

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Papel de los carbohidratos en la actividad de los glicopéptidos
anticongelantes**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandro Vilacampa Sanagustín

DIRIGIDA POR

Juan Luis Asensio Álvarez
Ester Jiménez Moreno

Madrid

© Alejandro Vilacampa Sanagustín, 2025

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LOS CARBOHIDRATOS EN LA ACTIVIDAD DE LOS
GLICOPÉPTIDOS ANTICONGELANTES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

ALEJANDRO VILLACAMPA SANAGUSTÍN

DIRECTORES

JUAN LUIS ASENSIO ÁLVAREZ

ESTER JIMÉNEZ MORENO

MADRID, 2025

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Programa de Doctorado en Química Orgánica



**PAPEL DE LOS CARBOHIDRATOS EN LA ACTIVIDAD DE LOS
GLICOPÉPTIDOS ANTICONGELANTES**

TESIS DOCTORAL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

ALEJANDRO VILLACAMPA SANAGUSTÍN

DIRECTORES

Dr. Juan Luis Asensio Álvarez

Dra. Ester Jiménez Moreno



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CSIC



MADRID, 2025

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Química Bio-Orgánica (QBO) del Instituto de Química Orgánica General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección de los Dres. Juan Luis Asensio Álvarez y Ester Jiménez Moreno.

El trabajo ha estado financiado por los proyectos “Glicoquímica y reconocimiento molecular: Análisis de procesos de glicosilación y su modulación por medio de interacciones catión/ π ” (PID2019-107476GB-I00) y “Estrategias químicas para estudio de glicopéptidos anticongelantes: síntesis, estructura y actividad de variantes no naturales” (PID2022-141085NB-I00) concedidos por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

Así mismo, agradezco al Ministerio de Economía y Competitividad, por la concesión del contrato de Formación de Personal Investigador (FPI), cuya referencia es PRE2020-093392.

AGRADECIMIENTOS

Después de años de trabajo, dedicación, dudas, descubrimientos, éxitos y errores, llegar al final de esta tesis doctoral representa no solo el cierre de una etapa académica, sino también el comienzo de otra, marcada por el crecimiento personal y profesional. Este camino no lo he recorrido solo, y por ello quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que, de una u otra forma, hicieron posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, deseo agradecer sinceramente a mis directores de tesis, el Dr. Juan Luis Asensio Álvarez y la Dra. Ester Jiménez Moreno. A Juan Luis, muchas gracias por haberme dado la oportunidad de poder trabajar en tu grupo de investigación, por tu rigor científico, tu exigencia constructiva y tu capacidad para transmitir tus conocimientos, que han sido, sin duda alguna, una fuente de inspiración constante. Tu confianza en mi trabajo, incluso en los momentos más inciertos, fue clave para que esta etapa de mi vida pueda ser catalogada como exitosa. A Ester, por haberme acogido como uno más en cada una de mis visitas a la Universidad de La Rioja. Gracias por transmitirme tus conocimientos, especialmente en el ámbito de la síntesis en fase sólida de péptidos. Sin tu esfuerzo y dedicación, esta tesis no habría sido lo mismo.

A la Dra. Ana M. Gómez, por estar siempre disponible cuando he tenido alguna duda especialmente en la síntesis de los compuestos, siempre ayudando con una sonrisa y sin esperar nada a cambio. Gracias también a los demás investigadores de su grupo: El Dr. Cristóbal López y la Dra. Clara Uriel, por tratarme siempre como uno más y hacerme sentir como en casa. Gracias también a todos los científicos del departamento que de alguna manera o de otra, han contribuido a que mi estancia en el CSIC haya sido mejor.

Al Dr. Andrés G. Santana, que actualmente se encuentra como científico titular en su Tenerife natal, pero con el que pude coincidir en el comienzo de mi andadura en esta tesis doctoral y fue clave en el éxito en la síntesis de algunos derivados de esta presente tesis. También me gustaría agradecer a la Dra. Laura Díaz, que también compartió conmigo vitrina durante gran parte de la tesis, transmitiéndome su conocimiento y enseñándome a perfeccionar mi técnica en el laboratorio, especialmente en la química de los azúcares. Aunque al principio estábamos 24/7 juntos, al final no se nos dio mal y sobrevivimos.

A lo largo de mi andadura por el IQOG he conocido a un montón de personas a las que quiero agradecer de corazón:

A Claudia, tu llegada al Laboratorio 243 fue un soplo de aire fresco para el grupo. Gracias por entrar siempre al laboratorio con una sonrisa y hacernos sin lugar a dudas, más divertidas nuestras inacabables horas dentro del laboratorio. Ha sido un placer cederte el testigo de la investigación de mi tesis, y ya sabes que estoy y estaré siempre para todo lo que necesites.

A Susana, una de las personas más importantes sin duda que me llevo en esta larga etapa. Hemos vivido momentos inolvidables que no olvidaremos nunca. Desde los bailes del Junco, hasta nuestros largos debates políticos y de la vida en general. Encontré a una persona y me llevo a una amiga, muchas gracias por todo.

A los compañeros de departamento, con los que hemos pasado inolvidables e incontables momentos juntos a lo largo de esta tesis, especialmente a la hora de la comida. Muchas gracias a Raúl, Sandra, Mireia, Alicia, M. Luisa y Quique por haberme hecho más amena mi estancia en la tesis, en los buenos y especialmente, en los peores momentos. Os deseo lo mejor en el futuro. Quisiera también agradecer a las personas que se han incorporado a este grupo más tarde: A Evel, Juliane y María, gracias por acompañarme también en este camino.

Al personal de Resonancia Magnética Nuclear del CENQUIOR, especialmente a Elisa, Maite y M. José, por la realización de los infinitos espectros de resonancia que he necesitado para la consecución de la tesis, siempre además dispuestas a buscar soluciones con una sonrisa. Gracias también al personal de Dirección, Gerencia y Administración.

A partir de ahora, me toca agradecer a las personas más importantes de mi vida, mi familia.

En primer lugar, quiero expresar mi más profunda gratitud a mis padres. Ellos han sido el verdadero pilar sobre el cual se ha construido todo este recorrido. Me han dado absolutamente todo para poder formarme, no solo como científico, sino también como persona. Su esfuerzo silencioso, su entrega generosa y su amor incondicional han sido la base de cada paso que he dado. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba, por enseñarme con el ejemplo el valor del trabajo, la honestidad y la perseverancia, y por estar siempre, incluso en la distancia, apoyándome sin condiciones. Esta tesis, en gran medida, os pertenece también a vosotros.

A mis hermanos, Alberto y Carlota. Alberto, es difícil mostrar con palabras lo orgulloso que me siento de ti. Tu perseverancia y tu tesón a la hora de buscar conseguir tus sueños, sin duda han tenido premio. Sigue así, y ya sabes que aquí está tu hermano para todo lo que necesites. A Carlota, la pequeña de la casa. Tu llegada a la familia fue sin duda, una de las alegrías más grandes de mi vida. Muchas gracias por aguantarme (aunque a veces sé que no es sencillo...) y por quererme, ya sabes que me tienes para siempre.

A mis abuelas, Adelina y Conchita, que son y han sido un ejemplo de vida en todos los aspectos. Me siento muy orgulloso de vosotras y de que podáis disfrutar en vida todos los logros que estoy consiguiendo. A mis abuelos, Rosendo y Esteban allá donde estén, estoy seguro que están tan orgullosos de mí como yo de ellos. Pese a que no están conmigo, los siento cerca siempre. Muchas gracias.

A mis tíos Víctor y Vicky, Carlos y Lola, Miguel y Ana, y a mis primos Alba, Carlos, Guillermo y Javi.

A mi otra familia, mi familia de Madrid. A mis suegros José y Sole. Sin duda sin vosotros mi estancia aquí en Madrid no hubiera sido lo mismo. Desde que conocí a vuestra hija, son incontables las cosas que habéis hecho por mí, haciéndome sentir, sin duda alguna, como alguien más de la familia, como un extremeño más. Muchas gracias por todo vuestro apoyo y consejos, siempre buscando lo mejor para mí y para los dos. Quisiera también agradecer a Olga que me han acompañado también en esta etapa. A Rosa, por ser un ejemplo de vida y superación y a toda la familia de Don Benito.

Finalmente quisiera agradecer a Laura. Nos conocimos hace ya casi 13 años estudiando en la carrera y sin duda no pude tener más suerte a la hora de encontrarte. Comencé la tesis siendo tu novio, y la termino siendo tu marido. No puedo agradecer con palabras todo lo importante que eres para mí y todo lo que me das día a día. Siempre a mi lado, al comienzo de la tesis compartiendo vitrina y al final de la misma separados por miles de kilómetros. No puedo estar más orgulloso de ti por todos los logros y premios que estás consiguiendo. Te mereces lo mejor. *Grazie per essere il mio compagno di viaggio. Ti amo.*

ÍNDICE

Glosario de abreviaturas.....	I
Resumen.....	V
Summary.....	IX

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Estructura y función biológica de los carbohidratos. 1

1.2 Consecuencias de la exposición a bajas temperaturas en organismos vivos 4

1.3 Adaptaciones biológicas al frío: proteínas anticongelantes..... 6

1.3.1 Características generales de las proteínas anticongelantes..... 6

1.3.2 Influencia de las proteínas anticongelantes sobre el crecimiento del hielo. 8

1.3.3 Características generales del hielo. 9

1.3.4 Mecanismo de acción de las proteínas anticongelantes: descripción general del proceso de Adsorción-Inhibición. 11

1.3.5. Reconocimiento molecular del hielo por las proteínas anticongelantes: bases moleculares de la interacción. 14

1.3.6. Inhibición de la recristalización: Bases moleculares..... 17

1.3.7. Glicopéptidos Anticongelantes (AFGPs): Estructura y características generales. 19

1.3.8. Bases moleculares de la actividad anticongelante: métodos de asociación glicopéptido/hielo..... 20

1.3.9. Estudios de relación estructura-función: Síntesis y evaluación de derivados. 23

1.3.10. Carbohidratos como miméticos del hielo: Evidencias experimentales. 25

1.3.11. Actividad anticongelante de carbohidratos no conjugados a proteínas..... 26

1.3.12. Cuestiones pendientes 28

1.3.13. Proteínas anticongelantes y nuevos materiales para criopreservación en biomedicina. 30

2. OBJETIVOS 35

3. MODIFICACIONES QUÍMICAS DE GLICOPÉPTIDOS ANTICONGELANTES Y SÍNTESIS DE MODELOS SENCILLOS 41

3.1. GLICODIVERSIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DISACARÍDICO β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc..... 41

3.1.1. Síntesis de los glicopéptidos portadores de β -D-Man-(1-3)- α -D-GalNAc (**GP-I**) y de α -D-Man-(1-3)- α -D-GalNAc (**GP-II**)..... 41

3.1.2. Síntesis del glicopéptido portador de β -D-Glc-(1-3)- α -D-GalNAc (**GP-III**) 52

3.1.3. Síntesis del glicopéptido portador de 4-desoxi- β -D-Glc-(1-3)- α -D-GalNAc (**GP-IV**). 55

3.1.4. Síntesis del glicopéptido híbrido portador de β -D-All-(1-3)- α -D-GalNAc y β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc (**GP-V**)..... 58

3.1.5. Síntesis del glicopéptido híbrido portador de β -L-Fuc-(1-3)- α -D-GalNAc y β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc (**GP-VI**) 64

3.1.6. Síntesis del glicopéptido híbrido portador de β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc y 3,4,6-tri-OMe- β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc (GP-VII).....	67
3.1.7. Síntesis del glicopéptido portador de β -D-Gal-(1-3)- α -D-(<i>N</i> -tioacetil)-galactosamina (GP-VIII).....	76
3.1.8. Síntesis de los glicopéptidos híbridos portadores de β -D-Gal-(1-3)- α -D-(<i>N</i> -formil)-galactosamina (GP-IX) y β -D-Gal-(1-3)- α -D-(<i>N</i> -trifluoroacetil)-galactosamina (GP-X y GP-XI)	78
3.2. SÍNTESIS DE TRIPÉPTIDOS MODELO (-ATA-) M-I, M-II, M-III, M-IV y M-V.	82
3.2.1. Síntesis del tripéptido portador de α -D-manosa M-I	82
3.2.2. Síntesis del tripéptido portador de α -D-galactosa M-II	83
3.2.3. Síntesis del tripéptido portador de α -D-GalNAc M-III	85
3.2.4. Síntesis del tripéptido portador de <i>N</i> -trifluoroacetilgalactosamina M-IV	86
3.2.5. Síntesis del tripéptido portador de α -D-(<i>N</i> -tioacetil)- galactosamina M-V	87
3.3. RESUMEN DE LAS ESTRUCTURAS SINTETIZADAS	87
4. ESTRUCTURA DE GLICOPÉPTIDOS ANTICONGELANTES EN DISOLUCIÓN.	93
4.1. Análisis de las propiedades conformacionales de los glicopéptidos sintetizados mediante RMN.	93
4.1.1. Características generales de los espectros de RMN.	94
4.1.2. Propiedades conformacionales generales de los glicopéptidos I-VII	100
4.1.3. Papel estructurador del fragmento <i>N</i> -acetilo ecuatorial de GalNAc.	105
4.1.4. Modificaciones en el fragmento <i>N</i> -acetilo; Preferencias conformacionales de los derivados GP-VIII a GP-XI	109
4.1.5. Conclusiones del estudio conformacional de los glicopéptidos no naturales.....	114
4.1.6. Breve reseña relativa al comportamiento de los tripéptidos modelo.....	116
5. ACTIVIDAD ANTICONGELANTE DE LOS GLICOPÉPTIDOS SINTETIZADOS: MEDIDAS DE “DYNAMIC ICE SHAPING” E HISTÉRESIS TÉRMICA.	121
5.1. Observaciones de carácter experimental.	121
5.2. Medidas de actividad de glicopéptidos no naturales.	122
5.3. Conclusiones: hacia un modelo alternativo de interacción <i>AFGP</i> /hielo.....	127
6. CONCLUSIONES	131
7. PARTE EXPERIMENTAL	137
7.1 Técnicas generales	137
7.2 Procedimientos Generales.	138
7.3 Síntesis de los “ <i>building block</i> ” para la preparación de los glicopéptidos GP-I a GP-XI.	142
7.3.1. Síntesis del donador de derivado de D-manosa (D1).....	142

7.3.2. Síntesis de la especie aceptora 6	143
7.3.3. Síntesis de la especie donadora D2	144
7.3.4. Reacción de acoplamiento entre D2 y 6 y transformaciones posteriores.	145
7.3.5. Síntesis de los “ <i>building blocks</i> ” derivados de D-manosa (BB1 y BB2).	148
7.3.6. Síntesis del donador D3	152
7.3.7. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB3	153
7.3.8. Síntesis del donador D4	155
7.3.9. Síntesis de los “ <i>building block</i> ” BB4	157
7.3.10. Síntesis del donador D5	159
7.3.12. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB5	160
7.3.13. Síntesis del donador D6	161
7.3.14. Síntesis del donador D7	163
7.3.15. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB6	164
7.3.16. Síntesis del donador D8	166
7.3.17. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB7	167
7.3.18. Síntesis del donador D9	169
7.3.19. Síntesis del donador D10	170
7.3.20. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB9	171
7.3.21. Síntesis del donador D12	173
7.3.22. Síntesis del aceptor 36	175
7.3.23. Síntesis del donador D11	176
7.3.24. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB8	178
7.3.25. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB10	180
7.3.26. Síntesis del aceptor A2	181
7.3.27. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB11	182
7.3.28. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB12	185
7.4 Síntesis de los “<i>building block</i>” para la preparación de los tripéptidos (TP-I a TP-V).	186
7.4.1. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB13	186
7.4.2. Síntesis del donador de glicosilo D13	187
7.4.3. Síntesis del aceptor de glicosilo A3	188
7.4.4. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB14	188
7.4.5. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB15	191
7.4.6. Síntesis del “ <i>building block</i> ” BB16	192
7.5 Caracterización de los glicopéptidos GP-I a GP-XI	193
7.5.1. Glicopéptido GP-I	193
7.5.2. Glicopéptido GP-II	193
7.5.3. Glicopéptido GP-III	194

7.5.4. Glicopéptido GP-IV	195
7.5.5. Glicopéptido GP-V	195
7.5.6. Glicopéptido GP-VI	196
7.5.7. Glicopéptido GP-VII	196
7.5.8. Glicopéptido GP-IX	197
7.5.9. Glicopéptido GP-X	197
7.5.10. Glicopéptido GP-XI	198
8. BIBLIOGRAFÍA	201

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Å	Ángstrom
Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Ácido fórmico
AFPs	<i>Antifreeze Proteins</i>
AFGPs	<i>Antifreeze Glycoproteins/Glycopeptides</i>
Ala	Alanina
All	Alosa
Ar	Argón
ARN	Ácido ribonucleico
Bn	Bencilo
Bz	Benzoílo
°C	Grados centígrados
cat.	Catalítico
COSY	Espectroscopía de correlación H-H
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
DBU	1,8-diazabicyclo [5.4.0]undeca-7-eno
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
dd	Doblete de dobletes
ddd	Doble doblete de dobletes
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DIS	<i>Dynamic Ice Shaping</i>
DMAP	4-Dimetilaminopiridina

DMF	<i>N,N'</i> -Dimetilformamida
DMP	Periodinano de Dess-Martin
DMSO	Dimetilsulfóxido
dq	Doblete de cuádrupletes
dt	Doblete de tripletes
EM	Espectroscopía de masas
eq.	Equivalentes
ESI	Ionización por Electrospray
Fmoc	Fluorenilmetoxycarbonilo
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
Glc	Glucosa
GP	Grupo protector
Grad	Gradiente
GS	Grupo saliente
h	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HSQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear cuántica simple (correlación directa C-H)
HT	Histéresis térmica
Hz	Hertzio
IRI	<i>Ice Recrystallization Inhibition</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kDa	Kilodalton
LacNAc	<i>N</i> -Acetillactosamina
M	Molar
MALDI	Desorción/Ionización láser asistida por matriz
Man	Manosa
ManNAc	<i>N</i> -Acetilmanosamina
min	Minuto

MW	Microondas
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimida
NOE	Efecto Nuclear Overhauser
NOESY	Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser
o/n	<i>overnight</i>
PC	Punto de congelación
pdb	<i>Protein data bank</i>
PF	Punto de fusión
Ph	Fenilo
PMP	<i>p</i> -metoxifenilo
PMB	<i>p</i> -metoxibencilo
<i>p</i> -TsOH	Ácido <i>p</i> -toluenosulfónico
Py	Piridina
QLL	<i>Quasi-Liquid Layer</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singlete
S _N 1	Sustitución nucleófila unimolecular
S _N 2	Sustitución nucleófila bimolecular
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TBAI	Yoduro de tetrabutilamonio
TBTA	Tricloroacetimidato de <i>tert</i> -butilo
T _c	Temperatura de Congelación
TCA	Tricloroacetónitrilo
T _f	Temperatura de Fusión
TFA	Ácido trifluoroacético
TFAA	Anhídrido trifluoroacético
TfOH	Ácido trifluorometanosulfónico
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
TIS	Triisopropilsilano

TM	Tamiz molecular
TMSOTf	Trifluorometanosulfonato de trimetilsililo
TOCSY	Espectroscopía de correlación total
tol	Tolueno
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

El resumen de mi tesis doctoral, titulada “Papel de los carbohidratos en la actividad de los glicopéptidos anticongelantes” es el siguiente:

Transcurridos más de 50 años desde su descubrimiento, el mecanismo de acción de las glicoproteínas anticongelantes sigue siendo objeto de debate en la comunidad química. De acuerdo con el consenso actual, su actividad crioprotectora se explica en base a un modelo de adsorción-inhibición, comúnmente aceptado para otras proteínas anticongelantes. Dicho modelo postula como primer paso la asociación del **glicopéptido** a la superficie del hielo, proceso que, adicionalmente, debe cumplir requerimientos estrictos en términos de especificidad y afinidad. En particular, las *AFGPs* reconocen de modo selectivo el plano prismático primario del hielo hexagonal, induciendo de modo preferente a la formación de microcristales de forma definida. Adicionalmente, la asociación debe ser irreversible con objeto de promover la formación de salientes en la superficie del cristal, cuya existencia constituye la base del efecto Kelvin y, por tanto, del fenómeno de histéresis térmica.

Más allá de estas consideraciones de carácter general, cabe mencionar que las interacciones concretas **glicopéptido**/hielo responsables de la formación de un complejo estable y específico son fundamentalmente desconocidas. Debe observarse que, desde una perspectiva química, se trata de uno de los procesos de reconocimiento molecular más complicados de estudiar concebibles. Así, el **glicopéptido** debe discriminar no solo entre dos fases distintas del mismo compuesto (agua líquida y hielo I_h), sino también entre los diferentes planos que componen el retículo cristalino. Hasta la fecha, se han postulado dos modelos de asociación incompatibles que otorgan papeles alternativos a las unidades de carbohidrato. Así, las propuestas iniciales apuntaban a los residuos de galactosa como epítipo de reconocimiento, siendo la naturaleza del complejo fundamentalmente polar. Posteriormente, estudios teóricos han sugerido la existencia de un epítipo alternativo, de naturaleza solvofóbica. De acuerdo con dicha propuesta, los carbohidratos, expuestos a la fase líquida, tendrían como función principal evitar su estructuración y posterior incorporación al cristal de hielo. Finalmente, es preciso mencionar que, en ambos supuestos, los glicósidos pueden, adicionalmente, ejercer una influencia significativa sobre las preferencias conformacionales del glicopéptido y, por tanto, condicionar indirectamente su actividad anticongelante.

El propósito principal de esta tesis doctoral es avanzar en la comprensión de las características esenciales de la interacción entre las *AFGPs* y el hielo, identificando el epítipo responsable del reconocimiento y las interacciones clave

que estabilizan el complejo. En particular, se busca esclarecer el papel específico de los glicósidos en la asociación o, en su defecto, en la actividad crioprotectora de los glicopéptidos. Partimos de la hipótesis de que esta información puede obtenerse mediante un análisis de relaciones estructura-actividad detallado, combinando la síntesis de un conjunto de glicopéptidos no naturales con estudios estructurales de RMN y medidas de actividad.

Con este objetivo general y como primer paso, hemos sintetizado una extensa batería de glicopéptidos no naturales que incorporan modificaciones diversas en los fragmentos disacarídicos. Para ello ha sido precisa la síntesis previa de los glicoaminoácidos correspondientes, convenientemente protegidos para su incorporación en protocolos de síntesis en fase sólida. Entre las modificaciones contempladas en nuestro estudio se incluyen inversiones de configuración, desoxigenaciones y *O*-metilaciones en posiciones concretas, así como la sustitución de fragmentos de acetamida por residuos de tioacetamida, trifluoroacetamida o formamida.

Seguidamente, hemos analizado las preferencias conformacionales de todos los glicopéptidos no naturales mediante RMN, a temperaturas próximas a 0 °C. Los resultados obtenidos subrayan el papel conformacional clave desempeñado por las funciones amida de GalNAc e indican que todos los glicopéptidos sintetizados adoptan conformaciones extendidas de tipo hélice PPII similares a las observadas en los sistemas naturales. De acuerdo con esto, podemos afirmar que las modificaciones químicas introducidas son estructuralmente conservativas.

En colaboración con el profesor Tsuda de la Universidad de Tokio, se ha evaluado la actividad anticongelante de los derivados sintetizados. Dicho estudio comprende tanto el análisis de la morfología del hielo como medidas de histéresis térmica a concentraciones crecientes de los diversos glicopéptidos. Los resultados obtenidos confirman que los grupos metilo de GalNAc y los residuos de alanina participan en el reconocimiento del hielo, tal y como postula el modelo de Molinero. Sin embargo, las modificaciones introducidas en las unidades de galactosa no reductoras ejercen igualmente una influencia crítica sobre la actividad anticongelante, lo que respalda la implicación directa del carbohidrato en la interacción con el hielo. Es importante señalar que dicha observación es difícilmente conciliable con el modelo de asociación hidrofóbica propuesto por Molinero, que debe, por tanto, ser modificado.

Basándonos en las consideraciones anteriores, hemos propuesto un modelo alternativo de asociación glicopéptido/hielo que combina elementos de los dos modelos existentes, asignando un papel clave tanto a las interacciones hidrofóbicas (mediadas por los grupos metilo) como a las polares (mediadas por los glicósidos).

Nuestro modelo requiere un ajuste geométrico menor en comparación con el propuesto por Molinero, permitiendo la incorporación de las galactosas en el epítipo de reconocimiento del hielo y explicando de manera natural la relevancia relativa de las distintas posiciones de la piranosa en el proceso.

Finalmente, cabe destacar que, de acuerdo al modelo propuesto, grupos del péptido claves para la actividad no adoptan una distribución coplanar. En consecuencia, alguno de ellos queda forzosamente alejado de la superficie del hielo tras la asociación inicial. Dicha circunstancia puede explicarse asumiendo que su participación en el proceso de reconocimiento se da en una etapa posterior y requiere el avance del frente de hielo en las regiones adyacentes al glicopéptido asociado. De acuerdo con esto, puede plantearse un proceso de dos etapas consecutivas. La primera de carácter reversible involucraría un conjunto limitado de interacciones glicopéptido/hielo. La asociación solo se haría irreversible una vez el frente de hielo avanza, generando contactos adicionales. Curiosamente, un proceso en dos etapas, la primera reversible y la segunda irreversible, se ha invocado en el pasado para explicar la actividad de proteínas anticongelantes no glicosiladas.

SUMMARY

The summary of my doctoral thesis, entitled ‘Role of carbohydrates in the activity of antifreeze glycopeptides,’ is as follows:

More than 50 years after their discovery, the mechanism of action of antifreeze glycoproteins (AFGPs) remains a subject of debate within the chemical community. According to the current consensus, their cryoprotective activity is explained by the adsorption-inhibition model, which is also widely accepted for other antifreeze proteins. This model proposes that the first step involves the association of the glycopeptide with the ice surface, a process that must meet stringent requirements of both specificity and affinity. In particular, AFGPs selectively recognize the primary prismatic plane of hexagonal ice, preferentially promoting the formation of microcrystals with a defined morphology. Moreover, the association must be irreversible in order to generate protrusions on the crystal surface, the presence of which underlies the Kelvin effect and, consequently, the phenomenon of thermal hysteresis.

Beyond these general considerations, the precise glycopeptide/ice interactions responsible for the formation of a stable and specific complex remain largely unknown. From a chemical perspective, this represents one of the most complex molecular recognition processes conceivable: the glycopeptide must not only discriminate between two phases of the same compound (liquid water and ice I_h) but also between the different planes comprising the crystal lattice. To date, two mutually incompatible association models have been proposed, each assigning distinct roles to the carbohydrate moieties. Early models identified galactose residues as the primary recognition epitope, suggesting that the complex is predominantly polar in nature. Later theoretical studies proposed an alternative solvophobic epitope. According to this latter hypothesis, the main role of the carbohydrates exposed to the liquid phase would be to prevent their structuring and subsequent incorporation into the ice lattice. In both cases, however, glycosides can also exert a significant influence on the conformational preferences of the glycopeptide and thus indirectly condition its antifreeze activity.

The main objective of this doctoral thesis is to advance our understanding of the essential features of AFGP-ice interactions, with the aim of identifying both the recognition epitope and the key interactions stabilizing the complex. Specifically, we seek to clarify the role of glycosides either in the initial association or, alternatively, in the overall cryoprotective activity of glycopeptides. Our working hypothesis is that this information can be obtained through a detailed structure-activity relationship analysis, combining the synthesis of a series of non-natural glycopeptides with NMR structural studies and activity measurements.

As a first step toward this goal, we synthesized an extensive library of non-natural glycopeptides incorporating various modifications into the disaccharide fragments. This required the prior preparation of suitably functionalized threonine glycoaminoacids for solid-phase synthesis protocols. The modifications introduced in this study include configuration inversions, deoxygenations and O-methylations at specific positions, as well as the replacement of acetamide groups with thioacetamide, trifluoroacetamide or formamide moieties.

The conformation preferences of all non-natural glycopeptides were then analyzed using NMR spectroscopy at temperatures close to 0 °C. The results highlight the key conformational role of the GalNAc functions and show that all synthesized glycopeptides adopt extended PPII helix conformations similar to those observed in natural systems. These findings indicate that the chemical modifications introduced are structurally conservative.

In collaboration with Professor Tsuda at the University of Tokyo, we evaluated the antifreeze activity of the synthesized derivatives. This study included both ice morphology analysis and thermal hysteresis measurements at increasing glycopeptide concentrations. The results confirm that the methyl groups of GalNAc and alanine residues participate in ice recognition, as proposed by Molinero's model. However, modifications in the non-reducing galactose residues also have a critical impact on antifreeze activity, supporting the direct involvement of carbohydrates in the interaction with ice. Notably, this observation is difficult to reconcile with Molinero's purely hydrophobic association model, which must therefore be revised.

Based on these findings, we propose an alternative glycopeptide/ice association model that integrates elements from both existing models, assigning essential roles to hydrophobic interactions (mediated by methyl groups) as well as polar interactions (mediated by glycosides). Our model requires less geometric precision than Molinero's and naturally accounts for the relative importance of the different pyranose positions in the process.

Finally, it should be noted that, according to the proposed model, key peptide groups for activity do not adopt a coplanar distribution. Consequently, some of them are necessarily moved away from the ice surface after the initial association. This circumstance can be explained by assuming that their participation in the recognition process occurs at a later stage and requires the advance of the ice front in the regions adjacent to the associated glycopeptide. In accordance with this, a two-stage process can be proposed. The first, reversible stage would involve a limited set of glycopeptide/ice interactions. The association would only become irreversible once the ice front advances, generating additional

contacts. Interestingly, a two-stage process, the first reversible and the second irreversible, has been proposed in the past to explain the activity of non-glycosylated antifreeze proteins.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estructura y función biológica de los carbohidratos

Los carbohidratos constituyen, junto con las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, una de las cuatro clases fundamentales de biomoléculas. Curiosamente, han recibido una atención relativamente tardía por parte de la comunidad científica, probablemente a consecuencia de su elevada complejidad estructural, y al hecho de que no están codificados en el genoma. A pesar de ello, la glicobiología ha constituido un campo de investigación tremendamente activo durante los últimos veinte años, y actualmente es una disciplina en rápido crecimiento.¹⁻⁴

Desde una perspectiva estructural, los glicanos están formados por unidades de monosacárido, cuya asociación mediante enlaces glicosídicos da lugar a una gran variedad de oligómeros/polímeros tanto lineales como ramificados. Adicionalmente, los anillos de piranosa o furanosa, en conjunción con los enlaces glicosídicos α y β , proporcionan, en buena parte de los casos, una libertad conformacional significativa, permitiéndoles adoptar una amplia diversidad de estructuras tridimensionales. En lo referente a su estructura en tres dimensiones, es preciso mencionar que esta está fuertemente condicionada por efectos estereoelectrónicos, tales como los efectos “gauche”,^{5,6} anomérico^{7,8} y exoanomérico,^{9,10} cuyo estudio ha constituido un campo activo de investigación en química (Figura 1.1).

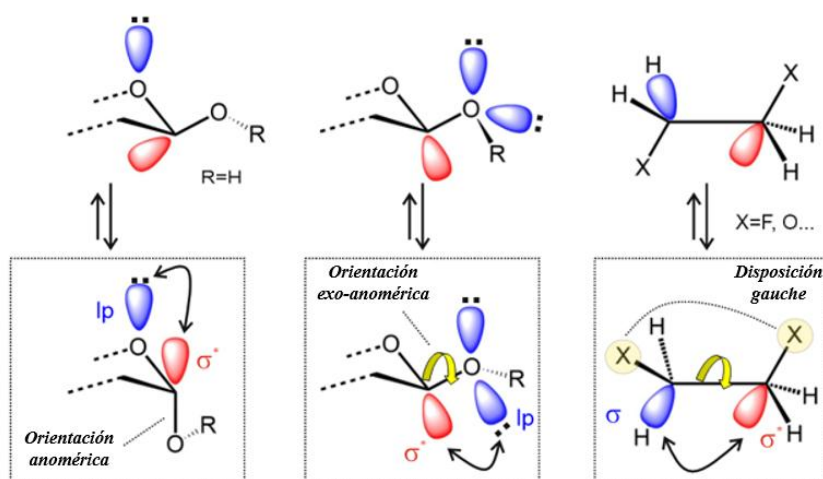


Figura 1.1.- Representación esquemática las interacciones orbitales responsables de los efectos anomérico (izquierda), exoanomérico (centro) y “gauche” (derecha) y su papel en la estructura tridimensional de los carbohidratos.

Cabe destacar que los carbohidratos son, por un amplio margen, las moléculas orgánicas más abundantes en la naturaleza. Así, la oxidación de glucosa proporciona la energía requerida para la práctica totalidad de los procesos celulares. Adicionalmente, su asociación mediante enlaces α -(1-4) y α -(1-6) da lugar al almidón, reservorio energético fundamental, mientras que si esta procede mediante enlaces β -(1-4) el polímero resultante es la celulosa, integrante de la pared celular vegetal y componente mayoritario de la biomasa planetaria. Sin embargo, además de desempeñar papeles estructurales clave y actuar como fuente de energía, los glicósidos solos o conjugados a proteínas (para generar *N*- u *O*-glicoproteínas)^{11,12} o lípidos, participan en una gran variedad de procesos de asociación de capital importancia en biología. De hecho, la lista de glico-conjugados se ha expandido recientemente con la incorporación de los glico-ARNs,^{13,14} resultado de la unión covalente de glicósidos complejos y fragmentos de ARN. Supuestamente, dichos sistemas se localizan en la superficie externa de la membrana celular y su estructura y función constituyen todavía una incógnita.

La versatilidad de los carbohidratos como elementos de reconocimiento está en última instancia relacionada con su tremenda capacidad de generar diversidad estructural y, por tanto, de codificar información. A modo de ejemplo, mientras que cuatro aminoácidos diferentes pueden originar únicamente 24 tetrapéptidos diferentes, cuatro monosacáridos diferentes pueden dar lugar potencialmente a 35560 tetrasacáridos.

Entre los procesos mediados por carbohidratos se incluyen algunos de indudable relevancia fundamental como la adhesión celular,¹⁵ la fertilización¹⁶, el desarrollo embrionario¹⁷ y el cáncer.^{18,19} Adicionalmente, debe considerarse que un buen número de patógenos humanos hacen uso de glicósidos de superficie para iniciar procesos de adhesión e infección.²⁰⁻²² Así, la bacteria *Escherichia coli* reconoce manósidos expuestos en la superficie de las células huesped.^{23,24} De un modo similar, se ha demostrado que la interacción entre la proteína gp120 del VIH y la lectina DC-SIGN constituye un punto crucial en el proceso de infección vírica.²⁵ Por otra parte, numerosas evidencias experimentales indican que las células cancerosas exhiben frecuentemente patrones de glicosilación alterados o aberrantes, tanto en glicolípidos como en glicoproteínas.^{26,27} Estas, y otras muchas observaciones, subrayan la importancia de los carbohidratos como elementos de señalización, adhesión y reconocimiento, abriendo la puerta a nuevas estrategias terapéuticas como las terapias antiadhesivas,²⁸ las vacunas basadas en carbohidratos,²⁹⁻³¹ la inhibición de enzimas/lectinas por glicomiméticos,^{32,33} los antibióticos basados en carbohidratos³⁴ o las chaperonas moleculares.³⁵⁻³⁷

La mayoría de los procesos anteriormente citados implican la interacción de estructuras oligosacarídicas con proteínas,³⁸⁻⁴⁰ ácidos nucleicos^{39,41} u otros

carbohidratos.^{42–44} La base molecular de estas asociaciones ha constituido tanto un objeto de estudio preferente, como una fuente de inspiración para la comunidad química.^{45–51} De un modo general, los estudios realizados hasta la fecha han demostrado el papel clave que enlaces de hidrógeno e interacciones de apilamiento CH/ π desempeñan en la estabilización de los complejos, así como en la especificidad de la asociación. Dichos contactos pueden verse, adicionalmente, complementados por interacciones hidrofóbicas, puentes salinos o interacciones polares con metales, entre otras (Figura 1.2).

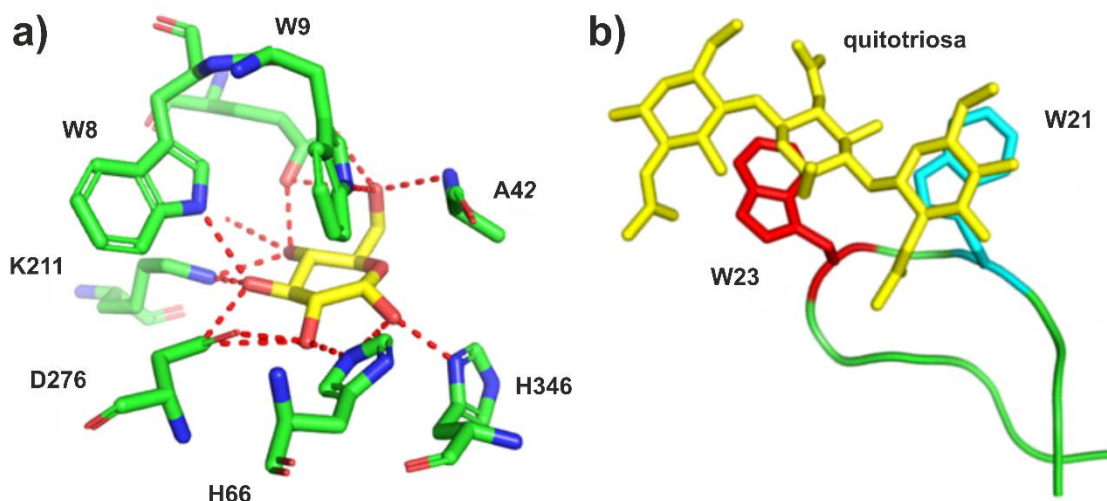


Figura 1.2.- a) Interacciones polares observadas en el centro activo de la proteína *Thermus thermophilus* en complejo con β -D-glucosa (pdb: 2B3B) **b)** Interacciones de apilamiento carbohidrato/aromático características de los dominios de tipo heveína (1T0W).

Finalmente, cabe destacar que, si bien las propiedades físicas y químicas de los carbohidratos sencillos son bien conocidas, no puede decirse lo mismo de glúcidos y glicoconjugados complejos, especialmente en un contexto celular. De hecho, su estudio constituye uno de los retos actuales en glicobiología. En la presente tesis doctoral analizaremos una función de los glúcidos de gran relevancia práctica pero pobremente comprendida hasta la fecha: la crioprotección. Para ello centraremos nuestra atención en glicopéptidos anticongelantes producidos por peces polares.⁵² Dichos glicoconjugados constituyen una adaptación clave del organismo a las bajas temperaturas y, de un modo general, actúan inhibiendo el crecimiento de cristales de hielo en los fluidos corporales. Es comúnmente aceptado que dicha inhibición implica un reconocimiento específico por parte del agente crioprotector de planos concretos del retículo cristalino. Cabe destacar que la discriminación entre dos fases diferentes, líquida y cristal, del mismo compuesto representa uno de los mayores retos concebibles en reconocimiento molecular. De hecho, la asociación de glicopéptidos o proteínas al

hielo ha sido calificada por algunos autores como “*arguably the toughest recognition problem in biology*” desde una perspectiva fundamental.⁵³

En los apartados subsiguientes de la presente introducción se resume el conocimiento actual en este campo. Para ello empezaremos por justificar la necesidad de mecanismos de crioprotección en seres vivos. A continuación, se describen las características generales de las proteínas anticongelantes y el hielo. Seguidamente, nos centraremos en los aspectos mecanísticos de la acción crioprotectora. Finalmente, detallaremos las propiedades y el mecanismo de acción de los glicopéptidos anticongelantes, poniendo especial énfasis en aquellos aspectos pobremente comprendidos en la actualidad.

1.2 Consecuencias de la exposición a bajas temperaturas en organismos vivos

Incluso a temperaturas por encima del punto de congelación de los fluidos corporales, los organismos ectotermos o de sangre fría se enfrentan a serios problemas relacionados con el frío (Figura 1.3). Entre ellos, podrían mencionarse alteraciones significativas en la fluidez de las membranas o cambios de fase de las mismas. De un modo similar, la reducción de temperatura corporal puede ir de la mano de disminuciones drásticas en la solubilidad de las proteínas o procesos de desnaturalización,⁵⁴ así como la peroxidación de lípidos⁵² o daño en el ADN.⁵⁵ Adicionalmente, pueden alterarse los gradientes de concentración de determinados solutos a través de las membranas, como reflejo de alteraciones en las propias membranas o de la conductividad de los canales iónicos.⁵⁶ Finalmente, a un nivel fundamental, parámetros fisicoquímicos clave como el pH o la solubilidad del oxígeno son igualmente función de la temperatura. Las alteraciones inducidas generan un desequilibrio que, en organismos no adaptados al frío, puede conllevar la muerte. De hecho, en un número diverso de organismos, la exposición a bajas temperaturas ralentiza e incluso llega a detener por completo la actividad celular, causando lo que se conoce como “*chill coma*”, que puede ser irreversible si es prolongado y/o extremo.⁵²

Como es lógico, a temperaturas inferiores al punto de congelación de los fluidos corporales, puede darse la aparición de cristales de hielo, típicamente en el medio extracelular, con efectos normalmente letales en organismos no adaptados (Figura 1.3).⁵⁷ Como primera consideración, es preciso tener en cuenta que el crecimiento del hielo implica la exclusión de moléculas de soluto del retículo cristalino, incrementándose su concentración en la fase líquida. Como consecuencia, se genera una diferencia osmótica significativa entre el citosol y los fluidos extracelulares. El “*shock osmótico*” asociado a la aparición de hielo constituye, de hecho, uno de los problemas fundamentales de la congelación en los

seres vivos.⁵⁷ Su consecuencia más inmediata es la salida de agua en grandes cantidades de las células, proceso de deshidratación que puede conllevar la ruptura de membranas si es demasiado rápido.

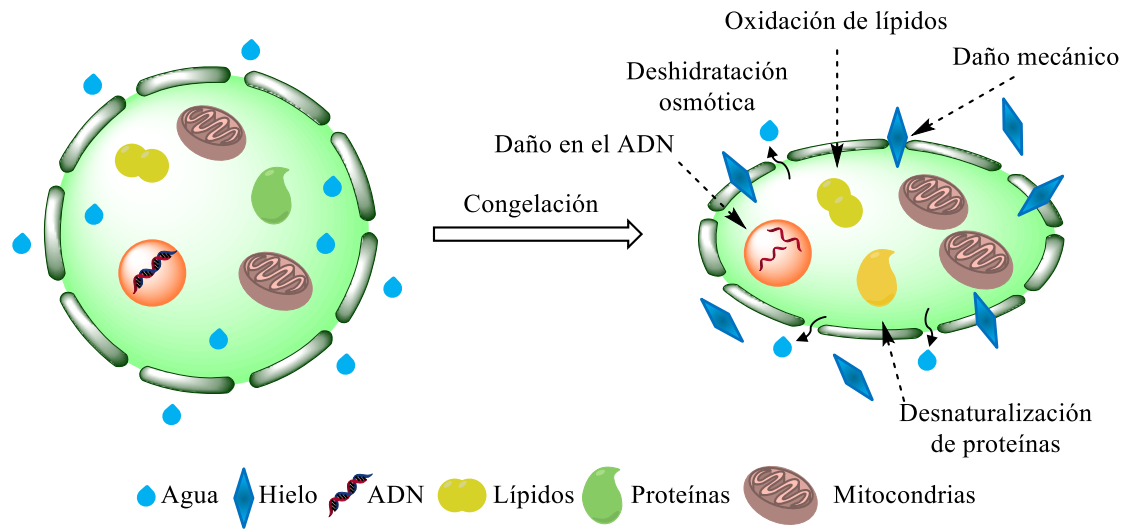


Figura 1.3.- Representación esquemática del daño que la exposición a bajas temperaturas puede generar en células.

Por otro lado, los propios cristales de hielo pueden ejercer una acción mecánica nociva sobre los tejidos vivos. Dicho efecto es dependiente tanto del tamaño como de la forma de dichos cristales. Desafortunadamente, un fenómeno natural en los procesos de congelación es la recrystalización,⁵⁸ mecanismo por el cual se generan cristales de mayor tamaño, y por tanto más perjudiciales, a expensas de otros menores.

Los organismos de sangre fría que habitan en entornos polares han desarrollado una gran variedad de adaptaciones moleculares, con el objeto de paliar los efectos nocivos asociados a las bajas temperaturas.^{52,59} De un modo general, dichos organismos pueden clasificarse en dos grandes grupos: aquellos capaces de tolerar los procesos de congelación (*freeze tolerant*) y aquellos que los evitan (*freeze avoiding*). Estos últimos recurren habitualmente a diversas estrategias con objeto de prevenir la aparición de cristales de hielo en sus fluidos biológicos. En primer lugar, es preciso considerar que el mecanismo de formación del hielo implica, en la mayoría de los casos, un proceso de nucleación heterogénea, sin el cual el agua puede sobreenfriarse decenas de grados sin llegar a congelar. Con objeto de mantener dicho estado metaestable, algunos organismos ejercen un control estricto de agentes de nucleación potenciales como partículas de polvo, algunos tipos de bacteria, fragmentos de hielo exógeno o restos de comida (de hecho, algunos dejan de alimentarse y vacían sus intestinos en preparación para las estaciones frías). Los organismos acuáticos, para evitar la inoculación de hielo externo, impiden el acceso de agua a los espacios internos

(especialmente a los intestinos) mediante esfínteres reforzados.⁵² Adicionalmente, resulta relativamente común la biosíntesis de agentes crioprotectores que, de un modo general, pueden dividirse en dos grandes grupos: aquellos que actúan reduciendo la temperatura de congelación del agua coligativamente y los que no. La depresión coligativa del punto de congelación del agua es 1.86 °C/molal, lo que implica que una disolución 1 molal de un soluto no ionizable tiene una temperatura de congelación de -1.86 °C. Las sustancias más comúnmente empleadas con este fin son polioles, azúcares o aminoácidos. A modo de ejemplo, el escarabajo *Rhagium inquisitor* presenta concentraciones de glicerol de hasta 3 M en los fluidos internos.⁶⁰ Otros organismos recurren a combinaciones de agentes tales como el glicerol y el sorbitol.⁶⁰ Finalmente, buena parte de los ectotermos de entornos polares sintetizan una amplia variedad de proteínas anticongelantes (*antifreeze glycoproteins* o *AFPs*) capaces de evitar el crecimiento de cristales de hielo de forma no coligativa y que, por tanto, operan a concentraciones muy inferiores.^{52,61} En los siguientes apartados se describen las características fundamentales y mecanismos de acción de las proteínas anticongelantes.

1.3 Adaptaciones biológicas al frío: proteínas anticongelantes

1.3.1 Características generales de las proteínas anticongelantes

Las proteínas anticongelantes constituyen un grupo estructuralmente heterogéneo de agentes crioprotectores cuyo rasgo común es su capacidad de inhibir de forma no coligativa el crecimiento de los cristales de hielo en los fluidos biológicos. Tienen un papel adaptativo importante en una amplia variedad de organismos que habitan en entornos fríos, incluyendo peces,^{62,63} insectos,⁶⁴ bacterias^{65,66} y plantas.^{67,68} Curiosamente, a pesar de ser parte habitual del arsenal desarrollado por los seres vivos para protegerse de las bajas temperaturas, su descubrimiento es relativamente reciente. Así, el primer ejemplo de actividad anticongelante descrito en la literatura fue detectado en la hemolinfa del escarabajo *Tenebrio molitor* en 1964.⁶⁴ A partir de ese momento, se describieron actividades similares en otros muchos organismos. Cabe destacar, por su relación con la presente tesis doctoral, el descubrimiento de las glicoproteínas anticongelantes (*antifreeze glycoproteins* o *AFGPs*) en peces antárticos por DeVries en 1969.^{62,69}

Con objeto de ilustrar la diversidad estructural que caracteriza estos sistemas, en la Figura 1.4 se muestran las principales familias de proteínas anticongelantes presentes en peces antárticos (de especial relevancia para la presente tesis, dado que en ella se incluyen los glicopéptidos anticongelantes). De entre ellas, las de tipo I (habituales en algunos tipos de platijas) son las más sencillas y, por lo tanto, han sido las más estudiadas hasta la fecha.⁷⁰ Están

formadas por 37 aminoácidos, incluyendo típicamente repeticiones de 11 residuos. En general, se caracterizan por un elevado contenido en alanina, que constituye más del 60% de la secuencia. De acuerdo con esto, no resulta sorprendente comprobar que todas ellas adoptan una estructura tridimensional de tipo α -hélice, tal y como demuestran numerosos estudios cristalográficos y de RMN.⁷¹ En algunos casos puede intercalarse algún residuo de prolina en la secuencia, lo cual se traduce en la existencia de dos tramos diferentes de α -hélice.

Las proteínas anticongelantes de tipo II, por su parte, son frecuentes en arenques. Curiosamente, su estructura muestra claras semejanzas con los dominios de reconocimiento de carbohidratos de las lectinas de tipo C.⁷² Se trata de sistemas globulares ricos en cisteínas cuyos pesos moleculares oscilan en el rango de 11 a 27 kDa. Típicamente, incluyen dos tramos de α -hélice y nueve de lámina β . Adicionalmente, cisteínas específicas confieren estabilidad estructural al sistema mediante la formación de enlaces disulfuro. Estudios comparativos de secuencia sugieren que estas proteínas han evolucionado a partir de lectinas de tipo C, compartiendo con ellas su dependencia de los iones calcio (Ca^{2+}).⁷³

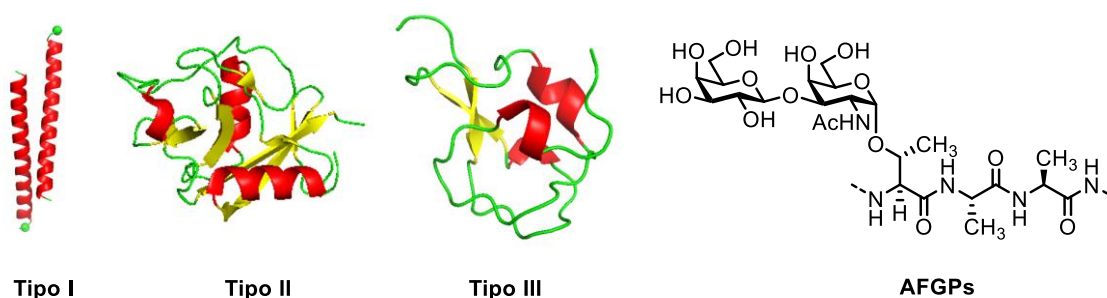


Figura 1.4.- Estructuras representativas de proteínas anticongelantes de Tipo I (*Pseudopleuronectes americanus*, pdb: 1WFA), **Tipo II** (*Clupea harengus*, pdb: 2PY2), **Tipo III** (*Zoarces viviparus*, 4UR4) y **AFGPs**.

Las proteínas anticongelantes de tipo III,⁵² por su parte, son sistemas globulares de bajo peso molecular (en torno a 6.5 kDa) y se encuentran en especies como el pez lobo y el *Macrozoarces americanus*. Pueden dividirse en dos grupos o isoformas de acuerdo a su secuencia, siendo una de ellas significativamente más activa que la otra. Presentan una estructura tridimensional globular de tipo β -sándwich integrada por dos láminas β antiparalelas de tres hebras unidas por diversos giros y estabilizada por un buen número de interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno.

Finalmente, el grupo de las proteínas anticongelantes de peces se completa con las glicoproteínas, cuyo estudio constituye el objetivo general de la presente tesis doctoral. Su estructura se muestra en la Figura 1.4 y sus propiedades se detallan en el apartado 1.3.7. Cabe destacar que, a pesar de la diversidad tanto

química como estructural de los sistemas descritos, todos ellos ejercen una misma influencia sobre el crecimiento de los cristales. Dichos efectos se resumen en el siguiente apartado.

1.3.2 Influencia de las proteínas anticongelantes sobre el crecimiento del hielo

De un modo general, las proteínas anticongelantes ejercen tres efectos visibles sobre la formación de los cristales de hielo. El primero de ellos se conoce, de modo habitual, como **histéresis térmica** (HT) y puede definirse como la diferencia entre el punto de congelación de equilibrio de un fluido y la temperatura a la que los cristales de hielo empiezan a crecer.^{52,74} En términos sencillos, dicho término describe la capacidad de las proteínas anticongelantes de reducir la temperatura de congelación de una disolución sin ejercer efecto alguno sobre la temperatura de fusión. Su medición se realiza habitualmente haciendo uso de un fotomicroscopio equipado con un sistema de control de temperatura.⁷⁴ Así, primeramente, se enfría la disolución objeto de estudio hasta su congelación para, a continuación, proceder a su calentamiento gradual hasta una temperatura ligeramente inferior a los 0 °C. El proceso se repite varias veces con el propósito de aislar un único monocristal de hielo de aproximadamente 20 µm de diámetro. En este punto se procede a enfriar lentamente la muestra, lo que comúnmente altera la morfología del cristal para generar, en el caso de las glicoproteínas anticongelantes de los peces árticos una bipirámide hexagonal cuyas dimensiones permanecen invariables. A temperaturas inferiores al punto de congelación (T_c), se produce un crecimiento explosivo del cristal fácilmente apreciable por el microscopio. La diferencia entre el punto de congelación y el punto de fusión (0 °C) determina la magnitud de la histéresis térmica ($T_c - T_f$) (Figura 1.5).

El segundo efecto de las proteínas anticongelantes es la inducción de alteraciones morfológicas en el cristal de hielo. Dicho fenómeno se conoce con el nombre de “**Dynamic Ice Shaping**” (DIS) (Figura 1.5) y puede evidenciarse haciendo uso de un fotomicroscopio para observar la forma de los cristales. Así, resultan habituales las transiciones de forma esférica (en ausencia de proteína anticongelante) a hexagonal o bipiramidal. Como veremos en apartados posteriores, el “**Dynamic Ice Shaping**” y la histéresis térmica comparten un origen molecular común.^{52,73}

Finalmente, la mayoría de las proteínas anticongelantes ejercen un efecto inhibitorio sobre el proceso de recristalización del hielo (**Ice Recrystallization Inhibition** o IRI. Figura 1.5).^{52,75} Tal y como se ha mencionado con anterioridad, durante el proceso de congelación se produce un crecimiento de cristales de mayor tamaño (y por tanto más perjudiciales para los organismos vivos) a expensas de

otros más pequeños. Se trata de un proceso complejo que en última instancia implica un intercambio de moléculas de agua entre diferentes cristales. Para ello se han propuesto diferentes mecanismos, siendo el denominado “*Ostwald ripening*” el más comúnmente aceptado.⁷⁶ En cualquier caso, su efecto final es un incremento en el tamaño promedio de los cristales de hielo que va acompañado de un decrecimiento en el número de cristales. De esta forma se mantiene el volumen total de hielo a la vez que se reduce la energía libre del sistema. El mecanismo mediante el cual las proteínas anticongelantes interfieren con este proceso es, todavía hoy, objeto de debate y se detalla en el apartado 1.3.6.

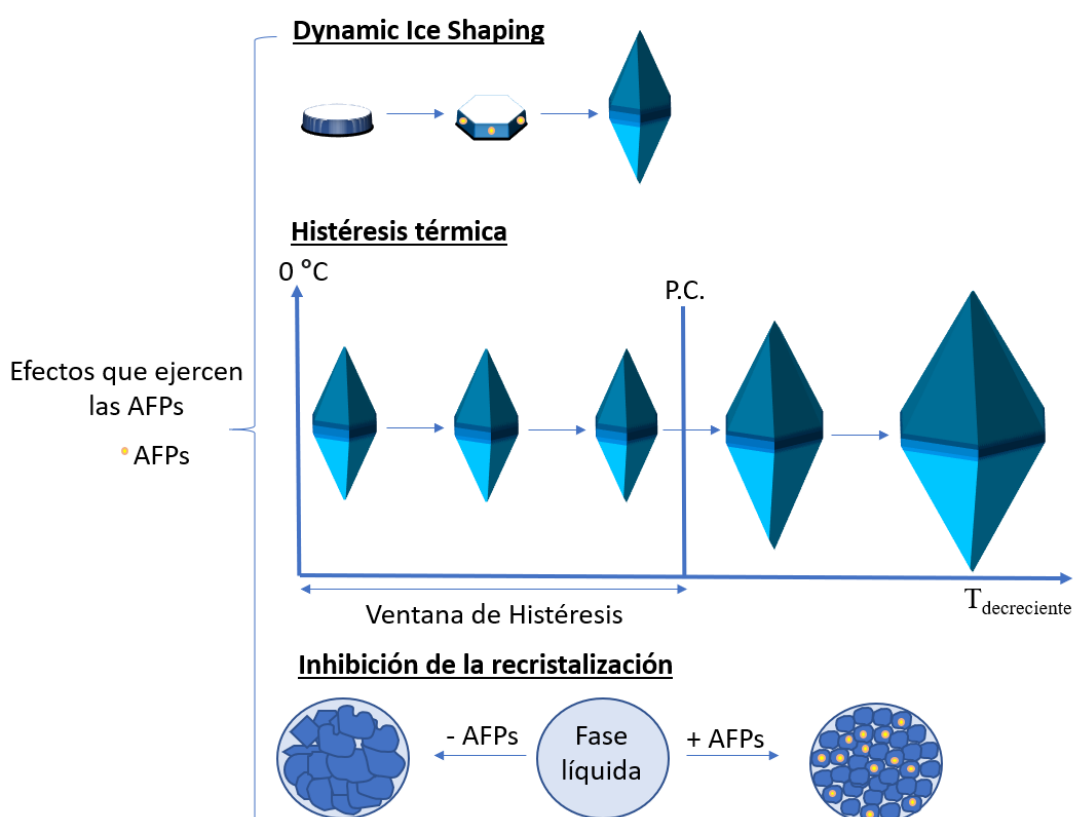


Figura 1.5.- Representación esquemática de los 3 efectos principales ejercidos por las AFPs: el “*Dynamic Ice Shaping*” (DIS), la *histéresis térmica* (HT) y la *inhibición de la recrystalización del hielo* (IRI).

1.3.3 Características generales del hielo

Llegado a este punto y con objeto de entender el funcionamiento de las proteínas anticongelantes, es preciso, primeramente, tener ciertas nociones generales sobre las propiedades del agua y su congelación. Una de las características fundamentales del hielo es el polimorfismo, o lo que es lo mismo, la capacidad de generar diferentes formas cristalinas cuya estabilidad está determinada por las condiciones de presión y temperatura. A pesar de ello, la forma dominante del hielo a temperatura inferior a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y presión atmosférica se conoce

con el nombre de hielo hexagonal o I_h . La celdilla unidad del hielo I_h se representa en la Figura 1.6. Puede apreciarse como esta se caracteriza por la existencia de cuatro ejes, habitualmente designados como a_1 , a_2 , a_3 y c , así como ocho caras, dos de ellas hexagonales (denominadas planos basales) y el resto cuadradas (denominadas planos prismáticos). Cabe mencionar que la acción de las proteínas anticongelantes se explica en base a su efecto sobre dicha ordenación de moléculas de agua.

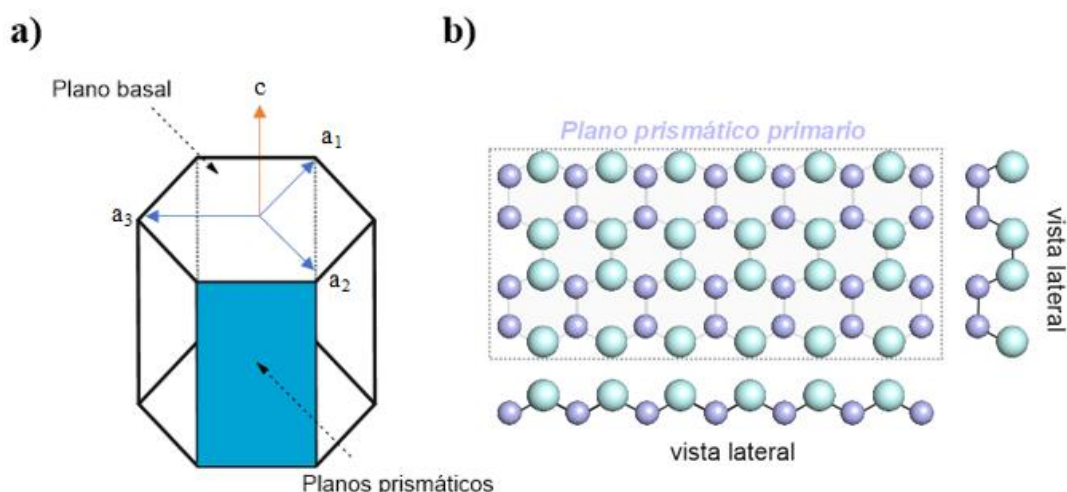


Figura 1.6.- a) Ejes cristalográficos y planos en la estructura del hielo hexagonal (I_h). En azul, se destaca el plano prismático primario $\{1010\}$ al que se unen las AFGPs. b) Representación esquemática del plano prismático primario. Las esferas azules y moradas representan átomos de oxígeno posicionados más cerca o más lejos de la superficie, respectivamente.

En segundo lugar, es preciso considerar que en disolución acuosa la transición entre la superficie del hielo y el agua no suele ser abrupta. Por el contrario, cada microcristal de hielo está rodeado de varias capas de agua semiordenadas, formando una zona de transición entre la fase líquida y sólida habitualmente conocida como *quasi-liquid-layer* (QLL).^{77,78} Las propiedades de dicha región (en términos de fluidez, densidad, etc.), así como sus dimensiones, han sido objeto de numerosos estudios por parte de la comunidad química.⁷⁷⁻⁷⁹ Así, se estima que su espesor se sitúa entre los 3 y los 15 Å, si bien este es dependiente de la temperatura, así como del plano concreto del retículo cristalino al que nos refiramos. Sus propiedades de solvatación son igualmente distintivas, mostrando de acuerdo a estudios teóricos una mayor tendencia a solvatar grupos apolares.^{80,81} Dicho comportamiento podría explicar la desnaturalización de las proteínas que acompaña frecuentemente a los procesos de formación del hielo.^{80,81} A su vez, tendría consecuencias en el mecanismo de acción de las proteínas anticongelantes.

1.3.4 Mecanismo de acción de las proteínas anticongelantes: descripción general del proceso de Adsorción-Inhibición

A pesar de que los detalles relativos a cómo las proteínas anticongelantes ejercen su actividad no son, todavía, comprendidos en su totalidad, existe un consenso básico en torno a su modo de acción general. El mecanismo comúnmente aceptado por el que dichos sistemas interfieren con el crecimiento de los cristales de hielo se conoce con el nombre de **Adsorción-Inhibición** y fue propuesto por De Vries en el año 1971.^{62,82,83} De acuerdo con este, el primer paso de la acción anticongelante implica una asociación de los agentes crioprotectores y la superficie del hielo. Dicho proceso es específico, de forma que diferentes sistemas pueden reconocer diferentes planos del retículo cristalino. Como consecuencia, el hielo se ve forzado a progresar de forma exclusiva en los intersticios entre proteínas/glicopéptidos, lo que determina la generación de un frente curvo convexo de crecimiento (Figura 1.7). Como es lógico, en dichas regiones las moléculas de agua presentan en promedio un menor número de interacciones con sus vecinos y, por tanto, muestran mayor energía y menor estabilidad. En otros términos, la presión de vapor de la fase sólida, reflejo de la tendencia del agua a escapar de la misma, se incrementa. Dicho parámetro es, de hecho, *dependiente de la curvatura de la interfase* en lo que se conoce con el nombre de **efecto Kelvin**.⁸⁴ Más concretamente, la diferencia de presión entre la fase sólida y líquida, a una temperatura dada, viene dada por la ecuación $\Delta P = 2\sigma/r$ donde r es el radio de curvatura (de signo contrario para superficies cóncavas y convexas) y σ la tensión superficial.⁸⁵

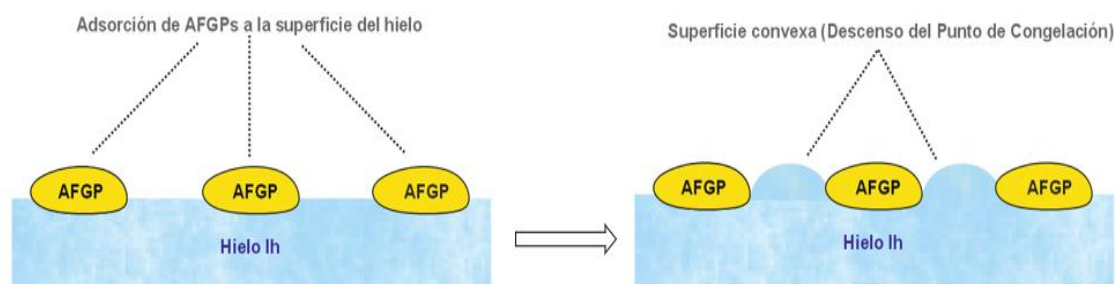


Figura 1.7.- Representación esquemática del proceso de adsorción-inhibición. La unión de las AFGPs a la superficie del hielo hace que este crezca con un frente convexo, disminuyendo el punto de congelación (Efecto Kelvin).

De acuerdo con todo lo anterior, a una temperatura inferior a 0 °C, el hielo progresa en los espacios intersticiales generando pequeños salientes (*ice caps*) de curvatura creciente. Dicho crecimiento se para en el momento en que se igualan las presiones de vapor de las fases sólida y líquida. Un descenso adicional de temperatura propiciaría un incremento en la curvatura del hielo y, como consecuencia, su presión de vapor se elevaría hasta equilibrarse con la de la fase

líquida, lo que detendría nuevamente el crecimiento. El proceso se repite a temperaturas aún inferiores hasta que las zonas intersticiales alcanzan un grado de convexidad crítico, pasado el cual crecimientos adicionales incrementan el radio de curvatura de los salientes del hielo en lugar de disminuirlo, es decir, la curvatura disminuye. Dicho efecto propicia una reducción en la presión de vapor de la fase cristalina y, por tanto, un crecimiento acelerado del cristal. Puede demostrarse que la curvatura máxima de las zonas de crecimiento está determinada por el espaciado d entre las proteínas/glicopéptidos adsorbidos sobre la superficie, siendo $r_{crítico} = d/2$ (Figura 1.8).⁸⁶ Es importante señalar que, en el rango de temperaturas comprendido dentro de la ventana de histéresis, el crecimiento de los planos cristalinos reconocidos por los agentes anticongelantes está efectivamente bloqueado. Por el contrario, el resto prosigue su expansión, lo que conlleva necesariamente una alteración en la morfología del cristal conocida como “*Dynamic Ice Shaping*”, de la que ya hemos hablado en el apartado 1.3.2 de la presente tesis doctoral. Sin embargo, dicho crecimiento es solo transitorio debido a un conocido principio rector del crecimiento de cristales poliédricos: “Aquellas caras que crecen más rápido terminan siendo truncadas por las de menor crecimiento”. De acuerdo con esto, el cristal termina exponiendo al exterior las caras bloqueadas por el agente anticongelante y, por tanto, su crecimiento se paraliza.

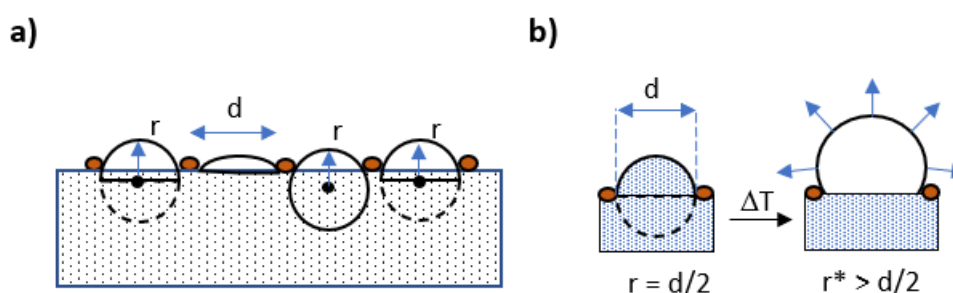


Figura 1.8.- Ilustraciones en 2D de los “ice caps” esféricos formados entre las AFPs (esferas rojas) a temperaturas inferiores al PF. a) La convexidad de las superficies intersticiales es dependiente del espaciado entre proteínas asociadas. b) Representación esquemática de la superficie de hielo convexa expuesta entre dos proteínas. Cuando el radio de la esfera es igual a $d/2$ cualquier aumento en la nucleación da como resultado un decrecimiento de la curvatura superficial. Llegado a ese punto, se observa un crecimiento acelerado del cristal.

Cabe mencionar que existen dos modelos concebibles de acuerdo con los cuales la unión de los agentes anticongelantes puede generar salientes en la superficie del hielo (Figura 1.9). El primero, propuesto originalmente por De Vries, se conoce con el nombre de “**Step Pinning Model**” y asume que el crecimiento del cristal se produce en escalones que se propagan a lo largo de la

superficie.⁸² En dicho modelo, las AFPs inhiben el crecimiento de un escalón de hielo fijándose a la superficie del hielo. El segundo modelo fue propuesto por Knight y De Vries y se conoce con el nombre de “**Mattress Model**”.⁸⁷ De acuerdo con este, los agentes anticongelantes actuarían bloqueando el crecimiento del cristal en una dirección perpendicular a la superficie a la que se asocian. En cualquiera de los dos casos, los principios generales anteriormente anunciados siguen siendo válidos.

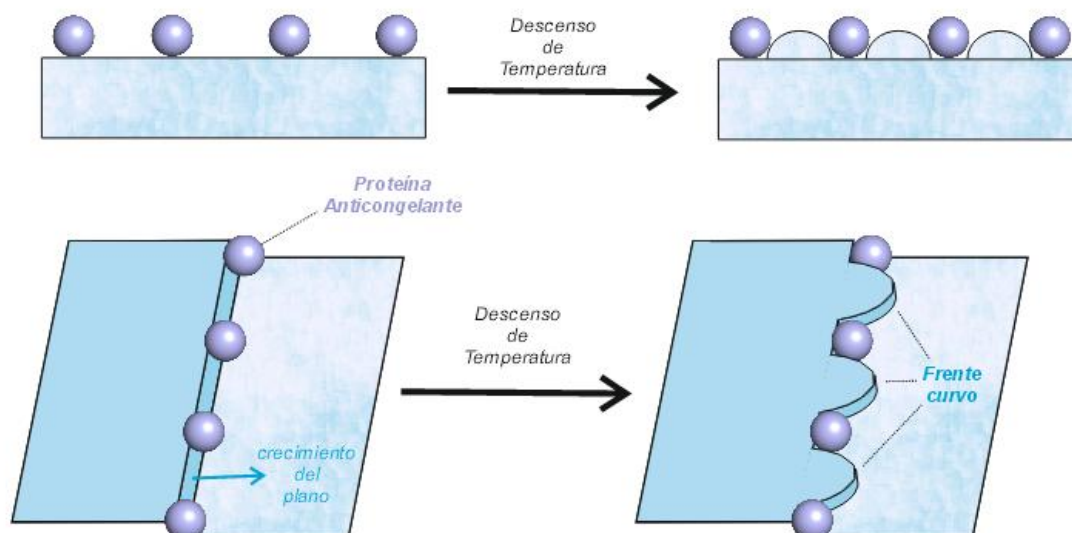


Figura 1.9.- Modelos concebibles para la unión de las AFPs (naranja) a la superficie del hielo: “Mattress Model” (arriba) y “Step Pinning Model” (abajo).

Es importante destacar que, para que los agentes anticongelantes inhiban efectivamente el crecimiento de los cristales de hielo, su asociación es condición necesaria, pero no suficiente.⁸⁸ Además, deben exhibir dos rasgos adicionales. El primero de ellos, conocido como **resistencia al hundimiento** (*resistance to engulfment*), describe la dificultad del hielo para crecer encima de las proteínas/glicopéptidos, enterrándolos en el cristal. De hecho, se ha propuesto que las superficies de las proteínas/glicopéptidos expuestas a la fase líquida en el estado asociado juegan un papel importante, dificultando la estructuración del agua, así como su incorporación al retículo cristalino.^{88–91} El segundo requerimiento se conoce con el nombre de **resistencia al rechazo** (“*resistance to rejection*”). Dicha expresión hace referencia a la necesidad de que los sistemas anticongelantes sellen de manera eficiente la superficie de hielo con la que establecen contacto, impidiendo la incorporación de nuevas moléculas de agua y con ello un desplazamiento del agente anticongelante en la dirección de crecimiento del cristal. De acuerdo con esto, fluctuaciones conformacionales que promuevan la apertura de huecos entre la proteína/glicopéptido y el hielo (incluso si son locales o transitorias) serían incompatibles con la inhibición del crecimiento cristalino.

Finalmente, de acuerdo con algunos autores, la inhibición de la recristalización del hielo no requiere un paso previo de asociación irreversible entre este y el agente anticongelante.^{75,92} Si bien las bases moleculares de esta actividad son todavía pobremente comprendidas, estudios recientes parecen sugerir que tiene su origen en las especiales propiedades de solvatación de las moléculas anticongelantes, las cuales se localizarían en la interfase entre el agua (“*bulk*”) y la *quasi-liquid-layer*. Sin embargo, dicha propuesta no es universalmente aceptada en la actualidad.

1.3.5. Reconocimiento molecular del hielo por las proteínas anticongelantes: bases moleculares de la interacción

Como primera consideración, cabe mencionar que el estudio de la interacción entre las proteínas anticongelantes y el hielo se ha visto irremisiblemente lastrado por la ausencia de información estructural de alta resolución relativa a los complejos. Como es lógico, teniendo en cuenta las peculiares características de las especies involucradas, esta no es accesible mediante cristalografía de rayos X, ni tampoco haciendo uso de criomicroscopía electrónica o resonancia magnética nuclear. Debido a estas dificultades, en la mayoría de los casos se ha derivado información cualitativa sobre los complejos de forma indirecta, recurriendo a la estructura de las proteínas libres en disolución, en conjunción con estudios de mutagénesis dirigida, medidas de actividad y cálculos teóricos.

Dichos estudios han demostrado que, la asociación de las proteínas anticongelantes (AFPs) a hielo hexagonal es un proceso altamente específico e involucra planos concretos del retículo cristalino, que pueden ser diferentes para cada sistema. Así, el reconocimiento del plano basal es característico de proteínas anticongelantes hiperactivas y constituye, de hecho, un requerimiento necesario para una elevada actividad anticongelante.⁹³ Por el contrario, las AFPs presentes en peces de tipo I, cuyos rasgos fundamentales se han descrito en el apartado 1.3.1, interaccionan de modo preferente con los planos piramidales del hielo,⁸⁷ mientras que las AFGPs se unen selectivamente al plano prismático primario.⁹⁴

Como es lógico, la unión entre proteína y hielo se logra mediante interacciones precisas entre las superficies involucradas. Teniendo en cuenta las características químicas del hielo, los enlaces de hidrógeno parecen un recurso idóneo para la estabilización de los complejos. De hecho, las primeras hipótesis relativas al modo de acción de las proteínas anticongelantes apuntaban a dichas interacciones como fuerza directora del proceso de asociación. De acuerdo con esta idea, grupos polares expuestos en la superficie del péptido se insertarían en el retículo del hielo para maximizar sus enlaces de hidrógeno con este.

Efectivamente, la participación de grupos polares en la asociación ha sido confirmada experimentalmente en algunos sistemas. A modo de ejemplo, la proteína anticongelante de tipo III del organismo *Macrozoarzes americanus* incluye en su secuencia residuos polares como Gln 9, Asn 14, Thr 18 o Gln 44, cuya implicación en la unión al hielo se ha demostrado mediante mutagénesis dirigida.⁹⁵

A pesar de ello, estudios posteriores han arrojado una visión diferente del proceso de asociación. Una de las observaciones más relevantes a este respecto es que los epítomos de reconocimiento del hielo suelen presentar un marcado carácter anfifílico, siendo habitual la coexistencia de residuos polares (habitualmente de treonina) con amplias regiones de carácter hidrofóbico (frecuentemente integradas por alaninas). Dicha evidencia ha llevado a proponer que las interacciones solvofóbicas podrían jugar un papel fundamental en la estabilización de los complejos. De acuerdo con esta idea, la fuerza directora fundamental del proceso de asociación vendría dada por la ocultación al disolvente de residuos hidrofóbicos expuestos en la superficie proteica. Diversos estudios han confirmado la participación de regiones altamente hidrofóbicas de los polipéptidos en la unión a hielo. Así, la sustitución de residuos de leucina, isoleucina o valina por alanina en proteínas anticongelantes de peces polares de tipo III conlleva pérdidas significativas de actividad.⁹⁶

Debido a su simplicidad estructural, las proteínas anticongelantes de peces antárticos de tipo I (descritas en el apartado 1.3.1) han sido uno de los sistemas más estudiados hasta la fecha. Están integradas por una única α -hélice de carácter anfipático, donde los residuos involucrados en la unión a hielo se alinean en una misma cara de la hélice. Dicha región incluye varios residuos de treonina flanqueados por un buen número de alaninas. Por lo que respecta a las unidades de alanina expuestas en la cara hidrofóbica de la hélice, se ha demostrado que su sustitución por grupos polares implica una pérdida drástica de la actividad. De un modo similar, la mutación conservativa de treoninas por serinas se traduce en todos los casos en una disminución importante de la actividad anticongelante. Por el contrario, mutaciones que implican su sustitución por valina promueven una disminución de actividad comparativamente menor. Dichas observaciones sugieren que, si bien regiones hidrofóbicas y grupos polares están involucrados en la asociación a hielo, estos últimos jugarían un papel secundario.^{97,98}

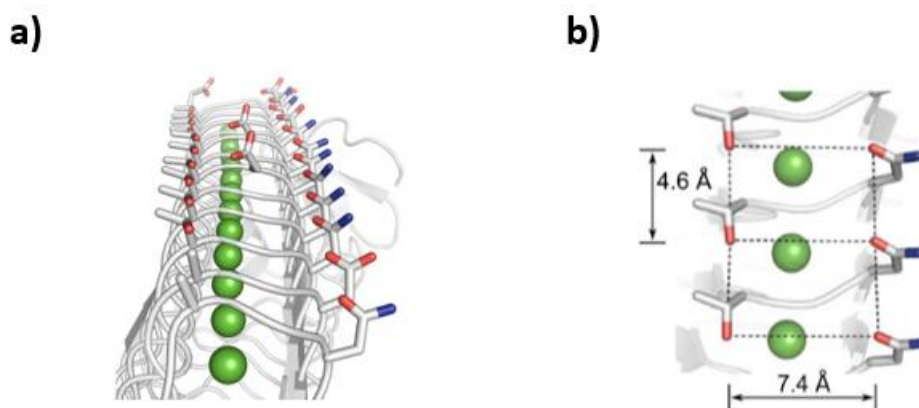


Figura 1.10.- a) Estructura de la proteína anticongelante MpAFP_RIV (pdb: 3P4G) mostrada en dos orientaciones diferentes (a y b). Las esferas verdes corresponden a iones Ca^{2+} . Los residuos de Asx (Asp o Asn) y Thr se dirigen hacia el exterior para crear un conjunto plano y repetitivo ideal para la fijación del hielo. b) Vista lateral de la proteína anticongelante MpAFP_RIV. La distancia entre átomos de oxígeno (en rojo) se expresa en Å.

Una tercera hipótesis relativa a las bases moleculares de la asociación otorga, sin embargo, un papel clave a ambos tipos de residuos. Así, estudios de modelización sugieren que los epítomos de reconocimiento de las proteínas anticongelantes podrían organizar el agua de acuerdo con un patrón altamente similar al observado en el hielo hexagonal. De hecho, podría considerarse que la superficie proteica lleva asociada una fina capa de agua estructurada como el hielo. El proceso de reconocimiento molecular implicaría, por tanto, la fusión de dicha capa con la superficie del cristal de hielo. Evidencias experimentales en favor de esta propuesta han sido proporcionadas por estudios cristalográficos posteriores.^{99–101} A modo de ejemplo, la estructura de la proteína anticongelante MpAFP de *Marinomonas primoryensis* muestra una capa de agua estructurada sobre la superficie.¹⁰¹ Más concretamente, las moléculas de agua forman jaulas (habitualmente conocidas como clatratos) alrededor de los grupos metilo de treonina abundantes en el epítipo de reconocimiento. Estas permanecen unidas a la superficie proteica mediante enlaces de hidrógeno con las funciones hidroxilo de dichos residuos o con los grupos amida de la cadena principal. De acuerdo con esto, las funciones hidrofóbicas tendrían la función de estructurar el agua, mientras que los grupos polares actuarían como puntos de anclaje (Figura 1.10). El modelo de asociación proteína-hielo resultante se conoce con el nombre de “*Anchored clathrate waters binding model*” y parece explicar el modo de acción de un buen número de sistemas proteicos diferentes. La proteína Maxi, una AFP de Tipo I, cuya estructura cristalográfica ha sido recientemente descrita, constituye un ejemplo paradigmático de esta situación.⁹⁹ Está integrada por cuatro hélices (*four-helix bundle*) que empaquetan por medio de más de 400 semiclratos de agua

estructurada, las cuales definen un auténtico núcleo hidrofílico. Dicha región interior de agua estructurada se proyecta hacia el exterior a través de dos de las hélices para definir la superficie de reconocimiento del hielo (Figura 1.11).

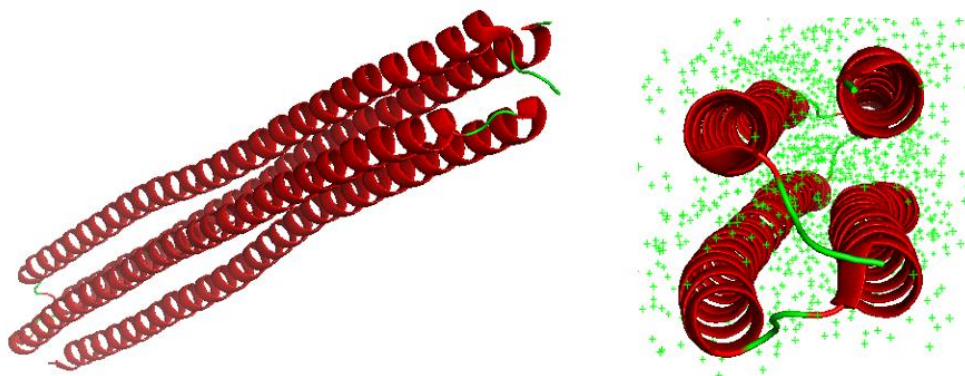


Figura 1.11.- a) Estructura de la proteína anticongelante Maxi (pdb: 4KE2) en dos orientaciones alternativas. Las moléculas de agua localizadas entre las hélices se organizan formando redes polipentagonales entrecruzadas.

Finalmente, cabe mencionar que el mecanismo de acción de las proteínas anticongelantes ha sido objeto de un intenso debate científico durante más de 50 años y que aún a día de hoy el debate persiste.

1.3.6. Inhibición de la recristalización: bases moleculares

Tal y como se ha mencionado con anterioridad, el fenómeno de la recristalización implica el crecimiento de cristales de hielo de mayor tamaño a expensas de los cristales más pequeños. Dado que los primeros generan una mayor deshidratación, así como un mayor daño estructural en tejidos vivos, inhibir dicho proceso es esencial en criopreservación.¹⁰²

Uno de los mecanismos comúnmente aceptados para la recristalización se conoce con el nombre de “*grain boundary migration*” e implica una transferencia directa de moléculas de agua individuales entre granos o microcristales de hielo.^{75,103,104} En general, los microcristales de menor tamaño presentan una mayor curvatura o convexidad en su superficie, lo que determina una mayor energía superficial. Por el contrario, aquellos de mayores dimensiones se caracterizan por superficies menos curvas y, por tanto, de menor energía. De acuerdo con esto, la transferencia de moléculas de agua de microcristales de menor tamaño a otros mayores está favorecida desde un punto de vista energético; en términos sencillos, la fuerza directora del proceso es la reducción en la curvatura de las superficies cristalinas, lo cual conlleva una reducción en la energía libre del sistema.

El mecanismo anteriormente descrito asume una transferencia directa de moléculas de agua entre microcristales de hielo. Sin embargo, es comúnmente

aceptado que el hielo en disolución está rodeado de una fina capa de moléculas de agua parcialmente ordenadas, en comparación con el estado altamente ordenado que representa el cristal y el desordenado propio del agua. Dicha fase se conoce con el nombre de “*quasi-liquid-layer*” (QLL)⁷⁷⁻⁷⁹ y, dependiendo de las condiciones, tiene un grosor estimado de entre 3 y 15 Å (Figura 1.12). El segundo mecanismo aceptado para el proceso de recrystalización se conoce con el nombre de “*Ostwald ripening*” y asume que la transferencia de moléculas de agua entre cristales de hielo involucra las capas de agua líquidas y cuasi-líquidas intermedias.¹⁰⁵ En cualquier caso, el motor termodinámico de dicha transferencia sería nuevamente la disminución en la curvatura de las superficies cristalinas, tal y como se ha mencionado anteriormente.

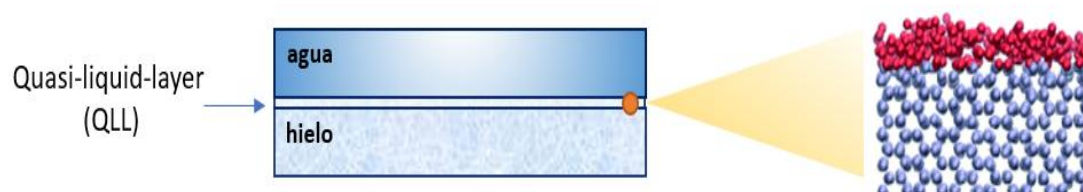


Figura 1.12.- Representación esquemática de la *quasi-liquid layer* formada entre los cristales de hielo y el agua. Las moléculas de agua en dicha capa están parcialmente ordenadas.

Con respecto al modo de actuación de los inhibidores de la recrystalización (entre los cuales se incluye a la mayoría de las proteínas anticongelantes) cabe mencionar que este es, a día de hoy, fundamentalmente desconocido. Sin embargo, parece claro que, a diferencia de la histéresis térmica, no requiere la asociación irreversible del agente crioprotector a la superficie del hielo. Así, se ha demostrado que mutaciones en *AFPs* que transforman la unión irreversible en reversible suprimen por completo la histéresis térmica.¹⁰⁶ Por el contrario, su efecto sobre la actividad inhibitoria de la recrystalización es limitado. De hecho, a diferencia del resto de las actividades crioprotectoras, la inhibición de la recrystalización podría no requerir en absoluto la unión del inhibidor a la superficie del hielo. Así, de acuerdo con hipótesis recientes, algunos podrían actuar en la interfase entre el agua líquida y la *QLL* que rodea el hielo, interfiriendo con la reorganización de las moléculas de agua necesarias para el crecimiento del cristal.⁷⁵

En cualquier caso, tal y como ya se ha mencionado, el mecanismo preciso que posibilita la inhibición del proceso de recrystalización del hielo por agentes crioprotectores es todavía objeto de intenso debate por parte de la comunidad científica.

1.3.7. Glicoproteínas Anticongelantes (AFGPs): Estructura y características generales

Los peces árticos de la familia de los *Notothernioidei*, así como diversos tipos de bacalaos antárticos, sintetizan glicopéptidos anticongelantes ricos en alanina.⁹⁴ Estos están constituidos por las repeticiones de tres residuos, -ATA-, donde el residuo de treonina está *O*-glicosilado por el fragmento disacárido β -D-galactosil-(1-3)- α -N-acetil-D-galactosamina. Se producen de forma natural en diversos tamaños que van de las 4 a las 50 repeticiones del tripéptido básico. Así, basándose en su movilidad electroforética, se han identificado especies de 8 tamaños diferentes, habitualmente designadas como AFGPs 1-8. Entre dichas variantes, AFGP-1 representa el glicopéptido de mayor tamaño (33 kDa), mientras que AFGP-8 es el más pequeño, con una masa de 2.6 kDa. Curiosamente, los dos glicopéptidos de menores dimensiones (AFGPs 7-8) son los más abundantes y representan aproximadamente dos tercios del total de AFGPs circulantes por los fluidos del pez. Los 8 tipos han sido, a su vez, subdivididos en dos categorías de acuerdo a su variabilidad de secuencia, de forma que los AFGPs 1-5 están íntegramente constituidos por repeticiones -ATA-, mientras que los de menor tamaño, AFGPs 6-8, incluyen ocasionalmente residuos de prolina sustituyendo a la primera alanina.

Por lo que respecta a la relación entre dimensiones y actividad anticongelante, diversos estudios demuestran que esta es, en general, superior para las variantes de mayor tamaño, si bien la correlación se mantiene solo hasta determinado peso molecular. Trabajando con glicopéptidos purificados de fuentes naturales se ha demostrado que, a idéntica concentración, las variantes AFGPs 1-5 determinan una histéresis térmica entre 3 y 4 veces superior a los derivados AFGPs 7-8.^{107,108} Por otro lado, estudios realizados por el grupo del profesor Nishimura con péptidos sintéticos indican que dicha actividad crece de modo continuo para longitudes comprendidas entre 2 y 5 repeticiones -ATA-, permaneciendo constante a partir de dicho tamaño.¹⁰⁹

En lo referente a los aspectos estructurales, cabe mencionar que, dado que carecen de puentes disulfuro, así como de residuos capaces de generar un núcleo hidrofóbico significativo, los glicopéptidos anticongelantes no presentan estructura terciaria, propiamente dicha. Sin embargo, tampoco generan un ovillo estadístico como podría esperarse. Por el contrario, diversos estudios de RMN y modelización molecular demuestran que, a pesar de mantener una flexibilidad significativa, muestran una marcada tendencia a generar estructuras secundarias extendidas del tipo hélice PPII (Figura 1.13).¹⁰⁹⁻¹¹² Dicho motivo estructural se caracteriza por ángulos ϕ/ψ de en torno a $-75^\circ/150^\circ$. Modificaciones químicas de la secuencia natural demuestran que dicha predisposición conformacional depende

críticamente de fragmentos químicos concretos.¹⁰⁹ En particular, la *O*-glicosilación del residuo de treonina con estereoquímica α - es esencial desde una perspectiva estructural. De un modo similar, el grupo metilo presente en posición β - de la cadena lateral tiene un efecto decisivo sobre la orientación del carbohidrato y, por tanto, sobre la conformación de la cadena peptídica. Adicionalmente, la función acetamida presente en la unidad de GalNAc parece tener, igualmente, un papel significativo de acuerdo con medidas de dicroísmo circular realizadas con derivados no naturales.

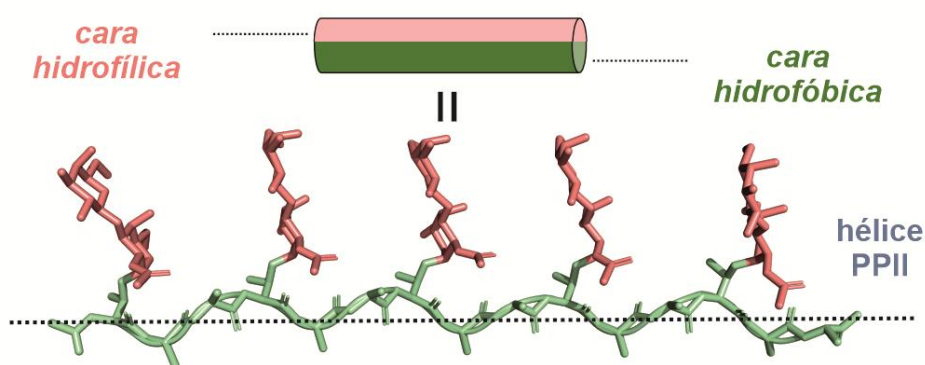


Figura 1.13.- Estructura secundaria tipo hélice PPII adoptada por las glicoproteínas anticongelantes. Se destaca el carácter anfifílico de las mismas, con una cara hidrofóbica (representada en verde) y otra hidrofílica (representada en rosa).

Como punto final, es importante destacar que la hélice PPII generada por las AFGPs presenta como rasgo distintivo un marcado carácter anfifílico. Así, los residuos de carbohidrato permanecen alineados en una cara de la hélice, mientras que la cara opuesta se encuentra tapizada por las funciones metilo presentes en las alaninas, así como en la función acetamida de la unidad de GalNAc. Se ha sugerido que dicha disposición es esencial para la asociación del glicopéptido al hielo y, por tanto, para el sostenimiento de la actividad anticongelante. En el siguiente apartado se describen las bases moleculares de la actividad anticongelante de acuerdo con las hipótesis propuestas hasta la fecha.

1.3.8. Bases moleculares de la actividad anticongelante: métodos de asociación glicopéptido/hielo

Como primer punto, cabe mencionar que no todas las hipótesis relativas al modo de acción de las AFGPs asumen la asociación al hielo como requerimiento esencial. Así, basándose en técnicas espectroscópicas capaces de revelar cambios en las vibraciones de la red de enlaces establecidos por el agua, algunos autores han sugerido que la actividad anticongelante tiene su origen en su capacidad para inducir perturbaciones a larga distancia en la estructura del disolvente.^{113,114}

A pesar de ello, dichas propuestas tienen un carácter marginal. A día de hoy, es comúnmente aceptado que estas biomoléculas actúan mediante un mecanismo general de *adsorción-inhibición* (ver apartado 1.3.4).⁸² Por el contrario, el modelo de asociación de los glicopéptidos al plano prismático primario del hielo es objeto de polémica científica. Tal y como apuntábamos en el apartado 1.3.5, la investigación a este respecto se ha visto igualmente dificultada por la ausencia de información estructural experimental de alta resolución relativa al complejo AFGP-hielo. En el caso de los glicopéptidos, el problema se ve agravado por su flexibilidad intrínseca, que ha impedido además la obtención de estructuras definidas correspondientes al estado libre en disolución. Como consecuencia, buena parte de las hipótesis mecanísticas planteadas se basan en estudios de modificación química, medidas de actividad y cálculos teóricos.

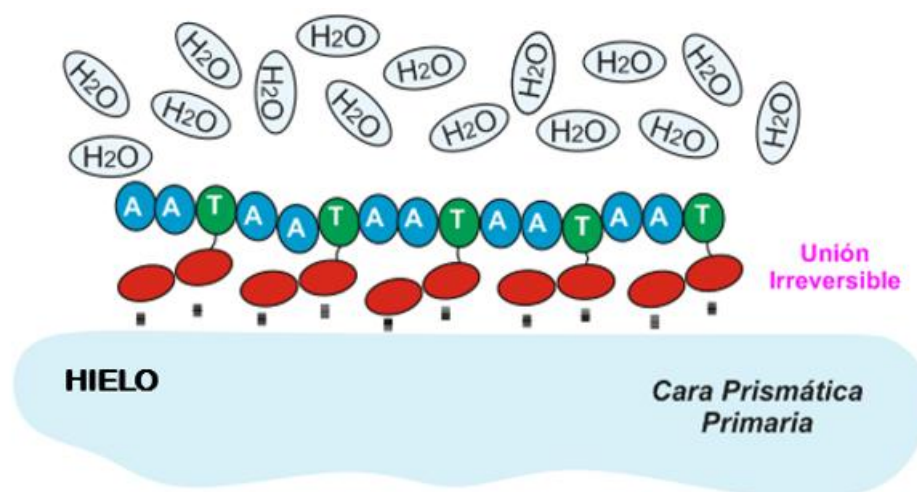


Figura 1.14.- Representación esquemática del modelo de interacción glicopéptido/hielo propuesto por DeVries en 1993. En él, se postulan los enlaces de hidrógeno entre los carbohidratos y el hielo como fuerza directora de la asociación.

La primera propuesta para la interacción glicopéptido/hielo, realizada por De Vries y colaboradores, pone su énfasis en los enlaces de hidrógeno como fuerza directora de la asociación.¹¹⁵ Dicha hipótesis toma en consideración el carácter polihidroxilado de los glicósidos y se basa en la observación de que el espaciado entre las unidades de galactosa presentes en el glicopéptido, asumiendo una hélice de tipo PPII, es óptimo para favorecer su interacción con el plano prismático primario. Se postula adicionalmente que para maximizar el número de enlaces de hidrógeno y con ello la estabilidad del complejo, hidroxilos clave de los azúcares deben penetrar en el retículo cristalino. Como crítica a dicho modelo de asociación, resulta cuestionable que, en agua, sea posible conseguir energías libres de interacción suficientemente grandes, solamente con enlaces de hidrógeno.

Más recientemente, teniendo en cuenta el carácter anfifílico de la hélice PPII y basándose en cálculos de dinámica molecular, se ha propuesto que la cara hidrofóbica de la misma, tapizada con grupos metilo de alanina y de acetamida, es la responsable de la asociación.¹¹⁶ De acuerdo con esta visión, la fuerza directora del proceso sería de naturaleza solvofóbica, es decir, estaría promovida por la ocultación al disolvente de un elevado número de funciones metilo. Dicha propuesta es consistente con observaciones realizadas con otras proteínas anticongelantes, tal y como se ha apuntado en el apartado 1.3.5. Es preciso señalar que, a pesar de no participar en la asociación, las unidades de carbohidrato podrían jugar un papel clave en la actividad anticongelante. Más concretamente, los fragmentos disacarídicos expuestos en la fase cuasi-líquida (QLL) anteriormente mencionada, impedirían su estructuración, dificultando el crecimiento del retículo cristalino (Figura 1.15).

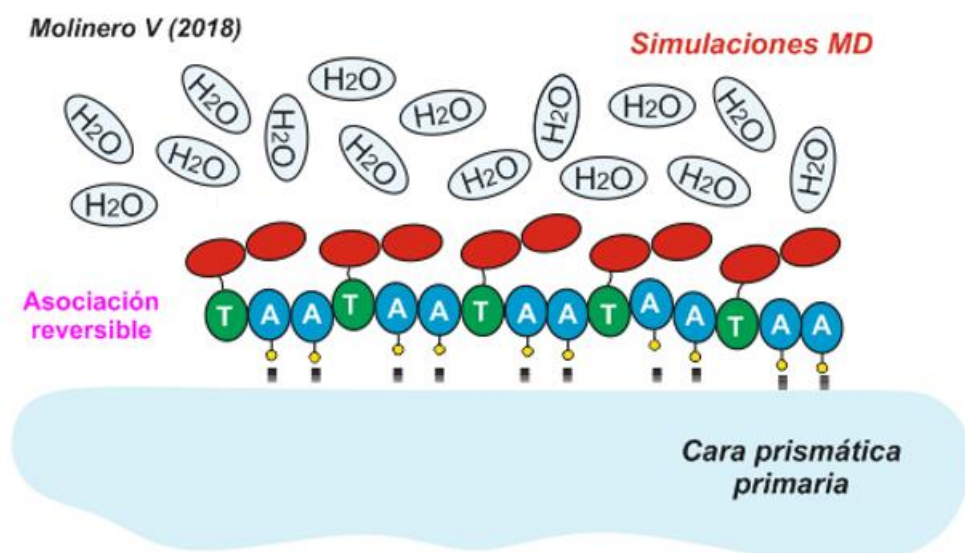


Figura 1.15.- Modelo de interacción glicopéptido/hielo propuesto por Molinero y col. en 2018. En él, se postulan las interacciones hidrofóbicas entre los grupos metilo del glicopéptido y el hielo como fuerza directora de la asociación.

Finalmente, mencionar nuevamente que, al igual que otros aspectos de los sistemas anticongelantes, el modelo de asociación AFGP/hielo es todavía objeto de debate y, por tanto, debe considerarse una cuestión no resuelta. De hecho, uno de los objetivos fundamentales de la presente tesis es proporcionar evidencias en favor de uno u otro modelo de asociación o, en caso necesario, plantear alternativas a los mismos.

1.3.9. Estudios de relación estructura-función: Síntesis y evaluación de derivados

Una de las aproximaciones clásicas al estudio mecanístico de agentes crioprotectores consiste en combinar la síntesis química de derivados modificados con ensayos de actividad posteriores. En el caso de los glicopéptidos anticongelantes, dicha metodología se ha visto, en buena medida, obstaculizada por la tremenda dificultad que entraña la preparación de *AFGPs* sintéticos. De hecho, una parte significativa de los estudios realizados a este respecto se ha basado en la modificación no selectiva de glicopéptidos naturales purificados. Así, se ha demostrado que la peracetilación completa (Figura 1.16) de todas las posiciones hidroxiladas de los carbohidratos conduce a una supresión total de la actividad anticongelante, lo cual podría considerarse una evidencia a favor de su participación en el reconocimiento de hielo hexagonal.⁶² Sin embargo, a este respecto hay que comentar que dichas funciones son igualmente esenciales para mantener la solubilidad del glicopéptido, especialmente a las elevadas concentraciones habitualmente requeridas para su función. Por lo tanto, esta modificación, por su carácter no selectivo, arroja poca luz sobre el mecanismo de acción de las *AFGPs*. De un modo similar, la oxidación con periodato de las unidades Gal en posición no reductora (Figura 1.16) elimina por completo la histéresis térmica.⁶² Desafortunadamente, dicha reacción supone la sustitución de un anillo de piranosa por fragmentos lineales cuyas propiedades químicas y conformacionales son claramente diferentes, lo que dificulta la obtención de conclusiones no ambiguas. Un tercer tipo de modificación (Figura 1.16) implica la formación de ésteres borónicos, de forma no selectiva, en las dos unidades de galactosa, lo cual rinde nuevamente especies totalmente inactivas.¹¹⁷ Cabe mencionar que el efecto conformacional que dichos ésteres tienen, tanto sobre el péptido como el disacárido, es desconocido. Por el contrario, la oxidación a aldehído de las posiciones primarias de galactosa y *N*-acetilgalactosamina parece no ejercer influencia alguna sobre la actividad anticongelante.¹¹⁸

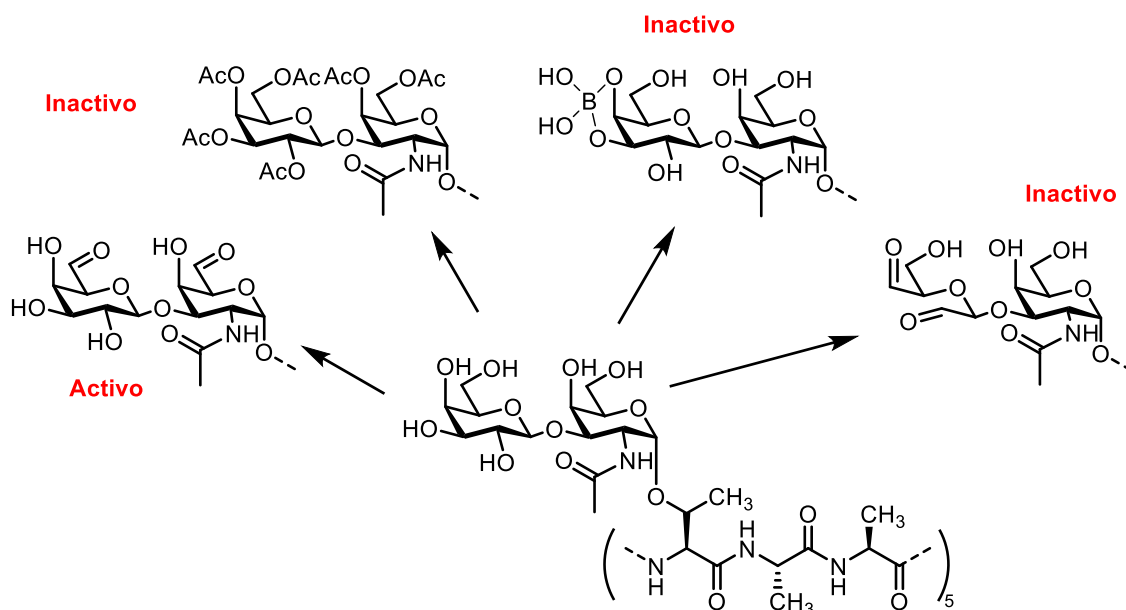


Figura 1.15.- Modificaciones químicas no selectivas realizadas sobre AFGPs y su efecto en la actividad anticongelante.

El estudio más detallado de modificación química de AFGPs fue realizado por el grupo del profesor Nishimura.¹⁰⁹ En él, se evaluó la actividad de un buen número de derivados no naturales obtenidos en forma polimérica a partir de fragmentos de glicopéptido desprotegidos, recurriendo a un procedimiento enzimático desarrollado en el propio laboratorio de Nishimura. Como primera conclusión, este trabajo demuestra que la unidad de GalNAc debe tener configuración α - necesariamente. En caso contrario, se pierde la actividad anticongelante. La presencia del fragmento de acetamida es igualmente esencial. Curiosamente, tanto la inversión de la configuración anomérica de la unidad de GalNAc como su sustitución por Gal tiene un efecto conformacional evidente sobre el glicopéptido, cuya naturaleza solo se analiza de forma cualitativa mediante dicroísmo circular. Por su parte, la supresión de la unidad terminal de galactosa mantiene la histéresis térmica, si bien esta se ve reducida en buena medida. Finalmente, la sustitución del disacárido completo por LacNAc implica una reducción drástica de la actividad anticongelante.

A pesar del incuestionable valor de dichos resultados, no es posible a partir de ellos discernir qué porciones de péptido son esenciales para mantener la conformación adecuada del péptido y cuáles están involucradas en la interacción con hielo. Por otro lado, sería altamente deseable discriminar de una forma más fina entre diferentes posiciones del sistema, especialmente en lo concerniente al fragmento disacarídico. Dicho estudio debería ir acompañado de un análisis estructural basado en técnicas de alta resolución, como la Resonancia Magnética Nuclear. Ambos constituyen objetivos fundamentales de la presente tesis doctoral.

1.3.10. Carbohidratos como miméticos del hielo: Evidencias experimentales

La función específica que desempeñan los carbohidratos en la actividad de los *AFGPs* es, a día de hoy, desconocida. A pesar de ello, tal y como se ha mencionado con anterioridad, se han planteado diversas hipótesis a este respecto. Una de las primeras postula su participación directa en el reconocimiento molecular de hielo hexagonal, mediante la formación de enlaces de hidrógeno con el plano prismático primario. Dichos enlaces podrían ser superficiales o suponer una penetración parcial de las funciones hidroxilo en la superficie del cristal, orientada a maximizar el número de interacciones establecidas por función hidroxilo.

Cabe mencionar que la integración parcial del carbohidrato en el retículo de hielo implicaría, en cierta medida, su actuación como mimético del mismo. Esta idea resulta especialmente sugerente si se considera la estructura del hielo hexagonal y la propia naturaleza química de los monosacáridos, constituidos por un armazón hexagonal polihidroxilado. A continuación, comentaremos brevemente diversas evidencias experimentales que apuntan en dicha dirección.

Una de las primeras proviene del estudio de proteínas anticongelantes de tipo II aisladas a partir de peces polares. Así, se ha demostrado que estas presentan un alto grado de homología, tanto estructural como de secuencia, con los dominios de reconocimiento de carbohidratos de las lectinas de tipo C.⁷² Estudios de mutagénesis dirigida indican, adicionalmente, que el epítipo de reconocimiento de hielo de la proteína anticongelante se corresponde exactamente con el lugar de asociación de carbohidratos en las lectinas. A partir de dichas evidencias, se ha sugerido que la función anticongelante debió evolucionar a partir de la función lectina. Como es lógico, el hecho de que ligeras variaciones en el centro de reconocimiento de carbohidratos permitan la asociación de hielo hexagonal sugiere una elevada semejanza estructural entre ambas dianas.

Si bien las lectinas tipo C no tienen la capacidad de asociarse a hielo, existen ejemplos descritos de proteínas con esta doble funcionalidad: el reconocimiento molecular de hielo y de glicósidos. Curiosamente, entre ellos se encuentran las *AFGPs*, cuyo estudio constituye el objetivo principal de la presente tesis doctoral. Más concretamente, se ha demostrado que *AFGPs* naturales de longitudes variables (de *AFGP 1* a *AFGP 8*. Ver apartado 1.3.7) presentan la capacidad de detener el crecimiento de cristales de metil- α -D-manopiranosido, así como de inhibir su recristalización.¹¹⁹ Además, la efectividad de los diferentes sistemas testados en ambas tareas muestra una excelente correlación con sus respectivas actividades anticongelantes. Este trabajo constituye el primer ejemplo descrito en

el cual se hace uso de proteínas anticongelantes para controlar el crecimiento de los cristales integrados por carbohidratos.

Más recientemente, se ha demostrado que la capacidad de las proteínas anticongelantes de reconocer tanto hielo como carbohidratos tiene, de hecho, un papel funcional adaptativo. Así, los insectos que habitan en entornos fríos presentan habitualmente elevadas concentraciones de trehalosa en la hemolinfa.^{120,121} Dicho disacárido muestra una elevada tendencia a precipitar a bajas temperaturas, lo cual tendría, como es lógico, serias consecuencias para el insecto. Afortunadamente, la precipitación de trehalosa en la hemolinfa es impedida gracias a la acción de proteínas anticongelantes que actúan inhibiendo el proceso. Esta acción inhibitoria parece tener su origen en la capacidad de las proteínas anticongelantes de reconocer y asociarse a los cristales de trehalosa.

En definitiva, las evidencias resumidas en los párrafos anteriores sugieren que, por su carácter polihidroxilado y su pseudo-simetría hexagonal, algunos carbohidratos podrían comportarse como miméticos del retículo cristalino. Dicha posibilidad debe, en nuestra opinión, ser tenida en cuenta a la hora de plantear hipótesis relativas al mecanismo de acción de las AFGPs.

1.3.11. Actividad anticongelante de carbohidratos no conjugados a proteínas

Además de ser componentes esenciales para la actividad de los glicopéptidos anticongelantes, los carbohidratos pueden tener, bien por sí mismos o bien conjugados con moléculas orgánicas sencillas, la capacidad de modular el crecimiento de cristales en disolución. Uno de sus efectos más frecuentes es la inhibición del proceso de recrystalización, que puede potenciarse mediante la conjugación del glicósido con armazones orgánicos (monoméricos o poliméricos) para generar sistemas anfífilos. De hecho, la síntesis de inhibidores de la recrystalización no naturales que incorporan carbohidratos ha sido un campo activo de investigación en tiempos recientes.¹²²⁻¹²⁵

Resulta especialmente destacable que, incluso en ausencia de modificaciones químicas, los propios carbohidratos naturales pueden ejercer un cierto efecto inhibitor del proceso de recrystalización del hielo. Así, de acuerdo con un estudio sistemático realizado en el grupo del profesor Robert N. Ben, dicho efecto es especialmente acusado para la *D*-galactosa, como monosacárido, y la *D*-melibiosa como disacárido.¹²³ Curiosamente, las actividades medidas correlacionan con el índice de hidratación del carbohidrato (*hydration index*), definido como el número de moléculas de agua fuertemente unidas al carbohidrato (*hydration number*) dividido por el volumen molar del carbohidrato. Las actividades medidas se explican en base a la capacidad de los glicósidos de

posicionarse en la interfase entre las fases líquida y cuasi-líquida (*QLL*) que rodea los cristales de hielo, alterando la estructura del disolvente y dificultando la transferencia de moléculas de agua entre microcristales.

Además de inhibir la recristalización del hielo, se ha demostrado que oligosacáridos complejos pueden generar un fenómeno de histéresis térmica comparable al observado con proteínas anticongelantes. Dicha observación implica una interacción directa entre los glicósidos y el cristal de hielo y demuestra que, en ausencia de componentes proteicos, los carbohidratos pueden tener la capacidad de reconocer de manera específica planos del retículo cristalino. Uno de los primeros ejemplos descritos en la literatura se trata de un agente crioprotector aislado a partir de una especie de escarabajo adaptado al frío (*Upis ceramboides*).^{126,127} Un análisis detallado de dicho componente demostró la ausencia de proteínas y certificó su composición mayoritariamente oligosacarídica.¹²⁶ Además, dicho estudio apunta a la presencia de un componente adicional de tipo lipídico importante para la actividad. Estudios posteriores permitieron definir la estructura química del polisacárido, principalmente integrado por el fragmento β -D-manopiranosil- β -D-(1-4)-xilopiranososa (Figura 1.16).¹²⁷

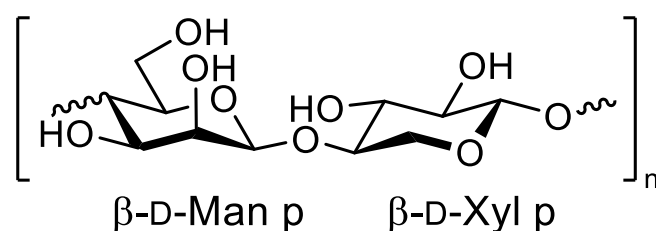


Figura 1.16.- Fragmento de β -manopiranosil- β -(1-4)-xilopiranososa (xilomanano) integrante del polisacárido anticongelante aislado de la especie de escarabajo *Upis ceramboides*.

Curiosamente, las bacterias que habitan entornos fríos producen de forma habitual polisacáridos extracelulares con función crioprotectora y una cierta capacidad de asociarse al hielo. Recientemente, se ha descrito un polisacárido capsular de la bacteria psicrófila *Colwellia psycherythraea*, cuyo hábitat son los sedimentos marinos árticos a $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$.¹²⁸ Dicho polisacárido está integrado por unidades repetitivas de tetrasacárido complejas que incluyan dos unidades de ácido glucurónico, una de GlcNAc y una de GalNAc (Figura 1.17). Adicionalmente, una de las unidades de ácido glucurónico porta un residuo de treonina en posición 6, unido a través de la cadena lateral del aminoácido. La combinación de treonina y carbohidrato es, como hemos visto, característica de las *AFGPs* y su presencia en polisacáridos anticongelantes confiere a dicho elemento estructural un claro protagonismo en el campo de los agentes crioprotectores. Un estudio estructural

del polisacárido demuestra que presenta una estructura tridimensional en zigzag altamente flexible con los residuos de treonina posicionados en los ángulos de la misma. Los autores especulan con la importancia de dicha conformación para la asociación al retículo cristalino. Cabe mencionar, finalmente, que el polisacárido aislado muestra además una clara actividad inhibidora de la recristalización del hielo.

En definitiva, en ausencia de componentes proteicos, los carbohidratos pueden desempeñar funciones anticongelantes significativas, lo cual les confiere un claro protagonismo en el campo.

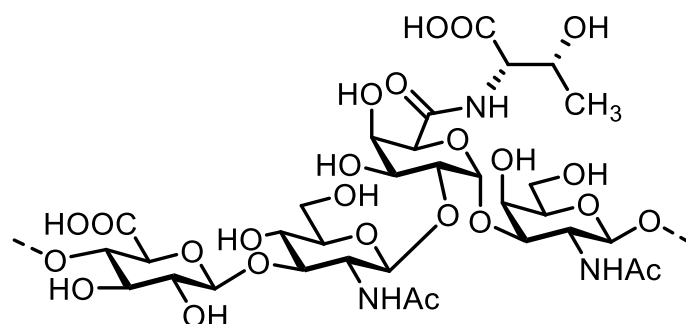


Figura 1.17.-Estructura química de la unidad repetitiva básica del polisacárido anticongelante aislado de bacteria psicrófila *Colwellia psycherythraea*.

1.3.12. Cuestiones pendientes

A pesar de los innegables avances experimentados en el campo de las proteínas anticongelantes, importantes aspectos de su acción crioprotectora están todavía por resolver. Así, si bien el modelo de adsorción-inhibición es, a día de hoy, comúnmente aceptado, los detalles relativos al modo de interacción entre los agentes crioprotectores y el hielo son pobremente comprendidos.

En particular, el carácter reversible/irreversible de la asociación ha sido objeto de debate reciente. Así, las hipótesis mecánicas iniciales apuntaban a una asociación de carácter irreversible. De hecho, este requerimiento parece esencial para que, de acuerdo con el efecto Kelvin descrito en el apartado 1.3.4, puedan generarse superficies convexas o pequeños salientes en la superficie del hielo; de otro modo, la forma plana de la superficie en crecimiento se restituiría aprovechando los momentos en los que la proteína/glicopéptido no está asociado. Curiosamente, diversos aspectos de la actividad anticongelante resultan difíciles de conciliar con una asociación de carácter irreversible.⁸⁶ Así, en primer lugar, si este fuera el caso, cabría esperar que la histéresis térmica fuera insensible a la concentración de agente crioprotector, siempre y cuando esta sea suficiente para saturar la superficie de los microcristales de hielo. Por el contrario, la práctica totalidad de los agentes crioprotectores de naturaleza proteica promueven el

fenómeno de histéresis térmica de un modo sensible a la concentración. En el caso de los glicopéptidos anticongelantes, esta crece de modo casi lineal para concentraciones comprendidas entre 2 mg/mL y más de 40 mg/mL. Adicionalmente, un proceso de asociación irreversible debería promover la completa desaparición de la proteína/glicopéptido de la disolución, especialmente cuando se emplean concentraciones reducidas de este. Sin embargo, dicho fenómeno no se ha observado nunca.

Finalmente, debe observarse que la adsorción irreversible de los agentes crioprotectores sobre el hielo debería afectar no solo al punto de congelación de la muestra, sino también a la temperatura de fusión. De hecho, esta debería proceder de modo preferente a partir de los espacios intersticiales entre las proteínas/glicopéptidos asociados, generándose así superficies cóncavas de punto de fusión más elevado de acuerdo con el efecto Kelvin anteriormente descrito. De nuevo, dicho fenómeno, conocido como sobrecalentamiento del hielo u *overheating* no ha sido observado nunca.

A pesar de estos problemas, los estudios experimentales más recientes, basados en microfluídica y espectrometría de fluorescencia, sostienen que la asociación de las AFGPs al plano prismático primario del hielo es esencialmente irreversible.¹²⁹ Por el contrario, el modo de asociación propuesto por Molinero a partir de cálculos de dinámica molecular apunta a una asociación reversible (Figura 1.15).¹¹⁶

Con objeto de resolver los conflictos existentes entre las diferentes propuestas mecanísticas, algunos autores han sugerido un proceso en dos etapas. De acuerdo con dicha idea, a 0 °C la asociación entre los sistemas anticongelantes y el hielo sería esencialmente reversible.⁸⁶ Por el contrario, al descender la temperatura, el glicopéptido/proteína quedaría irreversiblemente fijado sobre la superficie de crecimiento. Dicha fijación puede obedecer al establecimiento de contactos adicionales entre el agente crioprotector y el hielo. Alternativamente, este último podría crecer parcialmente sobre porciones del primero, que quedaría de este modo cinéticamente atrapado.

Como punto adicional, es preciso recordar que la transición entre las fases líquida y cristalina del agua no es abrupta, tal y como se ha mencionado con anterioridad. Cada cristal de hielo está rodeado de una capa de agua parcialmente estructurada o *quasi-liquid layer (QLL)*,⁷⁷⁻⁷⁹ de espesor variable dependiendo del plano cristalino concreto con el que está en contacto. A pesar de los esfuerzos realizados por la comunidad científica en años recientes, sus propiedades son todavía objeto de discusión científica. Por otro lado, si bien parece claro que dicha

región debe jugar un papel importante en la acción de los agentes anticongelantes esta es desconocida.

Finalmente, el debate en torno a los detalles concretos de la interacción entre los sistemas crioprotectores y el hielo persiste en la actualidad. Dicha discusión es especialmente intensa en lo relativo a los glicopéptidos anticongelantes y su modo de asociación. En particular, el epítipo de reconocimiento de las AFGPs es esencialmente desconocido, así como las interacciones concretas que estabilizan el complejo. Desde una perspectiva glicoquímica, resulta especialmente destacable nuestra ignorancia relativa al papel de los carbohidratos en la actividad anticongelante. Uno de los objetivos generales de la presente tesis doctoral es contribuir a clarificar alguna de estas cuestiones.

1.3.13. Proteínas anticongelantes y nuevos materiales para criopreservación en biomedicina

Como punto final cabe mencionar que, además del indudable interés que los glicopéptidos anticongelantes presentan desde una perspectiva fundamental, dichos sistemas revisten una especial relevancia en el diseño de nuevos sistemas de crioprotección de potencial utilidad en biomedicina.¹³⁰⁻¹³⁵ A este respecto, cabe mencionar que el desarrollo de alternativas para la preservación de órganos, tejidos o líneas celulares tendría un impacto fundamental en campos como la toxicología, la biología molecular o el trasplante de órganos.^{130-133,135} Así, con los métodos más actuales de preservación en frío, tanto órganos como tejidos puede mantenerse a temperaturas entre 4 y 8 °C tan solo por unas pocas horas. Como consecuencia de ello, buena parte de las donaciones se malogran. A modo de ejemplo, los corazones disponibles para donaciones se preservan aproximadamente durante 4 horas y tienen una tasa de desecho cercana al 70%. Reconociendo la enorme importancia del asunto, muchas organizaciones y agencias científicas, incluyendo el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH), han identificado la criopreservación como una cuestión prioritaria en investigación.

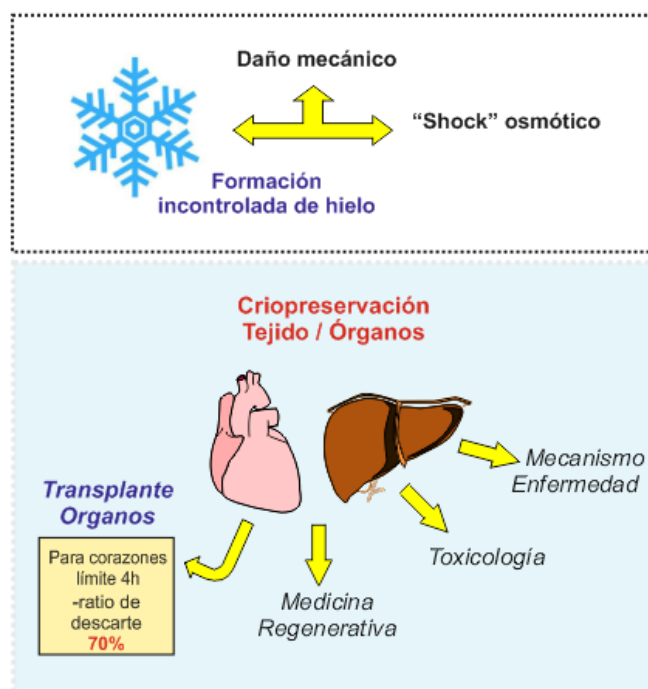


Figura 1.18.- Daños producidos por la formación incontrolada de cristales de hielo en tejidos vivos (arriba) y posibles aplicaciones de las proteínas anticongelantes en el ámbito de la criopreservación de órganos (abajo).

Como es lógico, el reto fundamental en esta materia es impedir el crecimiento descontrolado del hielo en los sistemas vivos, cuyos efectos, a menudo letales, han sido descritos con anterioridad. Esto es especialmente complejo en órganos completos debido a su elevado volumen. Las proteínas y glicopéptidos anticongelantes naturales han constituido en años recientes una alternativa a explorar, así como una fuente de inspiración en el desarrollo de nuevas tecnologías de preservación en frío. Cabe mencionar que, de los tres efectos comúnmente atribuidos a los glicopéptidos anticongelantes, dos de ellos son claramente beneficiosos. Así, la inhibición de la recrystalización del hielo impide la formación de cristales de mayor tamaño, más dañinos por su acción mecánica sobre células y tejidos (Figura 1.18). Por su parte, la histéresis térmica bloquea completamente el crecimiento de cristales de hielo siempre que los órganos y tejidos se preserven dentro de la ventana de temperatura comprendida entre la temperatura de congelación y la de fusión. Por el contrario, el fenómeno de “*Dynamic Ice Shaping*”, efecto colateral del reconocimiento específico de determinados planos del retículo cristalino, tiene como consecuencia frecuente la formación de cristales bipiramidales especialmente nocivos por su acción mecánica. A modo de ejemplo, la utilización de proteínas anticongelantes hiperactivas de insectos ha permitido observar riñones de rata a -4°C durante 72 horas, un periodo de tiempo tres veces superior al que permitiría su almacenaje a 4°C .¹³⁶ En contraste con estos resultados, la utilización de AFGPs en la preservación de corazones de rata a -1.4

°C durante 3-5 horas ha demostrado ser perjudicial debido a la aparición de lesiones mecánicas relacionadas con la forma bipiramidal de los cristales de hielo.¹³⁷

Una alternativa para incrementar el potencial de las proteínas anticongelantes en criopreservación es el diseño de modificaciones que potencien el fenómeno de la histéresis térmica. Una de las más utilizadas implica la expresión de sistemas multiméricos de mayor tamaño que, por sus dimensiones, generan protrusiones más acentuadas en la superficie del cristal.¹³⁸ De un modo similar, con objeto de limitar el efecto negativo del “*Dynamic ice Shaping*” se ha ensayado la utilización conjunta de diversos agentes crioprotectores capaces de reconocer diferentes planos del retículo cristalino, con resultados positivos.¹³⁹ Adicionalmente, diversos esfuerzos se han orientado al diseño y preparación de agentes crioprotectores enteramente sintéticos que mimeticen las principales propiedades de las proteínas anticongelantes (superficie extendida, carácter anfifílico, dimensiones adecuadas...).¹³² Además, dichos sistemas deben satisfacer criterios astringentes en lo relativo a su biocompatibilidad, propensión a la agregación en un contexto de elevada concentración de biomoléculas (*crowding*), y capacidad de permear tejidos u órganos, así como la capacidad de concentrarse en zonas específicas especialmente sensibles a la formación del hielo.

Actualmente, el desarrollo de estrategias eficientes de criopreservación constituye un campo activo de investigación y una línea prioritaria de acuerdo con importantes agencias y organismos internacionales. Una mayor comprensión de los mecanismos que posibilitan la inhibición del crecimiento de hielo por las AFGPs facilitaría sin duda el diseño de sistemas más eficientes. El estudio de dicho mecanismo constituye uno de los objetivos generales de la presente tesis.

CAPÍTULO 2.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de la presente tesis doctoral es contribuir a delinear las características fundamentales de la asociación *AFGPs*/hielo, identificando el epítipo de reconocimiento, así como las interacciones fundamentales que estabilizan el complejo. En particular, estamos interesados en determinar cuál es el papel concreto de los glicósidos en la asociación o, en su defecto, en la actividad crioprotectora de los glicopéptidos. Nuestra hipótesis de partida es que es posible acceder a dicha información mediante un estudio detallado de relaciones estructura/actividad que combine la preparación de un buen número de glicopéptidos no naturales puros con estudios estructurales, medidas de DIS e histéresis térmica y cálculos teóricos. Por simplicidad, limitaremos las dimensiones de los *AFGPs* a 5 repeticiones $-(TAA)_5-$, longitud suficiente para llevar a cabo dichas medidas a la vez que se mantienen sintéticamente accesibles, de acuerdo con estudios previos realizados por el grupo de Nishimura.¹⁰⁹ Como sistema de referencia, esencial para nuestro trabajo, se hará uso del glicopéptido natural **A**, sintetizado en el grupo del profesor Corzana en la Universidad de La Rioja. (Figura 2.1). A continuación, se detalla la estructura de las moléculas objetivo, así como las razones que justifican su preparación (Figura 2.1).

Principalmente, centraremos nuestra atención en el residuo de galactosa en posición no reductora de los fragmentos disacarídicos. Dicha elección obedece a dos razones fundamentales. En primer lugar, cabe esperar que su influencia sobre las propiedades conformacionales del glicopéptido sea despreciable, lo cual facilitará en buena medida la interpretación de los datos de actividad. En segundo lugar, dicha región de las *AFGPs* estaría involucrada en el reconocimiento del hielo, de acuerdo con el modelo de asociación postulado por DeVries (ver apartado 1.3.8).¹¹⁵

Primeramente, se abordará la preparación de diversos derivados portadores de modificaciones sencillas. Así la unidad de galactosa será reemplazada por manosa β o α (sistemas **GP-I** y **GP-II**, respectivamente), cuyas posiciones 2 y 4 difieren en configuración con respecto a la primera. De un modo similar, la posición 4 de galactosa se invertirá a una configuración de tipo gluco- (**GP-III**), o bien se procederá a la supresión de la función hidroxilo para generar un 4-desoxiazúcar (derivado **GP-IV**). Adicionalmente, se abordará la preparación de un glicopéptido equipado con unidades de alosa (**GP-V**), portadoras de funciones hidroxilo axiales en posiciones 3 del anillo de piranosa.

Seguidamente nos planteamos la introducción de dos modificaciones de mayor calado (glicopéptidos **GP-VI** y **GP-VII** en la Figura 2.1).

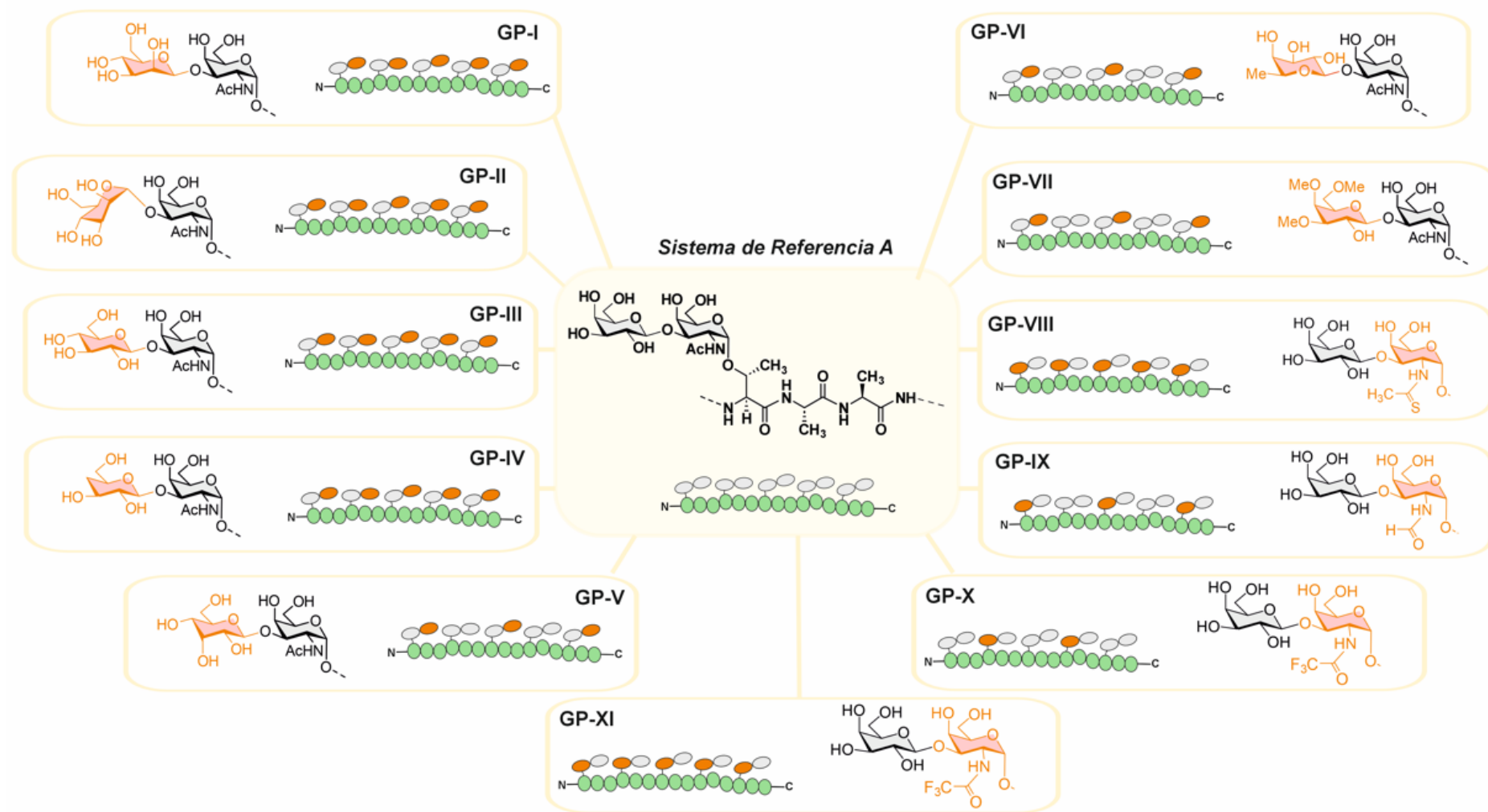


Figura 2.1.- Estructura química de los glicopéptidos no naturales cuya preparación y estudio se plantean en la presente tesis.

Así, analizaremos el efecto que la quiralidad de la galactosa no reductora (serie D o L) tiene sobre la actividad anticongelante. La idea subyacente a dicha modificación es que, si los azúcares están realmente involucrados en el reconocimiento del plano prismático primario, es concebible que solo uno de los enantiómeros sea compatible con la asociación. Por el contrario, si los carbohidratos ejercen simplemente un efecto desestructurador sobre la fase cuasi-líquida (*QLL*) este debería, en principio, ser menos sensible a dicho parámetro. Partiendo de dicho razonamiento, decidimos abordar la preparación de glicopéptidos equipados con L-fucosa en posición no reductora, considerando dicho azúcar como un mimético, económicamente más asequible, de la L-galactosa (derivado **GP-VI**).

De uno modo similar, decidimos suprimir el potencial donador de enlaces de hidrógeno de las galactosas terminales mediante la *O*-metilación selectiva de las posiciones 3, 4 y 6 (derivado **GP-VII**). La posición 2, por su parte, se dejará sin modificar con objeto de no limitar drásticamente la solubilidad del glicopéptido resultante.

Finalmente, centraremos nuestra atención en la función acetamida presente en los residuos de α -D-GalNAc. Dicho fragmento está involucrado en el reconocimiento del hielo de acuerdo con el modelo solvofóbico de asociación postulado por Molinero y colaboradores.¹¹⁶ Además, podría jugar un papel importante como determinante de las preferencias conformacionales de los glicopéptidos, mediante su participación en interacciones polares. Teniendo ambas consideraciones en mente, concebimos tres modificaciones sencillas orientadas a modular tanto el potencial donador de enlaces de hidrógeno de las amidas como su carácter polar. Así, decimos incrementar la acidez de los NH amídicos reemplazando las funciones acetamida por tioacetamida (glicopéptido **GP-VIII**). Seguidamente, nos planteamos suprimir los grupos metilo reemplazando las funciones acetamida por formamida, para generar un derivado más polar (**GP-IX**). En tercer lugar, reemplazaremos las acetamidas por trifluoroacetamidas que también incrementan la acidez de los NH amídicos. Debe observarse, que dichos fragmentos portan grupos trifluorometilo cuyo carácter súper solvofóbico¹⁴⁰ podría en principio potencia la interacción del glicopéptido con el retículo cristalino del hielo. Más concretamente, abordaremos la preparación de los derivados **GP-X** y **GP-XI** equipados con 2 o 5 fragmentos de trifluoroacetamida, respectivamente.

Como es lógico, la preparación de los glicopéptidos modificados requerirá como primer paso la síntesis de los “*building blocks*” derivados de treonina correspondientes. Estos se emplearán en la preparación de glicopéptidos homogéneos o híbridos (es decir, sistemas que combinan en su estructura fragmentos naturales y no naturales), atendiendo tanto a criterios químicos como

de disponibilidad (ver capítulo 3). El carácter homogéneo o híbrido de los diversos sistemas planteados se detalla de modo esquemático en la Figura 2.1.

Como consideración final, debe observarse que el estudio estructural de los glicopéptidos modificados constituye un reto en sí mismo el tratarse de sistemas altamente degenerados por su carácter repetitivo. Con objeto de facilitar la interpretación de los datos espectroscópicos y analizar el efecto local que la glicosilación de las treoninas tiene sobre las preferencias conformacionales del sistema, decidimos ampliar nuestro análisis a modelos sencillos, integrados por una única triada -ATA- O-glicosilada con galactosa, GalNAc y derivados de este. Más concretamente, decidimos abordar la síntesis de los modelos mostrados en la Figura 2.2. Su caracterización espectroscópica mediante RMN permitirá clarificar el efecto estructural que la función acetamida y sus derivados trifluoroacetamida y tioacetamida ejercen sobre el entorno más inmediato de la treonina, información más difícilmente accesible en el contexto de glicopéptidos complejos.

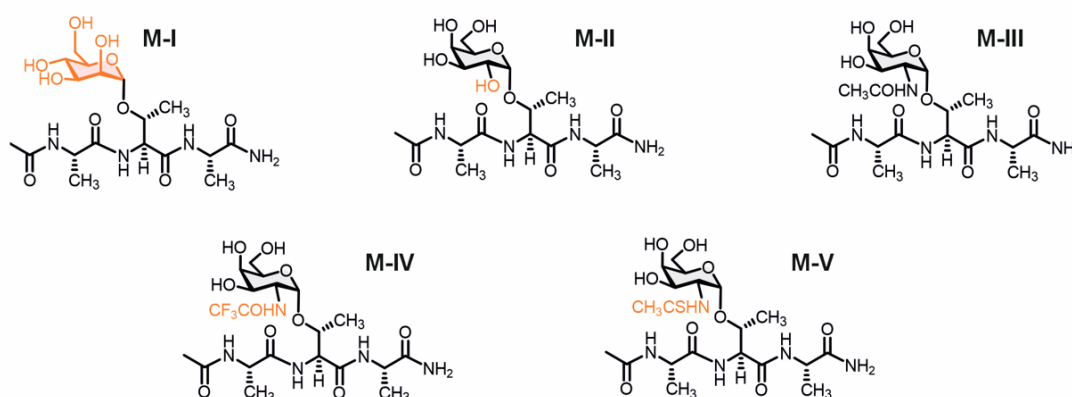


Figura 2.2.- Estructura química de los tripéptidos -ATA- O-glicosilados en la presente tesis doctoral.

En el siguiente capítulo (Capítulo 3) se describen las estrategias empleadas en la preparación de glicopéptidos no naturales (Figura 2.1) y modelos sencillos (Figura 2.2). A continuación, detallaremos las propiedades estructurales fundamentales de los derivados sintetizados, de acuerdo con datos espectroscópicos (Capítulo 4). En tercer lugar, se describirán las propiedades anticongelantes de los glicopéptidos no naturales planteados en el Capítulo 5 (datos obtenidos por el profesor S. Tsuda en la Universidad de Tokio). Finalmente, se discutirán los resultados obtenidos en el marco del actual debate científico relativo a las bases moleculares de la actividad crioprotectora. Los principales resultados de la presente tesis se resumen en el apartado de conclusiones (Capítulo 6).

CAPÍTULO 3.

MODIFICACIONES QUÍMICAS DE GLICOPÉPTIDOS ANTICONGELANTES Y SÍNTESIS DE MODELOS SENCILLOS

3. MODIFICACIONES QUÍMICAS DE GLICOPÉPTIDOS ANTICONGELANTES Y SÍNTESIS DE MODELOS SENCILLOS

3.1. GLICODIVERSIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DISACARÍDICO β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc

3.1.1. Síntesis de los glicopéptidos portadores de β -D-Man-(1-3)- α -D-GalNAc (GP-I) y de α -D-Man-(1-3)- α -D-GalNAc (GP-II)

La estructura de los glicopéptidos objetivo **GP-I** y **GP-II** se muestran en la Figura 3.1.

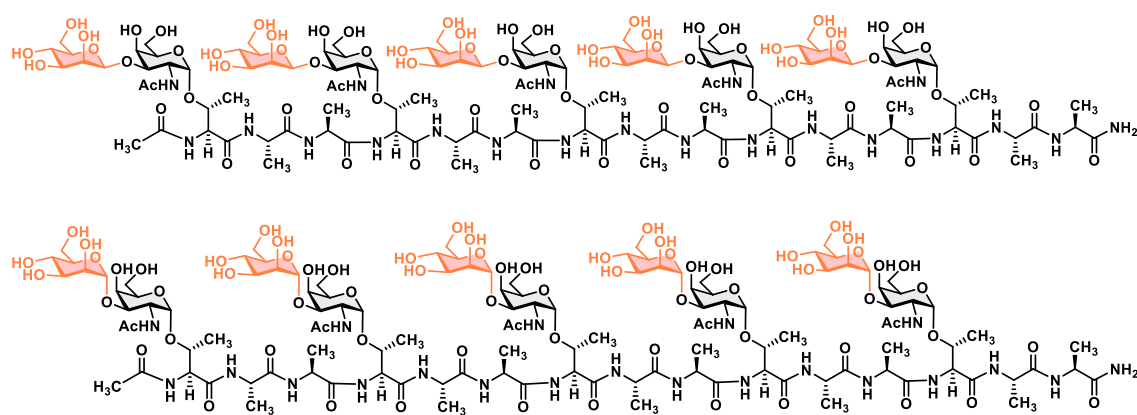
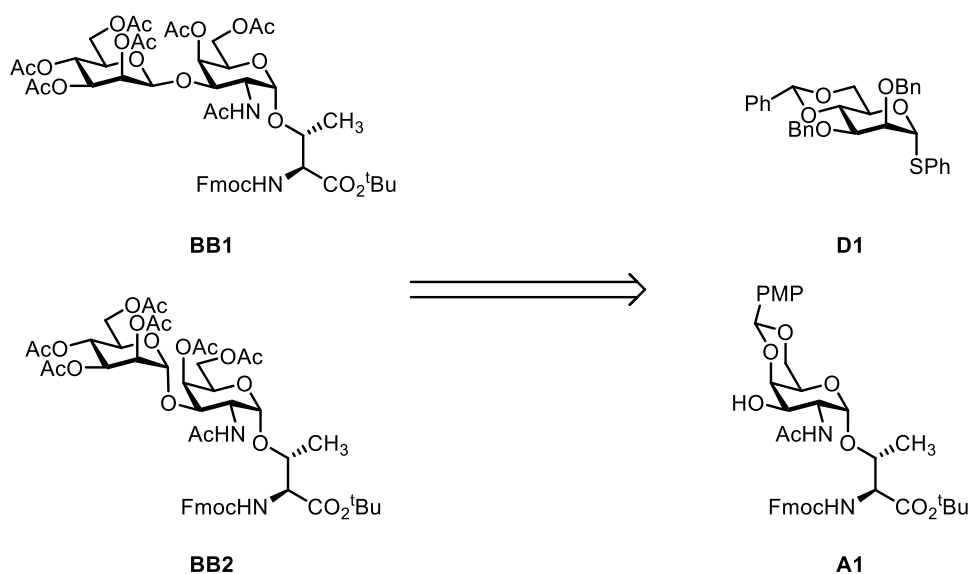


Figura 3.1.- Estructura química de los glicopéptidos objetivo **GP-I** (arriba) y **GP-II** (abajo).

El paso clave para su preparación es la obtención de los correspondientes “building blocks” de treonina glicosilados y adecuadamente funcionalizados para su incorporación en un protocolo de síntesis en fase sólida. A continuación, se detalla la estrategia empleada para la obtención de dichos derivados.

3.1.1.1. Síntesis de los “building blocks” derivados de β -D-Man-(1-3)- α -D-GalNAc y α -D-Man-(1-3)- α -D-GalNAc

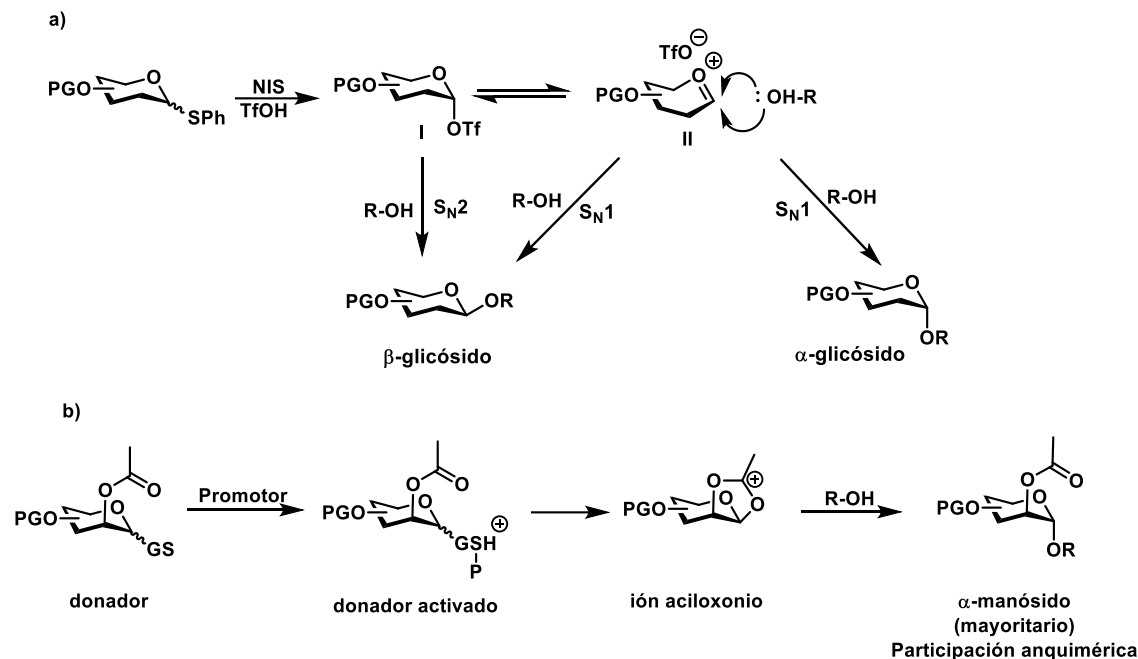
La estructura química de los derivados de treonina objetivo **BB1** y **BB2** se muestra en el Esquema 3.1.



Esquema 3.1.- Desconexión clave en el esquema retrosintético concebido para la preparación de los “building blocks” **BB1** y **BB2**.

Su preparación implica como paso clave una reacción de acoplamiento entre la especie donadora **D1** y el aceptor **A1**. En general, los donadores de manosa presentan una marcada tendencia a participar en procesos de glicosilación α -estereoselectivos. Dicho comportamiento es habitual incluso en ausencia de grupos protectores participantes en posición 2, y suele atribuirse al impedimento estérico selectivo que el grupo hidroxilo axial ejerce sobre la cara β de la piranosa. De acuerdo con esto, uno de nuestros principales retos en la preparación de los “building blocks” portadores de manosa es el de evitar una estereoselectividad excesivamente favorable al anómero α en el acoplamiento donador/aceptor. Teniendo esto en cuenta, nos decantamos por **D1** como especie donadora, previamente descrito por el profesor Crich.¹⁴¹ Dicho derivado porta en posición anomérica un grupo tiofenilo cuya activación con NIS en presencia de ácido trifluorometanosulfónico puede llevar a un α -glicosil triflato intermedio (**I**, Esquema 3.2a) capaz de evolucionar vía S_N2 , para dar el producto β , o generar un intermedio de tipo glicosil oxocarbenio (**II**, Esquema 3.2a) que es capturado por el aceptor en un proceso unimolecular S_N1 , generando el derivado α de manera mayoritaria. El objeto de la función benciliden en posiciones 4 y 6 es limitar la libertad conformacional del anillo de piranosa, evitando las distorsiones conformacionales que acompañan la formación del ion glicosil-oxocarbenio y, por tanto, favoreciendo los procesos de sustitución bimoleculares (S_N2) sobre los unimoleculares (S_N1). Por otra parte, se sabe que, en manosa, grupos participantes en la posición 2 del anillo de piranosa promueven la formación exclusiva del estereómero α mediante un proceso que implica su interacción directa con el centro anomérico para formar un ciclo de 5 miembros (Esquema 3.2b) y su posterior

apertura por el aceptor. Con objeto de evitar dicho efecto, se colocaron sustituyentes con grupos no participantes en posiciones 2 y 3 del anillo.

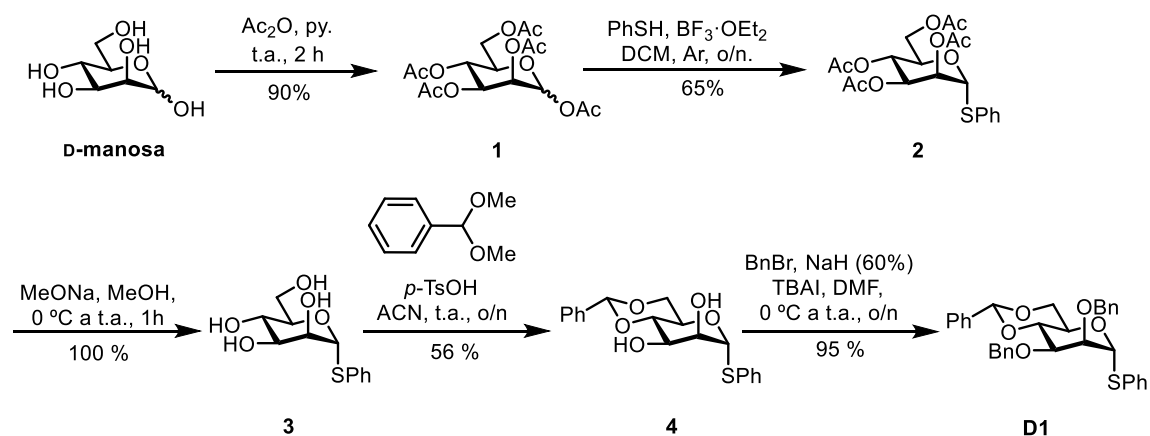


Esquema 3.2.- a) Intermedios clave en la reacción de acoplamiento de tioglicósidos con aceptores de glicosilo. b) Efecto de grupos participantes en posición 2 de manosa sobre la estereoselectividad del proceso.

Por lo que respecta a la especie aceptora nos decantamos por el derivado **A1** en base a antecedentes bibliográficos.¹⁴² A continuación, se detalla el procedimiento sintético empleado para la obtención de ambos compuestos.

3.1.1.1. Preparación del donador de manosa (D1)

Basándonos en la experiencia previa de nuestro grupo de investigación para la síntesis del donador **D1** seleccionamos la estrategia sintética mostrada en el Esquema 3.3.

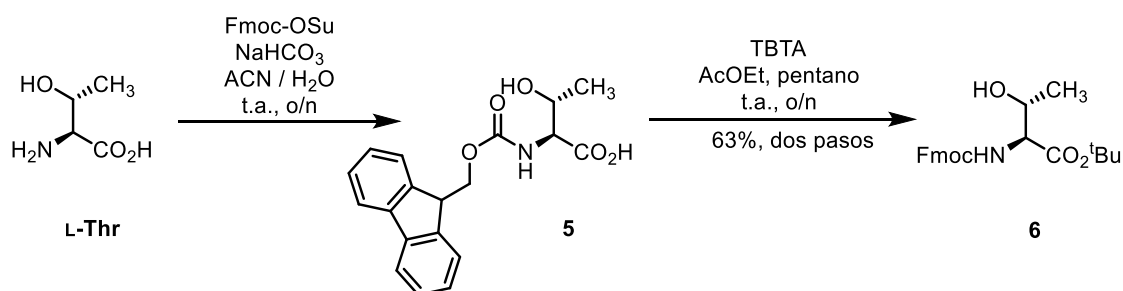


Esquema 3.3.- Procedimiento sintético empleado para la síntesis del donador **D1**.

A partir de D-manosa, se llevó a cabo una reacción de peracetilación para dar el compuesto **1** con un rendimiento óptimo. La etapa siguiente consistió en la introducción en posición anomérica de un grupo tiofenilo. Dicha transformación se consiguió mediante la reacción del compuesto **1** con tiofenol y trifluoruro de boro dietileterato como catalizador ácido, con un rendimiento del 65%. Cabe destacar que el proceso conduce de forma exclusiva al estereómero α como consecuencia del efecto de grupo participante ejercido por la función acetilo en posición 2 de la piranosa (Esquema 3.2b). Este método es una de las estrategias más extendidas para la introducción de tiofenilos anoméricos y presenta como ventaja el uso de reactivos de baja toxicidad.¹⁴³ El sustrato **2** fue sometido a continuación a un proceso de desacetilación en condiciones de Zemplen¹⁴⁴ para dar lugar al compuesto **3** con un rendimiento cuantitativo. Seguidamente, **3** fue tratado con benzaldehído dimetilacetal y ácido *p*-toluensulfónico catalítico, generándose el derivado conformacionalmente restringido **4** con rendimientos moderados. Finalmente, llevamos a cabo la protección de las funciones hidroxilo mediante una reacción de *O*-bencilación. Dicho proceso se llevó a cabo por tratamiento con bromuro de bencilo, yoduro de tetrabutilamonio e hidruro de sodio en DMF para generar el donador **D1** con buenos rendimientos. En dicha reacción, el yoduro de tetrabutilamonio actúa como catalizador, participando en un ataque de tipo S_N2 sobre el bromuro de bencilo *in situ* para generar yoduro de bencilo que ejerce, en un segundo paso, como agente bencilante.

3.1.1.1.2. Preparación del aceptor derivado de α -D-GalNAc-L-Thr (**A1**)

La síntesis de la especie aceptora **A1** comienza con la preparación del derivado de treonina **6**, cuyas funciones amino y carboxilo se hayan protegidas mediante grupos Fmoc y *t*-butiléster respectivamente (Esquema 3.4).

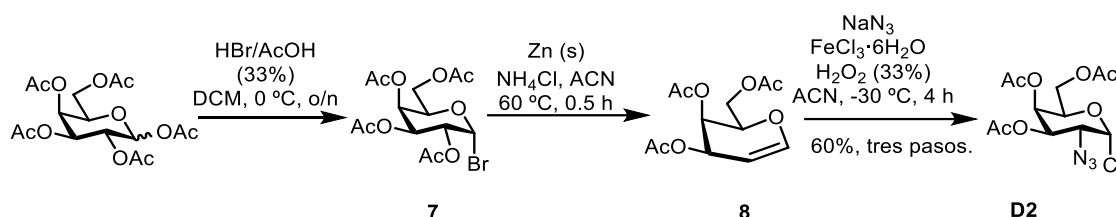


Esquema 3.4.- Procedimiento sintético empleado para la preparación de la especie aceptora **6** a partir de L-treonina comercial.

Así, partiendo de L-treonina comercial, se procedió a la protección en un primer paso de la función amino utilizando Fmoc-OSu en medio básico, para dar **5**. Dicho compuesto se hizo reaccionar, a continuación, sin previa purificación con tricloroacetimidato de *tert*-butilo (TBTA) en una mezcla de acetato de etilo y

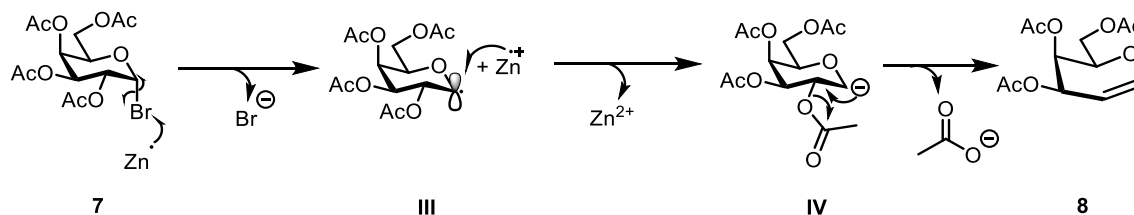
pentano a temperatura ambiente, obteniéndose el derivado **6** con un rendimiento del 63% para los dos pasos.

La siguiente etapa consiste en una glicosilación de la cadena lateral de treonina con un donador de galactosa convenientemente funcionalizado. Con dicho propósito se hizo uso del donador peracetilado **D2** portador de un cloro anomérico y una función azida en posición 2, que por su naturaleza no participante debiera favorecer, en principio, la formación preferente del estereoisómero α en la reacción de acoplamiento. El procedimiento empleado en la preparación del derivado **D2** se representa en el Esquema 3.5.



Esquema 3.5.- Procedimiento sintético empleado para la preparación del donador **D2 a partir de D-galactosa peracetilada comercial.**

Dicho proceso comienza con el tratamiento del derivado de D-galactosa peracetilado comercial con ácido bromhídrico en diclorometano a una temperatura de 0 °C, lo que conduce a la formación del compuesto **7** portador de un átomo de bromo anomérico. Este intermedio fue sometido sin purificación previa a un tratamiento con Zn y cloruro amónico en acetonitrilo a una temperatura de 60 °C durante 30 minutos para la obtención del glicial **8**.¹⁴⁵ El mecanismo de dicha reacción aparece reflejado en el Esquema 3.6.

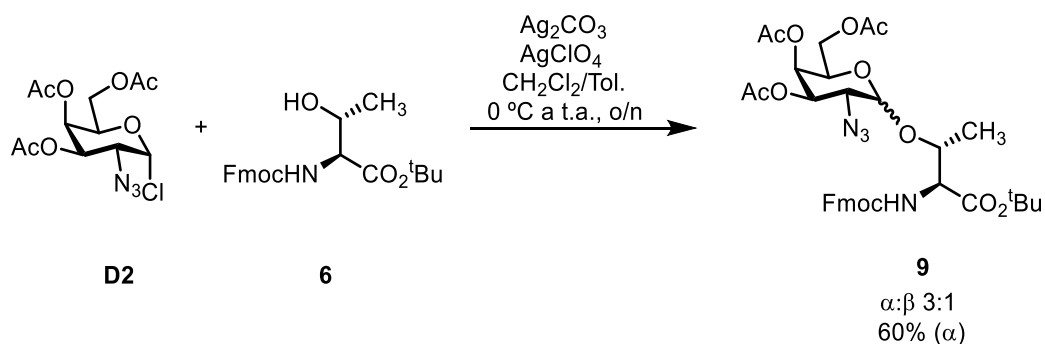


Esquema 3.6.- Mecanismo comúnmente aceptado para la síntesis del glicial **8 a partir del derivado bromado **7**.**

De acuerdo con este, en un primer paso el Zn cede un electrón al átomo de bromo, produciendo la rotura homolítica del enlace C-Br y generándose un anión bromuro, un catión radical $\text{Zn}^{\cdot+}$ y un radical anomérico (**III**). Seguidamente se produce la cesión de un segundo electrón por parte del $\text{Zn}^{\cdot+}$ al radical anomérico, liberándose Zn^{2+} y un carbanión anomérico (**IV**), que evoluciona expulsando el grupo acetato en posición 2 para formar el glicial deseado **8**.¹⁴⁶ Dicho glicial fue tratado con una mezcla de azida sódica y tricloruro de hierro hexahidratado en

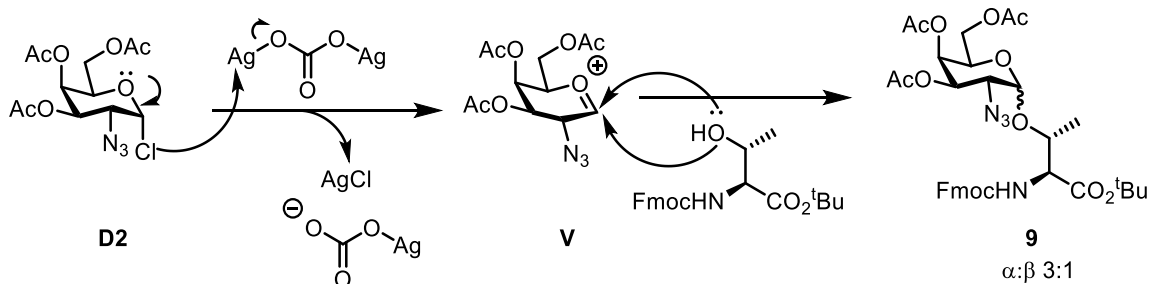
medio oxidante a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ para obtener el donador **D2** con un rendimiento moderado del 60% para los tres pasos.¹⁴⁷

Seguidamente se procedió al acoplamiento del donador **D2** con la especie aceptora **6** recurriendo para ello a las condiciones de Koenigs Knorr.¹⁴⁸ En esta reacción utilizamos carbonato de plata y perclorato de plata como activantes del proceso, y se empleó una mezcla de diclorometano y tolueno como disolventes. La reacción resultó en la formación del aducto **9** con rendimientos aceptables (60% en el anómero α) y una estereoselectividad 3:1 en favor del anómero deseado α (Esquema 3.7). Desafortunadamente, éste no pudo ser purificado por completo en este punto y solo pudo ser separado del estereoisómero minoritario β en la etapa posterior de la síntesis.



Esquema 3.7.- Reacción de acoplamiento entre el donador **D2** y el aceptor de treonina **6** empleada para la obtención del aducto **9**.

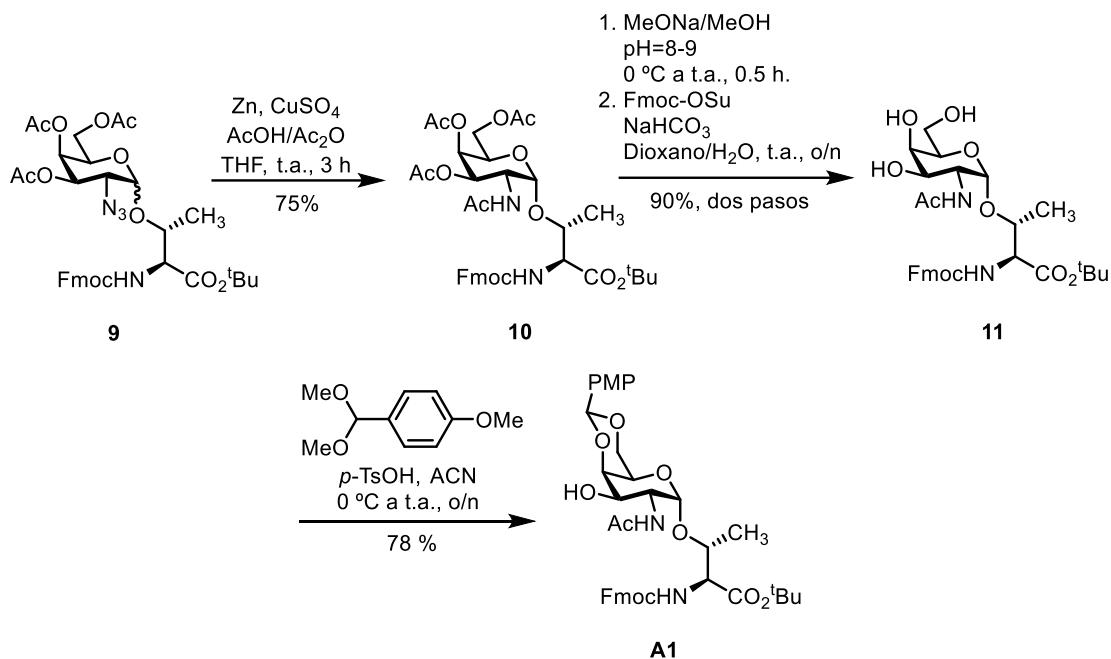
El mecanismo general comúnmente aceptado para las reacciones de acoplamiento entre un haluro de glicosilo y un nucleófilo en condiciones de Koenigs-Knorr se representa en el Esquema 3.8.



Esquema 3.8.- Mecanismo comúnmente aceptado para las reacciones de acoplamiento entre un haluro de glicosilo con grupo no participante en 2 y un nucleófilo en condiciones de Koenigs-Knorr.

De acuerdo con dicho mecanismo el cloruro de glicosilo reacciona en un primer paso con el carbonato de plata, generando el ión oxocarbenio (**V**) y liberándose cloruro de plata y carbonato de plata en forma aniónica. Seguidamente, el nucleófilo ataca la posición anomérica por cualquiera de las dos caras de la

piranosa, mediante un mecanismo S_N1 , generando el aducto **9**. En nuestro caso, la naturaleza no participante de la función azida favorece la formación mayoritaria del estereoisómero más estable α . A fin de obtener el aceptor final **A1**, fueron precisas varias reacciones adicionales de protección/desprotección orientadas a diferenciar la posición 3 del anillo de galactosa. Dichas etapas se detallan en el Esquema 3.9.



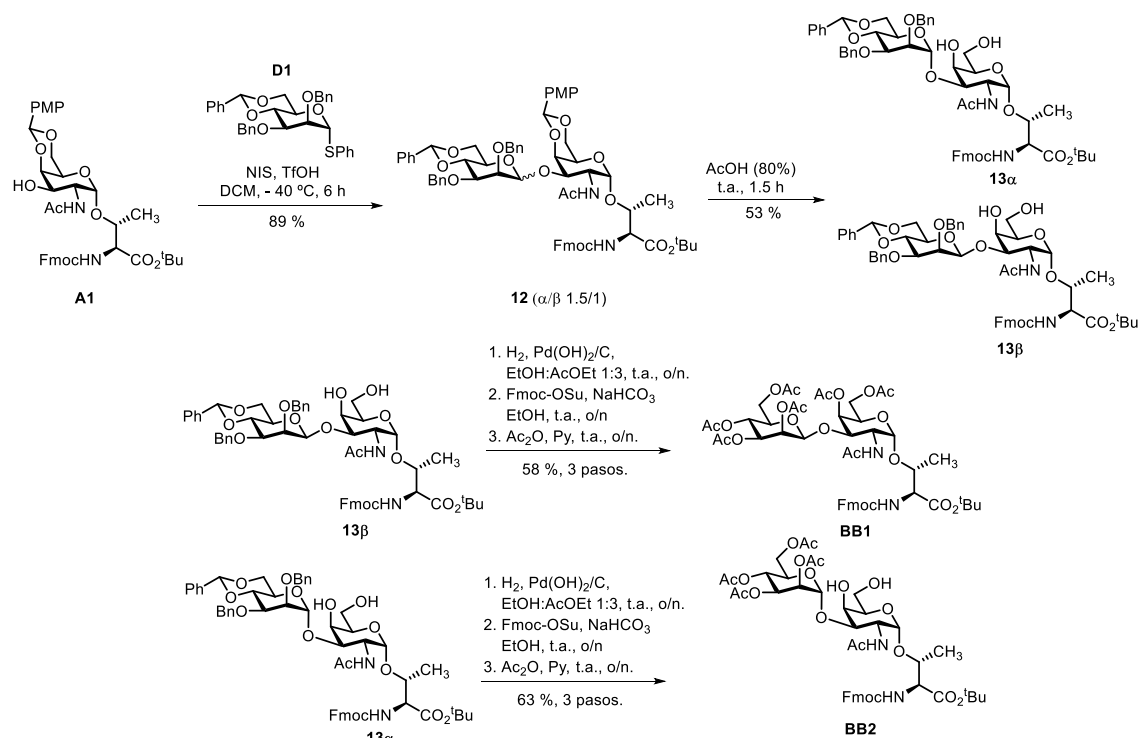
Esquema 3.9.- Secuencia de reacciones empleadas para la obtención del aceptor **A1** a partir del derivado **9**.

Así, partiendo de **9** llevamos a cabo una reducción de la función azida, seguida de una acetilación *in situ* de la amina resultante para obtener el compuesto **10** con un rendimiento del 75%. Es importante destacar que tras esta etapa se pudieron separar los anómeros α/β obtenidos tras la glicosilación del aceptor **6** (Esquema 3.7) continuando el esquema sintético únicamente con el derivado α . Seguidamente se eliminaron los grupos acetato por tratamiento con metóxido sódico en metanol. El medio básico empleado tuvo como efecto adverso la eliminación adicional de la función Fmoc que tuvo que ser reintroducida en un paso posterior, empleando las condiciones ya detalladas previamente (Esquema 3.4), para obtener el derivado **11**, equipado con tres funciones hidroxilo libres.

Para finalizar, las posiciones 4 y 6 de la piranosa fueron protegidas mediante un tratamiento con p -anisaldehído dimetilacetal en acetonitrilo, utilizando $p\text{-TsOH}$ como catalizador, obteniéndose el derivado **A1** con un rendimiento del 78%.

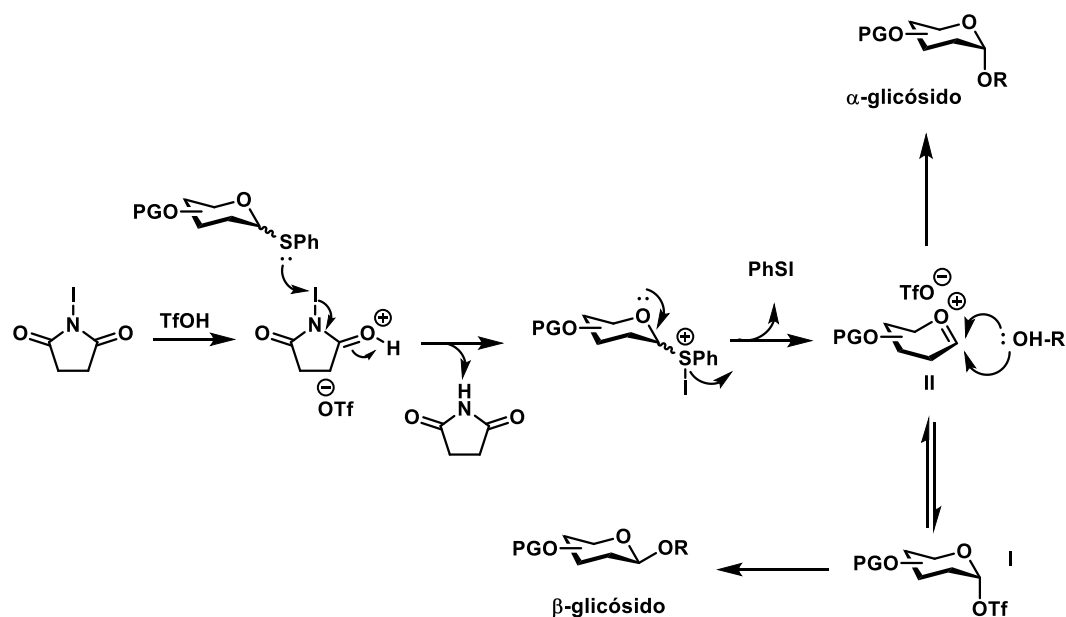
3.1.1.1.3. Reacción de acoplamiento D1/A1 y transformaciones posteriores

A partir de los derivados **D1** y **A1** se abordó la preparación de los “*building blocks*” objetivo, empleando para ello la ruta sintética detallada en el Esquema 3.10.



Esquema 3.10.- Procedimiento sintético empleado para la obtención de los “*building blocks*” **BB1 y **BB2** a partir del donador **D1** y el aceptor **A1**.**

El proceso comienza con una reacción de glicosilación entre el donador de manosa **D1** y el aceptor derivado de treonina **A1** en diclorometano, utilizando como promotores ácido trifílico y *N*-iodosuccinimida. La adición de los promotores se realizó a -40 °C. Dichas condiciones se mantuvieron hasta la completa transformación del donador, monitorizada mediante cromatografía en capa fina. El mecanismo general comúnmente aceptado para esta reacción se encuentra detallado en el Esquema 3.11.¹⁴⁹



Esquema 3.11.- Mecanismo comúnmente aceptado para la obtención de glicósidos mediante la activación de la especie donadora con NIS y TfOH.

Así, en un primer paso se produce la protonación de la *N*-iodosuccinimida por acción del ácido trifílico. En este punto, el par electrónico libre del azufre del tioglicósido reacciona con el yodo de la NIS, generando una especie catiónica activada que evoluciona para generar un catión oxocarbenio, tras la salida del sustituyente anomérico. Finalmente, el aceptor ataca la posición anomérica tanto por la cara α como por la cara β , siendo la primera la más favorable en donadores de manosa debido al efecto estérico ejercido por el sustituyente axial de la posición 2. Así mismo, en las condiciones empleadas también es posible la generación de un α -glicosil triflato intermedio capaz de evolucionar vía S_N2 , para dar el producto β . En cualquier caso, la proporción final de estereoisómeros depende de varios factores adicionales como la naturaleza del aceptor, los grupos protectores empleados, el disolvente o la temperatura.^{150–153} En nuestro caso, la selección de un donador conformacionalmente restringido equipado con un grupo no participante en posición 2 tiene como objetivo amortiguar la tendencia natural de la manosa a generar productos de glicosilación mayoritarios α , tal y como se ha mencionado con anterioridad (apartado 3.1.1).

En las condiciones descritas la reacción condujo a una mezcla de productos de glicosilación α/β en proporción 1.5/1, que no pudieron ser separados en esta etapa mediante procedimientos cromatográficos convencionales. A continuación, ambos productos fueron tratados con una mezcla de AcOH/H₂O (80/20) a temperatura ambiente para eliminar el grupo *p*-metoxibenciliden de las posiciones 4 y 6 del anillo de GalNAc, generando los compuestos **13 α** y **13 β** , que pudieron ser separados en esta etapa. Seguidamente, y por separado, ambos fueron

sometidos a una hidrogenación catalizada por $\text{Pd}(\text{OH})_2$ que nos permitió eliminar tanto los grupos bencilo como la función benciliden, lo cual llevó inevitablemente a la eliminación adicional no deseada del grupo Fmoc que tuvo que ser reintroducido en un segundo paso utilizando Fmoc-OSu en medio básico en una mezcla de dioxano y agua. Finalmente, los intermedios resultantes fueron acetilados sin purificación previa para dar los “*building blocks*” finales **BB1** y **BB2**.

3.1.1.2. Síntesis en fase sólida de los glicopéptidos portadores de β -D-Man-(1-3)- α -D-GalNAc (GP-I) y de α -D-Man-(1-3)- α -D-GalNAc (GP-II)

Una vez sintetizados los “*building blocks*” derivados de β -D-Man-(1-3)- α -D-GalNAc y α -D-Man-(1-3)- α -D-GalNAc (**BB1** y **BB2**) se procedió a la preparación de los glicopéptidos **GP-I** y **GP-II** mostrados en la Figura 2. Estos se obtuvieron haciendo uso de un sintetizador en fase sólida “Liberty Blue” asistido por microondas análogo al mostrado en la Figura 3.2.



Figura 3.2.- Sintetizador Liberty Blue similar al utilizado para la realización de este trabajo.

Como primera consideración, es preciso mencionar que, a diferencia de los “*building blocks*” comerciales derivados de alanina, los derivados de treonina **BB1** y **BB2** fueron acoplados manualmente, prescindiendo del sintetizador automático en estos casos. La razón de dicha elección es que tanto **BB1** como **BB2** son productos sintéticamente costosos, resultado de un buen número de etapas sintéticas, y por tanto es deseable limitar el número de equivalentes necesarios para realizar cada acoplamiento.¹⁵⁴

De manera general, la síntesis en fase sólida de las secuencias deseadas procede del extremo *C*-terminal al extremo *N*-terminal, al contrario que la síntesis biológica de proteínas, y como soporte sólido se emplean diversos tipos de resinas. En nuestro caso se empleó la resina *Rink-Amide MBHA*, cuyo conector se muestra en la Figura 3.3b.

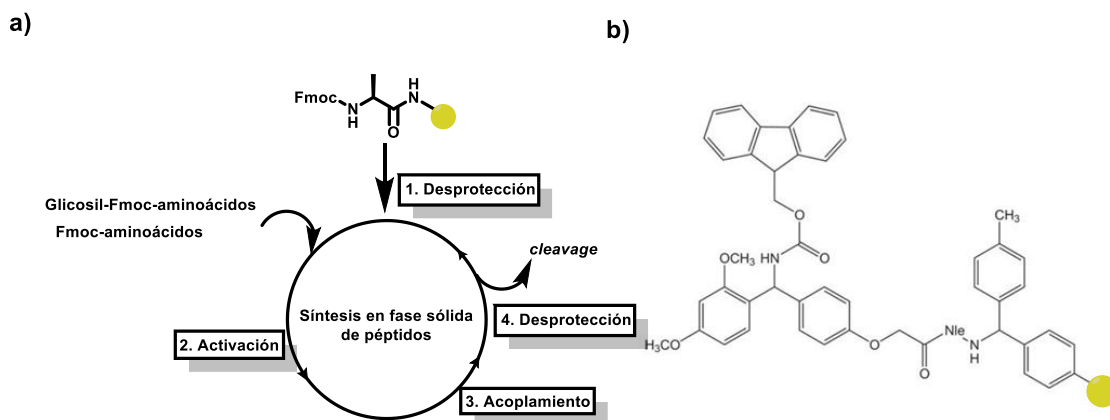


Figura 3.3.- a) Esquema sencillo del protocolo de síntesis en fase sólida de péptidos. b) Resina *Rink-Amide-MBHA* utilizada para la síntesis de los glicopéptidos presentes en esta tesis doctoral.

Así, la incorporación del primer residuo a la resina comporta, en un primer lugar, un tratamiento con piperidina (20% en DMF) para eliminar el grupo Fmoc de esta. A continuación, se realiza el acoplamiento del primer residuo de Fmoc-alanina haciendo uso del sintetizador de manera automática, utilizando Oxima y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) como agentes de acoplamiento y microondas como fuente de calefacción. La incorporación del segundo residuo de alanina sigue un procedimiento análogo consistente en un primer lugar de la desprotección del grupo α -amino para, a continuación, llevar a cabo la reacción de acoplamiento del segundo residuo de Fmoc-alanina, tal y como se muestra en la Figura 3.3a. Para la incorporación de la unidad de treonina glicosilada, en un primer lugar se procedió a la eliminación del grupo protector t Bu mediante el tratamiento de los correspondientes “*building blocks*” con una mezcla de TFA y DCM (1:1) con el objetivo de dejar el ácido carboxílico libre para el acoplamiento. A continuación, y tras la eliminación del grupo Fmoc de la alanina previamente unida a la resina, dicho acoplamiento se realizó de manera manual y en ausencia de microondas mediante el empleo de DIC, oxima y DIPEA en DMF a temperatura ambiente. Cabe destacar que la incorporación del residuo de treonina glicosilada requiere tiempos de acoplamiento más largos, que van creciendo a medida que se elonga la cadena peptídica. Una vez completada la síntesis de la primera repetición C-AAT-*N*, este procedimiento se repitió cuatro veces adicionales para obtener la secuencia completa del glicopéptido.

Así, una vez completada, y como etapa final, se realizó una reacción de acetilación del extremo N-terminal para evitar la presencia de cargas positivas en el glicopéptido una vez disuelto en agua y simular la continuación del esqueleto peptídico. A continuación, se eliminaron los grupos acetato tratando la resina con 10 ciclos de NH_2NH_2 / MeOH (7:3). Seguidamente, los glicopéptidos se liberaron de la resina, usando una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA), triisopropilsilano (TIS) y agua en proporciones 95:2.5 :2.5. El último paso consistió en una etapa de precipitación con éter dietílico frío, seguido de un proceso de centrifugación, para la recuperación del precipitado.

Finalmente, los crudos de los péptidos **GP-I** y **GP-II** obtenidos fueron purificados por HPLC, liofilizados y su estructura química confirmada mediante una combinación de MALDI-TOF, HRMS (ESI^+) y Resonancia Magnética Nuclear. Por su parte, la caracterización estructural de los mismos mediante RMN se detalla en los apartados 7.5.1 y 7.5.2.

3.1.2. Síntesis del glicopéptido portador de β -D-Glc-(1-3)- α -D-GalNAc (GP-III)

La estructura del glicopéptido **GP-III** se muestran en la Figura 3.4.

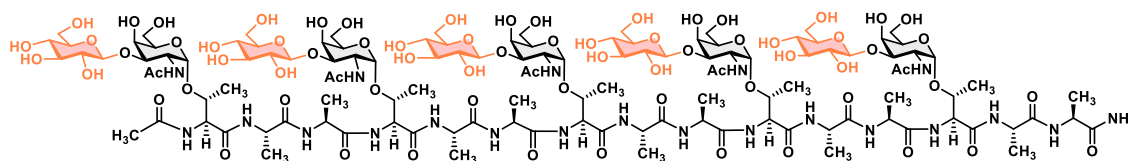
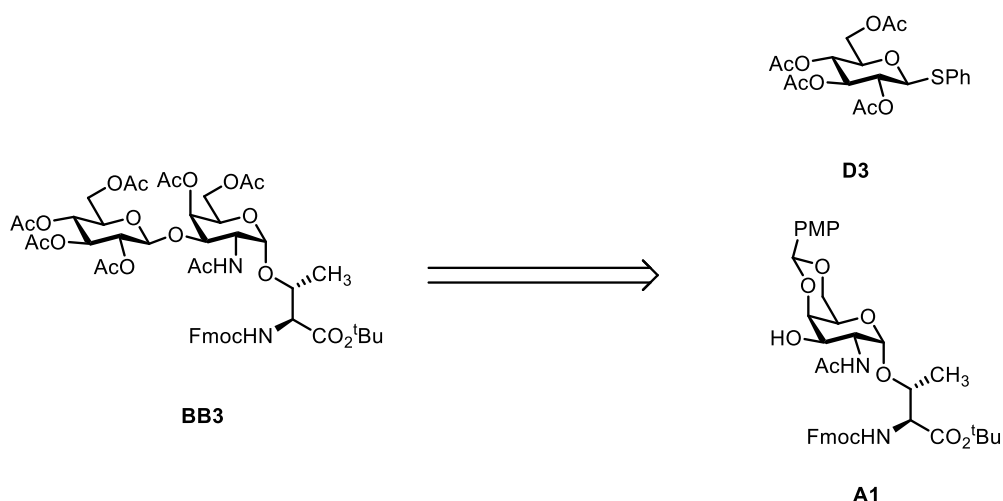


Figura 3.4.- Estructura química del glicopéptido objetivo GP-III.

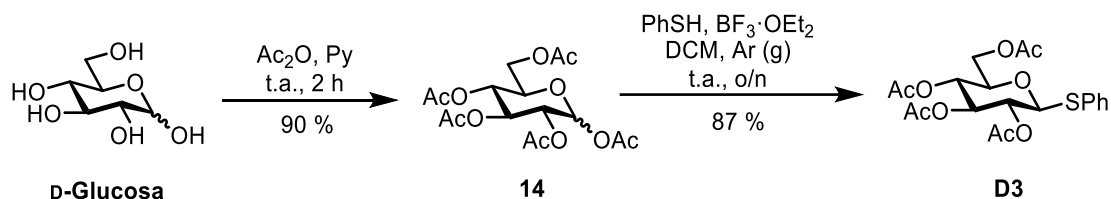
Para su preparación fue preciso, primeramente, abordar la síntesis del “building block” **BB3**, equipado con una unidad de glucosa como extremo no reductor. Dicho intermedio fue sintetizado recurriendo como paso clave al acoplamiento entre el aceptor común **A1**, cuya preparación ya se ha descrito en el apartado 3.1.1.1.2, y la especie donadora **D3**, portadora de un grupo tiofenilo en posición anomérica (Esquema 3.12).



Esquema 3.12.- Desconexión clave en la retrosíntesis concebida para la preparación del “building block” **BB3**.

Cabe destacar nuevamente la importancia del grupo participante en posición 2 del anillo de piranosa, que en este caso concreto debe servir a nuestros intereses dirigiendo la reacción hacia la formación mayoritaria del aducto deseado β (Esquema 3.2b). A continuación, se describe brevemente el procedimiento sintético empleado para la preparación del donador **D3**.

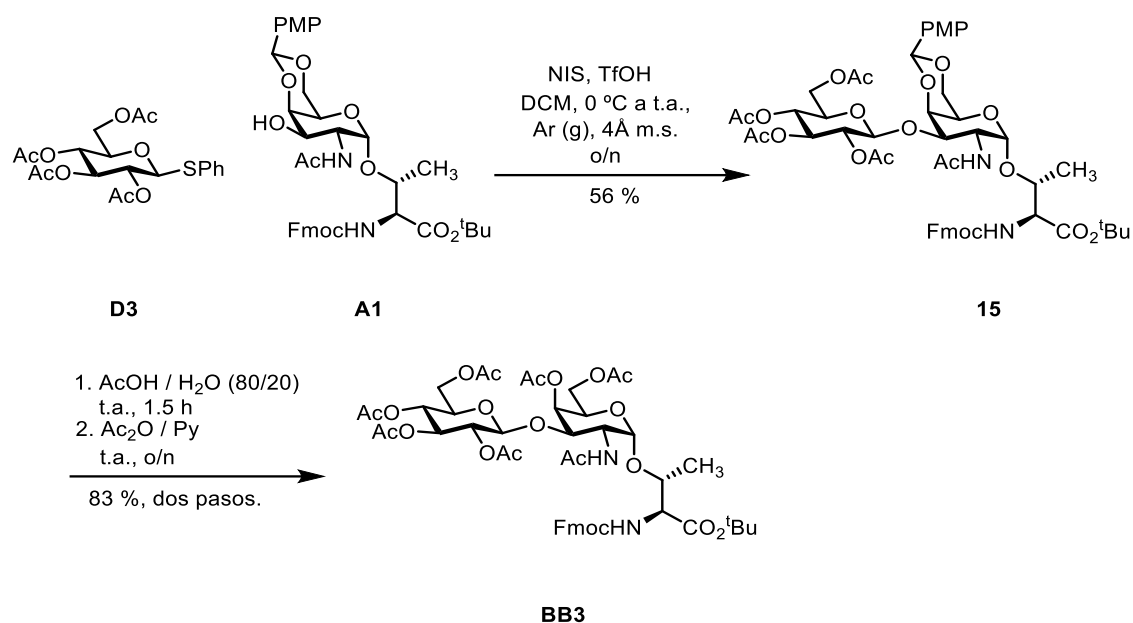
Con base a protocolos utilizados previamente en nuestro grupo de investigación se llevó a cabo la síntesis del donador **D3** en dos pasos tal y como se detalla en el Esquema 3.13.



Esquema 3.13.- Procedimiento sintético empleado para la síntesis del donador **D3**.

Así, a partir de D-glucosa comercial, realizamos una reacción de peracetilación para dar el compuesto **14** con excelente rendimiento. La siguiente etapa consistió en la funcionalización de la posición anomérica con un grupo tiofenilo. Dicha transformación se consiguió mediante el tratamiento de **14** con tiofenol y trifluoruro de boro dietileterato como catalizador ácido, obteniéndose el donador **D3** con un rendimiento del 87%.

A partir del donador **D3** y del aceptor **A1**, se abordó la síntesis del “building block” objetivo (**BB3**), empleando para ello la secuencia de tres pasos detallada en el Esquema 3.14.



Esquema 3.14.- Procedimiento sintético empleado para la obtención del “building block” BB3 a partir de los intermedios D3 y A1.

El proceso se inicia con una reacción de glicosilación entre el tioglicósido **D3** y el aceptor derivado de treonina **A1** en diclorometano anhidro, empleando como promotores *N*-iodosuccinimida y ácido trifílico. Cabe mencionar que dicho acoplamiento involucra un donador desarmado, por la presencia de las funciones acetato y un aceptor igualmente poco reactivo, debido a la presencia del grupo acetamida en posición 2 de la piranosa. Ello nos obligó a emplear condiciones de reacción enérgicas y relativamente poco habituales en glicosilaciones. Así, el acoplamiento transcurrió a una temperatura de 0 °C que posteriormente se dejó subir a temperatura ambiente, prolongando dichas condiciones durante toda la noche, periodo tras el cual se observó la completa transformación del donador mediante cromatografía en capa fina.

En las condiciones descritas la reacción condujo, de modo exclusivo, al producto de glicosilación β (**15**), que fue purificado por cromatografía en columna. Finalmente, **15** fue tratado con una mezcla de AcOH/H₂O (80/20) con objeto de eliminar el grupo *p*-metoxibenciliden de las posiciones 4 y 6 del anillo de GalNAc. El producto de reacción se hizo reaccionar, sin purificación previa, con anhídrido acético y piridina para obtener el “building block” final **BB3** con un rendimiento del 83% en los dos pasos.

A partir de **BB3**, el glicopéptido **GP-III** portador de glucosa se preparó empleando un procedimiento experimental enteramente análogo al previamente descrito para los glicopéptidos portadores de manosa **GP-I** y **GP-II** (Apartado 3.1.1.2).

3.1.3. Síntesis del glicopéptido portador de 4-desoxi- β -D-Glc-(1-3)- α -D-GalNAc (GP-IV).

Una vez obtenido el glicopéptido **GP-III** se abordó la preparación del glicopéptido **GP-IV**, equipado con unidades de 4-desoxi- β -D-Glc-(1-3)- α -D-GalNAc (Figura 3.5). Con dicho objetivo procedimos, en un primer lugar a la síntesis del “building block” **BB4**.

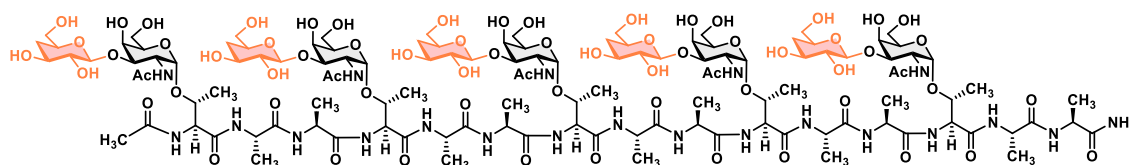
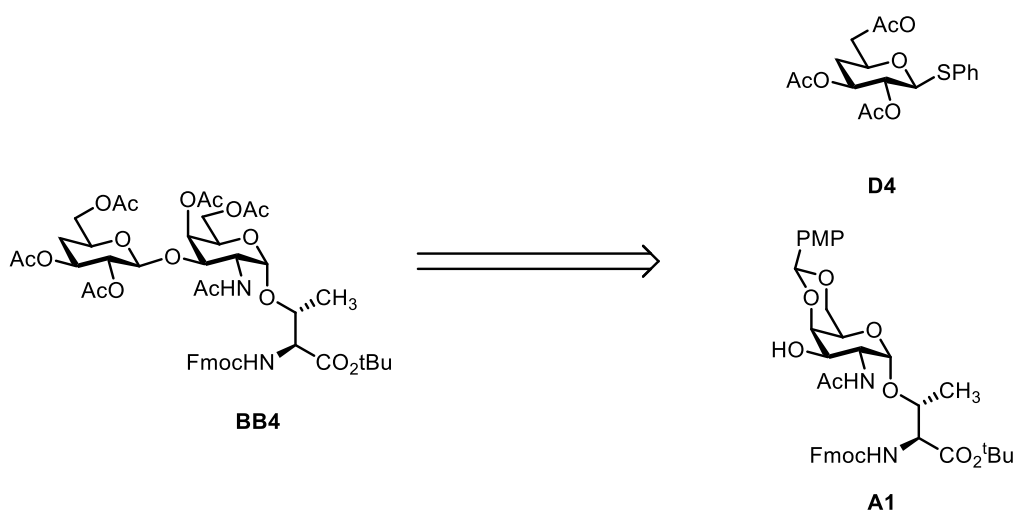


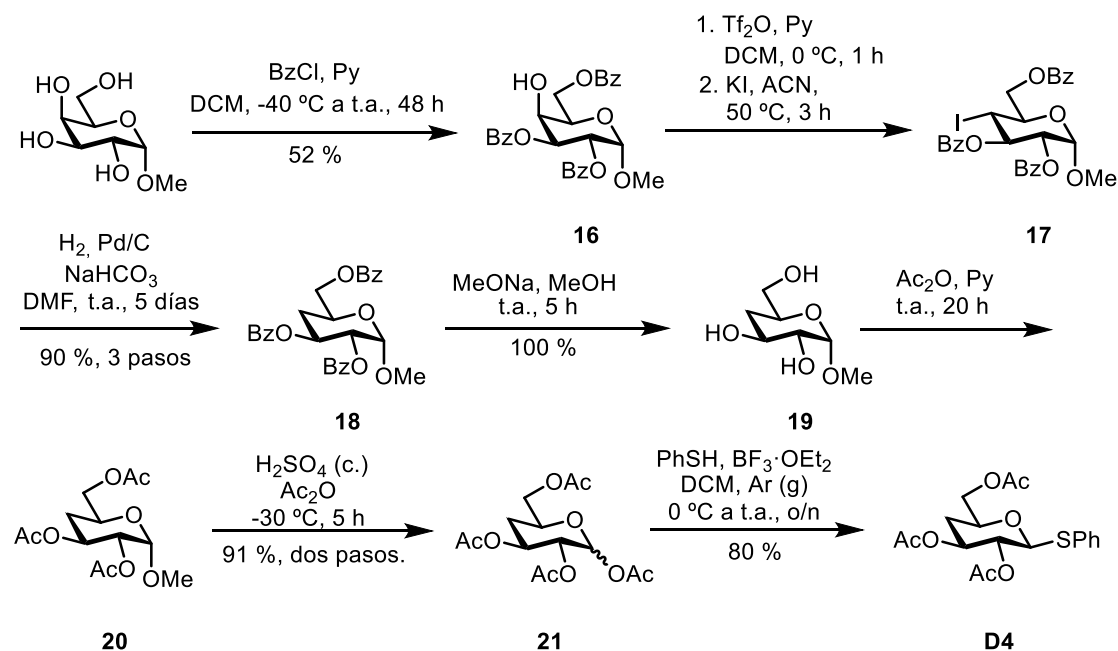
Figura 3.5.- Estructura química del glicopéptido objetivo GP-IV.

Nuevamente, el paso clave en la estrategia empleada implica una reacción de acoplamiento entre la especie aceptora **A1**, previamente descrita, y el derivado de 4-desoxi-glucosa **D4**. Teniendo en cuenta los resultados favorables obtenidos en la preparación de los “building blocks” anteriores, seleccionamos nuevamente un donador de tipo tiofenilo equipado con un grupo participante en posición 2 (Esquema 3.15).



Esquema 3.15.- Desconexión clave de la retrosíntesis concebida para la preparación del “building block” BB4.

Con objeto de preparar el donador **D4** fue preciso en primer lugar diferenciar la posición 4 de la piranosa, eliminando a continuación la función hidroxilo. El protocolo sintético empleado a tal efecto se describe en el Esquema 3.16.



Esquema 3.16.- Procedimiento sintético empleado para la síntesis del donador D4.

Así, partiendo de metil- α -D-galactopiranosido comercial, se llevó a cabo una reacción de benzoilación selectiva en las posiciones 2, 3 y 6 del anillo. Este proceso se realizó mediante el tratamiento de este con 3.3 equivalentes de cloruro de benzoílo en piridina a baja temperatura, lo que nos permitió acceder al intermedio **16** con un rendimiento del 52%.¹⁵⁵ La selectividad observada es simplemente un reflejo de la reactividad relativa de las diferentes posiciones de la piranosa, acentuada por el carácter relativamente voluminoso de los grupos benzoílo y las condiciones empleadas de baja temperatura. Así, es comúnmente aceptado que el hidroxilo en posición 6 suele ser más accesible y, por tanto, más reactivo. Por lo que respecta al resto de los hidroxilos, todos ellos en posiciones secundarias, aquellos cuya orientación es ecuatorial presentan habitualmente un mayor carácter nucleofílico.

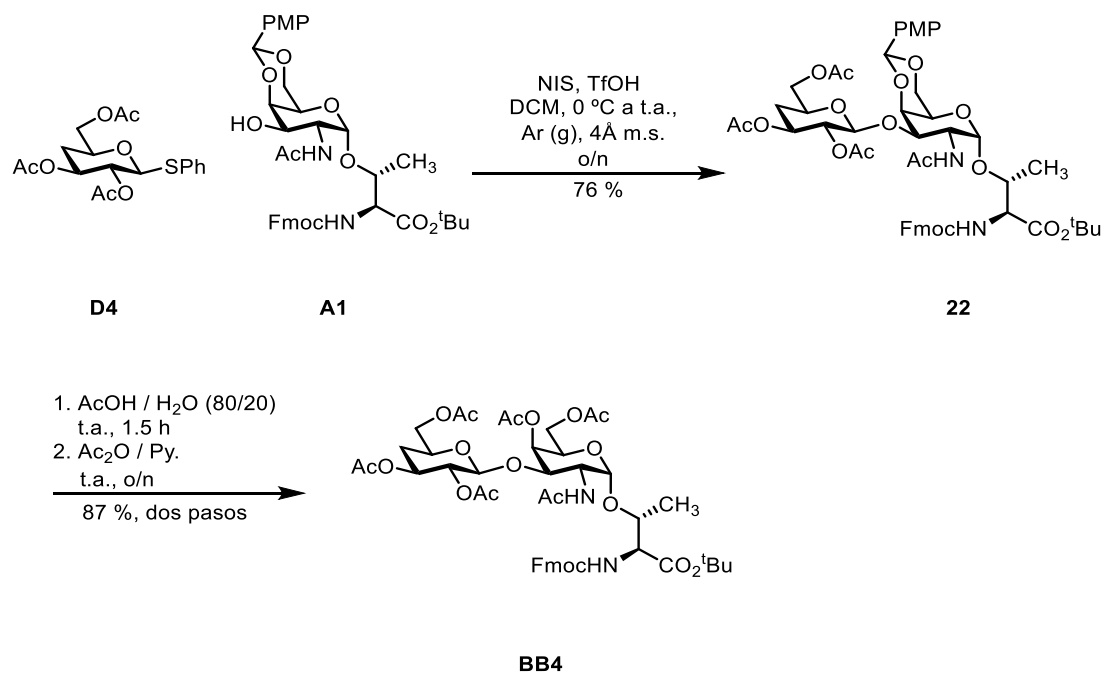
A continuación, procedimos a la activación del hidroxilo libre presente en **16** mediante un tratamiento con anhídrido triflico y piridina, para dar el derivado triflado correspondiente. En un segundo paso llevado a cabo *in situ*, el grupo triflato fue desplazado por yoduro, empleando para ello yoduro potásico en acetonitrilo a 50°C . Dicha reacción transcurre con inversión de la configuración, como corresponde a un mecanismo de sustitución nucleófila bimolecular para dar el derivado **17**. Seguidamente, se procedió a la hidrogenólisis del compuesto **17** utilizando Pd/C como catalizador y bicarbonato de sodio como base, lo que nos permitió acceder al compuesto desoxigenado **18**.¹⁵⁶ A partir del mismo, el donador final fue obtenido recurriendo a una serie de etapas de protección/desprotección

convencionales, seguidas de la incorporación final de la función tiofenilo en posición anomérica.

Así, en un primer lugar, se trató el derivado **18** en condiciones de Zemplén para obtener el compuesto desbenzoilado **19**. Seguidamente, este se acetiló empleando una mezcla de anhídrido acético y piridina para generar el compuesto **20** que, sin purificación previa, fue sometido a un tratamiento de acetólisis catalizada por ácido sulfúrico en presencia de anhídrido acético a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, aislándose el compuesto peracetilado **21** con un rendimiento del 91% en los dos pasos.

Finalmente, se procedió a la funcionalización de la posición anomérica del derivado **21** con un grupo tiofenilo. Esto se consiguió mediante el tratamiento con tiofenol y trifluoruro de boro dietileterato en diclorometano, generándose el donador deseado **D4** con un rendimiento del 80%.

Utilizando como sustratos de partida el donador **D4** y el aceptor **A1**, se procedió a la síntesis del “building block” objetivo (**BB4**) siguiendo la secuencia de reacciones mostrada en el Esquema 3.17.



Esquema 3.17.- Procedimiento sintético empleado para la obtención del “building block” **BB4** a partir de los fragmentos **D4** y **A1**.

El procedimiento empleado es enteramente análogo al descrito para la obtención del “building block” **BB3**. Así, en un primer paso se realizó una reacción de glicosilación entre el donador **D4**, desoxigenado en posición 4, y el aceptor **A1**. La reacción transcurrió con un rendimiento del 76%, para dar el disacárido

intermedio **22** con total estereoselectividad. Seguidamente, se eliminó el grupo bencilidén por tratamiento con ácido acético acuoso y finalmente se acetilaron todas las funciones hidroxilo empleando anhídrido acético y piridina, obteniéndose el compuesto final **BB4** con un rendimiento del 87% en los dos pasos. A partir del **BB4**, el glicopéptido portador de 4-desoxi-glucosa **GP-IV** se preparó empleando un procedimiento experimental análogo al previamente descrito para los glicopéptidos portadores de manosa **GP-I** y **GP-II**.

3.1.4. Síntesis del glicopéptido híbrido portador de β -D-All-(1-3)- α -D-GalNAc y β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc (**GP-V**)

La estructura del glicopéptido **GP-V** se muestra en la Figura 3.6.

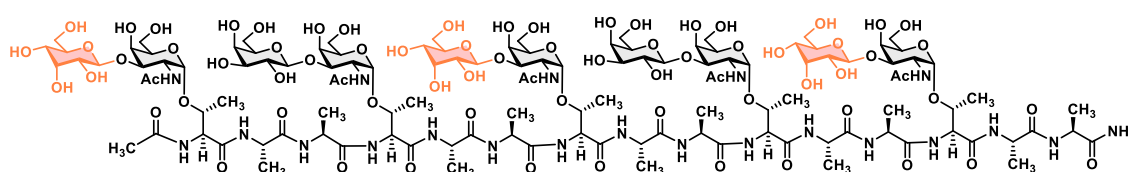
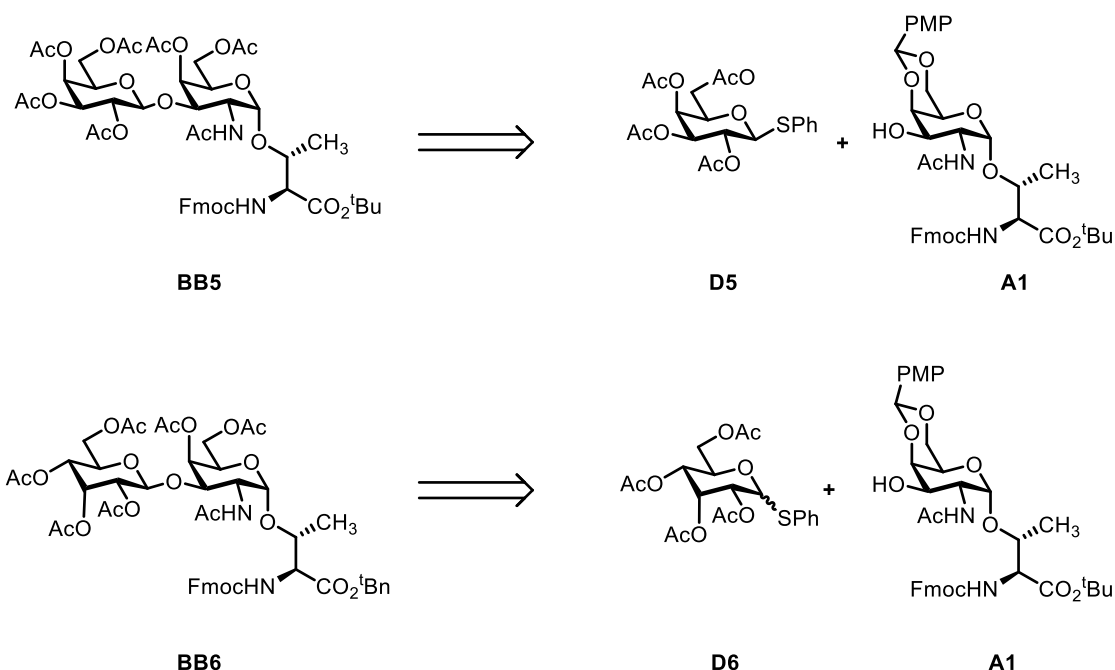


Figura 3.6.- Estructura química del glicopéptido objetivo GP-V.

El glicopéptido mostrado tiene una naturaleza híbrida y posee una combinación de unidades de β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc y β -D-All-(1-3)- α -D-GalNAc en posiciones alternas de treonina. El carácter híbrido de dicho compuesto obedece a razones de carácter práctico. Más concretamente, la preparación del “building block” derivado de alosa reviste una dificultad significativa. Su combinación con fragmentos de treonina portadores del disacárido natural β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc-L-Thr en un mismo glicopéptido nos permitió determinar el efecto de la sustitución galactosa/alosa sobre la actividad anticongelante, limitando el coste de la síntesis.

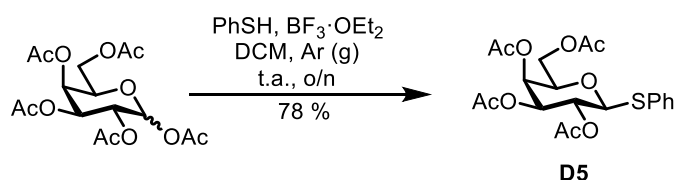
Para su preparación fue preciso obtener primero los “building blocks” derivados de galactosa (**BB5**) y alosa (**BB6**). El derivado **BB5** se preparó siguiendo protocolos puestos a punto previamente en el grupo del profesor Corzana en la Universidad de La Rioja. Por su parte, la síntesis de **BB6** fue puesta a punto por nosotros en el Instituto de Química Orgánica General del CSIC (IQOG-CSIC). Las desconexiones clave en los esquemas retrosintéticos concebidos para su preparación se muestran en el Esquema 3.18.



Esquema 3.18.- Desconexiones clave en los esquemas retrosintéticos concebidos para la síntesis de **BB5** (arriba) y **BB6** (abajo).

Así, los dos fragmentos se obtuvieron a partir del aceptor común **A1**, cuya síntesis se ha descrito en el apartado 3.1.1.1.2 de la presente tesis doctoral, y los donadores **D5** y **D6**, cuya preparación se muestra a continuación.

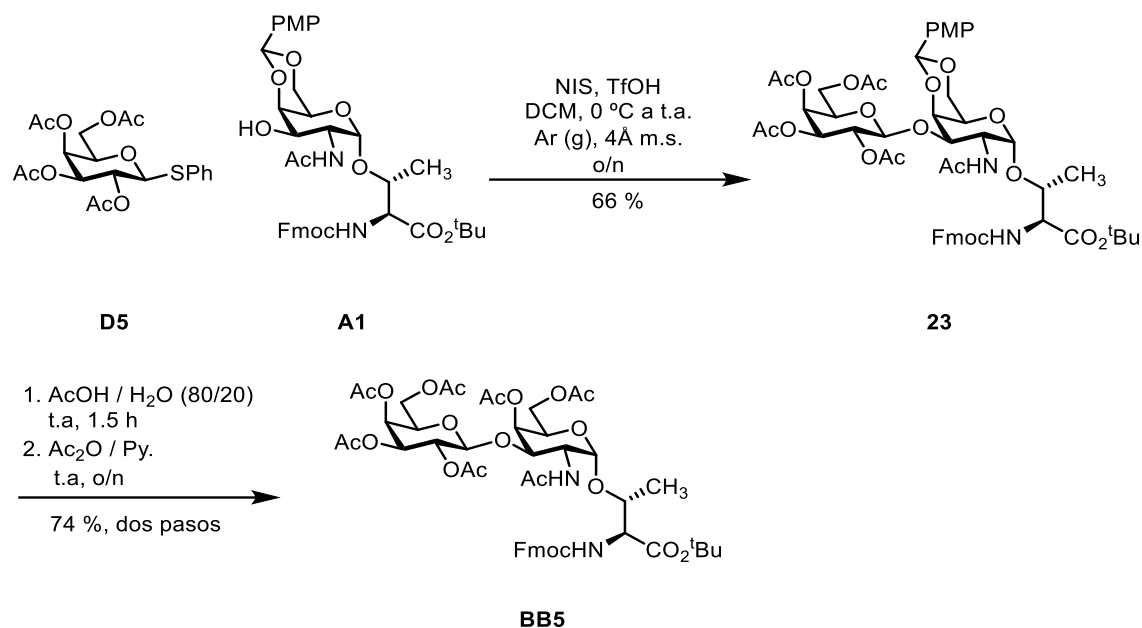
El donador de galactosa **D5** se obtuvo empleando un procedimiento sencillo de un solo paso, tal y como se detalla en el Esquema 3.19.



Esquema 3.19.- Procedimiento sintético empleado para la síntesis del donador de galactosa **D5**.

De acuerdo con este, a partir de D-galactosa peracetilada comercial se llevó a cabo una reacción con tiofenol y trifluoruro de boro dietileterato en diclorometano para generar el tioglicósido **D5** con un rendimiento óptimo.

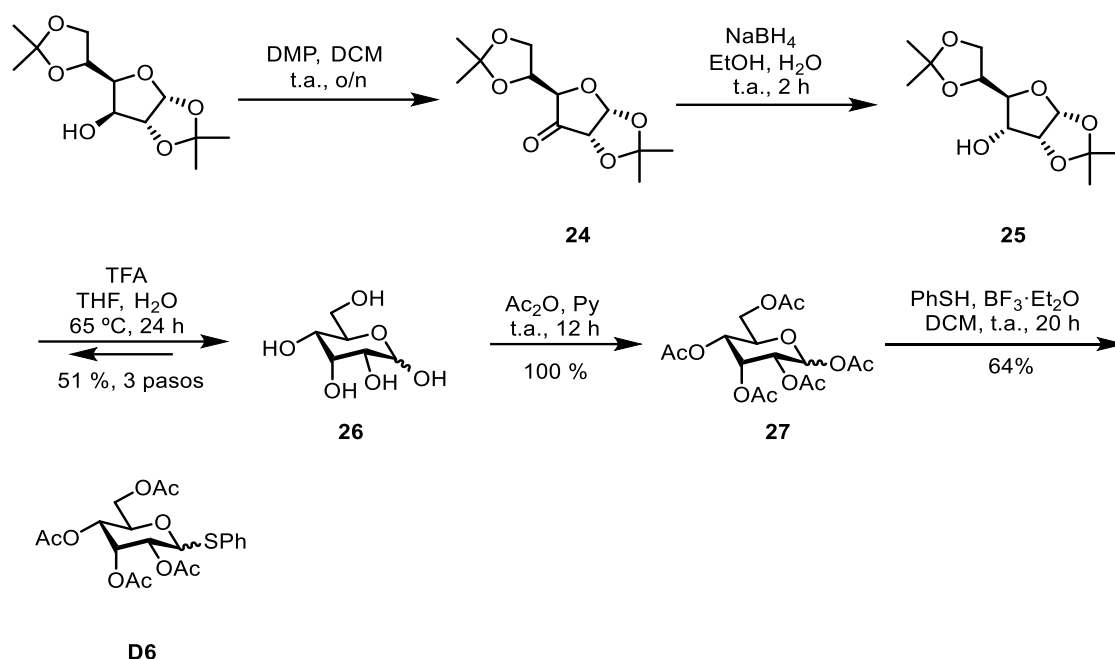
A continuación, utilizando como sustratos de partida el donador **D5** y el aceptor **A1**, se procedió a la síntesis del “building block” objetivo (**BB5**) siguiendo la ruta sintética mostrada en el Esquema 3.20. Por su parte, el procedimiento empleado para la síntesis del donador de alosa **D6** se detalla en el Esquema 3.21.



Esquema 3.20.- Procedimiento sintético empleado para la obtención del derivado BB5 a partir de la especie donadora D5 y el aceptor A1.

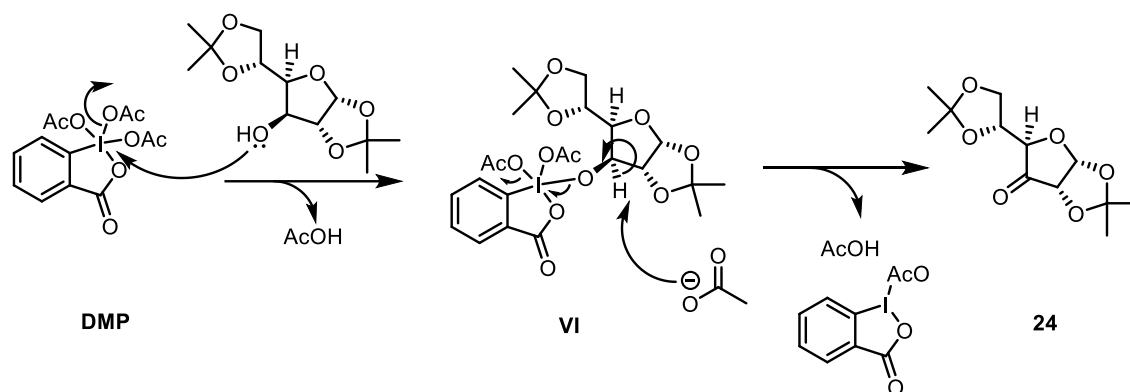
Dicho procedimiento es análogo al mostrado en el apartado 3.1.2 para la obtención de **BB3**. Así, en un primer paso se realizó una reacción de glicosilación entre el donador de galactosa **D5** y el aceptor **A1**, empleando nuevamente NIS como activante y ácido triflico como catalizador ácido. El proceso condujo de forma estereoselectiva al derivado **23** con un rendimiento del 66 %. Finalmente, suprimimos la función bencilidén, empleando medio ácido y tratamos el producto final en condiciones convencionales de acetilación para generar el “*building block*” **BB5** con un rendimiento del 74 % en los dos pasos.

Por su parte, el procedimiento empleado para la síntesis del donador de alosa **D6** se detalla en el Esquema 3.21.



Esquema 3.21.- Procedimiento sintético empleado para la preparación del donador **D6**.

Dicho procedimiento se inicia a partir del derivado de α -D-glucofuranosa protegido en las posiciones 1, 2, 5 y 6 con grupos isopropilideno. Cabe destacar que dicho producto es comercial y asequible a escala multigramo. A partir de este, se procedió, en primer lugar, a la oxidación de la función hidroxilo a cetona, mediante un tratamiento con el periodinano de Dess-Martin (DMP), para dar **24**. El periodinano de Dess-Martin es un compuesto de yodo hipervalente que permite oxidar en condiciones suaves alcoholes a compuestos carbonílicos.¹⁵⁷ El mecanismo por el cual transcurre esta transformación se muestra en el Esquema 3.22.



Esquema 3.22.- Mecanismo comúnmente aceptado para la oxidación de alcoholes por el periodinano de Dess-Martin.

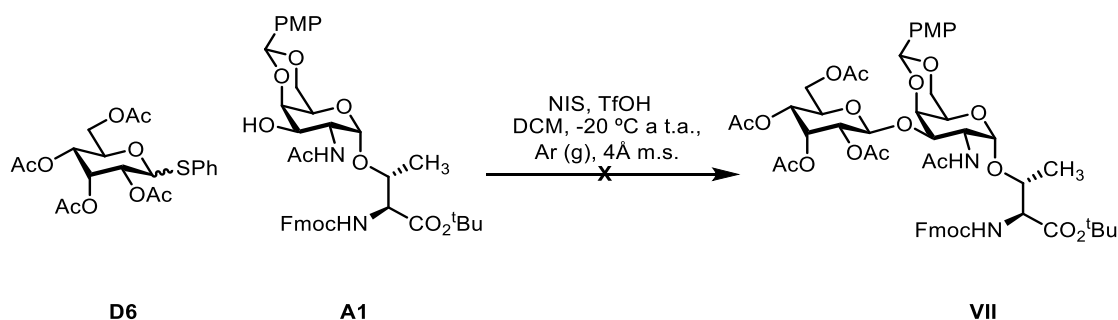
En un primer paso, el alcohol comercial ataca al átomo de yodo del **DMP** y desplaza uno de los grupos acetato, generando el intermedio **VI**. El protón liberado es captado por la propia molécula de acetato para dar ácido acético. Seguidamente,

una segunda molécula de acetato abstrae el protón del carbono unido directamente al oxígeno, conduciendo a la formación del grupo carbonílico presente en **24**. Como subproductos de reacción se generan una nueva molécula de ácido acético y un monoacetoxiyodinano.

En este punto, y sin purificación previa, se procedió a la reducción de **24** al compuesto **25** mediante un tratamiento con borohidruro sódico en una mezcla de etanol y agua. Esta reacción procede mediante el ataque de un ión hidruro por la cara del carbonilo más accesible estéricamente para dar de forma estereoselectiva el isómero **25**, cuya configuración relativa de los centros estereogénicos es la adecuada para generar finalmente el armazón de alosa. Seguidamente, se trató el alcohol **25** con ácido trifluoroacético en una mezcla de agua y THF. Dichas condiciones promueven la eliminación de las funciones isopropiliden, facilitando la equilibración de la furanosa resultante a la forma piranosa más estable **26**.

A continuación, procedimos a la peracetilación del derivado **26** con anhídrido acético y piridina, para obtener **27** con un rendimiento del 51% en los cuatro pasos. Como última etapa, se funcionalizó la posición anomérica del anillo de alopiranos mediante la introducción de un grupo tiofenilo. Con dicho fin utilizamos tiofenol y trifluoruro de boro dietileterato como catalizador ácido, obteniendo el donador **D6** con un rendimiento del 64%.

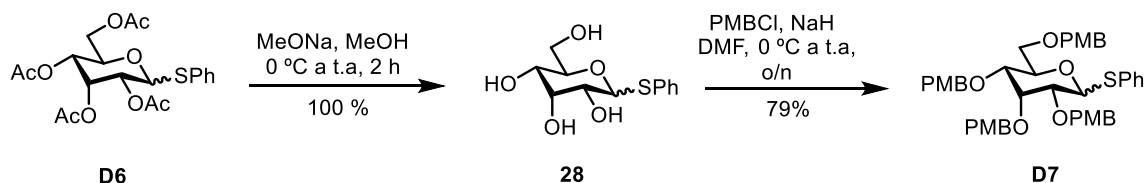
Empleando una secuencia de reacciones enteramente análoga a la mostrada para el “*building block*” **BB5**, se intentó llevar a cabo la síntesis del derivado de alosa **BB6**, cuya ruta sintética se muestra en el Esquema 3.23.



Esquema 3.23.- Procedimiento sintético fallido para la obtención del derivado **BB6** a partir de los fragmentos **D6** y **A1**.

Partiendo del donador de alosa **D6** y el aceptor **A1**, llevamos a cabo una reacción de glicosilación bajo atmósfera inerte, utilizando una mezcla de N-iodosuccinimida y ácido trifílico como activantes y diclorometano como disolvente. La adición de los activantes se realizó a una temperatura de -20 °C para posteriormente dejar la mezcla evolucionar hasta alcanzar la temperatura ambiente. En las condiciones descritas, la reacción condujo a una mezcla de

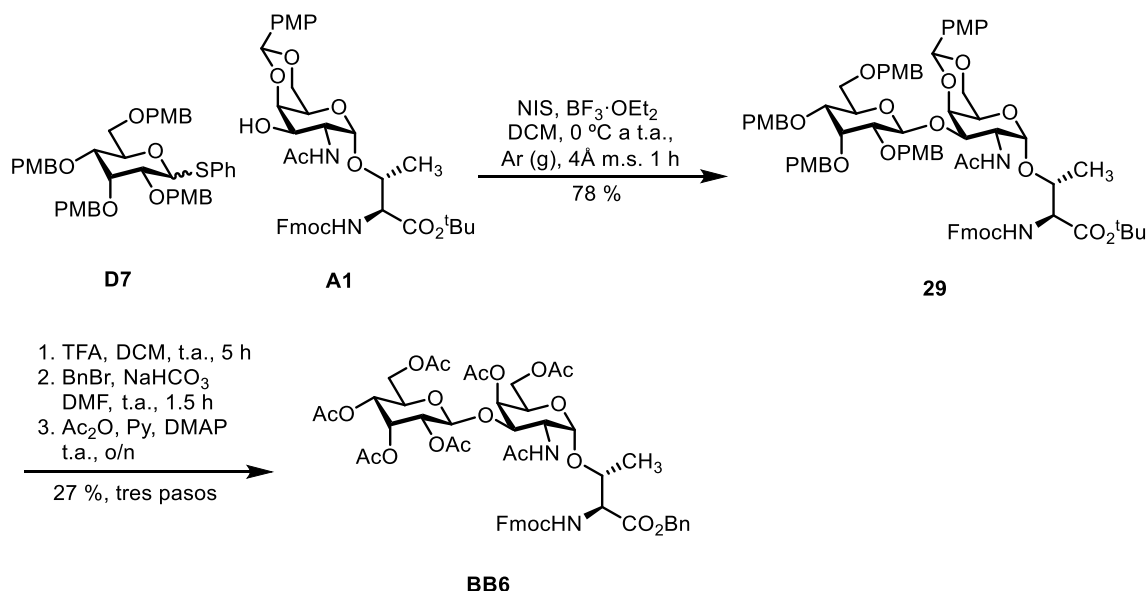
productos. Desafortunadamente, el derivado **VII** no pudo ser aislado y por ello fue preciso ensayar un método alternativo introduciendo diversos ajustes en nuestro esquema sintético. Más concretamente, utilizando como sustrato de partida el donador **D6** y tras la eliminación de los grupos acetato se obtuvo el derivado **28**. A continuación, se preparó el donador **D7** mediante una reacción en un solo paso que se detalla en el Esquema 3.24.



Esquema 3.24.- Procedimiento sintético empleado para la obtención del donador **D7** utilizando **D6** como sustrato de partida.

De esta manera, se llevó a cabo la reacción de **28** con cloruro de *p*-metoxibencilo en medio básico utilizando DMF como disolvente para obtener el donador final **D7** como una mezcla de anómeros α/β 1:1.2 y con un rendimiento del 79%.

Una vez sintetizado el nuevo donador, se llevó a cabo una reacción de acoplamiento de éste con el aceptor **A1** utilizando las condiciones mostradas en el Esquema 3.25.



Esquema 3.25.- Procedimiento sintético empleado para la obtención del “building block” **BB6** a partir de los fragmentos **D7** y **A1**.

Así, en primer lugar, se realizó una reacción de glicosilación entre el donador **D7** y el aceptor **A1** utilizando como activante de la reacción *N*-iodosuccinimida y como catalizador ácido trifluoruro de boro dietileterato en diclorometano. La adición del catalizador se realizó a 0 °C y dicha temperatura se mantuvo constante hasta observar por cromatografía en capa fina la completa desaparición del donador. De esta manera se obtuvo el aducto **29**, con un rendimiento del 78%. Cabe destacar que, a pesar de no contar con un grupo protector participante en la posición 2, se obtuvo únicamente el anómero β. Para finalmente llegar a la obtención del “*building block*” **BB6**, fueron necesarias etapas adicionales de protección/desprotección como las que se detallan en el Esquema 3.25. Partiendo del aducto de glicosilación **29** se realizó un tratamiento con ácido trifluoroacético en diclorometano para la eliminación de los grupos *p*-metoxibencilo y bencilidén que condujo también a la eliminación del grupo *t*-Bu presente en la función ácido carboxílico del aminoácido. Por ello, a continuación, se llevó a cabo una reacción de bencilación con bromuro de bencilo y bicarbonato de sodio para proteger dicho ácido. Finalmente, el crudo de reacción se trató, sin purificación previa con anhídrido acético y piridina, para obtener finalmente el derivado **BB6** con un rendimiento del 27% en tres pasos.

A partir de los “*building blocks*” sintetizados **BB5** y **BB6** se preparó el glicopéptido híbrido **GP-V** empleando un procedimiento experimental análogo al previamente descrito para los glicopéptidos portadores de manosa **GP-I** y **GP-II**, a excepción de la desprotección del grupo carboxílico de **BB6** que se llevó a cabo mediante una reacción de hidrogenólisis,

3.1.5. Síntesis del glicopéptido híbrido portador de β-L-Fuc-(1-3)-α-D-GalNAc y β-D-Gal-(1-3)-α-D-GalNAc (GP-VI)

La estructura del glicopéptido objetivo **GP-VI** se muestran en la Figura 3.7.

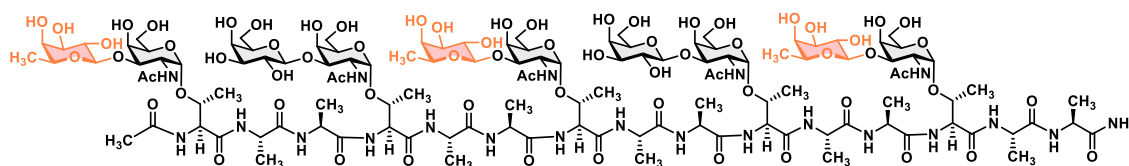
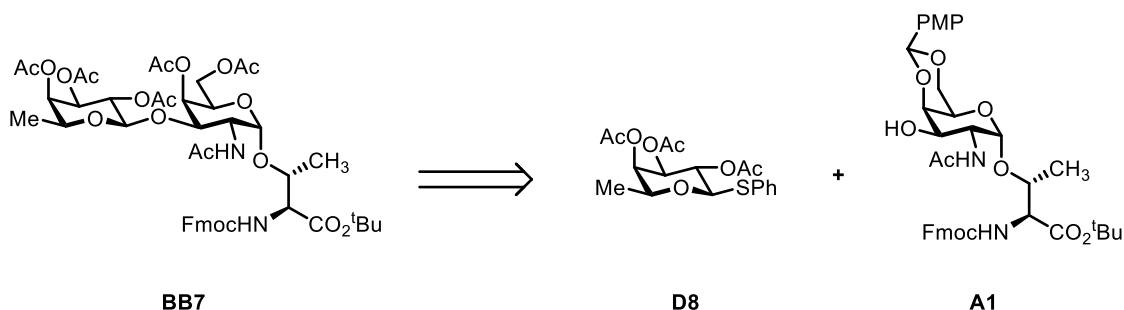


Figura 3.7.- Representación esquemática del glicopéptido objetivo GP-VI.

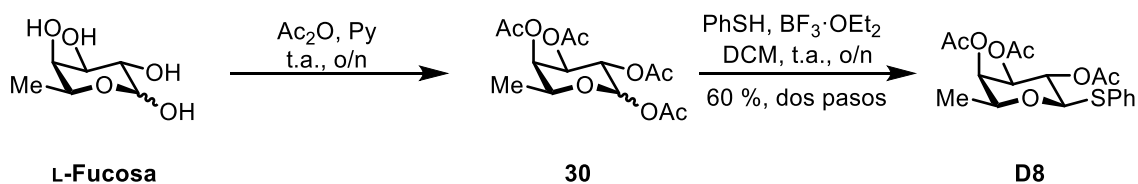
Nuevamente, se trata de un glicopéptido híbrido integrado por una combinación de unidades de treonina portadoras de β-D-Gal-(1-3)-α-D-GalNAc y β-L-Fuc-(1-3)-α-D-GalNAc en posiciones alternas de treonina. Dado que la preparación de **BB7** está perfectamente optimizada en nuestro grupo, dicha combinación nos permitió ensayar el efecto de la fucosa sobre la actividad anticongelante del glicopéptido, limitando el coste de su preparación. La síntesis

del derivado **BB5** portador del fragmento β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc ya se ha detallado en el apartado 3.1.4 de la presente tesis doctoral. A continuación, se describe el procedimiento empleado en la preparación del fragmento **BB7** portador de fucosa. La desconexión clave en el esquema retrosintético concebido para su preparación se muestra en el Esquema 3.26.



Esquema 3.26.- Desconexión clave en la retrosíntesis concebida para la preparación del derivado **BB7**.

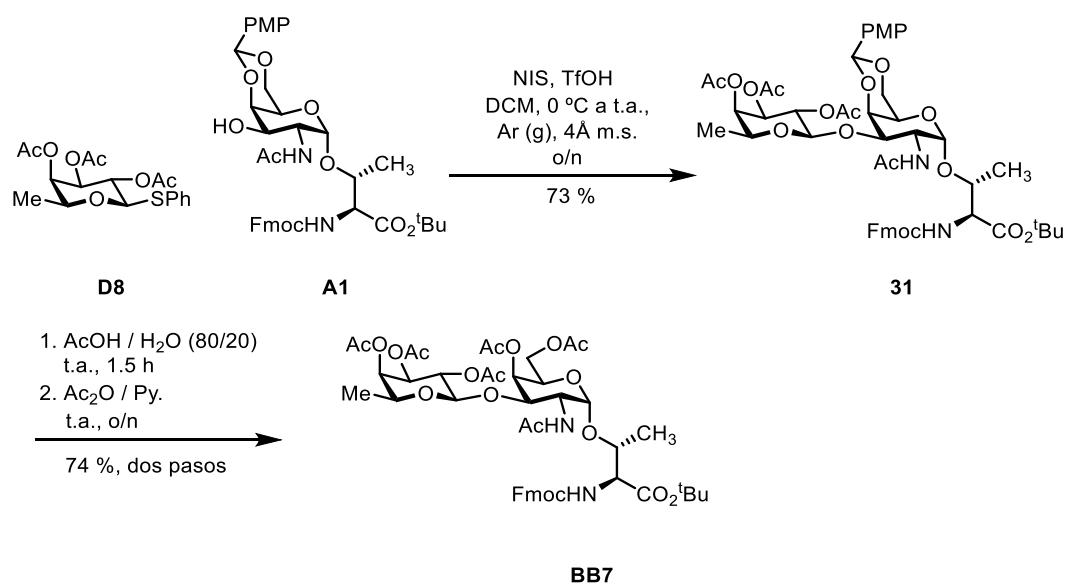
La preparación del aceptor **A1** ya ha sido descrita en la presente tesis (apartado 3.1.1.1.2). Por lo que respecta al donador **D8**, este se obtuvo en solo dos pasos partiendo de L-fucosa comercial tal y como se detalla en el Esquema 3.27.



Esquema 3.27.- Esquema sintético para la síntesis del donador de fucosa **D8** a partir de L-Fucosa comercial.

Así, primeramente, se realizó una reacción de peracetilación empleando anhídrido acético y piridina para obtener el compuesto **30** que, sin purificación previa, fue sometido a un tratamiento con tiofenol y trifluoruro de boro dietileterato como catalizador ácido para generar el tioglicósido **D8** con un rendimiento de un 60% en los dos pasos.

Utilizando como sustratos de partida el donador **D8** y el aceptor **A1**, se procedió a la síntesis del “*building block*” objetivo (**BB7**) siguiendo la ruta sintética mostrada en el Esquema 3.28.



Esquema 3.28.- Procedimiento sintético empleado para la obtención del “building block” **BB7** a partir de los intermedios **D8** y **A1**.

Esta es análoga a la mostrada en el apartado 3.1.2 para la obtención de **BB3**. Así, primeramente, realizamos una reacción de glicosilación entre el donador **D8** y el aceptor **A1**. Se utilizó N-iodosuccinimida y ácido triflico como activantes de la reacción y diclorometano como disolvente. La temperatura se fijó a 0 °C para la adición del ácido triflico y posteriormente se calentó hasta alcanzar temperatura ambiente, que se mantuvo constante hasta la completa desaparición del donador. Dicha reacción transcurrió con un rendimiento del 73% y dio como resultado el producto de glicosilación β **31**.

A continuación, fue necesario un tratamiento con ácido acético acuoso para eliminar la función *p*-metoxibenciliden, seguido de una acetilación del producto resultante para generar el derivado deseado, **BB7**, con un rendimiento del 74% en los dos pasos.

Finalmente, haciendo uso de los fragmentos **BB7** y **BB5**, se preparó el glicopéptido **GP-VI** empleando un procedimiento experimental análogo al descrito en el apartado 3.1.1.2 de la presente tesis doctoral para los glicopéptidos **GP-I** y **GP-II**.

3.1.6. Síntesis del glicopéptido híbrido portador de β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc y 3,4,6-tri-OMe- β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc (GP-VII)

La estructura del glicopéptido **GP-VII** se muestra en la Figura 3.8.

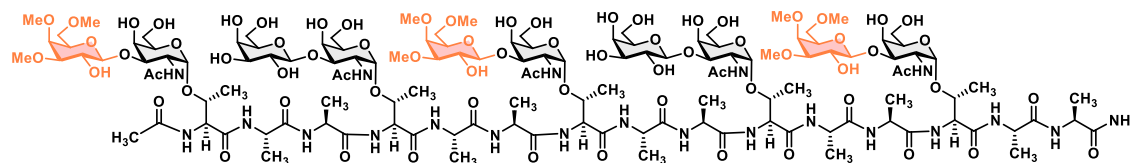
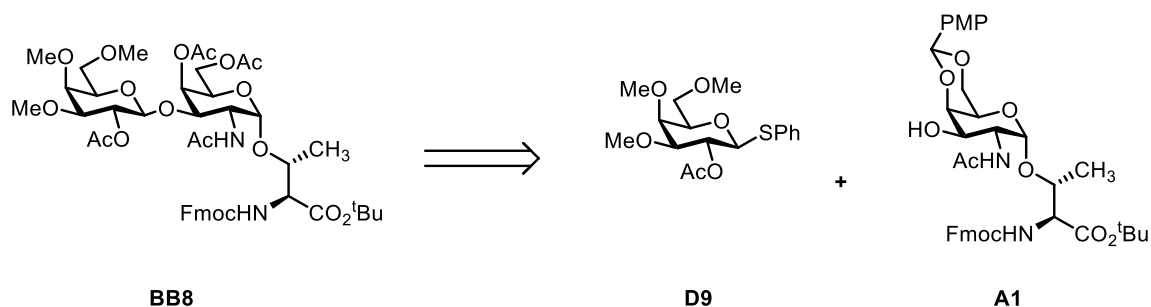


Figura 3.8.- Estructura química del glicopéptido objetivo GP-VII.

Este glicopéptido contiene residuos de treonina portadores de galactosa y 3,4,6-tri-*O*-metilgalactosa en posiciones alternas de la secuencia. Para su obtención se recurrió a los fragmentos **BB5**, cuya síntesis se ha descrito con anterioridad y **BB8**, cuya preparación se detalla a continuación. Cabe mencionar que, en este caso concreto, ante las dificultades encontradas, nos vimos obligados a rediseñar la estrategia sintética concebida inicialmente y explorar otras vías alternativas. Tanto los intentos fallidos como la metodología finalmente empleada se describen en los siguientes apartados.

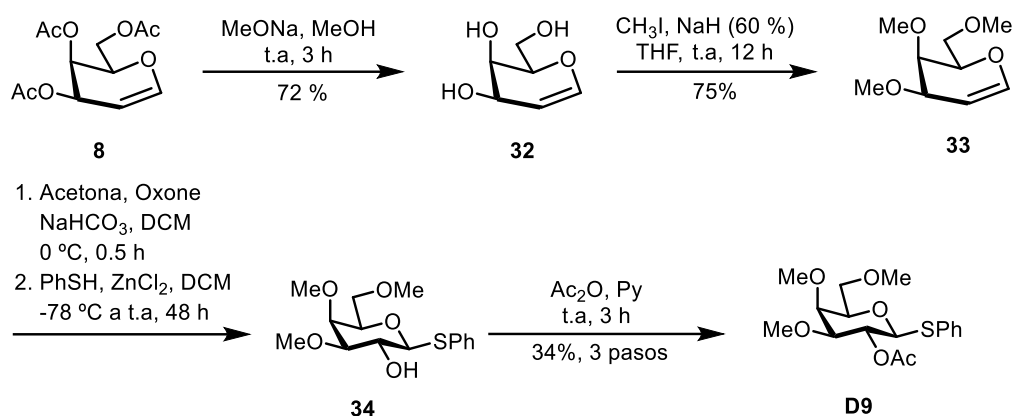
3.1.6.1. Primera aproximación para la síntesis del “building block” **BB8**

Nuestra primera tentativa para la síntesis de **BB8** se basó en la utilización, como paso clave, de una reacción de acoplamiento entre el aceptor **A1** (ver apartado 3.1.1.1.2) y la especie donadora **D9** (Esquema 3.29).



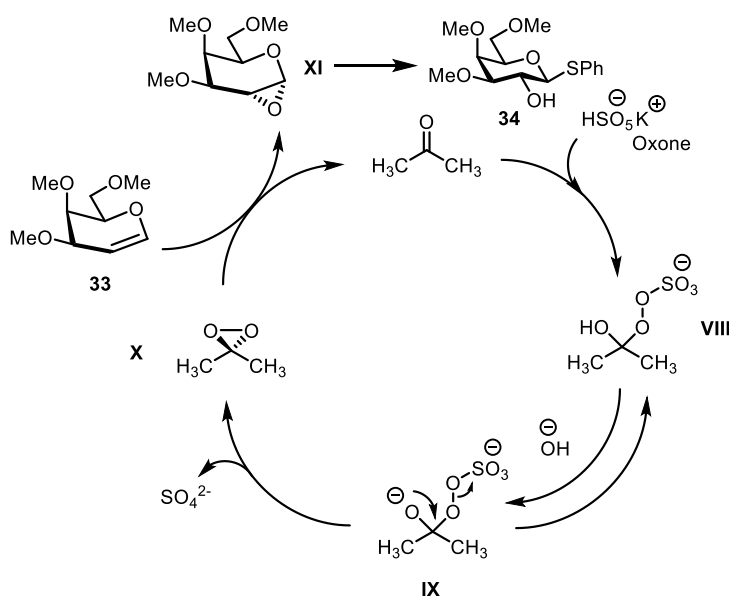
Esquema 3.29.- Desconexión clave del esquema retrosintético inicialmente concebido para la obtención del “building block” **BB8.**

Este último combina tres posiciones *O*-metiladas, cuyo efecto sobre la actividad anticongelante del péptido final se quiere determinar, con una posición *O*-acetilada, que nos permitirá controlar la estereoselectividad de la glicosilación, favoreciendo la formación preferente del isómero β . De acuerdo con esto, para su preparación es preciso diferenciar la posición 2 del anillo de piranosa del resto. Con dicho objetivo recurrimos a un galactal como material de partida, empleando a continuación la secuencia de reacciones que se describe en el Esquema 3.30.



Esquema 3.30.- Estrategia sintética empleada para la preparación del donador D9 a partir del galactal 8.

Así, como primer paso, se procedió a la desacetilación del glicol 8 en condiciones de Zemplén para obtener el intermedio 32 con un rendimiento moderado (72%). La siguiente etapa consistió en la O-metilación de las posiciones 3, 4 y 6 del anillo, recurriendo para ello a yoduro de metilo como agente metilante, hidruro de sodio como base y THF como disolvente. Dicha reacción nos permitió acceder al derivado 33 con un rendimiento del 75%. A continuación, este se hizo reaccionar con una mezcla de acetona y Oxone[®] en medio básico.¹⁵⁸ Dichas condiciones promueven la generación de un dimetildioxirano capaz de reaccionar, en un segundo paso, con el doble enlace del glicol para generar un epóxido. El mecanismo comúnmente aceptado para dicha reacción se describe en el Esquema 3.31.

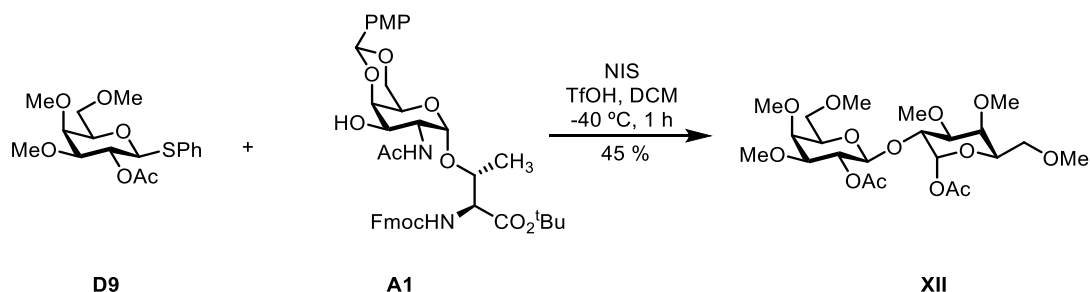


Esquema 3.31.- Mecanismo de reacción comúnmente aceptado para la epoxidación de alquenos mediante el empleo de dimetildioxiranos generados “in situ”.

De acuerdo con dicho mecanismo, la acetona reacciona con una molécula de Oxone[®], formándose el intermedio **VIII** que, en medio básico, se desprotona para dar el alcóxido **IX**. Este evoluciona al dimetildioxirano reactivo **X** que, finalmente, reacciona con el doble enlace del glicial para generar una mezcla de epóxidos cuya proporción depende de la configuración del resto de los centros estereogénicos presentes en la molécula. En nuestro caso concreto, al tratarse de un derivado de galactal, el epóxido se forma mayoritariamente por la cara α , menos impedida (Esquema 3.31).

Una vez formado el epóxido, se procedió, sin etapa de purificación previa, a la apertura del mismo mediante un ataque nucleofílico estereoselectivo con tiofenol, proceso catalizado por cloruro de cinc, como ácido de Lewis, que garantiza una disposición relativa *trans* de los sustituyentes en posiciones 1 y 2 del anillo de piranosa. Dicha reacción permitió acceder al compuesto intermedio **34** que, seguidamente, fue acetilado recurriendo a una mezcla de anhídrido acético y piridina para generar el compuesto final **D9** con un rendimiento del 34% en los tres pasos.

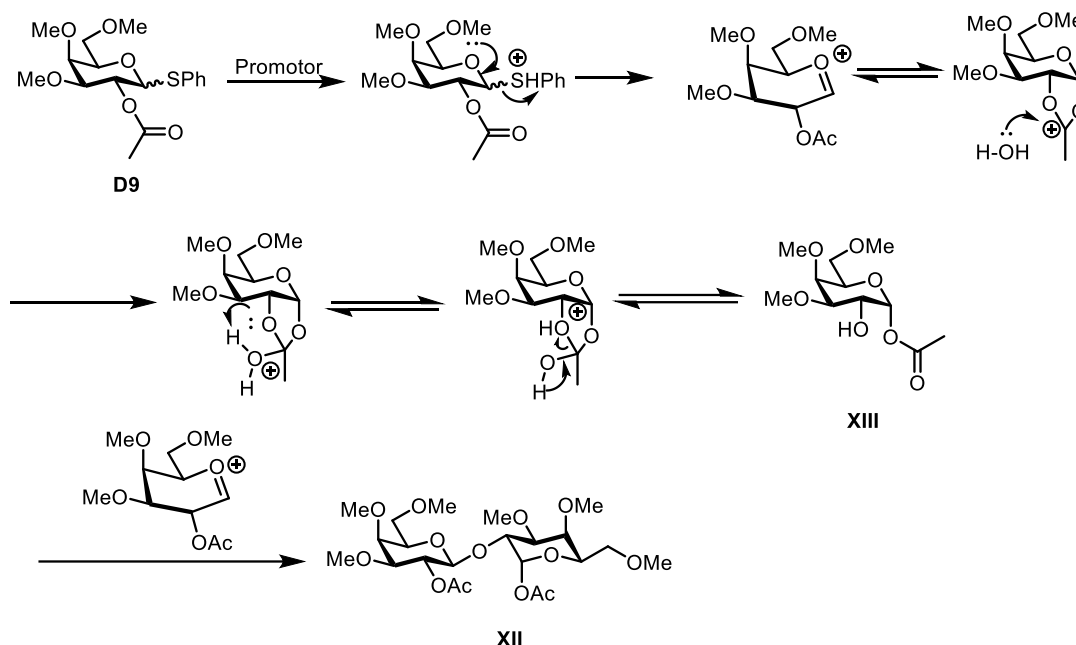
Tras la preparación del donador **D9** y el aceptor **A1**, se procedió al acoplamiento entre ambos. Nuevamente, se utilizaron NIS y ácido triflúrico como activantes del proceso y diclorometano como disolvente, tal y como se muestra en el Esquema 3.32. Cabe mencionar que, a diferencia de las glicosilaciones anteriormente descritas en los esquemas anteriores, en este caso la reacción involucra un donador bastante reactivo, debido a la ausencia de funciones acetato en las posiciones 3, 4 y 6. Teniendo esto en cuenta, se recurrió a unas condiciones de temperatura más convencionales en reacciones de glicosilación, de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Desafortunadamente, en este caso la reacción no llevó al producto deseado. Por el contrario, a partir de la mezcla de reacción fue posible aislar e identificar el derivado **XII** con un rendimiento del 45 % (Esquema 3.32).



Esquema 3.32.- Tentativa de acoplamiento entre el donador metilado **D9** y el aceptor **A1**.

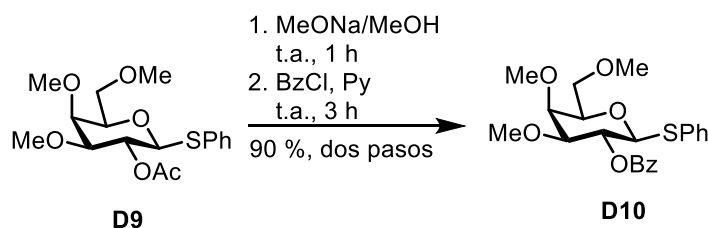
Dicho compuesto probablemente se origina en dos pasos a partir del donador **D9** (Esquema 3.33). Así, tras la activación de **D9** y generación del

oxocarbenio intermedio, se produciría la migración del acetato en posición 2 de la piranosa al centro anomérico (**XIII**). De esta forma se genera en el medio de reacción una nueva especie aceptora que, al ser más reactiva que el propio derivado **A1**, se acoplaría de forma preferente con **D9** para dar el disacárido no deseado (**XII**).



Esquema 3.33.- Mecanismo propuesto para la migración del grupo acetato de posición 2 a la posición 1 del anillo de piranosa en medio ácido y su posterior glicosilación con el donador **D9.**

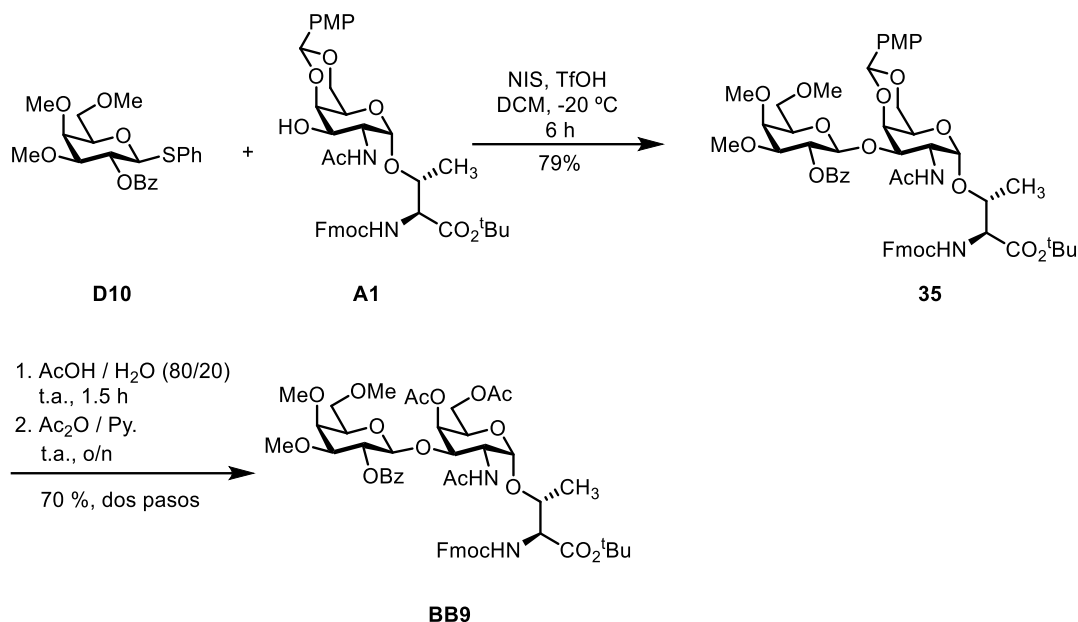
Con el objetivo de obstaculizar el reordenamiento de la especie donadora, decidimos modificarla, reemplazando la función acetilo presente en la posición 2 por un grupo benzoílo, menos proclive a participar en reacciones de migración. La preparación del donador **D10** se realizó a partir de **D9** en un solo paso, tal y como se muestra en el Esquema 3.34.



Esquema 3.34.- Preparación del donador benzoilado **D10 a partir de **D9**.**

Así, este último fue tratado en condiciones de Zemplén, para obtener el derivado desacetilado que, sin purificación previa, fue sometido a una transformación posterior con cloruro de benzoílo y piridina a 0 °C para generar **D10** con un rendimiento óptimo del 90%. A continuación, este derivado se ensayó

en la reacción de glicosilación con **A1**, empleando unas condiciones similares a las previamente descritas con el donador **D10** (Esquema 3.35).



Esquema 3.35.- Reacción de acoplamiento entre el donador benzoilado **D10** y el aceptor **A1** y transformaciones posteriores.

En este caso, la adición de los activantes se realizó a una temperatura de -20 °C, manteniendo dichas condiciones durante 6 horas hasta la completa desaparición del producto de partida, monitorizada por cromatografía en capa fina. Tal y como esperábamos, la presencia de la función benzoílo en el donador bloquea de forma eficiente el camino de reacción no deseado a la vez que dirige la estereoselectividad del acoplamiento, obteniéndose de forma exclusiva el producto de glicosilación β (**35**) con un rendimiento del 79%. La síntesis del producto final **BB9** requirió un tratamiento posterior con ácido acético acuoso para la eliminación del grupo *p*-metoxibenciliden, seguido de una reacción de acetilación en condiciones convencionales, con anhídrido acético y piridina. Ambos procesos transcurrieron con un rendimiento global del 70%.

Una vez obtenido **BB9**, se procedió a la preparación del glicopéptido **GP-VII** utilizando un procedimiento de síntesis en fase sólida enteramente análogo al previamente descrito para **GP-I** y **GP-II** (sección 3.1.1.2).

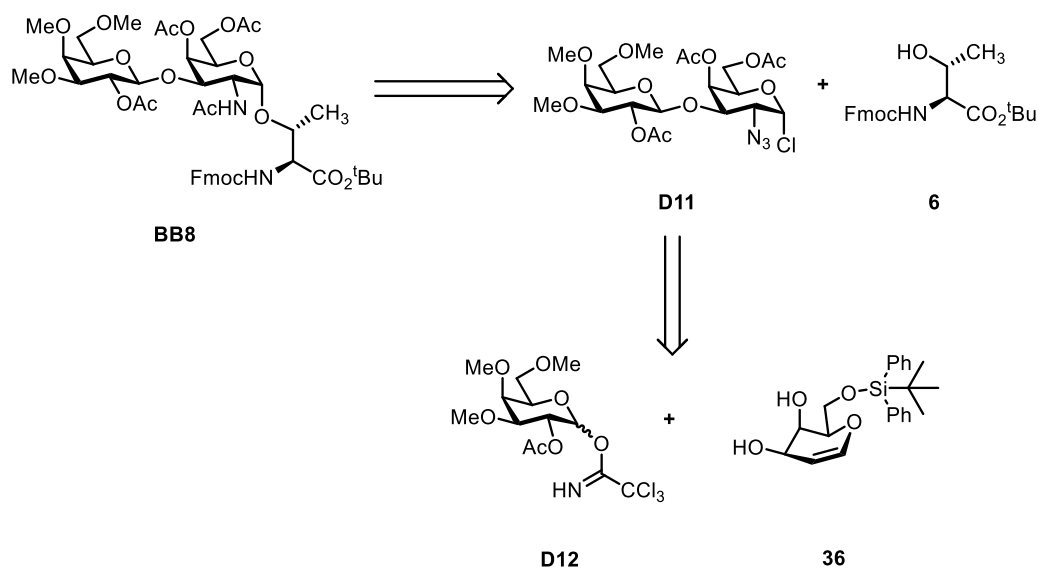
Desafortunadamente, esta vez la estabilidad extra del grupo *O*-benzoílo sobre el *O*-acetilo genera problemas irresolubles en el paso final de desprotección del péptido. Dicha etapa se realiza habitualmente mediante varios ciclos de tratamiento consecutivos con una mezcla de hidrazina y metanol sobre el péptido todavía anclado a la matriz polimérica. Sin embargo, una vez cumplimentado

dicho protocolo, pudimos confirmar mediante espectrometría de masas la persistencia de las funciones benzoílo.

En vista de dicho comportamiento, decidimos desanclar el péptido de la fase sólida y proceder con unas condiciones más energéticas ya en disolución, mediante un tratamiento con metóxido sódico en metanol. Cabe mencionar que dicho tratamiento es habitualmente compatible con la estructura química del péptido, siempre que se limite la cantidad de metóxido empleado, manteniendo un pH de la reacción entre 8 y 9, así como los tiempos de reacción. En nuestro caso, verificamos que es imposible eliminar las funciones *O*-benzoílo sin prolongar la exposición al medio básico durante un tiempo excesivo o subir el pH de la reacción, lo cual conlleva inevitablemente la epimerización parcial de las posiciones α - de la cadena peptídica para generar mezclas complejas. En definitiva, si bien la estabilidad extra de los grupos benzoílo bloquea eficazmente su migración durante la reacción de glicosilación, dicha estabilidad hace imposible desproteger el glicopéptido en la etapa final sin alterar su estructura irreversiblemente. Esta evidencia nos obligó a replantearnos la estrategia sintética y ensayar vías alternativas para la obtención de **BB8**.

3.1.6.2. Segunda aproximación para la síntesis del “building block” **BB8**

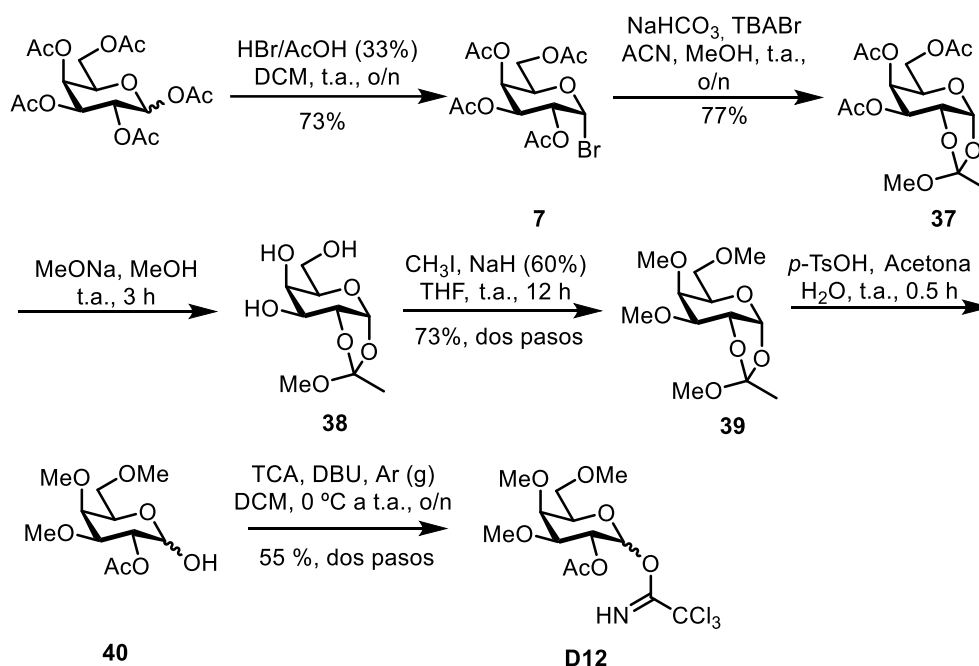
En esta segunda aproximación para la síntesis de **BB8** decidimos introducir modificaciones en las especies donadora y aceptora, empleadas en paso clave de glicosilación. Las desconexiones clave del nuevo esquema retrosintético concebido se muestran en el Esquema 3.36.



Esquema 3.36.- Desconexiones clave del esquema retrosintético concebido para la preparación del “building block” **BB8**.

Puede apreciarse cómo en este caso decidimos invertir el orden de las reacciones de glicosilación, generando primero un armazón disacarídico (**D11**) que posteriormente, es anclado a la cadena lateral de treonina. De esta forma es posible garantizar que el primero presenta el patrón de sustitución adecuado antes de unirlo al aminoácido.

La preparación de **D11** requirió el acoplamiento entre el donador **D12** y el aceptor **36**. Este primero fue sintetizado tal y como se detalla en el Esquema 3.37.

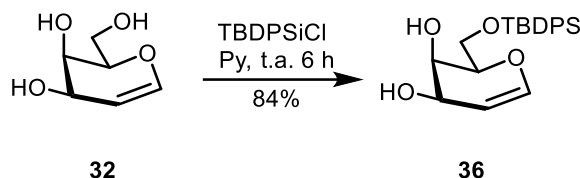


Esquema 3.37.- Procedimiento sintético empleado para la obtención del donador **D12 a partir de la galactosa peracetilada comercial.**

De acuerdo con este, en un primer paso se hizo reaccionar galactosa peracetilada con una mezcla de ácido bromhídrico y ácido acético en diclorometano a 0 °C para generar el bromuro de glicosilo **7** con un rendimiento del 73%. Su tratamiento posterior con bromuro de tetrabutilamonio y metanol en acetonitrilo, en presencia de bicarbonato sódico, generó el ortoéster de metilo **37** con rendimientos óptimos. A continuación, llevamos a cabo la desprotección de los grupos hidroxilo en condiciones de Zemplén, procediendo a la *O*-metilación del derivado resultante sin purificación previa, por tratamiento con hidruro sódico y yoduro de metilo en THF. De esta forma accedimos al ortoéster **39** con un rendimiento del 73% para las dos etapas. Su tratamiento posterior con ácido *p*-toluensulfónico en una mezcla de acetona y agua generó el hemiacetal **40** que no fue aislado. En su lugar, decidimos emplearlo directamente en la preparación del tricloroacetimidato final **D12**, mediante una reacción con tricloroacetimidato en

diclorometano, empleando DBU como base, que transcurrió con un rendimiento del 55 %.

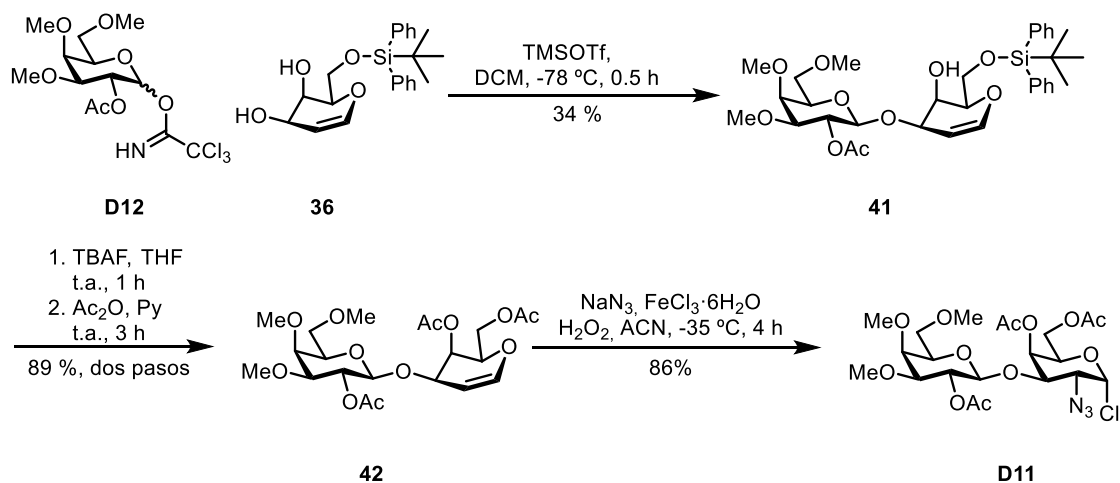
Por lo que representa a la especie aceptora **36**, se preparó a partir del glicial **32** en un solo paso, y con excelente rendimiento, tal y como se detalla en el Esquema 3.38.



Esquema 3.38.- Transformación empleada para la preparación del aceptor **36** a partir del glicial **32**.

Esta etapa consistió en una reacción de *O*-sililación regioselectiva de la posición 6, especialmente reactiva en base a criterios estéricos, utilizando para ello cloruro de *tert*-butildifenilsililo en piridina y condiciones de control cinético. La adición del cloruro se realizó a 0 °C para después dejar la reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Para asegurar la regioselectividad del proceso, limitamos el número de equivalentes de agente sililante añadido a 1.3.

Una vez sintetizados el donador **D12** y el aceptor **36**, se procedió al acoplamiento entre ambos (Esquema 3.39).



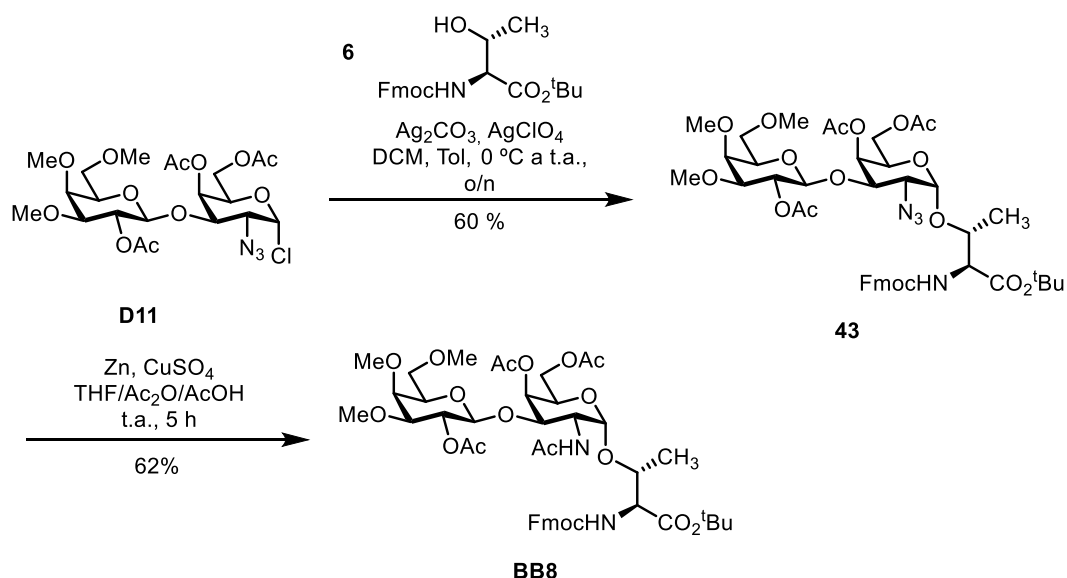
Esquema 3.39.- Reacción de acoplamiento entre el donador **D12** y el aceptor **36** y transformaciones posteriores.

Dicha reacción se realizó en diclorometano a baja temperatura (-78 °C) utilizando triflato de trimetilsililo como activante. De esta forma se accedió al intermedio **41** con excelente estereoselectividad, pero un rendimiento modesto, lo que refleja en buena medida el carácter relativamente lábil de los glicales en

medios ácidos. A continuación, fueron precisas varias etapas de protección/desprotección convencionales.

Así, se procedió a la eliminación de la función TBDPS por tratamiento de **41** con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en THF. El intermedio resultante fue sometido, sin purificación previa, a condiciones de acetilación convencionales, utilizando una mezcla de anhídrido acético y piridina para obtener el compuesto **42** con un rendimiento del 89% en los dos pasos. Finalmente, el tratamiento de **42** con azida sódica, tricloruro de hierro y peróxido de hidrógeno en acetonitrilo y a -35 °C generó el donador final **D11** con un rendimiento del 86%.

Partiendo de **D11**, se procedió a la preparación del fragmento **BB8** empleando la secuencia de reacciones que se muestra en el Esquema 3.40.



Esquema 3.40.- Síntesis del “building block” **BB8 a partir del donador **D11** y el aceptor **6** y transformaciones posteriores.**

Así, se realizó una reacción de glicosilación en condiciones de Koenigs-Knorr, idénticas a las mostradas en el apartado 3.1.1.1.2 de la presente tesis doctoral, obteniéndose el aducto **43** con un rendimiento del 60%. A continuación, el tratamiento de **43** con Zn en una mezcla de THF, anhídrido acético y ácido acético generó el “building block” **BB8** con un rendimiento del 62%.

Finalmente, haciendo uso de **BB8**, fuimos capaces de preparar el glicopéptido **GP-VII**, empleando para ello un procedimiento experimental enteramente análogo al utilizado para la síntesis de **GP-I** y **GP-II** (apartado 3.1.1.2).

3.1.7. Síntesis del glicopéptido portador de β -D-Gal-(1-3)- α -D-(N-tioacetil)-galactosamina (GP-VIII)

La estructura del glicopéptido objetivo **GP-VIII** se muestra en la Figura 3.9.

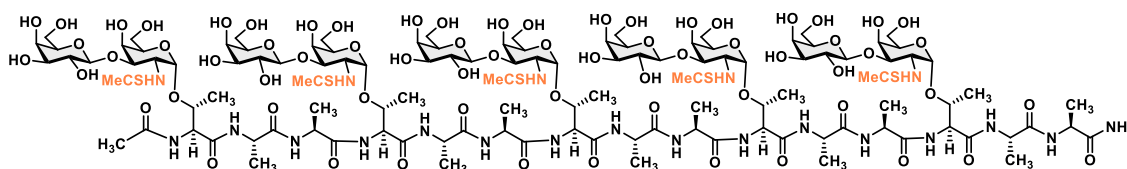
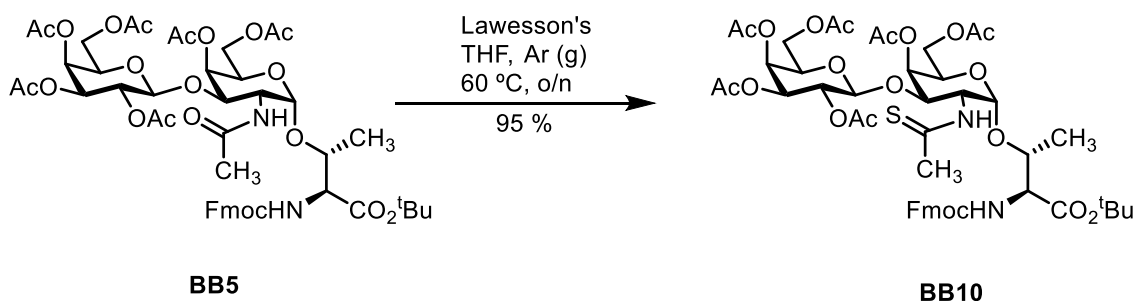


Figura 3.9.- Estructura química del glicopéptido objetivo GP-VIII.

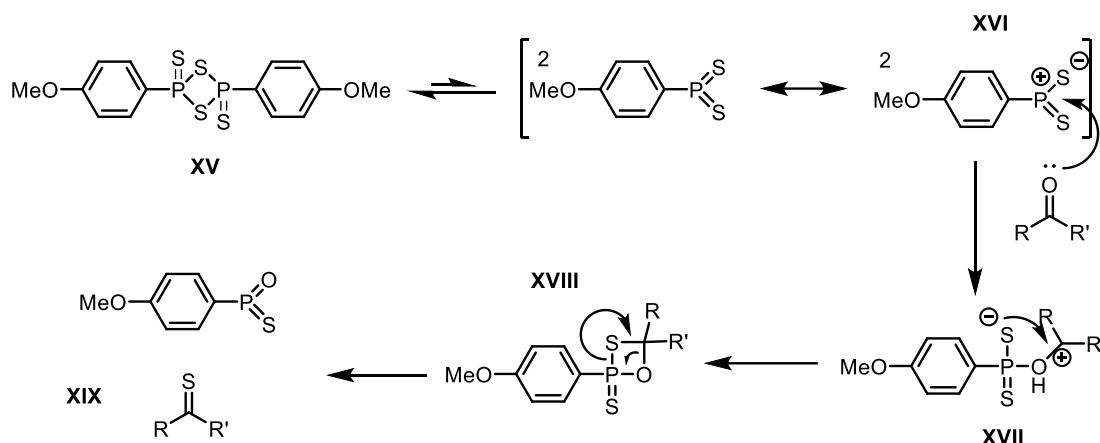
Este péptido contiene residuos de treonina equipados con fragmentos disacarídicos de β -D-Gal-(1-3)- α -D-(N-tioacetil)-galactosamina, donde las funciones acetamida, presentes en los sistemas naturales, han sido reemplazadas por grupos tioacetamida.

Para la preparación de **GP-VIII** hicimos uso del fragmento **BB5**, cuya síntesis se detalla en el apartado 3.1.4. de la presente tesis doctoral. Dicho intermedio fue sometido a un tratamiento con el reactivo de Lawesson's para obtener en un solo paso el derivado objetivo final **BB10**, tal y como se muestra en el Esquema 3.41.



Esquema 3.41.- Síntesis del “building block” BB10 a partir del precursor BB5.

La reacción se llevó a cabo en THF anhidro, haciendo uso de atmósfera inerte y procedió con un rendimiento del 95%. El mecanismo comúnmente aceptado para dicha transformación se detalla a continuación en el Esquema 3.42.



Esquema 3.42.- Mecanismo comúnmente aceptador para la transformación de grupos carbonilo en tiocarbonilo haciendo uso del reactivo de Lawesson's.

Primeramente, el reactivo de Lawesson's (**XV**) equilibra con la forma iluro de fósforo más reactiva (**XVI**), que tras el subsiguiente ataque nucleófilo del grupo carbonilo genera un tio-oxo-fosfetano intermedio (**XVII**). Dicha especie evoluciona para generar el tiocarbonilo final (**XIX**) a través del intermedio cíclico **XVIII**, proceso termodinámicamente favorecido por la formación del doble enlace P=O en un paso de cicloreversión que se asemeja en parte al mecanismo típico de la reacción de Wittig.

Finalmente, haciendo uso de **BB10**, preparamos el glicopéptido **GP-VIII**, empleando para ello un procedimiento experimental enteramente análogo al utilizado para la síntesis de **GP-I** y **GP-II** (ver apartado 3.1.1.2).

3.1.8. Síntesis de los glicopéptidos híbridos portadores de β -D-Gal-(1-3)- α -D-(N-formil)-galactosamina (GP-IX) y β -D-Gal-(1-3)- α -D-(N-trifluoroacetil)-galactosamina (GP-X y GP-XI)

La estructura de los glicopéptidos **GP-IX**, **GP-X** y **GP-XI** se muestran en la Figura 3.10.

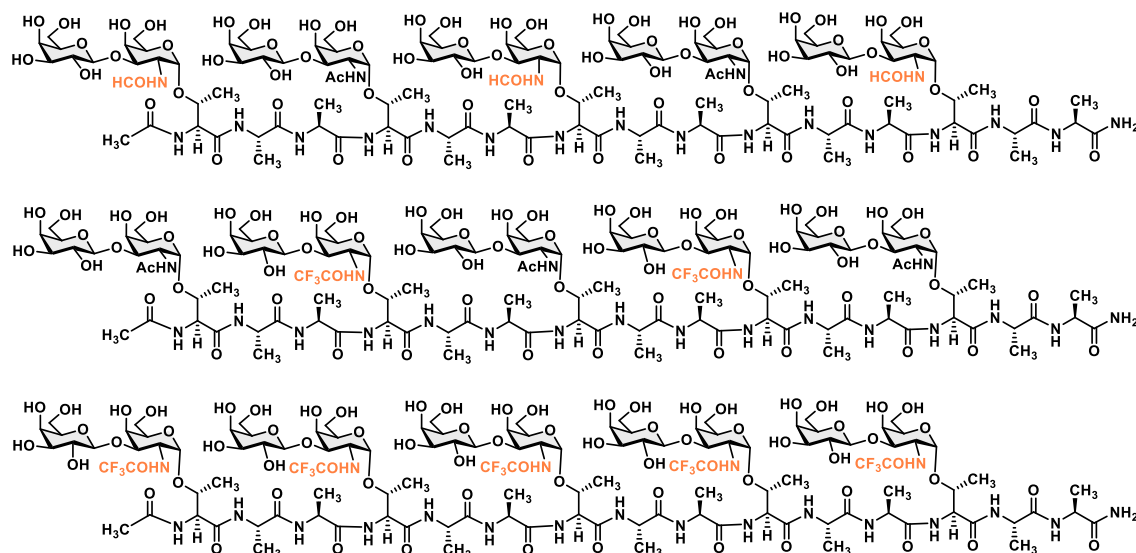
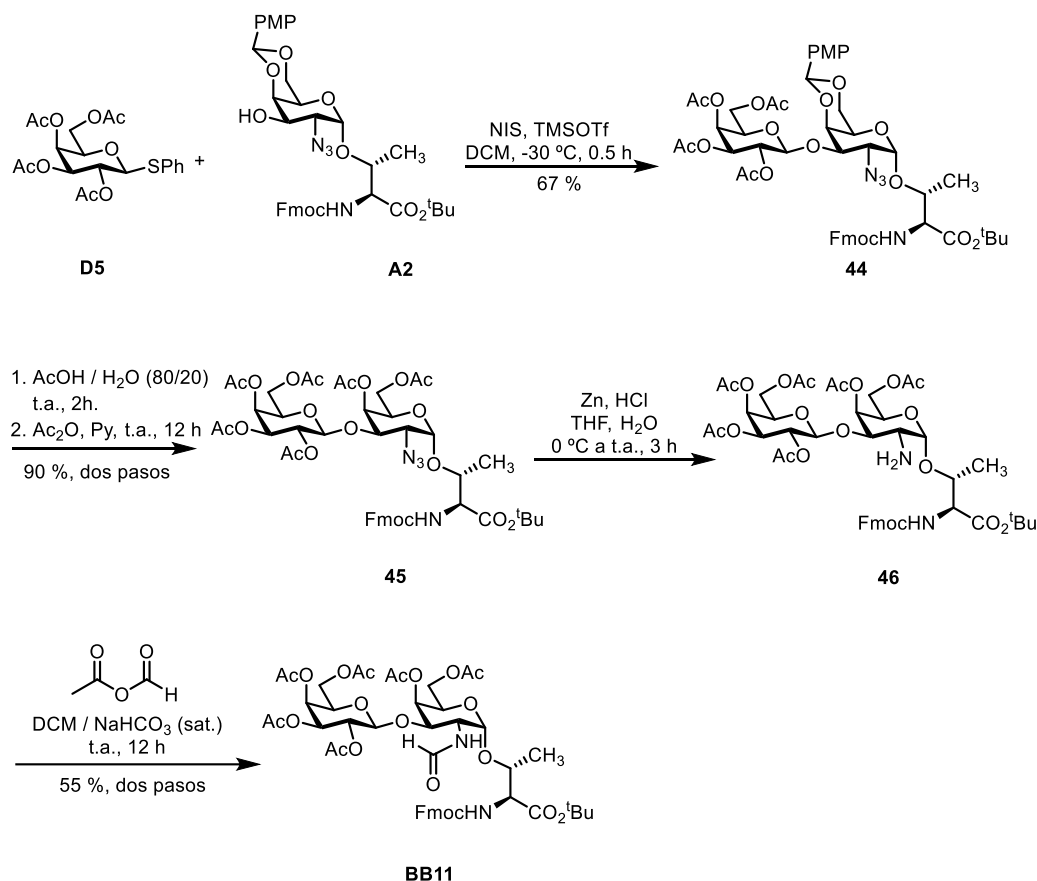


Figura 3.10.- Estructura química del glicopéptido objetivo **GP-IX** (arriba), **GP-X** (centro) y **GP-XI** (abajo).

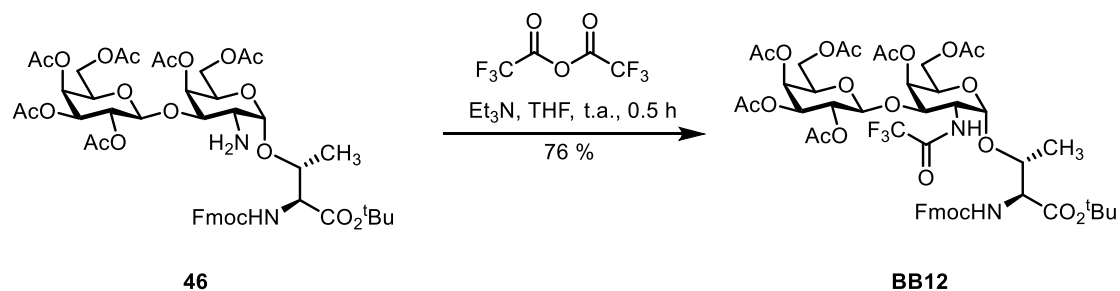
Como puede apreciarse, **GP-IX** combina unidades de β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc con fragmentos disacarídicos donde la función acetamida ha sido reemplazada por grupos formamida. En previsión de posibles equilibrios *E/Z* en las funciones formamida, decidimos limitar su número a tres, con objeto de aliviar la complejidad de los espectros de RMN resultantes y facilitar su análisis estructural. Por lo que respecta a **GP-X**, este incorpora funciones trifluoroacetamida, cuyo número se limitó inicialmente a dos con objeto de prevenir posibles problemas de solubilidad del glicopéptido. Finalmente, el derivado **GP-XI** incorpora funciones trifluoroacetamida en todos los fragmentos disacarídicos.

Para la preparación de **GP-IX** fue preciso preparar cantidades adicionales del fragmento **BB5**, cuya síntesis se detalla en el apartado 3.1.4. de la presente tesis doctoral, junto con una versión modificada del mismo (**BB11**) que incorpora la función formamida. Para la síntesis de este último, se requirió previamente la preparación del aceptor **A2**, que se preparó a partir del derivado **9** (ver apartado 3.1.1.1.2), tal y como se detalla en el Esquema 3.43.



Esquema 3.44.- Estrategia sintética empleada para la preparación de **BB11 a partir del donador **D5** y el aceptor **A2**.**

En lo referente a la preparación de los glicopéptidos **GP-X** y **GP-XI**, fue necesario en primer lugar obtener el “building block” **BB12**, cuya síntesis se realizó en un solo paso a partir del intermedio **46**, descrito en este mismo apartado, tal y como se muestra en el Esquema 3.45.



Esquema 3.45.- Reacción empleada para la síntesis del “building block” **BB12 a partir del intermedio **46**.**

Así, partiendo del intermedio **46** se procedió a su tratamiento con anhídrido trifluoroacético en medio básico, utilizando THF como disolvente, obteniéndose el compuesto final **BB12** con un rendimiento del 76%.

A partir de los “*building block*” **BB11** y **BB12** se prepararon los glicopéptidos **GP-IX**, **GP-X** y **GP-XI** respectivamente, empleando un procedimiento experimental análogo al previamente descrito para los glicopéptidos derivados de manosa **GP-I** y **GP-II** (apartado 3.1.1.2.).

3.2. SÍNTESIS DE TRIPÉPTIDOS MODELO (-ATA-) M-I, M-II, M-III, M-IV y M-V

Las estructuras de los tripéptidos objetivo se detallan en la Figura 3.11.

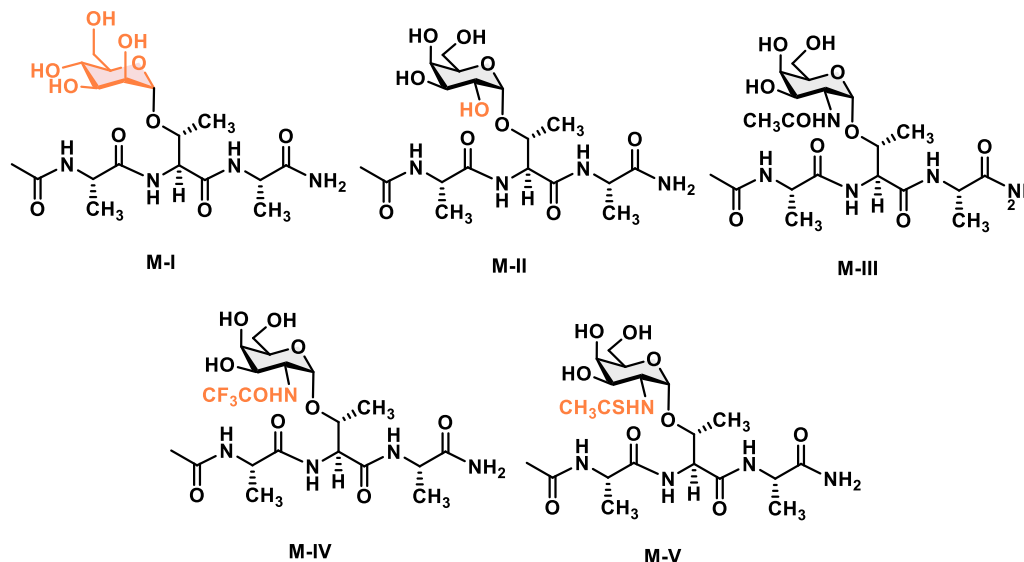
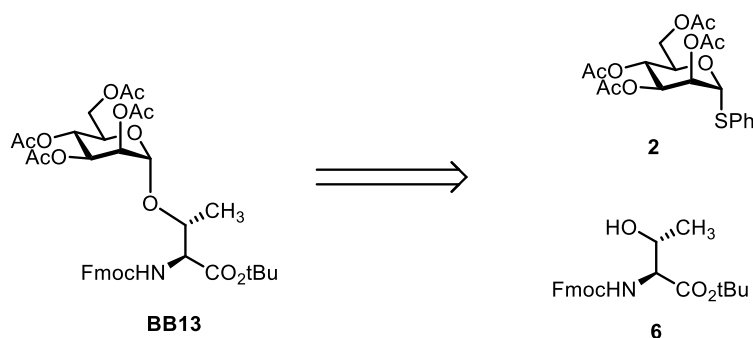


Figura 3.11.- Representación de los tripéptidos objetivo **M-I**, **M-II**, **M-III**, **M-IV** y **M-V**.

Nuevamente, el paso clave para su preparación es la obtención de los correspondientes “*building blocks*” de treonina glicosilados y convenientemente funcionalizados para su incorporación en un protocolo de síntesis en fase sólida. A continuación, se detalla la estrategia empleada para la síntesis de dichos derivados, así como de los tripéptidos finales.

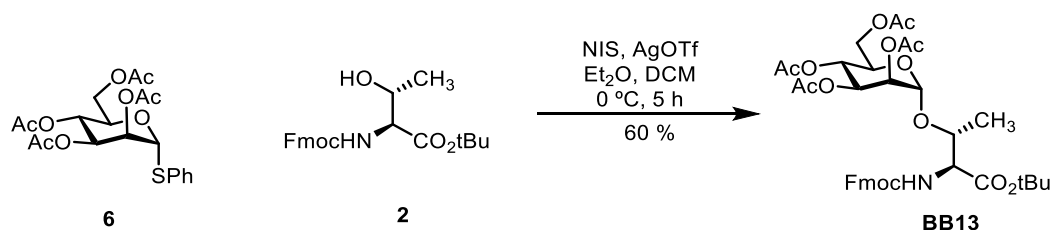
3.2.1. Síntesis del tripéptido portador de α -D-manosa M-I

Para su preparación fue preciso abordar, primeramente, la síntesis del “*building block*” **BB13**, equipado con una unidad de α -manosa anclada a la cadena lateral de la treonina, tal y como se muestra en el Esquema 3.46.



Esquema 3.46.- Desconexión clave del esquema retrosintético concebido para la preparación del “*building block*” **BB13**.

Su preparación implica como paso clave una reacción de acoplamiento entre la especie aceptora **2** y el donador **6**. En este caso, al utilizar una manosa como donador, la presencia de un grupo director en posición 2 del anillo nos facilitó la obtención del aducto de glicosilación con estereoquímica α deseada, de acuerdo con lo detallado en el apartado 3.1.1. de la presente tesis. La síntesis de las especies donadora **2** y aceptora **6** se detalla en los apartados 3.1.1.1.1 y 3.1.1.1.2, respectivamente. El acoplamiento entre ambos se llevó a cabo en las condiciones especificadas en el Esquema 3.47 con NIS y AgOTf para dar el derivado deseado con un rendimiento del 60%.

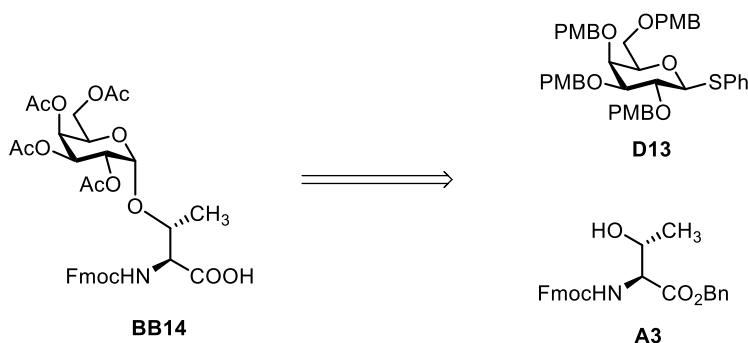


Esquema 3.47.- Representación de la reacción de glicosilación entre el donador **6** y el aceptor **2** para la obtención de **BB13**.

Este se empleó en la preparación del tripéptido **M-I**, haciendo uso de un protocolo de síntesis en fase sólida convencional, análogo al ya descrito en el apartado 3.1.1.2 de la presente tesis. Como única diferencia, en este caso no recurrimos a un sintetizador automático, llevando a cabo todos los acoplamientos de forma manual.

3.2.2. Síntesis del tripéptido portador de α -D-galactosa **M-II**.

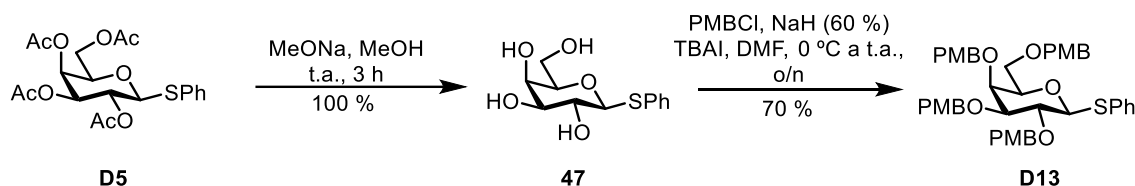
Para su preparación fue preciso, primeramente, abordar la síntesis del “building block” **BB14**, equipado con una unidad de α -galactosa anclada a la cadena lateral de la treonina.



Esquema 3.48.- Desconexión clave del esquema retrosintético concebido para la preparación del “building block” **BB14**.

Su preparación implica como paso clave una reacción de acoplamiento entre la especie donadora **D13** y el aceptor **A3**. Como donador se eligió **D13**, equipado

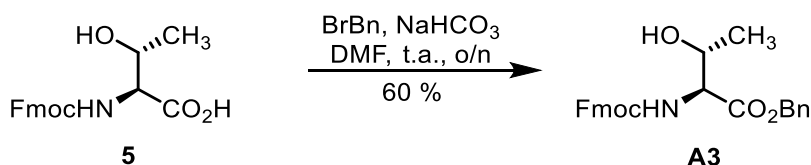
con un grupo protector no participante en posición 2, con el objetivo de favorecer la formación preferente del aducto α en la reacción de glicosilación. El procedimiento sintético para su preparación se detalla en el Esquema 3.49.



Esquema 3.49.- Síntesis del donador **D13 a partir del intermedio **D5**.**

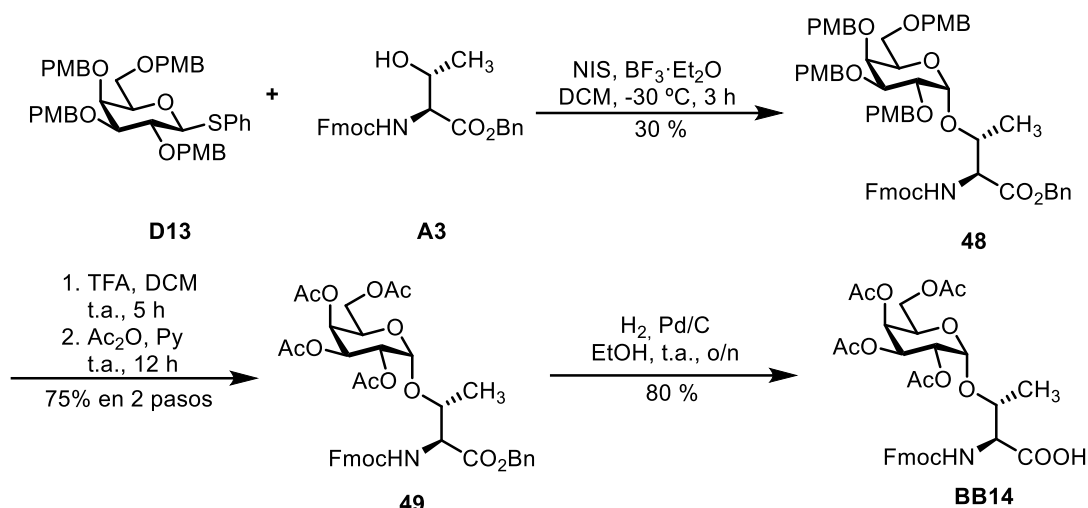
Así, partiendo de **D5** (cuya síntesis se detalló en el apartado 3.1.4 de la presente tesis), se realizó un tratamiento en condiciones de Zemplén con objeto de eliminar las funciones acetato. Finalmente, el tratamiento de **47** con cloruro de *p*-metoxibencilo en medio básico utilizando DMF como disolvente permitió la obtención del donador **D13** con un rendimiento del 70%.

Por lo que respecta a la síntesis del aceptor **A3**, este se obtuvo en un solo paso a partir del derivado **5**, tal y como se detalla en el Esquema 3.50.



Esquema 3.50.- Procedimiento sintético empleado para la preparación del aceptor **A3 a partir de **5**.**

Una vez obtenidos tanto el donador **D13** como el aceptor **A3**, procedimos al acoplamiento de ambos, siguiendo el procedimiento indicado en el Esquema 3.51. Así, llevamos a cabo la reacción de glicosilación utilizando *N*-iodosuccinimida como activante del tioglicósido, trifluoruro de boro dietileterato como ácido de Lewis y diclorometano como disolvente. La temperatura se estableció en $-30\text{ }^\circ\text{C}$, manteniéndose constante hasta la completa desaparición del donador, lo que condujo al aducto de glicosilación **48** con un rendimiento del 30%. El tratamiento subsiguiente con una mezcla de TFA en diclorometano al 40% permitió la eliminación de los grupos *p*-metoxibencilo para generar un intermedio que fue acetilado, sin purificación previa, empleando condiciones convencionales, para dar como resultado el derivado peracetilado **49** con un rendimiento del 75% en los dos pasos. Finalmente, fue necesaria una etapa de hidrogenólisis del bencil éster presente en el aminoácido para obtener el compuesto final **BB14** con un rendimiento del 80%.



Esquema 3.51.- Esquema sintético para la preparación del “building block” **BB14 a partir del donador **D13** y el aceptor **A3**.**

Una vez obtenido **BB14**, se procedió a la síntesis del tripéptido **M-II**, siguiendo un protocolo de síntesis en fase sólida convencional análogo al empleado en la síntesis del modelo **M-I**.

3.2.3. Síntesis del tripéptido portador de α -D-GalNAc (**M-III**)

Nuevamente, para la preparación de dicho compuesto fue necesaria, en primer lugar, la síntesis del “building block” correspondiente. En este caso en particular, se utilizó el derivado **10**, cuya síntesis fue descrita en el apartado 3.1.1.1.2 de la presente tesis doctoral y cuya estructura se muestra en la Figura 3.12.

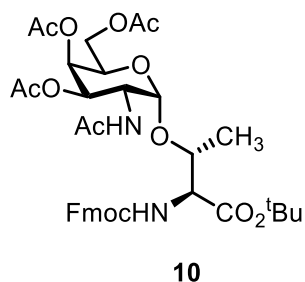
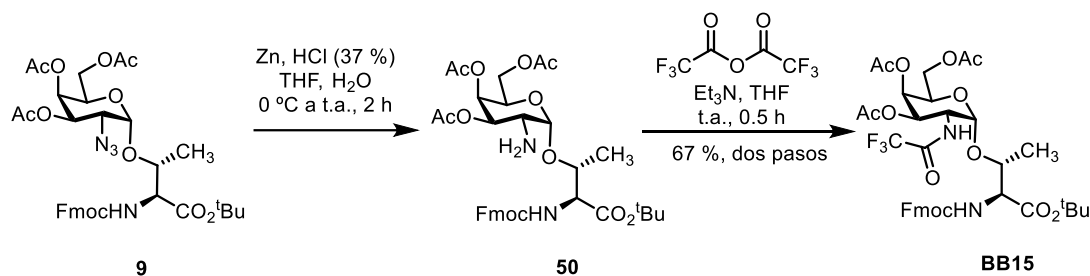


Figura 3.12.- Representación esquemática del derivado **10 empleado para la síntesis del tripéptido objetivo **M-III**.**

Utilizando **10** como “building block”, se procedió a la preparación del sistema modelo **M-III** de una manera enteramente análoga a la descrita para la síntesis de **M-I**.

3.2.4. Síntesis del tripéptido portador de *N*-trifluoroacetilgalactosamina M-IV

Para su preparación fue preciso, primeramente, abordar la síntesis del “*building block*” **BB15**, equipado con una unidad de *N*-trifluoroacetilgalactosamina anclada a la cadena lateral de la treonina. La preparación de este se realizó de una manera análoga a la utilizada para obtener el derivado disacárido **BB12** descrito en el apartado 3.1.8 de la presente tesis. La secuencia de reacciones utilizada se detalla en el Esquema 3.52.



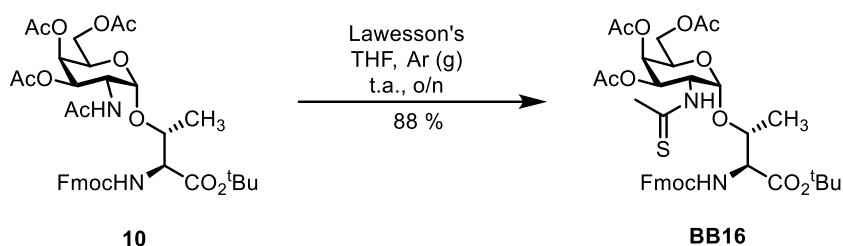
Esquema 3.52.- Procedimiento empleado para la preparación del “*building block*” **BB15 a partir del intermedio **9**.**

Así, partiendo de **9**, un tratamiento con Zn en medio ácido y utilizando una mezcla de THF y agua como disolventes promovió la reducción del grupo azida a amina. El derivado **50** resultante se hizo reaccionar, sin purificación previa, con anhídrido trifluoroacético en medio básico para generar el compuesto final **BB15** con un rendimiento global del 67%.

Finalmente, haciendo uso del intermedio **BB15**, se procedió a la síntesis del tripéptido modelo **M-IV** empleando procedimientos análogos a los ya explicados con anterioridad (Apartado 3.2.1).

3.2.5. Síntesis del tripéptido portador de α -D-(N-tioacetil)-galactosamina (M-V)

Para la síntesis del tripéptido **M-V** fue necesario en un primer lugar la síntesis del “*building block*” **BB16**, que se obtuvo en un solo paso mediante el tratamiento del derivado **10** con el reactivo de Lawesson's, tal y como se muestra en el Esquema 3.53.



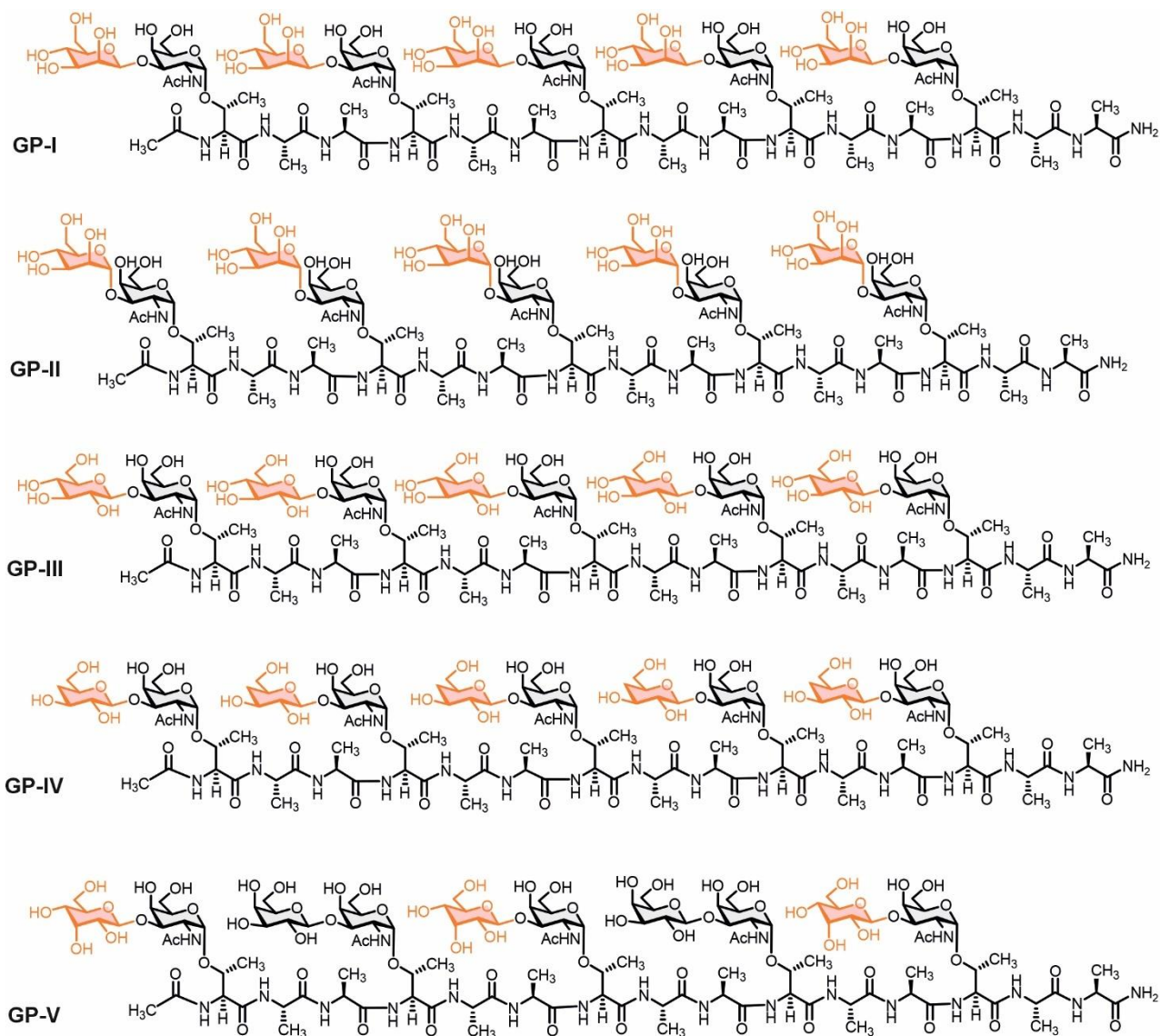
Esquema 3.53.- Procedimiento empleado para la preparación del “*building block*” **BB16 a partir del intermedio **10**.**

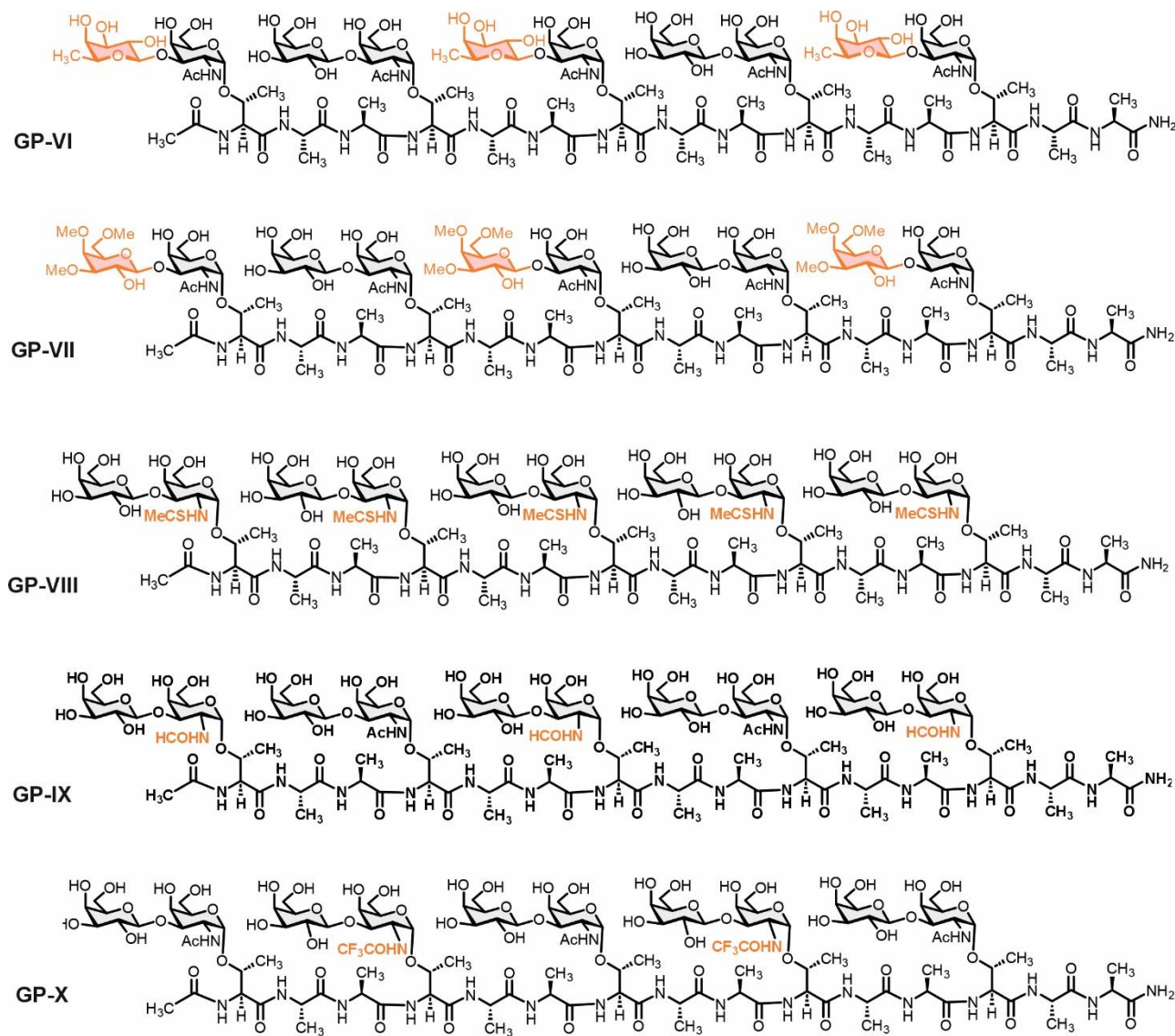
Dicha transformación se llevó a cabo en THF, a temperatura ambiente y en atmósfera inerte, y nos permitió obtener el compuesto final **BB16** en un solo paso y con un rendimiento del 88%.

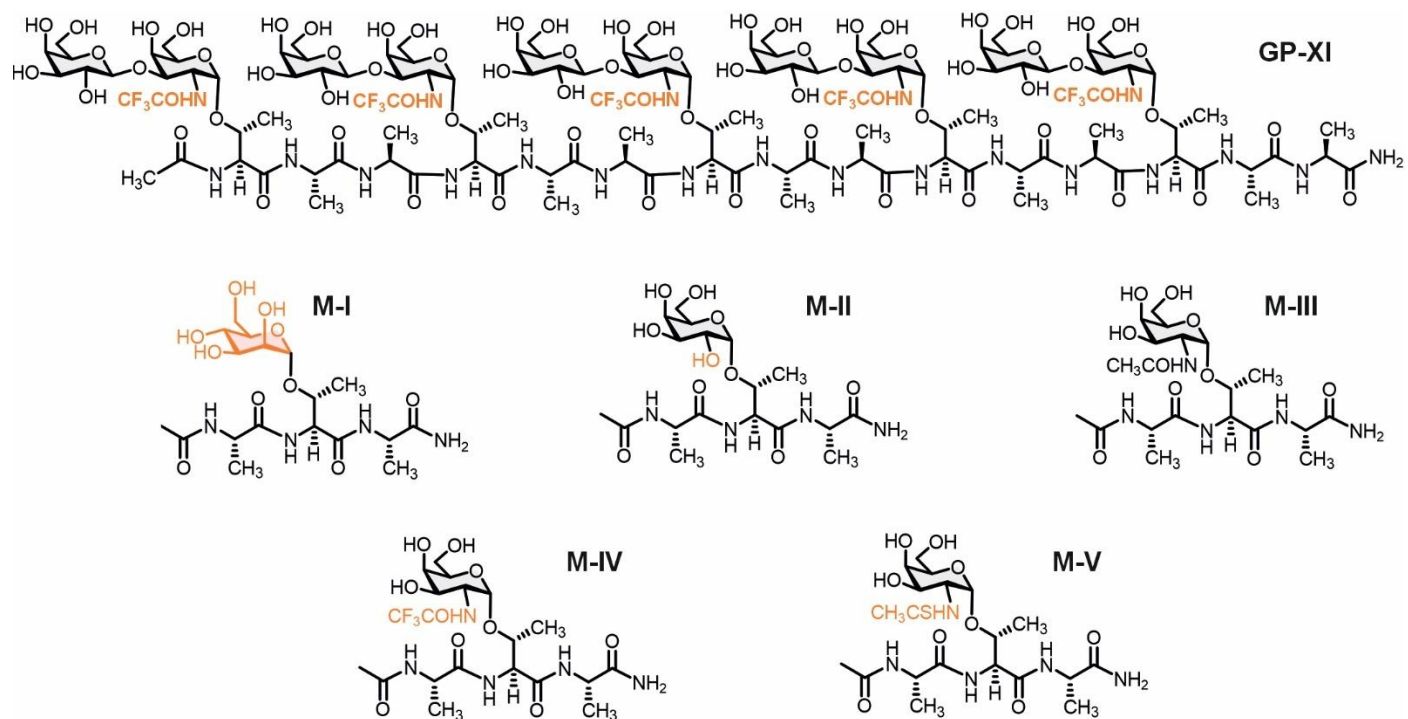
Nuevamente la preparación del modelo **M-V** se llevó a cabo tal y como se detalla en el apartado 3.2.1.

3.3. RESUMEN DE LAS ESTRUCTURAS SINTETIZADAS

En este apartado se muestra la estructura química completa de todos los derivados sintetizados. Con objeto de favorecer la visualización de las diferencias estructurales entre ellos, se representan todos los glicósidos en el mismo lado de la cadena principal peptídica. Adicionalmente, las modificaciones introducidas con respecto a la secuencia natural se destacan en naranja.







CAPÍTULO 4.

ESTRUCTURA DE GLICOPÉPTIDOS ANTICONGELANTES EN DISOLUCIÓN

4. ESTRUCTURA DE GLICOPÉPTIDOS ANTICONGELANTES EN DISOLUCIÓN

4.1. Análisis de las propiedades conformacionales de los glicopéptidos sintetizados mediante RMN

El objetivo del presente capítulo es determinar en qué medida las propiedades estructurales de los glicopéptidos anticongelantes se ven alteradas por las modificaciones introducidas en los derivados sintetizados. Para ello, incluimos en nuestro estudio tres sistemas de referencia sintetizados por el grupo del profesor Corzana en el Instituto de Investigación en Química de la Universidad de La Rioja. Dichos sistemas se nombraron con las letras **A-C** y su estructura química se muestra en la Figura 4.1. Puede apreciarse cómo el derivado **A** es el glicopéptido natural cuya estructura en disolución se asemeja, de acuerdo con estudios previos, a una hélice PPII flexible. El derivado **B**, por su parte, es una versión truncada del primero en la que las unidades de galactosa no reductora se han eliminado. Finalmente, el derivado **C** es una versión de **B** en la cual se ha invertido las posiciones 2 y 4 de las unidades de GalNAc para generar un glicopéptido equipado con residuos de ManNAc. Cabe destacar que en este último el fragmento acetamida adopta una orientación axial y, por tanto, su posición relativa con respecto a la cadena principal peptídica es marcadamente diferente.

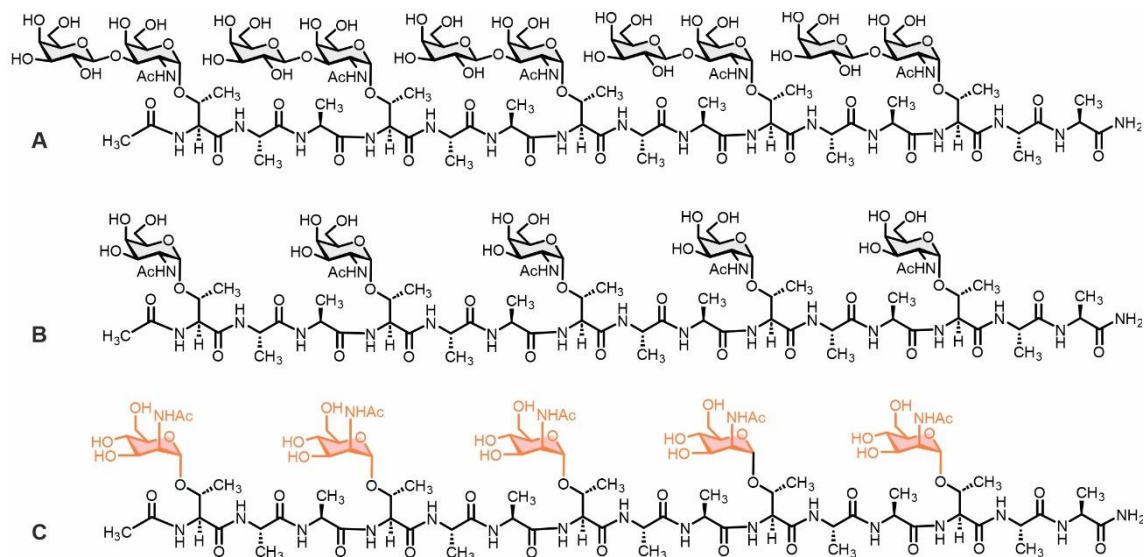


Figura 4.1.- Estructura química de los glicopéptidos de referencia incluidos en nuestro estudio conformacional.

4.1.1. Características generales de los espectros de RMN

Como primera consideración, es preciso señalar que todos los glicopéptidos analizados presentan secuencias altamente repetitivas, lo cual se traduce inevitablemente en espectros con un alto grado de solapamiento. Dicha circunstancia impide una determinación estructural completa por RMN. A pesar de ello, consideramos que una comparación detallada de los datos espectroscópicos obtenidos para el glicopéptido natural (**A**), los compuestos de referencia (**B** y **C**) y los derivados no naturales (**GP-I** a **GP-XI**) puede arrojar luz sobre *las preferencias conformacionales generales* de estos últimos. Con dicho objetivo en mente, adquirimos una batería completa de experimentos 1D y 2D para cada uno de los derivados, tanto en H₂O/D₂O (90/10) como en D₂O. Los experimentos fueron realizados en ausencia de “buffer” y a temperaturas próximas a aquellas en las que estas moléculas ejercen su actividad, esto es, 1 °C en H₂O y 5 °C en D₂O.

La Figura 4.2 muestra la región NH en experimentos 1D adquiridos a 800 MHz con una selección de derivados modificados en posición no reductora de los disacáridos, junto con los correspondientes glicopéptidos de referencia **A-C**. Una simple inspección de los mismos arroja varias conclusiones de gran relevancia. Como primera observación, todos los espectros muestran una apariencia general similar con la excepción del correspondiente al derivado **C**. En particular, las señales correspondientes al NH de treonina experimentan un desplazamiento significativo a campo bajo como consecuencia del cambio de axial a ecuatorial en la orientación de las funciones acetamida. Este comportamiento sugiere que *los fragmentos de acetamida ecuatoriales son un determinante estructural importante en el glicopéptido natural* y, por tanto, alterar su orientación tiene consecuencias conformacionales de calado. Como segunda observación, los espectros correspondientes al derivado natural (**A**) y a su versión truncada (**B**) son muy parecidos, indicando que el extremo no reductor de los disacáridos ejerce una influencia menor sobre la estructura del glicopéptido. De hecho, todos ellos presentan rasgos comunes con señales NH de treonina desplazadas a campo bajo entre 8.8 y 9.1 ppm (región destacada con un recuadro verde en la Figura 4.2). De acuerdo con esto, *los derivados modificados en dicha región deben compartir, en buena medida, propiedades conformacionales similares*.

Por lo que respecta a los protones no intercambiables, estos dan señales con desplazamientos químicos comprendidos en el rango 0-5 ppm. Como cabe esperar, el solapamiento de las mismas es significativo, lo que hace imposible una asignación específica de cada pico a un solo protón de la secuencia. A pesar de ello, las señales correspondientes a los diferentes tipos de protones se agrupan en regiones perfectamente definidas dentro del espectro y pueden, por tanto,

identificarse y etiquetarse de acuerdo con ello, a partir del análisis de experimentos 2D-COSY, 2D-TOCSY y 2D-NOESY a 600 MHz. La Figura 4.3 muestra las señales correspondientes a cada tipo de protón en un experimento HSQC adquirido con el derivado **GP-V**. A modo de ejemplo, también se muestran los experimentos HSQC adquiridos en D₂O para los derivados **GP-V**, **GP-VI** y **GP-VII** en las Figuras 4.3-4.5.

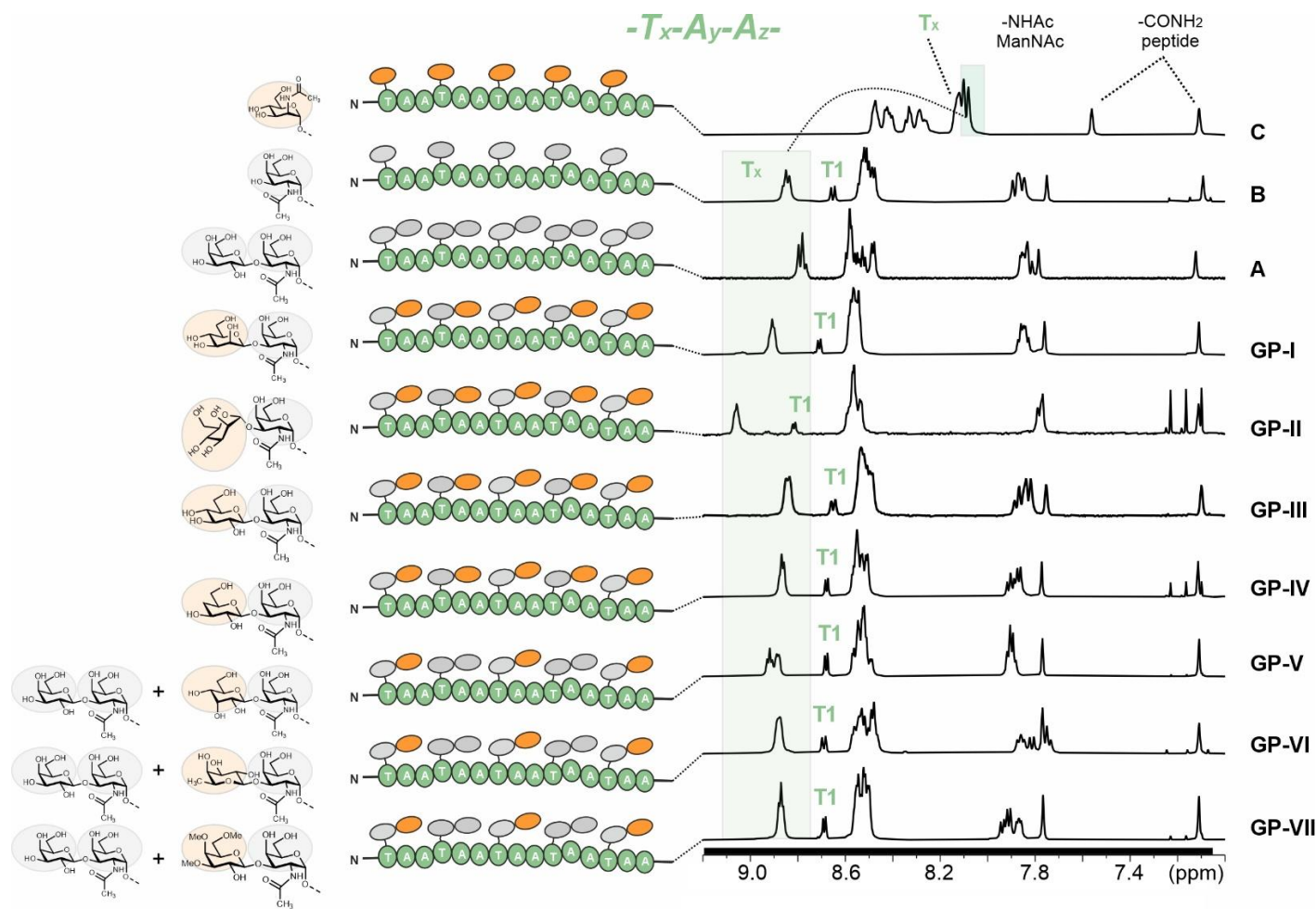


Figura 4.2.- Región NH de espectros de RMN 1D adquiridos con los glicopéptidos **I-VII** y los sistemas de referencia **A-C** en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ a 1 °C. A la izquierda se muestra la estructura química de los glicósidos presentes en los diferentes derivados, junto con una representación esquemática de los glicopéptidos en la que se destaca (en naranja) los puntos de modificación.

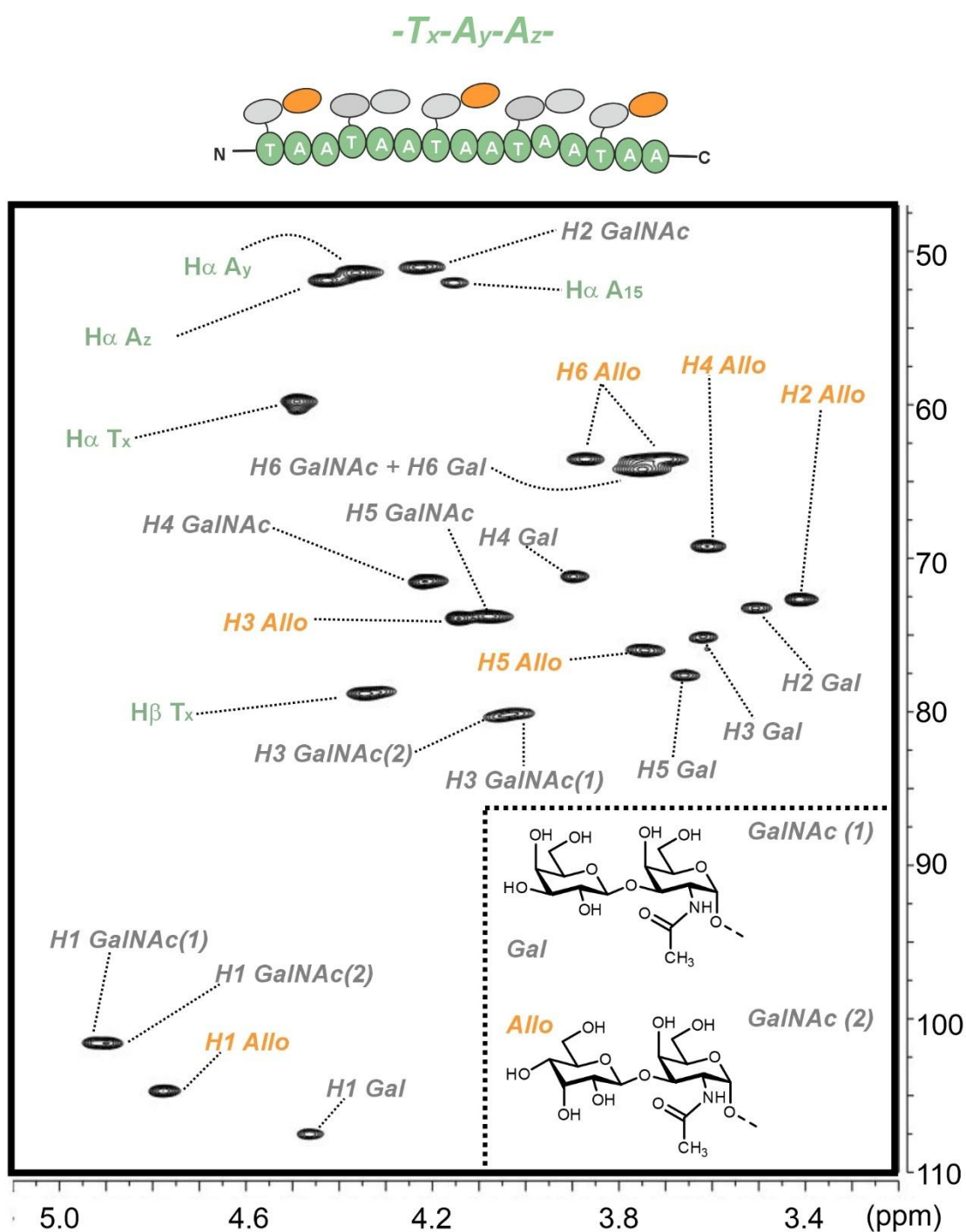


Figura 4.3.- Experimento 2D-HSQC adquirido con el derivado **GP-V** en D_2O a 600 MHz y 5 °C. Se muestra la asignación genérica de los diferentes picos. En el caso de los protones correspondientes a las unidades de GalNAc se indica, si dicha unidad está unida a galactosa o alosa (en paréntesis). Adicionalmente, se representa estructura química de los fragmentos disacarídicos presentes en el glicopéptido (derecha) junto con una representación esquemática del mismo arriba).

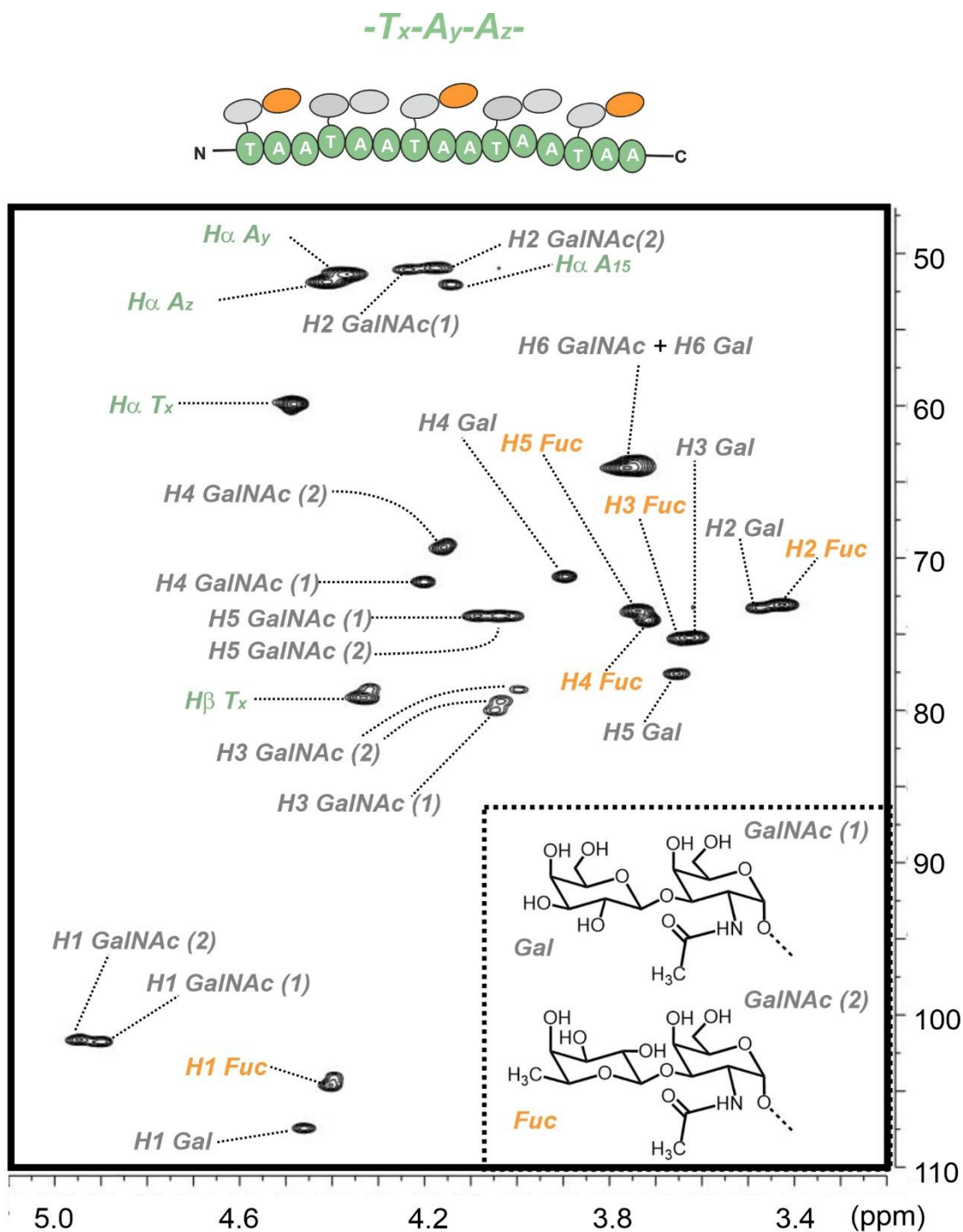


Figura 4.4.- Experimento 2D-HSQC adquirido con el derivado **GP-VI** en D₂O a 600 MHz y 5 °C. Se muestra la asignación genérica de los diferentes picos. En el caso de los protones correspondientes a las unidades de GalNAc se indica, si dicha unidad está unida a galactosa o fucosa (en paréntesis). Adicionalmente, se representa estructura química de los fragmentos disacarídicos presentes en el glicopéptido (derecha) junto con una representación esquemática del mismo arriba)

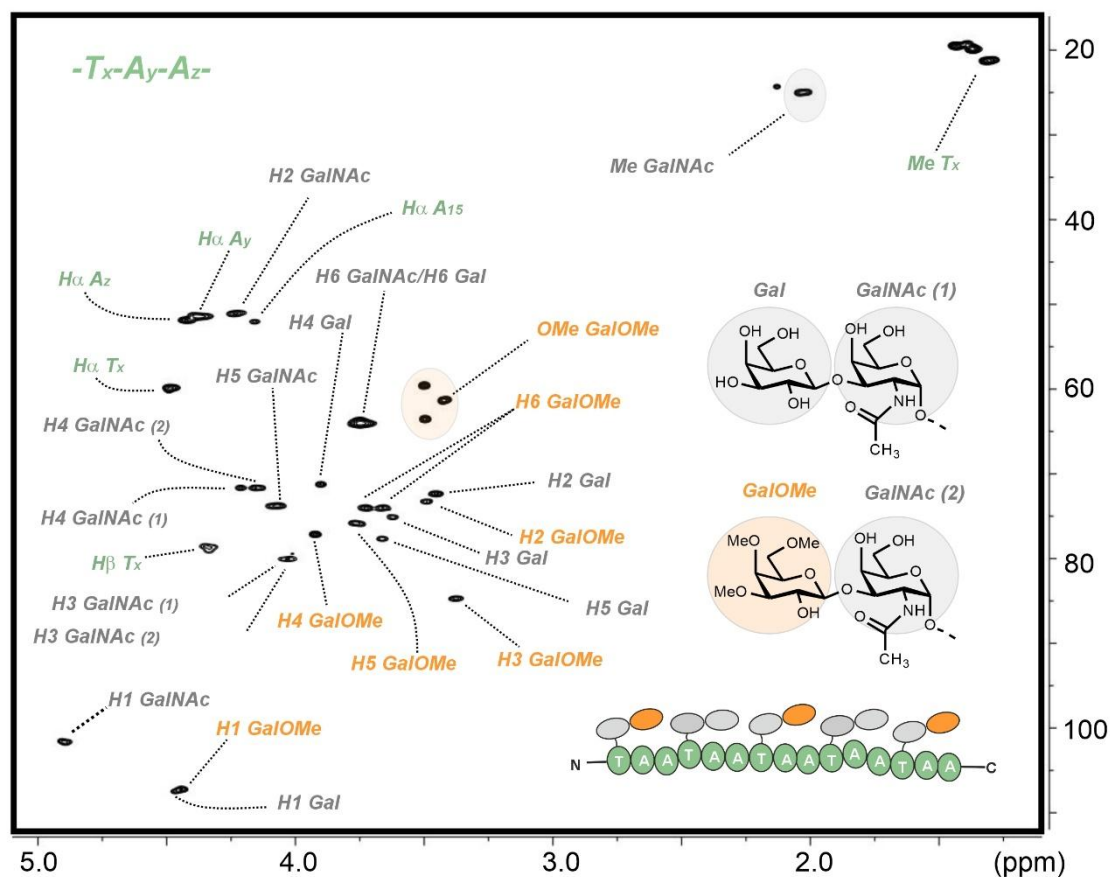


Figura 4.5.- Experimento 2D-HSQC adquirido con el derivado **GP-VII** en D_2O a 600 MHz y 5 °C. Se muestra la asignación genérica de los diferentes picos. En el caso de los protones correspondientes a las unidades de GalNAc se indica, en aquellos casos en los que es posible, si dicha unidad está unida a Galactosa o Galactosa O-metilada (en paréntesis). La estructura química de los glicósidos presentes junto con una representación esquemática del péptido se muestra a la derecha.

4.1.2. Propiedades conformacionales generales de los glicopéptidos I-VII

De acuerdo con los espectros 1D y 2D obtenidos, los *glicopéptidos no naturales I-VII* adoptan una conformación de tipo hélice PPII extendida, similar a la observada para el sistema natural (Modelo A). Así, los datos experimentales apuntan a un alto grado de organización para las treoninas glicosiladas, tanto en lo referente a la cadena principal como a la orientación de la cadena lateral o a la conformación adoptada por los fragmentos disacarídicos (Figura 4.6a). Dichos residuos presentan, típicamente, constantes de acoplamiento escalar $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ de 8.5-9.5 Hz, consistentes con valores del ángulo ϕ (C-N-C α -C) en el rango -75°/-100°. Por su parte, la orientación en torno a ψ (N-C α -C-N) es relativamente extendida, tal y como atestigua el patrón de NOEs secuenciales observados, con contactos H α_n /NH $_{n+1}$ muy intensos y NOEs NH $_n$ /NH $_{n+1}$ prácticamente indetectables. Ambas observaciones apuntan a una hélice de poliprolina de tipo PPII, cuyos valores de ϕ/ψ típicos se sitúan en torno a -75°/150°. De un modo similar, tanto las constantes $^3J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}$, cuyos valores son inferiores a 2.5 Hz, como los contactos secuenciales indican un alto grado de definición para el ángulo χ_1 (H α -C α -C β -O β), con valores próximos a 180°. Finalmente, los NOEs intraresiduo indican que los fragmentos de glicósido adoptan orientaciones relativamente definidas con respecto a la cadena principal peptídica.

Curiosamente, buena parte de estas observaciones son extensibles al tripéptido modelo **M-III** (Figura 3.11) equipado con único residuo de treonina, lo que sugiere que dicho comportamiento tiene su origen en interacciones carbohidrato/péptido de naturaleza estrictamente local. Entre ellas pueden considerarse varias posibilidades (Figura 4.6b). En primer lugar, la orientación de las funciones acetamida de GalNAc permite su participación en enlaces de hidrógeno mediados por agua con el NH de treonina, lo que restringiría el valor del ángulo diedro ϕ , así como la cadena lateral. Contactos similares se han observado mediante cristalografía de rayos X en derivados del antígeno T $_n$ y su existencia es consistente con la detección de NOEs claros entre ambas funciones NH (ver debajo). De modo simultáneo, el N-acetilo de GalNAc puede involucrarse en una interacción de tipo n- π con el carbonilo de treonina, contribuyendo a la definición del ángulo ψ . Además, es preciso considerar que transiciones de hélice PPII (ϕ/ψ -75°/150°) a α -hélice (ϕ/ψ -60°/-45°), en principio favorable en péptidos con un alto contenido en alanina, conducen a conflictos estéricos entre el péptido y el carbohidrato. En el caso de las unidades de treonina, la adopción de valores de ψ en torno a -45° genera interacciones desfavorables entre la función N-acetilo del GalNAc anclado a la treonina n y el metilo de la alanina en posición $n+1$, tal y como se ilustra en la Figura 4.6b. Por otra parte, cabe mencionar que, en el contexto

de los glicopéptidos, el mismo fragmento de GalNAc puede generar contactos solvofóbicos favorables con el metilo de la alanina en posición relativa $n+2$. Todas estas interacciones se representan en la Figura 4.6b y podrían en principio justificar el alto grado de estructuración observado en las unidades de treonina.

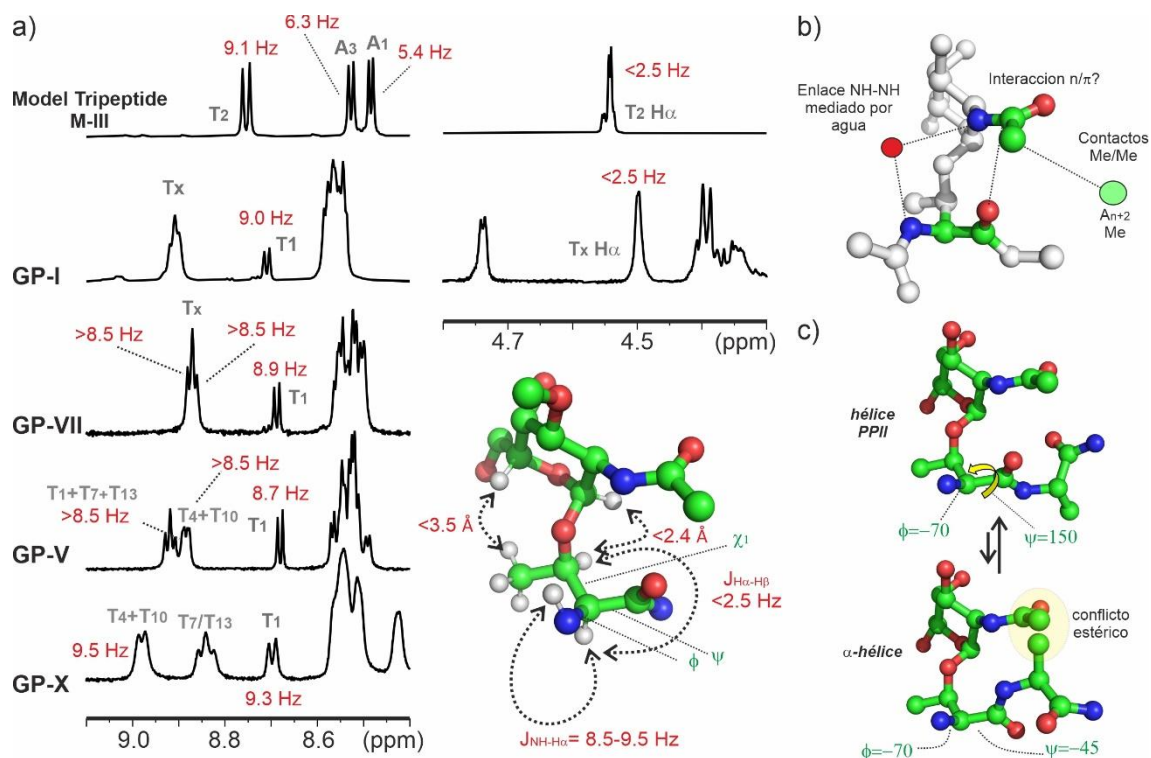


Figura 4.6.- a) Espectros 1D-RMN (600 MHz, H_2O , 1 °C) obtenidos para el tripéptido modelo **M-III**, y los glicopéptidos **GP-I**, **GP-VII**, **GP-V** y **GP-X** (de arriba abajo). Se muestran en rojo las constantes de acoplamiento homonuclear $^3J_{HN-H\alpha}$ para las señales resueltas. Para el tripéptido modelo **M-III** y el derivado **GP-I**, se muestra adicionalmente la región de los espectros correspondientes a los protones $H\alpha$ de treonina. Tanto las constantes de acoplamiento $^3J_{HN-H\alpha}$ y $^3J_{H\alpha-H\beta}$, como los contactos NOE son consistentes con una conformación relativamente fija para los residuos de treonina. b) Representación esquemática de las interacciones potencialmente responsables del carácter conformacionalmente rígido de los residuos de treonina glicosilados. c) Desestabilización estérica de conformaciones tipo α -hélice por el fragmento N-acetilo.

Por lo que respecta a los fragmentos disacarídicos, tanto las uniones entre los dos glicósidos como el enlace entre las unidades de GalNAc y la cadena lateral de treonina adoptan una conformación única, básicamente coincidente con la de mínima energía. Así, el protón anomérico de los residuos en posición no reductora, cuya naturaleza química varía dependiendo del derivado que consideremos, da en todos los casos NOEs muy intensos con el H3 de GalNAc. De un modo similar, los protones anoméricos de GalNAc presentan contactos intensos con el protón $H\beta$ de treonina. Ambas evidencias apuntan a una orientación mayoritaria de los enlaces glicosídicos habitualmente conocida como *syn-ψ*. A modo de ejemplo, la

Figura 4.7 muestra algunos de los NOEs clave que involucran los glicosidos en tres de los glicopéptidos sintetizados.

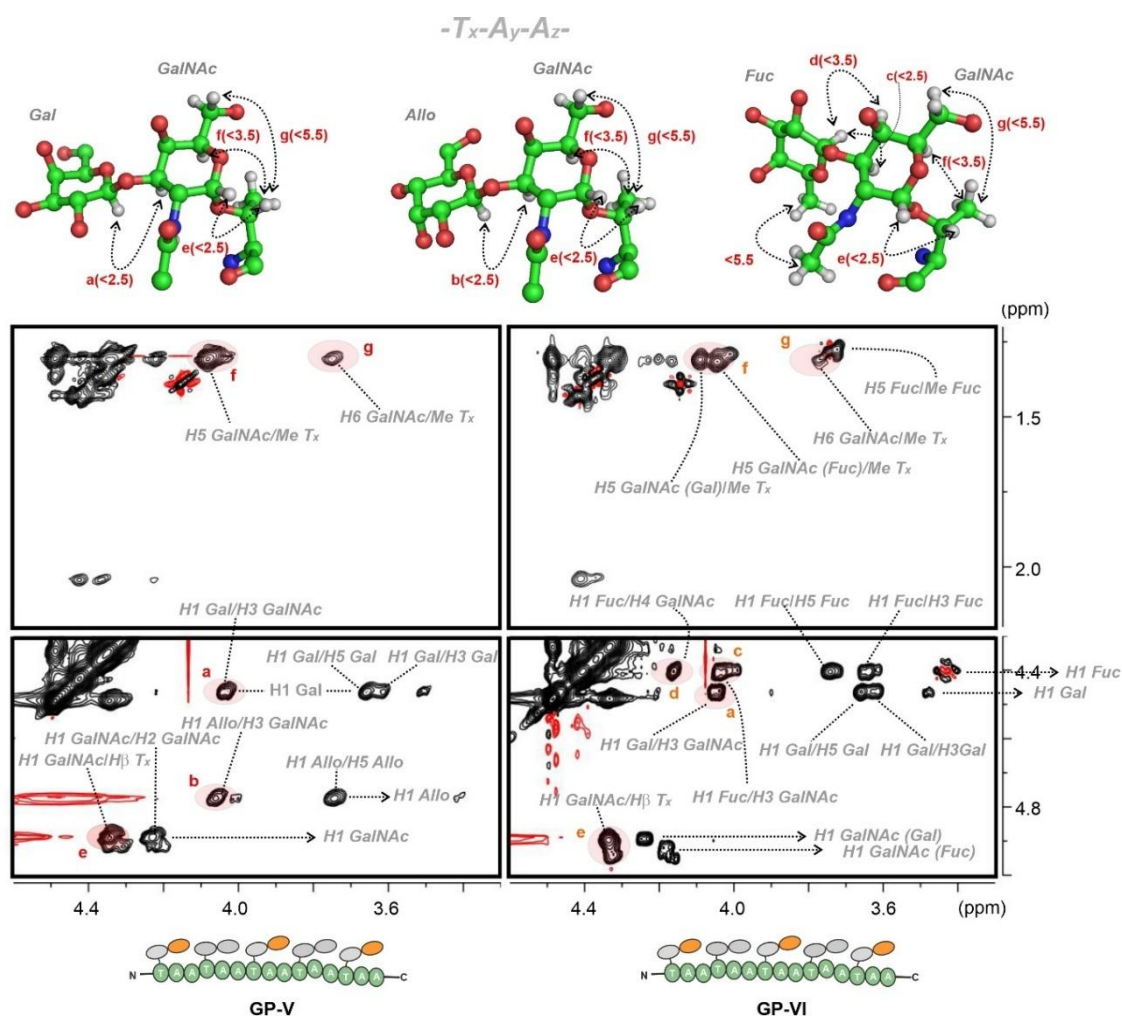


Figura 4.7.- Conformación de los fragmentos glicosídicos D-Gal- β -(1-3)-GalNAc, D-Allo- β -(1-3)-GalNAc y L-Fuc- β -(1-3)-GalNAc presentes en los glicopéptidos GP-V y/o GP-VI. Se muestran regiones seleccionadas de experimentos NOESY (en D_2O a 5 °C con un tiempo de mezcla de 100 ms), medidos con GP-V (izquierda) y GP-VI (derecha). Los contactos NOE clave están etiquetados como **a-f**. Las distancias estimadas se muestran arriba.

Por otra parte, el patrón de contactos NOE observado en todos los péptidos analizados resultó ser totalmente compatible con una hélice extendida de tipo PPII, análoga a la descrita por el grupo del profesor Nishimura para la secuencia natural de los AFGPs.¹⁰⁹ En particular, esta disposición se caracteriza por distancias $H\alpha_n/NH_{n+1}$ muy cortas (< 2.5 Å) y NH_n / NH_{n+1} largas (> 4.5 Å), lo que concuerda plenamente con las intensidades NOE/ROE empíricas a tiempo de mezcla cortos (Figura 4.8). Adicionalmente, los contactos de medio alcance que involucran residuos de treonina, alanina y/o carbohidrato son básicamente idénticos a lo largo de toda la librería de glicopéptidos, incluyendo el sistema natural (**A**), y resultan

coincidentes con los esperados para una hélice anfipática de tipo PPII (Figura 4.9). Curiosamente, para alguna de las secuencias híbridas estudiadas, se detectaron NOEs a media distancia entre fragmentos de carbohidrato posicionados en repeticiones -TAA- contiguas (tal y como se muestra en la Figura 4.10), demostrando que, efectivamente, los carbohidratos se localizan en una misma cara de la hélice. Cabe mencionar que dichos contactos serían indetectables en péptidos con patrones de glicosilación homogéneos.

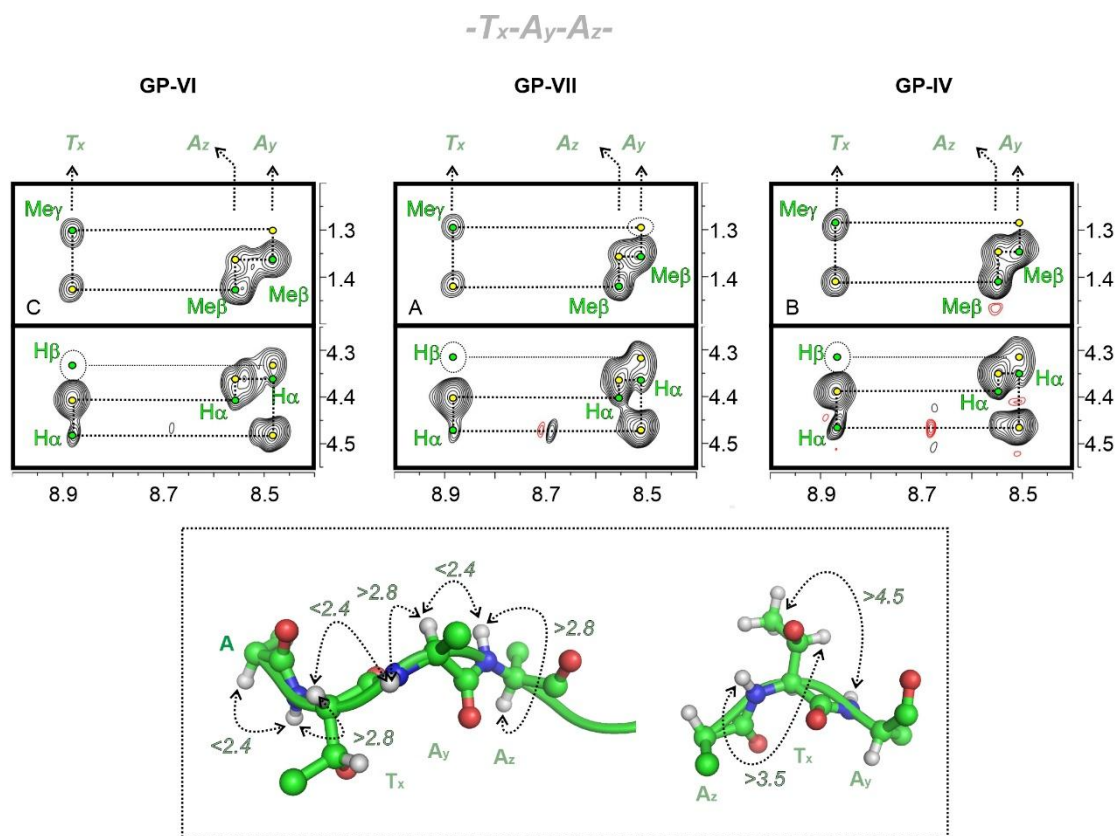


Figura 4.8.- Regiones seleccionadas de espectros NOESY, adquiridos en H_2O a $1^\circ C$ con un tiempo de mezcla de 100 ms, con los glicopéptidos **IV**, **VI** y **VII**. Se etiquetan los contactos $NH/H\alpha$, $NH/H\beta$ y $NH/H\gamma$ (intraresiduo en verde y secuenciales en amarillo). Sus intensidades relativas resultaron consistentes con el patrón de distancias secuenciales e intraresiduo esperadas para una hélice PPII (mostrado debajo).

En definitiva, los datos obtenidos indican que los carbohidratos localizados en posición no reductora de los fragmentos disacáridicos ejercen una influencia marginal sobre la estructura del glicopéptido. De acuerdo con ello, los derivados **I-VII** comparten preferencias conformacionales con el derivado natural.

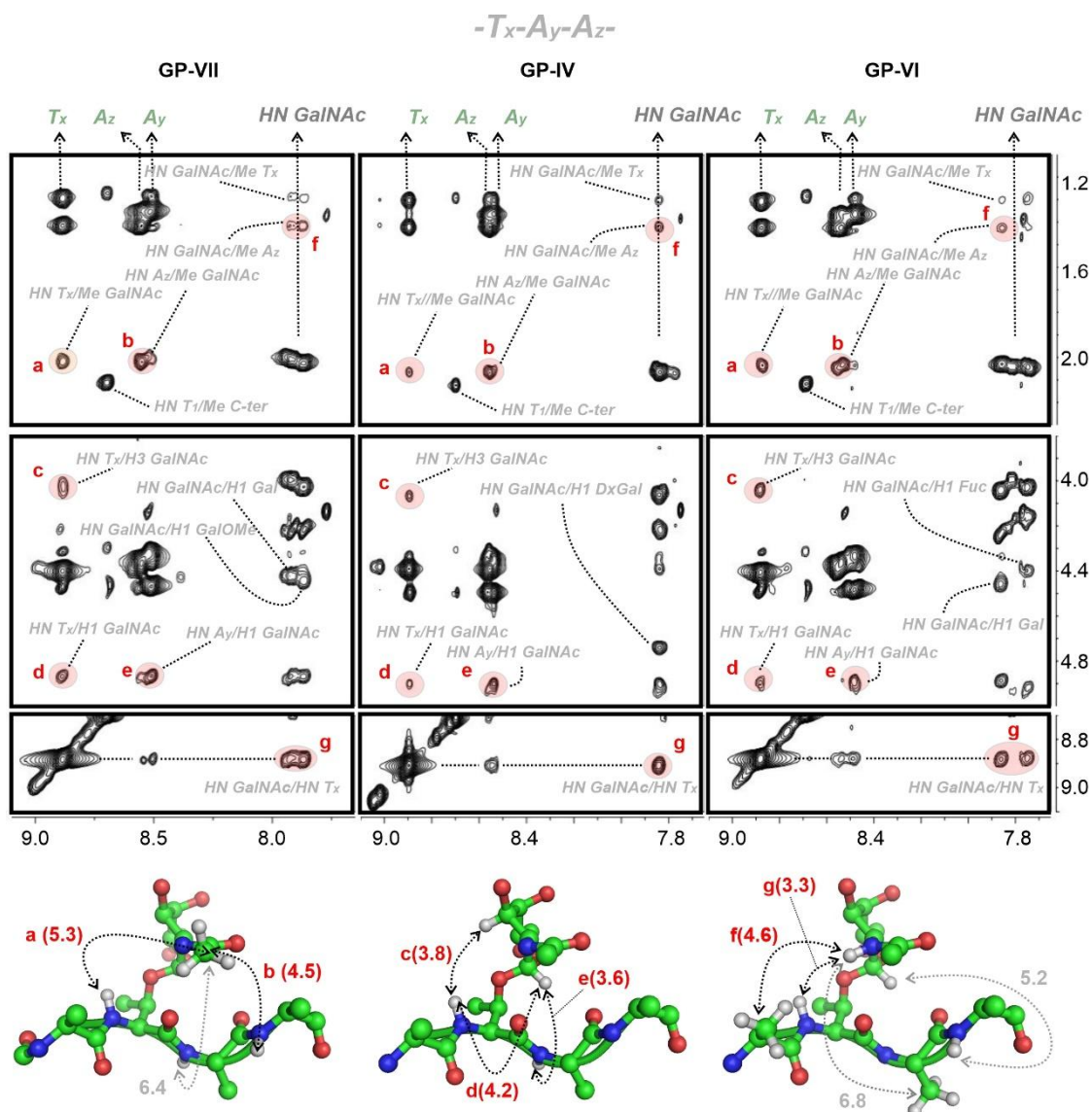


Figura 4.9.- Regiones seleccionadas de los espectros NOESY (en H_2O a $1^\circ C$ con un tiempo de mezcla de 100 ms) adquiridos con los glicopéptidos **IV**, **VI** y **VII**. Se etiquetan con las letras **a-g** (en rojo) los contactos interprotónicos clave observables en todos los casos. Sus intensidades relativas resultaron consistentes con el patrón de distancias esperado para una hélice PPII (mostrado debajo). En el panel inferior se representan en rojo los contactos clave observados experimentalmente y aquellos no detectados en gris.

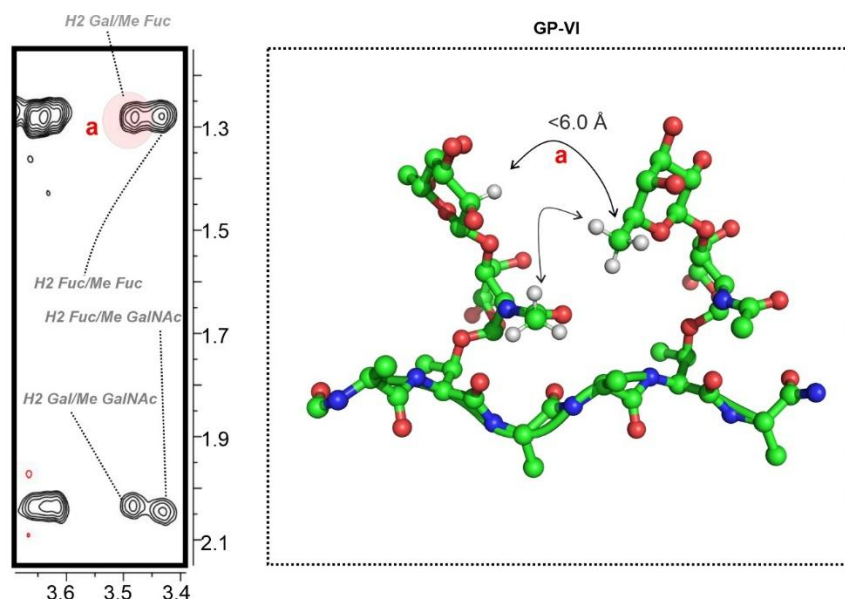


Figura 4.10.- Conexiones NOE entre glicósidos localizados en triadas -TAA- contiguas, detectadas en **GP-VI**. En la parte izquierda de la figura se muestra una sección representativa de un experimento NOESY adquirido con **GP-VI** en D_2O a 5 °C junto con la asignación de alguno de los contactos clave. Los contactos detectados se detallan a la derecha.

4.1.3. Papel estructurador del fragmento N-acetilo ecuatorial de GalNAc.

En contraste con los modelos **A-B** y los derivados **GP-I** a **GP-VII**, cuyos datos espectroscópicos comparten claras semejanzas, el modelo **C**, equipado con una unidad de ManNAc, presenta rasgos distintivos. Así, los espectros de RMN adquiridos indican que la simple inversión de la posición 2 del residuo de GalNAc (Modelo **B** vs. Modelo **C**, ver Figura 4.2) se traduce en alteraciones significativas de desplazamiento químico en la región NH de los espectros. Resulta interesante comprobar que las señales más afectadas se corresponden con los grupos NH de la treonina, los cuales experimentan un desplazamiento hacia campo alto de 0.67 ppm. Este cambio se acompaña de perturbaciones paralelas en la dimensión del carbono, que alcanzan 0.71, 0.77 y 0.44 ppm para los carbonos α de treonina y alanina en las posiciones relativas T_x , A_y y A_z , respectivamente (Figura 4.11). Adicionalmente, los espectros adquiridos con ambos glicopéptidos modelo (**B** y **C**) exhiben un comportamiento ligeramente diferente al variar la temperatura. Más concretamente, puede apreciarse como en **B**, los coeficientes de temperatura (alrededor de 13 ppb/°C) son mayores para los NH de treonina que para los de alanina, lo que indica una pérdida de estructura más pronunciada al aumentar la temperatura. Esta distinción no es evidente para el péptido **C**, donde todos los residuos presentan coeficientes de temperatura más reducidos (7 ppb/°C, Figura 4.12).

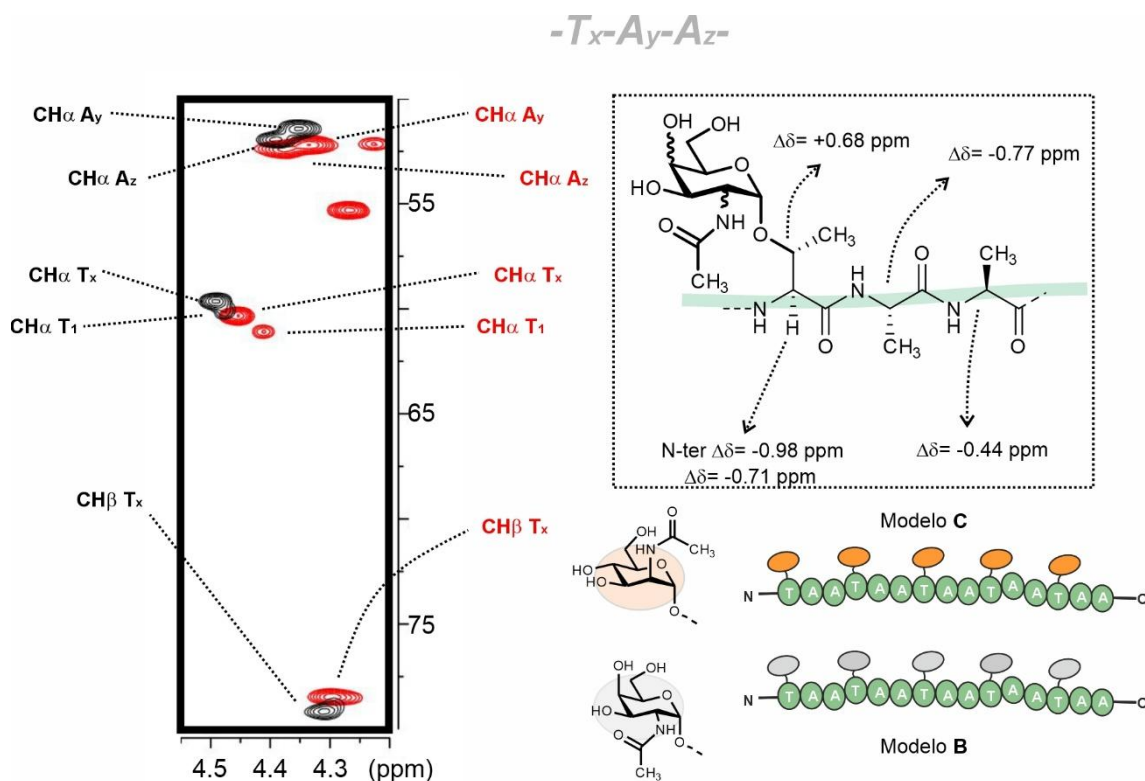


Figura 4.11.- Superposición de espectros HSQC adquiridos para los glicopéptidos modelo **B** (negro) y **C** (rojo). Se han etiquetado fragmentos CH_α y CH_β claves (izquierda). Diferencias de desplazamiento químico de carbono ($\Delta\delta$) entre ambos polipéptidos observadas para las posiciones α y β (derecha).

Con respecto a las constantes de acoplamiento homonucleares, a pesar del solapamiento extremo de señales, datos adquiridos a diferentes temperaturas, combinados con técnicas de deconvolución, nos permitieron acceder a varios valores de $^3J_{HN-H\alpha}$ y/o $^3J_{H\alpha-H\beta}$ (Figura 4.12). Por lo que respecta a los residuos clave de treonina, las primeras resultaron ser marginalmente inferiores a las previamente observadas en glicopéptidos portadores de GalNAc. Por el contrario, los valores de $^3J_{H\alpha-H\beta}$ resultaron ligeramente superiores a los previamente descritos. Ambas evidencias apuntan a una movilidad ligeramente superior a las previamente descritas en torno a los diedros ϕ (C-N-C α -C) y χ_1 (H α -C α -C β -O γ) que, sin embargo, se localizan en zonas similares del espacio conformacional. Finalmente, una inspección detallada de experimentos NOESY/ROESY adquiridos con el modelo **C** puso de manifiesto la existencia de picos de cruce no explicables en base a una conformación extendida de tipo PPII (Figura 4.13). En particular, experimentos ROESY muestran contactos NH/NH secuenciales de intensidad media para los pasos -TA-, consistentes con orientaciones del ángulo diedro ψ de treonina en la zona de α -hélice del Ramachandran. Dicho diagnóstico se ve reforzado por la identificación de contactos adicionales propios de dichas poblaciones conformacionales (Figura 4.13).

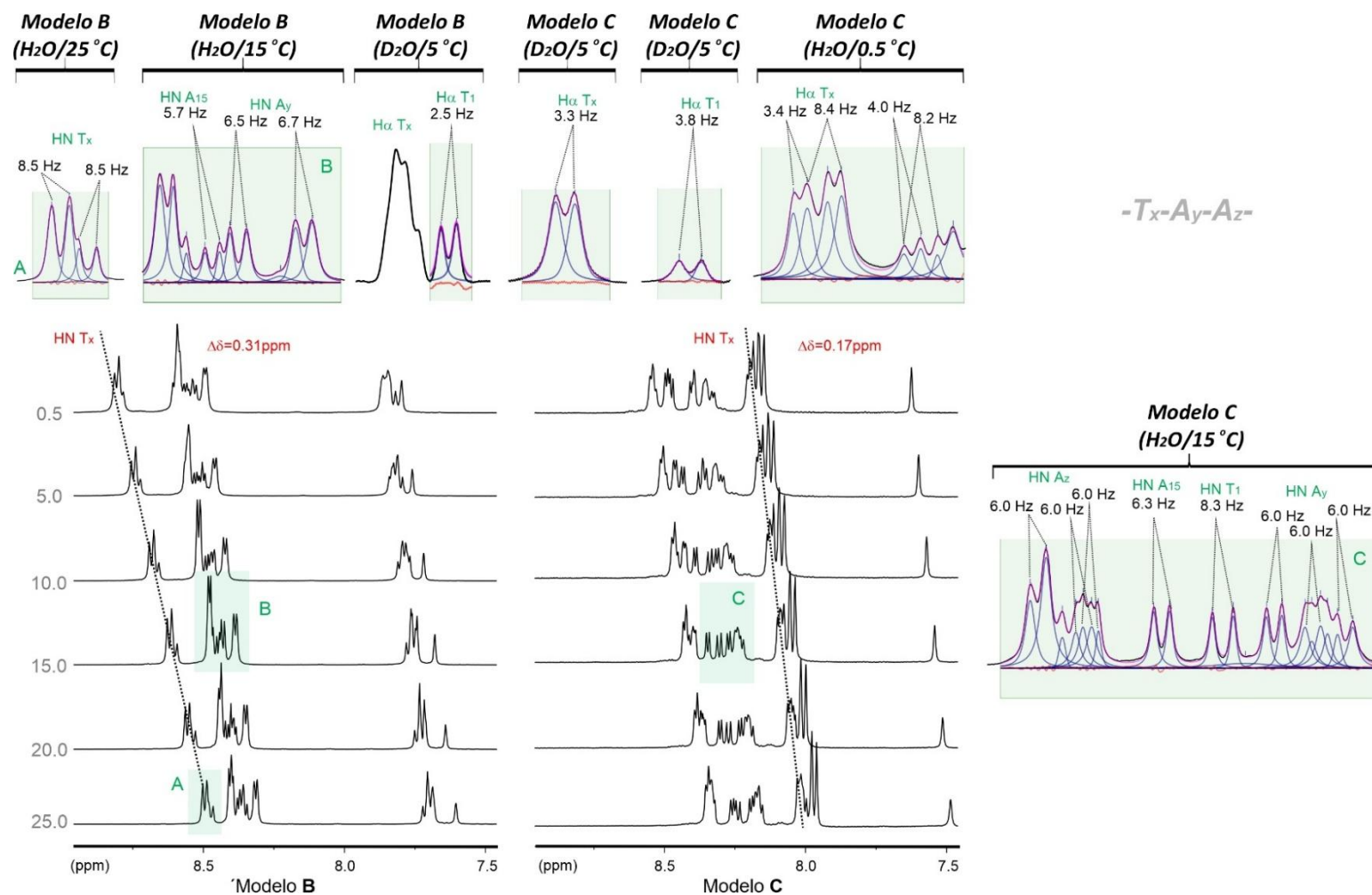


Figura 4.12.- Experimentos de RMN-1D (región HN) adquiridos con los glicopéptidos modelo **B** y **C** a temperaturas en el rango de 0.5 a 25 °C (de arriba abajo). Se ajustaron regiones HN y H α seleccionadas para estimar valores de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ y $^3J_{\text{HN-H}\beta}$.

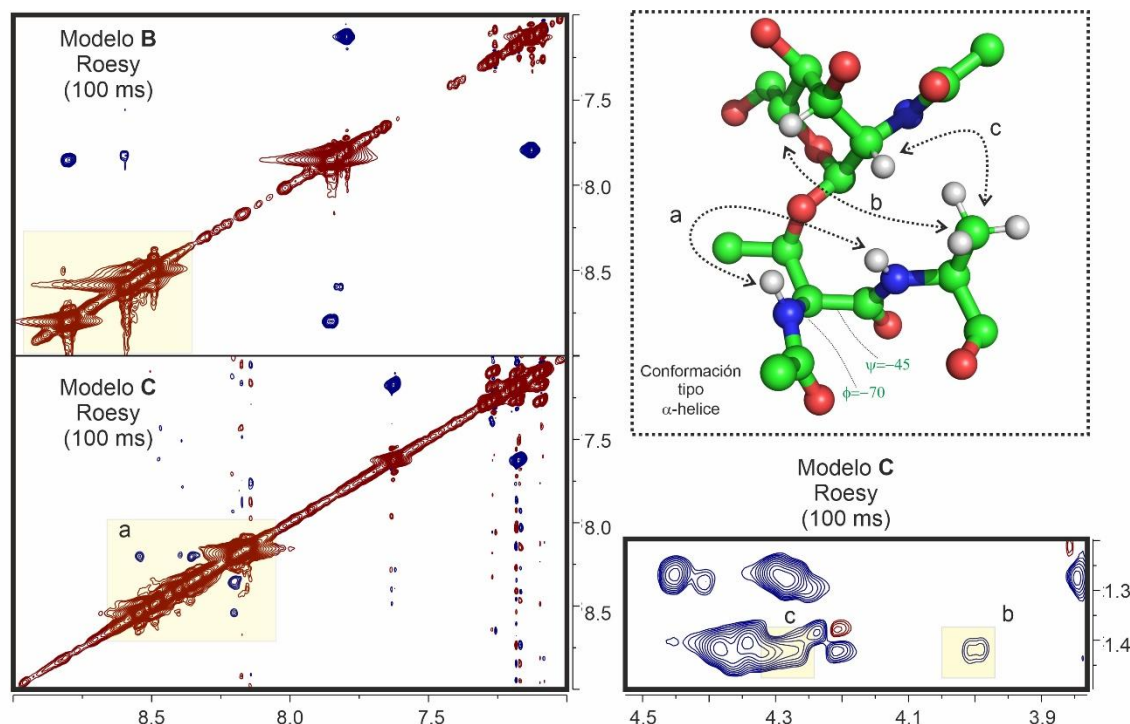


Figura 4.13.- Experimentos ROESY (1 °C y tiempo de mezcla de 100 ms adquiridos con los glicopéptidos modelo **B** y **C** (izquierda). En **C** se detectan contactos clave (etiquetados **a-c**) propios de conformaciones de treonina en la región de α -hélice.

Con objeto de afianzar estas conclusiones en sistemas más sencillos, analizamos el comportamiento conformacional de los tripéptidos modelo **M-I**, **M-II** y **M-III** (Figura 4.14). Los resultados obtenidos estuvieron en línea con los anteriormente expuestos. Así, pudo apreciarse cómo la supresión del grupo *N*-acetilo del GalNAc (**M-I** y **M-II**) se traduce en cambios de desplazamiento químico en la región NH, especialmente significativos para el NH de treonina. A su vez, se observó una ligera disminución de las $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ de treonina, acompañada por un incremento en el valor de $^3J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}$. Finalmente, dicha modificación tiene como consecuencia la aparición de picos de cruce ROE indicativos de conformaciones de tipo α -hélice para la treonina.

En definitiva, de acuerdo con los datos obtenidos, las funciones acetamida ecuatoriales, propias de los residuos de GalNAc, son un determinante estructural clave en glicopéptidos anticongelantes. Su presencia fija la conformación de los residuos de treonina, previniendo transiciones conformacionales entre las regiones PPII y α -hélice del espacio conformacional.

Por lo que respecta al péptido completo, nuestros resultados sugieren que las treoninas glicosiladas ejercen un papel protagonista como determinante estructural. De acuerdo con esta visión, su mayor definición/rigidez

conformacional les permitiría ejercer un efecto director, dictando el comportamiento de los residuos de alanina, inherentemente más flexibles.

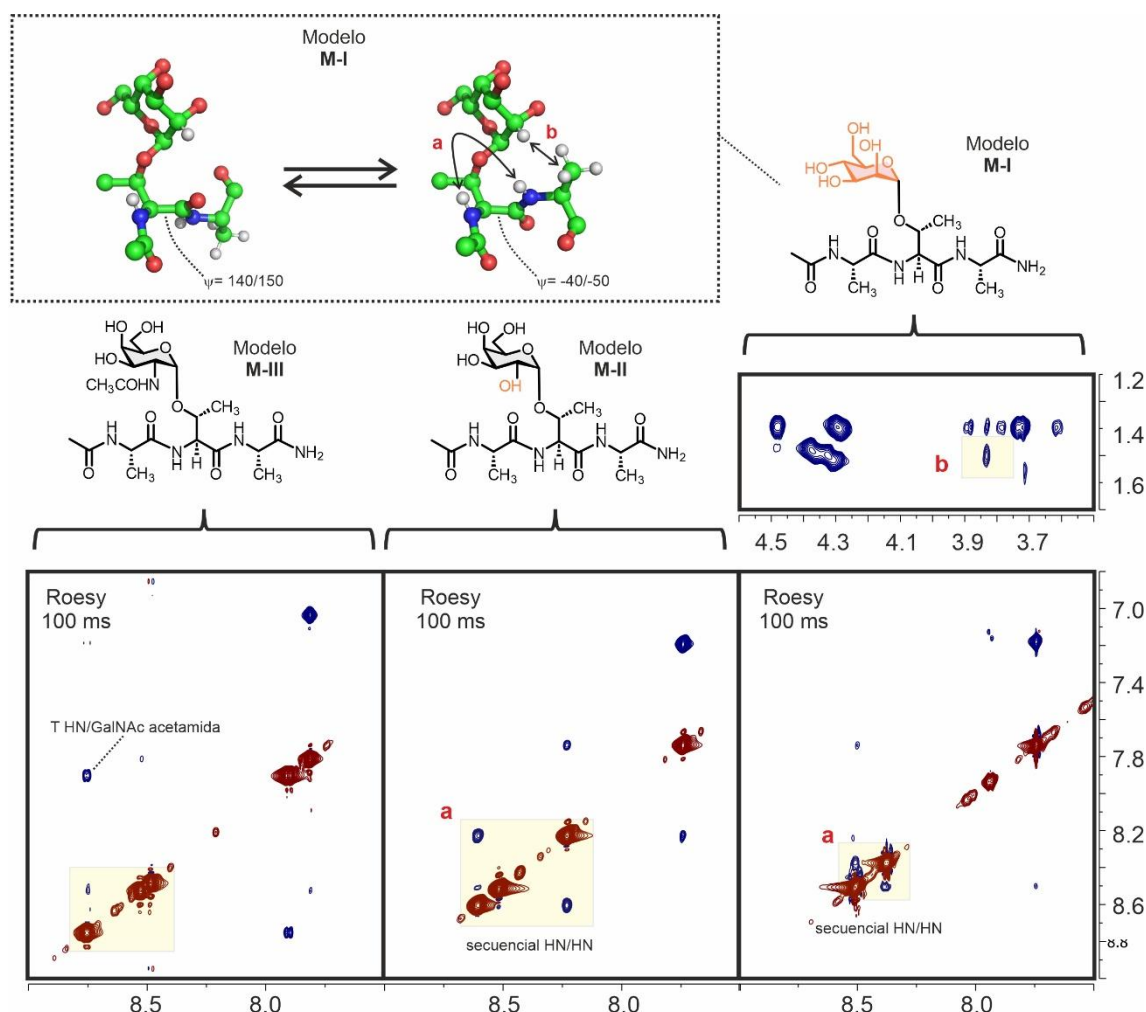


Figura 4.14.- Experimentos ROESY (1 °C y tiempo de mezcla de 100 ms) adquiridos con los tripéptidos modelo M-I, M-II y M-III (izquierda). En M-I y M-II se detectan contactos clave (etiquetados a-b en rojo) propios de conformaciones de treonina en la región de α -hélice.

4.1.4. Modificaciones en el fragmento N-acetilo; Preferencias conformacionales de los derivados GP-VIII a GP-XI

A diferencia del sistema modelo M-III, los datos espectroscópicos demostraron que tanto el derivado híbrido GP-IX como los derivados GP-X y GP-XI presentan características estructurales análogas a las del glicopéptido natural A en disolución. Dicha aseveración se apoya tanto en una inspección de los valores de constantes de acoplamiento escalar accesibles experimentalmente, como en el patrón de contactos observado en espectros NOESY (Figuras 4.15-4.17). Como rasgos distintivos, cabe mencionar que en el caso de GP-X y GP-XI las constantes de acoplamiento vecinales $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ de treonina fueron ligeramente superiores a las previamente observadas con la secuencia natural (en el rango de 9.6 Hz). A su vez,

el carácter híbrido de **GP-X** permitió la identificación de picos de cruce entre grupos trifluoroacetamida y acetamida situados en triadas -TAA- contiguas, proporcionando evidencias empíricas del carácter anfifílico de la estructura (Figura 4.16).

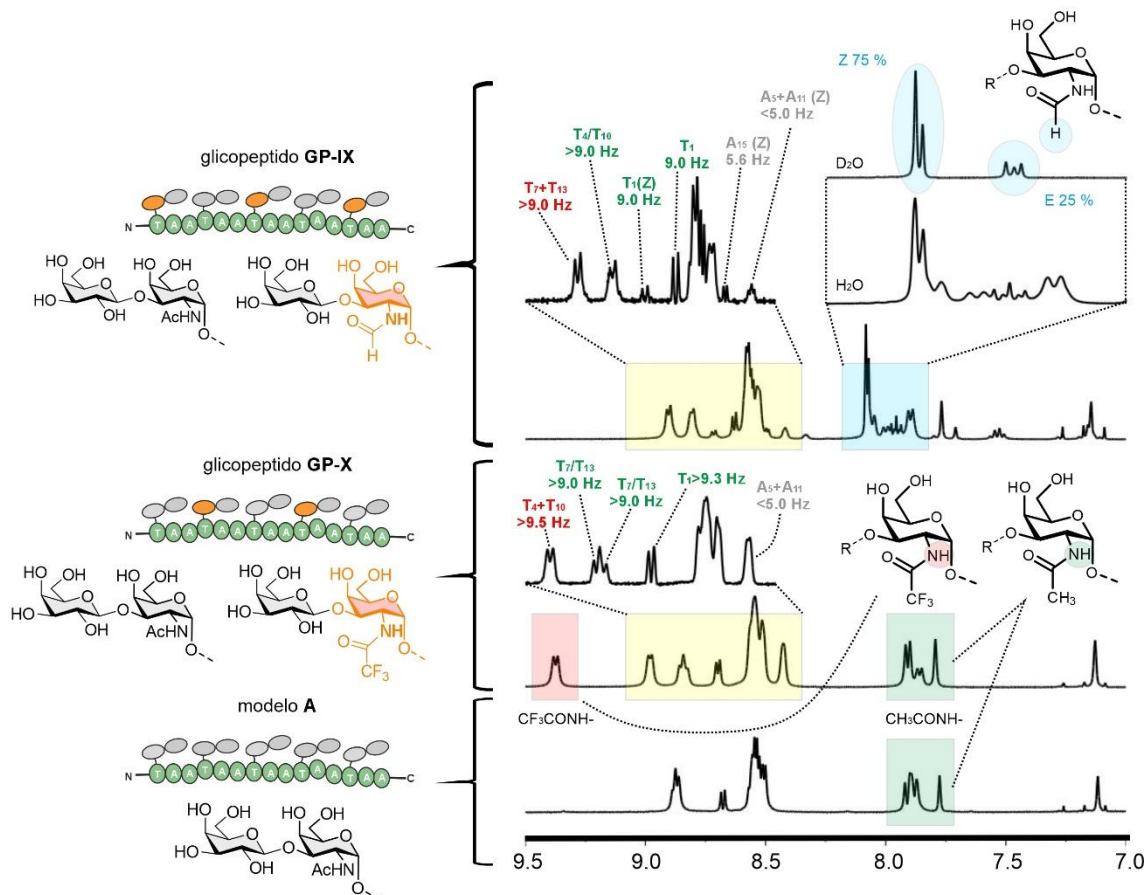


Figura 4.15.- Izquierda. - Representaciones esquemáticas del sistema modelo A (panel inferior) y los glicopéptidos **GP-IX** (panel superior) y **GP-X** (panel central), detallando sus composiciones específicas en glicósidos. Derecha. - Se presentan los espectros de RMN 1D correspondientes. En el caso de las variantes **GP-X** y **GP-IX**, se incluyen expansiones de las regiones resaltadas en amarillo, indicando los valores clave de $^3J_{HN/H\alpha}$. Para la variante **GP-IX**, se amplía la región señalada en azul claro, tanto de los espectros en H_2O como en D_2O . Este último puso de manifiesto la existencia de dos rotámeros para los fragmentos de formamida.

Adicionalmente, en el caso de **GP-IX**, la supresión del grupo metilo en las funciones acetamida tiene como consecuencia la aparición de poblaciones minoritarias del rotámero *E* (en torno al 20-25 %), no apreciables en el derivado natural. A pesar de dichas peculiaridades, podemos concluir que el rol estructurador, previamente atribuido a las funciones acetamida de GalNAc, puede, en cierta medida, ser asumido por los residuos de formamida o trifluoroacetamida. Así, en los sistemas híbridos **GP-IX** y **GP-X**, el patrón de NOEs/ROEs observado

para las triadas -TAA- portadoras de los carbohidratos modificados y sin modificar resultó ser prácticamente idéntico. (Figura 4.17). Dicha observación sugiere que el factor determinante desde un punto de vista conformacional reside, no en el grupo metilo, sino en las propias funciones amida. Estas podrían dirigir el comportamiento conformacional del péptido mediante interacciones estabilizantes con la cadena principal, o bien desestabilizar estéricamente estructuras alternativas de tipo α -hélice, tal y como se muestra en la Figura 4.6b, c.

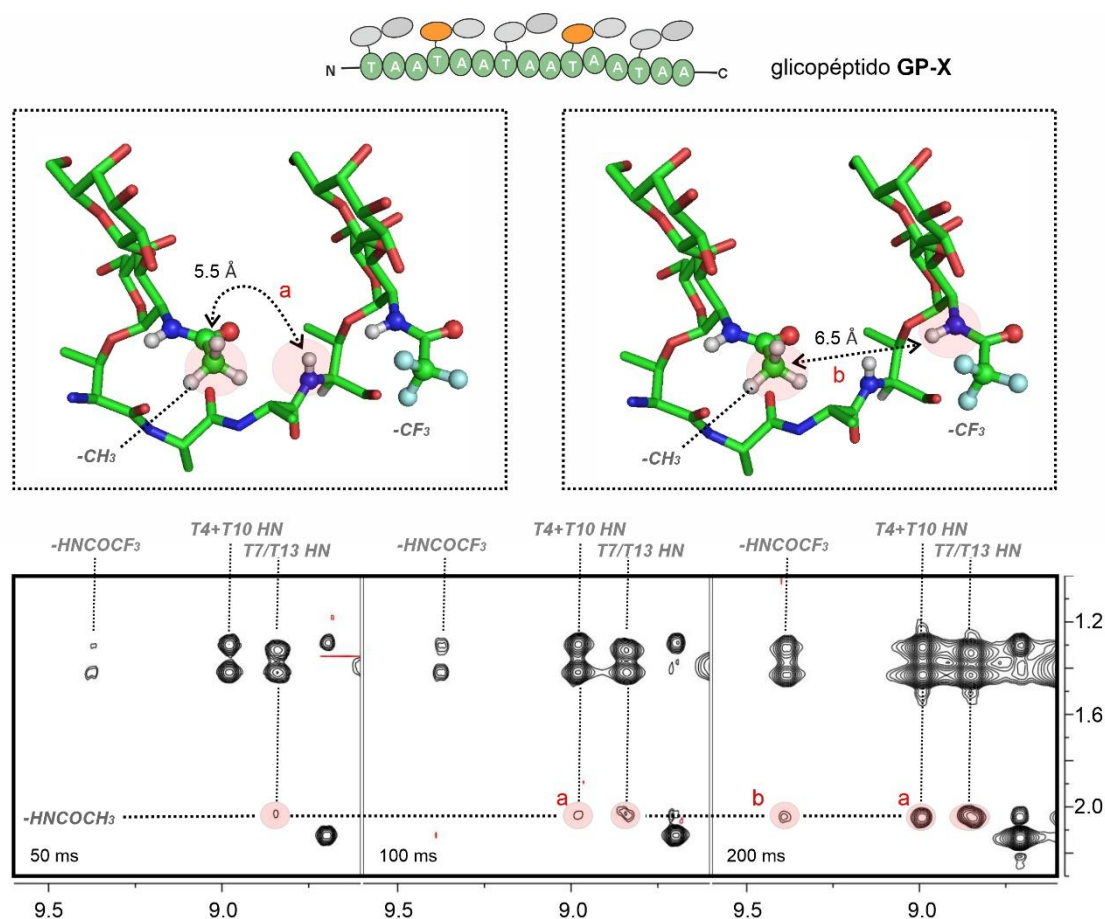


Figura 4.16.- Conexiones NOE entre residuos de treonina glicosilada localizadas en triadas -TAA- contiguas, detectadas en **GP-X**. En la parte inferior de la figura se muestran secciones representativas de experimentos NOESY adquiridos con **GP-X** en H_2O/D_2O 95:5 a 1 °C, empleando tres tiempos de mezcla, junto con la asignación de los contactos clave.

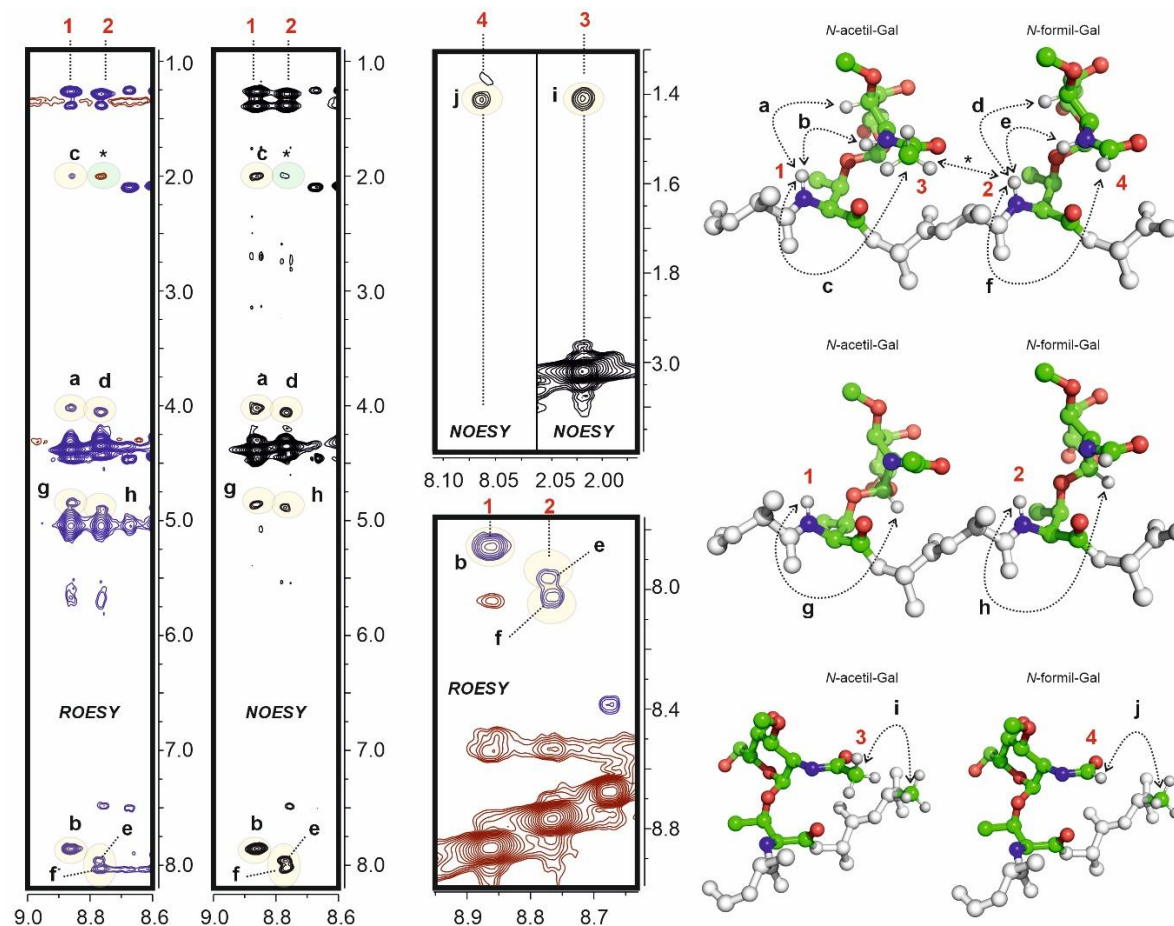


Figura 4.17.- Se presentan regiones seleccionadas de experimentos ROESY/NOESY (600 MHz, 1 °C, H₂O, tiempo de mezcla de 100 ms) obtenidos para la variante **GP-IX**. La conformación del glicopéptido en las proximidades de las treoninas unidas a N-acetil galactosamina o a N-formilgalactosamina es notablemente similar, tal como evidencian los contactos clave **a-j** (destacados en amarillo y representados a la derecha) que involucran los protones **1-4** (etiquetados en rojo).

A este respecto, cabe destacar que la orientación espacial de los grupos NH de treonina, les permitiría participar en interacciones polares mediadas por agua con las funciones acetamida o trifluoroacetamida ancladas a la galactosa. Dos evidencias experimentales apoyan esta propuesta. En primer lugar, los experimentos NOESY adquiridos demuestran la existencia de contactos claros entre el NH de treonina y el NH presente en el amido-azúcar. Curiosamente, dichos contactos son sensibles a la acidez de este último, siendo ligeramente más intensos cuando involucran el fragmento de trifluoroacetamida y más débiles para el fragmento de acetamida (Figura 4.18). Adicionalmente, experimentos ROESY adquiridos con la secuencia híbrida **GP-X** pusieron de manifiesto que los grupos NH involucrados en dicho contacto presentan de hecho ROEs con moléculas de agua que resultaron ser significativamente más intensos en las treoninas portadoras de α -D-(N-trifluoroacetil)-galactosamina (Figura 4.18).

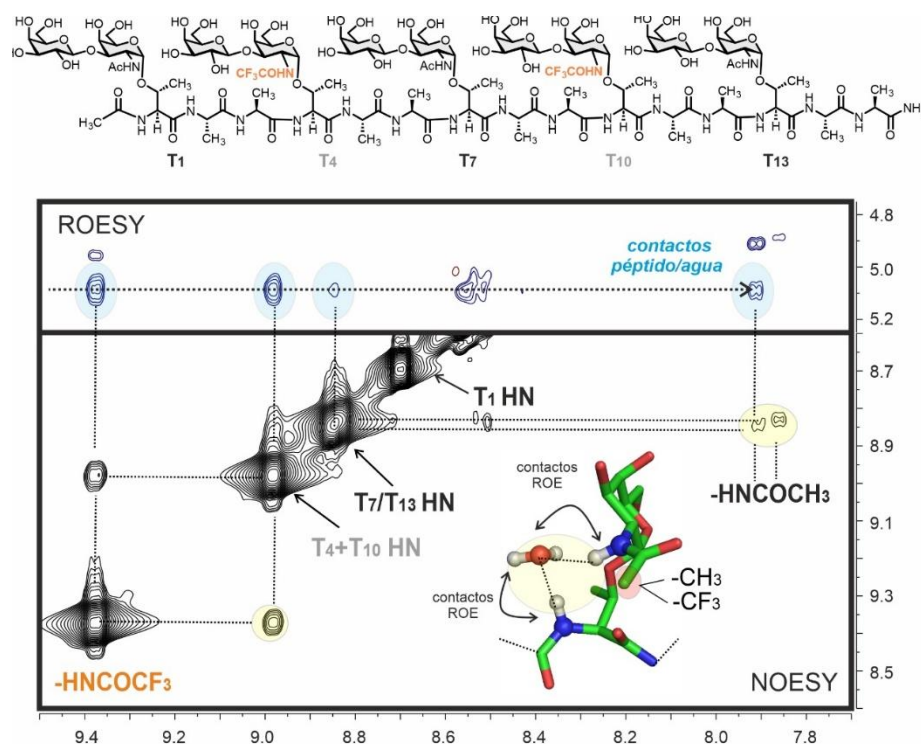


Figura 4.18.- Se presentan regiones seleccionadas de experimentos ROESY y NOESY (600 MHz, 1 °C, H₂O, tiempo de mezcla de 100 ms) adquiridos con **GP-X**. Los fragmentos HN de treonina, acetamida y trifluoroacetamida exhiben contactos ROE claros con moléculas de agua (señalados en azul claro en la parte superior). Cabe destacar que estos contactos son considerablemente más intensos para las treoninas unidas a galactosas trifluoroacetiladas (T4 y T10), lo cual es consistente con una interacción HN/HN mediada por agua más estable.

Finalmente, cabe mencionar que interacciones mediadas por agua equivalentes se han detectado mediante cristalografía de rayos X en secuencias de tipo mucina modificadas sintéticamente.¹⁵⁹

Por lo que respecta al derivado **GP-VIII**, este exhibió un comportamiento peculiar. Así, una vez completada su síntesis en fase sólida y suprimidos los grupos protectores tipo acetato, los intentos de purificación subsiguientes se vieron en buena medida dificultados por la baja solubilidad aparente del derivado. A pesar de las dificultades, y recurriendo a hexafluoroisopropanol como disolvente, pudimos purificar escasos miligramos del derivado, suficientes para la adquisición de espectros de RMN-1D en H₂O. Estos fueron consistentes con un alto grado de heterogeneidad, resultado probable de la formación de agregados (Figura 4.19). Si bien las razones de dicho comportamiento no son, en este momento, claras, podemos hipotetizar que la mayor tendencia de las tioacetamidas a participar en enlaces de hidrógeno conduce a interacciones potenciadas entre los glicósidos, sean intra o intermoleculares. Ello disminuiría su grado de exposición al disolvente y, por tanto, la solubilidad del sistema. Con objeto de clarificar este punto y obtener una mejor comprensión del comportamiento conformacional de los glicopéptidos anticongelantes, en este momento estamos procediendo a la preparación de derivados híbridos que incorporan únicamente 1-2 tioacetamidas en unidades de galactosa concretas.

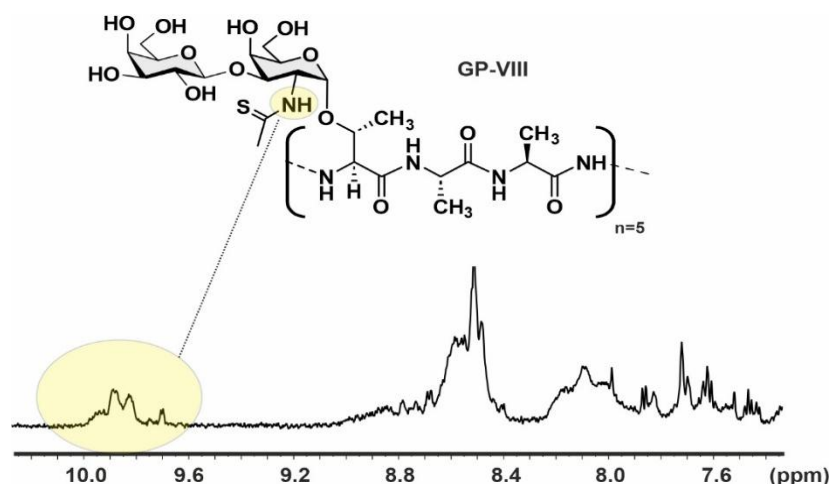


Figura 4.19.- Región NH del espectro de RMN 1D adquirido con el derivado **GP-VIII** a 25 °C en H₂O. Se destaca la región correspondiente a los grupos NH de tioacetamidas desplazados a campo bajo como reflejo de su acidez exacerbada.

4.1.5. Conclusiones del estudio conformacional de los glicopéptidos no naturales

En base a las observaciones descritas en este capítulo, puede concluirse que las funciones amida ecuatoriales presentes en los amidoazúcares desempeñan un papel crucial, fijando la conformación de los residuos de treonina. Este fenómeno, a su vez, es clave para el mantenimiento de una estructura extendida y anfipática de tipo hélice PPII, presumiblemente necesaria para la actividad anticongelante. En concordancia con esta perspectiva, simulaciones de dinámica molecular (DM)

realizadas con el modelo simplificado **B** demostraron que la mera fijación mediante restricciones de las treoninas en su conformación experimental es suficiente para inducir una rápida transición desde una estructura inicial de tipo α -helicoidal a una conformación extendida de tipo PPII (Figura 4.20). Dicho comportamiento sugiere que son los residuos de treonina glicosilados, más rígidos, los que dictan el comportamiento de los tramos de alanina adyacentes.

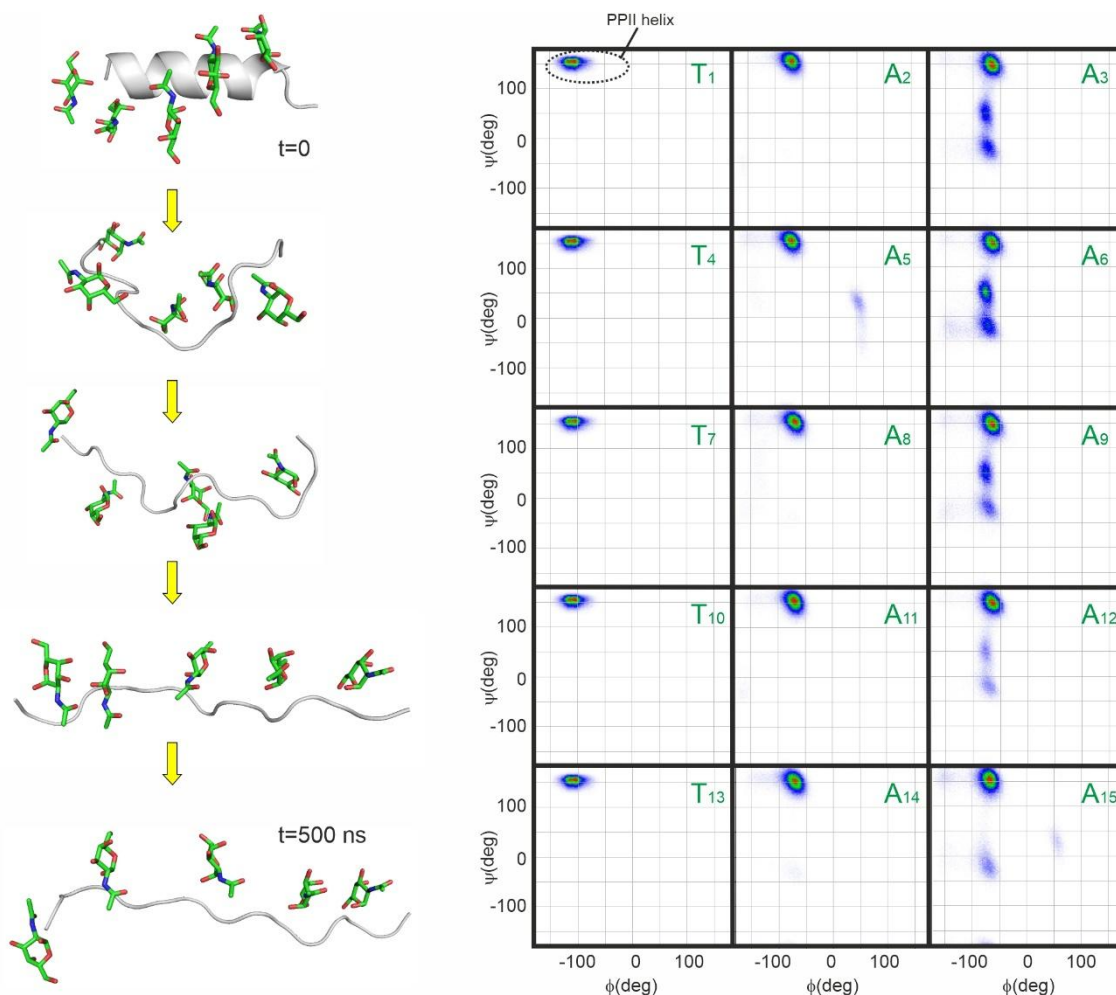


Figura 4.20.- Izquierda. – Instantáneas de una simulación de dinámica molecular restringida (500 ns, agua explícita TIP5P) realizada con el sistema modelo B, comenzando desde una estructura α -helicoidal. Derecha. – Se muestran las distribuciones de los ángulos diedros ϕ/ψ para cada residuo a lo largo de la trayectoria. Se aplicaron únicamente restricciones a los ángulos ϕ , ψ y χ_1 de las treoninas con objeto de reproducir las conformaciones encontradas en los glicopéptidos anticongelantes (AFGPs). A pesar de su carácter local, dichas restricciones fueron suficiente para inducir una transición en la estructura completa del glicopéptido desde configuraciones α -helicoidales a conformaciones extendidas de tipo PPII.

Como conclusión más importante, podemos afirmar que, a excepción del modelo **C** que contiene unidades de ManNAc, todas las modificaciones

introducidas en los glicopéptidos son conformacionalmente conservativas, preservando la estructura tipo hélice PPII previamente descrita por otros autores para el glicopéptido natural.

4.1.6. Breve reseña relativa al comportamiento de los tripéptidos modelo

Como punto final, cabe mencionar que (como se ha señalado anteriormente en las Figuras 4.6 y 4.14) los tripéptidos modelo sintetizados con objeto de facilitar nuestro estudio conformacional reproducen varias de las tendencias observadas en los glicopéptidos completos. Así, puede apreciarse que el cambio de una unidad de manosa (modelo **M-I**) por galactosa (**M-II**), *N*-acetilgalactosamina (**M-III**), *N*-trifluoroacetilgalactosamina (**M-IV**) y *N*-tioacetilgalactosamina (**M-V**) se traduce en un desplazamiento a campo bajo significativo de la señal NH de treonina (Figura 4.21). A pesar de ello, el efecto es menor al observado en la Figura 4.2 al comparar los sistemas modelo **B** y **C**, lo que sugiere que los efectos conformacionales promovidos por los grupos *N*-acetilo de GalNAc se ven en cierta medida potenciados en el contexto del glicopéptido completo. Ello podría ser el reflejo de interacciones entre fragmentos de glicósido anclados a treoninas en triadas -TAA- contiguas o redes de enlace de hidrógeno no identificadas en los sistemas naturales.

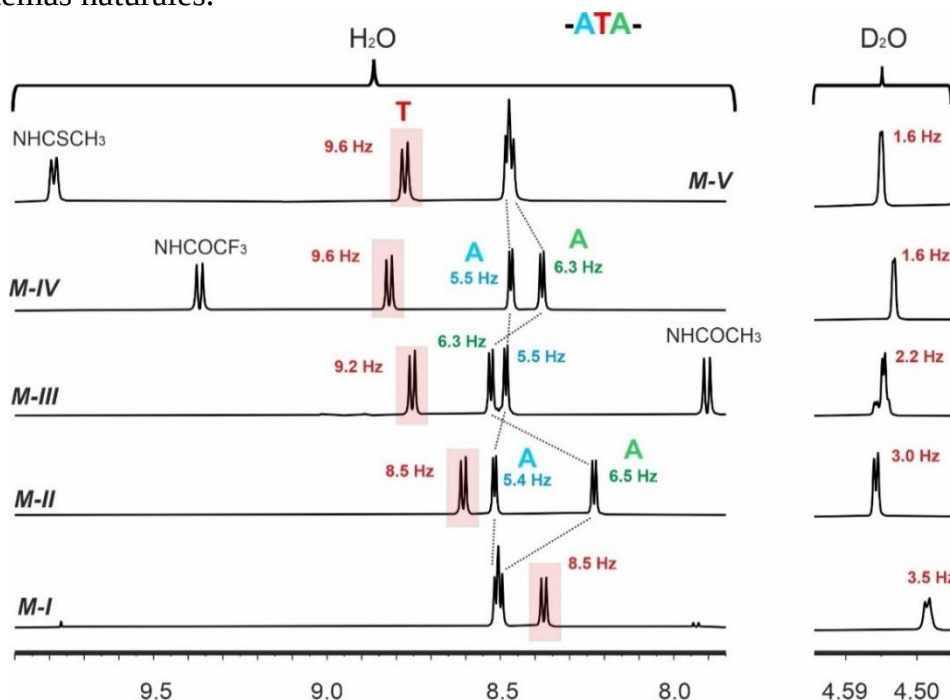


Figura 4.21.- Espectros de RMN 1D adquiridos con los tripéptidos modelo **M-I** a **M-V** en H_2O (izquierda, región NH) y D_2O (derecha, se muestra la señal correspondiente al H_α de treonina). Se destacan en rojo las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ y $^3J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}$ de treonina. Las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ de alanina se etiquetan siguiendo el código de colores que se muestra en la parte superior.

Por otra parte, la introducción de una función *N*-acetilo ecuatorial en el azúcar tiene un efecto claro sobre las constantes de acoplamiento de treonina (Figura 4.21), aumentando la definición conformacional de este residuo. Dicho efecto es, en cierta medida, potenciado por un incremento en la acidez de la función amida, sea mediante la introducción de átomos de flúor (tripéptido **M-IV**) o azufre (tripéptido **M-V**), reflejo de su interacción mediada por agua con el NH de treonina. Los efectos observados son pequeños pero consistentes en la serie de sistemas modelo.

De acuerdo con esto, la glicosilación de los residuos de treonina ejerce una influencia conformacional clara sobre dicho aminoácido, donde el grupo *N*-acetilo tiene un papel protagonista. El hecho de que las mismas tendencias se aprecien en los tripéptidos modelo y los glicopéptidos completos sugiere que los efectos conformacionales derivados de la glicosilación son, en buena medida, de naturaleza local.

CAPÍTULO 5.

ACTIVIDAD ANTICONGELANTE DE LOS GLICOPÉPTIDOS ANTICONGELANTES: MEDIDAS DE “DYNAMIC ICE SHAPING” E HISTÉRESIS TÉRMICA

5. ACTIVIDAD ANTICONGELANTE DE LOS GLICOPÉPTIDOS SINTETIZADOS: MEDIDAS DE “DYNAMIC ICE SHAPING” E HISTÉRESIS TÉRMICA

5.1. Observaciones de carácter experimental

Las medidas de actividad que se describen en este capítulo fueron realizadas por los doctores Akari Yamauchi y Sakae Tsuda, ambos en la Universidad de Hokkaido en Japón.

De un modo general, la histéresis térmica (HT) se define como la diferencia entre las temperaturas de fusión y congelación (T_f y T_c) de una solución y, en nuestro caso, representa el rango de temperaturas en que un monocristal de hielo asociado a AFGPs no crece ni se funde. Para su determinación, se hizo uso de un fotomicroscopio equipado con un sistema de enfriamiento *Peltier* que permite determinar tanto la temperatura de inicio del crecimiento como la temperatura de fusión de un monocristal de hielo (T_c y T_f respectivamente).

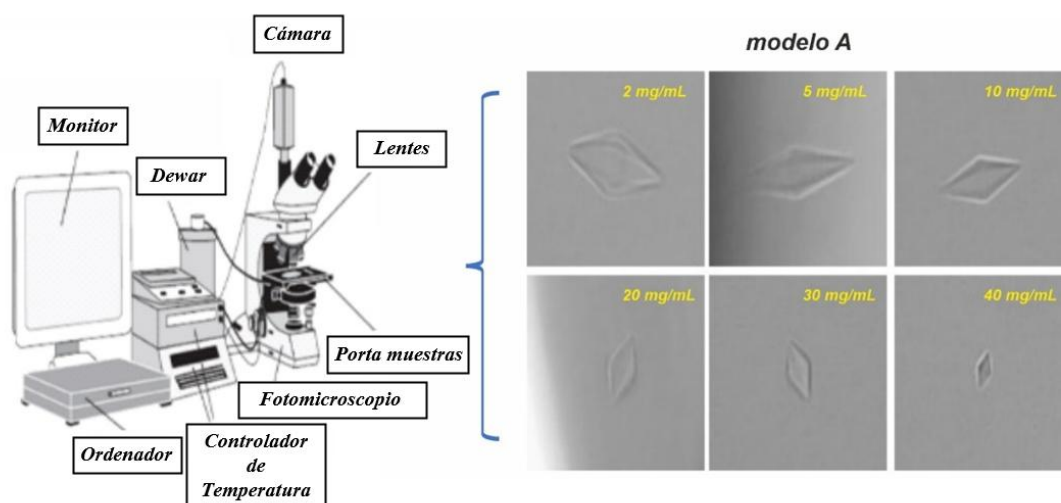


Figura 5.1.- Izquierda. - Representación esquemática del sistema empleado para la determinación de actividades DIS y HT de los glicopéptidos. Derecha. - Cristal de hielo observado en presencia de concentraciones crecientes del sistema modelo A.

El protocolo experimental típicamente empleado implica un enfriamiento inicial de *Peltier*, que se prolonga hasta verificar un oscurecimiento en la visión a través del fotomicroscopio, algo que habitualmente ocurre alrededor de los $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dicho oscurecimiento refleja la congelación rápida de la muestra para generar hielo policristalino, integrado por numerosos cristales estrechamente adheridos. A continuación, se eleva la temperatura de la muestra de forma gradual para disgregar el policristal en una dispersión y finalmente seleccionar un monocristal de hielo con forma de disco circular. Llegado a este punto, se lleva a cabo un enfriamiento

lento de la disolución, empleando un gradiente de temperatura de alrededor de $-0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, lo que, en presencia de AFGPs naturales, modifica la morfología cristalina a una bipirámide hexagonal cuyo crecimiento es efectivamente bloqueado dentro de la ventana de histéresis. Un enfriamiento adicional inicia un crecimiento cristalino explosivo desde las dos puntas de la bipirámide, lo que proporciona el valor de T_c . Este valor de T_c , así como la T_f (determinada separadamente mediante el seguimiento del proceso de fusión del hielo), permiten determinar el valor de HT generado por una muestra.

5.2. Medidas de actividad de glicopéptidos no naturales

Resultados descritos por el grupo de Nishimura demuestran que la sustitución de las unidades de GalNAc presentes en los sistemas naturales por Gal conlleva una pérdida completa de la actividad anticongelante.¹⁰⁹ Dicha observación es consistente con la ausencia de actividad observada en el modelo C y admite dos explicaciones no excluyentes. En primer lugar, los grupos *N*-acetilo ecuatoriales de GalNAc son esenciales para preservar la estructura PPII característica de los sistemas naturales, tal y como atestiguan los estudios de RMN descritos en esta tesis. En segundo lugar, los grupos metilo correspondientes podrían ser parte integrante del epítipo de reconocimiento del hielo.

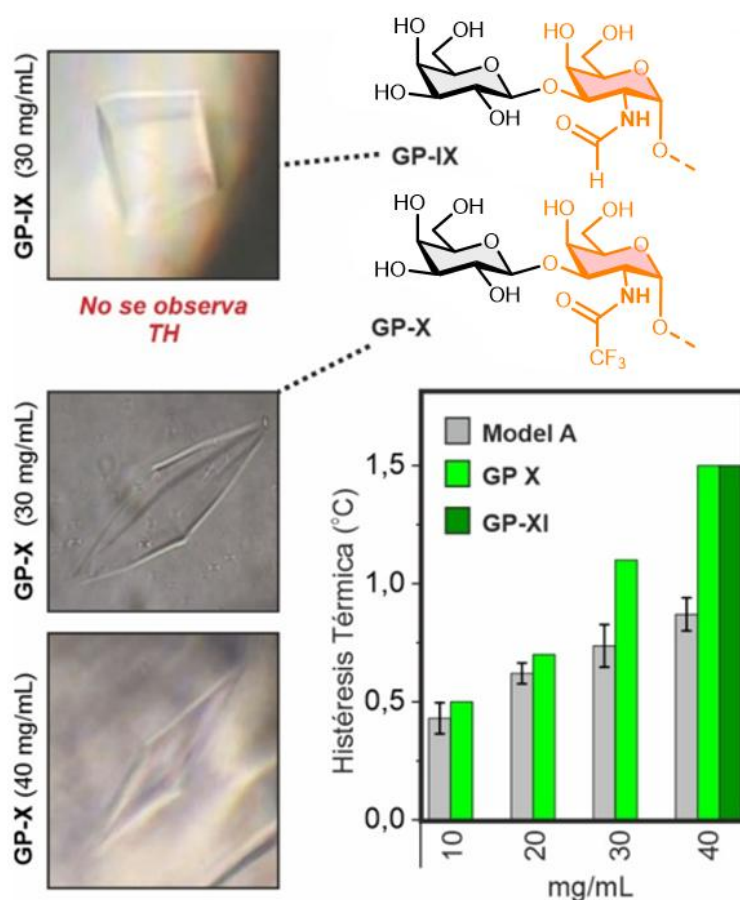


Figura 5.2.- Medidas de actividad DIS y HT realizadas con los derivados **GP-IX**, **GP-X**, **GP-XI** y el **modelo A**. Las fotografías ilustran la morfología de monocristales de hielo observadas a las concentraciones indicadas de glicopéptido.

En este contexto, los resultados obtenidos con los glicopéptidos **GP-IX**, **GP-X** y **GP-XI** resultan especialmente esclarecedores (Figura 5.2). Así, el derivado **GP-IX**, con sustituciones acetamida/formamida, carece por completo de actividad anticongelante. De hecho, esta variante no generó ningún fenómeno de histéresis térmica, mostrándose incapaz de alterar la morfología de los cristales de hielo, incluso a concentraciones de 40 mg/mL. Dicho comportamiento es particularmente significativo, considerando que el glicopéptido incorpora solo tres sustituciones de acetamida/formamida y que estas son conservadoras desde una perspectiva conformacional, preservando la estructura tipo PPII propia del sistema natural. De acuerdo con esto, nuestros resultados apuntan a una participación directa de los grupos metilo de la acetamida en las interacciones solvofóbicas/dispersivas con el plano prismático primario, en concordancia con simulaciones de dinámica molecular (DM) previamente descritas por Molinero y colaboradores.¹¹⁶

En contraste con la variante **GP-IX**, los derivados **GP-X** y **GP-XI**, con sustituciones acetamida/trifluoroacetamida, mostraron una capacidad significativa para detener el crecimiento de los cristales de hielo (Figura 5.2). A pesar de ello, su comportamiento presentó rasgos inusuales. Así, ambos glicopéptidos fueron capaces de promover la formación de microcristales bipiramidales a concentraciones de 10 mg/mL. Adicionalmente, en todos los casos se pudo identificar la temperatura de crecimiento explosivo o exponencial que típicamente delimita la ventana de histéresis térmica. De hecho, dicho fenómeno se produce a temperaturas significativamente más bajas que en el glicopéptido natural, lo que sugiere ventanas de histéresis térmica más amplias (1.6 vs 0.9 °C a 40 mg/mL) y, por tanto, una mayor actividad anticongelante. Sin embargo, pudo observarse que, dentro de dicha ventana de temperaturas, el crecimiento del hielo no llega a detenerse por completo, sino que progresa muy lentamente, ya sea de forma continua o escalonada. Este comportamiento no había sido observado nunca en AFGPs y puede racionalizarse asumiendo que los fragmentos supersolvofóbicos de -CF₃ aumentan la afinidad del glicopéptido por el plano prismático primario. A pesar de ello, la complementariedad de forma entre ambas superficies de contacto debe degradarse en cierta medida, lo que determina un sellado imperfecto de la superficie de hielo por el agente crioprotector. El crecimiento residual resultante sería, en principio, compatible con la generación de un frente altamente curvado entre las AFGPs unidas, condición necesaria para que opere el efecto Kelvin.

Por lo que respecta al resto de los glicopéptidos sintetizados, cabe mencionar que los valores de HT medidos con los sistemas de referencia **A** y **B** mostraron que, si bien los residuos de Gal en posiciones no reductoras contribuyen significativamente a la actividad anticongelante, no son realmente esenciales, en concordancia con trabajos previos de Nishimura y col.¹⁰⁹

A pesar de ello, varias de las modificaciones introducidas por nosotros en dicha región del glicopéptido tuvieron como resultado una abolición completa de la actividad anticongelante (Figura 5.3a-c). Tal es el caso del derivado **GP-VI**, con sustituciones D-Gal/L-Fuc en solo tres posiciones específicas. Dicho derivado no presentó capacidad alguna de alterar la morfología de los cristales de hielo ni generar fenómenos de histéresis térmica, ni siquiera concentraciones de 40 mg/mL. Por su parte, los ensayos realizados con el glicopéptido **GP-VII** demostraron que este mantiene una capacidad significativa de modificar la morfología cristalina del hielo, generando eventualmente estructuras bipiramidales a las máximas concentraciones ensayadas (40 mg/mL). Por el contrario, incluso en dichas condiciones experimentales no se apreció histéresis térmica alguna, demostrando que ambos tipos de actividad, *DIS* y HT, no van necesariamente unidas. Una interpretación sencilla de dicho comportamiento es que el derivado **GP-VII** se une

de forma reversible al plano prismático primario, lo que constituye una condición suficiente para alterar la morfología de los cristales de hielo. Sin embargo, no logra establecer una asociación irreversible posterior, requisito esencial para la histéresis térmica. A la luz de estos resultados, prestamos especial atención a los derivados modificados en una única posición de las galactosas no reductoras. Por lo que respecta a **GP-III** (Figura 5.3a), variante portadora de unidades de glucosa, este mantuvo unas propiedades anticongelantes significativas; si bien se aprecia una reducción de entorno al 40% en el valor de histéresis térmica con respecto al sistema natural (Modelo **A**). Por el contrario, **GP-IV**, equipado con unidades de 4-desoxiglucosa (o 4-desoxigalactosa), reprodujo el comportamiento previamente observado para el derivado *O*-metilado **GP-VII**; promovió la formación de cristales de hielo con forma de bipirámide hexagonal, pero no logró detener su crecimiento, ni mostrar actividad de HT incluso a 40 mg/mL. De acuerdo con estos resultados, la presencia de un grupo hidroxilo en posición 4 de las piranosas no reductoras es esencial para promover la asociación irreversible del glicopéptido a la superficie del hielo, con independencia de si su orientación es axial (como en **A**) o ecuatorial (como en **GP-III**).

Curiosamente, la influencia ejercida por las posiciones 2 y 3 de galactosa en las propiedades anticongelantes del glicopéptido es aún más pronunciada, tal y como ilustra el comportamiento de las variantes **GP-I** y **GP-V** (Figura 5.3b, c). Así, ninguno de estos derivados mostró actividad de HT incluso a una concentración de 40 mg/mL. Además, en ambos casos, la asociación reversible del péptido con el hielo también se ve gravemente afectada; mientras que **GP-I** carece totalmente de actividad *DIS* incluso a la mayor concentración ensayada, esta es

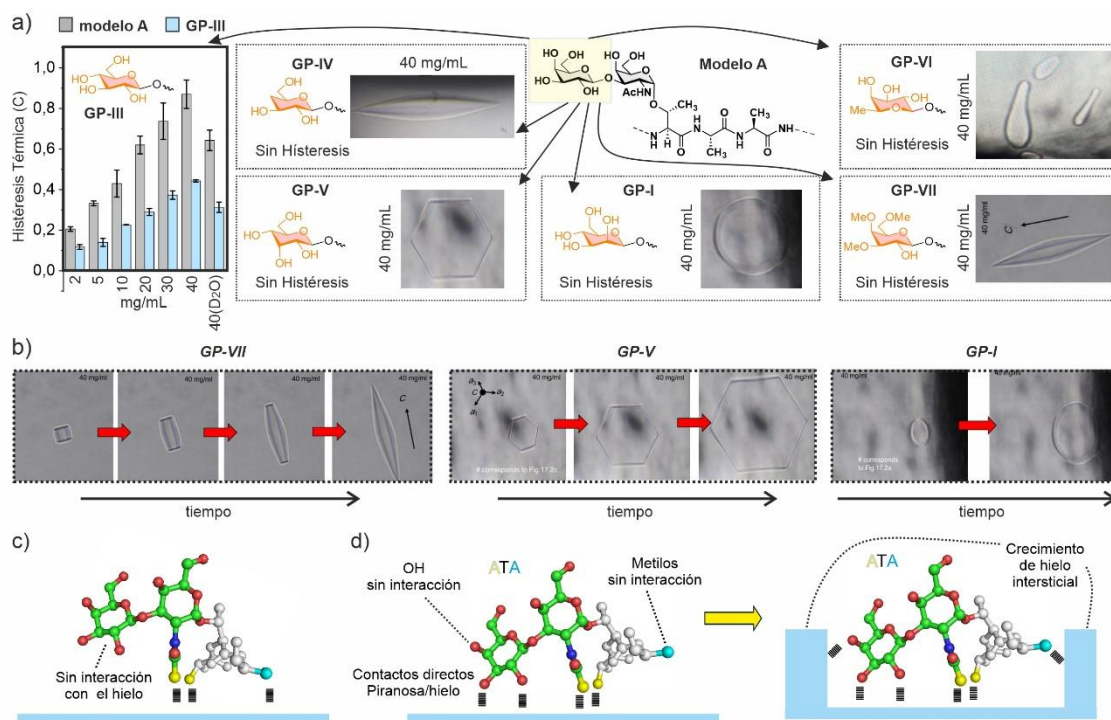


Figura 5.3.- a) Influencia de las modificaciones químicas en la unidad de galactosa no reductora sobre las propiedades anticongelantes de los glicopéptidos. A la izquierda, se muestran los valores de histéresis térmica medidos con la muestra **GP-III** en H₂O y D₂O. La variante **A** se incluye como referencia. Los glicopéptidos **GP-I**, **GP-IV**, **GP-V**, **GP-VI** y **GP-VII** no mostraron propiedades de histéresis térmica. A la derecha se representan las morfologías de los cristales de hielo en su presencia. B) Evolución temporal de un monocristal de hielo en presencia de **GP-VII**, **GP-V** y **GP-I**. c-d) Modelos esquemáticos para la interacción AFGP/hielo (véase el texto principal).

marginal para **GP-V**, el cual modificó los monocristales de hielo en forma de disco hexagonal, pero no en bipirámides.

Finalmente, el derivado **GP-II**, equipado con unidades de α -Man, mostró una solubilidad reducida, precipitando en las condiciones de alta concentración/baja temperatura habitualmente requeridas para los ensayos de HT. En consecuencia, sus propiedades anticongelantes no pudieron ser analizadas. Notablemente, simulaciones de Dinámica Molecular (DM) realizadas con este sistema revelan que la presencia de α -manósidos en posiciones no reductoras promueve contactos íntimos entre fragmentos de disacárido vecinos, limitando su accesibilidad al agua y posiblemente reduciendo la solubilidad del glicopéptido. Dicho comportamiento podría ser reminiscente del observado en polímeros naturales como la celulosa, donde la existencia de extensas interacciones dispersivas, hidrofóbicas y polares entre diferentes cadenas de carbohidrato, confiere al sistema una notable insolubilidad en agua. De acuerdo con esta hipótesis, la presentación de fragmentos de disacárido regularmente espaciados en el armazón peptídico, pero carentes de interacciones cercanas entre ellos, podría representar un requisito especial para la actividad anticongelante.

En resumen, de acuerdo con estos resultados, incluso modificaciones selectivas de la galactosa no reductora pueden afectar significativamente las propiedades anticongelantes de las AFGPs. Notablemente, la importancia de las distintas posiciones sigue una jerarquía clara: mientras que transformaciones en la posición 4 del anillo pueden impedir la formación de un complejo glicopéptido-hielo irreversible (como se observó en el caso de **GP-IV**), alteraciones en las posiciones 2 o 3 también afectan la asociación reversible, debilitándola o incluso suprimiéndola por completo (como se observa en los derivados **GP-I** y **GP-V**). En nuestra opinión, el comportamiento observado no puede explicarse mediante un modelo de asociación glicopéptido-hielo puramente solvofóbico (Figura 5.3c). Por el contrario, sugiere que los carbohidratos deben estar directamente involucrados en el proceso de reconocimiento del hielo.

5.3. Conclusiones: hacia un modelo alternativo de interacción AFGP/hielo

Estudios realizados en colaboración con el Prof. Francisco Corzana de la Universidad de La Rioja, en paralelo a los aquí descritos, han confirmado el protagonismo que los grupos metilo de alanina tienen en la unión AFGPs/hielo. Por su parte, los resultados recogidos en la presente tesis demuestran que tanto las funciones *N*-acetilo de GalNAc como los glicósidos en posiciones no reductoras son actores relevantes en el proceso. Tomados en su conjunto, estos datos resultan inconsistentes con un modelo de asociación de naturaleza exclusivamente

solvolílica como el propuesto por Molinero y col.¹¹⁶ o polar, como el inicialmente descrito por DeVries¹¹⁵ subrayando la necesidad de integrar interacciones polares y solvolílicas en un modo único de asociación. Curiosamente, partiendo del modelo postulado por Molinero, un simple ajuste geométrico basta para integrar los carbohidratos en el epítipo de reconocimiento de los *AFGPs* (Figura 5.3d). Más concretamente, una rotación de aproximadamente 30° alrededor del eje helicoidal del glicopéptido permitiría contactos directos de los OH-2 y OH-3 de Gal con el plano prismático, proporcionando una explicación sencilla de la influencia crítica que ambas posiciones ejercen sobre la actividad anticongelante. Por el contrario, el OH-4 de Gal, relevante para la asociación irreversible del glicopéptido, según los experimentos anteriormente descritos, permanece demasiado lejos del plano prismático primario para permitir una interacción directa, condición extensible a la mitad de las cadenas laterales de Ala (aquellas en la posición n+2 con respecto al residuo de Thr; Figura 5.3d). Sin embargo, es importante considerar que las *AFGPs* podrían haber evolucionado para reconocer no a una superficie estática, sino a un frente dinámico. Así, el crecimiento del retículo cristalino alrededor de las *AFGPs* (esencial para la actividad de HT de acuerdo con el efecto Kelvin) podría aproximar ambas regiones del glicopéptido al frente de hielo, para generar contactos adicionales y, en última instancia, promover una asociación irreversible (Figura 5.3d). De acuerdo con esta idea, la asociación inicial de las *AFGPs* al plano prismático primario sería esencialmente reversible. El glicopéptido solo quedaría irreversiblemente fijado al cristal de hielo una vez las posiciones 2, 3 y 4 de galactosa, así como todos los grupos metilo de Ala, entren en contacto con el hielo, proceso facilitado por el avance del frente de hielo en las regiones adyacentes.

Curiosamente, una asociación en dos pasos ha sido propuesta por Kristiansen y col.⁸⁶ Para explicar la actividad de proteínas anticongelantes no glicosiladas. Nuestras conclusiones se alinean con esta perspectiva y ofrecen un modelo plausible para el complejo *AFGP*/hielo. Finalmente, cabe mencionar que, en colaboración con la profesora Carme Rovira y la Dra. Alba Nin de la Universidad de Barcelona, estamos en estos momentos evaluando la viabilidad de nuestra propuesta desde una perspectiva teórica. Esperamos que dicho trabajo proporcione pistas adicionales sobre el modo de actuación de los glicopéptidos anticongelantes, contribuyendo a cerrar un debate de más de 50 años de antigüedad.

CAPÍTULO 6.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de la presente tesis doctoral se resumen a continuación.

1. Con el objetivo de esclarecer el papel desempeñado por los carbohidratos en la actividad anticongelante de las AFGPs, hemos diseñado 11 glicopéptidos no naturales equipados con fragmentos disacarídicos modificados, tanto en posiciones reductoras como en las no reductoras. Los puntos de modificación han sido cuidadosamente seleccionados para preservar las propiedades conformacionales de los glicopéptidos naturales.

2. Como segundo paso, hemos preparado con éxito un amplio abanico de derivados de treonina equipados con sistemas disacarídicos diversos, anclados a la cadena lateral y convenientemente funcionalizados para su incorporación en protocolos de síntesis en fase sólida. Entre las modificaciones introducidas se incluyen inversiones de configuración, desoxigenaciones y O-metilaciones en posiciones concretas, así como la sustitución de fragmentos de acetamida por residuos de trifluoroacetamida o formamida. Cabe mencionar que la necesidad de obtener al menos 10-20 mg de los glicopéptidos finales para nuestros propósitos nos ha obligado a preparar en torno a 0.5 g de cada “*building block*”. Como consecuencia, ha sido precisa una optimización sistemática de rendimientos para cada uno de los esquemas sintéticos empleados.

3. Hemos empleado los “*building blocks*” de treonina para la preparación de 11 glicopéptidos no naturales integrados por 5 repeticiones -T*AA- cada uno de ellos, recurriendo a protocolos de síntesis en fase sólida. Este trabajo se ha realizado en colaboración con el profesor Corzana haciendo uso de los equipos de síntesis de péptidos disponibles en el departamento de química de la Universidad de La Rioja. Entre los derivados sintetizados se incluyen tanto glicopéptidos homogéneos como híbridos. Estos últimos alternan repeticiones -T*AA- equipadas con glicósidos modificados con otras portadoras del fragmento natural. Dichos sistemas presentaron como ventajas principales la de limitar la cantidad de “*building blocks*” sintéticos requeridos para su preparación, aliviar el solapamiento de señales en los espectros de RMN y, en casos concretos (como **GP-VII** o **GP-X**), incrementar la solubilidad de los glicopéptidos en las condiciones requeridas para nuestros ensayos de actividad.

4. Hemos diseccionado las preferencias conformacionales de todos los derivados no naturales sintetizados, mediante un estudio exhaustivo de RMN, complementando, en algunos casos, con cálculos de dinámica molecular. Las tareas realizadas a tal efecto implican, en primer lugar, la asignación de los espectros de RMN de protón y carbono de los diferentes sistemas. Seguidamente,

hemos realizado un análisis detallado de constantes de acoplamiento, coeficientes de temperatura y contactos de tipo NOE/ROE a temperaturas próximas a 0 °C. Los resultados obtenidos confirmaron que todos los glicopéptidos sintetizados adoptan conformaciones extendidas de tipo hélice PPII, comparables a las previamente descritas con la secuencia natural. De acuerdo con esto, las modificaciones químicas introducidas pueden considerarse conservativas desde un punto de vista estructural.

5. Nuestro análisis conformacional nos ha permitido confirmar la relevancia que las funciones acetamida de GalNAc tienen como determinantes estructurales en *AFGPs*. Dichos fragmentos contribuyen a fijar la conformación de los residuos de treonina mediante una combinación de dos efectos: estabilizan conformaciones extendidas mediante interacciones polares con la cadena principal y, a su vez, desestabilizan estéricamente orientaciones alternativas, en especial, aquellas de tipo α -hélice.

6. Se ha analizado la actividad anticongelante de los glicopéptidos sintetizados. Las medidas realizadas implican una determinación de su efecto sobre la morfología de los cristales de hielo seguida de una cuantificación precisa del fenómeno de histéresis térmica. Ambos análisis se han realizado a concentraciones variables en el rango de 2-40 mg/mL. Los resultados obtenidos confirman la participación de los grupos metilo de GalNAc en el proceso de reconocimiento, de acuerdo con el modelo planteado por Molinero y col. Adicionalmente, demuestran que las galactosas no reductoras ejercen un papel importante sobre la actividad y que la relevancia de sus diferentes posiciones sigue un orden de prelación: OH-2 > OH-3 > OH-4. Dicha observación resulta consistente con el modelo originalmente propuesto por DeVries y parece descartar una asociación de naturaleza exclusivamente solvofóbica.

7. Nuestros estudios de actividad, demuestran que las actividades *DIS* y *HT* no están necesariamente conectadas; mientras que ambas reflejan la formación de un complejo *AFGP*/hielo, solo la histéresis térmica requiere que ese sea irreversible. De acuerdo con esta interpretación de los datos experimentales, la posición 4 de galactosa juega un papel muy importante en la asociación irreversible del glicopéptido al hielo. Por el contrario, las posiciones 2 y 3 de la piranosa son esenciales tanto para la unión reversible como para la irreversible.

8. De acuerdo con las consideraciones anteriores, hemos planteado un modelo alternativo de asociación glicopéptido/hielo que integra elementos de los dos modelos preexistentes, otorgando un papel clave tanto a las interacciones solvofóbicas (mediadas por metilos) como a las polares (mediadas por los glicósidos). Nuestro modelo implica un ajuste geométrico relativamente menor

con respecto al modelo de asociación postulado por Molinero. Este permite la integración de las galactosas en el epítipo de reconocimiento de hielo y explica de modo natural la relevancia relativa que las diferentes posiciones de la piranosa ejercen sobre el proceso.

9. Cabe destacar que, de acuerdo al modelo propuesto, grupos del péptido claves para la actividad no adoptan una distribución coplanar. En consecuencia, alguno de ellos queda forzosamente alejado de la superficie del hielo tras la asociación inicial. Tal es el caso de la posición 4 de galactosa, esencial para que la unión sea irreversible. Dicha circunstancia puede explicarse asumiendo que su participación en el proceso de reconocimiento se da en una etapa posterior y requiere el avance del frente de hielo en las regiones adyacentes al glicopéptido asociado. De acuerdo con esto, puede plantearse un proceso de dos etapas consecutivas. La primera de carácter reversible involucraría un conjunto limitado de interacciones glicopéptido/hielo. La asociación solo se haría irreversible una vez el frente de hielo avanza, generando contactos adicionales. Curiosamente, un proceso en dos etapas, la primera reversible y la segunda irreversible, se ha invocado en el pasado para explicar la actividad de proteínas anticongelantes no glicosiladas.

CAPÍTULO 7.
PARTE EXPERIMENTAL

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Técnicas generales

Todos los reactivos químicos y disolventes necesarios fueron comprados y se usaron tal y como se recibieron, a menos que se indique lo contrario. Para la eliminación de la humedad de los reactivos de partida, se realizó una destilación azeotrópica con tolueno. Todas las reacciones sensibles a la humedad, especialmente las reacciones de glicosilación, se llevaron a cabo en matraces secos equipados con septum de goma bajo una presión positiva de argón. Los líquidos y disoluciones sensibles al aire y/o la humedad se transfirieron mediante jeringas o cánulas de acero inoxidable. Para secar las disoluciones orgánicas provenientes de extracciones, se utilizó MgSO_4 anhidro y la evaporación de los disolventes se realizó a presión reducida en un rotavapor Buchi R-300. De manera general, las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario. La purificación de los compuestos se realizó mediante cromatografía *flash* en columna con gel de sílice 0.040-0.063 mm, 230-400 mesh ASTM (Merck). El seguimiento de las reacciones mediante cromatografía en capa fina se realizó utilizando cromatofolios TLC Silica gel 60 F₂₅₄. Las manchas se observaron primero con irradiación UV (254 nm) y luego se carbonizaron con una solución de H_2SO_4 al 5% en etanol o con ninhidrina (0.1 g) en acetona (100 mL). Los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN se registraron principalmente en CDCl_3 a 300, 400, 500, 600 o 800 MHz y fueron expresados en partes por millón (escala δ) y referenciados a la señal residual de ^1H del disolvente (CHCl_3 : δ 7.26 ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Todos los espectros de ^{13}C -RMN presentados están desacoplados de protón. Los espectros de masas se registraron mediante inyección directa con un espectrómetro Q-TOF LC/MS de masa precisa equipado con una fuente de iones de electrospray en modo positivo, y cuando se especifique, en modo negativo.

7.2 Procedimientos Generales

Procedimiento I. Método general para la desprotección de alcoholes protegidos como ésteres (acetatos y benzoatos)

A una disolución del éster (1.0 mmol) en MeOH (20 mL/mmol), se le añadió una cantidad catalítica de MeONa recién preparado a una temperatura de 0 °C. A continuación, la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta observar la desaparición completa del producto de partida por cromatografía en capa fina. A continuación, se neutralizó con AcOH, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida.

Procedimiento II. Método general para la metilación de grupos hidroxilo

A una disolución del alcohol (1.0 mmol) en DMF o THF anhidro (5 mL/mmol), según se indique en cada caso, bajo atmósfera inerte y a 0 °C se le añadió NaH (60%, en aceite mineral) (1.5 mmol/hidroxilo libre) y CH₃I (2.0 mmol/hidroxilo libre). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta observar por CCF la completa desaparición del producto de partida. La reacción se detuvo por adición de agua y el crudo se extrajo con AcOEt. Finalmente, la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice.

Procedimiento III. Método general para la acetilación de grupos hidroxilo

A una disolución del alcohol (1.0 mmol) en piridina seca (3 mL) se le añadió a 0 °C Ac₂O (1.6 mmol/hidroxilo libre) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta la desaparición total del producto de partida. La reacción se detuvo mediante la adición de MeOH y se concentró a presión reducida. El crudo se redisolvió en DCM y se lavó con disoluciones de HCl (1M), NaHCO₃ (sat.) y NaCl (sat.). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice.

Procedimiento IV. Método general para la benzoilación de grupos hidroxilo

A una disolución del alcohol (1.0 mmol) en piridina seca (3 mL) a 0 °C y bajo atmósfera inerte se añadió BzCl (1.6 mmol/hidroxilo libre) y se agitó a temperatura ambiente hasta la completa desaparición del producto de partida. La reacción se enfrió a 0 °C y el exceso de BzCl se consumió mediante la adición de MeOH. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el crudo se redisolvió en DCM y se lavó con HCl (1M), NaHCO₃ (sat.) y NaCl (sat.). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice.

Procedimiento V. Método general para la bencilidenación de dioles

A una disolución del alcohol (1.0 mmol) en ACN seco (15 mL/mmol) se le añadió bajo atmósfera inerte *p*-TsOH anhidro (0.1 mmol) y a continuación el arilacetaldéhido dimetilacetal correspondiente (1.2 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente hasta la conversión total del producto de partida. Finalmente, la reacción se detuvo mediante la adición de Et₃N, se concentró a presión reducida y el crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

Procedimiento VI. Método general para la glicosilación con donadores de tipo tricloroacetimidato

A una disolución del donador tricloroacetimidato (1.2 mmol) y el alcohol aceptor (1.0 mmol) en DCM (30 mL/mmol), se le añadieron tamices moleculares de 4 Å. La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte durante 15 minutos y, pasado ese tiempo, se enfrió a -78 °C. A continuación, se añadió el TMSOTf (0.4 mmol) y la mezcla resultante se agitó a esa temperatura hasta la completa desaparición del donador, monitorizada por CCF. La reacción se detuvo mediante la adición de Et₃N, se diluyó con diclorometano y se lavó con H₂O. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. Finalmente, el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

Procedimiento VII. Método general para la glicosilación con donadores de tipo tiofenilo promovida por TfOH

A una disolución del tioglicósido donador (1.5 mmol) y el alcohol aceptor (1.0 mmol) en DCM anhidro (5 mL/mmol) y bajo atmósfera inerte se adicionaron tamices moleculares de 4 Å y NIS (1.5 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente se enfrió a 0 °C, temperatura a la cual se añadió gota a gota TfOH (0.33 mmol). La mezcla se dejó evolucionar a temperatura ambiente durante toda la noche hasta observar la desaparición del donador por CCF. La reacción se detuvo mediante la adición de Et₃N y se diluyó con DCM. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con una mezcla de disoluciones saturadas de NaHCO₃ y Na₂S₂O₃. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

Procedimiento VIII. Método general para la glicosilación con donadores de tipo tiofenilo mediada por TMSOTf

A una disolución del tioglicósido donador (1.5 mmol) y el alcohol aceptor (1.1 mmol) en DCM anhidro (5 mL/mmol) y bajo atmósfera inerte se adicionaron tamices moleculares de 4 Å y NIS (1.5 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente se enfrió a -30 °C, temperatura a la que se añadió gota a gota TMSOTf (0.33 mmol). La mezcla se dejó evolucionar a dicha temperatura hasta la completa desaparición del producto de partida, monitorizada por CCF. La reacción se detuvo mediante la adición de Et₃N y se diluyó con DCM. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con una mezcla de disoluciones saturadas de NaHCO₃ y Na₂S₂O₃. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

Procedimiento IX. Método general para la glicosilación de haluros de glicosilo en condiciones de Koenigs-Knorr

A una disolución del alcohol aceptor (1.0 mmol) en una mezcla de DCM y tolueno seco (4 mL/mmol 1:1) se le añadieron tamices moleculares de 4 Å bajo atmósfera inerte y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, la mezcla se enfrió a 0 °C y en este punto se agregaron Ag₂CO₃ (1.2 mmol) y AgClO₄ (0.13 mmol). El matraz de reacción se cubrió con papel de aluminio y la mezcla se agitó de nuevo en ausencia de luz durante 30 minutos. Pasado dicho tiempo, se adicionó gota a gota una disolución del donador (1.1 mmol) en una mezcla 1.6:1 diclorometano: tolueno (5.2 mL/mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche en ausencia de luz. Pasado este tiempo, el crudo de reacción se filtró sobre Celita y se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ y de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

Procedimiento X. Método general para la obtención de tiofenilos anoméricos

A una disolución del monosacárido peracetilado (1.0 mmol) en DCM seco (10 mL/mmol) y bajo atmósfera inerte se le añadió a 0 °C PhSH (1.2 mmol) y BF₃·Et₂O (2.5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche hasta observar mediante CCF la desaparición del producto de partida. La reacción se detuvo por adición de Et₃N y el crudo de reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ y de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

Procedimiento XI. Método general para la bencilación de grupos hidroxilo

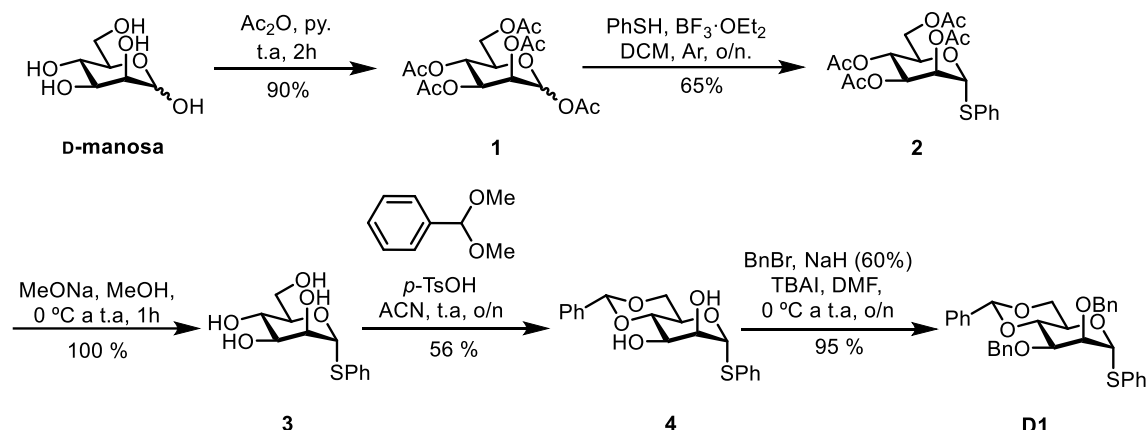
A una disolución del alcohol (1.0 mmol) en DMF o THF anhidro (10 mL/mmol) a 0 °C y bajo atmósfera inerte se añadió NaH (60% en aceite mineral) (2.0 mmol/hidroxilo libre), BnBr (1.25 mmol/hidroxilo libre) y TBAI (0.2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta la completa desaparición del producto de partida. La reacción se detuvo con la adición de MeOH y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se redisolvió en AcOEt y se lavó con H₂O y una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

Procedimiento XII. Método general para la síntesis en fase sólida de glicopéptidos

Como paso previo a la preparación de las secuencias peptídicas los “*building-blocks*” sintéticos fueron transformados mediante la eliminación de los grupos ^tBu por tratamiento con una mezcla TFA: DCM 1:1. La síntesis en fase sólida de los péptidos se llevó a cabo desde el extremo C-terminal al N-terminal. Para nuestro propósito, optamos por una resina Rink Amide MBHA. El primer paso implicó su transformación en su forma reactiva mediante la eliminación de los grupos protectores Fmoc, utilizando una solución de piperidina al 20% en DMF. Seguidamente, se incorporó el primer residuo, Fmoc-Ala, utilizando Oxima y *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) como agentes de acoplamiento, y microondas como fuente de calor. El proceso se repitió para todos los residuos subsiguientes con una particularidad; el acoplamiento de las treoninas glicosiladas se llevó a cabo de forma manual, es decir, sin hacer uso del sintetizador automático. Dicha elección obedece a la imposibilidad de emplear los “*building-blocks*” sintéticos en un exceso significativo. En estos casos, el reactor portador de la resina fue extraído del sintetizador y los acoplamientos se realizaron en ausencia de microondas y bajo condiciones de agitación, empleando como agentes de acoplamiento, DIC, Oxima y DIPEA en DMF a t.a. Tras la incorporación del último residuo a la cadena peptídica, procedimos a la acetilación del extremo N-terminal. Posteriormente, se eliminaron los grupos acetato utilizando diez ciclos de tratamiento con hidrazina: metanol 7:3. A continuación, los glicopéptidos se liberaron de la resina haciendo uso de una mezcla de TFA: TIS: H₂O (95:2.5:2.5). El proceso culminó con la precipitación del producto en Et₂O frío, y su aislamiento por centrifugación. Los glicopéptidos finales fueron purificados por HPLC y liofilizados.

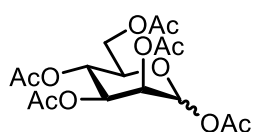
7.3 Síntesis de los “building block” para la preparación de los glicopéptidos GP-I a GP-XI

7.3.1. Síntesis del donador de derivado de D-manosa (D1)



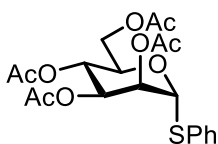
Esquema 7.1.- Ruta sintética empleada para la preparación del donador **D1**.

Compuesto 1



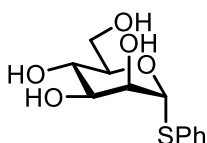
Dicho compuesto se obtuvo por reacción de D-manosa comercial (1 g, 5.55 mmol) con Ac_2O (4 mL) y piridina (5 mL) siguiendo el *Procedimiento General III* (3 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/ AcOEt , 6:4) para obtener el compuesto **1** como una mezcla de anómeros α y β (1.94 g, 90 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁶⁰

Compuesto 2



Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **1** (1.94 g, 4.97 mmol) con PhSH (0.6 mL, 5.96 mmol) y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1.56 mL, 12.42 mmol) siguiendo el *Procedimiento General X* (12 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/ AcOEt , 7:3) para obtener el compuesto **2** (1.42 g, 65 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁶¹

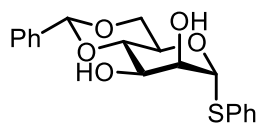
Compuesto 3



Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **2** (1.42 g, 3.22 mmol) en metanol con una cantidad catalítica de MeONa recién preparado siguiendo el *Procedimiento General I* (3 h, t.a.).

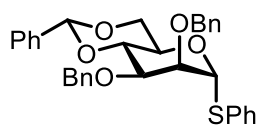
El residuo resultante se usó en la siguiente etapa sin purificación previa. (0.88 g, 100%).

Compuesto 4



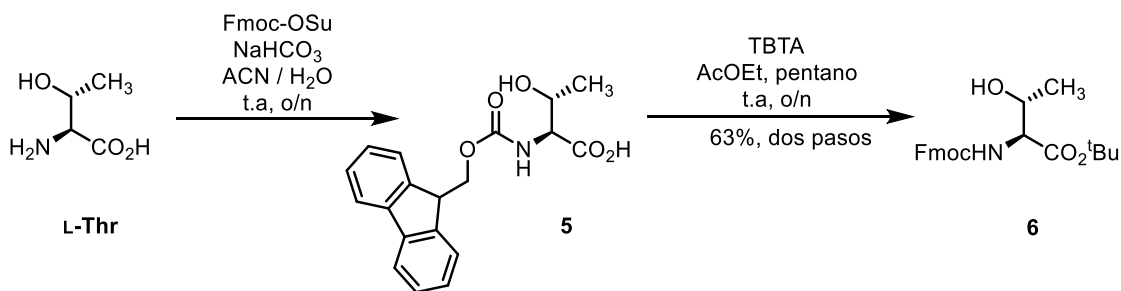
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **3** (3.40 g, 12.48 mmol) con *p*-TsOH (0.24 g, 1.25 mmol) y benzaldehído dimetilacetal (2.35 mL, 14.98 mmol) siguiendo *Procedimiento General V* (12h, t.a.). El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 6:4) para obtener **4** (2.5 g, 56 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁶²

Compuesto D1



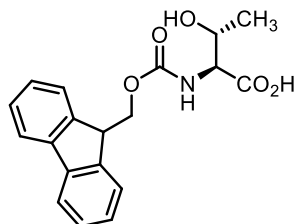
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **4** (0.96 g, 2.67 mmol) con NaH (60% en aceite mineral), (0.43 g, 10.69 mmol), bromuro de bencilo (1.14 g, 6.68 mmol) y TBAI (0.20 g, 0.53 mmol) siguiendo el *Procedimiento General XI* (12 h, t.a.). El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 95:5) para obtener **D1** (1.37 g, 95 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁶³

7.3.2. Síntesis de la especie aceptora 6



Esquema 7.2.- Ruta sintética empleada para la preparación del aceptor 6.

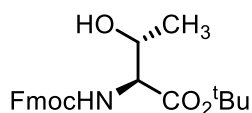
Compuesto 5



A una disolución de L-treonina comercial (5 g, 42 mmol) en ACN anhidro (140 mL) y H₂O (70 mL) se le añadió Fmoc-OSu (17.70 g, 52.5 mmol) y NaHCO₃ (10.58 g, 126 mmol). La mezcla resultante se dejó agitando vigorosamente durante 24 h. Pasado dicho tiempo el crudo se extrajo con acetato de etilo y fue lavado con agua. La fase orgánica fue acidificada con HCl (37%) hasta pH=2 y fue extraída con acetato de etilo. Dicha

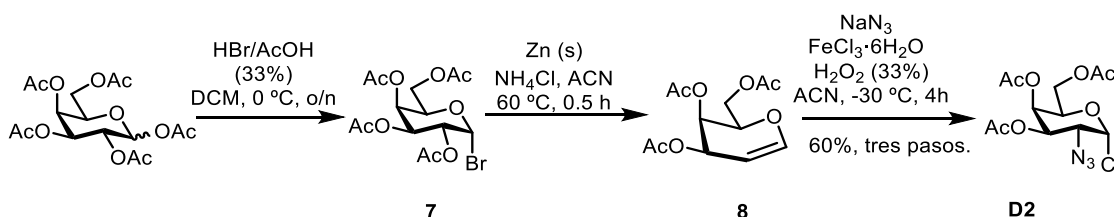
fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro y el disolvente fue eliminado a presión reducida. El crudo de la reacción fue utilizado en la próxima etapa sin purificación previa.

Compuesto 6



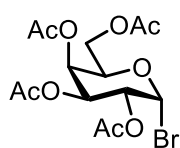
Sobre una disolución de **5** (14.3 g, 42 mmol) en AcOEt (280 mL) se añadió gota a gota una disolución de TBTA (13.74 g, 63 mmol) en *n*-pentano (140 mL) a temperatura ambiente. Una vez la adición fue terminada, el matraz se purgó, se puso bajo atmósfera inerte y la mezcla se dejó agitando vigorosamente durante toda la noche. A continuación, el disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo fue redissuelto en DCM, enfriado a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el precipitado formado fue eliminado por filtración. Finalmente, el compuesto fue purificado por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 7:3) para obtener **6** (10.54, 63 % en dos pasos). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁶⁴

7.3.3. Síntesis de la especie donadora D2

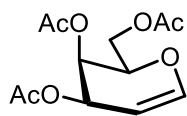


Esquema 7.3.- Procedimiento sintético empleado para la preparación del donador D2.

Compuesto 7

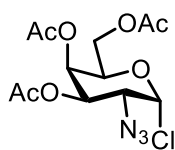


Sobre una disolución de D-galactosa peracetilada (10 g, 25.6 mmol) en DCM (100 mL) se añadió a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ una mezcla de HBr/AcOH al 33% (14 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche hasta observar la completa desaparición del producto de partida por CCF. La mezcla se diluyó con DCM y se lavó con H_2O . La fase orgánica se lavó con una disolución saturada de NaHCO_3 y de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro y el disolvente fue eliminado a presión reducida. El crudo de esta reacción se usó en la siguiente etapa sin purificación previa.

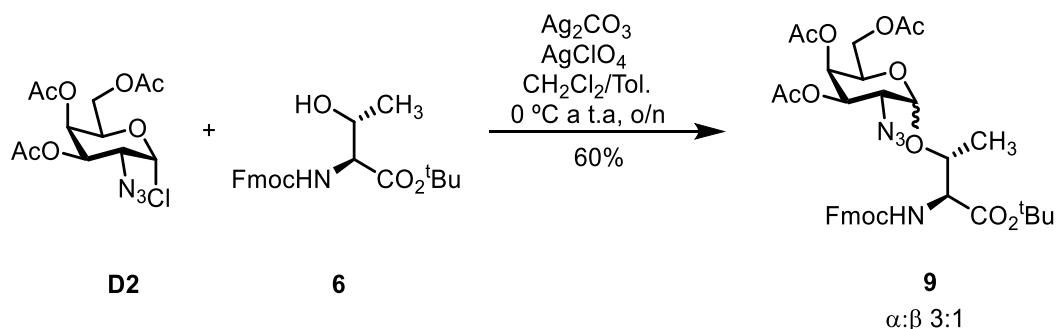
Compuesto 8

Sobre una disolución de **7** (10.9 g, 26.5 mmol) en ACN (132 mL) se añadió un exceso de Zn (6.9 g, 106 mmol) y NH₄Cl sólido (5.67 g, 106 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a 65 °C.

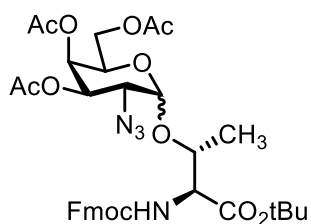
Pasado dicho tiempo, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo de reacción se filtró sobre Celita y finalmente el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo de esta reacción se usó en la siguiente etapa sin purificación previa.

Compuesto D2

Sobre una disolución de **8** (6.8 g, 26.5 mmol) en ACN (200 mL) a -30 °C se le añadió FeCl₃·6H₂O (3.44 g, 53 mmol), NaN₃ (1.89 g, 29.15 mmol) y H₂O₂ al 33% (3 mL) y la mezcla se dejó agitando por 2 h bajo atmósfera inerte. Pasado el tiempo, se añadió una nueva porción de NaN₃ (1.89 g, 29.15 mmol) y de H₂O₂ 33% (3 mL) y la mezcla se dejó agitando por otras 2 h, hasta ver la completa desaparición del compuesto de partida por CCF. El disolvente se eliminó a presión reducida, el crudo de reacción se redisolvió en AcOEt y se lavó en repetidas ocasiones con H₂O hasta lograr que la fase orgánica quedara incolora. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. Finalmente, el producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 75:25) para obtener **D2** (5.3 g, 60 % en los tres pasos). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁶⁵

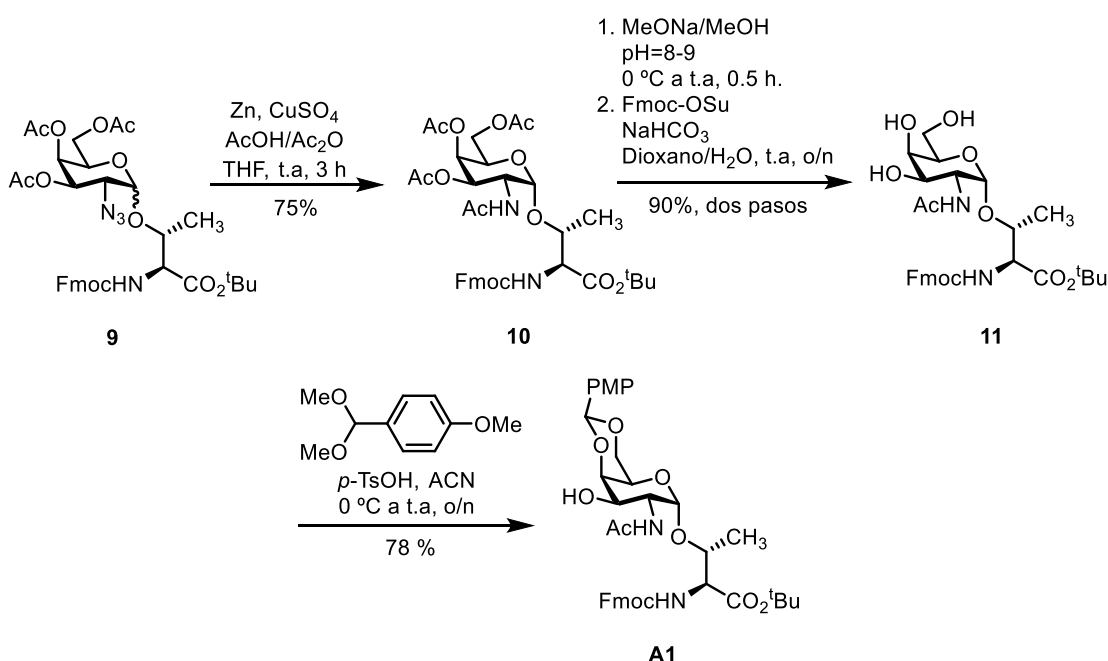
7.3.4. Reacción de acoplamiento entre D2 y 6 y transformaciones posteriores

Esquema 7.4.- Reacción de acoplamiento entre el donador **D2** y el aceptor de treonina **6**.

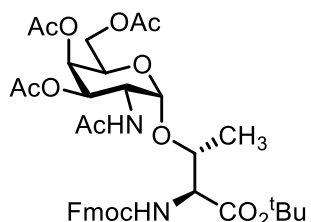
Compuesto 9

Dicho compuesto se obtuvo por reacción de acoplamiento entre **D2** (1.15 g, 3.3 mmol) y **6** (1.19 g, 3.0 mmol) utilizando como activantes Ag_2CO_3 (0.99 g, 3.6 mmol) y AgClO_4 (0.08 g, 0.39 mmol) en una mezcla de DCM y tolueno siguiendo el *Procedimiento General IX* (12h, t.a.).

El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tol/Acetona, 95:5) para obtener el compuesto **9** como una mezcla de anómeros α/β 3/1 (1.27 g, 60 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁴⁷



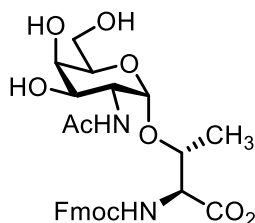
Esquema 7.5.- Secuencia de reacciones empleadas para la obtención del aceptor **A1** a partir del intermedio **9**.

Compuesto 10

A una disolución de **9** (0.88 g, 1.24 mmol) en una mezcla de THF/ Ac_2O / AcOH (3:2:1, 15 mL/mmol) se le añadió Zn metálico (0.81 g, 12.40 mmol) y una disolución saturada de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1.86 mL, 1.5 mL/mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y el crudo resultante se filtró sobre Celita. La disolución resultante se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una disolución saturada de NaHCO_3 y de NaCl . La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/ AcOEt , 1:2) para dar el compuesto **10** (0.68 g, 75 %). Los datos

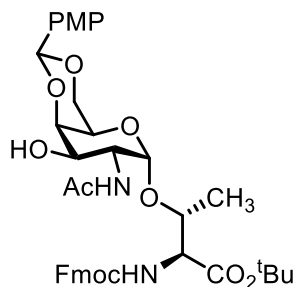
espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁶⁶

Compuesto 11



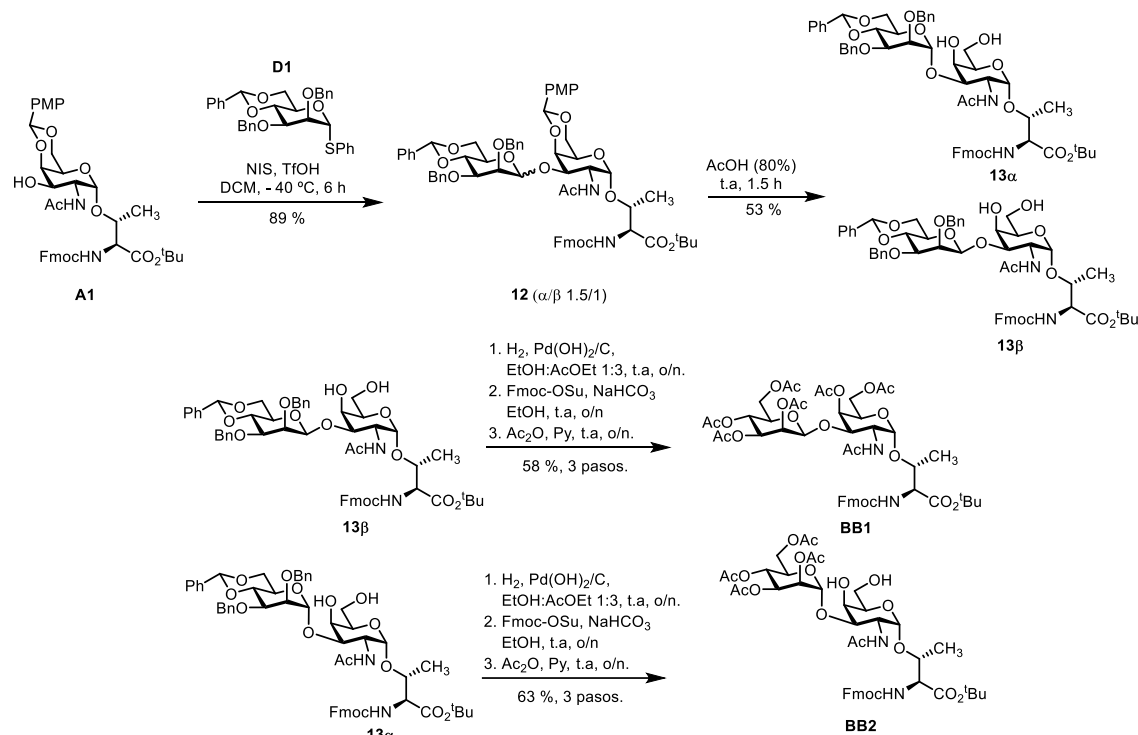
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **10** (1.28 g, 1.76 mmol) en MeOH con una cantidad catalítica de MeONa recién preparado siguiendo el *Procedimiento General I* (3 h, t.a.). El residuo resultante se hizo reaccionar, sin purificación previa, con Fmoc-OSu (0.58 g, 1.76 mmol) y NaHCO₃ (0.177 g, 2.11 mmol) en una mezcla de dioxano y H₂O (1:1, 10 mL/mmol) durante 3 h, hasta observar la desaparición del producto de partida por CCF. El crudo de reacción se extrajo con AcOEt y se lavó con una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 9:1) para obtener el compuesto **11** (0.95 g, 90% en los dos pasos). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁶⁷

Compuesto A1



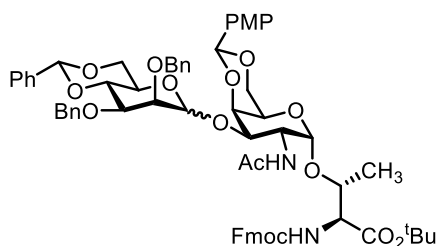
Dicho compuesto se obtuvo por reacción de **11** (3.47 g, 5.78 mmol) en ACN seco (290 mL) con *p*-metoxibenzaldehído dimetilacetal (2 mL, 11.56 mmol) y *p*-TsOH (0.10 g, 0.58 mmol) siguiendo el *Procedimiento General V* (12 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 4:6) para obtener el compuesto **A1** (3.61 g, 87%). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁶⁸

7.3.5. Síntesis de los “building blocks” derivados de D-manosa (BB1 y BB2)



Esquema 7.6.- Procedimiento sintético empleado para la obtención de los “building blocks” BB1 y BB2 a partir del donador D1 y el aceptor A1.

Compuesto 12

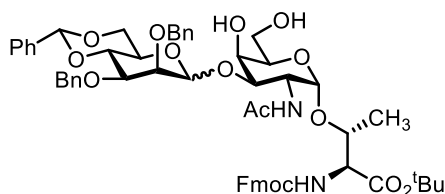


El compuesto **12** se preparó por reacción del donador **D1** (2.60 g, 4.81 mmol) con el aceptor **A1** (2.30 g, 3.21 mmol) en DCM (30 mL) utilizando como activantes NIS (1.08 g, 4.81 mmol) y TfOH (140 μL , 1.60 mmol) siguiendo el *Procedimiento General VII* (6h, -40 °C). El

crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 55:45) para dar el compuesto **12** como una mezcla de anómeros (1.40 g, 89 %; ratio α/β 1.5:1), que no fueron separados hasta la siguiente etapa. Se proporcionan datos espectroscópicos relevantes de la mezcla (solo picos elegidos). **^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3)** δ 5.98 (d, J = 9.7 Hz, 1H, NHAc , anómero α), 5.92 (d, J = 10.3 Hz, 1H, NHAc , anómero β), 4.92 (s, 1H, H-1, anómero α), 4.72-4.57 (m, 7H, H-1, anómero β), 2.00 (s, 3H, NHAc , anómero α), 1.94 (s, 3H, NHAc , anómero β). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 171.3, 170.2, 170.1, 169.8, 160.2, 160.1, 143.9, 143.8, 141.5, 141.5, 139.0, 138.8, 138.4, 137.8, 130.3, 130.1, 129.0, 128.8, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.5, 127.3, 127.2, 126.2, 125.2, 125.1, 120.3, 120.2, 120.2, 120.1, 113.7,

113.6, 102.8 (C-1, anómero β), 101.8, 101.5, 101.0, 100.8, 100.5, 95.4 (C-1, anómero α), 83.5, 83.5, 79.0, 78.2, 76.8, 76.7, 76.2, 75.8, 75.4, 75.1, 73.9, 73.6, 71.9, 71.2, 71.0, 69.4, 69.1, 68.9, 68.6, 67.8, 67.4, 67.0, 64.9, 63.9, 63.2, 60.5, 59.0, 55.4, 55.4, 48.1, 47.5, 47.4, 47.3, 28.2, 23.6, 19.0, 18.9

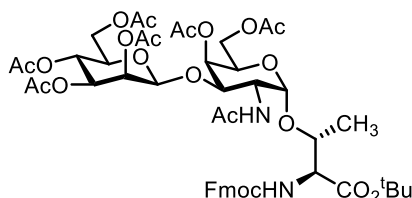
Compuestos **13 α** y **13 β**



Una disolución de **12** (1.40 g, 1.35 mmol) en AcOH acuoso al 80 % (25 mL) se agitó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Pasado dicho tiempo, el disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 95:5) lográndose separar el compuesto **13 α** (0.36 g) y **13 β** (0.12 g). Además, se obtuvo una fracción mezcla (0.23 g) que contenía ambos anómeros y que requirió una nueva purificación adicional (53 %). Para **13 β** **^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3)** δ 7.82 – 7.74 (m, 2H), 7.64 – 7.59 (m, 2H), 7.57 – 7.50 (m, 2H), 7.44 – 7.27 (m, 17H), 6.02 (d, J = 9.8 Hz, 1H, NHAc), 5.61 (s, 1H, CH-Ph), 5.42 (d, J = 9.4 Hz, 1H, NHFmoc), 4.91 (d, J = 11.9 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.87 (s, 1H, H-1), 4.83 (d, J = 11.9 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.71 – 4.63 (m, 2H, CH_2Ph , H-2), 4.63 – 4.58 (m, 2H, CH_2Ph , H-1'), 4.56 (d, J = 6.5 Hz, 2H, CH_2 Fmoc), 4.31 – 4.20 (m, 3H, CH Fmoc, H- α , H-6 α '), 4.20 – 4.10 (m, 3H, H-4, H-4', H- β), 3.98 – 3.81 (m, 4H, H-5, H-6 α , H-6 β ', H-2'), 3.82 – 3.73 (m, 1H, H-6 β), 3.66 (dd, J = 10.6, 3.1 Hz, 1H, H-3), 3.55 (dd, J = 9.9, 3.3 Hz, 1H, H-3'), 3.32 (td, J = 9.7, 5.0 Hz, 1H, H-5'), 2.01 (s, 3H, NHAc), 1.47 (s, 9H, ^tBu), 1.28 (d, J = 6.5 Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-}\gamma$). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (126 MHz, CDCl_3)** δ 170.4 (CO), 170.0 (CO), 156.5 (CO, Fmoc), 143.8, 143.6, 141.4, 141.4, 141.4, 138.7, 138.3, 137.5, 129.0, 128.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.6, 127.2, 126.2, 126.1, 124.9, 124.9, 120.2, 120.1, 103.4 (C-1'), 101.5 (CH-Ph), 100.4 (C-1), 83.3 (^tBu), 79.2 (C-3), 78.3, 77.6, 77.2, 76.6, 75.8 (CH_2Ph), 72.3 (CH_2Ph), 70.0 (C-5), 69.8 (C-4), 68.5 (C-6'), 67.7 (C-5'), 66.8 (CH_2 Fmoc), 62.8 (C-6), 59.1 (C- α), 47.9 (C-2), 47.3 (CH Fmoc), 28.1 (3 CH_3 ^tBu), 23.6 (NHAc), 18.9 ($\text{CH}_3\gamma$). **HRMS (ESI $^+$)** m/z Calc. para $\text{C}_{58}\text{H}_{67}\text{N}_2\text{O}_{15}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1031.4536; encontrada 1031.4532. Para **13 α** **^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3)** δ 7.76 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.59 (dd, J = 7.7, 3.9 Hz, 2H), 7.48 – 7.44 (m, 2H), 7.42 – 7.27 (m, 17H), 6.26 (d, J = 9.6 Hz, 1H, NHAc), 5.62 (s, 1H, CH-Ph), 5.43 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NHFmoc), 4.92 – 4.84 (m, 4H, H-1, H-1', CH_2Ph), 4.68 – 4.61 (m, 2H, CH_2Ph), 4.62 – 4.53 (m, 1H, H-2), 4.46 (d, J = 6.8 Hz, 2H, CH_2 Fmoc), 4.27 – 4.18 (m, 4H, CH Fmoc, H- α , H-4', H-6 α '), 4.17 – 4.12 (m, 1H, H- β), 4.00 – 3.73 (m, 9H), 2.04 (s, 3H, NHAc), 1.46 (s, 9H, ^tBu), 1.28 (d, J = 6.0 Hz, 3H, $\text{CH}_3\gamma$). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (126 MHz, CDCl_3)** δ 170.6 (CO), 170.3 (CO), 156.4 (CO Fmoc), 143.8, 141.5, 138.8, 138.2, 137.7, 129.0, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 127.9, 127.6, 127.2,

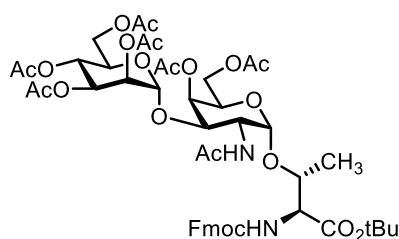
126.3, 125.2, 125.1, 120.2, 120.2, 101.9 (CH-Ph), 100.0, 95.7, 83.5 (^tBu), 78.9 (C-4'), 76.8, 76.6, 76.5, 74.2 (CH₂Ph), 73.8 (CH₂Ph), 73.2 (C-3), 70.3, 68.7 (C-6'), 67.3 (CH₂ Fmoc), 66.7, 65.0, 63.2 (C-6), 58.9 (C-α), 47.3 (CH Fmoc), 46.9 (C-2), 28.2 (3CH₃ ^tBu), 23.5 (NHAc), 18.7 (CH₃γ).

Compuesto BB1



En primer lugar, a una disolución de **13β** (0.48 g, 0.46 mmol) en una mezcla de EtOH y AcOH (1:3, 40 mL/mmol) se le añadió Pd(OH)₂ (0.24 g, 50% w/w) y se le realizó un ciclo de vacío/argón. A continuación, se le pasó una corriente de H₂ y la mezcla se dejó agitando durante toda la noche. Pasado este tiempo, el crudo de reacción se filtró sobre Celita, y se lavó con EtOH. El disolvente fue eliminado a presión reducida y posteriormente, el crudo fue disuelto en EtOH (20 mL) y se añadió NaHCO₃ (0.12 g, 1.38 mmol) y Fmoc-OSu (0.19 g, 0.55 mmol), dejando la mezcla reaccionando durante toda la noche. Finalmente, el disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo se puso a reaccionar en una mezcla de anhídrido acético (7 mL) y piridina (10 mL) siguiendo el *Procedimiento Experimental III* (12 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 2:8) para dar el compuesto **BB1** (0.27 g, 58 %). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.78 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, Fmoc), 7.62 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Fmoc), 7.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, Fmoc), 5.93 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, NH-OAc), 5.81 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, NHFmoc), 5.41 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-2'), 5.37 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-4), 5.24 (t, *J* = 10 Hz, 1H, H-4'), 5.01 (dd, *J* = 10.1, 3.3 Hz, 1H, H-3'), 4.84 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-1), 4.75 (s, 1H, H-1'), 4.49 – 4.47 (m, 3H, CH₂ Fmoc, H-2), 4.23 – 4.21 (m, 2H, H-α, CH Fmoc), 4.18 – 4.13 (m, 4H, H-β, H-6_b, H-6_a', H-6_b'), 4.10 – 4.00 (m, 1H, H-5), 3.99 – 3.92 (m, 2H, H-3, H-6_a), 3.57 (dt, *J* = 7.3 Hz, 2.33 Hz, 1H, H-5'), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.08 (3H, OAc), 2.06 (3H, OAc), 2.03 (3H, OAc), 2.02 (3H, OAc), 1.99 (3H, OAc), 1.93 (3H, OAc), 1.43 (s, 9H, ^tBu), 1.28 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 171.3 (CO), 170.6 (CO), 170.5 (CO), 170.3 (CO), 170.2 (CO), 170.1 (CO), 169.9 (CO), 169.6 (CO), 156.8 (CO, Fmoc), 143.8 (C, Fmoc), 143.7 (C, Fmoc), 141.42 (C, Fmoc), 141.4 (C, Fmoc), 127.9 (2CH, Fmoc), 127.1 (2CH, Fmoc), 125.0 (2CH, Fmoc), 120.1 (2CH, Fmoc), 100.0 (C-1), 97.1 (C-1'), 76.6 (C-β), 73.1 (C-5'), 73.0 (C-3), 70.9 (C-3'), 68.5 (C-2'), 67.9 (C-4), 67.8 (C-5), 67.1 (CH₂ Fmoc), 67.7 (C-4'), 63.1 (C-6), 62.1 (C-6'), 59.1 (C-α), 48.4 (C-2), 47.2 (CH Fmoc), 28.2 (3CH₃, ^tBu), 23.4 (NHAc), 20.9 (OAc), 20.8 (OAc), 20.8 (OAc), 20.8 (OAc), 20.7 (OAc), 20.6 (OAc), 18.9 (CH₃γ). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₄₉H₆₃N₂O₂₁ [M+H]⁺: 1015.3918, encontrada 1015.3916.

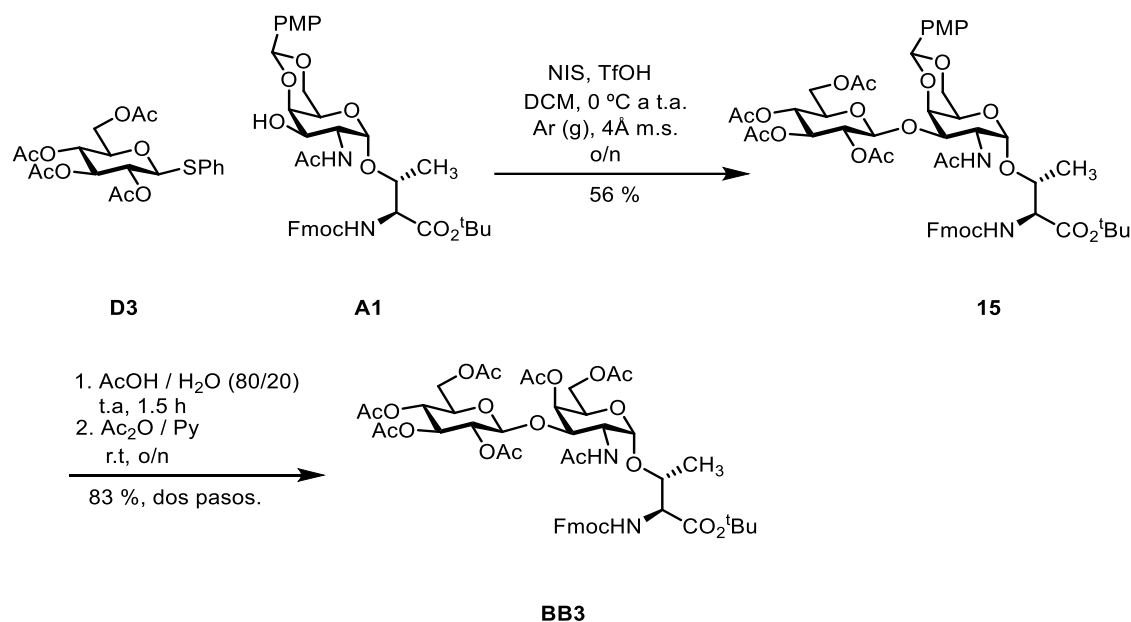
Compuesto BB2



En primer lugar, a una disolución de **13a** (0.54 g, 0.53 mmol) en una mezcla de EtOH y AcOH (1:3, 40 mL/mmol) se le añadió Pd(OH)₂ (0.05 g, 50% w/w) y se le realizó un ciclo de vacío/Argón. A continuación, se le pasó una corriente de H₂ y la mezcla se dejó agitando durante toda la noche.

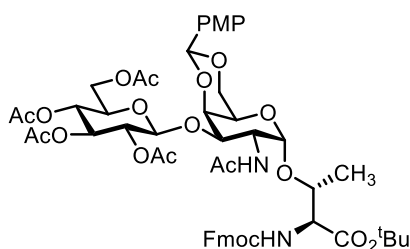
Pasado este tiempo, el crudo de reacción se filtró sobre Celita, y se lavó con EtOH. El disolvente fue eliminado a presión reducida y posteriormente fue redisoluto en EtOH y se añadió NaHCO₃ (0.12 g, 1.38 mmol) y Fmoc-OSu (0.19 g, 0.55 mmol), dejando la mezcla evolucionar durante toda la noche. Finalmente, el disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo se puso a reaccionar en una mezcla de anhídrido acético (7 mL) y piridina (10 mL) siguiendo el *Procedimiento Experimental III* (12 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 2:8) para dar el compuesto **BB2** (0.33 g, 63 %). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.74 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.56 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.38 (td, *J* = 7.5, 3.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.28 – 7.25 (m, 2H, Fmoc), 7.03 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, NHFmoc), 6.02 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, NHAc), 5.35 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-4), 5.20 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H-4'), 5.13 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-3'), 5.11 – 5.07 (m, 1H, H-2'), 5.02 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-1'), 4.82 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-1), 4.58 (dd, *J* = 10.8, 6.2 Hz, 2H, CH₂ Fmoc), 4.53 (dd, *J* = 10.5, 3.9 Hz, 1H, H-2), 4.44 – 4.35 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 3.99 (ddd, *J* = 10.4, 6.9, 3.5 Hz, 1H, H-5'), 4.32 – 4.27 (m, 2H, H-β, CH Fmoc), 4.19 – 4.15 (m, 2H, H-α, H-5), 4.15 – 4.06 (m, 2H, H-6a H-6b), 3.92 (dd, *J* = 11.1, 3.1 Hz, 1H, H-3), 2.17 (s, 3H, OAc), 2.12 (3H, OAc), 2.03 (3H, OAc), 2.02 (3H, OAc), 1.99 (3H, OAc), 1.97 (3H, OAc), 1.93 (3H, OAc), 1.42 (s, 9H, ^tBu), 1.30 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 173.6 (CO), 170.8 (CO), 170.5 (CO), 170.2 (CO), 170.1 (CO), 169.4 (CO), 169.4 (2CO), 157.2 (CO-Fmoc), 143.9 (C-Fmoc), 143.9 (C-Fmoc), 141.4 (C-Fmoc), 141.4 (C-Fmoc), 127.8 (2CH, Fmoc), 127.1 (CH-Fmoc), 127.0 (CH-Fmoc), 124.9 (CH-Fmoc), 124.9 (CH-Fmoc), 120.1 (CH-Fmoc), 120.1 (CH, Fmoc), 100.5 (C-1), 93.5 (C-1'), 82.9 (C, ^tBu), 77.6 (C-β), 69.6 (C-4'), 69.5 (C-3), 68.8 (C-2'), 68.6 (C-3'), 67.1 (C-5), 67.0 (C-3), 66.5 (CH₂ Fmoc), 66.4 (C-6), 65.0 (C-4), 62.6 (C-6'), 59.4 (C-α), 47.4 (CH Fmoc), 47.4 (C-2), 28.2 (3CH₃, ^tBu), 22.2 (NHAc), 20.9 (OAc), 20.8 (OAc), 20.8 (OAc), 20.8 (OAc), 20.7 (OAc), 20.5 (OAc), 19.2 (CH₃γ) **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₄₉H₆₃N₂O₂₁ [M+H]⁺: 1015.3918, encontrado 1015.3914.

7.3.7. Síntesis del “building block” BB3



Esquema 7.8.- Procedimiento sintético empleado para la síntesis del “building block” BB3.

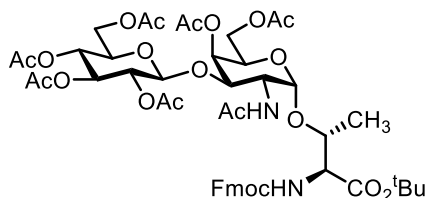
Compuesto 15



El compuesto **15** se preparó por reacción del donador **D3** (0.343 g, 0.78 mmol) con el aceptor **A1** (0.28 g, 0.39 mmol) en DCM (4 mL) utilizando como activantes NIS (0.17 g, 0.78 mmol) y TfOH (17 μ L, 0.20 mmol), siguiendo el *Procedimiento General VII* (16 h, t.a.). El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 4:6) para dar el compuesto **15** (0.23 g, 56 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (d, J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.61 (t, J = 9.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.47 – 7.38 (m, 4H, Fmoc, PMP), 7.32 (t, J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc), 6.88 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar), 5.95 – 5.90 (m, 2H, 2NH), 5.47 (s, 1H, CH-PMP), 5.10 – 5.08 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.96 (t, J = 8.6 Hz, 1H, H-2'), 4.92 (d, J = 2.9 Hz, 1H, H-1), 4.79 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-1'), 4.66 – 4.54 (m, 2H, H-2, CH₂-Fmoc), 4.51 – 4.40 (m, 2H, CH₂-Fmoc, H-6_a'), 4.33 – 4.16 (m, 5H, CH Fmoc, H- α , H- β , H-4, H-6_a), 4.12 (dd, J = 12.3, 3.8 Hz, 1H, H-6_b'), 4.04 (d, J = 12.3 Hz, 1H, H-6_b), 3.92 – 3.84 (m, 1H, H-3), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.74 – 3.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-5), 3.66 – 3.62 (m, 1H, H-5'), 2.04 (s, 6H, 2OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 6H, 2OAc), 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.26 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH₃ γ). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 171.2, 170.4, 170.0, 169.9, 169.8, 169.4, 160.1, 156.9, 143.9, 141.5, 130.3, 127.9, 127.7, 127.2, 125.1, 120.2, 113.6, 100.9 (CH, PMP), 100.5 (C-1), 99.8 (C-1'), 83.2, 75.4 (C- β), 73.0 (C-3'), 72.7 (C-3),

72.4 (C-5'), 71.2 (C-2'), 69.2 (C-6), 68.2 (C-4'), 66.9 (CH₂ Fmoc), 63.6 (C-5), 61.6 (C-6'), 59.4 (C-4, C- α), 55.4 (OMe), 47.8 (C-2), 47.4 (CH Fmoc), 28.2 (3CH₃, ^tBu), 23.6 (OAc), 20.89 (2OAc), 20.74 (2OAc), 19.38 (CH₃ γ). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₅₃H₆₅N₂O₂₀ [M+H]⁺: 1049.4125, encontrado 1049.4127.

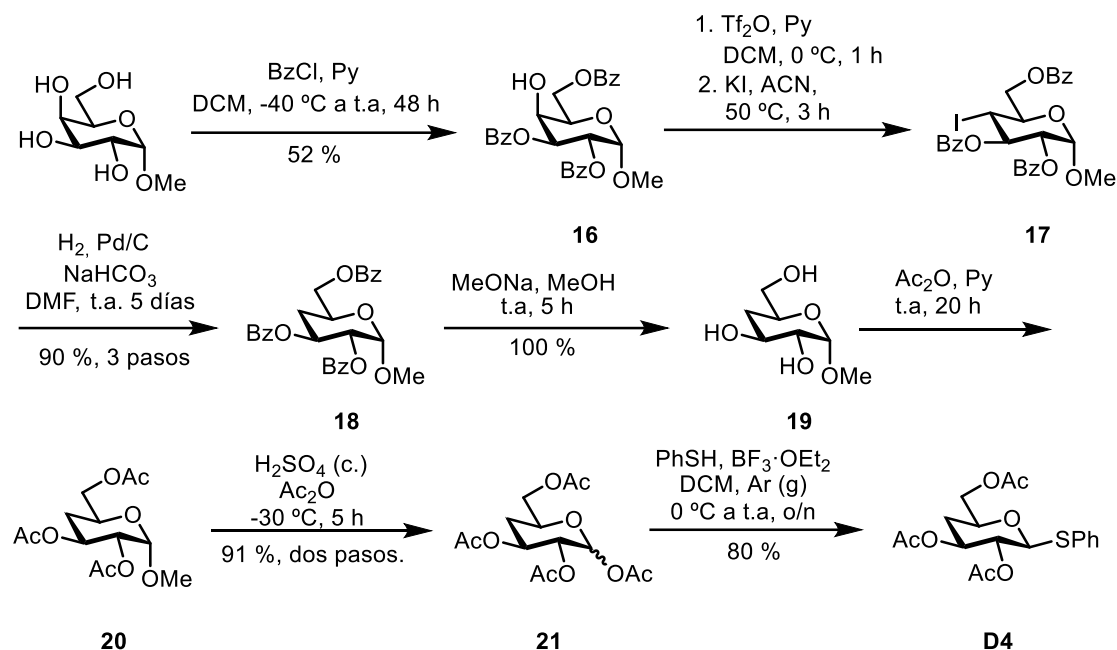
Compuesto BB3



Una disolución de **15** (0.86 g, 0.82 mmol) en ácido acético en agua al 80 % (15 mL) se dejó agitando durante 1 h, hasta observar por CCF la completa desaparición del producto de partida. A continuación, el disolvente se eliminó a presión

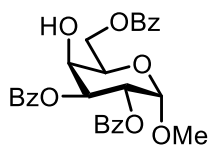
reducida y el residuo resultante se acetiló siguiendo el *Procedimiento General III* (12 h, t.a.). El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 4:6) para dar **BB3** (0.64 g, 76 %). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.78 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.62 (d, J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc), 7.42 (t, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.33 (t, J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc), 5.95 (d, J = 9.7 Hz, 1H, NH-Ac), 5.64 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NHFmoc), 5.33 – 5.27 (m, 1H, H-4), 5.17 – 5.07 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.91 – 4.85 (m, 1H, H-2'), 4.81 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H-1), 4.64 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.59 – 4.43 (m, 4H, H-2, H-6_a', CH₂ Fmoc), 4.30 – 4.16 (m, 3H, H- α , H- β , CH Fmoc), 4.16 – 3.96 (m, 4H, H-5, H-6_b', H-6_a, H-6_b), 3.80 – 3.72 (m, 1H, H-3), 3.71 – 3.64 (m, 1H, H-5'), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 6H, 2OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 3H, OAc), 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.29 (d, J = 5.7 Hz, 3H, CH₃ γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 171.2, 170.6, 170.4, 170.1, 170.0, 169.9, 169.8, 169.4, 156.7, 143.8, 141.5, 128.0, 127.3, 125.0, 120.2, 100.2 (C-1, C-1'), 83.4, 76.5 (C- β), 72.9 (C-3, C-3'), 72.1 (C-5'), 71.0 (C-2'), 69.3 (C-4), 68.3 (C-4'), 67.9 (C-5), 67.0 (CH₂ Fmoc), 62.8 (C-6), 61.2 (C-6'), 59.3 (C- α), 48.3 (C-2), 47.4 (CH Fmoc), 28.2 (^tBu), 23.5 (OAc), 20.8 (OAc), 20.8 (OAc), 20.8 (OAc), 20.7 (OAc), 20.7 (2OAc), 18.9 (CH₃ γ). **HRMS (ESI⁺) m/z:** Calc. para C₄₉H₆₃N₂O₂₁ [M+H]⁺ 1015.3918; encontrado 1015.3916.

7.3.8. Síntesis del donador D4



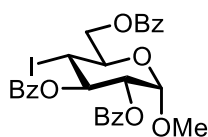
Esquema 7.9.- Procedimiento sintético empleado para la síntesis del donador D4.

Compuesto 16



A una disolución de metil- α -D-galactopiranosido comercial (10 g, 51.54 mmol) en una mezcla de DCM (150 mL) y Py (70 mL) se le adicionó BzCl (19.7 mL, 170.1 mmol) a una temperatura de -40 °C. La reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 48 h y posteriormente se detuvo mediante la adición de MeOH. El disolvente se eliminó a presión reducida y posteriormente el crudo se redisolvió con acetato de etilo y se lavó con una disolución de HCl (1M) y una disolución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 7:3) para dar el compuesto **16** (13.5 g, 52 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁷¹

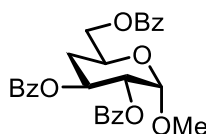
Compuesto 17



A una disolución de **16** (13.3 g, 26.28 mmol) en DCM (263 mL) se le adicionó Py (8.45 mL, 105.12 mmol) y TFAA (6.46 mL, 39.42 mmol) a 0 °C. La reacción se dejó agitando a esa temperatura durante 1 h y, posteriormente la mezcla se diluyó con DCM y se lavó con una disolución de HCl (1M) y una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a presión

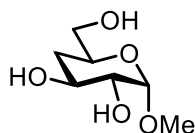
reducida. El crudo de dicha reacción se disolvió en ACN (263 mL) y se le adicionó KI (13.08 g, 78.84 mmol). La mezcla se calentó a 50 °C durante 3 horas hasta que se observó la desaparición por completo del producto de partida por CCF. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo se redisolvió en DCM y se lavó con agua y con una disolución saturada de NaCl. Finalmente, la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto resultante **17** se utilizó en el paso siguiente sin purificación previa.

Compuesto 18



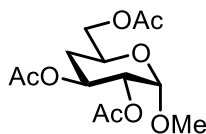
A una disolución de **17** (16.2 g, 26.28 mmol) en DMF (130 mL) se añadió NaHCO₃ (4.41 g, 52.56 mmol) y Pd/C 10 % (4.05 g, 25 % w/w). La disolución se sometió a una atmósfera de hidrógeno durante 5 días, hasta observar la completa desaparición del producto de partida por CCF. El crudo de reacción se filtró sobre Celita y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 8:2) para dar el compuesto **18** (11.5 g, 90%, en los tres pasos). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁷²

Compuesto 19



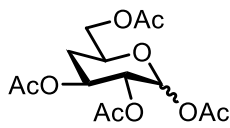
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **18** (9.6 g, 19.6 mmol) en metanol con una cantidad catalítica de MeONa recién preparado siguiendo el *Procedimiento General I* (5 h, t.a.). El residuo resultante se usó en la siguiente etapa sin purificación previa. (3.49 g, 100 %).

Compuesto 20



Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **21** (3.47 g, 19.49 mmol) con Ac₂O (20 mL) y piridina (25 mL) siguiendo el *Procedimiento General III* (20 h, t.a.). El crudo de reacción se utilizó en la siguiente etapa sin purificación previa.

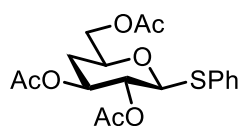
Compuesto 21



A una disolución de **20** (4.1 g, 13.5 mmol) en Ac₂O (34 mL) se le añadió H₂SO₄ concentrado (0.67 mL) a una temperatura de -30 °C. La mezcla se mantuvo a dicha temperatura hasta la completa desaparición del producto de partida, monitorizada por CCF. La reacción se detuvo mediante la adición de una disolución saturada de NaHCO₃ y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo de reacción se redisolvió en

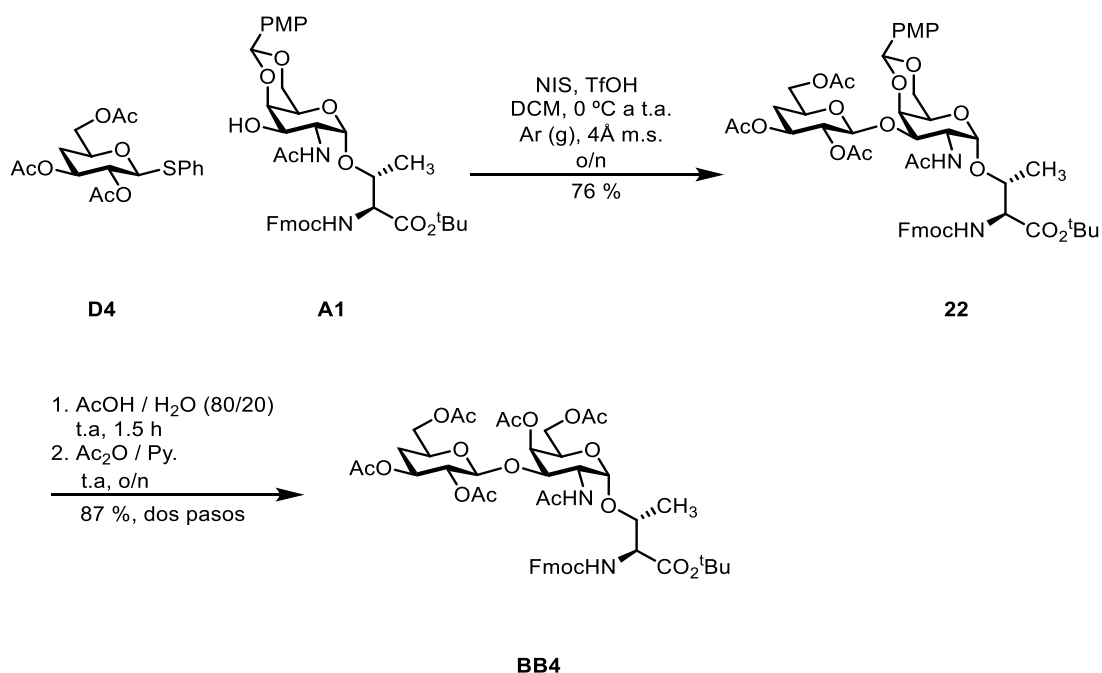
acetato de etilo y se lavó con sendas disoluciones de NaHCO_3 saturado y de NaCl . La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/ AcOEt , 7:3) para dar el compuesto **21** (4.09 g, 91 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁷³

Compuesto D4



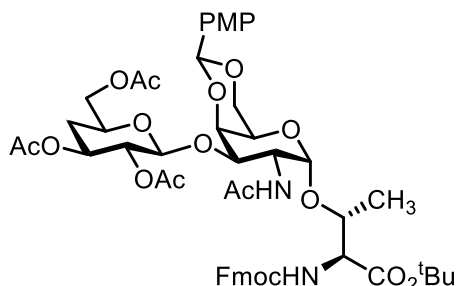
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **21** (4.09 g, 12.32 mmol) con PhSH (1.51 mL, 14.78 mmol) y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (3.8 mL, 30.80 mmol) siguiendo el *Procedimiento General X* (36 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/ AcOEt , 7:3) para obtener **D4** (3.78 g, 80 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁷³

7.3.9. Síntesis de los “building block” BB4



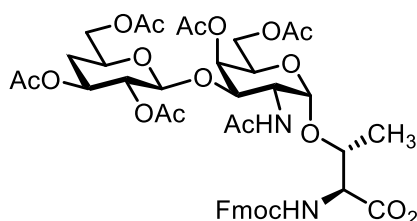
Esquema 7.10.- Procedimiento sintético empleado para la obtención del “building block” **BB4** a partir de los fragmentos **D4** y **A1**.

Compuesto 22



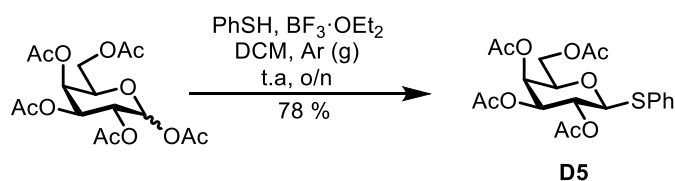
El compuesto **22** se preparó por reacción del donador **D4** (1.83 g, 4.80 mmol) con el aceptor **A1** (1.97, 2.74 mmol) en DCM (27 mL) utilizando como activantes NIS (1.07 g, 4.80 mmol) y TfOH (0.12 mL, 1.37 mmol), siguiendo el *Procedimiento General VII* (16 h, t.a.). El crudo se purificó por cromatografía en

columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 4:6) para dar el compuesto **22** (2.08 g, 76 %). **¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃)** δ 7.75 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.61 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.43 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, PMP), 7.39 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, Fmoc), 7.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, PMP), 6.09 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, NHFmoc), 5.93 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, NHAc), 5.45 (s, 1H, H-Bnd), 4.93 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-1), 4.91 – 4.87 (m, 1H, H-3'), 4.84 (dd, *J* = 9.5, 7.7 Hz, 1H, H-2'), 4.65 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-1'), 4.59 (td, *J* = 10.7, 3.8 Hz, 1H, H-2), 4.56 – 4.51 (m, 1H, H-6'a), 4.46 (dd, *J* = 10.7, 6.7 Hz, 1H, H-6b'), 4.37 (dd, *J* = 11.8, 3.4 Hz, 1H, H-6a), 4.28 (dt, *J* = 12.7, 6.4, 2.6 Hz, 1H, H-β), 4.25 – 4.19 (m, 3H, H-4, H-5', H-α), 4.17 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, CH₂ Fmoc), 4.07 (dd, *J* = 12.2, 5.3 Hz, 1H, H-6b), 4.02 (dd, *J* = 12.5, 1.7 Hz, 1H, CH₂-Fmoc), 3.89 (dd, *J* = 11.5, 3.8 Hz, 1H, H-3), 3.80 – 3.74 (m, 1H, H-5), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.63 (s, 1H, CHFmoc), 2.09 (ddd, *J* = 12.7, 5.2, 2.1 Hz, 1H, H-4'eq), 2.00 (s, 6H, 2OAc), 1.99 (s, 3H, OAc), 1.96 (s, 3H, NHAc), 1.67 (q, *J* = 12.0 Hz, 1H, H-4'ax), 1.43 (s, 9H, ^tBu), 1.24 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃γ). **¹³C{¹H}-RMN (126 MHz, CDCl₃)** δ 170.9 (CO), 170.1 (CO), 170.0 (CO), 169.6 (CO), 169.6 (CO), 159.8 (C, PMP), 156.8 (CO, Fmoc), 143.7 (C, Fmoc), 143.6 (C, Fmoc), 141.2 (C, Fmoc), 141.2 (C, Fmoc), 130.2 (C, PMP), 127.6 (2CH, Ar), 127.5 (2CH, Ar), 126.9 (2CH, Ar), 124.8 (2CH, Ar), 119.9 (2CH, Ar), 113.3 (2 CH, Ar), 100.6 (CH, Bnd), 100.2 (C-1), 99.6 (C-1'), 82.8 (C, ^tBu), 75.4 (C-β), 75.0 (C-4), 71.8 (C-2'), 71.5 (C-3), 70.6 (C-3'), 70.1 (C-5), 69.0 (CH₂ Fmoc), 66.5 (C-6'), 64.8 (C-6), 63.3 (CH Fmoc), 59.1 (C-5'), 55.1 (OMe, PMP), 47.5 (C-2), 47.1 (C-α), 31.7 (C-4'), 28.0 (3CH₃, ^tBu), 23.3 (NHAc), 20.8 (OAc), 20.62 (OAc), 20.58 (OAc), 19.2 (CH₃γ). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₅₁H₆₆N₃O₁₈ [M+NH₄]⁺: 1008.4336, encontrada: 1008.4329.

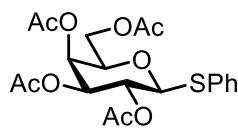
Compuesto BB4

Una disolución de **22** (2.08 g, 2.10 mmol) en ácido acético en agua al 80% (40 mL) se dejó agitando durante 1 h, hasta observar por CCF la completa desaparición del producto de partida.

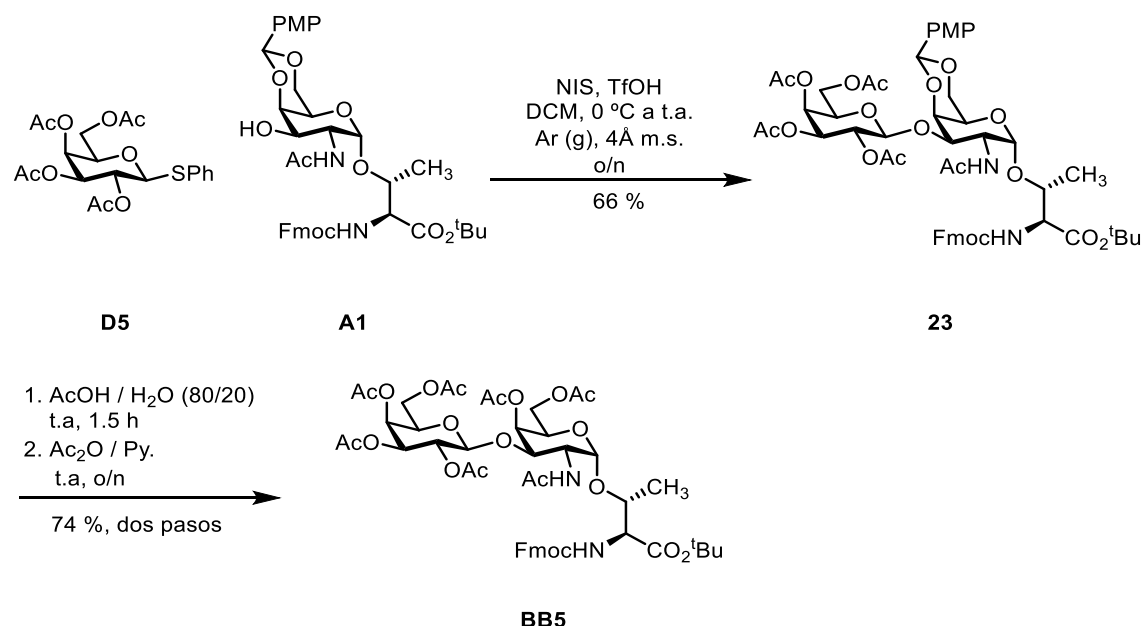
A continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se acetiló siguiendo el *Procedimiento General III* (16 h, t.a.). El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 1:2) para dar **BB4** (1.27 g, 87 %). ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, Fmoc), 7.61 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, Fmoc), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc), 7.32 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, Fmoc), 5.97 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, NHAc), 5.69 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, NHFmoc), 5.30 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, H-4), 4.91 (ddd, $J = 11.4, 9.5, 5.2$ Hz, 1H, H-3'), 4.82 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-1), 4.79 (dd, $J = 9.6, 7.6$ Hz, 1H, H-2'), 4.60 – 4.45 (m, 4H, H-1', H-2, CH_2 Fmoc), 4.34 (dd, $J = 11.7, 4.0$ Hz, 1H, H-6a), 4.25 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH Fmoc), 4.23 – 4.18 (m, 2H, H- α , H- β), 4.16 – 3.96 (m, 4H, H-3, H-6b, H-6a', H-6b'), 3.78 (dd, $J = 11.2, 3.1$ Hz, 1H, H-5), 3.76 – 3.70 (m, 1H, H-5'), 2.13 – 2.06 (m, 1H, H-4'eq), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, NHAc), 1.66 (q, $J = 12.6, 12.2$ Hz, 1H, H-4'ax), 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.28 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\gamma$). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (126 MHz, CDCl_3) δ 170.9 (CO), 170.4 (CO), 170.3 (CO), 170.1 (CO), 169.1 (2 CO), 156.6 (CO, Fmoc), 143.7 (C, Fmoc), 143.6 (C, Fmoc), 141.3 (C, Fmoc), 141.3 (C, Fmoc), 127.8 (2 CH, Fmoc), 127.1 (2 CH, Fmoc), 124.8 (2 CH, Fmoc), 120.0 (2 CH, Fmoc), 100.2 (C-1'), 99.9 (C-1), 83.1 (C, ^tBu), 76.1 (C- β), 71.8 (C-5), 71.6 (C-2'), 70.6 (C-3'), 69.8 (C-5'), 69.2 (C-4), 67.8 (C-3), 66.8 (CH_2 Fmoc), 64.8 (C-6), 62.7 (C-6'), 59.1 (C- α), 48.2 (C-2), 47.2 (CH Fmoc), 32.0 (CH_2 -4'), 28.1 (3 CH_3 , ^tBu), 23.3 (NHAc), 20.9 (OAc), 20.8 (OAc), 20.7 (OAc), 20.6 (OAc), 20.6 (OAc), 18.8 ($\text{CH}_3\gamma$). **HRMS (ESI $^+$)** m/z calc. para $\text{C}_{47}\text{H}_{61}\text{N}_2\text{O}_{19}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 957.3863, encontrada: 957.3852.

7.3.10. Síntesis del donador D5

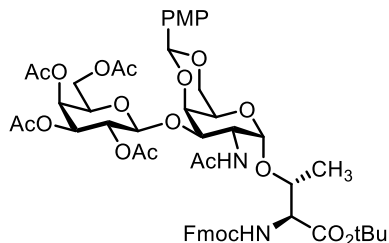
Esquema 7.11.- Procedimiento sintético empleado para la síntesis del donador de galactosa D5.

Compuesto D5

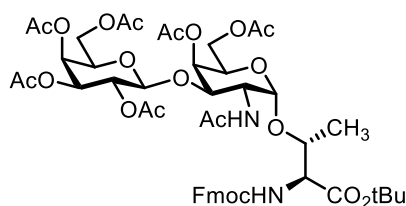
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **9** (5 g, 13 mmol) con PhSH (1.6 mL, 15.6 mmol) y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (4.1 mL, 32.5 mmol) en DCM (170 mL) siguiendo el *Procedimiento General X* (24 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt, 7:3) para obtener el compuesto **D5** (4.11 g, 78 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁷⁴

7.3.12. Síntesis del “building block” BB5

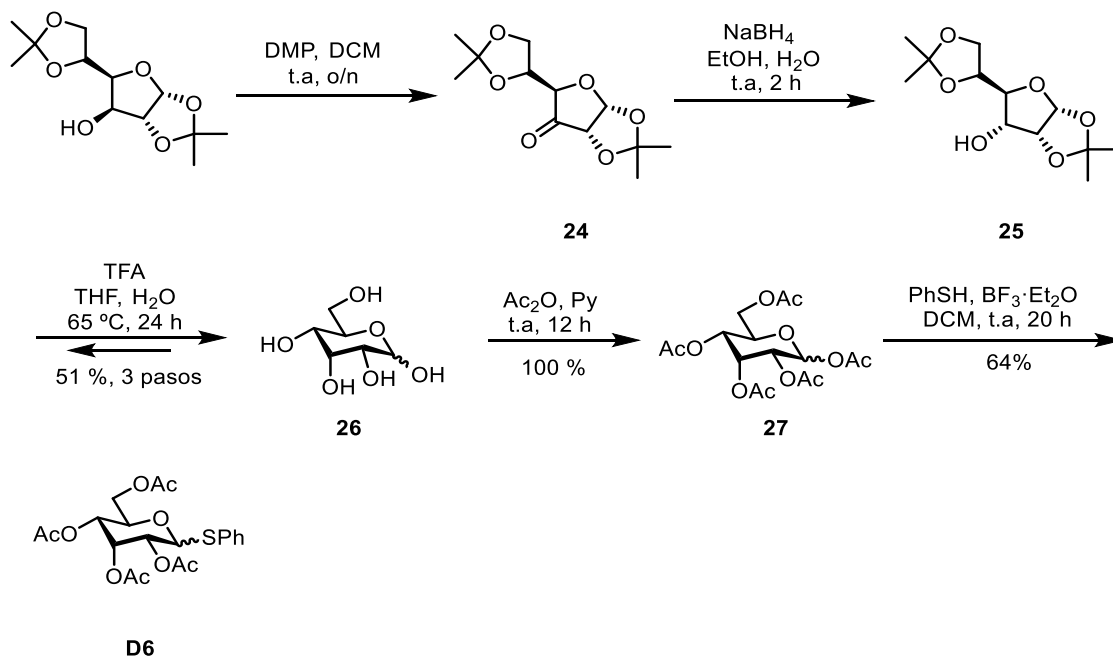
Esquema 7.12.- Procedimiento sintético empleado para la síntesis del “building block” BB5.

Compuesto 23

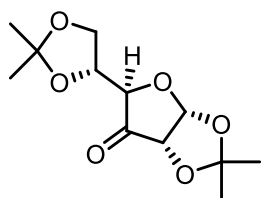
El compuesto **23** se preparó por reacción del donador **D5** (1.83 g, 4.17 mmol) con el aceptor **A1** (2.0 g, 2.78 mmol) en DCM (30 mL) utilizando como activantes NIS (0.94 g, 4.17 mmol) y TfOH (0.08 mL, 0.92 mmol), siguiendo el *Procedimiento General VII* (16 h, t.a.). El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 3:7) para dar el compuesto **27** (2.5 g, 66 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁷⁵

Compuesto BB5

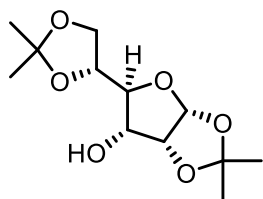
Una disolución de **23** (2.50 g, 2.40 mmol) en ácido acético en agua al 80 % (42 mL) se dejó agitando durante 1 h, hasta observar por CCF la completa desaparición del producto de partida. A continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se acetiló siguiendo el *Procedimiento General III* (16 h, t.a.). El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex: AcOEt 3:7) para dar **BB5** (1.87 g, 74 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁷⁵

7.3.13. Síntesis del donador D6

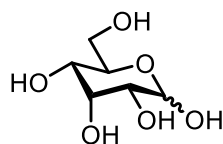
Esquema 7.13.- Procedimiento sintético empleado para la síntesis del donador **D6**.

Compuesto 24

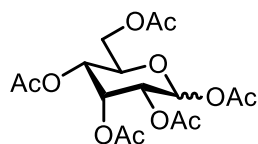
Sobre una disolución de 1,2,5,6-di-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa comercial (10 g, 38.46 mmol) en DCM (192 mL) se añadió DMP (19.57 g, 46.15 mmol) y la reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante toda la noche. El crudo de reacción se lavó con una disolución saturada de NaHCO_3 y de NaCl . La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

Compuesto 25

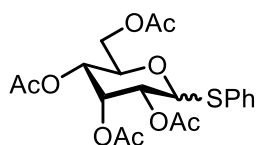
Sobre una disolución de **24** (9.93 g, 38.46 mmol) en una mezcla de EtOH/H₂O 9:1 (200 mL) se añadió NaBH₄ (1.46 g, 38.46 mmol) a 0 °C. La mezcla se dejó agitando a dicha temperatura durante 2 h, hasta observar por CCF la desaparición del producto de partida. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se redisolvió en DCM y se lavó con sendas disoluciones saturadas de NH₄Cl y NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

Compuesto 26

Dicho compuesto se obtuvo por reacción de **25** (8.6 g, 33.07 mmol) con una mezcla de TFA/H₂O/THF 1:1:9 (165 mL). La reacción se agitó a una temperatura de 65 °C durante 24 h hasta que se observó la completa conversión del producto de partida. El disolvente se evaporó a presión reducida y se coevaporó con EtOH. El crudo de reacción se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

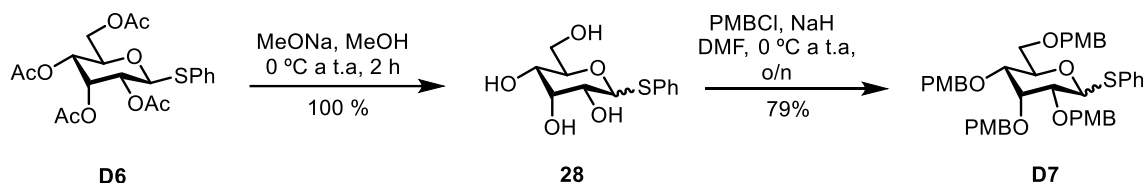
Compuesto 27

Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **26** con Ac₂O (20 mL) y piridina (25 mL) siguiendo el *Procedimiento General III* (12 h, t.a.). El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex: AcOEt 6:4) para dar el compuesto **27** (6.6 g, 52 %).

Compuesto D6

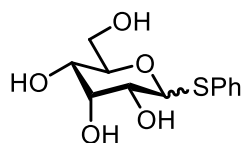
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **27** (6.60 g, 16.92 mmol) con PhSH (2.2 mL, 21.15 mmol) y BF₃·Et₂O (5.22 mL, 42.3 mmol) en DCM (170 mL), siguiendo el *Procedimiento General X* (20 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex: AcOEt 8:2) para obtener el compuesto **D6** (4.78 g, 78 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁷⁵

7.3.14. Síntesis del donador D7



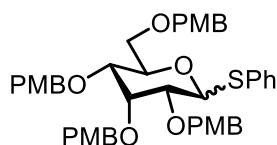
Esquema 7.14.- Procedimiento sintético empleado para la obtención del donador D7 utilizando D6 como sustrato de partida.

Compuesto 28



Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **D6** (1.42 g, 3.22 mmol) en metanol con una cantidad catalítica de MeONa recién preparado siguiendo el *Procedimiento General I* (3 h, t.a.), para obtener el compuesto **32** (0.34 g, 72%). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁷⁶

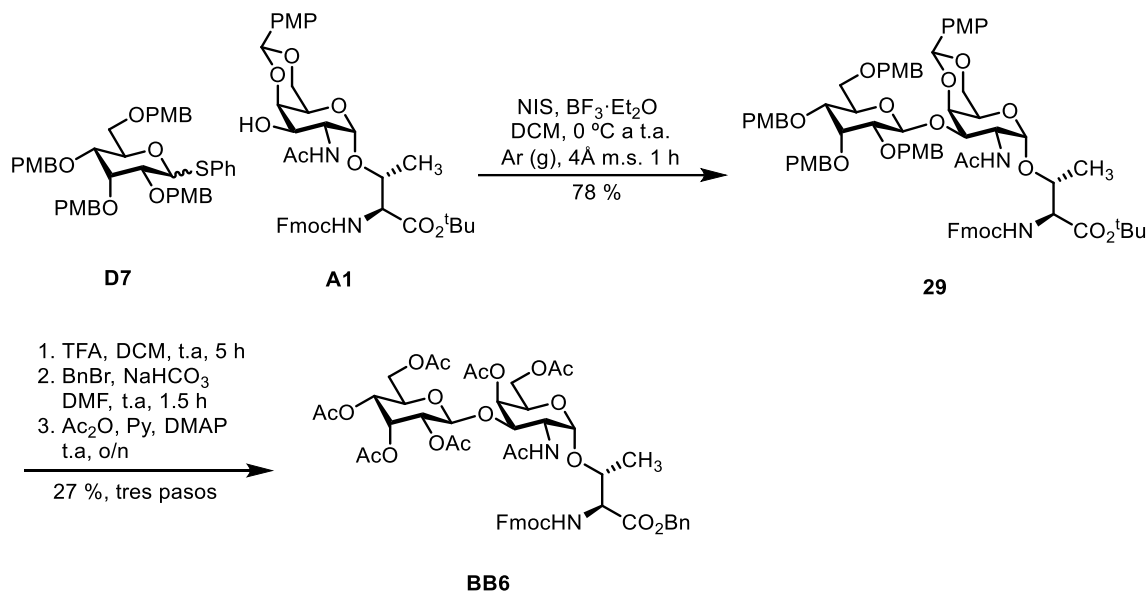
Compuesto D7



A una disolución de **28**¹⁷⁷ (3.41 g, 12.50 mmol) en DMF anhidra (63 mL) y bajo atmósfera inerte se le añadió a 0 °C PMBCl (8.5 mL, 62.70 mmol) y NaH (60% en aceite mineral, 3 g, 75 mmol). La reacción se dejó agitando a temperatura ambiente hasta la desaparición del producto de partida monitorizada por cromatografía en capa fina. La reacción se detuvo mediante la adición de metanol y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo resultante se disolvió en AcOEt, se lavó dos veces con agua y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida. Finalmente, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex: AcOEt 8:2) para dar **D7** (7.44 g, 79 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.61 – 7.51 (m, 4H, Ar), 7.42 – 7.34 (m, 2H, Ar), 7.32 – 7.16 (m, 20H, Ar), 7.16 – 7.11 (m, 2H, Ar), 7.10 – 7.04 (m, 2H, Ar), 6.94 – 6.76 (m, 18H, Ar), 5.55 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H-1α), 5.22 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, H-1β), 4.95 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.77 – 4.72 (m, 3H), 4.67 – 4.29 (m, 15H, CH₂ PMB, H-5α), 4.12 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-2α), 4.09 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-2β), 4.04 (ddd, *J* = 9.7, 4.7, 1.9 Hz, 1H, H-5β), 3.85 – 3.61 (m, 30H, OMe, H-6α, H-6β, H-2α), 3.53 (dd, *J* = 10.0, 2.7 Hz, 1H, H-4α), 3.44 (dd, *J* = 9.8, 2.4 Hz, 1H, H-4β), 3.30 (dd, *J* = 9.7, 2.4 Hz, 1H, H-2β). ¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 159.5, 159.4, 159.3, 159.2, 159.1, 159.0, 138.9, 134.4, 131.8, 131.2, 131.0, 130.8, 130.4, 130.3, 130.2, 130.1, 130.0, 129.8, 129.7, 129.6, 129.4, 129.3, 128.8, 127.0, 126.6, 87.4 (C-1α), 83.9 (C-1β), 77.6 (C-2β), 77.4 (C-2β), 75.3 (C-2α), 75.2, 74.1, 74.0, 73.6, 73.3, 73.2, 73.1, 72.9, 72.0, 71.3, 70.8, 70.7, 69.1 (C-6α), 68.6 (C-6β),

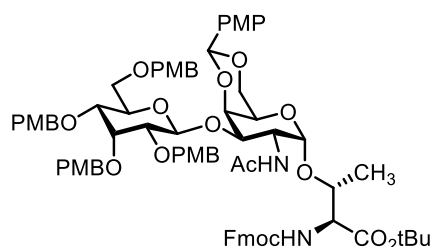
67.6 (C-5 α), 55.4, 55.4, 55.4, 55.3, 55.3. **HRMS (ESI⁺)** m/z: calc. para C₄₄H₄₉O₉S, [M+H]⁺ 753.30918; encontrada 753.30963.

7.3.15. Síntesis del “building block” BB6



Esquema 7.15.- Procedimiento sintético empleado para la obtención del “building block” **BB6** a partir de los fragmentos **D7** y **A1**.

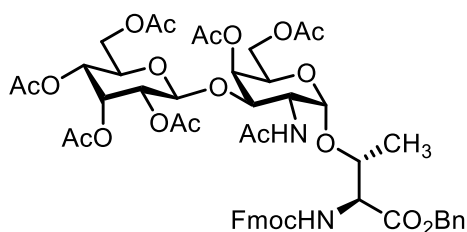
Compuesto 29



A una disolución del donador **D7** (3.42 g, 4.54 mmol) y el aceptor **A1** (1.31 g, 1.81 mmol) en DCM anhidro (30 mL) bajo atmósfera inerte y tamices moleculares de 4 Å se le añadió a 0 °C NIS (1.01 g, 1.81 mmol) y una disolución 0.8 M de BF₃·Et₂O (1.1 mL) en DCM. A continuación, la mezcla de reacción se dejó agitando durante 1 h, hasta la completa desaparición del donador, monitorizada por cromatografía en capa fina. La reacción se detuvo mediante la adición de Et₃N (150 μ L, 1.1 mmol) y se filtró sobre Celita. El crudo se lavó con sendas disoluciones saturadas de Na₂S₂O₃ y NaCl y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex: AcOEt 1:1) para dar **29** (1.95 g, 78 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.38 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.33 – 7.22 (m, 6H), 7.19 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.87 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.80 – 6.72 (m, 8H), 5.87 (d, J = 9.6 Hz, 1H, NHAc), 5.71 (d, J = 9.6 Hz, 1H, NHFmoc), 5.43 (s, 1H, CH-PMP), 4.98 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-1), 4.94 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-1'), 4.83 – 4.67 (m, 3H, H-2, CH₂), 4.57 – 4.32 (m, 3H,

CH₂, H-4), 4.30 – 4.16 (m, 4H, CH Fmoc, CH-*H* PMB, H- α , H- β), 4.15 – 4.03 (m, 2H, H-6_a, H-5'), 3.90 (s, 1H, H-3'), 3.85 – 3.66 (m, 18H, H-3, H-6_b, H-6_a', OMe), 3.61 (s, 1H, H-5), 3.52 (dd, J = 10.5, 6.5 Hz, 1H, H-6_b'), 3.26 – 3.17 (m, 2H, H-2', H-4'), 1.85 (s, 3H, NHAc), 1.43 (s, 9H, ^tBu), 1.25 (d, J = 6.0 Hz, 3H, CH₃ γ) ¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 178.6, 170.0, 160.0, 159.5, 159.3, 159.3, 156.7, 144.0, 143.9, 141.5, 131.3, 130.9, 130.5, 129.9, 129.6 (2C), 128.0, 127.9, 127.2, 125.3, 125.2, 120.1, 113.9, 113.9, 113.8, 113.7, 113.5, 103.1 (C-1'), 100.9 (CH-Bnd), 100.6 (C-1), 83.1 (C, ^tBu), 77.4 (C-2'), 76.7 (C-3), 76.3 (C- β), 75.9 (C-4), 75.6 (C-4'), 74.9 (C-3'), 74.3 (CH₂, PMB), 73.4 (CH₂, PMB), 72.4 (CH₂, PMB), 72.3 (C-5'), 71.2 (CH₂, PMB), 70.3 (C-6'), 69.2 (C-6), 67.3 (CH₂ Fmoc), 63.8 (C-5), 59.3 (C- α), 55.4 (OMe), 48.2 (C-2), 47.4 (CH Fmoc), 28.2 (C, ^tBu), 23.6 (NHAc), 19.1 (CH₃ γ). HRMS (ESI⁺) m/z : calc. para C₇₇H₈₉O₂₀N₂, [M+H]⁺ 1361.6003; encontrada 1361.6014.

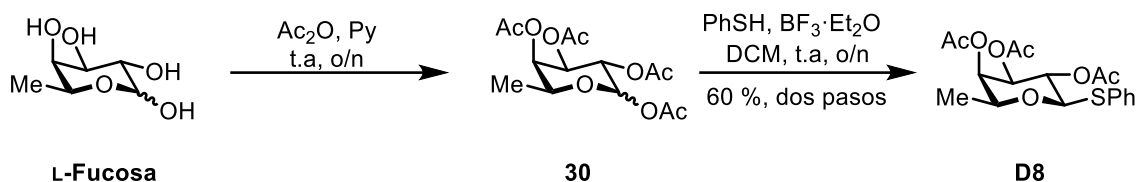
Compuesto BB6



A una disolución del compuesto **29** (1.95 g, 1.43 mmol) en diclorometano (30 mL) se añadió TFA (20 mL) y la reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 5 horas. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en DMF anhidra (14 mL) y se añadió BnBr (0.26 mL, 2.15 mmol) y NaHCO₃ (0.18 g, 2.15 mmol) bajo atmósfera inerte. La mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante toda la noche y el disolvente se eliminó a presión reducida. Finalmente, el crudo se sometió a un proceso de acetilación siguiendo el *Procedimiento General III* (12 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex: AcOEt, 4:6) para obtener el compuesto **BB6** (0.368 g, 27 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.61 (t, J = 6.7 Hz, 2H, Fmoc), 7.44 – 7.27 (m, 4H, Fmoc), 5.94 (d, J = 9.8 Hz, 1H, NH), 5.90 (d, J = 9.5 Hz, 1H, NH), 5.62 (t, J = 2.9 Hz, 1H, H-3'), 5.25 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H-4), 5.19 (d, J = 11.9 Hz, 1H, CH-Bn), 5.06 (d, J = 11.9 Hz, 1H, CH-Bn), 4.98 – 4.90 (m, 2H, H-1', H-4'), 4.84 – 4.76 (m, 2H, H-1, H-2'), 4.60 – 4.47 (m, 3H, H-6_a o H-6_a', CH₂ Fmoc), 4.47 – 4.35 (m, 2H, H- α , H-2), 4.33 – 4.21 (m, 2H, H- β , CH Fmoc), 4.14 – 3.91 (m, 5H, H-6_a o H-6_a' H-6_b, H-6_b', H-5, H-5'), 3.83 – 3.76 (m, 1H, H-3), 2.14 (s, 3H, OAc), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.06 – 2.04 (m, 6H, 2OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 6H, 2OAc), 1.27 (d, J = 8.5 Hz, 3H, CH₃ γ) ¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 171.5, 170.8, 170.6, 170.0, 169.8, 169.7, 169.0, 156.9, 143.9, 143.8, 141.5, 134.6, 128.9, 128.7, 127.9, 127.2, 125.0, 120.2, 100.0 (C-1), 97.7 (C-1'), 76.4 (C- β), 71.6 (C-3), 70.9 (C-5), 69.1 (C-4), 68.7 (C-3'), 68.3 (C-2'), 67.9 (C-5'), 67.1 (CH₂ Fmoc), 65.9 (C-4'), 62.8 (C-

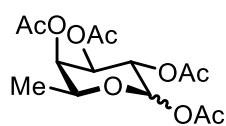
6), 61.6 (C-6'), 59.0 (C- α), 48.6 (C-2), 47.4 (CH Fmoc), 23.4 (OAc), 20.9 (OAc), 20.8 (OAc), 20.8 (OAc), 20.6 (OAc), 18.7 (CH₃ γ). **HRMS (ESI⁺)** m/z: calc. para C₅₂H₆₁O₂₁N₂, [M+H]⁺ 1049.3761; encontrada 1049.3790.

7.3.16. Síntesis del donador D8



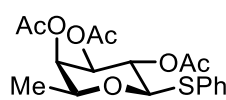
Esquema 7.16.- Esquema sintético para la síntesis del donador de fucosa **D8** a partir de L-fucosa comercial.

Compuesto 30



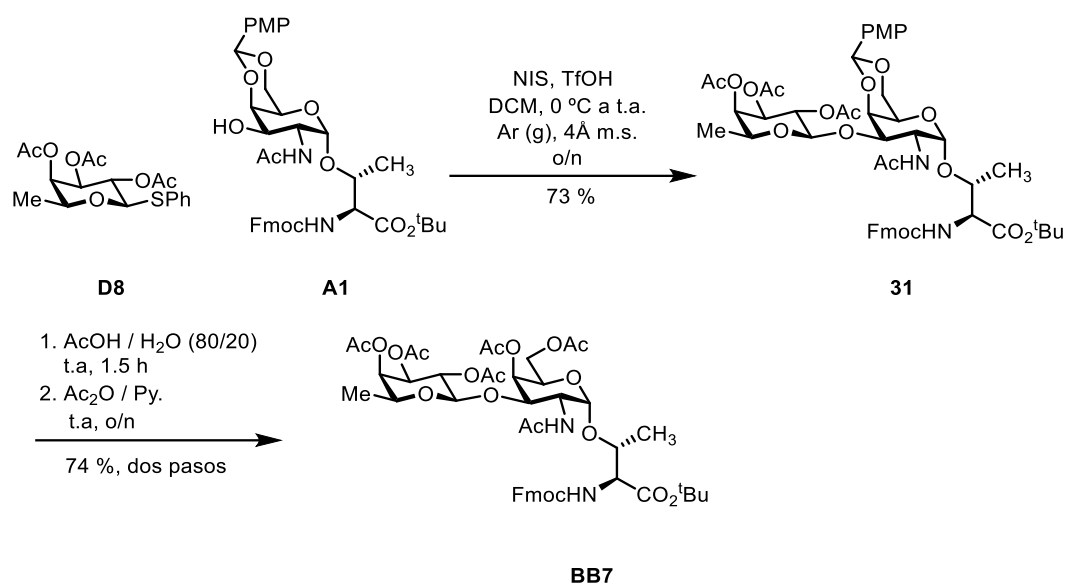
Dicho compuesto se obtuvo por reacción de L-fucosa comercial (2 g, 12.2 mmol) con Ac₂O (12 mL) y piridina (16 mL) siguiendo el *Procedimiento General III* (5h, t.a.). El crudo de reacción se utilizó en la siguiente etapa sin purificación previa.

Compuesto D8



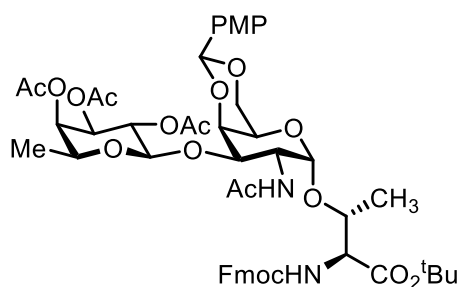
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **30** (5 g, 12.2 mmol) con PhSH (1.33 mL, 13.09 mmol) y BF₃·Et₂O (3.2 mL, 26.17 mmol) siguiendo el *Procedimiento General X* (12 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 6:4) para obtener el compuesto **D8** (2.8 g, 60 %, dos pasos). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁷⁸

7.3.17. Síntesis del “building block” BB7



Esquema 7.17.- Procedimiento sintético empleado para la obtención del “building block” BB7 a partir de los intermedios D8 y A1.

Compuesto 31

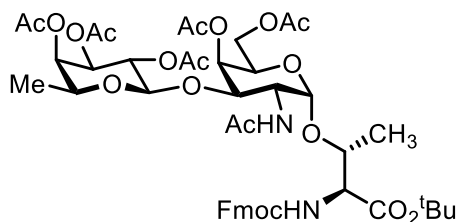


El compuesto **31** se preparó por reacción del donador **D8** (0.40 g, 1.04 mmol) con el aceptor **A1** (0.5 g, 0.695 mmol) en DCM (10 mL) utilizando como activantes NIS (0.23 g, 1.04 mmol) y TfOH (15 µL, 0.17 mmol), siguiendo el *Procedimiento General VII* (12 h, t.a.). El crudo se purificó por cromatografía en columna

de gel de sílice (Hex:AcOEt 3:7) para dar el compuesto **27** (0.50 g, 73 %). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.76 (dd, *J* = 7.5, 2.9 Hz, 2H, Ar, Fmoc), 7.62 (dd, *J* = 7.6, 3.1 Hz, 2H, Fmoc), 7.42 – 7.33 (m, 4H, Ar), 7.31 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, Ar, Fmoc), 6.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar) 5.87 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 5.57 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, NH), 5.49 (s, 1H, CH-Bnd), 5.22 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-4'), 5.16 – 5.11 (m, 2H, H-1, H-2'), 5.00 (dd, *J* = 10.6, 3.5 Hz, 1H, H-3'), 4.63 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-1'), 4.53 (ddd, *J* = 11.8, 8.0, 3.6 Hz, 1H, H-β), 4.43 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 4.30 – 4.17 (m, 5H, H-4, H-2, H-α, H-6_a, CH-Fmoc), 4.14 – 3.98 (m, 3H, H-3, H-6_b, H-5), 3.85 – 3.79 (m, 1H, H-5'), 3.78 (s, 3H, OMe), 2.15 (s, 3H, OAc), 1.95 (s, 6H, 2OAc), 1.82 (s, 3H, OAc), 1.44 (s, 9H, ^tBu), 1.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃γ), 1.22 (m, 3H, Me) **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 170.6 (CO), 170.5 (CO), 170.4 (CO), 169.8 (CO), 169.6 (CO), 160.1 (C, Ar), 156.6 (CO, Fmoc), 143.9 (C, Fmoc), 143.7 (C, Fmoc), 141.4 (C, Fmoc), 141.4 (C, Fmoc), 133.2 (CH, Ar), 130.2 (C, Ar), 127.9 (CH, Ar), 127.5 (2CH, Ar), 127.2 (2CH, Ar), 125.2 (CH, Ar), 125.1

(CH, Ar), 120.2 (2CH, Ar), 113.6 (2CH, Ar), 100.6 (CH-Bnd), 99.6 (C-1), 98.3 (C-1'), 82.9 (C, ^tBu), 76.4 (C-2), 72.7 (C-4), 72.5 (C-5), 71.1 (C-3'), 70.2 (C-4'), 69.5 (C-5'), 69.4 (C-6), 69.4 (C-3), 68.5 (C-2'), 67.1 (CH₂ Fmoc), 59.3 (C-α), 55.4 (OMe), 48.5 (C-β), 47.3 (CH Fmoc), 28.2 (3CH₃), 23.4 (OAc), 20.8 (OAc), 20.7 (OAc), 20.6 (OAc), 16.2 (CH₃γ), 14.3 (CH₃). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₅₁H₆₂N₂NaO₁₈ [M+Na]⁺: 1013.3870, encontrada 1013.3890.

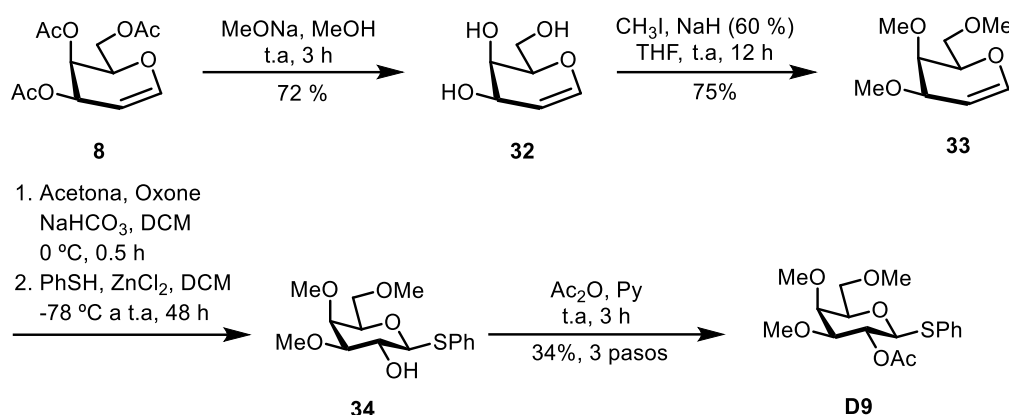
Compuesto BB7



Una disolución de **31** (0.60 g, 0.63 mmol) en ácido acético en agua al 80% (20 mL) se dejó agitando durante 2 h, hasta observar por CCF la completa desaparición del producto de partida. A continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se

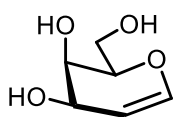
acetiló siguiendo el *Procedimiento General III* (12 h, t.a.). El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 2:8) para dar **BB7** (0.45 g, 74 %). **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (dd, *J* = 7.5, 2.9 Hz, 2H, Ar, Fmoc), 7.60 (dd, *J* = 7.6, 3.1 Hz, 2H, Fmoc), 7.42 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.31 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, Ar, Fmoc), 6.17 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, NH), 5.40 (s, 1H, H-4), 5.34 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, NH), 5.19 (d, *J* = 3.29 Hz, 1H, H-4'), 5.13 (d, *J* = 3.26 Hz, 1H, H-1), 5.06 (dd, *J* = 10.49, 7.55 Hz, 1H, H-2'), 4.97 (dd, *J* = 10.39, 3.32 Hz, 1H, H-3'), 4.49 – 4.42 (m, 3H, H-1', CH₂ Fmoc), 4.24 (m, 2H, H-2, CH Fmoc), 4.13 – 4.11 (m, 4H, H-5, H-α, H-β, H-6a), 3.95 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.72 (q, 1H, *J* = 6.3 Hz, H-5'), 2.13 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 6H, 2OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 1.96 (s, 3H, OAc), 1.95 (s, 3H, NHAc), 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.27 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃γ), 1.19 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, Me) **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃):** δ 170.7 (CO), 170.3 (CO), 170.5 (CO), 170.6 (CO), 170.4 (CO), 170.4 (CO), 170.2 (CO), 156.6 (CO, Fmoc), 143.9 (C, Fmoc), 143.7 (C, Fmoc), 141.4 (C, Fmoc), 141.4 (C, Fmoc), 133.2 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 127.2 (CH, Ar), 125.1 (2CH, Ar), 120.2 (2CH, Ar), 99.8 (C-1'), 99.2 (C-1), 82.9 (C, ^tBu), 76.5 (C-β), 73.2 (C-3), 71.3 (C-3'), 69.9 (C-4'), 69.3 (C-5'), 68.5 (C-2'), 67.8 (C-5), 67.6 (C-4), 66.8 (CH₂ Fmoc), 62.6 (C-6), 59.1 (C-α), 49.3 (C-2), 47.4 (CH Fmoc), 28.2 (3CH₃), 23.3 (OAc), 20.9 (OAc), 20.8 (OAc), 20.7 (3OAc), 16.2 (CH₃γ), 14.3 (CH₃). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₄₇H₆₀N₂NaO₁₁ [M+Na]⁺: 979.3682, encontrada 979.3665.

7.3.18. Síntesis del donador D9



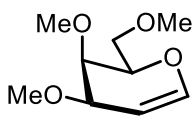
Esquema 7.18.- Estrategia sintética empleada para la preparación del donador D9 a partir del galactal 8.

Compuesto 32



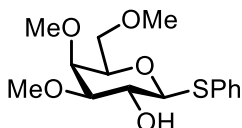
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **8** (1.42 g, 3.22 mmol) en metanol con una cantidad catalítica de MeONa recién preparado siguiendo el *Procedimiento General I* (3 h, t.a.), para obtener el compuesto **32** (0.34 g, 72 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁷⁶

Compuesto 33



Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **32** (1.92 g, 13.14 mmol) con CH₃I (3.27 mL, 52.58 mmol) y NaH (60% en aceite mineral, 2.63 g, 65.72 mmol) en THF anhidro (65 mL) siguiendo el *Procedimiento General II* (12h, t.a.). El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt, 8:2) para obtener **33** (1.85 g, 75 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁷⁹

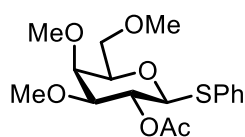
Compuesto 34



Sobre una disolución del compuesto **33** (2 g, 10.63 mmol) en DCM (45 mL) se añadió acetona (4.5 mL) y una disolución saturada de NaHCO₃ (7.5 mL). La mezcla se agitó vigorosamente y se enfrió a 0 °C para posteriormente añadir gota a gota una disolución de Oxone[®] (6.53g, 21.26 mmol) en agua destilada (26.5 mL). La mezcla se agitó a dicha temperatura durante 30 minutos, hasta observar por CCF la completa desaparición del producto de partida. La fase orgánica se separó de la

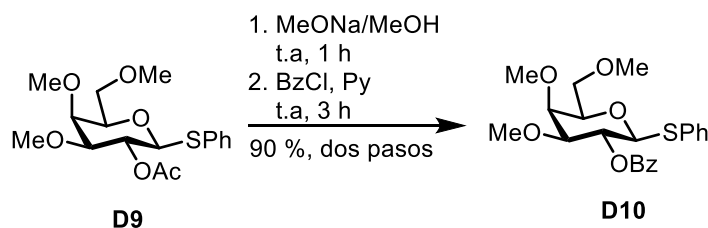
acuosa y esta se extrajo con diclorometano dos veces. Las fases orgánicas obtenidas se reunieron y se secaron sobre MgSO_4 anhidro para posteriormente eliminar el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se disolvió en DCM (100 mL) y la temperatura se bajó hasta $-78\text{ }^\circ\text{C}$. En este punto, se añadió el PhSH (4.4 mL, 42.52 mmol) y el ZnCl_2 (0.15 g, 1.63 mmol) y la mezcla de reacción se dejó agitando durante 48 h dejando que alcanzara la temperatura ambiente. Finalmente, la reacción se detuvo mediante la adición de Et_3N y el crudo se filtró sobre Celita. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto de reacción se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

Compuesto D9



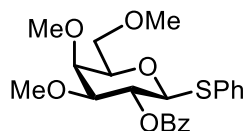
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **34** (0.86 g, 2.73 mmol) con anhídrido acético (4 mL) y piridina (5 mL) siguiendo el *Procedimiento General III* (3 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 6:4) para obtener el compuesto **D9** (1.28 g, 34 % en tres pasos). **^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3)** δ 7.48-7.44 (m, 2H, Ar, SPh), 7.30-7.22 (m, 3H, Ar, SPh), 5.24 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-2), 4.61 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-1), 3.75 (dd, $J = 2.9, 0.8$ Hz, 1H, H-4), 3.63 – 3.59 (m, 1H, H-6_a), 3.58 – 3.56 (m, 2H, H-6_b, H-5), 3.54 (s, 3H, OMe), 3.43 (s, 3H, OMe), 3.37 (s, 3H, OMe), 3.29 (dd, $J = 9.6, 2.9$ Hz, 1H, H-3), 2.09 (s, 3H, OAc). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 169.7 (CO), 134.0 (C, Ar), 131.7 (2CH, Ar), 128.9 (2CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 87.1 (C-1), 83.7 (C-3), 77.3 (C-5), 74.4 (C-4), 70.7 (C-6), 69.8 (C-2), 61.3 (OMe), 59.3 (OMe), 58.1 (OMe), 21.2 (OAc). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NaO}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 379.1186, encontrada 379.1185.

7.3.19. Síntesis del donador D10



Esquema 7.19.- Preparación del donador benzoilado **D10** a partir de **D9**.

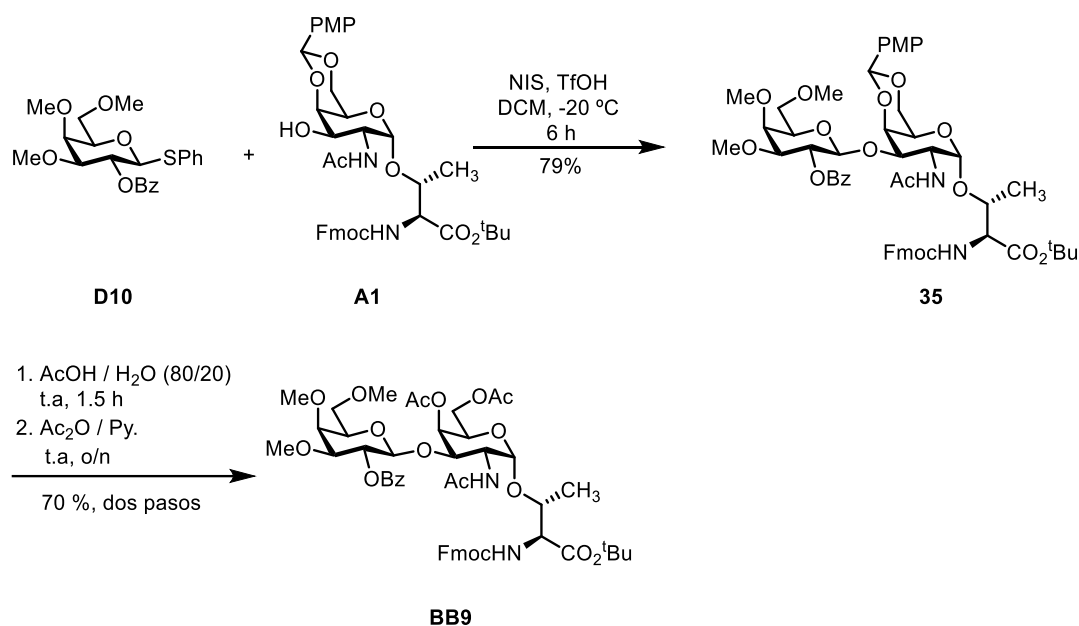
Compuesto D10



Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **D9** (1.90 g, 5.90 mmol) en metanol con una cantidad catalítica de MeONa recién preparado siguiendo el *Procedimiento General*

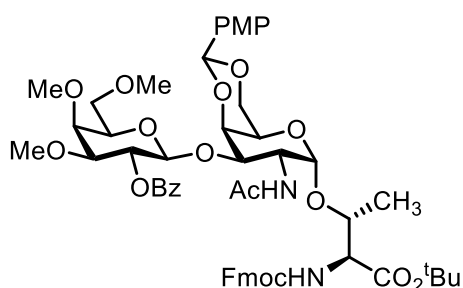
I (3h, t.a.). El residuo resultante se hizo reaccionar con BzCl (0.82 mL, 7.13 mmol) en Py (12 mL) siguiendo el *Procedimiento General IV* (3 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 7:3) para obtener el compuesto **D10** (2.20 g, 90 % en dos pasos). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 8.08 – 8.04 (m, 2H, Ar), 7.61 – 7.53 (m, 1H, Ar), 7.47 – 7.40 (m, 4H, Ar), 7.27 – 7.20 (m, 3H, Ar), 5.51 (t, *J* = 9.8 Hz, 1H, H-2), 4.78 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-1), 3.80 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-4), 3.70 – 3.59 (m, 3H, H-6_a, H-6_b, H-5), 3.59 (s, 3H, OMe), 3.46 (dd, *J* = 9.6, 2.9 Hz, 1H, H-3), 3.41 (s, 3H, OMe), 3.40 (s, 3H, OMe). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 165.4 (CO), 134.2 (C, Ar), 133.1 (CH, Ar), 131.9 (2CH, Ar), 130.2 (C, Ar), 129.9 (2CH, Ar), 128.8 (2CH, Ar), 128.4 (2CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 87.3 (C-1), 83.9 (C-3), 77.4 (C-5), 74.7 (C-4), 70.7 (C-6), 70.6 (C-2), 61.4 (OMe), 59.39 (OMe), 58.4 (OMe). **HRMS (ESI⁺) *m/z* calc.** para C₂₂H₃₀NO₆S [M+NH₄]⁺: 436.1789, encontrada 436.1788.

7.3.20. Síntesis del “building block” BB9



Esquema 7.20.- Reacción de acoplamiento entre el donador benzoilado **D10** y el aceptor **A1** y transformaciones posteriores.

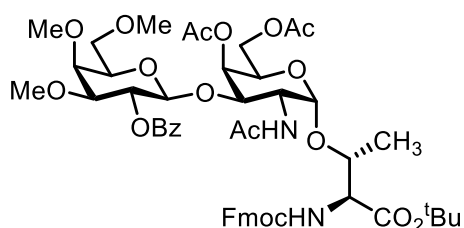
Compuesto 35



El compuesto **35** se preparó por reacción del donador **D10** (0.20 g, 0.48 mmol) con el aceptor **A1** (0.5 g, 0.695 mmol) en DCM (4 mL) utilizando como activantes NIS (0.11 g, 0.48 mmol) y TfOH (7 µL, 0.08 mmol), siguiendo el *Procedimiento General VII* (6 h, -

20 °C). El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt, 4:6) para dar el compuesto **35** (0.25 g, 79 %). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 8.08 – 8.04 (m, 2H, Ar, Bz), 7.79 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.67 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar), 7.55 (ddt, *J* = 8.8, 7.2, 1.3 Hz, 1H, Ar), 7.45 – 7.40 (m, 5H, Ar), 7.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar), 6.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar), 6.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NHAc), 5.66 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, NHFmoc), 5.46 (dd, *J* = 9.8, 8.0 Hz, 1H, H-2'), 5.26 (s, 1H, CH-Ph), 5.08 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-1), 4.94 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-1'), 4.55 – 4.43 (m, 3H, H-2, CH₂ Fmoc), 4.37 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-4), 4.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH Fmoc), 4.29 – 4.10 (m, 4H, H-6b', H-α, H-β, H-3), 4.01 (dd, *J* = 12.4, 1.7 Hz, 1H, H-6a'), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.74 – 3.68 (m, 3H, H-6a, H-4', H-5), 3.65 – 3.57 (m, 2H, H-6b, H-5'), 3.55 (s, 3H, OMe), 3.47 – 3.42 (m, 1H, H-3'), 3.40 (s, 3H, OMe), 3.39 (s, 3H, OMe), 1.83 (s, 3H, NHAc), 1.46 (s, 9H, ^tBu), 1.31 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 170.3 (CO), 169.6 (CO), 165.8 (CO), 159.7 (C, Ar), 156.7 (CO), 143.8 (2C, Ar), 141.3 (2C, Ar), 133.2 (CH, Ar), 129.9 (2CH, Ar), 128.4 (2CH, Ar), 127.8 (C, Ar), 127.7 (C, Ar), 127.4 (2CH, Ar), 127.2 (2CH, Ar), 127.1 (2CH, Ar), 126.4 (2CH, Ar), 125.1 (CH, Ar), 120.0 (CH, Ar), 113.2 (2CH, Ar), 100.8 (C, CH-Bnd), 99.8 (C-1), 99.2 (C-1'), 82.7 (C, ^tBu), 82.6 (C-3'), 75.9 (C-β), 75.2 (C-4), 74.6 (C-4'), 73.9 (C-α), 71.3 (C-6), 71.2 (C-2'), 69.2 (C-6'), 67.2 (CH₂ Fmoc), 63.5 (C-5), 61.4 (C-5'), 61.3 (OCH₃), 59.1 (OCH₃), 59.0 (C-3), 58.2 (OCH₃), 55.2 (OCH₃), 48.5 (C-2), 47.2 (CH Fmoc), 28.1 (^tBu), 23.1 (NHAc), 19.2 (CH₃γ). **HRMS (ESI⁺)** *m/z* calc. para C₅₅H₆₆N₂O₁₇ [M+H]⁺: 1027.4434, encontrada 1027.4438.

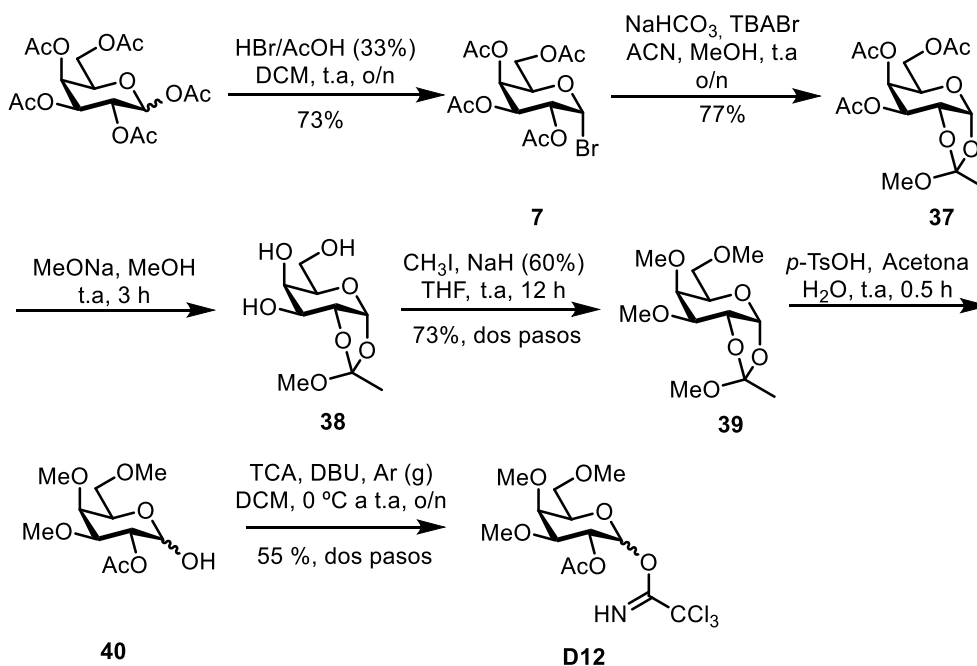
Compuesto BB9



Una disolución de **35** (0.90 g, 0.93 mmol) en ácido acético en agua al 80% (20 mL) se dejó agitando durante 2 h, hasta observar por CCF la completa desaparición del producto de partida. A continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se acetiló siguiendo el *Procedimiento General III* (12 h, t.a.). El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 2:8) para dar **BB9** (0.68 g, 74 % en dos pasos). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 8.03 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.63 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.50 – 7.44 (m, 3H, Ar), 7.40 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar), 5.75 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, NHAc), 5.45 – 5.32 (m, 3H, NHFmoc, H-2', H-4), 4.86 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-1), 4.67 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.49 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂ Fmoc), 4.41 (ddd, *J* = 11.8, 8.4, 3.5 Hz, 1H, H-2), 4.27 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, CH Fmoc), 4.20 – 4.04 (m, 4H, H-α, H-β, H-5, H-6a), 4.01 – 3.95 (m, 1H, H-3), 3.92 (dd, *J* = 11.4, 7.5 Hz, 1H, H-6b), 3.70 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-4'), 3.60 – 3.55 (m,

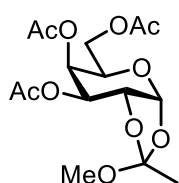
3H, H-5', H-6a', H-6b'), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.39 (s, 3H, OMe), 3.44 – 3.38 (m, 1H, H-3), 3.37 (s, 3H, OMe), 2.03 (s, 3H, OAc), 1.96 (s, 3H, OAc), 1.65 (s, 3H, NHAc), 1.39 (s, 9H, ^tBu), 1.23 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH₃γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 170.6 (CO), 170.3 (CO), 170.1 (CO), 169.6 (CO), 165.4 (CO), 156.6 (CO), 143.9 (C, Ar), 143.8 (C, Ar), 141.4 (2C, Ar), 133.2 (CH, Ar), 130.2 (C, Ar), 129.9 (2CH, Ar), 128.5 (2CH, Ar), 127.9 (2CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 127.2 (2CH, Ar), 125.1 (CH, Ar), 120.2 (2CH, Ar), 100.2 (C-1'), 99.6 (C-1), 82.9 (C-3), 76.2 (C-β), 74.3 (C-4'), 73.9 (C-5'), 72.6 (C-5'), 71.9 (C-2'), 70.7 (C-6'), 68.8 (C-4), 68.1 (C-5), 67.1 (CH₂ Fmoc), 63.2 (C-6), 61.2 (OMe), 59.2 (OMe), 59.2 (C-α), 58.3 (OMe), 48.9 (C-2), 47.4 (CH Fmoc), 28.1 (^tBu), 23.0 (NHAc), 20.8 (OAc), 20.8 (OAc), 18.9 (CH₃γ). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₅₁H₆₄N₂O₁₈ [M+H]⁺: 993.4227, encontrada 993.4232.

7.3.21. Síntesis del donador D12



Esquema 7.21.- Procedimiento sintético para la obtención del donador D12 a partir de D-galactosa peracetilada comercial.

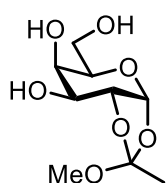
Compuesto 37



Sobre una disolución del compuesto 7 (7.40 g, 18 mmol) en ACN anhidro (100 mL) se añadió, bajo atmósfera inerte, MeOH (7.3 mL, 180 mmol), NaHCO₃ (3.02 g, 36 mmol) y TBABr (11.59 g, 36 mmol) y la mezcla se dejó agitando durante 12 h a temperatura ambiente. El crudo fue filtrado sobre celita y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna

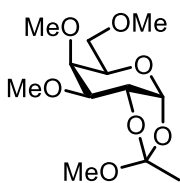
de gel de sílice (Hex:AcOEt 7:3) para obtener **37** (5 g, 77 %). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 5.81 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-1), 5.43 (dd, *J* = 3.4, 2.6 Hz, H-4), 5.06 (dd, *J* = 6.8, 3.3 Hz, H-3), 4.34 – 4.30 (m, 1H, H-2), 4.23 – 4.05 (m, 3H, H-5, H-6_a, H-6_b), 3.29 (s, 3H, OMe), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 1.67 (s, 3H, CH₃γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 170.6 (CO), 170.2 (CO), 169.9 (CO), 121.6 (C), 97.6 (C-1), 74.0 (C-2), 71.5 (C-3), 69.2 (C-5), 66.1 (C-4), 61.5 (C-6), 50.3 (OMe), 23.4 (Me), 20.9 (OAc), 20.8 (OAc), 20.7 (OAc). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₁₅H₂₂NaO₁₀ [M+Na]⁺: 385.1105, encontrada 385.1104.

Compuesto 38



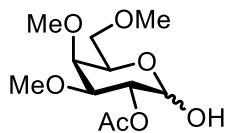
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **37** (5 g, 16.20 mmol) en metanol con una cantidad catalítica de MeONa recién preparado siguiendo el *Procedimiento General I* (3 h, t.a.). El residuo resultante se usó en la siguiente etapa sin purificación previa.

Compuesto 39

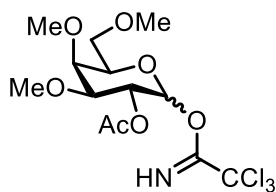


Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **38** con yoduro de metilo (5.27 mL, 84.72 mmol) y NaH (60% en aceite mineral, 4.23 g, 105.91 mmol) en THF anhidro (65 mL) siguiendo el *Procedimiento General II* (12 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 8:2) para obtener **39** (3.13 g, 73 % en dos pasos). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 5.70 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-1), 4.32 (dd, *J* = 6.1, 4.5 Hz, 1H, H-2), 4.02 (td, *J* = 6.6, 2.6 Hz, 1H, H-5), 3.74 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-4), 3.55 – 3.54 (m, 1H, H-6), 3.53 (s, 3H, OMe), 3.53 (s, 3H, OMe), 3.41 (s, 3H, OMe), 3.40 (m, 1H, H-3), 3.22 (s, 3H, OMe), 1.66 (3H, CH₃). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 122.0 (C), 97.5 (C-1), 82.6 (C-3), 79.2 (C-2), 74.5 (C-4), 72.8 (C-5), 70.4 (C-6), 61.0 (OMe), 59.2 (OMe), 57.6 (OMe), 49.6 (OMe), 24.4 (CH₃).

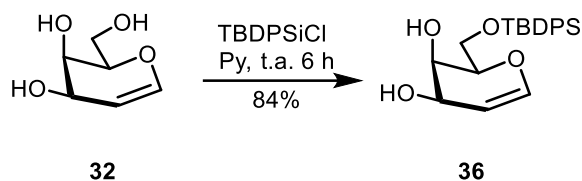
Compuesto 40



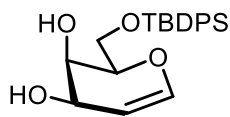
A una disolución de **39** (3.10 g, 11.43 mmol) en una mezcla de acetona (17 mL) y agua (11 mL) se le añadió a 0 °C, *p*-TsOH (0.22 g, 1.14 mmol) y la mezcla se dejó agitando durante 30 minutos hasta observar la completa desaparición del producto de partida por CCF. La reacción se detuvo mediante la adición de Et₃N y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se utilizó en la siguiente etapa sin purificación previa.

Compuesto D12

A una disolución de **40** (0.95 g, 3.59 mmol) en DCM anhidro (30 mL) se le añadió a 0 °C TCA (6.2 g, 43.08 mmol) y DBU anclada a una matriz de divinilbenceno (0.48 g, 0.90 mmol), y la mezcla se dejó agitando durante toda la noche bajo atmósfera inerte. Finalmente, el crudo de reacción se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. La mezcla de anómeros α/β se utilizó en la subsiguiente reacción de glicosilación sin purificación previa.

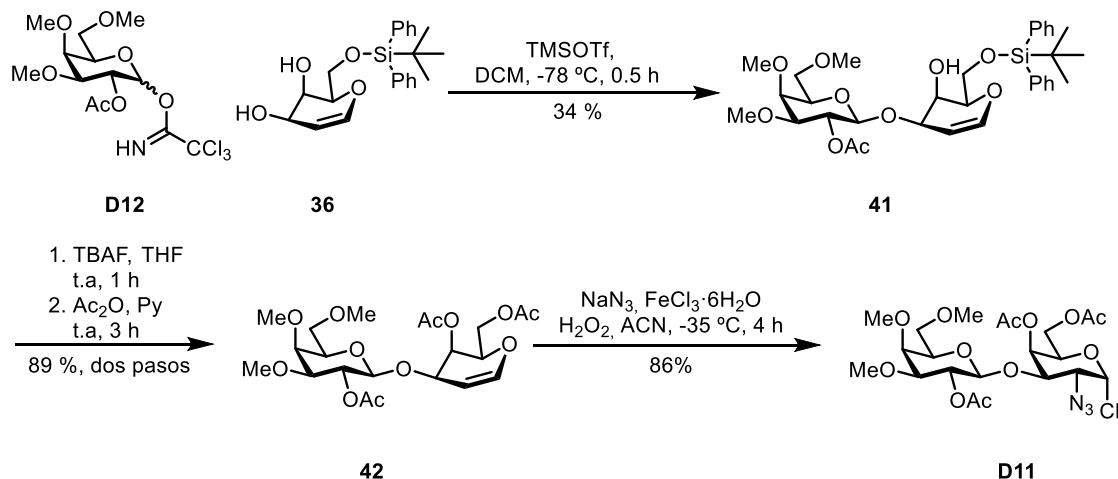
7.3.22. Síntesis del aceptor 36

Esquema 7.22.- Transformación empleada para la preparación del aceptor **36** a partir del glicial **41**.

Compuesto 36

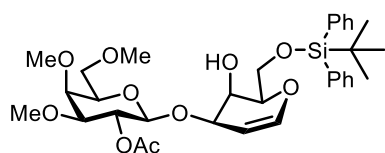
A una disolución de **41** (2.5 g, 17.1 mmol) en Py (5 mL) se le añadió a 0 °C TBDPSCl (4.9 mL, 18.8 mmol) y la mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante 4 h. Pasado dicho tiempo, el crudo de reacción se diluyó con diclorometano y se lavó en un primer lugar con una disolución de HCl 1M y posteriormente con una disolución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM:MeOH 95:5) para obtener **36** (5.5 g, 84%). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁸⁰

7.3.23. Síntesis del donador D11

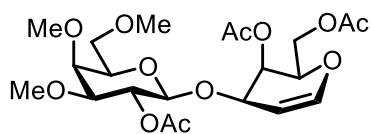


Esquema 7.23.- Reacción de acoplamiento entre el donador **D12** y el aceptor **36** y transformaciones posteriores.

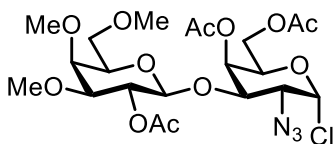
Compuesto 41



El compuesto **41** se preparó por reacción del donador **D12** (1.46 g, 3.59 mmol) con el aceptor **36** (1.51 g, 0.70 mmol) en DCM (20 mL) utilizando como activante TMSOTf (32 μ L, 0.18 mmol) siguiendo el *Procedimiento General VIII* (30 min. -78 °C). El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt, 6:4) para dar **41** (0.75g, 34 %). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.42 – 7.33 (m, 8H, Ar), 6.32 (d, J = 6.2 Hz, 1H, H-1), 5.18 (dd, J = 10.1, 7.9 Hz, 1H, H-2'), 4.57 (d, J = 6.4 Hz, 1H, H-2), 4.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-1'), 4.40 (d, J = 4.2 Hz, 1H, H-3), 4.19 (d, J = 4.0 Hz, 1H, H-4), 4.04 – 3.92 (m, 2H, H-5, H-6_a), 3.82 (dd, J = 9.1, 5.1 Hz, 1H, H-6_b), 3.73 (d, J = 2.9 Hz, 1H, H-4'), 3.62 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-6_a'), 3.57 (s, 3H, OMe), 3.54 – 3.47 (m, 1H, H-6_b'), 3.45 (s, 3H, OMe), 3.40 – 3.35 (m, 1H, H-5'), 3.35 (s, 3H, OMe), 3.29 (dd, J = 10.2, 2.9 Hz, 1H, H-3'), 2.68 (m, 1H, OH), 2.05 (s, 3H, OAc), 1.04 (s, 9H, ^tBu) **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 169.66 (CO), 145.11 (C-1), 135.68 (2CH, Ar), 135.63 (2CH, Ar), 133.53 (C, Ar), 133.30 (C, Ar), 129.77 (CH, Ar), 129.76 (CH, Ar), 127.80 (2CH, Ar), 127.77 (2CH, Ar), 100.36 (C-1'), 98.67 (C-2), 82.33 (C-3'), 76.61 (C-5), 74.19 (C-4'), 73.63 (C-5'), 72.51 (C-3), 71.25 (C-2'), 70.49 (C-6'), 63.42 (C-4), 61.97 (C-6), 61.40 (OMe), 59.30 (OMe), 58.09 (OMe), 26.85 (3CH₃), 21.06 (OAc), 19.32 (C, ^tBu). **HRMS (ESI⁺)** m/z calc. para C₃₃H₄₆NaSiO₁₀ [M+Na]⁺: 653.2752, encontrada 653.2739.

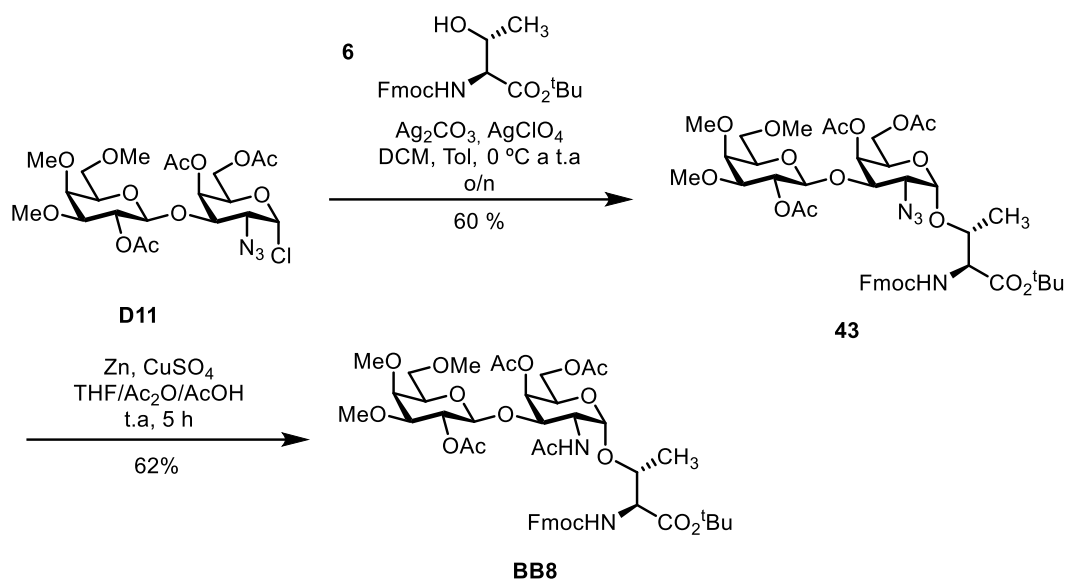
Compuesto 42

El compuesto **42** se preparó por reacción del compuesto **41** (3.5 g, 4.17 mmol) con TBAF (1.6 g, 5 mmol) en THF (60 mL). La mezcla se agitó durante 1 h hasta la completa desaparición del producto de partida. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo se trató con anhídrido acético (6 mL) y Py (10 mL) siguiendo el *Procedimiento General III* (3 h, t.a.). El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 1:1) para dar **42** (1.7 g, 89 %). **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 6.35 (dd, *J* = 6.4, 1.4 Hz, 1H, H-1), 5.29 – 5.26 (m, 1H, H-4), 5.15 (dd, *J* = 10.1, 7.9 Hz, 1H, H-2'), 4.80 (dd, *J* = 6.4, 3.0 Hz, 1H, H-2), 4.52 – 4.47 (m, 1H, H-3), 4.44 (d, *J* = 7.93 Hz, H-1'), 4.26 – 4.17 (m, 3H, H-5', H-6_a, H-6_b), 3.69 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-4'), 3.58 – 3.54 (m, 1H, H-6_a'), 3.54 (s, 3H, OMe), 3.49 (m, 2H, H-6_b', H-5), 3.42 (s, 3H, OMe), 3.38 (s, 3H, OMe), 3.23 (dd, *J* = 10.2, 2.9 Hz, 1H, H-3'), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc). **¹³C{¹H}-RMN** (101 MHz, CDCl₃): δ 170.7 (CO), 170.5 (CO), 169.7 (CO), 144.6 (C-1), 99.5 (C-2), 99.2 (C-1'), 82.5 (C-3'), 74.2 (C-4'), 73.7 (C-5), 73.5 (C-5'), 70.7 (C-2'), 70.5 (C-6), 66.9 (C-3), 65.9 (C-4), 62.5 (C-6'), 61.3 (OMe), 59.3 (OMe), 58.1 (OMe), 21.0 (OAc), 21.0 (OAc), 20.9 (OAc). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₂₁H₃₂NaO₁₂ [M+Na]⁺: 499.1786, encontrada 499.1766.

Compuesto D11

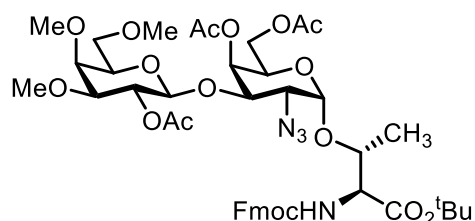
Sobre una disolución de **42** (1.00 g, 2.10 mmol) en ACN (20 mL) se añadió FeCl₃·6H₂O (1.13 g, 4.20 mmol), NaN₃ (0.15 g, 2.31 mmol) y H₂O₂ (0.23 mL, 2.31 mmol, disolución acuosa 33%). La mezcla se enfrió a -35 °C y se agitó a esa temperatura durante 4 h. La mezcla se diluyó con AcOEt (80 mL) y se lavó con agua (3 x 30 mL) hasta que la fase orgánica quedó incolora. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 7:3) para dar **D11** (1.00 g, 86 %). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 6.10 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-1), 5.44 (dd, *J* = 3.1, 2.1 Hz, 1H, H-4), 5.08 (dd, *J* = 10.2, 7.8 Hz, 1H, H-2'), 4.50 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.37 – 4.28 (m, 1H, H-5), 4.14 (dd, *J* = 11.9, 4.4 Hz, 1H, H-6_a), 4.01 – 3.87 (m, 3H, H-3, H-2, H-6_b), 3.63 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-4'), 3.54 – 3.49 (m, 1H, H-6_a'), 3.47 (m, 2H, H-5', H-6_b'), 3.46 (s, 3H, OMe), 3.36 (s, 3H, OMe), 3.34 (s, 3H, OMe), 3.17 (dd, *J* = 10.1, 3 Hz, 1H, H-3'), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 170.5 (CO), 169.7 (2CO), 102.0 (C-1'), 93.5 (C-1), 82.3 (C-3'), 74.7 (C-2), 73.8 (C-4'), 73.6 (C-5'), 70.9 (C-2'), 70.8 (C-5), 70.2 (C-6'), 69.0 (C-4), 62.2 (C-6), 61.2 (C-5'), 60.7 (OMe), 60.4 (C-3) 59.1 (OMe), 58.0 (OMe), 21.0 (OAc), 20.7 (OAc), 20.6 (OAc). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₂₁H₃₂ClN₃NaO₁₂ [M+Na]⁺: 576.1675, encontrada 576.164

7.3.24. Síntesis del “building block” BB8



Esquema 7.24.- Síntesis del “building block” BB8 a partir del donador D11 y el aceptor 6 y transformaciones posteriores.

Compuesto 43

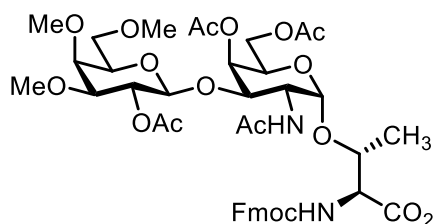


Dicho compuesto se obtuvo por reacción de acoplamiento entre **D11** (0.80 g, 1.45 mmol) y **6** (0.52 g, 1.32 mmol) utilizando como activantes Ag_2CO_3 (0.54 g, 1.98 mmol) y AgClO_4 (0.07 g, 0.33 mmol) en una mezcla de diclorometano y tolueno siguiendo el

Procedimiento General IX (12 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 3:7) para obtener el compuesto **43** (0.72 g, 60 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.70 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc), 7.57 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc), 7.34 (td, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 2H, Fmoc), 7.25 (td, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 2H, Fmoc), 5.64 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, NHFmoc), 5.40 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-4), 5.09 (d, $J = 10.1, 7.8$ Hz, 1H, H-2'), 4.97 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, H-1), 4.50 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1'), 4.41 – 4.31 (m, 2H, H- β , CH_2 Fmoc), 4.26 (dd, $J = 10, 7.6$ Hz, 1H, CH_2 Fmoc), 4.23 – 4.17 (m, 2H, H- α , CH Fmoc), 4.16 – 4.06 (m, 2H, H-5, H-6_a), 3.96 (dd, $J = 10.7, 3.4$ Hz, 1H, H-3), 3.90 (dd, $J = 10.3, 6.6$ Hz, 1H, H-6_b), 3.62 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H, H-4'), 3.55 – 3.47 (m, 2H, H-6_a', H-2), 3.46 (m, 2H, H-5', H-6_b'), 3.45 (s, 3H, OMe), 3.36 (s, 3H, OMe), 3.33 (s, 3H, OMe), 3.17 (dd, $J = 10.2, 3.0$ Hz, 1H, H-3'), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 1.98 (s, 3H, OAc), 1.44 (s, 9H, ^tBu), 1.27 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\gamma$). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 169.4 (CO), 168.9 (CO), 168.7 (CO), 168.1 (CO), 155.8 (CO, Fmoc), 142.9 (C, Fmoc), 142.8 (C, Fmoc), 140.3 (C, Fmoc), 140.2 (C, Fmoc), 126.7 (2CH, Fmoc), 126.0 (2CH, Fmoc), 124.2 (2CH, Fmoc), 119.0 (2CH,

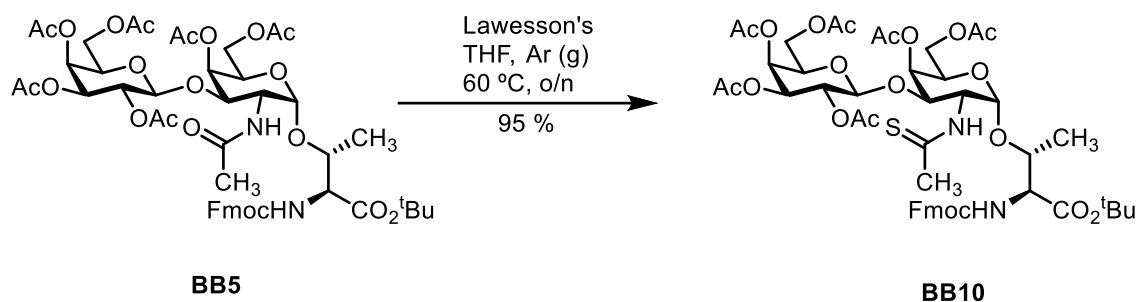
Fmoc), 101.1 (C-1'), 98.6 (C-1), 81.9 (C, ^tBu), 81.3 (C-3'), 75.3 (C-β), 73.3 (C-3), 72.8 (C-4'), 72.5 (C-5'), 69.9 (C-2'), 69.2 (C-6'), 68.7 (C-4), 67.0 (C-5), 66.4 (CH₂ Fmoc), 62.1 (C-6), 60.1 (OMe), 58.6 (C-2), 58.3 (C-α), 58.1 (OMe), 57.0 (OMe), 46.1 (CH Fmoc), 27.0 (3CH₃, ^tBu), 19.9 (OAc), 19.8 (OAc), 19.7 (OAc), 18.0 (CH₃γ). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₄₄H₅₈N₄NaO₁₇ [M+Na]⁺: 937.3689, encontrada 937.3652.

Compuesto BB8

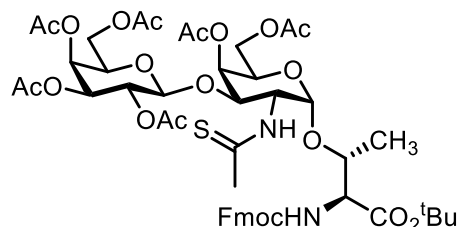


Sobre una disolución de **43** (0.69 g, 0.75 mmol) en una mezcla de THF/Ac₂O/AcOH (3:2:1, 12 mL) se añadió Zn metálico (0.49 g, 7.54 mmol) y una disolución saturada de CuSO₄ (10 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 h hasta la completa desaparición del producto de partida, monitorizada por CCF. El crudo se filtró sobre celita y se lavó con AcOEt. La fase orgánica se lavó posteriormente con sendas disoluciones saturadas de NaHCO₃ y de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt, 1:1) para dar **BB8** (0.41 g, 60 %). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.64 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.41 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 2H, Fmoc), 7.33 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 2H, Fmoc), 6.10 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, NHAc), 5.58 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, NHFmoc), 5.32 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-4), 5.14 (t, *J* = 9 Hz, 1H, H-2'), 4.93 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-1), 4.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.50 – 4.40 (m, 3H, H-2, CH₂ Fmoc), 4.34 – 4.25 (m, 1H, H-β), 4.25 – 4.17 (m, 1H, H-α), 4.17 – 4.12 (m, 3H, CH Fmoc, H-5, H-6_a), 4.03 – 3.93 (m, 2H, H-3, H-6_b), 3.63 – 3.56 (m, 4H, H-6_a', H-6_b', H-4, H-5), 3.50 (s, 3H, OMe), 3.40 (s, 3H, OMe), 3.37 (s, 3H, OMe), 3.19 (dd, *J* = 10.2, 3.0 Hz, 1H, H-3'), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, NHAc), 1.46 (s, 9H, ^tBu), 1.32 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 170.5 (CO), 170.2 (CO), 170.1 (CO), 170.0 (CO), 169.7 (CO), 156.7 (CO, Fmoc), 143.8 (2C, Fmoc), 141.3 (C, Fmoc), 141.3 (C, Fmoc), 127.8 (2CH, Fmoc), 127.1 (2CH, Fmoc), 125.1 (2CH, Fmoc), 120.0 (2CH, Fmoc), 99.9 (C-1), 99.7 (C-1'), 82.9 (C-^tBu), 82.6 (C-3'), 76.5 (C-β), 74.0 (C-4'), 73.3 (C-5'), 70.9 (C-6'), 70.6 (C-3), 70.1 (C-2'), 69.1 (C-4), 68.0 (C-5), 67.2 (CH₂ Fmoc), 62.7 (C-6), 61.2 (OMe), 59.2 (C-2), 59.1 (OMe), 58.0 (OMe), 48.9 (CH Fmoc), 47.2 (C-α), 28.1 (3CH₃, ^tBu), 23.3 (NHAc), 21.1 (OAc), 20.8 (OAc), 20.7 (OAc), 19.0 (CH₃γ). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₄₆H₆₂N₂NaO₁₈ [M+Na]⁺: 953.3890, encontrada 953.3849

7.3.25. Síntesis del “building block” BB10



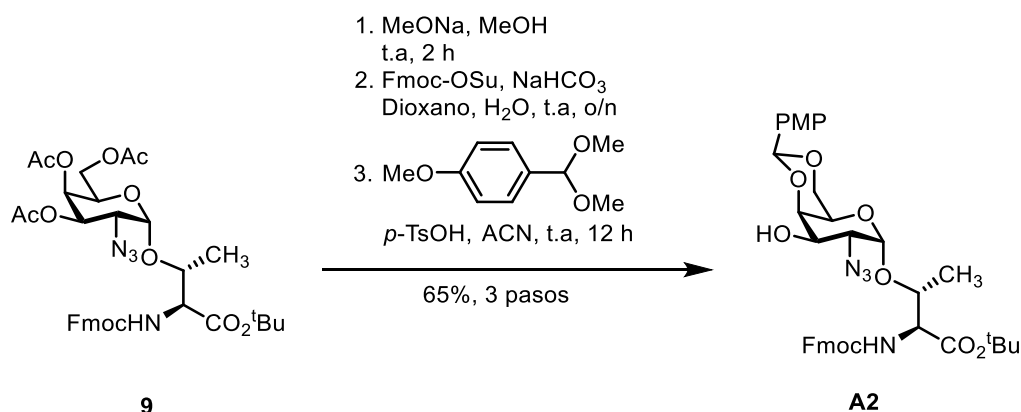
Esquema 7.25.- Procedimiento empleado para la síntesis del “building block” **BB10** a partir del “building block” **BB5**.

Compuesto BB10

Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **BB5** (0.7 g, 0.69 mmol) con el reactivo de Lawesson's (0.17 g, 0.41 mmol) en THF (10 mL) a 60 °C durante toda la noche. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía

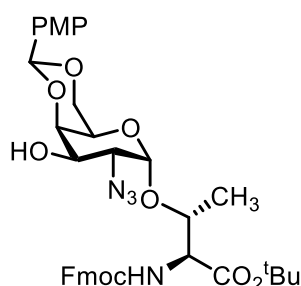
en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 3:7) para obtener el compuesto **BB10** (0.67 g, 95 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.63 – 7.47 (m, 2H, Fmoc), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.37 – 7.27 (m, 2H, Fmoc), 5.65 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, NHFmoc), 5.42 – 5.24 (m, 3H, H-4, H-3', H-4'), 5.05 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-2'), 4.98 – 4.79 (m, 1H, H-1), 4.59 – 4.43 (m, 3H, CH₂ Fmoc, H-1'), 4.26 – 3.95 (m, 9H, H-2, H-β, H-α, H-6_a, H-6_b, H-5', H-6_a', H-6_b', CH Fmoc), 3.89 – 3.74 (m, 2H, H-3, H-5), 2.53 (s, 3H, SAc), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 1.97 (s, 3H, OAc), 1.95 (s, 3H, OAc), 1.43 (s, 9H, ^tBu), 1.28 (m, 3H, CH₃γ). ¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 202.9 (CS), 170.8 (CO), 170.6 (CO), 170.5 (CO), 170.3 (CO), 170.2 (CO), 170.0 (CO), 169.9 (CO), 156.6 (CO, Fmoc), 143.7 (2C, Ar), 141.9 (2C, Ar), 128.0 (2CH, Ar), 127.3 (2CH, Ar), 125.0 (2CH, Ar), 120.2 (2CH, Ar), 100.5 (C-1'), 98.8 (C-1), 83.6 (C, ^tBu), 77.3 (C-β), 72.3 (C-5'), 70.9 (C-3), 69.2 (C-4), 68.7 (C-2'), 68.1 (C-2), 66.9 (CH₂ Fmoc), 66.9 (C-4'), 63.0 (C-6'), 61.4 (C-6), 59.3 (C-α), 55.5 (C-5), 54.6 (C-3'), 47.4 (CH Fmoc), 34.3 (CH₃, SAc), 28.2 (3CH₃, ^tBu), 21.2 (2OAc), 20.8 (2OAc), 20.7 (2OAc), 18.8 (CH₃γ). HRMS (ESI⁺) *m/z* calc. para C₄₉H₆₂N₂NaO₂₀S [M+Na]⁺: 1053.3685, encontrada 1053.3594.

7.3.26. Síntesis del aceptor A2



Esquema 7.26.- Síntesis del aceptor A2 a partir del intermedio 9.

Compuesto A2



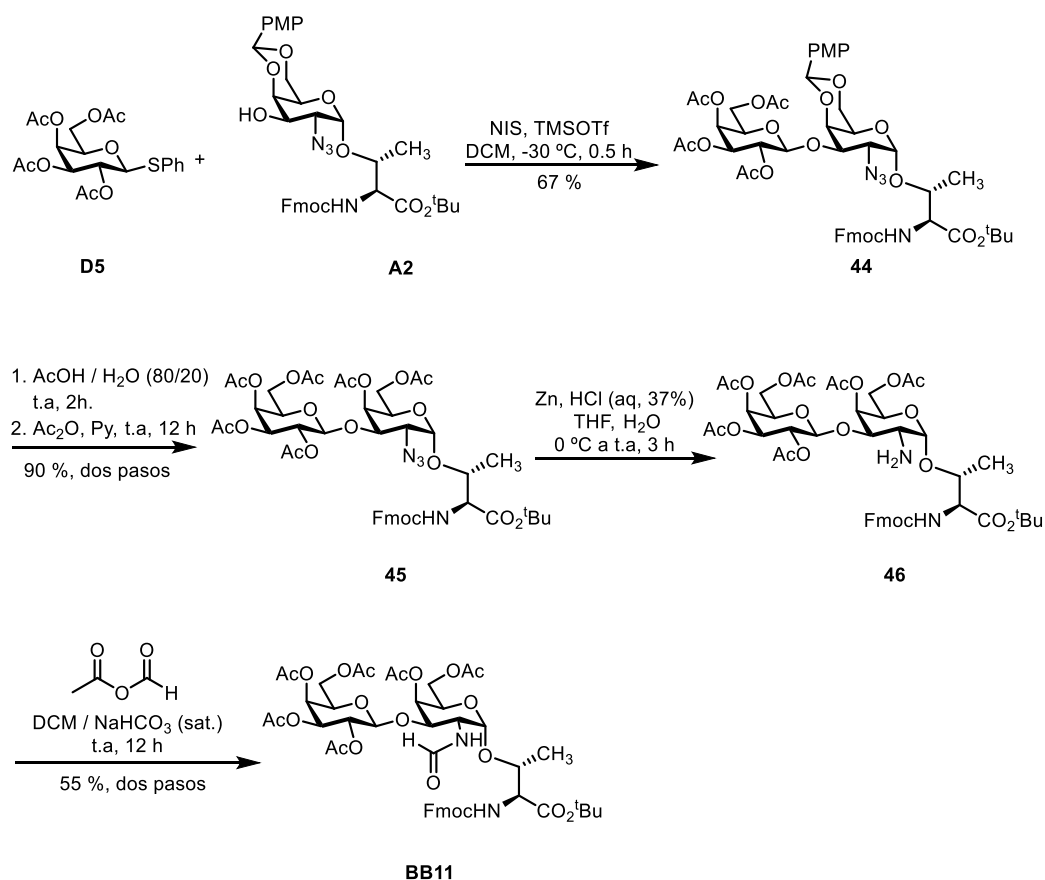
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **9** (2.8 g, 3.93 mmol) en metanol con una cantidad catalítica de MeONa recién preparado siguiendo el *Procedimiento General I* (2h, t.a.). El crudo de dicha reacción se hizo reaccionar, sin purificación previa, con Fmoc-OSu (1.29 g, 3.93 mmol) y NaHCO₃ (0.40 g, 4.72 mmol) en una mezcla de dioxano y agua (1:1, 40 mL). El disolvente se evaporó

a presión reducida y el crudo se redisolvió en acetato de etilo y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de dicha reacción se hizo reaccionar con *p*-anisaldehído dimetilacetel (1.45 mL, 8.54 mmol) en ACN anhidro (150 mL) empleando ácido *p*-toluenosulfónico como catalizador (75 mg, 0.43 mmol) siguiendo el *Procedimiento General V* (12 h, t.a.). El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt, 7:3) para dar **A2** (2.34 g, 65 % en tres pasos).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.63 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.44 – 7.36 (m, 4H, Ar), 7.34 – 7.28 (m, 2H, Fmoc), 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 5.74 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, NHFmoc), 5.54 (s, 1H, CH-Ph), 5.10 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-1), 4.46 – 4.39 (m, 2H, H-β, CH₂ Fmoc), 4.35 – 4.21 (m, 5H, CH₂ Fmoc, H-4, H-6_a, H-α, CH Fmoc), 4.16 (dd, *J* = 10.9, 3.5 Hz, 1H, H-3), 4.12 – 4.04 (m, 1H, H-6_b), 3.81 (s, 3H, OMe), 3.77 (m, 1H, H-5), 3.56 (dd, *J* = 10.5, 3.5 Hz, 1H, H-2), 1.50 (s, 9H, ^tBu), 1.30 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 169.3 (CO), 160.5 (CO, Fmoc), 156.9 (C, Ar), 144.0 (2C, Ar), 143.4 (2C, Ar), 141.4 (C, Ar), 127.9 (2CH, Ar), 127.6 (2CH, Ar), 127.2 (2CH, Ar), 125.3 (2CH, Ar), 120.0 (2CH, Ar), 113.8 (2CH, Ar), 101.3 (CH, Bnd), 99.4 (C-1), 76.0 (C-β), 75.4 (C-4), 69.2 (C-6), 67.4 (CH₂ Fmoc), 67.3 (C-3), 63.3 (C-5), 61.1 (C-2), 59.3 (C-α), 55.4 (OMe), 47.0 (CH Fmoc), 28.1 (3CH₃, ^tBu), 19.3 (CH₃γ).

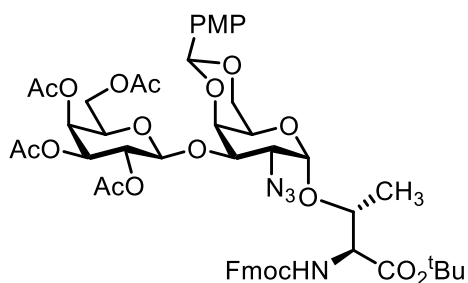
HRMS (ESI⁺) m/z calc. para C₃₇H₄₂N₄NaO₁₀ [M+Na]⁺: 725.2901, encontrada 725.1256.

7.3.27. Síntesis del “building block” BB11



Esquema 7.27.- Estrategia sintética empleada para la preparación de BB11 a partir del donador D5 y el aceptor A2.

Compuesto 44

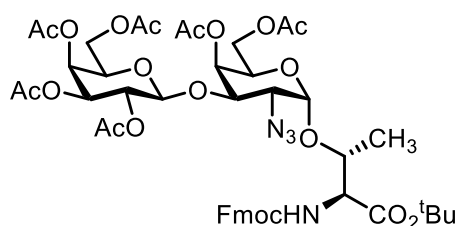


El compuesto **44** se preparó por reacción del donador **D5** (0.87 g, 1.96 mmol) con el aceptor **A2** (0.92 g, 1.31 mmol) en DCM (20 mL) utilizando como activante NIS (0.44 g, 1.96 mmol) y TMSOTf (80 µL, 0.43 mmol), siguiendo el *Procedimiento General VIII* (30 min. -30 °C). El disolvente se eliminó a presión

reducida y el producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt, 1:1) para dar **44** (0.90 g, 66 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.63 (dd, *J* = 7.6, 3.3 Hz, 2H, Ar), 7.47 – 7.37 (m, 4H, Ar), 7.34 – 7.28 (m, 2H, Ar), 6.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar), 5.76 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H,

NHfmoc), 5.51 (s, 1H, Bnd), 5.40 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-4'), 5.33 – 5.25 (m, 1H, H-2'), 5.12 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-1), 5.03 (dd, $J = 10.4, 3.5$ Hz, 1H, H-3'), 4.79 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-1'), 4.53 – 4.41 (m, 2H, H- β , CH₂ Fmoc), 4.38 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-4), 4.34 – 4.23 (m, 3H, CH₂ Fmoc, CH Fmoc, H- α), 4.23 – 4.16 (m, 2H, H-6_a, H-6_a'), 4.15 – 4.00 (m, 3H, H-3, H-6_b, H-6_b'), 3.93 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-5'), 3.81 (s, 3H, OMe), 3.78 – 3.80 (m, 1H, H-2), 3.69 – 3.71 (m, 1H, H-5), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 1.98 (s, 3H, OAc), 1.49 (s, 9H, ^tBu), 1.32 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₃ γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 170.6 (CO), 170.4 (CO), 170.4 (CO), 170.3 (CO), 170.2 (CO), 160.1 (CO, Fmoc), 157.0 (C, Ar), 144.0 (2C, Ar), 143.8 (2C, Ar), 141.4 (C, Ar), 127.8 (2CH, Ar), 127.5 (2CH, Ar), 127.2 (CH, Ar), 127.1 (CH, Ar), 125.3 (CH, Ar), 125.3 (CH, Ar), 120.1 (2CH, Ar), 113.6 (2CH, Ar), 102.6 (C-1'), 100.8 (CH, Bnd), 99.8 (C-1), 83.0 (C, ^tBu), 76.0 (C- β), 75.9 (C-3), 75.8 (C-4), 71.1 (C-3'), 70.9 (C-5'), 69.1 (C-6), 68.7 (C-2'), 67.4 (CH₂ Fmoc), 67.0 (C-4'), 63.5 (C-5), 61.4 (C-6'), 59.1 (C- α), 59.0 (C-2), 55.4 (OMe), 47.1 (CH Fmoc), 31.4 (s, 3CH₃, ^tBu), 20.9 (OAc), 20.8 (OAc), 20.7 (OAc), 20.6 (OAc), 19.4 (CH₃ γ). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₅₁H₆₀N₄NaO₁₉[M+Na]⁺: 1055.3744, encontrada 1055.3748.

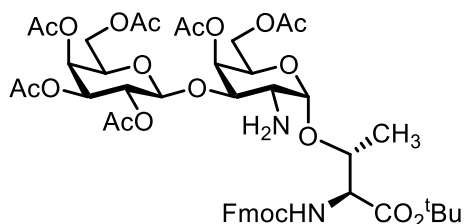
Compuesto 45



Una disolución de **44** (0.90 g, 0.87 mmol) en ácido acético en agua al 80% (15 mL) se dejó agitando durante 2 h, hasta observar por CCF la completa desaparición del producto de partida. A continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se acetiló siguiendo el *Procedimiento General III* (12 h, t.a.). El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 4:6) para dar **45** (0.79 g, 90 % en dos pasos). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.75 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc), 7.62 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, Fmoc), 7.40 (td, $J = 7.5, 2.2$ Hz, 2H, Fmoc), 7.31 (td, $J = 7.4, 2.1$ Hz, 2H, Fmoc), 5.64 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, NHfmoc), 5.48 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, H-4), 5.36 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H-4'), 5.19 (dd, $J = 10.4, 7.8$ Hz, 1H, H-2'), 5.04 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-1), 5.00 (dd, $J = 10.5, 3.3$ Hz, 1H, H-3'), 4.72 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1'), 4.47 (dd, $J = 10.1, 7.0$ Hz, 1H, CH₂ Fmoc), 4.45 – 4.35 (m, 1H, H- β), 4.34 – 4.21 (m, 3H, CH₂ Fmoc, CH Fmoc, H- α), 4.20 – 4.12 (m, 3H, H-5', H-6_a, H-6_a'), 4.12 – 4.02 (m, 2H, H-3, H-6_b'), 4.01 – 3.87 (m, 2H, H-5, H-6_b), 3.59 (dd, $J = 10.7, 3.7$ Hz, 1H, H-2), 2.14 (s, 3H, OAc), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 1.97 (s, 3H, OAc), 1.50 (s, 9H, ^tBu), 1.33 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH₃ γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 170.6 (CO), 170.5 (CO), 170.4 (CO), 170.2 (CO), 169.7 (CO), 169.6 (CO), 169.3 (CO), 156.9 (CO, Fmoc), 144.0 (C, Ar), 143.8 (C, Ar), 141.4 (2C, Ar), 127.9 (2CH, Ar), 127.2 (2CH, Ar), 125.3 (2CH, Ar),

120.2 (2CH, Ar), 101.7 (C-1'), 99.4 (C-1), 83.0 (C, ^tBu), 76.5 (C-β), 74.8 (C-3), 70.9 (C-3'), 70.9 (C-5), 69.5 (C-4), 68.8 (C-2'), 68.0 (C-5'), 67.5 (CH₂ Fmoc), 66.8 (C-4'), 63.0 (C-6), 61.1 (C-6'), 60.5 (C-3), 59.7 (C-2), 59.3 (C-α), 47.2 (CH-Fmoc), 28.1 (3CH₃, ^tBu), 21.2 (OAc), 20.8 (OAc), 20.8 (OAc), 20.7 (OAc), 20.6 (OAc), 20.5 (OAc), 19.1 (CH₃γ). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₄₇H₅₈N₄NaO₂₀ [M+Na]⁺:1021.3537, encontrada 1021.3526.

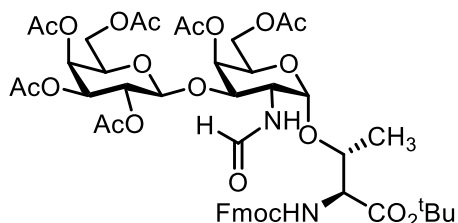
Compuesto 46



Sobre una disolución de **45** (0.70 g, 0.70 mmol) en THF (17.5 mL) se añadió agua (10.5 mL). La mezcla de reacción se agitó en un baño de hielo durante 15 minutos y se añadió una disolución acuosa de HCl al 33% (4.65 mL) y Zn metálico (0.46 g, 7.01 mmol). La disolución

se agitó vigorosamente hasta la completa desaparición del producto de partida. El crudo de reacción se filtró sobre Celita y se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

Compuesto BB11

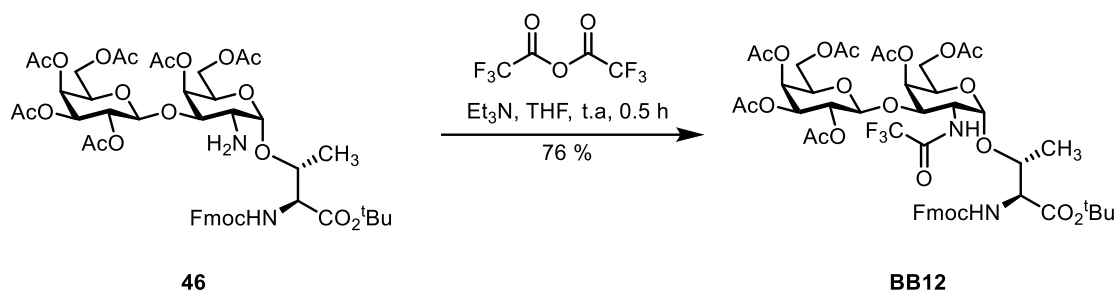


El compuesto **BB11** se obtuvo por reacción de **46** con anhídrido fórmico-acético (0.37 g, 4.2 mmol) en una mezcla de DCM/NaHCO₃ (sat.) (1:1, 15 mL). La mezcla se sometió a agitación durante 12 h hasta la desaparición completa del producto de partida. El crudo de reacción se

diluyó con diclorometano y se lavó con una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 4:6) para obtener **BB11** (0.69 g, 55 % en dos pasos). **¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD)** δ 8.01 (s, 1H, CHO), 7.81 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Fmoc), 7.67 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.39 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.35 – 7.27 (m, 2H, Fmoc), 5.37 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-4), 5.31 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H-4'), 4.99 – 4.92 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.87 – 4.85 (m, 1H, H-1), 4.62 – 4.54 (m, 1H, H-1'), 4.51 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂ Fmoc), 4.45 – 4.36 (m, 1H, H-3), 4.35 – 4.24 (m, 2H, H-β, CH Fmoc), 4.22 – 4.01 (m, 5H, H-α, H-6_a, H-6_a', H-6_b', H-5'), 3.99 – 3.89 (m, 2H, H-6_b, H-5), 3.83 (dd, *J* = 11.3, 3.4 Hz, 1H, H-2), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.97 (s, 3H, OAc), 1.90 (s, 3H, OAc), 1.42 (s,

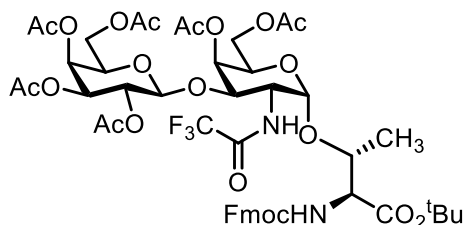
9H, ^tBu), 1.24 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃γ). ¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 171.0 (CO), 170.8 (CO), 170.7 (CO), 170.6 (CO), 170.1 (CO), 169.6 (CO), 169.6 (CO), 162.2 (CHO), 157.8 (CO, Fmoc), 143.9 (C, Ar), 143.9 (C, Ar), 141.4 (2C, Ar), 127.6 (2CH, Ar), 126.9 (2CH, Ar), 124.8 (CH, Ar), 124.7 (CH, Ar), 119.7 (2CH, Ar), 101.5 (C-1'), 99.3 (C-1), 82.3 (C, ^tBu), 75.6 (C-β), 74.5 (C-2), 70.8 (C-2'), 70.4 (C-5), 69.8 (C-4), 68.7 (C-3'), 67.8 (C-5), 67.2 (C-4'), 66.4 (CH₂ Fmoc), 63.0 (C-6), 61.0 (C-6'), 59.4 (C-α), 47.3 (CH Fmoc), 46.8 (C-3), 27.1 (3CH₃, ^tBu), 19.5 (OAc), 19.4 (OAc), 19.3 (OAc), 19.2 (OAc), 19.1 (OAc), 19.0 (OAc), 18.1 (CH₃γ). **HRMS (ESI⁺)** *m/z* calc. para C₄₈H₆₀N₂NaO₂₁ [M+Na]⁺:1023.3581, encontrada 1023.3580.

7.3.28. Síntesis del “building block” BB12



Esquema 7.28.- Reacción empleada para la síntesis del “building block” **BB12** a partir del intermedio **46**.

Compuesto BB12



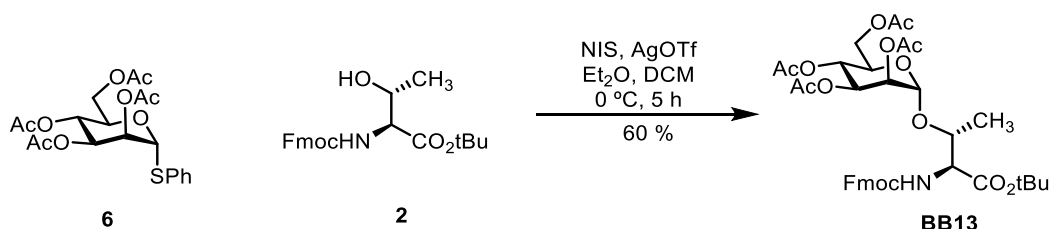
Sobre una disolución de **46** (0.32 g, 0.33 mmol) en THF (5 mL) se añadió anhídrido trifluoroacético (94 μL, 0.67 mmol) y Et₃N (94 μL, 0.67 mmol) y la mezcla se mantuvo agitando durante 30 minutos hasta observar la completa desaparición del producto de partida

por CCF. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 6:4) para obtener **BB12** (0.27 g, 76 %). ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7.79 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.66 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.38 (td, *J* = 7.5, 4.1 Hz, 2H, Fmoc), 7.34 – 7.25 (m, 2H, Fmoc), 5.39 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-4), 5.33 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-4'), 4.97 – 4.92 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.85 – 4.83 (m, 1H, H-1), 4.60 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-1'), 4.51 (td, *J* = 6.3, 3.3 Hz, 2H, CH₂ Fmoc), 4.37 (dd, *J* = 11.0, 3.8 Hz, 1H, H-2), 4.31 (dd, *J* = 6.6, 1.7 Hz, 1H, CH Fmoc), 4.28 – 4.18 (m, 2H, H-β, H-5'), 4.17 – 4.05 (m, 4H, H-α, H-6_a, H-6_a', H-6_b'), 4.04 – 3.97 (m, 2H, H-3, H-6_b), 3.94 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-5), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.93 (s, 3H, OAc), 1.90 (s, 3H, OAc), 1.40 (s, 9H, ^tBu), 1.24 (d, *J* =

6.4 Hz, 3H, CH₃γ). ¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CD₃OD) δ 171.0 (CO), 170.7 (CO), 170.6 (CO), 170.5 (CO), 170.1 (CO), 169.9 (CO), 169.4 (CO), 157.8 (CO, Fmoc), 143.9 (C, Ar), 143.8 (C, Ar), 141.3 (2C, Ar), 127.6 (2CH, Ar), 126.9 (2CH, Ar), 124.9 (CH, Ar), 124.7 (CH, Ar), 119.7 (CH, Ar), 119.7 (CH, Ar), 100.8 (C-1'), 98.3 (C-1), 82.3 (C, ^tBu), 74.9 (C-2), 72.1 (C-3), 70.8 (C-2'), 70.6 (C-5), 69.7 (C-4), 68.9 (C-3'), 67.7 (C-β), 66.4 (CH₂ Fmoc), 62.7 (C-6), 60.6 (C-6'), 59.1 (C-α), 49.4 (CH Fmoc), 47.1 (C-5'), 27.0 (3CH₃, ^tBu), 19.4 (OAc), 19.3 (OAc), 19.3 (OAc), 19.3 (OAc), 19.2 (OAc), 19.1 (OAc), 18.2 (CH₃γ). HRMS (ESI⁺) m/z calc. para C₄₉H₅₉F₃N₂NaO₂₁ [M+Na]⁺:1091.3455, encontrada 1091.3430.

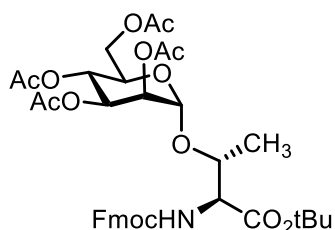
7.4 Síntesis de los “building block” para la preparación de los tripéptidos (TP-I a TP-V)

7.4.1. Síntesis del “building block” BB13



Esquema 7.29.- Representación de glicosilación entre el donador **6** y el aceptor **2** para la obtención de **BB13**.

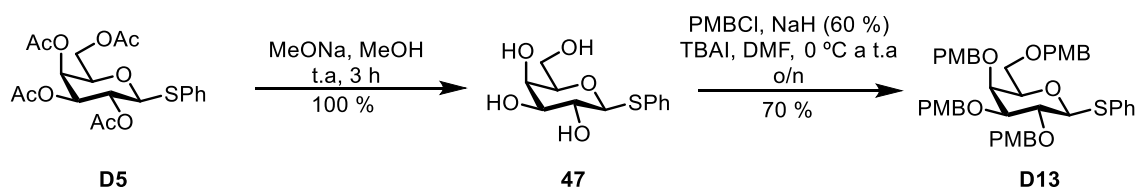
Compuesto BB13



Sobre una mezcla de **6** (0.8 g, 1.82 mmol) y **2** (1.8 g, 2.73 mmol) en DCM:Et₂O (1:1, 10 mL/mmol) se le añadieron tamices moleculares de 4 Å y la disolución se dejó agitando bajo atmósfera inerte durante 1 h a temperatura ambiente. Pasado dicho tiempo, la temperatura se disminuyó hasta 0 °C y se añadió NIS (0.61 g, 2.73 mmol) y AgOTf (94 mg, 0.36 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitando durante 5 horas hasta la completa desaparición del producto de partida. La reacción se detuvo mediante la adición de Et₃N y la mezcla resultante se filtró sobre Celita. El crudo de reacción se lavó con disoluciones saturadas de NaHCO₃ y Na₂S₂O₃ y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 6:4) para dar **BB13** (0.79 g, 60 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.26 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 5.46 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, NHFmoc), 5.25 (dd, *J* = 10.0, 3.3 Hz, 1H, H-3), 5.18 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-4), 5.10 (dd, *J* = 3.3, 1.8 Hz, 1H, H-2), 4.86 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-1), 4.40 –

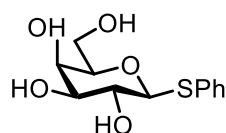
4.25 (m, 4H, H- β , CH₂ Fmoc, CH Fmoc), 4.24 – 4.13 (m, 2H, H-6_a, H- α), 4.10 – 3.96 (m, 2H, H-6_b, H-5), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 3H, OAc), 1.93 (s, 3H, OAc), 1.41 (s, 9H, ^tBu), 1.26 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH₃ γ). ¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 170.6 (CO), 169.9 (CO), 169.8 (2CO), 168.9 (CO), 156.7 (CO, Fmoc), 143.8 (2C, Fmoc), 141.3 (2C, Fmoc), 127.7 (2CH, Fmoc), 127.1 (2CH, Fmoc), 125.2 (2CH, Fmoc), 120.0 (2CH, Fmoc), 98.9 (C-1), 83.0 (C, ^tBu), 77.6 (C- β), 69.5 (C-2), 69.1 (C-5), 68.9 (C-3), 67.4 (CH₂ Fmoc), 66.3 (C-4), 62.6 (C-6), 58.9 (C- α), 47.2 (CH Fmoc), 27.9 (3CH₃, ^tBu), 20.8 (OAc), 20.7 (OAc), 20.7 (OAc), 20.6 (OAc), 18.0 (CH₃ γ). HRMS (ESI⁺) m/z calc. para C₃₇H₄₅NaNO₁₄ [M+Na]⁺: 750.2732, encontrada 750.2737.

7.4.2. Síntesis del donador de glicosilo D13



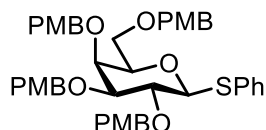
Esquema 7.30.- Reacción empleada para la síntesis del donador de glicosilo **D13** a partir de **D5**.

Compuesto 47



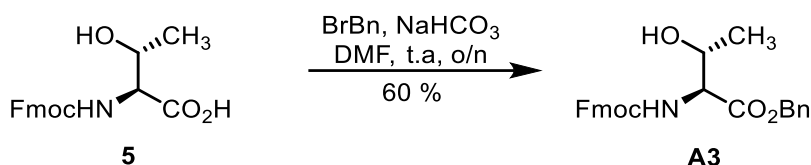
Dicho compuesto se obtuvo por reacción del compuesto **D5** (5.0 g, 12.8 mmol) en metanol con una cantidad catalítica de MeONa recién preparado siguiendo el *Procedimiento General I* (3 h, t.a.). El residuo resultante se usó en la siguiente etapa sin purificación previa. (3.48 g, 100 %).

Compuesto D13



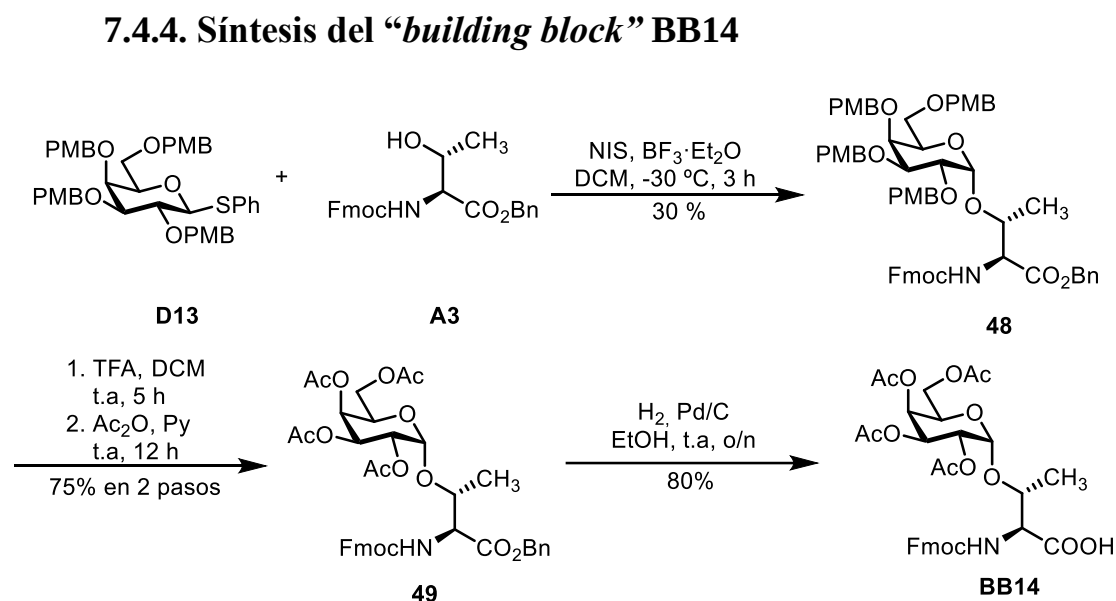
Sobre una disolución de **47** (3.48 g, 12.8 mmol) en DMF anhidro (120 mL) se añadió a 0 °C NaH (60% en aceite mineral, 4.1 g, 102.4 mmol) y TBAI (0.95 g, 2.56 mmol). Se realizó un ciclo vacío/argón y posteriormente se añadió PMBCl (8.7 mL, 64 mmol). La mezcla se dejó agitando durante toda la noche hasta la completa desaparición del producto de partida, que fue monitorizada por CCF. El exceso de PMBCl se eliminó mediante la adición a 0 °C de metanol, el disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 8:2) para obtener **D13** (6.73 g, 70 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁸¹

7.4.3. Síntesis del aceptor de glicosilo A3

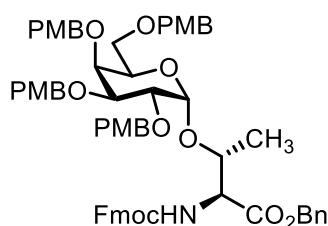


Esquema 7.31.- Reacción empleada para la síntesis del aceptor de glicosilo A3 a partir de 5.

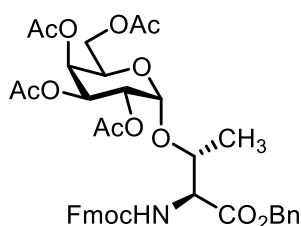
Sobre una disolución de **5** (5 g, 42 mmol) en DMF (100 mL) se añadió NaHCO₃ (10.6 g, 126 mmol) y BnBr (7.5 mL, 63 mmol) a 0 °C. Se realizó un ciclo de vacío/argón y la reacción se dejó agitando durante toda la noche a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida y posteriormente el crudo de reacción se redisolvió en AcOEt y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó en cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 7:3) para obtener **A3** (10.8 g, 60 %). Los datos espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con los publicados en la bibliografía.¹⁸²



Esquema 7.32.- Síntesis del “building block” BB14 a partir del donador D13 y el aceptor A3.

Compuesto 48

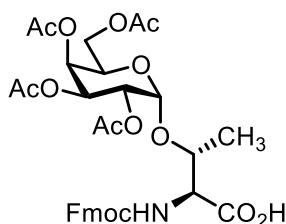
A una disolución del donador **D13** (1.30 g, 1.74 mmol) y el aceptor **A3** (0.5 g, 1.16 mmol) en DCM anhidro (12 mL) bajo atmósfera inerte y tamices moleculares de 4 Å se le añadió a -30 °C NIS (0.40 g, 1.74 mmol) y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (72 μL , 0.58 mmol). A continuación, la mezcla de reacción se dejó agitando durante 3 h, hasta la completa desaparición del donador, monitorizada por cromatografía en capa fina. La reacción se detuvo mediante la adición de Et_3N y se filtró sobre Celita. El crudo se lavó con sendas disoluciones saturadas de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y NaHCO_3 y la fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex: AcOEt 7:3) para dar **49** (0.51 g, 30 %). **^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3)** δ 7.72 (d, $J = 7.6, 3.2$ Hz, 2H, Ar, Fmoc), 7.59 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, Ar, Fmoc), 7.39 – 7.32 (m, 2H, Ar, Fmoc), 7.32 – 7.13 (m, 15H, Ar, Fmoc, PMB, Bn), 6.90 – 6.73 (m, 8H, Ar, PMB), 6.28 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, NHFmoc), 5.08 (s, 2H, CH_2Ph), 4.85 – 4.75 (m, 3H, H-1, CH_2PMB), 4.74 – 4.61 (m, 2H, CH_2PMB), 4.59 (s, 2H, CH_2PMB), 4.50 – 4.37 (m, 4H, CH_2 Fmoc, CH_2PMB), 4.37 – 4.25 (m, 4H, CH_2PMB , H- β , H-4), 4.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH Fmoc), 3.95 – 3.83 (m, 4H, H- α , H-2, H-3, H-5), 3.78 (s, 12H, 4OMe), 3.50 – 3.40 (m, 2H, H-6), 1.26 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\gamma$). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 170.8 (CO), 159.4 (C, Ar), 159.3 (C, Ar), 159.3 (C, Ar), 159.2 (C, Ar), 157.0 (CO), 144.1 (2C, Ar), 143.9 (2C, Ar), 135.4 (C, Ar), 130.9 (C, Ar), 130.5 (C, Ar), 130.1 (C, Ar), 130.0 (CH, Ar), 129.9 (2CH, Ar), 129.9 (CH, Ar), 129.6 (C, Ar), 129.5 (CH, Ar), 129.1 (CH, Ar), 128.7 (2CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.3 (2CH, Ar), 127.8 (CH, Fmoc), 127.7 (CH, Fmoc), 127.2 (2CH, Ar), 127.1 (2CH, Ar), 125.3 (CH, Fmoc), 125.2 (CH, Fmoc), 120.0 (2CH, Ar), 113.9 (CH, Ar), 113.8 (CH, Ar), 113.7 (CH, Ar), 113.6 (CH, Ar), 98.7 (C-1), 78.9 (C-3), 77.4 (C-2), 75.5 (C-5), 75.0 (C-4), 74.4 (CH_2), 73.3 (CH_2), 73.2 (CH_2), 72.6 (CH_2), 70.1 (C- α), 68.6 (C-6), 67.4 (CH_2), 67.2 (CH_2), 59.3 (C- β), 55.3 (4 CH_3 , PMB), 47.3 (CH Fmoc), 14.3 ($\text{CH}_3\gamma$). **HRMS (ESI⁺) m/z calc.** para $\text{C}_{64}\text{H}_{67}\text{F}_3\text{NNaO}_{14} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 1096.4454, encontrada 1096.4442.

Compuesto 49

A una disolución del compuesto **48** (0.5 g, 0.47 mmol) en diclorometano (6 mL) se añadió TFA (4 mL) y la reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 5 horas. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se sometió a un proceso de acetilación siguiendo el *Procedimiento General III* (12 h, t.a.). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de

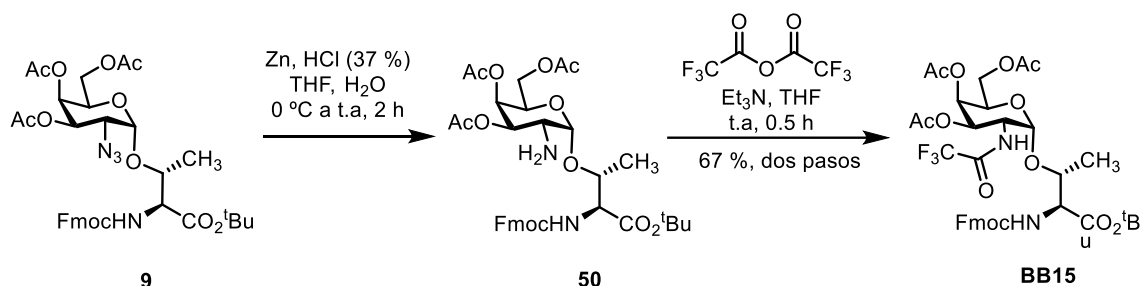
sílice (Hex:AcOEt 7:3) para obtener el compuesto **49** (0.265 g, 75 %). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.63 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.43 – 7.26 (m, 9H, Fmoc, Bn), 5.54 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, NHFmoc), 5.45 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-4), 5.39 – 5.34 (m, 1H, H-2), 5.17 (d, *J* = 12 Hz, 1H, CH₂Ph), 5.08 – 5.00 (m, 3H, CH₂Ph, H-1, H-3), 4.46 – 4.34 (m, 4H, H-α, H-β, CH₂ Fmoc), 4.30 – 4.20 (m, 2H, H-5, CH Fmoc), 4.07 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, H-6), 2.14 (s, 3H, OAc), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.32 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 170.9 (CO), 170.5 (CO), 170.3 (CO), 170.2 (CO), 170.1 (CO), 156.7 (CO, Fmoc), 143.9 (2C, Ar), 143.8 (2C, Ar), 134.8 (C, Ar), 128.9 (2CH, Fmoc), 128.8 (CH, Ar), 128.7 (2CH, Fmoc), 127.9 (2CH, Ar), 126.0 (2CH, Fmoc), 125.3 (2CH, Ar), 120.1 (2CH, Fmoc), 97.4 (C-1), 76.0 (C-β), 68.1 (C-4), 67.9 (C-3), 67.8 (CH₂-Ph), 67.6 (CH₂ Fmoc), 67.4 (C-2), 66.8 (C-5), 62.0 (C-6), 58.7 (C-α), 47.2 (CH Fmoc), 21.0 (OAc), 20.8 (OAc), 20.7 (OAc), 19.0 (CH₃γ). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₄₀H₄₃NNaO₁₄ [M+Na]⁺: 784.2573, encontrada 784.2576.

Compuesto BB14



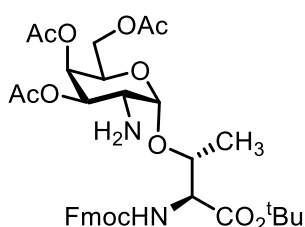
A una disolución de **49** (0.26 g, 0.34 mmol) en EtOH (10 mL) se le añadió Pd / C (50% w/w) y se le realizó un ciclo de vacío/argón. A continuación, se le pasó una corriente de H₂ y la mezcla se dejó agitando durante toda la noche. Pasado dicho tiempo, el crudo de reacción se filtró sobre Celita y se lavó con EtOH. El disolvente fue eliminado a presión reducida y el producto fue purificado por cromatografía en columna (DCM:MeOH:AcOH 98:2:3) para dar el compuesto **BB14** (0.18 g, 80 %). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.68 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 5.44 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-4), 5.35 (dd, *J* = 10.9, 3.4 Hz, 1H, H-3), 5.15 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-1), 4.98 (dd, *J* = 10.9, 3.7 Hz, 1H, H-2), 4.41 – 4.32 (m, 4H, H-5, H-β, CH₂ Fmoc), 4.27 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH Fmoc), 4.23 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-α), 4.10 – 4.02 (m, 2H, H-6), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 1.98 (s, 3H, OAc), 1.94 (s, 3H, OAc), 1.29 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 171.9 (CO), 157.9 (CO, Fmoc), 170.8 (CO), 170.8 (CO), 170.7 (CO), 144.0 (C, Ar), 143.9 (C, Ar), 141.3 (2C, Ar), 127.5 (2CH, Fmoc), 126.9 (2CH, Fmoc), 125.0 (2CH, Fmoc), 119.7 (2CH, Fmoc), 97.8 (H-1), 76.9 (C-β), 68.3 (C-4), 67.9 (C-2), 67.7 (C-3), 66.8 (CH₂ Fmoc), 66.7 (C-5), 61.8 (C-6), 58.8 (CH Fmoc), 47.1 (H-α), 19.5 (OAc), 19.3 (OAc), 19.3 (OAc), 19.2 (OAc), 17.7 (CH₃γ). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₃₃H₃₇NNaO₁₄ [M+Na]⁺: 694.2106, encontrada 694.2101.

7.4.5. Síntesis del “building block” BB15



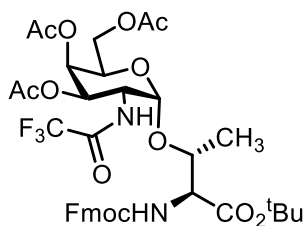
Esquema 7.33.- Esquema sintético para la preparación del “building block” BB15 utilizando el derivado **9** como precursor.

Compuesto 50



Sobre una disolución de **9** (1 g, 1.40 mmol) en THF (35 mL) se añadió agua (21 mL). La mezcla de reacción se agitó en un baño de hielo durante 15 minutos y se añadió una disolución acuosa de HCl al 33% (3.35 mL) y Zn metálico (0.92 g, 14 mmol). La disolución se agitó vigorosamente hasta la completa desaparición del producto de partida. El crudo de reacción se filtró sobre Celita y se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

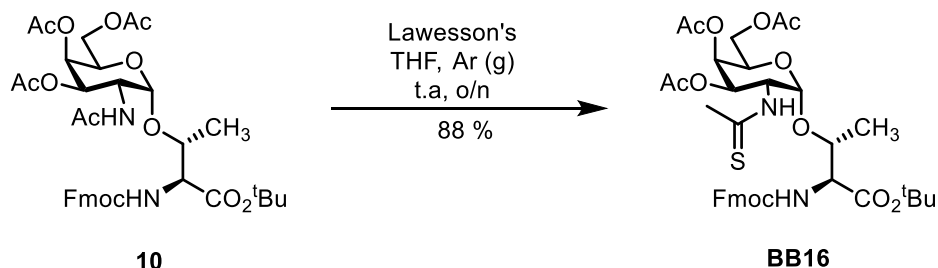
Compuesto BB15



Sobre una disolución de **50** (0.27 g, 0.39 mmol) en THF (5 mL) se añadió anhídrido trifluoroacético (110 µL, 0.67 mmol) y Et₃N (94 µL, 0.79 mmol) y la mezcla se mantuvo agitando durante 30 minutos hasta observar la completa desaparición del producto de partida por CCF. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex:AcOEt 6:4) para obtener **BB14** (0.73 g, 67 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.65 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.46 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Fmoc), 7.10 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, NH-CO-CF₃), 5.64 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, NHFmoc), 5.45 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, H-4), 5.12 (dd, *J* = 11.5, 3.2 Hz, 1H, H-3), 5.03 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-1), 4.71 – 4.60 (m, 1H, H-2), 4.54 – 4.41 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 4.32 – 4.19 (m, 4H, H-5, CH Fmoc, H-α, H-β), 4.18 – 4.06 (m, 2H, H-6), 2.21 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.48 (s, 9H, ^tBu), 1.33 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃γ). ¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 170.7 (CO), 170.4 (CO), 170.2 (CO), 169.4 (CO), 157.8 (q, ²*J*_{C-CF₃} = 37.8 Hz), 156.3 (CO,

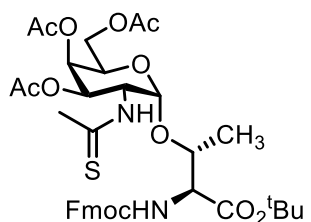
Fmoc), 143.8 (2C, Ar), 141.4 (2C, Ar), 127.8 (2CH, Fmoc), 127.1 (2CH, Fmoc), 125.1 (CH, Ar), 125.1 (CH, Ar), 120.0 (2CH, Ar), 115.6 (q, $^1J_{C-F} = 287.7$ Hz), 98.5 (C-1), 83.6 (C, ^{t} Bu), 76.6 (C- β), 68.3 (C-3), 67.5 (C-5), 67.3 (CH₂ Fmoc), 67.2 (C-4), 62.0 (C-6), 58.4 (CH Fmoc), 48.3 (C-2), 47.2 (C- α), 28.0 (3CH₃, ^{t} Bu), 20.7 (OAc), 20.6 (OAc), 20.5 (OAc), 18.1 (CH₃ γ). **HRMS (ESI⁺)** m/z calc. para C₃₇H₄₃F₃N₂NaO₁₃ [M+Na]⁺: 803.2609, encontrada 803.2610.

7.4.6. Síntesis del “building block” BB16



Esquema 7.34.- Esquema sintético para la preparación del “building block” **BB16** mediante el tratamiento de **10** con el reactivo de Lawesson's.

Compuesto BB16



Sobre una disolución de **10** (0.67 g, 0.92 mmol) en THF seco (5 mL) se añadió el reactivo de Lawesson's (0.23 g, 0.55 mmol). Se realizó un ciclo de vacío/Argón y la mezcla resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna (Hex:AcOEt 7:3) para dar **BB16** (0.60 g, 88 %). **¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.78 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc), 7.64 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc), 7.56 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, NHC(S)CH₃), 7.41 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc), 7.37 – 7.29 (m, 2H, Fmoc), 5.55 – 5.36 (m, 3H, H-2, H-4, NHFmoc), 5.25 (dd, $J = 11.3, 3.1$ Hz, 1H, H-3), 5.02 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-1), 4.45 (q, $J = 10.6, 9.1$ Hz, 2H, CH₂ Fmoc), 4.33 – 4.16 (m, 4H, H-5, H- α , H- β , CH Fmoc), 4.16 – 4.05 (m, 2H, H-6), 2.57 (s, 3H, CH₃C(S)NH), 2.20 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 3H, OAc), 1.46 (s, 9H, ^{t} Bu), 1.33 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH₃ γ). **¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃)** δ 203.6 (C=S), 170.9 (CO), 170.3 (CO), 170.3 (CO), 169.9 (CO), 156.4 (CO, Fmoc), 143.73 (C, Fmoc), 143.68 (C, Fmoc), 141.3 (2C, Fmoc), 127.8 (2CH, Fmoc), 127.1 (2CH, Fmoc), 125.1 (CH, Fmoc), 125.0 (CH, Fmoc), 120.04 (CH, Fmoc), 120.01 (CH, Fmoc), 98.7 (C-1), 83.5 (C, ^{t} Bu), 77.2 (C- β), 68.7 (C-3), 67.5 (C-5), 67.4 (CH₂ Fmoc), 67.3 (C-4), 62.0 (C-6), 58.8 (C- α), 53.4 (C-2), 47.2 (CH Fmoc), 34.4 (CH₃C(S)-NH), 28.1 (3CH₃, ^{t} Bu), 20.8

(OAc), 20.7 (OAc), 20.6 (OAc), 18.4 (CH₃γ). **HRMS (ESI⁺) m/z** calc. para C₃₇H₄₇N₂O₁₂S [M+H]⁺: 743.2844, encontrada 743.2830.

7.5 Caracterización de los glicopéptidos GP-I a GP-XI

7.5.1. Glicopéptido GP-I

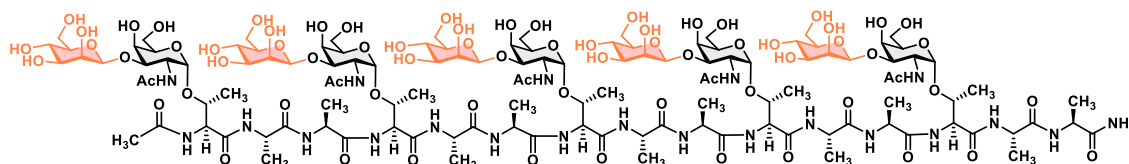


Figura 7.1.- Representación de la estructura del glicopéptido sintetizado **GP-I**.

¹H-RMN (800 MHz, H₂O + D₂O) δ 8.95 – 8.86 (m, 3H), 8.71 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.61 – 8.53 (m, 12H), 7.88 – 7.82 (m, 4H), 7.76 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 4.49 (d, *J* = 9.2 Hz, 5H), 4.41 – 4.30 (m, 15H), 4.24 – 4.17 (m, 10H), 4.10 – 4.04 (m, 10H), 3.96 – 3.91 (m, 5H), 3.85 (s, 5H), 3.78 – 3.69 (m, 20H), 3.63 – 3.59 (m, 5H), 3.58 – 3.53 (m, 5H), 3.37 – 3.32 (m, 5H), 2.12 (s, 3H), 2.07 (s, 9H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.43 – 1.34 (m, 30H), 1.32 – 1.29 (m, 15H).

HPLC-Semipreparativo Rt = 24.3 min (Phenomenex Luna C18 (2), 10 μm, 21.2x250 mm Grad: Agua + 0.1% AF / ACN 99:1 a 91:9, 30 min, 20 mL/min, λ = 212 nm).

HPLC-Analítico Rt = 4.7 min (Phenomenex BioZen Peptide XB-C18 Column, 1.7 μm, 100 x 2.1 mm, Grad: Agua + 0.1% AF / ACN 99:1 a 80:20, 10 min, 0.3 mL/min, λ = 190-400 nm).

HRMS (ESI⁺) m/z [M+2H]²⁺ calc. para C₁₂₂H₂₀₇O₇₁N₂₁: 1551.16109, encontrada 1551.16284.

7.5.2. Glicopéptido GP-II

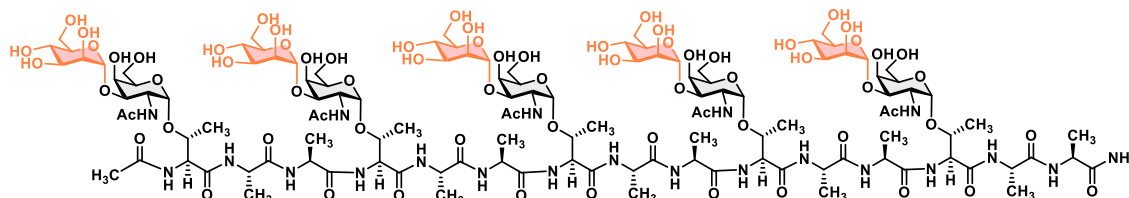


Figura 7.2.- Representación de la estructura del glicopéptido sintetizado **GP-II**.

¹H-RMN (800 MHz, H₂O + D₂O) δ 9.08 – 9.03 (m, 4H), 8.82 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.60 – 8.52 (m, 10H), 7.80 – 7.75 (m, 6H), 7.11 (s, 1H), 4.52 – 4.47 (m, 5H), 4.41 – 4.32 (m, 10H), 4.25 – 4.16 (m, 5H), 4.04 – 3.90 (m, 15H), 3.85 – 3.73 (m,

15H), 3.70 – 3.63 (m, 10H), 3.59 – 3.53 (m, 5H), 2.12 (s, 3H), 2.10 – 2.04 (m, 15H), 1.45 – 1.35 (m, 30H), 1.32 – 1.28 (m, 15H).

HPLC-Semipreparativo Rt = 21.8 min (Phenomenex Luna C18 (2), 10 μ m, 21.2x250 mm Grad: Agua + 0.1% FA / ACN 98:2 a 91:9, 30 min, 20 mL/min, λ = 212 nm).

HPLC-Analítico Rt = 4.6 min (Phenomenex BioZen Peptide XB-C18 Column, 1.7 μ m, 100 x 2.1 mm, Grad: Agua + 0.1% AF / ACN 99:1 a 80:20, 10 min, 0.3 mL/min, λ = 190-400 nm).

HRMS (ESI⁺) m/z [M+2H]²⁺ calc. para C₁₂₂H₂₀₇O₇₁N₂₁: 1551.16109, encontrada 1551.16394.

7.5.3. Glicopéptido GP-III

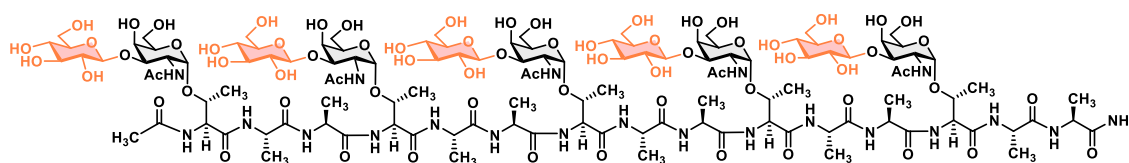


Figura 7.3.- Representación de la estructura del glicopéptido sintetizado **GP-III**.

¹H-RMN (600 MHz, H₂O + D₂O) δ 8.53 (d, J = 10.4 Hz, 4H), 8.34 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 8.28 – 8.17 (m, 10H), 7.59 – 7.49 (m, 5H), 7.44 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 4.24 – 4.16 (m, 10H), 4.11 – 4.00 (m, 15H), 3.95 – 3.86 (m, 10H), 3.79 – 3.66 (m, 10H), 3.62 – 3.54 (m, 5H), 3.48 – 3.39 (m, 15H), 3.17 – 3.06 (m, 15H), 2.96 (t, J = 9.9 Hz, 5H), 1.81 (s, 3H), 1.76 – 1.70 (m, 15H), 1.14 – 1.03 (m, 30H), 1.02 – 0.96 (m, 15H).

HPLC-Semipreparativo Rt = 28.5 min (Phenomenex Luna C18 (2), 10 μ m, 21.2x250 mm Grad: Agua + 0.1% TFA / ACN 99:1 a 92:8, 35 min, 20 mL/min, λ = 212 nm).

HPLC-Analítico Rt = 20.4 min (Phenomenex Luna C18 (2) Column, 5 μ m, 4.6 x 250 mm, Grad: Agua + 0.1% TFA / ACN 99:1 a 90:10, 30 min, 1 mL/min, λ = 212 nm).

HRMS (ESI⁺) m/z [M+2H]²⁺ calc. para C₁₂₂H₂₀₇O₇₁N₂₁: 1551.1611, encontrada 1551.1551.

7.5.4. Glicopéptido GP-IV

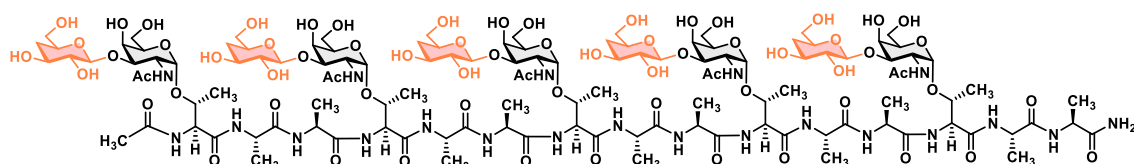


Figura 7.4.- Representación de la estructura del glicopéptido sintetizado **GP-IV**.

^1H -RMN (600 MHz, $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$) δ 8.93 – 8.86 (m, 4H), 8.70 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 8.61 – 8.50 (m, 10H), 7.96 – 7.85 (m, 5H), 7.79 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 4.51 – 4.30 (m, 25H), 4.27 – 4.16 (m, 10H), 4.12 – 4.01 (m, 10H), 3.79 – 3.58 (m, 30H), 3.17 (t, $J = 9.0$ Hz, 5H), 2.13 (s, 3H), 2.06 – 2.01 (m, 15H), 1.98 – 1.93 (m, 5H), 1.46 – 1.36 (m, 35H), 1.34 – 1.27 (m, 15H).

HPLC-Semipreparativo $R_t = 29.3$ min (Phenomenex Luna C18 (2), 10 μm , 21.2x250 mm Grad: Agua + 0.1% TFA / ACN 99:1 a 90:10, 35 min, 20 mL/min, $\lambda = 212$ nm).

HPLC-Analítico $R_t = 19.6$ min (Phenomenex Luna C18 (2) Column, 5 μm , 4.6 x 250 mm, Grad: Agua + 0.1% TFA / ACN 99:1 a 85:15, 30 min, 1 mL/min, $\lambda = 212$ nm).

HRMS (ESI^+) m/z $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ calc. para $\text{C}_{122}\text{H}_{208}\text{O}_{66}\text{N}_{21}$: 1007.7850, encontrada 1007.7854.

7.5.5. Glicopéptido GP-V

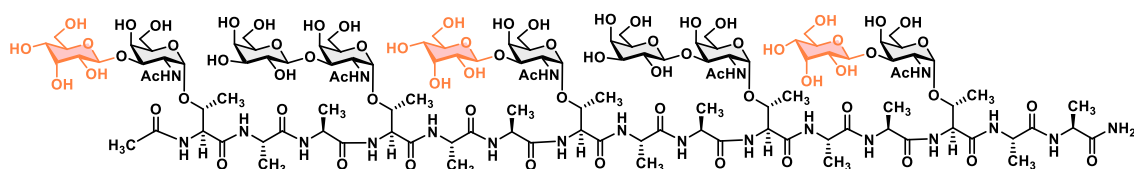


Figura 7.5.- Representación de la estructura del glicopéptido sintetizado **GP-V**.

^1H -RMN (600 MHz, D_2O) δ 4.93 – 4.88 (m, 3H), 4.80 – 4.75 (m, 3H), 4.51 – 4.46 (m, 5H), 4.44 – 4.40 (m, 5H), 4.39 – 4.32 (m, 10H), 4.25 – 4.19 (m, 10H), 4.18 – 4.12 (m, 4H), 4.11 – 4.00 (m, 10H), 3.91 – 3.84 (m, 5H), 3.78 – 3.56 (m, 30H), 3.51 (dd, $J = 9.9, 7.7$ Hz, 2H), 3.43 – 3.40 (m, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.07 – 2.02 (m, 15H), 1.43 (d, $J = 7.1$ Hz, 15H), 1.39 – 1.35 (m, 15H), 1.33 – 1.28 (m, 15H).

HPLC-Semipreparativo $R_t = 24.5$ min (Phenomenex Luna C18 (2), 10 μm , 21.2x250 mm Grad: Agua + 0.1% TFA / ACN 98:2 a 91.5:8.5, 35 min, 20 mL/min, $\lambda = 212$ nm).

HPLC-Analítico Rt = 4.6 min (Phenomenex BioZen Peptide XB-C18 Column, 1.7 μ m, 100 x 2.1 mm, Grad: Agua + 0.1% AF / ACN 99:1 a 80:20, 10 min, 0.3 mL/min, λ = 190-400 nm).

HRMS (ESI⁺) m/z [M+2H]²⁺ calc. para C₁₂₂H₂₀₇O₇₁N₂₁: 1551.16109, encontrada 1551.16138.

7.5.6. Glicopéptido GP-VI

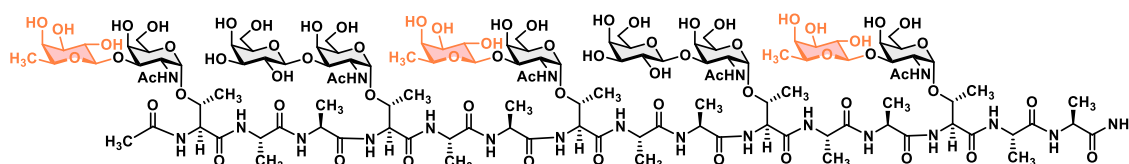


Figura 7.6.- Representación de la estructura del glicopéptido sintetizado **GP-VI**.

¹H-RMN (600 MHz, H₂O + D₂O) δ 8.88 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 8.69 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.59 – 8.46 (m, 10H), 7.90 – 7.72 (m, 6H), 7.11 (s, 1H), 4.51 – 4.29 (m, 25H), 4.27 – 4.13 (m, 15H), 4.10 – 3.97 (m, 10H), 3.81 – 3.70 (m, 25H), 3.69 – 3.61 (m, 10H), 3.51 – 3.42 (m, 5H), 2.12 (s, 3H), 2.07 – 2.01 (m, 15H), 1.45 – 1.34 (m, 30H), 1.34 – 1.25 (m, 30H).

HPLC-Semipreparativo Rt = 20.4 min (Phenomenex Luna C18 (2), 10 μ m, 21.2x250 mm Grad: Agua + 0.1% TFA / ACN 99:1 a 85:15, 30 min, 20 mL/min, λ = 212 nm).

HPLC-Analítico Rt = 5.5 min (Phenomenex BioZen Peptide XB-C18 Column, 1.7 μ m, 100 x 2.1 mm, Grad: Agua + 0.1% AF / ACN 99:1 a 80:20, 10 min, 0.3 mL/min, λ = 190-400 nm).

HRMS (ESI⁺) m/z [M+2Na]²⁺ calc. para C₁₂₂H₂₀₅O₆₈Na₂N₂₁: 1549.1507, encontrada 1549.1506.

7.5.7. Glicopéptido GP-VII

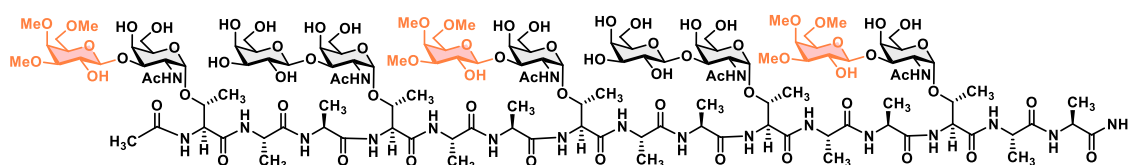


Figura 7.7.- Representación de la estructura del glicopéptido sintetizado **GP-VII**.

¹H-RMN (800 MHz, H₂O + D₂O) δ 8.91 – 8.85 (m, 4H), 8.69 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.58 – 8.49 (m, 10H), 7.97 – 7.84 (m, 5H), 7.77 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 4.50 – 4.30 (m, 20H), 4.26 – 4.19 (m, 5H), 4.18 – 4.12 (m, 5H), 4.11 – 3.98 (m, 10H), 3.96 – 3.90 (m, 5H), 3.79 – 3.70 (m, 25H), 3.69 – 3.61 (m, 5H), 3.51 –

3.48 (m, 18H), 3.47 – 3.43 (m, 5H), 3.42 (s, 6H), 3.41 (s, 3H), 3.40 – 3.35 (m, 5H), 2.13 (s, 3H), 2.04 (s, 6H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.43 (d, $J = 7.4$ Hz, 15H), 1.41 – 1.35 (m, 15H), 1.34 – 1.29 (m, 15H).

HPLC-Semipreparativo Rt = 33.9 min (Phenomenex Luna C18 (2), 10 μ m, 21.2x250 mm Grad: Agua + 0.1% FA / ACN 99:1 a 80:20, 45 min, 20 mL/min, $\lambda = 212$ nm).

HPLC-Analítico Rt = 10.2 min (Waters Sunfire C18, 3.5 μ m, 50 x 2.1 mm, Grad: Agua + 0.1% AF / ACN 99:1 a 80:20 para 10 min, 80:20 a 5:95 para 1.5 min, 5:95 a 0:100 para 0.5 min y 0:100 para 1 min, 0.35 mL/min, $\lambda = 190$ -700 nm).

HRMS (ESI⁺) m/z [M+2Na]²⁺ calc. para C₁₃₁H₂₂₃O₇₁Na₂N₂₁: 1636.2135, encontrada 1636.2138.

7.5.8. Glicopéptido GP-IX

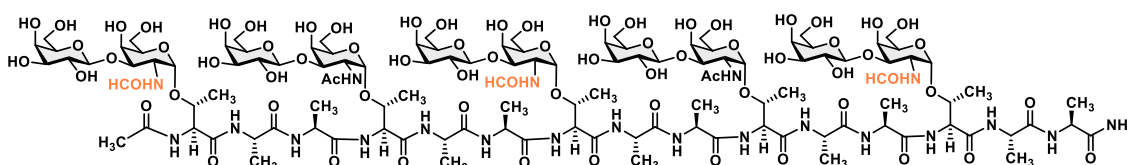


Figura 7.8.- Representación de la estructura del glicopéptido sintetizado **GP-IX**.

¹H-RMN (600 MHz, D₂O) δ 4.96 – 4.91 (m, 5H), 4.51 – 4.30 (m, 25H), 4.27 – 4.19 (m, 10H), 4.14 – 4.02 (m, 10H), 3.90 (s, 5H), 3.80 – 3.71 (m, 20H), 3.69 – 3.59 (m, 10H), 3.54 – 3.46 (m, 5H), 2.13 (2 x s (Z/E), 3H), 2.04 (s, 6H), 1.45 – 1.35 (m, 30H), 1.34 – 1.28 (m, 15H).

HPLC-Semipreparativo Rt = 21.7 min (Phenomenex Luna C18 (2), 10 μ m, 21.2x250 mm Grad: Agua + 0.1% TFA / ACN 99:1 a 90:10, 30 min, 20 mL/min, $\lambda = 212$ nm).

HPLC-Analítico Rt = 6.48 min (Waters Sunfire C18, 3.5 μ m, 50 x 2.1 mm, Grad: Agua + 0.1% AF / ACN 99:1 a 80:20 para 10 min, 0.35 mL/min, $\lambda = 190$ -700 nm).

HRMS (MALDI⁺) m/z [M+Na]⁺ calc. para C₁₁₉H₁₉₉O₇₁NaN₂₁: 3081.2499, encontrada 3081.2507.

7.5.9. Glicopéptido GP-X

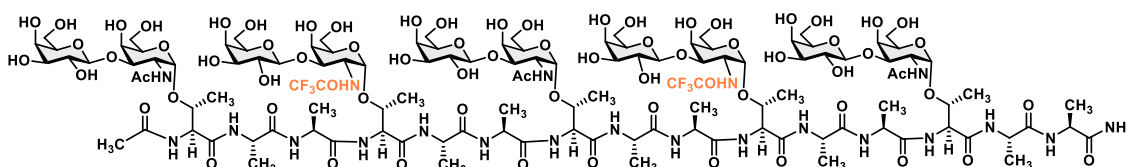


Figura 7.9.- Representación de la estructura del glicopéptido sintetizado GP-X.

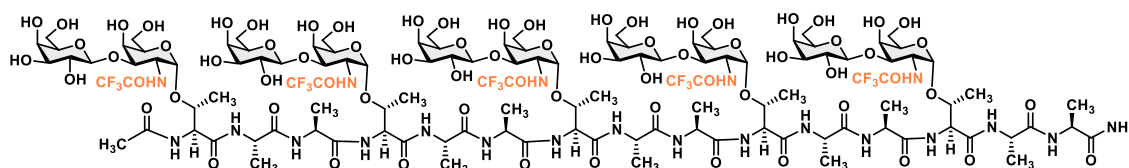
^1H -RMN (600 MHz, D_2O) δ 4.94 – 4.89 (m, 2H), 4.51 – 4.34 (m, 25H), 4.31 – 4.15 (m, 10H), 4.14 – 3.99 (m, 10H), 3.93 – 3.87 (m, 5H), 3.80 – 3.70 (m, 20H), 3.70 – 3.60 (m, 10H), 3.52 – 3.44 (m, 5H), 2.13 (s, 3H), 2.08 – 1.99 (m, 9H), 1.45 – 1.22 (m, 45H).

HPLC-Semipreparativo R_t = 18.6 min (Phenomenex Luna C18 (2), 10 μm , 21.2x250 mm Grad: Agua + 0.1% TFA / ACN 99:1 a 80:20, 40 min, 20 mL/min, λ = 212 nm).

HPLC-Analítico R_t = 7.00 min (Phenomenex BioZen Peptide XB-C18 Column, 1.7 μm , 100 x 2.1 mm, Grad: Agua + 0.1% AF / ACN 99:1 a 80:20 10 min, 0.3 mL/min, λ = 214 nm).

HRMS (ESI^+) m/z $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ calc. para $\text{C}_{122}\text{H}_{199}\text{F}_6\text{O}_{71}\text{Na}_2\text{N}_{21}$: 1627.1148, encontrada 1627.1116.

7.5.10. Glicopéptido GP-XI

**Figura 7.10.- Representación de la estructura del glicopéptido sintetizado GP-XI.**

^1H -RMN (600 MHz, D_2O) δ 4.50 – 4.33 (m, 15H), 4.32 – 4.22 (m, 10H), 4.22 – 4.08 (m, 10H), 3.93 – 3.85 (m, 5H), 3.80 – 3.71 (m, 25H), 3.70 – 3.57 (m, 10H), 3.50 – 3.43 (m, 5H), 2.12 (s, 3H), 1.43 – 1.25 (m, 45H).

HPLC-Semipreparativo R_t = 24.4 min (Phenomenex Luna C18 (2), 10 μm , 21.2x250 mm Grad: Agua + 0.1% TFA / ACN 99:1 a 85:15, 30 min, 20 mL/min, λ = 212 nm).

HPLC-Analítico R_t = 8.75 min (Waters Sunfire C18, 3.5 μm , 50 x 2.1 mm, Grad: Agua + 0.1% AF / ACN 99:1 a 80:20 10 min, 0.35 mL/min, λ = 190-700 nm).

HRMS (MALDI $^+$) m/z $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ calc. para $\text{C}_{122}\text{H}_{192}\text{F}_{15}\text{O}_{71}\text{N}_{21}$: 1686.0904, encontrada 1686.0915.

CAPÍTULO 8.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Seeberger, P. H. Chemical Glycobiology: Why Now? *Nat Chem Biol* **2009**, 5 (6), 368–372.
- (2) Schjoldager, K. T.; Narimatsu, Y.; Joshi, H. J.; Clausen, H. Global View of Human Protein Glycosylation Pathways and Functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, 21 (12), 729–749.
- (3) Smith, B. A. H.; Bertozzi, C. R. Author Correction: The Clinical Impact of Glycobiology: Targeting Selectins, Siglecs and Mammalian Glycans. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, 20 (3), 244–244.
- (4) Dwek, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem Rev* **1996**, 96 (2), 683–720.
- (5) Wolfe, S. *Gauche* Effect. Stereochemical Consequences of Adjacent Electron Pairs and Polar Bonds. *Acc Chem Res* **1972**, 5 (3), 102–111.
- (6) Rodrigues Silva, D.; de Azevedo Santos, L.; Hamlin, T. A.; Fonseca Guerra, C.; Freitas, M. P.; Bickelhaupt, F. M. The *Gauche* Effect in XCH_2CH_2X Revisited. *ChemPhysChem* **2021**, 22 (7), 641–648.
- (7) Alabugin, I. V.; Kuhn, L.; Krivoschapov, N. V.; Mehaffy, P.; Medvedev, M. G. Anomeric Effect, Hyperconjugation and Electrostatics: Lessons from Complexity in a Classic Stereoelectronic Phenomenon. *Chem Soc Rev* **2021**, 50 (18), 10212–10252.
- (8) Mo, Y. Computational Evidence That Hyperconjugative Interactions Are Not Responsible for the Anomeric Effect. *Nat Chem* **2010**, 2 (8), 666–671.
- (9) Asensio, J. L.; Cañada, F. J.; Cheng, X.; Khan, N.; Mootoo, D. R.; Jiménez-Barbero, J. Conformational Differences Between O- and C-Glycosides: The α -O-Man-(1 $\rightarrow$ 1)- β -Gal/ α -C-Man-(1 $\rightarrow$ 1)- β -Gal Case- A Decisive Demonstration of the Importance of Theexo-Anomeric Effect on the Conformation of Glycosides. *Chemistry - A European Journal* **2000**, 6 (6), 1035–1041.
- (10) Asensio, J. L.; Cañada, F. J.; García-Herrero, A.; Murillo, M. T.; Fernández-Mayoralas, A.; Johns, B. A.; Kozak, J.; Zhu, Z.; Johnson, C. R.; Jiménez-Barbero, J. Conformational Behavior of Aza- C -Glycosides: Experimental Demonstration of the Relative Role of the *Exo-Anomeric* Effect and 1,3-Type Interactions in Controlling the Conformation of Regular Glycosides. *J Am Chem Soc* **1999**, 121 (49), 11318–11329.
- (11) Schachter, H. Glycoproteins: Their Structure, Biosynthesis and Possible Clinical Implications. *Clin Biochem* **1984**, 17 (1), 3–14.

- (12) Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebersold, M.; Mohnen, D.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H. *Essentials of Glycobiology 4th Edition*, 4th ed.; 2022.
- (13) Flynn, R. A.; Pedram, K.; Malaker, S. A.; Batista, P. J.; Smith, B. A. H.; Johnson, A. G.; George, B. M.; Majzoub, K.; Villalta, P. W.; Carette, J. E.; Bertozzi, C. R. Small RNAs Are Modified with N-Glycans and Displayed on the Surface of Living Cells. *Cell* **2021**, *184* (12), 3109–3124.e22.
- (14) Xie, Y.; Chai, P.; Till, N. A.; Hemberger, H.; Lebedenko, C. G.; Porat, J.; Watkins, C. P.; Caldwell, R. M.; George, B. M.; Perr, J.; Bertozzi, C. R.; Garcia, B. A.; Flynn, R. A. The Modified RNA Base Acp3U Is an Attachment Site for N-Glycans in GlycoRNA. *Cell* **2024**, *187* (19), 5228–5237.e12.
- (15) Cummings, R. D. “Stuck on Sugars - How Carbohydrates Regulate Cell Adhesion, Recognition, and Signaling”. *Glycoconj J* **2019**, *36* (4), 241–257.
- (16) Gupta, S. K.; Bhandari, B.; Shrestha, A.; Biswal, B. K.; Palaniappan, C.; Malhotra, S. S.; Gupta, N. Mammalian Zona Pellucida Glycoproteins: Structure and Function during Fertilization. *Cell Tissue Res* **2012**, *349* (3), 665–678.
- (17) Alghazali, R.; Nugud, A.; El-Serafi, A. Glycan Modifications as Regulators of Stem Cell Fate. *Biology (Basel)* **2024**, *13* (2), 76.
- (18) Broussard, A. C.; Boyce, M. Life Is Sweet: The Cell Biology of Glycoconjugates. *Mol Biol Cell* **2019**, *30* (5), 525–529.
- (19) Gorelik, E.; Galili, U.; Raz, A. On the Role of Cell Surface Carbohydrates and Their Binding Proteins (Lectins) in Tumor Metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **2001**, *20* (3–4), 245–277.
- (20) Dugan, A. E.; Peiffer, A. L.; Kiessling, L. L. Advances in Glycoscience to Understand Viral Infection and Colonization. *Nat Methods* **2022**, *19* (4), 384–387.
- (21) Unione, L.; Moure, M. J.; Lenza, M. P.; Oyenarte, I.; Ereño-Orbea, J.; Ardá, A.; Jiménez-Barbero, J. The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Directly Binds Exogenous Sialic Acids: A NMR View. *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, *61* (18).
- (22) Wang, Y.; Liu, H.; Wang, B.; Gheyret, G.; Qin, J.; Wang, H.; Di, Y.; Wang, Y.; Wang, J.; Tan, H. Recent Advances in the Biosynthesis of Polysaccharide-Based Antimicrobial Glycoconjugate Vaccines. *Front Microbiol* **2025**, *15*.

- (23) Sokurenko, E. V.; Chesnokova, V.; Doyle, R. J.; Hasty, D. L. Diversity of the *Escherichia Coli* Type 1 Fimbrial Lectin. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272 (28), 17880–17886.
- (24) Hatton, N. E.; Baumann, C. G.; Fascione, M. A. Developments in Mannose-Based Treatments for Uropathogenic *Escherichia Coli* -Induced Urinary Tract Infections. *ChemBioChem* **2021**, 22 (4), 613–629.
- (25) 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. DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein That Enhances Trans-Infection of T Cells. *Cell* **2000**, 100 (5), 587–597.
- (26) Munkley, J.; Elliott, D. J. Hallmarks of Glycosylation in Cancer. *Oncotarget* **2016**, 7 (23), 35478–35489.
- (27) Qusairy, Z.; Rada, M. Glycosylation in Cancer: Mechanisms, Diagnostic Markers, and Therapeutic Applications. *Mol Cell Biochem* **2025**.
- (28) Ofek, I.; Hasty, D. L.; Sharon, N. Anti-Adhesion Therapy of Bacterial Diseases: Prospects and Problems. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2003**, 38 (3), 181–191.
- (29) Bermejo, I. A.; Navo, C. D.; Castro-López, J.; Guerreiro, A.; Jiménez-Moreno, E.; Sánchez Fernández, E. M.; García-Martín, F.; Hinou, H.; Nishimura, S.-I.; García Fernández, J. M.; Mellet, C. O.; Avenoz, A.; Busto, J. H.; Bernardes, G. J. L.; Hurtado-Guerrero, R.; Peregrina, J. M.; Corzana, F. Synthesis, Conformational Analysis and *in Vivo* Assays of an Anti-Cancer Vaccine That Features an Unnatural Antigen Based on an Sp²-Iminosugar Fragment. *Chem Sci* **2020**, 11 (15), 3996–4006.
- (30) Bermejo, I. A.; Guerreiro, A.; Eguskiza, A.; Martínez-Sáez, N.; Lazaris, F. S.; Asín, A.; Somovilla, V. J.; Compañón, I.; Raju, T. K.; Tadic, S.; Garrido, P.; García-Sanmartín, J.; Mangini, V.; Grosso, A. S.; Marcelo, F.; Avenoz, A.; Busto, J. H.; García-Martín, F.; Hurtado-Guerrero, R.; Peregrina, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Martínez, A.; Fiammengo, R.; Corzana, F. Structure-Guided Approach for the Development of MUC1-Glycopeptide-Based Cancer Vaccines with Predictable Responses. *JACS Au* **2024**, 4 (1), 150–163.
- (31) Guerreiro, A.; Compañón, I.; Lazaris, F. S.; Labão-Almeida, C.; Oroz, P.; Ghirardello, M.; Marques, M. C.; Corzana, F.; Bernardes, G. J. L. Non-Natural MUC1 Glycopeptide Homogeneous Cancer Vaccine with Enhanced Immunogenicity and Therapeutic Activity. *Angewandte Chemie International Edition* **2024**, 63 (49).

- (32) Leusmann, S.; Ménová, P.; Shanin, E.; Titz, A.; Rademacher, C. Glycomimetics for the Inhibition and Modulation of Lectins. *Chem Soc Rev* **2023**, 52 (11), 3663–3740.
- (33) Tamburrini, A.; Colombo, C.; Bernardi, A. Design and Synthesis of Glycomimetics: Recent Advances. *Med Res Rev* **2020**, 40 (2), 495–531.
- (34) Ritter, T. K.; Wong, C.-H. Carbohydrate-Based Antibiotics: A New Approach to Tackling the Problem of Resistance. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40 (19), 3508.
- (35) Han, T.-U.; Sam, R.; Sidransky, E. Small Molecule Chaperones for the Treatment of Gaucher Disease and GBA1-Associated Parkinson Disease. *Front Cell Dev Biol* **2020**, 8, 271.
- (36) Sánchez-Fernández, E. M.; García Fernández, J. M.; Mellet, C. O. Glycomimetic-Based Pharmacological Chaperones for Lysosomal Storage Disorders: Lessons from Gaucher, G_{M1}-Gangliosidosis and Fabry Diseases. *Chemical Communications* **2016**, 52 (32), 5497–5515.
- (37) Santana, A. G.; Robinson, K.; Vickers, C.; Deen, M. C.; Chen, H.; Zhou, S.; Dai, B.; Fuller, M.; Boraston, A. B.; Vocadlo, D. J.; Clarke, L. A.; Withers, S. G. Pharmacological Chaperones for GCase That Switch Conformation with PH Enhance Enzyme Levels in Gaucher Animal Models. *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, 61 (38).
- (38) Zhang, S.; Chen, K. Y.; Zou, X. Carbohydrate-Protein Interactions: Advances and Challenges. *Commun Inf Syst* **2021**, 21 (1), 147–163.
- (39) Sears, P.; Wong, C. H. Intervention of Carbohydrate Recognition by Proteins and Nucleic Acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93 (22), 12086–12093.
- (40) del Carmen Fernandez-Alonso, M.; Diaz, D.; Alvaro Berbis, M.; Marcelo, F.; Canada, J.; Jimenez-Barbero, J. Protein-Carbohydrate Interactions Studied by NMR: From Molecular Recognition to Drug Design. *Curr Protein Pept Sci* **2012**, 13 (8), 816–830.
- (41) Moser, H. E. Carbohydrate-Nucleic Acid Interactions. In *Carbohydrates in Chemistry and Biology*; Wiley, 2000; pp 1095–1124.
- (42) Bucior, I.; Scheuring, S.; Engel, A.; Burger, M. M. Carbohydrate–Carbohydrate Interaction Provides Adhesion Force and Specificity for Cellular Recognition. *J Cell Biol* **2004**, 165 (4), 529–537.
- (43) Hernáiz, M. J.; de la Fuente, J. M.; Barrientos, Á. G.; Penadés, S. A Model System Mimicking Glycosphingolipid Clusters to Quantify Carbohydrate

- Self-Interactions by Surface Plasmon Resonance. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41 (9), 1554–1557.
- (44) Zhang, Y.; Lu, D.; Sollogoub, M.; Zhang, Y. Carbohydrate–Carbohydrate Interaction: From Hypothesis to Confirmation; 2015, pp 238–254.
- (45) Asensio, J. L.; Ardá, A.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. Carbohydrate–Aromatic Interactions. *Acc Chem Res* **2013**, 46 (4), 946–954.
- (46) Jimenez-Barbero, J.; Junquera, E.; Martin-Pastor, M.; Sharma, S.; Vicent, C.; Penades, S. Molecular Recognition of Carbohydrates Using a Synthetic Receptor. A Model System to Understand the Stereoselectivity of a Carbohydrate–Carbohydrate Interaction in Water. *J Am Chem Soc* **1995**, 117 (45), 11198–11204.
- (47) Moser, H. E. Carbohydrate–Nucleic Acid Interactions. In *Carbohydrates in Chemistry and Biology*; Wiley, **2000**; pp 1095–1124.
- (48) Jiménez-Moreno, E.; Jiménez-Osés, G.; Gómez, A. M.; Santana, A. G.; Corzana, F.; Bastida, A.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L. A Thorough Experimental Study of CH/ π Interactions in Water: Quantitative Structure–Stability Relationships for Carbohydrate/Aromatic Complexes. *Chem Sci* **2015**, 6 (11), 6076–6085.
- (49) Jiménez-Moreno, E.; Gómez, A. M.; Bastida, A.; Corzana, F.; Jiménez-Oses, G.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L. Modulating Weak Interactions for Molecular Recognition: A Dynamic Combinatorial Analysis for Assessing the Contribution of Electrostatics to the Stability of CH– π Bonds in Water. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, 54 (14), 4344–4348.
- (50) Rojo, J.; Morales, J. C.; Penades, S. ChemInform Abstract: Carbohydrate—Carbohydrate Interactions in Biological and Model Systems. *ChemInform* **2002**, 33 (29).
- (51) Houser, J.; Kozmon, S.; Mishra, D.; Hammerová, Z.; Wimmerová, M.; Koča, J. The CH– π Interaction in Protein–Carbohydrate Binding: Bioinformatics and In Vitro Quantification. *Chemistry – A European Journal* **2020**, 26 (47), 10769–10780.
- (52) *Antifreeze Proteins Volume 1*; Ramløv, H., Friis, D. S., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2020.
- (53) Sharp, K. A. A Peek at Ice Binding by Antifreeze Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, 108 (18), 7281–7282.
- (54) Ben-Naim, A. Theory of Cold Denaturation of Proteins. *Adv Biol Chem* **2013**, 03 (01), 29–39.

- (55) Ladeira, C.; Koppen, G.; Scavone, F.; Giovannelli, L. The Comet Assay for Human Biomonitoring: Effect of Cryopreservation on DNA Damage in Different Blood Cell Preparations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **2019**, 843, 11–17.
- (56) Waagner, D.; Bouvrais, H.; Ipsen, J. H.; Holmstrup, M. Linking Membrane Physical Properties and Low Temperature Tolerance in Arthropods. *Cryobiology* **2013**, 67 (3), 383–385.
- (57) Muldrew, K.; McGann, L. E. The Osmotic Rupture Hypothesis of Intracellular Freezing Injury. *Biophys J* **1994**, 66 (2 Pt 1), 532–541.
- (58) Rios, P. R.; Siciliano Jr, F.; Sandim, H. R. Z.; Plaut, R. L.; Padilha, A. F. Nucleation and Growth during Recrystallization. *Materials Research* **2005**, 8 (3), 225–238.
- (59) Storey, K. B. Biochemistry of Natural Freeze Tolerance in Animals: Molecular Adaptations and Applications to Cryopreservation. *Biochemistry and Cell Biology* **1990**, 68 (4), 687–698.
- (60) Wilkens, C.; Ramløv, H. Seasonal Variations in Antifreeze Protein Activity and Haemolymph Osmolality in Larvae of the Beetle *Ragium Mordax* (Coleoptera: Cerambycidae). *Cryo Letters* **2008**, 29 (4), 293–300.
- (61) Yeh, Y.; Feeney, R. E. Antifreeze Proteins: Structures and Mechanisms of Function. *Chem Rev* **1996**, 96 (2), 601–618.
- (62) DeVries, A. L. Glycoproteins as Biological Antifreeze Agents in Antarctic Fishes. *Science* **1971**, 172 (3988), 1152–1155.
- (63) Cheng, C. C.; DeVries, A. L. The Role of Antifreeze Glycopeptides and Peptides in the Freezing Avoidance of Cold-Water Fish. In *Life Under Extreme Conditions*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1991; pp 1–14.
- (64) Tomchaney, A. P.; Morris, J. P.; Kang, S. H.; Duman, J. G. Purification, Composition, and Physical Properties of a Thermal Hysteresis “Antifreeze” Protein from Larvae of the Beetle *Tenebrio Molitor*. *Biochemistry* **1982**, 21 (4), 716–721.
- (65) Sun, X.; Griffith, M.; Pasternak, J. J.; Glick, B. R. Low Temperature Growth, Freezing Survival, and Production of Antifreeze Protein by the Plant Growth Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas Putida* GR12-2. *Can J Microbiol* **1995**, 41 (9), 776–784.
- (66) Yamashita, Y.; Nakamura, N.; Omiya, K.; Nishikawa, J.; Kawahara, H.; Obata, H. Identification of an Antifreeze Lipoprotein from *Moraxella* Sp. of Antarctic Origin. *Biosci Biotechnol Biochem* **2002**, 66 (2), 239–247.

- (67) Sharma, B.; Sahoo, D.; Deswal, R. Single-step Purification and Characterization of Antifreeze Proteins from Leaf and Berry of a Freeze-tolerant Shrub Seabuckthorn (*Hippophae Rhamnoides*). *J Sep Sci* **2018**, *41* (20), 3938–3945.
- (68) Wisniewski, M.; Willick, I. R.; Duman, J. G.; Livingston, D.; Newton, S. S. Plant Antifreeze Proteins. In *Antifreeze Proteins Volume 1*; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp 189–226.
- (69) DeVries, A. L.; Wohlschlag, D. E. Freezing Resistance in Some Antarctic Fishes. *Science* (1979) **1969**, *163* (3871), 1073–1075.
- (70) Harding, M. M.; Ward, L. G.; Haymet, A. D. J. Type I ‘Antifreeze’ Proteins. *Eur J Biochem* **1999**, *264* (3), 653–665.
- (71) Sicheri, F.; Yang, D. S. C. Ice-Binding Structure and Mechanism of an Antifreeze Protein from Winter Flounder. *Nature* **1995**, *375* (6530), 427–431.
- (72) Gronwald, W.; Loewen, M. C.; Lix, B.; Daugulis, A. J.; Sönnichsen, F. D.; Davies, P. L.; Sykes, B. D. The Solution Structure of Type II Antifreeze Protein Reveals a New Member of the Lectin Family. *Biochemistry* **1998**, *37* (14), 4712–4721.
- (73) Ewart, K. V.; Yang, D. S. C.; Ananthanarayanan, V. S.; Fletcher, G. L.; Hew, C. L. Ca²⁺-Dependent Antifreeze Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (28), 16627–16632.
- (74) Mahatabuddin, S.; Tsuda, S. *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation*; Iwaya-Inoue, M., Sakurai, M., Uemura, M., Eds.; Springer Singapore: Singapore, 2018; Vol. 1081.
- (75) J., C.; Doshi, M.; N., R. Ice Recrystallization Inhibitors: From Biological Antifreezes to Small Molecules. In *Recent Developments in the Study of Recrystallization*; InTech, 2013.
- (76) Sutton, R. L.; Lips, A.; Piccirillo, G.; Sztehlo, A. Kinetics of Ice Recrystallization in Aqueous Fructose Solutions. *J Food Sci* **1996**, *61* (4), 741–745.
- (77) Asakawa, H.; Sazaki, G.; Nagashima, K.; Nakatsubo, S.; Furukawa, Y. Two Types of Quasi-Liquid Layers on Ice Crystals Are Formed Kinetically. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113* (7), 1749–1753.
- (78) Hayward, J. A.; Haymet, A. D. J. The Ice/Water Interface: Molecular Dynamics Simulations of the Basal, Prism, {2021}, and {21T0} Interfaces of Ice Ih. *J Chem Phys* **2001**, *114* (8), 3713–3726.

- (79) Yasuda, I.; Endo, K.; Arai, N.; Yasuoka, K. In-Layer Inhomogeneity of Molecular Dynamics in Quasi-Liquid Layers of Ice. *Commun Chem* **2024**, 7 (1), 117.
- (80) Arsiccio, A.; McCarty, J.; Pisano, R.; Shea, J.-E. Heightened Cold-Denaturation of Proteins at the Ice–Water Interface. *J Am Chem Soc* **2020**, 142 (12), 5722–5730.
- (81) Arsiccio, A.; Pisano, R. The Ice-Water Interface and Protein Stability: A Review. *J Pharm Sci* **2020**, 109 (7), 2116–2130.
- (82) Raymond, J. A.; DeVries, A. L. Adsorption Inhibition as a Mechanism of Freezing Resistance in Polar Fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1977**, 74 (6), 2589–2593.
- (83) Raymond, J. A.; DeVries, A. L. Freezing Behavior of Fish Blood Glycoproteins with Antifreeze Properties. *Cryobiology* **1972**, 9 (6), 541–547.
- (84) Wilson, P. W. Explaining Thermal Hysteresis by the Kelvin Effect. *Cryo-Letters* **1993**, 14, 31–36.
- (85) Gibbs, J. W. On the Equilibrium of Heterogeneous Substances. *Am J Sci* **1878**, s3-16 (96), 441–458.
- (86) Kristiansen, E.; Zachariassen, K. E. The Mechanism by Which Fish Antifreeze Proteins Cause Thermal Hysteresis. *Cryobiology* **2005**, 51 (3), 262–280.
- (87) Knight, C. A.; Cheng, C. C.; DeVries, A. L. Adsorption of Alpha-Helical Antifreeze Peptides on Specific Ice Crystal Surface Planes. *Biophys J* **1991**, 59 (2), 409–418.
- (88) Knight, C. A.; Wierzbicki, A. Adsorption of Biomolecules to Ice and Their Effects upon Ice Growth. 2. A Discussion of the Basic Mechanism of “Antifreeze” Phenomena. *Cryst Growth Des* **2001**, 1 (6), 439–446.
- (89) Wu, D. W.; Duman, J. G. Activation of Antifreeze Proteins from Larvae of the Beetle *Dendroides Canadensis*. *Journal of Comparative Physiology B* **1991**, 161 (3), 279–283.
- (90) DeLuca, C. I.; Comley, R.; Davies, P. L. Antifreeze Proteins Bind Independently to Ice. *Biophys J* **1998**, 74 (3), 1502–1508.
- (91) Okamoto, R.; Orii, R.; Shibata, H.; Maki, Y.; Tsuda, S.; Kajihara, Y. Regulating Antifreeze Activity through Water: Latent Functions of the Sugars of Antifreeze Glycoprotein Revealed by Total Chemical Synthesis. *Chemistry – A European Journal* **2023**, 29 (21).

- (92) Tas, R. P.; Hendrix, M. M. R. M.; Voets, I. K. Nanoscopy of Single Antifreeze Proteins Reveals That Reversible Ice Binding Is Sufficient for Ice Recrystallization Inhibition but Not Thermal Hysteresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2023**, 120 (2).
- (93) Scotter, A. J.; Marshall, C. B.; Graham, L. A.; Gilbert, J. A.; Garnham, C. P.; Davies, P. L. The Basis for Hyperactivity of Antifreeze Proteins. *Cryobiology* **2006**, 53 (2), 229–239.
- (94) Harding, M. M.; Anderberg, P. I.; Haymet, A. D. J. ‘Antifreeze’ Glycoproteins from Polar Fish. *Eur J Biochem* **2003**, 270 (7), 1381–1392.
- (95) Chao, H.; DeLuca, C. I.; Davies, P. L.; Sykes, B. D.; Sönnichsen, F. D. Structure-function Relationship in the Globular Type III Antifreeze Protein: Identification of a Cluster of Surface Residues Required for Binding to Ice. *Protein Science* **1994**, 3 (10), 1760–1769.
- (96) Baardsnes, J.; Davies, P. L. Contribution of Hydrophobic Residues to Ice Binding by Fish Type III Antifreeze Protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2002**, 1601 (1), 49–54.
- (97) Haymet, A. D. J.; Ward, L. G.; Harding, M. M. Winter Flounder “Antifreeze” Proteins: Synthesis and Ice Growth Inhibition of Analogues That Probe the Relative Importance of Hydrophobic and Hydrogen-Bonding Interactions. *J Am Chem Soc* **1999**, 121 (5), 941–948.
- (98) Heman, C.; DeLuca, C. I.; Davies, P. L. Mixing Antifreeze Protein Types Changes Ice Crystal Morphology without Affecting Antifreeze Activity. *FEBS Lett* **1995**, 357 (2), 183–186.
- (99) Sun, T.; Lin, F.-H.; Campbell, R. L.; Allingham, J. S.; Davies, P. L. An Antifreeze Protein Folds with an Interior Network of More Than 400 Semi-Clathrate Waters. *Science (1979)* **2014**, 343 (6172), 795–798.
- (100) Mahatabuddin, S.; Fukami, D.; Arai, T.; Nishimiya, Y.; Shimizu, R.; Shibasaki, C.; Kondo, H.; Adachi, M.; Tsuda, S. Polypentagonal Ice-like Water Networks Emerge Solely in an Activity-Improved Variant of Ice-Binding Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2018**, 115 (21), 5456–5461.
- (101) Garnham, C. P.; Campbell, R. L.; Davies, P. L. Anchored Clathrate Waters Bind Antifreeze Proteins to Ice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, 108 (18), 7363–7367.
- (102) Chang, T.; Zhao, G. Ice Inhibition for Cryopreservation: Materials, Strategies, and Challenges. *Advanced Science* **2021**, 8 (6).

- (103) Alley, R. B.; Perepezko, J. H.; Bentley, C. R. Grain Growth in Polar Ice: II. Application. *Journal of Glaciology* **1986**, 32 (112), 425–433.
- (104) Alley, R. B.; Perepezko, J. H.; Bentley, C. R. Grain Growth in Polar Ice: I. Theory. *Journal of Glaciology* **1986**, 32 (112), 415–424.
- (105) Pronk, P.; Infante Ferreira, C. A.; Witkamp, G. J. A Dynamic Model of Ostwald Ripening in Ice Suspensions. *J Cryst Growth* **2005**, 275 (1–2), e1355–e1361.
- (106) Tas, R. P.; Hendrix, M. M. R. M.; Voets, I. K. Nanoscopy of Single Antifreeze Proteins Reveals That Reversible Ice Binding Is Sufficient for Ice Recrystallization Inhibition but Not Thermal Hysteresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2023**, 120 (2).
- (107) Knight, C. A.; De Vries, A. L.; Oolman, L. D. Fish Antifreeze Protein and the Freezing and Recrystallization of Ice. *Nature* **1984**, 308 (5956), 295–296.
- (108) DeVries, A. L. [21] Antifreeze Glycopeptides and Peptides: Interactions with Ice and Water; 1986; pp 293–303.
- (109) Tachibana, Y.; Fletcher, G. L.; Fujitani, N.; Tsuda, S.; Monde, K.; Nishimura, S. Antifreeze Glycoproteins: Elucidation of the Structural Motifs That Are Essential for Antifreeze Activity. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43 (7), 856–862.
- (110) Giubertoni, G.; Meister, K.; DeVries, A. L.; Bakker, H. J. Determination of the Solution Structure of Antifreeze Glycoproteins Using Two-Dimensional Infrared Spectroscopy. *J Phys Chem Lett* **2019**, 10 (3), 352–357.
- (111) Lane, A. N.; Hays, L. M.; Crowe, L. M.; Crowe, J. H.; Feeney, R. E. Conformational and Dynamic Properties of a 14 Residue Antifreeze Glycopeptide from Antarctic Cod. *Protein Science* **1998**, 7 (7), 1555–1563.
- (112) Bush, C. A.; Ralapati, S.; Matson, G. M.; Yamasaki, R. B.; Osuga, D. T.; Yeh, Y.; Feeney, R. E. Conformation of the Antifreeze Glycoprotein of Polar Fish. *Arch Biochem Biophys* **1984**, 232 (2), 624–631.
- (113) Ebbinghaus, S.; Meister, K.; Born, B.; DeVries, A. L.; Gruebele, M.; Havenith, M. Antifreeze Glycoprotein Activity Correlates with Long-Range Protein–Water Dynamics. *J Am Chem Soc* **2010**, 132 (35), 12210–12211.
- (114) Mallajosyula, S. S.; Vanommeslaeghe, K.; MacKerell, A. D. Perturbation of Long-Range Water Dynamics as the Mechanism for the Antifreeze Activity of Antifreeze Glycoprotein. *J Phys Chem B* **2014**, 118 (40), 11696–11706.
- (115) Knight, C. A.; Driggers, E.; DeVries, A. L. Adsorption to Ice of Fish Antifreeze Glycopeptides 7 and 8. *Biophys J* **1993**, 64 (1), 252–259.

- (116) Mochizuki, K.; Molinero, V. Antifreeze Glycoproteins Bind Reversibly to Ice via Hydrophobic Groups. *J Am Chem Soc* **2018**, *140* (14), 4803–4811.
- (117) Ahmed, A. I.; Yeh, Y.; Osuga, Y. Y.; Feeney, R. E. Antifreeze Glycoproteins from Antarctic Fish. Inactivation by Borate. *J Biol Chem* **1976**, *251* (10), 3033–3036.
- (118) Osuga, D. T.; Feather, M. S.; Shah, M. J.; Feeney, R. E. Modification of Galactose And N-Acetylgalactosamine Residues by Oxidation of C-6 Hydroxyls to the Aldehydes Followed by Reductive Amination: Model Systems and Antifreeze Glycoproteins. *J Protein Chem* **1989**, *8* (4), 519–528.
- (119) Wang, S.; Wen, X.; DeVries, A. L.; Bagdagulyan, Y.; Morita, A.; Golen, J. A.; Duman, J. G.; Rheingold, A. L. Molecular Recognition of Methyl α -D-Mannopyranoside by Antifreeze (Glyco)Proteins. *J Am Chem Soc* **2014**, *136* (25), 8973–8981.
- (120) Wen, X.; Wang, S.; Duman, J. G.; Arifin, J. F.; Juwita, V.; Goddard, W. A.; Rios, A.; Liu, F.; Kim, S.-K.; Abrol, R.; DeVries, A. L.; Henling, L. M. Antifreeze Proteins Govern the Precipitation of Trehalose in a Freezing-Avoiding Insect at Low Temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113* (24), 6683–6688.
- (121) Amornwittawat, N.; Wang, S.; Banatlao, J.; Chung, M.; Velasco, E.; Duman, J. G.; Wen, X. Effects of Polyhydroxy Compounds on Beetle Antifreeze Protein Activity. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1794* (2), 341–346.
- (122) Tam, R. Y.; Rowley, C. N.; Petrov, I.; Zhang, T.; Afagh, N. A.; Woo, T. K.; Ben, R. N. Solution Conformation of C-Linked Antifreeze Glycoprotein Analogues and Modulation of Ice Recrystallization. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (43), 15745–15753.
- (123) Tam, R. Y.; Ferreira, S. S.; Czechura, P.; Chaytor, J. L.; Ben, R. N. Hydration Index Δ A Better Parameter for Explaining Small Molecule Hydration in Inhibition of Ice Recrystallization. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (51), 17494–17501.
- (124) Graham, B.; Fayter, A. E. R.; Houston, J. E.; Evans, R. C.; Gibson, M. I. Facially Amphipathic Glycopolymers Inhibit Ice Recrystallization. *J Am Chem Soc* **2018**, *140* (17), 5682–5685.
- (125) Li, T.; Zhao, Y.; Zhong, Q.; Wu, T. Inhibiting Ice Recrystallization by Nanocelluloses. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (4), 1667–1674.
- (126) Walters, K. R.; Serianni, A. S.; Sformo, T.; Barnes, B. M.; Duman, J. G. A Nonprotein Thermal Hysteresis-Producing Xylomannan Antifreeze in the

- Freeze-Tolerant Alaskan Beetle *Upis Ceramboides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, 106 (48), 20210–20215.
- (127) Ishiwata, A.; Sakurai, A.; Nishimiya, Y.; Tsuda, S.; Ito, Y. Synthetic Study and Structural Analysis of the Antifreeze Agent Xylomannan from *Upis Ceramboides*. *J Am Chem Soc* **2011**, 133 (48), 19524–19535.
- (128) Carillo, S.; Casillo, A.; Pieretti, G.; Parrilli, E.; Sannino, F.; Bayer-Giraldi, M.; Cosconati, S.; Novellino, E.; Ewert, M.; Deming, J. W.; Lanzetta, R.; Marino, G.; Parrilli, M.; Randazzo, A.; Tutino, M. L.; Corsaro, M. M. A Unique Capsular Polysaccharide Structure from the Psychrophilic Marine Bacterium *Colwellia Psychrerythraea* 34H That Mimics Antifreeze (Glyco)Proteins. *J Am Chem Soc* **2015**, 137 (1), 179–189.
- (129) Meister, K.; DeVries, A. L.; Bakker, H. J.; Drori, R. Antifreeze Glycoproteins Bind Irreversibly to Ice. *J Am Chem Soc* **2018**, 140 (30), 9365–9368.
- (130) Gage, A. A.; Baust, J. Mechanisms of Tissue Injury in Cryosurgery. *Cryobiology* **1998**, 37 (3), 171–186.
- (131) Kaiser, J. New Prospects for Putting Organs on Ice. *Science* (1979) **2002**, 295 (5557), 1015–1015.
- (132) Biggs, C. I.; Bailey, T. L.; Ben Graham; Stubbs, C.; Fayter, A.; Gibson, M. I. Polymer Mimics of Biomacromolecular Antifreezes. *Nat Commun* **2017**, 8 (1), 1546.
- (133) Deller, R. C.; Vatish, M.; Mitchell, D. A.; Gibson, M. I. Synthetic Polymers Enable Non-Vitreous Cellular Cryopreservation by Reducing Ice Crystal Growth during Thawing. *Nat Commun* **2014**, 5 (1), 3244.
- (134) Chang, T.; Zhao, G. Ice Inhibition for Cryopreservation: Materials, Strategies, and Challenges. *Advanced Science* **2021**, 8 (6).
- (135) Liu, Z.; Zheng, X.; Wang, J. Bioinspired Ice-Binding Materials for Tissue and Organ Cryopreservation. *J Am Chem Soc* **2022**, 144 (13), 5685–5701.
- (136) Tomalty, H. E.; Hamilton, E. F.; Hamilton, A.; Kukal, O.; Allen, T.; Walker, V. K. Kidney Preservation at Subzero Temperatures Using a Novel Storage Solution and Insect Ice-Binding Proteins. *Cryo Letters* **2017**, 38 (2), 100–107.
- (137) Amir, G.; Rubinsky, B.; Basheer, S. Y.; Horowitz, L.; Jonathan, L.; Feinberg, M. S.; Smolinsky, A. K.; Lavee, J. Improved Viability and Reduced Apoptosis in Sub-Zero 21-Hour Preservation of Transplanted Rat Hearts Using Anti-Freeze Proteins. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **2005**, 24 (11), 1915–1929.

- (138) Phippen, S. W.; Stevens, C. A.; Vance, T. D. R.; King, N. P.; Baker, D.; Davies, P. L. Multivalent Display of Antifreeze Proteins by Fusion to Self-Assembling Protein Cages Enhances Ice-Binding Activities. *Biochemistry* **2016**, 55 (49), 6811–6820.
- (139) Berger, T.; Meister, K.; DeVries, A. L.; Eves, R.; Davies, P. L.; Drori, R. Synergy between Antifreeze Proteins Is Driven by Complementary Ice-Binding. *J Am Chem Soc* **2019**, 141 (48), 19144–19150.
- (140) Graziano, G. On the Superhydrophobicity of Tetrafluoromethane. *Chem Phys Lett* **2008**, 460 (4–6), 470–473.
- (141) Crich, D.; Chandrasekera, N. S. Mechanism of 4,6- O -Benzylidene-Directed B-Mannosylation as Determined by A-Deuterium Kinetic Isotope Effects. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43 (40), 5386–5389.
- (142) Cai, H.; Huang, Z.; Shi, L.; Zou, P.; Zhao, Y.; Kunz, H.; Li, Y. Synthesis of Tn/T Antigen MUC1 Glycopeptide BSA Conjugates and Their Evaluation as Vaccines. *European J Org Chem* **2011**, 2011 (20–21), 3685–3689.
- (143) Krumb, M.; Jäger, M.; Voss, A.; Immig, L.; Peters, K.; Kowalczyk, D.; Bufe, A.; Opatz, T.; Holst, O.; Vogel, C.; Peters, M. Total Synthesis of a Partial Structure from Arabinogalactan and Its Application for Allergy Prevention. *Chemistry – A European Journal* **2021**, 27 (3), 928–933.
- (144) Ren, B.; Wang, M.; Liu, J.; Ge, J.; Zhang, X.; Dong, H. Zemplén Transesterification: A Name Reaction That Has Misled Us for 90 Years. *Green Chemistry* **2015**, 17 (3), 1390–1394.
- (145) Chen, H.; Xian, T.; Zhang, W.; Si, W.; Luo, X.; Zhang, B.; Zhang, M.; Wang, Z.; Zhang, J. An Efficient Method for the Synthesis of Pyranoid Glycals. *Carbohydr Res* **2016**, 431, 42–46.
- (146) Zhao, J.; Wei, S.; Ma, X.; Shao, H. A Mild and Environmentally Benign Method for the Synthesis of Glycals in PEG-600/H₂O. *Green Chemistry* **2009**, 11 (8), 1124.
- (147) Plattner, C.; Höfener, M.; Sewald, N. One-Pot Azidochlorination of Glycals. *Org Lett* **2011**, 13 (4), 545–547.
- (148) Paulsen, H.; Adermann, K. ChemInform Abstract: Synthesis of O-Glycopeptides of the N-Terminus of Interleukin-2. *ChemInform* **1989**, 20 (46).
- (149) Das, R.; Mukhopadhyay, B. Chemical O-Glycosylations: An Overview. *ChemistryOpen* **2016**, 5 (5), 401–433.

- (150) Crich, D.; Dudkin, V. Efficient, Diastereoselective Chemical Synthesis of a β -Mannopyranosyl Phosphoisoprenoid. *Org Lett* **2000**, 2 (24), 3941–3943.
- (151) Nigudkar, S. S.; Demchenko, A. V. Stereocontrolled 1,2-Cis Glycosylation as the Driving Force of Progress in Synthetic Carbohydrate Chemistry. *Chem Sci* **2015**, 6 (5), 2687–2704.
- (152) Eby, R.; Schuerch, C. The Use of 1-O-Tosyl-d-Glucopyranose Derivatives in α -d-Glucoside Synthesis. *Carbohydr Res* **1974**, 34 (1), 79–90.
- (153) Chatterjee, S.; Moon, S.; Hentschel, F.; Gilmore, K.; Seeberger, P. H. An Empirical Understanding of the Glycosylation Reaction. *J Am Chem Soc* **2018**, 140 (38), 11942–11953.
- (154) Venketesh, S.; Dayananda, C. Properties, Potentials, and Prospects of Antifreeze Proteins. *Crit Rev Biotechnol* **2008**, 28 (1), 57–82.
- (155) Ge, J.-T.; Li, Y.-Y.; Tian, J.; Liao, R.-Z.; Dong, H. Synthesis of Deoxyglycosides by Desulfurization under UV Light. *J Org Chem* **2017**, 82 (13), 7008–7014.
- (156) Kovác, P.; Yeh, H. J.; Glaudemans, C. P. Synthesis of Methyl O-(3-Deoxy-3-Fluoro-Beta-D-Galactopyranosyl)-(1----6)-Beta-D- Galactopyranoside and Methyl O-(3-Deoxy-3-Fluoro-Beta-D-Galactopyranosyl)-(1----6)-O-Beta-D- Galactopyranosyl-(1----6)-Beta-D-Galactopyranoside. *Carbohydr Res* **1985**, 140 (2), 277–288.
- (157) Dess, D. B.; Martin, J. C. Readily Accessible 12-I-5 Oxidant for the Conversion of Primary and Secondary Alcohols to Aldehydes and Ketones. *J Org Chem* **1983**, 48 (22), 4155–4156.
- (158) Ferraz, H. M. C.; Muzzi, R. M.; de O. Vieira, T.; Viertler, H. A Simple and Efficient Protocol for Epoxidation of Olefins Using Dimethyldioxirane. *Tetrahedron Lett* **2000**, 41 (26), 5021–5023.
- (159) Jiang, L.; Kuhlman, B.; Kortemme, T.; Baker, D. A “Solvated Rotamer” Approach to Modeling Water-mediated Hydrogen Bonds at Protein–Protein Interfaces. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2005**, 58 (4), 893–904.
- (160) Sudibya, H. G.; Ma, J.; Dong, X.; Ng, S.; Li, L.-J.; Liu, X.-W.; Chen, P. Interfacing Glycosylated Carbon-Nanotube-Network Devices with Living Cells to Detect Dynamic Secretion of Biomolecules. *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, 48 (15), 2723–2726.
- (161) Krumb, M.; Lucas, T.; Opatz, T. Visible Light Enables Aerobic Iodine Catalyzed Glycosylation. *European J Org Chem* **2019**, 2019 (28), 4517–4521.

- (162) Ohira, S.; Yamaguchi, Y.; Takahashi, T.; Tanaka, H. The Chemoselective O-Glycosylation of Alcohols in the Presence of a Phosphate Diester and Its Application to the Synthesis of Oligomannosylated Phosphatidyl Inositols. *Tetrahedron* **2015**, *71* (37), 6602–6611.
- (163) Nielsen, M. M.; Holmstrøm, T.; Pedersen, C. M. Stereoselective O-Glycosylations by Pyrylium Salt Organocatalysis. *Angew Chem Int Ed Engl* **2022**, *61* (6), e202115394.
- (164) Liu, S.-X.; Tsai, Y.-T.; Lin, Y.-T.; Li, J.-Y.; Chang, C.-C. Design and Synthesis of Trivalent Tn Glycoconjugate Polymers by Nitroxide-Mediated Polymerization. *Tetrahedron* **2019**, *75* (52), 130776.
- (165) Plattner, C.; Höfener, M.; Sewald, N. One-Pot Azidochlorination of Glycals. *Org Lett* **2011**, *13* (4), 545–547.
- (166) Tavernaro, I.; Hartmann, S.; Sommer, L.; Hausmann, H.; Rohner, C.; Ruehl, M.; Hoffmann-Roeder, A.; Schlecht, S. Synthesis of Tumor-Associated MUC1-Glycopeptides and Their Multivalent Presentation by Functionalized Gold Colloids. *Org Biomol Chem* **2015**, *13* (1), 81–97.
- (167) Straßburger, D.; Glaffig, M.; Stergiou, N.; Bialas, S.; Besenius, P.; Schmitt, E.; Kunz, H. Synthetic MUC1 Antitumor Vaccine with Incorporated 2,3-Sialyl-T Carbohydrate Antigen Inducing Strong Immune Responses with Isotype Specificity. *Chembiochem* **2018**.
- (168) Dziadek, S.; Brocke, C.; Kunz, H. Biomimetic Synthesis of the Tumor-Associated (2,3)-Sialyl-T Antigen and Its Incorporation into Glycopeptide Antigens from the Mucins MUC1 and MUC4. *Chemistry – A European Journal* **2004**, *10* (17), 4150–4162.
- (169) Nalli, Y.; Bashir Mir, K.; Amin, T.; Gannedi, V.; Jameel, E.; Goswami, A.; Ali, A. Divergent Synthesis of Fractionated Cannabis Sativa Extract Led to Multiple Cannabinoids C-&O-Glycosides with Anti-Proliferative/Anti-Metastatic Properties. *Bioorg Chem* **2024**, *143*, 107030.
- (170) Buda, S.; Gołębiowska, P.; Mlynarski, J. Application of the 2-Nitrobenzyl Group in Glycosylation Reactions: A Valuable Example of an Arming Participating Group. *European J Org Chem* **2013**, *2013* (19), 3988–3991.
- (171) Ge, J.-T.; Li, Y.-Y.; Tian, J.; Liao, R.-Z.; Dong, H. Synthesis of Deoxyglycosides by Desulfurization under UV Light. *J Org Chem* **2017**, *82* (13), 7008–7014.
- (172) Hirschmann, R.; Nicolaou, K. C.; Pietranico, S.; Leahy, E. M.; Salvino, J.; Arison, B.; Cichy, M. A.; Spoors, P. G.; Shakespeare, W. C. De Novo Design and Synthesis of Somatostatin Non-Peptide Peptidomimetics

- Utilizing .Beta.-D-Glucose as a Novel Scaffolding. *J Am Chem Soc* **1993**, *115* (26), 12550–12568.
- (173) Stick, R. V.; Stubbs, K. A. From Glycoside Hydrolases to Thioglycoligases: The Synthesis of Thioglycosides. *Tetrahedron Asymmetry* **2005**, *16* (2), 321–335.
- (174) Krumb, M.; Jäger, M.; Voss, A.; Immig, L.; Peters, K.; Kowalczyk, D.; Bufe, A.; Opatz, T.; Holst, O.; Vogel, C.; Peters, M. Total Synthesis of a Partial Structure from Arabinogalactan and Its Application for Allergy Prevention. *Chemistry – A European Journal* **2021**, *27* (3), 928–933.
- (175) Brocke, C.; Kunz, H. Synthetic Glycopeptides of the Tandem Repeat Sequence of the Epithelial Mucin MUC4 with Tumour-Associated Carbohydrate Antigens. *Synlett* **2003**, No. 13, 2052–2056.
- (176) Tracz, A.; Malinowska, M.; Leśniak, S.; Zawisza, A. Aziridine Ring Opening as Regio- and Stereoselective Access to C-Glycosyl-Aminoethyl Sulfide Derivatives. *Molecules* **2022**, *27* (6), 1764.
- (177) D'Angelo, K. A.; Taylor, M. S. Borinic Acid-Catalyzed Stereo- and Site-Selective Synthesis of β -Glycosylceramides. *Chemical Communications* **2017**, *53* (44), 5978–5980.
- (178) Li, S.; Wang, Y.; Zhong, L.; Wang, S.; Liu, Z.; Dai, Y.; He, Y.; Feng, Z. Boron-Promoted Umpolung Reaction of Sulfonyl Chlorides for the Stereospecific Synthesis of Thioglycosides via Reductive Deoxygenation Coupling Reactions. *Org Lett* **2022**, *24* (13), 2463–2468.
- (179) Singh, A. K.; Kandasamy, J. Palladium Catalyzed Stereocontrolled Synthesis of C -Aryl Glycosides Using Glycals and Arenediazonium Salts at Room Temperature. *Org Biomol Chem* **2018**, *16* (28), 5107–5112.
- (180) Meng, S.; Zhong, W.; Yao, W.; Li, Z. Stereoselective Phenylselenoglycosylation of Glycals Bearing a Fused Carbonate Moiety toward the Synthesis of 2-Deoxy- β -Galactosides and β -Mannosides. *Org Lett* **2020**, *22* (8), 2981–2986.
- (181) Chen, Q.; Lan, P.; Tan, S.; Banwell, M. G. The Palladium-Catalyzed Glycosylation of Halotropones. *Org Lett* **2023**, *25* (2), 384–388.
- (182) Loke, I.; Park, N.; Kempf, K.; Jagusch, C.; Schobert, R.; Laschat, S. Influence of Steric Parameters on the Synthesis of Tetramates from α -Amino- β -Alkoxy-Esters and Ph₃PCCO. *Tetrahedron* **2012**, *68* (2), 697–704.