



**GLICODENDRONES COMO PLATAFORMAS
MULTIVALENTES PARA LA TRANSFERENCIA
SELECTIVA DE MOLÉCULAS DE INTERÉS
BIOLÓGICO**

M^a Olivia Sánchez Maldonado

Sevilla, 2010



**INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
QUÍMICAS**



**DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA ORGÁNICA**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS ISLA DE LA
CARTUJA**

**GLICODENDRONES COMO PLATAFORMAS
MULTIVALENTES PARA LA TRANSFERENCIA
SELECTIVA DE MOLÉCULAS DE INTERÉS
BIOLÓGICO**

Memoria presentada por la
Licenciada M^a Olivia Sánchez Maldonado
para optar al grado de Doctor en Química

Sevilla, 2010

Dr. Francisco Javier Rojo Marcos, Científico Titular del C.S.I.C.

CERTIFICA: Que el presente trabajo titulado: “Glicodendrones como plataformas multivalentes para la transferencia selectiva de moléculas de interés biológico” ha sido realizado bajo mi dirección y asesoramiento en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (Sevilla) constituyendo la Memoria que presenta la Lcda. M^a Olivia Sánchez Maldonado para aspirar al grado de Doctor en Química.

Sevilla, Septiembre de 2010

Fdo.: Francisco Javier Rojo Marcos

ABREVIATURAS.

μM	Micromolar
Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxiribonucleico
APCs	Células Presentadoras de Antígenos (<i>del inglés</i> Antigen Presenting Cells)
Ar	Aromático
Bis-MPA	Ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico (<i>del inglés</i> 2,2-Bis(hydroxy-methyl)propionic acid)
Bn	Bencilo
BOP	Hexafluoro fosfato de benzotriazol -1-il-oxi-tris-(dimetilamino)fosfonio (del inglés bezotriazole-1-yloxi-tris-(dimethyamino)-phosfonium hexafluorophosphate)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>del inglés</i> Bobine Serum Albumin)
Boc	<i>tert</i> - butiloxicarbonil
ccf	Cromatografía en capa fina
CRD	Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos (<i>del inglés</i> Carbohydrate Recognition Domain)
d	Doblete
DCs	Células Dendríticas (<i>del inglés</i> Dendritic Cells)
DCC	Diciclohexil carbodiimida
DCM	Diclorometano
DC-SIGN	Proteína de membrana tipo II con un dominio extracelular de lectina tipo C (<i>del inglés</i> Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin)
dd	Doble doblete
ddd	Doble doble doblete
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-diciano1,4-benzoquinona
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	Diisopropiletilamina

DIPEA	Diisopropiletilamina
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DMAP	4-Dimetilamino piridina
DMF	<i>N,N'</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPTS	4-Toluensulfonato de dimetilaminopiridinio
DTT	1,4-Ditiotriol
ECD	Dominio Extracelular (<i>del inglés</i> extracellular domain)
EDC	Hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>del inglés</i> Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
eq.	Equivalente
EM (ESI)	Espectrometría de masas con ionización por electrospray
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
FACS	Clasificador de células activadas por fluorescencia (<i>del inglés</i> Fluorescence-Activated Cell Sorter)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gal	Galactosa
G _n	Generación n
GM1	Gangliósido β Gal1-3 β GalNAc1-4[α Sia2-3]- β Gal1-4Glc
GP	Glicoproteína
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronilo
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinnámico
HD	Alta densidad (<i>del inglés</i> High density)
HMBC	Correlación heteronuclear a multiples enlaces (<i>del inglés</i> Heteronuclear Multiple Bond Connectivity)
HMQC	Correlación heteronuclear multiple cuántica (<i>Del inglés</i> Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de Alto rendimiento (<i>del inglés</i> High Performance

	Liquid Cromatography)
IC ₅₀	Capacidad de Inhibición del 50%
IL-10	Interleucina-10
ICAM-2	Molécula de Adhesión Intercelular-2 (<i>del inglés</i> Intracellular Adhesión Molecule 2)
ICAM-3	Molécula de Adhesión Intercelular-3 (<i>del inglés</i> Intracellular Adhesión Molecule 3)
IR	Infrarrojo
FTIR	Infrarrojo con transformada de Fourier (<i>del inglés</i> Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LD	Baja densidad (<i>del inglés</i> Low Density)
Lex	Trisacárido Lewis x
LPS	Lipopolisacáridos
m	Multiplete
m/z	Relación masa/carga
MALDI-ToF	Espectrometría de masas por ionización mediante Desorción por Láser asistido por una matriz con tiempo de vuelo (<i>del inglés</i> Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Fly).
Man	Manosa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>del inglés</i> Major histocompatibility complex)
MS	Tamiz molecular (<i>del inglés</i> Molecular Sieve)
mM	Milimolar
MR	Receptor de manosa (<i>del inglés</i> Mannose Receptor)
NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
NKP-1	Proteína natural asesina (<i>del inglés</i> Natural Killer-Protein 1)
NMP	<i>N</i> -Metilpirrolidina
OVA	Ovalbumina
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>del inglés</i> Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

PBMC	células mononucleares de sangre periférica (<i>del inglés</i> Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PAMAM	Poliamidoamina
Pf	Punto de fusión
Ph	Fenilo (<i>del inglés</i> Phenyl)
PPI	Polipropilenimina
ppm	Partes por millón
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones (<i>del inglés</i> Pattern Recognition Receptor)
RAFT	Plantilla para la funcionalización regioselectiva direccionable (<i>del inglés</i> Regioselectively Addressable Functionalized Templates)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RU	Unidades de Resonancia (<i>del inglés</i> Resonance units)
s	Singlete
sa	singlete ancho
SARS	Síndrome Respiratorio Agudo Severo (<i>del inglés</i> Severe Acute Respiratory Syndrome)
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIV	Virus de Inmunodeficiencia del Simio (<i>del inglés</i> Simium immunodefient virus)
SPR	Resonancia del Plasmón de Superficie (<i>del inglés</i> Surface Plasmon Resonance)
Ss β G	Sulfolobus solfataricus β -glycosidase
T	Temperatura
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TASPs	Plantilla de ensamblaje multivalente de péptidos (<i>del inglés</i> Template assembled multivalent peptides)
TCR	Receptor de células T (<i>del inglés</i> T-cell receptor)
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>del inglés</i> Trifluoroacetic acid)
THF	Tetrahidrofurano

TLRs	Receptor tipo Toll (<i>Del inglés</i> Toll-like receptors)
TMS	Tetrametilsilano
t_r	Tiempo de retención
TRIS	Trishidroximetilaminometano
<i>p</i> -TsOH	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE

1. Introducción.	3
1.1. Los carbohidratos en la naturaleza.	3
1.2. Modelos artificiales de sistemas multivalentes de carbohidratos.	6
1.3. Dendrímeros.	8
1.3.1. Características generales de los dendrímeros.	8
1.3.2. Estrategias sintéticas para la preparación de dendrímeros.	10
1.4. Glicodendrímeros.	14
1.5. Respuesta inmune y células dendríticas.	25
1.5.1. DC-SIGN, receptor de estructuras oligosacarídicas.	29
1.5.2. Activación de la respuesta inmune por interacción con el receptor DC-SIGN.	34
2. Antecedentes y objetivos.	47
2.1. Antecedentes del Grupo de Investigación.	47
2.2. Objetivos.	53
3. Síntesis de glicodendrones basados en el ácido bis-MPA.	57
3.1. Síntesis divergente de dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico empleando como núcleo TRIS.	63
3.1.1. Síntesis del soporte dendrítico.	63
3.1.2. Síntesis del glicodendrón 3GTBoc(SucMan) ₂₄ y del correspondiente control 3GTBoc(SucC) ₂₄ .	67
3.1.3. Análisis de la interacción usando biosensores.	73
3.1.3.1. Biosensor con detección SPR.	74
3.1.3.2. Evaluación de la inhibición de la interacción gp120/DC-SIGN usando el glicodendrón 3GTBoc(SucMan) ₂₄ .	77
3.1.4. Modificación de la posición focal de dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico empleando como núcleo TRIS.	79
3.2. Dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico con espaciador.	83

3.2.1. Síntesis del soporte dendrítico.	83
3.2.2. Síntesis de los glicodendrones de primera y segunda generación.	89
3.2.3. Análisis de la actividad de 1GLL(SucMan) ₆ y 2GLL(SucMan) ₁₂ usando biosensores.	101
4. Marcaje fluorescente e internalización.	107
4.1. Marcaje fluorescente del glicodendrón 2GLL(SucMan) ₁₂ .	107
4.2. Síntesis y marcaje fluorescente de dendrones control.	113
4.3. Estudios de internalización de los glicoconjugados 2GLLBodipy(SucMan) ₁₂ y 2GLLBodipy(SucGal) ₁₂ .	124
5. Conjugación de biomoléculas.	133
5.1. Adición quimioselectiva.	135
5.2. Síntesis de glicoconjugados a través de derivados de maleimida.	142
5.2.1. Acoplamiento del glicodendrón 54 a un péptido modelo.	146
5.2.2. Acoplamiento de glicodendrón 54 a un oligonucleótido modelo.	152
6. Conclusiones.	163
7. Parte experimental.	169
7.1. Disolventes y reactivos.	169
7.2. Técnicas y aparatos.	170
7.3. Caracterización.	172
7.3.1. Síntesis divergente de dendrones basados en el ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico empleando como núcleo TRIS.	172
7.3.2. Dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico con espaciador.	192
7.3.3. Marcaje fluorescente de dendrones.	210
7.3.4. Conjugación de biomoléculas.	223
Anexo 1. Estructuras y abreviaturas de aminoácidos.	231
Anexo 2. Estructuras y abreviaturas de nucleótidos.	237
Anexo 3. Espectros.	241

Capítulo 1
Introducción



1. Introducción.

1.1. Los carbohidratos en la naturaleza.

La superficie de la mayoría de las células de mamíferos se encuentra cubierta por una densa capa de carbohidratos denominada glicocálix. Estos carbohidratos aparecen fundamentalmente conjugados a otras biomoléculas (proteínas y lípidos), dando lugar a las denominadas glicoproteínas y los glicolípidos, respectivamente.¹ Los glicolípidos y glicoproteínas están involucrados en numerosos procesos biológicos de adhesión y reconocimiento célula-célula y célula-matriz extracelular a través de la interacción con sus correspondientes receptores (fundamentalmente interacción proteína-carbohidrato) (Figura 1).² Entre estos procesos biológicos naturales o patológicos cabe destacar la embriogénesis,³ la diferenciación celular,⁴ el proceso inflamatorio,⁵ la metástasis,⁶ etc.

¹ Dwek, R.A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.

² Feizi, T. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 701-710.

³ Muramatsu, T. *J. Cell. Biochem.* **1988**, *36*, 1-14.

⁴ Hakomori, S. *Ann. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 733-740.

⁵ Lasky, L.A. *Ann. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 113-139.

⁶ Muramatsu, T. *Glycobiology* **1993**, *3*, 291-296.

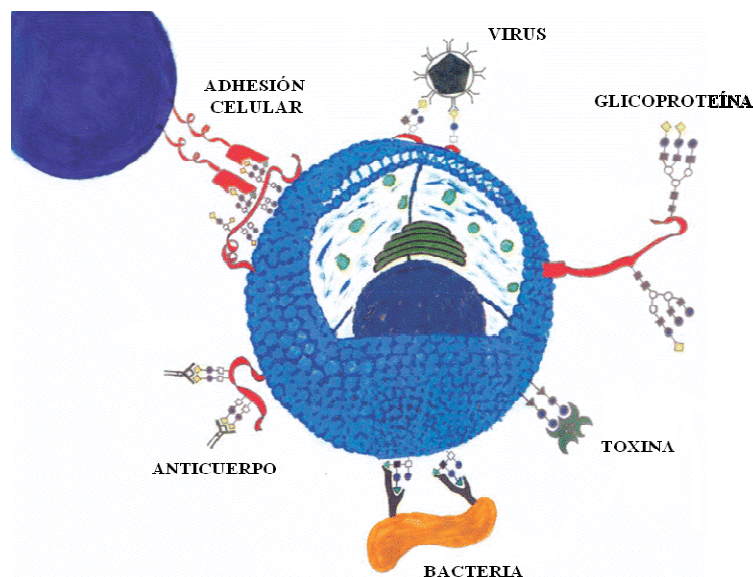


Figura 1. Representación de alguno de los diferentes procesos naturales e infecciosos de reconocimiento en los que están implicados los glicoconjugados de la superficie celular.

Las interacciones de los carbohidratos con sus receptores son altamente selectivas y, en la mayoría de los casos, dependientes de cationes divalentes (fundamentalmente calcio); sin embargo, estas interacciones presentan una baja afinidad, solventada en la naturaleza por una presentación multivalente de los carbohidratos y del receptor.⁷ La combinación de múltiples interacciones entre dos o más unidades de carbohidrato y su correspondiente receptor multimérico, da lugar a las llamadas interacciones multivalentes, también conocido como efecto cluster (Figura 2).⁸ Estas interacciones multivalentes presentan ventajas funcionales sobre las interacciones monovalentes; no solo aumentan la afinidad de forma significativa, sino que también aumentan la especificidad de la interacción y por lo tanto, del proceso de reconocimiento molecular.

⁷ Lundquist, J.J.; Toone, E.J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.

⁸ (a) Lee, Y.C.; Lee, R.T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327. (b) Mammen, M.; Choi, S.K.; Whitesides, G.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.

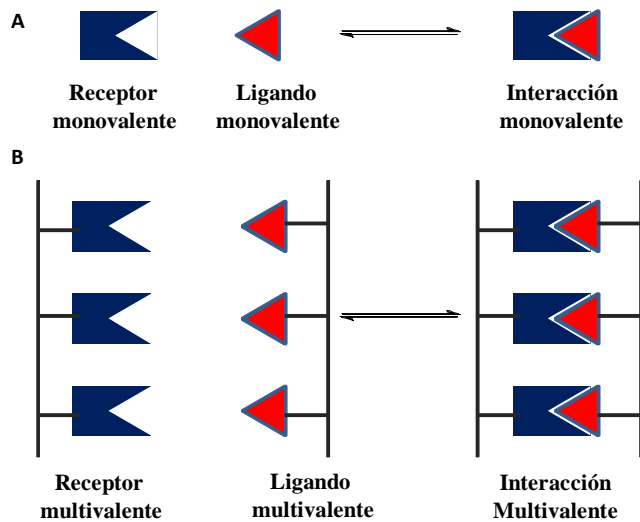


Figura 2. Representación general de una interacción ligando-receptor monovalente (A) y una interacción ligando-receptor multivalente (B).

Para entender correctamente el “*efecto cluster*” es necesario establecer las diferencias entre cooperatividad y multivalencia.⁹ La cooperatividad describe la influencia que puede tener sobre futuras uniones la unión de un ligando monovalente sobre su receptor si éste posee varios sitios activos. La cooperatividad puede ser positiva o sinérgica cuando la afinidad por la segunda unión es mayor que por la primera; negativa o interferente, cuando dicha afinidad es menor; o no cooperativa o aditiva cuando la magnitud de las uniones es la misma. Los ligandos que se unen sobre los distintos sitios activos no tienen por qué ser los mismos. El ejemplo más claro de cooperatividad descrito en la naturaleza es la oxigenación alostérica de la hemoglobina, donde esta proteína tetramérica se une a cuatro moléculas de oxígeno con afinidad creciente hasta que los cuatro sitios activos presentes están ocupados.¹⁰

Por otro lado, la multivalencia implica la unión simultánea de dos o más ligandos idénticos, que descansan sobre un mismo soporte, y un receptor múltiple que a

⁹ Badjic, J.D.; Nelson, A.; Cantrill, S.J.; Turnbull, W.C.; Stoddart, J.F. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 723-732.

¹⁰ Eaton, W.A.; Henry, E.R.; Hofrichter, J.; Mozzarelli, A. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 351-358.

su vez se encuentra sobre una misma entidad, siendo la intensidad de la interacción varios órdenes de magnitud mayor que la correspondiente a la interacción monovalente.

Los sistemas multivalentes de carbohidratos de origen natural son difíciles de obtener de sus fuentes naturales, dada su escasez, así como la dificultad de aislarlos puros. En la mayoría de los casos, estos sistemas naturales se encuentran como mezclas de compuestos (glicoformas), sistemas muy parecidos en los que varían en mayor o menor medida el tipo de carbohidrato o la posición que ocupan estos carbohidratos en el glicoconjugado, siendo muy complicada su separación.

1.2. Modelos artificiales de sistemas multivalentes de carbohidratos.

El estudio de los procesos moleculares (biológicos) en los que participan de forma activa los carbohidratos requiere el desarrollo de herramientas que permitan una presentación multivalente de dichos carbohidratos. En la bibliografía se encuentran descritos numerosos modelos de sistemas multivalentes de carbohidratos para el estudio de estos procesos biológicos.¹¹

El diseño de estos sistemas está basado en imitar a los glicoconjugados naturales que están involucrados en dichos procesos biológicos. Estos sistemas artificiales consisten fundamentalmente en soportes de muy diversa naturaleza sobre los que se unen varias copias del carbohidrato, originando una presentación multivalente del mismo.¹² La unión del carbohidrato al soporte se establece normalmente a través de un espaciador, que proporciona el medio de anclaje, así como una separación suficiente entre el soporte y el ligando para que el primero no interfiera en la interacción. Entre los sistemas multivalentes más usados cabe destacar los péptidos y proteínas,¹³ los

¹¹ Houseman, T.B.; Mrksich, M. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *218*, 1-44.

¹² Martos, V.; Castreño, P.; Valero, J.; de Mendoza, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 698-706.

¹³ Davis, B.G. *Science* **2004**, *303*, 480-482.

liposomas,¹⁴ los dendrímeros,¹⁵ los calixarenos,¹⁶ las ciclodextrinas,¹⁷ oligómeros y polímeros,¹⁸ y las nanopartículas¹⁹ (Figura 3).

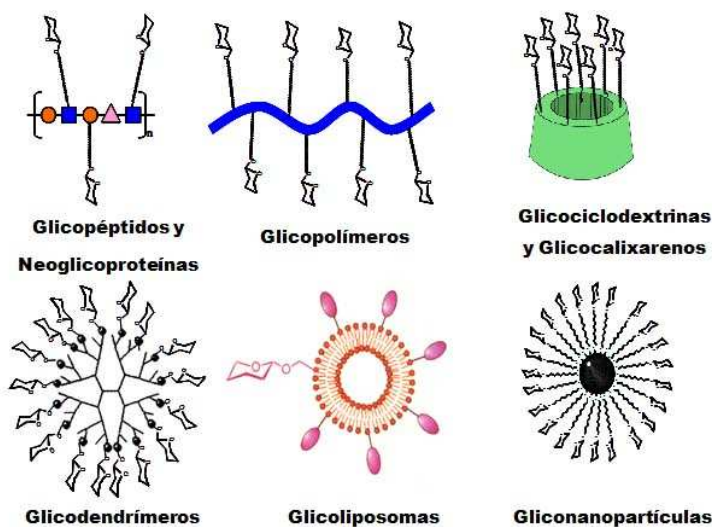


Figura 3. Representación de diferentes sistemas modelo multivalentes de carbohidratos.

El diseño y preparación de sistemas multivalentes sintéticos de carbohidrato permite un acceso a una cantidad mayor de compuesto y a un mayor control sobre la estructura, la pureza, la naturaleza del soporte, la multivalencia (número de copias de carbohidratos presentes), etc.

Entre todos estos sistemas multivalentes, los dendrímeros constituyen unos sistemas muy interesantes. Dado que el trabajo que se describe en esta memoria se centra en el uso de estos sistemas como soporte multivalente, en el siguiente apartado describiremos las características más interesantes de los mismos.

¹⁴ (a) Brewer, G.J.; Matinyan, N. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1816-1820. (b) Stewart, R.J.; Boggs, J.M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 10666-10674.

¹⁵ Röckendorf, N.; Lindhorst, T.H. *Top. Curr. Chem.* **2001**, *217*, 201-238.

¹⁶ Dondoni, A.; Marra, A.; Scherrmann, M.C.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1774-1782.

¹⁷ Roy, R.; Hernández-Mateo, F.; Santoyo-González, F. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8743-8746.

¹⁸ Roy, R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 692-702.

¹⁹ de la Fuente, J.M.; Barrientos, A.G.; Rojas, T.C.; Rojo, J.; Cañada, F.J.; Fernández, A.; Penadés, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2258-2261.

1.3. Dendrímeros.

1.3.1. Características generales de los dendrímeros.

Los dendrímeros se describen generalmente como macromoléculas que se caracterizan por una estructura tridimensional altamente ramificada y bien definida, lo que les proporciona un alto grado de funcionalidad superficial y versatilidad.²⁰ La palabra dendrímero proviene del griego “*Dendro-*”, que significa árbol, y el sufijo “*-mer*”, (unidad más pequeña que, por repetición, construye entidades de mayor tamaño). También se les ha llamado “arborols” (Latín: Arbor = árbol), “starburst polymers”, moléculas en cascada, etc.

Los elementos estructurales que componen un dendrímero son el núcleo o “core” de donde emergen las ramificaciones; los nudos, que posibilitan la ramificación en un número de ramas determinado y los grupos terminales que son los que quedan expuestos en la superficie (Figura 4). A cada capa de crecimiento de un dendrímero se le denomina generación (G_n). El número de grupos terminales está determinado por el grado de ramificación del núcleo, de los nodos y por el de la generación del dendrímero.^{20, 21}

Los dendrímeros pueden formarse prácticamente a partir de cualquier material que pueda ramificarse (átomos metálicos, grupos organometálicos, materiales orgánicos...) y pueden presentar una amplia variedad de funcionalidades dependiendo de la naturaleza de las unidades de ramificación. Las ramas que parten desde el núcleo están formadas por unidades repetitivas de monómero que poseen nuevos centros de ramificación o nodos en su extremo. Cada nodo permite la incorporación de nuevas unidades repetitivas incrementándose la generación en una unidad cuando han

²⁰ (a) Fréchet, J.M.J.; Tomalia, D.A. *Dendrimers and Other Dendritic Polymer*. Wiley: Chichester, **2001**. (b) Newkome, J.M.J.; Moorefield, C.N.; Vögtle, F. *Dendrimers and dendrons: Concepts, Syntheses, Applications*. Wiley-VCH, **2001**.

²¹ Tomalia, D.A.; Naylor, A.M.; Goddard, W.A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 138-175.

reaccionado todos ellos. El número de grupos terminales se multiplica de generación en generación por el número de ramificaciones que posee cada nodo.

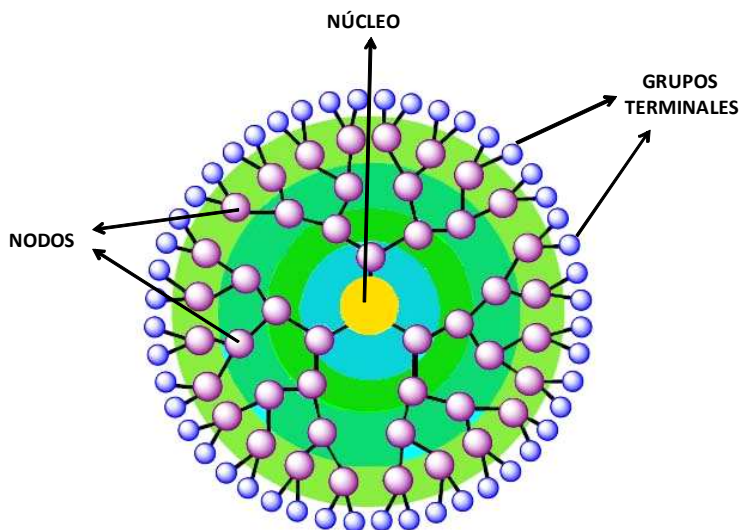


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de un dendrímero.

Las estructuras dendríticas se consideran actualmente como la cuarta clase de arquitectura molecular (junto con las arquitecturas lineales, entrecruzadas y ramificadas). Esta clase de arquitectura se divide en cuatro subcategorías: aleatoriamente hiperramificadas, estructuras dendríticas insertadas (dendrigraft), dendrones y dendrímeros (Figura 5). Los dendrones y dendrímeros han sido empleados ampliamente ya que presentan una serie de características que los hacen muy atractivos en diversos campos de la ciencia. Estas moléculas presentan un tamaño nanométrico, estructura globular o semiglobular, y los métodos de síntesis para su obtención permiten un buen control estructural, obteniéndose materiales esencialmente monodispersos, es decir, con todas las moléculas del mismo peso molecular, estructura y dimensiones. Estas características diferencian a los dendrímeros de las moléculas hiperramificadas, dendrigrfts y polímeros convencionales.

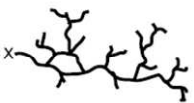
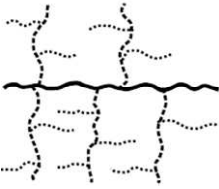
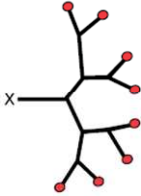
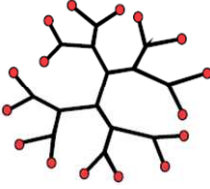
Estructura estadística	Estructura semicontrolada	Estructuras controladas	
<p data-bbox="220 324 432 349">Hiperramificadas al azar</p> 	<p data-bbox="509 324 621 349">Dendrigrfts</p> 	<p data-bbox="755 324 852 349">Dendrones</p> 	<p data-bbox="985 324 1098 349">Dendrimeros</p> 

Figura 5. Subcategorías de las arquitecturas dendríticas.

1.3.2. Estrategias sintéticas para la preparación de dendrimeros.

En general, para la preparación de dendrimeros es necesaria la elección de las unidades estructurales de construcción o monómeros, núcleo de crecimiento y una secuencia sintética cuya repetición permita el crecimiento. Esta última se compone de dos pasos, la incorporación del monómero al esqueleto dendrítico y la posterior activación de los grupos funcionales de éste. En este doble proceso es importante que las reacciones sean selectivas y con altos rendimientos evitando las imperfecciones en el crecimiento. Esta síntesis iterativa permite la preparación de estructuras bien definidas, monodispersas y que pueden incluso alcanzar tamaños macroscópicos. La síntesis de dendrimeros se puede realizar a través de diferentes métodos; sin embargo, todos ellos pueden englobarse dentro de dos estrategias sintéticas generales: convergente y divergente.

En la estrategia **divergente** el dendrimer se construye desde el núcleo polifuncional seleccionado hacia la superficie. El núcleo se hace reaccionar con el monómero correspondiente y posteriormente se realiza la activación de los grupos situados en la periferia. La repetición sucesiva de estos pasos conduce al crecimiento simultáneo de todas las ramas dendríticas, dando lugar a las diferentes generaciones del dendrimer (Figura 6). La estrategia divergente funciona bien para la obtención de grandes cantidades de dendrimer; sin embargo, a medida que hay más grupos

funcionales en la periferia (dendrimeros de altas generaciones) es más probable que se produzcan defectos estructurales en el crecimiento, ya que a medida que se aumenta la generación crece el número de enlaces covalentes que se han de formar en una única etapa sintética, lo que puede conducir a reacciones incompletas donde no todos los enlaces se han formado.

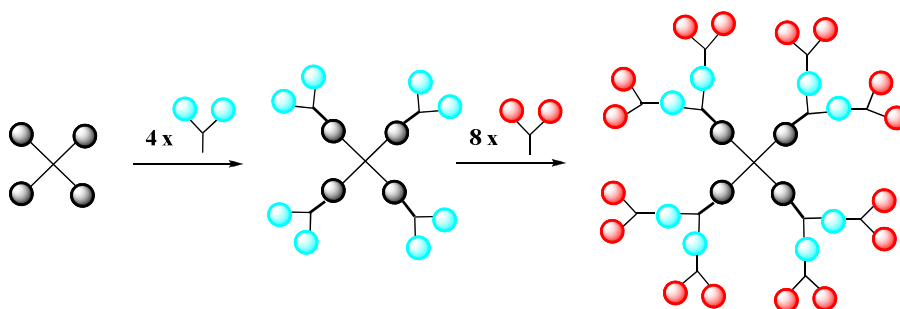


Figura 6. Representación esquemática de la estrategia divergente.

Una de las primeras síntesis de dendrimeros que podemos encontrar empleando este tipo de estrategia fue la desarrollada por Tomalia y colaboradores²² en 1985. En la ruta inicial de Tomalia la ramificación ocurría en los grupos funcionales de la superficie e implicaba dos pasos: una adición tipo Michael de una amina a metil acrilato y una posterior adición al éster resultante de etilendiamina (Figura 7). Siguiendo esta síntesis iterativa se pudieron preparar dendrones de poliamidoamina de hasta quinta generación.

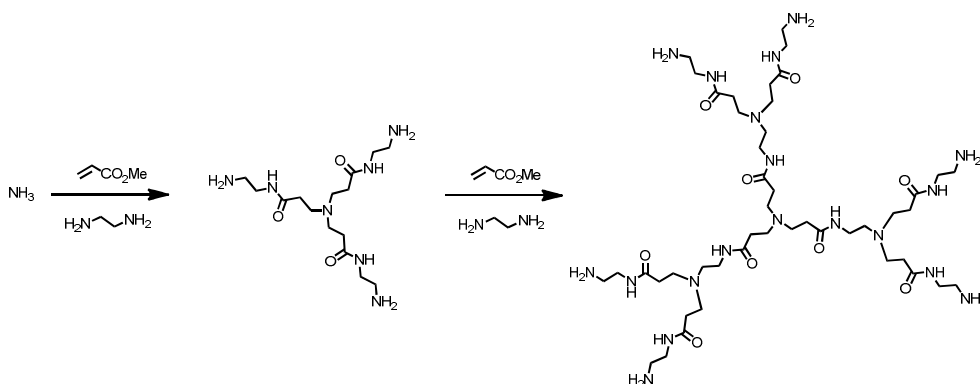


Figura 7. Síntesis de un dendrimer de poliamidoamina mediante una estrategia divergente.

²² Tomalia, D.A.; Baker, H.; Dewald, J.R.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roek, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polymer J.* **1985**, *17*, 117-132.

La otra estrategia que se puede seguir para abordar la síntesis de dendrímeros es la **convergente**. En ella, los dendrímeros se construyen desde la superficie hacia el núcleo. En primer lugar, se sintetiza cada rama dendrítica o dendrón, finalizando la síntesis con la unión de los dendrones a un núcleo polifuncional (Figura 8). A diferencia de la ruta divergente, en este caso el número de enlaces covalentes que se forman en cada etapa sintética permanece constante. Sin embargo, el problema reside en la última etapa donde se unen los diferentes dendrones al núcleo de crecimiento. En este caso, y dependiendo de la generación y el tipo de núcleo pueden existir impedimentos estéricos, sobre todo cuando los dendrones son de generación elevada. Por esta razón, este tipo de estrategia es válida para la síntesis de dendrímeros de generaciones inferiores.

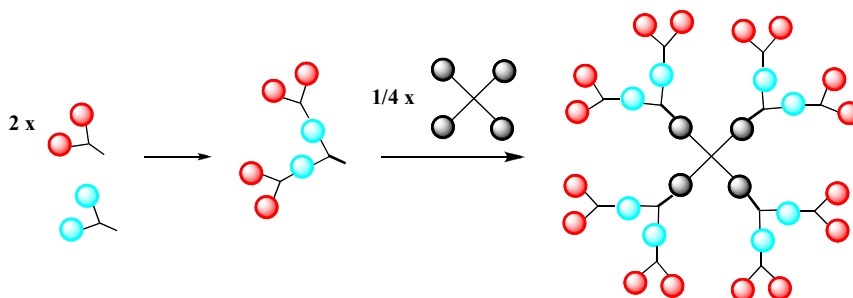


Figura 8. Representación esquemática de la estrategia convergente.

El primer ejemplo que encontramos en la bibliografía de este tipo de estrategia sintética fue descrito por Fréchet y colaboradores²³ en 1990. Estos autores sintetizaron dendrones de tipo oligoéter que presentaban el alcohol 3,5-dihidroxibencílico como unidad de repetición (Figura 9). En primer lugar se llevaban a cabo dos uniones de tipo éter mediante una alquilación selectiva de los alcoholes fenólicos mediante un acoplamiento de Williamson con un bromuro de alquilo en presencia de un exceso de carbonato potásico y del éter 18-corona-6. El segundo paso consistía en la activación de la posición bencílica focal mediante su bromación con tetrabromuro de carbono en presencia de trifetilfosfina. El acoplamiento se repetía usando dos equivalentes del producto bromado obtenido por equivalente del monómero inicial. Siguiendo esta síntesis iterativa se prepararon dendrones de hasta sexta generación.

²³ Fréchet, J.M.J.; Hawker, C.J. *Chem. Commun.* **1990**, 12, 7638-7647.

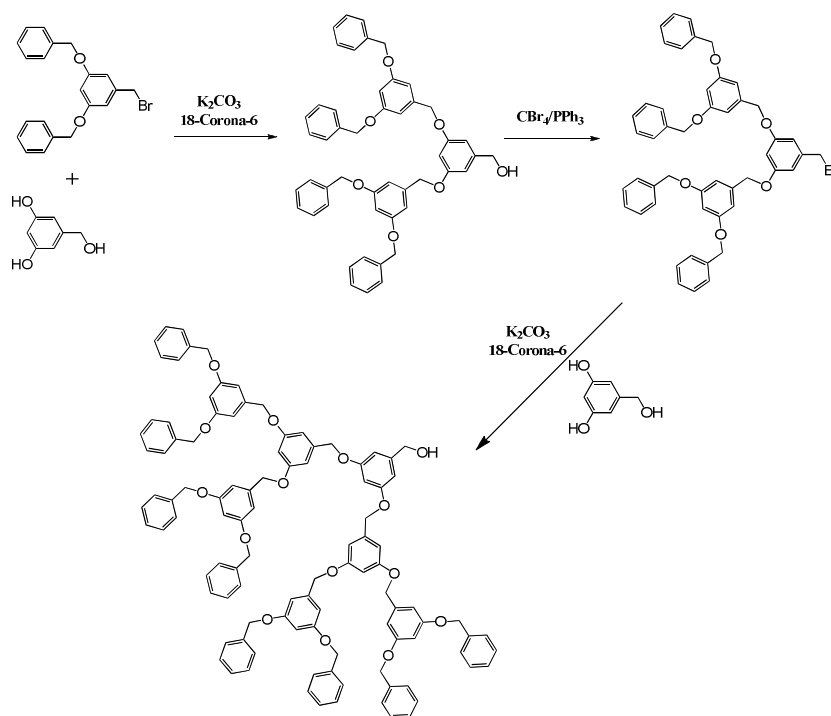


Figura 9. Síntesis convergente de dendrones basados en el alcohol 3,5-dihidroxibencílico.

Dado el interés que están adquiriendo los dendrímeros por sus potenciales aplicaciones, algunos de ellos ya están disponibles comercialmente. Dentro de éstos, podemos distinguir entre los que se preparan usando una estrategia divergente de varios pasos, tales como los derivados de poliamidoamina (PAMAM o Starburst) (Figura 10A) y polipropilenimina (PPI o Astramol) (Figura 10B), y los que se preparan en un único paso, que aunque son polímeros dendríticos, cuentan con un bajo grado de polidispersidad, tales como el poliglicerol (Figura 10C) y los derivados del ácido 2,2-bis-MPA (Boltorn) (Figura 10D).

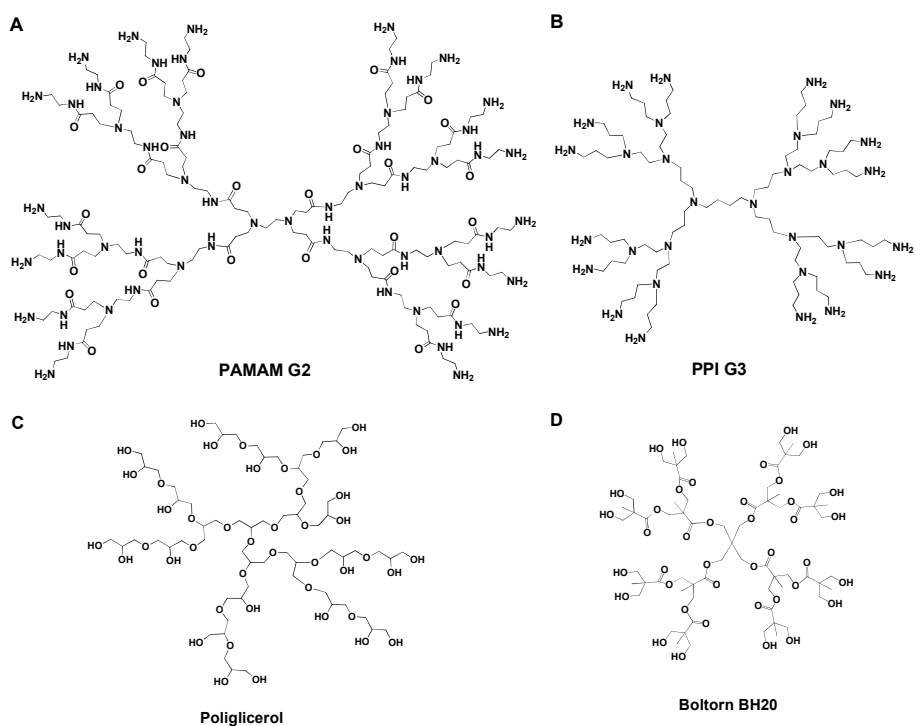


Figura 10. Estructuras de algunos soportes dendrímicos disponibles comercialmente.

Como hemos comentado anteriormente, los dendrímeros poseen múltiples funcionalidades en su periferia, lo que permite introducir múltiples ligandos en su superficie. En otras palabras, son plataformas ideales para la presentación multivalente de ligandos. Dependiendo de la estructura y generación del dendrímero se puede modular la multivalencia así como la presentación de estos ligandos en la superficie del dendrímero. La utilización de carbohidratos como ligandos permite disponer de una presentación multivalente de éstos, aspecto fundamental para poder entender y participar en los procesos biológicos en los que están implicados dichos carbohidratos.

1.4. Glicodendrímeros.

Los glicodendrímeros son un tipo de dendrímeros que incorporan carbohidratos en su estructura. Este tipo de compuestos pueden ser clasificados en tres grupos diferentes: los que contienen carbohidratos en la superficie (Figura 11A), los que

su núcleo es un carbohidrato (Figura 11B) y aquellos cuya estructura esta basada en carbohidratos (Figura 11C). En nuestro caso, y dado el objetivo de la presente memoria nos vamos a centrar en aquellos en los que los carbohidratos se encuentran en la superficie de los dendrímeros.

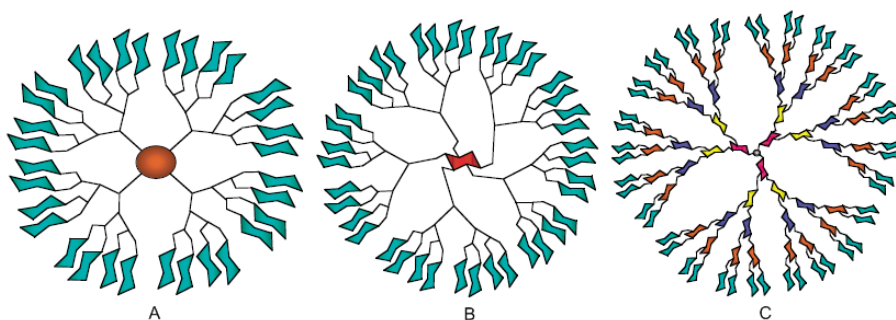


Figura 11. Tipos de glicodendrímeros.

Como hemos comentado anteriormente, los dendrímeros se caracterizan por su alta ramificación alrededor de un núcleo polifuncional, posibilitando la alta funcionalización de la superficie. Cuando estos grupos periféricos están constituidos por carbohidratos se obtienen lo que se denomina glicodendrímeros. Debido al gran número de posibilidades existentes, los glicodendrímeros pueden ser de muy diversa naturaleza dependiendo de la estructura dendrítica, así como de los carbohidratos existentes en su superficie. El número de ejemplos que se describen en la bibliografía es muy amplio por lo que se ha decidido seleccionar algunos ejemplos a modo ilustrativo de la diversidad de estructuras y métodos de preparar estos compuestos.^{24,7}

Centrándonos en los glicodendrímeros con ligandos carbohidrato en su superficie (Figura 11A), la funcionalización de dendrímeros comerciales ha sido un método muy útil para la obtención de glicoconjugados polivalentes en un número reducido de etapas. Es por tanto lógico que se haya explotado extensamente esta metodología, sobre todo empleando dos tipos de dendrímeros comerciales, PAMAM y

²⁴ (a) Okada, M. *Prog. Polym. Sci.* **2001**, *26*, 67-104. (b) Turnbull, W.B.; Stoddart, J.F. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 231-255. (c) Bezouska, K. *Rev. Mol. Biotech.* **2002**, *90*, 269-290. (d) Lindhorst, T.K. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *218*, 201-235.

⁷ Lundquist, J.J.; Toone, E.J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.

PPI. Ambos dendrímeros tienen un esqueleto basado en aminas terciarias y disponen de aminas primarias en su superficie que pueden reaccionar con otras moléculas o grupos funcionales formando enlaces amida, urea o tiourea. Así, Stoddart y colaboradores²⁵ prepararon glicodendrímeros de hasta quinta generación, basados en el dendrímero PPI, que contenían 64 unidades de galactosa o lactosa en la superficie. Para ello, hicieron reaccionar un equivalente del correspondiente glicosil NHS-éster (N-hidroxisucinimida) con los grupos amino del dendrímero (Figura 12).

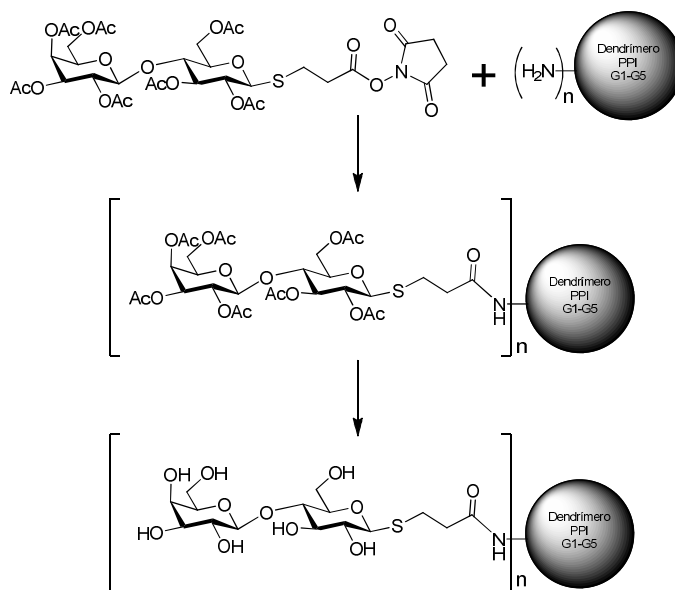


Figura 12. Síntesis de glicodendrímeros PPI de lactosa.

Aunque esta estrategia parece limitada por la escasa variedad de dendrímeros comerciales, ha sido posible obtener diferentes glicodendrímeros modificando, por ejemplo, los espaciadores que unen el esqueleto dendrítico con los azúcares. Este mismo grupo de investigación²⁶ modificó la longitud de estos espaciadores hasta en 10 unidades de metileno variando la densidad superficial de los carbohidratos. Este aspecto es interesante debido a que Roy y colaboradores²⁷ observaron que las afinidades

²⁵ Ashton, P.R.; Boyd, S.E.; Brown, C.L.; Nepogodiev, S.A.; Meijer, E.W.; Peerlings, H.W.I.; Stoddart, J.F. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 974-983.

²⁶ Peerlings, H.W.I.; Nepogodiev, S.A.; Stoddart, J.F.; Meijer, E.W. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *9*, 1879-1886.

²⁷ Pagé, D.; Roy, R. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 714-723.

de estos dendrímeros podrían disminuir a partir de cierta valencia, debido a impedimentos estéricos.

Otra forma de introducir diversidad en este tipo de glicodendrímeros es la unión de glicodendrones, previamente preparados, a dendrímeros comerciales usando éstos como núcleos. Esta metodología fue empleada por Stoddart y colaboradores²⁵ usando triadas dendríméricas de galactosa que se unieron al dendrímero comercial PPI de baja generación (Figura 13).

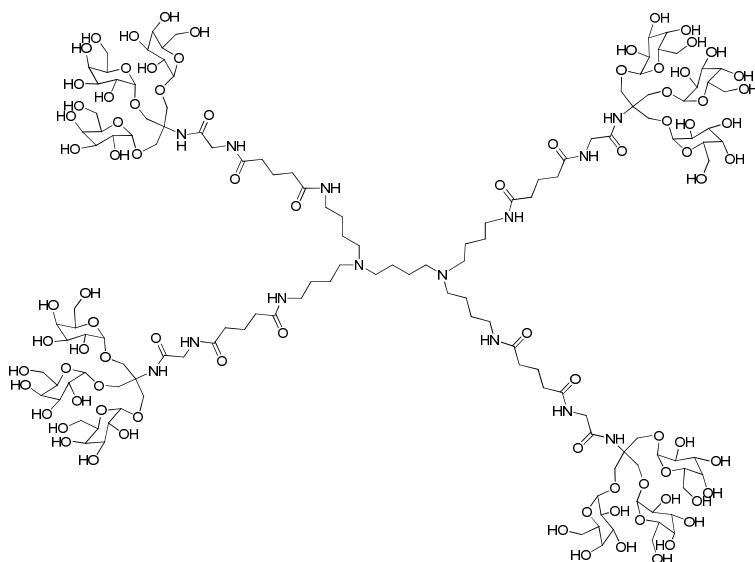


Figura 13. Glicodendrímero de primera generación de galactosa empleando como núcleo PPI.

En la síntesis de glicodendrímeros también se han empleado dendrímeros no comerciales. Así Roy y colaboradores²⁸ sintetizaron dendrones basados en la *N,N*-bis(3-aminopropil)glicina (Figura 14) y también basados en el ácido *N,N*-bis(3-aminopropil)succinámico mediante una estrategia en fase sólida.²⁹ En ambos casos se completaba la síntesis en una etapa divergente final funcionalizando los grupos periféricos con ácidos siálicos mediante la formación de tioésteres y amidas respectivamente.

²⁸ Zanini D.; Roy, R. J. *Org. Chem.* **1996**, *61*, 7348-7354.

²⁹ Llinares, M.; Roy, R. *Chem. Commun.* **1997**, 2119-2120.

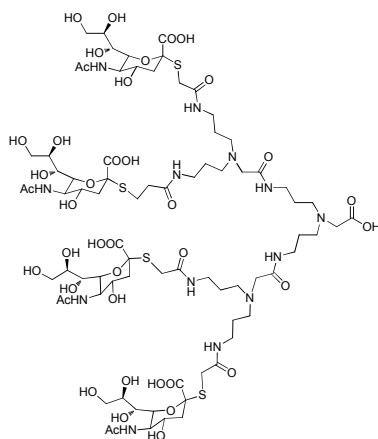


Figura 14. Glicodendrímtero basado en la *N,N*-bis (3-aminopropil)glicina.

Otra alternativa para llevar a cabo la síntesis de glicodendrímteros es mediante el uso de una estrategia convergente, en la que se parte de azúcares simples o pequeños glicoclusters que se unen a unidades ramificadas aumentando su tamaño para finalmente conjugarse a un núcleo. La preparación de estos dendrímteros se puede llevar a cabo utilizando unidades de repetición ramificadas previamente sintetizadas de modo que permiten una construcción más rápida de grandes estructuras. Así, el dendrón de tris(hidroxi metilamino)metano funcionalizado con diferentes monosacáridos peracetilados se ha unido a diferentes unidades de repetición bi o tridentadas así como a diferentes núcleos multidentados, para la síntesis de dendrímteros que presentan 9, 18 y 36 unidades de monosacárido en su periferia. La primera aproximación se realizó usando β -D-glucopiranososa³⁰ como carbohidrato y más tarde se extendió a la síntesis de derivados de α -D-manopiranososa (Figura 15).³¹

³⁰ (a) Ashton, P.R.; Boyd, S.E.; Brown, C.L.; Jayaraman, N.; Nepogodiev, S.A.; Stoddart, J.F. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1115-1128. (b) Ashton, P.R.; Boyd, S.E.; Brown, C.L.; Jayaraman, N.; Stoddart, J.F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 732-735.

³¹ Ashton, P.R.; Hounsell, E.F.; Jayaraman, N.; Nielsen, T.M.; Spencer, N.; Stoddart, J.F.; Young, M. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3429-3437.

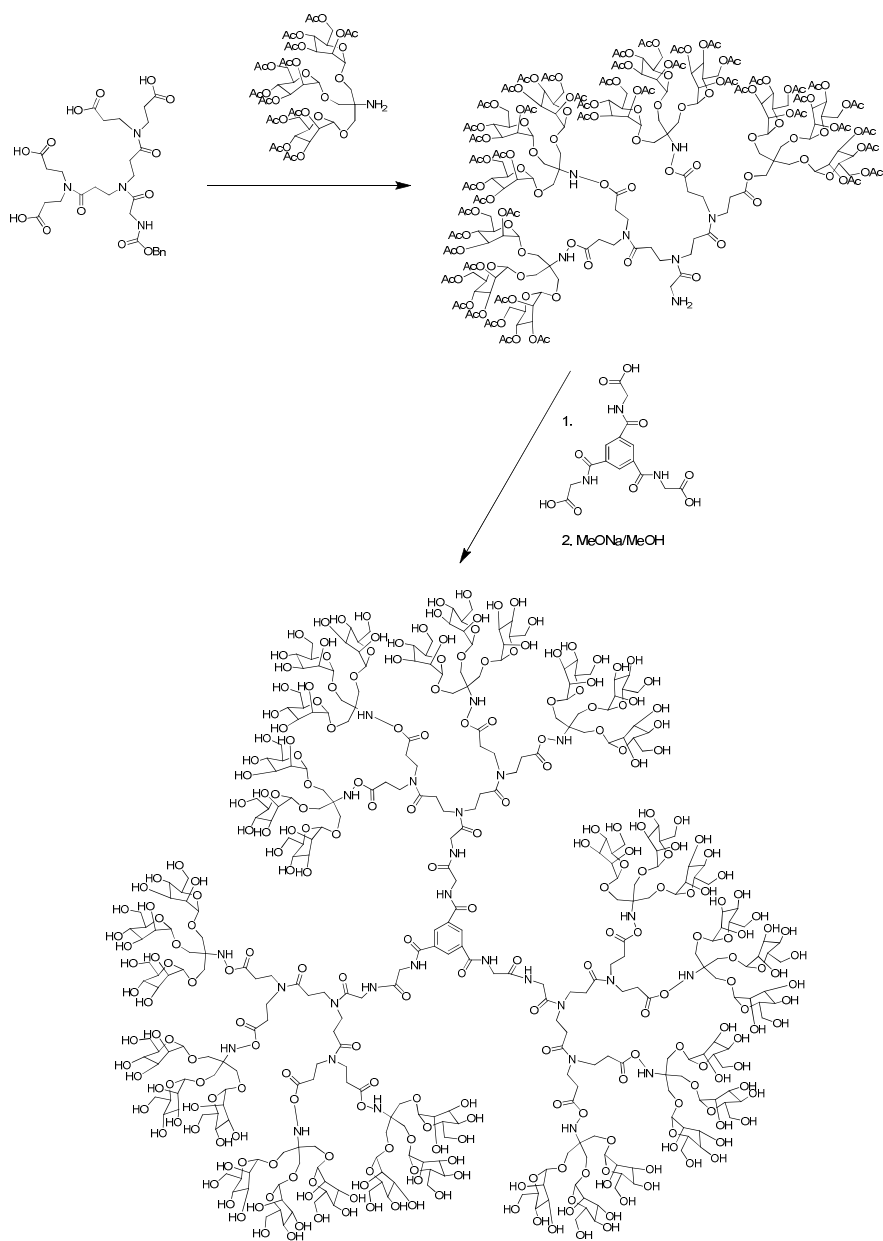


Figura 15. Síntesis convergente de glicodendrimeros de manosa.

La mayoría de las síntesis de dendrímeros mencionadas hasta el momento implican la utilización de carbohidratos protegidos. Esto se debe a que los grupos hidroxilo libres pueden interferir en las reacciones de acoplamiento utilizadas en la síntesis de glicodendrimeros. Además, la naturaleza altamente polar de los azúcares los

hacen inadecuados para la purificación mediante cromatografía en gel de sílice. Sin embargo, los grupos protectores traen asociado un aumento en el impedimento estérico que puede ser importante en sistemas de elevada generación con un gran número de carbohidratos. Para solventar este problema, Stoddart y colaboradores³² describieron la síntesis de glicodendrimeros usando carbohidratos totalmente desprotegidos, por formación de enlaces amida entre un glicocluster desprotegido conteniendo un grupo amino y un núcleo con ésteres activados con *N*-hidroxisuccinimida (Figura 16).

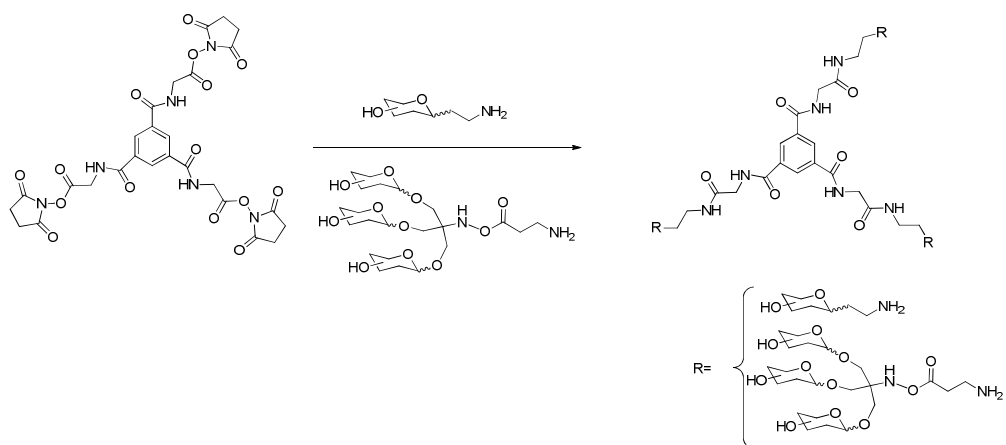


Figura 16. Síntesis de glicodendrimeros a partir de azúcares desprotegidos.

Otros métodos para la derivatización de dendrimeros con grupos amino terminales se llevaron a cabo mediante la apertura de anillos de aldolactonas,³³ o formación de tioureas con isotiocianatos (Figura 17).³⁴

³² Jayaraman N.; Stoddart, J.F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 6767-6770.

³³ Aoi, K.; Itoh, K.; Okada, M. *Macromolecules* **1995**, 28, 5391-5393.

³⁴ Kieburg, C.; Dubber, M.; Lindhorst, T.K. *Synlett* **1997**, 1447-1449.

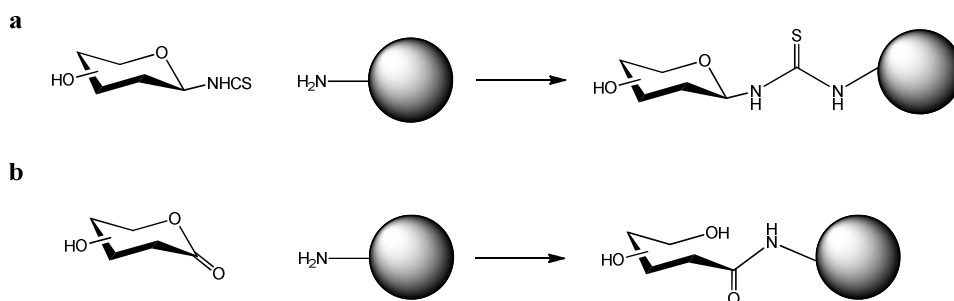


Figura 17. Acoplamiento directo de azúcares activados como isotiocianatos (a) y glicolactonas (b) a dendrímeros que contienen grupos amino primarios en su superficie.

La importancia de los glicodendrimeros se pone de manifiesto debido al gran número de aplicaciones biomédicas que se han descrito para este tipo de compuestos. Entre estas aplicaciones podemos destacar estudios de inhibición de infecciones víricas y bacterianas, erradicación de tumores por estimulación de la respuesta inmune, etc. A continuación describiremos algunos ejemplos representativos de glicodendrimeros con aplicaciones biológicas.

El primer ejemplo de glicodendrimeros que encontramos en la bibliografía fue publicado en 1993 por Roy y colaboradores.³⁵ Éste consistía en una oligolisina hiperramificada que presentaba 16 moléculas de ácido siálico. Este compuesto demostró ser un potente inhibidor de la hemoaglutinación causada por el virus de la gripe. En la Figura 18 se muestra la estructura del glicodendrón que contiene 8 moléculas de ácido siálico en su superficie.

³⁵ Roy, R.; Zanini, D.; Meunier, S.J.; Romanowska, A.J. *Chem. Commun.* **1993**, 1869-1872.

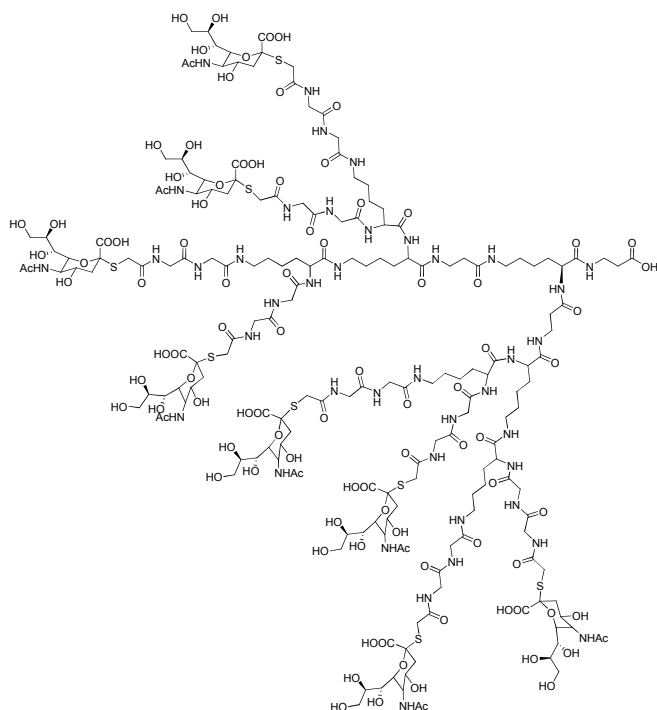


Figura 18. Glicodendrón que contiene 8 unidades de ácido siálico basado en una oligolisina ramificada.

Este primer trabajo dio lugar a la aparición de numerosos estudios en este campo, demostrándose que los glicodendrimeros eran unas herramientas muy útiles para obtener información detallada de la interacción carbohidrato-proteína a nivel molecular. Posteriormente, Roy, Tomalia y Baker³⁶ prepararon un glicodendrímtero empleando la cuarta generación del dendrímtero comercial PAMAM derivatizado también con ácidos siálicos (Figura 19). Los estudios experimentales realizados *in vivo* con ratones demostraron la protección frente al virus de la gripe. En este caso, el glicodendrímtero no solo mostró un incremento en la afinidad debido a la multivalencia,

³⁶ Reuter, J.D.; Myc, A.; Hayes, M.M.; Gan, Z.; Roy, R.; Qin, D.; Yin, R.; Piehler, L.T.; Esfand, R.; Tomalia, D.A.; Baker, J.R. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 271-278.

sino que también facilitó la liberación de ácido siálico previniendo el proceso enzimático *in vivo* y disminuyendo la citotoxicidad.³⁷

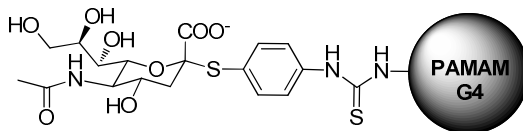


Figura 19. 4ª generación del dendrímero PAMAM conjugado con ácido siálico.

Otro ejemplo interesante lo constituyen los glicodendrimeros que presentan miméticos de GM1. La parte oligosacáridica del gangliósido GM1 (β Gal1-3 β GalNAc1-4[α Sia2-3]- β Gal1-4Glc) (Figura 20) es responsable de la adhesión de la toxina del cólera a la superficie de las células del intestino, siendo esta interacción crucial para que se desarrolle la enfermedad. Dendrimeros basados en PPI y PAMAM han sido funcionalizados con el oligosacárido GM1 mostrando propiedades de inhibición 1000 veces superior a la del oligosacárido monovalente.³⁸ Además, este oligosacárido se ha unido a otro tipo de estructura dendrímica más asequible como el ácido 3,5-bis-(2-aminoetoxi)benzoico. La afinidad mostrada por este tetrámero con respecto al monómero libre también supone una mejora muy significativa de la actividad.³⁹

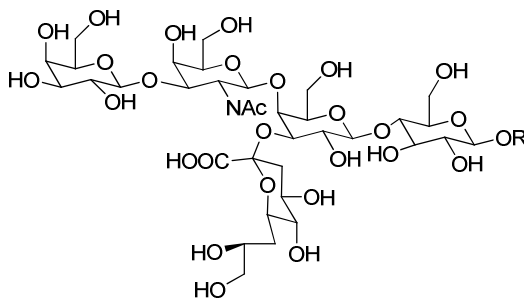


Figura 20. Estructura oligosacáridica del gangliósido GM1.

³⁷ Landers, J.J.; Cao, Z.; Lee, I.; Pichler, L.T.; Myc, P.P.; Myc, A.; Hamouda, T.; Galecki, A.T.; Baker, J.R. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1222-1230.

³⁸ Thompson, J.P.; Schengrund, C.L. *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 837-845.

³⁹ Arosio, D.; Vrasidas, I.; Valentini, P.; Liskamp, R.M.; Pieters, R.J.; Bernardi, A. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2113-2124.

También podemos encontrar en la bibliografía una serie de dendrímeros funcionalizados con manosas que han sido empleados fundamentalmente como inhibidores de lectinas.^{27,31,40} Por ejemplo, dendrímeros basados en PAMAM (Figura 21) y el ácido 3,5-bis-(2-aminoetoxi)benzoico han sido preparados para evaluar su capacidad de inhibición frente a las bacterias uropatógenas de *E. coli*. Todos los compuestos multivalentes preparados mostraron una mayor afinidad que la que presentaba el monómero de manosa libre.⁴¹

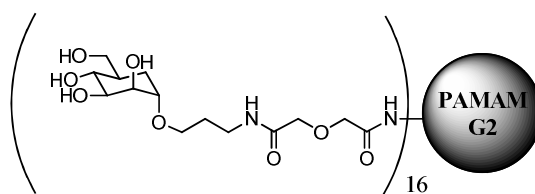


Figura 21. Dendrímero PAMAM de 2ª generación funcionalizado con manosa.

Otra de las aplicaciones de los glicodendrímeros se enmarca en la erradicación de tumores por activación de la respuesta inmune. Lindhorst y colaboradores⁴² desarrollaron dendrímeros octavalentes de PAMAM funcionalizados con residuos de *N*-acetilglucosamina los cuales presentaban una alta afinidad *in vitro* por el receptor NKP-1 (receptor de Natural killer-protein 1). Estos autores inocularon células de melanona en ratones y emplearon diferentes protocolos de administración del glicodendrímero, demostrando efectos positivos significativos tanto en la supervivencia del animal como en la inhibición del crecimiento del tumor. Este trabajo puso de manifiesto que el empleo de neoglicoconjugados puede estimular una respuesta inmune antitumoral.

²⁷ Pagé, D.; Roy, R. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 714-723.

³¹ Ashton, P.R.; Hounsell, E.F.; Jayaraman, N.; Nielsen, T.M.; Spencer, N.; Stoddart, J.F.; Young, M. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3429-3437.

⁴⁰ Mangold, S.L.; Cloninger, M.J. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2458-2465.

⁴¹ Appeldoorn, C.C.M.; Joosten, J.A.; Ait el Maate, F.; Dobrindt, U.; Hacker, J.; Liskamp, R.M.J.; Khan, A.S.; Pieters, R.J. *Tetrahedron: Asymm.* **2005**, *16*, 361-372.

⁴² Vannucci, L.; Fiserova, A.; Sadalpure, K.; Lindhorst, T.K.; Kuldova, M.; Rossmann, P.; Horvath, O.; Kren, V.; Krist, P.; Bezouska, K.; Luptovcova, M.; Mosca, F.; Pospisil, M. *Int. J. Oncol.* **2003**, *23*, 285-296.

Como se mencionó al comienzo de este capítulo, las interacciones proteína-carbohidrato son de gran importancia en un elevado número de procesos biológicos, entre ellos la respuesta inmune. En este campo particular existen ya descritos algunos ejemplos significativos de aplicación de sistemas multivalentes de carbohidratos de tipo dendrímérico. Antes de describir estos ejemplos comentaremos brevemente como se genera una respuesta inmune y sobre todo el papel de un receptor denominado DC-SIGN en dicho proceso. Este receptor ha sido objeto de estudio en nuestro grupo de investigación y es también el receptor utilizado en el trabajo que se describe en esta memoria.

1.5. Respuesta inmune y células dendríticas.

El sistema inmunológico es un sistema biológico de defensa responsable de proteger al organismo frente a sustancias extrañas ya sean productos químicos, microorganismos, tumores, etc. Este sistema está constituido por un entramado complejo de células y moléculas especializadas que interactúan con los agentes extraños (exógenos) para generar una respuesta selectiva, neutralizando dicho agente. Existen dos tipos diferentes de respuesta a la invasión de agentes patógenos; la respuesta innata (inespecífica) que ocurre al mismo tiempo que el agente patógeno es encontrado, y la respuesta adquirida (específica) que aumenta con la exposición repetitiva de dicho agente.⁴³

La respuesta inmune específica se caracteriza porque requiere un complicado mecanismo de proliferación de antígenos específicos B y células T (se entiende por antígeno toda sustancia con capacidad para generar una respuesta inmune, es decir, que posee capacidad de ser reconocida como extraña por el sistema inmune). Esta respuesta puede ser de dos tipos: celular y humoral. En general se considera que cuando las células implicadas son los linfocitos B, se trata de una respuesta tipo humoral mientras que cuando participan prioritariamente las células T, se trata de una respuesta tipo

⁴³ Male, D.; Brostoff, J.; Roth, D.B.; Roitt, I. *Inmunología* Harcourt Brace and company, 7ª ed, 2007.

celular. La respuesta inmune de tipo celular cubre una importante función como mecanismo inmunológico de defensa, actuando principalmente frente a virus, así como evitando la aparición y desarrollo de células tumorales. En la respuesta inmune de tipo humoral el antígeno es reconocido a través de las inmunoglobulinas de membrana. Sin embargo, este estímulo no es suficiente para que se inicie y desarrolle la respuesta inmune humoral. Para ello es necesario que los linfocitos B, además del estímulo antigénico, reciban el estímulo de ciertas citocinas producidas por las células T colaboradoras. Sólo cuando confluyen estos estímulos, el antigénico y el mediado por las citocinas, se produce la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B hasta la formación de células memoria y células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas, que serán el elemento efector final de la respuesta humoral.

Para que las células T puedan reconocer un antígeno, éste debe ser debidamente presentado. Esta función se realiza por las células presentadoras de antígenos (APCs) y sus determinantes antigénicos son expuestos en la superficie de estas células en el seno de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Figura 22).

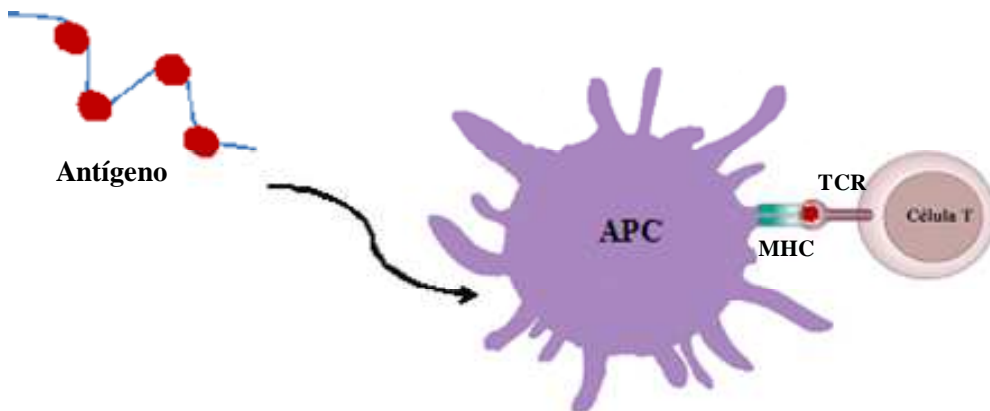


Figura 22. Presentación de antígenos mediada por células presentadoras de antígenos (APCs) mediante la formación de complejos peptídicos MHC.

Las moléculas del MHC son glicoproteínas presentes en las membranas de la mayoría de las células nucleadas. Estas moléculas son esencialmente de dos tipos, tipo I y tipo II y tienen entre otras funciones las de presentar el antígeno a los linfocitos así como participar en el proceso de maduración de los linfocitos T en el timo. Las células

presentadoras de antígenos (APCs) tienen como misión captar, procesar proteolíticamente en el interior de estas células y después presentar el antígeno a las células T conjuntamente con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.

Las células T expresan en su membrana un receptor para el reconocimiento del antígeno denominado TCR (receptor de las células T); sin embargo, este receptor no es capaz de reconocer el antígeno en su totalidad. Para que el antígeno pueda ser reconocido por las células T, el antígeno tiene que ser degradado y procesado de tal modo que el determinante reconocido por el receptor de las células T solo es un pequeño fragmento del antígeno original. Se entiende por procesamiento del antígeno la degradación del mismo dando lugar a fragmentos peptídicos, los cuales se unirán al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) siendo decisivos para activar las células T.

Las células especializadas del sistema inmunitario, denominadas células presentadoras de antígenos (APCs), exponen los antígenos a los linfocitos T y participan por tanto de forma activa, en la generación de la respuesta frente al antígeno.⁴⁴ Estas células son altamente especializadas y eficientes en el proceso de internalización de antígenos, bien por fagocitosis o por endocitosis mediada por receptores. Las células presentadoras de antígenos más importantes son las denominadas células dendríticas (DCs) que actúan como centinelas en las mucosas activándose frente a la infección de patógenos.⁴⁵ Las células dendríticas son consideradas como las APCs más importantes en los tejidos periféricos y órganos linfáticos.⁴⁶

Estas células presentan una gran variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que incluyen *Toll-like receptors (TLRs)*,⁴⁷ y lectinas tipo C⁴⁸ que pueden

⁴⁴ Peter, J.D.; Ivan, M. R. *New Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 37-49.

⁴⁵ (a) Hart, D. N. *J. Blood* **1997**, *90*, 3245-3287. (b) Banchereau, J.; Steinman, R.M. *Nature* **1998**, *392*, 245-252.

⁴⁶ (a) Théry, C.; Amigoreno, S. *Curr. Opin. Immunol.* **2001**, *13*, 45-51. (b) Mellman, I.; Steinman, R. M. *Cell* **2001**, *106*, 255-258.

⁴⁷ (a) Underhill, D.M.; Ozinsky, A. *Curr. Opin. Immunol.* **2002**, *14*, 103-110. (b) Thomas-Uszynski, S.; Stenger, S.; Takeuchi, O.; Ochoa, M.T.; Mentele, M. *Science* **2001**, *291*, 1544-1547.

reconocer patrones moleculares expresados por patógenos (Figura 23). Así por ejemplo, las lectinas de tipo C reconocen patrones o estructuras oligosacáridicas, los TLRs pueden reconocer lípidos (lipoproteínas, lipopolisacáridos (LPS)) y ácidos nucleicos.⁴⁹

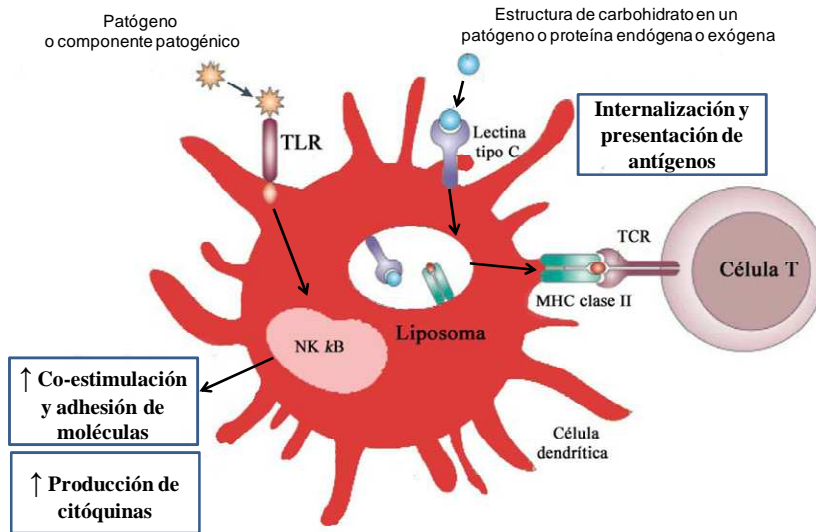


Figura 23. Receptores de patógenos en una célula dendrítica y presentación de antígenos a células T mediante el MHC.

Tras este proceso las DCs migran generalmente a través de los vasos linfáticos hasta alcanzar los nódulos linfáticos donde pueden interactuar con las células T. Durante la migración, las células dendríticas maduran, principalmente por la pérdida de la mayor parte de sus funciones como células fagocíticas, adquiriendo la capacidad de interacción y comunicación con las células T.

Dentro de los lisosomas de las células dendríticas tiene lugar la digestión de los patógenos que son internalizados, dando lugar a proteínas menores por la acción de proteasas, intermedios reactivos de oxígeno y monóxido de nitrógeno. Solamente algunas de estas proteínas son epítomos estables y son transportados a las superficies celulares y presentadas a las células T a través de los correspondientes complejos MHC.

⁴⁸ Weis, W.I.; Taylor, M. E.; Drickamer, K. *Immunol. Rev.* **1998**, *163*, 19-34.

⁴⁹ Janeway, C.A.Jr.; Medzhitov, R. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 197-216.

La respuesta de las DCs se modula dependiendo del tipo o forma del microorganismo que es reconocido por diferentes TLRs y lectinas tipo C. Los TLRs transmiten información sobre la interacción entre las DCs y los patógenos a través de cascadas de señalización, provocando así los procesos celulares necesarios para la maduración de las células dendríticas y la inducción de citoquinas inflamatorias.^{49,47a} Por el contrario, las lectinas tipo C internalizan patógenos conduciendo a su degradación proteolítica y amplificando el procesamiento y presentación de antígenos por las células dendríticas.⁵⁰ Por otra parte, las lectinas tipo C reconocen estructuras de carbohidratos como glicoproteínas endógenas permitiendo la tolerancia frente a antígenos propios y mediando en los procesos celulares, tales como la señalización, adhesión o migración celular.^{50a}

La principal función de las lectinas tipo C expresadas por células dendríticas es interaccionar con patrones moleculares que son compartidos por un amplio rango de microorganismos, e internalizar estos microorganismos (patógenos) para el procesamiento y presentación de antígenos. De este modo, se inicia una respuesta inmune frente a una gran diversidad de microorganismos.⁵¹

Uno de los receptores de reconocimiento de patógenos fundamentales de esta familia, expresado en células dendríticas, es la lectina DC-SIGN, que comentaremos en el siguiente apartado.

1.5.1. DC-SIGN, receptor de estructuras oligosacáridicas.

DC-SIGN (Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) también denominada CD209, es una proteína que no pertenece a la familia de las integrinas y que reconoce específicamente la molécula de adhesión intercelular-3 (ICAM-3). Esta

⁵⁰ (a) Figdor, C.G.; van Kooyk, Y.; Adema, G.J. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 77-84. (b) Engering, A.; Geijtenbeek, T.B.H.; van Vliet, S.J.; Wijers, M.; van Liempt, E.; Demaurex, N.; Lanzavecchia, A.; Fransen, J.; Figdor, C.G.; Piquet, V.; van Kooyk, Y. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 2118-2126.

⁵¹ (a) Drickamer, K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 612-616. (b) Kato, M.; T.K. Neil; D.B. Fearnley.; A.D. McLellan.; S. Vuckovic.; D.N.H. *Int. Immunol.* **2000**, *12*, 1511-1519.

proteína está presente fundamentalmente en la superficie de las células dendríticas inmaduras. DC-SIGN, es una proteína transmembrana de tipo II que pertenece a la familia de las lectinas de tipo C (reconocen carbohidratos de forma Ca^{2+} dependiente). Esta lectina presenta varios dominios bien diferenciados: un pequeño dominio intracelular en el extremo *N*-terminal, que está implicado en procesos de internalización y de señalización intracelular; un dominio transmembrana hidrofóbico; y un dominio extracelular (Figura 24). En el dominio extracelular se distinguen dos zonas bien diferenciadas, una zona denominada cuello constituido por un fragmento peptídico de 23 aminoácidos que se repite 7 veces de forma completa y otra vez más de forma incompleta, el cual es responsable de la oligomerización de la proteína (DC-SIGN es un homotetrámero).⁵² En el extremo *C*-terminal se encuentra el dominio de lectina de tipo C, o dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) (Figura 24). El CRD es el responsable de la interacción con carbohidratos presentes en glicoproteínas de ligandos naturales como ICAM-3, ICAM-2 o glicoproteínas de patógenos como gp120 (VIH), GP1 (Ébola), etc. DC-SIGN fue descubierta y clonada por primera vez por científicos de la compañía farmacéutica Bristol Myers Squibb en 1992.⁵³ Pero no fue hasta el año 2000, cuando el grupo de van Kooyk redescubrió esta proteína y puso de manifiesto el papel que podría jugar en el proceso de infección del VIH.⁵⁴

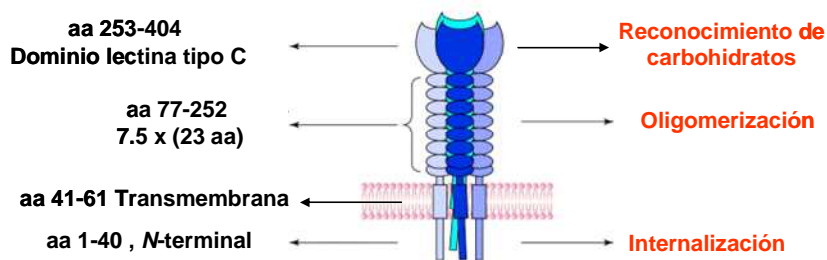


Figura 24. Dominios del receptor DC-SIGN.

⁵² Feinberg, H.; Guo, Y; Mitchel, D.A.; Drickamer, K.; Weis, W.I. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 1327-1335.

⁵³ Curtis, B.M.; Scharnowski, S.; Watson, A.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 8356-8360.

⁵⁴ (a) Geijtenbeek, T.B.H.; Torensma, R.; van Vliet, S.J.; van Duijnhoven, G.C.F.; Adema, G.J.; van Kooyk, Y.; Figdor, C.G. *Cell* **2000**, *100*, 575-585. (b) Geijtenbeek, T.B.H.; Kwon, D.S.; Torensma, R.; van Vliet, S.J.; van Duijnhoven, G.C.F.; Middel, J.; Cornelissen, I.L.M.H.A.; Nottet, H.S.L.M.; KewalRamani, V.N.; Littman, D.R.; Figdor, C.G.; van Kooyk, Y. *Cell* **2000**, *100*, 587-597.

Van Kooyk y col. demostraron que el VIH podía usar, a través de la interacción de la glicoproteína gp120 de la superficie viral con el receptor DC-SIGN, el mecanismo de defensa descrito anteriormente, como ruta para poder infectar las células T del sistema inmunitario. Sorprendentemente (no hay una explicación clara a este hecho), tras la interacción con el receptor en las DCs, el virus no es degradado sino que en una forma perfectamente infectiva viaja junto con las DCs hasta alcanzar los nódulos linfáticos donde entra en contacto con las células T. En otras palabras, el virus del SIDA es capaz de “secuestrar” este mecanismo de defensa del organismo para su propio beneficio y poder alcanzar así sus células diana (células T) del sistema inmune.

A partir de este descubrimiento, numerosos grupos de investigación han demostrado que el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) de DC-SIGN interacciona con multitud de proteínas altamente glicosiladas como las presentes en la superficie de muchos patógenos además del VIH. DC-SIGN interacciona con glicoproteínas de virus (VIH-1⁵⁴ y VIH-2,⁵⁵ SIV-1,⁵⁶ Ébola,⁵⁷ Hepatitis C,⁵⁸ SARS,⁵⁹ *Citomegalovirus*⁶⁰ o *Dengue*⁶¹), bacterias (*Helicobacter pylori*,⁶² *Mycobacterium tuberculosis*⁶³),

⁵⁵ Pöhlmann, S.; Soilleux, E.J.; Baribaud, F.; Leslie, G.J.; Morris, L.S.; Trowsdale, J.; Lee, B., Coleman, N.; Doms, R.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 2670-2675.

⁵⁶ Lee, B.; Leslie, G.; Soilleux, E.; O'Doherty, U.; Baik, S.; Levroney, E.; Flummerfelt, K.; Swiggard, W.; Coleman, N.; Malim, M.; Doms, R.W. *J. Virol.* **2001**, *75*, 12028-12038.

⁵⁷ Álvarez, C.P.; Lasala, F.; Carrillo, J.; Muñoz, O.; Corbí, A.L.; Delgado, R. *J. Virol.* **2002**, *76*, 6841-6844.

⁵⁸ Pöhlmann, S.; Zhang, J.; Baribaud, F.; Chen, Z.; Leslie, G.J.; Lin, G.; Granelli-Piperno, A.; Doms, R. W.; Rice, C.M.; McKeating, J.A. *J. Virol.* **2003**, *77*, 4070-4080.

⁵⁹ Marzi, A.; Gramberg, T.; Simmons, G.; Möller, P.; Rennekamp, A.J.; Krumbiegel, M.; Geier, M.; Eisemann, J.; Turza, N.; Saunier, B.; Steinkasserer, A.; Becker, S.; Bates, P.; Hofmann, H.; Pöhlmann, S. *J. Virol.* **2004**, *78*, 12090-12095.

⁶⁰ Halary, F.; Amara, A.; Lortat-Jacob, H.; Messerle, M.; Delaunay, T.; Houlès, C.; Fieschi, F.; Arenzana-Seisdedos, F.; Moreau, J. F.; Déchanet-Merville, M.J. *Immunity* **2002**, *17*, 653-664.

⁶¹ Navarro-Sanchez, E.; Altmeyer, R.; Amara, A.; Schwartz, O.; Fieschi, F.; Virelizier, J.L.; Arenzana-Seisdedos, F.; Desprès, P. *EMBO rep.* **2003**, *4*, 723-728.

⁶² Bergman, M.P.; Engering, A.; Smits, H.H.; van Vliet, S.J.; van Bodegraven, A.A.; Wirth, H.P.; Kapsenberg, M.L.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.; van Kooyk, Y.; Appelmelk, B.J. *J. Exp. Med.* **2004**, *200*, 979-990.

⁶³ Tailleux, L.; Schwartz, O.; Herrmann, J.L.; Pivert, E.; Jackson, M.; Amara, A.; Legres, L.; Dreher, D.; Nicod, L.P.; Gluckman, J.C.; Lagrange, P.H.; Gicquel, B.; Neyrolles, O. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 121-127.

hongos (*Candida albicans*⁶⁴), y parásitos (*Schistosoma mansoni*,⁶⁵ *Leishmania pifano*⁶⁶) entre otros. Este amplio espectro de patógenos que son reconocidos por DC-SIGN ha contribuido a que se considere a esta lectina como un receptor universal de patógenos.⁶⁷

Las glicoproteínas de estos patógenos que son reconocidas por DC-SIGN contienen, fundamentalmente, estructuras oligosacáridicas que presentan manosas y fucosas como parte de los *N*-glicanos unidos al aminoácido Asn presente en diferentes posiciones de estas glicoproteínas. La estructura de *high mannose* (Figura 25), constituida por Man₉GlcNAc₂ como epítipo principal, se considera como uno de los ligandos que interaccionan de forma más fuerte con esta lectina. DC-SIGN reconoce tanto estructuras ramificadas con un mínimo de tres unidades de manosa (trisacáridos del tipo Man α 1-3[Man α 1-6]Man indicado en color azul en la Figura 25) como estructuras con dos unidades de manosa terminales (disacáridos Man α 1-2Man indicado en color rojo en la Figura 25). Además, el reconocimiento específico de diferentes estructuras oligosacáridicas por DC-SIGN parece que depende del lugar que ocupe el carbohidrato en la glicoproteína.⁶⁸ Parece evidente que la disposición espacial de este “cluster” de manosas ramificadas presentes en distintos enclaves de la proteína viral es crítico en la interacción selectiva multivalente con DC-SIGN.

⁶⁴ Cambi, A.; Gijzen, K.; de Vries, J.M.; Torensma, R.; Joosten, B.; Adema, G.J.; Netea, M.G.; Kullberg, B.J.; Romani, L.; Figdor, C.G. *Eur. J. Immunol.* **2003**, *33*, 532-538.

⁶⁵ van Die, I.; van Vliet, S.J.; Nyame, A.K.; Cummings, R.D.; Bank, C.M.; Appelmelk, B.; Geijtenbeek, T.B.; van Kooyk, Y. *Glycobiology* **2003**, *13*, 471-478.

⁶⁶ Colmenares, M.; Puig-Kröger, A.; Pello, O.M.; Corbí, A.L.; Rivas, L. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36766-36769.

⁶⁷ (a) van Kooyk, Y.; Geijtenbeek, T.B. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 697-709. (b) Pöhlmann, S.; Baribaud, F.; Doms, R.W. *Trends Immunol.* **2001**, *22*, 643-646.

⁶⁸ Mitchell, D. A.; Fadden, A. J.; Drickamer, K. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 28939-28945.

1.5.2. Activación de la respuesta inmune por interacción con el receptor DC-SIGN.

A finales de los años 90 se publicaron las primeras evidencias de que epítomos (o péptidos inmunogénicos) manosilados estimulaban la correspondiente respuesta inmune por la interacción con Receptores de Manosa (MR) de células dendríticas. De manera simultánea, Pieters⁷⁰ y Koning⁷¹ demostraron que proteínas o péptidos inmunogénicos manosilados inducían una fuerte estimulación de células T. Pieters y colaboradores pusieron de manifiesto que la proteína BSA (albumina de suero bovino) manosilada (BSA-man) es reconocida por receptores de manosa, internalizándose y localizándose en compartimentos intracelulares para ser degradada y presentada en forma de complejos MHC de clase II. El reconocimiento de BSA-man a través de receptores de manosa se incrementó 100 veces con respecto a la BSA no manosilada. Koning y colaboradores realizaron un estudio complementario empleando diferentes péptidos antigénicos manosilados y BSA, concluyendo que la manosilación podía provocar una mejora de 200-10.000 veces en la actividad por estimulación de células T. Estos resultados mostraron por primera vez la potencial aplicación de antígenos manosilados usando células dendríticas como vehículos para su presentación.

Hay algunos ejemplos interesantes previos al descubrimiento de DC-SIGN como el descrito por Grandjean y colaboradores⁷² en los que un receptor de manosa se consideraba como vía de entrada al interior celular. Estos autores emplearon una estrategia modular para la unión de manosas y un péptido a una plataforma peptídica basada en lisinas (Figura 26). Este fue el primer ejemplo que combinaba una presentación multivalente de manosas y un péptido antigénico, el cual podría ser usado para inducir una respuesta inmune mediada por células dendríticas. Estudios de internalización en modelos celulares que presentaban receptores de manosa, de estos cluster (basados en lisina funcionalizados con manosa, quinina o ácido siquímico

⁷⁰ Engering, A.J.; Cella, M.; Fluitsma, D.; Brockhaus, M.; Hoefsmit, E.C.M.; Lanzavecchia, A.; Pieters, J. *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*, 2417-2425.

⁷¹ Tan, M.C.A.A.; Mommaas, A.M.; Drijfhout, J.W. y col. *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*, 2426-2435.

⁷² Grandjean, C.; Rommens, C.; Gras-Masse, H.; Melnyk, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1068-1072.

marcados fluorescentemente) mostraron la co-localización de los compuestos dendríticos y de los receptores de manosa, así como el proceso de internalización.⁷³

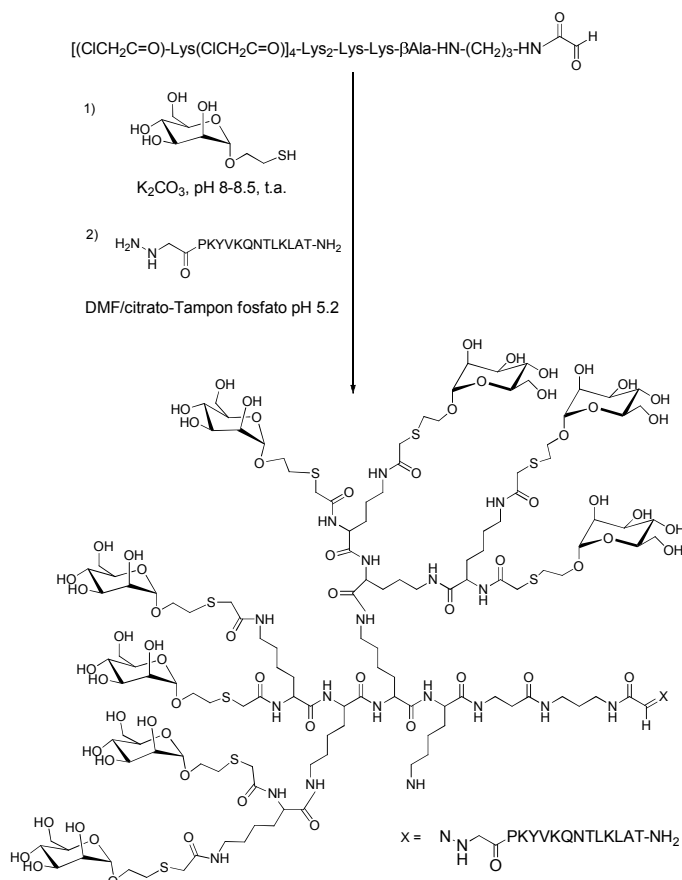


Figura 26. Síntesis de una estructura dendrítica manosilada basada en una plataforma peptídica de lisinas conjugada con un péptido inmunogénico.

Sin embargo, la mayoría de los trabajos descritos están basados en la glicosilación de proteínas antigénicas para ser capturadas por APCs. En todos estos ejemplos hay una ausencia completa del control sobre el nivel de manosilación. Uno de los primeros ejemplos fue descrito por Roche y colaboradores.⁷⁴ Estos autores usaron BSA conjugada con varias copias (25 unidades) de manosa, fucosa o lactosa (como control negativo) demostrando la internalización y el tráfico de estos glicoconjugados

⁷³ Grandjean, C.; Angyalosi, G.; Loing, E.; Adriaenssens, E.; Melnyk, O.; Pancré, V.; Auriault, C.; Gras-Masse, H. *ChemBioChem* **2001**, 2, 747-757.

⁷⁴ Frison, N.; Taylor, M.E.; Soilleux, E.; Bousser, M.T.; Mayer, R.; Monsigny, M.; Drickamer, K.; Roche, A.C. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 23922-23929.

tras la interacción mediada por lectinas tipo C (fundamentalmente receptores de manosa y DC-SIGN). Por otra parte, estos autores usaron también pequeños péptidos basados en lisina para conjugar entre 2 y 6 copias de diferentes azúcares incluyendo dimanósidos lineales, Lewis a, Lewis b o lewis x (Figura 27). Los experimentos *in vitro* demostraron una endocitosis, dependiente del receptor, de los glicoconjugados manosilados y fucosilados. Los carbohidratos presentes en estos glicoclusters modulaban la selectividad de la lectina tipo C. Así, los glicoconjugados que presentaban unidades de tipo Man α 1,6Man interaccionaban fundamentalmente con receptores de manosa, mientras que los glicoconjugados de Lewis lo hacían más selectivamente con el receptor DC-SIGN.

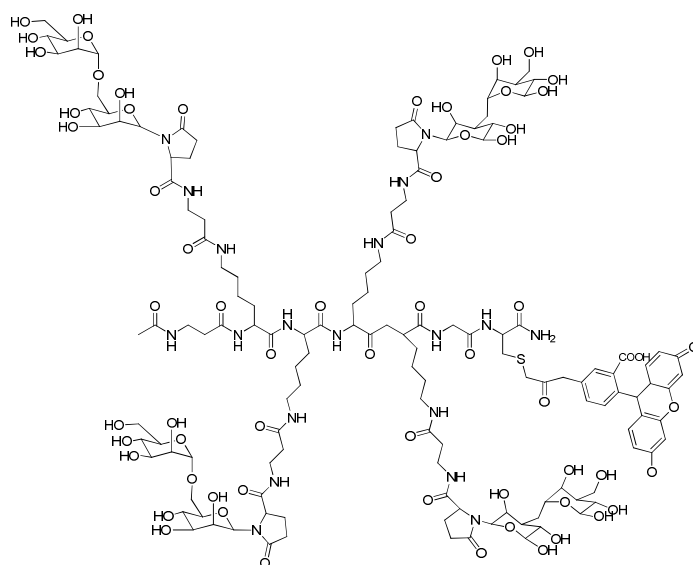


Figura 27. Glicodendrón basado en oligolisinas de Man α 1,6Man.

Estos estudios fueron completados posteriormente usando un péptido consistente en 25 aminoácidos del antígeno de un melanoma elongado en su extremo *N*-terminal con cuatro lisinas y glicosilado con cuatro copias de Man α 1,6Man o una mezcla de Lewis a y Lewis x o bien lactosa como control negativo (Figura 28).⁷⁵ Las células dendríticas indujeron una eficiente internalización de estos conjugados (con

⁷⁵ Srinivas, O.; Larrieu, P.; Duvenger, E.; Boccaccio, C.; Bousser, M.T.; Monsigny, M.; Fonteneau, J.F.; Jotereau, F.; Roche, A.C. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1547-1554.

excepción de los lactosil derivados). Mediante el uso de biosensores con detección por Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) se demostró la selectividad del receptor DC-SIGN por los glicoconjugados del derivado de dimanosa y Lewis x mientras los receptores de manosa reconocieron fundamentalmente derivados de manosa. Los glicoconjugados de manosa o de Lewis indujeron una clara activación de linfocitos citotóxicos dependiente del complejo MHC clase I.

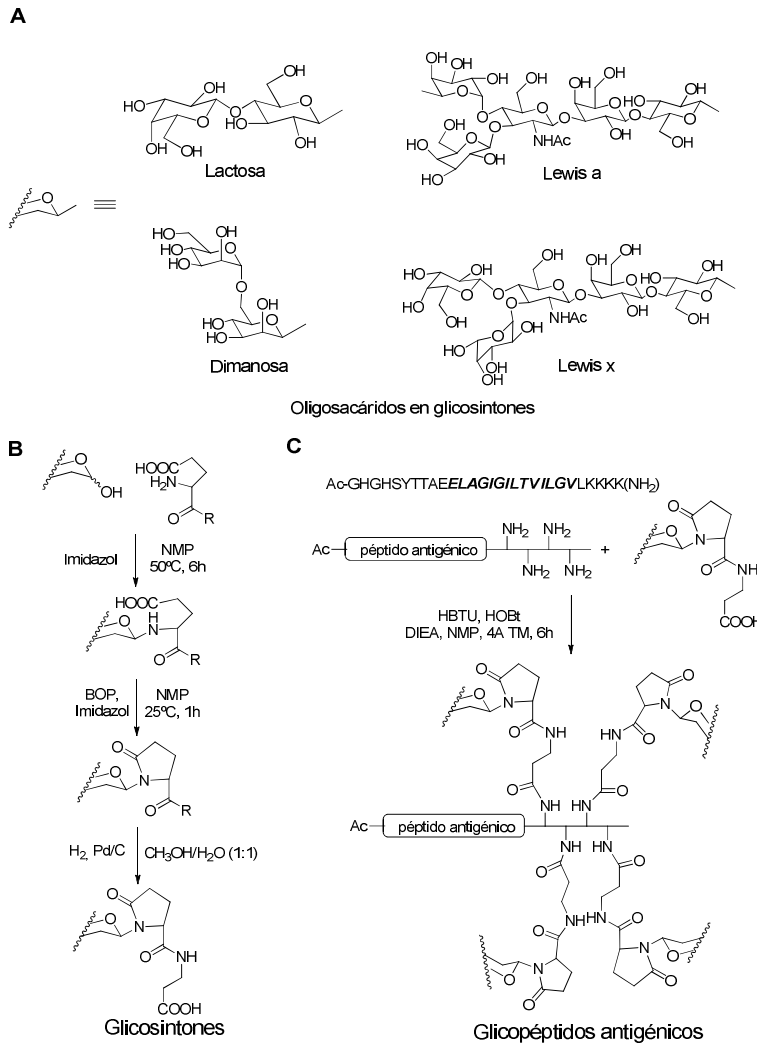


Figura 28. A) Oligosacáridos usados para preparar los glicosintones. B) Aproximación sintética en la preparación de glicosintones. C) Síntesis de glicopéptidos antigénicos.

Chang y colaboradores⁷⁶ han descrito un método directo basado en la síntesis en fase sólida para preparar dendrones de polilisina manosilados. La 4ª generación, que presentaba 16 copias de manosa en su superficie, fue marcado fluorescentemente (Figura 29) y se evaluó el proceso de internalización vía endocitosis. Mediante microscopía confocal pudo observarse que el glicodendrímtero se acumuló dentro de vesículas en las células dendríticas. La internalización a través de receptores de manosa fue demostrada mediante el empleo de controles negativos.

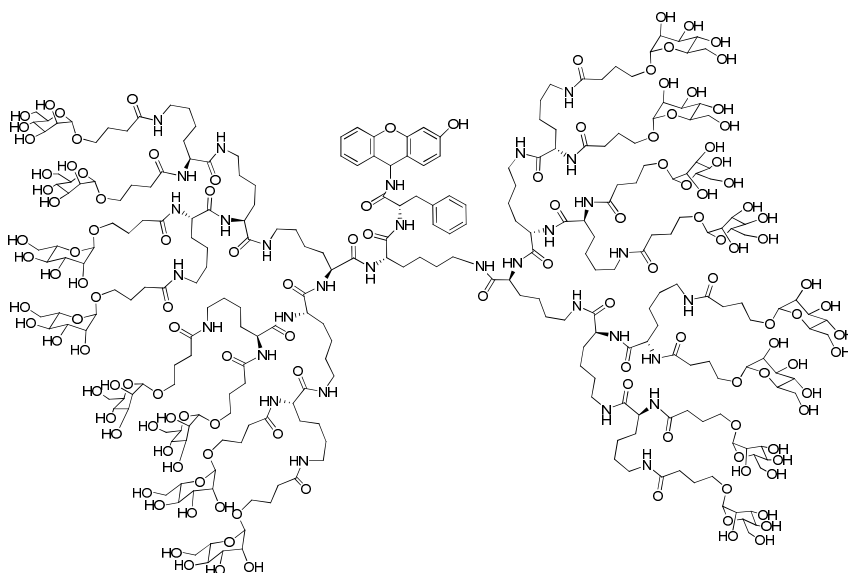


Figura 29. Dendrón monodisperso de 4ª generación basado en polilisina con 16 manosas.

Frisch y colaboradores⁷⁷ realizaron una aproximación multivalente que implicaba la utilización de mono, di, y tetramanosil derivados de moléculas anfifílicas que contenía una cola lipofílica (Figura 30). Éstos fueron anclados dentro de liposomas preparados mediante una combinación de fosfolípidos y colesterol.

La internalización en células dendríticas fue evaluada usando liposomas fluorescentes. El contenido de manosa de estos liposomas resultó jugar un papel muy

⁷⁶ Kantchev, E.A.B.; Chang, C.C.; Cheng, S.F.; Roche, A.C.; Chang, D.K. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1377-1385.

⁷⁷ Espuelas, S.; Thumann, C.; Heurtault, B.; Schuber, F.; Frisch, B. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2385-2393.

importante en el proceso de internalización. Este hecho confirmó la necesidad de una presentación multivalente de manosas para el diseño de sistemas que utilizan como diana las células dendríticas. El reconocimiento de liposomas manosilados fue inhibido por manano, demostrando una endocitosis vía receptores específicos de manosa. Por tanto, estos liposomas manosilados podrían ser considerados como unos vehículos apropiados para la presentación y liberación de fármacos o antígenos en células dendríticas. Esta estrategia podría ser aprovechada una respuesta inmune que podría emplearse para el desarrollo de vacunas.

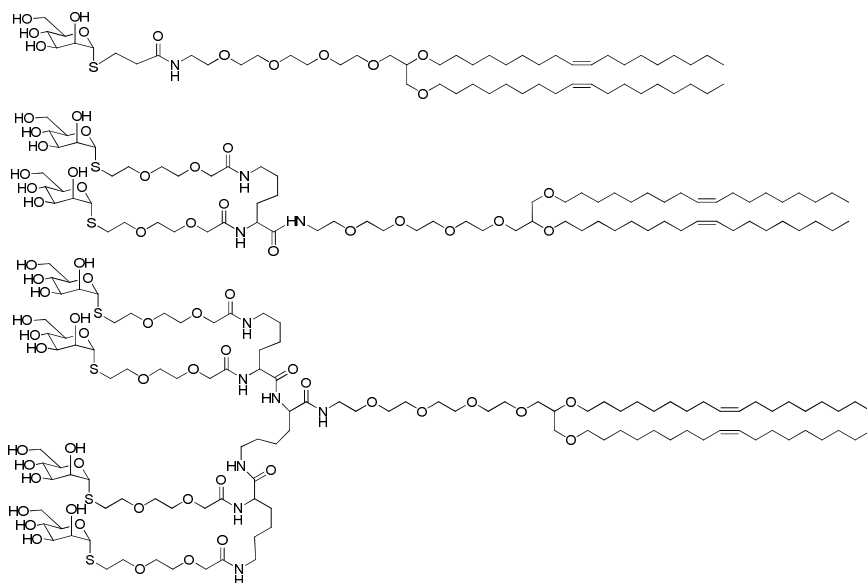


Figura 30. Mono, di y tetramanosilderivados usados para preparar liposomas.

Hacohen y colaboradores⁷⁸ han modificado ovalbumina (OVA) con una selección de oligosacáridos dirigidos a la diana DC-SIGN en DCs para la presentación de antígenos y con la posibilidad de modular la señalización de células dendríticas. OVA fue funcionalizado con un grupo maleimida posteriormente acoplado a una batería de oligosacáridos (Figura 31) que presentaban un espaciador en la posición anomérica con un grupo tiol.

⁷⁸ Adams, E.W.; Ratner, D.M.; Seeberger, P.H.; Hacohen, N. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 294-303.

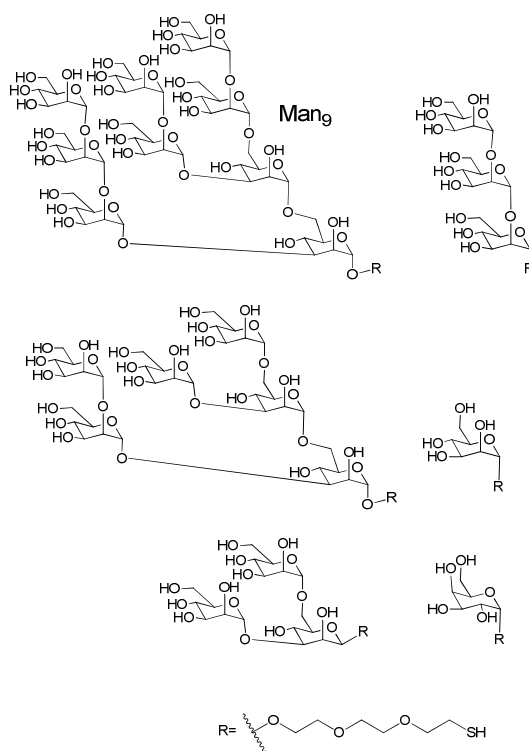


Figura 31. Análogos del oligosacárido *high-mannose* sintetizados para funcionalizar OVA.

Las células dendríticas fueron incubadas con Man₉-OVA y se observó un incremento de 10 veces en la presentación de complejo MHC clase I en comparación con el uso de OVA sin glicosilar. También, fue necesario incrementar la concentración de OVA para lograr la misma proliferación de células T obtenida con Man₉-OVA. Este efecto fue totalmente dependiente del carbohidrato empleado. El derivado de galactosa (Gal-OVA) no fue capaz de producir ningún efecto en comparación con OVA o OVA manosilado induciendo un efecto muy débil. Las células empleadas para este estudio no expresaban receptores de manosa como se comprobó por el uso del anticuerpo correspondiente. Sin embargo, estudios *in vivo* mostraron una disminución de la actividad de Man₉-OVA debido probablemente a la interferencia de otros receptores de manosa presentes en la superficie de diferentes tipos de células como macrófagos. La combinación de Man₉-OVA con Man-BSA, saturó otros receptores de manosa, provocando un efecto positivo en la captura de células dendríticas de estos antígenos manosilados de OVA.

Los problemas de selectividad encontrados para interactuar de forma exclusiva con la diana DC-SIGN fueron solventados mediante el empleo de glicoconjugados del trisacárido Lewis x. En 2007, Wu y colaboradores⁷⁹ prepararon un conjugado Lewis x-OVA que presentaba múltiples copias de este oligosacárido. La internalización de este conjugado vía DC-SIGN fue confirmada mediante microcopía confocal. Dicho glicoconjugado, produjo un incremento de 300 veces en la respuesta inmune mediada por células T empleando como diana el receptor DC-SIGN. Una combinación de LPS con Lewis x-OVA dio lugar a la secreción de IL-10. Este efecto fue muy dependiente de la multivalencia ya que el monómero de Lewis x no fue capaz de producir el mismo efecto en presencia de LPS.

Van Kooyk y colaboradores⁸⁰ han empleado un ratón transgénico que presenta el receptor DC-SIGN humano como modelo para evaluar *in vivo* la respuesta inmune inducida a través de dicho receptor. Estos autores prepararon dos nuevos neoglicoconjugados de OVA empleando Lewis x y Lewis b. Estos neoglicoconjugados indujeron un incremento de 7-10 veces la proliferación de células T CD4+ y un incremento de 2 veces en las CD8+. De nuevo, se observó la no maduración de DCs y el efecto fue debido a la mejora en el reconocimiento y presentación de antígenos.

Todos estos ejemplos están basados en la glicosilación directa de proteínas inmunogénicas, OVA en la mayoría de los casos. Aunque esta estrategia es apropiada para inducir una respuesta inmune mediada por DC-SIGN, la manipulación de proteínas podría ocasionar serios problemas para inducir la respuesta adecuada debido a la presentación y accesibilidad diferente de los correspondientes antígenos. En este contexto, Pietersz y colaboradores⁸¹ han descrito recientemente un nuevo sistema que combina un glicodendrímero y OVA. Para ello glicosilaron el dendrímero PAMAM comercial y el glicodendrímero resultante fue conjugado a OVA (Figura 32). A cada

⁷⁹ Wang, J.; Zhang, Y.; Wei, J.; Zhang, X.; Zhang, B.; Zhu, Z.; Zou, W.; Wang, Y.; Mou, Z.; Ni, B.; Wu, Y. *Immunology* **2007**, *121*, 174-182.

⁸⁰ Singh, S.K.; Stephani, J.; Schaefer, M.; Kalay, H.; García-Vallejo, J.J.; den Haan, J.; Saeland, E.; Sparwasser, T.; van Kooyk, Y. *Mol. Immunol.* **2009**, *47*, 164-174.

⁸¹ Sheng, K.C.; Kalkanidis, M.; Pouniotis, D.S.; Esapron, S.; Tang, C.K.; Apostolopoulos, V.; Pietersz, G.A. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 424-436.

molécula de OVA se le unieron de dos a cuatro glicodendrimeros y el número de manosas unidas a PAMAM osciló entre 8 y 20. Este sistema interactuó con células dendríticas y fue internalizado localizándose en los compartimentos liposomiales, como se observó mediante microscopía confocal. Además, también pudo detectarse una moderada maduración de las células dendríticas tras la internalización. Esto permitió una presentación de OVA como MHC I y MHC II provocando una fuerte respuesta mediada por células T en comparación con la respuesta encontrada utilizando OVA sin conjugar.

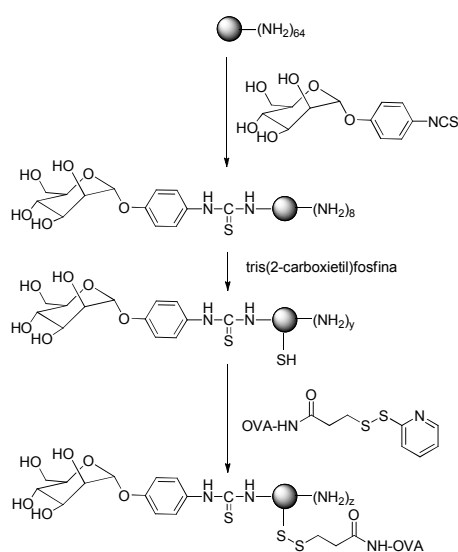


Figura 32. Funcionalización de PAMAM con manosa y OVA.

Muy recientemente, Rendle y col.⁸² han preparado un dendrón basado en lisinas funcionalizadas con manosil derivados para ser empleado como ligando del receptor DC-SIGN (Figura 33). Los derivados sacarídicos fueron conjugados mediante enlaces amida empleando *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y diisopropiletilamina (DIEA). Los dendrones mono, di y tetramanosidos fueron usados y evaluados para activar células dendríticas de médula espinal en ratones. Todos estos compuestos indujeron un cambio significativo en la expresión de células dendríticas maduras. Mediante estos

⁸² Greatrex, B.W.; Brodie, S.J.; Furneaux, R.H.; Hook, S.M.; McBurney, W.T.; Painter, G.F.; Rades, T.; Rendle, P.M. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2939-2950.

estudios se pudo determinar que los derivados manosilados sin ningún adyuvante (sustancia que administrada con un antígeno modifica o aumenta la respuesta inmune) no son capaces de inducir ninguna activación de células dendríticas.

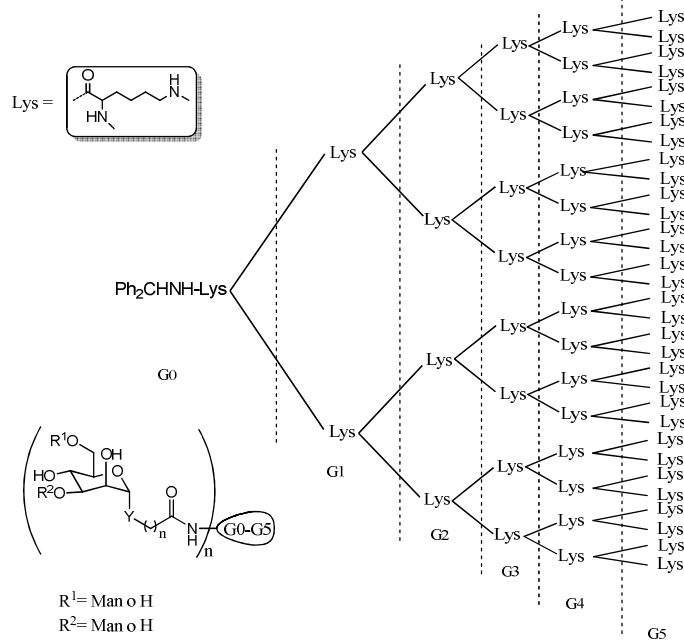


Figura 33. Dendrones manosilados basados en plataformas de polilisina.

A la vista de todo el trabajo desarrollado alrededor del receptor DC-SIGN se demuestra la relevancia de esta lectina como diana para el diseño de agentes terapéuticos. El uso de herramientas como los sistemas multivalentes de carbohidratos esta permitiendo el estudio del reconocimiento e internalización de moléculas a través del receptor DC-SIGN en células dendríticas. Estos trabajos ponen de manifiesto la posibilidad de utilizar este receptor tanto para inhibir procesos de infección como para interferir y modular la respuesta inmune.

Capítulo 2

Antecedentes y objetivos



2. Antecedentes y objetivos.

2.1. Antecedentes del Grupo de Investigación.

Anteriormente al trabajo desarrollado en la presente memoria, en nuestro grupo de investigación se habían preparado polímeros glicodendríticos de manosa uniendo unidades de este carbohidrato a una estructura polimérica comercial altamente ramificada a través de un espaciador. Estos polímeros denominados Boltorn están basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico como unidad de crecimiento y en el 2,2-bis(hidroximetil)-1,3-propanodiol o pentaeritritol como núcleo central de crecimiento. Existen diferentes generaciones de este polímero dendrítico que se encuentran disponibles comercialmente, lo que ha permitido acceder a diversos polímeros con un número diferente de grupos hidroxilo en la superficie para ser funcionalizados: segunda generación (2G), Boltorn H20 (16 OH); tercera generación (3G), Boltorn H30 (32 OH); y cuarta generación (4 G), Boltorn H40 (64 OH) (Figura 34).

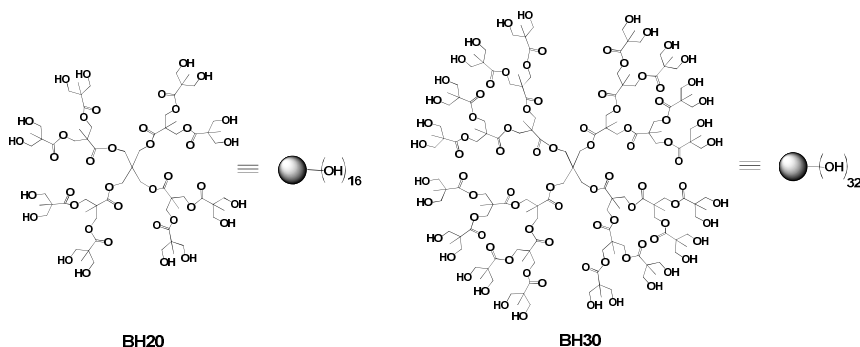
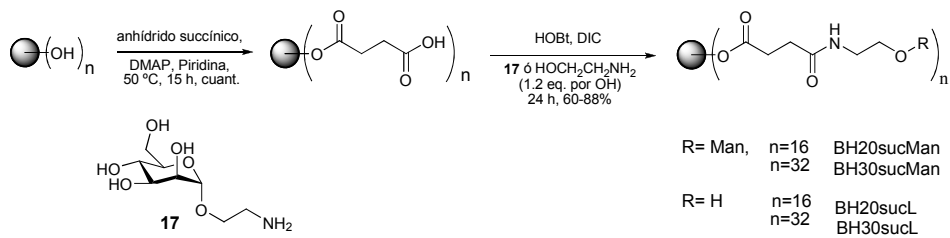


Figura 34. Polímeros dendríticos Boltorn de segunda (BH20) y tercera (BH30) generación.

Estos polímeros comerciales se han utilizado fundamentalmente en la industria como aditivos en pinturas y como superficies protectoras para plásticos. Sólo se había descrito una excepción a estas aplicaciones, su uso como soporte sólido para la síntesis de oligosacáridos en disolución.⁸³ Dichos sistemas nunca habían sido considerados como soporte para una presentación multivalente de ligandos con importancia biológica.

En nuestro grupo de investigación se ha trabajado fundamentalmente con los polímeros de segunda (BH20) y tercera (BH30) generación. Para la preparación de los sistemas multivalente basados en los polímeros Boltorn se activó, en primer lugar, la superficie de dichos polímeros mediante la introducción de grupos carboxilo. Este paso proporcionó un soporte dendrítico funcionalizado con ácidos carboxílicos terminales que permitió, en una segunda etapa, la introducción de glicoconjugados a través de la formación de un enlace amida, como se indica en el Esquema 1.

⁸³ Kantchev, A.S.; Parquette, J. R.; *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8049-8053.



Esquema 1. Preparación de los sistemas dendríticos BH20sucL, BH20sucMan, BH30sucL y BH30sucMan.

Como primera aproximación se había utilizado como azúcar un monosacárido, la α -D-manopiranos. Para poder unir el azúcar al soporte multivalente fue necesario funcionalizar dicha manosa en la posición anomérica con un espaciador que presentara un grupo amino terminal (compuesto **17**) como se representa en el Esquema 1.

Una vez preparados estos compuestos, se evaluó su solubilidad en medios fisiológicos y su toxicidad frente a diferentes líneas celulares demostrándose su viabilidad para aplicaciones biológicas.⁸⁴ También se confirmó que las unidades de manosa presentes en la superficie del polímero dendrítico Boltorn eran reconocidas por una lectina modelo (*Lens Culinaris*), que reconoce manosa y además, este proceso de reconocimiento transcurría de forma multivalente, formándose agregados que precipitaban en el medio de reacción.⁸⁴

Los primeros estudios biológicos que se realizaron con estos sistemas multivalentes fueron los experimentos de inhibición de la interacción del receptor DC-SIGN con la glicoproteína GP1 del virus del Ébola.⁸⁵ Estos experimentos se realizaron en el Hospital 12 de Octubre de Madrid en colaboración con el doctor Rafael Delgado. En estos experimentos se utilizaron células Jurkat capaces de expresar DC-SIGN de forma estable y se determinó la cantidad de proteína GP1 unida al receptor en presencia y en ausencia de los inhibidores glicodendríticos, mediante la utilización de anticuerpos

⁸⁴ Arce, E.; Nieto, P.M.; Díaz, V.; García-Castro, R.; Bernad, A.; Rojo, J. *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 817-823.

⁸⁵ (a) Lasala, F.; Arce, E.; Otero, J.R.; Rojo, J.; Delgado, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3970-3972. (b) Rojo, J.; Delgado, R. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 579-581.

marcados fluorescentemente. En este experimento se demostró que al menos la 3ª generación con 32 manosas en la superficie (BH30sucMan) inhibía la interacción entre DC-SIGN y GP1.

Posteriormente, se realizaron experimentos de inhibición de la infección *en cis* (directa) y *en trans* (a través de un intermedio) con un modelo artificial del virus del Ébola. Los resultados obtenidos indicaban que los controles BH20sucL, BH30sucL producían una pequeña disminución de la infección atribuida a interacciones no selectivas de estos compuestos con la superficie celular. En el caso de BH20sucMan también se observó una pequeña disminución de la infección. Por el contrario, cuando se usó BH30sucMan como inhibidor se observó una disminución de la infección muy significativa, calculándose un IC₅₀ de 0.3 μM (Figura 35). También se llevaron a cabo experimentos con el sistema monovalente O-metil-α-D-manopiranosido (ManOMe) observándose un IC₅₀ del orden 1 mM. Estos resultados indicaban que pasar de un sistema monovalente (ManOMe), al sistema multivalente con 32 manosas (BH30sucMan) suponía un incremento de la actividad de 3000 veces, lo que puso de relieve un claro efecto multivalente.

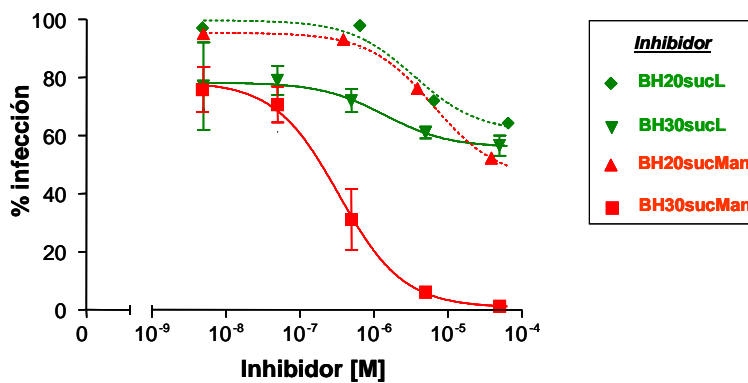


Figura 35. Resultados de inhibición de la infección *en cis*.

Posteriormente, se realizaron los experimentos de infección *en trans*. Este es un experimento más complicado donde una de las líneas celulares (K562 que expresa DC-SIGN) actúa como transportadora del patógeno a una segunda línea celular (HeLa)

donde se produce la infección. En ausencia de inhibidor se observó una infección en las células HeLa correspondiente al 100%. El mismo valor se obtuvo con el dendrímero control BH30sucL. Sin embargo, el compuesto BH30sucMan dio lugar de nuevo a una clara inhibición en el proceso de infección *en trans* de forma similar a como lo hizo *en cis*.

Además de estos estudios, también se llevaron a cabo estudios de interacción de sistemas glicodendríticos con DC-SIGN utilizando biosensores con detección por Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR). Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron dos modelos diferentes de la lectina DC-SIGN: el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CDR) monomérico y el dominio extracelular (ECD) soluble tetramérico. Estos dos modelos permitieron estudiar el papel de la multivalencia desde el punto de vista del receptor, debido a que el CRD posee únicamente un centro de reconocimiento de carbohidratos mientras que el ECD posee cuatro centros de reconocimiento, pudiendo dar lugar a interacciones multivalentes. Las proteínas (CRD y ECD de DC-SIGN) utilizadas en estos estudios se obtuvieron por sobreexpresión de los correspondientes plásmidos en *E. coli* en el laboratorio del Prof. Franck Fieschi.⁶⁰

En los experimentos se SPR se utilizaron tres tipos diferentes de superficies con las dos proteínas (Figura 36). Así, en este estudio se pudo observar que las estructuras dendríticas control (BH20sucL y BH30sucL) no presentaban una interacción apreciable con ninguna de las tres superficies, esto mismo fue observado con el polímero dendrítico de segunda generación con 16 manosas (BH20sucMan). Sin embargo, el compuesto dendrítico con 32 manosas (BH30sucMan) interaccionó de forma clara con la superficie ECD de alta densidad.⁸⁶ Este dato demostró que la alta densidad y la proximidad entre dominios de CRD eran esenciales para que tuviera lugar una interacción multivalente.

⁶⁰ Halary, F.; Amara, A.; Lortat-Jacob, H.; Messerle, M.; Delaunay, T.; Houlès, C.; Fieschi, F.; Arenzana-Seisdedos, F.; Moreau, J. F.; Déchanet-Merville, M.J. *Immunity* **2002**, *17*, 653-664.

⁸⁶ Tabarini, G.; Reina, J. J.; Ebel, C.; Vivés, C.; Lortat-Jacob, H.; Rojo, J.; Fieschi, F. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 2402-2408.

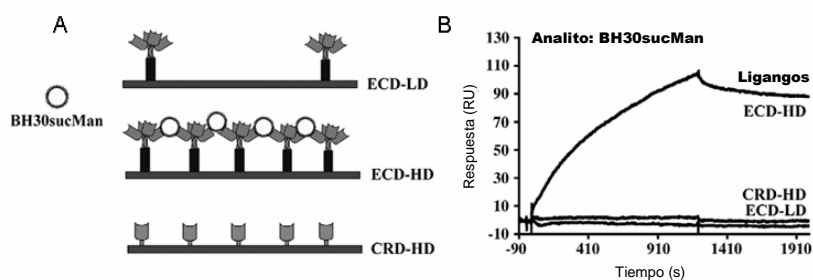


Figura 36. A) Representación esquemática de las tres superficies funcionalizadas interactuando con BH30sucMan; B) Sensograma del proceso de interacción de BH30sucMan con las tres superficies.

Posteriormente, se empleó la superficie de alta densidad ECD-HD y diferentes concentraciones de BH30sucMan para la obtención de los sensogramas (Figura 37) a partir de los cuales se pudo deducir que dicha interacción era estable y además se obtuvo una constante de afinidad aparente del orden submicromolar.

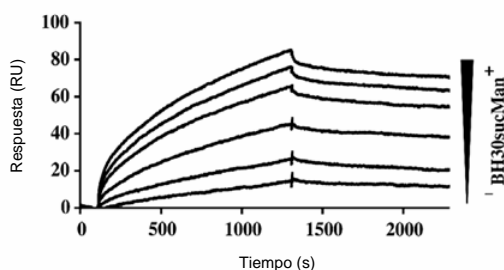


Figura 37. Sensogramas de la interacción DC-SIGN con BH30sucMan a diferentes concentraciones.

El posterior estudio de la interacción de DC-SIGN con la glicoproteína viral gp120 del VIH en competición con los compuestos glicodendríticos preparados puso en evidencia que los compuestos dendríticos BH30sucL, BH20sucL y BH20sucMan no eran capaces de inhibir la asociación entre el receptor DC-SIGN y gp120 (Figura 38B) mientras que el compuesto BH30sucMan (Figura 38A) era capaz de inhibir dicha interacción con una IC_{50} de 50 μ M.

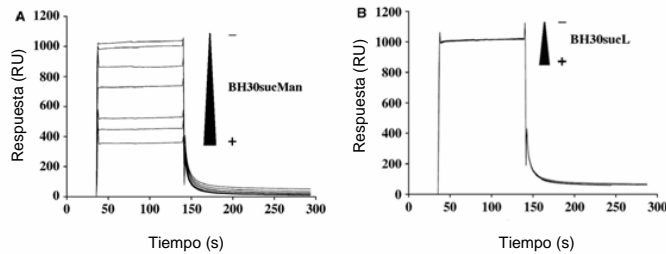


Figura 38. Inhibición de la interacción DC-SIGN/gp120 usando una superficie de ECD de alta densidad. A) BH30sucMan; B) BH30sucL a las siguientes concentraciones 0, 7.5, 14, 28, 57, 85, 128 μ M.

Estos experimentos permitieron estudiar en detalle la interacción de las estructuras glicodendríticas con una superficie funcionalizada con DC-SIGN demostrándose que para observar una fuerte interacción se requería al menos 32 manosas y una superficie con una alta densidad de DC-SIGN. También se confirmó que la interacción era calcio y carbohidrato dependiente.

A la vista de los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación se deduce que, la tercera generación del polímero dendrítico Boltorn presenta una estructura y tamaño adecuado para interactuar con el receptor DC-SIGN y es una buena plataforma para el diseño de sistemas multivalentes de carbohidratos.

2.2. Objetivos.

El objetivo fundamental del trabajo que se presenta es la preparación de sistemas glicodendríticos como vehículos para internalizar de forma selectiva moléculas de interés biológico en dianas celulares. Para ello utilizaremos la capacidad del receptor DC-SIGN para internalizar compuestos en las células dendríticas mediante el reconocimiento de carbohidratos, fundamentalmente manosas. Para alcanzar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos como parte del trabajo de la presente Memoria:

Capítulo 2

1. Preparación de sistemas multivalentes que presenten carbohidratos y una posición funcionalizada de forma diferente que nos permita la posterior conjugación de moléculas de interés biológico.
2. Análisis de la interacción con el receptor DC-SIGN utilizando biosensores con detección de Resonancia del Plasmón de Superficie de los sistemas glicodendríticos preparados.
3. Estudios de internalización de los sistemas glicodendríticos preparados.
4. Estudios de conjugación con biomoléculas.

Capítulo 3

**Síntesis de glicodendrones
basados en el ácido bis- MPA**

3. Síntesis de glicodendrones basados en el ácido bis-MPA.

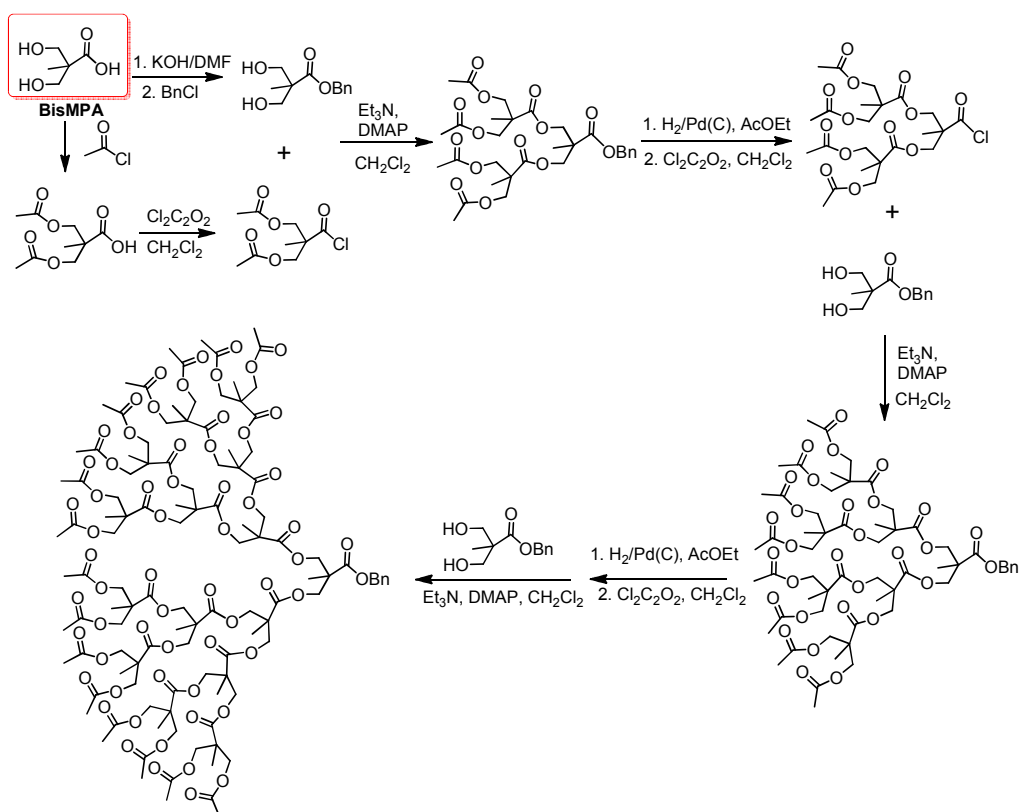
Los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, que se han comentado en el capítulo de antecedentes, indican que al menos la tercera generación del polímero dendrítico Boltorn funcionalizado con 32 manosas presenta una estructura y tamaño adecuado para interactuar con el receptor DC-SIGN. Sin embargo, éste es un polímero polidisperso que, aunque comercial y barato, presenta como principal inconveniente el ser una mezcla de compuestos, lo que puede dificultar la reproducibilidad e interpretación de los resultados obtenidos. Con la idea de poder aplicar estos sistemas como transportadores selectivos de moléculas biológicas al interior celular dependientes del receptor DC-SIGN, nos planteamos llevar a cabo la síntesis del dendrímero monodisperso Boltorn de tercera generación, pero bloqueando una de las posiciones del núcleo de crecimiento. Esto permitiría obtener el dendrón correspondiente con una posición de crecimiento diferenciada que se usaría posteriormente para introducir diferentes tipos de moléculas. Para abordar esta síntesis sería necesaria la preparación de sistemas monodispersos con una estructura bien definida.

En este sentido, decidimos abordar esta síntesis usando como monómero de crecimiento el ácido 2,2-bis(hidroxiometil) propionico o bis-MPA, que es el mismo que se emplea para preparar el polímero dendrítico Boltorn.

En la bibliografía hay descritos diferentes ejemplos que usan este ácido como unidad de crecimiento para generar dendrímeros y que comentaremos a continuación.

La primera síntesis monodispersa de dendrímeros basados en el ácido 2,2-bis(hidroxiometil)propiónico (bis-MPA) fue descrita por Ihre y colaboradores⁸⁷ a mediados de los años 90. Mediante una síntesis convergente sintetizaron dendrímeros de primera a cuarta generación empleando como núcleo de crecimiento la molécula de 1,1,1-tris(hidroxifenil)etano con estructura de poliésteres, que presentaban como función terminal grupos acetatos. La aproximación utilizada consistió en la preparación de dendrones de 1ª a 4ª generación los cuales fueron posteriormente unidos al núcleo a través de un enlace éster, utilizando el cloruro de ácido presente en la posición focal de dichos dendrones (Esquema 2).

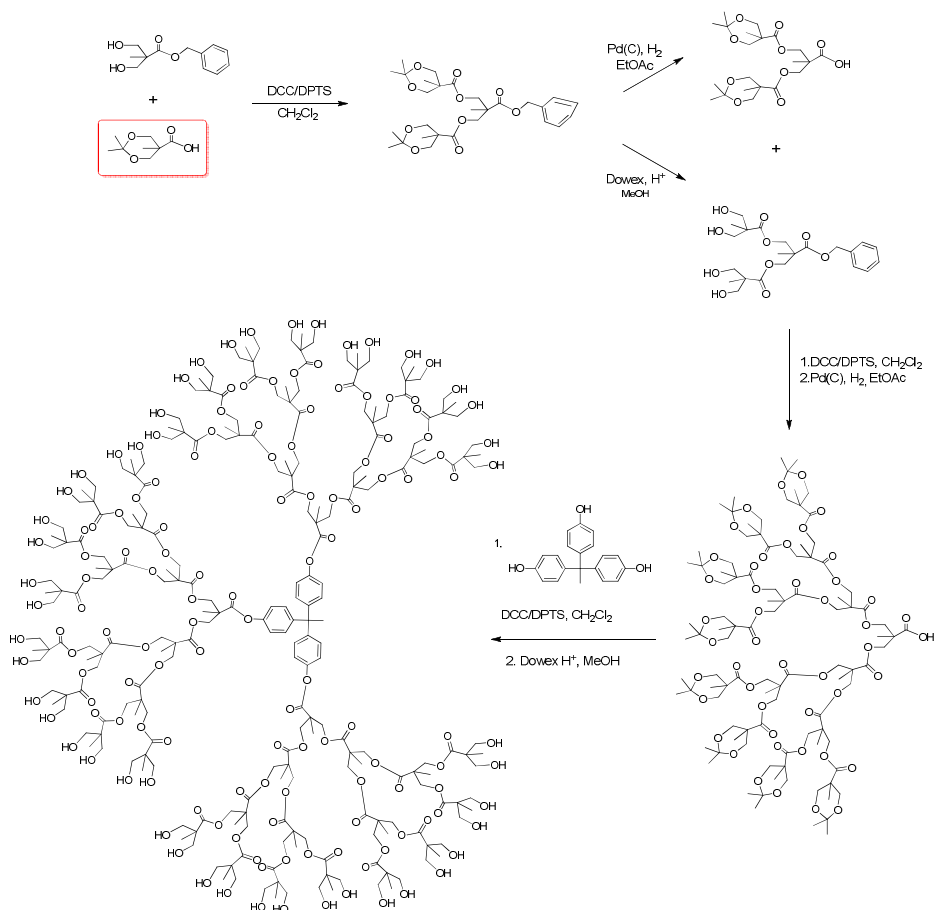
⁸⁷ Ihre, H.; Hult, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6388-6395.



Esquema 2. Primera síntesis monodispersa descrita de dendrones basados en el ácido bis-MPA.

En 1998, estos mismos autores pusieron de manifiesto que esta síntesis no resultaba demasiado versátil ya que la desprotección de los grupos acetato de los hidroxilos terminales del dendrímero producía la ruptura de la estructura de poliéster.⁸⁸ Así, propusieron la síntesis convergente del mismo dendrímero de cuarta generación pero empleando el ácido isopropilidenacetal del bis-MPA como unidad de crecimiento. Los dendrones de cuarta generación así generados serían unidos posteriormente a través de su posición focal al núcleo.⁸⁸ Esta nueva ruta sintética permitió la desprotección selectiva de los grupos hidroxilo terminales mediante el uso de una resina ácida.

⁸⁸ Ihre, H.; Hult, A.; Fréchet, J.M.J.; Gitsov, I. *Macromolecules* **1998**, *31*, 4061-4068.

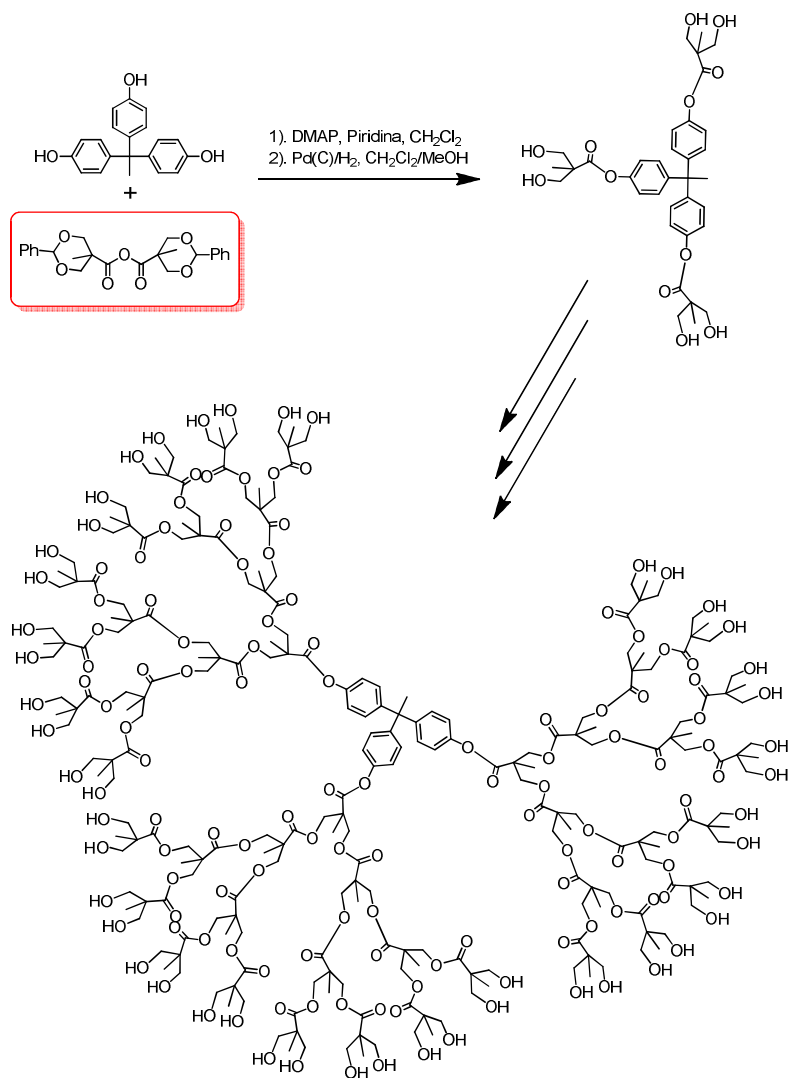


Esquema 3. Síntesis convergente de un dendrímoro de 4^a generación empleando el isopropilidenacetato del bis-MPA como agente acilante.

En 2001 se describe la primera síntesis divergente de dendrímoros basados en el bis-MPA empleando como agente acilante el anhídrido del ácido benciliden-2,2-bis(hidroxi metil)propiónico.⁸⁹ Esta nueva síntesis plantea una ruta alternativa que solventa los problemas detectados en el caso de emplear como agente acilante el ácido isopropilidenacetato del bis-MPA. En aquel caso el empleo de *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente de acoplamiento producía una disminución del rendimiento de las reacciones a medida que aumenta la generación del dendrímoro. Esto era debido a la disminución de la solubilidad de los compuestos (gran número de grupos hidroxilo en su superficie), efectos estéricos, pérdida de dendrones

⁸⁹ Ihre, H.; Padilla, O. L.; Fréchet, J.M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5908-5917.

por su uso en exceso y formación de subproductos (*N*-acilurea).⁹⁰ El empleo del anhídrido del ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico como agente acilante para la síntesis de dendrímeros con estructura de poliéster presenta como principales ventajas el empleo de bajas temperaturas de esterificación, tiempos cortos de reacción, fácil manipulación de los crudos de reacción y altos rendimientos.



Esquema 4. Síntesis divergente de dendrímeros de 4^a generación empleando el anhídrido del ácido benciliden-2,2-bis-(hidroximetil)propiónico como agente acilante.

⁹⁰ Moore, J.S.; Stupp, S.I. *Macromolecules* **1990**, *23*, 65-77.

Posteriormente Malkoch y colaboradores,⁹¹ emplearon como agente acilante el anhídrido del ácido isopropiliden-2,2-bis-(hidroximetil)propiónico para realizar la síntesis divergente de dendrones cuyo punto focal presentaba distintos grupos funcionales los cuales eran sensibles a la hidrogenolisis. Estos autores, utilizan la misma estrategia de crecimiento que la empleada en el caso del anhídrido del ácido benciliden-2,2-bis-(hidroximetil)propiónico y la posterior desprotección de los grupos isopropilidenacetil es llevada a cabo mediante el empleo de una resina ácida.

Más adelante, en 2005, Sharpless y colaboradores⁹² describieron la primera síntesis de glicodendrones a partir de este tipo de estructuras. Para ello, sintetizaron dendrones de 1ª a 4ª generación y funcionalizaron los grupos hidroxilo de su superficie con el anhídrido del ácido 4-pentínico. De este modo, mediante el uso de una reacción de cicloadición 1,3 dipolar se introducía en la superficie de los distintos dendrones el monosacárido 2-azidoetil- α -D-manopiranosido. En este ejemplo particular, la posición focal del dendrón se funcionalizó con diferentes cumarinas lo que condujo a “compuestos duales” que combinaban reconocimiento con detección, es decir, en una misma molécula, contaban con un grupo que facilitaba su detección, un fluoróforo en este caso, y grupos que eran específicos para un receptor, en este caso los carbohidratos. Estas propiedades hacían de estos sistemas modelos muy interesantes para la identificación de diferentes procesos que transcurrían vía interacción multivalente. En la siguiente figura se recoge la estructura de uno de los glicodendrones preparados.

⁹¹ Malkoch, M.; Malmström, E.; Hult, A. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8307-8314.

⁹² Malkoch, M.; Hunt, J.N.; Vestberg, R.; Katgrad, E.; Finn, M.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B.; Hawker, C.J. *Chem. Commun.* **2005**, *43*, 5775.

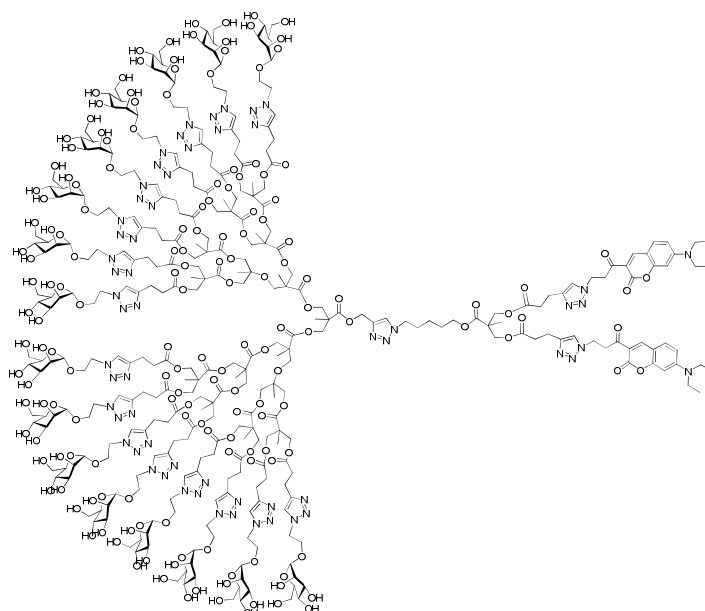
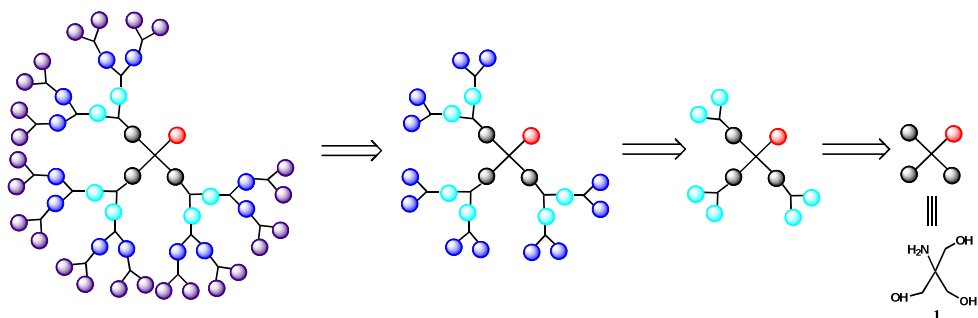


Figura 39. Estructura del primer glicodendrón descrito basado en el ácido bis-MPA.

3.1. Síntesis divergente de dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico empleando como núcleo TRIS.

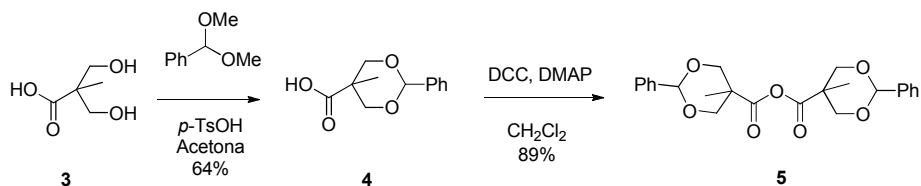
3.1.1. Síntesis del soporte dendrítico.

Como primera aproximación, para realizar la síntesis de los dendrones utilizando una metodología divergente se empleó como núcleo de crecimiento el trishidroximetilaminometano o TRIS (**1**) (Esquema 5). Este núcleo presenta una posición diferenciada, el grupo amino, que será protegido durante la síntesis y posteriormente será utilizado para introducir diferentes moléculas de interés biológico. Para la preparación de las diferentes generaciones del dendrón se ha utilizado como unidad de crecimiento el anhídrido del ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico (**5**). En el Esquema 5 se muestra el esquema retrosintético de la síntesis de un dendrón de tercera generación basado en el núcleo TRIS.



Esquema 5. Esquema retrosintético de la preparación de un dendrón de tercera generación.

La síntesis del anhídrido **5** se ha llevado a cabo según el procedimiento descrito en la bibliografía.⁸⁹ Así, en primer lugar se realizó la protección del diol del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (**3**) con benzaldehído dimetilacetal en presencia de una cantidad catalítica de ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH), en acetona anhidra. Posteriormente, se realizó la autocondensación del ácido benciliden-2,2-bis(hidroximetil)propiónico (**4**) usando DCC como activador del ácido carboxílico (Esquema 6). La formación del anhídrido **5** se confirmó por el análisis de su espectro de ¹³C-RMN donde se observó la variación del desplazamiento químico del carbono carbonílico, pasando de 178.7 ppm en el compuesto **4** a 169.2 ppm en el anhídrido **5**, ya que el resto de señales en los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN aparecen a desplazamientos químicos muy parecidos debido a la similitud de las moléculas.

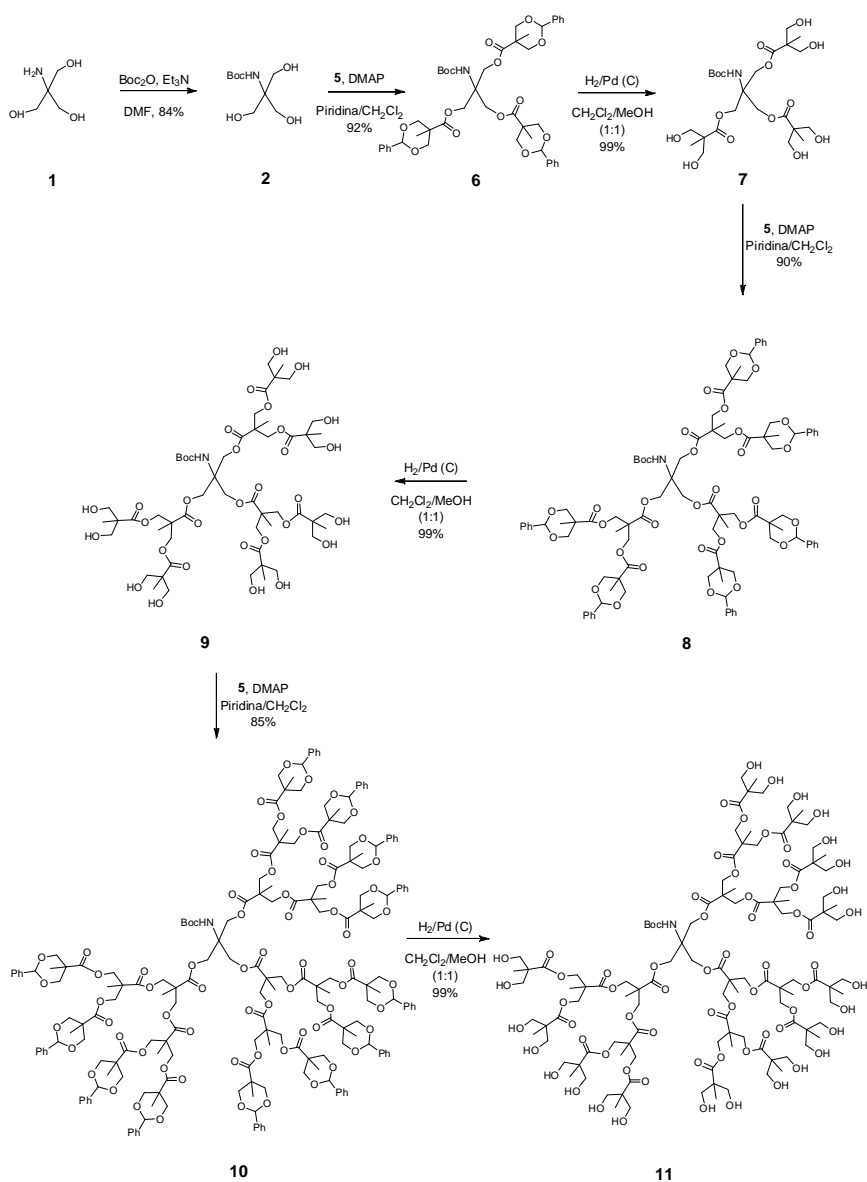


Esquema 6. Síntesis del anhídrido **5**.

Una vez preparado el anhídrido **5** que se va a utilizar como unidad de crecimiento, fue necesario proteger el grupo amino presente en el núcleo de crecimiento **1**. Esta protección se llevó a cabo empleando Boc₂O en presencia de Et₃N, dando lugar al intermedio **2** (Esquema 7). La protección del grupo amino se confirmó en el espectro de ¹H-RMN por la señal característica del metilo del grupo Boc a 1.26

⁸⁹ Ihre, H.; Padilla, O.L.; Fréchet, J.M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5908-5917.

ppm. Hemos de destacar que las condiciones empleadas en esta reacción mejoran sensiblemente las condiciones descritas hasta ahora en la bibliografía.^{93, 94}



Esquema 7. Síntesis divergente de los dendrones de 1^a (**7**), 2^a (**9**) y 3^a (**11**) generación basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico.

⁹³ Seto, C.T.; Mathias, J.P.; Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1321-1329.

⁹⁴ Kang, J.H.; Chung, H.E.; Kim, S.Y.; Kim, Y.; Lee, J.; Lewin, N.E.; Pearce, L.V.; Blumberg, P.M.; Marquez, V.E. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2529-2539.

Una vez protegido el grupo amino del núcleo de crecimiento **1**, los dendrones se construyeron paso a paso mediante la repetición de la secuencia de reacciones que se comenta a continuación (acoplamiento y desprotección), empleando las condiciones de reacción descritas en la bibliografía para obtener las diferentes generaciones de dendrones (Esquema 7).⁸⁹

El compuesto **2** se hizo reaccionar con el anhídrido **5** (1.35 equivalentes por enlace formado) en una mezcla diclorometano/piridina en presencia de una cantidad catalítica de dimetilaminopiridina (DMAP) dando lugar al dendrón de primera generación protegido **6** con un rendimiento excelente. La esterificación de los tres grupos hidróxilo se confirmó por ¹H-RMN donde aparecen nuevas señales, características del monómero **4**, (7.28-7.46, 5.45, 4.62, 3.63 y 0.96 ppm) cuya integración concuerda exactamente con la entrada de tres unidades de dicho monómero. Adicionalmente, en el espectro de masas se observó exclusivamente la señal correspondiente al ión molecular, $m/z = 856.3 [M+ Na]^+$, lo que confirma la entrada de tres unidades de monómero **4**. Estos análisis demuestran la monodispersidad de los compuestos sintetizados.

En una segunda etapa, se llevó a cabo la desprotección de los grupos hidroxilo mediante una hidrogenación con paladio sobre carbono como catalizador, en una mezcla diclorometano/metanol a temperatura ambiente. De este modo, se obtuvo la primera generación de nuestro sistema multivalente **7** con buenos rendimientos. La eliminación del grupo protector se confirmó por la desaparición en el espectro de ¹H-RMN de todas las señales aromáticas correspondientes a los fenilos del benciliden acetal.

Siguiendo la misma secuencia sintética (acoplamiento con el anhídrido **5** e hidrogenación) se preparó la segunda generación del dendrón correspondiente, compuesto **9**, que presenta 12 grupos hidroxilo en la superficie, y el producto de tercera generación **11** conteniendo 24 hidroxilos en su superficie. Mediante el análisis de los

⁸⁹ Ihre, H.; Padilla, O. L.; Fréchet, J.M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5908-5917.

espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se pudieron corroborar las estructuras de los compuestos obtenidos, observándose a campo bajo, primero la aparición y después la pérdida de las señales correspondientes a los grupos fenilo. La monodispersidad de estos compuestos se confirmó nuevamente mediante espectrometría de masas. En la Figura 40 se muestran los espectros de masas de los compuestos desprotegidos de segunda y tercera generación **9** y **11** respectivamente.

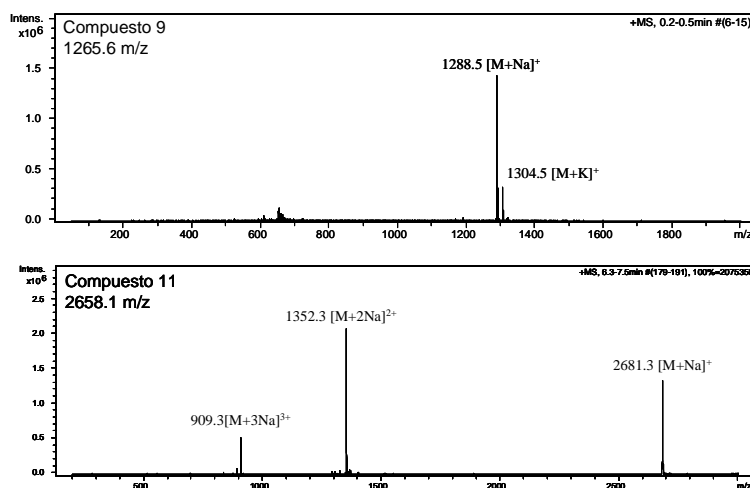


Figura 40. Espectros de masas (ESI) de los dendrones desprotegidos **9** y **11**.

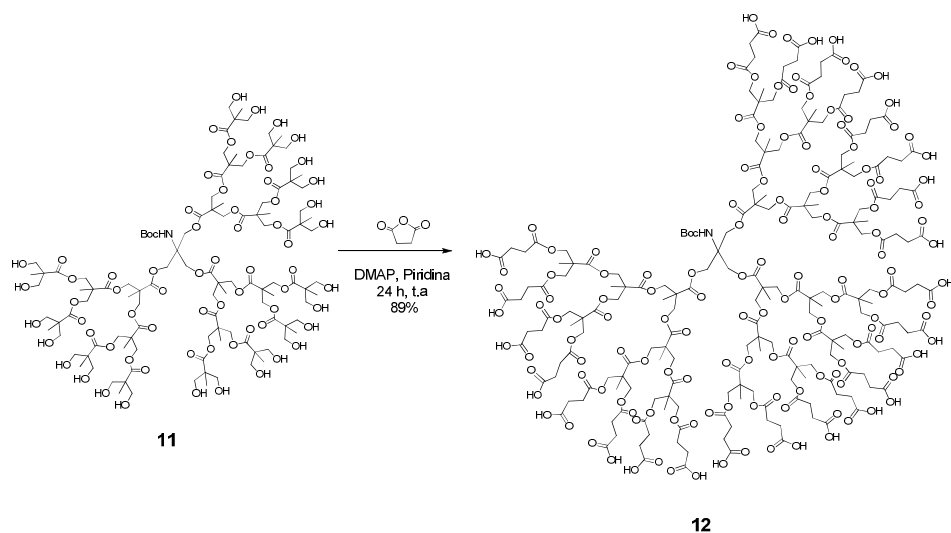
De esta forma, mediante una síntesis divergente se han podido preparar los dendrones de primera, segunda y tercera generación en escala multigramo, de una forma sencilla, barata y monodispersa. Además, cabe destacar que la purificación de todos estos dendrones se realizó por recristalización lo que facilitó enormemente la purificación de dichos compuestos, obteniéndose en todos los casos productos de elevada pureza.

3.1.2. Síntesis del glicodendrón 3GTBoc(SucMan)₂₄ y del correspondiente control 3GTBoc(SucC)₂₄.

La preparación de los sistemas multivalentes glicodendríticos requiere, en primer lugar, la activación del dendrón de tercera generación **11**, mediante la

introducción de ácidos carboxílicos en la superficie siguiendo la metodología que había sido puesta a punto en nuestro grupo de investigación previamente.⁸³ Estos grupos carboxílicos terminales permitirán posteriormente el anclaje de los glicoconjugados y los correspondientes controles al soporte multivalente a través de la formación de un enlace amida.

La funcionalización del dendrón de tercera generación con ácidos carboxílicos se realizó en una etapa mediante la apertura de anhídrido succínico (en gran exceso), en piridina empleando DMAP como catalizador. De esta forma, se obtuvo con buen rendimiento el compuesto **12** (Esquema 8).



Esquema 8. Preparación del dendrón **12**.

La formación de este producto se confirmó mediante el análisis de su espectro ¹H-RMN en el que se pudo observar la aparición de un multiplete a 2.55-2.72 ppm, correspondiente a los protones de los metilenos del ácido succínico. El análisis por espectrometría de masas de este compuesto presentaba una distribución gaussiana de picos en torno al peso molecular esperado (5058.5), lo que indicaba la polidispersidad del compuesto (Figura 41).

⁸³ Arce, E.; Nieto, P.M.; Díaz, V.; García-Castro, R.; Bernad, A.; Rojo, J. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 817-823.

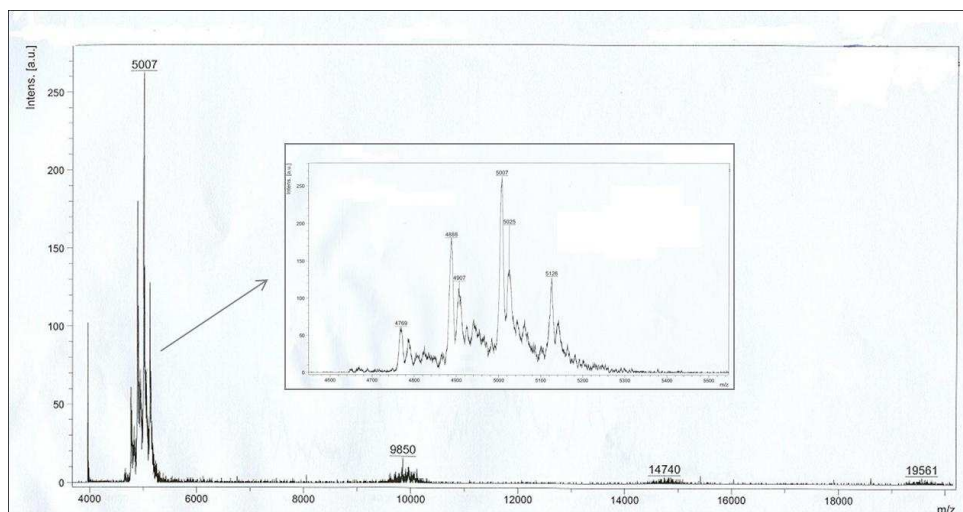
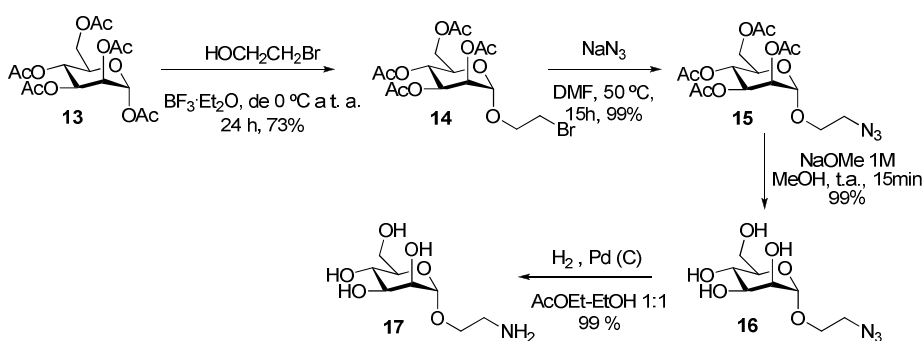


Figura 41. Espectro de masas MALDI-ToF del dendrón 12.

La siguiente etapa en la preparación del glicodendrón fue la introducción de las unidades de carbohidrato, en este caso manosa, en la superficie del dendrón. Para ello fue necesario funcionalizar adecuadamente dicho monosacárido en su posición anomérica con un espaciador que presentara un grupo amino terminal. Así, el derivado de manosa **17** se preparó en cuatro etapas a partir de la correspondiente manosa peracetilada comercial **13** siguiendo la metodología desarrollada en nuestro grupo de investigación, según se muestra en el Esquema 9.⁸³



Esquema 9. Síntesis del derivado de manosa **17**.

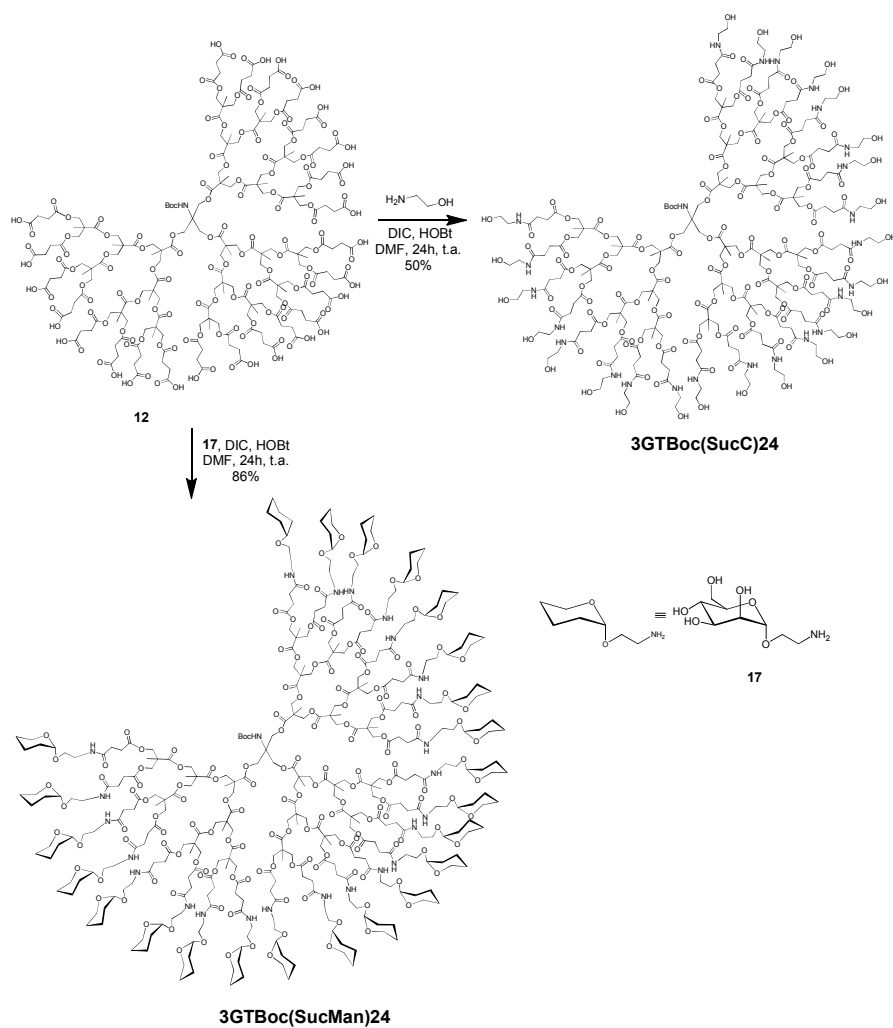
⁸³ Arce, E.; Nieto, P.M.; Díaz, V.; García-Castro, R.; Bernad, A.; Rojo, J. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 817-823.

La primera etapa consistió en la glicosilación del derivado peracetilado **13** usando como aceptor de glicosilo el 2-bromoetanol y como promotor $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$, obteniéndose el derivado glicosilado **14** con un rendimiento del 73%. El análisis del espectro de ^1H -RMN nos muestra la aparición de un doblete a 4.87 ppm correspondiente al protón anomérico cuya constante de acoplamiento es 1.5 Hz, lo que indica la formación exclusiva del anómero α .

El siguiente paso consistió en la sustitución nucleófila del grupo Br del extremo terminal del espaciador del derivado de manosa **14** por un grupo azida. Esta etapa se realizó utilizando un gran exceso de NaN_3 en DMF anhidra, obteniéndose el derivado **15** de forma cuantitativa. La sustitución fue confirmada por el análisis del espectro de ^{13}C -RMN del producto **15** en que se pudo observar la desaparición de la señal del carbono unido al bromo (30.1 ppm) y la aparición de una nueva señal a 50.7 ppm correspondiente al desplazamiento de un carbono unido a un grupo azida.

La desacetilación del compuesto **15** utilizando NaOMe 1M en MeOH condujo al producto **16** con excelentes rendimientos. Mediante el análisis del espectro de ^1H -RMN se pudo observar la desaparición de las señales correspondientes a los metilos de los grupos acetato. Por último, la hidrogenación del grupo azida utilizando como catalizador paladio sobre carbono a presión y temperatura ambiente, condujo al derivado de manosa **17** cuya formación fue corroborada mediante el análisis del espectro de ^{13}C -RMN. La desaparición de la señal a 51.7 ppm ($\text{CH}_2\text{-N}_3$) y la aparición de una nueva señal a 41.8 ppm característica de un carbono metilénico unido a un grupo amino confirmó la formación del producto **17**.

Una vez obtenido el dendrón **12** y el derivado de manosa **17** convenientemente funcionalizados, se llevo a cabo la conjugación entre ambos utilizando las condiciones clásicas de formación de enlaces peptídicos (Esquema 10).



Esquema 10. Preparación del glicodendrón $3\text{GTBoc}(\text{SucMan})_{24}$ y del dendrón control $3\text{GTBoc}(\text{SucC})_{24}$.

Así, los ácidos carboxílicos del dendrón **12** se activaron utilizando diisopropilcarbodiimida (DIC) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) en DMF, y a continuación se hicieron reaccionar con el derivado de manosa **17** (1.2 eq. por grupo carboxílico del dendrón) a temperatura ambiente. De esta forma se obtuvo el glicodendrón de tercera generación que hemos denominado $3\text{GTBoc}(\text{SucMan})_{24}$. El producto se purificó por ultrafiltración, utilizando filtros de exclusión por tamaño centriplus YM-3000, con tamaño de poro de 3000 daltons. En el espectro de ^1H -RMN se pudo observar la aparición de la señal correspondiente al protón anomérico de la

manosa (4.78 ppm), así como el desdoblamiento de las señales correspondientes a los metilenos del succínico en dos multipletes, debido al cambio en el entorno químico de estos por la formación de un enlace amida.

Siguiendo la misma aproximación, se preparó el correspondiente control con etanolamina en las mismas condiciones de reacción anteriormente mencionadas, obteniéndose el dendrón control 3GTBoc(SucC)₂₄. El producto se purificó al igual que el glicodendrón por ultrafiltración, utilizando filtros de exclusión por tamaño centriplus YM-3000. La formación de este dendrón se pudo confirmar mediante el análisis de su espectro de ¹H-RMN en el que se observó la aparición de dos tripletes centrados a 3.05 y 3.72 ppm correspondientes a los metilenos de la unidad de etanolamina.

Desafortunadamente, no fue posible la caracterización de los productos **12**, 3GTBoc(SucC)₂₄ y 3GTBoc(SucMan)₂₄ mediante espectrometría de masas empleando la técnica MALDI-ToF, a pesar de todas las condiciones ensayadas (diferentes matrices y disolventes). En todos los casos se observó una distribución de señales alrededor del peso molecular del producto, indicando la polidispersidad de dichos compuestos (Figura 42).

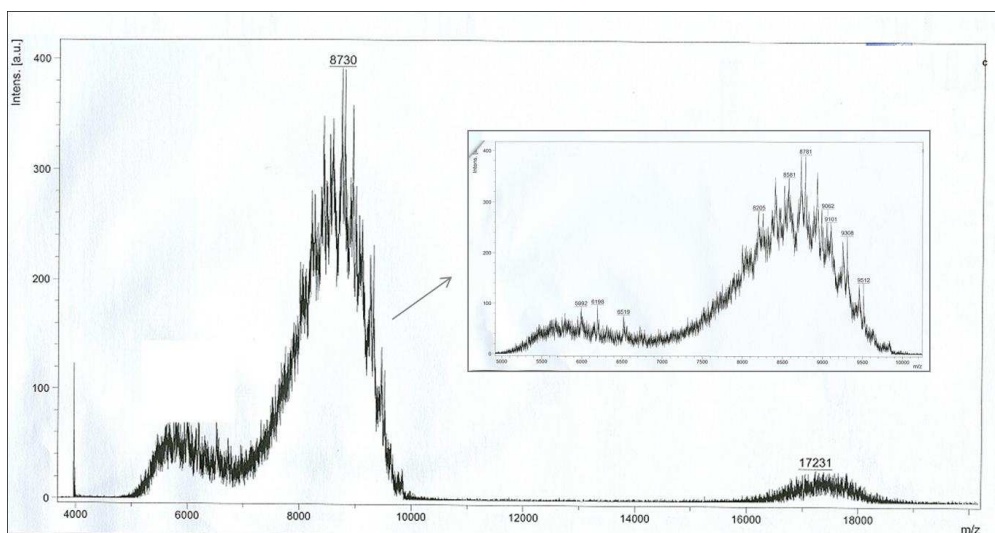


Figura 42. Espectro de masas MALDI-ToF del glicodendrón 3GTBoc(SucMan)₂₄.

Mediante la integración de las señales del espectro de ^1H -RMN se pudo constatar que no se consiguió la funcionalización completa del glicodendróon 3GTBoc(SucMan) $_{24}$, sino que se obtuvo una mezcla de compuestos que tenían aproximadamente una media de 20 unidades de azúcar por molécula. En la Figura 43 se puede observar como la integración correspondiente a los protones anoméricos (4.8 ppm) es de aproximadamente 20 mientras que la integración teórica sería de 24.

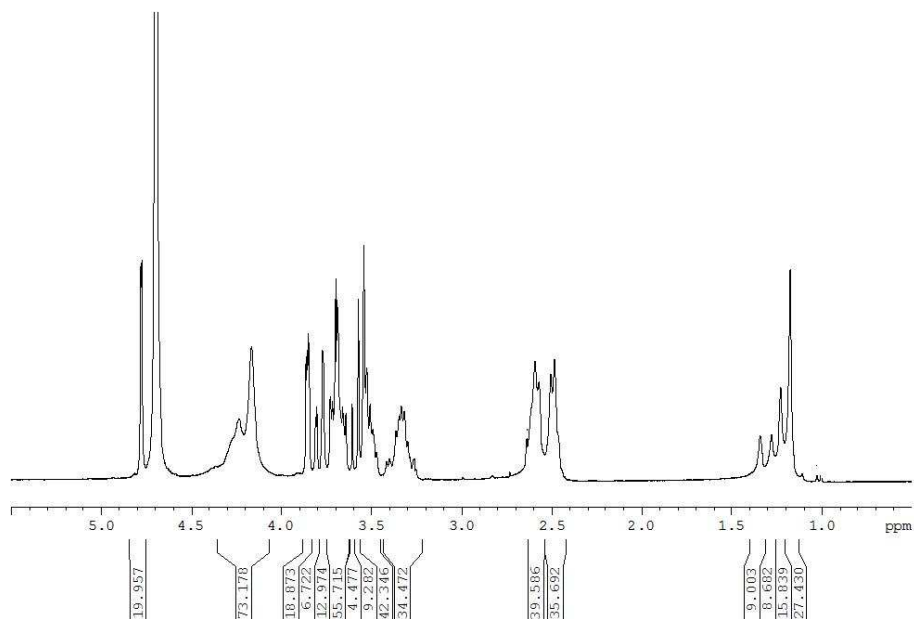


Figura 43. Espectro de ^1H -RMN del glicodendróon 3GTBoc(SucMan) $_{24}$ en D_2O .

A pesar de no tratarse de estructuras monodispersas, era importante confirmar que este tipo de sistemas (dendrones) con un brazo menos que el correspondiente dendrímico de igual generación, es decir que presentan un menor número de carbohidratos en su superficie, eran capaces de interactuar con el receptor DC-SIGN.

3.1.3. Análisis de la interacción usando biosensores.

Una vez preparado el glicodendróon 3GTBoc(SucMan) $_{24}$, se realizaron experimentos para analizar su interacción con el receptor DC-SIGN usando un Biosensor con detección por Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR) en el Instituto

de Biología Estructural (CNRS, Grenoble, Francia) bajo la supervisión del Prof. Franck Fieschi.

Antes de pasar a comentar los resultados obtenidos, se presentará de forma resumida en qué consiste un Biosensor con detección por SPR y la información que se puede extraer de los experimentos en los que se usan estos biosensores.

3.1.3.1 Biosensor con detección por SPR.

Los biosensores con detección por Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR) permiten obtener información cinética de la interacción de un ligando con un receptor en tiempo real, y ha llegado a convertirse en un método estándar para el estudio de las interacciones biológicas.⁹⁵

De forma muy resumida, la resonancia del plasmón de superficie es un fenómeno óptico que tiene lugar en una superficie metálica cuando existe un cambio en el índice de refracción de dos medios distintos (Figura 44). Cuando se produce una variación en la masa de dicha superficie (una interacción, por ejemplo) se origina un cambio en el índice de refracción y, por lo tanto, el ángulo de la luz reflejada a la cual se produce la resonancia entre la luz y el plasmón de superficie varía. La diferencia entre los ángulos a los cuales esta resonancia se produce es proporcional a la cantidad de sustrato unida a la superficie, mientras que la velocidad a la que se produce el cambio de ángulo depende de la cinética de la interacción.

⁹⁵ (a) Szabo, A.; Stolz, L.; Granzow, R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 699-705. (b) Jäger, W. In *Carbohydrates in chemistry and biology*. Ed. Ernst, B.; Hart, G.W.; Sinaÿ, P. Willey-VCH, **2000**, *2*, 1045-1059. (c) McDonnell, J.M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 572-577. (d) Haseley, S.P.; Kamerling, J.P.; Vliegthart, J.F.G. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *218*, 93-114. (e) Myszk, D.G. *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 279-284. (f) Myszk, D.G. *Curr. Opin. Biotech.* **1997**, *8*, 50-57. (g) Gestwicki, J.E.; Cairo, C.W.; Mann, D.A.; Owen, R.M.; and Kiessling, L.L. *Anal. Biochem.* **2002**, *305*, 149-155. (h) Quinn, J.G.; O'Neill, S.; Doyle, A.; McAtamney, C.; Diamond, D.; MacCraith, B.D.; O'Kennedy, R. *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 135-143. (i) Hernáiz, M.J.; de la Fuente, J.M.; Barrientos, A.G.; Penadés, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1554-1557.

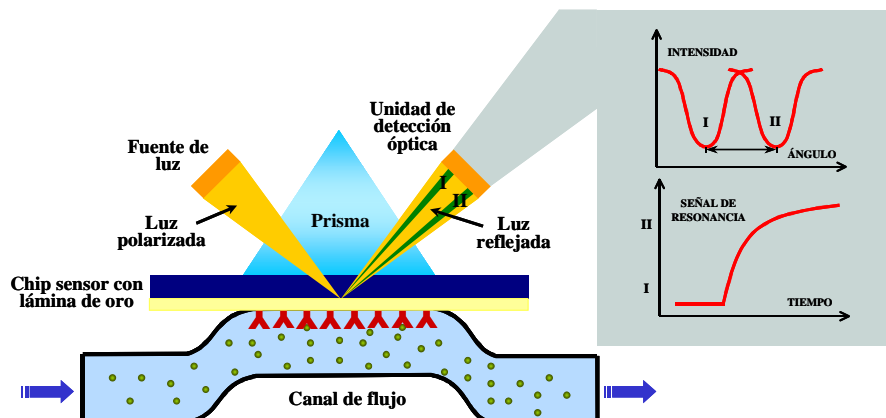


Figura 44. Representación esquemática del sistema de detección de un biosensor por Resonancia de Plasmón de Superficie.

Los biosensores basados en esta técnica, contienen un prisma como uno de los medios y una disolución acuosa como el otro medio. La interfase es una capa muy fina de oro (chip) que se puede funcionalizar con biomoléculas para estudiar interacciones biológicas (Figura 44). En concreto, el BIAcore 3000,⁹⁶ que es el equipo que se ha usado en estos estudios, presenta un sistema integrado que suministra un flujo continuo de disolución tampón o de las muestras a estudiar sobre el chip a través de cuatro canales independientes. La inyección de la muestra y su medida están automatizadas. El sistema de detección relaciona directamente el analito acumulado y la señal que se origina, la cual depende del peso molecular y concentración de las muestras que se inyectan. Los límites de detección están en concentraciones picomolares o en una masa de 180 Da. La respuesta de la unión del ligando al receptor, medida en unidades arbitrarias de resonancia (RU), representa la cantidad de materia unida a la superficie (1000 RU serían equivalentes a $1\text{ nmol L}^{-1}\text{ mm}^{-2}$ en el caso de proteínas). La cinética de la interacción se obtiene a partir del cambio de la respuesta con el tiempo. La relación entre la respuesta (RU) y el tiempo (t) en segundos da lugar a lo que se denomina sensograma (Figura 45).

⁹⁶ www.biacore.com.

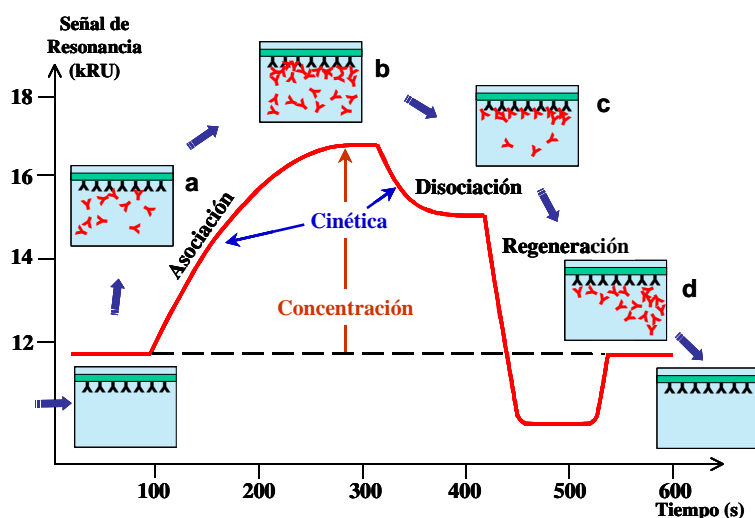


Figura 45. Representación esquemática de un sensograma ideal.

Un sensograma se puede obtener de la siguiente forma: una vez inmovilizado el ligando en la superficie, se fluye el analito sobre la misma, teniendo lugar la interacción (Figura 45, a) y provocando un aumento en la señal hasta llegar a un punto en el que la superficie se encuentra saturada (situación de equilibrio) y la señal se estabiliza (Figura 45, b). En ese momento, se inicia una fase de disociación del analito que será más o menos lenta dependiendo de la fuerza de la interacción. (Figura 45, c) Por último, se lleva a cabo la regeneración de la superficie del chip eliminando todo el analito (Figura 45, d), con lo cual la superficie se queda regenerada para realizar una nueva medida. La cinética de la interacción se obtiene analizando las curvas de asociación (k_a) y disociación (k_d) que van variando a lo largo del tiempo para diferentes concentraciones de analito, pudiéndose obtener la constante de afinidad K . El análisis de las curvas se realiza automáticamente utilizando el programa BIAevaluation 4.1.

Las ventajas fundamentales de esta técnica son las siguientes: la cantidad requerida de ligando y de receptor para llevar a cabo los medidas de interacción es muy pequeña (del orden del μg , o incluso menor), no es necesario realizar un marcaje en ninguno de ellos para detectar la interacción y, además, se obtiene una medida cuantitativa de la interacción en tiempo real y en flujo. Esta técnica se ha usado en el

estudio de la interacción carbohidrato-proteína⁹⁷ incluida la lectina DC-SIGN,^{74,60,61} para la obtención de parámetros cinéticos.

3.1.3.2. Evaluación de la inhibición de la interacción gp120/DC-SIGN usando el glicodendrón 3GTBoc(SucMan)₂₄.

Para la realización del experimento de inhibición usando el glicodendrón 3GTBoc(SucMan)₂₄ como inhibidor, se funcionalizó el chip del biosensor con la proteína gp120 monomérica del VIH y se inyectaron cantidades crecientes (0, 7.5, 14, 28, 57, 85 y 128 μM) tanto del glicodendrón 3GTBoc(SucMan)₂₄ como del control 3GTBoc(SucC)₂₄ y una concentración fija (50 μM) del dominio extracelular soluble tetravalente de DC-SIGN (ECD-DC-SIGN). Cuando se inyectó únicamente la proteína ECD se obtuvo una curva que correspondía al proceso de interacción de dicha proteína con la superficie funcionalizada con la proteína gp120. Al añadir cantidades crecientes del compuesto multivalente control 3GTBoc(SucC)₂₄ no se observó cambio alguno en esta señal, lo que indicaba que la cantidad de proteína DC-SIGN unida a la superficie funcionalizada con la proteína gp120 no había variado y, por tanto, no se había producido inhibición con el dendrón control (Figura 46a). Sin embargo, cuando se inyectaron cantidades crecientes del glicodendrón 3GTBoc(SucMan)₂₄, se observó una clara disminución de la señal directamente proporcional a la concentración de glicodendrón (Figura 46b). Esto indicaba que el compuesto 3GTBoc(SucMan)₂₄ competía de forma favorable con la proteína gp120 por la interacción con el receptor DC-SIGN, inhibiendo la interacción de dicho receptor con la superficie de gp120.

⁹⁷ (a) Duverger, E.; Frison, N.; Roche, A.C.; Monsigny, M. *Biochimie* **2003**, *85*, 167-179. (b) Smith, E.A.; Thomas, W.D.; Kiessling, L.L.; Corn, R.M.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140-6148. (c) Critchley, P.; Clarkson, G.J. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 4148-4159.

⁷⁴ Frison, N.; Taylor, M.E.; Soilleux, E.; Bousser, M.T.; Mayer, R.; Monsigny, M.; Drickamer, K.; Roche, A.C. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 23922-23929.

⁶⁰ Halary, F.; Amara, A.; Lortat-Jacob, H.; Messerle, M.; Delaunay, T.; Houlès, C.; Fieschi, F.; Arenzana-Seisdedos, F.; Moreau, J. F.; Déchanet-Merville, J. *Immunity* **2002**, *17*, 653-664.

⁶¹ Navarro-Sánchez, E.; Altmeyer, R.; Amara, A.; Schwartz, O.; Fieschi, F.; Virelizier, J. L.; Arenzana-Seisdedos, F.; Després, P.; *EMBO rep.* **2003**, *4*, 723-728.

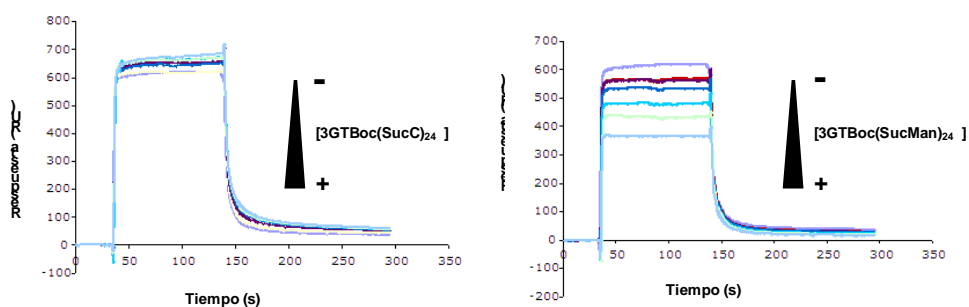


Figura 46. Inhibición de la interacción DC-SIGN/gp120 usando una superficie de gp120 y como inhibidores: a) 3GTBoc(SucC)₂₄ a concentraciones (0, 7.5, 14, 28, 57, 85 y 128 μ M); b) 3GTBoc(SucC)₂₄ a concentraciones (0, 7.5, 14, 28, 57, 85 y 128 μ M).

Como se ha comentado anteriormente en los antecedentes, se había demostrado usando biosensores que el polímero dendrítico Boltorn de tercera generación funcionalizado con 32 manosas (BH30SucMan) era capaz de inhibir la interacción DC-SIGN/gp120 con un IC₅₀ de 50 μ M. La inhibición de la interacción entre DC-SIGN/gp120 que se obtiene usando el glicodendrón 3GTBoc(SucMan)₂₄ es del mismo orden (\approx 50 μ M) que la obtenida usando el glicodendrímulo homólogo de tercera generación con 32 manosas. A la vista de estos resultados, se pudo concluir que la ausencia de un brazo en estos sistemas dendríticos, que implicaría un menor número de manosas en la superficie, no tiene un efecto significativo en la capacidad de inhibición de la interacción de DC-SIGN/gp120. En otras palabras, el nuevo dendrón preparado, con una media de 20 manosas es capaz de interactuar con el receptor DC-SIGN con una afinidad similar a como lo hacía el dendrímulo correspondiente BH30SucMan con 32 manosas.

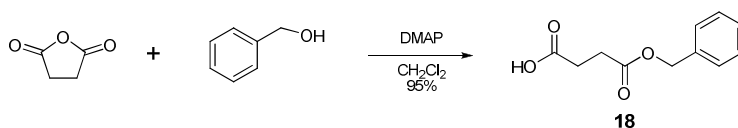
Esto parece indicar, que en este proceso de interacción, es más importante una adecuada presentación de los ligandos que posibilite la interacción de forma multivalente con el receptor, que el número total de ligandos (manosas en este caso).

Una vez sintetizado el glicodendrón y comprobada su capacidad de interacción con el receptor DC-SIGN, el siguiente paso sería la funcionalización de la posición focal diferenciada del dendrón para introducir moléculas de interés biológico.

3.1.4. Modificación de la posición focal de dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico empleando como núcleo TRIS.

Dados los problemas de caracterización y con el fin de reducir al máximo la polidispersidad en el dendrón activado con ácidos carboxílicos, se planteó una estrategia sintética diferente que consistió en introducir el ácido succínico protegido como monobenciléster, de forma que se facilitara la síntesis y purificación del compuesto final.

Para llevar a cabo esta funcionalización fue necesario, en primer lugar, preparar el monobenciléster del ácido succínico, utilizando la metodología descrita en la bibliografía.⁹⁸ La apertura del anillo de anhídrido succínico se realizó por ataque nucleófilo del alcohol bencílico en CH₂Cl₂ catalizado por DMAP, dando lugar al monosuccinato de bencilo **18** (Esquema 11). La formación del producto pudo confirmarse claramente mediante la aparición de las señales características del grupo bencilo a 7.38 y 5.18 ppm en el espectro ¹H-RMN.

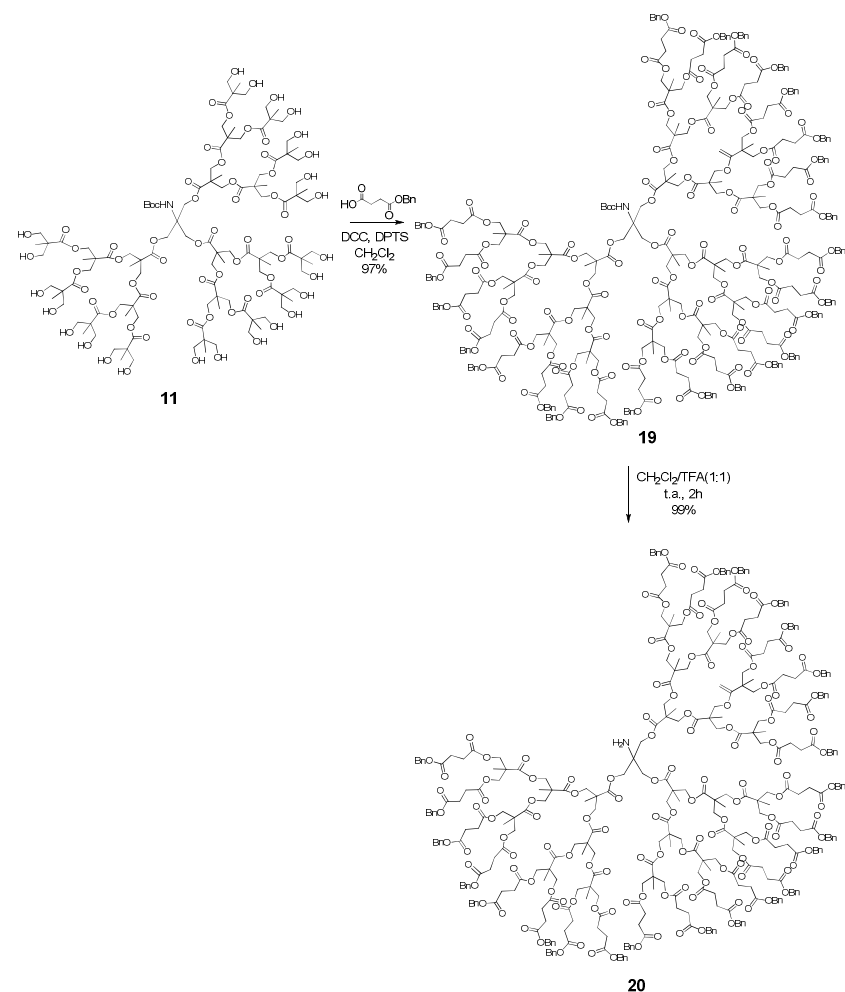


Esquema 11. Síntesis del monobenciléster del ácido succínico **18**.

Una vez sintetizado el monobenciléster derivado **18**, la siguiente etapa fue la funcionalización de la superficie del dendrón **11** con 24 unidades del compuesto **18**, mediante la formación de enlaces éster. Aunque el número de enlaces que se tienen que formar en una única etapa sintética sobre la superficie del dendrón **11** es muy elevado,

⁹⁸ Isomura, I.; Wirsching, P.; Janda, K. D. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4115-4121.

se consiguieron funcionalizar todas las posiciones del dendrón con un buen rendimiento. Para ello, se utilizaron las condiciones desarrolladas por Ihre y col.⁸⁸ El dendrón **11**, el monobenciléster del anhídrido succínico **18** y *p*-toluensulfonato de dimetilaminopiridina (DPTS)⁹⁹ se disolvieron en CH₂Cl₂ en atmosfera inerte y posteriormente se añadió DCC a la mezcla de reacción. Tras 24 horas a temperatura ambiente se obtuvo el compuesto **19** con un excelente rendimiento (Esquema 12), que fue purificado mediante cromatografía de exclusión por tamaños (Sephadex LH-20).



Esquema 12. Síntesis del dendrón **20**.

⁸⁸ Ihre, H.; Hult, A.; Fréchet, J.M.J.; Gitsov, I. *Macromolecules* **1998**, *31*, 4061-4068.

⁹⁹ Moore, J. S.; Stupp, S. I. *Macromolecules* **1990**, *23*, 65-70.

El compuesto **19** se caracterizó mediante experimentos de RMN y espectrometría de masas. En el espectro de ^1H -RMN se pudo observar la aparición de nuevas señales a 7.26 ppm correspondientes a los protones aromáticos, un singlete a 5.03 ppm correspondiente al metileno del grupo bencilo y la señal correspondiente a los metilenos del succínico a 2.57 ppm. La integración de estas señales puso de manifiesto el acoplamiento de 24 unidades de monosuccinato de bencilo. Adicionalmente, por espectrometría de masas usando ionización electrospray (ESI) se pudo observar las señales correspondientes al compuesto con dos y tres cargas cuya masa coincide con el producto completamente funcionalizado, lo que indicaba claramente que este producto era monodisperso (Figura 47).

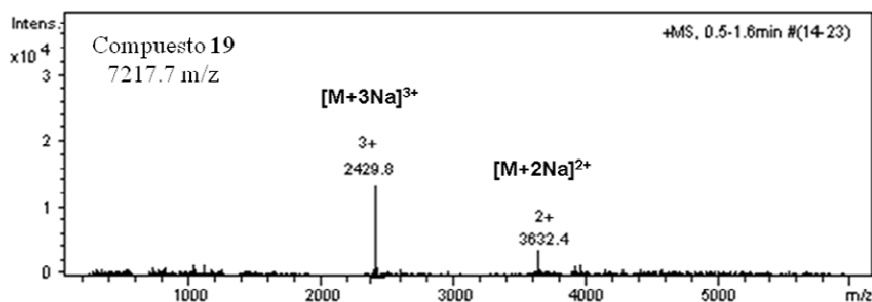


Figura 47. Espectro de masas ESI del dendrón **19**.

Antes de introducir los azúcares sobre el dendrón **19** y dado el coste sintético que suponía preparar dicho glicodendrón de manosa, se decidió realizar las pruebas de desprotección del grupo amino sobre el dendrón **19** y su posterior funcionalización para demostrar la viabilidad de la estrategia sintética. La desprotección del grupo carbamato se llevó a cabo empleando condiciones clásicas (CH_2Cl_2 /ácido trifluoroacético (TFA)(1:1) a temperatura ambiente) obteniéndose el compuesto **20** de forma cuantitativa (Esquema 12). La eliminación del grupo protector Boc se confirmó mediante el análisis del espectro de ^1H -RMN de este compuesto, en el que se pudo observar la desaparición de la señal a 1.33 ppm característica del grupo *tert*-butilo del Boc.

Una vez sintetizado el compuesto **20** nuestro objetivo era introducir en la posición amino libre diferentes moléculas de interés biológico. Para ello, era necesario añadir un espaciador adecuadamente funcionalizado y suficientemente largo para permitir, en etapas posteriores, la conjugación de moléculas biológicas de interés. En este sentido, se intentó la apertura del anhídrido succínico con objeto de introducir posteriormente un espaciador que permitiera dicha conjugación. Sin embargo, los distintos ensayos de apertura empleando cantidades crecientes de anhídrido succínico (1.5, 2.5 y 5 eq), así como el aumento de la temperatura (t.a., 40 °C y 60 °C) no condujo, en ningún caso, al producto deseado. Mediante cromatografía en capa fina no se observó la aparición de un nuevo producto, confirmándose a través del espectro de ¹H-RMN la recuperación del producto de partida en todos los casos. También, se intentó la funcionalización del producto **20** con fluoresceína, utilizando el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y trietilamina en DMF. La reacción de una amina con un isocianato es una reacción muy eficaz, limpia y rápida que se usa de forma general para introducir fluoresceína en moléculas complejas como proteínas. Sin embargo, en todas las condiciones que se ensayaron, donde se varió tanto el número de equivalentes de FITC, la temperatura y los tiempos de reacción, se recuperó, al igual que en el caso comentado anteriormente, el producto de partida inalterado.

A pesar de que en la bibliografía^{100,101} existen descritos ejemplos en que una amina unida a un carbono tetrasustituido y con un impedimento estérico semejante se funcionaliza, en nuestro caso todos los intentos para funcionalizar el compuesto **20** resultaron infructuosos.

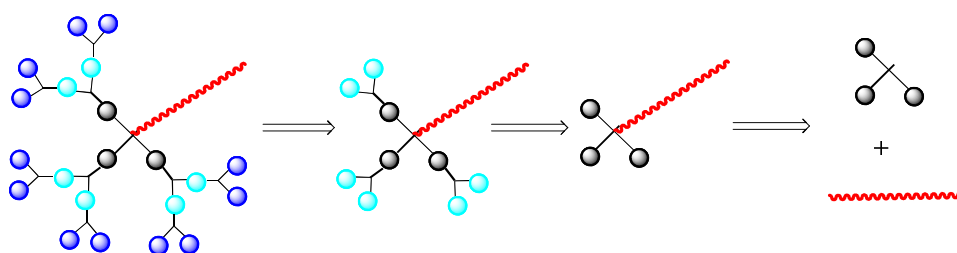
A la vista de estos resultados, se decidió cambiar la estrategia sintética y realizar una síntesis divergente en la que la posición diferenciada del núcleo de crecimiento estuviera funcionalizada con un espaciador largo desde el inicio de la secuencia sintética.

¹⁰⁰ Kleinert, M.; Röckerdorf, N.; Lindhorst, T. K. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3931-3940.

¹⁰¹ Huang, K.; Voss, B.; Kumar, D.; Hamm, H. E.; Harth, E. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 403-409.

3.2. Dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico con espaciador.

Dadas las dificultades encontradas a la hora de intentar la funcionalización del dendrón **20**, nos planteamos la síntesis de dendrones a partir de un núcleo de crecimiento que llevara desde el inicio un espaciador convenientemente protegido y con la flexibilidad suficiente para que nos permitiera la introducción de cualquier molécula de interés en etapas posteriores. Además, como ya se ha comentado anteriormente, el dendrón de tercera generación 3GTBoc(SucMan)₂₄ no presentaba una pérdida significativa de actividad en la inhibición de la interacción DC-SIGN/gp120 con respecto al dendrímero BH30sucMan, por ello nos planteamos la síntesis de dendrones de generaciones inferiores (2^a generación en lugar de tercera), lo que implica un menor número de unidades de carbohidrato en su superficie. La síntesis de generaciones inferiores, conllevaría por consiguiente un ahorro sintético que puede ser importante a la hora de su posible uso en aplicaciones biomédicas aunque ello supusiera una disminución en la afinidad por el receptor. En el Esquema 13 se muestra el análisis retrosintético para la preparación de un dendrón de segunda generación que contiene en su estructura un espaciador.

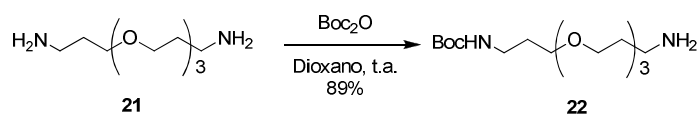


Esquema 13. Esquema retrosintético de la preparación de un dendrón de segunda generación con un espaciador.

3.2.1. Síntesis del soporte dendrítico.

La primera cuestión a abordar para preparar el núcleo de crecimiento era la elección de un espaciador adecuado. Se optó por la diamina comercial 1,13-diamino-

4,7,10-trioxatridecano (**21**). Esta diamina es un derivado de tetraetilenglicol que a priori debe aportarnos una gran flexibilidad y una alta solubilidad en disolventes polares. Dado que el derivado **21** es una diamina, el primer paso fue la protección de una de las aminas. Para ello se seleccionó un grupo protector que fuera compatible con cada una de las etapas de crecimiento posterior del dendrón. De todas las opciones posibles elegimos como más adecuado para nuestros objetivos el grupo protector Boc. De esta forma la diamina **21** se monoprotegió utilizando Boc_2O y dioxano como disolvente, en las condiciones descritas en la bibliografía¹⁰² (Esquema 14), obteniéndose el compuesto **22** con un excelente rendimiento. El espectro de ^1H -RMN del producto **22** confirmó la incorporación del carbamato al presentar la señal característica del grupo *tert*-butilo a 1.43 ppm. La integración de esta señal en dicho espectro nos indicaba claramente que se había producido la monoprotección de la diamina. En el espectro de masas, se observó un único pico, correspondiente al ión molecular del producto monoprotegido (m/z 343.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$).

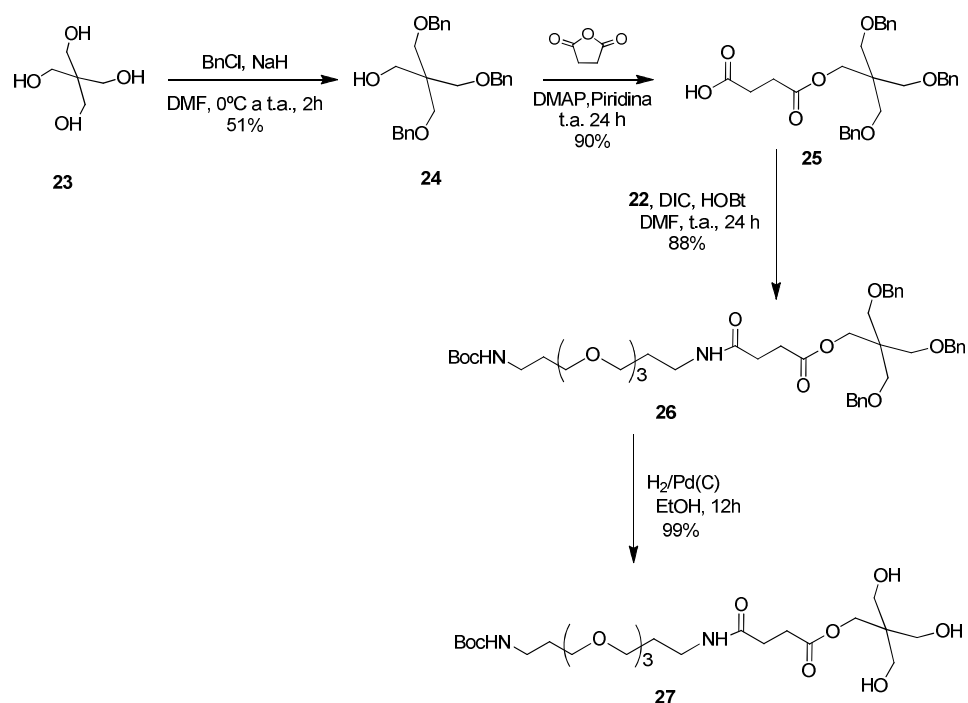


Esquema 14. Síntesis de la diamina monoprotegida **22**.

Una vez sintetizado el espaciador convenientemente protegido realizamos la síntesis de un nuevo núcleo al que poder anclarlo. Para ello se llevó a cabo la protección selectiva de tres de los cuatro grupos hidroxilo presentes en el pentaeritritol (**23**), dejando una posición libre para la posterior unión del espaciador. Para esta reacción se utilizaron tres equivalentes de cloruro de bencilo en presencia de hidruro sódico. El análisis del espectro de ^1H -RMN y del espectro de masas del crudo de reacción indicó la existencia de tres productos que correspondían a las especies di-, tri- y tetrabenciladas. La posterior purificación mediante el empleo de cromatografía en columna condujo fácilmente al compuesto tribencilado **24** con un rendimiento del 51% (Esquema 15). La protección de los tres hidroxilos se confirmó en el espectro de ^1H -

¹⁰² Braun, M.; Hartnagel, U.; Ravanelli, E.; Schade, B.; Böttcher, C.; Vostrowsky, O.; Hirsch, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1983-2001.

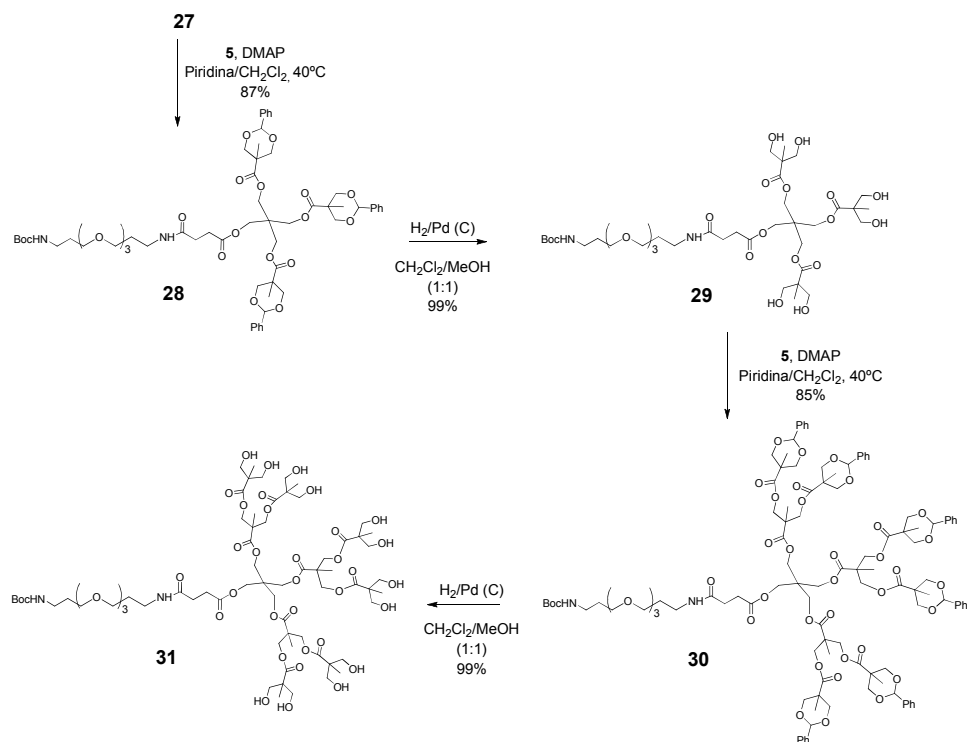
RMN por la aparición de las señales características del grupo bencilo (4.56 y 7.31-7.43 ppm) del producto **24**. Por otra parte, se observó también las señales correspondientes a los metilenos unidos a los grupos hidroxilo protegidos, ya que en este compuesto aparecían a mayor campo, permaneciendo la señal geminal de los metilos inalterada. La integración de las señales confirmó la protección de 3 de las posiciones hidroxilo, hecho que fue ratificado por espectrometría de masas donde se observó una única señal correspondiente al ión molecular (429.3 [M +Na]⁺). La siguiente etapa sintética era la apertura del anhídrido succínico en presencia de DMAP y piridina por el grupo hidroxilo libre presente en el compuesto **24**. Esta reacción condujo, con un excelente rendimiento al producto **25** el cual fue purificado empleando cromatografía en columna de gel de sílice. La incorporación del ácido succínico en la estructura fue confirmada en el espectro de ¹H-RMN del producto **25** por la aparición de un multiplete a 2.50-2.57 ppm correspondiente a los grupos metileno del resto succínico introducido en la molécula.



Esquema 15. Síntesis del núcleo de crecimiento **27**.

Posteriormente, el ácido carboxílico se acopló con el espaciador **22** mediante la formación de un enlace amida, empleando como reactivos DIC y HOBt en DMF anhidra, obteniéndose el compuesto **26** con buen rendimiento. En el espectro de ^{13}C -RMN del producto **26** se confirmó la formación del enlace amida por la desaparición de la señal a 178.1 ppm correspondiente al ácido carboxílico libre y la aparición de una nueva señal a 171.3 ppm. Una vez ensamblados el espaciador y el núcleo, el siguiente paso de la síntesis era el crecimiento del núcleo para preparar las distintas generaciones del dendrón. Para ello, procedimos a la desprotección de los grupos hidroxilo por hidrogenación del producto **26**, empleando como catalizador paladio sobre carbono. Esta reacción dio lugar a la liberación de los grupos hidroxilo obteniéndose el compuesto **27** de forma cuantitativa (Esquema 15). En el espectro de ^1H -RMN del compuesto **27** se observó la desaparición del multiplete a 7.23-7.33 ppm, correspondiente a los protones aromáticos, y de la señal a 4.49 ppm, de los metilenos del grupo bencilo.

Una vez sintetizado el núcleo de crecimiento **27** adecuadamente funcionalizado, se siguió la misma metodología que en el caso de los dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico sin espaciador, para la síntesis de los dendrones de primera y segunda generación **29** y **31** (Esquema 16).



Esquema 16. Síntesis de los dendrones **29** y **31**.

El compuesto **27** se hizo reaccionar con el anhídrido **5** en una mezcla diclorometano/piridina empleando DMAP como catalizador a 40 °C durante 24 h, dando lugar al compuesto **28** el cual fue purificado empleando cromatografía por columna. La esterificación de todos los grupos hidroxilo se confirmó mediante la integración de las señales características de la unidad de crecimiento en el espectro de ¹H-RMN. Adicionalmente, la monodispersidad del compuesto se puso de manifiesto por la observación de una única señal correspondiente al ión molecular en el espectro de masas del compuesto **28**, m/z 1173.5 [M+Na]⁺. La hidrogenación de este compuesto, empleando paladio sobre carbono como catalizador, condujo al dendrón de primera generación desprotegido **29**. La desprotección se confirmó mediante el análisis del espectro de ¹H-RMN, en el cual se observó la desaparición de las señales correspondientes a los grupos fenilo. Realizando la misma secuencia de reacciones, acoplamiento con el anhídrido **5** e hidrogenación, se obtuvo el dendrón de segunda generación **31** con buenos rendimientos. La monodispersidad de los productos **29** y **31**

se confirmó mediante espectrometría de masas. En los espectros de masas de ambos compuestos se pudo observar la existencia de una señal correspondiente al ión molecular, así como las señales correspondientes a los compuestos doblemente cargados (Figura 48).

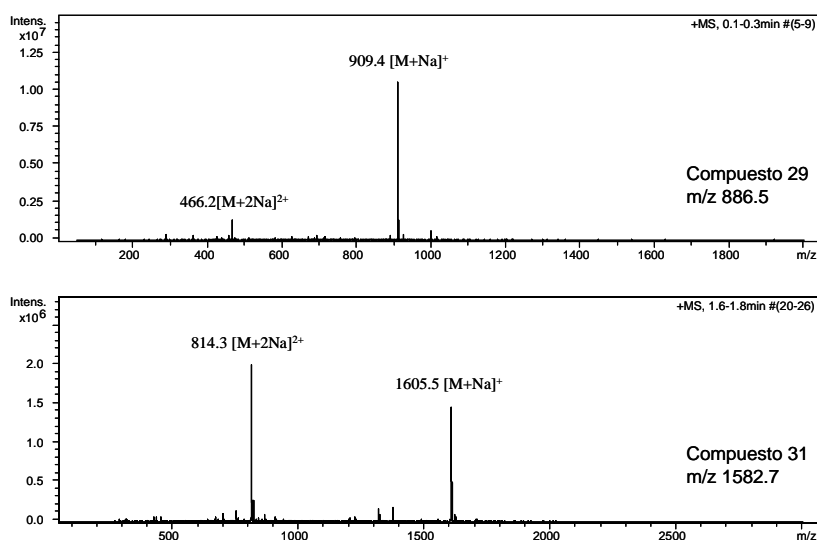
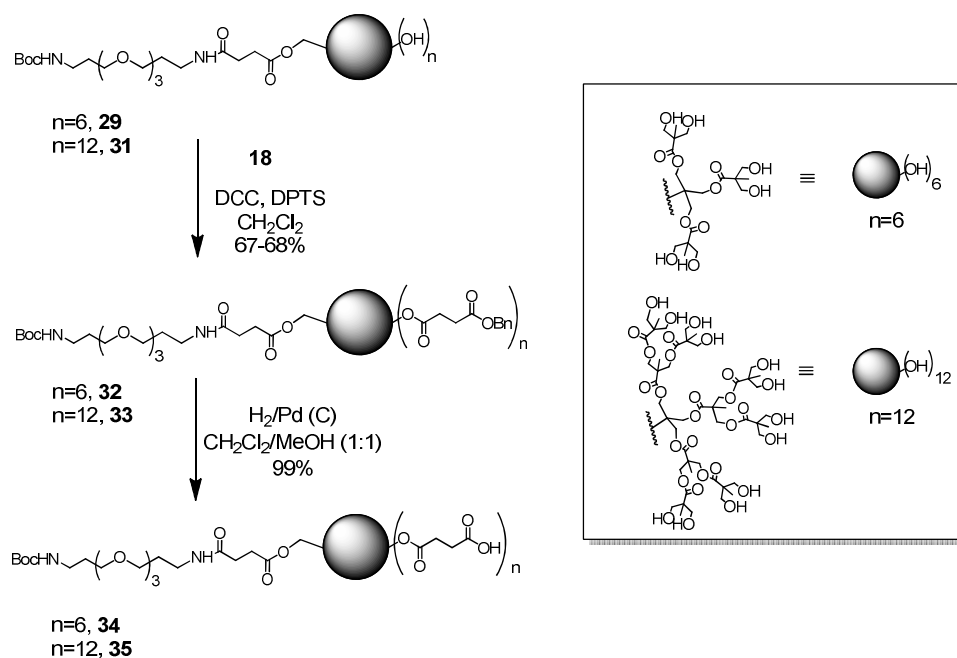


Figura 48. Espectros de masas ESI de los dendrones **29** y **31**.

Cabe destacar que en este caso las reacciones de acoplamiento con el anhídrido **5**, tanto del compuesto **27** como del compuesto **29**, se realizaron a 40°C, en lugar de a temperatura ambiente, ya que cuando se ensayaron las reacciones a dicha temperatura, se obtuvieron mezclas de compuestos en los que no se habían funcionalizado todas las posiciones, como se dedujo del análisis de los espectros de masas. Es de reseñar que, la presencia del espaciador desde el inicio de la síntesis no permitió cristalizar los compuestos ya que se trataba de sirupos que se tuvieron que purificar mediante cromatografía en columna de gel de sílice. A pesar de ello, el rendimiento global de la síntesis es elevado.

3.2.2. Síntesis de los glicodendrones de primera y segunda generación.

Una vez realizada la síntesis de los compuestos **29** y **31** era necesaria la funcionalización con ácidos carboxílicos de la superficie de estos dendrones, que nos permitiera posteriormente la introducción del derivado de manosa **17**. Para activar la superficie de los dendrones se empleó la misma metodología que en el caso de los dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico con TRIS, aunque aumentando la temperatura hasta 40 °C. De nuevo, las reacciones de acoplamiento a temperatura ambiente daban lugar en este caso a moléculas incompletas. Así, el acoplamiento del monosuccinato de bencilo **18**, con los compuestos de primera y segunda generación **29** y **31**, empleando DCC y DPTS en diclorometano, dio lugar a los dendrones **32** y **33** respectivamente (Esquema 17).



Esquema 17. Síntesis de los dendrones de 1^a y 2^a generación funcionalizados con ácidos carboxílicos **34** y **35** respectivamente.

La monodispersidad de los compuestos **32** y **33** fue confirmada mediante espectrometría de masas. En los espectros de ambos compuestos se pudo observar un

único pico correspondiente al ión molecular que indicaba claramente la entrada de 6 y 12 unidades de monosuccinato de bencilo, respectivamente (Figura 49).

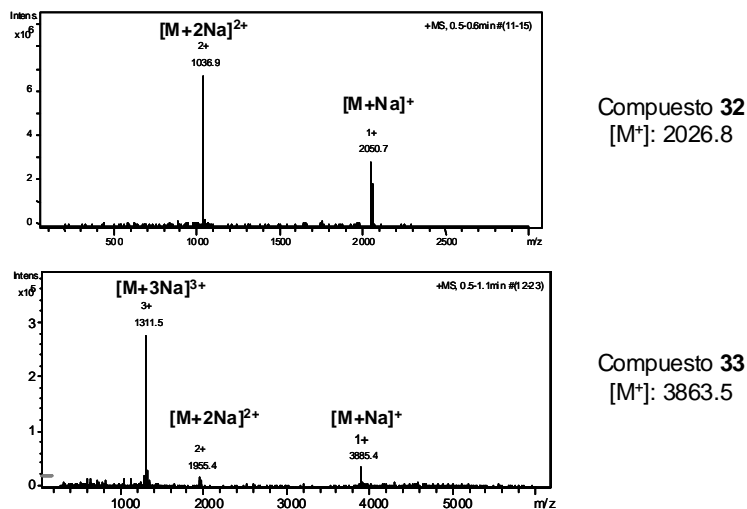


Figura 49. Espectro ESI de masas de los dendrones **32** y **33**.

Posteriormente, se llevó a cabo la desprotección de los grupos carboxílicos mediante hidrogenación en las mismas condiciones antes reseñadas. De este modo, se obtuvieron la primera y segunda generación de nuestro soporte multivalente con ácidos carboxílicos libres en su superficie **34** y **35**, respectivamente (Esquema 17). En los espectros de ^1H -RMN de estos compuestos se pudo observar la desaparición de todas las señales correspondientes a los protones aromáticos, así como la desaparición de la señal del grupo metileno unido al grupo fenilo. En este caso, no fue posible la obtención de los espectros de masas dado el número de ácidos carboxílicos presentes en su superficie y la posibilidad de encontrarse libres o formando sales. Además, este tipo de compuestos no suelen volar bien en los procesos de ionización en el espectrómetro de masas y por tanto no se suelen obtener buenos espectros. Sin embargo, dado que en el caso de los dendrones protegidos de los que proceden si se lograron obtener dichos espectros, podemos concluir diciendo que la desaparición de todas las señales características de los bencilos en ^1H -RMN es suficiente para confirmar la estructura y monodispersidad de los productos **34** y **35**.

Una vez sintetizados los dendrones monodispersos de primera y segunda generación funcionalizados con ácidos carboxílicos (**34** y **35** respectivamente), la siguiente etapa consistió en la introducción del derivado de manosa **17** mediante la formación de un enlace amida para obtener los glicodendrones de primera y segunda generación.

Las primeras condiciones ensayadas fueron las mismas que se emplearon en la síntesis del dendrón 3GTBoc(SucMan)₂₄, (1.2 equiv. por hidroxilo del derivado de manosa **17** y 3 equiv. por hidroxilo de los reactivos DIC y HOBt). Cuando los dendrones **34** y **35** se hicieron reaccionar con el derivado de manosa **17** empleando esas condiciones, el análisis de los espectros de ¹H-RMN nos mostraron una integración de las señales muy inferior a la esperada en el caso de haber obtenido una completa funcionalización. Por consiguiente, para llevar a cabo el acoplamiento de los dendrones **34** y **35** con el derivado de manosa **17**, se ensayaron numerosas condiciones de reacción que se recogen en la Tabla 1.

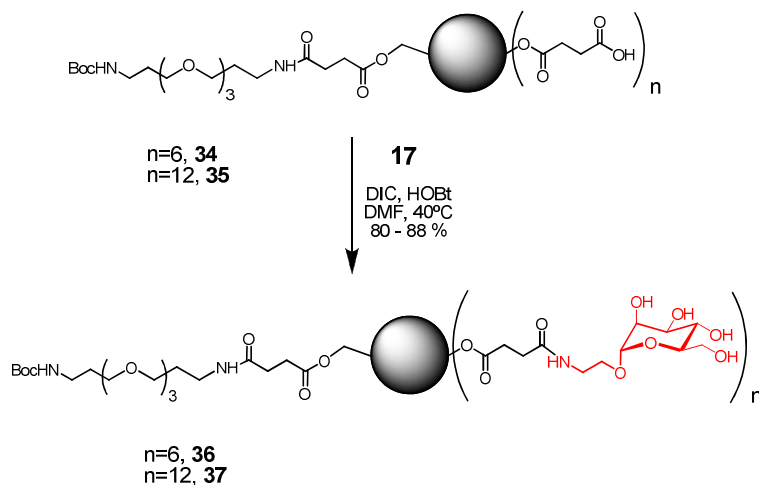
Los productos obtenidos para cada una de las condiciones ensayadas, mostradas en la Tabla 1, fueron purificados empleando cromatografía por exclusión de tamaños, Sephadex LH20. El análisis de las integrales de los espectros de ¹H-RMN en D₂O nos indicó que las mejores condiciones para la realización del acoplamiento fueron las recogidas en la última entrada de la Tabla 1.

	Reactivos	Disolvente	Temperatura	Tiempo	Resultado
a	1) 34 ó 35 , DCC, HOBT (2 eq x COOH) 2) 17 (1.5 eq x COOH)	DMF	1) t.a. 2) 0°C a t.a	1) 30 min. 2) 24 h	Mezcla polidispersa
b	1) 34 ó 35 , DCC, HOBT (2 eq x COOH) 2) 17 (1.5 eq x COOH)	DMF	1) t.a. 2) 0 a 45 °C	1) 30 min. 2) 24 h	Mezcla polidispersa
c	1) 34 ó 35 , DCC, HOBT (3 eq x COOH) 2) 17 (2 eq x COOH)	DMF	1) t.a. 2) 0 a 45 °C	1) 30 min. 2) 24 h	Mezcla polidispersa
d	1) 34 ó 35 , NHS, EDC (3 eq x COOH) 2) 17 (2 eq x COOH)	1) DMF 2) Py	1) t.a 2) 60°C	1) 2h 2) 24 h	Mezcla polidispersa
e	1) 34 ó 35 , NHS, EDC (3 eq x COOH) 2) 17 (2 eq x COOH)	1) DMF 2) Py	1) t.a 2) 60°C	1) 2h 2) 48 h	Mezcla polidispersa
f	34 ó 35 , HATU (2 eq x COOH) 17 (1.5 eq x COOH), DIEA (4 eq x COOH)	DMF	t.a a 45°C	24 h	Mezcla polidispersa
g	34 ó 35 , HATU (2eq x COOH) 17 (2 eq x COOH), DIEA (4 eq x COOH)	DMF	t.a a 45°C	48 h	Mezcla polidispersa
h	1) 34 ó 35 , DIC, HOBT (2 eq x COOH) 2) 17 (1.5 eq x COOH)	DMF	t.a	1) 30 min. 2) 48 h	Mezcla polidispersa
i	1) 34 ó 35 , DIC, HOBT (3 eq x COOH) 2) 17 (2 eq x COOH)	DMF	1) t.a. 2) 40°C	1) 30 min. 2) 48 h	Mezcla Polidispersa
j	1) 34 ó 35 , 17 (2 eq x COOH) 2) DIC, HOBT (3 eq x COOH)	DMF	t.a a 40°C	48 h	Productos monodispersos

Tabla 1. Condiciones de acoplamiento de los dendrones **34** y **35** con el derivado de manosa **17**.

Así, los dendrones **34** ó **35** y el derivado de manosa **17** (2 eq x COOH) se disolvieron en DMF anhidra. Posteriormente se realizó la adición a temperatura ambiente de DIC y HOBT (3 eq x COOH) y se mantuvo la reacción a 40°C durante 48 h. En estas condiciones se obtuvieron los glicodendrones de primera y segunda

generación **36** y **37** con buenos rendimientos tras su purificación por cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH20 (Esquema 18).



Esquema 18. Síntesis de los glicodendrones **36** y **37**.

En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ en D_2O de los glicodendrones **36** y **37** (Figura 50), se observó un desdoblamiento de las señales correspondientes a los grupos metilénicos del fragmento succínico mientras que en el espectro del producto de partida aparecían como un único multiplete. Este resultado indicaba un claro cambio en el entorno químico de los mismos, poniendo de manifiesto la formación de los enlaces amida consecuencia de la conjugación del carbohidrato. Además, en los espectros de ambos glicodendrones se pudo observar la aparición de nuevas señales correspondientes a la unidad de manosa, cuya integración con respecto a las señales propias de los dendrones ponen de manifiesto la entrada de 6 unidades de manosa en el caso del dendrón de primera generación y 12 en el caso de segunda generación.

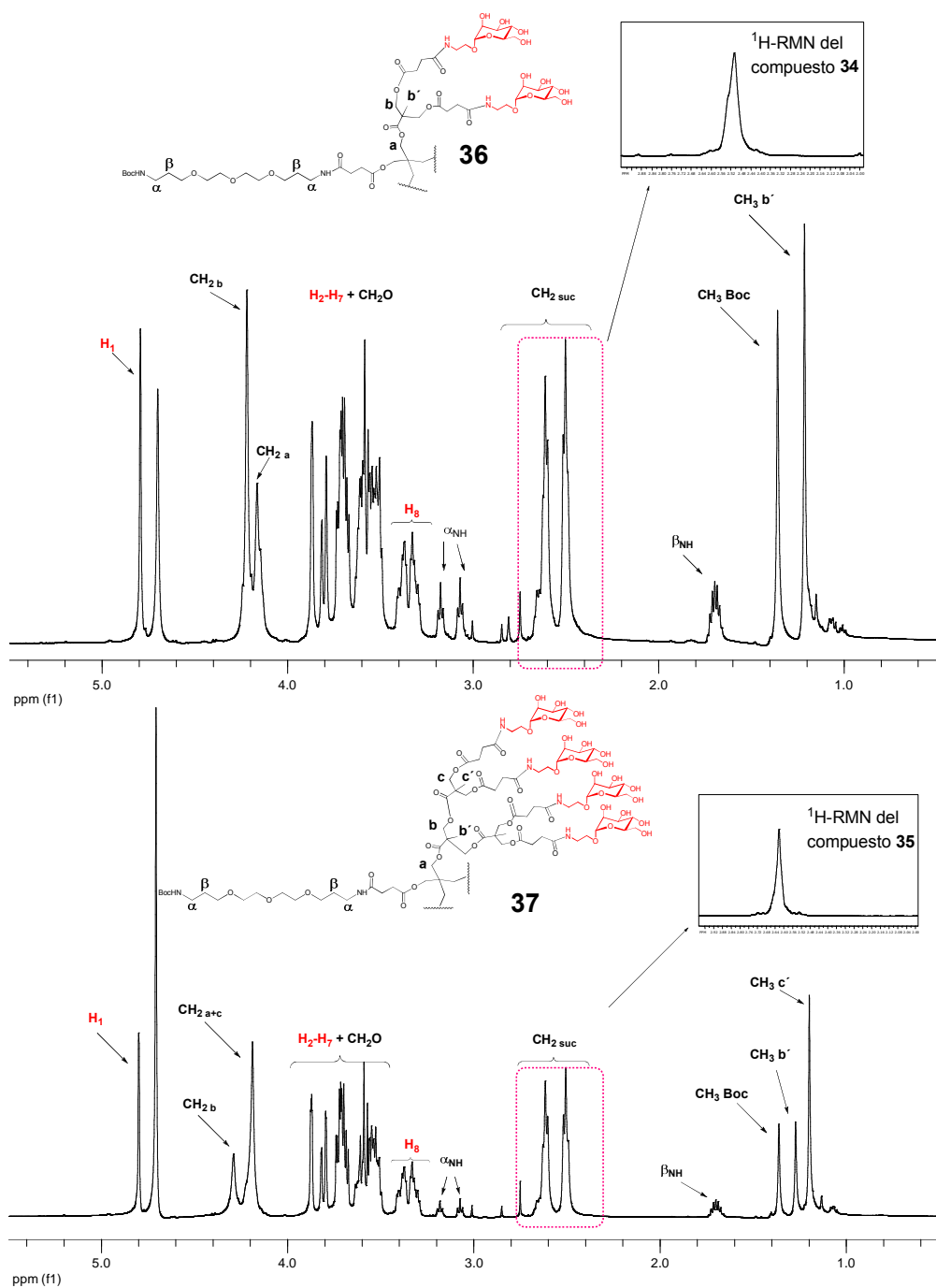


Figura 50. Espectros de ¹H-RMN de los glicodendrones **36** y **37** en D₂O.

El análisis por espectrometría de masas de los glicodendrones **36** y **37** se llevó a cabo mediante la técnica MALDI-ToF. En el caso del glicodendrón de primera generación **36**, las mejores condiciones para registrar este espectro fueron las siguientes: el producto se disolvió en H₂O y se usó el ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) como matriz. Así, como puede observarse en la Figura 51, el espectro muestra un pico a m/z 2739.6 muy mayoritario, el cual corresponde a la entrada de 6 unidades del derivado de manosa **17**.

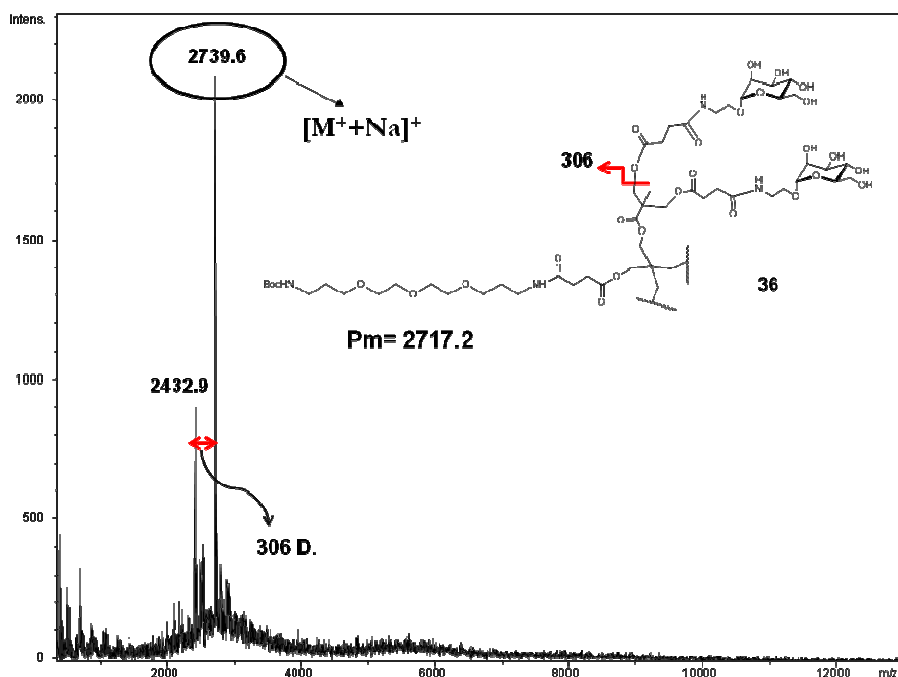


Figura 51. Espectro de masas MALDI-ToF del glicodendrón de primera generación **36**.

En el espectro también se observaba un pico a m/z 2432.9, que no se corresponde con el pico esperado si el compuesto presentara una unidad menos de manosa. Un análisis más exhaustivo de dicho pico revela que este podría deberse a una fragmentación del compuesto **36**. La fragmentación observada correspondería a la ruptura del enlace éster más externo de la molécula como se indica en la Figura 51.

Para el análisis por espectrometría de masas MALDI-ToF del glicodendrón de segunda generación **37**, las mejores condiciones para la obtención del espectro se consiguieron disolviendo el compuesto en H₂O y usando ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) como matriz. El espectro de masas muestra un grupo de señales, entre las que se puede observar el pico m/z 5267.3 que corresponde a la entrada de 12 unidades del derivado de manosa **17** (Figura 52). En el espectro también aparecen otras señales a m/z inferiores que, al igual que se observó en el caso del glicodendrón de primera generación, no corresponden a la entrada de un menor número de unidades de manosa sino a la fragmentación de los enlaces ésteres más externos de la molécula.

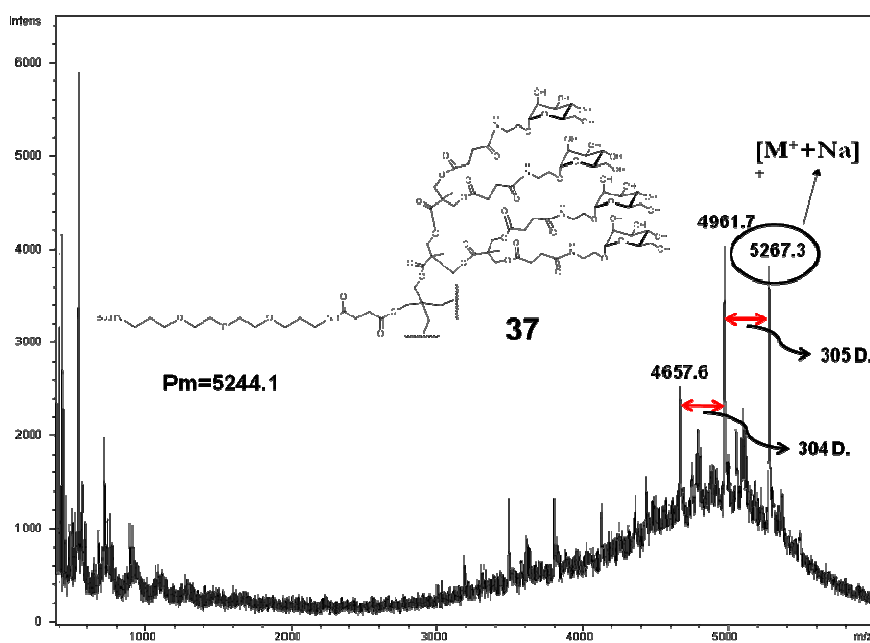
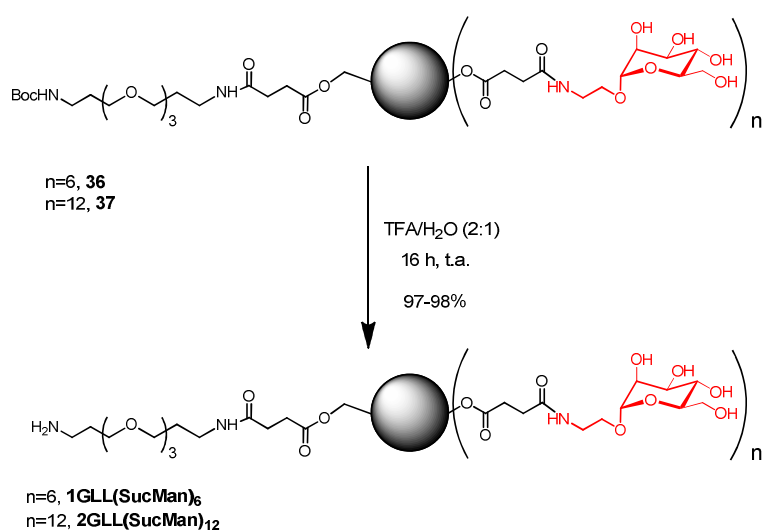


Figura 52. Espectro de masas MALDI-ToF del glicodendrón de segunda generación **37**.

Una vez obtenidos los glicodendrones de primera y segunda generación (**36** y **37**), se procedió a la desprotección del grupo amino. Para ello los compuestos protegidos se trataron con una mezcla H₂O/TFA (1:2) durante 16 horas a temperatura ambiente. En estas condiciones se obtuvieron los glicodendrones de primera y segunda generación que hemos denominado 1GLL(SucMan)₆ y 2GLL(SucMan)₁₂,

respectivamente (Esquema 19). La desprotección del grupo amino se confirmó en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ por la desaparición de la señal característica del grupo *tert*-butilo (1.36 ppm), así como la desaparición de la señal correspondiente en el espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ a 27.8 ppm tanto para el compuesto **36** como para el compuesto **37**.



Esquema 19. Síntesis de los glicodendrones **1GLL(SucMan)₆** y **2GLL(SucMan)₁₂**.

Además de la desaparición de las señal correspondientes al grupo *tert*-butilo, en los espectros de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ de los productos **1GLL(SucMan)₆** y **2GLL(SucMan)₁₂**, se pudieron observar notables cambios en dichos espectros que fueron realizados en las mismas condiciones y disolvente que los espectros de los correspondientes productos de partida protegidos. A continuación se comentarán los cambios detectados en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ del glicodendrón de **2GLL(SucMan)₁₂** (Figura 53), los cuales son extensibles al glicodendrón de primera generación **1GLL(SucMan)₆**.

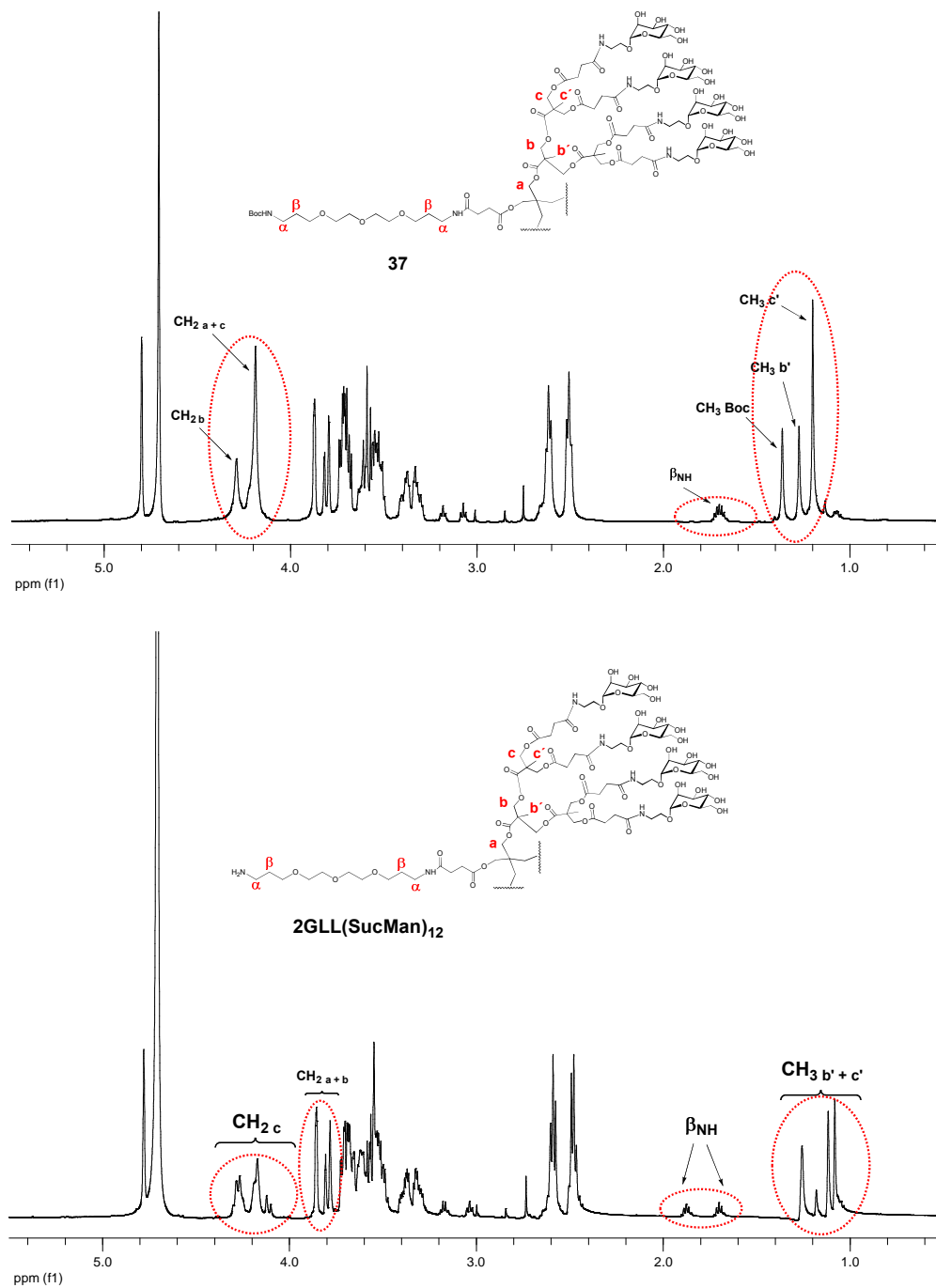


Figura 53. Espectros de ¹H-RMN de los glicodendrones **37** y **2GLL(SucMan)₁₂** en D₂O.

En primer lugar, se pudo observar cambios tanto en los desplazamientos químicos como en la multiplicidad de los metilenos correspondientes a la unidad de crecimiento (CH_{2a} , CH_{2b} , CH_{2c}). En el caso del glicodendrón protegido **37** estas señales aparecían como un conjunto de singletes anchos en torno a 4.0-4.4 ppm, mientras que es el caso del glicodendrón desprotegido $2\text{GLL}(\text{SucMan})_{12}$ los metilos externos (CH_{2c}) mantenían su desplazamiento químico aunque variando su multiplicidad, y los metilenos internos (CH_{2a} , CH_{2b}) cambiaban sustancialmente su desplazamiento químico apareciendo en la zona de 3.5 a 3.9 ppm. También, se pudo observar que las señales de los metilos (CH_{3b} , CH_{3c}) del glicodendrón protegido **37** que aparecían como singletes, cambiaron su aspecto en el caso del producto desprotegido. Otra variación observada fue el desdoblamiento de los protones beta al amino del espaciador. En el espectro de ^1H -RMN del glicodendrón protegido **37** estos aparecían como un único multiplete centrado a 1.70 ppm, por el contrario en el compuesto desprotegido $2\text{GLL}(\text{SucMan})_{12}$ la señal se desdoblaba en dos multipletes centrados a 1.70 y 1.88 ppm. Todas estos cambios en el desplazamiento químico y multiplicidad de las señales fueron corroboradas mediante el análisis de los espectros bidimensionales de correlación protón-carbono HMQC, los cuales se muestran en la Figura 54. Estos cambios detectados en el espectro de ^1H -RMN del producto $2\text{GLL}(\text{SucMan})_{12}$ no tienen una explicación sencilla y seguramente se deban a la conformación diferente de esta molécula en disolución.

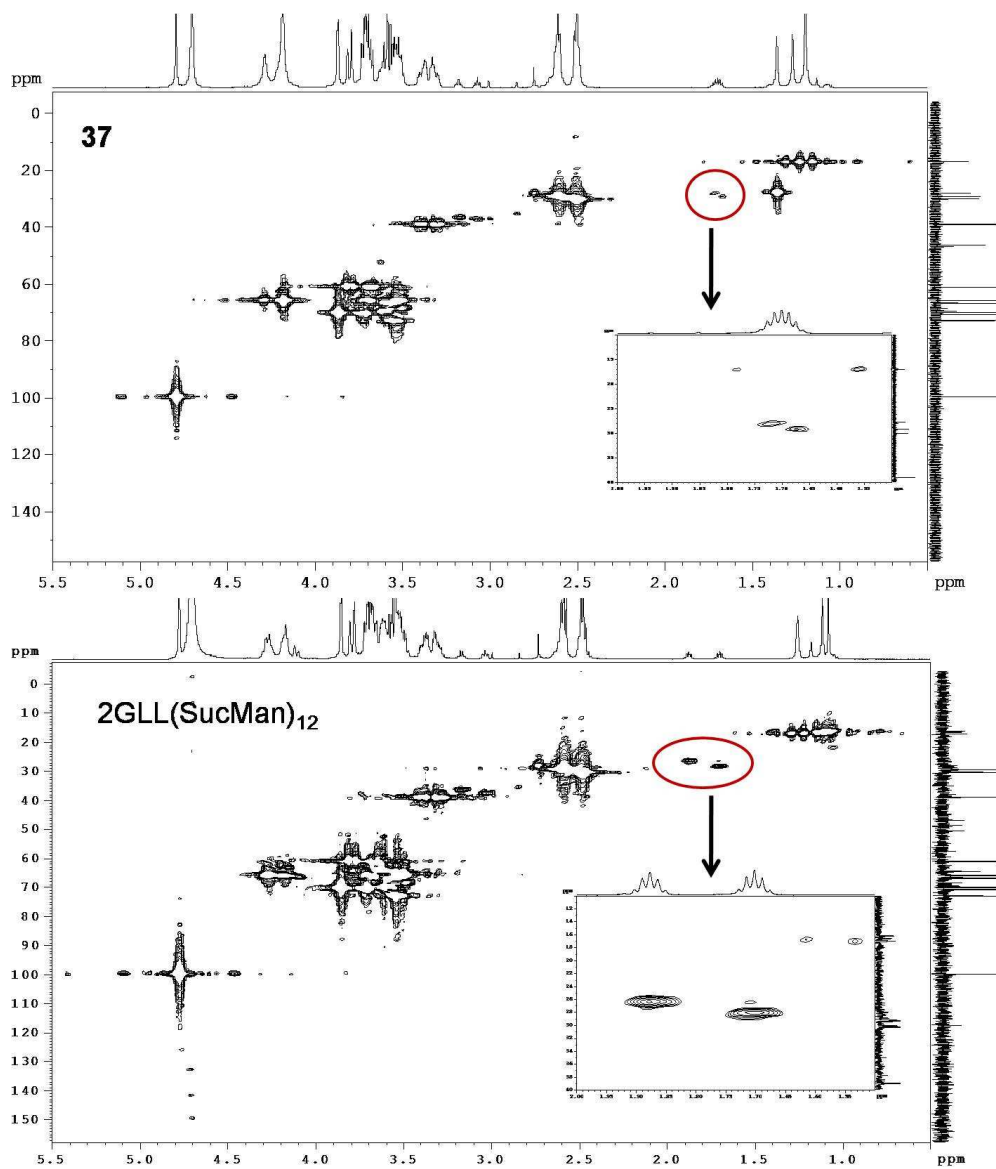


Figura 54. Espectros HMQC de los compuestos **37** y **2GLL(SucMan)₁₂**.

3.2.3. Análisis de la actividad biológica de 1GLL(SucMan)₆ y 2GLL(SucMan)₁₂ usando biosensores.

Para la evaluación de la actividad biológica de los sistemas preparados (1GLL(SucMan)₆ y 2GLL(SucMan)₁₂) se eligió un experimento de competición. Para ello se funcionalizó un chip CM4 del biosensor (cubierto con una superficie de carboxidextrano que permite su funcionalización mediante la formación de enlaces amida), con la proteína α 1-3, α 1-6 Manotriosa BSA (BSA-Man) que contenía 15 residuos del trisacárido manotriosa por molécula de BSA. Se hizo fluir una cantidad fija del dominio extracelular soluble de la lectina (DC-SIGN-EDC) en presencia o ausencia de los glicodendrones de primera y segunda generación 1GLL(SucMan)₆ y 2GLL(SucMan)₁₂ preparados previamente. Se inyectaron conjuntamente cantidades crecientes del compuesto multivalente 1GLL(SucMan)₆ (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 μ M) y una concentración fija del receptor DC-SIGN (800 μ M). En la Figura 55 se representan los sensogramas obtenidos para el ensayo de inhibición de la interacción del receptor DC-SIGN con BSA-Man. En ausencia de inhibidores, se obtuvo una curva que correspondía al proceso de interacción de DC-SIGN con la superficie funcionalizada con la proteína BSA-Man. Sin embargo, cuando se inyectaron cantidades crecientes del glicodendrón 1GLL(SucMan)₆ se observó una disminución de la señal que era directamente proporcional a la concentración de glicodendrón, lo que indicaba una inhibición de dicha interacción. Desafortunadamente, el análisis de las curvas del sensograma mostró que el estado de disociación comenzaba antes de llegar al estado en el que la superficie se encuentra saturada (situación de equilibrio en el que la señal se estabiliza, probablemente sea debido a una interacción débil). Dado que los datos en dicha situación de equilibrio se utilizan para calcular el IC₅₀ no fue posible estimar el mismo para la inhibición de la interacción DC-SIGN/BSA-Man.

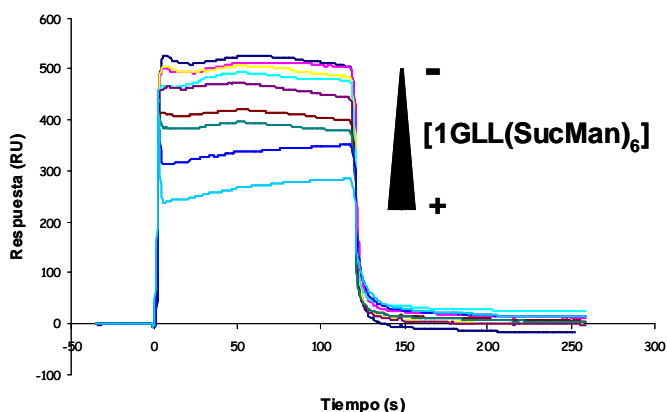


Figura 55. Sensogramas del proceso de inhibición de la interacción DC-SIGN/BSA-Man usando como inhibidor el glicodendrón 1GLL(SucMan)₆ a distintas concentraciones.

Del mismo modo, se realizó el estudio de inhibición de la interacción empleando el compuesto multivalente 2GLL(SucMan)₁₂. Se inyectaron conjuntamente cantidades crecientes de dicho glicodendrón (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 μ M) y una concentración fija del receptor DC-SIGN (800 μ M). En la Figura 56 se representan los sensogramas obtenidos para el ensayo de inhibición de la interacción del receptor DC-SIGN con BSA-Man. Cuando se inyectaron cantidades crecientes del glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂ se observó una clara disminución de la señal directamente proporcional a la concentración de dicho glicodendrón (Figura 56). Esto indicaba que el compuesto 2GLL(SucMan)₁₂ competía de forma favorable con la proteína BSA-Man por la interacción con el receptor DC-SIGN, inhibiendo dicha interacción. En este caso, el análisis de las curvas obtenidas en el sensograma permitió estimar un IC₅₀ para el glicodendrón de segunda generación 2GLL(SucMan)₁₂ de 200 μ M.

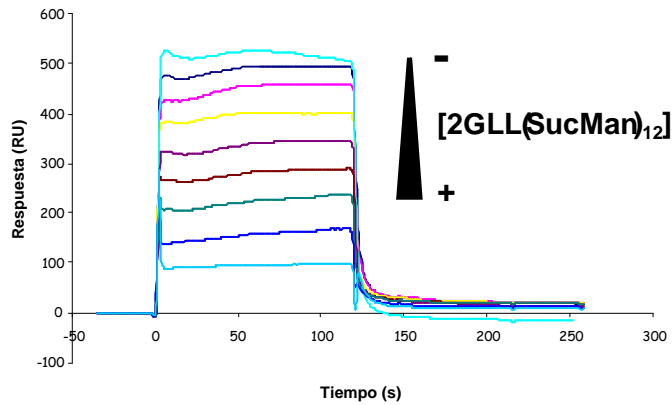


Figura 56. Sensogramas del proceso de inhibición de la interacción DC-SIGN/BSA-Man usando como inhibidor el glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂ a distintas concentraciones.

De este modo, y mediante el uso de biosensores hemos demostrado que el compuesto 2GLL(SucMan)₁₂ es capaz de inhibir la interacción del receptor DC-SIGN y la glicoproteína BSA-Man. En otras palabras, este compuesto tiene el tamaño y el número de azúcares necesario para poder interaccionar con el receptor DC-SIGN de manera significativa. Por lo tanto, es un buen candidato para ser conjugado con biomoléculas y estudiar el proceso de internalización dependiente de DC-SIGN.

Capítulo 4

**Marcaje fluorescente e
internalización**

4. Marcaje fluorescente e internalización.

Como hemos comentado anteriormente el glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂ tiene la capacidad de interactuar de forma significativa con el receptor. Utilizando el mecanismo de internalización en el que DC-SIGN está involucrado tras la interacción con un ligando, como podría ser nuestro glicodendrón de manosa, pretendemos que este tipo de sistemas puedan ser internalizados por células dendríticas de forma receptor-dependiente. Para poder confirmar la entrada de nuestro sistema en el interior celular empleando dicho mecanismo, nos planteamos el marcaje fluorescente del glicodendrón de segunda generación 2GLL(SucMan)₁₂. Utilizando diferentes técnicas como la citometría de flujo o la microscopía confocal sería factible determinar si los glicodendrones sintetizados pueden ser internalizados y por tanto servir como sistemas para la introducción selectiva de moléculas de interés biológico dentro de una determinada diana celular.

4.1. Marcaje fluorescente del glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂.

Como fluoróforo para el marcaje fluorescente del glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂ se eligió un derivado de bodipy. Los derivados de este tipo de

fluoróforos están basados en el esqueleto de la molécula de 4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-indaceno (Figura 57). Estos fluoróforos presentan propiedades ópticas que normalmente son mejores que las encontradas para otro tipo de fluoróforos más comunes como la fluoresceína,¹⁰³ rojo de Texas,¹⁰⁴ etc. El interés de estas sondas fluorescentes puede atribuirse a sus propiedades fotofísicas. Entre ellas podemos resaltar que sus características de excitación y de emisión se pueden regular por modificación del núcleo de pirrol,^{105,106} poseen un alto coeficiente de absorción molar (normalmente $\log_{\text{emax}} > 8,8$), altos rendimientos cuánticos de fluorescencia ($\Phi_F \approx 1.0$, incluso en agua), buena fotoestabilidad, y bandas estrechas de emisión. Además, son relativamente poco sensibles a la polaridad y al pH del medio, lo que los hace razonablemente estables en condiciones fisiológicas. Los fluoróforos basados en la estructura de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indaceno son muy versátiles y útiles en muchas aplicaciones biológicas ya que se pueden emplear para marcar fluorescentemente biomoléculas como proteínas,¹⁰⁷ ADN¹⁰⁸, etc.^{109,110}

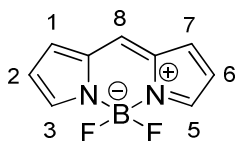


Figura 57. Estructura básica de los fluoróforos basados en 4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-indaceno.

El derivado de bodipy que tenemos que usar debe presentar en su estructura una funcionalización tal que nos permitiese conjugarlo con el grupo amino terminal del compuesto 2GLL(SucMan)₁₂. Así, se planteó la síntesis de un derivado que contuviese

¹⁰³ Soumillon, P.; Jaspers, L.; Vervoort, J.; Fastrez, J. *Protein Eng.* **1995**, *8*, 451-456.

¹⁰⁴ MacBeath, G.; Schreiber, S.L. *Science* **2000**, *289*, 1760-1763.

¹⁰⁵ Thoresen, L.H.; Kim, H.; Welch, M.B.; Burghart, A.; Burgess, K. *Synlett* **1998**, 1276-1278.

¹⁰⁶ Rurack, K.; Kollmannsberger, M.; Daub, J. *New J. Chem.* **2001**, *25*, 289-292.

¹⁰⁷ (a) Karolin, J.; Johansson, L.B.A.; Strandberg, L.; Ny, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7801-7806. (b) Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6th ed.; Molecular Probes: Eugene, OR, **1996**. (c) Tan, K.; Jaquinod, L.; Paolesse, R.; Nardis, S.; Di Natale, C.; Di Carlo, A.; Prodi, L.; Montalti, M.; Zaccheroni, N.; Smith, K.M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1099-1106. (d) Yee, M.C.; Fas, S.C.; Stohlmeyer, M.M.; Wandless, T.J.; Cimprich, K. A. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29053-29059. (e) Wagner, R.W.; Lindsey, J.S. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1373-1380.

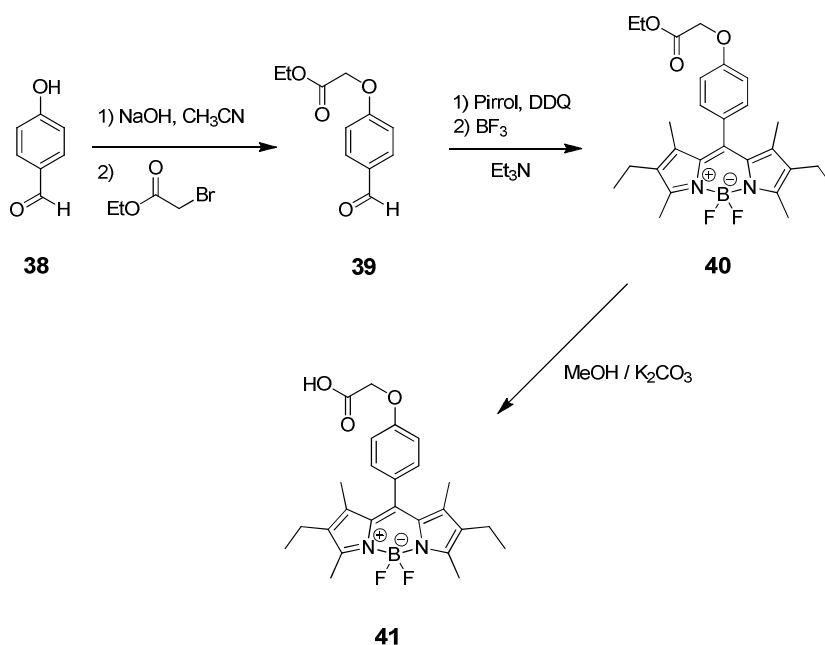
¹⁰⁸ Metzker, M.L. WO Patent WO/2003/066812, **2003**.

¹⁰⁹ Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.

¹¹⁰ Gonçalves, M.S.T. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190-212.

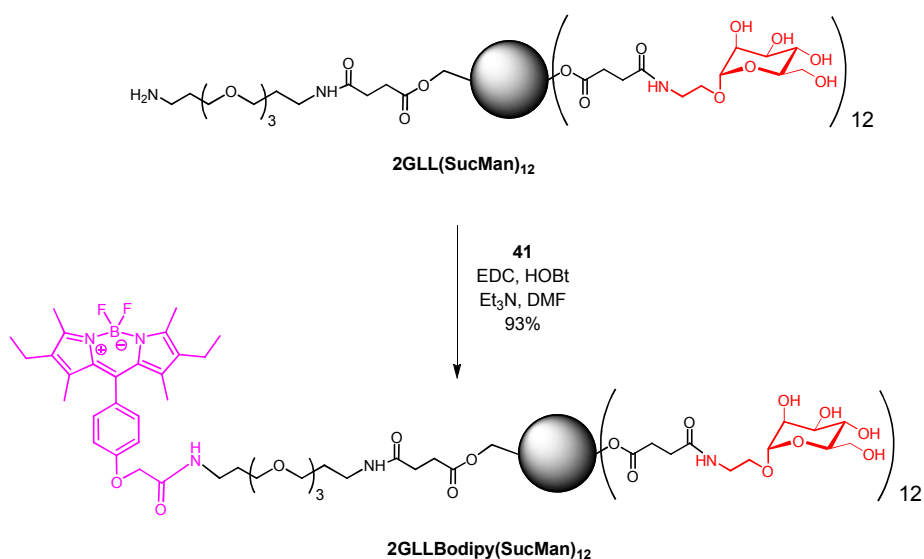
en su estructura un ácido carboxílico libre que mediante la formación de un enlace amida diera lugar al marcaje fluorescente del compuesto.

El derivado de bodipy seleccionado fue el compuesto **41**, el cual fue sintetizado en el laboratorio de los Profesores Rafael Suau y Ezequiel Pérez-Inestrosa de la Universidad de Málaga. Éste se preparó en cuatro etapas a partir del 4-hidroxibenzaldehído **38** según se muestra en la Esquema 20.



Esquema 20. Síntesis del derivado de bodipy **41**.

El compuesto 2GLL(SucMan)₁₂ se hizo reaccionar con el fluoróforo **41** empleando como condiciones de acoplamiento, EDC y HOBt en DMF anhidra. La posterior purificación utilizando sephadex LH20 nos condujo al producto 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ el cual presentaba un color rojo intenso (Esquema 21).



Esquema 21. Síntesis del glicodendrón de manosa marcado fluorescentemente con bodipy, 2GLLBodipy(SucMan)₁₂.

En la Figura 58 se muestran los espectros de ¹H-RMN del derivado de bodipy **41** (Figura 58a), así como del glicodendrón de manosa de segunda generación marcado fluorescentemente 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ (Figura 58b). El análisis del espectro de dicho compuesto marcado fluorescentemente nos indica la aparición de una serie de señales que están en concordancia con el anclaje del fluoróforo **41** al soporte glicodendrítico mediante un enlace tipo amida. Así, en el espectro que se muestra podemos observar la aparición de las señales A-G las cuales pertenecen al residuo de bodipy unido al glicodendrón.

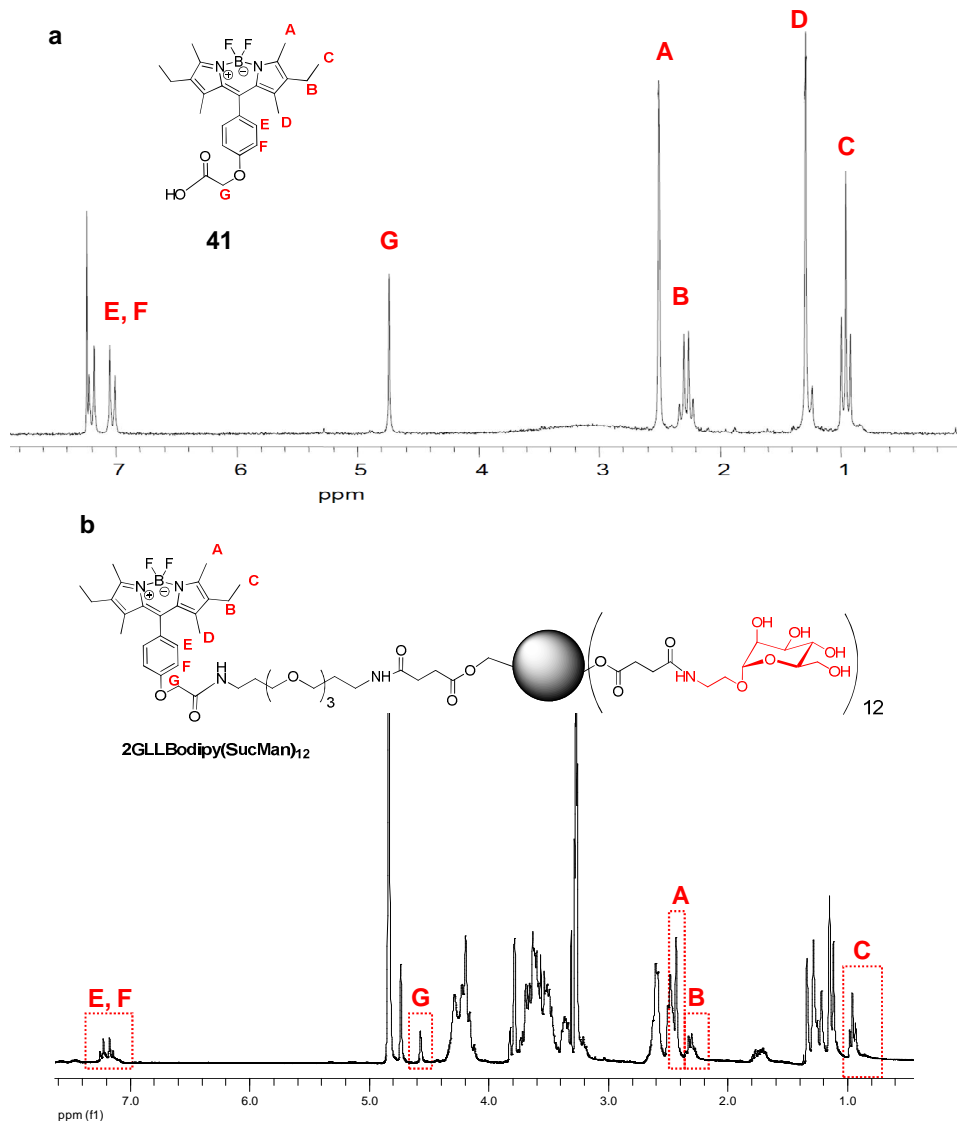


Figura 58. (a) Espectro de ¹H-RMN del fluoróforo **41** en CDCl₃. (b) Espectro de ¹H-RMN del glicodendrón 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ en MeOH-d₄.

Otra variación observada fue el desdoblamiento de los protones beta al amino del espaciador. En el espectro de ¹H-RMN del glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂, éstos aparecían como dos multipletes centrados a 1.70 y 1.88 ppm mientras que en el nuevo compuesto esta señal aparece como un único multiplete centrado a 1.55 ppm (Figura 59).

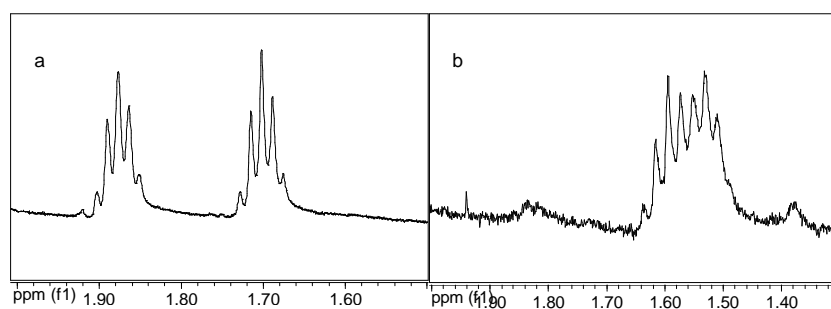


Figura 59. Ampliación de los espectros de ^1H -RMN del glicodendrón $2\text{GLL}(\text{SucMan})_{12}$ (a) y del $2\text{GLLBodipy}(\text{SucMan})_{12}$ (b).

Adicionalmente, se realizó el estudio de las propiedades espectrocópicas del derivado de bodipy **41** en comparación con el glicodendrón marcado fluorescentemente $2\text{GLLBodipy}(\text{SucMan})_{12}$. En un principio se realizaron estas medidas en agua y no se observó ninguna variación significativa en las medidas de máximos de absorción, emisión y rendimiento cuántico entre las dos moléculas fluorescentes. Además, en este mismo medio también se midió el tiempo de vida media de ambos compuestos observándose un incremento moderado de éste en el caso del glicodendrón. Dado el efecto que puede tener el medio (pH, fuerza iónica, etc.) en la fluorescencia de este tipo de fluoróforos, también se realizó el estudio de las propiedades fluorescentes del glicodendrón en un medio H_2O -PBS para simular el pH y las condiciones fisiológicas en las que se harían los estudios biológicos de este tipo de compuestos. Así, al igual que en el caso de los estudios en agua no se observó ningún cambio significativo salvo en la mejora del tiempo de vida media, por lo que podemos decir que el glicodendrón $2\text{GLLBodipy}(\text{SucMan})_{12}$ posee unas buenas propiedades de fluorescencia a pH fisiológico (Figura 60).

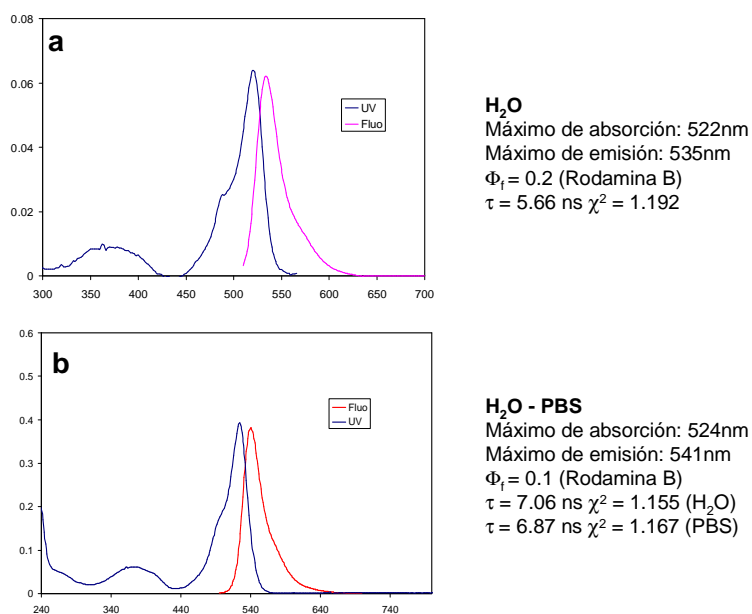
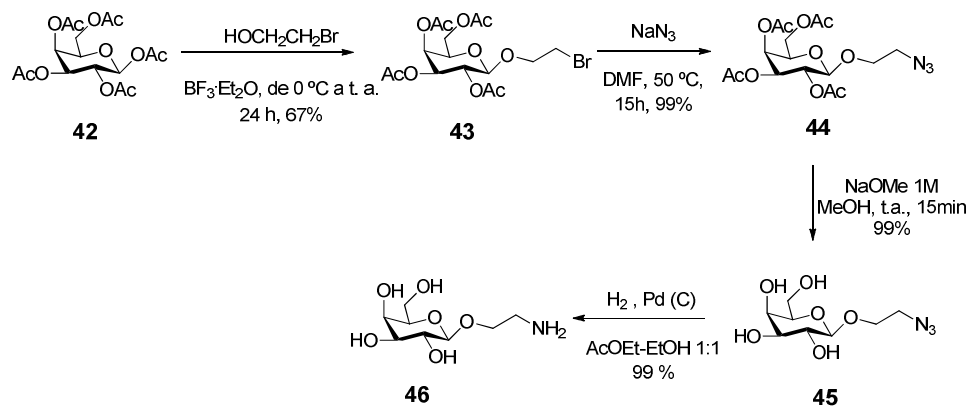


Figura 60. Espectros de emisión y absorción de UV y fluorescencia. (a) Derivado de bodipy **41** en H₂O; (b) Glicodendrón 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ en H₂O-PBS.

4.2. Síntesis y marcaje fluorescente de dendrones control.

Adicionalmente, se planteó la síntesis del glicodendrón de galactosa marcado fluorescentemente que sería empleado posteriormente como control negativo para los estudios de internalización en células dendríticas. El receptor DC-SIGN reconoce derivados de manosa, fucosa e incluso glucosa pero no galactosa. Este glicodendrón nos permitiría confirmar que el proceso de internalización es dependiente del carbohidrato y por tanto del receptor DC-SIGN de forma selectiva. Para sintetizar el glicodendrón de galactosa fue necesaria la síntesis de un derivado de galactosa que contuviese en su estructura un grupo amino libre, que al igual que en el caso de la manosa **17**, nos permitiese la unión al dendrón de segunda generación **35**.

Así, el derivado de galactosa **46** se preparó en cuatro etapas a partir de la correspondiente galactosa peracetilada comercial **42**, utilizando la misma metodología empleada para la síntesis del derivado de manosa **17** (Esquema 22).



Esquema 22. Síntesis del derivado de galactosa 46.

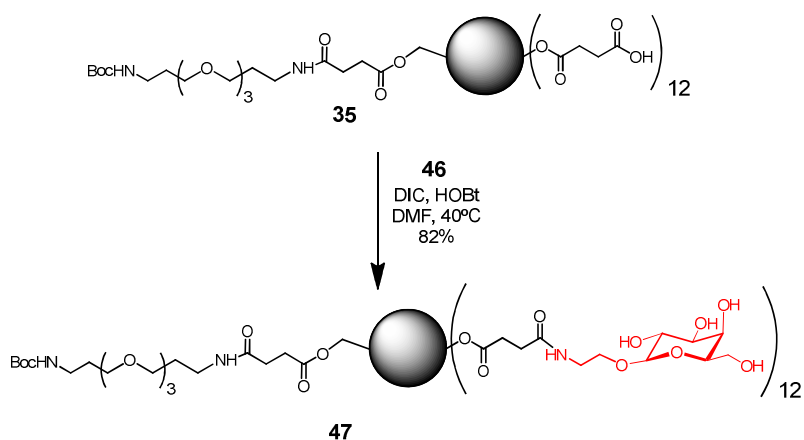
La primera etapa consistió en la glicosidación del compuesto peracetilado **42** con 2-bromoetanol empleando las condiciones descritas previamente en la bibliografía,¹¹¹ obteniéndose el derivado glicosilado **43** con un rendimiento del 67%. El espectro de ¹H-RMN del producto **43** mostraba la aparición de un doblete a 4.52 ppm correspondiente al protón anomérico cuya constante de acoplamiento era 8 Hz, lo que indicaba la formación exclusiva del anómero β. Posteriormente, se realizó la sustitución nucleófila del grupo Br del extremo terminal del espaciador del producto **43** por un grupo azida. Esta etapa se realizó utilizando un gran exceso de NaN₃ en DMF anhidra, obteniéndose el derivado **44** de forma cuantitativa. La sustitución de bromo por azida fue confirmada por el análisis del espectro de ¹³C-RMN del producto **44** en que se pudo observar la desaparición de la señal del carbono unido al bromo a 29.8 ppm y la aparición de una nueva señal a 50.6 ppm correspondiente al desplazamiento de un carbono unido a un grupo azida.

La desacetilación del producto **44** utilizando NaOMe 1M en MeOH condujo al compuesto **45** con excelentes rendimientos. Mediante el análisis del espectro de ¹H-RMN se pudo observar la desaparición de las señales correspondientes a los metilos de los grupos acetato. Por último, la hidrogenación del grupo azida utilizando como catalizador paladio sobre carbono a presión y temperatura ambiente, condujo al

¹¹¹ Davis, B.G.; Maughan, M.A.T.; Ullman, A.; Jones, J.B. *Tetrahedron: Asymm.* **2000**, *11*, 245–262.

derivado de galactosa **46**. El análisis del espectro de ^{13}C -RMN del producto **46** mostró la desaparición de la señal a 52.0 ppm ($\text{CH}_2\text{-N}_3$) y la aparición de una nueva señal a 42.3 ppm característica de un carbono unido a un grupo amino.

Una vez sintetizado el derivado de galactosa **46** correctamente funcionalizado, se llevó a cabo el acoplamiento con el dendrón de segunda generación **35**. Para ello, se emplearon las mismas condiciones anteriormente utilizadas para la síntesis del glicodendrón de manosa de segunda generación **37**. Así, el dendrón de segunda generación **35** y el derivado de galactosa **46** (2 eq x COOH) se disolvieron en DMF anhidra. Posteriormente, se realizó la adición a temperatura ambiente de DIC y HOBT (3 eq x COOH) y se mantuvo la reacción a 40°C durante 48 h. En estas condiciones se obtuvo el glicodendrón de segunda generación de galactosa **47** con buen rendimiento tras su purificación por cromatografía de exclusión por tamaño usando Sephadex LH20 (Esquema 23).



Esquema 23. Síntesis del glicodendrón de galactosa **47**.

Al igual que en el caso del glicodendrón de manosa de segunda generación **37**, en el espectro de ^1H -RMN en D_2O del glicodendrón **47** se observó un desdoblamiento de las señales correspondientes a los grupos metilénicos de los succínicos mientras que en el espectro del producto de partida aparecían como un único multiplete. Este resultado indicaba un claro cambio en el entorno químico de los mismos, poniendo de

manifiesto la formación de los enlaces amida necesarios para la conjugación del carbohidrato. Además, en el espectro también se pudo apreciar la aparición de nuevas señales correspondientes a la unidad de galactosa, cuya integración con respecto a las señales propias de los dendrones pusieron de manifiesto la entrada de 12 unidades de galactosa (Figura 61).

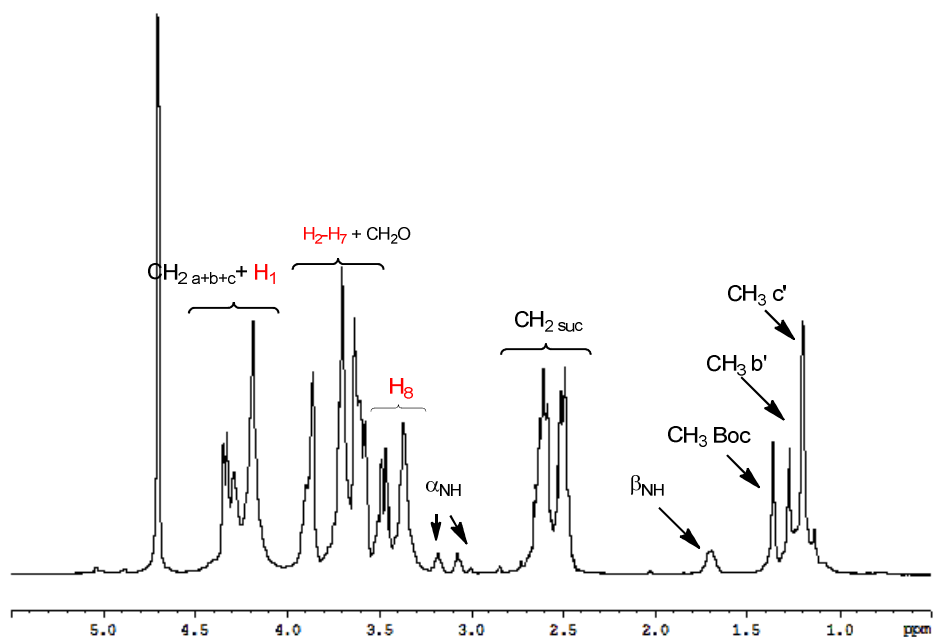
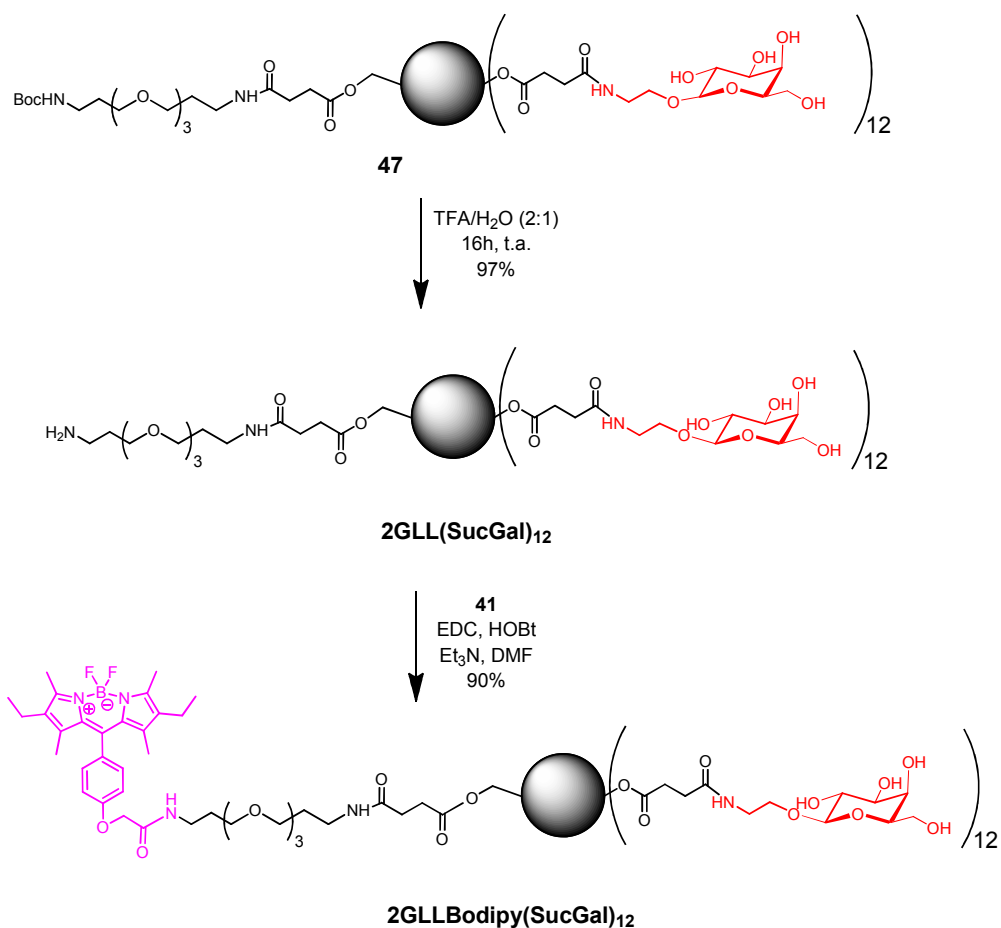


Figura 61. Espectro de ¹H-RMN de los glicodendrones 47 en D₂O.

Una vez obtenido el glicodendrón de galactosa 47, se realizó la desprotección del grupo amino. Para ello, dicho compuesto se trató con una mezcla H₂O/TFA (1:2) durante 16 horas a temperatura ambiente, bajo estas condiciones se obtuvo el glicodendrón 2GLL(SucGal)₁₂ (Esquema 24). La desprotección del grupo amino se confirmó en el espectro de ¹H-RMN por la desaparición de la señal característica del grupo *tert*-butilo (1.36 ppm) del producto 47, así como la desaparición de la señal correspondiente en el espectro de ¹³C-RMN a 27.8 ppm.



Esquema 24. Síntesis del glicodendrón **2GLL(SucGal)₁₂** y del glicodendrón marcado fluorescentemente **2GLLBodipy(SucGal)₁₂**.

Posteriormente, se realizó el acoplamiento del glicodendrón de galactosa con el fluoróforo **41**, obteniéndose de este modo el glicodendrón marcado **2GLLBodipy(SucGal)₁₂** (Esquema 24). El análisis del espectro ¹H-RMN del glicodendrón de galactosa marcado fluorescentemente presentaba al igual que en el caso del compuesto **2GLLBodipy(SucMan)₁₂** la aparición de las señales del fluoróforo **41** lo que determinó el anclaje de éste al soporte glicodendrítico mediante un enlace tipo amida.

Otro control negativo para los estudios de internalización celular interesante sería el mismo dendrón pero sin azúcares. Este sistema nos permitiría demostrar que son los carbohidratos los que realmente inducen la internalización de forma selectiva dependiente del receptor. Podría ocurrir que en las células utilizadas hubiera algún receptor de galactosa y por tanto podría interferir en el estudio de la selectividad del proceso de internalización dependiente del receptor DC-SIGN. Por ello se planteó la síntesis del derivado **52** (Figura 62) que presenta grupos hidroxilo en su superficie.

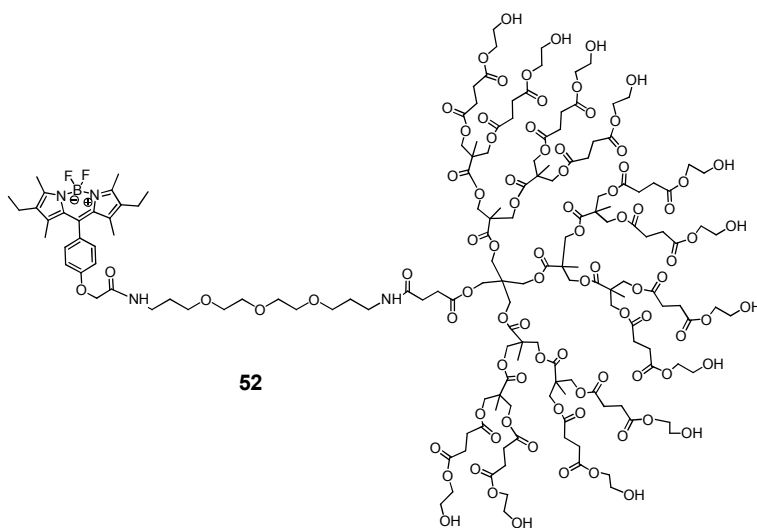
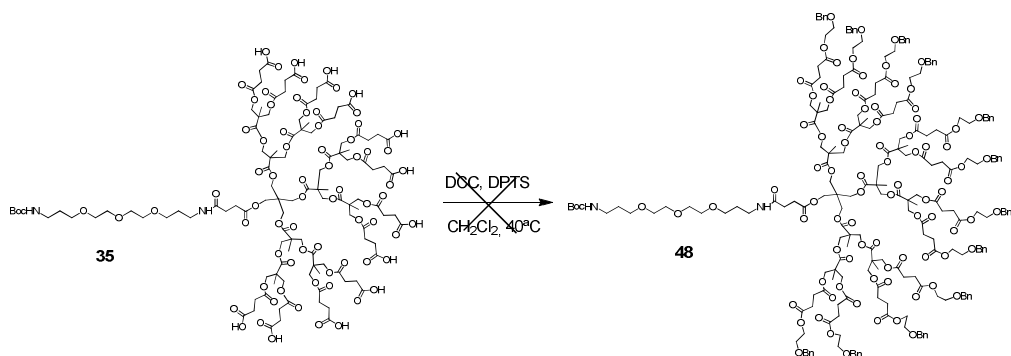


Figura 62. Dendrón control **52** con grupos hidroxilo en su superficie marcado fluorescentemente.

El primer paso de esta ruta sintética implicaba el acoplamiento mediante un enlace éster del 2-bencioxietanol comercial al dendrón **35** (Esquema 25). Para ello se utilizaron las condiciones empleadas anteriormente para la obtención de los dendrones de primera y segunda generación **32** y **33** (DCC, DPTS y como disolvente diclorometano a 40°C).



Esquema 25. Síntesis del dendrón **48** a partir del dendrón **35**.

Sin embargo, en estas condiciones se obtuvo una mezcla de productos consecuencia de una entrada incompleta del 2-benciloxietanol tal y como se muestra en la Figura 63. El aumento en el número de equivalentes de alcohol, DCC o HOBt no mostró una mejora significativa, obteniéndose espectros de masas muy similares. El cambio de disolvente por otros tales como THF o DMF no condujo en ningún caso al producto monodisperso deseado.

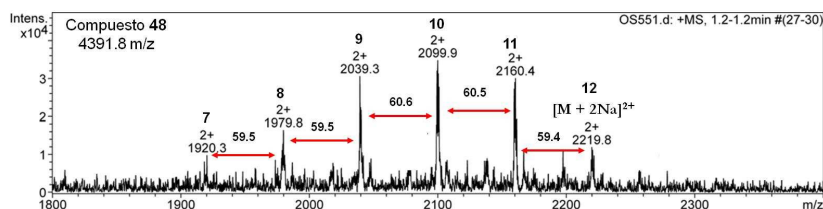
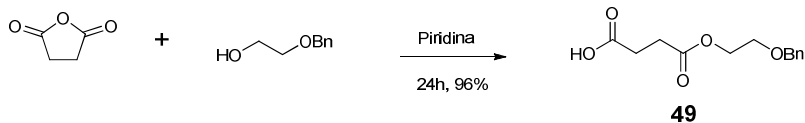


Figura 63. Espectro de masas ESI del dendrón **48**.

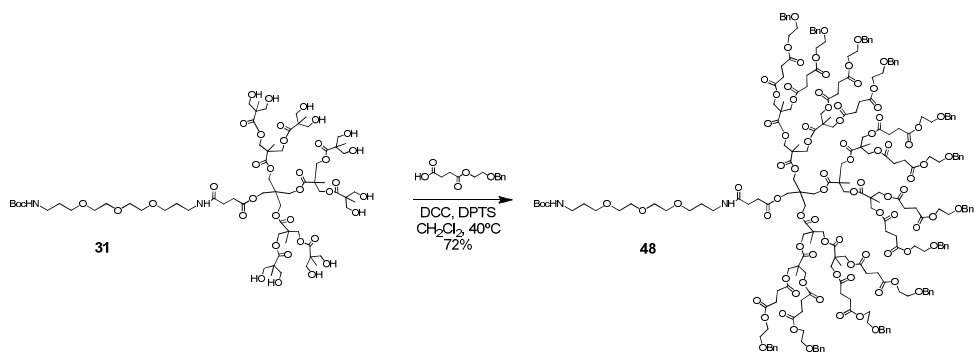
Dado que hasta el momento, los acoplamientos tipo éster que se habían realizado mediante el empleo de DCC y DPTS habían dado excelentes resultados en la obtención de productos monodispersos, se planteó que el problema podía radicar en el acoplamiento sobre una superficie de poliácidos como es el producto **35**. Así, se planteó una nueva síntesis del derivado **48** a partir del dendrón de segunda generación **31**. Esta ruta implicaba la síntesis del producto **49** que tras el acoplamiento nos conduciría al dendrón deseado. El producto **49** se obtuvo mediante la apertura del anillo de anhídrido succínico por ataque nucleofilo del 2-benciloxietanol en piridina (Esquema 26). La formación del producto pudo confirmarse claramente mediante la

aparición de las señales características del grupo bencilo a 7.12 y 4.34 ppm en el espectro $^1\text{H-RMN}$.



Esquema 26. Síntesis del derivado **49**.

Una vez sintetizado el derivado **49** se llevó a cabo el acoplamiento mediante el empleo de las condiciones usadas anteriormente (DCC, DPTS, CH_2Cl_2 , 40°C) con el dendrón de segunda generación **31**. De este modo se obtuvo el producto **48** (Esquema 27).



Esquema 27. Síntesis del dendrón **48** a partir del dendrón **31**.

La monodispersidad del producto **48** fue confirmada mediante espectrometría de masas. En el espectro de este compuesto se pudo observar una única señal correspondiente al ión molecular que indicaba claramente la entrada de 12 unidades del derivado **49** (Figura 64).

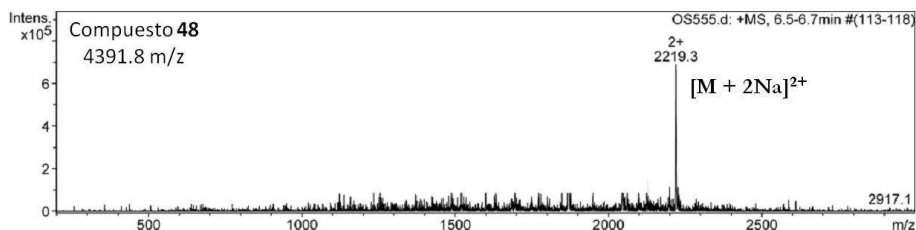
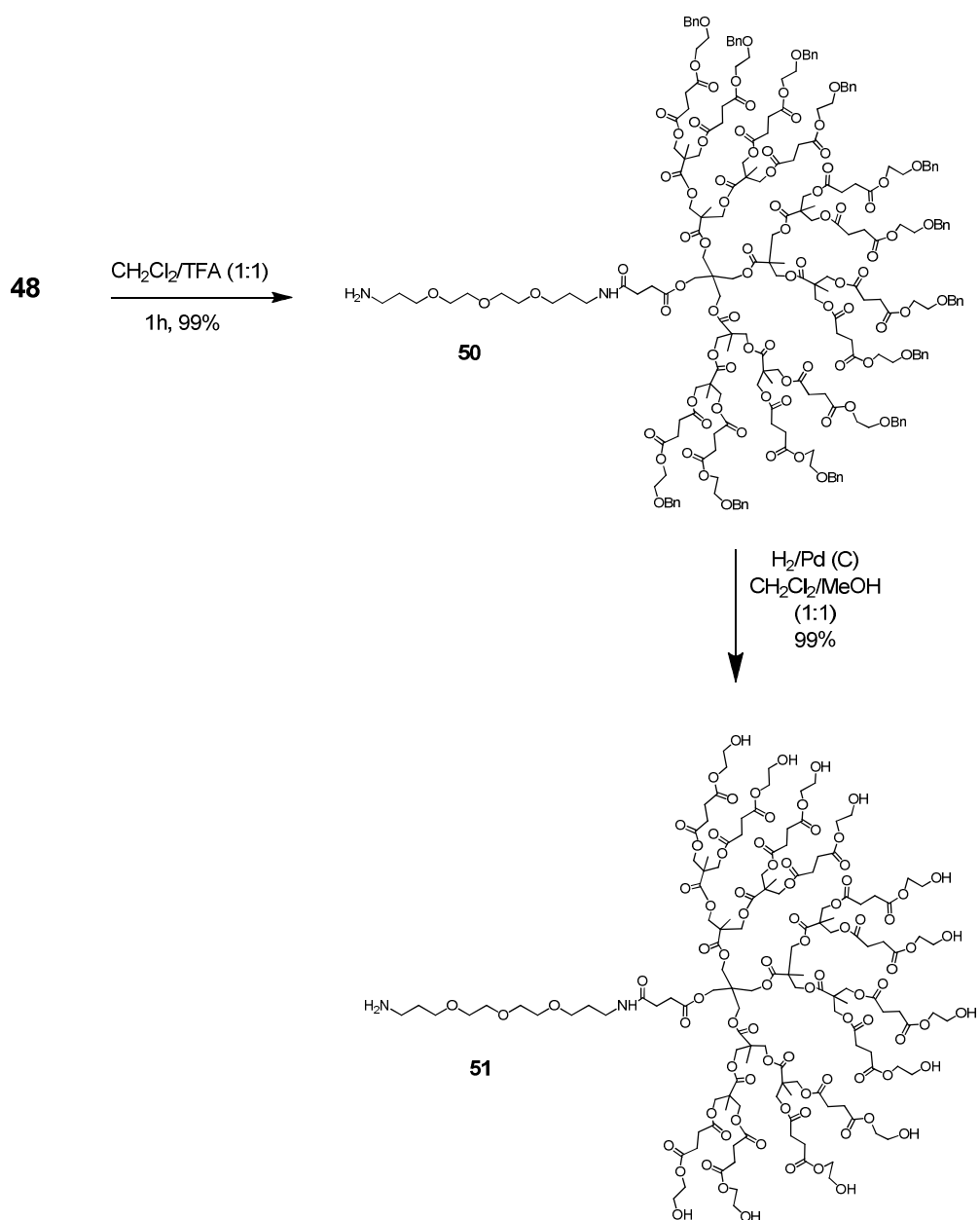


Figura 64. Espectro ESI de masas del dendrón **48** monodisperso.

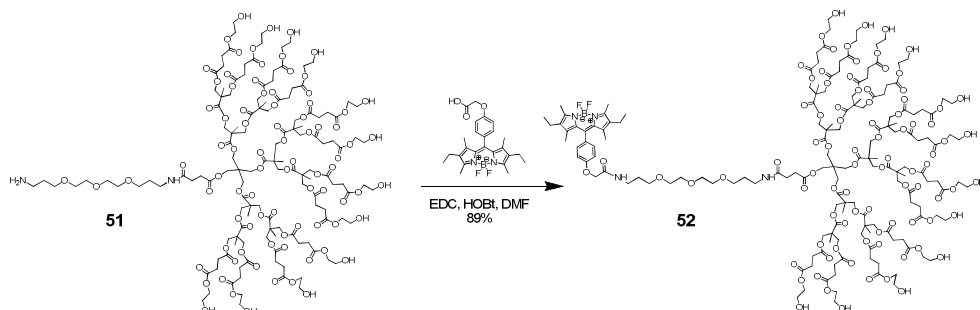
La desprotección selectiva del grupo carbamato del producto **48** se llevó a cabo empleando condiciones clásicas ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (1:1) a temperatura ambiente) obteniéndose el compuesto **50** de forma cuantitativa. La eliminación del grupo protector Boc se confirmó mediante el espectro de ^1H -RMN de este compuesto, en el que se pudo observar la desaparición de la señal a 1.42 ppm característica del grupo *tert*-butilo del Boc. Posteriormente, se llevó a cabo la desprotección de los grupos hidroxilos mediante hidrogenación catalizada por paladio sobre carbono. De este modo, se obtuvo el dendrón **51** el cual presenta los grupos hidroxilos libres en su superficie. En el espectro de ^1H -RMN del producto **51** se pudo observar la desaparición de todas las señales correspondientes a los protones aromáticos, así como la desaparición de la señal del grupo metileno unido al grupo fenilo (Esquema 28).



Esquema 28. Síntesis del dendrón **51**.

Una vez obtenido el dendrón **51**, el cual posee un grupo amino terminal libre, se hizo reaccionar con el fluoróforo **41** con objeto de obtener el dendrón que contenía grupos hidroxilo en la superficie marcado fluorescentemente. Para ello, se emplearon las mismas condiciones de acoplamiento que en el caso de los glicodendrones de

manosa y galactosa (EDC, HOBt en DMF anhidra) (Esquema 29). La posterior purificación empleando sephadex LH20 nos condujo al producto **52** que al igual que los productos anteriores presentaba un color rojo intenso.



Esquema 29. Síntesis del dendrón control **52** marcado fluorescentemente.

En el espectro de ^1H -RMN en MeOH-d_4 se pudo observar la presencia de todas las señales características del fluoróforo introducido. Además, el espectro de masas verificó que el derivado obtenido era el correspondiente al dendrón funcionalizado fluorescentemente **52** (Figura 65).

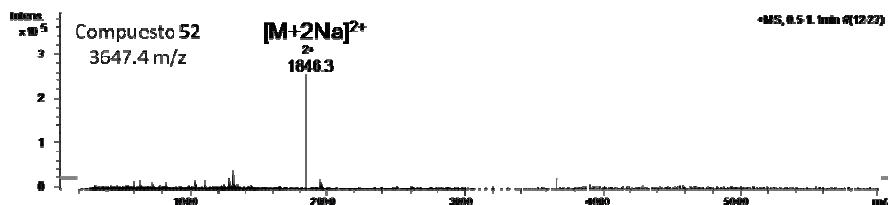


Figura 65. Espectro de masas ESI del dendrón marcado con bodipy **52**.

Desafortunadamente, el dendrón control **52** preparado para ser utilizado en los estudios de internalización resultó ser un compuesto poco soluble en medios acuosos y por lo tanto no han podido emplearse en dichos estudios.

4.3. Estudios de internalización de los glicoconjugados 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ y 2GLLBodipy(SucGal)₁₂

Una vez preparados los compuestos glicodendríticos marcados fluorescentemente, 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ y 2GLLBodipy(SucGal)₁₂, la idea era demostrar que dichos compuestos eran capaces de interaccionar con un receptor presente en la superficie celular e internalizarse de forma receptor-dependiente en el citoplasma de dichas células. Los compuestos que se pretenden internalizar presentan como carbohidrato en su superficie unidades de manosa y por tanto era necesario utilizar células que presentaran un receptor capaz de reconocer manosas como es la lectina DC-SIGN Figura 66.

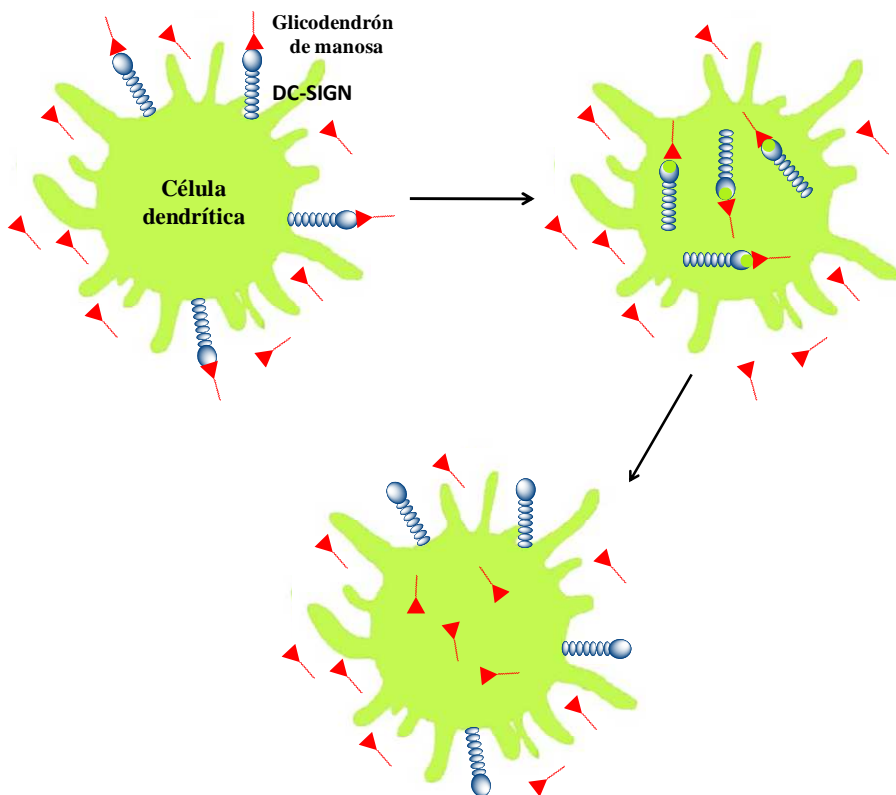


Figura 66. Representación esquemática del proceso de internalización de un glicodendrón de manosa mediado por DC-SIGN.

Para ello se usaron células dendríticas inmaduras, que expresan en gran cantidad el receptor DC-SIGN en su superficie, obtenidas a partir de células leucocitarias de donantes sanos. Estas células dendríticas, se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de los glicodendrones de manosa y galactosa durante 1 hora a 37° C, temperatura a la cual tienen lugar los procesos de internalización. De este modo la mayor parte de la señal detectada correspondería al proceso de internalización ya que este se ve favorecido en las condiciones experimentales empleadas. Para poder cuantificar los niveles de internalización del receptor de los sistemas preparados se realizaron ensayos de interacción/internalización empleando citometría de flujo.

La citometría de flujo es un método de análisis automatizado en el que células individuales, u otras partículas biológicas, inmersas en una corriente, son sometidas a un haz lumínico y examinadas por sensores, que miden sus características físicas o químicas. Si el análisis incluye la detección de fluorescencia hablamos estrictamente de citofluorímetros de flujo conocidos como citómetros o FACS. En nuestro caso, hemos empleado la citometría de flujo para cuantificar el grado de interacción e internalización de los glicodendrones fluorescentes preparados empleando para ello el aumento de la señal de fluorescencia de una media geométrica de células. Al interaccionar y posteriormente internalizar los glicodendrones fluorescentes se produciría una señal de fluorescencia debido a la presencia de estos ligandos bien en la superficie celular o en el interior de la misma.

Los resultados obtenidos en estos experimentos demuestran que ambos glicodendrones (con manosas y con galactosas como ligandos) interaccionan con el receptor y son internalizados en las células dendríticas, aunque como puede observarse en la Figura 67 la señal del glicodendrón 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ es entre 2.5 y 3 veces mayor que la del glicodendrón 2GLLBodipy(SucGal)₁₂.

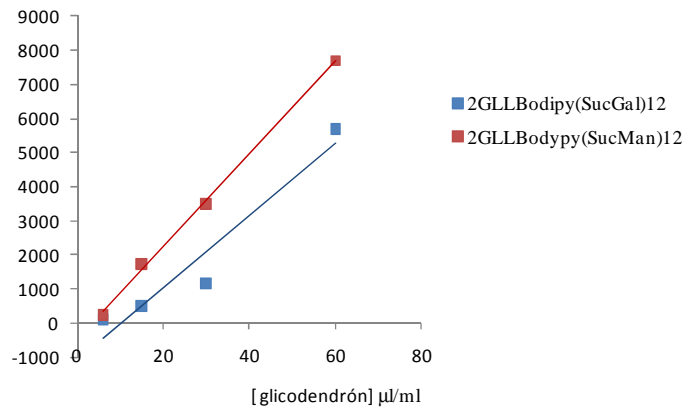


Figura 67. Ensayos de interacción/internalización de los glicodendrones 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ y 2GLLBodipy(SucGal)₁₂ empleando citometría de flujo.

Estos resultados demuestran que este tipo de glicodendrones son capaces de interactuar con el receptor DC-SIGN e internalizarse al interior de las células dendríticas. Aunque el receptor DC-SIGN no es capaz de reconocer galactosas, el glicodendron que lleva como ligando este tipo de carbohidrato es internalizado en las células dendríticas, aunque en menor medida que el que presenta manosas. Una explicación para este hecho podría ser que las células dendríticas pueden expresar en su superficie otros receptores distintos de DC-SIGN capaces de interactuar con galactosas lo que explicaría los resultados encontrados. Es claro que el glicodendron de galactosas 2GLLBodipy(SucGal)₁₂ no es un control negativo adecuado para estos experimentos aunque la diferencia encontrada entre el compuesto de manosa y galactosa pone en evidencia la selectividad del proceso dependiente de un receptor. A la vista de estos resultados podemos concluir que los glicodendrones sintetizados que contienen 12 copias de manosas son capaces de ser internalizados en las células dendríticas vía DC-SIGN. Para confirmar el proceso de internalización al interior celular se están llevando a cabo estos estudios usando un microscopio confocal y marcadores específicos de determinadas estructuras intracelulares para confirmar que el proceso de interacción del glicodendron con el receptor conduce a un proceso de internalización mediado por dicho receptor.

Estos resultados muy prometedores abren las puertas para la potencial utilización de estos sistemas glicodendríticos como transportadores selectivos de moléculas (fármacos, péptidos, ácidos nucleicos) que puedan conjugarse a dichos sistemas con aplicaciones en diferentes campos de investigación como pueden ser la terapia génica no viral, el desarrollo de vacunas, y el transporte selectivo de fármacos aumentando su eficiencia y disminuyendo los potenciales efectos secundarios.

La implicación de DC-SIGN en procesos de señalización hace de este receptor una diana muy interesante para poder modular, a través de la interacción de diferentes carbohidratos con dicho receptor, el proceso de señalización y por tanto una respuesta inmune específica.⁶⁹

Para evaluar si nuestros sistemas glicodendríticos, al interactuar con el receptor DC-SIGN, dan lugar a algún tipo de señalización, se llevaron a cabo experimentos en los que se analizó la secreción de citoquinas mediante ELISA, usando de nuevo las DC inmaduras obtenidas a partir de células leucocitarias de dos donantes sanos. Estas células se incubaron en presencia o ausencia de ambos glicodendrones y en presencia o ausencia de lipopolisacáridos (LPS) durante 18 horas a 37° C.

Los Lipopolisacáridos (LPS) son macromoléculas constituidas por un lípido y un polisacárido, que se encuentran en la membrana externa de bacterias Gram-negativas. Estos actúan como endotoxinas prototipo porque pueden ser reconocidas por TLRs desencadenado, entre otras respuestas, la secreción de la citoquina interleuquina 10 (IL-10). El reconocimiento de los epítomos de manosa por el receptor DC-SIGN puede hacer que éste actúe como inmunomodulador, activando los TLRs y aumentando por tanto el reconocimiento de LPS, un efecto que tendría como consecuencia el aumento de la producción de IL-10.

⁶⁹ (a) Zhou, T.; Chen, Y.; Hao, L.; Zhang, Y. *Cell. Mol. Immunol.* **2006**, *3*, 279-283. (b) van Kooyk, Y. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 1478-1481. (c) den Dunnen, J.; Gringhuis, S.I.; Geijtenbeek, T.B.H. *Cancer Immunol. Immunother.* **2009**, *58*, 1149-1157. (d) Geijtenbeek, T.B.H.; den Dunnen, J.; Gringhuis, S.I. *Future Microbiol.* **2009**, *4*, 879-890. (e) Gringhuis, S.I.; Dunnen, J.; Litjens, M.; Vlist, M.; Geijtenbeek, T.B.H. *Nat. Immunol.* **2010**, *10*, 1081-1089. (f) Dunnen, J.; Gringhuis, S.I.; Geijtenbeek, T.B.H. *Immunol. Lett.* **2010**, *128*, 12-16.

Mediante este experimento, se observó, como puede verse en la Figura 68, un cierto grado de sinergia en la elevación de la secreción de la citoquina, IL-10 en el caso del glicodendrón 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ en presencia de LPS, y en menor medida con el glicodendrón 2GLLBodipy(SucGal)₁₂. Estos resultados indican que estos glicodendrones pueden inducir una señalización determinada tras su interacción con el receptor DC-SIGN. Sin embargo, este efecto es dependiente del donante del que se obtengan las células dendríticas, como se ve en la Figura 68, el efecto es diferente en el caso del donante B, en el que dicho efecto no está tan claro ya que se aprecian menos diferencias en la producción de IL-10.

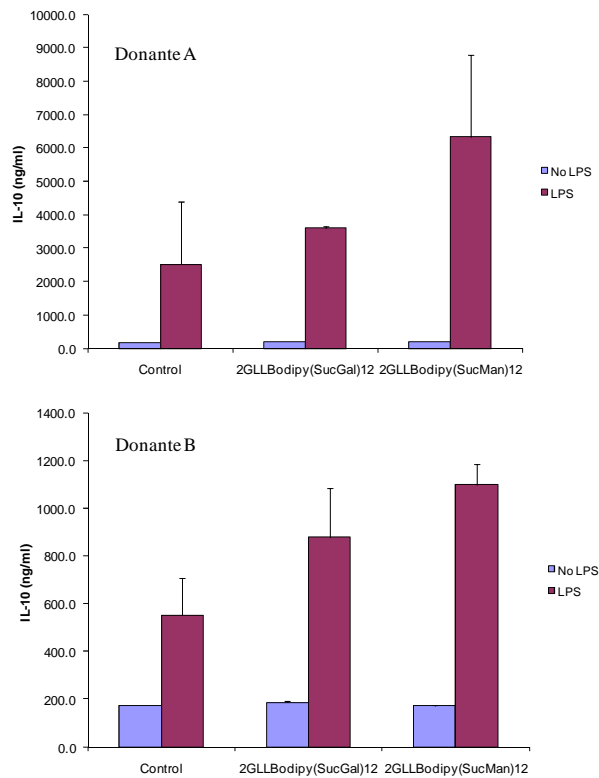


Figura 68. Experimentos de secreción de citoquinas IL-10 10 por los glicodendrones de manosa y galactosa en presencia de LPS.

En resumen podemos decir que se han preparado glicodendrones que presentan 12 unidades de manosa o de galactosa marcados fluorescentemente

(2GLLBodipy(SucMan)₁₂ y 2GLLBodipy(SucGal)₁₂ respectivamente) los cuales se han empleado para realizar estudios de interacción/internalización que han sido evaluados mediante citometría de flujo, así como experimentos de secreción de citoquinas IL-10 evaluados mediante el empleo de ELISA en células dendríticas. Estos experimentos han puesto de relieve que el proceso de internalización es dependiente del carbohidrato y por tanto del receptor DC-SIGN de forma selectiva.

Capítulo 5

Conjugación de biomoléculas

5. Conjugación de biomoléculas.

Como comentamos en el capítulo 3 de la presente memoria el glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂ tiene la capacidad de bloquear la interacción entre el receptor DC-SIGN y la glicoproteína BSA-Man. Aprovechando el mecanismo de internalización del receptor DC-SIGN y la interacción entre DC-SIGN y el glicodendrón de manosa de segunda generación 2GLL(SucMan)₁₂ nos planteamos la preparación de sistemas multivalentes mixtos que presenten carbohidratos y otras moléculas de interés biológico. De esta forma, estos glicodendrones mixtos interaccionarían de forma selectiva con el receptor DC-SIGN a través de los carbohidratos y se internalizarían introduciendo de forma selectiva las moléculas de interés biológico que llevan ancladas. Como moléculas de interés biológico por la potencial aplicación que pueden tener en el futuro, vamos a emplear péptidos y oligonucleótidos.

Los carbohidratos son moléculas poco inmunogénicas y no van a dar lugar a anticuerpos específicos frente a los mismos; sin embargo, los péptidos en general si lo son. Seleccionando adecuadamente estos péptidos se podría internalizar en las células dendríticas estos sistemas desencadenando una respuesta inmune específica frente a

dichos péptidos que se podría utilizar en el desarrollo de vacunas frente a un determinado tipo de enfermedad.¹¹²

Además de la generación de vacunas, los sistemas multivalentes mixtos también podrían emplearse en transferencia de plásmidos en lo que se denomina terapia génica. Desde el descubrimiento del origen genético (gen defectuoso, inactivo, etc.) de muchas enfermedades frente a las cuales no hay por el momento ningún tipo de terapia, la esperanza para curar este tipo de enfermedades reside en lo que se denomina la terapia génica. Esta terapia génica consiste en la sustitución del gen defectuoso por otro funcional utilizando un vector de transferencia adecuado.¹¹³ Inicialmente se han utilizado vectores de transfección basados en sistemas virales, pero estos sistemas están dando muchos problemas desde el punto de vista experimental, ético y de seguridad. Por esta razón, el uso de vectores no virales ha recibido una gran atención en los últimos años. Aunque se han desarrollado un gran número de estos vectores, todos ellos adolecen de una falta parcial o total de selectividad a la hora de transferir el plásmido a una determinada célula diana.¹¹⁴ En este sentido, se pretende utilizar los glicodendrones para conseguir plásmidos de forma que, a través de los carbohidratos del sistema multivalente, se dote al sistema una especificidad adecuada en función del carbohidrato elegido para cada tipo de receptor celular. De esta forma, se podrá hacer una transferencia selectiva del plásmido a un determinado tipo de célula diana.

En este capítulo se ha estudiado la funcionalización del sistema multivalente de carbohidratos 2GLL(SucMan)₁₂ para generar sistemas mixtos con un péptido o un oligonucleótido modelo.

A continuación se hará un breve repaso sobre los distintos tipos de adición quimioselectiva que han sido empleados mayoritariamente en los procesos de conjugación de biomoléculas.

¹¹² Rojo, J. *Anti-Infective Agents Med. Chem.* **2009**, *23*, 50-72.

¹¹³ Stephanopoulos, N. *Harvard Sci. Rev.* **2001**, *14*, 43-46.

¹¹⁴ Ferber, D. *Science* **2001**, *294*, 1638-1642.

5.1. Adición quimioselectiva.

La adición de biomoléculas quimioselectiva es el acoplamiento covalente de dos o más sustancias desprotegidas en medio acuoso en el cual dichas moléculas están altamente funcionalizadas y contienen únicamente un grupo reactivo funcional. El concepto subyacente que caracteriza la adición de biomoléculas quimioselectiva es el término “bioortogonalidad”. En otras palabras, el par de grupos funcionales que dan lugar a la unión deben ser los únicos que se vean alterados. En resumen podemos decir que la mejor conjugación de moléculas de forma quimioselectiva debe ser: rápida, de elevado rendimiento, no debe requerir un gran exceso de reactivos (y si lo emplea que sean fácilmente reutilizables), deben llevarse a cabo en medios acuosos sin requerir el uso de co-disolventes y han de ser irreversibles en condiciones fisiológicas.

Una de las reacciones que ha sido empleada en este tipo de uniones quimioselectivas han sido las reacciones de cicloadición (Figura 69), entre ellas podemos destacar la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre azidas y alquinos (Figura 69B). La utilidad de este tipo de reacciones radica en la facilidad para introducir las funciones alquino o azida en moléculas orgánicas, y en el hecho de que estas funciones son estables bajo una gran variedad de condiciones. Además, son fundamentalmente inertes tanto en disolventes orgánicos como en condiciones fisiológicas donde existen moléculas con alta funcionalización, inertes en presencia de oxígeno molecular y/o agua, y bajo la mayoría de las condiciones comunes en síntesis orgánica.

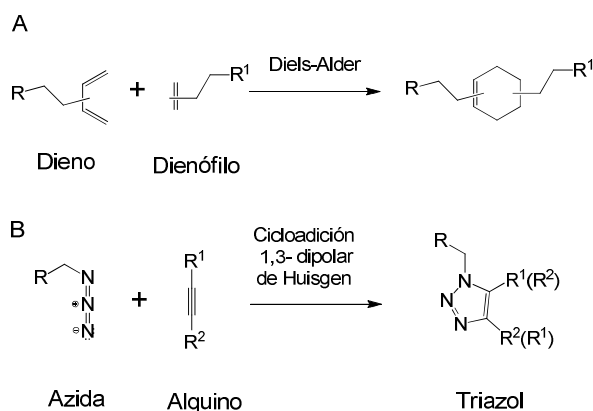


Figura 69. Cicloadiciones que han sido empleadas en uniones quimioselectivas. A) Reacción de Diels-Alder; B) cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen.

Este tipo de reacciones han sido empleadas en numerosos campos como por ejemplo el diseño de microarrays,¹¹⁵ generación de inhibidores enzimáticos,¹¹⁶ modificación de la superficie de virus¹¹⁷ y bacterias¹¹⁸, etc.

Un ejemplo interesante de este tipo de metodología fue el empleado por Davis y colaboradores¹¹⁹ para realizar la síntesis de una glicoproteína. Para abordar la síntesis de la glicoproteína emplearon una proteína modelo SsβG (*Sulfolobus solfataricus* β-glicosidase) en la que el aminoácido alanina de la posición 43 se había sustituido por un aminoácido no natural que contenía un grupo azida. Mediante el empleo de una cicloadición catalizada por cobre (I) introdujeron el tetrasacárido siálico de Lewis x que contenía un grupo alquino (Figura 70).

¹¹⁵ Fazio, F.; Bryan, M. C.; Blixt, O.; Paulson, J. C.; Wong, C.H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397-14402.

¹¹⁶ Lewis, W.G.; Green, L.G.; Grynszpan, F.; Radic, Z.; Carlier, P.R.; Taylor, P.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1053-1057.

¹¹⁷ Wang, Q.; Chan, T.R.; Hilgraf, R.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B.; Finn, M.G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.

¹¹⁸ Link, J.A.; Tirrell, D.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164-11165.

¹¹⁹ van Kasteren, S.I.; Kramer, H.B.; Jensen, H.H.; Campbell, S.J.; Kirkpatrick, J.; Oldham, N.J.; Anthony, D.C.; Davis, B.G. *Nature* **2007**, *446*, 1105-1109.

ejemplos en la preparación de vacunas,¹²⁰ microarrays,¹²¹ agentes de imagen,¹²² agentes terapéuticos para el tratamiento contra el cáncer,¹²³ proteínas miméticas,¹²⁴ etc.

Un ejemplo interesante de este tipo de uniones quimiosselectivas vía oxima, es la empleada por Dumy y colaboradores¹²⁵ en la preparación de conjugados glicopéptidos-oligonucleótidos. Estos autores emplean una plataforma ciclopeptídica “RAFT” (regioselectively addressable functionalized templates) para el anclaje de varios carbohidratos y un oligonucleótido (Figura 72). Las múltiples copias del carbohidrato fueron unidas a una de las caras de la plataforma, mientras que la otra cara fue empleada para el anclaje del oligonucleótido. Tanto los residuos de lactosa como el oligonucleótido fueron conjugados a la plataforma peptídica mediante la formación secuencial de enlaces tipo oxima. Los autores seleccionaron este tipo de conjugación porque suele ser muy eficiente, compatible con el empleo de fragmentos desprotegidos y puede llevarse a cabo en ausencia de reactivos de acoplamiento con una mínima manipulación química.

¹²⁰ (a) Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Deriaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1149-1159. (b) Renaudet, O.; BenMohamed, L.; Dasgupta, G.; Bettahi, I.; Dumy, P. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 737-741. (d) Cremer, G.A.; Bureaud, N.; Lelièvre, D.; Piller, V.; Piller, F.; Delmas, A. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 6353-6360. (e) Cremer, G.A.; Bureaud, N.; Piller, V.; Kunz, H.; Piller, F.; Delmas, A.F. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965-968.

¹²¹ (a) Zhou, X.; Zhou, J. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1451-1458. (b) Falsey, J.R.; Renil, R.; Park, S.; Li, S.; Lam, K.S. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 346-353 (c) Liu, Y.; Chai, W.; Childs, R.A.; Feizi, T. *Methods Enzymol.* **2006**, *415*, 326-340.

¹²² Renaudet, O.; Dumy, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *32*, 5383-5586.

¹²³ (a) Garanger, E.; Boturyn, D.; Jin, Z.; Dumy, P.; Favrot, M.C.; Coll, J.L. *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 1168-1175 (b) Foillard, S.; Jin, Z.; Garanger, E.; Boturyn, D.; Favrot, M.C.; Coll, J.L.; Dumy, P. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2326-2332.

¹²⁴ (a) Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2699-2702 (b) Sénèque, O.; Crouzy, S.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Ferrand, M.; Delangle, P. *Chem. Commun.* **2004**, *7*, 769-770.

¹²⁵ Singh, Y.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359-1362.

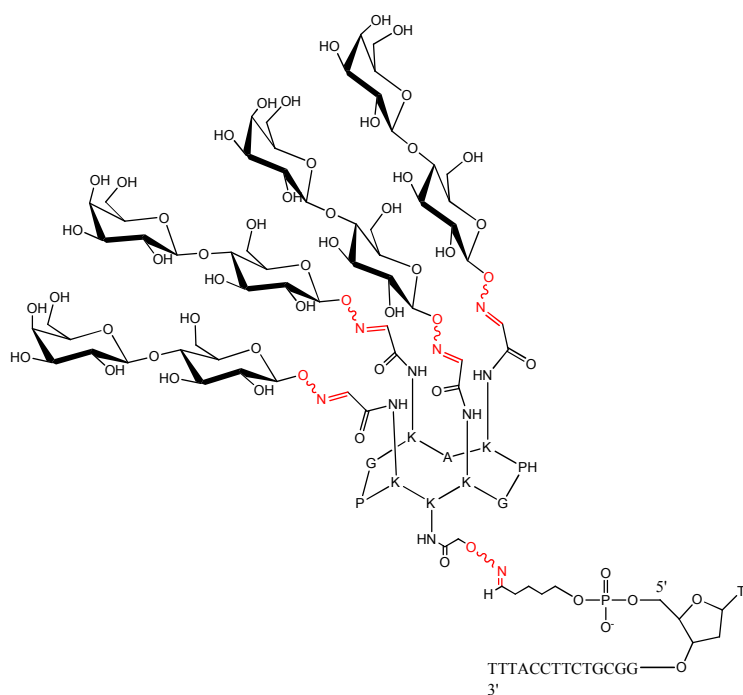


Figura 72. Conjugados de lactosa y oligonucleótido vía oxima empleando como plataforma un RAFT.

Otro grupo de reacciones que se emplean en la unión quimioselectiva es la adición de grupos tiol a una amplia variedad de electrófilos, como son grupos haloacetilo, maleimidas, disulfuros, sulfamidatos y ésteres α,β -insaturados, dando lugar a una amplia gama de productos (Figura 73).

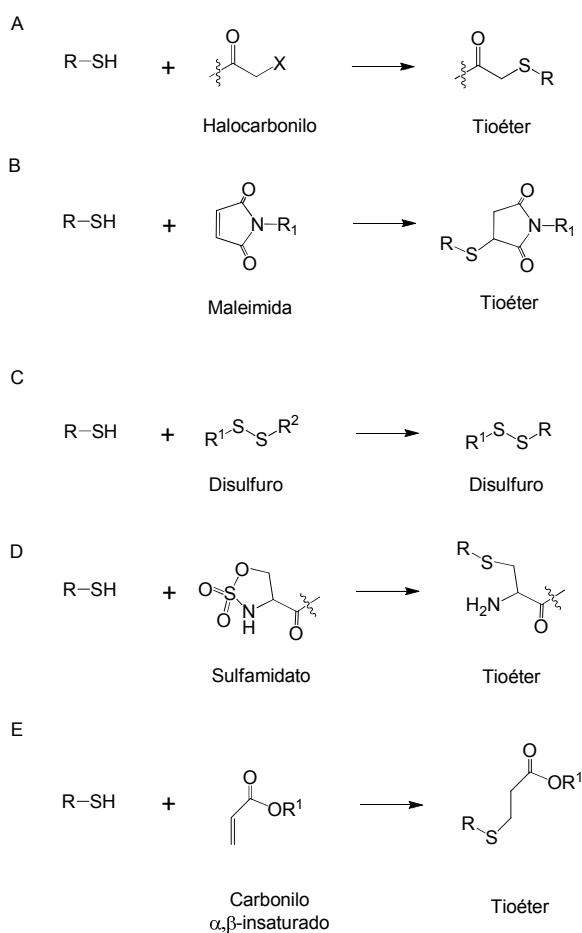


Figura 73. Diferentes reacciones quimiosselectivas en las que se encuentran implicados grupos tiol.

Este tipo de reacciones se pueden llevar a cabo en agua, en condiciones de pH cercanas a la neutralidad. Los tioles son excelentes grupos nucleófilos y presentan una excelente selectividad con numerosos electrófilos. Sin embargo, existen muchos grupos tiol presentes en medios biológicos que pueden interferir fácilmente en este tipo de unión quimiosselectiva (por ejemplo los presentes en la cisteína y el glutatión). De este modo, la formación de enlaces tioéter o disulfuro no es completamente bioortogonal y generalmente puede ser usada cuando no compiten otros grupos tiol presentes en medios biológicos. Otro inconveniente del uso de tioles reside en la gran tendencia de éstos a oxidarse dando lugar a homodímeros unidos mediante enlaces disulfuro. No obstante, los grupos tiol son empleados en numerosas reacciones de unión

quimioselectiva, como la preparación de microarrays,¹²⁶ vacunas,¹²⁷ agentes inhibidores en la infección del VIH,¹²⁸ etc.

Una de las reacciones de este tipo más empleada en la literatura es la adición de tioles a grupos maleimida. La maleimida es una imida insaturada de gran importancia en síntesis orgánica. Posee dos grupos carbonilo conjugados con un doble enlace, que le hace ser un doble enlace pobre en electrones susceptible de reaccionar con una amplia gama de nucleófilos. La maleimida también incluye una clase de derivados de la maleimida donde el protón del grupo NH es sustituido por grupos alquilo o arilo. El sustituyente puede ser también un polímero como el polietilenglicol (Figura 74).

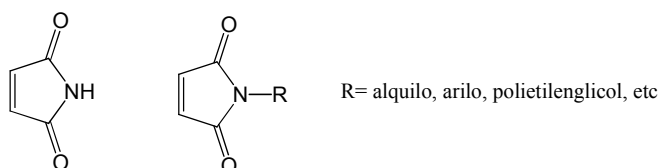


Figura 74. Derivados tipo maleimida.

La bioconjugación vía maleimida es una estrategia bastante común la cual implica la adición de Michael del tiolato de una biomolécula al doble enlace de una maleimida formando un succinamidil tioéter (Figura 75).

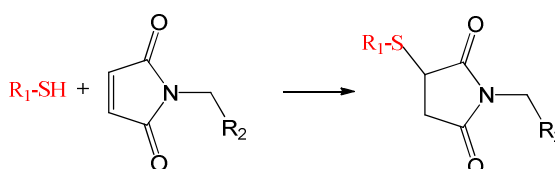


Figura 75. Adición tipo Michael de un tiolato a un derivado de maleimida.

¹²⁶ (a) Smith, E.A.; Thomas, W.D.; Kiessling, L. L.; Corn, R.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140-6148. (b) Park, S.; Shin, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3180-3182. (c) Köhn, M.; Benito, J.M.; Ortiz, M.C.; Lindhorst, T.K.; García-Fernández J.M. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 771-777.

¹²⁷ Wright, K.; Guerreiro, C.; Laurent, I.; Baleux, F.; Mulard, L.A. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1518-1527.

¹²⁸ (a) Ni, J.; Singh, S.; Wang, L.X. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 232-238. (b) Shin, I.; Jung, H.J.; Lee, M.R. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1325-1328.

Un ejemplo interesante de este tipo de acoplamiento fue el descrito por Wang y colaboradores.¹²⁹ Estos autores describen la síntesis de un cluster de maleimidas centrado en un núcleo de glucosa o galactosa y su aplicación como un nuevo tipo de TASP (Template assembled multivalent peptides). El cluster de maleimidas permitió acceder de una forma rápida y muy eficiente a un sistema polipeptídico a través de la adición de los grupos tiol de las cadenas laterales de las cisteínas presentes en los péptidos a las maleimidas del cluster empleando condiciones suaves de pH y temperatura (Figura 76).

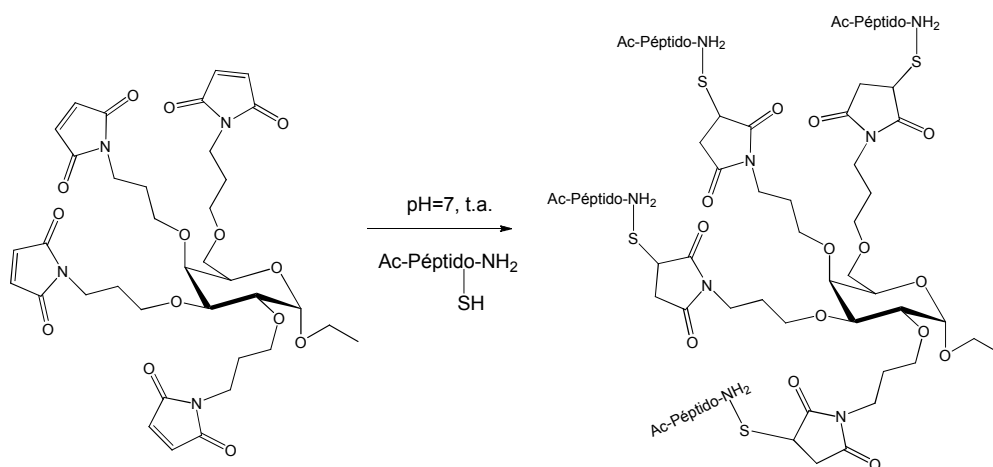


Figura 76. Formación de TAPs a través de la adición de tioles a maleimidas.

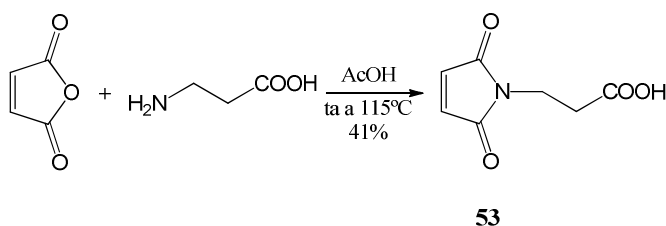
Entre todas las reacciones quimioselectivas que se han descrito, nosotros hemos seleccionado esta última, la adición de tioles a maleimidas. La razón fundamental ha sido la existencia de numerosos precedentes bibliográficos y sobre todo, la accesibilidad del grupo tiol en las biomoléculas y la fácil introducción de un grupo maleimida en nuestro glicodendrón.

5.2. Síntesis de glicoconjugados a través de derivados de maleimida.

Para llevar a cabo el acoplamiento de diferentes moléculas de interés biológico, como péptidos u oligonucleótidos, a los glicodendrones preparados con anterioridad a

¹²⁹ Wang, L.X.; Ni, J.; Singh, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 159-166.

través de una reacción quimioselectiva de tiol a maleimida habría que funcionalizar dichos glicodendrones del tal modo que contuviesen en su estructura un derivado tipo maleimida. El derivado de maleimida seleccionado debería presentar en su estructura una funcionalización tal que nos permitiese el anclaje al amino terminal del glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂. Así, se planteó la síntesis de un derivado que contuviese en su estructura un ácido carboxílico libre que mediante la formación de un enlace amida permitiera la unión de dicho derivado a nuestro dendrón. La maleimida y sus derivados se preparan a partir de anhídrido maléico por tratamiento con diferentes aminas seguido de deshidratación. En nuestro caso, la amina seleccionada fue la β-alanina, este aminoácido presenta en su estructura el grupo amino necesario para la formación de un derivado de maleimida y por otro lado un ácido carboxílico, el cual nos permitirá posteriormente el anclaje de dicho derivado a nuestro glicodendrón. Así, la síntesis del derivado de maleimida **53** se ha llevado a cabo en un único paso según el procedimiento descrito en la bibliografía¹³⁰ a partir del anhídrido maléico y β-alanina por tratamiento con ácido acético, obteniéndose dicha maleimida con un rendimiento moderado (Esquema 30).



Esquema 30. Síntesis del derivado de maleimida **53**.

La formación del derivado **53** pudo confirmarse claramente mediante la aparición en el espectro ¹H-RMN de dos tripletes pertenecientes a los grupos metileno a 2.68 y 3.81 ppm, así como la presencia de un singlete característico en este tipo de compuestos a 6.72 ppm correspondiente a los protones olefínicos.

¹³⁰ Mantovani, G.; Lecolley, F.; Tao, L.; Haddleton, D.M.; Clerx, J.; Cornelissen, J.J.L.M.; Velonia, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2966-2973.

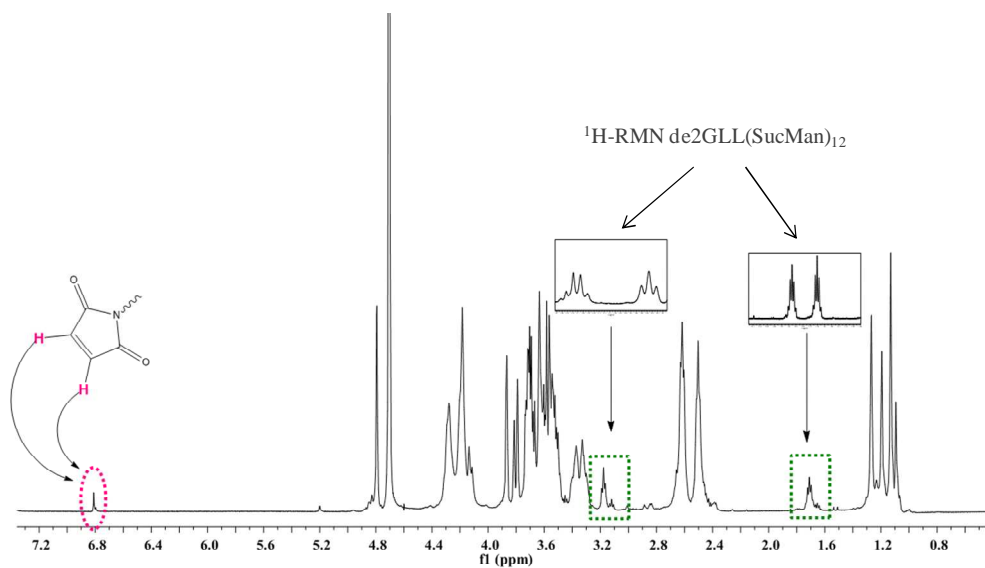


Figura 77. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ del glicodendrón **54** en D_2O y comparación con las regiones más significativas del espectro de $^1\text{H-RMN}$ del compuesto $2\text{GLL}(\text{SucMan})_{12}$.

Adicionalmente, se realizó el espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ para intentar detectar los carbonos olefínicos de la molécula. Cuando el espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ se hizo a temperatura ambiente, no se observó ninguna señal de carbono en la zona olefínica del mismo. Sin embargo, este mismo experimento a 40°C puso de manifiesto la existencia de una señal a 134.4 ppm cuyo desplazamiento es característico para este tipo de carbono olefínico (Figura 78).

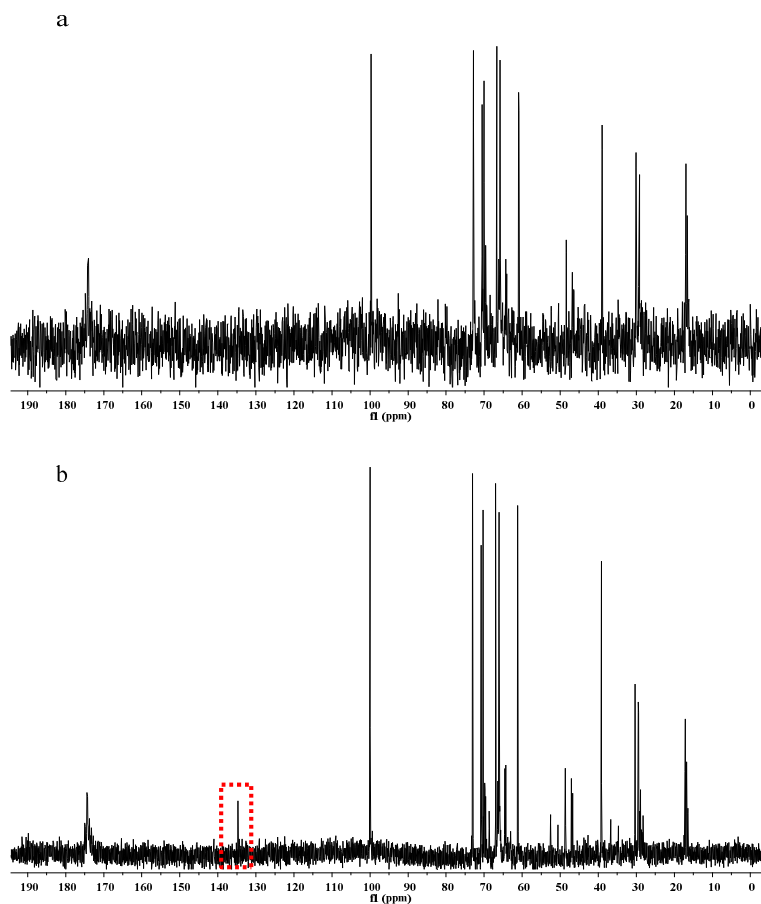


Figura 78. Espectros de ¹³C-RMN del glicodendrón 54 en D₂O. a) t.a b) 40°C

5.2.1. Acoplamiento del glicodendrón 54 a un péptido modelo.

Para poner a punto el acoplamiento con este tipo de glicodendrones que contienen maleimida en su estructura, se seleccionó un péptido modelo facilitado por el grupo del Prof. Antonio Bernad del CSIC en Madrid. Este péptido modelo contiene en su estructura una cisteína terminal que nos permitirá mediante el grupo tiol, el anclaje al glicodendrón de manosa 54 (Figura 79).

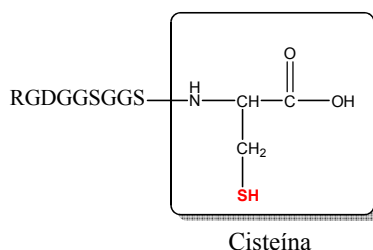


Figura 79. Estructura del péptido modelo.

Antes de proceder a la conjugación de dicho péptido modelo con el glicodendrón **54**, se decidió poner a punto la reacción de conjugación en un modelo más sencillo y asequible, como sería el derivado monovalente de manosa **56** (Figura 80). De esta forma, se estudiaría el proceso de conjugación y se optimizarían las condiciones de dicho proceso para luego aplicarlas al glicodendrón **54**.

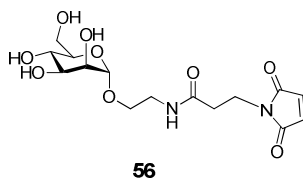
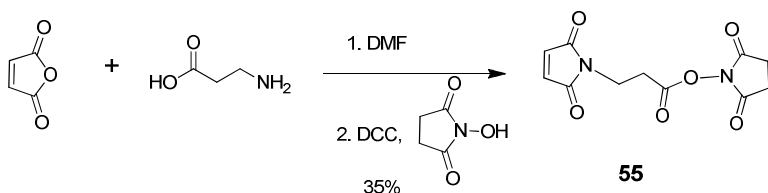


Figura 80. Modelo monovalente de manosa con maleimida **56**.

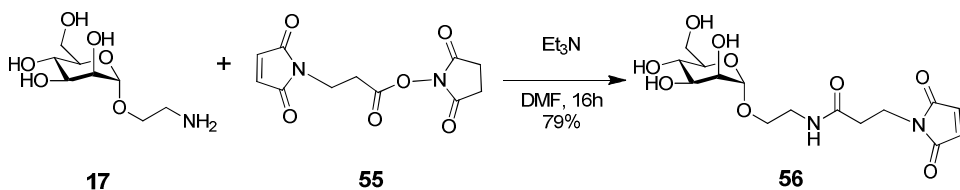
Para la síntesis del derivado de manosa **56**, se llevó a cabo el acoplamiento de la manosa **17** y el derivado de maleimida **53**. Para ello, se emplearon las condiciones clásicas de formación de enlaces amida, es decir, DIC y HOBt; sin embargo, el exceso de HOBt en el crudo de reacción no permitió la purificación de dicho producto. Dados los problemas de purificación encontrados, nos planteamos la síntesis de un nuevo derivado de maleimida que no implicara el empleo de dicho reactivo en su reacción posterior. Así, se realizó la síntesis del derivado de maleimida **55** activado como NHS a partir del anhídrido maléico y β -alanina empleando NHS y DCC como agentes de acoplamiento (Esquema 32).¹³¹

¹³¹ Nielsen, O.; Buchardt, O. *Synthesis* **1991**, 819-821.



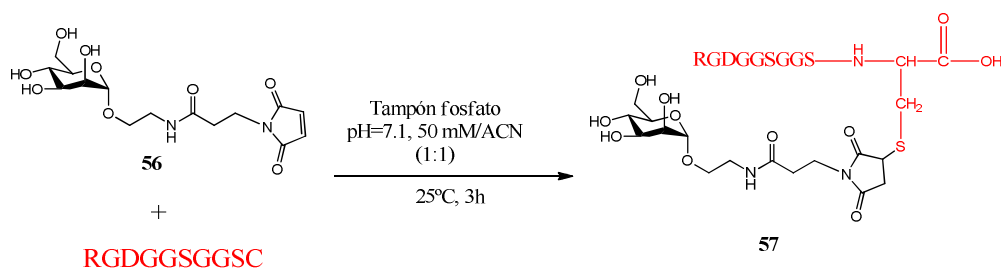
Esquema 32. Síntesis del derivado de maleimida activado como NHS **55**.

El derivado de manosa **17** se hizo reaccionar con la maleimida activada **55** empleando DMF y trietilamina dando lugar al compuesto **56** (Esquema 33). La formación del producto se confirmó mediante el análisis del espectro de ^{13}C -RMN en el cual se pudo observar la aparición de una señal correspondiente a un nuevo carbono carboxílico a 173.2 ppm debido a la formación del enlace amida.



Esquema 33. Síntesis del compuesto **56**.

Una vez sintetizado el modelo monovalente de manosa **56**, se realizó una prueba a pequeña escala para demostrar el acoplamiento de dicho sistema monovalente con el péptido modelo seleccionado (RGDGGSGGSG) para optimizar las condiciones del mismo. Para llevar a cabo dicho acoplamiento, se empleó una disolución 1:1 de tampón fosfato 50 mM a pH 7.1 y acetonitrilo usando cantidades equimoleculares del derivado de maleimida **56** y del péptido modelo (Esquema 34).



Esquema 34. Síntesis del compuesto **57**.

Transcurridas 3 horas, el crudo de reacción fue analizado mediante espectrometría de masas ESI en modo negativo. En el espectro se pudo observar las señales correspondientes únicamente al producto **57**, no detectándose el péptido de partida (Figura 81).

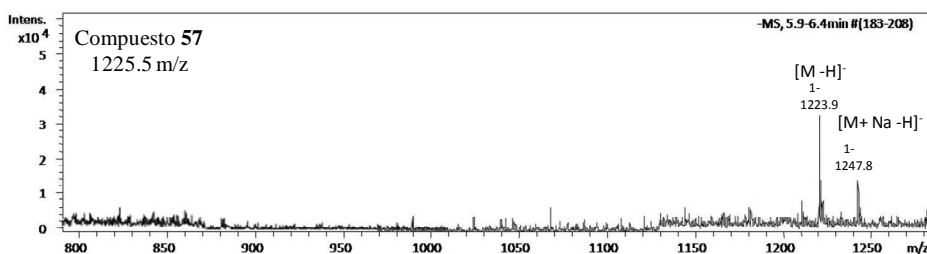
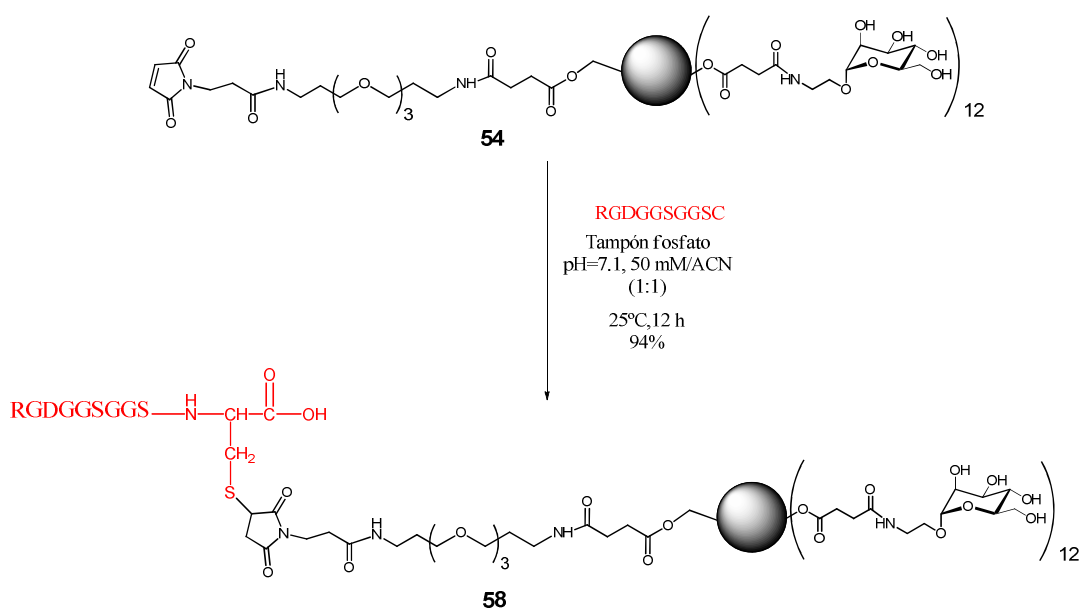


Figura 81. Espectro de masas ESI del glicoconjugado **57**.

Una vez demostrado que el acoplamiento vía maleimida del péptido modelo al sistema monovalente de manosa **56** era efectivo, se llevó a cabo el acoplamiento del mismo péptido con el sistema multivalente de manosa **54**. Para realizar dicho acoplamiento se emplearon las mismas condiciones de reacción pero se aumentó la cantidad de péptido (2 equivalentes), así como el tiempo de reacción. La razón de este aumento era intentar que en la reacción no quedase glicodendrón de partida sin conjugar con el péptido lo que facilitaría la purificación posterior mediante cromatografía por exclusión de tamaños (Esquema 35).



Esquema 35. Síntesis del glicoconjugado **58**.

El producto obtenido empleando las condiciones de acoplamiento anteriormente comentadas y purificado usando sephadex LH20 en MeOH y caracterizado tanto por RMN como por espectrometría de masas. En el espectro de ^1H -RMN del producto se pudo observar la desaparición de la señal correspondiente a los protones olefinicos de la maleimida, lo que es un claro indicativo de la formación del producto. Además, en la zona de 3.5 a 4 ppm también se pudo observar cambios debido al gran número de metilenos pertenecientes al péptido modelo.

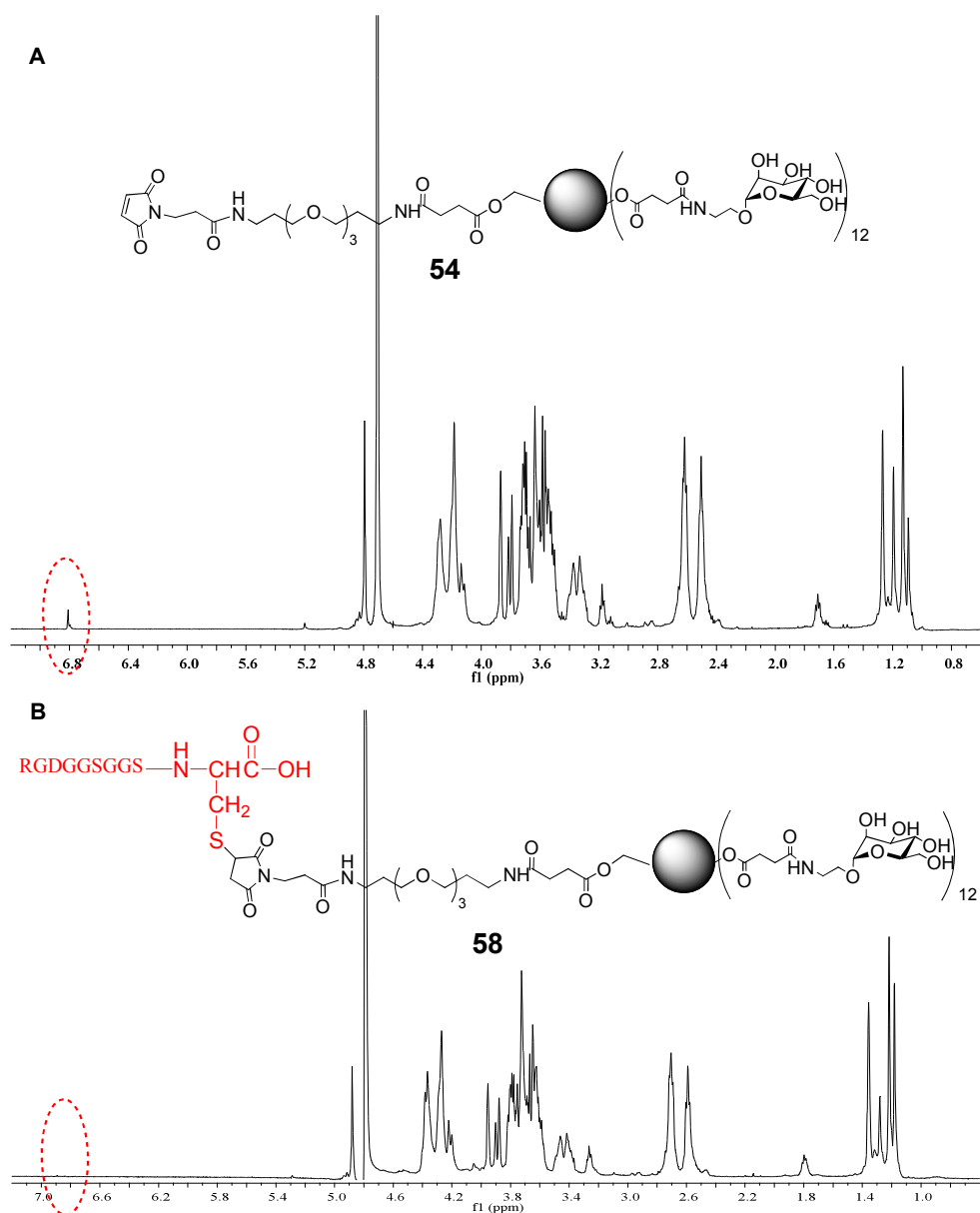


Figura 82. Espectros de ^1H -RMN en D_2O de A) glicoconjugado **54** y B) glicoconjugado **58**.

Adicionalmente, se realizó el espectro de masas del compuesto, utilizando la técnica MALDI-ToF. Este tipo de compuestos conjugan en única estructura, características de péptidos, de polímeros, y de azúcares lo que implica una gran dificultad para encontrar las condiciones adecuadas para ser detectadas por espectrometrías de masas. Después de varios ensayos, se pudo detectar el pico

correspondiente el ión molecular (Figura 83). Este espectro de masas se logró disolviendo el glicodendrón en una mezcla cloroformo/metanol 3:1 con una disolución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico disuelto en cloroformo/metanol 3:1.

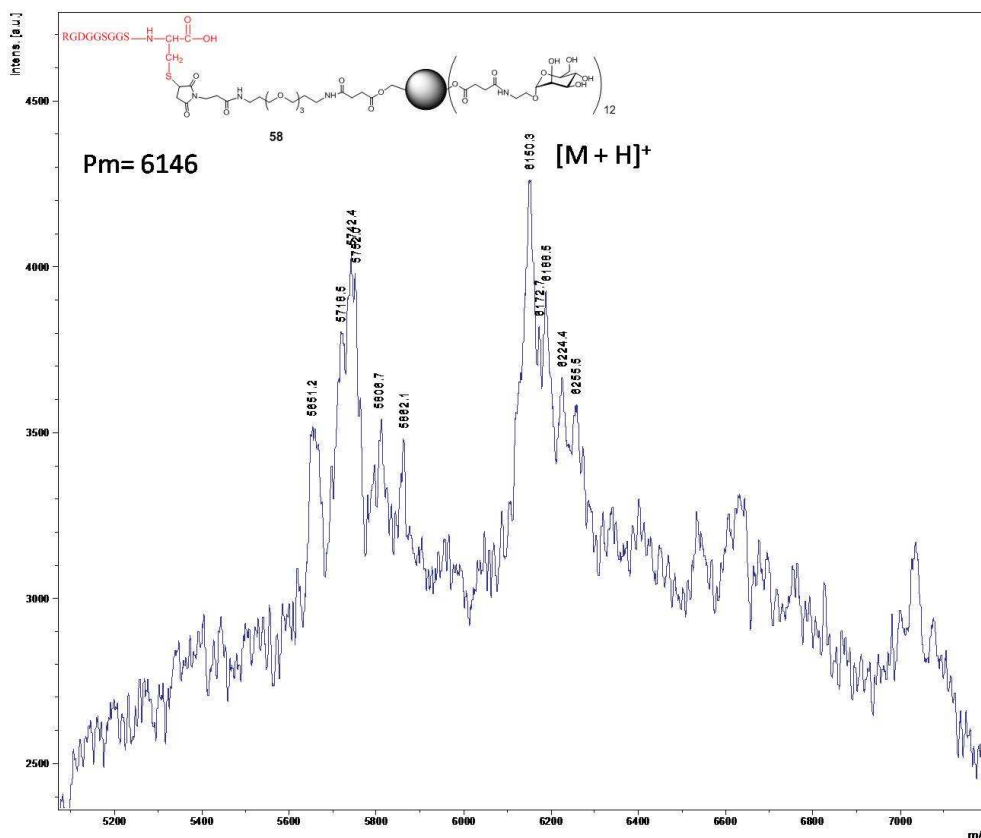


Figura 83. Espectro de masas MALDI-ToF del glicodendrón de segunda generación 58.

5.2.2. Acoplamiento de glicodendrón 54 a un oligonucleótido modelo.

Siguiendo la misma estrategia que en el caso del acoplamiento de péptidos, se seleccionó un oligonucleótido modelo. El oligonucleótido seleccionado consistía en una secuencia modificada en su extremo 5' por un grupo tiol (Figura 84) y que fue adquirido en la compañía STAB vida.

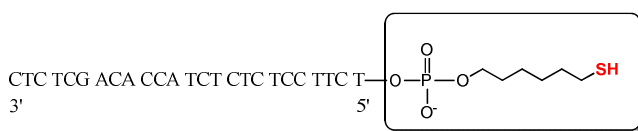


Figura 84. Estructura del oligonucleótido modelo.

Dado que el modo de purificación que se iba a emplear en este tipo de glicoconjugados era la cromatografía HPLC en fase reversa, el primer paso fue seleccionar unas condiciones óptimas en la cuales se pudiera observar el oligonucleótido modelo con un tiempo de retención tal que nos permitiera el seguimiento y purificación de las reacciones de acoplamiento con los glicodendrones seleccionados. Para ello se empleó una columna C18 semi-preparativa y como fase móvil una mezcla de tampón acetato de trietilamonio 0.1 mM a pH 6.8 y acetonitrilo. De este modo se obtuvo el cromatograma que se muestra en la Figura 85.

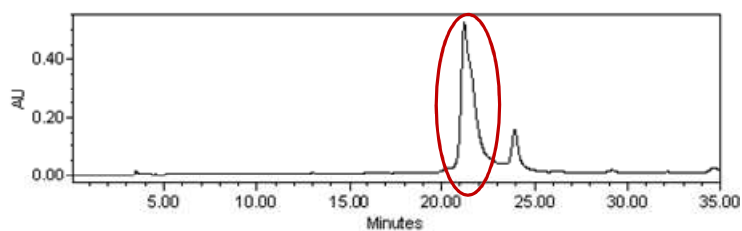


Figura 85. Cromatograma del oligonucleótido modelo.

Los dos picos del cromatograma fueron recogidos separadamente y se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-ToF. Mediante esta técnica se pudo ratificar que el primer pico del cromatograma ($t_r=21.41$ min) era el oligonucleótido modelo seleccionado (Figura 86), mientras que el pico minoritario ($t_r=23.92$ min) correspondía al dímero del oligonucleótido formado por la oxidación del grupo tiol que da lugar al disulfuro correspondiente (Oligonucleótido-S-S-Oligonucleótido).

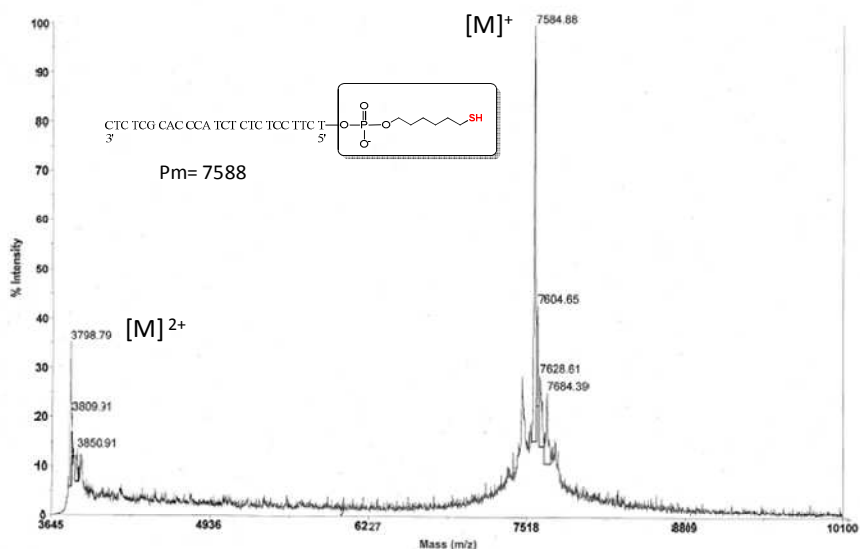
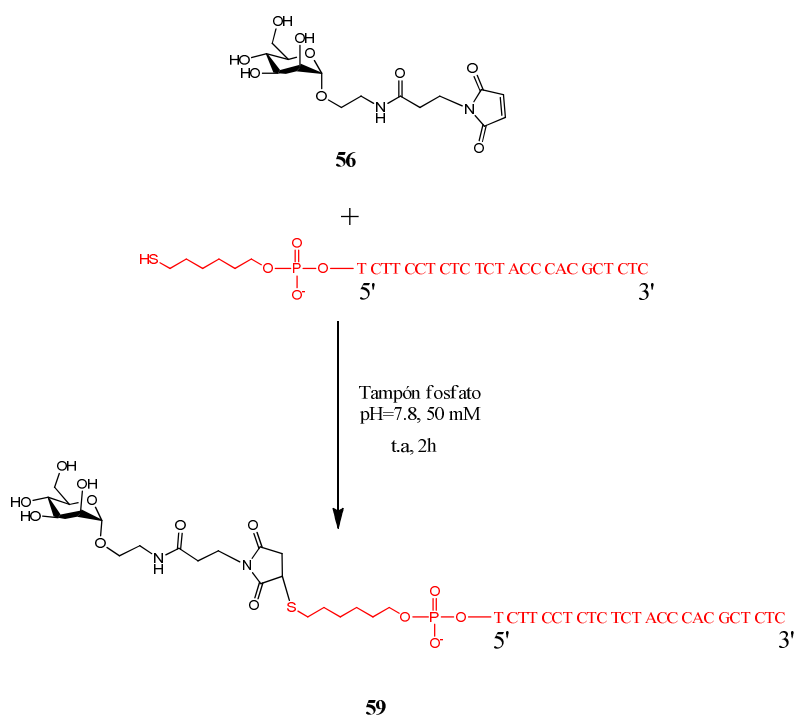


Figura 86. Espectro de masas MALDI-ToF del oligonucleótido modelo.

Una vez establecidas las condiciones de detección del oligonucleótido, se llevó a cabo el acoplamiento entre el oligonucleótido modelo y el sistema monovalente de manosa **56** para optimizar las condiciones de conjugación igual que se hizo con la conjugación de péptidos (Esquema 36). Para llevar a cabo el acoplamiento de ambas moléculas se seleccionaron como condiciones de acoplamiento un tampón fosfato 50 mM a pH 7.8, y un exceso de 5 equivalentes del derivado de manosa **56**.



Esquema 36. Síntesis del conjugado **59**.

El análisis mediante HPLC del crudo de reacción a las 2 horas mostró tres señales tal y como muestra el cromatograma que se recoge en la Figura 87.

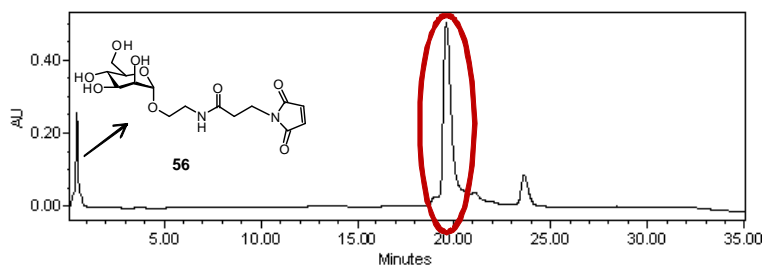


Figura 87. Cromatograma de la conjugación del derivado **56** con el oligonucleótido modelo.

El primer pico ($t_r=0.55$ min) correspondía al sistema monovalente de manosa **56**. El pico con un tiempo de retención mayor ($t_r=24.89$ min) pertenecía al dímero del oligonucleótido modelo. El cromatograma también presentaba un pico mayoritario con un tiempo de retención levemente adelantado ($t_r=19.98$ min) con respecto al

oligonucleótido modelo de partida ($t_r=21.41$ min). Este producto mayoritario se aisló y se analizó mediante espectrometría de masas MALDI-ToF. El análisis de dicho espectro mostró que el producto aislado correspondía al conjugado **59** (Figura 88).

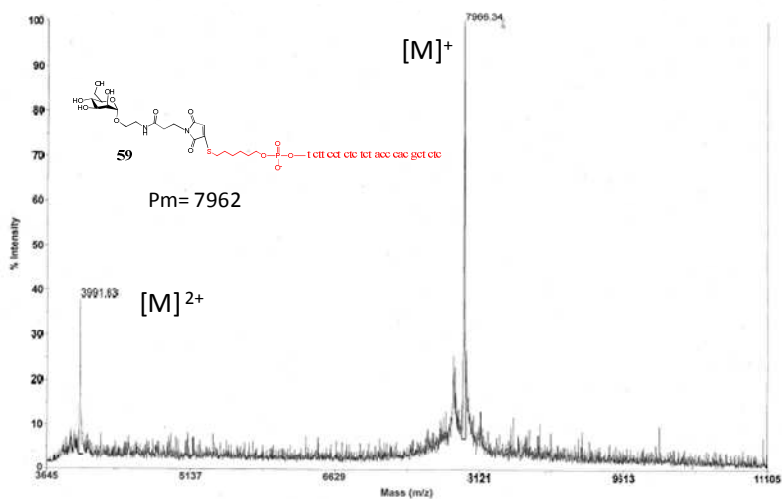
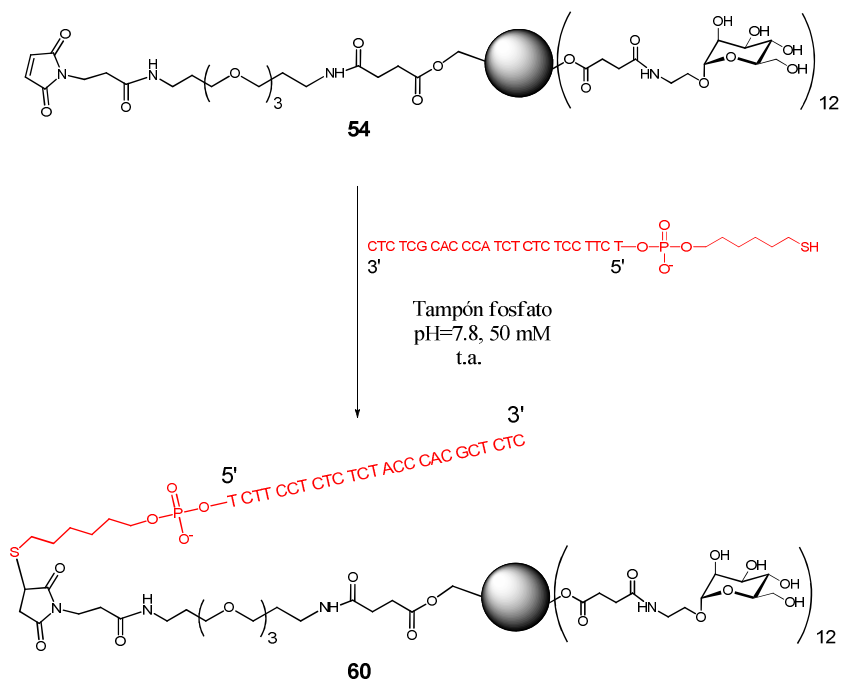


Figura 88. Espectro de masas MALDI-ToF del conjugado **59**.

Una vez corroborado que el acoplamiento del derivado de manosa monovalente **56** y el oligonucleótido modelo era efectiva, nos dispusimos a realizar el acoplamiento de éste con el glicodendrón de manosa **54** (Esquema 37), empleando las mismas condiciones que en el caso del sistema monovalente.



Esquema 37. Síntesis del glicoconjugado **60**.

Transcurridas 2 horas del comienzo de la reacción el crudo se analizó mediante HPLC empleando las mismas condiciones de purificación que en el caso del oligonucleótido modelo. Así, en la Figura 89A se muestra el cromatograma de dicha reacción en la que se observa una señal ancha de gran intensidad ($t_r=21.20$ min) que al ampliarla permite apreciar la presencia de dos picos diferentes. A las 4 horas la reacción se volvió a analizar el crudo de reacción obteniendo el cromatograma de la Figura 89B. En este nuevo cromatograma se puede ver el mismo tipo de señal que en el caso anterior y al ampliarla observamos de nuevo la existencia de 2 señales diferentes en las que se observa que el segundo pico (oligonucleótido modelo) ha disminuido en intensidad. El análisis de la reacción con tiempo de reacción más prolongado no mostró un avance significativo en la reacción, observándose cromatogramas similares al mostrado en la Figura 89B. Posteriormente se hicieron barridos con diferentes eluyentes, proporciones de los mismos y tiempos para intentar encontrar unas condiciones en las que se pudieran separar ambos picos. Sin embargo, en ningún caso se pudo mejorar la resolución conseguida.

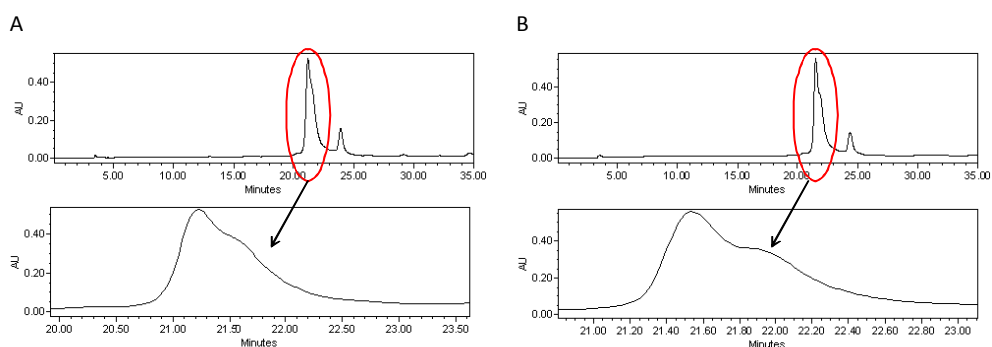


Figura 89. Cromatogramas de la conjugación del glicodendrón **54** con el oligonucleótido modelo: A) a las 2h de reacción, B) a las 4h de reacción.

Con el objetivo de poder aislar dicho pico que podría corresponder al producto de la conjugación, se pensó en la utilización de electroforesis en gel con una matriz de poliacrilamida (PAGE). La electroforesis es un método analítico-semipreparativo en el que se separan biomoléculas dependiendo de factores como su carga, masa y estructura tridimensional, bajo la acción de un campo eléctrico. La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Además, forma geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Otra ventaja es que variando la concentración de los polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro mediante cambios en la reticulación.

Una vez preparado el gel (los detalles experimentales se recogen en el capítulo 7), se cargaron diferentes muestras tal y como se muestra en la Figura 90. En el pocillo 1 se introdujo el oligonucleótido modelo comercial y en él se pudieron detectar dos bandas, una primera muy intensa correspondiente al oligonucleótido modelo y otra de muy pequeña intensidad que correspondería al dímero del oligonucleótido. En el segundo pocillo se cargó el glicoconjugado **59** observándose una única banda ligeramente retrasada al oligonucleótido modelo. En los pocillos 3 y 4 se cargó la mezcla de productos aislados mediante HPLC de la reacción a las 2 y 4 horas,

respectivamente. En ellos se observó la presencia de dos bandas de similar intensidad una correspondiente al oligonucleótido modelo de partida y otra que coincide en desplazamiento con la banda que correspondería al dímero del oligonucleótido en el pocillo 1. Sin embargo, esta última banda no debería ser el dímero del oligonucleótido ya que el pico aislado mediante HPLC no lo contenía, lo que nos podría conducir a pensar que se debe a la formación del glicoconjugado **60**, a no ser que se pudiera dar la dimerización del oligonucleótido en las condiciones de la electroforesis.

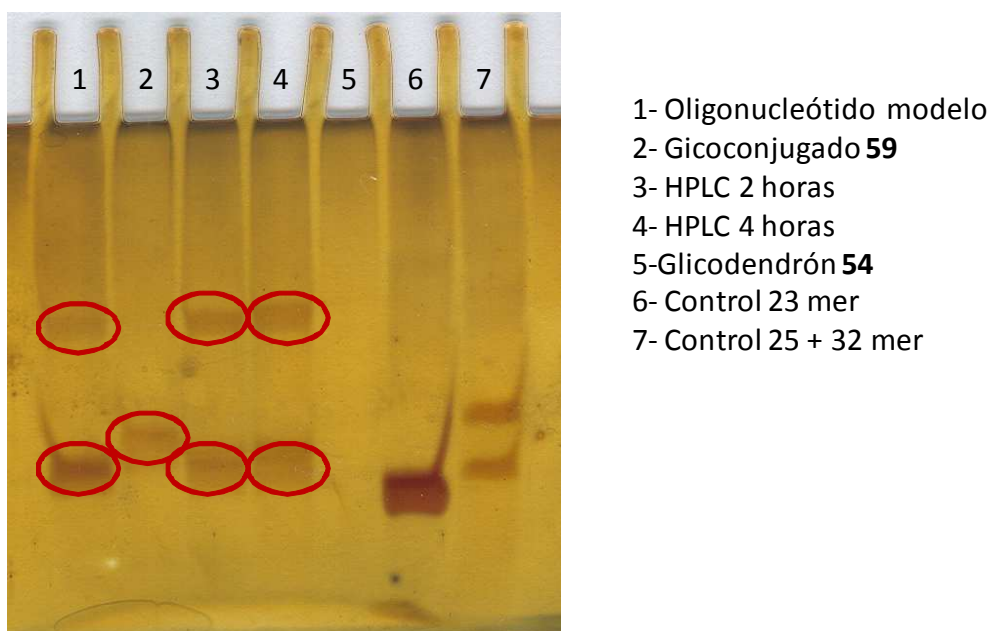


Figura 90. Gel de poliacrilamida con tinción de plata.

Para confirmar si efectivamente se trataba del glicoconjugado deseado **60** o del dímero del oligonucleótido, las mezclas presentes en los pocillos 1, 3 y 4 se trataron con un agente reductor de puentes disulfuro como es el 1,4-ditiotriol (DTT). Tras su tratamiento con el agente reductor, se volvieron a cargar en un gel de poliacrilamida (Figura 91). El tratamiento con dicho agente no logró la reducción del disulfuro del oligonucleótido por lo que no se pudo confirmar si las bandas se debían a la formación del glicoconjugado deseado.

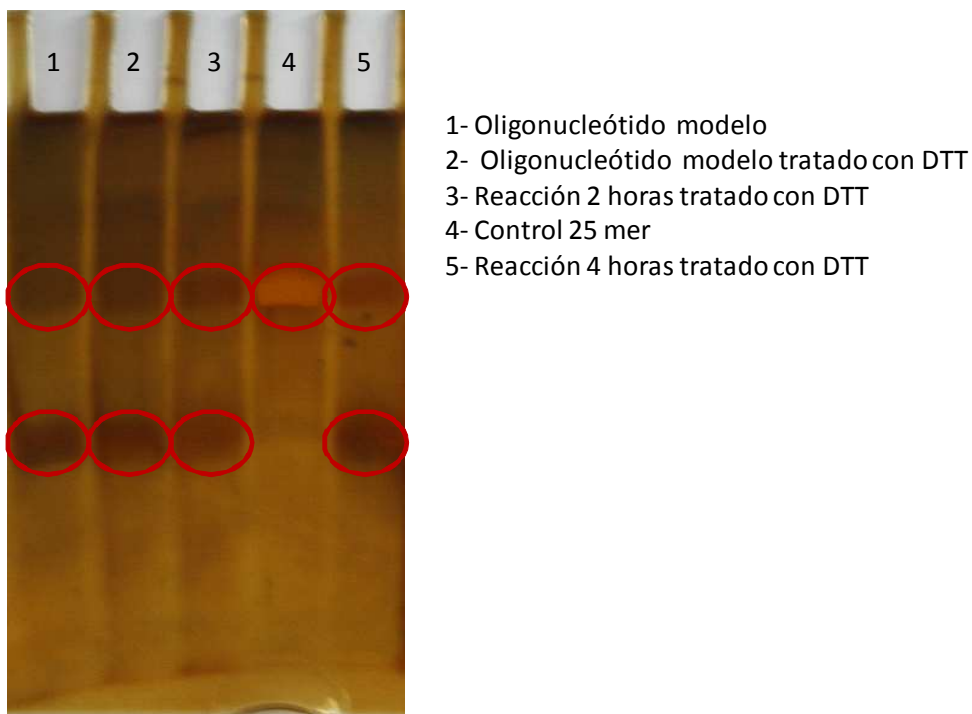



Figura 91. Gel de poliacrilamida con tinción de plata.

A la vista de los todos estos resultados podemos decir que a través de una reacción quimioselectiva de un grupo tiol a maleimida se ha optimizado el acoplamiento del péptido modelo al sistema monovalente de manosa **56** así como al glicodendrón de manosa de segunda generación **54**. Empleando este mismo tipo de reacción quimioselectiva se ha optimizado la funcionalización del sistema monovalente de manosa **56** con un oligonucleótido modelo y sin embargo, no ha sido posible la optimización de la funcionalización del sistema multivalente de manosa debido a que no se ha logrado encontrar unas condiciones en las que la reacción transcurra de forma cuantitativa perdiendo la purificación del glicoconjugado.

Capítulo 6

Conclusiones



6. Conclusiones.

1. Se ha puesto a punto la síntesis de dendrones de hasta 3ª generación, basados en bis-MPA con la posición focal bloqueada, de forma monodispersa. A partir de éste se han preparado el glicodendrón de manosa polidisperso así como el correspondiente control de etanolamina. Mediante el uso de biosensores con detección por SPR se ha evaluado la inhibición de la interacción de la proteína gp120 del VIH con DC-SIGN en comparación con su dendrímero homólogo BH30sucMan. Los resultados obtenidos han demostrado que la ausencia de un brazo en estos sistemas no tiene un efecto significativo en la inhibición de la interacción de DC-SIGN/gp120. Una vez sintetizado el dendrón se ha comprobado que no es posible la funcionalización posterior de la posición focal.
2. Se ha optimizado la síntesis de glicodendrones de manosa de primera y segunda generación de manera monodispersa basados en bis-MPA que contienen un espaciador en su posición focal. Mediante el uso de biosensores con detección de SPR se ha evaluado la inhibición de la interacción de la glicoproteína BSA-Man y el receptor DC-SIGN. Estos estudios han demostrado que el

compuesto 2GLL(SucMan)₁₂ es capaz de inhibir la interacción del receptor DC-SIGN y la glicoproteína BSA-Man.

3. Con objeto de llevar a cabo estudios de internalización en células dendríticas se ha marcado fluorescentemente el glicodendrón de manosa de segunda generación 2GLL(SucMan)₁₂. Además, se ha preparado un glicodendrón de galactosa marcado fluorescentemente 2GLLBodipy(SucGal)₁₂ para ser empleado como control negativo en dichos estudios. Se han realizado estudios de binding/internalización con citometría de flujo así como experimentos de secreción de citoquinas IL-10 mediante ELISA en células dendríticas demostrando que el proceso de internalización es dependiente del carbohidrato y por tanto del receptor DC-SIGN de forma selectiva.
4. El glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂ se ha funcionalizado con un derivado tipo maleimida para llevar a cabo sobre él reacciones de adicción quimioselectivas de grupos tiol a maleimida. Además, se ha preparado el sistema monovalente de manosa **56** para optimizar las condiciones de reacción.
5. Se ha optimizado el acoplamiento de un péptido modelo (RGDGGSGGSC) al sistema monovalente de manosa **56** y al glicodendrón de manosa de segunda generación **54** a través de una reacción quimioselectiva del grupo tiol del péptido modelo al grupo maleimida.
6. Se ha optimizado el acoplamiento de un oligonucleótido modelo modificado en su extremo 5' por un grupo tiol al sistema monovalente de manosa **56** a través de una reacción quimioselectiva del grupo tiol de péptido modelo al grupo maleimida. La aplicación de esta metodología de conjugación del oligonucleótido al sistema multivalente de manosa **54** no ha dado lugar por el momento a resultados concluyentes que nos permitan asegurar que dicha conjugación ha tenido lugar.

En resumen podemos decir que se ha podido preparar un glicodendrón conjugado a un péptido que es el objetivo sintético fundamental de este trabajo. Los estudios de internalización e interacción con DC-SIGN demuestran que este tipo de glicoconjugados pueden ser una herramienta muy interesante. En un futuro se utilizara un péptido inmunogénico relevante relacionado con algún tipo de patología para estudiar el efecto de estos compuestos en la modulación de la respuesta inmune y ser potencial aplicación en el desarrollo de vacunas.

Capítulo 7

Parte experimental

7. Parte experimental.

7.1. Disolventes y reactivos.

Todos los disolventes orgánicos anhidros se secaron siguiendo procedimientos descritos.¹³² A continuación se exponen algunos de los protocolos más empleados: THF y éter etílico se destilaron sobre Na/Benzofenona bajo atmósfera de nitrógeno inmediatamente antes de su utilización. Acetonitrilo y diclorometano se destilaron sobre CaH₂ bajo atmósfera de nitrógeno inmediatamente antes de su utilización. Metanol, Piridina, Et₃N y DMF se secaron sobre tamiz molecular de 4 Å y se almacenaron bajo atmósfera de argón. El agua utilizada era de pureza miliQ (18.3 Ω). Todos los reactivos utilizados fueron de alta pureza y se adquirieron a distintas casas comerciales (Aldrich, Fluka, Lancaster, Panreac, Acros, etc.) y fueron utilizados sin ningún tratamiento a no ser que se indique lo contrario.

¹³² Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of laboratory chemicals* **1996**, Editorial Butterworth-Heinemann, Oxford.

7.2. Técnicas y Aparatos.

El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina (ccf) empleando cromatofolios de aluminio de gel de sílice tipo 60 F254 (Merck). Para la detección de los productos se utilizó luz UV ($\lambda = 254$ nm), y/o los siguientes reveladores: H₂SO₄:EtOH (1:9, v:v), anisaldehído (450 mL etanol, 25 mL anisaldehído, 25 mL H₂SO₄ y 1 mL AcOH), verde de bromocresol (0.3 % de verde de bromocresol en Agua/Etanol 1:4, 2 mL de NaOH 30% por 100 mL de disolución), ninhidrina (0.25 g de ninhidrina en 100 mL de etanol) y permanganato (1.5 g KMnO₄, 10 g de K₂CO₃, 1.25 ml de NaOH al 10% en 200 ml de H₂O). La cromatografía en columna se realizó sobre gel de sílice Merck tipo 60, de diversos tamaños de partícula (0.5-0.2 mm, 0.2-0.063 mm, 0.040-0.015 mm). La composición del eluyente empleado se detalla en cada caso.

Se han empleado cromatografía en capa fina preparativa para optimizar la purificación de productos en pequeñas cantidades, usando cromatoplasmas con soporte de vidrio Silicagel 60 F254 (20 x 20 cm) de Merck.

La cromatografía de permeación sobre gel se llevó a cabo utilizando gel Sephadex LH-20 de la empresa Pharmacia.

Los valores de rotación óptica se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 341. En cada caso se indica el disolvente y la concentración de la muestra sobre la que se realizó la medida.

Los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear se realizaron en los espectrómetros Bruker DRX-500, DRX-400 y DPX-300. Los espectros se realizaron en el disolvente deuterado que se indica y los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), usando como referencia la señal del tetrametilsilano (TMS, referencia interna) o la señal residual del disolvente empleado. Si no se indica lo contrario, los espectros se registraron a temperatura ambiente. Para la asignación de los compuestos más

complejos se han utilizado experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY) y protón-carbono (HMQC, HSQC) usando las secuencias de pulso estándar.

Los espectros de masas se realizaron en los espectrómetros Esquire 6000 Bruker-Daltonics (ESI), Bruker-Autoflex (ionización MALDI), Micromass Autospec (ionización MALDI), Bruker- Ultraflex (ionización MALDI), Micromass Autospec-Q (EMAR-FAB),

Los análisis elementales se llevaron a cabo con un aparato Leco CHNS-932 y los resultados se expresan en tanto por ciento en todos los casos.

Los puntos de fusión han sido determinados en un aparato MEL-TEMP® modelo 1002D y no están corregidos.

El oligonucleótido modelo y los conjugados de éste se analizaron usando HPLC, Waters 2690 Alliance Separations Module y Waters 996 Photodiode Array Detector. La columna usada en el HPLC fue Col NUCLEOSIL 120 C18 10.0 μm 250 x 8.0 mm. Las muestras fueron inyectadas y eluidas (3.0 mL min^{-1}) usando un gradiente desde el disolvente A (5 % de acetonitrilo, 95 % tampón de acetato de trietilamonio 0.1 mM a pH 6.8) hasta disolvente B (70 % acetonitrilo, 30 % tampón de acetato de trietilamonio 0.1 mM a pH 6.8). El gradiente se programó de este modo: 100% A hasta 70% A después de 28 minutos; 70% de A hasta 100% A en 2 minutos (seguido de 5 minutos en modo isocrático). Todos los disolventes fueron filtrados empleando filtros de nylon 0.2 μm de la casa comercial Waters y posteriormente se desgasificaron por sonicación durante 15 minutos antes de ser usados.

Preparación y revelado de geles de poliacrilamida:

Preparación del gel:

- 50 ml (40%) Acrilamida: 19 g de acrilamida, 1g de bisacrilamida

- 10 ml al 20% de gel desnaturizante: 5ml de acrilamida, 1ml de TBE 10x, 4.2 g de urea, 50 µl de APS, 5 µl de TEMED hasta 10 ml con agua.
- Tampón de carga (500 µl): 500 µl urea a saturación, 20 µl de EDTA 20 mM, 2.5 µl de TRIS 5mM a pH 7.5, 20 µl BPB/xc.

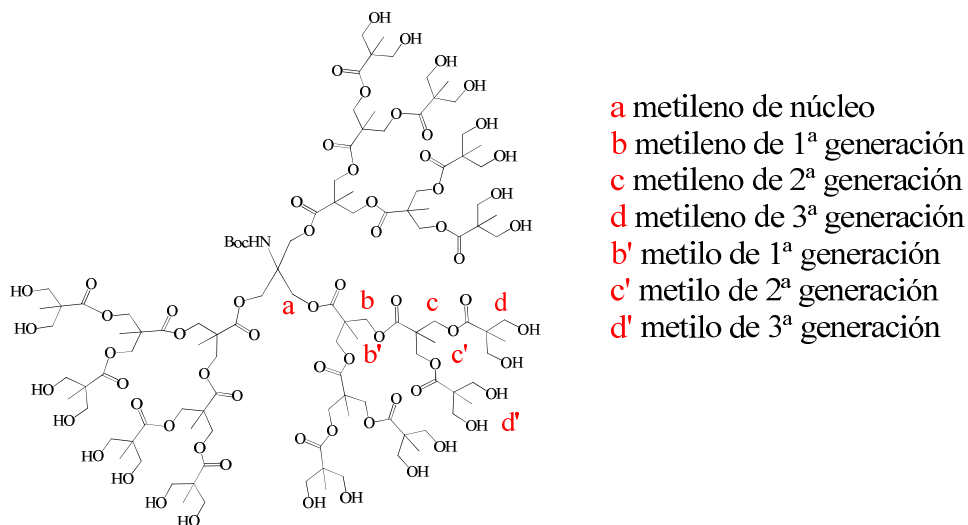
Revelado del gel (tinción de plata):

- Fijación: 10 min con AcOH 7.5% a t.a.
- Lavados: 3 lavados de 2 min en agua.
- Pretratamiento con formaldehído: 10 min sumergido en una disolución de 15 ml de formaldehído en 85 ml de agua.
- Impregnación: 20 min en una disolución de AgNO₃ (50 mg de AgNO₃ en 50 ml de agua).
- Lavado: 5 a 10 seg en agua.
- Revelado: sobre hielo (a partir de 3 min): 3 g de NaCO₃ en 100 ml de agua + 50 µl de una disolución de tiosulfato (100 mg de Na₂S₂O₃ en 25 ml de agua).
- Parada del revelado: sobre hielo, 10 min en AcOH 7.5%

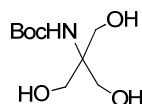
7.3. Caracterización.

7.3.1 Síntesis divergente de dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico empleando como núcleo TRIS.

Para facilitar la caracterización de los dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico empleando como núcleo TRIS se ha utilizado la nomenclatura que se muestra a continuación:



***N*-(*tert*-Butiloxycarbonil)tris(hidroximetil)aminometano (2).**^{93,94}



A una disolución de trishidroximetilaminometano (**1**) (0.50 g, 3.17 mmol) en DMF anhidra (20 ml), se le añade una disolución de Boc₂O (0.73 g, 3.33 mmol) en DMF anhidra (5 ml) y trietilamina (84 μl, 6.64 mmol). La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24h. El disolvente se concentra a vacío y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente CH₂Cl₂/MeOH (9:1) obteniéndose el compuesto **2** como un sólido blanco (0.59 g, 84%).

Pf: 146-147 °C.

⁹³ Seto, C.T.; Mathias, J.P.; Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1321-1329.

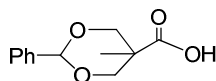
⁹⁴ Kang, J.H.; Chung, H.E.; Kim, S.Y.; Kim, Y.; Lee, J.; Lewin, N.E.; Pearce, L.V.; Blumberg, P. M.; Marquez, V.E. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2529-2539.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 5.66 (s, 1H, NH); 4.40 (m, 3H, CH₂OH); 3.40 (d, 6H, J=5.4Hz, CH₂NHBoc); 1.26 (s, 9H, CH₃Boc).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 156.8 (CO); 79.7 (C_{Boc}); 62.2 (CH₂-OH); 62.1 (C-CH₂OH); 30.08 (CH₃Boc).

Análisis elemental para C₉H₁₉NO₅; calculado: C, 48.86%; H, 8.66%; N, 6.33%; encontrado: C, 49.04%; H, 8.81%; N, 6.14%.

Ácido benciliden-2,2-bis(oximetil) propiónico (4).⁸⁹



Una mezcla del ácido 2,2-bis(hidroximetil) propanóico (**3**) (20 g, 149 mmol), benzaldehído dimetil acetal (34.04 g, 222 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico monohidratado (1.42 g, 7.4 mmol) en acetona (150 ml) se mantiene en agitación durante 4h a temperatura ambiente y posteriormente durante toda la noche a 4°C. El sólido formado se filtra lavando con acetona fría, obteniéndose el compuesto **4** como un sólido blanco cristalino (21 g, 64%).

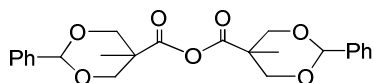
Pf: 193-195 °C; **Pf_{lit}**¹³³: 197-198 °C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.48 (m, 3H, Ar); 7.36 (m, 2H, Ar); 5.51 (s, 1H, CH-Ph); 4.65 (d, 2H, J= 11.4 Hz, CH₂-O); 3.72 (d, 2H, J= 11.4 Hz, CH₂-O); 1.13 (s, 3H, CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 178.7 (CO); 137.5 (C_{Ar}); 129.1 (CH_{Ar}); 128.3 (CH_{Ar}); 126.2 (CH_{Ar}); 101.9 (CH-Ar); 73.4 (CH₂-O); 42.2 (C-CH₂-O); 17.8 (CH₃).

⁸⁹ Ihre, H.; Padilla, O.L.; Fréchet, J.M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5908-5917.

¹³³ Trollsas, M.; Hedrick, J.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4644-4651.

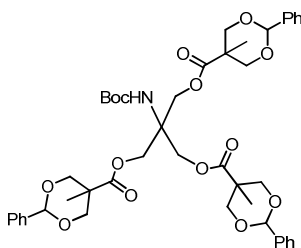
Anhídrido benciliden-2,2-bis(oximetil) propiónico (5).⁸⁹

El ácido **4** (20.0 g, 90 mmol) y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (10.2 g, 49.5 mmol) se disuelven en CH₂Cl₂ anhidro (150 ml). La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. El crudo de reacción se purifica por precipitación con hexano bajo fuerte agitación. Tras filtrar, se obtiene el anhídrido **5** como un sólido blanco (17.1 g, 89%).

Pf: 144-145 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.49 (m, 6H, Ar); 7.37 (m, 4H, Ar); 5.50 (s, 2H, CH-Ph); 4.68 (d, 4H, *J*= 11.4 Hz, CH₂-O); 3.70 (d, 4H, *J*= 11.4 Hz, CH₂-O); 1.14 (s, 6H, CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 169.2 (CO); 137.7 (C_{Ar}); 129.2 (CH_{Ar}); 128.3 (CH_{Ar}); 126.4 (CH_{Ar}); 102.1 (CH-Ar); 73.2 (CH₂-O); 44.2 (C-CH₂-O); 16.9 (CH₃).

Dendrón de primera generación protegido (6).

⁸⁹ Ihre, H.; Padilla, O.L.; Fréchet, J.M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5908-5917.

Capítulo 7

N-(*tert*-Butiloxicarbonil) tris(hidroxiometil) aminometano (**2**) (1.0 g, 4.52 mmol) y DMAP (276 mg 2.26 mmol) se disuelven en piridina (5 ml) y se diluyen con diclorometano (10 ml). Posteriormente se añade el anhídrido benciliden-2,2-bis(oximetil) propiónico (**5**) (7.8 g, 18.32 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 h. El crudo de reacción se trata con una mezcla piridina:agua (1:1) durante 12 h y se diluye con CH₂Cl₂ (1 l) lavándose con NaHSO₄, 1M (2 x 400 ml), Na₂CO₃ (10%) (2 x 400 ml) y una disolución saturada de NaCl (1 x 400 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro y se evapora a vacío dando lugar al compuesto **6** como un sólido blanco que se recristaliza empleando CHCl₃/eter (3.5 g, 92 %).

Pf: 154-155 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.28-7.46 (m, 15H, Ar); 5.45 (s, 3H, CH-Ph); 4.62 (d, 6H, *J*= 11.4 Hz, CH₂_b); 4.56 (s, 6H, CH₂_a); 3.63 (d, 6H, *J*= 11.4 Hz, CH₂_b); 1.35 (s, 9H, CH₃_{Boc}); 0.96 (s, 9H, CH₃_b).

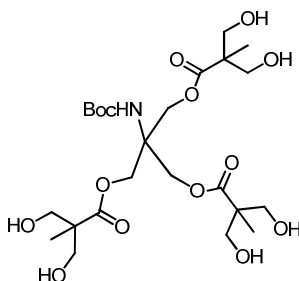
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 173.4 (CO); 154.4 (CO_{Boc}); 137.9 (C_{Ar}); 128.9 (CH_{Ar}); 128.3 (CH_{Ar}); 126.3 (CH_{Ar}); 101.9 (CH-Ar); 81.2 (C_{Boc}); 73.7 (CH₂_b); 62.9 (CH₂_a); 58.1 (C-CH₂_a); 42.8 (C-CH₂_b); 28.3 (CH₃_{Boc}); 17.8 (CH₃_b).

IR (KBr, cm⁻¹) ν: 3407, 3346, 3065, 3037, 2930, 1741, 1714.

EM (ESI) calculado para C₄₅H₅₅NO₁₄: 833.4 [M]⁺; encontrado: 856.3 [M+ Na]⁺.

Análisis elemental para C₄₅H₅₅NO₁₄; calculado: C, 64.81%; H, 6.65%; N, 1.68%; encontrado: C, 64.96%; H, 6.56%; N, 1.94%.

Dendrón de primera generación desprotegido (7).



A una disolución del compuesto **6** (1.5 g, 1.8 mmol) en CH₂Cl₂/MeOH (1:1) se añade una cantidad catalítica de paladio al 10% sobre carbono. La mezcla se somete a hidrogenación a temperatura y presión ambiente durante 12 horas. A continuación, la reacción se filtra sobre celita y el disolvente se evapora a vacío dando lugar al compuesto **7** como un sólido blanco (1.0 g, 99%).

Pf: 130-132 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 4.43 (s, 6H, CH₂_a); 3.72 (d, 6H, *J*= 10.8 Hz, CH₂_b); 3.63 (d, 6H, *J*= 10.8 Hz, CH₂_b); 1.46 (s, 9H, CH₃_{Boc}); 1.19 (s, 9H, CH₃_b).

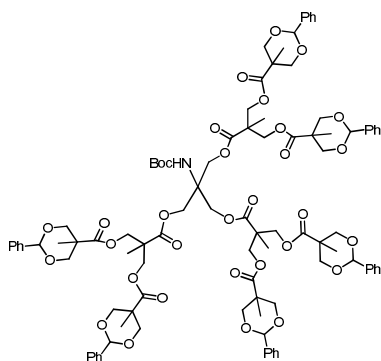
¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ: 175.9 (CO); 156.7 (CO_{Boc}); 80.5 (C_{Boc}); 65.8 (CH₂_b); 63.4 (CH₂_a); 58.4 (C-CH₂_a); 50.5 (C-CH₂_b); 28.7 (CH₃_{Boc}); 17.3 (CH₃_b).

IR (KBr, cm⁻¹) ν: 3331, 2974, 2934, 2885, 2852, 1727.

EM (ESI) calculado para C₂₄H₄₃NO₁₄: 569.6 [M]⁺; encontrado: 592.2 [M+ Na]⁺ y 608.2 [M+K]⁺.

Análisis elemental para C₂₄H₄₃NO₁₄; calculado: C, 50.61%; H, 7.61%; N, 2.46%; encontrado: C, 51.03%; H, 7.63%; N, 2.77%.

Dendrón de segunda generación protegido (8).



El compuesto **7** (685 mg, 1.20 mmol) y DMAP (292 mg 2.38 mmol), se disuelven en piridina (8 ml) y se diluyen con diclorometano (16 ml). Posteriormente se añade el anhídrido bencilideno-2,2-bis(oximetil) propiónico (**5**) (4.15 g, 9.75 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 h. El crudo de reacción se trata con una mezcla piridina:agua (1:1) durante 12 h. Posteriormente se diluye con CH₂Cl₂ (600 ml) y se lava con NaHSO₄, 1M (2 x 250 ml), Na₂CO₃ (10%) (2 x 250 ml) y una disolución saturada de NaCl (1 x 250 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro y se evapora a vacío dando lugar al compuesto **8** como un sólido blanco que se recristaliza empleando CHCl₃/eter (1.9 g, 90 %).

Pf: 94-95 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.28-7.44 (m, 30H, H_{Ar}); 5.40 (s, 6H, CH-Ar); 4.58 (d, 12 H, *J*= 11.4 Hz, CH₂ c); 4.37 (m, 12 H, *J*= 11.4 Hz, CH₂ b); 4.19 (s, 6H, CH₂ a); 3.58 (d, 12 H, *J*= 11.4 Hz, CH₂ c); 1.42 (s, 9H, CH₃ Boc); 1.19 (s, 9H, CH₃ b); 0.93 (s, 18 H, CH₃ c).

¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃) δ: 173.3 (CO-C-CH₂ c); 172.0 (CO-C-CH₂ b); 154.2 (CO_{Boc}); 137.9 (C_{Ar}); 129.0 (CH_{Ar}); 128.6 (CH_{Ar}); 126.3 (CH_{Ar}); 101.8 (CH-Ar); 80.1 (C_{Boc}); 73.6

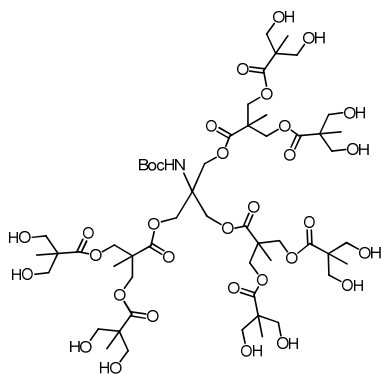
(CH₂ c); 65.1 (CH₂ b); 62.5 (CH₂ a); 57.2 (C- CH₂ a); 49.3 (C- CH₂ b); 42.7 (C- CH₂ c); 28.4 (CH₃ Boc); 17.8 (CH₃ e); 17.7 (CH₃ b).

IR (KBr, cm⁻¹) ν : 3396, 2979, 2932, 2853, 1740.

EM (ESI) calculado para C₉₆H₁₁₅NO₃₂: 1793.7 [M]⁺; encontrado: 1816.7 [M+Na]⁺ y 1832.6 [M+K]⁺.

Análisis elemental para C₉₆H₁₁₅NO₃₂; calculado: C, 64.24%; H, 6.46%; N, 0.78%; encontrado: C, 64.00%; H, 6.57%; N, 0.94%.

Dendrón de segunda generación desprotegido (**9**).



A una disolución del compuesto **8** (1.5 g, 0.8 mmol) en CH₂Cl₂/MeOH (1:1) se añade una cantidad catalítica de paladio al 10% sobre carbono. La mezcla se somete a hidrogenación a temperatura y presión ambientes durante 12 horas. La mezcla de reacción se filtra sobre celita y el disolvente se evapora a vacío dando lugar al compuesto **9** como un sólido blanco (1.0 g, 99%).

Pf: 126-128 °C.

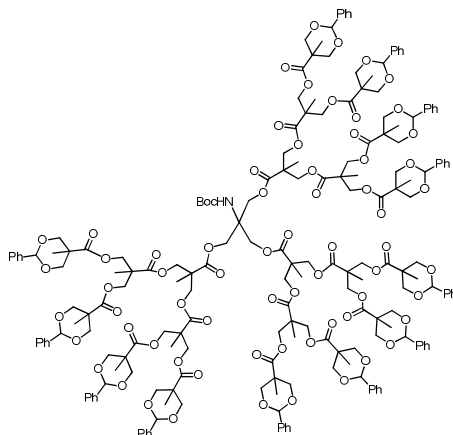
¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 4.44 (s, 6H, CH₂_a); 4.33 (dd, 12H, J= 11.1 y 15.3 Hz, CH₂_b); 3.66 (dd, 24H, J= 10.8 y 16.2 Hz, CH₂_c); 1.47 (s, 9H, CH₃_{Boc}); 1.34 (s, 9H, CH₃_b); 1.17 (s, 18H, CH₃_c).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ: 176.0 (CO-C-CH₂_c); 173.3 (CO-C-CH₂_b); 156.6 (CO_{Boc}); 79.9 (C_{Boc}); 66.1(CH₂_b); 66.0 (CH₂_c); 63.5 (CH₂_a); 58.4 (C-CH₂_a); 51.8 (C-CH₂_b + CH₂_c); 28.8 (CH₃_{Boc}); 18.3 (CH₃_b); 17.4 (CH₃_c).

EM (ESI) calculado para C₄₅H₅₅NO₁₄: 1265.6 [M]⁺; encontrado: 1288.5 [M+ Na]⁺ y 1305.4 [M+ K]⁺.

Análisis elemental para C₄₅H₅₅NO₁₄; calculado: C, 51.22%; H, 7.24%; N, 1.11%; encontrado: C, 51.03%; H, 7.08%; N, 1.35%.

Dendrón de tercera generación protegido (10).



El compuesto **9** (1.0 g, 0.79 mmol) y DMAP (405 mg, 3.32 mmol), se disuelven en piridina (8 ml) y se diluyen con diclorometano (16 ml). Posteriormente se añade el anhídrido bencilideno-2,2-bis(oximetil) propiónico (**5**) (5.6 g, 12.3 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 h. El crudo de reacción se trata con una mezcla piridina:agua (1:1) durante 12 h. Posteriormente se diluye con CH₂Cl₂

(600 ml) y se lava con NaHSO₄, 1M (2 x 250 ml), Na₂CO₃ (10%) (2 x 250 ml) y una disolución saturada de NaCl (1 x 250 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro y se evapora a vacío dando lugar al compuesto **10** como un sólido blanco que se recristaliza empleando CHCl₃/eter (2.5 g, 85 %).

Pf: 97-99 °C.

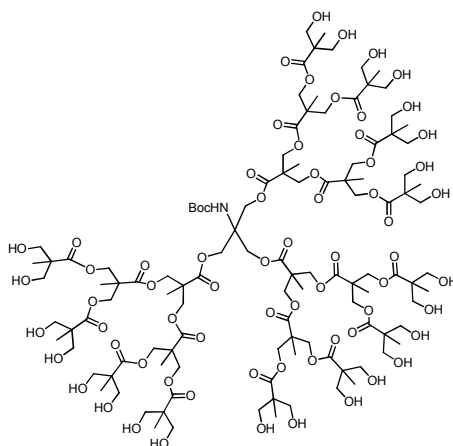
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.28-7.43 (m, 60H, H_{Ar}); 5.39 (s, 12H, CH-Ar); 4.56 (d, 24H, J= 11.4 Hz, CH₂ d); 4.36 (m, 30H, CH₂ a + CH₂ c); 4.09 (m, 12 H, J=11.4 Hz, CH₂ b); 3.54 (d, 24 H, J= 11.4 Hz, CH₂ d); 1.40 (s, 9H, CH₃ Boc); 1.20 (s, 18H, CH₃ c); 1.04 (s, 18H, CH₃ b); 0.91 (s, 36H, CH₃ d).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 173.2 (CO-C-CH₂ d); 171.9 (CO-C-CH₂ c); 171.5 (CO-C-CH₂ b); 154.1 (CO_{Boc}); 137.9 (C_{Ar}); 128.8 (CH_{Ar}); 128.1 (CH_{Ar}); 126.2 (CH_{Ar}); 101.6 (CH-Ar); 80.1 (C_{Boc}); 73.4 (CH₂ d); 65.0 (CH₂ c + CH₂ b); 63.5 (CH₂ a); 57.2 (C- CH₂ a); 46.9 (C- CH₂ c); 46.5 (C- CH₂ b); 42.6 (C- CH₂ d); 28.3 (CH₃ Boc); 17.7 (CH₃ d); 17.6 (CH₃ b); 17.2 (CH₃ b).

EM (ESI) calculado para C₁₉₈H₂₃₅NO₆₈: 3713.5 [M]⁺; encontrado: 3736.7 [M+ Na]⁺.

Análisis elemental para C₁₉₈H₂₃₅NO₆₈; calculado: C, 63.98%; H, 6.37%; N, 0.38%; encontrado: C, 63.80%; H, 6.41%; N, 0.33%.

Dendrón de tercera generación desprotegido (11).



A una solución del compuesto **10** (2.4 g, 0.7 mmol) en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) se añade una cantidad catalítica de paladio al 10% sobre carbono. La mezcla se somete a hidrogenación a temperatura y presión ambiente durante 12 horas. La mezcla de reacción se filtra sobre celita y el disolvente se evapora a vacío dando lugar al compuesto **11** como un sólido blanco (1.7 g, 99%).

Pf: 110-112 °C.

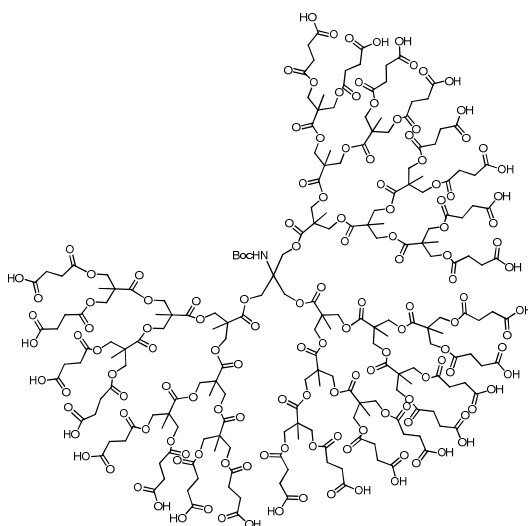
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 4.47 (s, 6H, CH_2a); 4.37- 4.27 (m, 36H, CH_2b y CH_2c); 3.72- 3.62 (m, 48 H, CH_2d); 1.48 (s, 9H, CH_3Boc); 1.38 (s, 9H, CH_3b); 1.33 (s, 18H, CH_3c); 1.17 (s, 36H, CH_3d).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ : 175.9 ($\text{CO-C-CH}_2\text{d}$); 173.8 ($\text{CO-C-CH}_2\text{c}$); 173.3 ($\text{CO-C-CH}_2\text{b}$); 156.4 (CO_{Boc}); 80.1 (C_{Boc}); 65.5 (CH_2b); 64.8 (CH_2c); 64.5 (CH_2d); 62.3 (CH_2a); 50.4 ($\text{C-CH}_2\text{a,b,c,d}$); 27.6 (CH_3Boc); 17.0 (CH_3c); 16.8 (CH_3b); 16.8 (CH_3d).

EM (ESI) calculado para $\text{C}_{114}\text{H}_{187}\text{NO}_{68}$: 2658.1 $[\text{M}]^+$; encontrado: 2681.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1352 $[\text{M} + 2\text{Na}]^{2+}$ y 909.3 $[\text{M} + 3\text{Na}]^{3+}$.

Análisis elemental para $C_{114}H_{187}NO_{68}$; calculado: C, 51.48%; H, 7.09%; N, 0.53%; encontrado: C, 51.27%; H, 7.11%; N, 0.56%.

Dendrón de tercera generación funcionalizado con ácido succínico (12).

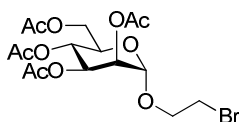


El dendrón **11** (40 mg, 0.015 mmol), anhídrido succínico (54 mg, 0.54 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP (3 mg, 0.018 mmol) se disuelven en piridina (2 ml). La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se evapora a vacío y el residuo resultante se disuelve en metanol purificándose mediante filtración usando Amicón Centri plus 3000 y realizando ocho ciclos de lavado. Posteriormente, el disolvente se evapora a vacío obteniéndose el compuesto **12** como un aceite incoloro (67 mg, 89%).

1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) δ : 4.55 (s, 6H, CH_{2a}); 4.41 (s, 12H, CH_{2b}); 4.35 (s, 24H, CH_{2c}); 4.28 (s, 48H, CH_{2d}); 2.72- 2.55 (m, 96 H, $OOC-CH_2-CH_2-COO$); 1.48 (s, 9H, CH_{3Boc}); 1.39 (s, 9H, CH_{3b}); 1.33 (s, 18H, CH_{3c}); 1.20 (s, 36H, CH_{3d}).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ: 172.9 (CO); 171.9 (CO); 171.6 (CO); 171.5 (CO); 160.6 (CO_{Boc}); 79.9 (C_{Boc}); 65.3 (CH₂); 46.2 (C-CH₂); 28.9 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 29.3 (CH₃_{Boc}); 17.8 (CH₃_a); 17.6 (CH₃_b); 17.5 (CH₃_c).

2-Bromoetil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-manopiranosido (14).¹³⁴



Sobre una disolución de 2-bromoetanol (910 μL, 12.8 mmol) y 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-α,β-D-manosa (**13**) (4 g, 10.25 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se añade BF₃.Et₂O (6.5 mL, 51.2 mmol, 5 eq.) gota a gota durante 15 min. Transcurridas 2 horas, se permite que la disolución alcance temperatura ambiente. Después de 24 horas, la mezcla de reacción se añade sobre agua-hielo (30 mL) y se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). La combinación de los extractos orgánicos se lava con agua (30 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (30 mL), agua (30 mL) y se seca sobre MgSO₄. El disolvente se elimina a vacío y el residuo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano:AcOEt, 1:1) obteniéndose el 2-bromoetil-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-manopiranosido (**14**) como un sólido blanco (3.41 g, 73%).

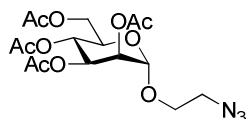
[α]_D²⁰: + 37.3 (c 0.75, CHCl₃); Lit.¹³⁴ [α]_D²³: + 45 (c 0.6, CHCl₃)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 5.36 (dd, 1H, J=10.0, 3.1 Hz, H₃), 5.32-5.26 (m, 2H, H₄,H₂), 4.87 (d, 1H, J=1.5 Hz, H₁), 4.29 (dd, 1H, J=12.2, 5.3 Hz, H₆), 4.12 (dd, 1H, J=12.2, 2.2 Hz, H₆), 4.05 (ddd, 1H, J=10.2, 5.3, 2.2 Hz, H₅), 3.87 (ddd, 1H, J=10.6, 6.6, 4.0 Hz, H₇), 3.67 (ddd, 1H, J=10.6, 5.8, 3.8 Hz, H₇), 3.47 (m, 2H, 2H₈), 2.16, 2.10, 2.05, 1.99 (4s, 12H, CH₃COO).

¹³⁴ Dahm, J.; Frejd, T.; Gronberg, J.; Law, T.; Magnusson, G.; Noori, G. *Carbohydr. Res.* **1983**, *116*, 303-307.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 170.6, 170.0, 169.9 y 169.8 (CO), 97.7 (C1), 69.4 (C2), 69.0 y 68.9 (C3, C5), 66.4 (C4), 66.0 (C7), 62.4 (C6), 30.4 (C8), 21.8, 21.7, 21.7 y 21.6 (CH_3COO).

2-Azidoetil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido (15).¹³⁵



El 2-bromoetil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido (**14**) (1.3 g, 2.85 mmol) y azida sódica (1.5 g, 22.84 mmol) se disuelven en DMF anhidra (30 mL) y la mezcla de reacción se mantiene en agitación a 50°C durante 15 h. El crudo de reacción se diluye con AcOEt (150 mL) y se lava con agua para extraer el exceso de NaN_3 y el NaBr formado durante la reacción. La fracción orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro, y se elimina el disolvente a vacío, obteniéndose el 2-azidoetil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido (**15**) como un sólido blanco (1.19 g, 99%).

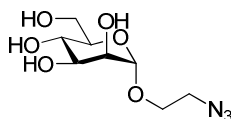
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +50.2 (c 0.75, CHCl_3); Lit.¹³⁵ $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: + 39 (c 1.5, CHCl_3)

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 5.36 (dd, 1H, $J=10.0$ Hz, $J=3.1$ Hz, H_3); 5.32-5.26 (m, 2H, $\text{H}_4 + \text{H}_2$); 4.87 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_1); 4.29 (dd, 1H, $J=12.2$ Hz, $J=5.3$ Hz, H_6); 4.12 (dd, 1H, $J=12.2$ Hz, $J=2.2$ Hz, H_6); 4.05 (ddd, 1H, $J=10.2$ Hz, $J=5.3$ Hz, $J=2.2$ Hz, H_5); 3.87 (ddd, 1H, $J=10.6$ Hz, $J=6.6$ Hz, $J=4.0$ Hz, H_7); 3.67 (ddd, 1H, $J=10.6$ Hz, $J=5.8$ Hz, $J=3.8$ Hz, H_7); 3.47 (m, 2H, H_8); 2.16(s, 3H, CH_3CO); 2.10(s, 3H, CH_3CO); 2.05(s, 3H, CH_3CO); 1.99(s, 3H, CH_3CO)

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 171.0 (CO); 170.4(CO); 170.3(CO); 170.2 (CO); 98.1 (C-1); 69.8 (C-2); 69.2 (C-3, C-5); 67.5 (C-7); 66.4 (C-4); 62.8 (C-6); 50.7 (C-8); 21.3 (CH_3CO); 21.2(CH_3CO); 21.1 (CH_3CO); 21.1 (CH_3CO)

¹³⁵ Chernyak, A.Y.; Sharma, G.V.M.; Kononov, L.O.; Krishna, P.R.; Levinsky, A.B.; Kochetkov, N.K. *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 303-309.

2-Azidoetil- α -D-manopiranosido(16).¹³⁶



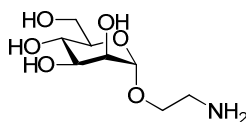
El compuesto **15** (1.2 g, 2.85 mmol) se disuelve en MeOH seco (40 mL) y una disolución 1M de NaOMe en MeOH (5 mL) se añade hasta que se alcanza pH 9. La mezcla de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Después, se neutraliza con resina Amberlite IR 120, se filtra y el disolvente se elimina a vacío obteniéndose el 2-azidoetil- α -D-manopiranosido (**16**) como un sólido blanco (710 mg, 99%).

$[\alpha]_{D^{20}}$: +135.0 (c 0.5, CHCl₃); Lit.¹³⁶ $[\alpha]_{D^{20}}$: +139.2 (c 0.5, CHCl₃).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ : 4.83 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H₁); 3.97-3.88 (m, 2H, H₃ + H₄); 3.84 (m, 1H, H₂); 3.76-3.57 (m, 5H, H₅ + 2H₆ + 2H₇); 3.43 (m, 2H, H₈).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ : 101.8 (C-1); 74.9 (C-2); 72.4; 72.0 (C-3, C-5); 68.5 (C-4); 67.7 (C-7); 62.9 (C-6); 51.7 (C-8).

2-Aminoetil α -D-mannopiranosido (17).¹³⁶



A una disolución de **16** (540 mg, 2.20 mmol) en MeOH (15 ml) se añade una cantidad catalítica de paladio al 10% sobre carbono. La mezcla se somete a hidrogenación a temperatura y presión ambientes durante 24 horas. La mezcla de

¹³⁶Lindhorst, T.K.; Koetter, S.; Krallmann-Wenzel, U.; Ehlers, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 823-831.

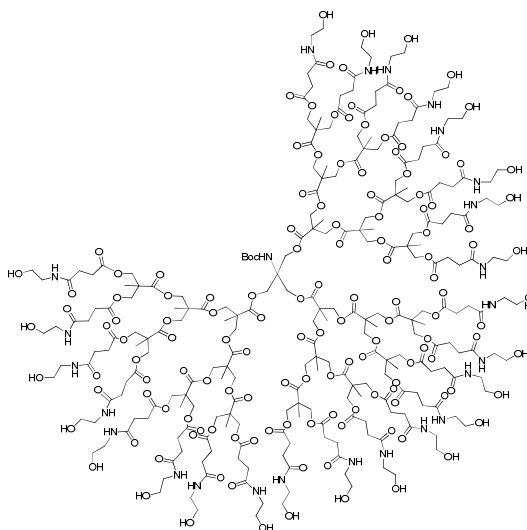
reacción se filtra sobre celita y el disolvente se evapora a vacío obteniéndose el 2-aminoetil α -D-manopiranosido (**17**) como un sólido blanco (425 mg, 99%).

$[\alpha]_{D^{20}}$: +75.4 (c 1, MeOH); Lit.¹³⁶ $[\alpha]_{D^{23}}$: + 84.5 (c 1.2, MeOH).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, D_2O) δ : 4.75 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_1); 3.85 (dd, 1H, $J=3.3$, Hz, $J=1.5$ Hz, H_2); 3.75 (m, 1H, H_6); 3.74-3.59 (m, 3H, $\text{H}_3 + \text{H}_4 + \text{H}_6$); 3.53 (m, 2H, H_7); 3.45 (m, 1H, H_5); 2.80 (m, 2H, H_8).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, D_2O) δ : 101.2 (C-1); 74.1 (C-5); 71.8 (C-3); 71.2 (C-2); 68.8 (C-4); 68.1 (C-7); 62.2 (C-6); 41.8 (C-8).

Dendrón control de tercera generación 3GTBoc(Suc)₂₄.



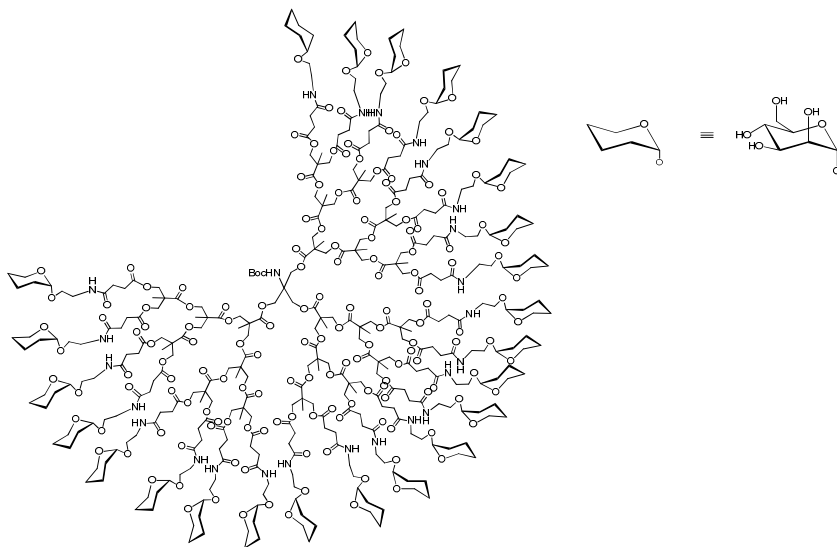
A una disolución del dendrón **12** (35 mg, 6.9×10^{-3} mmol) en DMF (5 ml), se añade DIC (84 μl , 0.49 mmol) y HOBt (72 mg, 0.49 mmol) y se mantiene en agitación durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se añade etanolamina (32 mg, 0.49 mmol). La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se evapora a vacío y el residuo resultante se disuelve en agua purificándose

mediante filtración usando Amicon Centri plus 3000 realizando ocho ciclos de lavado. Su posterior liofilización conduce a 3GTBoc(SucC)₂₄ como un aceite incoloro (21 mg, 50%).

¹H-RMN (300 MHz, D₂O) δ: 4.41 (s, 6H, CH₂ a); 4.30 (s, 12H, CH₂ b); 4.22 (s, 24H, CH₂ c); 4.09 (s, 48H, CH₂ d); 3.72 (t, 48H, *J*= 5.2 Hz, CH₂-OH); 3.05 (t, 48H, *J*= 5.2 Hz, CH₂-NHCO); 2.57- 2.43 (m, 92 H, OOC-CH₂-CH₂-COO); 1.35 (s, 9H, CH₃ Boc); 1.28 (s, 9H, CH₃ b); 1.18 (s, 18H, CH₃ c); 1.06 (s, 36H, CH₃ d)

¹³C-RMN (75 MHz, D₂O) δ: 173.3 (CO); 172.1 (CO); 171.9 (CO); 160.4 (CO_{Boc}); 80.9 (C_{Boc}); 67.3 (CH₂ a+b+c); 59.9 (CH₂-O); 45.3 (C-CH₂); 40.9 (CH₂-N); 29.1 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.9 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.4 (CH₃ Boc); 18.1 (CH₃ a); 17.9 (CH₃ b); 17.8 (CH₃ c)

Glicodendrón de manosa de tercera generación 3GTBoc(SucMan)₂₄.



A una disolución del dendrón **12** (29 mg, 5.7 x 10⁻³ mmol) en DMF (6 ml), se añade DIC (66 µl, 0.42 mmol) y HOBt (57 mg, 0.42 mmol) y se mantiene en agitación

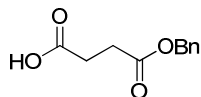
durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se añade el glicoconjugado **17** (50 mg, 0.22 mmol) disuelto en DMF (4 ml). La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se evapora a vacío y el residuo resultante se disuelve en agua purificándose mediante filtración usando Amicon Centri plus 3000 realizando ocho ciclos de lavado. Su posterior liofilización conduce al producto 3GTBoc(SucMan)₂₄ como un sólido blanco (50 mg, 86%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: + 50.5 (c 0.75, MeOH).

¹H-RMN (300 MHz, D₂O) δ : 4.78 (s, 24H, H₁); 4.23- 4.16 (m, 90H, CH_{2 a} + CH_{2 b} + CH_{2 c} + CH_{2 d}); 3.91-3.25 (m, 192H, H₂ + H₃ + H₄+ H₅ +H₆ + H₇ + H₈); 2.59 (m, 48H, HNOC-CH₂-CH₂-COO); 1.35 (s, 9H, CH_{3 Boc}); 2.48 (m, 48H, HNOC-CH₂-CH₂-COO); 1.34 (s, 9H, CH_{3 Boc}); 1.28 (s, 9H, CH_{3 b}); 1.23 (s, 18H, CH_{3 c}); 1.18 (s, 36H, CH_{3 d})

¹³C-RMN (75 MHz, D₂O) δ : 174.9 (CO); 174.7 (CO); 173.1 (CO); 161.7 (CO_{Boc}); 101.8 (C₁); 80.9 (C_{Boc}); 74.9 (C₅); 72.1 (C_{3,4}); 71.8 (C₂); 69.1 (C_{3,4}); 65.9 (CH_{2 a}+ CH_{2 b} + CH_{2 c}); 65.1 (C₇); 62.3 (C₆); 45.3 (C-CH₂); 41.0 (C₈); 29.5 (NOC-CH₂-CH₂-COO); 28.6 (NOC-CH₂-CH₂-COO); 29.1 (CH_{3 Boc}); 18.3 (CH_{3 a}); 18.1 (CH_{3 b}); 17.9 (CH_{3 c})

Monosuccinato de bencilo (**18**).⁹⁸



Una mezcla de anhídrido succínico (1.0 g, 10 mmol), alcohol bencílico (860 μ L, 8.30 mmol) y DMAP (1.02 g, 8.30 mmol) en CH₂Cl₂ (30 ml) se agita durante 18 horas a temperatura ambiente. Después, se añade a la mezcla de reacción una disolución al 5% de Na₂CO₃ (3 \times 20 mL). Se acidifica la fase acuosa con HCl 1M (hasta pH=4) y se extrae

⁹⁸ Isomura, I.; Wirsching, P.; Janda, K. D. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4115-4121.

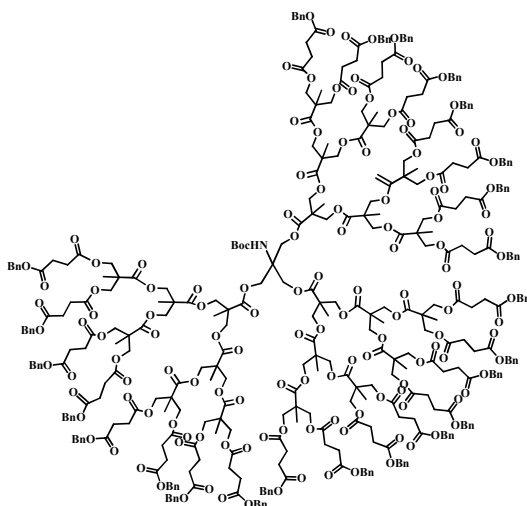
con AcOEt (3×15 mL). La fase orgánica se lava con una disolución de NaCl saturada y se seca sobre MgSO₄. Se evapora el disolvente a presión reducida dando lugar al monosuccinato de bencilo **18** como un sólido blanco (1.6 g, 94%).

Pf: 55-57 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.38 (m, 5 H, H_{Ar}), 5.18 (s, 2 H, CH₂-Ph), 2.72 (m, 4 H, OOC-CH₂-CH₂-COO).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 177.3, 171.0 (CO), 134.7 (C_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}); 127.6 (CH_{Ar}); 127.3 (CH_{Ar}); 127.2(CH_{Ar}); 127.2 (CH_{Ar}); 65.7 (CH₂-Ph), 28.0 (CH₂-CO); 27.9 (CH₂-CO).

Dendrón de tercera generación funcionalizado con monosuccinato de bencilo y protegido con Boc (19).



A una disolución del dendrón **11** (100 mg, 0.04 mmol), monosuccinato de bencilo **18** (301 mg, 1.44 mmol) y DPTS (266 mg, 0.90 mmol) en CH₂Cl₂ (8 ml) se añade DCC (299 mg, 1.44 mmol) disuelta en CH₂Cl₂ (3ml). La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24h. La mezcla de reacción se filtra sobre celita. El crudo se diluye en CH₂Cl₂ (15 ml) y se lava con una disolución saturada de

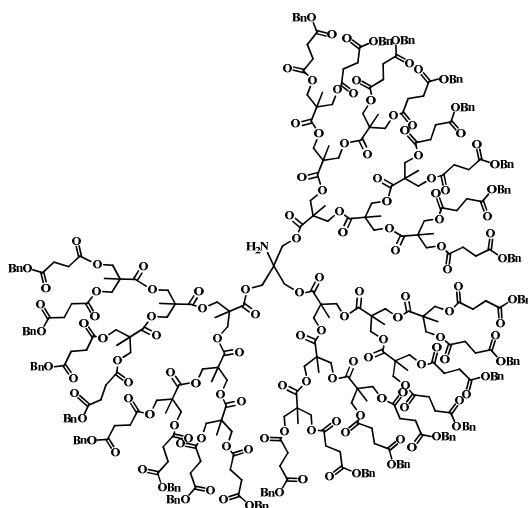
NaHCO₃ (30 ml x 3). Se purifica empleando sephadex LH20 (CH₂Cl₂/MeOH) obteniéndose el dendrón **19** como un aceite incoloro (264 mg, 97 %).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.26 (m, 120H, Ar); 5.03 (s, 48H, CH₂-Ph); 4.10-4.27 (m, 90H, CH₂_a + CH₂_b + CH₂_c + CH₂_d); 2.57 (m, 96H, CH₂CO); 1.33 (s, 9H, CH₃ Boc); 1.26 (s, 9H, CH₃ b); 1.19 (s, 18H, CH₃ c); 1.03 (s, 27H, CH₃ d).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 171.9 (CO); 171.7 (CO); 171.6 (CO); 171.5 (CO); 159.6 (CO_{Boc}); 135.9 (C_{Ar}); 128.6 (CH_{Ar}); 128.2 (CH_{Ar}); 79.9 (C_{Boc}); 66.5 (CH₂-Ph); 65.17 (CH₂_a + CH₂_b + CH₂_c); 28.9 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.8 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.3 (CH₃ Boc); 17.7 (CH₃ a); 17.6 (CH₃ b); 17.5 (CH₃ c).

EM (ESI) calculado para C₃₇₉H₄₂₉NO₁₃₉: 7217.7 [M]⁺; encontrado: 3632.4 [M + 2Na]²⁺ y 2429.8 [M + 3Na]³⁺.

Dendrón de tercera generación funcionalizado con monosuccinato de bencilo (20).



El dendrón **19** (200 mg, 0.028 mmol) se disuelve en CH₂Cl₂ (1 ml) y se le añade ácido trifluoroacético (1ml). La disolución se deja en agitación a temperatura ambiente durante 2h. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente. El crudo de reacción se purifica empleando sephadex LH20 (CH₂Cl₂/MeOH) obteniéndose el dendron **20** como un aceite incoloro (196 mg, 99 %).

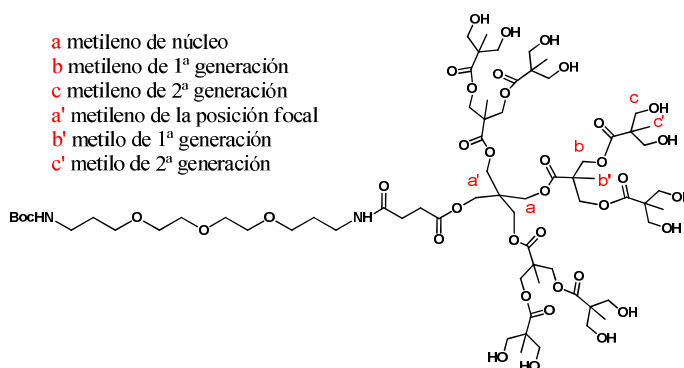
¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 7.28 (m, 120H, Ar); 5.04 (s, 48H, CH₂-Ph); 4.12-4.26 (m, 90H, CH₂_a + CH₂_b + CH₂_c + CH₂_d); 2.58 (m, 96H, CH₂CO); 1.23 (s, 9H, CH₃_{b'}); 1.15 (s, 18H, CH₃_{c'}); 1.03 (s, 36H, CH₃_{d'}).

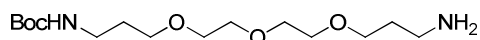
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 171.8 (CO); 171.6 (CO); 171.5 (CO); 171.4 (CO); 136.0 (C_{Ar}); 128.7 (CH_{Ar}); 128.3 (CH_{Ar}); 66.7 (CH₂-Ph); 65.3 (CH₂ CH₂_a + CH₂_b + CH₂_c); 28.8 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.6 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 17.6 (CH₃_{a'}); 17.5 (CH₃_{b'}); 17.4 (CH₃_{c'}).

EM (ESI) calculado para C₃₇₃H₄₁₉NO₁₃₈: 7119.6 [M]⁺; encontrado: 3583.1 [M+ 2Na]²⁺ y 2397.5 [M + 3Na]³⁺.

7.3.2. Dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico con espaciador.

Para facilitar la caracterización de los dendrones basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico con espaciador se ha empleado la nomenclatura que se muestra a continuación:

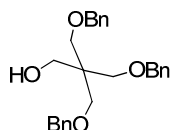


***N*-(*tert*-Butoxicarbonil)-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecano (22).**¹⁰³

4,7,10-Trioxa-1,13-tridecanenamina (**21**) (26.7 mL, 122 mmol) se disuelve en 1,4-dioxano (30 ml). Posteriormente se adiciona lentamente durante una hora una disolución de Boc₂O (4.37 g, 23.5 mmol) en 1,4-dioxano (30 ml) manteniéndose la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante cinco horas más. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo resultante se disuelve en agua (50 ml) y se extrae con CH₂Cl₂ (4 x 50 ml). La fase orgánica se lava con una disolución de NaCl saturada (4 x 30 mL) y se seca sobre MgSO₄ anhidro; el disolvente se evapora a vacío dando lugar al producto **22** como un aceite incoloro (6.7 g, 89 %).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.66-3.53 (m, 12 H, CH₂-O); 3.22 (q, 2H, *J*= 6 Hz, CH₂-CH₂-NH); 2.79 (t, 2H, *J*= 6.9 Hz, CH₂-CH₂-NH); 3.22 (m, 4H, CH₂-CH₂-NH); 1.43 (s, 9H, CH₃ Boc).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 156.2 (CO_{Boc}); 78.9 (C_{Boc}); 70.7 (CH₂-O); 70.4 (CH₂-O); 69.6 (CH₂-O); 39.7 (CH₂-CH₂-NH); 38.6 (CH₂-CH₂-NH); 29.7 (CH₂-CH₂-NH); 28.6 (CH₃ Boc).

3-(Benziloxi)-2,2-bis(benziloximetil)propan-1-ol (24).

¹⁰³ Braun, M.; Hartnagel, U.; Ravanelli, E.; Schade, B.; Böttcher, C.; Vostrowsky, O.; Hirsch, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1983-2001.

A una disolución de pentaeritritol (**23**) (3.0 g, 22.2 mmol) en DMF (60 ml), se le añade cloruro de bencilo (7.9 ml, 66.6 mmol). A la mezcla de reacción se le adiciona lentamente y a 0°C NaH (2.7 g, 66.6 mmol). La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 2h. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo (12:1), obteniéndose el producto **24** como un aceite incoloro (4.6 g; 51%).

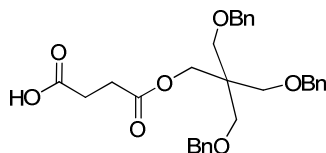
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.31-7.43 (m, 15H, H_{Ar}); 4.56 (s, 6H, CH₂-Ph); 3.87 (d, 2H, J=5.4 Hz, CH₂-OH); 3.66 (s, 6H, CH₂-OBn); 2.99 (t, 1H, J=5.4, OH).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 138.5 (C_{Ar}); 128.4 (CH_{Ar}); 127.6 (CH_{Ar}); 127.5 (CH_{Ar}); 73.6 (CH₂-OBn); 70.9 (CH₂-Ph); 66.1 (CH₂-OH); 45.2 (C-CH₂OBn).

IR (NaCl, cm⁻¹) ν: 3456.

EMAR-FAB calculado para [M+Na] C₂₆H₃₀O₄Na (m/z): 429.2042; encontrado: 429.2057.

Ácido 4-(3'-(benziloxi)-2',2'-bis(benziloximetil)propoxi)-4-oxobutanoico (**25**).



Se disuelven el compuesto **24** (2.08 g, 5.12 mmol), anhídrido succínico (0.77g, 7.68 mmol) y DMAP (0.31 mg, 2.56 mmol) en piridina seca (30 ml). La disolución se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. El disolvente se evapora y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano/Acetato de etilo (4:1) dando lugar al compuesto **25** como un aceite incoloro (2.33 g, 90%).

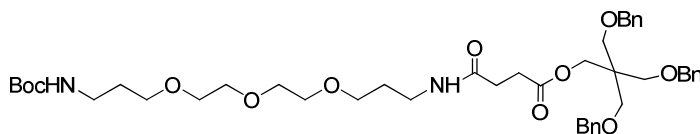
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.28-7.34 (m, 15H, H_{Ar}); 4.49 (s, 6H, CH₂-Ph); 4.28 (s, 2H, CH₂-OCO); 3.55 (s, 6H, CH₂-OBn); 2.50-2.57 (m, 4H, HOOC-CH₂CH₂-COO).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 178.1 (COOH); 171.8 (COO); 138.7 (C_{Ar}); 128.4 (CH_{Ar}); 127.6 (CH_{Ar}); 127.5 (CH_{Ar}); 73.4 (CH₂-Ph); 69.8 (CH₂-OBn); 64.3 (CH₂-OCO); 44.7 (C-CH₂OBn); 28.9 (HOOC-CH₂CH₂-COO).

IR (NaCl, cm⁻¹) ν: 3250, 1738, 1713.

EMAR-FAB calculado para [M+Na] C₃₀H₃₄O₇Na (m/z): 529.2202; encontrado: 529.2215.

Núcleo de crecimiento protegido con espaciador (26).



A una disolución del ácido **25** (0.10 g, 0.19 mmol) y *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecano (**22**) (0.76 mg, 0.24 mmol) en DMF (5 ml), se le añade DIC (62 µl, 0.39 mmol) y HOBt (0.54 g, 0.39 mmol). La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. El crudo de reacción se evapora y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente acetato de etilo/hexano (4:1) dando lugar al compuesto **26** como un aceite incoloro (0.14 g, 88%).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.33-7.23 (m, 15H, H_{Ar}); 6.25 (s, 1H, NH); 4.99 (s, 1H, NH); 4.49 (s, 6H, CH₂-Ar); 4.24 (s, 2H, CH₂-OCO); 3.53-3.68 (m, 12 H, CH₂-O); 3.54 (s, 6H, CH₂-OAr); 3.35 (q, 2H, J = 6 Hz, CH₂CH₂NH); 3.24 (m, 2H, OCH₂CH₂NH); 2.57 (t, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂COO); 2.38 (t, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂COO); 1.77 (m, 4H, CH₂CH₂NH); 1.46 (s, 9H, CH₃Boc).

Capítulo 7

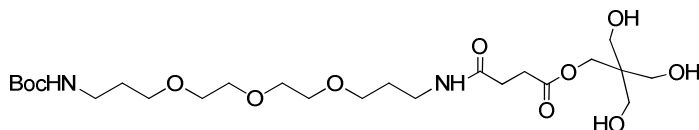
¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 172.8 (COO); 171.3 (CONH); 156.2 (CO_{Boc}); 138.7 (C_{Ar}); 128.4 (CH_{Ar}); 127.5 (CH_{Ar}); 127.5 (CH_{Ar}); 79.1 (C_{Boc}); 73.5 (CH₂-Ar); 70.8 (CH₂-O); 70.7 (CH₂-O); 70.4 (CH₂-O) ; 69.2 (CH₂-OBn); 64.1 (CH₂-OCO); 44.8 (C-CH₂OBn); 31.1 (CH₂-CO); 29.8 (CH₂CH₂NH); 29.7 (CH₂-CO); 29.1 (CH₂CH₂NH); 28.6 (CH₃_{Boc}).

IR (NaCl, cm⁻¹) υ: 1739; 1672; 1525.

EM (ESI): calculado para C₄₅H₆₄N₂O₁₁: 808.5 [M]⁺; encontrado: 831.5 [M + Na]⁺ y 847.4 [M + K]⁺.

Análisis elemental para C₄₅H₆₄N₂O₁₁; calculado: C, 66.81%; H, 7.97%; N, 3.46%; encontrado: C, 66.78%; H, 7.09%; N, 3.74%.

Núcleo de crecimiento desprotegido con espaciador (27).



A una solución del compuesto **26** (0.14 g, 0.173mmol) en etanol (10 ml) se añade una cantidad catalítica de paladio al 10% sobre carbono. La mezcla se somete a hidrogenación a temperatura y presión ambiente durante 12 horas. La mezcla de reacción se filtra sobre celita y el disolvente se evapora a vacío dando lugar a un aceite incoloro **27** (92 mg, 99%).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 4.10 (s, 2H, CH₂OCO); 3.50-3.67 (m, 12 H, CH₂-O); 3.60 (s, 6H, CH₂-OH); 3.28 (t, 2H, J= 6.9 Hz, CH₂-NH); 3.14 (t, 2H, J= 6.9 Hz, CH₂-NH); 2.65 (m, 2H, CH₂CO); 2.51 (m, 2H, CH₂CO); 1.76 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.41 (s, 9H, CH₃_{Boc}).

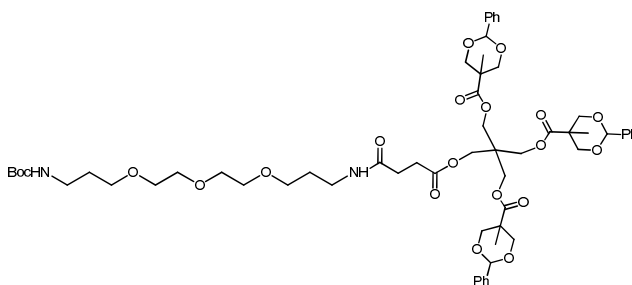
¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ: 175.3 (COO); 175.1 (CONH); 159.3 (CO_{Boc}); 80.7 (C_{Boc}); 72.4 (CH₂-O); 72.1 (CH₂-O); 70.7 (CH₂-O); 65.3 (CH₂-OCO); 63.1 (CH₂-OH); 47.2 (C-CH₂OH); 39.6 (CH₂CH₂NHCO); 38.7 (CH₂CH₂NHBoc); 32.3 (NOC-CH₂CH₂-COO); 31.7 (CH₂CH₂NH); 31.2 (NOC-CH₂CH₂-COO); 29.7 (CH₃ Boc).

IR (NaCl, cm⁻¹) υ: 3365; 1720; 1692; 1657; 1538.

EM (ESI): Calculado para C₂₄H₄₆N₂O₁₁: 538.3 [M]⁺; encontrado: 539.3 [M+H]⁺, 561.3 [M+Na]⁺ y 577.2 [M+K]⁺.

Análisis elemental para C₂₄H₄₆N₂O₁₁; calculado: C, 53.52 %; H, 8.61%; N, 5.20%; encontrado: C, 53.05 %; H, 8.50%; N, 4.93%.

Dendrón de primera generación protegido con espaciador (28).



El compuesto **27** (1.1 g; 2.1 mmol) y DMAP (385 mg; 3.1 mmol), se disuelven en piridina seca (5 ml) y se diluyen con diclorometano (10 ml). Posteriormente se añade el anhídrido benciliden-2,2-bis(oximetil) propiónico (**5**) (3.6 g; 8.4 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 h. El crudo de reacción se trata con una mezcla de piridina:agua (1:1) durante 12 h. Posteriormente se diluye con CH₂Cl₂ (1 l) y se lava con NaHSO₄, 1M (2 x 400 ml), Na₂CO₃ (10%) (2 x 400 ml) y una disolución saturada de NaCl (1 x 400 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro y se evapora. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice

utilizando como eluyente CH₂Cl₂/isopropanol (9.7:0.3), obteniéndose el compuesto **28** como un aceite incoloro (2.0 g; 87 %).

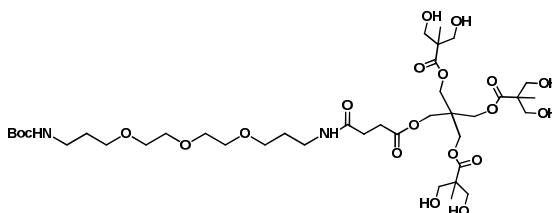
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.28-7.42 (m, 15H, Ar); 5.43 (s, 3H, CH-Ph); 4.59 (d, 6H, *J*= 11.6 Hz, CH₂ b); 4.29 (s, 6H, CH₂ a); 4.16 (s, 6H, CH₂ a'); 3.50-3.64 (m, 18 H, CH₂-O + CH₂ b); 3.29 (m, 2H, CH₂-NH); 3.28 (t, 2H, *J*= 6.9 Hz, CH₂-NH); 2.52 (m, 2H, CH₂CO); 2.26 (m, 2H, CH₂CO); 1.73 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.45 (s, 9H, CH₃ Boc); 0.93 (s, 9H, CH₃ b').

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 173.2 (CO-C-CH₂ b); 172.1 (COO); 171.1 (CONH); 156.1 (CO_{Boc}); 137.8 (C_{Ar}); 128.9 (CH_{Ar}); 128.2 (CH_{Ar}); 126.2 (CH_{Ar}); 101.8 (CH-Ar); 81.2 (C_{Boc}); 73.6 (CH₂ b); 70.6 (CH₂-O); 70.3 (CH₂-O); 70.1 (CH₂-O); 69.7 (CH₂-O); 62.1 (CH₂ a + CH₂ a'); 43.4 (C-CH₂ a); 42.8 (C-CH₂ b); 38.7 (CH₂CH₂NHCO); 37.7 (CH₂CH₂NHBoc); 29.7 (NOC-CH₂CH₂-COO); 29.4 (CH₂CH₂NH); 29.1 (NOC-CH₂CH₂-COO); 28.1 (CH₃ Boc) 17.8 (CH₃ b').

IR (NaCl, cm⁻¹) υ: 1740, 1163, 1094.

EMAR-FAB calculado para [M + Na] C₆₀H₈₂N₂O₂₀Na (m/z): 1173.5359; encontrado: 1173.5315.

Dendrón de primera generación desprotegido con espaciador (**29**).



A una disolución del dendrón **28** (1.3 g, 1.1 mmol) en CH₂Cl₂/MeOH (1:1) se añade una cantidad catalítica de paladio al 10% sobre carbono. La mezcla se somete a hidrogenación a temperatura y presión ambiente durante 12 horas. La mezcla de

reacción se filtra sobre celita y el disolvente se evapora a vacío dando lugar al dendrón **29** como un aceite incoloro (0.99 g, 99%).

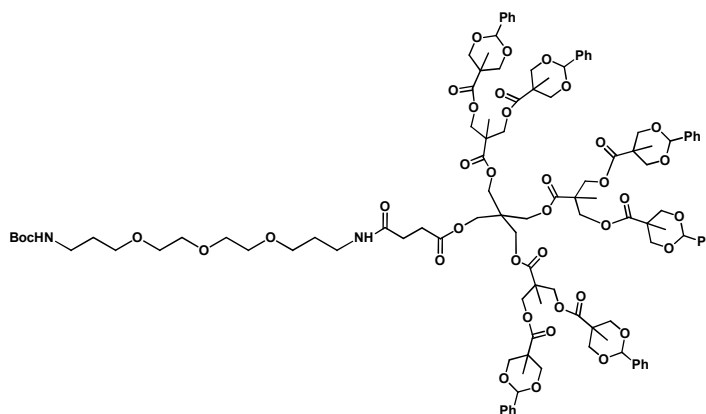
¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ: 4.23 (s, 8H, CH₂_a + CH₂_{a'}); 3.72 (d, 6H, *J*= 10.8 Hz, CH₂_b); 3.62 (d, 6H, *J*= 10.8 Hz, CH₂_b); 3.51-3.66 (m, 12H, CH₂-O); 3.27 (t, 2H, *J*= 6.8 Hz, CH₂-NH); 3.14 (t, 2H, *J*= 6.8 Hz, CH₂-NH); 2.67 (t, 2H, *J*= 6.4 Hz, CH₂CO); 2.51 (t, 2H, *J*= 6.4 Hz, CH₂CO); 1.76 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.45 (s, 9H, CH₃_{Boc}); 1.19 (s, 9H, CH₃_b).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 174.5 (CO-C-CH₂_b); 172.7 (COO); 171.5 (CONH); 157.1 (CO_{Boc}); 78.5 (C_{Boc}); 70.1 (CH₂-O); 69.9 (CH₂-O); 68.5 (CH₂-O); 64.5 (CH₂_b); 61.7 (CH₂_a + CH₂_{a'}); 50.6 (C-CH₂_b); 42.6 (C-CH₂_a); 37.3 (CH₂CH₂NHCO); 36.5 (CH₂CH₂NHBoc); 29.9 (NOC-CH₂CH₂-COO); 29.6 (CH₂CH₂NH); 28.9 (NOC-CH₂CH₂-COO); 27.5 (CH₃_{Boc}); 16.0 (CH₃_b).

IR (NaCl, cm⁻¹) ν: 3382, 2938, 2881, 1728.

EMAR-FAB calculado para [M + Na] C₃₉H₇₀N₂O₂₀Na (m/z): 909.4420; encontrado: 909.4501.

Dendrón de segunda generación protegido con espaciador (**30**).



Capítulo 7

El dendrón **29** (938 mg; 1.1 mmol) y DMAP (64 mg; 0.5 mmol), se disuelven en piridina seca (5 ml) y se diluyen con diclorometano (10 ml). Posteriormente se añade el anhídrido benciliden-2,2-bis(oximetil) propiónico (**5**) (3.6 g; 8.6 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 h a 40°C. El crudo de reacción se trata con una mezcla de piridina:agua (1:1) durante 12 h. Posteriormente se diluye con CH₂Cl₂ (500 ml) y se lava con NaHSO₄, 1M (2 x 200 ml), Na₂CO₃ (10%) (2 x 200 ml) y una disolución saturada de NaCl (1 x 200 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro y se evapora. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente CH₂Cl₂/isopropanol (9.7:0.3), obteniéndose el dendrón **30** como un aceite incoloro (1.9 g; 85 %).

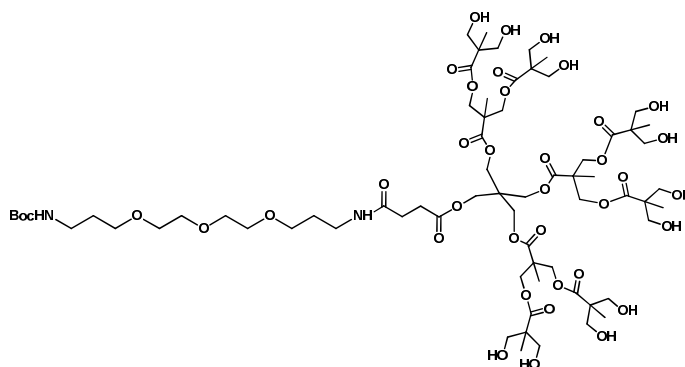
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.28-7.42 (m, 30H, Ar); 5.41 (s, 6H, CH-Ph); 4.57 (d, 12H, *J*= 11.6 Hz, CH₂ c); 4.37 (s, 12H, CH₂ b); 3.94 (s, 8H, CH₂ a + CH₂ a'); 3.49-3.66 (m, 24 H, CH₂-O + CH₂ c); 3.24 (m, 4H, CH₂-NH); 2.53 (m, 2H, CH₂CO); 2.33 (m, 2H, CH₂CO); 1.76 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.45 (s, 9H, CH₃ Boc); 1.21 (s, 9H, CH₃ b'); 0.94 (s, 9H, CH₃ c).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 173.3 (CO-C-CH₂ c); 172.1 (COO); 171.8 (CO-C-CH₂ b); 171.1 (CONH); 156.1 (CO_{Boc}); 137.9 (C_{Ar}); 128.9 (CH_{Ar}); 128.1 (CH_{Ar}); 126.2 (CH_{Ar}); 101.8 (CH-Ar); 101.6 (CH-Ar); 78.8 (C_{Boc}); 73.4 (CH₂ c); 70.5 (CH₂-O); 70.4 (CH₂-O); 70.1 (CH₂-O); 70.0 (CH₂-O); 69.4 (CH₂-O); 65.0 (CH₂ b); 60.4 (CH₂ a + CH₂ a'); 47.0 (C-CH₂ b); 42.6 (C-CH₂ c + CH₂ a'); 38.5 (CH₂CH₂NHCO); 37.4 (CH₂CH₂NHBoc); 29.7 (NOC-CH₂CH₂-COO); 29.4 (CH₂CH₂NH); 29.1 (NOC-CH₂CH₂-COO); 28.5 (CH₃ Boc); 17.7 (CH₃ c); 17.6 (CH₃ b').

IR (NaCl, cm⁻¹) ν: 1739, 1121, 1093.

EMAR-FAB calculado para [M+ Na] C₁₁₁H₁₄₂N₂O₃₈Na (m/z): 2133.9138; encontrado: 2133.9294.

Dendrón de primera generación desprotegido con espaciador (31).



A una disolución del dendrón **30** (1.0 g, 0.5 mmol) en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) se añade una cantidad catalítica de paladio al 10% sobre carbono. La mezcla se somete a hidrogenación a temperatura y presión ambiente durante 12 horas. La mezcla de reacción se filtra sobre celita y el disolvente se evapora a vacío dando lugar al dendrón **31** como un aceite incoloro (0.74 g, 99%).

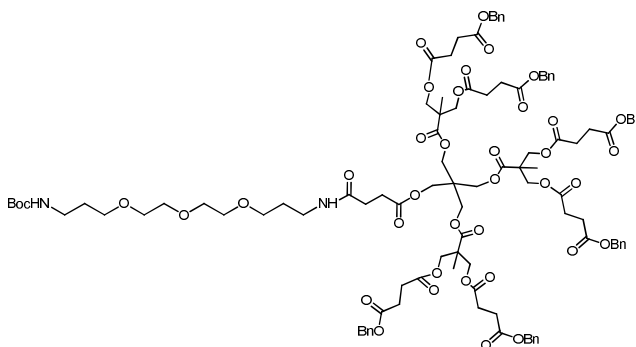
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 4.31 (m, 20H, $\text{CH}_2_a + \text{CH}_2_{a'} + \text{CH}_2_b$); 3.51-3.72 (m, 36 H, $\text{CH}_2\text{-O} + \text{CH}_2_c$); 3.28 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 3.14 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 2.69 (m, 2H, CH_2CO); 2.52 (m, 2H, CH_2CO); 1.76 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 1.45 (s, 9H, CH_3_{Boc}); 1.34 (s, 9H, CH_3_b); 1.17 (s, 9H, CH_3_b).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 174.6 (CO); 172.4 (CO); 157.3 (CO_{Boc}); 78.5 (C_{Boc}); 70.2 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 69.8 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 68.5 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 64.8 (CH_2_b); 64.5 (CH_2_b); 62.5 ($\text{CH}_2_a + \text{CH}_2_{a'}$); 50.4 (C-CH_2_c); 46.7 (C-CH_2_b); 42.7 (C-CH_2_a); 37.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$); 36.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$); 29.9 ($\text{NOC-CH}_2\text{CH}_2\text{-COO}$); 29.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 29.0 ($\text{NOC-CH}_2\text{CH}_2\text{-COO}$); 27.5 (CH_3_{Boc}); 16.9 (CH_3_b); 16.0 (CH_3_c).

IR (NaCl , cm^{-1}) ν : 3390, 2943, 2872, 1723.

EMAR-FAB calculado para $[M+ Na]$ $C_{69}H_{118}N_2O_{38}Na$ (m/z): 1605.7260; encontrado: 1605.7253.

Dendrón de primera generación con espaciador funcionalizado con monosuccinato de bencilo (32).



A una disolución del dendrón **29** (532 mg, 0.6 mmol), ácido succínico monobencil ester **18** (1.2 g, 5.8 mmol) y DPTS (1.0 g, 3.6 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (15 ml) se le añade DCC (1.2 g, 5.8 mmol) disuelta en CH_2Cl_2 anhidro (5 ml). La reacción se mantiene en agitación a 40°C durante 15h. La mezcla de reacción se filtra sobre celita. El crudo se diluye en CH_2Cl_2 (20 ml) y se lava con una disolución saturada de $NaHCO_3$ (3 x 35 ml), se combinan las fases orgánicas, se secan con $MgSO_4$ anhidro y se evapora. Se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente AcOEt/Hexano (6:1) obteniéndose el compuesto **32** como un aceite incoloro (807 mg, 67 %).

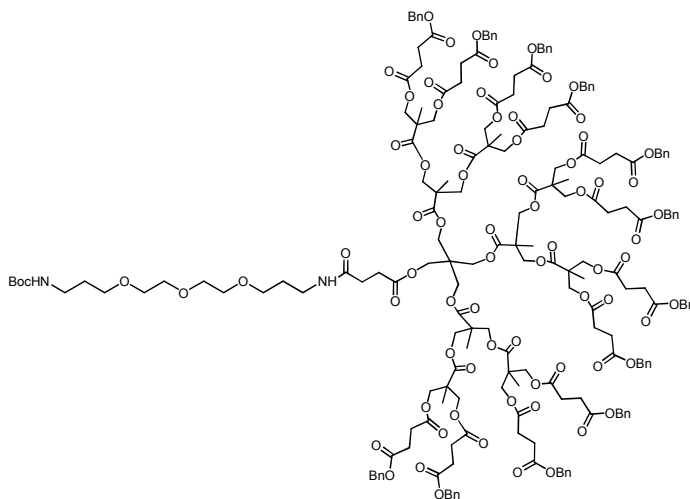
1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.35 (m, 30H, Ar); 5.12 (s, 12H, $\underline{CH_2}$ -Ph); 4.24 (s, 12H, CH_2 b); 4.19 (s, 6 H, CH_2 a); 4.19 (s, 2 H, CH_2 a); 3.63-3.52 (m, 12 H, $\underline{CH_2}$ -O); 3.31 (m, 2H, CH_2 -NH); 3.22 (m, 2H, CH_2 -NH); 2.65 (m, 26H, $\underline{CH_2}$ CO); 2.43 (m, 2H, $\underline{CH_2}$ CO); 1.76 (m, 4H, O- $\underline{CH_2CH_2}$ CH₂-NH); 1.45 (s, 9H, CH_3 Boc); 1.22 (s, 9H, CH_3 b).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 175.8 (CO); 175.6 (CO); 175.5 (CO); 175.3 (CO); 174.5 (CO); 159.6 (CO_{Boc}); 139.6 (C_{Ar}); 132.1 (CH_{Ar}); 131.8 (CH_{Ar}); 131.8 (CH_{Ar}); 82.1 (C_{Boc}); 74.1 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 73.8 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 73.6 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 73.3 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 70.1 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$); 68.9 (CH_2b); 65.8 ($\text{CH}_2\text{a} + \text{CH}_2\text{a}$); 50.1 ($\text{C-CH}_2\text{b}$); 46.5 ($\text{C-CH}_2\text{a}$); 41.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$); 38.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$); 33.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 32.6 ($\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$); 30.4 ($\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$); 32.0 (CH_3Boc); 21.3 (CH_3b).

IR (NaCl , cm^{-1}) ν : 2935, 1738, 1152.

EMAR-FAB calculado para $[\text{M}+\text{Na}] \text{C}_{105}\text{H}_{130}\text{N}_2\text{O}_{38}\text{Na}$ (m/z): 2049.8199; encontrado: 2049.8232.

Dendrón de segunda generación con espaciador funcionalizado con monosuccinato de bencilo (33).



A una disolución del dendrón **31** (373 mg, 0.2 mmol), ácido succínico monobencil ester **18** (941 mg, 4.5 mmol) y DPTS (833 mg, 2.8 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (8 ml) se le añade DCC (932 mg, 4.5 mmol) disuelta en CH_2Cl_2 anhidro (2 ml). La reacción se mantiene en agitación a 40°C durante 15h. La mezcla de reacción se filtra sobre celita. El crudo se diluye en CH_2Cl_2 (15 ml) y se lava con una disolución saturada

Capítulo 7

de NaHCO₃ (3 x 30 ml). Se combinan las fases orgánicas, se secan con MgSO₄ anhidro y se evapora. Se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente AcOEt/Hexano (6:1) obteniéndose el dendrón **33** como un aceite incoloro (619 mg, 68 %).

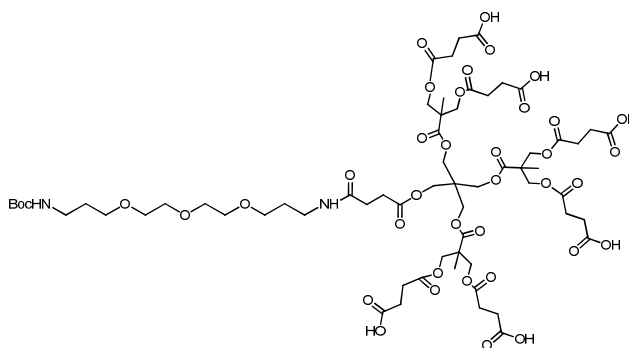
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.32 (m, 60H, Ar); 5.16 (s, 24H, CH₂-Ph); 4.25 (m, 44H, CH₂_a + CH₂_{a'} + CH₂_b + CH₂_c); 3.52-3.72 (m, 12 H, CH₂-O); 3.29 (m, 2H, CH₂-NH); 3.19 (m, 2H, CH₂-NH); 2.70 (m, 50H, CH₂CO); 2.49 (m, 2H, CH₂CO); 1.75 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.45 (s, 9H, CH₃ Boc); 1.36 (s, 9H, CH₃ b'); 1.18 (s, 9H, CH₃ b').

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 171.9 (CO); 171.7 (CO); 171.0 (CO); 170.9 (CO); 156.0 (CO_{Boc}); 135.8 (C_{Ar}); 128.5 (CH_{Ar}); 128.3 (CH_{Ar}); 128.2 (CH_{Ar}); 78.9 (C_{Boc}); 70.5 (CH₂-O); 70.2 (CH₂-O); 70.1 (CH₂-O); 69.5 (CH₂-O); 66.5 (CH₂-Ph); 65.3 (CH₂_c); 65.1 (CH₂_b); 60.4 (CH₂_a + CH₂_{a'}); 46.8 (C-CH₂_b); 46.4 (C-CH₂_c); 42.8 (C-CH₂_a); 38.5 (CH₂CH₂NHCO); 37.4 (CH₂CH₂NHBoc); 29.3(CH₂CH₂NH); 29.0(OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.9 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.5 (CH₃ Boc); 17.7 (CH₃ c'); 17.5 (CH₃ b').

IR (NaCl, cm⁻¹) υ: 2960, 1738, 1153.

EM (ESI) calculado para C₂₀₁H₂₃₈N₂O₇₄: 3863.5 [M]⁺; encontrado: 3885.1 [M+ Na]⁺.

Dendrón de primera generación con espaciador funcionalizado con ácido succínico (34).



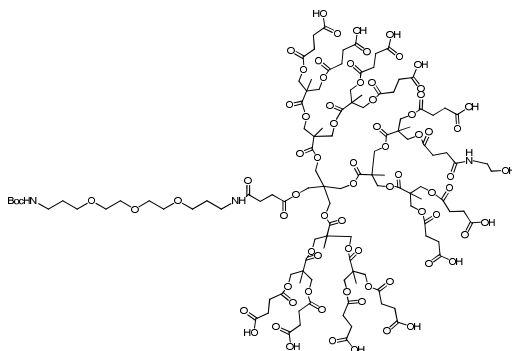
A una disolución del dendrón **32** (500 mg, 0.25 mmol) en CH₂Cl₂/MeOH (1:1) se añade una cantidad catalítica de paladio al 10% sobre carbono. La mezcla se somete a hidrogenación a temperatura y presión ambiente durante 12 horas. La mezcla de reacción se filtra sobre celita y el disolvente se evapora a vacío dando lugar al compuesto **34** como un aceite incoloro (363 mg, 99%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 4.38 (s, 12H, CH₂ b); 4.29 (s, 6 H, CH₂ a); 4.19 (s, 2 H, CH₂ a); 3.69-3.53 (m, 12 H, CH₂-O); 3.30 (m, 2H, CH₂-NH); 3.16 (m, 2H, CH₂-NH); 2.65 (m, 28H, CH₂CO); 1.76 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.45 (s, 9H, CH₃ Boc); 1.28 (s, 9H, CH₃ b').

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 175.7 (CO); 175.5 (CO); 175.3 (CO); 174.5 (CO); 158.1 (CO_{Boc}); 79.1 (C_{Boc}); 71.1 (CH₂-O); 70.0 (CH₂-O); 69.3 (CH₂-O); 66.3 (CH₂ b); 62.3 (CH₂ a + CH₂ a); 43.5 (C-CH₂ b); 43.2 (C-CH₂ a); 38.1 (CH₂CH₂NHCO); 37.2 (CH₂CH₂NHBoc); 30.1 (CH₂CH₂NH); 29.7 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 29.1 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.3 (CH₃ Boc); 17.5 (CH₃ b').

EMAR-FAB calculado para [M + Na] C₆₃H₉₄N₂O₃₈Na (m/z): 1509.5382; encontrado: 1509.5491.

Dendrón de segunda generación con espaciador funcionalizado con ácido succínico (35).

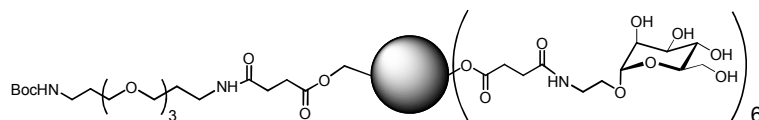


A una disolución del dendrón **33** (555 mg, 0.27 mmol) en CH₂Cl₂/MeOH (1:1) se añade una cantidad catalítica de paladio al 10% sobre carbono. La mezcla se somete a hidrogenación a temperatura y presión ambientes durante 12 horas. La mezcla de reacción se filtra sobre celita y el disolvente se evapora a vacío dando lugar al compuesto **35** como un aceite incoloro (399 mg, 99%).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 4.36 (s, 12H, CH₂_b); 4.31 (s, 8H, CH₂_a + CH₂_{a'}); 4.26 (s, 24H, CH₂_c); 3.69-3.51 (m, 12 H, CH₂-O); 3.28 (m, 2H, CH₂-NH); 3.14 (m, 2H, CH₂-NH); 2.62 (m, 52 H, CH₂CO); 1.76 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.45 (s, 9H, CH₃ Boc); 1.36 (s, 9H, CH₃_b); 1.28 (s, 18H, CH₃_c).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 174.6 (CO); 173.2 (CO); 172.5 (CO); 172.3 (CO); 172.2 (CO); 172.1 (CO); 172.0 (CO); 157.1 (CO_{Boc}); 78.6 (C_{Boc}); 70.1 (CH₂-O); 69.8 (CH₂-O); 68.5 (CH₂-O); 65.3 (CH₂_b + CH₂_c); 62.7 (CH₂_a + CH₂_{a'}); 42.6 (C-CH₂_a + C-CH₂_b + C-CH₂_c); 37.3 (CH₂CH₂NHCO); 36.5 (CH₂CH₂NHBoc); 29.5 (CH₂CH₂NH); 29.0 (CH₂CH₂NH); 28.7 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.4 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 27.5 (CH₃ Boc); 16.9 (CH₃_c); 16.7 (CH₃_b).

Glicodendrón de manosa de primera generación con espaciador (36).



A una disolución del dendrón **34** (70 mg, 4.7×10^{-3} mmol) y el derivado de manosa **17** (126 mg, 0.56 mmol) en DMF anhidra (4 ml) se añade DIC (88 μ l, 0.56 mmol) y HOBT (76 mg, 0.56 mmol). La reacción se mantiene a 40°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente y el crudo se purifica empleando sephadex LH20 en MeOH obteniéndose el glicodendrón **36** como un sólido blanco (112 mg, 88%).

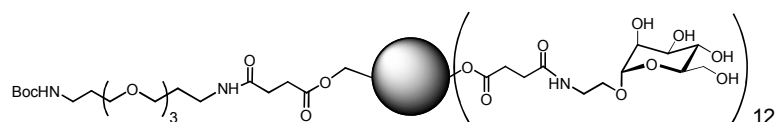
$[\alpha]_{D^{20}}$: + 34.9 (c 0.85, MeOH).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, D_2O) δ : 4.96 (s, 6H, $\text{H}_{1\text{manosa}}$); 4.39-4.33 (m, 20H, $\text{CH}_{2\text{a} + \text{b}}$); 4.04-3.69 (m, 54H, $\text{H}_2 + \text{H}_3 + \text{H}_4 + \text{H}_5 + \text{H}_6$ manosa + $\text{CH}_2\text{-O} + \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{C}_1$ manosa); 3.67 (m, 12H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{C}_1$ manosa); 3.47 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 3.33 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 2.78-2.67 (m, 28H, CH_2CO); 1.87 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 1.53 (s, 9H, CH_3 Boc); 1.38 (s, 9H, CH_3 b).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, D_2O) δ : 174.3 (CO); 174.2 (CO); 174.1 (CO); 173.7 (CO); 157.0 (CO_{Boc}); 99.7 (CH_1 manosa); 78.7 (C_{Boc}); 72.8 ($\text{CH}_{\text{manosa}}$); 70.5 ($\text{CH}_{\text{manosa}}$); 70.0 ($\text{CH}_{\text{manosa}}$); 69.6 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 69.4 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 68.5 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 66.7 ($\text{CH}_{\text{manosa}}$); 65.8 (CH_2 b); 63.6 (CH_2 a); 62.2 (CH_2 a); 60.9 (CH_2 C_6 manosa); 46.6 (C-CH_2 b); 42.6 (C-CH_2 a); 38.9 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OC}_1$ manosa); 37.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$); 36.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$); 30.0 ($\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$); 29.2 ($\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$); 28.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 28.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 32.0 (CH_3 Boc); 17.0 (CH_3 b).

EM (MALDI-ToF) calculado para $\text{C}_{111}\text{H}_{184}\text{N}_8\text{O}_{68}$: 2717.1 $[\text{M}]^+$; encontrado: 2739.6 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Glicodendrón de manosa de segunda generación con espaciador (37).



A una disolución del dendrón **35** (73 mg, 2.6×10^{-3} mmol) y el derivado de manosa **17** (140 mg, 0.63 mmol) en DMF anhidra (4 ml) se añade DIC (99 μ l, 0.63 mmol) y HOBT (85 mg, 0.63 mmol). La reacción se mantiene a 40°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente y el crudo se purifica empleando sephadex LH20 en MeOH obteniéndose el glicodendrón **37** como un sólido blanco (110 mg, 80%).

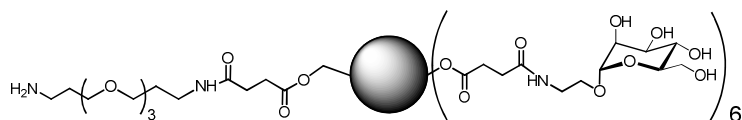
$[\alpha]_{D^{20}}$: + 45.3 (c 1, MeOH).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, D_2O) δ : 4.80 (s, 12H, H_1 manosa); 4.29 (s, 12H, CH_2 b); 4.19 (m, 32H, CH_2 a + CH_2 c); 4.88-3.59 (m, 96H, $\text{H}_2 + \text{H}_3 + \text{H}_4 + \text{H}_5 + \text{H}_6$ manosa + $\text{CH}_2\text{-O} + \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{C}_1$ manosa); 3.57-3.52 (m, 24H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{C}_1$ manosa); 3.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 3.33 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 2.63-2.51 (m, 52H, CH_2CO); 1.70 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 1.36 (s, 9H, CH_3 Boc); 1.27 (s, 9H, CH_3 b); 1.20 (s, 18H, CH_3 c).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, D_2O) δ : 174.1 (CO); 173.4 (CO); 173.5 (CO); 157.3 (CO_{Boc}); 79.0 (C_{Boc}); 99.7 (CH_1 manosa); 72.8 (CH manosa); 70.6 (CH manosa); 70.0 (CH manosa); 69.7 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 69.4 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 68.5 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 66.7 (CH manosa); 65.8 (CH_2 b); 63.6 (CH_2 a'); 62.2 (CH_2 a); 65.9 (CH_2 b); 65.8 (CH_{2a}); 60.9 ($\text{CH}_{2c} + \text{CH}_2$ C6manosa); 46.9 (C-CH_{2a}); 46.8 (C-CH_{2b}); 46.4 (C-CH_{2c}); 39.0 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OC}_1$ manosa); 37.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$); 36.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$); 30.0 ($\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$); 29.2 ($\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$); 28.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 28.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 27.8 (CH_3 Boc); 17.0 (CH_3 b' + CH_3 c').

EM (MALDI-ToF) calculado para $\text{C}_{213}\text{H}_{346}\text{N}_{14}\text{O}_{134}$: 5244.1 $[\text{M}]^+$; encontrado: 5267.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Glicodendrón de manosa de primera generación con espaciador desprotegido 1GLL(SucMan)₆.



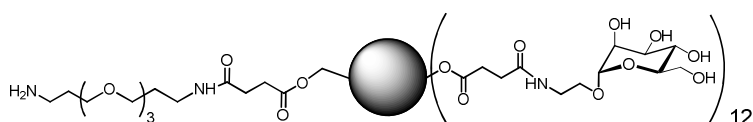
Se disuelve el glicodendrón **36** (100 mg, 3.9×10^{-2} mmol) en agua (1ml) y se le añade ácido trifluoroacético (2 ml). La disolución se deja en agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente y se purifica utilizando sephadex LH20 (MeOH) obteniéndose el glicodendrón 1GLL(SucMan)₆ como un sólido blanco (93 mg, 97%).

$[\alpha]_{D^{20}}$: + 40.3 (c 0.90, MeOH).

¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ : 4.71 (s, 6H, H_{1manosa}); 4.12-4.23 (m, 12H, CH₂ b); 3.47-3.86 (m, 74H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅ + H₆ manosa + CH₂-O + NHCH₂CH₂C₁ manosa + CH₂ a); 3.29-3.41 (m, 12H, NHCH₂CH₂C₁ manosa); 3.18 (m, 2H, CH₂-NH); 3.04 (m, 2H, CH₂-NH); 2.47-2.60 (m, 28H, CH₂CO); 1.88 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.70 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.12 (d, 9H, CH₃ b').

¹³C-RMN (125 MHz, D₂O) δ : 174.3 (CO); 174.2 (CO); 99.8 (CH₁ manosa); 72.9 (CH manosa); 70.5 (CH manosa); 70.0 (CH manosa); 69.6 (CH₂-O); 69.4 (CH₂-O); 68.7 (CH₂-O); 66.6 (CH manosa); 65.9 (CH₂ b); 63.6 (CH₂ a'); 62.3 (CH₂ a); 60.9 (CH₂ C₆manosa); 46.4 (C-CH₂ b); 42.3 (C-CH₂ a); 39.0 (NHCH₂CH₂OC₁ manosa); 37.7 (CH₂CH₂NHCO); 36.3 (CH₂CH₂NH); 30.3 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 29.3 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.2 (CH₂CH₂NH); 26.5 (CH₂CH₂NH); 16.4 (CH₃ b').

Glicodendrón de manosa de segunda generación con espaciador desprotegido 2GLL(SucMan)₁₂.



Se disuelve el glicodendrón **37** (100 mg, 3.9×10^{-2} mmol) en agua (1ml) y se le añade ácido trifluoroacético (2 ml). La disolución se deja en agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente y se purifica utilizando sephadex LH20 (MeOH) obteniéndose el glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂ como un sólido blanco (96 mg, 98%).

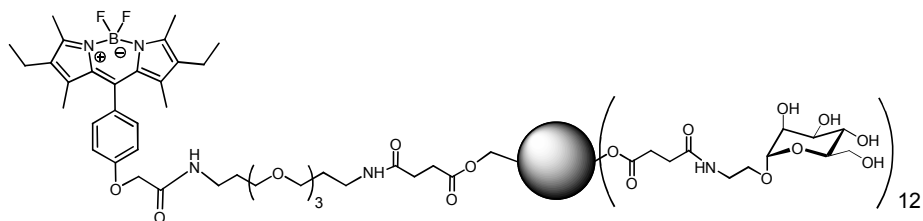
$[\alpha]_{D^{20}}$: + 51.9 (c 0.80, MeOH).

¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ : 4.78 (s, 12H, H₁ manosa); 4.10- 4.28 (m, 24H, CH₂ c); 3.47-3.86 (m, 128 H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅+ H₆ manosa + CH₂-O + NHCH₂CH₂C₁ manosa + CH₂ a + CH₂ b); 3.29-3.41 (m, 24H, NHCH₂CH₂C₁ manosa); 3.18 (m, 2H, CH₂-NH); 3.04 (m, 2H, CH₂-NH); 2.46-2.60 (m, 52H, CH₂CO); 1.88 (m, 2H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.70 (m, 2H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.26 (s, 9H, CH₃ b'); 1.12 (s, 9H, CH₃ c'); 1.08 (s, 9H, CH₃ c');

¹³C-RMN (125 MHz, D₂O) δ :177.0 (CO); 174.9 (CO); 99.7 (CH₁ manosa); 72.8 (CH manosa); 70.5 (CH manosa); 70.1 (CH manosa); 69.7 (CH₂-O); 69.4 (CH₂-O); 68.5 (CH₂-O); 66.8 (CH manosa); 65.9 (CH₂ b); 65.9 (CH₂ b); 64.4 (CH₂ a); 60.9 (CH₂ c + CH₂ C₆manosa) 46.8 (C-CH₂ d); 46.6 (C-CH₂ b); 46.3 (C-CH₂ c); 39.0 (NHCH₂CH₂OC₁ manosa); 37.4 (CH₂CH₂NHCO); 36.5 (CH₂CH₂NH₂); 30.3 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 29.3 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.0 (CH₂CH₂NH); 26.2 (CH₂CH₂NH); 17.2 (CH₃ b' + CH₃ c').

7.3.3. Marcaje fluorescente de dendrones.

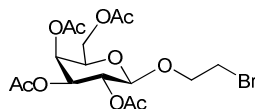
Glicodendrón de manosa de segunda generación marcado con bodipy 2GLLBodipy(SucMan)₁₂.



A una disolución del glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂ (30.0 mg, 5.8 x 10⁻³ mmol) y el derivado de bodipy **41** (5.3 mg, 1.2 x 10⁻² mmol) en DMF anhidra (3 ml) se añade EDC (3.3 mg, 1.7 x 10⁻² mmol), HOBt (2.3 mg, 1.7 x 10⁻² mmol) y Et₃N (3 µl, 1.7 x 10⁻² mmol). La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 16 horas. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente y el crudo se purifica empleando sephadex LH20 en MeOH obteniéndose el glicodendrón 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ como un sólido rojo (30.2 mg, 93%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.21 (m, 4H, Ar_{bodipy}); 4.76 (s, 12H, H₁ manosa); 4.58 (s, 2H, CH₂_{bodipy}CON) + 4.09- 4.38 (m, 24H, CH₂ c); 3.11-3.83 (m, 156 H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅ + H₆ manosa + CH₂-O + NHCH₂CH₂C₁ manosa + CH₂ a + CH₂ b + CH₂-NH); 2.49- 2.67 (m, 58H, CH₂CO + CH₃_{bodipy}); 2.58 (m, 4H, CH₂_{bodipy}); 1.71 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.02-1.38 (s, 33H, CH₃_{bodipy} + CH₃ b' + CH₃ c'); 0.98 (t, 6H, CH₃_{bodipy})

2-Bromoetil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosido (**43**).¹¹²



A una disolución de 2-bromoetanol (1.15 mL, 13.1 mmol) y 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-α,β-D-galactose (**42**) (5.1 g, 13.1 mmol) en CH₂Cl₂ (24 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se añade BF₃.Et₂O (8.5 ml, 67.0 mmol) gota a gota. Tras una hora, se deja que la disolución alcance temperatura ambiente. Después de 24 horas la mezcla de reacción se añade sobre agua-hielo (20 mL) y se extrae con AcOEt (3 x 30 mL). La combinación de los extractos orgánicos se lava con agua (20 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (20 mL), agua (20 mL) y se secan sobre MgSO₄. El disolvente se elimina a vacío y el residuo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente hexano:AcOEt (3:1) obteniéndose el compuesto 2-bromoetil-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopiranosido (**43**) como un sólido blanco (3.9 g, 65%).

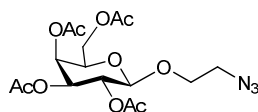
¹¹² Davis, B.G.; Maughan, M.A.T.; Ullman, A.; Jones, J.B. *Tetrahedron: Asymm.* **2000**, *11*, 245–262.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: - 4.1 (c 1, CHCl_3); Lit.¹³⁵ $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: -5.0 (c 1.4, CHCl_3).

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.34 (m, 1H, H_4); 5.19 (dd, 1H, $J_{1,2} = 8$ Hz y $J_{2,3} = 12$ Hz, H_2); 5.00 (dd, 1H, $J_{2,3} = 12$ Hz y $J_{3,4} = 4$ Hz, H_3); 4.52 (d, 1H, $J_{1,2} = 8$ Hz, H_1); 4.07-4.17 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-O} + \text{H}_6$); 3.89-3.92 (m, 1H, H_5); 3.76-3.83 (m, 1H, H_6'); 3.40-3.50 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$); 2.12, 2.05, 2.02, 1.96 (4s, 12 H, 4 x CH_3CO)

$^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 170.2 (CO); 170.0 (CO); 169.9 (CO); 169.3 (CO); 101.3 (C1); 70.7 (C3); 70.6 (C5); 69.6 (C6); 68.4 (C4); 66.8 (C2); 61.1 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 29.8 ($\text{CH}_2\text{-N}_3$); 20.7 (CH_3); 20.5 (CH_3); 20.5 (CH_3); 20.4 (CH_3).

2-Azidoetil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosido (44).



2-Bromoetil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosido (**43**) (2.5 g, 5.51 mmol) y azida sódica (2.9g, 44.05 mmol) se disuelven en DMF anhidra (60 mL) y la mezcla de reacción se mantiene en agitación a 50°C durante 15 h. El crudo de reacción se diluye con AcOEt (200 mL) y se filtra. El disolvente se elimina a vacío obteniéndose el 2-azidoetil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosido (**44**) (2.3g, 99%) como un sólido blanco.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: - 27 (c 1, CHCl_3); Lit.¹³⁶ $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: -12 (c 1.7, CHCl_3).

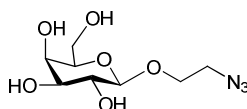
¹³⁵ Dahm, J.; Frejd, T.; Gronberg, J.; Law, T.; Magnusson, G.; Noori, G. *Carbohydr. Res.* **1983**, *116*, 303-307.

¹³⁶ Chernyak, A.Y.; Sharma, G.V.M.; Kononov, L.O.; Krishna, P.R.; Levinsky, A.B.; Kochetkov, N.K. *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 303-309.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 5.34 (m, 1H, H₄); 5.18 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 7.8 Hz y $J_{2,3}$ = 10.5 Hz, H₂); 4.97 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 10.5 Hz y $J_{3,4}$ = 3.3 Hz, H₃); 4.52 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7.8 Hz, H₁); 3.96-4.16 (m, 3H, H₅ + H₆ + H₇); 3.86-3.91 (m, 1H, H_{6'}); 3.60-3.68 (m, 1H, H₇); 3.41-3.49 (m, 1H, H₈); 3.22-3.28 (m, 1H, H₈); 2.09, 2.01, 1.99, 1.92 (4s, 12H, 4 x CH₃CO).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 170.4 (CO); 170.2 (CO); 170.1 (CO); 169.5 (CO); 101.1 (C1); 70.9 (C3); 70.8 (C5); 68.5 (C2); 68.4 (C7); 67.0 (C4); 61.3 (C6); 50.6 (C8); 20.8 (CH₃); 20.7 (CH₃); 20.6 (CH₃); 20.5 (CH₃).

2-Azidoetil-β-D-galactopiranosido (45).



2-Azidoetil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosido (**44**) (1.25 g, 3.99 mmol) se disuelve en MeOH anhidro (30 mL) y se añade una disolución 1M de NaOMe en MeOH hasta que se alcanza pH 9. La mezcla de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Después, se neutraliza con resina Amberlite IR 120, se filtra y el disolvente se elimina a vacío obteniéndose el 2-azidoetil-β-D-galactopiranosido (**45**) (0.74 g, 99%) como un sólido blanco.

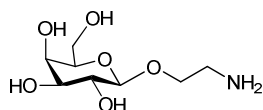
$[\alpha]_{D^{23}}$: - 2.1 (c 1, MeOH); Lit.¹³⁷ $[\alpha]_{D^{23}}$: -3.6 (c 1.11, MeOH).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 4.29 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7.2 Hz, H₁); 4.00-4.08 (m, 1H, H₇); 3.86 (m, 1H, H₄); 3.71-3.8 (m, 3H, H₆ + H_{6'} + H₇); 3.47-3.58 (m, 5H, H₂ + H₃ + H₅ + H₈).

¹³⁷ Susaki, H.; Susaki, K.; Ikeda, M.; Yamada, H.; Watanabe, H.K. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 2090-2096.

^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD) δ : 105.0 (C1); 76.7 (C3); 74.9 (C5); 72.4 (C2); 70.2 (C4); 69.17 (C6); 62.4 (C7); 52.0 (C8).

2-Aminoetil- β -D-galactopiranosido (46).



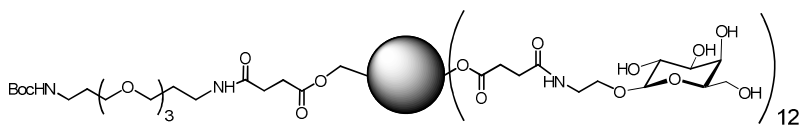
2-Azidoetil- β -D-galactopiranosido (**45**) (0.25 g, 1.00 mmol) se disuelve en MeOH (8 mL) se añade Pd-C 10% (cat.) a la mezcla de reacción y se hidrogena a presión ambiente obteniéndose el 2-aminoetil- β -D-galactopiranosido (**46**) como un sólido blanco (0.22g, 99%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: - 11.3 (c 0.23, MeOH).

^1H RMN (300 MHz, D_2O) δ : 4.43 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7.8 Hz, H₁); 3.94-4.00 (m, 2H, H₄ + H₇); 3.66-3.82 (m, 5H, H₃ + H₅ + H₆ + H₇); 3.55 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 7.8 Hz y $J_{2,3}$ = 9.8 Hz, H₂); 2.80-2.90 (m, 2H, H₈).

^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD) δ : 105.2 (C1); 76.7 (C2); 74.9 (C3); 72.6 (C5); 72.2 (C6); 70.3 (C6); 62.5 (C7); 42.3 (C8).

Glicodendrón de galactosa de segunda generación con espaciador (47).



A una disolución del dendrón **35** (79 mg, 2.8×10^{-2} mmol) y el derivado de galactosa **46** (150 mg, 0.67 mmol) en DMF anhidra (4 ml) se añade DIC (105 μl , 0.67 mmol) y HOBT (91 mg, 0.67 mmol). La reacción se mantiene a 40°C durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente y el crudo se purifica empleando sephadex LH20 en MeOH obteniéndose el glicodendrón **47** como un sólido blanco (122 mg, 82%).

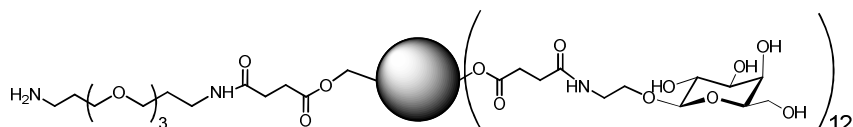
$[\alpha]_{D^{20}}$: + 38.6 (c 0.85, MeOH).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, D_2O) δ : 4.09- 4.42 (m, 56H, $\text{H}_{1\text{ galactosa}} + \text{CH}_2\text{ a} + \text{CH}_2\text{ a}' + \text{CH}_2\text{ b} + \text{CH}_2\text{ c}$); 3.27-3.96 (m, 132H, $\text{H}_2 + \text{H}_3 + \text{H}_4 + \text{H}_5 + \text{H}_6\text{ galactosa} + \text{CH}_2\text{-O} + \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{C}_1\text{ galactosa}$); 3.19 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 3.08 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 2.43-2.57 (m, 52H, CH_2CO); 1.71 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 1.37 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{ Boc}$); 1.26 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{ b}'$); 1.21 (s, 18H, $\text{CH}_3\text{ c}$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, D_2O) δ : 174.2 (CO); 173.7 (CO); 173.4 (CO); 157.4 (CO_{Boc}); 102.9 ($\text{CH}_{1\text{ galactosa}}$); 79.1 (C_{Boc}); 75.1 ($\text{CH}_{\text{ galactosa}}$); 72.7 ($\text{CH}_{\text{ galactosa}}$); 70.6 ($\text{CH}_{\text{ galactosa}}$); 69.9 ($\text{CH}_{\text{ galactosa}}$); 69.6 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 69.3 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 68.5 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 65.9 ($\text{CH}_2\text{ b}$); 63.6 ($\text{CH}_2\text{ a}'$); 62.3 ($\text{CH}_2\text{ a}$); 60.9 ($\text{CH}_2\text{ c}$); 60.7 ($\text{CH}_2\text{ C}_6\text{ galactosa}$); 47.1 ($\text{C-CH}_{2\text{a}}$); 46.9 ($\text{C-CH}_{2\text{b}}$); 46.3 ($\text{C-CH}_{2\text{c}}$); 39.1 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OC}_1\text{ galactosa}$); 37.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$); 36.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$); 29.8 ($\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$); 28.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 28.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 27.9 ($\text{CH}_3\text{ Boc}$); 17.2 ($\text{CH}_3\text{ b}' + \text{CH}_3\text{ c}$).

EM (MALDI-TOF) calculado para $\text{C}_{213}\text{H}_{346}\text{N}_{14}\text{O}_{134}$: 5244.1 $[\text{M}]^+$; encontrado: 5267.8 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Glicodendrón de galactosa de segunda generación con espaciador desprotegido 2GLL(SucGal)₁₂.



Se disuelve el glicodendrón **47** (90 mg, 1.7×10^{-3} mmol) en agua (1ml) y se le añade ácido trifluoroacético (2 ml). La disolución se deja en agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente y se purifica utilizando sephadex LH20 (MeOH) obteniéndose el glicodendrón 2GLL(SucGal)₁₂ como un sólido blanco (86 mg, 97%).

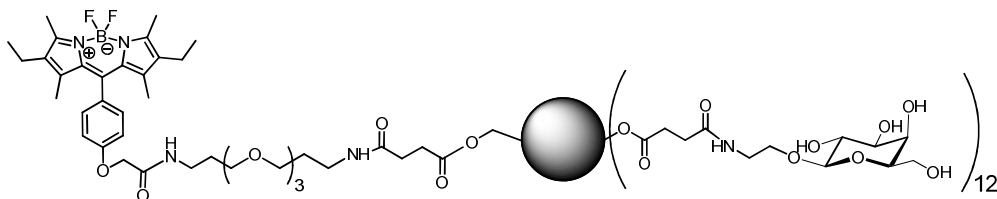
$[\alpha]_{D^{20}}$: + 31.9 (c 0.70, MeOH).

UV/VIS(H₂O-PBS) λ max (ϵ) = 524 nm.

¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ : 4.03- 4.47 (m, 36H, H₁ galactosa + CH₂ c); 3.05-3.90 (m, 154H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅+ H₆ galactosa + CH₂ a + CH₂ a' + CH₂ b + + CH₂-O + NHCH₂CH₂C₁ galactosa + CH₂-NH); 2.96 (m, 2H, CH₂-NH); 2.45-2.59 (m, 52H, CH₂CO); 1.73 (m, 2H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.55 (m, 2H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.27 (s, 9H, CH₃ b'); 1.13 (s, 9H, CH₃ c'); 1.09 (s, 9H, CH₃ c');

¹³C-RMN (125 MHz, D₂O) δ : 174.5 (CO); 173.7 (CO); 102.9 (CH₁ galactosa); 75.2 (CH galactosa); 72.8 (CH galactosa); 70.6 (CH galactosa); 70.0 (CH galactosa); 69.7 (CH₂-O); 69.3 (CH₂-O); 65.9 (CH₂ b); 63.7 (CH₂ a); 62.3 (CH₂ a); 61.0 (CH₂); 60.7 (CH₂ C₆galactosa); 47.2 (C-CH₂a); 47.0 (C-CH₂b); 46.4 (C-CH₂c); 39.1 (NHCH₂CH₂OC₁galactosa); 37.5 (CH₂CH₂NHCO); 36.5 (CH₂CH₂NHBoc); 29.9 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.8 (CH₂CH₂NH); 28.0 (CH₂CH₂NH); 17.4 (CH₃ b' + CH₃ c').

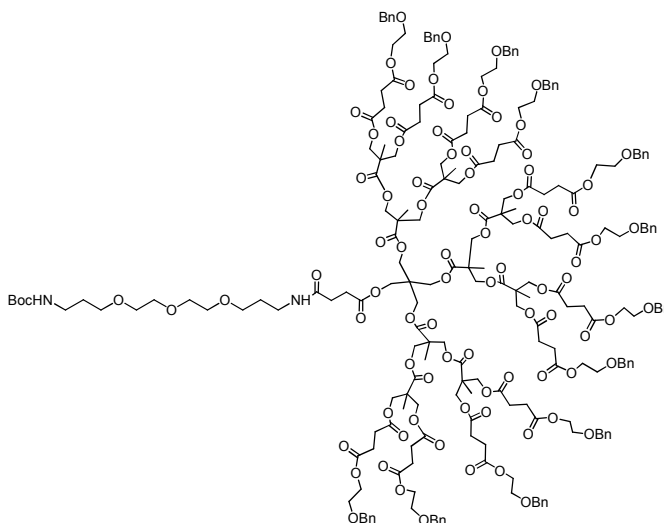
Glicodendrón de galactosa de segunda generación marcado con bodipy 2GLLBodipy(SucGal)₁₂.



A una disolución del glicodendrón 2GLL(SucGal)₁₂ (22.0 mg, 4.3 x 10⁻³ mmol) y el derivado de bodipy **41** (3.9 mg, 8.6 x 10⁻³ mmol) en DMF anhidra (3 ml) se añade EDC (2.5 mg, 1.3 x 10⁻² mmol), HOBt (1.8 mg, 1.3 x 10⁻² mmol) y Et₃N (2 µl, 1.3 x 10⁻² mmol). La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 16 horas. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente y el crudo se purifica empleando sephadex LH20-MeOH obteniéndose el glicodendrón 2GLLBodipy(SucGal)₁₂ como un sólido rojo (21.5 mg, 90%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.23 (m, 4H, Ar bodipy); 4.05- 4.56 (m, 38H, H₁ galactosa + CH₂_c + CH₂_{bodipy}CON); 3.10-3.92 (m, 154H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅+ H₆ galactosa + CH₂_a + CH₂_{a'} + CH₂_b + + CH₂-O + NHCH₂CH₂C₁ galactosa + CH₂-NH); 2.47-2.67 (m, 58H, CH₂CO + CH₃ bodipy); 2.60 (m, 4H, CH₂ bodipy); 1.69 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.02-1.38 (s, 33H, CH₃ bodipy + CH₃_{b'} + CH₃_{c'}); 0.98 (t, 6H, CH₃ bodipy).

Dendrón de segunda generación funcionalizado con benciloxietanol **48**.



A una disolución del dendrón **31** (100 mg, 6.3 x 10⁻² mmol), el ácido **49** (382 mg, 1.5 mmol) y DPTS (223 mg, 0.8 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (3 ml) se le añade DCC (309 mg, 1.5 mmol) disuelta en CH₂Cl₂ anhidro (1 ml). La reacción se mantiene en

Capítulo 7

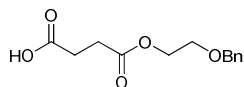
agitación a 40°C durante 15h. La mezcla de reacción se filtra sobre celita. El crudo se diluye en CH₂Cl₂ (10 ml) y se lava con una disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 20 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro y se purifica empleando sephadex LH 20 (CH₂Cl₂/MeOH) obteniéndose el dendrón **48** como un aceite incoloro (200 mg, 72%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.31 (m, 60H, Ar); 4.53 (s, 24H, CH₂-Ph); 4.19 (m, 68H, CH₂_a+ CH₂_{a'}+ CH₂_b + CH₂_c + OCH₂CH₂OBn); 3.63 (s, 24 H, OCH₂CH₂OBn); 3.51-3.60 (m, 12 H, CH₂-O); 3.26 (m, 2H, CH₂-NH); 3.18 (m, 2H, CH₂-NH); 2.61 (m, 50H, CH₂CO); 2.41 (m, 2H, CH₂CO); 1.72 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.42 (s, 9H, CH₃_{Boc}); 1.25 (s, 9H, CH₃_{b'}); 1.20 (s, 9H, CH₃_{b'}).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 172.3 (CO); 172.1 (CO); 171.8 (CO); 156.3 (CO_{Boc}); 138.0 (C_{Ar}); 129.8 (CH_{Ar}); 128.6 (CH_{Ar}); 127.9 (CH_{Ar}); 78.4 (C_{Boc}); 73.2 (CH₂-OBn); 70.6 (CH₂-O); 70.3 (CH₂-O); 70.2 (CH₂-O); 69.6 (CH₂-O); 67.9 (CH₂-OBn); 65.3 (CH₂_b); 64.0 (CH₂_c + OCH₂CH₂OBn); 62.8 (CH₂_a); 51.9 (C-CH₂_a); 46.9 (C-CH₂_b); 46.5 (C-CH₂_c); 38.5 (CH₂CH₂NHCO); 37.4 (CH₂CH₂NHBoc); 29.8 (CH₂CH₂NH); 28.9 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.6 (CH₃_{Boc}); 17.9 (CH₃_c); 17.6 (CH₃_{b'}).

EM (ESI) calculado para C₂₂₅H₂₈₆N₂O₈₆: 4391.8 [M]⁺; encontrado: 2219.3 [M+ 2Na]²⁺

Compuesto 49.



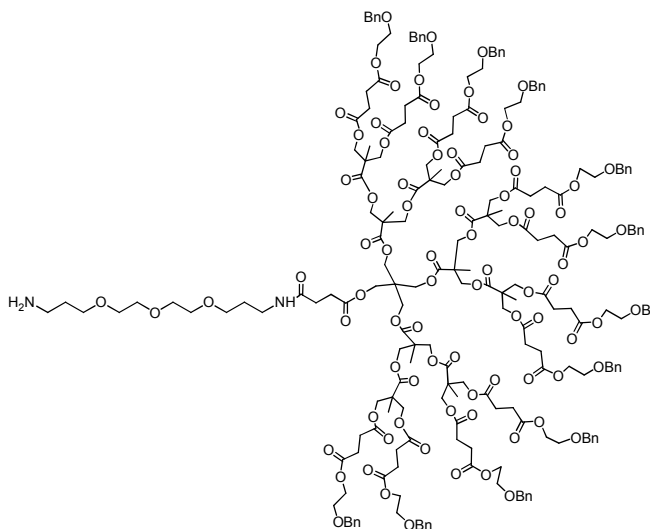
A una disolución del anhídrido succínico (500 mg, 5.0 mmol) en piridina seca (5 ml) se le añade 2-benciloxietanol (783μl, 5.5 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. El crudo de reacción se evapora a vacío, se disuelve en CH₂Cl₂ (10 ml) y se trata con una disolución de Na₂CO₃ al 10 % hasta alcanzar pH básico. La fase acuosa se lava con AcOEt (3 x 25 ml). Se combinan los extractos orgánicos se lava con NaCl_{sat} (30 ml), se seca empleando MgSO₄ anhidro y se evapora a vacío obteniéndose el compuesto **49** como un aceite incoloro (1.21 mg, 96%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.14 (m, 5 H, H_{Ar}); 4.35 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$); 4.06 (t, 2H, $J= 4.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-OSuc}$); 3.46 (t, 2H, $J= 4.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-OBn}$); 2.44 (m, 4 H, $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 178.0 (COOH); 172.3 (CO); 137.8 (C_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}); 127.8 (CH_{Ar}); 73.1 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$); 67.8 ($\text{CH}_2\text{-OBn}$); 64.0 ($\text{CH}_2\text{-OSuc}$); 28.8 ($\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$).

EMAR-FAB calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{Na}$: 275.0893; encontrado: 275.0887.

Dendrón de segunda generación funcionalizado con benciloxietanol y el espaciador desprotegido 50.



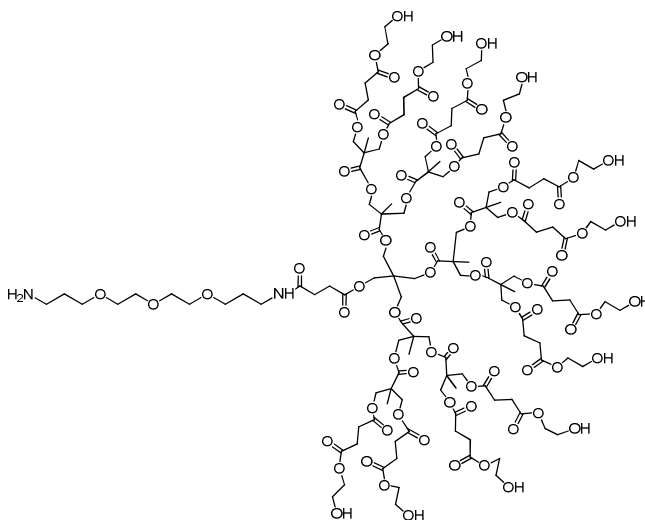
Se disuelve el dendrón **48** (73 mg, 1.7×10^{-2} mmol) en CH_2Cl_2 (1 ml) y se le añade ácido trifluoroacético (1 ml). La disolución se deja en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente y se purifica utilizando sephadex LH20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) obteniéndose el dendrón **50** como un aceite incoloro (70 mg, 99%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.28 (m, 60H, Ar); 4.57 (s, 24H, CH₂-Ph); 4.11-4.30 (m, 68H, CH₂_a + CH₂_{a'} + CH₂_b + CH₂_c + OCH₂CH₂OBn); 3.68-3.50 (m, 36 H, OCH₂CH₂OBn + CH₂-O); 3.29 (m, 2H, CH₂-NH); 3.18 (m, 2H, CH₂-NH); 2.66 (m, 50H, CH₂CO); 2.47 (m, 2H, CH₂CO); 1.82 (m, 2H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.65 (m, 2H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.16 (s, 9H, CH₃_b); 1.09 (s, 18H, CH₃_c).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 172.4 (CO); 172.3 (CO); 171.8 (CO); 138.1 (C_{Ar}); 129.8 (CH_{Ar}); 128.7 (CH_{Ar}); 128.0 (CH_{Ar}); 73.3 (CH₂-OBn); 70.5 (CH₂-O); 70.3 (CH₂-O); 70.2 (CH₂-O); 69.7 (CH₂-O); 68.0 (CH₂-OBn); 65.4 (CH₂_b); 64.0 (CH₂_c + OCH₂CH₂OBn); 62.9 (CH₂_a); 51.8 (C-CH₂_a); 46.9 (C-CH₂_b); 46.4 (C-CH₂_c); 38.6 (CH₂CH₂NHCO); 37.3 (CH₂CH₂NHBoc); 29.8 (CH₂CH₂NH); 29.0 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 18.0 (CH₃_c); 17.6 (CH₃_b).

EM (ESI) calculado para C₂₂₀H₂₇₈N₂O₈₄: 4291.8 [M]⁺; encontrado: 2169.5 [M+ 2Na]²⁺

Dendrón de segunda generación funcionalizado con etilenglicol 51.



A una disolución del dendrón **50** (40 mg, 9.3 x 10⁻³ mmol) en CH₂Cl₂/MeOH (1:1) (2 ml) se añade una cantidad catalítica de paladio al 10% sobre carbono. La mezcla

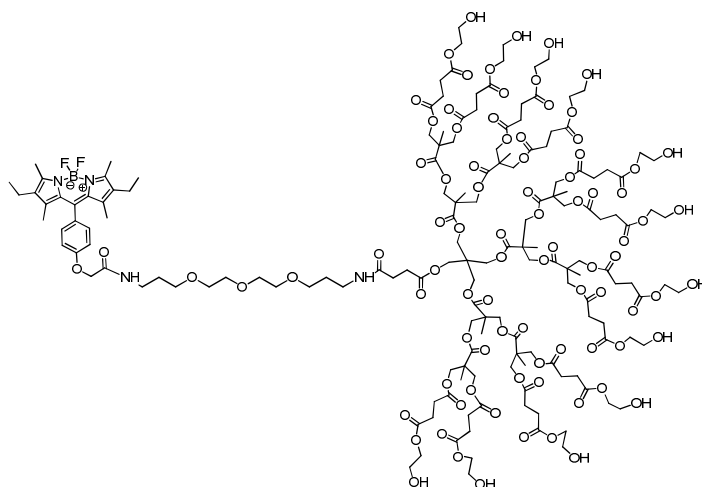
se somete a hidrogenación a temperatura y presión ambiente durante 12 horas. A continuación, la reacción se filtra sobre celita y el disolvente se evapora a vacío dando lugar al compuesto **51** como un aceite incoloro (30 mg, 99%).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 3.99-4.25 (m, 68H, CH_{2 a}+ CH_{2 a'}+ CH_{2 b} + CH_{2 c} + OCH₂CH₂OH); 3.42-3.69 (m, 36 H, OCH₂CH₂OH + CH₂-O); 3.20 (m, 2H, CH₂-NH); 3.11 (m, 2H, CH₂-NH); 2.55 (m, 50H, CH₂CO); 2.44 (m, 2H, CH₂CO); 1.65 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.19 (s, 9H, CH_{3 b}); 1.12 (s, 18H, CH_{3 c}).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 172.6 (CO); 172.1 (CO); 70.6 (CH₂-O); 70.3 (CH₂-O); 70.2 (CH₂-O); 69.6 (CH₂-O); 66.0 (CH₂-OH); 65.3 (CH_{2 b}); 64.0 (CH_{2 c} + OCH₂CH₂OH); 62.3 (CH_{2 a}); 52.0 (C-CH_{2 a}); 47.1 (C-CH_{2 b}); 46.4 (C-CH_{2 c}); 38.7 (CH₂CH₂NHCO); 37.6 (CH₂CH₂NHBoc); 29.9 (CH₂CH₂NH); 28.7 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 17.6 (CH_{3 b'} + CH_{3 c}).

EM (ESI) calculado para C₁₃₆H₂₀₆N₂O₈₄: 3211.2 [M]⁺; encontrado: 3234.9 [M+ Na]⁺ y 1629.1 [M+ 2Na]²⁺

Dendrón de segunda generación funcionalizado con etanol y marcado fluorescentemente con bodipy 52.



Una disolución del dendrón **51** (19.0 mg, 5.9×10^{-3} mmol) y el derivado de bodipy **41** (5.4 mg, 1.2×10^{-2} mmol) en DMF anhidra (2 ml) se añade EDC (3.5 mg, 1.8×10^{-2} mmol), HOBT (2.4 mg, 1.8×10^{-2} mmol) y Et₃N (2.5 μ l, 1.8×10^{-2} mmol). La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 16 horas. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente y el crudo se purificado empleando sephadex LH20 en MeOH obteniéndose el dendrón **52** como un aceite rojo (19.2 mg, 89%).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.09 (m, 4H, Ar_{bodipy}); 4.02-4.30 (m, 70H, CH_{2 a}+ CH_{2 a'}+ CH_{2 b} + CH_{2 c} + OCH₂CH₂OH + CH_{2 bodipy}CON); 3.43-3.70 (m, 36 H, OCH₂CH₂OH + CH₂-O); 3.18 (m, 4H, CH₂-NH); 2.59 (m, 50H, CH₂CO); 2.33 (m, 8H, CH₂CO + CH_{3 bodipy}); 2.15 (m, 4H, CH_{2 bodipy}); 1.66 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.21 (s, 6H, CH_{3 bodipy}); 1.18 (s, 9H, CH_{3 b'}); 1.11 (s, 18H, CH_{3 c'}); 0.97 (t, 6H, CH_{3 bodipy}).

EM (ESI) calculado para C₁₆₁H₂₃₃BF₂N₂O₈₆: 3647.4 [M]⁺; encontrado: 1846.3 [M+ 2Na]²⁺.

Obtención de células dendríticas para los ensayos de internalización.

Las DC inmaduras fueron obtenidas a partir de capa leucocitaria de donantes sanos (Sanquin). Las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) humanas se aislaron por gradiente de Ficoll y una selección positiva utilizando micropartículas con el anticuerpo anti-CD14 (MACS, Miltenyi Biotec). Las DC inmaduras fueron generadas mediante el cultivo de monocitos recién aislados ($\geq 95\%$ de pureza) durante 5 días en medio RPMI (definir y luego añadir a la lista de abreviaturas) 1640 suplementado con FCS (definir y luego añadir a la lista de abreviaturas) al 10%, 2 mM de L-glutamina, y 30 mg/ml de penicilina/estreptomicina en presencia de IL-4 y GM-CSF (500 U/ml y 800 U/ml, respectivamente; BioSource Internacional).

Ensayos de interacción/internalización de los glicodendrones 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ y 2GLLBodipy(SucGal)₁₂ empleando citometría de flujo.

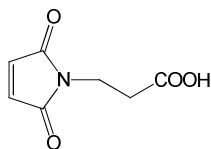
Las DC se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de los glicodendrones 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ y 2GLLBodipy(SucGal)₁₂ (6, 15, 30 60 µg/ml). Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se mantuvieron en hielo durante la medición por citometría de flujo (FACS Calibur, BD). La señal de interacción/internalización fue medida como el aumento de la fluorescencia de una media geométrica de células.

Experimentos de secreción de citoquinas IL-10 mediante ELISA.

Las DC se incubaron en presencia o ausencia de 10 µg/ml de los glicodendrones 2GLLBodipy(SucMan)₁₂ y 2GLLBodipy(SucGal)₁₂ y 10 ng/ml de LPS TLR4 ligando (Sigma) durante 18 horas a 37 C. La secreción de IL-10 fue medida en el sobrenadante por ELISA (International BioSource).

7.3.4. Conjugación de biomoléculas.

Ácido 3-maleimidopropionico (53).¹³¹



A una disolución de anhídrido maléico (5.00 g, 56.1 mmol) en ácido acético (70 ml) se añade gota a gota una disolución de β-alanina (5.50 g, 56.1 mmol) en ácido acético (25 ml) y la mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Posteriormente, se añade a la suspensión ácido acético (50 ml) y se calienta a

¹³¹ Mantovani, G.; Lecolley, F.; Tao, L.; Haddleton, D.M.; Clerx, J.; Cornelissen, J. J. L. M.; Velonia, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2966-2973.

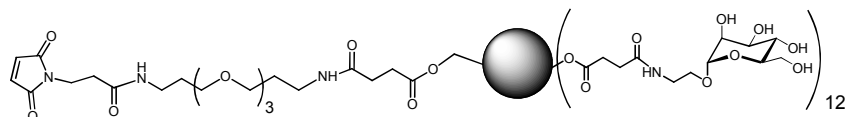
115°C durante una hora. Transcurrido este tiempo se deja que alcance temperatura ambiente y se mantiene en agitación durante 12 horas más. El disolvente es co-evaporado a presión reducida con tolueno y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente CH₂Cl₂/EtOAc (9:1) obteniéndose el compuesto **53** como un sólido blanco (3.86 g, 41%).

Pf: 110-112 °C; Pf_{lit}^{131} = 105-107 °C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 6.72 (s, 2H, CH=CH), 3.81 (t, 2H, J = 7.3 Hz, CH₂-N), 2.68 (t, 2H, J = 7.3Hz, CH₂-COOH).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 176.7 (COOH), 170.4 (CO), 134.4 (CH=CH), 33.5 (CH₂-N), 32.6 (CH₂-COOH).

Glicodendrón de manosa de segunda generación funcionalizado con maleimida **54**.



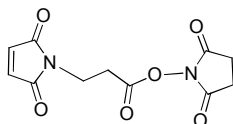
A disolución del glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂ (28.0 mg, 5.4 x 10⁻³ mmol) y el derivado de maleimida **53** (2.8 mg, 1.6 x 10⁻² mmol) en DMF anhidra (3 ml) se añade EDC (3.1 mg, 1.6 x 10⁻² mmol), HOBt (2.2 mg, 1.6 x 10⁻² mmol) y Et₃N (2.2 µl, 1.6 x 10⁻² mmol). La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente y el crudo se purifica empleando sephadex LH20 en MeOH obteniéndose el glicodendrón **54** como un sólido blanco (25.1 mg, 87%).

¹³¹ Mantovani, G.; Lecolley, F.; Tao, L.; Haddleton, D.M.; Clerx, J.; Cornelissen, J. J. L. M.; Velonia, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2966-2973.

¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ: 6.90 (s, 2H, CH=CH); 4.89 (s, 12H, H₁ manosa); 4.21-4.37 (m, 44H, CH₂_a + CH₂_{a'} + CH₂_b + CH₂_c); 3.66-3.96 (m, 108 H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅ + H₆ manosa + CH₂-O + NHCH₂CH₂C₁ manosa); 3.35-3.52 (m, 24H, NHCH₂CH₂C₁ manosa); 3.21-3.27 (m, 6H, CH₂-NH + CH₂-NH maleimida); 2.53-2.75 (m, 52H, CH₂CO + CH₂-CO maleimida); 1.78 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.36, 1.29, 1.22, 1.19 (s x 4, 27H, CH₃_{b'} + CH₃_c).

¹³C-RMN (125 MHz, D₂O, 40°C) δ: 174.0 (CO); 134.7 (CH=CH); 99.7 (CH₁ manosa); 73.1 (CH manosa); 70.8 (CH manosa); 70.3 (CH manosa); 67.0 (CH manosa); 66.1 (CH₂_a + CH₂_b + CH₂_c); 64.6 (CH₂-O); 64.3 (CH₂-O); 61.2 (CH₂ C₆manosa); 48.7 (C-CH₂_c); 47.1 (C-CH₂_b); 46.7 (C-CH₂_c); 39.2 (NHCH₂CH₂OC₁ manosa); 37.4 (CH₂CH₂NH + CH₂-NH maleimida); 30.4 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 29.5 (OOC-CH₂-CH₂-COO); 28.3 (CH₂CH₂NH); 26.2 (CH₂CH₂NH); 17.2 (CH₃_{b'} + CH₃_c).

Succinimido 3-maleimidopropanoato (55).¹³²



A una disolución de anhídrido maléico (1.00 g, 10 mmol) en DMF (10 ml) se añade β-alanina (0.91 g, 10 mmol). La suspensión se agita durante una hora una vez que el aminoácido se ha disuelto. Transcurrido este tiempo, la reacción se introduce en un baño de hielo y se añade *N*-hidroxisuccinimida (1.44 g, 12.5 mmol) seguida de DCC (4.12, 20 mmol). Posteriormente se deja que la mezcla de reacción alcance temperatura ambiente y se mantiene en agitación durante 4 horas. El crudo de reacción se filtra sobre celita, se diluye con agua (50 ml) y se extrae con CH₂Cl₂ (2 x 50 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro y se evapora a vacío dando lugar al compuesto **55** como un sólido blanco que se recrystaliza empleando CH₂Cl₂/éter (0.88 g, 35%).

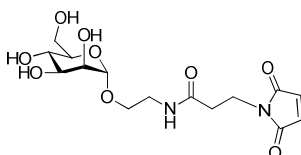
Pf: 160-162 °C; **Pf_{lit}**¹³²= 164-166 °C

¹³²Nielsen, O.; Buchardt, O. *Synthesis* **1991**, 819-821.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.72 (s, 2H, CH=CH), 3.90 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.04 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CON}$), 2.79 (s, 4H, OC- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CO}$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 170.1 (CO), 168.7 (CO), 165.9 (CO), 134.3 (CH=CH), 33.1 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 29.8 ($\text{CH}_2\text{-CON}$), 25.7 (OC- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CO}$).

Derivado de manosa con maleimida 56.



Se disuelven el derivado de manosa **17** (124 mg, 0.56 mmol) y el compuesto **55** (172 mg, 0.83 mmol) en DMF anhidra (10 ml) y se añade Et_3N (231 μl , 1.67 mmol). La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 16 horas. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente isopropanol/agua (9:1), obteniéndose el producto **56** como un aceite incoloro (164 mg, 79%).

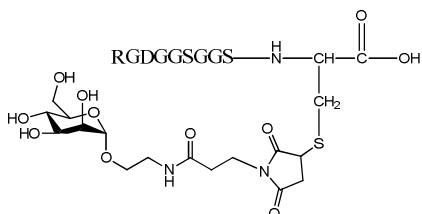
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 6.88 (s, 2H, CH=CH); 4.81 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, H_1); 3.34-3.91 (m, 12 H); 2.53 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CONH}$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 173.2 (CONH); 172.2 (CO); 135.5 (CH=CH); 101.6 (C-1); 74.7 (CH_{man}); 72.5 (CH_{man}); 72.0 (CH_{man}); 68.6 (CH_{man}), 67.2 (C-7); 62.2 (C-6); 40.3 (C-8); 35.7 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 35.5 ($\text{CH}_2\text{-CONH}$).

EMAR-FAB calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_9\text{Na}$: 397.1223; encontrado: 397.1230.

¹³²Nielsen, O.; Buchardt, O. *Synthesis* **1991**, 819-821.

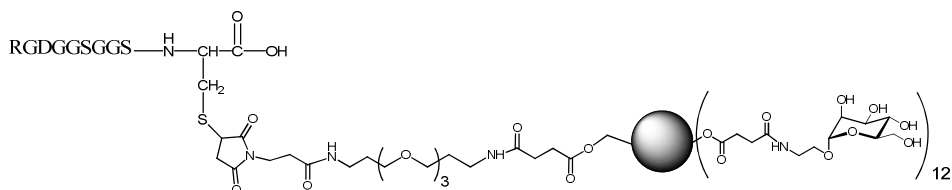
Sistema monovalente de manosa funcionalizado con el péptido modelo 57.



Se disuelve el derivado de manosa **56** (20 mg, 5.3×10^{-2} mmol) en acetonitrilo (3 ml). Se coge una alícuota de esta disolución (66 μ l, 0.44 mg, 1.8×10^{-3} mmol) y se añade a una disolución del péptido modelo RGDGGSGGSC (1mg, 1.8×10^{-3} mmol) en tampón fosfato 50 mM a pH 7.1 (66 μ l). La reacción se mantiene en agitación a 25°C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo la muestra se analiza por EM (ESI) observándose la completa conversión del péptido modelo de partida en el compuesto **57**.

EM (ESI) calculado para $C_{44}H_{71}N_{15}O_{24}S$: 1225.5 [M]⁺; encontrado: 1223.9 [M - H]⁻ y 1247.8 [M + Na - H]⁻

Glicodendrón de manosa de segunda generación funcionalizado con el péptido modelo 58.

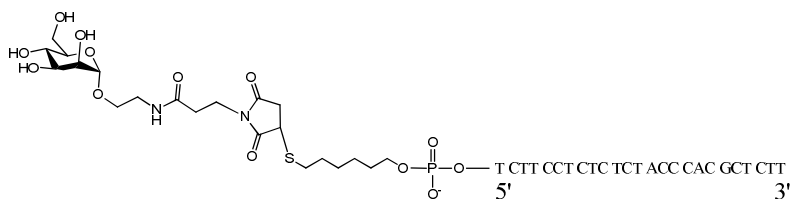


Se disuelve el glicodendrón **54** (10.0 mg, 1.9×10^{-3} mmol) y el péptido modelo (3.2 mg, 3.8×10^{-3} mmol) en una disolución 1:1 de tampón fosfato 50 mM a pH 7.1 y acetonitrilo (2 ml). La reacción se mantiene en agitación a 25°C durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente y el crudo se purifica empleando sephadex LH20 en MeOH obteniéndose el glicodendrón **58** como un sólido blanco (10.9 mg, 94%).

¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ: 4.88 (s, 12H, H₁ manosa); 4.20-4.38 (m, 44H, CH₂_a + CH₂_{a'} + CH₂_b + CH₂_c); 3.56-3.95 (m, 108 H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅ + H₆ manosa + CH₂-O + NHCH₂CH₂C₁ manosa); 3.37-3.46 (m, 24H, NHCH₂CH₂C₁ manosa); 3.25 (m, 6H, CH₂-NH + CH₂-NH maleimida); 2.58-2.71 (m, 52H, CH₂CO + CH₂-CO maleimida); 1.80 (m, 4H, O-CH₂CH₂CH₂-NH); 1.36, 1.28, 1.22, 1.18 (s x 4, 27H, CH₃_{b'} + CH₃_{c'}).

EM (MALDI-ToF) calculado para C₂₄₄H₃₉₆N₂₈O₁₅₀S: 6146.4 [M]⁺; encontrado: 6150.3 [M+ H]⁺.

Sistema monovalente de manosa funcionalizado con el oligonucleótido modelo 59.



Se disuelve el derivado de manosa **56** (10 mg, 2.7 x 10⁻² mmol) en tampón fosfato 50 mM a pH 7.8 (10 ml). Se coge una alícuota de esta disolución (33.2 μl, 8.9 x 10⁻⁵ mmol) y se añade a una disolución del oligonucleótido modelo (1.8 x 10⁻⁵ mmol) en tampón fosfato 50 mM a pH 7.8 (200 μl). La reacción se mantiene en agitación a 25°C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo la muestra se purifica empleando HPLC, aislando la señal correspondiente al conjugado **59** con un tr= 19.98 min.

EM (MALDI-TOF) calculado para 7962 [M]⁺; encontrado: 7966.3 [M+ H]⁺ y 3991.6 [M+ 2H]²⁺

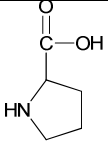
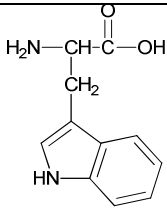
Anexo 1

**Estructuras y abreviaturas de
aminoácidos**

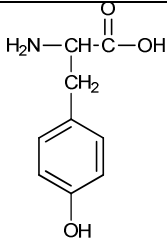
Abreviatura de una letra	Abreviatura de tres letras	Nombre	Estructura
A	Ala	Alanina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
C	Cys	Cisteína	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$
D	Asp	Ácido aspártico	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
E	Glu	Ácido glutámico	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
F	Phe	Fenilalanina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$
G	Gly	Glicina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$

H	His	Histidina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \end{array} $
I	Ile	Isoleucina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
K	Lys	Lisina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $
L	Leu	Leucina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
M	Met	Metionina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
N	Asn	Asparagina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $

Estructuras y abreviaturas de aminoácidos

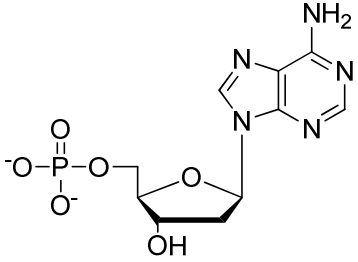
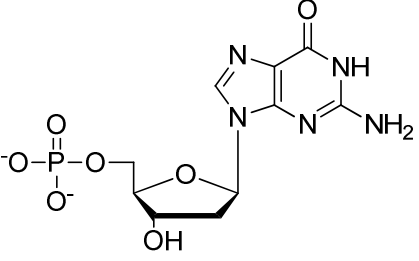
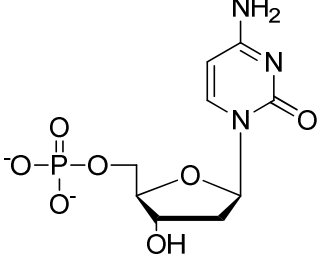
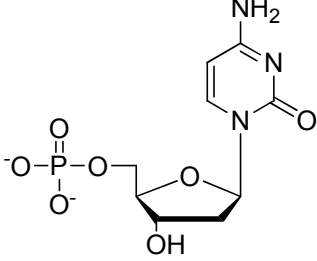
P	Pro	Prolina	
Q	Gln	Glutamina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
R	Arg	Arginina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
S	Ser	Serina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
T	Thr	Treonina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
V	Val	Valina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
W	Trp	Triptófano	

Anexo 1

Y	Tyr	Tirosina	 <p>The chemical structure of Tyrosine is shown. It consists of a central alpha-carbon atom bonded to an amino group (H₂N), a carboxyl group (COOH), a hydrogen atom, and a side chain. The side chain is a methylene group (CH₂) attached to a para-substituted phenol ring (a benzene ring with a hydroxyl group, OH, at the para position).</p>
---	-----	----------	--

Anexo 2

**Estructuras y abreviaturas de
nucleótidos**

Abreviatura	Nombre	Estructura
A	Adenina	 <p>The structure shows a phosphate group attached to the 5' carbon of a ribose sugar, which is linked to the 9th nitrogen of an adenine base. The adenine base is a purine ring system with an amino group at the 6th position.</p>
G	Guanina	 <p>The structure shows a phosphate group attached to the 5' carbon of a ribose sugar, which is linked to the 9th nitrogen of a guanine base. The guanine base is a purine ring system with a carbonyl group at the 6th position and an amino group at the 2nd position.</p>
C	Citosina	 <p>The structure shows a phosphate group attached to the 5' carbon of a ribose sugar, which is linked to the 4th nitrogen of a cytosine base. The cytosine base is a pyrimidine ring system with an amino group at the 4th position and a carbonyl group at the 2nd position.</p>
T	Timina	 <p>The structure shows a phosphate group attached to the 5' carbon of a ribose sugar, which is linked to the 4th nitrogen of a thymine base. The thymine base is a pyrimidine ring system with an amino group at the 5th position and carbonyl groups at the 2nd and 4th positions.</p>

Anexo 3
Espectros



