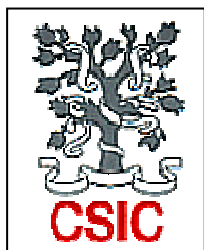




**DISEÑO Y SÍNTESIS DE LIGANDOS BASADOS EN
CARBOHIDRATOS Y ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN
CON LA LECTINA DC-SIGN**

José Juan Reina Martín

Sevilla, 2008



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ORGÁNICA**

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

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE LIGANDOS BASADOS EN
CARBOHIDRATOS Y ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN
CON LA LECTINA DC-SIGN**

Director de la tesis

Doctorando

Fdo. Dr. F. Javier Rojo Marcos

Fdo. José Juan Reina Martín

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

CERTIFICA: Que el presente trabajo titulado: diseño y síntesis de ligandos basados en carbohidratos y estudio de la interacción con la lectina DC-SIGN 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) durante los años académicos 2003-2004, 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007 y 2007-2008 constituyendo la Memoria que presenta el Lcdo. José Juan Reina Martín para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Sevilla, Septiembre de 2008

Fdo.: Francisco Javier Rojo Marcos

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo con ayuda de una beca con cargo al proyecto: “Interacción del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) con los transreceptores DC- y L-SIGN: Relevancia biológica y diseño de inhibidores específicos” (Ref: FIS PI030093) del ISCIII (Instituto de Salud Carlos III) del Ministerio de Sanidad y Consumo

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de Investigaciones Químicas en el Grupo de Carbohidratos bajo la dirección del Doctor Francisco Javier Rojo Marcos, a quien quiero expresar mi más sincera gratitud, ya que sin su ayuda, apoyo y confianza, no hubiera podido realizarse.

También quiero recordar a los Profesores Rafael Suau y María Valpuesta y a los Doctores Gregorio Torres y Ezequiel Perez Inestrosa de la Universidad de Málaga, a los que siempre estaré agradecido por haberme guiado en mis primeros pasos en un laboratorio de Química Orgánica.

Asimismo agradezco al Dr. Jose M^a Fernández-Bolaños, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, por haber aceptado ser tutor de esta Tesis Doctoral.

Quiero agradecer especialmente al Doctor Juan Carlos Morales por la ayuda prestada en un momento crítico de esta Tesis Doctoral, y por la flexibilidad ofrecida para poder finalizar la Tesis, nunca lo olvidaré.

Esta Tesis ha sido posible gracias a la ayuda de los Doctores Pedro M. Nieto y Jesus Ángulo, además de Irene Díaz que han realizado los estudios estructurales de los oligosacáridos y el pseudodisacárido que se presentan en esta Tesis Doctoral.

Agradecer también al Prof. Franck Fieschi y al Dr. George Tabarani del Instituto de Biología Estructural (IBS) de Grenoble por todo el entusiasmo mostrado en este proyecto, además, sin ellos todo el trabajo realizado hubiera sido imposible. Gracias por proporcionarnos toda la proteína que necesitábamos y por vuestra paciencia, durante mis estancias en vuestro laboratorio, para realizar los estudios de las interacciones por SPR. Pero, sobre todo, porque sois dos de las mejores personas que he conocido nunca.

A la Profesora Anna Bernardi, de la Universidad de Milán quiero agradecerle su amabilidad y la ayuda que me prestó durante mi estancia en su laboratorio donde realicé la síntesis del pseudodisacárido. No puedo olvidarme de Sara Sattin, de la Dr. Silvia Mari y del Dr. Crtomir Podlipnik porque durante mi estancia en Milán hicieron que me sintiera como en casa.

Me gustaría también agradecer al Dr. Rafael Delgado, del Hospital 12 de Octubre (Madrid) por la realización de los experimentos de infección. Y a los doctores Nuria Campillo y Juan Antonio Páez del Instituto de Química Médica (CSIC, Madrid) por la realización de los estudios de Docking de los oligosacáridos de manosa.

Agradecer también al Prof. Julio Delgado, uno de los mejores investigadores que he tenido el honor de conocer, persona a la que admiro y ejemplo para la comunidad científica.

A los Dres. José Luis de Paz, África G. Barrientos, Ricardo Pérez, Javier López, Julia Bonilla, Ricardo Lucas, Luz Cándenas y Francisco Pinto por la ayuda prestada en estos años.

De una manera muy especial quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, que han sido mi familia desde que llegué a Sevilla para realizar esta Tesis Doctoral. A mis hermanos David, Rafa, Marco, Pedro Miguel, Andrea y Mikael por todas esas duras jornadas de trabajo que llegaron Al Alba. A Natalia, Caroline y Olga gracias por vuestra amistad, habéis formado parte de mi familia en Sevilla.

Por supuesto que también quiero recordar al resto de compañeras del laboratorio Irene, María del Mar, Sara, Julie, Rute, Ana Bellomo, Ainhoa, Silvia y Susana que en todo momento me han mostrado su apoyo, ayuda y amistad, y con las que he vivido momentos que no olvidaré nunca.

A mis compañeros de Málaga, Amelia, Carmen, Dani, Antonio, Maribel, Kiko, Yolanda, Jose Mari, Paco y Manolo, porque fue allí donde empecé a saber que para terminar una tesis doctoral hay que pasar mucho tiempo en el laboratorio y que es muy importante disfrutar de todo ese tiempo que se pasa juntos. Gracias por haberme hecho disfrutar cada día que pasamos juntos.

Tambien quiero agradecerle todo a Raquel, la persona más importante en mi vida y con la que tengo una química especial, solo los dos sabemos todo lo que ha costado llegar hasta este momento. Gracias por tu paciencia, tu apoyo, tu alegría y por todo lo que hemos vivido juntos.

Para finalizar quiero hacer un agradecimiento muy especial a mis padres, que me han apoyado y me han prestado ayuda en todo lo que he necesitado y, sobre todo, por enseñarme con su ejemplo personal que por encima de todo lo más importante en esta vida es ser una buena persona. Como no, a mi hermana Alma que aunque de vez en cuando me da algún “disgustillo” la quiero con locura.

*A mis padres,
a Alma y Raquel*

Índice

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Los Carbohidratos en la Naturaleza.....	3
1.2.- Modelos artificiales de sistemas multivalentes con carbohidratos.....	5
1.3.- DC-SIGN: receptor clave en procesos de infección.....	19
2.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	31
2.1.- Antecedentes del Grupo de Investigación.....	33
2.2.- Objetivos.....	41
3.- EVALUACIÓN DE LA AFINIDAD Y DE LA ACTIVIDAD ANTI-VIH DE LOS SISTEMAS GLICODENDRÍTICOS POLIDISPERSOS.....	43
3.1.- Estudio de afinidad de los sistemas multivalentes glicodendríticos de manosa con el receptor DC-SIGN.....	45
3.1.1.- Síntesis de los sistemas multivalentes dendríticos BH20sucMan, BH30sucMan, BH20sucL y BH30sucL.....	45
3.1.2.- Estudios de afinidad de los sistemas multivalentes glicodendríticos y DC-SIGN utilizando biosensores.....	49
3.1.2.1.- Biosensor con detección SPR.....	49
3.1.2.2.- Interacción de los sistemas glicodendríticos con la lectina DC-SIGN.....	52
3.2.- Evaluación de la actividad antiviral frente al virus del sida (VIH).....	59
3.2.1.- Inhibición de la interacción DC-SIGN-gp120 por BH30sucMan.....	62
3.2.2.- Evaluación de la actividad antiviral de los sistemas glicodendríticos frente al VIH en líneas celulares y tejidos explantes.....	66
4.- MODIFICACIONES DEL SISTEMA MULTIVALENTE: EL MODELO DE ANCLAJE DEL CARBOHIDRATO.....	73
4.1.- Sistemas dendríticos multivalentes con un espaciador basado en tres unidades de etilenglicol.....	75

4.1.1.- Síntesis de los sistemas dendríticos multivalentes BH20sucLMan, BH30sucLMan, BH20sucLL y BH30sucLL.....	77
4.1.2.- Interacción de los sistemas glicodendríticos BH20sucLMan, BH30sucLMan, BH20sucLL y BH30sucLL con la lectina DC-SIGN.....	82
4.1.3.- Inhibición de la interacción DC-SIGN-gp120 por BH30sucLMan	84
4.2.- Glicoconjugados de manosa funcionalizados en las posiciones 1 y 6.....	87
4.2.1.- Síntesis de glicoconjugados de manosa 17 y 23 funcionalizados en las posiciones 1 y 6, respectivamente...	89
4.2.2.- Estudios de interacción de los glicoconjugados de manosa 17 y 23 con el receptor DC-SIGN usando un biosensor SPR.....	94
5.- MODIFICACIONES DEL FRAGMENTO SACARÍDICO: SÍNTESIS, ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y ENSAYOS BIOLÓGICOS.....	99
5.1.- Compuestos oligosacarídicos de manosa como ligandos para el receptor DC-SIGN: docking, síntesis y estudios de RMN.....	101
5.1.1.- Estudios de docking de los di- y trisacáridos seleccionados.....	103
5.1.2.- Síntesis de los ligandos oligosacarídicos para el receptor DC-SIGN.....	111
5.1.2.1.- Síntesis del 2-azidoetil α -D-manopiranosido ortogonalmente protegido 31	112
5.1.2.2.- Desprotecciones selectivas del derivado de manosa 31	120
5.1.2.3.- Síntesis del disacárido 45 y los trisacáridos de manosa 48 y 51	121
5.1.3.- Estudios de la interacción del disacárido 45 y los trisacáridos 48 y 51 con DC-SIGN por RMN (Transfer- NOE y STD).....	135
5.1.3.1.- Complejo del trisacárido Man α 1,2[Man α 1,6]Man 51 con DC-SIGN.....	139

5.1.3.2.- Complejo del trisacárido Man α 1,3[Man α 1,6]Man 48 con DC-SIGN.....	144
5.1.3.3.- Complejo del disacárido Man α 1,2Man 45 con DC-SIGN.....	147
5.2.- Síntesis y estudios de interacción con el receptor DC-SIGN por RMN y docking de un pseudodisacárido de manosa.....	155
5.2.1.- Moléculas glicomiméticas.....	155
5.2.2.- Síntesis del disacárido mimético 55	159
5.2.3.- Estudios de la interacción del pseudodisacárido con DC-SIGN utilizando docking y RMN (Transfer-NOE y STD)	164
5.2.3.1.- Estudios conformacionales y de estabilidad del disacárido mimético 53	165
5.2.3.2.- Estudios de RMN en disolución del disacárido mimético 54 con la lectina DC-SIGN.....	167
5.2.3.3.- Estudios de docking del disacárido mímico 52 con la lectina DC-SIGN.....	170
5.3.- Actividad antiviral de los compuestos monovalentes oligosacarídicos 45 , 48 , 51 y del glicomimético 55	173
 6.- SISTEMA MULTIVALENTE MONODISPERSO DE 3ª GENERACIÓN FUNCIONALIZADO CON EL PSEUDODISACÁRIDO 55	177
6.1.- Sistema multivalente monodisperso de 3ª generación funcionalizado con el pseudodisacárido 55 . Síntesis y actividad biológica.....	179
6.1.1.- Síntesis de dendrímeros monodispersos basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico.....	180
6.1.2.- Síntesis del glicodendrímico de 3ª generación G3(pseudodisacárido) ₂₄	188
6.1.3.- Inhibición de la interacción DC-SIGN/gp120 por el glicodendrímico G3(pseudisacárido) ₂₄	190
 7.- CONCLUSIONES.....	193

8.- PARTE EXPERIMENTAL.....	199
8.1- Métodos generales.....	201
8.2.- Síntesis de los sistemas dendríticos polidispersos de manosa y sus correspondientes controles.....	203
8.3.- Síntesis de los sistemas dendríticos polidispersos de manosa y sus correspondientes controles con espaciador tipo trietilenglicol.....	213
8.4.- Síntesis de los derivados de manosa funcionalizados en la posición 1 y 6.....	221
8.5.- Síntesis de los oligosacáridos de manosa 45, 48 y 51	231
8.6.- Síntesis del pseudodisacárido de manosa 55	254
8.7.- Síntesis de dendrímeros monodispersos.....	259
9.-ANEXOS.....	271
9.1.- Aspectos estereoelectrónicos de los carbohidratos.....	273
9.2.- Publicaciones.....	279
9.3.- Espectros.....	287

ABREVIATURAS

μM	micromolar
aa	aminoácido
Ac	Acetilo
AD	Alta Densidad
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Factor de Agregación
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
APCs	Células Presentadoras de Antígenos
ARN	Ácido Ribonucleico
Asn	Asparagina
Asp	Aspártico
BD	Baja Densidad
BnBr	Bromuro de bencilo
BSA	Albúmina de suero bovino
Bz	Benzoilo
Carb	Carbohidrato
c.c.f.	cromatografía en capa fina
CMV	Citomegalovirus
CORCEMA	Complete Relaxation and Conformational Exchange Matrix Analysis
CRD	Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos
d	doblete
Da	Dalton
DBU	Diazabicycloundeceno
DCs	Células Dendríticas
DCC	Diciclohexil carbodiimida
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin
DIC	Diisopropil carbodiimida
DIPEA	Diisopropil etilamina
DM	Dinámica molecular
DMAP	4-Dimetilamino piridina
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMP	Dimetoxipropano

DPTS	<i>p</i> -toluensulfonato de dimetilamino piridinio
ECD	Dominio Extracelular
EDC	Hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELLA	Enzime Linked Lectin Assay
eq.	equivalente
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electrospray
Fc	Fragmento cristalizabile de un anticuerpo
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonil
Fmoc-OSuc	Succinato de 9-fluorenilmetiloxicarbonilo
Glu	Ácido glutámico
GlcNAc	<i>N</i> -Acetil glucosamina
Gp	Glicoproteína
HA	Hemaaglutinina
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronilo
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
IC ₅₀	Capacidad de Inhibición del 50%
ICAM-2	Molécula de Adhesión Intercelular-2
ICAM-3	Molécula de Adhesión Intercelular-3
Im	Imidazol
IR-FT	Infrarrojo con transformada de Fourier
K	grados Kelvin
LAM	Lipoarabinomannano
lev	levulino
Le ^x	Trisacárido Lewis x
Lys	Lisina
m	multiplete
Man	Manosa
MCPBA	Ácido metacloroperbenzóico
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
mM	milimolar
nm	nanómetro

nM	nanomolar
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimida
NOE	Efecto Nuclear Overhauser
PAA	Poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato
Piv	Pivaloilo
Ph	Fenilo
Phe	Fenilalanina
PMBCl	Cloruro de <i>p</i> -metoxibencilo
PPTS	<i>p</i> -Toluensulfonato de Piridinio
Rf	Factor de Retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROM	Ring-Opening Methatesis
RU	Unidades de Resonancia
S	Selectina
s	singlete
sa	singlete ancho
SA	Ácido siálico
SAM	Monocapas autoensambladas
SARS	Síndrome Respiratorio Agudo Severo
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIV	Virus de Inmunodeficiencia del Simio
SN	Sustitución Nucleófila
SPR	Resonancia del Plasmón de Superficie
STD	Diferencia de la transferencia de saturación
ROMP	Ring-Opening Methatesis Polymerization
T	Temperatura
t	triplete
t.a.	temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBDPSCI	Cloruro de <i>tert</i> -butildifenilsililo
TEA	Trietilamina
TEM	Microscopía Electronica de Transmisión

TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMSOTf	Triflato de trimetilsililo
TsCl	Cloruro de tosilo
TsOH	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
UV-vis	Ultravioleta-visible
Val	Valina
VIF	Virus de Inmunodeficiencia del Felino
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los Carbohidratos en la Naturaleza.

En la naturaleza existen cuatro clases importantes de macromoléculas: ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y lípidos. A diferencia de los ácidos nucleicos y las proteínas que presentan una disposición lineal con un único tipo de unión de sus unidades constitutivas, los polisacáridos presentan estructuras altamente ramificadas, cuyas unidades monoméricas se puede unir unas a otras por diferentes posiciones y con diferente estereoquímica. Esta complejidad permite a los carbohidratos presentar variaciones casi ilimitadas en su estructura y, por tanto, una gran cantidad de información molecular. Dicha complejidad estructural aumenta aún más por modificaciones post-transduccionales como pueden ser fosforilaciones, sulfataciones, acetilaciones u oxidaciones que contribuyen de forma importante a modular las actividades biológicas de estos carbohidratos.¹ Todo esto ha contribuido sustancialmente al lento desarrollo de la investigación relacionada con los carbohidratos en cuanto a la elucidación de sus estructuras y especialmente, de sus funciones biológicas.

La superficie de la mayoría de las células de mamíferos se encuentra cubierta por una densa capa de carbohidratos denominada glicocálix. (Figura 1) Estos carbohidratos se presentan fundamentalmente conjugados a otras biomoléculas (proteínas y lípidos), dando lugar a las denominadas glicoproteínas y los glicolípidos, respectivamente.² Los glicolípidos y glicoproteínas que constituyen este glicocálix 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).³ Entre estos procesos biológicos naturales o

¹ (a) Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J. (eds) *Essentials of glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**. (b) Fraser-Reid, B. O; Tatsuta, K.; Thiem, J. (eds) *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, Springer, London, **2001**. (c) Varki, A.; *Glycobiology*, **1993**, 3, 97-130.

² Dwek, R. A.; *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 683-720.

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

patológicos cabe destacar la embriogénesis,⁴ la diferenciación celular,⁵ el proceso inflamatorio,⁶ la metástasis,⁷ etc.

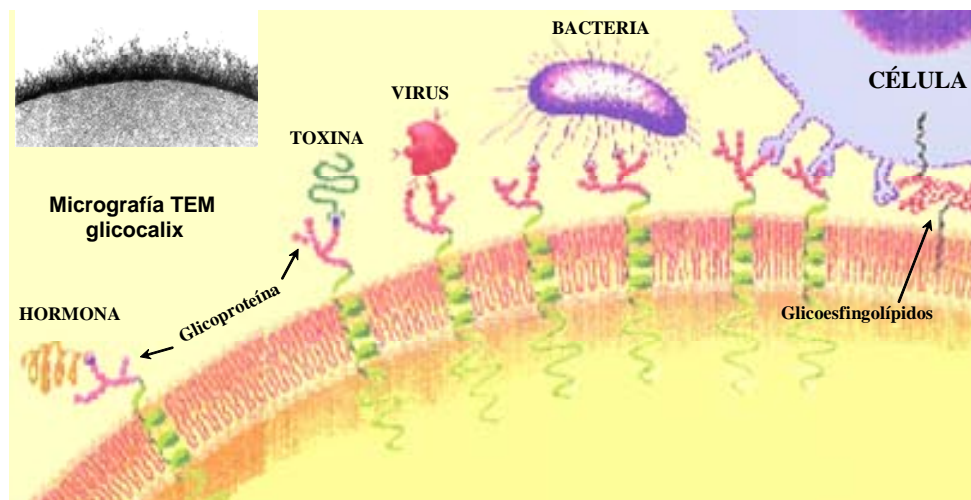


Figura 1. Representación de alguno de los diferentes procesos naturales e infecciosos de reconocimiento en los que están implicados los glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos) de la superficie celular.

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, esta interacción presenta una baja afinidad (rara vez se observan constantes de asociación superiores a 10^6 M^{-1}), solventada en la naturaleza por una presentación multivalente de los carbohidratos y del receptor.⁸ 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.⁹ (Figura 2) Estas interacciones multivalentes presentan ventajas funcionales sobre las interacciones monovalentes; no solo aumentan la afinidad

⁴ Muramatsu, T.; *J. Cell. Biochem.*, **1988**, *36*, 1-14.

⁵ Hakomori, S.; *Ann. Rev. Biochem.*, **1981**, *50*, 733-740.

⁶ Lasky, L. A.; *Ann. Rev. Biochem.*, **1995**, *64*, 113-139.

⁷ Muramatsu, T.; *Glycobiology*, **1993**, *3*, 291-296.

⁸ Lundquist, J. J.; Toone, E. J.; *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 555-578.

⁹ (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.

de forma significativa, sino que también aumentan la especificidad de la interacción y por lo tanto, del proceso de reconocimiento molecular.

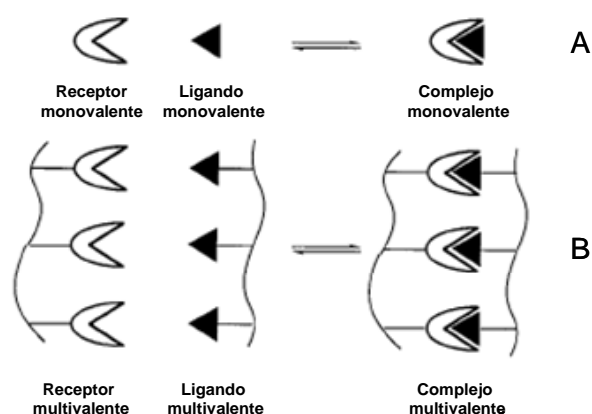


Figura 2. Representación general de una interacción ligando-receptor monovalente (A); y de una interacción ligando-receptor multivalente (B).

Los sistemas multivalentes de carbohidratos de origen natural son difíciles de obtener de sus fuentes naturales, dada su escasez, así como el problema de aislarlos puros. En la mayoría de los casos, estos sistemas naturales se encuentran como mezclas de compuestos (glicofomas), 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 con 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 con carbohidratos para el estudio de estos procesos biológicos.¹⁰

¹⁰ Houseman, T. B.; Mrksich, M.; *Top. Curr. Chem.*, **2002**, 218, 1-44.

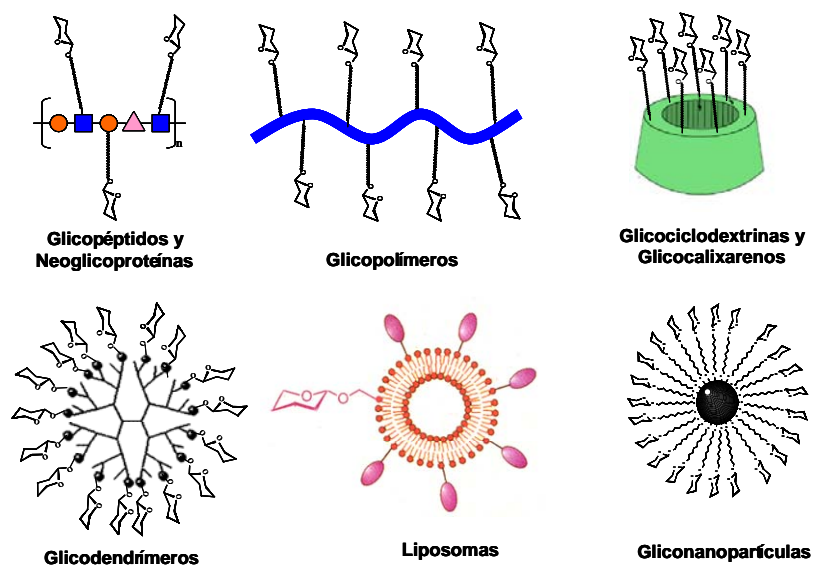


Figura 3. Representación de diferentes modelos multivalentes de carbohidrato.

El diseño de estos sistemas está basado en la imitación de 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. 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,¹¹ los liposomas,¹² los dendrímeros,¹³ los calixarenos,¹⁴ las ciclodextrinas,¹⁵ oligómeros y polímeros,¹⁶ y las nanopartículas.¹⁷ (Figura 3)

¹¹ Davis, B.G.; *Science*, **2004**, *303*, 480-482.

¹² (a) Brewer, G. J.; Matinyan, N.; *Biochemistry*, **1992**, *31*, 1816-1820. (b) Stewart, R. J.; Boggs, J. M.; *Biochemistry*, **1993**, *32*, 10666-10674.

¹³ Röckendorf, N.; Lindhorst, T. H.; *Top. Curr. Chem.*, **2001**, *217*, 201-238.

¹⁴ Dondoni, A.; Marra, A.; Scherrmann, M. C.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R.; *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 1774-1782.

¹⁵ Roy, R.; Hernández-Mateo, F.; Santoyo-González, F.; *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 8743-8746.

¹⁶ Roy, R.; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1996**, *6*, 692-702.

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.

Los primeros **neoglicoconjugados** multivalentes fueron preparados por el grupo de Y. C. Lee a finales de los años 70s.¹⁸ En este modelo, el carbohidrato se une a un soporte orgánico multivalente con la intención de mimetizar la presentación del carbohidrato en una glicoproteína. (Figura 4) Con estos agrupamientos (“clusters”) de glicósidos constituidos por dos o tres moléculas de carbohidrato, Lee y col. observaron un aumento logarítmico de su afinidad por lectinas hepáticas multiméricas en comparación con la observada para el ligando monovalente.^{9(a),19} Este hecho se conoce actualmente como “efecto cluster glicosídico”.

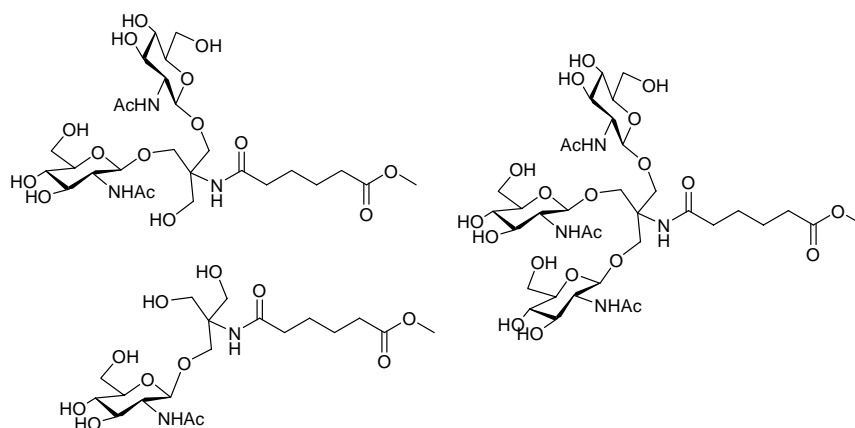


Figura 4. Primeros glicoclusters sintetizados por Lee y colaboradores.

Otro de los sistemas modelo utilizados, aunque más alejado de los glicoconjugados naturales, son aquellos que presentan como soporte

¹⁷ de la Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; Rojas, T. C.; Rojo, J.; Cañada, J.; Fernández, A.; Penadés, S.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2258-2261.

¹⁸ Lee, Y. C.; *Carbohydr. Res.*, **1978**, *67*, 519-514.

^{9(a)} Lee, Y. C.; Lee, R. T.; *Acc. Chem. Res.*, **1995**, *28*, 321-327.

¹⁹ Lee, Y. C.; Lee, R. T.; Rice, K.; Ichikawa, Y.; Wong, T. C.; *Pure Appl. Chem.*, **1991**, *63*, 499-506.

ciclodextrinas y calixarenos. Estos sistemas permiten la presentación de un número reducido de carbohidratos; sin embargo, presentan la propiedad de tener un interior hidrofóbico, capaz de atrapar pequeñas moléculas orgánicas no polares, y un exterior hidrofílico que se puede funcionalizar con carbohidratos.²⁰ Estas características les confieren propiedades especiales con respecto a otros glicoclusters y muchas de las glicociclodextrinas y glicocalixarenos sintetizados, además de ser utilizados como herramientas para estudiar interacciones carbohidrato-proteína, se han empleado como transportadores de fármacos.²¹

Los **liposomas** son sistemas multivalentes que permiten la presentación de un mayor número de ligandos en la superficie. Son vesículas lipídicas artificiales ampliamente utilizadas como sistemas de liberación de sustancias en el interior de las células. Representan uno de los mejores sistemas modelo para mimetizar las agrupaciones de glicoesfingolípidos de la membrana plasmática. Estos sistemas han permitido estudiar la fusión de virus con la superficie celular en las primeras etapas del proceso de infección y también se han utilizado como transportadores de fármacos. Así, por ejemplo, Whitesides y colaboradores realizaron estudios de inhibición de la aglutinación del virus de la gripe con liposomas que contenían ácido siálico.²² Uno de los principales problemas de este tipo de sistemas multivalentes es que presentan una baja estabilidad y una composición difícil de controlar, puesto que se obtienen por autoensamblaje de las unidades constitutivas. Para solucionar los problemas de estabilidad que presentaban los liposomas, se desarrollaron los llamados “*liposomas covalentes*”. (Figura 5) Estas sustancias son agregados de monómeros anfifílicos que contienen en algún punto de su estructura molecular un grupo funcional que

²⁰ (a) Duchne, D.; Ponchel, G.; Wouessidjewe, D.; *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1999**, *36*, 29-40. (b) Gattuso, G.; Nepogodiev, S. A.; Sttodart, J. F.; *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 1919-1958.

²¹ (a) Payre, N.; Cottaz, S.; Boisset, C.; Borsali, R.; Svensson, B.; Henrisat, B.; Driguez, H.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 369-372. (b) García-López, J. J.; Hernández-Matero, F.; Isac-García, J.; Kim, J. M.; Roy, R.; Santoyo-González, F.; Vargas-Berenguel, A.; *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 522-531. (c) Aoyama, Y.; Matsuda, Y.; Chuleeraruk, J.; Mishiyama, K.; Fujimoto, K.; Fujimoto, T.; Shimizu, T.; Hayashida, O.; *Pure Appl. Chem.*, **1998**, *70*, 3279-3281. (d) Roy, R.; Kim, J. M.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 369-372.

²² Kingery-Wood, J. E.; Willians, K. W.; Sigal, G. B.; Whitesides, G. M.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 7303-7305.

puede polimerizar.²³ Estos liposomas, además de presentar una mayor estabilidad, siguen manteniendo la flexibilidad, son biocompatibles y permiten la circulación *in vivo* de las sustancias que transportan en el interior de la vesícula. También presentan características ópticas, debido a la presencia de dobles enlaces conjugados en la estructura de la vesícula, que pueden tener muchas aplicaciones biomédicas.²⁴

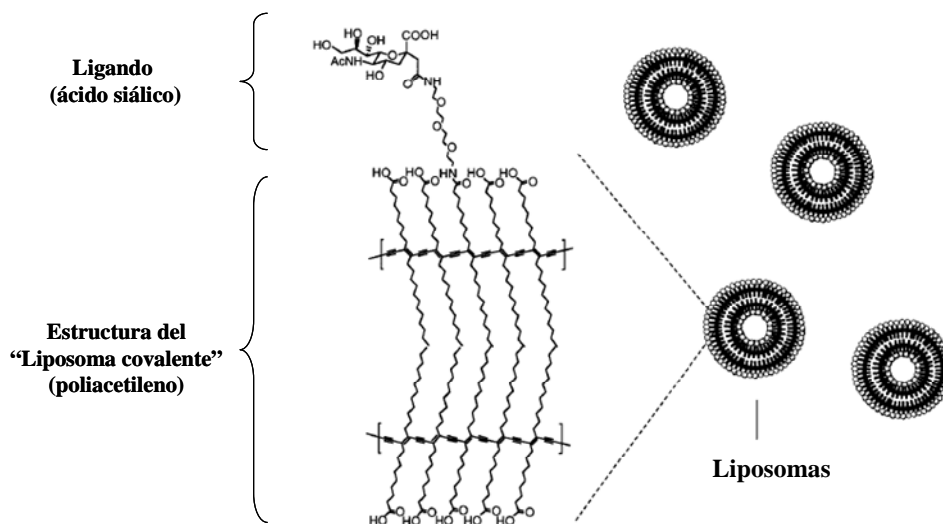


Figura 5. Representación esquemática de un "liposoma covalente" basado en poliacetileno con un carbohidrato como ligando (ácido siálico).

Las **neoglicoproteínas** representan uno de los neoglicoconjugados más ampliamente utilizados. Estos modelos son proteínas naturales que han sido modificadas sintéticamente introduciendo en su estructura carbohidratos. Existen muchos métodos sintéticos para la preparación de neoglicoproteínas y un gran número de estos métodos proporcionan un control razonable del número de unidades de carbohidrato introducidas.²⁵ Pero estas aproximaciones tienen serias

²³ (a) Ringsdorf, H.; Schlarb, B.; Venzmer, J.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1988**, 27, 113-158. (b) Gros, L.; Ringsdorf, H.; Schupp, H.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1981**, 20, 305-325. (c) O'Brien, D. F.; *Trends Polym. Sci.*, **1994**, 2, 183-188. (d) Fendler, J. H.; *Science*, **1984**, 223, 888-894. (e) Chen, H.; Langer, R.; *Pharm. Res.*, **1997**, 14, 537-548.

²⁴ Okada, S.; Peng, S.; Spevak, W.; Charych, D.; *Acc. Chem. Res.*, **1998**, 31, 229-239.

²⁵ (a) Yi, D.; Lee, R. T.; Longo, P.; Boger, E. T.; Lee, Y. C.; Petri, W. A.; Schnaar, R. L.; *Glycobiology*, **1998**, 8, 1037-1043. (b) Davis, B. G.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1999**,

limitaciones, por ejemplo, los puntos de glicosilación no están estrictamente definidos y esto produce una heterogeneidad de glicofomas. Actualmente, se están desarrollando nuevos métodos para producir glicofomas definidas, como la mutagénesis dirigida, que permite introducir, por ejemplo, residuos de cisteína en puntos definidos de la secuencia de la proteína. Al grupo tiol de la cadena lateral de la cisteína se le puede unir selectivamente carbohidratos funcionalizados con metanotiosulfonato.²⁶ (Figura 6) El grupo de Davis en Oxford ha conseguido introducir, a través de mutagénesis dirigida, aminoácidos no naturales en posiciones precisas de la secuencia aminoacídica de la neoglicoproteína. Estos aminoácidos presentan una cadena lateral con una funcionalización (grupo azida, alquino, etc.) que permite el anclaje selectivo del carbohidrato, mediante reacciones de tipo Staudinger, cicloadición (“click chemistry”), etc.^{11,27} Estas metodologías permitirán sintetizar glicoproteínas perfectamente definidas y homogéneas en su forma, que faciliten el estudio de interacciones glicoproteína-lectina fundamentales en muchos procesos biológicos.

-
- 3215-3237. (c) Roy, R., *The chemistry of neoglycoconjugates*. Boons, G. J. (ed.) *Carbohydrate Chemistry*. Chapman and Hall, Glasgow, **1994**. (d) Roy, R.; *Top. Curr. Chem.*, **1997**, *187*, 242-274.
- ²⁶ (b) Davis, B. G.; Lloyd, R. C.; Jones, J. B.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, 1527-1535. (b) Davis, B. G.; Jones, J. B.; *Synlett*, **1999**, 1495-1507.
- ¹¹ Davis, B.G.; *Science*, **2004**, *303*, 480-482.
- ²⁷ (a) Davis, B. G.; *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 579-602. (b) 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. (c) van Kasteren, S. I.; Kramer, H. B.; Gamblin, D. P.; Davis, B. G.; *Nat. Protoc.*, **2007**, *2*, 3185-3194.

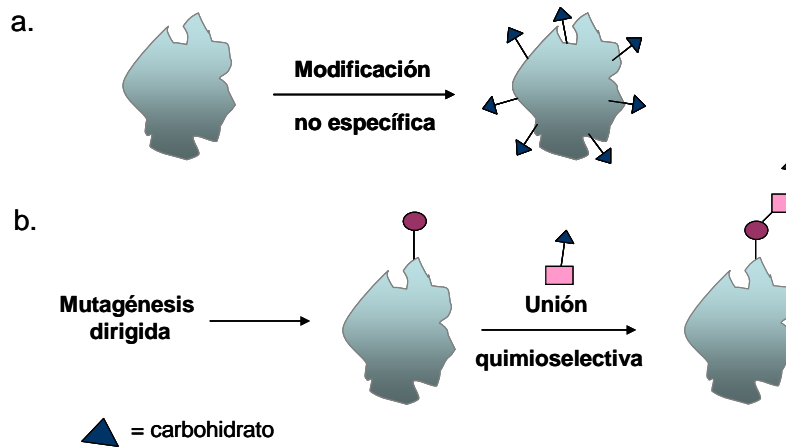


Figura 6. Preparación de neoglicoproteínas mediante: (a) modificación no específica; (b) unión quimioselectiva.

Otro grupo de compuestos multivalentes modelo son **los glicopolímeros**, sistemas que presentan una gran multivalencia, pero a la vez una alta polidispersidad. (Figura 7A) Los polímeros han sido unos soportes muy atractivos y el desarrollo de nuevas aproximaciones sintéticas para su preparación ha permitido un control más riguroso del tamaño del polímero y de la densidad de los ligandos que se unen al esqueleto polimérico. Los glicopolímeros presentan como limitación más importante la indefinición del entorno en el que se encuentra el ligando, en este caso el carbohidrato. Este entorno no está perfectamente definido (el polímero tiende a plegarse en disolución en función del disolvente y de la naturaleza de su constitución), produciendo una estructura tridimensional en la que no todos los carbohidratos introducidos están accesibles y, por tanto, el número de interacciones que se producen con el receptor normalmente es difícil de evaluar y cuantificar. Por este motivo, estos modelos son buenos para estudios que no requieran una interpretación estricta del mecanismo de interacción.

En los últimos años, también se ha desarrollado un grupo de glicopolímeros utilizando la metodología ROMP (Ring-opening metathesis polymerization), fundamentalmente por el laboratorio de la Profesora Laura Kiessling. Este grupo ha preparado una serie de glicopolímeros y los ha

funcionalizado con otras moléculas como marcadores fluorescentes. Un ejemplo son los polímeros que contienen 3',6-disulfo Le^x y que han resultado ser potentes inhibidores de L-selectina, una glicoproteína muy importante en procesos de inflamación.²⁸ (Figura 7B)

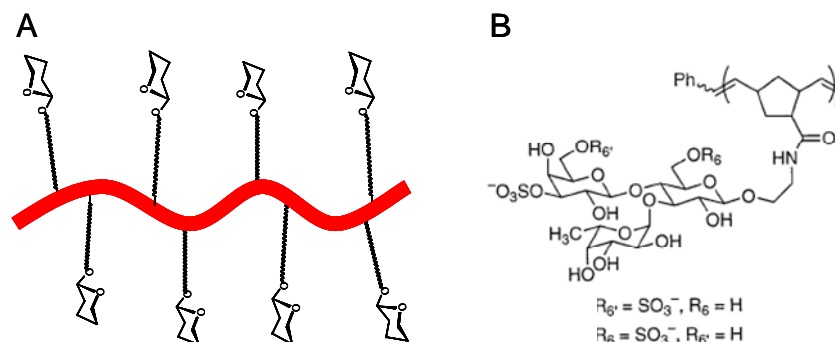


Figura 7. (A) Representación general de un glicopolímero. (B) Polímero de 3',6-disulfo Le^x, inhibidor de L-selectina.

Las **gliconanopartículas** son sistemas modelo basados en un soporte o núcleo central metálico (oro, plata, etc.) de dimensiones nanométricas a los que se les une un neoglicoconjugado, a través de un espaciador, cuya longitud y naturaleza puede modificarse. (Figura 8) Estos sistemas multivalentes de carbohidratos fueron desarrollados en nuestro grupo de investigación para el estudio de interacciones carbohidrato-proteína y carbohidrato-carbohidrato.^{17,29} Las gliconanopartículas presentan una alta estabilidad y multivalencia, son

²⁸ (a) Gordon, E. J.; Sanders, W. J.; Kiessling, L. L.; *Nature*, **1998**, 392, 30-31. (b) Gordon, E. J.; Sanders, W. J.; Kiessling, L. L.; *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, 6, 1293-1299. (c) Gestwicki, J. E.; Kiessling, L. L.; *Nature*, **2002**, 415, 81-84. (d) Gestwicki, J. E.; Strong, L. E.; Cairo, C. W.; Boehm, F. J.; Kiessling, L. L.; *Chem. Biol.*, **2002**, 9, 163-169.

¹⁷ de la Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; Rojas, T. C.; Rojo, J.; Cañada, J.; Fernández, A.; Penadés, S.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2258-2261.

²⁹ (a) Barrientos, A. G.; de la Fuente, J. M.; Rojas, T. C.; Fernández, A.; Penadés, S.; *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 1909-1921. (b) Rojo, J.; Díaz, V.; de la Fuente, J. M.; Segura, I.; Barrientos, A. G.; Riese, H. H.; Bernad, A.; Penadés, S.; *ChemBioChem*, **2004**, 5, 291-297. (c) Penadés, S.; de la Fuente, J. M.; *Glycoconjugate J.*, **2004**, 21, 149-163. (d) de la Fuente, J. M.; Eaton, P.; Barrientos, A. G.; Menéndez, M.; Penadés, S.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 6192-6197.

solubles en medios fisiológicos y sus características especiales les permiten ser estudiadas por otras técnicas como la microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), etc. El problema que presenta este tipo de sistemas multivalentes es que el rendimiento de la síntesis es muy bajo y no se pueden sintetizar en gran escala porque se produce la agregación de los núcleos de oro. Además, hasta ahora no se ha estudiado en profundidad los problemas que puede presentar la introducción de metales *in vivo* que no son biodegradables, existiendo poca información sobre el metabolismo de este tipo de metales y los problemas que puede acarrear su acumulación en el organismo.

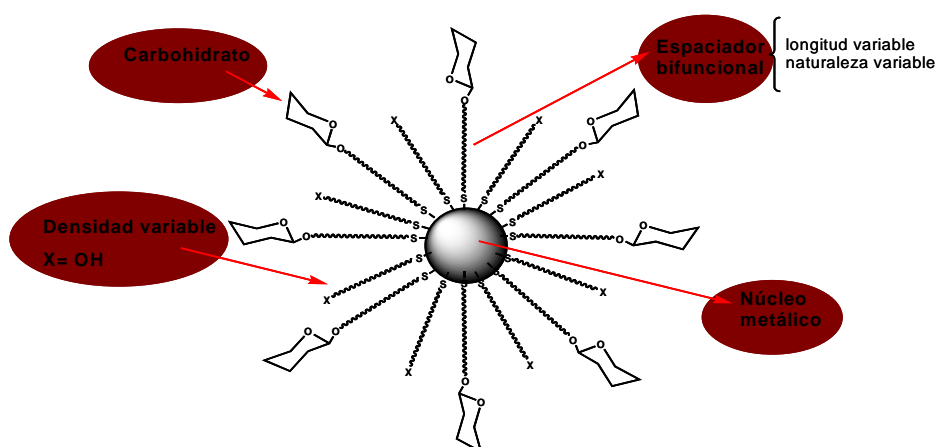


Figura 8. Representación esquemática de una gliconanopartícula.

Otro ejemplo que mimetiza la presentación de los carbohidratos sobre la superficie celular son las **monocapas autoensambladas** de alcanotioles sobre superficies de oro (SAMs). (Figura 9) Aunque estos sistemas no se pueden utilizar *in vivo*, sin embargo, son modelos interesantes que permiten obtener información muy valiosa en ensayos *in vitro*. Las SAMs constituyen una clase de sistema modelo utilizado para estudios de interacciones multivalentes en interfases.³⁰ Estas monocapas se forman espontáneamente por adsorción de alcanotioles en solución sobre una superficie limpia de oro.

³⁰ Mrksich, M.; *Chem. Soc. Rev.*, **2000**, 29, 267-273.

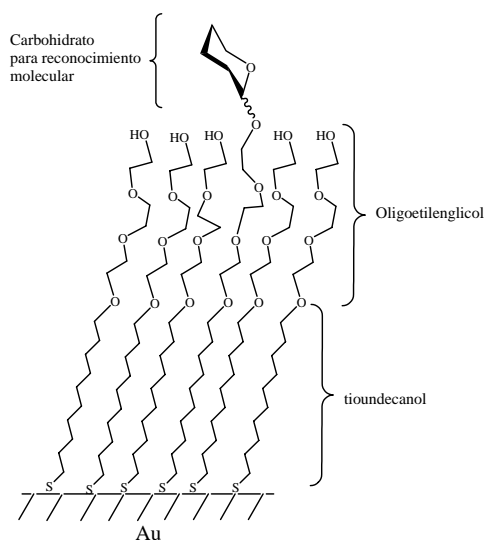


Figura 9. Arquitectura de una monocapa de alcanotioles sobre una superficie de oro.

Para los estudios de multivalencia, las monocapas tienen algunas ventajas sobre otros modelos, ya que se puede controlar a nivel molecular la estructura, la densidad y el entorno de los ligandos, pero no pueden utilizarse en estudios en disolución.

Una característica común a todos estos sistemas multivalentes modelo anteriormente descritos, es que no presentan a los carbohidratos en su entorno celular; sin embargo, se han desarrollado varias aproximaciones que intentan solucionar este problema. La primera de estas aproximaciones se basa en la modificación enzimática de células de mamíferos para que expresen carbohidratos no naturales.³¹ Un ejemplo, desarrollado por Hindsgaul y colaboradores, utiliza una $Le^x\alpha$ (1-3,4)-fucosiltransferasa para transferir el trisacárido Le^x a la superficie de eritrocitos.³² Más recientemente y dentro de esta aproximación, el grupo de Bertozzi aprovecha la maquinaria enzimática propia

³¹ (a) Öhrlein, R.; *Top. Curr. Chem.*, **1999**, 200, 227-254. (b) Takayama, S.; Wong, C. H.; *Curr. Org. Chem.*, **1997**, 1, 109-126.

³² Srivastava, G.; Kaur, K. J.; Hindsgaul, O.; Palcic, M.; *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 22356-22361.

de la célula para que ésta modifique los carbohidratos sobre su superficie.³³ En uno de estos ejemplos, la *N*-acetilmanosamina, que es procesada por las enzimas responsables de la síntesis del ácido siálico, se sustituye por una *N*-levulinoilmanosamina que lleva un grupo cetónico (levulino) en lugar de un grupo acetilo. (Figura 10) El ácido siálico modificado se transporta a la superficie celular donde puede ser modificado selectivamente usando grupos nucleófilos como hidrazina, aminooxi o tiosemicarbazida. Aunque este método es muy selectivo, está limitado a unas pocas rutas biosintéticas celulares que puedan tolerar grupos funcionales no naturales. Sin embargo, los resultados obtenidos por Bertozzi permiten albergar la esperanza de que estos modelos celulares pueden llegar a ser en un futuro herramientas muy útiles para modificaciones más complejas de la superficie celular.

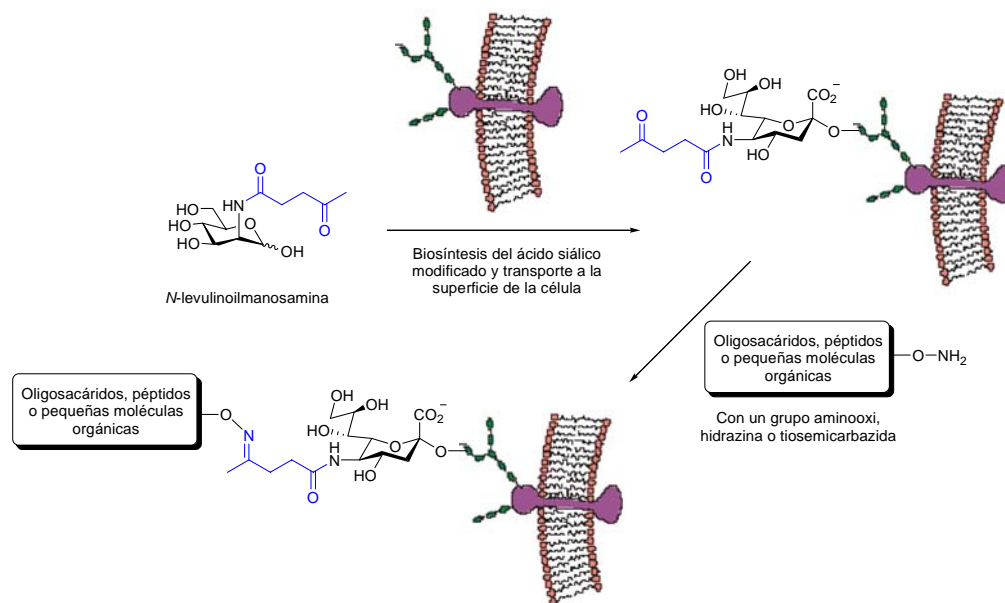


Figura 10. Uso de la maquinaria enzimática celular para la introducción de carbohidratos modificados que permiten enlazar diferentes moléculas a la superficie de la célula.

³³ Jacobs, C. L.; Yarema, K. L.; Nauman, D. A.; Charters, N. W.; Bertozzi, C. R.; *Methods Enzymol.*, **2000**, 327, 260-275. (b) Mahal, L. K.; Yamera, K. J.; Bertozzi, C. R.; *Science*, **1997**, 276, 1125-1128. (c) Saxon, E.; Bertozzi, C. R.; *Science*, **2000**, 287, 2007-2010.

El último de los sistemas multivalentes de carbohidratos modelo que se va a comentar son **los glicodendrimeros**. El nombre de dendrimer deriva del griego: 'dendron' (árbol) y el sufijo 'mer' (segmento), porque su estructura molecular tiene cierto parecido a la disposición que presentan las ramas o las raíces de los árboles. Además, la arquitectura dendrítica es una topología que está ampliamente presente en la naturaleza. Numerosos ejemplos de este patrón se pueden encontrar a diferentes escalas de tamaño: árboles (metros), hongos (milímetros/centímetros), neuronas (micrómetros) como se puede observar en la figura 11.

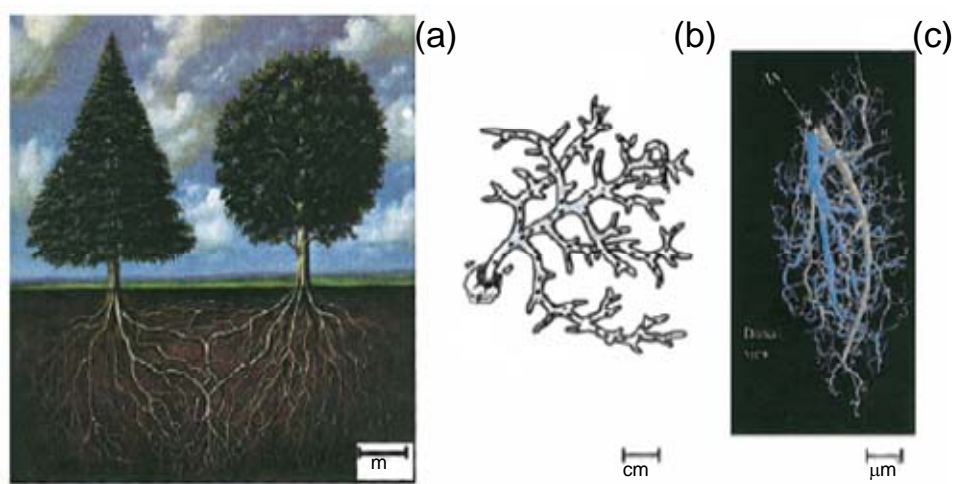


Figura 11. *Sistemas naturales que presentan topología dendrítica: (a) ramas y raíces de los árboles, (b) anatomía de un hongo, (c) neurona gigante de cucaracha.*

Los dendrimeros son polímeros altamente ramificados con estructura casi globular (en función de su tamaño), versátiles, derivatizables y estructuralmente bien definidos (monodispersos) con tamaños y propiedades fisicoquímicas que pueden parecerse mucho a biomoléculas como, por ejemplo, proteínas. Desde su descubrimiento a finales de los años 70s,³⁴ los dendrimeros han demostrado ser unos compuestos con múltiples aplicaciones tanto en ciencia de materiales como

³⁴ Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F.; *Synthesis*, **1978**, 155-158.

en biología y biomedicina.³⁵ Estos sistemas son muy interesantes para una eficiente presentación multivalente de ligandos biológicos, como los carbohidratos, dando lugar a los denominados glicodendrimeros.³⁶ La ventaja de los glicodendrimeros frente a otros sistemas multivalentes con carbohidratos es que se pueden preparar desde compuestos que presentan un número pequeño de unidades de carbohidrato hasta sistemas que presentan un gran número de carbohidratos en la superficie. Es decir, el diseño puede ser ajustado a las características del receptor que se pretende estudiar. Hay dos estrategias principales para la síntesis de dendrimeros. La síntesis divergente, en la que la construcción del dendrímtero se comienza desde el núcleo hacia el exterior y la síntesis convergente, en la que el dendrímtero se construye desde el exterior hacia el núcleo. (Figura 12)

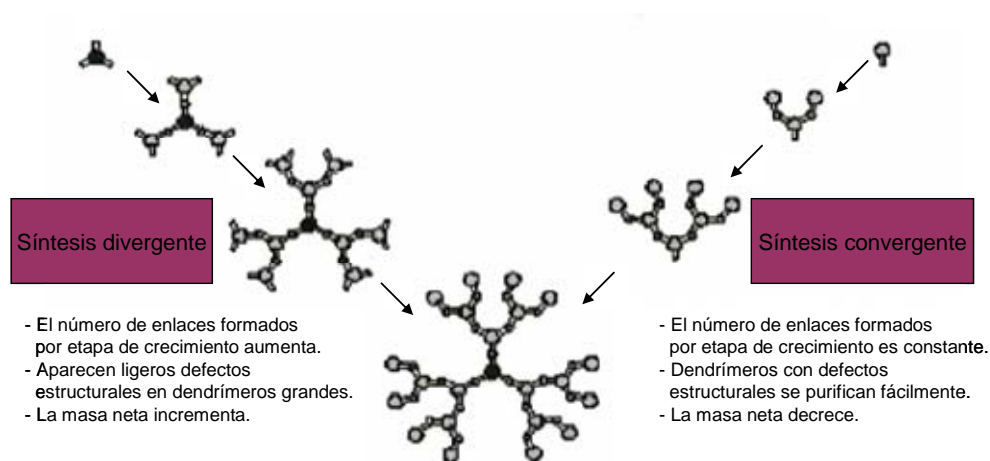


Figura 12. Representación de las estrategias convergente y divergente para la síntesis de dendrimeros.

³⁵ (a) Fréchet, J. M. J.; Tomalia, D. A. (eds.) *Dendrimers and other Dendritic Polymers*, John Wiley and Sons Ltd, New York, **2001**. (b) Fréchet, J. M.; *Science*, **1994**, *263*, 1710-1715. (c) Bossman, A. W.; Janssen, H. M.; Meijer, E. W.; *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 1665-1668. (d) Esfand, R.; Tomalia, D. A.; *Drug Discovery Today*, **2001**, *8*, 427-436. (e) Cloninger, M. J.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, *6*, 742-748. (f) Lee, C. C.; MacKay, J. A.; Fréchet, J. M.; *Nat. Biotech.*, **2005**, *23*, 1517-1526.

³⁶ (a) Röckendorf, N.; Lindhorst, T. K.; *Top. Curr. Chem.*, **2001**, *217*, 201-238. (b) Turnbull, W. B.; Stoddart, J. K.; *Rev. Mol. Biotech.*, **2002**, *90*, 231-255. (c) Bezouska, K.; *Rev. Mol. Biotech.*, **2002**, *90*, 269-290. (d) Roy, R.; Baek, M-G.; *Rev. Mol. Biotech.*, **2002**, *90*, 291-309.

El primer ejemplo de glicodendrúmero fue desarrollado por Roy y col. y consistía en una oligolisina hiperramificada que presentaba 16 moléculas de ácido siálico. Este sistema demostró ser un potente inhibidor de la hemoaglutinación causada por el virus de la gripe.³⁷

Todos los sistemas anteriores se han aplicado al estudio de interacciones carbohidrato-proteína. Algunos de estos modelos que presentan un número pequeño de carbohidratos, se han diseñado basándose en los requerimientos estructurales de un sistema biológico concreto, mientras que otros se han desarrollado para estudiar la interacción entre grandes superficies, intentando mimetizar la membrana celular. En muchos casos, la falta de información estructural que se tiene sobre el receptor y la disposición de éste en el entorno natural, hace que estos sistemas multivalentes se diseñen basándose fundamentalmente en los resultados precedentes y no en parámetros estructurales reales. Los esfuerzos realizados en la preparación de nuevos sistemas multivalentes más eficaces enfatizan la necesidad del desarrollo de nuevas herramientas analíticas, nuevos métodos sintéticos y sistemas modelo más sofisticados, que faciliten la comprensión de los complejos procesos biológicos.

Nuestro grupo de investigación desarrolla su actividad fundamentalmente en la preparación de herramientas basadas en carbohidratos para entender el papel de éstos en determinados procesos biológicos de interés. En los últimos años una parte de la investigación se ha encaminado fundamentalmente hacia la preparación de sistemas glicodendríticos que permitan estudiar el papel que juega el receptor denominado DC-SIGN en los procesos de infección y en la modulación de la respuesta inmune.

³⁷ Roy, R.; Zanini, D.; Meunier, S. J.; Romanowska, A. J.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 1869-1872.

1.3 DC-SIGN: receptor clave en procesos de infección.

DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin) también denominado 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 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 calcio 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 13) 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, responsable de la oligomerización de la proteína (DC-SIGN es un tetrámero)³⁸ y en el extremo *C*-terminal, el dominio de lectina de tipo C, o dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD). (Figura 13) El CRD es el responsable de la interacción con carbohidratos presentes en glicoproteínas 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 1992.³⁹ Pero no fue hasta el año 2000, cuando el grupo de la Profesora van Kooyk redescubrió esta proteína y puso de manifiesto el papel que podría jugar DC-SIGN en el proceso de infección del VIH.⁴⁰

³⁸ Feinberg, H.; Guo, Y.; Mitchel, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I.; *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 1327-1335.

³⁹ Curtis, B. M.; Scharnowski, S.; Watson, A. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 8356-8360.

⁴⁰ (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.

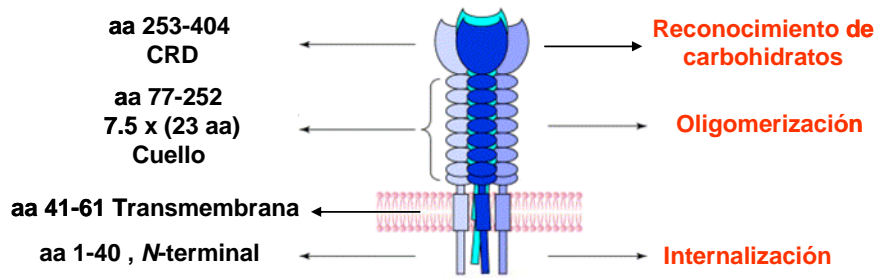


Figura 13. Dominios del receptor DC-SIGN.

DC-SIGN participa de una forma crucial en uno de los mecanismos que utiliza nuestro organismo para el reconocimiento de patógenos y su posterior presentación a células del sistema inmunitario (células T) para generar una respuesta inmune adaptativa (en contraposición a la respuesta inmune innata). Esta lectina está presente en la superficie de las células dendríticas (DCs) que forman parte de un grupo específico de células del sistema inmunitario denominadas células presentadoras de antígenos (APCs). Estas células son los centinelas que tiene el sistema inmune para detectar y defenderse de la invasión de patógenos, encargándose de capturar y procesar los fragmentos antigénicos.⁴¹ Los altos niveles de expresión de DC-SIGN en células dendríticas inmaduras y la alta afinidad que presenta por las glicoproteínas de la envoltura de algunos patógenos, indican que el receptor DC-SIGN está dotado de la capacidad de capturar de forma eficiente estos patógenos. Después de la interacción e internalización del patógeno, estas células dendríticas maduran, sufren una serie de complejas transformaciones y adquieren la capacidad de migrar al tejido linfático para presentar los antígenos procesados en forma de complejos MHC a las células T y desencadenar una respuesta inmune. (Figura 14)

⁴¹ Banchereau, J.; Steinman, R. M.; *Nature*, **1998**, 392, 245-252.

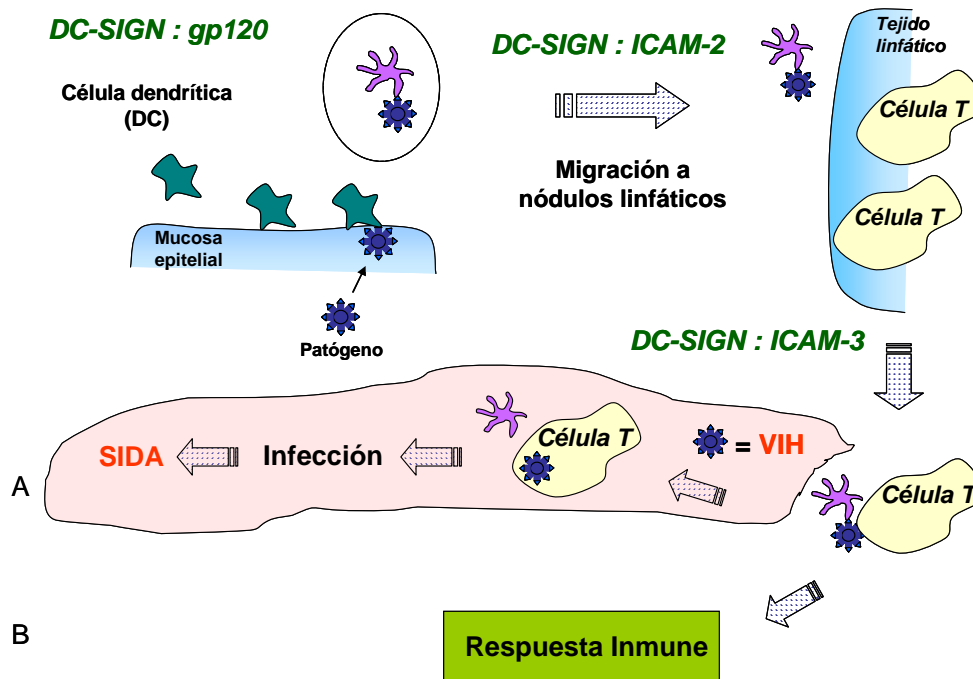


Figura 14. (A) Esquema de infección del virus del sida utilizando la interacción DC-SIGN:gp120. (B) Esquema general del desarrollo de la respuesta inmune ante un proceso de infección.

Todo este complejo mecanismo en el que se producen numerosos procesos de reconocimiento molecular y que está orquestado por la liberación de moléculas señalizadoras, tiene como etapa inicial y clave el reconocimiento del patógeno por la célula dendrítica.⁴²

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. En otras palabras, el virus del SIDA es capaz de “secuestrar” este mecanismo de defensa del organismo para su

⁴² (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.; Demareux, N.; Lanzavecchia, A.; Franssen, J.; Figdor, C. G.; Piguet, V.; van Kooyk, Y.; *J. Immunol.*, **2002**, *168*, 2118-2126.

propio beneficio y poder alcanzar así sus células diana (células T) del sistema inmune. (Figura 14A)

Después de la aparición de estos trabajos sobre el papel de la lectina DC-SIGN en el proceso de infección del VIH, este receptor ha despertado un interés creciente en la comunidad científica, debido al potencial que presenta como nueva diana para el desarrollo de compuestos que bloqueen la interacción de los patógenos y que puedan actuar como fármacos antivirales. A modo ilustrativo, en la figura 15 se recoge el número de publicaciones relacionadas con DC-SIGN desde su redescubrimiento en el año 2000.⁴³ Como se puede observar hay un gran aumento en la bibliografía que concierne a este receptor, sobre todo en los últimos años.

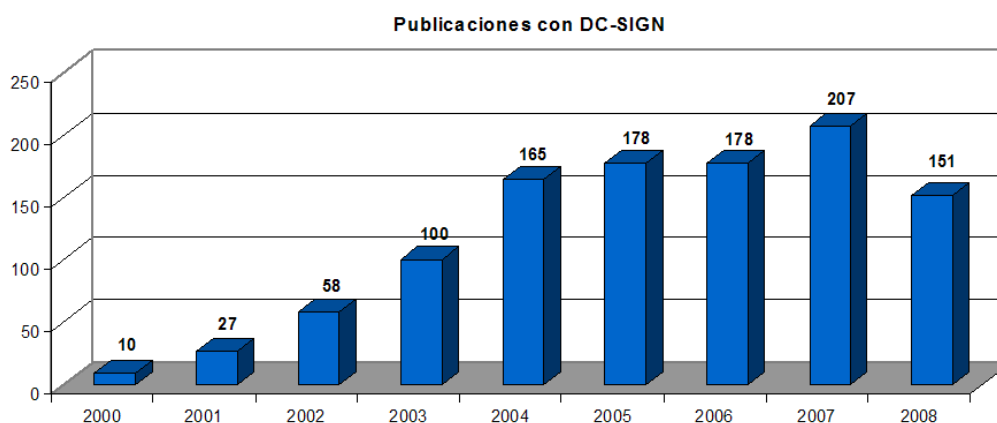


Figura 15. Evolución del número de trabajos publicados sobre la lectina DC-SIGN desde su redescubrimiento en el año 2000 hasta agosto del 2008.

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-1⁴⁰ y VIH-2,⁴⁴ SIV-1,⁴⁵ Ébola,⁴⁶

⁴³ Fuente ISIS Web of Knowledge.

⁴⁰ (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.;

Hepatitis C,⁴⁷ SARS,⁴⁸ Citomegalovirus⁴⁹ o Dengue⁵⁰), bacterias (*Helicobacter pylori*,⁵¹ *Mycobacterium Tuberculosis*⁵²), hongos (*Candida albicans*⁵³), y parásitos (*Schistosoma mansoni*,⁵⁴ *Leishmania pifanoi*⁵⁵) 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.⁵⁶

Las glicoproteínas de estos patógenos que son reconocidos por DC-SIGN contienen, fundamentalmente, estructuras oligosacáridicas que presenta 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*, constituida por Man₉GlcNAc₂ como epítipo principal, es considerada como uno

-
- 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.
- ⁴⁴ 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.
- ⁴⁵ 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.
- ⁴⁶ Álvarez, C. P.; Lasala, F.; Carrillo, J.; Muñoz, O.; Corbí, A. L.; Delgado, R.; *J. Virol.*, **2002**, *76*, 6841-6844.
- ⁴⁷ 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.
- ⁴⁸ 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.
- ⁴⁹ 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.
- ⁵⁰ 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.
- ⁵¹ 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.
- ⁵² 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.
- ⁵³ 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.
- ⁵⁴ 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.
- ⁵⁵ Colmenares, M.; Puig-Kröger, A.; Pello, O. M.; Corbí, A. L.; Rivas, L.; *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 36766-36769.
- ⁵⁶ (a) van Kooyk, Y.; Geijtenbeek, T. B.; *Nat. Rev. Immunol.*, **2003**, *3*, 697-709. (b) Pöhlmann, S.; Baribaud, F.; Doms, R. W.; *Trends in Immunol.*, **2001**, *22*, 643-646.

de los ligandos que interaccionan de forma más fuerte con esta lectina. (Figura 16). DC-SIGN reconoce tanto estructuras ramificadas con un mínimo de tres unidades de manosa (trisacáridos del tipo $\text{Man}\alpha 1-3[\text{Man}\alpha 1-6]\text{Man}$ indicado en color azul en la figura 16) como estructuras con dos unidades de manosa terminales (disacáridos $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}$ indicado en color rojo en la figura 16). Además, el reconocimiento específico de diferentes estructuras oligosacáridicas por DC-SIGN parece que depende del lugar que ocupe el carbohidrato en la glicoproteína.⁵⁷ Parece evidente que la disposición espacial de este “cluster” de manosas ramificadas presente en distintos enclaves de la proteína viral es crítico en la interacción selectiva multivalente con DC-SIGN.

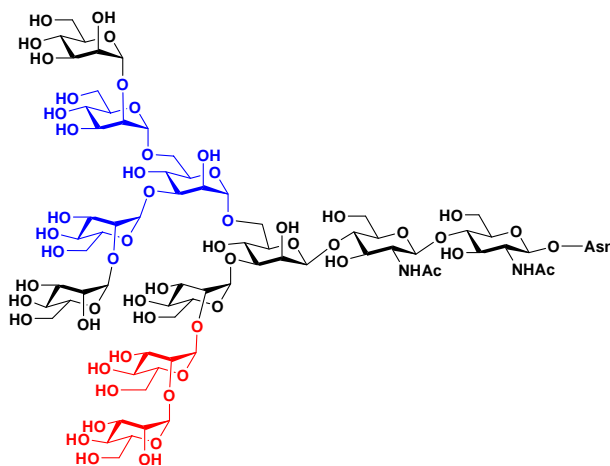


Figura 16. Estructura del oligosacárido high mannose.

El CRD de DC-SIGN es una estructura globular consistente en 12 láminas β , dos hélices α , tres puentes disulfuro y tres cationes Ca^{2+} . Dos bucles que sobresalen de la superficie de la proteína forman los tres sitios de enlace de los cationes Ca^{2+} . (Figura 17) Dos de estos cationes Ca^{2+} son esenciales para mantener la conformación del CRD, pero pueden coordinarse con grupos hidroxilo de los anillos de piranosa de algunos oligosacáridos. El ión calcio número 2, en cambio, es esencial para la coordinación directa con los grupos

⁵⁷ Mitchell, D. A.; Fadden, A. J.; Drickamer, K.; *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 28939-28945.

hidroxilo del carbohidrato y participa directamente en el proceso de reconocimiento. (Figura 17)

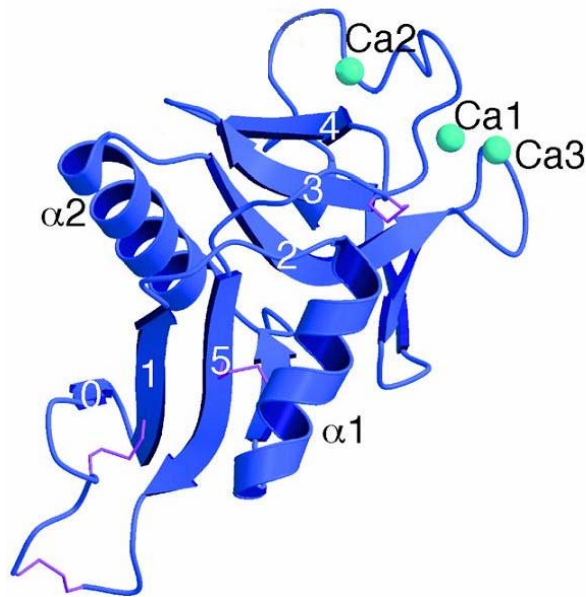


Figura 17. Estructura cristalina del CRD de DC-SIGN.

Actualmente, no existe disponible mucha información, a nivel molecular, sobre el reconocimiento de los diferentes oligosacáridos por el CRD de DC-SIGN. La única información disponible se ha obtenido en estado sólido. La primera estructura de rayos X obtenida por Weis y colaboradores, corresponde a un complejo formado por el pentasacárido $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ y el CRD de DC-SIGN.⁵⁸ (Figura 18A) En este trabajo se proponen las bases de la selectividad de la interacción de los oligosacáridos del tipo *high mannose* con DC-SIGN, utilizando la estructura cristalina obtenida y realizando estudios de modelado molecular con el undecasacárido de *high mannose* ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). Posteriormente, se han obtenido estructuras de los complejos de DC-SIGN con un pentasacárido que contiene en su estructura el trisacárido de Lewis x⁵⁹ y de

⁵⁸ Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I.; *Science*, **2001**, *294*, 2163-2166.

⁵⁹ Gou, Y.; Feinberg, H.; Conroy, E.; Mitchell, D. A.; Alvarez, R.; Blixt, O.; Taylor, M. E.; Weis, W. I.; Drickamer, K.; *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2004**, *11*, 591-598.

diferentes oligosacáridos de manosa que van desde $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ (Figura 18C) hasta disacáridos de manosa como $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ (Figura 18 D) que forman parte de la estructura de *high mannose*.⁶⁰

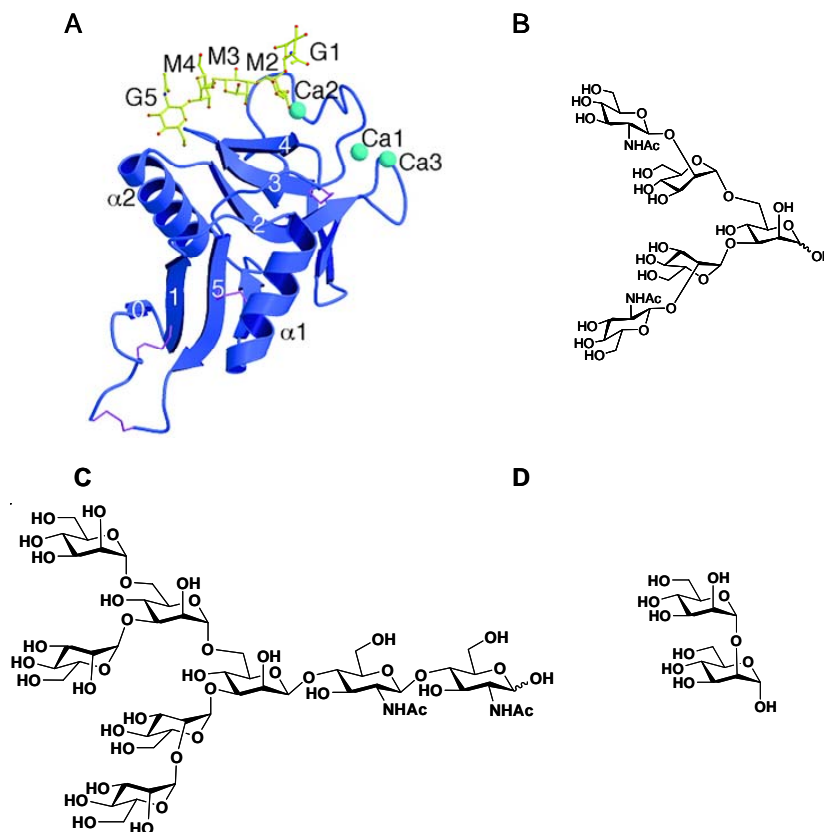


Figura 18. (A) Representación de la estructura del Complejo CRD de DC-SIGN con el pentasacárido $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ obtenida por difracción de rayos X. (B) Estructura del pentasacárido $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ (C) Estructura del carbohidrato $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$. (D) Estructura del disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$.

Estas estructuras revelan la existencia de al menos dos modos de unión del oligosacárido a DC-SIGN. Los dos modos de unión presentan características típicas de la interacción de las lectinas de tipo C, en las que el Ca^{2+} situado en la posición principal interacciona con grupos hidroxilo vecinales de uno de los

⁶⁰ Feinberg, H.; Castelli, R.; Drickamer, K.; Seeberger, P. H.; Weis, W. I.; *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 4202-4209.

residuos de manosa. Esta coordinación se produce a través de los grupos hidroxilo ecuatoriales 3 y 4 de la unidad de manosa. (Figura 19) En cambio, el siguiente residuo de manosa que interacciona con la lectina presenta contactos específicos para cada uno de los oligosacáridos estudiados.

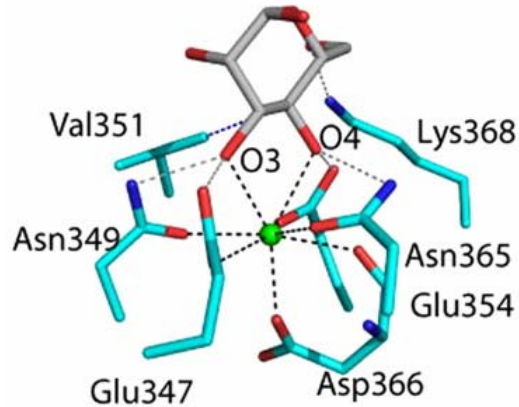


Figura 19. Representación del modo de unión de los residuos de los aminoácidos del CRD en el sitio del Ca^{2+} principal (verde) con manosa (gris). Coordinación de Ca^{2+} con los grupos OH ecuatoriales 3 y 4 de la manosa.

La selección de los oligosacáridos que puedan actuar como ligandos selectivos que bloqueen la interacción entre las glicoproteínas de los patógenos y DC-SIGN en sistemas multivalentes requiere un conocimiento profundo del proceso de reconocimiento molecular. Hasta ahora, no se ha obtenido información a nivel estructural en disolución, pero sí se puede encontrar en la bibliografía información sobre constantes de afinidad de sistemas mono y multivalentes que presentan diversos oligosacáridos con DC-SIGN mediante el uso de diferentes técnicas como ELLA (Enzyme Linked Lectin Assay), Biosensores, Microarrays, citometría de flujo, etc.^{49,61} (Tabla 1)

⁴⁹ (a) Halary, F.; Amara, A.; Lortat-Jacob, H.; Messerle, M.; Delaunay, T.; Houles, C.; Fieschi, F.; Aranzana-Seisdedos, F.; Moreau, J. F.; Chanet-Merville, J.; *Immunity*, **2002**, *17*, 653-664.

⁶¹ (a) Lozach, P. Y.; Lortat-Jacob, H.; de Lacroix, L. A.; Staropoli, I.; Fong, S.; Amara, A.; Houles, C.; Fieschi, F.; Schwartz, O.; Virelizier, J. L.; Aranzana-Seisdedos, F.; Altmeyer, R.; *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 20358-20366. (b) de Parseval, A.; Su, S. V.; Elder, J. H.; Lee, B.; *J. Virol.*, **2004**, *78*, 2597-2600. (c) Su, S. V.; Hong, P.; Baik, S.; Negrete, O. A.; Gurney, K. B.; Lee, B.; *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 19122-19132. (d) Adams, E. W.; Ratner, D. M.;

Tabla 1. Datos de interacción de diferentes oligosacáridos, glicoproteínas y sistemas multivalentes con la lectina DC-SIGN.

Molécula	Carbohidrato implicado	Técnica	Afinidad por DC-SIGN
Manosa	Man	Competición con BSA-Man*	Ki=13.1 mM ^{61h}
Galactosa	Gal	Competición con BSA-Man	Ki=72.0 mM ^{61h}
L-Fucosa	Fuc	Competición con BSA-Man	Ki=6.7 mM ^{61h}
High Mannose	Man ₉ Glc ₂ NAc	Competición con BSA-Man	Ki=0.21 mM ^{61h}
PAA-Lewis x*	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc	Array de Carbohidratos	IC₅₀=5.0 μM ^{61e}
PAA-Lewis a*	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc	Array de Carbohidratos	IC₅₀=2.4 μM ^{61e}
Dendrón con 25 unidades de Man ₄	Man ₄	Array de Carbohidratos	IC₅₀=0.16 μM ^{61g}
Dendrón con 9 unidades de Man ₉	Man ₉ Glc ₂ NAc	Array de Carbohidratos	IC₅₀=26nM ^{61g}
gp120 (VIH)	Man ₉ Glc ₂ NAc	Biosensor	Kd=0.3 μM ⁴⁹
gB (CMV)*	—	Biosensor	Kd=0.29μM ⁴⁹
gp95-Fc (VIF)*	Man ₉ Glc ₂ NAc	ELLA	Kd=1.03 nM ^{61b}
gp120-Fc (VIH)	Man ₉ Glc ₂ NAc	ELLA	Kd=2.99 nM ^{61c}

*PAA:poliacrilamida, VIF: virus de inmunodeficiencia del felino, CMV: citomegalovirus, BSA-Man: conjugado multivalente de la albúmina de suero bovino con manosa

Bokesch, H. R.; McMahon, J. B.; O'Keefe, B. R.; Seeberger, P. H.; *Chem. Biol.*, **2004**, *11*, 875-881. (e) van Liempt, E.; Bank, C. M. C.; Mehta, P.; García-Vallejo, J. J.; Kwar, Z. S.; Geyer, R.; Alvarez, R. A.; Cummings, R. D.; van Kooyk, Y.; van Die, I.; *FEBS Lett.*, **2006**, *580*, 6123-6131. (f) Meyer, S.; van Liempt, E.; Imberty, A.; van Kooyk, Y.; Geyer, H.; Geyer, R.; van Die, I.; *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 37349-37359. (g) Wang, S.-K.; Liang, P.-H.; Astronomo, R. D.; Hsu, T.-L.; Hsieh, S.-L.; Burton, D. R.; Wong, C.-H.; *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **2008**, *105*, 3690-3695. (h) Mitchell, D. A.; Fadden, A. J.; Drickamer, K.; *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 28939-28945.

El uso de técnicas diferentes para obtener estos datos de la interacción no permite hacer una comparativa rigurosa entre los ligandos estudiados. En la tabla anterior se exponen los datos que existen de interacción o inhibición de diferentes oligosacáridos, glicoproteínas y sistemas multivalentes de carbohidratos con DC-SIGN. La conclusión que se puede extraer de estos resultados es que algunos de los oligosacáridos de manosa y fucosa más complejos son los que presentan mayor interacción con DC-SIGN, pero la diferencia con estructuras más sencillas no es demasiado grande. Además, estas diferencias se pueden compensar con una presentación multivalente de los oligosacáridos sencillos, disminuyendo el coste y el tiempo de preparación de los ligandos.

De estos resultados cabe destacar la gran afinidad de los sistemas naturales gp95 y gp120 por DC-SIGN poniendo de relieve no solo la importancia de la multivalencia, sino también de una presentación espacial determinada.

En estos trabajos se han estudiados oligosacáridos de manosa de diferentes tamaños que forman parte de la estructura de *high mannose*, así como oligosacáridos que contienen fucosa en sus estructuras. Muy recientemente, el grupo de Kiessling ha realizado un cribado de miles de moléculas, que no son carbohidratos, en la búsqueda de inhibidores de DC-SIGN.⁶²

Kiessling y col. realizaron una búsqueda de moléculas comerciales de pequeño tamaño, que no fueran oligosacáridos y que tuvieran la capacidad de bloquear a la lectina DC-SIGN. Para ello realizaron un ensayo de competición en fase sólida utilizando BSA-Man₂₀₋₂₅ (proteína BSA funcionalizada con un número de manosas entre 20 y 25) marcada fluorescentemente. En el estudio se realizó un barrido de 36000 productos comerciales provenientes de dos bases de datos distintas (Chembridge DIVERSet y Chemical Diversity Labs) y se encontraron 7 productos que presentaban un IC₅₀ del orden micromolar (μM). (Figura 20) Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de moléculas de pequeño tamaño que no son carbohidratos que presentan muy alta afinidad por DC-SIGN. Estas

⁶² Borrok, M. J.; Kiessling, L. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 12780-12785.

moléculas presentan un gran potencial para ser utilizadas como inhibidores de este receptor.

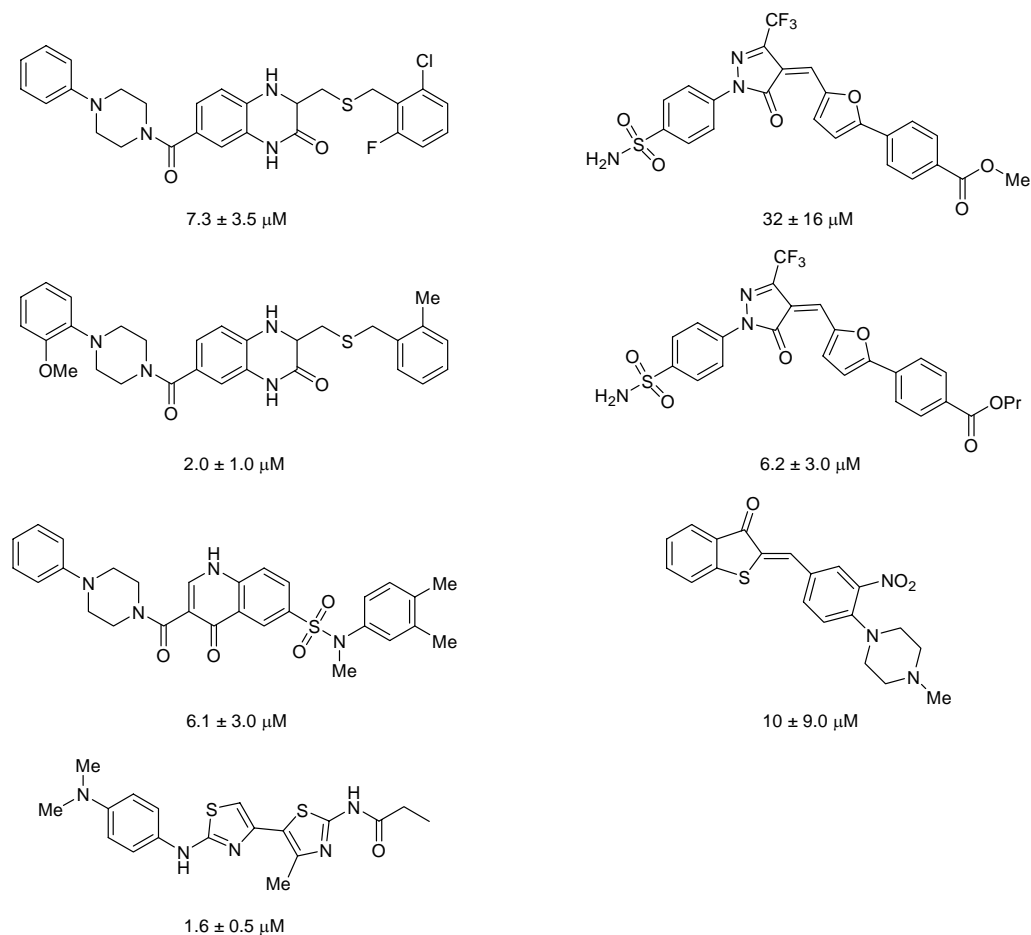


Figura 20. Estructura de los compuestos inhibidores de la lectina DC-SIGN que no presentan naturaleza de carbohidrato.

Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de desarrollar más trabajo en éste área en la búsqueda de nuevos ligandos y sistemas multivalentes que se puedan usar como inhibidores del receptor DC-SIGN. Además, el desarrollo de herramientas y técnicas que permitan obtener una mayor información en disolución a nivel estructural del proceso de reconocimiento molecular entre DC-SIGN y diferentes ligandos permitirá el diseño y la preparación de sistemas más selectivos y eficaces.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1 Antecedentes del Grupo de Investigación.

Anteriormente al trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral, en nuestro laboratorio se habían preparado polímeros glicodendríticos de manosa uniendo unidades de este carbohidrato a una estructura polimérica comercial altamente ramificada denominada Boltorn a través de un espaciador. Estos polímeros están basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico, que se usa como monómero AB₂ y en el 2,2-bis(hidroximetil)-1,3-propanodiol o pentaeritritol como núcleo central de crecimiento. Diferentes generaciones de este polímero dendrítico se encuentran disponibles comercialmente, lo que ha permitido acceder a diversos polímeros con un número diferente de grupos hidroxilos en la superficie para ser funcionalizados: 2^a generación (2 G), Boltorn H20 (16 OH); 3^a generación (3 G), Boltorn H30 (32 OH); y 4^a generación (4 G), Boltorn H40 (64 OH). (Figura 21)

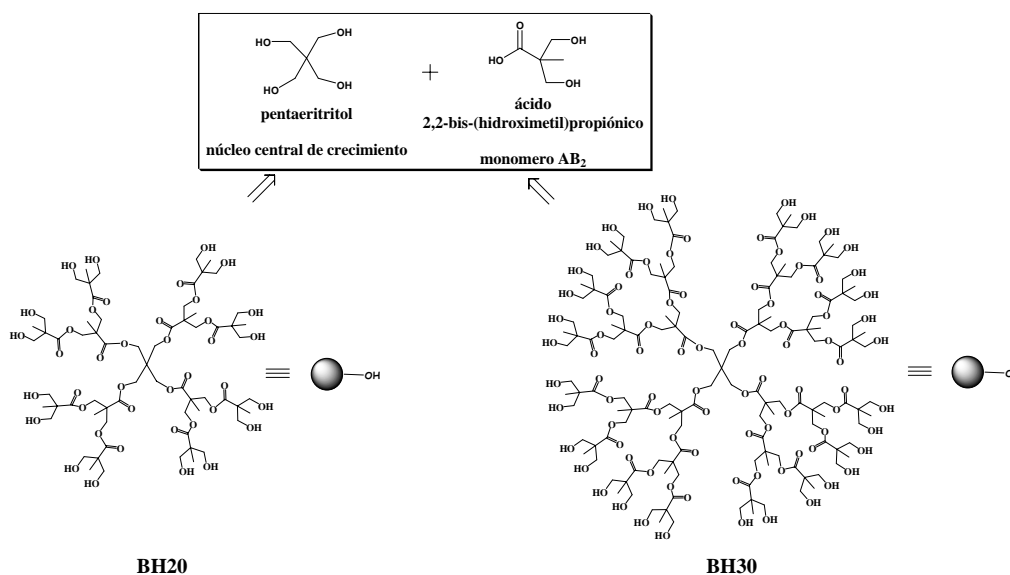
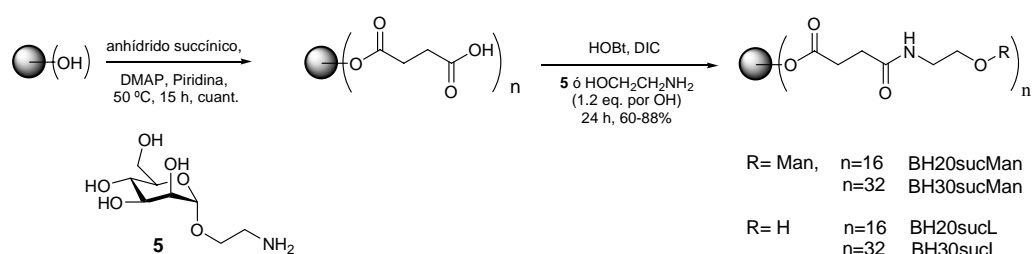


Figura 21. Sistemas poliméricos dendríticos Boltorn de 2^a (BH20) y 3^a (BH30) generación.

Estos polímeros comerciales Boltorn se han utilizado fundamentalmente en la industria como aditivos en pinturas y como superficies protectoras para plásticos. Hasta la fecha, sólo se había descrito una excepción a estas

aplicaciones, que era su uso como soporte para la síntesis de oligosacáridos en disolución.⁶³ Estos polímeros dendríticos nunca habían sido considerados como soporte para una presentación multivalente de ligandos con importancia biológica.

En nuestro grupo de investigación se ha utilizado fundamentalmente los polímeros de 2^a generación (BH20) y 3^a generación (BH30). 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 carboxílicos. 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.



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

Como primera aproximación se utilizó como azúcar un monosacárido, la α -D-manopiranososa, pensando en preparar posteriormente estructuras oligosacarídicas más complejas. Para poder unir la manosa al soporte multivalente fue necesario utilizar una manosa funcionalizada en la posición anomérica con un espaciador que presentara una amina terminal (manosa **5**) como se representa en el esquema 1.

⁶³ Kantchev, A.S.; Parquette, J. R.; *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 8049-8053.

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.⁶⁴

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.⁶⁴ Una vez confirmadas estas características, se llevaron a cabo estudios de inhibición en modelos de infección.

Los primeros estudios biológicos que se realizaron con estos sistemas multivalentes fueron los experimentos de inhibición de la interacción de DC-SIGN con la glicoproteína GP1 del virus del Ébola. 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 a dicho receptor en presencia y en ausencia de los inhibidores glicodendríticos, mediante la utilización de anticuerpos marcados fluorescentemente como se muestra en la figura 22a. La medida de la fluorescencia observada indicaba la capacidad de inhibición de los compuestos utilizados. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la gráfica de la figura 22b. En este experimento se demostró que al menos la 3ª generación con 32 manosas en la superficie inhibía la interacción entre DC-SIGN y GP1.

⁶⁴ Arce, E.; Nieto, P. M.; Díaz, V.; García-Castro, R.; Bernad, A.; Rojo, J.; *Bioconjug. Chem.*, **2003**, *14*, 817-823.

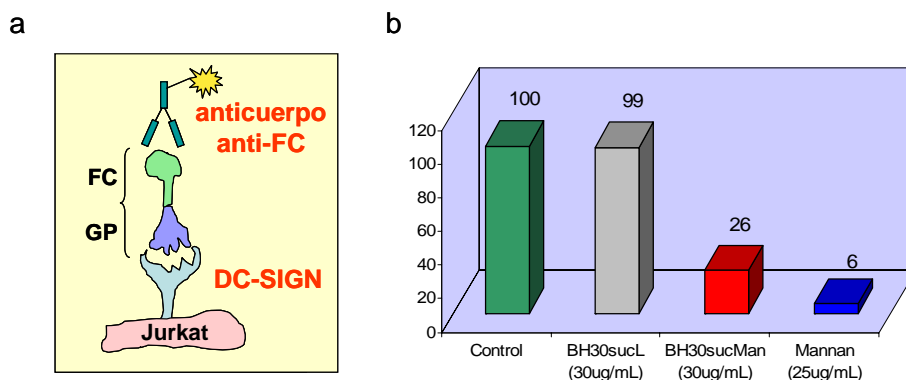


Figura 22. (a) Representación del experimento de inhibición de la interacción GPI-DC-SIGN. (b) Resultados obtenidos en el experimento de inhibición.

Posteriormente, se realizaron experimentos de inhibición de la infección directa (en *cis*) y de la infección mediada por un transportador (en *trans*) con un modelo artificial del virus del Ébola denominado partículas virales pseudotipadas.⁶⁵ Estas partículas virales son sencillamente virus construidos de forma artificial que presentan en la superficie, en este caso particular, las moléculas del virus del Ébola necesarias para el reconocimiento y posterior entrada en las dianas celulares. El material genético basado en el VIH presente en estas partículas se modificó para que contuvieran el gen de la luciferasa que permitiría la cuantificación de la infección, y se eliminaron otros genes para que el virus no fuera capaz de volverse a autoensamblar y se pudiera utilizar en laboratorios de seguridad P2 en lugar de los P4 necesarios para trabajar con el virus del Ébola.⁶⁶ De forma resumida, estos experimentos de inhibición en *cis* consistieron en la incubación de las partículas virales pseudotipadas del Ébola con las células Jurkat que expresan DC-SIGN en presencia o en ausencia de inhibidores. (Figura 23) Tras 48 horas, se lavaron las muestras para eliminar del medio las partículas virales que no habían interactuado y finalmente se llevó a cabo un ensayo de actividad de luciferasa (enzima expresado por las células

⁶⁵ (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.

⁶⁶ Yang, S.; Delgado, R.; Xu, L.; Todd, R. F.; Nabel, E. G.; Sanchez, A.; Nabel, G. J.; *Science*, **1998**, *279*, 1034-1037.

infectadas) añadiendo luciferina que se degrada produciendo luz que es cuantificada en un fotómetro. En presencia de inhibidores, DC-SIGN sería bloqueada por estos inhibidores, y el nivel de infección se reduciría. El ensayo de luciferasa reflejaría, en este caso, un decrecimiento de la actividad enzimática comparada con el control positivo (sin inhibidores).

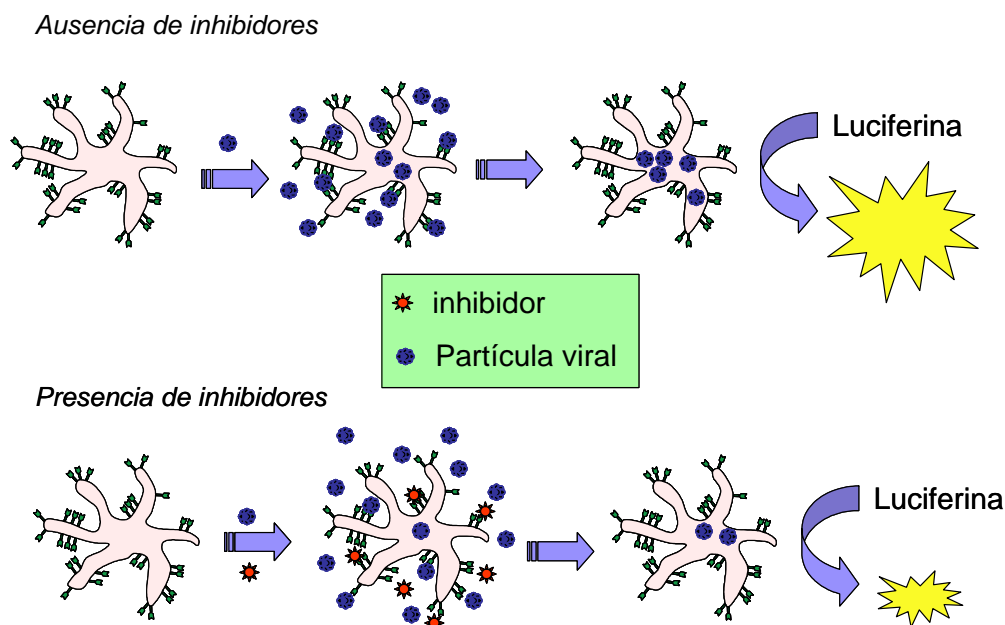


Figura 23. Esquema de inhibición de la infección *in cis*.

Los resultados que se obtuvieron se recogen en la gráfica de la figura 24. Con los controles BH20sucL, BH30sucL se observó una pequeña disminución de la infección atribuida a interacciones no específicas de estos compuestos con la superficie celular. Con el compuesto BH20sucMan tampoco se apreció una inhibición significativa. Por el contrario, cuando se usó el dendrímero BH30sucMan se observó una clara disminución de la infección, calculándose un IC_{50} de $0.3 \mu\text{M}$. También se llevaron a cabo experimentos con el sistema monovalente metil α -D-manopiranosido, ManOMe (no se muestran en la figura 24), observándose un IC_{50} de aproximadamente 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, también denominado efecto cluster.

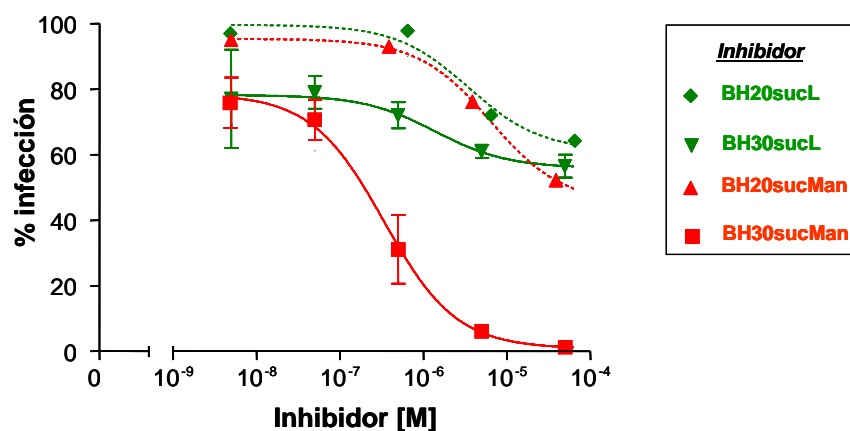


Figura 24. Resultados de inhibición de la infección *in cis*.

Por otra parte, se realizaron los experimentos de infección *in trans*. Este es un experimento más complejo, donde una de las líneas celulares (K562), que expresa DC-SIGN, actuaba como transportadora del patógeno a una segunda línea celular (HeLa) permisiva al virus donde se produciría la infección. (Figura 25) En ausencia de inhibidor, las partículas virales interactúan con DC-SIGN en la superficie de las células K562. Después del lavado, estas células se incuban con las células diana HeLa, se separan ambas líneas celulares y se realiza el ensayo de luciferasa que permitirá cuantificar el nivel de transfección en las células HeLa. En presencia de inhibidores, el número de partículas virales que se unirían a las K562 debería ser mucho menor, efecto que se debería observar como una disminución de la actividad luciferasa. (Figura 25)

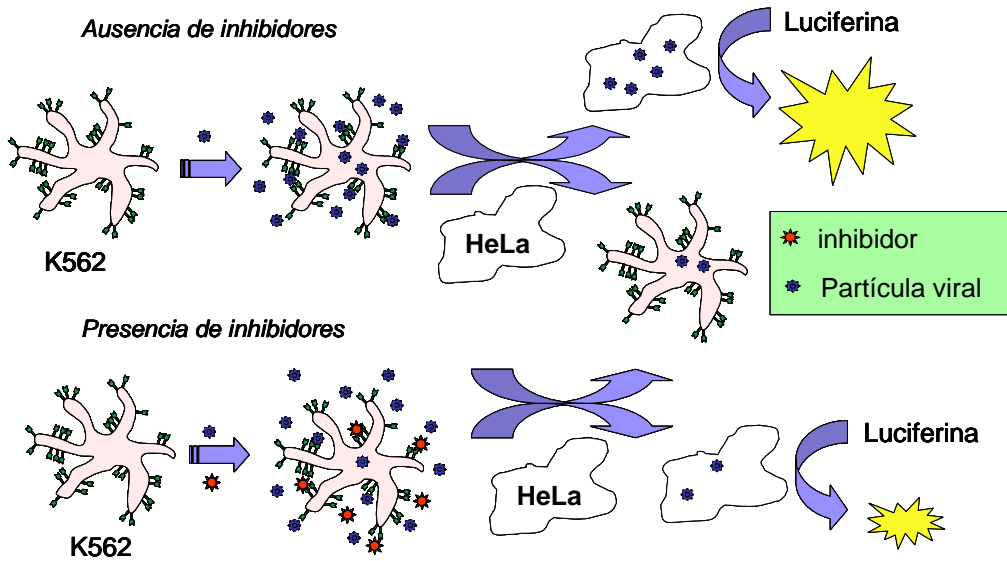


Figura 25. Esquema de inhibición de la infección en trans.

Los resultados que se obtuvieron en los ensayos de infección en *trans* se representan en la gráfica de la figura 26. Las células K562 que no expresaban DC-SIGN fueron el control negativo. En ausencia de inhibidor se observó una infección en las células HeLa correspondiente al 100%. El mismo valor se obtuvo con el dendrímtero control BH30sucL. Sin embargo, el compuesto BH30sucMan inhibió de nuevo claramente el proceso de infección en *trans* de forma similar a como lo hizo en *cis*.

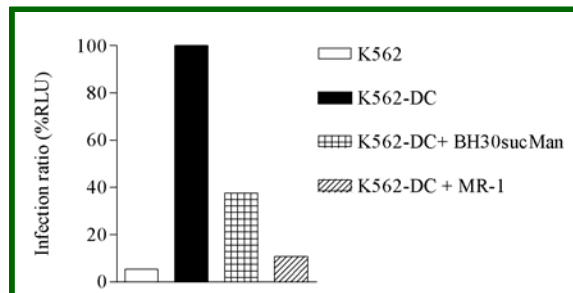


Figura 26. Resultados de la inhibición de la infección en trans.

Antecedentes y Objetivos

Estos resultados preliminares obtenidos en el grupo de investigación en el momento de mi incorporación a dicho grupo indicaban que este tipo de estructuras glicodendríticas podrían considerarse como moléculas prometedoras con potencial aplicación como inhibidores de procesos de infección mediados por el receptor DC-SIGN.

2.2 Objetivos.

Con estos antecedentes y con el fin de mejorar la actividad de los sistemas mencionados anteriormente, nos propusimos como objetivo principal de esta Tesis Doctoral el desarrollo de nuevos y mejores inhibidores de la infección y propagación de agentes patógenos que utilizan la proteína DC-SIGN como receptor de entrada celular. Para alcanzar dicho objetivo general se marcaron los siguientes objetivos concretos que constituyen el trabajo de la presente Tesis Doctoral:

1. Ampliar el espectro de inhibición a otros agentes de infección viral como el VIH.
2. Análisis de la interacción entre estos sistemas glicodendríticos y el receptor DC-SIGN utilizando biosensores con detección de Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR).
3. Mejora de la actividad antiviral de los compuestos utilizando oligosacáridos de manosa más complejos (disacáridos y trisacáridos), similares a los que se encuentran en la estructura de *high mannose*.
4. Preparación de sistemas multivalentes de forma monodispersa por síntesis química, que faciliten la caracterización de los productos finales y la interpretación de los resultados biológicos.

**3. EVALUACIÓN DE LA AFINIDAD Y DE LA ACTIVIDAD
ANTI-VIH DE LOS SISTEMAS GLICODENDRÍTICOS
POLIDISPERSOS**

3.1 Estudio de afinidad de los sistemas multivalentes glicodendríticos de manosa con el receptor DC-SIGN.

Nuestro grupo de investigación ha estudiado la potencial actividad de los sistemas glicodendríticos BH20sucMan y BH30sucMan en diferentes ensayos biológicos. (ver capítulo de Antecedentes) Sin embargo, hasta este momento, no se habían obtenidos datos cuantitativos sobre la afinidad de dichos sistemas glicodendríticos con el receptor DC-SIGN. Para obtener este tipo de datos normalmente se utilizan técnicas clásicas (ELISA, citometría de flujo, etc.) que necesitan algún tipo de marcaje (fluorescente, radioisótopos, etc.) en el ligando o en el receptor. Actualmente, es posible obtener esos datos utilizando una técnica basada en un Biosensor con detección por Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR). En la presente Tesis Doctoral se ha podido evaluar la afinidad de los sistemas multivalentes glicodendríticos usando biosensores con detección por SPR gracias a una colaboración con el Prof. Franck Fieschi del Instituto de Biología Estructural (IBS) de Grenoble.

Para la realización de estos experimentos de afinidad con el biosensor, ha sido necesario preparar, nuevamente, los sistemas glicodendríticos BH20sucMan, BH30sucMan y los correspondientes controles BH20sucL y BH30sucL. Aunque la síntesis de estos compuestos se había puesto a punto con anterioridad en el grupo de investigación,⁶⁴ dicha síntesis se describe con cierto detalle en la presente Tesis Doctoral, porque forma parte del trabajo experimental realizado durante este periodo de formación.

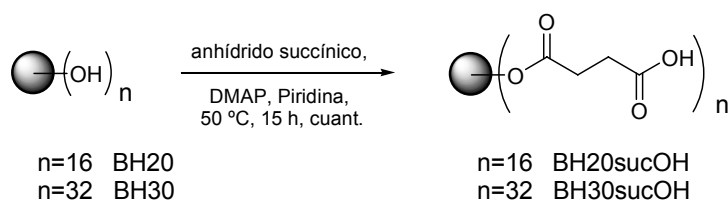
3.1.1 Síntesis de los sistemas multivalentes dendríticos BH20sucMan, BH30sucMan, BH20sucL y BH30sucL.

La preparación de los sistemas multivalentes glicodendríticos supone, en primer lugar, la activación del polímero dendrítico Boltorn de 2^a y 3^a generación mediante la introducción de ácidos carboxílicos en la superficie para obtener los

⁶⁴ Arce, E.; Nieto, P. M.; Díaz, V.; García-Castro, R.; Bernad, A.; Rojo, J.; *Bioconjug. Chem.*, **2003**, *14*, 817-823.

polímeros dendríticos denominados BH20sucOH y BH30sucOH. Estos grupos carboxílicos terminales permitirán el anclaje de los glicoconjugados y los correspondientes controles al soporte multivalente a través de la formación de un enlace amida.

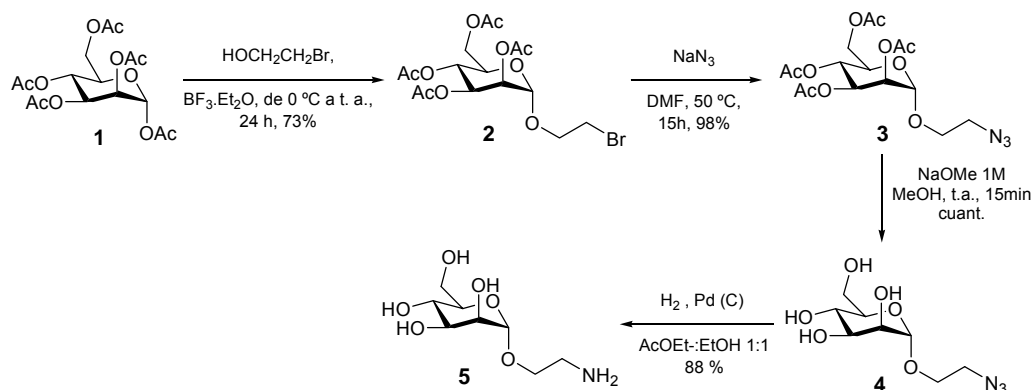
La funcionalización con ácidos carboxílicos se realizó en una etapa utilizando los polímeros dendríticos comerciales Boltorn H20 (BH20) y Boltorn H30 (BH30), que presentan grupos hidroxilo en su superficie y anhídrido succínico, en presencia de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y piridina. De esta forma, se obtuvieron con un rendimiento cuantitativo los compuestos BH20sucOH y BH30sucOH que presentan 16 y 32 ácidos carboxílicos, respectivamente. (Esquema 2)



Esquema 2. Preparación de los sistemas dendríticos BH20sucOH y BH30sucOH.

Para unir las unidades de manosa a la superficie del dendrímero fue necesario funcionalizar adecuadamente la manosa en su posición anomérica con un espaciador que presentaría un grupo amino terminal. Así, el derivado de manosa **5** se preparó en cuatro etapas, con buenos rendimientos, a partir de la correspondiente manosa peracetilada comercial **1**, según se muestra en el esquema 3.⁶⁴ La primera etapa consistió en la glicosidación del derivado **1** usando como aceptor de glicosilo el 2-bromoetanol y como promotor $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (que se añadió en exceso, 5 eq.). La reacción se mantuvo en agitación durante 24 horas, comenzando a 0°C durante 2 horas y después, dejándola que alcanzase temperatura ambiente, obteniéndose el derivado glicosilado **2** con un rendimiento del 73%. La siguiente etapa consistió en la sustitución nucleófila bimolecular ($\text{S}_\text{N}2$) del grupo Br del extremo terminal del espaciador del derivado de manosa **2** por un grupo azida. Esta etapa se realizó utilizando un gran exceso de NaN_3 (8.0 eq.) en DMF a 50°C durante 15 horas, obteniéndose el derivado de manosa **3** con

un rendimiento del 98%. Las dos últimas etapas de la síntesis consistieron en la eliminación de los grupos acetato del compuesto **3** utilizando las condiciones de Zempler⁶⁷ (NaOMe 1M en MeOH) obteniéndose el derivado de manosa **4** de forma cuantitativa y, por último, la hidrogenación del grupo azida utilizando como catalizador Pd soportado sobre carbono en atmósfera de H₂ a presión y temperatura ambiente para llegar al derivado de manosa **5** con un rendimiento del 88%. (Esquema 3)



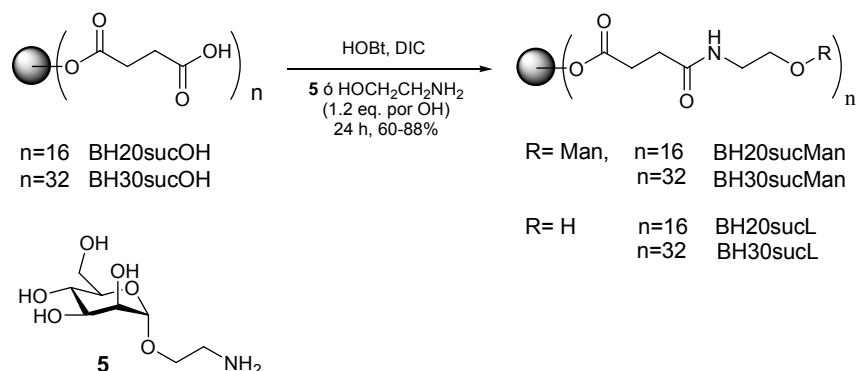
Esquema 3. Síntesis del glicoconjugado de manosa **5**.

Una vez sintetizado el derivado de manosa **5**, la última etapa de la síntesis de los mencionados sistemas glicodendríticos consistió en la conjugación de 16 y 32 unidades de la manosa **5** con los polímeros dendríticos BH20sucOH y BH30sucOH, respectivamente. (Esquema 4)

Las reacciones de formación del enlace amida para la conjugación entre el carbohidrato de manosa **5** ó la etanolamina y los sistemas multivalentes BH30sucOH y BH20sucOH, se realizaron utilizando las condiciones clásicas de formación de enlaces peptídicos. Los ácidos carboxílicos se activaron utilizando diisopropilcarbodiimida (DIC) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), en una mezcla de disolventes (DMF-CH₂Cl₂, 1:1), haciéndose reaccionar con la manosa **5** (1.2 eq. por grupo carboxilo del polímero dendrítico) a temperatura ambiente durante 24 horas y, obteniéndose de esta forma, los productos denominados BH20sucMan y

⁶⁷ Zemplen, G.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1927**, 60, 1555-1564.

BH30sucMan que presentan 16 y 32 manosas respectivamente, con rendimientos que oscilaron entre el 60 y el 68%. (Esquema 4)



Esquema 4. Síntesis de los sistemas multivalentes BH20sucMan, BH30sucMan y los correspondientes controles BH20sucL y BH30sucL.

De igual forma, se prepararon los correspondientes controles que serán usados en los ensayos biológicos por reacción de los sistemas dendríticos BH20sucOH y BH30sucOH con etanolamina en las mismas condiciones de reacción anteriormente descritas. Así, se obtuvieron los compuestos control BH20sucL y BH30sucL que presentaban 16 y 32 espaciadores respectivamente, con rendimientos del 71% y 88%. (Esquema 4)

Todos los sistemas multivalentes dendríticos anteriores fueron purificados por diálisis usando una membrana de celulosa benzoilada con masa molecular de corte de 1 kDa.

Una vez sintetizados estos compuestos, los estudios de afinidad de estos productos con la lectina DC-SIGN fueron realizados en el Laboratorio de Proteínas de Membranas del Instituto de Biología Estructural (IBS, CNRS) en Grenoble, en colaboración con el Prof. Franck Fieschi.

3.1.2 Estudios de afinidad de los sistemas multivalentes glicodendríticos y DC-SIGN utilizando biosensores.

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

3.1.2.1 Biosensor con detección 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.⁶⁸

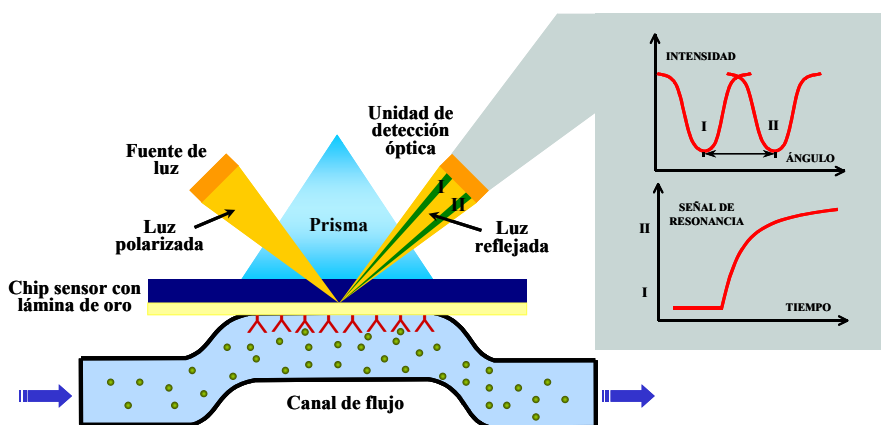


Figura 27. Esquema general del sistema de detección de un biosensor por SPR.

⁶⁸ (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.; Sinaý, P. Willey-VCH, **2000**, *2(1)*, 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) Myszká, D. G.; *J. Mol. Recog.*, **1999**, *12*, 279-284. (f) Myszká, 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.

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 27) 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 unido a la superficie, mientras que la velocidad a la que se produce el cambio de ángulo depende de la cinética de la interacción.

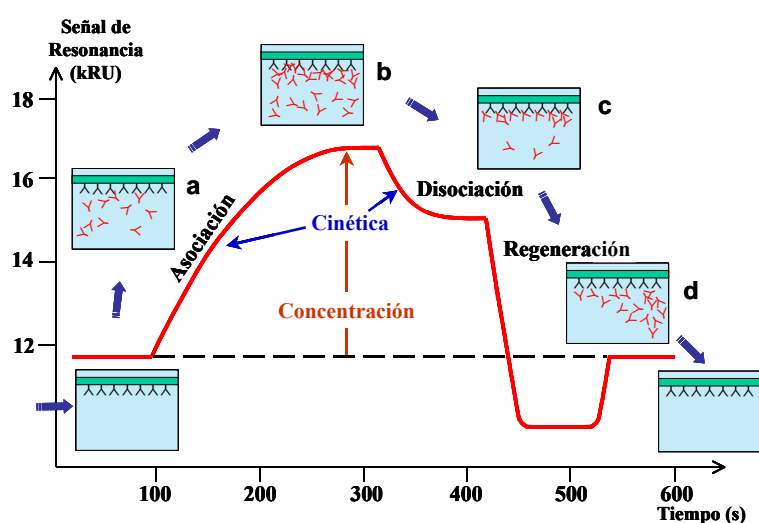


Figura 28. Esquema de un sensograma ideal.

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 27). En concreto, el BIAcore 3000,⁶⁹ 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

⁶⁹ www.biacore.com

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 teóricos 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 28)

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 28, 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 28, 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 28, c) Por último, se lleva a cabo la regeneración de la superficie del chip eliminando todo el analito, (figura 28, d) con lo cual la superficie se queda lista para 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

de ha usado en el estudio de la interacción carbohidrato-proteína⁷⁰ incluida la lectina DC-SIGN,^{71,48,49} para la obtención de parámetros cinéticos.

3.1.2.2 Interacción de los sistemas glicodendríticos con la lectina DC-SIGN.

Para llevar a cabo estos experimentos se han utilizado dos modelos diferentes de la lectina DC-SIGN: el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) monomérico y el dominio extracelular (ECD) soluble tetramérico. Estos dos modelos nos permitirán 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 sobreexpresaron en *E. coli*, en el laboratorio del Prof. Franck Fieschi.⁴⁸

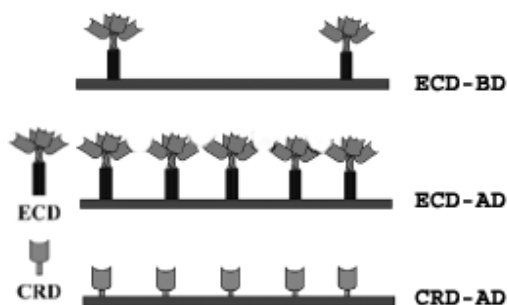


Figura 29. Representación esquemática de las tres superficies funcionalizadas del biosensor con ECD y CRD a baja (BD) y alta (AD) densidad.

⁷⁰ (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.

⁷¹ 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.

⁴⁸ 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.

⁴⁹ 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.

⁴⁸ 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.

Utilizando el biosensor se han preparado tres tipos diferentes de superficies con las dos proteínas (CRD, ECD), usando un chip CM4 comercial de BIAcore. (Figura 29) Este chip CM4 presenta sobre la superficie de oro un polímero de dextrano funcionalizado con ácidos carboxílicos y es usado normalmente para el anclaje de receptores (proteínas) mediante la formación de enlaces amida con los grupos amina de las cadenas laterales de los residuos de lisina. La activación de dichos grupos carboxílicos se llevó a cabo *in situ* con *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y el hidrocloreuro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC). De los cuatro canales del biosensor, dos se funcionalizaron con DC-SIGN ECD, uno de ellos con baja densidad molecular de proteína (ECD-BD) inyectando una disolución de ECD (6 µg/mL) en tampón acetato 10 mM a pH 4.0 y otra con alta densidad (ECD-AD) inyectando la misma disolución de ECD (6 µg/mL) en las mismas condiciones, varias veces. El tercer canal se funcionalizó con DC-SIGN CRD con alta densidad (CRD-AD) inyectando una disolución de CRD (57 µg/mL), también en tampón acetato 10 mM a pH 4.0. (Figura 29) La superficie de DC-SIGN ECD, como consecuencia de su organización tetramérica presenta cuatro veces más unidades de CRD que la superficie monomérica de CRD. La funcionalización de las tres superficies preparadas, así como la capacidad de reconocimiento de estas proteínas ancladas sobre la superficie del biosensor, se comprobó midiendo la interacción con la proteína gp120 del VIH (Figura 30). Como se puede apreciar en los sensogramas de la figura 30, las tres superficies eran funcionales, observándose diferente capacidad de interacción con la proteína gp120 en función de la densidad de la superficie.

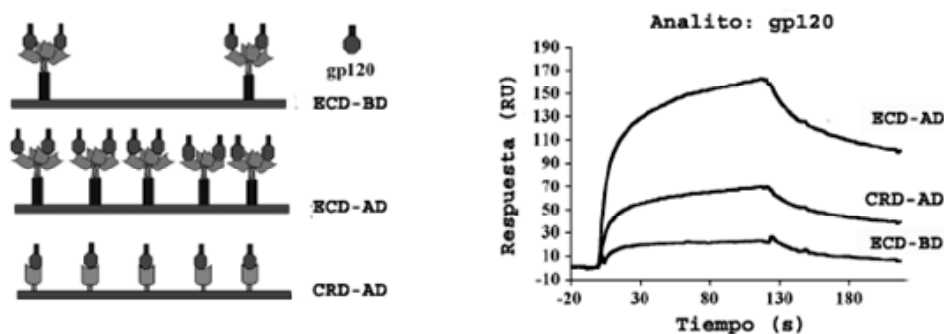


Figura 30. Interacción de las tres superficies preparadas (ECD-BD, ECD-AD y CRD-AD) con la glicoproteína gp120.

Estas tres superficies se usaron para los estudios de interacción con los diferentes polímeros dendríticos preparados. Se inyectaron, simultáneamente sobre las tres superficies funcionalizadas y la superficie control del chip, los compuestos BH20sucL, BH30sucL, BH20sucMan y BH30sucMan a una concentración 10 μ M en el tampón 25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂. Los sistemas dendríticos control que no presentaban carbohidratos (BH20sucL y BH30sucL) no dieron lugar a una interacción apreciable con ninguna de las tres superficies. El polímero de segunda generación con 16 manosas en la superficie (BH20sucMan) mostró el mismo comportamiento que los controles. Sin embargo, el compuesto dendrítico con 32 manosas (BH30sucMan) interaccionó de forma clara con la superficie ECD de alta densidad. En cambio, a pesar de presentar la misma densidad de proteína, no interaccionó de forma significativa con la superficie de CRD como se puede apreciar en el sensograma de la figura 31.

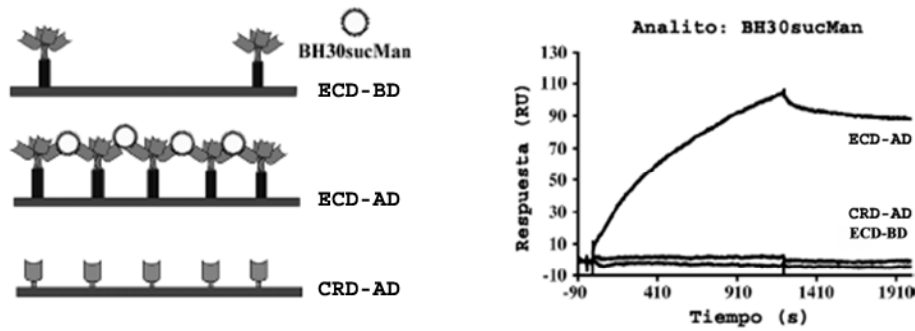


Figura 31. (A) Representación esquemática de la interacción de BH30sucMan con las tres superficies funcionalizadas (ECD-BD, ECD-AD y CRD-AD). (B) Sensograma del proceso de interacción de BH30sucMan con las tres superficies

Estos resultados ponen en evidencia que la alta densidad y la proximidad entre dominios de CRD son esenciales para que se produzca la interacción multivalente. De hecho, se preparó una superficie con el CRD de DC-SIGN en una densidad todavía mayor y se pudo apreciar claramente una interacción como la que ocurre en la superficie ECD-AD. Si observamos la estructura de difracción de rayos X de un dímero del dominio extracelular de DC-SIGNR,⁷² (figura 32) aunque no es exactamente la misma proteína que DC-SIGN, presenta una elevada homología y su estructura tridimensional es muy parecida.

⁷² Feinberg, H.; Guo, Y.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I.; *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 1327-1335.

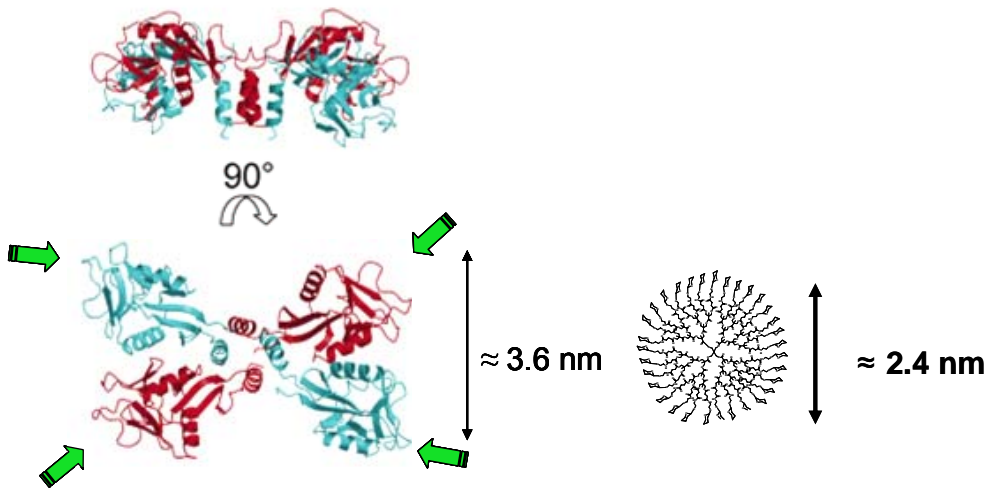


Figura 32. Estructura cristalina del dominio extracelular tetramérico (ECD) de DC-SIGNR obtenida por difracción de rayos X y comparación con el tamaño medio del sistema multivalente dendrítico de 3ª generación.

La distancia entre los CRDs en una misma proteína es aproximadamente de 3.6 nm, una distancia mucho mayor que el tamaño del dendrímico de 3ª generación que sería de aproximadamente 2,4 nm. (Figura 32) Este hecho indica que el efecto multivalente de la interacción no se produce entre un glicodendrímico y dos subunidades de CRD de una misma proteína, sino que se produce entre un glicodendrímico y dos o más subunidades de CRD pero pertenecientes a diferentes proteínas. En el caso de la superficie CRD-AD, a pesar de la alta densidad, la posibilidad de tener dos dominios bien orientados es menor y, por tanto, las posibilidades de tener una interacción multivalente disminuyen. Es decir, como el anclaje a la superficie del chip se realiza a través de las cadenas laterales de cualquier residuo de lisina de la proteína, la proteína se fija a la superficie del chip de forma aleatoria, dando lugar a situaciones en las que el sitio de unión del carbohidrato no está accesible para que se produzca la interacción con los sistemas multivalentes. Sin embargo, en el caso de la superficie ECD-AD, la posibilidad de tener un CRD bien orientado aumenta y, por tanto, aumentan las posibilidades de interacción. Esto explica por qué la superficie ECD de alta densidad es la que da una mayor señal de resonancia de

plasmón de superficie. Además esta superficie sería la que imita de manera más adecuada la presentación del receptor DC-SIGN en la superficie de las células dendríticas, donde dicha proteína se expresa abundantemente como tetrámeros formando “clusters” localizados de unos 200 nm de diámetro.⁷³

La adición de EDTA a la solución tampón permitió eliminar los iones calcio de los sitios activos y, por lo tanto, la destrucción de la interacción entre las estructuras glicodendríticas y DC-SIGN, recuperándose la línea base en el sensograma. Esto demuestra que la interacción entre la proteína y el glicodendrímico tiene lugar fundamentalmente a través de las unidades de carbohidratos presentes en la superficie del sistema multivalente.

Con el Biosensor es posible analizar de forma cuantitativa la interacción entre el receptor (DC-SIGN) y el ligando (BH30sucMan), y obtener los parámetros cinéticos de dicha interacción. Utilizando la superficie de alta densidad ECD-AD y diferentes concentraciones de BH30sucMan se han obtenido las curvas representadas en la figura 33. A partir del análisis de dichas curvas se pudo concluir: 1) la interacción BH30sucMan con ECD es estable, observándose un proceso de asociación relativamente lento y una disociación bastante lenta; 2) el análisis cinético de las curvas predecía un sistema muy complejo que no se adecuaba bien a ninguno de los modelos cinéticos más comunes (Langmuir, etc.). Este hecho puede ser el resultado de la complejidad del sistema en estudio, multivalente en el ligando y también en el receptor. Además, hay que tener en cuenta que el sistema dendrítico es polidisperso y la unión de la proteína a la superficie del chip puede dar lugar a diferentes tipos de presentaciones del CRD, lo que complica enormemente el proceso de interacción y su análisis a partir de estos datos. Sin embargo, sí se ha podido obtener, a partir de dicho análisis, una constante de afinidad aparente que es del orden submicromolar.

⁷³ Cambi, A.; de Lange, F.; van Maarseveen, N. M.; Nijhuis, M.; Joosten, B.; van Dijk, E. M. H. P.; de Bakker, B. I.; Fransen, J. A. M.; Bovee-Geurts, P. H. M.; van Leeuwen, F. N.; van Hulst, N. F.; Figdor, C. G.; *J. Cell. Biol.*, **2004**, *164*, 145-155.

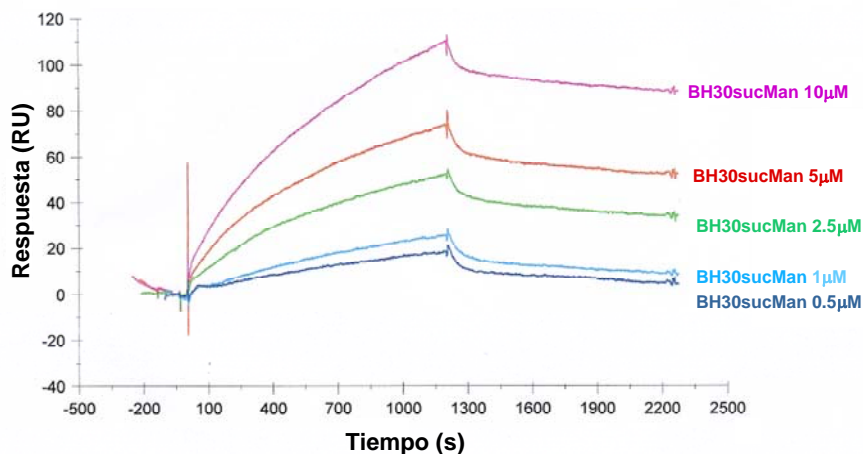


Figura 33. Sensogramas de la interacción DC-SIGN con BH30sucMan a diferentes concentraciones utilizando una superficie ECD-AD.

En resumen, con estos experimentos se ha podido probar la interacción de las estructuras glicodendríticas preparadas con una superficie funcionalizada con DC-SIGN, demostrándose que para observar una fuerte interacción se requiere al menos 32 manosas y una superficie con una alta densidad de DC-SIGN. También se ha confirmado que la interacción es calcio y carbohidrato dependiente. Igualmente, se ha puesto de manifiesto que la interacción de BH30sucMan con el receptor DC-SIGN es multivalente, pero los CRDs implicados en dicha interacción pertenecen a diferentes moléculas (intermolecular), probablemente debido a que los CRDs de la misma molécula se encuentran demasiado separados o en disposiciones espaciales que no son adecuadas para interactuar con más de una manosa del glicodendrímtero. La densidad de la superficie de ECD es crucial para que se produzca la interacción como lo demuestra la comparación entre las superficies de alta y baja densidad.

3.2 Evaluación de la actividad antiviral frente al virus del sida (VIH).

Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación con el sistema glicodendrítico de manosa BH30sucMan en los experimentos de inhibición de la interacción de DC-SIGN con la glicoproteína GP1 del virus del Ébola y en los experimentos de inhibición de la infección en *cis* y en *trans* con un modelo artificial de dicho virus, habían sido muy prometedores. Por esa razón, se planteó evaluar la actividad de este sistema glicodendrítico como inhibidor frente a otros patógenos que utilizan la interacción con DC-SIGN en algún estadio del proceso de infección.

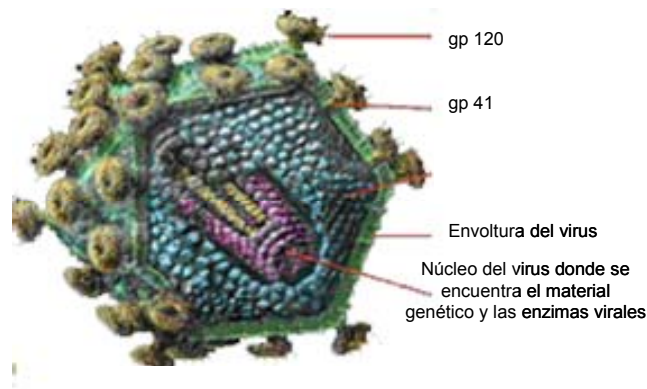


Figura 34. Representación del VIH con sus unidades constitutivas más significativas.

Como ya se mencionó en la introducción, en el año 2000, el grupo de van Kooyk puso de manifiesto el papel de DC-SIGN en el proceso de infección en *cis* y en *trans* del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).^{40b} El VIH (figura 34) es uno de los patógenos con mayor expansión a nivel mundial. Actualmente hay unos 40 millones de personas infectadas en el mundo, número que aumenta cada

^{40b} 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.

año en unos 5 millones. Además, y pese al arsenal de fármacos que existen en el mercado, anualmente mueren unos 3 millones de personas a causa de este virus.⁷⁴

En la actualidad, la terapia que se aplica para combatir esta enfermedad está basada fundamentalmente en el uso de fármacos antirretrovirales que inciden en las diferentes etapas del ciclo replicativo del virus.⁷⁵ Este tipo de tratamientos no curan la enfermedad, pero pueden hacer que los enfermos lleven una vida más o menos normal durante bastante tiempo. Este tratamiento consiste en fármacos que se deben tomar todos los días durante el resto de la vida del enfermo y que actúan contra la infección del VIH disminuyendo los niveles de replicación del virus en el cuerpo humano. Los diferentes antirretrovirales que se encuentran actualmente en el mercado se pueden dividir en: a) inhibidores de la Transcriptasa Reversa, que es una enzima viral que el VIH requiere para su replicación. La inhibición de esta enzima impide el desarrollo de ADN viral basado en su ARN. Existen tres clases: inhibidores análogos de nucleósidos, inhibidores no-nucleósidos, inhibidores análogos de nucleótido; b) inhibidores de la Proteasa, que es una enzima requerida por el VIH para el ensamblaje final de los viriones, por lo cual la inhibición de esta proteína resulta en una inhibición de la replicación viral; c) inhibidores de Fusión, que impiden la entrada del virus a la célula previniendo la infección de células sanas; d) inhibidores de la Integrasa, son fármacos que evitan la acción de la integrasa, selectivos únicamente al VIH-1.

Este tipo de tratamientos presentan algunos inconvenientes. Primeramente, para que la terapia antiretroviral sea efectiva se debe tomar más de un fármaco diferente de forma simultánea, en combinaciones de 3 o 4 fármacos, en lo que se conoce como Terapia Antirretroviral Altamente Activa (terapia combinada). Además, el coste de esta terapia hace inaccesible el uso de

⁷⁴ Los datos que se citan en esta introducción sobre el SIDA se han obtenido de las siguientes fuentes: la Organización Mundial de la salud (OMS) (www.who.int) y del National Institute of Allergy and Infectious Diseases de Estados Unidos (www.niaid.nih.gov). Estas páginas web tienen enlaces con información sobre VIH y SIDA.

antivirales en los países subdesarrollados que son, sin embargo, los que presentan mayor índice de contagios de la enfermedad. Otro problema importante es que en la actualidad no existe ningún candidato que pueda ser considerado como una potencial vacuna, a pesar del gran esfuerzo que se está realizando por diferentes organismos e instituciones en la búsqueda y financiación de vacunas contra el VIH. La búsqueda de vacunas frente al VIH continúa; sin embargo, los resultados negativos encontrados hasta el momento, a pesar de estos esfuerzos, ha hecho disminuir las expectativas de encontrar una vacuna efectiva en un futuro inmediato.

Por todos estos motivos, en los últimos años se ha buscado una alternativa al uso de agentes antirretrovirales para prevenir el contagio del VIH, basada en el uso de unos compuestos denominados microbicidas.⁷⁶ Los microbicidas son agentes preventivos que se usan de forma tópica y que evitan la transmisión del VIH desde un individuo a otro.⁷⁷ Aunque la palabra microbicida significa literalmente destructor de un microbio (patógeno), este término se usa de forma más general aplicándose a compuestos que no necesariamente atacan al microbio, sino que simplemente inhiben su entrada en el organismo. Por ello, se le llama microbicida a cualquier agente que se aplique de forma tópica y que evite el contagio del VIH o de otros patógenos. En países del tercer mundo, donde el contagio del VIH es más significativo, existe una fuerte oposición por parte de los hombres al uso de preservativos. Este sería el método más seguro y barato para evitar el contagio durante las relaciones sexuales. Es por ello, que el uso de microbicidas aplicados de forma tópica en las mujeres supondría una ventaja, porque su nivel de protección puede ser similar al preservativo, evitando el rechazo que tiene el uso de preservativos en estos países del tercer mundo.

⁷⁵ (a) Warnke, D.; Barreto, J.; Temesgen, Z.; *J. Clin. Pharmacol.*, **2007**, *47*, 1570-1579. (b) Piacenti, F. J.; *Pharmacotherapy*, **2006**, *26*, 1111-1133. (c) Temesgen, Z.; Warnke, D.; Kasten, M. J.; *Exp. Opin. Pharmacother.*, **2006**, *7*, 1541-1554.

⁷⁶ (a) Stone, A.; *Nat. Rev. Drugs Discov.*, **2002**, *1*, 977-985. (b) Shattock, R. J.; Moore, J. P.; *Nat. Rev. Microbiol.*, **2003**, *1*, 25-34. (c) Davis, C. W.; Doms, R. W.; *J. Exp. Med.*, **2004**, *199*, 1037-1040. (d) Lederman, M. M.; Oxford, R. E.; Hartley, O.; *Nat. Rev. Immunol.*, **2006**, *6*, 371-381.

⁷⁷ Piot, P.; Mensaje en ocasión del día mundial del SIDA. UNAIDS [online], http://data.unaids.org/Media/Speeches02/SP_Piot_WAD2004_01Dec04_en.pdf (2004).

A la vista de los datos anteriores, queda claro, que es de vital importancia el desarrollo de microbicidas que nos ayuden a bloquear la infección del virus del sida.

En la presente Tesis Doctoral, se ha comenzado a evaluar la actividad de los sistemas glicodendríticos de manosa como agentes que inhiben la interacción entre DC-SIGN y la glicoproteína gp120, presente de la envoltura del VIH, etapa de vital importancia en los primeros estadios del proceso de infección de este virus.

Para abordar este estudio se han seguido dos aproximaciones. En primer lugar, se ha estudiado el proceso de inhibición de la interacción de la proteína gp120 del VIH con el receptor DC-SIGN usando biosensores. En segundo lugar, se han llevado a cabo estudios preliminares de inhibición de la infección de células y tejidos permisivos al VIH.

3.2.1 Inhibición de la interacción DC-SIGN-gp120 por BH30sucMan.

Para llevar a cabo los estudios de inhibición de la interacción entre la glicoproteína gp120 del VIH y el receptor DC-SIGN se utilizaron los biosensores. A la hora de diseñar el modelo se plantearon dos posibilidades: 1) funcionalizar el chip del biosensor con DC-SIGN y fluir la proteína gp120 en ausencia y en presencia de los inhibidores; 2) funcionalizar la superficie del chip con la proteína gp120 y fluir DC-SIGN en presencia o ausencia de inhibidores. (Figura 35) De las dos posibilidades se optó por la segunda opción, debido a que en nuestro caso la proteína más difícil de obtener era la gp120 y utilizando esta metodología se consume menor cantidad de dicha proteína.

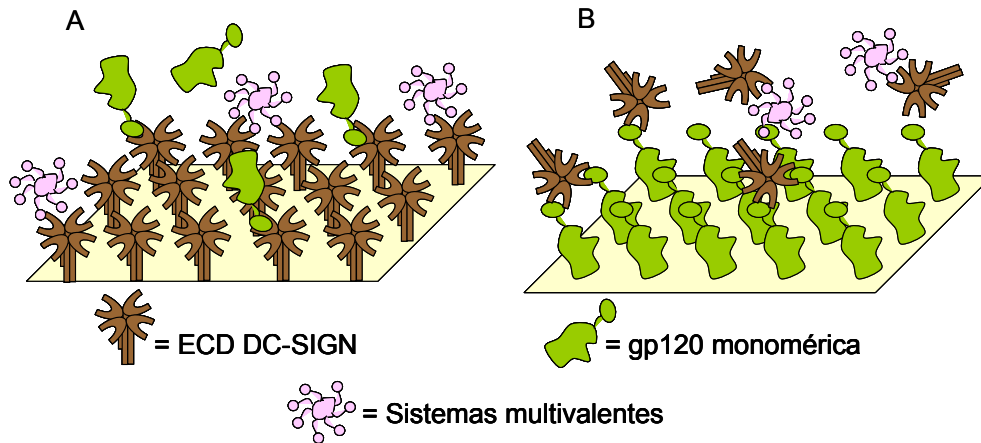


Figura 35. Representación de dos modelos posibles para realizar los estudios de inhibición DC-SIGN/gp120 con los sistemas multivalentes dendríticos. (A) Superficie del biosensor funcionalizada con DC-SIGN. (B) Superficie del biosensor funcionalizada con gp120.

Para realizar los experimentos de competición, se funcionalizó el chip del biosensor con la proteína gp120 y se inyectó conjuntamente cantidades crecientes (0, 7.5, 14, 28, 57, 85 y 128 μM) de los compuestos multivalentes BH20sucL, BH30sucL, BH20sucMan y BH30sucMan y una concentración fija de DC-SIGN ECD (50 μM). Los resultados obtenidos en estos experimentos se muestran en la figura 36. Cuando se inyecta únicamente la proteína ECD de DC-SIGN se obtiene una curva que corresponde al proceso de interacción de dicha proteína con la superficie funcionalizada con gp120. (Figura 36A) Al añadir cantidades crecientes de los compuestos multivalentes BH30sucL, BH20sucL y BH20sucMan no se observó cambio alguno en esta señal, lo que indicaba que la interacción entre gp120 y DC-SIGN no había variado y, por tanto, no se había producido inhibición con estos compuestos dendríticos.

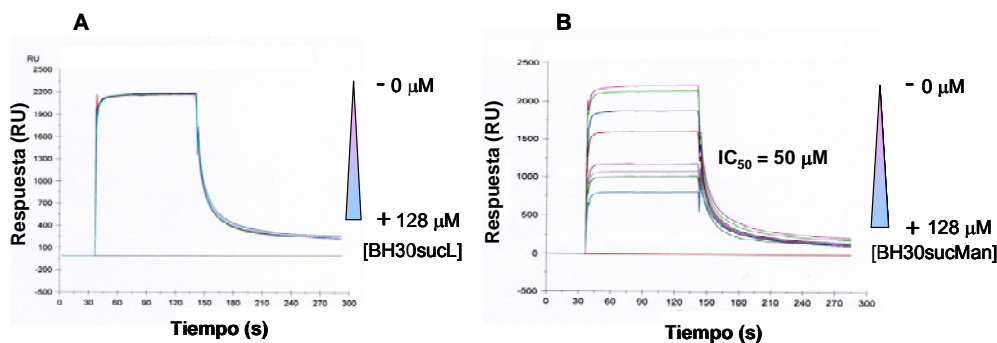


Figura 36. Inhibición de la interacción DC-SIGN/gp120 usando una superficie de gp120 y como inhibidores: A) BH20sucL, BH20sucMan y BH30sucL a distintas concentraciones (0, 7.5, 14, 28, 57, 85 y 128 μM). B) BH30sucMan a las siguientes concentraciones 0, 7.5, 14, 28, 57, 85 y 128 μM .

Sin embargo, cuando se inyectaron cantidades crecientes del polímero glicodendrítico BH30sucMan (0, 7.5, 14, 28, 57, 85 y 128 μM), se observó una clara disminución de la señal directamente proporcional a la concentración de dendrímero. (Figura 36B) Esto indica que el compuesto BH30sucMan compite de forma favorable con gp120 por la interacción con DC-SIGN, inhibiendo la interacción ECD con la superficie de gp120. El análisis de estas curvas permitió estimar un IC_{50} para BH30sucMan de 50 μM .

En la figura 37 se representa el poder de inhibición de cada uno de los sistemas dendríticos estudiados. En dicha gráfica se observa claramente la mayor capacidad de inhibición del sistema glicodendrítico BH30sucMan en comparación con los otros sistemas dendríticos preparados.

Este valor del IC_{50} encontrado en los experimentos de competición (50 μM) es mayor del esperado considerando la K_d aparente (submicromolar) obtenida de los experimentos de afinidad. Hay que tener en cuenta que en este experimento DC-SIGN no se encuentra unida a una superficie, sino que se encuentra libre en disolución. En esta situación, el efecto multivalente de la interacción con respecto a la superficie ECD de alta densidad no se consigue fácilmente, lo que provoca una disminución en la eficiencia de la interacción de los glicodendrimeros con la proteína en disolución. En otras palabras, la

posibilidad de establecer interacciones multivalentes entre el dendrímero y la proteína soluble es más difícil que cuando ésta se encuentra en una superficie fija a alta concentración.

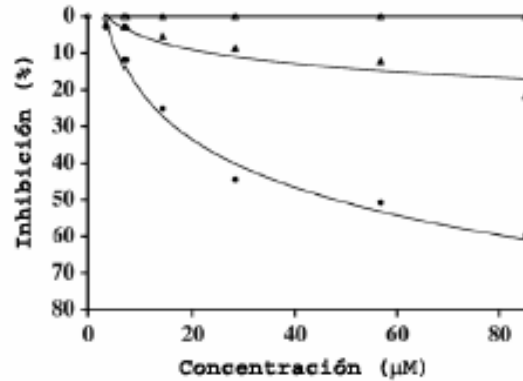


Figura 37. Comparación del poder inhibitorio de los diferentes polímeros dendríticos y glicodendríticos frente a la interacción DC-SIGN/gp120 (○) BH30sucL, (△) BH20sucL, (▲) BH20sucMan, (●) BH30sucMan.

En resumen, podemos decir, que el uso de los biosensores ha demostrado que el polímero dendrítico Boltorn de tercera generación funcionalizado con 32 manosas interacciona con DC-SIGN con una constante aparente del orden submicroMolar y que dicho sistema es capaz de inhibir la interacción de DC-SIGN/gp120 con un IC_{50} de 50 μ M. A priori, estos resultados indican que el dendrímero de 3^a generación (BH30sucMan) podría ser un candidato para ser utilizado en ensayos biológicos celulares de infección con el VIH.

3.2.2 Evaluación de la actividad antiviral de los sistemas glicodendríticos frente al VIH en líneas celulares y tejidos explante.

Una vez realizados los experimentos de inhibición de la interacción entre la lectina DC-SIGN y la glicoproteína gp120 del VIH, se empezó a evaluar la actividad biológica de estos sistemas en modelos celulares y tisulares, a través de una colaboración con el Prof. Robin Shattock, del Sant George's Medical School de la Universidad de Londres, dentro del proyecto integrado EMPRO del 6º Programa Marco de la Unión Europea.

En primer lugar, se llevó a cabo la evaluación de los sistemas glicodendríticos BH20sucL, BH20sucMan, BH30sucL y BH30sucMan en un modelo de infección directa del VIH de células T de la línea celular PM-1 (permissivas a dicho virus). El procedimiento experimental⁷⁸ consistió en fijar el VIH a una placa de 96 pocillos funcionalizada con el anticuerpo monoclonal anti-VIH HLA-DR mediante la incubación en los pocillos de la placa durante 1 hora. Después, el virus que no se había unido al anticuerpo se eliminó mediante lavado. El VIH inmovilizado se trató con los compuestos BH20sucL, BH20sucMan, BH30sucL y BH30sucMan a diferentes concentraciones (10, 1 y 0.1 μ M). Posteriormente, se añadieron las células objetivo (PM-1, 4×10^4 células/pocillo), incubándose durante 6 días sin realizar ningún lavado. La infección se determinó por la medida del antígeno p24 en el cultivo, utilizando un anticuerpo anti-p24 marcado mediante un ensayo de tipo ELISA, usando un kit comercial. Los resultados obtenidos se representan en la figura 38.

⁷⁸ Fletcher, P. S.; Wallace, G. S.; Mesquida, P. M.-M; Shattock, R. J.; *Retrovirol.*, **2006**, 3, 46-57.

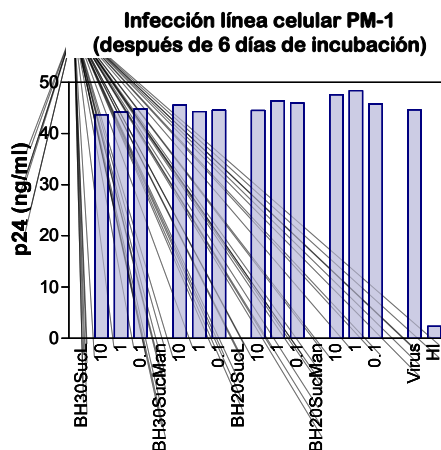


Figura 38. Resultado de los experimentos de inhibición de la infección *in cis* del VIH de la línea celular PM-1 con los sistemas dendríticos BH20sucL, BH20sucMan, BH30sucL y BH30sucMan a concentraciones de 10, 1 y 0.1 μM .

Como se puede observar en la figura 38, ninguno de los compuestos dendríticos es capaz de inhibir la infección de las células PM-1 por el VIH en las concentraciones indicadas de 10, 1, 0.1 μM . Los valores de inhibición son prácticamente nulos, obteniéndose niveles de infección equivalentes a los encontrados cuando se realizan los experimentos utilizando el VIH sin inhibidores. Como control negativo del experimento se utilizó un virus VIH inactivado por calor (HI) que no tiene capacidad infectiva.

El segundo estudio que se realizó fueron los experimentos de inhibición de la infección de VIH en un modelo de tejido explante de cuello de útero. Un tejido explante es un tejido extraído de un organismo y transferido para su crecimiento a un medio artificial. El tejido explante de cuello de útero mimetiza al tejido *in vivo* que está inicialmente expuesto al virus durante el proceso de transmisión heterosexual y, por lo tanto, es un modelo experimental más complejo que el celular y más cercano a un proceso *in vivo*.⁷⁹ Este tipo de experimentos utilizando tejido explante ha sido usado por el grupo del Prof.

⁷⁹ (a) Palacio, J.; Souberbielle, B.; Shattock, R.; Robinson, G.; Manyonda, I.; Griffin, G. E.; *Res. Virol.*, **1994**, *145*, 155-161. (b) Greenhead, P.; Hayes, P.; Watts, P. S.; Laing, K. G.; Griffin, G. E.; Shattock, R. J.; *J. Virol.*, **2000**, *74*, 5577-5586.

Robin Shattock en numerosos estudios para medir la potencial actividad de varios microbicidas frente al VIH.^{80, 78}

El procedimiento que se sigue para realizar este tipo de experimentos es muy complejo y se describe a continuación de forma breve y sin entrar en detalles. El tejido de cuello de útero se obtiene de una mujer a la que se le realiza una histerectomía terapéutica. Este tejido se cultiva según el procedimiento descrito en la literatura.⁸¹ Después, se corta en explantes de 3 mm³ y se fija en los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos. Los explantes se trataron con los compuestos que se querían evaluar como microbicidas (BH20sucL, BH20sucMan, BH30sucL y BH30sucMan) durante una hora. Posteriormente, los tejidos fueron incubados con el VIH durante 2 horas a 37° C. Transcurrido este tiempo durante el cual se ha tenido que producir la infección del tejido por parte del VIH, o la acción inhibitoria de la infección por parte de los sistemas multivalentes glicodendríticos, los explantes son lavados varias veces con PBS, para eliminar los restos de VIH y de los inhibidores que quedan en el medio de cultivo. Estos explantes de cuello de útero se cultivaron durante toda la noche antes de ser transferidos a pocillos frescos con medio de cultivo nuevo. La infección del VIH se determinó por la técnica ELISA mediante la medida del antígeno p24 utilizando un kit comercial. Los resultados de infección obtenidos de los sobranes líquidos del cultivo del tejido explante se representan en la figura 39.

⁸⁰ (a) Fletcher, P.; Kiselyeva, Y.; Wallace, G.; Romano, J.; Griffin, G.; Margolis, L.; Shattock, R.; *J. Virol.*, **2005**, *79*, 11179-11186.

⁷⁸ Fletcher, P. S.; Wallace, G. S.; Mesquida, P. M.-M; Shattock, R. J.; *Retrovirol.*, **2006**, *3*, 46-57.

⁸¹ Greenhead, P.; Hayes, P.; Watts, P. S.; Laing, K. G.; Griffin, G. E.; Moore, J. P.; Pope, M.; Shattock, R. J.; *J. Exp. Med.*, **2004**, *199*, 1065-1075.

Evaluación de la afinidad y de la actividad anti-VIH de los sistemas glicodendríticos polidispersos

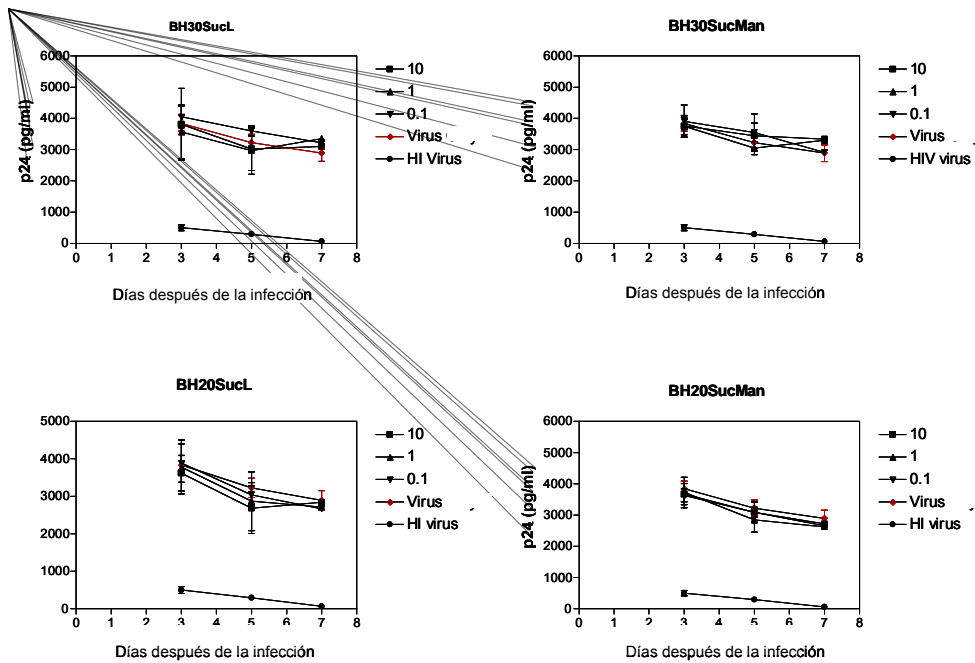


Figura 39. Resultados de los experimentos de inhibición de la infección del VIH de tejidos explante de cuello de útero por los sistemas dendríticos BH20sucL, BH20sucMan, BH30sucL y BH30sucMan a concentraciones de 10, 1 y 0.1 μ M.

Como se observa en las gráficas representadas en la figura 39, ninguno de los sistemas multivalentes dendríticos consiguen inhibir la infección directa del VIH sobre el tejido explante de cuello de útero a las concentraciones probadas. Prácticamente no se observa ningún efecto sobre la infección del VIH cuando se usan estos compuestos como inhibidores.

Por último, se llevaron a cabo los experimentos de infección en *trans* de células T, permisivas a la infección por el VIH de la línea celular PM-1. El procedimiento seguido para este experimento es similar al descrito para el experimento anterior. En este caso, no se mide la infección directamente sobre los sobrenadantes de los tejidos explante, sino que las células migratorias (en este caso, las células dendríticas) procedentes del tejido explante infectado después del cultivo durante la noche, y que son las que deben estar infectadas por el VIH, se lavan con PBS y se co-cultivan con células T, para evaluar el bloqueo de la transferencia del virus por las células dendríticas. Los resultados

de infección obtenidos de los sobrantes líquidos del co-cultivo de células dendríticas y células T PM-1 determinados por la técnica ELISA mediante la medida del antígeno p24 utilizando un kit comercial, se representan en la figura 40.

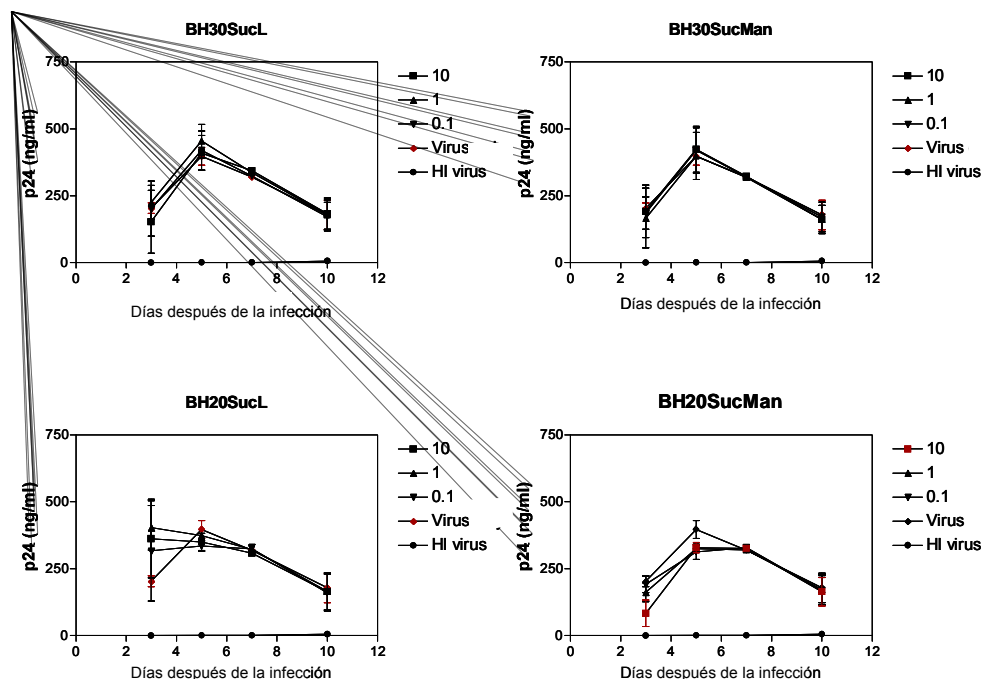


Figura 40. Resultados de los experimentos de inhibición en trans de la infección del VIH en células T usando células dendríticas como mediadoras y usando como inhibidores los sistemas dendríticos BH20sucL, BH20sucMan, BH30sucL y BH30sucMan a concentraciones de 10, 1 y 0.1 μM .

Como se puede observar, en ninguno de los casos los sistemas multivalentes dendríticos consiguen inhibir la infección del VIH. Al igual que en los ensayos de infección directa sobre la línea celular PM-1, los valores de inhibición son prácticamente nulos y no se puede distinguir entre los niveles de infección cuando se realizan los experimentos utilizando solo el VIH o en combinación con los sistemas dendríticos.

A la vista de estos estudios biológicos de infección se puede concluir que ninguno de los sistemas dendríticos utilizados presentan actividad antiviral significativa a las concentraciones ensayadas, a pesar del efecto inhibitorio que se observó en el caso del compuesto BH30sucMan utilizando Biosensores.

Hay que decir, por un lado, que los biosensores representan un modelo para el estudio de la actividad, modelo que puede imitar en mayor o menor medida al sistema natural y que nos sirve para comparar actividades de varios compuestos entre si, pero el valor encontrado de actividad debería considerarse como orientativo. Por otro lado, la concentración máxima de los sistemas glicodendríticos en estos ensayos biológicos fue 10 μM , lejos del IC_{50} encontrado en los ensayos con biosensores que era de 50 μM . Los ensayos biológicos tenían como fin el seleccionar un compuesto que se pudiera utilizar como Microbicida. Dentro del proyecto EMPRO (European Microbicide Project) se consideró que aquellas moléculas que no presentaran una actividad inhibitoria en el rango bajo μM , no serían considerados como candidatos a microbicidas puesto que el fin último de estos ensayos era seleccionar compuestos para pasar a fases preclínicas. Por esta razón, no se consideró oportuno utilizar concentraciones más elevadas.

A la vista de estos resultados, parecía necesario mejorar la actividad de estos sistemas glicodendríticos modificando su estructura, ya fuera a nivel del soporte multivalente o de los carbohidratos que presentaban. En los siguientes capítulos se recogen los trabajos de modificación de las estructuras glicodendríticas encaminadas a la mejora de la actividad antiviral de las mismas.

**4. MODIFICACIONES DEL SISTEMA MULTIVALENTE:
EL MODELO DE ANCLAJE DEL CARBOHIDRATO**

4.1 Sistemas dendríticos multivalentes con un espaciador basado en tres unidades de etilenglicol.

Una vez realizados los ensayos biológicos con los sistemas glicodendríticos BH30sucMan y BH20sucMan, (ver capítulos anteriores) se planteó la introducción de mejoras en los sistemas multivalentes, esperando que estos cambios implicaran un incremento en la actividad antiviral de los polímeros glicodendríticos. Atendiendo a la estructura que presentan, los compuestos dendríticos que se describen en esta Tesis Doctoral están formados por un soporte multivalente, un espaciador y la unidad de carbohidrato. (Figura 41) Las modificaciones en estos sistemas se pueden llevar a cabo a nivel de estas tres unidades constitutivas fundamentales que conforman la estructura de los sistemas glicodendríticos.

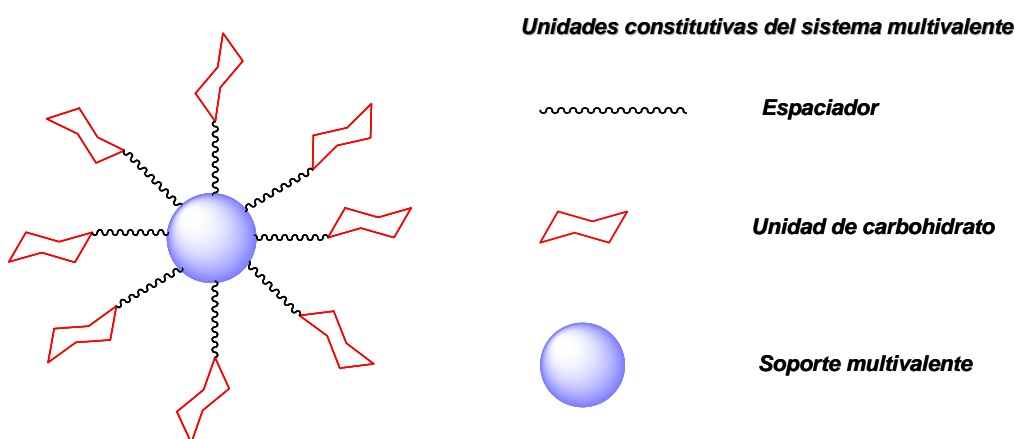


Figura 41. Estructura general y unidades constitutivas de los sistemas glicodendríticos.

El primer cambio en la estructura que se puede plantear es la modificación del espaciador. Hasta el momento se había utilizado un espaciador pequeño basado en una unidad de etilenglicol como sistema de anclaje del carbohidrato al soporte multivalente. Se puede llevar a cabo la síntesis de sistemas dendríticos que presenten un espaciador más largo, que pueda conferir mayor flexibilidad al glicoconjugado y que aumente la accesibilidad de los

carbohidratos para que interaccionen más fácilmente con el sitio de unión de los dominios de reconocimiento de carbohidratos de la lectina DC-SIGN.

También sería posible cambiar la posición de anclaje del carbohidrato al sistema multivalente. Además de la posición 1 ó anomérica que se ha utilizado hasta el momento como lugar de conjugación, la posición 6 sería una posición factible para el anclaje ya que dicha posición no participa de manera activa en el proceso de reconocimiento del carbohidrato por parte de la lectina DC-SIGN. Por tanto, se podría realizar el anclaje de la unidad de carbohidrato por la posición 6, y esto permitiría introducir diferentes grupos sustituyentes en la posición anomérica del carbohidrato que pudieran aumentar la afinidad por el receptor DC-SIGN.

En el caso de la mejora de la unidad de carbohidrato, existen diferentes posibilidades sobre las que se puede actuar:

(1) Preparar oligosacáridos de manosa más complejos del tipo disacáridos o trisacáridos, que no presenten un coste sintético elevado y que exhiban mayor afinidad que el monosacárido de manosa.

(2) Emplear carbohidratos miméticos que presenten mayor estabilidad frente a la degradación por glicosidasas y que dispongan de grupos funcionales que incrementen la afinidad por el receptor DC-SIGN.

Con respecto a la mejora del soporte multivalente, se puede realizar la preparación de los sistemas multivalentes de forma monodispersa (por síntesis química). Esto nos proporcionaría el acceso a compuestos totalmente definidos, lo que facilitaría la caracterización de los productos finales y la interpretación de los resultados biológicos. También se podrían preparar sistemas de mayor generación que permitieran aumentar el número de unidades de carbohidrato sobre la superficie del dendrímero.

En este capítulo, se presentarán los estudios que se han realizado en relación al espaciador. En este sentido, se ha llevado a cabo la síntesis de los sistemas multivalentes dendríticos que hemos denominado BH30sucLMan, BH30sucLL, BH20sucLMan y BH20sucL. Con estas moléculas se han realizado

experimentos con biosensores para obtener datos sobre la afinidad de estos nuevos sistemas por el receptor DC-SIGN. También se ha estudiado la conjugación de la manosa por la posición anomérica y la posición 6, y su afinidad por el receptor DC-SIGN.

4.1.1 Síntesis de los sistemas dendríticos multivalentes *BH20sucLMan*, *BH30sucLMan*, *BH20sucLL* y *BH30sucLL*.

Para la preparación de los sistemas dendríticos denominados *BH20sucLMan*, *BH30sucLMan*, *BH20sucLL* y *BH30sucLL* (figura 42) se ha utilizado la misma estrategia de síntesis que la usada para los sistemas dendríticos descritos en el capítulo anterior. En el caso del *BH20sucLMan* y *BH30sucLMan*, las unidades de manosa se han unido a la superficie del dendrímico a través de un espaciador que presenta un grupo amino terminal, vía la formación de un enlace amida. Para los compuestos *BH20sucLL* y *BH30sucLL* se ha utilizado el espaciador pero sin la unidad de carbohidrato.

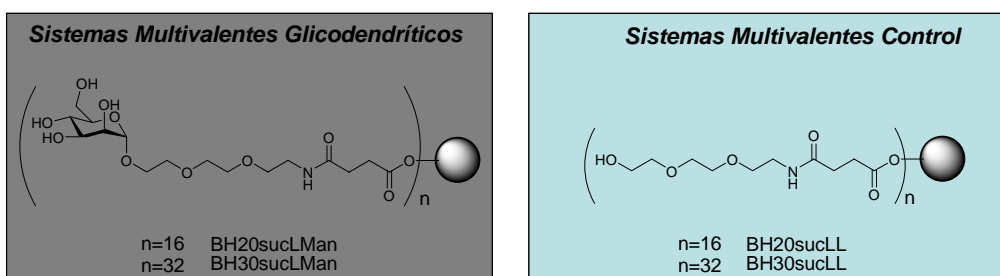
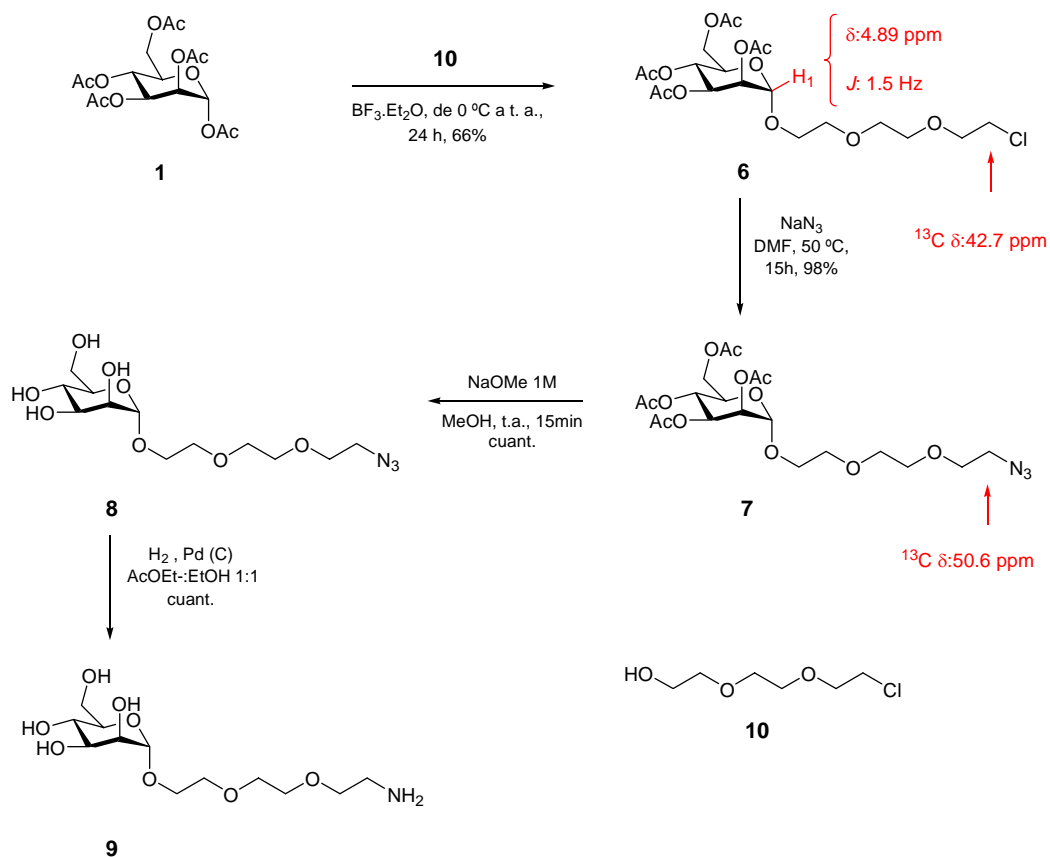


Figura 42. *Sistemas multivalentes dendríticos BH20sucLMan, BH30sucLMan, BH20sucLL y BH30sucLL que presentan un espaciador basado en tres unidades de etilenglicol.*

Como espaciador se ha utilizado un derivado del trietilenglicol. Para la preparación de los sistemas que presentan manosa (*BH20sucLMan*, *BH30sucLMan*) fue necesario, en primer lugar, sintetizar el derivado de manosa **9** con este espaciador. Esta manosa **9** se preparó en cuatro etapas, con buenos rendimientos, a partir de la correspondiente manosa peracetilada comercial **1**

siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía,⁸⁰ pero con algunas modificaciones. (Esquema 5)



Esquema 5. Síntesis del glicoconjugado de manosa **9**.

La reacción de glicosidación del derivado **1** se llevó a cabo usando como aceptor de glicosilo el compuesto comercial 2-[2-(2-cloroetoxi)etoxi]etanol (**10**) y como promotor $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (que se añadió en gran exceso, 5 eq.). La reacción se mantuvo en agitación durante 24 horas, comenzando a 0°C durante 2 horas y después, dejándola que alcanzase temperatura ambiente. El derivado de manosa **6** se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, obteniéndose con un

⁸⁰ Lindhorst, T. K.; Kötter, S.; Krallmann-Wenzel, U.; Ehlers, S.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 823-831.

rendimiento moderado del 66%. El análisis del producto **6** por ^1H -RMN en CDCl_3 nos muestra la aparición de una señal doblete a 4.89 ppm correspondiente al protón anomérico y un valor de la constante de acoplamiento (J) de 1.5 Hz, que nos indica claramente que se ha formado únicamente el isómero α .

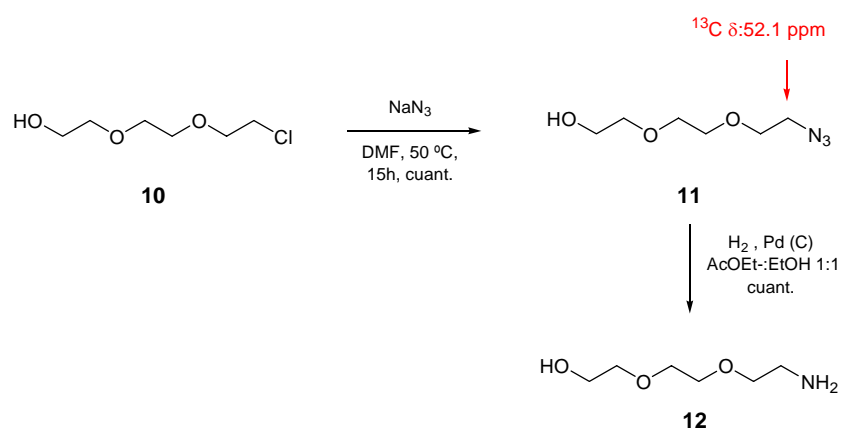
La siguiente etapa consistió en la sustitución nucleófila bimolecular (SN_2) del átomo de Cl del extremo terminal del espaciador del derivado de manosa **6** por un grupo azida. Esta reacción se realizó utilizando un exceso grande de NaN_3 (8.0 eq.) en DMF a 50°C durante 15 horas, obteniéndose el derivado de manosa **7** con un rendimiento del 98%. La reacción no se pudo seguir por c.c.f., debido a que tanto el producto de partida como el producto final presentaban el mismo Rf. La formación del compuesto **7** se pudo determinar por ^{13}C -RMN, comparando éste con el producto de partida **6**, debido a que en el compuesto **6** la señal del carbono unido a cloro aparecía en el espectro a un desplazamiento químico de 42.7 ppm. En cambio, ese mismo carbono unido a un grupo azida en el compuesto **7** aparecía a un desplazamiento químico de 50.6 ppm.

Posteriormente, se realizó la etapa de eliminación de los grupos acetatos del derivado de manosa **7** utilizando las condiciones de Zempler⁶⁷ (NaOMe 1M en MeOH), obteniéndose el compuesto con los grupos hidroxilos libres **8** de forma cuantitativa. Mediante el análisis del espectro de ^1H -RMN se pudo observar, de forma clara, la desaparición de las cuatro señales correspondientes a los metilos de los grupos protectores acetato (AcO-) a 2.16, 2.11, 2.05, 1.99 ppm del derivado **7**. Por último, la hidrogenación del grupo azida utilizando como catalizador Pd soportado sobre carbono en atmósfera de H_2 a presión y temperatura ambiente dio lugar al derivado de manosa **9** de forma cuantitativa. (Esquema 5)

Para la preparación de los compuestos control BH20sucLL y BH30sucLL fue necesario preparar el espaciador **12**, que no es un producto comercial. Este espaciador **12** se obtuvo en dos etapas a partir del compuesto comercial **10**, como

⁶⁷ Zemplen, G.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1927**, 60, 1555-1564.

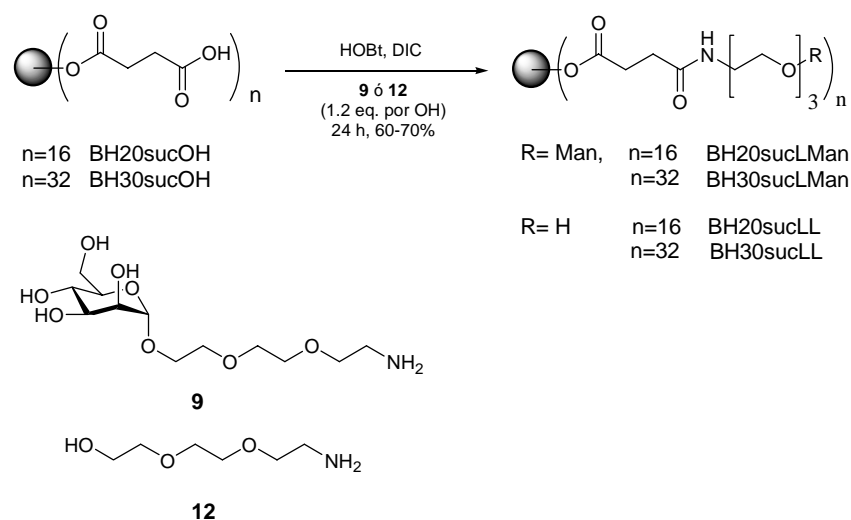
se muestra en el esquema 6. La primera etapa consistió en la reacción de sustitución nucleófila bimolecular, donde el átomo de cloro del compuesto **10** se sustituyó por un grupo azida. La reacción se realizó utilizando NaN_3 en exceso (8 eq.) en DMF a 50° durante 15 horas, obteniéndose el compuesto **11** con un rendimiento cuantitativo, sin realizar ninguna etapa de purificación. La reacción tampoco se pudo seguir por c.c.f., debido a que, al igual que en el caso del derivado de manosa **7**, el producto de partida **10** y el producto final **11** presentaban el mismo Rf. La formación del compuesto **11** se determinó de nuevo por ^{13}C -RMN, comparando éste con el producto de partida **10**, debido a que en el espectro del compuesto **11** se observó una señal a un desplazamiento químico de 52.1 ppm correspondiente a un átomo de carbono unido a un grupo azida. La segunda etapa consistió en la hidrogenación del grupo azida utilizando como catalizador Pd soportado sobre carbono en atmósfera de H_2 a presión y temperatura ambiente durante 12 horas, obteniéndose el derivado **12** de forma cuantitativa.



Esquema 6. Síntesis del espaciador **12**.

Una vez preparados el derivado de manosa **9** y el espaciador **12**, la última etapa de la síntesis de los mencionados sistemas dendríticos consistió en la conjugación de 16 y 32 unidades de la manosa **9** y del espaciador **12** con los polímeros dendríticos BH20sucOH y BH30sucOH, respectivamente, mediante la formación de un enlace amida. (Esquema 7)

Modificaciones del sistema multivalente: el modelo de anclaje del carbohidrato



Esquema 7. Síntesis de los sistemas dendríticos multivalentes BH20sucLMan, BH30sucLMan y los correspondientes controles BH20sucLL y BH30sucLL.

Las reacciones de formación del enlace amida para la conjugación entre el carbohidrato de manosa **9** ó el espaciador **12** y los sistema multivalente BH30sucOH y BH20sucOH, se realizaron utilizando las misma condiciones que las usadas para los polímeros dendríticos BH20sucL, BH20sucMan, BH30sucL y BH30sucMan. Los ácidos carboxílicos del polímero dendrítico se activaron utilizando DIC y HOBt, en una mezcla de disolventes (DMF-CH₂Cl₂, 1:1), haciéndose reaccionar con la manosa **9** (1.2 eq. por grupo carboxilo del polímero dendrítico) a temperatura ambiente durante 24 horas y obteniéndose los productos denominados BH20sucLMan y BH30sucLMan que presentan 16 y 32 manosas respectivamente con rendimientos que oscilaron entre el 60 y el 62%. (Esquema 7) Estos compuestos se caracterizaron usando RMN. Desafortunadamente no se encontraron condiciones (diferentes técnicas, matrices, disolventes, etc.) para obtener un espectro de masas de estos compuestos. Hay que señalar que este tipo de sistemas glicodendríticos se ionizan con dificultad, lo que complica enormemente la obtención de buenos espectros de masas.

De igual forma, se prepararon los correspondientes controles con el compuesto **12** en las mismas condiciones de reacción anteriormente descritas.

Así, se obtuvieron los compuestos control BH20sucLL y BH30sucLL que presentan 16 y 32 espaciadores respectivamente, con rendimientos del 66% y 70%. (Esquema 7)

Todos los polímeros dendríticos anteriores se purificaron por ultracentrifugación a 3000 g utilizando filtros centriplus YM-3000 (con una masa molecular de corte de 3kDa).

4.1.2 Interacción de los sistemas glicodendríticos BH20sucLMan, BH30sucLMan, BH20sucLL y BH30sucLL con la lectina DC-SIGN.

Una vez realizada la síntesis de los compuestos dendríticos con el espaciador más flexible, se llevaron a cabo los estudios de afinidad con el biosensor, utilizando al igual que en el capítulo anterior dos modelos diferentes de la lectina DC-SIGN: el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) monomérico y el dominio extracelular (ECD) soluble tetramérico.

Se prepararon de nuevo tres tipos diferentes de superficies de alta (AD) y baja densidad (BD) de proteína (CRD y ECD), usando un chip CM4 comercial de BIAcore, como se ha comentado en el capítulo anterior. Estas tres superficies se usaron para los estudios de interacción con los diferentes polímeros dendríticos preparados. Se inyectaron, simultáneamente sobre las tres superficies funcionalizadas y la superficie control del chip, los compuestos BH20sucLL, BH30sucLL, BH20sucLMan y BH30sucLMan a una concentración 10 μ M en el tampón 25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂. Las estructuras dendríticas control que no presentaban carbohidratos (BH20sucLL y BH30sucLL) no dieron lugar a una interacción apreciable con ninguna de las tres superficies. El polímero de segunda generación con 16 manosas en la superficie (BH20sucLMan) mostró el mismo comportamiento que los controles. Sin embargo, el compuesto dendrítico con 32 manosas (BH30sucLMan) interaccionó de forma clara con la superficie ECD de alta densidad. En cambio, a pesar de presentar la misma densidad de proteína, no interaccionó de forma significativa con la superficie de CRD.

La adición de EDTA a la solución tampón permitió eliminar los iones calcio de los sitios activos pero no consiguió eliminar totalmente la interacción entre las estructuras glicodendríticas y DC-SIGN. Tampoco se consiguió ningún resultado usando condiciones más drásticas como el uso de un detergente (SDS), como se observa en la figura 43. En estas condiciones no se pudo regenerar la superficie quedando siempre una señal residual. Esto puede significar que entre el polímero dendrítico BH30sucLMan y el receptor DC-SIGN tienen lugar interacciones no específicas, en las que no intervienen las unidades de carbohidrato presentes en la superficie del sistema multivalente. Es posible también que la polidispersidad de estos sistemas (presencia de estructuras con defectos e incompletas) y el empleo de un espaciador más largo y flexible, en comparación con el que presenta BH30sucMan, permita que se puedan producir interacciones no específicas entre la proteína y el soporte dendrítico que tiene un carácter más hidrofóbico que la superficie del mismo con la presencia de los carbohidratos.

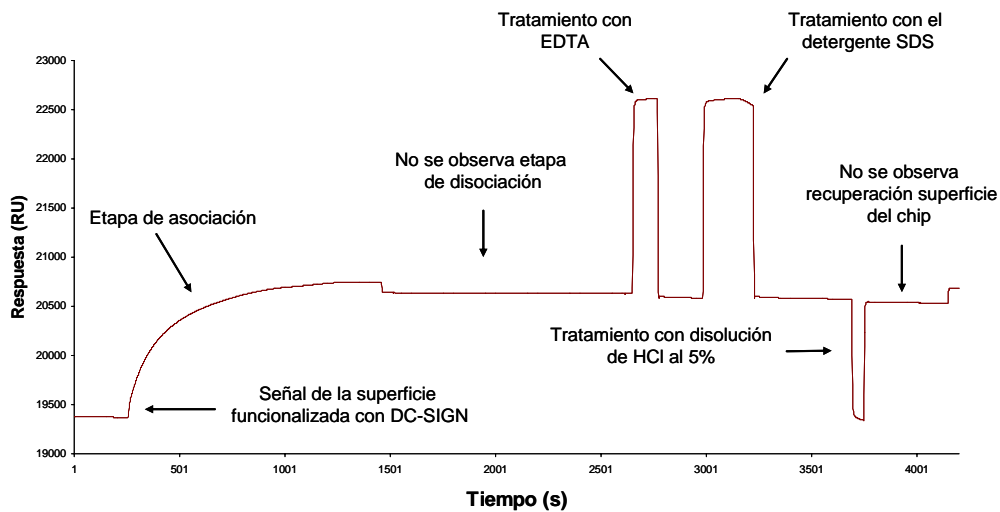


Figura 43. Sensograma de la interacción DC-SIGN con BH30sucLMan en el que se observa los diferentes intentos realizados para recuperar la señal inicial de la superficie funcionalizada con la lectina DC-SIGN

Debido a este problema no se pudieron llevar a cabo los estudios de interacción a diferentes concentraciones del sistema glicodendrítico, a partir de

los cuales se podrían haber obtenido los datos cinéticos de la afinidad del sistema glicodendrítico BH30sucLMan y el ECD de DC-SIGN.

4.1.3 Inhibición de la interacción DC-SIGN-gp120 por BH30sucLMan.

Como el compuesto BH30sucLMan presentaba una afinidad apreciable por el receptor DC-SIGN, se llevaron a cabo los estudios de inhibición de la interacción entre la glicoproteína gp120 del VIH y el receptor DC-SIGN. Para ello, se funcionalizó la superficie del chip con la proteína gp120 y se hizo fluir una concentración mínima de la lectina DC-SIGN ECD (50 μM) en presencia o ausencia de BH30sucLMan, como se había realizado anteriormente para el polímero glicodendrítico BH30sucMan.

Para ello se inyectó conjuntamente cantidades crecientes de los compuestos multivalentes BH30sucLL o BH30sucLMan (0, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 μM) y una concentración fija de DC-SIGN ECD (50 μM). Los resultados obtenidos indicaban que el compuesto dendrítico control BH30sucLL no era capaz de inhibir la asociación entre ECD y gp120, independientemente de la concentración de dendrímero usada, como se observa en el sensograma de la figura 44A. La intensidad de la señal que se observa corresponde a la cantidad máxima de proteína DC-SIGN que interacciona con gp120. Al añadir cantidades crecientes del agente multivalente sintetizado no se observó cambio alguno en esta señal, lo que indicaba que la interacción entre gp120 y DC-SIGN no había variado y por tanto, no se había producido inhibición con el compuesto dendrítico BH30sucLL.

Sin embargo, cuando se inyectaron cantidades crecientes del compuesto BH30sucLMan (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 μM), se observó una clara disminución de la señal directamente proporcional a la concentración de dendrímero. (Figura 44B) Este resultado indicaba una clara inhibición de la interacción ECD con la superficie de gp120. El análisis de estas curvas permitió estimar un IC_{50} para BH30sucMan de 120 μM .

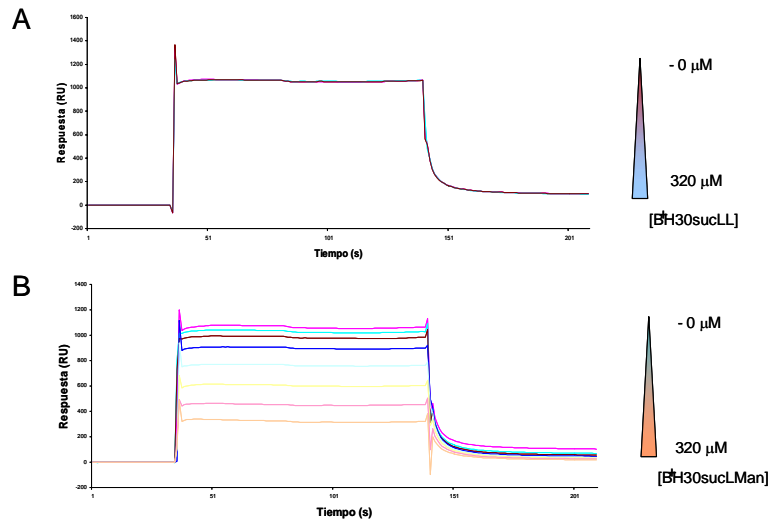


Figura 44. *Inhibición de la interacción DC-SIGN/gp120 usando una superficie de gp120 de alta densidad y (A) BH30sucLL a concentraciones 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 μM. (B) BH30sucLMan a concentraciones 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 μM.*

Estos resultados ponen de manifiesto que el compuesto BH30sucLMan compite de forma favorable con gp120 por la interacción con DC-SIGN. Sin embargo, no mejora el resultado obtenido con el compuesto BH30sucMan con el que se obtuvo un IC_{50} de 50 μM.

A la vista de estos resultados podemos decir, que usando biosensores se ha demostrado que el polímero dendrítico Boltorn de tercera generación funcionalizado con 32 manosas BH30sucLMan es capaz de inhibir la interacción de DC-SIGN/gp120 con un IC_{50} de 120 μM. El empleo de un espaciador más largo y flexible para conjugar el carbohidrato al soporte multivalente da lugar a un dendrímero de 3^a generación (BH30sucLMan) que no mejora los resultados obtenidos para el compuesto BH30sucMan que presenta un espaciador más corto. Es decir, el uso de un espaciador largo que proporciona mayor flexibilidad en el sistema, y que teóricamente permitiría una accesibilidad mejor para que el carbohidrato acceda al sitio de unión de la lectina DC-SIGN, no solo no mejora la interacción, sino más bien al contrario, obteniéndose un peor resultado.

Hay que considerar también que el introducir un sistema más flexible puede conllevar un coste entrópico significativo en el proceso de interacción y por tanto, dar lugar a un reconocimiento molecular menos favorable. Este hecho nos hizo descartar el empleo de otros espaciadores diferentes tanto en tamaño como en constitución química, y centrarnos fundamentalmente en la modificación sobre el carbohidrato para intentar mejorar la actividad biológica de estos sistemas dendríticos multivalentes.

4.2 Glicoconjugados de manosa funcionalizados en las posiciones 1 y 6.

En nuestro grupo de investigación se había llevado a cabo el anclaje de la manosa al soporte multivalente para preparar sistemas glicodendríticos usando siempre la posición anomérica de dicho azúcar. Esta elección se basaba fundamentalmente en dos razones. En primer lugar, los grupos hidroxilo de la manosa implicados en la interacción con las lectinas de tipo C son los hidroxilos que ocupan las posiciones 2, 3 y 4 del carbohidrato,⁸¹ es decir, la posición anomérica no está implicada en la interacción. En segundo lugar, la posición anomérica es la posición sintéticamente más fácil de funcionalizar para generar los correspondientes glicoconjugados, existiendo numerosos antecedentes en la bibliografía. Sin embargo, el grupo hidroxilo que ocupa la posición 6 puede considerarse como otra posibilidad interesante para obtener glicoconjugados funcionalizados. Hay que tener en cuenta que este grupo hidroxilo se diferencia bien del resto de los grupos hidroxilo del carbohidrato al ser el único hidroxilo primario del azúcar y, además, no participa de manera significativa en los procesos de reconocimiento por lectinas del tipo C.⁸² La funcionalización de la posición 6 podría permitir la introducción de residuos hidrofóbicos, como anillos aromáticos, en la posición anomérica, pudiendo aumentar la afinidad del glicoconjugado por contactos no covalentes del tipo van der Waals con los residuos de aminoácidos alifáticos o aromáticos presentes en la cavidad hidrofóbica del centro de reconocimiento de carbohidratos de la lectina.^{58,59} (Figura 45) En la bibliografía se encuentran descritos numerosos ejemplos que demuestran que los aril manopiranosidos presentan una afinidad mayor que la correspondiente manosa con la posición anomérica libre.⁸³ Este hecho puede ser

⁸¹ Weis, W. I.; Drickamer, K., *Annu. Rev. Biochem.*, **1996**, *65*, 441-473.

⁸² Kötter, S.; Krallmann-Wenzel, U.; Ehlers, S.; Lindhorst, T. K.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 2163-2166.

⁵⁸ Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I.; *Science*, **2001**, *294*, 2163-2166.

⁵⁹ Gou, Y.; Feinberg, H.; Conroy, E.; Mitchell, D. A.; Alvarez, R.; Blixt, O.; Taylor, M. E.; Weis, W. I.; Drickamer, K.; *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2004**, *11*, 591-598.

⁸³ (a) Firon, N.; Ashkenazi, S.; Mirelman, D.; Ofek, I.; Sharon, N., *Infect. Immunol.*, **1987**, *55*, 472-476. (b) Hamodrakas, S. J.; Alexandraki, E.; Troganis, A.; Stassinopoulou, C. I., *Int. J. Biol. Macromol.*, **1989**, *11*, 17-22. (c) Lee, R. T.; Ichikawa, Y.; Fay, M.; Drickamer, K.; Shao, M. C.; Lee, Y. C., *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 4810-4815.

aplicado también al receptor DC-SIGN, que presenta una cavidad hidrofóbica. La introducción de este tipo de anillos aromáticos en la posición anomérica podría proporcionar un incremento considerable en la afinidad. Dependiendo del residuo introducido en la posición anomérica, en algunos casos sería necesario conjugar el derivado de manosa en otra posición distinta a la anomérica, fundamentalmente en la posición 6 del anillo de piranosa, que no participa activamente en el proceso de reconocimiento molecular por la proteína, como se ha comentado anteriormente.

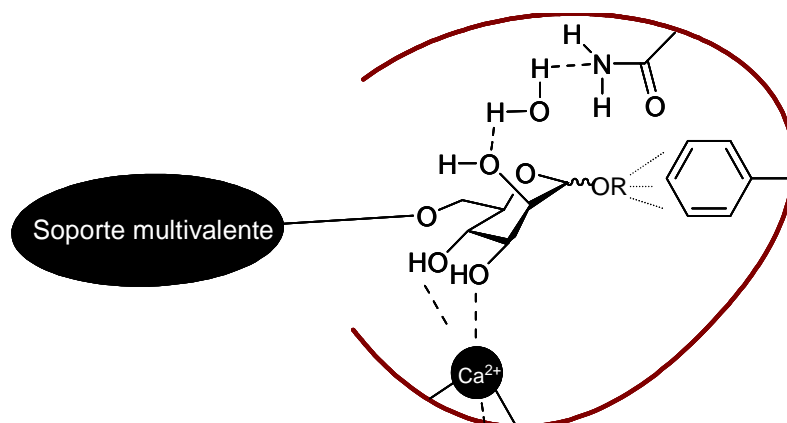


Figura 45. Representación esquemática de una cavidad hidrofóbica dentro del centro de reconocimiento de carbohidratos de una lectina de tipo C.

Para evaluar esta hipótesis y confirmar que la funcionalización de la manosa en la posición 6 con un espaciador no interfiere de forma negativa en la interacción con el receptor DC-SIGN, se prepararon dos conjugados de manosa con un espaciador común en la posición 6, **23** y en la posición 1 (anomérica), **17**. (Figura 46) Para estudiar la afinidad de estos glicoconjugados con el dominio extracelular (ECD) del receptor DC-SIGN se empleó un biosensor con detección SPR. Como se observa en la figura 46, estos glicoconjugados presentan un espaciador lo suficientemente largo para permitir el anclaje de estas moléculas a la superficie del chip del biosensor, evitando que el carbohidrato esté demasiado cerca de la superficie del mismo y se puedan producir interferencias en el proceso de reconocimiento.

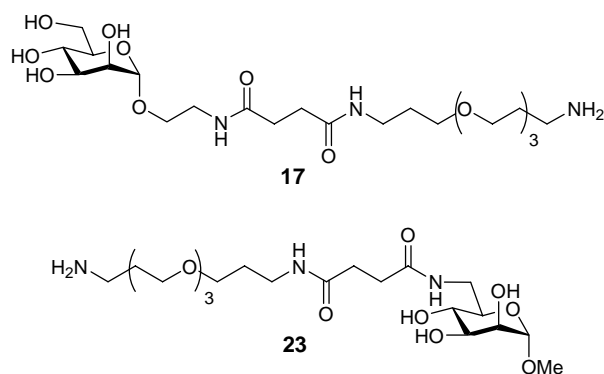


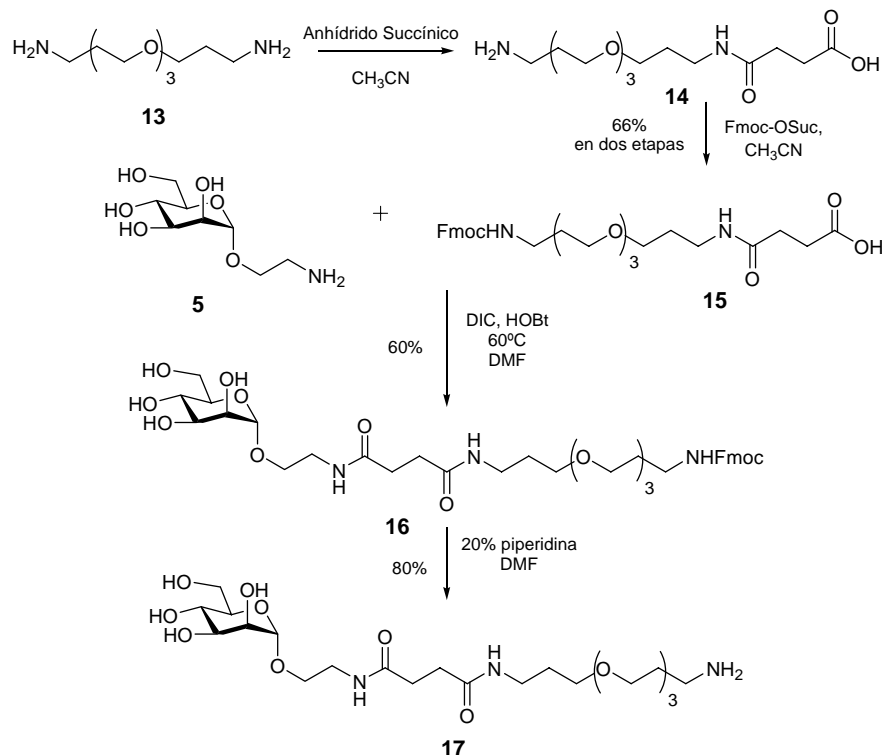
Figura 46. Glicoconjugados de manosa **17** y **23** funcionalizados en la posición 1 y 6 respectivamente.

4.2.1 Síntesis de glicoconjugados de manosa **17** y **23** funcionalizados en las posiciones 1 y 6, respectivamente.

Para realizar los estudios de interacción usando biosensores los carbohidratos seleccionados deberían estar enlazados al chip del biosensor a través de un espaciador suficientemente largo. Este espaciador debería permitir la unión covalente a la superficie del chip de forma sencilla y además, aportar flexibilidad al sistema y hacer que el carbohidrato esté más accesible a la lectina, ayudando a que se produzca la interacción y evitando los posibles impedimentos estéricos que se puedan producir en el caso de usar espaciadores más cortos. El espaciador debe suministrar una adecuada solubilidad al glicoconjugado para permitir la unión al chip del biosensor de forma sencilla. Además, es importante evitar la utilización de un espaciador hidrofóbico que pudiera dar lugar a interacciones no específicas con la lectina en agua. Por último, el espaciador debe estar funcionalizado en los dos extremos de la cadena de forma que permita, por un lado, anclarse a la superficie del chip del biosensor y por otro, unirse al carbohidrato que se va a usar en el estudio. El espaciador que se consideró y que cumplía los requisitos comentados anteriormente fue el compuesto **15**, (esquema 8) que fue preparado en dos etapas sintéticas, como se describe en la literatura,⁸⁴ a partir del producto comercial 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (**13**) por reacción con anhídrido succínico en acetonitrilo y una etapa posterior de

⁸⁴ Zhao, Z. G.; Im, J. S.; Lam, K. S.; Lake, D. F., *Bioconjug. Chem.*, **1999**, *10*, 424-430.

protección de la amina libre como carbamato, usando como reactivo la *N*-(9-fluorenilmetoxicarboniloxi)succinimida (Fmoc-OSuc) en acetonitrilo. De esta forma se obtuvo el espaciador bifuncionalizado **15** con un 66% de rendimiento global en las dos etapas.



Esquema 8. Síntesis del espaciador **15** y del glicoconjugado de manosa funcionalizado en posición anomérica, **17**.

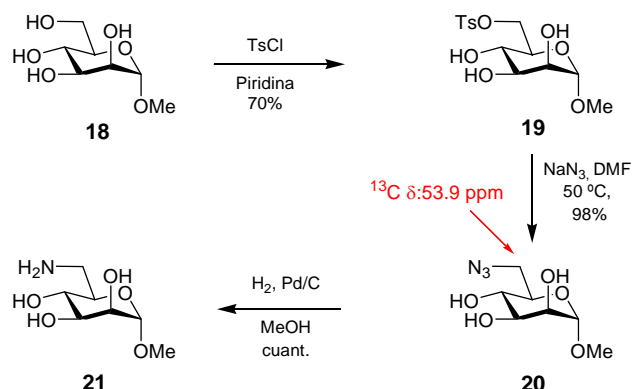
Para la síntesis del glicoconjugado **17**, (esquema 8) funcionalizado en la posición anomérica, se partió del derivado de manosa 2-aminoetil α -D-manopiranosido (**5**), descrito en el capítulo 3. La primera etapa fue la formación de un enlace de tipo amida entre la amina terminal presente en la posición anomérica del azúcar y el grupo ácido carboxílico del espaciador **15**. En la bibliografía se han descrito numerosas metodologías para la formación de enlaces de tipo amida,⁸⁵ pero las condiciones que se debían utilizar tenían que ser

⁸⁵ Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V.; *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 10827-10852.

selectivas para la formación del enlace amida, en presencia de los grupos hidroxilos libres de la manosa **5**. En nuestro grupo de investigación se habían llevado a cabo este tipo de acoplamiento y, por tanto, se decidió utilizar la metodología ya empleada para la síntesis de los sistemas glicodendríticos de manosa BH20sucMan, BH30sucMan, que había dado buenos resultados. Esta metodología consiste en la utilización de DIC y HOBt para activar el grupo ácido carboxílico del derivado **15**, porque usando estas condiciones de reacción no es necesaria la protección de los grupos hidroxilo del azúcar. La reacción del derivado de manosa **5** con el espaciador **15** en presencia de DIC y HOBt a 60°C, condujo a la formación selectiva del enlace amida, obteniéndose el derivado **16**. La purificación del derivado **16** presentó algunos problemas debido a que el producto final no se lograba separar del HOBt por cromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice, en ninguna de las condiciones que se intentaron. Dada la diferencia de peso molecular entre el producto final **16** y el reactivo HOBt, se decidió usar una primera etapa de purificación utilizando cromatografía de exclusión por tamaño, empleando una columna de Sephadex LH-20 y utilizando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (1:1). En esta purificación se logró eliminar la mayor parte del HOBt presente en el crudo de la reacción y en una segunda etapa de purificación por cromatografía en columna de gel de sílice, usando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (9:1), se logró obtener el compuesto **16** puro con un rendimiento del 60 %. Después de la etapa de acoplamiento, el grupo protector Fmoc se eliminó fácilmente a temperatura ambiente por tratamiento con una disolución de piperidina en DMF al 20%, para dar el compuesto **17** con un 80% de rendimiento. (Esquema 8) Para la purificación del compuesto **17** se eliminó la DMF y el crudo se disolvió en agua, la piperidina y el derivado de Fmoc que se forma en la reacción se eliminaron por lavado con CH₂Cl₂, quedando el compuesto **17** en la fase acuosa.

Para la síntesis del derivado de manosa **23**, (esquema 10) funcionalizado en la posición 6 se usó como producto de partida el metil α -D-manopiranosido (**18**) comercial. (Esquema 9) Para unir el derivado **18** al espaciador **15** con el mismo tipo de enlace que el usado para el glicoconjugado **17**, fue necesario introducir una amina primaria en la posición 6 del derivado de manosa **18**. El

compuesto metil 6-deoxi-6-amino- α -D-manopiranosido (**21**) se preparó en tres etapas usando la metodología descrita en la bibliografía,⁸⁶ aunque introduciendo algunas modificaciones.



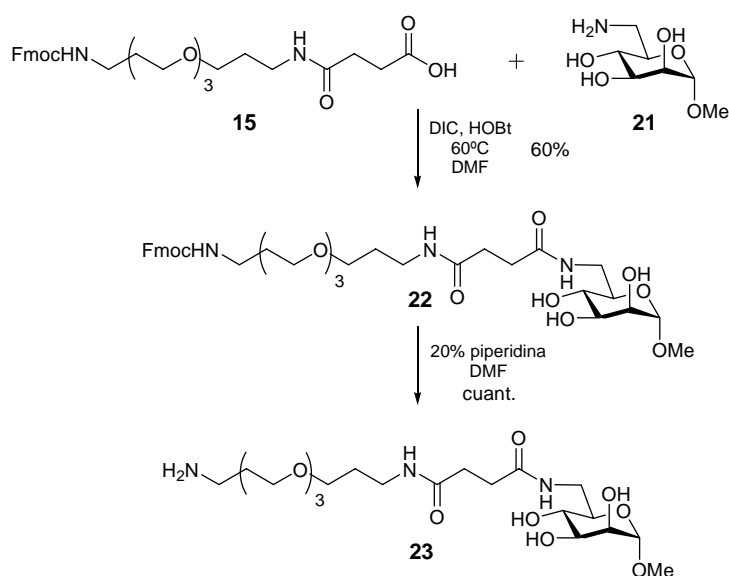
Esquema 9. Síntesis del metil 6-deoxi-6-amino- α -D-manopiranosido (**21**).

El grupo hidroxilo en la posición 6 se convirtió en un buen grupo saliente por reacción con cloruro de tosilo en piridina a 0°C , obteniéndose el derivado **19** con un 70% de rendimiento. Posteriormente, el grupo tosilo se sustituyó por un grupo azida mediante reacción con un exceso de azida sódica en DMF. Cuando se emplearon las condiciones descritas⁸⁶ para la sustitución del grupo tosilo por el grupo azida en una mezcla de acetona- H_2O (3-2) a reflujo, todos los intentos realizados en estas condiciones fueron infructuosos, recuperándose el producto de partida en todos los casos. Sin embargo, usando DMF como disolvente a 60°C , la reacción se completó en 12 horas obteniéndose la metil 6-deoxi-6-azidomanopiranososa (**20**) con un rendimiento del 98%. En el espectro de ^1H -RMN se observó claramente la desaparición de las señales en la zona aromática del espectro y el singlete de metilo pertenecientes al grupo tosilo y, además, en el espectro de ^{13}C -RMN se observó la aparición de una señal a 53.9 ppm característica de un carbono unido a un grupo azida. La última etapa para la obtención del grupo amina en la posición 6 fue la hidrogenación catalítica del grupo azida usando Pd soportado sobre carbono como catalizador e H_2 a 1 atm de

⁸⁶ Wang, P.; Shen, G. J.; Wang, Y. F.; Ichikawa, Y.; Wong, C. H.; *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 3895-3990.

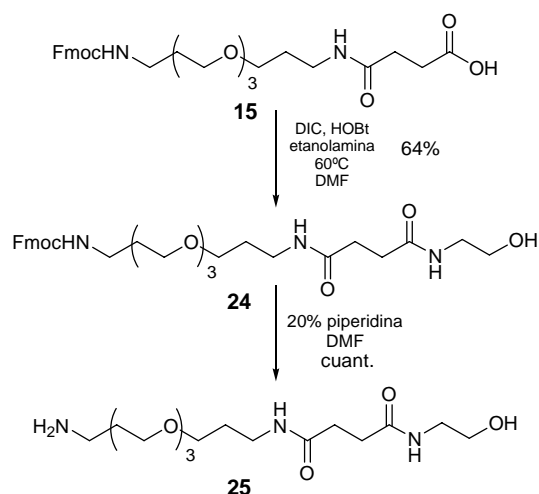
presión en MeOH como disolvente, obteniéndose el metil 6-deoxi-6-amino- α -D-manopiranosido (**21**) de forma cuantitativa. Este compuesto se utilizó en la siguiente etapa sin necesidad de purificación.

Una vez obtenido el derivado de manosa **21**, la reacción de acoplamiento con el espaciador **15** se realizó usando las mismas condiciones que las empleadas para el derivado de manosa **5**, es decir, DIC y HOBt, para activar el ácido carboxílico del espaciador **15** en DMF y a temperatura ambiente. (Esquema 10) En estas condiciones, se obtuvo el derivado de manosa **22** que presenta el espaciador en la posición 6 con un 60% de rendimiento. La purificación de este compuesto presentó los mismos problemas que el compuesto **16**. De nuevo, el empleo de una columna de Sephadex LH-20 usando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) y, posteriormente, una segunda purificación usando cromatografía en columna de gel de sílice y como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (95:5) dio lugar al compuesto **22** puro. El último paso fue la eliminación a temperatura ambiente del grupo Fmoc con una disolución de piperidina en DMF al 20%, obteniéndose el glicoconjugado **23** de forma cuantitativa.



Esquema 10. Síntesis del glicoconjugado de manosa **23** funcionalizado en la posición 6.

Finalmente, se preparó también el compuesto **25** que no presenta el azúcar, como control para los estudios de interacción. (Esquema 11) De esta forma se podría confirmar que la interacción observada sería debida únicamente al carbohidrato y no al espaciador. Para ello, se hizo reaccionar el espaciador **15** con etanolamina usando DIC y HOBT en DMF a 60°C obteniéndose el compuesto **24** con un 64% de rendimiento. Nuevamente, fue necesario el empleo de dos etapas de purificación, una columna de Sephadex LH-20 usando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (1:1) y una segunda purificación usando cromatografía en columna de gel de sílice y como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (95:5), como se ha comentado anteriormente y que dio lugar al compuesto **24** puro. La desprotección del grupo amino a temperatura ambiente usando una disolución de piperidina en DMF al 20%, dio lugar finalmente al compuesto **25** de forma cuantitativa.



Esquema 11. Síntesis del compuesto control **25**.

4.2.2 Estudios de interacción de los glicoconjugados de manosa **17** y **23** con el receptor DC-SIGN usando un biosensor SPR.

Una vez sintetizados los compuestos **17**, **23** y **25**, se llevaron a cabo los estudios de interacción con el receptor DC-SIGN usando el biosensor con detección SPR. La primera etapa para realizar estos experimentos de afinidad fue la funcionalización de la superficie del chip del biosensor. Para ello se utilizó el

grupo amino libre presente en el extremo del espaciador de los tres compuestos y un chip CM5 (similar al CM4 pero con un nivel de funcionalización mayor, lo que permite una mayor densidad de ligando en la superficie del chip) que presenta un polímero de dextrano funcionalizado con ácidos carboxílicos. La activación de dichos grupos ácidos se llevó a cabo de nuevo con NHS y EDC. Posteriormente se realizó la conjugación de los compuestos **17**, **23** y **25** (se usó un canal del chip del biosensor para cada uno de los compuestos) al chip activado mediante la formación de un enlace covalente amida. Después de la inyección de los distintos compuestos, se observaron incrementos en la señal (en unidades de resonancia, RU) de los correspondientes sensogramas que indicaban claramente la unión covalente de estos compuestos con los ácidos carboxílicos activados de la superficie del chip. Los niveles de funcionalización obtenidos fueron de 793, 961.5 y 884 RU para los compuestos **17**, **23** y **25**, respectivamente. Estos datos indicaban que el gliconjugado con el espaciador seleccionado permitía la funcionalización de la superficie del chip del biosensor con un nivel de inmovilización muy razonable para llevar a cabo, posteriormente, los estudios de interacción con el receptor DC-SIGN.

Los estudios de afinidad se realizaron utilizando concentraciones crecientes de ECD de DC-SIGN en un rango de 0.1 a 100 μM . Las diferentes disoluciones de la lectina se inyectaron a través de los canales del chip, obteniéndose unos perfiles de interacción de DC-SIGN ECD con las superficies funcionalizadas. La señal observada crece en proporción a la concentración de proteína. La pequeña señal que se observó debido a la interacción de la lectina con el compuesto control **25** se restó de las señales encontradas en los canales funcionalizados con los compuestos **17** y **23**, eliminándose de esta forma la señal correspondiente a procesos de interacción no específicos. En la figura 46 están representados los sensogramas correspondientes a los procesos de interacción con **17** y **23**. Se puede observar que los procesos de asociación y disociación son rápidos para dichos compuestos. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente para manosa, que presenta una constante de disociación con el receptor DC-SIGN en el rango milimolar.

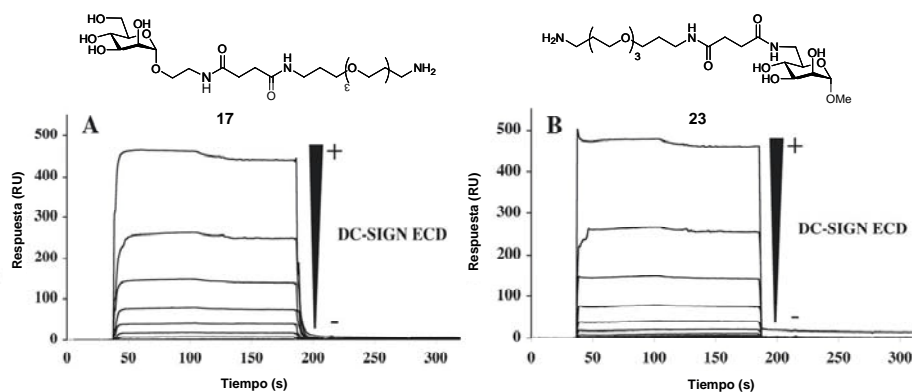


Figura 46. Representación de los sensogramas obtenidos para los glicoconjugados **17** (A) y **23** (B) en función de la concentración de ECD de DC-SIGN.

El análisis de las curvas obtenidas al representar la concentración del receptor DC-SIGN frente a la respuesta (RU) obtenida para las diferentes superficies funcionalizadas con una densidad similar, muestran un comportamiento análogo para los compuestos **17** y **23**. (Figura 47) Debido a la pequeña afinidad observada para este tipo de interacción proteína-carbohidrato, no es posible alcanzar el nivel de saturación para el rango de concentración del receptor ECD de DC-SIGN usado, como se observa en la grafica de la figura 47. Para poder obtener una constante de disociación sería necesario alcanzar el equilibrio en el proceso de reconocimiento, lo que supondría, en este caso, la utilización de una gran cantidad de lectina DC-SIGN, lectina no comercial y difícil de obtener en grandes cantidades, debido al complejo proceso de plegamiento de la proteína para que sea funcional. En la gráfica de la figura 47 podemos observar solamente la parte ascendente de la curva de saturación, porque no se ha llegado al equilibrio. En el caso de diferencias grandes de afinidad de DC-SIGN por ambos tipos de manosas modificadas, el cambio en la constante de disociación se vería reflejada en la parte ascendente de la curva de saturación. Sin embargo, en la figura 47 se observa que prácticamente no hay diferencia entre los dos glicoconjugados.

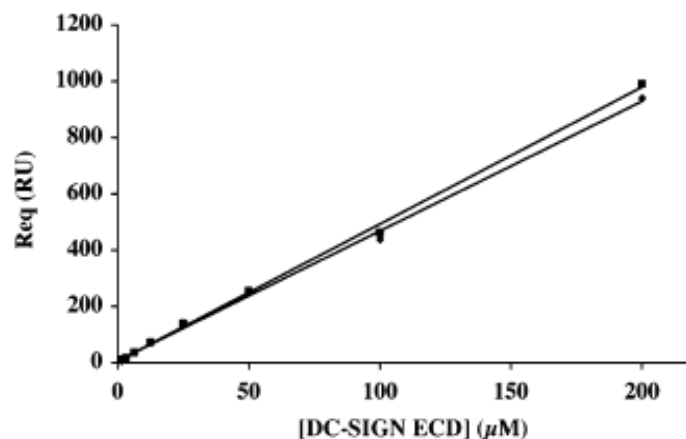


Figura 47. Representación de la respuesta de las superficies funcionalizadas con los glicoconjugados **17** (rombos) y **23** (cuadrados) en función de la concentración de ECD de DC-SIGN.

Aunque no se haya podido cuantificar una constante de afinidad para cada uno de los compuestos **17** y **23**, cualitativamente los análisis que se han realizado demuestran que ambas posiciones (1 y 6) en la manosa son apropiadas para ser usadas como punto de funcionalización y generar así los correspondientes glicoconjugados. Incluso es razonable decir que el conjugado en la posición 6, como se puede observar en la figura 47, es al menos tan bueno sino mejor que el conjugado en la posición anomérica que es la que habitualmente se ha utilizado para la preparación de los glicoconjugados en su interacción con DC-SIGN.

Estos resultados abren nuevas posibilidades en el diseño de ligandos para el receptor DC-SIGN. La introducción de grupos hidrofóbicos en la posición anomérica del extremo reductor del carbohidrato y la conjugación de dichos carbohidratos por la posición 6 permitirá la creación de sistemas multivalentes más selectivos y que presentan una mayor afinidad por el receptor DC-SIGN.

**5. MODIFICACIONES DEL FRAGMENTO SACARÍDICO:
SÍNTESIS, ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y ENSAYOS
BIOLÓGICOS**

5.1 Compuestos oligosacarídicos de manosa como ligandos para el receptor DC-SIGN: docking, síntesis y estudios de RMN.

Todos los estudios de interacción con el receptor DC-SIGN llevados a cabo anteriormente en nuestro grupo de investigación estaban basados en compuestos que presentaban como carbohidrato el monosacárido de manosa. Es evidente que este es el sistema modelo más sencillo desde el punto de vista del carbohidrato y por lo tanto, una de las formas de mejorar la actividad de nuestros sistemas glicodendríticos sería utilizar carbohidratos más complejos que imiten mejor los sistemas oligosacarídicos presentes en los sistemas naturales. En este sentido, nos hemos propuesto preparar y estudiar la interacción de sistemas di- y trisacarídicos presentes en las estructuras oligosacarídicas de las glicoproteínas de los patógenos que interaccionan con el receptor DC-SIGN. Inicialmente, se ha llevado a cabo un estudio a nivel monovalente que nos ha permitido seleccionar los mejores ligandos para preparar, posteriormente, los correspondientes sistemas multivalentes.

Como se ha comentado anteriormente en el capítulo de introducción, en la bibliografía hay descritos varios trabajos sobre el estudio y la evaluación de las constantes de afinidad de sistemas mono y multivalentes de oligosacáridos de manosa y fucosa frente al receptor DC-SIGN utilizando diferentes técnicas como ELLA, Biosensores, etc.⁶¹ Sin embargo, la información estructural a nivel molecular disponible actualmente sobre el proceso de reconocimiento de

⁶¹ (a) Halary, F.; Amara, A.; Lortat-Jacob, H.; Messerle, M.; Delaunay, T.; Houles, C.; Fieschi, F.; Aranzana-Seisdedos, F.; Moreau, J. F.; Chanet-Merville, J.; *Immunity*, **2002**, *17*, 653-664. (b) Lozach, P. Y.; Lortat-Jacob, H.; de Lacroix, L. A.; Staropoli, I.; Foug, S.; Amara, A.; Houles, C.; Fieschi, F.; Schwartz, O.; Virelizier, J. L.; Aranzana-Seisdedos, F.; Altmeyer, R.; *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 20358-20366. (c) de Parseval, A.; Su, S. V.; Elder, J. H.; Lee, B.; *J. Virol.*, **2004**, *78*, 2597-2600. (d) Su, S. V.; Hong, P.; Baik, S.; Negrete, O. A.; Gurney, K. B.; Lee, B.; *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 19122-19132. (e) Adams, E. W.; Ratner, D. M.; Bokesch, H. R.; McMahon, J. B.; O'Keefe, B. R.; Seeberger, P. H.; *Chem. Biol.*, **2004**, *11*, 875-881. (f) van Liempt, E.; Bank, C. M. C.; Mehta, P.; García-Vallejo, J. J.; Kwar, Z. S.; Geyer, R.; Alvarez, R. A.; Cummings, R. D.; van Kooyk, Y.; van Die, I.; *FEBS Lett.*, **2006**, *580*, 6123-6131. (g) Meyer, S.; van Liempt, E.; Imberty, A.; van Kooyk, Y.; Geyer, H.; Geyer, R.; van Die, I.; *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 37349-37359. (h) Mitchell, D. A.; Fadden, A. J.; Drickamer, K.; *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 28939-28945.

carbohidratos por DC-SIGN es escasa, y se reduce a resultados obtenidos en estado sólido. Las estructuras de rayos X de complejos formados por diferentes oligosacáridos que van desde $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ hasta disacáridos de manosa ($\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$), que forman parte de la estructura de *high mannose* y el CRD de DC-SIGN y L-SIGN han sido publicados recientemente.^{58,59,60} En el caso particular del disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ estos estudios ponen de relieve la posibilidad de la existencia de varios modos de enlace del ligando, lo que da idea de la complejidad del sistema y de la importancia que puede tener el estudio en detalle del proceso de reconocimiento molecular para el diseño de nuevos ligandos.⁶⁰ Nuestro interés en el receptor DC-SIGN nos ha llevado a explorar con más detalle las bases moleculares del proceso de reconocimiento con el objetivo de diseñar y preparar ligandos apropiados y sus correspondientes sistemas multivalentes para su potencial uso en procesos biológicos en los que está involucrado dicho receptor.

Como se ha comentado anteriormente, el oligosacárido *high mannose* es uno de los más abundantes presente en las glicoproteínas de las envueltas virales. Esta estructura de *high mannose* presenta unidades de manosa unidas entre sí a través de enlaces glicosídicos con estereoquímica α en las posiciones 2, 3 y 6. (Figura 48) Entre los potenciales ligandos para ser evaluados, se han seleccionado tres disacáridos y dos trisacáridos de manosa. Estos ligandos que son más complejos que el monosacárido de manosa y, que se pueden obtener con un coste sintético razonable, constituyen una buena opción como potenciales ligandos para bloquear el receptor DC-SIGN. Los tres disacáridos seleccionados, $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$, $\text{Man}\alpha 1,3\text{Man}$ y $\text{Man}\alpha 1,6\text{Man}$, y el trisacárido $\text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$ están presentes en la estructura de *high mannose*. El trisacárido $\text{Man}\alpha 1,2[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$ que no está presente en dicha estructura, constituye la unidad repetitiva de los mannanos como el lipoarabinomanano

⁵⁸ Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I.; *Science*, **2001**, *294*, 2163-2166.

⁵⁹ Gou, Y.; Feinberg, H.; Conroy, E.; Mitchell, D. A.; Alvarez, R.; Blixt, O.; Taylor, M. E.; Weis, W. I.; Drickamer, K.; *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2004**, *11*, 591-598.

⁶⁰ Feinberg, H.; Castelli, R.; Drickamer, K.; Seeberger, P. H.; Weis, W. I.; *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 4202-4209.

(LAM), presente en la pared celular de la bacteria *Mycobacterium Tuberculosis*, bacteria que interacciona con DC-SIGN. (Figura 48)

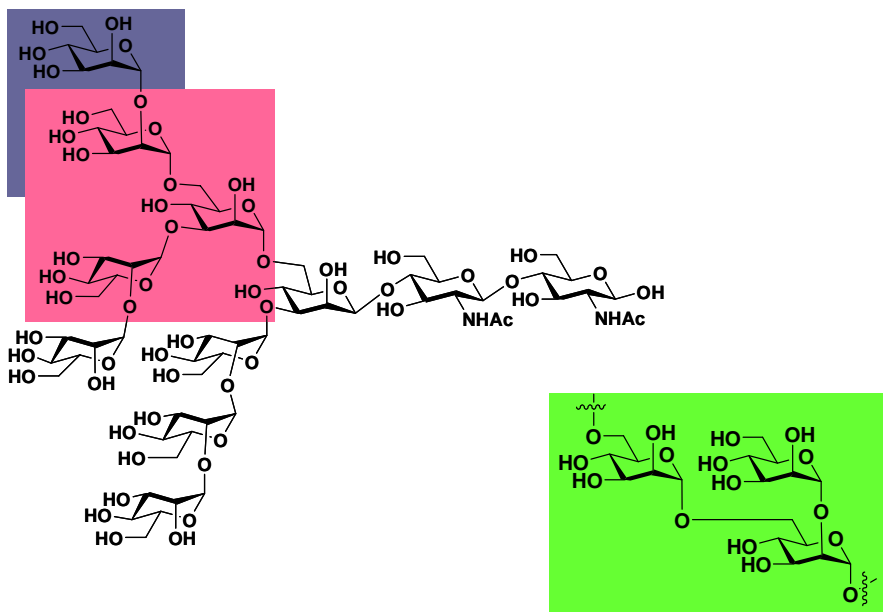


Figura 48. Fragmentos di y trisacarídicos presentes en la estructura de high mannose y LAM.

Con estos ligandos seleccionados se ha llevado a cabo en primer lugar un estudio computacional mediante técnicas de docking.

5.1.1 Estudios de docking de los di- y trisacáridos seleccionados.

Los procesos de docking son cálculos computacionales que permiten la predicción de la conformación, la orientación y la posición de un ligando dentro del sitio de unión de un receptor (una proteína en la mayoría de los casos).

Estos estudios de docking permiten, por una parte, predecir la estructura del ligando cuando esta interaccionando con la proteína y, por otra parte, permiten realizar una predicción de las características de la interacción, para poder obtener valores energéticos sobre la misma.⁸⁷ Estos estudios teóricos

⁸⁷ Kitchen, D. B.; Decornez, D.; Furr, J. R.; Bajorath, J.; *Nat. Rev. Drugs Discov.*, **2004**, *3*, 935-949.

suministran información que puede ser de gran ayuda a la hora de diseñar ligandos para un receptor determinado. De hecho, pueden permitir incluso hacer una evaluación comparativa de dichos ligandos para seleccionar el mejor candidato en base a la energía calculada para cada uno de los correspondientes complejos formados.

Para poder llevar a cabo estos estudios de docking es necesario conocer la estructura tridimensional del receptor, obtenida por técnicas experimentales como pueden ser la difracción de rayos X o la resonancia magnética nuclear (RMN) en disolución. Una vez determinada la diana y conocido el sitio activo, se aplican técnicas computacionales diversas. Una posibilidad consiste en el cálculo de la interacción de moléculas conocidas que se unen en el sitio activo, y posteriormente se lleva a cabo un refinamiento de la estructural para aumentar la actividad. Otra posibilidad es lo que se conoce como “screening virtual” que consiste en evaluar un gran número de compuestos procedentes de quimiotecas frente a la diana considerada para seleccionar el mejor ligando.

El docking es una aproximación que se basa en el concepto “llave-cerradura” formulado por Emil Fischer hace más de un siglo. Idealmente el sitio de unión debe ser un hueco más o menos profundo con una serie de grupos funcionales en las cadenas laterales de los aminoácidos que forman el centro activo capaces de establecer interacciones mediante la formación de enlaces de hidrógeno (como donadores o como aceptores), interacciones hidrofóbicas (residuos aromáticos o alifáticos) o electrostáticas (residuos cargados).

Después de colocar los ligando en el centro activo, viene la parte más importante de la metodología. Utilizando algoritmos informáticos se estudia el ligando en el centro de unión en multitud de orientaciones. En esta etapa se emplea un criterio numérico para distinguir cual o cuales de todas las disposiciones probadas resulta ser la más adecuada, es decir, la que teóricamente adoptaría el ligando si tuviera acceso al sitio de unión. El resultado proporciona a menudo una medida aproximada de la adecuación de un ligando al sitio activo. El criterio numérico de puntuación es generalmente muy completo. Además, para

realizar una estimación de la energía de interacción los algoritmos utilizados son muchos más complejos, repitiéndose el proceso de cálculo varias veces para poder estimar, de esta forma, la energía de la interacción con la mayor precisión posible. Aunque para el estudio de la conformación de los ligandos se utilizan cálculos energéticos simples (interacciones electrostáticas y de van der Waals), para los cálculos de la energías de interacción se usan criterios como entropía, solvatación, etc.

Los estudios computacionales de docking que se presentan a continuación fueron realizados por la Dra. Nuria Campillo y el Dr. Juan Antonio Páez del Instituto de Química Médica (CSIC, Madrid).

En estos estudios de docking se utilizaron como parámetros estructurales del receptor DC-SIGN los datos publicados por Drickamer y colaboradores de la estructura cristalina del complejo CRD de DC-SIGN y el pentasacárido GlcNAc₂Man₃ (codigo pdb 1k19).⁵⁸ Como ligandos se han seleccionado los dos trisacáridos Man α 1,3[Man α 1,6]Man y Man α 1,2[Man α 1,6]Man y los disacáridos Man α 1,2Man, Man α 1,3Man y Man α 1,6Man. (Figura 49)

Para los disacáridos Man α 1,2Man y Man α 1,6Man se examinaron dos modos de enlaces, uno correspondiente al sitio de unión primario de la proteína (denominados complejos 1d16 y 1d12), y el otro implicado en un sitio de enlace secundario (complejos 2d16 y 2d12). La nomenclatura utilizada para nombrar a los complejos se indica de la siguiente forma: **1d16** se refiere al complejo obtenido al colocar el disacárido (d) Man α **1,6**Man en el sitio de unión primario **1** del CRD de DC-SIGN. En el caso de los trisacáridos solo se ha considerado el sitio de unión primario y la nomenclatura es la misma. Por ejemplo, **1t26** se refiere al trisacárido (t) con las uniones glicosídicas en las posiciones **2** y **6**, en el sitio de unión primario **1**.

⁵⁸ Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I.; *Science*, **2001**, 294, 2163-2166.

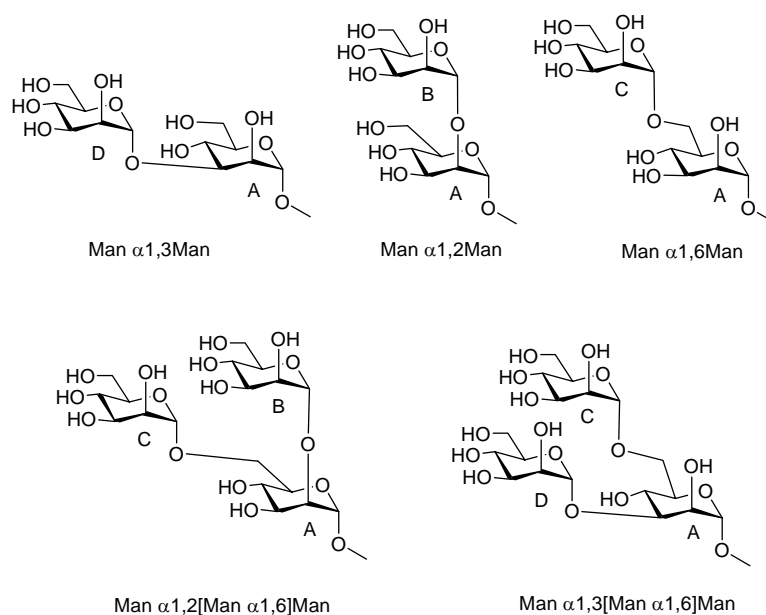


Figura 49. Estructura de los disacáridos y trisacáridos seleccionados para los estudios de docking.

La conformación de los trisacáridos ha sido calculada usando como modelo la estructura del fragmento trisacarídico $\text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$ del pentasacárido $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ resuelto en la estructura del complejo de rayos X (ManD-ManA-ManC). (Figura 49) La manosa A corresponde siempre al extremo reductor, la manosa B es la que se encuentra unida en la posición 2, la manosa C se encuentra unida en la posición 6 y la manosa D en la posición 3.

Para determinar la localización y la orientación de enlace de los diferentes oligosacáridos de manosa se ha usado un procedimiento automático de docking (FlexiDock). Las estructuras energéticamente favorables obtenidas para cada ligando que presentaban parámetros estructurales razonables (distancia entre los residuos y ángulos de torsión típicos) se seleccionaron, realizándose a continuación una minimización de la energía de estos complejos antes del posterior análisis.

Los complejos finales (1d13, 1d16, 2d16, 1d12, 2d12, 1t36 y 1t26) se evaluaron en términos de consenso de interacciones ligando-proteína y ángulos

diedros con los datos experimentales y los valores conocidos para la energía de interacción usando los programas STC y DOCK module (SYBYL). (Tabla 2)

Tabla 2. Ángulos diedros y energías de los complejos.

Complejos	Phi/Psi (Φ/Ψ)	ΔG_{ent} Kcal mol ⁻¹
1d13	1→3: 65.2/144.8	-4.8
1d16	1→6: 63.8/153.0	-5.3
2d16	1→6: 52.2/166.0	-2.2
1d12	1→2: 68.5/85.9	-5.9
2d12	1→2: 42.1/90.3	-5.6
1t36	1→3: 96.5/155.1 6←1: 68.7/181.4	-7.3
1t26	1→2: 81.4/168.0 6←1: 88.4/205.6	-6.7

Hay que señalar, que los carbohidratos no son estructuras rígidas y por tanto, presentan cierta libertad en la conformación que pueden adoptar tanto libres en disolución como unidos a un receptor. Sin embargo, los anillos de piranosa de los carbohidratos les confieren cierta rigidez conformacional. Son las uniones glicosídicas entre los monosacáridos que forman la estructura del carbohidrato las que poseen mayor libertad conformacional. El enlace glicosídico forma dos ángulos diedros claramente reconocibles, como se puede observar en la figura 50. Por ello, el cálculo de los valores de los ángulos diedros Phi (Φ) y Psi (Ψ) nos proporciona información muy importante sobre la conformación que adquiere el carbohidrato en el sitio de unión de la proteína. (Tabla 2) El ángulo diedro Phi (Φ) está definido por los átomos ($H_1-C_1-O-C_x$) y el ángulo diedro Psi (Ψ) por los átomos ($C_1-O-C_x-H_x$), siendo x la posición del átomo del anillo de piranosa sobre el que se ha producido la glicosidación.

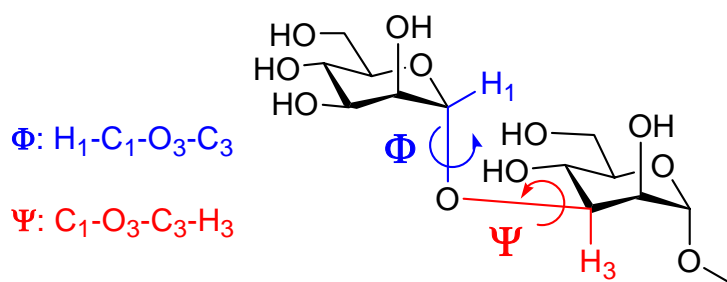


Figura 50. Representación de los ángulos diedros Φ y Ψ en un disacárido.

El análisis de la interacción en cada uno de los complejos condujo a la determinación de los residuos de proteína claves implicados en la interacción y a proponer la red de enlaces de hidrógeno que participan en la estabilización de dicha interacción entre las unidades de manosa y DC-SIGN, contribuyendo de forma energéticamente favorable a cada uno de los complejos mencionados anteriormente. Estos enlaces de hidrógeno también se observaron experimentalmente en estado sólido en el complejo de DC-SIGN y el pentasacárido GlcNAc₂Man₃.⁵⁸ Las interacciones más fuertes se encontraron entre los residuos Glu 347, Asn 349, Glu 354, Asn 365, Asp 366 y Lys 368, que constituyen el sitio de unión primario y los anillos ManD en el complejo con 1d13, ManC en el 1d16 y ManB en el 1d12. Adicionalmente, los grupos hidroxilo ecuatoriales de las posiciones 3 y 4 de la manosa (extremo no reductor o extremo reductor) interaccionan con el ión Ca²⁺, esto también se ha observado en los resultados experimentales obtenidos en los estudios de difracción de rayos X. También existen contactos hidrofóbicos del anillo de piranosa ManA con los residuos Val 351 y Phe 313. Los complejos 1d16 y 1d12 muestran un apilamiento entre la unidad de manosa ManA y el residuo aromático del aminoácido Phe 313 (interacción C-H...aromático). (Figura 51)

⁵⁸ Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I.; *Science*, **2001**, *294*, 2163-2166.

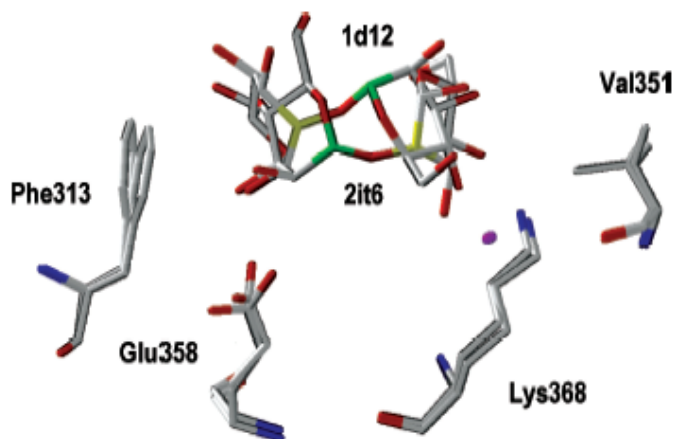


Figura 51. Superposición del complejo DC-SIGN/Man α 1,2Man (1d12) obtenido por cálculos teóricos de docking y de la estructura 3D del complejo DC-SIGN con el disacárido obtenido por cristalografía de rayos X (2it6).

La energía libre de Gibbs de enlace (AG_{enl}) calculada con los programas STC y DOCK, sugieren que los disacáridos con el tipo de unión α 1,2 y α 1,6 son los mejores ligandos para DC-SIGN. (Tabla 2) Estos resultados concuerdan con los valores experimentales de interacción publicados por Weis y col.,⁵⁹ que demuestran que el disacárido Man α 1,2Man presenta la mayor constante de disociación relativa K_{DS} (relativa a la K_{D} de manosa), y que los disacáridos Man α 1,3Man y Man α 1,6Man, presentan un valor similar. Se puede concluir, por tanto, que teniendo en cuenta la energía de enlace calculada, los disacáridos que contienen uniones α 1,2 ó α 1,6 presentan una mayor afinidad por DC-SIGN.

Recientemente, se han resuelto las estructuras cristalinas de los complejos del CRD de DC-SIGN con el disacárido Man α 1,2Man y con un hexasacárido que contiene unidades de dicho disacárido.⁶⁰ Estas estructuras revelan una mezcla de dos modos de enlace en el ión Ca^{2+} primario, para los dos casos. Los autores sugieren que una interacción presentando modos de enlace múltiples proporciona por un lado, contactos adicionales y por otro, mejora

⁵⁹ Gou, Y.; Feinberg, H.; Conroy, E.; Mitchell, D. A.; Alvarez, R.; Blixt, O.; Taylor, M. E.; Weis, W. I.; Drickamer, K.; *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2004**, *11*, 591-598.

estadísticamente el enlace. En la orientación principal del complejo $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$, la manosa que se coordina con el ión Ca^{2+} es la que se encuentra en el extremo reductor del disacárido (ManA). Se han comparado los resultados teóricos para el complejo $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ (1d12) con los experimentales (rayos X) mediante la superposición de ambas estructuras (Figura 51). Ambas estructuras difieren fundamentalmente una de otra en términos de modo de enlace de las manosas. El modo de enlace principal muestra en el caso experimental el extremo reductor del disacárido enlazado al átomo de Ca^{2+} , mientras en nuestro modelo, el extremo no reductor es el que interacciona con el ión Ca^{2+} . Sin embargo, los contactos del disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ con los aminoácidos del sitio de reconocimiento de DC-SIGN en el complejo teórico (1d12) son similares a los encontrados en los datos experimentales.

En el caso de los dos trisacáridos, la red de enlaces de hidrógeno mencionada anteriormente para los disacáridos estudiados se mantiene en los dos complejos de los trisacáridos, aunque con algún enlace de hidrógeno adicional para el fragmento ManC en el complejo con $\text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$. Los dos trisacáridos muestran interacciones hidrofóbicas entre las unidades ManC (1t26) y ManD (1t36) y el residuo Val 351. También se observaron interacciones C-H aromáticas en ambos complejos con la Phe 313.

Considerando los trisacáridos en el sitio de unión del receptor, los modelos calculados para estos ligandos mostraban que el extremo no reductor de la manosa terminal interaccionaba con bastantes residuos de DC-SIGN, mientras la manosa central (ManA), no lo hacía. A partir de estos datos se pudo concluir que el modo de enlace de estos trisacáridos puede ser como una pinza, donde los extremos interaccionan con la proteína. Esta forma de interaccionar es en cierta manera similar a la encontrada para la estructura de rayos X del complejo $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ con DC-SIGN. (Figura 52)

⁶⁰ Feinberg, H.; Castelli, R.; Drickamer, K.; Seeberger, P. H.; Weis, W. I.; *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 4202-4209.

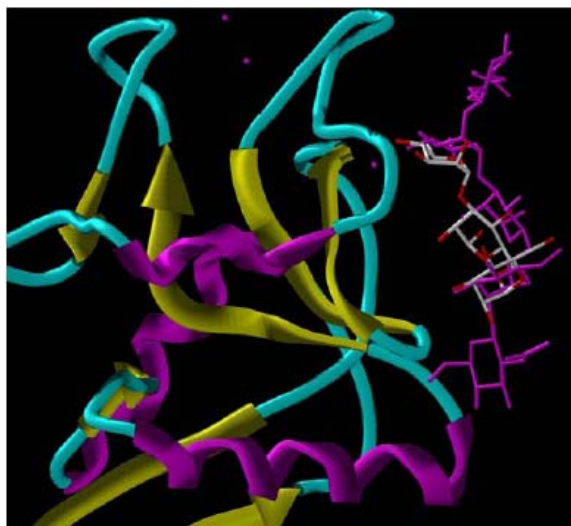
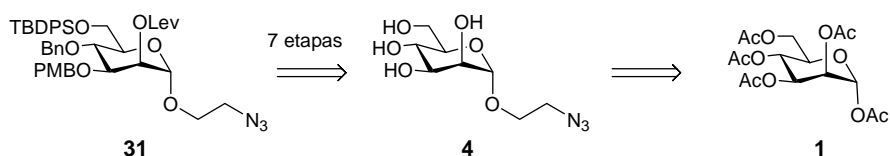


Figura 52. Superposición del trisacárido $\text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$ y el complejo *1k9i*. ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ en color morado) en el sitio activo del CRD de DC-SIGN.

5.1.2 Síntesis de los ligandos oligosacarídicos para el receptor DC-SIGN.

A la vista de los resultados de docking, los ligandos seleccionados para ser sintetizados fueron el disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ y los trisacáridos $\text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$ y $\text{Man}\alpha 1,2[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$. La preparación de estos ligandos permitiría la realización de estudios de interacción en disolución con la proteína DC-SIGN por RMN para confirmar los resultados obtenidos computacionalmente en los estudios de docking. Además, la actividad biológica de estos compuestos podría ser estudiada en diferentes modelos biológicos tanto en su forma monovalente como con sus correspondientes sistemas multivalentes.

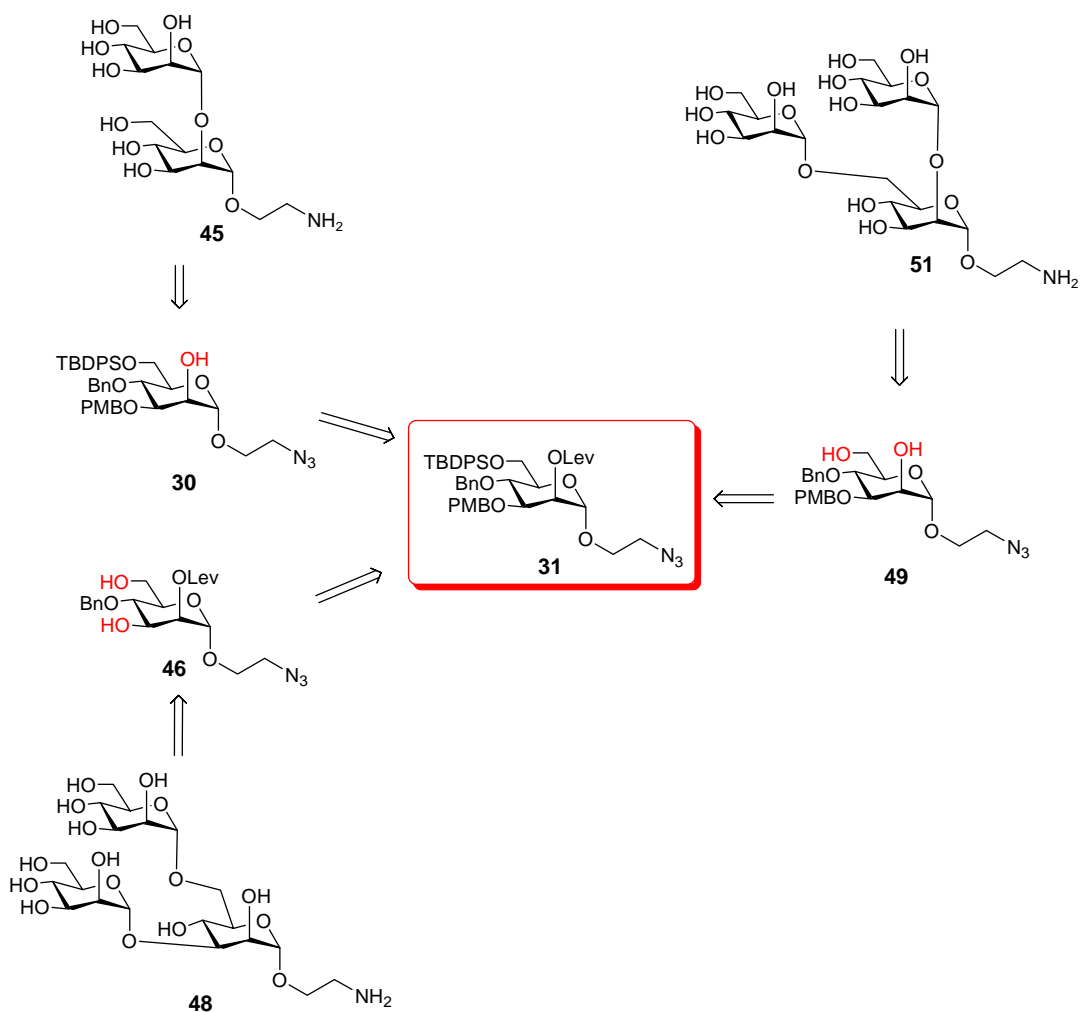
Para acceder a estos tres compuestos, se diseñó una ruta sintética que presentaba un intermedio común, el derivado de manosa **31** protegido ortogonalmente. (Esquema 13) Este derivado de manosa **31** se obtuvo en 7 etapas de síntesis a partir del derivado 2-azidoetil α -D-manopiranosido (**4**), (Esquema 12) cuya preparación ha sido descrita previamente en el capítulo 3.



Esquema 12. Esquema retrosintético para la manosa ortogonalmente protegida **31**.

5.1.2.1 Síntesis del 2-azidoetil α -D-manopiranosido ortogonalmente protegido **31**.

En el diseño de la síntesis de la manosa **31** se optó por una protección permanente del grupo hidroxilo de la posición 4 con un grupo bencilo (-OBn), puesto que no se iban a preparar oligosacáridos que presentaran una ramificación en dicha posición. En el espaciador presente en la posición anomérica de dicha manosa, el grupo amina terminal necesario para la formación de los sistemas multivalentes con carbohidratos se llevó protegido como grupo azida. Estos grupos (-OBn y azida) se reducirían al final de la ruta sintética por hidrogenolisis. Las posiciones 2, 3 y 6 que corresponden a los puntos de ramificación presentes en las estructuras de *high mannose*, se protegieron con los grupos éster levulínico (Lev), 4-metoxibencilo (PMB) y *t*-butildifenilsililo (TBDPS), respectivamente. Esta selección de grupos protectores ortogonales permitiría la desprotección selectiva de cada uno de ellos en función de los requerimientos para preparar los diferentes oligosacáridos seleccionados, como se puede observar en el esquema 13.

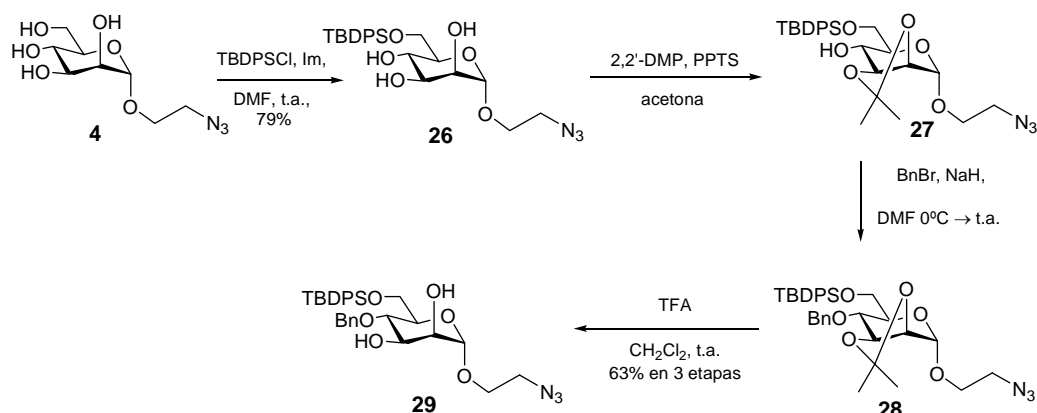


Esquema 13. Análisis retrosintético de la síntesis del disacárido **45** y los trisacáridos **48** y **51**, a partir del intermedio común ortogonalmente protegido **31**.

A partir del derivado de manosa **4**, el grupo hidroxilo primario de la posición 6 se protegió con un grupo sililo por reacción con cloruro de *t*-butildifenilsililo (TBDPSCl) usando imidazol como base en DMF durante 4 horas y a temperatura ambiente, siguiendo las condiciones descritas en la bibliografía,⁸⁸ obteniéndose el derivado **26** con un rendimiento del 79%. (Esquema 14) El análisis del producto **26** por ¹H-RMN en CDCl₃ mostró las

⁸⁸ Baeschlin, D. K.; Chaperon, A. R.; Green, L. G.; Hanh, M. G.; Ince, S. J.; Ley, S. V.; *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 172-186.

señales típicas de los protones aromáticos a 7.72-7.68 ppm (m, 4H) y 7.48-7.38 ppm (m, 6H) correspondientes a los grupos fenilo y un singlete a 1.01 ppm de los metilos del grupo *tert*-butilo.



Esquema 14. Ruta sintética para la obtención del derivado protegido **29**.

La siguiente etapa de la síntesis consistió en la protección del grupo hidroxilo de la posición 4 del derivado de manosa **26** como éter bencílico. Para realizar esta protección se llevó a cabo inicialmente una protección temporal de los hidroxilos presentes en las posiciones 2 y 3 del derivado de manosa **26** mediante la formación de un acetónido con 2,2'-dimetoxipropano (2,2'-DMP) y *p*-toluensulfonato de piridinio (PPTS) en acetona. Tras la desaparición del producto de partida observada por c.c.f., la reacción se elaboró por tratamiento con Et₃N y eliminación del disolvente a vacío, obteniéndose el compuesto **27**. Este compuesto se utilizó en la siguiente etapa sin realizar ningún tipo purificación. La bencilación del hidroxilo de la posición 4 del derivado **27** se realizó por tratamiento con bromuro de bencilo (BnBr) y NaH en DMF, durante 12 horas a temperatura ambiente. La reacción se siguió por c.c.f., observándose la desaparición total de la señal correspondiente al producto de partida y la aparición de una nueva señal a un R_f mayor correspondiente al compuesto **28**, según se pudo determinar por ESI-MS del crudo de reacción. En esta etapa tampoco se realizó purificación del producto final de la reacción. Por último, la desprotección del acetónido del derivado de manosa **28** se llevó a cabo usando ácido trifluoroacético (TFA) en CH₂Cl₂ durante 5 horas a temperatura ambiente.

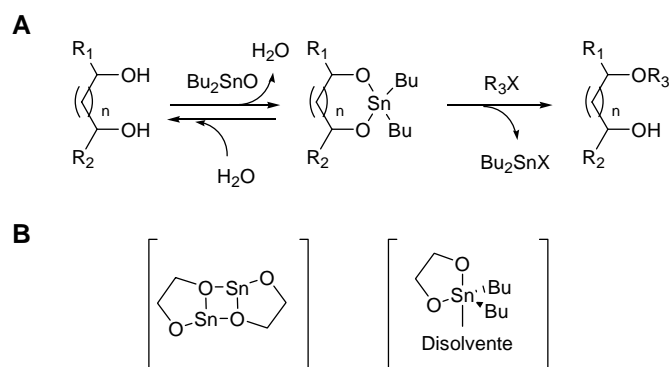
La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice, nos proporcionó el derivado **29** con un rendimiento global del 63% para las tres etapas de síntesis. (Esquema 14) El análisis del producto **29** por $^1\text{H-RMN}$ en CDCl_3 nos muestra una región aromática más compleja que la que presentaba el derivado de manosa **26** y un sistema AB correspondiente al metileno del grupo bencilo centrado a 4.69 ppm. También se observó el desplazamiento a campo alto de la señal correspondiente al H_4 del compuesto **29**, como un multiplete a 3.81-3.65 ppm, en comparación con la señal correspondiente al mismo protón en el compuesto **26**.

El siguiente paso de la síntesis fue la protección del grupo hidroxilo de la posición 3 del derivado de manosa **29**. Dada la reactividad parecida que presentan los dos grupos hidroxilo secundarios de las posiciones 2 y 3, fue necesario establecer una estrategia que permitiera la protección regioselectiva de la posición 3 evitando la mezcla de productos protegidos en 2 y 3 de difícil purificación y que disminuiría el rendimiento global de la síntesis. Por esa razón se decidió utilizar la estrategia de formación de un acetal de estaño que permitiría diferenciar estos dos grupos hidroxilo.⁸⁹

La formación de un acetal de estaño cíclico sobre un diol, generalmente, aumenta la nucleofilia de uno de los grupos hidroxilos. (Esquema 15A) La regioselectividad encontrada en este tipo de reacciones todavía no ha llegado a entenderse totalmente, aunque se ha propuesto que el acetal de estaño existe como un dímero en el que cada átomo de estaño está en el centro de una bipirámide trigonal, en la cual los grupos butilo ocupan las posiciones ecuatoriales. (Esquema 15B) El hidroxilo más electronegativo se coordina con dos átomos de estaño. Por lo tanto, la regioselectividad es consecuencia de un efecto cascada que comienza con la selección de un par particular de grupos hidroxilo para la formación del acetal, seguida de la orientación del oxígeno más electronegativo en la posición apical, que es intrínsecamente la más reactiva. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la reactividad observada no solo depende

⁸⁹ (a) Hanessian, S. (ed) *Preparative Carbohydrate Chemistry*, Taylor and Francis CRC Press, New York, **1997**, pp. 69-73. (b) Grindley, T. B.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1998**,

de la estructura del sustrato, sino que también se ve afectada por las condiciones de la reacción. Como norma general, los acetales de estaño derivados de una mezcla de un diol que presenta un alcohol primario o secundario, se alquilan selectivamente en la posición primaria. Un acetal derivado de un *cis*-1,2-ciclohexano es alquilado selectivamente en la posición ecuatorial, pero la regioselectividad no es buena en el caso de que los dos grupos hidroxilo estén en posición ecuatorial. En nuestro caso, la manosa **29**, presenta el grupo hidroxilo de la posición 2 axial, mientras el grupo hidroxilo de la posición 3 se encuentra en ecuatorial, por lo que esta metodología nos podría proporcionar la regioselectividad deseada.⁸⁹

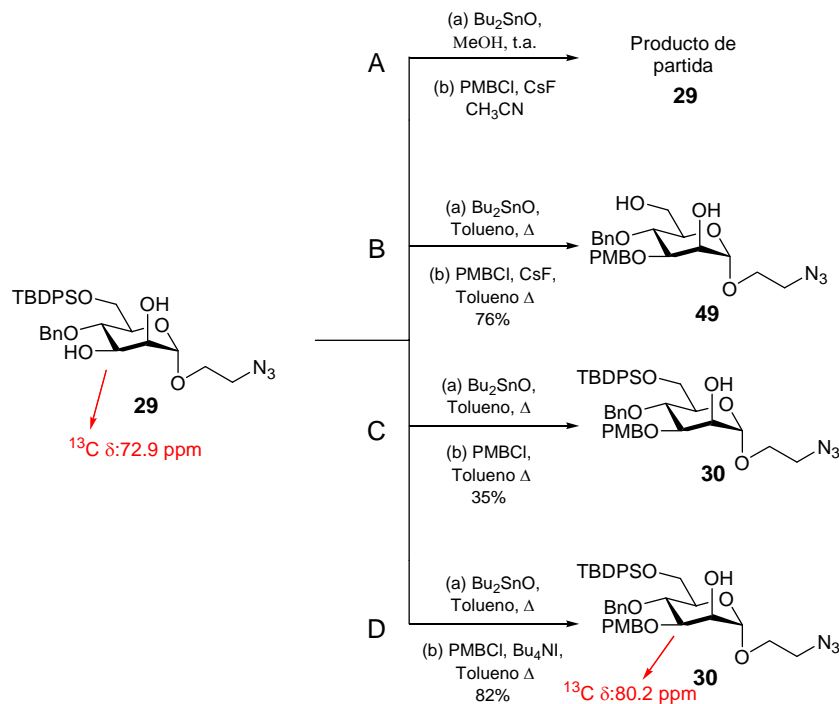


Esquema 15. (A) Mecanismo de reacción de alquilación usando un acetal de estaño. (B) Intermedios de reacción propuestos.

Para llevar a cabo la formación del acetal de estaño en el derivado de manosa **29** se usó inicialmente Bu_2SnO en MeOH , a reflujo. Este acetal es muy inestable, se hidroliza fácilmente y no se puede seguir su formación por cromatografía en capa fina. La formación del acetal se confirmó cuando se observó la desaparición de un precipitado blanco que apareció al añadir el Bu_2SnO a la disolución metanólica donde se encontraba el carbohidrato. Después, se eliminó el disolvente para realizar una segunda etapa de bencilación usando cloruro de *p*-metoxibencilo (PMBCl) y CsF en acetonitrilo como

53, 17–142. (c) Cherif, S.; Clavel, J.-M.; Monneret, C. J.; *Carbohydr. Chem.*, **1998**, *17*, 1203-1218.

disolvente. En estas condiciones no se observó la evolución de la reacción hasta el producto final, solo se obtuvo el producto de partida. (Esquema 16A)



Esquema 16. Condiciones ensayadas para la bencilación regioselectiva del grupo hidroxilo de la posición 3 del derivado de manosa **29**.

En la segunda aproximación que se ensayó, se usó Bu_2SnO en tolueno a reflujo empleando un Dean-Stark para desplazar el equilibrio de la reacción al eliminar el agua que se genera durante la formación del acetal de estaño mediante la formación del azeótropo con el tolueno. Después, se añadió PMBCl y CsF. El producto final que se obtuvo no correspondía con el producto deseado, se había producido la bencilación de la posición 3, pero también se observó la eliminación del grupo TBDPS, debido probablemente a los aniones F^- provenientes de la sal de cesio. (Esquema 16B) Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió realizar la reacción en las mismas condiciones pero sin usar CsF. En este caso, se obtuvo el producto final **30**, pero con un rendimiento del 35%. (Esquema 16C) El compuesto se caracterizó por resonancia magnética nuclear, pudiéndose comprobar que se había formado un único

regioisómero. En el espectro de ^1H -RMN del compuesto **30** se observó, en comparación con el derivado de manosa **29**, el desplazamiento a campo bajo de la señal que corresponde al protón H_2 , mientras que la señal que corresponde al H_3 se desplazaba a campo alto. También se observó la aparición de un singlete correspondiente a los dos protones metilénicos del grupo *p*-metoxibencilo a 4.63 ppm y otro singlete correspondiente a los tres protones del grupo metoxilo del (-OPMB). Pero más significativo fue el espectro de ^{13}C -RMN donde se observó un desplazamiento de la señal correspondiente al C_3 desde 72.9 a 80.2 ppm, mientras que la señal del C_2 pasa de 72.0 a 68.7 ppm.

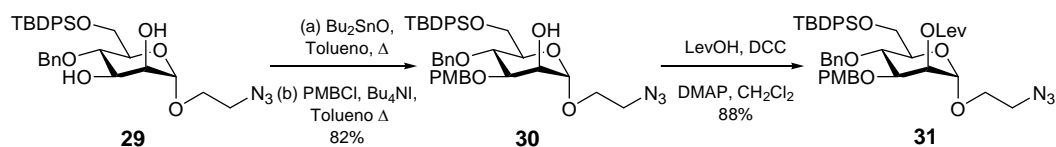
En la bibliografía se ha descrito que las sales de tetrabutilamonio aumentan el rendimiento de la reacción de alquilación regioselectiva cuando se usa el acetal de estaño. Teniendo en cuenta este hecho y evitando el uso de iones F^- se decidió utilizar otra sal de amonio como era el Bu_4NI .⁹⁰ Finalmente, la reacción de **29** con Bu_2SnO seguido de la adición de PMBCl y Bu_4NI en tolueno a reflujo proporcionó el derivado **30** protegido exclusivamente en la posición 3 con un grupo *p*-metoxibencilo con un rendimiento del 82%, como un único regioisómero. (Esquema 16D)

La protección del grupo hidroxilo axial de la posición 2 de la manosa **30** constituye la etapa final de la síntesis del derivado de manosa ortogonalmente protegido **31**. Para esta posición se seleccionó como grupo protector el éster levulínico. (Esquema 17) El grupo levulino no es un grupo protector muy común en química de carbohidratos, pero la desprotección selectiva de este grupo en presencia de multitud de otros grupos protectores usando acetato de hidrazina, lo hace muy atractivo para muchas estrategias sintéticas. La reacción del derivado **30** con ácido levulínico en presencia de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y DMAP como base, usando unas condiciones de reacción anteriormente descritas en nuestro grupo de investigación⁹¹ nos proporcionó el derivado de manosa

⁹⁰ David, S.; Thieffry, A.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1981**, 1796-1801.

⁹¹ Reichardt, N.-C.; Martín-Lomas, M.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 4674-4677.

totalmente protegido **31**, con un rendimiento del 88%, después de una etapa de purificación mediante cromatografía en columna en gel de sílice. (Esquema 17)



Esquema 17. Ruta sintética para la obtención del derivado de manosa ortogonalmente protegido **31** a partir del derivado **29**.

El compuesto **31** se caracterizó haciendo uso de experimentos de RMN mono- y bidimensionales. Los datos más significativos son el desapantallamiento del H₂ desde 4.06 a 5.34 ppm y la presencia de nuevas señales correspondientes a los grupos metilénicos a 2.83-2.61 ppm (m, 4H) y el grupo metilo a 2.15 ppm y el grupo levulino. (Figura 53)

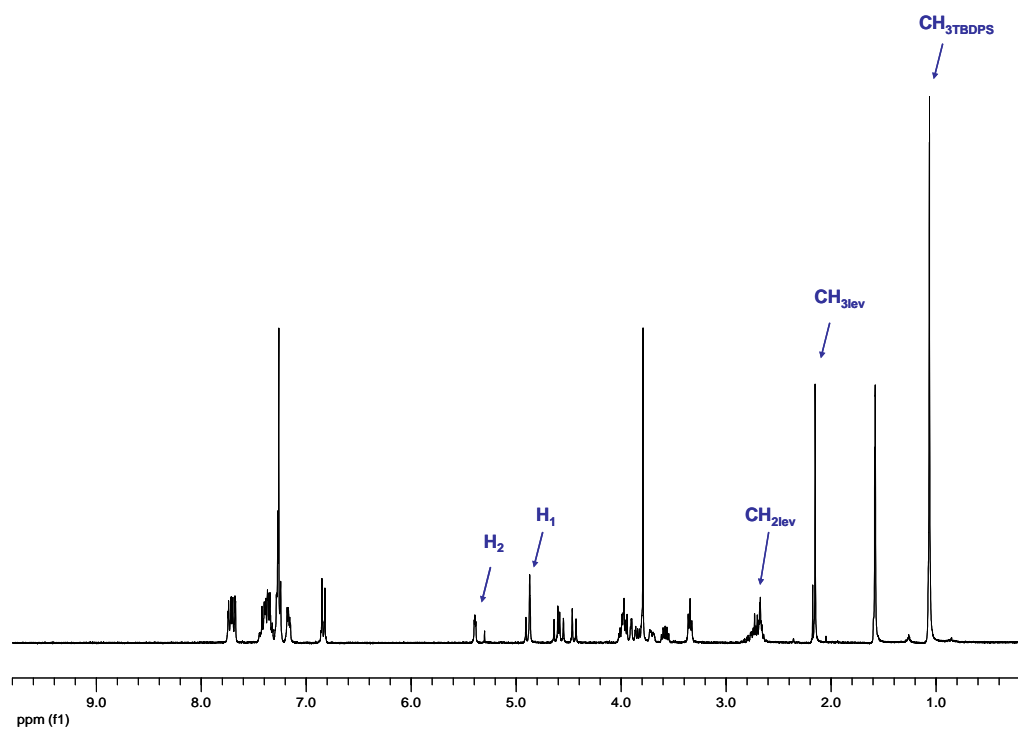
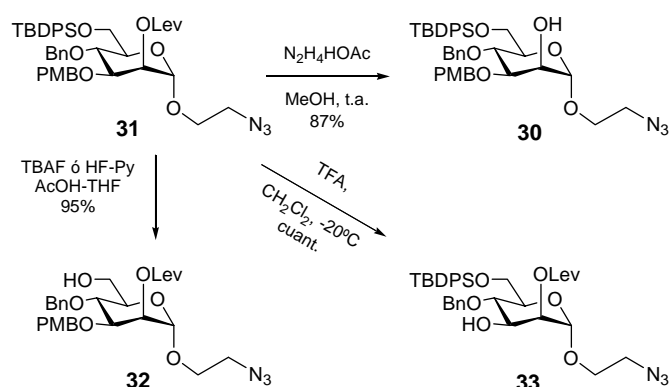


Figura 53. Espectro de ¹H-RMN del derivado de manosa ortogonalmente protegido **31** en CDCl₃.

5.1.2.2 Desprotecciones selectivas del derivado de manosa **31**.

Una vez sintetizado el derivado de manosa **31** con la selección de grupos protectores ortogonales, se realizaron las desprotecciones selectivas para demostrar el comportamiento ortogonal de dichos grupos protectores. Estas etapas de desprotección selectiva son críticas para la potencial aplicación de este derivado de manosa **31** en la síntesis de los distintos oligosacáridos de manosa seleccionados como objetivo. Las condiciones elegidas para conseguir la desprotección completa y selectiva de cada grupo protector se muestran en el esquema 18.



Esquema 18. Desprotecciones selectivas sobre el derivado de manosa ortogonalmente protegido **31**.

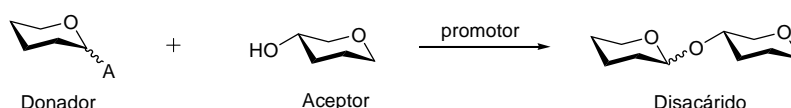
El grupo sililo de la posición 6 del compuesto **31** se eliminó de forma limpia y eficiente usando TBAF en THF añadiendo AcOH a la disolución a temperatura ambiente o con el complejo HF-Py en THF como disolvente y añadiendo también AcOH a la disolución, obteniéndose el derivado **32** con un rendimiento del 95%, en los dos casos. El derivado de manosa resultante **32** se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice. En el espectro de ¹H-RMN se observó la desaparición de la señal correspondiente al grupo *tert*-butilo del TBDPS a 1.05 ppm y también se observó la simplificación de las señales que aparecen en la región aromática del espectro, debido a la pérdida de los dos grupos fenilos que forman parte del grupo protector eliminado. El derivado de manosa **33**, con el grupo hidroxilo libre de la posición 3, se obtuvo de forma cuantitativa por el tratamiento del derivado **31** con TFA en CH₂Cl₂ a -20°C.

(Esquema 18) La pérdida del grupo *p*-metoxibencilo se confirmó por ^1H -RMN al observarse la desaparición del sistema AB a 4.53 ppm correspondiente a los metilenos del grupo *p*-metoxibencilo y el singlete a 3.83 ppm correspondiente al grupo metoxilo. Además, se observó que el protón H_3 se desplazaba a campo bajo desde 3.90 a 4.18 ppm y en ^{13}C -RMN se observó un desplazamiento del C_3 desde 78.1 a 70.8 ppm.

El derivado de manosa **30** desprotegido en la posición 2 se obtuvo directamente como el último intermedio en la ruta sintética utilizada para la síntesis del derivado de manosa ortogonalmente protegido **31**. (Esquema 17) De todas formas, y para demostrar la ortogonalidad de los grupos protectores se realizó la desprotección selectiva del grupo levulino a partir del derivado **31**. La utilización de acetato de hidrazina a temperatura ambiente usando como disolvente metanol, permitió la eliminación del grupo levulino, obteniéndose el derivado de manosa **30** con un 87% de rendimiento. (Esquema 18)

5.1.2.3 Síntesis del disacárido **45** y los trisacáridos de manosa **48** y **51**.

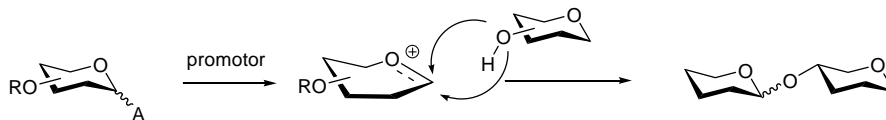
La preparación simple, eficiente y selectiva de oligosacáridos es el problema principal de la química de carbohidratos y la reacción de glicosidación es la etapa clave en la síntesis de dichos oligosacáridos. Esta reacción consiste en la unión de 2 o más unidades de azúcar a través de la posición anomérica de uno de ellos y cualquiera de los grupos hidroxilo del otro azúcar. Es decir, el acoplamiento de un donador de glicosilo, que es la unidad que aporta el carbohidrato en el acoplamiento, con un aceptor de glicosilo, que es el fragmento que acepta el carbohidrato en la reacción. (Esquema 19)



Esquema 19. Esquema general de la reacción de glicosidación.

El aceptor puede ser propiamente un carbohidrato u otro tipo de sustancias como alcoholes de tipo alifático, etilenglicol, alcoholes aromáticos,

etc. En presencia de un promotor, cuya función es actuar sobre el grupo saliente del donador, activando el carbono anomérico del mismo, se forma el intermedio oxónio, que puede ser atacado por el nucleófilo presente en el aceptor. (Esquema 20)



Esquema 20. Mecanismo de la reacción de glicosidación.

En los últimos años se ha producido un importante avance en los métodos de glicosidación, utilizándose distintos grupos activantes en la molécula de donador, y distintos promotores.⁹² Los tres métodos más utilizados han sido el desarrollado por Koenigs-Knorr (uso de cloruros y bromuros),⁹³ los tioglicósidos⁹⁴ y el método del tricloroacetimidato.⁹⁵ (Figura 54)

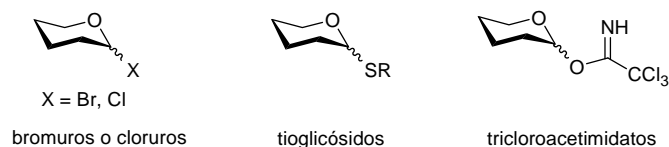


Figura 54. Principales donadores de glicosilo.

Otro factor fundamental para obtener el producto deseado con una estructura definida es el control de la estereoquímica de la reacción de glicosidación. Este aspecto requiere un estudio del conjunto de factores que directa o indirectamente están relacionados con la reacción de acoplamiento y que influyen, y a veces condicionan, la reacción de glicosidación.⁹⁶

⁹² (a) Nicolau, K. C.; Mitchell, H. J.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 1576-1624. (b) Boons, G. J.; *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 1095- (c) Toshima, K.; Tatsuta, K.; *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 1503-1531.

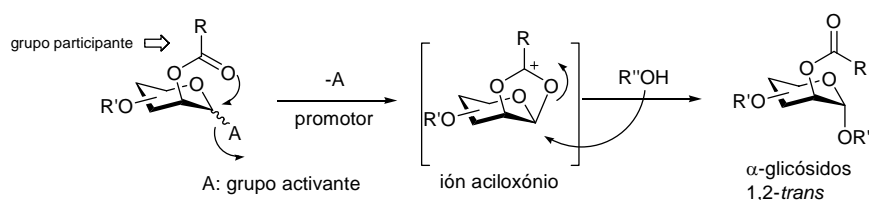
⁹³ Koenigs, W.; Knorr, E.; *Chem. Ber.*, **1901**, *34*, 957-982.

⁹⁴ Ferrier, R. J.; Hay, R. W.; Vethaviasar, N.; *Carbohydr. Res.*, **1973**, *27*, 55-61.

⁹⁵ Schmidt, R. R.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1994**, *50*, 21-123.

⁹⁶ Demchenko, A. V.; *Synlett*, **2003**, *9*, 1225-1240.

El resultado estereoquímico depende fundamentalmente del efecto anomérico que favorece la formación de los glicósidos α .⁹⁷ Sin embargo, existen otros factores que afectan la orientación del nuevo enlace formado entre los que se encuentra el grupo presente en C-2 del donador. Este efecto fue puesto de manifiesto por primera vez por Isbell y Winstein,⁹⁸ que observaron que ciertos grupos protectores en la posición 2 del carbohidrato participan en la estabilización del intermedio oxónio, este efecto es conocido como participación de grupo vecino. Cuando el grupo protector situado en la posición 2 del donador es de tipo éster (acetilo, benzoílo o pivaloílo, etc) actúa como función participante y dirige la reacción hacia la formación de los 1,2-*trans* glicósidos. (Figura 21) El catión aciloxonio formado es el resultado de la salida del grupo activante A, asistida por el promotor, seguida de la estabilización intramolecular del carbocatión por el grupo presente en la posición C-2.



Esquema 21. Participación del grupo vecino en el intermedio de la reacción de glicosidación.

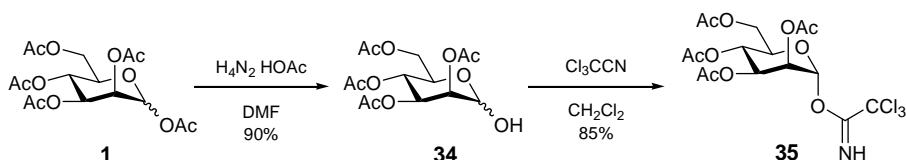
Además, hay otros muchos factores que afectan a la regioselectividad de la reacción de glicosidación como son las condiciones de reacción, disolvente, efectos estéricos y geométricos, etc.⁹⁶

En esta Tesis Doctoral, como primera estrategia en la síntesis del disacárido **45** y los trisacáridos **48** y **51** se utilizó como donador de glicosilo la manosa peracetilada **35**, que tiene el grupo tricloroacetimidato como grupo activante en la posición anomérica. (Esquema 22) La síntesis del derivado de manosa **35** se realizó a partir de la manosa peracetilada **1** en dos etapas, según se

⁹⁷ Lemieux, R. U.; *Pure Appl. Chem.*, **1971**, 25, 527-548.

⁹⁸ (a) Isbell, H. S.; *Ann. Rev. Biochem.*, **1940**, 9, 65-92. (b) Winstein, S.; Buckles, R. E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1942**, 64, 2780-2787.

describe en la bibliografía.⁹⁹ La primera etapa fue la desacetilación selectiva en la posición anomérica (C₁), usando acetato de hidrazina en DMF a 50°C durante 2 horas. Tras la purificación cromatográfica, el compuesto **34** se trató con tricloroacetnitrilo, usando DBU en CH₂Cl₂ como base según el procedimiento descrito por Schmidt,⁹⁵ obteniéndose el tricloroacetimidato **35** con un excelente rendimiento. (Esquema 22) En el espectro de ¹H-RMN se observa entre otras señales la aparición de un singlete a 8.50 ppm correspondiente al grupo NH del tricloroacetimidato.

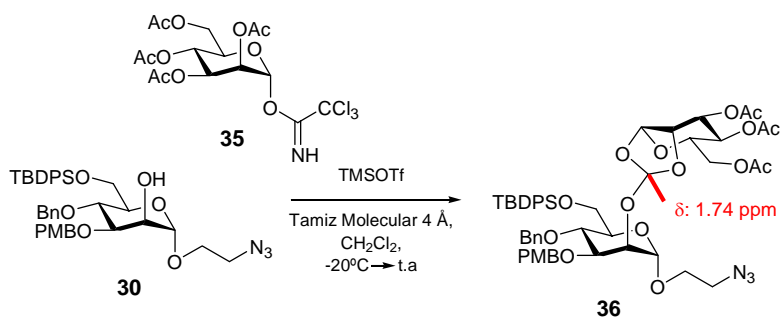


Esquema 22. Síntesis del tricloroacetimidato donador **35**.

La elección del tricloroacetimidato como donador de glicosilo se basó en que las condiciones de glicosidación son suaves y la reacción se procesa fácilmente. La estereoquímica de la reacción viene determinada por la presencia de un grupo acilo participante sobre la posición 2 del donador de glicosilo. Para la obtención del glicosilo α fue necesaria la presencia de este grupo acilo participante.

El primer compuesto que se seleccionó para ser sintetizado fue el disacárido de manosa **45**. En la reacción de glicosidación se utilizó como donador de glicosilo el tricloroacetimidato de manosa peracetilada **35**, como aceptor el derivado de manosa **30** y como promotor el trifluorometano sulfonato de trimetilsililo (TMSOTf), como se muestra en el esquema 23. El resultado de la reacción no fue el deseado, obteniéndose un compuesto que parecía corresponder con la formación de un ortoéster.

⁹⁹ Excoffier, G.; Gagnaire, D.; Utile, J-P.; *Carbohydr. Res.*, **1975**, 39, 368-373.

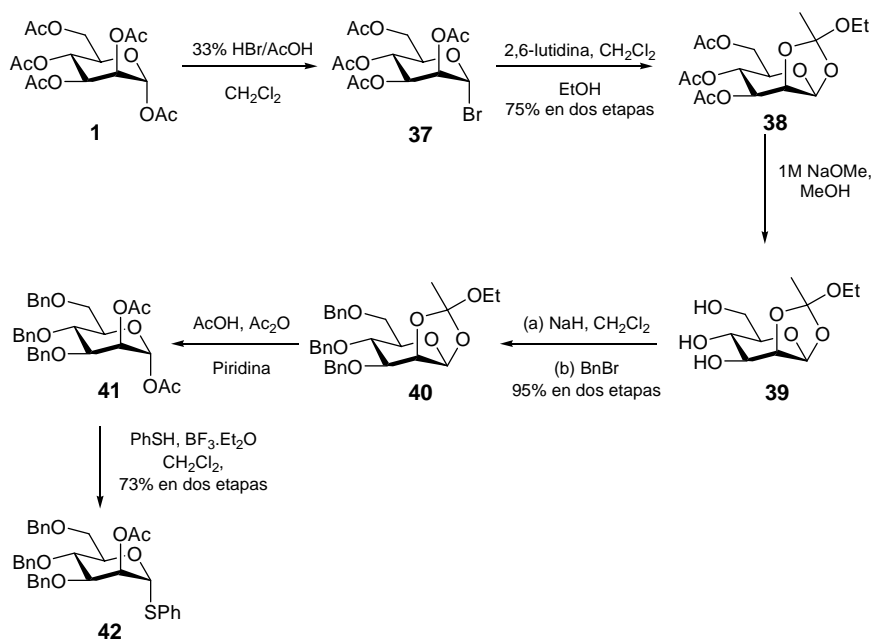


Esquema 23. Reacción de glicosidación con el derivado de manosa **30**, usando como donador la manosa tricloroacetimidato **35**.

La caracterización estructural de este compuesto **36** se realizó en base a su espectro de ¹H-RMN, donde se observaba un singlete a 1.74 ppm correspondiente a una señal característica del grupo metilo del ortoéster.

Con el fin de evitar la formación del ortoéster, se realizaron modificaciones en las condiciones de reacción, variando la temperatura (-20°C, 0°C y temperatura ambiente) y también se usaron diferentes proporciones del promotor TMSOTf (5, 10, 20 y 30%). En ningún caso se obtuvo el disacárido deseado, solo se pudo obtener el ortoéster con rendimientos diferentes para cada una de las condiciones de reacción ensayadas.

Debido a los resultados obtenidos en la reacción de glicosidación anterior, se decidió cambiar el donador de glicosilo. El aceptor utilizado en la reacción de glicosidación estaba activado con hasta dos grupos bencilo, por lo que sería conveniente utilizar un donador de glicosilo que presentase una reactividad parecida. Por ello se decidió utilizar el donador **42** empleando la química de tioglicósidos. (Esquema 24)



Esquema 24. Síntesis del tioglicósido donador **42**.

El donador de glicosilo **42** se preparó en 6 etapas de síntesis a partir de la manosa peracetilada **1**, según el procedimiento descrito en la bibliografía.¹⁰⁰ (Esquema 24) En una primera etapa se realizó la bromación de la posición anomérica con HBr al 33% en AcOH durante 30 min usando como disolvente CH₂Cl₂. Se aisló el derivado **37** y, sin realizar una etapa de purificación, se llevó a cabo la formación del ortoéster **38**, utilizando 2,6-lutidina como base en CH₂Cl₂, añadiendo posteriormente el etanol y manteniendo la agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. El ortoéster **38** se purificó por cristalización usando una mezcla Etanol-H₂O con un rendimiento del 75% en las dos etapas.

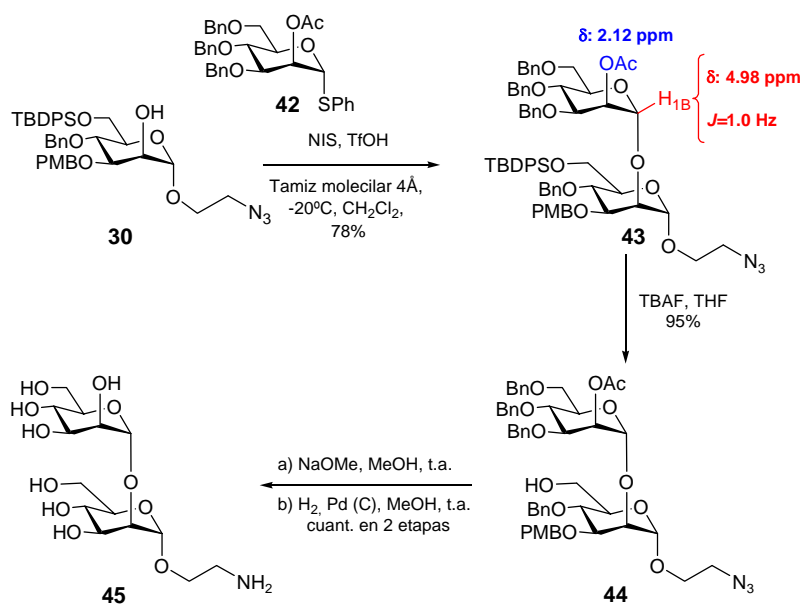
A continuación se llevó a cabo la desprotección de los acetatos del derivado **38** utilizando las condiciones de Zempler,⁶⁷ NaOMe 1M en MeOH, la

¹⁰⁰ (a) Lilley, K.; Zhang, C. L.; Villar-Palasi, C.; Lamer, J.; Huang, L.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1992**, *296*, 170-174. (b) Martín-Lomas, M.; Khiar, N.; García, S.; Koessler, J. L.; Nieto, P. M.; Rademacher, T. W.; *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 3608–3621.

⁶⁷ Zemplen, G.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1927**, *60*, 1555-1564.

reacción se siguió por c.c.f.. A los 30 minutos, la reacción finalizó y la mezcla de reacción se neutralizó con resina Amberlite IRA-120 y se filtró. El derivado ortoéster **39** con los grupos hidroxilos libres se utilizó sin realizar ninguna etapa de purificación. La bencilación de los grupos hidroxilos de las posiciones 3, 4, y 6 del derivado **39** se llevó a cabo usando BnBr y utilizando como base NaH en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente, obteniéndose el derivado **40** con un rendimiento del 95% en las dos etapas, después de realizar una etapa de purificación por cromatografía en columna de gel de sílice. La siguiente etapa consistió en la apertura del grupo ortoéster del derivado de manosa **40**, que se realizó utilizando AcOH en H₂O y a continuación, una mezcla de Ac₂O y piridina a temperatura ambiente, obteniéndose el producto **41** sin necesidad de ninguna etapa de purificación. Por último, se introdujo el grupo tiofenilo en la posición anomérica por reacción de glicosidación directa sobre el derivado de manosa **41**, usando como promotor BF₃.Et₂O. La reacción finalizó en 5 horas, obteniéndose el derivado **42** con un rendimiento del 73%. (Esquema 24)

Una vez preparado el tioglicósido **42**, se realizó la reacción de glicosidación usando 1.2 eq. del tioglicósido derivado **42** como donador, 1 eq. del derivado de manosa **30** como aceptor, *N*-Iodosuccinimida (NIS) y TfOH en CH₂Cl₂ a -20°C. En estas condiciones se obtuvo el disacárido **43** con un rendimiento del 78%. (Esquema 25) La estereoquímica α del nuevo enlace glicosídico se confirmó por el espectro de ¹H-RMN. La señal correspondiente al H₁ de la unidad B (extremo no reductor) aparece a 4.98 ppm como doblete con una constante de acoplamiento $J=1.0$ Hz indicando una disposición *trans*-diecuatorial entre los protones H₁ y H₂ de la unidad B. También se observó la aparición de un singlete a 2.12 ppm correspondiente al grupo acetilo de la posición 2 de la unidad B.



Esquema 25. Síntesis del disacárido *Man* α 1,2*Man* **45**.

La siguiente etapa fue la eliminación del grupo TBDPS de la posición 6 de la unidad A (extremo reductor) del compuesto **43**. (Esquema 25) Para ello, a la disolución del disacárido derivado **43** en THF, se añadió TBAF a temperatura ambiente y se dejó reaccionar durante 5 horas, obteniéndose el disacárido **44** sin grupo sililo en la posición 6 de la unidad A con un rendimiento del 95%. En el espectro de ^1H -RMN se observó la desaparición del singlete a 1.00 ppm y la simplificación de las señales correspondientes a los protones aromáticos que confirmaban la desaparición del grupo sililo protector.

Por último, la desprotección del grupo acetilo, de los grupos bencilo y la reducción del grupo azida para obtener el disacárido *Man* α 1,2*Man* **45**, se realizó en dos etapas sin purificación. En una primera etapa de desprotección se eliminó el grupo acetilo de la posición 2 de la unidad B usando una disolución 1M de NaOMe en MeOH. El tratamiento de la disolución con resina ácida Amberlite IRA-120, permitió neutralizar la disolución y no generar sales en el medio, evitando realizar una purificación en esta etapa de reacción. Por último, la hidrogenación del producto de la reacción anterior usando Pd soportado sobre carbón activo, eliminó los grupos bencilos y redujo el grupo azida, obteniéndose

el disacárido **45** con un rendimiento cuantitativo para las dos etapas de síntesis. (Esquema 25) En el espectro de ^1H -RMN de este compuesto se pudo observar la desaparición de todas las señales correspondientes a protones aromáticos pertenecientes a los grupos bencilo. También se observó la desaparición del singlete a 2.12 ppm correspondiente al grupo aceto eliminado. En cuanto al espectro de ^{13}C -RMN se observó la desaparición de todas las señales de la zona aromática, y de la señal a 50.4 ppm correspondiente al carbono unido al grupo azida, apareciendo una nueva señal a 38.7 ppm que correspondía al carbono unido al grupo amina. La estructura de este compuesto fue confirmada por espectroscopía 2D (COSY, TOCSY y HMQC) y espectrometría de masas.

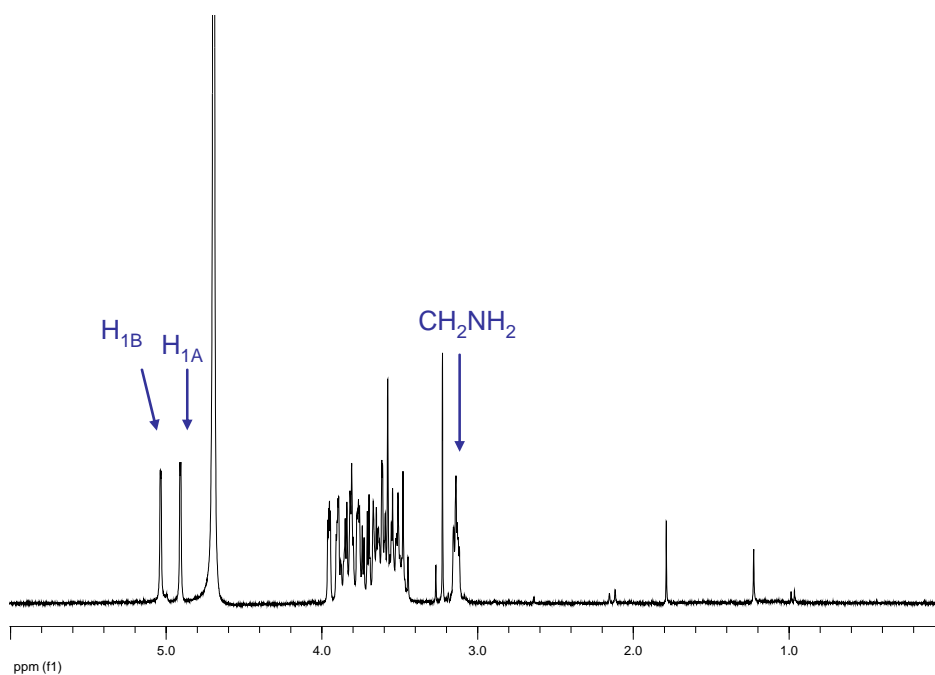
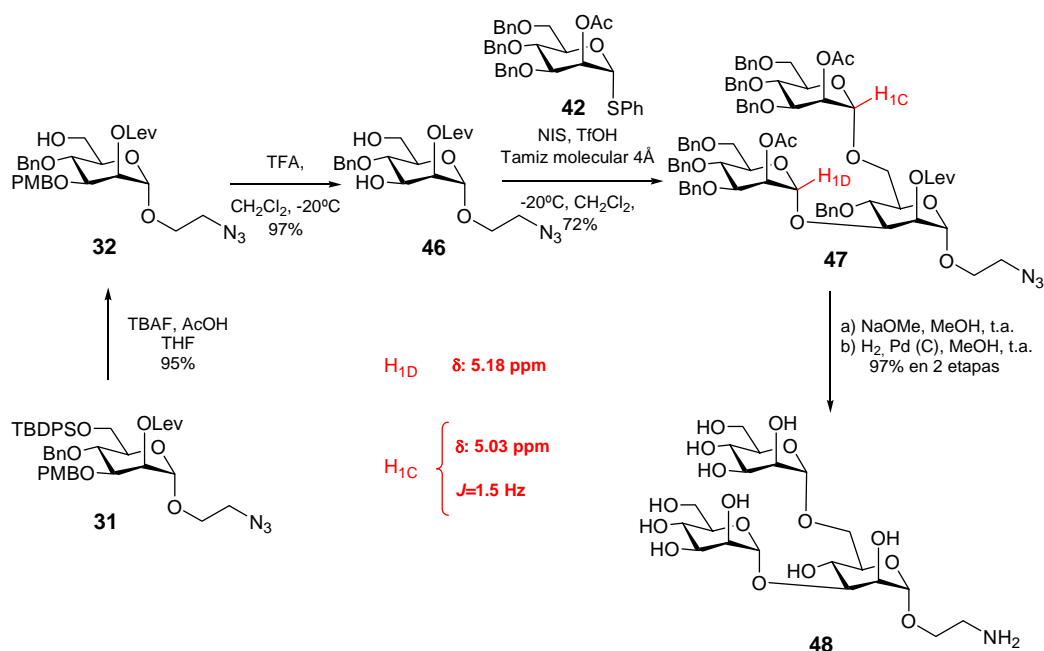


Figura 55. Espectro de ^1H -RMN del disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ **45** en D_2O .

Una vez completada la síntesis del disacárido **45**, se abordó la preparación de los trisacáridos **48** y **51**. Una síntesis tradicional de cualquiera de los dos trisacáridos seleccionados implicaría dos etapas de glicosidación para cada uno de los compuestos. Por ello, se pensó en simplificar la síntesis de estos dos trisacáridos preparando dos aceptores, los compuestos **46** y **49** que presentan

libres los dos grupos hidroxilos sobre los que se pretende realizar las glicosidaciones. Como se muestra en el esquema 13, sobre estos grupos hidroxilo se realizaría una doble glicosidación que nos evitaría una etapa de síntesis y una purificación adicionales. Además, las desprotecciones selectivas para obtener los grupos hidroxilos libres que deben ser glicosilados, se realizarían sobre compuestos con un valor sintético menor. Los resultados de esta estrategia fueron excelentes y se comentan a continuación.

La síntesis del trisacárido de manosa **48** se realizó a partir del derivado **46** con los grupos hidroxilos libres en las posiciones 3 y 6 como unidad central, según se muestra en el esquema 26. Este derivado de manosa **46** se preparó a partir del derivado ortogonalmente protegido **31** en dos etapas sintéticas. La primera etapa consistió en la eliminación del grupo sililo de la posición 6, que ya ha sido descrita anteriormente en este capítulo. Después, el tratamiento de este derivado **32** con TFA a -20° C en diclorometano para eliminar selectivamente el grupo PMB de la posición 3 dio lugar, con un rendimiento del 97%, al aceptor **46**. (Esquema 26) En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ cabe destacar un sistema AB correspondiente al metileno del grupo bencilo centrado a 4.76 ppm, los dos multipletes centrados a 2.80 y 2.63 ppm correspondientes a los grupos metilenos y un singlete a 2.19 ppm correspondiente al metilo del grupo levulino, indicativo de que estos grupos protectores (Bn, Lev) permanecían en la molécula.



Esquema 26. Síntesis del trisacárido *Man* α 1,3[*Man* α 1,6]*Man* **48**.

La doble glicosidación se realizó usando 2.4 eq. (1.2 eq. de donador por grupo OH del aceptor) del tioglicósido derivado **42** como donador, 1 eq. del derivado de manosa **46** como aceptor, NIS y TfOH en CH₂Cl₂ a -20°C. En estas condiciones se obtuvo el trisacárido **47** con un rendimiento del 72%, rendimiento muy bueno si se tiene en cuenta que se ha llevado a cabo una doble glicosidación con un control completo de la estereoquímica de los dos enlaces glicosídicos nuevos que se han formado. (Esquema 26) La estereoquímica α del trisacárido se confirmó por el espectro de ¹H-RMN, observando los desplazamientos químicos de los protones H_{1C} y H_{1D} de las manos que correspondían a una estereoquímica del enlace glicosídico α . Por último, la desprotección de los grupos acilo, de los grupos bencilo y la reducción del grupo azida para obtener el trisacárido libre **48**, se realizó en dos etapas sin purificación. En una primera etapa de desprotección se eliminó los grupos acetilo de la posición 2 de las unidades C y D, y el grupo levulino de la manosa central A usando una disolución 1M de NaOMe en MeOH. El tratamiento posterior de la disolución

con resina ácida Amberlite IRA-120, permitió neutralizar la disolución, y realizar la siguiente reacción de desprotección sin necesidad de una etapa de purificación. Por último, la hidrogenación del producto de la reacción anterior usando Pd soportado sobre carbón activo a presión atmosférica de H₂ dio lugar a la eliminación de los grupos bencilo y a la reducción del grupo azida, obteniéndose el trisacárido **48** con un rendimiento del 97% para las dos etapas de síntesis. (Esquema 26) En el espectro de ¹H-RMN de este compuesto **48** (figura 56) se pudo observar la desaparición de todas las señales correspondientes a protones aromáticos pertenecientes a los grupos bencilos. También se observó la desaparición de los singletes a 2.20, 2.15 y 2.20 ppm correspondiente a los grupos acilo eliminados. En cuanto al espectro de ¹³C-RMN se observó la desaparición de todas las señales de la zona aromática, y de la señal a 52.5 ppm correspondiente al carbono unido al grupo azida, apareciendo una nueva señal a 39.1 ppm que corresponde al carbono unido al grupo amina.

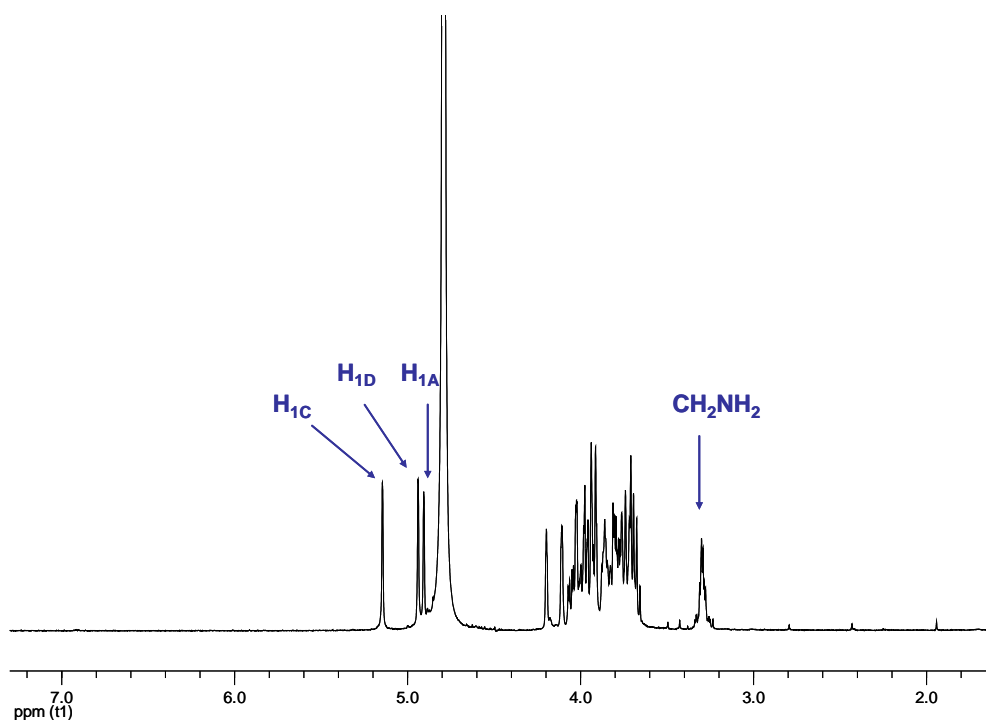
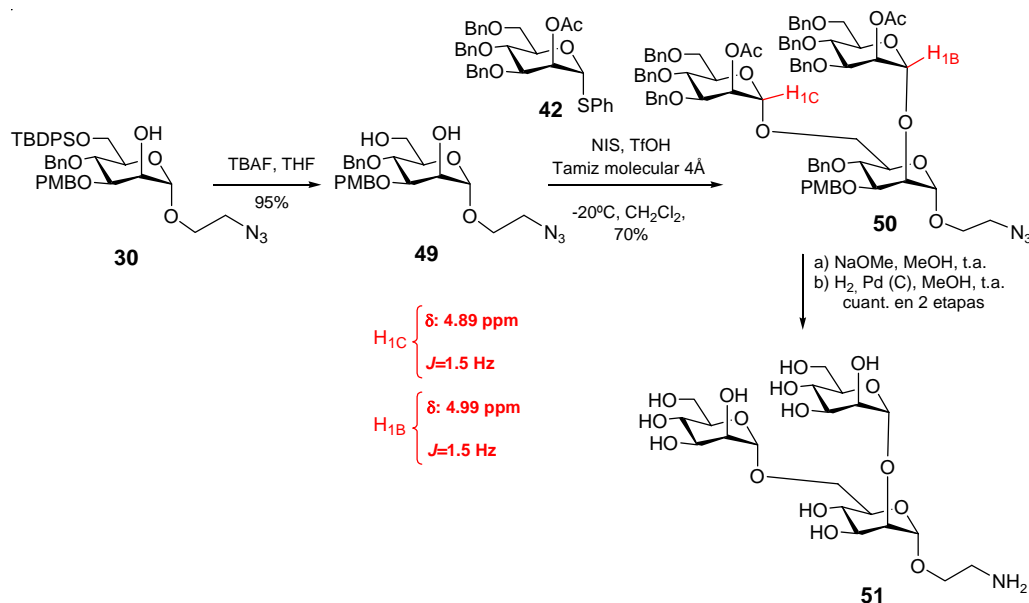


Figura 56. Espectro de ¹H-RMN del trisacárido Man α 1,3[Man α 1,6]Man **48** en D₂O.

Para la síntesis del trisacárido **51**, se partió del derivado de manosa **30**, que presenta desprotegido el grupo hidroxilo de la posición 2. En primer lugar, se realizó la desprotección del grupo TBDPS de la posición 6 en las condiciones indicadas anteriormente, para obtener el derivado de manosa **49**, con dos grupos hidroxilos libres. Sobre este derivado de manosa **49** se realizó la doble glicosidación, usando las mismas condiciones anteriormente descritas para la síntesis del trisacárido **47**; es decir, 2.4 eq. del tioglicósido derivado **42** como donador, 1 eq. del derivado de manosa **49** como aceptor, NIS y TfOH en CH₂Cl₂ a -20°C. En estas condiciones se obtuvo el trisacárido **50** con un rendimiento del 70%. (Esquema 27) La estequiometría α de los dos enlaces glicosídicos formados se confirmó por el espectro de ¹H-RMN. La señal correspondiente al H₁ de las unidades B y C aparecen a 4.99 y 4.89 ppm, respectivamente, como dobletes con una constante de acoplamiento $J=1.5$ Hz en ambos casos, indicando una disposición *trans*-diecuatorial entre los protones H₁ y H₂ de las dos unidades. También se observó la aparición de dos singletes a 2.10 y 2.09 ppm correspondientes a los grupos acetilo de las posiciones 2 de las unidades B y C.



Esquema 27. Síntesis del trisacárido Man α 1,2[Man α 1,6]Man **51**.

Por último, la desprotección de los dos grupos acetilo, de los grupos bencilo y la reducción del grupo azida para obtener el trisacárido libre **51**, se realizó en las mismas condiciones que las usadas en el caso del trisacárido **48** y el disacárido **45**. En una primera etapa de desprotección se eliminó los dos grupos acetilo usando una disolución 1M de NaOMe en MeOH y, en una etapa posterior se realizó la hidrogenación del producto de la reacción anterior usando Pd soportado sobre carbón activo, obteniéndose el trisacárido **51** con un rendimiento cuantitativo para las dos etapas de síntesis. (Esquema 27) En el espectro de ^1H -RMN (figura 57) de este compuesto se pudo observar la desaparición de todas las señales correspondientes a los protones aromáticos pertenecientes a los grupos bencilo. También se observó la desaparición de las dos señales singlete a 2.10 y 2.09 ppm correspondiente a los grupos grupo acetilo eliminados. En cuanto al espectro de ^{13}C -RMN se observó la desaparición de todas las señales de la zona aromática, y de la señal a 50.3 ppm correspondiente al carbono unido al grupo azida, apareciendo una nueva señal a 39.1 ppm que corresponde al carbono unido al grupo amina.

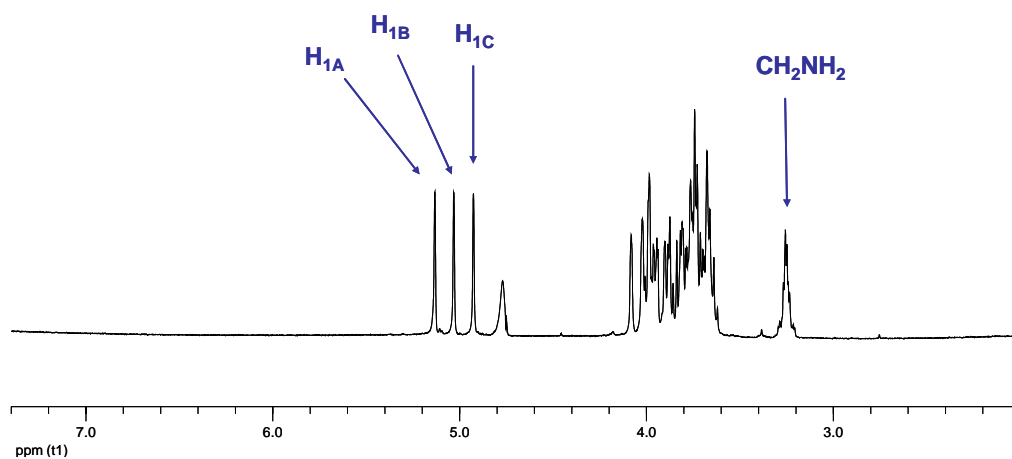


Figura 57. Espectro de ^1H -RMN del trisacárido $\text{Man}\alpha 1,2[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$ **51** en D_2O .

Una vez finalizada la síntesis del disacárido **45** y de los trisacáridos **48** y **51**, estos productos se utilizaron para estudiar su interacción con la lectina DC-SIGN en disolución mediante experimentos de resonancia magnética nuclear.

5.1.3 Estudios de la interacción del disacárido **45 y los trisacáridos **48** y **51** con DC-SIGN por RMN (Transfer-NOE y STD).**

El análisis estructural del disacárido Man α 1,2Man **45** y de los dos trisacáridos Man α 1,3[Man α 1,6]Man **48** y Man α 1,2[Man α 1,6]Man **51** que se presentan en esta Tesis Doctoral han sido realizados por el Dr. Pedro Nieto, el Dr. Jesús Angulo e Irene Díaz en el Instituto de Investigaciones Químicas del CSIC en Sevilla.

Las conformaciones de los trisacáridos **48** y **51** y del disacárido **45** en el estado enlazado con el receptor DC-SIGN se dedujeron mediante la realización de experimentos de transfer-NOE en presencia del dominio extracelular (ECD) de DC-SIGN y se compararon con los datos de RMN obtenidos para estos compuestos en ausencia de proteína, registrados en las mismas condiciones que las usadas para los experimentos de los complejos con DC-SIGN. El estudio se completó con cálculos de dinámica molecular y modelado molecular. Finalmente, se realizó un análisis para determinar la región de los carbohidratos que está en contacto con la lectina por técnicas de STD (Diferencia en la Transferencia de Saturación).

Para facilitar el entendimiento de los resultados obtenidos en este análisis estructural, a continuación se detallan los aspectos más significativos de las técnicas de RMN basadas en transfer-NOE y STD.

El denominado Efecto Nuclear Overhauser (NOE, del inglés Nuclear Overhauser Effect) es el resultado del cambio observable de la intensidad de la señal de resonancia de un núcleo debido a la transferencia de la magnetización, a través del espacio, de un spín a otro. Es una interacción dipolo-dipolo y como tal, depende de la distancia (r^{-6}). El NOE funciona como mecanismo de relajación y además, este efecto nos permite medir distancias interatómicas de pocos angstroms. Es bien conocido que los efectos NOE son extremadamente útiles para determinar la estructura tridimensional de cualquier tipo de molécula

en disolución.¹⁰¹ Este método ha sido también especialmente utilizado para el análisis estructural de proteínas.¹⁰² Un NOE con valor positivo es característico de moléculas de tamaño pequeño en disoluciones no viscosas, para las que se cumple que el tiempo de correlación molecular es mucho menor que el inverso de la frecuencia de Larmor ($\omega\tau_c$, donde ω (rad/s) es la frecuencia del espectrómetro y τ_c el tiempo de correlación de la molécula), mientras que los NOE negativos se presentan en medios muy viscosos o en macromoléculas, casos en los que el tiempo de correlación molecular es muy superior al inverso de la frecuencia de Larmor.¹⁰¹ (Figura 58)

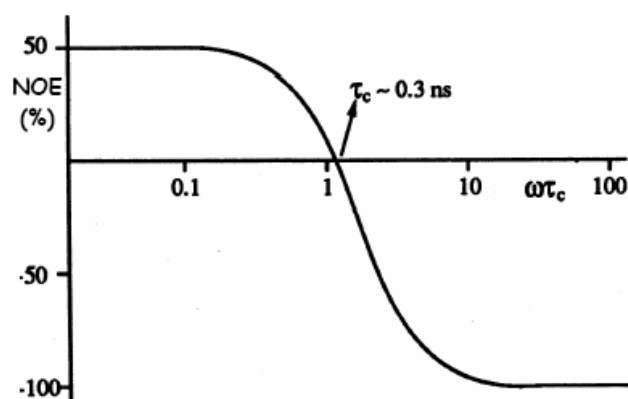


Figura 58. Dependencia del incremento del NOE homonuclear con $\omega\tau_c$. Se representa el caso de un espectrómetro de 500 MHz.

Cuando un ligando de pequeño tamaño se une a una proteína que actúa como receptor, los NOEs sufren cambios drásticos permitiendo la observación de lo que se llama Transferred NOE (Transfer-NOE).^{103, 104}

¹⁰¹ Neuhaus, D.; Williamson, M. P.; *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, Wiley-VCH, 2000.

¹⁰² (a) Wüthrich, K.; Wagner, G.; Richarz, R.; Perkins, S. J.; *Biochemistry*, **1978**, *17*, 2253-2263. (b) Krishna, N. R.; Agresti, D. G.; Glickson, J. D.; Walter, R.; *Biophys. J.*, **1978**, *24*, 791-814. (c) Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1980**, *95*, 1-6. (d) Wagner, G.; Havel, T. F.; Schaumann, T.; Go, N.; Wüthrich, K.; *J. Mol. Biol.*, **1987**, *196*, 611-639. (e) Bax, A.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1989**, *58*, 223-256.

¹⁰³ (a) Balaram, P.; Bothner-By, A. A.; Dadok, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 4015-4017. (b) Balaram, P.; Bothner-By, A. A.; Breslow, E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 4017-4018. (c)

En un experimento típico, el ligando está en exceso respecto al receptor (ca. 50:1), por lo que los desplazamientos químicos observados están muy próximos a los del ligando libre. En general, si el intercambio ligando libre-complejo es rápido en la escala de tiempos de la relajación, estos experimentos funcionan muy bien, ya que el ligando asociado adopta el movimiento lento de la macromolécula receptora, siendo las constantes de velocidad de relajación de los protones del ligando en el estado asociado negativas y de distinto signo de las del estado libre. Por tanto, los picos de cruce del Transfer-NOESY son negativos, aunque el ligando sea muy pequeño. (Figura 59) Por tanto, la existencia de una interacción ligando-receptor puede detectarse fácilmente mediante la inspección visual de los picos de cruce. Las condiciones para que el experimento funcione son bien conocidas y dependen fundamentalmente de la constante de velocidad de disociación del complejo y de la relación molar empleada.

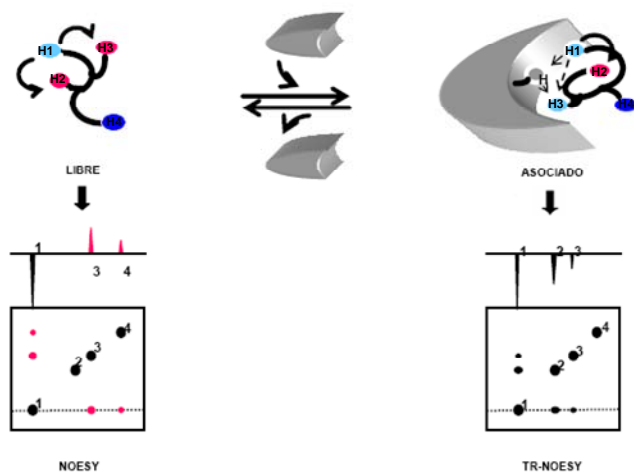


Figura 59. Esquema del experimento Transfer-NOE. Los picos de cruce del ligando en el espectro Transfer-NOESY son del mismo signo que los de la diagonal.

- Clore, G. M.; Gronenborn, A.; *J. Magn. Reson.*, **1983**, *53*, 423-442. (d) Feeney, J.; Birdsall, B.; Roberts, G. C.; Burgen, A. S.; *Biochemistry*, **1983**, *22*, 628-633.
- ¹⁰⁴ (a) Krishna, N. R.; Moseley, H. N. B.; *Structural Computation and Dynamics in Protein NMR, Vol. 17* (Eds.: N. R. Krishna, L. J. Berliner), Kluwer Academic, New York, **1999**, pp. 223-307. (b) London, R. E.; *J. Magn. Reson.*, **1999**, *141*, 301-311. (c) Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L.; Cañada, F. J.; Poveda, A.; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, *9*, 549-555. (d) Peters, T.; Pinto, B. M.; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1996**, *6*, 710-720.

En general, se pueden observar señales transfer-NOE intra- o intermoleculares. Mientras los NOE intramoleculares son una herramienta para determinar la conformación del ligando cuando está unido al receptor; los NOE intermoleculares son los que ocurren entre el ligando y el receptor y, por tanto, pueden permitir la determinación de la orientación del ligando enlazado en el sitio activo de la proteína.

La otra técnica que se va a utilizar para estos estudios en disolución por RMN es el STD. Actualmente, esta metodología es una de las más utilizadas en RMN para el estudio de la interacción entre ligandos pequeños y macromoléculas que actúan como receptor.¹⁰⁵ Esta técnica está basada en el principio ampliamente conocido en el que una proteína saturada puede transferir esa saturación a un ligando cuando se produce un intercambio entre el ligando y la proteína. Anteriormente al STD, la espectroscopía de RMN de transferencia de saturación había sido usada durante muchos años para caracterizar el modo de enlace de un ligando que se une fuertemente a una proteína que actúa como receptor. En esta situación, el ligando muestra dos tipos de señales, o dos espectros, uno correspondiente al estado libre y otro al enlazado, debido a un intercambio lento entre dichos estados. La transferencia de saturación es posible entre el estado libre y el enlazado. Por irradiación, por ejemplo, de las señales correspondientes al ligando libre, las señales del ligando enlazado se pueden identificar. Dependiendo de la asignación de las señales de resonancia del ligando enlazado, el método de transferencia de saturación se ha empleado para analizar cinéticas de enlace de la formación del complejo ligando-proteína. Esta técnica se aplica para analizar la afinidad de los carbohidratos con las lectinas.

El STD es un método basado en la transferencia de saturación desde la proteína al ligando enlazado, el cual en el equilibrio, pasa a la disolución donde se detecta esa transferencia. (Figura 60) La sustracción del espectro en el que la proteína está saturada del espectro sin saturación produce un espectro diferencia en el que solo permanecen las señales del ligando que están en contacto directo

¹⁰⁵ (a) Mayer, M.; Meyer, B.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 1784-1788. (b) Meyer, B.; Peters, T.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 864-890.

con el receptor (señales correspondientes a los protones que han sufrido la transferencia de la magnetización). La frecuencia de irradiación se selecciona de forma que se vean afectados sólo los núcleos de la proteína y no los núcleos del ligando, normalmente a campo muy alto $\cong -1$ ppm o en el punto donde aparecen los protones correspondientes al grupo funcional amida de los enlaces peptídicos, eligiendo una zona del espectro donde no haya solapamiento con señales del ligando.

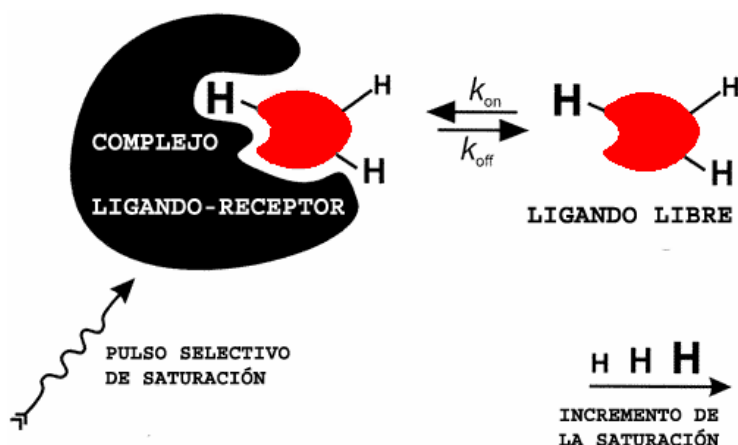


Figura 60. Representación gráfica de un experimento STD.

Los experimentos de STD se aplicaron, inicialmente, para hacer cribados de librerías de carbohidratos y comprobar la afinidad frente a una lectina o proteína que reconoce carbohidratos. Se ha demostrado, que el STD es una técnica excelente para determinar el modo de enlace de un ligando. Además, esta técnica se puede usar fácilmente para identificar qué fragmento de un ligando está en contacto con el receptor, porque esta parte recibe mayor grado de saturación. Toda esta información es de gran importancia para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos.

5.1.3.1 Complejo del trisacárido *Man α 1,2[Man α 1,6]Man 51* con DC-SIGN.

Antes de comenzar el estudio por RMN, se realizó una dinámica molecular del trisacárido **51** libre, para evaluar la conformación que presentaba

en base a las uniones glicosídicas. En estos estudios se obtuvieron resultados muy similares a los descritos anteriormente en la bibliografía para este tipo de uniones glicosídicas (α 1,2) y (α 1,6), y que han sido ampliamente estudiadas tanto en disacáridos, como en compuestos que forman parte de estructuras oligosacáridas más complejas.¹⁰⁶ Estas estructuras están recogidas en varias bases de datos estructurales.¹⁰⁷

Los dos enlaces glicosídicos (Φ , Ψ) del trisacárido presentan un comportamiento conformacional independiente, es decir, las conformaciones que presenta la unión α 1,6 no influyen en las preferencias conformacionales de la unión α 1,2. La unión 1,2 de la manosa se ha descrito principalmente como un conjunto de confórmeros exo-anoméricos (con un ángulo Φ_2 entre 0 y -60°) y con un amplio grado de flexibilidad sobre el ángulo Ψ_2 , que presenta valores tanto negativos como positivos. También se ha detectado una pequeña población correspondiente a una conformación no-exoanomérica (valores de Φ_2 y Ψ_2 positivos). (Figura 61)

¹⁰⁶ (a) Clavel, C.; Canales, A.; Gupta, G.; Cañada, F. J.; Penadés, S.; Suriola, A.; Jiménez-Barbero, J.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 1577-1585. (b) Chevalier, F.; López-Prados, J.; Groves, P.; Perez, S.; Martín-Lomas, M.; Nieto, P. M.; *Glycobiology*, **2006**, *16*, 969-980. (c) Lutteke, T.; Frank, M.; von der Lieth, C. W.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **2000**, *383*, 17-27. (d) Mari, S.; Posterl, H.; Marcou, G.; Potenza, D.; Micheli, F.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Bernardi, A.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 5119-5125. (e) Woods, R. J.; Pathiaseril, A.; Wormald, M. R.; Edge, C. J.; Dwek, R. A.; *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *258*, 372-386.

¹⁰⁷ (a) Frank, M.; Lutteke, T.; von der Lieth, C. W.; *Nucleic. Acids. Res.*, **2007**, *35*, D287-D290. (b) <http://www.cermav.cnrs.fr/glyco3d/index.php>.

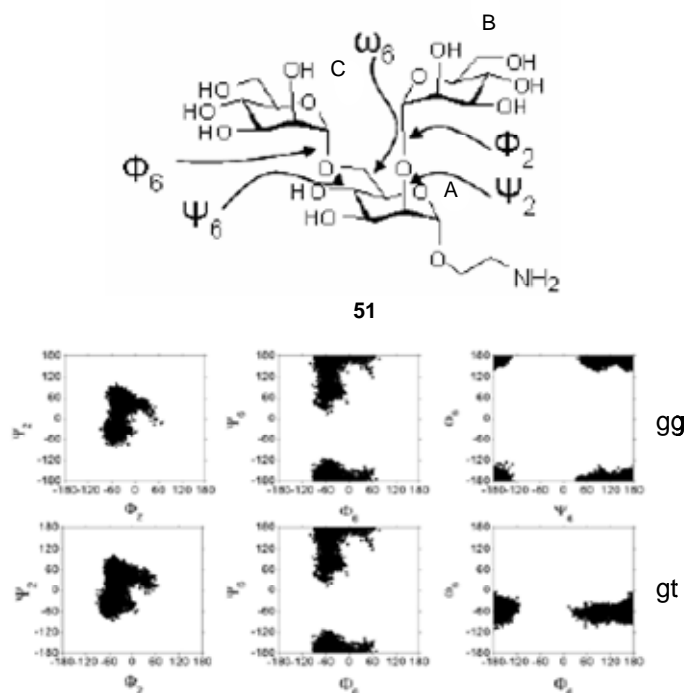


Figura 61. Mapas conformacionales correspondientes a los ángulos dihedros Φ , Ψ y ω de los enlaces glicosídicos del trisacárido **51** después de la dinámica molecular para los conformeros *gg* (arriba) y *gt* (abajo).

El cálculo de las distancias experimentales por RMN para el compuesto **51** se realizó en las mismas condiciones que las utilizadas para el estudio del complejo con la lectina DC-SIGN y se muestran en la tabla 3. Se observan distancias cortas entre los protones H₁B-H₂A y H₁B-H₁A características de la conformación exo-anomérica, $\Psi_{+/-}$ mínima. En cambio, el NOE entre H₁A y H₂B, que sería indicativo de una conformación no exo-anomérica no se observa.

Tabla 3. Distancias interprotónicas calculadas a partir de los experimentos NOE, distancias medias obtenidas por la simulación de DM (Dinámica molecular) y distancias de la conformación enlazada obtenidas de los experimentos de docking para el compuesto 51.

	Datos experimentales RMN		Datos teóricos		
	Libre	Enlazado	DM	DM	Docking
			(gg)	(gt)	
H ₁ A-H ₂ A	2.5	2.5	2.5	2.5	2.6
H ₁ A-H ₂ B	nd	3.5	4.8	4.9	4.9
H ₁ A-H ₅ B	3.7	2.6	3.1	2.7	3.2
H ₁ C-H ₃ B	3.9	3.4	3.8	3.8	3.7
H ₁ C-H ₅ C	3.7	3.6	3.7	3.6	3.7
H ₁ C-H ₆ A	3.9	3.8	2.9	3.0	2.7
H ₁ C-H ₆ 'A	2.5	2.6	2.5	2.5	2.4
H ₁ B-H ₁ A	-	-	2.7	2.9	2.9
H ₁ B-H ₂ A	2.3	2.5	2.4	2.4	2.3
H ₂ B-H ₃ B	2.3	2.5	2.4	2.4	2.4

La unión 1,6 se encuentra como una mezcla de conformeros *gauche-gauche* (gg) y *gauche-trans* (gt), alrededor del ángulo de torsión ω .^{106(e)} Sin embargo, en las condiciones experimentales usadas para la comparación de las conformaciones del trisacárido en estado libre y enlazado al ECD de DC-SIGN, se produce un ensanchamiento global de las señales que impide la medida exacta de las constantes de acoplamiento. Los NOEs ente H₁C y H₆·A y H₆'·A son los únicos que se observan, y están de acuerdo con la disposición *trans* del ángulo de torsión Ψ observado previamente. (Figura 62) Por consiguiente, la estructura del trisacárido libre en disolución se puede describir como una parte flexible en la unión 1,6 y una parte más rígida en la unión 1,2.

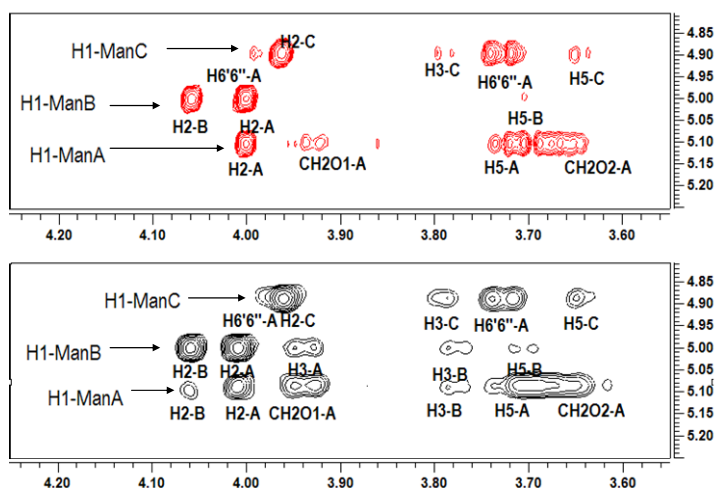


Figura 62. Expansión de los experimentos NOESY del trisacárido **51** libre (arriba) y en presencia de DC-SIGN (50:1 molar) (debajo), donde se muestran los picos NOE representativos de la conformación de los enlaces glicosídicos.

La conformación enlazada del trisacárido **51** al receptor DC-SIGN se estudió por experimentos de transfer-NOE en presencia de un 5 % de lectina. Las señales de los NOE cambian de signo, indicando que la unión ligando-receptor está en un rango favorable. El patrón de NOEs es esencialmente similar al que presenta el ligando libre. Desgraciadamente, los datos respecto a la unión 1,6 no son concluyentes en cuanto a la discriminación del rotámero ω . La observación de un NOE débil entre H₂B y H₁A puede ser indicativo de un incremento en la población del conformero no-exoanomérico para la unión 1,2. La importancia relativa de cada una de las unidades en la interacción con DC-SIGN se evaluó por medio de experimentos de STD en las mismas condiciones experimentales que las usadas para realizar los experimentos de transfer-NOE.

Los efectos STD relativos se muestran en la figura 63. Los mayores efectos se observan en el residuo unido por el enlace 1,2 (ManB), seguido por la otra manosa terminal, ManC, mientras la manosa central, ManA, muestra los menores efectos. Estos resultados se pueden explicar basándose en una conformación plegada donde los residuos de manosa terminales contactan con la lectina, aunque también es posible explicar estos hechos por la existencia de varios modos de enlace.

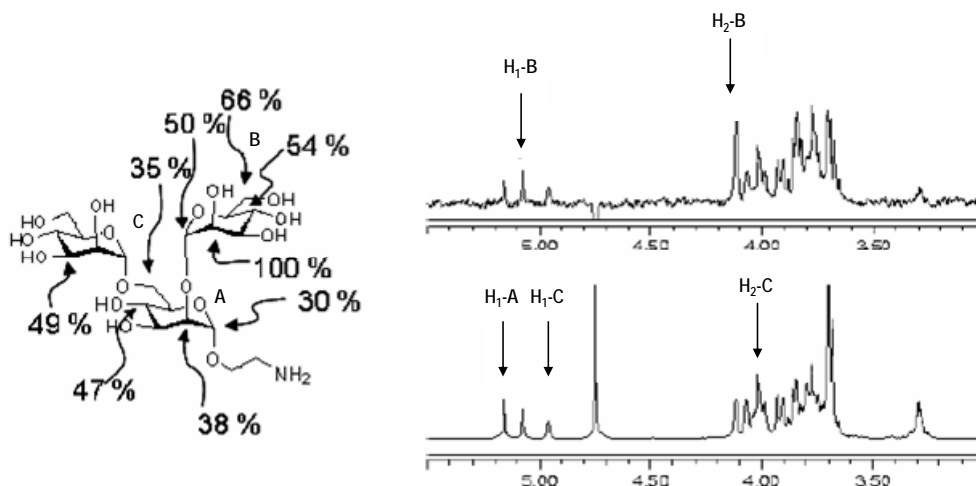
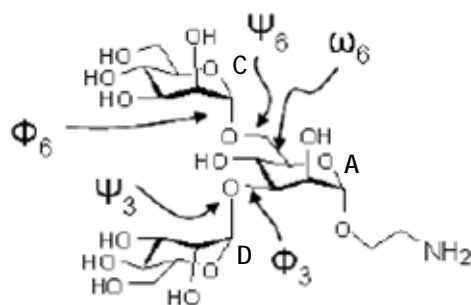


Figura 63. Experimentos de STD del compuesto **51** en presencia de DC-SIGN, realizados con 2.5 s de tiempo de saturación.

5.1.3.2 Complejo del trisacárido $\text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$ **48** con DC-SIGN.

Usando la misma aproximación que para el trisacárido **51**, los datos experimentales de RMN obtenidos para el trisacárido **48** en condiciones salinas y de tampón idénticas y en ausencia de lectina confirman el comportamiento del enlace $\alpha 1,6$. La unión $\alpha 1,3$ se encuentra fundamentalmente en disposición *syn* para el ángulo Ψ y con distribución de ángulos Φ compatibles con el efecto exo-anomérico, ya mostrado por la unión $\alpha 1,2$ en el trisacárido **51**. Sin embargo, la unión $\alpha 1,3$ es significativamente más flexible que la unión $\alpha 1,2$ en el trisacárido **51**. En la simulación, la principal región que abarca el espacio conformacional Φ/Ψ es más ancha que en el caso del compuesto **51** y, por este motivo, se han podido observar transiciones hasta conformaciones anti- Ψ . (Figura 64)



48

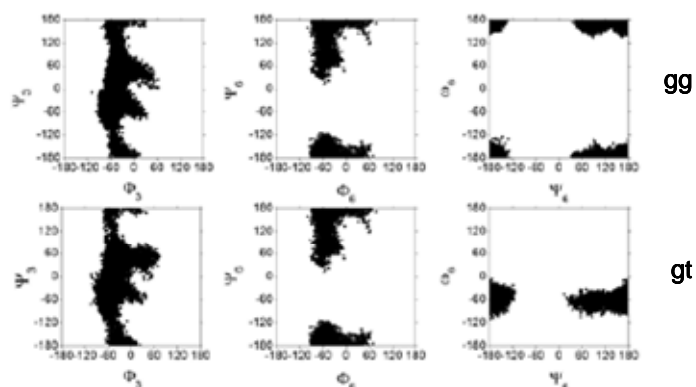


Figura 64. Mapas conformacionales correspondientes a los ángulos dihedros Φ , Ψ y ω de los enlaces glicosídicos del trisacárido **48** después de la dinámica molecular para los conformeros gg (arriba) y gt (abajo).

Sin embargo, no se han observado NOEs no exclusivos para la conformación anti- Ψ lo que sugiere que la población que presenta esta conformación no supera el 5%. Los buenos acuerdos cuantitativos entre las distancias obtenidas experimentalmente y las predichas teóricamente también apoyan estas conclusiones.

Los experimentos NOE para el trisacárido **48** registrados en presencia del ECD de DC-SIGN muestran NOEs con valor negativo, indicativos de la interacción transitoria del carbohidrato con el ligando (Figura 65). Las diferencias observadas entre los experimentos equivalentes del trisacárido **48**

libre o con DC-SIGN son debidos a los cambios esperados en la anchura de línea y los tiempos de correlación. Un análisis más cuantitativo de los índices de crecimiento de las señales NOE no evidencia cambios en las distancias interprotónicas claves. El acuerdo encontrado entre las distancias experimentales del ligando cuando está enlazado a DC-SIGN es bueno con la excepción de un NOE de largo alcance observado entre el H₂ de la manosa central, ManA, y el H₅ de la manosa unida por la posición 3, ManD.

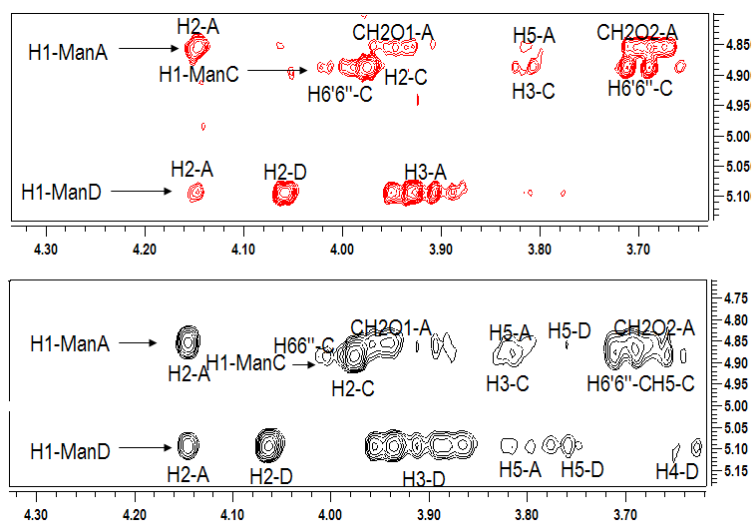


Figura 65. Expansión de los experimentos NOESY del trisacárido **48** libre (arriba) y en presencia de DC-SIGN (50:1 molar) (debajo), donde se muestran los picos NOE representativos de la conformación de los enlaces glicosídicos.

Los experimentos de STD son también concluyentes sobre la interacción entre el trisacárido **48** y DC-SIGN. Se observa una clara transferencia de la magnetización para algunas señales y, en general, la magnitud absoluta de los efectos de STD es mayor que la observada para el trisacárido **51**. Los valores relativos de STD son mayores para la ManD enlazada por la unión α 1,3, indicando que esta unidad presenta una interacción más fuerte con la lectina. En el caso del residuo ManC, éste presenta una menor transferencia que la unidad central, sugiriéndose pequeñas diferencias en el modo de enlace entre ambos trisacáridos. Los valores absolutos de STD de ambas muestras pueden compararse considerando la naturaleza similar de ambos compuestos, la

equivalencia en la concentración y en la proporción ligando/proteína de ambas muestras y que la constante de disociación ha sido estimada en el rango micromolar alto. En estas condiciones, el mayor efecto STD observado para **48** nos indica que interacciona de forma más fuerte con el receptor DC-SIGN que el trisacárido **51**.

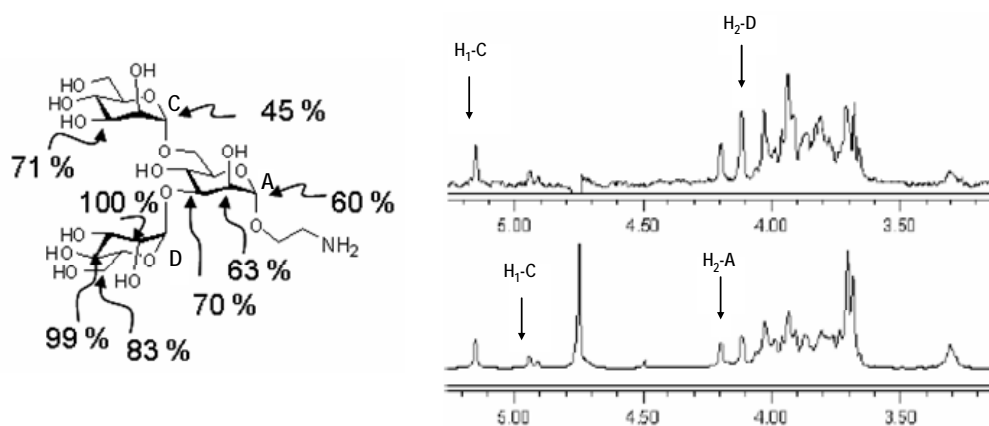


Figura 66. Experimentos de STD del compuesto **48** en presencia de DC-SIGN, realizados con 2.5 s de tiempo de saturación.

5.1.3.3 Complejo del disacárido Man α 1,2Man **45** con DC-SIGN.

Los estudios estructurales realizados con el disacárido **45** han sido mucho más completos y complejos que los realizados para los trisacáridos **48** y **51**, y exceden los objetivos de la presente Tesis Doctoral. En este apartado se va a comentar de forma resumida los experimentos realizados, además de los resultados obtenidos para el disacárido **45**, dada la relevancia de estos resultados desde el punto de vista del diseño de nuevos ligandos para el receptor DC-SIGN.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral apareció publicado en la bibliografía una estructura cristalográfica de un complejo de CRD de DC-SIGN con el disacárido Man α 1,2Man.⁶⁰ En este trabajo se demostró que el disacárido Man α 1,2Man presentaba dos modos distintos de enlace para el mismo sitio de

unión a la proteína DC-SIGN. (Figura 67) En las estructuras obtenidas por difracción de rayos X se podía apreciar que los dos modos de enlaces que se producían presentaban una relación 3:1. Es decir, se observaba un modo mayoritario (M) (figura 67 A y B) cuya orientación estaba claramente definida en los datos cristalográficos y un complejo minoritario (m) (figura 67 C y D) cuya estructura era ambigua y en la que algunos átomos del ligando no estaban bien definidos.

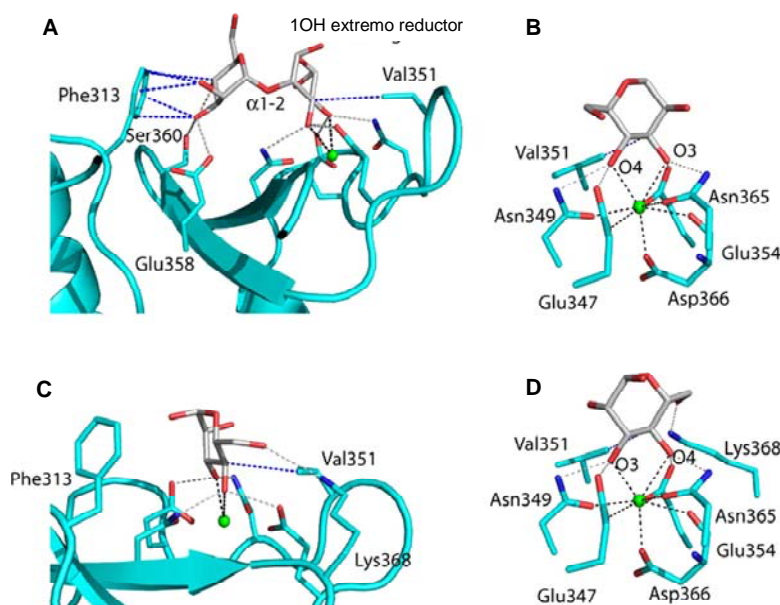


Figura 67. (A) Estructura del complejo mayoritario (M) de CRD de DC-SIGN con el disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$. (B) Primer plano de la unión de la manosa del complejo mayoritario al ión Ca^{2+} principal. (C) Estructura del complejo minoritario (m). (D) Primer plano de la unión de la manosa del complejo minoritario al ión Ca^{2+} principal.

A la vista de estos resultados en los que uno de los modos de enlace del disacárido no estaba definido, se decidió realizar un estudio estructural del complejo DC-SIGN con el disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ **45** en disolución por RMN, con el cual se pudiera determinar la disposición espacial que dicho disacárido

⁶⁰ Feinberg, H.; Castelli, R.; Drickamer, K.; Seeberger, P. H.; Weis, W. I.; *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 4202-4209.

adquiría en los dos modos de enlaces que se observaron en los estudios cristalográficos.

Este caso de múltiples modos de enlace para un mismo ligando en un sitio de unión único es un caso especial de sistema receptor/ligando-inhibidor competitivo, debido a que uno de los complejos formados es inhibidor de los otros. El problema para realizar un estudio estructural con este tipo de complejos es que tanto el ligando como el inhibidor son la misma especie, por lo que los desplazamientos químicos y las intensidades de las señales de resonancia en el equilibrio son equivalentes e indistinguibles. Por otra parte hay que señalar que los experimentos de STD son sensibles a los diferentes modos de unión que presenta un ligando. Es decir, la medida experimental del STD correspondería a la suma de los STD individuales de cada uno de los modos de enlace del ligando. El análisis de estos datos, aunque muy complejo, puede arrojar mucha información sobre estos modos de enlace distintos.

Utilizando CORCEMA-ST (Complete Relaxation and Conformational Exchange Matrix Analysis of Saturation Transfer), que es un protocolo recientemente desarrollado, se puede calcular teóricamente los efectos STD de los protones de un ligando para diferentes modos de enlace con un receptor.¹⁰⁸ De esta forma, la saturación proporcionada por cada uno de los complejos considerados (originados por un modo de enlace alternativo) pueden ser calculados por separado. El problema que se presenta en este tipo de cálculos es que esta aproximación no es directamente aplicable, porque los valores de STD se ven afectados por el denominado “rebinding”, es decir, un ligando saturado previamente puede volver a entrar en el sitio de unión utilizando un modo de enlace distinto. En este caso, las intensidades de las señales son diferentes para cada uno de los equilibrios. Con el CORCEMA-ST no se puede estimar la contribución de este efecto. Para evitar este problema hay dos opciones: a) usar tiempos de saturación cortos en los que los efectos de este “rebinding” se anulan. Sin embargo, en estas condiciones la calidad del experimento es muy pobre, debido a la baja transferencia de saturación desde el receptor al ligando; b) usar

los índices de crecimiento iniciales del STD (STD_0),¹⁰⁹ lo que evitaría la posibilidad de “rebinding”. Esta última ha sido la opción escogida por nosotros. Dada la complejidad de estos cálculos, que excede el objetivo de esta Tesis Doctoral, no se discutirá aquí su modo de aplicación y solamente se presentaran los resultados obtenidos.

Las estructuras tridimensionales usadas para el cálculo de la matriz de relajación completa (para los cálculos de CORCEMA-ST) se basan en los datos obtenidos por difracción de rayos X que han sido publicados para el complejo de CRD de DC-SIGN con $Man\alpha 1,2Man$ (pdb: 2IT6).⁶⁰ En este caso, se desarrollaron dos posibles estructuras para el modo de enlace que se ha denominado minoritario (m1 y m2) compatible con los datos cristalográficos, a partir de las coordenadas disponibles en estos estudios en estado sólido. (Figura 68)

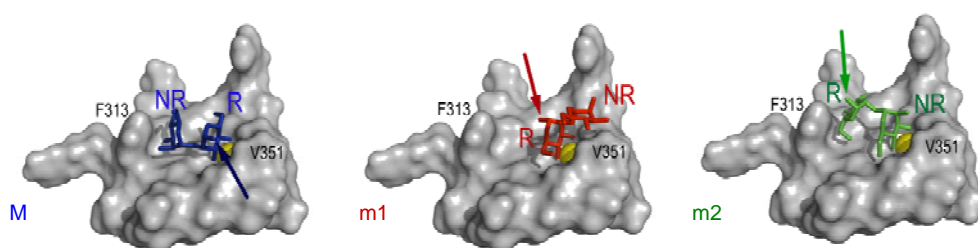


Figura 68. Estructuras del complejo CRD de DC-SIGN con $Man\alpha 1,2Man$ usadas para los cálculos teóricos de los valores mostrando la orientación relativa del disacárido frente al ión Ca^{2+} principal (esfera amarilla). R = “extremo reductor” NR = “extremo no reductor” del disacárido. Mayoritario (M), minoritario 1 (m1), minoritario 2 (m2).

Se realizaron los experimentos STD para el disacárido **45** con el ECD de DC-SIGN en las mismas condiciones que las utilizadas para los trisacáridos **48** y **51**. Hay que señalar, que la magnitud de las señales STD es fuertemente dependiente de la constante de disociación del complejo ECD de DC-SIGN con el disacárido **45**. Este valor se puede trasladar directamente a la constante de equilibrio, K_D , asumiendo que los procesos de asociación están controlados por

¹⁰⁸ Jayalakshmi, V.; Krishna, N. R.; *J. Magn. Reson.*, **2002**, *155*, 106-118.

¹⁰⁹ Mayer, M.; James, T. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 4453-4460.

⁶⁰ Feinberg, H.; Castelli, R.; Drickamer, K.; Seeberger, P. H.; Weis, W. I.; *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 4202-4209.

la difusión,^{105b} ya que es necesario el uso de las K_D en los cálculos de CORCEMA. En la bibliografía solo se encuentran afinidades relativas de oligosacáridos por DC-SIGN obtenidas en experimentos de competición. Estas constantes de disociación son del orden micromolar y son las que se han considerado para los cálculos de COCERMA.^{58,61h}

Una vez realizados los experimentos de STD y los cálculos de CORCEMA, la concordancia entre los datos experimentales y los resultados teóricos se evaluó usando el factor NOE R. Los resultados de los estudios monomodales (un único modo de enlace) para el ligando con orientación m1 (los grupos OH del extremo no reductor del disacárido coordinados con el ión Ca^{2+} primario) muestran un incremento en el factor NOE R con tendencia a crecer cuando los valores de K_D decrecen. (Figura 69, círculos rojos) Los datos para la unión monomodal del ligando con orientación m2 (los grupos OH del extremo reductor del disacárido interaccionan con el ión Ca^{2+} primario), muestran un factor NOE R con tendencia a crecer cuando los valores de K_D aumentan. (Figura 69, triángulos verdes) En cambio, el modo de enlace mayoritario tiene la menor desviación relativa frente a los valores experimentales por encima de 0.5 mM. (Figura 69, cuadros azules)

^{105b} Meyer, B.; Peters, T.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 864-890.

⁵⁸ Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I.; *Science*, **2001**, 294, 2163-2166.

^{61h} Mitchell, D. A.; Fadden, A. J.; Drickamer, K.; *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 28939-28945.

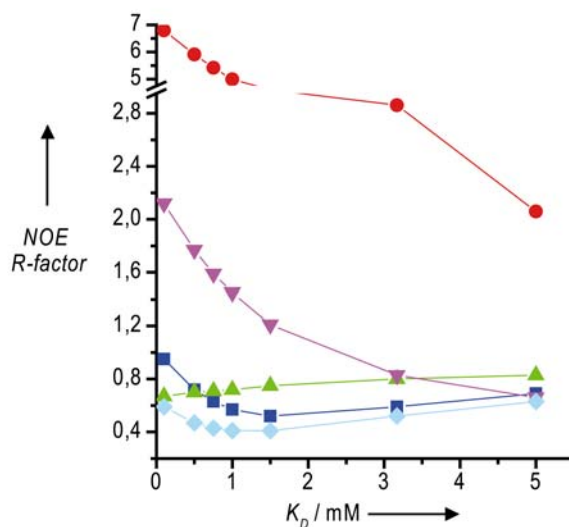


Figura 69. Representación gráfica de la desviación entre los valores experimentales y teóricos de STD en función de la constante de disociación usada en la predicción. Complejos monomodales: M (cuadros azules), m1 (círculos rojos), y m2 (triángulos verdes). Complejos bimodales: M+m1 (triángulos invertidos morados), y M+m2 (diamantes celestes).

Estos resultados confirman los datos obtenidos en estado sólido con el CRD de DC-SIGN y el disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$, demostrando que el modo de enlace denominado M es el que proporciona la mayor contribución al dato experimental.

Considerando sistemas bimodales (dos modos de enlace simultáneos), la combinación de los modos M y m1 (figura 69, triángulos invertidos morados) proporcionan valores del factor NOE R muy alto, mostrando un resultado peor que el componente mayoritario M de forma monomodal.

En cambio, la contribución del ligando en la orientación m2 junto con el modo de enlace mayoritario M + m2 (figura 69, diamantes celestes), producen una reducción del factor R NOE para todos los rangos de K_D considerados, en comparación a cuando se consideran las dos orientaciones de forma individual. Además, el menor factor NOE R se observa por debajo del rango micromolar,

estando completamente de acuerdo con los datos recogidos en la bibliografía en los experimentos de competición.

Estos resultados clarifican los estudios cristalográficos y determinan la estructura precisa del modo de enlace minoritario del disacárido en el sitio de unión de DC-SIGN. En este modo de enlace, el disacárido se localiza en el mismo sitio de unión que el complejo mayoritario pero la orientación (extremo reductor y no reductor) impuesta por la coordinación de la manosa con el ión calcio primario es la contraria. En el caso del modo de unión minoritario es el extremo no reductor del disacárido el que se coordina con el ión calcio. Esta información puede ser muy útil para posteriores estudios de interacción y para el diseño de nuevos ligandos para el receptor DC-SIGN.

Como conclusión de este apartado se puede decir que, se ha descrito una aproximación combinada basada en los estudios de docking, síntesis y RMN para estudiar la interacción de ligandos carbohidrato (di- y trisacáridos de manosa) con el dominio de reconocimiento de carbohidratos de la lectina DC-SIGN para evaluar su afinidad relativa. Basándonos en el análisis computacional, dos trisacáridos ramificados ($\text{Man}\alpha 1,2[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$ y $\text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$) se han seleccionados como los mejores candidatos para ser sintetizados y estudiados por RMN. Estos trisacáridos contienen en su estructura los disacáridos 1-2, 1-3 y 1-6 presentes en la estructura de *high mannose*. $\text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$ forma parte de un fragmento de la estructura de *high mannose* y es considerado como uno de los trisacáridos más importantes que interaccionan con DC-SIGN. Por otra parte, el trisacárido $\text{Man}\alpha 1,2[\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}$, forma parte del oligosacárido arabinomannano y los estudios de docking prevén una mejor interacción con DC-SIGN probablemente basados en una interacción carbohidrato-aromático de una de las unidades de manosa con la cadena lateral del aminoácido Phe 313.

El análisis conformacional de ambos trisacáridos demuestra que la geometría que reconoce el receptor es la conformación que presenta una mayor población en estado libre y no se producen grandes cambios conformacionales durante la interacción. En esencia, estas estructuras están de acuerdo con las

predichas por el docking y los datos cristalográficos publicados. Los experimentos de STD indican que los fragmentos disacarídicos de manosa 1-2 y 1-3 interaccionan de forma más fuerte con la lectina, como se había deducido de las estructuras de docking en las cuales se observaba una fuerte interacción con el ión Ca^{2+} . Sin embargo, los patrones de STD indican diferencias apreciables en el modo de enlace de ambos compuestos, probablemente como consecuencia de la existencia de múltiples modos de enlace como se ha propuesto en este apartado.

Además, usando CORCEMA-ST para el caso del disacárido **45** se ha podido determinar la orientación relativa que adopta este compuesto en el sitio de unión en el modo de enlace minoritario que se observaba en las estructuras de rayos X.

5.2. Síntesis y estudios de interacción con el receptor DC-SIGN por RMN y docking de un pseudodisacárido de manosa.

En este apartado de la presente Tesis Doctoral, se describe la síntesis del disacárido mimético **55**, que imita al disacárido natural Man α 1,2Man, presente en los extremos no reductores de la estructura de *high mannose* y que puede interactuar con el receptor DC-SIGN. Antes de pasar a discutir los resultados obtenidos, se introducirá de forma general el concepto de mimético de carbohidrato (o glicomimético).

5.2.1 Moléculas glicomiméticas.

El término glicomimético o mimético de carbohidrato se usa frecuentemente para denominar a aquellos análogos de carbohidratos en los que se ha sustituido alguno de los átomos de la molécula de azúcar natural por átomos o grupos funcionales más simples, desde el punto de vista sintético, con objeto de aumentar la estabilidad del compuesto natural y manteniendo (y en lo posible mejorando) las propiedades de reconocimiento molecular.¹¹⁰

Los glicomiméticos presentan ventajas frente a sus parientes estructurales naturales, fundamentalmente: 1) suelen presentar mayor estabilidad frente a la degradación por enzimas endógenas del tipo glicosidasas, exhibiendo una mayor biodisponibilidad y tardando más tiempo en degradarse en los medios fisiológicos; 2) pueden presentar mayor afinidad por los receptores del carbohidrato natural, porque pueden dar lugar a interacciones distintas y más ventajosas que el oligosacárido natural correspondiente.

Para el diseño de un buen compuesto que mimetice las propiedades de un carbohidrato natural es importante conocer las interacciones que se producen

¹¹⁰ (a) Dam, T. K.; Brewer, C. F.; *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 387-429. (b) Mikkelsen, L. M.; Hernaiz, M. J.; Martin-Pastor, M.; Skrydstrup, T.; Jiménez-Barbero, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 14940-14951. (c) Weatherman, R. V.; Mortell, K. H.; Chervenak, M.; Kiessling, L. L.; Toone, E. J.; *Biochemistry*, **1996**, *35*, 3619-3624. (d) Weatherman, R. V.; Kiessling, L. L.; *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 534-538. (e) Searle, M. S.; Williams, D. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 10690-10697. (f) Gabius, H. J.; *Pharm. Res.*, **1998**, *15*, 23-30.

entre el carbohidrato natural y el receptor. Es decir, hay que conocer el número de interacciones y el tipo (enlace de hidrógeno, coordinación con metales, interacciones hidrofóbicas, iónicas, etc).

El conocimiento de cómo los carbohidratos interaccionan con sus receptores proporciona información muy útil para el diseño de carbohidratos miméticos. Por ejemplo, la baja afinidad en las interacciones entre proteínas y carbohidratos se atribuye a varias causas. Primeramente, los carbohidratos no presentan habitualmente grupos hidrofóbicos que pueden dar lugar a contactos de tipo van der Waals. Solo en algunos casos particulares, como los derivados de heparina o los ácidos siálicos, presentan sustituciones en grupos hidroxilo por grupos cargados de tipo sulfato o carboxilato, que dan lugar a interacciones electrostáticas fuertes.¹¹¹ Además, la energía asociada a las múltiples interacciones por enlaces de hidrógeno en los procesos de reconocimiento carbohidrato-proteína disminuye significativamente por la competición con el disolvente, el agua en condiciones fisiológicas. Por último, la flexibilidad de muchos de los grupos formadores de enlaces de hidrógeno implica una penalización entrópica grande cuando estos están obligados a estar confinados en el sitio de unión de la proteína.

Con esta información, se pueden elegir varias estrategias para el diseño de moléculas orgánicas que mimeticen la conformación activa y la función de los ligandos oligosacáridicos. Una primera opción sería eliminar grupos funcionales innecesarios, manteniendo las uniones glicosídicas, a fin de no variar la conformación. (Figura 70) En esta aproximación, se reduce la polaridad de los carbohidratos y se aumenta la afinidad del ligando por el receptor al incrementarse las interacciones hidrofóbicas, reduciendo de esta forma la penalización por desolvatación de los grupos funcionales polares del carbohidrato. Sin embargo, la síntesis de desoxiazúcares no es trivial, por lo que se usan algunas variaciones en la estrategia, en donde grupos funcionales se

¹¹¹ (a) Noti, C.; Seeberger, P. H.; *Chem. Biol.*, **2005**, *12*, 731-756. (b) Pellegrini, L.; Burke, D. F.; von Delft, F.; Mulloy, B.; Blundell, T.L.; *Nature*, **2000**, *407*, 1029-1034. (c) Faham, S.; Hileman, R. E.; Fromm, J.R.; Linhardt, R. J.; Rees, D. C.; *Science*, **1996**, *271*, 1116-1120.

introducen o se cambian para incrementar la afinidad o la estabilidad. La introducción de grupos hidrofóbicos permite aumentar la afinidad por el receptor si dichos grupos se encuentran con otros grupos hidrofóbicos complementarios en el sitio de unión de dicho receptor. (Figura 70)

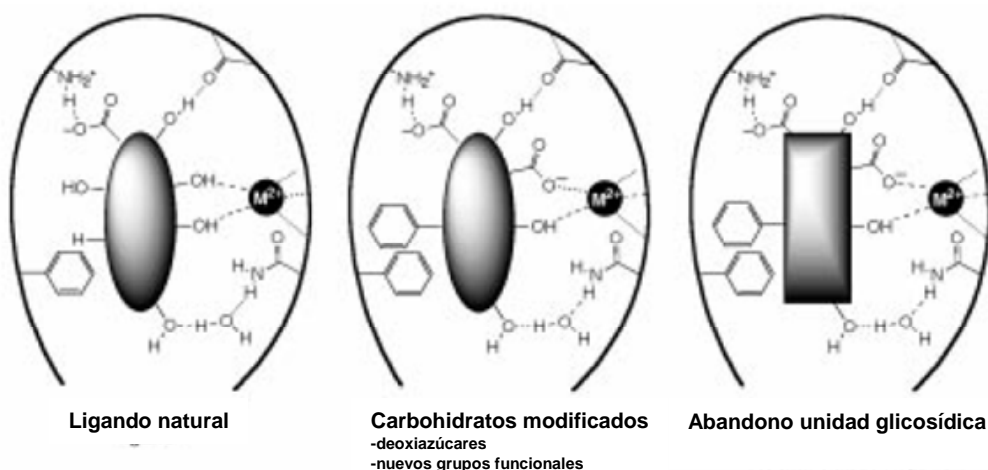


Figura 70. Representación esquemática de las estrategias generales para el diseño de carbohidratos miméticos.

Una segunda aproximación para la preparación de mímicos de carbohidrato es el abandono de la unidad glicosídica por completo, y en su lugar, se utilizaría un nuevo fragmento que no fuera un carbohidrato. (Figura 70) Esto requiere la presencia de grupos funcionales que deberían tener la misma disposición espacial que la que presentarían las estructuras a las que mimetizan. Esto se ha logrado, fundamentalmente, de cuatro maneras. Un primer tipo de glicomimético “inerte” conlleva la sustitución del oxígeno exocíclico de un glicósido, el oxígeno anomérico, por un grupo metileno para dar lugar a los denominados C-glicósidos. (Figura 71) Un segundo tipo sería aquel en el que se ha sustituido el oxígeno endocíclico por un grupo metileno (carbaazúcar). El tercer grupo es el formado por los aza-azúcares, que son el resultado de sustituir el oxígeno endocíclico del anillo por un átomo de nitrógeno. Por último, otro gran grupo es el de los tioglicósidos, en el que se sustituye el oxígeno de la posición anomérica por un átomo de azufre. (Figura 71) En este caso, nuevos

grupos hidrofóbicos o grupos que presenten carga deben ser incorporados para incrementar la afinidad. (Figura 70)

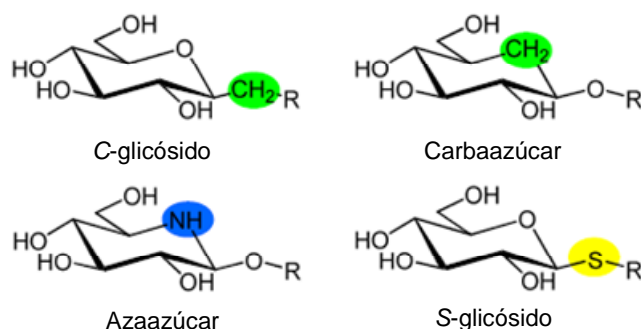


Figura 71. Representación de diferentes glicomiméticos en los que se abandona la unidad glicosídica.

En este apartado se presenta la síntesis de un glicomimético que contiene una estructura análoga al disacárido Man α 1,2Man, presente en los extremos no reductores de la estructura de *high mannose*. (Figura 72) Este trabajo se desarrolló durante una estancia realizada en el Departamento de Química Orgánica e Industrial de la Universidad de Milán, bajo la dirección de la profesora Anna Bernardi.

Para la preparación de este mimético del disacárido Man α 1,2Man se ha utilizado la segunda aproximación para la síntesis de glicomiméticos, es decir, el diseño de un nuevo fragmento que no sea un carbohidrato, en concepto de sustitución de una unidad constitutiva. En nuestro caso, se llevó a cabo la sustitución de la manosa del extremo reductor del disacárido por una unidad de ciclohexanodiol conformacionalmente estable, el diol trans-diaxial [(1*S*,2*S*,4*S*,5*S*)-dicarboxiciclohexanodiol].¹¹² (Figura 72)

¹¹² Bernardi, A.; Arosio, D.; Dellavecchia, D.; Micheli, F.; *Tetrahedron: Asymm.*, **1999**, *10*, 3043-3047.

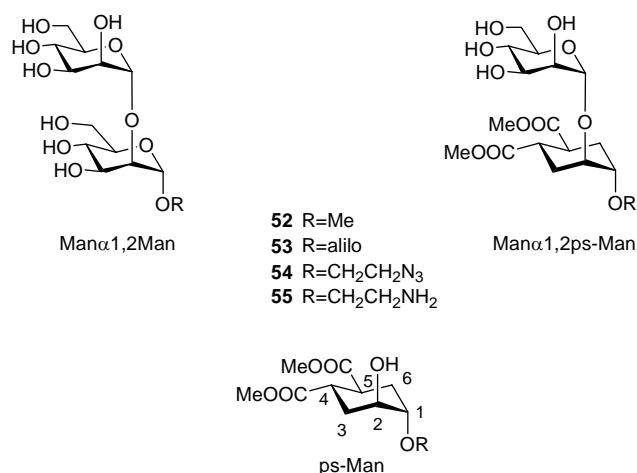


Figura 72. Estructura del pseudodisacárido *Manα1,2ps-Man*, del disacárido *Manα1,2Man* y numeración del fragmento *ps-Man*.

Los estudios de cálculos computacionales y de RMN en disolución realizados con anterioridad por el grupo de la profesora Anna Bernardi con un compuesto libre similar, el compuesto **53**, confirmaron que este tipo de glicomiméticos (**52-55**), efectivamente, tiene el mismo comportamiento conformacional que el disacárido natural *Manα1,2Man*, pero exhiben un incremento en la estabilidad frente a la degradación por enzimas manosidasas.¹¹³

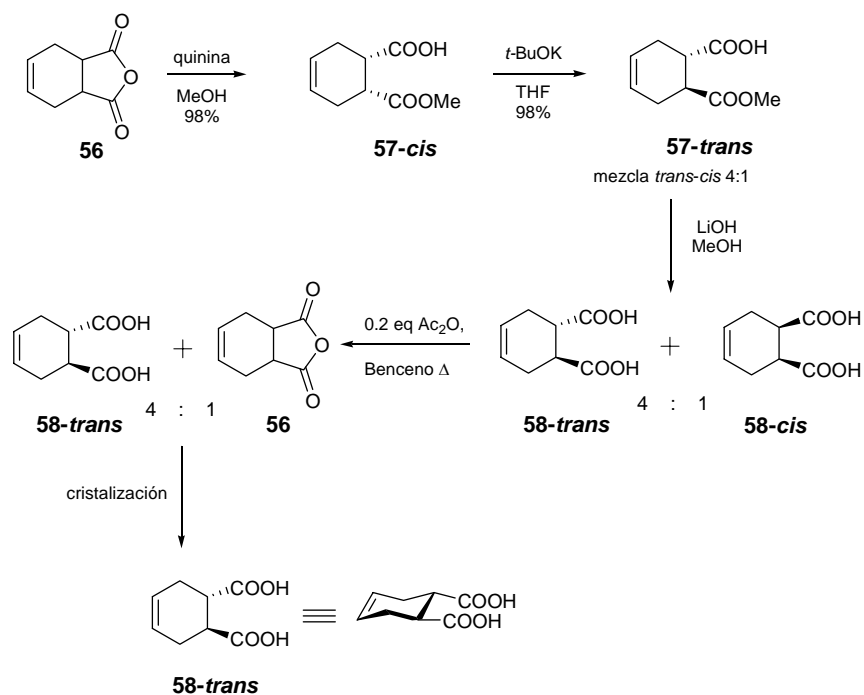
El pseudodisacárido es, por tanto, un buen candidato para realizar los estudios de interacción con la lectina DC-SIGN utilizando RMN en disolución y cálculos computacionales de docking.

5.2.2 Síntesis del disacárido mimético **55**.

Como modelo de pseudodisacárido se eligió el glicomimético **55** que presentaba en la posición anomérica un pequeño espaciador, el mismo que se ha utilizado en la síntesis de los oligosacáridos descritos anteriormente. Este espaciador permitirá la preparación de los correspondientes sistemas multivalentes. La primera etapa de la síntesis del disacárido mimético **55**,

¹¹³ Mari, S.; Posteri, H.; Gilles, M.; Potenza, D.; Micheli, F.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Bernardi, A.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 5119-5125.

consistió en la preparación del ácido (1*S*,2*S*)-*trans*-ciclohex-4-eno-1,2-dicarboxílico **58-*trans***, que es un intermedio común para la síntesis de miméticos de diferentes carbohidratos. Esta síntesis ha sido previamente descrita por el grupo de Anna Bernardi y col.,¹¹³ utilizando como producto de partida el anhídrido tetrahidroftálico comercial **56**, como se muestra en el esquema 28.



Esquema 28. Síntesis estereoselectiva del ácido (1*S*,2*S*)-*trans*-ciclohex-4-eno-1,2-dicarboxílico (**58-*trans***).

El tratamiento del anhídrido comercial **56** con MeOH a -50 °C, en presencia de 1.1 equiv. de quinina y utilizando como disolvente una mezcla tolueno-CCl₄ (1:1) durante 24 horas proporcionó de forma enantioselectiva el monoácido **57-*cis***, con un rendimiento del 98% y un exceso enantiomérico (e.e.) del 89%. (Esquema 28) El crudo del monoácido se utilizó sin posterior purificación en la siguiente etapa de la síntesis. La base quiral (quinina) se recuperó de forma cuantitativa por tratamiento con NaOH 3M, pudiendo reutilizarse nuevamente para el mismo tipo de reacción. Esta reacción se puede

realizar en escala multigramo con rendimientos casi cuantitativos y con una elevada estereoselectividad.

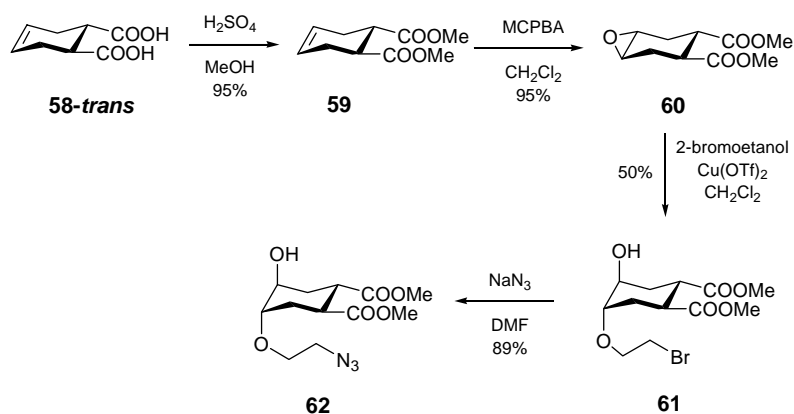
La epimerización del monoácido **57-cis** con *t*BuOK a 0°C durante 1h y utilizando THF como disolvente, proporcionó una mezcla de isómeros *trans:cis*, (4:1) del compuesto **57**, descrito anteriormente por Seebach y colaboradores.¹¹⁴ La separación de la mezcla de los dos isómeros anteriores no se realizó en esta etapa. El éster metílico se hidrolizó utilizando LiOH en una mezcla metanol-H₂O (3:1) a temperatura ambiente y en agitación durante 2 horas, para obtener el diácido deseado **58-trans** junto con un 20% del isomero **58-cis**. El isomero **58-cis** se transformó selectivamente en el producto de partida (ácido tetrahidroftálico **56**) por tratamiento de la mezcla con 0.2 equiv. de Ac₂O en benceno a reflujo durante 2 horas. Bajo estas condiciones el diácido **58-trans** no sufre ninguna transformación y se pudo aislar del crudo de reacción por cristalización en benceno con un 80% de rendimiento. (Esquema 28)

La secuencia completa de síntesis no requiere ninguna etapa de purificación, y puede realizarse en escala multigramo en pocos días, con un rendimiento global del 60%.

A partir del diácido **58-trans** se sintetizó el derivado **62**, que es el fragmento no natural componente del disacárido mimético objetivo **55**. (Esquema 29) Para completar la síntesis de esta unidad, primeramente se realizó la metilación de los ácidos carboxílicos usando H₂SO₄ en metanol. La disolución se agitó a reflujo durante 20 horas, obteniéndose el derivado **59** con un 95% de rendimiento. El análisis del producto por ¹H-RMN mostró la aparición de un singlete a 3.70 ppm correspondiente a los dos grupos metilo. La oxidación del doble enlace del compuesto **59** en condiciones de epoxidación por tratamiento con ácido metacloroperbenzóico (MCPBA) durante 3 horas a temperatura ambiente y utilizando CH₂Cl₂ como disolvente proporcionó el epóxido **60** con un rendimiento del 95% después de su purificación por cromatografía en columna de

¹¹⁴ Ito, Y. N.; Ariza, X.; Beck, A. K.; Bohac, A.; Ganter, C.; Gawley, R. E.; Kuehnle, F. N.; Tuleja, J.; Wang, Y.-M.; Seebach, D.; *Helv. Chim. Acta*, **1994**, *77*, 2071-2110.

gel de sílice. La siguiente etapa de la síntesis fue la apertura del epóxido **60** usando 2-bromoetanol como nucleófilo. Anteriormente, se había realizado esta apertura del epóxido **60** usando como nucleófilo y a la vez como disolvente, el alcohol alílico y utilizando $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ como ácido de Lewis, obteniéndose el producto deseado con un rendimiento del 98%.¹¹³



Esquema 29. Síntesis del derivado **62**, a partir del diácido **58-trans**.

En cuanto al uso del 2-bromoetanol como nucleófilo, esta apertura fue una de las etapa clave de la síntesis, porque no se pudo conseguir llegar al producto deseado con un buen rendimiento. La apertura del epóxido puede ser catalizada por un gran número de ácidos de Lewis,¹¹⁵ y debido a la estabilidad conformacional del 1,2-*trans*-dicarboxilciclohexano, solo se puede obtener la apertura del epóxido por ataque axial. Se realizaron pruebas de apertura usando como ácidos de Lewis el $\text{Mg}(\text{OTf})_2$ y el $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ en diferentes condiciones, obteniéndose el mejor resultado cuando se usó 0.1 eq/mol de $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ en CH_2Cl_2 durante 3h, así se obtuvo el derivado **61** con un rendimiento del 50%. Como dato más significativo en su espectro de ^1H -RMN se observó la aparición de un triplete a 3.01 ppm correspondiente al grupo metileno unido al bromo del espaciador. También por ^{13}C -RMN se observó la aparición de dos nuevas señales

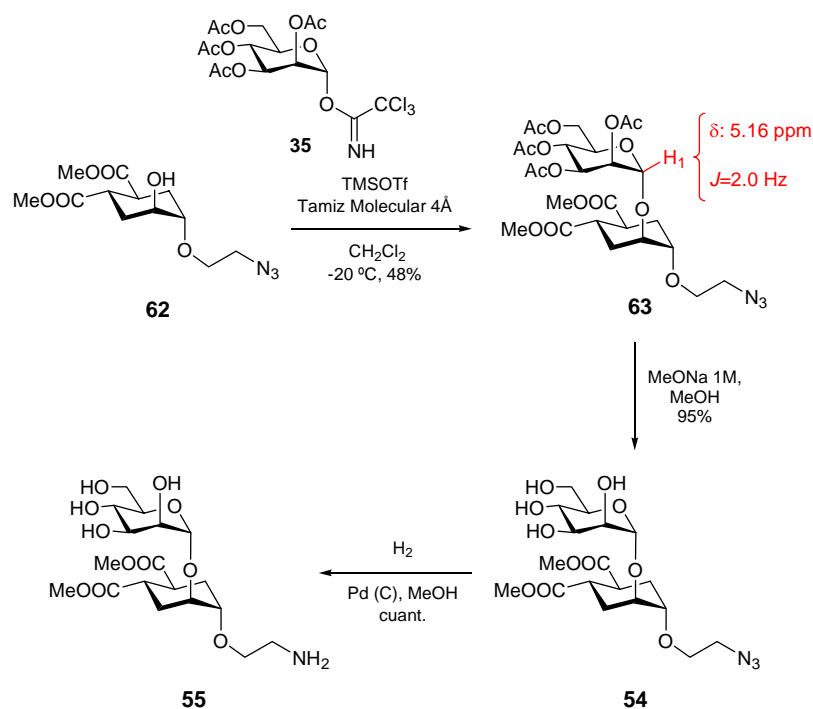
¹¹³ Mari, S.; Posteri, H.; Gilles, M.; Potenza, D.; Micheli, F.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Bernardi, A.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 5119-5125.

¹¹⁵ Bernardi, A.; Arosio, D.; Manzini, L.; Micheli, F.; Pasquarello, A.; Seneci, P.; *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 6209-6216.

a 30.8 y 68.8 ppm correspondientes a los dos carbonos metilénicos del espaciador unidos a Br y oxígeno respectivamente.

Finalmente, la sustitución del bromo por azida usando NaN_3 en DMF al 50% durante 24 horas nos proporcionó el derivado deseado **62** con un rendimiento del 89%. El análisis de este compuesto por ^{13}C -RMN nos muestra la aparición de una nueva señal correspondiente a un átomo de carbono unido a un grupo azida a 55.9 ppm.

Para finalizar la síntesis del disacárido mimético **55**, (esquema 30) se realizó la etapa de glicosidación usando como donador de glicosilo el tricloroacetimidato de tetraacetilmanosa **35** (que se describe en el apartado anterior) y usando como promotor el TMSOTf. Las primeras condiciones usadas fueron 25% de TMSOTf en CH_2Cl_2 a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. En estas condiciones se observó la formación del ortoéster a los 10 minutos de la reacción, debido al ataque nucleófilo del hidroxilo libre en la posición 2 del compuesto **35** al grupo acetato de la posición 2. Utilizando un 40% de promotor en CH_2Cl_2 a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ se obtuvo el producto deseado **63** con un rendimiento del 48%, después de la purificación por cromatografía en columna. Se puede observar por ^1H -RMN para el compuesto **63** la señal correspondiente al H_1 de la unidad de manosa del glicomimético que aparece a 5.16 ppm como doblete con una constante de acoplamiento $J=2.0\text{ Hz}$ indicando una disposición *trans*-diecuatorial entre los protones H_1 y H_2 de la unidad de manosa y confirmando que el isómero que se había formado en la etapa de glicosidación era el isómero α .



Esquema 30. Síntesis del disacárido mimico **55** a partir del derivado **62**.

El pseudodisacárido **55** se obtuvo finalmente mediante la desprotección de los grupos acetatos usando NaOMe en MeOH y la reducción del grupo azida a grupo amino con Pd sobre carbono en atmósfera de hidrógeno usando como disolvente metanol. (Esquema 30) La estructura del pseudodisacárido **55** se confirmó de forma inequívoca por $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ y espectrometría de masas.

5.2.3 Estudios de la interacción del pseudodisacárido con DC-SIGN utilizando docking y RMN (Transfer-NOE y STD).

Anteriormente a la síntesis del pseudodisacárido **55** que presenta un espaciador corto con un grupo amino en la posición anomérica, el grupo de la profesora Bernardi había realizado la síntesis de un compuesto similar, el carbohidrato mimético **53**, que presentaba como espaciador un grupo alilo. Con este compuesto se realizaron estudios conformacionales y de estabilidad que sirvieron como punto de partida para los estudios de docking y RMN que se

presentan en esta Tesis Doctoral. A continuación, se comentarán los datos más significativos de estos estudios que son de relevancia para este capítulo.

5.2.3.1 Estudios conformacionales y de estabilidad del disacárido mimético **53**.

Con el compuesto **53** se realizó un estudio conformacional en el que se comparaba este compuesto con el disacárido natural $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$. El disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ había sido ampliamente estudiado tanto en su forma libre como formando parte de la estructura de oligosacáridos más complejos como $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.¹¹⁶ Los resultados que se obtuvieron tanto experimentales como de los cálculos computacionales¹¹⁷ para el disacárido natural sugieren una unión entre las dos unidades de manosa presentando dos conformaciones distintas con valores muy similares para el ángulo Φ y diferentes valores para el ángulo Ψ , que se interconvierten lentamente. Las dos conformaciones se han denominado apilada o S (del inglés stacked), y extendida o E (del inglés extend). Ambas se pueden observar en las estructuras de rayos X de oligosacáridos de manosa y se pueden distinguir en RMN en disolución por 3 contactos típicos de NOE que se pueden observar a través del enlace glicosídico. (Figura 73)^{117b}

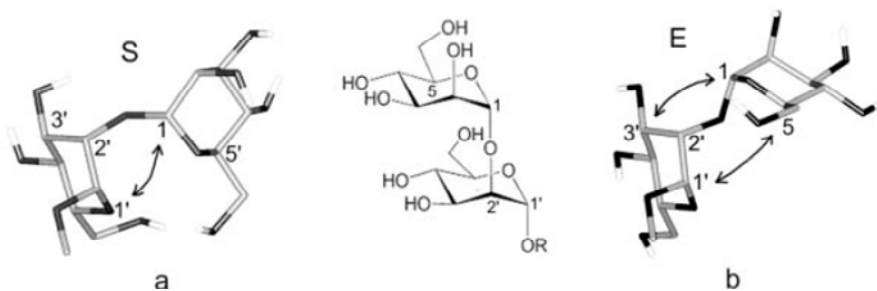


Figura 73. Conformaciones de mínima energía del disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$: (a) conformación apilada S ($\Phi=88^\circ$, $\Psi=-58^\circ$); (b) conformación extendida E ($\Phi=72^\circ$, $\Psi=-138^\circ$). Los contactos NOE característicos están representados por flechas.

¹¹⁶ Woods, R. J.; Pathiaseril, A.; Wormald, M. R.; Edge, C. J.; Dwek, R. A.; *Eur. J. Biochem.*, **1998**, 259, 372-386.

¹¹⁷ (a) Bernardi, A.; Colombo, A.; Sánchez-Medina, I.; *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 967-973.
(b) Wormald, M. R.; Petrescu, A. J.; Pao, Y.-L.; Glithero, A.; Elliot, T.; Dwek, R. A.; *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 371-386.

Estos mismos cálculos se llevaron a cabo para el disacárido mimético **53**, utilizando el campo de fuerzas AMBER y modelos de solvatación GB/SA. Los resultados obtenidos se representan en la siguiente figura 74.

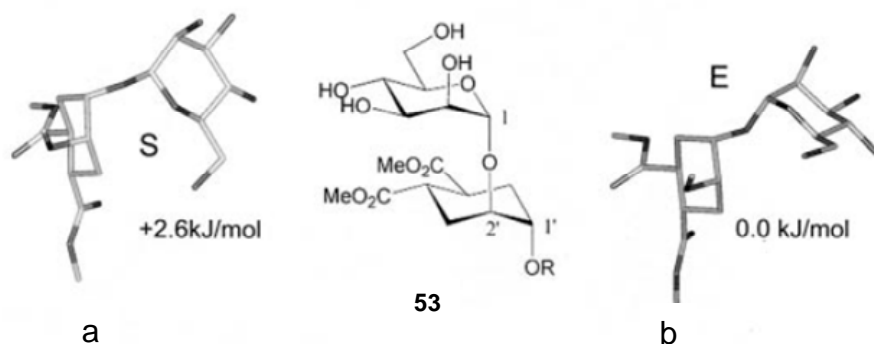


Figura 74. Conformaciones de mínima energía del disacárido mimético **53**: (a) Conformación apilada S ($\Delta E = 2.6$ KJ/mol; $\Phi = 94^\circ$, $\Psi = -72^\circ$); (b) Conformación extendida E ($\Phi = 70^\circ$, $\Psi = -117^\circ$).

La dinámica de simulación mostró que las dos conformaciones del pseudodisacárido **53**, tanto la apilada (S) como la extendida (E) están en un equilibrio dinámico rápido, a través del enlace glicosídico. Comparándolo con el disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$, el glicomimético tiene mayor predisposición a presentar una conformación extendida (E). En resumen, la dinámica molecular confirmó que el pseudodisacárido **53** podría ser utilizado como mimico estructural del disacárido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$.

Estudios de RMN en disolución del compuesto mimético **54** utilizando experimentos NOESY permitieron determinar la presencia de los dos conformeros S y E en equilibrio rápido. Las dos series de NOE exclusivos para cada una de las conformaciones se observaron en el espectro, el $\text{H}_1\text{-H}_{1'}$, contacto original de la conformación S y el $\text{H}_1\text{-H}_{3'}$ y el $\text{H}_5\text{-H}_{1'}$, contactos originales de las conformaciones E. (Figura 75)

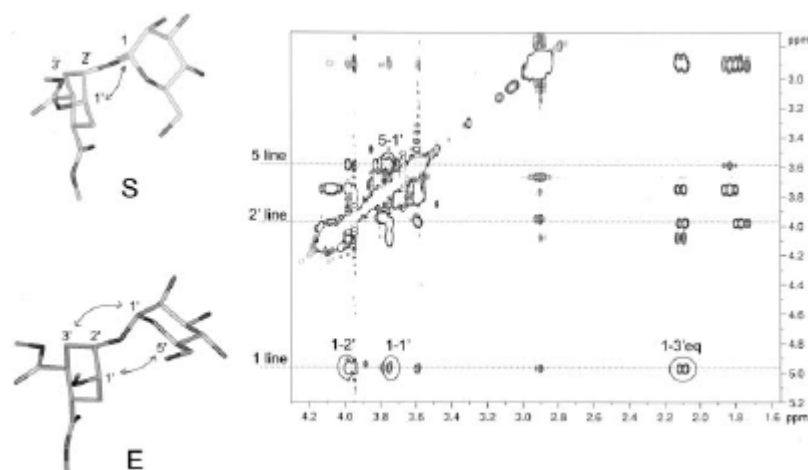


Figura 75. Espectro NOESY del disacárido mimico **54** donde se puede observar la coexistencia de las dos conformaciones E y S.

También se realizaron estudios de estabilidad del glicomimético **53** frente a la hidrólisis enzimática por manosidasas,¹¹³ en el grupo del Prof. Cañada, del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC-Madrid). Esta es una de las características importantes que se citan normalmente como ventaja de los glicomiméticos frente a los oligosacáridos naturales en el desarrollo de fármacos. En estos estudios se determinó que la estabilidad que presentaba este tipo de miméticos frente a la degradación por manosidasas es significativamente mayor que la estabilidad del oligosacárido natural (6 veces más estable).

5.2.3.2. Estudios de RMN en disolución del disacárido mimético **54** con la lectina DC-SIGN.

Los estudios de Docking y de RMN que se presentan en este apartado han sido realizados por las Dras. Silvia Mari, Donatella Invernizzi y Anna Bernardi del Departamento de Química Orgánica e Industrial de la Universidad de Milán y por el Dr. Pedro M. Nieto del Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC, Sevilla).

¹¹³ Mari, S.; Posteri, H.; Gilles, M.; Potenza, D.; Micheli, F.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Bernardi, A.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 5119-5125.

Para los estudios de RMN en disolución se seleccionó el glicomimético **54** como producto más adecuado, debido a que el disacárido mímico **53** con el espaciador alilo, que había sido utilizado con anterioridad en los estudios conformacionales y de estabilidad podría presentar una interacción no específica entre el grupo alilo y la lectina DC-SIGN (como ya hemos observado en otro caso). La interacción del disacárido mímico **54** con el dominio extracelular (ECD) de DC-SIGN se estudió por espectroscopía de RMN a 600 MHz. Primeramente, se realizó la adición del dominio extracelular de la proteína DC-SIGN a una disolución 2 mM del pseudodisacárido **54** en D₂O (d-Tris buffer, pH 8, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂) esto provocó un ensanchamiento de las señales del espectro de ¹H-RMN del compuesto **54**, indicativo de que se había producido una interacción entre el carbohidrato mimético **54** y el receptor DC-SIGN.

Los estudios que se realizaron para el disacárido mimético **54** fueron similares a los llevados a cabo para los di- y trisacáridos de manosa que se han presentado anteriormente. En este caso también nos encontramos en las condiciones en las que el intercambio entre el estado libre y el enlazado para el compuesto **54** con la proteína era suficientemente rápido en comparación con la escala de tiempo de RMN, por lo que se pudieron realizar los experimentos de Transfer-NOE y STD.

Los experimentos de STD se llevaron a cabo para el compuesto **54** en presencia del ECD de DC-SIGN (50:1, ligando:receptor). El espectro diferencia, que se puede observar en la figura 76c, muestra claramente las señales de resonancia que pertenecen tanto a la unidad de manosa como a la unidad de ciclohexanodiol. Estos datos confirmaron, en primer lugar, que el disacárido mimético **54** interaccionaba con la lectina DC-SIGN y, además, nos indicaba que el compuesto **54** estaba en contacto cercano con dicha proteína. En este caso, la cuantificación de los datos obtenidos en el espectro de STD para determinar qué fragmento del disacárido mimético **54** interacciona de manera más intensa con la proteína fue muy difícil, ya que, como se puede observar en la figura 76, muchas de las señales correspondientes a los protones del compuesto aparecen solapadas en el experimento de STD.

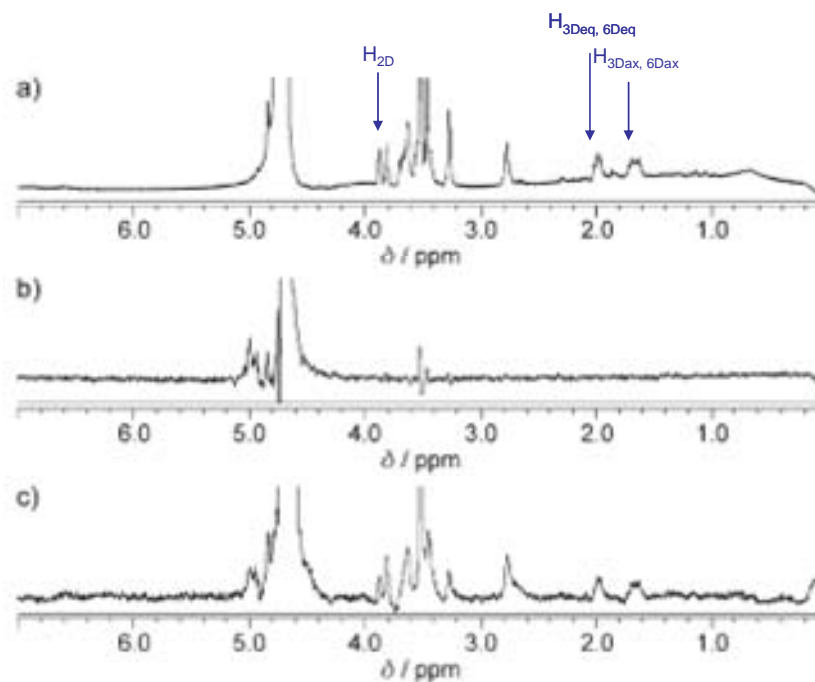


Figura 76. (a) Espectro de ^1H -RMN del compuesto **54**. (b) Experimento de STD del compuesto **54** sin la lectina DC-SIGN, utilizado como referencia (c) Experimento de STD del compuesto **54** en presencia de la lectina DC-SIGN.

El proceso de interacción se analizó también utilizando experimentos de Transfer-NOESY. Los picos de cruce con el mismo signo a los de la diagonal se observaron claramente a 288 K, confirmando nuevamente la interacción entre DC-SIGN y el ligando (Figura 77). En el estado libre, el pseudodisacárido **54** presenta dos conformaciones distintas, E y S, cada una de ellas caracterizada por un pico de cruce representativo.¹¹³ Estos dos picos se pueden observar en el espectro de Transfer-NOESY que se representa en la figura 77 sugiriendo que ambos conformeros pueden interaccionar con la proteína. Sin embargo, la presencia de ruido procedente de la difusión de espín en el espectro no nos permitió determinar de forma clara cual de las conformaciones del ligando era la preferente en el sitio de unión.

¹¹³ Mari, S.; Posteri, H.; Gilles, M.; Potenza, D.; Micheli, F.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Bernardi, A.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 5119-5125.

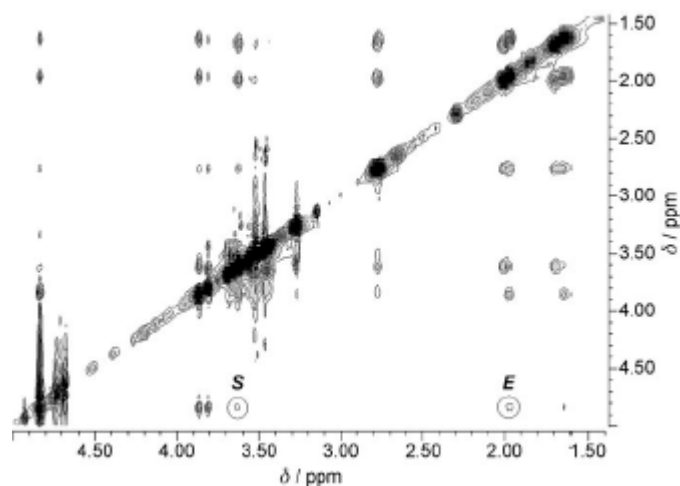


Figura 77. Experimento de Transfer-NOESY del compuesto **54** con el receptor DC-SIGN. Se indican los picos NOE correspondientes a las dos conformaciones E y S en el estado enlazado.

5.2.3.3 Estudios de docking del disacárido mímico **52** con la lectina DC-SIGN.

Para obtener un modelo de la estructura del complejo DC-SIGN con el disacárido mímico **52**, se llevaron a cabo estudios de docking tomando como estructura de partida la publicada para el complejo de DC-SIGN con Man₄ (Man α 1,3[Man α 1,6]Man α 1,6Man).¹¹⁸ Como se indicó anteriormente, en disolución acuosa los pseudodisacáridos **54** y **55** adoptan dos conformaciones distintas que se intercambian rápidamente y que difieren en el ángulo diedro alrededor del enlace inter(pseudo)glicosídico C1-O1-C2'-C1'. Estas estructuras son equivalentes a las estructuras extendidas (E) y apilada (S) descritas anteriormente para el pseudodisacárido **54**. Las dos estructuras, tanto la apilada (S) como la extendida (E) se usaron como punto de partida para los experimentos de docking. Se escogió el metil glicósido **52** (R=Me) como el modelo más conveniente para los cálculos computacionales.

¹¹⁸ Gou, Y.; Feinberg, H.; Conroy, E.; Mitchell, D. A.; Alvarez, R.; Blixt, O.; Taylor, M. E.; Weis, W. I.; Drickamer, K.; *Nat. Struc. Mol. Biol.*, **2004**, *11*, 591-598.

Todos los complejos obtenidos del docking mantienen la interacción entre el átomo de Ca^{2+} y los grupos hidroxilo de las posiciones 2 y 3 de la unidad de manosa natural situada en el extremo no reductor. En este caso particular, la parte no natural del compuesto no presenta grupos hidroxilo que puedan coordinarse con el Ca^{2+} del CRD de DC-SIGN y, por tanto, es la manosa del extremo no reductor la que se une a dicho ión calcio. Aunque en el caso del disacárido natural, el modo de enlace mayoritario es aquel que presenta la manosa del extremo reductor coordinada con el calcio, se ha puesto de manifiesto que otros modos de enlace minoritarios son factibles y participan en el proceso de reconocimiento molecular. El caso particular de este glicomimético pone en evidencia las posibilidades que presenta este receptor a la hora de diseñar nuevos ligandos, asumiendo que diferentes modos de enlace pueden tener lugar. Del análisis del complejo usando los ángulos diedros Φ y Ψ se determinó que el complejo más favorecido es aquel en el que el pseudodisacárido **52** presentaba una conformación apilada (S); (figura 78a) el segundo complejo más favorecido era el que presentaba una conformación extendida (E) del ligando. (Figura 78b)

Adicionalmente, se observó una tercera conformación distorsionada que presentaba un valor de $\Phi=156^\circ$. (Figura 78c) Los α -glicósidos como **52** están sometidos a un fuerte efecto exo-anomérico que fuerza al ángulo Φ a adoptar una conformación gauche.¹¹⁹

¹¹⁹ Rao, V. S. R.; Qasba, P. K.; Balaji, P. V.; Chandrasekaran, R.; *Conformation of carbohydrates*, Harwood Academics Publishers, Amsterdam, **1998**.

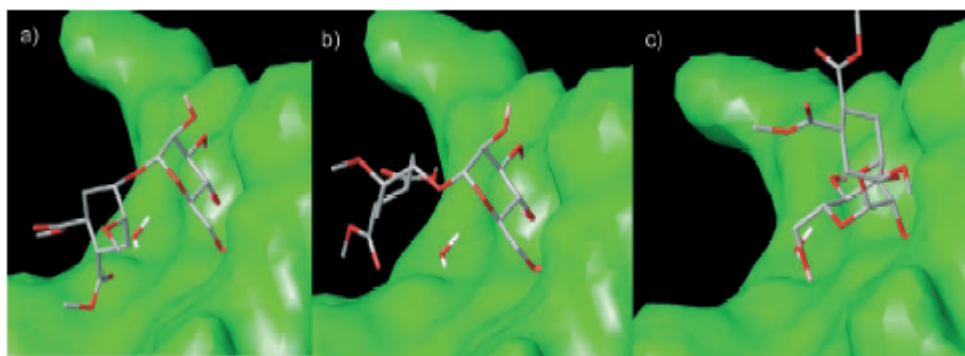


Figura 78. (a) *Conformación más favorecida del proceso de docking para el pseudodisacárido 52 formando complejo con DC-SIGN; (b) conformación extendida de 52 con DC-SIGN; (c) conformación distorsionada de 52 con DC-SIGN.*

A partir de todos los datos mencionados anteriormente podemos concluir que el pseudodisacárido **55** que se ha desarrollado en la presente Tesis Doctoral, presenta una gran similitud conformacional con el disacárido natural $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ e interacciona con la lectina DC-SIGN de forma eficiente, como se ha demostrado tanto por RMN (utilizando experimentos de STD y Transfer-NOE) así como utilizando cálculos computacionales de docking. Por lo tanto, el compuesto **55** puede ser considerado un buen candidato para el desarrollo de sistemas multivalentes efectivos que bloqueen el receptor DC-SIGN.

5.3 Actividad antiviral de los compuestos monovalentes oligosacáridicos 45, 48, 51, y del glicomimético 55.

Antes de llevar a cabo la preparación de los sistemas glicodendríticos monodispersos con los ligandos que se han estudiado en el capítulo anterior, se evaluó la actividad antiviral de estos compuestos como sistemas monovalentes. Con estos experimentos se pretendía llevar a cabo la selección del ligando que presentara mayor afinidad por DC-SIGN y que pudiera actuar de forma más eficiente como agente antiviral bloqueando el receptor DC-SIGN. Estos estudios permitirían seleccionar el mejor ligando para preparar el correspondiente sistema multivalente.

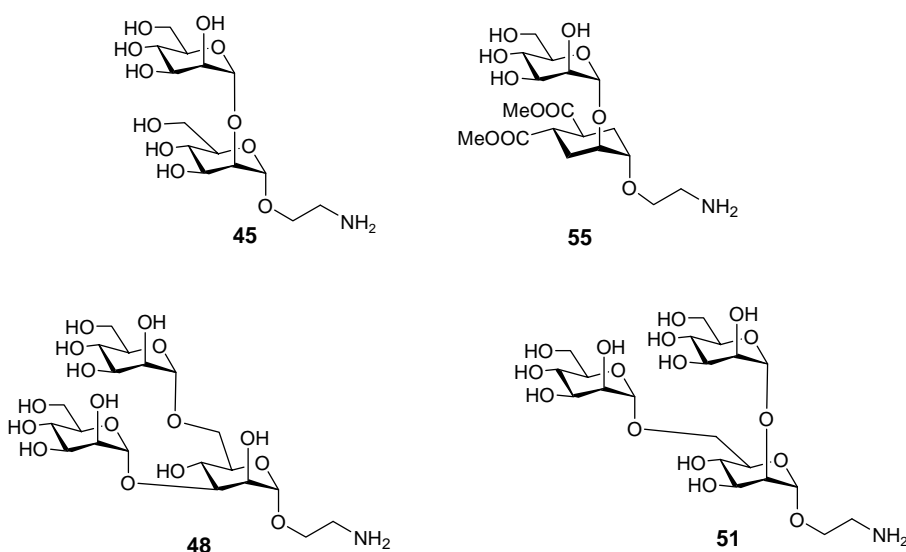


Figura 79. Estructura de los compuestos monovalentes que se han estudiado en los experimentos de infección.

La actividad antiviral de los compuestos 45, 48, 51 y 55 (figura 79) se evaluó utilizando un modelo de infección viral en *cis* basado en el uso de partículas pseudotipadas del virus del Ébola y células Jurkat que expresan DC-SIGN. Estas células son permisivas a este tipo de virus y este modelo de infección viral ha sido usado previamente por nuestro grupo de investigación satisfactoriamente para estudiar la actividad antiviral de los sistemas

glicodendríticos de manosa BH30sucMan, BH20sucMan. (Ver capítulo antecedentes y objetivos)

De forma resumida, estos experimentos de inhibición en *cis* consistieron en la incubación de las partículas virales pseudotipadas del Ébola con las células Jurkat que expresan DC-SIGN en presencia de los compuestos **45**, **48**, **51** y **55**. Tras 48 horas, se lavaron las muestras para eliminar del medio las partículas virales que no habían interactuado y finalmente se llevó a cabo un ensayo de actividad de luciferasa (enzima expresado por las células infectadas) añadiendo luciferina como ya se ha comentado en detalle en el capítulo de antecedentes y objetivos.

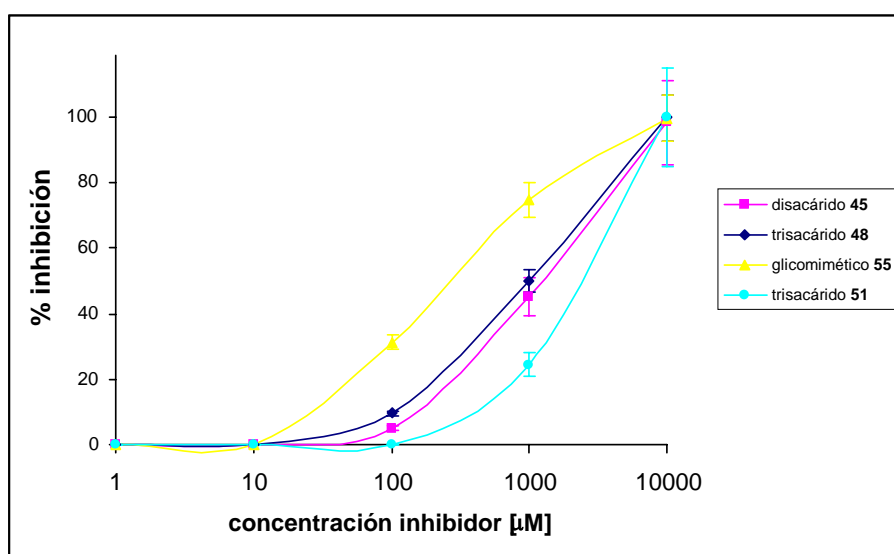


Figura 80. Representación gráfica de los resultados de inhibición de la infección para los compuestos **45**, **48**, **51** y **55**.

Los resultados que se obtuvieron para los compuestos **45**, **48**, **51** y **55** se recogen en la gráfica de la figura 80. El pseudodisacárido **55** fue el compuesto que presentó una inhibición de la infección más significativa, calculándose un IC_{50} de 0.62 mM. Este valor es aproximadamente tres veces menor que el valor de IC_{50} estimado para el disacárido natural **45** (1.91 mM). En el caso de los trisacáridos **48** y **51**, no se pudo obtener un valor cuantitativo de IC_{50} para

ninguno de los dos casos. Aunque, si se analiza la gráfica de la figura 80, se puede observar que el trisacárido **48** presenta una capacidad de inhibición del mismo orden que la que presenta el disacárido natural **45**. En cambio, el trisacárido **51** presenta una inhibición de la infección en *cis* menor que los otros compuestos ensayados. (Figura 81) Hay que señalar que en el caso de los trisacáridos, los experimentos se realizaron una única vez para cada concentración y, por lo tanto, dichos experimentos no son estadísticamente significativos. Además, estos compuestos presentaron toxicidad a concentraciones elevadas en los estudios de infección, impidiendo obtener valores cuantitativos de IC₅₀ para dichos trisacáridos.

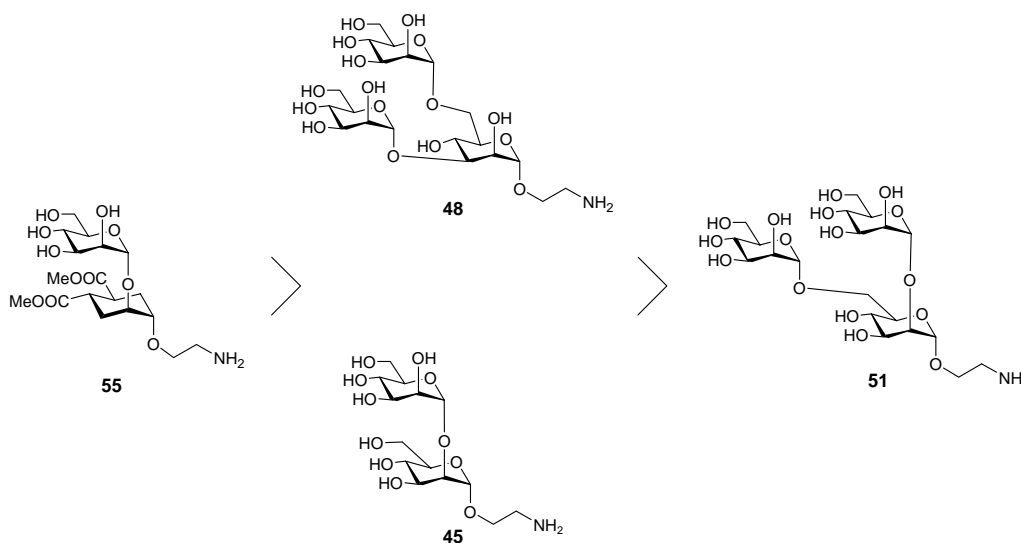


Figura 81. Representación de los ligandos ordenados en función de su actividad antiviral.

Los resultados cualitativos obtenidos para el trisacárido **51** ponen de relieve que los datos computacionales obtenidos en los estudios de docking no coinciden con los datos experimentales. Sin embargo, estos datos de actividad antiviral concuerdan con los datos obtenidos experimentalmente por RMN, donde los experimentos de STD preveían una mejor interacción del trisacárido **48** con DC-SIGN que la del trisacárido **51**.

Podemos decir que los estudios llevados a cabo usando un modelo de infección del virus del Ébola, nos indican que el pseudodisácarido **55** es probablemente el mejor candidato de los estudiados para la preparación de compuestos multivalentes que presenten una alta afinidad y que puedan bloquear al receptor DC-SIGN. Además, este tipo de compuestos presentan ventajas adicionales en términos de estabilidad frente a glicosidasas, convirtiéndolos en unos ligandos muy interesantes para el desarrollo de nuevos compuestos antivirales con potenciales aplicaciones *in vivo*.

**6. SISTEMA MULTIVALENTE MONODISPERSO DE 3^a
GENERACIÓN FUNCIONALIZADO CON EL
PSEUDODISACÁRIDO 55**

6.1 Sistema multivalente monodisperso de 3ª generación funcionalizado con el pseudodisacárido 55. Síntesis y actividad biológica.

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios de RMN, docking y en los experimentos de infección con los diferentes ligandos monovalentes se pudo concluir que, de todos los ligandos que se han preparado durante la presente Tesis Doctoral, el compuesto más interesante era el pseudodisacárido **55**.

Por otro lado, este compuesto presentaba una actividad antiviral en los ensayos de inhibición de infección en *cis* con partículas pseudotipadas del virus del Ébola muy significativa. Además, era un compuesto asequible sintéticamente y que presentaba una elevada estabilidad frente a la degradación enzimática.¹¹³

Sin embargo, y como era de esperar para este tipo de interacción carbohidrato-proteína, el pseudodisacárido **55** como sistema monovalente presentaba una afinidad baja por el receptor DC-SIGN. Por tanto, era necesario preparar el correspondiente sistema multivalente para obtener afinidades mucho más elevadas. En este sentido, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente en el grupo de investigación, se consideró adecuado usar el sistema dendrítico de 3ª generación que permitiría introducir en su superficie 32 unidades de este pseudodisacárido **55**.

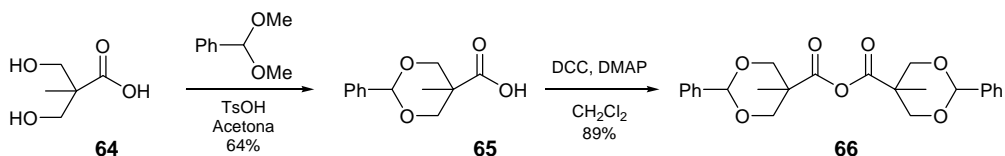
El polímero dendrítico Boltorn usado anteriormente es un polímero polidisperso que aunque comercial y barato, presenta el inconveniente de ser una mezcla de compuestos y, por este motivo, puede dificultar la reproducibilidad de los resultados, así como la interpretación de los mismos. Para solventar este problema, se decidió abordar la preparación de estos dendrímeros de 3ª generación mediante una síntesis iterativa por pasos que nos permitiera tener acceso a moléculas de estructura única y bien definida (sistemas monodispersos). Dependiendo del número de iteraciones que se realizan se pueden obtener las

¹¹³ Mari, S.; Posteri, H.; Gilles, M.; Potenza, D.; Micheli, F.; Cañada, F. J. ; Jiménez-Barbero, J. ; Bernardi, A.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 5119-5125.

diferentes generaciones para introducir un mayor o menor número (multivalencia) de carbohidratos en la superficie.

6.1.1 Síntesis de dendrímeros monodispersos basados en el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico.

Para la preparación de estos sistemas multivalentes dendríticos monodispersos se ha utilizado el ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico como monómero AB₂ y el 2,2-bis(hidroximetil)-1,3-propanodiol (pentaeritritol) como núcleo central de crecimiento. Dicha síntesis consistió en una aproximación divergente, es decir, se partió del núcleo central (pentaeritritol) y se fue incrementando el tamaño (la generación) del sistema a partir de este punto por reacción con el monómero AB₂ según se muestra en los esquema 32 y 33.¹¹⁹ Como módulo para el crecimiento del dendrímero se utilizó el anhídrido derivado del ácido 2,2 bis-(hidroximetil)propiónico protegido como benciliden acetal **66**. La síntesis de este anhídrido, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en la bibliografía,¹¹⁹ mediante la protección del grupo diol del ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico (**64**) con benzaldehído dimetilacetal y una cantidad catalítica de ácido *p*-toluensulfónico (TsOH) en acetona seca y posterior autocondensación del ácido **65** en CH₂Cl₂ usando DCC como agente de acoplamiento. (Esquema 31) El anhídrido **66** se purificó fácilmente por precipitación de la disolución de diclorometano añadiendo hexano y agitando vigorosamente.¹¹⁹

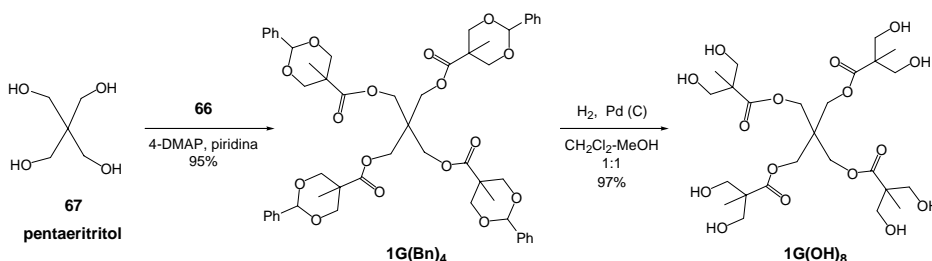


Esquema 31. Síntesis del anhídrido **66**.

El acoplamiento del anhídrido **66** con el núcleo pentaeritritol se realizó en las condiciones descritas en la bibliografía,¹¹⁹ usando 1.25 equivalentes del

¹¹⁹ Henrink, I.; Omayra, L.; de Padilla, J.; Fréchet, J. M. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5908-5917.

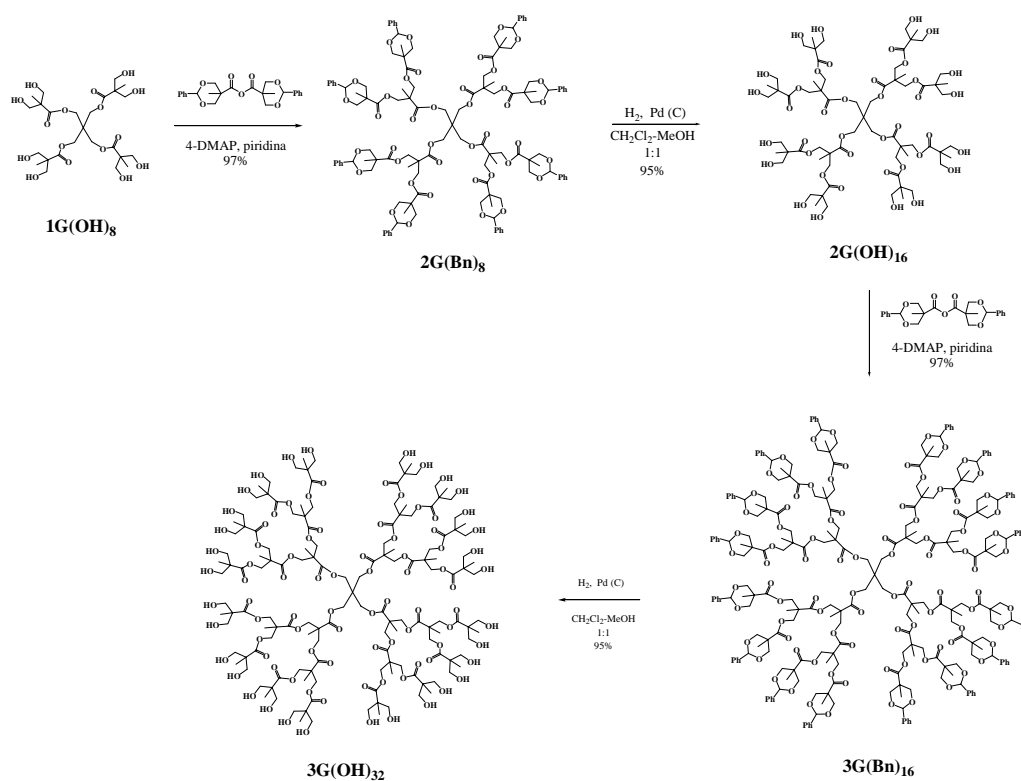
compuesto **66** por grupo hidroxilo que presentaba el pentaeritritol (**67**) utilizando una cantidad catalítica de DMAP en piridina como disolvente. De esta forma se obtuvo el dendrímero protegido de primera generación que hemos denominado **1G(Bn)₄** con un rendimiento del 95%. (Esquema 32) Este producto se purificó por recristalización.



Esquema 32. Síntesis del dendrímero de 1^a generación **1G(OH)₈**.

La siguiente etapa en la síntesis fue la desprotección de los grupos benciliden acetal del dendrímero **1G(Bn)₄** para obtener el dendrímero de 1^a generación con grupos hidroxilo libres **1G(OH)₈**, que nos permitirá continuar creciendo el dendrímero a la siguiente generación. La desprotección del benciliden acetal se consiguió con muy buenos rendimientos por hidrogenación, usando H₂ a presión atmosférica y 10% de Pd(C) como catalizador en CH₂Cl₂:MeOH (1:1) a temperatura ambiente durante 15 horas. Así se obtuvo el producto desprotegido **1G(OH)₈** con un 97% de rendimiento. (Esquema 32) El uso de esta combinación de disolventes en la reacción de hidrogenación se debió a que el producto de partida, el dendrímero **1G(Bn)₄**, no es soluble en MeOH, en cambio el producto final, el compuesto **1G(OH)₈**, no es soluble en CH₂Cl₂. Sin embargo, en esta mezcla de disolventes seleccionada, tanto el producto de partida como el producto final son solubles. La pureza del compuesto **1G(OH)₈** preparado de esta forma permite seguir adelante en la síntesis sin llevar a cabo ninguna etapa adicional de purificación. La preparación del compuesto **1G(OH)₈** a partir del núcleo de pentaeritritol fue realizada por la doctoranda Olivia Sánchez, del Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC, Sevilla.

Para la preparación de dendrímeros de tamaño mayor, se repitió de forma iterativa la secuencia de reacciones anteriormente comentadas (acoplamiento con el anhídrido **66** y desprotección del grupo benciliden acetal mediante hidrogenación). Las etapas iterativas se realizaron exactamente en las mismas condiciones que las descritas para la síntesis del dendrímero de 1ª generación **1G(OH)₈**. (Esquema 33) Para los dendrímeros **2G(Bn)₈** y **3G(Bn)₁₆** se usaron la mismas condiciones de recristalización, y no se necesitó ninguna etapa de purificación para los compuestos **2G(OH)₁₆** y **3G(OH)₃₂**. Este procedimiento es muy efectivo para la obtención de dendrímeros hasta la tercera generación de forma completamente monodispersa y sin aparición de errores estructurales, muy comunes en la síntesis de compuestos dendríticos. La integridad de los compuestos preparados se confirmó mediante técnicas espectroscópicas de ¹H-, ¹³C-RMN y espectrometría de masas (ESI). (Figura 82)



Esquema 33. Síntesis divergente del dendrímero de 3ª Generación **3G(OH)₃₂** monodisperso.

La ventaja de esta síntesis divergente es que se pueden preparar dendrímeros de 2^a y 3^a generación en escala multigramo, de forma simple, muy barata y obteniendo los productos con gran pureza, sin la necesidad de realizar purificaciones cromatográficas.

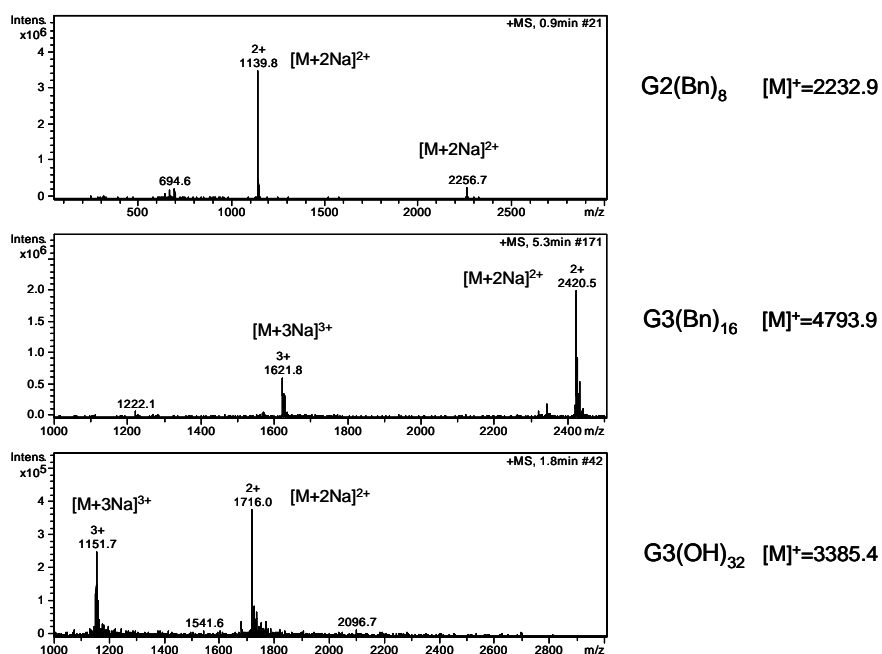
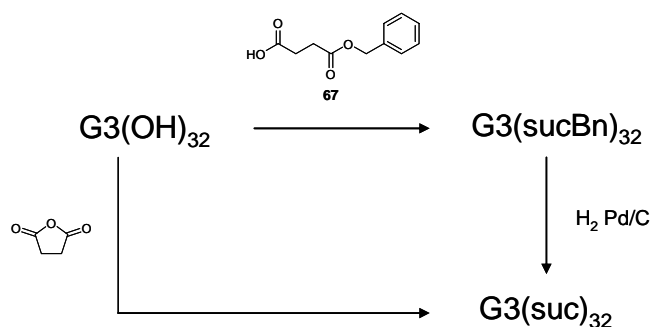


Figura 82. Representación de los espectro de masas (ESI-MS) obtenidos para los dendrímeros **G2(Bn)₈**, **G3(Bn)₁₆** y **G3(OH)₃₂**.

El dendrímero de 3^a Generación **G3(OH)₃₂**, es el compuesto equivalente, pero en forma monodispersa, al Boltorn BH30 comercial usado como soporte multivalente hasta este momento. Una vez obtenido el dendrímero **G3(OH)₃₂** la siguiente etapa consistió en la funcionalización de los grupos hidroxilo de la superficie del dendrímero con ácidos carboxílicos, que nos permitan acoplar los diferentes carbohidratos al soporte dendrítico a través de un enlace amida, usando la estrategia desarrollada en nuestro grupo de investigación que ya se ha comentado con anterioridad.

Hasta este momento, la funcionalización de los sistemas multivalentes dendríticos con ácido succínico se había llevado a cabo mediante una reacción de apertura del anhídrido succínico por parte de los grupos hidroxilo de la superficie del sistema multivalente dendrítico, utilizando una cantidad catalítica de DMAP en piridina como disolvente. (ver capítulo 3) En el caso del sistema monodisperso, se pensó en introducir el ácido succínico protegido como monobenciléster para facilitar la síntesis y purificación del compuesto final. El compuesto resultante sería bastante apolar, al no presentar los ácidos carboxílicos libres, y se podría purificar por cromatografía en columna de gel de sílice. Además, se podría confirmar la funcionalización completa en las 32 posiciones libres del dendrímero simplemente por espectrometría de masas. En el caso de tener los ácidos carboxílicos libres la caracterización por espectrometría de masas es mucho más compleja debido a la posibilidad de generarse diferentes combinaciones con sales de Na^+ , como ya se había comprobado para los otros sistemas anteriormente. Una vez obtenido el producto deseado **G3(sucBn)₃₂**, se realizaría una hidrogenación catalizada por Pd(C) para obtener el dendrímero de tercera generación funcionalizado con ácidos carboxílicos en la superficie **G3(suc)₃₂** lo que permitirá el acoplamiento con los carbohidratos. (Esquema 34)

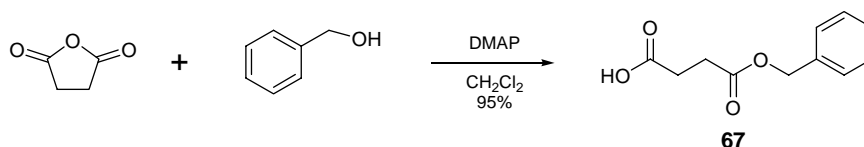


Esquema 34. Representación esquemática de las dos rutas sintéticas que permiten el acceso al dendrímero **G3(suc)₃₂**.

Para llevar a cabo esta funcionalización fue necesario, en primer lugar, preparar el monobenciléster del ácido succínico **67**, utilizando la metodología

Sistema multivalente monodisperso de 3^a generación funcionalizado con el pseudodisacárido 55

descrita en la bibliografía.¹²⁰ (Esquema 35) La apertura del anillo de anhídrido succínico se realizó por ataque nucleófilo del alcohol bencílico utilizando 0.86 eq. de alcohol bencílico por mol de anhídrido succínico, en CH₂Cl₂. El uso del alcohol bencílico en defecto facilita la purificación del producto final monobencilado. La disolución se mantuvo en agitación durante 18 horas, tras lo cual, el producto final se extrajo de la disolución orgánica con una disolución acuosa de Na₂CO₃ al 5%. Tras acidificar la fase acuosa y extraer con AcOEt se obtuvo el producto deseado **67** con un rendimiento del 95%.



Esquema 35. Síntesis del monobenciléster del ácido succínico **67**.

Una vez sintetizado el monobenciléster derivado **67**, la siguiente etapa fue la funcionalización de la superficie del dendrímero **G3(OH)₃₂** con 32 unidades del derivado **67**, por formación de un enlace éster. (Esquema 36) Aunque el número de enlaces que se tienen que formar, en una única etapa sintética, sobre la superficie del dendrímero **G3(OH)₃₂** es muy elevado (32 enlaces), se consiguió funcionalizar todas las posiciones del dendrímero con un rendimiento excelente. Para ello, se utilizaron las condiciones desarrolladas por Fréchet y col.¹²¹ El dendrímero **G3(OH)₃₂**, el monobenciléster del anhídrido succínico **67**, y DPTS se disolvieron en CH₂Cl₂. Aunque el dendrímero **G3(OH)₃₂** no es muy soluble en CH₂Cl₂, se mantuvo en suspensión bajo agitación. Después se generó atmósfera de argón y se añadió DCC a la mezcla de reacción. En ese momento, apareció un precipitado blanco indicativo de la formación de urea. La reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente y se siguió por c.c.f. Al cabo de 24 horas, la mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, obteniéndose el producto final **G3(sucBn)₃₂** con un rendimiento del 81%. (Esquema 36) El compuesto **G3(sucBn)₃₂** se caracterizó mediante experimentos de RMN mono- y bidimensionales y espectrometría de masas. Se pudo observar

¹²⁰ Isomura, S.; Wirsching, P.; Janda, K. D.; *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 4115-4121.

la presencia de nuevas señales correspondientes a los protones aromáticos 7.41-7.33 (m, 160H), al metileno del grupo bencilo a 5.13 ppm (sa, 64H) y la señal correspondiente a los grupos metileno del grupo succínico a 2.63 (sa, 128H). Por espectrometría de masas se observó un pico a 4758.5 $[M+2Na]^{2+}$ y otro a 3185.3 $[M+3Na]^{3+}$ correspondientes al compuesto completamente funcionalizado doblemente cargado y triplemente cargado, respectivamente. Hay que decir que en algún caso en el que la reacción no se completó totalmente se pudo determinar por ESI-MS la presencia de otros picos con relación m/z correspondientes a compuestos en los que faltaba una o más unidades de succínico. Este hecho permite confirmar de forma inequívoca la funcionalización del dendrímero.

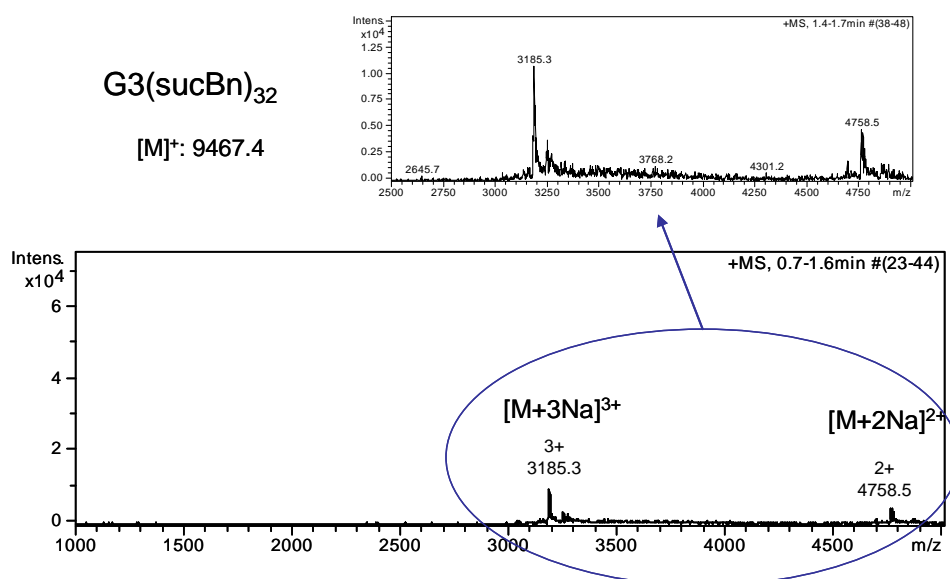
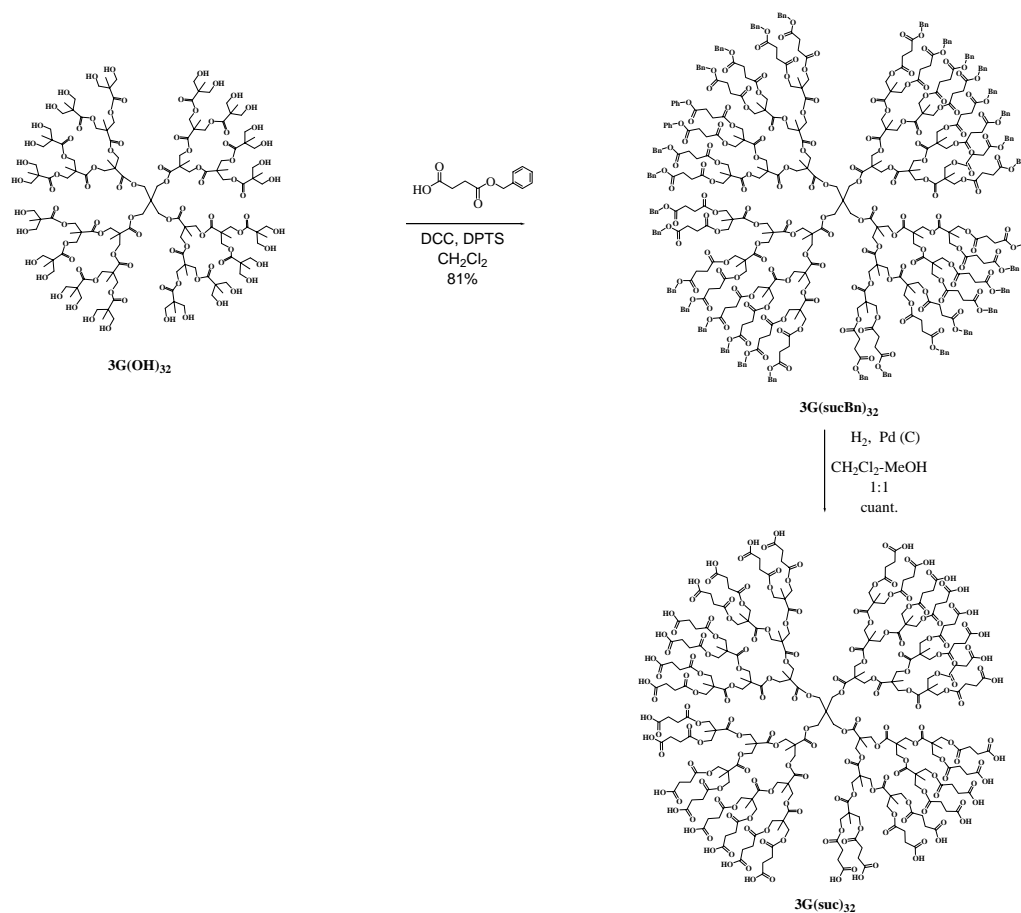


Figura 82. Representación del espectro de masas (ESI-MS) obtenido para el dendrímero G3(sucBn)₃₂.

¹²¹ Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 8405-84013.

Sistema multivalente monodisperso de 3^a generación funcionalizado con el pseudodisacárido 55



Esquema 36. Síntesis del dendrímero funcionalizado con ácidos carboxílicos **G3(suc)₃₂**.

La desprotección de los grupos protectores bencilo del compuesto **G3(sucBn)₃₂** representó la etapa final de la síntesis del dendrímero de tercera generación funcionalizado con ácidos carboxílicos **G3(suc)₃₂**. La desprotección se realizó por hidrogenación catalizada por Pd(C) a 1 atm de presión a temperatura ambiente durante 12 horas, obteniéndose el producto deseado con rendimiento cuantitativo. (Esquema 36) En el espectro de ¹H-RMN de este compuesto se pudo observar la desaparición de todas las señales correspondientes a los protones aromáticos pertenecientes a los grupos bencilo. También se observó la desaparición del singlete a 5.13 ppm (sa, 64H) correspondiente al grupo metileno bencílico. En cuanto al espectro de ¹³C-RMN se observó la desaparición de todas las señales de la zona aromática, y de la

señal a 66.3 ppm correspondiente al carbono metileno bencílico. Como el compuesto anterior **3G(sucBn)**₃₂ se había caracterizado por espectrometría de masas, confirmando la entrada de todos los grupos succínicos, en este caso la desaparición en RMN de los grupos bencilo fue suficiente para confirmar la estructura del este compuesto **3G(suc)**₃₂.

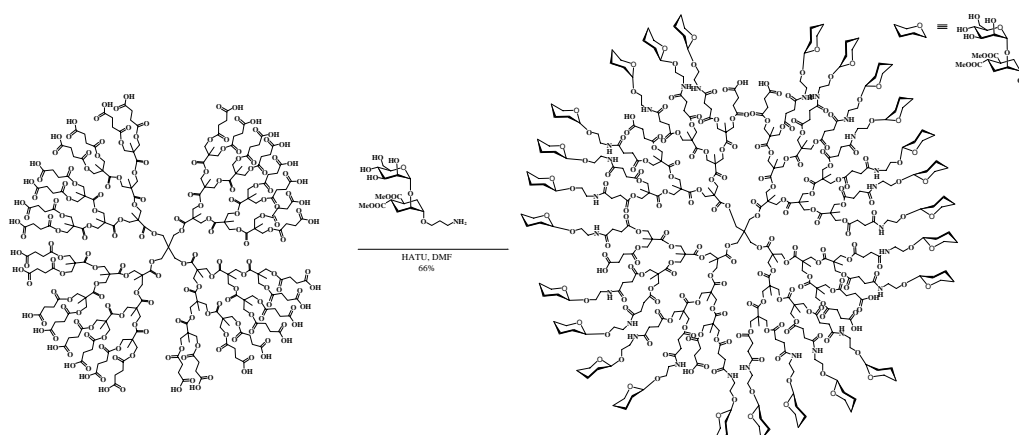
6.1.2 Síntesis del glicodendrúmero de 3^a generación **G3(pseudodisacárido)**₂₄.

Una vez sintetizado el dendrúmero monodisperso funcionalizado con ácidos carboxílicos **G3(suc)**₃₂, la siguiente etapa de la síntesis consistió en la introducción de 32 unidades del pseudodisacárido **55** mediante la formación de un enlace amida para obtener el glicodendrúmero **G3(pseudodisacárido)**₃₂. (Esquema 37)

Las primeras condiciones ensayadas para la formación del enlace amida entre el pseudodisacárido **55** y el sistema multivalente **G3(suc)**₃₂, fueron las condiciones clásicas de formación de enlaces peptídicos, anteriormente usadas para la síntesis de todos los sistemas multivalentes dendríticos de manosa que se han presentado en esta Tesis Doctoral. Los grupos ácidos carboxílicos se activaron utilizando DIC y HOBt, en una mezcla de disolventes (DMF-CH₂Cl₂, 1:1), para reaccionar con el disacárido mimético **55** (1.2 eq. por grupo carboxilo del dendrúmero) a temperatura ambiente durante 24 horas. El producto se purificó por ultrafiltración, utilizando filtros de exclusión por tamaño centriplus YM-3000, con tamaño de poro de 3000 daltons. Como los glicodendrúmeros tienen un peso molecular superior, no atraviesan el poro y, de esta forma, se pueden purificar del resto de los componentes del crudo de reacción. Una vez purificado el compuesto se liofilizó y se caracterizó por RMN.

El análisis del espectro ¹H-RMN en D₂O parecía indicar que no todas las posiciones del dendrúmero sobre las que podría fijarse el disacárido mimético estaban ocupadas. Probablemente, lo que se había obtenido era una mezcla de compuestos con diferente conjugación y que como promedio presentaban 24 unidades de carbohidrato mimético covalentemente unido sobre el soporte dendrítico, **G3(pseudodisacárido)**₂₄. (Esquema 37)

Sistema multivalente monodisperso de 3^a generación funcionalizado con el pseudodisacárido 55



Esquema 37. Síntesis del glicodendrímico **G3(pseudodisacárido)₂₄**.

Para intentar la funcionalización completa del dendrímico, es decir, intentar conjugar 32 unidades de carbohidrato mimético **55** sobre el soporte dendrítico se realizaron modificaciones en las condiciones de reacción. Así, se aumentó el número de equivalentes del pseudodisacárido **55** (hasta 2 eq. por cada uno de los 32 grupos carboxílicos de la superficie del dendrímico), se incrementaron los tiempos de reacción hasta 5 días y, por último, se aumentó la temperatura de la reacción hasta 50°C utilizando siempre DMF como disolvente. En ninguno de los casos se logró incrementar el número de unidades de carbohidrato mimético fijado sobre la superficie del dendrímico.

Finalmente, se utilizó otro reactivo para activar los grupos carboxílicos del dendrímico **G3(suc)₃₂**, HATU (Hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronilo) que es mucho más activo que la combinación de DIC y HOBt. La reacción se llevó a cabo disolviendo el dendrímico **G3(suc)₃₂** en DMF seca y bajo atmósfera de argón. Después, se añadió HATU y DIPEA y se dejó en agitación durante 30 min. para activar los ácidos carboxílicos del dendrímico **G3(suc)₃₂**. Una vez pasado este tiempo, el pseudodisacárido **55** (1.3 eq. por grupo carboxílico del dendrímico) se añadió a la reacción y la disolución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 3 días. Después de realizar una purificación utilizando una columna de

exclusión por tamaño Sephadex G-25, se obtuvo de nuevo el compuesto **G3(pseudodisacárido)₂₄** que se caracterizó por ¹H-RMN.

A la vista de estos resultados, donde ninguna de las condiciones probadas ha permitido obtener el glicodendrímico **G3(pseudodisacárido)₃₂** funcionalizado con 32 pseudodisacáridos en la superficie, parece complicado conseguir, usando esta aproximación, un dendrímico con 32 unidades de pseudodisacárido. Es posible, que debido a los impedimentos estéricos que se generan cuando se va introduciendo las unidades del pseudodisacárido **55** al soporte multivalente, sea muy complicada la funcionalización total del sistema multivalente. Está claro que, con todas las condiciones probadas, el nivel de funcionalización máximo que se llega es bastante parecido en todos los casos, en torno a unas 24 unidades de disacárido mimético **55**. Esto no ocurre con el monosacárido de manosa, que debido a su menor tamaño, es posible que no presente los impedimentos estéricos que aparecen en este caso. Estos resultados y el posible interés que puede tener el conjugar sistemas más complejos que un simple monosacárido hacen necesario un planteamiento diferente para preparar este tipo de sistemas multivalentes. En nuestro grupo de investigación se están desarrollando actualmente metodologías para acceder a este tipo de glicodendrímicos utilizando una estrategia convergente. Este trabajo forma parte de otra Tesis Doctoral que se está realizando en el grupo.

A pesar de que el compuesto **G3(pseudodisacárido)₂₄** es un compuesto incompleto, y dado el potencial interés que este compuesto podría tener, se decidió realizar los estudios preliminares de inhibición de la interacción de gp120 y DC-SIGN, para poder evaluar el aumento de la afinidad respecto al correspondiente sistema monovalente.

6.1.3 Inhibición de la interacción DC-SIGN/gp120 por el glicodendrímico G3(pseudodisacárido)₂₄.

Para llevar a cabo los estudios de inhibición de la interacción entre la glicoproteína gp120 del VIH y el receptor DC-SIGN se utilizó de nuevo el biosensor con detección SPR. Se funcionalizó la superficie del chip CM4 del

biosensor con la proteína gp120 y se hizo fluir DC-SIGN en presencia o ausencia del **G3(pseudodisacárido)₂₄** a distintas concentraciones, siguiendo un procedimiento similar al que se había usado anteriormente para los polímeros glicodendríticos BH30sucMan y BH30sucLMan.

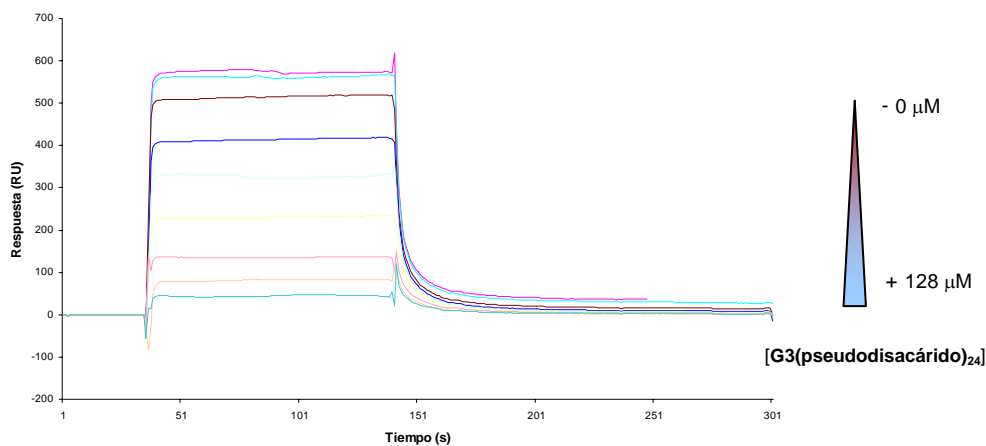


Figura 84. Sensograma que representa la inhibición de la interacción DC-SIGN/gp120 usando como inhibidor el **G3(pseudodisacárido)₂₄** a distintas concentraciones (0, 1.8, 3.6, 7.1, 14.2, 28.4, 56.8, 85.2 y 128 μM).

Para ello, se inyectó conjuntamente cantidades crecientes del compuesto multivalente **G3(pseudodisacárido)₂₄** (0, 1.8, 3.6, 7.1, 14.2, 28.4, 56.8, 85.2 y 128 μM) y una concentración fija de DC-SIGN ECD (50 μM). En la figura 84 se representan las curvas obtenidas para los ensayos de inhibición de la interacción de la lectina DC-SIGN con la glicoproteína gp120 de la envoltura del VIH. Se puede observar que al aumentar la concentración de **G3(pseudodisacárido)₂₄** se produce un descenso del máximo de la señal del sensograma, máximo correspondiente a la cantidad de DC-SIGN que interacciona con la superficie de gp120. Este resultado indicaba que el compuesto **G3(pseudodisacárido)₂₄** competía de forma favorable con gp120 por la interacción con DC-SIGN e inhibía la interacción del ECD de DC-SIGN con la superficie de gp120. Esta disminución de la señal era directamente proporcional a la concentración de dendrímero. (Figura 84) El análisis de estas curvas permitió estimar un IC_{50} para el **G3(pseudodisacárido)₂₄** de 20 μM .

En comparación con los resultados obtenidos para los compuestos BH30sucMan y BH30sucLMan con los que se obtuvieron valores de IC_{50} de 50 y 120 μM , respectivamente, se puede decir que este compuesto **G3(pseudodisacárido)₂₄** es, al menos, 2.5 veces mejor. Es decir, el uso del disacárido mimético **55**, un ligando más complejo que el monosacárido de manosa, aunque en menor proporción sobre la superficie del dendrímero, aumenta la afinidad de estos compuestos por la lectina DC-SIGN de forma considerable.

Es razonable pensar que en estos procesos de interacción multivalente, el número de carbohidratos implicados es relativamente pequeño en comparación con todos los que se encuentran cubriendo la superficie del dendrímero. Quizás el hecho más importante es que los carbohidratos que interaccionan se encuentran en una disposición espacial adecuada para hacerlo de forma multivalente. Por esta razón, pensamos que, a pesar de que el glicodendrímero **G3(pseudodisacárido)₂₄** no está completo y presenta una cantidad de pseudodisacáridos menor, su interacción es mejor que la del sistema multivalente dendrítico BH30sucMan, al contener un número suficiente de carbohidratos en una superficie de igual tamaño pero con un ligando que presenta una afinidad mejor por el receptor.

7. CONCLUSIONES

Conclusiones

1.- Se ha llevado a cabo la síntesis de los sistemas multivalentes dendríticos BH20sucL, BH20sucMan, BH30sucL y B30sucMan siguiendo la metodología desarrollada en nuestro grupo de investigación. Con estos compuestos se ha evaluado la afinidad por la lectina DC-SIGN usando biosensores con detección por resonancia del plasmon de superficie (SPR), demostrándose que para observar una interacción fuerte se requiere al menos 32 manosas y una superficie con una alta densidad de DC-SIGN. Se ha podido obtener una constante aparente de afinidad del orden submicroMolar para el sistema BH30sucMan.

En estos estudios también se ha puesto de manifiesto que la interacción de BH30sucMan con el receptor DC-SIGN es multivalente, pero los CRDs implicados en dicha interacción pertenecen a diferentes moléculas (intermolecular), probablemente debido a que los CRDs de la misma molécula se encuentran demasiado separados o en disposiciones espaciales que no son adecuadas para interactuar con más de una manosa del glicodendrúmero.

2.- Utilizando biosensores se ha demostrado que el polímero dendrítico Boltorn de tercera generación funcionalizado con 32 manosas es capaz de inhibir la interacción de DC-SIGN/gp120 con una IC_{50} de 50 μ M. Sin embargo, ninguno de los sistemas multivalentes dendríticos preparados (BH20sucMan, BH30sucMan) consiguen inhibir la infección del VIH, ni en ensayos de infección directa sobre la línea celular PM-1, ni usando tejidos explante de cuello de útero.

3.- Se ha preparado un sistema dendrítico donde los carbohidratos se han conjugado al soporte multivalente usando un espaciador más largo, que contenía tres unidades de etilenglicol. Usando biosensores se ha demostrado que este polímero dendrítico Boltorn de tercera generación funcionalizado con 32 manosas BH30sucLMan es capaz de inhibir la interacción de DC-SIGN gp120 con IC_{50} de 120 μ M. El empleo de un espaciador más largo y flexible para conjugar el carbohidrato al soporte multivalente no mejora los resultados obtenidos para el compuesto BH30sucMan que presenta un espaciador más corto. Es decir, el uso de un espaciador largo que proporciona mayor flexibilidad en el sistema, y que teóricamente permitiría una accesibilidad mejor para que el

carbohidrato acceda al sitio de unión de la lectina DC-SIGN, no solo no mejora la interacción, sino más bien al contrario, obteniéndose un peor resultado.

4.- Se han preparado dos compuestos con manosa conjugados con un espaciador largo, uno en la posición anomérica y otro en la posición 6 del carbohidrato, respectivamente. Mediante el uso de biosensores se ha demostrado que ambos glicoconjugados interaccionan de una forma similar con DC-SIGN y, por lo tanto, ambas posiciones son factibles para ser usadas como punto de funcionalización en el diseño de nuevos ligandos para el receptor DC-SIGN y la preparación de sistemas multivalentes.

5.- Se ha realizado la síntesis del derivado de manosa ortogonalmente protegido **31**, a partir del cual, se han preparado dos trisacáridos y un disacárido que son ligandos del receptor DC-SIGN. Además, se ha descrito una aproximación combinada basada en los estudios de docking y RMN para estudiar la interacción de estos di- y trisacáridos con el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) de la lectina DC-SIGN y evaluar su afinidad relativa.

El análisis conformacional de ambos trisacáridos demuestra que la geometría que reconoce el receptor es la conformación que presenta una mayor población en estado libre y no se producen grandes cambios conformacionales durante la interacción. Los experimentos de STD indican que los fragmentos disacarídicos de manosa 1-2 y 1-3 interaccionan de forma más fuerte con la lectina, como se había deducido de las estructuras de docking. Sin embargo, los patrones de STD indican diferencias apreciables en el modo de enlace de ambos compuestos, probablemente como consecuencia de la existencia de múltiples modos de enlace.

Además, usando CORCEMA-ST para el caso del disacárido **45** se ha podido determinar la orientación relativa que adopta este compuesto en el sitio de unión en el modo de enlace minoritario que se observaba en las estructuras de rayos X.

6.- Se ha llevado a cabo la síntesis del pseudodisacárido **55** que presenta una gran similitud conformacional con el disacárido natural $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$. Se ha demostrado tanto por RMN (utilizando experimentos de STD y Transfer-NOE),

Conclusiones

como por cálculos computacionales de docking que este compuesto interacciona de forma eficiente con la lectina DC-SIGN.

7.- Se ha evaluado la actividad antiviral de los oligosacáridos **45**, **48**, y **51**, y del pseudodisacárido **55** en un modelo de infección del virus del Ébola. Estos estudios indican que de todos los ligandos probados, el pseudodisacárido **55** es el mejor candidato para la preparación de compuestos multivalentes que presenten una alta afinidad y que puedan bloquear al receptor DC-SIGN.

8.- Se ha realizado la síntesis de forma monodispersa del dendrimero de 3^a generación $G3(\text{suc})_{32}$, y, a partir de este compuesto, se ha preparado el glicodendrímico incompleto **G3(pseudodisacárido)**₂₄. Todas las condiciones probadas no han permitido conjugar 32 unidades de pseudodisacárido como era deseable, probablemente por problemas estéricos. En los estudios de inhibición usando **biosensores** se ha demostrado que este compuesto es al menos 2.5 veces mejor inhibidor de la interacción DC-SIGN-gp120 que el sistema multivalente glicodendrítico BH30sucMan. El uso del pseudodisacárido **55**, un ligando más complejo que el monosacárido de manosa, aunque en menor proporción sobre la superficie del dendrímico, aumenta la afinidad de estos compuestos por la lectina DC-SIGN de forma considerable.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1 Métodos generales

Disolventes y reactivos

Todos los disolventes orgánicos anhidros se secaron siguiendo procedimientos descritos.¹²² 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 en esta Tesis Doctoral fueron de alta pureza y se adquirieron a distintas casas comerciales (Aldrich, Fluka, Lancaster, Panreac, Acros, etc).

Los compuestos Boltorn BH20 y BH30 fueron suministrados por cortesía de Perstorp Speciality Chemicals A.B.

Técnicas y Aparatos

El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina (c.c.f.) 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 100mL de disolución); y ninhidrina (0,25 g de ninhidrina en 100 mL de etanol). 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.

¹²² Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of laboratory chemical*, **1996**, Editorial Butterworth-Heinemann, Oxford.

Se utilizó cromatografía en capa fina preparativa para optimizar la purificación de productos en pequeñas cantidades, usando cromatoplaacas 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 y G-25 de la empresa Pharmacia.

Para la purificación por ultracentrifugación se utilizaron membranas de celulosa CENTRIPLUS YM-30 de MILLIPORE.

Para la purificación por diálisis se utilizaron membranas de celulosa benzoilada de 32mm de ancho, con masa molecular de corte de 1kDA de la casa comercial SIGMA.

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.

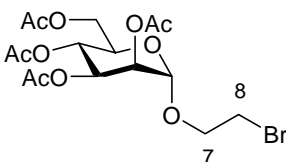
Los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear se realizaron en los espectrómetros Bruker DRX-500, DRX-400 y DPX-300. Los espectros se realizaron en el disolvente deuterado que se indica y los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), usando como referencia la señal del tetrametilsilano (TMS, 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 las estructuras más complejas se han utilizado experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY, TOCSY, NOESY) y protón-carbono (HMQC, HSQC) usando las secuencias de pulso estándar.

Los espectros de masas se realizaron en los espectrómetros Esquire 6000 ESI-MS Bruker-Daltonics, Omnisflex (ionización MALDI), Micromass Autospec (ionización MALDI) y Apex II ICR FTMS (con ionización ESI, HR-MS). Las muestras de los productos se disolvieron en MeOH ó acetonitrilo a concentración micromolar (μM).

Los análisis elementales se llevaron a cabo con un aparato Leco CHNS-932, después de secar las muestras sobre pentóxido de fósforo durante 24 h. Los resultados se expresan en tanto por ciento en todos los casos.

8.2 Síntesis de los sistemas dendríticos polidispersos de manosa y sus correspondientes controles.

2-Bromoetil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosido (**2**)⁶⁴



Sobre una disolución de 2-bromoetanol (910 μ L, 12.8 mmoles) y 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α -D-manosapiranosido (**1**) (4 g, 10.25 mmoles) en CH_2Cl_2 (20 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se añadió $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (6.5 mL, 51.2 mmol, 5 eq.) gota a gota durante 15 min. Transcurridas 2 horas, se permitió que la disolución alcanzara temperatura ambiente. Después de 24 horas, la mezcla de reacción se añadió sobre agua-hielo (30 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). La combinación de los extractos orgánicos se lavó con agua (30 mL), disolución saturada de NaHCO_3 (30 mL), agua (30 mL) y se secó sobre MgSO_4 . El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se purificó 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 (**2**) (3.41 g, 73%) como un sólido blanco.

$[\alpha]_D^{23}$: + 37.3 (c. 0.75 en CHCl_3)

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 5.36 (dd, 1H, $J=10.0$ & 3.1 Hz, H_3), 5.32-5.26 (m, 2H, $H_4 + H_2$), 4.87 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_1), 4.29 (dd, 1H, $J=12.2$ & 5.3

⁶⁴ Arce, E.; Nieto, P. M.; Díaz, V.; García-Castro, R.; Bernad, A.; Rojo, J.; *Bioconjug. Chem.*, **2003**, *14*, 817-823.

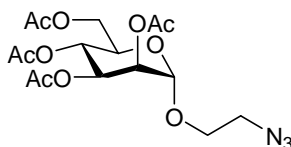
Hz, H_6), 4.12 (dd, 1H, $J=12.2$ & 2.2 Hz, H_6), 4.05 (ddd, 1H, $J=10.2$, 5.3 & 2.2 Hz, H_5), 3.87 (ddd, 1H, $J=10.6$, 6.6 & 4.0 Hz, H_7), 3.67 (ddd, 1H, $J=10.6$, 5.8 & 3.8 Hz, H_7), 3.47 (m, 2H, $2H_8$), 2.16, 2.10, 2.05 & 1.99 (4s, 3H cada uno, 4 x CH_3COO)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 170.6, 170.0, 169.9 & 169.8 (4 x CO), 97.7 (C_1), 69.4 (C_2), 69.0 & 68.9 (C_3 , C_5), 66.4 (C_4), 66.0 (C_7), 62.4 (C_6), 20.4 (C_8), 21.8, 21.7, 21.7 & 21.6 (4 x CH_3COO)

EM (MALDI-TOF) para $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{BrO}_{10}$; calculado: 453.5 $[\text{M}]^+$, encontrado: 476.5 & 478.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 492.4 & 494.5 $[\text{M}+\text{K}]^+$

Análisis Elemental: Calculado: C, 42.21%; H, 5.09%
 Encontrado: C, 42.39%; H, 4.92%

2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosido (3)⁶⁴



La manosa bromo sustituida **2** (1.3 g, 2.85 mmoles) y azida sódica (1.5 g, 22.84 mmoles) se disolvieron en DMF seca (30 mL) y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 50°C durante 15 h. El crudo de reacción se diluyó con AcOEt (150 mL) y se lavó con agua para extraer el exceso de NaN_3 y el NaBr formado durante la reacción. La fracción orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, y se eliminó el disolvente a vacío, obteniéndose el 2-azidoetil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosido (**3**) (1.19 g, cuant.) como un sólido blanco que se utilizó sin posterior purificación.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: +50.2 (c 0.75 en CHCl_3)

Parte Experimental

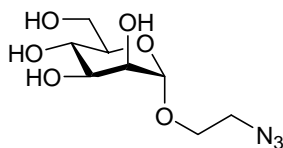
^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 5.36 (dd, 1H, $J=10.0$ & 3.1 Hz, H_3), 5.32-5.26 (m, 2H, $H_4 + H_2$), 4.87 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_1), 4.29 (dd, 1H, $J=12.2$ & 5.3 Hz, H_6), 4.12 (dd, 1H, $J=12.2$ & 2.2 Hz, H_6'), 4.05 (ddd, 1H, $J=10.2$, 5.3 & 2.2 Hz, H_5), 3.87 (ddd, 1H, $J=10.6$, 6.6 & 4.0 Hz, H_7), 3.67 (ddd, 1H, $J=10.6$, 5.8 & 3.8 Hz, H_7'), 3.47 (m, 2H, $2H_8$), 2.16, 2.10, 2.05 & 1.99 (4s, 3H cada uno, 4 x CH_3CO)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 171.0, 170.4, 170.3 & 170.2 (4 x 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, 21.2, 21.1 & 21.1 (4 x CH_3COO)

EM (MALDI-TOF) para $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}$; calculado: 417.4 $[\text{M}]^+$; encontrado: 440.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ & 456.4 $[\text{M}+\text{K}]^+$

Análisis Elemental: Calculado: C, 46.04%; H, 5.55%; N, 10.07%
Encontrado: C, 46.28%; H, 5.64%; N, 9.87%

2-Azidoetil α -D-manopiranosido (**4**)⁶⁴



El derivado de manosa **3** (1.2 g, 2.85 mmol) se disolvió en MeOH seco (40 mL) y una disolución 1M de NaOMe en MeOH (5 mL) se añadió hasta que se alcanzó pH 9. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Después, se neutralizó con resina Amberlite IR 120, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío obteniéndose el 2-azidoetil α -D-manopiranosido (**4**) (710 mg, cuant.) como un sólido blanco.

$[\alpha]_D^{23}$: +139.2 (c 0.5 en CHCl_3)

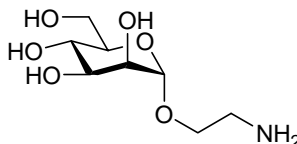
^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz): δ (ppm) 4.83 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_1), 3.97-3.88 (m, 2H, $H_3 + H_4$), 3.84 (m, 1H, H_2), 3.76-3.57 (m, 5H, $H_5 + 2H_6 + 2H_7$), 3.43 (m, 2H, $2H_8$)

^{13}C RMN (CD_3OD , 75 MHz): δ (ppm) 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)

EM (MALDI-TOF) para $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_6$; calculado: 249.1 $[\text{M}]^+$; encontrado: 272.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ & 288.4 $[\text{M}+\text{K}]^+$

Análisis Elemental: Calculado: C 38.55%, H 6.07%, N 16.86%
 Encontrado: C 38.72%, H 5.91%, N 16.80%

2-Aminoetil α -D-manopiranosido (5)⁶⁴



El derivado de manosa **4** (540 mg, 2.20 mmoles) se disolvió en MeOH (15 mL), se añadió Pd-C 10% (cat.) a la mezcla de reacción bajo atmósfera de hidrógeno (1 bar) hasta reducción completa (c.c.f *i*-PrOH:H₂O, 7:3 + 1% AcOH) obteniéndose el 2-aminoetil α -D-manopiranosido (**5**) (425 mg, 88%) como un sólido blanco.

$[\alpha]_D^{23}$: +84.5 (c. 1.2 en CH_3OH)

^1H RMN (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) 4.75 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_1), 3.85 (dd, 1H, $J=3.3$ & 1.5 Hz, H_2), 3.75 (m, 1H, H_6), 3.74-3.59 (m, 3H, $H_3 + H_4 + H_6'$), 3.53 (m, 2H, $2H_7$), 3.45 (m, 1H, H_5), 2.80 (m, 2H, $2H_8$)

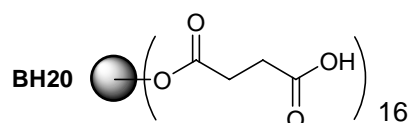
Parte Experimental

^{13}C RMN (D_2O , 75 MHz): δ (ppm) 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)

EM (MALDI-TOF) para $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_6$; calculado: 223.1 $[\text{M}]^+$; encontrado: 224.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 246.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ & 262.2 $[\text{M}+\text{K}]^+$

Análisis Elemental: Calculado: C, 43,04%; H, 7.68%; N, 6.27%
Encontrado: C, 43.21%; H, 7.87%; N, 6.31%

BH20sucOH⁶⁴



A una disolución de Boltorn H20 (5.0 g, 2.86 mmoles) en piridina (30 mL), se añadió anhídrido succínico (5.44 g, 54.34 mmoles) y una cantidad catalítica de DMAP (100 mg). La mezcla se mantuvo en agitación durante 15 horas y después se concentró a vacío. El residuo se disolvió en agua y se volvió a concentrar a vacío. Por último, se liofilizó el producto proporcionando el compuesto BH20sucOH (10.2 g, cuant.) como un sólido blanco.

^1H RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 500 MHz): δ (ppm) 4.08 (m, 56H, 28 x CH_2OCO), 2.48 (m, 2 x 32H, 16 x $\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 1.14 (m, 36H, 12 x CH_3)

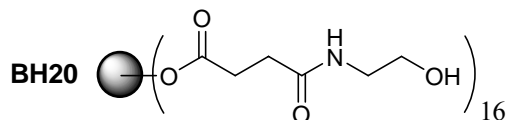
^1H RMN (CD_3CN , 500 MHz): δ (ppm) 9.06 (sa, 16H, 16 COOH), 4.23 (m, 56H, 28 x CH_2OCO), 2.58 (m, 64H, 16 x $\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 1.25 (m, 36H, 12 x CH_3)

^{13}C RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 125 MHz): δ (ppm) 176.3 (COOH), 176.0 (COO), 174.4 (COO), 67.7 (CH_2O), 48.8 (C), 31.5 & 31.3 ($\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 19.8 & 19.7 (CH_3).

^{13}C RMN (CD_3CN , 125 MHz): δ (ppm) 174.1 (COOH), 172.9 (COO), 172.8 (COO), 66.3 (CH_2O), 47.3 (C), 29.6 & 29.2 ($\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 17.9 (CH_3).

IR (KBr): 3415 (OH), 1731 (CO), 1695 (COOH), 1470

BH20SucL⁶⁴



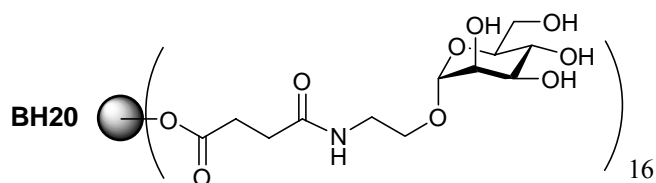
A una disolución de 2-aminoetanol (19 μL , 0.307 mmoles) y BH20sucOH (20 mg, 6.39×10^{-3} mmoles) en $\text{DMF}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1 (5 mL), se añadieron DIC (48 μL , 0.307 mmoles) y HOBt (41 mg, 0.307 mmoles). La disolución se mantuvo en agitación durante 24 horas y después se eliminó la mezcla de disolventes a vacío. El residuo se lavó con Et_2O y se purificó por diálisis en H_2O (utilizando membranas de celulosa benzoilada de 32 mm de ancho, con una masa molecular de corte de 1kDA) obteniéndose el sistema multivalente dendrítico BH20sucL (17 mg, 71%) como un aceite.

^1H RMN (D_2O , 400 MHz): δ (ppm) 4.36-4.22 (m, 56H, 28 x $\text{CH}_2\text{OCO}_{\text{Boltorn}}$), 3.63 (t, 32H, $J=5.7$ Hz, 16 x CH_2OH), 3.31 (t, 32H, $J=5.7$ Hz, 16 x CH_2NHCO), 2.67 (m, 32H, 16 x $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 2.67 (m, 32H, 16 x $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 1.27 (m, 36H, 12 x $\text{CH}_3_{\text{Boltorn}}$)

^{13}C RMN (D_2O , 125 MHz): δ (ppm) 182.1 ($\text{COO}_{\text{Boltorn}}$), 181.3 (COO), 175.2 (CONH), 65.9 ($\text{CH}_2_{\text{Boltorn}}$), 60.1 (CH_2OH), 41.5 (CH_2NH), 30.1 ($\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 29.2 ($\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 17.0 ($\text{CH}_3_{\text{Boltorn}}$)

IR (KBr) 3415, 2935, 1735, 1655, 1560, 1420

BH20SucMan⁶⁴



A una disolución de 2-aminoetil α -D-manopiranosido (**5**) (25 mg, 0.112 mmoles) y BH20sucOH (20 mg, 6.39×10^{-3} mmoles) en DMF:CH₂Cl₂ 1:1 (5 mL), se añadieron DIC (48 μ L, 0.307 mmoles) y HOBt (41 mg, 0.307 mmoles). La disolución se mantuvo en agitación durante 24 horas y después se eliminó la mezcla de disolventes a vacío. El residuo se lavó con Et₂O y se purificó por diálisis en H₂O (utilizando membranas de celulosa benzoilada de 32 mm de ancho, con una masa molecular de corte de 1kDA) obteniéndose el sistema multivalente dendrítico BH20sucL (22 mg, 60%) como sólido blanco.

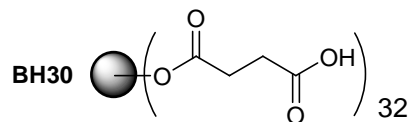
¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) 4.75 (s, 16H, 16 x H₁), 4.26-4.09 (m, 56H, 28 x CH₂OCO_{Boltorn}), 3.82 (m, 16H, 16 x H₂), 3.76 (m, 16H, 16 x H₆), 3.66 (m, 16H, 16 x H₇), 3.64 (m, 16H, 16 x H_{6'}), 3.59 & 3.52 3.82 (2m, 2 x 16H, 16 x H₃ + 16 x H₄), 3.51 (m, 16H, 16 x H₅), 3.45 (m, 16H, 16 x H₇), 3.30 (m, 16H, 16 x H_{6'}) 2.57 (m, 32H, 16 x NHCOCH₂CH₂COO), 2.46 (m, 32H, 16 x NHCOCH₂CH₂COO), 1.17 (m, 36H, 12 x CH₃_{Boltorn})

¹³C RMN (D₂O, 75 MHz): δ (ppm) 181.6 (COO_{Boltorn}), 175.6 (CONH), 99.9 (C₁), 73.0 (C₅), 70.2 (C₂), 70.0 & 67.0 (C₃ & C₄), 65.9 (CH₂_{Boltorn}), 65.9 (C₇), 61.1 (C₆), 46.8 (C_{Boltorn}), 39.3 (CH₂NH), 30.5 (NHCOCH₂CH₂COO), 29.9 (NHCOCH₂CH₂COO), 17.0 (CH₃_{Boltorn})

IR (KBr) 3415, 1635, 1570, 1425

Análisis Elemental: Calculado: C, 44.61%; H, 6.82%; N, 3.24%
 Encontrado: C, 44.62%; H, 6.75%; N, 3.38%

BH30sucOH⁶⁴



A una disolución de Boltorn H30 (3.0 g, 0.88 mmoles) en piridina (30 mL), se añadió anhídrido succínico (3.40 g, 34.01 mmoles) y una cantidad catalítica de DMAP (100 mg). La mezcla se mantuvo en agitación durante 15 horas y después se concentró a vacío. El residuo se disolvió en agua y se volvió a concentrar a vacío. Por último, la liofilización del producto proporcionó el compuesto BH20sucOH (5.83 g, cuant.) como un sólido blanco.

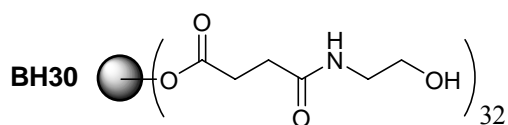
¹H RMN ((CD₃)₂SO, 500 MHz): δ (ppm) 4.12 (m, 120, 60 x CH₂OCO), 2.48 & 2.42 (2m, 2 x 64H, 32 x OCOCH₂CH₂COOH), 1.14 (m, 84H, 28 x CH₃)

¹H RMN (CD₃CN, 500 MHz): δ (ppm) 4.16 (m, 120H, 60 x CH₂OCO), 2.54 (m, 2 x 64H, 32 x OCOCH₂CH₂COOH), 1.25 (m, 84H, 12 x CH₃)

¹³C RMN (CD₃CN, 125 MHz): δ (ppm) 174.2 (COOH), 173.0 (COO), 172.9 (COO), 66.3 (CH₂O), 47.4 (C), 29.1 (OCOCH₂CH₂COOH), 17.9 (CH₃)

IR (KBr) 3415, 1735, 1695, 1475, 1420

BH30SucL⁶⁴



A una disolución de 2-aminoetanol (44 μL, 0.728 mmoles) y BH30sucOH (50 mg, 7.59 x 10⁻³ mmoles) en DMF:CH₂Cl₂ 1:1 (5 mL), se añadieron DIC (115

Parte Experimental

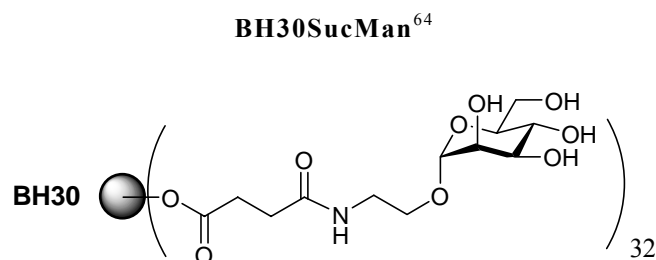
μL , 0.728 mmoles) y HOBt (100 mg, 0.728 mmoles). La disolución se mantuvo en agitación durante 24 horas y después se eliminó a vacío la mezcla de disolventes. El residuo se lavó con Et_2O y se purificó por diálisis en H_2O (utilizando membranas de celulosa benzoilada de 32 mm de ancho, con una masa molecular de corte de 1kDA) obteniéndose el sistema multivalente dendrítico BH20sucL (53 mg, 88%) como un aceite.

^1H RMN (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) 4.37-4.22 (m, 120H, 60 x $\text{CH}_2\text{OCO}_{\text{Boltorn}}$), 3.63 (t, 64H, $J=5.1$ Hz, 32 x CH_2OH), 3.31 (t, 64H, $J=5.7$ Hz, 32 x CH_2NHCO), 2.68 (m, 64H, 32 x $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 2.57 (m, 64H, 32 x $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 1.28 (m, 84H, 28 x $\text{CH}_3_{\text{Boltorn}}$)

^{13}C RMN (D_2O , 75 MHz): δ (ppm) 182.1 ($\text{COO}_{\text{Boltorn}}$), 181.3 (COO), 175.6 (CONH), 67.7 & 67.1 ($\text{CH}_2_{\text{Boltorn}}$), 61.4 (CH_2OH), 47.9 ($\text{C}_{\text{Boltorn}}$), 42.8 (CH_2NH), 31.4 ($\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 30.5 ($\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 18.3 ($\text{CH}_3_{\text{Boltorn}}$).

IR (KBr) 3415, 2940, 1740, 1655, 1560, 1430

Análisis Elemental: Calculado: C, 50.80%; H, 6.63%; N, 5.62%
Encontrado: C, 50.20%; H, 7.14%; N, 5.53%



A una disolución de 2-aminoetil α -D-manopiranosido (**5**) (26 mg, 0.112 mmoles) y BH30sucOH (20 mg, 3.03×10^{-3} mmoles) en $\text{DMF}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1 (5 mL), se añadieron DIC (46 μL , 0.307 mmoles) y HOBt (40 mg, 0.307 mmoles). La

disolución se mantuvo en agitación durante 24 horas y después se eliminó la mezcla de disolventes a vacío. El residuo se lavó con Et₂O y se purificó por diálisis en H₂O (utilizando membranas de celulosa benzoilada de 32 mm de ancho, con una masa molecular de corte de 1kDA) obteniéndose el sistema multivalente dendrítico BH20sucL (27 mg, 68%) como un sólido blanco.

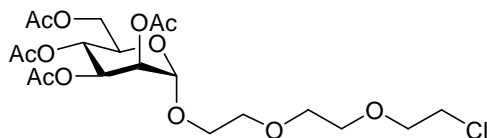
¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) 4.84 (s, 32H, 32 x H₁), 4.32-4.21 (m, 120H, 60 x CH₂OCO Boltorn), 3.92 (m, 32H, 32 x H₂), 3.86 (m, 32H, 32 x H₆), 3.76-3.57 (m, 192H, 32 x H₇ + H₆' + H₃ + H₄ + H₅), 3.40 (m, 64H, 32 x 2H₈), 3.30 (m, 32H, 32 x H') 2.67 (m, 64H, 32 x NHCOCH₂CH₂COO), 2.56 (m, 64H, 32 x NHCOCH₂CH₂COO), 1.27 (m, 84H, 28 x CH₃Boltorn)

¹³C RMN (D₂O, 75 MHz): δ (ppm) 176.2, 175.4 & 175.3 (CO Boltorn, COO, CONH), 101.1 (C₁), 74.2 (C₅), 71.9 (C₃ ó C₄), 71.4 (C₂), 68.0 (C₃ ó C₄), 67.3 (CH₂ Boltorn), 67.2 (C₇), 62.2 (C₆), 47.9 (C Boltorn), 40.3 (CH₂NH), 31.4 (NHCOCH₂CH₂COO), 30.5 (NHCOCH₂CH₂COO), 18.4 (CH₃ Boltorn)

IR (KBr) 3415, 1735, 1635, 1615, 1560

8.3 Síntesis de los sistemas dendríticos polidispersos de manosa y sus correspondientes controles con espaciador tipo trietilenglicol.

2-[2-(2-Cloroetoxi)etoxi]etil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosido (**6**)⁸⁰



Sobre una disolución de 2-[2-(2-cloroetoxi)etoxi]etanol (**10**) (1.90 mL, 12.80 mmoles) y 1,2,3,5,6-penta-*O*-acetil- α -D-manopiranosido (**1**) (4 g, 10.25 mmoles) en CH₂Cl₂ (20 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se añadió BF₃·Et₂O (6.5 mL, 51.2 mmoles) gota a gota durante 15 min. Transcurridas 2 horas, la disolución se llevó hasta temperatura ambiente. Después de 24 h. la disolución se añadió sobre agua-hielo (30 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). La combinación de los extractos orgánicos se lavó con agua (30 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (30 mL), agua (30 mL) y se secó sobre MgSO₄ anhidro. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Et₂O-Hexano, 3:1) obteniéndose el compuesto **6** (3.16 g, 66%) en forma de sólido blanco.

$[\alpha]_D^{20}$: +119.1 (c 0.3 en CHCl₃)

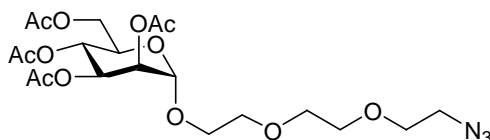
¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 5.38 (dd, 1H, $J=10.2$ & 3.6 Hz, H_3), 5.31-5.28 (m, 2H, H_2 & H_4), 4.89 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_1), 4.31 (dd, 1H, $J=12.3$ & 4.1 Hz, H_6), 4.15-4.06 (m, 2H, H_5 & H_6'), 3.86-3.63 (m, 12H, 6 x CH₂), 2.18, 2.13, 2.06, 2.01 (4s, 4 x 3H, 4 x CH₃COO)

⁸⁰ Lindhorst, T. K.; Kötter, S.; Krallmann-Wenzel, U.; Ehlers, S.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **2001**, 823-831.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 170.6, 170.0, 169.9 & 169.7 (4 x COO), 97.7 (C_1), 71.3, 70.7, 70.6, 70.1(OCH_2), 69.6 (C_2), 69.0 (C_3), 68.4 (C_5), 67.4 (CH_2), 66.1 (C_4), 62.4 (C_6), 42.7 (CH_2Cl), 20.8, 20.7, 20.7, 20.6 (4 x CH_3COO).

ESI-MS para $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{ClO}_{11}$; calculado: 498.2 $[\text{M}]^+$; encontrado: 521.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

2-[2-(2-Azidoetoxi)etoxi]etil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosido (7)⁸⁰



El derivado de manosa **6** (1.49 g, 3.00 mmoles) y azida sódica (1.5 g, 23.84 mmoles) se disolvieron en DMF seca (80 mL) y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 60°C durante 15 h. El crudo de reacción se diluyó con AcOEt (150 mL) y se lavó con agua (200 mL) para extraer el exceso de NaN_3 y el NaCl formado durante la reacción. La fracción orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, y se eliminó el disolvente a vacío, obteniéndose el 2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosido (**7**) (1.51 g, cuant.) como un sólido blanco que se utilizó sin posterior purificación.

$[\alpha]_D^{20}$: +59.3 (c 0.5 en CHCl_3)

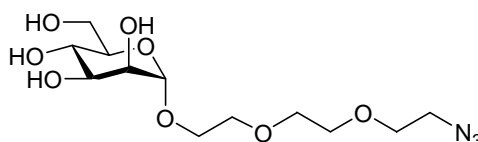
^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 5.37 (1H, dd, $J= 3.6$ & 10.2 Hz, H_3), 5.29 (t, 1H, $J= 9.7$ Hz, H_4), 5.27 (dd, 1H, H_2), 4.88 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_1), 4.30 (dd, 1H, $J=4.6$ Hz, H_6), 4.10 (dd, 1H, $J=2.6$ & 12.2 Hz, H_6'), 4.07 (m, 1H, H_5), 3.86–3.76 (m, 1H, OCH_2), 3.71–3.65 (m, 9H, OCH_2), 3.40 (t, 2H, $J=5.1$ Hz, CH_2N_3), 2.16, 2.11, 2.05, 1.99 (4 s, 4 x 3H, 4 x CH_3COO).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 170.6, 169.9, 169.8, 169.7 (COO), 97.6 (C_1), 70.7, 70.6, 70.0, 70.0 (CH_2O), 69.5 (C_2), 69.00 (C_3), 68.3 (C_5), 67.3

(CH₂O), 66.1(C₄), 62.3 (C₆), 50.6 (CH₂N₃), 20.82, 20.67, 20.62, 20.61 (4 × CH₃COO)

ESI-MS para C₂₀H₃₁N₃O₁₂; calculado: 505.2 [M]⁺; encontrado: 528.3 [M + Na]⁺

2-[2-(2-Azidoetoxi)etoxi]etil α-D-manopiranosido (**8**)⁸⁰



El derivado de manosa **7** (1.47 g, 2.91 mmol) se disolvió en MeOH seco (40 mL) y una disolución 1M de NaOMe en MeOH (5 mL) se añadió hasta que se alcanzó pH 9. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Después, se neutralizó con resina Amberlite IR 120, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío obteniéndose el compuesto 2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etil α-D-manopiranosido (**8**) (980 mg, cuant.) como un sólido blanco.

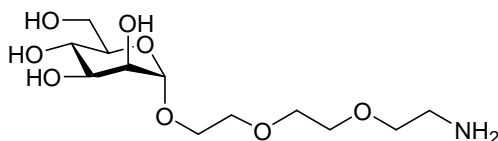
[α]_D²³: +32.2 (c 0.3, MeOH)

¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ (ppm) 4.84 (d, 1H, J=1.5 Hz, H₁), 3.89 (dd, 1H, J=3.6 & 10.7 Hz, H₃), 3.89 (t, 1H, J=9.2 Hz, H₄), 3.85 (dd, 1H, H₂), 3.79–3.63 (m, 12H, J=11.2 Hz, 5 × CH₂O + 2H₆), 3.60 (m, 1H, H₅), 3.43–3.39 (m, 2H, CH₂N₃)

¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz): δ (ppm) 101.9 (C₁), 74.8 (C₅), 72.8 (C₂), 72.4 (C₃), 72.0, 71.8, 71.7, 71.5 (4 × CH₂O), 68.9 (C₄), 68.1 (CH₂O), 63.2 (C₆), 52.1 (CH₂N₃)

ESI-MS para C₁₂H₂₃N₃O₈; calculado: 337.1 [M]⁺; encontrado: 560.1 [M + Na]⁺

2-[2-(2-Aminoetoxi)etoxi]etil α -D-manopiranosido (**9**)⁸⁰



El derivado de manosa desprotegida **8** (540 mg, 2.20 mmoles) se disolvió en MeOH (15 mL), y se añadió Pd-C 10% (cat.) a la mezcla de reacción bajo atmósfera de hidrógeno (1 bar) hasta reducción completa (ccf *i*-PrOH:H₂O 7:3 + 1% AcOH) obteniéndose el 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil α -D-manopiranosido (**9**) (425 mg, cuant.) como un sólido blanco.

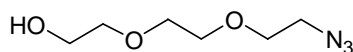
$[\alpha]_D^{23}$: +37.2 (*c* 1.0, MeOH)

¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ (ppm) 4.87 (d, 1H, *J*=1.5 Hz, *H*₁), 3.89 (dd, 1H, *J*=3.6 & 9.2 Hz, *H*₃), 3.88 (t, 1H, *H*₄), 3.85 (dd, 1H, *H*₂), 3.79–3.62 (m, 12H, 5 × CH₂O + 2*H*₆), 3.58 (m, 1H, *H*₅), 3.40 (m, 2H, CH₂NH₂)

¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz): δ (ppm) 102.0 (C₁), 74.9 (C₅), 73.2 (OCH₂), 72.8 (C₂), 72.4 (C₃), 71.8, 71.6, 70.8 (3 × OCH₂), 68.9 (C₄), 67.8 (OCH₂), 63.2 (C₆), 41.7 (CH₂NH₂)

ESI-MS para C₁₂H₂₅NO₈; calculado: 311.2 [M]⁺; encontrado: 334.1 [M + Na]⁺

2-[2-(2-Azidoetoxi)etoxi]etanol (**11**)



2-[2-(2-Cloroetoxi)etoxi]etanol (**10**) (0.2 mL, 1.38 mmoles) y azida sódica (715 mg, 11.00 mmoles) se disolvieron en DMF seca (10 mL) y la mezcla

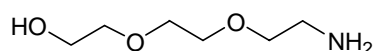
de reacción se mantuvo en agitación a 45°C durante 15 h. El crudo de reacción se diluyó con AcOEt (20 mL) y se lavó con agua (2 x 20 mL) para extraer el exceso de NaN₃ y el NaCl formado durante la reacción. La fracción orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, y se eliminó el disolvente a vacío, obteniéndose el 2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etanol (**11**) (241 mg, cuant.) como un aceite incoloro.

¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ (ppm) 3.70 (t, 1H, *J*=6.5 Hz, CH₂N₃), 3.73-3.66 (m, 8H, 4 x CH₂O), 3.63-3.58 (dt, 2H, CH₂OH), 3.41 (t, 1H, *J*=6.5 Hz, CH₂N₃)

¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz): δ (ppm) 74.0, 72.4, 72.3, 72.0, 68.1 (4 × CH₂O), 52.1 (CH₂N₃)

ESI-MS para C₆H₁₃N₃O₃; calculado: 175.1 [M]⁺; encontrado: 198.0 [M + Na]⁺ & 214.0 [M + K]⁺

2-[2-(2-Aminoetoxi)etoxi]etanol (**12**)



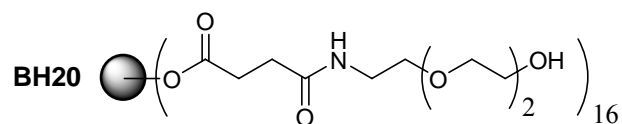
El compuesto **11** (740 mg, 4.23 mmoles) se disolvió en MeOH (15 mL), se añadió Pd-C 10% (cat.) a la mezcla de reacción y se mantuvo bajo atmósfera de hidrógeno (1 bar) hasta reducción completa (c.c.f. CH₂Cl₂:MeOH:Et₃N, 3:3:1), obteniéndose el 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etanol (**12**) (675 mg, cuant.) como un aceite.

¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ (ppm) 3.65-3.58 (m, 8H, 4 x CH₂O), 3.55-3.50 (m, 2H, CH₂OH), 2.70 (t, 1H, *J*=5.5 Hz, CH₂NH₂) 2.77 (t, 1H, *J*=5.5 Hz, CH₂NH₂)

¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz): δ (ppm) 72.3, 71.6, 70.0, 69.4 68.1 (5 × CH₂O), 40.6 (CH₂NH₂)

ESI-MS para $C_6H_{15}NO_3$; calculado: 149.1 $[M]^+$; encontrado: 150.1 $[M + H]^+$

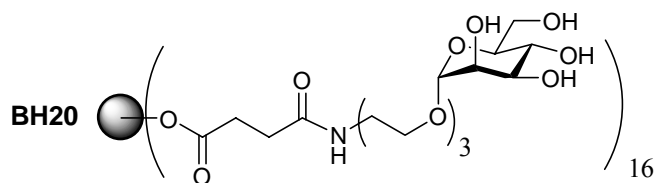
BH20SucLL



A una disolución de 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etanol (**12**) (45 mg, 0.307 mmoles) y BH20sucOH (20 mg, 6.39×10^{-3} mmoles) en DMF:CH₂Cl₂ 1:1 (5 mL), se añadieron DIC (48 μ L, 0.307 mmoles) y HOBt (41 mg, 0.307 mmoles). La disolución se mantuvo en agitación durante 96 horas y después se eliminó la mezcla de disolventes a vacío. El residuo se lavó con Et₂O y se purificó por ultracentrifugación a 3000 g usando filtros centriplus YM-3 (con una masa molecular de corte de 3kDA) obteniéndose el sistema multivalente dendrítico BH20sucLL (22 mg, 66%) como un aceite.

¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) 4.25-4.05 (m, 56H, 28 x CH₂OCO_{Boltorn}), 3.62-3.45 (m, 160H, 80 x -CH₂O-), 3.30-3.18 (m, 32H, 16 x CH₂NHCO), 2.64-2.50 (m, 32H, 16 x NHCOCH₂CH₂COO), 2.50-2.38 (m, 32H, 16 x NHCOCH₂CH₂COO), 1.15 (m, 36H, 12 x CH₃_{Boltorn})

BH20SucLMan

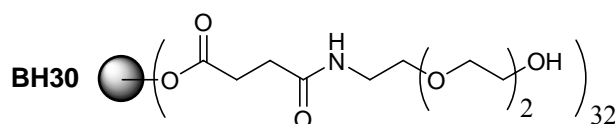


Parte Experimental

A una disolución de 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil α -D-manopiranosido (**9**) (48 mg, 0.153 mmoles) y BH20sucOH (20 mg, 6.39×10^{-3} mmoles) en DMF:CH₂Cl₂ 1:1 (5 mL), se añadieron DIC (48 μ L, 0.307 mmoles) y HOBt (41 mg, 0.307 mmoles). La disolución se mantuvo en agitación durante 96 horas y después se eliminó la mezcla de disolventes a vacío. El residuo se lavó con Et₂O y se purificó por ultracentrifugación a 3000 g usando filtros centriplus YM-3 (con una masa molecular de corte de 3kDA) obteniéndose el sistema multivalente dendrítico BH20sucLMan (30 mg, 60%) como un sólido blanco.

¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) 4.77 (s, 16H, 16 x H₁), 4.30-4.10 (m, 56H, 28 x CH₂OCO_{Boltorn}), 3.84 (m, 16H, 16 x H₂), 3.78 (m, 16H, 16 x H₆), 3.74-3.46 (m, 224 H, 16 x H₃ + H₄ + H₅ + H₆ + 5CH₂O), 3.31-3.22 (m, 32H, 16 x CH₂NH), 2.62-2.51 (m, 32H, 16 x NHCOCH₂CH₂COO), 2.51-2.40 (m, 32H, 16 x NHCOCH₂CH₂COO), 1.24-1.10 (m, 36H, 12 x CH₃_{Boltorn})

BH30SucLL



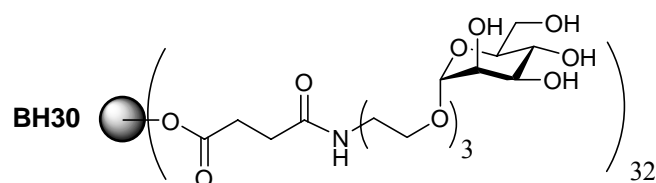
A una disolución de 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etanol (**12**) (108 mg, 0.728 mmoles) y BH30sucOH (50 mg, 7.9×10^{-3} mmoles) en DMF:CH₂Cl₂ 1:1 (5 mL), se añadieron DIC (114 μ L, 0.728 mmoles) y HOBt (99 mg, 0.728 mmoles). La disolución se mantuvo en agitación durante 96 horas y después se eliminó la mezcla de disolventes a vacío. El residuo se lavó con Et₂O y se purificó por ultracentrifugación a 3000 g usando filtros centriplus YM-3 (con una masa molecular de corte de 3kDA), obteniéndose el sistema multivalente dendrítico BH20sucLMan (60 mg, 70%) como un aceite.

¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) 4.25-4.05 (m, 120H, 60 x CH₂OCO_{Boltorn}), 3.62-3.45 (m, 320H, 160 x -CH₂O-), 3.30-3.18 (m, 64H, 32 x CH₂NHCO), 2.64-

2.50 (m, 64H, 32 x $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 2.50-2.38 (m, 64H, 32 x $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 1.15 (m, 84H, 28 x $\text{CH}_{3\text{Boltorn}}$)

^{13}C RMN (D_2O , 75 MHz): δ (ppm) 181.9 (CO), 62.1 ($\text{CH}_{2\text{Boltorn}}$), 72.0 (CH_2O), 69.8 (CH_2O), 69.7 (CH_2O), 69.6 (CH_2O), 69.1 (CH_2O), 67.1 (CH_2O), 60.6 (CH_2NH), 39.2 ($\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 38.2 ($\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 18.3 ($\text{CH}_{3\text{Boltorn}}$)

BH30SucLMan



A una disolución de 2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etil α -D-manopiranosido (**9**) (45 mg, 0.145 mmoles) y BH30sucOH (20 mg, 3.03×10^{-3} mmoles) en $\text{DMF}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1 (5 mL), se añadieron DIC (45 μL , 0.290 mmoles) y HOBT (39 mg, 0.290 mmoles). La disolución se mantuvo en agitación durante 96 horas y después se eliminó la mezcla de disolventes a vacío. El residuo se lavó con Et_2O y se purificó por ultracentrifugación a 3000 g usando filtros centriplus YM-3 (con una masa molecular de corte de 3kDA) obteniéndose el sistema multivalente dendrítico BH30sucLMan (30 mg, 62%) como un sólido blanco.

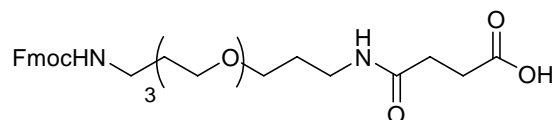
^1H RMN (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) 4.78 (s, 32H, 16 x H_1), 4.28-4.05 (m, 120H, 60 x $\text{CH}_2\text{OCO}_{\text{Boltorn}}$), 3.85 (m, 32H, 16 x H_2), 3.80 (m, 16H, 16 x H_6), 3.76-3.48 (m, 448 H, 32 x $H_3 + H_4 + H_5 + H_6 + 5\text{CH}_2\text{O}$), 3.34-3.21 (m, 64H, 32 x CH_2NH), 2.63-2.51 (m, 64H, 32 x $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 2.51-2.40 (m, 64H, 32 x $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 1.26-1.07 (m, 84H, 28 x $\text{CH}_{3\text{Boltorn}}$)

^{13}C RMN (D_2O , 75 MHz): δ (ppm) 181.6 (CO), 99.8 (C_1), 72.7 (C_5), 71.7 (CH_2O) 70.6, 70.5 ($\text{C}_2 + \text{C}_3$), 70.0, 69.7, 69.6, 69.5, 69.2, 66.9, 66.7, 66.4 (4 x $\text{CH}_2\text{O} + 2$

x CH₂Boltorn + C₄ + C₆) 61.0 (C₅), 60.3 (CH₂NH), 38.9 (NHCOCH₂CH₂COO), 37.9 (NHCOCH₂CH₂COO), 28.0, 17.0 (CH₃Boltorn)

8.4 Síntesis de los derivados de manosa funcionalizados en la posición 1 y 6.

Espaciador protegido con un grupo Fmoc (15)



A una disolución de 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (**13**) (1.11 g, 5.045 mmoles) en acetonitrilo (25 mL), se añadió gota a gota durante 1 hora una disolución de anhídrido succínico (0.5 g, 5.045 mmoles) en acetonitrilo (12.5 mL). La reacción se mantuvo en agitación durante 3 horas más. Después, la fase orgánica se decantó y el aceite viscoso resultante de la reacción se volvió a disolver en una mezcla acetonitrilo-agua al 50% (50 mL) y se enfrió a 0 °C durante 1 hora. Se añadió lentamente una disolución 1.3 equiv de Fmoc-OSuc (2.2 g, 6.52 mmoles) en acetonitrilo (12.5 mL) junto con DIPEA para mantener el pH entre 8-9. Después de mantener la reacción en agitación durante una noche a temperatura ambiente, los disolventes se eliminaron a vacío, el residuo resultante se disolvió en una disolución de NaHCO₃ al 5% en agua (50 mL) y se lavó con AcOEt (50 mL). La fase orgánica se descartó, y la fase acuosa se acidificó hasta pH 2 con una disolución HCl al 5%. Después, se realizó una extracción de la fase acuosa con AcOEt (3 x 25 mL). La combinación de las fases orgánicas se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a vacío, obteniéndose el compuesto **15** (1.8 g, 66%) como un aceite.

¹H RMN (CD₃OD, 500 MHz): δ (ppm) 7.77 (d, 1H, *J*=7.5 Hz, CH_{ArFmoc}), 7.62 (d, 1H, *J*=7.5 Hz, CH_{ArFmoc}), 7.36 (d, 1H, *J*=7.5 Hz, CH_{ArFmoc}), 7.28 (d, 1H, *J*=7.5 Hz, CH_{ArFmoc}), 4.34 (d, 2H, *J*=7.0 Hz, CH_{2Fmoc}), 4.17 (t, 1H, *J*=6.5 Hz, CH_{Fmoc}), 3.62-3.42 (m, 12H, 6 x CH₂O), 3.21 (t, 2H, *J*=6.5 Hz,) 3.16 (t, 2H, *J*=6.5 Hz,)

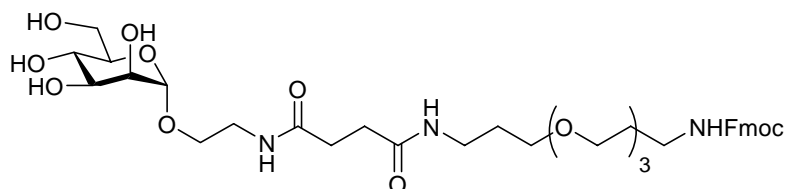
2.53 (t, 2H, $J=6.7$ Hz, $N(O)CCH_2$), 2.41 (t, 2H, $J=6.7$ Hz, $N(O)CCH_2$), 1.75-1.66 (m, 4H, 2 x $NHCH_2CH_2CH_2O$)

^{13}C RMN (CD_3OD , 125 MHz) δ (ppm) 175.9 (COO), 159.7 (COO), 146.2 (C_{ArFmoc}), 143.5 (C_{ArFmoc}), 129.6 (C_{ArFmoc}), 129.0 (C_{ArFmoc}), 127.0 (C_{ArFmoc}), 121.8 (C_{ArFmoc}), 72.4 (CH_2O), 72.0 (CH_2O), 70.7 (CH_2O), 70.6 (CH_2O), 68.3 (CH_2O), 39.9 (CH_2NH), 38.6 (CH_2NH), 33.5 ($N(O)CCH_2$), 32.9 ($N(O)CCH_2$), 31.6 ($NHCH_2CH_2CH_2O$), 31.2 ($NHCH_2CH_2CH_2O$)

ESI-MS para $C_{29}H_{38}N_2O_8$; calculado: 542.3 $[M]^+$; encontrado: 543.3 $[M+H]^+$, 565.3 $[M+Na]^+$ y 581.2 $[M+K]^+$

Derivado de manosa con un espaciador en la posición 1 protegido con Fmoc

(16)



A una disolución del espaciador **15** (18 mg, 0.088 mmoles) y del derivado de manosa **5** (50 mg, 0.092 mmol) en DMF (3 mL), se añadieron DIC (27 μ L, 0.18 mmoles) y HOBt (24 mg, 0.18 mmoles). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 60 °C durante 24 horas. Después, el disolvente se eliminó a vacío y el producto final se purificó, primero por Sephadex LH-20 usando como eluyente (CH_2Cl_2 -MeOH, 1:1) y, finalmente, por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente (CH_2Cl_2 :MeOH, 9:1), obteniéndose el compuesto **16** (37 mg, 60%) como un aceite.

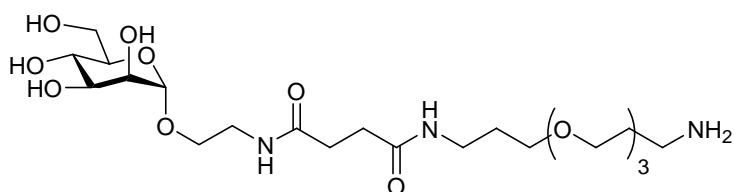
$[\alpha]_D^{23}$: +21.8 (c 0.46, MeOH)

¹H RMN (CD₃OD, 500 MHz): δ (ppm) 7.77 (d, 2H, *J*=7.5 Hz, CH_{ArFmoc}), 7.62 (d, 2H, *J*=7.5 Hz, CH_{ArFmoc}), 7.36 (t, 2H, *J*=7.5 Hz, CH_{ArFmoc}), 7.28 (d, 2H, *J*=7.5 Hz, CH_{ArFmoc}), 4.72 (d, 1H, *J*=2.0 Hz, H₁), 4.34 (d, 2H, *J*=6.5 Hz, CH_{2Fmoc}), 4.17 (t, 1H, *J*=6.5 Hz, CH_{Fmoc}), 3.81 (dd, 1H, *J*=2.0 & 11.7 Hz, H₆), 3.78 (dd, 1H, *J*=1.5 & 3.0 Hz, H₂), 3.75- 3.63 (m, 4H, H₃ + H₄ + H₆ + H₇), 3.63-3.45 (m, 14H, 6 x CH₂O + H₇ + H₅), 3.42-3.35 (m, 1H, H₈), 3.34-3.29 (m, 1H, H₈), 3.20 (t, 2H, *J*=6.5 Hz, CH₂NH), 3.17 (t, 2H, *J*=6.5 Hz, CH₂NH), 2.55-2.39 (m, 4H, HNOCC₂H₂CONH), 1.74- 1.66 (m, 4H, 2 x HNCH₂CH₂CH₂O)

¹³C RMN (CD₃OD, 125 MHz) δ (ppm) 173.4 (COO), 173.1 (COO), 144.0 (C_{ArFmoc}), 141.2 (C_{ArFmoc}), 127.4 (C_{ArFmoc}), 126.7 (C_{ArFmoc}), 124.7 (C_{ArFmoc}), 119.5 (C_{ArFmoc}), 100.3 (C₁), 73.4 (C₅), 71.1 (C₃), 70.7 (C₂), 70.1, 69.8, 68.5, 68.3, 67.3 (CH₂O + C₄) 66.1 (CH₂Fmoc), 65.8 (C₇), 61.6 (C₆), 38.9 (C₈), 37.7 (CH₂NH), 36.5 (CH₂NH), 30.9(N(O)CCH₂), 30.8(N(O)CCH₂), 29.4 (NHCH₂CH₂-CH₂O), 29.0 (NHCH₂CH₂CH₂O)

ESI-MS para C₃₇H₅₃N₃O₁₃; calculado: 747.4 [M]⁺; encontrado: 770.4.3 [M+Na]⁺, 786.3 [M+K]⁺

Derivado de manosa con un espaciador en la posición 1 (17)



Sobre una disolución del compuesto **16** (7 mg, 9.36 x 10⁻³ mmoles) en DMF (1 mL) se añadió una disolución de piperidina al 20% en DMF (200 µL) y la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, el disolvente se eliminó a vacío, el residuo se disolvió en agua (10 mL) y se lavó con CH₂Cl₂ (10 mL). La fase acuosa se eliminó a vacío para obtener el producto deseado **17** (4 mg, 80%) como un aceite.

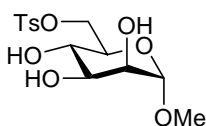
$[\alpha]_D^{23}$: +23.2 (*c* 0.3, MeOH)

$^1\text{H RMN}$ (CD_3OD , 500 MHz): δ (ppm) 4.73 (d, 1H, $J=1.7$ Hz, H_1), 3.81 (dd, 1H, $J=2.0$ & 11.5 Hz, H_6'), 3.78 (dd, 1H, $J=1.7$ & 3.5 Hz, H_2), 3.74-3.71 (m, 1H, H_7'), 3.71-3.46 (m, 17H, $H_7 + H_6 + H_4 + H_5 + H_3 + 6 \times \text{CH}_2\text{O}$), 3.46-3.37 (m, 1H, H_8), 3.35-3.29 (m, 1H, H_8'), 3.22 (t, 1H, $J=7.0$ Hz, CH_2NH), 3.08 (t, 1H, $J=6.5$ Hz, CH_2NH), 2.49-2.43 (m, 4H, $\text{HNOCCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.79-1.64 (m, 4H, $2 \times \text{HNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)

$^{13}\text{C RMN}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ (ppm) 173.4 (COO), 173.1 (COO), 100.3 (C_1), 73.4 (C_5), 71.9, 70.8, 70.1, 70.0, 69.7, 69.6, 69.0, 68.3, 67.3 ($6 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4$), 65.8 (C_7), 61.5 (C_6), 38.9 (C_8), 38.8 (CH_2NH), 38.3 (CH_2NH), 30.7 ($\text{N}(\text{O})\text{CCH}_2$), 30.6 ($\text{N}(\text{O})\text{CCH}_2$), 29.3 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 29.3 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)

ESI-MS para $\text{C}_{22}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_{11}$; calculado: 525.3 $[\text{M}]^+$; encontrado: 526.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Metil 6-tosil- α -D-manopiranosido (19)⁸⁶



El α -metilmanopiranosido (**18**) (2.0 g, 10.30 mmol) se disolvió en piridina seca (30 mL) y la disolución se enfrió a 0°C. Después, TsCl (2.77 g, 14.53 mmol) se añadió lentamente sobre la disolución. La reacción se mantuvo en agitación a 0°C durante una noche. El disolvente se eliminó a vacío y el producto final se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente (Hexano:AcOEt, 7:1), obteniéndose el producto deseado **19** (5.1 g, 70%) como un sólido blanco.

⁸⁶ Wang, P.; Shen, G. J.; Wang, Y. F.; Ichikawa, Y.; Wong, C. H.; *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 3895-3990.

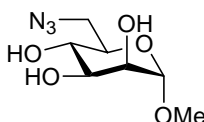
$[\alpha]_D^{23}$: +47.3 (*c* 1.00, CHCl₃)

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 7.80 (d, 2H, *J*=8.3 Hz, 2H_{Ts}), 7.33 (d, 2H, *J*=2.0 & 8.0 Hz, 2H_{Ts}), 4.67 (d, 1H, *J*=1.2 Hz, H_I), 4.35 (dd, 1H, *J*=10.7 & 4.1 Hz, H₆), 4.26 (dd, 1H, *J*=4 & 10.7 Hz, H_{6'}), 3.95-3.87 (m, 1H, H₂), 3.78-3.62 (m, 3H, H₃ + H₄ + H₅), 3.30 (s, 3H, -OCH₃), 2.42 (s, 3H, -CH_{3Ts})

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm) 145.0 (C_{Ts}), 132.7 (C_{Ts}), 129.9 (CH_{Ts}), 128.0 (CH_{Ts}), 100.9 (C₁), 71.6 (C₃), 70.5 (C₂), 69.8 (C₄), 69.1 (C₆), 67.3 (C₅), 55.2(-OCH₃), 21.7 (-CH_{3Ts})

ESI-MS para C₁₄H₂₀O₈S; calculado: 348.1 [M]⁺; encontrado: 386.9 [M+K]⁺

Metil 6-azido-6-deoxy-α-D-manopiranosido (20)⁸⁶



Una mezcla de metil 6-tosil-α-D-manopiranosido (**19**) (2.8 g, 8.04 mmol) y azida sódica (4.18 g, 64.35 mmol) en DMF seca (40 mL) se mantuvo en agitación durante 15 horas a 60°C. Transcurrido este tiempo, el disolvente se eliminó a vacío y el residuo se disolvió en AcOEt. El exceso de azida sódica y tosilato de sodio, se eliminó por filtración, y el filtrado se evaporó y purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (95:5), obteniéndose el producto deseado **20** (1.52 g, 98%) como un aceite.

$[\alpha]_D^{23}$: +54.8 (*c* 1.00, MeOH)

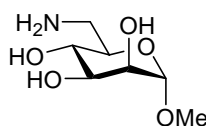
¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm) 4.62 (d, 1H, *J*=1.4 Hz, H_I), 3.77 (dd, 1H, *J*=1.6 & 3.2 Hz, H₂), 3.60 (dt, 1H, *J*=3.3 & 9.3 Hz, H₃), 3.61-3.56 (m, 1H, H₅)

3.54 (c, 1H, $J=9.3$ Hz, H_4), 3.45 (dd, 1H, $J=2.2$ & 12.9 Hz, H_6), 3.43 (dd, 1H, $J=6.0$ & 12.9 Hz, H_6') 3.38 (s, 3H, $-OCH_3$)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm) 101.5 (C_1), 72.3 (C_5), 71.0 (C_3), 70.6 (C_2), 68.1 (C_4), 53.9 (C_6), 51.5 ($-OCH_3$)

ESI-MS para $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_5$; calculado: 219.1 $[\text{M}]^+$; encontrado: 242.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Metil 6-amino-6-deoxy- α -D-manopiranososa (21)⁸⁶



El compuesto metil 6-azido-6-deoxy- α -D-manopiranosido (**20**) (130 mg, 0.59 mmol) se disolvió en MeOH (30 mL), se añadió Pd-C 10% (cat.) a la mezcla de reacción y se hidrogenó (1 bar) hasta reducción completa, obteniéndose el compuesto **21** (120 mg, cuant.) como un sólido blanco.

$[\alpha]_D^{23}$: +49.3 (c 1.00, MeOH)

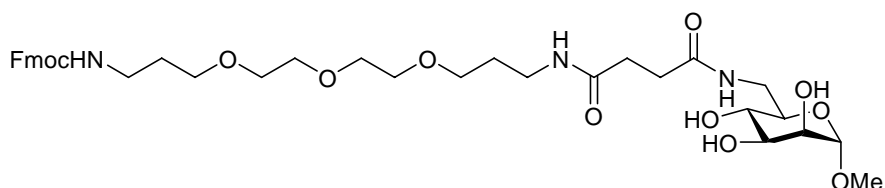
^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ (ppm) 4.67 (d, 1H, $J=1.1$ Hz, H_1), 3.84-3.74 (m, 1H, H_2), 3.71-3.63 (m, 1H, H_3), 3.60-3.45 (m, 2H, H_4 & H_5), 3.40 (s, 3H, OCH_3), 3.13 (d, 1H, $J=12.0$ Hz, H_6), 2.95 (dd, 1H, $J=6.0$ & 13.2 Hz, H_6')

^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm) 102.9 (C_1), 72.7 (C_4), 72.3 (C_3), 72.0 (C_2), 69.7 (C_5), 55.5 (OCH_3), 43.0 (C_6)

ESI-MS para $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_5$; calculado: 193.1 $[\text{M}]^+$; encontrado: 194.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ & 219.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Derivado de manosa con un espaciador en la posición 6 protegido con Fmoc

(22)



A una disolución del derivado de manosa **21** (33 mg, 0.17 mmol) y el espaciador **15** (100 mg, 0.09 mmol) en DMF (7 mL), se añadió DIC (60 μ L, 0.35 mmol) y HOBt (47 mg, 0.35 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 60 °C durante 24 horas. Después, el disolvente se eliminó a vacío y el producto final se purificó, primero por Sephadex LH-20 usando como eluyente CH_2Cl_2 :MeOH (95:5) y, finalmente, por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente CH_2Cl_2 :MeOH (95:5), obteniéndose el compuesto **22** (75 mg, 60%) como un aceite.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: +19.0 (*c* 1.00, MeOH)

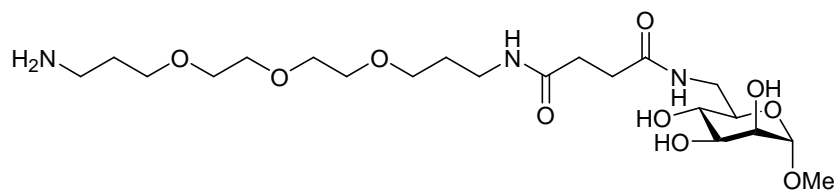
$^1\text{H RMN}$ (CD_3OD , 300 MHz) δ (ppm) 7.81 (d, 2H, $J=7.5$ Hz, $\text{CH}_{\text{ArFmoc}}$), 7.66 (d, 2H, $J=7.2$ Hz, $\text{CH}_{\text{ArFmoc}}$), 7.43 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, $\text{CH}_{\text{ArFmoc}}$), 7.32 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, $\text{CH}_{\text{ArFmoc}}$), 4.62 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_1), 4.38 (d, 2H, $J=6.6$ Hz, CH_2Fmoc), 4.21 (t, 1H, $J=6.3$ Hz, CH_{Fmoc}), 3.80 (dd, 1H, $J=1.8$ & 3.3 Hz, H_2), 3.72-3.45 (m, 17H, 6 x CH_2O + H_3 + H_4 + H_5 + $2H_6$), 3.35 (s, 3H, OCH_3), 3.29-3.17 (m, 4H, 2 x CH_2NH), 2.56-2.44 (m, 4H, 2 x $\text{N}(\text{O})\text{CCH}_2$), 1.80-1.69 (m, 4H, 2 x $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)

$^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm) 175.1 (COO), 174.5 (COO), 145.3 (C_{ArFmoc}), 142.6 (C_{ArFmoc}), 128.7 ($\text{CH}_{\text{ArFmoc}}$), 128.1 ($\text{CH}_{\text{ArFmoc}}$), 126.1 ($\text{CH}_{\text{ArFmoc}}$), 121.9 ($\text{CH}_{\text{ArFmoc}}$), 102.8 (C_1), 72.4, 72.2, 72.1, 71.5, 71.2, 69.8, 69.7, 69.4 (CH_2O + C_2 + C_3 + C_4 + C_5), 67.5 (CH_2Fmoc), 55.3 (C_6), 48.5 (CH_{Fmoc}), 41.3 (CH_2NH),

39.1 (CH₂NH), 37.9 (CH₂NH), 32.3 (N(O)CCH₂), 32.2 (N(O)CCH₂), 30.8 (NHCH₂CH₂CH₂O), 30.3 (NHCH₂CH₂CH₂O)

ESI-MS para C₃₆H₅₁N₃O₁₀; calculado: 717.3 [M]⁺; encontrado: 740.3 [M+Na]⁺ & 756.3 [M+K]⁺

Derivado de manosa con un espaciador en la posición 6 (23)



A una disolución del compuesto **22** (25 mg, 0.035 mmol) en DMF (2 mL), se le añadió una disolución de piperidina al 20% en DMF (400 µL) y la reacción se mantuvo en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, el disolvente se eliminó a vacío, el residuo se disolvió en agua (20 mL) y se lavó con CH₂Cl₂ (20 mL). El agua se eliminó a vacío para obtener el producto deseado **23** (17 mg, cuant.) como un aceite.

[α]_D²³: +20.9 (c 1.00, MeOH)

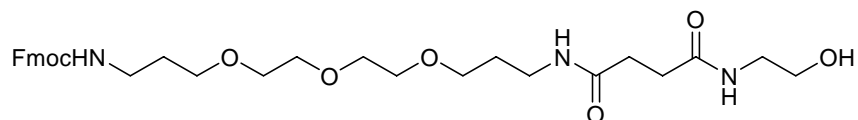
¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm) 4.63 (d, 1H, *J*=1.8 Hz, *H*₁), 3.80 (dd, 1H, *J*=1.8 & 3.6 Hz, *H*₂), 3.70-3.56 (m, 13H, *H*₃, *H*₅, *H*₄, 5 x CH₂O) 3.56-3.48 (m, 6H, 2*H*₆, CH₂O), 3.37 (s, 3H, OCH₃), 3.27 (t, 2 H, *J*=6.9 Hz, CH₂NH), 2.85 (t, 2H, *J*=6.9 Hz, CH₂NH), 2.57-2.44 (m, 4H, 2 x N(O)CCH₂), 1.86-1.71 (m, 4H, 2 x NHCH₂CH₂-CH₂O)

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm) 175.1 (COO), 174.6 (COO), 102.8 (C₁), 72.4, 72.2, 72.1, 71.5, 71.4, 71.2, 71.1, 70.4, 69.8, 69.4 (C₂, C₃, C₄, C₅, 6 x

CH₂O), 55.3 (OCH₃), 41.3 (C₆), 40.1 (CH₂NH), 37.8 (CH₂NH), 32.3 (N(O)CCH₂), 32.1 (N(O)CCH₂), 31.9 (CCH₂CH₂CH₂O), 30.4 (CH₂CH₂CH₂O)

ESI-MS para C₂₁H₄₁N₃O₁₀; calculado: 495.3 [M]⁺; encontrado: 496.3 [M+H]⁺

Espaciador etanolamina protegido con Fmoc (24)



A una disolución de 2-aminoetanol (5.5 μ L, 0.09 mmol) y del espaciador **15** (100 mg, 0.09 mmol) en DMF (4 mL), se añadió DIC (29 μ L, 0.184 mmol) y HOBT (25 mg, 0.184 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 60 °C durante 24 horas. Después, el disolvente se eliminó a vacío y el producto final se purificó, primero por Sephadex LH-20 usando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (1:1) y, finalmente, por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (95:5), obteniéndose el compuesto **24** (34 mg, 64%) como un aceite.

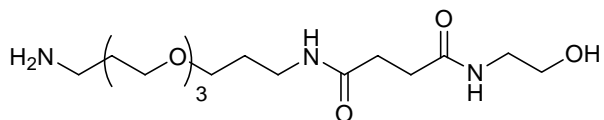
¹H RMN (CD₃OD, 500 MHz): δ (ppm) 7.77 (d, 2H, $J=7.5$ Hz, CH_{ArFmoc}), 7.62 (d, 2H, $J=7.5$ Hz, CH_{ArFmoc}), 7.38 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, CH_{ArFmoc}), 7.28 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, CH_{ArFmoc}), 4.34 (d, 2H, $J=6.5$ Hz, CH_{2Fmoc}), 4.17 (t, 1H, $J=6.5$ Hz, CH_{Fmoc}), 3.65-3.50 (m, 12H, CH₂O), 3.46 (m, 4H, NHCH₂CH₂CH₂O), 3.26 (t, 2H, $J=5.5$ Hz, CH₂NH), 3.20 (t, 2H, $J=6.5$ Hz, CH₂NH), 3.16 (t, 2H, $J=5.5$ Hz, CH₂NH), 2.47-2.41 (m, 4H, N(O)CCH₂) 1.73-1.71 (m, 4H, NHCH₂CH₂CH₂O)

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm) 173.5 (COO), 173.1 (COO), 144.0 (C_{ArFmoc}), 141.2 (C_{ArFmoc}), 127.4 (CH_{ArFmoc}), 126.7 (CH_{ArFmoc}), 124.7 (CH_{ArFmoc}), 119.5 (CH_{ArFmoc}), 70.1 (CH₂O), 69.8 (CH₂O), 68.5 (CH₂O), 68.3 (CH₂O), 66.1 (CH_{2Fmoc}), 60.2 (CH₂OH), 47.2 (CH_{Fmoc}), 41.6 (CH₂NH), 37.7 (CH₂NH), 36.4

(CH₂NH), 30.9 (2 x N(O)CCH₂), 29.4 (NHCH₂CH₂CH₂O), 29.0 (NHCH₂CH₂CH₂O)

ESI-MS para C₃₁H₄₃N₃O₈; calculado: 585.3 [M]⁺; encontrado: 608.3 [M+Na]⁺ y 624.2 [M+K]⁺

Espaciador etanolamina (25)



Sobre una disolución del compuesto **24** (10 mg, 0.17 mmoles) en DMF (2 mL) se añadió una disolución de piperidina al 20% en DMF (400 µL) y la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante dos 2 horas. Después, el disolvente se eliminó a vacío, el residuo se disolvió en agua (10 mL) y se lavó con CH₂Cl₂ (10 mL). El agua se eliminó a vacío, obteniéndose el producto deseado **25** (6 mg, cuant.) como un aceite.

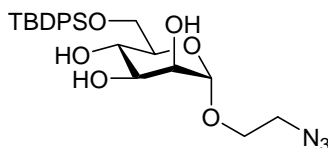
¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz): δ (ppm) 3.65-3.50 (m, 12H, 5 x CH₂O + CH₂OH), 3.49 (t, 2H, J=6.0 Hz, CH₂O), 3.26 (t, 2H, J=6.5 Hz, CH₂NH), 3.22 (t, 2H, J=6.5 Hz, CH₂NH), 2.86 (t, 2H, J=6.5 Hz, CH₂NH), 2.46-2.43 (m, 4H, 2 x N(O)CCH₂), 1.79 (q, 2H, J=6.0 Hz, NHCH₂CH₂CH₂O), 1.72 (q, 2H, J=6.0 Hz, 2 x NHCH₂CH₂CH₂O)

¹³C RMN (CD₃OD, 125 MHz) δ (ppm) 173.5 (COO), 173.2 (COO), 70.1, 70.0, 69.8, 69.7, 69.0, 68.4, 60.2 (6 x CH₂O + CH₂OH), 41.6 (CH₂NH), 38.7 (CH₂NH), 36.4 (CH₂NH), 30.8 (N(O)CCH₂), 30.8 (N(O)CCH₂), 29.8 (CH₂CH₂CH₂O), 29.0 (CH₂CH₂CH₂O)

ESI-MS para C₁₆H₃₃N₃O₆; calculado: 363.2 [M]⁺; encontrado: 386.2 [M+Na]⁺

8.5 Síntesis de los oligosacáridos de manosa 45, 48 y 51

2-Azidoetil 6-*O*-*tert*-butildifenilsilil- α -D-manopiranosido (26)



A una disolución del derivado de manosa **4** (945 mg, 3.80 mmoles) e imidazol (388 mg, 5.7 mmoles) en DMF seca (10 mL), se añadió TBDPSCl (1 mL, 5.7 mmoles) a temperatura ambiente. La disolución se mantuvo en agitación durante 4 horas y, transcurrido ese tiempo, el disolvente se eliminó a vacío. El crudo de reacción resultante se disolvió en CH₂Cl₂ (30 mL), se lavó con agua (3 x 30 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5) obteniéndose el derivado de manosa **26** (1.46g, 79%) como un aceite.

$[\alpha]_D^{23}$: +16.04 (c. 0.75, CHCl₃)

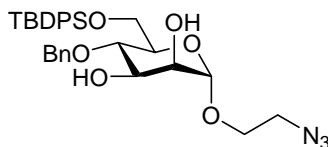
¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 7.72-7.68 (m, 4H, H_{fenilo}), 7.48-7.38 (m, 6H, H_{fenilo}), 4.85 (d, 1H, $J=1.8$ Hz, H_1), 3.97-3.77 (m, 5H, $H_7 + 2H_6 + H_4 + H_7'$), 3.75-3.65 (m, 1H, H_7), 3.60-3.53 (m, 1H, H_5), 3.38-3.32 (m, 2H, $2H_8$), 1.01 (s, 9H, CH_{3TBDPS})

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm) 135.6 ($\underline{C}H_{TBDPS}$), 132.8 (C_{TBDPS}), 132.7 (C_{TBDPS}), 129.9 (C_{TBDPS}), 127.9 (\underline{C}_{TBDPS}), 99.7 (C_1), 71.5 (C_3 ó C_4), 70.9 (C_5), 70.4 (C_3 ó C_4), 66.5 (C_7), 65.2 (C_6), 50.5 (C_8), 26.8 ($\underline{C}H_{3TBDPS}$), 19.2 (C_{TBDPS})

ESI-MS para C₂₄H₃₃N₃O₆Si; calculado: 487.2 [M]⁺; Encontrado: 510.2 [M + Na]⁺

Análisis Elemental: Calculado: C, 59,11%; H, 6,82%; N, 8,62%;
 Encontrado: C, 59,53%; H, 7,07%; N, 8,74%;

2-Azidoetil 4-O-bencil-6-O-(*tert*-butildifenilsilil)- α -D-manopiranosido (29**)**



El derivado de manosa **26** (1.17 g, 2.4 mmoles), 2,2'-dimetoxipropano (2.7 mL) y PPTS (29 mg, 0.11 mmoles), se disolvieron en acetona (20 mL) y se mantuvieron en agitación durante 24 horas. La reacción se siguió por c.c.f. (tolueno-AcOEt, 9:1), cuando desapareció el producto de partida se añadió Et₃N a la disolución y se concentró a vacío. El crudo de reacción y bromuro de bencilo (0.45 mL, 3.8 mmoles) se disolvieron en DMF seca (20 mL). Después, sobre la disolución se añadió NaH (222 mg, 3.8 mmoles) en pequeñas porciones a 0°C y la mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La evolución de la reacción se siguió por c.c.f. (tolueno-AcOEt, 94:6). Después, se añadió MeOH (1mL) para eliminar el exceso de NaH de la reacción y el disolvente se evaporó a vacío. Al crudo de reacción se añadió Et₂O (100 mL), se lavó con agua (2 x 100 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró. El aceite anterior se disolvió en DCM (60 mL) y se añadió TFA (10 mL) a temperatura ambiente. La reacción se mantuvo en agitación durante 5 h. A la disolución se le añadió agua a 0 °C, se neutralizó con NaHCO₃ sat. (100 mL), se lavó dos veces más con NaHCO₃ sat. (50 mL) y con NaCl sat. (100 mL), se secó con MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente (tolueno-AcOEt, 9:1), obteniéndose el derivado de manosa **29** (843 mg, 63% en tres etapas) como un aceite.

$[\alpha]_D^{23}$: +16.02 (c= 0.75, CHCl₃)

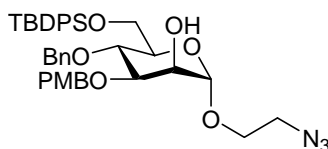
$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 7.76-7.68 (m, 4H, H_{TBDPS}), 7.47-7.20 (m, 11H, $5H_{\text{Bn}}$ & $6H_{\text{TBDPS}}$), 4.89 (s, 1H, H_1), 4.69 (sist AB_{Bn} , 2H), 4.02-3.90 (m, 4H, $H_2 + H_3 + 2H_6$), 3.85 (dt, 1H, $J=10.5$ & 4.9 Hz, H_7), 3.81-3.65 (m, 2H, H_4 & H_5), 3.59 (dt, 1H, $J=10.5$ & 4.9 Hz, H_7), 3.38-3.32 (m, 2H, $2H_8$), 1.07 (s, 9H, H_{TBDPS})

$^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 138.6 (C_{TBDPS}), 136.3(CH_{TBDPS}), 136.0 (CH_{TBDPS}), 133.9 (C_{Ar}), 133.6 (C_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 99.9 (C_1), 77.6 (C_5 ó C_4), 77.2 ($\text{CH}_{2\text{Bn}}$), 75.2 (C_5 ó C_4), 72.9 (C_2 ó C_3), 72.0 (C_2 ó C_3), 66.7 (C_7), 63.5 (C_6), 50.9 (C_8), 27.2 (CH_3TBDPS), 19.7 (C_{TBDPS})

ESI-MS para $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_6\text{Si}$; calculado: 577,3 $[\text{M}]^+$; encontrado: 600.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

Análisis Elemental: Calculado: C, 64.14%; H, 7.07%; N, 6.94%
Encontrado: C, 64.45%; H, 6.80%; N, 7.27%

2-Azidoetil 4-O-bencil-3-O-(4-metoxibencil)-6-O-tert-butildifenilsilil- α -D-manopiranosido (30)



Una disolución del compuesto **29** (850 mg, 1.48 mmoles) y óxido de dibutilestaño (406 mg, 1.63 mmoles, 1.1 eq) en tolueno (40 mL) se calentó a reflujo usando un Dean-Stark durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, la disolución se enfrió hasta temperatura ambiente. PMBCl (227 μL , 1.63 mmoles) y Bu_4NI (602 mg, 1.63 mmoles) se añadieron a la disolución y se mantuvo a reflujo durante 3 horas. La evolución de la reacción se siguió por c.c.f. (tolueno-AcOEt, 96:4). La mezcla de reacción se diluyó con AcOEt (50 mL), se lavó con agua (2 x 100 mL) y se secó sobre MgSO_4 anhidro. El disolvente se eliminó a

vacío y el producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (tolueno-MeOH, 94:6), obteniéndose el derivado **30** (849 mg, 82%) como un aceite.

$[\alpha]_D^{23}$: +12.00 (c= 1.00, CHCl₃)

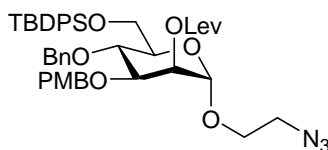
¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7.78-7.66 (m, 4H, 4H_{TBDPS}), 7.47-7.23 (m, 11H, 2H_{PMB} & 9H_{Ar}), 6.87 (d, 2H, J=8.6 Hz, 2H_{PMB}), 4.94 (d, 1H, J=1.0 Hz, H₁), 4.84 (d, 1H, J=10.9 Hz, CH_{2Bn}), 4.63 (s, 2H, CH_{2PMB}) 4.55 (d, 1H, J=10.9 Hz, CH_{2Bn}), 4.09-4.04 (m, 1H, H₂), 3.97-3.84 (m, 4H, H₃ + 2H₆ + H₇), 3.84-3.77 (m, 4H, H₄ + -OCH₃), 3.77-3.69 (m, 1H, H₅), 3.65-3.55 (m, 1H, H₇), 3.44-3.27 (m, 2H, 2H₈), 1.05 (s, 9H, H_{TBDPS})

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 159.8 (C_{Ar}), 138.7 (C_{Ar}), 136.3 (C_{Ar}), 136.0 (C_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}), 133.7 (C_{Ar}), 130.4 (C_{Ar}), 130.1 (C_{Ar}), 130.0 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.3(C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 114.4 (C_{Ar}), 99.6 (C₁), 80.2 (C₃), 74.4 (CH_{2Bn}), 73.2 (C₅), 72.2 (CH_{2PMB}), 68.7 (C₂), 66.7 (C₇), 63.6 (C₆), 55.7 (CH_{3OPMB}), 50.9 (C₈), 27.2 (CH_{3TBDPS}), 19.7 (C_{TBDPS})

ESI-MS para C₃₉H₄₇N₃O₇Si; calculado: 697.3 [M]⁺; encontrado: 720.3 [M + Na]⁺ & 736.3 [M + K]⁺

Análisis Elemental: Calculado: C, 66.96%; H, 6.80%; N, 5.74%
 Encontrado: C, 67.12%; H, 6.79%; N, 6.02%

2-Azidoetil 4-O-bencil-6-O-*tert*-butildifenilsilil-2-O-levulinoil-3-O-(4-metoxibencil)- α -D-manopiranosido (31)



El compuesto **30** (100 mg, 0.144 mmoles) y DCC (149 mg, 0.720 mmoles) se disolvieron en CH₂Cl₂ (2 mL) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón. Después se añadió ácido levulínico (30 μ L, 0.288 mmoles), observándose la formación de la urea como un precipitado blanco. Se adicionó una cantidad catalítica de DMAP (8 mg) y la reacción se mantuvo en agitación durante 24 h. La evolución de la reacción se siguió por c.c.f (tolueno-MeOH, 9:1). La mezcla de reacción se diluyó en CH₂Cl₂ (6 mL), se filtró sobre celita y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂, 0.5 % acetona), obteniéndose el derivado de manosa **31** como un aceite (100 mg, 88%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: +2.10 (c= 0.75, CHCl₃)

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7.76-7.65 (m, 4H, *H*_{Ar}), 7.46-7.30 (m, 6H, 6*H*_{Ar}), 7.30-7.22 (m, 5H, 6*H*_{Ar}), 7.21-7.13 (m, 2H, *H*_{Ar}), 6.83 (d, 2H, *J*=8.7 Hz, 2*H*_{PMB}), 5.34 (dd, 1H, *J*=1.9 & 2.8 Hz, *H*₂), 4.89 (d, 1H, *J*=10.6 Hz, CH₂Bn), 4.87 (s, 1H, *H*₁), 4.62 (d, 1H, *J*=10.9 Hz, CH₂PMB), 4.57 (d, 1H, *J*=10.7 Hz, CH₂Bn), 4.45 (d, 1H, *J*= 10.9 Hz, CH₂PMB), 4.03-3.87 (m, 4H, *H*₃ + *H*₅ + 2*H*₆), 3.87-3.77 (m, 4H, -OCH₃ & *H*₇), 3.74-3.66 (m, 1H, *H*₄), 3.58 (dt, 1H, *J*=10.6 & 5.1 Hz, *H*₇), 3.34 (t, 2H, *J*=5.1 Hz, 2*H*₈), 2.83-2.61 (m, 4H, CH₂CH₂lev), 2.15 (s, 3H, CH₃lev), 1.56 (s, 9H, CH₃TBDPS)

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 206.8 (CO_{lev}), 172.6 (COO_{lev}), 159.7 (C_{Ar}), 136.3 (C_{Ar}), 136.0 (C_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}), 133.6 (C_{Ar}), 130.5 (C_{Ar}), 130.3 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 114.2 (C_{Ar}), 98.2 (C₁), 78.1 (C₃),

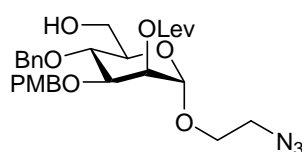
75.7 (CH₂Bn), 74.3 (C₅), 73.3 (C₄), 71.8 (CH₂PMB), 69.3 (C₂), 66.9 (C₇), 63.3 (C₆), 55.7 (-OCH₃PMB), 50.8 (C₈), 38.4 (CH₂lev), 30.3 (CH₃lev), 28.5 (CH₂lev), 27.2 (CH₃TBDPS), 19.8 (C_{TBDPS})

ESI-MS para C₄₄H₅₃N₃O₉Si; calculado: 795.4 [M]⁺; Encontrado: 818.3 [M+Na]⁺

Análisis Elemental: Calculado: C, 66.39%; H, 6.71%; N, 5.28%

Encontrado: C, 66.27%; H, 6.87%; N, 5.08%

2-Azidoetil 4-O-bencil-2-O-levulinoil-3-O-(4-metoxibencil)- α -D-manopiranosido (32)



Procedimiento A: Sobre una disolución del compuesto **31** (215 mg, 0.27 mmoles) en THF (2 mL) se añadió AcOH (150 μ L) a 0° C y bajo atmosfera de argón. Después, se permitió que la reacción alcanzara temperatura ambiente y se añadió una disolución 1 M de TBAF en THF (330 μ L, 0.33 mmoles). La disolución se mantuvo en agitación bajo atmósfera de argón y se siguió por c.c.f. (tolueno-MeOH, 9:1). Al cabo de 5 horas el disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se purificó por cromatografía en columna gel de sílice (Hexano-AcOEt, 1:2) obteniéndose el compuesto **32** (150 mg, 95%) como un aceite.

Procedimiento B: Sobre una disolución del compuesto **31** (45 mg, 6.3 x 10⁻² mmoles) en THF (8 mL) se añadió AcOH (150 μ L) y el complejo HF-piridina (1.1 mL), bajo atmosfera de argón y a temperatura ambiente. La disolución se mantuvo en agitación y se siguió por c.c.f. (tolueno-MeOH, 100:2). Al cabo de 7 horas, el contenido de la reacción se diluyó en AcOEt y se trató con NaHCO₃ sat. (4 x 10 mL) y NaCl sat. (10 mL). La fase orgánica se seco sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se purificó por

Parte Experimental

cromatografía en columna gel de sílice (Hexano-AcOEt, 1:1.5) obteniéndose el compuesto **32** (35 mg, 95%) como un aceite.

$[\alpha]_D^{23}$: +13.02 (c= 0.4, CHCl₃)

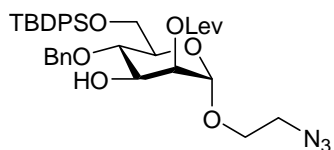
¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7.38-7.21 (m, 7H, 5H_{Bn} & 2H_{PMB}), 6.84 (d, 2H, J=8.7 Hz, 2H_{PMB}), 5.34 (dd, 1H, J= 3.1 & 1.8 Hz, H₂), 4.90 (d, 1H, J=10.9 Hz, CH_{2Bn}), 4.86 (d, 1H, J=1.6 Hz, H₁), 4.61 (d, 1H, J=10.9 Hz, CH_{2Bn}), 4.61 (d, 1H, J=10.9 Hz, CH_{2Bn}), 4.45 (d, 1H, J=10.9 Hz, CH_{2Bn}), 4.00 (dd, 1H, J=3.3 & 9.1 Hz, H₃), 3.89-3.66 (m, 5H, H₄ + H₅ + 2H₆ + H₇), 3.59 (dt, 1H, J=10.3 & 4.9 Hz, H₇), 3.37 (t, 2H, J=4.9 Hz, 2H₈), 2.87-2.57 (m, 4H, CH₂CH_{2lev}), 2.18 (s, 3H, CH_{3lev})

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 206.9 (CO_{lev}), 172.5 (COO_{lev}), 159.7 (C_{PMB}), 138.6 (C_{Ar}), 130.4 (C_{Ar}), 130.2 (C_{Ar}), 128.9 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 114.2 (C_{Ar}), 98.2 (C₁), 77.8 (C₃), 75.6 (CH_{2Bn}), 74.2 (C₄ ó C₅), 72.5 (C₄ ó C₅), 71.8 (CH_{2Bn}), 69.2 (C₂), 67.2 (C₇), 62.5 (C₆), 55.7 (-OCH₃), 50.8 (C₈), 38.5 (CH_{2lev}), 30.2 (CH_{3lev}), 28.5 (CH_{2lev})

ESI-MS para C₂₈H₃₅N₃O₉; calculado: 557.2 [M]⁺; Encontrado: 596.1 [M+Na]⁺ & 580.1 [M+K]⁺

Análisis Elemental: Calculado: C, 59.66%; H, 6.12%; N, 7.73%
Encontrado: C, 59.84%; H, 6.00%; N, 7.74%

2-Azidoetil 4-O-bencil-6-O-(*tert*-butildifenilsilil)-2-O-levulinoil- α -D-manopiranosido (33)



El derivado de manosa **31** (40 mg, 0.05 mmoles) se disolvió CH₂Cl₂ (2 mL), la disolución se enfrió a -20 °C y se añadió TFA (0.6 mL), manteniéndose la agitación durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se añadió etanol (0.5 mL) y CH₂Cl₂ (4 mL) a la mezcla de reacción. La disolución se lavó con NaHCO₃ (2 x 10 mL), NaCl sat. (10 mL), y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Después de eliminar el disolvente a vacío, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano-AcOEt, 2:1), obteniéndose el compuesto **33** (33 mg, cuant.) como un aceite.

$[\alpha]_D^{23}$: +18.12 (c= 0.9, CHCl₃)

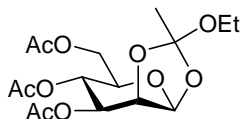
¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7.76-7.65 (m, 4H, *H*_{Ph}), 7.46-7.36 (m, 6H, *H*_{Ar}), 7.36-7.23 (m, 5H, *H*_{Ar}), 5.26-5.17 (m, 1H, *H*₂), 4.88 (d, 1H, *J*=10.7 Hz, *CH*_{2Bn}), 4.86 (s, 1H, *H*₁), 4.67 (d, 1H, *J*=10.7 Hz, *CH*_{2Bn}), 4.21-4.15 (m, 1H, *H*₃), 4.02-3.78 (m, 4H, 2*H*₆ + *H*₄ + *H*₇), 3.74-3.70 (m, 1H, *H*₅), 3.61-3.54 (m, 1H, *H*₇), 3.37-3.33 (m, 2H, *H*₈), 2.80 (t, 2H, *J*=5.7 Hz, *CH*_{2lev}), 2.65 (t, 2H, *J*=5.7 Hz, *CH*_{2lev}), 2.18 (s, 3H, *CH*_{3lev}), 1.09 (s, 9H, *CH*_{3_{tert-Bu})}

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 207.4 (CO_{1lev}), 172.9 (COO_{1lev}), 138.6 (C_{Ar}), 136.3 (C_{Ar}), 136.0 (C_{Ar}), 135.9 (C_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}), 133.5 (C_{Ar}), 130.1 (C_{Ar}), 128.9 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 97.8 (C₁), 77.6 (C₄), 75.4 (C₂), 73.0 (C₅), 70.8 (C₃), 66.8 (C₇), 63.3 (C₆), 50.8 (C₈), 38.6 (CH_{2lev}), 30.3 (CH_{3lev}), 28.5 (CH_{2lev}), 27.2 (CH_{3TBDPS}), 19.8 (C_{TBDPS})

ESI-MS para $C_{36}H_{45}N_3O_8Si$; calculado: 675,3 $[M]^+$; Encontrado: 698.3 $[M+Na]^+$ & 714.3 $[M+K]^+$

Análisis Elemental: Calculado: C, 63.52%; H, 6.55%; N, 19.35%
Encontrado: C, 63.81%; H, 6.41%; N, 19.65%

3,4,6-tri-*O*-Acetil-1,2(1-etoxietiliden)- β -D-manopiranosido (38)¹²³



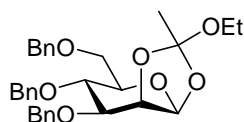
A una disolución de 1,2,3,5,6-penta-*O*-acetil- α -D-manospiranosido (**1**) (11.0 g, 28.18 mmoles) en CH_2Cl_2 (90mL) a 0°C, se añadió una disolución de HBr al 33% en AcOH (30 mL). La disolución se dejó enfriar hasta temperatura ambiente manteniéndose la agitación durante 30 min. Transcurrido este tiempo, el crudo de la reacción se añadió sobre una mezcla H_2O :Hielo (150 mL) y se extrajo con AcOEt (150 mL). La fase orgánica se lavó con $NaHSO_4$ sat. (3 x 150 mL), NaCl sat. (150 mL), se secó con $MgSO_4$ anhidro y el disolvente se eliminó a vacío. El crudo de la reacción se disolvió en CH_2Cl_2 (90 mL), se añadió 2,6-lutidina (10 mL) y EtOH (15 mL) y la disolución se mantuvo en agitación durante 24 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó en Et_2O (50 mL) y el precipitado blanco que se generó se eliminó por filtración sobre celita. El filtrado se lavó con H_2O (150 mL), $NaHSO_4$ sat. (150 mL) y NaCl sat. (150 mL). La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$ anhidro y el disolvente se eliminó a vacío. El producto se purificó por recristalización Etanol: H_2O , obteniéndose el compuesto **38** (8.0 g , 75%) como un sólido blanco.

¹H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): δ (ppm) 5.47 (d, 1H, $J=2.5$ Hz, H_1), 5.30 (t, 1H, $J=9.7$ Hz, H_4), 5.14 (dd, 1H, $J=4.0$ & 9.9 Hz, H_3), 4.59 (dd, 1H, $J=2.5$ & 3.9 Hz,

¹²³ Millar, A.; Kim, K. H.; Minster, D. K.; Ohgi, T.; Hecht, S. M.; *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 189-196.

H_2), 4.23 (dd, 1H, $J=4.9$ & 12.1 Hz, H_6), 4.23 (dd, 1H, $J=2.7$ & 12.1 Hz, H_6'), 3.70-3.64 (m, 1H, H_5), 3.53 (q, 2H, $J=7.0$ Hz, OCH_2CH_3), 2.12, 2.07 & 2.05 (3s, 3 x 3H, CH_3COO), 1.76 (s, 3H, OCH_3), 1.18 (t, 3H, $J=7.0$ Hz, OCH_2CH_3)

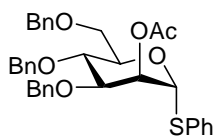
3,4,6-tri-*O*-Bencil-1,2(1-etoetiliden)- β -D-manopiranosido (40)¹²³



A una disolución del ortoéster **38** (7.9 g, 21.12 mmoles) en MeOH anhidro (200 mL) se añadió una disolución de NaOMe 1M (10 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Después, se neutralizó con resina Amberlite IR 120, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. El crudo de la reacción se disolvió DMF (400 mL) y se llevó a 0 °C. Sobre la disolución se añadió NaH (3.8 g, 95.04 mmoles) y BnBr (11.3 mL, 95.05 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La evolución de la reacción se siguió por c.c.f. (Hex-AcOEt, 2:1). Después, se añadió MeOH (10 mL) para eliminar el exceso de NaH de la reacción y el disolvente se eliminó a vacío. Al crudo de reacción se le adicionó Et₂O (100 mL), se lavó con NaCl sat. (2x 100 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno-AcOEt, 1:1), obteniéndose el compuesto **40** (10.5 g, 95%) como un sólido blanco.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7.40-7.25 (m, 15H, 15 x H_{Ph}), 5.30 (d, 1H, $J=3.5$ Hz, H_1), 4.88 (d, 1H, $J=10.8$ Hz, CH_{2Bn}), 4.74 (d, 1H, $J=11.4$ Hz, CH_{2Bn}), 4.65 (d, 1H, $J=12.1$ Hz, CH_{2Bn}), 4.56 (d, 1H, $J=10.8$ Hz, CH_{2Bn}), 4.50 (d, 1H, $J=11.4$ Hz, CH_{2Bn}), 4.47 (d, 1H, $J=10.8$ Hz, CH_{2Bn}), 4.35 (t, 1H, $J=3.5$ Hz, H_2), 4.20-3.62 (m, 5H, $H_3 + H_4 + H_5 + 2H_6$), 3.53 (q, 2H, $J=6.7$ Hz, OCH_2CH_3) 1.76 (s, 3H, OCH_3), 1.20 (t, 3H, $J=6.7$ Hz, OCH_2CH_3)

Fenil 2-*O*-acetil 3,4,6-tri-*O*-bencil-1-tio- α -D-manopiranosido (**42**)

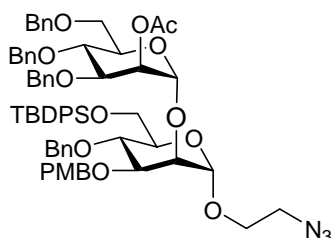


Una disolución del ortoéster **40** (675 mg, 1.30 mmoles) en una mezcla de AcOH (17 mL) y H₂O (8 mL) se calentó a 50°C durante 5 horas. Transcurrido este tiempo, la disolución se concentró a sequedad. El crudo de reacción se disolvió en CH₂Cl₂ (50 mL) y se lavó con NaHCO₃ sat. (50 mL) y H₂O (50 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a vacío. El aceite formado se disolvió en piridina (8 mL), se enfrió a 0°C y se añadió Ac₂O (4 mL). La disolución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 5 horas. Después, sobre la disolución se añadió AcOEt (50 mL), se trató con una disolución HCl al 10% (100 mL), NaOH al 10% (100 mL) y H₂O (100 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a vacío, obteniéndose el compuesto **41**. Sobre una disolución del compuesto **41** (690 mg, 1.28 mmoles) y PhSH (200 μ L, 1.94 mmoles) en CH₂Cl₂ (5 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se añadió BF₃.Et₂O (65 μ L, 1.29 mmol). Transcurridas 2 horas, se permitió que la disolución alcanzara temperatura ambiente. Después de 24 horas la mezcla de reacción se añadió sobre agua-hielo (30 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). La combinación de los extractos orgánicos se lavó con agua (30 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (30 mL), agua (30 mL) y se secó sobre MgSO₄ anhidro. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano:AcOEt, 7:1) obteniéndose el donador **42** (545 mg, 73%) como un aceite.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7.50-7.18 (m, 20H, 20 x H_{Ph}), 5.60 (dd, 1H, $J=1.9$ & 3.5 Hz, H_2), 4.88 (d, 1H, $J=12.1$ Hz, CH_{2Bn}), 4.72 (d, 1H, $J=11.4$ Hz, CH_{2Bn}), 4.66 (d, 1H, $J=12.1$ Hz, CH_{2Bn}), 4.57 (d, 1H, $J=10.8$ Hz, CH_{2Bn}), 4.51 (d, 1H, $J=11.4$ Hz, CH_{2Bn}), 4.47 (d, 1H, $J=12.1$ Hz, CH_{2Bn}), 4.33 (m, 1H,

H_5), 4.00-3.91 (m, 2H, $H_3 + H_4$), 3.85 (dd, 1H, $J=4.5$ & 11.0 Hz, H_6), 3.72 (dd, 1H, $J=2.1$ & 11.0 Hz, H_6'), 2.13 (s, 3H, CH_3COO)

2-Azidoetil 2-O-acetil-3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-4-O-bencil-6-O-(*tert*-butildifenilsilil)-3-O-(4-metoxibencil)- α -D-manopiranosido (43)



El derivado manosa **30** (84 mg, 0.120 mmoles), el donador de glicosilo **42** (91 mg, 0.156 mmoles) y tamiz molecular de 4 Å se disolvieron en DCM seco (2 mL). La mezcla se agitó durante 2 horas a t.a. bajo atmósfera de Ar. Después el sistema se enfrió a -20 °C y se añadió NIS (35 mg, 0.156 mmoles) y TfOH (1.5 μ L, 0.015 mmoles). A los 20 min. se paró la reacción con $NaHCO_3$ sat. El crudo de reacción se filtró sobre celita, se lavó con $Na_2S_2O_3$ sat., se secó sobre $MgSO_4$ anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía flash en gel de sílice (Hexano:AcOEt, 7:1) obteniéndose el disacárido **43** (110 mg, 78%) como un aceite.

$[\alpha]_D^{23}$: +4.05 (c= 1.00, $CHCl_3$)

1H RMN ($CDCl_3$, 500 MHz): δ (ppm) 7.73-7.71 (m, 2H, $2H_{TBDPS}$), 7.68-7.65 (m, 2H, $2H_{TBDPS}$), 7.34-7.19 (m, 23H, $23H_{Ar}$), 7.16-7.14 (m, 2H, $2H_{TBDPS}$), 7.12-7.10 (m, 2H, $2H_{TBDPS}$), 6.82 (d, 2H, $J=9.0$ Hz, $2H_{PMB}$), 5.52 (dd, 1H, $J=1.5$ & 3.0 Hz, H_{2B}), 4.98 (d, 1H, $J=1.0$ Hz, H_{1B}), 4.96 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_{1A}), 4.87 (d, 1H, $J=10.5$ Hz, CH_{2Bn}), 4.86 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CH_{2Bn}), 4.67 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CH_{2Bn}), 4.60 (d, 1H, $J=12.0$ Hz, CH_{2Bn}), 4.56 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CH_{2Bn}), 4.55 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CH_{2Bn}), 4.49 (d, 1H, $J=12.0$ Hz, CH_{2Bn}), 4.46 (d, 1H, $J=11.0$ Hz,

Parte Experimental

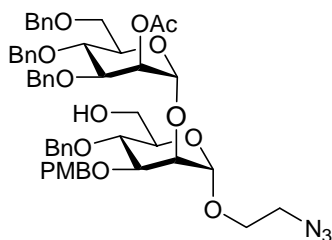
CH_{2Bn}), 4.41 (d, 1H, $J=10.5$ Hz, CH_{2Bn}) 4.02-3.98 (m, 1H, H_{5A}), 3.97 (dd, 1H, $J=3.5$ & 9.5 Hz, H_{3B}), 3.92 (m, 1H, H_{2A}), 3.91-3.83 (m, 4H, $2H_{6A} + H_{3A} + H_{4B}$), 3.78-3.74 (m, 3H, $2H_{6B}$ & H_{4A}), 3.77 (s, 3H, $-OCH_3$), 3.65-3.61 (m, 2H, H_7 & H_{5B}), 3.29-3.25 (m, 1H, H_7), 3.18-3.15 (m, 2H, $2H_8$), 2.12 (s, 3H, $3H_{Ac}$), 1.00 (s, 9H, CH_{3TBDPS})

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 125 MHz) δ (ppm) 170.1 (COO), 159.2 (C_{Ar}), 138.6 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}), 138.0 (C_{Ar}), 135.8 (C_{Ar}), 135.6 (C_{Ar}), 133.7 (C_{Ar}), 133.3 (C_{Ar}), 130.6 (C_{Ar}), 129.6 (C_{Ar}), 129.4 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 127.5 (C_{Ar}), 127.4 (C_{Ar}), 113.8 (C_{Ar}), 100.1 (C_{1B}), 98.8 (C_{1A}), 79.5 (C_{3A}), 78.4 (C_{3B}), 75.8 (C_{2A}), 75.1, 74.6, 74.2, 73.6, 73.0, 72.0, 72.0, 71.8, (5 x $-CH_2-Ph + C_{4A} + C_{5A} + C_{4B} + C_{5B}$) 69.6 (C_{6B}), 68.8 (C_{2B}), 66.2 (C_7), 63.1 (C_{6A}), 55.2 ($-OCH_3$), 50.4 (C_8), 26.9 (CH_{3TBDPS}), 21.1 ($OCOCH_3$), 19.2 (C_{TBDPS})

ESI-MS para $C_{68}H_{77}N_3O_{13}Si$; calculado: 1171,5 $[M]^+$; encontrado: 1194.5 $[M+Na]^+$

Análisis Elemental: Calculado: C, 69.66%; H, 6.62%; N, 3.58%
Encontrado: C, 69.43%; H, 6.79%; N, 3.32%

2-Azidoetil 2-O-acetil-3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-4-O-bencil-3-O-(4-metoxibencil)- α -D-manopiranosido (44)



El disacárido **43** (100 mg, 0.086 mmoles) y TBAF (46 mg, 0.172) se disolvieron en THF (1.5 mL). La disolución se mantuvo en agitación durante 5 horas bajo atmósfera de argón. La reacción se siguió por c.c.f. (tolueno-MeOH, 9:1). El disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano-AcOEt, 1:2), obteniéndose el compuesto **44** (34.5 mg, 95%) como un aceite.

$[\alpha]_D^{23}$: +16.9 (c 0.6, CHCl₃)

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 7.34-7.23 (m, 20H, 18 x H_{ArBn} & 2 x H_{ArPMB}), 7.17-7.14 (m, 2H, 2 x H_{ArBn}), 6.82 (d, 2H, $J=6.5$ Hz, 2 x H_{ArPMB}), 5.49 (dd, 1H, $J=1.9$ Hz & 3.1 Hz, H_{2B}), 4.94 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_{1B}), 4.88 (d, 1H, CH_{2Bn}), 4.87 (s, 1H, H_{1A}), 4.84 (d, 1H, $J=10.5$ Hz, CH_{2Bn}), 4.73 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CH_{2Bn}), 4.61 (d, 2H, $J=11.0$ Hz, CH_{2Bn}), 4.59 (d, 1H, $J=9.5$ Hz, CH_{2Bn}), 4.57 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CH_{2Bn}), 4.52 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CH_{2Bn}), 4.47 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CH_{2Bn}), 4.44 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CH_{2Bn}), 3.93 (dd, 1H, $J=3.2$ Hz & 9.0 Hz, H_{3B}), 3.92-3.86 (m, 3H, $H_{3A} + H_{2A} + H_{5A}$), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 3.76-3.66 (m, 6H, $2H_{6A} + 2H_{6B} + H_{4A} + H_{4B}$), 3.66-6.63 (m, 1H, H_7), 3.58 (dt, 1H, $J=3.5$ & 10.5 Hz, H_{5B}), 3.31-3.26 (m, 1H, H_7), 3.24-3.17 (m, 2H, $2H_8$), 2.12 (s, 3H, -OCH₃).

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm) 170.1 (COO), 159.2 (C_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}), 138.1 (C_{Ar}), 137.9 (C_{Ar}), 130.5 (C_{Ar}), 129.3 (C_{Ar}), 128.4 (C_{Ar}), 128.4

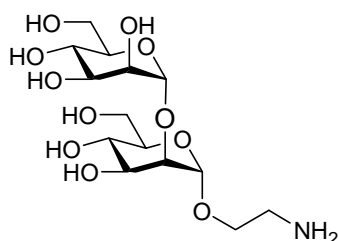
Parte Experimental

(C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 113.9 (C_{Ar}), 99.7 (H_{1B}), 98.8 (H_{1A}), 79.1 (C_{3A}), 77.9 (C_{3B}), 75.4, 74.5, 74.1, 73.5, 72.2, 71.9, 71.8 (5 x $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$ + C_{2A} + C_{4A} + C_{5A} + C_{4B}, C_{5B}), 69.5 (C_{6B}), 68.6 (C_{2B}), 66.5 (C₇), 62.3 (C_{6A}), 55.2 (-OCH₃), 50.4 (C₈), 21.1 (OCOCH₃).

ESI-MS para C₅₂H₅₉N₃O₁₃; calculado: 933,4 [M]⁺; Encontrado: 956.5 [M + Na]⁺ & 972.4 [M + K]⁺

Análisis Elemental: Calculado: C, 66.87%; H, 6.37%; N, 4.50%
Encontrado: C, 66.76%; H, 6.53%; N, 4.37%

2-Azidoetil *O*- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido (**45**)



El disacárido protegido **44** (34 mg, 0.04 mmoles) se disolvió en MeOH seco (1 mL) y una disolución de NaOMe (1M en MeOH) (70 μ l, 0.07 mmol) se añadió a la disolución. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, se neutralizó con resina Amberlite IR 120, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. El sólido blanco que se formó se disolvió en MeOH (3 mL) y una cantidad catalítica de Pd-C 10% (cat.) se añadió y la mezcla de reacción se hidrogenó (1 bar de presión) hasta que la reducción de la azida se completó (c.c.f. *i*-PrOH:H₂O 7:3 + 1% AcOH) para obtener el disacárido **45** (14 mg, cuant. en dos etapas) como un sólido blanco.

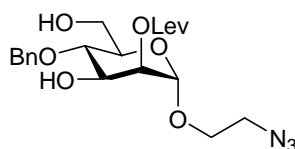
$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: +82.5 (c. 1.0 en H₂O)

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 500 MHz): 5.13 (s, 1H, H_{1B}), 5.01 (s, 1H, H_{1A}), 4.01 (m, 1H, H_{2A}), 4.00 (m, 1H, H_{2B}), 3.96 (m, 1H, H_{6A}), 3.91 (m, 1H, H_{3A}), 3.88 (m, 1H, H_7), 3.81 (m, 1H, H_{4A}), 3.79 (m, 1H, H_{3B}), 3.73 (m, 1H, H_{6A}), 3.73 (m, 1H, $2H_{6B}$), 3.72 (m, 1H, H_{5A}), 3.67 (m, 1H, H_7), 3.64 (m, 1H, H_{5B}), 3.61 (m, 1H, H_{4B}), 3.23 (m, 1H, $2H_8$)

$^{13}\text{C NMR}$ (D_2O , 125 MHz) δ (ppm): 101.9 (C_{1B}), 98.0 (C_{1A}), 78.2 (C_{2A}), 72.9 (C_{5B}), 72.6 (C_{5A}), 70.0 (C_{3B}), 69.7 (C_{3A}), 69.6 (C_{2B}), 66.6 (C_{4B}), 66.4 (C_{4A}), 63.2 (C_{6A}), 60.8 (C_7), 60.6 (C_{6B}), 38.7 (C_8)

ESI-MS para $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_{16}$; calculado: 385.2 $[\text{M}]^+$; Encontrado: 408.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

2-Azidoetil 4-O-bencil-2-O-levulinoil- α -D-manopiranosido (46)



El derivado de manosa **32** (74 mg, 0.126 mmoles) se disolvió CH_2Cl_2 (5 mL). La disolución se enfrió a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y se añadió TFA (1.5 mL), manteniéndose en agitación durante 20 min. Transcurrido este tiempo se añadió etanol (0.5 mL) y CH_2Cl_2 (4 mL) a la mezcla de reacción. La disolución se lavó con NaHCO_3 sat. (2 x 15 mL), NaCl sat. (15 mL), y se secó sobre MgSO_4 anhidro. Después de eliminar el disolvente a vacío, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexane-AcOEt, 2:1) obteniéndose el compuesto **46** (53 mg, 97%) como un aceite.

$[\alpha]_D^{23}$: +32.91 ($c=0.70$, CHCl_3)

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 7.40-7.31 (m, 4H, $4H_{Bn}$), 7.31-7.25 (m, 1H, H_{Bn}), 5.13 (dd, 1H, $J=2.0$ & 3.3 Hz, H_2), 4.87 (d, 1H, $J=10.9$ Hz, CH_{2Bn}), 4.82 (d,

Parte Experimental

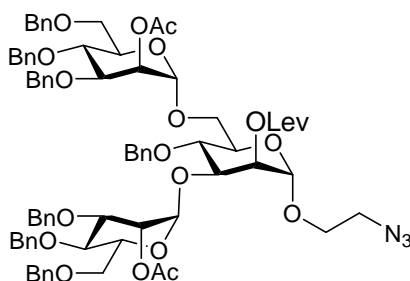
1H, $J=1.2$ Hz, H_1), 4.71 (d, 1H, $J=10.9$ Hz, CH_{2Bn}), 4.19-4.13 (m, 1H, H_3), 3.89-3.76 (m, 3H, $2H_6$ & H_7), 3.75-3.64 (m, 2H, H_4 & H_5) 3.61-3.55 (m, 1H, H_7), 3.42-3.32 (m, 2H, $2H_8$), 2.84-2.75 (m, 2H, CH_{2lev}), 2.67-2.59 (m, 2H, CH_{2lev}), 2.19 (s, 3H, CH_{3lev}).

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz): δ (ppm) 207.1 (CO_{lev}), 170.1 (COO_{lev}), 133.7 (C_{Ar}), 133.2(C_{Ar}), 130.6 (C_{Ar}), 129.6 (C_{Ar}), 127.5 (C_{Ar}), 127.4 (C_{Ar}), 97.5 (C_1), 75.7 (C_4 ó C_5), 72.7 (C_2), 72.0 (C_4 ó C_5), 70.1 (C_3), 66.6 (C_7), 61.7 (C_6), 50.4 (C_8), 38.4 (CH_{2lev}), 29.7 (CH_{3lev}), 28.4 (CH_{2lev}).

ESI-MS para $C_{20}H_{27}N_3O_8$; calculado: 437.2 M^+ ; Encontrado: 460.2 $[M+Na]^+$

Análisis Elemental: Calculado: C, 53.90%; H, 5.95%; N, 9.92%
Encontrado: C, 53.99%; H, 5.75%; N, 10.14%

2-Azidoetil *O*-(2-*O*-acetil-3,4,6-tri-*O*-bencil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3))-*O*-[2-*O*-acetil-3,4,6-tri-*O*-bencil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- 4-*O*-bencil-2-*O*-levulinoil- α -D-manopiranosido (47)



El derivado de manosa **46** (40 mg, 0.092 mmoles), el donador de glicosilo **42** (146 mg, 0.249 mmoles) y tamiz molecular de 4 Å se disolvieron en CH_2Cl_2 seco (3 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 2 horas a

temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón. Después, el sistema se enfrió a -20 °C y se añadió NIS (56 mg, 0.249 mmoles) y TfOH (2.5 µL, 0.026 mmoles). A los 20 min. se paró la reacción con NaHCO₃ sat. El crudo de reacción se filtró sobre celita, se lavó con Na₂S₂O₃ sat., se secó sobre MgSO₄ anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano:AcOEt, 7:1) obteniéndose el trisacárido **47** (91 mg, 72%) como un aceite.

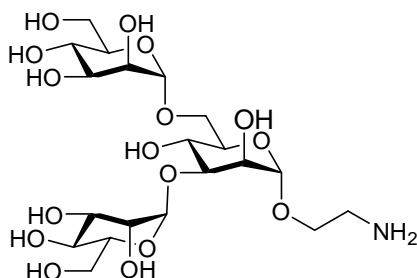
$[\alpha]_D^{23}$: +45.76 (c= 1.0, CHCl₃)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 7.47-7.16 (m, 32H, 32 x *H*_{ArBn}), 5.49 (dd, 1H, *J*=3.5 & 1.5 Hz, *H*₂), 4.47 (dd, 1H, *J*=3.5 & 1.5 Hz, *H*₂), 5.22-5.18 (m, 2H, *H*₂ & *H*₁), 5.03 (s, 1H, *J*=1.5 Hz, *H*₁), 4.89 (d, 1H, *J*=11.0 Hz, *H*_{Bn}), 4.86 (d, 1H, *J*=11.0 Hz, *H*_{Bn}), 4.79 (s, 2H, 2*H*_{Bn}), 4.75 (d, 1H, *J*=11.0 Hz, 1*H*_{Bn}), 4.73 (d, 1H, *J*=11.0 Hz, *H*_{Bn}), 4.72 (d, 1H, *J*=11.0 Hz, *H*_{Bn}), 4.69 (d, 1H, *J*=1.5 Hz, *H*₁), 4.62-4.47 (m, 7H, 7*H*_{Bn}), 4.24 (dd, 1H, *J*=3.8 & 9.4 Hz, *H*₃), 4.01-4.67 (m, 15H, *H*_{4A} + *H*_{5A} + 2*H*_{6A} + *H*_{3C} + *H*_{4C} + *H*_{5C} + 2*H*_{6C} + *H*_{3D} + *H*_{4D} + *H*_{5D} + 2*H*_{6D} + *H*₇), 3.56-5.51 (m, 1H, *H*₇), 3.33-3.27 (m, 2H, 2*H*₈), 2.74-2.61 (m, 4H, 2 x *CH*_{2lev}), 2.20 (s, 3H, *CH*_{3lev}), 2.15 (s, 3H, *CH*_{3COO}), 2.13 (s, 3H, *CH*_{3COO})

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 208.1 (CO_{lev}), 174.5 (COO), 172.6 (COO), 172.4 (CO), 141.0 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 140.5 (C_{Ar}), 140.3 (C_{Ar}), 140.2 (C_{Ar}), 139.9 (C_{Ar}), 130.7 (C_{Ar}), 130.7 (C_{Ar}), 130.6 (C_{Ar}), 130.5 (C_{Ar}), 130.4 (C_{Ar}), 130.3 (C_{Ar}), 130.2 (C_{Ar}), 130.1 (C_{Ar}), 130.0 (C_{Ar}), 129.8 (C_{Ar}), 129.7 (C_{Ar}), 102.4 (C₁), 100.9 (C₁), 99.4 (C₁), 80.2 80.0, 76.7, 76.5, 76.3, 75.7, 75.7, 74.6, 74.2, 74.1, 73.8, 73.6, 71.1, 71.0, 70.8, 70.7, 69.0, 67.6 (C_{2A} + C_{3A} + C_{4A} + C_{5A} + C_{6A}, C_{2B} + C_{3B} + C_{4B} + C_{5B} + C_{6B} + C_{2C} + C_{3C} + C_{4C} + C_{5C} + C_{6C}) 52.5 (C₈), 40.1 (CH_{2lev}), 32.0(CH_{2lev}), 30.3 (CH_{3lev}), 23.4 (OCOCH₃), 23.3 (OCOCH₃)

ESI-MS para C₇₈H₈₇N₃O₂₀; calculado: 1385.6 [M]⁺; Encontrado: 1408.6 [M + Na]⁺ & 1424.4 (M + K)⁺

2-Azidoetil *O*- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[*O*- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- α -D-manopiranosido (48)



El trisacárido **47** (70 mg, 0.05 mmoles) se disolvió en MeOH anhidro (2 mL) y una disolución de NaOMe (1M en MeOH) (50 μ l, 0.05 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, se neutralizó con resina Amberlite IR 120, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. El sólido blanco que se formó se disolvió en MeOH (3 mL) y una cantidad catalítica de Pd-C 10% (cat.) se añadió y la mezcla de reacción se hidrogenó (1 bar de presión) hasta que la reducción de la azida se completó (c.c.f. *i*-PrOH:H₂O 7:3 + 1% AcOH) para obtener (27 mg, 97% en dos etapas) como un sólido blanco.

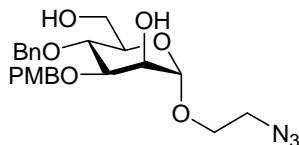
$[\alpha]_D^{25}$: +84.5 (*c* 0.50, H₂O)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ (ppm); 5.10 (m, 1H, *H*_{1B}), 4.90 (s, 1H, *H*_{1D}), 4.85 (s, 1H, *H*_{1A}), 4.15 (m, 1H, *H*_{2A}), 4.06 (m, 1H, *H*_{2B}), 4.00 (m, 1H, *H*_{6A}), 3.98 (m, 1H, *H*_{2D}), 3.96 (m, 1H, *H*₇), 3.93 (m, 1H, *H*_{3A}), 3.92 (m, 1H, *H*_{4A}), 3.89 (m, 1H, *H*_{6A}), 3.87 (m, 1H, *H*_{3B}), 3.82 (m, 1H, *H*_{3D}), 3.79 (m, 1H, *H*_{5A}), 3.77 (m, 1H, *H*_{5B}), 3.75 (m, 1H, *H*_{6A}), 3.75 (m, 1H, *H*_{6D}), 3.70 (m, 1H, *H*_{6A}), 3.70 (m, 1H, *H*₇), 3.67 (m, 1H, *H*_{4D}), 3.66 (m, 1H, *H*_{5D}), 3.61 (m, 1H, *H*_{4B}), 3.24 (m, 1H, 2*H*₈).

¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ (ppm) 102.4 (C_{1B}), 99.8 (C_{1A}), 99.3 (C_{1D}), 78.5 (C_{3A}), 73.4 (C_{5B}), 72.6 (C_{5D}), 71.1 (C_{5A}), 70.7 (C_{3D}), 70.3 (C_{3B}), 70.1 (C_{2B}), 70.0 (C_{2D}), 69.4 (C_{2A}), 66.6 (C_{4D}), 66.6 (C_{4B}), 65.3 (C_{4A}), 65.2 (C_{6A}), 63.6 (C₇), 60.8 (C_{6D}), 60.8 (C_{6B}), 39.1 (C₈)

ESI-MS para $C_{20}H_{37}NO_{16}$; calculado: 547.2 $[M]^+$; Encontrado: 548.2 $[M + H]^+$

2-Azidoetil 4-O-bencil-3-O-(4-metoxibencil)- α -D-manopiranosido (49)



El compuesto **30** (700 mg, 1.00 mmoles) y TBAF (533 mg, 2.00 mmoles) se disolvieron en THF (7 mL). La disolución se mantuvo en agitación bajo atmósfera de argón y la reacción se siguió por c.c.f. (Hexano-AcOEt, 1:3). Transcurridas 5 horas el disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano-AcOEt, 1:2), obteniéndose el derivado de manosa **49** (436 mg, 95%) como un aceite.

$[\alpha]_D^{23}$: +34.5 (c= 0.75, $CHCl_3$)

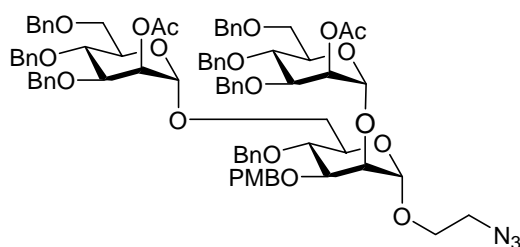
1H RMN ($CDCl_3$, 500 MHz): δ (ppm) 7.33-7.24 (m, 6H, H_{Ar}), 6.84 (d, 2H, $2H_{PMB}$), 4.90 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_1), 4.86 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CH_{2PMB}), 4.63 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CH_{2PMB}), 4.60 (s, 2H, CH_{2Bn}), 4.01 (dd, 1H, $J=1.5$ & 3.1 Hz, H_2), 3.88 (dd, 1H, $J=3.1$ & 9.0 Hz, H_3), 3.86-3.79 (m, 3H, H_4 & $2H_6$), 3.78 (s, 3H, - OCH_3), 3.75 (dd, 1H, $J=3.9$ & 12.3 Hz, H_7), 3.58 (dt, 1H, $J=3.9$ & 9.9 Hz, H_7), 3.40-3.29 (m, 2H, $2H_8$).

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 125 MHz): δ (ppm) 159.5 (C_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}), 129.9 (C_{Ar}), 129.7 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 114.0 (C_{Ar}), 99.4 (C_1), 79.5 (C_3), 75.2 (CH_{2Bn}), 73.8 (C_4 ó C_5), 71.9 (C_4 ó C_5), 71.8 (CH_{2PMB}), 68.3 (C_2), 66.7 (C_7), 62.1 (C_6), 55.3 (- OCH_3), 50.5 (C_8).

ESI-MS para C₂₃H₂₉N₃O₇; calculado: 459.2 [M]⁺; Encontrado: 482.3 [M+Na]⁺ & 498.2 [M+K]⁺

Análisis Elemental: Calculado: C, 60.12%; H, 6.36%; N, 9.16%
 Encontrado: C, 60.15%; H, 6.69%; N, 9.16%

2-Azidoetil O-(2-O-acetil-3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2))-O-[2-O-acetil-3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-4-O-bencil-3-O-(4-metoxibencil)- α -D-manopiranosido (50)



El derivado de manosa manosa **49** (49 mg, 0.107 mmoles), el donador de glicosilo **42** (91 mg, 0.278 mmoles) y tamiz molecular de 4 Å se disolvieron en CH₂Cl₂ seco (3 mL). La mezcla se mantuvo en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón. Después, el sistema se enfrió a -20 °C y se añadió NIS (63 mg, 0.278 mmoles) y TfOH (2.5 μ L, 0.028 mmoles). A los 20 min. se paró la reacción con NaHCO₃ sat. El crudo de reacción se filtró sobre celita, se lavó con Na₂S₂O₃ sat., se secó sobre MgSO₄ anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano:AcOEt, 10:1) obteniéndose el trisacárido **50** (88 mg, 70%) como un aceite.

$[\alpha]_D^{23}$: +17.05 (*c* 1.00, CHCl₃)

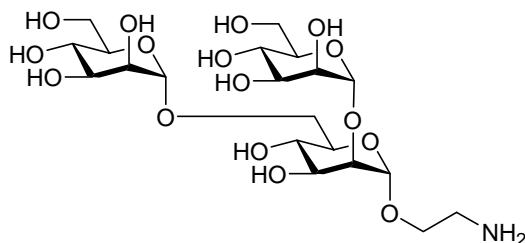
¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 7.32-7.21 (m, 32H, 18H_{ArBn} + 2H_{ArPMB}), 7.16-7.13 (m, 2H, 2H_{ArBn}), 7.12-7.08 (m, 2H, 2H_{ArBn}), 6.80 (d, 2H, *J*=9.0 Hz, 2H_{ArPMB}), 5.51 (dd, 1H, *J*=3.5 Hz & 1.5 Hz, H₂), 5.34 (dd, 1H, *J*= 2.0 Hz and 3.0

Hz, H_{2C}), 4.99 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_{1B}), 4.89 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_{1C}), 4.82 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, H_{Bn}), 4.81 (d, 2H, $J=11.0$ Hz, $2H_{Bn}$), 4.81 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H_{1A}), 4.79 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, H_{Bn}), 4.61 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, H_{Bn}), 4.61 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, H_{Bn}), 4.56 (s, 2H, $2H_{Bn}$), 4.50 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, H_{Bn}), 4.49 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, H_{Bn}), 4.46-4.40 (m, 5H, $5H_{Bn}$), 3.95 (dd, 1H $J=3.2$ Hz & 9.3 Hz, H_{3A}), 3.94-3.60 (m, 15H, $H_{2A} + H_{4A} + H_{5A} + 2H_{6A} + H_{3B} + H_{4B} + H_{5B} + 2H_{6B} + H_{3C} + H_{4C} + H_{5C} + 2H_{6C}$), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.52 (t, 1H, $J=9.3$ Hz, H_7), 3.32-3.28 (m, 1H, H_7), 3.20-3.11 (m, 2H, $2H_8$), 2.10 (s, 3H, CH_3COO), 2.09 (s, 3H, CH_3COO)

^{13}C RMN (125 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 170.3 (COO), 170.07 (COO), 159.2 (C_{Ar}), 138.6 (C_{Ar}), 138.4 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}), 138.0 (C_{Ar}), 137.9 (C_{Ar}), 130.3 (C_{Ar}), 129.3 (C_{Ar}), 128.4 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 127.5 (C_{Ar}), 110.0 (C_{Ar}), 113.8 (C_{Ar}), 99.8 (C_1), 98.7 (C_1), 97.1 (C_1), 79.4, 78.1, 78.0, 77.2, 75.2, 75.1, 74.9, 74.4, 73.5, 73.4, 71.9, 71.5, 71.4, 70.8, 69.2, 68.7, 68.5, 68.5, 66.3, 55.2 ($C_{2A} + C_{3A} + C_{4A} + C_{5A} + C_{6A} + C_{2B} + C_{3B} + C_{4B} + C_{5B} + C_{6B} + C_{2C} + C_{3C} + C_{4C} + C_{5C} + C_{6C} + C_7$), 50.3 (C_8), 21.1 (CH_3COO), 21.1 (CH_3COO)

ESI-MS for $C_{81}H_{89}N_3O_{19}$; calculado: 1407.6 $[M]^+$; encontrado: 1446.6 $[M + K]^+$.

2-Azidoetil *O*- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[*O*- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- α -D-manopiranosido (51)



El trisacárido **50** (34 mg, 0.04 mmoles) se disolvió en MeOH seco (1 mL) y una disolución de NaOMe (1M en MeOH) (60 μ l, 0.06 mmol) se añadió a la disolución. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30

Parte Experimental

minutos. Después, se neutralizó con resina Amberlite IR 120, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. El sólido blanco que se formó se disolvió en MeOH (3 mL) y una cantidad catalítica de Pd-C 10% (cat.) se añadió y la mezcla de reacción se hidrogenó (1 bar de presión) hasta que la reducción de la azida se completó (c.c.f. *i*-PrOH:H₂O 7:3 + 1% AcOH), obteniéndose el trisacárido **51** (32 mg, cuant. en dos etapas) como un sólido blanco.

$[\alpha]_D^{23}$: +84.0 (*c* 0.50, H₂O)

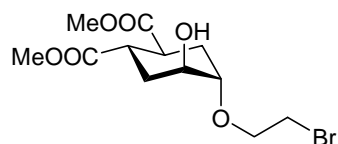
¹H NMR (D₂O, 500 MHz): 5.10 (s, 1H, *H*_{1A}), 5.00 (s, 1H, *H*_{1C}), 4.90 (s, 1H, *H*_{1B}), 4.06 (m, 1H, *H*_{2C}), 3.99 (m, 1H, *H*_{2A}), 3.97 (m, 1H, *H*_{6A}), 3.96 (m, 1H, *H*_{2B}), 3.91 (m, 1H, *H*_{3A}), 3.90 (m, 1H, *H*₇), 3.87 (m, 1H, *H*_{6C}), 3.81 (m, 1H, *H*_{4A}), 3.80 (m, 1H, *H*_{3B}), 3.77 (m, 1H, *H*_{3C}), 3.73 (m, 1H, *H*_{6A}), 3.73 (m, 1H, 2*H*_{6B}), 3.72 (m, 1H, *H*_{5A}), 3.71 (m, 1H, *H*_{5C}), 3.69 (m, 1H, *H*_{6C}), 3.65 (m, 1H, *H*₇), 3.65 (m, 1H, *H*_{5B}), 3.64 (m, 1H, *H*_{4B}), 3.61 (m, 1H, *H*_{4C}), 3.17 (m, 1H, 2*H*₈)

¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ (ppm): 102.4 (C_{1C}), 99.5 (C_{1B}), 98.4 (C_{1A}), 78.7 (C_{2A}), 73.3 (C_{5C}), 72.8 (C_{5B}), 70.5 (C_{3B}), 70.5 (C_{3C}), 71.4 (C_{5A}), 70.1 (C_{3A}), 69.9 (C_{2C}), 69.9 (C_{2B}), 66.7 (C_{4C}), 66.6 (C_{4B}), 66.4 (C_{4A}), 65.1 (C_{6A}), 64.5 (C₇), 61.0 (C_{6C}), 60.9 (C_{6B}), 39.1 (C₈)

ESI-MS para C₂₀H₃₇NO₁₆; calculado: 547.2 [M]⁺; Encontrado: 470.2 [M+Na]⁺

8.6 Síntesis del pseudodisacárido de manosa 55.

Dimetil (1*S*,2*S*,4*S*,5*S*)-4-(2-bromoetoxi)-5-hidroxiciclohexano-1,2-dicarboxilato (61)



El catalizador $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (17 mg, 0.05 mmoles) se añadió a una disolución del epóxido **60** (100 mg, 0.47 mmoles) y 2-bromoetanol (135 μL , 1.86 mmoles) en CH_2Cl_2 (1 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 4 horas. Después, se añadió a la reacción 10 ml de una disolución NH_4OH y NH_4Cl saturado (1:1) y se extrajo con AcOEt (2x10 mL). La fase orgánica se lavó con una disolución de NH_4Cl sat. (10 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó a vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente Éter de Petróleo- AcOEt (2:1), obteniéndose el compuesto **61** (81 mg, 50%) como un aceite.

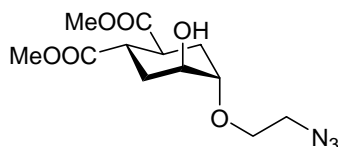
$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: +3.7 (*c* 1.55, CHCl_3)

$^1\text{H RMN}$ (C_6D_6 , 400 MHz): δ (ppm) 3.70 (q, 1H, $J_{2,3ax}=J_{2,3eq}=J_{2,1}=2.5$ Hz, H_2), 3.50-3.30 (m, 3H, $H_4 + H_5 + H_7$), 3.45 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.46 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.25-3.15 (m, 2H, H_1 & H_7'), 3.01 (t, 2H, $J=4.2$ Hz, $2H_8$), 2.18 (dt, 1H, $J_{gem}=J_{3ax,4}=2.5$ Hz, H_{3ax}), 2.08-1.95 (m, 2H, $2H_6$), 1.95 (dt, 1H, $J_{gem}=13.8$ Hz & $J_{3eq,2}=J_{3eq,4}=4.2$ Hz, H_{3eq})

$^{13}\text{C RMN}$ (C_6D_6 , 100 MHz): δ (ppm) 174.9 (COO), 76.9 (C_1), 68.8 (C_7), 66.7 (C_2), 51.4 ($-\text{OCH}_3$), 51.3 ($-\text{OCH}_3$), 39.5 (C_4), 39.0 (C_5), 30.8 (C_8), 30.7 (C_3), 27.3 (C_6).

HR-MS (ESI) para $C_{12}H_{19}BrO_6$; calculado: 361.02572 $[M+Na]^+$; Encontrado: 361.02525 $[M+Na]^+$

Dimetil (1*S*,2*S*,4*S*,5*S*)-4-(2-azidoetoxi)-5-hidroxiciclohexano-1,2-dicarboxilato (62)



NaN_3 (87 mg, 1.3 mmoles, 10 eq), se añadió a una disolución de **61** (45mg, 0.13 mmoles) en DMF (1mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 50° C durante 24 horas. Después, sobre la suspensión se añadió AcOEt (8mL) y se lavó con agua (10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó a vacío, obteniéndose el compuesto **62** (40 mg, 89%) como un aceite.

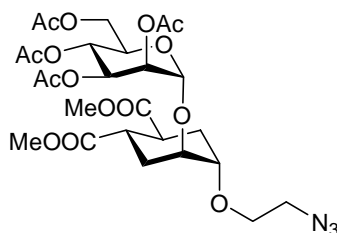
$[\alpha]_D^{23}$: +19.2 (*c* 1.15, $CHCl_3$)

1H RMN (C_6D_6 , 400 MHz): δ (ppm) 3.75 (sa, 1H, H_2), 3.50-3.30 (m, 3H, $H_4 + H_5$), 3.48 (s, 3H, $-OCH_3$), 3.47 (s, 3H, $-OCH_3$), 3.28-3.20 (m, 2H, H_1 & H_7), 3.03 (ddd, 1H, $J = 3.6, 7.6$ & 10.4 Hz, H_7), 2.68 (m, 1H, H_8), 2.18 (dt, 1H, $J_{3ax,2} = 2.8$ Hz & $J_{gem} = J_{3ax,4} = 13.6$ Hz, H_{3ax}), 2.10-1.95 (m, 2H, $2H_6$), 1.97 (dt, 1H, $J_{3eq,2} = J_{3eq,4} = 4.4$ Hz & $J_{gem} = 13.6$ Hz, H_{3eq})

^{13}C RMN (C_6D_6 , 100 MHz): δ (ppm) 174.9 (C=O), 77.7 (C_1), 66.7 (C_7), 66.6 (C_2), 55.9 (C_8), 51.2 ($-OCH_3$), 51.1 ($-OCH_3$), 39.4 (C_4), 39.0 (C_5), 30.8 (C_3), 26.5 (C_6)

HR-MS (ESI) para $C_{12}H_{19}O_6N_3$; calculado: 324.11661 $[M+Na]^+$; Encontrado: 324.11624 $[M+Na]^+$

Dimetil (1*S*,2*S*,4*S*,5*S*)-4-(2-azidoetil)-5- (2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-mannopiranosil) ciclohexano-1,2-dicarboxilato (63)



Una mezcla del compuesto **62** (30 mg, 0.10 mmoles) y el tricloroacetimidato de manosa **35** (84 mg, 0.17 mmoles), se mantuvo a vacío durante toda una noche. Después, se añadió CH₂Cl₂ anhidro (2 mL) bajo atmosfera de N₂ y la disolución se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La temperatura se ajustó a -20° C, y se añadió TMSOTf (8 μ L, 0.045 mmoles). La reacción se siguió por c.c.f. (CH₂Cl₂:Acetona, 95:5). A los 20 minutos se añadió TEA, la suspensión se filtró sobre celita y el disolvente se eliminó a vacío. El producto final se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente (CH₂Cl₂:Acetona, 95:5), obteniéndose el pseudodisacárido **63** (31 mg, 48%) como un aceite.

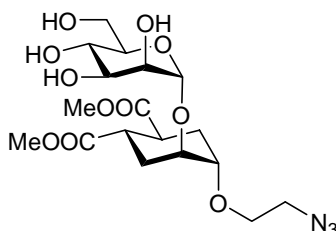
$[\alpha]_D^{23}$: +33.3 (*c* 1.10, CHCl₃)

¹H RMN (C₆D₆, 400 MHz): δ (ppm) 5.86 (dd, 1H, *J*= 10.0 & 3.5 Hz, *H*_{3B}) 5.79 (t, 1H, *J*=10.0 Hz, *H*_{4B}) 5.65 (dd, 1H, *J*=3.5 & 2.0 Hz, *H*_{2B}) 5.16 (d, 1H, *J*=2.0 Hz, *H*_{1B}), 4.52 (dd, 1H, *J*= 12.4 & 6.0 Hz, *H*_{6B}) 1H, 4.41 (dd, 1H, *J*=12.4 & 2.4 Hz, *H*_{6B}), Hz 4.35-4.39 (m, 1H, *H*_{5B}) 4.00-3.96 (m, 1H, *H*_{1p}), 3.50-3.46 (m, 1H, *H*_{2p}), 3.46 (s, 3H, -OCH₃), 3.45 (s, 3H, -OCH₃), 3.23-3.38 (m, 3H, *H*₄ + *H*₅ + CH₂O), 3.13-3.20 (m, 1H, CH₂O-), 2.74-2.87 (m, 2H, CH₂N₃) 2.03-2.13 (m, 4H 2*H*_{3p} & 2*H*_{6p}), 1.89 (s, 3H, -OCOCH₃), 1.82 (s, 3H, -OCOCH₃), 1.80 (s, 3H, -OCOCH₃), 1.75 (s, 3H, -OCOCH₃)

¹³C RMN (C₆D₆, 100 MHz): δ (ppm) 175.0, 170.5, 170.0 (C=O), 96, 76, 73, 71, 70.5, 70, 69, 67.5, 63, 52, 51.5, 40.0, 39.9, 28.5, 27.5, 20.7, 20.6, 20.6

HR-MS (ESI) para $C_{26}H_{37}N_3O_{15}$; calculado: 654.21169 $[M+Na]^+$; Encontrado: 654.21075 $[M+Na]^+$

Dimetil (1S,2S,4S,5S)-4-(2-azidoetil)-5- (α -D-mannopiranosil) ciclohexano-1,2-dicarboxilato (54)



A una disolución del pseudodisacárido **63** (197 mg, 0.31 mmol) en MeOH seco (3 mL), se añadió una disolución 1M de NaOMe en MeOH) (50 μ L, 0.05 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Después, se neutralizó con resina Amberlite IR 120, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío, obteniéndose el compuesto **54** (137 mg, 95%) como un sólido blanco.

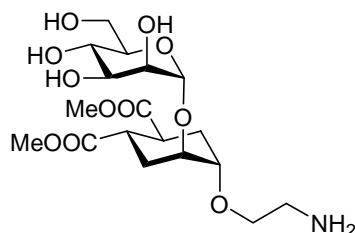
$[\alpha]_D^{23}$: +80.0 (*c* 0.65, MeOH)

1H RMN (600 MHz, D_2O , pD 8 Tampón Tris-d): δ (ppm) 4.85 (sa, 1H, H_1), 3.88 (sa, 1H, H_{2D}), 3.82 (sa, 1H, H_2), 3.67 (m, 1H, $H_{6'}$), 3.65 (m, 1H, H_3), 3.63 (m, 2H, H_{1D} + CH_2O), 3.56 (m, 1H, CH_2O), 3.52 (m, 4H, CH_3O + H_6), 3.46 (m, 4H, CH_3O + H_5), 3.45 (m, 1H, H_4), 3.28 (m, 2H, CH_2N_3), 2.79 (m, 2H, H_{4D} + H_{5D}), 2.79 (m, 2H, H_{4D} + H_{5D}), 1.96–2.02 (m, 2H, H_{3Deq} + H_{6Deq}), 1.69 (app. t, 1H, $J=12$ Hz, H_{6Dax}), 1.64 (app t, 1H, $J=12$ Hz, H_{3Dax})

^{13}C RMN (D_2O , 150 MHz): δ (ppm) 98 ppm (C_1), 74 (C_{1D}), 70 (C_{2D}), 70 (C_2 , C_3), 67.5 (CH_2O), 66.5 (C_4), 61 (C_6), 60 ($COOCH_3$), 53 ($COOCH_3$), 50.5 (CH_2N_3), 39 (C_{4D} & C_{5D}), 27 (C_{6D}), 26.5 (C_{3D})

HR-MS (ESI) para $C_{18}H_{29}N_3O_{11}$; calculado: 486.16943 $[M+Na]^+$; encontrado: 486.16870 $[M+Na]^+$

Dimetil (1*S*,2*S*,4*S*,5*S*)-4-(2-aminoetil)-5- (α -D-mannopiranosil) ciclohexano-1,2-dicarboxilato (55)



El compuesto **54** (130 mg, 0.28 mmol) se disolvió en MeOH (10 mL), una cantidad catalítica de Pd-C 10% (cat.) se añadió y la mezcla de reacción se hidrogenó (1 bar de presión) hasta que la reducción de la azida se completó (CH₂Cl₂-MeOH, 7:3), obteniéndose el pseudodisacárido **55** (120 mg, cuant.) como un sólido blanco.

$[\alpha]_D^{23}$: +48.3 (*c* 0.60, MeOH)

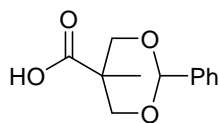
¹H RMN (D₂O, 500 MHz): δ (ppm) 4.93 (sa, 1H, *H*₁), 3.93 (m, 1H, *H*_{2D}), 3.89 (dd, 1H, *J*= 1.5 & 3.0 Hz, *H*₂), 3.80-3.70 (m, 2H, *H*₆ & *H*₃), 3.70-3.50 (m, 6H, *H*₄ + *H*₅ + *H*₆ + *H*_{1D} + *CH*₂*O*), 3.60 (s, 6H, 2 x *COOCH*₃), 2.96 (m, 2H, *CH*₂*NH*₂), 2.85 (m, 2H, *H*_{4D} & *H*_{5D}), 2.06 (m, 1H, *H*_{6Dax}), 1.98 (m, 1H, *H*_{3Deq}), 1.71 (m, 1H, *H*_{3Deq}), 1.68 (m, 1H, *H*_{6Dax})

¹³C RMN (D₂O, 125 MHz): δ (ppm) 178.6 (COO), 178.5 (COO), 98.5 (C₁), 75.0 (C_{1D}), 74.3 (C₅), 70.8 (C_{2D}), 66.8 (CH₂O), 61.0 (C₆), 52.6 (COOCH₃), 52.3 (COOCH₃), 42.0 (CH₂NH₂), 38.9 & 39.7 (C_{4D} & C_{5D}), 26.9 (C_{6D}), 26.5 (C_{3D})

HR-MS (ESI) para C₁₈H₃₁NO₁₁; calculado: 460.17893 [M+Na]⁺; encontrado: 460.17826 [M+Na]⁺

8.7 Síntesis de dendrímeros monodispersos.

Ácido benciliden-2,2-bis(oximetil)propiónico (**65**)¹¹⁹

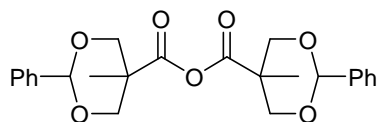


65

El ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (**64**) (10 g, 74.6 mmoles), benzaldehído dimetilacetal (11.2 mL, 74.6 mmol) y TsOH (0.70 g, 3.7 mmoles) se disolvieron en acetona (75 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la disolución se almacenó a 4°C durante 15 horas, obteniéndose un precipitado blanco. Este precipitado se filtró sobre papel y se lavó con acetona fría, obteniéndose el compuesto **65** (10.5 g, 64%) como un sólido blanco

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ(ppm) 7.48-7.37 (m, 5H, 5 x H_{Ph}), 5.49 (s, 1H, $CH_{acetalBn}$), 4.63 (d, 2H, $J=11.4$ Hz, CH_2), 3.70 (d, 2H, $J=11.7$ Hz, CH_2), 1.10 (s, 3H, CH_3)

Anhídrido benciliden-2,2-bis(oximetil)propiónico (**66**)



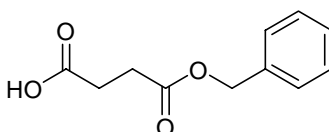
66

El ácido benciliden-2,2-bis(oximetil)propiónico (**65**) (10 g, 45.0 mmoles), y DCC (5.1 g, 25 mmol) se disolvieron en CH₂Cl₂ (75 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 15 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, el precipitado blanco correspondiente a la urea formada se filtró sobre celita y el producto se purificó por precipitación añadiendo Hexano (500 mL) y manteniendo la disolución en agitación vigorosa, obteniéndose el compuesto **66** (8.5 g, 89%) como un sólido blanco.

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta(\text{ppm})$ 7.45-7.35 (m, 10H, 10 x H_{Ph}), 5.47 (s, 2H, 2 x $\text{CH}_{\text{acetatBn}}$), 4.66 (d, 4H, $J=10.5$ Hz, 2 x CH_2), 3.69 (d, 4H, $J=10.5$ Hz, 2 x CH_2), 1.12 (s, 6H, 2 x CH_3)

Monobenciléster del ácido succínico (67)¹²⁰



Una disolución de anhídrido succínico (1.00 g, 10,0 mmoles), alcohol bencílico (860 μL , 8.30 mmoles) y DMAP (1.02 g, 8.30 mmoles) en CH_2Cl_2 (30 mL) se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, se añadió a la mezcla de reacción una disolución de Na_2CO_3 al 5% (50 mL). La fase acuosa se acidificó con una disolución 1M de HCl (50 mL) y se extrajo con AcOEt (50 mL). La fase orgánica se lavó con NaCl sat. (50 mL), se secó con MgSO_4 anhidro y se eliminó el disolvente a vacío, obteniéndose el compuesto **67** (95%) como un aceite.

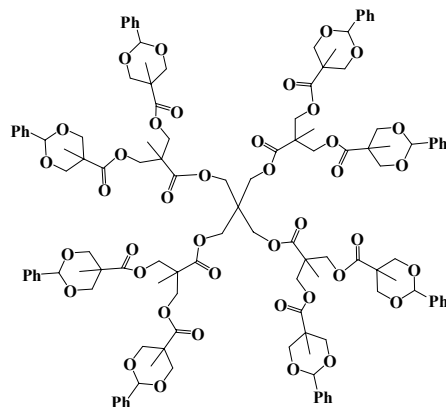
$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta(\text{ppm})$ 7.37-7.32 (m, 5H, 5 x H_{Ph}), 5.15 (s, 2H, $\text{CH}_{2\text{Bn}}$), 2.70-2.68 (m, 4H, 2 x $\text{CH}_{2\text{suc}}$)

¹¹⁹ Henrink, I.; Omayra, L.; de Padilla, J.; Fréchet, J. M. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5908-5917.

¹²⁰ Isomura, S.; Wirsching, P.; Janda, K. D.; *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 4115-4121.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz): δ (ppm) 178.3 (COO), 172.3 (COOH), 136.1 (C_{Ph}), 129.0 (CH_{Ph}), 128.7 (CH_{Ph}), 128.6 (CH_{Ph}), 67.1 (CH_2Bn), 61.0 (C_6), 29.3 (CH_2suc), 29.2 (CH_2suc)

G2(Bn)₈



G1(OH)₈ (100 mg, 0.17 mmoles, 1 eq.) y DMAP (70 mg) se disolvieron en piridina (1 mL). La mezcla se diluyó en CH_2Cl_2 (2 ml) y se añadió el anhídrido **66** (812 mg, 2.04 mmoles, 1.5 eq. x OH), la disolución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 15 horas. Después se añadió una disolución piridina: H_2O (1:1) y se mantuvo en agitación durante 5 horas. La fase orgánica se diluyó con CH_2Cl_2 (100 mL), y se lavó con una disolución 1M NaHSO_4 (2 x 40 mL), Na_2CO_3 (10%) (2 x 40 mL) y NaCl sat. (40 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro y el disolvente se eliminó a vacío. El producto se purificó por recristalización CH_2Cl_2 :Hexano, obteniéndose **G2(Bn)₈** (370 mg, 97%) como un sólido blanco.

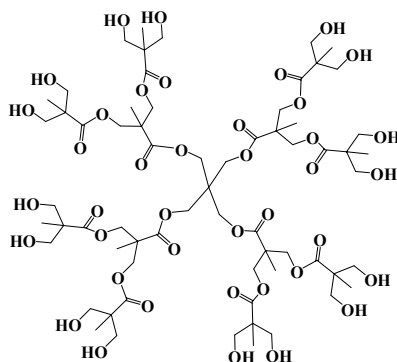
^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 7.40-7.38 (m, 16 H, H_{Ar}), 7.32-7.26 (m, 30H, H_{Ar}), 5.36 (s, 8H, 8 x $\text{CH}_{\text{Bencilico}}$), 4.53 (d, 16H, $J= 11.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{Generación 2}$), 4.36 (d, 8H, $J=11.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{Generación 1}$), 4.29 (d, 8H, $J=11.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{Generación 1}$), 3.89 (s, 8H, $\text{CH}_2\text{Pentaeritritol}$), 3.52 (d, 16H, $J= 11.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{Generación 2}$), 1.15 (s, 12H, $\text{CH}_3\text{Generación 1}$), 0.88 (s, 24H, $\text{CH}_3\text{Generación 1}$)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 175.9 ($\text{COO}_{\text{Generación 2}}$), 174.1 ($\text{COO}_{\text{Generación 1}}$), 140.2 (C_{Ph}), 131.2 (C_{Ph}), 130.4 (CH_{Ph}), 128.5 (CH_{Ph}), 104.0 ($\text{CH}_{\text{Bencilico}}$), 75.7, 75.7, 67.2, 63.6, 49.2, 44.8, 36.2, 20.0 ($\text{CH}_3_{\text{Generación 2}}$), 19.9 ($\text{CH}_3_{\text{generacion 1}}$)

ESI-MS para $\text{C}_{121}\text{H}_{140}\text{O}_{40}$; calculado: 2232.9 $[\text{M}]^+$; Encontrado: 2256.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ & 1139.8 $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$

Análisis Elemental: Calculado: C, 65.04%; H, 6.32%
 Encontrado: C, 65.32%; H, 6.31%

G2(OH)₁₆



G2(Bn)₈ (3.8 g, 1.70 mmoles) se disolvió en la mezcla CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) (100 mL). A la disolución se añadió Pd(C) cat., se generó atmosfera de H_2 y se dejó en agitación durante 12 horas. La disolución se filtró sobre celita y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose el compuesto **G2(OH)₁₆** (860 mg, 95%) como un sólido blanco.

^1H RMN (MeOD, 300 MHz) δ (ppm) 4.39 (d, 8H, $J=11.1$ Hz, $\text{CH}_2_{\text{Generación 1}}$), 4.30 (d, 8H, $J=11.1$ Hz, $\text{CH}_2_{\text{Generación 1}}$), 4.29 (s, 8H, $\text{CH}_2_{\text{Pentaeritritol}}$), 3.70 (d,

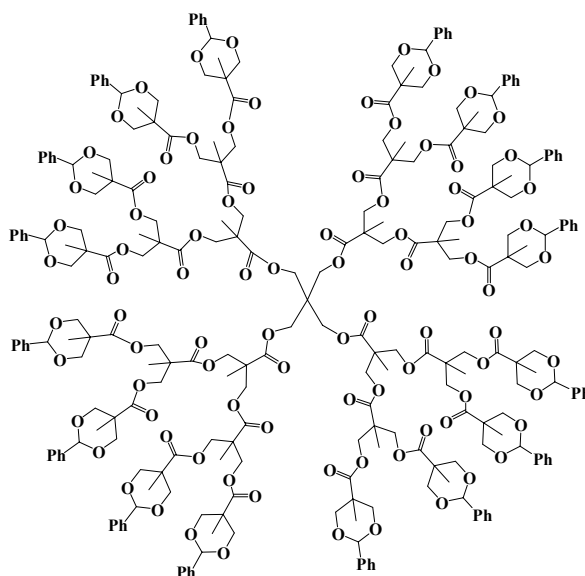
Parte Experimental

16H, $J= 10.8$ Hz, $CH_{2\text{Generación } 2}$), 3.61 (d, 16H, $J=10.8$ Hz, $CH_{2\text{Generación } 2}$), 1.35 (s, 12H, $CH_{3\text{Generación } 1}$), 1.17 (s, 24H, $CH_{3\text{Generación } 2}$)

^{13}C RMN (MeOD, 75 MHz) δ (ppm) 176.0 ($\text{COO}_{\text{Generación } 2}$), 173.8 ($\text{COO}_{\text{Generación } 1}$), 66.1 ($\text{CH}_{2\text{Pentaeritritol}}$), 65.9 ($\text{CH}_{2\text{Generación } 2}$), 63.6 ($\text{C}_{\text{Generación } 2}$), 51.8 ($\text{CH}_{2\text{Generación } 1}$), 44.3 ($\text{C}_{\text{Generación } 1}$), 18.3 ($\text{CH}_{3\text{Generación } 1}$), 17.4 ($\text{CH}_{3\text{Generación } 2}$)

ESI-MS para $\text{C}_{65}\text{H}_{108}\text{O}_{40}$; calculado: 1528,6 $[\text{M}]^+$; Encontrado: 1551.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

G3(Bn)₁₆



G2(OH)₁₆ (1.00 g, 0.654 mmoles) y DMAP (445 mg) se disolvieron en piridina (20 mL). La mezcla se diluyó en CH_2Cl_2 (40 ml) y se añadió el anhídrido **66** (6.02 g, 14.13 mmoles), la disolución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante una noche. Después se añadió una disolución piridina: H_2O (1:1) y se mantuvo en agitación 5 horas. La fase orgánica se diluyó con CH_2Cl_2 (100 mL) y se lavó con una disolución 1M de NaHSO_4 (2 x 200 mL), Na_2CO_3

(10%) (2 x 200 mL) y NaCl sat. (200 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y se el disolvente se eliminó a vacío. El producto se purificó por recristalización CH₂Cl₂:MeOH, obteniéndose **G3(Bn)₁₆** (2.7g, 97%) como un sólido blanco.

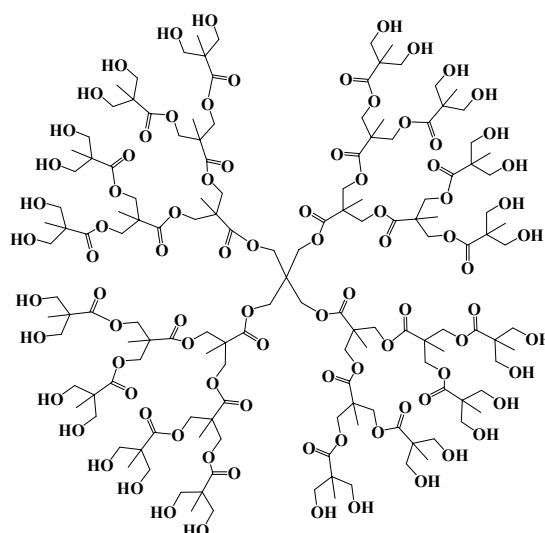
¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) 7.37-7.34 (m, 32H, CH_{Ph}), 7.27-7.21 (m, 48H, CH_{Ph}), 5.32 (s, 16H, CH_{Bencilico}), 4.49 (d, 32H, CH_{2generación3}), 4.34-4.25 (m, 32 H, 2 x 16 CH_{2generación2}), 4.12 (d, 8H, CH_{generación 1}), 4.11 (s, 8H, CH_{2Pentaeritritol}), 4.02 (d, 8H, CH_{generación 1}), 3.55-3.51 (m, 32H, CH_{2generación 3}), 1.18 (s, 24H, CH_{3generación 2}), 1.08 (s, 12H, CH_{3generación 1}), 0.88 (s, 48H, CH_{3generación 3})

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz): δ (ppm) 173.2 (COO_{generación 3}), 171.9 (COO_{generación 2}), 171.5 (COO_{generación 1}), 138.0 (C_{Ph}), 128.8 (CH_{Ph}), 128.1 (CH_{Ph}), 126.2 (CH_{Ph}), 101.6 (CH_{bencilico}), 73.4, 73.3, 64.9, 46.9, 46.6, 42.5 (CH_{2generación 3}), 34.0, 25.0, 17.7 (CH_{3generacion 2}), 17.6 (CH_{3generacion 3}), 17,2 (CH_{3generacion 1})

ESI-MS para C₂₅₇H₃₀₀O₈₈; calculado: 4793,9 [M]⁺; Encontrado: 2420.5 [M+2Na]²⁺ & 1621.8 [M+3Na]³⁺

Análisis Elemental: Calculado: C, 64.34%; H, 6.30%
Encontrado: C, 64.07%; H, 6.46%

G3(OH)₃₂

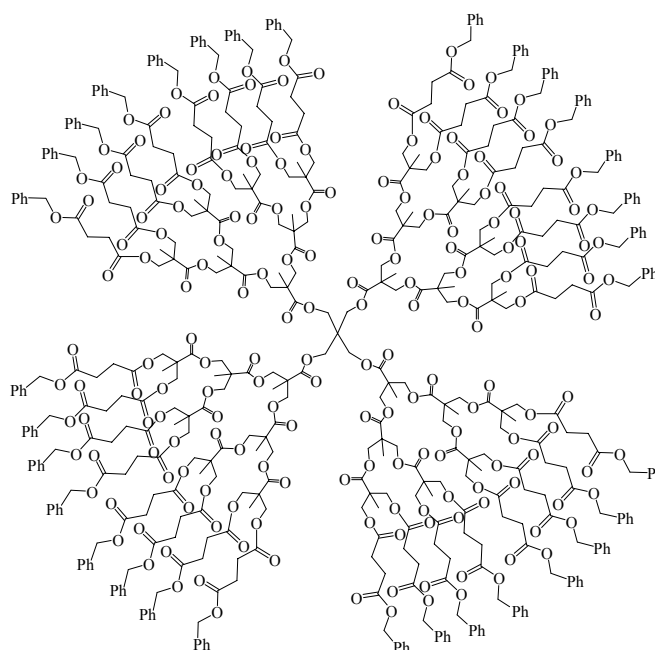


G3(Bn)₁₆ (1.7 g, 1.70 mmoles) se disolvió en la mezcla CH₂Cl₂-MeOH (1:1) (60 mL). A la disolución se añadió Pd(C) cat., se generó atmosfera de H₂ y se dejó en agitación durante 12 h. La disolución se filtró sobre celita y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose **G2(OH)₃₂** (g, 95%) como un sólido blanco.

¹H RMN (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm) 4.36-4.22 (m, 56H, CH₂pentaeritritol + CH₂generación 1 + CH₂generación 2), 3.68 (m, 32H, CH₂generación 3), 3.58 (d, 32H, J=10.0 Hz, CH₂generación 3), 3.39 (s, 32H, CH₂OH), 1.34 (s, 12H, CH₃generación 1), 1.30 (s, 24H, CH₃generación 2), 1.12 (s, 48H, CH₃generación 3)

¹³C RMN (MeOD, 75 MHz) δ (ppm) 176.0 (COO_{Generación 2}), 173.8 (COO_{Generación 1}), 66.1 (CH₂Pentaeritritol), 65.9 (CH₂Generación 2), 63.6 (C_{Generación 2}), 51.8 (CH₂Generación 1), 44.3 (C_{Generación 1}), 18.3 (CH₃Generación 1), 17.4 (CH₃Generación 2)

ESI-MS para C₆₅H₁₀₈O₄₀; calculado: 3385,4 [M]⁺; Encontrado: 1716.0 [M+2Na]²⁺ & 1151.0 [M+3Na]³⁺

G3(sucBn)₃₂

El compuesto **G3(OH)₃₂** (460mg, 1.36 mmol), el derivado del ácido succínico **67** (1.086 g, 5.22 mmol) y DPTS (512 mg, 1.74 mmol) se disolvieron en CH₂Cl₂ (15 mL) bajo atmósfera de argón. Se añadió DCC (1.433 g, 6.96 mmol) y la disolución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Después, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (6 mL), se filtró sobre celita y el disolvente se eliminó a vacío. El producto final se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente (Hex-AcOEt, 1:1.2), obteniéndose el compuesto **G3(sucBn)₃₂** (1.10g, 81%) como un aceite.

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 7.41-7.33 (m, 160H, CH_{Ar}), 5.13 (sa, 64 H, CH₂Bn), 4.50-4.21 (m, 120H, CH₂dendrimer), 2.63 (sa, 128H, CH₂suc), 1.39 (sa, 12H, CH₃generacion1), 1.31 (sa, 24H, CH₃generación2), 1.23 (sa, 48H, CH₃generacion3)

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm) 171.9 (COO_{generacion 3}), 171.7 (COO_{generacion 2}), 171.6 (COO_{generacion 1}), 135.9 (C_{ArBn}), 128.5 (CH_{ArBn}), 128.4 (CH_{ArBn}), 128.2 (CH_{ArBn}), 66.4 (CH₂Bn), 65.1, 64.9 (CH₂dendrimer), 46.7 (C_{generacion 1}), 46.6

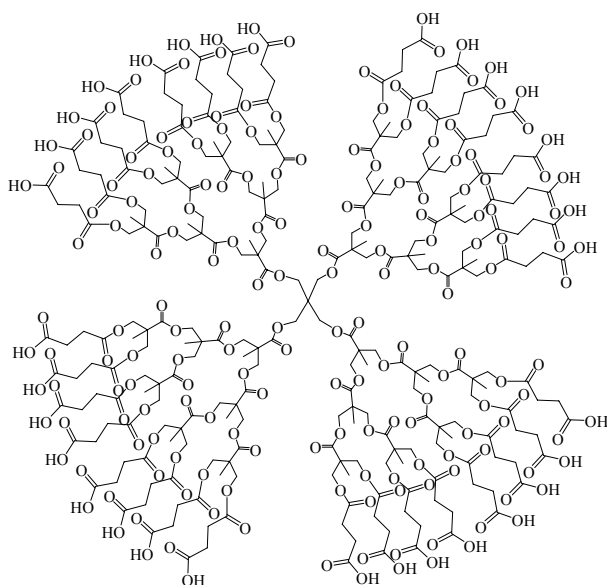
Parte Experimental

(C_{generación 2}), 46.3 (C_{generación 3}), 28.9 (CH_{2suc}), 28.8 (CH_{2suc}), 17.7 (CH_{3generacion 3}), 17.6 (CH_{3generacion 2}), 17.4 (CH_{3generacion 1})

ESI-MS para C₆₅H₁₀₈O₄₀; calculado: 9467.4 [M]⁺; Encontrado: 4758.5 [M+2Na]²⁺ & 3185.3 [M+3Na]³⁺

Análisis Elemental: Calculado: C, 63.01%; H, 5.92%
Encontrado: C, 62.54%; H, 6.00%

G3(suc)₃₂

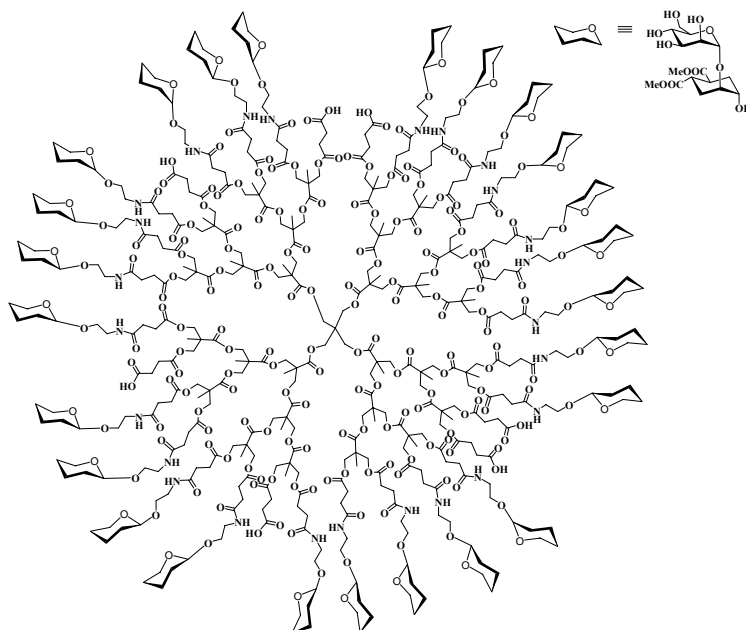


G3(sucBn)₃₂ (87 mg, 9.19 x 10⁻³ mmoles) se disolvió en la mezcla CH₂Cl₂-MeOH (1:2) (9 mL). A la disolución se añadió Pd(C) cat., se generó atmosfera de H₂ y se dejó en agitación durante 12 h. La disolución se filtró sobre celita y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose **G3(suc)₃₂** (79mg, cuant.) como un sólido blanco.

^1H RMN (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) 4.50-4.20 (m, 120, 60 x CH_2OCO), 2.70-2.57 (m, 128H, 32 x $\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 1.42 (s, 12H, 4 x CH_3 _{generación 1}), 1.35 (s, 32H, 8 x CH_3 _{generación 2}), 1.28 (s, 52H, 16 x CH_3 _{generación 3})

^{13}C RMN (CD_3CN , 125 MHz): δ (ppm) 174.2 (COOH), 173.0 (COO), 172.9 (COO), 66.3 (CH_2O), 47.4 (C), 29.1 ($\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 17.9 (CH_3)

G3(pseudodisacárido)₂₄



Procedimiento A: Sobre una disolución de **G3(suc)₃₂** (7.4 mg, 1.12×10^{-3} mmoles) en DMF seca (400 μL) se añadió HATU (27 mg, 0.71 mmoles) y DIPEA (25 μL , 0.14 mmoles) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón. Después de 30 minutos, una disolución del pseudodisacárido **55** (14 mg, 0.023 mmoles) en DMF seca (150 μL) se adicionó a la reacción. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 3 días, después el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se lavó con Et_2O y se purificó por diálisis en H_2O (utilizando membranas de celulosa benzoilada de 32 mm de ancho, con una masa molecular

de corte de 1kDA) obteniéndose el sistema multivalente dendrítico **G3(pseudodisacárido)₂₄** (22 mg, 66%) como un liofilizado blanco.

Procedimiento B: A una disolución del pseudodisacárido **55** (16.5 mg, 0.038 mmoles) y disolución de **G3(suc)₃₂** (6 mg, 1.12×10^{-3} mmoles) en DMF:CH₂Cl₂ 1:1 (5 mL), se añadieron DIC (14 μL, 0.087 mmoles) y HOBt (12 mg, 0.087 mmoles). La disolución se mantuvo en agitación durante 24 horas y después se eliminó la mezcla de disolventes a vacío. El residuo se lavó con Et₂O y se purificó por ultracentrifugación a 3000 g usando filtros centriplus YM-3 (con una masa molecular de corte de 3kDA) obteniéndose el sistema multivalente dendrítico **G3(pseudodisacárido)₂₄** (17 mg, 60%) como un sólido blanco.

¹H RMN (D₂O, 400 MHz): δ (ppm) 4.96 (sa, 24H, 24 x H₁), 4.40-4.06 (m, 120H, CH₂dendrimer), 3.93-3.42 (m, 360H, 24 x H₂ + 2H₆ + H₃ + H_{1D} + CH₂O + 2CH₃O + H₅ + H₄), 3.03-2.44 (m, 224H, 24CH₂NH₂ + 24H_{4D} + 24H_{5D} + 64 CH_{2suc}), 2.19-1.95 (m, 48H, 24H_{6Dax} + 24H_{3Deq}), 1.86 (m, 48H, 24H_{3Deq} + 24H_{6Dax}), 1.23 (m, 84H, CH_{3dendrimer})

9. ANEXOS

**ANEXO 1: ASPECTOS ESTEREOELECTRÓNICOS DE LOS
CARBOHIDRATOS**

En lo referente a la conformación de los carbohidratos, son dos los factores fundamentales que determinan su estructura tridimensional: los efectos estéricos, como en cualquier molécula, y los efectos estereoelectrónicos. Entre estos últimos los más importantes son los denominados efecto “anomérico” y efecto “exoanomérico”.¹²⁴

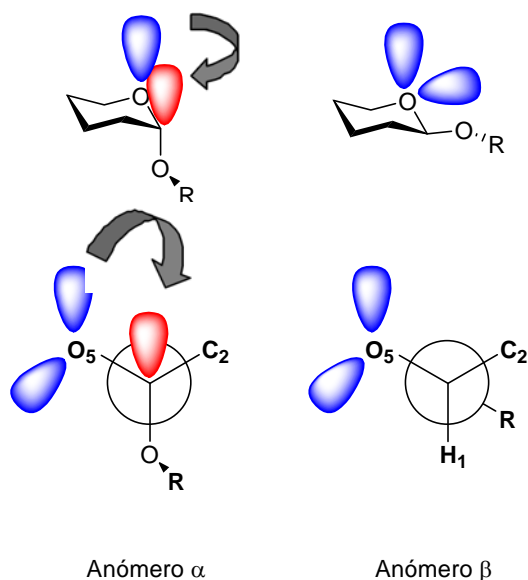


Figura 85. Representación esquemática del efecto anomérico.

El efecto anomérico determina que, para los sustituyentes electronegativos en posición 1 de los anillos de piranosa, la orientación axial es más estable que la ecuatorial, en contra de lo previsible en base a interacciones estéricas. Esta preferencia tiene su origen en la deslocalización hiperconjugativa de un par electrónico no enlazante del oxígeno endocíclico con el orbital σ^* del enlace contiguo C_1-O_1 , que únicamente es posible en la orientación axial. Debido

¹²⁴ (a) Tvaroska, I.; Bleha, T.; *Adv. Carbohydr. Chem.*, **1989**, *47*, 45-123. (b) Thatcher, G. R. C.; *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects*, American Chemical Society, Washington DC, **1993**. (c) Lemieux, R. U.; Bock, K.; Delbaere, L. T. J.; Koto, S.; Rao, V. S.; *Can. J. Chem.*, **1980**, *58*, 631-653. (d) Wolfe, S.; Whangbo, M. H.; Mitchell, D. J.; *Carbohydr. Res.*, **1979**, *69*, 1-26. (e) Praly, J. P.; Lemieux, R. U.; *Can. J. Chem.*, **1987**, *65*, 213-223. (f) Thogersen, H.; Lemieux, R. U.; Bock, K.; Meyer, B.; *Can. J. Chem.*, **1982**,

a este hecho, en la configuración axial (anómero α) se observa un acortamiento del enlace O_5-C_1 , un alargamiento del enlace C_1-O_1 y un aumento del ángulo $O_5-C_1-O_1$, con respecto al análogo ecuatorial. Los carbohidratos que presentan una configuración anomérica en el enlace glicosídico, presentan un valor del ángulo diedro determinado por este enlace de 60° . La magnitud del efecto anomérico varía con la naturaleza del grupo electronegativo, con la polaridad del disolvente y con la orientación y naturaleza química del resto de sustituyentes de la molécula. (Figura 85)

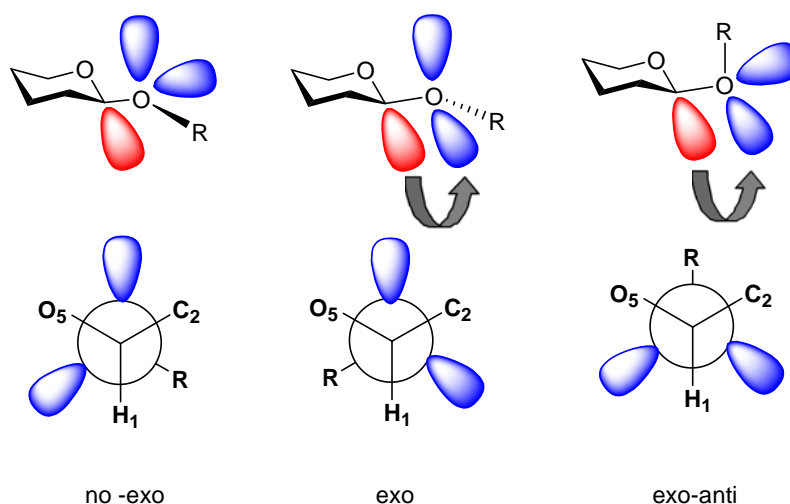


Figura 86. Representación esquemática del efecto exo-anomérico.

Por otro lado, el efecto exo-anomérico se refiere al predominio de una orientación de tipo gauche para la torsión exocíclica. Es decir, afecta al ángulo diedro definido por el enlace glicosídico y determina que aquellas conformaciones alrededor del enlace interglicosídico que permitan la interacción entre el par electrónico del átomo de oxígeno unido a la posición 1 del anillo de piranosa con el orbital σ^* del enlace endocíclico C_1-O_5 se encuentren favorecidas. (Figura 86) Los oligosacáridos que presentan conformación exoanomérica presentan valores del ángulo diedro definido por el enlace

60, 44-57. (g) Pophristic, V.; Goodman, L.; *Nature*, **2001**, *411*, 565-568. (h) Schreiner, P. R.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 3579-3581.

Anexo 1

glicosídico entre 0 y -60° y los que presentan conformación no-exoanomélica valores positivos.

ANEXO 2: PUBLICACIONES

Mannose hyperbranched dendritic polymers interact with clustered organization of DC-SIGN and inhibit gp120 binding

Georges Tabarani^a, José J. Reina^b, Christine Ebel^a, Corinne Vivès^a, Hugues Lortat-Jacob^a,
Javier Rojo^{b,*}, Franck Fieschi^{a,*}

^a Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France
^b Grupo de Carbohidratos, Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC, Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla, Spain

Received 15 February 2006; accepted 21 March 2006

Available online 31 March 2006

Edited by Michael R. Bubb

Abstract DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin) is a C-type lectin receptor of dendritic cells and is involved in the initial steps of numerous infectious diseases. Surface plasmon resonance has been used to study the affinity of a glycodendritic polymer with 32 mannoses, to DC-SIGN. This glycodendrimer binds to DC-SIGN surfaces in the submicromolar range. This binding depends on a clustered organization of DC-SIGN mimicking its natural organization as microdomain in the dendritic cells plasma membrane. Moreover, this compound inhibits DC-SIGN binding to the HIV glycoprotein gp120 with an IC₅₀ in the micromolar range and therefore can be considered as a potential antiviral drug.
© 2006 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Carbohydrates; DC-SIGN; gp120; Multivalency; Surface plasmon resonance; Antiviral compound

1. Introduction

DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin) is a C-type lectin able to recognize high glycosylated proteins, especially those presenting high mannose structures such as the viral envelop glycoproteins gp120 (HIV) [1], GP1 (Ebola) [2] or glycoprotein E (Dengue) [3]. A few years ago, *in vitro* studies carried out by van Kooyk et al. suggested a role for DC-SIGN in HIV infection [1]. New evidences have demonstrated that this lectin is able to interact with a large number of pathogens such as virus, bacteria, fungi and parasites as well [4]. The broad pathogen spectrum that could use DC-SIGN during their infection process places this lectin as new target in infectious diseases.

DC-SIGN, expressed at the surface of dendritic cells, has a C-terminus carbohydrate recognition domain (CRD). Ultracentrifugation [5] and hydrodynamic [6] studies have demonstrated that this protein oligomerize into homotetramers thus presenting four CRDs. Moreover, at the plasma membrane level, DC-SIGN is organized in microdomains, within lipid rafts, proposed to act as docking site for pathogens [7]. The interaction of this C-type lectin with high mannose structures displayed by the pathogen glycoproteins is multivalent and cal-

cium dependent [5,8]. Inhibition of this interaction could be considered as new strategy to design compounds with antiviral activity. In this aim, a multivalent presentation of mannose oligosaccharides on an adequate scaffold mimicking the natural organization of high mannose structures should be required. Taking this into account, we have recently described the synthesis of mannose glycodendritic structures based on second and third generations of Boltorn hyperbranched dendritic polymers (BH20 and BH30) that have been functionalized with mannose (Fig. 1) [9].

These compounds showed a high solubility in physiological conditions and no cytotoxicity against several cell lines [9]. We have also demonstrated that at least the third generation with 32 mannoses at the surface (BH30sucMan) inhibited the infection process of pseudotyped viral particles presenting the Ebola viral glycoprotein GP1 at the surface [10,11]. This inhibition presumably occurs through the blockage, by the glycodendritic polymer BH30sucMan, of the receptor DC-SIGN expressed by the target cell surface. To further investigate this binding at the molecular level, we adopted a method in which DC-SIGN is coupled to a solid phase, at different density, and BH30sucMan binding is analysed by surface plasmon resonance (SPR). Biosensors have already been successfully applied to study carbohydrate-protein interactions [12] including DC-SIGN [13] and to determine the kinetic and thermodynamic parameters. Surfaces functionalized with increasing DC-SIGN density may mimic, to some extent, the presentation of DC-SIGN as microdomain at the cell surface, but also enable us to analyse possible "avidity" for mannose carrying molecule if binding occurs at more than one site and the role of multivalency from the point of view of the receptor. This information could be very useful to improve the design of better inhibitors for this protein.

2. Materials and methods

2.1. Multivalent compounds

Synthesis of dendritic compounds BH20sucL, BH30sucL, BH20sucMan and BH30sucMan have been previously described [9].

2.2. Expression of CRD and ECD of DC-SIGN in Escherichia coli

Plasmids pET30b (Novagen) containing cDNA encoding CRD (corresponding to aminoacids 254–404) or extracellular domain (ECD) (corresponding to aminoacids 66–404) of DC-SIGN were used for overproduction as described previously [14]. Proteins produced in inclusion bodies have been refolded as already described [5]. Purification of functional DC-SIGN proteins were achieved by an affinity

*Corresponding authors. Fax: +34 954 46 05 65 (J. Rojo), +33 (0)4 38 78 54 94 (F. Fieschi).
E-mail addresses: javier.rojo@iq.csic.es (J. Rojo), franck.fieschi@ibs.fr (F. Fieschi).



Synthesis of 2-azidoethyl α -D-mannopyranoside orthogonally protected and selective deprotections

José Juan Reina and Javier Rojo*

Grupo de Carbohidratos, Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC, Av. Américo Vespucio 49, 41092 Seville, Spain

Received 24 January 2006; revised 7 February 2006; accepted 13 February 2006
Available online 28 February 2006

Abstract—We present the synthesis of a fully orthogonally protected mannosyl glycoside **1** and the corresponding methods for selective deprotections. Mannosyl glycoside **1** contains a functionalized linker at the anomeric position to allow for the attachment of carbohydrate units to scaffolds in order to prepare carbohydrate multivalent systems.
© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN) is a C-type lectin that presents a carbohydrate recognition domain (CRD) at the C-terminus. This lectin is not only capable of interacting with highly glycosylated proteins found at the surface of several pathogens such as viruses, bacteria, fungi and parasites,¹ but also recognizes in a calcium dependent way high mannose structures present in *N*-glycans of pathogen glycoproteins. After the discovery of the role that DC-SIGN plays in the HIV infection process,² much effort has been devoted to the synthesis of these mannosylated structures and related neoglycoconjugates in order to obtain multivalent carbohydrate systems that mimic the natural systems.^{3–7} The epitope present on high mannose that shows the strongest binding affinity to DC-SIGN is the glycan Man₉GlcNAc₂ as represented in Figure 1.⁸

The synthesis of complex oligosaccharides is usually based on a well defined selection of protecting groups in order to achieve efficient protection and deprotection pathways leading to the target compound. Some examples of orthogonal protection-deprotection strategies have been developed for galactose and *N*-acetyl glucosamine both for solution and solid phase synthesis, respectively, with the aim of preparing libraries of saccharides.^{9,10} The weak affinity of individual carbohydrate-protein interactions has been overcome in nature by multivalent presentation of the requisite carbohy-

drates. Consequently, there is a need to prepare glycans functionalized via the anomeric position in such a way as to incorporate the handle necessary to establish the key arrays.

Here, we present a new and effective synthesis of the orthogonally protected mannose derivative **1** functionalized at the anomeric position with a short and functionally versatile spacer moiety. In this synthesis, we have chosen 'permanent' protection for position 4 (*O*-benzyl group) and for one end of the linker (the azido group). These residues will be reduced at the end of the synthetic sequence by hydrogenolysis (palladium on carbon and H₂ at atmospheric pressure). Positions 2, 3 and 6 (corresponding to the branched positions present in high mannose structures, see Fig. 1) have been protected with levulinic ester (Lev), 4-methoxybenzyl (PMB) and *t*-butyldiphenylsilyl (TBDPS) groups, respectively. This selection of orthogonal groups allows for the preparation of different branched oligosaccharides with linkage in 2, 3 or 6 position followed by a simple hydrogenolysis to liberate position 4 and simultaneously provide the amine function at the terminus of the linker. This terminal amine provides a means of incorporating these mannose derivatives into a multivalent scaffold using classical strategies such as amide,^{11–13} urea or thiourea bond formation.^{14,15} The synthesis of the mannose derivative **1** begins with commercially available peracetylated α -D-mannose **2**. In three steps, and following the procedure we have published previously based on a modification of earlier work,^{11,16} 2-azidoethyl α -D-mannopyranoside (**3**) was prepared in good yield. Glycosylation of **2** with 2-bromoethanol using a large excess of BF₃·Et₂O as

* Corresponding author. Tel.: +34 954 48 95 68; fax: +34 954 46 05 65; e-mail: javier.rojo@iiq.csic.es

1,2-Mannobioside Mimic: Synthesis, DC-SIGN Interaction by NMR and Docking, and Antiviral Activity

José J. Reina,^[a] Sara Sattin,^[b] Donatella Invernizzi,^[b] Silvia Mari,^[b] Lorena Martínez-Prats,^[d] Georges Tabarani,^[c] Franck Fieschi,^[c] Rafael Delgado,^[d] Pedro M. Nieto,^[a] Javier Rojo,^{*,[a]} and Anna Bernardi^{*,[b]}

The design and preparation of carbohydrate ligands for DC-SIGN is a topic of high interest because of the role played by this C-type lectin in immunity and infection processes. The low chemical stability of carbohydrates against enzymatic hydrolysis by glycosylases has stimulated the search for new alternatives more stable in vivo. Herein, we present a good alternative for a DC-SIGN ligand based on a mannobioside mimic with a higher enzymatic stability than the corresponding disaccharide. NMR and

docking studies have been performed to study the interaction of this mimic with DC-SIGN in solution demonstrating that this pseudomannobioside is a good ligand for this lectin. In vitro studies using an infection model with Ebola pseudotyped virus demonstrates that this compound presents an antiviral activity even better than the corresponding disaccharide and could be an interesting ligand to prepare multivalent systems with higher affinities for DC-SIGN with potential biomedical applications.

Introduction

DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) is a tetrameric C-type lectin presenting four copies of a carbohydrate recognition domain (CRD) at the C terminus.^[1–3] This calcium dependent lectin specifically recognizes highly-glycosylated structures present at the surface of several pathogens such as viruses (HIV, SIV, Hepatitis C, Ebola, Cytomegalovirus, Dengue, SARS), bacteria (*Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*), yeasts (*Candida albicans*), and parasites (*Leishmania* spp., *Schistosoma mansoni*).^[4] The main carbohydrate ligand recognized by DC-SIGN is the high mannose glycan, (Man)₆(GlcNAc)₂ also represented as (Man)₈, a branched oligosaccharide which is presented in multiple copies by several pathogen glycoproteins (gp120, GP1, etc.). DC-SIGN plays a key role in the infection process of some of these pathogens and it is considered as an interesting new target for the design of anti-infective agents.

Carbohydrate multivalent display should be an adequate strategy to interact with this lectin with high affinity. The complexity of high mannose structures makes them unlikely candidates for the preparation of multivalent systems with potential applications in biomedicine. However, high mannose presents in all its arms, terminal disaccharides Man α 1-2Man which are likely to be involved in high mannose recognition processes. For instance, the well characterized neutralizing monoclonal antibody 2G12 that recognizes the highly glycosylated HIV glycoprotein gp120 interacts with this disaccharide.^[5,6] Very recently, it has also been demonstrated that high-density arrays of unbranched Man α 1-2Man-terminated oligosaccharides bind to DC-SIGN almost as efficiently as the entire Man.^[7] This sug-

gests an important role of the nonreducing end Man α 1-2Man fragment of Man₈ in DC-SIGN recognition.

We have recently reported that compound **1** shares the three-dimensional structure and conformational behavior of Man α 1-2Man **2** (Figure 1) but is more stable to hydrolysis mediated by jack-bean mannosidase.^[8]

Herein, we describe the synthesis of a pseudo-1,2-mannobioside (Man_{1,2}-psMan-OCH₂CH₂NH₂; **1 a**, Scheme 1) designed to allow conjugation of the mimic to polyvalent or solid supports. The molecule was built by connecting a mannose unit to a conformationally locked diol (psMan, R=H in Figure 1), which acts as a mimic of the reducing end mannose ring and

[a] J. J. Reina, Dr. P. M. Nieto, Dr. J. Rojo
Departamento de Química Bioorgánica, Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC, Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla (Spain)
Fax: (+34) 954460565
E-mail: javier.rojo@iq.csic.es

[b] S. Sattin, Dr. D. Invernizzi, Dr. S. Mari, Prof. Dr. A. Bernardi
Dipartimento di Chimica Organica e Industriale e CISI, Università di Milano, via Venezian 21, 20133 Milano (Italy)
Fax: (+39) 0250314072
E-mail: anna.bernardi@unimi.it

[c] G. Tabarani, Dr. F. Fieschi
Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble (France)

[d] L. Martínez-Prats, Dr. R. Delgado
Laboratorio de Microbiología Molecular, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (Spain)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chemmedchem.org> or from the author.

Mannose Glycoconjugates Functionalized at Positions 1 and 6. Binding Analysis to DC-SIGN Using Biosensors

José J. Reina,[†] Olivia S. Maldonado,[†] Georges Tabarani,[‡] Franck Fieschi,^{†,*} and Javier Rojo^{†,*}

Grupo de Carbohidratos, Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC, Américo Vespucio 49, E-41092 Sevilla, Spain, IBS, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CEA, CNRS, Université Joseph Fourier, 41 rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble, France. Received November 28, 2006; Revised Manuscript Received January 11, 2007

The design of glycoconjugates to allow the generation of multivalent ligands capable of interacting with the receptor DC-SIGN is a topic of high interest due to the role played by this lectin in pathogen infections. Mannose, a ligand of this lectin, could be conjugated at two different positions, 1 and 6, not implicated in the binding process. We have prepared mannose conjugates at these two positions with a long spacer to allow their attachment to a biosensor chip surface. Analysis of the interaction between these surfaces and the tetravalent extracellular domain (ECD) of DC-SIGN by SPR biosensor has demonstrated that both positions are available for this conjugation without affecting the protein binding process. These results emphasize the possibility to conjugate mannose at position 6, allowing the incorporation of hydrophobic groups at the anomeric position to interact with hydrophobic residues in the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN, increasing binding affinities. This fact is relevant for the future design of new ligands and the corresponding multivalent systems for DC-SIGN.

INTRODUCTION

Carbohydrate–protein interactions are involved in several cell adhesion and cell communication processes that govern basically the social behavior of cells. Inflammation (1), tumor progression and metastasis (2), cell development and embryogenesis (3), and infection (4) are some of the important biological events where carbohydrates play a key role through the interaction with their corresponding protein receptors (5, 6). These carbohydrate interactions are highly selective, calcium dependent, and very weak (7). Nature has overcome this problem with a multivalent presentation of carbohydrate epitopes such as glycosphingolipid clustering into lipid rafts and presentation of multiple copies of carbohydrates on glycoproteins. Therefore, the design and development of chemical tools to understand and intervene into these processes involving carbohydrates require the appropriate multivalent scaffolds that can be functionalized with selected carbohydrates (8–10).

Our research interest has been focused during the last years on a lectin named DC-SIGN¹ (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) or CD209. This C-type lectin is expressed at the surface of immature dendritic cells and presents at its C-terminus a carbohydrate recognition domain (CRD) (11, 12). Recognition of pathogens by dendritic cells takes place through an interaction involving glycosylated proteins at the surface of pathogens and the receptor DC-SIGN (13–16). This recognition process is one of the first steps in a complex pathway of events controlled by the immune system. Previous work of our

laboratory has demonstrated that multivalent systems based on mannose as carbohydrate and hyperbranched dendritic polymer Boltorn as a multivalent scaffold are capable to interact with DC-SIGN and inhibit the infection process of a pseudotyped viral particle that expresses the GP1 glycoprotein of Ebola virus (17–19).

Functionalization of mannose to create these glycodendritic polymers was performed at the anomeric position. This election was based on two main reasons. First of all, the hydroxyl groups of mannose implicated on binding with C type lectins are those presented at positions 2, 3, and 4 (20). Second, the easiest position to functionalize carbohydrates to generate glycoconjugates is the anomeric position. Position 6 could be considered as another possibility to be functionalized, taking into account that this hydroxyl group is well differentiated from the others (it is the only primary hydroxy group on the sugars), and also it does not seem to participate in the recognition process by the C-type lectin (21). Moreover, introducing hydrophobic residues, such as aromatic rings, at the anomeric position can improve the binding affinities of mannoses due to noncovalent van der Waals contacts with amino acid residues of a hydrophobic pocket present at the carbohydrate recognition domain of the lectin (22, 23). As proved previously in several examples, aryl mannopyranosides show higher binding affinities than the corresponding mannose with a free anomeric position (24–27). This fact could also be applied for DC-SIGN presenting this hydrophobic pocket, and it would mean a considerable increase of mannose binding affinity. Depending on the residues introduced at the anomeric position, in some cases it could be necessary to conjugate these mannose derivatives at a position different from the anomeric one, mainly at position 6 of the mannose.

To prove that functionalization of mannose position 6 with a linker will not interfere in the binding process with DC-SIGN, we have prepared two mannose conjugates with a linker at position 6 and position 1 (anomeric), respectively. We have studied the binding process of these mannoses with the tetrameric extracellular domain (ECD) of DC-SIGN using a biosensor with surface plasmon resonance (SPR) detection. The

* Corresponding authors. Franck.fieschi@ibs.fr (FF), Fax: +33 (0)4 38 78 54 94; Tel: +33 (0)4 38 78 91 77, javier.rojo@iiq.csic.es (JR). Fax: +34 954 46 05 65; Tel: +34 954 48 95 68.

[†] Institut de Biologie Structurale.

[‡] Grupo de Carbohidratos.

¹ Abbreviations: CRD, carbohydrate recognition domain; DC-SIGN, dendritic cell-specific; ICAM-3, grabbing nonintegrin; DIC, diisopropylcarbodiimide; ECD, extra cellular domain; EDC, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HOBT, 1-hydroxybenzotriazole; ICAM, intercellular adhesion molecule; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; RU, response units; SPR, surface plasmon resonance

Docking, synthesis, and NMR studies of mannosyl trisaccharide ligands for DC-SIGN lectin†

José J. Reina,^a Irene Díaz,^a Pedro M. Nieto,^{*a} Nuria E. Campillo,^b Juan A. Pérez,^b Georges Tabarani,^c Franck Fieschi^c and Javier Rojo^{*a}

Received 6th February 2008, Accepted 28th April 2008

First published as an Advance Article on the web 5th June 2008

DOI: 10.1039/b802144a

DC-SIGN, a lectin, which presents at the surface of immature dendritic cells, constitutes nowadays a promising target for the design of new antiviral drugs. This lectin recognizes highly glycosylated proteins present at the surface of several pathogens such as HIV, Ebola virus, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, etc. Understanding the binding mode of this lectin is a topic of tremendous interest and will permit a rational design of new and more selective ligands. Here, we present computational and experimental tools to study the interaction of di- and trisaccharides with DC-SIGN. Docking analysis of complexes involving mannosyl di- and trisaccharides and the carbohydrate recognition domain (CRD) of DC-SIGN have been performed. Trisaccharides Man₁,₂[Man₁,₆]Man 1 and Man₁,₃[Man₁,₆]Man 2 were synthesized from an orthogonally protected mannose as a common intermediate. Using these ligands and the soluble extracellular domain (ECD) of DC-SIGN, NMR experiments based on STD and transfer-NOE were performed providing additional information. Conformational analysis of the mannosyl ligands in the free and bound states was done. These studies have demonstrated that terminal mannoses at positions 2 or 3 in the trisaccharides are the most important moiety and present the strongest contact with the binding site of the lectin. Multiple binding modes could be proposed and therefore should be considered in the design of new ligands.

Introduction

DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin) or CD209 is a C-type lectin expressed at the surface of immature dendritic cells. This lectin presents at the C-terminus a carbohydrate recognition domain (CRD) able to interact with highly glycosylated proteins found on several pathogens such as viruses (HIV-1 and 2, SIV-1, Ebola virus, HCV, SARS virus, cytomegalovirus, dengue virus); bacteria (*Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*); yeast (*Candida albicans*); and parasites (*Schistosoma mansoni*, *Leishmania pifanoi*).^{1,2} This so broad spectrum of pathogens recognized by DC-SIGN has led to consider this lectin as an universal pathogen receptor. This lectin has attracted the interest of the scientific community since the discovery of the role that DC-SIGN plays in a HIV *trans* infection process.³

Pathogen glycoproteins recognized by DC-SIGN contain mainly mannose and fucose carbohydrate structures as *N*-glycans at different Asn positions of the glycoproteins. High mannose structure, constituted by Man₉GlcNAc₂ as the main

epitope, is considered one of the strongest ligands for this lectin. Carbohydrate–protein interactions are selective, most of the time calcium dependent, and very weak. Nature overcomes this weak affinity providing a multivalent presentation of carbohydrate epitopes such as cluster organization at the cell surface of glycosphingolipids and highly glycosylated glycoproteins. To study and intervene in biological processes where this type of interaction is involved, the design and preparation of multivalent carbohydrate systems is required. There is a continuing interest in designing new and effective multivalent tools. Selection of carbohydrate epitopes requires a deep knowledge of the binding mode of the ligands and the binding site of the protein receptor. Information about binding constants of monovalent and multivalent mannosyl and fucosyl oligosaccharides with DC-SIGN have been reported by different groups using a variety of techniques such as ELLA, biosensors, etc.^{4–11} However, to date only scarce information at the molecular level is available about how carbohydrates are recognized by DC-SIGN in solution. To our best knowledge, the only available information concerning carbohydrate ligands and DC-SIGN is at the solid state. X-Ray structures of complexes formed by different carbohydrate oligosaccharides with up to 9 units constituting part of the high mannose structure and CRD of DC- and L-SIGN have been recently published.^{12–14} Our interest on the receptor DC-SIGN lead us to explore in more detail the molecular basis of this recognition process with the aim to design and prepare appropriate ligands and their corresponding multivalent systems for potential applications in biological processes where DC-SIGN is involved. Also, available structural information about the binding process of carbohydrates to DC-SIGN indicates the possibility of different binding modes of these ligands. A preliminary study involving

^aGrupo de Carbohidratos, Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC - Universidad de Sevilla, Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla, Spain. E-mail: javier.rojo@iiq.csic.es; pedro.nieto@iiq.csic.es; Fax: +34 954 46 05 65

^bInstituto de Química Médica, CSIC, Juan de la Cierva 3, 20006 Madrid, Spain

^cLaboratoire des Protéines Membranaires, Université Joseph Fourier/CEA, DSV/CNRS, UMR 5075, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, Cedex 1, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Further details of docking and NMR studies. See DOI: 10.1039/b802144a

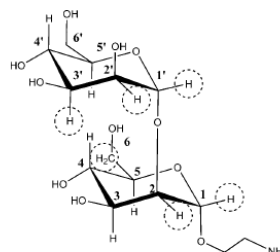
DOI: 10.1002/cbic.200800361

Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy Characterization of Dual Binding Mode of a Mannose Disaccharide to DC-SIGN

Jesús Angulo,^[a] Irene Díaz,^[a] José J. Reina,^[a] Georges Tabarani,^[b] Franck Fieschi,^[b] Javier Rojo,^[a] and Pedro M. Nieto^{*[a]}

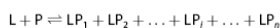
Saturation transfer difference NMR spectroscopy (STD-NMR), together with transfer NOE, is one of the most widespread NMR methods for the study of the interactions between small ligands and macromolecular receptors.^[1] Originally proposed as a technique for the rapid screening of compound libraries, its scope has been extended to include mapping the interaction epitope by determining the ligand regions in contact with the receptor.^[2] More recently, it has been applied to the study of receptor-bound ligand conformations by using quantitative STD theoretical calculations.^[3–5] Herein, we investigate the effect of multiple ligand-binding modes on the quantitative analysis of STD experiments by analyzing the multimodal binding of a mannose disaccharide to DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin).^[6] Our results demonstrate that STD-NMR is sensitive to the existence of multiple binding modes. Furthermore, we propose an approach for the quantitative analysis of experimental NMR data and theoretical predictions in the case of multiple binding modes. This approach has allowed us to confirm the dual character of the multiple binding modes of the Man α (1 \rightarrow 2)ManOC₂H₄NH₂ disaccharide (Scheme 1) to DC-SIGN in solution and to elucidate the ligand orientation in the less populated bound conformation, which was undefined in the crystallographic study.^[6]

The interaction between Man α (1 \rightarrow 2)Man and DC-SIGN was selected as a model system to verify the sensitivity of STD to multiple binding modes. DC-SIGN, also known as CD209, is a dendritic cell surface receptor. Specifically, DC-SIGN is a C-type lectin receptor with a carbohydrate recognition domain (CRD) at the C terminus able to interact with highly glycosylated proteins found on several pathogens.^[7] DC-SIGN is considered an universal pathogen receptor and plays a key role in HIV *trans* infection.^[8] The interaction of the CRD with different carbohydrates has been studied both the liquid and the solid state, and by STD-NMR.^[6,9,10] Recent crystallographic structures demonstrate that DC-SIGN binds mannose oligosaccharides in a multimodal fashion within the same binding site.^[6]



Scheme 1. Disaccharide Man α (1 \rightarrow 2)ManOC₂H₄NH₂. Dashed circles indicate the protons whose NMR signals have been used for this study.

Multiple binding modes of a ligand in a single site can be considered a special receptor–ligand–competitive inhibitor system, where one complex is an inhibitor of the others. As the ligand and inhibitor(s) are the same species, the chemical shifts and equilibrium intensities of their signals are equivalent and undistinguishable. Therefore, the total saturation observed in a STD experiment would be the sum of the accumulated saturations corresponding to each binding mode.



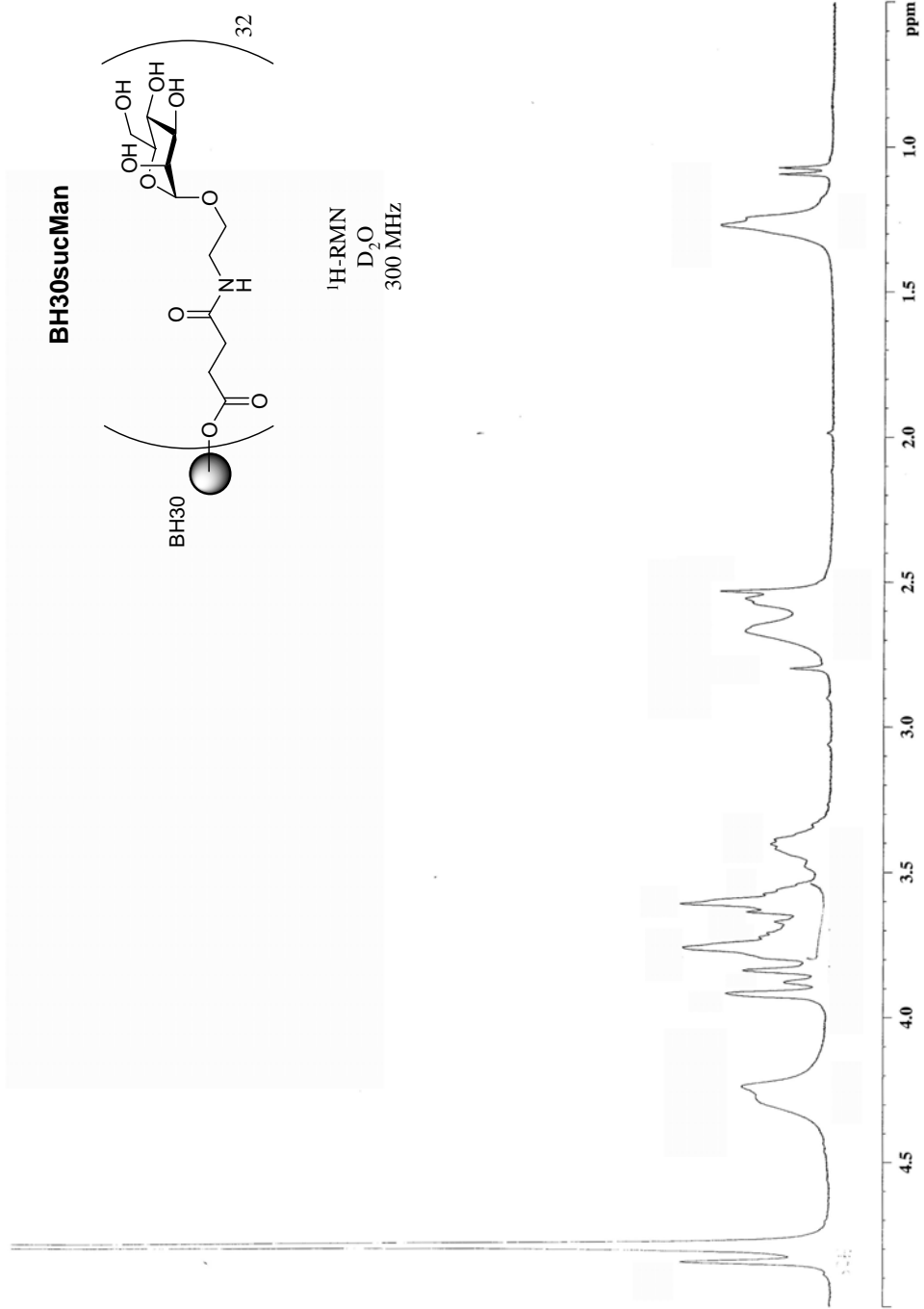
CORCEMA-ST calculates the theoretical intensities of STD spectra via full relaxation matrix analysis based on the three-dimensional co-ordinates of the complex, concentrations, and association and dissociation rate constants.^[3] The saturation due to each complex considered (derived from an alternative binding mode) can be calculated separately. Nevertheless, this approach is not directly applicable because the STD values can be affected by cross-rebinding, where a previously saturated ligand re-enters the binding pocket in an alternative mode, as the initial intensities of the signals are different from those at equilibrium. Equally, it is not possible to estimate the cross-rebinding contribution as CORCEMA-ST does not implement algorithms for multiple binding modes. When the saturation times are short enough, the potential effect of cross-rebinding becomes negligible. Unfortunately, under these conditions, the quality of the experimental data is very poor due to low magnetization transfer from the receptor. Our approach uses the STD initial growing rates (STD₀) to avoid possible rebinding contributions.

[a] Dr. J. Angulo, I. Díaz, J. J. Reina, Dr. J. Rojo, Dr. P. M. Nieto
Grupo de Carbohidratos, Instituto de Investigaciones Químicas
CSIC-Universidad de Sevilla
Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla (Spain)
Fax: (+34) 954-46-05-65
E-mail: pedro.nieto@iiq.csic.es

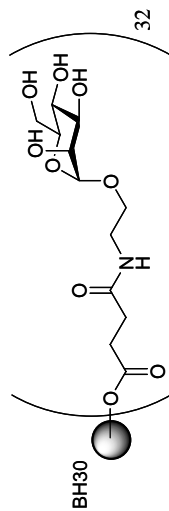
[b] G. Tabarani, Prof. F. Fieschi
Laboratoire des Protéines Membranaires
Université Joseph Fourier/CEA
DSV/CNRS, UMR 5075, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel
41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1 (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chembiochem.org> or from the author.

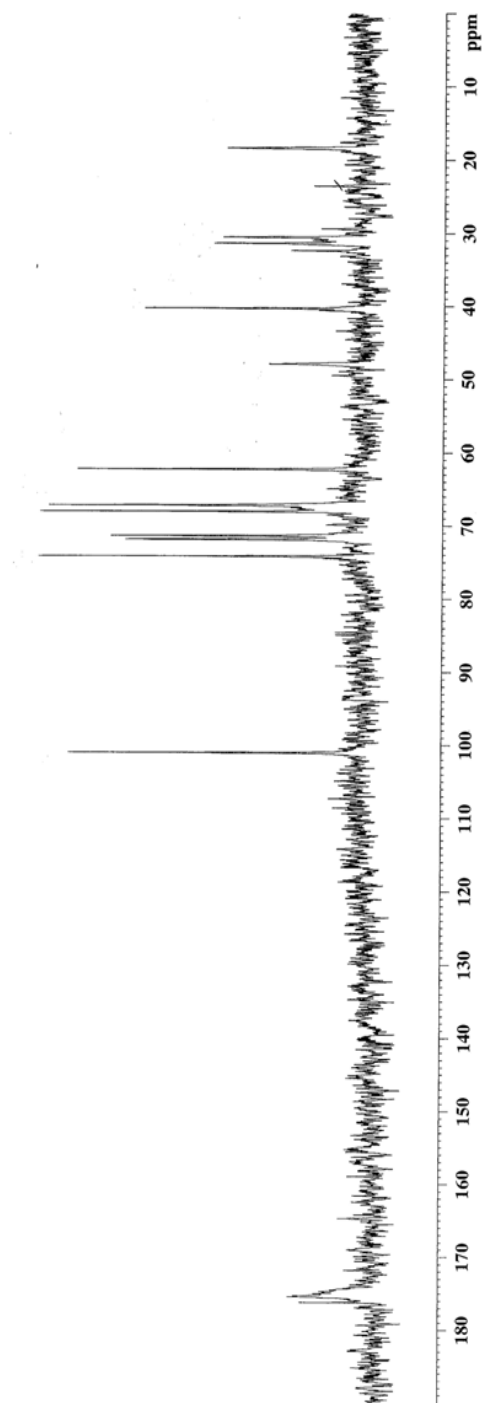
ANEXO 3: ESPECTROS

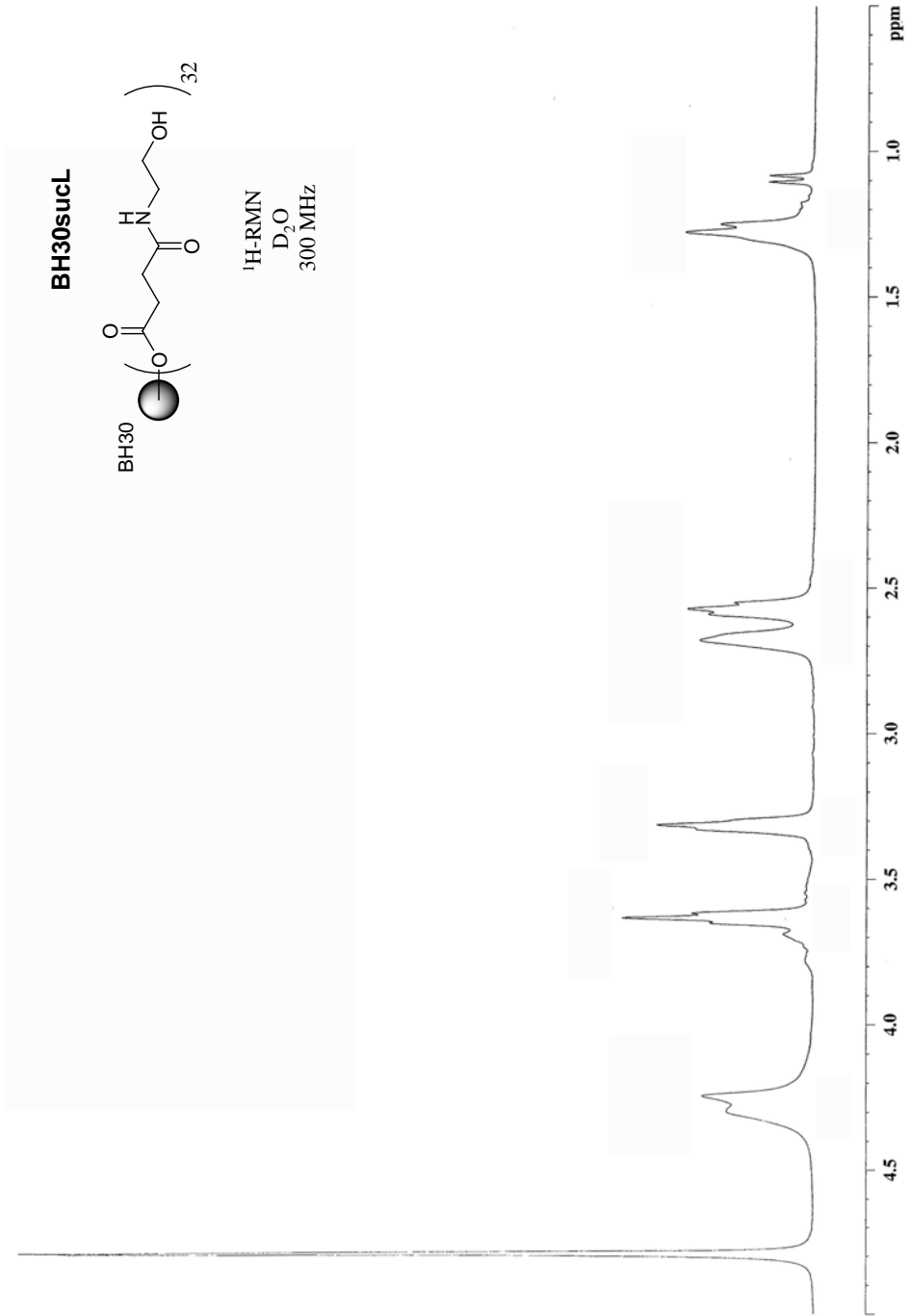


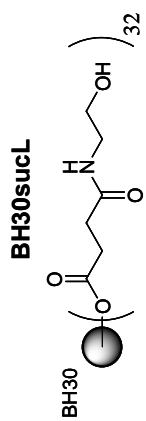
BH30sucMan



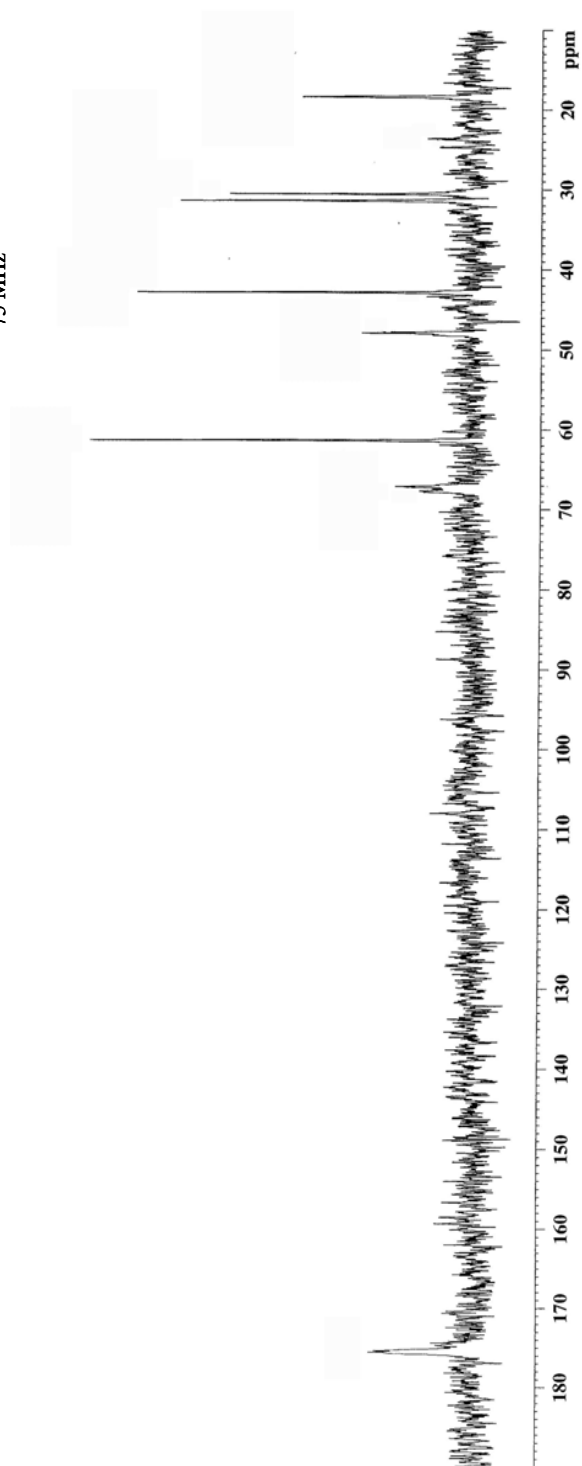
^{13}C -RMN
 D_2O
75 MHz

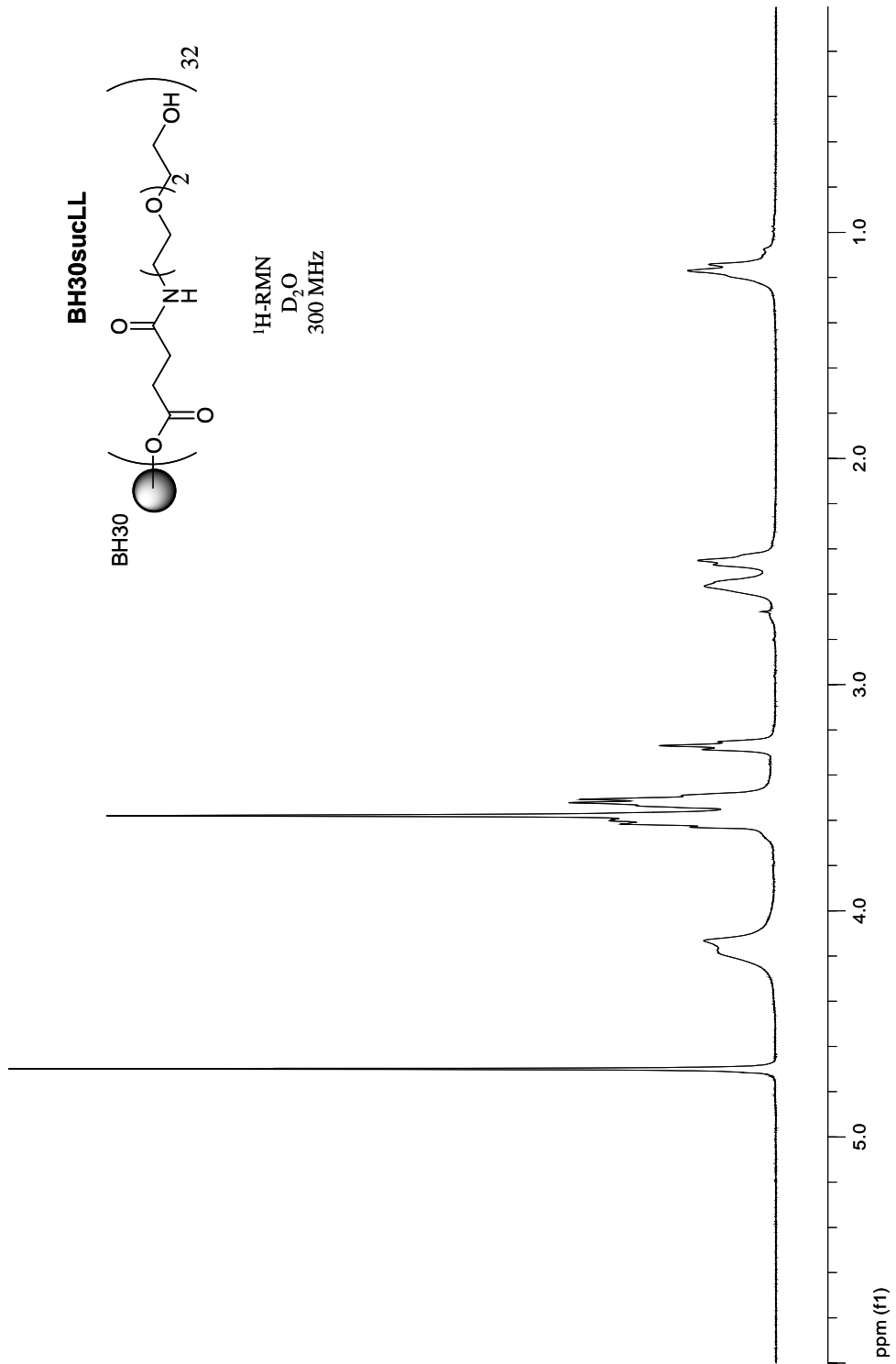


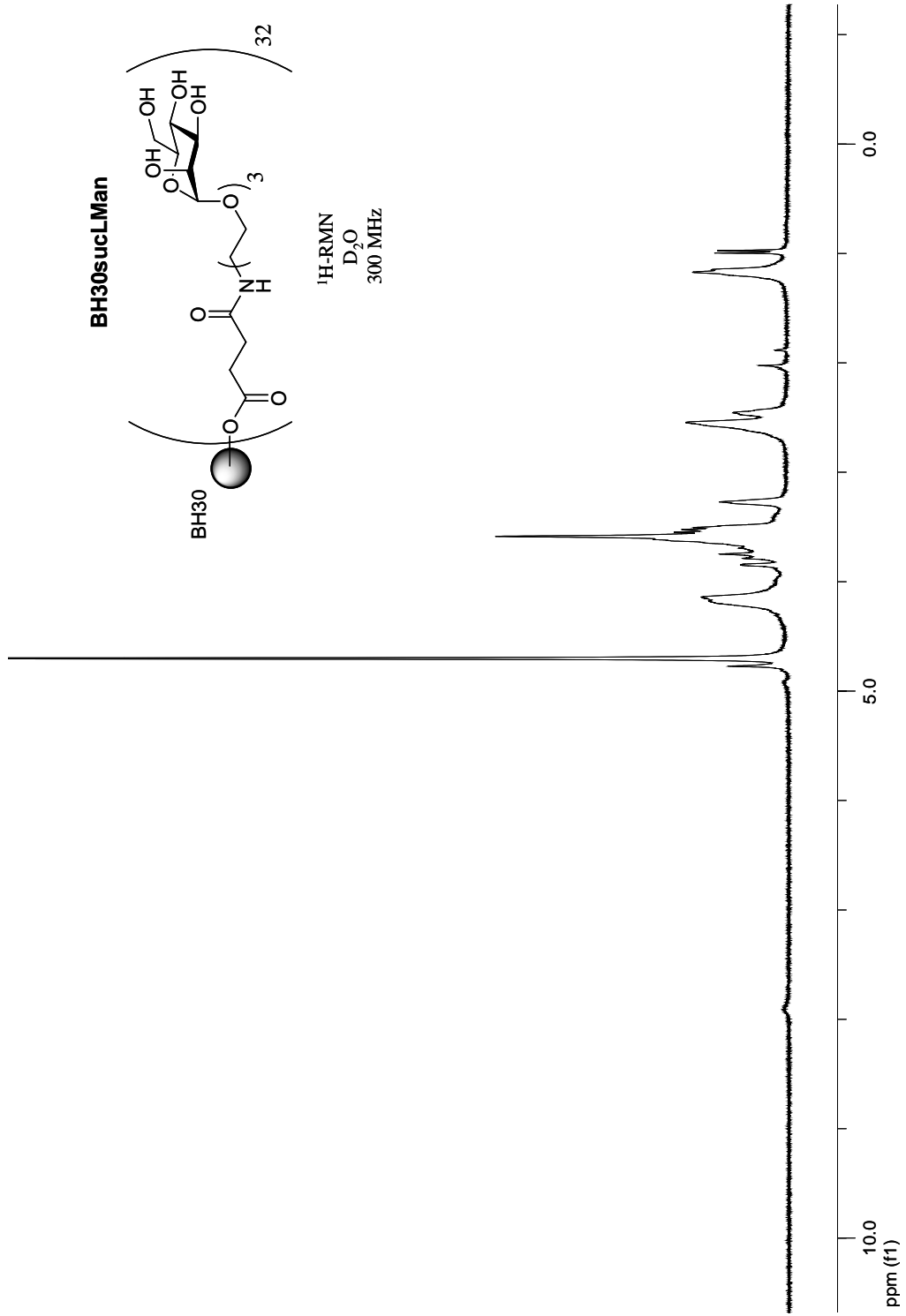


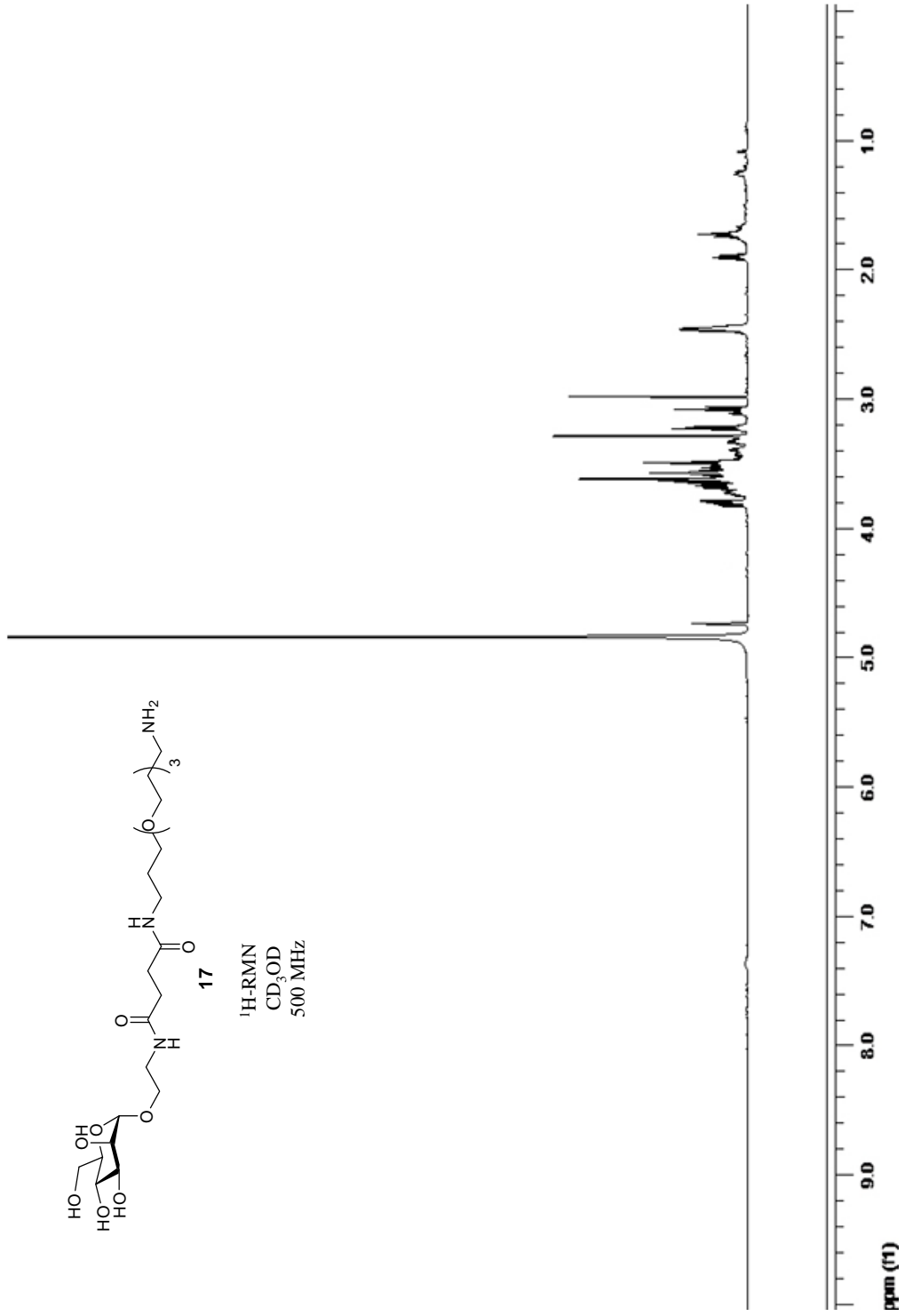


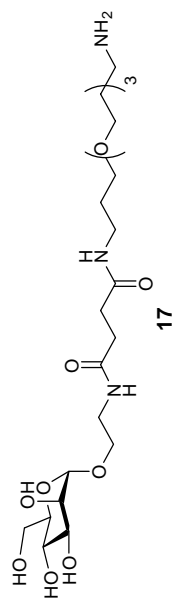
¹³C-RMN
D₂O
75 MHz



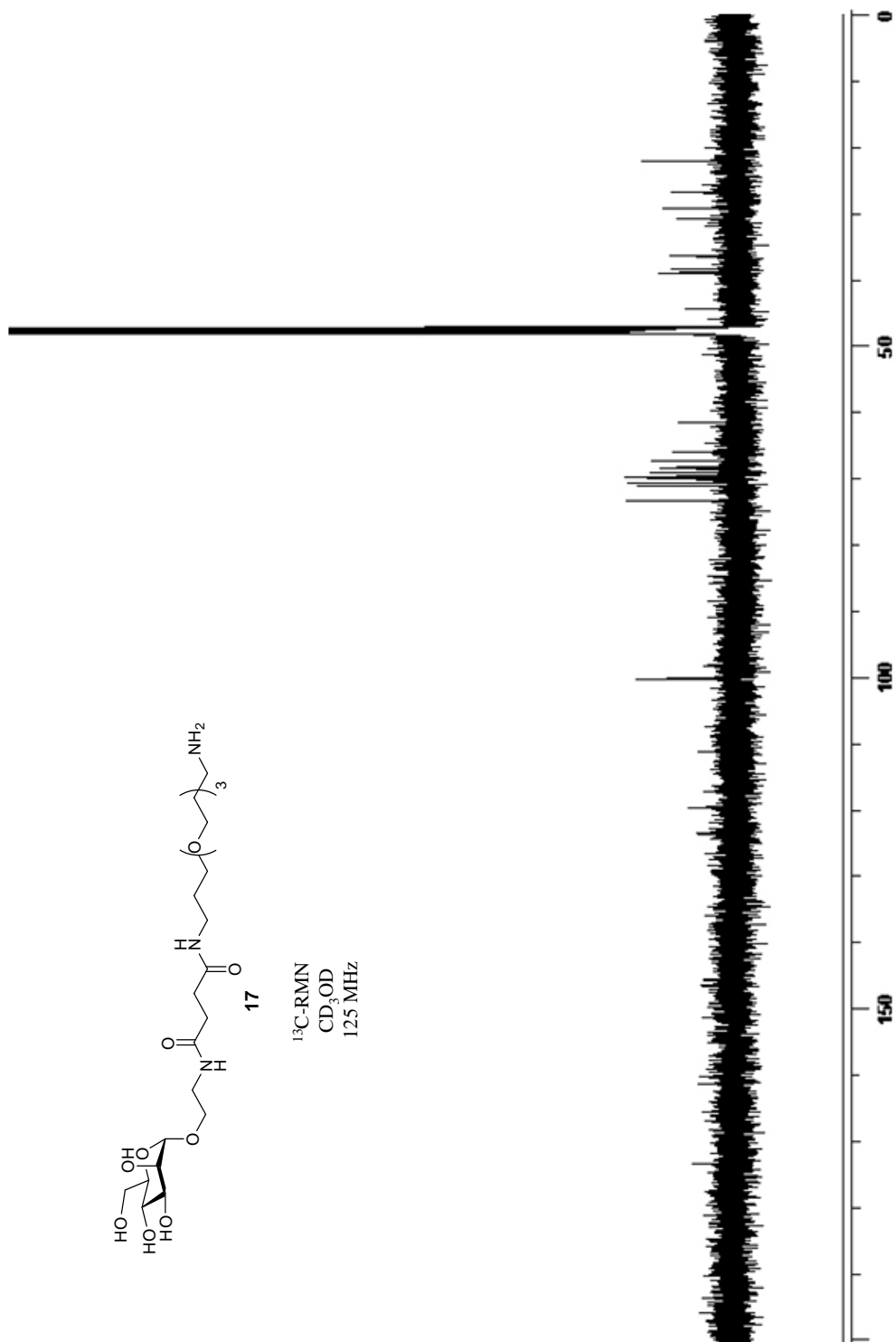


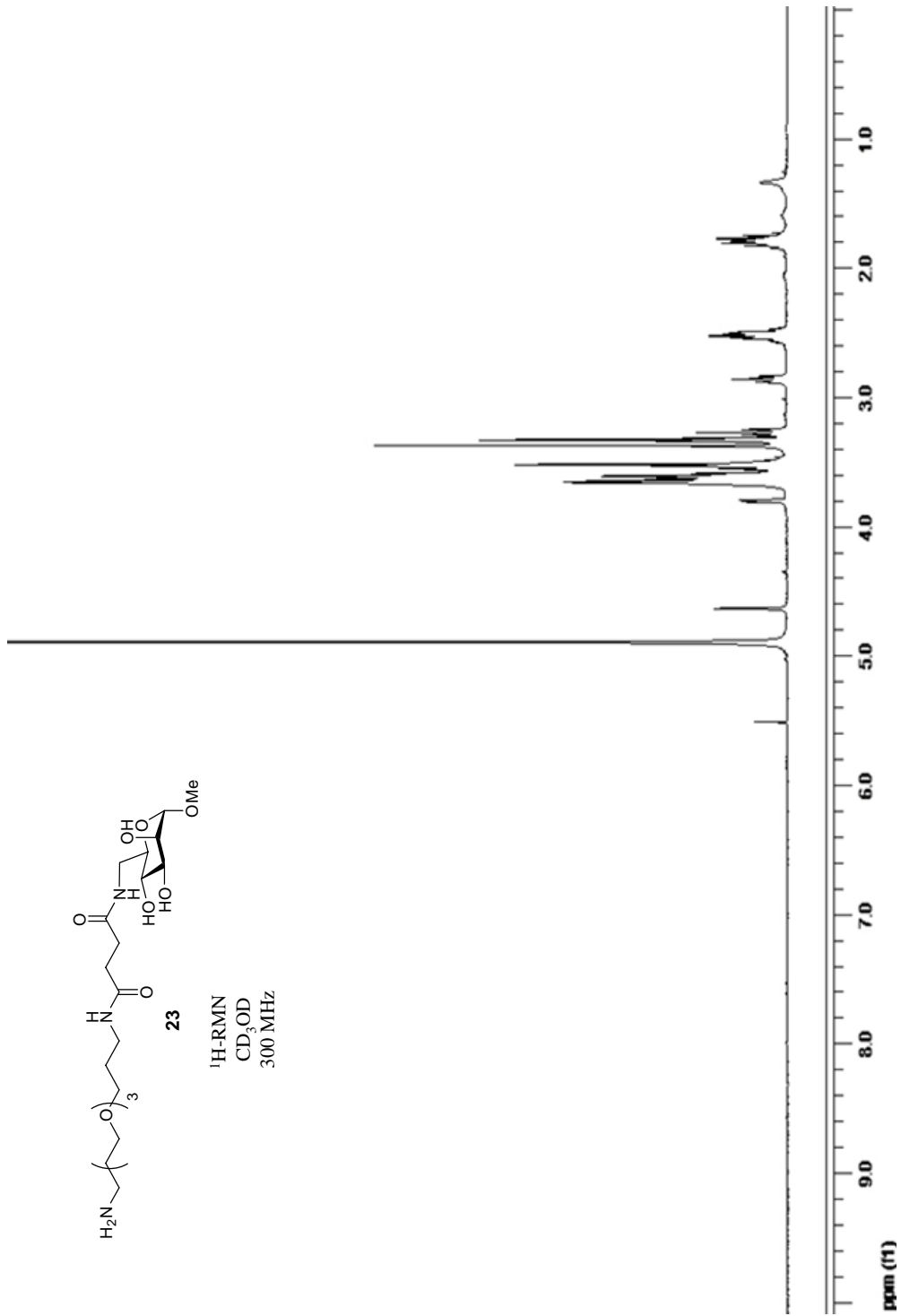


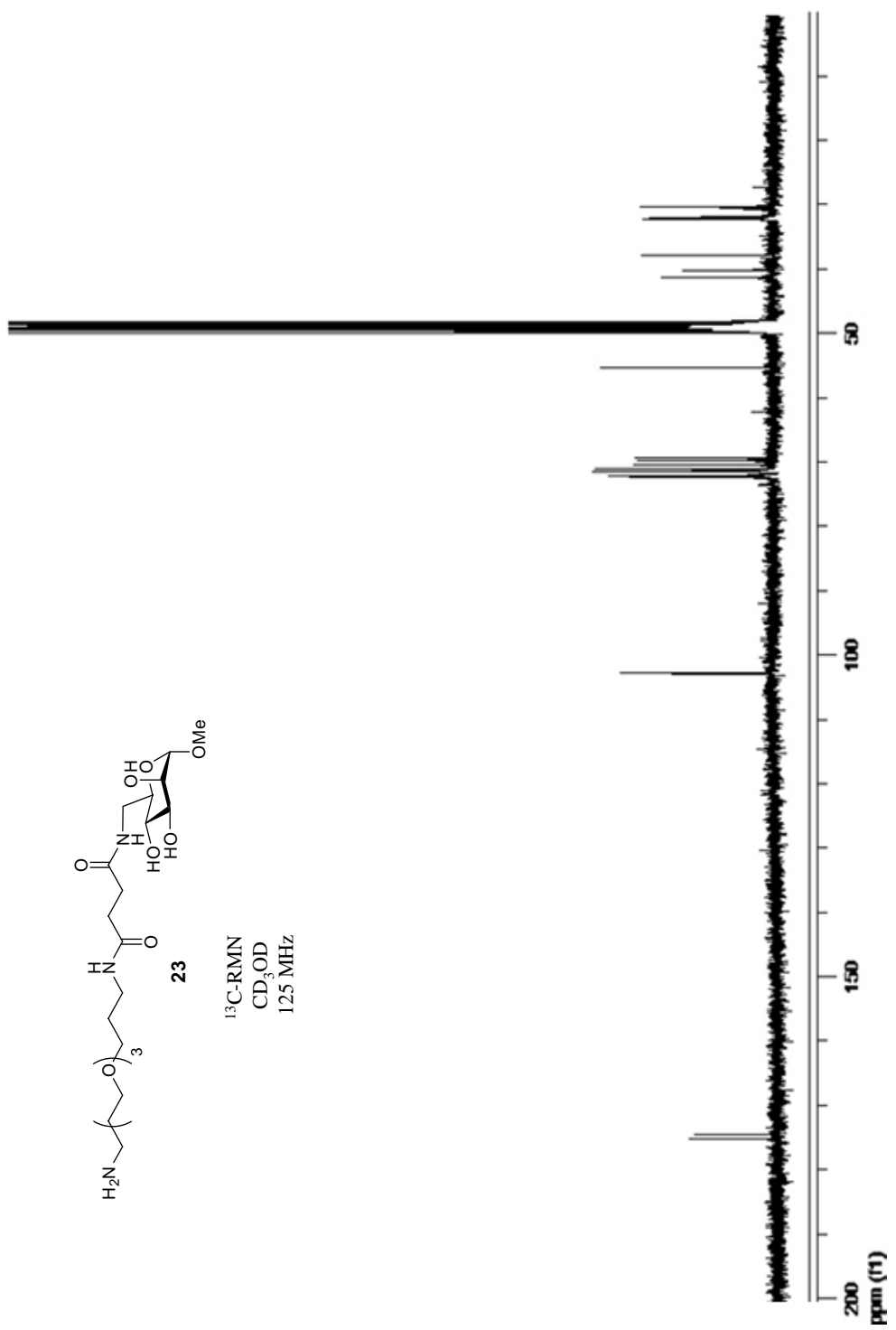


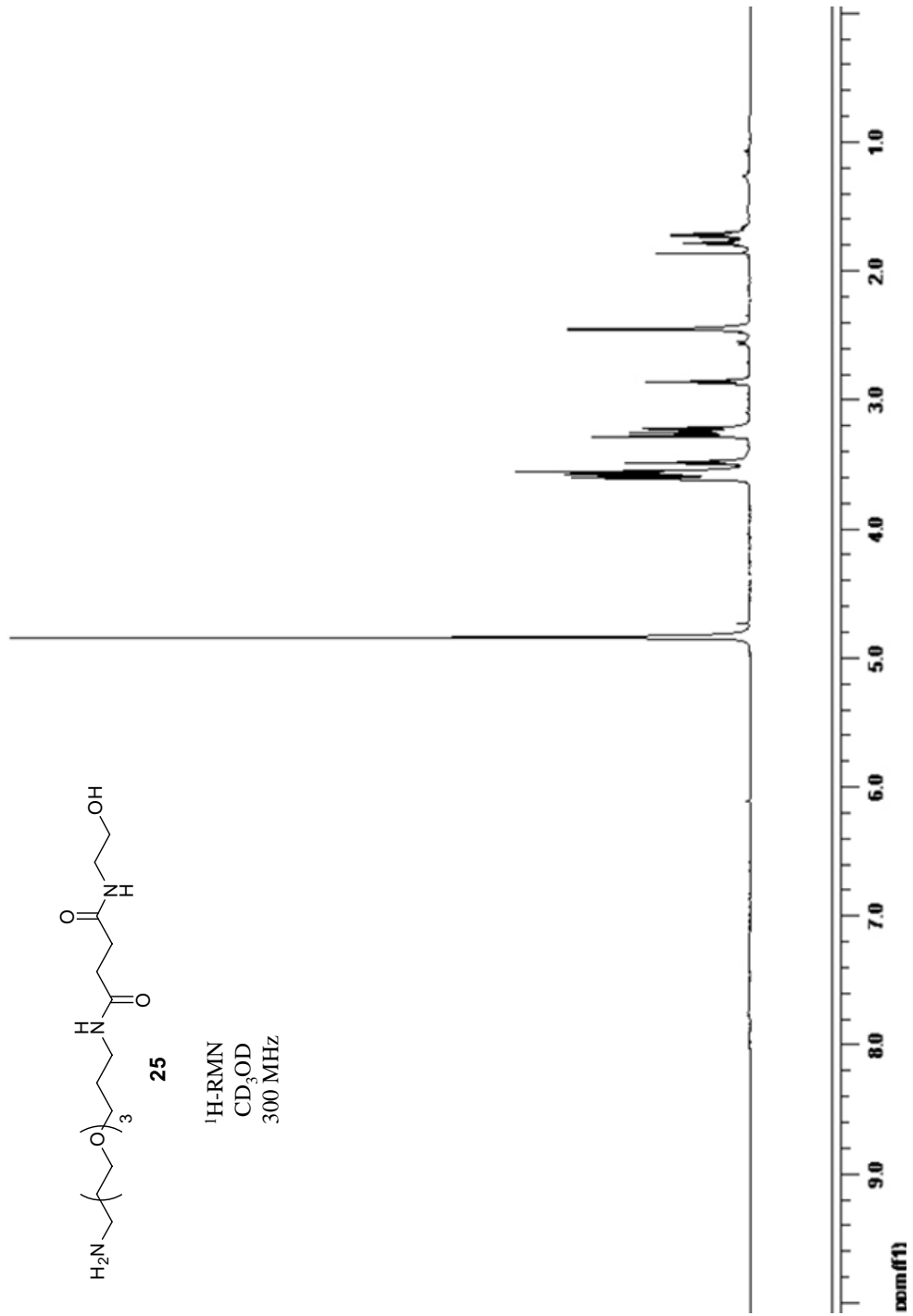


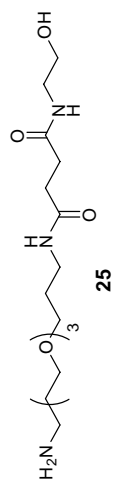
^{13}C -RMN
 CD_3OD
125 MHz



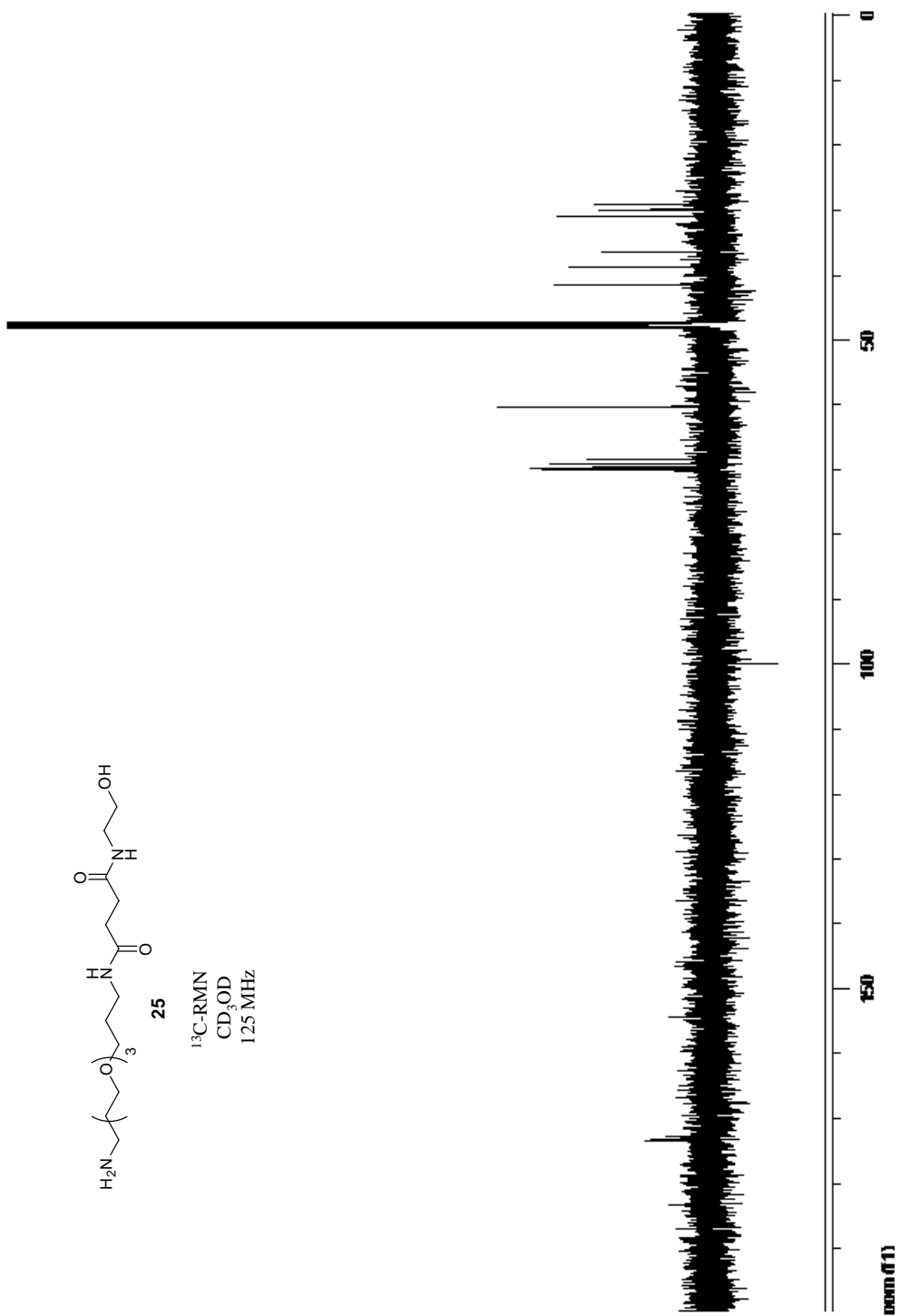


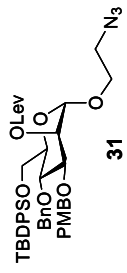




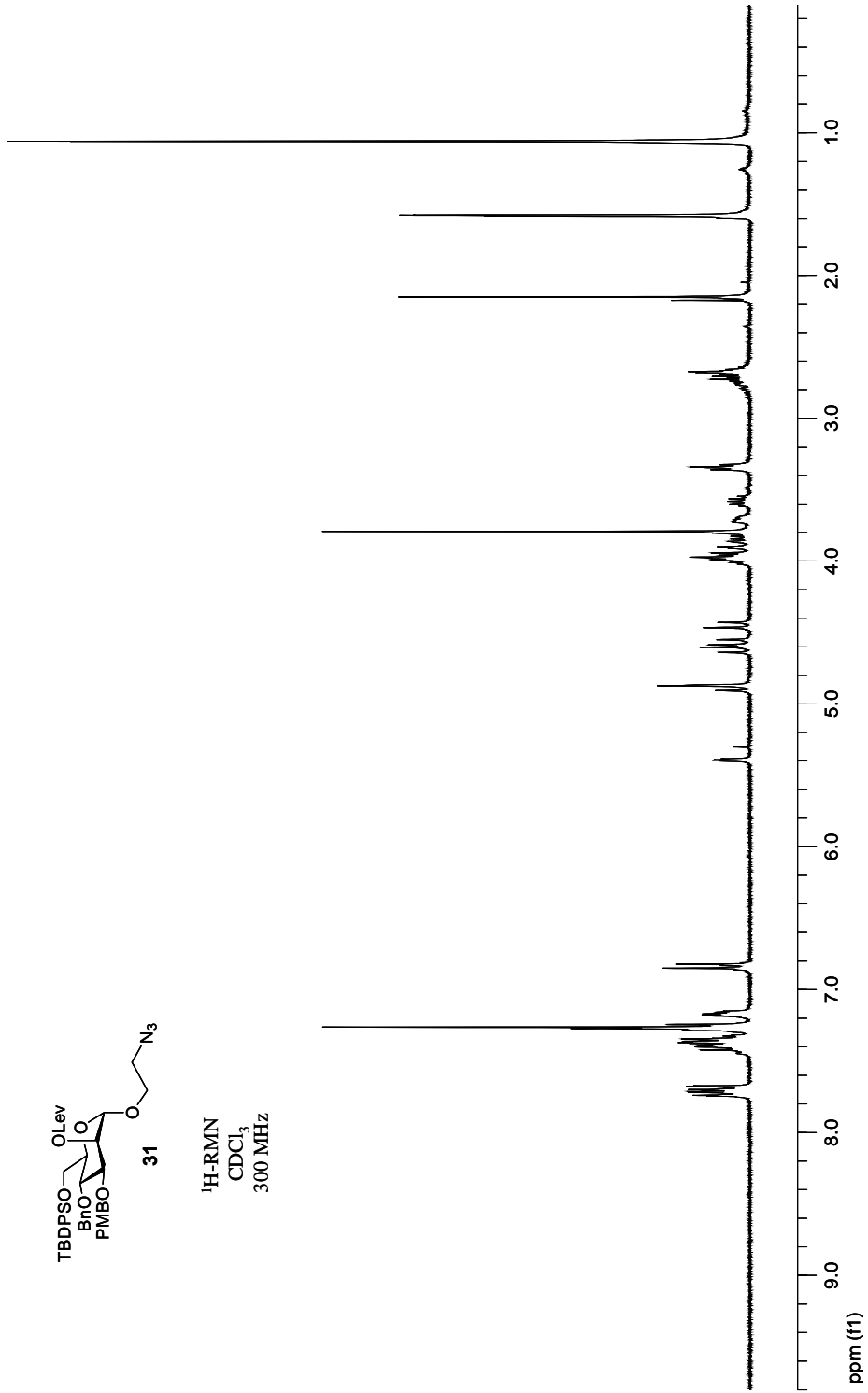


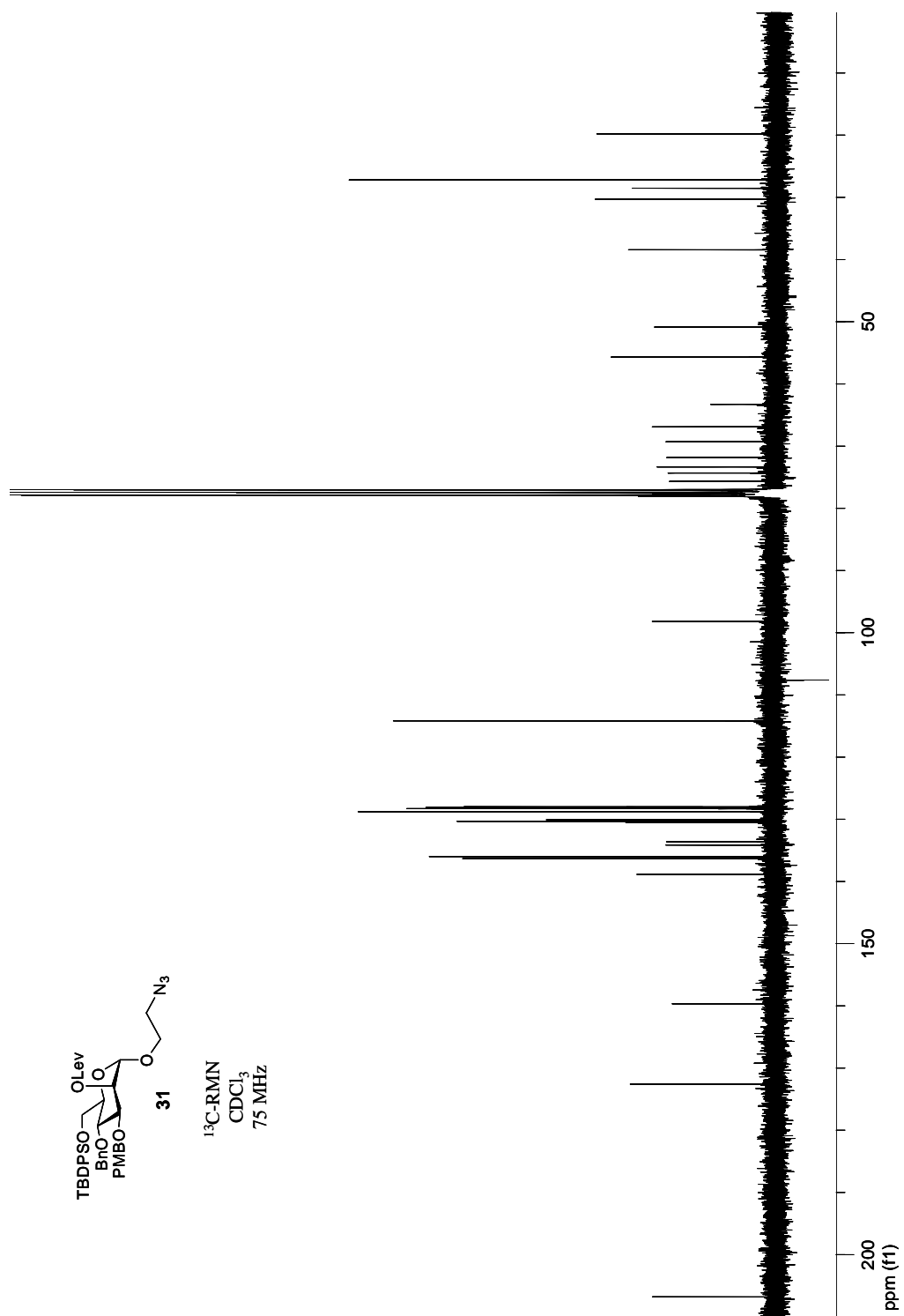
¹³C-RMN
CD₃OD
125 MHz

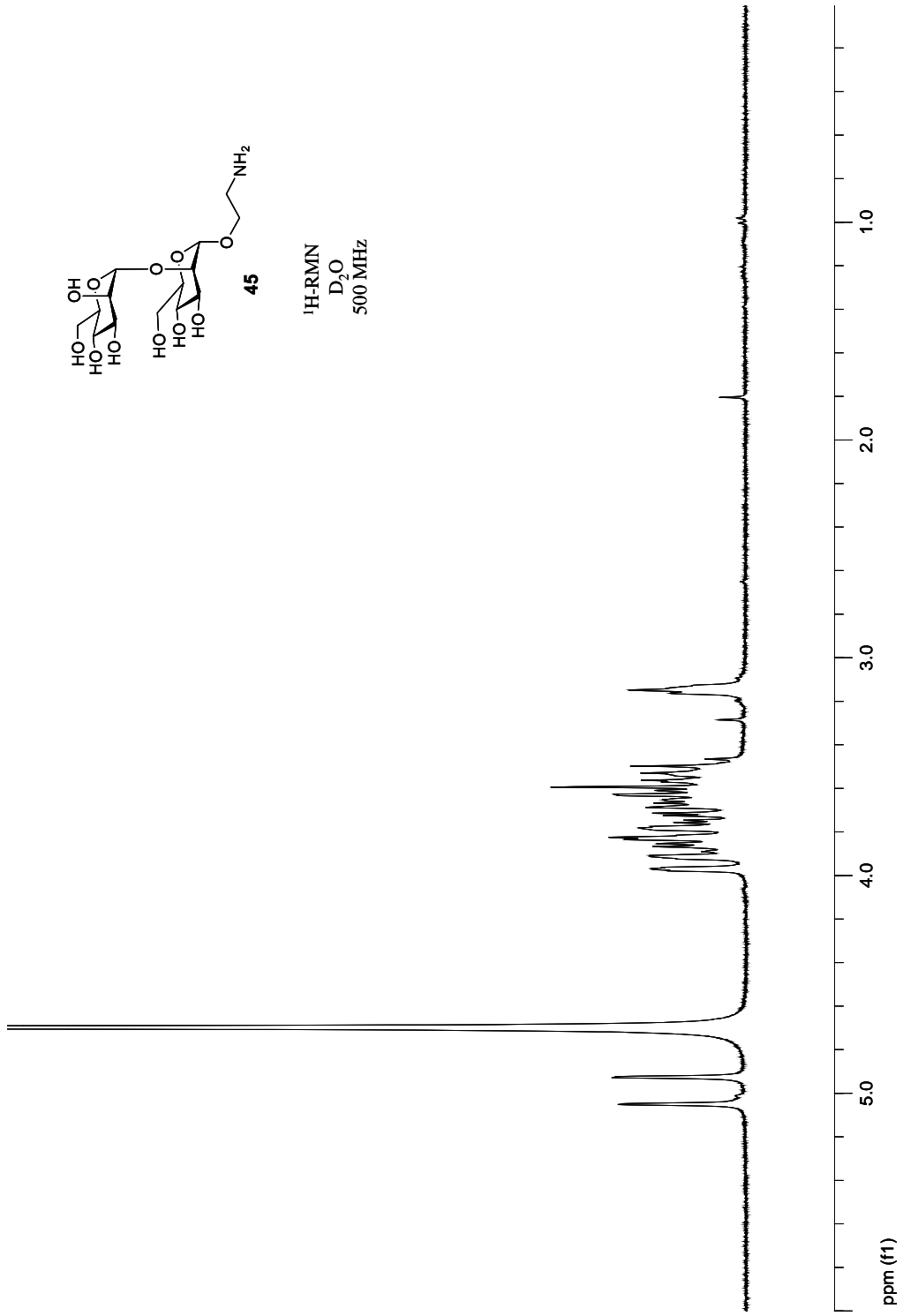


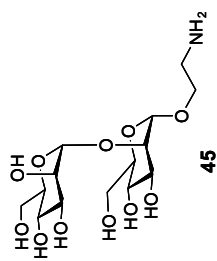


¹H-RMN
CDCl₃
300 MHz

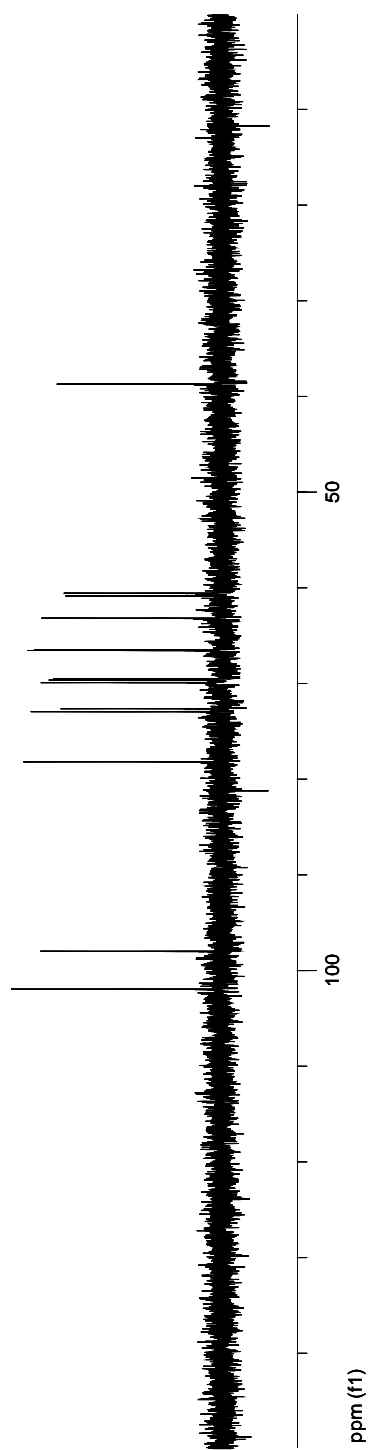


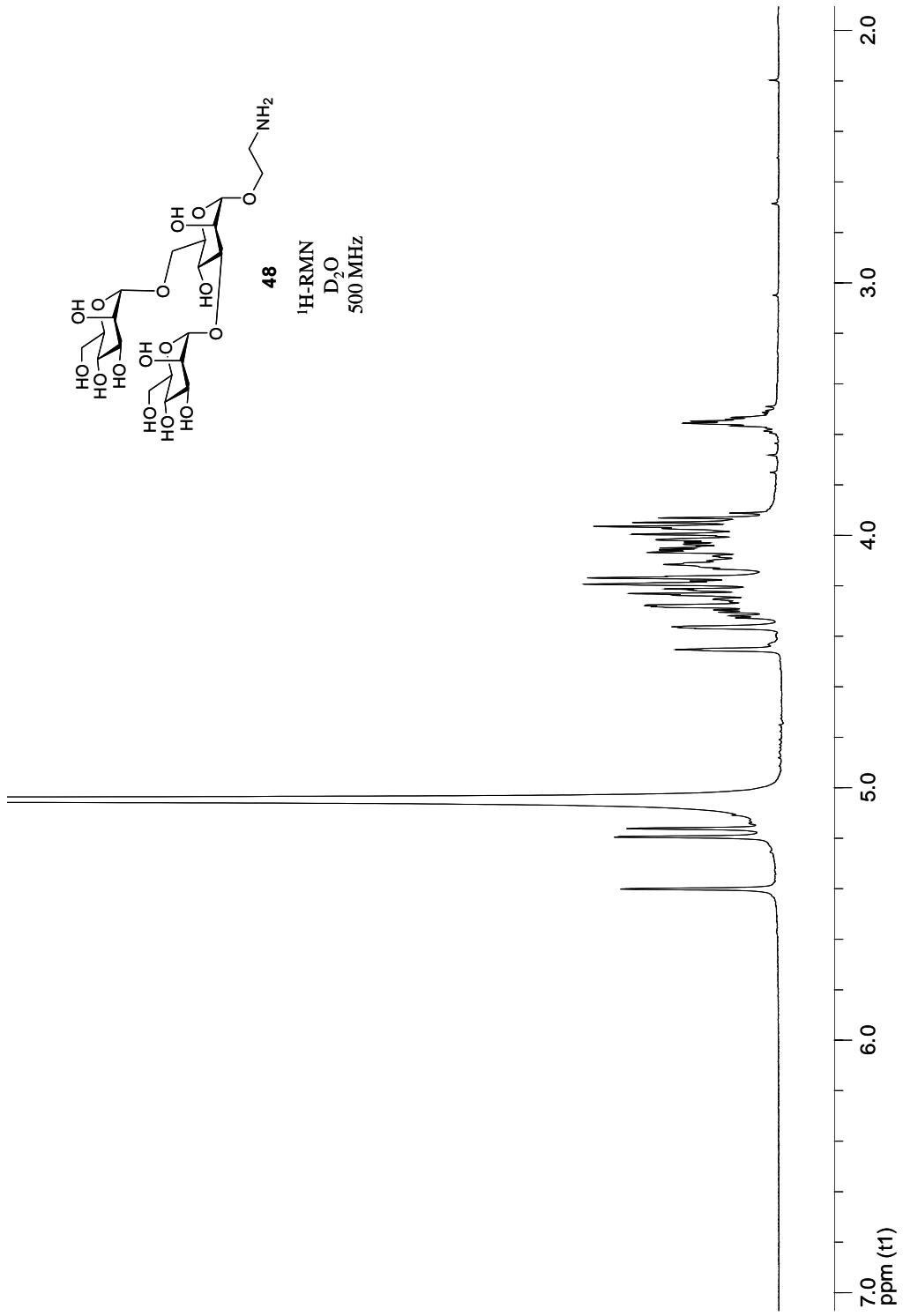


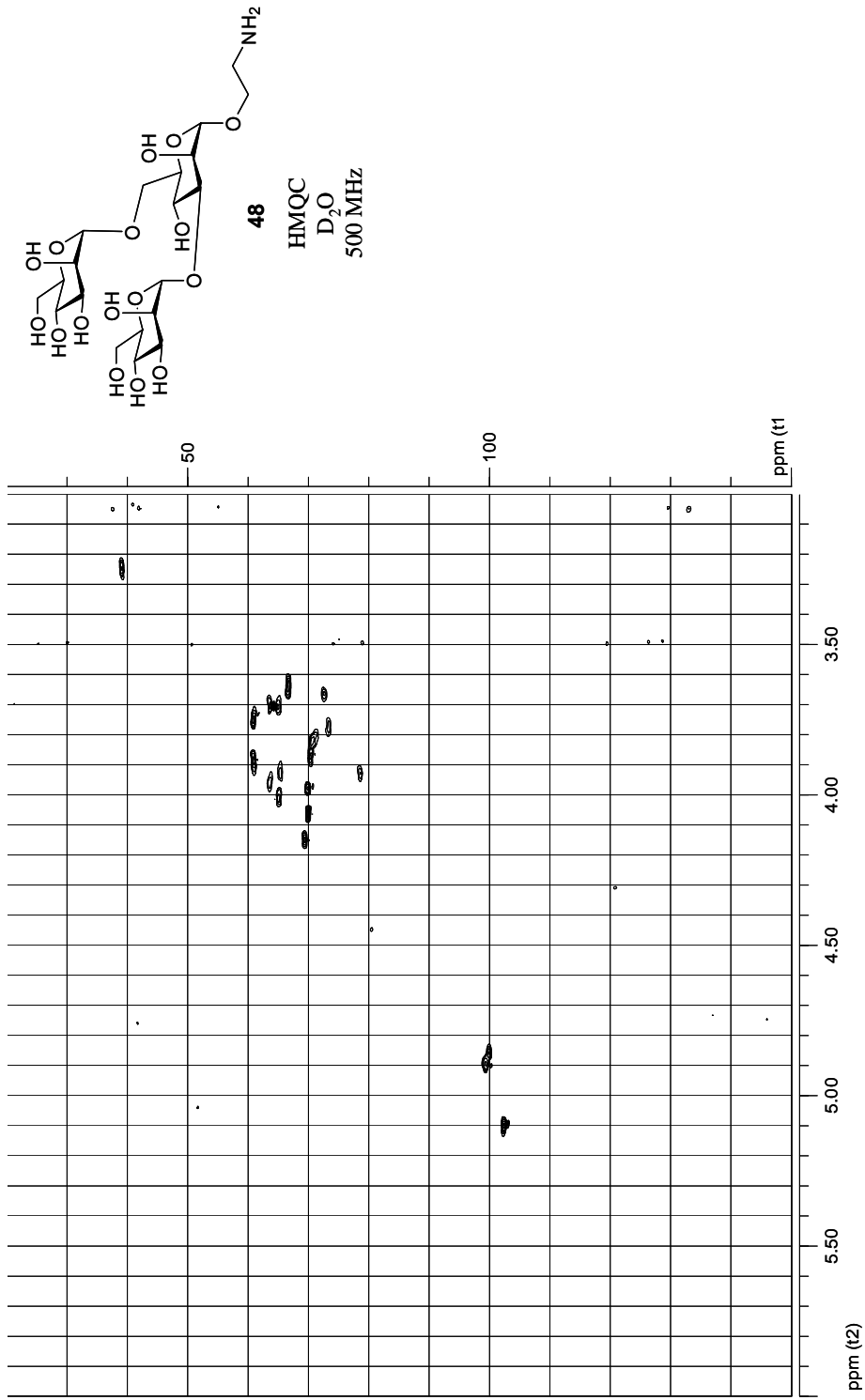


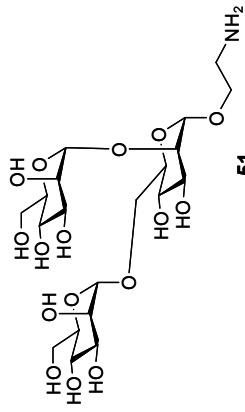


^{13}C -RMN
 D_2O
125 MHz



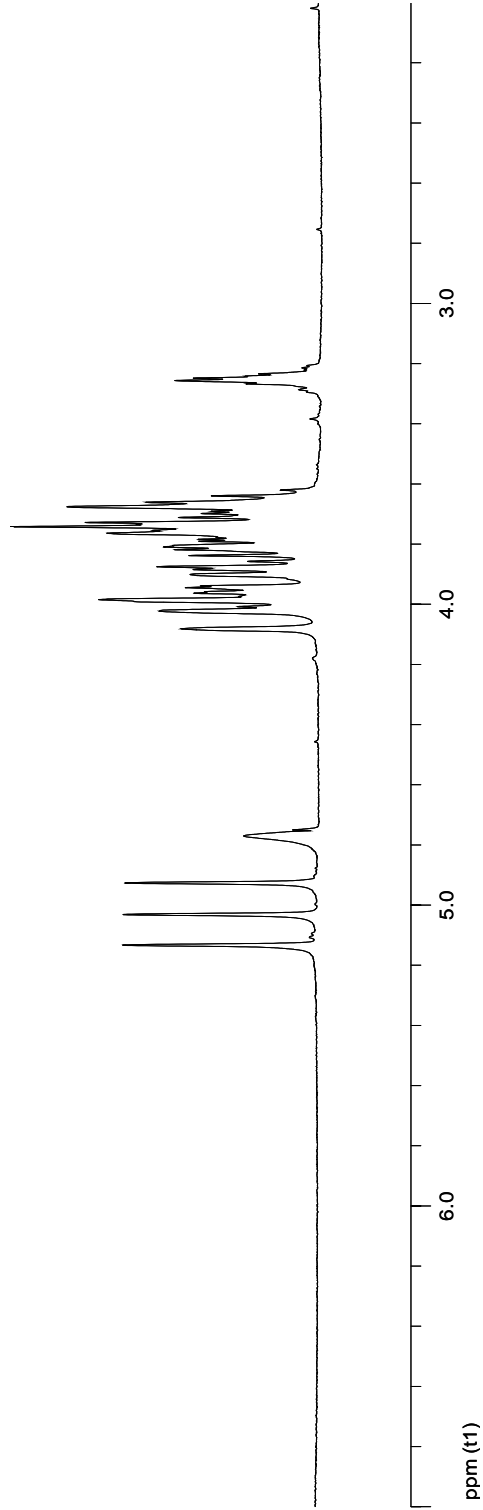


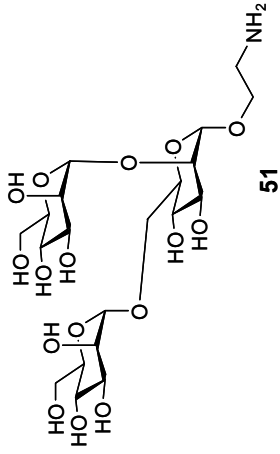




51

¹H-RMN
D₂O
500 MHz





HMQC
D₂O
500 MHz

