

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

Síntesis de nanoestructuras basadas en carbohidratos y estudio de la interacción con viscumina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mario Deir-Kaspar Prieto

Directores

María José Hernáiz Gómez-Dégano

Ángel Rumbero Sánchez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACIA



Memoria que para optar al Grado de

DOCTOR EN FARMACIA

presenta

MARIO DEIR-KASPAR PRIETO



La Prof. Dra. D^a María José Hernáiz Gómez-Dégano, Prof. Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, como **TUTOR** y **DIRECTORA** y el Prof. Dr. D. Ángel Rumbero Sánchez, Prof. Titular del Departamento de Química Orgánica C-I de la Universidad Autónoma de Madrid, como **CODIRECTOR**.

HACEN CONSTAR:

Que el Trabajo Experimental titulado

**SÍNTESIS DE NANOESTRUCTURAS BASADAS EN CARBOHIDRATOS Y
ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN CON VISCUMINA.**

presentado por D. Mario Deir-Kaspar Prieto presenta la calidad suficiente para ser defendido como Trabajo Original de Investigación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Madrid, a 5 de Noviembre de 2014.

Fdo. Prof. Hernáiz

Fdo. Prof. Rumbero

ASIGNATURAS DE LOS CURSOS DE DOCTORADO 2009.

CONCEPTOS BÁSICOS EN QUÍMICA SOSTENIBLE.

La Química Sostenible es un concepto relativamente moderno, por eso es importante establecer unas bases a partir de las cuales sea posible desarrollar compuestos, metodologías y alternativas que permitan llevar a cabo procesos químicos más respetuosos con el medio ambiente.

APLICACIONES INDUSTRIALES.

El objetivo último de los procesos químicos es la aplicación industrial de los mismos. Del mismo modo, esta asignatura permite apreciar la importancia de desarrollar procesos industriales respetuosos con el medio ambiente y cómo en los últimos años, la Química Sostenible se está introduciendo cada vez más en las diferentes industrias.

MICROONDAS. PROCESOS SIN DISOLVENTE.

Mediante el empleo de equipos de microondas adaptados a síntesis química se pueden llevar a cabo reacciones que con medios convencionales producirían un enorme gasto de materia y energía, por tanto en esta asignatura vemos las ventajas de las reacciones con microondas y sin disolvente para la Química Sostenible.

MICROORGANISMOS EN BIOTRANSFORMACIONES.

Las células microbianas se han demostrado muy útiles en la síntesis de determinados compuestos. Además, el desarrollo actual de la ingeniería genética ha permitido la aparición de células mejoradas para el empleo en este tipo de procesos. Así pues, en esta asignatura se ha podido apreciar la utilidad de las células para llevar a cabo reacciones químicas respetuosas con el medio ambiente.

POLÍMEROS ORGÁNICOS. APLICACIONES EN QUÍMICA SOSTENIBLE.

En esta asignatura hemos estudiado las diferentes vías de síntesis y métodos de caracterización de reactivos/catalizadores soportados, así como las principales aplicaciones de estos materiales en Química sostenible.

BIOTRANSFORMACIONES INDUSTRIALES.

En esta asignatura se ha podido apreciar el empleo de enzimas en los procesos industriales. Así mismo, esta asignatura permite conocer las distintas técnicas de procesos de escalado en las reacciones enzimáticas y su gran desarrollo.

CATÁLISIS ENZIMÁTICA.

En esta asignatura se ha podido analizar la aplicación de las enzimas como catalizadores biológicos de reacciones químicas. Las enzimas son muy versátiles, capaces de llevar a cabo una gran diversidad de procesos químicos, por eso en los últimos años ha demostrado su gran capacidad para desarrollar la Química Sostenible.

ABREVIATURAS

ASN	asparagina.
ASP	aspártico.
CCF	cromatografía en capa fina.
COSY	correlation spectroscopy.
DAN	1,5 diaminonaftaleno.
DEAD	azodicarboxilato de dietilo.
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer.
DMF	dimetilformamida.
DRC	dominio de reconocimiento de carbohidratos.
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
ELLA	enzyme-linked lectin assay.
EM	espectrometría de masas.
Fc	canal de flujo.
FRET	fluorescence resonance energy transfer.
Gal	galactosa.
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina.
Gb3	globotriaosilceramida.
Glc	glucosa.
GLN	glutamina.
HBSP	tampón 10 mM HEPES, 150mM NaCl, 0.005% tensioactivo P20, pH=7.4.
HEPES	ácido 4(2-hydroxyethyl)-1-piperazinetanosulfónico.
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation.
HMQC	heteronuclear multiple quantum correlation.
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución.
HSQC	heteronuclear single quantum correlation.
ITC	isothermal titration calorimetry.
kDa	kilodalton.

Man	manosa.
NHS	<i>N</i> -hidroxisulfosuccinimida.
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy.
PANAM	dendrimeros de poli(amidoamina).
PM	peso molecular.
QSAR	quantitative structure-activity relationship.
ROESY	rotating-frame overhauser enhancement spectroscopy.
RMN	resonancia magnética nuclear.
RMN-H¹	resonancia magnética nuclear de protones.
RMN-C¹³	resonancia magnética nuclear de C ¹³ .
RU	unidades de respuesta o de resonancia.
SHC	Sonogashira - Heck - Cassar.
S_N2	sustitución nucleofílica tipo 2.
SPR	surface plasmon resonance.
STD	saturation transfer difference.
TF	antígeno Thomsen-Friedenreich.
TMS	tetrametilsilano.
Tn	antígeno GalNAc.
TOCSY	total correlation spectroscopy.
tr-NOE	transferencia del efecto nuclear overhauser.
TYR	tirosina.
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano.
VAA	lectina de <i>Viscum album</i> .
WGA	aglutinina del germen de trigo.

ÍNDICE

I- Introducción

I.1- Importancia biológica de los carbohidratos.

I.2- Neoglicoconjugados multivalentes.

I.2.1- Definición y tipos de neoglicoconjugados multivalentes.

I.2.2- Aplicaciones de los neoglicoconjugados multivalentes.

I.3- Dendrímeros como neoglicoconjugados multivalentes para el estudio de su implicación en procesos de reconocimiento molecular.

I.3.1- Definición de dendrímero.

I.3.2- Síntesis y aplicaciones de los dendrímeros.

I.3.3- Glicodendrímeros. Clasificación y aplicaciones.

I.3.3.1- Glicodendrímeros con núcleo alifático.

A) Núcleo de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y sus derivados.

B) Núcleo con grupos amino.

C) Núcleo de pentaeritritol y sus derivados.

D) Núcleo de derivados de lisina.

E) Núcleo de carbosilano.

I.3.3.2- Glicodendrímeros con núcleo aromático.

A) Glicodendrímeros obtenidos por ciclotrimerización intermolecular.

B) Glicodendrímeros obtenidos por reacciones de acoplamiento cruzado.

I.4- Estudio de interacciones carbohidrato-proteína.

I.4.1- Introducción a las proteínas de unión a carbohidratos. Lectinas.

I.4.2- Resonancia de plasmón superficial.

I.4.3- Resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación.

I.4.4- Fluorescencia.

I.4.5- Calorimetría isoterma de titulación.

I.5- Objetivos.

I.6- Resumen en inglés.

II- Materiales y métodos.

II. 1-Materiales.

II.2- Síntesis química de glicoconjugados y glicodendrimeros.

II.2.1- Funcionalización de la lactosa.

II.2.2- Síntesis de los *cores* funcionalizados con grupo acetileno.

II.2.3- Síntesis de los *cores* funcionalizados con cloruro de ácido.

II.2.4- Síntesis de glicodendrimeros por cicloadición 1,3-dipolar.

II.2.5- Síntesis de glicodendrimeros por reacción de amidación.

II. 3- Resonancia de plasmón superficial.

II.4- Resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación.

II. 5- Fluorescencia.

II.6- Calorimetría isoterma de titulación.

II.7- Modelado molecular.

III. Resultados y discusión.

III.1- Síntesis química de glicoconjugados y glicodendrimeros.

III.2- Resonancia de plasmón superficial.

III.3- Resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación.

III.4- Fluorescencia.

III.5- Calorimetría isoterma de titulación.

III.6- Modelado molecular.

IV. Conclusiones.

V. Bibliografía.

I- INTRODUCCIÓN

I.1- Importancia biológica de los carbohidratos.

En la naturaleza existen cuatro clases importantes de macromoléculas: ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y lípidos. A diferencia de los ácidos nucleicos y las proteínas que presentan una disposición lineal con un único tipo de unión de sus unidades constitutivas, los polisacáridos presentan estructuras altamente ramificadas, cuyas unidades monoméricas se puede unir unas a otras por diferentes posiciones y con diferente estereoquímica. Esta complejidad permite a los carbohidratos presentar variaciones casi ilimitadas en su estructura y, por tanto, una gran cantidad de información molecular.

Los carbohidratos constituyen el tipo de biomoléculas más abundantes en el planeta. Juegan papeles muy diversos en la naturaleza, como reservas energéticas, reconocimiento molecular para el tráfico intracelular o en las interacciones que se producen entre microorganismos patógenos y virus con la superficie de las células de mamíferos.¹ Los carbohidratos, presentes tanto dentro como en la superficie de las células, median en multitud de procesos biológicos que son fundamentales tanto en el mantenimiento de la salud como en las distintas patologías de los seres vivos (Figura 1).^{2, 3} Normalmente los carbohidratos están unidos covalentemente a otras moléculas como proteínas o lípidos, en forma de glicoproteínas, proteoglicanos o glicolípidos, formando lo que conocemos como glicoconjugados. La estructura molecular y supramolecular de estos glicoconjugados les confieren una importante propiedad, la multivalencia.⁴⁻⁶ Generalmente, la valencia de una partícula (por ejemplo, una molécula pequeña, oligosacárido, proteína, ácido nucleico, lípido, etc.) puede ser definida como el número de unidades estructurales separadas de un mismo tipo que pueden interaccionar con otras partículas mediante interacciones ligando-receptor.⁷ De este modo, podemos considerar que una molécula que tenga dos copias idénticas y unidas de componentes de unión puede clasificarse como una entidad divalente. De forma similar, las interacciones multivalente o polivalentes pueden definirse como asociaciones simultáneas específicas de múltiples ligandos (o epítomos) presentes en una construcción molecular o una superficie biológica que se unen de forma cooperativa a múltiples receptores expresados en una unidad complementaria. La ubicuidad de estas interacciones multivalentes a distintos niveles en numerosos mecanismos biológicos testifican su papel esencial. De hecho, la multivalencia en la naturaleza es a menudo expresada en forma de fractales o

estructuras “dendríticas” que representan quizás la topología más representativa observada en el reino animal y vegetal.⁸

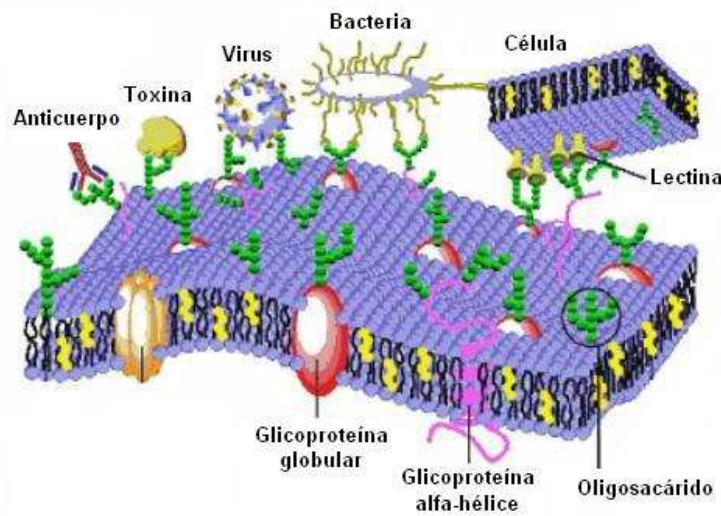


Figura 1. Representación de algunas de las interacciones moleculares que ocurren en la membrana celular donde participan glicoconjugados.

Aunque los carbohidratos y sus correspondientes formas glicoconjugadas han sido consideradas durante mucho tiempo como meras matrices de relleno o elementos post-transcripcionales accesorios en glicoproteínas, que servían para protegerlas de una degradación prematura, ha quedado claro que tanto estas glicoproteínas como los glicolípidos o los glicosaminoglicanos glicoconjugados tienen una gran variedad de funciones biológicas adicionales. De hecho los carbohidratos están expresados en la mayoría de las superficies celulares de los mamíferos, y se unen a proteínas o lípidos de membrana formando glicoproteínas o glicolípidos respectivamente; también pueden estar conjugados a estas entidades celulares formando proteoglicanos embebidos en la membrana celular y agregados de forma ramificada. Además, estos oligosacáridos constituyen transductores de señales entre el medio extra e intracelular.^{9, 10} Estas estructuras glicosiladas son la diana de la presentación inicial ante microorganismos, toxinas y anticuerpos, también controlan la vida media de las proteínas o son parte esencial de mecanismos de unión específica. Además se ha observado su importancia en el reconocimiento intercelular, en la señalización celular y como ligandos para infecciones víricas o bacterianas.^{11, 12} Por tanto, constituyen la primera línea de contacto

para la adhesión y colonización tisular de numerosos patógenos que expresan proteínas de unión a carbohidratos o lectinas. De hecho, muchos microorganismos infecciosos se valen o evitan los mecanismos de defensa inmune imitando, con sus propias estructuras glicosídicas, a importantes receptores o determinantes antigénicos del huésped. Como consecuencia de esto los patógenos son transportados a sus órganos diana por el propio sistema de transporte celular del organismo infectado.

A pesar de su crítica importancia, las interacciones carbohidrato-proteína están caracterizadas paradójicamente por unas constantes de asociación relativamente débiles (mili-micromolar).^{13, 14} En la naturaleza normalmente se compensa esta situación mediante la exposición de numerosas copias de los mismos carbohidratos que actúan como ligandos en los dominios extracelulares. Consecuentemente, estas interacciones se convierten en unas fuerzas de atracción muy potentes, reforzadas de forma natural, cuando varias copias del ligando se presentan a receptores agrupados de forma similar (Figura 2). Este fenómeno, resultado de un efecto sinérgico y cooperativo, se conoce como “efecto dendrítico o glicocluster”,⁶ y se observó por primera vez en los receptores de asialoglicoproteínas de los hepatocitos.¹⁵ En su versión más extendida, está normalmente asumido que este efecto tiene su origen en la afinidad aumentada de un glicósido multivalente hacia su dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) ocupando completamente el sitio activo en un momento determinado. Está ampliamente aceptado que este fenómeno tiene su base en una estabilización por efectos de entrecruzamiento del glicocluster de tipo macroscópico. Es un hecho establecido que la multivalencia ofrece numerosos beneficios en términos de afinidad y selectividad hacia el receptor frente a las interacciones monovalentes, y puede inducir una organización particular de la superficie celular muy importante en el control de las vías de transducción de señales entre células.¹⁶

Sorprendentemente los mamíferos sólo emplean nueve monosacáridos diferentes, que se combinan en una ingente cantidad de estructuras diferentes. Las variaciones en la configuración anomérica y los enlaces de unión entre los monosacáridos son los responsables de desvelar los variados “glicocódigos” existentes.¹⁷ Como consecuencia de esto, las diferentes arquitecturas y expresiones topológicas que se obtienen son el origen de la elevada especificidad y selectividad requerida para una interacción determinada. También es interesante resaltar que incluso en glicanos tan complejos como Man₉GlcNAc₂, sólo una parte de la estructura esté implicada en estos procesos de

unión, e incluso a veces sólo los grupos periféricos se ven involucrados en la unión al centro activo del receptor. Por tanto, las interacciones multivalentes se entienden como una estrategia omnipresente que ha evolucionado en la naturaleza para un sinnúmero de funciones diferentes, y que provee de numerosos beneficios y funciones únicas que no se pueden obtener mediante interacciones monovalentes.

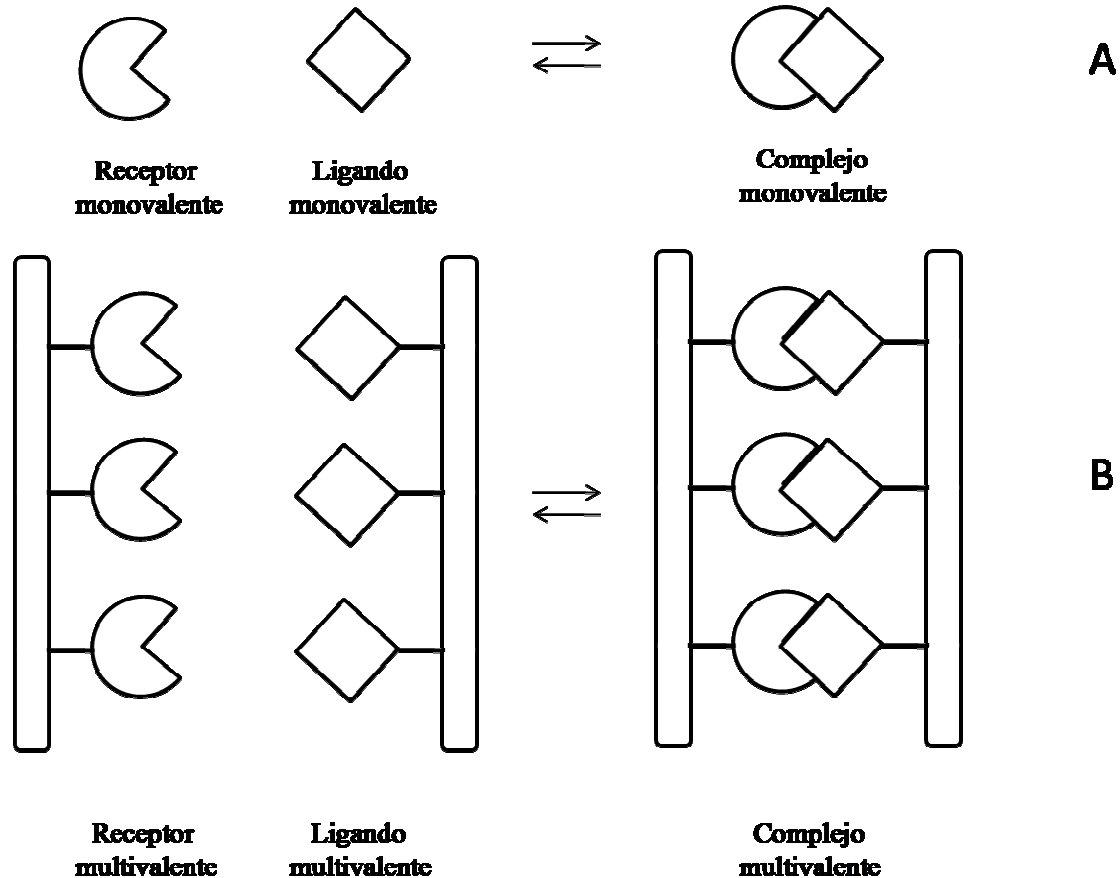


Figura 2. Representación general de una interacción ligando-receptor monovalente (A); y de una interacción ligando receptor multivalente (B).

Los mecanismos principales que producen el incremento de la afinidad de la unión multivalente son los siguientes:

- Efecto quelato

Se produce en aquellas proteínas o en agregados multiméricos de éstas donde es posible la unión simultánea de más de un ligando de un mismo sistema multivalente. Después de la unión del primer ligando, la unión de un segundo debería ser más sencilla debido a que los costes entrópicos traslacionales y rotacionales ya han sido cubiertos en la primera unión (Figura 3a). El efecto quelato también puede ocurrir con dos ligandos que

no sean idénticos en dos lugares de unión diferentes. Algunos de los efectos de multivalencia más significativos han sido atribuidos a este efecto, especialmente en la inhibición de toxinas y otras proteínas con más de un lugar de unión, como el receptor de asialoglicoproteínas de hígado humano descrito por Lee¹⁵ o la aglutinina del germen de trigo (WGA).¹⁸

- Efecto de reasociación estadística

En los casos en los que la longitud entre las unidades de carbohidrato es demasiado corta para permitir el efecto quelato o donde la proteína posee un único lugar de unión, el incremento en la afinidad se debe fundamentalmente al efecto de reasociación estadística¹⁹⁻²² (Figura 3b). La constante cinética de disociación de un carbohidrato multivalente es mucho más lenta en comparación con un ligando monovalente, debido a la proximidad entre los ligandos, uno de los carbohidratos puede ocupar un lugar de unión después de que otro lo abandone, resultando en un incremento neto en la afinidad.²³

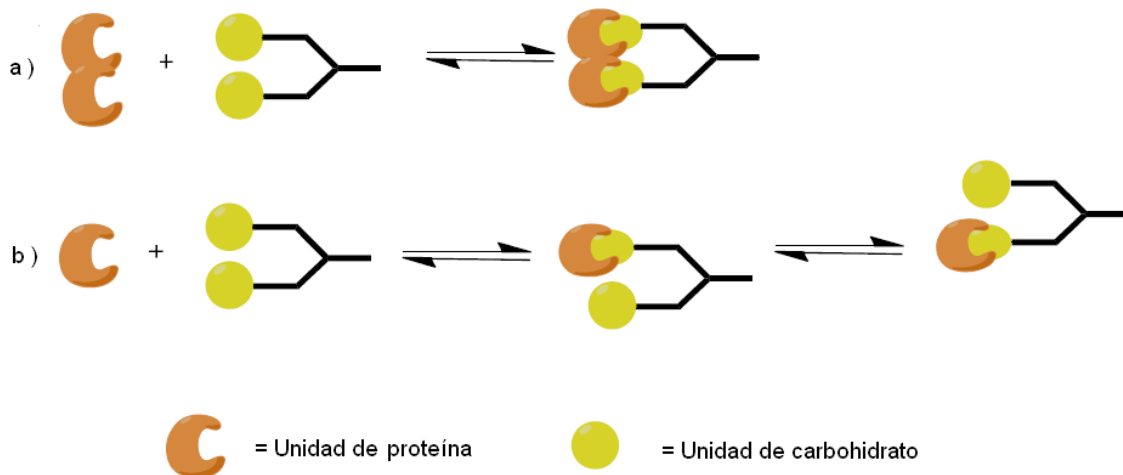


Figura 3. A) Representación del efecto quelato. B) Representación del efecto de reasociación estadística.

- Entrecruzamiento (“cross-linking”)

Este efecto se produce en aquellas proteínas que tienen dos o más lugares de unión. Se forman agregados ordenados, con una repetición homogénea proteína-carbohidrato-proteína (Figura 4) y un espaciado regular que le confiere una alta estabilidad termodinámica a este entramado.^{24, 25} Se sabe que el proceso de entrecruzamiento ocurre en muchos casos de multivalencia, pero no está tan claro en qué medida el aumento de la afinidad se debe a este proceso y si se puede diferenciar de la reasociación estadística.²³

Otros efectos no quelato que pueden participar en el fenómeno de multivalencia son la estabilización estérica²⁶ y la presencia de un lugar de unión secundario que favorezca la unión.²⁷ Los efectos no quelato suelen provocar un aumento más pequeño de la afinidad que en aquellos casos donde el mecanismo quelato es operativo, donde se producen aumentos exponenciales de la afinidad. Sin embargo, cuando los ligandos multivalentes son grandes y contienen muchas subunidades de carbohidratos, los efectos no quelato contribuyen de manera muy importante al aumento de la afinidad. Esto ocurre de por ejemplo en los casos de dendrímeros de poli(amidoamina) (PANAM). El mecanismo en este último caso ha sido llamado mecanismo interno de difusión o también “bind and slide”, que también es operativo en la unión de proteínas al ADN.²⁸

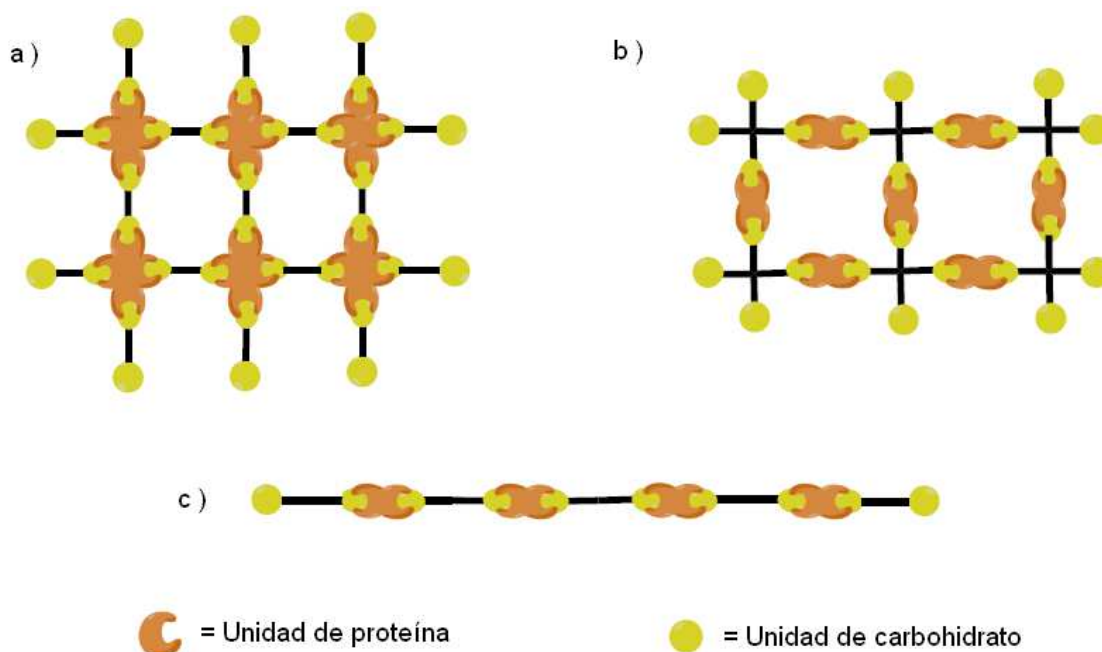


Figura 4. Representación del entrecruzamiento entre carbohidratos y proteínas. **A)** Entrecruzamiento entre una proteína tetravalente y un ligando bivalente. **B)** Entrecruzamiento de un ligando tetravalente con una proteína bivalente. **C)** Entrecruzamiento de una proteína bivalente con un ligando bivalente.

1.2- Neoglicoconjugados multivalentes.

1.2.1- Definición y tipos de neoglicoconjugados multivalentes.

Los neoglicoconjugados son análogos sintéticos de los correspondientes glicoconjugados naturales (glicolípidos y glicoproteínas) que mimetizan el

comportamiento de éstos en su interacción con el medio. Cuando estas estructuras presentan un efecto multivalente se les denominan generalmente como neoglicoconjugados multivalentes.^{29, 30}

Los neoglicoconjugados multivalentes intentan mimetizar las estructuras complejas que están involucradas en el proceso de reconocimiento celular, así como el resto de procesos biológicos que median los carbohidratos. En todos los casos, los ejemplos naturales se simplifican por diseños más sencillos que incluyen: un armazón molecular, un epítipo de carbohidrato que sirve como ligando y un espaciador que une el ligando con el armazón molecular. Estos compuestos presentan una serie de ventajas frente a los correspondientes productos naturales. Principalmente son mucho más fáciles de sintetizar que las estructuras naturales, se puede variar de forma sencilla la simetría del armazón molecular, la longitud y propiedades del espaciador, así como su tamaño y el número de epítopos sacarídicos (la “valencia”). Por otro lado podemos añadir grupos funcionales diferentes a los presentes en medios biológicos, fragmentos fluorescentes, así como otros fragmentos que ayuden a dirigir el compuesto hasta el tejido diana. Sin embargo, escoger el armazón molecular y el espaciador correcto, es crucial para el éxito en la síntesis de neoglicoconjugados como ligandos de alta afinidad por la proteína diana. Esto es debido a que estos elementos estructurales determinan el tamaño, la disposición tridimensional y la valencia funcional del neoglicoconjugado.³¹

En el diseño de estos neoglicoconjugados hay que tener en cuenta, además de la multivalencia expuesta anteriormente, otra serie de consideraciones importantes. En primer lugar, la existencia en las lectinas de un posible sitio de unión secundario no específico para un carbohidrato. Muy a menudo, estos receptores suelen presentar interacciones hidrofóbicas vecinas al sitio de unión del carbohidrato. Por tanto, si se quiere mejorar la afinidad, la naturaleza del aglicón del carbohidrato puede ser crítica.

Entre los tipos de neoglicoconjugados multivalentes más usados cabe destacar los péptidos y proteínas,³² los liposomas,³³ los dendrímeros,³⁴ los calixarenos,³⁵ las ciclodextrinas,³⁶ oligómeros y polímeros³⁷ y las nanopartículas³⁸ (Figura 5).

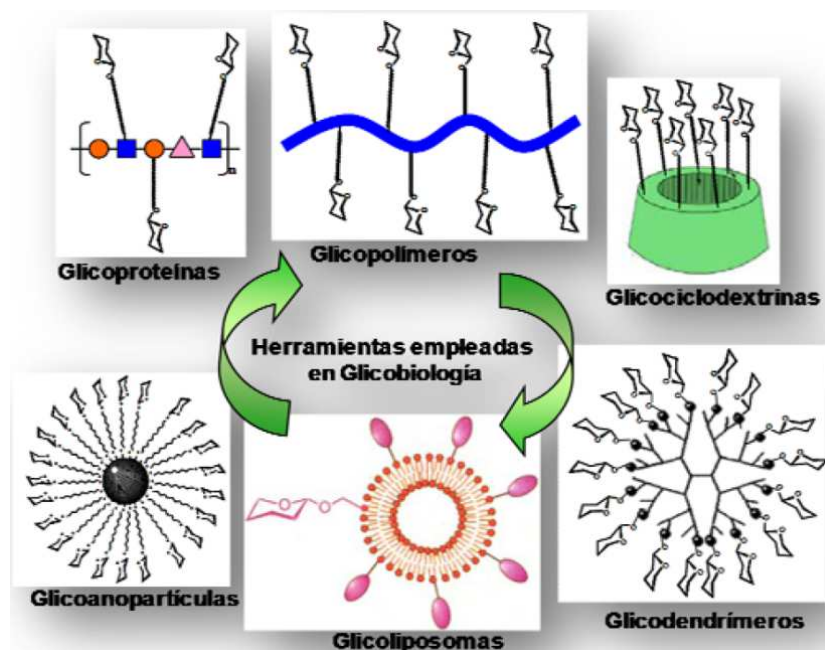


Figura 5. Neoglicoconjugados multivalentes para el estudio de interacciones carbohidrato-proteína.

1.2.2- Aplicaciones de los neoglicoconjugados multivalentes.

Como se mencionó anteriormente, las interacciones multivalentes carbohidrato-proteínas median muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos importantes. Sin embargo, su completa comprensión sufre de la complejidad natural de los hidratos de carbono que resultan de su biosíntesis o de la sutil unión de diferentes grupos asociados a posiciones específicas a lo largo de la secuencia de oligosacáridos. Numerosas funciones clave de los carbohidratos dependen de la microheterogeneidad observada, así como de la bien definida organización agrupada. Con el fin de estudiar, caracterizar, comprender y manipular estas críticas interacciones, se han hecho sorprendentes avances en el aislamiento y purificación de glicoconjugados naturales, se ha llevado a cabo su análisis estructural, así como procesos de degradación parcial o selectiva. Aún así, la síntesis química o quimioenzimática de ligandos de carbohidratos multivalentes es probablemente el método de elección para proporcionar estructuras multivalentes a medida, desarrolladas como efectores o inhibidores de mecanismos biológicos. En consecuencia, es necesario abordar el problema inherente de la alta especificidad y la afinidad que presentan estos sistemas multivalentes mediante la optimización simultánea de los factores que intervienen tanto en la multivalencia, como

en la especificidad de los grupos de la molécula que se unen a sus proteínas de unión a carbohidratos específicos.

Para lograr estos objetivos, los glicoquímicos están trabajando activamente en un enfoque que puede ser resumido en la Figura 6. Las etapas que se desarrollan en este proceso se pueden expresar de la siguiente manera. Después de la evaluación de los genomas de bacterias o virus, el análisis proteómico, y la búsqueda de proteínas de unión a carbohidratos mediante homología a través de la bioinformática, la presencia de una de estas proteínas se confirma. Para lectinas bacterianas o virales, las proteínas aisladas se pueden marcar con sondas fluorogénicas. La especificidad de unión al ligando de la lectinas fluorescentes se determina entonces por chips de carbohidratos como el que está libremente accesible desde el Consortium for Functional Glycomics para identificar el mejor oligosacárido que genera respuesta.³⁹ Los microchips más recientes suelen estar constituidos de aproximadamente 400 carbohidratos naturales y sintéticos (versión 3.10).⁴⁰⁻⁴⁴ Una vez que los residuos esenciales de los carbohidratos (epítomos) responsables de la actividad biológica de interés se identifican, los candidatos principales se validan mediante el uso de una serie de ensayos de unión, tales como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), ELLA (enzyme-linked lectin assay), ITC (isothermal titration calorimetry), SPR (surface plasmon resonance), FRET (fluorescence resonance energy transfer), cristalografía de rayos X, y técnicas análogas. Las afinidades de unión relativas de ligandos oligosacáridos confirmados se evalúa a continuación junto con un grupo de oligosacáridos simples, idealmente con un monosacárido como el objetivo más simple para disminuir la complejidad de la síntesis y encauzar la optimización que se puede obtener por QSAR (quantitative structure-activity relationship). Los glicomiméticos resultantes se transforman aún más en las estructuras multivalentes como glicodendrimeros que también deben someterse a una optimización del núcleo estructural de la molécula.

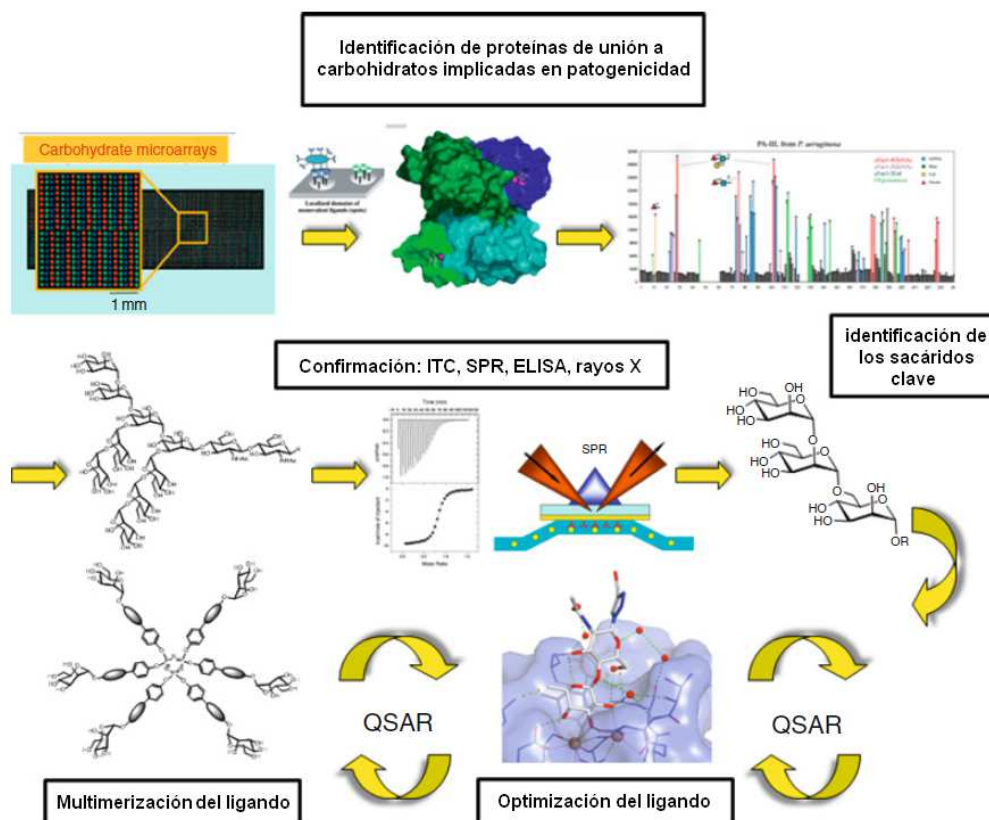


Figura 6. Pasos implicados en el descubrimiento de glicodendrimeros multivalentes y en el proceso de su optimización.

I.3- Dendrimeros como neoglicoconjugados multivalentes para el estudio de su implicación en procesos de reconocimiento molecular.

I.3.1- Definición de dendrimeros.

Un dendrimeros es una macromolécula sintética monodispersa altamente ramificada y polifuncional, constituida por unidades repetitivas (denominadas generaciones) que están unidas químicamente entre sí mediante un proceso arborescente alrededor de un centro multifuncional denominado núcleo.^{45, 46} Por lo tanto, a diferencia de los polímeros tradicionales, que presentan una estructura molecular polidispersa lo cual es un inconveniente para su aplicación a procesos industriales, los dendrimeros están estructuralmente bien definidos y pueden ser sintetizados a partir de un enfoque totalmente controlado. Aunque existen diferencias en cuanto a la rigidez y compactación, los dendrimeros a menudo se comparan con proteínas artificiales, con sus estructuras semiglobulares o globulares, la mayoría con una alta densidad de grupos

periféricos y un pequeño volumen molecular.^{47, 48} Los polímeros dendríticos son conocidos como la cuarta clase de las arquitecturas polímeras, y se dividen a su vez en cinco subclases (Figura 7): (1) polímeros hiperramificados al azar, (2) polímeros arborescentes (“Dendrigraft”) ó estructuras dendríticas insertadas, (3) dendrones, (4) dendrímeros y (5) tecto(dendrímeros) o megámeros. El término “dendrímero” fue propuesto a principios de 1985 por Tomalia⁴⁹ y proviene del término griego *dendra* que significa árbol. Términos sinónimos son “arborol”, propuesto por Newkome,⁵⁰ derivado del término griego *arbor* que significa rama y “moléculas cascada” utilizado por Vögtle.⁵¹

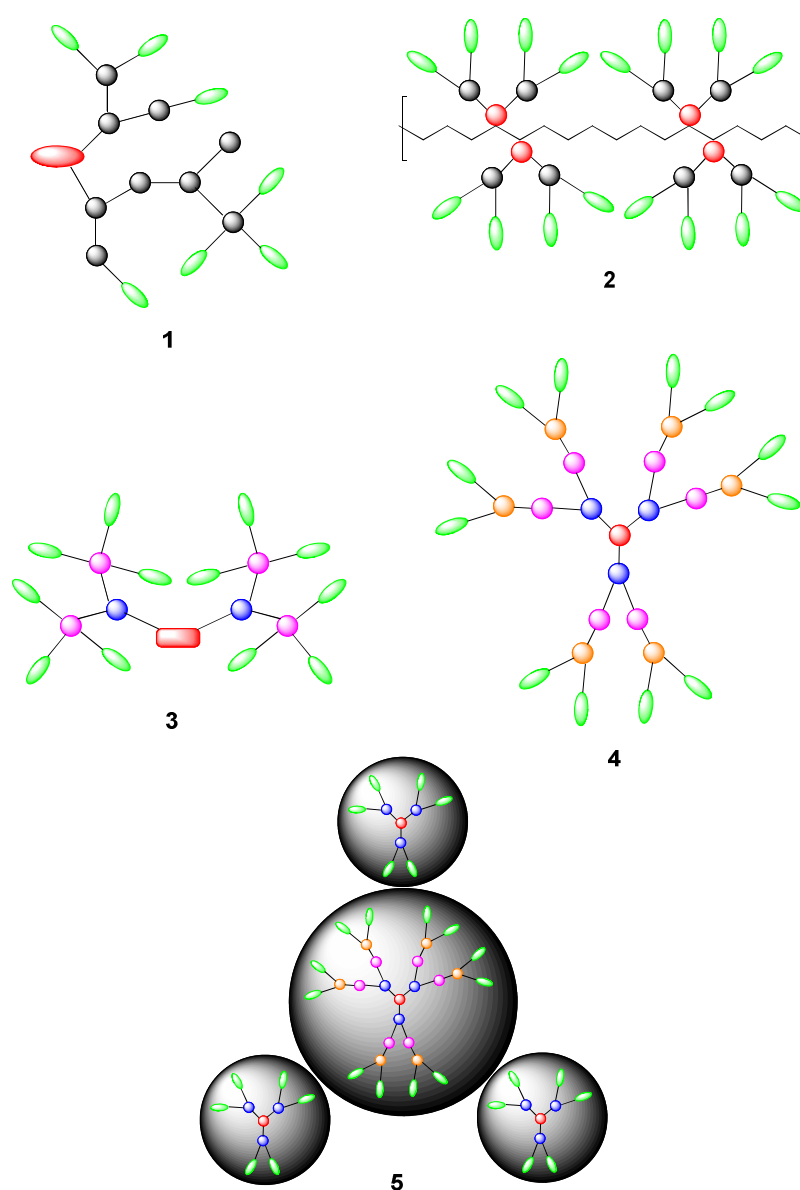


Figura 7. Tipos de polímeros dendríticos: (1) polímeros hiperramificados al azar, (2) polímeros arborescentes (3) dendrones, (4) dendrímeros y (5) megámeros

I.3.2- Estrategias sintéticas y aplicaciones de los dendrímeros.

La síntesis de los dendrímeros puede llevarse a cabo principalmente mediante dos estrategias (Figura 8). La primera, descrita por Tomalia *et al.*^{49, 52} llamada “método divergente”, es un proceso de síntesis que consiste en una serie de pasos repetitivos partiendo de un núcleo iniciador central. Cada subsiguiente paso de crecimiento representa una nueva “generación” del dendrímero con un mayor diámetro molecular, dos veces el número de sitios reactivos en la superficie y aproximadamente el doble del peso molecular que la generación precedente. La segunda estrategia de síntesis fue descrita por primera vez por Fréchet *et al.*,^{53, 54} se denomina “método convergente”. Avanza desde lo que será la superficie funcionalizada del dendrímero hacia un punto focal interior reactivo, dando lugar a la formación de lo que se denomina “dendrón”. Varios dendrones reaccionan con un núcleo multifuncional para dar lugar al dendrímero. La mayoría de las síntesis divergentes requieren un exceso de carga de monómero y separaciones por cromatografía a veces muy lentas y tediosas, en particular para las generaciones altas. Por otro lado las estrategias de síntesis convergente están limitadas a la construcción de dendrímeros de más bajas generaciones debido a la congestión estérica que se produce cuando se unen dendrones de generación alta al núcleo central.

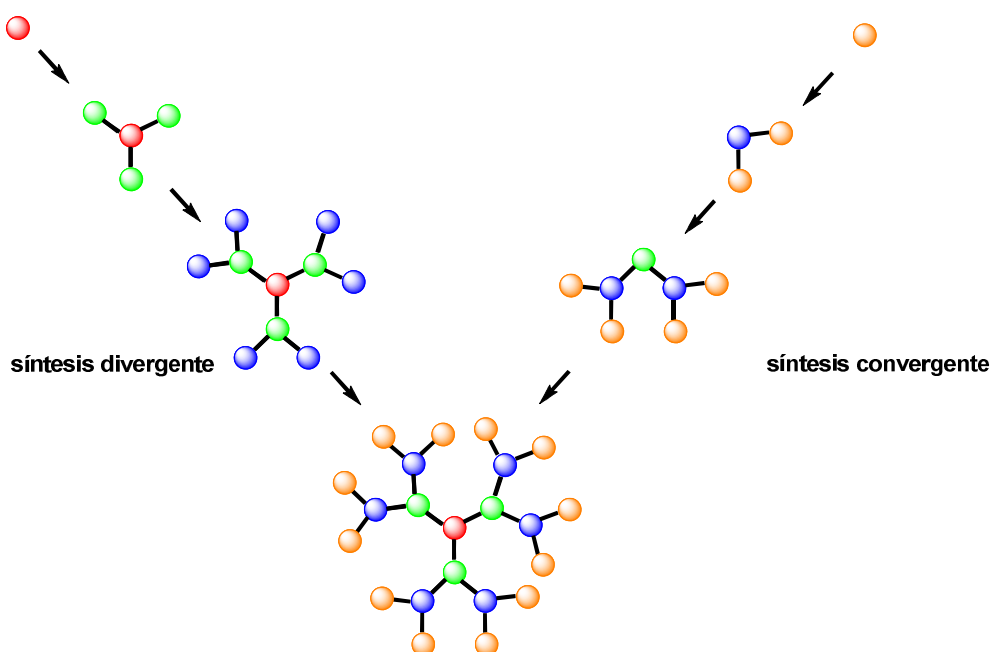


Figura 8. Estrategias de síntesis convergente y divergente para la obtención de dendrímeros.

En la década de los 90 se produce un crecimiento explosivo tanto a nivel de publicaciones académicas como de patentes, lo que contribuye a la comercialización de los mismos. Sin lugar a dudas, la biología y nanomedicina, más particularmente las aplicaciones biomédicas y terapéuticas, son los campos que han generado un mayor entusiasmo por estas estructuras. Sin embargo, la complejidad de los mecanismos que participan en los procesos biológicos presenta un reto importante para el diseño eficiente de estas moléculas. De hecho, históricamente, los problemas relativos a la toxicidad, solubilidad en agua, degradabilidad, especificidad sobre la diana, farmacocinética, y perfiles de biodistribución para estas aplicaciones han sido recurrentes cuando se utilizan sistemas monoméricos. La aplicación de sistemas poliméricos ha sido explotada ventajosamente para mejorar la solubilidad en agua, la biocompatibilidad, la falta de toxicidad y la inmunogenicidad con el fin de mejorar la estabilidad del fármaco, y mejorar la selectividad hacia los tejidos malignos. Esta mejora de las propiedades terapéuticas que se observó con el uso de profármacos, ha sido explicada por las propiedades físicas de estas estructuras poliméricas, presentando altos volúmenes hidrodinámicos que facilitan la persistencia en la sangre y la acumulación en los tejidos tumorales.⁵⁵

Los dendrímeros, que combinan varias de las ventajas descritas para los polímeros, junto con que son estructuras monodispersas y tienen una alta densidad de funcionalización con un pequeño volumen molecular, han sido estudiados ampliamente para superar los problemas encontrados con otras moléculas. Por lo tanto, sus estructuras y propiedades particularmente únicas han motivado su uso en numerosas aplicaciones como fármacos o como vehículos de suministro de genes en la terapia contra el cáncer, y como agentes antibacterianos, antivirales, o antitumorales. El uso de dendrímeros en sistemas biológicos, así como estudios sistemáticos de los núcleos dendríticos más comunes para determinar su biocompatibilidad y citotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*, y su bioestabilidad e inmunogenicidad han sido ampliamente revisados.^{56, 57} Un ejemplo típico se refiere al uso de dendrímeros como “glicocarriers” para el control de la presentación multimérica de restos de carbohidratos que son biológicamente relevantes, siendo útiles para dirigirlos al tejido modificado en enfermedades malignas para su diagnóstico y con propósitos terapéuticos. En estas moléculas, denominadas glicodendrimeros, las porciones de sacárido se expresan de acuerdo con los principios de crecimiento dendrítico o se unen a núcleos dendríticos

altamente funcionalizados y repetidos obteniendo estructuras con variados pesos moleculares. Desde que aparecieron por primera vez en la literatura en 1993⁵⁸ los glicodendrimeros, fueron diseñados inicialmente como bioisómeros de los glicósidos ramificados de la superficie celular y originaron amplio interés dentro de la comunidad científica.^{34, 59-63}

I.3.3- Glicodendrimeros. Clasificación, síntesis y aplicaciones.

Debido a la gran cantidad de glicodendrimeros sintetizados y a la variedad de sus estructuras constituyentes, existen diferentes criterios para su clasificación.^{30, 34} En esta tesis vamos a dividirlos en glicodendrimeros con núcleo alifático y glicodendrimeros con núcleo aromático.

I.3.3.1- Glicodendrimeros con núcleo alifático.

A) Núcleo de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y sus derivados.

Uno de los primeros grupos de glicósidos ramificados se basó en un núcleo fácilmente disponible, el TRIS, utilizado por Lee a finales de la década de 1970.⁶⁴ Debido a las ventajas sintéticas en términos de simetría que garantizan una funcionalización ortogonal y rápida, este núcleo sintético constituye un candidato ideal para la obtención de sacáridos multivalentes. Por lo tanto, el TRIS y sus derivados (Figura 9) han sido utilizados ampliamente por varios grupos para la fijación directa de glucósidos sobre grupos hidroxilo para generar glicoclusters trivalentes.⁶⁵

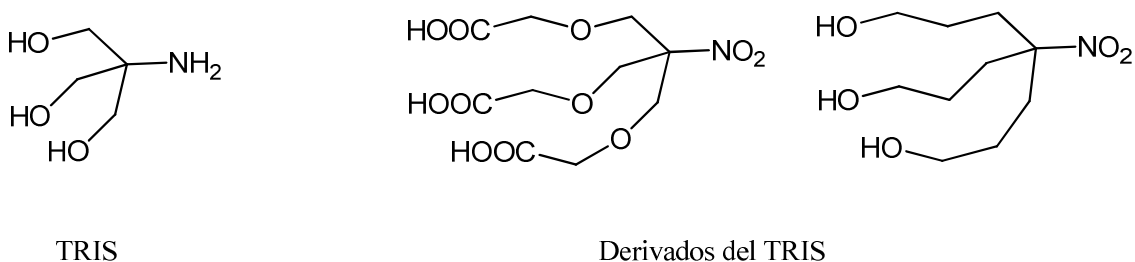


Figura 9. TRIS y sus derivados

Sin embargo, a pesar de que se puso a punto la estrategia de síntesis química de estos compuestos, presentaron factores estéricos desfavorables para su unión a proteínas. En este contexto, Kötter *et al.* utilizaron derivados de TRIS, tales como 4-(3-hidroxipropil)-4-nitroheptano-1,7-diol para preparar glicomiméticos altamente ramificados (Figura 10).⁶⁶ Basándose en estos precursores sintéticos trivalentes y en metodologías de

síntesis peptídica, se logró la síntesis de glicoclusters manosilados tri y nonavalentes que varían en las características químicas de sus grupos espaciadores y sus longitudes.⁶⁷

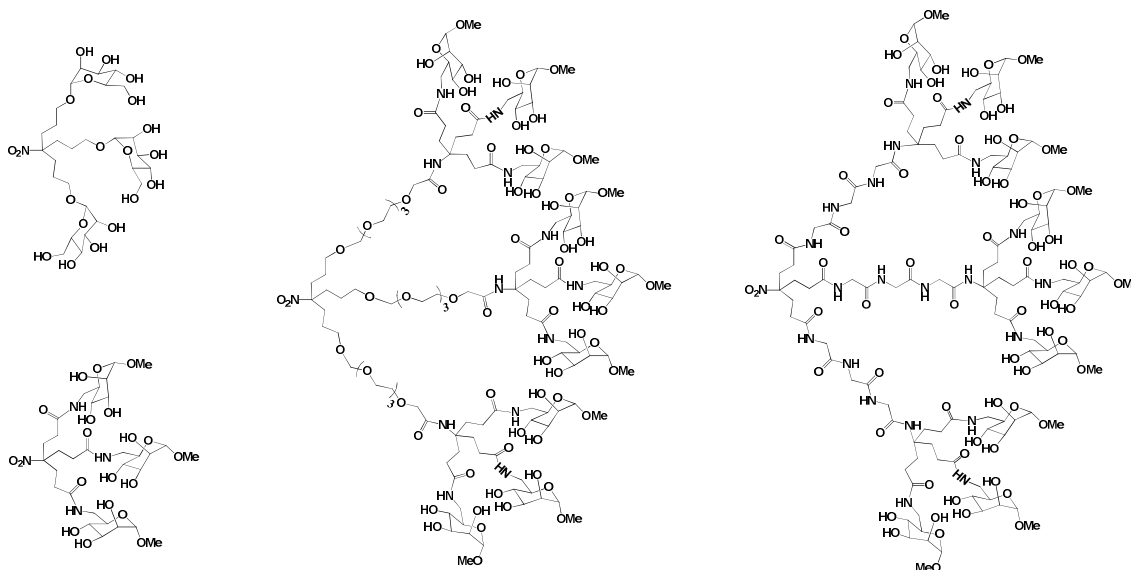


Figura 10. Glicodendrimeros manosilados sintetizados por Kötter *et al.*

B) Núcleo con grupos amino.

Debido a los prometedores resultados biológicos preliminares que indicaban que los glicoclusters tri- y tetravalentes constituían potentes inhibidores de la unión bacteriana, que se unían particularmente bien al DRC de las lectinas bacterianas (especialmente para la adhesión específica a manosa), se iniciaron síntesis más sencillas de glicoconjugados de baja valencia. En este contexto, la preparación de glicosilaminas por condensación directa de aminas con azúcares reductores podría ser una estrategia viable. Por ello se ha descrito la conjugación directa de azúcares reductores con dietilentriamina como una estrategia eficiente, rápida y con excelentes rendimientos para la síntesis de derivados de carbohidratos divalentes.⁶⁸ Unos años más tarde, Hayes *et al.* extendieron esta estrategia, describiendo una metodología “one-pot” que permitió la síntesis de derivados de valencia más alta a través de la reacción de grupos amino más funcionalizados con D-manosa y dimanósidos desprotegidos.⁶⁹ Glicoclusters simétricos, basados en un núcleo central trivalente, y que tienen tres o seis manósidos periféricos han sido preparados por Dubber y Lindhorst; en este caso se analizó el potencial de la aminación reductora para la introducción de un grupo aldehído de un derivado de D- manosa como el ligando carbohidratado, utilizando la tris (2-aminoetil)amina como el núcleo de ramificación (Figura 11).⁷⁰ Otro ejemplo ha sido

descrito por Li *et al.*, que proponían una síntesis convergente de tipo “one pot” de un glicocluster trivalente funcionalizado con manosa usando una reacción de Ugi multicomponente, que implica el uso de 2-carboxietil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido, benzaldehído, isocianoacetato de metilo y la tris(2-aminoetil) amina como núcleo en metanol.⁷¹

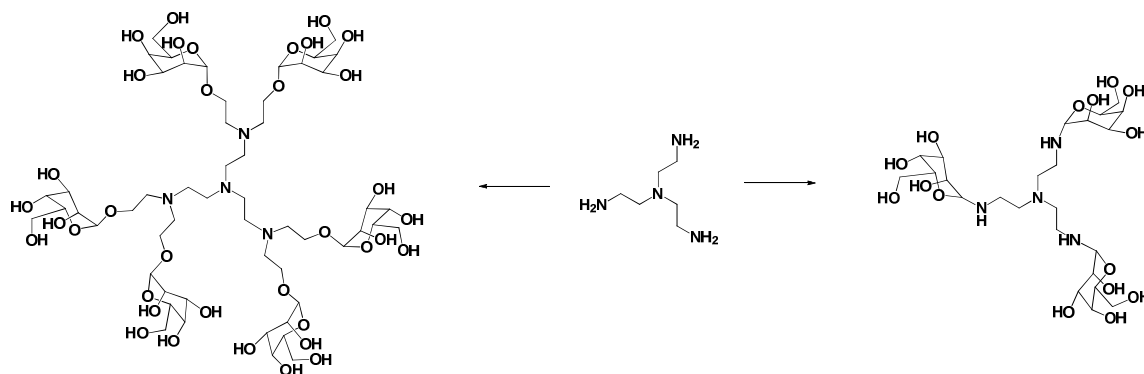


Figura 11. Glicodendrimeros derivados de tris (2-aminoetil)amina.

C) Núcleo de pentaeritritol y sus derivados.

El pentaeritritol y sus derivados constituyen otro grupo ampliamente utilizado de núcleos alifáticos (Figura 12), lo que permite la construcción de estructuras ramificadas multivalentes a través de la unión de cuatro grupos similares o diferentes.

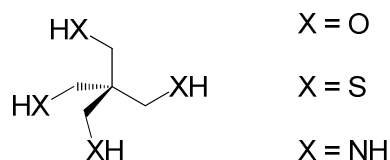


Figura 12. Pentaeritritol (X = O) y sus derivados.

Uno de los primeros ejemplos de un glicocluster basado en pentaeritritol fue diseñado a finales de 1990 por Hanessian *et al.*, que describen la síntesis de grupos di- y tri-hapténicos compuesto por los antígenos Tn (GalNAc) y el TF [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-GalNAc] alargados con espaciadores de serina y ácido glicólico y unidos a través de enlaces amida a derivados aminados de pentaeritritol.⁷² Unos años más tarde, Hansen *et al.* propusieron la primera evaluación biológica de agrupaciones de galabiosa construidas alrededor de núcleos tiolados con diferentes valencias, incluyendo derivados de pentaeritritol. Se consiguió la inhibición eficaz de la hemaglutinación por la bacteria

gram-positiva *Streptococcus suis*, en concentración nanomolar, en presencia de estas moléculas.⁷³ La inhibición de la adhesión bacteriana de las fimbrias de *E. coli* mediante derivados de pentaeritritol con grupos α -D-manopiranosido periféricos también ha sido a menudo investigada, aunque sin relaciones estructura-actividad confirmadas.^{74, 75} De forma similar, Lindhorst *et al.* propusieron investigaciones biológicas de agrupaciones de manósidos basadas en pentaeritritol, para poner a prueba su capacidad para bloquear la unión de *E. coli* al manano de la pared fúngica in vitro.⁷⁶ Posteriormente, Touaibia *et al.* describieron la síntesis eficiente y sistemática de un familia de agrupaciones de manosa construidas sobre núcleos de pentaeritritol y dipentaeritritol⁷⁷ utilizando la cicloadición [1,3] dipolar regioselectiva catalizada por Cu(I) azida-alquino (Figura 13).⁷⁸⁻⁸⁰

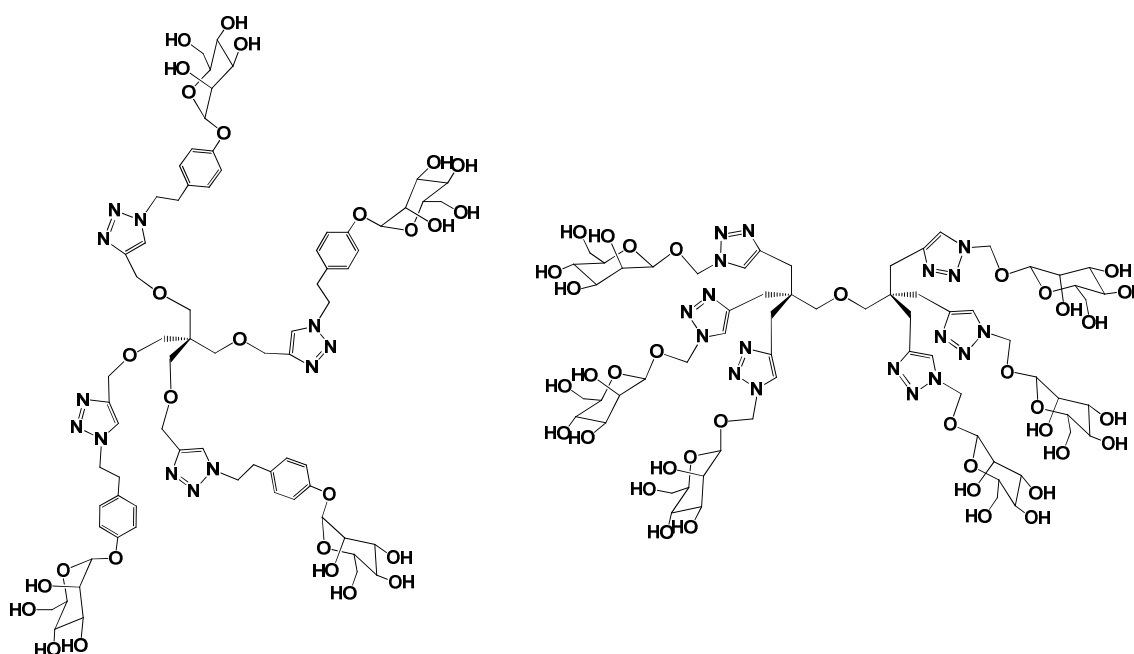


Figura 13. Derivados manosilados con núcleo de pentaeritritol y dipentaeritritol.

D) Núcleo de derivados de lisina.

Estos derivados de lisina fueron descritos por primera vez y patentados por Denkewalter *et al.* a finales de 1970,⁸¹ los derivados de lisina son uno de los núcleos estructurales más ampliamente utilizados en síntesis de dendrímeros⁸² y glicodendrímeros. Una serie de revisiones ha sido publicada por el grupo de Jezek sobre la síntesis y aplicaciones biológicas de glicodendrímeros a base de lisina.⁸³⁻⁸⁶ Estos dendrímeros glicosilados de lisina se han preparado tanto en soportes sólidos⁸⁷⁻⁸⁹ como en solución.⁹⁰⁻⁹² La reacción

de los grupos amino periféricos con una variedad de electrófilos que llevan residuos de azúcar asociados (tales como isotiocianatos, ácido carboxílico, y azúcares reductores) han conducido a glicodendrimeros con tioureas, amidas y aminas respectivamente. Los azúcares que llevan grupos éster activados también han sido acoplados a las lisinas dendríticas para proporcionar glicoclusters de galactosa y *N*-acetilglucosamina,^{93, 94} incluyendo el importante antígeno Thomsen Friedenreich (TF), disacárido conocido como un marcador de cáncer de mama y contra el cual fueron creados anticuerpos monoclonales.^{95, 96} El glicodendrímtero análogo con β -D-*N*-acetilglucosamina también se modificó ampliamente utilizando múltiples procesos quimioenzimáticos originando el antígeno Lewis^X (Figura 14).⁹⁷ También se han propuesto estructuras análogas manosiladas, la proteína de unión a manosa puede actuar como receptor de estas moléculas, mediando en la captación y la internalización de glicoconjugados solubles y en suspensión, originando una respuesta inmune innata.^{98, 99} La amplia capacidad de reconocimiento de los receptores de manosa, junto con su implicación en la inmunidad adaptativa, ha originado considerables esfuerzos hacia la administración dirigida de enzimas,^{100, 101} medicamentos,¹⁰²⁻¹⁰⁴ oligonucleótidos o genes,¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ y antígenos¹⁰⁹⁻¹¹¹ a células que los expresan, para diferentes estrategias terapéuticas y de obtención de vacunas.

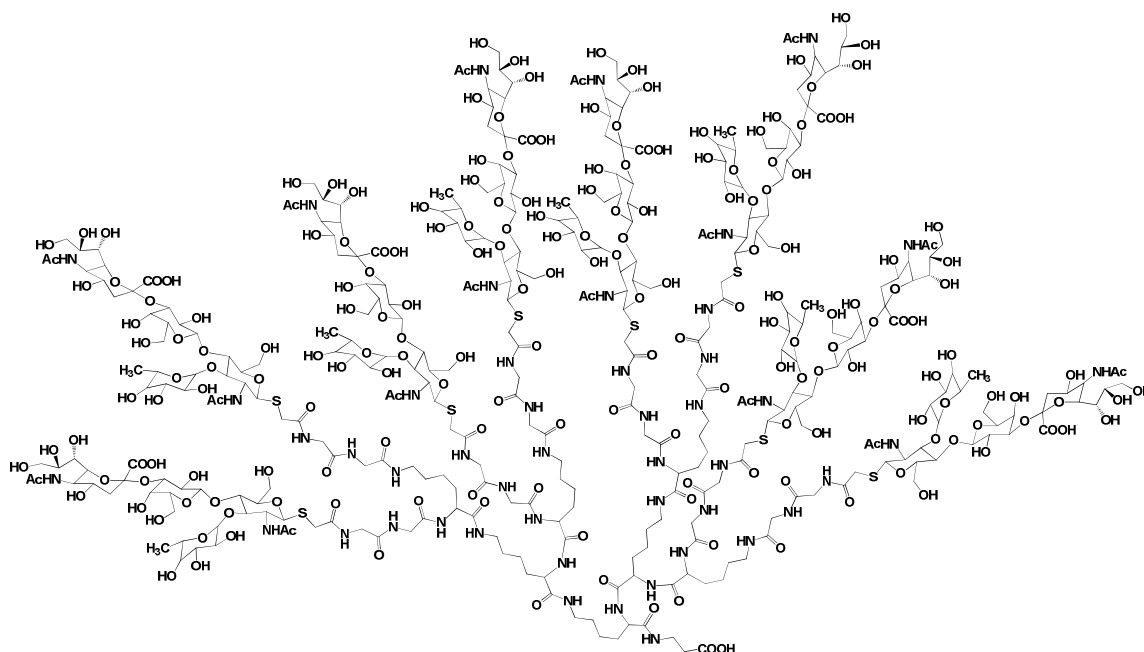


Figura 14. Glicodendrímtero del antígeno Lewis^X sintetizado quimioenzimáticamente.⁹⁷

E) Núcleo de carbosilano.

En 1999, Matsuoka *et al.* sintetizaron el residuo trisacárido presente en la globotriaosilceramida (Gb3), un glicolípido que se acumula en ciertas enfermedades metabólicas afectando a la función renal, mediante el uso de dendrímeros basados en carbosilano (Figura 15).¹¹² Además de una metodología eficiente para la construcción de núcleos multivalentes de tipo carbosilano, los autores desarrollaron simultáneamente una estrategia general de síntesis para la unión de los restos de carbohidrato, que emplea una eficiente sustitución S_N2 de un anión tiolato altamente reactivo sobre un haluro de alquilo. Además de las ventajas típicas encontradas en los dendrímeros, las arquitecturas multivalentes tipo carbosilano tienen las siguientes ventajas (i) la simplicidad sintética para ampliar la generación a voluntad y por lo tanto, acceder a los derivados de peso molecular definido y con el grado de funcionalización terminal adecuado, (ii) la naturaleza neutra de los núcleos dendríticos que les proporcionan estabilidad química y bioquímica, y (iii) que son biológicamente inertes. El mismo grupo estudió estos glicodendrimeros de carbosilanos como agentes terapéuticos para el tratamiento de las infecciones por cepas de *E. coli* O157 productoras de verotoxina, demostrando su potencial inhibidor de la toxicidad.¹¹³

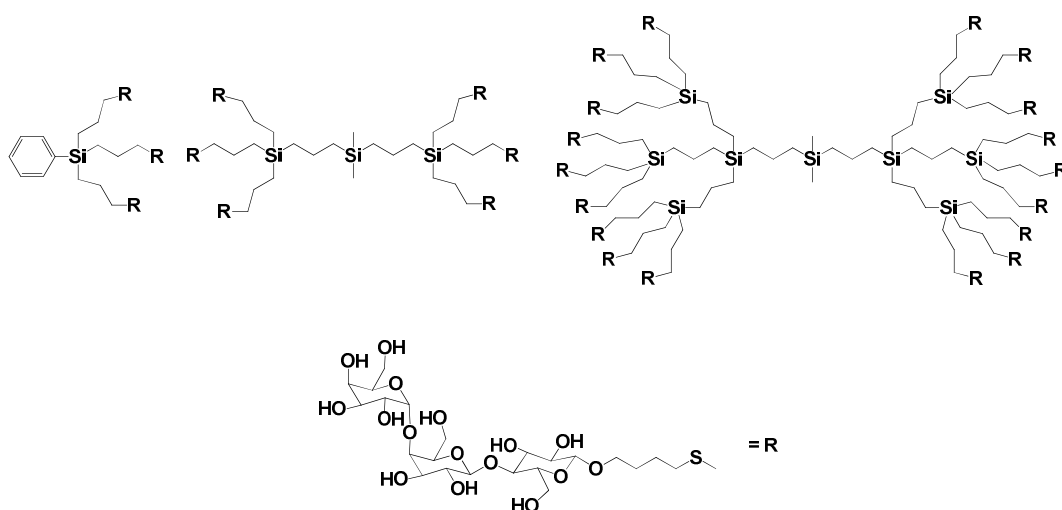


Figura 15. Glicodendrimeros derivados de carbosilano. R= residuo trisacárido presente en la globotriaosilceramida.

I.3.3.2- Glicodendrimeros con núcleo aromático.

A) Glicodendrimeros obtenidos por ciclotrimerización intermolecular.

En 1982, Kaufman y Sidhu describieron la síntesis en un solo paso de glicoclusters aromáticos a través de ciclotrimerización por catálisis metálica a partir de los adecuados precursores de derivados acetilénicos de carbohidratos.¹¹⁴ Sin embargo, estas nanoestructuras glicosiladas muestran una débil actividad biológica en relación con sus homólogos naturales. A pesar de esto, tales glicoclusters proporcionan ambientes únicos para el estudio de moléculas anfipáticas debido a su núcleo lipófilo rodeado por una periferia hidrófila. Posteriormente, Roy *et al.* consiguieron mejorar la metodología para proporcionar manopiranosidos hexavalentes (Figura 16) a través de [2+2+2]-cicloadiciones en presencia del catalizador de dicobalto octacarbonilo por calentamiento a reflujo en 1,4-dioxano durante sólo 2 h (en comparación con los 21 días necesarios para el glicocluster manósido obtenido en el ejemplo anterior).¹¹⁵ El clúster resultante desprotegido, obtenido cuantitativamente mediante reacción de Zemplén, era soluble en agua y mostró una excelente capacidad de entrecruzamiento con lectinas tetraméricas de plantas, lo que indica que la orientación espacial y la rigidez provista por el núcleo interior tipo arilo ofrecen un gran potencial como neoglicoconjugados.¹¹⁶ Más tarde, el mismo grupo amplió esta estrategia con el fin de obtener conjugados C-glicósidos estables metabólicamente que contienen espaciadores largos, mediante una secuencia de transformaciones catalizadas por metales de transición.¹¹⁷ Tras estas investigaciones, Das y Roy publicaron por primera una síntesis, mediante el uso de derivados de 2-propinilo y un catalizador de rutenio, donde obtuvieron mezclas de regioisómeros manopiranosidos derivados de arilo, en proporciones similares a los observados con el catalizador de dicobalto octacarbonilo, pero con una disminución del tiempo de reacción y mejorando mucho los rendimientos.¹¹⁸

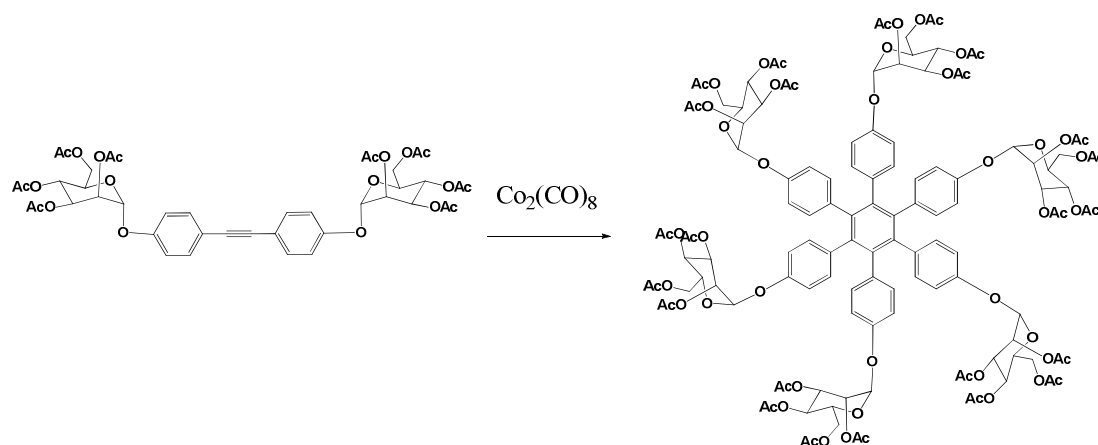


Figura 16. Glicodendrímtero obtenido por ciclotrimerización intermolecular.

B) Glicodendrímteros obtenidos por reacciones de acoplamiento cruzado.

A mediados de los años 90 varios grupos de investigación mostraron la formación de entramados reticulados producidos cuando los receptores proteicos multivalentes se mezclaban con hidratos de carbono sintéticos multiméricos, incluyendo dímeros.^{119, 120} Todos los datos apuntan a apoyar la idea de que grupos de hidratos de carbono pequeños y rigidificados que llevan residuos hidrófobos forman complejos estables. Estas estructuras se han sintetizado uniendo el glúcido a la estructura central mediante enlaces O-, S-, o C- glucosídicos. Basándose en estas observaciones, Roy *et al.* consiguieron la síntesis eficaz de grupos de carbohidrato oligoméricos mediante el uso de reacciones de acoplamiento cruzado tipo Sonogashira - Heck - Cassar (SHC).¹²¹ Esta estrategia general, compatible con varios glucósidos, y el habitual método de protección mediante grupos acetato, se han aplicado también a la síntesis de tioglicósidos divalentes, que representan una capacidad como potenciales inhibidores enzimáticos debido a su resistencia a la hidrólisis.¹²² Sengupta y Sadhukhan adaptaron esta metodología de un solo paso catalizada por Pd a núcleos aromáticos trivalentes a fin de generar glicoclusters ramificados (Figura 17).¹²³

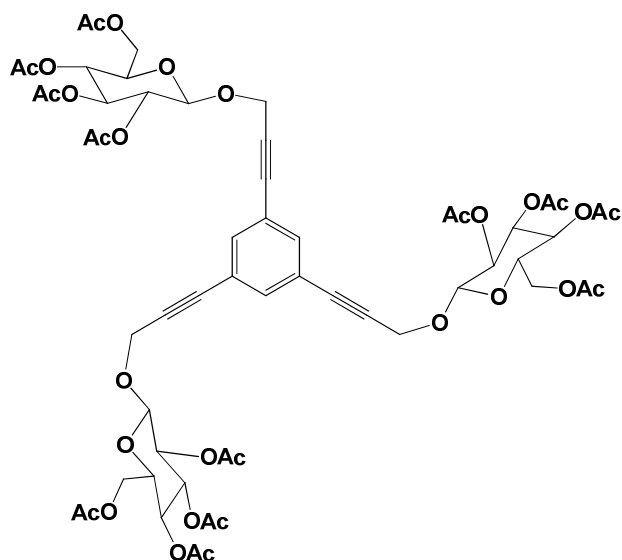


Figura 17. Glicodendrímtero trivalente obtenido por acoplamiento cruzado.

I.4- Estudio de interacciones carbohidrato-proteína.

I.4.1- Introducción a las proteínas de unión a carbohidratos. Lectinas.

El término lectina se aplica a proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen específicamente carbohidratos de la superficie celular o en suspensión. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido identificadas en diferentes organismos como virus, bacterias, hongos, plantas o animales.

A pesar de que algunas de estas proteínas reconocen específicamente estructuras sacarídicas similares, la actividad biológica es diferente como la aglutinación de eritrocitos en diferentes especies o la estimulación mitogénica de linfocitos o la inhibición de la fagocitosis. Debido a la capacidad de estas proteínas para interactuar con células de la respuesta inmune, algunas lectinas poseen efectos inmunosupresores, inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular.

Las lectinas tanto de origen animal como vegetal ¹²⁴ están implicadas en numerosos procesos biológicos y patológicos como pueden ser mecanismos de adhesión, inflamación y procesos cancerígenos como por ejemplo cáncer colorrectal y cáncer de pecho con o sin propensión a la metástasis,¹²⁵ e incluso se han propuesto como potenciales fármacos anticancerígenos.¹²⁶⁻¹²⁸

En cuanto a las lectinas de origen animal reconocedoras de β -galactósidos son una familia de proteínas de unos 135 aminoácidos que presentan homologías de secuencia

¹²⁹ y que se han denominado de múltiples maneras, la más empleada de todas ha sido tradicionalmente S-lectinas o lectinas de tipo-S, y en la actualidad se ha aceptado universalmente su denominación como galectinas.¹³⁰ La localización de las lectinas animales en la naturaleza está muy extendida, ya que se encuentran desde en invertebrados, como nematodos o esponjas, hasta en seres tan evolucionados como pueden ser los mamíferos.¹³¹

Lectina de *Viscum álbum* (VAA)

Las lectinas de origen vegetal han sido estudiadas desde hace décadas, no sólo por sus intereses nutricionales, sino también por otras posibles aplicaciones terapéuticas.¹³²⁻¹³⁵

Dada su importancia biológica y su implicación en procesos patológicos, existe un gran interés en conocer en detalle los diferentes procesos en los que intervienen. Como por ejemplo, su aplicación como inductor de apoptosis de linfocitos humanos¹³⁶ o sus propiedades inmunomoduladoras. La lectina del muérdago (*Viscum album*), conocida como viscumina o VAA (del inglés *Viscum album* agglutinin), induce la apoptosis; y a su vez está involucrada en la apoptosis de neutrófilos inducida por viscumina mediante la inhibición bien de la síntesis de novo de proteínas o por activación de las caspasas.^{137,}

¹³⁸

La viscumina es una lectina que reconoce específicamente residuos de galactosa, de estructura conocida y constituida por dos cadenas A y B. Mientras que la capacidad de reconocimiento de carbohidratos (lectina) se encuentra en la cadena-B (Figura 20), la cadena-A tiene actividad RNAr N-glicosidasa e inhibe irreversiblemente la biosíntesis de proteínas, motivo por el cual se clasifica a esta lectina en la clase de proteínas inactivantes de ribosoma.¹³⁹⁻¹⁴⁴

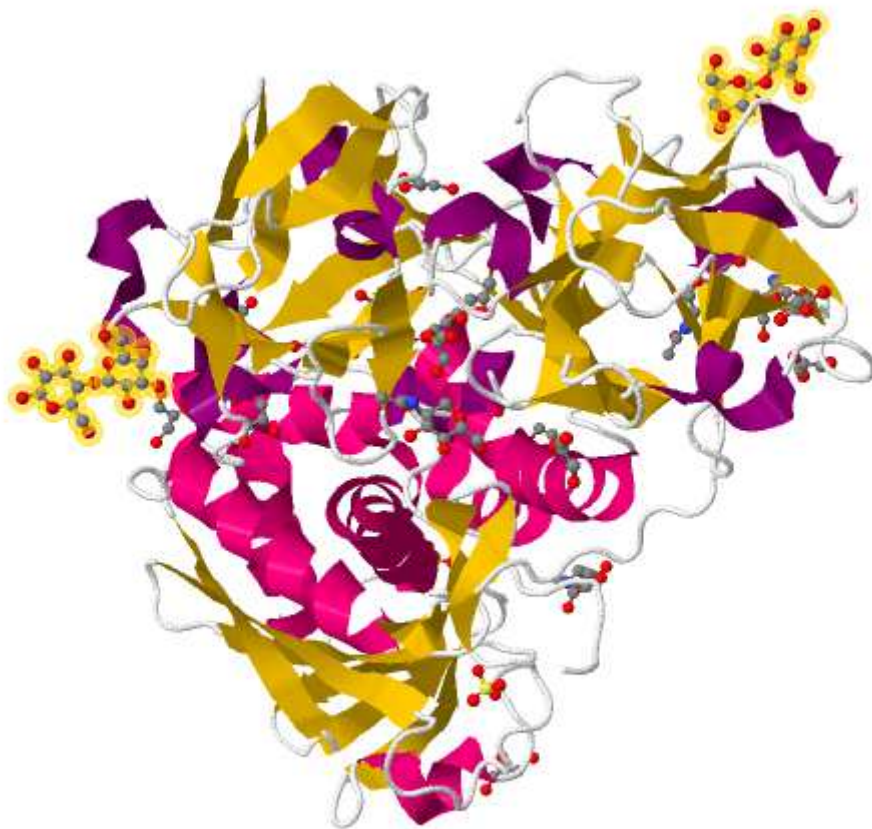


Figura 20. Estructura de la cadena B de la viscumina, sombreado en amarillo vemos las dos moléculas de lactosa que puede unir la lectina (imagen obtenida de PDB código 1PUU).

Mikeska *et al.* han descrito basados en sus estudios de la estructura cristalina de esta lectina que en la cadena-B localizan dos sitios de reconocimiento de galactosa, casi idénticos uno al otro.¹³⁹ Esta estructura primaria de la lectina del muérdago presenta muchas homologías con la lectina de *Ricinus communis* (64% de homologías en la cadena-B).¹⁴⁵ A pesar de ello, Lee *et al.*¹⁴⁶ señalan algunas diferencias entre ambas lectinas a la hora de interactuar con el carbohidrato.

Además y como ya hemos destacado en el comportamiento de las demás galectinas, estudios sobre viscumina reflejan cómo la afinidad aumenta con la multivalencia del glicoconjugado.¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ Por ejemplo, estudios llevados a cabo mediante ensayos de superficie con dendrímeros inmovilizados han permitido determinar la K_D del proceso de interacción y comprobar cómo la multivalencia aumenta la interacción pasando del rango micromolar a nanomolar.¹⁴⁷ Por eso en los últimos años se han llevado a cabo estudios sobre la interacción carbohidrato-proteínas de estas lectinas mediante diferentes metodologías.

Se han realizado estudios de inhibición que fueron llevados a cabo por Galanina *et al.*¹⁵⁰ mediante la inmovilización de diferentes glicoconjugados, comprobando que los compuestos más activos presentaban galactosa en el extremo terminal. Este estudio se llevó a cabo además con derivados desoxi-galactosa (2-, 3-, 4- y 6-), y corroboraron los datos obtenidos por rayos-X. El residuo OH-4 está implicado en mayor medida que los OH en posiciones 2, 3 y 6.

La técnica de RMN, combinada con los datos que proporcionan el modelado molecular y el conocimiento de la estructura cristalina de la lectina en su unión con galactosa, ha sido una herramienta de utilidad para determinar el patrón de reconocimiento. En este sentido, podemos citar por ejemplo el trabajo publicado por Alonso-Plaza *et al.*¹⁵¹ Estos autores han llevado a cabo estudios de reconocimiento de residuos de Gal- β -(1-3)-Glc y otras β -galactosil xilosas mediante RMN, comprobando que se cumple el patrón de reconocimiento de galactosas que se había observado mediante rayos-X.

La técnica de ITC, ha permitido obtener datos termodinámicos de la interacción de viscumina con sus ligandos. Por ejemplo, Jiménez *et al.*¹⁵² han estudiado mediante ITC, la interacción de lactosa con la cadena-B de viscumina. Estos autores observaron que al llevar a cabo los estudios de interacción en solución la estequiometría del proceso es fundamental, puesto que los dos sitios de reconocimiento interaccionan con lactosa pero no con la misma afinidad (K_A calculada del orden de 10^3 M para el primer sitio de reconocimiento y 10^4 M para el segundo).

Estos datos termodinámicos, se corroboran con los parámetros cinéticos obtenidos para los procesos de asociación y disociación determinados por técnicas como AFM y SPR. Por ejemplo, Dettman *et al.*¹⁵³ determinaron mediante SPR y AFM la velocidad de disociación (en un rango de 10^{-3} x s^{-1}) en la interacción de la lectina de *Viscum album* con derivados de lactosa y asialofetuina para comparar la intensidad de la interacción con la que se produce en la interacción de la lectina de *Ricinus communis* con los mismos ligandos.

Por último, se ha descrito la aplicación de la técnica de SPR en la interacción de viscumina con glicoconjugados de lactosa inmovilizados en superficie. Vornholt *et al.*¹⁵⁴ han empleado glicoconjugados inmovilizados en la superficie de un sensor de SPR para llevar a cabo la búsqueda de la especificidad de diferentes lectinas. Estos autores observaron que la viscumina presenta una elevada especificidad por residuos de Gal, puesto que no se observó interacción con otros residuos presentados en diferentes polisacáridos como manano, fucoidano, almidón y ácido hialurónico.

También se ha estudiado, por Muñoz *et al.*,^{155, 156} la interacción de viscumina con residuos de lactosa funcionalizada con 1,5-diaminonaftaleno o 2,6-diaminopiridina inmovilizada sobre la superficie del biosensor.

En el proceso de interacción, la viscumina también reconoce residuos de ácido siálico unidos a la galactosa terminal, especialmente los residuos unidos a ésta por enlaces $\alpha(2-6)$.^{157, 158} Por otro lado, los residuos como glucosa, fucosa, xilosa o GlcNAc unidos a la galactosa terminal no afectan al proceso de interacción.^{151, 159, 160}

I.4.2- Resonancia de plasmón superficial.

I.4.2.1-Introducción

Los organismos biológicos se encuentran entre los sistemas más eficientes y, en concreto, su capacidad para el reconocimiento de sustancias externas es insuperable. El uso de receptores biológicos en química analítica permite aprovechar su aptitud como sistemas de reconocimiento. La combinación de este tipo de elementos de reconocimiento biológico con una amplia variedad de sistemas de transducción ha abierto la puerta a un campo en rápida expansión como es el de los biosensores.¹⁶¹

Un biosensor se define como un dispositivo analítico compuesto por un elemento de reconocimiento biológico, capaz de reconocer un analito, en contacto íntimo con un transductor físico-químico capaz de generar una respuesta proporcional a la concentración de ese analito. Como resultado de la interacción específica del elemento de reconocimiento biológico con el analito, se produce un cambio físico-químico que el transductor convierte en una señal medible.¹⁶²

En la Figura 21 se muestra el esquema básico de funcionamiento de un biosensor. Las características únicas de este tipo de dispositivos vienen determinadas por la selectividad proporcionada por el elemento de reconocimiento biológico y la sensibilidad conseguida mediante un mecanismo de transducción adecuado. Podemos comprender, por tanto, que el comportamiento químico de la interfase interna entre el elemento de reconocimiento biológico y el transductor sea de una importancia crucial en el desarrollo de este tipo de sistemas.

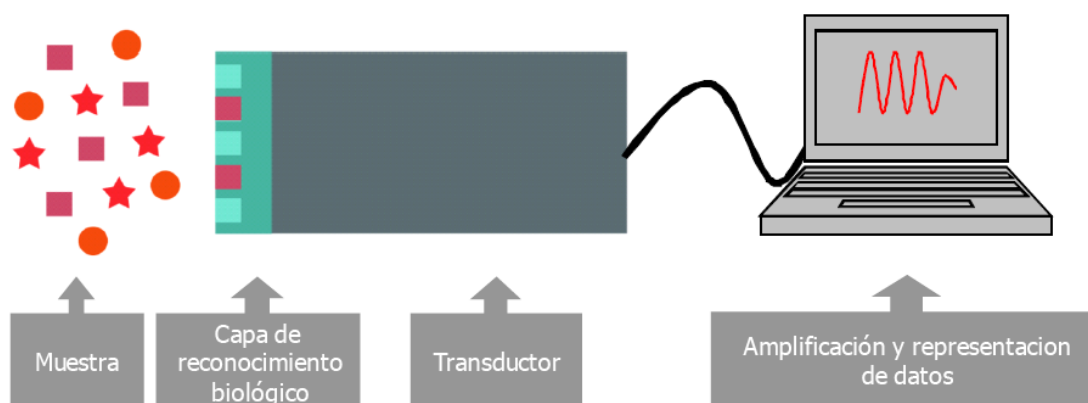


Figura 21. Configuración básica de un biosensor

Las dos características más importantes de un biosensor son la sensibilidad y la selectividad. Además de estas dos características esenciales, los biosensores presentan muchas otras entre las que destacan:

- Una elevada fiabilidad y estabilidad, que le otorgue un tiempo de vida largo.
- Versatilidad, que permite seleccionar diferentes receptores biológicos para determinar diferentes analitos o grupos de analitos.
- Capacidad de miniaturización, para poder desarrollar dispositivos portátiles que lleven a cabo medidas in situ.
- Posibilidad de realizar multi-análisis simultáneos.
- Bajo coste de producción, que permita su desarrollo comercial.
- Tiempo de análisis bajo.
- Mínimo pretratamiento de muestra.
- Reducido volumen de muestra.
- Manejo sencillo, que permita su uso por usuarios no especializados.
- Capacidad de automatización, para poder integrarlos en procesos industriales o estaciones de medida.

Los sensores de Resonancia de Plasmón de Superficie miden cambios en el índice de refracción en la superficie de un metal que presenta plasmón superficial y pueden ser dispositivos biosensores altamente sensibles para detectar interacciones biomoleculares cuando un elemento de reconocimiento adecuado se inmoviliza en la proximidad de la superficie de la capa metálica. Las moléculas de analito que entran en contacto con el biosensor, se unen al elemento de reconocimiento, produciéndose un incremento del

índice de refracción local en la superficie. Los cambios en el índice de refracción de este medio producen cambios en la constante de propagación del plasmón superficial, que a su vez altera características de la luz acoplada a éste como el ángulo y la longitud de onda de acoplamiento, la intensidad o la fase. Al registrar de forma continua la luz reflejada, se obtiene un perfil de los cambios del índice de refracción en el medio adyacente a la superficie metálica, obteniendo información en tiempo real de las interacciones que ocurren en este.

La técnica de SPR permite llevar a cabo el análisis cinético de interacciones biomoleculares de un modo accesible, en tiempo real y sin la necesidad de marcar las moléculas. Como la detección es independiente de la naturaleza química de las muestras analizadas, en principio, todo tipo de moléculas son susceptibles de estudio por esta técnica: proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, fármacos, cofactores o carbohidratos.¹⁶³

Desde que apareció el primer biosensor óptico en 1990 desarrollado por BIAcore AB (Pharmacia Biosensor, Uppsala), el número de instrumentos disponibles, no sólo de la casa BIAcore, sino de otras empresas ha aumentado de forma constante, algunos de ellos incluso dedicados a aplicaciones muy concretas. El principal interés en el uso de la técnica de SPR para la investigación es que proporciona un buen sistema de estudio de las interacciones biomoleculares ya que permite determinar la especificidad de la interacción con otras moléculas, las velocidades de asociación y disociación del proceso e incluso la afinidad, esto es, la fortaleza de la interacción.¹⁶⁴⁻¹⁶⁷

I.4.2.2-Aspectos técnicos de un equipo de SPR

Los biosensores de SPR se basan en una técnica óptica altamente especializada para detectar cambios en el índice de refracción en las proximidades de una superficie. Este fenómeno ocurre cuando, en condiciones de reflexión interna total, la luz polarizada incide sobre una superficie de oro (superficie del sensor) en la interfaz entre el soporte sólido y el medio líquido, que son dos medios con índice de refracción muy diferente: la superficie del sensor con un elevado índice de refracción y la fase líquida con bajo índice de refracción (Figura 22).

El equipo de SPR consta de un detector, un chip y un circuito integrado de líquidos para el transporte de la muestra, la adsorción a la superficie y la detección. El chip consiste en una superficie de vidrio sobre la que se dispone una capa muy fina de oro.

Esta superficie está normalmente funcionalizada con diferente tipo de matrices que proporciona un entorno adecuado para la interacción (como la matriz de dextrano) o

como alternativa para evitar interacciones inespecíficas con la matriz, o que están funcionalizadas de diferente manera para permitir varias estrategias de inmovilización.

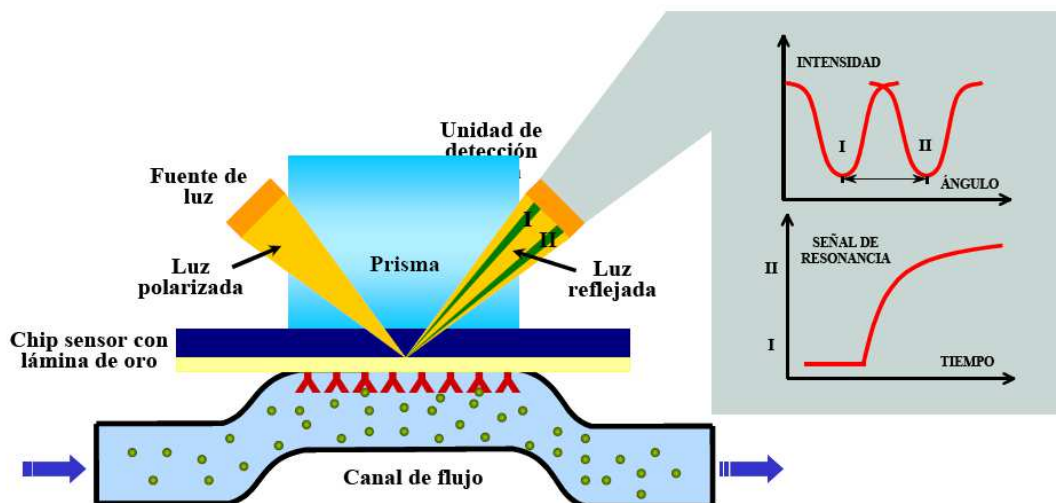


Figura 22. Esquema de la técnica de SPR. La luz polarizada incide sobre la superficie de oro y dependiendo de la masa que haya en la superficie, varía el índice de refracción del medio líquido (canal de flujo) que provoca la variación en el ángulo de reflexión del haz de luz. La variación física se traduce en una señal de resonancia en función del tiempo que se conoce como sensorgrama.

El sistema integrado de microfluído permite que las moléculas en solución pasen sobre la superficie del sensor con un flujo continuo y controlado lo que hace que la concentración de analito se mantenga constante durante todo el análisis. Los canales por donde fluye el líquido están diseñados para albergar volúmenes muy pequeños como 5 μL . Cuando el analito fluye por los canales y se une a la biomolécula diana inmovilizada en la superficie, la masa que aumenta en las proximidades del oro provoca un cambio en el índice de refracción del medio que se traduce como RU. Se puede correlacionar la cantidad de masa en la superficie en función de la intensidad de la señal, se conoce que 1 RU corresponde a 1 pg/mm^2 de sustancia inmovilizada en la superficie.

I.4.2.3- Experimento tipo de SPR

A) Inmovilización.

A la hora de llevar a cabo el procedimiento experimental, se requiere en primer lugar que una de las biomoléculas se inmovilice en la superficie de oro (ligando) mientras que

se monitoriza la interacción con una segunda biomolécula (analito) que se encuentra en solución.

La inmovilización del ligando en la superficie del sensor se lleva a cabo en función de la naturaleza de la molécula. En general existen tres estrategias generales para ello: la unión covalente, la estrategia de captura y por último la inmovilización mediante interacciones hidrofóbicas (Figura 23).

La unión covalente es la estrategia más empleada para la inmovilización de ligandos a la superficie del sensor. Los grupos carboximetilo presentes en los diferentes chips, permiten una amplia variedad de alternativas de unión ya que se pueden inmovilizar biomoléculas funcionalizadas con grupos amino, tiol o incluso aldehído mediante el empleo de hidrazina (Figura 23.a).

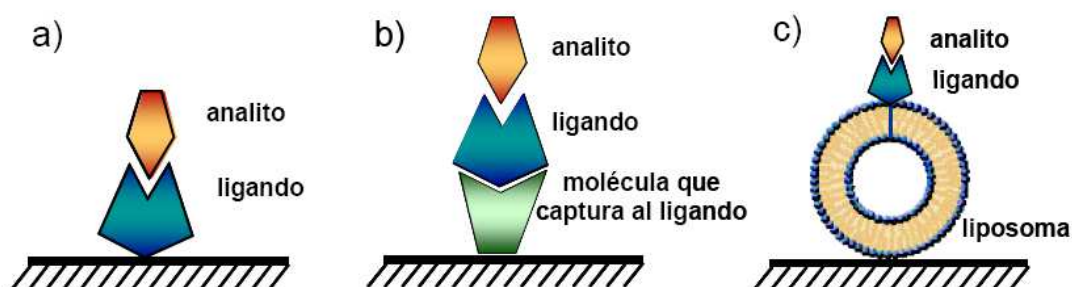


Figura 23. Posibilidades de inmovilización de los ligandos sobre la superficie del sensor: a) Inmovilización covalente; b) inmovilización mediante la captura del ligando y c) inmovilización a través de interacciones hidrofóbicas.

Para llevar a cabo la inmovilización covalente en los grupos carboximetilo, es importante controlar determinados factores como la temperatura, la concentración del ligando y el pH. Este último factor es fundamental cuando el ligando es una macromolécula o presenta cargas en su estructura, puesto que a pH superior a 3,5 los grupos carboxilo de la superficie están cargados negativamente. Por ello, en ocasiones es necesario llevar a cabo los llamados estudios de pre-concentración electrostática. Estos estudios consisten en comprobar la interacción del ligando con la matriz cargada en un rango de pH entre 3,5 (en la que los grupos carboxilos están cargados) y el punto isoelectrico del ligando, de modo que éste tenga carga opuesta a la de la superficie (Figura 24).

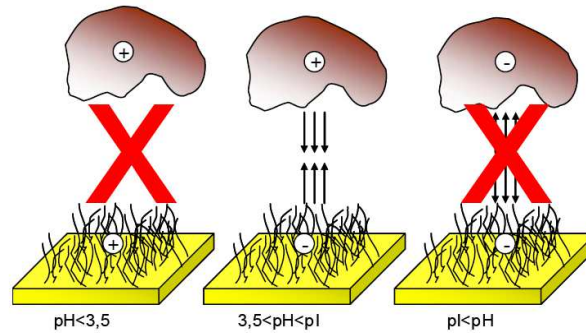


Figura 24. Estudio de preconcentración del ligando con la superficie. Si el pH en el que se lleva a cabo la inmovilización es demasiado alto o bajo, el ligando no se aproximará a la superficie.

En segundo lugar, la inmovilización del ligando puede llevarse a cabo mediante la captura de éste por parte de otra molécula que se encuentra inmovilizada en la superficie (Figura 23.b). La interacción entre el ligando y la molécula que lo captura debe tener una afinidad muy elevada y muy baja velocidad de disociación, de modo que el ligando se encuentre en la superficie todo el tiempo que dure el análisis. Los casos más comúnmente usados son ligandos biotinilados que presentan una afección extrema por la proteína estreptavidina, y por otro lado, la inmovilización de anticuerpos que permiten la captura de su antígeno.

Y en tercer lugar, la inmovilización del ligando se puede realizar a través de interacciones hidrofóbicas, cuando el estudio no pueda o deba hacerse en un entorno acuoso (Figura 23.c). En este caso, la adsorción del ligando hidrófobo puede hacerse a través de monocapas o de bicapas lipídicas, dependiendo de las características de las moléculas que se vayan a estudiar.

B) Registro de la interacción

Básicamente, la técnica de SPR va a detectar cambios en la masa de la fase acuosa que se encuentre próxima a la superficie del sensor (chip) mediante la medida de la variación del índice de refracción. Estos cambios en el índice de refracción se monitorizan en tiempo real y el resultado se expresa como unidades de respuesta o de resonancia (RU) en función del tiempo. La representación gráfica de la respuesta en función del tiempo es lo que se conoce como sensorgrama (Figura 25).

Inicialmente no hay inyección de la proteína y se observa una línea base. Cuando se inyecta el analito la señal aumenta a medida que se produce la interacción, es la fase de asociación. Cuando se deja de inyectar analito se libera espontáneamente en la fase de disociación. Por último, se inyecta una disolución para recuperar la línea base evitando

que quede analito asociado al ligando, esta solución es la de regeneración de la superficie, hace que desaparezca la interacción residual entre analito y ligando.

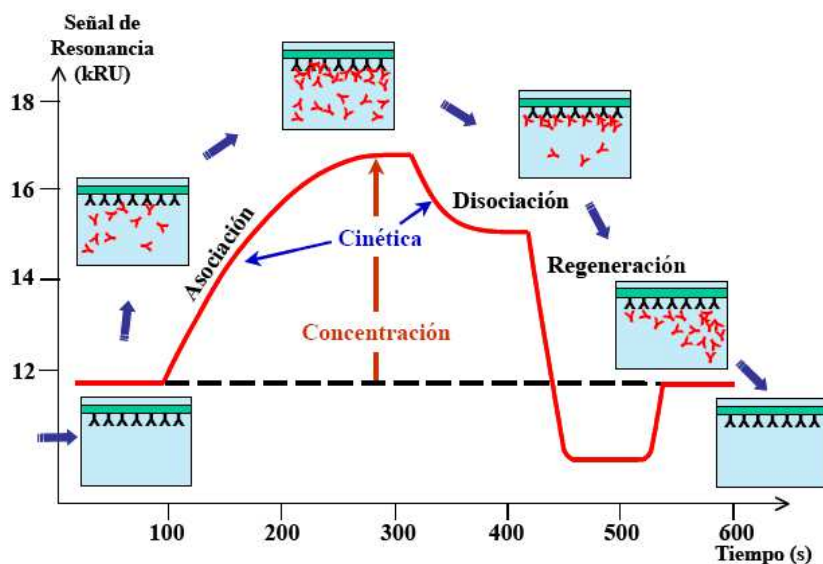


Figura 25. Representación de un sensorgrama.

Cuando registramos una interacción, inicialmente el tampón de trabajo fluye de modo continuo sobre la superficie del sensor y se obtiene la línea base (Figura 25). Cuando se inyecta la muestra de analito, la pendiente de la curva hacia arriba indica que hay asociación con el ligando inmovilizado. Después de la inyección, el analito unido al ligando se disocia espontáneamente con el flujo de tampón.

C) Regeneración de la superficie

La regeneración es el proceso por el cual se elimina el analito que haya quedado unido al ligando en el proceso de estudio de la interacción (Figura 25). La eliminación del analito de la superficie debe ser completa llegando a recuperar la línea base sin que el ligando vea perjudicada su actividad, porque de este proceso dependen los siguientes análisis que se realicen en esa superficie. La elección de la disolución regeneradora dependerá de la naturaleza de la interacción y de las características del ligando, de modo que éste permanezca inalterado. Este proceso no siempre es necesario, puesto que la disociación puede ser lo suficientemente rápida como para permitir la completa eliminación del analito.

I.4.2.4- Análisis de los datos

El análisis de los datos obtenidos mediante SPR se puede llevar a cabo a partir de la determinación de las constantes cinéticas o a partir de la respuesta en el equilibrio.

A) Determinación de los parámetros cinéticos de la interacción

Para llevar a cabo el análisis cinético de la interacción, lo primero es eliminar los posibles artefactos, mediante la sustracción de la respuesta de fondo que se obtiene al fluir el analito por la superficie control. Posteriormente, se determinan los parámetros cinéticos de la interacción. El modelo más simple es el de la interacción uno-uno (Langmuir) que puede ser aplicado en la mayoría de los casos (ecuación [1]).



La velocidad del proceso de interacción entre el analito y el ligando se define mediante las constantes de asociación (k_{on}) y la de disociación (k_{off}), según se expresa en la ecuación [2]:

$$d[AL]/dt = k_{on} [A][L] - k_{off} [AL] \quad [2]$$

Cuando se alcanza el equilibrio, la velocidad con que se asocian el analito y el ligando es igual a la velocidad con que se disocian, y por tanto el proceso responde a la siguiente ecuación [3]:

$$k_{on} [A][L] = k_{off} [AL] \quad [3]$$

De este modo, se pueden calcular a partir de la velocidad de asociación y disociación las constantes de afinidad en el equilibrio. Se definen como constantes de asociación (K_A) y de disociación (K_D) y se relacionan con k_{on} y k_{off} siguiendo las expresiones [4] y [5]:

$$K_A = [AL]/[A][L] = k_{on} / k_{off} \quad [4]$$

$$K_D = [A][L]/[AL] = k_{off} / k_{on} \quad [5]$$

En estos casos se asume que el analito es monovalente y homogéneo, que el ligando es homogéneo y que en la interacción no interviene ningún factor externo. Bajo estas condiciones, para calcular la afinidad los datos se deben ajustar a una isoterma de Langmuir que responde a la siguiente ecuación:

$$R_{max} = R_0 + (R_{sat} - R_0) K_A g_0 / (1 + K_A g_0) \quad [6]$$

Donde R_{max} es, para una concentración de ligando g_0 , el valor máximo de R a $t = \infty$ que se puede deducir fácilmente de la curva:

$$dR \cdot dt^{-1} \text{ frente } R \quad [7]$$

R_0 es el valor de R en el punto de partida correspondiente al canal que contiene el tampón sin ligando y R_{sat} es el valor máximo de R cuando todos los sitios de

reconocimiento están ocupados. Los parámetros cinéticos se pueden determinar directamente de las curvas experimentales de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$R = R_{\infty} + (R_{max} - R_{\infty}) [1 - \exp(-k_{off} t)] \quad [8]$$

B) Determinación de la constante de asociación en el estado estacionario

En determinadas situaciones, los datos obtenidos de un teórico ajuste cinético serían erróneos, puesto que los procesos de asociación y disociación son tan rápidos que no permiten recoger información.

Cuando esto ocurre y en el estudio se alcanza el estado estacionario de la interacción, es posible llevar a cabo el cálculo de la constante de disociación en el equilibrio (K_D) o de asociación (K_A) de la interacción entre analito y ligando, aplicando la siguiente ecuación:

$$R_{eq} = K_A \cdot C \cdot R_{max} / (K_A \cdot C \cdot n + 1) \quad [9]$$

En la que R_{eq} es la intensidad de la señal (RU) en el equilibrio, K_A es la constante de asociación en el equilibrio, C es la concentración del analito, R_{max} es la máxima intensidad que podría alcanzar el analito y n es un factor determinado por el impedimento estérico.

C) Factores que afectan a la interacción

- Inmovilización. La inmovilización del ligando puede afectar al proceso de interacción modificando las propiedades de la unión analito-ligando. Por ejemplo, la inmovilización puede inducir cambios conformacionales en el sitio de unión, puede provocar que la orientación de las moléculas sea inespecífica restringiendo así el acceso del analito al ligando o si la molécula inmovilizada es un macromolécula podría darse el caso de que se produzca una oligomerización.
- Impedimento estérico. Altas concentraciones de la macromolécula que se fluye pueden causar este problema que provoca una restricción en el acceso del analito al sitio de unión del ligando.
- Asociación. La fase de asociación se ve afectada principalmente por diversos factores como que la concentración del analito se aproxime a la concentración del ligando, la concentración de ligando y la constante de asociación.
- Limitación del transporte de masa. Debido a una densidad elevada de ligando en la superficie del sensor, la velocidad a la que el analito se une al ligando puede superar a la velocidad por la que circula por el canal. Lo mismo puede ocurrir en el proceso de disociación, en el que el transporte del analito por el canal es más lento que la velocidad

con que el analito se disocia del ligando. Este efecto se llama limitación del transporte de masa y provoca que la velocidad de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) sea más lenta que la real.

- Disociación. Los factores que afectan al proceso de disociación son la densidad de la superficie del analito asociado, la velocidad de disociación (k_{off}) y la posibilidad de que el analito que se disocia vuelva a asociarse al ligando antes de abandonar la superficie del sensor en un efecto que se conoce como reasociación (rebinding).

I.4.2.5- Aplicaciones del SPR al estudio de los glicoconjugados.

Todas estas características han provocado la expansión de la técnica de SPR para determinar los parámetros cinéticos de la interacción y la afinidad. Encontramos en la literatura muchos ejemplos de las aplicaciones de la SPR en glicobiología.

La aplicación más común del SPR en glicobiología es el estudio de reconocimiento molecular carbohidrato-proteína. La mayoría de estos estudios de interacción carbohidrato-lectina se llevan a cabo con el glicoconjugado inmovilizado¹⁶⁸ puesto que de ese modo se intenta mimetizar la presentación de los glicoconjugados en las membranas biológicas. Sin embargo, la otra posibilidad, la de inmovilizar la lectina en la superficie ha sido por lo general menos empleada aunque según Shinohara *et al.*¹⁶⁹ las constantes cinéticas y de afinidad determinadas son iguales por ambas aproximaciones.

En los últimos años, con el desarrollo de la técnica, ha aumentado el número de estudios de interacción carbohidrato-proteína. De todas ellas, quizás las lectinas más empleadas en este tipo de análisis sean tradicionalmente Concanavalina-A y la aglutinina de *Ricinus communis* (RCA120). Shinohara *et al.*¹⁷⁰ y Nahálková *et al.*¹⁷¹ describen la interacción de diferentes galactósidos inmovilizados en el sensor en su interacción con RCA120 que reconoce específicamente residuos de galactosa.

Del mismo modo, se podrían citar muchos ejemplos de la interacción de concanavalina-A con derivados de manosa. Pero destacamos el ejemplo de Yonzon *et al.* en el que se estudia la interacción de esta lectina con derivados de manosa funcionalizados con cadenas de tiol, de modo que se inmovilicen en superficie formando una monocapa autoensamblada. De este modo, los autores defienden que el empaquetamiento de las cadenas proporciona buenas características de presentación a la vez que se reducen las interacciones inespecíficas con la matriz.

Recientemente, Vornholt *et al.*¹⁵⁴ han aplicado la técnica de SPR a la búsqueda de especificidad de lectinas. Estos autores, emplean diferentes oligosacáridos con diferente

cadena de monosacáridos (Man, Gal o GalNAc) inmovilizados en la superficie del sensor para después fluir sobre ella diferentes lectinas (concanavalina-A o la lectina de *Viscum album* entre otras) y comparar así la especificidad por unos carbohidratos o por otros.

En los últimos años, ha aparecido la técnica de SPR de imagen, que permite visualizar la interacción. Karamanska *et al.*¹⁷² han aplicado esta técnica al estudio de alto rendimiento del reconocimiento de carbohidratos inmovilizados en superficie.

Pero como ya hemos mencionado anteriormente, esta técnica no sólo permite el estudio de las interacciones biomoleculares, sino que además, en los últimos años, se ha descrito la posibilidad de llevar a cabo reacciones enzimáticas catalizadas en la superficie del sensor.

Es una aproximación muy compleja puesto que la limitación en el acceso del sustrato y la enzima al aceptor puede provocar que no todas las moléculas del sustrato aceptor sean modificadas. Incluso también, si la reacción no presenta elevados rendimientos podría dar lugar como en el caso anterior a la formación de superficies heterogéneas, con dos tipos de ligando inmovilizados.

Sin embargo, esta metodología presenta dos ventajas principales. La primera de ellas es que se necesita poca cantidad de muestra para llevar a cabo la reacción y además no se producen pérdidas del producto de la reacción puesto que éste ya se encuentra inmovilizado para llevar a cabo estudios de interacción. Y en segundo lugar, es que la reacción se puede seguir en tiempo real mediante la visualización de los sensorgramas.

Por ejemplo, Muñoz *et al.*¹⁷³ y Hernáiz *et al.*¹⁷⁴ han descrito la modificación enzimática de residuos de derivados de heparina mediante sulfotransferasas para desarrollar un sistema de búsqueda de derivados de heparina con actividad biológica.

Por último, encontramos otro ejemplo en el trabajo publicado por Plath *et al.*¹⁷⁵ Estos autores han desarrollado un ensayo de actividad enzimática de la enzima sialiltransferasa a través del SPR. Mediante diferentes concentraciones de enzima provocan una modificación en el chip, y posteriormente correlacionan la intensidad de la respuesta de la interacción de una lectina específica de residuos de siálico con la actividad enzimática.

I.4.3- Resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación.

La espectroscopía de RMN proporciona un número elevado de técnicas para llevar a cabo el estudio de interacciones moleculares.^{176, 177} Estas interacciones pueden ser estudiadas bajo condiciones muy diversas y con diferentes grados de complejidad.¹⁷⁸ Desde la interacción de proteínas con proteínas en soluciones acuosas, o con proteínas embebidas en membranas, hasta la interacción de moléculas más pequeñas como los carbohidratos con proteínas que reconocen específicamente residuos glicosídicos. En este aspecto han sido muchos los estudios llevados a cabo en este tipo de interacciones, que se puede analizar desde dos puntos de vista: por un lado, se puede estudiar la interacción desde el punto de vista de la proteína (receptor), y por otro, se puede basar el estudio en el análisis de las señales del carbohidrato o ligando.

A pesar de que se obtenga una mayor información de la interacción desde el punto de vista de las señales del receptor, se aplican con mayor frecuencia las técnicas basadas en los cambios en las señales del ligando. Entre los experimentos empleados para llevar a cabo esta determinación se encuentran los experimentos de transferencia del efecto nuclear Overhauser (tr-NOE),¹⁷⁹ que detectan la diferente movilidad rotacional del ligando en el estado libre frente al estado asociado y los experimentos de STD (Saturation transfer difference),^{180, 181} que detectan la magnetización que se transfiere del receptor al ligando en el proceso de asociación.

Experimentos de tr-NOE.

Este experimento se ha convertido ya en clásico para determinar la conformación bioactiva de oligosacáridos unidos a una proteína.¹⁷⁹ Como en un experimento NOE, este experimento proporciona información de los protones cercanos en el espacio y que son posteriormente empleados para deducir la información conformacional en la interacción.

Los tr-NOE se miden preferentemente empleando experimentos bidimensionales 2D-NOESY (Nuclear Overhauser effect spectroscopy). Estos experimentos se basan en las variaciones del tiempo de correlación τ_c de los ligandos en estado libre o asociado con la proteína receptora. Para llevar a cabo estos experimentos lo primero que se hace es adquirir espectros NOESY a diferentes tiempos de mezcla para el ligando-carbohidrato sin proteína y determinar así las propiedades conformacionales del carbohidrato y

posteriormente se repiten en presencia de la proteína receptora. En general se admite que la proporción óptima para llevar a cabo estos estudios es de aproximadamente un exceso de ligando entre 10 y 30 veces sobre la de proteína.

Los carbohidratos son moléculas que se pueden considerar pequeñas (<1-2 kDa) y que presentan τ_c cortos y como consecuencia presentan generalmente NOEs positivos, a veces negativos, pero en todos los casos de poca intensidad. Cuando el carbohidrato se une a la molécula receptora, en este caso una proteína, de tamaño mucho mayor, el movimiento del carbohidrato se hace más lento como si fuera parte de la proteína, y su τ_c varía desde el rango de picosegundos hasta las decenas de nanosegundos lo que se traduce en la aparición de NOEs intensos y de signo negativo que se llaman NOEs transferidos.^{177, 181} Los tr-NOEs reflejan la conformación del ligando cuando se une al receptor en el sitio de reconocimiento (Figura 26)

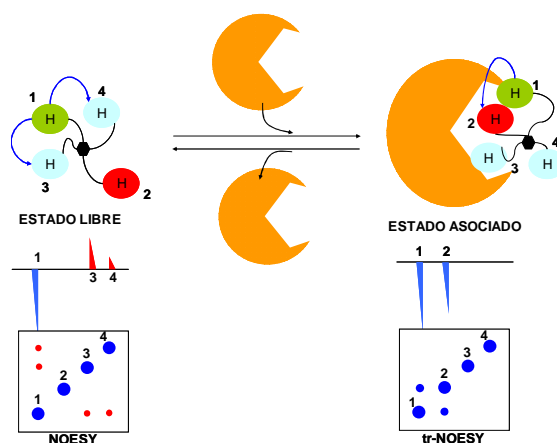


Figura 26 Esquema de un experimento tr-NOESY. Los picos de cruce del ligando cuando está asociado al ligando son intensos y del mismo signo que los de la diagonal.

Para observar el efecto del tr-NOE de una forma adecuada es necesario optimizar el tiempo de mezclado de los experimentos y la relación entre el ligando y el receptor. Esta relación va a depender de la velocidad de disociación del ligando. Si hay demasiado exceso de ligando sobre la proteína no se van a poder observar los efectos tr-NOE, puesto que van a predominar los NOEs del ligando en estado libre. Por el contrario, si no hay suficiente exceso de ligando, la fracción de carbohidrato unido a la proteína es mayor, pero esto puede traducirse en un ensanchamiento de la señal, en cambios en el desplazamiento químico o en superposiciones con las señales correspondientes a la proteína que son muy difíciles de interpretar.

Confirmando lo descrito anteriormente tenemos el ejemplo de Meyer *et al.*¹⁸² En la que se describen las curvas de NOEs observados para la unión de un disacárido a la aglutinina de *Aleuria aurantia*. Se ve claramente que el valor absoluto del NOE observado aumenta al mismo tiempo que el signo cambia de positivo a negativo. También se observó que el tiempo de mezclado para el que el efecto NOE en estado asociado se hacía máximo, era mucho menor que para el ligando en estado libre.

Por tanto, si observamos la presencia de tr-NOEs indica per se que hay unión del carbohidrato a la proteína y por tanto puede ser empleada para la búsqueda de bibliotecas de glicoconjugados en su unión a proteínas receptoras, y permite además el análisis conformacional de un glicoconjugado en el centro de reconocimiento de una lectina.^{151, 183-191}

Experimentos de diferencia de la transferencia de saturación (STD)

Los experimentos de diferencia de la transferencia de saturación (STD, Saturation Transfer Difference) son complementarios a los experimentos de tr-NOE y se fundamentan en las diferentes propiedades entre la forma libre del ligando y el tamaño del complejo debidas principalmente a la diferencia de tamaño entre ambas.^{180, 181, 192} El enorme potencial de esta técnica viene del potencial que tiene para la búsqueda de compuestos que se unan a ligandos y además la capacidad de determinar los epítomos de reconocimiento del ligando a nivel atómico.¹⁸⁰ El espectro de transferencia de la saturación por sí solo no tiene la misma repercusión que si lo combinamos con los espectro de sustracción. Ambos experimentos conjuntamente permiten separar las señales de las moléculas que se unen a la proteína de aquellas que no.

Para explicar con más detalle este experimento, se debe aclarar que se basa, como se ha mencionado, en la transferencia de la saturación desde la proteína al ligando en el estado asociado y que por su parte está en equilibrio con su estado libre en disolución, siendo en la forma libre en la que se detecta la saturación. De este modo, la sustracción del espectro en el que se saturan las resonancias de la proteína del espectro en el que no se saturan, se obtiene un nuevo espectro, diferencia, en el que sólo se observan las señales del ligando que se hayan visto afectadas por la saturación. Para asegurar que la variación de la intensidad de las señales del ligando proviene únicamente de la transferencia de saturación desde la proteína al ligando, debemos irradiar exclusivamente las señales de la proteína sin que las señales del ligando se vean

afectadas. La irradiación selectiva de la proteína se conoce como *on-resonance* y el valor de la frecuencia que se emplea generalmente está alrededor de -1 ppm, puesto que en esta región del espectro no se va a encontrar ninguna señal de resonancia del ligando y sí de la proteína. También es posible elegir una frecuencia de saturación entre 7-8 ppm, pero siempre y cuando el ligando no presente ninguna señal en esa región. Para conseguir la irradiación selectiva se usa generalmente sucesivos pulsos gaussianos, siguiendo la secuencia descrita por primera vez por sus autores,^{180, 192} lo cual supone una ventaja en cuanto a la robustez del método frente a otro tipo de pulsos que pudieran emplearse. Por cuestiones técnicas, para obtener el espectro en el cual está presente el complejo ligando-receptor pero sin irradiar selectivamente al receptor (*off-resonance*) es necesario elegir un valor de frecuencia en el que nos aseguremos que no hay ninguna señal ni del ligando ni del receptor, ya que no es posible programar un experimento STD en el que no haya irradiación. Para este fin se suelen seleccionar valores de frecuencia de 30-50 ppm, alejados de la región espectral donde se encuentran las señales correspondientes al ligando o al receptor.

Este efecto se basa en la capacidad de las macromoléculas de relajar muy eficientemente. La saturación selectiva de la resonancia de la proteína provoca que la magnetización se transfiera intramolecularmente a través de toda la proteína (difusión de espín) hasta que llegue al sitio de unión. Cuando el ligando es reconocido por el receptor y se produce la interacción, la magnetización se transfiere intermolecularmente a los protones del ligando que se encuentren en contacto íntimo con la proteína (Figura 27). La transferencia de la saturación será más eficiente cuanto más largo sea el tiempo de saturación y mayor sea el tamaño del receptor presentando además la ventaja de que no hay límite superior respecto al tamaño del receptor.

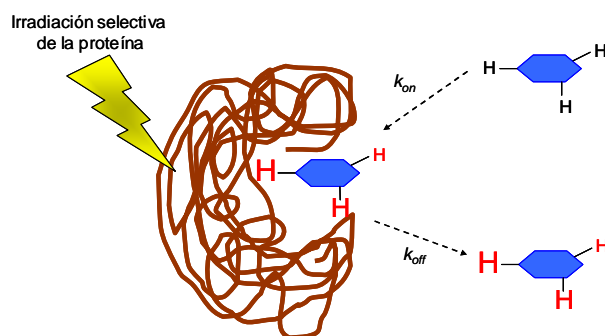


Figura 27. Esquema del experimento de STD. Cuando el ligando interactúa con la proteína irradiada, la saturación se transfiere al ligando. Como se trata de un intercambio rápido, el ligando conserva sus características en el estado libre que es donde se detecta.

Con los experimentos STD, es posible detectar interacciones ligando-proteína cuando las constantes de disociación están entre 10^{-3} y 10^{-8} M. Las aplicaciones de estos experimentos de STD son muy variadas, por ejemplo se ha descrito la posibilidad de determinar los protones de los ligandos que interactúan con la proteína de una mezcla de moléculas procedentes de extractos o bibliotecas.^{187, 193-195}

El STD, también permite llevar a cabo estudios de reconocimiento del sustrato por parte de una enzima.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ Por ejemplo, en el grupo del Dr. Peters *et al.* se ha estudiado la especificidad de la galactosiltransferasa humana responsable de la síntesis del determinante antigénico del grupo sanguíneo B por el sustrato donador.^{196, 197} Además, tiene aplicación para llevar a cabo un mapeo refinado de los epítomos de diferentes glicoconjugados en su unión a proteínas que reconocen selectivamente carbohidratos. Por ejemplo, Bhunia *et al.*¹⁹⁹ y Haselhorst *et al.*²⁰⁰ han empleado estos experimentos STD para llevar a cabo el reconocimiento de sialil Lewis^x mediante dos lectinas específicas de estos residuos. Incluso, para la aplicación de los experimentos STD a células enteras, se ha descrito una técnica de doble diferencia (STDD-NMR) que básicamente lo que hace es filtrar la señal de fondo de la célula.¹⁹⁵

I.4.4- Fluorescencia.

Las proteínas pueden presentar en su secuencia aminoácidos con propiedades fluorescentes: triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe). Estos residuos se

utilizan como sondas intrínsecas de fluorescencia para la caracterización y cuantificación de diferentes efectos: cambio de pH, temperatura, unión de glicodendrimeros y asociación proteína-proteína, entre otros. Dependiendo de la longitud de onda de excitación se obtiene una información u otra, así si λ_{exc} es 280 nm el espectro de emisión corresponde a los residuos Tyr y Trp; sin embargo si se excita a λ_{exc} 295 nm la emisión es únicamente causada por el Trp. El triptófano es un aminoácido natural cuya cadena lateral contiene un grupo indol sustituido en posición C3 (Figura 29). Presenta un comportamiento fotofísico complejo, que aunque limita en muchos casos su utilización como sonda fluorescente en distintos sistemas biológicos, siempre representa un buen punto de partida en la caracterización de las proteínas nativas.

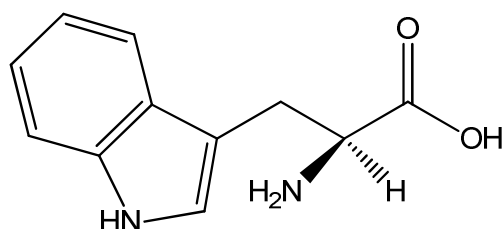


Figura 29- Estructura del aminoácido triptófano.

La emisión del Trp es muy sensible a la polaridad del microentorno que le rodea, así, las proteínas que poseen estos aminoácidos presentan una emisión entre 320nm, si el Trp está oculto y 350 nm cuando el Trp se encuentra expuesto. La variación en la intensidad de fluorescencia y el desplazamiento de la longitud de onda del máximo de emisión, $\lambda_{m\acute{a}x}$, permiten caracterizar y cuantificar diferentes fenómenos.²⁰¹

Laviscumina presenta en su estructura primaria un total de 8 triptófanos (Trp), 7 tirosinas (Tyr) y 5 fenilalaninas (Phe). La adición de los glicodendrimeros produce una disminución de intensidad de la señal en la muestra original, a este fenómeno se le denomina amortiguación o inhibición de fluorescencia. Existen dos tipos de inhibición; dinámica y estática.

La inhibición dinámica se debe a los choques ocasionados entre las moléculas. En cambio en la inhibición estática esta desactivación se debe fundamentalmente a la formación de complejos. Ambos requieren contacto molecular entre el fluoróforo y el inhibidor. La inhibición colisional (dinámica) se describe por la ecuación de Stern-Volmer que se representa a continuación.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q]$$

Donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y en presencia del ligando respectivamente; $[Q]$ es la concentración del ligando; K_q es la constante de inhibición de Stern-Volmer. El valor de K_{sv} es la pendiente de la recta obtenida al representar F_0/F frente a la concentración del ligando $[Q]$. Una representación lineal indica un caso sencillo en los que todos los fluoróforos son igualmente accesibles para el inhibidor.

En el caso de proteínas con múltiples residuos Trp, como la viscumina, se utiliza una ecuación modificada de Stern-Volmer que tiene en cuenta la fluorescencia de los residuos que no intervienen en la unión, pero que contribuyen al total de la intensidad.^{202, 203} En este caso se utiliza la ecuación modificada que vemos a continuación.

$$\frac{F}{F_0} = f_0 + \frac{f_1}{1 + K_a \cdot [Q]}$$

Donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y en presencia del ligando respectivamente; f_0 es la fracción de contribución a la fluorescencia de los residuos que no intervienen en la unión, que son totalmente inaccesibles al ligando; f_1 es la fracción de fluorescencia correspondiente a los residuos que se ven afectados por la unión al ligando; K_a es la constante de amortiguación de Stern-Volmer de la fracción accesible al ligando; y $[Q]$ es la concentración del ligando.

I.4.5- Calorimetría isoterma de titulación.

Es una técnica física que permite determinar los parámetros termodinámicos de las interacciones químicas. Es una técnica cuantitativa mediante la cual se pueden medir directamente constantes de afinidad (K_A), cambios de entalpía (ΔH) y la estequiometría (n) de la interacción entre dos o más moléculas en disolución. De este modo es posible

calcular la energía de Gibbs (ΔG) y la variación de la entropía (ΔS) del proceso mediante la ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$$

R = constante universal de los gases ideales; T = temperatura absoluta.

Un calorímetro está compuesto por dos celdas idénticas hechas de un material conductor térmico altamente eficiente recubierto por una manta adiabática (Figura 28). Se emplean circuitos termopila/termopar muy sensibles para detectar diferencias en la temperatura entre la celda de referencia (llena de tampón o agua) y la celda de muestra que contiene la macromolécula. Antes de la adición del ligando se aplica una potencia constante ($< 1\text{mW}$) a la celda de referencia y se pone en funcionamiento un circuito de retroalimentación que activa un calefactor en la celda de la muestra. Durante el experimento el ligando es añadido a la celda de la muestra en cantidades perfectamente conocidas produciendo calor o absorbiendo calor del medio dependiendo de la naturaleza de la unión. Las medidas que se recogen son la potencia en función del tiempo requerida para mantener una temperatura idéntica entre la celda de muestra y la de referencia.^{204, 205}

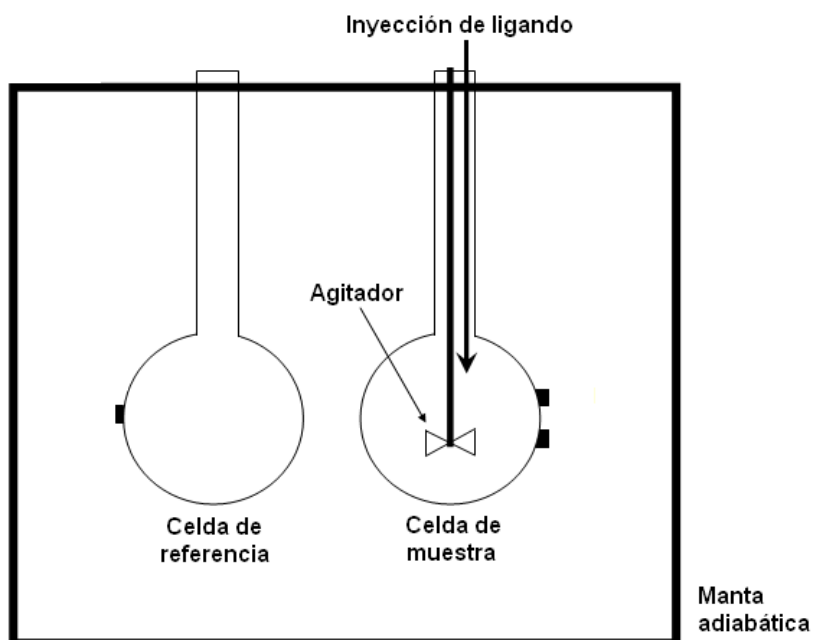


Figura 28. Representación esquemática de un dispositivo de ITC.

En una reacción exotérmica, la temperatura de la celda de muestra aumenta a medida que se adiciona el ligando. Esto provoca una disminución de la potencia eléctrica aplicada al calefactor de la celda de muestra para mantener las temperaturas iguales en las dos celdas. En una reacción endotérmica, ocurre lo contrario, el circuito de retroalimentación aumenta la potencia aplicada para mantener la temperatura constante. Los datos se recogen como las $\mu\text{cal/s}$ necesarias para mantener a la misma temperatura la celda de muestra y la de referencia. Como resultado se obtienen una serie de picos de flujo de calor/inyección que pueden integrarse con respecto al tiempo dando lugar al calor producido en cada inyección. Estos calores producidos se pueden analizar en función de la concentración molar de ligando y macromolécula usados en el experimento para obtener los parámetros termodinámicos de la unión.

La versatilidad de ésta técnica hace que pueda aplicarse al estudio de diversos procesos biológicos. Además de los ejemplos vistos anteriormente,^{206, 207} ésta metodología se ha aplicado al estudio de la cuantificación de la afinidad de unión específica,^{208, 209} al descubrimiento de nuevos fármacos,²¹⁰ o a la caracterización del mecanismo de acción enzimático.²¹¹ También encontramos ejemplos del uso del ITC en el estudio de la interacción de glicodendrimeros con lectinas.^{212, 213}

I.5- Objetivos.

El objetivo de la presente memoria es la síntesis química de nanoestructuras basadas en carbohidratos para llevar a cabo el estudio de interacción carbohidrato-proteína mediante distintas técnicas biofísicas como SPR, RMN, fluorescencia e ITC.

Para desarrollar este objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos más específicos.

1- Desarrollo de una estrategia sintética para la síntesis de nanoestructuras con *cores* aromáticos y conjugación π -extendida tipo etinilbenceno, basado en la reacción de Sonogashira asistida por microondas.

2- Desarrollo de una estrategia sintética para la síntesis de nanoestructuras aromáticas con *cores* bencénicos funcionalizados con acetilenos terminales, basada en reacciones de S_N2 y Mitsunobu.

3- Desarrollo de una estrategia sintética para la síntesis de nanoestructuras alifáticas funcionalizadas con cloruros de ácido.

4- Puesta a punto de la síntesis de de la lactosa funcionalizada con un grupo azida terminal o un grupo naftaleno terminal.

5- Puesta a punto de una estrategia sintética basada en la reacción de cicloadición 1,3-dipolar asistida por microondas, para la síntesis de glicodendrímeros funcionalizados con lactosa y con *core* aromático y alifático.

6- Puesta a punto de una estrategia sintética basada en la reacción de amidación, para la síntesis de glicodendrímeros funcionalizados con lactosa unida a 1,5-diaminonaftaleno y con *core* alifático.

7- Estudio de caracterización estructural de los glicodendrímeros obtenidos en los apartados 5 y 6.

8- Estudio de las interacciones glicodendrímero-viscumina mediante SPR, STD, fluorescencia e ITC.

9- Estudio de las interacciones glicodendrímero-viscumina mediante modelado molecular.

I.6- Resumen en inglés.

- Introduction.

Carbohydrates are the most abundant type of biomolecules on the planet. They play very different roles in nature such as energy reserves, molecular recognition intracellular trafficking or interactions that occur between pathogenic microorganisms and viruses with the surface of mammalian cells. Carbohydrates are expressed on cell surfaces and bind to proteins or glycoproteins forming membrane lipids or glycolipids. Despite its critical importance, the carbohydrate-protein interactions are characterized paradoxically by a relatively weak association constants (milli-micromolar). In nature, this situation is normally compensated for by displaying multiple copies of the same carbohydrates act as ligands in the extracellular domains. This phenomenon results in a synergistic and cooperative effect, known as dendritic or glicocluster effect. The neoglycoconjugates are synthetic analogs of the corresponding natural glycoconjugates (glycoproteins and glycolipids) that mimic their behavior in their interaction with the environment. A synthetic compound having a carbohydrate with a multivalent effect is generally referred to as multivalent neoglycoconjugate. Among the most commonly used types included in multivalent neoglycoconjugates we can find glycodendrimers, which has in the surface carbohydrate compounds. The term lectin applies to proteins or glycoproteins of non-immune origin which specifically recognize carbohydrates on cell surface or suspension. These proteins are widely distributed in nature and have been identified in different organisms such as viruses, bacteria, fungi, plants or animals.

The objectives of this thesis are:

1. Lactose functionalization with suitable groups for the formation of glycodendrimers specifically functionalization with amine and azido groups.
2. Synthesis of the suitable cores for binding lactose functionalized to glycodendrimers, in particular aliphatic and aromatic synthetic cores.
3. Synthesis of glycodendrimers by bonding lactose and the previously synthesized cores by S_N2 and 1-3dipolar cycloaddition catalyzed by microwave.
4. Molecular characterization of newly synthesized molecules.
5. Study of the interaction of synthesized glycodendrimers with lectins of biological interest, using different techniques.

Results.

In this thesis we have synthesized new glycodendrimers, dividing them into two groups, those with a central core with aliphatic and aromatic core. Carbohydrates have been synthesized functionalized with azide and amino groups, have joined the various cores functionalized with alkyne groups or acid chloride respectively. After synthesis and characterization by NMR, their interactions were studied with the *Viscum album* agglutinin, a lectin of biological interest. The techniques used were SPR, STD-NMR, ITC and Fluorescence. The SPR technique allows to conduct kinetic analysis of biomolecular interactions in a manner accessible in real time and without the need to make the molecules, this technique gives kinetic parameters as association constants, dissociation. As the detection is independent of the chemical nature of the samples, in principle, all types of molecules are susceptible to study by this technique: proteins, lipids, nucleic acids, drugs, cofactors or carbohydrate. We found that the K_D of the interaction of the viscumin with the glycodendrimers are in the μM range, and the stronger interaction appears with the tri and tetravalent compounds. The STD-NMR experiments are based on the different properties between the free form of the ligand and complex size mainly due to the size difference between them. The study indicates that the viscumin interacts mainly with the hydroxy groups of the galactose moiety. ITC is a physical technique for determining the thermodynamic parameters of the chemical interactions. It is a constant directly quantitative technique whereby one can measure affinity and enthalpy changes the stoichiometry of the interaction between two or more molecules in solution. The results indicated that the interaction of the molecules with the viscumin is in the μM range. Fluorescence is a technique to analyze the interaction between a protein and a ligand. Fluorescence spectrum of the protein as the ligand concentration is increased is measured, changes in the spectra give us information interaction. As we increase the ligand concentration is a change in the tertiary structure of the protein, suggesting that an interaction occurs between glycodendrimers and the viscumin. Glycodendrimers that have worked best in their interaction with viscumin have been those who have a central core with aromatic groups within. The compounds which interact the best with the protein are the trivalent and tetravalent ones, compared with the bivalent. The obtained kinetics are consistent with the literature.

II- MATERIALES Y MÉTODOS

II.1- Materiales

Todos los reactivos se obtuvieron de diferentes casas comerciales y se usaron directamente sin necesidad de purificación previa: Bio-Rad, Fisher, Fluka, Merck, Pierce, Scharlau, SDS, Sigma-Aldrich.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono se registraron en un espectrómetro de 300 MHz Bruker Avance y Bruker Avance II, empleando en ambos casos tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos se asignan en unidades de ppm. El disolvente empleado fue cloroformo deuterado.

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro BrukerReflex III en una matriz sólida de TCNQ por la técnica de MALDI. Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa.

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron cromatofolios de gel de sílice Macherey-Nagel G/UV254. Las cromatografías en columna se realizaron con gel de sílice Scharlau 60, 0.04-0.06 mm para columna flash (230-400 mesh), el eluyente se indica en cada caso, se emplearon como reveladores, lámpara de ultravioleta/visible (UV/vis) de $\lambda = 254$ nm, revelador de azúcares: 10% de ácido sulfúrico en metanol y calor, revelador de ácido fosfomolibdico 10% en etanol y calor.

Las reacciones en microondas se han llevado a cabo en el equipo Biotage Initiator Classic 2.5.

Los estudios de interacción mediante SPR se realizaron en un aparato BIAcore-3000 (Biacore). Los datos se analizaron empleando BIAEvaluation software versión 4.1, 2003 (Biacore). Los Chips para inmovilización de ligandos en SPR, surfactantes y el kit de unión covalente (amino coupling kit) fueron adquiridos de GE Healthcare, Uppsala, Suecia. La cadena B de la lectina de *Viscum album* (viscumina), fue proporcionada por el Prof. Dr. H.J. Gabius.

Los estudios de STD realizados por el grupo de Prof. Jiménez Barbero se registraron mediante un espectrómetro Bruker Avance de 500 y 600 MHz equipados con criosonda.

Los estudios de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro modular PTI. En todos los experimentos se utilizaron cubetas de cuarzo Hellma con una longitud de paso de 0.2 cm. Los espectros realizados se han obtenido como promedio de tres

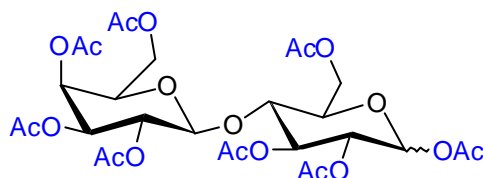
acumulaciones. La temperatura de trabajo se mantuvo constante mediante un Peltier TLC 50 integrado en el espectrofluorímetro. El análisis de espectros así como la adquisición de datos se ha realizado mediante el programa FELIX 32.

Los experimentos de calorimetría se realizaron empleando un micocalorímetro MicroCal iTC 200 de GE Healthcare.

II.2- Síntesis química de glicoconjugados y glicodendrimeros.

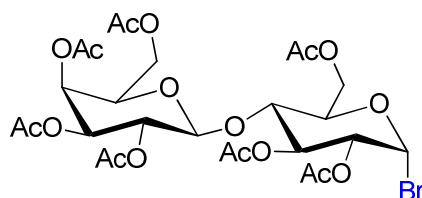
II.2.1- Funcionalización de la lactosa.

II.2.1.1- Síntesis de O-acetil-lactosa (2).



En un matraz se añaden lactosa **1** (10 g, 29.2 mmol) anhídrido acético (27 g, 264 mmol) y piridina (2.44 g, 30 mmol) previamente destilada. La reacción se calienta a 100° C y se deja en agitación durante 12 horas. Se deja enfriar la reacción y se añade CH₂Cl₂. La fase orgánica se lava con HCl 2%, una disolución saturada de NaHCO₃ y finalmente con una disolución saturada de NaCl. Se seca la fase orgánica con MgSO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene un sólido de color blanco con un rendimiento del 94% que no necesita posterior purificación para ser utilizado en la siguiente etapa de reacción.

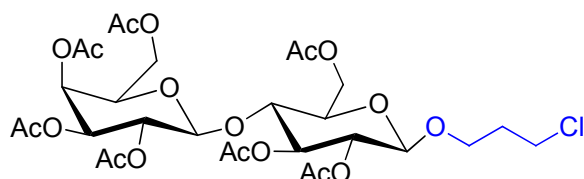
II.2.1.2- Síntesis de 1-bromo-hepta-O-acetil-β-lactosa (3).



En una matraz de fondo redondo se adiciona una disolución de **2** (5 g, 2.95 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (5 ml), se añaden, gota a gota, 5 ml de HBr al 30% en ácido acético glacial y a 0° C. Finalizada la adición, se deja en agitación durante 3 horas. La reacción

se sigue mediante TLC, usando como eluyente, una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH (20:1). El crudo de reacción se adiciona sobre un baño de agua-hielo en agitación, se deja reposar y se observa la formación de dos fases. Se extrae la fase orgánica con CH₂Cl₂ se lava con: agua, NaHCO₃ y NaCl. Se seca con MgSO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene un sólido blanco con un rendimiento del 69 %. RMN-1H, 300 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 1.96, 2.05, 2.06, 2.07, 2.09, 2.12, 2.15 (s, 7 CH₃), 3.86 (t, J=9.8 Hz, 1H, H-4), 3.88 (m, 1H, H-5''), 4.00 – 4.20 (m, 4H, H-6B, H-5, H-6''A, H-6''B), 4.49(m, 1H, H-6A), 4.52 (d, J= 7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.77 (dd, J= 10.0 y 4.1 Hz, 1H, H-2), 4.96 (dd, J= 9.8 y 3.3 Hz, 1H, H-3'), 5.12 (dd, J= 9.8 y 7.8 Hz, 1H, H-2'), 5.35 (d, J=3.3 Hz), 1H, H-4'), 5.55 (t, J=10 Hz Hz, 1H, H-3), 6.52 (d, J= 4.1 Hz, 1H, H-1). RMN-13C, 75,5 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 61.02, 61.19, 66.65, 69.07, 69.63, 70.82, 70.86, 71.00, 73.01, 74.95, 86.42 (C-1), 100.89 (C-1'), 169.04 (CO), 169.30 (CO), 170.04 (CO), 170.13 (CO), 1780.21 (CO), 170.25 (CO), 170.41.

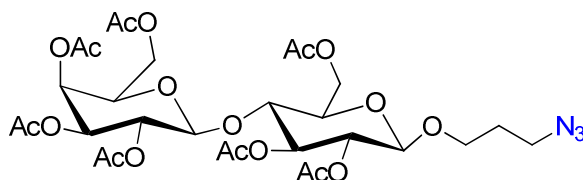
II.2.1.3- Síntesis de 1-O-(3-cloropropil)-hepta-O-acetil-β-lactosa (4).



Se disuelve **3** (4 g, 5.71 mmol) en 4.75 ml de 3-cloropropanol anhidro (5.4 g, 57.1 mmol), se añaden Hg(CN)₂ (1.44 g, 5.71 mmol), HgBr₂ (205 mg, 0.57 mmol) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 6 horas. Se realiza un seguimiento de la reacción mediante TLC, usando como eluyente una mezcla de Hexano:AcOEt (2:3). Se disuelve el crudo de reacción en CH₂Cl₂ y se lava la fase orgánica con NaHCO₃ y NaCl. Se secó dicha fase con MgSO₄ anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente Hexano:AcOEt (2:3). Se obtiene el producto **4** como un aceite incoloro con un rendimiento de 75%. RMN-1H, 300 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 1.93-2.11 (7 CH₃), 1.95 (m, 2H, H-2), 3.55 (t, J=6.8 Hz, 2H, H-3), 3.60 (t, J=6.8 Hz, 2H, H-1), 3.57 (m, 1H, H-5'), 3.75 (m, 1H, H-4'), 3.85 (m, 1H, H-5''), 4.0-4.2 (m, 3H, H-6''B, H-6''A, H-6''B), 4.43 (d, J= 7.8 Hz, 1H, H-1''), 4.44 (m, 1H, H-6'A), 4.46 (d, J=7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.85 (dd, J= 9.8 y 7.8 Hz, 1H, H-2'), 4.92 (dd, J=9.8 y 3.3 Hz, 1H, H-3''), 5.06 (dd, J=9.8 y 7.8 Hz, 1H, H-2''), 5.16 (t, J=9.8 Hz, 1H, H-3'), 5.30 (d, J=3.3 Hz, 1H, H-4'). RMN-13C, 75,5 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 20.55-20.90 (7 CH₃), 32.31 (C-2), 41.36 (C-3),

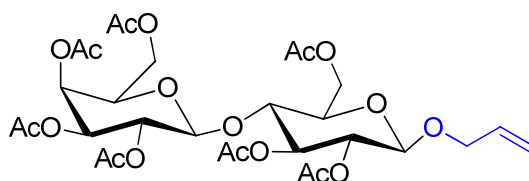
60.29 (C-6''), 61.95 (C-1'), 66.30 (C-1), 66.60 (C-4'), 69.03 (C-2''), 70.58 (C-5''), 70.90 (C-3''), 71.54 (C-2), 72.57 (C-3'), 72.61 (C-5'), 100.69 (C-1'), 100.95 (C-1''), 169.19 (CO), 169.70 (CO), 169.87(CO), 170.14 (CO), 170.24 (CO), 170.43 (CO), 170.49 (CO).

II.2.1.4-Síntesis de 1-O-(3-azidopropil)-hepta-O-acetil-β-lactosa (5).



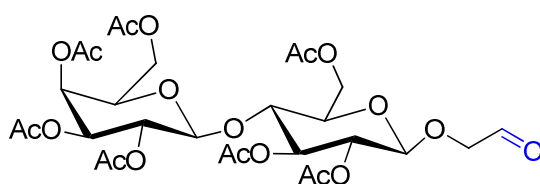
Se disuelve **4** (2 g, 2.8 mmol) en DMF seca (10 ml) y se calienta la disolución a 60° C. Una vez disuelto el compuesto **4**, se añade NaN₃ (270 mg, 4.2 mmol) y se deja en agitación 24 horas a 100° C. Se realizó un seguimiento de la reacción mediante TLC usando como eluyente Hexano:AcOEt (1:2). Se deja enfriar y se disuelve el crudo en acetato de etilo. La fase orgánica se lava con agua y una disolución saturada de NaCl. Se seca la fase orgánica con MgSO₄ anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purificó mediante cromatografía flash utilizando como eluyente Hexano:AcOEt (1:2). Se obtiene **5** como un sólido blanco con un rendimiento 36%. RMN-1H, 300 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 1.73 (m, 2H, H-2), 1.80-2.10 (21 H, 7 CH₃), 3.25 (t, J= 6.4Hz, H-3), 3.47 (m, 1H, H-1B), 3.53 (m, 1H, H-5'), 3.71 (t, J=9.4 Hz, 1H, H-4'), 3.81 (m, 1H, H 5'), 3.83 (m, 1H, H-1A), 3.95-4.05 (m, 3H, H-6'B, H-6'A, H-6'B), 4.39 (m, 1H, H-6'A), 4.38 (d, J=7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.42 (d, J=7.8 Hz, H-1''), 4.77 (dd, J=9.4 y 7.8 Hz, 1H, H-2'), 4.87 (dd, J=10.4 y 3.4 Hz, 1H, H-3''), 4.99 (dd, J=10.4 y 7.8 Hz, 1H, H-2''), 5.08 (t, J=9.4 Hz, 1H, H-3'), 5.23 (d, J=3.4 Hz, 1H, H-4''), RMN-13C, 75,5 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 28.94 (C-2), 47.92 (C-3), 60.84 (C-6''), 61.95 (C-6'), 66.43 (C-1), 66.65 (C-4'), 69.11 (C-2''), 70.66 (C-5''), 70.94 (C-3''), 71.62 (C-2), 72.66 (C-3'), 72.74 (C-5'), 76.19 (C-4'), 100.52 (C-1'), 100.99 (C-1''), 169.00 (CO), 169.54 (CO), 169.68 (CO), 169.96 (CO), 170.07 (CO), 170.28 (2x CO).

II.2.1.5- Síntesis de 1-O-(2-propen-1-il)-hepta-O-acetil-β-lactosa (6).



Se disuelve **3** (4 g, 5.71 mmol) en 4.75 ml de alcohol alílico (5.4 g, 57.1 mmol), se añaden $\text{Hg}(\text{CN})_2$ (1.44 g, 5.71 mmol), HgBr_2 (205 mg, 0.57 mmol) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 6 horas. Se realiza un seguimiento de la reacción mediante TLC, usando como eluyente una mezcla de Hexano:AcOEt (2:3). Se disuelve el crudo de reacción en CH_2Cl_2 y se lava la fase orgánica con NaHCO_3 y NaCl . Se secó dicha fase con MgSO_4 anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente Hexano:AcOEt (2:3). Se obtiene el compuesto **6** como un aceite incoloro con un rendimiento de 68%. RMN- ^1H , (CDCl_3 , δ ppm): 1.94-2.12 (7 CH₃), 3.57 (m, 1H, H-5'), 3.78 (t, J= 9.7 Hz, 1H, H-4'), 3.86 (t, J=6.7 Hz, 1H, H-5''), 4.02 (dd, J= 6.9, 1.3 Hz, 1H, H-6'' B), 4.05 (dd, J= 15.0, 0.8 Hz, 1H, H-1B), 4.07 (dd, J= 12.1, 5.6 Hz, 1H, H-6'B), 4.08 (dd, J=11.9, 2.4 Hz, 1H, H-6''A), 4.28 (dd, J= 13.2, 4.9 Hz, 1H, H-1A), 4.44 (d, J= 7.8 Hz, 1H, H-1''), 4.49 (d, J=7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.50 (m, 1H, H-6'A), 4.93 (dd, J= 9.8 y 7.8 Hz, 1H, H-2'), 4.91 (dd, J=9.8 y 3.3 Hz, 1H, H-3''), 4.93 (dd, J= 9.8 y 7.8 Hz, 1H, H-2''), 5.11 (dd, J=9.8 y 7.8 Hz, 1H, H-2''), 5.17 (dd, 1H, J=10.5, 9.2 Hz, 1H, H-3B), 5.19 (m, 1H, H-3A), 5.27 (t, J=9.8 Hz, 1H, H-3'), 5.32 (d, J=3.3 Hz, 1H, H-4''), 5.81 (m, 1H, H-2). RMN- ^{13}C (CDCl_3 δ ppm): 21.34-20.97 (7 CH₃), 61.19 (C-6''), 62.39 (C-6'), 66.98 (C-4''), 69.45 (C-2''), 70.45 (C-1), 71.06 (C-5''), 71.40 (C-3''), 72.02 (C-2'), 72.98 (C-3'), 73.21 (C-5'), 76.71 (C-4'), 99.68 (C-1'), 101.51 (C-1''), 118.14 (C-3), 133.71 (C-2), 169.46-170.76 (7CO).

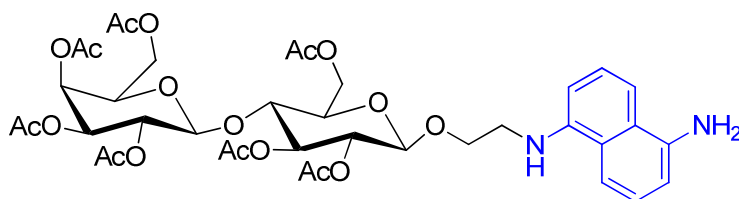
II.2.1.6-Síntesis de 1-O-(2-acetaldehído)-hepta-O-acetil- β -lactosa (7).



Disolvemos **6** (1 g, 1.48 mmol) en diclorometano anhidro (50 ml) a -78°C e introducimos una corriente de ozono a un flujo constante, mantenemos en agitación durante 40 minutos, hasta que la disolución adquiere un tono azulado. A continuación quitamos la corriente de ozono e introducimos una corriente de argón durante 5 minutos para eliminar los restos de ozono, posteriormente añadimos sulfuro de dimetilo en exceso (2mmol). Cuando la solución ha perdido el color azulado dejamos atemperar hasta alcanzar la temperatura ambiente y eliminamos el disolvente a vacío, el crudo de reacción lo purificamos mediante cromatografía de columna de sílica empleando una

fase móvil hexano-acetato de etilo (1:2), obtenemos **7** (0.75g, 75%) como un sólido blanco. RMN- ^1H , (CDCl_3 , δ ppm): 1.97-2.16 (7 CH₃), 3.62 (m, 1H, H-5'), 3.81 (t, J= 9.7 Hz, 1H, H-4'), 3.87 (t, J=6.7 Hz, 1H, H-5''), 4.06 (dd, J= 6.9, 1.3 Hz, 1H, H-6'' B), 4.05 (dd, J= 15.0, 0.8 Hz, 1H, H-1B), 4.08 (dd, J= 12.1, 5.6 Hz, 1H, H-6'B), 4.12 (dd, J=11.9, 2.4 Hz, 1H, H-6''A), 4.17 (dd, J= 15.0, 0.8 Hz, 1H, H-2B), 4.26 (dd, J= 15.0, 0.8 Hz, 1H, H-2A), 4.47 (dd, J=12.0, 2.2 Hz, 1H, H-6'A), 4.49 (d, J= 7.8 Hz, 1H, H-1''), 4.55 (d, J=7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.96 (dd, J=9.8 y 3.3 Hz, 1H, H-3''), 5.00 (dd, J= 9.8 y 7.8 Hz, 1H, H-2'), 5.11 (dd, J=9.8 y 7.8 Hz, 1H, H-2''), 5.22 (t, J=9.8 Hz, 1H, H-3'), 5.35 (d, J=3.3 Hz, 1H, H-4'), 9.65 (s, 1H, H-1). RMN- ^{13}C (CDCl_3 , δ ppm): 20.72-20.46 (7 CH₃), 60.70 (C-6''), 61.58 (C-6'), 66.48 (C-4''), 68.94 (C-2''), 70.60 (C-5''), 70.83 (C-3''), 71.10 (C-2'), 72.36 (C-3'), 72.80 (C-5'), 74.21 (C-1), 76.10 (C-4'), 100.70 (C-1'), 101.00 (C-1''), 169.03-170.33 (7CO), 200.04 (C-1).

II.2.1.7-Síntesis de 1-O-2-[1'-(5'-aminonaftil)amino]etil-hepta-O-acetil- β -lactosa (**8**).

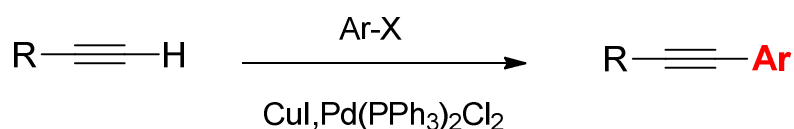


A una solución de **7** (500 mg, 0.75 mmol) en DMF anhidra (2 ml) añadimos 1,5-diaminonaftaleno (585 mg, 3.7 mmol), NaBH_3CN (95 mg, 1.5 mmol) y ácido acético (20 μL), mantenemos la reacción en agitación en atmósfera inerte a temperatura ambiente durante 20 horas. A continuación disolvemos el crudo de reacción en acetato de etilo y lavamos con una solución saturada de cloruro sódico y con agua, posteriormente secamos la fase orgánica con MgSO_4 anhidro, filtramos, rotamos y purificamos mediante cromatografía de columna de sílica empleando una fase móvil diclorometano-acetona (12:1), obtenemos **8** (430 mg, 70%) como un sólido morado. RMN- ^1H , (CDCl_3 , δ ppm): 1.80-2.01 (7 CH₃), 3.38 (t, J= 6.8 Hz, 1H, H-9), 3.57 (m, 1H, H-5'), 3.72 (t, J= 9.7 Hz, 1H, H-4'), 3.80 (t, J=6.8 Hz, 1H, H-10), 3.86 (t, J=6.7 Hz, 1H, H-5''), 4.01 (dd, J= 12.1, 5.6 Hz, 1H, H-6'B), 4.03 (dd, J= 6.9, 1.3 Hz, 1H, H-6'' B), 4.07 (dd, J=11.9, 2.4 Hz, 1H, H-6''A), 4.38 (d, J= 7.8 Hz, 1H, H-1''), 4.40 (dd, J=12.0, 2.2 Hz, 1H, H-6'A), 4.49 (d, J=7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.86 (dd, J= 9.8 y 7.8 Hz, 1H, H-2'), 4.89 (dd, J=9.8 y 3.3 Hz, 1H, H-3''), 5.04 (dd, J=9.8 y 7.8 Hz, 1H, H-2''), 5.13 (t, J=9.8 Hz, 1H, H-3'), 5.27 (d, J=3.3 Hz, 1H, H-4'), 6.52 (d, J= 7.4 Hz, 1H, H-2),

6.70 (d, J= 7.4 Hz, 1H, H-6), 7.12 (t, J=7.4 Hz, 1H, H-7), 7.16 (d, J= 7.4 Hz, 1H, H-8), 7.20 (d, J=7.4 Hz, 1H, H-4), 7.28 (t, J=7.4 Hz, 1H, H-3). RMN- C^{13} ($CDCl_3$, δ ppm): 20.96-21.26 (7 CH₃), 44.02 (C-9), 61.18 (C-6''), 62.49 (C-6'), 66.97 (C-4''), 68.77 (C-10), 69.43 (C-2''), 71.04 (C-5''), 71.38 (C-3''), 72.03 (C-2'), 73.08 (C-3'), 73.18 (C-5'), 76.71 (C-4'), 100.89 (C-1'), 101.53 (C-1''), 105.33 (C-2), 110.46 (C-6), 110.84 (C-7), 111.06 (C-4), 124.64 (C-8a), 124.90 (C-4a), 125.67 (C-8), 125.90 (C-3), 143.07 (C-5), 143.91 (C-1), 169.56-170.87 (7CO).

II.2.2- Síntesis de los cores funcionalizados con grupo acetileno.

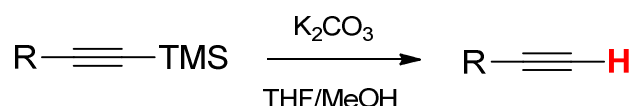
II.2.2.1- Procedimiento general de la reacción de Sonogashira: MÉTODO A



A una solución del derivado halogenado (Ar-X), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (5%) y una cantidad de ioduro cuproso (10%) en trietilamina, recientemente destilada y saturada de argón, se añade el derivado acetilénico, gota a gota y con agitación en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se transfiere a un reactor de microondas (Biotage Initiator Classic 2.5) y se calienta a 130° C durante 15 minutos. Después, el crudo de reacción se enfría a temperatura ambiente y se elimina la trietilamina a vacío. El crudo de la reacción se disuelve en diclorometano y se lava con una solución saturada de cloruro amónico en agua y una pequeña cantidad de KCN. Se seca la fase orgánica con MgSO₄ anhidro y después de filtrar el desecante y eliminar el disolvente, el crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna de sílica (flash).

II.2.2.2- Procedimientos generales de desprotección de acetilenos:

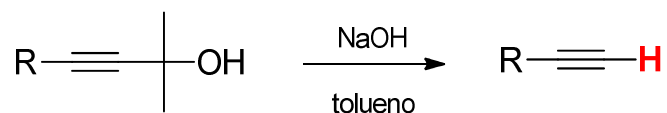
MÉTODO B: desprotección de trimetilsililacetileno.



En un matraz se disuelve el derivado trimetilsililo en una mezcla de disolventes THF/metanol 4:1 (v:v) y se añade el carbonato potásico, dejando la mezcla de reacción con agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Transcurrido este tiempo, se elimina totalmente la mezcla de disolventes a presión reducida, y se añade una

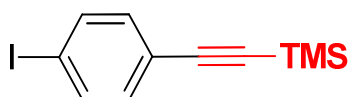
disolución acuosa de cloruro amónico. Se extrae con diclorometano y la fase orgánica se seca con sulfato magnésico anhidro, se filtra el desecante y se evapora el disolvente. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna de sílica (flash).

MÉTODO C: desprotección del derivado del alcohol propargílico.



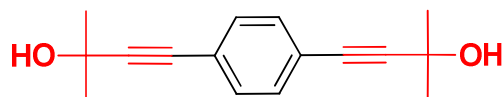
En un matraz se añade el derivado del alcohol propargílico disuelto en tolueno seco y se añade el hidróxido sódico seco y en polvo. La mezcla se calienta a reflujo durante tres horas. Al cabo de este tiempo se deja enfriar, se filtra el NaOH y, posteriormente, se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna de sílica (flash).

II.2.2.3- Síntesis de 4-yodo-1-trimetilsililetinilbenceno (10).



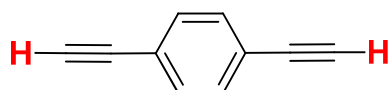
Siguiendo el MÉTODO A, a partir de 1-4-diyodobenceno **9** (6 g, 18.2 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (128 mg, 0.18 mmol), trimetilsililacetileno (1.78 g, 18.2 mmol), una cantidad catalítica de ioduro cuproso y 25 ml de trietilamina en atmósfera inerte, después de 12 h de reacción, se obtiene el compuesto **10** (3.01 g, 55%) (Hexano-AcOEt 3:1). ¹H RMN (CDCl₃): 7.63 (d, J=8.6 Hz, 2H), 7.17 (d, J=8.6 Hz, 2H), 0.23 (s, 9H).

II.2.2.4- Síntesis de 1,4-bis(3-hidroxi-2-metil-1-butil)benzeno (11).



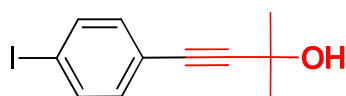
Siguiendo el MÉTODO A, a partir de 1-4-diyodobenceno **9** (4 g, 12.1 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (212 mg, 0.30 mmol), 2-metil-3-butin-2-ol (2.54 g, 30.3 mmol), CuI y 60 ml de NEt₃, se obtiene el compuesto **11** (2.2 g, 75%), como un aceite incoloro (CH₂Cl₂-AcOEt 3:1). ¹H RMN (CDCl₃): 7.35 (s, 4H), 4.53 (s br, 2H), 1.53 (s, 12H). ¹³C RMN (CDCl₃): 131.6, 123.2, 97.2, 80.6, 64.5, 31.3.

II.2.2.5- Síntesis de 1,4-bis(etinil)benceno (12).



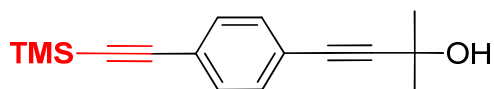
Según el MÉTODO C, a partir del compuesto **11** (2 g, 8.25 mmol) en 25 ml de tolueno seco y NaOH (28 mg, 0.7 mmol), pulverizado y seco, después de 3 hr a reflujo, se obtiene el compuesto **12** (853 mg, 82%), como un sólido blanco (Hexano). ^1H RMN (CDCl_3): 7.42 (s, 4H), 3.15 (s, 2H).

II.2.2.6- Síntesis de 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butinil)-1-yodobenceno (13).



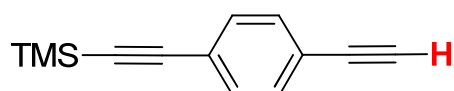
Siguiendo el MÉTODO A, a partir de 1-4-diyodobenceno **9** (6 g, 18.2 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (127.8 mg, 0.182 mmol), 2-metil-3-butin-2-ol (1.53 g, 18.2 mmol), CuI y 25 ml de NEt_3 , se obtiene, después de 12 h a 25°C , el compuesto **13** (2.47 g, 47%), como un sólido blanco (Hexano-AcOEt 2:1). ^1H RMN (CDCl_3): 7.63 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H); 7.12 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H); 1.60 (s, 6H).

II.2.2.7- Síntesis de 4-trimetilsililetinil-1-(3-hidroxi-3-metil-1-butinil)benceno (14).



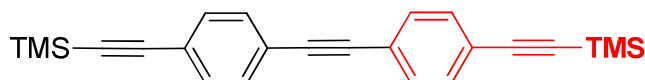
Siguiendo el MÉTODO A, a partir de **13** (2.47 g, 8.64 mmoles), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (611 mg, 0.86 mmoles), trimetilsilisacetileno (1.018g, 10.5 mmoles), una cantidad catalítica de ioduro cuproso y 25 ml de trietilamina en atmósfera inerte, después de 12 h de reacción, se obtiene el compuesto **14** (1.80 g, 81%) (Hexano-AcOEt 5:1). ^1H -RMN (CDCl_3): 7.40 (d, $J=8.6$ Hz, 2H); 7.33 (d, $J=8.6$ Hz, 2H); 1.6 (s, 2H); 0.24 (s, 9H). ^{13}C -RMN (CDCl_3): 131.7, 131.4, 122.8, 122.7, 104.5, 96.0, 95.6, 81.7, 65.5, 31.3 y 0.13.

II.2.2.8- Síntesis de 4-etinil-1-trimetilsililetinilbenceno (15).



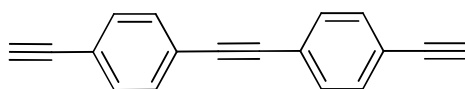
Siguiendo el MÉTODO C, a partir del compuesto **14** (1.8 g, 7.0 mmol) en 25 ml de tolueno seco y NaOH (28 mg, 0.7 mmol), pulverizado y seco, después de 3 h a reflujo, se obtiene el compuesto **15** (1.23 g, 89%), como un sólido amarillo. ^1H RMN (CDCl_3): 7.45 (s br, 4H); 3.20 (s, 1H); 0.30 (s, 9H); ^{13}C RMN (CDCl_3): 131.8, 131.7, 123.5, 122.1, 104.3, 96.4, 83.1, 78.9 y -0.13.

II.2.2.9- Síntesis de 1,2-bis[4-((trimetilsilil)etnil)-1-fenil]etino (**16**).



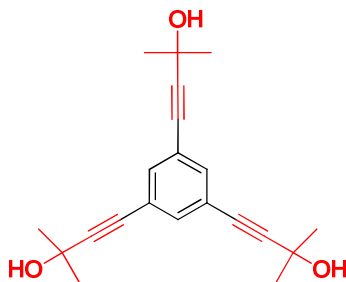
Siguiendo el MÉTODO A, a partir de **15** (1.98 g., 10 mmoles), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (70.19 mg, 0.1 mmoles), **10** (2 g, 6.67 mmol), una cantidad catalítica de ioduro cuproso y 25 ml de trietilamina en atmósfera inerte, después de 12 h de reacción, se obtiene el compuesto **16** (1.65 g, 67%) (Hexano- CH_2Cl_2 5:1). ^1H RMN (CDCl_3): 7.44 (s, 4H), 7.43 (s, 4H), 0.25 (s, 18H), ^{13}C RMN (CDCl_3): 132.0, 131.5, 123.2, 123.1, 104.7, 96.5, 91.0, -0.11.

II.2.2.10- Síntesis de 1,2-bis(4-etnil-1-fenil)etino (**17**).



Siguiendo el MÉTODO B, a partir de **16** (1g, 2.69 mmol), K_2CO_3 (7.42 g, 53.8 mmol) en la mezcla de disolventes THF/metanol (4:1) durante 2 h, se obtuvo **14** (530 mg, 87%), como un sólido blanco (Hexano-acetato de etilo 3:1). ^1H RMN (CDCl_3): 7.47 (s, 8H, ArH); 3.17 (s, 2H); ^{13}C RMN (CDCl_3): 132.10, 131.49, 123.40, 122.18, 90.76, 83.20, 79.06.

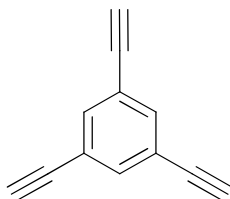
II.2.2.11- Síntesis de 1,3,5-tris(3-hidroxi-3-metil-1-butil)benzeno (**19**).



Siguiendo el MÉTODO A, a partir de 1,3,5-tribromobenceno **18** (5 g, 16 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (4.49 g, 6.4 mmol), 2-metil-3-butil-2-ol (5.38 g, 64 mmol), CuI y 50 ml

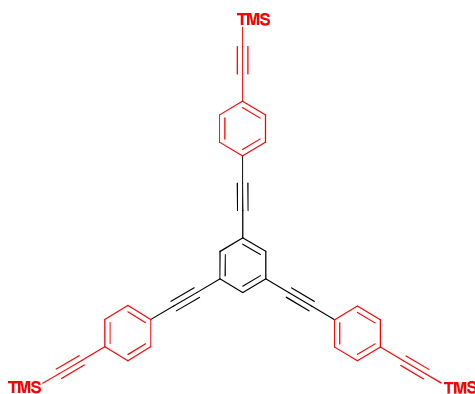
de NEt_3 , se obtiene, después de 12 h a 25°C , el compuesto **19** (4.15 g, 85%), como un aceite amarillento (Hexano-AcOEt 1:1). ^1H RMN (CDCl_3): 7.39 (s, 3H, ArH); 1.56 (s, 18H); ^{13}C RMN (CDCl_3): 137.2, 123.3, 94.9, 80.5, 65.5, 31.4.

II.2.2.12- Síntesis de 1,3,5-trietinilbenceno (**20**).



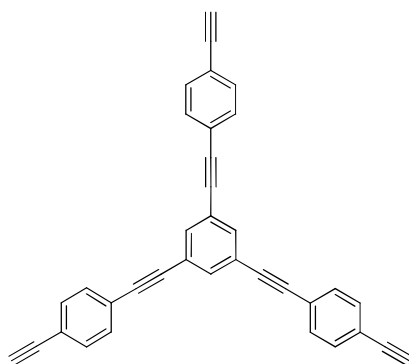
Siguiendo el MÉTODO C, a partir del compuesto **19** (2 g, 6.16 mmol) en 25 ml de tolueno seco y NaOH (24.4 mg, 0.61 mmol), pulverizado y seco, después de 5 h a reflujo, se obtiene el compuesto **20** (740 g, 82%), como un sólido blanco. ^1H RMN (CDCl_3): 7.57 (s, 3H, ArH); 3.15 (s, 3H); ^{13}C RMN (CDCl_3): 135.6, 122.9, 81.6, 78.7.

II.2.2.13- Síntesis de 1,3,5-tris[4-(trimetilsililetinil)fenil]etinilbenceno (**21**).



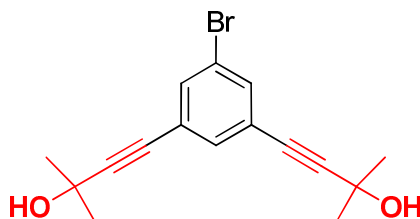
Siguiendo el MÉTODO A, a partir de **20** (315 mg, 2.1 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (590 mg, 0.84 mmoles), **10** (2.52 g, 8.4 mmol), una cantidad catalítica de ioduro cuproso y 45 ml de trietilamina en atmósfera inerte, después de 12 h de reacción a 60°C , se obtiene el compuesto **21** (90%), como un sólido amarillento (Hexano- CH_2Cl_2 5:1). ^1H RMN (CDCl_3): 7.61 (s, 3H, ArH); 7.44 (s, 12H, ArH), 0.24 (s, 27H, SiMe_3).

II.2.2.14- Síntesis de 1,3,5-tris(4-etinilfenil)etinilbenceno (**22**).



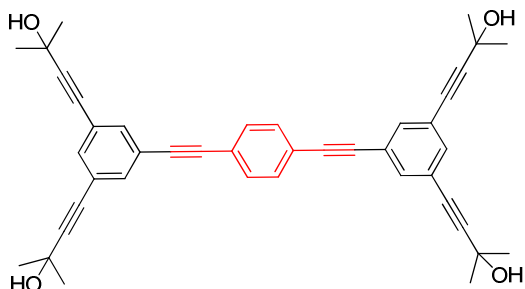
Siguiendo el MÉTODO B, a partir de **21** (280 mg, 0.42 mmol), K_2CO_3 (1.16 g, 8.4 mmol) en la mezcla de disolventes THF/metanol (4:1) con agitación durante 3 h, se obtuvo **22** (140 mg, 74%), como un sólido amarillo (Hexano-acetato de etilo 8:1). 1H RMN ($CDCl_3$): 7.62 (s, 3H, ArH); 7.50 (s, 12H, ArH), 3.12 (s, 3H). ^{13}C RMN ($CDCl_3$): 135.42, 135.28, 131.84, 123.85, 123.16, 81.89, 78.76.

II.2.2.15- Síntesis de 5-bromo-1,3-bis(3-hidroxi-3-metil-1-butilin)benzeno (**23**).



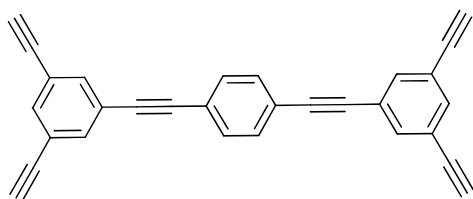
Siguiendo el MÉTODO A, a partir de 1,3,5-tribromobenceno **18** (4 g, 12.74 mmol), $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (1.78 g, 2.54 mmol), 2-metil-3-butil-2-ol (2.13 g, 25.4 mmol), CuI y 25 ml de NEt_3 , se obtiene, después de 18 h a $25^\circ C$, el compuesto **23** (2.57 g, 63%), como un aceite amarillento (Hexano-AcOEt 2:1). $RMN-H^1$: 7.59 (s, 1H), 7.34 (s, 2H), 1.59 (s, 12H).

II.2.2.16- Síntesis de 1,4-bis[3,5-bis(3-hidroxi-3-metil-1-butilinil)feniletinil]benceno (24).



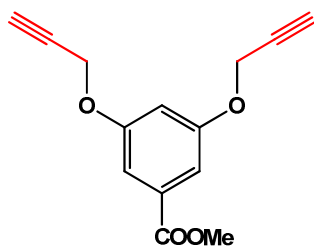
Siguiendo el MÉTODO A, a partir de **23** (2.44 g, 7.59 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (533 mg, 0.76 mmoles), **12** (319 mg, 2.53 mmol), una cantidad catalítica de ioduro cuproso y 10 ml de trietilamina en atmósfera inerte, después de 12 h de reacción a 60° C, se obtiene el compuesto **24** (600 mg, 40%), como un aceite amarillento (Hexano-AcOEt 1:2). RMN-H¹: 7.61 (s, 2H), 7.57 (s, 4H), 7.32 (s, 4H).

II.2.2.17- Síntesis de 1,4-bis[3,5-bis(etinil)feniletinil]benceno (25).



Siguiendo el MÉTODO C, a partir del compuesto **24** (500 mg, 0.82 mmol) en 15 ml de tolueno seco y NaOH (13.2 mg, 0.34 mmol), pulverizado y seco, después de 3 h a reflujo, se obtiene el compuesto **25** (193 g, 63%), como un sólido amarillo (Hexano-AcOEt 20:1). RMN-H¹: 7.61 (s, 4H), 7.56 (s, 2H), 7.49 (s, 4H), 3.09 (s, 4H). ¹³C RMN (CDCl₃): 135.27, 135.13, 131.69, 123.81, 123.00, 90.32, 89.41, 81.73, 78.60.

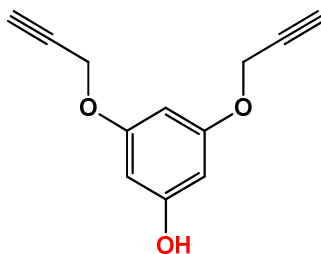
II.2.2.18- Síntesis de 3,5-bis(2-propin-1-oxi)-benzoato de metilo (27).



Se disuelve 3,5-dihidroxibenzoato de metilo (**26**) (5 g, 30.45 mmol) en DMF (10 ml), se añade K₂CO₃ (10.5 g, 76 mmol) y se agita durante 30 minutos. A continuación se añade

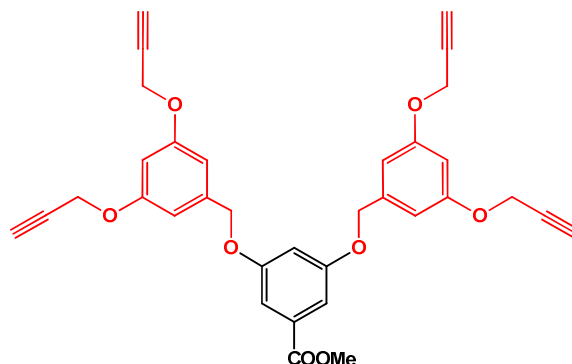
bromuro de propargilo (10.9 g, 91.5 mmol) manteniendo la agitación 12 h. Una vez finalizada la reacción, se disuelve el crudo de reacción en acetato de etilo y se lava con una solución acuosa saturada de NaCl, seguidamente se seca la fase orgánica con MgSO₄ anhidro, se filtra el desecante y se elimina el disolvente a presión reducida. Se purifica el compuesto por cromatografía en columna de sílica (flash), utilizando como fase móvil una mezcla de hexano-acetato de etilo (5:1). Se obtienen 5.95 g (80%) del compuesto **27**, como un sólido blanco. RMN-H¹ (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.29 (d, J=2.4 Hz, 2H), 6.82 (t, J=2.4 Hz, 1H), 4.73 (d, J=2.4 Hz, 4H), 3.91 (s, 3H), 2.55 (t, J=2.4 Hz, 2H).

II.2.2.19- Síntesis de 3,5-bis(2-propin-1-oxi)-benzil alcohol (**28**).



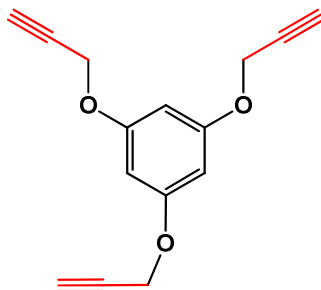
A una suspensión de hidruro de litio y aluminio (165 mg, 4.34 mmol) en THF seco y a 0° C, se añade, gota a gota, una solución de **27** (530 mg 2.17 mmol) disuelto en THF seco. Tras la adición, se deja que la reacción alcance la temperatura ambiente y se agita durante 12 h. A continuación, el exceso de hidruro de litio y aluminio se neutraliza con una solución acuosa de HCl al 2%. Seguidamente, se elimina el THF a presión reducida y extraemos el crudo de reacción con éter etílico. Se lava la fase orgánica con una solución saturada de NaCl, se seca la fase orgánica con MgSO₄ anhidro, se filtra el desecante, y se elimina el disolvente a presión reducida. El compuesto final se purifica por cromatografía en columna de sílica (flash) utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo (2:1). Se obtiene el compuesto **28** (450 mg, 96%) como un sólido blanco. RMN-H¹ (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 6.61 (d, J=2.4 Hz, 2H), 6.53 (t, J=2.4 Hz, 1H), 4.65 (d, J=2.4 Hz, 4H), 4.61 (sbr, 2H), 2.52 (t, J=2.4 Hz, 2H).

II.2.2.20- Síntesis de 3,5-bis[3,5-bis(2-propin-1-oxi)-benziloxi]-benzoato de metilo (29).



A una solución de 3,5-dihidroxi benzoato de metilo (400 mg, 1.84 mmol) a 0°C en THF anhidro, se añaden **28** (144 mg, 0.87 mmol) y trifenilfosfina (482 mg, 1.84 mmol). A continuación se añade, gota a gota, una solución de azodicarboxilato de dietilo (320 mg, 1.84 mmol) (DEAD) en THF seco. Se deja que la reacción alcance la temperatura ambiente y se mantiene la agitación durante una hora. A continuación, se calienta la reacción hasta 60°C y se mantiene la agitación durante 12 h. Seguidamente, se elimina el disolvente a presión reducida y el crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna de sílica utilizando como fase móvil una mezcla de hexano-acetato de etilo (7:1). Se obtiene el compuesto **29** (462 mg, 93%), como un sólido blanco. RMN- H^1 (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 7.26 (d, $J=2.4$ Hz, 2H), 6.25 (t, $J=2.4$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J=2.4$ Hz, 4H), 6.56 (t, $J=2.4$ Hz, 2H), 5.02 (s, 4H), 4.67 (d, $J=2.4$ Hz, 8H), 3.91 (s, 3H), 2.52 (t, $J=2.4$ Hz, 4H).

II.2.2.21- Síntesis de 1,3,5-tris(2-propin-1-oxi)-benceno (31).

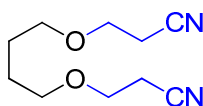


Se disuelve el floroglucinol (**30**) (2g, 15.8 mmol) en DMF (15 ml), se añade K_2CO_3 (13.4 g, 95.1 mmol) y se agita la disolución durante media hora. A continuación se añade bromuro de propargilo (11.31 g, 95.1 mmol), gota a gota, y se calienta la mezcla de reacción a 60° C durante 40 h con agitación. Una vez finalizada la reacción, se

disuelve el crudo de reacción en acetato de etilo y se lava con una solución acuosa saturada de NaCl, seguidamente se seca la fase orgánica con MgSO₄ anhidro, se filtra el desecante y se elimina el disolvente a presión reducida. El compuesto final se purifica por cromatografía en columna de sílica (flash) utilizando, como fase móvil, una mezcla de hexano-acetato de etilo (4:1). Se obtiene el compuesto **31** (2.43 g, 64%), como un sólido amarillento. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 6.26 (s, 3H), 4.64 (d, J=2.4 Hz, 6H), 2.51 (t, J=2.4 Hz, 3H).

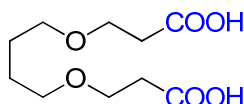
II.2.3- Síntesis de los *cores* funcionalizados con cloruros de ácido.

II.2.3.1- Síntesis de **33**.



A una solución de 1,4-butanodiol (**32**) (1 g, 11 mmol) en 1,4-dioxano (3.18 ml) y agua (0.16 ml) a 0° C añadimos acrilonitrilo (1.47 g, 27.5 mmol) y una solución de KOH al 40% en agua (50 mg, 0.88 mmol), tras una hora en agitación a 0° C lo dejamos agitando a temperatura ambiente overnight. A continuación eliminamos el disolvente a presión reducida, añadimos CH₂Cl₂ al crudo de reacción y lavamos con agua. La fase orgánica la secamos con MgSO₄ anhidro, evaporamos el disolvente al rotavapor y purificamos mediante cromatografía de columna de sílica empleando una fase móvil hexano-acetato de etilo (1:1), obtenemos **33** (1.51 g, 70%) como un aceite incoloro. RMN-H¹ (CDCl₃, δ ppm): 1.62 (t, J= 6.1 Hz, 4H, H-5), 2.54 (t, J= 6.4 Hz, 4H, H-2), 3.46 (t, J= 6.1 Hz, 4H, H-4), 3.58 (t, J= 6.4 Hz, 4H, H-3). RMN-C¹³ (CDCl₃, δ ppm): 18.83 (C-5), 26.10 (C-2), 65.18 (C-4), 70.90 (C-3), 118.02 (C-1).

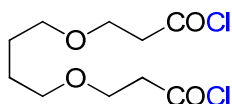
II.2.3.2- Síntesis de **34**.



Disolvemos **33** (500 mg, 2.55 mmol) en una solución de HCl acuoso al 37% (2 ml) y lo dejamos en agitación a 50° C durante 24 horas, después lo dejamos en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas más. A continuación el crudo de reacción lo disolvemos en acetato de etilo y lo lavamos con agua, la fase orgánica la secamos con MgSO₄ anhidro y evaporamos el disolvente a presión reducida. Obtenemos **34** (525 mg,

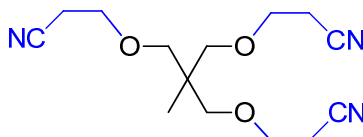
88%) como un aceite amarillento. RMN- H^1 ($CDCl_3$, δ ppm): 1.59 (t, $J= 6.1$ Hz, 4H, H-5), 2.59 (t, $J= 6.4$ Hz, 4H, H-2), 3.44 (t, $J= 6.1$ Hz, 4H, H-4), 3.67 (t, $J= 6.4$ Hz, 4H, H-3), 10.69 (s, 2H, OH). RMN- C^{13} ($CDCl_3$, δ ppm): 26.14 (C-5), 35.00 (C-2), 65.82 (C-4), 70.91 (C-3), 177.30 (C-1).

II.2.3.3- Síntesis de 35.

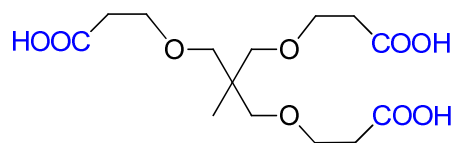


Disolvemos **34** (500 mg, 2.27 mmol) en un exceso de cloruro de oxalilo a 0° C y lo mantenemos en agitación durante 1 hora, a continuación lo dejamos agitando a temperatura ambiente durante 2 horas más. Eliminamos a presión reducida el exceso de cloruro de oxalilo y obtenemos **35** con rendimiento cuantitativo como un aceite marrón. RMN- H^1 ($CDCl_3$, δ ppm): 1.59 (t, $J= 6.1$ Hz, 4H, H-5), 3.08 (t, $J= 6.4$ Hz, 4H, H-2), 3.44 (t, $J= 6.1$ Hz, 4H, H-4), 3.71 (t, $J= 6.4$ Hz, 4H, H-3). RMN- C^{13} ($CDCl_3$, δ ppm): 26.17 (C-5), 47.44 (C-2), 65.36 (C-4), 71.06 (C-3), 172.04 (C-1).

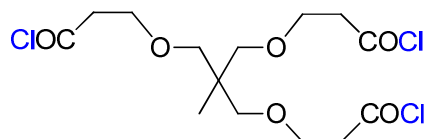
II.2.3.4- Síntesis de 37.



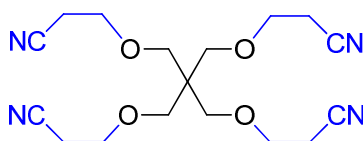
A una solución de 1,1,1-Tris(hidroxi metil)etano (**36**) (1 g, 8.3 mmol) en 1,4-dioxano (3.18 ml) y agua (0.16 ml) a 0° C añadimos acrilonitrilo (1.54 g, 29.1 mmol) y una solución de KOH al 40% en agua (37 mg, 0.67 mmol), tras una hora en agitación a 0° C lo dejamos agitando a temperatura ambiente overnight. A continuación eliminamos el disolvente a presión reducida, añadimos CH_2Cl_2 al crudo de reacción y lavamos con agua. La fase orgánica la secamos con $MgSO_4$ anhidro, evaporamos el disolvente al rotavapor y purificamos mediante cromatografía de columna de sílica empleando una fase móvil diclorometano-acetato de etilo (10:1), obtenemos **37** (1.9 g, 82%) como un aceite incoloro. RMN- H^1 ($CDCl_3$, δ ppm): 0.88 (s, 3H, H-6), 2.51 (t, $J= 6.4$ Hz, 6H, H-2), 3.27 (s, 6H, H-4), 3.55 (t, $J= 6.4$ Hz, 6H, H-3). RMN- C^{13} ($CDCl_3$, δ ppm): 17.03 (C-6), 18.51 (C-2), 40.73 (C-5), 65.52 (C-4), 72.74 (C-3), 118.05 (C-1).

II.2.3.5- Síntesis de 38.

Disolvemos **37** (500 mg, 1.79 mmol) en una solución de HCl acuoso al 37% (2 ml) y lo dejamos en agitación a 50° C durante 24 horas, después lo dejamos en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas más. A continuación el crudo de reacción lo disolvemos en acetato de etilo y lo lavamos con agua, la fase orgánica la secamos con MgSO₄ anhidro y evaporamos el disolvente a presión reducida. Obtenemos **38** (469 mg, 78%) como un aceite incoloro. RMN-H¹ (CDCl₃, δ ppm): 0.84 (s, 3H, H-6), 2.56 (t, J= 6.4 Hz, 6H, H-2), 3.24 (s, 6H, H-4), 3.63 (t, J= 6.4 Hz, 6H, H-3), 10.71 (s, 3H, OH). RMN-C¹³ (CDCl₃, δ ppm): 17.14 (C-6), 34.85 (C-2), 40.78 (C-5), 66.48 (C-4), 73.41 (C-3), 177.40 (C-1).

II.2.3.6- Síntesis de 39.

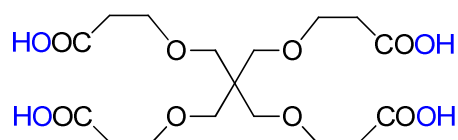
Disolvemos **38** (250 mg, 0.74 mmol) en un exceso de cloruro de oxalilo a 0° C y lo mantenemos en agitación durante 1 hora, a continuación lo dejamos agitando a temperatura ambiente durante 2 horas más. Eliminamos a presión reducida el exceso de cloruro de oxalilo y obtenemos **39** con rendimiento cuantitativo como un aceite amarillo. RMN-H¹ (CDCl₃, δ ppm): 0.86 (s, 3H, H-6), 3.06 (t, J= 6.4 Hz, 6H, H-2), 3.26 (s, 6H, H-4), 3.69 (t, J= 6.4 Hz, 6H, H-3). RMN-C¹³ (CDCl₃, δ ppm): 17.19 (C-6), 40.88 (C-5), 47.26 (C-2), 65.96 (C-4), 73.29 (C-3), 171.89 (C-1).

II.2.3.7- Síntesis de 41.

A una solución de pentaeritritol (**40**) (1,77 g, 13 mmol) en 1,4-dioxano (3.18 ml) y agua (0.16 ml) a 0° C añadimos acrilonitrilo (2.36 g, 44.5 mmol) y una solución de KOH al

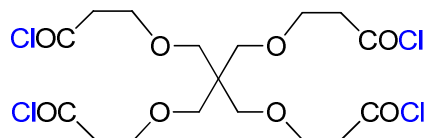
40% en agua (56 mg, 1 mmol), tras una hora en agitación a 0° C lo dejamos agitando a temperatura ambiente overnight. A continuación eliminamos el disolvente a presión reducida, añadimos CH₂Cl₂ al crudo de reacción y lavamos con agua. La fase orgánica la secamos con MgSO₄ anhidro, evaporamos el disolvente al rotavapor y purificamos mediante cromatografía de columna de sílica empleando una fase móvil hexano-acetato de etilo (1:1), obtenemos **41** (4.92 g, 77%) como un aceite incoloro. RMN-H¹ (CDCl₃, δ ppm): 2.60 (t, J= 6.4 Hz, 8H, H-2), 3.48 (s, 8H, H-4), 3.67 (t, J= 6.4 Hz, 8H, H-3). RMN-C¹³ (CDCl₃, δ ppm): 18.04 (C-2), 45.03 (C-5), 65.57 (C-4), 68.29 (C-3), 119.16 (C-1).

II.2.3.8- Síntesis de **42**.



Disolvemos **41** (1,35 g, 2.75 mmol) en una solución de HCl acuoso al 37% (2 ml) y lo dejamos en agitación a 50° C durante 24 horas, después lo dejamos en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas más. A continuación el crudo de reacción lo disolvemos en acetato de etilo y lo lavamos con agua, la fase orgánica la secamos con MgSO₄ anhidro y evaporamos el disolvente a presión reducida. Obtenemos **42** (992 mg, 85%) como un aceite amarillento. RMN-H¹ (DMSO-d₆, δ ppm): 2.44 (t, J= 6.4 Hz, 8H, H-2), 3.31 (s, 8H, H-4), 3.58 (t, J= 6.4 Hz, 8H, H-3). RMN-C¹³ (DMSO-d₆, δ ppm): 34.84 (C-2), 45.89 (C-5), 66.92 (C-4), 73.07 (C-3), 174.15 (C-1).

II.2.3.9- Síntesis de **43**.



Disolvemos **42** (962 mg, 2.27 mmol) en un exceso de cloruro de oxalilo a 0° C y lo mantenemos en agitación durante 1 hora, a continuación lo dejamos agitando a temperatura ambiente durante 2 horas más. Eliminamos a presión reducida el exceso de cloruro de oxalilo y obtenemos **43** con rendimiento cuantitativo como un aceite verdoso. RMN-H¹ (CDCl₃, δ ppm): 3.02 (t, J= 6.4 Hz, 8H, H-2), 3.27 (s, 8H, H-4), 3.72 (t, J= 6.4 Hz, 8H, H-3). RMN-C¹³ (CDCl₃, δ ppm): 45.93 (C-5), 47.20 (C-2), 67.41 (C-4), 73.02

(C-3), 171.92 (C-1). Los datos espectroscópicos concuerdan con los publicados en la literatura.²¹¹

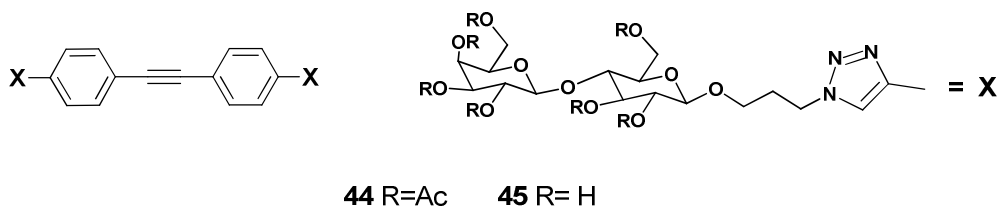
II.2.4- Síntesis de los glicodendrimeros por cicloadición 1,3 dipolar.

II.2.4.1- Procedimiento general: reacción de cicloadición 1,3-dipolar.



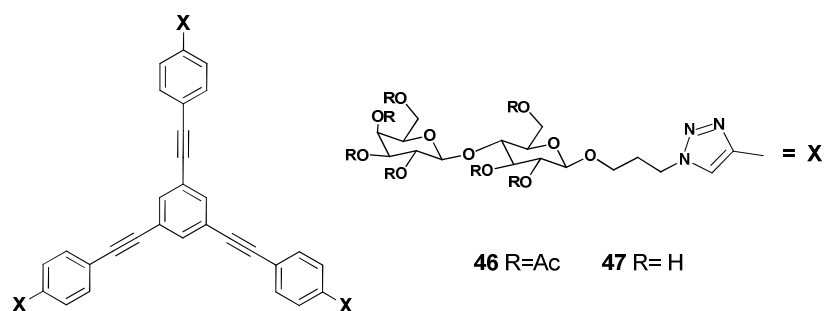
MÉTODO D. El derivado acetilénico terminal se disuelve en una mezcla de DMF-H₂O (4:1) y se agita a 50° C hasta su completa disolución. A continuación se añade CuSO₄·5H₂O y ascorbato sódico, manteniendo la agitación hasta la completa disolución de las sales. Finalmente, se añade el derivado del disacárido **5**, disuelto en DMF-H₂O, y la mezcla de reacción se sella en un vial y se introduce en el microondas, se agita durante 4 minutos y se deja reaccionar durante 20 minutos a 80° C, 2 bares de presión y 80 W. El crudo de la reacción se disuelve en acetato de etilo y se lava, varias veces, con una disolución de EDTA en agua y una disolución saturada de NaCl. A continuación se seca la fase orgánica sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. Se purifica el compuesto final por columna de sílica.

II.2.4.2-Síntesis del compuesto 44.



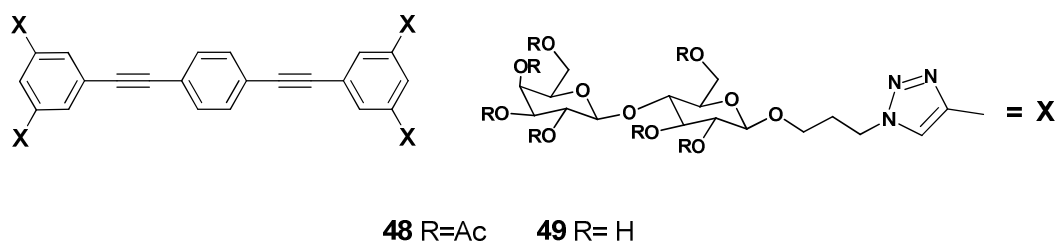
Siguiendo el MÉTODO D, a partir de **17** (62 mg, 0.28 mmol), CuSO₄·5H₂O (7 mg, 0.028 mmol), ascorbato sódico (11 mg, 0.056 mmol) y **5** (600 mg, 0.84 mmol), en 2 ml de DMF-H₂O (4:1) a 50° C durante 12 h, se obtiene el compuesto **44** (360 mg, 77%), como un sólido blanco (AcOEt-Etanol 50:1). Datos RMN (ver Tabla 1).

II.2.4.3- Síntesis del compuesto 46.



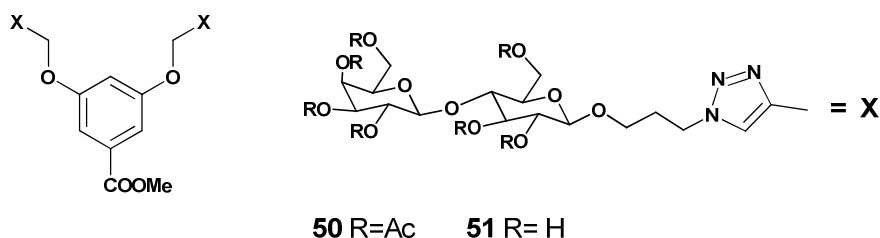
Siguiendo el MÉTODO D, a partir de **22** (89 mg, 0.20 mmol), CuSO₄·5H₂O (7 mg, 0.028 mmol), ascorbato sódico (11 mg, 0.056 mmol) y **5** (650 mg, 0.9 mmol), en 2 ml de DMF-H₂O (4:1) a 50° C durante 12 h, se obtiene el compuesto **46** (391 mg, 75%), como un sólido amarillento (AcOEt-Etanol 50:1). Datos RMN (ver Tabla 2).

II.2.4.4- Síntesis del compuesto 48.

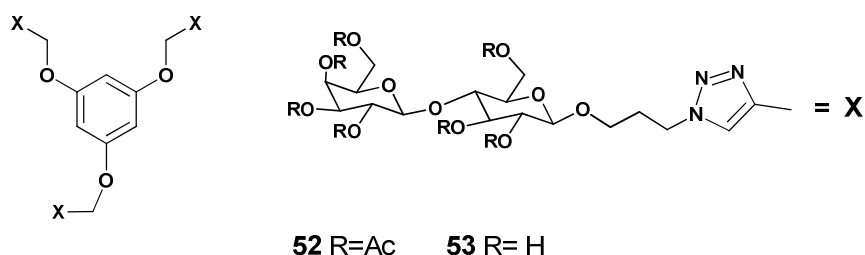


Siguiendo el MÉTODO D, a partir de **25** (67 mg, 0.18 mmol), CuSO₄·5H₂O (9 mg, 0.036 mmol), ascorbato sódico (14 mg, 0.072 mmol) y **5** (776 mg, 1.08 mmol), en 2 ml de DMF-H₂O (4:1) a 50° C durante 12 h, se obtiene el compuesto **48** (398 mg, 68%), como un sólido amarillo (AcOEt-Etanol 50:1). Datos RMN (ver Tabla 3).

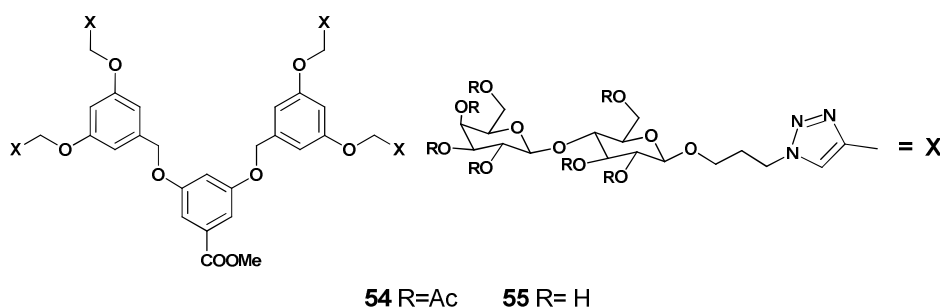
II.2.4.6- Síntesis del compuesto 50.



Siguiendo el MÉTODO D, a partir de **27** (68 mg, 0.28 mmol), CuSO₄·5H₂O (7 mg, 0.028 mmol), ascorbato sódico (11 mg, 0.056 mmol) y **5** (600 mg, 0.84 mmol), en 2 ml de DMF-H₂O (4:1) a 50° C durante 12 h, se obtiene el compuesto **50** (386 mg, 82%), como un sólido blanco (AcOEt-Etanol 25:1). Datos RMN (ver Tabla 4).

II.2.4.7- Síntesis del compuesto 52.

Siguiendo el MÉTODO D, a partir de **31** (60 mg, 0.26 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (9 mg, 0.036 mmol), ascorbato sódico (15 mg, 0.078 mmol) y **5** (840 mg, 1.17 mmol), en 2 ml de DMF- H_2O (4:1) a 50° C durante 12 h, se obtiene el compuesto **52** (493 mg, 79 %), como un sólido blanco (AcOEt-Etanol 25:1). Datos RMN (ver Tabla 5).

II.2.4.8- Síntesis del compuesto 54.

Siguiendo el MÉTODO D, a partir de **29** (87 mg, 0.15 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (7 mg, 0.03 mmol), ascorbato sódico (12 mg, 0.06 mmol) y **5** (650 mg, 0.9 mmol), en 2 ml de DMF- H_2O (4:1) a 50° C durante 12 h, se obtiene el compuesto **54** (377 mg, 79 %), como un sólido blanco (AcOEt-Etanol 25:1). Datos RMN (ver Tabla 6).

II.2.4.9- Procedimiento general: desprotección de los grupos acetilo.

MÉTODO E: Se disuelve el derivado acetilado en metanol anhidro y, a continuación, se adiciona, gota a gota, una disolución de metóxido sódico (0.5 M) en metanol anhidro, se agita a temperatura ambiente y se sigue la reacción por TLC. Se ajusta el pH con amberlita ácida, se filtra la resina, y se elimina el metanol a presión reducida.

II.2.4.10-Síntesis de los compuestos 45, 47, 49, 51, 53 y 55.

Siguiendo la MÉTODO E, se obtienen cuantitativamente los compuestos **45**, **47**, **49**, **51**, **53** y **55** sin necesidad de posterior purificación. **45:** RMN (ver Tabla 1), MALDI $\text{C}_{48}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{O}_{22}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 1099.5; **47:** RMN (ver Tabla 2), MALDI $\text{C}_{81}\text{H}_{99}\text{N}_9\text{O}_{33}$ $[\text{M} +$

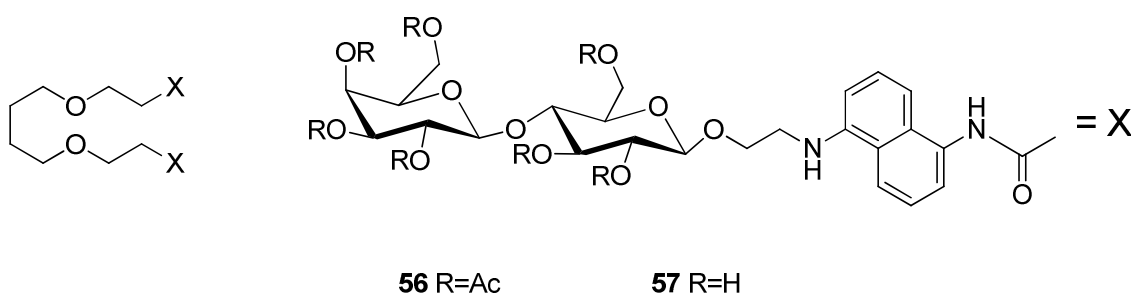
Na]⁺ 1748.8; **49**: RMN (ver Tabla 3), MALDI C₉₀H₁₂₂N₁₂O₄₄ [M + Na]⁺ 2097.8; **51**: RMN (ver Tabla 4), MALDI C₄₄H₆₆N₆O₂₆ [M + Na]⁺ 1117.5; **53**: RMN (ver Tabla 5), MALDI C₆₀H₉₃N₉O₃₆ [M + Na]⁺ 1538.6; **55**: RMN (ver Tabla 6), MALDI C₉₄H₁₃₆N₁₂O₅₂ [M + Na]⁺ 2287.8

II.2.5- Síntesis de glicodendrimeros por reacción de amidación.

II.2.5.1- Procedimiento general: reacción de amidación.

MÉTODO F: El derivado acetilado de lactosa con el grupo diaminonaftaleno se disuelve junto con trietilamina, recientemente destilada, en THF anhidro bajo atmósfera inerte, en presencia de tamiz molecular, y se agita a 0° C hasta su completa disolución. A continuación se añade gota a gota el cloruro de ácido correspondiente disuelto en THF anhidro, una vez añadido todo el cloruro de ácido se mantiene la reacción en agitación a 0° C durante una hora. Finalmente se deja alcanzar RT y se mantiene la agitación durante 48 horas.

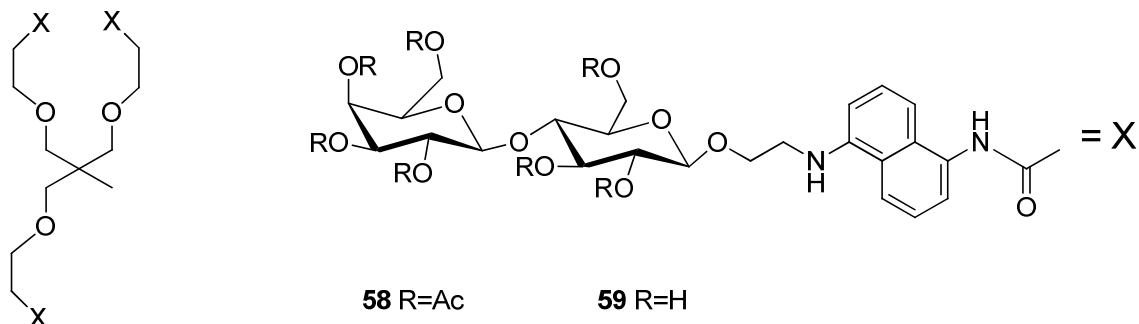
II.2.5.2- Síntesis del compuesto 56.



Siguiendo el MÉTODO F, a partir de **35** (400 mg, 0.48 mmol), trietilamina (196 mg, 1.92 mmol), y **8** (52 mg, 0.19 mmol), en 2 ml de THF anhidro, se obtiene el compuesto **56** (168 mg, 48%), como un sólido marrón (CH₂Cl₂-Acetona 2:1). RMN-¹H, 300 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 1.82 (m, 4H, H-13), 2.05-2.25 (14 CH₃), 2.72 (t, J= 6.4 Hz, 4H, H-10), 3.45 (m, 4H, H-14), 3.60 (t, J=6.4 Hz, 4H, H-12), 3.67 (ddd, J= 9.4, 5.9, 2.0 Hz, 2H, H-5'), 3.78 (t, J=6.4 Hz, 4H, H-11), 3.80 (t, J= 9.4 Hz, 2H, H-4'), 3.85 (t br, J= 7.0 Hz, 2H, H-5''), 4.03 (m, 2H, H-15A), 4.05 (m, 2H, H-6''A), 4.10 (dd, J= 12.0 y 3.0 Hz, 2H, H-6'A), 4.15 (m, 2H, H-6'B), 4.20 (m, 2H, H-15B), 4.49 (d, J=7.9 Hz, 2H, H-1'), 4.50 (dd, J= 12.0 y 2.0 Hz, 2H, H-6'B), 4.60 (d, J=7.9 Hz, H-1'), 4.95 (dd, J= 9.4 y 7.8 Hz, 2H, H-2'), 4.98 (dd, J= 9.4 y 3.4 Hz, 2H, H-3''), 5.13 (dd, J= 9.4 y 7.9 Hz, 2H, H-2''), 5.20(t, J= 9.4 Hz, 2H, H-3'), 5.37 (d, J= 3.4 Hz, 2H, H-4''), 6.60 (d, J= 7.7 Hz,

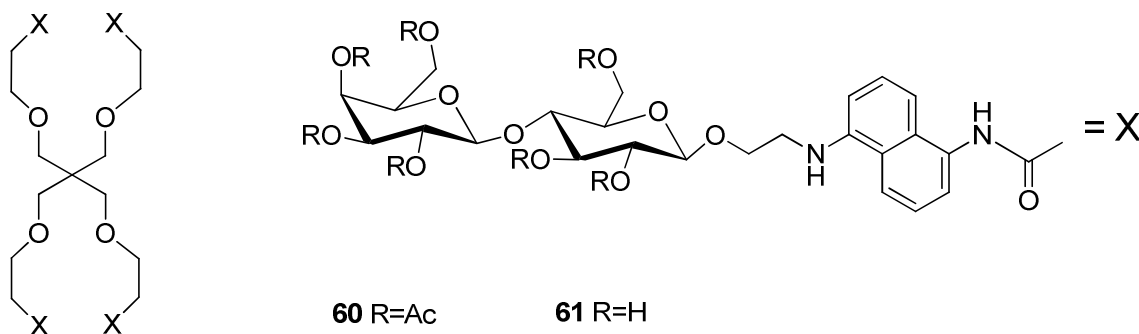
2H, H-6), 7.25 (d, $J=7.7$ Hz, 2H, H-8), 7.34 (d, $J=7.7$ Hz, 2H, H-4), 7.41 (t, $J=7.7$ Hz, 2H, H-7), 7.61 (t, $J=7.7$ Hz, 2H, H-3), 8.09 (d, $J=7.7$ Hz, H-2).

II.2.5.3- Síntesis del compuesto 58.



Siguiendo el MÉTODO F, a partir de **39** (476 mg, 0.56 mmol), trietilamina (152 mg, 1.52 mmol), y **8** (60 mg, 0.15 mmol), en 2 ml de THF anhidro, se obtiene el compuesto **58** (181 mg, 44%), como un sólido marrón (AcOEt-Etanol 25:1). RMN- 1 H, 300 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 1.22 (s, 3H, H-14), 2.05-2.25 (21 CH₃), 2.70 (t, $J=6.4$ Hz, 6H, H-10), 3.46 (m, 6H, H-15), 3.51 (s, 6H, H-12), 3.65 (ddd, $J=9.4, 5.9, 2.0$ Hz, 3H, H-5'), 3.79 (t, $J=6.4$ Hz, 6H, H-11), 3.81 (t, $J=9.4$ Hz, 3H, H-4'), 3.87 (t br, $J=7.0$ Hz, 3H, H-5''), 3.93 (m, 3H, H-16A), 4.05 (m, 3H, H-6''A), 4.10 (dd, $J=12.0$ y 3.0 Hz, 3H, H-6'A), 4.13 (m, 3H, H-16B), 4.15 (m, 3H, H-6''B), 4.48 (d, $J=7.9$ Hz, 3H, H-1'), 4.49 (dd, $J=12.0$ y 2.0 Hz, 3H, H-6'B), 4.59 (d, $J=7.9$ Hz, 3H, H-1'), 4.95 (dd, $J=9.4$ y 7.8 Hz, 3H, H-2'), 4.96 (dd, $J=9.4$ y 3.4 Hz, 3H, H-3''), 5.11 (dd, $J=9.4$ y 7.9 Hz, 3H, H-2''), 5.21 (t, $J=9.4$ Hz, 3H, H-3'), 5.35 (d, $J=3.4$ Hz, 3H, H-4''), 6.61 (d, $J=7.7$ Hz, 3H, H-6), 7.28 (d, $J=7.7$ Hz, 3H, H-8), 7.34 (d, $J=7.7$ Hz, 3H, H-4), 7.35 (t, $J=7.7$ Hz, 3H, H-7), 7.62 (t, $J=7.7$ Hz, 3H, H-3), 8.11 (d, $J=7.7$ Hz, 3H, H-2).

II.2.5.4- Síntesis del compuesto 60.



Siguiendo el MÉTODO F, a partir de **43** (300 mg, 0.36 mmol), trietilamina (70 mg, 0.7 mmol), y **8** (35 mg, 0.07 mmol), en 2 ml de THF anhidro, se obtiene el compuesto **60** (107 mg, 42%), como un sólido marrón (AcOEt-Etanol 25:1). RMN-¹H, 300 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 2.05-2.25 (28 CH₃), 2.65 (t, J= 6.4 Hz, 8H, H-10), 3.49 (s, 8H, H-12), 3.56 (m, 8H, H-14), 3.59 (ddd, J= 9.4, 5.9, 2.0 Hz, 4H, H-5'), 3.76 (t, J=6.4 Hz, 8H, H-11), 3.80 (t, J= 9.4 Hz, 4H, H-4'), 3.88 (t br, J= 7.0 Hz, 4H, H-5''), 3.95(m, 4H, H-15A), 4.08 (m, 4H, H-6''A), 4.10 (dd, J= 12.0 y 3.0 Hz, 4H, H-6'A), 4.12 (m, 4H, H-6'B), 4.14 (m, 4H, H-15B), 4.45 (d, J=7.9 Hz, 4H, H-1'), B), 4.50 (d, J=7.9 Hz, 4H, H-1')4.52 (dd, J= 12.0 y 2.0 Hz, 4H, H-6'), 4.90 (dd, J= 9.4 y 7.8 Hz, 4H, H-2'), 4.96 (dd, J= 9.4 y 3.4 Hz, 4H, H-3''), 5.10 (dd, J= 9.4 y 7.9 Hz, 4H, H-2''), 5.18(t, J= 9.4 Hz, 4H, H-3'), 5.34 (d, J= 3.4 Hz, 4H, H-4''), 6.63 (d, J= 7.7 Hz, 4H, H-6), 7.30 (d, J= 7.7 Hz, 4H, H-8), 7.35 (d, J= 7.7 Hz, 4H, H-4), 7.37 (t, J= 7.7 Hz, 4H, H-7), 7.65 (t, J= 7.7 Hz, 4H, H-3), 8.12 (d, J= 7.7 Hz, 4H, H-2).

II.2.5.5- Procedimiento general: desprotección de los grupos acetilo.

MÉTODO G: Se disuelve el derivado acetilado en una mezcla de CH₂Cl₂-metanol 2:1 y, a continuación, se adiciona, gota a gota, una disolución de metóxido sódico (0.5 M) en metanol anhidro, se agita a temperatura ambiente y se sigue la reacción por TLC. Se elimina el disolvente a presión reducida y el sólido se lava con éter dietílico y CH₂Cl₂.

II.2.5.6- Síntesis de los compuestos 57, 59 y 61.

Siguiendo el MÉTODO G, se obtienen cuantitativamente los compuestos sin necesidad de posterior purificación. **57** (99 mg, 92%), RMN (ver Tabla 7), MALDI C₅₈H₈₂N₄O₂₆ [M + Na]⁺ 1273.5134, calculado 1273.5109; **59** (101 mg, 97%), RMN (ver Tabla 8), MALDI C₈₆H₁₂₀N₆O₃₉ [M + Na]⁺ 1883.7428, calculado 1883.7483 y **61** (63 mg, 93%), RMN (ver Tabla 9), MALDI C₁₁₃H₁₅₆N₈O₅₂ [M + Na]⁺ 2479.5243, calculado 2479.5298.

II.3- Resonancia de Plasmón Superficial (SPR).

Para los estudios de SPR se emplearon diferentes chips comerciales de BIAcore, los cuales constan de una carcasa de plástico en la cual se dispone una superficie de oro que puede estar funcionalizada de diferentes formas.

En nuestros estudios hemos empleado el chip denominado CM5. Este chip contiene una superficie de oro funcionalizada con una matriz de dextrano de 100 nm. Esta matriz está funcionalizada con grupos carboxilo lo cual permite la inmovilización covalente mediante distintos métodos químicos. De ellos, el tipo de enlace más ampliamente utilizado es la formación de un enlace amida entre los grupos carboxilo del chip y los grupos amino de la molécula a inmovilizar.

Cuando el chip se introduce en el equipo, se definen 4 canales (Fc1, Fc2, Fc3 y Fc4) por los que se puede fluir la muestra simultánea o individualmente. En todos los casos, uno de los canales se deja siempre como control negativo para restar las interacciones inespecíficas debidas a la matriz, y en los otros se inmoviliza una de las moléculas que queremos estudiar. Esta molécula que se inmoviliza recibe el nombre de ligando. En nuestro caso, llevamos a cabo dos aproximaciones diferentes, primero, inmovilizamos el glicoconjugado sobre la superficie del chip (ligando) y fluimos posteriormente la lectina (analito) sobre la misma para estudiar la interacción. Otra aproximación es la unión de la lectina a la superficie del biosensor (ligando) y a continuación fluir el glicodendrímico (analito) para observar su interacción con la proteína.

La respuesta se monitoriza mediante la unidad de respuesta (RU) que es una unidad arbitraria directamente proporcional a la masa que se une a la superficie de oro. De este modo, todo incremento de RU en la señal implicará una unión de la biomolécula con la superficie. De este modo se puede monitorizar a tiempo real fenómenos de inmovilización del ligando y la interacción analito-ligando. Todos los datos se evaluaron mediante el programa BIAEvaluation (version 4.1, Biacore). Dependiendo de la interacción se pueden obtener datos cinéticos y de afinidad mediante el ajuste a diferentes modelos matemáticos que corresponden a diferentes comportamientos biológicos.

II.3.1. Método general de preconcentración sobre la superficie del chip.

Los diferentes chips empleados en los experimentos de SPR tienen un grado de funcionalización de grupos carboxilo en su superficie que varía de unos a otros, ésta característica hace que su superficie tenga una determinada carga electrostática. Al fluir una molécula sobre la superficie para inmovilizarla, tenemos que considerar que en función del pH del tampón en que está disuelta variará su carga electrostática, y si la

molécula y la superficie están cargadas con el mismo signo se producirá un efecto de repulsión que impedirá una correcta inmovilización.

Para estudiar este fenómeno se realiza la preconcentración, ésta consiste en la inyección en la superficie del chip sobre el que vamos a inmovilizar nuestro ligando de varias disoluciones de éste, disueltas en tampón acetato a diferentes pH. Al hacer esto la solución que presente una mayor señal en RU será la que mejor atracción electrostática tiene por la superficie y la que deberemos emplear para la inmovilización.

II.3.2. Método general de activación del chip.

Para llevar a cabo la activación de los grupos carboxilo de la superficie del biosensor los reactivos utilizados fueron: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisulfosuccinimida (NHS). El protocolo de activación consistió en la inyección de 35 μ L de una mezcla de EDC (0,2 M) y NHS (0,05 M), a 5 μ l/min de flujo, temperatura constante de 25 °C y empleando como tampón de trabajo 10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005 % de tensioactivo P20 (HBSP). Tras este procedimiento general de activación la superficie queda lista para inmovilizar el ligando.

II.3.3. Método general de bloqueo de grupos activados del chip.

Después del proceso de inmovilización de los ligandos en el chip activado, es posible que queden grupos carboxilos de la matriz activados donde no se haya producido la inmovilización. Para evitar que estos grupos remanentes puedan interferir en los estudios de interacción, se bloqueó la superficie mediante una inyección de etanolamina (1 M, 35 μ L) a un flujo de 5 μ L/min y 28°C y empleando como tampón de trabajo HBSP.

II.3.4. Inmovilización de viscumina.

El primer paso consistió en inmovilizar sobre el canal de flujo Fc2 de la superficie del biosensor la lectina, para ello se procedió a la activación de la superficie mediante el método estándar con la mezcla de EDC/NHS. A continuación se inyectaron 40 μ l de una solución de viscumina 30 μ g/ml disuelta en tampón acetato sódico 10 mM pH 4.5 a un flujo de 5 μ l/min. Posteriormente se inyectó una solución de NaCl 1M (10 μ l) y HBSP (10 μ l) para eliminar los restos de lectina que no se han inmovilizado covalentemente a la superficie. Por último se bloqueó con etanolamina el resto de

grupos activados sin reaccionar. La señal final de inmovilización fue de 6124 RU. La celda Fc1 se usó como blanco tras la activación con EDC/NHS y el posterior bloqueo con etanolamina.

Tras la inmovilización de la lectina sobre la superficie del biosensor se fluyeron los distintos glicodendrimeros. Los estudios se realizaron a 25°C a un flujo de 30 µl/min, con un tiempo de contacto de 180 s y un tiempo de disociación de 180 s. Los distintos glicoderivados se inyectaron a diferentes concentraciones.

II.4- Resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación.

Los estudios de interacción glicodendrimer-proteína por RMN fueron realizados por Pilar Blasco, Doctoranda del grupo del Prof. Dr. Jiménez Barbero, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

Los estudios de RMN de los compuestos **51**, **53** y **55** en solución acuosa se llevaron a cabo usando muestras 1 mM en D₂O. Los métodos estándar en 2D, como TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) con tiempos de mezcla de 30 y 80 ms, ROESY (Rotating-Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy) con tiempos de mezcla de 300 ms, NOESY (Nuclear Overhauser effect spectroscopy) con tiempos de mezcla de 400 y 600 ms, y HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) se emplearon para asignar los desplazamientos químicos de RMN. Se usaron equipos Bruker Avance 500 y 600 Mhz equipados con criosonda de triple canal.

Las muestras de viscumina para los experimentos de STD se prepararon en tampón fosfato salino deuterado (NaD₂PO₄ 10 mM, NaCl 137 mM y KCl 2.7 mM pH 7.3) con una relación de ligando/lectina de 1:50. La temperatura se fijó en 298° K. Los datos de STD monodimensional se adquirieron a 500 y 600 Mhz empleando una serie de pulsos Gaussianos (49 ms) en cascada con una separación de 1ms. En todos los casos la radiación *on-resonance* se fijó en la región alifática (-0.2 ppm) y los experimentos se obtuvieron con un tiempo de saturación de 2s. La irradiación *off-resonance* se mantuvo siempre a 100 ppm.

II.5- Fluorescencia.

Los experimentos se llevaron a cabo por el equipo de la Prof. Dr. M^a Concepción Civera Tejuca en el departamento de Química Física II (Fisicoquímica Farmacéutica).

En todos los experimentos la concentración de proteína fue inferior a 1 μ M cuya absorbancia es de 0.02 evitando así efectos de filtro interno. Los glicodendrimeros empleados tenían concentraciones de 115.8 μ M para **47**, 168.6 μ M para **49** y 75 μ M para **55** respectivamente. Se empleó como tampón de trabajo HBS-P. Todos los disolventes empleados fueron de calidad espectroscópica. Los experimentos se realizaron añadiendo alícuotas de 2 μ l de la disolución de glicodendrimeros sobre la disolución de proteína.

Los espectros de excitación y de emisión, se adquirieron en un espectrofluorímetro modular PTI en todos ellos la λ_{exc} fue 295 nm. Las rendijas de excitación y de emisión fueron ajustadas a 2 nm. En todos los experimentos se utilizaron cubetas de cuarzo Hellma con una longitud de paso de 0.2 cm. Los espectros realizados se han obtenido como promedio de tres acumulaciones. La temperatura de trabajo (25 °C) se mantuvo constante mediante un Peltier TLC 50 integrado en el espectrofluorímetro. El análisis de espectros así como la adquisición de datos se realizó mediante el programa FELIX 32.

II.6- Calorimetría isoterma de titulación.

Los experimentos se realizaron introduciendo en la celda de muestra una disolución a una concentración conocida de viscumina en el tampón 10 Mm HEPES, 150 Mm NaCl a pH 7.4 y valorando el glicodendrimeros mediante adición controlada a través de la microjeringa. Se empleó una concentración de viscumina 100 μ M y una concentración de **55** 1000 μ M.

Los diferentes experimentos se llevaron a cabo con un tiempo de retardo de 60 s, el número de inyecciones fue de 20, la temperatura se fijó a 25 °C y la potencia de referencia fue de 11 μ Cal/s.

II.7- Modelado molecular.

El modelado molecular y docking de la interacción glicodendrúmero-proteína fue realizado por el grupo del Prof. Dr. Jiménez Barbero, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

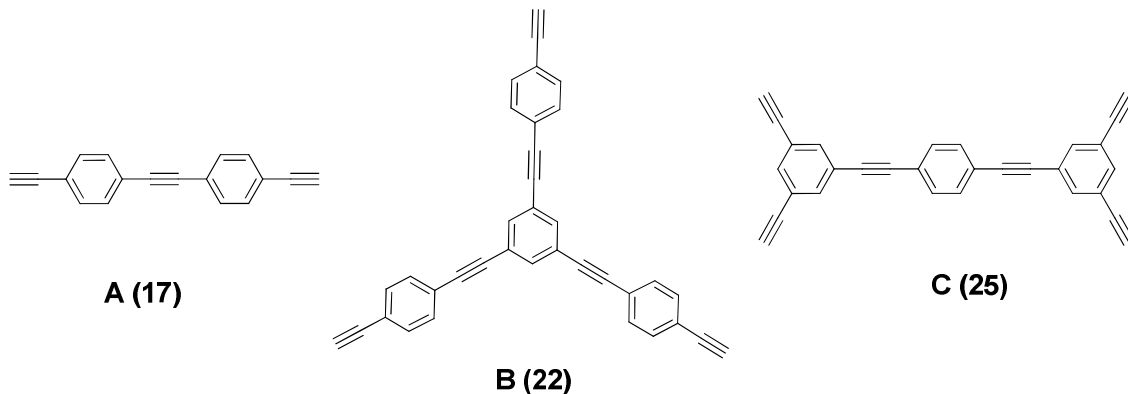
Las plantillas para el procedimiento de modelado molecular fueron construidas basándose en la estructura de Rayos-X de la viscumina en su complejo con lactosa (código pdb: 1PUU). Las estructuras de los glicoclusters fueron superpuestas sobre el sitio de unión TYR249 empleando la conformación estructural en estado libre más probable (de acuerdo a una aproximación mediante un modelado molecular NOE estandar). La estructura del glicodendrúmero fue previamente minimizada mediante un corto cálculo de dinámica molecular, seguida de una minimización energética con un bajo umbral de gradiente de convergencia (0.05) en 5000 etapas. En todos los casos fue empleado el campo de fuerza OPL2005, integrado en el conjunto de programas MAESTRO (Schroedinger Inc).

III- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

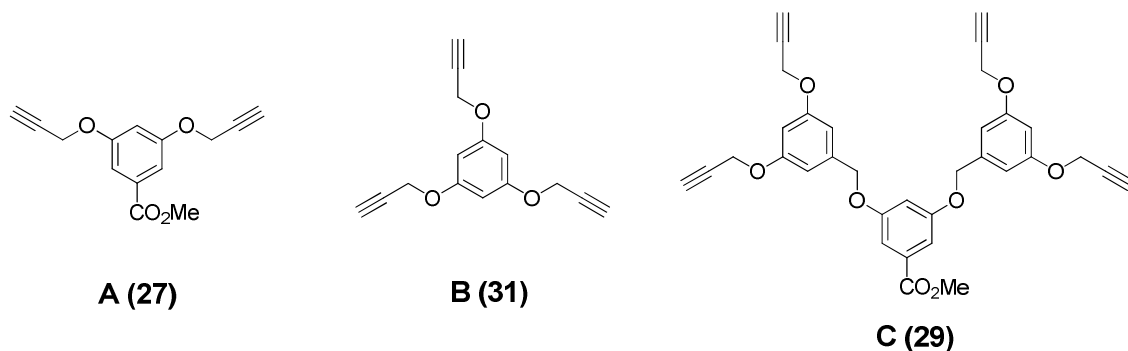
III.1- Síntesis química de glicoconjugados y glicodendrimeros

Los esqueletos carbonados de los *cores* sintetizados se agrupan en tres clases:

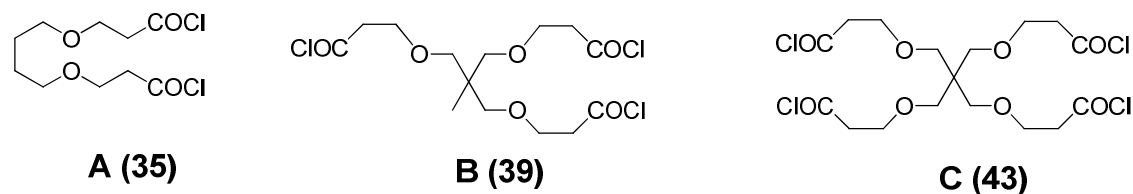
I. Nanoestructuras con *cores* aromáticos y conjugación π -extendida, tipo etinilbenceno.



II. Nanoestructuras aromáticas con *cores* bencénicos.



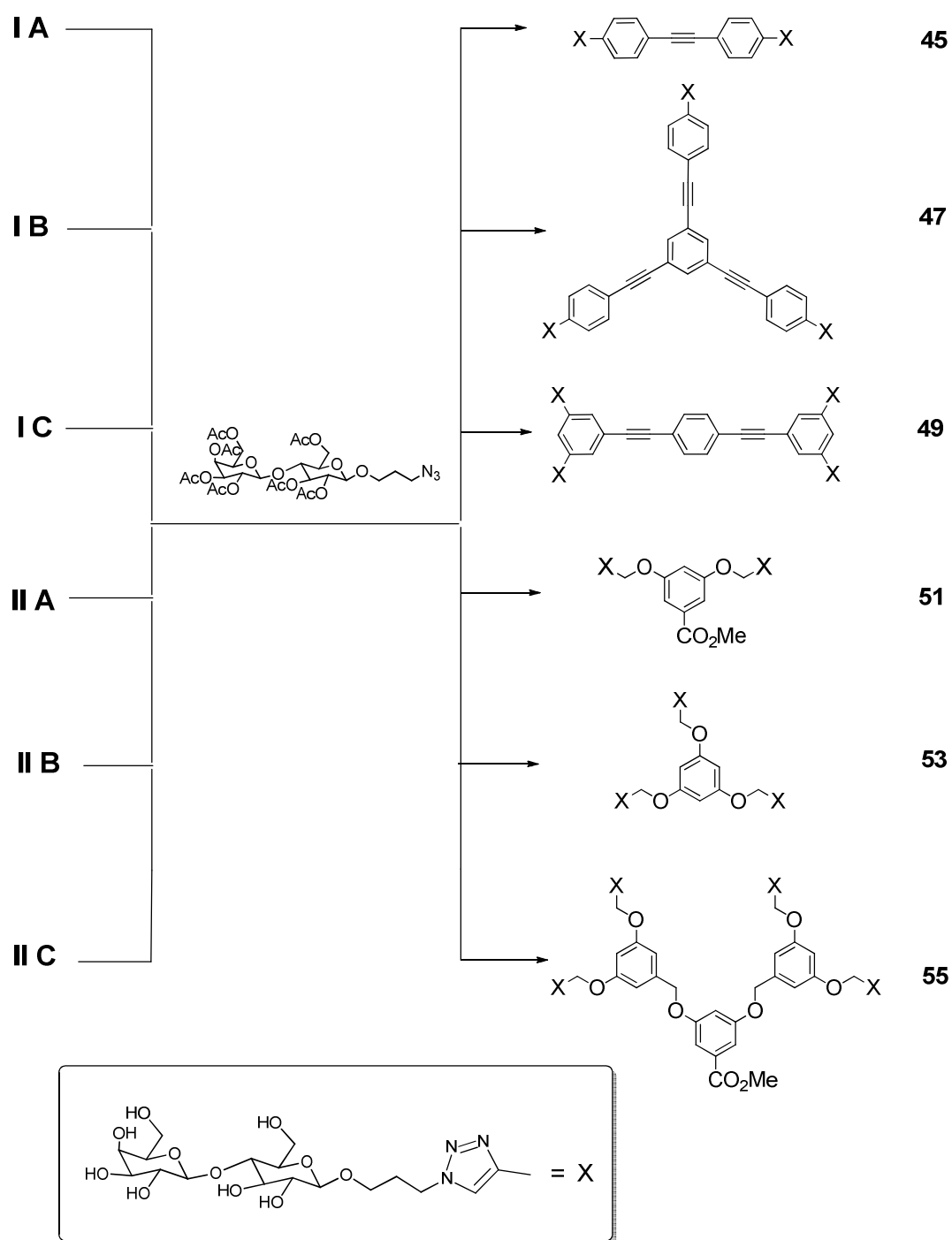
III. Nanoestructuras funcionalizadas con cloruros de ácido.



Los *cores* de tipo **A** (IA, IIA y IIIA) presentarán **dos** restos de lactosa, los *cores* de tipo **B** (IB, IIB y IIIB) presentarán **tres** restos de lactosa y los *cores* de tipo **C** (IC, IIC y IIIC) presentarán **cuatro** restos de lactosa.

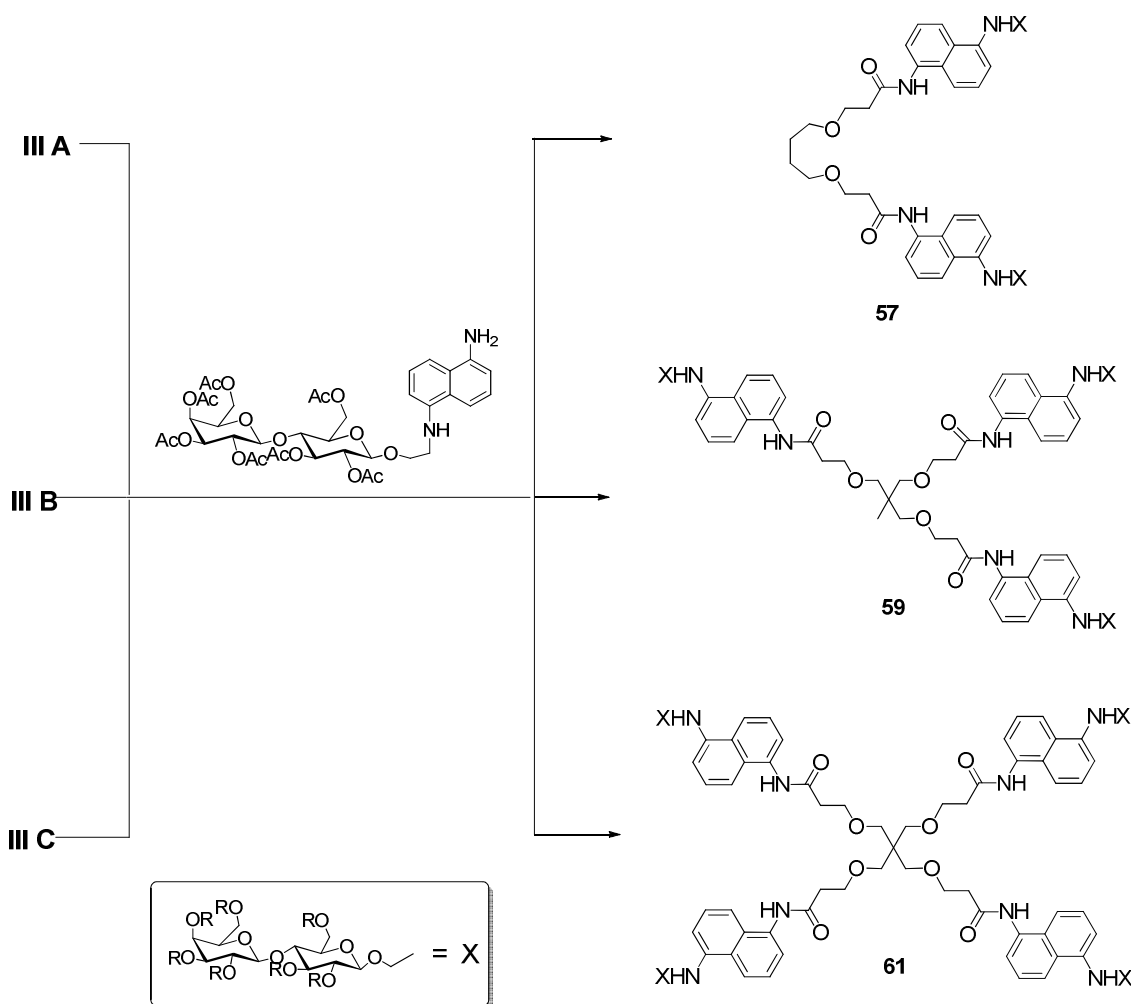
La unión de los distintos *cores* a la lactosa, se hará de dos formas distintas:

1) Los *cores* de tipo **I** y **II** se unirán, a través de los restos acetilénicos terminales, con el grupo azido del glicoconjugado de la lactosa, mediante una reacción de cicloadición 1,3-dipolar (Esquema 1)



Esquema 1. Reacción de los *cores* tipo I y II mediante cicloadición 1,3-dipolar.

Mientras que los *cores* de tipo **III** se unirán mediante una reacción de amidación entre los grupos amino del naftaleno del glicoconjugado y el cloruro de ácido del *core*.



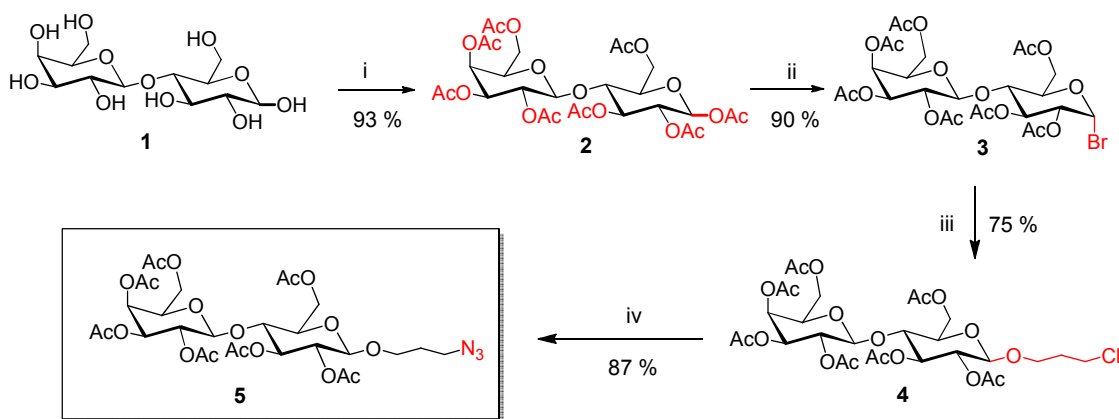
Esquema 2. Reacción de los *cores* tipo III mediante amidación.

La preparación de todos los glicodendrimeros de la presente Memoria, se han llevado a cabo en cuatro etapas fundamentales:

ETAPA 1. Formación de la lactosa funcionalizada correspondiente.

Para anclar la lactosa al resto de la molécula, ésta ha sido funcionalizada mediante dos vías distintas, por un lado con una cadena carbonada de tres carbonos con un grupo azido terminal, y por otro, con una cadena carbonada de dos carbonos con un grupo aldehído terminal. En ambos casos la cadena con el grupo funcional está unida al carbono anomérico libre. A continuación vemos los dos métodos.

La síntesis del glicoconjugado con un resto azido terminal, se ha preparado siguiendo la secuencia de reacciones que aparecen en el Esquema 3.



Esquema 3. Reactivos y condiciones: i) Ac_2O , Py; ii) HBr (30 %) AcOH; iii) 1-cloropropanol, $\text{Hg}(\text{CN})_2$, HgBr_2 ; iv) NaN_3 , DMF

Como se puede observar en el Esquema 3, la primera etapa consiste en la protección de los grupos hidroxílicos de la lactosa en forma de acetatos, con anhídrido acético y piridina. Esta estrategia nos permite funcionalizar regioselectivamente la posición anomérica C-1' y juega un papel vital en la síntesis de oligosacáridos biológicamente activos.²¹⁴

El derivado acetilado **2** es una mezcla de epímeros α y β en equilibrio, que por reacción con HBr se obtiene únicamente el epímero α ; este hecho queda demostrado por RMN. Efectivamente, en el espectro de RMN- ^1H aparece un doblete a 6.52 ppm con una $J = 4.1$ Hz, constante característica de un acoplamiento escalar axial-ecuatorial en el ciclohexano; mientras que si estuviese en posición β , resonaría a campo más alto y con una J próxima a 8 Hz, característica de un acoplamiento axial-axial. De hecho, el otro protón anomérico H-1' de este compuesto, que está en posición β , resuena a 4.52 ppm y con una $J = 7.8$ Hz.

La justificación de la formación del anómero α de forma estereoselectiva, puede explicarse mediante el efecto Edward-Lemieux,²¹⁵ el cual, describe la tendencia de los sustituyentes heteroatómicos a disponerse en posición axial y no en ecuatorial como cabría esperar. Se da en sistemas en los que existe un átomo con pares de electrones libres contiguo a un carbono anomérico. Como se puede observar en la Figura 30, los pares de electrones libres del oxígeno generan repulsión frente a los pares de electrones libres del halógeno, haciendo la estructura α la más estable.

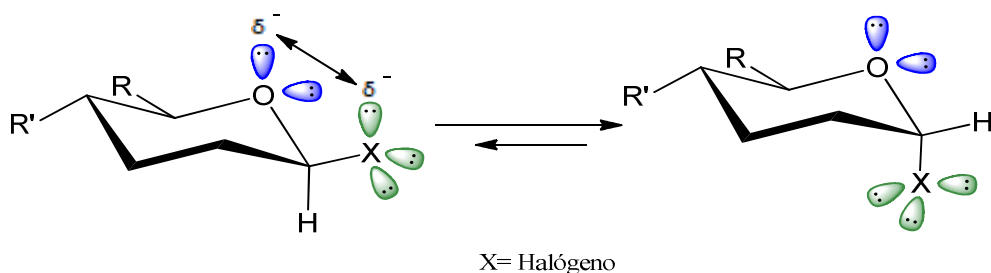


Figura 30. Efecto anomérico o efecto de Edward-Lemieux.

A continuación, se da la formación del enlace O-glicosídico, mediante una sustitución nucleófila S_N2 promovida por sales de mercurio (Figura 31), para dar lugar a la formación del compuesto **4**.

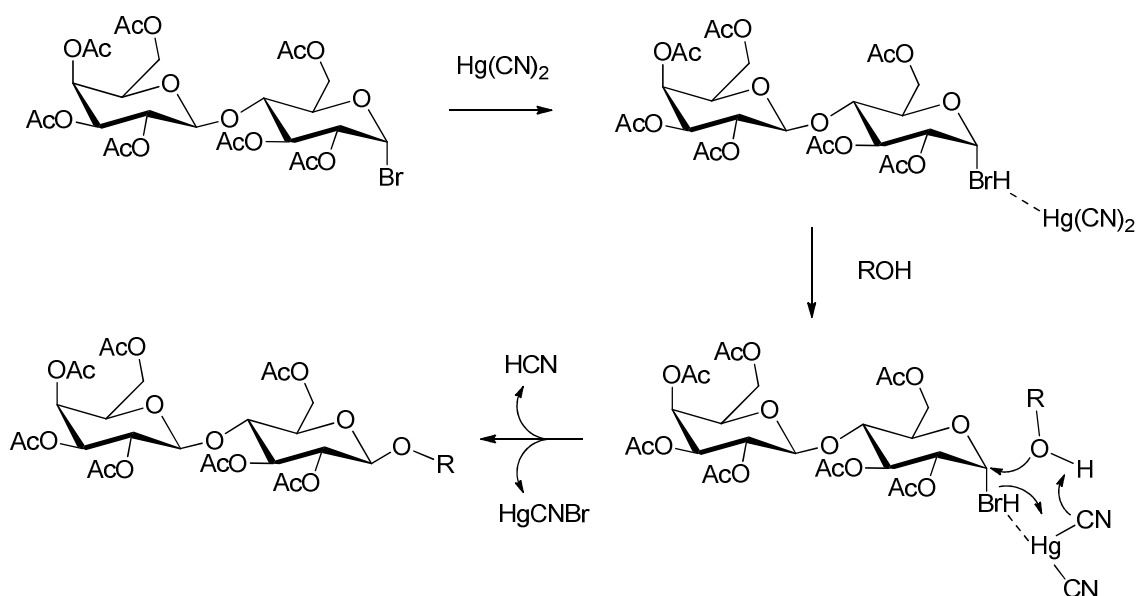


Figura 31. Mecanismo propuesto de la sustitución S_N2 promovida por sales de mercurio.

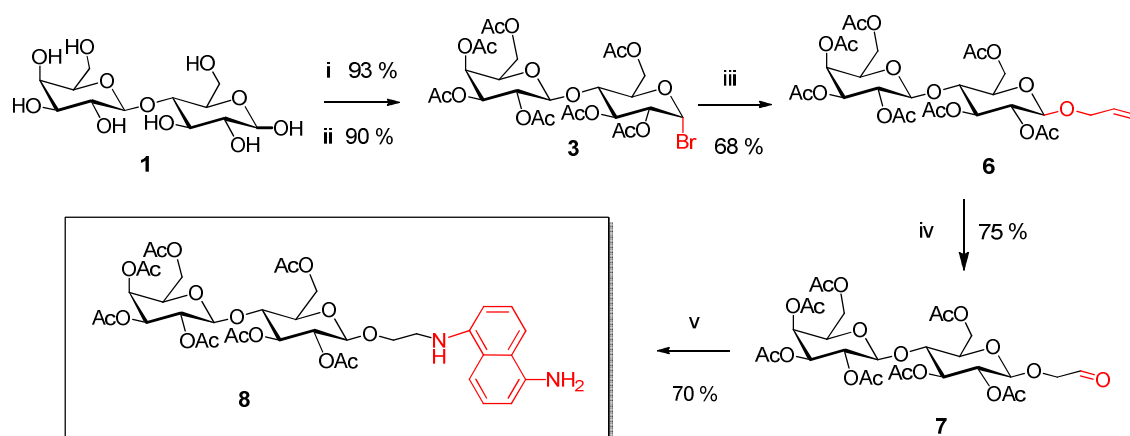
El cianuro de mercurio, coordina con el bromo del glicósido, polarizándose el enlace carbono-bromo. A continuación se da una reacción de sustitución S_N2 , donde el átomo de oxígeno del cloropropanol, que actúa como nucleófilo, ataca por la cara opuesta al grupo saliente (ion bromuro), para formar el glicósido β , liberándose $HgCNBr$ y ácido cianhídrico. El uso del mercurio aumenta considerablemente la facilidad del halógeno de actuar como grupo saliente.

Al transcurrir la reacción a través de una S_N2 , el linker o espaciador, entra en posición β , sin observarse mezcla de epímeros por RMN. En RMN- C^{13} aparecen señales correspondientes a dos carbonos anoméricos (δ_c 100.69 y (δ_c 100.95), desplazamientos

químicos típicos de C-β. Igualmente, por RMN-H¹, aparecen dos señales correspondientes a Hβ (δ_H 4.43 y 4.46) como dobletes con una J = 7.8 Hz.

Finalmente, mediante otra reacción tipo S_N2 entre el derivado clorado **4** y azida sódica, se obtiene el compuesto final **5**. Las únicas diferencias espectroscópicas de RMN entre los compuestos **4** y **5**, radican en los átomos próximos al grupo funcional sustituido: CH₂-Cl (δ_H 3.55 y δ_C 41.36) y CH₂-N₃ (δ_H 3.25 y δ_C 47.92).

La síntesis del glicoconjugado con un resto aldehído terminal se ha llevado a cabo mediante una reacción de aminación reductora, siguiendo la secuencia de reacciones que aparecen en el Esquema 4



Esquema 4. Reactivos y condiciones: i) Ac₂O, Py; ii) HBr (30 %) AcOH; iii) alcohol alílico, Hg(CN)₂, HgBr₂; iv) O₃, -78°C; v) 1,5-diaminonaftaleno, NaBH₃CN,DMF

A partir de la mezcla α,β de lactosa peracetilada, mediante Hg(CN)₂, HgBr₂;y alcohol alílico, se introduce el resto alilo en posición β, que tras su ozonólisis conduce al aldehído (7), que reacciona con el grupo amino libre del naftaleno, dando una imina que, posteriormente, se reduce mediante cianoborohidruro sódico, conduciendo al glicoconjugado **8**.

ETAPA 2. Preparación de los *cores* de distinta naturaleza.

Síntesis de los *cores* aromáticos con conjugación π-extendida: IA, IB y IC

La preparación de las nanoestructuras con conjugación π-extendida, se han realizado mediante reacciones de acoplamiento cruzado con Pd⁰ (reacciones de Sonogashira),²¹⁶ utilizando Pd(PPh₃)₂Cl₂ como catalizador. El mecanismo de estos acoplamientos viene reflejado en la Figura 32, de tal forma que el haluro de arilo sufre la adición oxidativa

de la especie Pd^0 , que se forma por reducción con NEt_3 . Posteriormente, se produce una transmetalación entre el complejo formado por la adición del paladio y el complejo de cobre con un resto alquino. Y, finalmente, se produce la eliminación reductora del Pd^{II} a Pd^0 y la formación de la unión entre el alquino y el derivado de arilo.

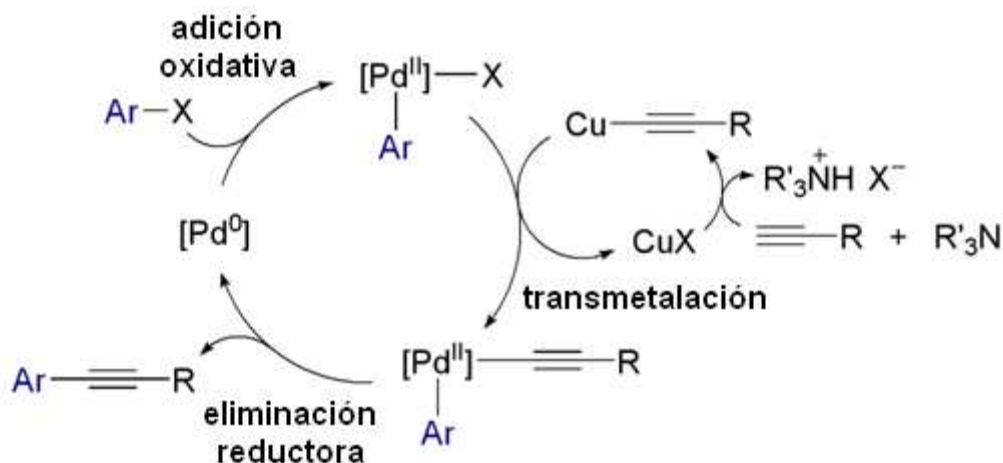
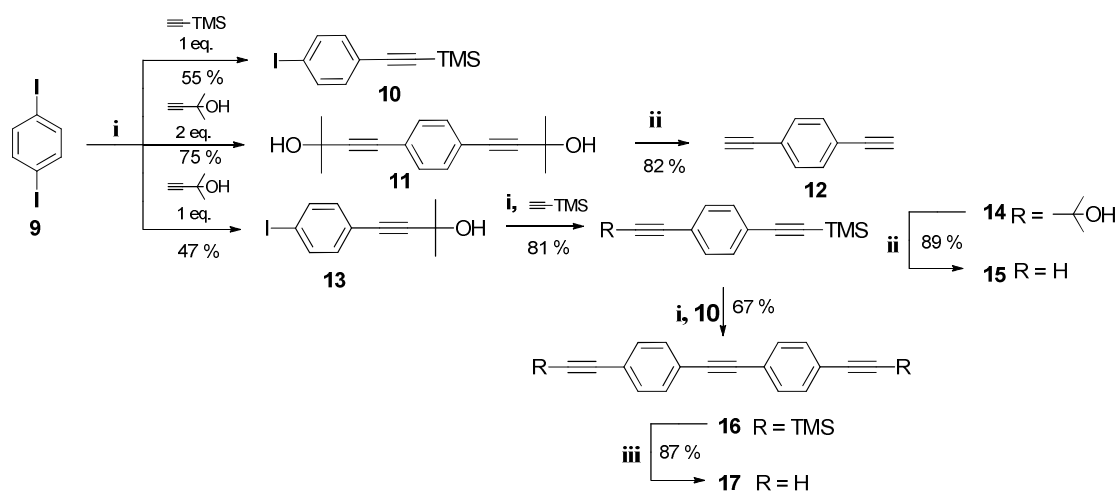


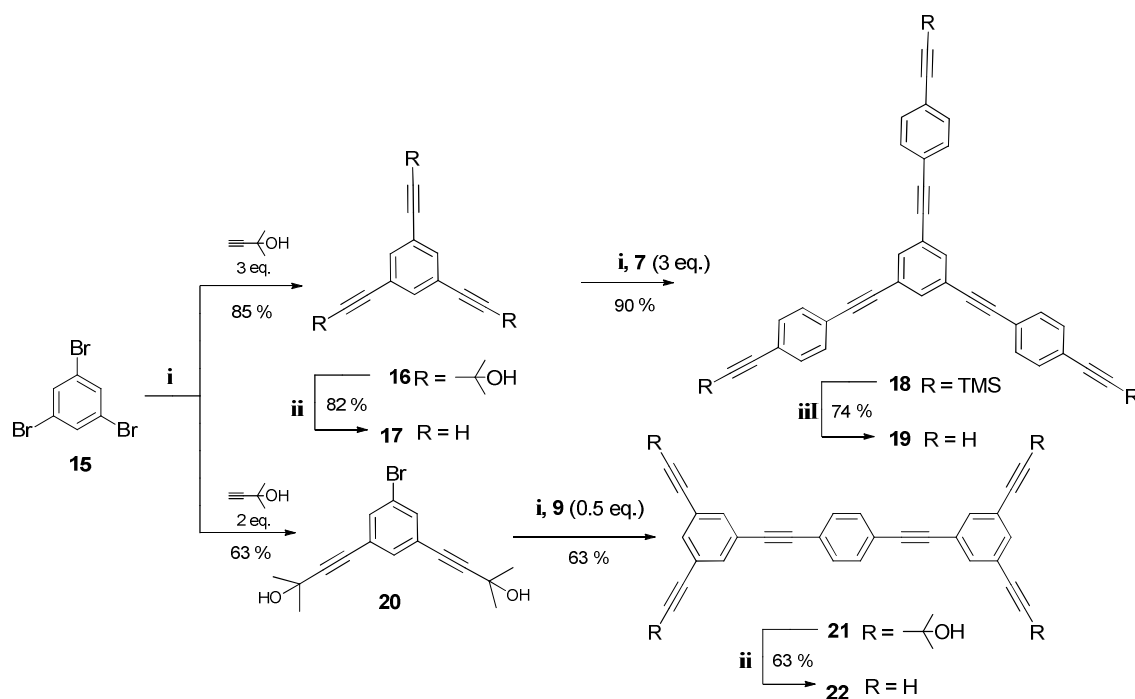
Figura 32. Mecanismo de la reacción de Sonogashira.

La síntesis del *core* lineal **IA** (**17**), se ha llevado a cabo a partir de 1,4-diyodobenceno y siguiendo la secuencia de reacciones que figuran en el Esquema 5.²¹⁷



Esquema 5. Reactivos y condiciones: i) $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, CuI , NEt_3 ; ii) NaOH seco, tolueno, reflujo; iii. K_2CO_3 , $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Los *cores* ramificados **IB** (**22**) y **IC** (**25**), con esqueleto tipo dendrón, se han realizado a partir de 1,3,5-tribromobenceno y siguiendo la misma metodología que en el caso anterior, como se refleja en el Esquema 6.

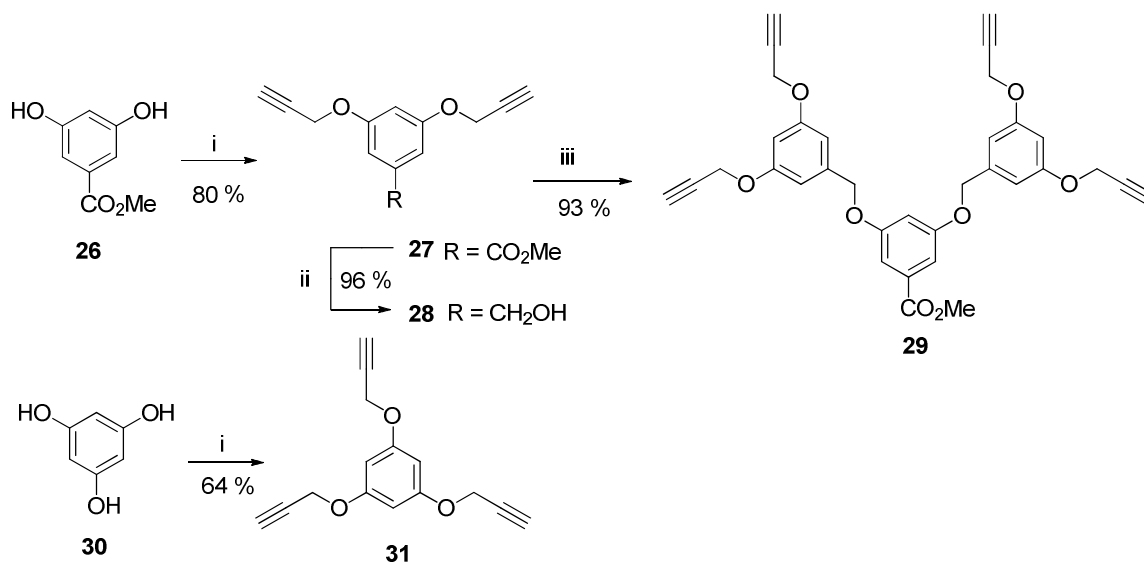


Esquema 6. Reactivos y condiciones: i) $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, CuI , NEt_3 ; ii) NaOH seco, tolueno, reflujo; iii. K_2CO_3 , $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$

En las síntesis de todos los *cores* que presentan alquinos terminales, hemos utilizado el trimetilsililacetileno y el 2-metil-2-hidroxibutino, como fuente de los acetilenos terminales, ya que nos permite desproteger selectivamente los grupos OH de los derivados tipo alcohol propargílico frente a los grupos de trimetilsilano. Utilizando NaOH seca, mediante una eliminación retro-Favorskii,²¹⁸ el grupo hidroxilo se elimina en forma de acetona con excelentes rendimientos. La protección / desprotección selectiva es fundamental en la síntesis de este tipo de derivados, ya que, a menudo, tenemos que dirigir adecuadamente las reacciones de Sonogashira, entre el acetileno terminal y el derivado halogenado.²¹⁹

Síntesis de los *cores* aromáticos bencénicos: IIA, IIB y IIC

La síntesis de *cores* IIA (27) y IIC (29), con 2 y 4 acetilenos terminales, respectivamente, se han preparado a partir de 3,5-dihidroxibenzoato de metilo y el *core* IIB (31), que presenta tres acetilenos terminales, se ha preparado a partir del 1,3,5-trihidroxibenceno (floroglucinol), siguiendo la secuencia de reacciones que figura en el Esquema 7.



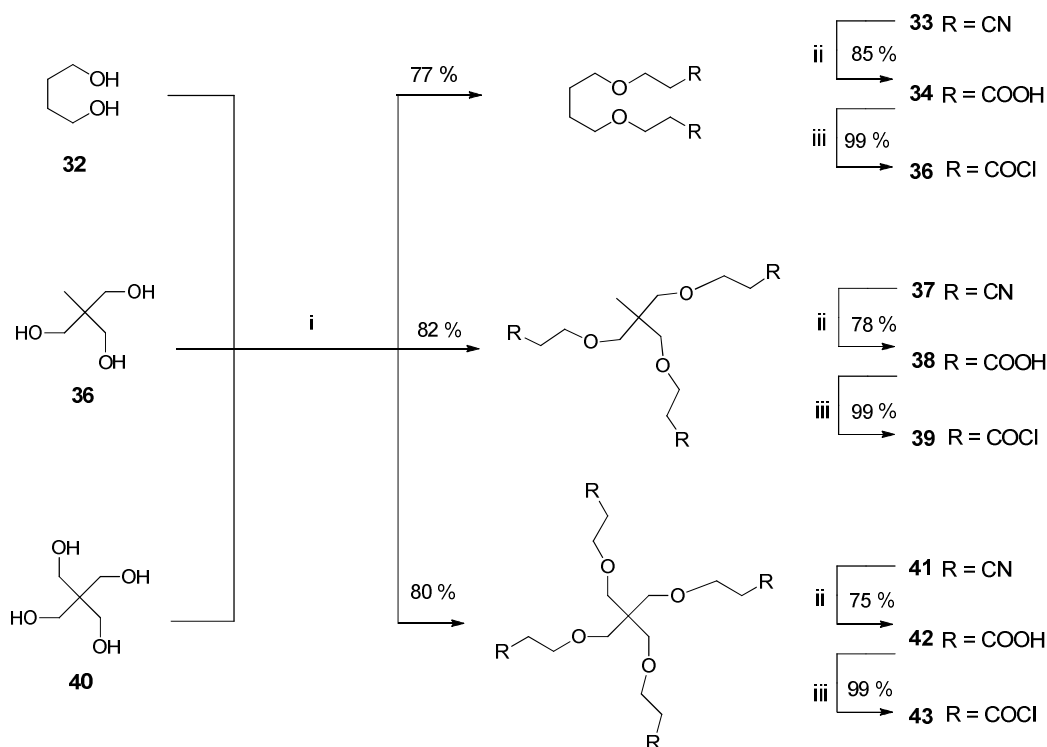
Esquema 7. Reactivos y condiciones: i) bromuro de propargilo, K₂CO₃, DMF; ii) LiAlH₄, DMF; iii) PPh₃, DEAD, THF.

Como fuente del resto acetilénico terminal, en los *cores* con 2 y 3 acetilenos terminales, se han utilizado el bromuro de propargilo que, mediante una S_N2, en medio básico, conduce a los derivados etínicos correspondientes. Para la síntesis del *core* con cuatro acetilenos terminales (**29**) se ha utilizado la reacción de Mitsunobu entre el 3,5-dihidroxibenzoato de metilo y el alcohol **28**.

2.3. Síntesis de los *cores* con cloruros de ácido: IIIA, IIIB y IIIC.

En este grupo de compuestos el anclaje del *core* al glicoconjugado, seguirá una estrategia distinta a la cicloadición 1,3-dipolar. En este caso, la unión entre el *core* y el glicoconjugado se llevará a cabo a través de un enlace amida formado por la reacción del grupo funcional, cloruro de ácido, del *core* y el grupo amino del glicoconjugado.

Para preparar los *cores* respectivos con grupos funcionales de cloruros de ácido, hemos seguido la estrategia que figura en el Esquema 8.



Esquema 8. *Reactivos y condiciones:* i) acrilonitrilo, KOH; ii) HCl (37%), 50° C, 24 h; iii) cloruro de oxalilo exceso, 25° C, 2 h.

Partiendo de los polialcoholes correspondientes **32**, **36** y **40**, y mediante una adición conjugada tipo Michael con acrilonitrilo, en medio básico, se obtienen los nitrilo-derivados: **33**, **37** y **41**, los cuales mediante una hidrólisis ácida del grupo ciano, conducen a los ácidos carboxílicos: **34**, **38**, y **42**. Finalmente, los cloruros de ácido finales: **35**, **39** y **43**, se obtienen por reacción de los ácidos carboxílicos con cloruro de oxalilo.

ETAPA 3. Preparación de los glicodendrimeros.

La síntesis de los compuestos finales se lleva a cabo mediante la unión entre los glicoconjugados y los *cores* correspondientes. Es tipo de anclaje se ha realizado de dos formas distintas.

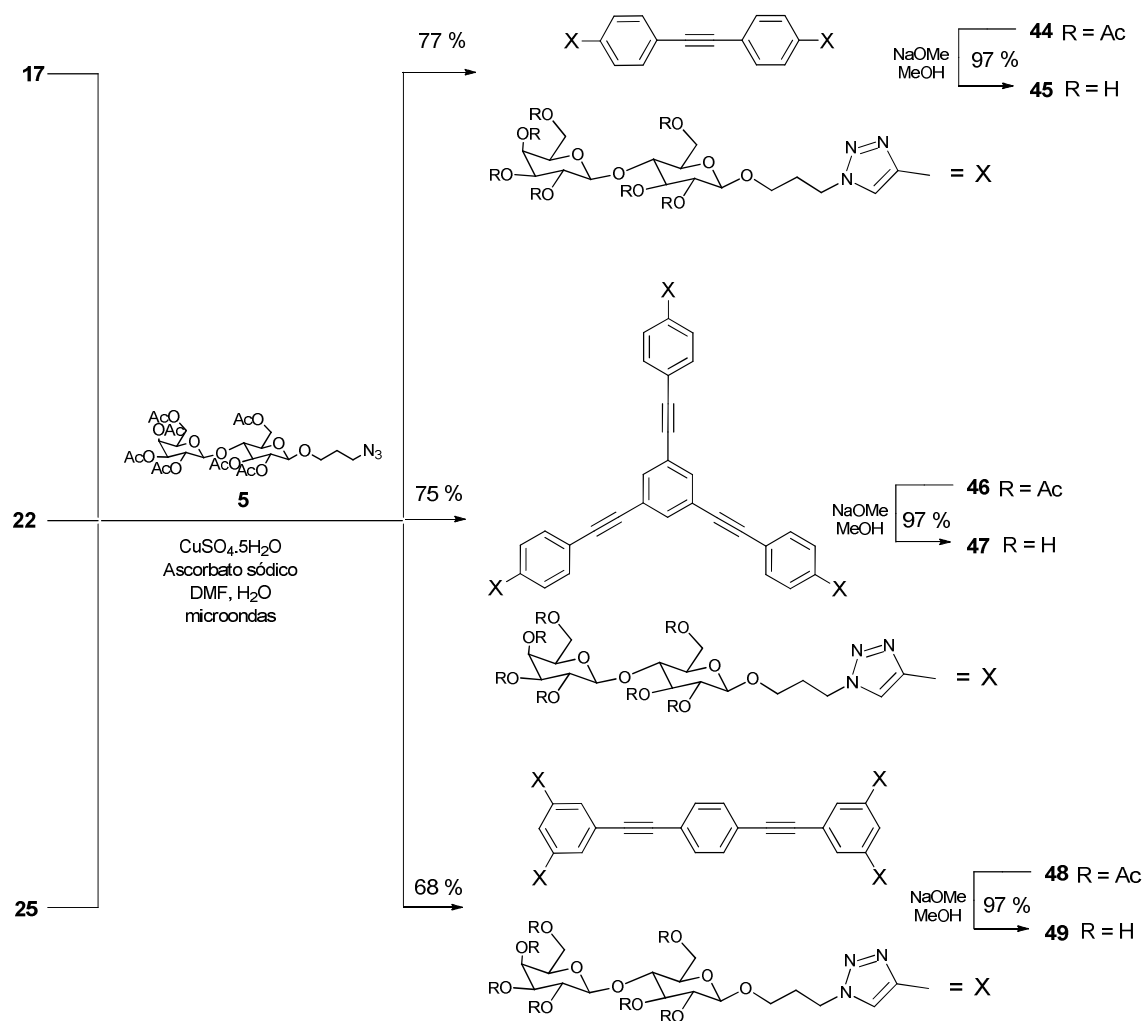
- Mediante reacciones de cicloadición 1,3-dipolar entre el grupo acetileno terminal de los *cores* y el resto azido del glicoconjugado, y
- Mediante reacciones de amidación entre el cloruro de ácido del *core* y el resto amino del glicoconjugado.

3.1. Síntesis de los glicodendrimeros mediante reacciones de cicloadición 1,3-dipolar.

Esta metodología se ha llevado a cabo con los *cores* que presentan acetilenos terminales, es decir, los *cores* de tipo **I** y **II**, con el glicoconjugado que presenta en su linker un grupo azido, que actúa como dipolo, es decir, el glicósido **5**.

Esta química se conoce como *click chemistry* y hemos puesto a punto el método para llevarlo a cabo a través del microondas (MW); de los distintos disolventes probados: CH₂Cl₂-H₂O, THF-H₂O y DMF-H₂O, el que mejores resultados a dado, por cuestiones de solubilidad, ha sido la mezcla DMF-H₂O.

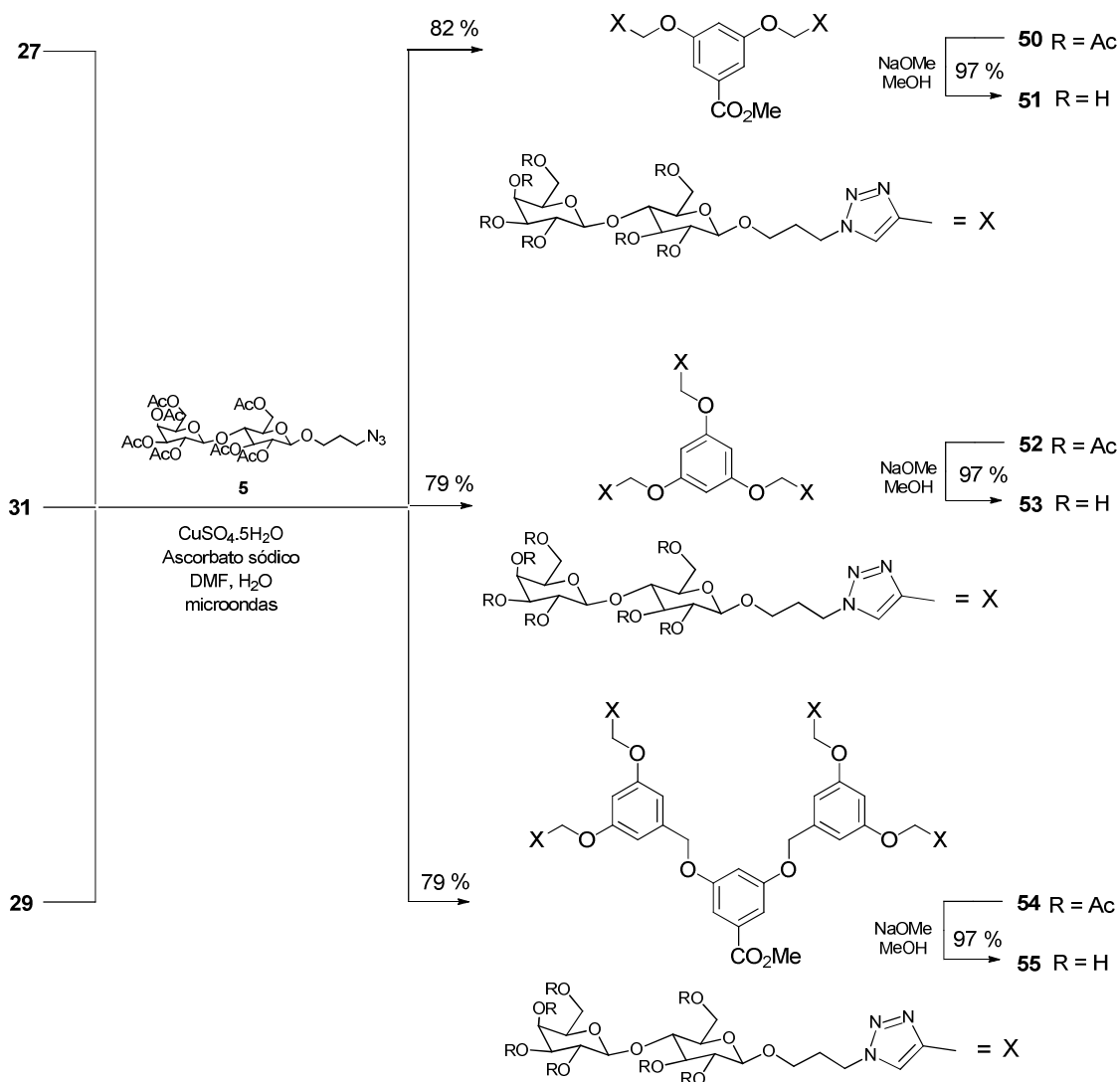
Las reacciones de cicloadición 1,3-dipolares con los *cores* altamente conjugados, que presentan una conjugación *p*-extendida, aparecen en el Esquema 9.



Esquema 9. Síntesis mediante "click chemistry" y desprotección.

Finalmente, la desprotección de los grupos acetato con metóxido sódico y metanol, nos ha conducido a los compuestos finales que se utilizarán para los estudios de interacciones carbohidrato-proteína.

De forma similar, se han obtenido los glicodendrmeros con anillos bencénicos, cuya secuencia de reacciones de síntesis, aparece reflejada en el Esquema 10.



Esquema 10. Síntesis mediante "click chemistry" y desprotección.

La desprotección de los grupos hidroxilo de la lactosa (desacetilación), se ha llevado a cabo, igualmente, con NaOMe y MeOH, de forma cuantitativa, sin necesidad de posterior purificación de los compuestos finales, los cuales se utilizarán para el estudio de interacciones carbohidrato-proteína.

ETAPA 4. Determinación estructural de los glicodendrimeros.

La determinación estructural de los compuestos descritos por primera vez se llevó a cabo, principalmente, mediante la espectrometría de masas (EM) de masas exactas que nos permite conocer la fórmula molecular del compuesto químico y las diferentes técnicas espectroscópicas de RMN, tanto monodimensionales (RMN- H^1 , RMN- C^{13} y DEPT) como bidimensionales (COSY, TOCSY, HMQC, HMBC, ROESY y NOESY).

Las técnicas monodimensionales (1D) de RMN, como RMN- H^1 (Resonancia magnética nuclear de protones), RMN- C^{13} (Resonancia Magnética Nuclear de C^{13}) y DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), nos permite conocer el esqueleto básico hidrocarbonado del compuesto, que en combinación con los datos de EM, nos proporciona una información imprescindible para determinar la estructura de un nuevo compuesto químico, pero no suficiente; es imprescindible combinar las técnicas monodimensionales (1D) con las técnicas bidimensionales (2D).

Las principales técnicas bidimensionales aplicadas a la determinación estructural de compuestos orgánicos son:

-Técnicas bidimensionales homonucleares ($^1H, ^1H$):

a) COSY (Correlation spectroscopy), establece conectividades entre protones unidos escalaramente a través de 2 a 4 enlaces ($^{2-4}J_{H,H}$)

b) ROESY (Rotating-Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy), establece conectividades H-H a través del espacio. Da información sobre la proximidad en el espacio de los átomos dentro de una molécula, lo cual resulta de gran interés a la hora de analizar aspectos estereoquímicos.

-Técnicas bidimensionales heteronucleares ($^1H, ^{13}C$):

a) HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) y HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), ambas técnicas establecen correlaciones entre H^1 y C^{13} unidos a través de un enlace ($^1J_{H,C}$).

b) HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), permite correlaciones H^1-C^{13} a través de un enlace o más, normalmente entre uno y cuatro enlaces (^{1-4}J), siendo las más características los acoplamientos a tres enlaces (3J).

4.1. Determinación estructural de los compuestos 44 y 45.

El espectro de ^1H -RMN del compuesto **44** presenta tres zonas bien diferenciadas:

- a) 1.5-2.5 ppm: aparecen todos los metilos de los grupos acetilo, así como el CH_2 -18 del linker.
- b) 3.5-5.5 ppm: resuenan los protones de la lactosa y los protones de los metilenos CH_2 -17 y CH_2 -19 del linker.
- c) 7.0-8.0 ppm : aparecen los protones aromáticos de los anillos bencénicos y del 1,2,3-triazol.

Partiendo de las señales correspondientes al CH_2 -18 (δ_{H} 2.28 y δ_{C} 30.33), mediante el espectro COSY asignamos las señales de los otros dos grupos metilénicos del linker CH_2 -17 (δ_{H} 4.45-4.55, δ_{C} 46.86) y CH_2 -19 (δ_{Ha} 3.85, δ_{Hb} 3.55, δ_{C} 66.03). Las asignaciones de estos metilenos nos permitirán llevar a cabo las asignaciones del resto de señales.

El metileno CH_2 -19 presenta conectividades bidireccionales en el espectro HMBC con el protón anomérico H-1' (δ_{H} 4.49, δ_{C} 100.71). A partir del protón H-1', mediante combinación adecuada de los espectros COSY, HSQC y HMBC, se asignan todas las señales del resto glucosa del disacárido. Las señales correspondientes al fragmento de galactosa se han asignado utilizando el espectro HMBC, en el que se observa conectividad bidireccional entre el grupo CH-4' de la glucosa y el grupo anomérico CH-1'' de la galactosa (δ_{H} 4.51, δ_{C} 101.10), el resto de las señales de la galactosa se asignan de la misma forma que se procedió en el caso de la glucosa.

La conexión con las señales de la parte aromática del triazol se realizó partiendo de grupo metilénico CH_2 -17, el cual presenta conectividad bidireccional, en el espectro HMBC, con el grupo CH-16 del anillo de triazol ($\delta_{\text{H-16}}$ 7.86, $\delta_{\text{C-16}}$ 120.49); a su vez, el protón H-16 presenta conectividad, en el mismo espectro, con C-1 (δ_{C} 130.45). De esta forma se conecta con las señales de los anillos bencénicos. El C-12 presenta conectividad HMBC con H-3 (δ_{H} 7.60, δ_{C} 132.17), a su vez, el grupo CH-10 presenta conectividad de $J^3_{\text{C-H}}$ (HMBC) con C-7 (δ_{C} 90.15).

En el espectro COSY se observan acoplamiento escalar entre H-13 y H-2 (δ_{H} 7.85, δ_{C} 125.57) con una constante de acoplamiento $J_{10,11} = 8.2$ Hz, típica de un acoplamiento

orto en el anillo de benceno. Finalmente, utilizando el espectro HMBC, se observa conectividad entre H-2 y los átomos de carbono C-4 (δ_c 122.88) y C-15 (δ_c 147.11), correspondiente al δ_c típico del carbono cuaternario del anillo del 1,2,3-triazol. Todos los resultados de RMN del compuesto **44** aparecen en la Tabla 1. Todos los datos espectroscópicos están en consonancia con la estructura propuesta para el compuesto **44**.

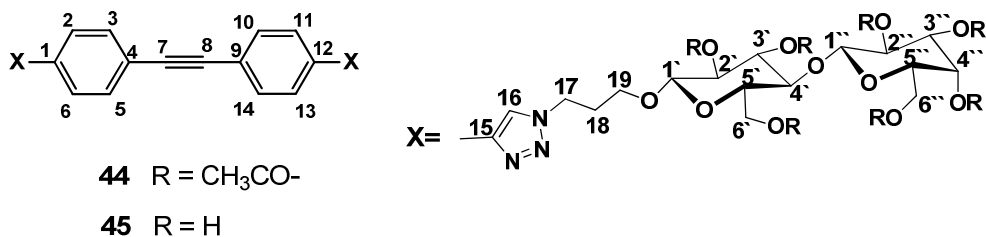


Tabla 1. Datos de RMN de los compuestos **44** (CDCl₃) y **45** (D₂O) en δ ppm.

44			45		
Nº	C-13	H-1	C-13	H-1	DEPT
1,12	130.45	-	129.40	-	2 C
2,6,11,13	125.57	7.85 (d,J= 8.2Hz)	125.01	7.18 (d,J= 8.2Hz)	4 CH
3,5,10,14	132.17	7.60 (d,J= 8.2Hz)	132.20	6.93 (d,J= 8.2Hz)	4 CH
4,9	122.88	-	122.06	-	2 C
7,8	90.15	-	90.28	-	2 C
15	147.11	-	146.16	-	2 C
16	120.49	7.60 (sbr)	121.02	7.45 (sbr)	2 CH
17	46.86	4.45-4.55 (m)	47.00	4.05-4.20 (m)	2 CH ₂
18	30.33	2.28 (m)	30.22	2.15-2.20 (m)	2 CH ₂
19	66.03	A→ 3.85 (m) B→ 3.55 (m)	66.20	A→ 3.61 (m,) B→ 3.27 (m)	2 CH ₂
1'	100.71	4.49 (d,J= 7.9Hz)	102.22	4.21	2 CH
2'	71.70	4.94(dd, J= 9.5 y 7.9Hz)	72.80	3.27	2 CH
3'	72.70	5.21(t,J= 9.5Hz)	74.39	3.55	2 CH
4'	76.16	3.80(t,J= 9.5Hz)	78.66	3.54	2 CH
5'	72.89	3.61(ddd, J= 9.5, 4.9 y 1.9Hz)	74.71	3.40	2 CH
6'	61.82	A→ 4.54 (m) B→ 4.08 (m)	60.24	3.70-3.80	2 CH ₂
1''	101.10	4.51 (d,J= 7.9Hz)	103.05	4.38	2 CH
2''	69.15	5.12(dd, J= 10.0 y 8.0 Hz)	70.97	3.52	2 CH
3''	71.00	4.98 (t,J= 10.0 y 3.9Hz)	72.62	3.61	2 CH
4''	66.63	5.36(dd,J= 4.6 y 3.9Hz)	68.56	3.88	2 CH
5''	70.75	3.88(ddd, J= 7.1 y 6.7Hz)	75.35	3.68	2 CH

6''	60.81	A→ 4.15 (m) B→ 4.08 (m)	61.04	3.70-3.80	2 CH ₂
CH ₃ CO-	20.53-20.83	1.95-2.15	-	-	14 CH ₃
-OCOCH ₃	-	169.07,169.70,170.08, 170.14, 170.31,170.36	-	-	14 C

La desprotección de los grupos acetato del compuesto **44**, con metóxido sódico y metanol, conduce al compuesto **45**. La asignación de las señales de RMN de este compuesto se ha realizado siguiendo la misma estrategia que con el derivado acetilado **44**, y los resultados se reflejan en la Tabla 1. Adicionalmente, se ha realizado el estudio de EM presentando un ion molecular $[M+Na]^+$ 1099.5 que está de acuerdo con el espectro de RMN-C¹³ para la fórmula molecular C₄₈H₆₄N₆O₂₂.

4.2. Determinación estructural de los compuestos **46** y **47**.

El compuesto **46** presenta el mismo glicoconjugado que el compuesto **44**, por lo que las asignaciones de RMN del resto de lactosa y los metilenos (CH₂-17, CH₂-18, CH₂-19) del linker, se ha llevado a cabo de la misma forma que en el caso anterior.

Nos centraremos, por tanto, en las asignaciones del fragmento etinilbenceno, correspondiente al *core*, que es distinto del compuesto **44**. Asignados, inequívocamente, las señales correspondientes al anillo del 1,2,3-triazol y utilizando el espectro HMBC, se asignan las señales correspondientes al anillo bencénico unido directamente al 1,2,3-triazol. Efectivamente, a partir del H-16 (δ_H 7.84, δ_C 120.54) se asigna el C-12 (δ_C 130.85) mientras que el C-15 (δ_C 147.05) presenta conectividad vía J^3_{C-H} con H-11 (δ_H 7.85) y el H-11, a su vez, presenta conectividad J^3_{C-H} con C-9 (δ_C 122.43). Igualmente, el H-11 se encuentra acoplado, en el espectro COSY, con H-10 (δ_H 7.60) con una $J=8.3$ Hz, típica de un acoplamiento *orto* en el anillo de benceno.

La asignación del resto etino se realiza mediante el espectro HMBC a través de la señal correspondiente al H-10, que presenta conectividad J^3 con C-8 (δ_C 90.45). La otra señal del grupo alquino, el C-7 (δ_C 88.66) presenta conectividad J^3 con la única señal correspondiente a un proton aromático que queda por asignar, el H-2 (δ_H 7.67, δ_C 134.11) que aparece como singlete. Por descarte, la señal que queda por asignar es la correspondiente al C-1 (δ_C 124.07). Todos los datos de RMN que aparecen reflejados en la Tabla 2, están en concordancia con la estructura propuesta para el compuesto **46**.

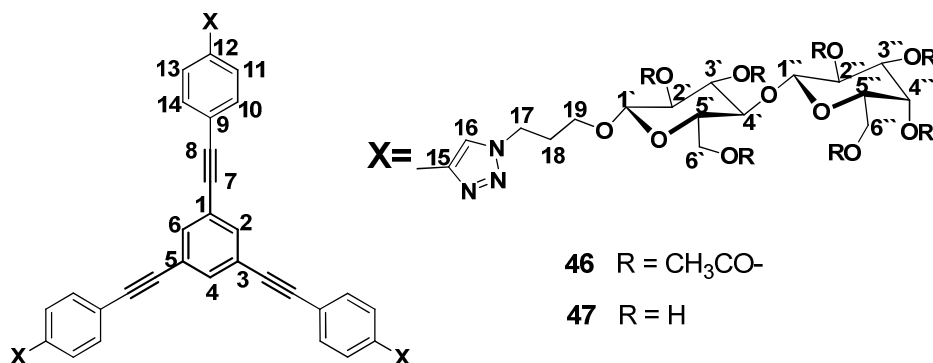


Tabla 2. Datos de RMN de los compuestos **46** (CDCl₃) y **47** (DMSO-d₆) en δppm.

46			47		
Nº	C-13	H-1	C-13	H-1	DEPT
1,3,5	124.07	-	124.24	-	3 C
2,4,6	134.11	7.67 (s)	134.25	7.81 (s)	3 CH
7	88.66	-	88.56	-	3 C
8	90.45	-	91.43	-	3 C
9	122.43	-	121.32	-	3 C
10,14	132.28	7.60(d, J=8.3Hz)	132.72	7.70(d, J=8.2 Hz)	6 CH
11,13	125.61	7.85 (d, J=8.3Hz)	125.83	7.95 (d, J=8.2Hz)	6 CH
12	130.85	-	131.99	-	3 C
15	147.05	-	145.92	-	3 C
16	120.54	7.84 (s)	122.87	8.69 (s)	3 CH
17	46.87	A→ 4.52 (m) B→ 4.46 (m)	47.20	4.55(t, J=6.7 m)	3 CH ₂
18	30.34	2.23 (m)	30.38	2.15 (m)	3 CH ₂
19	66.05	A→ 3.84 (m) B→ 3.55 (m)	65.91	A→ 3.83 (m) B→ 3.50	3 CH ₂
1'	100.10	4.47 (d, J= 7.9Hz)	103.02	4.25 (d, J=7.9 Hz)	3 CH
2'	71.69	4.93(dd, J= 9.6 y 7.9Hz)	73.66	3.08(dd, J=9.5 y 7.9Hz)	3 CH
3'	72.67	5.21(dd, J= 9.6Hz)	75.37	3.36	3 CH
4'	76.19	3.80(t, J= 9.6Hz)	81.17	3.32	3 CH
5'	72.88	3.60(ddd, J= 9.5, 4.9 y 1.9Hz)	75.37	3.32	3 CH
6'	61.82	A→ 4.52 (m) B→ 4.08 (m)	60.95	A→ 3.77 (dbr, J=11.5Hz) B→ 3.63	3 CH ₂
1''	100.72	4.48 (d, J= 7.9Hz)	104.34	4.22 (d, J=7.0Hz)	3 CH
2''	69.14	5.11(dd, J= 10.4 y 7.9 Hz)	71.01	3.33	3 CH
3''	70.99	4.97 (dd, J= 10.4 y 3.5Hz)	73.71	3.34	3 CH
4''	66.62	5.35(dbr, J= 3.5 Hz)	68.62	3.63	3 CH
5''	70.74	3.86(tbr, J= 7.0 Hz)	76.00	3.48	3 CH

6''	60.81	A → 4.13 (m) B → 4.08 (m)	60.88	3.50-3.55	3 CH ₂
CH ₃ CO-	20.53- 20.83	1.96-2.15	-	-	21 CH ₃
-OCOCH ₃	-	169.08,169.71,169.82, 170.09, 170.31,170.36	-	-	21 C

La desacetilación con metóxido sódico y metanol del compuesto **46** conduce al glicodendrímico **47**, cuya determinación estructural se ha realizado de forma similar, mediante RMN, y cuyos datos se reflejan en la Tabla 2. Adicionalmente, se ha realizado el estudio de EM presentando un ion molecular $[M+Na]^+$ 1748.8 que está de acuerdo con el espectro de RMN-C¹³ para la fórmula molecular C₈₁H₉₉N₉O₃₃.

4.3. Determinación estructural de los compuestos **48** y **49**.

Las señales de RMN del gliconjugado, se han asignado de idéntica forma a los compuestos anteriores. Igualmente, siguiendo la misma estrategia que en el caso anterior, asignamos las señales del anillo del 1,2,3-triazol C-23 (δ_c 146.25) y CH-24 (δ_H 8.05, δ_c 121.38). Mediante el espectro de HMBC se conecta con las señales del anillo bencénico (C₁-C₆) unido directamente al triazol. Igualmente, a partir de la señal del protón H-2 (δ_H 8.05, δ_c 128.44), se asigna el átomo del carbono etilínico C-7 (δ_c 90.67) y, a partir del otro carbono etílico C-8 (δ_c 89.90), se asignan las señales del anillo bencénico central (C₉-C₁₄), presentando conectividad bidireccional (HMBC) entre el C-8 y el H-10 (δ_H 7.56, δ_c 131.73) de dicho anillo. Todos los datos de RMN que aparecen reflejados en la Tabla 3, están en concordancia con la estructura propuesta para el compuesto **48**.

La desprotección de los grupos acetato del compuesto **48**, con metóxido sódico y metanol, conduce al compuesto **49**. La asignación de las señales de RMN se ha realizado siguiendo la misma estrategia que en los casos anteriores, y cuyos resultados aparecen los resultados en la Tabla 3. Adicionalmente, se ha realizado el estudio de EM presentando un ion molecular $[M+Na]^+$ 2097.8 que está de acuerdo con el espectro de RMN-C¹³ para la fórmula molecular C₉₀H₁₂₂N₁₂O₄₄.

Los datos espectroscópicos de los compuestos **48** y **49**, aparecen en la Tabla 3.

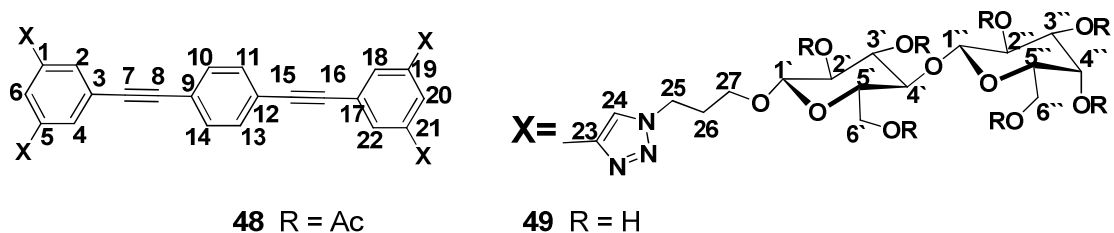


Tabla 3. Datos de RMN de los compuestos **48** (CDCl₃) y **49** (DMSO-d₆) en δppm

48			49		
Nº	C-13	H-1	C-13	H-1	DEPT
1,5,19,21	131.15	-	132.32	-	4 CH
2,4,18,22	128.44	8.07 (sbr)	127.25	8.02 (sbr)	4 CH
3,17	124.50	-	123.00	-	2 C
6,20	123.09	8.43 (sbr)	122.20	8.45 (sbr)	2 CH
7,16	90.67	-	91.20	-	2 C
8,15	89.90	-	89.70	-	2 C
9,12	123.00	-	123.50	-	2 C
10,11,13,14	131.73	7.56(sbr)	132.18	7.72(sbr)	4 CH
23	146.25	-	145.32	-	4 C
24	47.15	4.50-4.60 (m)	122.64	8.79 (sbr)	4 CH
25	47.15	4.50-4.60 (m)	47.02	4.58(t, J=6.0 Hz)	4 CH ₂
26	30.24	2.28 (m)	30.04	2.18 (m)	4 CH ₂
27	65.77	A→ 3.86 (m) B→ 3.58 (m)	65.65	A→ 3.86 (m) B→ 3.50 (m)	4 CH ₂
1'	100.63	4.52 (d, J= 7.9Hz)	102.70	4.26 (d, J=7.8 Hz)	4 CH
2'	71.72	4.95(dd, J= 9.5 y 7.9Hz)	73.40	3.09(dd, J=9.5 y 7.8Hz)	4 CH
3'	72.68	5.22(t, J= 9.5Hz)	75.03	3.35	4 CH
4'	76.35	3.83(t, J= 9.5Hz)	80.90	3.32	4 CH
5'	72.93	3.62(m)	75.09	3.32	4 CH
6'	61.93	A→ 4.54 (m) B→ 4.14 (m)	60.67	A→ 3.77 B→ 3.63	4 CH ₂
1''	101.07	4.56 (d, J= 8.0Hz)	104.34	4.22 (d, J=7.0Hz)	4 CH
2''	69.12	5.11(dd, J= 10.0 y 8.0 Hz)	73.43	3.32	4 CH
3''	71.04	4.98 (dd, J= 10.0 y 3.2Hz)	70.74	3.33	4 CH
4''	66.71	5.36(sbr)	68.30	3.63	4 CH
5''	70.71	3.93(tbr, J= 6.7 Hz)	75.71	3.47	4 CH
6''	60.85	A→ 4.15 (m) B→ 4.08 (m)	60.56	3.50-3.60	4 CH ₂
CH₃CO-	20.53-20.93	1.95-2.15	-	-	28 CH ₃
-OCOCH₃	-	169.10,169.74,170.09,170.19, 170.30,170.37	-	-	28 C

4.4. Determinación estructural de los compuestos **50** y **51**.

El compuesto **50** presenta el mismo glicoconjugado que el compuesto **44**, por lo que las asignaciones de RMN del resto de lactosa y los metilenos (CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14) del linker, se ha llevado a cabo de la misma forma que en el caso anterior. Nos centraremos, por tanto, en las asignaciones de anillo bencénico.

En el espectro HMBC, se observan conectividades bidireccionales entre el H-12 ($\delta_{\text{H}}4.48$, $\delta_{\text{C}}47.15$) y el protón del anillo de triazol, H-11 ($\delta_{\text{H}}7.70$, $\delta_{\text{C}}123.66$) y, a su vez, el CH-11 presenta conectividad $J^3_{\text{C-H}}$ con CH₂-9 ($\delta_{\text{H}}5.24$, $\delta_{\text{C}}62.07$). Igualmente, el espectro HMBC nos servirá para asignar las señales del anillo bencénico. Efectivamente, el metileno CH₂-9 se encuentra acoplado vía $J^3_{\text{C-H}}$ con C-3 ($\delta_{\text{C}}159.27$), por descarte, el otro carbono cuaternario del anillo bencénico debe corresponder al átomo C-1 ($\delta_{\text{C}}132.31$). Las asignaciones de los CH bencénicos: CH-2 ($\delta_{\text{H}}7.31$ 2H, $\delta_{\text{C}}108.84$) y CH-4 ($\delta_{\text{H}}6.87$ 1H, $\delta_{\text{C}}107.05$), se realiza fácilmente teniendo en cuenta la integral del espectro de RMN-H¹ y, al hecho, de que el H-2 presenta conectividad HMBC con el C-7 ($\delta_{\text{C}}166.55$).

Todos los datos de RMN aparecen reflejados en la Tabla 4, y están en concordancia con la estructura propuesta para el compuesto **50**.

La desacetilación, con metóxido sódico y metanol, del compuesto **50** conduce al glicodendrímico **51**, cuya determinación estructural se ha realizado de forma similar, mediante RMN, y cuyos datos se reflejan en la Tabla 4. Adicionalmente, se ha realizado el estudio de EM presentando un ion molecular $[\text{M}+\text{Na}]^+1117.5$ que está de acuerdo con el espectro de RMN-C¹³ para la fórmula molecular C₄₄H₆₆N₆O₂₆.

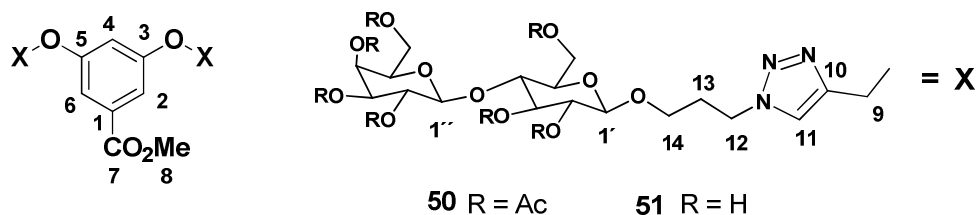


Tabla 4. Datos de RMN de los compuestos **50** (CDCl₃) y **51** (D₂O) en δ ppm.

50			51		
Nº	C-13	H-1	C-13	H-1	DEPT
1	132.31	-	131.61	-	C
2,6	108.84	7.31 (s br)	109.23	7.09 (s br)	2 CH
3,5	159.27	-	158.58	-	2 C

4	107.05	6.87 (s br)	107.84	6.74 (s br)	CH
7	166.55	-	167.95	-	C
8	52.40	3.91 (s)	52.86	3.80 (s)	CH ₃
9	62.07	5.24 (s br)	61.53	5.11 (s br)	2 CH ₂
10	143.21	-	142.88	-	2 C
11	123.66	7.70 (t, J= 4.9 Hz)	125.39	8.00 (s br)	2 CH
12	47.15	4.48 (m)	47.13	4.47 (t, J= 6.5 Hz)	2 CH ₂
13	30.16	2.23 (m)	29.47	2.09 (m)	2 CH ₂
14	65.88	A → 3.82 (m) B → 3.51 (m)	66.25	A → 3.75 (m) B → 3.42 (m)	2 CH ₂
1'	100.56	4.47 (d, J= 7.9 Hz)	102.10	4.22 (d, J= 7.9 Hz)	2 CH
2'	71.64	4.91 (dd, J= 9.5 y 7.9 Hz)	72.75	3.22 (dd, J= 9.5 y 7.9 Hz)	2 CH
3'	72.72	5.19 (t, J= 9.5 Hz)	74.33	3.52 (m)	2 CH
4'	76.16	3.81 (t, J= 9.5 Hz)	78.45	3.50 – 3.60	2 CH
5'	72.89	3.60 (m)	74.72	3.41 (m)	2 CH
6'	61.76	4.05 – 4.15	60.05	A → 3.84 (m) B → 3.72 (m)	2 CH ₂
1''	101.08	4.51 (d, J= 7.9 Hz)	102.98	4.36 (d, J= 7.9 Hz)	2 CH
2''	69.15	5.11 (dd, J= 10.4 y 7.9 Hz)	70.82	3.45 – 3.55	2 CH
3''	71.00	4.97 (t, J= 10.4 y 3.4 Hz)	72.55	3.58 (m)	2 CH
4''	66.65	5.34 (dd, J= 4.6 y 3.4 Hz)	68.53	3.85 (m)	2 CH
5''	70.72	3.89 (m)	75.34	3.64 (m)	2 CH
6''	60.80	4.05 – 4.15	60.99	3.65-3.75	2 CH ₂
CH₂CO-	20.53- 20.87	1.96 - 2.15	-	-	14 CH ₃
-OCOCH₃	169.09- 170.36		-	-	14 C

4.5. Determinación estructural de los compuestos **52** y **53**.

La asignación estructural del resto del glicoconjugado (lactosa y linker), así como del anillo de 1,2,3-triazol, se asignan de la misma forma que el compuesto **44**. Para la asignación de las señales del anillo bencénico, se utiliza el espectro HMBC, observándose conectividad entre CH₂-7 (δ_{H} 5.02, δ_{C} 61.29) y el átomo de carbono cuaternario del anillo bencénico C-1 (δ_{C} 159.40). La única señal que queda por asignar, debe corresponder, al protón CH-2 (δ_{H} 6.20, δ_{C} 96.09).

Todos los datos de RMN del compuesto **52** se reflejan en la Tabla 5 y están en consonancia con la estructura propuesta.

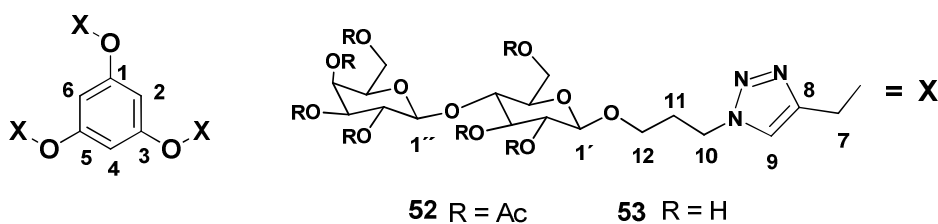


Tabla 5. Datos de RMN de los compuestos **52** (CDCl₃) y **53** (D₂O) en δppm.

52			53		
Nº	C-13	H-1	C-13	H-1	DEPT
1,3,5	160.13	-	159.40	-	3 C
2,4,6	95.27	6.30 (s br)	96.09	6.20 (s br)	3 CH
7	61.90	5.15 (s br)	61.29	5.02 (s br)	3 CH ₂
8	143.15	-	143.00	-	3 C
9	117.95	7.68 (s)	125.33	7.96 (s br)	3 CH
10	47.20	4.45 (m)	47.14	4.44 (m)	3 CH ₂
11	29.72	2.20 (m)	29.47	2.08 (m)	3 CH ₂
12	65.94	A→ 3.88 (m) B→ 3.57 (m)	66.28	A→ 3.74 (m) B→ 3.42 (m)	3 CH ₂
1'	100.58	4.47 (d, J= 7.9 Hz)	102.09	4.23 (d, J= 7.9 Hz)	3 CH
2'	71.64	4.91 (dd, J= 9.5 y 7.9 Hz)	72.77	3.20 (dd, J= 9.5 y 7.9 Hz)	3 CH
3'	72.73	5.20 (t, J= 9.5 Hz)	74.33	3.51 (m)	3 CH
4'	76.18	3.80 (t, J= 9.5 Hz)	78.49	3.53	3 CH
5'	72.86	3.61 (m)	74.71	3.40 (m)	3 CH
6'	61.81	4.05 – 4.20	60.06	A→ 3.85 (m) B→ 3.70 (m)	3 CH ₂
1''	101.24	4.51 (d, J= 7.9 Hz)	103.00	4.34 (d, J= 7.9 Hz)	3 CH
2''	69.16	5.10 (dd, J= 10.4 y 7.9 Hz)	70.93	3.45 – 3.50	3 CH
3''	71.00	4.96 (t, J= 10.4 y 3.4 Hz)	72.56	3.58 (m)	3 CH
4''	66.66	5.35 (dd, J= 4.6 y 3.4 Hz)	68.53	3.84 (m)	3 CH
5''	70.72	3.89 (m)	75.35	3.64 (m)	3 CH
6''	60.81	4.05 – 4.20	61.00	3.65-3.75	3 CH ₂
CH₂CO-	20.52- 20.88	1.96 - 2.15	-	-	21 CH ₃
-OCOCH₃	169.09- 170.36		-	-	21 C

La desacetilación, con metóxido sódico y metanol, del compuesto **52** conduce al glicodendrímico **53**, cuya determinación estructural se ha realizado de forma similar, mediante RMN, y cuyos datos se reflejan en la Tabla 5. Adicionalmente, se ha realizado el estudio de EM presentando un ion molecular $[M+Na]^+$ 1538.6 que está de acuerdo con el espectro de RMN-C¹³ para la fórmula molecular C₆₀H₉₃N₉O₃₆.

4.6. Determinación estructural de los compuestos **54** y **55**.

Como en casos anteriores, se asignan las señales del glicoconjugado con el anillo de 1,2,3-triazol, que son comunes a todos estos compuestos.

Las asignaciones del fragmento benzoato de metilo se realizan, utilizando el espectro HMBC y observando conexión entre el metoxilo CH₃O- (δ_{H} 3.85, δ_{C} 52.83) y el carbono del grupo acilo C-7 (δ_{C} 166.31). A su vez, el carbono-acilo, presenta conectividad con los protones H-2 y H-6, que resuenan a 7.18 ppm, como un doblete con una $J = 1.9$ Hz, propia de un acoplamiento *meta*, con el H-4 (δ_{H} 6.99, δ_{C} 107.43). El resto de las señales del anillo aromático del benzoato de metilo, se realizó a través del espectro HMBC, observándose además, en este caso, conectividades vía $J^2_{\text{C,H}}$ entre el H-4 y los átomos de carbono C-3, C-5 (δ_{C} 159.93), y entre el H-2 y el C-1 (δ_{C} 132.09). A través de los C-3 y C-5, se conecta con los metilenos CH₂-9 y CH₂-16 (δ_{H} 5.10, δ_{C} 69.84), observándose $J^3_{\text{C,H}}$ entre el C-3 y los H-9 y H-16. Finalmente, las asignaciones de las señales del resto de los anillos bencénicos se abordan mediante el espectro HMBC, por dos itinerarios. a) a partir del CH₂-9 se conecta con CH-11 y CH-15 (δ_{H} 6.74, δ_{C} 106.97), que están acoplados, en el espectro COSY, con H-13, con una J_{meta} , y b) a partir del CH₂-23 se conecta con C-12 C-14 (δ_{C} 159.78). El átomo de carbono cuaternario que queda por asignar, debe corresponder al C-10 y C-17 (δ_{C} 139.56).

Todos los datos de RMN del compuesto **54** se reflejan en la Tabla 6 y están en consonancia con la estructura propuesta.

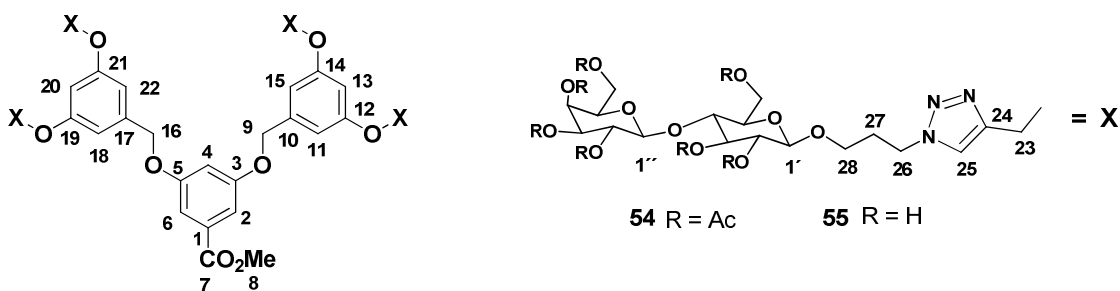


Tabla 6. Datos de RMN de los compuestos **54** (CDCl₃) y **55** (D₂O) en δ ppm.

54			55		
Nº	C-13	H-1	C-13	H-1	DEPT
1	132.13	-	132.09	-	C

2,6	108.47	7.29 (d, J = 2.3 Hz)	108.34	7.18 (s br)	2 CH
3,5	159.67	-	159.93	-	2 C
4	107.13	6.82 (s br)	107.43	6.99 (s br)	CH
7	166.69	-	166.31	-	C
8	52.34	3.94 (s)	52.83	3.85 (s)	CH ₃
9,16	70.00	5.06 (s br)	69.84	5.10 (s br)	2 CH ₂
10,17	139.15	-	139.56	-	2 C
11,15,18,22	106.57	6.73 (s br)	106.97	6.74 (s br)	4 CH
12,14,19,21	159.70	-	159.78	-	4 CH
13,20	101.54	6.65(s br)	101.34	6.72 (s br)	2 CH
23	62.09	5.21 (s br)	61.70	5.14 (s br)	4 CH ₂
24	143.76	-	142.89	-	4 C
25	123.28	7.68 (s br)	125.26	8.25 (s br)	4 CH
26	46.88	4.44 (m)	47.02	4.49 (t, j= 6.8 Hz))	4 CH ₂
27	30.25	2.22 (m)	30.50	2.10 (m)	4 CH ₂
28	65.99	A→ 3.87 (m) B→ 3.54 (m)	65.93	A→ 3.78 (m) B→ 3.47 (m)	4 CH ₂
1'	100.57	4.51 (d, J= 7.9 Hz)	102.99	4.22 (d, J= 7.9 Hz)	4 CH
2'	71.63	4.94 (dd, J= 9.5 y 7.9 Hz)	73.63	3.06 (dd, J= 9.5 y 7.9 Hz)	4 CH
3'	72.73	5.22 (t, J= 9.5 Hz)	75.32	3.30 – 3.40	4 CH
4'	76.17	3.83 (t, J= 9.5 Hz)	81.15	3.30 – 3.40	4 CH
5'	72.81	3.63 (ddd, J = 9.5, 4.9 y 2.0 Hz)	75.29	3.30 – 3.40	4 CH
6'	61.82	4.10 – 4.20	60.64	3.60 – 3.70	4 CH ₂
1''	101.07	4.54 (d, J= 7.9 Hz)	104.32	4.20 (d, J= 7.9 Hz)	4 CH
2''	69.14	5.13 (dd, J= 10.4 y 7.9 Hz)	71.01	3.30 – 3.40	4 CH
3''	70.99	4.99 (t, J= 10.4 y 3.4 Hz)	73.70	3.30 – 3.40	4 CH
4''	66.65	5.38 (dd,J= 4.5 y 3.4Hz)	68.61	3.62 8s br)	4 CH
5''	70.70	3.92 (t br, J=7.0 Hz)	75.99	3.46 (m)	4 CH
6''	60.81	4.10 – 4.20	60.97	3.45-3.55	4 CH ₂
CH₃CO-	20.53- 20.87	1.99 - 2.18	-	-	28 CH ₃
-O$\overset{\text{O}}$COCH₃	169.10- 170.37		-	-	28 C

La desacetilación, con metóxido sódico y metanol, del compuesto **54** conduce al glicodendrón **55**, cuya determinación estructural se ha realizado de forma similar, mediante RMN, y cuyos datos se reflejan en la Tabla 6. Adicionalmente, se ha realizado el estudio de EM presentando un ion molecular $[M+Na]^+$ 2287.8 que está de acuerdo con el espectro de RMN-C¹³ para la fórmula molecular C₉₄H₁₃₆N₁₂O₅₂.

4.7. Determinación estructural del compuesto **57**.

El compuesto **57**, estructuralmente hablando, tiene tres partes diferenciadas: a) el azúcar (lactosa) y el linker C₁₄-C₁₅, b) el anillo de naftaleno y c) el *core* C₁₀-C₁₃.

La asignación de las señales de RMN de la lactosa y el linker se ha realizado de la misma forma que en los compuestos anteriores, que presentan el mismo azúcar.

Las asignaciones de las señales del anillo de naftaleno se han realizado, principalmente, mediante el espectro bidimensional HMBC, encontrándose conectividades $J^3_{C,H}$ entre el H-14 (δ 3.32) y el C-5 (δ 143.26). El C-5, a su vez, presenta conectividad HMBC con un protón que resuena como triplete y que tiene que ser el H-7 (δ 7.30), el cual también presenta una conectividad $J^3_{C,H}$ con C-8a (δ 129.40). En el espectro COSY, el H-7 se encuentra acoplado con los protones H-6 (δ 6.52) y H-8 (δ 7.21), que se asignan atendiendo a la diferencia de desplazamiento químico. El protón H-6 presenta conectividad HMBC con C-4a (δ 131.92) y el protón H-8 presenta conectividad $J^3_{C,H}$ con C-1 (δ 136.72). Ambos átomos de carbono, C-4a y C-1, presentan conectividad HMBC con H-3 (δ 7.38), que resuena como un triplete debido a su acoplamiento con los protones H-2 (δ 7.88) y H-4 (δ 7.32), cuyas asignaciones, además de la diferencia del desplazamiento químico, se han confirmado por HMBC. Todas las asignaciones de los átomos de carbono restantes se han hecho mediante el espectro HSQC.

Las asignaciones de las señales de RMN correspondientes al *core*, también se han realizado mediante el espectro de HMBC a partir del desplazamiento químico del C-9 (δ 173.80). El átomo de carbono del grupo amida presenta dos conectividades HMBC con los metilenos CH₂-10 (δ_H 2.64, δ_C 36.50) y CH₂-11 (δ_H 3.76, δ_C 66.56), que están acoplados entre sí con una constante de acoplamiento $J = 6.4$ Hz; las asignaciones se han realizado atendiendo a los desplazamientos químicos de protón y carbono. Únicamente, quedan por asignar las señales correspondientes a dos metilenos: CH₂-12 (δ_H 3.51, δ_C 70.75) y CH₂-13 (δ_H 1.65, δ_C 25.90) que, igualmente, se han asignado atendiendo a los desplazamientos químicos de protón y carbono.

Todos los datos espectroscópicos reflejados en la Tabla 7, están en consonancia con la estructura propuesta para el compuesto **57**. Adicionalmente, se ha realizado el estudio de espectrometría de masas presentando un ion molecular $[M+Na]^+$ 1273.5 que está de acuerdo con el espectro de RMN-C¹³ para la fórmula molecular C₅₈H₈₂N₄O₂₆.

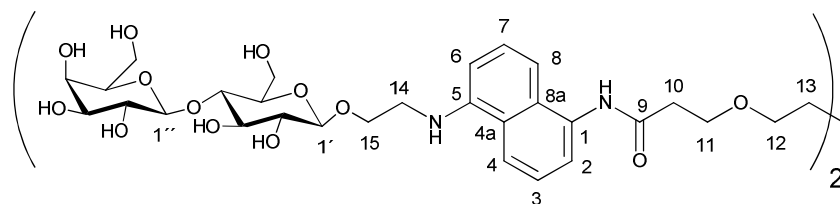


Tabla 7. Datos de RMN del compuesto **57** (D₂O) en δ ppm.

57			
Nº	DEPT	C-13	H-1
1	2 C	136.72	-
2	2 CH	120.16	7.88 (d, J= 7.7 Hz, 2H)
3	2 CH	124.49	7.38 (t, J= 7.7 Hz, 2H)
4	2 CH	123.98	7.32 (d, J= 7.7 Hz, 2H)
4a	2 C	131.92	-
5	2 C	143.26	-
6	2 CH	106.56	6.52 (d, J= 7.7 Hz, 2H)
7	2 CH	127.12	7.30 (t, J= 7.7 Hz, 2H)
8	2 CH	112.33	7.21 (d, J= 7.7 Hz, 2H)
8a	2 C	129.40	-
9	2 C	173.80	-
10	2 CH ₂	36.50	2.64 (t, J= 6.4 Hz, 4H)
11	2 CH ₂	66.56	3.76 (t, J= 6.4 Hz, 4H)
12	2 CH ₂	70.75	3.51(t, J= 6.4 Hz, 4H)
13	2 CH ₂	25.90	1.65 (m, 4H))
14	2 CH ₂	43.07	3.32 (m)
15	2 CH ₂	65.71	A → 3.63 (m) B → 3.89 (m)
1'	2 CH	102.33	4.19 (d, J= 7.9 Hz, 2H)
2'	2 CH	72.59	3.30 (dd, J= 9.5 y 7.9 Hz)
3'	2 CH	74.34	3.54 (m)
4'	2 CH	78.35	3.60 (m)
5'	2 CH	74.73	3.43 (m)
6'	2 CH ₂	61.01	A → 3.71 (m) B → 3.80 (m)
1''	2 CH	102.93	4.33 (d, J= 7.9 Hz, 2H)
2''	2 CH	70.92	3.50 (m)
3''	2 CH	72.82	3.60 (m)
4''	2 CH	68.52	3.81 (dd, J= 4.6 y 3.4Hz, 2H)
5''	2 CH	75.27	3.72 (m)
6''	2 CH ₂	60.07	3.65 – 3.75

4.8. Determinación estructural del compuesto 59.

Las señales correspondientes al resto de lactosa y los átomos correspondientes al linker CH₂-15 y CH₂-16, se han asignado de la misma forma que los compuestos anteriores.

Las asignaciones del anillo de naftaleno se realizan mediante el espectro HMBC, encontrándose conectividad $J^3_{C,H}$ entre el H-15 y el C-5 (δ 143.30); a su vez, el C-5 presenta conectividad HMBC con el protón H-7 (δ 7.29) que resuena como un triplete con una $J= 7.7$ Hz, debido a su acoplamiento con los protones H-8 (δ 7.20) y H-6 (δ 6.61). A su vez, el H-6 presenta conectividad HMBC con el carbono cuaternario que resuena a δ 131.96 y que debe corresponder a C-4a; el H-7 presenta conectividad $J^3_{C,H}$ con C-8a (δ 129.50) y, finalmente, el H-8 presenta conectividad HMBC con el átomo de carbono cuaternario que queda por asignar del anillo de naftaleno, el C-1 (δ 136.81). La señal que presenta una multiplicidad triplete en la zona aromática del espectro de RMN- H^1 , debe corresponder al H-3 (δ 7.40), hecho que queda confirmado mediante su conectividad HMBC con C-4a. El protón H-3 está acoplado, en el espectro COSY, con los protones: H-2 (δ 7.90) que presenta conectividad HMBC con C-8a, y con el protón H-4 (δ 7.32) que presenta conectividad $J^3_{C,H}$ con C-5. Mediante el espectro HSQC se asignan el resto de las señales de los átomos de carbono del anillo de naftaleno.

La señal a δ 173.62 en el espectro de RMN-C13 corresponde, inequívocamente, al átomo de carbono del grupo amida y presenta conectividades HMBC con los metilenos CH₂-10 (δ_H 2.63, δ_C 36.58) y CH₂-11 (δ_H 3.81, δ_C 67.10), acoplados entre sí con una $J= 6.4$ Hz), las asignaciones se han realizado atendiendo a los desplazamientos químicos de protón y carbono. Únicamente, quedan por asignar tres señales: un átomo de carbono cuaternario que resuena a δ 41.02 y que debe corresponder al C-13; un singlete correspondiente a un metileno (δ_H 3.59, δ_C 74.02), que debe corresponder al CH₂-12 y, finalmente, un singlete correspondiente a un metilo (δ_H 1.20, δ_C 16.83), que corresponde al CH₃-14.

Todos los datos espectroscópicos reflejados en la Tabla 8 están de acuerdo con la estructura propuesta para el compuesto **59**. Adicionalmente, se ha realizado el estudio de espectrometría de masas presentando un ion molecular molecular $[M+Na]^+$ 1883.7 que está de acuerdo con el espectro de RMN-C¹³ para la fórmula molecular C₈₆H₁₂₀N₆O₃₉.

4.9. Determinación estructural del compuesto 61.

Estructuralmente hablando el compuesto **61** es muy similar al compuesto **59**, presentando pequeñas variaciones en el *core*. Desaparece el metilo CH₃-14, y presentan ligeras diferencias el C-13 (δ 40.91) y el metileno singlete CH₂-12 (δ_H 3.56, δ_C 73.93). Las asignaciones de todas las señales de RMN se han realizado de forma similar al compuesto **59** y quedan reflejadas en la Tabla 9.

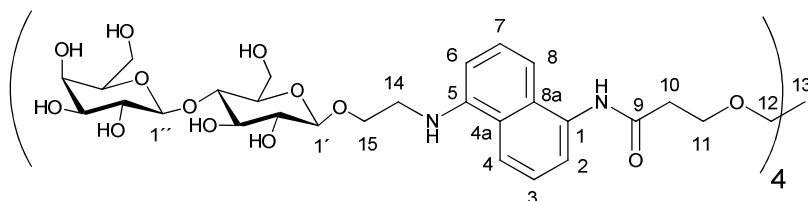


Tabla 9. Datos de RMN del compuesto **61** (D₂O) en δ ppm.

61			
Nº	DEPT	C-13	H-1
1	4 C	136.41	-
2	4 CH	119.84	7.85 (d, J= 7.7 Hz, 4H)
3	4 CH	124.37	7.40 (t, J= 7.7 Hz, 4H)
4	4 CH	123.86	7.30 (d, J= 7.7 Hz, 4H)
4a	4 C	131.77	-
5	4 C	143.18	-
6	4 CH	106.03	6.40(d, J= 7.7 Hz, 4H)
7	4 CH	126.72	7.30 (t, J= 7.7 Hz, 4H)
8	4 CH	111.92	7.15 (d, J= 7.7 Hz, 4H)
8a	4 C	129.62	-
9	4 C	173.42	-
10	4 CH ₂	36.42	2.56 (t, J= 6.4 Hz, 8H)
11	4 CH ₂	67.21	3.76 (t, J= 6.4 Hz, 8H)
12	4 CH ₂	73.93	3.56 (s,8H)
13	C	40.91	-
14	4 CH ₂	43.55	3.38 (m)
15	4 CH ₂	67.84	A → 3.80 (m) B → 3.93 (m)
1'	4 CH	102.31	4.19 (d, J= 7.9 Hz, 4H)
2'	4 CH	72.58	3.31 (dd, J= 9.5 y 7.9 Hz, 4H)
3'	4 CH	74.32	3.54 (m)
4'	4 CH	78.26	3.60 (m)
5'	4 CH	74.79	3.40 (m)
6'	4 CH ₂	61.01	A → 3.74 (m) B → 3.87 (m)
1''	4 CH	102.90	4.31 (d, J= 7.9 Hz)
2''	4 CH	70.93	3.51 (dd, J= 10.4 y 7.9 Hz, 4H)
3''	4 CH	72.79	3.59 (m)

4''	4 CH	68.54	3.81 (m)
5''	4 CH	75.26	3.73 (m)
6''	4 CH ₂	60.05	3.65 – 3.75

III.2- Resonancia de Plasmón Superficial (SPR).

III.2.1- Estudio de la interacción de los glicodendrimeros con viscumina.

Hemos estudiado la interacción de los compuestos **45**, **47**, **49**, **51**, **53**, **55**, **57**, **59**, y **61** con la viscumina inmovilizada sobre la superficie del biosensor. En este estudio se inmovilizó la viscumina sobre un chip mediante unión covalente de los restos nucleófilos de la lectina con los grupos ácido de la superficie activados mediante la mezcla de EDC/NHS. Tras el bloqueo de los restos ácidos activados que no han reaccionado con etanolamina, quedaron unidas unas 6000 RU de viscumina. Como blanco se utilizó un canal de flujo, sobre el que se realizó el proceso de activación mediante EDC/NHS y posterior bloqueo con etanolamina.

Todos los estudios se hicieron a 25° C, con un flujo de 30 µl/minuto, los diferentes compuestos fueron diluïdos en HBSP.

Para el compuesto **45** obtenemos el sensograma de la Figura 33, que tras su análisis nos da los siguientes parámetros cinéticos de la interacción, k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) 3.46×10^3 ; k_{off} (s^{-1}) 3.61×10^{-3} ; K_A (M^{-1}) 9.58×10^5 ; K_D (M) 1.04×10^{-6}

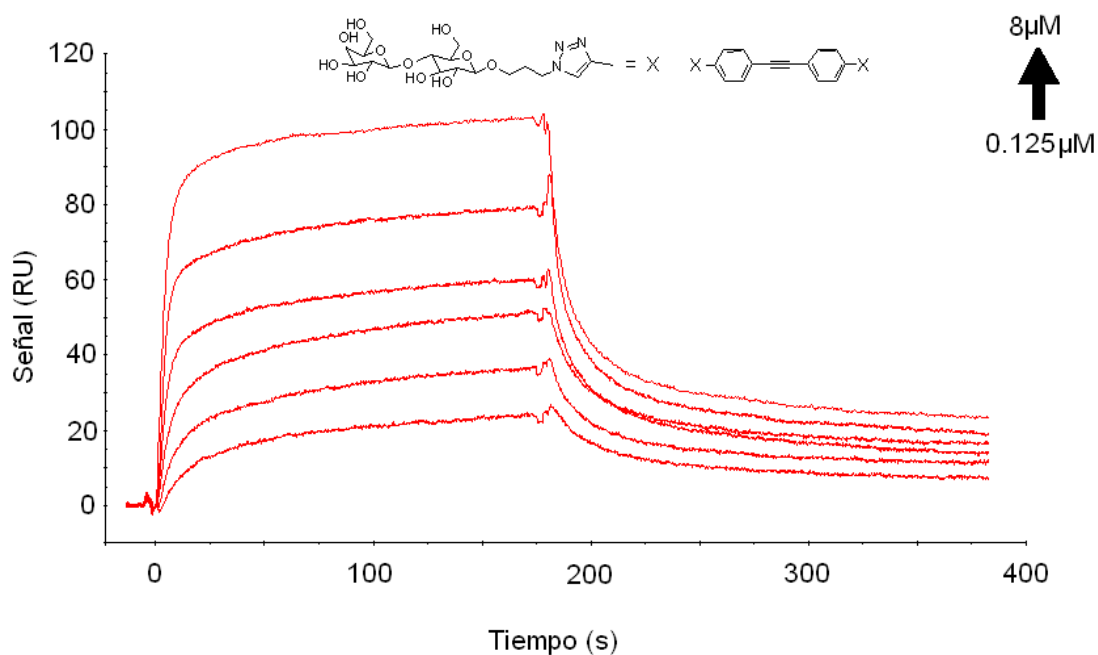


Figura 33. Interacción de **45** con viscumina.

Para el compuesto **47** obtenemos el sensograma de la Figura 34, que tras su análisis nos da los siguientes parámetros cinéticos de la interacción, k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) 4.29×10^3 ; k_{off} (s^{-1}) 5.09×10^{-3} ; K_A (M^{-1}) 8.42×10^5 ; K_D (M) 1.19×10^{-6}

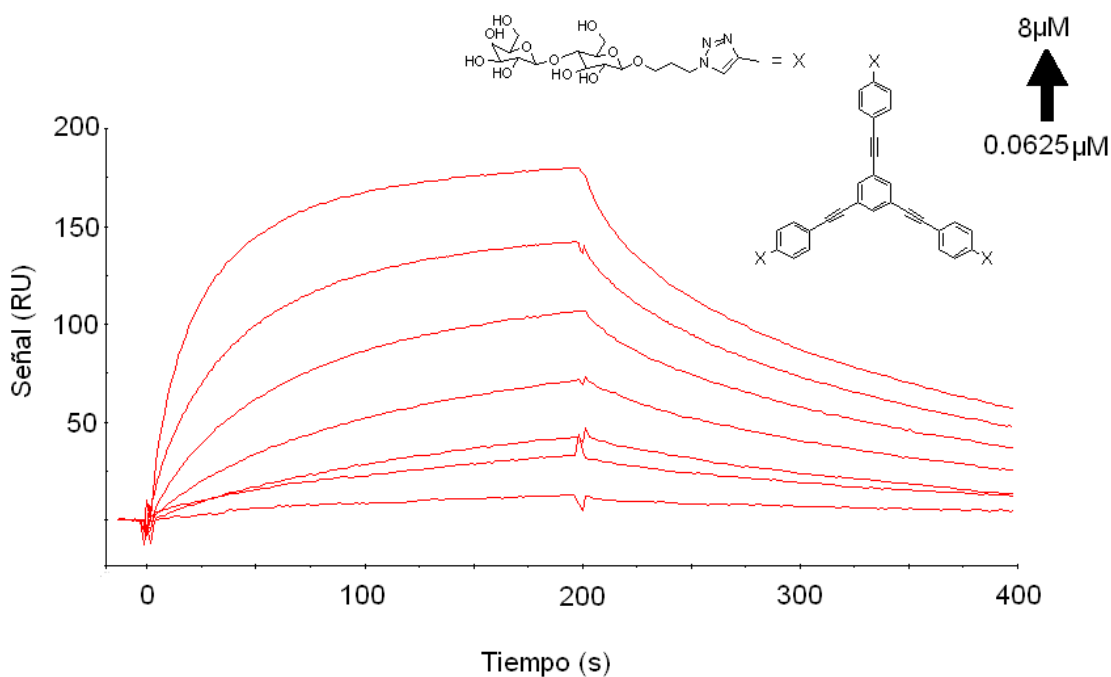


Figura 34. Interacción de **47** con viscumina.

Para el compuesto **49** obtenemos el sensograma de la Figura 35, que tras su análisis nos da los siguientes parámetros cinéticos de la interacción, k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) 11.6×10^3 ; k_{off} (s^{-1}) 6.77×10^{-3} ; K_A (M^{-1}) 17.2×10^5 ; K_D (M) 0.58×10^{-6}

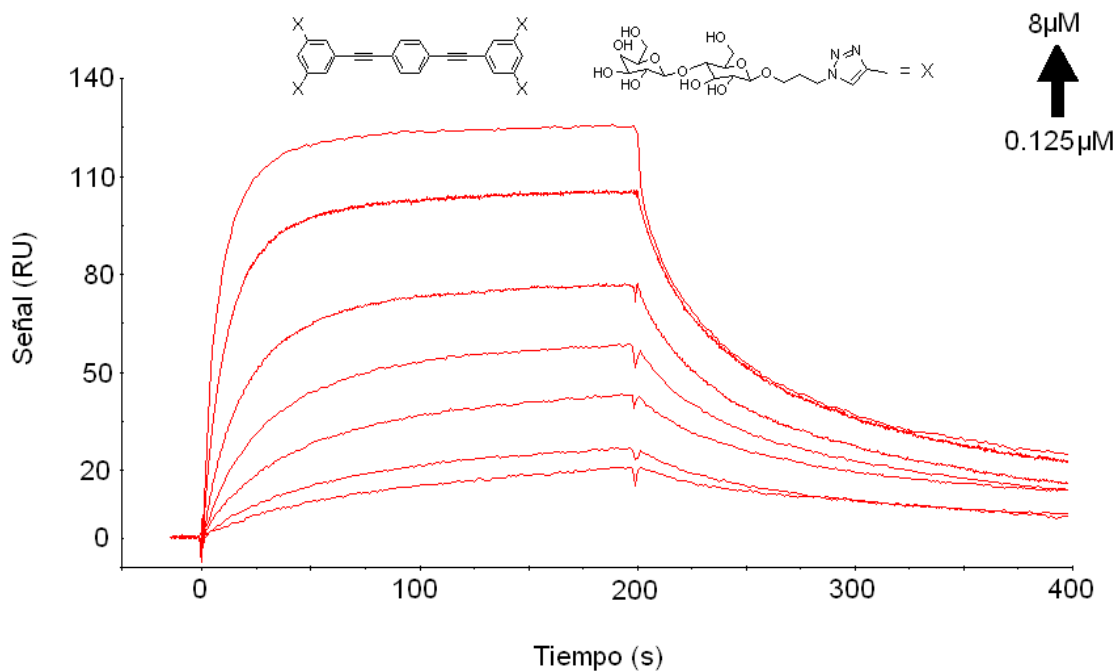


Figura 35. Interacción de **49** con viscumina.

Para el compuesto **51** obtenemos el sensograma de la Figura 36, que tras su análisis nos da los siguientes parámetros cinéticos de la interacción, k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) 12.2×10^3 ; k_{off} (s^{-1}) 10.2×10^{-3} ; K_A (M^{-1}) 12×10^5 ; K_D (M) 0.83×10^{-6}

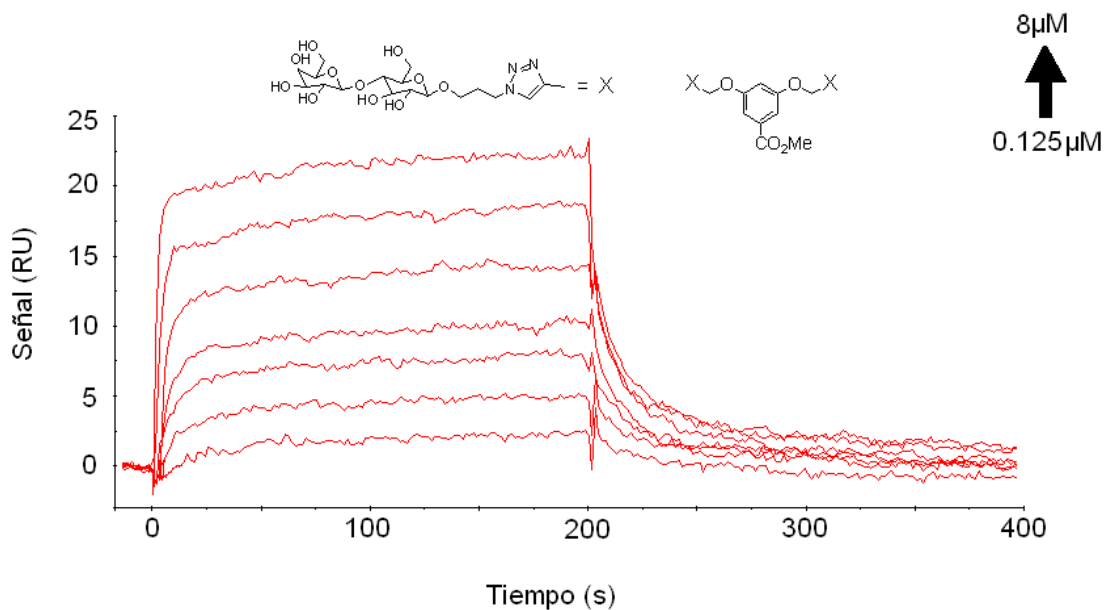


Figura 36. Interacción de **51** con viscumina.

Para el compuesto **53** obtenemos el sensograma de la Figura 37, que tras su análisis nos da los siguientes parámetros cinéticos de la interacción, k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) 2.53×10^3 ; k_{off} (s^{-1}) 4.39×10^{-3} ; K_A (M^{-1}) 5.77×10^5 ; K_D (M) 1.73×10^{-6}

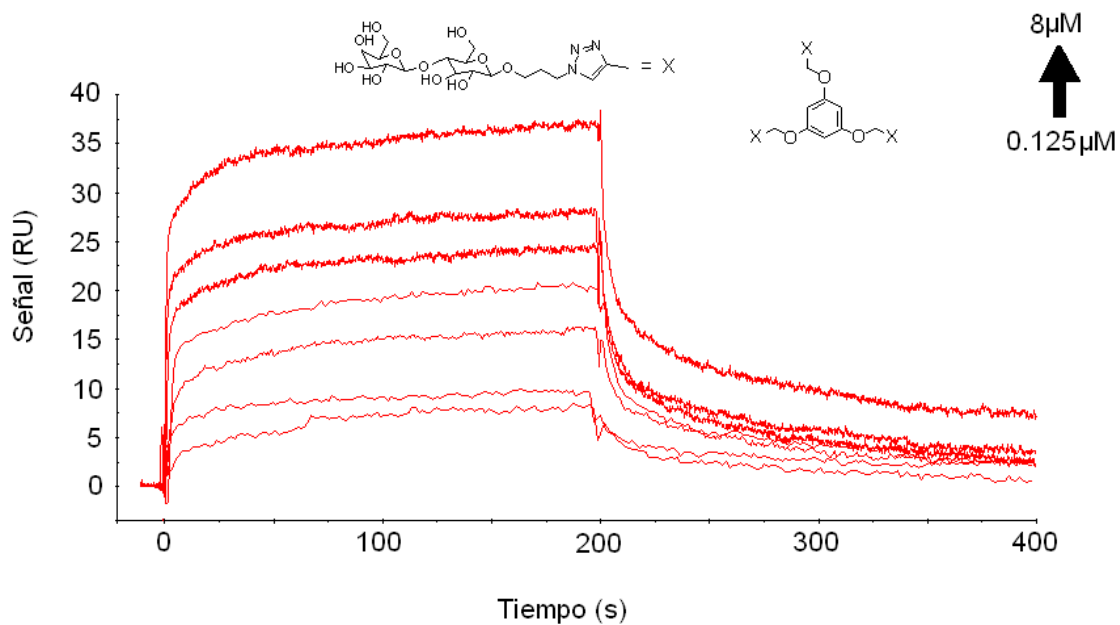


Figura 37. Interacción de **53** con viscumina.

Para el compuesto **55** obtenemos el sensograma de la Figura 38, que tras su análisis nos da los siguientes parámetros cinéticos de la interacción, k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) 234×10^3 ; k_{off} (s^{-1}) 7.45×10^{-3} ; K_A (M^{-1}) 314×10^5 ; K_D (M) 0.031×10^{-6}

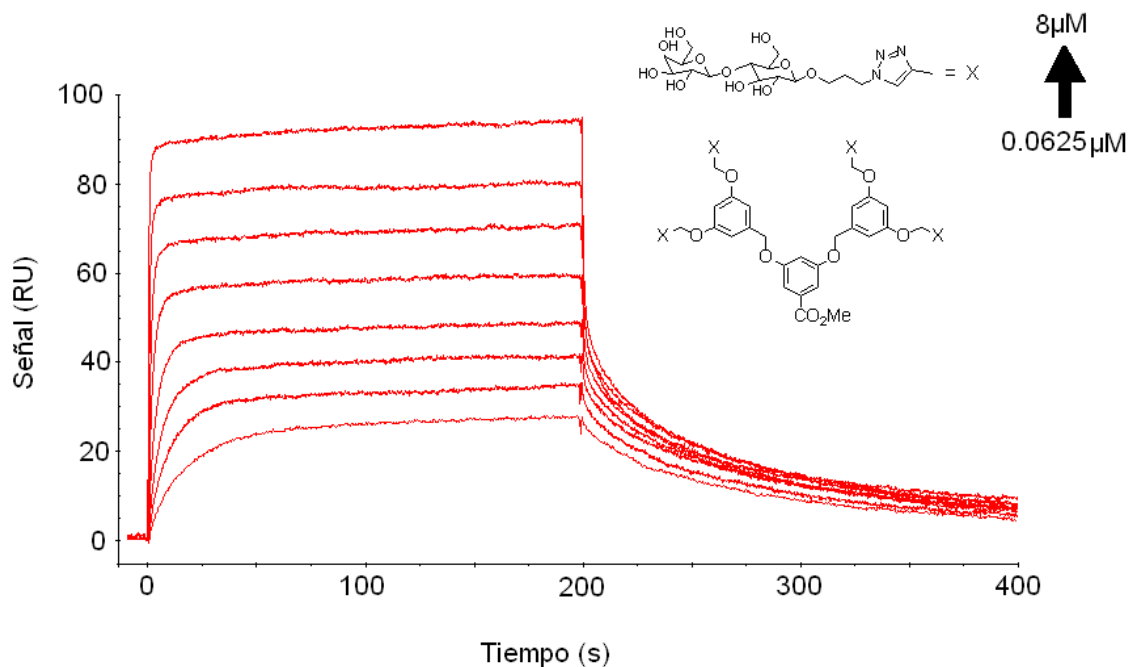


Figura 38. Interacción de **55** con viscumina.

Para el compuesto **57** obtenemos el sensograma de la Figura 39, que tras su análisis nos da los siguientes parámetros cinéticos de la interacción, k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) 0.312×10^3 ; k_{off} (s^{-1}) 7.1×10^{-3} ; K_A (M^{-1}) 0.44×10^5 ; K_D (M) 22.7×10^{-6}

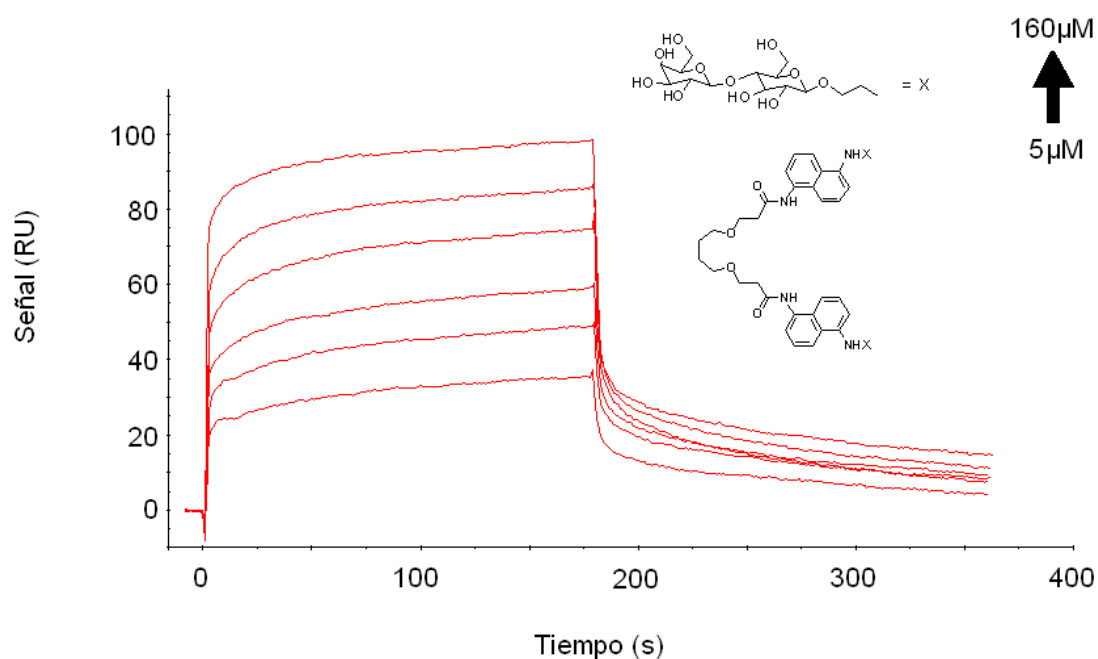


Figura 39. Interacción de **57** con viscumina.

Para el compuesto **59** obtenemos el sensograma de la Figura 41, que tras su análisis nos da los siguientes parámetros cinéticos de la interacción, k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) 6.8×10^3 ; k_{off} (s^{-1}) 4.77×10^{-3} ; K_A (M^{-1}) 40.9×10^5 ; K_D (M) 0.24×10^{-6}

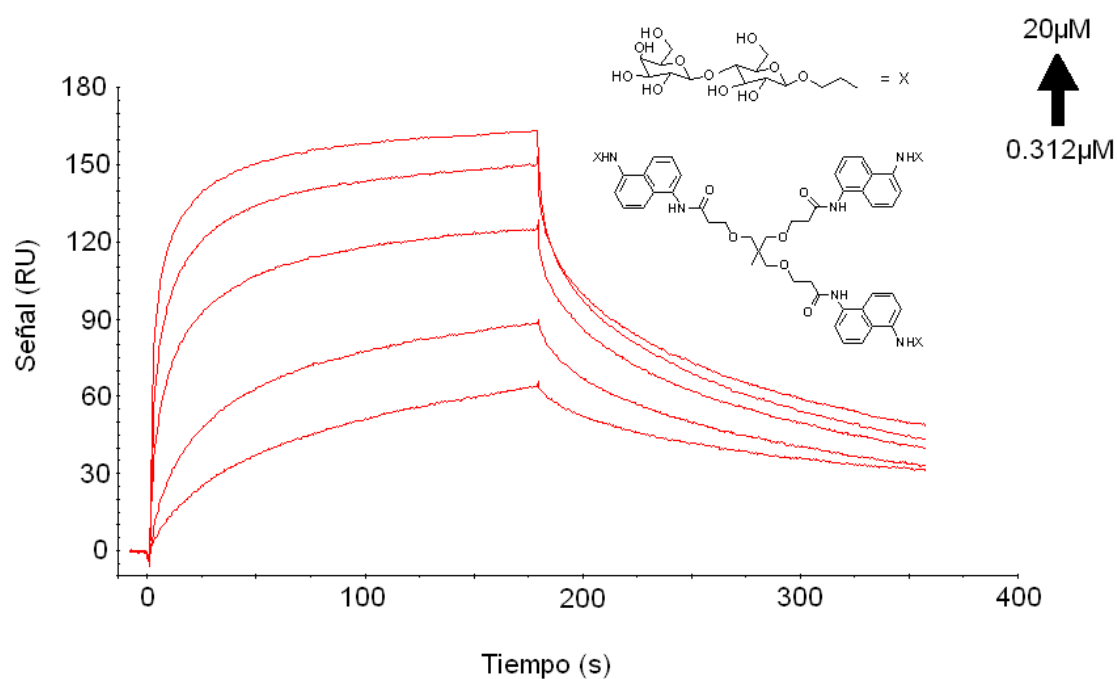


Figura 41. Interacción de **59** con viscumina.

Para el compuesto **61** obtenemos el sensograma de la Figura 42, que tras su análisis nos da los siguientes parámetros cinéticos de la interacción, k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) 0.91×10^3 ; k_{off} (s^{-1}) 6.95×10^{-3} ; K_A (M^{-1}) 1.32×10^5 ; K_D (M) 7.6×10^{-6}

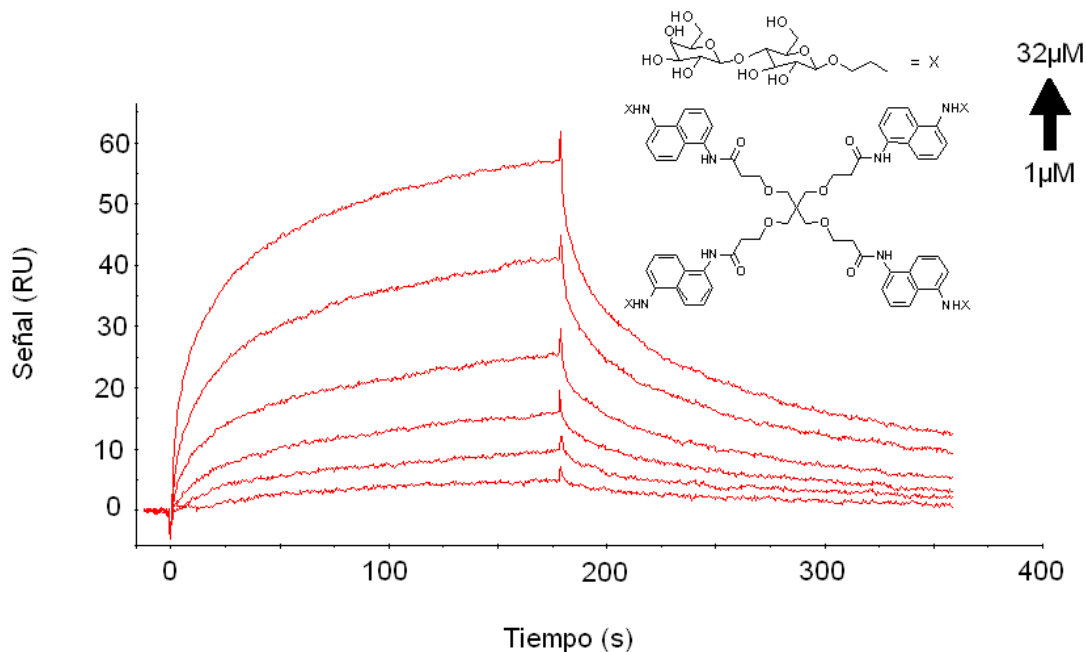


Figura 42. Interacción de **61** con viscumina.

Tras el análisis de los datos cinéticos de los compuestos con viscumina, comprobamos que todas las interacciones se ajustan a un modelo de Langmuir tipo 1:1 (Tabla 10). La constante de disociación en el equilibrio K_D , tiene en todos los casos un valor en el rango μM . Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos anteriormente por otros autores, por ejemplo, Duverger *et al.*¹⁶⁸ determinaron la k_{off} espontánea en la interacción de esta lectina con lactosa mediante SPR, obteniendo un valor de $1,1 \times 10^{-3} s^{-1}$, lo cual se encuentra en el mismo rango de magnitud que el obtenido en nuestro caso para los glicodendrimeros. Por otro lado, André *et al.*¹⁴⁷ determinaron mediante ensayos en fase sólida, que la K_D de la interacción de viscumina con un derivado dimérico de lactosa inmovilizado en superficie es de $0,3 \mu M$. Posteriormente, mediante un ensayo de inhibición competitiva demostraron que este derivado es 15 veces más potente que lactosa en su unión a la lectina. En un estudio realizado en nuestro laboratorio mediante SPR, Muñoz *et al.*¹⁵⁶ obtuvieron un valor en el rango μM en la interacción con viscumina de derivados de lactosa inmovilizados sobre la superficie del biosensor. Estos resultados corroboran los resultados aquí descritos por SPR y que establecen que viscumina reconoce específicamente lactosa en un rango micromolar.

Tabla 10. Constantes cinéticas de los distintos glicodendrimeros con viscumina.

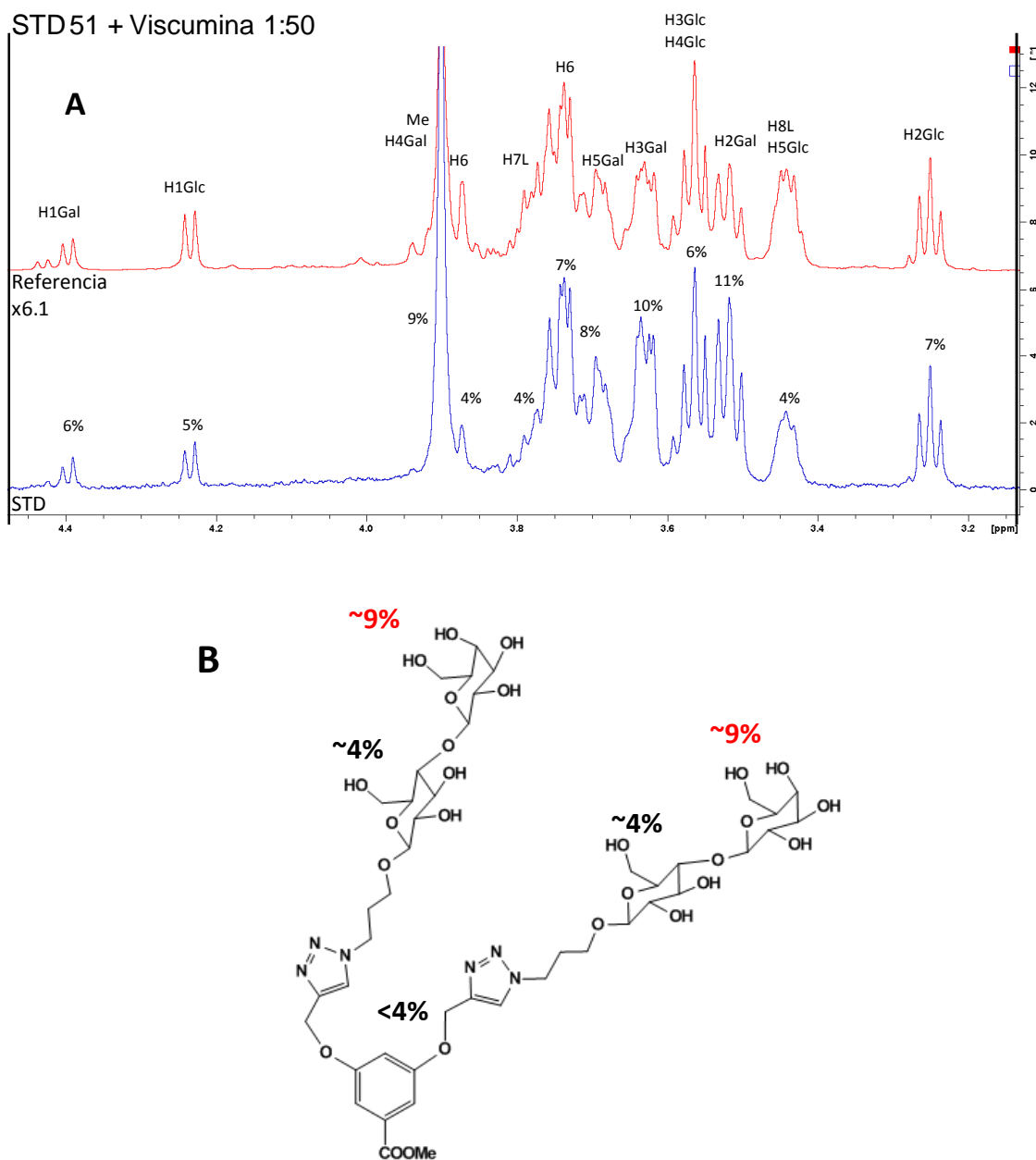
compuesto	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_A (M^{-1})	K_D (M)	χ^2
45	3.46×10^3	3.61×10^{-3}	9.58×10^5	1.04×10^{-6}	4.03
47	4.29×10^3	5.09×10^{-3}	8.42×10^5	1.19×10^{-6}	6.64
49	11.6×10^3	6.77×10^{-3}	17.2×10^5	0.58×10^{-6}	6.07
51	12.2×10^3	10.2×10^{-3}	12×10^5	0.83×10^{-6}	0.283
53	2.53×10^3	4.39×10^{-3}	5.77×10^5	1.73×10^{-6}	1.4
55	234×10^3	7.45×10^{-3}	314×10^5	0.031×10^{-6}	1.08
57	0.312×10^3	7.1×10^{-3}	0.44×10^5	22.7×10^{-6}	1.22
59	6.8×10^3	4.77×10^{-3}	40.9×10^5	0.24×10^{-6}	6.78
61	0.91×10^3	6.95×10^{-3}	1.32×10^5	7.6×10^{-6}	1.25

En estos estudios de interacción hemos analizado glicodendrimeros con tres tipos de *cores* en su estructura central, los que hemos denominado tipo I (compuestos **45**, **47** y **49**) tienen un *core* aromático y conjugación π -extendida, tipo etinilbenceno; los que hemos denominado tipo II (compuestos **51**, **53** y **55**) tienen *cores* bencénicos; y los que hemos denominado tipo III (compuestos **57**, **59** y **61**) tienen *cores* alifáticos. Los glicodendrimeros con *core* tipo I son los que presentan una mayor rigidez en su estructura central; los que tienen el *core* tipo II poseen cierta flexibilidad, ya que los grupos aromáticos están conectados por enlaces saturados, lo que también les proporciona una mejor hidrofilia; y los que presentan el *core* tipo III tienen una libertad de giro total, al ser totalmente alifáticos. Los compuestos que presentan mejores resultados globales en su interacción con viscumina son los glicodendrimeros con los *cores* tipo I y II, por tanto, a raíz de estos resultados son los que seleccionamos para estudios posteriores de interacción carbohidrato-proteína.

III.3- Resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación.

A continuación se llevan a cabo estudios de interacción carbohidrato proteína por RMN. En estos estudios se utilizan los glicodendrimeros con los *cores* tipo II, debido a la mayor solubilidad de estas gliconanoestructuras a las concentraciones necesarias para llevar a cabo los estudios de RMN (1 mM para los diferentes ligandos, con una relación ligando:proteína 50:1). Estos ensayos se llevan a cabo mediante la técnica de STD-RMN, comentados sus fundamentos en el apartado I.4.3 de la introducción.

La Figura 63 muestra el análisis de STD del ligando **51** con viscumina, junto con las señales clave para la asignación. En el espectro se observan claras señales de STD, que también se aprecian en la Figura. El efecto de STD más fuerte se detectó para los protones del azúcar del residuo Gal (con un promedio de intensidad absoluta de STD aproximadamente del 9%; véase la Figura 63B), lo que sugiere de manera clara que esta región del ligando se encuentra en un contacto más estrecho con la proteína. Los protones pertenecientes al residuo Glc muestran señales de STD menos intensas, alrededor del 4%, como se identifica en la Figura 63B.



51

Figura 63. (A) espectro de STD (parte inferior) y espectro de referencia u *off resonance* (parte superior) de la muestra que contiene glicodendrímtero **51** en presencia de viscumina con una relación molar de 50:1. Los porcentajes absolutos de STD se dan para las señales de protones correspondientes. (B) Estructura esquemática de **51** junto con los valores medios de las intensidades de STD absolutas.

La Figura 64 muestra los resultados de STD para el ligando **53** en presencia de VAA, junto con la asignación de los desplazamientos químicos clave. No se observaron señales claras de STD, y el efecto más fuerte de STD entre los protones del carbohidrato

fue para el residuo Gal con un promedio de intensidad absoluta de STD de aproximadamente un 8% (ver Figura 64B). De hecho, el resto de los protones del dendrímero presentaron señales significativamente más débiles, alrededor de 3%, como se representa en la Figura 64B.

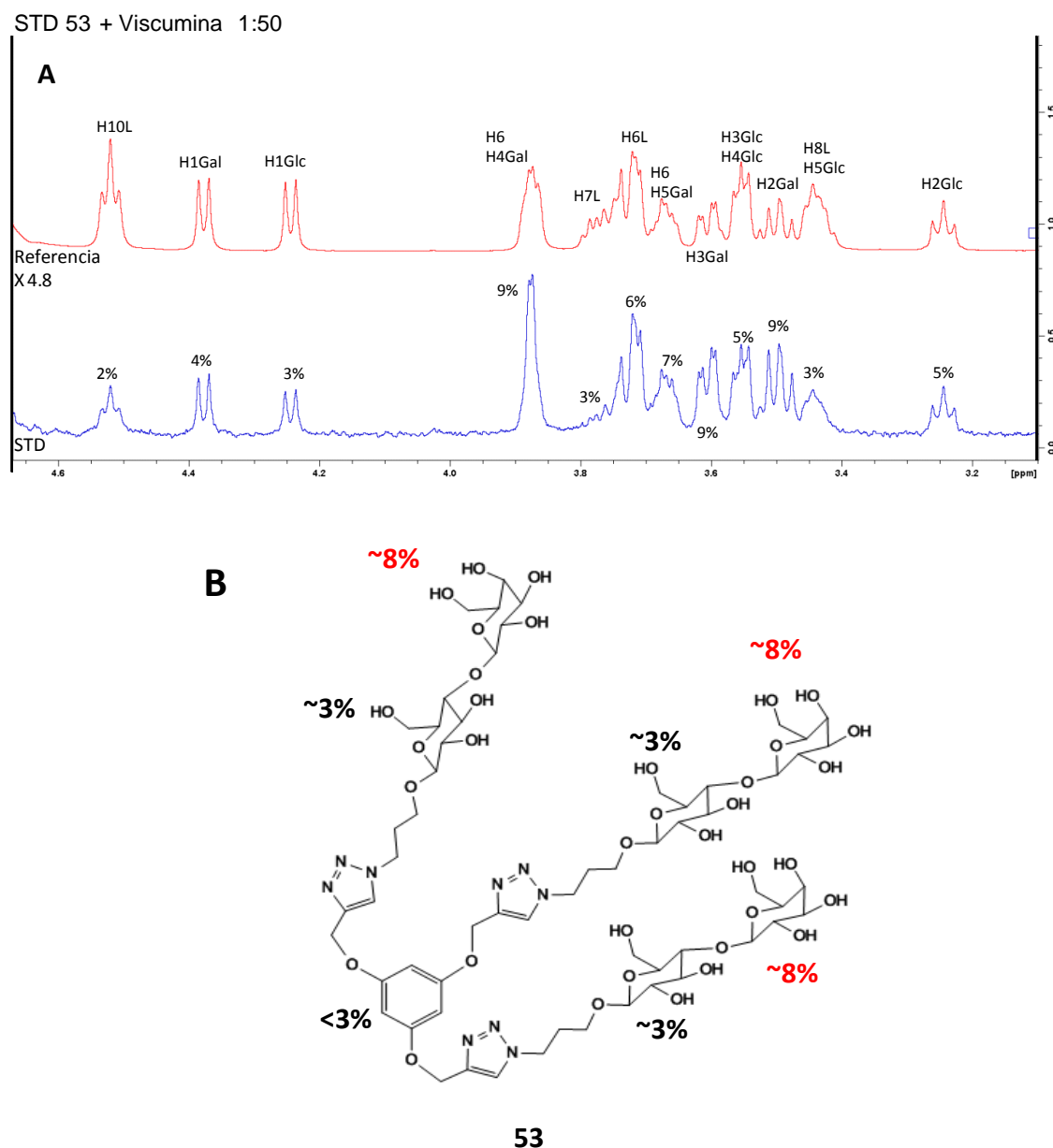


Figura 64. (A) espectro de STD (parte inferior) y espectro de referencia u *off resonance* (parte superior) de la muestra que contiene glicodendrímero **53** en presencia de viscumina con una relación molar de 50:1. Los porcentajes absolutos de STD se dan para las señales de protones correspondientes. (B) Estructura esquemática de **53** junto con los valores medios de las intensidades de STD absolutas.

relación molar de 50:1. Los porcentajes absolutos de STD se dan para las señales de protones correspondientes. **(B)** Estructura esquemática de **55** junto con los valores medios de las intensidades de STD absolutas.

Tras estos estudios podemos concluir que en todos los casos los dos residuos glicosídicos (Glu, Gal) están implicados en el reconocimiento molecular de la viscumina, si bien el residuo de Gal presenta una mayor interacción.

III.4- Fluorescencia.

Una de las características más importantes de los glicodendrimeros con los *cores* tipo I (**45**, **47** y **49**) es que poseen fluorescencia, ya que tienen conjugación π -extendida entre los grupos bencénicos. Por otro lado, la lectina utilizada en estos estudios de interacción carbohidrato-proteína presenta varios aminoácidos aromáticos en su estructura (8 Trp, 7 Tyr y 5 Phe), por lo que también pueden llevarse a cabo estudios de fluorescencia con ella. Por ello decidimos llevar a cabo estos estudios con los compuestos que mejor funcionaron por SPR (**47**, **49** y **55**).

En primer lugar, se adquirieron los espectros de fluorescencia de excitación y de emisión de la proteína y de los glicodendrimeros fluorescentes y después se estudiaron las modificaciones a concentración constante de la proteína y creciente de glicodendrimeros. En la Figura 66 se observa en verde el espectro de excitación de la viscumina nativa con una longitud de onda máxima de excitación de 280 nm, lo que corresponde a todos los residuos Tyr y Trp; y a la derecha se muestran los espectros de emisión a 280 y 295 nm con un λ_{max} de emisión a 330 nm.

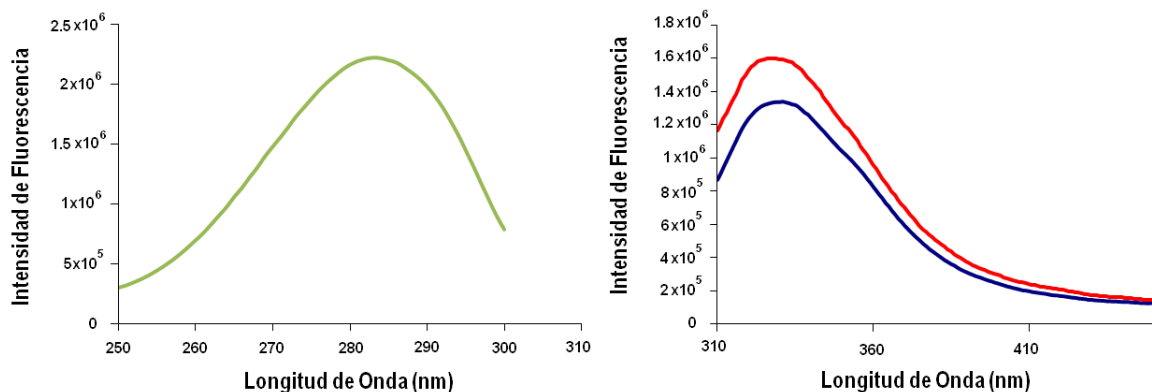


Figura 66. Espectros de excitación (verde) y de emisión a 280 y 295 nm (Azul y rojo respectivamente) de la proteína viscumina.

A continuación se muestran los espectros de fluorescencia de los ligandos libres **47** y **49** (figura 67). El compuesto **55** no presenta fluorescencia debido a que carece de dobles enlaces conjugados en la parte central de su estructura.

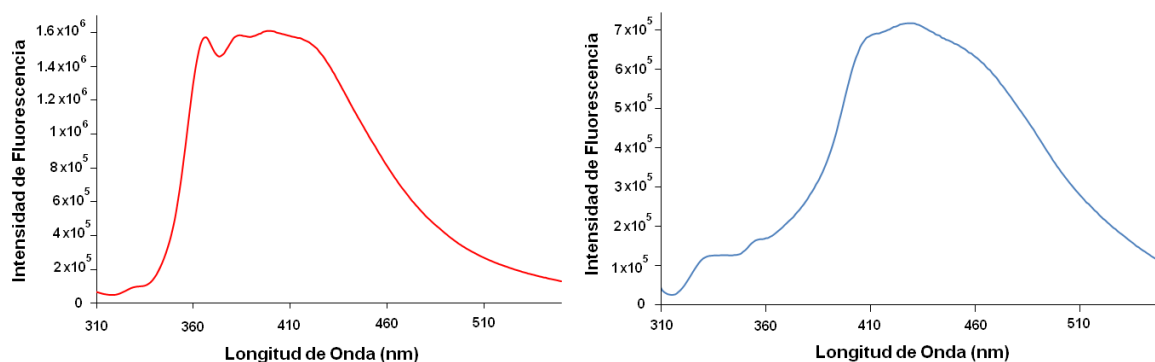


Figura 67. Espectros de emisión de **47** (rojo) y de **49** (azul) en solución tampón.

En la Figura 67 se observa la existencia de dos máximos de emisión de fluorescencia; uno en 360 nm y otro en 430 nm para **47**; mientras que para **49** los máximos aparecen a 330 nm y 430 nm.

- Estudio de la variación de fluorescencia de la viscumina con **47** y **49**

En la Figura 68 se muestran los espectros de emisión de la interacción de viscumina con los glicodendrimeros (**47** y **49**) a λ_{exc} 295 nm y a temperatura de 25 °C. Los espectros muestran como la adición de glicodendrimeros a la proteína da lugar a una disminución de la intensidad de fluorescencia como consecuencia de la interacción proteína-glicodendrimeros. Sin embargo, dicha interacción no produce cambios en la forma de los espectros de fluorescencia ni en la posición del máximo de emisión de fluorescencia, lo

que puede interpretarse como que la interacción no produce cambios en la estructura terciaria.

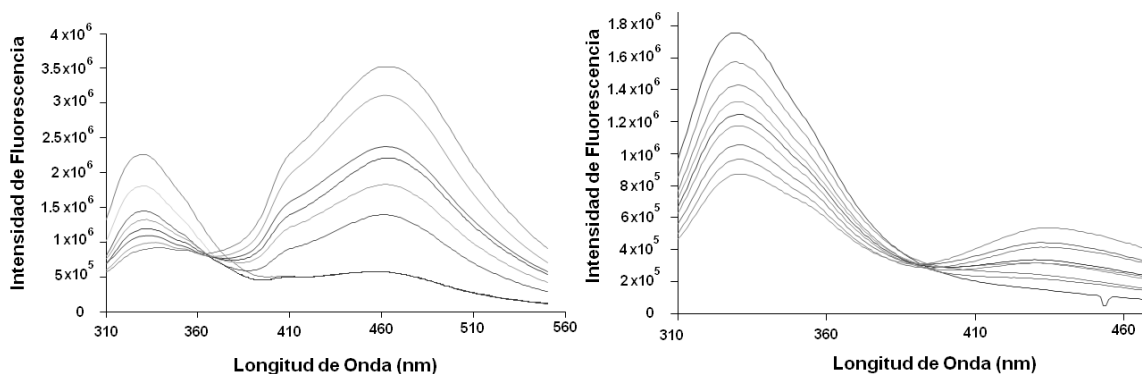


Figura 68. Espectros de emisión de los complejo viscumina con **47** y **49**.

- Estudio de fluorescencia con **55**

Aunque el glicodendrímico **55** no posee fluorescencia se estudiaron los cambios que se producen en el espectro de emisión de la proteína cuando interacciona con el ligando. Como se muestra en la Figura 69 a concentración constante de proteína la adición de cantidades crecientes de **55** produce una disminución en la intensidad de fluorescencia sin afectar al máximo de emisión aunque a altas concentraciones de **55** sí aparece un pequeño desplazamiento hacia el azul. Este desplazamiento hacia longitudes de onda mayores podría indicar un cambio en la estructura terciaria de la proteína.

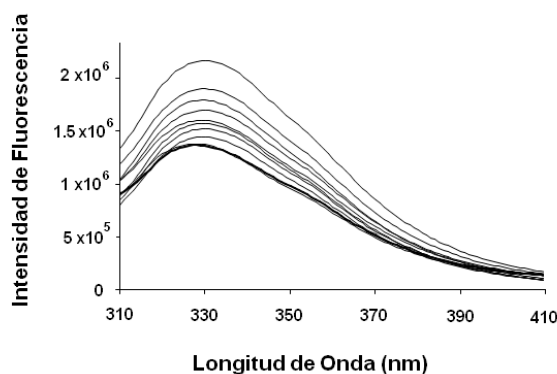


Figura 69. Espectros de emisión de la viscumina a concentraciones crecientes de **55**.

Los datos obtenidos para **47**, **49** y **55** se analizaron con la ecuación de SternVolmer modificada (apartado I.4.4 de la introducción) usando el valor de la intensidad de fluorescencia del máximo de emisión (295nm). El análisis con la ecuación modificada de SternVolmer permite ajustar los datos, y conocer la fracción de contribución de los

fluoróforos accesibles (f_1) e inaccesibles (f_0) para el ligando, así como las constantes de asociación y disociación del proceso (Tabla 11).

Compuesto	f_0	f_1	K_A (M)	K_D (M ⁻¹)
47	0.1	0.9	3×10^5	3.3×10^{-6}
49	0.18	0.82	2.1×10^5	4.8×10^{-6}
55	0.33	0.67	18×10^5	7×10^{-6}

Como podemos ver, los datos obtenidos por fluorescencia para el proceso de reconocimiento carbohidrato-proteína están en el rango micromolar, al igual que los obtenidos por SPR.

III.5- Calorimetría isoterma de titulación.

Finalmente decidimos llevar a cabo estudios de interacción carbohidrato-proteína por microcalorimetría. Para este tipo de estudios, al igual que ocurre para los estudios de fluorescencia, se requieren concentraciones superiores de glicodendrímico que para SPR. En SPR se ha empleado una concentración máxima de 8 μ M para los glicodendrímeros que presentan una mayor afinidad por viscumina, mientras que para ITC necesitamos unas concentraciones de hasta 100 μ M. De los glicodendrímeros que mejor han interactuado con la viscumina por SPR y fluorescencia (**47**, **49** y **55**) sólo hemos podido estudiar por ITC el compuesto **55**, esto se debe a dos causas. Por un lado, una de las características del microcalorímetro, es que posee una microjeringa que gira a 1000 r.p.m. mientras inyecta la solución de ligando sobre la celda con la proteína; por otra parte, los compuestos con el *core* tipo I (**47** y **49**) poseen un marcado carácter anfipático, lo que hace que sean afrógenos en solución acuosa al producirse la agitación de la microjeringa del calorímetro. Estas dos circunstancias hacen que se formen burbujas en la celda de trabajo, impidiendo la adquisición de los datos.

Se llevó a cabo el experimento de ITC con una concentración de viscumina 100 μ M y una concentración de **55** 1000 μ M. La gráfica obtenida se observa en la Figura 70.

Obtenemos un valor de $n= 0.40$; $K_A= 1.2 \times 10^5$ M⁻¹; $K_D= 8.3 \times 10^{-6}$ M; $\Delta H= -81$ Kcal mol⁻¹ y $\Delta S= -175$ cal mol⁻¹ deg⁻¹; $c= 4.8$

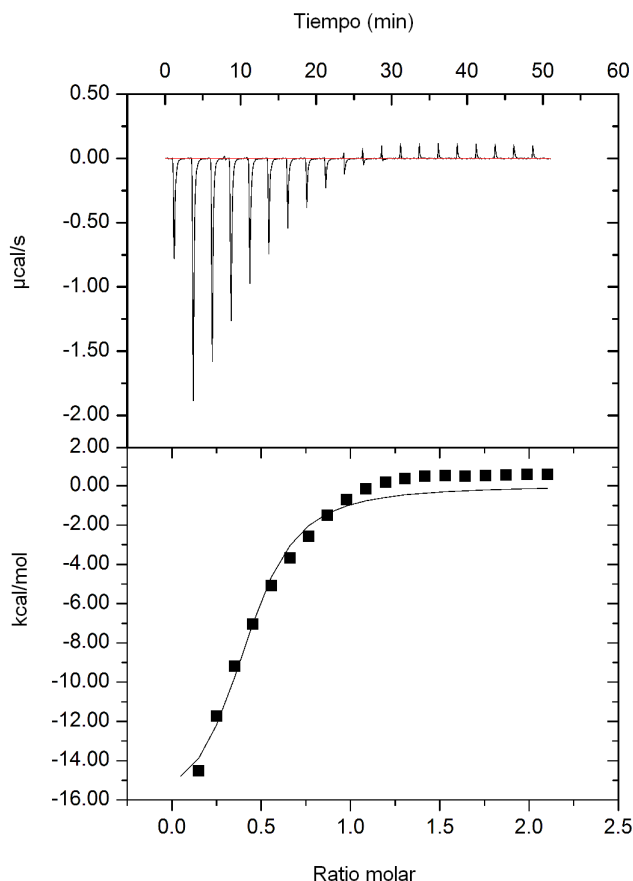


Figura 70. Representación de los datos de ITC para la interacción de viscumina con **55**.

Para el compuesto **55**, que tiene cuatro unidades de lactosa en su estructura, observamos un valor de $n=0.4$, lo que indica que por cada unidad de glicoderivado se unen 2.5 moléculas de viscumina. Teóricamente cada molécula de glicodendrímico podría unir 4 unidades de viscumina, por tanto el valor de 2.5 puede indicar que existe un impedimento estérico al acomplamiento simultáneo de cuatro unidades de viscumina.

III.6- Modelado molecular.

Las observaciones experimentales encontradas en SPR, STD, fluorescencia e ITC se validaron utilizando un modelo tridimensional del complejo, que fue construido utilizando el método descrito en el apartado II.7 de Materiales y métodos. El sitio de unión conocido de viscumina¹⁵² (el sitio de unión TYR) fue empleado para el protocolo de acomplamiento. Los ligandos **51**, **53** y **55** produjeron resultados similares en presencia de viscumina. La Figura 71 muestra los aminoácidos que están implicados en el

reconocimiento del glicodendrúmero. La mayor parte de las interacciones clave implican al resto de Gal, como se deduce del análisis de STD RMN. Cabe señalar la existencia de un enlace de hidrógeno doble entre el ASP235 con el OH3 y OH4 del residuo de Gal, así como un segundo enlace de hidrógeno entre ASN256 y el OH3 del residuo de Gal. Por otra parte, existe una clara interacción de apilamiento CH- π entre TYR249 y el residuo Gal. Curiosamente, GLN238 establece un enlace de hidrógeno con el OH3 del residuo de Glc.

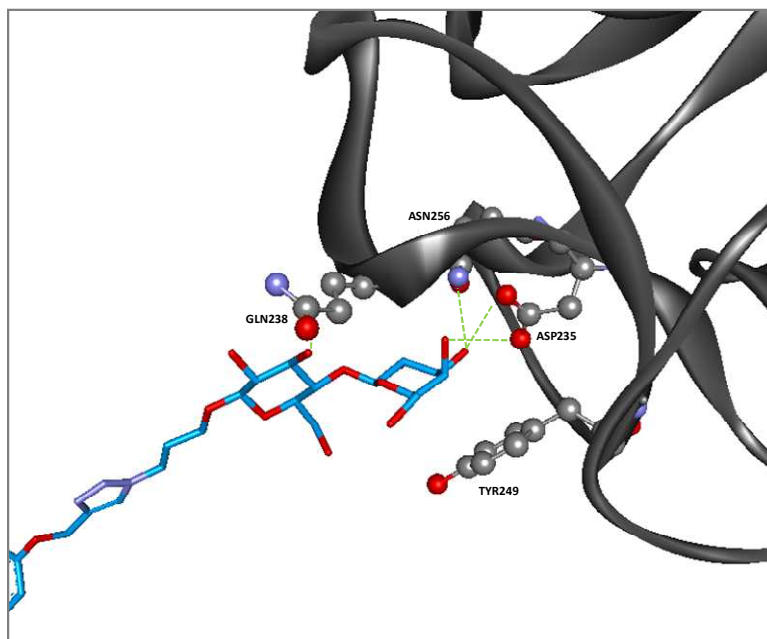


Figura 71. Modelo de acoplamiento de la región (lactosa) del glicodendrúmero **51** que se une al sitio de unión viscumina TYR. Los aminoácidos que proporcionan mejores contactos con el ligando (GLN238, ASN256, ASP235, TYR249) están resaltados.

La posibilidad de unión simultánea de dos, tres, o cuatro restos de viscumina al ligando también fue explorada, utilizando el protocolo de modelado molecular. Los resultados se muestran en las Figuras 72, 73 y 74, respectivamente. El modelo construido sugiere la posibilidad de unión simultánea de dos y tres unidades de VAA en el caso de los glicodendrúmeros **51** y **53** respectivamente (véase la Figura 72 y 73). Sin embargo, sólo un máximo de tres unidades de viscumina pueden acoplarse al ligando **55**. De hecho, la unión de cuatro unidades simultáneas produciría importantes conflictos de impedimento estérico (Ver Figura 74B), lo que impide la existencia de complejos multivalentes grandes. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales empleadas para los experimentos de RMN, con un gran exceso de ligando sobre la lectina, es evidente que la probabilidad de que se formen de complejos de elevado

entrecruzamiento es pequeña. Muy probablemente, los datos de RMN reflejan la presencia de complejos 1:1 en rápida disociación, que se producen en la corta escala de tiempo de relajación que se requiere para este tipo de experimentos.

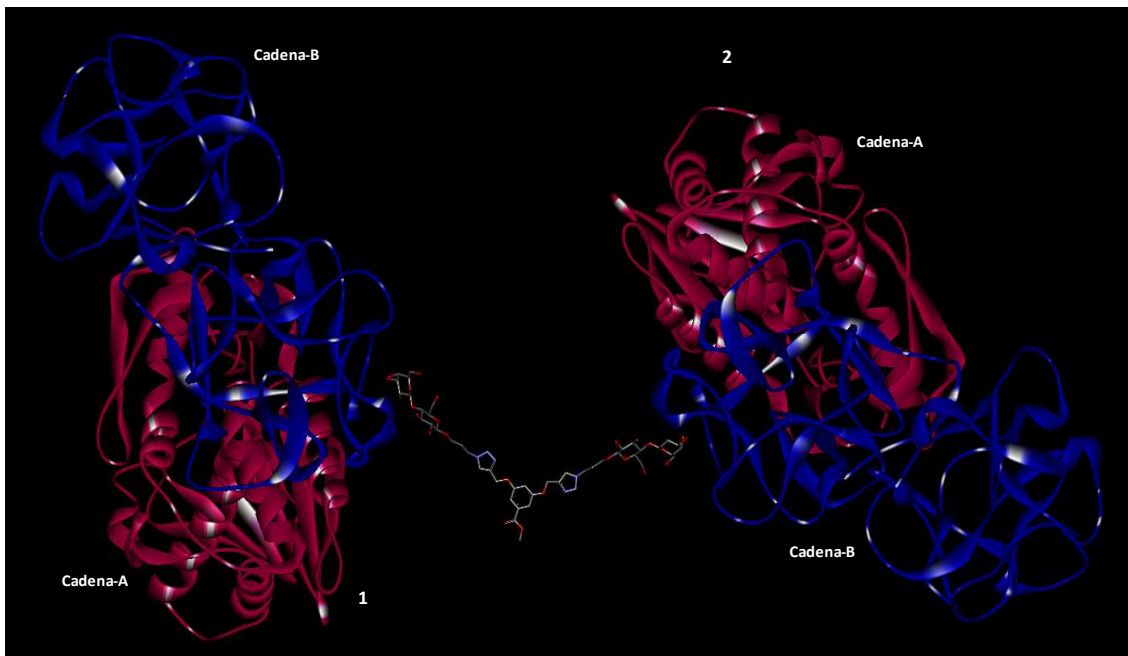


Figura 72. Modelado molecular del glicodendrímtero **51** unido a dos unidades de viscumina.



Figura 73. Modelado molecular del glicodendrímtero **53** unido a tres unidades de viscumina.

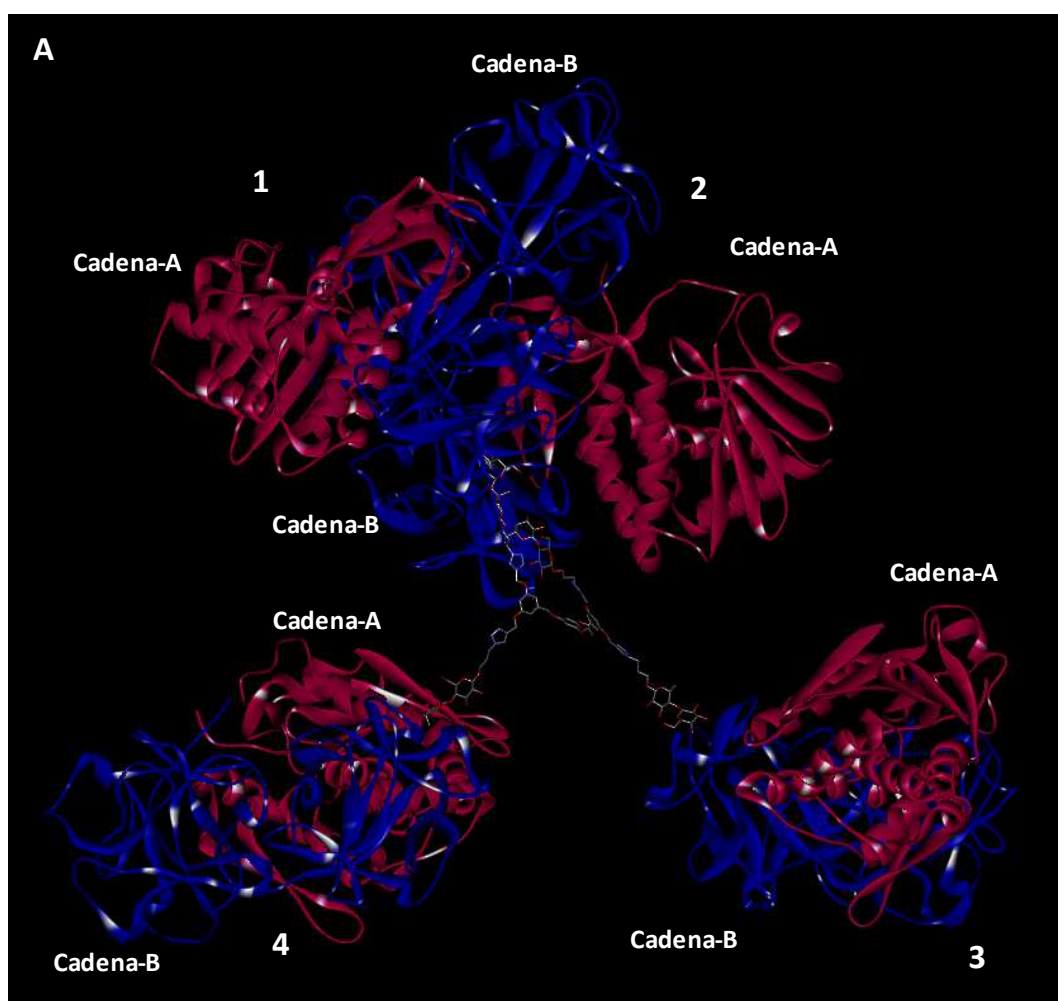


Figura 74. (A) Modelado molecular del glicodendrímtero **55** unido a cuatro unidades de viscumina.

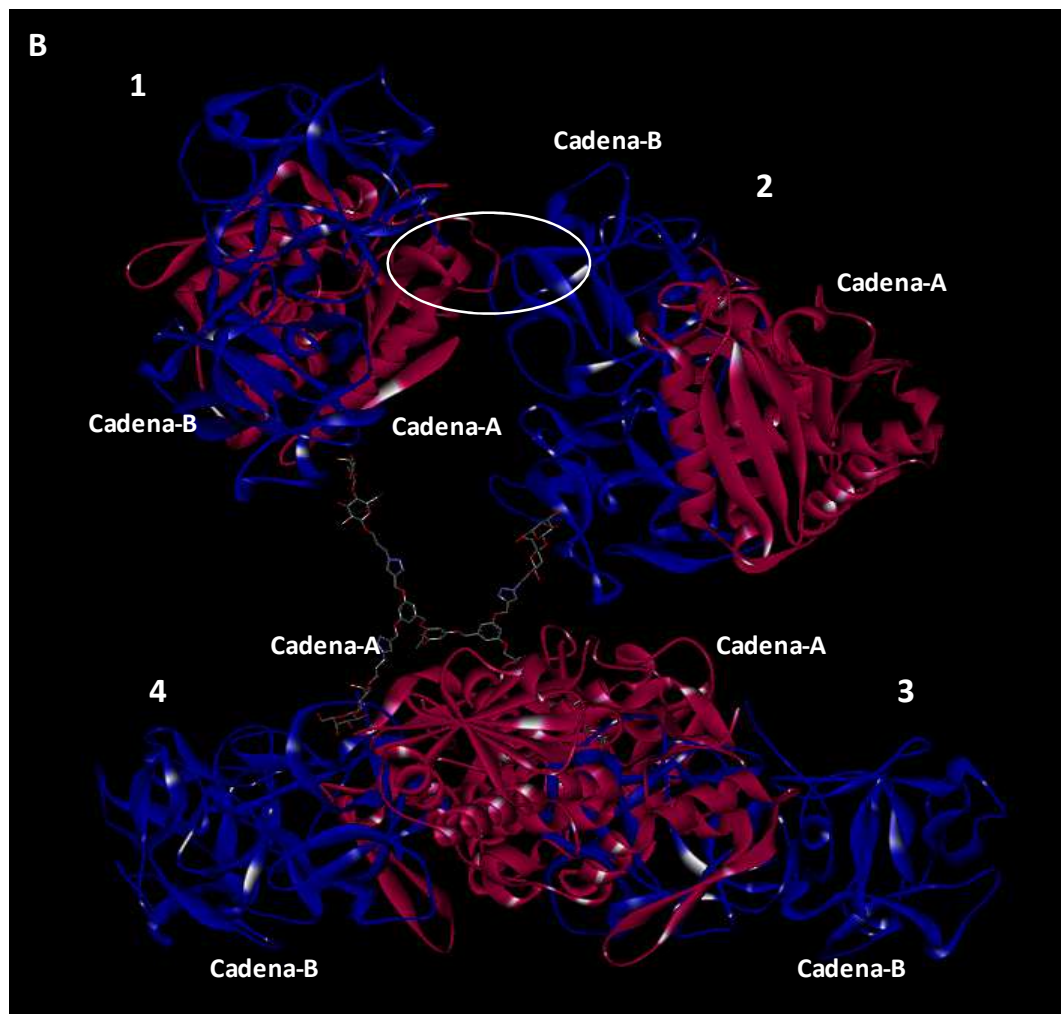


Figura 74. (B) Otra vista del modelado molecular del glicodendrímtero **55** unido a cuatro unidades de viscumina.

IV- CONCLUSIONES

- 1- Se han sintetizado, mediante la reacción de Sonogashira asistida por microondas, *cores* di, tri y tetravalentes con una estructura central formada por grupos fluoróforos unidos mediante triples enlaces conjugados, lo que les confiere rigidez estructural, y permite su funcionalización mediante reacciones de cicloadición 1,3-dipolar (compuestos **17**, **22** y **25**).

- 2- Se han sintetizado, mediante reacciones de S_N2 y Mitsunobu, *cores* di, tri y tetravalentes con grupos aromáticos centrales unidos mediante hibridación sp^3 a los grupos alquino terminales, lo que permite una libertad de giro de la molécula, y la funcionalización mediante reacciones de cicloadición 1,3-dipolar (compuestos **27**, **29** y **31**).

- 3- Se han sintetizado *cores* di, tri y tetravalentes a partir de polialcoholes alifáticos, funcionalizados en su periferia con cloruros de ácido que permiten su unión a moléculas funcionalizadas con grupos nucleófilos (compuestos **35**, **39** y **43**).

- 4- Se ha funcionalizado la lactosa con una cadena espaciadora unida al carbono anomérico libre, manteniendo la forma cerrada en configuración β en el extremo reductor; dicha cadena espaciadora tiene en su extremo un grupo azida, lo que permite unir la lactosa funcionalizada mediante reacciones de cicloadición 1,3-dipolar (compuesto **5**).

- 5- Se ha funcionalizado la lactosa con una cadena espaciadora unida al carbono anomérico libre, manteniendo la forma cerrada en configuración β en el extremo reductor; dicha cadena espaciadora tiene en su extremo un grupo 1,5-diaminonaftaleno, lo que permite unir la lactosa funcionalizada mediante reacciones S_N2 (compuesto **8**).

- 6- Se han sintetizado glicodendrimeros di, tri y tetravalentes mediante dos estrategias sintéticas diferentes, en primer lugar mediante cicloadición 1,3 dipolar catalizada por

microondas entre el compuesto **5** y los núcleos **17, 22, 25, 27, 29** y **31**; y a continuación, mediante S_N2 entre el compuesto **8** y los núcleos **35, 39** y **43**.

7- Se ha realizado la determinación estructural de los compuestos finales **45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59** y **61** mediante RMN y EM.

8- Se ha estudiado mediante SPR la interacción carbohidrato-proteína de los glicodendrimeros sintetizados con la viscumina (cadena B de la lectina de *Viscum album*), que reconoce específicamente residuos de galactosa. En todos los casos encontramos una K_D en el rango micromolar, lo que concuerda con los datos obtenidos por otras técnicas. Los glicodendrimeros que mejor interaccionan con la viscumina son los que tienen los *cores* aromáticos (**45, 47, 49, 51, 53** y **55**) en comparación con los que tienen *cores* alifáticos (**57, 59** y **61**). En todos los casos, tienen una mayor afinidad por la viscumina los compuestos tri o tetravalentes frente a los divalentes, lo que corrobora la importancia de la presentación multivalente en las interacciones carbohidrato-proteína.

9- Se ha estudiado por STD-RMN la interacción carbohidrato-proteína de los compuestos **51, 53** y **55** con viscumina. En todos los casos el efecto de STD más fuerte se detectó para los protones del carbohidrato del residuo de galactosa frente a glucosa, lo que sugiere de manera clara que esta región del ligando se encuentra en un contacto más estrecho con la proteína.

10- Se ha estudiado por fluorescencia la interacción de los compuestos **47, 49** y **55** con viscumina. Se ha seguido la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión de la proteína (295nm), a medida que se añadían alícuotas de glicodendrimeros. Al ajustar los datos obtenidos a la ecuación de Stern-Volmer modificada para proteínas multitriptófano, obtenemos unos valores de K_D en el rango micromolar para dicha interacción, lo que corrobora los datos obtenidos por SPR.

11- Se ha estudiado por ITC la interacción del compuesto **55** con viscumina. Se ha obtenido un valor de K_D en el rango micromolar para dicha interacción, lo que corrobora los datos obtenidos por SPR y fluorescencia. La estequiometría del proceso muestra que por cada molécula de glicodendrúmero se pueden unir 2.5 moléculas de viscumina, lo que indica la existencia de un posible impedimento estérico para el acoplamiento simultáneo de las teóricas 4 moléculas de viscumina que puede unir el glicodendrúmero tetravalente.

12- Se ha estudiado por modelado molecular la interacción de los glicodendrímeros **51**, **53** y **55** con viscumina. La mayor parte de las interacciones clave implican al resto de galactosa, como se deduce del análisis de STD RMN. Además el modelado molecular de la interacción de **55** con viscumina, muestra un impedimento estérico para la unión simultánea de 4 moléculas de viscumina al glicodendrúmero, lo que corrobora el dato de estequiometría para esta interacción obtenido por ITC.

V- BIBLIOGRAFÍA

1. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Bertozzi, C. R.; Hart, G. W. and Etzler, M. E. *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbour, New York, 2nd edn. **2009**.
2. Gabius, H. J.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J.; Romero, A. and Solis, D. From lectin structure to functional glycomics; principles of the sugar code. *Trends. Biochem. Sci.* **2012**; 36; 298-313.
3. Lis, H. and Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* **1998**; 98; 637-674.
4. Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E and Strong, L. E. Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions. *Current Opinion in Chemical Biology.* **2000**; 4; 696-703.
5. Lee, Y.C. and Lee, R. T. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Accounts of Chemical Research.* **1995**; 28; 321-327.
6. Lundquist, J. J. and Toone, E. J. The Cluster Glycoside Effect. *Chemical Reviews.* **2002**; 102; 555-578.
7. Mammen, M.; Choi, S. K. and Whitesides, G. M. Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**; 37; 2754-2794.
8. Thompson, D. *On growth and form*. Cambridge University Press. **1987**.
9. Dwek, R. *Glycobiology: Toward understanding the function of sugars.* *Chem Rev.* **1996**; 96; 683-720.
10. Bertozzi, C. R. and Kiessling, L. L. Chemical bioglycology. *Science.* **2001**; 291; 2357-2364.
11. Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology.* **1997**; 3; 97-130.
12. Dwek, R. A. Biological importance of glycosylation. *Dev. Biol. Stand.* **1998**; 96; 43-47.
13. Mann, D.A.; Kanai, M.; Maly, D. J. and Kiessling, L. L. Probing low affinity and multivalent interactions with surface plasmon resonance: Ligands for concavalin A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**; 120; 10575-10582.
14. Dam, T. K.; Roy, R.; Pagé, D. and Brewer, C. F. Thermodynamic binding parameters of individual epitopes of multivalent carbohydrates to concavalin A as determined by "reverse" isothermal titration microcalorimetry. *Biochemistry.* **2002**; 41; 1359-1363.

15. Lee, Y. C. Carbohydrate-protein interactions: Basis of glycobiology. *Acc. Chem. Res.* **1995**; 28; 321-327.
16. Choi, S. K. Synthetic multivalent molecules: concepts and biomedical applications. Wiley, New York. **2004**.
17. Gabius, H. J.; Siebert, H. C.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J. and Rüdiger, H. Chemical biology of the sugar code. *ChemBioChem.* **2004**; 5; 740-764.
18. Maierhofer, C.; Rohmer, K. and Wittmann, V. Probing multivalent carbohydrate–lectin interactions by an enzyme-linked lectin assay employing covalently immobilized carbohydrates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **2007**; 15; 7661-7676.
19. Kiessling, L.L.; Gestwicki, J. E. and Strong, L. E. Synthetic Multivalent Ligands as Probes of Signal Transduction. *Angewandte Chemie International Edition.* **2006**; 45; 2348-2368.
20. Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A. and Kiessling, L. L. Influencing Receptor–Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. *Journal of the American Chemical Society.* **2002**; 124; 14922-14933.
21. Wolfenden, M. L. and Cloninger, M. J. Carbohydrate-Functionalized Dendrimers To Investigate the Predictable Tunability of Multivalent Interactions. *Bioconjugate Chemistry.* **2006**; 17; 958-966.
22. Muñoz, E. M.; Correa, J.; Fernandez-Megia, E. and Riguera, R. Probing the Relevance of Lectin Clustering for the Reliable Evaluation of Multivalent Carbohydrate Recognition. *Journal of the American Chemical Society.* **2009**; 131; 17765-17767.
23. Pieters, R. J. Maximising multivalency effects in protein-carbohydrate interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry.* **2009**; 7; 2013-2025.
24. Brewer, C. F.; Miceli, M. C. and Baum, L. G. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin–saccharide mediated cellular interactions. *Current Opinion in Structural Biology.* **2002**; 12; 616-623.
25. Rabinovich, G. A.; Toscano, M. A.; Jackson, S. S. and Vasta, G. R. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current Opinion in Structural Biology.* **2007**; 17; 513-520.
26. Mammen, M.; Dahmann, G. and Whitesides, G. M. Effective Inhibitors of Hemagglutination by Influenza Virus Synthesized from Polymers Having Active Ester Groups. Insight into Mechanism of Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry.* **1995**; 38; 4179-4190.

27. Howorka, S.; Nam, J.; Bayley, H. and Kahne, D. Stochastic Detection of Monovalent and Bivalent Protein–Ligand Interactions. *Angewandte Chemie International Edition*. **2004**; 43; 842-846.
28. Dam, T. K. and Brewer, C. F. Effects of Clustered Epitopes in Multivalent Ligand–Receptor Interactions. *Biochemistry*. **2008**; 47; 8470-8476.
29. Jayaraman, N. Multivalent ligand presentation as a central concept to study intricate carbohydrate-protein interactions. *Chemical Society Reviews*. **2009**; 38; 3463-3483.
30. Chabre, Y. M. and Roy, R. Chapter 6 - Design and Creativity in Synthesis of Multivalent Neoglycoconjugates. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*: Academic Press; **2010**; 165-393.
31. Lindhorst, T. Artificial Multivalent Sugar Ligands to Understand and Manipulate Carbohydrate-Protein Interactions. *Topics in Current Chemistry*. **2002**; 208; 201-235.
32. Davis, B. G. Synthesis of glycoproteins. *Chem Rev*. **2002**; 102; 579-601.
33. Stewart, R. J. and Boggs, J. M. A carbohydrate-carbohydrate interaction between galactosylceramide-containing liposomes and cerebroside sulfate-containing liposomes: Dependence on the glycolipid ceramide composition. *Biochemistry*. **1993**; 32; 10666-10674.
34. Röckendorf, N. and Lindhorst, T. Glycodendrimers. In: Vögtle F, Schalley C, editors. *Dendrimers IV*: Springer Berlin Heidelberg; **2001**; 201-238.
35. Sansone, F. and Casnati, A. Multivalent glycolixarenes for recognition of biological macromolecules: glycolixarene mimics capable of multitasking. *Chemical Society Reviews*. **2013**; 42; 4623-4639.
36. Roy, R.; Hernández-Mateo, F. and Santoyo-González, F. Synthesis of Persialylated β -Cyclodextrins. *The Journal of Organic Chemistry*. **2000**; 65; 8743-8746.
37. Roy, R. Syntheses and some applications of chemically defined multivalent glycoconjugates. *Current Opinion in Structural Biology*. **1996**; 6; 692-702.
38. de la Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; Rojas, T. C.; Rojo, J.; Cañada, J. and Fernández, A. Gold Glyconanoparticles as Water-Soluble Polyvalent Models To Study Carbohydrate Interactions. *Angewandte Chemie International Edition*. **2001**; 40; 2257-2261.
39. Imberty, A.; Chabre, Y. M. and Roy, R. Glycomimetics and glycodendrimers as high affinity microbial anti-adhesins. *Chem. Eur. J*. **2008**; 14; 7490-7499.

40. Shin, I.; Park, S. and Lee, M. R. Carbohydrate microarrays: An advanced technology for functional studies of glycans. *Chem. Eur. J.* **2005**; 11; 2894-2901.
41. Feizi, T.; Fazio, F.; Chai, W. and Wong, C. H. Carbohydrate microarrays - a new set of technologies at the frontiers of glycomics. *Current Opinion in Structural Biology.* **2003**; 13; 637-645.
42. de Paz, J. L. and Seeberger, P. H. Recent Advances in Carbohydrate Microarrays. *QSAR & Combinatorial Science.* **2006**; 25; 1027-1032.
43. Ratner, D. M. and Seeberger, P. H. Carbohydrate microarrays as tools in HIV glycobiology. *Curr. Pharm. Des.* **2007**; 13; 173-183.
44. Disney, M. D. and Seeberger, P. H. The Use of Carbohydrate Microarrays to Study Carbohydrate-Cell Interactions and to Detect Pathogens. *Chemistry & biology.* **2004**; 11; 1701-1707.
45. Newkome, G. R.; Moorefield, C. N. and Vögtle, F. Dendrimers and dendrons: concepts, synthesis, applications. Wiley-VCH, New York. **2001**.
46. Fréchet, J. M. J. and Tomalia, D. A. Dendrimers and other dendritic polymers. Wiley, New York. **2001**.
47. Esfand, R. and Tomalia, D. A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discovery Today.* **2001**; 6; 427-436.
48. Tomalia, D. A.; Naylor, A. M. and Goddard, W. A. Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter. *Angewandte Chemie International Edition.* **1990**; 29; 138-175.
49. Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J. and Smith, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polymer Journal.* **1985**; 117-132.
50. Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R. and Gupta, V. K. Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol. *The Journal of Organic Chemistry.* **1985**; 50; 2003-2004.
51. Vögtle, F.; Buhleier, E. and Wehner, W. Cascade and Nonskid-chain-like Synthesis of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis.* **1978**; 2; 155-158.
52. Tomalia, D. A. Starburst dendrimers - Nanoscopic supermolecules according to dendritic rules and principles. *Macromolecular Symposia.* **1996**; 101; 243-255.

53. Hawker, C. J. and Fréchet, J. M. J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*. **1990**; 112; 7638-7647.
54. Grayson, S. M. and Fréchet, J. M. J. Convergent Dendrons and Dendrimers: from Synthesis to Applications. *Chemical Reviews*. **2001**; 101; 3819-3868.
55. Haag, R. and Kratz, F. Polymer Therapeutics: Concepts and Applications. *Angewandte Chemie International Edition*. **2006**; 45; 1198-1215.
56. Duncan, R. and Izzo, L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2005**; 57; 2215-2237.
57. Boas, U.; Christensen, J. B. and Heegaard, P. M. H. Dendrimers in medicine and biotechnology: new molecular tools. RSC Publishing, Cambridge. **2006**.
58. Roy, R.; Zanini, D.; Meunier, S. J. and Romanowska, A. Solid-phase synthesis of dendritic sialoside inhibitors of influenza A virus haemagglutinin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. **1993**; 1869-1872.
59. Nepogodiev, S. A. Glycodendrimers: Chemical aspects. *Adv. Macromol. Carbohydr. Res.* **2003**; 2; 191-239.
60. Li, Y.; Cheng, Y. and Xu, T. Design, synthesis and potent pharmaceutical applications of glycodendrimers: A mini review. *Curr. Drug. Discov. Technol.* **2007**; 4 246-254.
61. Cloninger, M. J. Biological applications of dendrimers. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2002**; 6; 742-748.
62. Bezouška, K. Design, functional evaluation and biomedical applications of carbohydrate dendrimers (glycodendrimers). *Reviews in Molecular Biotechnology*. **2002**; 90; 269-290.
63. Turnbull, W.B. and Stoddart, J. F. Design and synthesis of glycodendrimers. *Reviews in Molecular Biotechnology*. **2002**; 90; 231-255.
64. Lee, Y. C. Synthesis of some cluster glycosides suitable for attachment to proteins or solid matrices. *Carbohydr. Res.* **1978**; 67 509-514.
65. Lindhorst, T. K.; Kotter, S.; Krallmann-Wenzel, U. and Ehlers, S. Trivalent [small alpha]-D-mannoside clusters as inhibitors of type-1 fimbriae mediated adhesion of Escherichia coli: structural variation and biotinylation. *Journal of the Chemical Society*. **2001**; 8; 823-831.

66. Kötter, S.; Krallman-Wenzel, U.; Ehlers, S. and Lindhorst, T. B. Multivalent ligands for the mannose-specific lectin on type 1 fimbriae of *Escherichia coli*: Syntheses and testing of trivalent α -D-mannoside clusters. *J. Chem. Soc.* **1998**; 1; 2193-2200.
67. Patel, A. and Lindhorst, T. K. Multivalent glycomimetics: synthesis of nonavalent mannoside clusters with variation of spacer properties. *Carbohydrate Research.* **2006**; 341; 1657-1668.
68. Gaucher, S. P.; Pedersen, S. F. and Leary, J. A. Stereospecific Synthesis and Characterization of Aminoglycoside Ligands from Diethylenetriamine. *The Journal of Organic Chemistry.* **1999**; 64; 4012-4015.
69. Hayes, W.; Osborn, H. M. I.; Osborne, S. D.; Rastall, R. A. and Romagnoli, B. One-pot synthesis of multivalent arrays of mannose mono- and disaccharides. *Tetrahedron.* **2003**; 59; 7983-7996.
70. Dubber, M. and Lindhorst, T. K. Exploration of reductive amination for the synthesis of cluster glycosides. *Synthesis.* **2001**; 2; 327-330.
71. Li, Y.; Zhang, X.; Chu, S.; Yu, K. and Guan, H. Synthesis of cluster mannosides via a Ugi four-component reaction and their inhibition against the binding of yeast mannan to concanavalin A. *Carbohydrate Research.* **2004**; 339; 873-879.
72. Hanessian, S.; Qiu, D.; Prabhanjan, H.; Reddy, G. V. and Lou, B. Synthesis of clustered D-GalNAc (Tn) and D-Galb(1 \rightarrow 3)GalNAc (T) antigenic motifs using a pentaerythritol scaffold. *Can. J. Chem.* **1996**; 74; 1738-1747.
73. Hansen, H.C.; Haataja, S.; Finne, J. and Magnusson, G. Di-, Tri-, and Tetravalent Dendritic Galabiosides That Inhibit Hemagglutination by *Streptococcus suis* at Nanomolar Concentration. *Journal of the American Chemical Society.* **1997**; 119; 6974-6979.
74. Langer, P. J.; Ince, S. V. and Ley, S. Assembly of dendritic glycoclusters from monomeric mannose building blocks. *Journal of the Chemical Society.* **1998**; 23; 3913-3916.
75. Al-Mughaid, H. and Grindley, T. B. Synthesis of a Nonavalent Mannoside Glycodendrimer Based on Pentaerythritol. *The Journal of Organic Chemistry.* **2006**; 71; 1390-1398.
76. Lindhorst, T. K.; Dubber, M.; Krallmann-Wenzel, U. and Ehlers, S. Cluster Mannosides as Inhibitors of Type 1 Fimbriae-Mediated Adhesion of *Escherichia coli*: Pentaerythritol Derivatives as Scaffolds. *European Journal of Organic Chemistry.* **2000**; 11; 2027-2034.

77. Touaibia, M.; Shiao, T. C.; Papadopoulos, A.; Vaucher, J.; Wang, Q. and Benhamioud, K. Tri- and hexavalent mannoside clusters as potential inhibitors of type 1 fimbriated bacteria using pentaerythritol and triazole linkages. *Chemical Communications*. **2007**; 380-382.
78. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L. and Sharpless, K.B. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *Journal of the American Chemical Society*. **2004**; 127; 210-216.
79. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V. and Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*. **2002**; 41; 2596-2599.
80. Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A. and Voit, B. Efficiency and Fidelity in a Click-Chemistry Route to Triazole Dendrimers by the Copper(I)-Catalyzed Ligation of Azides and Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*. **2004**; 43; 3928-3932.
81. Denkewalter, R. G.; Kolc, J. and Lukasavage, W. J. Macromolecular highly branched homogeneous compound based on lysine units. US Patent, 4289872. **1981**.
82. Crespo, L.; Sanclimens, G.; Pons, M.; Giralt, E.; Royo, M. and Albericio, F. Peptide and Amide Bond-Containing Dendrimers. *Chemical Reviews*. **2005**; 105; 1663-1682.
83. Niederhafner, P.; Šebestík, J. and Ježek, J. Peptide dendrimers. *Journal of Peptide Science*. **2005**; 11; 757-788.
84. Niederhafner, P.; Šebestík, J. and Ježek, J. Glycopeptide dendrimers. Part I. *Journal of Peptide Science*. **2008**; 14; 2-43.
85. Niederhafner, P.; Šebestík, J. and Ježek, J. Glycopeptide dendrimers. Part II. *Journal of Peptide Science*. **2008**; 14; 44-65.
86. Niederhafner, P.; Reiniš, M.; Šebestík, J. and Ježek, J. Glycopeptide dendrimers, Part III—a review: Use of glycopeptide dendrimers in immunotherapy and diagnosis of cancer and viral diseases. *Journal of Peptide Science*. **2008**; 14; 556-587.
87. Valentijn, A. R. P. M.; van der Marel, G. A.; Sliedregt, L. A. J. M.; van Berkel, T. J. C.; Biessen, E. A. L. and van Boom, J.H. Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the asialoglycoprotein Receptor. *Tetrahedron*. **1997**; 53; 759-770.

88. Grandjean, C.; Rommens, C.; Gras-Masse, H. and Melnyk, O. Convergent synthesis of fluorescein-labelled lysine-based cluster glycosides. *Tetrahedron Letters*. **1999**; 40; 7235-7238.
89. Ježek, J.; Velek, J.; Vepřek, P.; Velková, V.; Trnka, T. and Pecka, J. Solid phase synthesis of glycopeptide dendrimers with Tn antigenic structure and their biological activities. Part I. *Journal of Peptide Science*. **1999**; 5; 46-55.
90. Frison, N.; Taylor, M. E.; Soilleux, E.; Bousser, M.T.; Mayer, R. and Monsigny, M. Oligolysine-based oligosaccharide clusters: selective recognition and endocytosis by the mannose receptor and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin. *Journal of Biological Chemistry*. **2003**; 278; 23922-23929.
91. Baigude, H.; Katsuraya, K.; Okuyama, K.; Tokunaga, S. and Uryu, T. Synthesis of Sphere-Type Monodispersed Oligosaccharide–Polypeptide Dendrimers. *Macromolecules*. **2003**; 36; 7100-7106.
92. Greatrex, B. W.; Brodie, S. J.; Furneaux, R. H.; Hook, S. M.; McBurney, W. T. and Painter, G.F. The synthesis and immune stimulating action of mannose-capped lysine-based dendrimers. *Tetrahedron*. **2009**; 65; 2939-2950.
93. Zanini, D. and Roy, R. Chemoenzymatic Synthesis and Lectin Binding Properties of Dendritic N-Acetyllactosamine. *Bioconjugate Chemistry*. **1997**; 8; 187-192.
94. Baek, M. G, and Roy R. Simultaneous binding of mouse monoclonal antibody and streptavidin to heterobifunctional dendritic l-lysine core bearing T-antigen tumor marker and biotin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2001**; 9; 3005-3011.
95. Roy, R.; Baek, M. G. and Rittenhouse-Olson, K. Synthesis of N,N'-bis(Acrylamido)acetic Acid-Based T-Antigen Glycodendrimers and Their Mouse Monoclonal IgG Antibody Binding Properties. *Journal of the American Chemical Society*. **2001**; 123; 1809-1816.
96. Roy, R. and Baek, M. G. Glycodendrimers: novel glycotope isosteres unmasking sugar coding. Case study with T-antigen markers from breast cancer MUC1 glycoprotein. *Reviews in Molecular Biotechnology*. **2002**; 90; 291-309.
97. Palcic, M. M.; Li, H.; Zanini, D.; Bhella, R. S.; Roy, R. Chemoenzymatic synthesis of dendritic sialyl Lewis^x. *Carbohydrate Research*. **1997**; 305; 433-442.

98. Otter, M.; Barrett-Bergshoeff, M. M. and Rijken, D. C. Binding of tissue-type plasminogen activator by the mannose receptor. *Journal of Biological Chemistry*. **1991**; 266; 13931-13935.
99. Fraser, I.P.; Koziel, H. and Ezekowitz, R. A. B. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunology*. **1998**; 10; 363-372.
100. Bijsterbosch, M. K.; Donker, W.; Van De Bilt, H.; Van Weely, S.; Van Berkel, T. J. C. and Aerts, J. M. F. G. Quantitative Analysis of the Targeting of Mannose-Terminal Glucocerebrosidase. *European Journal of Biochemistry*. **1996**; 237; 344-349.
101. Friedman, B.; Vaddi, K.; Preston, C.; Mahon, E.; Cataldo, J. R. and McPherson, J. M. A Comparison of the Pharmacological Properties of Carbohydrate Remodeled Recombinant and Placental-Derived β -Glucocerebrosidase: Implications for Clinical Efficacy in Treatment of Gaucher Disease. *Blood*. **1999**; 93; 2807-2816.
102. Gac, S.; Coudane, J.; Boustta, M.; Domurado, M. and Vert, M. Synthesis, characterization and in vivo behavior of a norfloxacin-poly(L-lysine citramide imide) conjugate bearing mannosyl residues. *J. Drug Targeting*. **2000**; 7; 393-406.
103. Chakraborty, P.; Bhaduri, A. N. and Das, P. K. Neoglycoproteins as carriers for receptor-mediated drug targeting in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. *J. Protozool*. **1990**; 37; 358-364.
104. Barratt, G. M.; Nolibé, D.; Yapo, A.; Petit, J. F. and Tenu, J.P. Use of mannosylated liposomes for in vivo targeting of a macrophage activator and control of artificial pulmonary metastases. *Annales de l'Institut Pasteur / Immunologie*. **1987**; 138; 437-450.
105. Liang, W.; Shi, X.; Deshpande, D.; Malanga, C. J. and Rojanasakul, Y. Oligonucleotide targeting to alveolar macrophages by mannose receptor-mediated endocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1996**; 1279; 227-234.
106. Ferkol, T.; Mularo, F.; Hilliard, J.; Lodish, S.; Perales, J. C. and Ziady, A. Transfer of the Human Alpha1-Antitrypsin Gene into Pulmonary Macrophages In Vivo. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **1998**; 18; 591-601.
107. Nishikawa, M.; Takamura, S.; Yamashita, F.; Takahura, Y.; Meijer, D. K.; Hashida, M. and Swart J. P. Pharmacokinetics and In Vivo Gene Transfer of Plasmid DNA Complexed with Mannosylated Poly(L-Lysine) in Mice. *Journal of Drug Targeting*. **2000**; 8; 29-38.

108. Diebold, S.S.; Lehrmann, H.; Kursa, M.; Wagner, E.; Cotten, M. and Zenke, M. Efficient gene delivery into human dendritic cells by adenovirus polyethylenimine and mannose polyethylenimine transfection. *Hum. Gen. Ther.* **1999**; 10; 775-786.
109. Fukasawa, M.; Shimizu, Y.; Shikata, K.; Nakata, M.; Sakakibara, R.; Yamamoto, N.; Hatanaka, M. and Mizuochi, T. Liposome oligomannose-coated with neoglycolipid, a new candidate for a safe adjuvant for induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *FEBS Lett.* **1998**; 441; 353-356.
110. van Bergen, J.; Ossendorp, F.; Jordens, R.; Mommaas, A.M.; Drijfhout, J. W. and Koning, F. Get into the groove! Targeting antigens to MHC class II. *Immunological Reviews.* **1999**; 172; 87-96.
111. Apostolopoulos, V.; Barnes, N.; Pietersz, G.A. and McKenzie, I.F.C. Ex vivo targeting of the macrophage mannose receptor generates anti-tumor CTL responses. *Vaccine.* **2000**; 18; 3174-3184.
112. Matsuoka, K.; Terabatake, M.; Esumi, Y.; Terunuma, D. and Kuzuhara, H. Synthetic assembly of trisaccharide moieties of globotriaosyl ceramide using carbosilane dendrimers as cores. A new type of functional glyco-material. *Tetrahedron Letters.* **1999**; 40; 7839-7842.
113. Nishikawa, K.; Matsuoka, K.; Kita, E.; Okabe, N.; Mizuguchi, M, and Hino, K. A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **2002**; 99; 7669-7674.
114. Kaufman, R. J. and Sidhu, R. S. Synthesis of aryl cluster glycosides by cyclotrimerization of 2-propynyl carbohydrate derivatives. *J. Org. Chem.* **1982**; 47; 4941-4947.
115. Roy, R.; Das, S. K.; Dominique, R.; Corazon Trono, M.; Hernández-Mateo, F. and Santoyo-González, F. Transition metal catalyzed neoglycoconjugate syntheses. *Pure Appl. Chem.* **1999**; 71; 565-571.
116. Roy, R.; Trono, M.C. and Giguère, D. Effects of Linker Rigidity and Orientation of Mannoside Cluster for Multivalent Interactions with Proteins. *Glycomimetics: Modern Synthetic Methodologies. American Chemical Society.* **2005**. 137-150.
117. Romyr, D.; Bingcan, L.; Das, S. K. and Roy, R. Synthesis of “Molecular Asterisks” via Sequential Cross-Metathesis, Sonogashira and Cyclotrimerization Reactions. *Synthesis.* **2000**; 6; 862-868.

118. Das, S. K. and Roy, R. Mild ruthenium-catalyzed intermolecular alkyne cyclotrimerization. *Tetrahedron Letters*. **1999**; 40; 4015-4018.
119. Page, D. R. Synthesis of divalent α -D-mannopyranosylated clusters having enhanced binding affinities towards concanavalin A and pea lectins. *Bioorg. Med. Chem Lett*. **1996**; 6; 1765-1770.
120. Lehmann, J. W. Synthesis and application of α -D-mannosyl clusters as photoaffinity ligands for mannose-binding proteins: Concanavalin A as a model receptor. *Carbohydr. Res*. **1996**; 294; 65-94.
121. Roy, R.; Das, S. K.; Santoyo-González, F.; Hernández-Mateo, F.; Dam, T. K. and Brewer, C.F. Synthesis of "Sugar-Rods" with Phytohemagglutinin Cross-Linking Properties by Using the Palladium-Catalyzed Sonogashira Reaction. *Chemistry - A European Journal*. **2000**; 6; 1757-1762.
122. Gan, Z. and Roy, R. Transition metal-catalyzed syntheses of 'rod-like' thioglycoside dimers. *Tetrahedron Letters*. **2000**; 41; 1155-1158.
123. Sengupta, S. and Sadhukhan, S. K. Synthetic studies on dendritic glycoclusters: a convergent palladium-catalyzed strategy. *Carbohydrate Research*. **2001**; 332; 215-219.
124. Sharon, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem*. **2007**; 282; 2753-2764.
125. André, S.; Kojima, S.; Yamazaki, N.; Fink, C.; Kaltner, H.; Kayser, K. and Gabius, H. J. Galectins-1 and -3 and their ligands in tumor biology. *Cancer Res. Clin. Oncol*. **1999**; 125; 461-474.
126. Ingrassia, L.; Camby, I.; Lefranc, F.; Mathieu, V.; Nshimyumukiza, P.; Darro, F. and Kiss, R. Anti-galectin compounds as potential anti-cancer drugs. *Curr. Med. Chem*. **2006**; 13; 3513-3527.
127. Barondes, S.H.; Cooper, D.N.W.; Gitt, M. A. and Leffler, H. Galectins. structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem*. **1994**; 269; 20807-20810.
128. Hasan, S.S.; Ashraf, G. M. and Banu, N. Galectins - potential targets for cancer therapy. *Cancer Lett*. **2007**; 253; 25-33.
129. Henrick, K.; Bawumia, S.; Barboni, E. A. M.; Mehul, B. and Hughes, R. C. Evidence for subsites in the galectins involved in sugar binding at the nonreducing end of the central galactose of oligosaccharide ligands: sequence analysis, homology modeling and mutagenesis studies of hamster galectin-3. *Glycobiology*. **1998**; 8; 45-57.

130. Barondes, S. H.; Castronovo, I. V.; Cooper, D. N. W.; Cummings, R. D.; Drickamer, K.; Feizi, T.; Gitt, M. A.; Hirabayashi, J.; Hughes, C.; Kasai, K.; Leffler, H.; Liu, F. T.; Lotan, R.; Mercurio, A. M.; Monsigny, M.; Pillai, S.; Poirer, F.; Raz, A.; Rigby, P. W. J.; Rini, J. M. and Wang, J. L. Galectins: a family of animal β -galactoside-binding lectins. *Cell*. **1994**; 76; 597-598.
131. Nangia-Makker, P.; Conklin, J.; Hogan, V. and Raz, A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *TRENDS Mol. Med.* **2002**; 8; 187-192.
132. Sharon, N. and Lis, H. How proteins bind carbohydrates: Lessons from legume lectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**; 50; 6586-6591.
133. Rüdiger, H. and Gabius, H. J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*. **2002**; 18; 589-613.
134. Müthing, J.; Burg, M.; Möckel, B.; Langer, M.; Metelmann-Strupat, W.; Werner, A.; Neumann, U.; Peter-Katalinic, J. and Eck, J. Preferential binding of the anticancer drug rViscumin (recombinant mistletoe lectin) to terminally α -2-6-sialylated neolacto-series gangliosides. *Glycobiology*. **2002**; 12; 485-497.
135. Müthing, J.; Meisen, I.; Kniep, B.; Haier, J.; Senninger, N.; Neumann, U.; Langer, M.; Witthohn, K.; Milosević, J. and Peter-Katalinić, J. Tumor-associated CD75s gangliosides and CD75s-bearing glycoproteins with Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc residues are receptors for the anticancer drug rViscumin. *The FASEB Journal*. **2004**; 19; 103-105.
136. Büssing, A.; Suzart, K.; Bergmann, J.; Pfüller, U.; Schietzel, M. and Schweizer, K. Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album L.* is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Letters*. **1996**; 99; 59-72.
137. Savoie, A.; Lavastre, V.; Pelletier, M.; Hajto, T.; Hostanska, K. and Girard, D. Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of *de novo* protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*. **2000**; 68; 845-853.
138. Lavastre, V.; Pelletier, M.; Saller, R.; Hostanska, K. and Girard, D. Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *The Journal of Immunology*. **2002**; 168; 1419-1427.

139. Mikeska, R.; Wacker, R.; Arni, R.; Singh, T.P.; Mikhailov, A.; Gabdoulkhakov, A.; Voelter, W. and Betzela, C. Mistletoe lectin I in complex with galactose and lactose reveals distinct sugar-binding properties. *Acta Crystallographica Section F*. **2005**; 61; 17-25.
140. Eck, J.; Langer, M.; Möckel, B.; Witthohn, K.; Zinke, H. and Lentzen, H. Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chains. *European Journal of Biochemistry*. **1999**; 265; 788-797.
141. Sweeney, E.C.; Tonevitsky, A.G.; Palmer, R.A.; Niwa, H.; Pfueller, U.; Eck, J.; Lentzen, H.; Agapov, I. I. and Kirpichnikov, M. P. Mistletoe lectin I forms a double trefoil structure. *FEBS Letters*. **1998**; 431; 367-370.
142. Huguet Soler, M.; Stoeva, S. and Voelter, W. Complete amino acid sequence of the B chain of mistletoe lectin I. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1998**; 246; 596-601.
143. Krauspenhaar, R.; Eschenburg, S.; Perbandt, M.; Kornilov, V.; Konareva, N.; Mikailova, I.; Stoeva, S.; Wacker, R.; Maier, T.; Singh, T.; Mikhailov, A.; Voelter, W. and Betzel, C. Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1999**; 257; 418-424.
144. Niwa, H.; Tonevitsky, A. G.; Agapov, I. I.; Seward, S.; Pfüller, U. and Palmer, R. A. Crystal structure at 3 Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome-inactivating protein, complexed with galactose. *European Journal of Biochemistry*. **2003**; 270; 2739-2749.
145. Eschenburg, S.; Krauspenhaar, R.; Mikhailov, A.; Stoeva, S.; Betzel, C. and Voelter, W. Primary structure and molecular modeling of mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1998**; 247; 367-372.
146. Lee, R. T.; Gabius, H. J.; Lee, Y. C. The sugar-combining area of the galactose-specific toxic lectin of mistletoe extends beyond the terminal sugar residue: comparison with a homologous toxic lectin, ricin. *Carbohydr. Res.* **1994**; 254; 269-276.
147. André, S.; Cejas Ortega, P. J.; Perez, M. A.; Roy, R. and Gabius, H. J. Lactose-containing starburst dendrimers: influence of dendrimer generation and binding-site orientation of receptors (plant/animal lectins and immunoglobulins) on binding properties. *Glycobiology*. **1999**; 9; 1253-1261.
148. André, S.; Frisch, B.; Kaltner, H.; Desouza, D.; Schuber, F. and Gabius, H. J. Lectin-Mediated Drug Targeting: Selection of Valency, Sugar Type (Gal/Lac), and

Spacer Length for Cluster Glycosides as Parameters to Distinguish Ligand Binding to C-Type Asialoglycoprotein Receptors and Galectins. *Pharm. Res.* **2000**; 17; 985-990.

149. Unverzagt, C.; André, S.; Seifert, J.; Kojima, S.; Fink, C. and Srikrishna, G. Structure–Activity Profiles of Complex Biantennary Glycans with Core Fucosylation and with/without Additional α 2,3/ α 2,6 Sialylation: Synthesis of Neoglycoproteins and Their Properties in Lectin Assays, Cell Binding, and Organ Uptake. *Journal of Medicinal Chemistry.* **2001**; 45; 478-491.

150. Galanina, O.E.; Kaltner, H.; Khraltsova, L. S.; Bovin, N. V. and Gabius, H. J. Further refinement of the description of the ligand-binding characteristics for the galactoside-binding Mistletoe lectin, a plant agglutinin with immunomodulatory potency. *Journal of Molecular Recognition.* **1997**; 10; 139-147.

151. Alonso-Plaza, J. M.; Canales, M. A.; Jiménez, M.; Roldán, J. L.; García-Herrero, A. and Iturrino, L.. NMR investigations of protein–carbohydrate interactions: insights into the topology of the bound conformation of a lactose isomer and β -galactosyl xyloses to mistletoe lectin and galectin-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* **2001**; 1568; 225-236.

152. Jimenez, M.; Andre, S.; Siebert, H. C.; Gabius, H. J. and Solis, D. AB-type lectin (toxin/agglutinin) from mistletoe: differences in affinity of the two galactoside-binding Trp/Tyr-sites and regulation of their functionality by monomer/dimer equilibrium. *Glycobiology.* **2006**; 16; 926-937.

153. Dettmann, W.; Grandbois, M.; André, S.; Benoit, M.; Wehle, A. K. and Kaltner Differences in Zero-Force and Force-Driven Kinetics of Ligand Dissociation from β -Galactoside-Specific Proteins (Plant and Animal Lectins, Immunoglobulin G) Monitored by Plasmon Resonance and Dynamic Single Molecule Force Microscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **2000**; 383; 157-170.

154. Vornholt, W.; Hartmann, M. and Keusgen, M. SPR studies of carbohydrate-lectin interactions as useful tool for screening on lectin sources. *Biosensors and Bioelectronics.* **2007**; 22; 2983-2988.

155. Muñoz, F.J.; Rumbero, A.; Sinisterra, J. V.; Santos, J. I.; André, S.; Gabius, H. J.; Jiménez-Barbero, J. and Hernáiz, M. J. Versatile strategy for the synthesis of biotin-labelled glycans, their immobilization to establish a bioactive surface and interaction studies with a lectin on a biochip. *Glycoconjugate J.* **2008**; 25; 633-646.

156. Muñoz, F.J.; Pérez, J.; Rumbero, A.; Santos, J. I.; Cañada, F. J.; André, S.; Gabius, H. J.; Jiménez-Barbero, J.; Sinisterra, J. V. and Hernáiz, M. J. Glycan Tagging

to Produce Bioactive Ligands for a Surface Plasmon Resonance (SPR) Study via Immobilization on Different Surfaces. *Bioconjugate Chemistry*. **2009**; 20; 673-682.

157. Muthing, J.; Burg, M.; Mockel, B.; Langer, M.; Metelmann-Strupat, W. and Werner, A. Preferential binding of the anticancer drug rViscumin (recombinant mistletoe lectin) to terminally alpha2-6-sialylated neolacto-series gangliosides. *Glycobiology*. **2002**; 12; 485-497.

158. Muthing, J.; Meisen, I.; Bulau, P.; Langer, M.; Witthohn, K. and Lentzen, H. Mistletoe lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Ac alpha 2-6Gal beta 1-4GlcNAc residues. *Biochemistry*. **2004**; 43; 2996-3007.

159. André, S.; Kožár, T.; Schuberth, R.; Unverzagt, C.; Kojima, S. and Gabius, H. J. Substitutions in the N-Glycan Core as Regulators of Biorecognition: The Case of Core-Fucose and Bisecting GlcNAc Moieties. *Biochemistry*. **2007**; 46; 6984-6995.

160. André, S.; Pei, Z.; Siebert, H. C.; Ramström, O. and Gabius, H. J. Glycosyldisulfides from dynamic combinatorial libraries as O-glycoside mimetics for plant and endogenous lectins: Their reactivities in solid-phase and cell assays and conformational analysis by molecular dynamics simulations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2006**; 14; 6314-6326.

161. Vo-Dinh, T. B. Cullum. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. **2000**; 366; 540-551.

162. Turner, A. P.F.; Karube, I.; Wilson, G. S. Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press. **1989**.

163. Karlsson, R. SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *J. Mol. Recognition*. **2004**; 17; 151-161.

164. Szabo, A.; Stolz, L. and Granzow, R. Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**; 5; 699-705.

165. Torreri, P.; Ceccarini, M.; Macioce, P.; Petrucci, T. C. Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology. *Ann. Ist. Super. Sanita*. **2005**; 41; 437-441.

166. Myszka, D. G. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**; 8; 50-74.

167. Van der Merwe, P. A.; Harding, S. and Chowdhry, P. Z. Surface Plasmon Resonance. In Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry. Oxford University Press. **2001**; 137-170.

168. Duverger, E.; Frison, N.; Roche, A. C. and Monsigny, M. Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance. *Biochimie*. **2003**; 85; 167-179.
169. Shinohara, Y.; Hasegawa, Y.; Kaku, H. and Shibuya, N. Elucidation of the mechanism enhancing the avidity of lectin with oligosaccharides on the solid phase surface. *Glycobiology*. **1997**; 7; 1201-1208.
170. Shinohara, Y.; Kim, F.; Shimizu, M.; Goto, M.; Tosu, M. and Hasegawa, Y. Kinetic measurement of the interaction between an oligosaccharide and lectins by a biosensor based on surface plasmon resonance. *Eur. J. Biochem*. **1994**; 223; 189-194.
171. Nahalkova, J.; Svitel, J.; Gemeiner, P.; Danielsson, B.; Pribulova, B. and Petrus, L. Affinity analysis of lectin interaction with immobilized C- and O- glycosides studied by surface plasmon resonance assay. *J. Biochem. and Biophys. Methods*. **2002**; 52; 11-18.
172. Karamanska, R.; Clarke, J.; Blixt, O.; Macrae, J. I.; Zhang, J. Q.; Crocker, P. R.; Laurent, N.; Wright, A.; Flitsch, S. L.; Russell, D. A. and Field, R. A. Surface plasmon resonance imaging for real-time, label-free analysis of protein interactions with carbohydrate microarrays. *Glycoconjugate J*. **2008**; 25; 69-74.
173. Muñoz, E.; Xu, D.; Avci, F.; Kemp, M.; Liu, J. and Linhardt, R. J. Enzymatic synthesis of heparin related polysaccharides on sensor chips: rapid screening of heparin-protein interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2006**; 339; 597-602.
174. Hernáiz, M. J.; Liu, J.; Rosenberg, R. D. and Linhardt, R. J. Enzymatic modification of heparan sulfate on a biochip promotes its interaction with antithrombin III. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2000**; 276; 292-297.
175. Plath, C.; Weimar, T.; Peters, H. and Peters, T. Assaying Sialyltransferase activity with surface plasmon resonance. *ChemBioChem*. **2006**; 7; 1226-1230.
176. Claridge, T. D. W. High-resolution NMR techniques in organic chemistry. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo: Pergamon. Elsevier Science; **1999**.
177. Jiménez-Barbero, J. and Peters, T. NMR spectroscopy of glycoconjugates. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.; **2003**.
178. Kogelberg, H.; Solis, D. and Jiménez-Barbero, J. New structural insights into carbohydrate-protein interactions from NMR spectroscopy. *Current Opinion in Structural Biology*. **2003**; 13; 1-8.

179. Balaram, P.; Bothner-By, A. A. and Dadok, J. Negative nuclear Overhauser effects as probes of macromolecular structure. *Journal of the American Chemical Society*. **1972**; 94; 4015-4017.
180. Mayer, M. and Meyer, B. Characterization of ligand binding by Saturation Transfer Difference NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie Int. Ed.* **1999**; 38; 1784-1788.
181. Meyer, B. and Peters, T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angewandte Chemie Int. Ed.* **2003**; 42; 864-890.
182. Meyer, B.; Weimar, T. and Peters T. Screening mixtures for biological activity by NMR. *European Journal of Biochemistry*. **1997**; 246; 705-709.
183. Lycknert, K.; Edblad, M.; Imberty, A. and Widmalm, G. NMR and molecular modeling studies of the interaction between wheat germ agglutinin and the b-D-GlcpNAc-(1g6)-a-D-Manp epitope present in glycoproteins of tumor cells. *Biochemistry*. **2004**; 43; 9647-9654.
184. Asensio, J. L.; Espinosa, J.F.; Dietrich, H.; Cañada, F. J.; Schmidt, R. R. and Martín-Lomas, M.. Bovine Heart Galectin-1 Selects a Unique (Syn) Conformation of C-Lactose, a Flexible Lactose Analogue. *Journal of the American Chemical Society*. **1999**; 121; 8995-9000.
185. Mikkelsen, L. M.; Hernáiz, M. J.; Martín-Pastor, M.; Skrydstrup, T. and Jiménez-Barbero, J. Conformation of glycomimetics in the free and protein-bound state: structural and binding features of the C-glycosyl analogue of the core trisaccharide a-D-Man-(1-3)-[a-D-Man-(1-6)]-D-Man. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**; 124; 14940-14951.
186. Fernández-Alonso, M. C.; Cañada, F. J.; Solís, D.; Cheng, X.; Kumaran, G.; André, S.; Siebert, H. C.; Mootoo, D. R.; Gabius, H. J. and Jiménez-Barbero, J. Computational and experimental NMR definition of differences in the conformational behavior of free and lectin-bound glycomimetic aza/carba-lactosides. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**; 7; 1604-1613.
187. Moller, H.; Serttas, N.; Paulsen, H. and Burchell, J. M. Taylor-Papadimitriou J. NMR-based determination of the binding epitope and conformational analysis of MUC-1 glycopeptides and peptides bound to the breast cancer-selective monoclonal antibody SM3. *European Journal of Biochemistry*. **2002**; 269; 1444-1455.
188. Siebert, H. C.; Andre, S.; Asensio, J. L.; Canada, F. J.; Dong, X. and Espinosa, J. F. A new combined computational and NMR-spectroscopical strategy for the

identification of additional conformational constraints of the bound ligand in an aprotic solvent. *ChemBioChem*. **2000**; 1; 181-195.

189. Asensio, J. L.; Martin-Pastor, M. and Jiménez-Barbero, J. The use of cvff and cff91 force-fields in conformational-analysis of carbohydrate molecules. Comparison with amber molecular mechanics and dynamics calculations for methyl alpha-lactoside. *Int. J. Biol. Macromol.* **1995**; 17; 137-148.

190. Poveda, A.; Asensio, J. L.; Martin-Pastor, M. and Jiménez-Barbero, J. Solution conformation and dynamics of a tetrasaccharide related to the Lewis(x) antigen deduced by NMR relaxation measurements. *Journal of Biomolecular NMR*. **1997**; 10; 29-43.

191. Espinosa, J. F.; Cañada, F. J.; Asensio, J. L.; Martín-Pastor, M.; Dietrich, H.; Martín-Lomas, M.; Schmidt, R. R. and Jiménez-Barbero, J. Experimental evidence of conformational differences between C-glycosides and O-glycosides in solution and in the protein-bound state: The C-lactose/O-lactose case. *Journal of the American Chemical Society*. **1996**; 118; 10862-10871.

192. Mayer, M. and Meyer, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *Journal of the American Chemical Society*. **2001**; 123; 6108-6117.

193. Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M. and Meyer, B. Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR. *Journal of the American Chemical Society*. **1999**; 121; 5336-5337.

194. Meinecke, R. and Meyer, B. Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR: RGD peptide ligands binding to integrin alphaIIb beta3. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2001**; 44; 3059-3065.

195. Claasen, B.; Axmann, M.; Meinecke, R. and Meyer, B. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin alpha(IIb)beta3 in native platelets than in liposomes. *Journal of the American Chemical Society*. **2005**; 127; 916-919.

196. Angulo, J.; Langpap, B.; Blume, A.; Biet, T.; Meyer, B.; Krishna, N. R.; Peters, H.; Palcic, M. M. and Peters, T. Blood group B galactosyltransferase: Insights into substrate binding from NMR experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**; 128; 13529-13538.

197. Blume, A.; Angulo, J.; Biet, T.; Peters, H.; Benie, A. J.; Palcic, M. and Peters, T. Fragment-based screening of the donor substrate specificity of human blood group B

- galactosyltransferase using saturation transfer difference NMR. *J. Biol. Chem.* **2006**; 281; 32728-32740.
198. Berteau, O.; Sandström, C.; Bielicki, J.; Anson, D. S. and Kenne, L. Glycosidase-substrate interactions analysis by STD-NMR spectroscopy: Study of α -L-fucosidase. *Journal of the American Chemical Society.* **2003**; 125; 15296-15297.
199. Bhunia, A.; Jayalakshmi, V.; Benie, A. J.; Schuster, O.; Kelm, S.; Krishna, N. R. and Peters, T. Saturation transfer difference NMR and computational modeling of a sialoadhesin-sialyl lactose complex. *Carbohydrate Research.* **2004**; 339; 259-267.
200. Haselhorst, T.; Weimar, T. and Peters, T. Molecular recognition of sialyl Lewis^x and related saccharides by two lectins. *Journal of the American Chemical Society.* **2001**; 123; 10705-10714.
201. Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer. **2006**.
202. Stryjewski, W. and Wasylewski, Z. The resolution of heterogeneous fluorescence of multitryptophan-containing proteins studied by a fluorescence-quenching method. *European Journal of Biochemistry.* **1986**; 158; 547-553.
204. O'Brien, R.; Ladbury, J. E. and Chowdry, B.Z. Isothermal titration calorimetry of biomolecules. Ed Harding, SE, Oxford University Press. **2000**.
205. Dam, T. K. and Brewer, C. F. Thermodynamic Studies of Lectin–Carbohydrate Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. *Chemical Reviews.* **2002**; 102; 387-430.
206. Bachhawat-Sikder, K.; Thomas, C. J. and Surolia, A. Thermodynamic analysis of the binding of galactose and poly-N-acetyllactosamine derivatives to human galectin-3. *FEBS Letters.* **2001**; 500; 75-79.
207. Brewer, C. F. Thermodynamic binding studies of galectin-1, -3 and -7. *Glycoconj J.* **2002**; 19; 459-465.
208. Krainer, G.; Broecker, J.; Vargas, C.; Fanghänel, J. and Keller, S. Quantifying High-Affinity Binding of Hydrophobic Ligands by Isothermal Titration Calorimetry. *Analytical Chemistry.* **2012**; 84; 10715-10722.
209. Pochetti, G. and Montanari, R. Isothermal titration calorimetry to determine the association constants for a ligand bound simultaneously to two specific protein binding sites with different affinities. *Protocol Exchange, Nature Publishing Group.* **2012**.
210. Zhou, X.; Kini, R. M. and Sivaraman, J. Application of isothermal titration calorimetry and column chromatography for identification of biomolecular targets. *Nat. Protocols.* **2011**; 6; 158-165.

211. Bec, G.; Meyer, B.; Gerard, M. A.; Steger, J.; Fauster, K. and Wolff, P. Thermodynamics of HIV-1 Reverse Transcriptase in Action Elucidates the Mechanism of Action of Non-Nucleoside Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*. **2013**; 135; 9743-9752.
212. Martos-Maldonado, M. C.; Casas-Solvas, J. M.; Quesada-Soriano, I.; García-Fuentes, L. and Vargas-Berenguel, A. Poly(amido amine)-Based Mannose-Glycodendrimers As Multielectron Redox Probes for Improving Lectin Sensing. *Langmuir*. **2013**; 29; 1318-1326.
213. Berthet, N.; Thomas, B.; Bossu, I.; Dufour, E.; Gillon, E. and Garcia, J. High Affinity Glycodendrimers for the Lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioconjugate Chemistry*. **2013**; 24; 1598-1611.
214. Mukherjee, D.; Ali Shah, B.; Gupta, P. and Taneja, S. C. Tandem Acetalation–Acetylation of Sugars and Related Derivatives with Enolacetates under Solvent-Free Conditions. *The Journal of Organic Chemistry*. **2007**; 72; 8965-8968.
215. Lemieux, R. U. and Koto, S. The conformational properties of glycosidic linkages. *Tetrahedron*. **1974**; 30; 1933-1944.
216. Sonogashira, K.; Tohda, Y. and Hagihara, N. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Letters*. **1975**; 16; 4467-4470.
217. Rodríguez, J. G. and Esquivias, J. Synthesis of nanostructures based on 1,4- and 1,3,5-phenylethynyl units with π -extended conjugation. Carbon networks dendrimer base units. *Tetrahedron Letters*. **2003**; 44; 4831-4834.
218. Dabdoub, M. J.; Dabdoub, V. B. and Lenardão, E. J. Synthesis of 1-methyl-4-alkyl-1,3-diacetylenes. Prototropic rearrangement in 1-alkyl-1,3-diacetylenes. *Tetrahedron Letters*. **2001**; 42; 1807-1809.
219. Rodríguez, J. G.; Tejedor, J. L.; Esquivias, J. and Díaz, C. Synthesis of carbon dendron nano-chains with π -extended conjugation based on linear 1,4-phenylethynyl and 1,5-naphthylethynyl subunits. *Tetrahedron Letters*. **2003**; 44; 6375-6378.