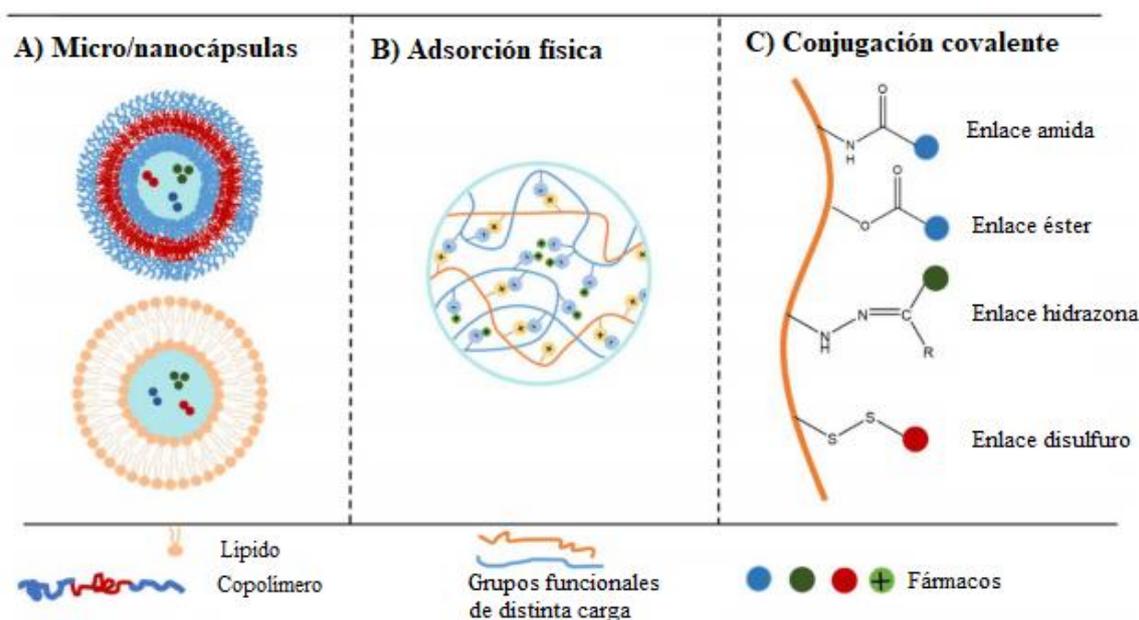


Figura 6.16. Representación de las distintas estrategias empleadas en el transporte de fármacos. Figura modificada de la referencia 290.

²⁹⁵ Ahmad, Z.; Shah, A.; Siddiq, M.; Kraatz, H.B.; *RSC Adv.* **2014**, *4*, 17028-17038.

²⁹⁶ Peppas, N.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 27-46.

²⁹⁷ Neamtu, I.; *et al.*; *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 539-557.

²⁹⁸ Wang, Y.; *et al.*; *NBM* **2015**, *11*, 313-327.

²⁹⁹ Hirsch, L.; *et al.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13549-13554.

³⁰⁰ Maier-Hauff, K.; *et al.*; *Neurooncol.* **2011**, *103*, 317-324.

³⁰¹ Kim, S.W.; *et al.*; *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1-17.

Todas estas estrategias han sido ampliamente estudiadas; sin embargo, se han encontrado dificultades para atrapar fármacos hidrófilos mediante encapsulación física, lo que resulta en unas bajas eficiencias de carga.³⁰² Debido a este problema, la conjugación covalente constituye uno de los campos más interesantes de desarrollo. Una de sus principales ventajas consiste en el elevado control sobre la liberación del fármaco. Esta liberación se consigue a partir de enlaces lábiles que pueden ser hidrolizables o biodegradables. Dependiendo de la naturaleza del enlace, este puede ser escindido por medio de diferentes estímulos como pueden ser la luz, el pH, enzimas, energía térmica, potenciales redox, entre otros.³⁰³ (Figura 6.17)

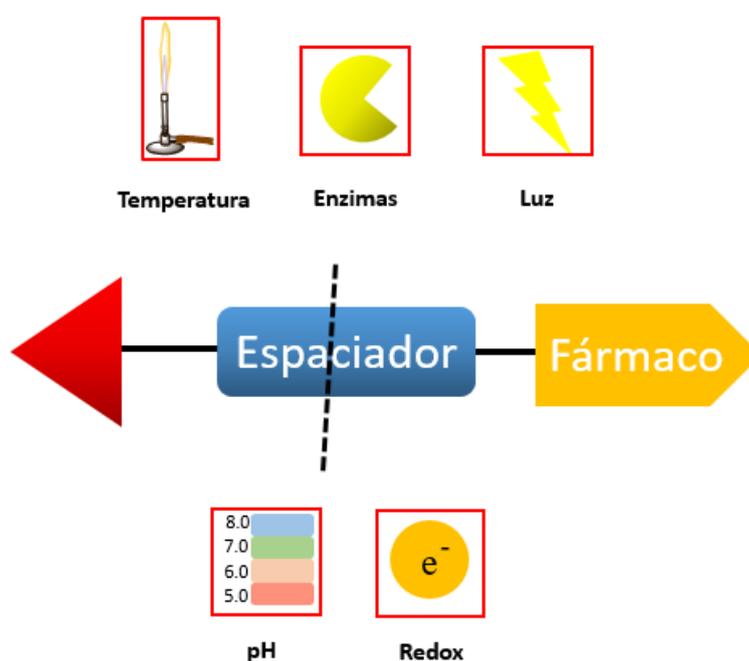


Figura 6.17. Diferentes estímulos que pueden provocar la ruptura de un enlace covalente y la posterior liberación del fármaco conjugado.

En función de la composición del espaciador, se usará un estímulo u otro para su ruptura. La elección de este espaciador debe ser realizada cuidadosamente, ya que debe permanecer inalterado durante la administración y transporte hacia el tejido diana del compuesto. Por otro lado, el estímulo necesario para su escisión debe producirse en el

³⁰² Vrignaud S.; Benoit, J.P.; Saulnier, P.; *Biomaterials* **2011**, 32, 8593-8604.

³⁰³ Fasiku, V.; Amuhaya, E.K.; Rajab, K.M.; Omolo, C.A.; *Nano- and Microencapsulation, Chapter 4: Nano/Microparticles Encapsulation Via Covalent Drug Conjugation*, **2020**, IntechOpen.

momento preciso para la liberación del fármaco, pudiendo ser emitido este estímulo desde el exterior o en el interior del organismo, una vez el fármaco ha llegado a su destino.

De entre las estrategias usadas para esta ruptura, una de las más estudiadas es la basada en la sensibilidad al pH que será detallada en la siguiente sección.

6.4.1 Espaciadores sensibles al medio ácido

Las estrategias basadas en diferencias de pH constituyen una aproximación interesante y elegante para la ruptura selectiva de enlaces y la liberación de fármacos. Estas diferencias de pH posibilitan la creación de metodologías para el transporte de fármacos en función del tejido. En las células tumorales, debido a su diferente metabolismo con respecto a las células sanas, se produce una acidificación alrededor de su medio extracelular (pH= 6.5-7.2), cuando normalmente debería ser neutro (pH= 7.4), constituyendo esta una de las propiedades más destacadas de las células tumorales.³⁰⁴ En base a este hecho, se han desarrollado diversas investigaciones para el transporte y liberación de fármacos antitumorales en estas células cancerosas usando esta estrategia.³⁰⁵

A nivel celular, también se producen diferencias de pH en tejidos sanos. La mayoría de los sistemas de liberación de fármacos se internalizan en las células a través de un proceso de endocitosis,³⁰⁶ mediante la formación de una vesícula endocítica que posteriormente se fusiona con endosomas tempranos. Después, se produce la maduración, formándose lo que se denomina un endosoma tardío y finalmente, tiene lugar la acumulación en el lisosoma.³⁰⁷ Este proceso conlleva una acidificación constante y progresiva del medio intracelular. El pH disminuye desde el pH fisiológico de 7.4 (extracelular) hasta un pH~6.5 en el endosoma temprano, encontrándose el endosoma tardío sobre un pH~6.0 y alcanzándose un máximo de acidificación en el lisosoma, entorno a un pH~5.0.³⁰⁸ La acidificación se produce mediante bombas de protones³⁰⁹ y canales³¹⁰ asociados con las

³⁰⁴ Corbet, C.; Feron, O.; *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 577-593.

³⁰⁵ Tang, H.; Zhao, W.; Yu, J.; Li, Y.; Zhao, C.; *Molecules* **2019**, *24*, 4.

³⁰⁶ Canton, I.; Battaglia, G.; *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2718-2739.

³⁰⁷ Iversen, T.G.; Skotland, T.; Sandvig, K.; *Nano Today* **2011**, *6*, 176-185.

³⁰⁸ Such, G.K.; Yan, Y.; Johnston, A.P.; Gunawan, S.T.; Caruso, F.; *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 2278-2297.

³⁰⁹ Yates, R.M.; Russell, D.G.; *Immunity* **2005**, *23*, 409-417.

³¹⁰ DeCoursey, T.E.; Cherny, V.V.; Morgan, D.; Katz, B.Z.; Dinauer, M.C.; *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36063-36066.

membranas endosomales. Para mantener un equilibrio de carga, contraiones como el cloruro son bombeados al endosoma. Utilizando estos gradientes de pH, se han estudiado una gran variedad de sistemas de transporte de fármacos. Una vez que el compuesto es internalizado, los enlaces sensibles a pH ácido que están unidos al fármaco son hidrolizados, liberándose este de una forma controlada y precisa.³¹¹ (Figura 6.18)

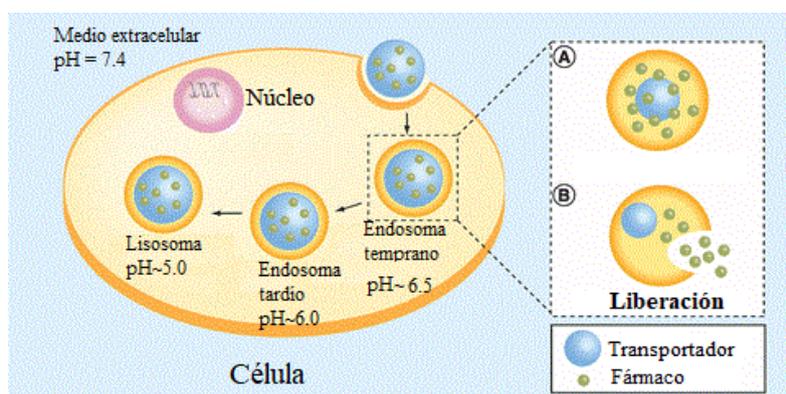


Figura 6.18. Representación de un transporte de fármacos al interior celular. Se produce una acidificación progresiva en los diferentes compartimentos celulares. A) Se hidrolizan las uniones entre el transportador y el fármaco. B) Se produce la liberación del fármaco. Figura modificada de la referencia 310.

Para la viabilidad de esta estrategia de transporte es necesario que los enlaces entre el transportador y el fármaco sean estables a un pH fisiológico, pero que puedan ser hidrolizables en medios ligeramente ácidos. De esta forma, se garantiza que el fármaco se mantendrá unido a lo largo de la administración y el transporte hasta el tejido diana, así como una liberación en el interior celular. Algunos tipos de enlaces químicos que han demostrado esta estabilidad dependiente del pH para su uso en el transporte de fármacos han sido acetales,³¹² ortoésteres,³¹³ aminas³¹⁴ y éteres vinílicos³¹⁵ entre otros. Pero sin duda, de los más utilizados han sido los enlaces basados en hidrazonas, debido a su rápida hidrólisis en medios ácidos en comparación con su estabilidad a pH fisiológico. Las hidrazonas poseen una estructura general $R_2C=NNR_2$ y existen tres vías generales para su síntesis: (a) La condensación entre hidrazinas y carbonilos como aldehídos y cetonas; (b) El acoplamiento entre sales de arildiazonio y β -cetoésteres o ácidos, conocido también

³¹¹ He, X.; Li, J.; An, S.; Jiang, C.; *Ther. Deliv.* **2013**, *4*, 1499-1510.

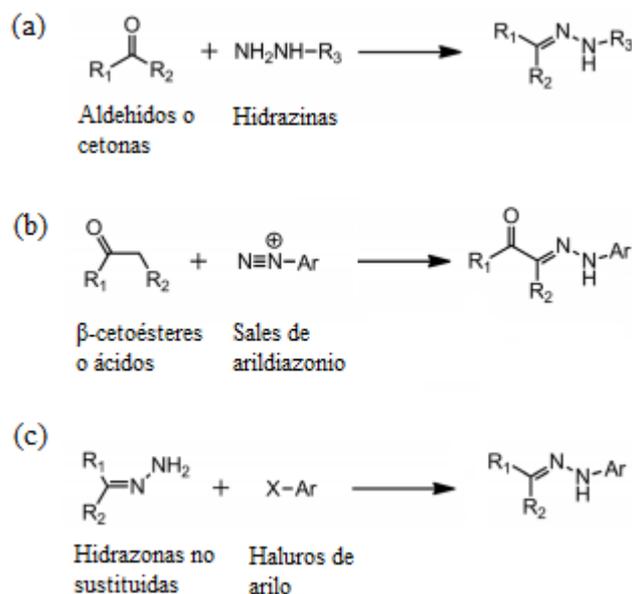
³¹² Chen, W.; Meng, F.; Cheng, R.; Zhong, Z.; *J. Control. Release* **2010**, *142*, 40-46.

³¹³ Tang, R.; Ji, W.; Wang, C.; *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 192-201.

³¹⁴ Lee, E.S.; Na, K.; Bae, Y.H.; *J. Control. Release* **2003**, *91*, 103-113.

³¹⁵ Shin, J.; Shum, P.; Thompson, D.H.; *J. Control. Release* **2003**, *91*, 187-200.

como la reacción de Japp–Klingemann; (c) La reacción entre haluros de arilo e hidrazonas no sustituidas.³¹⁶ (Esquema 6.3)



Esquema 6.3. Síntesis de hidrazonas vía: (a) condensación hidrazina-cetona/aldehído; (b) la reacción de Japp–Klingemann; (c) la sustitución con haluros de arilo.

Sin embargo, el método más común para la síntesis de casi todos los enlaces hidrazona descritos como estrategia de enlace sensible, se ha llevado a cabo principalmente por condensación entre grupos hidrazina y grupos cetona o aldehído de los fármacos para formar conjugados. Con algunas excepciones, como la conjugación del antibiótico estreptomicina,³¹⁷ la mayoría de fármacos conjugados vía enlace hidrazona descritos en la bibliografía son agentes antitumorales. Dentro de estos fármacos antitumorales destacan la doxorrubicina (DOX),³¹⁸ el docetaxel (DTX)³¹⁹ y el paclitaxel (PTX),³²⁰ obteniéndose buenos resultados mediante esta estrategia de transporte y liberación. Usando estos enlaces basados en hidrazonas, se han usado una amplia variedad de transportadores como polímeros,³²¹ dendrímeros³²² y micelas,³²³ entre otros.

³¹⁶ Su, X.; Aprahamian, I.; *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1963-1981.

³¹⁷ Coessens, V.; Schacht, E.; Domurado, D.; *J. Control. Release* **1996**, *38*, 141-150.

³¹⁸ Prabakaran, M.; Grailer, J.J.; Pilla, S.; Steeber, D.A.; Gong, S.; *Biomaterials* **2009**, *30*, 5757-5766.

³¹⁹ Su, Z.; Liang, Y.; Yao, Y.; Wang, T.; Zhang, N.; *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 1122-1133.

³²⁰ Alani, A.W.; Bae, Y.; Rao, D.A.; Kwon, G.S.; *Biomaterials* **2010**, *31*, 1765-1772.

³²¹ Etrych, T.; Šubr, V.; Laga, R.; Říhová, B.; Ulbrich, K.; *J. Control. Release* **2001**, *73*, 89-102.

³²² Chang Y.; *et al.*; *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *363*, 403-409.

³²³ Xiao, Y.; *et al.*; *Biomaterials* **2012**, *33*, 3071-3082.

6.5 Síntesis de glicodendrones con un espaciador sensible a medio ácido

Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación demuestran el gran potencial del uso de glicodendrones como adyuvantes en vacunas frente a la alergia. En este contexto, nos propusimos modificar estas estructuras incorporando un espaciador, sensible al medio ácido, entre el glicodendrón y el péptido alergénico. La idea sería, una vez internalizado el conjugado en las DCs a través de DC-SIGN, la bajada del pH en sus diferentes compartimentos hidrolizaría el espaciador liberando el péptido alergénico, lo que facilitaría y mejoraría su presentación. (Figura 6.19) De esta forma, se pretende evaluar si se obtendrían mejores resultados terapéuticos al facilitar la presentación del péptido alergénico al separarse este del glicodendrón. Para llevar a cabo estos estudios, se eligió el epítipo de Pru p 3 debido a que es el alérgeno más estudiado por nuestro grupo de investigación.

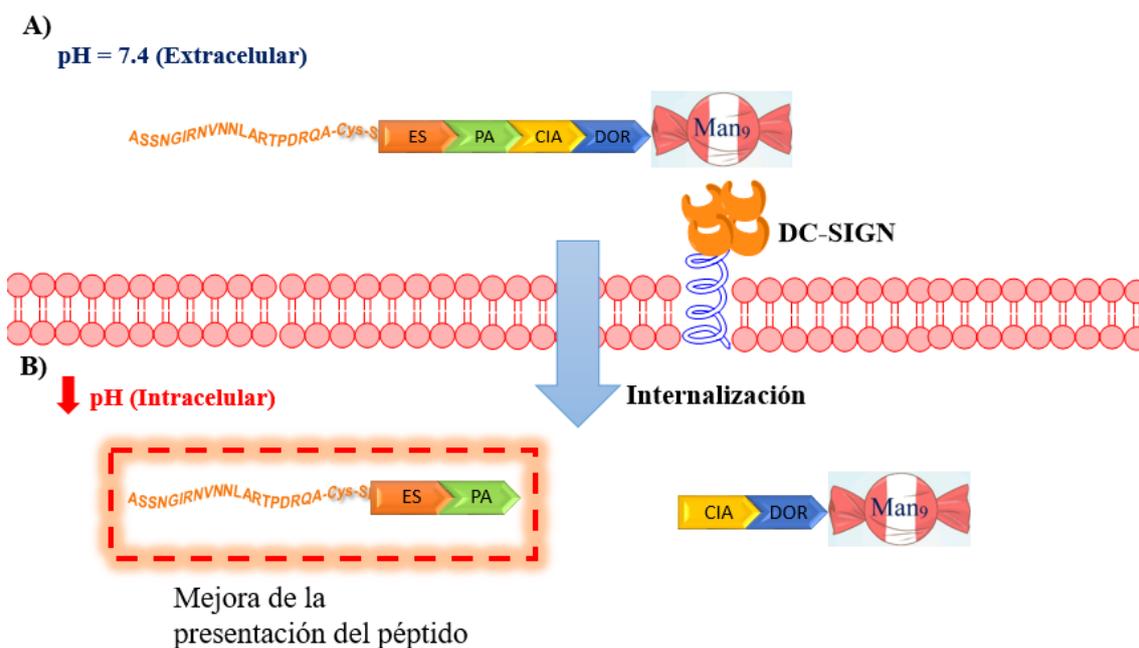


Figura 6.19. Representación del conjugado entre el péptido Pru p 3 y el glicodendrón de nueve manosas unidos por un espaciador sensible al medio ácido. **A)** En el exterior celular, a un pH fisiológico, el conjugado mantiene su integridad y la parte glicodendrítica es reconocida por DC-SIGN, lo que da lugar a la internalización. **B)** En el interior celular, la bajada de pH induce la ruptura del espaciador, liberándose el péptido Pru p 3 y mejorando su presentación.

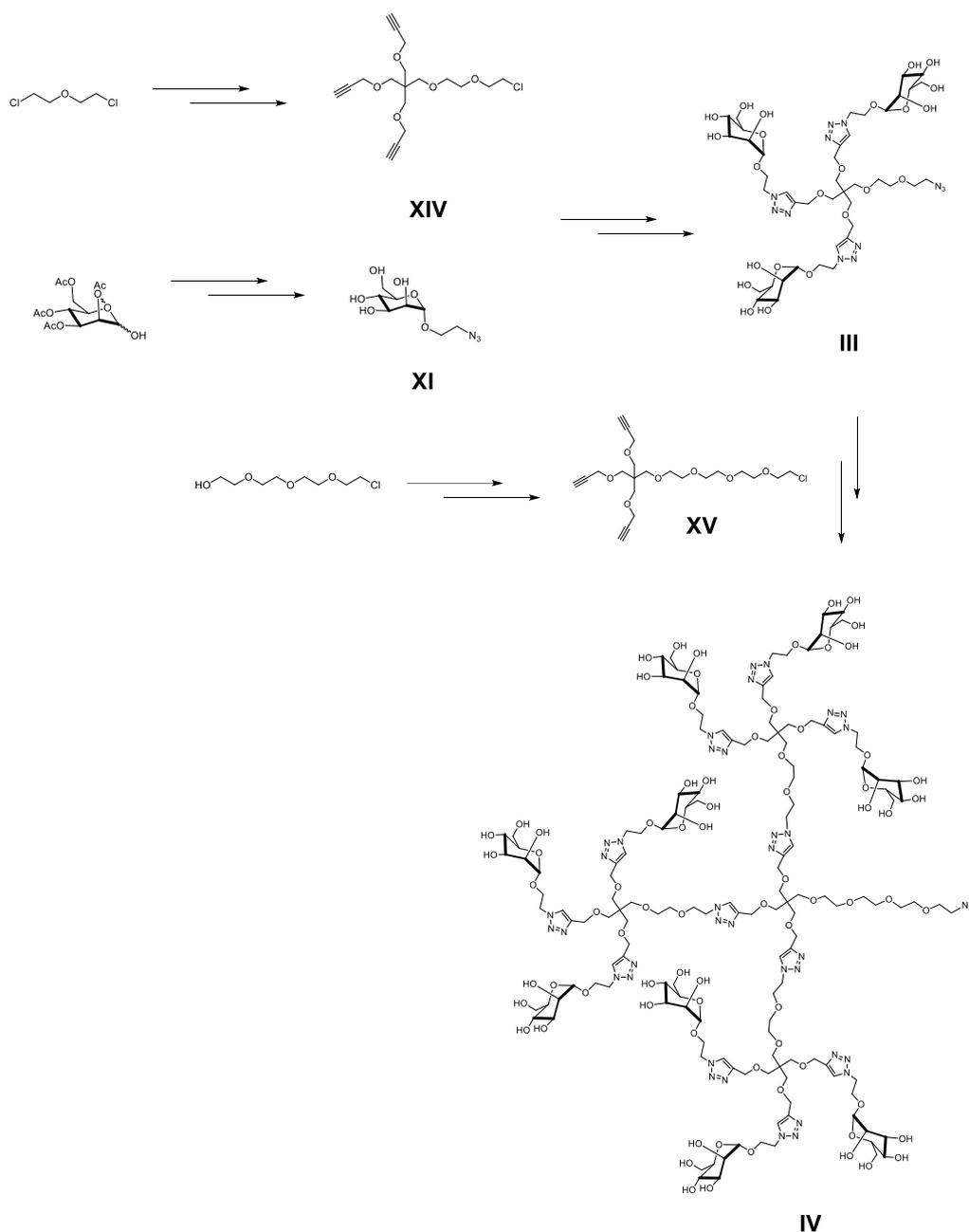
Como espaciador sensible al medio ácido decidimos usar uno de tipo hidrazona, debido a su amplio uso descrito en la bibliografía. Para ello, en primer lugar, fue necesario

diseñar los diferentes bloques de construcción de este conjugado. Como se ha comentado previamente, la síntesis de hidrazonas más sencilla consiste en la reacción de condensación entre hidrazinas y aldehídos o cetonas. Se ha descrito la síntesis de sales de hidrazina funcionalizadas con un grupo maleimido,³²⁴ necesario para el último paso en la conjugación del péptido Pru p 3-SH. Aplicando esta estrategia, se necesitaría un glicodendrón cuyo punto focal esté funcionalizado con un grupo carbonilo, preferentemente una cetona. Esta elección se debe a que en general, las hidrazonas obtenidas de cetonas tienen una mayor estabilidad que las derivadas de aldehídos.³²⁵

Como estrategia sintética más simple, nos planteamos la derivatización del glicodendrón de nueve manosas **IV** para que su punto focal fuera transformado en un grupo cetona. La síntesis del glicodendrón se llevó a cabo tal y como fue descrito previamente por nuestro grupo de investigación.²⁶⁷ En el esquema 6.4 se recoge el esquema sintético para la obtención de este glicodendrón **IV**.

³²⁴ Beyer, U.; *et al.*; *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2701-2708.

³²⁵ Hermanson, G.T.; *Bioconjugate Techniques*, 2013, *3th Edition*; *Academic Press*, 251.



Esquema 6.4. Esquema sintético abreviado del glicodendrón IV.

Esta estrategia de síntesis es muy similar a la planteada anteriormente para el glicodendrón homólogo con esqueleto de ésteres. Presentan algunos intermedios sintéticos comunes como la manosa desprotegida funcionalizada con azida **XI** o el núcleo basado en el pentaeritritol comercial. El elemento diferenciador en la estructura de éteres consiste en que el pentaeritritol es funcionalizado con un espaciador corto basado en el 2-cloroetiléter comercial, de esta forma se obtiene el núcleo **XIV**. La síntesis del glicodendrón trivalente se realizó usando la misma estrategia, a través de la reacción CuAAC con la manosa con azida **XI**, sintetizada previamente. Se usaron las condiciones

puestas a punto por nuestro grupo de investigación, utilizando CuSO_4 , TBTA y ascorbato sódico para el acoplamiento. Posteriormente, mediante una reacción de azidación, se intercambió el cloro del punto focal por un grupo azido, obteniéndose el glicodendrón trivalente **III**. Partiendo de nuevo del pentaeritritol, este fue funcionalizado con un espaciador largo comercial, el (2-(2-cloroetoxi)etiléter, para formar el núcleo **XV**. Este núcleo se hizo reaccionar con el glicodendrón trivalente **III**, usando de nuevo la reacción CuAAC, obteniéndose el correspondiente glicodendrón de nueve manosas. Por último, mediante una reacción de azidación se intercambió el cloro por azida en la posición focal, obteniéndose el glicodendrón de segunda generación **IV**. El compuesto obtenido se caracterizó por medio de UHPLC/MS, cuyo cromatograma demostró la formación de un solo compuesto con la relación de señales m/z correspondientes al glicodendrón **IV**. (Figura 6.20)

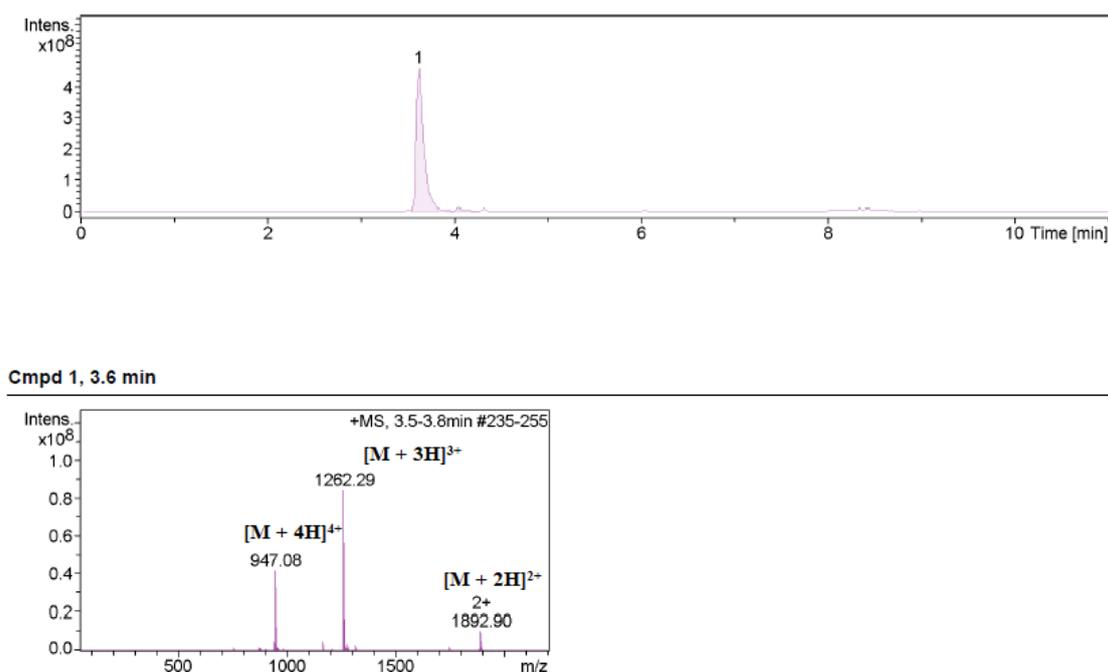
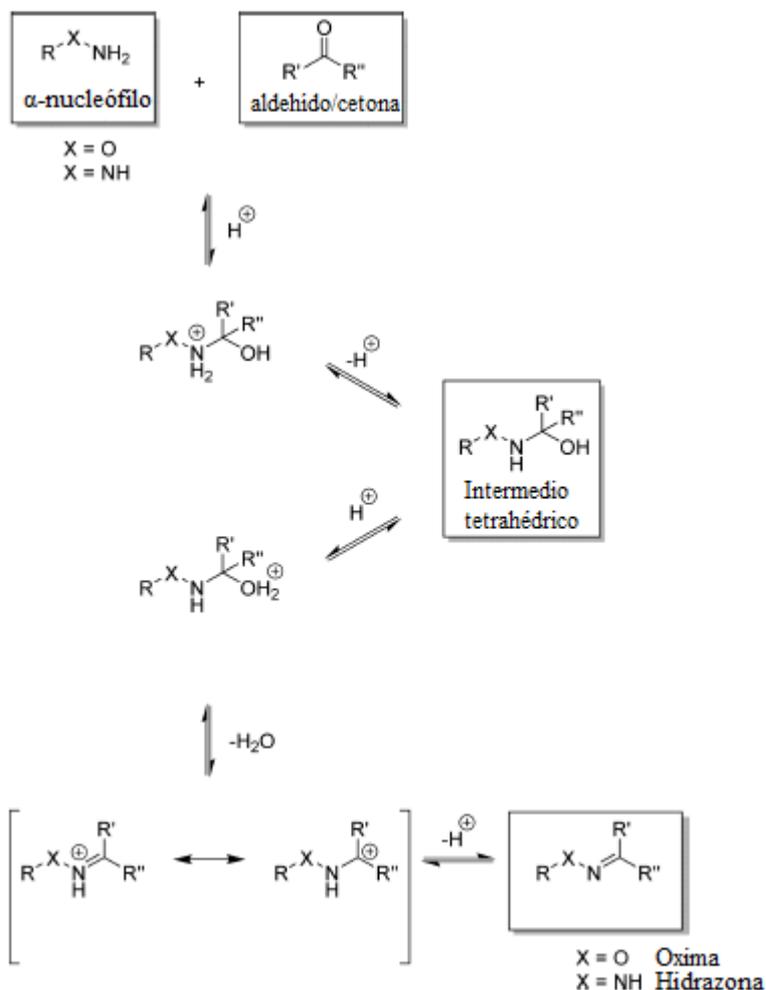


Figura 6.20. Cromatograma de UHPLC/MS del compuesto **IV**.

Una vez sintetizado este glicodendrón, se abordó su funcionalización para presentar un grupo cetona en su posición focal. Posteriormente, se formará la hidrazona entre el glicodendrón y una hidrazina que incorpora un grupo maleimido. El último paso sintético consistirá por tanto en la conjugación del péptido Pru p 3-SH a través de la adición tioleno. Debido a que este espaciador con un grupo hidrazona debe ser capaz de resistir este paso sintético sin hidrolizarse es necesario que tenga la suficiente estabilidad.

Para elegir los sustituyentes más adecuados del grupo hidrazona, en la bibliografía pueden encontrarse una amplia variedad de trabajos sobre la influencia de los sustituyentes y estudios mecanísticos de formación e hidrólisis de las hidrazonas.³²⁶ De forma general, las iminas son compuestos con una estructura tipo $R_2C=NX$. Cuando $X = O$, se llaman oximas y cuando $X = NH$, se denominan hidrazonas. El mecanismo de síntesis de estos grupos funcionales puede ser descrito de forma homóloga, como se detalla en el Esquema 6.5.³²⁷



Esquema 6.5. Mecanismo de formación de oximas e hidrazonas a partir de compuestos carbonílicos. Imagen modificada de la referencia 327.

La reacción comienza por un ataque nucleófilo del α -nucleófilo al carbono carbonílico, catalizado por un protón. Después de la transferencia del protón, se forma un intermedio tetrahédrico como hemiaminal. A continuación, el catalizador ácido protona el hidroxilo

³²⁶ Stempel, G.H.Jr.; Schaffel, G.S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 1158-1161.

³²⁷ Kölmel, D.K.; Kool, E.T.; *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10358-10376.

y de esta forma, el par electrónico del nitrógeno expulsa una molécula de agua a través de una deshidratación, formándose un ión iminio que puede ser representado por dos formas resonantes. Por último, la desprotonación conduce al producto neutro como oxima o hidrazona. Como se observa, generalmente esta síntesis está mediada por una catálisis ácida.³²⁸ Es importante destacar que la formación de hidrazonas es completamente reversible, la reacción de hidrólisis se obtiene invirtiendo el orden de los pasos de reacción, siendo por tanto el primer paso la protonación del nitrógeno de la imina.³²⁹

Estudios mecanísticos han demostrado que el efecto inductivo negativo del grupo X unido al nitrógeno influye directamente en la estabilidad del conjugado. Esto explica la tendencia general observada: las iminas ($X = CH_2$) se hidrolizan fácilmente en condiciones acuosas, mientras que las oximas y las hidrazonas son mucho más estables debido al efecto inductivo negativo adicional del heteroátomo ($X = O, NH$), siendo el primero el más estable en esta serie debido a la mayor electronegatividad del oxígeno ($\chi(O) = 3,5$ frente a $\chi(N) = 3,0$).³³⁰ Debido a su estabilidad inherentemente mayor, las oximas son típicamente utilizadas en reacciones de bioconjugación cuando se requiere un enlace más resistente mientras que las hidrazonas, siendo más lábiles, se emplean para la liberación controlada de fármacos, como se ha comentado anteriormente. Las constantes de equilibrio de las hidrazonas se encuentran en torno a 10^4 - $10^6 M^{-1}$, mientras que para la oximas son del orden de $10^8 M^{-1}$.³³¹

Otro aspecto importante relacionado con la estabilidad es la elección del sustituyente adecuado. La estabilidad de los conjugados de hidrazona está influenciada directamente por factores estéricos, pero fundamentalmente está atribuida a los factores electrónicos en las proximidades del enlace. En la figura 6.21 se recogen algunos ejemplos.

³²⁸ Westheimer, F.H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 1962-1965.

³²⁹ Egberink, H.; van Heerden, C.; *Anal. Chim. Acta* **1980**, *118*, 359-368.

³³⁰ Kalia, J.; Raines, R.T.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523-7526.

³³¹ Dirksen, A.; Dawson, P.E.; *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2543-2548.

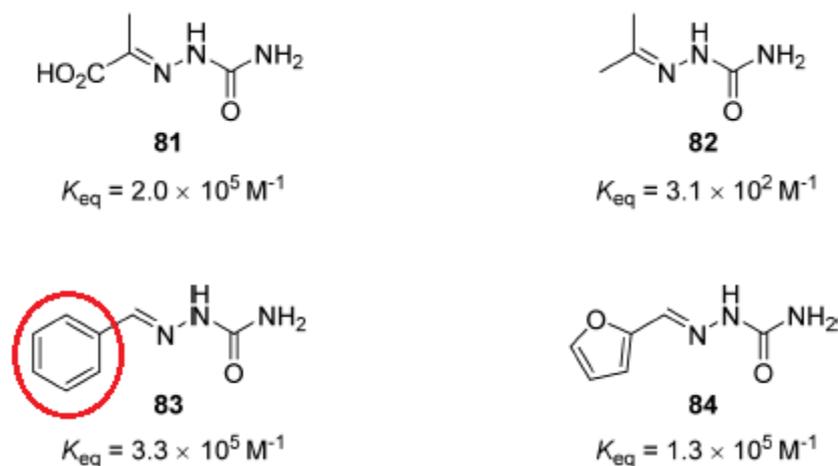
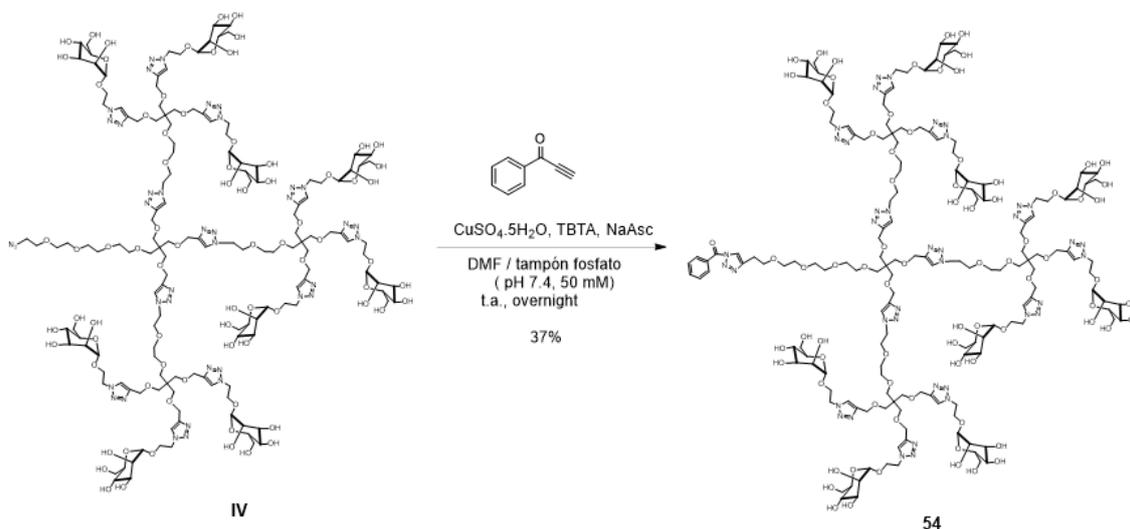


Figura 6.21. Constantes de equilibrio de algunas hidrazonas. $K_{eq} = [\text{hidrazona}]/[\text{carbonilo}] \times [\text{hidrazina}]$. La hidrazona aromática es la más estable (en rojo). Figura modificada de la referencia 327.

A la vista de estos datos, un anillo aromático directamente unido al grupo cetona parecía una buena opción para funcionalizar el punto focal del glicodendrón **IV**. Para ello, se abordó esta funcionalización a través de la reacción CuAAC entre la azida del punto focal del glicodendrón **IV** y el alquino comercial fenil-2-propin-1-ona, usando CuSO_4 , TBTA y ascorbato sódico. (Esquema 6.6)



Esquema 6.6. Síntesis del glicodendrón **54**.

Cuando se llevó a cabo este acoplamiento, se observó que no se consumían completamente los reactivos y la aparición de productos secundarios que dificultaban enormemente la purificación. Optimizando las condiciones de dicha reacción, las mejores condiciones se encontraron usando una mezcla de DMF y tampón fosfato. Después del

lavado y filtrado varias veces del crudo de reacción, usando la resina Quadrasil® Mercaptopropil para eliminar el cobre, no pudo ser purificado por cromatografía de exclusión por tamaño debido a la presencia de impurezas de difícil separación. Por esta razón, se optó por una purificación por medio de RP-HPLC, obteniéndose el glicodendrón **54** como un sólido blanco, pero reduciéndose el rendimiento al 37%, debido a la purificación de forma iterativa usando un HPLC analítico. La obtención del glicodendrón fue confirmado por medio de ^1H -RMN, en el que se observa la aparición del protón asociado al nuevo triazol a 8.59 ppm. De la misma forma, también se observa la aparición de las señales aromáticas del benceno, así como la correcta relación de integración entre ellas y el resto de señales de la molécula. Estos datos son consistentes con el espectro ESI-MS, en el que se detectó la relación de señales m/z correspondientes al glicodendrón **54**, demostrándose la obtención del glicodendrón de forma completamente monodispersa. (Figura 6.22)

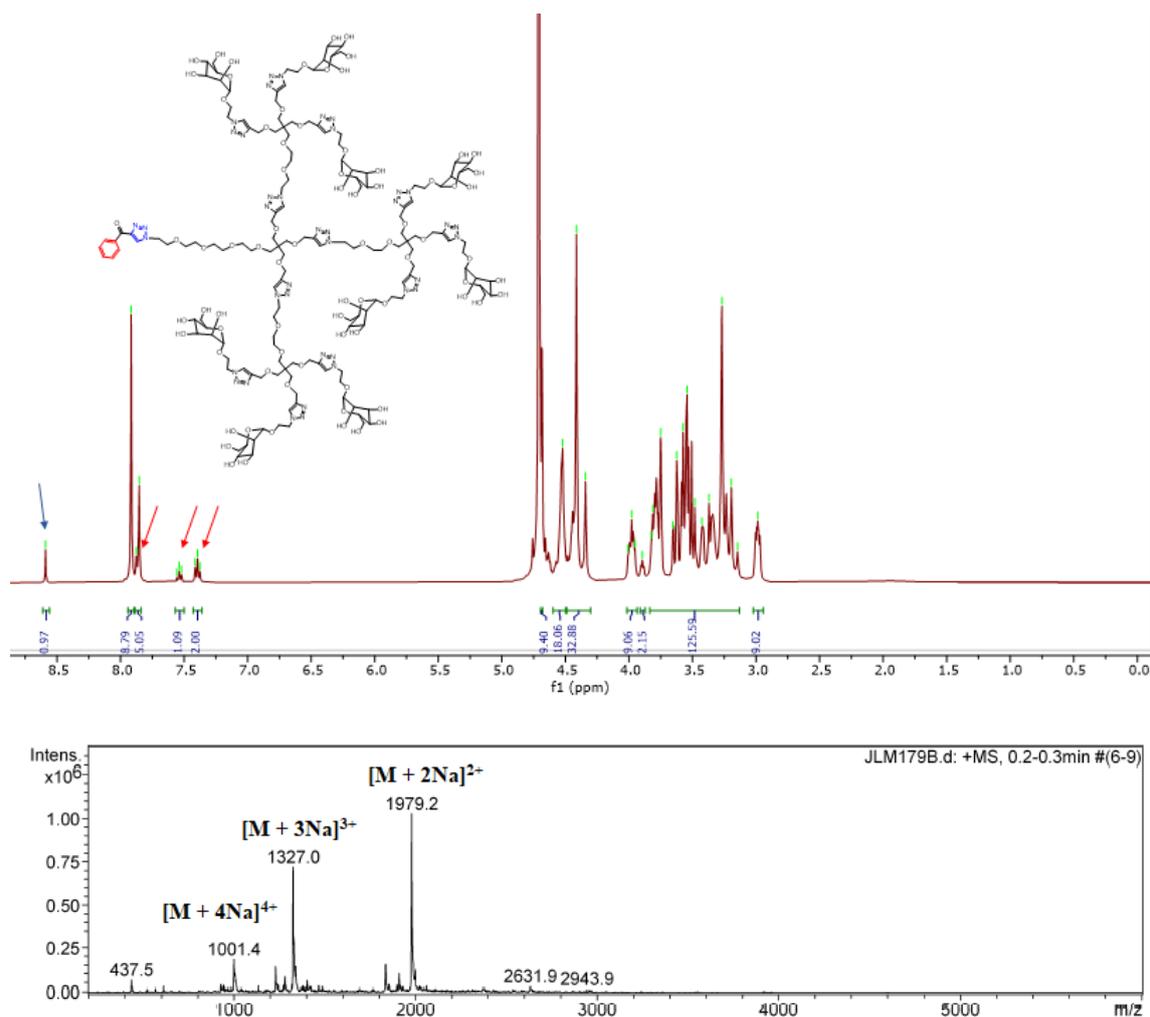
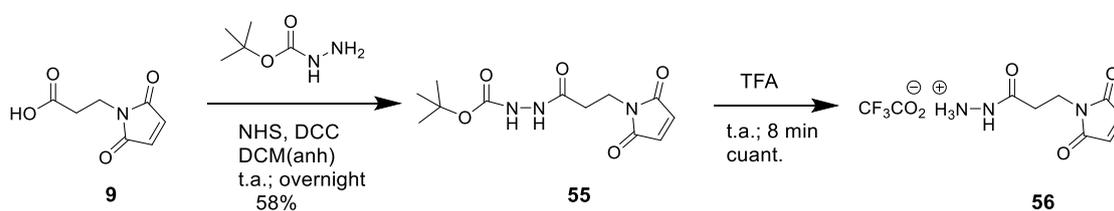


Figura 6.22. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) (arriba) y ESI-MS (abajo) del glicodendrón **54**.

Una vez sintetizado el glicodendrón **54** que presenta una cetona aromática en su punto focal, se abordó la síntesis de una hidrazina funcionalizada con un grupo maleimido. Para ello se modificó la maleimida **9** usada previamente. (Esquema 6.7)

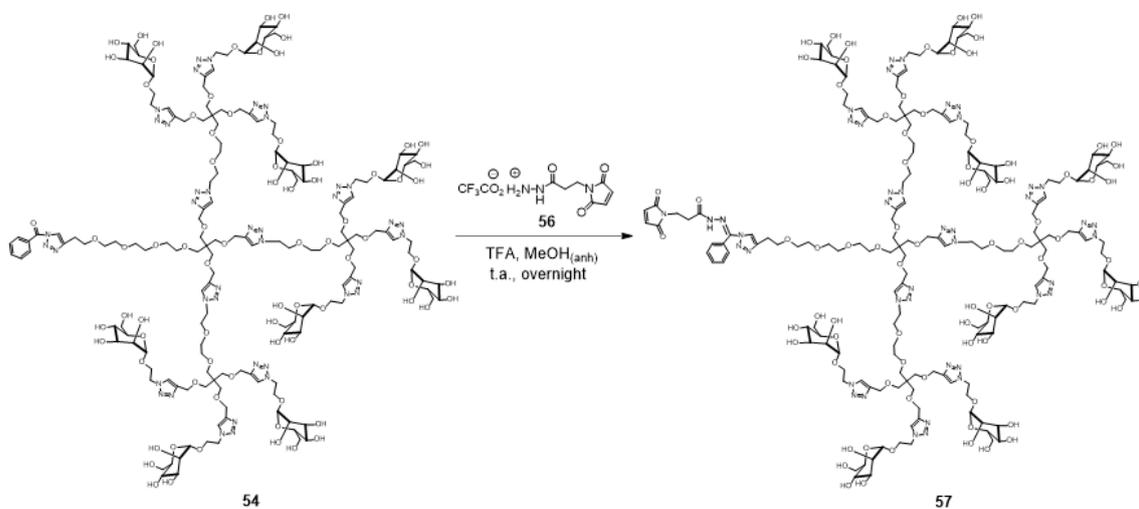


Esquema 6.7. Síntesis de la sal de hidrazonio **56**.

La maleimida **9** se hizo reaccionar con carbazato de *tert*-butilo en presencia del agente de acoplamiento *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) en diclorometano anhidro. Después de la purificación por cromatografía en columna de gel

de sílice, se obtuvo la maleimida **55** protegida con un grupo Boc con un 58% de rendimiento. Mediante la integración en el espectro de ^1H -RMN del singulete a 1.48 ppm que corresponde a los tres metilos del grupo Boc con el resto señales, se confirmó la obtención del compuesto. El siguiente paso consistió en la desprotección del grupo Boc de la maleimida **55** usando TFA. Después de una precipitación en Et_2O frío, se obtuvo la sal de hidrazonio **56** como un sólido blanco de forma cuantitativa.

Una vez formada la maleimida, se abordó la síntesis de la hidrazona utilizando el glicodendrón **54**. Para ello, se utilizaron las condiciones descritas en la bibliografía para la formación de hidrazonas usando derivados de maleimida como sales de hidrazonio. Se ha descrito la formación de estos conjugados usando únicamente MeOH;³³² sin embargo, en estas condiciones no se observó un avance apreciable de la reacción. La formación de hidrazonas presenta una cinética lenta en condiciones de pH neutro.³³³ Como se ha comentado previamente (ver Esquema 6.5), esta reacción está catalizada por medios ligeramente ácidos. Por ello, se usaron unas condiciones similares a las usadas por el grupo de Zhou, en el que añaden TFA como catalizador para la formación de una hidrazona con el fármaco DOX.³³⁴ (Esquema 6.8)



Esquema 6.8. Condiciones probadas para la síntesis de la hidrazona glicodendrítica **57**.

El uso de TFA mejoró sensiblemente la formación de la hidrazona; sin embargo, por medio de TLC se observaba la presencia de producto de partida. Después de una

³³² Deygen, I.M.; *et al.*; *Langmuir* **2016**, *32*, 10861-10869.

³³³ Dirksen, A.; Dirksen, S.; Hacking, T.M.; Dawson, P.E.; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15602-15603.

³³⁴ Zhou, X.; *et al.*; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15656-15657.

purificación mediante una columna de exclusión por tamaño, Sephadex-LH20 (100% MeOH), se confirmó la mezcla de la cetona de partida **54** y la hidrazona **57** por medio de espectrometría de masas ESI. (Figura 6.23)

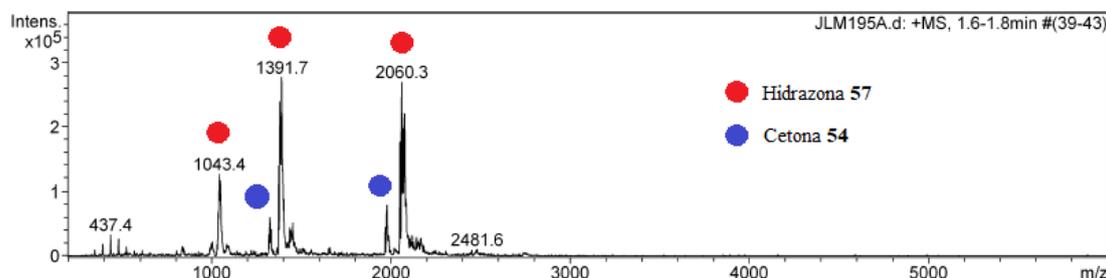


Figura 6.23. Espectro de ESI-MS que muestra la síntesis incompleta de la hidrazona **57**.

Para obtener exclusivamente la hidrazona **57**, esta reacción fue optimizada modificando todas las variables posibles. Se encontraron mejoras con el uso de metanol anhidro, probablemente limitando la presencia de agua en el medio de reacción se minimizaba la reacción de hidrólisis de la hidrazona; sin embargo, no se obtuvo exclusivamente la hidrazona **57**. Las pruebas con diversas modificaciones también resultaron infructuosas, como el uso de disolventes apróticos como DMF, la variación del número de equivalentes usados de la sal de hidrazonio **56** o de TFA e incluso el aumento de los tiempos de reacción hasta dos días. El uso de TFA como catalizador ácido debe realizarse con sumo cuidado ya que, como se ha comentado previamente, tanto la síntesis como la hidrólisis de la hidrazona está catalizada por medio ácido. De esta forma, se necesita una ligera acidificación para promover la síntesis pero no demasiada para no desplazar el equilibrio hacia la hidrólisis.

En vista de estos malos resultados, se probaron otras estrategias basadas en el uso de organocatalizadores a pH neutro, como anilina³³⁵ o ácido antranílico;³³⁶ sin embargo, estas modificaciones tampoco dieron lugar a un avance significativo de la reacción.

A la vista de estos resultados infructuosos para obtener la hidrazona, se decidió cambiar la estrategia de síntesis preparando un nuevo glicodendrón que tuviera una cetona con diferente funcionalización. Para obtener una hidrazona razonablemente estable y que resistiera en el último paso la introducción del péptido, se mantuvo un resto aromático

³³⁵ Trausel, F.; Fan, B.; van Rossum, S.A.P.; van Esch, J. H.; Eelkema, R.; *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360*, 1-7.

³³⁶ Crisalli, P.; Kool, E.T.; *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1184-1189.

como se comentó previamente; sin embargo, se decidió cambiar los otros sustituyentes. El grupo de Kool realizó un amplio estudio usando cetonas y aldehídos diferentemente sustituidos, evaluando su capacidad para formar hidrazonas.³³⁷ Una de las conclusiones de este estudio fue que los carbonilos unidos a grupos electro-deficientes reaccionaban más rápidamente. Adicionalmente, el grupo de Kraft publicó un trabajo en el que derivatizó el fármaco antitumoral PTX conteniendo una metil cetona aromática con un grupo acilo para la formación de un enlace hidrazona.³³⁸ (Figura 6.24)

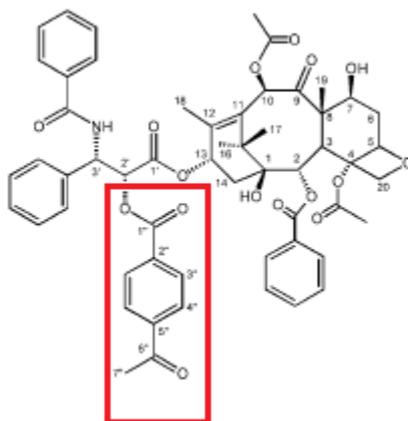


Figura 6.24. Modificación de la estructura del PTX para incorporar una cetona funcionalizada marcada en rojo. Figura modificada de la referencia 338.

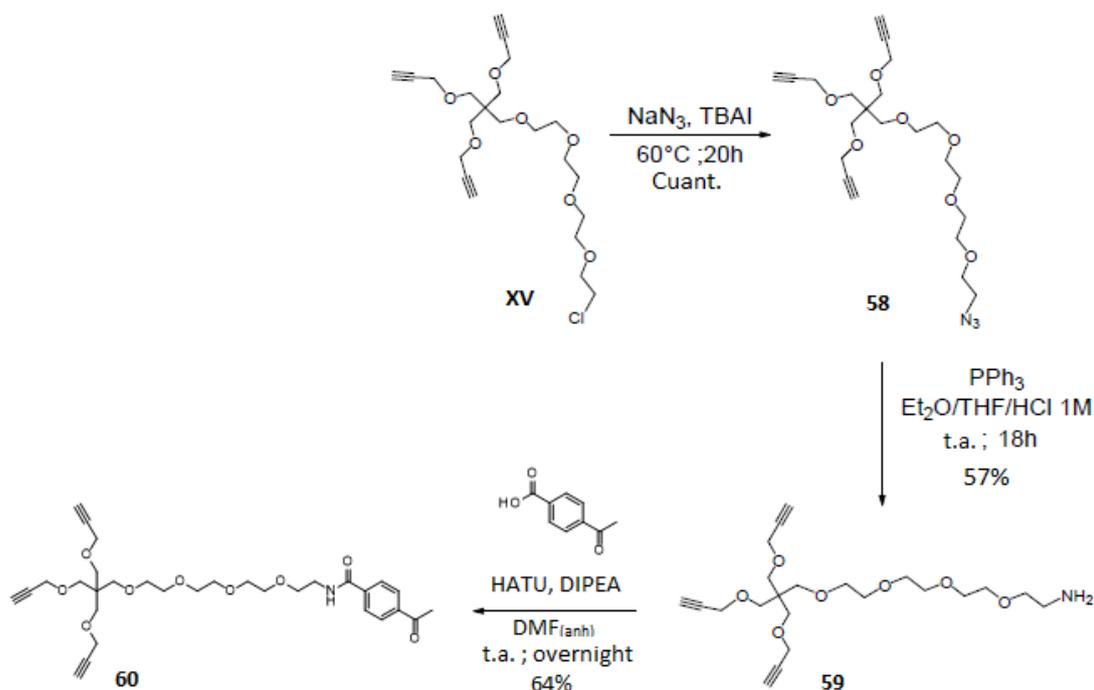
Con estos precedentes, decidimos usar una cetona aromática que presentara un grupo acilo en su posición *para*, abordando la síntesis del glicodendrón con esta funcionalización en su punto focal. Para ello, fue necesario la construcción de un núcleo de pentaeritritol partiendo del intermedio **XV** sintetizado previamente. (Esquema 6.9)

En primer lugar, se llevó a cabo la sustitución del átomo de cloro por un grupo azido, mediante el tratamiento con azida sódica en DMF, usando como catalizador yoduro de tetrabutilamonio (TBAI), obteniéndose la azida **58** con un rendimiento cuantitativo. La completa reacción de azidación fue verificada por medio del espectro de ¹³C-RMN en el que se observó la desaparición de la señal del metileno unido al átomo de cloro a 42.7 ppm y la aparición de una nueva señal a 50.7 ppm asociada al metileno unido al grupo azido. A continuación, se llevó a cabo la reducción de la azida a una amina usando la reacción de Staudinger, empleando las condiciones descritas en la bibliografía,

³³⁷ Kool, E. T.; Park, D.-H.; Crisalli, P.; *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 17663-17666.

³³⁸ Rodrigues, P.C.A.; *et al.*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 355-360.

trifenilfosfina en una mezcla de Et₂O/THF/HCl 1M,³³⁹ obteniéndose la amina **59** con un rendimiento del 57%.



Esquema 6.9. Ruta de síntesis del núcleo **60**.

El último paso consistió en la incorporación del grupo cetona. Para ello, se realizó una reacción de amidación entre la amina **59** y el ácido 4-acetilbenzoico comercial, usando HATU como agente de acoplamiento, DIPEA y DMF en condiciones anhidras. En estas condiciones, se obtuvo la cetona aromática **60** con un rendimiento del 64%. La formación de este compuesto fue confirmada por medio de su espectro de ¹H-RMN en el que se observa la aparición, a campo bajo, de las señales aromáticas correspondientes, el singlete ancho a 7.18 ppm asociado al protón de la amida generada, así como la correcta relación de integración con el resto de señales de la molécula. (Figura 6.25)

³³⁹ Lin, F.L.; Hoyt, H. M.; Halbeek, H. V.; Bergman, R. G.; Bertozzi, C. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686-2695.

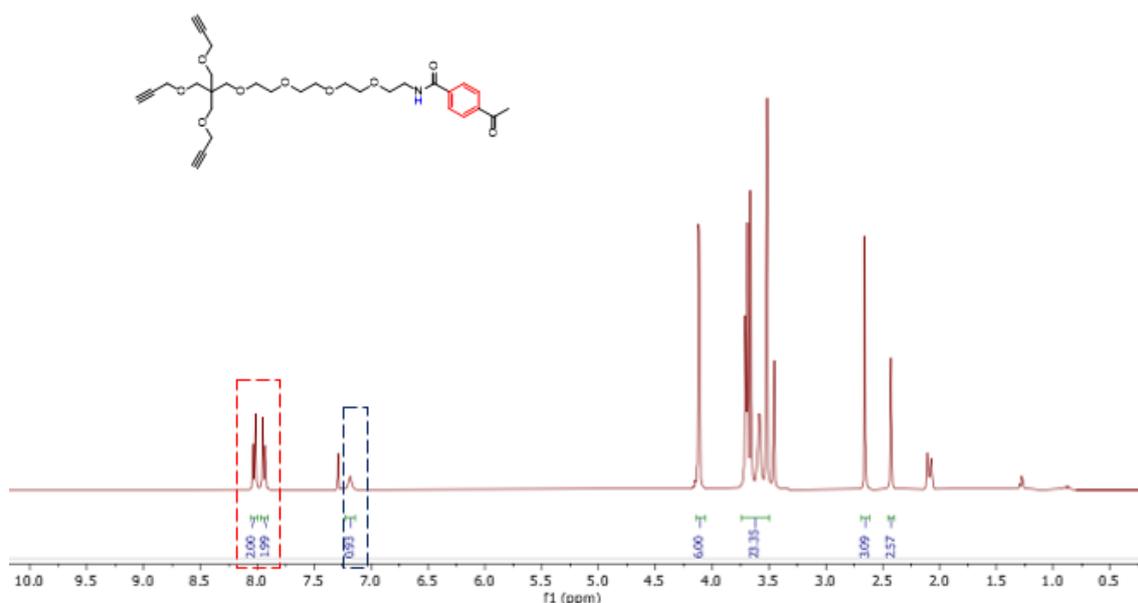
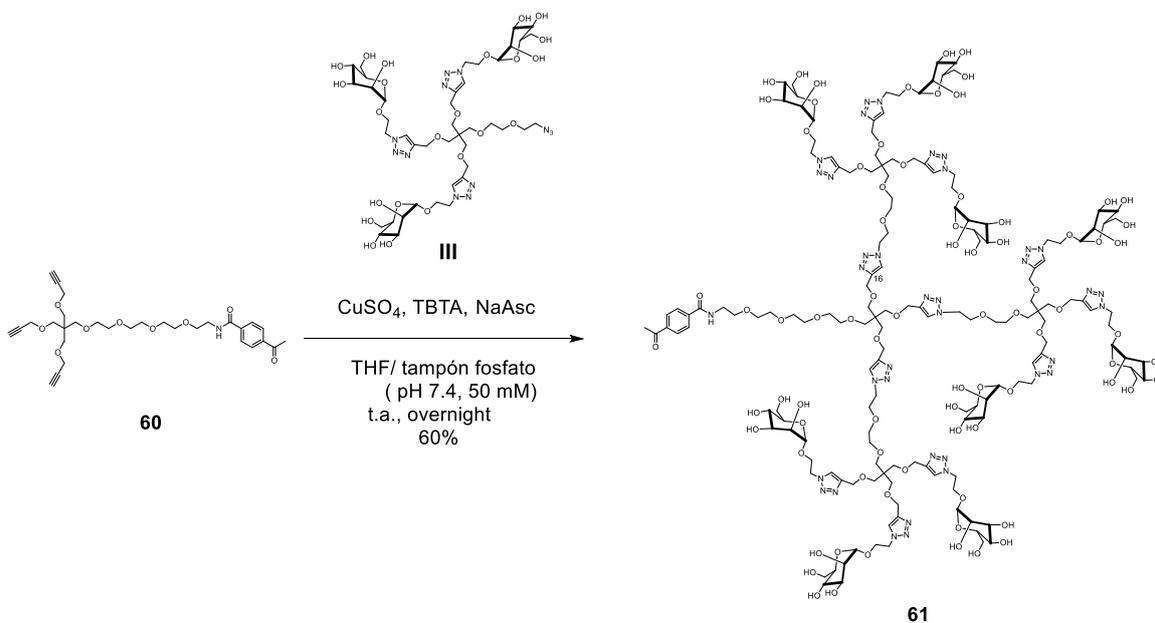


Figura 6.25. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3 , 298 K) del núcleo **60**.

Una vez formado el núcleo **60** funcionalizado con una metil cetona aromática, abordamos la formación del correspondiente glicodendrón de nueve manos. Para ello, se utilizó el glicodendrón trivalente con azida en el punto focal **III** sintetizado previamente. (Esquema 6.10)



Esquema 6.10. Síntesis del glicodendrón **61**.

Tras la reacción de CuAAC en las condiciones habituales, el crudo de reacción fue tratado y filtrado varias veces con la resina Quadrasil[®] para eliminar el cobre presente. A

continuación, mediante una purificación por cromatografía de exclusión por tamaño usando Sephadex LH20 (100% MeOH), se obtuvo el glicodendrón **61** con un 60% de rendimiento. La completa funcionalización del núcleo **60** fue verificada por medio del espectro de ^1H -RMN en el que se observa la correcta relación de integración (9:3) de las dos señales correspondientes a los dos tipos de triazoles (nueve triazoles externos y tres triazoles internos). Junto a esta señal, se observan las señales aromáticas del anillo de benceno del punto focal. Estos datos son consistentes con el espectro de ESI-MS, en el que se detectó la relación de señales m/z correspondientes al glicodendrón **61**, demostrando la obtención del glicodendrón de forma completamente monodispersa. (Figura 6.26)

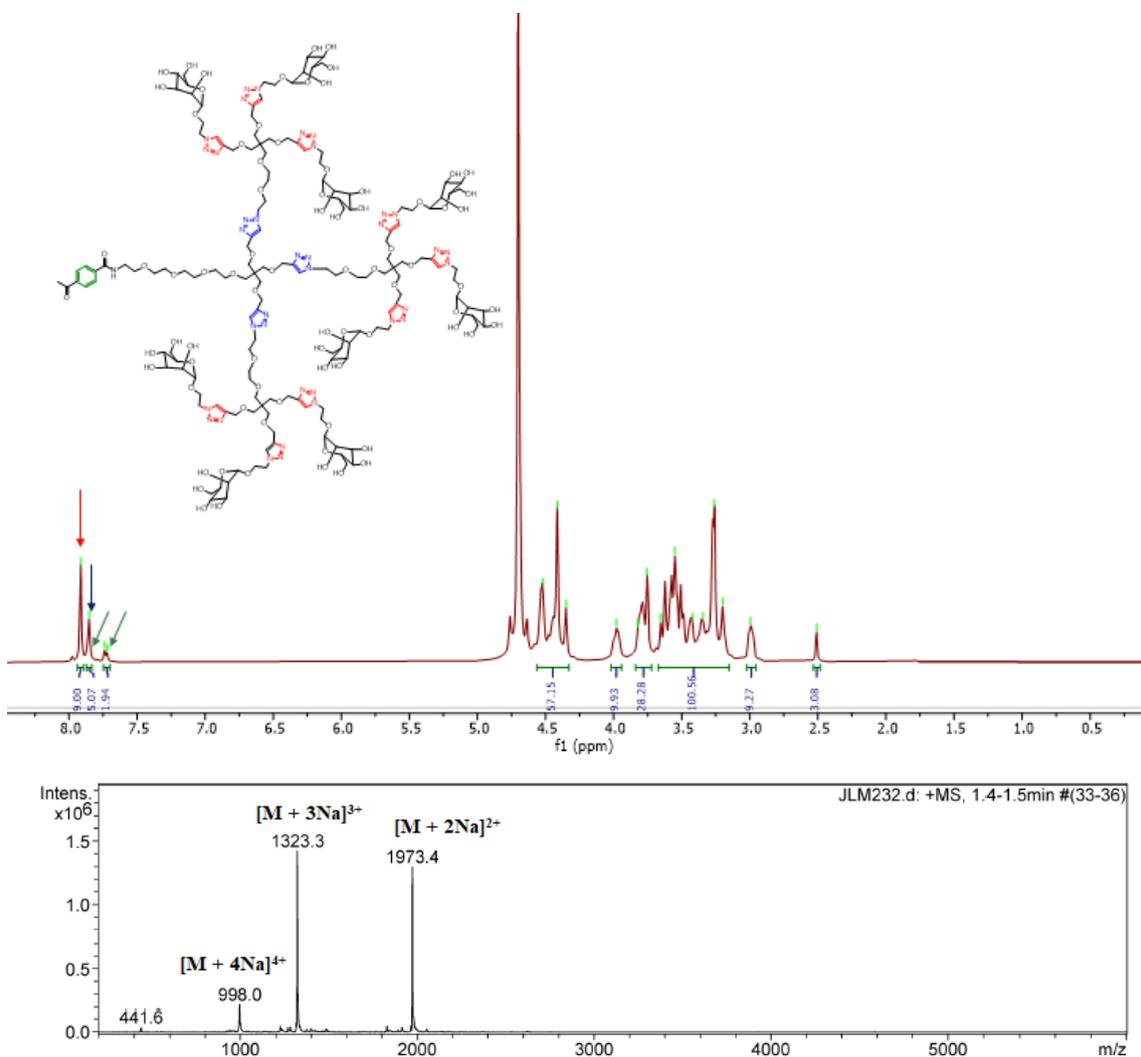
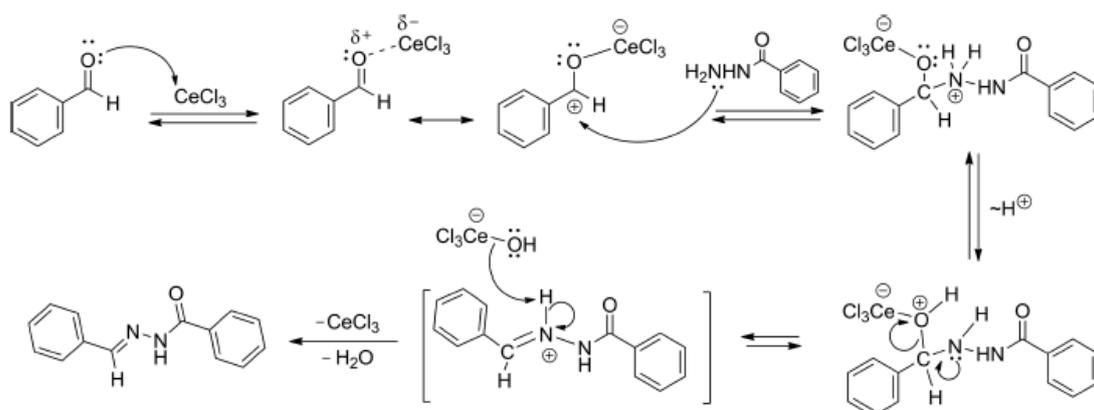


Figura 6.26. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K) (arriba) y ESI-MS (abajo) del glicodendrón **61**.

Una vez sintetizado el glicodendrón **61**, que presenta una metil cetona aromática en su punto focal, llevamos a cabo la formación de la hidrazona empleando la sal de hidrazonio **56**. En base a la experiencia adquirida en las pruebas realizadas para la síntesis de la hidrazona **57**, se probaron las condiciones descritas anteriormente; sin embargo, con esta nueva cetona **63** tampoco pudo aislarse la correspondiente hidrazona.

A pesar de que todos estos esfuerzos realizados para conseguir la formación de la hidrazona fueron infructuosos, se estudiaron otras variantes de la síntesis. En un trabajo de dos Santos Filho, se puso de manifiesto que el $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ era un eficiente catalizador para la síntesis de hidrazonas en condiciones suaves.³⁴⁰ Este catalizador es un ácido de Lewis que ha demostrado su potencial en la condensación de hidrazonas usando disolventes próticos en una amplia variedad de sustratos. El mecanismo propuesto para esta catálisis comienza con una interacción ácido-base de Lewis del oxígeno carbonílico y el tricloruro de cerio. Esta interacción provoca un aumento de la electrofilia del carbono carbonílico, favoreciendo de esta forma el ataque nucleófilo de la hidrazina. (Esquema 6.11)

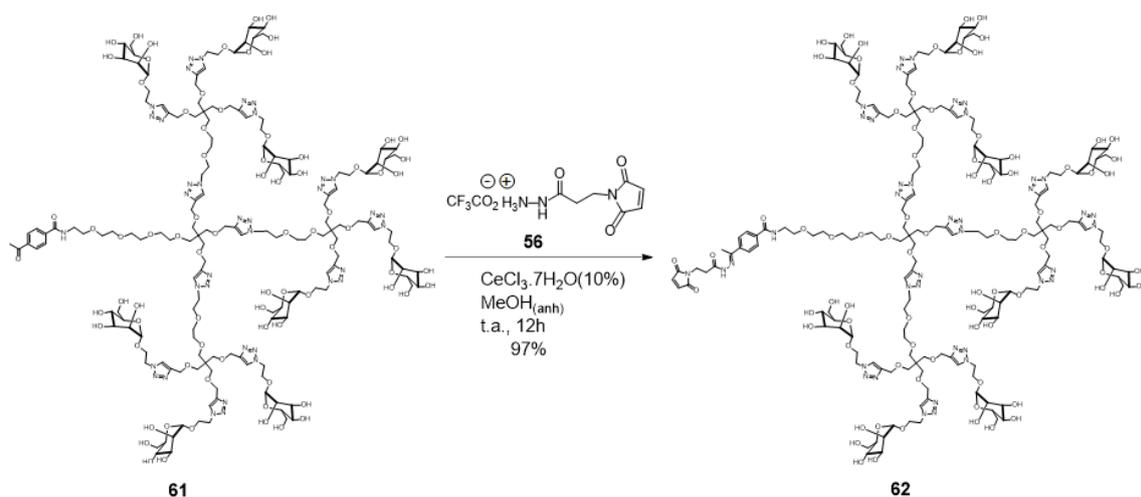


Esquema 6.11. Mecanismo propuesto para la síntesis de hidrazonas catalizada por $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Esquema extraído de la referencia 340.

Los mejores resultados fueron obtenidos usando aldehídos; sin embargo, este catalizador también demostró su eficacia con diferentes cetonas.

Animados por estos precedentes, investigamos el uso de este catalizador para la formación de la hidrazona glicodendrítica. Para ello, se hizo reaccionar la cetona **61** junto a la sal de hidrazonio **56** añadiendo un 10% de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. (Esquema 6.12)

³⁴⁰ Dos Santos Filho, J.M.; *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 29, 6411-6417.



Esquema 6.12. Síntesis de la hidrazona glicodendrítica **62**.

El avance de la reacción pudo ser fácilmente monitorizado por TLC, revelando la desaparición completa de la cetona de partida **61** a las 12 horas de reacción y la aparición de una sola señal. El crudo de reacción fue purificado mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando Sephadex LH20 (100% MeOH) con excelente rendimiento (97%). El espectro de ^1H -RMN reveló la formación de la hidrazona **62** como una mezcla de isómeros geométricos E y Z, identificados por las dos señales a 10.64 y 10.54 ppm correspondientes al protón de la hidrazona $\text{HNN}=\text{C}$, cuya integración corresponde a una proporción aproximadamente 3:1. Otras de las señales en las que también se observa esta relación es, por ejemplo, en los protones olefínicos de la maleimida, que se corresponden con la aparición de dos singuletes a 7.04 ppm y 6.95. Estas señales guardan la correcta relación de integración con el resto de señales de la molécula, observado con las señales aromáticas y las señales de los triazoles. En el espectro de masas (ESI) se detectan inequívocamente las señales m/z correspondientes a la formación de la hidrazona **62**. (Figura 6.27)

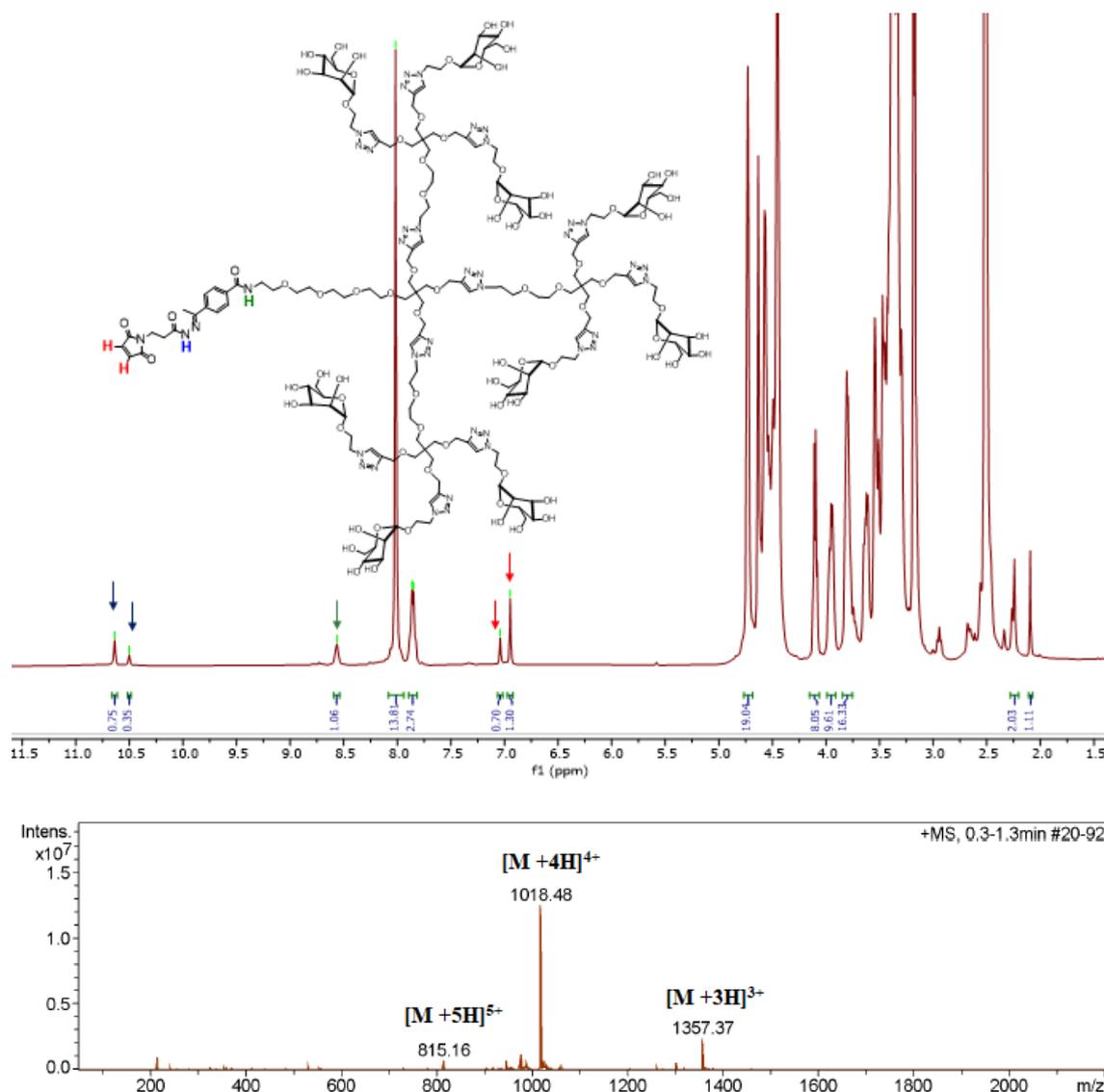


Figura 6.27. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, MeOH-d_4 , 298 K) (arriba) y ESI-MS (abajo) de la hidrazona **62**.

La formación de estos isómeros geométricos no resulta sorprendente, ya que se han descrito en la síntesis de una amplia variedad de hidrazonas.³⁴¹ Esta isomería geométrica E/Z está definida por los sustituyentes unidos al doble enlace $\text{N}=\text{C}$. (Figura 6.28)

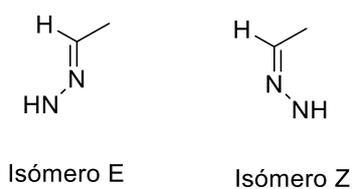


Figura 6.28. Posibles isómeros geométricos E/Z de las hidrazonas.

³⁴¹ Andrade, M.M.; Barros, M.T.; *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 245-247.

Generalmente el isómero E es el mayoritario, al ser el menos impedido estéricamente.³⁴² Una vez sintetizada la hidrazona glicodendrítica **62**, decidimos evaluar la capacidad para hidrolizarse a diferentes pH y de esta forma, estudiar su comportamiento frente a la acidificación en el interior celular. Esta monitorización fue realizada a diferentes tiempos y pH mediante RP-HPLC.

En todos los análisis por RP-HPLC de las moléculas de la presente Tesis Doctoral, la fase móvil que se había utilizado era una mezcla de acetonitrilo y H₂O Milli-Q con un 0.05% de TFA. El uso de TFA como aditivo ha sido ampliamente usado, pues cumple varias funciones ya que la formación de pares iónicos con grupos de carga opuesta mejora la resolución de pico o la supresión de interacciones iónicas adversas entre los analitos y los grupos silanol de la columna cromatográfica. Concretamente, para la separación de proteínas y péptidos resulta fundamental, debido a su capacidad de protonar aminoácidos y de esta forma reducir el ensanchamiento de picos en el cromatograma.³⁴³ Esto es debido a la propiedad intrínseca del punto isoeléctrico de las proteínas.³⁴⁴

Sin embargo, este aditivo ácido no es compatible con la monitorización de la hidrazona **62**, ya que provoca su hidrólisis. El empleo de una fase móvil sin TFA, usando solamente acetonitrilo y H₂O Milli-Q resultó adecuado, ya que en estas condiciones no se observaba hidrólisis de la hidrazona. (Figura 6.29)

³⁴² Palla, G.; Pelizzi, C.; Predieri, G.; Vignali, C.; *Gazz. Chim. Ital.* **1982**, *112*, 339-341.

³⁴³ Chen, Y.; Mehok, A.R.; Mant, C.T.; Hodges, R.S.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1043*, 9-18.

³⁴⁴ Taghvaei, M.; Smith, B.; *Food Anal. Methods* **2020**, *13*, 1482-1491.

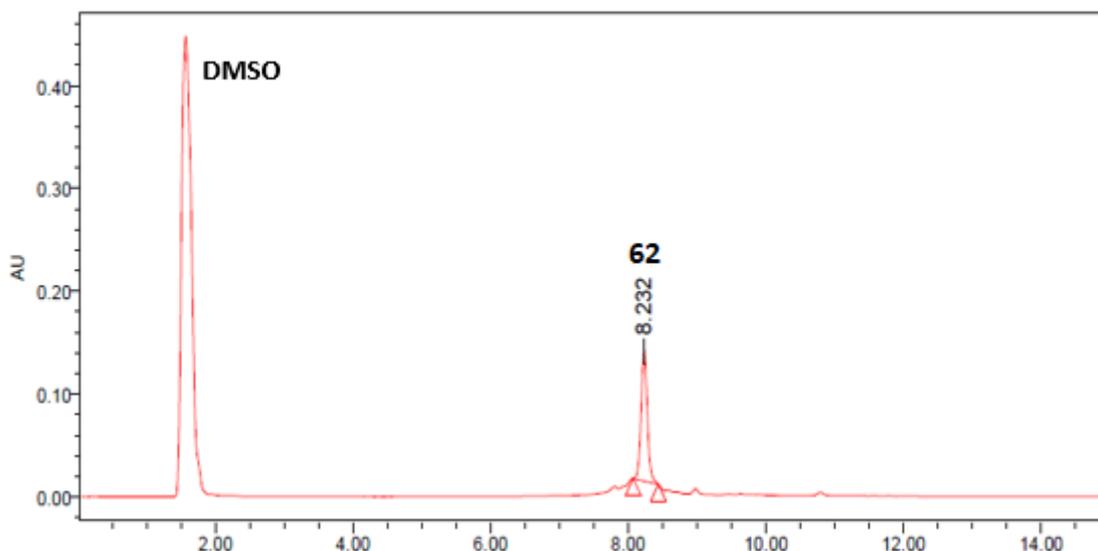


Figura 6.29. Cromatograma de la hidrazona **62**.

Una vez encontrado el método para poder monitorizar la hidrazona, era necesario encontrar unas condiciones para poder visualizar simultáneamente la cetona y poder determinar el porcentaje de hidrólisis de la hidrazona **62**. De forma equivalente, se cuantificó el porcentaje de cetona **61** formada, ya que como se ha comentado previamente, la protonación de la hidrazona desplaza el equilibrio hacia la cetona de partida. Para establecer esta relación, se prepararon dos disoluciones 50 μM , una de la cetona **61** y otra de la hidrazona **62**, se mezclaron y se inyectaron en el RP-HPLC como una co-elución. A partir de los patrones de partida se observó que primero eluye la cetona y después la hidrazona. Mediante esta co-elución, usando el detector de UV-Vis. acoplado al HPLC, se observó un punto de intersección de los espectros de absorción de cada uno de los compuestos. Esta intersección se correspondía a una $\lambda = 275.6 \text{ nm}$. (Figura 6.30)

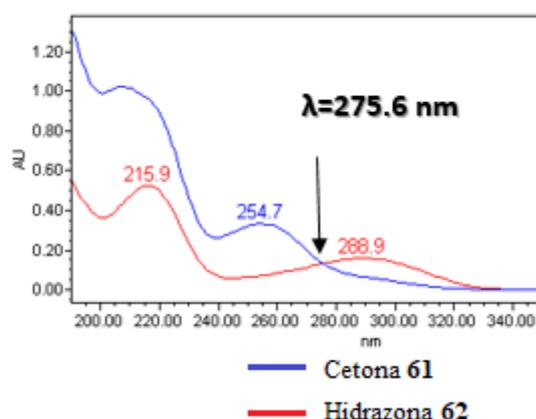


Figura 6.30. Superposición de los espectros de absorción de la cetona **61** (en azul) y la hidrazona **62** (en rojo).

La ecuación de Lambert-Beer establece que $A = l\epsilon C$, siendo, A la absorbancia, l es la longitud del camino óptico, ϵ la absorptividad de la sustancia y C la concentración de la misma.³⁴⁵ Realizando la medición a $\lambda = 275.6$ nm, podemos establecer que las absorptividades de la cetona y la hidrazona son equivalentes, de esta forma se satisface la ecuación de Lambert-Beer. Por lo tanto, a esta longitud de onda es posible cuantificar el porcentaje de hidrólisis de la hidrazona **62** mediante integración de los picos de los dos glicodendrones. Para la co-elución anterior a la misma concentración de ambos analitos, a una $\lambda = 275.6$ nm, la integración de cada uno de los picos resultó del 50%.

Una vez optimizadas las condiciones para realizar la medición, se prepararon cuatro disoluciones tampón para evaluar el grado de hidrólisis de la hidrazona **62** en cada una de ellas. Un tampón fosfato a pH= 7.4 y tampones citrato a pH= 6, 5 y 3. Una vez preparadas, una disolución de la hidrazona **62** fue diluida en cada una de estas disoluciones tampón y agitadas a una temperatura de 37°C. Se tomaron alícuotas de las incubaciones de la hidrazona **62** a diferentes intervalos de tiempo (1, 2, 4, 8, 24 y 36 h) y fueron analizadas por RP-HPLC a $\lambda = 275.6$ nm.

Como se comentó previamente, a partir de la integración de los picos de la hidrazona **62** que se va hidrolizando y de la cetona **61** formándose, se obtuvieron los porcentajes de hidrólisis. Con estos datos se construyó la gráfica mostrada en la figura 6.31.

³⁴⁵ Mayerhöfer, T.G.; Pipa, A.; Popp, J.; *ChemPhysChem* **2019**, *20*, 2748-2753.

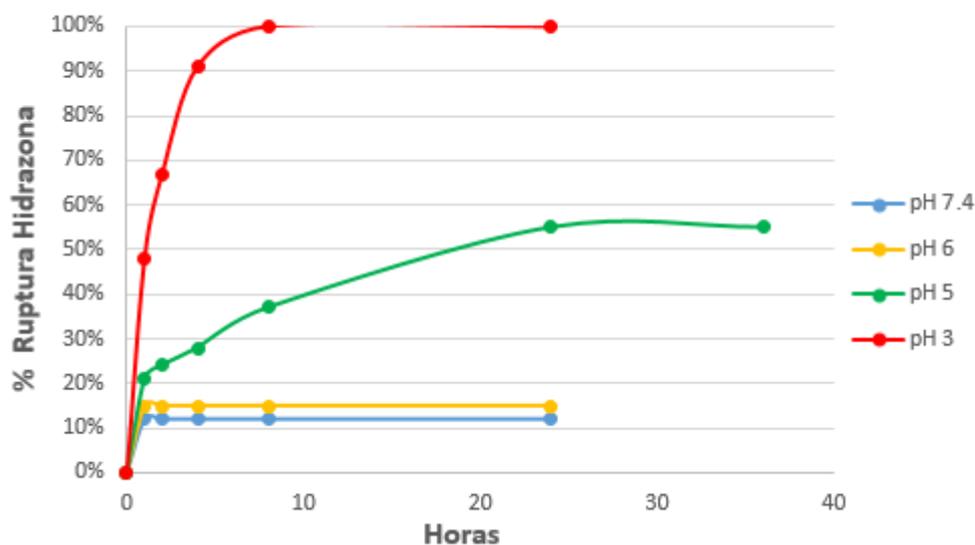


Figura 6.31. Gráfica que representa el porcentaje de hidrólisis de la hidrazona **62** a diferentes tiempos a pH= 7.4 (azul), 6 (amarillo), 5 (verde) y 3 (rojo).

Cómo era previsible, los resultados demuestran una mayor ruptura de la hidrazona a valores de pH más bajos. En todos los casos se observa un valor constante a las 24 horas de la incubación. Desde la primera hora se observa una hidrólisis del 12% para un pH= 7.4 que no progresa, siendo ligeramente superior (15%) para pH= 6. La incubación a pH= 5.0 presenta una hidrólisis progresiva a lo largo del tiempo, siendo constante a las 24 horas, observándose una ruptura del 54%. Por último, en las condiciones más ácidas a pH= 3.0, se observa una rápida hidrólisis de la hidrazona **62**, siendo completa a las 8 h. Si bien este último pH es demasiado extremo para el interior celular, es utilizado como control para demostrar las condiciones en la que la hidrazona **62** es completamente hidrolizada. Este experimento se realizó por duplicado observándose el mismo resultado. Como se comentó previamente, en compartimentos celulares como los lisosomas se alcanza aproximadamente un pH= 5.0. Con este pequeño ensayo, que replicaría las condiciones en el interior celular, se produciría una ruptura de aproximadamente la mitad de la hidrazona, lo que podría mejorar la presentación del péptido. También se confirma que, en un ambiente fisiológico de pH= 7.4, no se observa una hidrólisis relevante de la hidrazona, por lo que durante las etapas de administración, transporte e internalización celular no se liberaría una proporción significativa de péptido.

Para verificar el grado de hidrólisis durante su almacenamiento, se realizó un experimento adicional con la hidrazona **62**. Después de un almacenamiento sin disolvente a -20°C durante un año y cinco meses, se realizó un análisis por RP-HPLC. (Figura 6.32)

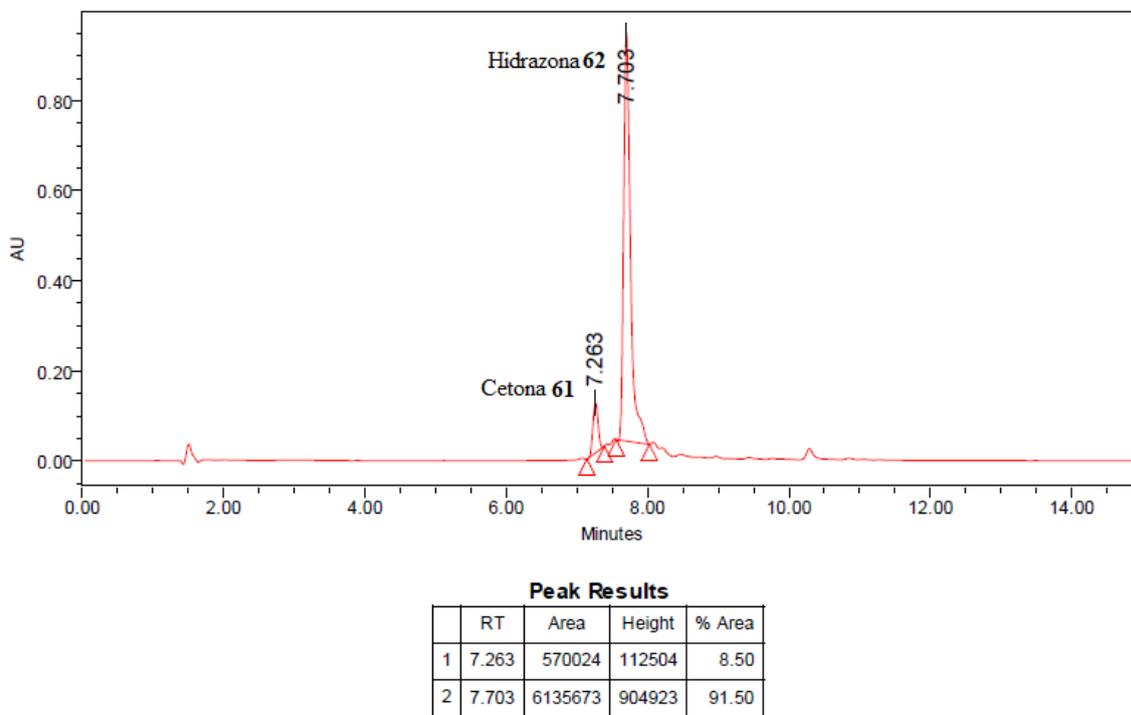


Figura 6.32. Cromatograma que muestra la hidrólisis de la hidrazona **62** después de 1 año y 5 meses almacenada a -20°C .

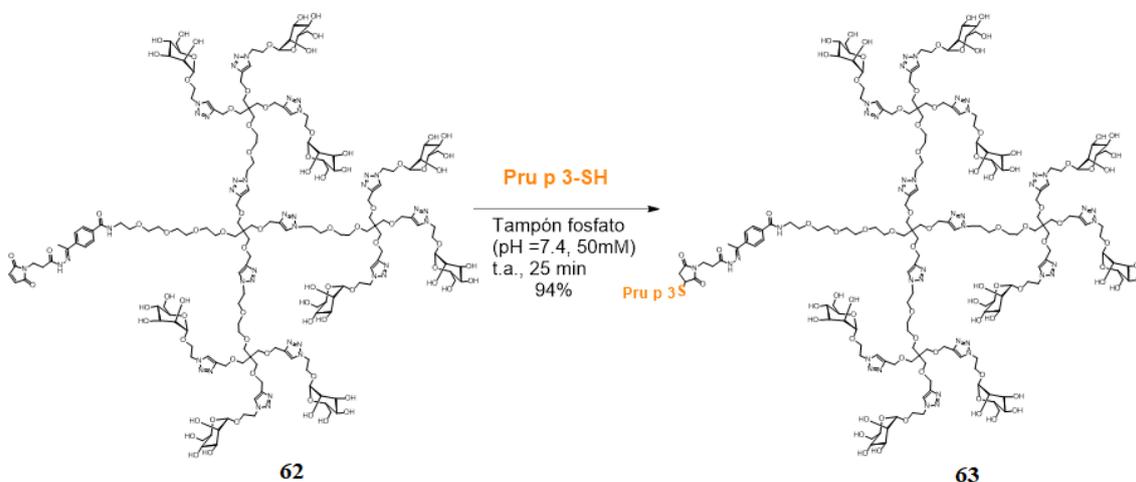
Este análisis por RP-HPLC demostró que durante todo este tiempo, solamente se había producido un 8.5% de hidrólisis de la hidrazona **62**, siendo un dato fundamental para su potencial aplicación en el desarrollo de un fármaco.

Estos resultados ponen de manifiesto una buena robustez de la hidrazona **62** durante largos períodos de almacenamiento que, junto a su capacidad de hidrólisis en condiciones intracelulares, constituyen unos prometedores resultados.

6.6 Conjugación del péptido Pru p 3 al glicodendrón con un espaciador de tipo hidrazona

Como se ha comentado previamente, una vez demostrada las características de hidrólisis ácida de esta hidrazona **62**, el siguiente paso consistió en la conjugación del péptido Pru

p 3-SH. Para esta adición tiol-eno se usaron las condiciones puestas a punto a lo largo de la presente Tesis Doctoral. (Esquema 6.13)



Esquema 6.13. Síntesis del conjugado **63**.

El péptido Pru p 3-SH y la hidrazona glicodendrítica **62** fueron disueltos en tampón fosfato (50 mM, pH= 7.4), en proporciones equimoleculares. Seguidamente, se mezclaron por medio de agitación orbital durante 25 min a temperatura ambiente. En la monitorización por RP-HPLC se observó la desaparición de la hidrazona **62**. Después de una purificación por medio de ultrafiltración, a través de una membrana de corte molecular de 3 KDa, se obtuvo el conjugado **63** con un excelente rendimiento (94%). Este conjugado fue caracterizado satisfactoriamente por espectrometría de masas (ESI), donde se detectó la presencia del conjugado **63** mediante la relación de señales m/z correspondientes. (Figura 6.33)

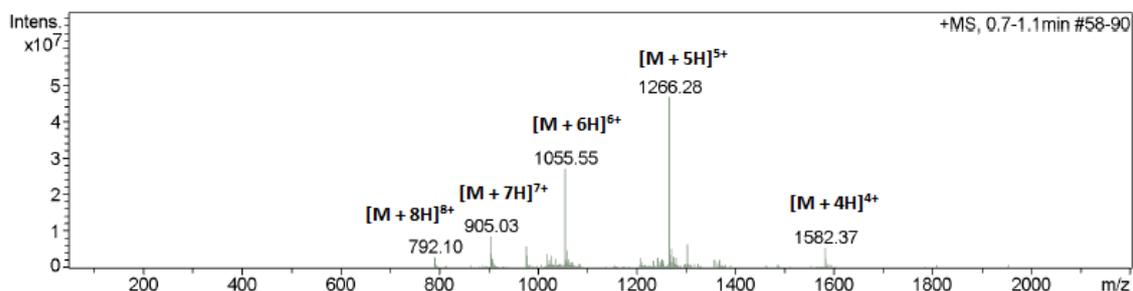


Figura 6.33. Espectro ESI-MS del conjugado **63**.

Mediante la puesta a punto de este protocolo de conjugación, pudo ser obtenido el conjugado **63** con el enlace hidrazona inalterado.

6.7 Evaluación biológica del conjugado con un espaciador de tipo hidrazona

Una vez sintetizado y caracterizado el glicodendrón conjugado **63**, se procedió a su evaluación biológica para determinar su capacidad de mediar en el trastorno de enfermedades alérgicas a través de la modulación de la respuesta inmune. Como se ha comentado previamente, se pretende evaluar si el enlace hidrazona entre el glicodendrón y el péptido se hidroliza suficientemente en el interior celular para mejorar la presentación del epítipo de Pru p 3. Estos estudios se están realizando actualmente en el grupo de alergología de la Dra. Cristobalina Mayorga del Hospital Regional Universitario de Málaga. A continuación, se presentan los resultados preliminares de los que disponemos hasta el momento.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de la hidrazona conjugada **63**, para ser internalizada en las moDCs, en comparación con el conjugado de glicodendrón de nueve manosas **V**, sintetizado previamente, y el péptido Pru p 3-SH como control. Los tres compuestos fueron marcados fluorescentemente en la región del péptido por medio del reactivo comercial Alexa fluor 647. Una vez marcados, se analizó la internalización en las moDCs usando citometría de flujo y microscopía confocal. (Figura 6.34)

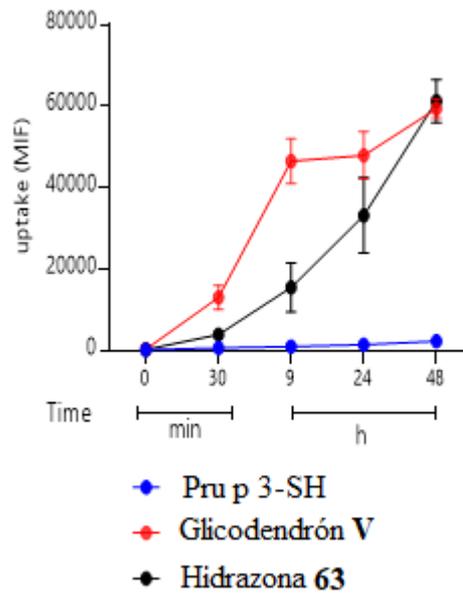
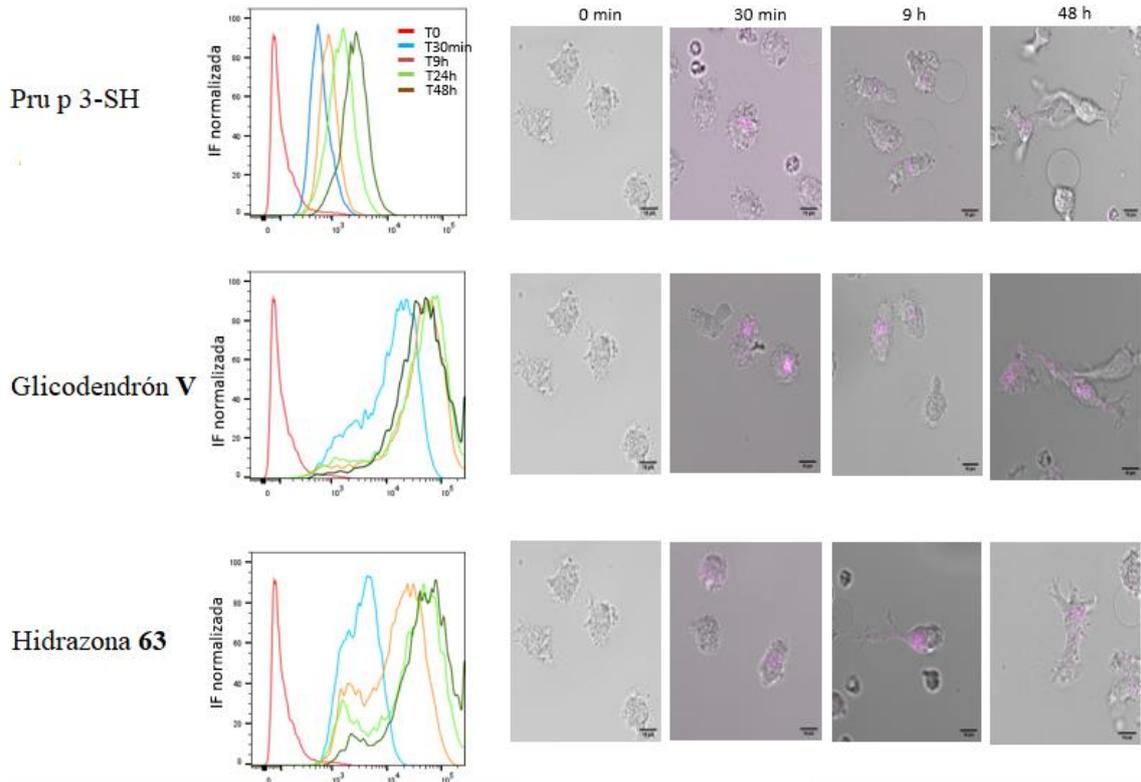


Figura 6.34. Estudios de internalización de Pru p 3-SH, glicodendrón **V** e hidrazona **63** marcados fluorescentemente. Histogramas de cada uno de ellos, así como las imágenes de microscopía confocal a diferentes tiempos (arriba). Gráfico que representa la internalización a diferentes tiempos (abajo).

Las mediciones de citometría de flujo indicaron que los glicodendrones conjugados **V** y **63** eran internalizados por las moDCs de una manera dependiente del tiempo, si bien

presentan diferencias en su velocidad, se observa el mismo grado de internalización a las 48 horas. Estos resultados son consistentes, debido a que ambos glicodendrones están decorados con nueve manosas en su periferia, de forma que son reconocidos por la lectina DC-SIGN de igual forma, lo que induce dicha internalización. Este hecho también explica la baja internalización del péptido Pru p 3-SH, que puede atribuirse a procesos de endocitosis no específicos.

La captación de estos compuestos continuó aumentando hasta las 48 horas. Mediante microscopía confocal y la tinción de diferentes estructuras intracelulares se pudo visualizar el proceso de internalización de los tres compuestos marcados. (Figura 6.35)

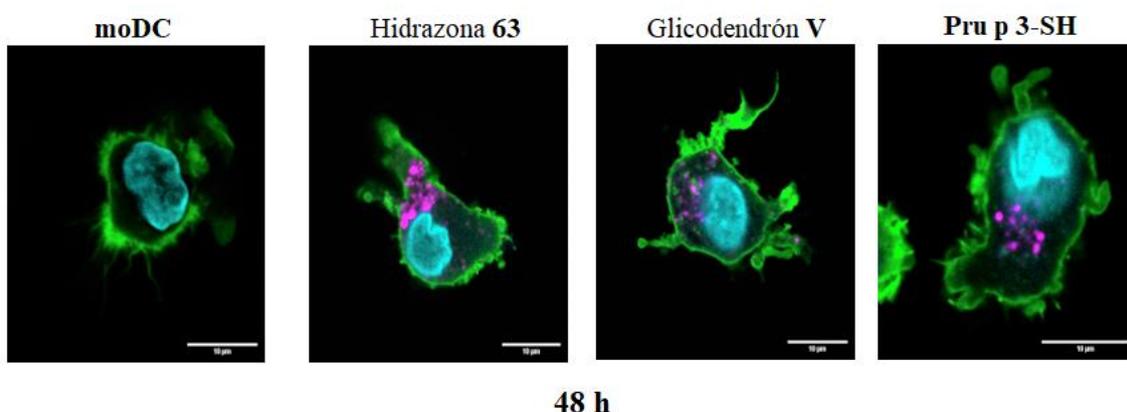


Figura 6.35. Imágenes confocales a las 48 h que muestran diversas regiones celulares (la actina de la submembrana se tiñó con Atto 488-faloidina (verde) y los núcleos con Hoechst (azul)) y los diferentes compuestos marcados con Alexa fluor 647 (rosa).

Estos resultados indican que la distribución intracelular de los glicodendrones **63** y **V** en las moDCs es similar a la del péptido, mostrando una acumulación en la región citoplasmática/perinuclear. Esta zona es especialmente interesante en el caso de la hidrazona **63**, pues es aquí donde se encuentran compartimentos celulares como los lisosomas, donde se produce una disminución del pH.

Todos estos estudios previos ponen de manifiesto que la hidrazona conjugada **63** es reconocida e internalizada por las moDCs, lo que resulta fundamental para la presentación del péptido. Actualmente se están desarrollando estudios *in vitro* adicionales, como la expresión de marcadores de moléculas co-estimuladoras y citoquinas para poder comprobar si con este nuevo compuesto se mejora la presentación del péptido.

Capítulo 7

Conclusiones

7. Conclusiones

7.1 Capítulo 3

- ✓ Se ha realizado la síntesis de una estructura basada en un pirimido[5,4-b]indol como ligando de TLR4 convenientemente funcionalizado para su conjugación y se ha demostrado su versatilidad para la conjugación de tres péptidos alergénicos diferentes a través de la reacción click tiol-eno, de una forma rápida, simple y eficiente.
- ✓ Por medio de estudios *in vitro* se ha evaluado el conjugado del péptido de Pru p 3 con células de pacientes alérgicos al melocotón. Estos estudios han demostrado que este conjugado estimula la maduración y activación de las moDCs de estos pacientes alérgicos. Adicionalmente, se ha demostrado que la activación por parte de las moDCs promueve la presentación del alérgeno y genera una respuesta inmunológica específica con un patrón inmunológico de tipo T_H1 / Treg y la supresión de las células efectoras T_H2 . Estos resultados ponen de manifiesto el uso de este ligando de TLR4, conjugado a péptidos alergénicos, como potenciales vacunas frente a la alergia en el ámbito de la AIT. Sin embargo sin bajos los valores de Treg de

7.2 Capítulo 4

- ✓ Se ha realizado la síntesis de una estructura basada en un derivado de 8-oxoadenina como ligando de TLR7 convenientemente funcionalizado para su conjugación y se ha demostrado su versatilidad para la conjugación de tres péptidos alergénicos diferentes a través de la reacción click tiol-eno, de una forma rápida, simple y eficiente.
- ✓ Por medio de estudios *in vitro* se ha evaluado el conjugado del péptido de Pru p 3 con células de pacientes alérgicos al melocotón. Estos estudios han demostrado que este conjugado estimula la maduración y activación de las moDCs de estos pacientes alérgicos. Adicionalmente se ha demostrado que la activación por parte de las moDCs promueve la presentación del alérgeno y genera una respuesta inmunológica específica con un patrón inmunológico de tipo T_H1 / Treg y la supresión de las células efectoras T_H2 . Estos resultados ponen de manifiesto el uso de este ligando de TLR7, conjugado a péptidos alergénicos como potenciales vacunas frente a la alergia en el ámbito de la AIT. Si bien parece que se observa una menor activación y regulación

en ensayos de moDC comparado con el conjugado del ligando de TLR4, por otro lado, se observa para el ligando de TLR7 un mayor aumento del perfil de citoquinas de los ensayos de proliferación asociadas a una respuesta tipo T_H1 (IL-10 e IFN γ). Sin embargo, ambas estructuras estimulan la formación de células Treg de forma similar, fundamentales en la generación de tolerancia para su uso como vacunas frente a la alergia.

7.3 Capítulo 5

- ✓ Se ha realizado la síntesis de estructuras basadas en la 1,3,5-triazina para la formación de homodímeros de ligandos de TLR4 y TLR7, así como de un heterodímero de ambos, convenientemente funcionalizados para su conjugación. Estos dímeros han sido conjugados al péptido Pru p 3-SH a través de la reacción click tiol-eno, de una forma rápida, simple y eficiente.
- ✓ Por medio de estudios *in vitro* preliminares se han evaluado estos tres dímeros conjugados con células de pacientes alérgicos al melocotón. Estos estudios han demostrado que estos dímeros también son capaces de estimular la maduración y activación de las moDCs de estos pacientes alérgicos. Por otro lado, estos estudios indican que el uso de estructuras diméricas mejora el patrón de tolerancia comparado con sus homólogos monoméricos. Adicionalmente, estos resultados ponen de manifiesto que la combinación de los ligandos de TLR4/7 en una misma estructura resulta mucho más eficaz que la simple combinación de los conjugados en disolución y que por lo tanto es un compuesto con un gran potencial en el desarrollo de vacunas frente a la alergia

7.4 Capítulo 6

- ✓ Se han ampliado los estudios biológicos del conjugado de glicodendrón de manosas con esqueleto de ésteres a Pru p 3. Los estudios *in vivo* con ratones han demostrado que este conjugado administrado por vía sublingual se distribuye a órganos inmunocompetentes como el bazo o los ganglios linfáticos, así como a otros tejidos relevantes para la alergia alimentaria como la mucosa intestinal. Estos datos preliminares confirman la viabilidad del uso de estos conjugados glicodendríticos en la SLIT.

- ✓ Se ha realizado la síntesis de un glicodendrón provisto de un espaciador sensible al medio ácido basado en un enlace hidrazona, convenientemente funcionalizado para su conjugación. Estudios de hidrólisis a diferentes pH con esta estructura han demostrado la capacidad de hidrólisis de este enlace hidrazona en condiciones similares a las del interior celular (pH= 5).
- ✓ Este glicodendrón ha sido conjugado al péptido Pru p 3-SH a través de la reacción click tiol-eno, de una forma rápida, simple y eficiente. Estudios *in vitro* preliminares han demostrado que este conjugado es reconocido e internalizado por las moDCs de pacientes alérgicos de igual forma que el glicodendrón conjugado sin el enlace hidrazona.

Capítulo 8

Experimental section

8. Experimental section

8.1 Reagents, solvents and analytical techniques

Chemicals were purchased from Merck, Acros Organics or CarboSynth used without further purification. Pr u p 3-SH and Ole₁₀₉₋₁₃₀-SH peptides were synthesized at the Peptide Synthesis Facility, Department of Experimental and Health Science, Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain. β -PRVB-SH peptide was synthesized at the JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany. Solvents were purchased from Fisher scientific, ScharLab and Carlo Erba. Anhydrous solvents were purchased from Merck with a content of water ≤ 0.005 %. When dry solvents were employed, reactions were performed under Ar atmosphere. H₂O was purified with a Milli-Q purification system from Millipore (18.3 Ω). TLCs were performed using pre-coated aluminum chromatoplates Silica Gel 60 F254 Merck of 0.25 mm thick. Compounds were visualized by using UV light (254 nm) and revealed by immersion of TLCs into solutions of molybdenum blue, ninhydrin or KMnO₄ and heating at 100°C.

Purifications by column chromatography were performed using Silica gel 60 (particle size 0,063-0,200 mm or 0,015-0,040 mm), from Merck, eluting by gravity or subjecting it to light pressure. Purifications by Size-Exclusion Chromatography have been carried out in columns filled with Sephadex LH-20 (GE Healthcare LifeScience), eluting by gravity. For ultrafiltration, Amicon Ultra-15, MWCO 3KDa centrifugal filters from Merck were employed.

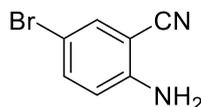
NMR spectra, ¹H and ¹³C, were recorded at 298 K on a Bruker DRX400 spectrometer. HSQC NMR experiments were carried out to assist in signal assignment. All chemical shifts were reported in ppm (δ) using the residual proton solvent peaks as internal standards. These abbreviations were used to indicate the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, brs = broad singlet. Deuterated solvents for NMR are indicated in each case. NMR spectra were analyzed with MestReNova software.

ESI Mass spectra were obtained with an Esquire 6000 ESI-Ion Trap, Bruker Daltonics (Mass Spectrometry Service of the Institute for Chemical Research, IIQ, CSIC-US) and ESI HRMS Mass spectra were obtained with a Q Exactive MS/MS (Thermo Scientific, CITIUS-US). MALDI-TOF MS experiments were carried out in a bench-top Microflex LRF (Bruker Daltonics, Inc., Biomolecular Interactions, Platform at CicCartuja). UHPLC-MS were registered at the Mass Spectrometry Service of the Institute for Chemical Research (unit 824861, IIQ, CSIC-US) using an Elute UHPLC system coupled to a Bruker Amazon SL spectrometer instrument. The reverse phase chromatography was performed with an analytical C18 column (100 × 2.1 mm, 2 μm, ACE Excel). The optimized method used a binary gradient mobile phase with water and 0.1 % formic acid as mobile phase A, and acetonitrile with 0.1% formic acid as mobile phase B. The flow rate was 0.25 mL/min. AmaZon SL Dual Fuel Ion Trap mass spectrometer equipped with Compass HyStar software was used for the detection of the analytes in positive ionization mode

Analytical HPLC was carried out on column BioZen, 3.6 μm, Peptide XB-C8 or BioZen, 2.6 μm, Peptide XB-C18 with a Waters Alliance 2690. Solvents A and B were Milli-Q H₂O (0.05 % TFA) and CH₃CN, respectively. Elution was performed with linear gradients of solvent B into A over 15 min, at a 1 mL min⁻¹ flow rate. For HPLC purifications the same conditions were used but with semipreparative columns Luna C8 and Luna C18, over 30 min, at a 3 mL min⁻¹ flow rate. Microwave reactions were performed on a Biotage Initiator EXP US MicrowaveReactor Synthesis System w Robot Sixty/Eight. The reagents and techniques used in biological studies will be detailed in the next section " Biological assays ".

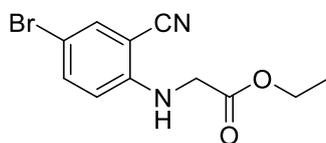
8.2 Synthesis of TLR4 ligand conjugates

2-Amino-5-bromobenzonitrile (**1**)¹²¹



2-Aminobenzonitrile (8.472 g, 71.71 mmol) was dissolved in anhydrous ACN (72 mL), the solution was then cooled to 0°C with an ice bath and a solution of NBS (12.763 g, 71.71 mmol) in anhydrous ACN (95 mL) was added slowly. The mixture was stirred at r.t. overnight. Then, 15 mL of distilled water was added and the mixture was concentrated under vacuum and purified by column chromatography on silica gel (hexane/ethyl acetate, 3:1 → 1:1) to afford the product as a fluffy yellow solid (9.465 g, 67% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.49 (ArCH, d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.45-7.38 (ArCH, m, 1H), 6.66 (ArCH, d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.50 (NH₂, brs, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 148.7 (CNH₂), 137.0 (ArCH), 134.1 (ArCH), 116.8 (ArCH), 116.3 (CCN), 108.7 (CBr), 97.5 (CCN).

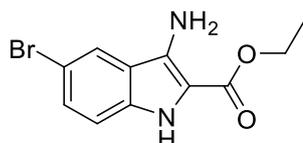
Ethyl 2-((4-Bromo-2-cyanophenyl)amino)acetate (**2**)



The aniline derivative **1** (8.18 g, 41.51 mmol), ethyl bromoacetate (41.59 g, 249 mmol) and potassium carbonate (6.31 g, 45.66 mmol) were combined in anhydrous DMF at 75°C for 2 days. Then, the solvent was removed under high vacuum and the crude was purified by column chromatography on silica gel (hexane/ethyl acetate, 8:1) affording **2** (7.37 g, 63%) as a white solid. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.53 (ArCH, d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.49 (ArCH, dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 6.47 (ArCH, d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.23 (NH, brs, 1H), 4.28 (CH₂CH₃, q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.98 (NHCH₂, d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 1.32 (CH₂CH₃, t, *J* =

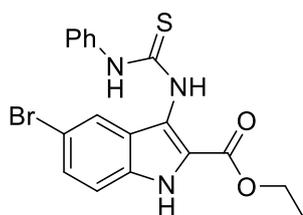
7.1 Hz, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 169.4 (CO), 148.2 (CNH), 137.2 (ArCH), 134.8 (ArCH), 116.1 (CCN), 112.5 (ArCH), 108.4 (CBr), 98.2 (CCN), 61.9 (OCH_2CH_2), 45.0 (COCH_2NH), 14.2 (OCH_2CH_2).

Ethyl 3-Amino-5-bromo-1H-indole-2-carboxylate (3)¹²⁰



In a flame-dried flask, a suspension of potassium *tert*-butoxide (1.72 g, 15.38 mmol) in 8.3 mL anhydrous tetrahydrofuran was stirred and maintained below 30°C with a water bath under argon. To this solution was added a solution of compound **2** (14.35 g, 15.38 mmol) in anhydrous THF (12.3 mL) over 45 min and stirred for an additional 2 h. The reaction was then poured into ice-water (35 mL), extracted with EtOAc (2x100 mL), and dried over anhydrous MgSO_4 . The solvent was concentrated under vacuum, and the resultant residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/ethyl acetate, 4:1) affording compound **3** (1.61 g, 39%) as a yellow solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.99 (NH, brs, 1H), 7.71 (ArCH, s, 1H), 7.40 (ArCH, d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.17 (ArCH, d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.7 (NH₂, brs, 2H), 4.43 (CH_2CH_3 , q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.44 (CH_2CH_3 , t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

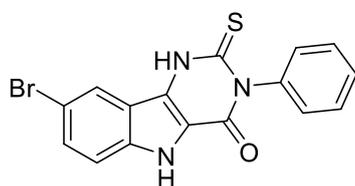
Ethyl 5-Bromo-3-(3-phenylthioureido)-1H-indole-2-carboxylate (4)¹²⁰



To a solution of compound **3** (1.21 g, 4.27 mmol) in warm EtOH (18 mL) was added dropwise under stirring phenyl isothiocyanate (0.56 mL, 4.70 mmol). The reaction was

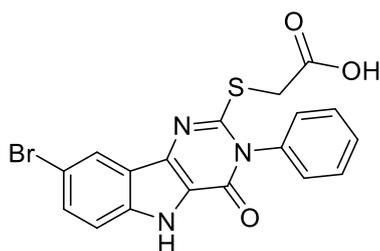
refluxed for 6 h and cooled overnight. Solid residues were filtered off, washed with EtOH, and dried overnight under vacuum to give the product as a white solid (1.624 g, 93%). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 12.07 (SCNH $\underline{\text{C}}$, s, 1H), 9.84 (NH $\underline{\text{H}}$, s, 1H), 9.38 (ArNH $\underline{\text{C}}$ S, s, 1H), 8.46 (ArCH $\underline{\text{H}}$, s, 1H), 7.73 (ArCH $\underline{\text{H}}$, s, 1H), 7.52 (ArCH $\underline{\text{H}}$, d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.51 (ArCH $\underline{\text{H}}$, s, 2H), 7.34 (ArCH $\underline{\text{H}}$, m, 2H), 7.14 (ArCH $\underline{\text{H}}$, m, 1H), 4.34 (CH $\underline{2}$ CH $\underline{3}$, q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.33 (CH $\underline{2}$ CH $\underline{3}$, t, $J = 7.0$ Hz, 3H). ESI-MS m/z calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}_3\text{BrS}$: 418.3 $[\text{M}]^+$; found: 419.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 441 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

8-Bromo-3-phenyl-2-thioxo-2,3-dihydro-1H-pyrimido[5,4-b]-indol-4(5H)-one (5)¹²⁰



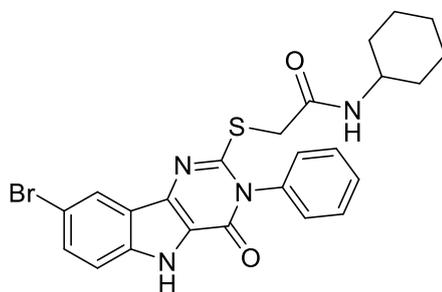
To a sealed flame-dried flask charged with argon, a solution of compound **4** (1.09, 2.61 mmol) in anhydrous EtOH (20 mL) was stored. Separately, in a flask with anhydrous ethanol (27 ml), cooled to 0°C with an ice bath was added acetyl chloride (7.78 mL, 109.44 mmol) dropwise (caution, exothermic reaction) under argon atmosphere. This solution was added dropwise to the first solution under stirring. After completion, the mixture was stirred at reflux overnight. Once completed, the reaction mixture was cooled at 0°C and solids were filtered off and washed with cold EtOH to give compound **5** as a white solid (697 mg, 72%). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 13.70 (NH $\underline{\text{C}}$ S, s, 1H), 12.44 (NH $\underline{\text{H}}$, s, 1H), 8.46 (ArCH $\underline{\text{H}}$, s, 1H), 7.80 (ArCH $\underline{\text{H}}$, d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.59-7.41 (ArCH $\underline{\text{H}}$, m, 2H), 7.29 (ArCH $\underline{\text{H}}$, d, $J = 7.4$ Hz, 2H).

2-((8-Bromo-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyrimido[5,4-b]indol-2-yl)thio)acetic acid (6)



In a schlenk flask, to a solution of bromo derivative **5** (697 mg, 1.87 mmol) in warm EtOH (15 mL) was added potassium hydroxide (210 mg, 3.74 mmol) with stirring. To this solution was added a solution of bromoacetic acid (269 mg, 1.87 mmol) in EtOH (3 mL) and the mixture was refluxed overnight. Then, about half volume of the mixture was removed on a rotavap and the mixture was acidified to pH= 4 with 4M HCl. The solid was filtered off and washed with distilled water and finally with EtOH to give compound **6** as a white solid (810 mg, quant.). ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 12.36 (NH, s, 1H), 8.09 (ArCH, s, 1H), 7.61-7.49 (ArCH, m, 7H), 3.96 (SCH₂, s, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 170.3 (CO), 155.3 (NCHS), 153.5 (OCN-Ph), 137.9 (ArC), 136.6 (ArC), 136.3 (ArC), 130.5 (NCCNH), 130.3 (ArC), 130.1 (ArCH), 129.9 (ArCH), 122.7 (ArCH), 122.4 (ArCH), 120.7 (ArC), 115.6 (ArCH), 112.9 (ArCH), 35.7 (SCH₂). ESI-MS m/z calcd. for C₁₈H₁₂O₃N₃BrS: 430.3 [M]⁺; found: 432.1. [M + H]⁺. ESI-HRMS m/z calcd. for C₁₈H₁₁O₃N₃BrNaS: 451.9680; found: 451.9675.

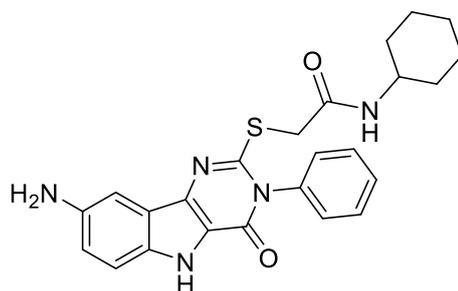
2-((8-Bromo-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyrimido[5,4-b]indol-2-yl)thio)-N-cyclohexylacetamide (7)



Compound **6** (1.732 g, 4.025 mmol), anhydrous triethylamine (1.12 mL, 8.05 mmol), and cyclohexylamine (0.51 mL, 4.428 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (29 mL). To this solution, HATU (823 mg, 2.16 mmol) dissolved in anhydrous DMF (5.7 mL) was added and stirred at room temperature for 6 h. The solvent was removed under high vacuum and the crude material was washed twice with MeOH, yielding compound **7** as a white solid (2.036 g, quant.). ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 12.32 (NH, s, 1H), 8.29 (OCNH, s, 1H), 8.22 (ArCH, d, J= 7.6 Hz, 1H), 7.61-7.49 (ArCH, m, 7H), 3.86 (SCH₂, s, 2H), 3.54 (HNCH, m, 1H, overlapped with water signal), 1.75-1.54 (cyclohexyl, m, 5H), 1.25 (cyclohexyl, m, 5H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 166.3 (CO), 155.3 (NCHS), 153.8 (OCN-Ph), 137.9 (ArC), 136.8 (ArC), 136.4 (ArC), 130.4 (NCCNH),

130.2 (ArC), 130.0 (ArCH), 129.9 (ArCH), 123.3 (ArCH), 122.5 (ArCH), 120.7 (ArC), 115.4 (ArCH), 112.8 (ArCH), 48.5 (HNCH), 37.2 (SCH₂), 33.0 (cyclohexyl-CH₂), 25.5 (cyclohexyl-CH₂), 25.0 (cyclohexyl-CH₂). ESI-MS *m/z* calcd. for C₂₄H₂₃O₂N₄BrS: 510.1 [M]⁺; found: 511.1 [M + H]⁺. ESI-HRMS *m/z* calcd. for C₂₄H₂₃O₂N₄BrNaS: 533.0623, found: 533.0617.

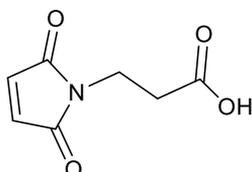
2-((8-Amino-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyrimido[5,4-b]indol-2-yl)thio)-*N*-cyclohexylacetamide (8)



Compound **7** (295 mg, 0.58 mmol), sodium azide (375 mg, 5.77 mmol), copper (I) iodide (549 mg, 2.88 mmol), and sodium ascorbate (286 mg, 1.44 mmol) were combined in a flask under argon atmosphere. A mixture of DMSO:H₂O (5:1, 9.1 mL) was degassed with argon and added to the mixture, followed by the addition of *N,N*-dimethylethylenediamine (310 μ L, 2.88 mmol) degassed as well. The reaction was heated to 90°C overnight with stirring. The suspension was extracted with EtOAc and brine. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM:MeOH, 100/3) affording the amine derivative **8** as a brown solid (185 mg, 72%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 11.61 (NH, s, 1H), 8.12 (OCNH, d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.59 (ArCH, m, 3H), 7.44 (ArCH, m, 2H), 7.24 (ArCH, m, 1H), 7.13 (ArCH, s, 1H), 6.90 (ArCH, d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.90 (NH₂, brs, 2H), 3.89 (SCH₂, s, 2H), 3.50 (HNCH, m, 1H, overlap water signal), 1.74-1.66 (cyclohexyl, m, 4H), 1.52 (cyclohexyl, m, 1H), 1.25-1.11 (cyclohexyl, m, 5H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 166.1 (CO), 155.4 (NCHS), 151.2 (OCN-Ph), 142.9 (ArC), 136.7 (ArC), 133.3 (NCCNH), 130.3 (ArC), 130.2 (ArC), 130.1 (ArCH), 129.9 (ArCH), 121.7 (ArCH), 119.6 (NCCNH), 119.1 (ArCH), 113.5 (ArCH), 102.0 (ArCH), 48.4 (HNCH), 37.2 (SCH₂), 32.7 (cyclohexyl-CH₂), 25.6 (cyclohexyl-CH₂), 24.9 (cyclohexyl-CH₂). ESI-S *m/z* calcd. for C₂₄H₂₅O₂N₅S: 447.2 [M]⁺; found: 448.1 [M +

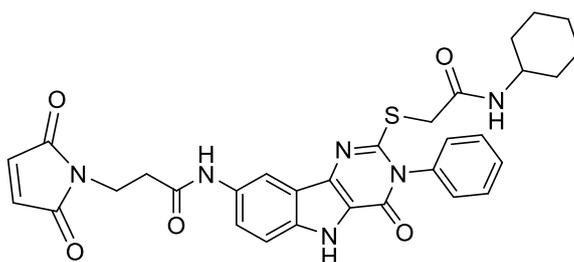
$\text{H}]^+$, 470.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 917.2 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$. ESI-HRMS m/z calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{N}_5\text{S}$: 448.1807; found: 448.1802.

3-Maleimido-propionic acid (**9**)¹²⁶



To a solution of maleic anhydride (5.5 g, 56.12 mmol) in acetic acid (70 mL), was added dropwise another solution of β -alanine (5 g, 56.12 mmol) in the same solvent (25 mL). The mixture was kept under stirring at room temperature for 3 hours. Then, acetic acid (50 mL) was added and the mixture was heated at 115°C overnight under stirring. Then, the solvent was removed under high vacuum and the crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM/ethyl acetate, 9:1) affording the acid **9** (3.0 g, 32%) as a white solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6.72 (CH , s, 2H), 3.81 (NCH_2CH_2 , t, $J=7.3$ Hz, 2H), 2.86 (NCH_2CH_2 , t, $J=7.3$ Hz, 2H).

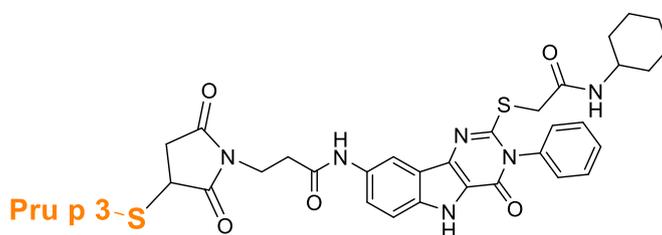
N-(2-((2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)thio)-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyrimido[5,4-*b*]indol-8-yl)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanamide (**10**)



Compound **8** (185 mg, 0.41 mmol), anhydrous DIPEA (144 μL , 0.83 mmol), 3-maleimidopropionic acid (**9**) (77 mg, 0.45 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (3 mL). To this solution, HATU (173 mg, 0.45 mmol) dissolved in anhydrous DMF (1.7 mL) was added and stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under high vacuum and the crude material was washed twice with MeOH yielding compound **10** as a white solid (182 mg, 73%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 12.05

(NH, s, 1H), 10.06 (OCNH-Ar, 1H), 8.49 (OCNH, s, 1H), 8.21 (ArCH, d, $J= 6.2$ Hz, 1H), 7.60-7.42 (ArCH, m, 7H), 7.05 ((OCCH)₂N, s, 2H), 3.94 (SCH₂, s, 2H), 3.77 (NCH₂CH₂, t, $J= 7.2$ Hz, 2H), 3.50 (HNCH, m, 1H, overlapped with water signal), 2.64 (NCH₂CH₂, t, $J= 7.2$ Hz, 2H), 1.74-1.54 (cyclohexyl, m, 5H), 1.21-1.10 (cyclohexyl, m, 5H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ : 171.3 (CO_{maleimide}), 168.6 (HNCO-maleimide), 165.9 (HNCO), 155.4 (NCHS), 152.7 (OCN-Ph), 137.6 (ArC), 136.6 (ArC), 136.1 (ArC), 135.1 (CH_{maleimide}), 132.54 (NCCNH), 130.3 (ArC), 130.1 (ArCH), 130.0 (ArCH), 121.7 (ArCH), 120.6 (NCCNH), 120.4 (ArCH), 113.4 (ArCH), 110.8 (ArCH), 48.5 (HNCH), 37.5 (SCH₂), 35.4 (CH₂CH₂-maleimide), 34.4 (CH₂CH₂-maleimide), 32.7 (cyclohexyl-CH₂), 25.6 (cyclohexyl-CH₂), 24.9 (cyclohexyl-CH₂). ESI-MS m/z calcd. for C₃₁H₃₀O₅N₆S: 598.2 [M]⁺; found: 621.2 [M + Na]⁺. ESI-HRMS m/z calcd. for C₃₁H₃₀O₅N₆NaS: 621.1896; found: 621.1891. RP-HPLC $t_R= 14.31$ min (Column: analytical BioZen, 2.6 μ m, Peptide XB-C18; A: Milli-Q H₂O (0.05 % TFA), B: Acetonitrile; first two minutes with 10% of B, the rest, 10 to 95% linear gradient of B into A over 15 min, F= 1 mL/min).

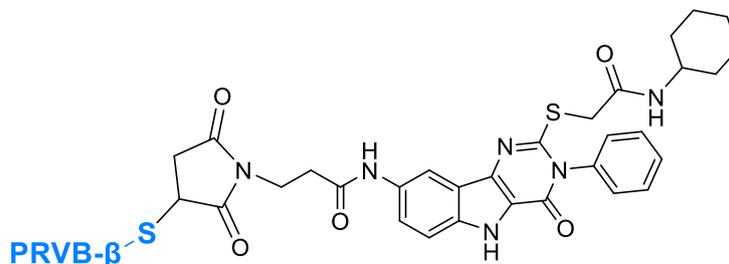
Conjugate of TLR4 ligand, **11**



A solution of peptide Pru p 3 SH (2.60 mg, 1.15 μ mol) in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 80 μ L) and Milli-Q water (160 μ L) was added to a solution of maleimide derivative **10** (0.69 mg, 1.15 μ mol) in DMSO (390 μ L). After shaking for approx. 25 min at room temperature (the progression of the reaction was monitored by analytical RP-HPLC), only a signal corresponding to the final product was observed. To remove salts, the solution was filtered in an Amicon Ultra centrifugal filter (Ultra-15, MWCO 3KDa) and after washing with Milli-Q water in a centrifuge at 4000 rpm, the collected aqueous phase was lyophilized, providing the corresponding conjugate **11** as a white solid (2.79 mg, 85%). ESI-MS m/z calcd.: 2853.8 [M]⁺, found: 952.5 [M + 3H]³⁺, 1427.8 [M + 2H]²⁺. RP-HPLC $t_R= 10.65$ min (Column: analytical BioZen, 2.6 μ m, Peptide XB-C18;

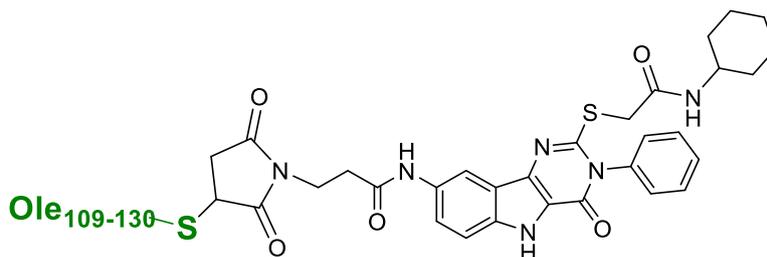
A: Milli-Q H₂O (0.05% TFA), B: Acetonitrile; first two minutes with 10% of B, the rest, 10 to 95% linear gradient of B into A over 15 min, F= 1 mL/min).

Conjugate of TLR4 ligand, **12**



A solution of peptide β -PRVB-SH (1.32 mg, 1.37 μ mol) in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 96 μ L) and Milli-Q water (192 μ L) was added to a solution of maleimide derivative **10** (0.82 mg, 1.37 μ mol) in DMSO (464 μ L). After shaking for aprox. 25 min at room temperature (the progression of the reaction was monitored by analytical RP-HPLC), the reaction mixture was purified by semipreparative RP-HPLC (C8 Phenomenex Luna column, 10 \times 250 mm, 10 μ m; A: Milli-Q H₂O (0.05% TFA), B: Acetonitrile; 20 to 60% linear gradient of B into A over 30 min, F= 3 mL/min). The corresponding analyzed fractions were collected and lyophilized to affording the corresponding conjugate **12** (1.7 mg, 79%) as a white amorphous solid. ESI-MS m/z calcd.: 1560.94 [M]⁺; found: 521.3 [M + 3H]³⁺, 781.3 [M + 2H]²⁺, 1560.5 [M + H]⁺. RP-HPLC t_R = 10.57 min (Column: analytical BioZen, 3.6 μ m, Peptide XB-C8; A: Milli-Q H₂O (0.05% TFA), B: Acetonitrile; 20 to 60% linear gradient of B into A over 15 min, F= 1 mL/min).

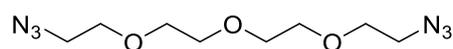
Conjugate of TLR4 ligand, **13**



A solution of peptide Ole₁₀₉₋₁₃₀-SH (2.35 mg, 0.93 μmol) in 65 μL of sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 150 μL) and Milli-Q water (180 μL) was added to a solution of maleimide derivative **10** (0.56 mg, 0.93 μmol) in DMSO (317 μL). After shaking for approx. 25 min at room temperature (the progression of the reaction was monitored by analytical RP-HPLC), the reaction mixture was directly purified by semipreparative RP-HPLC (C18 Phenomenex Luna column, 10 \times 250 mm, 10 μm ; A: Milli-Q H₂O (0.05% TFA), B: Acetonitrile; first four minutes with 30% of B, the rest, 30 to 70% linear gradient of B into A over 30 min, F= 3 mL/min). The corresponding analyzed fractions were collected and lyophilized, affording the corresponding conjugate **13** as a white solid (0.7 mg, 34%). ESI-MS m/z calcd.: 3119.7 [M]⁺; found: 1040.4 [M + 3H]³⁺, 1559.3 [M + 2H]²⁺. RP-HPLC t_{R} = 8.8 min (Column: analytical BioZen, 3.6 μm , Peptide XB-C8; A: Milli-Q H₂O (0.05% TFA), B: Acetonitrile; 20 to 60% linear gradient of B into A over 15 min, F= 1 mL/min).

8.3 Synthesis of TLR7 ligand conjugates

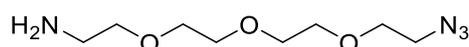
1-Azido-2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethane (**14**)¹⁷⁹



Bis[2-(2-chloroethoxy)ethyl] ether (4.72 g, 20.42 mmol) was diluted into *N,N*-dimethylformamide (69 mL) and treated with an excess of sodium azide (13.27 g, 204.2 mmol) at 60 °C for 2 days. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting mixture was diluted into ether and filtered. The filtrate was again concentrated

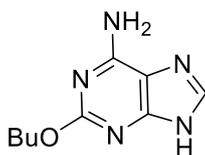
under reduced pressure, diluted into DCM and washed with H₂O (2x200 ml). The final filtrate was concentrated under reduced pressure to give compound **14** as a yellow oil (4.323 g, 87%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 3.69–3.61 (CH₂PEG, m, 12H), 3.37 (CH₂N₃, t, *J*= 6.4 Hz, 4H).

2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-amine (**15**)¹⁷⁹



Compound **14** (4.323 g, 17.71 mmol) was diluted in a mixture of diethyl ether (42 mL), THF (8.4 mL) and 1N HCl (42 mL). To this, PPh₃ (4.64g, 17.71) in diethyl ether (42 mL) was added dropwise during 3 hours and the reaction was vigorously stirred overnight at room temperature. The mixture was treated with 4N HCl. The aqueous layer was washed with ether and turned basic using NaOH pellets. The basic aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic phases were concentrated under reduced pressure to yield the product **15** as a yellow oil (3.29 g, 85%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 3.61–3.57 (CH₂PEG, m, 10H), 3.40 (CH₂N₃, t, *J*= 5.2 Hz, 2H), 3.29 (CH₂CH₂NH₂, t, *J*= 5.2 Hz, 2H), 2.77 (CH₂NH₂, t, *J*= 5.2 Hz, 2H), 1.39 (CH₂NH₂, s, 2H). ESI-MS *m/z* calcd. for C₈H₁₈O₃N₄: 218.1 [M]⁺; found: 219.1 [M + H]⁺

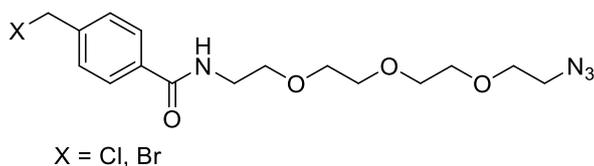
2-Butoxy-9H-purin-6-amine (**16**)¹⁷⁷



To Sodium (340 mg, 14.75 mmol) in *n*-BuOH (10 mL), 2-chloropurin-6-amine (500 mg, 2.95 mmol) was added under argon atmosphere. The mixture was stirred at 140°C for 10 h and then, water was added. The organic layer was separated, concentrated under vacuum, and water was added to the residue. HCl was added until pH 6 and the precipitate was collected by filtration and washed with EtOH to give compound **16** (515 mg, 84%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 7.88 (NCHNH, brs, 1H), 7.25

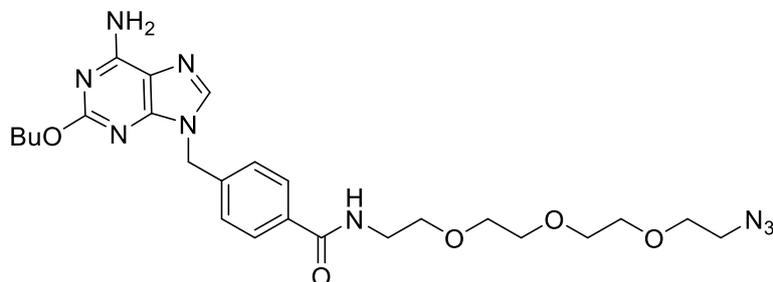
(NH₂, brs, 2H), 4.17 (CH₃CH₂CH₂CH₂, t, *J*= 6.6 Hz, 2H), 1.65 (CH₃CH₂CH₂CH₂, m, 2H), 1.40 (CH₃CH₂CH₂CH₂, m 2H), 0.92 (CH₃CH₂CH₂CH₂, t, *J*= 7.4 Hz, 3H).

***N*-(2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-(bromomethyl)benzamide (17)**



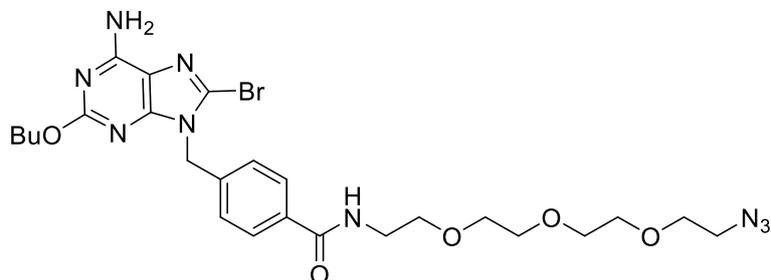
4-Bromometilbenzoic acid (1.5 g, 6.9 mmol) was reacted with thionyl chloride (15.18 ml, 209.25 mmol). The reaction was refluxed for 3 hours and then, concentrated under reduced pressure. A solution of the linker amino azide **15** (2.28 g, 10.46 mmol) in anhydrous DCM (10 mL) was added dropwise at 0°C to the crude redissolved in anhydrous DCM (20 ml). The reaction was stirred overnight at r.t and the mixture was washed with 1M HCl, saturated solution NaHCO₃ and H₂O, and dried over anhydrous magnesium sulfate. The organic layer was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (hexane/ethyl acetate, 1:1) to afford compound **17** (a 60:40 mixture of Br:Cl derivatives approximately) as a yellow oil (1.72 g, 60%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.80 (ArCH, d, *J*= 8.2 Hz, 2H), 7.48 (ArCH, d, *J*= 8.2 Hz, 2H), 6.79 (NH, brs, 1H), 4.53/4.63 (CH₂Br/Cl, s, 2H), 3.59-3.72 (CH₂PEG, m, 14H), 3.36 (CH₂N₃, t, *J*= 5.0 Hz, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.8 (HNCO), 141.1 (ArC), 134.6 (ArC), 129.1 (ArCH_{Br}), 128.6 (ArCH_{Cl}), 127.6 (ArCH), 127.5 (ArCH), 70.7, 70.2, 70.0, 69.8 (CH₂PEG), 50.6 (CH₂N₃), 45.6 (CH₂Cl), 39.8 (OCNHCH₂), 32.4 (CH₂Br). ESI-MS *m/z* calcd. for C₁₆H₂₃O₄N₅Br: 414.1 [M]⁺; found: 437.1 [M + Na]⁺. ESI-MS *m/z* calcd. for C₁₆H₂₃O₄N₅Cl: 370.1 [M]⁺; found: 393.2 [M + Na]⁺. ESI-HRMS *m/z* calcd. for C₁₆H₂₃O₄N₅BrNa: 437.0803; found: 437.0795. ESI-HRMS *m/z* calcd. for C₁₆H₂₃O₄N₅ClNa: 393.1308; found: 393.1300.

4-((6-Amino-2-butoxy-9H-purin-9-yl)methyl)-N-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)benzamide (18)



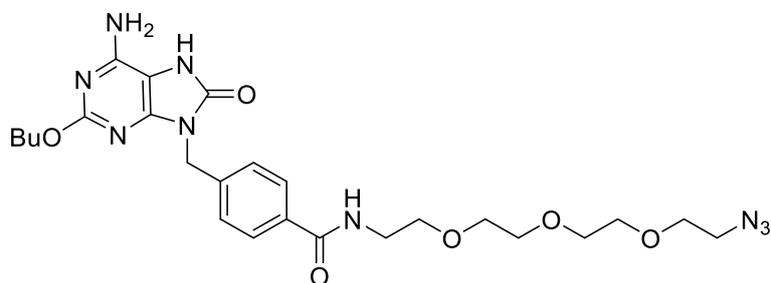
A mixture of 2-butoxy-9H-purin-6-amine (**16**), (110 mg, 0.53 mmol) and K_2CO_3 (220 mg, 1.53 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) was stirred under argon atmosphere at 65°C for 30 min. The azide derivative **17** (331 mg, 0.80 mmol) was added and the mixture was stirred for 72 h. The mixture was filtered, and the solvent was evaporated under vacuum. Then, the residue was diluted with chloroform and washed with distilled water, and dried over anhydrous magnesium sulfate. The organic layer was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (chloroform/methanol, 25:1) to afford compound **18** as a colourless oil (199 mg, 69%). 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 7.80 (ArCH, d, $J=7.7$ Hz, 2H), 7.62 (NCHN, s, 1H), 7.37 (ArCH, d, $J=7.7$ Hz, 2H), 6.80 (NH, brs, 1H), 5.56 (NH₂, brs, 2H), 5.34 (NCH₂, s, 2H), 4.34 (CH₃CH₂CH₂CH₂, t, $J=6.5$ Hz, 2H), 3.64-3.33 (CH₂PEG, m, 14H, overlapped with water signal), 3.34 (CH₂N₃, m, 2H), 1.80 (CH₃CH₂CH₂CH₂, m, 2H), 1.52 (CH₃CH₂CH₂CH₂, q, $J=7.5$ Hz, 2H), 0.99 (CH₃CH₂CH₂CH₂, t, $J=7.5$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.8 (HNCO), 162.4 (NCNH₂), 156.5 (NH₂CNHCCN), 151.9 (COBu), 139.2 (HNCHN), 138.6 (ArC), 134.5 (ArC), 127.7 (ArCH), 127.2 (ArCH), 115.5 (NH₂CNHCCN), 70.61, 70.57, 70.51, 70.23, 70.0, 69.7 (CH₂PEG), 67.1 (CH₃CH₂CH₂CH₂O), 50.6 (CH₂N₃), 46.5 (NCH₂Ar), 39.8 (OCNHCH₂), 31.0 (CH₃CH₂CH₂CH₂O), 19.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂O), 13.9 (CH₃CH₂CH₂CH₂O). ESI-MS m/z calcd. for $C_{25}H_{35}O_5N_9$: 541.3 $[M]^+$; found: 542.4 $[M+H]^+$. ESI-HRMS m/z calcd. for $C_{25}H_{36}O_5N_9$: 542.2840; found: 542.2834.

4-((6-Amino-8-bromo-2-butoxy-7,8-dihydro-9H-purin-9-yl)methyl)-N-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)benzamide (19)



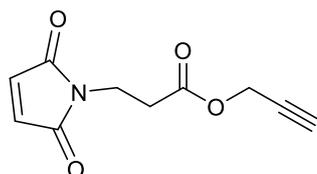
Adenine derivative **18** (609 mg, 1.12 mmol) was dissolved in chloroform (42 mL) and bromine (0.36 mL, 7 mmol) was added. The flask was fitted with a condenser and the resulting mixture was stirred at r.t. for 17 h in the dark. The flask was left open in the fumehood until most of the Br₂ was evaporated, and the solvent was removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography on silica gel (chloroform/methanol 30:1) to afford the product as a yellow oil (463 mg, 66%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.78 (ArCH, d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.37 (ArCH, d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.93 (NH, brs, 1H), 5.92 (NH₂, brs, 2H), 5.35 (NCH₂, s, 2H), 4.31 (CH₃CH₂CH₂CH₂, t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.67-3.33 (NHCH₂ (CH₂OCH₂)₃CH₂, m, 14H), 3.34 (CH₂N₃, m, 2H), 1.79 (CH₃CH₂CH₂CH₂, m, 2H), 1.48 (CH₃CH₂CH₂CH₂, q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 0.97 (CH₃CH₂CH₂CH₂, t, *J* = 7.3 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.9 (HNCO), 162.2 (NCNH₂), 155.2 (NH₂CNHCCN), 153.0 (COBu), 138.6 (ArC), 134.5 (ArC), 127.8 (ArCH), 127.6 (ArCH), 124.3 (HNCON), 116.0 (NH₂CNHCCN), 70.7, 70.6, 70.5, 70.3, 70.0, 69.8 (CH₂PEG), 67.3 (CH₃CH₂CH₂CH₂O), 50.6 (CH₂N₃), 46.9 (NCH₂Ar), 39.8 (OCNHCH₂), 31.0 (CH₃CH₂CH₂CH₂O), 19.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂O), 13.9 (CH₃CH₂CH₂CH₂O). ESI-MS *m/z* calcd. for C₂₅H₃₄O₉N₉Br: 619.2 [M]⁺; found: 642.2 [M + Na]⁺. ESI-HRMS *m/z* calcd. for C₂₅H₃₅O₅N₉Br: 620.1945; found: 620.1929.

4-((6-Amino-2-butoxy-8-oxo-7,8-dihydro-9H-purin-9-yl)methyl)-N-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)benzamide (20)



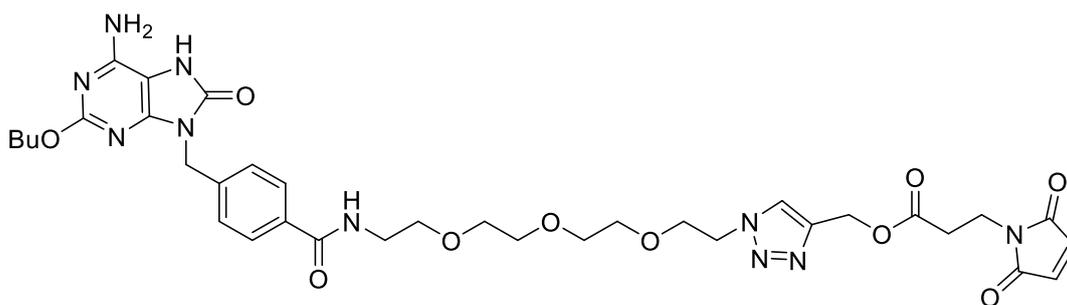
A mixture of 8-bromoadenine derivative **19** (463 mg, 0.747 mmol) in concentrated HCO₂H (45 mL) was stirred at reflux overnight. The HCO₂H was co-evaporated with distilled water (3x50 mL), and the residue was dried under vacuum and purified by column chromatography on silica gel (chloroform/methanol, 20:1) to afford the compound **20** as a white amorphous solid (192 mg, 47%). ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 10.0 (NH, s, 1H), 8.46 (OCNH-PEG, brs, 1H), 7.80 (ArCH, d, *J*= 7.9 Hz, 2H), 7.34 (ArCH, d, *J*= 7.6 Hz, 2H), 6.47 (NH₂, brs, 2H), 4.91 (NCH₂, s, 2H), 4.14 (CH₃CH₂CH₂CH₂, t, *J*= 6.8 Hz, 2H), 3.58-3.33 (CH₂PEG, m, 16H, overlap water signal), 1.61 (CH₃CH₂CH₂CH₂, q, *J*= 7.4 Hz, 2H), 1.37 (CH₃CH₂CH₂CH₂, q, *J*= 7.2 Hz, 2H), 0.91 (CH₃CH₂CH₂CH₂, t, *J*= 7.3 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 166.4 (HNCO), 160.5 (NCNH₂), 152.7 (COBu), 149.6 (HNCON), 148.2 (NH₂CNHCCN), 140.6 (ArC), 134.0 (ArC), 127.9 (ArCH), 127.8 (ArCH), 98.7 (NH₂CNHCCN), 70.2, 70.1, 69.7, 69.3 (CH₂PEG), 66.3 (CH₃CH₂CH₂CH₂O), 50.4 (CH₂N₃), 42.6 (NCH₂Ar), 31.0 (CH₃CH₂CH₂CH₂O), 19.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂O), 14.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂O). ESI-MS *m/z* calcd. for C₂₅H₂₃O₆N₉: 557.3 [M]⁺; found: 580.2 [M + Na]⁺. ESI-HRMS *m/z* calcd. for C₂₅H₃₆O₆N₉: 558.2789; found: 558.2774.

Prop-2-yn-1-yl-3-maleimidopropanoate (21)¹⁸²



3-Maleimidopropionic acid (**9**) (869 mg, 5.14 mmol), propargyl alcohol (0.2 mL, 3.43 mmol) and DPTS (503 mg, 1.71 mmol) were dissolved in anhydrous DCM (26.1 mL). To this solution, DCC (1.72 g, 0.45 mmol) dissolved in anhydrous DCM (8.7 mL) was added dropwise and stirred at room temperature overnight. Then, the solvent was removed under high vacuum and the crude was purified by column chromatography on silica gel (hexane/ethyl acetate, 2:1) affording **21** (544 mg, 77%) as a white solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6.71 (CH , s, 2H), 4.67 (HCCCH_2 , d, $J= 2.4$ Hz, 2H), 3.85 (NCH_2CH_2 , t, $J= 7.1$ Hz, 2H), 2.69 (NCH_2CH_2 , t, $J= 7.1$ Hz, 2H), 2.48 (CH_2CH , t, $J= 7.1$ Hz, 1H).

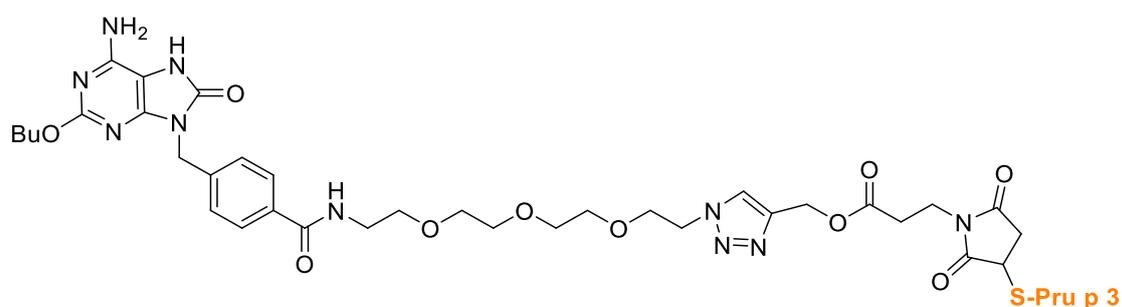
(1-(1-(4-((6-Amino-2-butoxy-8-oxo-7,8-dihydro-9H-purin-9-yl)methyl)phenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatriecan-13-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoate (22)



A solution of CuBr (1.55 mg, 0.01 mmol) in acetonitrile/DMSO (10:1, 0.6 mL) was added to a flask containing TentaGelTM-TBTA resin (159 mg, 0.17 mmol/g, 0.03 mmol) under argon atmosphere. The mixture was stirred for 10 min in the dark. Then, a solution of azide **20** (20 mg, 0.04 mmol) in DMSO (0.5 mL) and prop-2-yn-1-yl-3-maleimidopropanoate (**21**) (15 mg, 0.07 mmol) in acetonitrile/DMSO (10:1, 0.4 mL) were added. Under argon atmosphere and darkness, two additional portions of CuBr (1.5 mg, 0.01 mmol) in the same mixture of acetonitrile/DMSO (0.2 mL) were added every 2 hours. Finally, the sample was shaking overnight. Afterwards, the solvent was evaporated under high vacuum and the residue was purified by column chromatography on silica gel (chloroform/methanol, 25:1) to afford compound **22** as a white solid (26 mg, 94%). ^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ : 9.99 (NH , s, 1H), 8.46 (OCNH-PEG , brs, 1H), 8.08 ($\text{H}_{\text{triazole}}$, s, 1H), 7.80 (ArCH , d, $J= 7.9$ Hz, 2H), 7.34 (ArCH , d, $J= 8.0$ Hz, 2H), 6.99 (OCCH , s, 2H), 6.47 (NH_2 , brs, 2H), 5.10 (CCH_2OCO , s, 2H), 4.91 (NCH_2 , s, 2H), 4.51 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, m, 2H), 4.14 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, t, $J= 6.6$ Hz, 2H), 3.79 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{triazole}$, t, J

= 5.0 Hz, 2H), 3.65 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{triazole}$, t, $J= 7.0$ Hz, 2H), 3.52-3.38 (CH_2PEG , m, 12H, overlap water signal), 2.61 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, t, $J= 7.0$ Hz, 2H), 1.61 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, q, $J= 7.4$ Hz, 2H), 1.38 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, q, $J= 7.2$ Hz, 2H), 0.90 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, t, $J= 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.1 ($\text{CO}_{\text{maleimide}}$), 170.7 ($\text{HNCO}_{\text{maleimide}}$), 166.4 (HNCO), 160.6 (NCNH_2), 152.7 (COBu), 149.6 (HNCON), 148.3 (NH_2CNHCCN), 141.9 ($\text{CH}_{\text{triazol}}$), 140.6 (ArC), 135.0 ($\text{CH}_{\text{maleimide}}$), 134.0 (ArC), 127.9 (ArCH), 127.6 (ArCH), 125.6 ($\text{CH}_{\text{triazol}}$), 98.7 (NH_2CNHCCN), 70.14, 70.06, 69.97, 69.32, 69.06 (CH_2PEG), 66.32 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 57.9 ($\text{triazoleCH}_2\text{O}$), 49.8 ($\text{triazole-CH}_2\text{CH}_2$), 42.6 (NCH_2Ar), 40.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-maleimide}$, overlapping with DMSO signal), 33.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-maleimide}$), 32.7 ($\text{OCNHCH}_2\text{-PEG}$), 31.0 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 19.2 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 14.2 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$). ESI-MS m/z calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{O}_{10}\text{N}_{10}$: 764.6 $[\text{M}]^+$; found: 787.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. ESI-HRMS m/z calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{O}_{10}\text{N}_{10}$: 765.3320; found: 765.3304. RP-HPLC $t_{\text{R}}= 11.07$ min (Column: analytical BioZen, 3.6 μm , Peptide XB-C8; A: Milli-Q H_2O (0.05 % TFA), B: Acetonitrile, 10 to 60% linear gradient of B into A over 15 min, $F= 1$ mL/min).

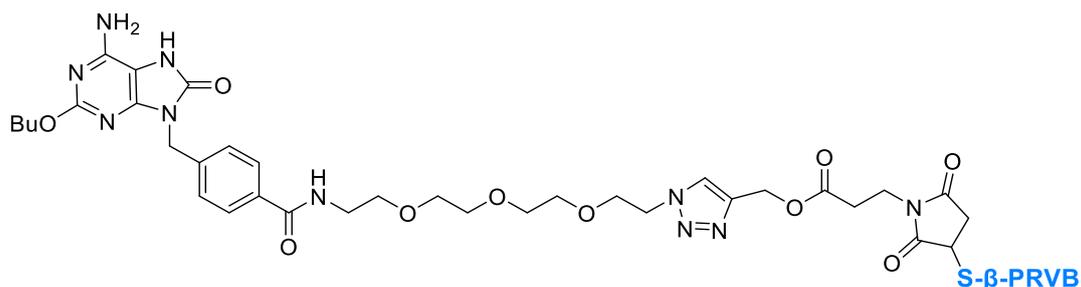
Conjugate of TLR7 ligand, **23**



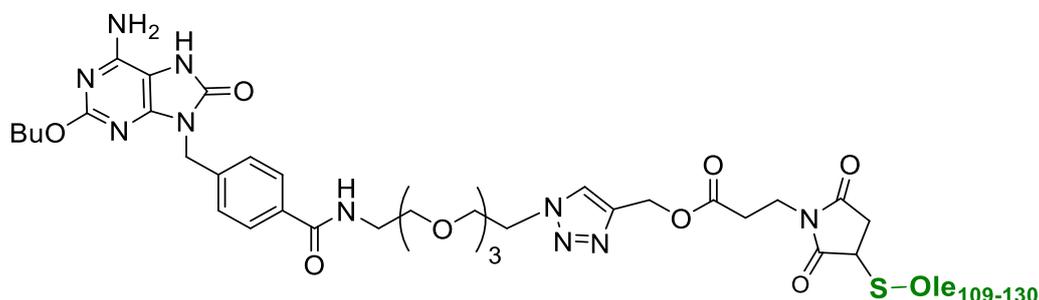
A solution of peptide Pru p 3-SH (1.3 mg, 0.59 μmol) in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 40 μL) and Milli-Q water (80 μL) was added to a solution of maleimide derivative **22** (0.45 mg, 0.59 μmol) in DMSO (195 μL). After shaking for aprox. 25 min at room temperature (the progression of the reaction was monitored by analytical RP-HPLC), only a signal corresponding to the final product was observed. To remove salts, an Amicon Ultra centrifugal filter (Ultra-15, MWCO 3KDa) was used and after washing with Milli-Q water in a centrifuge at 4000 rpm, the collected aqueous phase was lyophilized, affording the corresponding conjugate **23** as a white solid (1.7 mg, 96%).

ESI-MS m/z calcd.: 3019.9 $[M]^+$; found: 605.3 $[M + 5H]^{5+}$, 756.3 $[M + 4H]^{4+}$, 1007.9 $[M + 3H]^{3+}$, 1511.0 $[M + 2H]^{2+}$. RP-HPLC t_R = 8.91 min (Column: analytical BioZen, 3.6 μm , Peptide XB-C8; A: Milli-Q H_2O (0.05 % TFA), B: Acetonitrile, 10 to 60% linear gradient of B into A over 15 min, F = 1 mL/min).

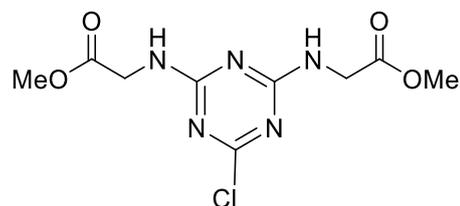
Conjugate of TLR7 ligand, **24**



A solution of peptide β -PRVB-SH (0.75 mg, 0.78 μmol) in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 90 μL) and Milli-Q water (150 μL) was added to a solution of maleimide derivative **22** (0.60 mg, 0.78 μmol) in DMSO (200 μL). After shaking for approx. 25 min at room temperature (the progression of the reaction was monitored by analytical RP-HPLC), only a signal corresponding to the product was observed. To remove salts, an Amicon Ultra centrifugal filter (Ultra-15, MWCO 3KDa) was used and after washing with Milli-Q water in a centrifuge at 4000 rpm, the aqueous phase collected was lyophilized, affording the corresponding conjugate **24** as a white solid (1.3 mg, 96%). ESI-MS m/z calcd.: 1726.6 $[M]^+$; found: 576.7 $[M + 3H]^{3+}$, 864.4 $[M + 2H]^{2+}$, 1726.7 $[M + H]^+$. RP-HPLC t_R = 9.42 min (Column: analytical BioZen, 3.6 μm , Peptide XB-C8; A: Milli-Q H_2O (0.05% TFA), B: Acetonitrile, 20 to 60% linear gradient of B into A over 15 min, F = 1 mL/min).

Conjugate of TLR7 ligand, 25

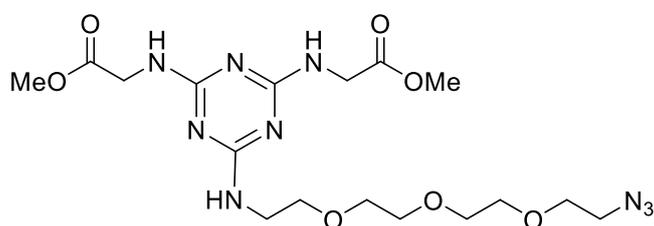
A solution of peptide Ole₁₀₉₋₁₃₀-SH (3.623 mg, 1.44 μmol) in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 30 μL) and Milli-Q water (100 μL) was added to a solution of maleimide derivative **22** (1.0 mg, 1.31 μmol) in DMSO (367 μL). After shaking for approx. 25 min at room temperature (the progression of the reaction was monitored by analytical RP-HPLC), the solution was filtered using an Amicon Ultra centrifugal filter (Ultra-15, MWCO 3KDa). After washing with Milli-Q water in a centrifuge at 4000 rpm, the aqueous phase collected was lyophilized, providing the corresponding conjugate **25** as a white solid (3.1 mg, 72%). ESI-MS m/z calcd.: 3285.8 $[\text{M}]^+$; found: 1095.9 $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$, 1643.6 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$. RP-HPLC $t_{\text{R}} = 11.50$ and 11.75 min (Column: analytical BioZen, 2.6 μm , Peptide XB-C18; A: Milli-Q H₂O (0.05% TFA), B: Acetonitrile, 20 to 70% linear gradient of B into A over 15 min, F= 1 mL/min).

8.4 Synthesis of TLR ligand dimer conjugates**Methyl (4-Chloro-6-((2-oxopropyl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl)glycinate (26)**

A suspension of cyanuric chloride (1 g, 4.92 mmol) in 40 mL of acetonitrile was cooled to 0°C. Then, a mixture of glycine methyl ester hydrochloride (1.24 g, 9.85 mmol) and DIPEA (3.43 mL, 19.7 mmol) was added dropwise under stirring. Then, the mixture was allowed to reach room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum

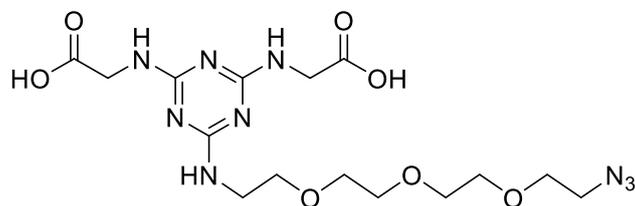
and the solid was washed with distilled water (3x10 mL) and MeOH (3x10 mL) yielding compound **26** as a white solid (1.15 g, 81%). ^1H NMR (MeOH- d_4 , 400 MHz) δ 4.12 and 4.04 (NHCH $_2$, s, 4H), 3.75 (CH $_3$, s, 6H). ESI-MS m/z calcd. for C $_9$ H $_{12}$ N $_5$ O $_4$ Cl: 289.1 [M] $^+$; found: 290.1 [M + H] $^+$. ESI-HRMS m/z calcd. for C $_9$ H $_{13}$ N $_5$ O $_4$ Cl: 290.0656; found: 290.0651.

Dimethyl 2,2'-((6-((2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)amino)-1,3,5-triazine-2,4-diyl)bis(azanediyl))diacetate (27)



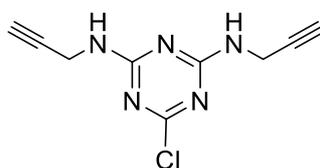
A solution of triazine derivative **26** (595.5 mg, 2.06 mmol), DIPEA (1.43 mL, 8.24 mmol) and amine **15** (900 mg, 4.12 mmol) in dioxane (8.24 mL) was heated at 100°C overnight. The solvent was removed under vacuum and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH, 20:1) to afford compound **27** as a yellow oil (841 mg, 87%). ^1H NMR (MeOH- d_4 , 400 MHz) δ : 4.07 (NHCH $_2$, brs, 4H), 3.74 (CH $_3$, s, 6H), 3.70 – 3.61 (m, 14H, CH $_2$ PEG), 3.39 (CH $_2$ N $_3$, m, 2H). ^{13}C NMR (MeOH- d_4 , 100 MHz) δ : 171.8 (CO), 165.8 (CNH), 165.6 (CNH), 70.2, 70.1, 69.9, 69.7, 69.5 (CH $_2$ PEG), 51.1 (CH $_3$), 50.4 (CH $_2$ N $_3$), 42.0, 41.8 (NHCH $_2$ PEG), 39.9 (CH $_2$ COO). ESI-MS m/z calcd. for C $_{17}$ H $_{29}$ N $_9$ O $_7$: 471.2 [M] $^+$; found: 472.2 [M + H] $^+$, 494.2 [M + Na] $^+$. ESI-HRMS m/z calcd. for C $_{17}$ H $_{30}$ N $_9$ O $_7$: 472.2268; found: 472.2263.

2,2'-((6-((2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)amino)-1,3,5-triazine-2,4-diyl)bis(azanediyl))diacetic acid (28)



Triazine **27** (465 mg, 0.99 mmol) was dissolved in THF (10 mL) and LiOH·H₂O (207.7 mg, 4.95 mmol) dissolved in 10 mL of distilled water was added to the mixture with stirring at r.t. overnight. The mixture was acidified to pH= 3 with 2M HCl. The solvent was removed under vacuum and the crude was purified by size exclusion chromatography, Sephadex LH20 (100% MeOH), giving the triazine **28** as a white solid (354 mg, 81%). ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ: 3.87 (NHCH₂, brs, 4H), 3.65 – 3.58 (m, 12H, CH₂PEG), 3.51 (HNCH₂CH₂, m, 2H), 3.41 (CH₂N₃, m, 2H). ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz) δ: 175.9 (CO), 162.7, 156.0, 154.9 (CNH), 69.6, 69.4, 69.2, 68.8, 68.4 (CH₂PEG), 50.2 (CH₂N₃), 43.9, (NHCH₂PEG), 42.0 (CH₂COO). ESI-MS m/z calcd. for C₁₅H₂₅N₉O₇: 443.2 [M]⁺; found: 444.2 [M + H]⁺. ESI-HRMS m/z calcd. for C₁₅H₂₆N₉O₇: 444.1955; found: 444.1944.

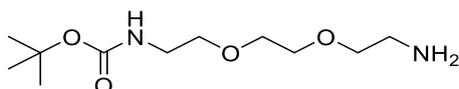
6-Chloro-N2,N4-di(prop-2-yn-1-yl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine (30)



A suspension of cyanuric chloride (1.5 g, 7.39 mmol) in acetonitrile (60 mL) was cooled to 0°C. Then, a mixture of propargylamine (0.95 mL, 14.78 mmol) and DIPEA (2.57 mL, 14.78 mmol) was added dropwise with stirring. Then, the mixture was allowed to reach room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum and the solid was washed with distilled water (3x10 mL) and MeOH (3x10 mL) yielding compound **30** as a white solid (1.51 g, 92%). ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 8.30 (NH, t, J= 5.9 Hz,

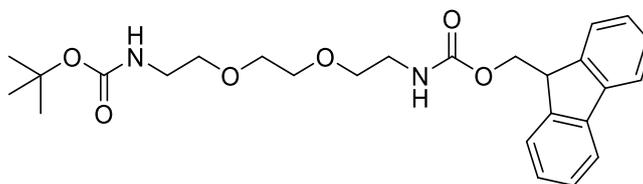
1.3H), 8.21 (NH, t, $J= 5.9$ Hz, 0.5H), 8.07 (NH, t, $J= 5.9$ Hz, 0.2H), 4.09 and 4.01 (NHCH₂, d, $J= 5.9$ Hz, 4H), 3.09 (CCH, s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ : 168.9, 168.5 (C=O), 165.8, 165.5, 165.4 (CNH), 81.4, 81.3, 81.1 (CCH), 73.6, 73.5 (CCH), 30.1, 30.0 (CH₂). ESI-MS m/z calcd. for C₉H₈N₅Cl: 221.6 [M]⁺; found: 222.1 [M + H]⁺.

***tert*-Butyl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (**31**)**²⁴⁰



To a solution of commercial 2,2'-(ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethan-1-amine) (34 mL, 233.2 mmol) in DCM (80 mL) was cooled to 0°C. Then, di-*tert*-butyl dicarbonate (5.09 g, 23.32 mmol) was added in portions during 2h. After 18h of stirring, the mixture was washed with brine (3x60 mL), distilled water (3x60 mL) and was dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford the amine **31** (4.30 g, 74%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 5.17 (NH, brs, 1H), 3.63 – 3.54 (CH₂PEG, m, 8H), 3.31 (CH₂NHBoc, m, 2H), 2.90 (CH₂NH₂, m, 2H), 1.45 (CH₃Boc, s, 9H).

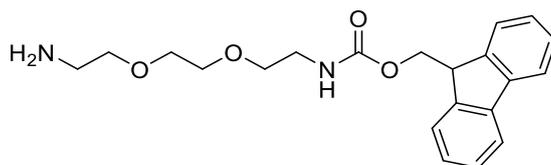
***tert*-Butyl (1-(9H-fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4-azadodecan-12-yl)carbamate (**32**)**²⁴⁰



To a solution of **31** (4.30 g, 17.33 mmol) in THF (80 mL), Fmoc-Cl (5.82 g, 22.53 mmol) was added in portions during 30 min. The mixture was stirred at r.t. for 2 h then, the solvent was removed under vacuum and purified by column chromatography on silica gel (hexane/ethyl acetate, 25:1) to afford compound **32** as a yellow oil (3.33 g, 41% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.80 (ArCH, d, $J= 7.5$ Hz, 2H), 7.62 (ArCH, d, $J= 7.5$ Hz, 2H), 7.43 (ArCH, t, $J= 7.4$ Hz, 2H), 7.33 (ArCH, t, $J= 7.4$ Hz, 2H), 5.71 (s, 1H, NH-Fmoc), 5.39 (NHBoc, brs, 1H), 5.02 (NHFmoc, brs, 1H), 4.43 (CH₂OCO, d, $J= 7.0$ Hz,

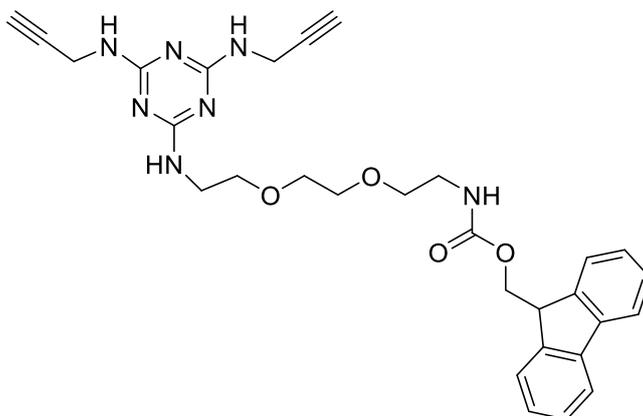
2H), 4.25 (CHFmoc, t, $J=7.0$ Hz, 1H), 3.64 – 3.56 (m, 10H, CH₂PEG), 3.45 (CH₂Fmoc, m, 2H), 1.45 (CH₃Boc, s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 156.5 (CO-Fmoc), 155.9 (CO-Boc), 143.9 (CAr), 141.2 (CAr), 127.6 (CAr), 126.9 (CAr), 125.0 (CAr), 119.8 (CAr), 78.9 (C(CH₃)₃), 70.1, 69.9, 66.4 (CPEG), 60.2 (CH₂-Fmoc), 47.2 (CHFmoc), 40.8 (CH₂NH-Boc), 40.2 (CH₂NHFmoc), 28.3 (CH₃).

(9H-Fluoren-9-yl)methyl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (33)²⁴⁰



To a solution of carbamate derivative **32** (3.33 g, 7.08 mmol) in dichloromethane (29.2 mL), TFA (13.3 mL) was added dropwise. The mixture was stirred at r.t. for 1.5 h. Then, the solvent was eliminated under vacuum affording the amine **33** as an orange oil (2.62 g, quant.). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.79 (ArCH, d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.58 (ArCH, d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.43-7.29 (ArCH, m, 4H), 4.51-4.45 (CH₂OCO, m, 2H), 4.25 (CHFmoc, brs, 1H), 3.69 (NH₂CH₂, brs, 2H), 3.62 – 3.21 (CH₂PEG, m, 10H). ESI-MS m/z calcd. for C₂₁H₂₆N₂O₄: 370.2 [M]⁺; found: 371.3 [M + H]⁺.

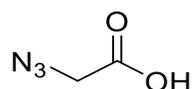
(9H-Fluoren-9-yl)methyl (2-(2-(2-((4,6-bis(prop-2-yn-1-ylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (34)



A solution of triazine derivative **30** (71 mg, 0.32 mmol), DIPEA (141 μ L, 0.81 mmol), and amine **33** (179 mg, 0.48 mmol) in dioxane (2.6 mL) was irradiated, under microwave activation, for 45 min at 100°C (closed system). The solvent was removed under vacuum

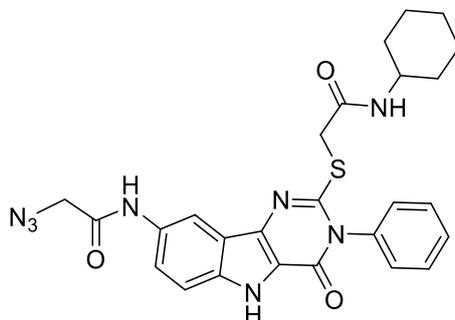
and purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 60:1) to afford compound **34** as a colourless oil (92 mg, 51%). ^1H NMR (MeOH- d_4 , 400 MHz) δ : 7.80 (ArCH, d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.64 (ArCH, d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.39 (ArCH, t, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.21 (ArCH, t, $J=7.3$ Hz, 2H), 4.37 (CH₂OCO, d, $J=6.9$ Hz, 2H), 4.21 (CHFmoc, t, $J=6.9$ Hz, 1H), 3.64 – 3.56 (CH₂PEG, m, 12H), 2.51 (CCH, t, $J=2.5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (MeOH- d_4 , 100 MHz) δ : 165.8, 165.4 (CNH), 157.5 (HNCO), 143.9 (CAr), 141.2 (CAr), 127.3 (CAr), 126.7 (CAr), 124.7 (CAr), 119.5 (CAr), 80.6 (CCH), 70.9 (CCH), 69.9, 69.8, 69.5 (CH₂PEG), 66.3 (CH₂CH), 43.1 (CH₂CH), 40.4 (CNHCH₂), 40.2 (CH₂NHCO), 28.3 (CH₂CCH). ESI-MS m/z calcd. for C₃₀H₃₃N₇O₄: 555.2 [M]⁺; found: 556.2 [M + H]⁺. ESI-HRMS m/z calcd. for C₃₀H₃₄N₇O₄: 556.2672; found: 556.2667.

2-Azidoacetic acid (**35**)²⁴⁶

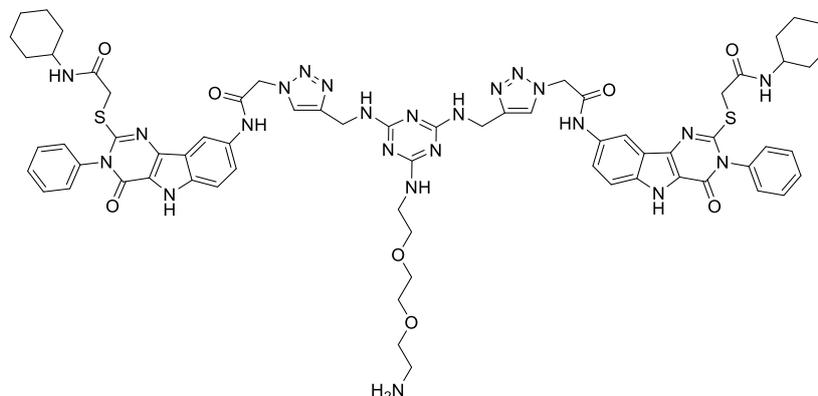


Bromoacetic acid (0.86 g, 6.22 mmol) was dissolved in distilled H₂O (12.5 mL). Sodium azide (0.81 g, 12.44 mmol) was added and stirred for 15h. The reaction mixture was acidified with conc. HCl to pH= 1 and extracted with diethyl ether (3x37 mL). The combined organic layers were washed with brine (37 mL). The solvent was dried over Na₂SO₄ and evaporated at 25°C to obtain the azide **35** (489 mg, 78%) as a colorless oil, which was used without further purification. ^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 11.07 (COOH, s, 1H), 3.96 (CH₂N₃, s, 2H). ^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 174.1 (CO), 49.9 (CH₂N₃).

2-Azido-N-(2-((2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl)thio)-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyrimido[5,4-b]indol-8-yl)acetamide (36)



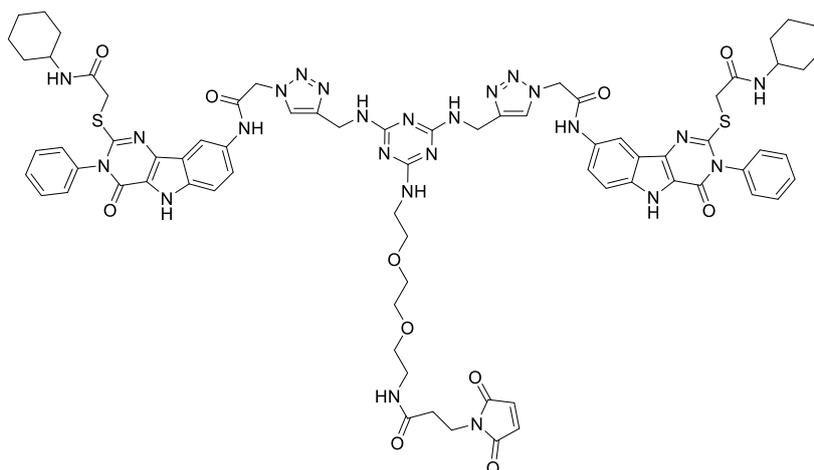
Compound **35** (175 mg, 0.39 mmol), anhydrous DIPEA (272 μ L, 1.56 mmol) and the amine **8** (99 mg, 0.98 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (3.67 mL). To this solution, HATU (373 mg, 0.98 mmol) dissolved in anhydrous DMF (1.0 mL) was added and stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under high vacuum and the crude material was washed twice with MeOH yielding compound **36** as a brown pale solid (166 mg, 80%). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 12.08 (NH , s, 1H), 10.21 ($\text{N}_3\text{CH}_2\text{CONH}$, s, 1H), 8.56 (ArCH, brs, 1H), 8.20 (OCNH, brs, 1H), 7.60-7.42 (ArCH, m, 7H), 4.07 (N_3CH_2 , s, 2H), 3.93 (SCH_2 , s, 2H), 3.50 (HNCH, m, 1H, overlapped with the water signal), 1.75-1.52 (cyclohexyl, m, 5H), 1.25-1.11 (cyclohexyl, m, 5H). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.4 (SCH_2CO), 166.0 ($\text{N}_3\text{CH}_2\text{CO}$), 155.4 (NCHS), 152.8 (OCN-Ph), 137.6 (ArC), 136.6 (ArC), 136.3 (ArC), 131.9 (NCCNH), 130.3 (ArC), 130.3 (ArC), 130.3 (ArCH), 130.0 (ArCH), 121.5 (ArCH), 120.7 (NCCNH), 120.5 (ArCH), 113.6 (ArCH), 111.0 (ArCH), 49.1 (N_3CH_2), 48.5 (HNCH), 37.4 (SCH_2), 32.7 (cyclohexyl- CH_2), 25.6 (cyclohexyl- CH_2), 25.0 (cyclohexyl- CH_2). ESI-MS m/z calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_3\text{S}$: 530.2 [M] $^+$; found: 553.0 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 569.0 [$\text{M} + \text{K}$] $^+$. ESI-HRMS m/z calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_3\text{SNa}$: 553.1746; found: 553.1741.

TLR4 Ligand dimer with amine, **37**

To a solution of triazine **34** (25 mg, 0.45 mmol) and the azide ligand **36** (60 mg, 0.11 mmol) in DMSO (2 mL), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4.5 mg, 0.02 mmol) and TBTA (19.1 mg, 0.04 mmol) dissolved in DMSO (2 mL) and finally a solution of sodium ascorbate (14.3 mg, 0.07 mmol) in 0.7 mL of phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) were added to the mixture. The solution was stirred at room temperature overnight. Then, copper was removed by adding a metal scavenger resin, Quadrasil[®] Mercaptopropyl (a spatula tip) and stirred for 15 min at room temperature. After that, the mixture was filtered, washed with DMSO and the solvent was removed under high vacuum. The crude material was washed twice with MeOH, the solid was dissolved in a 20% piperidine DMF solution (5 mL) and shaken at r.t. for 30 minutes. Then, the solvent was removed under high vacuum and the solid was washed twice with MeOH, yielding the compound **37** as a white solid (64 mg, 88%, two steps). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 10.51 (OCNH-Ar, brs, 2H), 8.52 (ArCH, s, 2H), 8.16 (OCNHCH, brs, 2H), 7.97 ($\text{H}_{\text{triazole}}$, s, 2H), 7.59-7.44 (ArCH, m, 14H), 5.32 (triazole- CH_2CO , brs, 4H), 4.51 (HNCH $_2$ -triazole, brs, 4H), 3.90 (SCH $_2$, s, 4H), 3.61 – 3.52 (CH $_2$ PEG, m, 12H), 3.17 (HNCH, s, 2H), 1.69-1.47 (cyclohexyl, m, 10H), 1.24-1.17 (cyclohexyl, m, 10H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 166.2, 166.1 (CNH), 166.0 (HNCO), 164.4 (HNCO), 155.4 (NCHS), 152.8 (OCN-Ph), 146.6 ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 137.6 (ArC), 136.5 (ArC), 136.3 (ArC), 131.9 (NCCNH), 130.4 (ArC), 130.1 (ArCH), 130.0 (ArCH), 125.0 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 121.5 (ArCH), 120.6 (ArC), 120.5 (ArCH), 113.6 (ArCH), 110.9 (ArCH), 70.1, 70.0, 69.7 (CH $_2$ PEG), 52.6 (triazole- CH_2CO), 48.5 (HNCH), 37.4 (SCH $_2$), 36.0 (HNCH $_2$ -Triazole), 32.6 (cyclohexyl-CH $_2$), 25.5 (cyclohexyl-CH $_2$), 24.9 (cyclohexyl-CH $_2$). ESI-MS m/z calcd. for $\text{C}_{67}\text{H}_{75}\text{N}_{23}\text{O}_8\text{S}_2$: 1393.6 $[\text{M}]^+$; found: 465.8 $[\text{M}$

+ 3H]³⁺, 698.3 [M + 2H]²⁺, 1394.4 [M + H]⁺, . ESI-HRMS m/z calcd. for C₆₇H₇₆N₂₃O₈S₂: 1394.5689; found: 1394.5683.

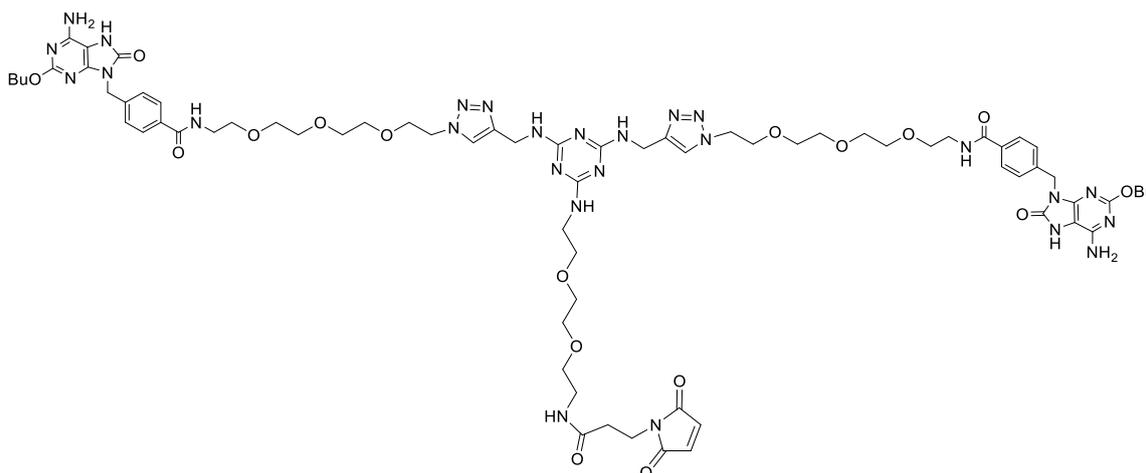
TLR4 Ligand dimer with maleimide, **38**



Compound **37** (49 mg, 0.03 mmol), anhydrous DIPEA (18.3 μ L, 0.10 mmol), and 3-maleimidopropionic acid **9** (12 mg, 0.07 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (1.3 mL). To this solution, HATU (27 mg, 0.07 mmol) dissolved in anhydrous DMF (0.4 mL) was added and stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under high vacuum and the crude material was washed twice with MeOH yielding compound **38** as a brown pale solid (37 mg, 68%). ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ : 12.09 (NH, brs, 2H), 10.51 (OCNH-Ar, brs, 2H), 8.53 (ArCH, s, 2H), 8.19 (OCNHCH, brs, 2H), 7.99 (CH₂OCNH, H_{triazole}, brs, 3H), 7.59-7.44 (ArCH, m, 14H), 6.98 (CH_{maleimide}, s, 2H), 5.33 (triazole-CH₂CO, brs, 4H), 4.51 (HNCH₂-triazole, brs, 4H), 3.90 (SCH₂, s, 4H), 3.61 – 3.52 (CH₂PEG, m, 12H, overlapped with water signal), 3.17 (HNCH, CH₂CH₂-maleimide, brs, 4H), 2.31 (CH₂CH₂-maleimide, brs, 2H), 1.77-1.46 (cyclohexyl, m, 10H), 1.24-1.03 (cyclohexyl, m, 10H). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ : 171.2 (CO_{maleimide}), 169.9 (HNCO-maleimide), 166.6, 166.5 (CNH), 166.4 (HNCO), 164.5 (HNCO), 155.4 (NCHS), 152.8 (OCN-Ph), 146.5 (C_{triazole}), 137.6 (ArC), 136.5 (ArC), 136.2 (ArC), 135.0 (CH_{maleimide}), 131.9 (NCCNH), 130.3 (ArC), 130.1 (ArCH), 130.0 (ArCH), 125.0 (CH_{triazole}), 121.4 (ArCH), 120.7 (ArC), 120.5 (ArCH), 113.6 (ArCH), 110.9 (ArCH), 70.0, 69.4 (CH₂PEG), 52.6 (triazole-CH₂CO), 48.4 (HNCH), 38.9 (CH₂CH₂-maleimide), 37.6 (SCH₂), 36.0 (OCNHCH₂-PEG), 34.5 (HNCH₂-Triazole), 34.4 (CH₂CH₂-

q, $J=7.2$ Hz, 6H), 0.90 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, t, $J=7.4$ Hz, 4H). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.5 (HNCO), 166.2, 166.1 (CNH), 160.5 (NCNH $_2$), 152.8 (COBu), 149.6 (HNCON), 148.4 (NH $_2$ CNHCCN), 146.5 (C $_{\text{triazol}}$), 140.7 (ArC), 134.0 (ArC), 127.9 (ArCH), 127.7 (ArCH), 123.6 (CH $_{\text{triazol}}$), 98.8 (NH $_2$ CNHCCN), 70.1, 70.0, 69.9, 69.6, 69.3, 69.2 (CH $_2$ PEG), 66.3 (CH $_3$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ O), 49.7 (NH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ O), 49.1 (triazole-CH $_2$ CH $_2$), 42.6 (NCH $_2$ Ar), 36.1 (HNCH $_2$ -Triazole), 31.0 (CH $_3$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ O), 19.2 (CH $_3$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ O), 14.2 (CH $_3$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ O). ESI-MS m/z calcd. for $\text{C}_{65}\text{H}_{93}\text{N}_{25}\text{O}_{14}$: 1447.7 [M] $^+$; found: 363.3 [M + 4H] $^{4+}$, 483.9 [M + 3H] $^{3+}$, 724.9 [M + 2H] $^{2+}$, 1448.6 [M + H] $^+$. ESI-HRMS m/z calcd. for $\text{C}_{65}\text{H}_{94}\text{N}_{25}\text{O}_{14}$: 1448.7412; found: 1448.7407.

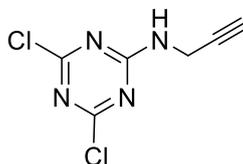
TLR7 Ligand dimer with maleimide, **40**



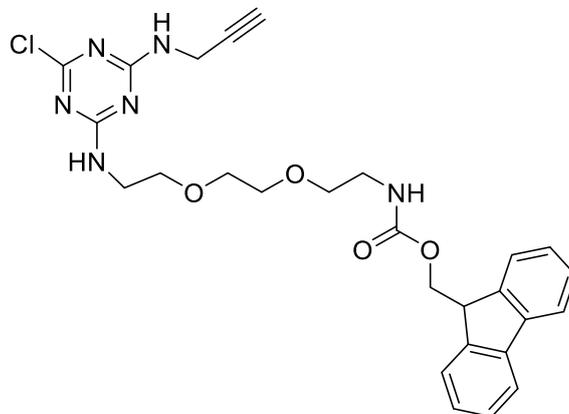
Compound **39** (44 mg, 0.03 mmol), anhydrous DIPEA (16 μL , 0.09 mmol), and 3-maleimidopropionic acid **9** (10.2 mg, 0.06 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (1.3 mL). To this solution, HATU (23.1 mg, 0.06 mmol) dissolved in anhydrous DMF (0.3 mL) was added and stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under high vacuum and the crude material was washed twice with MeOH yielding **40** as a yellow pale solid (43 mg, 89%). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 10.0 (CNHCON, brs, 2H), 8.46 (OCNH-PEG, brs, 2H), 8.01 (CH $_2$ OCNH, brs, 1H), 7.91 (H $_{\text{triazole}}$, brs, 2H), 7.79 (ArCH, brs, 4H), 7.36 (ArCH, brs, 4H), 7.00 (CH $_{\text{maleimide}}$, brs, 2H), 6.48 (NCNH $_2$, brs, 4H), 4.92 (NCH $_2$ Ar, brs, 4H), 4.46 (HNCH $_2$ -triazole, brs, 4H), 4.14 (CH $_3$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$, brs, 4H), 3.76 (triazole-CH $_2$ CH $_2$, brs, 4H), 3.75-3.30 (CH $_2$ PEG, m, 42H, overlapped water signal), 3.16 (CH $_2$ CH $_2$ -maleimide, brs, 2H), 2.34 (CH $_2$ CH $_2$ -

maleimide, brs, 2H), 1.62 (CH₃CH₂CH₂CH₂, brs, 4H), 1.37 (CH₃CH₂CH₂CH₂, brs, 4H), 0.90 (CH₃CH₂CH₂CH₂, brs, 6H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 171.2 (CO_{maleimide}), 170.0 (HNCO-maleimide), 166.4 (HNCO), (CNH), 160.6 (NCNH₂), 152.7 (COBu), 149.6 (HNCON), 148.3 (NH₂CNHCCN), 146.5 (C_{triazol}), 140.7 (ArC), 135.0 (CH_{maleimide}), 134.0 (ArC), 127.9 (ArCH), 127.7 (ArCH), 123.8 (CH_{triazol}), 98.8 (NH₂CNHCCN), 70.1, 70.0, 69.9, 69.6, 69.3, 69.2 (CH₂PEG), 66.3 (CH₃CH₂CH₂CH₂O), 49.7 (triazole-CH₂CH₂), 42.6 (NCH₂Ar), 38.9 (CH₂CH₂-maleimide), 36.1 (HNCH₂-Triazole), 34.5 (OCNHCH₂-PEG), 34.4 (CH₂CH₂-maleimide), 31.4 (CH₃CH₂CH₂CH₂O), 19.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂O), 14.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂O). ESI-MS m/z calcd. for C₇₂H₉₈N₂₆O₁₇: 1598.8 [M]⁺; found: 534.3 [M + 3H]³⁺, 800.8 [M + 2H]²⁺, 1599.7 [M + H]⁺. ESI-HRMS m/z calcd. for C₇₂H₉₈N₂₆O₁₇Na: 1621.7501; found: 1621.7495. RP-HPLC t_R = 11.65 min (Column: analytical BioZen, 3.6 μm, Peptide XB-C8; A: Milli-Q H₂O (0.05% TFA), B: Acetonitrile, 10 to 60% linear gradient of B into A over 15 min, F = 1 mL/min).

4,6-Dichloro-N-(prop-2-yn-1-yl)-1,3,5-triazin-2-amine (**41**)²⁴⁸

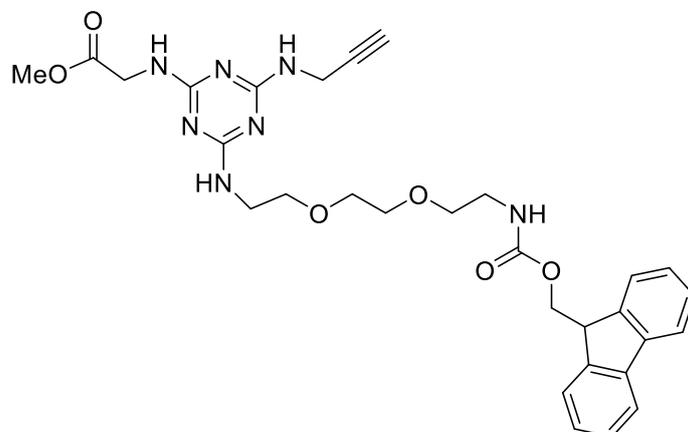


A solution of cyanuric chloride (3 g, 16.27 mmol) in 54 mL THF-DCM (1:4 v/v) was cooled in an ice bath to 0°C. Then, a solution of propargylamine (1.05 mL, 16.27 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (4.82 mL, 27.66 mmol) in 43 ml THF-DCM (2:1 v/v) mixture was added slowly. After the addition, the reaction was stirred for 90 min at 0°C. Then, the reaction mixture was allowed to reach room temperature and stirred for another two hours. The solvent was evaporated under vacuum and the product was purified by column chromatography on silica gel using dichloromethane as an eluent to afford compound **41** as a white solid (2.69 g, 82%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6.75 (NH, brs, 1H), 4.32 (NHCH₂, brs, 2H), 2.33 (CCH, s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 171.3, 170.2 (CCl), 165.5 (CNH), 77.7 (CCH), 72.8 (CCH), 31.3 (CH₂).

(9H-Fluoren-9-yl)methyl (2-(2-(2-((4-chloro-6-(prop-2-yn-1-ylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (42)

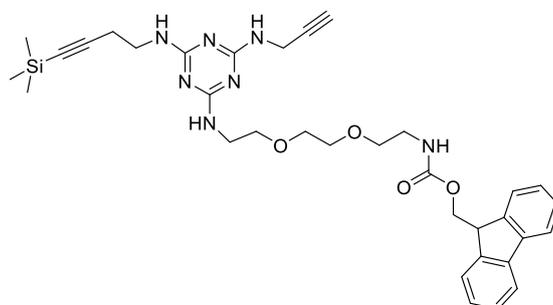
A solution of triazine **41** (768 mg, 3.78 mmol) in THF/DCM (2:1, 38 mL) was cooled in an ice/NaCl bath to -20°C . Then, a solution of amine **33** (1.40 g, 3.78 mmol) and DIPEA (1.32 mL, 7.56 mmol) in THF/DCM (2:1, 76 mL) mixture was added slowly over 30 minutes. After the addition, the reaction was stirred for 1 h at -20°C . Then, the reaction mixture was allowed to warm until room temperature and stirred for another two hours. The solvent was removed under vacuum and purified by column chromatography on silica gel (DCM \rightarrow DCM/MeOH, 60:1) to afford compound **42** as a white solid (1.39 g, 70%). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 8.20 (NH, m, 1H), 7.93-7.81 (NH, ArCH, m, 3H), 7.70 (ArCH, d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.41 (ArCH, m, 2H), 7.33 (ArCH, m, 2H), 5.75 (CONH, s, 1H), 4.31 (CH₂OCO, d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.23 (CHFmoc, t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.02 (HNCH₂CCH, brs, 2H), 3.52-3.42 (CH₂PEG, HNCH₂CH₂, m, 10H), 3.16 (HNCH₂CH₂, m, 2H), 3.10 (CCH, s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 168.9, 168.7, 168.3 (CCl), 166.0, 165.8, 168.7, 168.6, 166.3 (CNH), 144.4 (CAr), 141.2 (CAr), 128.1 (CAr), 127.5 (CAr), 125.6 (CAr), 120.5 (CAr), 81.5, 81.4 (CCH), 73.4, 73.2 (CCH), 70.0, 69.6, 69.1, 68.8 (CH₂PEG), 65.8 (CH₂CH), 55.4 (triazine-NHCH₂), 47.2 (CH₂CH), 39.1 (CH₂CCH). ESI-MS m/z calcd. for C₂₇H₂₉N₆O₄Cl: 536.2 [M]⁺; found: 537.3 [M + H]⁺. ESI-HRMS m/z calcd. for C₂₇H₂₉N₆O₄ClNa: 559.1837; found: 559.1827.

Methyl (4-((1-(9H-Fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4-azadodecan-12-yl)amino)-6-(prop-2-yn-1-ylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)glycinate (43)

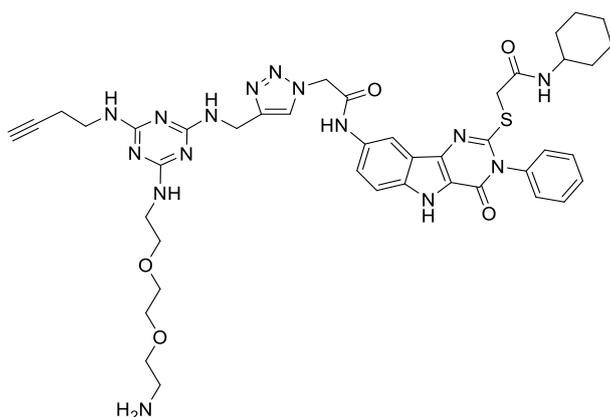


Triazine **42** (244 mg, 0.45 mmol), DIPEA (174 μ L, 1.82 mmol), and glycine methyl ester hydrochloride (114 mg, 0.90 mmol) were dissolved in dioxane (32.5 mL). The reaction was heated at 95°C overnight with stirring. The solvent was removed under vacuum and purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 60:1) to afford compound **43** as a sticky yellow solid (189 mg, 71%). ^1H NMR (MeOH- d_4 , 400 MHz) δ : 7.80 (ArCH, d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.65 (ArCH, d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (ArCH, t, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.32 (ArCH, t, $J=7.3$ Hz, 2H), 4.37 (CH₂OCO, d, $J=6.9$ Hz, 2H), 4.21 (CHFmoc, t, $J=6.9$ Hz, 1H), 4.08-4.05 (HNCH₂CCH, HNCH₂CO, m, 4H), 3.71 (COOCH₃, s, 3H), 3.63-3.48 (CH₂PEG, m, 12H), 2.50 (CCH, s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD- d_4) δ : 171.9 (CO), 165.7, 165.1 (CNH), 144.0 (CAr), 141.2 (CAr), 128.4 (CAr), 126.8 (CAr), 124.8 (CAr), 119.5 (CAr), 80.7 (CCH), 70.4, 69.9, 69.6, 69.5 (CH₂PEG), 66.3 (CH₂CH), 51.1 (OCH₃), 47.1 (CH₂CH), 40.4 (triazine-NHCH₂), 39.9 (NHCH₂CCO), 29.4 (NHCH₂CCH). ESI-MS m/z calcd. for C₃₀H₃₅N₇O₆: 589.3 [M]⁺; found: 612.3 [M + Na]⁺. ESI-HRMS m/z calcd. for C₃₀H₃₆N₇O₆: 590.2727; found: 590.2722.

(9H-Fluoren-9-yl)methyl 2-(2-(2-((4-(prop-2-yn-1-ylamino)-6-((4-(trimethylsilyl)but-3-yn-1-yl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (45)



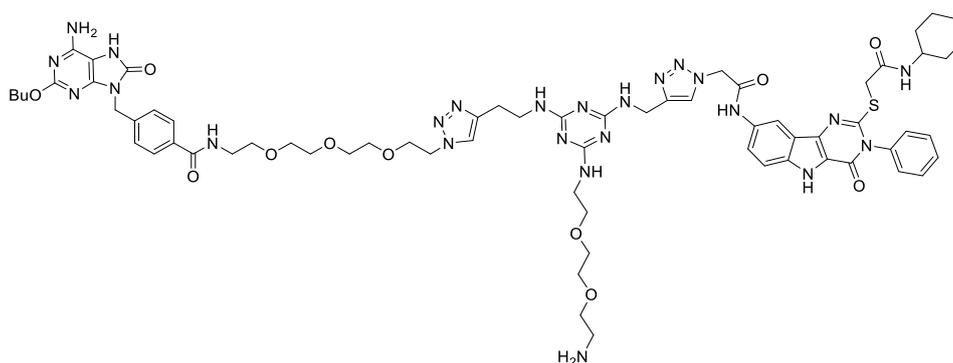
A solution of triazine derivative **42** (252 mg, 0.47 mmol), DIPEA (205 μ L, 1.17 mmol), and 4-(trimethylsilyl)-3-butyn-1-amine (78 mg, 0.61 mmol) in dioxane (3.9 mL) was irradiated, under microwave activation, for 2h at 100°C (closed system). The solvent was removed under vacuum and purified by column chromatography on silica gel (hexane/THF, 3:2) to afford compound **45** as a colourless oil (123 mg, 41%). ^1H NMR (MeOH- d_4 , 400 MHz) δ : 7.80 (ArCH, d, $J= 7.4$ Hz, 2H), 7.64 (ArCH, d, $J= 7.4$ Hz, 2H), 7.39 (ArCH, t, $J= 7.4$ Hz, 2H), 7.31 (ArCH, t, $J= 7.4$ Hz, 2H), 4.37 (CH₂OCO, d, $J= 6.9$ Hz, 2H), 4.20 (CHFmoc, t, $J= 6.9$ Hz, 1H), 4.09 (HNCH₂CCH, brs, 2H), 3.64-3.40 (CH₂PEG, HNCH₂CH₂, m, 14H), 2.51-2.47 (HNCH₂CH₂, CCH, m, 3H), 0.12 (SiCH₃, m, 9H). ^{13}C NMR (MeOD- d_4 , 100 MHz) δ : 165.7 (CNH), 157.5 (HNCO), 143.9 (CAr), 141.2 (CAr), 127.34 (CAr), 126.8 (CAr), 124.8 (CAr), 119.5 (CAr), 104.8 (SiCC), 84.8 (SiCC), 80.7 (CCH), 69.9 (CCH), 69.8, 69.6 (CH₂PEG), 66.3 (CH₂CH), 47.1 (CH₂CH), 40.4, 39.9, 39.3 (NHCH₂CH₂), 29.4 (CH₂CCH), 20.3 (NHCH₂CH₂), -1.2 (SiCH₃). ESI-MS m/z calcd. for C₃₄H₄₃N₇O₄Si: 641.3 [M]⁺; found: 642.4 [M + H]⁺. ESI-HRMS m/z calcd. for C₃₄H₄₄N₇O₄Si: 642.3224; found: 642.3219.

Intermediate heterodimer of TLR4/7, **46**

A solution of triazine **45** (29, 0.04 mmol) and the azide ligand **36** (15.9, 0.03 mmol) in DMSO (1.1 mL) was placed into a flask under argon atmosphere. To this solution, CuBr (0.86 mg, 6 μ mol) dissolved in DMSO (0.2 mL) was added and stirred at room temperature for 1h in the dark. Under argon atmosphere and darkness, another portion of CuBr (0.86 mg, 6 μ mol) in DMSO (0.2 mL) was added and stirred for 30 minutes. Then, copper was removed by adding a metal scavenger resin, Quadrasil[®] Mercaptopropyl (a spatula tip) and stirred for 15 min at room temperature. After that, the mixture was filtered, washed with DMSO and the solvent was removed under high vacuum. The crude material was washed twice with cold dichloromethane and the white crystals were dissolved in DMF (2.2 mL). Then, a TBAF solution (1M THF, 55 μ L) was added, the mixture was stirred at r.t. for 2 h and the solvent was removed under high vacuum. The crude material was precipitated by adding ACN and cooled to -40°C (acetone / N_2), washed with ACN and filtered to give compound **46** as a white solid (18 mg, 46%, two steps). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 10.58 (OCNH-Ar, brs, 1H), 8.55 (ArCH, s, 1H), 8.20 (OCNHCH, brs, 1H), 7.94 ($\text{H}_{\text{triazole}}$, s, 1H), 7.59-7.45 (ArCH, m, 7H), 5.32 (triazole- CH_2CO , brs, 2H), 4.49 (HNCH_2 -triazole, brs, 2H), 3.91 (SCH_2 , s, 2H), 3.68 – 3.47 (CH_2PEG , HNCH , m, 13H, overlapped with water signal), 3.18-3.13 ($\text{HCCCH}_2\text{CH}_2$, m, 2H), 2.79 (HCCH_2CH_2 , s, 1H), 1.79-1.48 (cyclohexyl, m, 5H), 1.32-1.06 (cyclohexyl, m, 10H). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.2, 166.1 (CNH), 165.9 (HNCO), 164.5 (HNCO), 155.4 (NCHS), 152.8 (OCN-Ph), 146.6 ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 137.6 (ArC), 136.6 (ArC), 136.3 (ArC), 132.0 (NCCNH), 130.4 (ArC), 130.1 (ArCH), 130.0 (ArCH), 124.9 ($\text{CH}_{\text{triazole}}$), 121.4 (ArCH), 120.7 (ArC), 120.5 (ArCH), 113.6 (ArCH), 111.8 (ArCH), 83.6 (HCC), 72.4 (HCC), 70.0, 69.7 (CH_2PEG), 58.0 ($\text{HCCCH}_2\text{CH}_2$), 52.6 (triazole- CH_2CO), 48.5 (HNCH), 37.6 (SCH_2), 36.0 (HNCH_2 -Triazole), 32.6 (cyclohexyl- CH_2),

25.6 (cyclohexyl-CH₂), 24.9 (cyclohexyl-CH₂), 23.5 (cyclohexyl-CH₂), 19.7 (cyclohexyl-CH₂), 19.5 (HCCCH₂). ESI-MS *m/z* calcd. for C₄₂H₅₁N₁₅O₅S: 877.4 [M]⁺; found: 439.8 [M + 2H]²⁺, 878.4 [M + H]⁺. ESI-HRMS *m/z* calcd. for C₄₂H₅₂N₁₅O₅S: 878.3997; found: 878.3991.

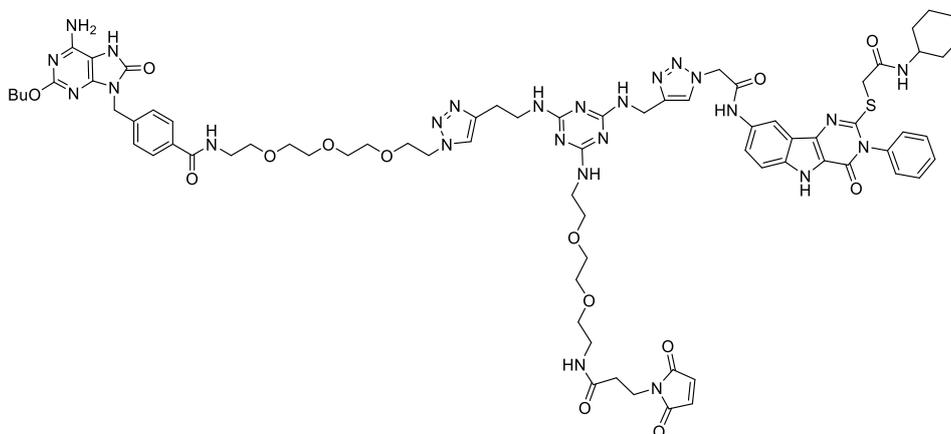
Heterodimer TLR4/7 ligand with amine, **47**



To a solution of triazine **46** (24.7 mg, 0.03 mmol) and the azide ligand **20** (17.3 mg, 0.03 mmol) in DMSO (2.3 mL), CuSO₄·5H₂O (2.8 mg, 0.01 mmol) and TBTA (12.0 mg, 0.02 mmol) were added in DMSO (2.3 mL) and finally a solution of sodium ascorbate (8.9 mg, 0.04 mmol) in 590 μL of phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) were added to the mixture. The solution was stirred at room temperature overnight. Then, copper was removed by adding a metal scavenger resin, Quadrasil[®] Mercaptopropyl (a spatula tip) and stirred for 15 min at room temperature. After that, the mixture was filtered, washed with DMSO and the solvent was removed under high vacuum. The resulting crude was purified by size exclusion chromatography, Sephadex LH20 (DMF/MeOH, 1:1) and by semipreparative RP-HPLC (C8 Phenomenex Luna column, 10 × 250 mm, 10 μm); A: Milli-Q H₂O (0.05 % TFA), B: Acetonitrile; 30 to 35% linear gradient of B into A over 30 min, F= 3 mL/min. The corresponding analyzed fractions were collected and lyophilized affording the corresponding compound **47** (6 mg, 15%) as a white amorphous solid. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 12.10 (NH_{TLR4}, s, 1H), 10.57 (OCNH-Ar_{TLR4}, brs, 1H), 10.06 (CNHCON_{TLR7}, brs, 1H), 8.48 (OCNH-PEG_{TLR7}, ArCH_{TLR4}, m, 2H), 8.12 (OCNHCH_{TLR4}, H_{triazol}_{TLR7}, m, 2H), 7.87 (H_{triazol}_{TLR4}, m, 1H), 7.77 (ArCH_{TLR7}, d, *J*= 8.2 Hz, 2H), 7.59-7.44 (ArCH_{TLR4}, m, 7H), 7.34 (ArCH_{TLR7}, d, *J*= 8.2 Hz, 2H), 6.49 (NH₂_{TLR7}, brs, 2H), 5.36 (triazole-CH₂CO_{TLR4}, s, 2H), 4.90 (OCH₂Ar_{TLR7}, s, 2H), 4.61

(triazole-CH₂CH₂TLR₇, brs, 2H), 4.45 (HNCH₂-triazole_{TLR4}, brs, 2H), 4.13 (CH₃CH₂CH₂CH₂TLR₇, t, *J*= 6.6 Hz, 2H), 3.89 (SCH₂TLR₄, s, 2H), 3.75 (triazole-CH₂CH₂TLR₇, m, 2H), 3.75-3.30 (CH₂PEG_{TLR7+triazine}, HNCH_{TLR4}, m, 43H, overlapped with water signal), 2.96 (triazole-CH₂CH₂TLR₇, brs, 2H), 2.89 (CH₂CH₂NH₂triazine, brs, 2H), 1.69-1.46 (CH₃CH₂CH₂CH₂TLR₇, cyclohexyl_{TLR4}, m, 7H), 1.37 (CH₃CH₂CH₂CH₂TLR₇, q, *J*= 7.6 Hz, 2H), 1.14-1.06 (cyclohexyl_{TLR4}, m, 5H), 0.89 (CH₃CH₂CH₂CH₂TLR₇, t, *J*= 7.4 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 166.5 (HNCO_{TLR7}), 166.2, 166.1 (CNH_{triazine}), 166.0 (HNCO_{TLR4}), 164.4 (HNCO_{TLR4}), 160.5 (NCNH₂TLR₇), 155.4 (NCHS_{TLR4}), 152.8 (OCN-Ph_{TLR4}), 152.7 (COBu_{TLR7}), 149.6 (HNCON_{TLR7}), 148.3 (NH₂CNHCCN_{TLR7}), 146.5 (C_{triazol}), 140.7 (ArC_{TLR7}), 137.6 (ArC_{TLR4}), 136.7 (ArC_{TLR4}), 136.3 (ArC_{TLR4}), 134.0 (ArC_{TLR7}), 132.0 (NCCNH_{TLR4}), 130.4 (ArC_{TLR4}), 130.1 (ArCH_{TLR4}), 130.0 (ArCH_{TLR4}), 127.9 (ArCH_{TLR7}), 127.6 (ArCH_{TLR7}), 123.3 (CH_{triazol}TLR_{4/7}), 121.4 (ArCH_{TLR4}), 120.7 (ArC_{TLR4}), 120.0 (ArCH_{TLR4}), 113.7 (ArCH_{TLR4}), 110.9 (ArCH_{TLR4}), 98.8 (NH₂CNHCCN_{TLR7}), 70.1, 70.0, 69.3, 69.2, 68.9, 68.4, 67.2 (CH₂PEG_{TLR7+triazine}), 66.3 (CH₃CH₂CH₂CH₂O_{TLR7}), 52.7 (triazole-CH₂CO_{TLR4}), 49.7 (triazole-CH₂TLR₇), 48.4 (HNCH₂CH₂TLR₇), 42.6 (CH₂Ar_{TLR7}), 40.9 (HNCH₂-triazole_{TLR4}), 39.0 (HNCH₂CH₂TLR₇), 37.4 (SCH₂TLR₄), 32.6 (cyclohexyl-CH₂TLR₄), 31.0 (CH₃CH₂CH₂CH₂O_{TLR7}), 25.5 (cyclohexyl-CH₂TLR₄), 24.9 (cyclohexyl-CH₂TLR₄), 19.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂O_{TLR7}), 14.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂O_{TLR7}). ESI-MS *m/z* calcd. for C₆₇H₈₆N₂₄O₁₁S: 1434.7 [M]⁺; found: 479.5 [M + 3H]³⁺, 718.8 [M + 2H]²⁺, 1436.4 [M + H]⁺. ESI-HRMS *m/z* calcd. for C₆₇H₈₇N₂₄O₁₁S: 1435.6707; found: 1435.6701. RP-HPLC *t_R* = 8.01 min (Column: analytical BioZen, 3.6 μm, Peptide XB-C8; A: Milli-Q H₂O (0.05% TFA), B: Acetonitrile, 30 to 35% linear gradient of B into A over 15 min, F = 1 mL/min).

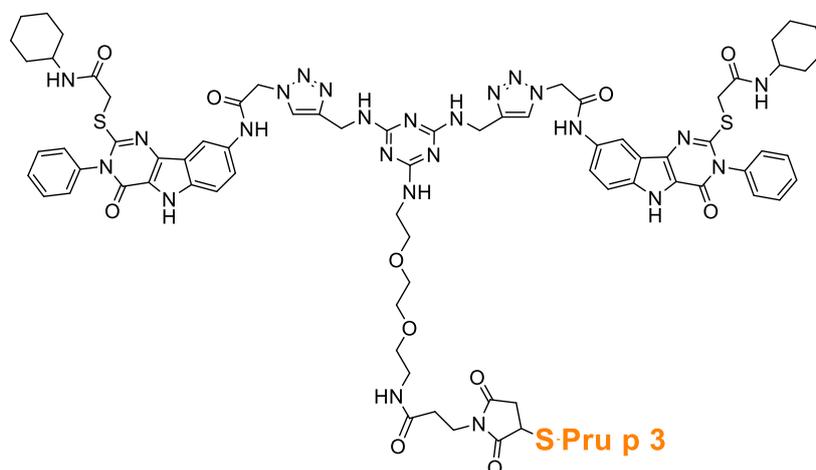
Heterodimer TLR4/7 ligand with maleimide, 48



Compound **47** (6 mg, 4.18 μmol), anhydrous DIPEA (2.18 μL , 12.5 μmol), and 3-maleimidopropionic acid **9** (1.41 mg, 8.36 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (1.2 mL). To this solution, HATU (3.18 mg, 8.36 μmol) dissolved in anhydrous DMF (0.3 mL) was added and stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under high vacuum and the crude material was washed twice with MeOH yielding compound **48** as a white solid (5.6 mg, 84%). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 12.08 (NH_{TLR4} , s, 1H), 10.52 ($\text{OCNH-Ar}_{\text{TLR4}}$, s, 1H), 10.02 ($\text{CNHCON}_{\text{TLR7}}$, s, 1H), 8.52 ($\text{ArCH}_{\text{TLR4}}$, s, 1H), 8.45 ($\text{OCNH-PEG}_{\text{TLR7}}$, s, 1H), 8.16 ($\text{OCNHCH}_{\text{TLR4}}$, m, 1H), 8.12 ($\text{OCNHCH}_{\text{triazina}}$, $\text{H}_{\text{triazolTLR7}}$, brs, 2H), 7.84 ($\text{H}_{\text{triazolTLR4}}$, m, 1H), 7.77 ($\text{ArCH}_{\text{TLR7}}$, d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.61-7.44 ($\text{ArCH}_{\text{TLR4}}$, m, 7H), 7.34 ($\text{ArCH}_{\text{TLR7}}$, d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.02 and 6.97 ($\text{CH}_{\text{maleimide}}$, s, 2H), 6.47 (NH_{TLR7} , brs, 2H), 5.34 ($\text{triazole-CH}_2\text{CO}_{\text{TLR4}}$, s, 2H), 4.90 ($\text{OCH}_2\text{Ar}_{\text{TLR7}}$, s, 2H), 4.54 ($\text{triazole-CH}_2\text{CH}_2\text{TLR7}$, brs, 2H), 4.44 ($\text{HNCH}_2\text{-triazole}_{\text{TLR4}}$, brs, 2H), 4.13 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{TLR7}$, t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.90 ($\text{SCH}_2\text{TLR4}$, s, 2H), 3.75-3.30 ($\text{CH}_2\text{PEG}_{\text{TLR7+triazine}}$, m, 42H, overlapped with water signal), 3.14 ($\text{HNCH}_{\text{TLR4}}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-maleimide}$, m, 3H), 2.86 ($\text{triazole-CH}_2\text{CH}_2\text{TLR7}$, brs, 2H), 2.46 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-maleimide}$, m, 2H), 1.69-1.49 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{TLR7}$, cyclohexyl $_{\text{TLR4}}$, m, 7H), 1.37 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{TLR7}$, q, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.24-1.12 (cyclohexyl $_{\text{TLR4}}$, m, 5H), 0.89 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{TLR7}$, t, $J=7.4$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.2 ($\text{CO}_{\text{maleimide}}$), 170.0 (HNCO-maleimide), 166.5 ($\text{HNCO}_{\text{TLR7}}$), 166.0 ($\text{CNH}_{\text{triazine}}$), 164.4 ($\text{HNCO}_{\text{TLR4}}$), 163.4 ($\text{HNCO}_{\text{TLR4}}$), 160.5 ($\text{NCNH}_2\text{TLR7}$), 155.4 ($\text{NCHS}_{\text{TLR4}}$), 152.8 ($\text{OCN-Ph}_{\text{TLR4}}$), 152.7 ($\text{COBu}_{\text{TLR7}}$), 149.6 ($\text{HNCON}_{\text{TLR7}}$), 148.3 ($\text{NH}_2\text{CNHCCN}_{\text{TLR7}}$), 140.7 (ArC_{TLR7}), 137.6 (ArC_{TLR4}), 136.7 (ArC_{TLR4}), 136.3 (ArC_{TLR4}), 135.0 ($\text{CH}_{\text{maleimide}}$), 134.0

(ArC_{TLR7}), 131.9 (NCCNH_{TLR4}), 130.4 (ArC_{TLR4}), 130.1 (ArCH_{TLR4}), 130.0 (ArCH_{TLR4}), 127.9 (ArCH_{TLR7}), 127.7 (ArCH_{TLR7}), 123.3 (CH_{triazoloTLR4/7}), 121.4 (ArCH_{TLR4}), 120.7 (ArC_{TLR4}), 120.0 (ArCH_{TLR4}), 113.7 (ArCH_{TLR4}), 110.9 (ArCH_{TLR4}), 98.7 (NH₂CNHCCN_{TLR7}), 70.1, 70.0, 69.3 (CH₂PEG_{TLR7+triazine}), 66.3 (CH₃CH₂CH₂CH₂O_{TLR7}), 52.6 (triazole-CH₂CO_{TLR4}), 49.7 (triazole-CH₂TLR7), 48.4 (HNCH₂CH₂TLR7), 43.2 (CH₂Ar_{TLR7}), (HNCH₂-triazole_{TLR4}, HNCH₂CH₂TLR7, overlapped with DMSO signal), 39.0 (CH₂CH₂-maleimide), 37.5 (SCH₂TLR4), 34.5 (CONHCH₂PEG), 34.4 (CH₂CH₂-maleimide), 32.6 (cyclohexyl-CH₂TLR4), 31.0 (CH₃CH₂CH₂CH₂O_{TLR7}), 25.5 (cyclohexyl-CH₂TLR4), 24.9 (cyclohexyl-CH₂TLR4), 19.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂O_{TLR7}), 14.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂O_{TLR7}). ESI-MS m/z calcd. for C₇₄H₉₁N₂₅O₁₄S: 1585.7 [M]⁺; found: 530.0 [M + 3H]³⁺, 794.3 [M + 2H]²⁺, 1586.5 [M + H]⁺. ESI-HRMS m/z calcd. for C₇₄H₉₁N₂₅O₁₄SNa: 1608.6796; found: 1608.6790. RP-HPLC t_R = 12.60 min (Column: analytical BioZen, 3.6 μm, Peptide XB-C8; A: Milli-Q H₂O (0.05% TFA), B: Acetonitrile, 10 to 60% linear gradient of B into A over 15 min, F = 1 mL/min).

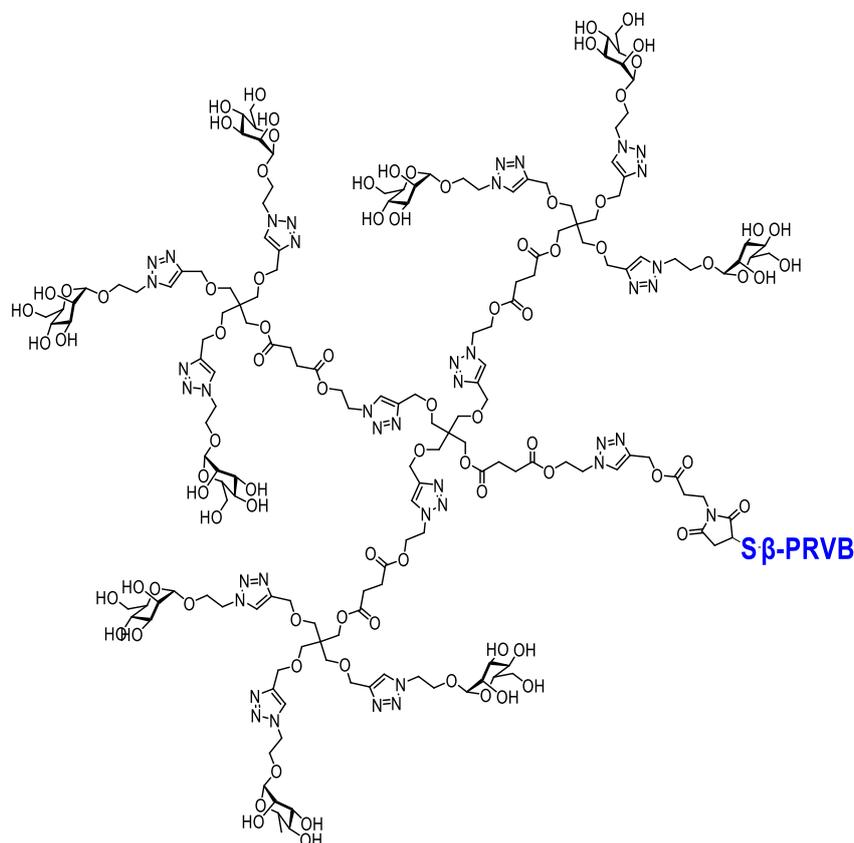
TLR4 Ligand dimer conjugate, 49



A solution of peptide Pru p 3 SH (1.2 mg, 0.54 μmol) in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 37 μL) and Milli-Q water (74 μL) was added to a solution of dimer **38** (0.70 mg, 0.45 μmol) in DMSO (220 μL). After shaking for approx. 25 min at room temperature (the progression of the reaction was monitored by analytical RP-HPLC), 1 ml of Milli-Q water was added until precipitation and the supernatant was removed. The precipitate was dissolved in DMSO and MeOH was added until the solution was cloudy. After

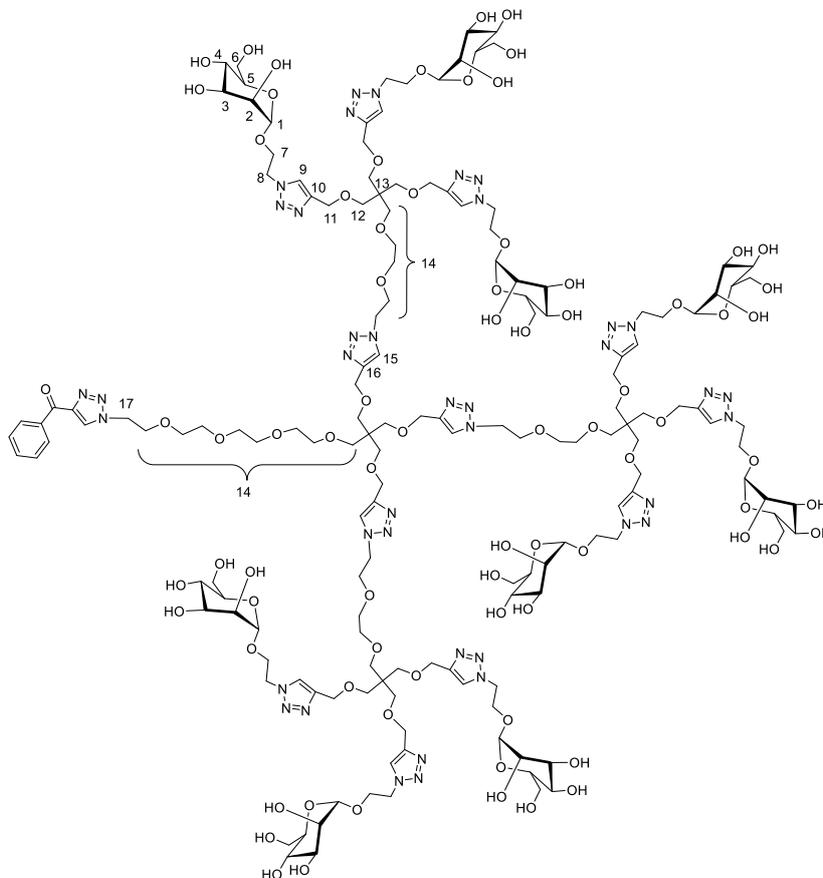
8.5 Synthesis of conjugated glycodendrons

Conjugated glycodendron **53**



A solution of peptide β -PRVB-SH (0.67 mg, 0.69 μ mol) in Milli-Q water (338 μ L) was added to a solution of glycodendron **52** (2.60 mg, 0.63 μ mol) in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 476 μ L). After shaking for aprox. 25 min at room temperature (the progression of the reaction was monitored by analytical RP-HPLC), only a signal corresponding to the final product was observed. To remove salts, the solution was filtered using an Amicon Ultra centrifugal filter (Ultra-15, MWCO 3KDa) and after washing with Milli-Q water in a centrifuge at 4000 rpm, the collected aqueous phase was lyophilized, affording the corresponding conjugate **53** as a white solid (3.2 mg, quant). ESI-MS m/z calcd.: 5091.15 $[M]^+$, found: 1274.2 $[M + 4H]^{4+}$, 1699.3 $[M + 3H]^{3+}$. RP-HPLC t_R = 7.96 min (Column: analytical BioZen, 3.6 μ m, Peptide XB-C8; A: Milli-Q H₂O (0.05% TFA), B: Acetonitrile; 15 to 60% linear gradient of B into A over 15 min, F= 1 mL/min).

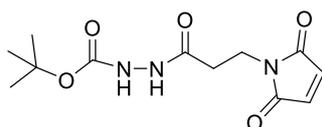
Glycodendron 54



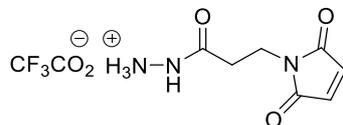
To a solution of mannose nonavalent glycodendron **IV** (112 mg, 0.030 mmol) and 1-phenyl-2-propyn-1-one (19.3 mg, 0.15 mmol) in DMF (1.6 mL), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3.7 mg, 0.015 mmol) and TBTA (15.7 mg, 0.03 mmol) dissolved in DMF (1.0 mL) and finally sodium ascorbate (9.4 mg, 0.05 mmol) in 0.4 mL of phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) were added to the mixture. The solution was stirred at room temperature overnight. Then, copper was removed by adding a metal scavenger resin, Quadrasil[®] Mercaptopropyl (a spatula tip) and stirred for 15 min at room temperature. After that, the mixture in DMF was filtered and the resulting solution was directly purified by semipreparative RP-HPLC (C18 Phenomenex Luna column, 10×250 mm, 10 μm); A: Milli-Q H_2O (0.05 % TFA), B: Acetonitrile; 18 to 25% linear gradient of B into A over 40 min, F= 3 mL/min. The corresponding analyzed fractions were collected and lyophilized affording the corresponding glycodendron **54** (43.5 mg, 37%) as a white amorphous solid. ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ : 8.59 ($\text{H}_{\text{triazole}}$, s, 1H), 7.92 ($\text{H}_{\text{triazole}}$, s, 9H), 7.88-7.38 ($\text{H}_{\text{triazole}}$, ArCH, m, 5H), 7.53 (ArCH, t, J = 7.53 Hz, 1H), 7.39 (ArCH, t, J = 7.53 Hz, 2H), 4.70 (H_1 ,

overlapped with water signal, 9H), 4.58-4.49 (H₈, m, 18H), 4.48-4.33 (H₁₁, H₇, m, 36H), 4.01-3.95 (H₂, m, 9H), 3.89 (H₁₇, t, *J*= 5.0 Hz, 2H), 3.89-3.15 (H₃, H₄, H₆, H₁₂, H₁₄, m, 122H), 3.01-2.96 (H₅, m, 9H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 179.1, 145.6, 144.2, 144.1, 134.1, 130.1, 129.8, 125.3, 125.0, 99.5, 72.8, 70.4, 69.9, 69.6, 69.4, 68.9, 68.7, 68.4, 68.2, 66.3, 65.4, 63.5, 60.6, 50.3, 50.0, 44.8. ESI-MS *m/z* calcd. for C₁₅₇H₂₄₉O₇₇N₃₉: 3912.7 [M]⁺; found: 1001.4 [M + 4Na]⁴⁺, 1327.0 [M + 3Na]³⁺, 1979.2 [M + 2Na]²⁺. RP-HPLC *t_R* = 7.4 min (Column: analytical BioZen, 3.6 μm, Peptide XB-C8; A: Milli-Q H₂O (0.05% TFA), B: Acetonitrile; 20 to 25% linear gradient of B into A over 15 min, F = 1 mL/min).

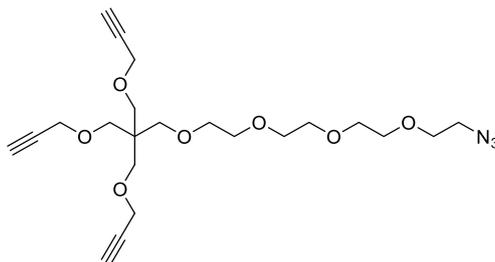
***tert*-Butyl 2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoyl)hydrazine-1-carboxylate (55)**



3-Maleimidopropionic acid (**9**) (400 mg, 2.36 mmol), *tert*-butylcarbazate (469 mg, 3.55 mmol) and NHS (190 mg, 1.65 mmol) were dissolved in anhydrous DCM (9.4 mL). To this solution, DCC (732 mg, 3.55 mmol) dissolved in anhydrous DCM (4.0 mL) was added dropwise and stirred at room temperature overnight. Then, the solvent was removed under high vacuum and the crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM/ MeOH, 30:1) affording **55** (408 mg, 58%) as a white solid. ¹H NMR (MeOH-d₄, 400 MHz) δ: 6.81 (CH, s, 2H), 3.81 (NCH₂CH₂, t, *J*= 7.3 Hz, 2H), 2.55 (NCH₂CH₂, t, *J*= 7.3 Hz, 2H), 1.48 (CH₃, s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, MeOH-d₄) δ: 170.5 (CH₂NHCO), 169.5 (CO_{maleimide}), 155.5 (NHCOO), 134.2 (CH_{maleimide}), 81.9 (C(CH₃)₃), 33.9 (NCH₂CH₂), 32.3 (NCH₂CH₂), 28.1 (CH₃).

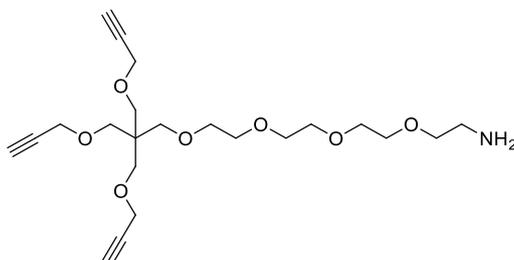
***N*-[β -Maleimidopropionic acid] hydrozide trifluoroacetate salt (**56**)**

Compound **55** (23 mg, 0.08 mmol) was dissolved in TFA (430 μ L) and stirred at 0°C for 8 min. The solvent was removed under high vacuum and Et₂O was added until precipitation. The precipitate was filtered to provide compound **56** (24 mg, quant.) as a white solid. ¹H NMR (MeOH-d₄, 400 MHz) δ : 6.81 (CH, s, 2H), 3.84 (NCH₂CH₂, t, *J*= 7.3 Hz, 2H), 2.59 (NCH₂CH₂, t, *J*= 7.3 Hz, 2H).

1-Azido-14,14-bis((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)-3,6,9,12,16-pentaoxanonadec-18-yne (58**)²⁶⁷**

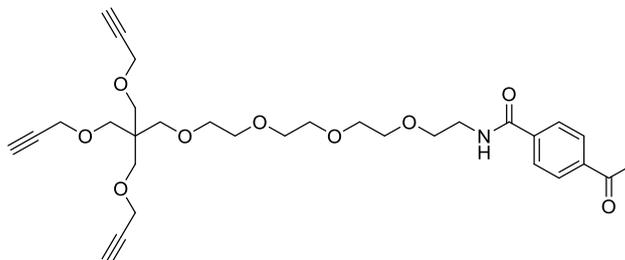
A solution of **XV** (275 mg, 0.62 mmol) in DMF (9.2 mL) was added TBAI (a spatula tip) and sodium azide (402 mg, 6.2 mmol). Then, the mixture was stirred at 60°C for 20h. The solvent was removed under high vacuum and the crude was purified by column chromatography on silica gel (hexane/ethyl acetate, 2:1) to afford compound **58** as a colourless oil (278 mg, quant.). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 4.14 (HCCCH₂O, d, *J*= 2.5 Hz, 6H), 3.70-3.41 (CH₂PEG, CH₂N₃, CH₂OC, m, 24H), 2.43 (HCCCH₂O, t, *J*= 2.4 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 80.1 (CCH), 74.1 (CCH), 71.1, 70.8, 70.7, 70.0 (CH₂PEG), 69.8 (CH₂O-PEG), 69.1 (CH₂OCH₂CCH), 58.7 (CH₂CCH), 50.7 (CH₂N₃) 45.0 (C(CH₂)₃).

**14,14-Bis((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)-3,6,9,12,16-pentaoxanonadec-18-yn-1-amine
(59)³³⁹**

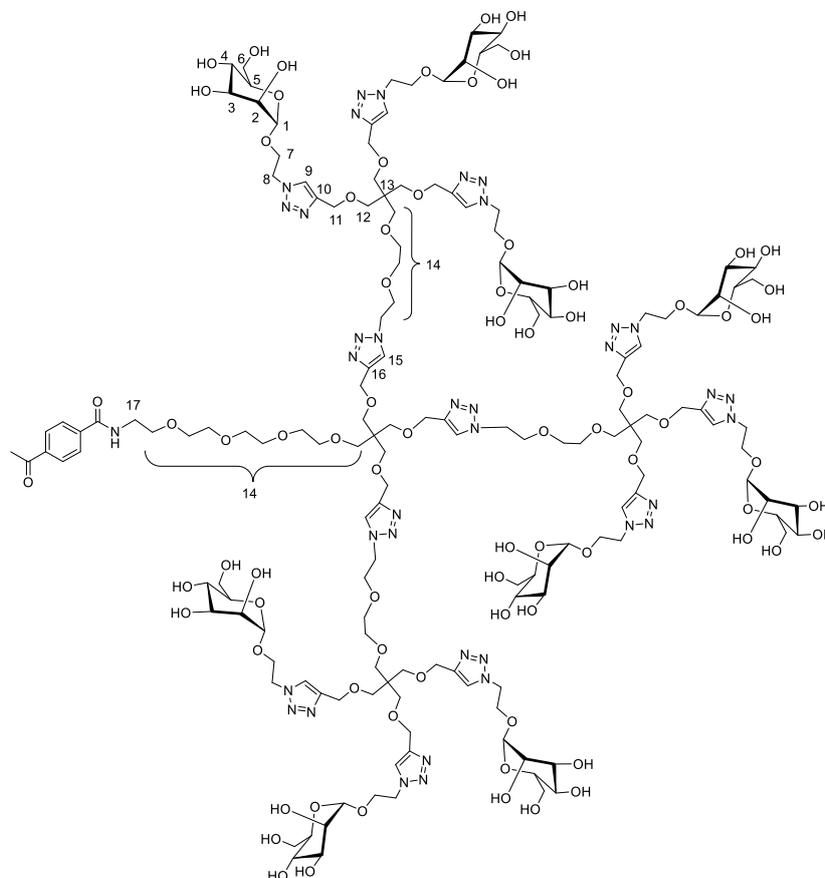


A solution of azide derivative **58** (203 mg, 0.45 mmol) was dissolved in a mixture of Et₂O/THF/HCl 1M (2.5 mL, 0.5 mL, 2.5 mL) and a solution of triphenylphosphine (295 mg, 1.2 mmol) in Et₂O (5.8 mL) was added dropwise during 2 h at room temperature and stirred for 18h. Then, the reaction was quenched by addition of HCl 4M and the aqueous phase was washed with Et₂O (20x2 mL) and basified at pH 14 by addition of NaOH pads keeping the solution cold with an ice bath. The aqueous phase was extracted with DCM (15x5 mL), the organic phases were combined and the solvent was removed under vacuum to afford the product **59** as a yellow oil (110 mg, 57%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 4.11 (HCCCH₂O, d, *J*= 2.5 Hz, 6H), 3.65-3.44 (CH₂PEG, CH₂OC, m, 22H), 2.86 (CH₂NH₂, t, *J*= 5.1 Hz, 2H), 2.41 (HCCCH₂O, s, 3H), 1.55 (NH₂, brs, 2H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 80.0 (CCH), 74.1 (CCH), 71.2, 70.5, 70.4, 70.3, 70.2 70.1 (CH₂PEG), 69.8 (CH₂O-PEG), 69.0 (CH₂OCH₂CCH), 58.7 (CH₂CCH), 44.9 (C(CH₂)₃), 40.9 (CH₂NH₂). ESI-MS *m/z* calcd. for C₂₂H₃₅O₇N: 425.1 [M]⁺; found: 426.3 [M + H]⁺.

4-Acetyl-N-(14,14-bis((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)-3,6,9,12,16-pentaoxonadec-18-yn-1-yl)benzamide (60)



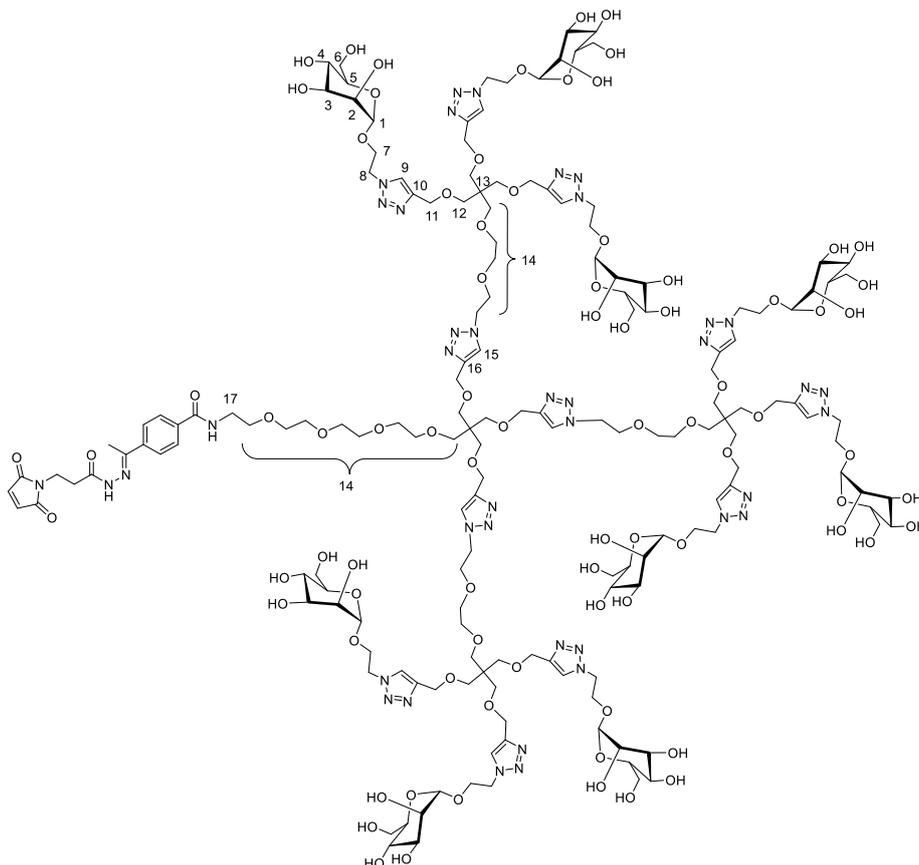
Compound **59** (49 mg, 0.11 mmol), anhydrous DIPEA (48.1 μ L, 0.28 mmol), and 4-acetylbenzoic acid (21 mg, 0.13 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (1 mL). To this solution, HATU (48.1 mg, 0.13 mmol) dissolved in anhydrous DMF (0.5 mL) was added and stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under high vacuum and the crude was purified by column chromatography on silica gel (hexane/ethyl acetate, 1:0.5) to afford the product **60** as a colourless oil (42 mg, 64%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.03 (ArCH, d, $J= 8.4$ Hz, 2H), 7.94 (ArCH, d, $J= 8.4$ Hz, 2H), 7.18 (NH, s, 1H), 4.12 (HCCCH₂O, d, $J= 2.4$ Hz, 6H), 3.70-3.51 (CH₂PEG, CH₂OC, m, 24H), 2.66 (CH₃, s, 3H), 2.41 (HCCCH₂O, t, $J= 2.4$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 197.65 (CO), 167.4 (CONH), 139.2 (ArC), 138.1 (ArC), 128.5 (ArCH), 127.5 (ArCH), 79.7 (CCH), 74.5 (CCH), 71.4, 70.9, 70.8, 70.1, 70.0 (CH₂PEG), 69.9 (CH₂O-PEG), 69.7 (CH₂OCH₂CCH), 58.8 (CH₂CCH), 44.8 (C(CH₂)₃), 39.9 (CH₂NHCO), 26.9 (OCCH₃). ESI-HRMS m/z calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{O}_9\text{NNa}$: 594.2679; found: 594.2674.

Glycodendron **61**

To a solution of mannose trivalent dendron **III** (140 mg, 0.126 mmol), **60** (20 mg, 0.035 mmol) in a mixture phosphate buffer/THF (1:1, 1.6mL) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3.5 mg, 0.01 mmol) and TBTA (14.8 mg, 0.03 mmol) dissolved in a mixture PBS/THF (1:1, 1.6 mL), and finally sodium ascorbate (11.1 mg, 0.06 mmol) in 0.4 mL of phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) were added. The solution was stirred at room temperature overnight. Then, copper was removed by adding a metal scavenger resin, Quadrasil[®] Mercaptopropyl (a spatula tip) and stirred for 15 min at room temperature. After that, the mixture was filtered, washed with MeOH and the solvent was removed under vacuum. The resulting crude was purified by size exclusion chromatography, Sephadex LH20 (100% MeOH), giving the mannose nonavalent dendron **61** as a white foam (82 mg, 60%). ¹H NMR (D_2O , 400 MHz) δ : 8.59 ($\text{H}_{\text{triazole}}$, s, 1H), 7.92 ($\text{H}_{\text{triazole}}$, s, 9H), 7.88-7.38 ($\text{H}_{\text{triazole}}$, ArCH, m, 5H), 7.53 (ArCH, t, $J = 7.53$ Hz, 1H), 7.39 (ArCH, t, $J = 7.53$ Hz, 2H), 4.70 (H_1 , overlapped with water signal, 9H), 4.52-4.35 (H_{11} , H_8 , H_7 , m, 54H), 3.98 (H_2 , m, 9H), 3.81-3.75 (H_{14} , m, 28H), 3.65-3.20 (H_3 , H_4 , H_6 , H_{12} , H_{14} , H_{17} , m, 98H), 3.00 (H_5 , m, 9H), 2.51

(CH₃, s, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 202.1 (CO), 169.2 (HNCO), 144.3 (C10), 144.2 (C16), 138.7 (ArC), 138.0 (ArC), 128.7 (ArCH), 127.5 (ArCH), 125.3 (C9), 125.0 (C15), 99.5 (C1), 72.7 (C5), 70.4 (C3), 69.9 (C2), 69.6 (C12), 69.6, 68.7, 68.2 (C14), 66.4 (C4), 65.4 (C7), 63.5 (C11), 60.6 (C6), 50.0 (C8), 44.8 (C13), 44.7 (C17), 26.4 (CH₃). ESI-MS m/z calcd. for C₁₅₇H₂₅₁O₇₈N₃₇: 3902.7 [M]⁺; found: 998 [M + 4Na]⁴⁺, 1323.3 [M + 3Na]³⁺, 1973.4 [M + 2Na]²⁺, 3925.8 [M + Na]⁺. RP-HPLC t_R = 8.5 min (Column: analytical BioZen, 3.6 μm, Peptide XB-C8; A: Milli-Q H₂O, B: Acetonitrile; 15 to 35% linear gradient of B into A over 15 min, F = 1 mL/min).

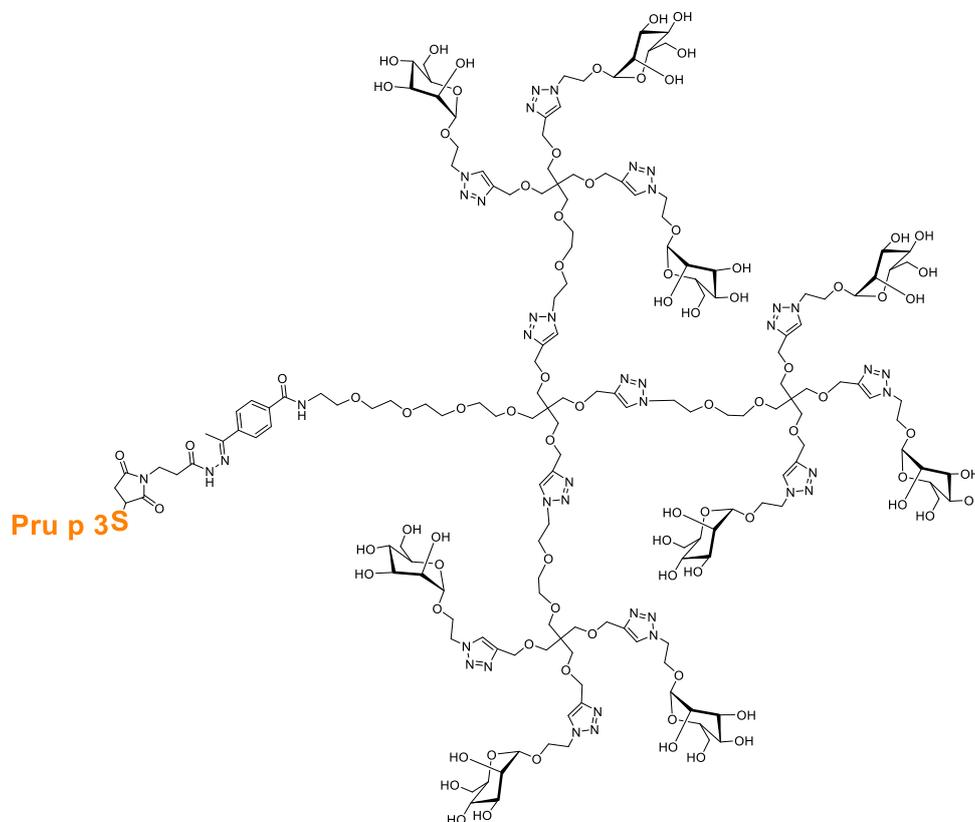
Hydrazone glycodendron **62**



Mannose nonavalent dendron **61** (8.9 mg, 2.28 μmol) and 3-maleimidobenzoic acid hydrazide trifluoroacetate **56** (3.4 mg, 11.40 μmol) were combined in anhydrous methanol (950 μL). Then, CeCl₃·7H₂O (0.1 mg, 0.23 μmol) in anhydrous methanol (275

μL) was added and the mixture was stirred in the dark at room temperature for 12 h. After that, the solvent was removed under vacuum and the resulting crude was purified by size exclusion chromatography, Sephadex LH20 (100% MeOH), giving the mannose nonavalent dendron **62** as a white foam (9.0 mg, 97%). ¹H NMR (MeOH-d₄, 400 MHz) δ: 8.01-7.95 (H_{triazole}, ArCH, m, 14H), 7.92-7.84 (ArCH, m, 2H), 6.85 and 6.71 (CH_{maleimide}, s, 2H), 4.70 (H₁, overlapped with water signal, 9H), 4.75-4.50 (H11, H8, H7, m, 54H), 4.13 (H2, m, 9H), 3.90-3.78 (H2, H14, CH₂CH₂-maleimide, m, 30H), 3.70-3.37 (H3, H4, H6, H12, H14, H17, m, 98H). 3.32 (H5, overlapped with methanol signal, 9H), 2.64 (CH₂CH₂-maleimide, brs, 2H), 2.35 and 2.28 (CH₃, s, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 171.2 (CO_{maleimide}), 166.9 (NHNCO), 166.3 (Ar-CONH), 155.4 (CH₃CNNH), 147.4 (ArC), 147.2 (ArC), 144.5 (C10), 144.4 (C16), 135.0 (CH_{maleimide}), 127.7 (ArCH), 126.3 (ArCH), 124.5 (C9), 124.4 (C15), 100.3 (C1), 74.6 (C5), 71.5 (C3), 70.9 (C12), 70.5 (C2), 70.2, 69.6, 69.1, (C14), 67.2 (C4), 65.4 (C7), 64.6 (C11), 61.6 (C6), 49.7 (C8), 49.1 (C13), 45.4 (C17), 40.7 (CH₂CH₂-maleimide), 34.0 (CH₂CH₂-maleimide), 20.1 (NCH₃). ESI-MS m/z calcd. for C₁₆₄H₂₅₈O₈₀N₄₀: 4070.1 [M]⁺; found: 815.2 [M + 5H]⁵⁺, 1018.5 [M + 4H]⁴⁺, 1357.4 [M + 3H]³⁺. RP-HPLC t_R = 8.2 min (Column: analytical BioZen, 3.6 μm, Peptide XB-C8; A: Milli-Q H₂O, B: Acetonitrile; 15 to 35% linear gradient of B into A over 15 min, F = 1 mL/min).

Conjugated glycodendron **63**



Peptide Pru p 3-SH (0.65 mg, 0.29 μmol) and glycodendron **62** (1.17 mg, 0.29 μmol) were dissolved in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 420 μL). After shaking for approx. 25 min at room temperature, the consumption of glycodendron **62** was monitored by analytical RP-HPLC. The solution was filtered using an Amicon Ultra centrifugal filter (Ultra-15, MWCO 3KDa) and after washing with Milli-Q water in a centrifuge at 4000 rpm, the collected aqueous phase was lyophilized, affording the conjugate **63** as a white solid (1.7 mg, 94%). ESI-MS m/z calcd.: 6325.2 $[\text{M}]^+$; found: 792.1 $[\text{M} + 8\text{H}]^{8+}$, 905.0 $[\text{M} + 7\text{H}]^{7+}$, 1055.5 $[\text{M} + 6\text{H}]^{6+}$, 1266.3 $[\text{M} + 5\text{H}]^{5+}$, 1582.4 $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$.

8.6 Evaluation of hydrazone **62** hydrolysis at different pH

Studies at different pH were performed with hydrazone **62**. Four buffer solutions were prepared with a concentration of 50 mM. One phosphate buffer at pH 7.4 and three citrate buffers at pH= 3, 5 and 6. 300 μL of a stock solution of hydrazone **62** in MeOH (0.5 mM)

were diluted 1:2 with each of the buffer solutions. The solutions were incubated in a thermostated bath at 37°C with stirring. Then, 10 µL of sample were analyzed at $\lambda = 275.6$ nm by RP-HPLC (analytical column BioZen, 3.6 µm, Peptide XB-C8; A: Milli-Q H₂O, B: Acetonitrile; 15 to 35% linear gradient of B into A over 15 min, F= 1 mL/min) every 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h and after 36 h.

8.7 Biological assays

All the results of biological studies of the Pru p 3-adjuvant conjugates described in this doctoral thesis were carried out by the allergology group of Dr. Cristobalina Mayorga (Hospital Regional Universitario de Málaga).

8.7.1 Allergic patients and tolerant controls

For all these studies were included Pru p 3 (peach) allergic patients. Inclusion criteria were: clear clinical history of peach allergy, a positive skin prick test (SPT), and specific IgE (sIgE) to Pru p 3 or a positive oral food challenge (OFC) to unpeeled-peach. OFC was not performed in patients with a history of more than two episodes of anaphylaxis after peach ingestion in the two years preceding the study. A tolerant control group of subjects with negative SPT and sIgE results, and good tolerance to unpeeled-peach was also included. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the local ethics committee. All participants signed informed consent forms before the study began.

8.7.2 Generation of moDCs

Fresh peripheral blood mononuclear cells, obtained by a ficoll gradient from 40 mL of blood per individual, were used for monocyte purification by means of anti-CD14 microbeads following the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The CD14⁻ cell fraction was placed in 10% DMSO and frozen for a later lymphocyte proliferation test. To generate DCs, monocytes (CD14⁺ cells) were incubated in complete medium containing Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (Thermo

Fisher Scientific, Carlsbad, CA) supplemented with 10% FBS (Thermo Fisher Scientific), streptomycin (100 µg/mL), and gentamicin (1.25 U/mL), as well as recombinant human rhGM-CSF (200 ng/mL) and rhIL-4 (100 ng/mL) (both from R&D Systems Inc, Minneapolis, MN) for 5 days at 37°C and 5% CO₂.

8.7.3 Fluorescent labelling of Pru p 3 conjugates

Pru p 3 conjugates were labelled with Alexa Fluor 647 NHS Ester (Succinimidyl Ester) according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). After 1 hour of incubation with constant stirring in the dark, the uncoupled free Alexa Fluor 647 was removed by gel filtration column (PD MiniTRap G-25 column, GE Healthcare, Chicago, IL) with PBS. The conjugates were concentrated with Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

8.7.4 Studies by flow cytometry and confocal microscopy

Immature moDCs were cultured with 10 nM of corresponding compounds at different time points (from 15 min to 48 h) at 37°C. The moDC were stained with anti-human-CD86 (Becton Dickinson (BD) Bergen, NJ) and analyzed using flow cytometry. Cells were acquired in a FACSCanto II Cytometer (BD) and data analyzed using FlowJo[®] software (Tree Star, Inc., Ashland, OR). Results were expressed as mean intensity fluorescence (MIF) and as percentages of double positive cells for CD86 and fluorescent conjugates. Following incubation with the corresponding compounds at different time points, moDCs were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde for 1 h, washed three times with PBS, and stored protected from light at 4°C until analysis. Submembrane actin and nuclei (DNA) were labeled by 20 min incubations with 10 µM Atto 488-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and 1 µg/mL Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich), respectively. Once prepared, moDCs were either mounted on glass slides in Fluoroshield mounting medium (Sigma-Aldrich) or transferred to optical bottom 96-well plates (Nunc) in PBS for observation by confocal microscopy. For the lysosome staining, after fixation, cells were permeabilized with saponin (0.1% in PBS with 2% bovine serum albumin V fraction (Sigma-Aldrich) followed by an overnight incubation at 4°C with the

primary rabbit LAMP-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) antibody using a 1:25 dilution followed by a 1 h incubation at room temperature with a secondary anti-rabbit Cy2- conjugated antibody (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Cells were washed three times after each antibody incubation and finally mounted on glass slides. Samples were analyzed using a Leica DM6000 inverted microscope connected to a Leica SP5 laser scanning confocal system and Fiji software.

8.7.5 moDC maturation studies

To assess changes in the moDC maturation state after stimulation, 10^5 moDCs /mL were incubated in 96-well plates (Thermo-Fisher Scientific) with the corresponding compounds. All experiments were done at 10 nM (This concentration was shown to be effective in preliminary experiments). Moreover, LPS (Sigma-Aldrich) was included as positive controls (100 μ g/mL), and complete medium as negative control, for 48 hours at 37°C in 5% CO₂. After this, moDCs were harvested and their maturation status assessed by analysing the expression of CD80, CD83, CD86 and PD-L1 molecules (BD and Biolegend, San Diego, CA). Cells were acquired in a FACSCanto II Cytometer (BD) and data analyzed using FlowJo® software (Tree Star, Inc). Results were expressed as maturation index (MI).

8.7.6 Specific proliferative response of different cell subpopulations

The specific proliferation of different lymphocyte subpopulations was evaluated using, as antigen presenting cells (APC), autologous moDCs pre-stimulated with 10 nM of different experimental combinations for 48 h previously described. Proliferation was determined using a 5,6-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE) dilution assay (Thermo Fisher Scientific). A total of 1.5×10^6 /mL pre-labelled CD14⁻ cells were cultured with different experimental combinations-pre-stimulated-moDC (10:1 ratio) at a final volume of 250 μ L of complete medium, in 96-well plates for 6 days at 37°C and 5% CO₂. 10 μ g/mL phytohemagglutinin (Sigma-Aldrich) was used as positive proliferative control and unstimulated moDCs as negative proliferative control. The proliferative responses were assessed by flow cytometry, analyzing CFSElow expression in the different cell subsets as lymphocytes T (CD3⁺T, CD4⁺T and CD8⁺T), lymphocytes B (CD19⁺B) and NK cells (CD56⁺NK). Results were expressed as proliferation index

(PI). The PI was calculated for each cell subset as $([\% \text{ CFSE}_{\text{low}} \text{ stimulated PBMCs+DC}] - [\% \text{ CFSE}_{\text{low}} \text{ stimulated PBMCs}] / (\% \text{ CFSE}_{\text{low}} \text{ unstimulated PBMCs+DCs}))$. In addition, the percentages of regulatory T (Treg) cells were also evaluated by flow cytometry, analyzing the expression of the $\text{CD4}^+\text{CD127}^{-/\text{low}}\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ markers.

8.7.7 Cytokine determination

To determine cytokine production from the corresponding compounds of specific T lymphocytes, the supernatants from moDC (48 h of culture) and the lymphocyte cultures (6 days) were collected, and cytokine production (IL-4, IL-5, IL-10 and $\text{IFN}\gamma$) was determined with a human ProcartaPlex Multiplex Immunoassays kit (Thermo Fisher Scientific), following the manufacturer's indications and detected in a Bio-Plex 200 (Bio-Rad, Hercules, CA). Data were analyzed using Bio-Plex® Data Analysis Software (Bio-Rad, Hercules, CA).

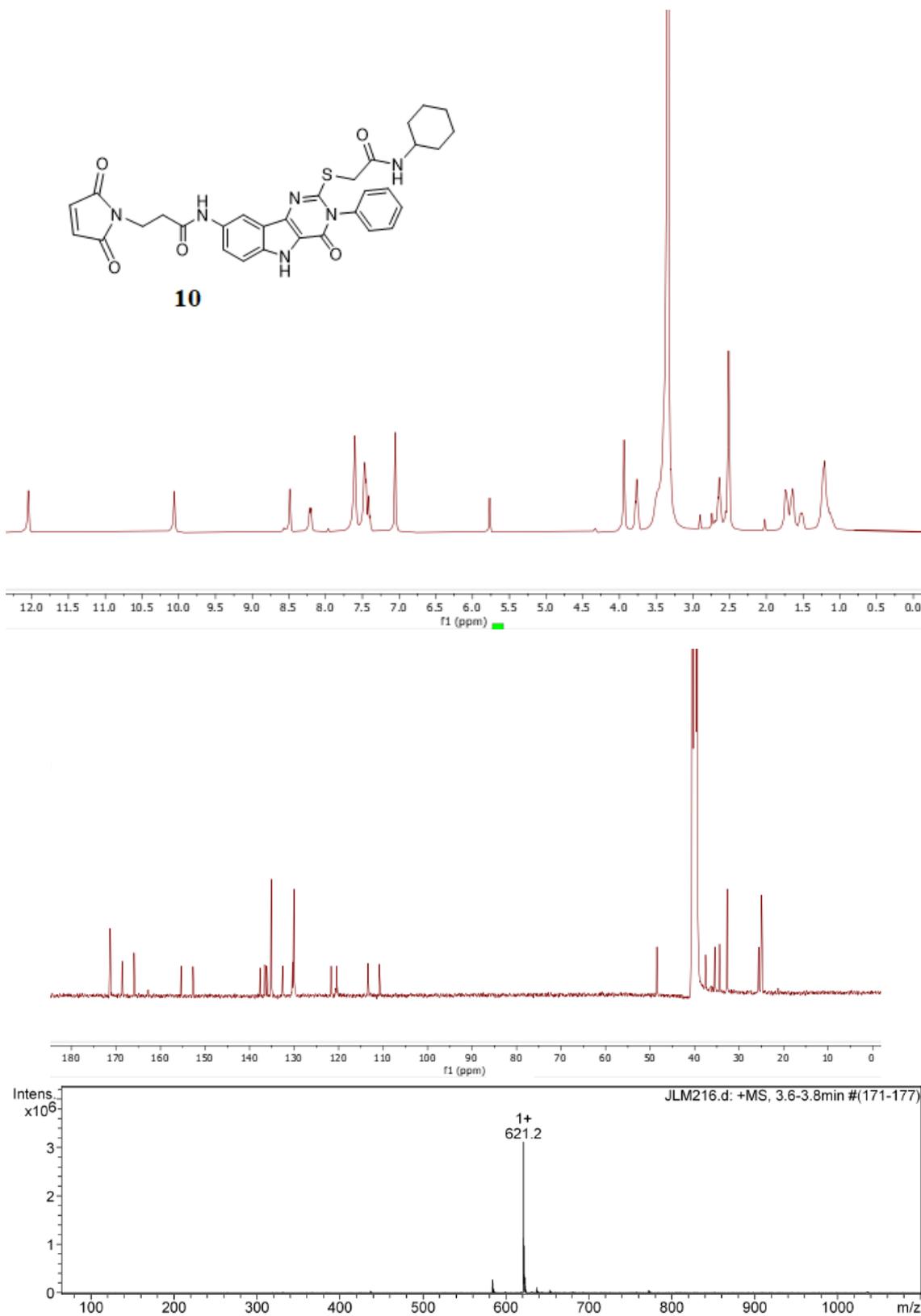
8.7.8 Statistic

The data were analyzed using the Shapiro-Wilk test to determine the normal distribution but the most variables were fitted to non-parametric distribution. The Friedman test was used to find significant differences due to the effects of different compounds between subjects from the same group. In the case that the Friedman test indicated the existence of significant differences between treatments, we applied Mann-Whitney U test for pairwise comparisons between unrelated groups and Wilcoxon signed-rank test was used for pairwise comparisons in related samples. Bonferroni correction was used to reduce the threshold for significance as indicated in each study. The Kruskal-Wallis test was used to compare between different groups of subjects (allergic patients vs. tolerant controls).

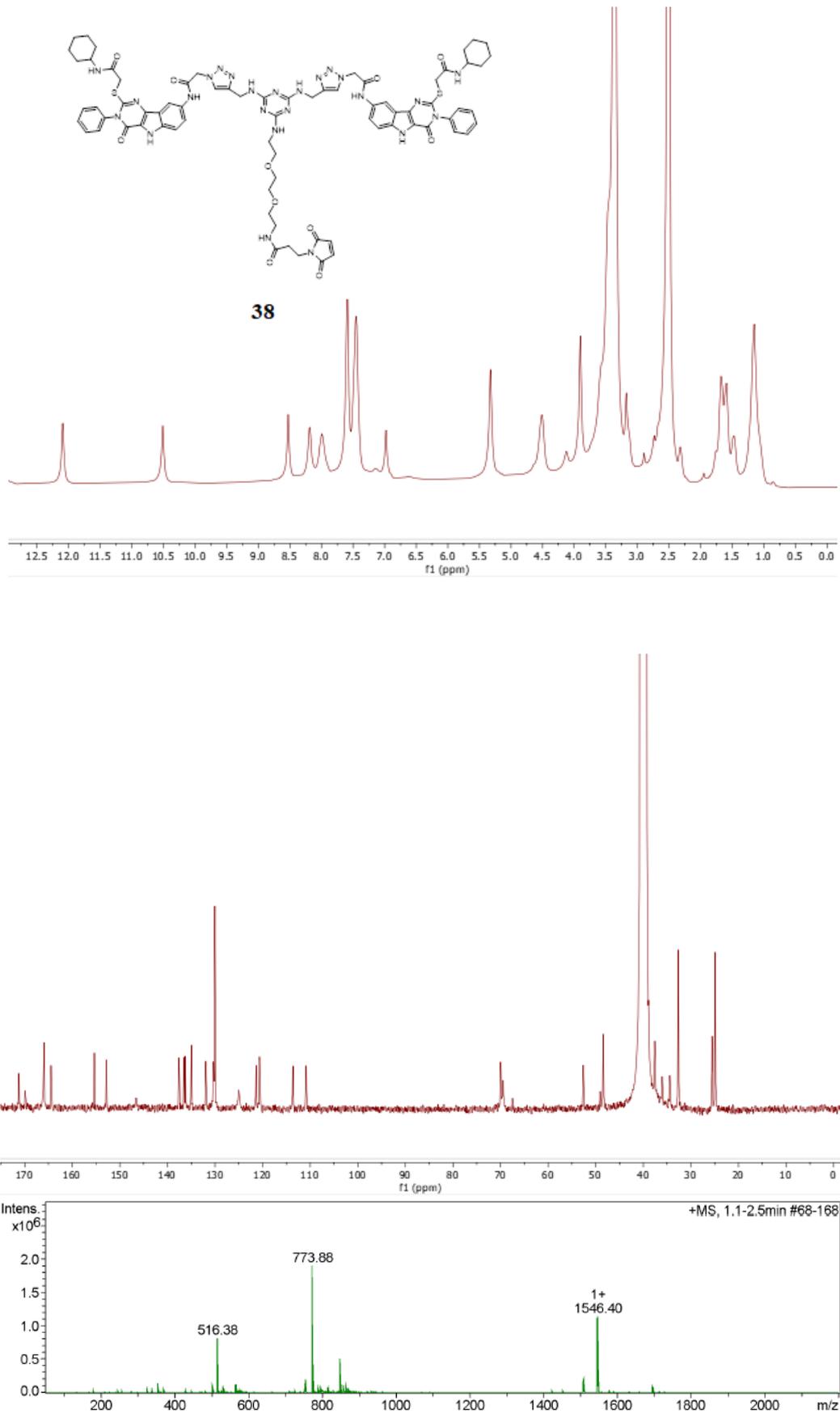
Appendix 1

Selection of spectra and chromatograms

Appendix 1. Selection of spectra and chromatograms

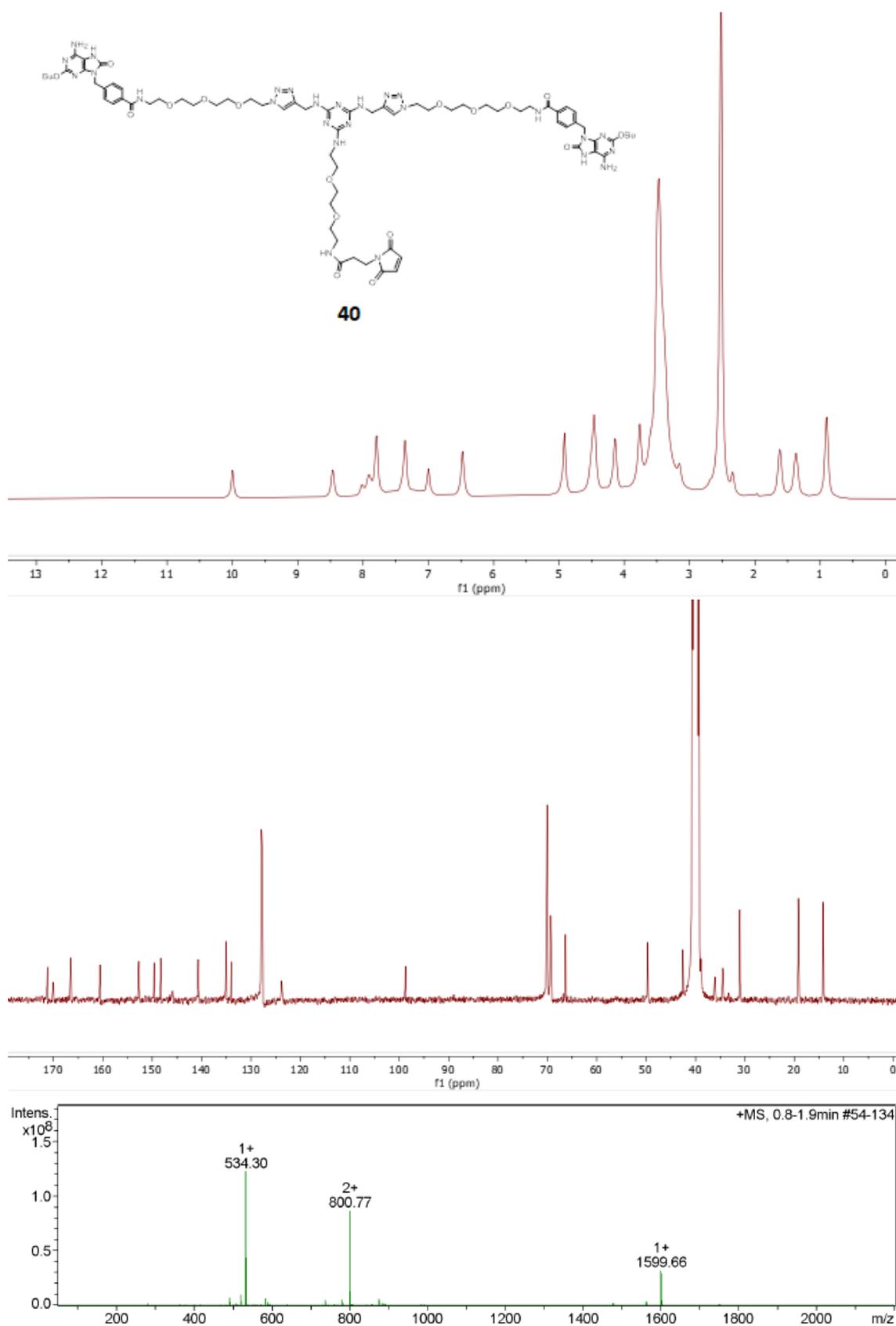


Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , 298 K), $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) y de ESI-MS del compuesto **10**, según orden de aparición.

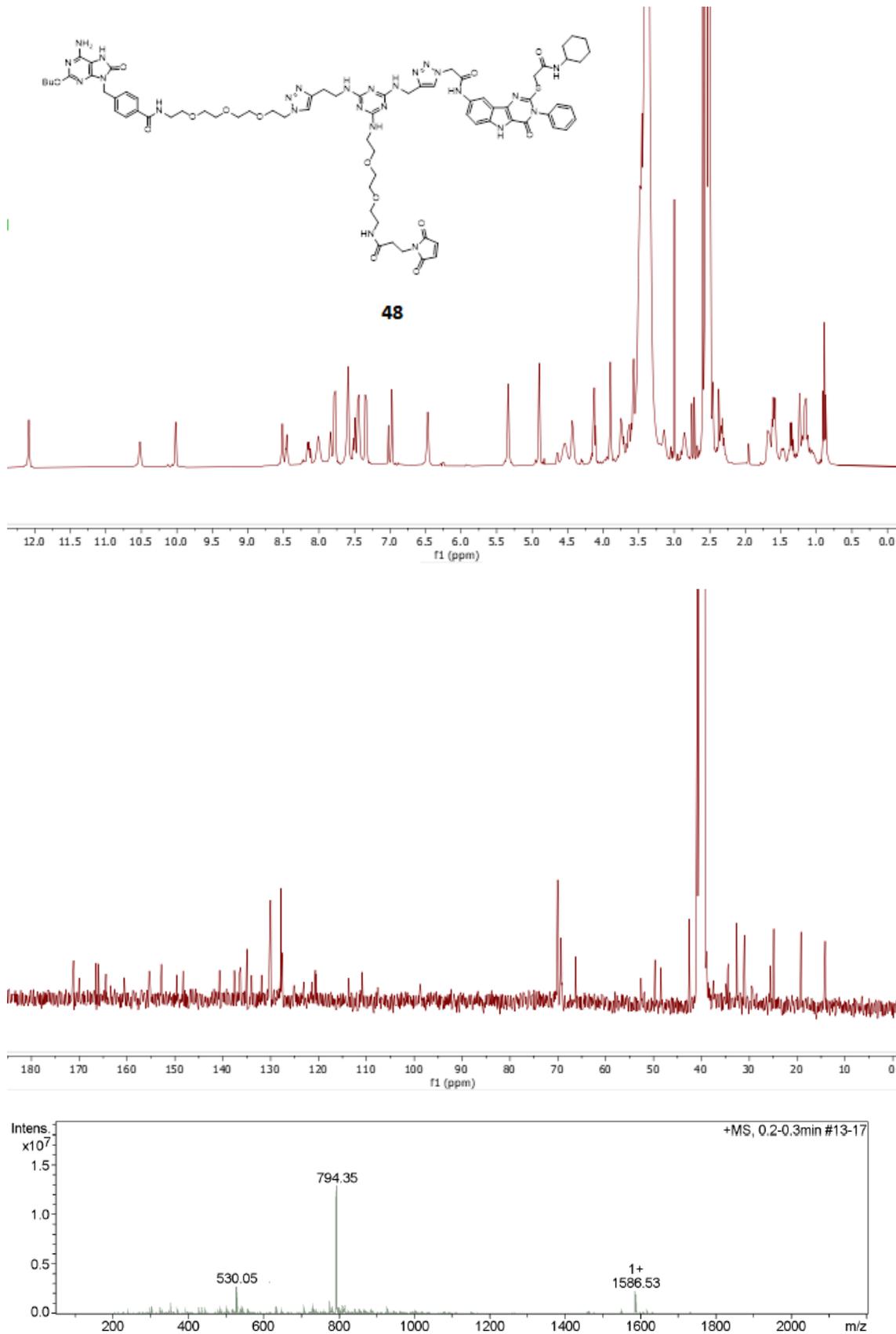


Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , 298 K), $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) y de ESI-MS del compuesto **38**, según orden de aparición.

Appendix 1

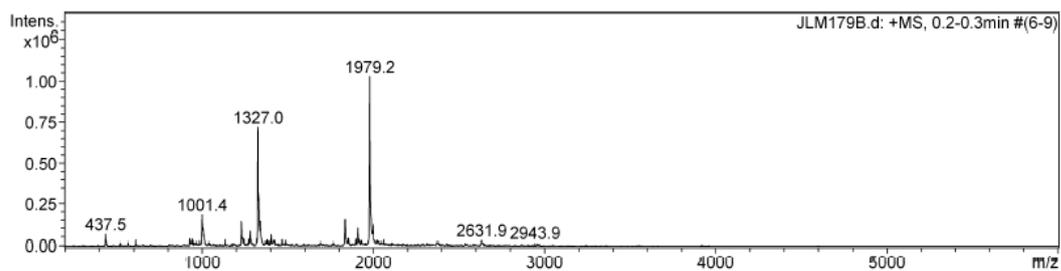
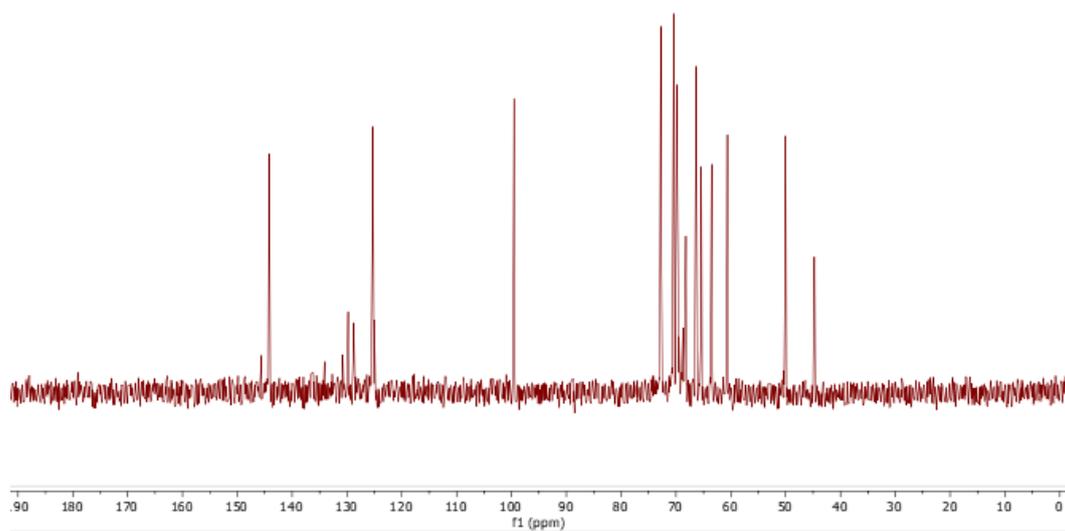
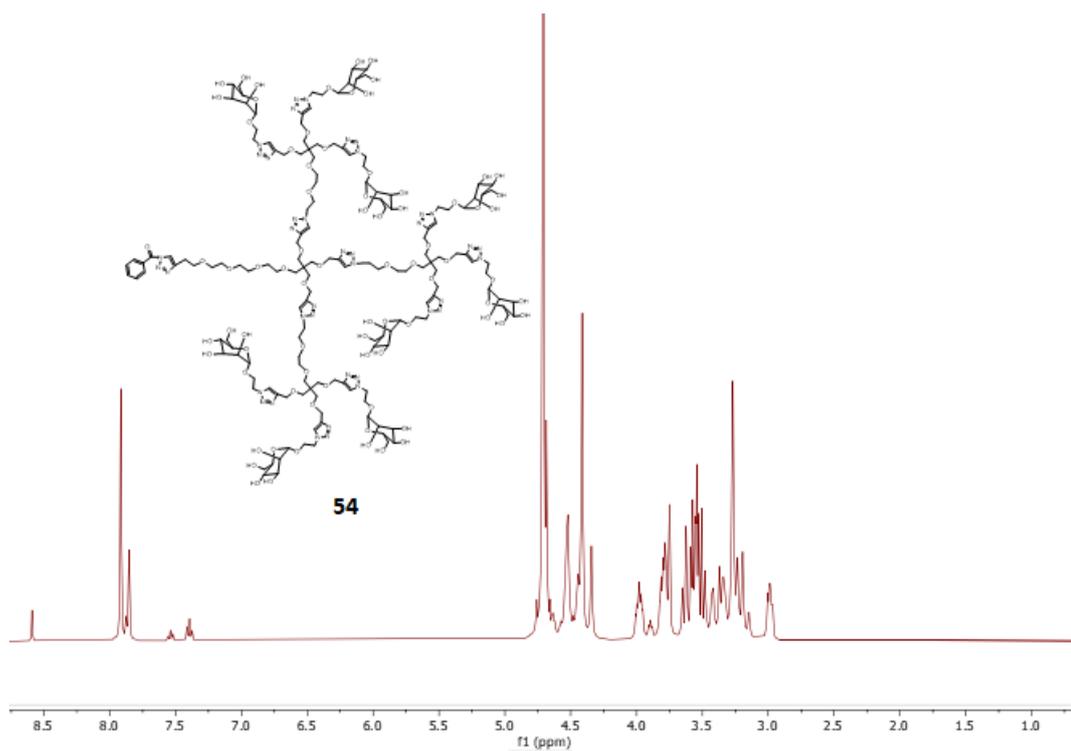


Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , 298 K), $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) y de ESI-MS del compuesto **40**, según orden de aparición.

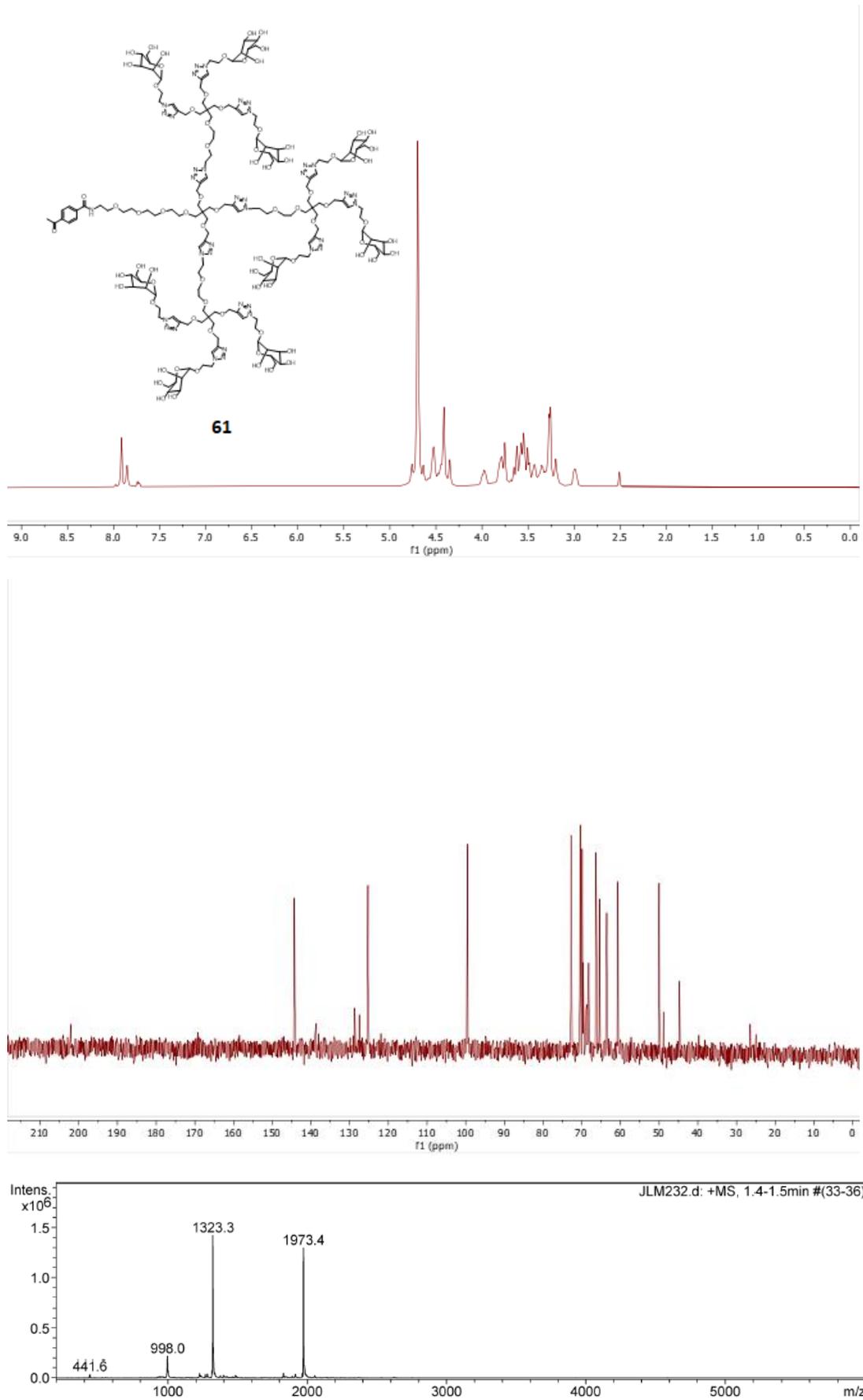


Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , 298 K), $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) y de ESI-MS del compuesto **48**, según orden de aparición.

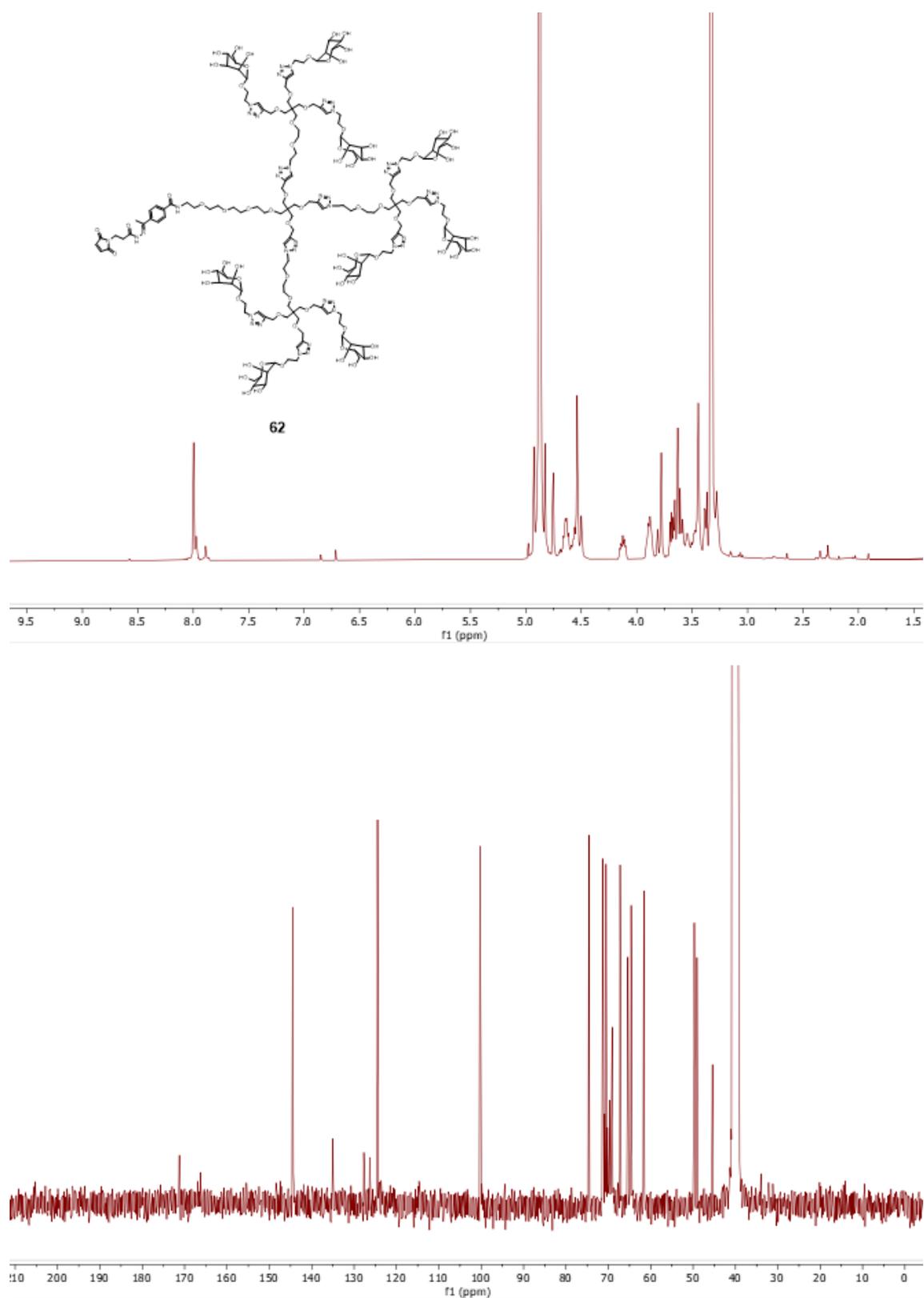
Appendix 1



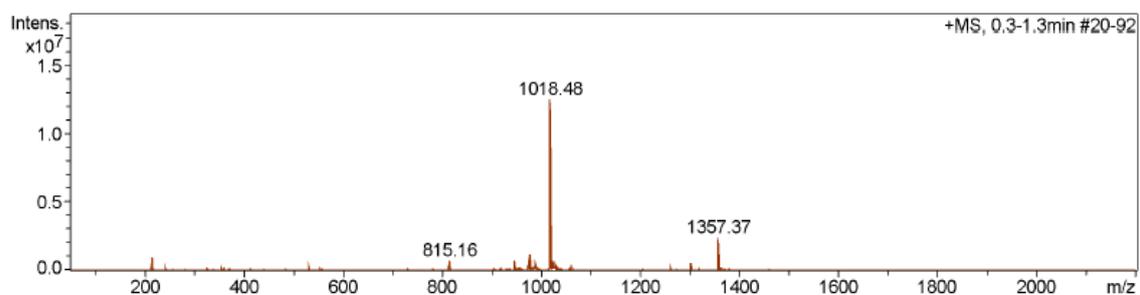
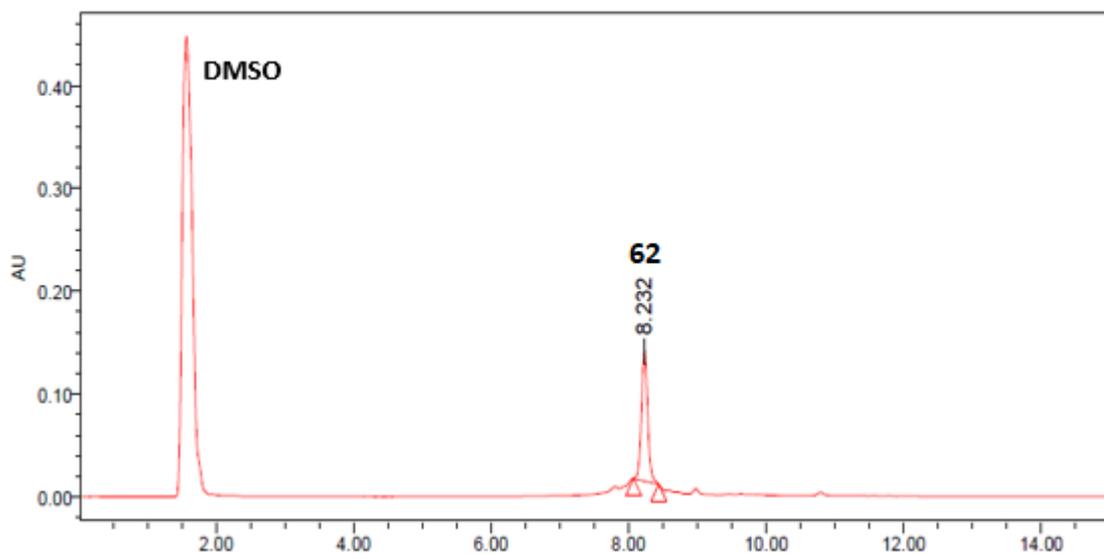
Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, D_2O , 298 K), $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, D_2O , 298 K) y de ESI-MS del compuesto **54**, según orden de aparición.



Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , 298 K), ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O , 298 K) y de ESI-MS del compuesto **61**, según orden de aparición.

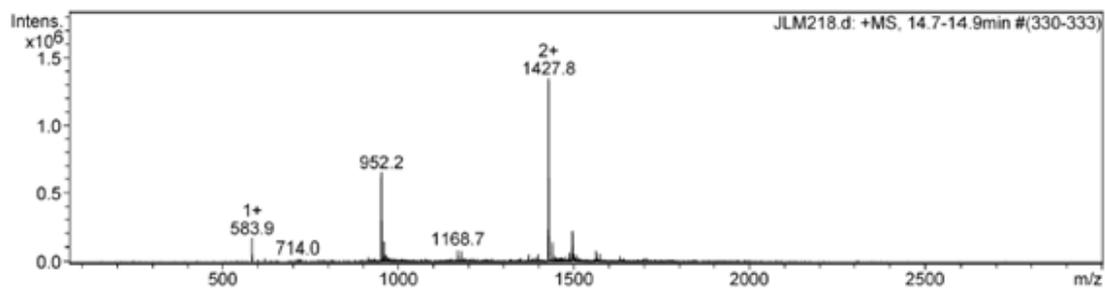
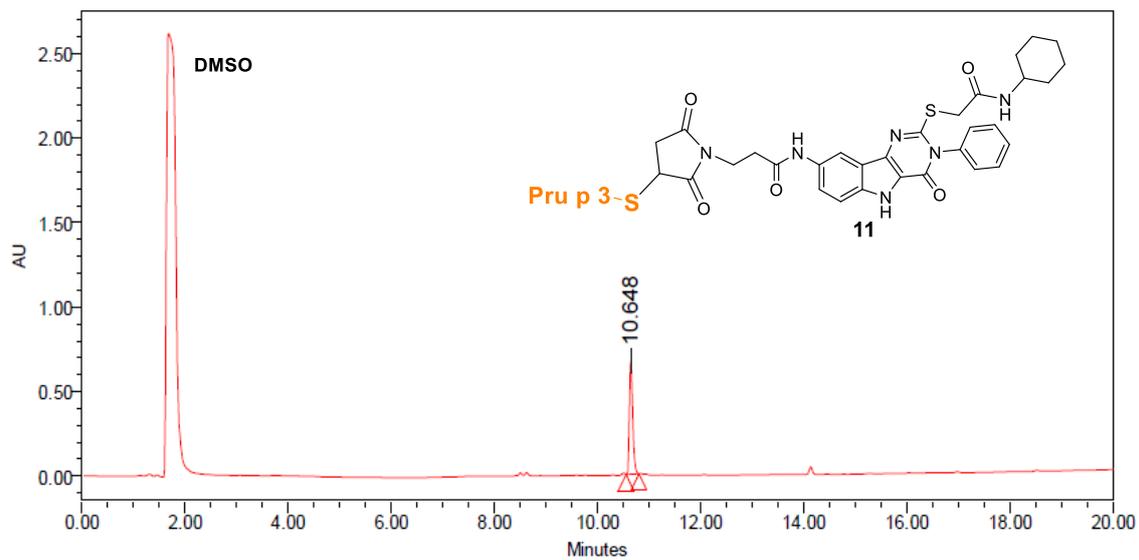


Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, MeOH- d_4 , 298 K), ^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO- d_6 , 298 K) del compuesto **62**, según orden de aparición.

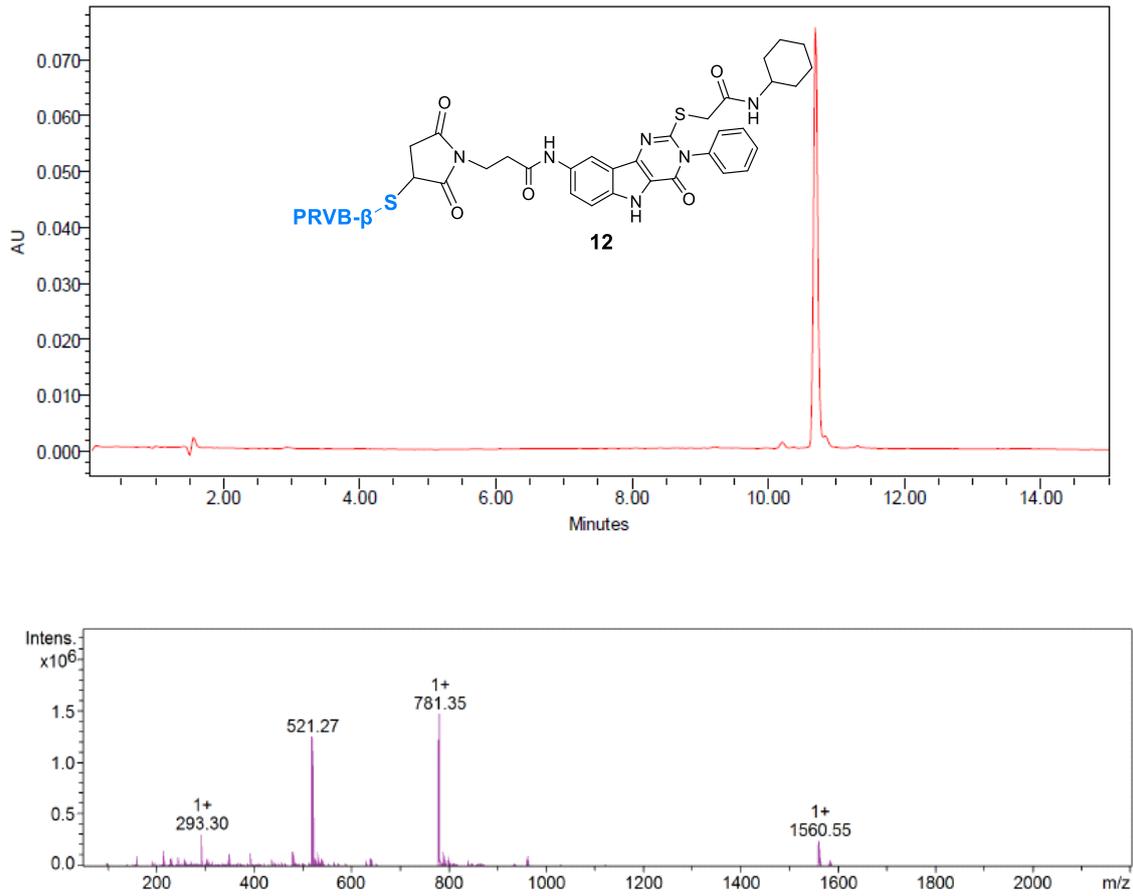


Cromatograma y espectro de ESI-MS del compuesto **62**, según orden de aparición.

Conjugados a péptidos alergénicos

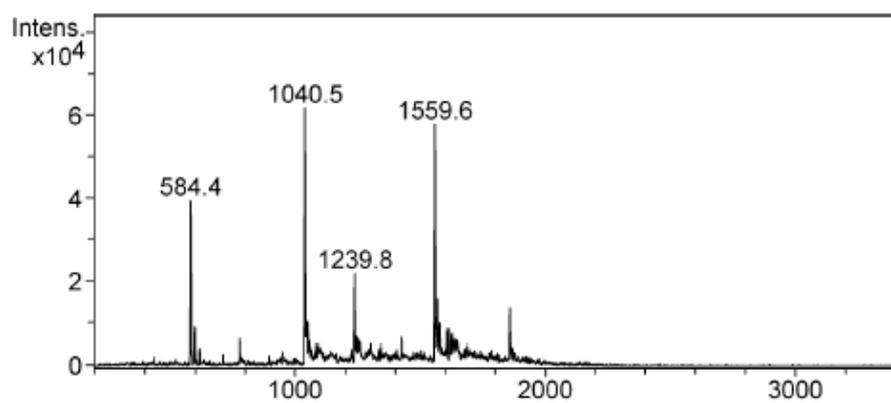
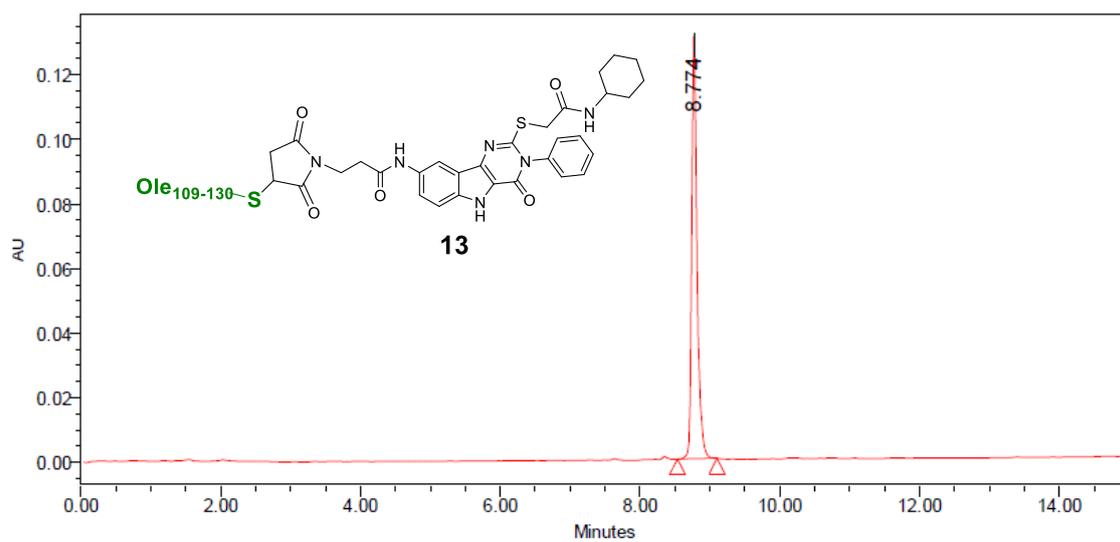


Cromatograma y espectro de ESI-MS del conjugado **11**, según orden de aparición.

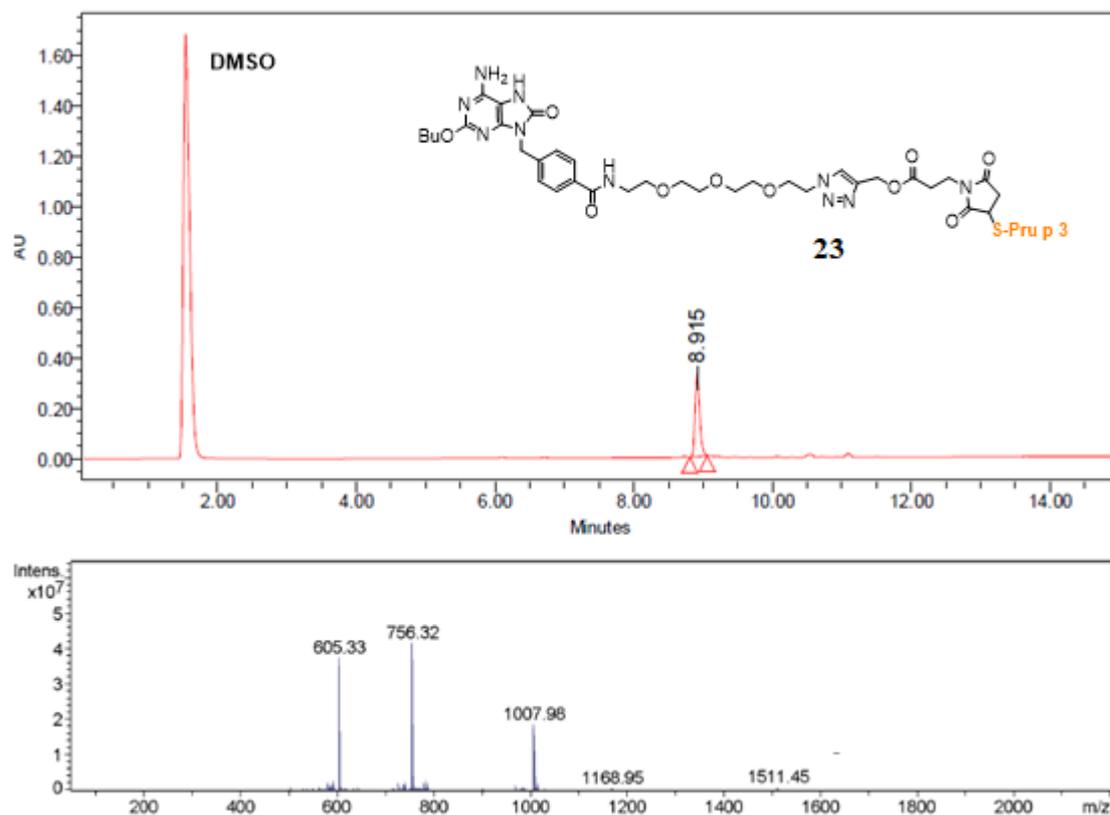


Cromatograma y espectro de ESI-MS del conjugado **12**, según orden de aparición.

Appendix 1

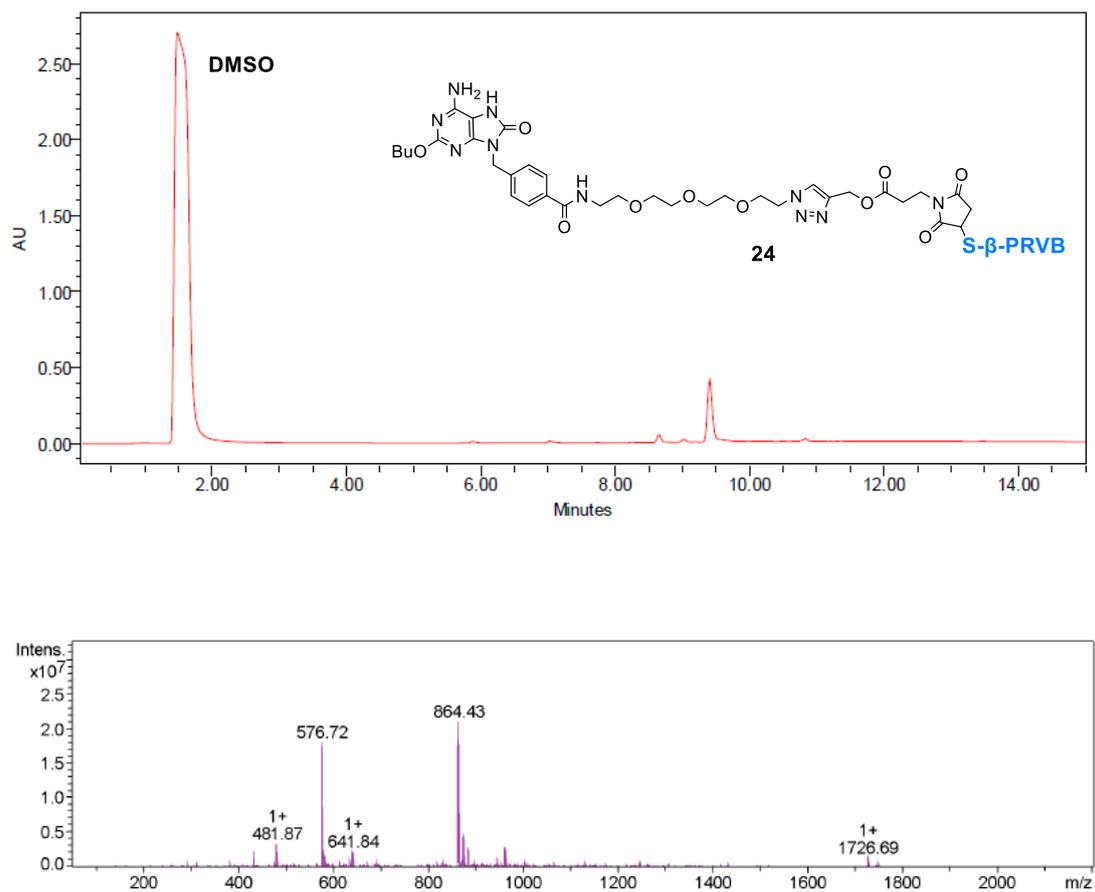


Cromatograma y espectro de ESI-MS del conjugado **13**, según orden de aparición.

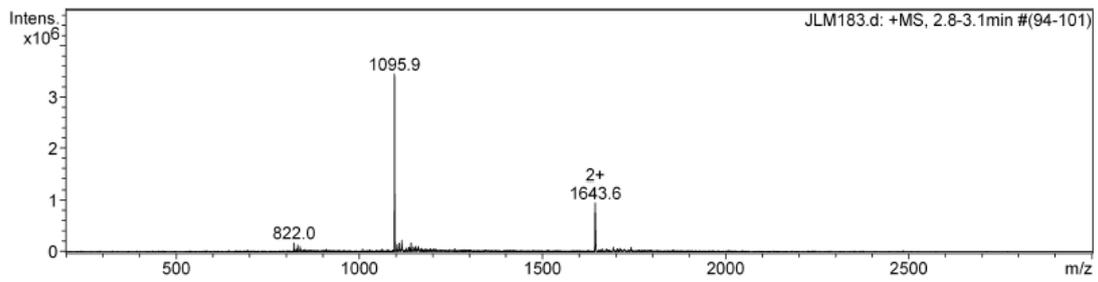
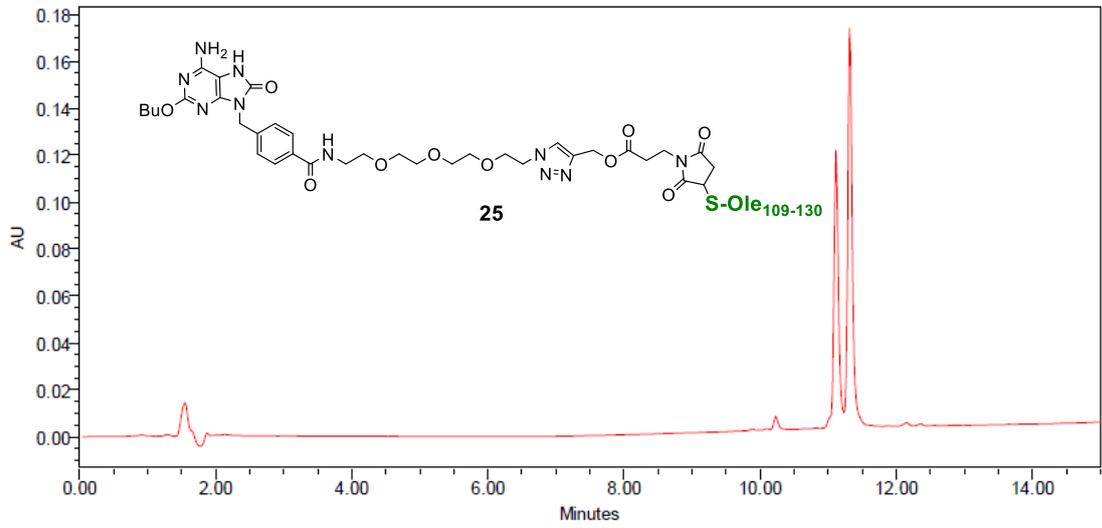


Cromatograma y espectro de ESI-MS del conjugado **23**, según orden de aparición.

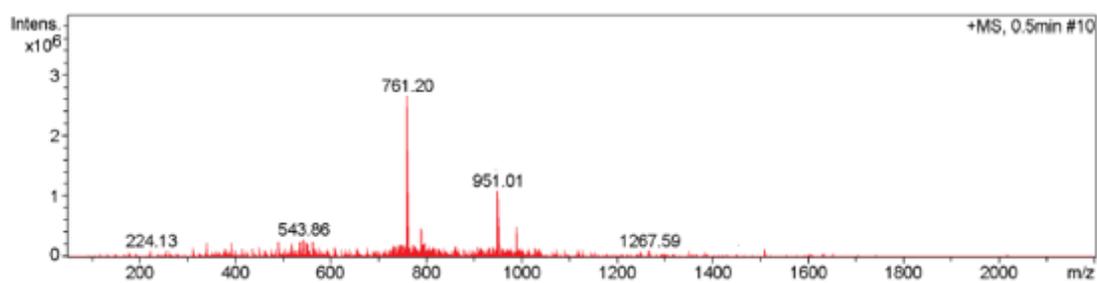
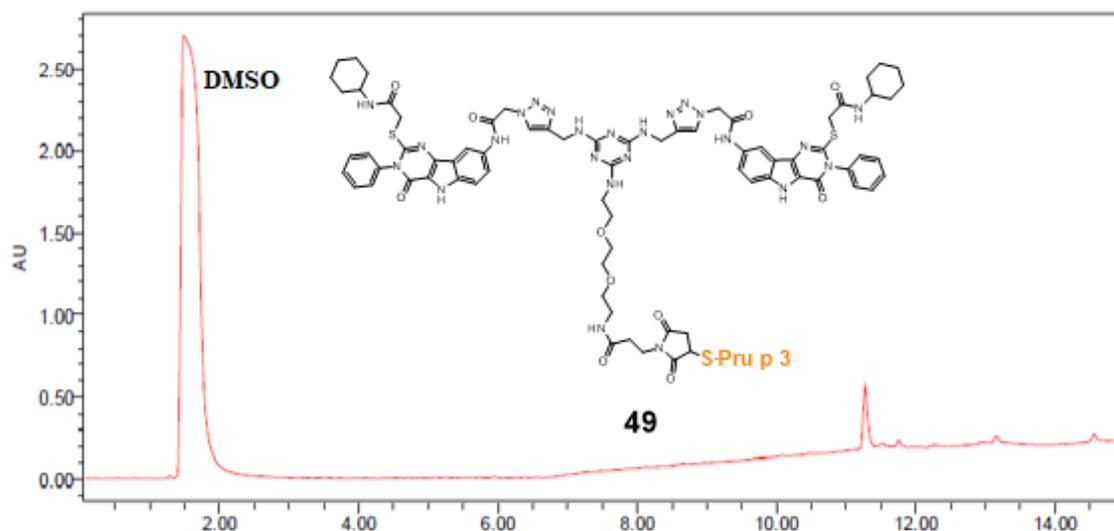
Appendix 1



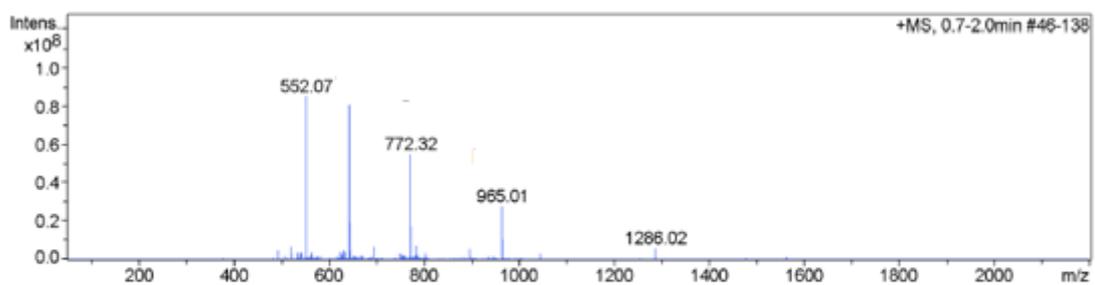
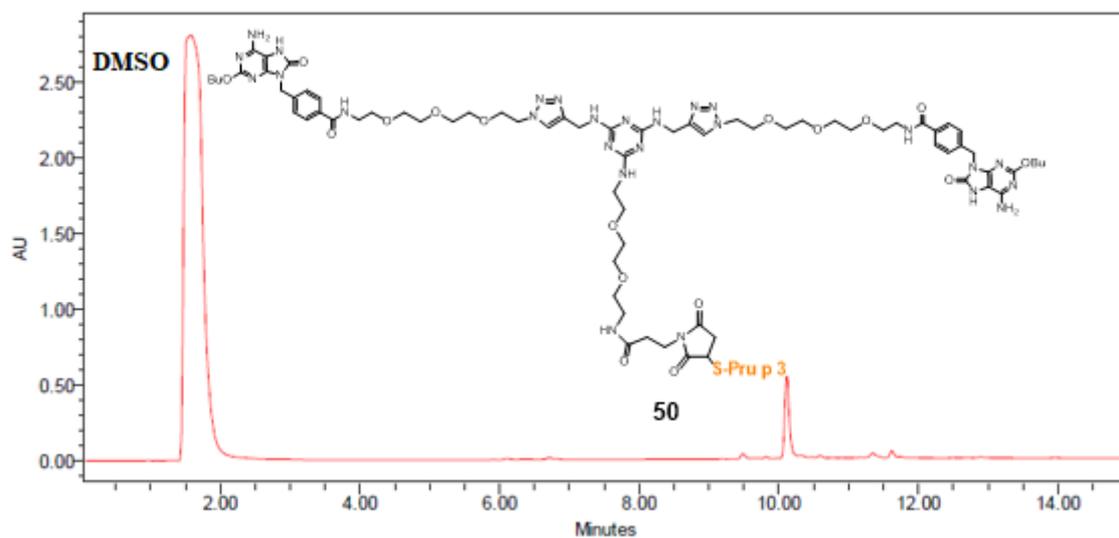
Cromatograma y espectro de ESI-MS del conjugado **24**, según orden de aparición.



Cromatograma y espectro de ESI-MS del conjugado **25**, según orden de aparición.

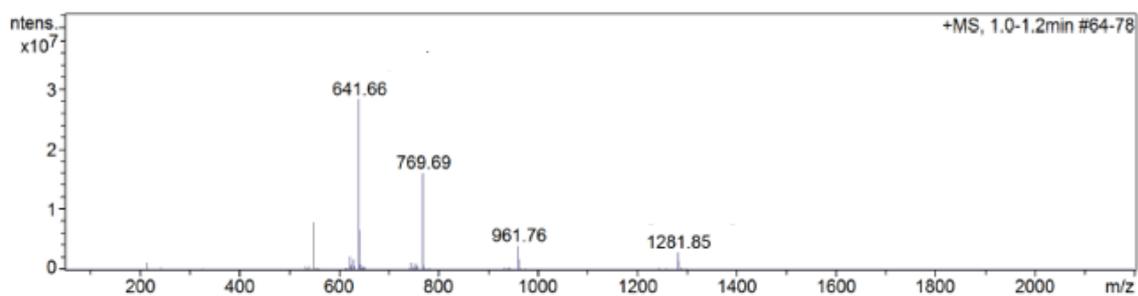
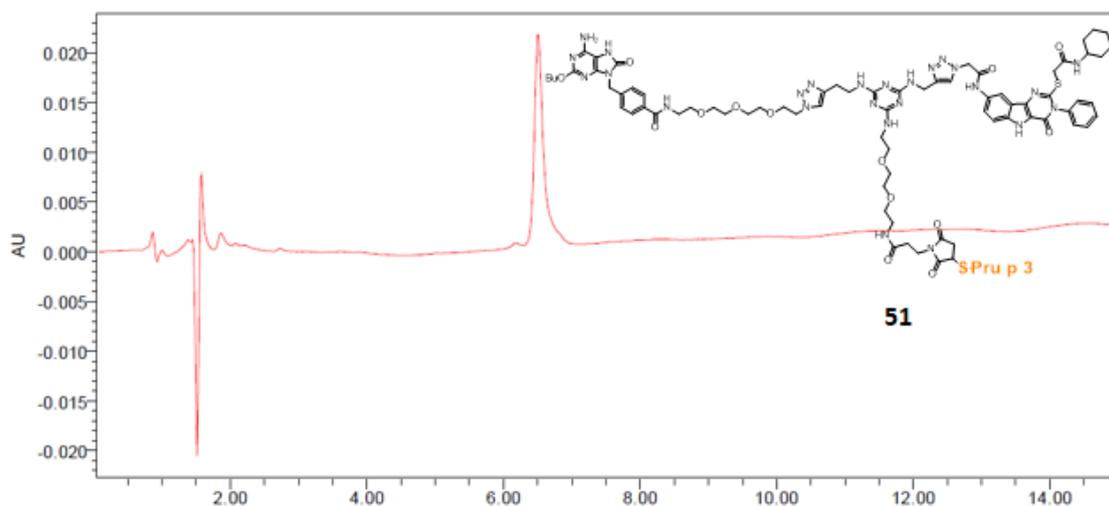


Cromatograma y espectro de ESI-MS del conjugado **49**, según orden de aparición.

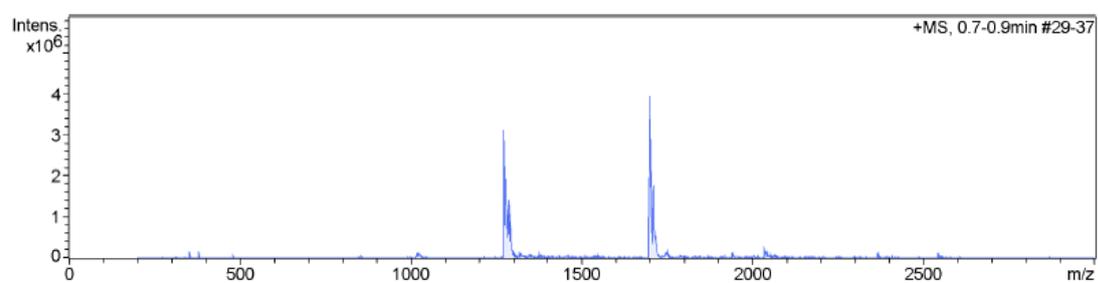
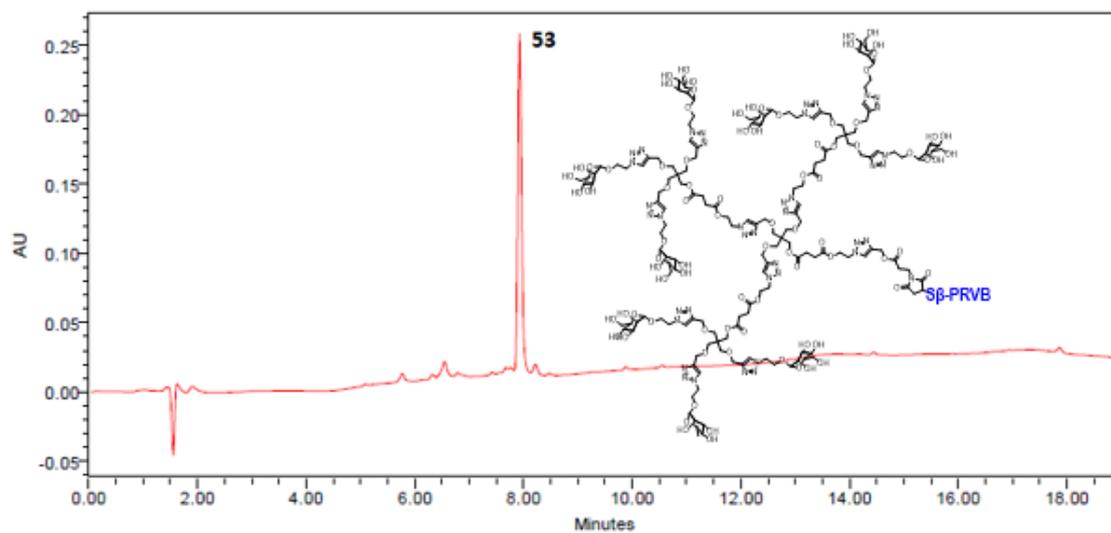


Cromatograma y espectro de ESI-MS del conjugado **50**, según orden de aparición.

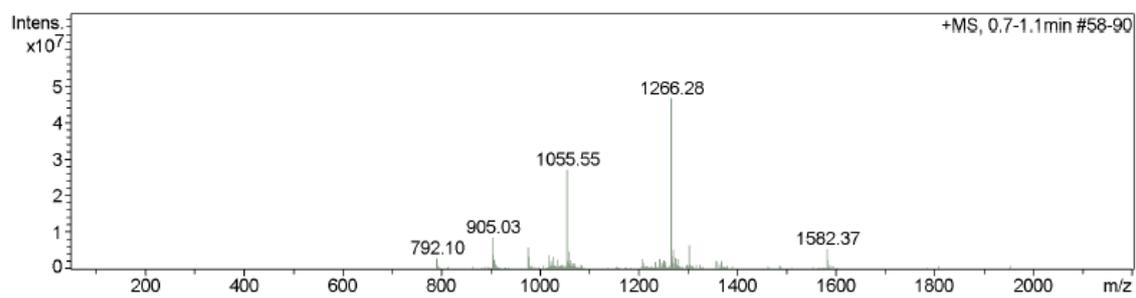
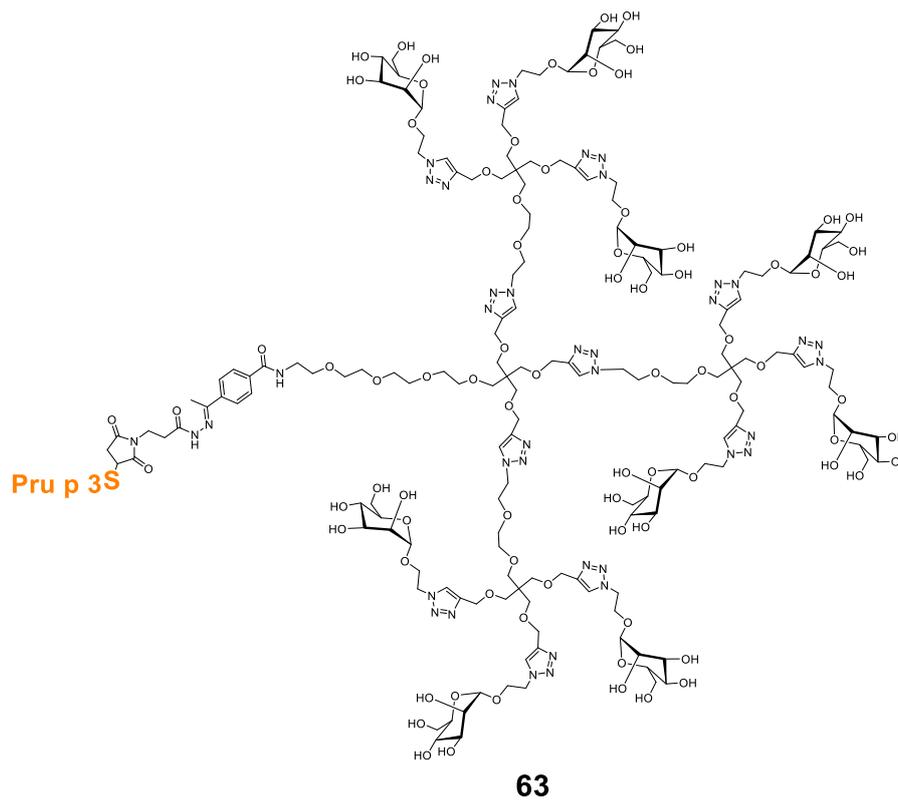
Appendix 1



Cromatograma y espectro de ESI-MS del conjugado **51**, según orden de aparición.



Cromatograma y espectro de ESI-MS del conjugado **53**, según orden de aparición.

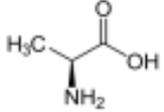
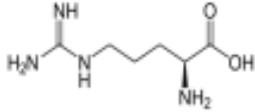
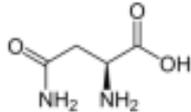
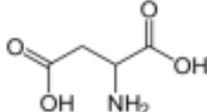
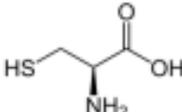
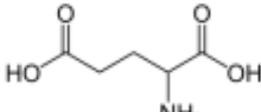
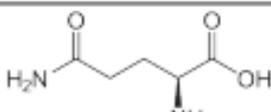
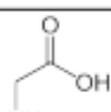
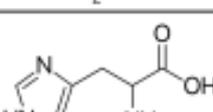
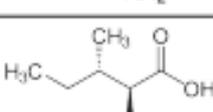


Espectro de ESI-MS del conjugado **63**.

Appendix 2

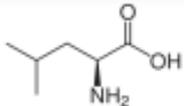
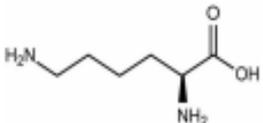
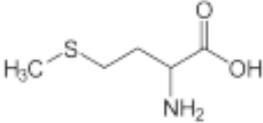
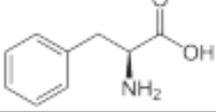
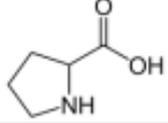
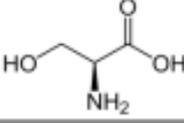
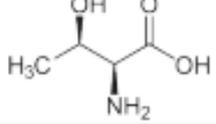
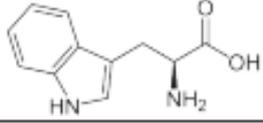
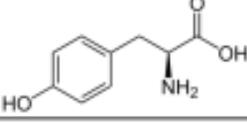
Structure and abbreviations of essential amino acids

Appendix 2. Structure and abbreviations of essential amino acids ³⁴⁶

Name	Abbreviations		Molecular weight (g/mole)	Structure
Alanine	Ala	A	89.1	
Arginine	Arg	R	174.2	
Asparagine	Asn	N	132.1	
Aspartic acid	Asp	D	133.1	
Cysteine	Cys	C	121.2	
Glutamic acid	Glu	E	147.1	
Glutamine	Gln	Q	146.2	
Glycine	Gly	G	75.1	
Histidine	His	H	155.2	
Isoleucine	Ile	I	131.2	

³⁴⁶ Mustăţea, G.; Ungureanu, E.L.; Iorga, E.; *J. Hyg. Eng. Des.* **2019**, *26*, 81-87.

Appendix 2

Leucine	Leu	L	131.2	
Lysine	Lys	K	146.2	
Methionine	Met	M	149.2	
Phenylalanine	Phe	F	165.2	
Proline	Pro	P	115.1	
Serine	Ser	S	105.1	
Threonine	Thr	T	119.1	
Tryptophan	Trp	W	204.2	
Tyrosine	Tyr	Y	181.2	
Valine	Val	V	117.1	