



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Síntesis y análisis conformacional de glicopéptidos que incorporan β-glucosa y α-N-acetilgalactosamina
Autor/es
Víctor Jesús Somovilla Busto
Director/es
Jesús Manuel Peregrina García y Francisco Corzana López
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Química
Curso Académico
2014-2015



Síntesis y análisis conformacional de glicopéptidos que incorporan β -glucosa y α -N-acetilgalactosamina, tesis doctoral

de Víctor Jesús Somovilla Busto, dirigida por Jesús Manuel Peregrina García y Francisco Corzana López (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

FACULTAD DE CIENCIAS, ESTUDIOS
AGROALIMENTARIOS E INFORMÁTICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ÁREA DE QUÍMICA ORGÁNICA



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

TESIS DOCTORAL

Síntesis y análisis conformacional de glicopéptidos que incorporan β -glucosa y α -*N*-acetilgalactosamina

Memoria presentada en la Universidad de
La Rioja para optar al grado de Doctor en
Química por

Víctor J. Somovilla Busto

Octubre 2014

JESÚS MANUEL PEREGRINA GARCÍA, Catedrático de Química Orgánica del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja y

FRANCISCO CORZANA LÓPEZ, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja

CERTIFICAN:

*Que la memoria "**SÍNTESIS Y ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE GLICOPÉPTIDOS QUE INCORPORAN β -GLUCOSA Y α -N-ACETILGALACTOSAMINA**" ha sido realizada por el Licenciado **Víctor J. Somovilla Busto** en el Departamento de Química de la Universidad de La Rioja bajo su inmediata dirección y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Química.*

Logroño, Octubre 2014

Fdo.: Jesús Manuel Peregrina García

Fdo.: Francisco Corzana López

A la familia y amigos.

A quien le haga ilusión...

Me gustaría agradecer a las siguientes instituciones la ayuda económica aportada para la realización de este proyecto:

- Ministerio de Ciencia e Innovación por la beca F.P.I. concedida en el 2010
- Universidad de La Rioja, por su apoyo en forma de proyectos y ayudas a tesis doctorales (ATUR), así como por conformar el marco humano y tecnológico idóneo para el desarrollo de este trabajo.
- Gobierno de La Rioja, por su aportación económica en forma de proyectos COLABORA.
- Ministerio de Ciencia e Innovación por su aportación económica al proyecto *“Síntesis y análisis conformacional de O-glicopéptidos de interés estructural y biológico”* (CTQ2009–013814).
- Ministerio de Economía y Competitividad por su aportación económica al proyecto *“Diseño racional de glicopéptidos con aplicaciones en química biológica”* (CTQ2012–36365).

El campo de la glicobiología, es decir, el estudio de carbohidratos, glicopéptidos y glicoproteínas, ha experimentado un gran auge en las últimas dos décadas debido a la multitud de procesos fundamentales en los que se ven inmersos este tipo de moléculas. Uno de estos procesos es el reconocimiento molecular de un determinado ligando (carbohidrato, péptido o glicopéptido) por parte de un receptor (proteína). Además, es bien sabido que esta interacción está íntimamente ligada con la estructura tridimensional tanto del receptor como del ligando. Por todo ello, la presente tesis doctoral busca en primer lugar, disponer de nuevos glicosilaminoácidos no naturales que muestran conformaciones distintas a las exploradas por sus análogos naturales. Para ello, se recurre a la síntesis de derivados que incorporan aminoácidos de diseño, en concreto, aminoácidos α,α -disustituidos. Una vez conocidas las preferencias estructurales de estos nuevos residuos, se pueden desarrollar derivados glicosilados con conformaciones a la carta.

Otro aspecto que se estudia en la presente Tesis Doctoral es averiguar por qué la glucosa se encuentra unida a Ser cuando ésta se encuentra flanqueada por una determinada secuencia peptídica (secuencia de consenso). En concreto, se ha estudiado la secuencia que con frecuencia incorpora la β -O-glucosilación. Con este objetivo, se han sintetizado dos péptidos y un glicopéptido, y como una primera aproximación se muestra que la disposición del grupo hidroxilo que después va a ser glicosilado se encuentra expuesto hacia el disolvente de tal manera que facilitaría la unión del carbohidrato.

Por otra lado, otra parte del trabajo, arroja algo de luz a la controversia que existe acerca del papel que la parte peptídica juega en el reconocimiento de

glicopéptidos por lectinas. En este sentido, se han sintetizado dos glicopéptidos ricos en glicinas, Gly-Gly-Xxx-Gly-Gly, donde Xxx puede ser Thr/Ser(α -O-GalNac). Además, se ha llevado a cabo el estudio conformacional de ambos, en el estado libre y en el estado asociado y se han determinado experimentalmente los valores termodinámicos de la interacción de cada una de las lectinas con ambos glicopéptidos, a través de microcalorimetrías. En esta parte de la Tesis se deja claro que el aminoácido al que está unido la α -N-acetilgalactosmina no es un mero espectador en el proceso de reconocimiento molecular de dicho carbohidrato por parte de la lectina (proteína), sino que presenta un claro papel como agente modulador.

In the last two decades, the glycobiology field, which comprises the study of carbohydrates, glycopeptides and glycoproteins, has attracted considerable attention due to these molecules are involved in many fundamental processes of the life. One of these processes is known as molecular recognition of ligands by receptors. In particular, this interaction is tightly related to the 3D structure they adopt.

In this context, this Thesis focuses on searching new non-natural glycosylamino acids that display different conformations from those that adopt glycosylated natural amino acids. In this sense, several glycosylamino acids have been synthesized, which incorporate α,α -disubstituted amino acids. The structural preferences of these new compounds were elucidated, combining NMR experiments and Molecular Dynamics simulations. As a result, the synthetic modifications made in the amino acid moiety can be regarded as a tool to develop glycosylated derivatives with conformations *a la cartè*.

Another issue which this Thesis focuses on, is to find out why glucose only appear linked to serine, when it is incorporated in a certain peptide sequence (consensus sequence). In particular, in this work, we studied the consensus sequence for β -O-glycosylation with glucose. For this purpose, two peptides and one glycopeptide were synthesized. As a first approaching, we calculated the spatial distribution of the hydroxyl group of serine, that later will be glycosylated, and interestingly it is exposed to the solvent, therefore the glycosylation would be easier.

On the other hand, this Thesis tries to shed some light to the controversial about the role that peptide moiety plays in the molecular recognition of glycopeptides by lectins. In this regard, two glycine rich glycopeptides were

synthesized, Gly-Gly-Xxx-Gly-Gly, where Xxx was replaced by Thr/Ser(α -O-GalNac). Besides, conformational studies both in the free and bound-states were developed. In addition, thermodynamic parameters corresponding to molecular recognition of each glycopeptides by two specific lectins were obtained by microcalorimetry. All this work shows the importance of the amino acid linked to the carbohydrate plays in the molecular recognition process. In fact, it is not a mere spectator but it develops a role as modulator agent.

Índice

Abreviaturas, siglas, acrónimos y símbolos	I
1. Introducción	1
2. Antecedentes	13
2.1. Conceptos relevantes en el análisis conformacional de péptidos y glicopéptidos	15
2.2. Influencia que la β -glucosa tiene sobre la conformación de la cadena peptídica.....	23
2.3. Preferencias conformacionales de glicosilaminoácidos que incorporan aminoácidos no naturales	25
2.4. Bibliografía.....	36
3. Objetivos	39
4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos	43
4.1. Introducción	45
4.2. Objetivos	46
4.3. Discusión de resultados	47
4.3.1. <i>Síntesis</i>	47
4.3.2. <i>Estudio conformacional</i>	64
4.3.3. <i>Extrapolación de los resultados obtenidos a péptidos de mayor tamaño</i>	82
4.4. Conclusión	85

4.5. Bibliografía.....	86
5. Secuencia de consenso para la glicosilación con β-O-glucosa	89
5.1. Introducción	91
5.2. Objetivos	91
5.3. Discusión de resultados.....	92
5.3.1. <i>Síntesis</i>	92
5.3.2. <i>Estudio conformacional</i>	98
5.4. Conclusión	111
5.4. Bibliografía.....	113
6. Reconocimiento del antígeno Tn por lectinas: Ser vs Thr	115
6.1. Introducción	117
6.2. Objetivos	119
6.3. Discusión de resultados.....	121
6.3.1. <i>Síntesis</i>	121
6.3.2. <i>Elección de las lectinas</i>	125
6.3.3. <i>Estudios de afinidad</i>	127
6.3.4. <i>Estudio conformacional</i>	129
6.4. Conclusión	141
6.5. Bibliografía.....	143
7. Conclusiones	147
8. Supplementary information.....	153

8.1. Instrumentation and general procedures	155
8.2. General procedures to obtain peptides and glycopeptides by SPPS ..	156
8.3. Experimental section of the chapter 4	157
8.4. Experimental section of the chapter 5	186
8.5. Experimental section of the chapter 6	195
8.6. 1D- and 2D-NMR spectra. 2D-NOESY spectra and build-up curves (NMR)	204
8.7. X-Ray diffraction	246
8.8. References	248
Anexos	249
Anexo I. Síntesis de péptidos y glicopéptidos en fase sólida	251
Anexo II. Técnicas de RMN	260
Anexo III. Cálculos de dinámica molecular (DM)	263
Anexo IV. Microcalorimetrías	268
Anexo V. Bibliografía	271

Abreviaturas, siglas, acrónimos y símbolos

δ	desplazamiento químico
ΔG	variación de energía libre de Gibbs
ΔH	variación de la entalpía
ΔS	variación de la entropía
Ac	acetilo
Acm	acetamidometil
Ala	alanina
arom	aromático
atm	atmósfera
Asn	asparagina
BAM	benzamidoacrilato de metilo
Bn	bencilo
Boc	<i>terc</i> -butoxicarbonilo
Bu	butilo
^tBu	<i>terc</i> -butilo
Bz	benzoilo

II

c₄Ser	ácido 1-amino-2-hidroxiciclobutano-1-carboxílico
c₆Ser	ácido 1-amino-2-hidroxiciclohexano-1-carboxílico
CAN	nitrato de cerio y amonio
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
Cy	ciclohexilo
Cys	cisteína
d	doblete
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
dd	doblete de dobletes
DFT	teoría de densidad funcional
DIEA	diisopropiletilamina
DMAP	dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DO	densidad óptica
EDT	etanoditol
EGF	factor de crecimiento epidérmico

ELLA	<i>enzyme-linked lectin assay</i>
ESI	ionización por electrospray
Et	etilo
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
Fuc	fucosa
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
Glc	glucosa
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
Gly	glicina
HATU	1-(bis(dimetilamino)metileno)-1H-1,2,3-triazol(4,5-b)piridinio 3-oxido hexafluorofosfato
HBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio hexafluorofosfato
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	comatografía líquida de alta resolución
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPA	<i>Helix pomatia</i> aglutinina
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución

IV

HRMS	espectrometría de masas de alta resolución
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
ID	identificador
ITC	calorimetría isoterma de titulación
<i>J</i>	constante de acoplamiento
K_d	constante de disociación
m	multiplete
Man	manosa
MBHA	metilbencilhidrilamina
MD	<i>molecular dynamics</i>
MD-tar	<i>molecular dynamics with time average restraints</i>
Me	metilo
MeSer	metilserina
MeThr	metiltreonina
MM	mecánica molecular
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
PDB	base de datos de proteínas

Ph	fenilo
Phe	fenilalanina
Piv	pivaloilo
PPII	poliprolina
ppm	partes por millón
Pro	prolina
py	piridina
R	sustituyente alquilo o arilo
ref.	referencia
RMN	resonancia magnética nuclear
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
Rto	rendimiento
s	singlete
SBA	soybean aglutinina
Ser	serina
STD	<i>Saturation transfer difference</i> (Diferencia de Transferencia de Saturación)
T	temperatura
t	triplete
t.a.	temperatura ambiente

VI

TBTU	tetrafluoroborato de <i>O</i> -benzotriazol-1-il- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
TEA	triethylamina
TFA	ácido trifluoroacético
TfO	triflato
TfOH	ácido trifluorometanosulfónico (ácido tríflico)
THF	tetrahidrofurano
Thr	treonina
TIS	triisopropilsililo
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TMS	tetrametilsilano, trimetilsililo
TMSI	yoduro de trimetilsilano
Trt	trifenilmetilo (tritilo)
T_r	tiempo de reacción
Ts	<i>p</i> -toluensulfonilo (tosilo)
UV	ultravioleta
VVA	<i>Vicia villosa</i> aglutinina
Xyl	xilosa

No se han incluido los símbolos de magnitudes y unidades del Sistema Internacional.



1. Introducción

La Química de los Carbohidratos es una parte de la Química Orgánica que ha adquirido entidad propia desde los comienzos del siglo XX, probablemente debido a la importancia química, biológica e industrial de estas sustancias. Ya muy avanzada la segunda mitad del siglo XX, sucedieron dos hitos que han potenciado a la Química de Carbohidratos como una de las áreas con más desarrollo dentro de la Química Orgánica actual. El primero fue el descubrimiento de las importantes y variadas actividades biológicas de los carbohidratos y sus derivados, que ha dado lugar a una nueva rama interdisciplinar de la Ciencia que se ha llamado Glicobiología.^[1] El segundo hecho se debió a la toma de conciencia del potencial sintético de los carbohidratos, ya que estos constituyen una fuente de quiralidad natural abundante, versátil y barata. La polifuncionalidad de las moléculas de carbohidrato, el gran número de posibilidades estereoquímicas y la reactividad, especialmente del carbono anomérico, son un reto para el desarrollo de procesos de síntesis donde los carbohidratos son materias primas, intermedios quirales clave, auxiliares o inductores quirales.

La Glicobiología ha sido calificada como una de las diez ciencias más importantes del futuro por el *Massachusetts Institute of Technology* (M.I.T.). Sobre todo, y gracias en gran medida, a su potencial en la elaboración de vacunas contra enfermedades inmunológicas, sin olvidar otros usos como la cosmética o la nutrición. Dicha ciencia, frontera entre la biología y la química de carbohidratos, ha experimentado gran auge en los últimos años, ya que su investigación supone un reto indudable para el entendimiento de las funciones llevadas a cabo por los carbohidratos.

Los carbohidratos son moléculas de gran abundancia en la naturaleza, no hay duda de que su presencia en la superficie celular juega un papel clave en

variedad de procesos biológicos. Podemos encontrarlos formando parte de los glicolípidos (carbohidratos unidos a lípidos) y de las glicoproteínas (carbohidratos unidos a proteínas), los cuales están presentes en muchos e importantes procesos celulares que ocurren en nuestro organismo. Por ejemplo, la especificidad de los grupos sanguíneos (A, B, AB y O) viene determinada por la diferente parte carbohidrato que contienen ciertas glicoproteínas presentes en la superficie de los glóbulos rojos de la sangre. Además, las glicoproteínas también están involucradas en el desarrollo neuronal, en la actividad hormonal, en la respuesta inmune y en procesos inflamatorios y de fertilización.^[2-5]

Un aspecto interesante de estos glicanos es su papel post-traducciona como “control de calidad” en la síntesis de proteínas.^[6-8] Por otro lado, se conoce que los carbohidratos unidos a la proteína alteran la estructura y en consecuencia, la función de ésta.^[9,10] Además, la glicosilación parece aumentar la estabilidad de la proteína reduciendo su vulnerabilidad a la degradación proteolítica, lo cual ayuda a su transporte.^[11] La glicosilación anormal puede provocar variaciones en el plegamiento de las proteínas alterando su estructura terciaria. Además, este tipo de errores post-traduccionales están asociados con fallos en el sistema inmune así como con enfermedades infecciosas y cáncer.

Los carbohidratos alteran también otras propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Por ejemplo, las denominadas glicoproteínas anticongelantes^[12-14] permiten sobrevivir a temperaturas muy bajas a animales que habitan en aguas polares. Estas glicoproteínas inhiben el crecimiento de cristales de hielo en su interior, evitando así la congelación de los fluidos de estos

organismos vivos. Esta característica ha suscitado un enorme interés en medicina y en la industria.

Así, la glicosilación constituye una herramienta imprescindible capaz de aumentar tanto el número de estructuras como la función de las proteínas de forma exponencial. Lo cual genera que esta modificación post-traduccional amplíe significativamente la información contenida en el genoma.^[15]

Además de la inherente variación en la configuración de los carbohidratos (glucosa, manosa...), otras variaciones como el tamaño del anillo, la ramificación, la configuración del carbono anomérico y modificaciones como la acilación, sulfuración y fosforilación proporcionan a estas moléculas gran diversidad estructural. Esta diversidad es explotada por la naturaleza a través de la combinación de los hidratos de carbono con proteínas. Por ello, el estudio de las glicoproteínas es imprescindible para comprender en profundidad la función de estos carbohidratos a nivel molecular, ya que a pesar de su obvia importancia, el acceso al entendimiento del papel que juega la glicosilación es más bien limitado.^[16]

En las células eucariotas, uno de los tipos de *O*-glicoproteínas más importantes lo constituyen las mucinas, las cuales se emplean como marcadores en el diagnóstico de ciertos tipos de cáncer. Estas glicoproteínas se caracterizan por poseer serinas y treoninas glicosiladas con α -*O*-GalNAc como primer carbohidrato. Por otro lado, las glicoproteínas glicosiladas con β -*O*-*N*-acetilglucosamina (β -*O*-GlcNAc) son también muy abundantes y poseen funciones biológicas de gran importancia. Por ejemplo, están involucradas en enfermedades degenerativas y diabetes. Existen otros tipos de *O*-glicosilación menos frecuentes, pero no por ello menos importantes,^[16]

como por ejemplo con β -glucosa (β -Glc), α -manosa^[17] (α -Man), α -fucosa^[18] (α -Fuc) o β -xilosa (β -Xyl).

Además de la *O*-glicosilación, como se ha comentado anteriormente, otra de las modificaciones post-traduccionales más importantes que pueden sufrir las proteínas es la *N*-glicosilación. Esta modificación se produce sobre el residuo de asparagina (Asn) con *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y también en ocasiones con carbohidratos más complejos.^[19,20] La secuencia de consenso para este tipo de glicosilación (llamada *sequon*) es la formada por Asn-Xxx-Thr/Ser, donde Asn es asparagina, Thr/Ser son treonina/serina y Xxx es cualquier aminoácido excepto prolina (Pro).^[21]

La presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de *O*-glicopéptidos, más concretamente en la β -*O*-glicosilación de aminoácidos, con glucosa, β -Glc (β -*O*-glicosilación), aunque también se realiza un pequeño análisis sobre péptidos α -*O*-glicosilados, con *N*-acetilgalactosamina, GalNAc.

La β -*O*-glicosilación es un tipo específico de glicosilación no muy habitual pero que ha atraído mucha atención en los últimos años al estar presente en glicoproteínas relacionadas con el factor de crecimiento epidérmico (EGF)^[22,23] y con el receptor de Notch.^[24] En concreto, la β -Glc unida a un residuo de serina se ha encontrado en una secuencia consenso determinada que aparece en dominios proteicos del EGF de diferentes proteínas.^[23] Sin embargo, desgraciadamente, todavía no se conoce bien la función estructural de la glucosa en estos sistemas y no está exenta de debate.

Los dominios EGF son pequeños motivos de unos 40 aminoácidos definidos por 6 cisteínas conservativas que forman tres enlaces disulfuro.^[25] Se sabe que estos fragmentos juegan un papel importante en las interacciones proteína-proteína, como por ejemplo, en la unión ligando-receptor.^[22]

Estudios recientes han demostrado que dichas interacciones receptor-ligando pueden verse afectadas por alteraciones en los carbohidratos que modifican estos dominios EGF. Además del EGF, varias seroproteínas como los factores de coagulación de la sangre bovina (factores VII y IX),^[26] factores de coagulación humanos (VII y IX), la proteína Z de plasma humano y bovino^[27] y la trombospondina^[28] presentan esta inusual modificación post-traducciona con *O*-glucosa. La comparación de los sitios de glicosilación en estas proteínas revela una secuencia consenso compuesta por: -Cys¹-Xxx-Ser-Yyy-Pro-Cys²- donde Cys¹ y Cys² son la primera y segunda cisteínas conservativas del dominio EGF, donde Xxx e Yyy puede ser cualquier aminoácido excepto Pro.^[23] Este caso, al contrario que para la mayoría de los tipos de *O*-glicosilación, constituye uno de los pocos ejemplos para los que existe una secuencia consenso clara. Este sitio de unión para la β -Glc parece, hasta ahora, estar limitado únicamente al residuo de Ser, y a su vez esta glucosa es, en muchas ocasiones, punto de unión de uno o dos residuos más de xilosa (Xyl).^[29]

Las funciones de los carbohidratos en estas las proteínas modificadas con β -Glc son, como se ha comentado, todavía desconocidas en la mayor parte de los casos. Sin embargo, en el factor VII humano, tras mutagénesis de la Ser glicosilada con β -Glc por alanina (Ala) se encontró que la actividad coagulante disminuía.^[30] Esta mutación lógicamente suprime la β -glucosilación, pero también lo hacen la reducción y la alquilación de los puentes disulfuro del EGF, lo cual sugiere que la enzima que añade el residuo de Glc reconoce no sólo la secuencia consenso en sí misma, sino también la estructura tridimensional del dominio EGF.^[22]

Por tanto, a la vista de la influencia que la glicosilación parece tener en la actividad biológica de las proteínas, es importante estudiar el papel que juega el carbohidrato sobre los cambios estructurales de dichas moléculas, los cuales son responsables de las variaciones en sus funciones biológicas. Por otro lado, otra aproximación interesante para estudiar en detalle la influencia que tienen los distintos elementos estructurales en las preferencias conformacionales de una molécula, es el diseño de glicopéptidos que incorporan aminoácidos no naturales. Estos nuevos glicopéptidos pueden estabilizar una conformación (por ejemplo, la conformación bioactiva) o bien exhibir conformeros que raramente se hayan observado en derivados naturales, modificándose así la unión a las moléculas diana. La mayor parte de las modificaciones estudiadas hasta el momento se han centrado en la parte del carbohidrato^[31-33] y raramente en la cadena peptídica.^[34] En este sentido, el campo de glicosilaminoácidos- α , α -disustituidos puede ser considerado una herramienta útil en el diseño de moléculas con un comportamiento conformacional novedoso respecto al observado para los compuestos naturales, como se describirá más detalladamente en el siguiente capítulo (antecedentes).^[35-38]

Con esta idea, en la presente Tesis Doctoral se pretende llevar a cabo el estudio de los efectos que la *O*-glicosilación tiene sobre la estructura de pequeños péptidos, así como modular sus conformaciones introduciendo pequeñas modificaciones en la cadena peptídica. De esta manera, combinando ambas modificaciones se podría ampliar el espacio conformacional de los glicopéptidos, fijando conformaciones “a la carta” de glicosilaminoácidos. Estos derivados, una vez incorporados en péptidos, podrían ser capaces de modular el reconocimiento molecular de dichos

péptidos modificados por parte de las correspondientes dianas biológicas, como pueden ser lectinas y anticuerpos.

Bibliografía

- [1] A. Varki, R. D. Cummings, J. Esko, G. Freeze, G. W. Hart, J. Marth, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Labs, New York, **1999**.
- [2] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science* **2001**, *291*, 2357–2364.
- [3] P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek, *Science* **2001**, *291*, 2370–2376.
- [4] P. Talbot, B. D. Shur, D. G. Myles, *Biol. Reprod.* **2003**, *68*, 1–9.
- [5] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
- [6] A. Helenius, *Mol. Biol. Cell* **1994**, *5*, 253–265.
- [7] A. Helenius, M. Aebi, *Science* **2001**, *291*, 2364–2369.
- [8] E. S. Trombetta, A. Helenius, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 587–592.
- [9] K. A. Karlsson, *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, *12*, 265–272.
- [10] H. Park, T. Suzuki, W. J. Lennarz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 11163–11168.
- [11] G. Opdenakker, P. M. Rudd, C. P. Ponting, R. A. Dwek, *FASEB J.* **1993**, *7*, 1330–1337.
- [12] L. Chen, A. L. DeVries, C. H. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 3811–3816.
- [13] N. M. Tsvetkova, B. L. Phillips, V. V. Krishnan, R. E. Feeney, W. H. Fink, J. H. Crowe, S. H. Risbud, F. Tablin, Y. Yeh, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 464–473.
- [14] Y. Tachibana, G. L. Fletcher, N. Fujitani, S. Tsuda, K. Monde, S.-I. Nishimura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 765–765.
- [15] B. G. Davis, *Science* **2004**, *303*, 480–482.
- [16] T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons, *Glycobiology* **2006**, *16*, 113R–136R.
- [17] S. Strahl-Bolsinger, M. Gentzsch, W. Tanner, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 297–307.
- [18] R. S. Haltiwanger, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 593–598.
- [19] D. P. Gamblin, E. M. Scanlan, B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131–163.
- [20] E. Weerapana, B. Imperiali, *Glycobiology* **2006**, *16*, 91R–101R.

- [21] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631–664.
- [22] L. Shao, Y. Luo, D. J. Moloney, R. S. Haltiwanger, *Glycobiology* **2002**, *12*, 763–770.
- [23] R. J. Harris, M. W. Spellman, **1993**, *3*, 219–224.
- [24] K. Bruckner, L. Perez, H. Clausen, S. Cohen, *Nature* **2000**, *406*, 411–415.
- [25] I. D. Campbell, P. Bork, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 385–392.
- [26] S. Hase, S.-I. Kawabata, H. Nishimura, H. Takeya, T. Sueyoshi, T. Miyata, S. Iwanaga, T. Takao, Y. Shimonishi, T. Ikenaka, *J. Biochem.* **1988**, *104*, 867–868.
- [27] H. Nishimura, S.-I. Kawabata, W. Kisiel, S. Hase, T. Ikenaka, T. Takao, Y. Shimonishi, S. Iwanaga, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20320–20325.
- [28] H. Nishimura, S. Yamashita, Z. Zeng, D. A. Walz, S. Iwanaga, *J. Biochem.* **1992**, *111*, 460–464.
- [29] P. Van den Steen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, G. Opdenakker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33*, 151–208.
- [30] S. Bjoern, D. C. Foster, L. Thim, F. C. Wiberg, M. Christensen, Y. Komiyama, A. H. Pedersen, W. Kisiel, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 11051–11057.
- [31] M. Wilstermann, L. O. Kononov, U. Nilsson, A. K. Ray, G. Magnusson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4742–4754.
- [32] R. Alibes, D. R. Bundle, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6288–6301.
- [33] A. Geyer, M. Muller, R. R. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6312–6313.
- [34] J. W. Lane, R. L. Halcomb, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1348–1357.
- [35] F. Corzana, J. H. Busto, S. B. Engelsen, J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7864–7871.
- [36] A. Fernández-Tejada, F. Corzana, J. H. Busto, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2885–2893.
- [37] A. Fernández-Tejada, F. Corzana, J. H. Busto, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9305–9313.
- [38] A. Fernández-Tejada, F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, J. M.

Peregrina, A. Avenzoa, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7042–7058.



2. Antecedentes

2.1. Conceptos relevantes en el análisis conformacional de péptidos y glicopéptidos

2.2. Influencia que la β -glucosa tiene sobre la conformación de la cadena peptídica

2.3. Preferencias conformacionales de glicosilaminoácidos que incorporan aminoácidos no naturales

2.4. Bibliografía

En este capítulo se recogen los estudios más importantes realizados en nuestro grupo de investigación hasta la fecha con respecto a la β -O-glicosilación con glucosa y desde un punto de vista conformacional. Estos estudios son imprescindibles para el entendimiento de la función estructural que este carbohidrato desempeña en distintos glicopéptidos y/o glicoproteínas en los que está presente.

En la primera parte, se ha considerado interesante introducir los conceptos básicos necesarios para la comprensión del estudio conformacional de péptidos y glicopéptidos.

2.1. Conceptos relevantes en el análisis conformacional de péptidos y glicopéptidos

Para poder conocer la estructura de un péptido o glicopéptido es importante conocer los ángulos diedros más significativos con información estructural relevante.

La estructura de la cadena peptídica viene determinada por los valores de los ángulos diedros φ y ψ . Así, la rotación en torno al enlace entre el C_{α} y el NH está definida por el ángulo diedro φ , mientras que el giro en torno al enlace formado entre el C_{α} y el $C=O$ está caracterizado por el ángulo ψ .

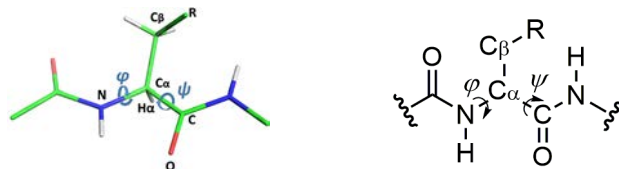


Figura 1. Ángulos diedros φ/ψ que definen la conformación del esqueleto peptídico.

Aunque existe un gran número de combinaciones para los valores que pueden tomar los ángulos φ y ψ , sólo algunas de ellas van a dar lugar a

conformaciones energéticamente favorables.^[1] Dentro de éstas destacan la hélice α y la lámina β , estructuras secundarias particularmente estables que forman parte de gran número de proteínas.

En la hélice α , los aminoácidos están dispuestos en una estructura helicoidal dextrógira, con unos 3.6 aminoácidos por vuelta. Cada aminoácido supone un giro de unos 100° en la hélice y los carbonos α de dos aminoácidos contiguos están separados por 1.5 Å. Todas las cadenas laterales de los aminoácidos están dispuestas hacia el exterior de la hélice. En estas condiciones, el hidrógeno del grupo amida del aminoácido i puede establecer un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo del aminoácido $i+4$. De esta forma, cada aminoácido i de la hélice forma dos enlaces de hidrógeno, uno con el residuo $i+4$ y otro con el $i-4$. En total son 7 enlaces de hidrógeno por vuelta, lo que estabiliza enormemente a esta estructura (Figura 2a).

La lámina beta se forma por el posicionamiento paralelo de dos cadenas de aminoácidos dentro de la misma proteína, en el que los grupos amino de una de las cadenas forman enlaces de hidrógeno con los grupos carbonilo de la opuesta.

Los valores de los ángulos para la hélice α son $\varphi = \pm 55^\circ$ y $\psi = \pm 45^\circ$. Para la lámina β , las cadenas paralelas toman unos valores para los ángulos de rotación de $\varphi = -119^\circ$ y $\psi = +113^\circ$, y las cadenas antiparalelas de $\varphi = -139^\circ$ y $\psi = +135^\circ$. Todas estas conformaciones son más estables que una estructura totalmente extendida, $\varphi = \psi = +180^\circ$. En la figura 2b se puede ver la estructura terciaria de una proteína que contiene hélices α , láminas β y giros.

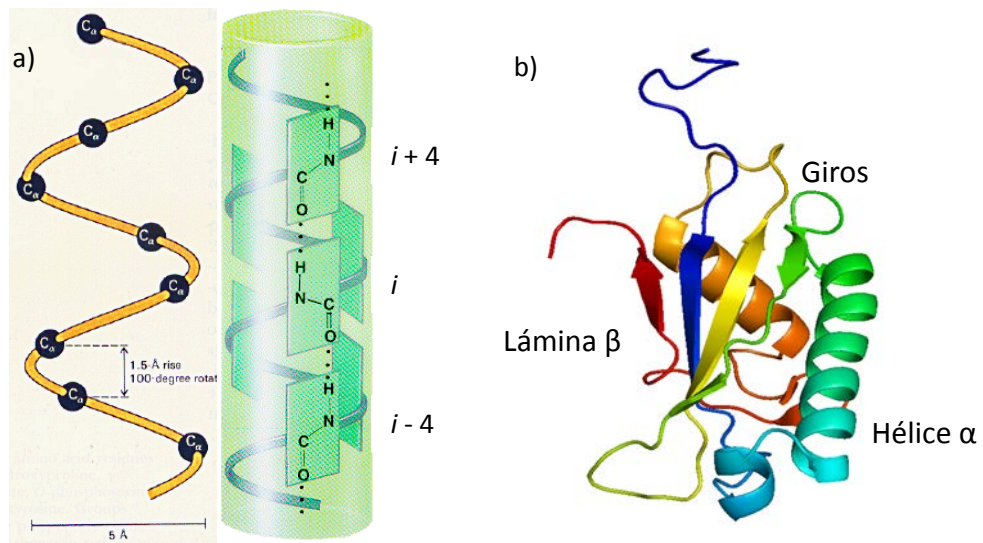


Figura 2. a) Esquema de una hélice α . b) Estructura de una proteína que contiene hélices α , láminas β y giros.

El bioquímico G. N. Ramachandran ideó un gráfico bidimensional para representar la conformación de una cadena polipeptídica de una manera más intuitiva.^[1] En este gráfico se representan los valores de los ángulos diedros φ y ψ de cada uno de los residuos que componen la cadena. En el gráfico de la figura 3 se muestra la representación de la hélice α y la lámina β , además de otras conformaciones usuales, como la poliprolina (PPII).

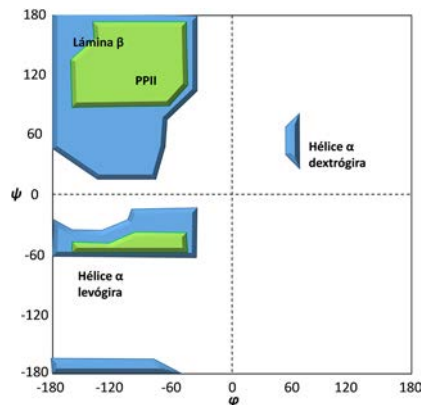


Figura 3. Diagrama de Ramachandran donde se representan las conformaciones de menor energía para péptidos.

Las cadenas polipeptídicas sufren varios cambios de dirección durante su plegamiento, apareciendo así las conformaciones conocidas como giros (ver figura 2). Existen dos tipos importantes de giros: los giros β y los giros γ .

Los **giros β (o β turns, en inglés)** se originan cuando la cadena polipeptídica se pliega sobre sí misma dando lugar a una conformación en la que se puede formar un enlace de hidrógeno intramolecular entre los residuos i e $i+3$. Esta región comprende cuatro residuos consecutivos, resultando involucrados 10 átomos (Figura 4). La distancia entre el átomo de oxígeno del grupo carbonilo del residuo i y el nitrógeno amídico del residuo $i+3$ ha de ser igual o inferior a 3.5 Å. Las distancias entre los carbonos α de los residuos i e $i+3$ oscilan entre 4 y 7 Å. Existen varios tipos^[2-5] de giros β atendiendo a los ángulos de los residuos $i+1$ e $i+2$; la tabla 1 recoge los valores para los ángulos diedros de cada uno de los diferentes tipos de giro β .

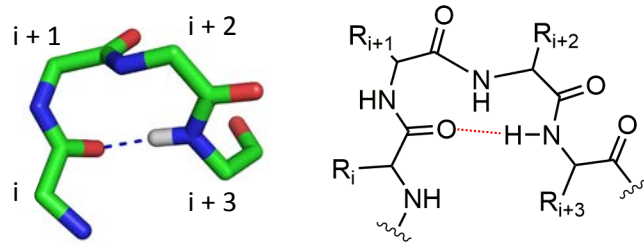


Figura 4. Giro β tipo I.

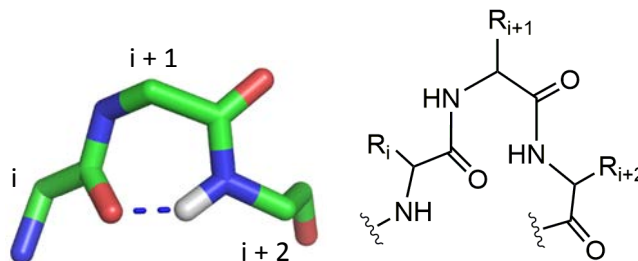
Tabla 1. Valores de los ángulos diedros ϕ y ψ para los residuos $i+1$ e $i+2$ de los diferentes tipos de giro β .

Tipo de giro β	Ángulos diedros ($^\circ$)			
	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
IV	-61	10	-53	17
Vla1	-60	120	-90	0
Vla2	-120	120	-60	0
Vlb	-135	135	-75	160
VIII	-60	-30	-120	120

Los giros γ (**o γ turns, en inglés**) se originan por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el residuo i y el residuo $i+2$ (Figura 5). En ellos se encuentran involucrados tres residuos consecutivos y 7 átomos. Se pueden dividir en clásicos e inversos en función de los valores de los ángulos diedros ϕ y ψ del residuo en posición $i+1$. En la tabla 2 se encuentran los valores de los ángulos diedros que definen el giro γ .

Tabla 2. Valores de los ángulos diedros ϕ y ψ para el residuo $i+1$ en los giros γ .

Tipo de giro γ	Ángulos diedros ($^\circ$)	
	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}
Clásico	70	-60
Inverso	-70	60

**Figura 5.** Giro γ clásico

Tanto los giros β como los γ son muy importantes en funciones de reconocimiento a nivel molecular,^[2,3,5] como por ejemplo en el reconocimiento de los antígenos por los anticuerpos^[6-8] y en la fosforilación^[9,10] o glicosilación^[11] de proteínas.

Por otro lado, otro factor que también va a influir en la conformación de cada residuo, y por tanto en la de los péptidos o glicopéptidos de los que forme parte, es el de la disposición espacial de la cadena lateral.^[12,13] Para la cadena lateral se define el ángulo de rotación χ^1 alrededor del enlace $C\alpha-C\beta$, tal como se muestra en la figura 6. Los valores que debe adoptar χ^1 , para que la cadena lateral muestre conformaciones de mayor estabilidad son -60° , $+60^\circ$, $+180^\circ$.

**Figura 6.** Ángulo χ^1 que define la conformación de la cadena lateral.

Por último, para el caso de los glicopéptidos existe otro elemento a tener en cuenta, la disposición espacial del carbohidrato, que va a venir dada por los dos ángulos diedros que se muestran en la figura 7. El ángulo de torsión φ está definido por la rotación en torno al enlace entre el C anomérico del carbohidrato y el O del enlace glicosídico, mientras que la rotación alrededor del enlace entre el O del enlace glicosídico y el C β del péptido forma el ángulo ψ (Figura 7). Para no confundirlos con los ángulos diedros que definen la conformación del esqueleto peptídico, a partir de ahora se denominarán φ_s y ψ_s , haciendo referencia la 's' a *sugar*, y los de la parte peptídica serán φ_p y ψ_p .

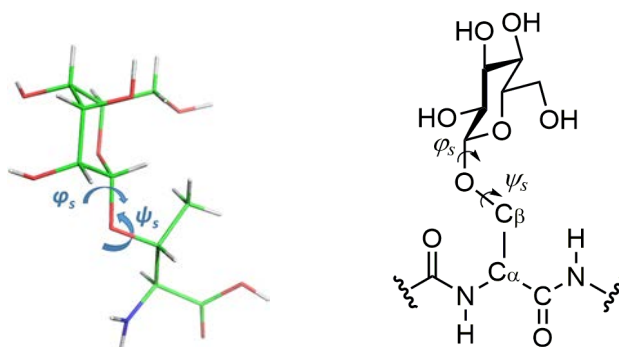


Figura 7. Ángulos φ_s/ψ_s que definen la conformación del enlace glicosídico.

Análogamente a lo encontrado para los ángulos φ_p y ψ_p de la cadena peptídica, sólo algunos de los valores posibles para φ_s y ψ_s van a dar lugar a conformaciones energéticamente favorables. En este contexto, cabe destacar la rigidez que normalmente presenta el ángulo diedro φ_s debido al efecto exo-anomérico.^[14]

En este sentido, tanto para el enlace glicosídico α como para el enlace glicosídico β se obtienen dos conformaciones estabilizadas debido al efecto exo-anomérico, siendo φ_s de $+60^\circ$ y -60° . Sin embargo, la situación de mínima

energía para el enlace glicosídico α se corresponde con $\varphi_s = +60^\circ$ y para el enlace glicosídico β con $\varphi_s = -60^\circ$, debido a que estas conformaciones presentan menor impedimento estérico.

En cuanto al ángulo diedro ψ_s en el caso de las glicoproteínas con serina, toma valores en torno a 180° para disminuir las repulsiones estéricas entre el carbohidrato y la cadena peptídica (Figura 8), en cambio cuando el aminoácido que se glicosila es la treonina este ángulo ψ_s toma valores alrededor de 120° y muestra una conformación eclipsada (Figura 9).^[15]

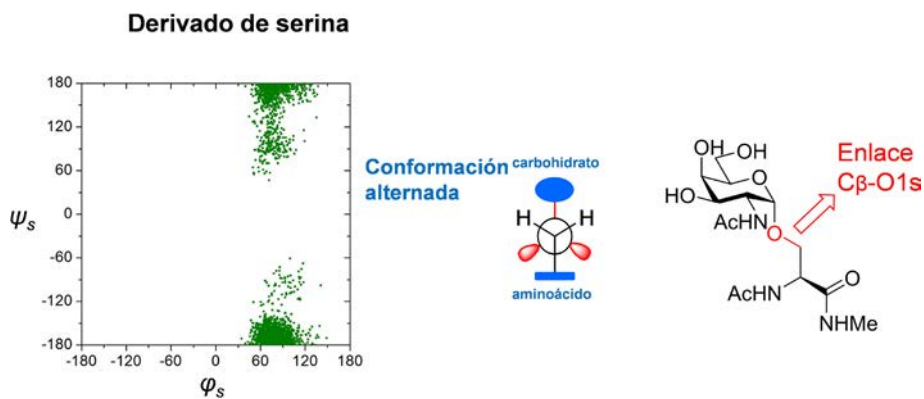


Figura 8. Conformación alternada de ψ_s en el derivado de serina.

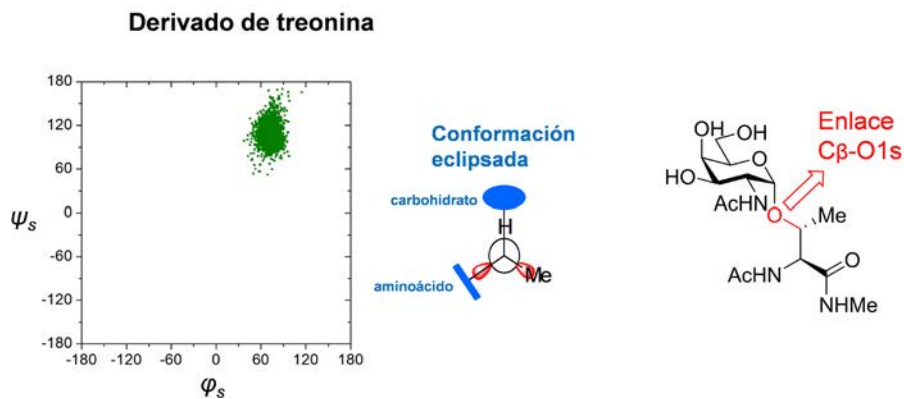


Figura 9. Conformación eclipsada de ψ_s en el derivado de treonina.

Por lo tanto, podemos concluir diciendo que la estructura secundaria de péptidos y glicopéptidos es función, en último término, de los valores de los ángulos diedros φ_p , ψ_p , χ^1 , φ_s y ψ_s .

2.2. Influencia que la β -glucosa tiene sobre la conformación de la cadena peptídica

En el capítulo anterior se ha comentado la importancia que tienen las glicoproteínas en la Naturaleza, debido a la gran cantidad de procesos biológicos en los que se ven involucradas. Además, se ha resaltado la vital importancia de las modificaciones post-traduccionales, ya que a través de estos mecanismos las proteínas incorporan otras biomoléculas como carbohidratos, lípidos, etc. Una de las modificaciones menos frecuentes es la β -*O*-glucosilación, ésta consiste en una glucosa unida directamente a una proteína a través de un enlace β -*O*-glicosídico.

En este sentido, en este capítulo se van a exponer los estudios que nuestro grupo de investigación ha realizado sobre la β -O-glicosilación de péptidos con D-glucosa.

Como es sabido, la función estructural de la D-Glc en los péptidos en los que es incorporada no es del todo desconocida y existe aún cierta controversia al respecto. Teniendo esto en cuenta, nuestro grupo de investigación decidió estudiar, en primer lugar, el efecto de la β -D-O-glicosilación en péptidos modelo derivados de Ser y Thr, llamados así porque ambos extremos del aminoácido se encuentran terminados como diamida, para simular una cadena peptídica mayor. Posteriormente, se glicosilaron con β -O-Glc para obtener así sus correspondientes β -O-glucopeptidos (Figura 10).

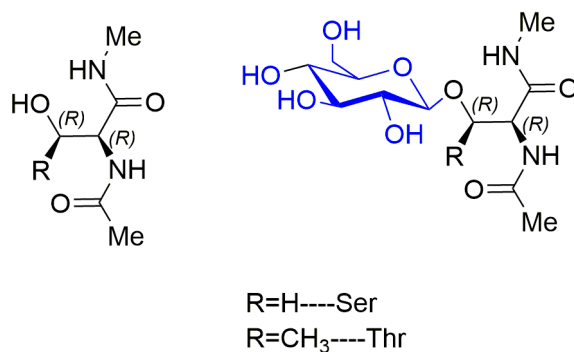


Figura 10. Derivados del serina y treonina estudiados.

El estudio reveló que este tipo de glicosilación produce un importante efecto sobre el esqueleto peptídico, siendo responsable del cambio de conformaciones extendidas, observadas generalmente en los péptidos, a plegadas en los glicopéptidos modelo derivados de Ser y Thr (Figura 11).^[16]

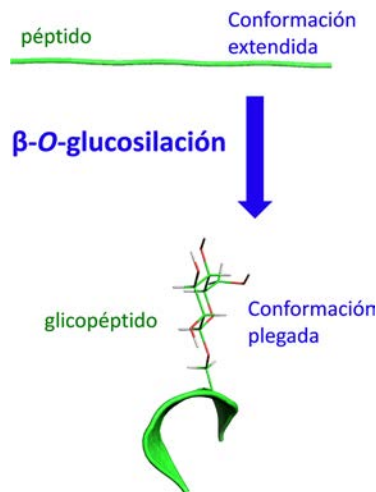


Figura 11. Influencia de la β -D-O-glucosilación en péptidos modelo de Ser y Thr.

2.3. Preferencias conformacionales de glicosilaminoácidos que incorporan aminoácidos no naturales

Posteriormente, se decidió estudiar en detalle la influencia que tiene la presencia de un aminoácido no natural, tanto en el esqueleto peptídico como en la disposición espacial del carbohidrato. Así, los nuevos glicopéptidos sintetizados podrían estabilizar una conformación (por ejemplo, la conformación bioactiva) o bien exhibir conformeros que raramente se hayan observado en derivados naturales, modificándose así la unión a las moléculas diana.^[17]

En este sentido, se sintetizaron y analizaron los péptidos y los glicopéptidos modelo que aparecen en la figura 12. Como se puede observar se utilizaron péptidos y glicopéptidos en los que se incluyeron aminoácidos que presentaban todas las combinaciones posibles de sustituciones con un grupo metilo en las posiciones α y β (α -metilados que derivan de la α -metilserina (MeSer) y α,β -dimetilados que lo hacen de la α -metiltreonina (MeThr), así

como los dos derivados posibles que incluían un ciclobutano en la estructura, con el fin de averiguar cómo afectaban estos cambios estructurales a la disposición tridimensional de la molécula.

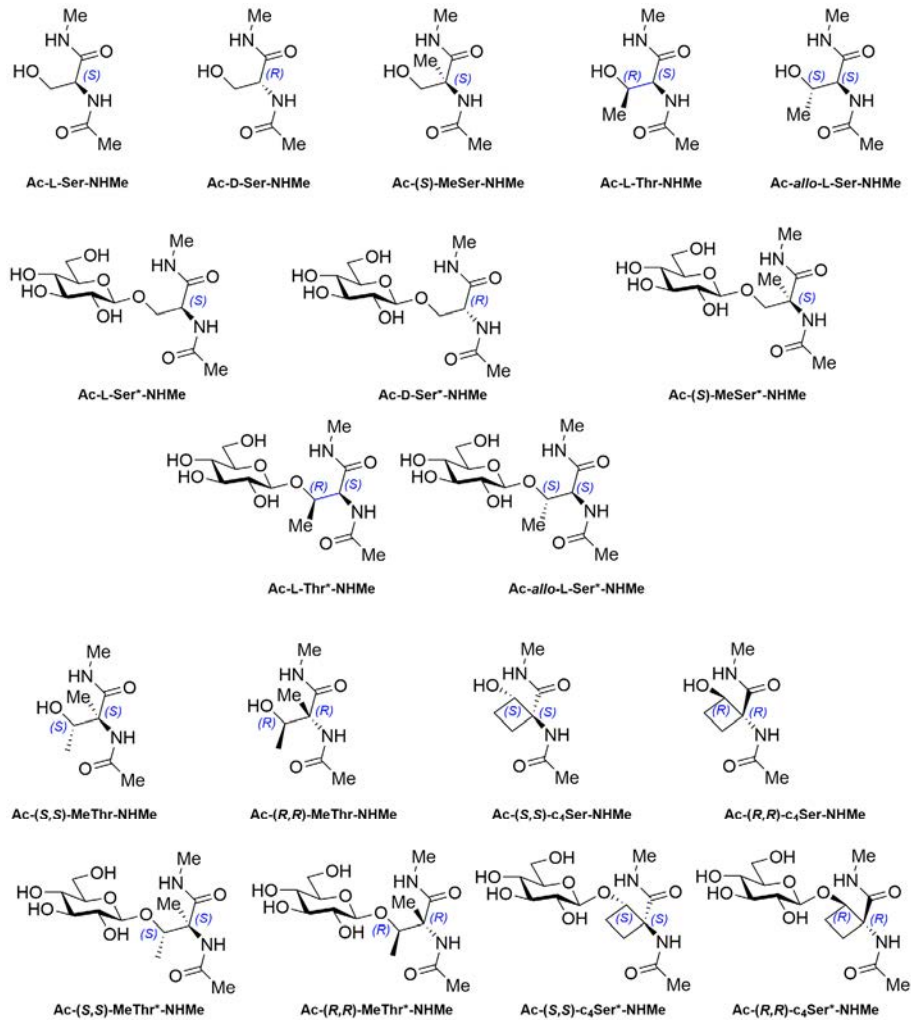


Figura 12. Péptidos y glicopéptidos modelo estudiados.

Por un lado, este estudio reveló, que la incorporación de un grupo metilo en el carbono α del aminoácido fuerza a la cadena peptídica a adoptar

conformaciones plegadas, tipo alfa hélice. Este efecto, que se observa en los derivados de MeSer, aumenta en la α -metiltreonina (α -MeThr), siendo aún mayor cuando la estructura que incorpora el aminoácido en su cadena lateral es un ciclobutano (Figura 13).

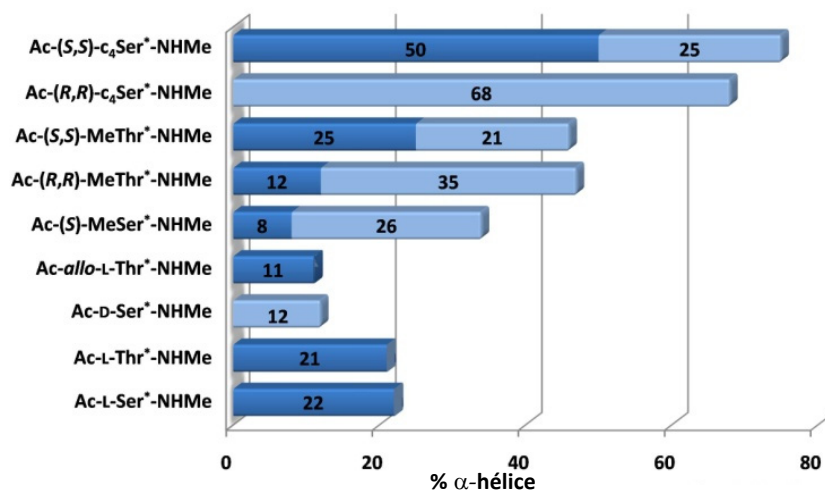


Figura 13. Población total para la conformación α hélice (α_D en azul oscuro + α_L en azul claro) obtenida de los glicopéptidos estudiados (imagen tomada de la publicación *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 7042-7058).

Por otro lado, las sustituciones en el carbono beta no afectan a la cadena peptídica, pero sí a la cadena lateral. En concreto, para el derivado natural de serina, las sustituciones en beta tanto con configuración *S* como *R* rigidifican la cadena lateral y la fuerzan a adoptar una conformación claramente *g*(+). Si existe un metilo en posición alfa, además de en beta (MeThr), la conformación mayoritaria de la cadena lateral es claramente *anti*. Por otra parte, la incorporación de una estructura restringida como es el ciclobutano, obliga al péptido a adoptar conformaciones plegadas. Además, el ciclo de cuatro miembros fuerza una sola conformación, *g*(+) para la cadena lateral (Figura 14).

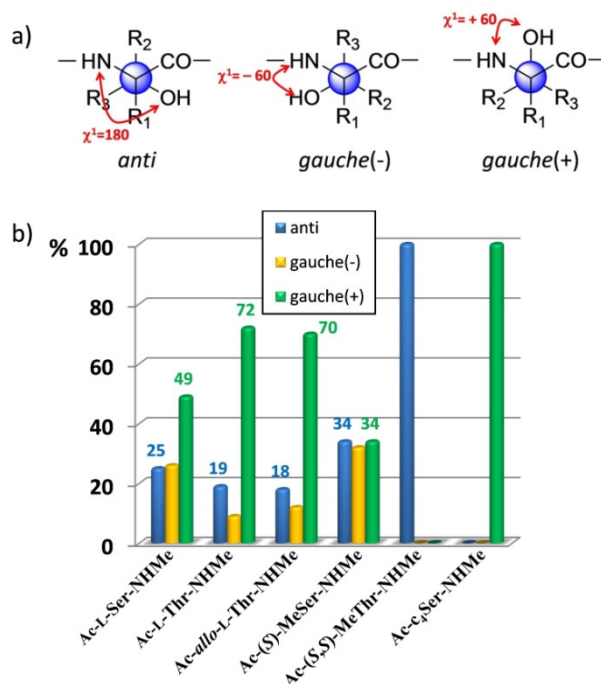


Figura 14. a) Conformaciones más estables para la cadena lateral (ángulo diedro χ^1). b) Distribuciones de χ^1 para los péptidos modelo. Para el compuesto Ac-c₄Ser-NHMe χ^1 tiene un valor en torno a 105° (imagen tomada de la publicación Chem. Eur. J. 2008, 14, 7042-7058).

En lo referente a la disposición espacial del carbohidrato, estos estudios indican que también puede modularse al modificar la cadena lateral del aminoácido al que va unido el azúcar. El enlace glicosídico está definido por los ángulos diedros φ_s y ψ_s . En la mayor parte de los casos, solo el ángulo de torsión ψ_s es susceptible de sufrir variaciones, puesto que el ángulo φ_s adopta el valor típico -60° para un enlace β -O-glicosídico, determinado por el efecto exo-anomérico, como se ha comentado anteriormente. Pero hay una excepción que merece la pena resaltar con respecto al ángulo diedro φ_s , y es que aparece una población significativa de la inusual conformación *anti- φ* para el derivado de ciclobutano con configuración S,S. Esta conformación, a

priori, de mayor energía, se estabiliza a través de un enlace de hidrógeno intramolecular (Figuras 15 y 16).

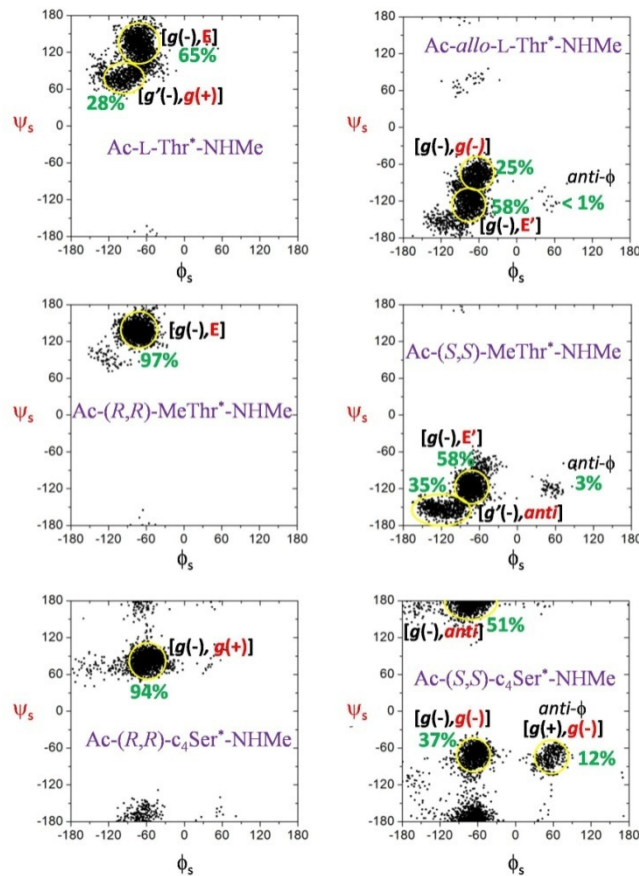


Figura 15. Distribución del enlace glicosídico (ϕ_s/ψ_s) para los glicopéptidos Ac-L-Thr*-NHMe, Ac-allo-L-Thr*-NHMe, Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe, Ac-(R,R)-MeThr*-NHMe, Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe, y Ac-(R,R)-c₄Ser*-NHMe. La conformación $g(+)$ del ángulo diedro ϕ_s ($O5s-C1s-O1s-C\beta=60^\circ$) se conoce también como $anti-\phi$ (que corresponde a un valor de 180° para este ángulo diedro cuando es definido con los átomos $H1s-C1s-O1s-C\beta$) (imagen tomada de la publicación Chem. Eur. J. 2008, 14, 7042-7058).

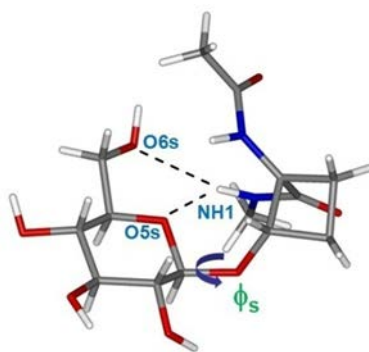


Figura 16. Enlace de hidrógeno intramolecular presente en el derivado *Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe* que estabiliza la conformación *anti-φ* observada en dicho derivado (imagen tomada de la publicación *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 7042-7058).

En cuanto al ángulo ψ_s , su comportamiento varía en función del patrón de sustitución en los carbonos $C\alpha$ y $C\beta$. Así:

- 1) La no existencia de sustituyente en el carbono beta fuerza a ψ_s a adoptar conformación tipo *anti*. Este es el caso de los derivados de L-Ser, D-Ser y (*S*)-MeSer.
- 2) La presencia de un grupo metilo en beta con configuración *R*, por ejemplo L-Thr, favorece conformaciones de ψ_s alternadas *g*(+). También se observa una conformación eclipsada *E* (120°), que puede ser debido a que el grupo metilo de la Thr fuerza al ángulo ψ_s a adoptar un valor cercano a 120° .
- 3) Cuando el grupo metilo sustituido en beta tiene configuración *S*, estamos hablando del derivado de *allo*-Thr, entonces las preferencias para el ángulo de torsión ψ_s cambian hacia la conformación alternada *g*(-) y la eclipsada *E'* (-120°).
- 4) Si la sustitución se produce en el carbono alfa y en el beta con configuración *R,R*, el derivado *Ac-(R,R)-MeThr*-NHMe*, entonces el

ángulo diedro se rigidifica hacia el conformero eclipsado y hacia el alternado $g(+)$ en el caso de $Ac-(R,R)-c_4Ser^*-NHMe$.

- 5) Por el contrario e inesperadamente, cuando los derivados poseen la configuración S,S , el ángulo de torsión ψ_s se vuelve más flexible poblando varias conformaciones.

Como continuación lógica de este trabajo, se consideró expandir esos sistemas pequeños a glicopéptidos de mayor tamaño con la intención de comprobar si las conclusiones obtenidas previamente se seguían observando en moléculas más complejas. Para ello se eligió la secuencia Thr-Ala-Ala presente en péptidos con diversas funciones biológicas,^[18-20] como por ejemplo en las glicoproteínas anticongelantes,^[21] de suma importancia en la naturaleza, ya que evitan la congelación del agua y el crecimiento de cristales de hielo. Estas glicoproteínas han atraído un gran interés debido a sus potenciales aplicaciones en medicina y en la industria.^[22] Así, se decidió diseñar los derivados no naturales de mayor tamaño que aparecen en la figura 17.

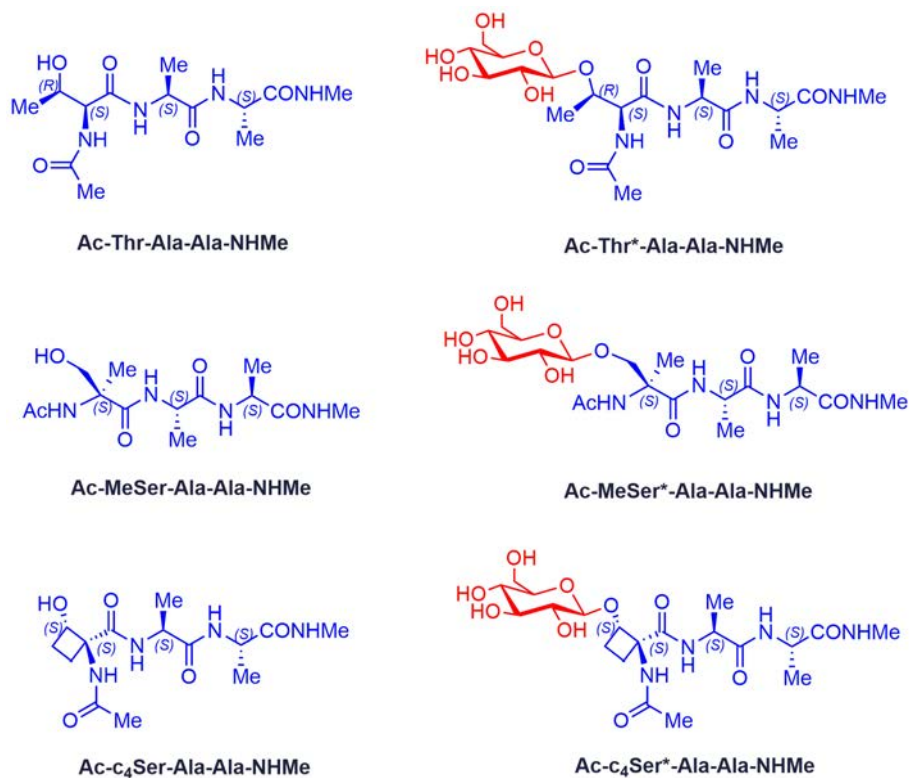


Figura 17. Péptidos y glicopéptidos estudiados.

De este estudio^[23,24] se pudo concluir que la sustitución de un aminoácido natural por uno cuaternario es capaz de modular la conformación. Mientras que para los derivados de Thr son mayoritarias las conformaciones extendidas, apareciendo cierto porcentaje de población correspondiente a α -hélice en el caso del glucopéptido (aproximadamente del 36%). En el caso de los derivados de MeSer se observa que tanto en péptidos como en glicopéptidos su incorporación promueve el paso de conformaciones extendidas para la cadena peptídica a plegadas. Sin embargo, no es capaz de rigidificar el sistema, si no que más bien lo flexibiliza, ya que coexisten en disolución ambas conformaciones. En cuanto a la cadena lateral, ésta se

flexibiliza bastante y muestra las tres posibles conformaciones: $g(+)$, $g(-)$ y $anti$. En la figura 18 se muestran las distribuciones obtenidas para el enlace glicosídico (ϕ_s/ψ_s) y para la cadena lateral (χ^1) de dicho glucopéptido de MeSer obtenidas mediante cálculos de *MD-tar* (metodología que se explica detalladamente en el anexo III).

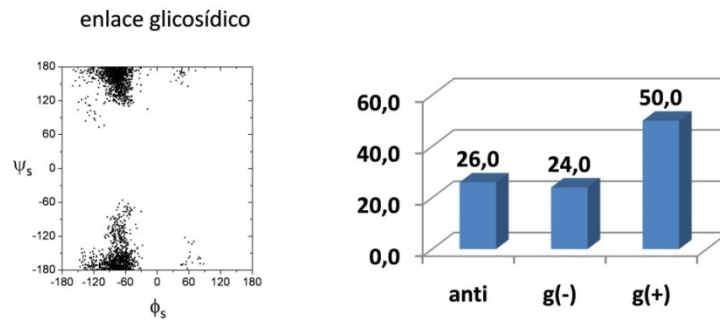


Figura 18. Distribución ϕ_s/ψ_s para el enlace glicosídico del glucopéptido (izquierda). Distribución χ^1 para la cadena lateral (derecha).

Sin embargo, en el derivado no natural que incorpora el ciclobutano, mientras que el péptido muestra conformaciones plegadas (dos giros β consecutivos (Figura 19), en el glicopéptido no aparecen ninguno de estos *giros*. Esto es debido a la existencia de dos enlaces de hidrógeno simultáneos entre el oxígeno endocíclico de la glucosa y dos protones amida de la cadena peptídica (Figura 20).

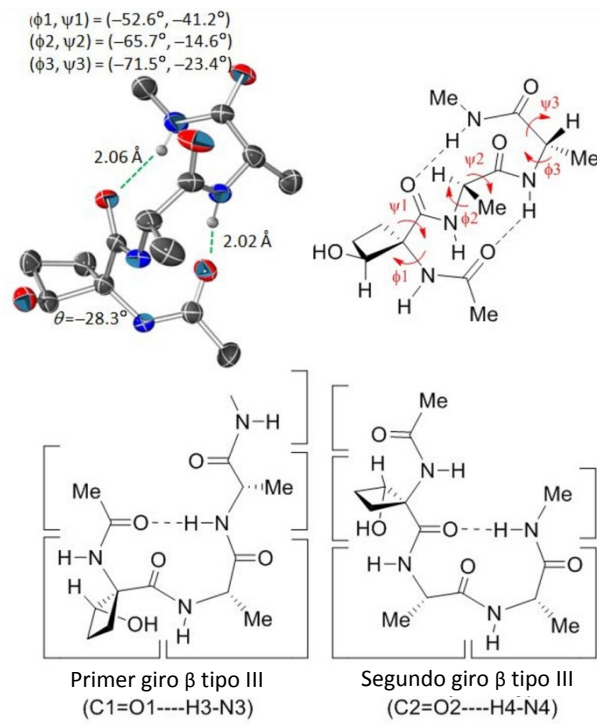


Figura 19. β -Turns observados en el péptido **Ac-c₄Ser*-Ala-Ala-NHMe** (imagen tomada de la publicación *Org. Biomol. Chem.* 2009, 7, 2885-2893).

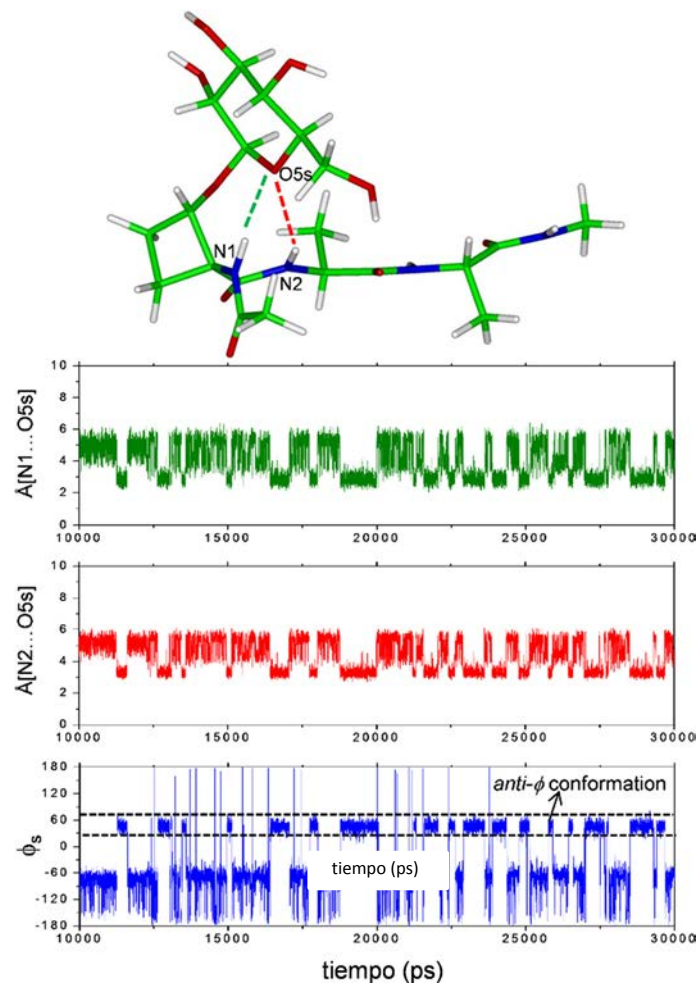


Figura 20. Monitorización en el tiempo del ángulo diedro ϕ_s y las distancias $N1 \cdots O5s$ y $N2 \cdots O5s$ para el compuesto *Ac-c₄Ser*-Ala-Ala-NHMe*.

En estos estudios se pudo observar cómo a través de la β -*O*-glucosilación o utilizando pequeñas modificaciones en la cadena peptídica se pueden explorar diferentes conformaciones. Éstas son herramientas que podrían ser utilizadas para obtener sistemas con preferencias conformacionales a la carta.

2.4. Bibliografía

- [1] G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, *Adv. Protein Chem.* **1968**, 23, 283–438.
- [2] C. M. Venkatachalam, *Biopolymers* **1968**, 6, 1425–1436.
- [3] P. N. Lewis, F. A. Momany, H. A. Scheraga, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 303, 211–229.
- [4] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *J. Mol. Biol.* **1977**, 115, 135–175.
- [5] C. M. Wilmot, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1988**, 203, 221–232.
- [6] H. J. Dyson, K. J. Cross, R. A. Houghten, I. A. Wilson, P. E. Wright, R. A. Lerner, *Nature* **1985**, 318, 480–483.
- [7] D. Picone, P. A. Temussi, M. Marastoni, R. Tomatis, A. Motta, *FEBS Lett.* **1988**, 231, 159–163.
- [8] J. M. Rini, U. Schulze-Gahmen, I. A. Wilson, *Science* **1992**, 255, 959–965.
- [9] J. Reed, V. Kinzel, H. C. Cheng, D. A. Walsh, *Biochemistry* **1987**, 26, 7641–7647.
- [10] D. A. Tinker, E. A. Krebs, I. C. Feltham, S. K. Attahpoku, V. S. Ananthanarayanan, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 5024–5026.
- [11] B. Imperiali, K. L. Shannon, K. W. Rickert, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7942–7944.
- [12] V. J. Hruby, G. Li, C. Haskell Luevano, M. Shenderovich, *Biopolymers* **1997**, 43, 219–266.
- [13] S. M. Cowell, Y. S. Lee, J. P. Cain, V. J. Hruby, *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 2785–2798.
- [14] G. R. J. Thatcher, *ACS Symp. Ser.* **1993**, 539, 6–25.
- [15] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, M. García de Luis, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 9458–9467.
- [16] F. Corzana, J. H. Busto, S. B. Engelsen, J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 7864–7871.
- [17] A. Fernández-Tejada, F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 7042–7058.

- [18] J. M. Conlon, A. Demandt, P. F. Nielsen, J. Leprince, H. Vaudry, D. C. Woodhams, *Peptides* **2009**, *30*, 1069–1073.
- [19] H. Baumann, K. J. Wilson, P. S. Chen, R. E. Humbel, *Eur. J. Biochem.* **1975**, *52*, 521–529.
- [20] S. Wong-Lun-Sang, J.-J. Bernardini, C. Hennard, P. Kyslik, A. Dell, M. A. Abdallah, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3329–3332.
- [21] Y. Tachibana, G. L. Fletcher, N. Fujitani, S. Tsuda, K. Monde, S.-I. Nishimura, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 856–862.
- [22] M. M. Harding, P. I. Anderberg, A. Haymet, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1381–1392.
- [23] A. Fernández-Tejada, F. Corzana, J. H. Busto, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2885–2893.
- [24] A. Fernández-Tejada, F. Corzana, J. H. Busto, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9305–9313.



3. Objetivos

Teniendo en cuenta lo mencionado en el capítulo de antecedentes y como continuación lógica de este trabajo, en la presente tesis doctoral se propuso ahondar en los siguientes aspectos:

- Explorar nuevos glicopéptidos con aminoácidos no naturales que proporcionen nuevas conformaciones, tanto para el péptido como para el carbohidrato, o que nos ayuden a fijar aquellas de mayor interés. Este trabajo da lugar al cuarto capítulo de esta tesis: titulado “Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos”. En particular, se estudia la incorporación de un anillo de 6 miembros en los C α y C β del aminoácido serina o treonina.

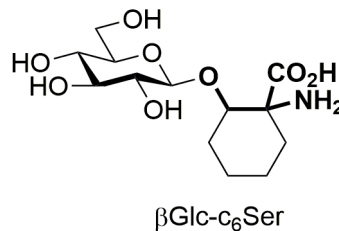


Figura 1. Glicosilaminoácido que incorpora el aminoácido no natural c_6 Ser.

- Esclarecer las implicaciones que tiene la β -O-glicosilación desde un punto de vista estructural, sobre todo en la conformación de la cadena peptídica a la cual está unida la glucosa y explicar, en la medida de lo posible, el porqué de la secuencia de consenso para esta glicosidación. El resultado de este trabajo es el cuarto capítulo de esta Tesis.

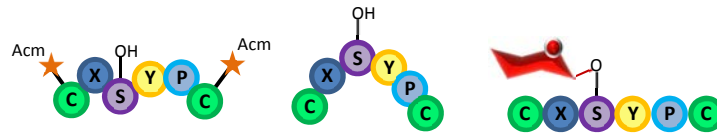


Figura 2. Péptidos y glicopéptidos estudiados, donde X e Y son cualquier aminoácido excepto prolina

- El tercer objetivo es muy distinto a los anteriores y supone un paso más. Tiene que ver con el reconocimiento molecular de carbohidratos por parte de lectinas. Así, dado que no es muy habitual encontrar lectinas que reconozcan a la glucosa, se decidió cambiar de carbohidrato y focalizar nuestros estudios hacia la α -N-acetilgalactosamina. En este sentido, como se ha visto en capítulos anteriores, el carbohidrato se dispone de maneras diferentes ante sus dianas biológicas cuando está unido a Ser o Thr. Teniendo en cuenta este hecho, en este tercer objetivo se quiso estudiar cómo influye el aminoácido al que está unido la N-acetilgalactosamina (GalNAc) en la orientación del carbohidrato y las implicaciones que ésto puede tener en el reconocimiento molecular de carbohidratos por moléculas diana de interés biológico, como son las lectinas. Este estudio ha dado lugar al capítulo sexto de la Tesis.

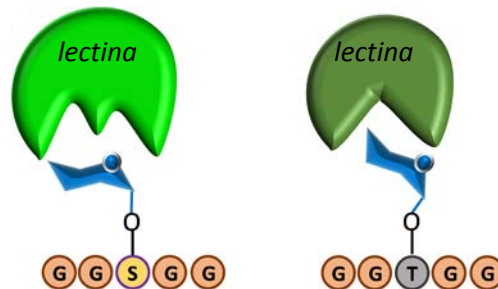



Figura 3. Reconocimiento molecular de los glicopéptidos objetivo por diferentes lectinas.



4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

4.1. Introducción

4.2. Objetivos

4.3. Discusión de resultados

4.3.1. *Síntesis*

4.3.2. *Estudio conformacional*

4.3.3. *Extrapolación de los resultados obtenidos a péptidos de mayor tamaño*

4.4. Conclusión

4.5. Bibliografía

4.1. Introducción

Como se ha comentado anteriormente, habitualmente no es solo una conformación la que corresponde a una molécula, sino un conjunto de varias de ellas, pero de todas las conformaciones, en general, solo una es la bioactiva.

En este sentido, como se ha expuesto en el capítulo de antecedentes, nuestro grupo ha estado involucrado en el diseño de nuevos glicopéptidos con preferencias conformacionales variadas.^[1-8] En general, nuestros estudios concluyen que mientras los sustituyentes en el carbono C α del aminoácido glicosilado afectan principalmente a la conformación del esqueleto peptídico (forzándolo a adoptar conformación tipo hélice) los sustituyentes del carbono C β modifican el comportamiento del enlace glicosídico. Por otra parte, los sustituyentes del aminoácido en posiciones α y/o β , y la configuración del carbono al que se unen éstos, tienen un importante efecto en las conformaciones de la cadena lateral. Incluso se abordó la incorporación de un ciclo de 4 miembros, que involucraba al C α y al C β , obteniendo interesantes resultados. Como consecuencia, los nuevos glicopéptidos diseñados a medida pueden estabilizar conformaciones presentes en las moléculas de origen natural, así como exhibir algunas conformaciones atípicas. Esta característica es una poderosa herramienta que podría ser usada para diseñar y modular el espacio conformacional de glicopéptidos y podría ser útil en la determinación de los elementos estructurales clave de glicopéptidos para la unión con sus dianas biológicas.

4.2. Objetivos

Con la intención de ampliar esta perspectiva a nuevos sistemas, teniendo en cuenta la versatilidad que ofrecen los ciclos de 6 miembros en cuanto a disposición espacial, se decidió incorporarlos a las estructuras de los glicosilaminoácidos. Ello permitiría disponer de otras combinaciones posibles de estructura peptídica y orientación del carbohidrato. Así, en este capítulo, se muestra la síntesis y el análisis conformacional en disolución acuosa de los cuatro aminoácidos glicosilados mostrados en la figura 1, combinando experimentos de RMN y cálculos de dinámica molecular (*MD*).

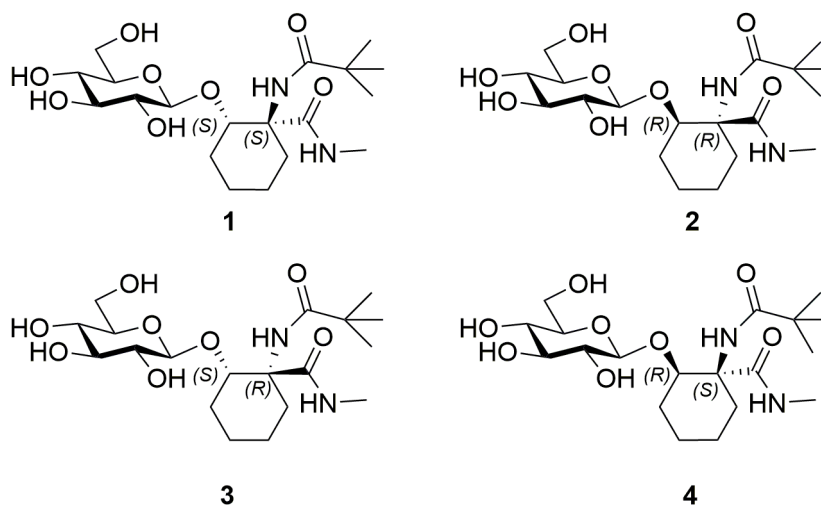


Figura 1. Aminoácidos glicosilados acabados en diamida estudiados en este trabajo.

En estas moléculas, el aminoácido Ser o Thr ha sido reemplazado por todos los posibles estereoisómeros del derivado no natural β -hidroxiciclohexano- α -aminoácido (c_6 Ser).^[9] Además, tanto el grupo amino como el ácido carboxílico fueron transformados en las correspondientes amidas para simular un esqueleto peptídico de mayor tamaño. En el caso del grupo amino

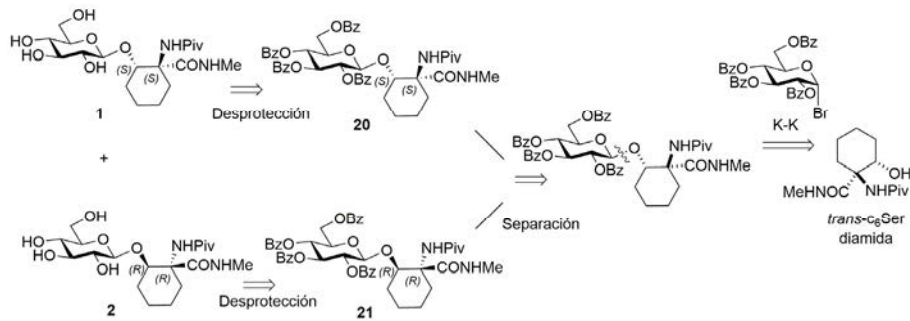
formamos la amida con el grupo pivaloilo, que favorece la formación de monocristales, facilitando también la manipulación de nuevos compuestos. Es importante resaltar que la subestructura β -O-Glc unida al anillo de ciclohexano se encuentra en las saponinas esteroides, que poseen propiedades antiinflamatorias, hemolíticas, citotóxicas, antifúngicas y antibacterianas.^[10,11]

4.3. Discusión de resultados

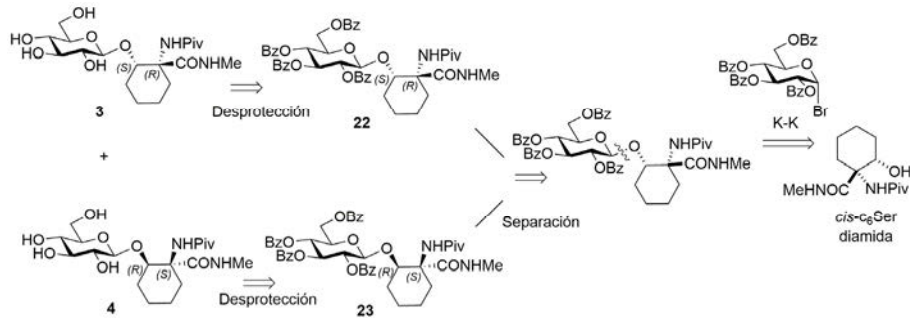
4.3.1. Síntesis

Desde un punto de vista retrosintético, el acceso a los derivados de los glicosilaminoácidos **1-4** objetivo, en sus formas enantioméricamente puras, conlleva una desconexión C–O. Así, este enlace pueden generarse mediante una reacción de tipo Koenigs-Knorr entre un derivado de glucosa adecuadamente protegido y cada uno de los cuatro ciclohexan- α -aminoácidos. Para ello, se necesitaría entonces disponer de ellos en sus formas enantioméricamente puras, lo cual es posible ya que nuestro grupo de investigación hace unos años realizó y publicó la síntesis de estos 4 enantiómeros: (1*S*,2*S*)-c₆Ser, (1*R*,2*R*)-c₆Ser, (1*R*,2*S*)-c₆Ser y (1*S*,2*R*)-c₆Ser.^[9] Esta síntesis resulta bastante larga, por ello, en esta ocasión se ha considerado más apropiado llevar a cabo esta desconexión utilizando los aminoácidos en sus formas racémicas (*cis*-c₆Ser y *trans*-c₆Ser), para en un paso posterior, una vez llevada a cabo la glicosilación con β -O-D-glucosa, que ésta actúe como auxiliar quiral y permita la separación de cada uno de los diastereómeros (Esquemas 1 y 2).

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

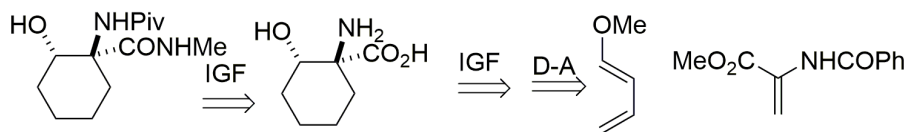


Esquema 1.



Esquema 2.

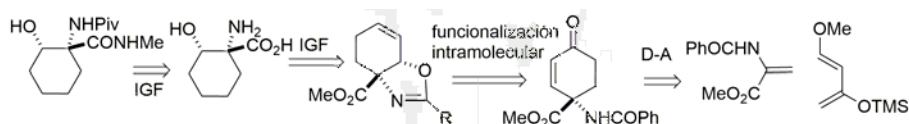
Por tanto, el primer objetivo fue conseguir cantidad suficiente de los aminoácidos racémicos *cis*-c₆Ser y *trans*-c₆Ser en forma de diamida, siguiendo la misma metodología.^[9] El paso clave para ambos racémicos consiste en la reacción de Diels-Alder entre un dieno oxigenado y un filodieno que incorpora a los grupos amino y ácido carboxílicos latentes en su estructura (2-benzamidoacrilato de metilo) (Esquema 3).



Esquema 3.

Así, utilizando 1-metoxi-1,3-butadieno se consigue fácilmente el derivado *trans*-c₆Ser después de los correspondientes intercambios de grupo funcional (IGF).

Sin embargo, para obtener el derivado *cis*-c₆Ser fue necesario alguna etapa adicional de *O*-funcionalización intramolecular, una vez llevada a cabo la reacción de Diels-Alder con el dieno de Danishefsky (Esquema 4).

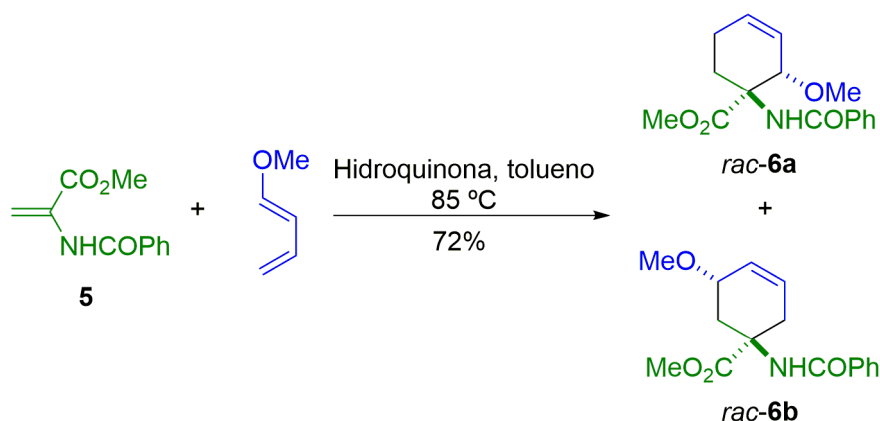


Esquema 4.

A continuación se describen las etapas en modo síntesis para obtener los compuestos glicosilaminoácidos en forma de diamida y enantioméricamente puros.

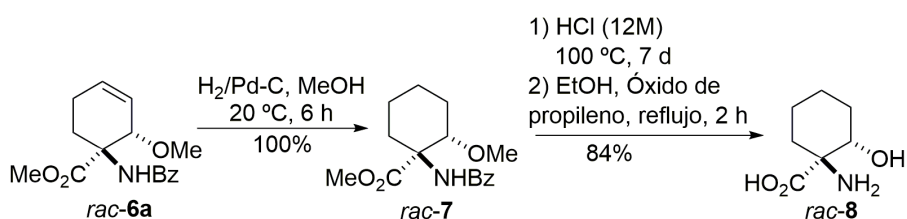
En primer lugar, se describirá la síntesis del aducto precursor de los derivados **1** y **2**, derivados de *rac*-**10**. Para ello, se partió del 2-benzamidoacrilato de metilo (BAM, **5**), previamente sintetizado en nuestro grupo de investigación,^[12] y utilizando la reacción de Diels-Alder con 1-metoxi-1,3-butadieno como dieno, se obtuvo mayoritariamente el derivado *rac*-**6a**, el cual se purificó por columna cromatográfica. Con el fin de evitar la polimerización del acrilato, la reacción se llevó a cabo en presencia de cantidades catalíticas de hidroquinona (Esquema 5).

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos



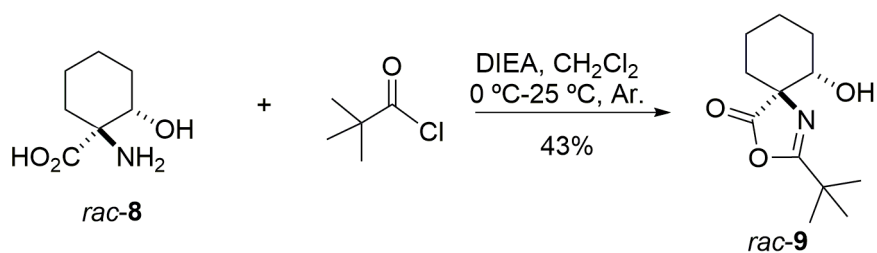
Esquema 5.

A continuación, se hidrogenó el doble enlace usando H_2 con un catalizador de Pd-C (20%), para después desproteger todos los grupos funcionales con una hidrólisis ácida. En este caso, tras 7 días de hidrólisis se obtuvo el clorhidrato del aminoácido **rac-8** (Esquema 6).



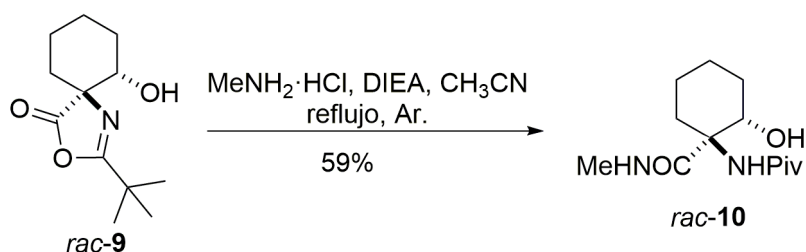
Esquema 6.

En el siguiente paso se hizo reaccionar el grupo amino con cloruro de pivaloilo y DIEA a 0 °C. En estas condiciones de reacción, no se pudo aislar la correspondiente amida ya que ésta reaccionó *in situ* para dar directamente la oxazolona **rac-9** con un rendimiento moderado (Esquema 7).



Esquema 7.

Después, el aducto *rac-9* disuelto en DCM, se trató con metilamina y en presencia de un exceso de DIEA para realizar la apertura del anillo de oxazolona, y llegar al compuesto con los grupos ácido y amina convenientemente protegidos. En este caso, no fue necesario añadir un agente de acoplamiento, ya que la oxazolona se encuentra activada *per se* (Esquema 8).



Esquema 8.

Afortunadamente, se obtuvieron buenos monocristales del racémico **10** por evaporación lenta en una disolución acetato de etilo-hexano. En la figura 2 se puede ver la estructura del compuesto obtenida por difracción de rayos X, donde puede observarse la disposición *trans* del OH y del grupo amino del derivado c_6Ser .

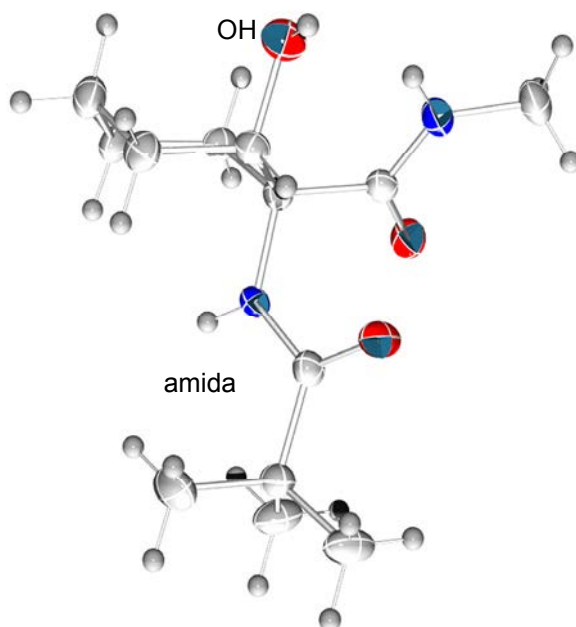
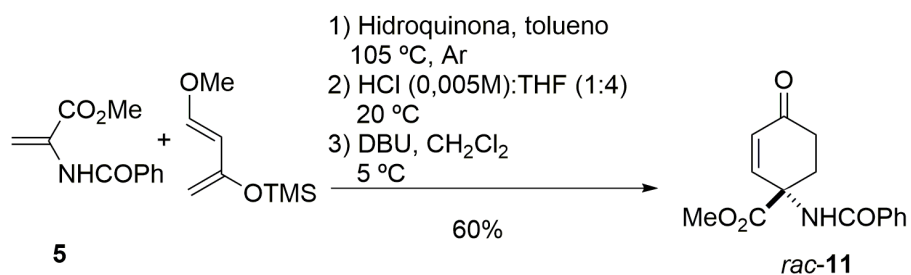


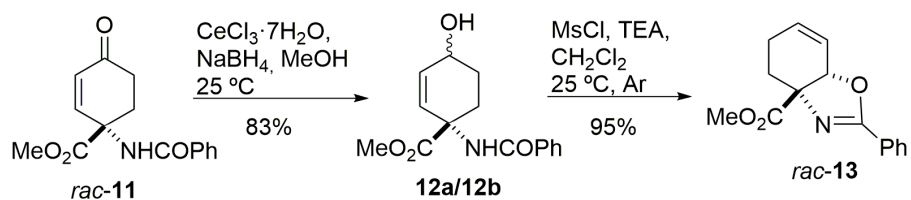
Figura 2. Estructura obtenida por difracción de rayos X para *rac-10*.

Para la síntesis del derivado de ciclohexano, *rac-18*, que dará lugar a los compuestos **3** y **4**, se partió igualmente del BAM, pero en este caso se usó el dieno de Danishefsky (1-trimetilsililoxi-3-metoxi-1,3-butadieno). Una vez llevada a cabo la reacción de Diels-Alder, se obtuvo mezcla de estereoisómeros, que se trataron con HCl (0.005M) en THF (1:4) para hidrolizar el grupo trimetilsililo en posición 4. A continuación, el crudo de reacción se trató con DBU para eliminar el grupo metoxi en posición 2 y conseguir de esta manera la enona *rac-11* (Esquema 9).



Esquema 9.

Seguidamente, el compuesto *rac-11* se trató con CeCl₃·7H₂O y NaBH₄ para obtener el correspondiente alcohol, es importante resaltar que se emplea CeCl₃·7H₂O para reducir selectivamente el carbonilo dejando intacto el doble enlace. Este compuesto en presencia de cloruro de mesilo y trietilamina como base originó la oxazolina *rac-13* (Esquema 10) que sitúa, como puede verse en el esquema siguiente, los átomos de oxígeno y de nitrógeno en *cis*.



Esquema 10.

En la figura 3, se describe el mecanismo que sigue la reacción, para la formación de la oxazolina *rac-13*

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

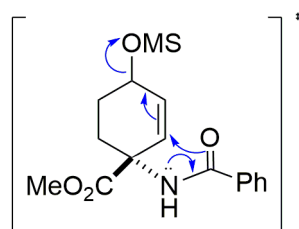
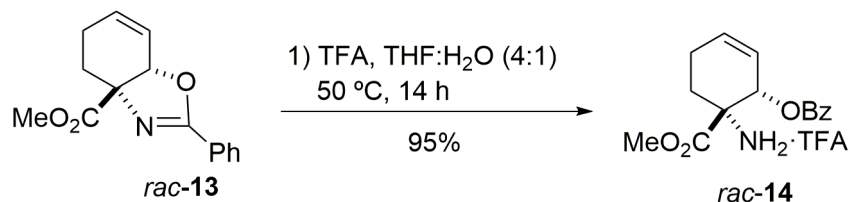


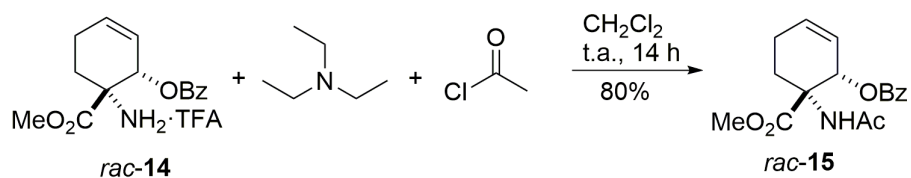
Figura 3. Mecanismo de reacción que da lugar a la oxazolina *rac-13*.

A continuación, el compuesto *rac-13* se trató con TFA para abrir la oxazolina, quedando el grupo alcohólico benzoilado en 2 y el grupo amino como trifluoroacetato (Esquema 11).



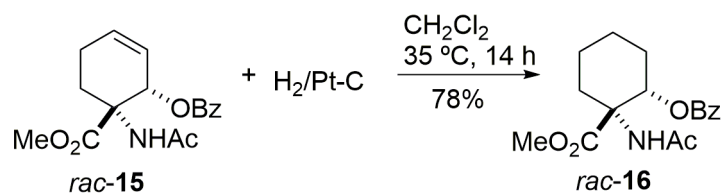
Esquema 11.

El racémico **14** se acetiló utilizando una mezcla de cloruro de acetilo y trietilamina en diclorometano (Esquema 12).



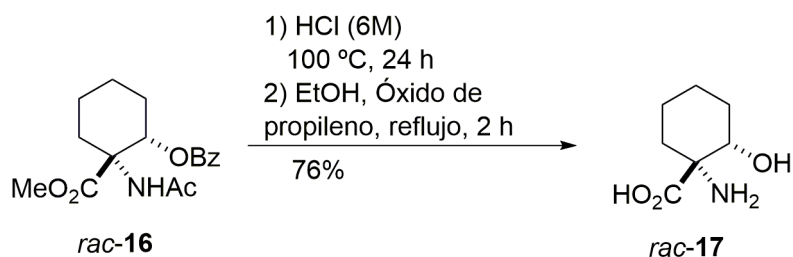
Esquema 12.

Para la obtención del aducto *rac*-16, se llevó a cabo la hidrogenación del doble enlace. Para ello, el *rac*-15 se disolvió en diclorometano y se añadió un catalizador de platino soportado sobre carbono y en presencia de hidrógeno (Esquema 13).



Esquema 13.

El siguiente paso en la síntesis fue la eliminación de los grupos protectores en medio ácido a reflujo, durante una noche, dando lugar a la mezcla racémica *rac*-17 (Esquema 14).

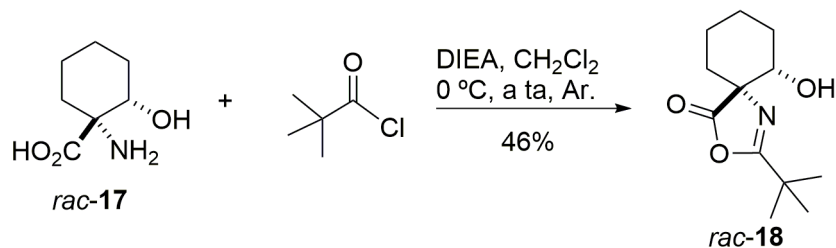


Esquema 14.

La siguiente etapa de la síntesis consistió en la protección del grupo amino. Con dicho fin, se puso a reaccionar el compuesto *rac*-17 con cloruro de pivaloilo y DIEA a 0 °C. En estas condiciones de reacción, no se pudo aislar la

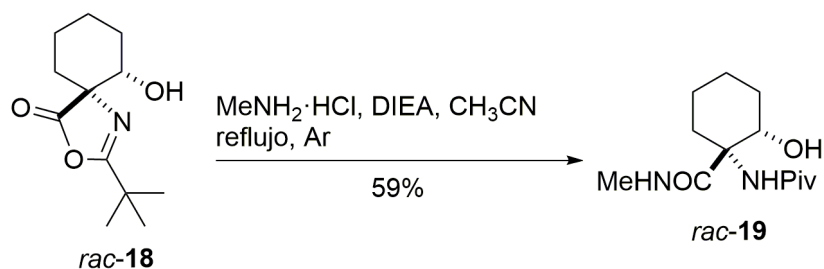
4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

correspondiente amida ya que esta reaccionó *in situ* para dar directamente la oxazolona *rac-18* con un rendimiento moderado (Esquema 15).



Esquema 15.

El último paso en la obtención del derivado aminoácido deseado, fue la apertura de la oxazolona por reacción con el clorhidrato de la metilamina en presencia de DIEA (Esquema 16).



Esquema 16.

Una vez sintetizados los aminoácidos en forma diamida, para simular esqueletos peptídicos (Figura 4), se llevaron a cabo las glicosilaciones, siguiendo las condiciones habituales de la reacción de Koenigs-Knorr para formar el enlace β -O-glicosídico.

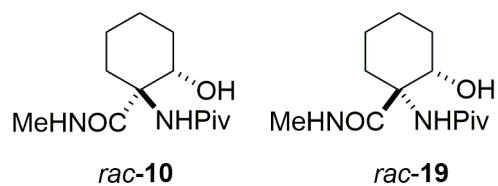
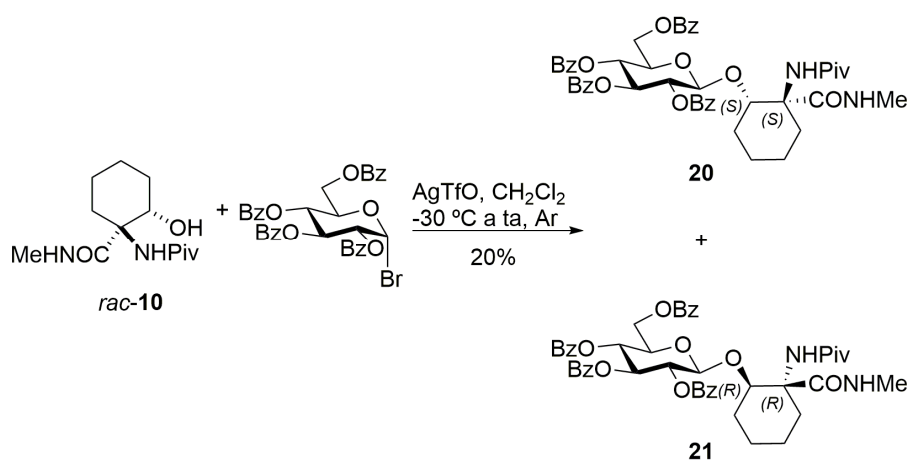


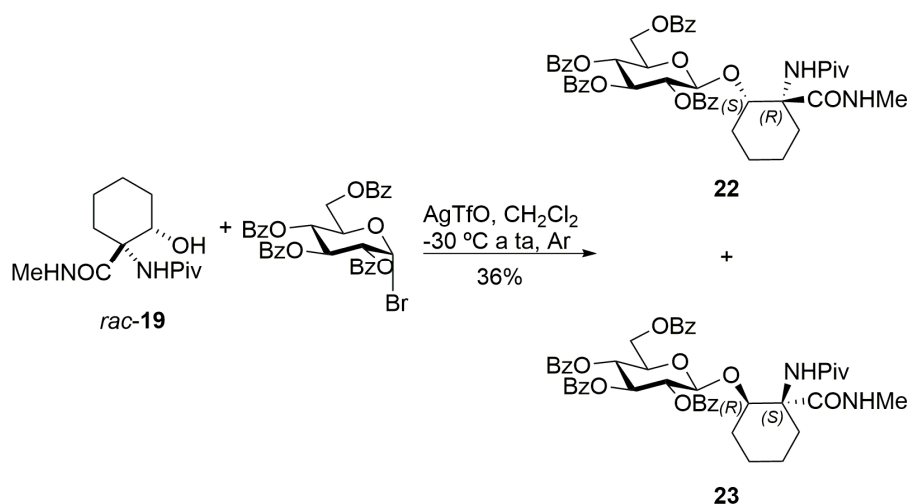
Figura 4. Esqueletos peptídicos que se utilizarán para su posterior glicosilación con β -D-glucosa.

Para ello, se trataron ambos racémicos (*rac-10* y *rac-19*) con el bromuro de la α -D-glucopiranosita tetrabenzoilada y triflato de plata, en condiciones anhidras y en ausencia de luz, para obtener los compuestos **20** y **21** (Esquema 17), a partir del *rac-10*, y el **22** y **23** (Esquema 18), a partir del racémico **19**. Es conveniente señalar que, la glicosilación de los diastereoisómeros cuyo precursor era el *rac-19* se dio con mayor rendimiento que en el caso de los derivados que provenían del *rac-10*.



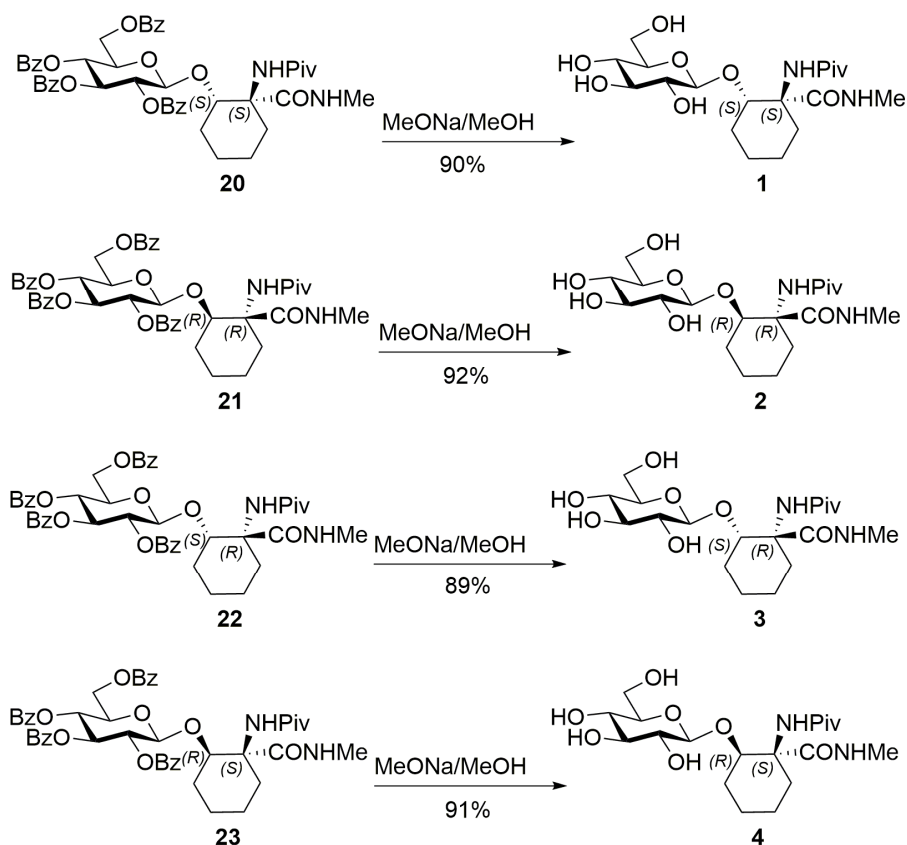
Esquema 17.

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos



Esquema 18.

Tanto la mezcla de diaestereoisómeros **20** y **21**, como la mezcla **22** y **23**, se separaron mediante columna cromatográfica. Una vez separados los glicosilderivados, cada uno se trató con MeONa/MeOH para desproteger los grupos hidroxilo de la glucosa y así obtener los cuatro derivados objeto de estudio en este trabajo (Esquema 19).



Esquema 19.

El siguiente paso consistió en la identificación de la configuración de los centros quirales de los compuestos sintetizados. Con este propósito se obtuvieron monocristales por evaporación lenta de éter/hexano del derivado **22**. La difracción de rayos X de dichos cristales nos permitió conocer de forma inequívoca la configuración absoluta de los centros estereogénicos del anillo de c_6Ser para los compuestos derivados del racémico **19**, los cuales resultaron ser (*R*) y (*S*), para el carbono α y el carbono β , respectivamente, tal como se muestra en la figura 5.

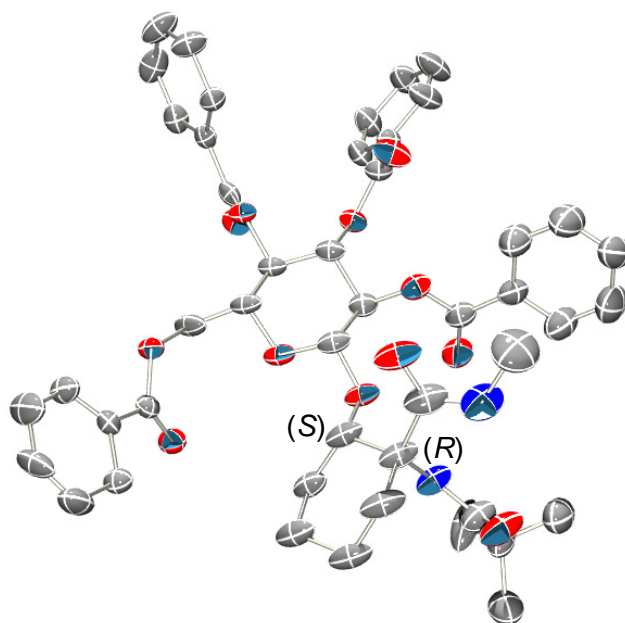
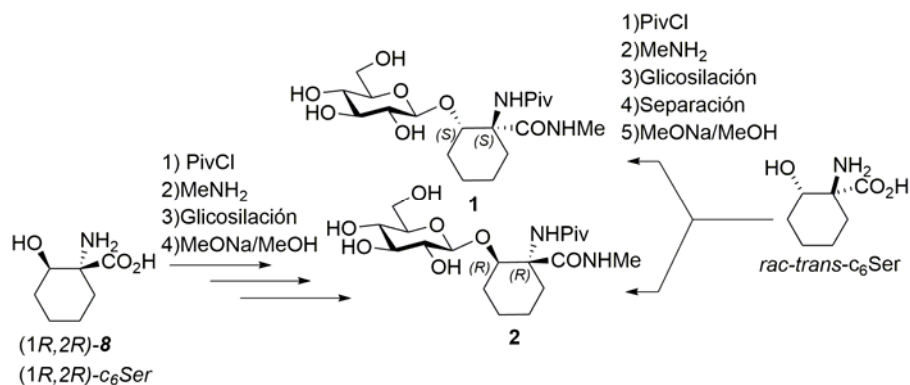


Figura 5. Estructura obtenida por difracción de rayos X del derivado **22**.

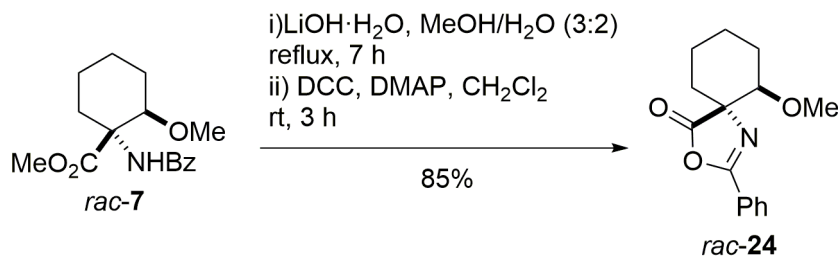
Para los compuestos **20** y **21** procedentes del racémico **10**, no se pudieron obtener buenos monocristales para la difracción de rayos X, por lo que para asignar la correspondiente configuración absoluta de los carbonos α y β del aminoácido a cada compuesto obtenido (*R,R*) o (*S,S*), fue necesario realizar de nuevo la síntesis de uno de ellos, pero partiendo del aminoácido c_6 Ser en su forma enantioméricamente pura:

Así, el aminoácido (*1R,2R*)-**8** se transformó en el glicosilaminoácido derivado de él: (*1R,2R*)- c_6 Ser, cuyo valor de rotación óptico fue comparado con los valores de la síntesis por vía racémica, permitiendo averiguar de modo inequívoca que dicho derivado correspondía con el compuesto **2** (Esquema 20).



Esquema 20.

Para la síntesis del enantiómero (1R,2R)-8, se partió del *rac-7*, primero se eliminó el éster metílico por reacción con hidróxido de litio, después se puso a reaccionar en diclorometano en presencia de dimetilaminopiridina y dicitlohexilcarbodiimida, para obtener la oxazolona racémica *rac-24* (Esquema 21).

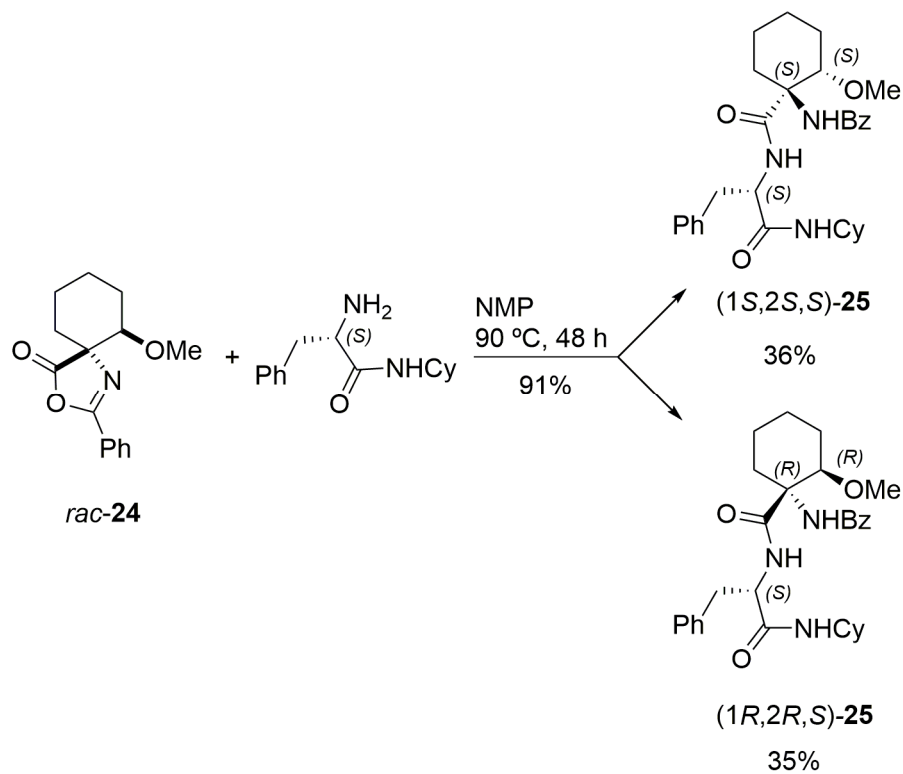


Esquema 21.

El siguiente paso fue la derivatización del racémico en dos diastereoisómeros, por reacción del *rac-24* con la ciclohexilamida de la L-

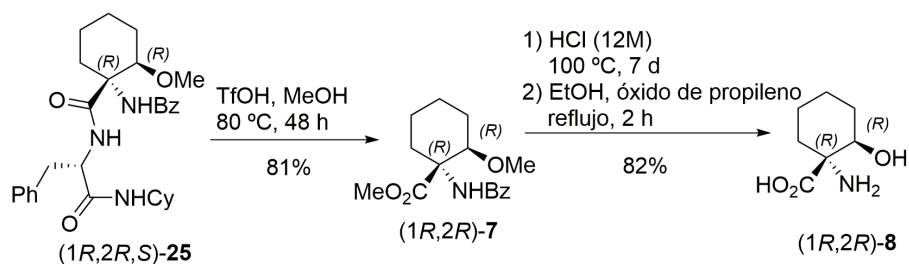
4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

fenilalanina, y después de separarlos por columna cromatográfica, se obtuvieron los diastereoisómeros (1*R*,2*R*,*S*)-**25** y (1*S*,2*S*,*S*)-**25** (Esquema 22).



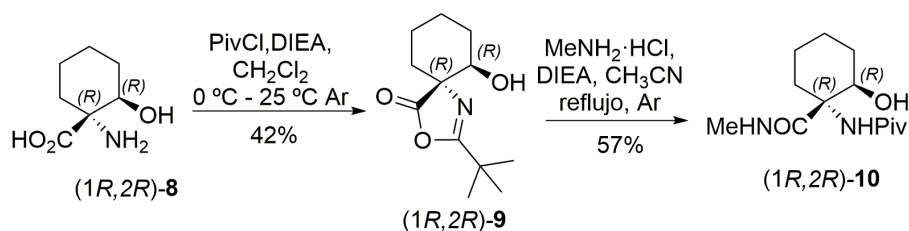
Esquema 22.

La desprotección de todos los grupos funcionales del esqueleto peptídico dio lugar al enantiómero (1*R*,2*R*)-**8** (Esquema 23).



Esquema 23.

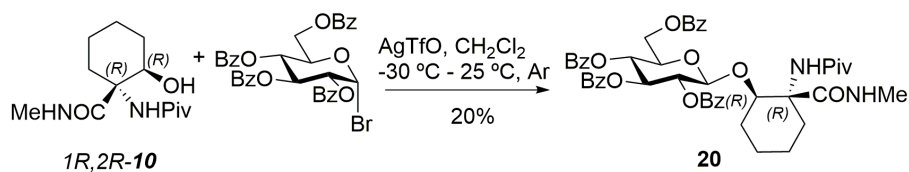
De forma análoga a la descrita anteriormente, se formó la oxazolona partiendo del aminoácido totalmente desprotegido y ésta se transformó al derivado diamida (1R,2R)-10 (Esquema24).



Esquema 24.

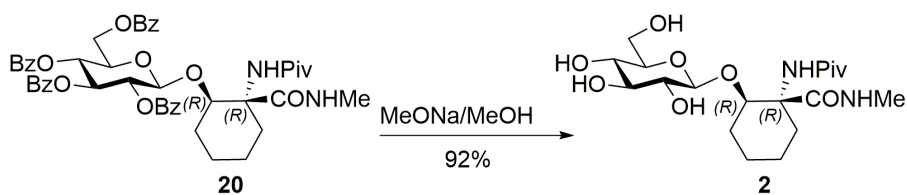
El siguiente paso que se llevó a cabo, una vez obtenido el ciclohexano convenientemente funcionalizado, fue la glicosilación siguiendo las condiciones de una de las modificaciones de la reacción de Koenigs-Knorr (Esquema 25).

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos



Esquema 25.

Por último, la desprotección de los grupos hidroxilo del carbohidrato dio lugar al compuesto **2** (Esquema 26).



Esquema 26.

De esta manera, se pudieron asignar inequívocamente las configuraciones absolutas de los carbonos α y β de los derivados c₆Ser glicosilados **1** y **2**.

4.3.2. Estudio conformacional

En la figura 7 se muestran los ángulos de torsión más relevantes, y las etiquetas de los átomos para poder identificarlos durante el análisis conformacional de cada uno de los compuestos objeto de estudio, en concreto en la figura se muestra la imagen del derivado **22**, del cual se pudieron obtener monocristales y su estructura pudo ser resuelta por difracción de rayos X.

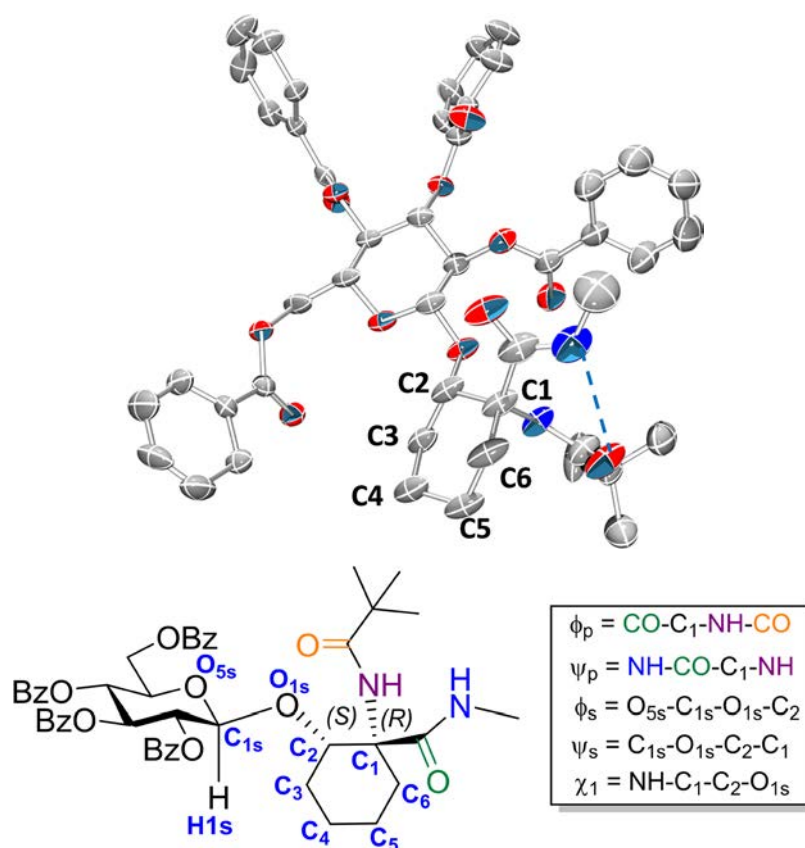


Figura 7. Ángulos de torsión estudiados y etiquetas de los átomos.

El primer paso en el análisis conformacional de los derivados glicosilados fue la asignación de las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C de RMN, en todos los compuestos. A modo de ejemplo, en la tabla 1 y en la figura 8 se muestra la asignación de todas las señales para el compuesto **1**.

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

Tabla 1. Asignación de los protones y constantes de acoplamiento de ${}^nJ_{H,H}$ experimentales para **1**^a

δ (ppm)	Protones	Multiplicidad ^b	${}^nJ_{H,H}$ (Hz)
1.20	(CH ₃) ₃ Piv	s (9H)	---
1.33 – 1.54	H _{Alif} (c6)	m (2H)	---
1.55 – 1.73	H _{Alif} (c6)	m (2H)	---
1.77 – 1.88	H _{Alif} (c6)	m (1H)	---
1.89 – 2.03	H _{Alif} (c6)	m (2H)	---
2.04 – 2.14	H _{Alif} (c6)	m (1H)	---
2.74	CH ₃ NHMe	s (3H)	---
3.30	H _{2s}	't' (1H)	${}^3J_{H_{2s},H_{1s},H_{3s}} = 8.6$
3.36	H _{4s}	't' (1H)	${}^3J_{H_{4s},H_{3s},H_{5s}} = 9.2$
3.41 – 3.50	H _{5s} + H _{3s}	m (2H)	---
3.70	H _{6s}	dd (1H)	${}^3J_{H_{6s},H_{6s'}} = 12.4$ ${}^3J_{H_{6s},H_{5s}} = 5.9$
3.91	H _{6s'}	dd (1H)	${}^3J_{H_{6s'},H_{6s}} = 12.4$ ${}^3J_{H_{6s'},H_{5s}} = 2.2$
4.06 – 4.13	H _{β}	m (1H)	---
4.44	H _{α}	d (1H)	${}^3J_{H_{\alpha},H_{\beta}} = 7.9$

^aDatos extraídos del experimento de RMN de ¹H (400 MHz) llevado a cabo en D₂O (298 K, pH = 5.2) ^bs = singlete, d = doblete, dd = doblete de dobletes, 't' = pseudotriplete, m = multiplete.

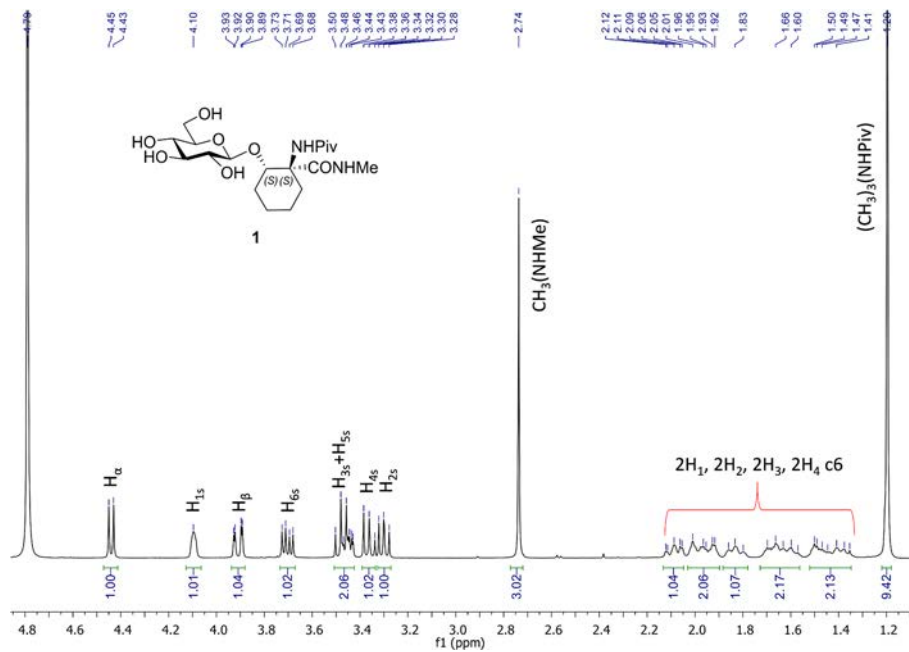


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **1**.

Como puede verse en el espectro de la figura 8, no fue posible asignar los protones alifáticos del esqueleto peptídico, pero pudimos obtener la información de la disposición de los sustituyentes gracias a los experimentos de NOESY 1D selectivos en D_2O y experimentos NOESY 2D en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) que se realizaron (Figura 9).

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

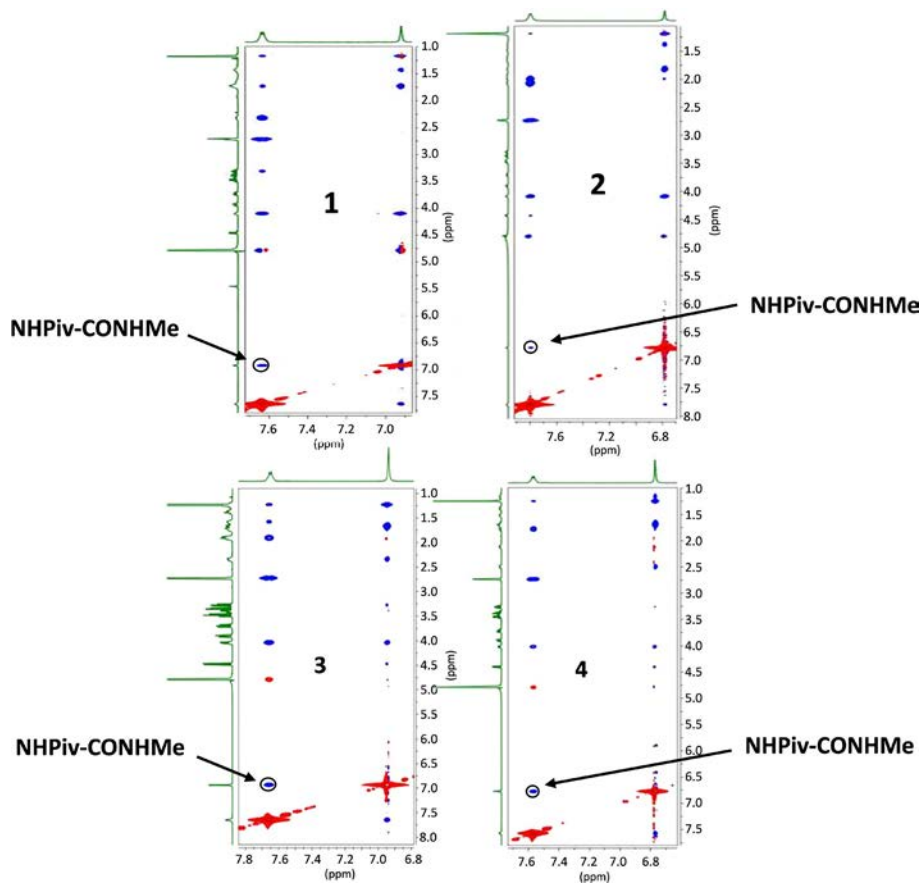


Figura 9. 2D-NOESY (H_2O/D_2O , 9:1), 400MHz; Los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C y pH 5.8.

La presencia de los picos de cruce que aparecen en el NOE entre los protones NH de la cadena peptídica indica que las conformaciones tipo hélice son mayoritarias en los cuatro derivados.^[13] Además, el NOE intenso que se observa entre el protón anomérico H1s y el protón H2 implica que existe una conformación típica *syn* (ángulo C1s-O1s-C2-H2 muy próximo a 0°) para el enlace glicosídico, para los compuestos **1-4** (ver experimental).^[5,14]

El siguiente paso fue construir un modelo teórico que fuera capaz de reproducir nuestros datos experimentales de RMN. Con este propósito, usamos nuestro protocolo previamente desarrollado (ver anexos II y II),^[2-8,15,16] que combina resonancia magnética nuclear (RMN) con dinámicas moleculares (*MD*), emplea los datos experimentales obtenidos de la RMN para llevar a cabo cálculos de dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo (*MD-tar*).^[17-19] Las distancias protón-protón fueron determinadas experimentalmente a través de las curvas de crecimiento NOE (Figura 10)^[20] y las distancias que involucran a los protones del NH fueron calculadas semicuantitativamente integrando el volumen de los correspondientes picos de cruce (Figura 9). Estos datos fueron usados posteriormente como restricciones en las simulaciones *MD-tar*.

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

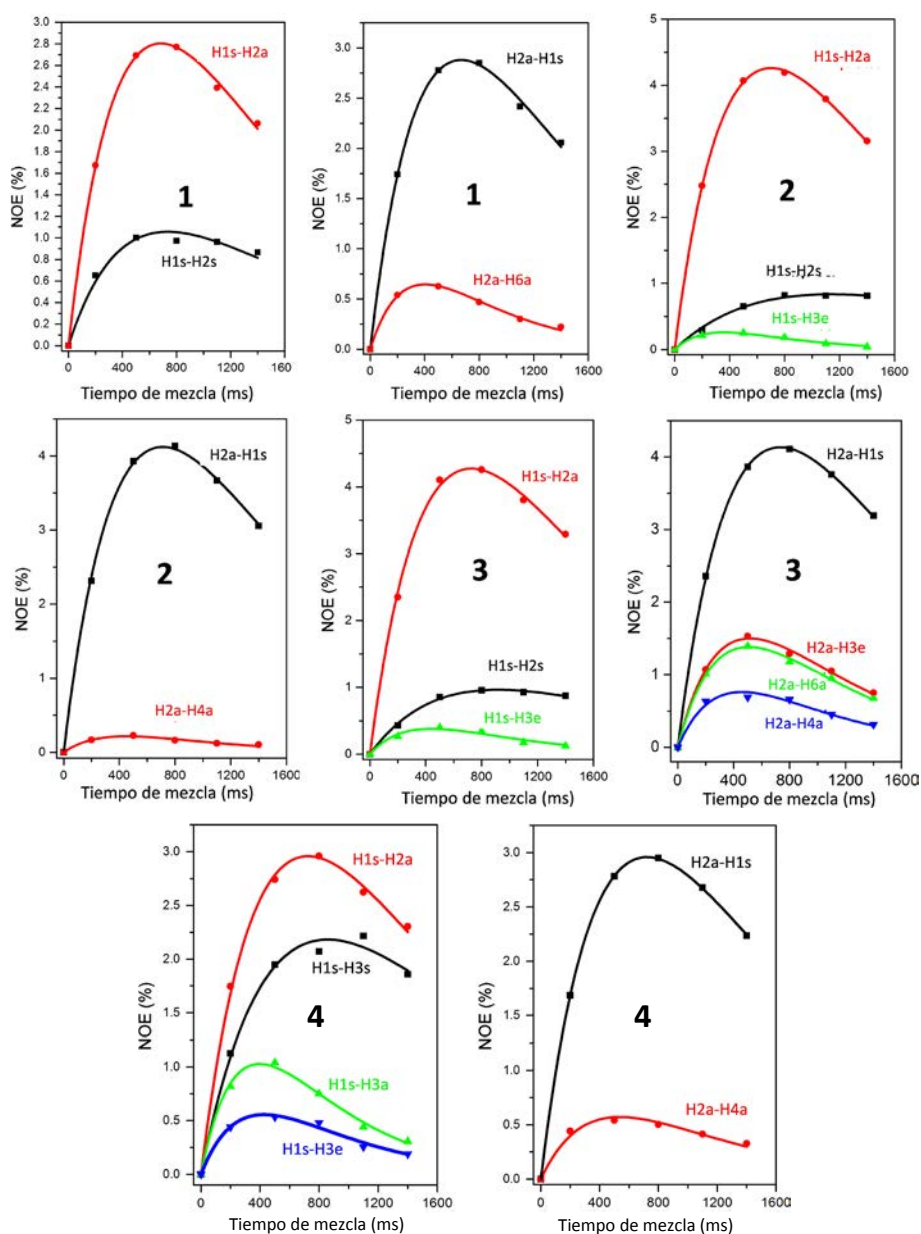


Figura 10. Curvas de crecimiento NOE para los cuatro glicosilderivados.

La distribución para el esqueleto peptídico (φ_p/ψ_p), que se obtuvo de la simulación (*MD-tar*) se puede ver en la tabla 2.

Tabla 2. Poblaciones mayoritarias de los conformeros obtenidas de las simulaciones de MD con restricciones promediadas en el tiempo, para los esqueletos peptídicos de los compuestos **1 - 4**.

Compuesto	α_D [%]	α_L [%]	PPII [%]
1	54	3	42
2	6	91	3
3	5	89	4
4	48	47	3

De acuerdo con los datos de RMN descritos arriba, los cuatro glicosilaminoácidos acabados en amida mostraron una alta población de conformeros con valores para los ángulos diedros (φ_p/ψ_p) característicos de conformaciones tipo hélice. Sin embargo, pueden establecerse algunas diferencias importantes entre ellos. Por ejemplo, mientras que para **4** la simulación de *MD* sugiere la existencia de poblaciones similares para las dos posibles conformaciones tipo hélice, el conformero α_L (hélice levógira) fue el más poblado para los compuestos **2** y **3**. La conformación mayoritaria adoptada por el compuesto **3** en disolución acuosa es la misma que se observó en estado sólido en su precursor (derivado **22**, figura 7). En este caso es importante destacar que la estructura cristalina de **22** mostraba un giro y inverso en el estado sólido, estabilizado por un enlace de hidrógeno entre los grupos $\text{PivC=O}\cdots\text{NHMe}$. En contra de esto, el derivado **3** mostró tanto la conformación tipo PPII (poliprolina II) como la hélice para el esqueleto

peptídico. Por otra parte, mientras que los derivados con configuración R en el C α (compuestos **2** y **3**) tienden a adoptar conformación α_L los derivados **1** y **4** exhiben el confórmero α_D (hélice derecha). Es importante mencionar que estos confórmeros mayoritarios encontrados para el esqueleto peptídico de los glicosilaminoácidos en forma de diamida caen en el mínimo local previamente calculado para otros aminoácidos α,α -disustituidos.^[5]

Por otra parte, en lo que respecta al enlace glicosídico, φ_S está principalmente determinado por el efecto exoanomérico,^[21] éste fija el valor del ángulo diedro alrededor de -60° en todos los derivados. Además, ni la estereoquímica del C α ni la presencia de un sustituyente en el C α afecta significativamente a la conformación del enlace glicosídico (Figura 11). Por el contrario, si la sustitución se produce en el C2 (o C β) el ángulo de torsión ψ_S se ve afectado notablemente, llegando a tomar un valor cercano a 120° (compuestos **2** y **4**) o -120° (compuestos **1** y **3**). Esta conformación, nombrada como A y A' en la figura 11, muestra los enlaces H2-C2 y O1s-C1s en conformación eclipsada para evitar interacciones desestabilizantes entre el anillo de ciclohexano del aminoácido y el oxígeno endocíclico del residuo carbohidrato. Además, en el caso en que el C2 tiene configuración (S) (compuestos **1** y **3**), el enlace glicosídico es más flexible, y encontramos una pequeña población de un confórmero adicional (llamado B en la figura 11) con ψ_S cercano a -180° y φ_S alrededor -120° . Esta conformación se ha observado en otras diamidas de glicosilaminoácidos no naturales.^[5]

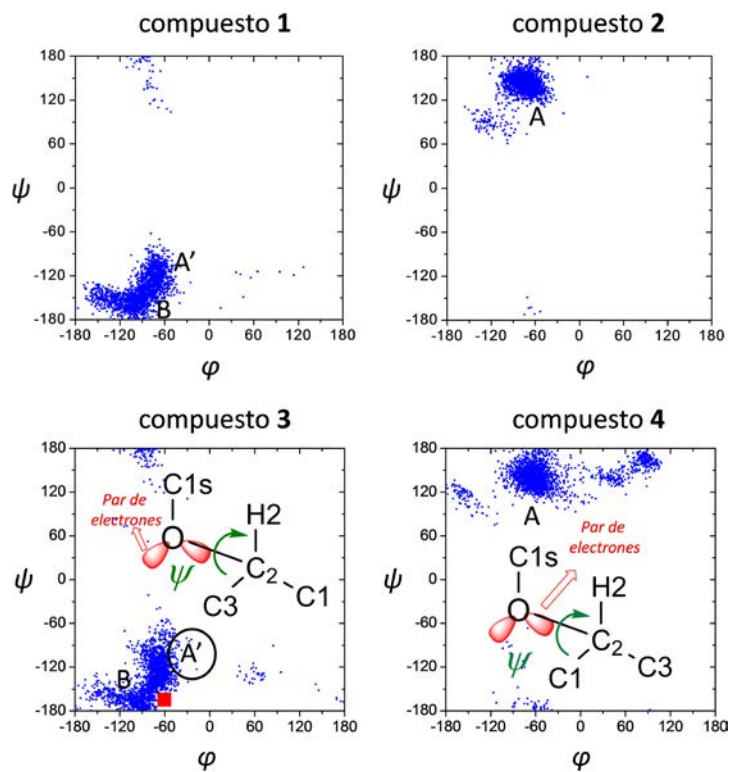


Figura 11. Distribuciones del enlace glicosídico (φ_s/ψ_s) de los cuatro compuestos, obtenidas de las simulaciones MD-tar: a) 1; b) 2; c) 3; d) 4. Para el compuesto 3, la conformación del enlace glicosídico en el estado sólido de su predecesor (compuesto 22) se ha marcado con un cuadrado rojo.

Además, el análisis de los NOE reveló un interesante equilibrio entre dos posibles conformaciones tipo silla para el anillo de ciclohexano del aminoácido (Figura 12). En todos los casos, la silla **a** se refiere al confórmero con el grupo NHPiv en posición axial.

Desde un punto de vista experimental, el equilibrio entre las dos posibles sillas puede ser determinado examinando las distancias entre los protones H2a y H6a deducidas de las curvas de crecimiento.

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

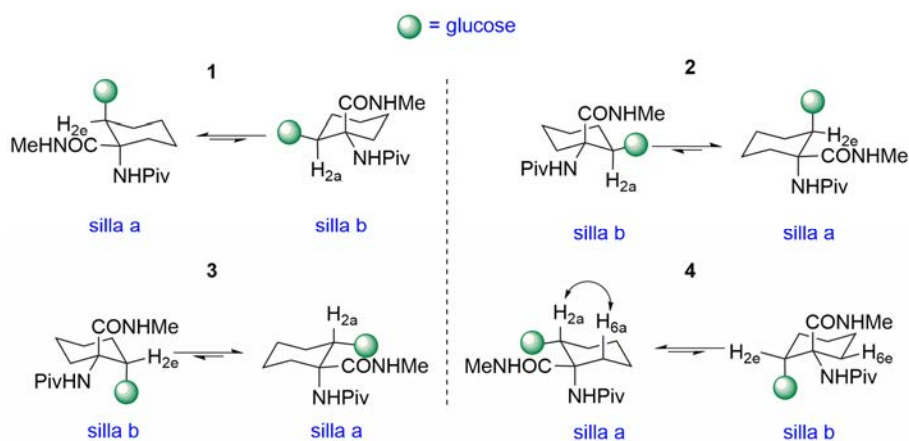


Figura 12. Equilibrio observado en disolución acuosa entre las dos posibles sillas (llamadas silla *a* y *b*) de los anillos de seis miembros de la parte aminoacídica para los compuestos estudiados.

Es interesante destacar, que la conformación tipo silla más abundante es aquella que deja el grupo más voluminoso (NHPiv) en posición axial (silla *a*), en particular para los derivados **1** y **3**. Este resultado es, en cierta medida, lo esperado. En efecto, la preferencia por parte de los grupos amino y amida a adoptar la posición axial en ciclohexano- α -aminoácidos ya se conocía previamente en el estado sólido.^[22,23] De hecho, existen algunas estructuras cristalinas que corroboran estas evidencias.^[24,25] Por otra parte, los resultados de las simulaciones de *MD* se ajustan bien a los datos experimentales (Tabla 3). En el compuesto **3**, en el que el residuo carbohidrato y el grupo NHPiv están en una posición relativa *cis*, el azúcar ocupa la posición ecuatorial, que es lo esperado para evitar las interacciones 1,3-diaxiales. La silla *a* fue encontrada también en la estructura cristalina del compuesto perbenzoilado **22**, que es el precursor de **3**. Por el contrario, para el compuesto **4**, las dos sillas coexisten en disolución en una abundancia

similar. Hay que resaltar, que en los compuestos **1** y **2** la mayor parte de la población adopta la conformación de silla **a**, que deja los grupos voluminosos en axial (NHPiv y glucosa).

Tabla 3. Distancias experimentales (\AA) entre H2 y H6 y % experimental y calculado mediante MD para la silla a.

Compuesto	d (H2a-H6a)	% silla a (expt)	% silla a (MD-tar)
1	3.1	62	62
2	3.3	73	94
3	2.7	80	75
4	2.9	54	41

Respecto a esta evidencia, hay algunas excepciones a la regla establecida que dicen, que en un anillo de ciclohexano, los grupos más voluminosos prefieren situarse en posiciones ecuatoriales. Una de las excepciones se conoce como estabilidad inversa axial/ecuatorial.^[26,27] Por ejemplo, una molécula con gran impedimento estérico como todo-*trans*-hexaalquilciclohexano prefiere la conformación que deja dispuestos los sustituyentes en posición axial en lugar de en ecuatorial (Figura 13).

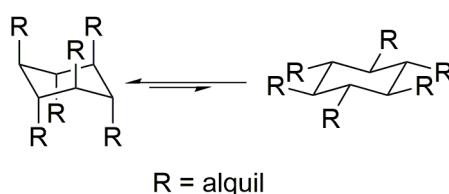


Figura 13. Representación del equilibrio entre las dos posibles sillas.

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

Los autores sugieren que la estabilidad inversa no es debida a la estabilización del conformero axial, sino que se debe a la desestabilización del conformero ecuatorial a causa de contribuciones estéricas y de torsión.

En lo que a la cadena lateral se refiere, su comportamiento conformacional está determinado por el ángulo de torsión χ^1 , que puede adoptar tres rotámeros de mínima energía, llamados $g(-)$ ($\chi^1 \approx -60^\circ$), $g(+)$ ($\chi^1 \approx +60^\circ$) y $anti$ ($\chi^1 \approx 180^\circ$). La figura 14 muestra la población de χ^1 obtenida de las simulaciones de las *MD-tar* para todos los aminoácidos glicosilados **1-4**. Para estos sistemas, uno debería esperar un ángulo de torsión χ^1 rígido debido a la restricción propia del anillo. Los diferentes valores de χ^1 observados para cada molécula se deben al equilibrio, descrito anteriormente, entre las dos posibles sillas.

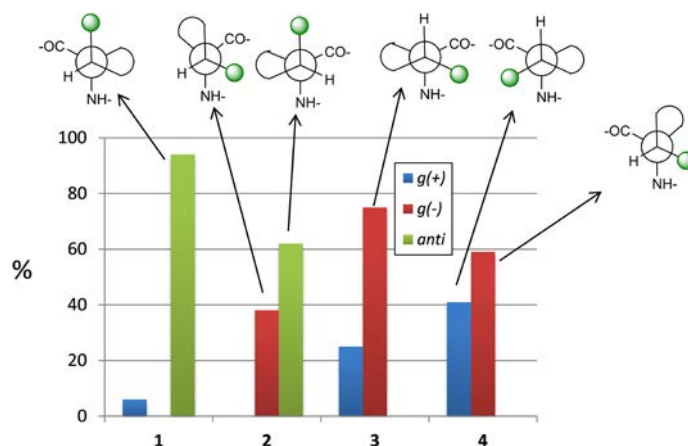


Figura 14. Distribuciones para la cadena lateral de los cuatro glicosilaminoácidos en forma de diamida, obtenidos de las MD con restricciones promediadas en el tiempo.

Así, para los compuestos **2** y **4**, que presentan poblaciones significativas para las dos sillas en disolución, la cadena lateral es bastante flexible, con dos posibles valores, conformaciones tipo $g(+)$ y $g(-)$ para el derivado **4** y

conformaciones *g(-)* y *anti* para el compuesto **2**. Por el contrario, el derivado **3** y especialmente el compuesto **1**, exhibieron preferentemente valores de χ^1 correspondientes a *g(-)* y *anti*, respectivamente. Además, como puede verse en la figura 14, los compuestos **1** y **2** mostraron una clara preferencia por la conformación *anti* para la cadena lateral. Una importante consecuencia de este hecho es que mientras los derivados **3** y **4** presentan el carbohidrato con una orientación perpendicular al esqueleto peptídico, los derivados **1** y **2** disponen la glucosa casi paralela a la secuencia peptídica. En la figura 15 se muestra la superposición de las estructuras encontradas para cada uno de los derivados, donde podemos observar la disposición del carbohidrato y compararlo además con las correspondientes estructuras de Thr y Ser previamente estudiadas en nuestro grupo.

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

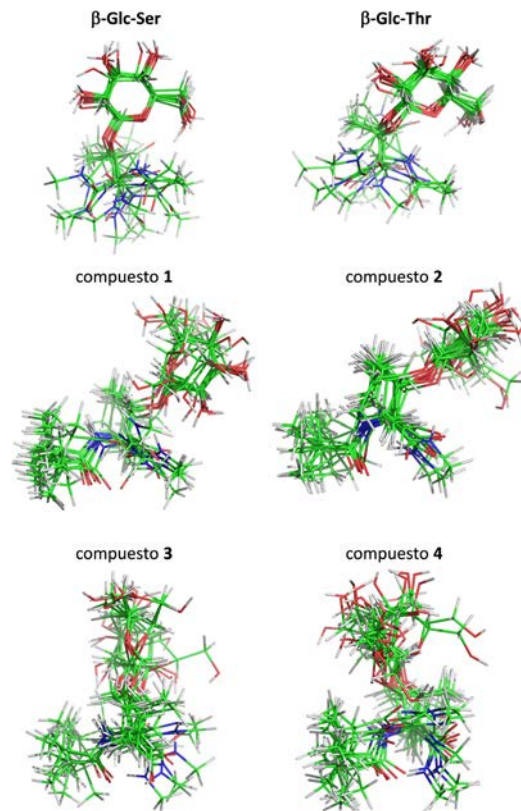


Figura 15. Superposición de las estructuras encontradas mediante simulación de MD de 80 ns para cada uno de los glicosilaminoácidos en forma de diamida, así como de los correspondientes derivados de Ser y Thr.

En trabajos anteriores, demostramos que mientras que en los derivados de β -Glc-Ser, el carbohidrato y la parte peptídica exhibían una disposición perpendicular, esta orientación cambia, cuando se trata del compuesto β -Glc-Thr, hacia una conformación en la que el carbohidrato respecto al esqueleto peptídico se dispuso en paralelo. Sobre esta base, podemos afirmar que los derivados ciclohexano **3** y **4** imitan el comportamiento

conformacional de los glicopéptidos de Ser, mientras que los compuestos **1** y **2** se comportan igual que los glicopéptidos que incorporan Thr.

Para investigar si estas conformaciones se encuentran estabilizadas por interacciones entre el péptido y el carbohidrato, se llevó a cabo un análisis para comprobar la existencia de algún enlace de hidrógeno, sin embargo, en todos los casos, los enlaces de hidrógeno que se encontraron entre las dos partes de la molécula fueron muy débiles (menos de un 10% de la población muestra la conformación en la que existe el enlace de hidrógeno). Por lo tanto, teniendo en cuenta la influencia que las moléculas de agua pueden exhibir en la conformación de los glicosilaminoácidos en forma de diamida, se llevó a cabo un experimento para observar la hidratación anisotrópica de los solutos. Con este objetivo, se calcularon los pares de distribuciones radiales 1D y 2D normalizados,^[28,29] para ello se realizaron simulaciones de *MD* de 20 ns, sin restricciones y en disolvente explícito para todos los posibles sitios de densidad de agua compartida. Hay que destacar, que solo en el caso del compuesto **4** se encontró un puente de agua entre los átomos O6s y el oxígeno del carbonilo del aminoácido (Figura 16). Este bolsillo de agua está presente el 50% del tiempo total de la trayectoria, coincidiendo con la conformación *g*(+) para la cadena lateral, exhibe una alta densidad (alrededor de 7.6 veces la densidad aparente) y difiere de la encontrada previamente para su análogo natural (β -Glc-Ser diamida).²⁶

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

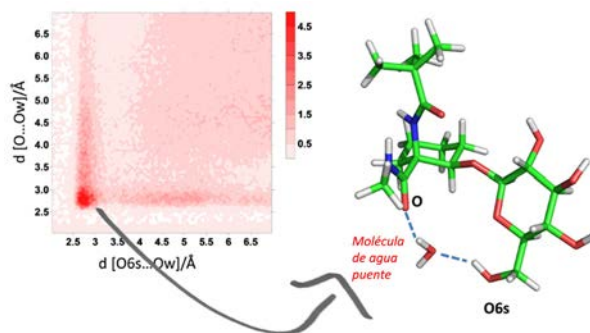


Figura 16. Función de distribución en dos dimensiones para el O6 y el O del carbonilo, encontrados para el compuesto **4** en la simulación de MD en agua explícita.

La figura 17 muestra las conformaciones mayoritarias encontradas para los glicosilaminoácidos en forma de diamida en disolución acuosa estudiados en este trabajo. Como se ve, cuando se emplea el aminoácido que incorpora el anillo de ciclohexano, aparecen varias presentaciones del resto carbohidrato con respecto al propio aminoácido. Así, por ejemplo, el compuesto **2** muestra una de las mayores conformaciones que tiene el derivado natural β -Glc-Thr (ver compuesto **2** en figura 17) y estabiliza una inusual conformación que se observa en la naturaleza. Estas geometrías podrían ser usadas para mejorar el reconocimiento entre el carbohidrato y su diana biológica. Por consiguiente, las diversas disposiciones 3D del azúcar podrían tener implicaciones importantes en el diseño de fármacos. Los conformeros derivados de estos sistemas podrían también ser útiles para definir los elementos fundamentales en los procesos de reconocimiento molecular.

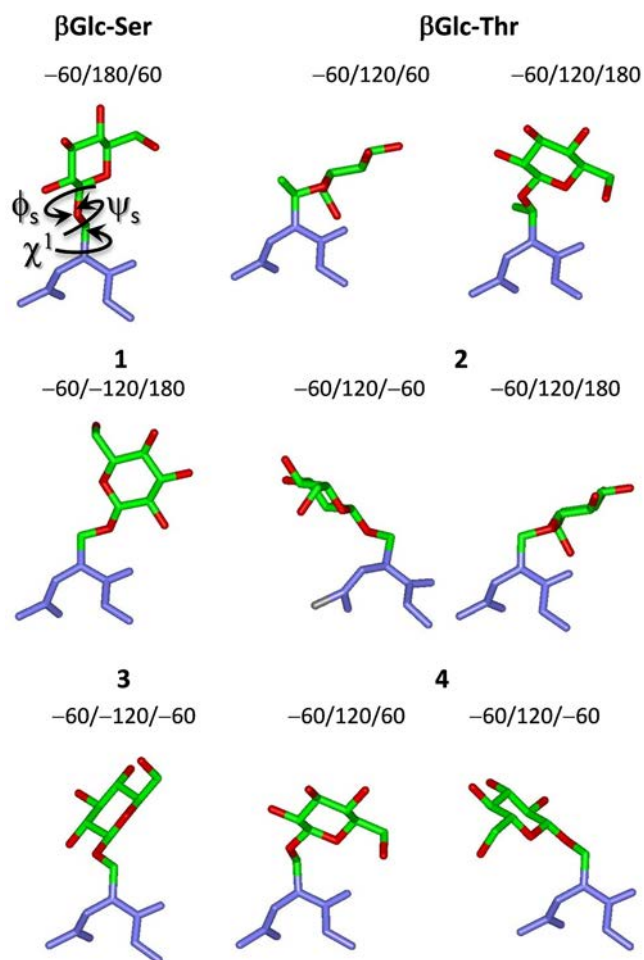
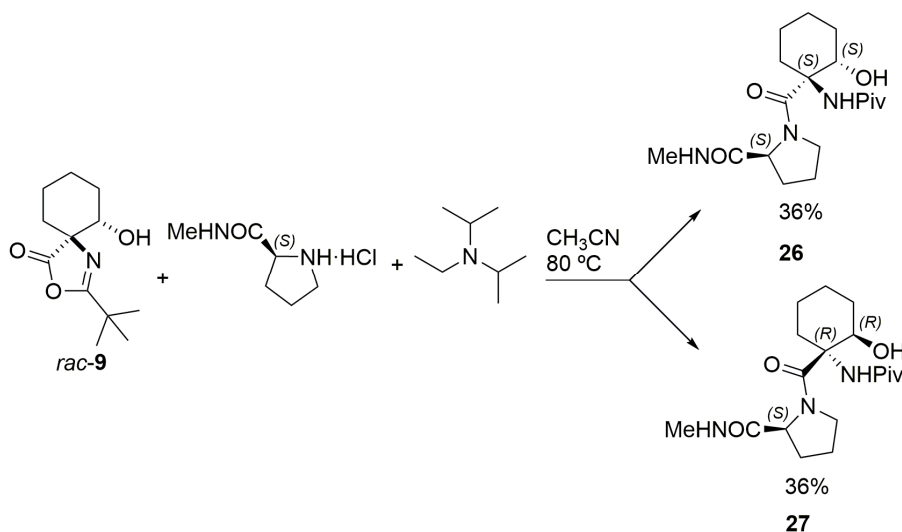


Figura 17. Valores obtenidos para $\phi_s/\psi_s/\chi^1$ de las simulaciones de MD con restricciones promediadas en el tiempo para los conformeros mayoritarios de los compuestos **1 - 4**, junto a ellos se pueden observar los conformeros previamente deducidos para los derivados naturales de Ser y Thr (el anillo de ciclohexano se ha eliminado para mayor claridad).

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

4.3.3. Extrapolación de los resultados obtenidos a péptidos de mayor tamaño

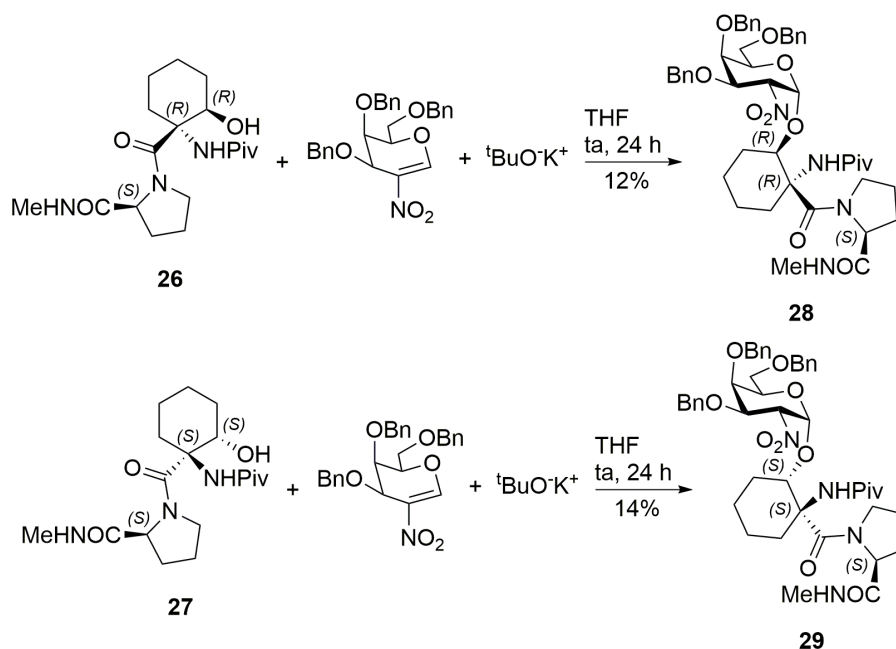
Para demostrar el enfoque que se presenta en este trabajo, se incorporaron algunos de los aminoácidos no naturales desarrollados en este trabajo, en pequeños péptidos: (1*R*,2*R*)-c₆Ser-L-Pro (**26**) y (1*S*,2*S*)-c₆Ser-L-Pro (**27**). Para ello, se partió del racémico *rac*-**9**, que se hizo reaccionar con el clorhidrato de la L-prolinametilamida, en presencia de DIEA, para obtener los compuestos (**26**) y (**27**) que pudieron separarse fácilmente mediante columna cromatográfica (Esquema 27).



Esquema 27.

Igual que en el caso de los aminoácidos, en estos dipéptidos, los grupos terminales amino y ácido carboxílico aparecen en forma de amidas para simular péptidos más largos. Estos dipéptidos fueron tratados con tri-*O*-bencil-2-nitro-D-galactal y *terc*-butóxido de potasio para obtener los correspondientes α-anómeros **28** y **29**. Se decidió cambiar el carbohidrato

para demostrar que este tipo de aminoácidos no naturales pueden usarse para formar tanto enlaces α - como β -glicosídicos en las reacciones de glicosilación (Esquema 28).



Esquema 28.

Afortunadamente, fue posible obtener la estructura cristalina del compuesto **28**, que correspondió a PivHN-(1*R*,2*R*)-c₆Ser*-L-Pro-CONHMe, donde (*) se refiere a la parte del glicano indicado en la figura 18.

4. Ciclohexano como herramienta para ampliar el espacio conformacional de glicopéptidos

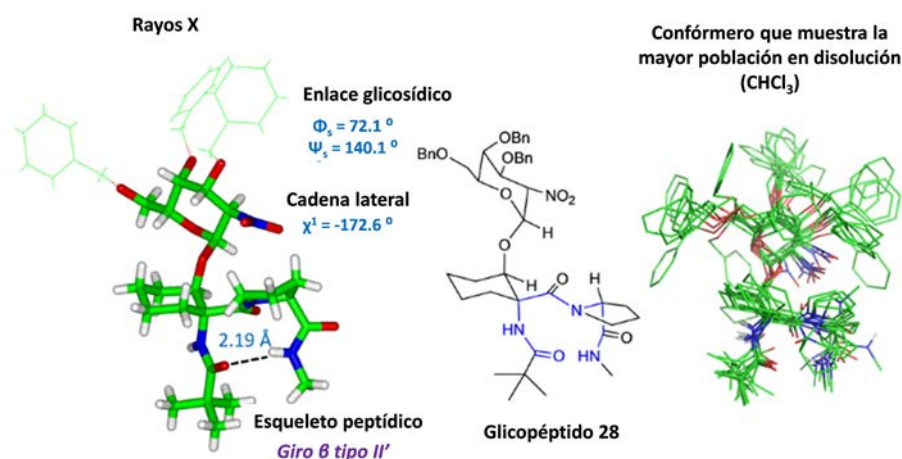


Figura 18. A la izquierda vemos la estructura cristalina y a la derecha el confórmero que presenta la mayoría de la población en disolución, ambas estructuras para el compuesto **28**.

Como puede verse, en dicha figura, el esqueleto peptídico adopta un giro β tipo II' y el enlace glicosídico mostraba la conformación típica eclipsada, con ψ_s alrededor de 140° . Como también ocurre para su análogo, compuesto **2**, el anillo de ciclohexano del derivado **28** principalmente adopta la conformación de silla **a**, con los grupos voluminosos situados en posición axial. Adicionalmente, el comportamiento conformacional de **28** en disolución de CHCl₃ fue analizado combinando la técnica de RMN (picos de cruce NOE) y MD con restricciones promediadas en el tiempo (anexos II y III). Mientras que la conformación de silla **a** está totalmente poblada en disolución y el enlace glicosídico muestra principalmente el confórmero eclipsado, la estructura del giro β del esqueleto peptídico coexistió con la conformación típica de hélice forzada por el residuo c₆Ser, en una relación 3:1, respectivamente.

4.4. Conclusión

Se ha llevado a cabo la síntesis y el análisis conformacional de glicosilaminoácidos en forma de diamida, cuyos residuos peptídico y carbohidrato están unidos a través de un enlace β -O-glicosídico. Como carbohidrato representativo de dicho enlace se ha utilizado la β -glucosa y los aminoácidos no naturales a los que está unido, son los 4 estereoisómeros del β -hidroxiciclohexano- α -aminoácido.

El estudio, que combina experimentos de RMN, espectroscopia de rayos X y cálculos de dinámica molecular, revela que el anillo de ciclohexano puede efectivamente modular la presentación del carbohidrato con respecto al aminoácido al que está unido. Estas características, junto con el hecho de que el aminoácido exhibe diferentes conformaciones tipo silla para el anillo de seis miembros, permite a la molécula adoptar conformaciones que nunca antes se habían observado en derivados naturales.

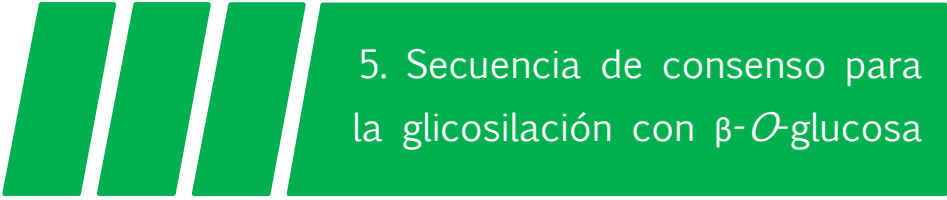
Además, se han sintetizado dos dipéptidos que incorporan el nuevo derivado de ciclohexano- α -aminoácido y también se han glicosilado para obtener los correspondientes α -O-glicopéptidos.

La utilización de estos derivados no naturales podría tener implicaciones importantes en el desarrollo de nuevos fármacos, así como, en el entendimiento de los complejos procesos moleculares entre glicopéptidos y sus dianas biológicas.

4.5. Bibliografía

- [1] F. Corzana, A. Fernández-Tejada, J. H. Busto, G. Joshi, A. P. Davis, J. Jiménez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *ChemBioChem* **2010**, *12*, 110–117.
- [2] A. Fernández-Tejada, F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, J. Jiménez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7297–7301.
- [3] A. Fernández-Tejada, F. Corzana, J. H. Busto, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2885–2893.
- [4] A. Fernández-Tejada, F. Corzana, J. H. Busto, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9305–9313.
- [5] A. Fernández-Tejada, F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7042–7058.
- [6] F. Corzana, J. H. Busto, M. García de Luis, A. Fernández-Tejada, F. Rodríguez, J. Jiménez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 3525–3532.
- [7] F. Corzana, J. H. Busto, F. Marcelo, M. García de Luis, J. L. Asensio, S. Martín-Santamaría, J. Jiménez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3105–3110.
- [8] F. Corzana, J. H. Busto, F. Marcelo, M. García de Luis, J. L. Asensio, S. Martín-Santamaría, Y. Sáenz, C. Torres, J. Jiménez-Barbero, A. Avenoza, et al., *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5319–5321.
- [9] A. Avenoza, J. I. Barriobero, C. Cativiela, M. A. Fernández-Recio, J. M. Peregrina, F. Rodríguez, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2745–2755.
- [10] V. L. Challinor, P. Y. Hayes, P. V. Bernhardt, W. Kitching, R. P. Lehmann, J. J. De Voss, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7275–7280.
- [11] S. G. Sparg, M. E. Light, J. Van Staden, *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 219–243.
- [12] Fernández-Recio, M.A., *Tesis Doctoral* **2000**, 1–543.
- [13] H. J. Dyson, P. E. Wright, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 519–538.
- [14] F. Corzana, J. H. Busto, S. B. Engelsen, J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7864–

- 7871.
- [15] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14640–14648.
- [16] J.-P. P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen, *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327–341.
- [17] A. P. Nanzer, T. Huber, A. E. Torda, W. F. van Gunsteren, *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 285–291.
- [18] A. E. Torda, R. M. Scheek, W. F. van Gunsteren, *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 223–235.
- [19] D. A. Pearlman, P. A. Kollman, *J. Mol. Biol.* **1991**, *220*, 457–479.
- [20] T. Haselhorst, T. Weimar, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10705–10714.
- [21] G. R. J. Thatcher, in *ACS Symposium Series*, American Chemical Society, Washington, DC, **2009**, pp. 6–25.
- [22] P. G. Vasudev, R. Rai, N. Shamala, P. Balaram, *Biopolymers* **2008**, *90*, 138–150.
- [23] M. Lasa, A. I. Jiménez, M. M. Zurbano, C. Cativiela, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8377–8380.
- [24] A. Avenoza, J. H. Busto, C. Cativiela, J. M. Peregrina, F. Rodríguez, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1429–1432.
- [25] A. Avenoza, C. Cativiela, M. A. Fernández-Recio, J. M. Peregrina, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999**, *0*, 3375–3379.
- [26] O. Golan, Z. Goren, S. E. Biali, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9300–9307.
- [27] Z. Goren, S. E. Biali, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 893–894.
- [28] C. Andersson, S. B. Engelsen, *J. Mol. Graphics Mod.* **1999**, *17*, 101–105.
- [29] F. Corzana, M. S. Motawia, C. H. Du Penhoat, S. Perez, S. M. Tschampel, R. J. Woods, S. B. Engelsen, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 573–586.



5. Secuencia de consenso para la glicosilación con β -*O*-glucosa

5.1. Introducción

5.2. Objetivos

5.3. Discusión de resultados

5.3.1. *Síntesis*

5.3.2. *Estudio conformacional*

5.4. Conclusión

5.4. Bibliografía

5.1. Introducción

Como ya hemos comentado, la *O*-glicosilación de proteínas o péptidos modifica tanto la conformación de sus cadenas peptídicas como las propiedades biológicas de estas biomoléculas.^[1-6] En este sentido, y como comentamos en antecedentes, uno de los tipos de *O*-glicosilación presentes en la naturaleza es el que comprende un enlace β -*O*-glicosídico entre un residuo de glucosa (Glc) y una serina (Ser). Este tipo de estructura se encuentra por ejemplo en el receptor de Notch,^[7-9] en el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), que forma parte de diferentes proteínas,^[10-13] y está involucrado en numerosos procesos celulares como la división celular y la comunicación intercelular.

La secuencia de consenso más común en la naturaleza donde aparecen péptidos y proteínas glicosilados con β -*O*-Glc está definida por el siguiente hexapéptido Cys-Xxx-Ser-Yyy-Pro-Cys donde Xxx e Yyy son cualquier aminoácido excepto prolina. De las distintas posibilidades, la secuencia más común es Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-Cys.^[14] Sin embargo, el papel de la glucosa en estos sistemas y la razón que hace que este fragmento sea una secuencia de consenso para la *O*-glicosilación, no ha sido explicado hasta la fecha.

5.2. Objetivos

Teniendo en cuenta estas consideraciones, y con el fin de intentar esclarecer qué hace peculiar a la secuencia Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-Cys para que sea la secuencia de consenso para la glicosilación con β -*O*-glucosa, en este capítulo se ha sintetizado y analizado el comportamiento de los péptidos y del glicopéptido que pueden verse en la figura 1. Este estudio combina, nuevamente, experimentos de RMN con cálculos de *MD*.

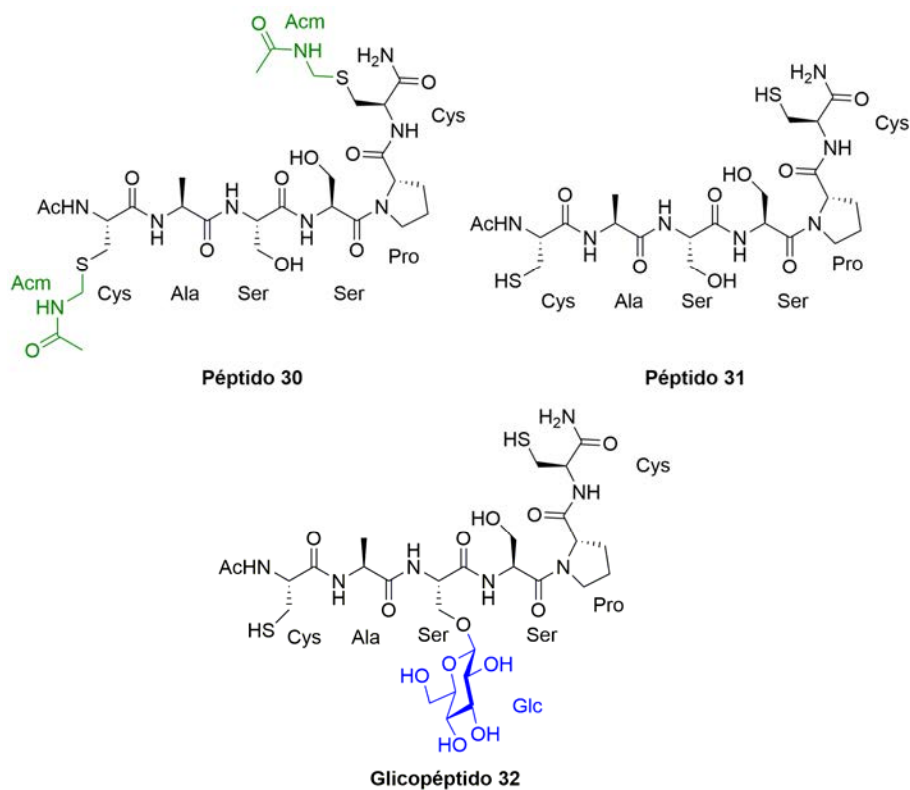


Figura 1. Péptidos y glicopéptido estudiados en este trabajo.

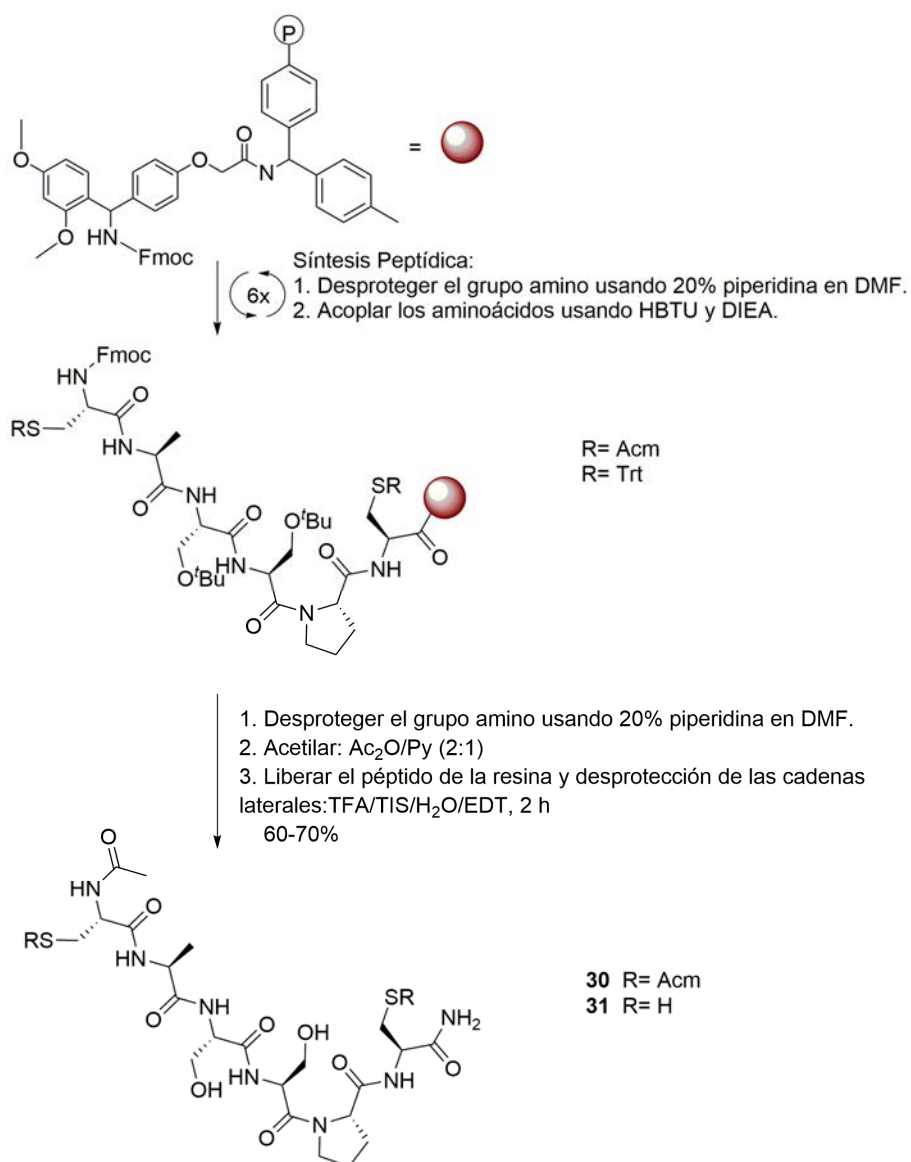
5.3. Discusión de resultados

5.3.1. Síntesis

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis del péptido **30**, en la cual los grupos SH de las cisteínas están protegidos con el grupo acetamidometil (Acm) evitando así la formación de puentes disulfuro entre las dos cisteínas presentes en el péptido. Sin embargo, el empleo de Acm como grupo protector tiene también algunos inconvenientes, ya que el carbonilo, que añade a la cadena lateral de la cisteína, puede interactuar con otras partes

de la molécula. Por ello, también se llevó a cabo la síntesis del péptido **31** y se estudiaron ambos (**30** y **31**), para ver si la incorporación del grupo Acm tenía consecuencias en el comportamiento del péptido en disolución acuosa. La síntesis de los péptidos **30** y **31** fue llevada a cabo usando el protocolo de síntesis de péptidos en fase sólida con la resina comercial Rink Amide MBHA (descrito detalladamente en el anexo I). El grupo amino de los aminoácidos se protegió con el Fmoc y el grupo funcional de la cadena lateral con diferentes grupos protectores lábiles al medio ácido (Esquema 1).

5. Secuencia de consenso para la glicosilación con β -*O*-glucosa



Esquema 1.

Para la síntesis del glicopéptido **32**, primero se sintetizó el *building block* de Fmoc-Ser(β -Glc(OBz₄))-OH (**33**) (Figura 2).

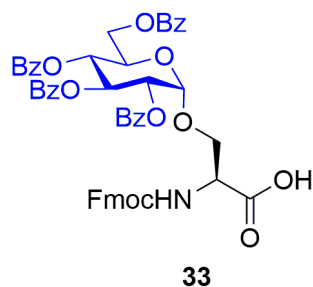
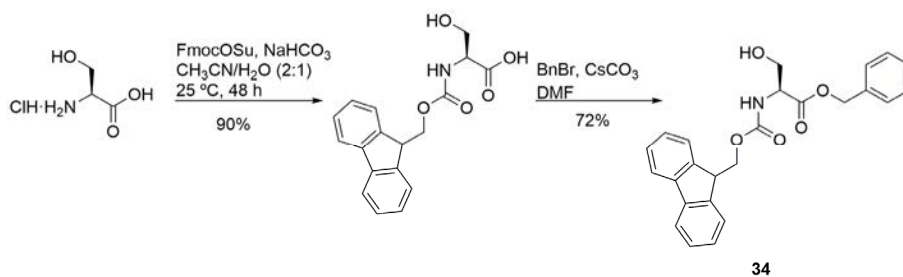


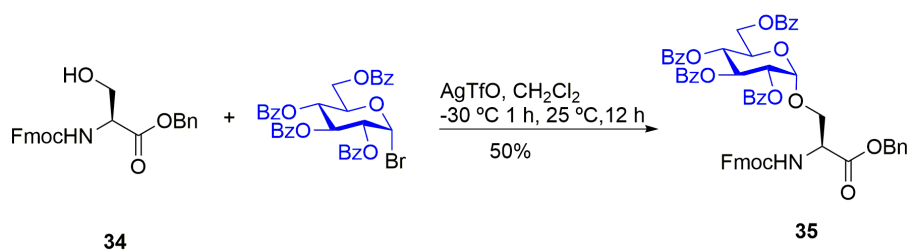
Figura 2. Building block utilizado en la síntesis del glicopéptido **32**.

En primer lugar, se protegió convenientemente la serina. Así, se partió del clorhidrato de L-serina y se protegió el grupo amino con Fmoc. Posteriormente, el grupo ácido se transformó en el correspondiente éster bencílico, como puede verse en el esquema 2.



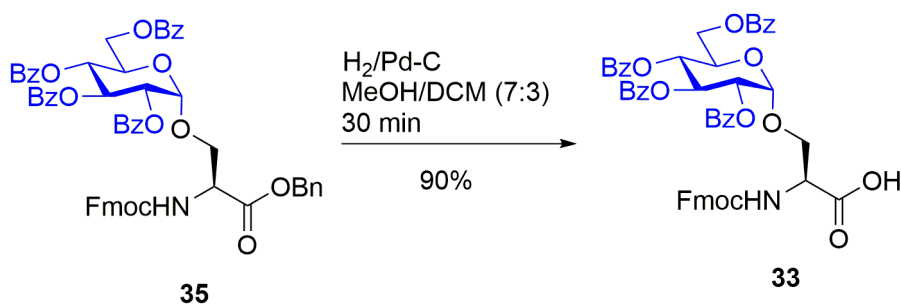
Esquema 2.

El siguiente paso fue la reacción de glicosilación utilizando la metodología de Koenings-Knorr, haciendo reaccionar el compuesto **34** con el bromuro de glucosa (Esquema 3).

5. Secuencia de consenso para la glicosilación con β -*O*-glucosa

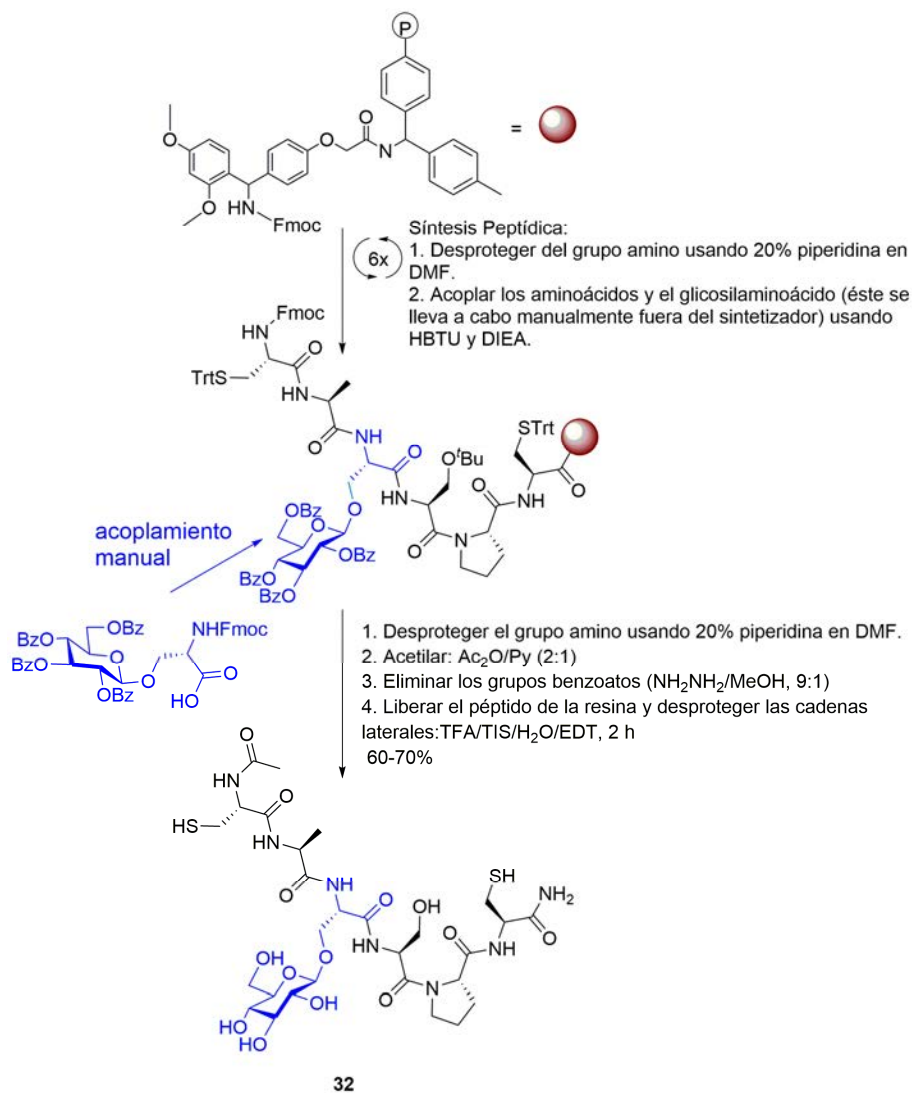
Esquema 3.

Por último, antes de acoplar el aminoácido a la cadena peptídica, se llevó a cabo la desprotección del éster bencílico mediante hidrogenólisis, obteniéndose el *building block* **33** (Esquema 4).



Esquema 4.

El derivado **33** se incorporó a la cadena peptídica mediante síntesis en fase sólida pero esta vez manual (fuera del sintetizador) con el fin de aumentar el rendimiento de la reacción de acoplamiento (Esquema 5).



Esquema 5.

Todos los acoplamientos fueron realizados usando HBTU para activar el grupo ácido y DIEA como base, empleando DMF como disolvente. Una vez completada la secuencia, el siguiente paso fue la acetilación del grupo amino de la cisteína terminal. En particular, en el caso del compuesto **32**, antes de

liberar el glicopéptido de la resina, se llevó a cabo un paso previo de desprotección de los grupos hidroxilo del carbohidrato, usando una mezcla de hidrazina/metanol (7:3). Por último, tanto los péptidos como el glicopéptido se liberaron de la resina, empleando una mezcla de ácido trifluoroacético, TIS, EDT y agua, que también conllevó la desprotección de los grupos protectores de las cadenas laterales. La purificación mediante cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) y su posterior liofilización dio lugar a los compuestos deseados **30**, **31** y **32** con un rendimiento final del 60 - 70%.

5.3.2. Estudio conformacional

El siguiente paso fue el análisis conformacional en disolución acuosa de los péptidos y del glicopéptido mostrados anteriormente en la figura 1. Este análisis se llevó a cabo usando el mismo protocolo que en el caso del capítulo anterior. Es decir, se utilizaron datos de distancias obtenidos de experimentos de RMN para guiar a los cálculos de Dinámica Molecular.^[15,16] Para ello, lo primero fue la asignación de todos los protones de todos los compuestos que fue realizada usando experimentos 2D como COSY, HSQC y NOESY (Tablas 1 - 3).

Tabla 1. Asignación de protones y constantes de acoplamiento para el compuesto 30^o.

δ (ppm)	Protones	Multiplicidad ^b	ⁿ J _{H,H} (Hz)
1.21	CH ₃ Ala	d(3H)	³ J _{CH₃, Hα} = 4.44
1.77 – 1.89	2 CH ₃ AcM CH ₃ AcO H β , 2H γ Pro	m(12H)	—
2.03 – 2.15	H β Pro	m(1H)	—
2.65 – 2.74	2H β Cys2	m(2H)	—
2.81 – 2.88	H β Cys1	m(1H)	—
2.88 – 2.97	H β Cys1	m(1H)	—
3.53 – 3.61	2H δ Pro	m(2H)	—
3.62 – 3.74	4H β Ser	m(4H)	—
4.04 – 4.21	2 CH ₂ AcM H α Ala	m(5H)	—
4.23 – 4.31	H α Ser3 H α Pro	m(2H)	—
4.32 – 4.41	2H α Cys	m(1H)	—
4.55 – 4.66	H α Ser4	m(1H)	—
7.08	NH ₂ ^c	s(1H)	—
7.35	NH ₂ ^c	s(1H)	—
8.09 – 8.13	NH Ser3 ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 6.98
8.13 – 8.17	NH Ser4 ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 6.75
8.22 – 8.26	NH Cys6 ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 7.41
8.27 – 8.30	NH Cys1 ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 7.03
8.35 – 8.41	NH Ala ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 5.87
8.42 – 8.47	2NH AcM ^c	m(2H)	—

^aDatos extraídos del experimento de RMN de ¹H (400 MHz) llevado a cabo en D₂O (298 K, pH = 5.2) ^bs = singlete, d = doblete, m = multiplete. ^cDatos extraídos del experimento de RMN de ¹H 400 (MHz) llevado a cabo en H₂O/D₂O (9:1) (298 K, pH = 5.2)

Tabla 2. Asignación de protones y constantes de acoplamiento para el compuesto 31^o.

δ (ppm)	Protones	Multiplicidad ^b	ⁿ J _{H,H} (Hz)
1.28 – 1.40	CH ₃ Ala	d(3H)	³ J _{CH₃, Hα} = 7.21
1.74 – 2.02	2H _{γ} Pro H _{β} Pro	m(3H)	—
1.97	CH ₃ AcO	s(3H)	—
2.15 – 2.33	H _{β} Pro	m(1H)	—
2.76 – 2.99	4H _{β} Cys	m(4H)	—
3.60 – 3.71	H _{δ} Pro	m(1H)	—
3.72 – 3.83	4H _{β} Ser H _{δ} Pro	m(5H)	—
4.23 – 4.35	H _{α} Ala	m(1H)	—
4.35 – 4.46	H _{α} Ser3 H _{α} Pro 2H _{α} Cys	m(4H)	—
4.81 – 4.86	H _{α} Ser3	t(1H)	³ J _{Hβ, Hα} = 6.20
7.12	NH ₂ ^c	s(1H)	—
7.47	NH ₂ ^c	s(1H)	—
8.12 – 8.22	NH Ser3 ^c NH Ser4 ^c	m(2H)	—
8.23 – 8.33	NH Cys1 ^c NH Cys6 ^c	m(2H)	—
8.41 – 8.51	NH Ala ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 5.87

^aDatos extraídos del experimento de RMN de ¹H (400 MHz) llevado a cabo en D₂O (298 K, pH = 5.2) ^bs = singlete, d = doblete, t = triplete, m = multiplete. ^cDatos extraídos del experimento de RMN de ¹H 400 (MHz) llevado a cabo en H₂O/D₂O (9:1) (298 K, pH = 5.2).

Tabla 3. Asignación de protones y constantes de acoplamiento para el compuesto 32^o.

δ (ppm)	Protones	Multiplicidad ^b	ⁿ J _{H,H} (Hz)
1.38 – 1.26	CH ₃ Ala	d(3H)	³ J _{CH₃, Hα} = 7.21
1.78 – 2.02	CH ₃ AcO 2H _{γ} Pro H β Pro	m(6H)	—
2.13 – 2.27	H β Pro	m(1H)	—
2.68 – 2.90	4H β Cys	m(4H)	—
3.10 – 3.22	H _{2s}	m(1H)	—
3.21 – 3.29	H _{4s}	m(1H)	—
3.30 – 3.45	H _{5s} H _{3s}	m(2H)	—
3.52 – 3.62	H _{6s}	m(1H)	—
3.62 – 3.69	H δ Pro	m(1H)	—
3.69 – 3.76	H δ Pro 2H β Ser4	m(3H)	—
3.77 – 3.84	H _{6s} H β Ser3	m(2H)	—
4.02 – 4.16	H β Ser3	dd(1H)	³ J _{Hβ, Hα} = 5.35, 10.65
4.19 – 4.31	H α Ala	m(1H)	—
4.31 – 4.45	H α Pro 2H α Cys	m(3H)	—
4.48 – 4.58	H α Ser3	t(1H)	³ J _{Hβ, Hα} = 4.97
4.67 – 4.75	H α Ser4	m(1H)	—
7.11	NH ₂ ^c	s(1H)	—
7.47	NH ₂ ^c	s(1H)	—
8.18 – 8.23	NH Ser4 ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 7.04
8.23 – 8.26	NH Cys6 ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 7.11
8.27 – 8.31	NH Cys1 ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 7.43
8.31 – 8.36	NH Ser3 ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 7.02
8.40 – 8.44	NH Ala ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 5.76

^aDatos extraídos del experimento de RMN de ¹H (400 MHz) llevado a cabo en D₂O (298 K, pH = 5.2) ^bs = singlete, d = doblete, dd = doble de dobletes, t = triplete, m = multiplete. ^cDatos extraídos del experimento de RMN de ¹H 400 (MHz) llevado a cabo en H₂O/D₂O (9:1) (298 K, pH = 5.2).

Las distancias con información estructural extraídas de los picos de cruce de los experimentos 2D NOESY (Figura 3), fueron usadas como restricciones para las simulaciones de Dinámica Molecular con restricciones promediadas en el tiempo,^[17,18] para obtener una distribución de conformeros que puedan reproducir cuantitativamente los datos de RMN.

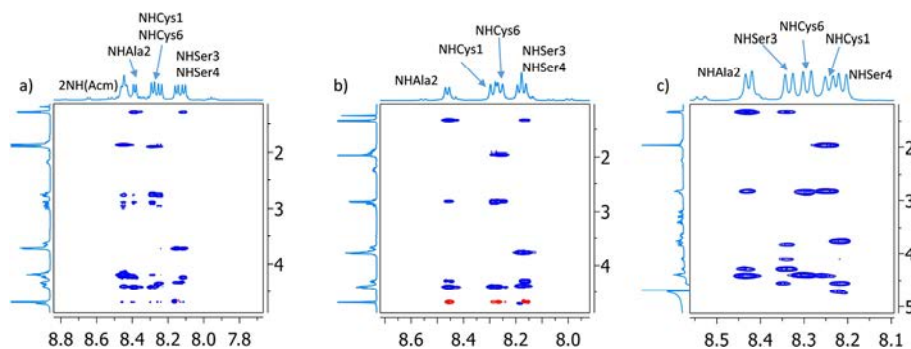


Figura 3. Espectro de 2D-NOESY (H_2O/D_2O , 9:1, (293 K, pH = 6.5) para los compuestos **30** (a), **31** (b), **32** (c).

Como puede verse en las siguientes tablas (Tablas 4-6) existe una buena concordancia entre los datos teóricos y experimentales, lo que valida los modelos teóricos obtenidos.

Tabla 4. Comparación entre las distancias (Å) experimentales y las obtenidas de la MD para el compuesto **30**.

Distancias	Experimental	Teóricas
NH Ser3 – H α Ala2	2.9	3.1
NH Cys6 – H α Cys6	3.0	2.9
NH Ala2 – H α Cys1	2.4	2.3
NH Ser4 – H α Ser4	3.0	2.9

Tabla 5. Comparación entre las distancias (\AA) experimentales y las obtenidas de la MD para el compuesto **31**.

<i>Distancia</i>	Experimental	Teórica
NH Ser3 – Me Ala2	3.3	3.6
NH Cys6 – H β -proR Pro5	3.3	3.1
NH Cys6 – H β -proS Pro5	3.7	3.7
NH Ala2 – H α Ala2	2.9	2.9
NH Ser3 – H α Ala2	2.5	2.8
NH Ser4 – H α Ser4	3.2	3.0
H α Ser4 – H δ -proS Pro5	2.6	2.4

Tabla 6. Comparación entre las distancias (\AA) experimentales y las obtenidas de la MD para el compuesto **32**.

<i>Distancia</i>	Experimental	Teórica
NH Ala2 – H α Ala2	2.8	2.9
NH Ala2 – H α Cys1	2.2	2.2
NH Ser3 – H α Ala2	2.5	2.3
NH Ser3 – H α Ser3	3.0	2.9
NH Ser4 – H α Ser3	2.6	2.4
NH Ser4 – H α Ser4	2.8	2.9
NH Cys6 – H β -proR Pro5	3.6	3.4

Como se puede extraer de la figura 4, el péptido **30** es bastante flexible en disolución, con dos principales conformaciones pobladas alrededor del 24% y 19% del tiempo total de simulación. Estas dos conformaciones muestran un típico giro β tipo I (las características conformacionales de este tipo de giros quedan recogidas en los antecedentes), que comprende el grupo

carbonilo de la Cys1 y el grupo NH de la Ser4. Este giro puede verse también para la misma secuencia glicosilada con β -glucosa en la Ser3, en la estructura cristalina del complejo del factor de coagulación VIIa con el factor de tejido soluble (código pdb: 1DAN).^[19] En el compuesto **30**, sin embargo, el grupo Acm interacciona también con el esqueleto peptídico. De hecho, existe un enlace de hidrógeno formado entre el grupo carbonilo del grupo Acm de la Cys1 y el grupo hidroxilo de la Ser4 en una de las conformaciones más pobladas (Figura 4, parte derecha). Por todo esto, se decidió analizar el péptido **31**, con los grupos SH de las cisteínas libres.

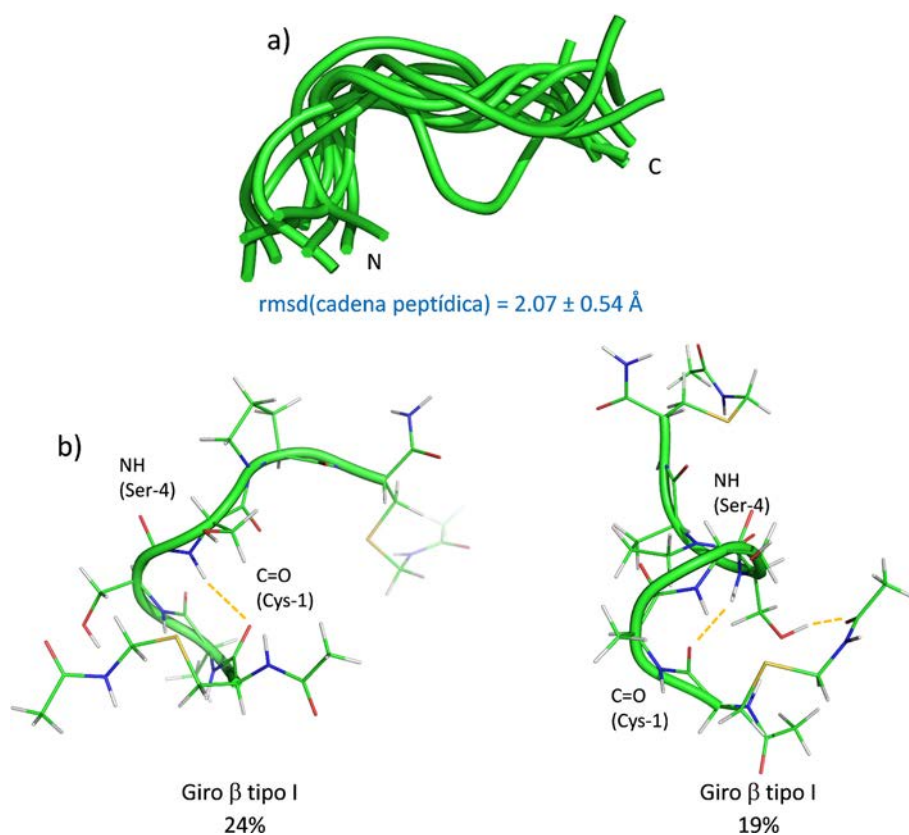


Figura 4. a) Superposición de diferentes imágenes obtenidas de la MD para el péptido **30**. b) Principales conformaciones en disolución acuosa.

Al contrario que el compuesto **30**, el péptido **31** fue bastante más rígido en disolución acuosa (Figura 5).

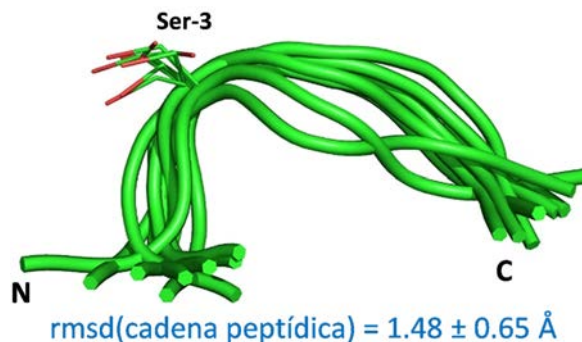


Figura 5. Superposición de distintas imágenes obtenidas de la MD para el péptido **31**.

De hecho, éste mostró una conformación principal para la cadena peptídica caracterizada por un giro β tipo I que incluye un enlace de hidrógeno entre el carbonilo del grupo acetilo terminal y el grupo NH de la Ser3 (Figura 6).

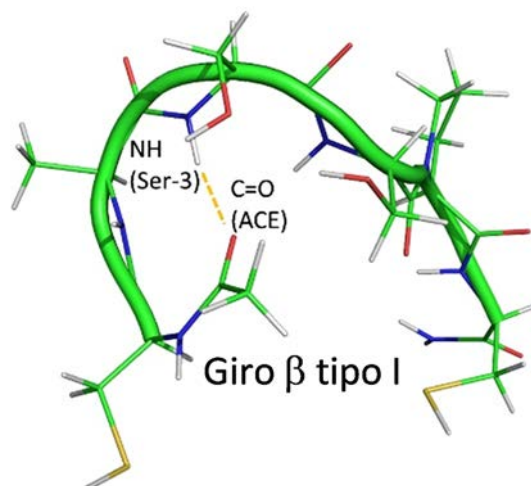


Figura 6. Conformación principal del compuesto **31**.

Las distribuciones de los ángulos φ y ψ obtenidas de las simulaciones de Dinámica Molecular de 20 ns para los aminoácidos del péptido **31** se

muestran en la figura 7, corroborando la conformación plegada. De hecho, los residuos Cys1, Ala2, Ser3 y Cys6 muestran valores de los ángulos diedros φ y ψ correspondientes a conformaciones plegadas (G y hélice α).^[20] Solamente Ser4 y Pro5 exhiben valores de φ y ψ correspondientes a lámina β y a poliprolina II (PPII), respectivamente.

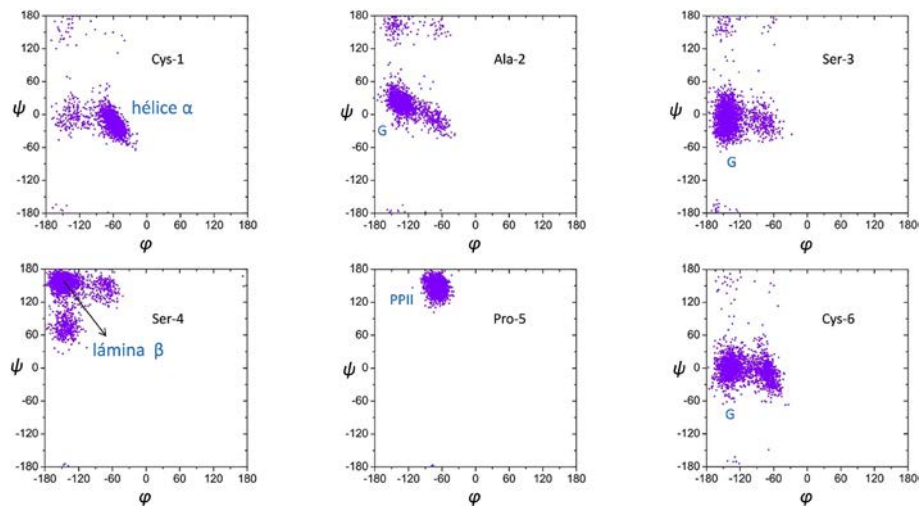


Figura 7. Distribuciones φ y ψ para los residuos del péptido **31**.

Esta disposición 3D está presente alrededor del 75% de la simulación de *MD* y favorece la exposición del grupo hidroxilo de la cadena lateral de la Ser3 hacia el disolvente. De acuerdo con esto, el grupo hidroxilo de la Ser3 apenas participa en enlaces de hidrógeno con el esqueleto peptídico, solo en algunos casos que no superan el 5% del tiempo de simulación. Aunque solo es una especulación, es posible que este confórmero de la secuencia de consenso, disponga el grupo hidroxilo de la Ser3 hacia el disolvente para facilitar la β -*O*-glucosilación.

El siguiente paso fue realizar el análisis conformacional del glicopéptido **32**, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Al igual que en el caso del

péptido **31**, los datos teóricos que fueron obtenidos concuerdan con los datos experimentales (Tabla 6). Las distribuciones de φ y ψ para los aminoácidos del glicopéptido **32** obtenidas de las *MD-tar* (20 ns) se muestran en la figura 8. Como se puede extraer de la comparación entre las figuras 7 y 8, la glicosilación cambia la conformación plegada del esqueleto peptídico a otras más extendidas. De hecho, todos los residuos, excepto el C-terminal de la cisteína (Cys6), mostraron una clara conformación extendida, ya sea bien PPII o tipo lamina β . Para la Pro5, fueron observadas tanto conformaciones extendidas como plegadas con igualdad de población.

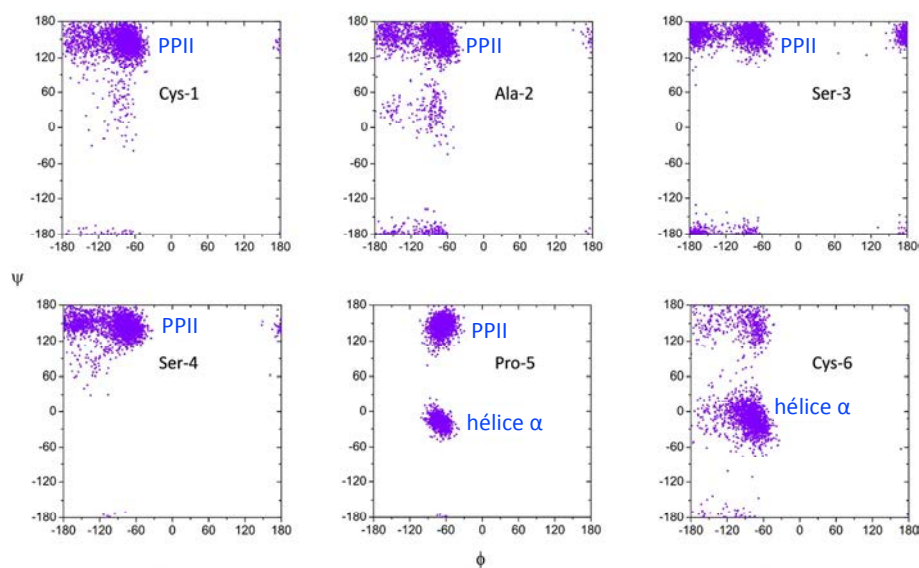


Figura 8. Distribuciones φ y ψ para los residuos del péptido **32**.

Con respecto al enlace glicosídico del glicopéptido **32**, se encontró que éste era bastante rígido con valores alrededor de -60° para φ , de acuerdo con el efecto exoanomérico,^[21] y cercano a 180° para ψ . En efecto, este es el valor esperado para el ángulo de torsión ψ , como nuestro grupo publicó previamente cuando el carbohidrato está unido a un residuo de serina.^[22]

5. Secuencia de consenso para la glicosilación con β -*O*-glucosa

Además, la cadena lateral ($\chi^1 = \text{O1-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}$), solamente mostró valores alrededor de 60° , lo que indica que la conformación *gauche* (+) del ángulo diedro χ^1 es la más poblada (Figura 9).

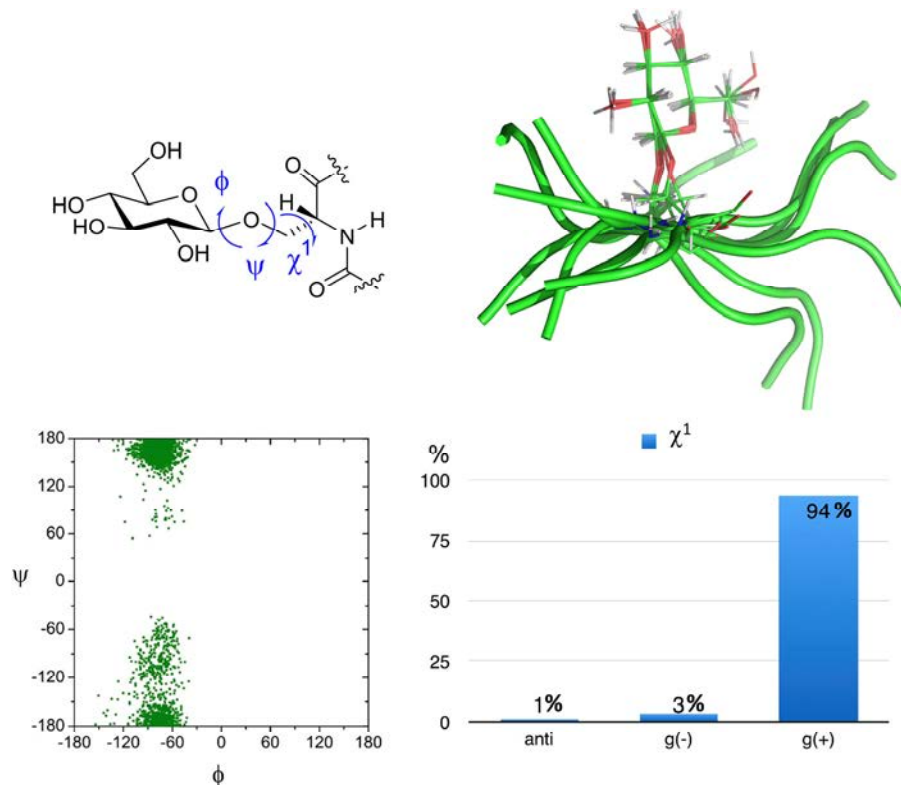


Figura 9. Distribuciones ϕ y ψ para el enlace glicosídico, junto con la principal conformación de la cadena lateral (ángulo de torsión χ^1) para el glicopéptido **32**.

Es interesante resaltar que, mientras la cadena lateral y el enlace glicosídico del glicopéptido **32** muestran conformaciones muy rígidas (ver la superposición de la figura 9), el esqueleto peptídico, en cambio, presenta algo de flexibilidad y exhibe diferentes conformaciones extendidas. En todos los casos, como puede ser observado en la figura 10, la parte carbohidrato está siempre situada en la misma cara del péptido.

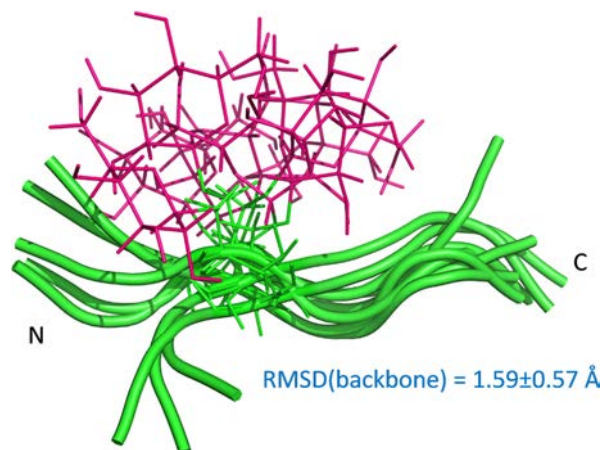


Figura 10. Superposición de diferentes conformaciones de las MD para el compuesto **32**.

Con el fin de esclarecer los factores que gobiernan el cambio observado experimentalmente hacia conformaciones más extendidas, fue llevado a cabo un estudio teórico sobre el glicopéptido **32**. El primer paso fue investigar la red de puentes de hidrógeno que pudiera haber entre el carbohidrato y el péptido. Se encontró un importante enlace de hidrógeno entre el grupo carbonilo de la Ser4 y el grupo hidroxilo OH6 de la glucosa. De acuerdo con nuestros cálculos, este enlace de hidrógeno se mantiene durante un 40% del tiempo de simulación (Figura 11).

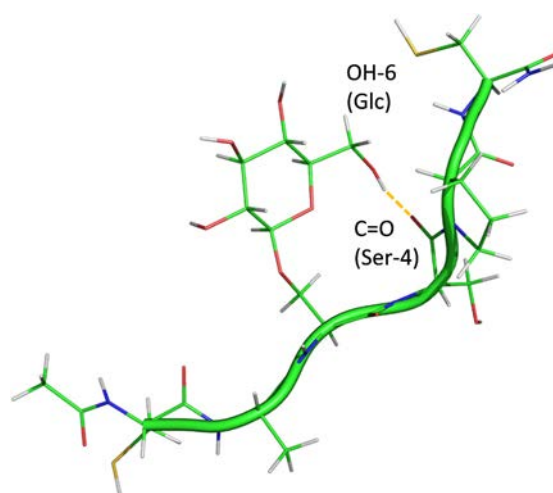


Figura 11. Conformación principal (40%) para el glicopéptido **32**.

Para estudiar también la influencia del agua en la conformación del péptido, se estudió la distribución de su primera esfera de solvatación. Los resultados indicaron que existe una molécula de agua puente entre el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo OH2 del azúcar y el átomo de nitrógeno de la Ser3 (Figuras 12). Este bolsillo de agua es similar al que fue encontrado en el caso de la molécula Ac-L-Ser(α -D-Glc)-NHMe.^[22] Sin embargo es interesante resaltar, que al contrario a lo que fue observado en aquella ocasión para el glicosilaminoácido, la molécula de agua puente que aquí aparece, lo hace para estabilizar conformaciones extendidas del glicopéptido **32** en disolución.

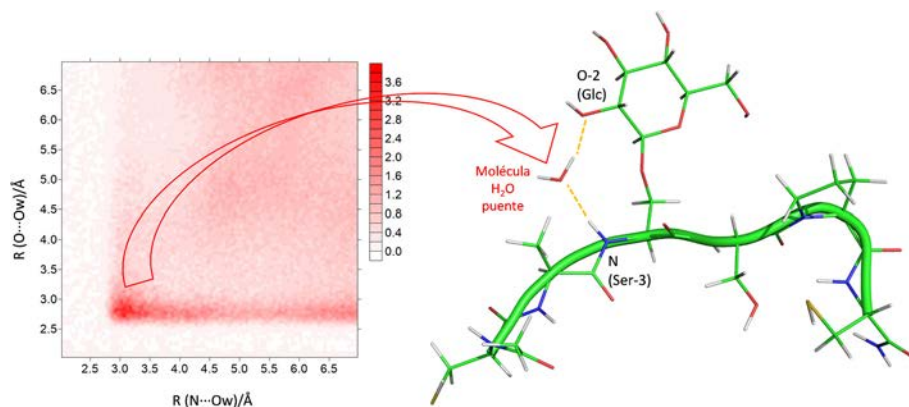


Figura 12. Diagrama que representa la estabilidad de la molécula de agua puente y representación de la molécula de agua puente calculada mediante simulación de MD.

5.4. Conclusión

En resumen, se ha realizado la síntesis y el análisis conformacional de la secuencia peptídica Cys-Ala-Ser-Ala-Pro-Cys. Teniendo en cuenta la falta de estudios conformacionales sobre este fragmento, hemos sintetizado no sólo el péptido si no también el derivado glicosilado Cys-Ala-Ser(β -*O*-Glc)-Ser-Pro-Cys. Este glicopéptido en particular, ha sido encontrado en la estructura cristalina del complejo formado por el factor de coagulación sanguíneo VIIa con el factor de tejido soluble.

Además, el comportamiento conformacional de estas moléculas fue analizado en disolución acuosa combinando experimentos NOE y simulaciones de Dinámica Molecular. Estos estudios indican que el péptido adopta una conformación plegada similar a la que se encuentra en la estructura cristalina.


El conformero mayoritario de la secuencia consenso sin glicosilar, expone el grupo hidroxilo de la Ser3 hacia el disolvente. Esta característica podría facilitar la β -*O*-glucosilación de ese residuo.

Además, la glicosilación con β -*O*-glucosa de este fragmento peptídico en la posición de la Ser3, fuerza al esqueleto peptídico, caracterizado por un β -*turn* tipo I, a adoptar conformaciones extendidas en disolución acuosa. Estas conformaciones están estabilizadas tanto por un enlace de hidrógeno intramolecular, como por una molécula de agua puente entre el péptido y el carbohidrato.

5.5. Bibliografía

- [1] P. Van den Steen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, G. Opdenakker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33*, 151–208.
- [2] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- [3] C. M. Taylor, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11317–11362.
- [4] H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. W. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495–4538.
- [5] K. C. Nicolaou, H. J. Mitchell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1576–1624.
- [6] M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58–68.
- [7] S. Hase, H. Nishimura, S.-I. Kawabata, S. Iwanaga, T. Ikenaka, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 1858–1861.
- [8] K. B. Reimer, M. Meldal, S. Kusumoto, K. Fukase, K. Bocka, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, *0*, 925–932.
- [9] L. Shao, Y. Luo, D. J. Moloney, R. S. Haltiwanger, *Glycobiology* **2002**, *12*, 763–770.
- [10] H. Nishimura, S.-I. Kawabata, W. Kisiel, S. Hase, T. Ikenaka, T. Takao, Y. Shimonishi, S. Iwanaga, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20320–20325.
- [11] C. T. Kriss, B.-S. Lou, L. Z. Szabo, S. A. Mitchell, V. J. Hruby, R. Polt, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 9–25.
- [12] C. M. Jackson, Y. Nemerson, *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 765–811.
- [13] K. G. Mann, R. J. Jenny, S. Krishnaswamy, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 915–956.
- [14] R. G. Spiro, *Glycobiology* **2002**, *12*, 43R–56R.
- [15] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14640–14648.
- [16] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, M. García de Luis, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9458–9467.
- [17] A. E. Torda, R. M. Scheek, W. F. van Gunsteren, *Chem. Phys. Lett.*

- 1989**, *157*, 289–294.
- [18] A. P. Nanzer, W. F. van Gunsteren, A. E. Torda, *J Biomol NMR* **1995**, *6*, 313–320.
- [19] D. W. Banner, A. D'Arcy, C. Chène, F. K. Winkler, A. Guha, W. H. Konigsberg, Y. Nemerson, D. Kirchhofer, *Nature* **1996**, *380*, 41–46.
- [20] S. S. Zimmerman, M. S. Pottle, G. Némethy, H. A. Scheraga, *Macromolecules* **1977**, *10*, 1–9.
- [21] G. R. J. Thatcher, *ACS Symp. Ser.* **1993**, *539*, 6–25.
- [22] F. Corzana, J. H. Busto, S. B. Engelsen, J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7864–7871.



6. Reconocimiento del antígeno Tn por lectinas: Ser vs Thr

6.1. Introducción

6.2. Objetivos

6.3. Discusión de resultados

6.3.1. *Síntesis*

6.3.2. *Elección de las lectinas*

6.3.3. *Estudios de afinidad*

6.3.4. *Estudio conformacional*

6.4. Conclusión

6.5. Bibliografía

6.1. Introducción

Una gran cantidad de proteínas sufren modificaciones post-traduccionales por glicosilación de sus aminoácidos serina (Ser) y/o treonina (Thr). Como se ha comentado anteriormente, dicha glicosilación influye de forma notoria en distintas propiedades de las proteínas, como la solubilidad, la estabilidad a la degradación, tanto química como enzimática, y también tiene influencia sobre su conformación y su plegamiento. Estas modificaciones pueden también afectar a las funciones biológicas de las proteínas, como son el reconocimiento molecular, la comunicación entre células o la adhesión de bacterias y/o virus a las proteínas de la superficie celular.^[1-6]

Desde un punto de vista estructural, tanto la disposición espacial que adquiere el carbohidrato con respecto al aminoácido al que está unido (Ser o Thr), como las propiedades estructurales de dicho aminoácido, son cruciales en la interacción con dianas biológicas. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha publicado varios trabajos donde se demuestra que la presentación (disposición) del carbohidrato en glicopéptidos es diferente en función de si está unido al péptido a través de una serina o de una treonina.^[7] Y esto tiene implicaciones en el reconocimiento molecular de dicho carbohidrato por parte de diferentes lectinas.^[8]

Como se ha comentado en la introducción, el antigéno Tn es una estructura asociada a tumores en humanos.^[9-14] Esta molécula está involucrada en la infección del VIH^[15] y se expresa también en células tumorales. Se ha observado que hay una correlación directa entre la agresividad del carcinoma y la densidad del antigéno Tn, por todo esto, el Tn es un biomarcador muy adecuado.^[16] En general, cuando se habla de antigéno Tn, se refiere al carbohidrato *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) unido a través de

un enlace α -O-glicosídico con el aminoácido serina (Ser) o treonina (Thr), sin hacer distinción entre estos dos aminoácidos. Sin embargo, nuestro grupo de investigación publicó las diferencias en el comportamiento conformacional que existen entre el enlace glicosídico α -O-GalNAc-Ser y α -O-GalNAc-Thr.^[7,17,18] En concreto, el grupo metilo en β que posee el residuo de Thr fuerza al carbohidrato a adoptar una orientación casi perpendicular al esqueleto peptídico. Por el contrario, el aminoácido serina no posee ese grupo metilo y el azúcar se dispone de manera paralela a la cadena peptídica. Estas diferencias en la estructura 3D de estos glicosilaminoácidos hacen que Ser y Thr tengan una primera esfera de hidratación completamente diferente.^[7,17] Esta observación puede tener gran importancia biológica. De hecho, en el contexto de las glicoproteínas anticongelantes, la presencia del residuo de Thr (en lugar de serina) es crucial para que se mantenga esa actividad.^[19-21]

Respecto al reconocimiento molecular del antígeno Tn por diferentes dianas biológicas, también se han descrito las diferencias que aparecen según a que aminoácido se encuentra unido el carbohidrato, serina o treonina. Por ejemplo, un análisis reciente de anticuerpos monoclonales anti-Tn que se unen a glicopéptidos, informó de sutiles diferencias en la afinidad de estos anticuerpos por glicopéptidos que incorporan serina o treonina. Los autores, además, establecieron que la parte peptídica del Tn juega un papel clave en la detección de cánceres de pecho y colon debido a su especificidad, lo cual puede ser de gran valor clínico.^[22] Otro ejemplo está relacionado con la enfermedad de Kanzaki, el desarrollo de dicha enfermedad, se atribuye a la deficiencia de α -N-acetilgalactosaminidasa (α -NAGA). Esta enzima hidroliza el enlace glicosídico unido al residuo α -O-GalNAc.^[23] La velocidad de hidrólisis

es bastante diferente según se trate del aminoácido al que está unido el carbohidrato serina o treonina.^[24] En otro ejemplo más reciente, relacionado con la proteína microtubular tau que tiene que ver con la enfermedad de Alzheimer, se ha observado que los cambios estructurales causados por la fosforilación de treoninas son mucho más habituales que los que aparecen en el caso de la serina.^[25]

Por otro lado, se ha demostrado que las lectinas son herramientas muy versátiles en la detección del antígeno Tn,^[26] porque, en general, éstas reconocen a aquellos glicopéptidos que llevan incorporado el antígeno Tn en su estructura. En este contexto, el resto carbohidrato es clave en el proceso de reconocimiento.^[27,28] Sin embargo, es importante resaltar que el fragmento peptídico al que está unido el carbohidrato puede tener también influencia en la estabilización del complejo, ya sea con interacciones con el receptor, de manera directa o a través de moléculas de agua puente, o forzando al carbohidrato a adoptar conformaciones específicas. De hecho, en trabajos anteriores se describió que la incorporación de un aminoácido no natural forzaba al péptido a adoptar conformaciones tipo hélice α , obteniéndose un glicopéptido con un patrón de interacciones péptido-lectina diferente (cuando lo comparas con el derivado natural), y esto se refleja en la afinidad.^[29]

6.2. Objetivos

Por todo ello, nos propusimos esclarecer la influencia que el aminoácido que acompaña al carbohidrato (serina o treonina) puede tener en el reconocimiento molecular del antígeno Tn, por diferentes lectinas específicas para reconocer GalNAc. Con este propósito, se sintetizaron los

glicopéptidos que aparecen en la figura 1. Estos glicopéptidos incorporan la secuencia Gly-Gly-Xxx-Gly-Gly, donde Xxx puede ser α -O-GalNAc-Thr o α -O-GalNAc-Ser. Los péptidos ricos en glicinas están siendo estudiados actualmente de manera intensiva, debido a alguna controversia acerca de su comportamiento conformacional en disolución acuosa. Así que, aunque ha sido aceptado, de manera general, que estas moléculas presentan una conformación orientada al azar, es decir, carecen de una estructura determinada, investigaciones recientes establecen que estos fragmentos peptídicos, aún sin glicosilar se encuentran estructurados, principalmente muestran conformaciones tipo poliprolina II (PPII).^[30-32] Teniendo en cuenta esto y considerando que los correspondientes glicopéptidos con GalNAc no han sido analizados todavía, decidimos estudiar estos derivados tanto en estado libre como en el estado asociado.

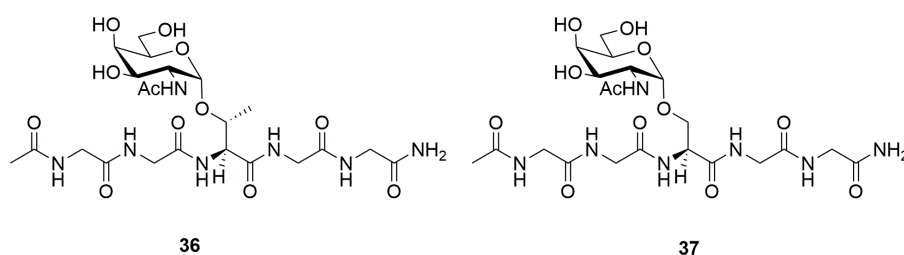


Figura 1. Glicopéptidos **36** y **37** objeto de estudio.

Para el análisis en el estado asociado, se seleccionaron las siguientes lectinas que reconocen el antígeno Tn (soybean aglutinina (SBA),^[33] *Vicia villosa* aglutinina (VVA)^[34] y *Helix pomatia* aglutinina (HPA)).^[35]

6.3. Discusión de resultados

6.3.1. Síntesis

La síntesis de los glicopéptidos se llevó a cabo usando síntesis peptídica en fase sólida (SPPS), como en el capítulo anterior, e incorporando el glicosilaminoácido convenientemente protegido fuera del sintetizador aumentando el tiempo de reacción para poder reducir el número de equivalentes necesario. Por lo tanto, primero se abordó la síntesis de los *building blocks* **38** y **39** (Figura 2), de Thr y Ser, los cuales se incorporaron posteriormente en la cadena peptídica para obtener los glicopéptidos **36** y **37** respectivamente.

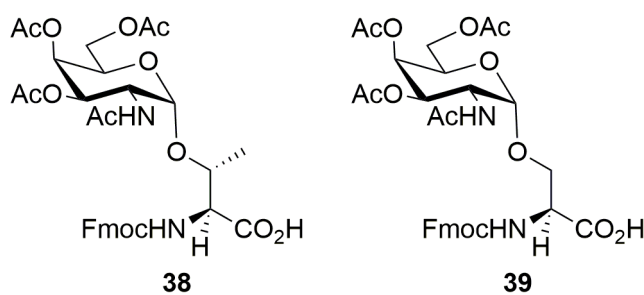
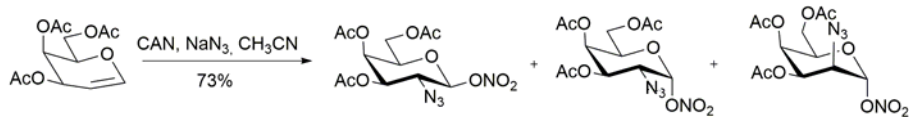


Figura 2. *Building blocks* de serina y treonina glicosiladas con α -D-N-acetilgalactosamina.

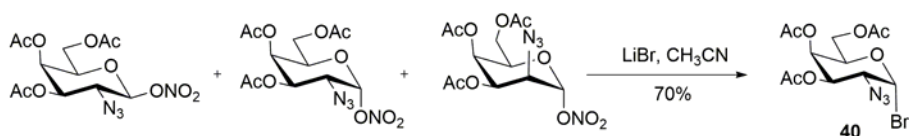
A continuación se describirá detalladamente la síntesis del building block **38** de treonina siguiendo el procedimiento descrito en la literatura.^[36-38] El primer paso fue la preparación del carbohidrato a partir del producto comercialmente disponible 3,4,6-tri-*O*-acetil-D-galactal. Se trató una disolución de dicho compuesto en acetonitrilo (CH₃CN) con nitrato de cerio y amonio (CAN) y azida de sodio (NaN₃) bajo atmósfera inerte (Esquema 1). Tras la purificación por columna cromatográfica del crudo de reacción, se

obtuvo la correspondiente nitroazida como una mezcla de varios estereoisómeros.



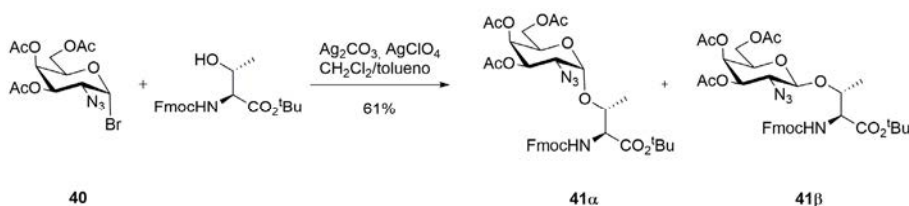
Esquema 1.

Dicha mezcla se hizo reaccionar con bromuro de litio (LiBr) en CH₃CN (Esquema 2). Posteriormente, el crudo de reacción se purificó mediante columna cromatográfica para obtener el compuesto **40**.^[39]



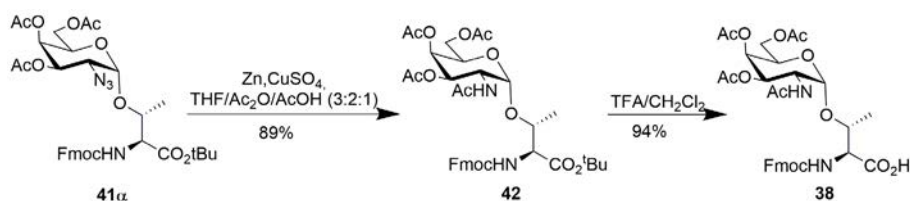
Esquema 2.

Una vez preparado el carbohidrato, el siguiente paso fue formar el enlace α -*O*-glicosídico con la treonina convenientemente protegida con Fmoc y éster *terc*-butílico. Para la reacción de glicosilación se empleó la metodología de Liebe y Kunz,^[40] mediante la cual se trata el aminoácido con Ag₂CO₃ y AgClO₄ en una mezcla DCM/tolueno y posteriormente se adiciona el compuesto **40**, para obtener los derivados **41 α** y **41 β** (Esquema 3), la mezcla que se obtiene es 3:1 en favor del anómero α , que se separa del anómero β mediante columna cromatográfica.



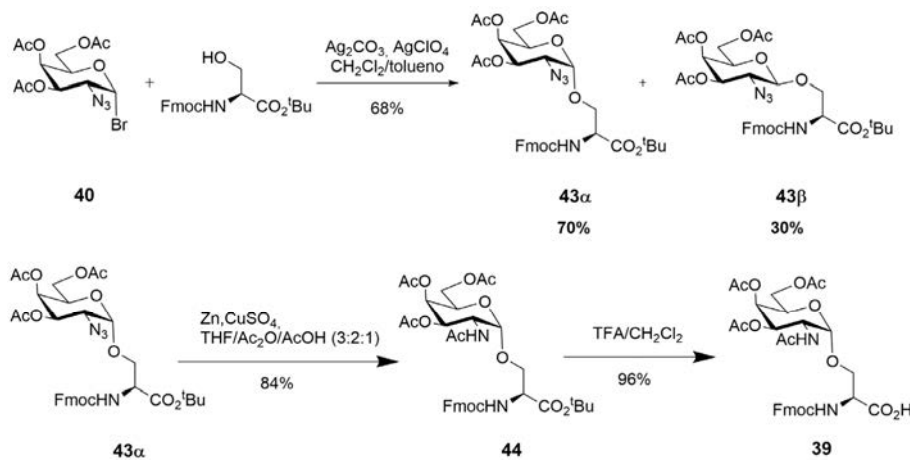
Esquema 3.

Seguidamente se llevó a cabo la transformación del grupo azida a amina y su posterior acetilación (Esquema 4). Esta reacción pudo llevarse a cabo disolviendo el compuesto **41 α** en una mezcla de THF/AcOH/Ac₂O con Zn y una disolución saturada de CuSO₄, para obtener **42** con un rendimiento del 89%. El siguiente paso fue la desprotección del éster *tert*-butílico utilizando una mezcla TFA/DCM (1:1). Tras su correspondiente purificación mediante columna cromatográfica, se obtuvo el *building block* **38** preparado para su incorporación en el péptido.



Esquema 4.

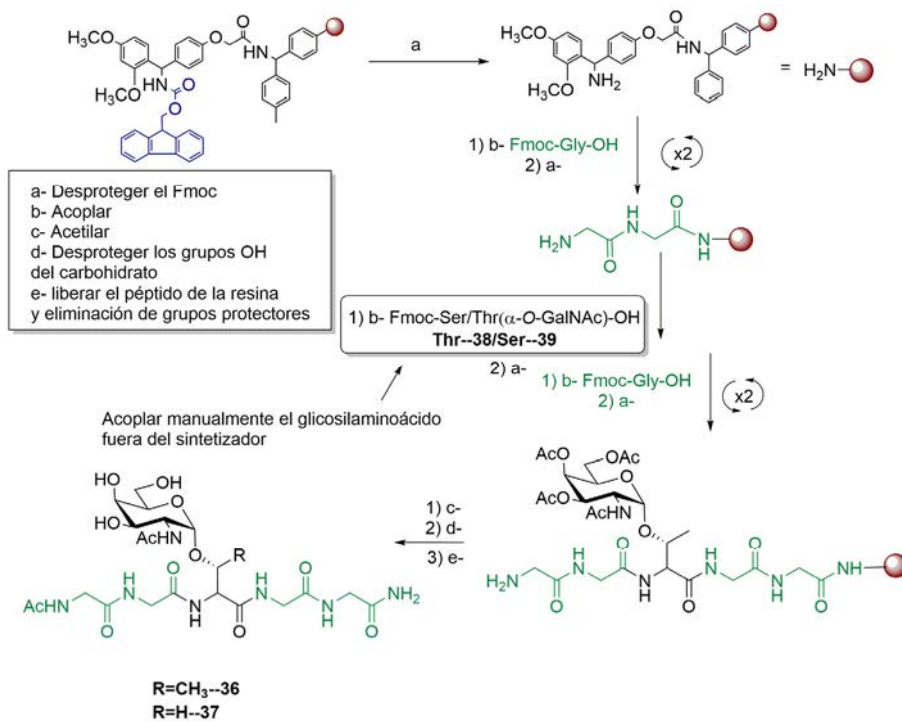
La síntesis del *building block* **39** de serina se llevó a cabo de manera análoga a la anterior y queda recogida en el esquema 5.



Esquema 5.

Una vez sintetizados los compuestos **38** y **39**, se abordó la síntesis de los glicopéptidos **36** y **37**. Ambos fueron obtenidos mediante síntesis en fase sólida usando la resina *Rink amide* (MBHA) y empleando Fmoc como grupo protector de las glicinas (Esquema 6), posteriormente se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución, *HPLC* (Esquema 6).

Tanto el derivado **38** como el **39** fueron incorporados a la cadena peptídica manualmente, con el fin de necesitar un menor número de equivalentes para la síntesis. En todos los acoplamientos se usó *O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU) como agente de acoplamiento y *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) como base. Después de que el péptido fuera completado se acetiló el extremo amino, para más tarde desproteger los grupos hidroxilo del carbohidrato empleando una disolución de hidracina/metanol, y posteriormente liberarlo de la resina usando un cóctel de ácido trifluoroacético (TFA). Seguidamente, se purificó el glicopéptido usando el equipo preparativo HPLC y después se liofilizó, para obtener los glicopéptidos deseados con un rendimiento general de 60 - 70 %.



Esquema 6.

6.3.2. Elección de las lectinas

Se eligieron SBA, VVA y HPA como dianas biológicas. La razón principal fue porque reconocen específicamente al carbohidrato GalNAc y también porque estas lectinas son estables y comercialmente disponibles, pero además, dichas lectinas fueron escogidas ya que se han resuelto sus estructuras cristalinas con diferentes ligandos, en el caso de la HPA y la VVA en la estructura de rayos X la lectina está acomplejada con el antígeno Tn (α -O-GalNAc-Ser), en el caso de la SBA ésta se encuentra unida al disacárido Gal β (1-4)GalNAc. La figura 3 muestra la estructura tridimensional de las lectinas anteriormente mencionadas (PDB IDs: 2CGZ(HPA),^[41] 1N47(VVA),^[42] 1SBF(SBA).^[43]

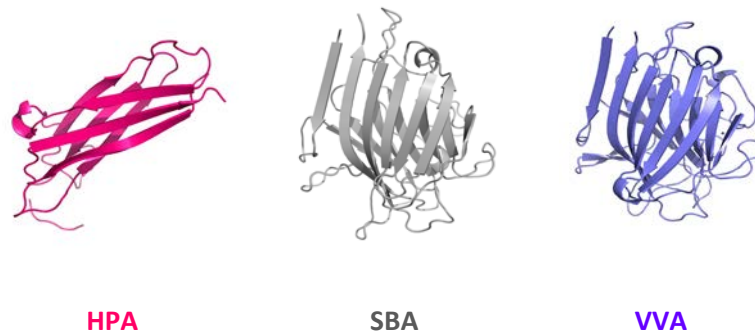


Figura 3. Lectinas elegidas para los ensayos de afinidad.

Aunque SBA y VVA son tetrámeros y HPA tiene 6 subunidades, hay un sitio de unión por cada subunidad en los tres casos. Mientras que la SBA reconoce débilmente el GalNAc,^[44] cuando éste no se encuentra formando parte de un agregado, HPA y VVA tienen una gran afinidad tanto por GalNAc como por el antígeno Tn.^[45] Es importante resaltar, que el sitio de unión para las lectinas SBA y VVA es muy similar. Ambas lectinas forman una red de enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo del azúcar, además de una interacción CH $\cdots\pi$ entre la cara α del GalNAc y el residuo fenilalanina de la lectina SBA (o la tirosina en la VVA) (Figura 4). Sin embargo, en el caso de la HPA, aunque existe un patrón similar de enlaces de hidrógeno en la interacción entre la lectina y ligando, el contacto CH $\cdots\pi$ involucra al H1 del GalNAc y al protón o protones H β del aminoácido al que está unido, bien sea serina o treonina respectivamente.

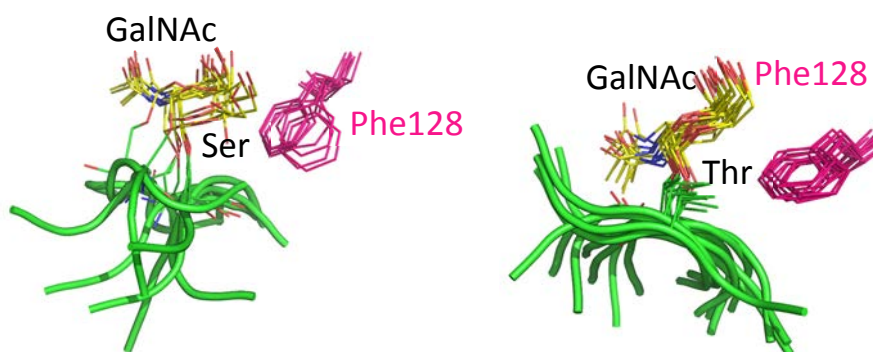


Figura 4. Interacciones entre los glicopéptidos de serina (izda.) y treonina con el residuo fenilalanina de la lectina SBA.

6.3.3. Estudios de afinidad

Una vez sintetizados los derivados **36** y **37**, el siguiente paso fue llevar a cabo la medida de su afinidad con las lectinas anteriores. Estos estudios se realizaron utilizando las lectinas SBA y HPA, no se utilizó en este caso la VVA ya que como se ha comentado anteriormente el sitio de unión para las lectinas SBA y VVA es muy similar. Para realizar este análisis, se llevaron a cabo experimentos de microcalorimetría (ITC por sus siglas en inglés *Isothermal Titration Calorimetry*, esta metodología se describe en el anexo IV). En las tablas 1 y 2 se muestran los valores de las constantes termodinámicas obtenidos para los glicopéptidos **36** y **37** con ambas lectinas.

Tabla 1. Parámetros termodinámicos obtenidos para el reconocimiento molecular entre los glicopéptidos 36 y 37 y la lectina SBA, medidos a 25 °C y pH 7.5.

Ligando	$K_D^{[a]}$ (μM)	$\Delta G^{[b]}$ (kcal/mol)	$\Delta H^{[c]}$ (kcal/mol)	$T\Delta S^{[b]}$ (kcal/mol)	$n^{[c]}$
36	45.6	-5.92	-3.03	2.89	1.20
37	189.8	-5.08	-10.80	-5.72	1.00

[a] Rango de error 1-7%. [b] Error < 2%. [c] Rango de error 1-4%.

Tabla 2. Parámetros termodinámicos obtenidos para el reconocimiento molecular entre los glicopéptidos 36 y 37 y la lectina HPA, medidos a 25 °C y pH 7.5.

Ligando	$K_D^{[a]}$ (μM)	$\Delta G^{[b]}$ (kcal/mol)	$\Delta H^{[c]}$ (kcal/mol)	$T\Delta S^{[b]}$ (kcal/mol)	$n^{[c]}$
36	125.9	-5.32	-5.96	-0.64	1.03
37	33.3	-6.11	-3.92	2.19	1.09

[a] Rango de error 1-7%. [b] Error < 2%. [c] Rango de error 1-4%.

Respecto a la lectina SBA, los experimentos de ITC dieron unos resultados de la constante de disociación (K_D), para el glicopéptido que lleva el Tn-Ser (**37**) cuatro veces mayor que el derivado del Tn-Thr (**36**). Este resultado sugiere que la afinidad que tiene la lectina SBA por el antígeno Tn, depende en gran medida del aminoácido al que está unido el GalNAc. También es interesante resaltar, que el gasto entrópico fue mayor en el caso del derivado **37** que en el **36**. El asunto es totalmente opuesto cuando la lectina analizada es la HPA. De hecho, esta lectina muestra una afinidad cuatro veces superior pero en este caso a favor del derivado de serina. Pero al contrario que en el caso de la SBA, el gasto entrópico que muestra el derivado de treonina no es muy alto. Con el fin de explicar estos resultados experimentales, se realizaron análisis conformacionales de estos glicopéptidos tanto en estado libre como en el asociado con las lectinas SBA, VVA y HPA.

6.3.4. Estudio conformacional

El estudio conformacional de los derivados **36** y **37** se llevó a cabo mediante RMN y cálculos de MD.

El primer paso del análisis conformacional consistió en asignar las señales de los espectros de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) para ambas moléculas. En la figura 5 y en la tabla 3 se muestra la asignación de todos los protones para el compuesto **36**.

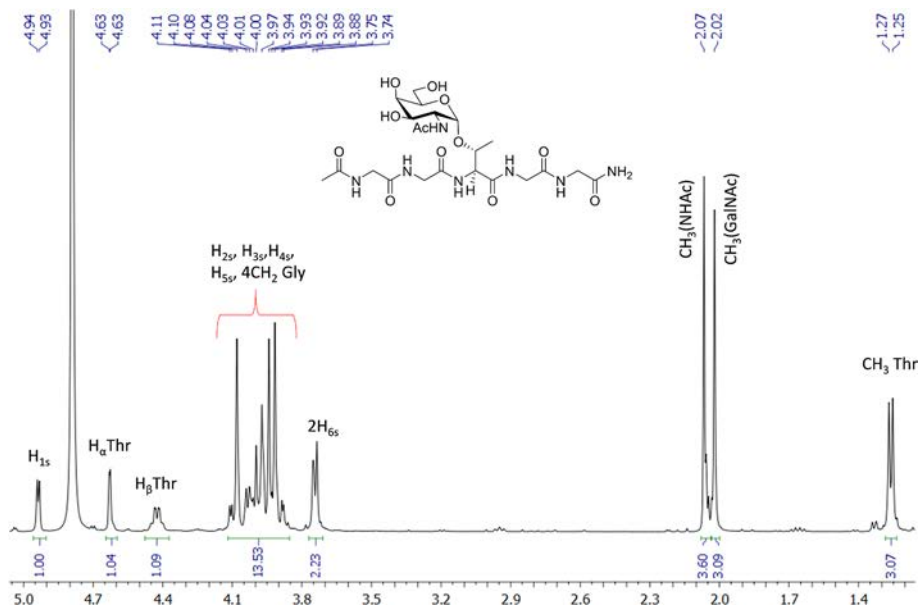


Figura 5. Espectro de Protón asignado del glicopéptido **36**.

Tabla 3. Asignación de protones y constantes de acoplamiento para el compuesto 36^a.

δ (ppm)	Protones	Multiplicidad ^b	ⁿ J _{H,H} (Hz)
1.30	CH ₃ Thr	d(3H)	³ J _{CH₃, Hα} = 6.4
2.05	CH ₃ GalNAc	m(3H)	—
2.08	CH ₃ NHAc	m(3H)	—
3.75 – 3.79	2H _{6s} Cys	m(2H)	—
3.89 – 4.13	4CH ₂ Gly H _{2s} , H _{3s} , H _{4s} , H _{5s}	m(12H)	—
4.38 – 4.52	H β Thr	m(1H)	—
4.65	H α Thr	d(1H)	³ J _{Hα, Hβ} = 2.2
4.96	H _{1s}	m(2H)	³ J _{H_{1s}, H_{2s}} = 3.7
7.94	NH(GalNAc) ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 9.6
8.32 – 8.47	3NH Gly ^c	m(3H)	—
8.40	NH Thr ^c	d(1H)	³ J _{NH, Hα} = 7.6
8.51 – 8.53	NH Gly4 ^c	m(1H)	—

^aDatos extraídos del experimento de RMN de ¹H (400 MHz) llevado a cabo en D₂O (298 K, pH = 5.2) ^bs = singlete, d = doblete, m = multiplete. ^cDatos extraídos del experimento de RMN de ¹H 400 (MHz) llevado a cabo en H₂O/D₂O (9:1) (298 K, pH = 5.2).

A continuación, se llevaron a cabo experimentos 2D-NOESY en una mezcla H₂O/D₂O (9:1) y a pH = 5.2. En particular, el análisis del NOESY de los compuestos **36** y **37** (Figura 6) indica que estos compuestos tienen un patrón de NOEs para la cadena peptídica similar. De hecho, el pico de cruce intenso entre H α (i)-NH(i+1), se observó en ambos casos, para serina y treonina, y es característico de conformaciones extendidas y PPII.^[46] Estas conformaciones

extendidas se ven corroboradas por los valores altos de las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{NH},\text{H}\alpha}$, alrededor de 7.4 Hz^[32] para ambos aminoácidos.

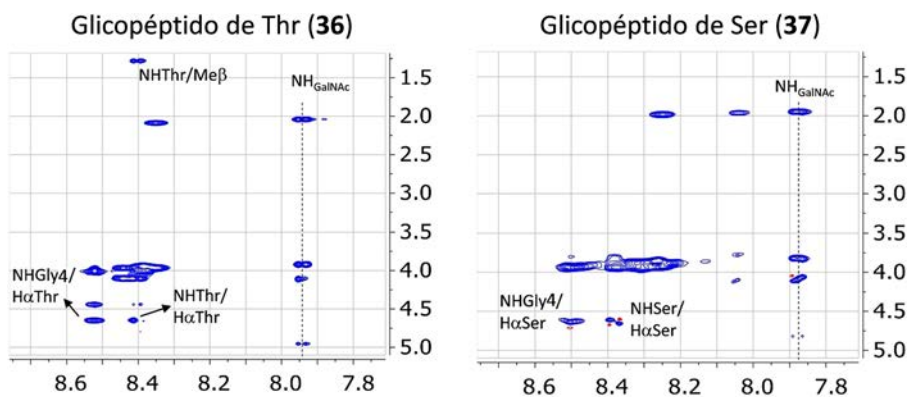


Figura 6. 2D-NOESY (400 MHz) en una mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1) (20 °C, pH 5.2) de los compuestos **36** y **37**.

Los cálculos computacionales fueron el siguiente paso en el análisis estructural, para ello, se dedujeron tanto las constantes de acoplamiento, como las distancias protón-protón, que contenían información estructural, de los experimentos de RMN 2D NOESY, para luego usarlas como restricciones en las simulaciones *MD-tar*.^[47] Estos cálculos, como en los capítulos anteriores, se han aplicado con éxito a sistemas flexibles y dieron una distribución de conformeros capaz de reproducir cuantitativamente los datos espectroscópicos de RMN. ^[29,48-52]

Tabla 4. Distancias (\AA) H-H experimentales y teóricas para 36 y 37.

	Compuesto 36		Compuesto 37	
	Exp.	MD-tar(H ₂ O)	Exp.	MD-tar(H ₂ O)
NHThr3/Ser3-NH α Thr3/Ser3	2.7	2.9	2.7	2.9
NHGly4-H α Thr3/Ser3	2.3	2.4	2.2	2.4
³ J(H α ,H β)	2.2	2.5	4.6	3.8/4.1

En la siguiente figura se muestra la superposición de las conformaciones obtenidas de manera teórica para los glicopéptidos **36** y **37**. Ambos glicopéptidos muestran principalmente una conformación extendida para la cadena peptídica, como puede deducirse de las distribuciones de φ/ψ obtenidas de la simulación de MD-tar (Figura 7). Estos hechos están de acuerdo con estudios recientes.^[30-32] Sin embargo, estos glicopéptidos son bastante flexibles en disolución acuosa, en particular, el derivado de serina (con $rmsd = 2.34 \text{ \AA}$). El enlace glicosídico del glicopéptido **36** es bastante rígido con φ alrededor de 60° , debido al efecto exoanomérico,^[53] y el ángulo de torsión ψ está cercano a 120° . Ésta es la geometría esperada para este ángulo cuando el carbohidrato se encuentra unido a treonina.^[48]

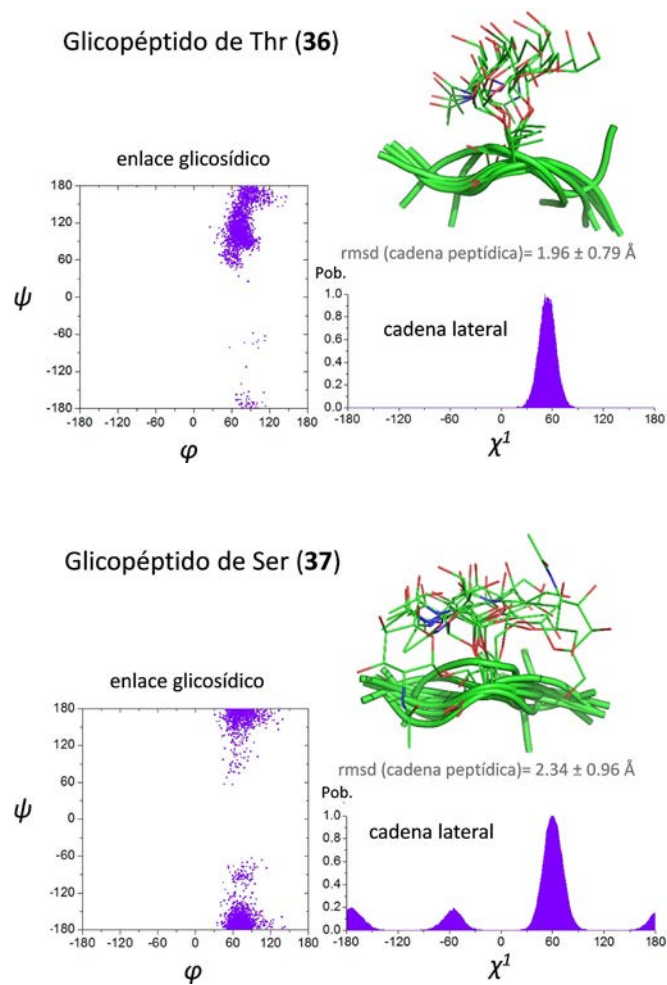


Figura 7. En verde la superposición de las estructuras obtenidas mediante MD para los glicopéptidos **36** y **37**, en morado gráficos que muestran la geometría del enlace O-glicosídico, así como de la cadena lateral de ambas moléculas.

Por otra parte, el NOE que existe entre el NH del GalNAc y el NH de la treonina corrobora esta disposición 3D del enlace glicosídico^[7] (ver parte experimental). Al contrario, en el glicopéptido **37**, el ángulo de torsión ψ del enlace glicosídico toma valores alrededor de 180°, característico de

conformación alternada, que se encuentra normalmente en compuestos de serina glicosilada.^[17] Además, mientras que la cadena lateral del glicopéptido **36** ($\chi^1 = \text{N-C}\alpha\text{-C}\beta\text{-O1}$) adopta solamente valores cercanos a 60° , el glicopéptido **37** presenta tres conformeros. Estos resultados están en consonancia con el valor de $^3J(\text{H}\alpha, \text{H}\beta)$ observado para el derivado **36** en comparación con el **37** ($^3J = 2.2$ y 4.6 Hz respectivamente).^[7] Estas diferencias observadas en la estructura del enlace glicosídico tienen como consecuencia una modificación en la primera esfera de solvatación de los glicopéptidos. La figura 8 muestra la existencia de moléculas de agua puente entre la parte carbohidrato y peptídica para los dos derivados,^[54] obtenidos de las simulaciones de dinámica molecular (*MD-tar*) en agua explícita. Mientras que en el compuesto **36** el agua puente se encuentra entre el grupo NH de la Thr y el grupo NH del GalNAc, en el derivado **37**, las moléculas de agua puente se posicionan entre el grupo carbonilo de la Ser y el grupo NH del carbohidrato. También puede observarse que la densidad de agua en estas zonas es mayor en el caso del derivado **36**, lo que indicaría una mayor persistencia de las moléculas de agua en el derivado de treonina.

De este estudio puede inferirse que el agua en la primera esfera de solvatación contribuye de forma importante a estabilizar una determinada conformación del glicopéptido. Las regiones de agua encontradas en este trabajo son similares a las que se habían descrito anteriormente en nuestro grupo para otros glicopéptidos.^[7,17,55]

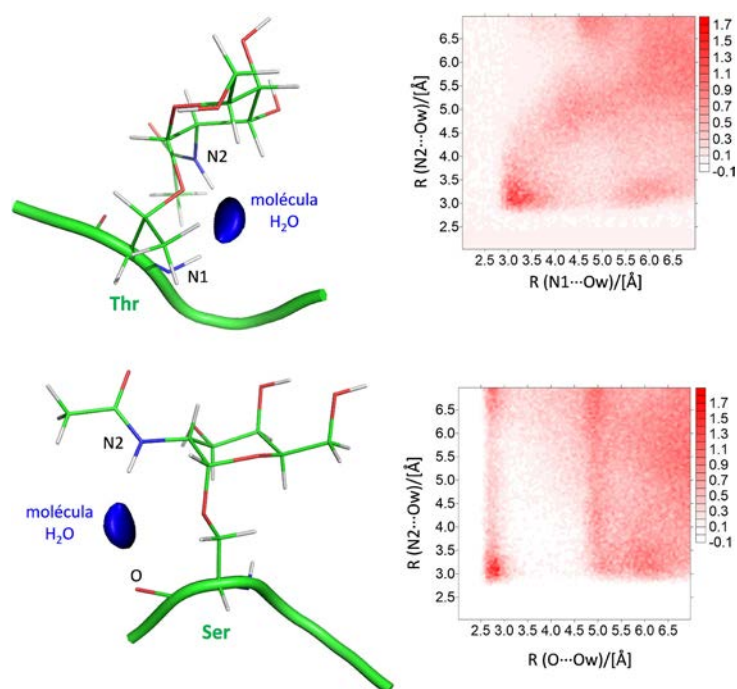


Figura 8. Representación de la densidad de agua encontrada entre el carbohidrato y el esqueleto peptídico obtenida de las simulaciones de MD para los glicopéptidos **36** y **37**.

Con respecto al estado asociado, considerando, razonablemente, que los ligandos están fijados en el estado asociado, un factor que contribuye a la baja afinidad observada para la lectina SBA por el derivado **37** podría ser esta flexibilidad extra de la cadena lateral del compuesto glicosilado. Por tanto, este grado de flexibilidad contribuye con un alto gasto entrópico al proceso de reconocimiento si lo comparamos con su homólogo **36**.

Para validar esta hipótesis, se llevó a cabo un análisis conformacional en el estado asociado de los dos glicopéptidos con la lectina SBA. La superposición de las diferentes imágenes extraídas de las simulaciones para los complejos SBA:**36** y SBA:**37** se muestran en la figura 9a y 9b, respectivamente.

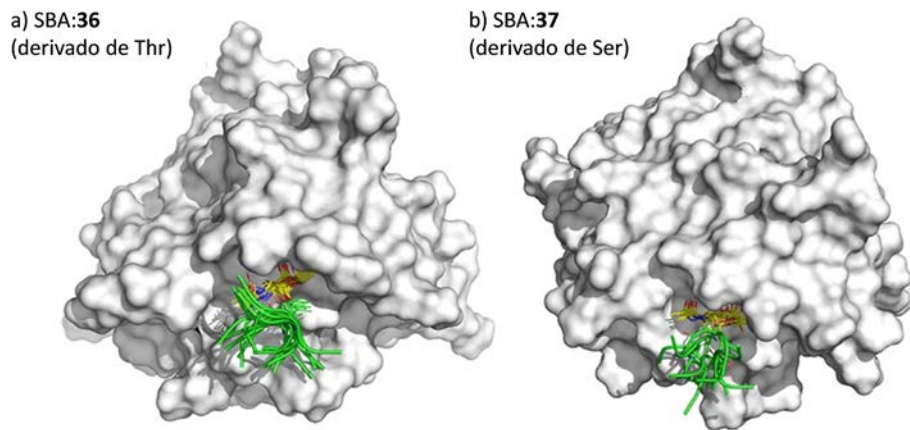


Figura 9. a) y b) Superposiciones de las imágenes de los glicopéptidos en el estado asociado de Thr y Ser respectivamente.

Algunas de las propiedades estructurales son compartidas con complejos descritos previamente. En primer lugar, los enlaces de hidrógeno que existen entre el GalNAc y la lectina son los mismos que pueden verse en la estructura obtenida por difracción de rayos X.^[43] En segundo lugar, el grupo metilo de la Thr (en el complejo SBA:36) participa en un contacto hidrofóbico con la Phe128 (Figura 10).

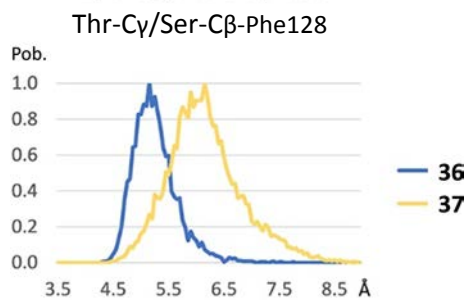


Figura 10. Distribución de la distancia obtenida por MD entre la lectina SBA y los glicopéptidos.

El esqueleto peptídico de los glicopéptidos **36** y **37** no muestra enlaces de hidrógeno importantes con el receptor. De hecho, la suma de todos

ellos no representa siquiera ni el 10% en ambos complejos. La característica que más cabe resaltar es que la cadena lateral del compuesto **37** adopta principalmente una conformación tipo *anti* (χ^1 alrededor de 180°) en el estado asociado (Figura 11b). Esta disposición 3D de χ^1 difiere de la geometría típica observada en el estado libre para este compuesto, normalmente alrededor de 60° (Figura 7). Este comportamiento de la cadena lateral podría tener un impacto negativo en el proceso de reconocimiento, esto explicaría la baja afinidad que muestra la lectina SBA por el glicopéptido que incluye la Ser. Por el contrario, en el caso del glicopéptido con Thr, la cadena lateral muestra el mismo valor para el ángulo diedro χ^1 tanto en el estado libre (Figura 7) como asociado (Figura 11a).

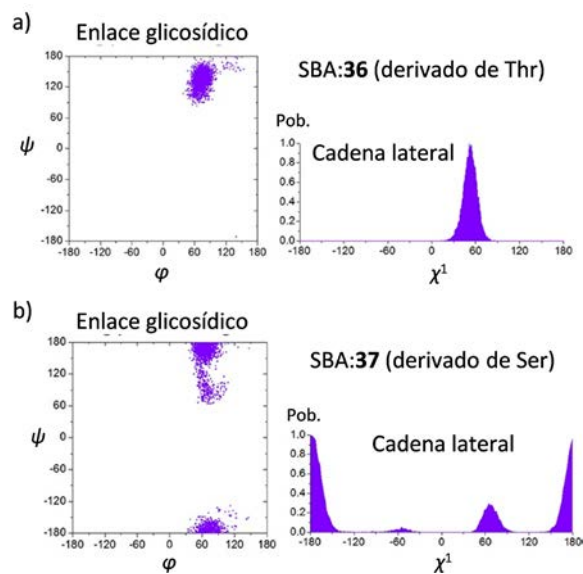


Figura 11. a) y b) Geometría de la cadena y el enlace glicosídico para los glicopéptidos de Ser y Thr, en el estado asociado respectivamente.

Del estudio realizado sobre ambos glicopéptidos con la lectina VVA, se extrajeron conclusiones comparables. En este caso, el residuo a través del cual interacciona la lectina cambia de la Phe128 en la SBA a la Tyr127 en la VVA. Igualmente, la lectina VVA exhibió mayor afinidad por el glicopéptido que lleva la treonina en su estructura en lugar de la serina. En la figura 12 pueden verse las distancias, existentes en el complejo, entre las partes del ligando y el receptor responsables del reconocimiento.

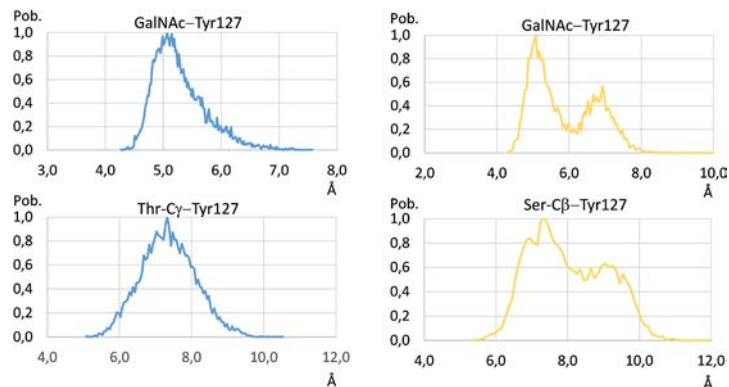


Figura 12. Distribución de distancias en el estado asociado entre ligando y receptor.

La figura 13 muestra una superposición de imágenes obtenidas por MD para ambos complejos VVA:36 y VVA:37. Donde inicialmente se puede apreciar un aumento de flexibilidad en la cadena peptídica del glicopéptido que incorpora Thr. Por el contrario, el glicopéptido con serina exhibe una mayor rigidez de la cadena peptídica.

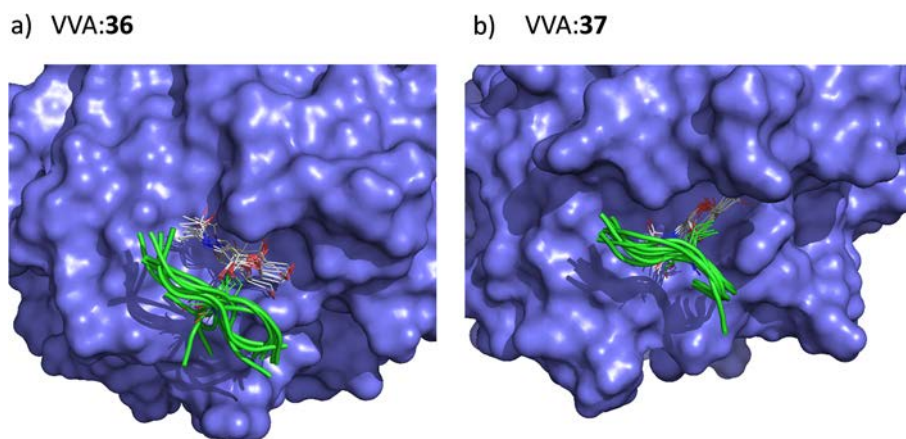


Figura 13. Superposición de las imágenes obtenidas de la MD de los complejos VVA:36 y VVA:37.

El siguiente paso fue el análisis de los complejos con la lectina HPA. En este caso, para el complejo HPA:36, la cadena lateral toma una conformación inusual en el estado asociado, concretamente, χ^1 toma valores cercanos a 180° (Figura 14a). Además, aunque el ángulo de torsión φ_s del enlace glicosídico muestra valores que están de acuerdo con el efecto exoanomérico, ψ_s exhibe una flexibilidad inesperada, tomando valores entre 60° y 180° . Cuando se comparó con la geometría del glicopéptido de serina (37) (Figura 14b), se observó que en este caso la cadena lateral de la serina mostraba mayor rigidez.

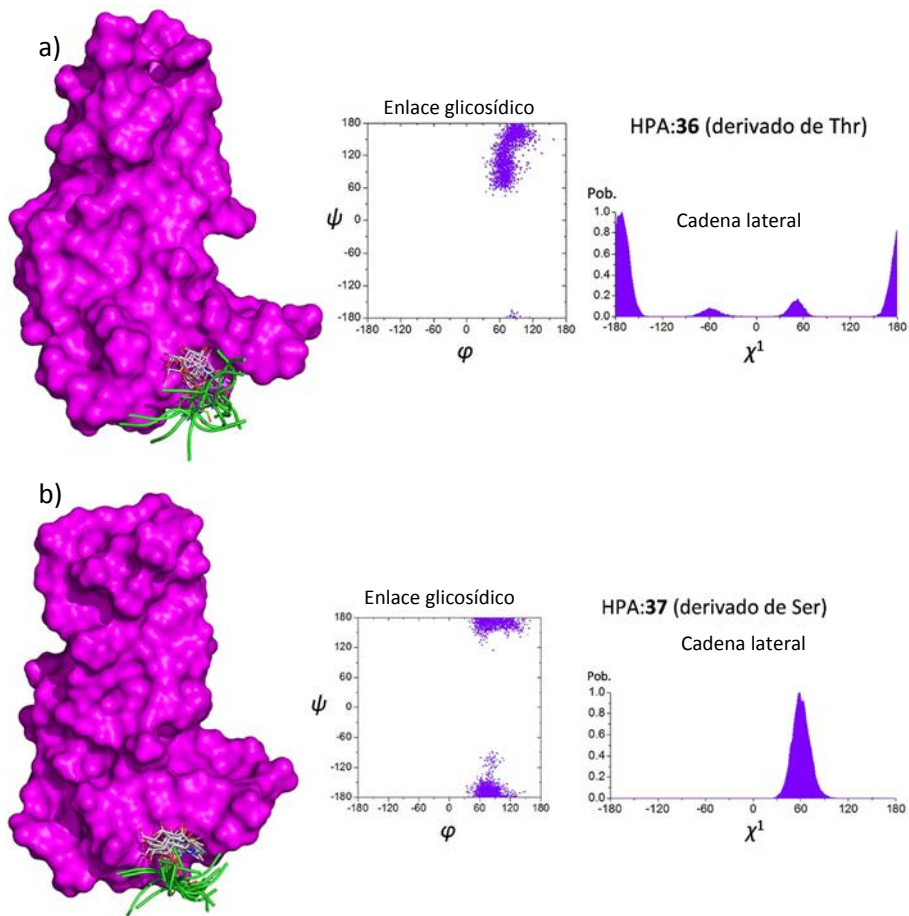


Figura 14. a) y b) Geometría del enlace glicosídico y de la cadena peptídica de los glicopéptidos **36** y **37** respectivamente en el estado asociado con la lectina HPA. Superposición de imágenes obtenidas mediante MD para dicho complejo.

Por último, se observó que el reconocimiento molecular, en el caso de la lectina HPA, ocurre a través de la His84. En la figura 15, se muestran las distancias más representativas entre receptor y ligando en el estado asociado.

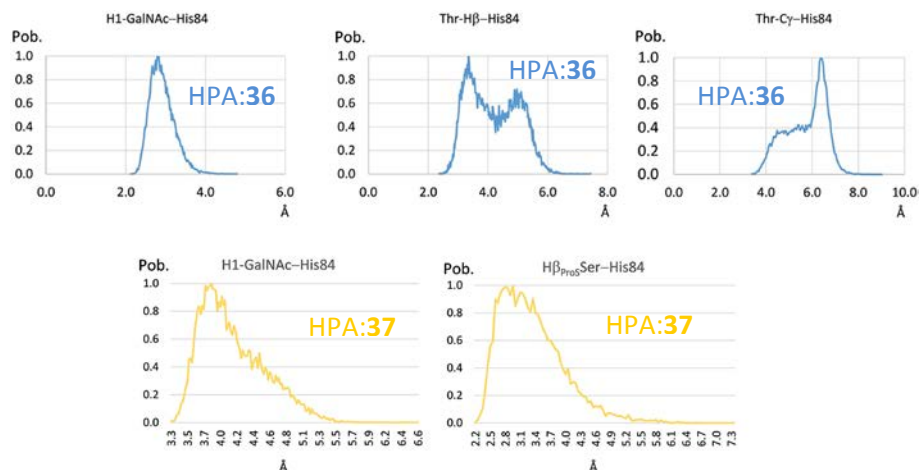


Figura 15. Distancias entre ligando y receptor para los complejos HPA:36 y HPA:37.

6.4. Conclusión

Se han sintetizado dos glicopéptidos ricos en glicinas y que incorporan en su estructura el antígeno Tn, α -O-GalNAc-Ser y α -O-GalNAc-Thr.

Se ha llevado a cabo el análisis estructural en el estado libre, en disolución acuosa, de los dos glicopéptidos Gly-Gly-Thr(α -O-GalNAc)-Gly-Gly (**36**) y Gly-Gly-Ser(α -O-GalNAc)-Gly-Gly (**37**), combinando los datos obtenidos experimentalmente de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear con las simulaciones de dinámica molecular.

Se ha analizado el reconocimiento molecular de estos glicopéptidos que llevan el antígeno Tn (Ser y Thr) en su estructura por tres lectinas con afinidad por este carbohidrato. De este trabajo se han extraído importantes resultados acerca del epítipo de reconocimiento, mostrando que el aminoácido, serina o treonina, al que se encuentra unido el azúcar juega un papel clave en el reconocimiento. De hecho, mientras que las lectinas SBA y VVA prefieren el antígeno Tn con treonina, la lectina HPA muestra una

afinidad más alta por el derivado de serina. Una explicación razonable de este resultado se extrae, de las microcalorimetrías (ITC), de los experimentos de RMN y de las simulaciones de dinámica molecular. Tanto la distinta geometría de los dos antígenos Tn, que dependen fundamentalmente del aminoácido al que está unido el GalNAc, como los distintos patrones de interacción con las lectinas utilizadas en el estudio son responsables de las diferencias observadas en el reconocimiento molecular del Tn-Ser y Tn-Thr por estas proteínas.

6.5. Bibliografía

- [1] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- [2] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
- [3] D. H. Williams, *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 469–477.
- [4] T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons, *Glycobiology* **2006**, *16*, 113R–136R.
- [5] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science* **2001**, *291*, 2357–2364.
- [6] M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58–68.
- [7] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, M. García de Luis, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9458–9467.
- [8] D. Madariaga, N. Martínez-Sáez, V. J. Somovilla, L. García-García, M. Á. Berbis, J. Valero-González, S. Martín-Santamaría, R. Hurtado-Guerrero, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, et al., *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 12616–12627.
- [9] T. Ju, V. I. Otto, R. D. Cummings, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1770–1791.
- [10] T. Buskas, P. Thompson, G.-J. Boons, *Chem. Commun.* **2009**, 5335–5349.
- [11] R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14462–14472.
- [12] R. E. Beatson, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, *Immunotherapy* **2010**, *2*, 305–327.
- [13] M. A. Tarp, H. Clausen, *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 546–563.
- [14] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. W. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9977–9981.
- [15] L. Mathiesen, J. O. Nielsen, H. Clausen, *J. Virol.* **1991**, *65*, 6461–6467.
- [16] K. Terasawa, H. Furumoto, M. Kamada, T. Aono, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2229–2232.
- [17] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, J. L. Asensio, J. Jiménez-

- Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14640–14648.
- [18] F. Corzana, J. H. Busto, M. García de Luis, J. Jiménez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3863–3874.
- [19] L. Chen, A. L. DeVries, C. H. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 3811–3816.
- [20] N. M. Tsvetkova, B. L. Phillips, V. V. Krishnan, R. E. Feeney, W. H. Fink, J. H. Crowe, S. H. Risbud, F. Tablin, Y. Yeh, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 464–473.
- [21] Y. Tachibana, G. L. Fletcher, N. Fujitani, S. Tsuda, K. Monde, S.-I. Nishimura, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 874–880.
- [22] D. Mazal, R. Lo-Man, S. Bay, O. Pritsch, E. Dériaud, C. Ganneau, A. Medeiros, L. Ubillos, G. Obal, N. Berois, et al., *Cancer Immunol. Immunother.* **2013**, *62*, 1107–1122.
- [23] T. Kanzaki, N. Mizuno, M. Yokota, Y. Matsumoto, Y. Hirabayashi, *The Lancet* **1989**, *333*, 875–877.
- [24] T. Kanekura, H. Sakuraba, F. Matsuzawa, S. Aikawa, H. Doi, Y. Hirabayashi, N. Yoshii, T. Fukushige, T. Kanzaki, *J. Dermatol. Sci.* **2005**, *37*, 15–20.
- [25] M. A. Brister, A. K. Pandey, A. A. Bielska, N. J. Zondlo, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3803–3816.
- [26] D. Clark, L. Mao, *Dis. Markers* **2012**, *33*, 1–10.
- [27] T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387–429.
- [28] A. Varrot, B. Blanchard, A. Imberty, *Carbohydrate Recognition* **2011**.
- [29] F. Corzana, J. H. Busto, F. Marcelo, M. García de Luis, J. L. Asensio, S. Martín-Santamaría, J. Jiménez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3105–3110.
- [30] L. Ding, K. Chen, P. A. Santini, Z. Shi, N. R. Kallenbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8092–8093.
- [31] Z. Shi, K. Chen, Z. Liu, A. Ng, W. C. Bracken, N. R. Kallenbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 17964–17968.
- [32] L. He, A. E. Navarro, Z. Shi, N. R. Kallenbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1571–1576.

- [33] R. Lotan, H. W. Siegelman, H. Lis, N. Sharon, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 1219–1224.
- [34] S. E. Tollefsen, R. Kornfeld, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 5172–5176.
- [35] J.-F. Sanchez, J. Lescar, V. Chazalet, A. Audfray, J. Gagnon, R. Alvarez, C. Breton, A. Imberty, E. P. Mitchell, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 20171–20180.
- [36] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem* **1979**, *57*, 1244–1251.
- [37] C. Heggemann, C. Budke, B. Schomburg, Z. Majer, M. Wissbrock, T. Koop, N. Sewald, *Amino Acids* **2010**, *38*, 213–222.
- [38] N. Martínez-Sáez, *Tesis Doctoral*, **2013**, 1–312 .
- [39] M. Liu, V. G. Young Jr., S. Lohani, D. Live, G. Barany, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1273–1285.
- [40] B. Liebe, H. W. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473–1482.
- [41] J. Lescar, J.-F. Sanchez, A. Audfray, J.-L. Coll, C. Breton, E. P. Mitchell, A. Imberty, *Glycobiology* **2007**, *17*, 1077–1083.
- [42] A. Babino, D. Tello, A. Rojas, S. Bay, E. Osinaga, P. M. Alzari, *FEBS Lett.* **2003**, *536*, 106–110.
- [43] L. R. Olsen, A. Dessen, D. Gupta, S. Sabesan, J. C. Sacchettini, C. F. Brewer, *Biochemistry* **1997**, *36*, 15073–15080.
- [44] T. K. Dam, T. A. Gerken, B. S. Cavada, K. S. Nascimento, T. R. Moura, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28256–28263.
- [45] K. Godula, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15732–15742.
- [46] H. J. Dyson, P. E. Wright, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 519–538.
- [47] D. A. Pearlman, *J Biomol NMR* **1994**, *4*, 279–299.
- [48] F. Corzana, J. H. Busto, S. B. Engelsen, J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7864–7871.
- [49] E. Jimenez-Moreno, I. Gomez-Pinto, F. Corzana, A. G. Santana, J. Revuelta, A. Bastida, J. Jiménez-Barbero, C. Gonzalez, J. L. Asensio, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3148–3151.
- [50] J. Carlos Munoz-Garcia, F. Corzana, J. L. de Paz, J. Angulo, P. M. Nieto, *Glycobiology* **2013**, *23*, 1220–1229.

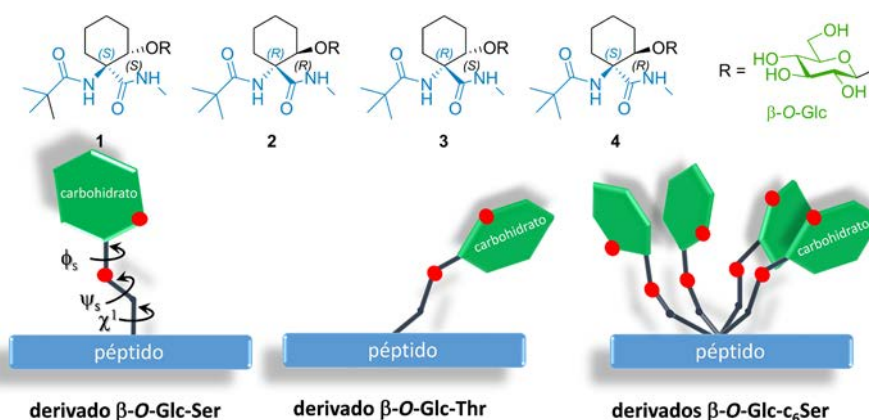
- [51] P. M. S. Hendrickx, F. Corzana, S. Depraetere, D. A. Tourwe, K. Augustyns, J. C. Martins, *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 561–572.
- [52] Z. Zhang, S. A. McCallum, J. Xie, L. Nieto, F. Corzana, J. Jiménez-Barbero, M. Chen, J. Liu, R. J. Linhardt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12998–13007.
- [53] G. R. J. Thatcher, *ACS Symp. Ser.* **1993**, *539*, 6–25.
- [54] C. Andersson, S. B. Engelsen, *J. Mol. Graphics Mod.* **1999**, *17*, 101–105.
- [55] F. Corzana, J. H. Busto, M. García de Luis, A. Fernández-Tejada, F. Rodríguez, J. Jiménez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 3525–3532.



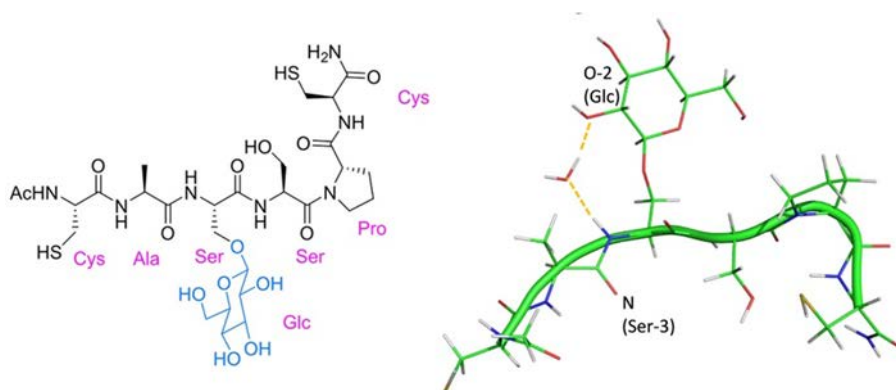
7. Conclusiones

En este capítulo se resumen las conclusiones que se han obtenido durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

- El trabajo desarrollado en el capítulo 4 dio como fruto una publicación científica (*Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 5096–5104) y la conclusión derivada de dicho capítulo se expone a continuación brevemente, incluyendo un esquema gráfico para mayor claridad, que se corresponde con el *Graphical Abstract* de dicha publicación. Se han sintetizado y analizado, desde un punto de vista conformacional, cuatro derivados β -*O*-glicosilados de aminoácidos no naturales (**1**, **2**, **3** y **4**) que incorporan en su estructura un ciclohexano (c_6 Ser). Gracias a esta estructura cíclica, en función de las configuraciones absolutas de sus carbonos α y β , se puede modular la disposición del carbohidrato con respecto al *backbone*, permitiendo obtener conformaciones no observadas en los glicosilaminoácidos naturales e incluso conformaciones de alta energía. Además, se demostró que estas conformaciones se mantienen cuando se aumenta el tamaño de la cadena peptídica.

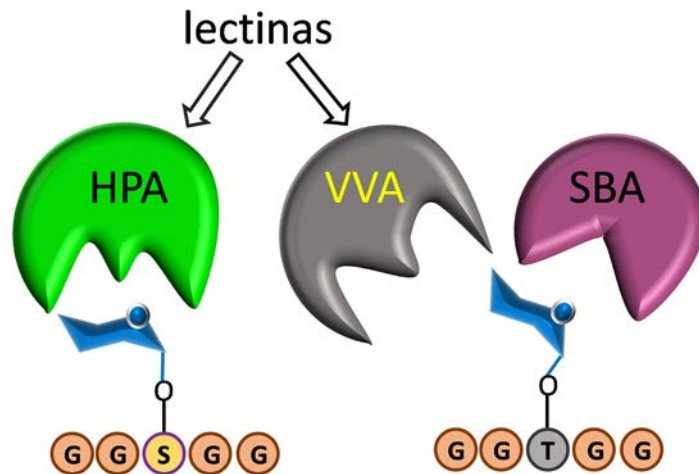



- Del mismo modo que en el capítulo anterior, el trabajo desarrollado en el capítulo 5 pudo ser publicado en una revista científica (*Curr. Topics Med. Chem.*, **2014**, en prensa) y la conclusión más relevante de dicho capítulo se comenta en las siguientes líneas incluyendo también el correspondiente *Graphical Abstract*. Se han sintetizado dos péptidos (**30** y **31**) y un glicopéptido (**32**) relacionados con la secuencia de consenso (Cys1-Ala2-Ser3-Ser4-Pro5-Cys6) para la glicosilación con β -*O*-glucosa y se han analizado sus estructuras en disolución. En este estudio se propone una posible explicación para justificar esta secuencia de consenso. De esta forma, la clara disposición del grupo hidroxilo de la Ser3 hacia el disolvente facilitaría la reacción de glicosilación por parte de la correspondiente enzima.



- También, el trabajo del capítulo 6 junto con otro trabajo que se desarrolló paralelamente en el laboratorio, pudo ser publicado en una revista científica (*Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, 12616-12627). A continuación se resume dicho capítulo y se adjunta un esquema gráfico. Se ha realizado la síntesis y el análisis conformacional en el

estado libre de dos glicopéptidos ricos en glicinas (**36** y **37**). En concreto, derivados del tipo Gly-Gly-Xxx-Gly-Gly, donde Xxx es Ser/Thr glicosilada con α -O-GalNac, es decir el antígeno Tn. Además, se ha evaluado su afinidad con tres lectinas (SBA, VVA Y HPA) mediante ensayos ITC. Posteriormente, se ha realizado un estudio conformacional en el estado asociado que muestra evidencias de que el reconocimiento molecular de carbohidratos por lectinas, se ve fuertemente modulado por el aminoácido al que está unido el carbohidrato, el GalNac (serina o treonina). Por lo tanto, mientras que SBA y VVA muestran mayor preferencia por glicopéptidos en los que el antígeno Tn está formado por Thr, la lectina HPA tiene mayor afinidad por los antígenos Tn formados por serina.





8. Supplementary information

- 8.1. Instrumentation and general procedures
- 8.2. General procedures to obtain peptides and glycopeptides by SPPS
- 8.3. Experimental section of chapter 4
- 8.4. Experimental section of chapter 5
- 8.5. Experimental section of chapter 6
- 8.6. 1D- and 2D-NMR spectra. 2D-NOESY spectra and build-up curves (NMR)
- 8.7. X-Ray diffraction
- 8.8. References

8.1. Instrumentation and general procedures

General Procedures: Solvents were purified according to standard procedures. Analytical TLC was performed using Polychrom SI F254 plates. Column chromatography was performed using Silica gel 60 (230–400 mesh). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded with Bruker ARX 300 and Bruker AVANCE 400 spectrometers. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in CDCl_3 with TMS as the internal standard or in D_2O (chemical shifts referenced to the internal solvent signals and are reported in ppm on the δ scale, coupling constants in Hz). Assignment of all separate signals for the final compounds in the ^1H NMR spectra was made on the basis of coupling constants, ge-COSY and ge-HSQC experiments on a Bruker AVANCE 400 spectrometer. The NMR data were processed with MestreNova software (Mestrelab Research, Spain). Melting points were determined on a Büchi SMP-20 melting point apparatus and are uncorrected. Microanalyses were carried out on a CE Instruments EA-1110 analyser and are in good agreement with the calculated values. Optical rotations were measured with a Perkin-Elmer 341 polarimeter. Electrospray mass spectra were recorded on a micrOTOF-Q-BRUKER connected to a 996 photodiode array detector with H_2O or MeOH as carrier solvents.

8.2. General procedures to obtain peptides and glycopeptides by SPPS

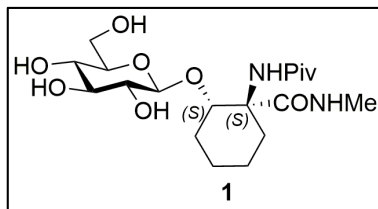
All peptides and glycopeptides were synthesized by stepwise solid-phase peptide synthesis using the Fmoc strategy on Rink Amide MBHA resin (0.1 mmol).

The Fmoc amino acids were coupled in the automated mode in an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer using 10 equiv. and HBTU as a coupling agent.

In the case of the glycopeptides, the building block coupling was carried out manually, by treating the resin with two equivalents of the glycosylated amino acids, which were previously activated with 75.8 mg of HBTU and 0.5 mL of a 2.0 M solution of DIEA in 2 mL of DMF. The time required to complete the coupling was monitored by Kaiser Test. Once the coupling of building block is completed, the synthesis continued on the synthesizer to the desired peptide sequence.

The acetylation of the terminal amide was carried out with Ac_2O /pyridine (1:2). In the case of the glycopeptides, the *O*-acetyl groups of the sugar moiety were deprotected in a mixture of $\text{NH}_2\text{NH}_2/\text{MeOH}$ (7:3). The peptides were then released from the resin, and all acid sensitive side-chain protecting groups simultaneously removed using 2 mL of a mixture of TFA/TIS/ H_2O (95:2.5:2.5). In case of peptides and glycopeptides which comprise cysteines, the cocktail cleavage used was the next mixture TFA/TIS/ H_2O /DTT (94:1:2.5:2.5), followed by precipitation with diethyl ether. Finally, all the compounds were purified by HPLC on a Waters Delta Prep chromatograph [Phenomenex Luna C18 (2) column (10 μ , 21.20 mm \times 250 mm)].

8.3. Experimental section of chapter 4

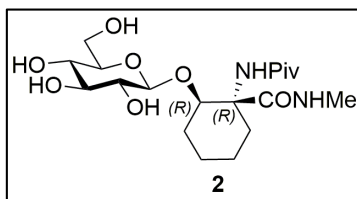
Synthesis of compound **1**

A solution of **20** (6 mg, 0.007 mmol) in MeOH (4 mL) was treated with MeONa/MeOH (0.5 M) to pH 9. The reaction mixture was then stirred for 3 h and neutralized with Dowex 50W-X8. The resin was filtered off and the aqueous solution washed with CH₂Cl₂ (2 x 3 mL) and Et₂O (2 x 3 mL). The H₂O was evaporated to give **1** as a colourless oil (2.5 mg, 83% yield); $[\alpha]_D^{25} = +9.0$ (c = 0.80, MeOH).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for C₁₉H₃₅N₂O₈⁺ [M+H]⁺ 419.2388, found 419.2380.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.20 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.33-1.54 (m, 2H), 1.55-1.73 (m, 2H), 1.77-1.88 (m, 1H), 1.89-2.03 (m, 2H), 2.04-2.14 (m, 1H), 2.74 (s, 3H, CH₃NH), 3.30 ('t', 1H, J = 8.6 Hz, H_{2s}), 3.36 ('t', 1H, J = 9.2 Hz, H_{4s}), 3.41-3.50 (m, 2H, H_{5s}, H_{3s}), 3.70 (dd, 1H, J₁ = 12.4 Hz, J₂ = 5.9 Hz, H_{6s}), 3.91 (dd, 1H, J₁ = 12.4 Hz, J₂ = 2.2 Hz, H_{6s}), 4.06-4.13 (m, 1H, H_β), 4.44 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H_{1s}).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 19.8, 20.3, 26.1 (NHCH₃), 26.3 ((CH₃)₃), 26.6, 28.0, 38.6 (C(CH₃)₃), 60.6 (C_{6s}), 61.5 (C_α), 69.7 (C_{4s}), 73.2 (C_{2s}), 75.6, 76.0 (C_{3s}, C_{5s}), 79.8 (C_β), 103.9 (C_{1s}), 174.9, 181.6 (COC(CH₃)₃, CONHCH₃).

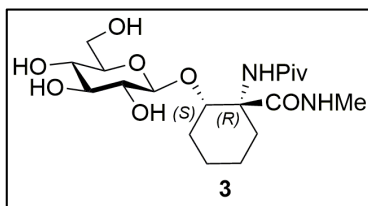
Synthesis of compound **2**

A solution of **21** (5 mg, 0.006 mmol) in MeOH (4 mL) was treated with MeONa/MeOH (0.5 M) to pH 9. The reaction mixture was then stirred for 3 h and neutralized with Dowex 50W-X8. The resin was filtered off and the aqueous solution washed with CH₂Cl₂ (2 x 3 mL) and Et₂O (2 x 3 mL). The H₂O was evaporated to give **2** as a colourless oil (2.0 mg, 80% yield); $[\alpha]_{D}^{25} = -10.7$ (c = 0.75, MeOH).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for C₁₉H₃₅N₂O₈⁺ [M+H]⁺ 419.2388, found 419.2388.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.19 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.38-1.53 (m, 2H), 1.60-1.83 (m, 5H), 2.28-2.40 (m, 1H), 2.73 (s, 3H, CH₃NH), 3.32 (‘t’, 1H, J = 8.6 Hz, H_{2s}), 3.38 (‘t’, 1H, J = 9.4 Hz, H_{4s}), 3.42-3.52 (m, 2H, H_{5s}, H_{3s}), 3.74 (dd, 1H, J₁ = 12.0 Hz, J₂ = 6.4 Hz, H_{6s}), 3.95 (d, 1H, J = 12.0 Hz, H_{6s}), 4.08-4.15 (m, 1H, H_β), 4.48 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H_{1s}).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 20.6, 20.9, 25.6 (NHCH₃), 26.0 ((CH₃)₃), 26.3, 28.4, 38.5 (C(CH₃)₃), 61.0 (C_{6s}), 61.5 (C_α), 69.8 (C_{4s}), 72.7 (C_{2s}), 75.6 (C_{3s}), 76.1 (C_{5s}), 76.7 (C_β), 99.6 (C_{1s}), 174.6, 181.6 (COC(CH₃)₃, CONHCH₃).

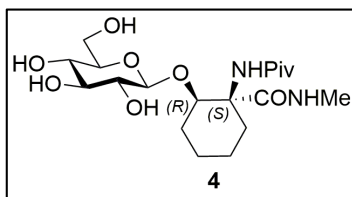
Synthesis of compound **3**

A solution of **22** (6 mg, 0.007 mmol) in MeOH (4 mL) was treated with MeONa/MeOH (0.5 M) to pH 9. The reaction mixture was then stirred for 3 h and neutralized with Dowex 50W-X8. The resin was filtered off and the aqueous solution washed with CH₂Cl₂ (2 x 3 mL) and Et₂O (2 x 3 mL). The H₂O was evaporated to give **3** as a colourless oil (2.4 mg, 80% yield); $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -26.1$ (c = 0.76, MeOH).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for C₁₉H₃₅N₂O₈⁺ [M+H]⁺ 419.2388, found 419.2378.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.00-1.23 (m, 1H), 1.26 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.31-1.43 (m, 1H), 1.48-1.58 (m, 1H), 1.63-1.83 (m, 3H), 2.08-2.17 (m, 1H), 2.46-2.55 (m, 1H), 2.74 (s, 3H, CH₃NH), 3.27 (‘t’, 1H, J = 9.2 Hz, H_{2s}), 3.34-3.41 (m, 1H, H_{4s}), 3.41-3.49 (m, 2H, H_{5s} + H_{3s}), 3.72 (dd, 1H, J₁ = 12.4 Hz, J₂ = 5.6 Hz, H_{6s}), 3.91 (dd, 1H, J₁ = 12.4 Hz, J₂ = 2.0 Hz, H_{6s}), 4.03 (dd, 1H, J₁ = 10.0 Hz, J₂ = 4.4 Hz, H_β), 4.42 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H_{1s}).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 19.7, 22.6, 26.3 (NHCH₃), 26.4 ((CH₃)₃), 28.7, 29.4, 39.2 (C(CH₃)₃), 60.5 (C_{6s}), 63.8 (C_α), 69.6 (C_{4s}), 73.2 (C_{2s}), 75.6, 75.9 (C_{3s} + C_{5s}), 81.1 (C_β), 103.3 (C_{1s}), 174.4, 182.1 (COC(CH₃)₃, CONHCH₃).

Synthesis of compound **4**

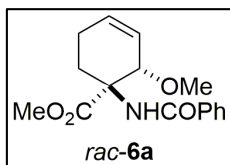
A solution of **23** (8 mg, 0.01 mmol) in MeOH (4 mL) was treated with MeONa/MeOH (0.5 M) to pH 9. The reaction mixture was then stirred for 3 h and neutralized with Dowex 50W-X8. The resin was filtered off and the aqueous solution washed with CH₂Cl₂ (2 x 3 mL) and Et₂O (2 x 3 mL). The H₂O was evaporated to give **4** as a colourless oil (3.3 mg, 82% yield); $[\alpha]_{D}^{25} = +5.4$ (c = 0.43, MeOH).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for C₁₉H₃₅N₂O₈⁺ [M+H]⁺ 419.2388, found 419.2388.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.24 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.24-1.31 (m, 1H), 1.31-1.44 (m, 1H), 1.53-1.80 (m, 3H), 1.85-1.97 (m, 2H), 2.30-2.41 (m, 1H), 2.73 (s, 3H, CH₃NH), 3.28 ('t', 1H, J = 8.6 Hz, H_{2s}), 3.34 ('t', 1H, J = 9.4 Hz, H_{4s}), 3.37-3.44 (m, 1H, H_{5s}), 3.48 ('t', 1H, J = 9.2 Hz, H_{3s}), 3.70 (dd, 1H, J₁ = 12.0 Hz, J₂ = 6.4 Hz, H_{6s}), 3.91 (dd, 1H, J₁ = 12.0 Hz, J₂ = 1.2 Hz, H_{6s}), 4.05 (dd, 1H, J₁ = 9.2 Hz, J₂ = 3.6 Hz, H_β), 4.49 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H_{1s}).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 20.0, 21.5, 26.2 (NHCH₃), 26.4 ((CH₃)₃), 28.1, 31.5, 39.1 (C(CH₃)₃), 61.2 (C_{6s}), 63.3 (C_α), 70.0 (C_{4s}), 72.9 (C_{2s}), 75.7 (C_{3s}), 75.9 (C_{5s}), 77.2 (C_β), 99.4 (C_{1s}), 174.5, 181.9 (COC(CH₃)₃, CONHCH₃).

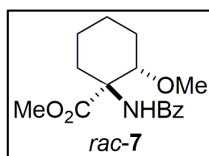
Synthesis of Methyl 1-benzamido-*c*-2-methoxy-3-cyclohexene-*r*-1-carboxylate (**6a**)



1-Methoxy-1,3-butadiene (4 g, 19.52 mmol) and hydroquinone (10 mg) were added to a solution of methyl 2-benzamidoacrylate **5** (4 g, 47.62 mmol)^[1] in toluene (40 mL) at 85 °C. After stirring for 6 d, the reaction was allowed to cool down to 25 °C. The formed precipitate was filtered and washed with cold diethyl ether (2 x 30 mL), to yield 3.22 g of compound **6a** as a white solid (57%). The filtrate was evaporated and the residue was chromatographed on silica gel eluting with hexane/ethyl acetate (6:4), to yield a further 870 mg of compound **6a** (15%, 72% overall).

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[2]

Synthesis of Methyl 1-benzamido-*c*-2-methoxycyclohexane-*r*-1-carboxylate (*rac*-**7**)

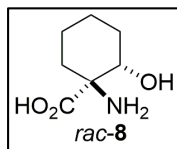


A solution of compound **6a** (1.0 g, 3.46 mmol) in MeOH (30 mL) was hydrogenated at atmospheric pressure, using palladium on carbon (10%) as a catalyst (100 mg), vigorously stirring at 25 °C for 6 h. The catalyst was filtered off through Celite and the solvent evaporated to yield 1 g of

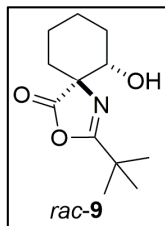
compound *rac-7* as a white solid (99%).

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[2]

Synthesis of 1-Amino-*c*-2-hydroxycyclohexane-*r*-1-carboxylic acid (*rac-8*)



Compound *rac-7* (2 g, 6.87 mmol) was suspended in a 12 N HCl solution (25 mL). After stirring under reflux for 7 d, the solvent was evaporated, the excess of HCl removed under vacuum and the residue was dissolved in distilled water (20 mL). The aqueous mixture was washed with diethyl ether (4 x 20 mL) and evaporated to yield 1.2 g of *rac-8*·HCl as a white solid (91%). The hydrochloride was dissolved in ethanol (30 mL) and propylene oxide (10 mL) was added. After stirring under reflux for 2 h, the precipitate was filtered off and washed with cold EtOH to yield 819 mg of *rac-8* as a white solid (75%). The filtrate was evaporated and the residue was dissolved in distilled water (5 mL) and eluted through a C18 reverse-phase Sep-pak cartridge which, after removal of water, gave another 105 mg (9%, 84% overall) of the amino acid. Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[2]

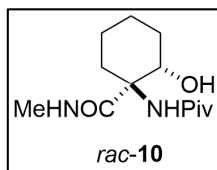
Synthesis of compound *rac-9*

DIEA (0.28 mL, 1.60 mmol) and PivCl (0.08 mL, 0.63 mmol) were added at 0 °C to a suspension of *rac-8* (100 mg, 0.51 mmol) in 10 mL of dry DCM. The resulting mixture was then stirred at 20 °C for 16 h and washed with H₂O (2 x 10 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to give a residue that was purified by silica gel column chromatography, eluting with ethyl acetate/hexane (1:1) to afford *rac-9* as a white solid (50 mg, 43% yield); mp 128-130 °C.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for C₁₂H₂₀NO₃⁺ [M+H]⁺ 226.1438, found 226.1431.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.23 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.26-1.39 (m, 1H), 1.49-1.59 (m, 1H), 1.64-1.73 (m, 2H), 1.75-2.02 (m, 4H), 3.74 (dd, 1H, J₁ = 10.8 Hz, J₂ = 4.5 Hz, H₂).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 19.6, 23.5, 26.8 ((CH₃)₃), 28.2, 32.2, 33.9 (C(CH₃)₃), 72.6 (C₁), 72.8 (C₂), 171.6 (C=N), 178.0 (CO).

Synthesis of compound *rac-10*

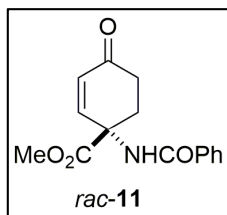
DIEA (0.12 mL, 0.73 mmol) and a solution of oxazolone *rac-9* (55 mg, 0.24 mmol) in 3 mL of dry CH₃CN were added at 0 °C and under an inert atmosphere to a suspension of methylamine hydrochloride (49 mg, 0.72 mmol) in 5 mL of dry CH₃CN. The resulting mixture was stirred at 70 °C for 24 h. Then, the solvent was concentrated under vacuum to give a residue that was purified by silica gel column chromatography, eluting with ethyl acetate/MeOH (9:1) to afford *rac-10* as a white solid (38 mg, 61% yield); mp 123-125 °C.

HRMS (ESI) (*m/z*) calcd. for C₁₃H₂₅N₂O₃⁺ [M+H]⁺ 257.1860, found 257.1851.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.20 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.22-1.42 (m, 3H), 1.48-1.61 (m, 1H), 1.71-1.82 (m, 1H), 1.85-1.99 (m, 2H), 2.79 (d, 3H, *J* = 4.8 Hz, CH₃NH), 2.82-2.93 (m, 1H), 3.56-3.67 (m, 1H, H₂), 5.16 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, OH), 6.44 (br s, 1H, NHCO(CH₃)₃), 7.84-7.99 (m, 1H, NHCH₃).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 21.9, 23.6, 25.9 (NHCH₃), 27.4 ((CH₃)₃), 31.1, 33.1, 39.4 (C(CH₃)₃), 62.8 (C₁), 75.3 (C₂), 173.5, 180.0 (COC(CH₃)₃, CONHCH₃).

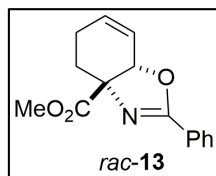
Synthesis of Methyl 1-benzamido-4-oxo-2-cyclohexene-1-carboxylate (*rac*-**11**)



Danishefsky's diene (6.5 mL, 33.4 mmol) was added to a solution of methyl 2-benzamidoacrylate **5** (1.7 g, 8.3 mmol)^[1] in dry toluene (80 mL) under an inert atmosphere. After stirring at reflux for 24 h, another 8.3 mmol of Danishefsky's diene were added. After stirring for another 2 d at the same temperature, the solvent was evaporated in vacuo and a 0.005 N HCl/THF (1:4) solution (40 mL) was added to the residue. The reaction mixture was stirred for 15 h at 20 °C, the solvent was evaporated and the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (75 mL) and DBU (2.7 mL, 18.2 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 24 h at 2 °C and the solution was washed with 0.5 N HCl (60 mL). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (5 x 30 mL) and the combined organic phases were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated. The residue was chromatographed on silica gel eluting with hexane/ethyl acetate (1:1), to yield 2.5 g of enone *rac*-**11** as a white solid (60%).

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[2]

Synthesis of Methyl *cis*-3-phenyl-2-oxa-4-azabicyclo[4.3.0]-nona-3,8-diene-5-carboxylate (*rac*-**13**)

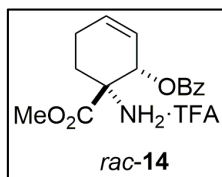


A 0.4 M solution of CeCl₃·7H₂O in MeOH (2.56 mL, 1.02 mmol) was added to a solution of enone *rac*-**11** (280 mg, 1.02 mmol) in MeOH (20 mL) at 25 °C. NaBH₄ (38.7 mg, 1.02 mmol) was then added to the mixture and after stirring for 10 min at the same temperature, the reaction was quenched by the dropwise addition of a 2 N HCl solution. The mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 25 mL) and the combined organic phases were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated. The residue was chromatographed on silica gel, eluting with hexane/ethyl acetate (3:7), to yield 234 mg of the mixture of alcohols **12a/12b** in an approximate ratio of 6:4 as a white solid (83%). This mixture of alcohols (300 mg, 1.10 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (25 mL) and then Et₃N (143 mg, 2.42 mmol) and MsCl (162 mg, 1.42 mmol) were added to this solution at 25 °C, under an inert atmosphere. After stirring for 14 h, the mixture was washed with a saturated NaHCO₃ solution (2 x 20 mL) and the organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated. The residue was chromatographed on silica gel, eluting with hexane/ethyl acetate (1:1), to yield 270 mg of compound *rac*-**13** as an oil (95%).

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[2]

Synthesis of Methyl 1-amino-*t*-2-benzoyloxy-3-cyclohexene-*r*-1-carboxylate

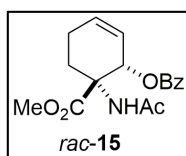
trifluoroacetate (*rac-14*)



Compound *rac-13* (385 mg, 1.50mmol) was dissolved in THF/H₂O (4:1) (30 mL) and trifluoroacetic acid (855 mg, 7.50 mmol) was then added. After stirring for 14 h at 50 °C, the water was removed by the addition of anhydrous Na₂SO₄. The remaining filtrate was then evaporated without warming. The oily residue was then dissolved in Et₂O and the solvent and the residual trifluoroacetic acid were distilled off in vacuo. This operation was repeated to ensure the complete removal of the trifluoroacetic acid, to give 550 mg of trifluoroacetate *rac-14* as a white solid (95%).

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[2]

Synthesis of Methyl 1-acetamido-*t*-2-benzoyloxy-3-cyclohexene-*r*-1-carboxylate (*rac-15*)

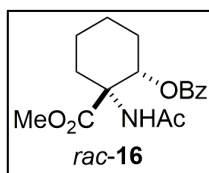


Trifluoroacetate *rac-14* (550 mg, 1.41 mmol), Et₃N (186 mg, 1.84 mmol) and acetyl chloride (144 mg, 1.84 mmol) were dissolved in dry CH₂Cl₂ (35 mL) at 25 °C, under an inert atmosphere. After stirring for 14 h, the reaction was washed with a saturated NaHCO₃ solution (2 x 25 mL) and the organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated. The residue was

chromatographed on silica gel eluting with hexane/ethyl acetate (8:2), to yield 358 mg of compound *rac-15* as a white solid (80%).

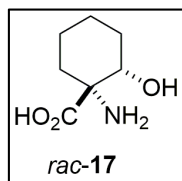
Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[2]

Synthesis of Methyl 1-acetamido-*t*-2-benzoyloxycyclohexane-*r*-1-carboxylate (*rac-16*)



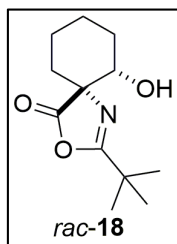
A solution of compound *rac-15* (350 mg, 1.10 mmol) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) was hydrogenated at atmospheric pressure, using platinum on carbon (10%) as a catalyst (50 mg), vigorously stirring at 35 °C for 14 h. The catalyst was filtered off through Celite and the solvent was evaporated. The residue was chromatographed on silica gel eluting with hexane/ethyl acetate (4:6), to yield 273 mg of compound *rac-16* as a white solid (78%).

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[2]

Synthesis of 1-Amino-*t*-2-hydroxycyclohexane-*r*-1-carboxylic acid (*rac*-**17**)

Compound *rac*-**16** (250 mg, 0.78 mmol) was suspended in a 6 M HCl solution (20 mL) and stirred under reflux for 24 h. The solvent was evaporated and the excess of HCl was removed in vacuo. The residue was dissolved in distilled water (15 mL) and washed with Et₂O (2 x 20 mL). The aqueous layer was evaporated to yield 125 mg of *rac*-**17**·HCl as a white solid (82%), which was dissolved in ethanol (6 mL) and propylene oxide (2 mL) was added. After stirring at reflux for 2 h, the amino acid precipitated partially. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in distilled water (2 mL) and eluted through a C18 reverse-phase Sep-pak cartridge to yield, after removal of water, 95 mg of the amino acid *rac*-**17** as a white solid (76%).

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[2]

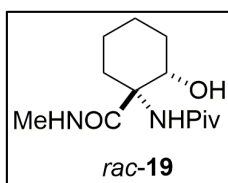
Synthesis of compound *rac-18*

DIEA (0.28 mL, 1.60 mmol) and PivCl (0.08 mL, 0.63 mmol) were added at 0 °C to a suspension of *rac-17* (100 mg, 0.51 mmol) in 10 mL of dry DCM. The resulting mixture was then stirred at 20 °C for 16 h and washed with H₂O (2 x 10 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to give a residue that was purified by a silica gel column chromatography, eluting with ethyl acetate/hexane (1:1) to afford *rac-18* as a white solid (53 mg, 46% yield); mp 69-71 °C.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for C₁₂H₂₀NO₃⁺ [M+H]⁺ 226.1438, found 226.1433.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.22 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.28-1.43 (m, 1H), 1.52-1.71 (m, 5H), 1.73-1.90 (m, 2H), 3.73 (dd, 1H, J₁ = 12.0 Hz, J₂ = 6.0 Hz, H₂).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 20.4, 24.0, 26.9 ((CH₃)₃), 30.7, 33.1, 34.2 (C(CH₃)₃), 72.4 (C₂), 73.5 (C₁), 171.1 (CN), 180.9 (CO).

Synthesis of compound *rac-19*

DIEA (0.13 mL, 0.77 mmol) and a solution of oxazolone *rac-18* (58 mg, 0.26 mmol) in 3 mL of dry CH₃CN were added at 0 °C and under an inert

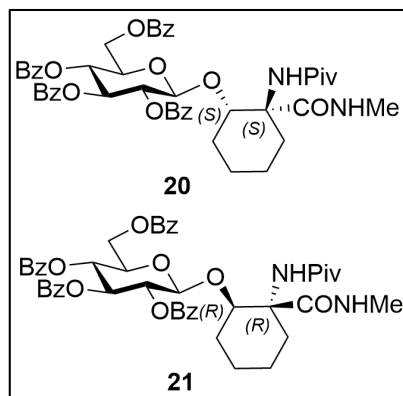
atmosphere to a suspension of methylamine hydrochloride (52 mg, 0.77 mmol) in 5 mL of dry CH₃CN. The resulting mixture was stirred at 70 °C for 24 h. Then, the solvent was concentrated under vacuum to give a residue that was purified by silica gel column chromatography, eluting with ethyl acetate/MeOH (9:1) to afford *rac*-**19** as a white solid (39 mg, 59% yield); mp 86-88 °C.

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for C₁₃H₂₅N₂O₃⁺ [M+H]⁺ 257.1860, found 257.1852.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 0.98-1.16 (m, 1H), 1.18 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.20-1.40 (m, 3H), 1.43-1.52 (m, 1H), 1.62-1.72 (m, 1H), 1.81-1.92 (m, 1H), 2.72 (d, 3H, *J* = 4.8 Hz, CH₃NH), 2.93-3.03 (m, 1H), 3.89 (s, 1H, OH), 4.06-4.18 (m, 1H, H₂), 6.34 (brs, 1H, NHCOC(CH₃)₃), 7.73-7.88 (m, 1H, NHCH₃).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 20.4, 23.6, 26.0 (NHCH₃), 27.5 ((CH₃)₃), 28.3, 29.5, 39.7 (C(CH₃)₃), 63.3 (C₁), 71.8 (C₂), 175.4, 180.4 (COC(CH₃)₃, CONHCH₃).

Synthesis of compounds **20** and **21**



A solution of 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl-β-D-glucopyranosyl bromide (131 mg, 0.20 mmol) in 4 mL of dry CH₂Cl₂ was added at -30 °C and under an inert atmosphere to a suspension of *rac*-**10**^[6] (37 mg, 0.14 mmol), silver triflate

(56 mg, 0.22 mmol) and molecular sieves (4 Å, 15 mg) in 5 mL of dry CH₂Cl₂. The resulting mixture was stirred at -30 °C for 1 h and was then left to reach 20 °C. The reaction mixture was stirred at this temperature for 14 h and filtered through a pad of Celite to get rid of the silver bromide formed. The filter cake was rinsed with CH₂Cl₂ (80 mL). Then, the CH₂Cl₂ was evaporated to give a crude that was purified by a silica gel column chromatography, eluting with ethyl acetate/hexane (8:2) to afford **20** (11 mg, 9% yield) and **21** (12 mg, 10% yield) both as a white solids.

Compound 20: mp 207-209 °C; [α]²⁵_D = + 16.4 (c = 0.78, CHCl₃).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for C₄₇H₅₀N₂NaO₁₂⁺ [M+Na]⁺ 857.3256, found 857.3228.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 0.99 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.31-1.49 (m, 3H), 1.54-1.67 (m, 1H), 1.70-1.88 (m, 2H), 1.97-2.10 (m, 2H), 2.56 (d, 3H, J = 3.6 Hz, CH₃NH), 4.08-4.19 (m, 1H, H_{5s}), 4.51 (dd, 1H, J₁ = 12.0 Hz, J₂ = 5.5 Hz, H_{6s}), 4.62 (dd, 1H, J₁ = 12.0 Hz, J₂ = 3.0 Hz, H_{6s}), 4.81-4.90 (m, 1H, H _{β}), 4.95 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H_{1s}), 5.42 (br s, 1H, NHCO(CH₃)₃), 5.49 ('t', 1H, J = 7.8 Hz, H_{2s}), 5.67 ('t', 1H, J = 9.7 Hz, H_{4s}), 5.92 ('t', 1H, J = 9.6 Hz, H_{3s}), 6.86-6.99 (m 1H, NHCH₃), 7.22-7.59 (m, 12H, arom), 7.76-7.86 (m, 2H, arom), 7.87-7.96 (m, 4H, arom), 8.01-8.10 (m, 2H, arom).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 21.7, 26.1, 27.2 (NHCH₃), 29.2 ((CH₃)₃), 29.6, 30.1, 39.1 (C(CH₃)₃), 62.8 (C_{6s}), 63.3 (C _{α}), 69.5 (C_{4s}), 72.0 (C_{5s}), 72.3 (C_{2s}), 72.5 (C_{3s}), 78.0 (C _{β}), 101.4 (C_{1s}), 128.3, 128.4, 128.4, 128.6, 128.6, 129.1, 129.5, 129.6, 129.7, 129.8, 133.1, 133.3, 133.4, 133.5 (arom), 165.2, 165.6, 165.7, 166.0 (4 C_{OPh}), 171.5, 178.9 (COC(CH₃)₃, CONHCH₃).

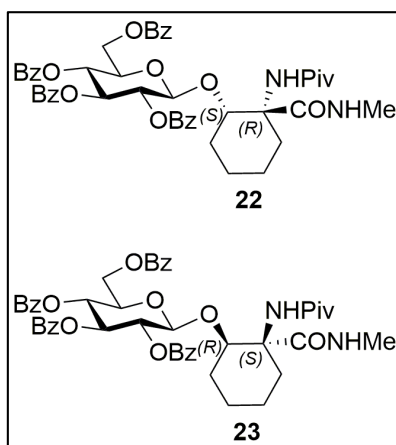
Compound 21: mp 110-112 °C; [α]²⁵_D = -1.0 (c = 0.80, CHCl₃).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for C₄₇H₅₁N₂O₁₂⁺ [M+H]⁺ 835.3437, found 835.3417.

$^1\text{H NMR (D}_2\text{O) } \delta$ (ppm): 1.13 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.23-1.56 (m, 4H), 1.58-1.86 (m, 4H), 2.72 (d, 3H, $J = 4.8$ Hz, CH_3NH), 4.12-4.22 (m, 1H, H_{5s}), 4.23-4.35 (m, 1H, H_β), 4.49 (dd, 1H, $J_1 = 12.3$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, H_{6s}), 4.66 (dd, 1H, $J_1 = 12.3$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, H_{6s}), 4.92 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_{1s}), 5.59 ('t', 1H, $J = 8.1$ Hz, H_{2s}), 5.74 ('t', 1H, $J = 9.7$ Hz, H_{4s}), 5.97 ('t', 1H, $J = 9.8$ Hz, H_{3s}), 6.16 (br s, 1H, $\text{NHCO}(\text{CH}_3)_3$), 6.71-6.83 (m 1H, NHCH_3), 7.24-7.57 (m, 12H, arom), 7.78-7.88 (m, 2H, arom), 7.89-7.99 (m, 4H, arom), 8.02-8.12 (m, 2H, arom).

$^{13}\text{C NMR (D}_2\text{O) } \delta$ (ppm): 20.8, 21.4, 26.3 (NHCH_3), 27.4 ($(\text{CH}_3)_3$), 27.5, 32.1, 38.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 61.2 (C_α), 62.8 (C_{6s}), 69.3 (C_{4s}), 71.5 (C_{2s}), 72.3 (C_{3s}), 72.6 (C_{5s}), 77.2 (C_β), 98.8 (C_{1s}), 128.4, 128.5, 128.5, 128.5, 128.7, 129.3, 129.6, 129.7, 129.8, 133.4, 133.6, 133.6 (arom), 165.1, 165.3, 165.7, 166.0 (4 COPh), 171.0, 178.2 ($\text{COC}(\text{CH}_3)_3$, CONHCH_3).

Synthesis of compounds **22** and **23**



A solution of 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranosyl bromide (136 mg, 0.21 mmol) in 4 mL of dry CH_2Cl_2 was added at -30 °C and under an inert atmosphere to a suspension of *rac*-**19**^[6] (39 mg, 0.15 mmol), silver triflate (59

mg, 0.23 mmol) and molecular sieves (4 Å, 17 mg) in 5 mL of dry CH₂Cl₂. The resulting mixture was stirred at -30 °C for 1 h and was then left to reach 20 °C. The reaction mixture was stirred at this temperature for 16 h and filtered through a pad of Celite to get rid of the silver bromide formed. The filter cake was rinsed with CH₂Cl₂ (80 mL). Afterwards, the organic solvent was evaporated to give a crude that was purified by a silica gel column chromatography, eluting with ethyl acetate/hexane (1:1) to afford **22** (22 mg, 17% yield) and **23** (24 mg, 19% yield) both as a white solids.

Compound 22: mp 71-73 °C; [α]²⁵_D = +34.6 (c = 0.76, CHCl₃).

HRMS (ESI) (m/z) calcd. for C₄₇H₅₁N₂O₁₂⁺ [M+H]⁺ 835.3437, found 835.3428.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 0.75-1.17 (m, 2H), 1.19 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.20-1.68 (m, 4H), 2.01-2.15 (m, 4H, CH₃NH + 1H), 2.93-3.03 (m, 1H), 4.09-4.21 (m, 1H, H_{5s}), 4.38 (dd, 1H, J₁ = 11.8 Hz, J₂ = 4.9 Hz, H _{β}), 4.53-4.64 (m, 2H, 2H_{6s}), 5.23 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H_{1s}), 5.44 ('t', 1H, J = 8.1 Hz, H_{2s}), 5.61 ('t', 1H, J = 9.8 Hz, H_{4s}), 5.95 ('t', 1H, J = 9.8 Hz, H_{3s}), 6.18 (br s, 1H, NHCOC(CH₃)₃), 6.89-6.99 (m, 1H, NHCH₃), 7.19-7.58 (m, 12H, arom), 7.73-7.84 (m, 2H, arom), 7.85-7.96 (m, 4H, arom), 7.99-8.08 (m, 2H, arom).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 20.2, 23.8, 25.7 (NHCH₃), 27.4 ((CH₃)₃), 29.8, 30.0, 39.8 (C(CH₃)₃), 63.0 (C_{6s}), 65.4 (C _{α}), 69.9 (C_{4s}), 71.9 (C_{5s}), 72.1 (C_{2s}), 72.4 (C_{3s}), 79.8 (C _{β}), 102.0 (C_{1s}), 128.2, 128.3, 128.4, 128.4, 128.7, 128.8, 129.1, 129.7, 129.7, 129.8, 129.8, 133.1, 133.2, 133.2, 133.5 (arom), 165.1, 165.3, 165.5, 166.0 (4 C_{OPh}), 174.3, 180.6 (COC(CH₃)₃, CONHCH₃).

Compound 23: mp 93-95 °C; [α]²⁵_D = -13.2 (c = 0.77, CHCl₃).

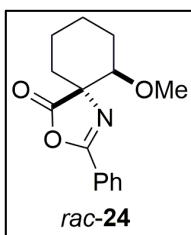
HRMS (ESI) (m/z) calcd. for C₄₇H₅₁N₂O₁₂⁺ [M+H]⁺ 835.3437, found 835.3454.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.03 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.12-1.39 (m, 3H), 1.52-1.78 (m, 4H), 2.56-2.66 (m, 1H), 2.72 (d, 3H, J = 4.8 Hz, CH₃NH), 3.96-4.05 (m, 1H, H_{5s}),

4.29 (dd, 1H, $J_1 = 12.0$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz, H_{6s}), 4.38 (dd, 1H, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, H_β), 4.49 (dd, 1H, $J_1 = 12.0$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, H_{6s}), 5.04 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_{1s}), 5.42 ('t', 1H, $J = 8.1$ Hz, H_{2s}), 5.69 ('t', 1H, $J = 9.6$ Hz, H_{4s}), 5.82 ('t', 1H, $J = 9.8$ Hz, H_{3s}), 6.33 (br s, 1H, NHCO(CH₃)₃), 7.18-7.51 (m, 13H, arom + NHCH₃), 7.71-7.82 (m, 4H, arom), 7.83-8.02 (m, 4H, arom).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 20.6, 22.3, 26.5 (NHCH₃), 27.4 ((CH₃)₃), 28.0, 29.6, 39.6 (C(CH₃)₃), 62.4 (C_{6s}), 63.6 (C_α), 69.2 (C_{4s}), 71.8 (C_{5s}), 72.0 (C_{2s}), 72.8 (C_{3s}), 78.9 (C_β), 100.2 (C_{1s}), 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 128.8, 129.1, 129.4, 129.7, 129.7, 129.8, 133.2, 133.2, 133.4 (arom), 165.0, 165.2, 165.7, 166.0 (4 C_{OPh}), 174.0, 179.9 (COC(CH₃)₃, CONHCH₃).

Synthesis of *trans*-2-Methoxycyclohexane-1-spiro-{4'[2'-phenyl-5'(4'H)oxazolone]} (*rac*-**24**)

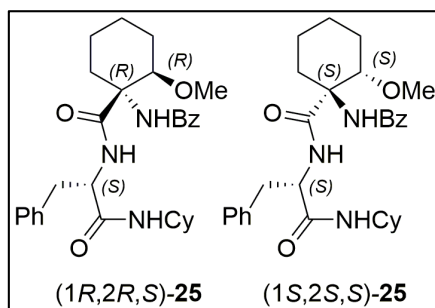


A suspension of compound *rac*-**7** (500 mg, 1.72 mmol) and LiOH·H₂O (722 mg, 17.2 mmol) in methanol/water (3:2) (25 mL) was stirred under reflux for 7 h. The solvent was removed, the residue was then dissolved in water and washed with CH₂Cl₂ (2 x 20 mL). The aqueous phase was acidified with 2 N HCl and then extracted with CH₂Cl₂ (4 x 25 mL). The combined last organic phases were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated, to yield 444 mg of the 1-benzamido-*c*-2-methoxycyclohexane-*r*-1-carboxylic acid as a white solid (93%). This carboxylic acid (444 mg, 1.6 mmol) and

dimethylaminopyridine (192 mg, 1.6 mmol) were dissolved in CH_2Cl_2 (13 mL) at 0 °C. Dicyclohexylcarbodiimide (335 mg, 1.6 mmol) was then added and the mixture was allowed to warm up to 25 °C. After stirring for 3 h, the solvent was evaporated and the residue was chromatographed on silica gel eluting with hexane/ethyl acetate (1:1), to yield 337 mg of the oxazolone *rac*-**24** as a white solid (91%).

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[2]

Synthesis of (1*S*,2*S*)-[1-Benzamido-2-methoxycyclohexane-1-carboxamido]-(*S*)-phenylalanine cyclohexylamide ((1*S*,2*S*,*S*)-**25**) and (1*R*,2*R*)-[1-benzamido-2-methoxycyclohexane-1-carboxamido]-(*S*)-phenylalanine cyclohexylamide ((1*R*,2*R*,*S*)-**25**)

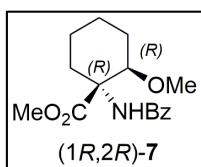


A solution of (*S*)-phenylalanine cyclohexylamide (1.6 g, 6.66 mmol) in *N*-methylpyrrolidin-2-one (NMP) (3 mL) was added to a solution of compound *rac*-**24** (750 mg, 2.9 mmol) in NMP (3 mL) under an inert atmosphere. After stirring for 48 h at 90 °C, the reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and was then poured onto a mixture of ice (12 g), 1 N HCl (12 mL) and ethyl acetate (15 mL). After stirring for 30 min, the organic phase was washed with water (2 x 15 mL) and the combined aqueous phases were

extracted with ethyl acetate (2 x 15 mL). The combined organic phases were washed with brine (2 x 15 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and the solvent was evaporated. The mixture of diastereoisomeric peptides was chromatographed on silica gel eluting with toluene/ethyl acetate (1:1), to yield 525 mg of the peptide (1*S*,2*S*,*S*)-**25** as a white solid (36%) and 514 mg of the peptide (1*R*,2*R*,*S*)-**25** as a white solid (35%).

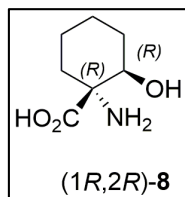
Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[2]

Synthesis of Methyl (1*R*,2*R*)-1-benzamido-2-methoxycyclohexane-1-carboxylate ((1*R*,2*R*)-**7**)

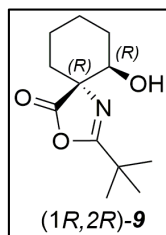


Triflic acid (0.11 mL, 2.37 mmol) was added to a solution of (1*R*,2*R*,*S*)-**25** (400 mg, 0.79 mmol) in dry methanol (12 mL) at 0 °C, under an inert atmosphere. The reaction mixture was warmed up to 80 °C and after stirring for 48 h, the solvent was evaporated. The residue was chromatographed on silica gel eluting with hexane/ethyl acetate (1:1), to yield 196 mg of the compound (1*R*,2*R*)-**7** as a white solid (81%). Spectral data for the compound (1*R*,2*R*)-**7** were identical to those described for *rac*-**7**.

Synthesis of (1*S*,2*S*)-1-Amino-2-hydroxycyclohexane-1-carboxylic acid ((1*R*,2*R*)-**8**)



Compound (1*R*,2*R*)-**7** (170 mg, 0.58 mmol) was suspended in a 12 N HCl solution (5 mL) and stirred under reflux for 7 d. The solvent was evaporated and the excess of HCl removed in vacuo. The residue was dissolved in distilled water (8 mL) and washed with Et₂O (4 x 10 mL). The aqueous layer was evaporated to yield 103 mg (90%) of (1*R*,2*R*)-**8**·HCl as a white solid, which was dissolved in ethanol (3 mL) and propylene oxide (1 mL) was added. After stirring under reflux for 2 h, the amino acid precipitated partially. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in distilled water (2 mL) and eluted through a C18 reverse-phase Sep-pak cartridge to yield, after removal of water, 75 mg of the amino acid (1*R*,2*R*)-**8** as a white solid (82%). Analytical and spectral data for the amino acid and its hydrochloride were identical to those described for rac-**8**.

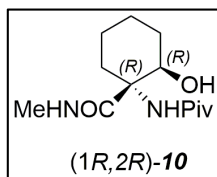
Synthesis of compound (1*R*,2*R*)-9

DIEA (0.21 mL, 1.20 mmol) and PivCl (0.06 mL, 0.48 mmol) were added at 0 °C to a suspension of (1*R*,2*R*)-8 (75 mg, 0.38 mmol) in 10 mL of dry DCM. The resulting mixture was then stirred at 20 °C for 16 h and washed with H₂O (2 x 10 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to give a residue that was purified by silica gel column chromatography, eluting with ethyl acetate/hexane (1:1) to afford (1*R*,2*R*)-9 as a white solid (36 mg, 42% yield); mp 128-130 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +16.3$ ($c = 0.82$, CHCl₃).

HRMS (ESI⁺) (m/z) calcd. for C₁₂H₂₀NO₃⁺ [M+H]⁺ 226.1438, found 226.1445.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.23 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.26-1.39 (m, 1H), 1.49-1.59 (m, 1H), 1.64-1.73 (m, 2H), 1.75-2.02 (m, 4H), 3.74 (dd, 1H, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, H₂).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 19.5, 23.4, 26.7 ((CH₃)₃), 28.2, 32.2, 33.9 (C(CH₃)₃), 72.6 (C₁), 72.8 (C₂), 171.6 (C=N), 178.3 (CO).

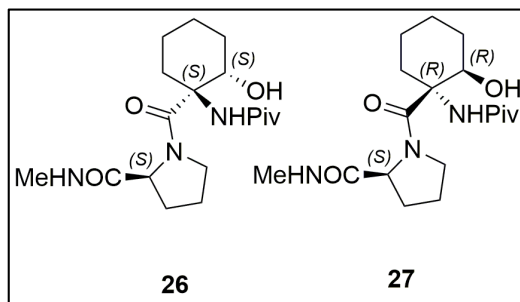
Synthesis of compound (1*R*,2*R*)-**10**

DIEA (0.06 mL, 0.37 mmol) and a solution of the oxazolone (1*R*,2*R*)-**9** (28 mg, 0.12 mmol) in 3 mL of dry CH₃CN were added at 0 °C and under an inert atmosphere to a suspension of methylamine hydrochloride (25 mg, 0.37 mmol) in 5 mL of dry CH₃CN. The resulting mixture was stirred at 70 °C for 24 h. Then, the solvent was concentrated under vacuum to give a residue that was purified by silica gel column chromatography, eluting with ethyl acetate/MeOH (9:1) to afford (1*R*,2*R*)-**10** as a white solid (18 mg, 57% yield); mp 123-125 °C.

HRMS (ESI⁺) (*m/z*) calcd. for C₁₃H₂₅NO₃⁺ [M+H]⁺ 257.1860, found 257.1849.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.20 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.22-1.42 (m, 3H), 1.48-1.61 (m, 1H), 1.71-1.82 (m, 1H), 1.85-1.99 (m, 2H), 2.79 (d, 3H, *J* = 4.8 Hz, CH₃NH), 2.82-2.93 (m, 1H), 3.56-3.67 (m, 1H, H₂), 5.16 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, OH), 6.44 (br s, 1H, NHCO(CH₃)₃), 7.84-7.99 (m, 1H, NHCH₃).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 21.9, 23.6, 25.9 (NHCH₃), 27.4 ((CH₃)₃), 31.1, 33.1, 39.4 (C(CH₃)₃), 62.8 (C₁), 75.3 (C₂), 173.5, 180.0 (COC(CH₃)₃, CONHCH₃).

Synthesis of compound **26** and **27**

DIEA (0.11 mL, 0.67 mmol) and a solution of the oxazolone *rac*-**9** (120 mg, 0.53 mmol) in 6 mL of dry CH₃CN were added at 0 °C and under an inert atmosphere to a suspension of L-Pro-NHMe hydrochloride (105 mg, 0.64 mmol) in 8 mL of dry CH₃CN. The resulting mixture was stirred at 70 °C for 24 h. The solvent was concentrated then under vacuum to give a residue that was purified by a silica gel column chromatography, eluting with ethyl acetate/MeOH (85:15) to afford **26** (66 mg, 35% yield) and **27** (68 mg, 36% yield) both as white solids.

Compound 26: mp > 200 °C; $[\alpha]_D^{25} = -35.7$ ($c = 0.63$, CHCl₃).

HRMS (ESI⁺) (m/z) calcd. for C₁₈H₃₂N₃O₄⁺ [M+H]⁺ 354.2387, found 354.2383.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.17 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.20-1.39 (m, 2H), 1.41-1.53 (m, 1H), 1.61-1.82 (m, 5H), 1.83-2.04 (m, 3H), 2.24-2.36 (m, 1H), 2.70 (d, 3H, $J = 4.5$ Hz, CH₃NH), 3.30-3.42 (m, 1H, H_{5 Pro}), 3.72 ('dt', 1H, $J_1 = 10.2$ Hz, $J_2 = 6.6$ Hz, H_{5 Pro}), 4.04-4.11 (m, 1H, H_{β c6Ser}), 4.56 (dd, 1H, $J_1 = 8.1$ Hz, $J_2 = 5.1$ Hz, H_{α Pro}), 4.74-4.92 (m, 1H, OH), 6.04 (br s, 1H, NHCO(CH₃)₃), 7.03-7.14 (m, 1H, NHCH₃).

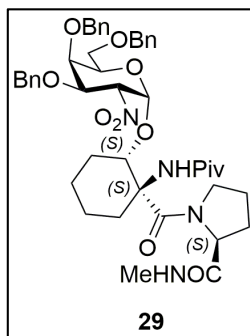
¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 19.3, 21.2, 25.7, 26.2 (CH₃NH), 27.5, 27.5 ((CH₃)₃), 27.8, 28.8, 38.9 (C(CH₃)₃), 47.8 (C_{5 Pro}), 61.1 (C_{α c6Ser}), 61.8 (C_{α Pro}), 68.8 (C_{β c6Ser}), 172.3, 172.7 (CONHCH₃, CO_{c6Ser}), 177.5 (COC(CH₃)₃).

of Celite and the solvent was removed by evaporation to give a residue that was purified by a silica gel column chromatography, eluting with ethyl acetate to afford **26** (10 mg, 12% yield) as a white solid; mp 73 - 75 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +15.4$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

HRMS (ESI⁺) (m/z) calcd. for $\text{C}_{45}\text{H}_{59}\text{N}_4\text{O}_{10}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 815.4226, found 815.4225.

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.11 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.17-1.26 (m, 1H), 1.38-1.48 (m, 2H), 1.56-1.75 (m, 3H), 1.79-2.09 (m, 4H), 2.18-2.31 (m, 1H), 2.49-2.59 (m, 1H), 2.60 (d, 3H, $J = 4.5$ Hz, CH₃NH), 3.40-3.48 (m, 2H, CH₂OBn), 3.49-3.60 (m, 1H, H_{5 Pro}), 3.81-3.91 (m, 1H, H_{5s}), 3.92-3.97 (m, 1H, H_{4s}), 3.99-4.09 (m, 1H, H_{5 Pro}), 4.20-4.28 (m, 1H, H _{β c6Ser}), 4.29-4.46 (m, 4H, HCHPh + CH₂Ph + H_{3s}), 4.62 (m, 3H, H _{α Pro} + CH₂Ph), 4.75 (d, 1H, $J = 11.1$ Hz, HCHPh), 4.89 (dd, 1H, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.2$ Hz, H_{2s}), 5.30 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz, H_{1s}), 5.67 (br s, 1H, NHCO(CH₃)₃), 6.74-6.85 (m, 1H, NHCH₃), 7.10-7.31 (m, 15H, arom).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 19.2, 21.1, 25.1 (CH₃NH), 26.3, 27.0, 27.3 ((CH₃)₃), 27.6, 29.7, 38.9 (C(CH₃)₃), 47.8 (C_{5 Pro}), 62.8 (C _{α c6Ser}), 64.6 (C _{α Pro}), 68.5 (CH_{2 OBn}), 70.5 (C_{5s}), 72.7 (C_{4s}), 72.9 (CH₂Ph), 73.5 (CH₂Ph), 74.9 (CH₂Ph), 75.3 (C_{3s}), 77.9 (C _{β c6Ser}), 84.2 (C_{2s}), 97.6 (C_{1s}), 127.6, 127.8, 127.9, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 137.1, 137.7, 137.7 (arom), 170.3, 172.8 (CONHCH₃, CO_{c6Ser}), 179.1 (COC(CH₃)₃).

Synthesis of compound **29**

Starting from compound **27** (36 mg, 0.10 mmol) and following the same procedure described for dipeptide **26**, compound **29** (12 mg, 14% yield) was obtained as a white solid after purification by a silica gel column chromatography eluting with ethyl acetate; mp 101-103 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +71.1$ ($c = 0.98$, CHCl_3).

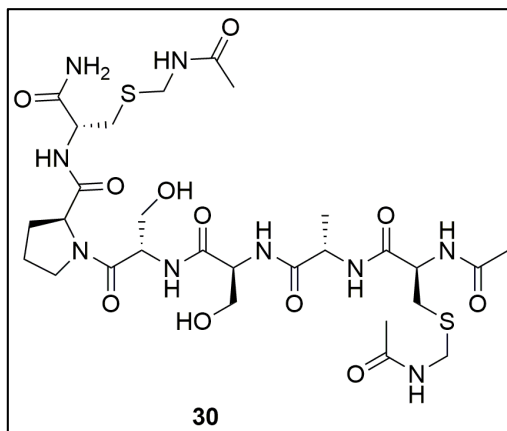
HRMS (ESI⁺) (m/z) calcd. for $\text{C}_{45}\text{H}_{59}\text{N}_4\text{O}_{10}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 815.4226, found 815.4222.

¹H NMR (D_2O) δ (ppm): 1.24 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.25-1.48 (m, 3H), 1.52-1.78 (m, 3H), 1.83-2.09 (m, 4H), 2.09-2.19 (m, 1H), 2.19-2.22 (m, 1H), 2.77 (d, 3H, $J = 4.5$ Hz, CH_3NH), 3.30-3.42 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{OBn} + \text{H}_5\text{Pro}$), 3.43-3.56 (m, 1H, H_5Pro), 3.57-3.66 (m, 1H, H_{5s}), 3.69-3.75 (m, 1H, H_{4s}), 3.98-4.09 (m, 1H, $\text{H}_{\beta\text{c6Ser}}$), 4.29-4.42 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{Ph} + \text{CH}_2\text{Ph}$), 4.49-4.63 (m, 2H, $\text{H}_{3s} + \text{H}_{\alpha\text{Pro}}$), 4.73-4.86 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{Ph} + \text{CH}_2\text{Ph}$), 4.98 (dd, 1H, $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, H_{2s}), 5.46 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz, H_{1s}), 5.79 (br s, 1H, $\text{NHCO}(\text{CH}_3)_3$), 7.09-7.51 (m, 16H, arom + NHCH_3).

¹³C NMR (D_2O) δ (ppm): 17.9, 20.2, 23.2, 25.2, 25.6, 26.1 (CH_3NH), 27.5 ($(\text{CH}_3)_3$), 28.2, 39.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.4 (C_5Pro), 61.5 ($\text{C}_{\alpha\text{c6Ser}}$), 62.9 ($\text{C}_{\alpha\text{Pro}}$), 68.6 ($\text{C}_{\beta\text{c6Ser}}$), 69.1 (CH_2OBn), 70.8 (C_{5s}), 73.6 (C_{4s}), 73.6 (CH_2Ph), 73.8 (CH_2Ph), 74.4 (C_{3s}), 75.2 (CH_2Ph), 83.8 (C_{2s}), 92.1 (C_{1s}), 127.8, 127.9, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4,

128.5, 128.6, 137.2, 137.3, 137.7 (arom), 168.6, 172.1 (CONHCH₃, CO _{c6Ser}),
177.7 (COC(CH₃)₃).

8.4. Experimental section of chapter 5

Synthesis of Ac-Cys(Acm)-Ala-Ser-Ser-Pro-Cys(Acm)-CONH₂ (**30**)

The synthesis was carried out following the above mentioned *general procedure* for preparing peptides by SPPS.

In this case the thiol group of the Cys amino acids, it was protected with acetamidomethyl (Acm). The peptide sequence was obtained using the synthesizer. The peptide acetylation, cleavage and purification was carried out using the general procedure for peptides which incorporates Cys residues to obtain compound **30**.

HRMS (ESI+) (*m/z*): calcd. for C₂₈H₄₈N₉O₁₁S₂⁺ [M+H]⁺: 750.2909, found: 750.2925, calcd. for C₂₈H₄₇N₉ Na O₁₁S₂⁺ [M+Na]⁺: 772.2729, found: 772.2751

Semi-preparative HPLC: T_r = 34.55 min. Isocratic method.

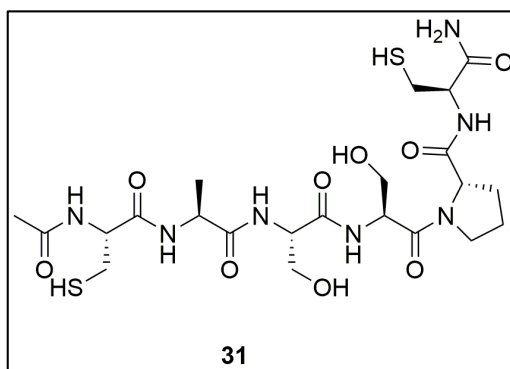
Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1 % TFA (%)
Isoc 40	10	7	93

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.21 (d, *J*=4.4 Hz, 3H, CH₃ Ala), 1.77-1.89 (m, 12H, H_β Pro, 2H_γ Pro, 2SCH₂NHCOCH₃, NHCOCH₃), 2.03-2.15 (m, 1H, H_β Pro), 2.65-2.74 (m,

2H, 2H_{β Cys2}), 2.81-2.88 (m, 1H H_{β Cys1}), 2.88-2.97 (m, 1H H_{β Cys1}), 3.53-3.61 (m, 2H, 2H_{δ Pro}), 3.61-3.74 (m, 4H, 4H_{β 2Ser}), 4.04-4.21 (m, 5H, H_{α Ala}, 2SCH₂), 4.23-4.31 (m, 2H, H_{α Ser}, H_{α Pro}), 4.32-4.41 (m, 2H, 2H_{α 2Cys}), 4.55-4.66 (m, 1H, H_{α Ser}).
¹H NMR (H₂O/D₂O) (9:1) δ (ppm): 7.08 (s, 1H, NH₂), 7.35 (s, 1H, NH₂), 8.11 (d, *J*=7.0 Hz, 1H, NH_{Ser1}), 8.15 (d, *J*=6.7 Hz, 1H, NH_{Ser2}), 8.24 (d, *J*=7.4 Hz, 1H, NH_{Cys2}), 8.28 (d, *J*=7.0 Hz, 1H, NH_{Cys1}), 8.39 (d, *J*=5.9 Hz, 1H, NH_{Ala}), 8.42-8.47 (m, 2H, 2SCH₂NHCOCH₃).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 16.4 (CH_{3 Ala}), 21.6, 21.9, 21.9 (NHCOCH₃, 2SCH₂NHCOCH₃), 24.4 (C_{γ Pro}), 29.2 (C_{β Pro}), 31.7, 31.8 (2C_{β 2Cys}), 40.8, 40.9 (2SCH₂NHCOCH₃), 48.0 (C_{δ Pro}), 49.8 (C_{α Ala}), 52.8, 53.1, 53.4 (C_{α Ser2}, 2C_{α 2Cys}), 55.2 (C_{α Ser1}), 60.7, 60.9, 61.0 (2C_{β 2Ser}, C_{α Pro}), 170.3, 171.2, 172.1, 174.0, 174.1, 174.1, 174.3, 174.4, 174.6 (CO).

Synthesis of Ac-Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-Cys-CONH₂ (**31**)



The synthesis was carried out following the above mentioned *general procedure* for preparing peptides by SPPS.

The peptide sequence was obtained using the synthesizer. The peptide acetylation, cleavage and purification was carried out using the general

procedure for peptides which incorporates Cys residues to obtain compound

31.

HRMS (ESI+) (*m/z*): calcd. for $C_{22}H_{38}N_7O_9S_2^+$ [M+H]⁺: 608.2167, found: 608.2177, calcd. for $C_{22}H_{37}N_7NaO_9S_2^+$ [M+Na]⁺: 630.1986, found: 630.2002.

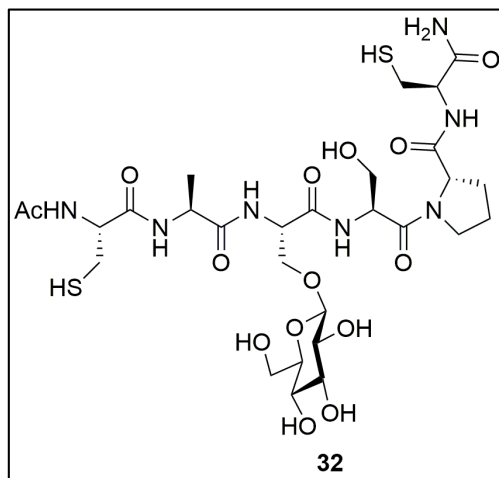
Semi-preparative HPLC: $T_r = 19.42$ min. Isocratic method.

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1 % TFA (%)
30	10	10	90

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.44 (d, *J*=7.5 Hz, 3H, CH₃ Ala), 1.92-2.15 (m, 6H, H_β Pro, 2H_γ Pro, NHCOCH₃), 2.25-2.45 (m, 1H, H_β Pro), 2.80-3.16 (m, 4H, 4H_β 2Cys), 3.71-3.83 (m, 1H, H_δ Pro), 3.82-3.98 (m, 5H, H_δ Pro, 4H_β 2Ser), 4.34-4.45 (m, 1H, H_α Ala), 4.44-4.58 (m, 4H, H_α Pro, 2H_α 2Cys, H_α Ser1), 4.82 (t, *J*=6.2 Hz, 1H, H_α Ser2).

¹H NMR (H₂O/ D₂O) δ (ppm): 7.12 (s, 1H, NH₂), 7.47 (s, 1H, NH₂), 8.12-8.22 (m, 2H, NH Ser1, NH Ser2), 8.23-8.33 (m, 2H, NH Cys1, NH Cys2), 8.46 (d, *J*=5.9 Hz, 1H, NH Ala).

¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 16.4 (CH₃ Ala), 21.7 (NHCOCH₃), 24.6 (C_γ Pro), 25.2, 25.3 (2C_β 2Cys), 29.3 (C_β Pro), 48.1 (C_δ Pro), 49.9 (C_α Ala), 53.6 (C_α Ser2), 55.3, 55.3, 55.5 (C_α Ser, 2C_α 2Cys), 60.6, 60.9, 61.0 (C_α Pro, 2C_β 2Ser), 170.2, 171.4, 172.2, 174.2, 174.2, 174.3, 174.9 (CO).

Synthesis of Ac-Cys-Ala-Ser(β -O-D-Glc)-Ser-Pro-Cys-CONH₂ (**32**)

The synthesis was carried out following the above mentioned *general procedure* for preparing glycopeptides by SPPS.

After incorporation of the first Ser to the peptide chain, the resin was removed from the synthesizer. The coupling was carried out manually according to the general protocol with 2 equivalents of compound **33** (131 mg). Next, the resin was again incorporated into the synthesizer to complete the peptide sequence. Once incorporated the six amino acids, the last Cys was acetylated by treating the resin with 2 mL of pyridine and 1 mL of Ac₂O. Finally, the acetates were removed and held on cleavage and purification of glycopeptide using the methodology set out above for peptides which incorporates Cys residues, to obtain compound **32**.

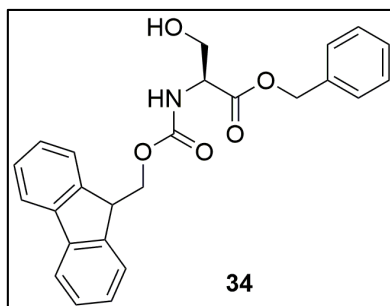
HRMS (ESI+) (*m/z*): calcd. for C₂₈H₄₈N₇O₁₄S₂⁺ [M+H]⁺: 770.2695, found: 770.2661, calcd. for C₂₈H₄₇N₇NaO₁₄S₂⁺ [M+Na]⁺: 792.2515, found 792.2477.

Semi-preparative HPLC: T_r = 22.52 min. Gradient method.

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1 % TFA (%)
0	10	8	92
12	10	8	92
13	10	11	89
25	10	11	89

¹H NMR (D₂O) δ (ppm): 1.30 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃Ala), 1.78-2.02 (m, 6H, H_βPro, 2H_γPro, NHCOCH₃), 2.13-2.27 (m, 1H, H_βPro), 2.68-2.90 (m, 4H, 4H_β2Cys), 3.10-3.22 (m, 1H, H_{2s}), 3.21-3.29 (m, 1H, H_{4s}), 3.30-3.45 (m, 2H, H_{3s}, H_{5s}), 3.52-3.62 (m, 1H, H_{6s}), 3.62-3.69 (m, 1H, H_δPro), 3.68-3.76 (m, 3H, H_δPro, 2H_βSer2), 3.77-3.84 (m, 2H, H_{6s}, H_βSer1*), 4.08 (dd, $J=10.6, 5.3$ Hz, 1H, H_βSer1*), 4.25 (q, $J=7.2, 7.1, 7.1$ Hz, 1H, H_αAla), 4.31-4.45 (m, 4H, H_{1s}, H_αPro, 2H_α2Cys), 4.53 (t, $J=5.0$ Hz, 5.0, 1H, H_αSer1*), 4.68-4.75 (m, 1H, H_αSer2). **¹H NMR (H₂O/D₂O) (9:1) δ (ppm):** 7.11 (s, 1H, NH₂), 7.47 (s, 1H, NH₂), 8.21 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, NH_{Ser2}), 8.24 (d, $J=7.1$ Hz, 1H, NH_{Cys1}), 8.29 (d, $J=7.4$ Hz, 1H, NH_{Cys2}), 8.33 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, NH_{Ser1*}), 8.43 (d, $J=5.8$ Hz, 1H, NH_{Ala}).

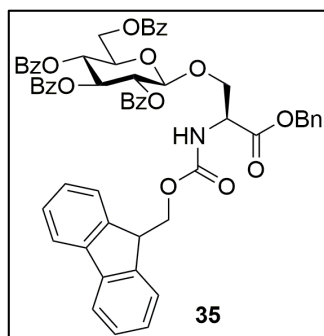
¹³C NMR (D₂O) δ (ppm): 16.4 (CH₃Ala), 21.7 (NHCOCH₃), 24.6 (C_γPro), 25.1, 25.4 (2C_β2Cys), 29.3 (C_βPro), 48.1 (C_δPro), 49.9 (C_αAla), 53.4 (C_αSer1*), 53.6 (C_αSer2), 55.3, 55.4 (2C_α2Cys), 60.7, 60.8, 60.8 (C_{6s}, C_αPro, C_βSer2), 68.5 (C_βSer1*), 69.6 (C_{4s}), 73.0 (C_{2s}), 75.6 (C_{3s}), 76.0 (C_{5s}), 102.3 (C_{1s}), 170.1, 171.0, 172.0, 174.2, 174.3, 174.3, 174.9 (CO).

Synthesis of Fmoc-L-Ser-OH (**34**)

L-Serine (1 g, 9.51 mmol) was dissolved in H₂O (25 mL) and NaHCO₃ (1.60 g, 19.03 mmol) was then added. The resulting mixture was stirred at room temperature until complete dissolution was achieved. The reaction mixture was diluted with acetonitrile (50 mL), followed by the addition of Fmoc–OSu (4.81 g, 14.27 mmol). The white suspension was stirred vigorously at room temperature for 48 h. The acetonitrile was removed under reduced pressure and the aqueous solution was extracted several times with Et₂O, followed by acidification and subsequent extraction with a mixture of CHCl₃/iPrOH (3:1). The organic layer was concentrated and the corresponding amino acid (2.80 g, 8.55 mmol) conveniently protected with Fmoc, was dissolved in DMF (15 mL) under an argon atmosphere. Cs₂CO₃ (4.18 g, 12.83 mmol) was added at room temperature and stirred for 1 h, followed by the addition of benzyl bromide (1.22 mL, 10.26 mmol) and stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was poured into a saturated solution of LiBr (100 mL), extracted with ethyl acetate (50 mL), and washed with water (50 mL) and brine (25 mL). The organic layer was dried (Na₂SO₄), filtered and the filtrate was concentrated in vacuum. The residue was purified by a silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate, 1:1) to give compound **34** (2.56 g, overall yield, 65%) as a white solid.

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[3]

Synthesis of Fmoc-L-Ser-[β -O-D-Glc(OBz₄)]-OBn (**35**)



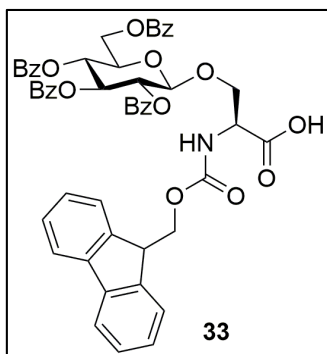
Silver triflate (254 mg, 0.99 mmol) was added under inert atmosphere over a suspension of Fmoc-L-Ser-CO₂Bn (**34**) (250 mg, 0.6 mmol) in dry CH₂Cl₂ (4 mL) with molecular sieve (4 Å). The mixture was stirred at -30 °C and then a solution of 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranosyl bromide (552 mg, 0.84 mmol) in dry CH₂Cl₂ (4 mL) was added. The mixture was stirred at this temperature for 1 h and then it was left to reach room temperature, stirring was continued for another 14. The oil was filtered to remove the sieves and washed with saturated NaHCO₃ (1 x 10 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The resulting residue was purified by a column chromatography on silica gel eluting with ethyl acetate/MeOH (95:5) to obtain 251 mg (42%) of Fmoc-L-Ser [β -O-D-Glc(OBz₄)]-CO₂Bn as a white solid.

HRMS (ESI+) (*m/z*): calcd. for C₅₉H₅₀NO₁₄⁺ [M+H]⁺: 996.3153, found: 996.3150.

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 3.92 (dd, *J*=10.3, 3.1, 1H, H_βSer), 4.01 – 4.14 (m, 2H, CH_{Fmoc}, H_{5S}), 4.21 (dd, *J*=10.4, 7.3, 1H, CH₂Fmoc), 4.28 – 4.47 (m, 3H, CH₂Fmoc, H_βSer, H_{6S}), 4.48 – 4.55 (m, 1H, H_αSer), 4.62 (dd, *J*=12.1, 3.1, 1H, H_{6S}), 4.77 (d, *J*=7.8, 1H, H_{1S}), 5.04 – 5.20 (m, 2H, CH₂Bn), 5.43 – 5.51 (m, 1H, H_{2S}), 5.64 (dd, *J*=19.6, 9.4, 2H, H_{4S}), 5.82 – 5.96 (m, 1H, H_{3S}), 7.16 – 7.62 (m, 23H, arom), 7.70 – 8.08 (m, 10H, arom).

¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 47.1 (CH_{Fmoc}), 54.4 (C_αSer), 63.0 (C_{6S}), 67.0 (CH₂Fmoc), 67.5 (CH₂Bn), 69.5, 69.6 (C_βSer, C_{4S}), 71.8 (C_{2S}), 72.3 (C_{5S}), 72.6 (C_{3S}), 101.4 (C_{1S}), 120.0, 120.0, 120.0, 124.7, 125.1, 125.2, 127.1, 127.6, 127.77, 127.8, 128.2, 128.3, 128.4, 128.4, 128.6, 128.8, 129.3, 129.5, 129.8, 129.8, 129.8, 133.2, 133.3, 133.5, 135.2, 141.3, 141.3, 143.7, 143.9 (arom), 155.91, 165.1, 165.2, 165.8, 166.1, 169.3 (6CO).

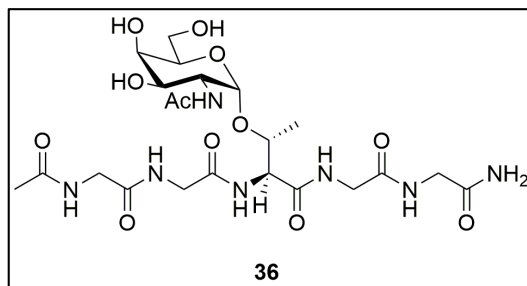
Synthesis of Fmoc-L-Ser-[β-O-D-Glc(OBz₄)]-OH (**33**)



A solution of compound **35** (250 mg, 1.10 mmol) in dry MeOH/CH₂Cl₂ (7:3) (10 mL) was hydrogenated at atmospheric pressure, using platinum on carbon (20%) as a catalyst (25 mg), vigorously stirring at room temperature for 30 min. The catalyst was filtered off through Celite and the solvent was

removed, to obtain 205 mg (90%) of compound **33**. The residue was used for SPPS without further purification.

HRMS (ESI+) (m/z): calcd. for $C_{52}H_{44}NO_{14}^+$ $[M+H]^+$: 906.2756, found: 906.2757, calcd. for $C_{52}H_{43}NNaO_{14}^+$ $[M+Na]^+$: 928.2576, found 928.2572.

8.5. Experimental section of chapter 6.Synthesis of Ac-Gly-Gly-Thr(α -O-D-GalNAc)-Gly-Gly-CONH₂ (**36**)

The synthesis was carried out following the above mentioned *general procedure* for preparing glycopeptides by SPPS.

After the incorporation of the second Gly to the peptide chain, the resin was removed from the synthesizer. The coupling was carried out manually according to the general protocol with 2 equivalents of compound **38** (184 mg). Next, the resin was again incorporated into the synthesizer to complete the peptide sequence. Once incorporated the five amino acids, the last Gly is acetylated by treating the resin with 2 mL of pyridine and 1 mL of Ac₂O. Finally, the acetates were removed and held on cleavage and purification of glycopeptide using the methodology set out above, to obtain compound **36**. HRMS (ESI+) (*m/z*): calcd. for C₂₂H₃₈N₇O₁₂⁺ [M+H]⁺: 592.2573, found: 592.2555.

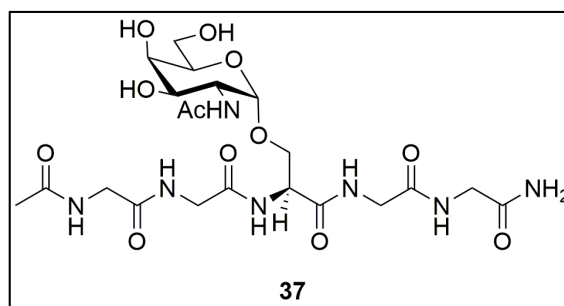
Semi-preparative HPLC: T_r = 8.95 min. Gradient method.

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1% TFA (%)
0	10	2	98
30	10	15	85

^1H NMR (D_2O) δ (ppm): 1.30 (d, 3H, $J=6.5$ Hz, CH_3_{Thr}), 2.05 (s, 3H, COCH_3), 2.08 (s, 3H, COCH_3), 3.75–3.79 (m, 2H, 2H_6), 3.89–4.13 (m, 12H, 4 CH_2_{Gly} , H_2 , H_3 , H_4 , H_5), 4.38–4.52 (m, 1H, $\text{H}_\beta_{\text{Thr}}$), 4.65 (d, 1H, $J=2.2$ Hz, $\text{H}_\alpha_{\text{Thr}}$), 4.96 ppm (d, 1H, $J=3.8$ Hz, H_1); **^1H NMR ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) δ (ppm):** 7.94 (d, 1H, $J=9.6$ Hz, $\text{NH}_{\text{GalNAc}}$), 8.32–8.47 (m, 3H, 3NH_{Gly}), 8.40 (d, 1H, $J=7.6$ Hz, NH_{Thr}), 8.51–8.53 ppm (m, 1H, NH_{Gly4}).

^{13}C NMR (D_2O) δ (ppm): 21.0 (CH_3_{Thr}), 24.6, 25.3 (2 COCH_3), 44.7, 45.4, 45.5 (4 CH_2_{Gly}), 52.9 (C_2), 60.5 ($\text{C}_\alpha_{\text{Thr}}$), 64.5 (C_6), 70.5 (C_3), 71.7 (C_4), 74.1 (C_5), 78.1 ($\text{C}_\beta_{\text{Thr}}$), 101.8 (C_1), 174.4, 175.0, 175.7, 177.2, 177.5, 178.1 ppm (7CO).

Synthesis of Ac-Gly-Gly-Ser(α -O-D-GalNAc)-Gly-Gly-CONH₂ (**37**)



The synthesis was carried out following the above mentioned *general procedure* for preparing glycopeptides by SPPS.

After incorporation of the second Gly to the peptide chain, the resin was removed from the synthesizer. The coupling was carried out manually according to the general protocol with 2 equivalents of compound **39** (181 mg). Next, the resin was again incorporated into the synthesizer to complete the peptide sequence. Once incorporated the five amino acids, the last Gly was acetylated by treating the resin with 2 mL of pyridine and 1 mL of Ac_2O .

Finally, the acetates were removed and held on cleavage and purification of glycopeptide using the methodology set out above, to obtain compound **37**.

HRMS (ESI+) (m/z): calcd. for $C_{21}H_{36}N_7O_{12}^+$ $[M+H]^+$: 578.2344, found: 578.2415.

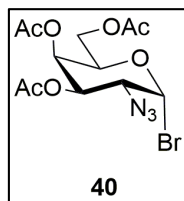
Semi-preparative HPLC: T_r = 8.85 min. Gradient method.

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1% TFA (%)
0	10	2	98
30	10	15	85

$^1\text{H NMR (D}_2\text{O) } \delta$ (ppm): 2.04 (s, 3H, COCH₃), 2.07 (s, 3H, COCH₃), 3.74–3.79 (m, 2H, 2H₆), 3.80–4.07 (m, 13H, 4 CH₂ Gly, 2H_β Ser, H₃, H₄, H₅), 4.13–4.28 (m, 1H, H₂), 4.71 (“t”, 1H, $J=4.6$ Hz, H_α Ser), 4.90 ppm (d, 1H, $J=3.6$ Hz, H₁); $^1\text{H NMR (H}_2\text{O/ D}_2\text{O) } \delta$ (ppm): 7.97 (d, 1H, $J=9.3$ Hz, NH GalNAc), 8.30–8.45 (m, 3H, 3NH Gly), 8.47 (d, 1H, $J=7.4$ Hz, NH Ser), 8.56–8.63 ppm (m, 1H, NH Gly₄).

$^{13}\text{C NMR (D}_2\text{O) } \delta$ (ppm): 24.6, 25.0 (2 COCH₃), 44.8, 45.3, 45.5, 45.6 (4CH₂ Gly), 52.7 (C₂), 56.6 (C_α Ser), 63.9 (C₆), 69.9 (C_β Ser), 70.5 (C₃), 71.4 (C₄), 74.3 (C₅), 100.6 (C₁), 174.5, 174.5, 174.8, 175.3, 177.0, 177.4, 177.9 ppm (7CO).

Synthesis of α -D-Tri-*O*-acetyl-2-azido-1-bromo-2-desoxygalactopyranose (40)

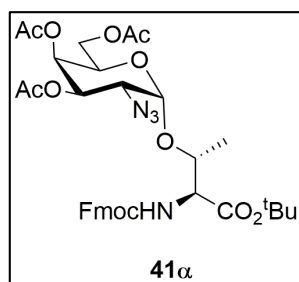


A solution of 3,4,6-tri-*O*-acetyl-D-galactal (5.00 g, 18.60 mmol) in CH₃CN (80 mL) was added dropwise over 5 min to a vigorously stirred mixture of solid sodium azide (1.79 g, 27.5 mmol) and solid ceric ammonium nitrate (CAN, 30.20 g, 55.1 mmol) at -20 °C. After stirring for 10 h, the reaction was quenched by adding cold Et₂O (50 mL) and water (50 mL). The organic layer was separated and washed with ice-cold water (3 x 50 mL) and dried (MgSO₄). Evaporation of the solvent left a crude azidonitration reaction product mixture, which was purified by a flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 3:2), giving 5.00 g (72%) of a yellow syrup.

The above compound (5.00 g, 6.68 mmol) was treated with a suspension of LiBr (5.56 g, 64.05 mmol) in CH₃CN (50 mL) at 25 °C for 8 h. The reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ (100 mL) and water (2 x 50 mL) and the organic phase was concentrated. The crude was purified by a flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 8:2 to 6:4), giving 3.50 g (70%) as a syrup.

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[4]

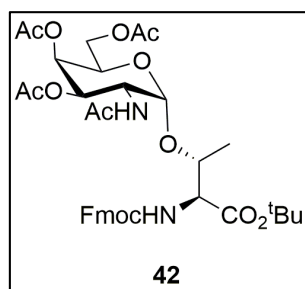
Synthesis of Fmoc-L-Thr(α -O-D-tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxygalactopyranosyl)-O^tBu (**41 α**)



Activated 4 Å molecular sieve and N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-threonine *tert*-butyl ester (345 mg, 0.86 mmol) were stirred in a mixture of dry toluene (5 mL) and dry CH₂Cl₂ (8 mL) for 1 h at room temperature under Ar and in the absence of light. After cooling the mixture to 0 °C, Ag₂CO₃ (263 mg, 0.95 mmol) was added followed by AgClO₄ (23 mg, 0.11 mmol) dissolved in toluene (3 mL). The mixture was stirred for 30 min at 0 °C. A solution of compound **40** (342.15 mg, 0.87 mmol) in toluene (10 mL) and CH₂Cl₂, (10 mL) was added dropwise to the mixture. After stirring overnight at room temperature, the mixture was diluted with CH₂Cl₂ and filtered through Celite. The filtrate was extracted twice with a saturated NaHCO₃ solution (2 x 200 mL) and twice with H₂O (2 x 200 mL). The solvents were removed and the crude was purified by a silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate, 7:3) to give a mixture 9:1 of α / β anomers, followed by other silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate, 7:3) to obtain compound **41 α** (620 mg, 83%) as a white solid.

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[4]

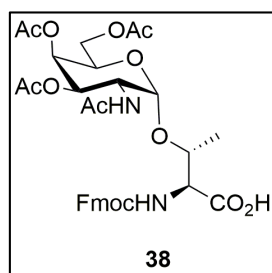
Synthesis of Fmoc-L-Thr(α -*O*-D-tri-*O*-acetyl-*N*-acetylgalactosaminyloxy)-O^tBu (**42**)



To a solution of compound **41a** (376 mg, 0.53 mmol) in THF/AcOH/Ac₂O (15 mL, 3:2:1) cooled to 0 °C, Zn (429 mg, 6.56 mmol) and 0.8 mL of a saturated CuSO₄ aqueous solution were added. The mixture was stirred for 1 h. After filtration, the solvent was removed in vacuum and the residue was purified by a silica gel column chromatography (ethyl acetate/hexane, 7:3) to give compound **42** (345 mg, 89%) as a white solid.

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[4]

Synthesis of Fmoc-L-Thr (α -*O*-D-tri-*O*-acetyl-*N*-acetylgalactosaminyloxy)-OH (**38**)

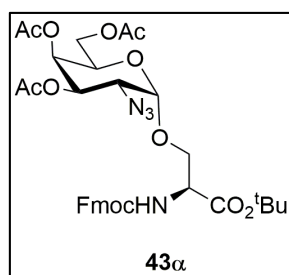


A solution of compound **42** (580 mg, 762 μmol) in a mixture 1:1 CH₂Cl₂/TFA (6 mL) was shaken at 25°C. After stirring for 1 h, the solvent was removed and the crude product was purified by silica gel column chromatography

(CH₂Cl₂/MeOH, 9:1, 0.1% AcOH) to afford compound **38** (300 mg, 94%) as a white solid.

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[4]

Synthesis of Fmoc-L-Ser(α -O-D-tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxygalactopyranosyl)-O^tBu (**43 α**)

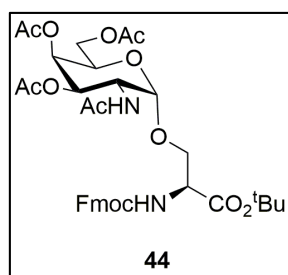


N-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-serine *tert*-butyl ester (650 mg, 1.70 mmol) and activated 4 Å molecular sieves were stirred in a mixture of dry toluene (10 mL) and dry CH₂Cl₂ (16 mL) for 1 h at room temperature under Ar and exclusion of light. After cooling the mixture to 0 °C, Ag₂CO₃ (514 mg, 1.86 mmol) was added followed by AgClO₄ (45 mg, 0.22 mmol) dissolved in toluene (6 mL). The mixture was stirred for 30 min at 0 °C. A solution of compound **40** (668 mg, 1.70 mmol) in toluene (20 mL) and CH₂Cl₂, (20 mL) was added dropwise to the mixture. After stirring overnight at room temperature, the mixture was diluted with CH₂Cl₂, and filtered through Celite. The filtrate was extracted twice with a saturated NaHCO₃ solution (2 x 200 mL) and twice with H₂O (2 x 200 mL). The solvents were removed and the crude was purified by a silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate, 7:3) to give a mixture 9:1 of α / β anomers, followed by other silica

gel column chromatography (hexane/ethyl acetate, 7:3) to obtain compound **43a** (805 mg, 68%) as a white solid.

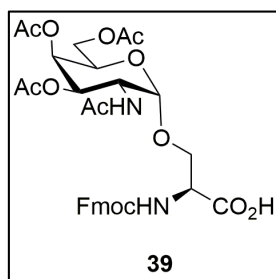
Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[4]

Synthesis of Fmoc-L-Ser(α -O-D-tri-O-acetyl-N-acetylgalactosaminy)-O^tBu (**44**)



To a solution of compound **43a** (805 mg, 1.08 mmol) in THF/AcOH/Ac₂O (30 mL, 3:2:1) cooled to 0 °C, Zn (918 mg, 14.03 mmol) and 1.7 mL of a saturated CuSO₄ aqueous solution were added. The mixture was stirred for 1 h. After filtration, the solvent was removed in vacuum and the residue was purified by a silica gel column chromatography (ethyl acetate/hexane, 7:3) to give compound **44** (690 mg, 84%) as a white solid.

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[4]

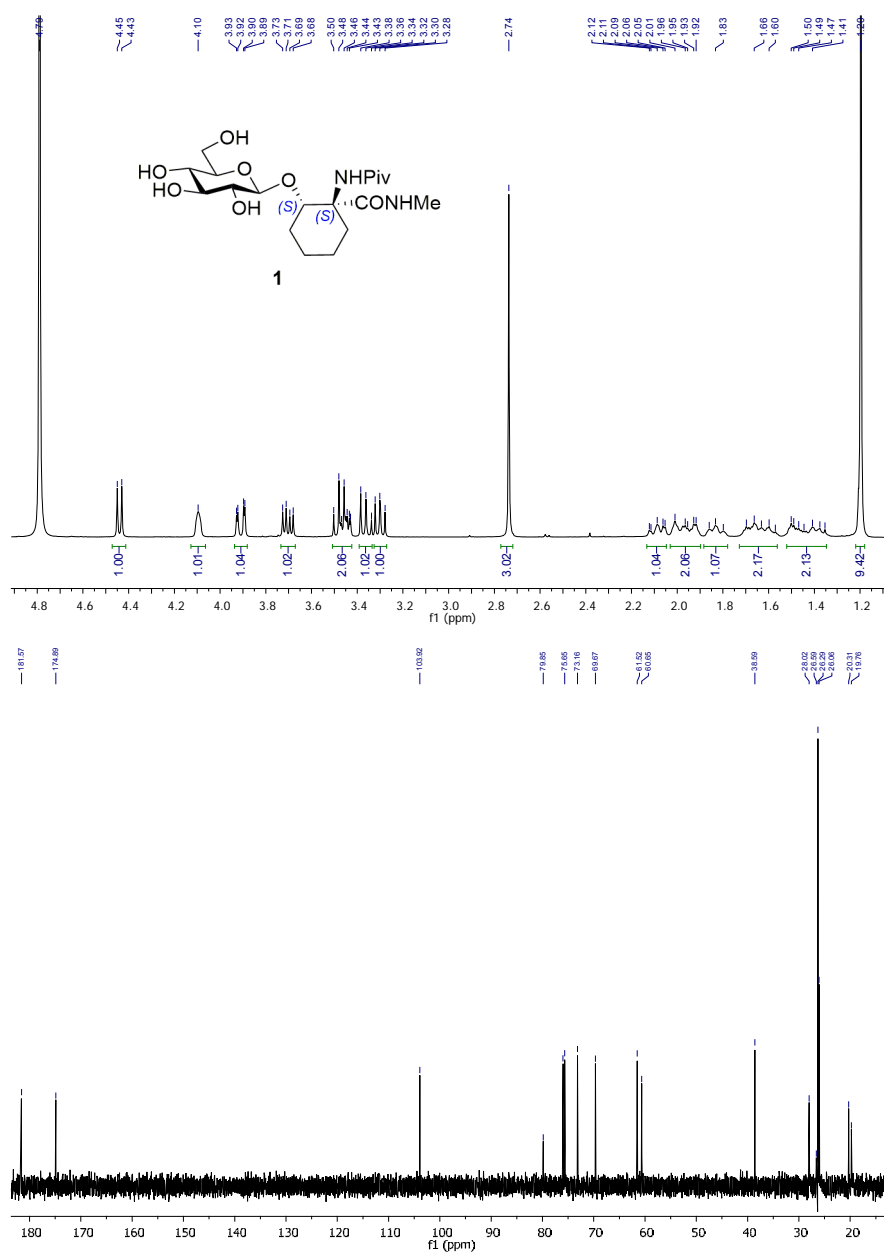
Synthesis of Fmoc-L-Ser(α -O-D-tri-O-acetyl-N-acetylgalactosaminyl)-OH (**39**)

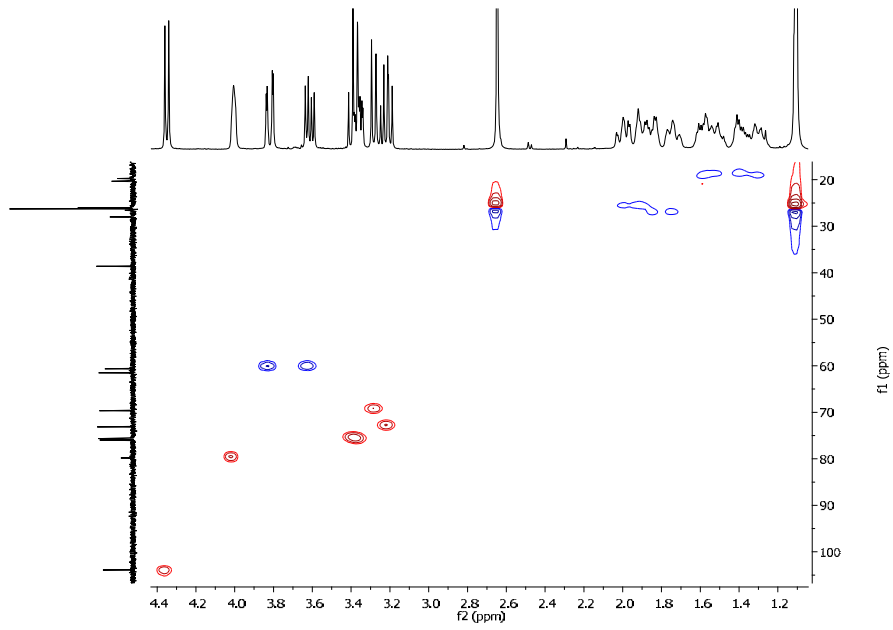
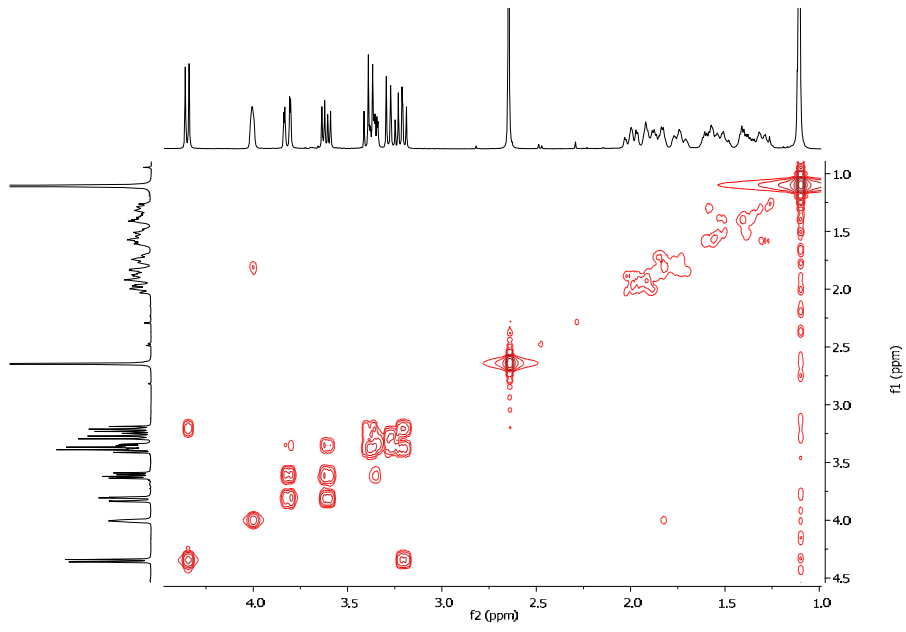
A solution of the compound **44** (690 mg, 0.95 mmol) in a mixture 1:1 CH₂Cl₂/TFA (8 mL) was shaken at 25°C. After stirring for 1 h the solvent was removed, and the crude product was purified by a silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1, 0.1% AcOH) to afford compound **39** (610 mg, 96%) as a white solid.

Its physical properties and spectroscopic data are described in the literature.^[4]

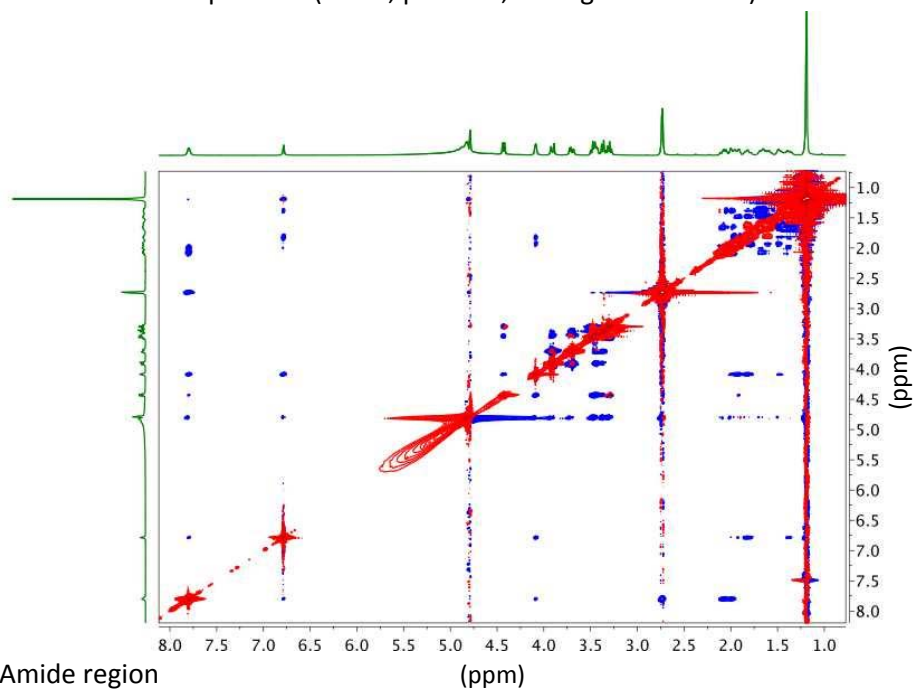
8.6. 1D- and 2D-NMR spectra. 2D-NOESY spectra and build-up curves (NMR)

Compound 1

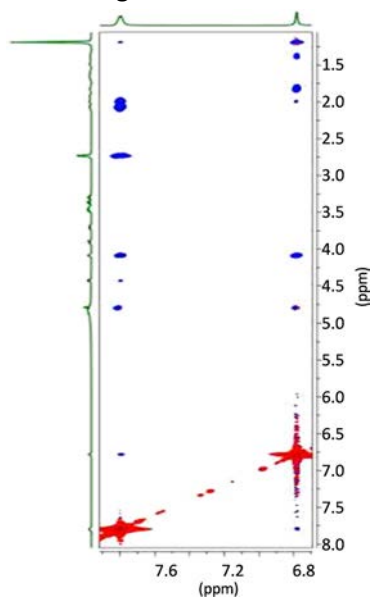




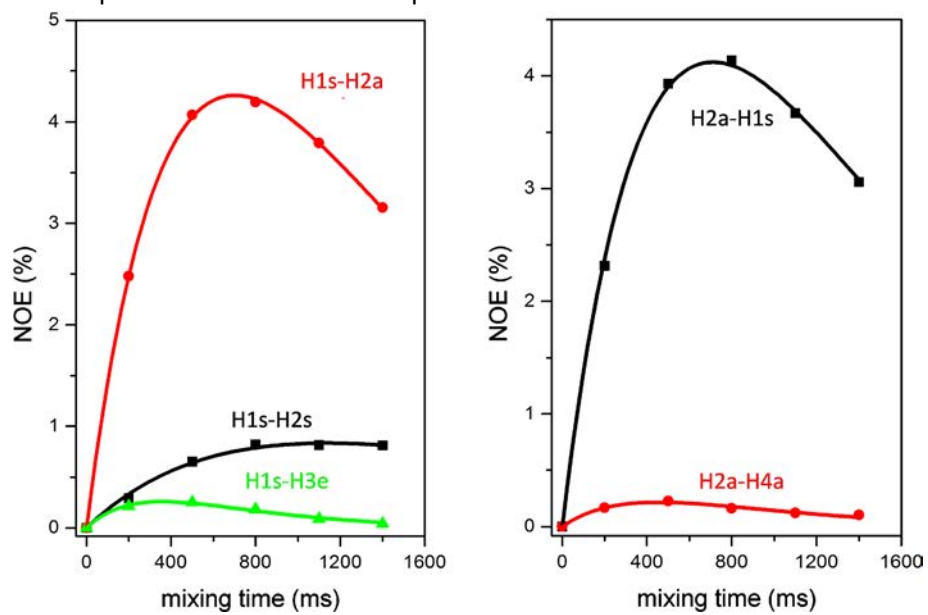
2D NOESY of compound 1 (298 K, pH = 5.7, mixing time 800 ms)



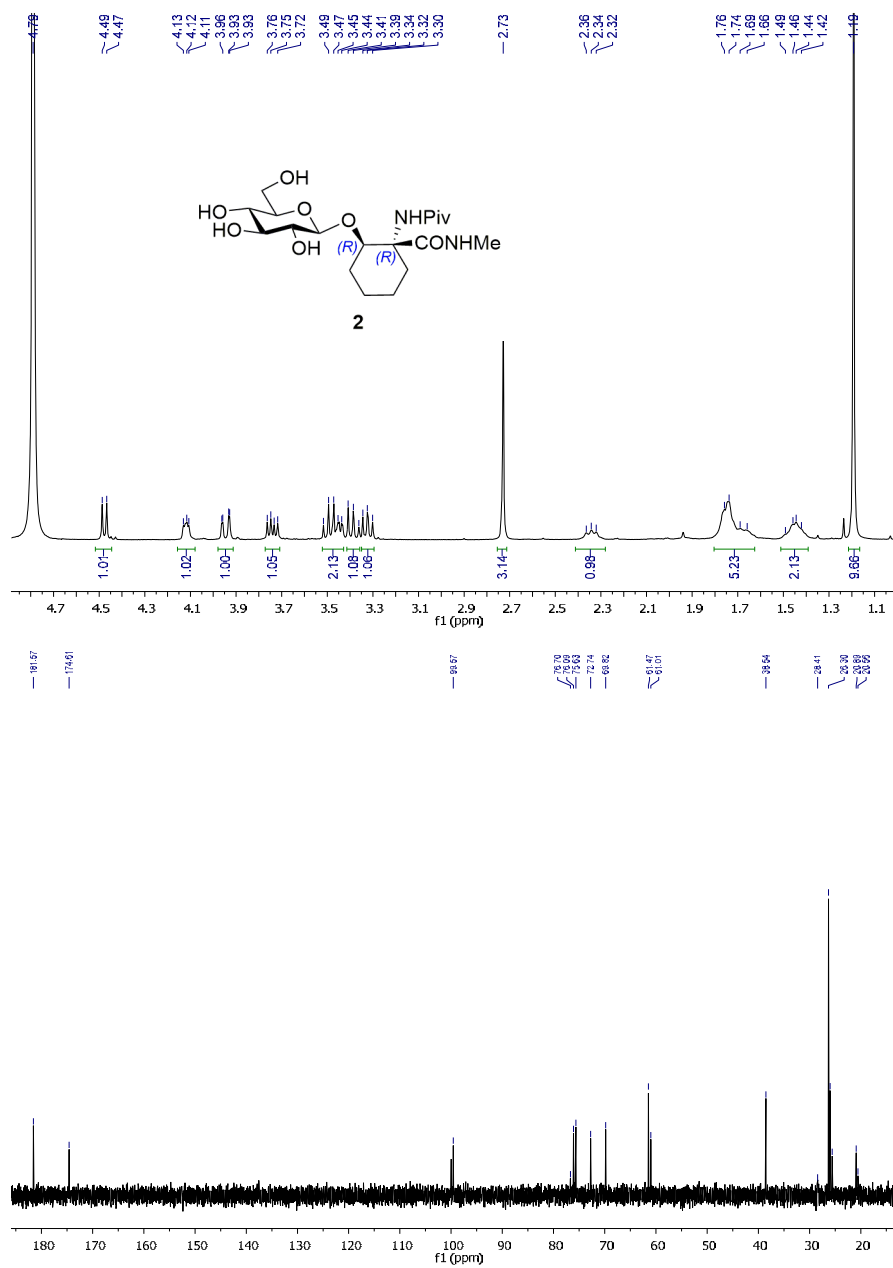
Amide region

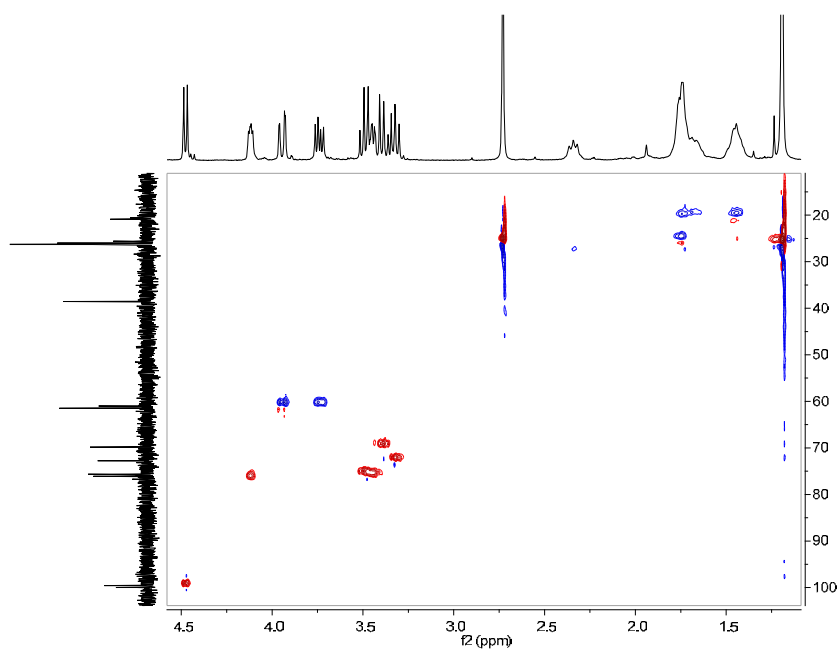
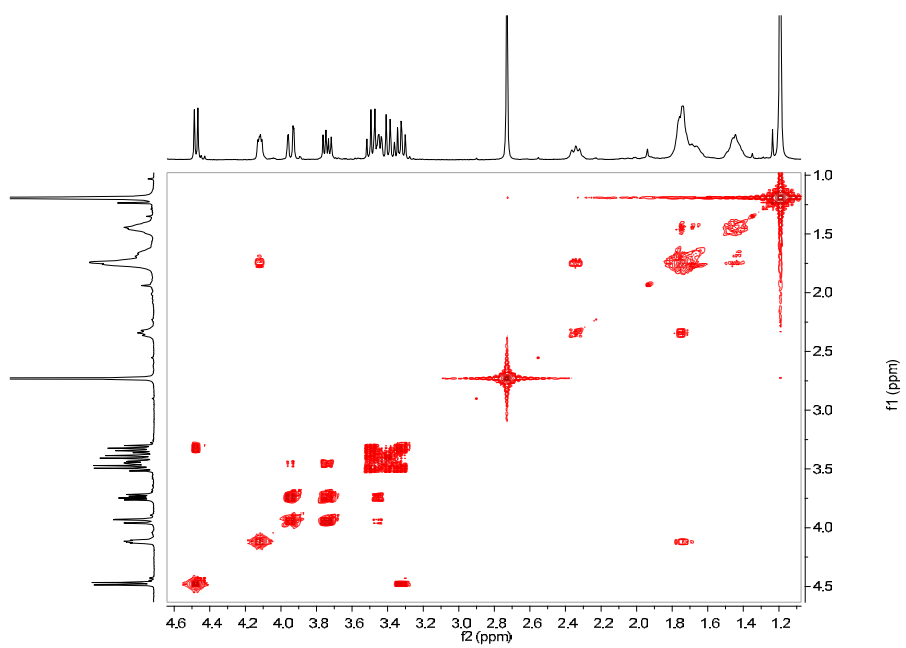


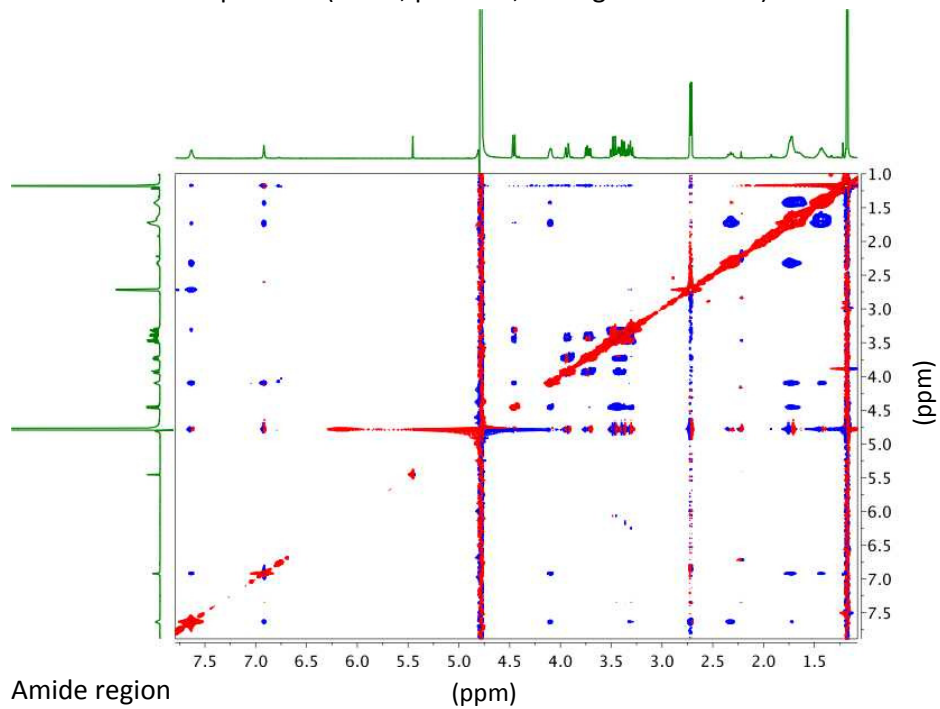
Build-up curves obtained for compound 1



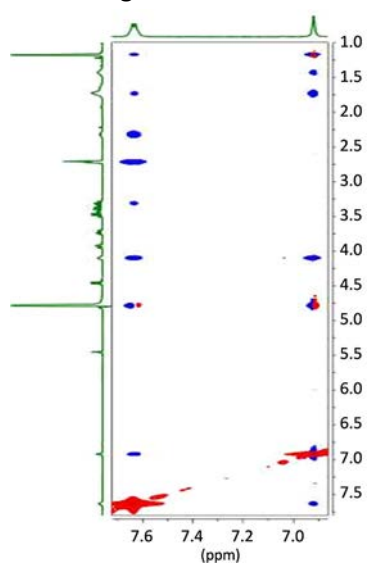
Compound 2



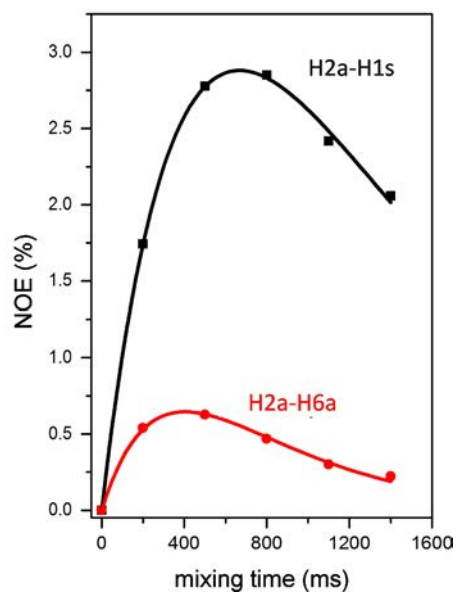
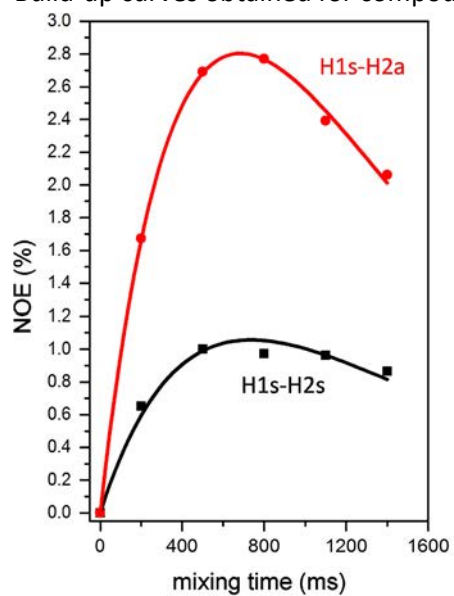


2D NOESY of compound **2** (298 K, pH = 5.8, mixing time 800 ms)

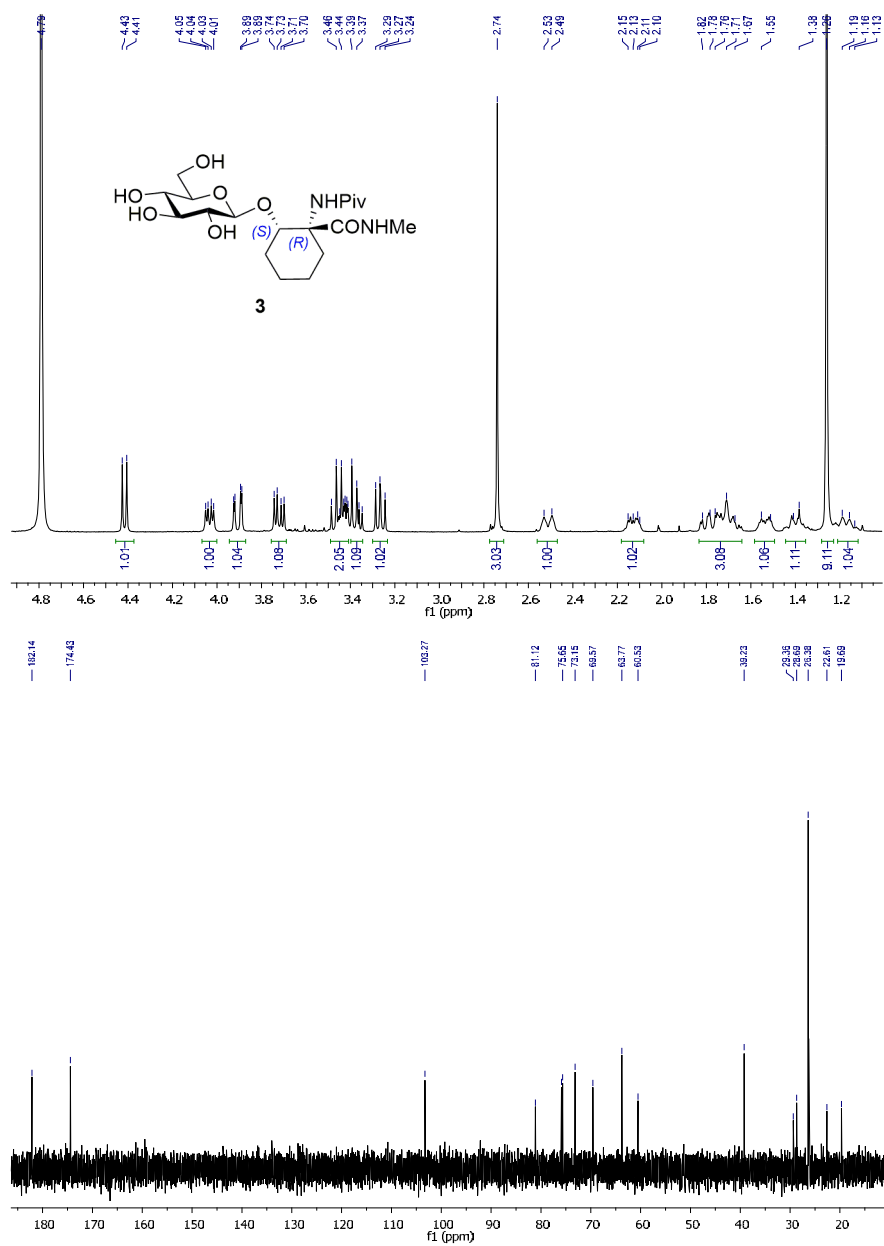
Amide region

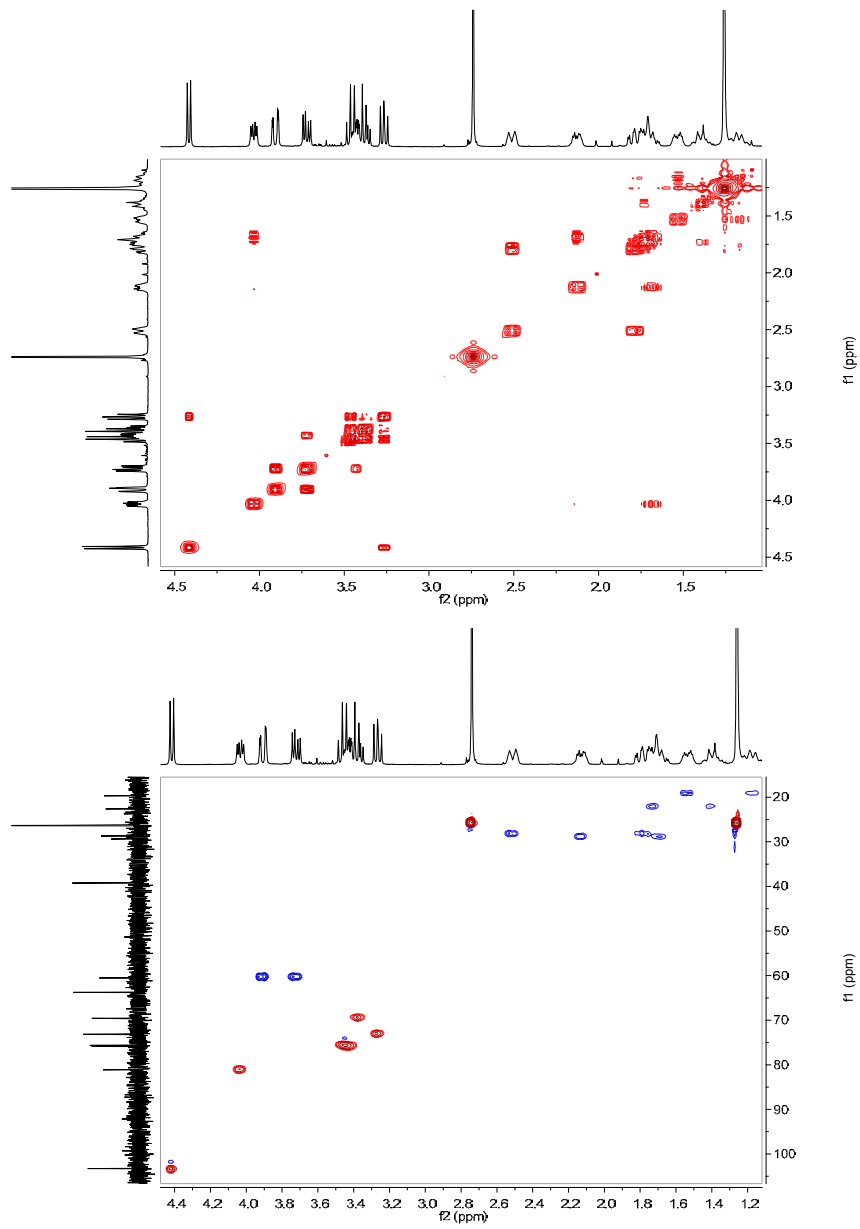


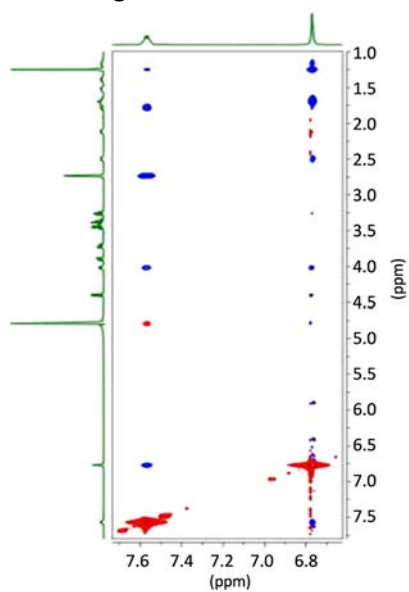
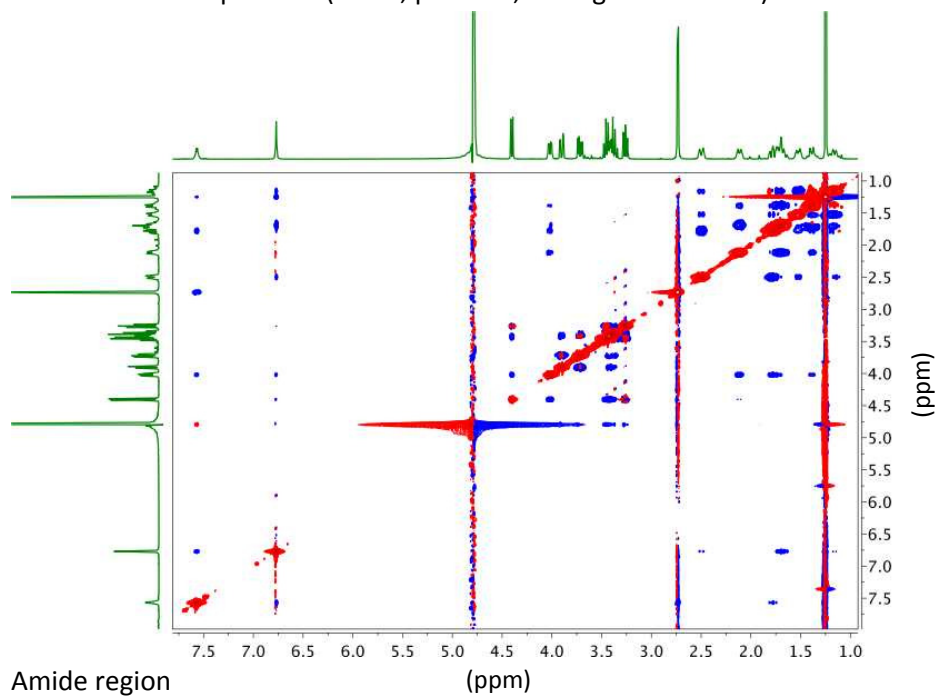
Build-up curves obtained for compound 2



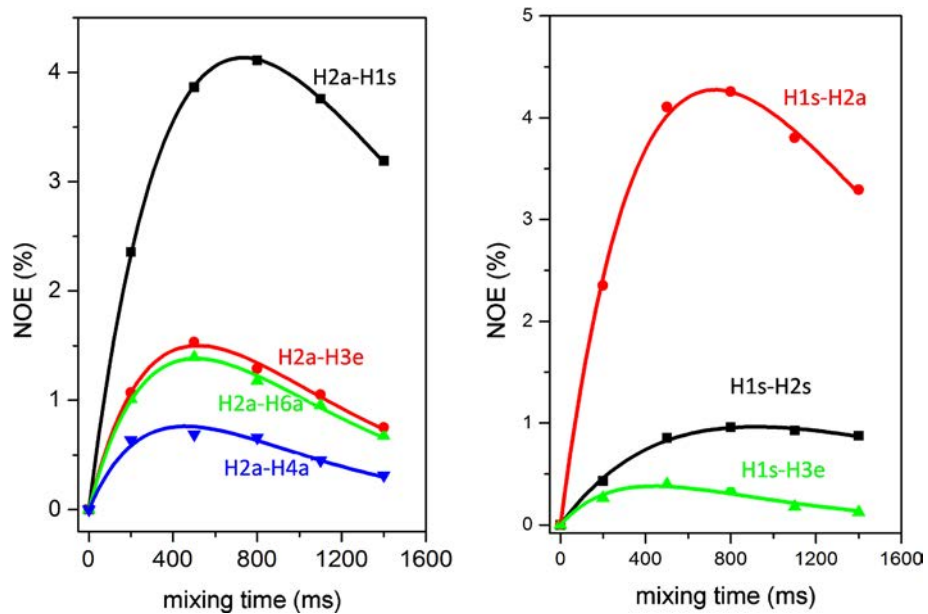
Compound 3



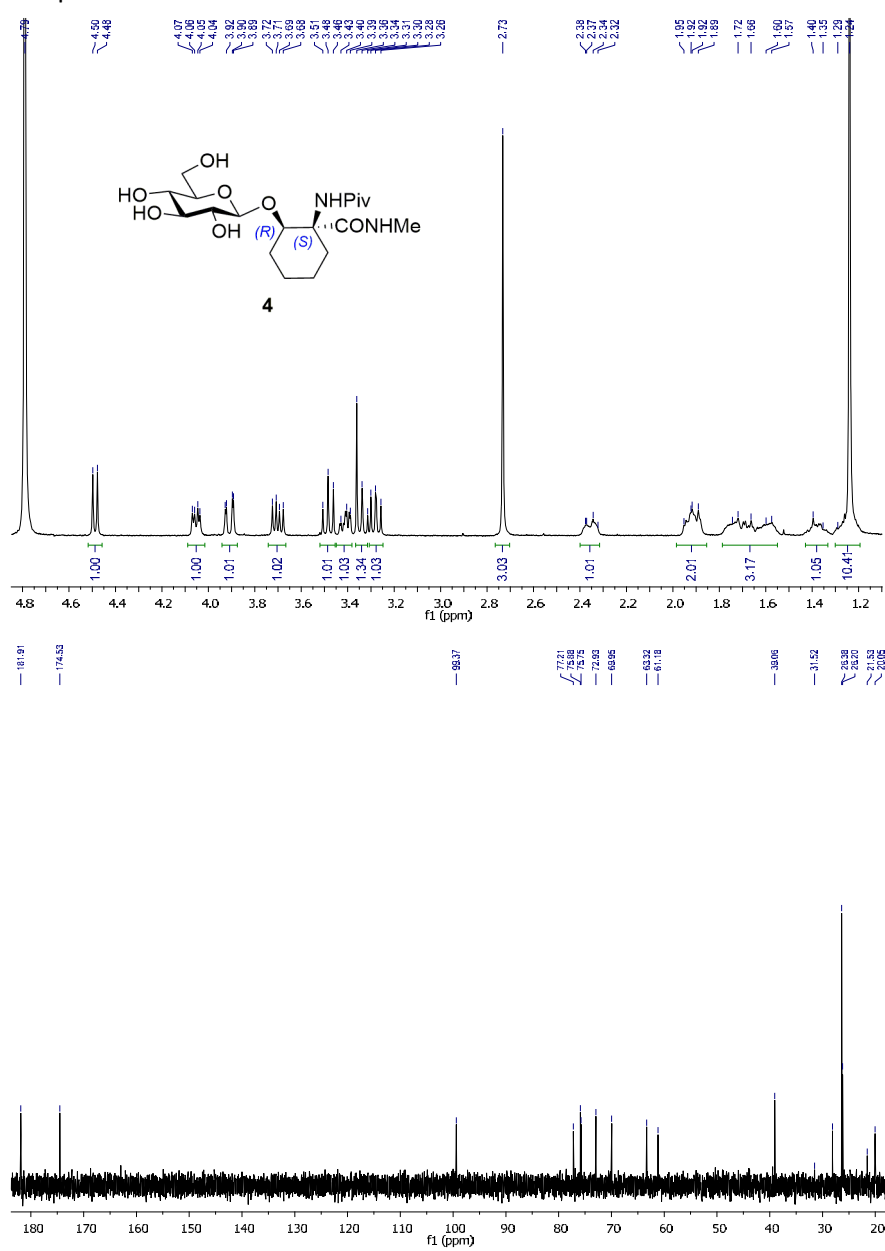


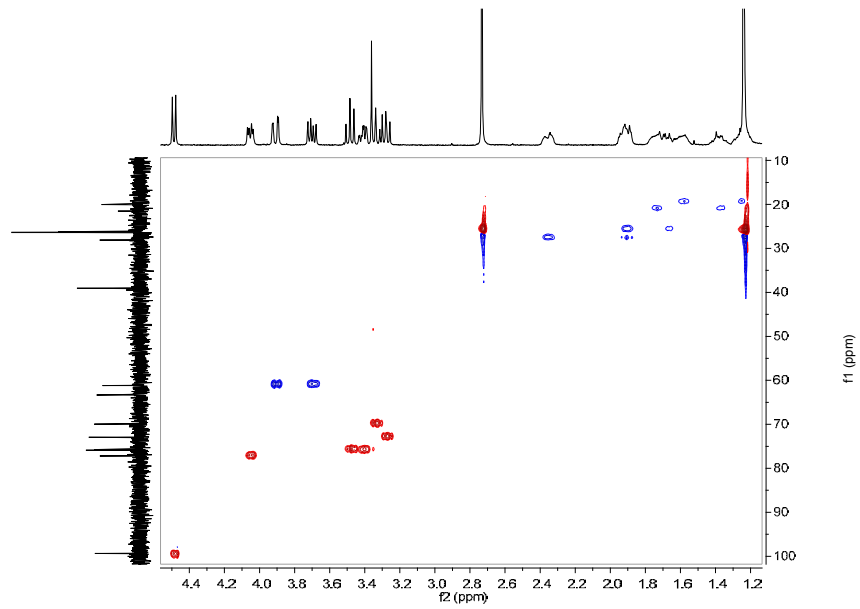
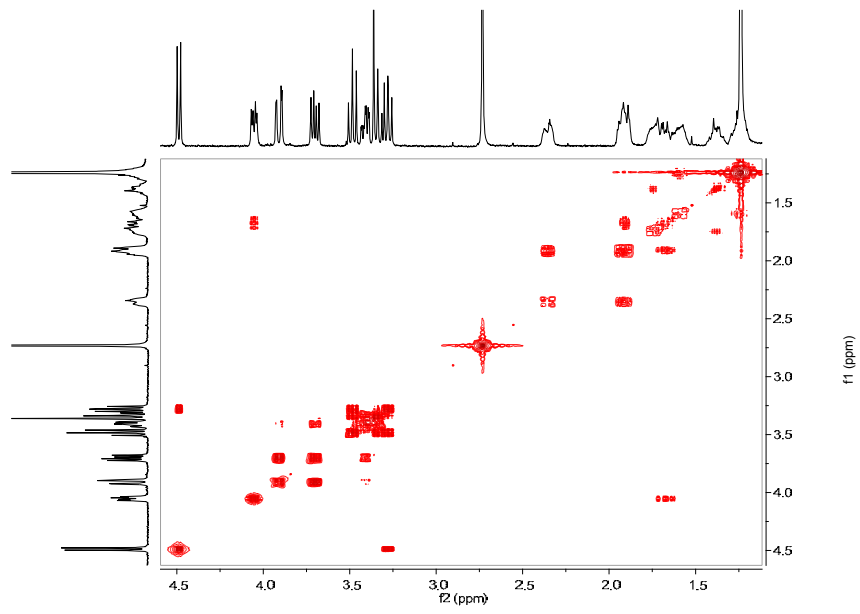
2D NOESY of compound **3** (298 K, pH = 5.9, mixing time 800 ms)

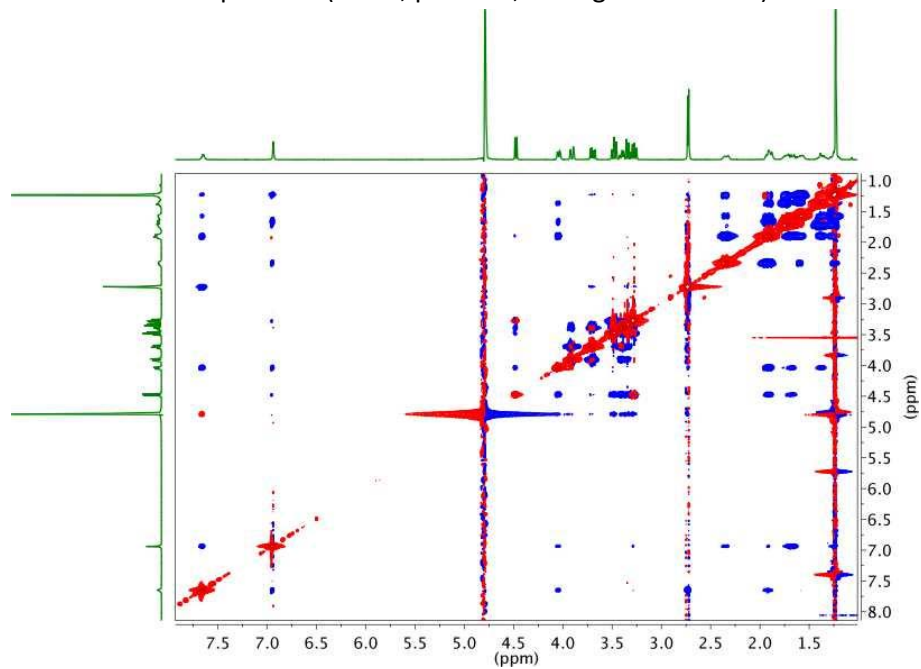
Build-up curves obtained for compound 3



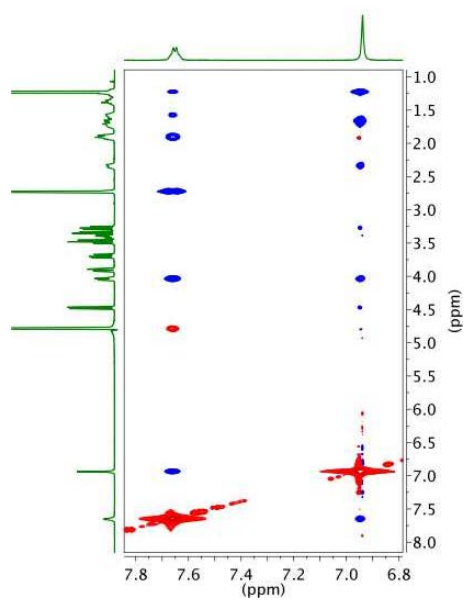
Compound 4



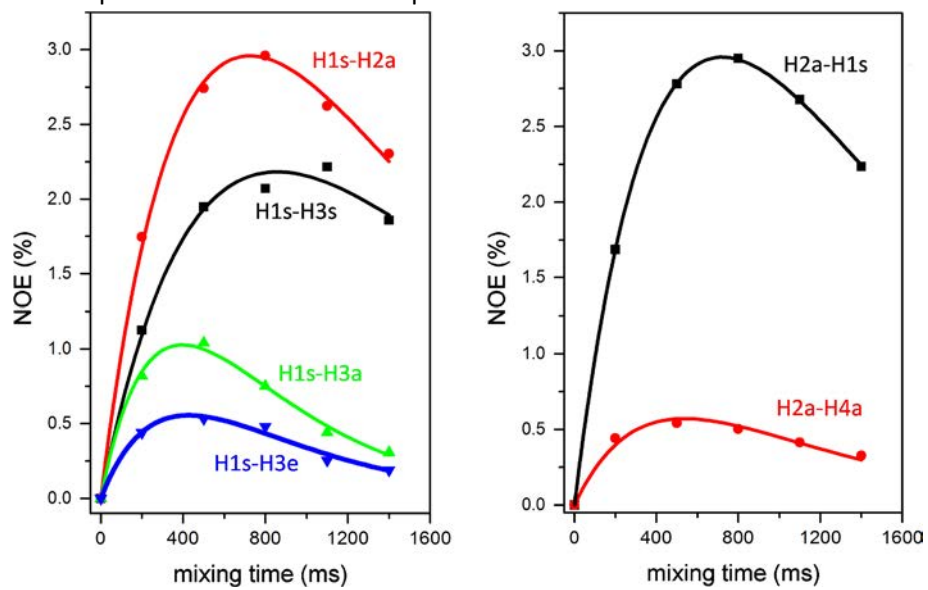


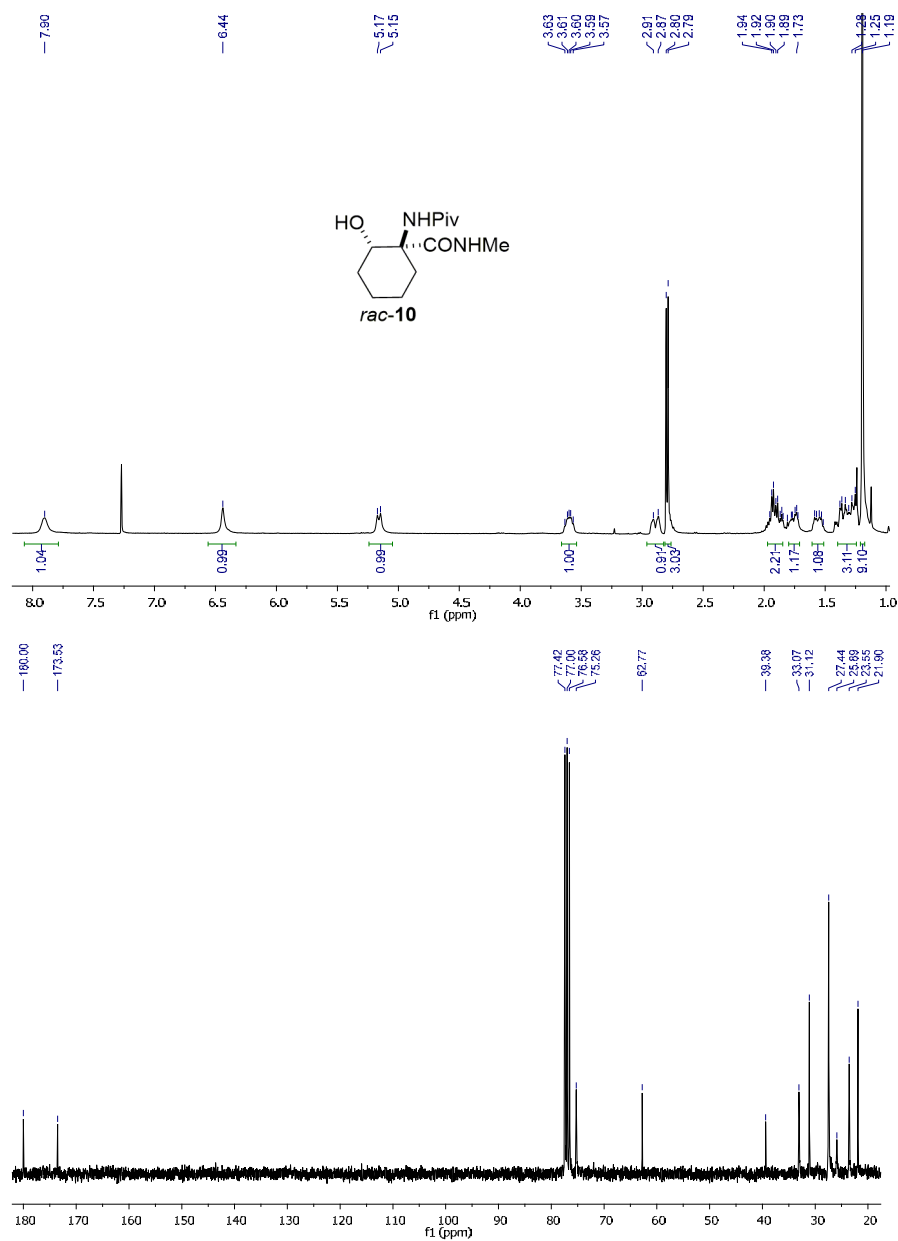
2D NOESY of compound **4** (298 K, pH = 5.7, mixing time 800 ms)

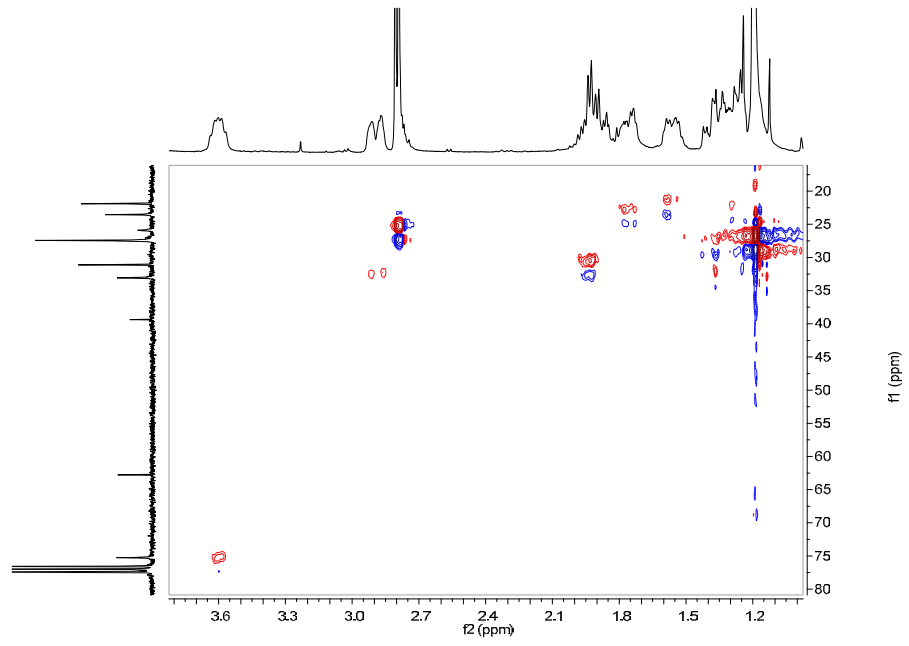
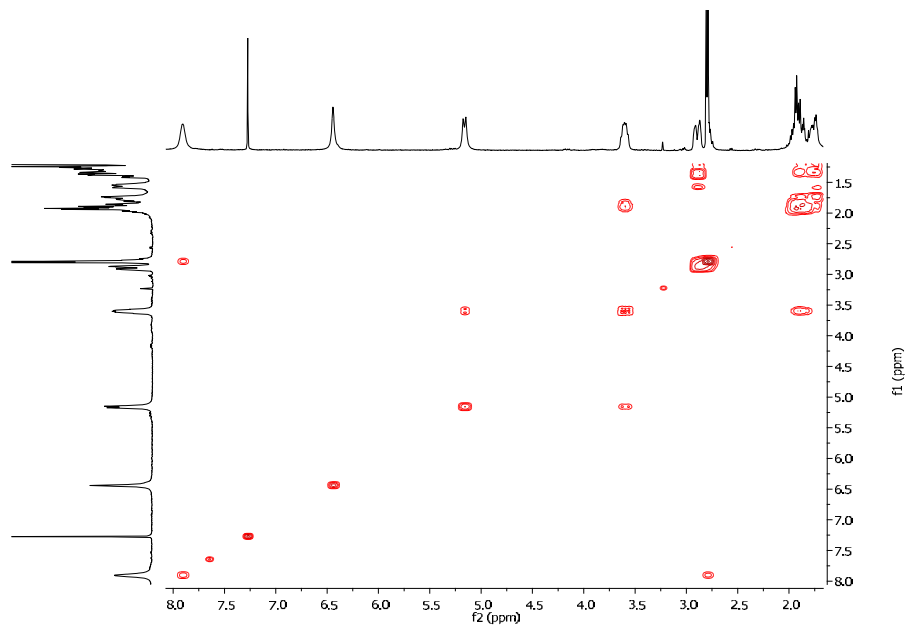
Amide region



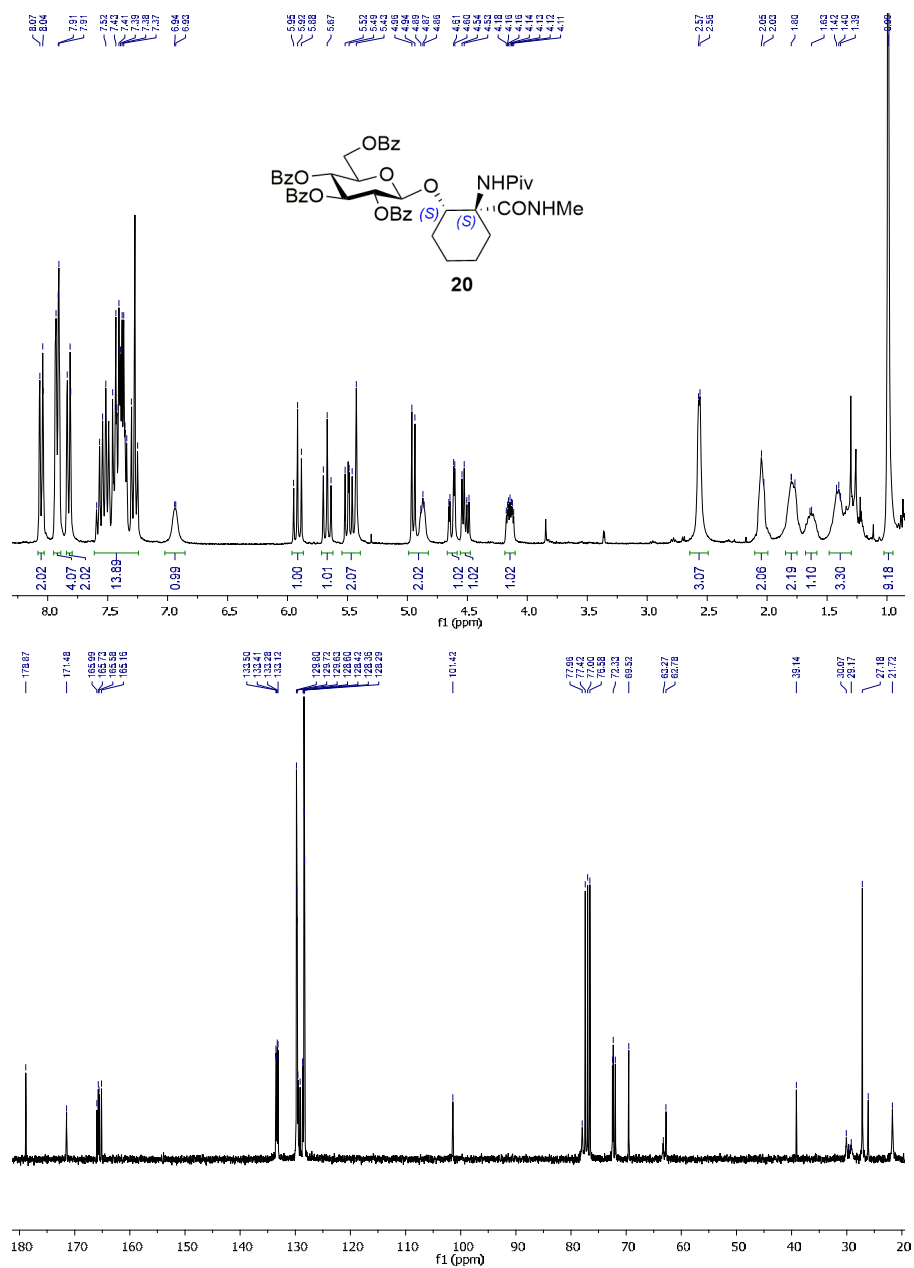
Build-up curves obtained for compound 4

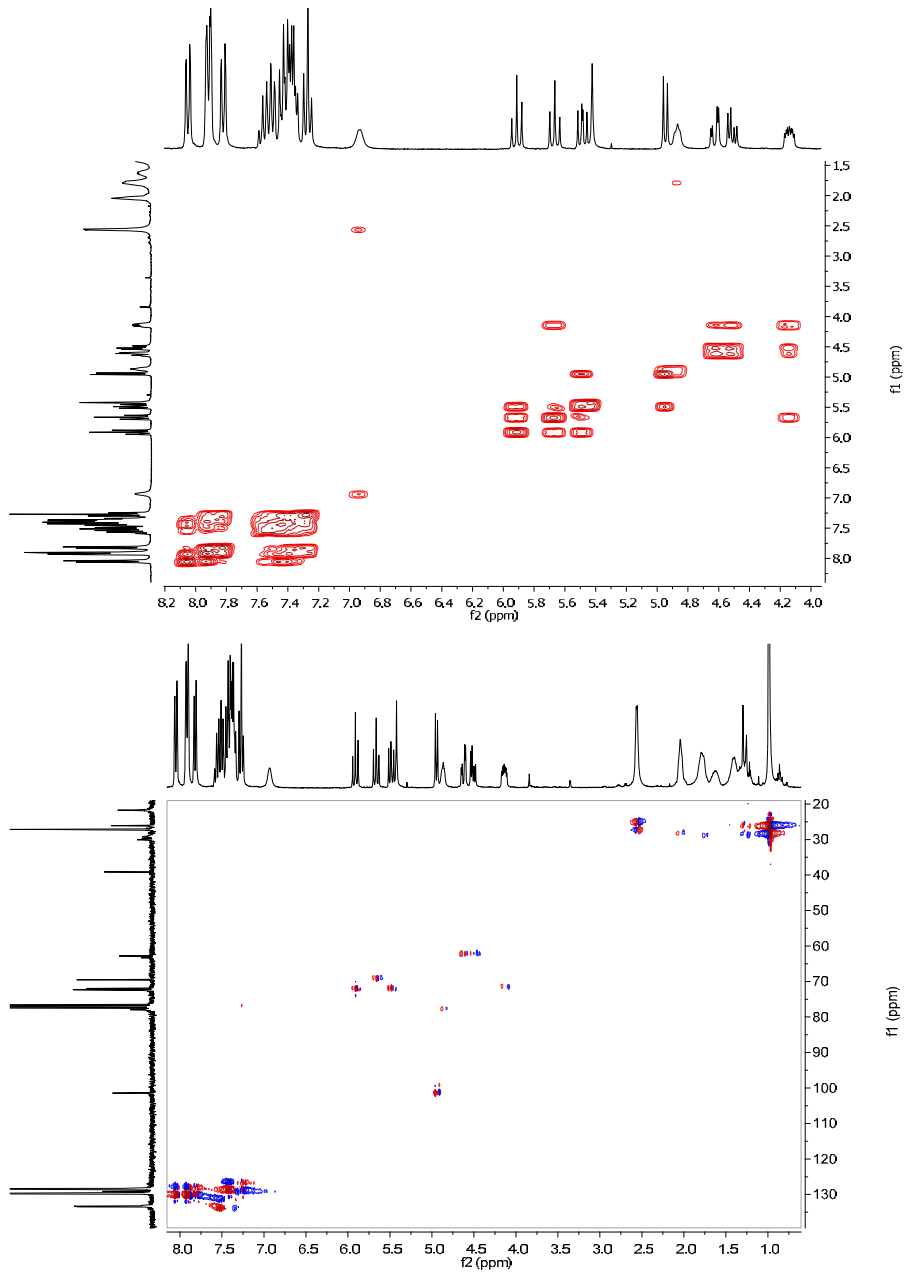


Compound *rac-10*

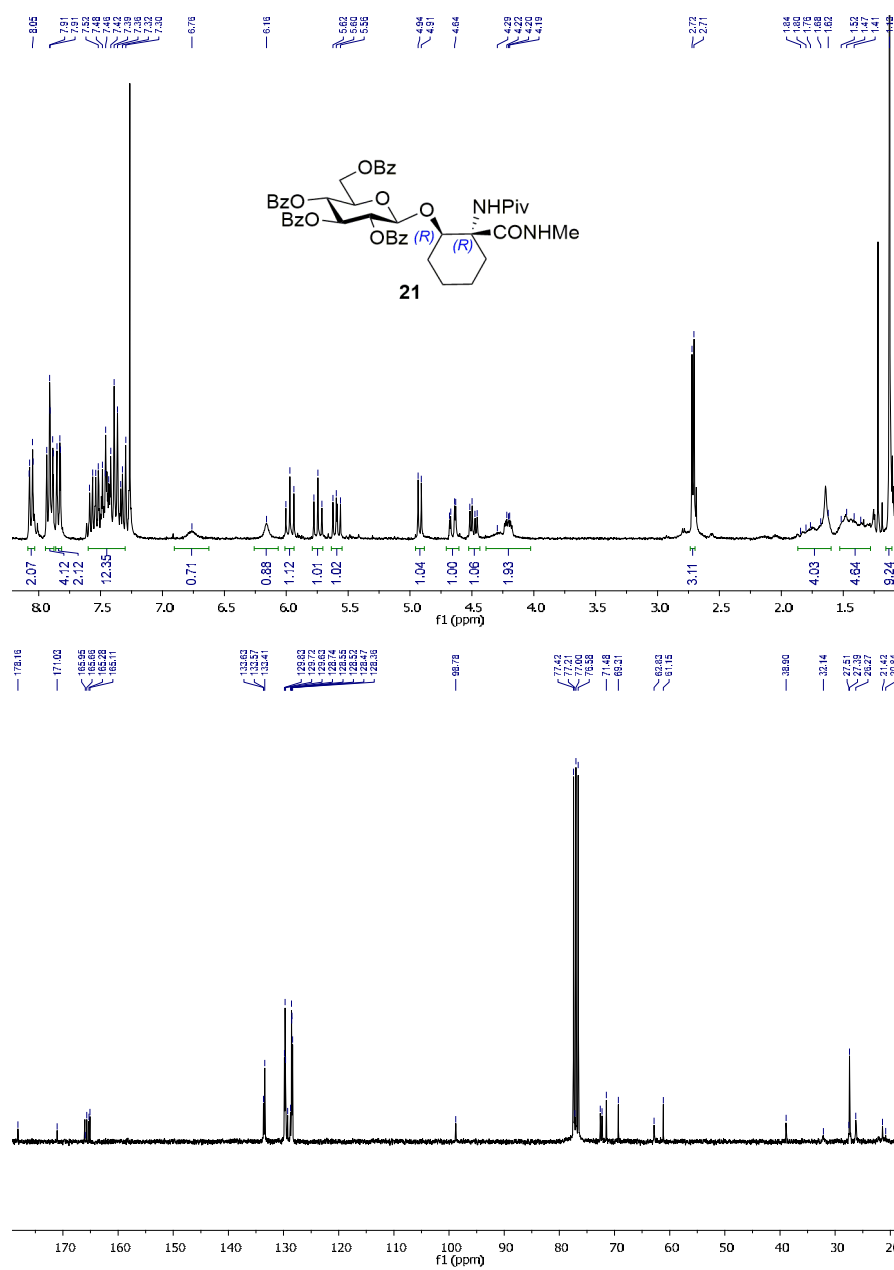


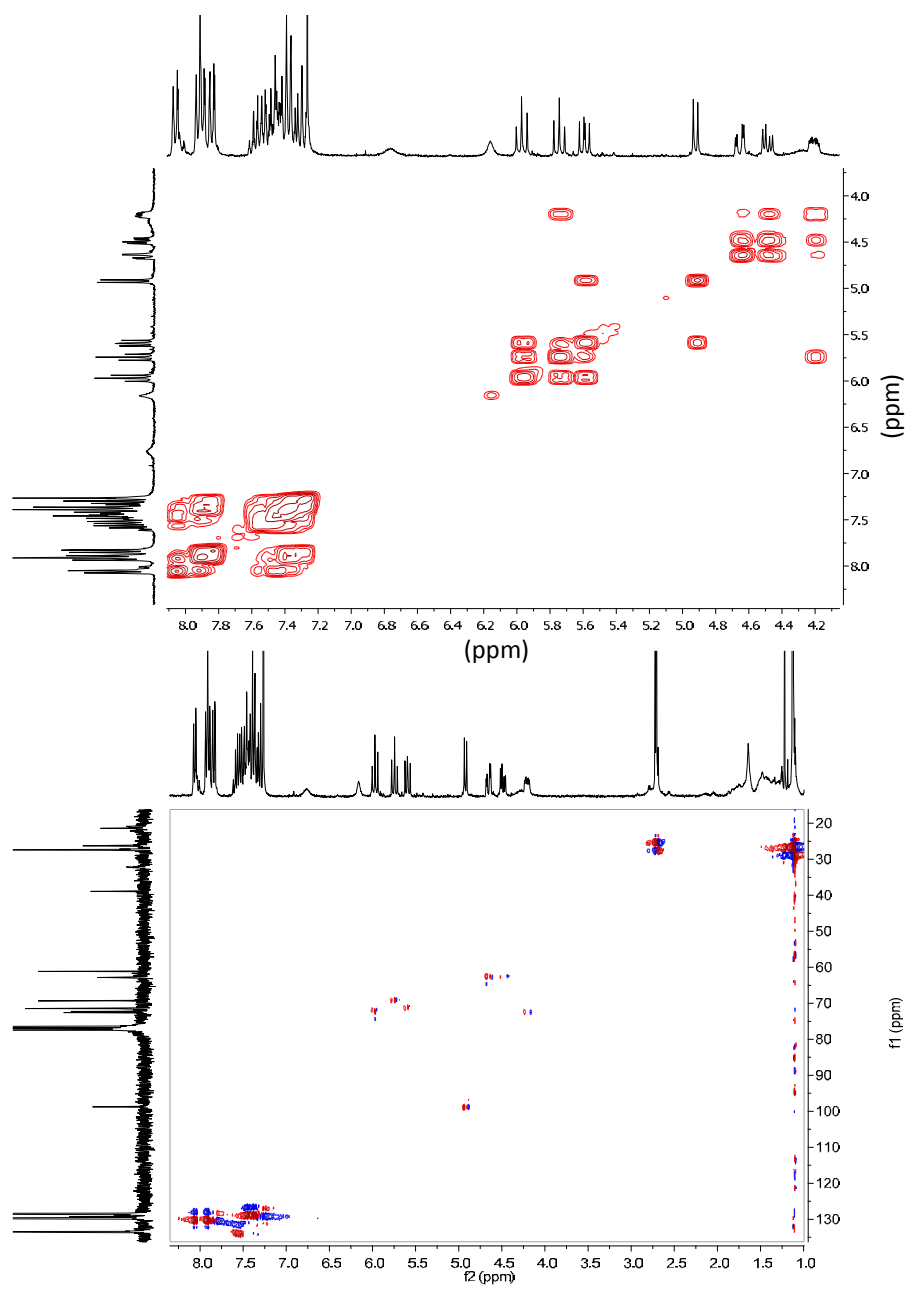
Compound 20

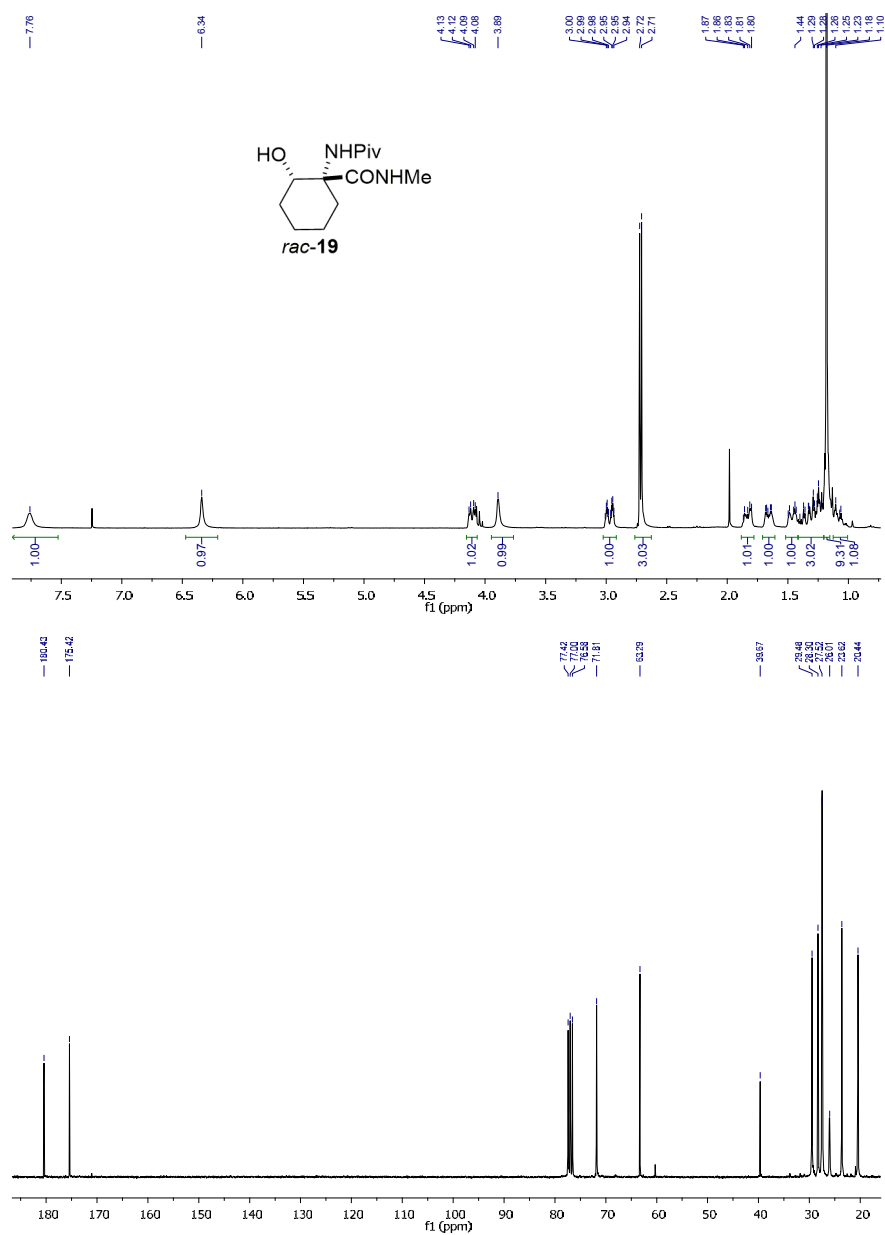


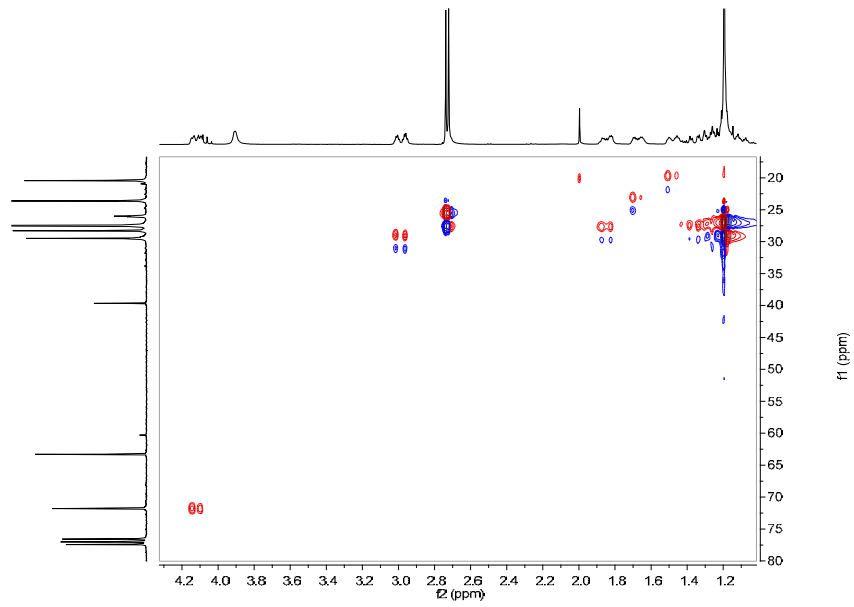
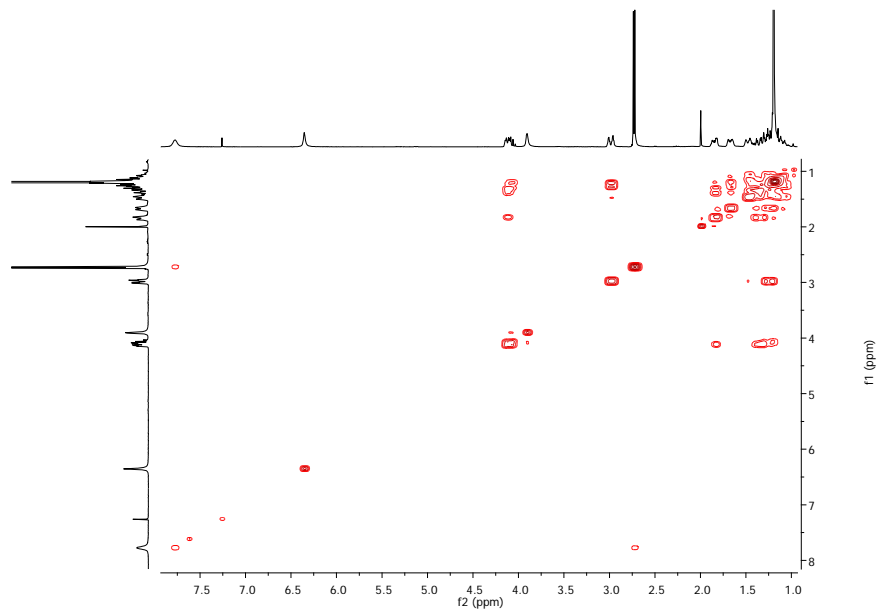


Compound 21

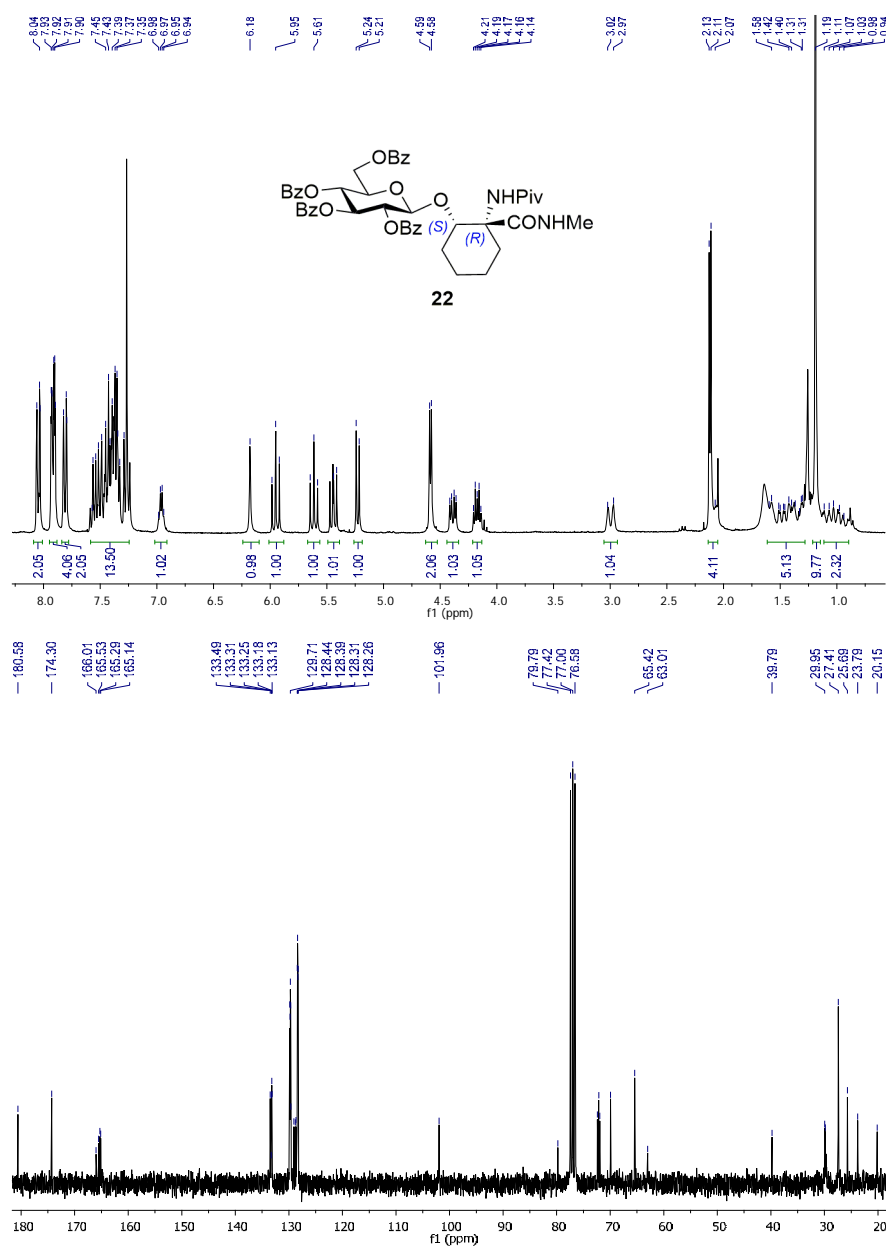


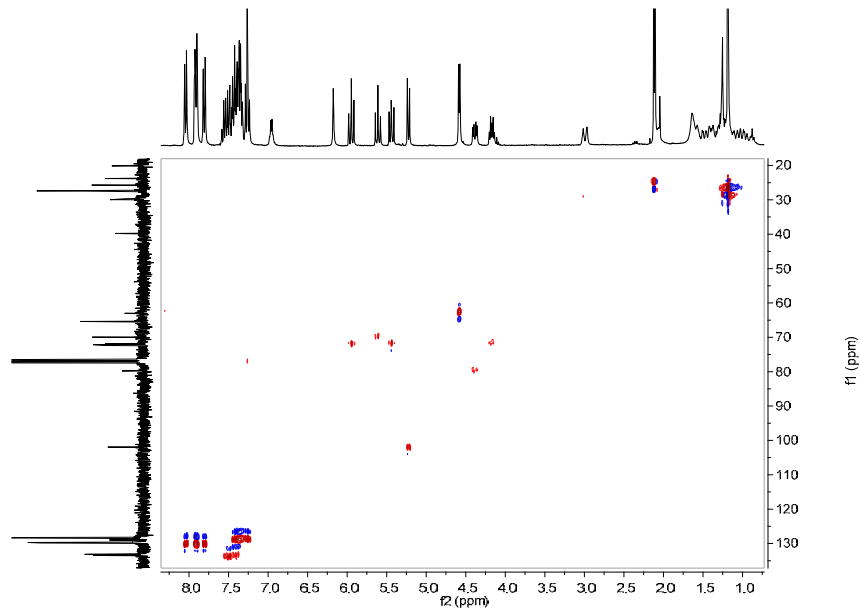
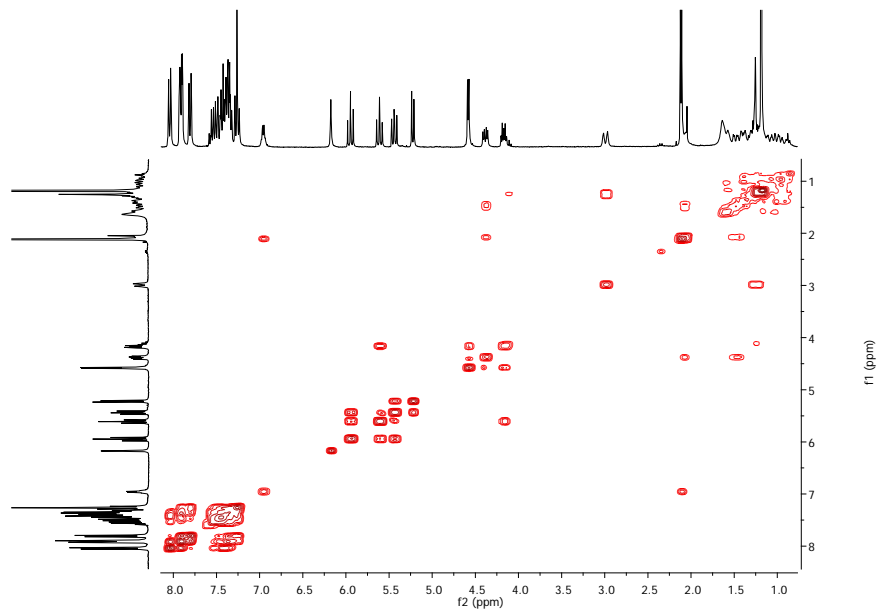


Compound *rac-19*

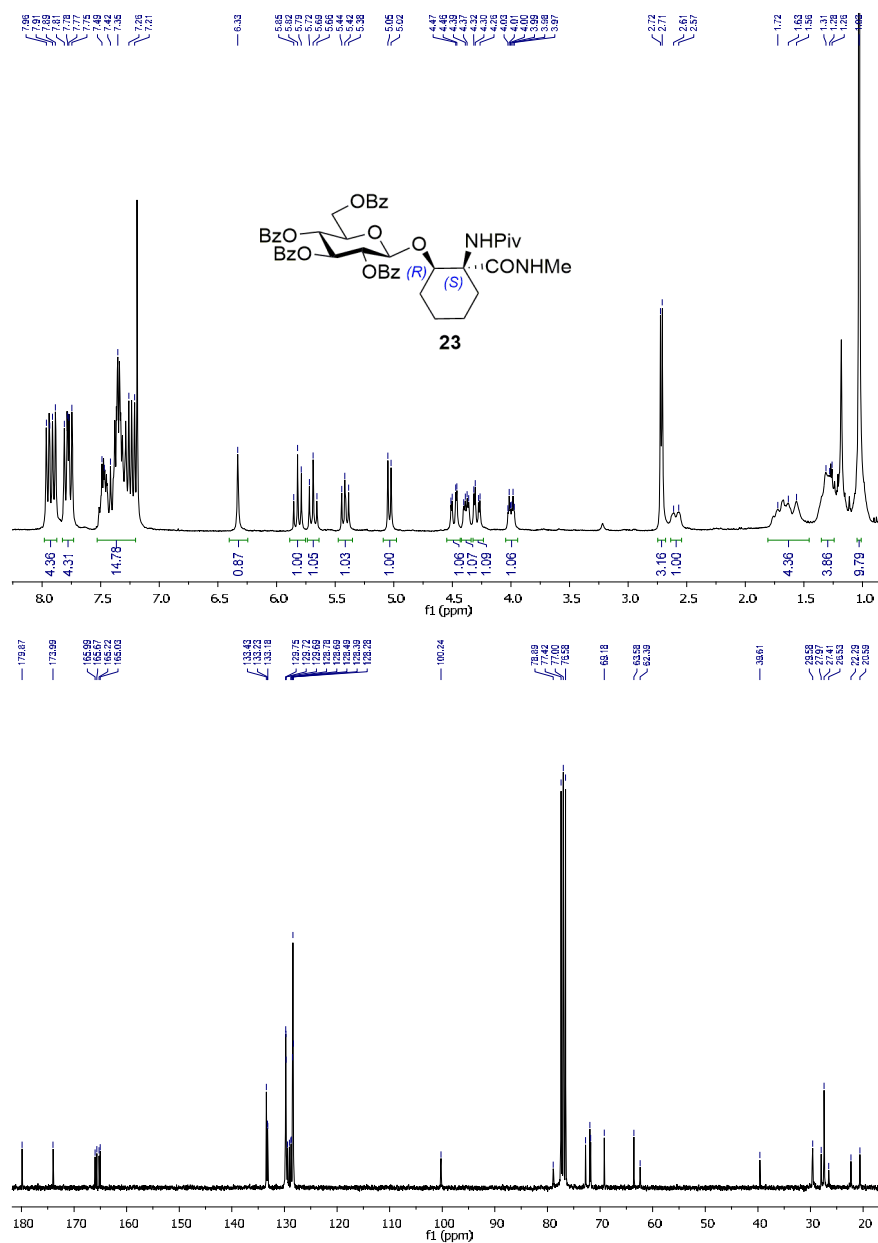


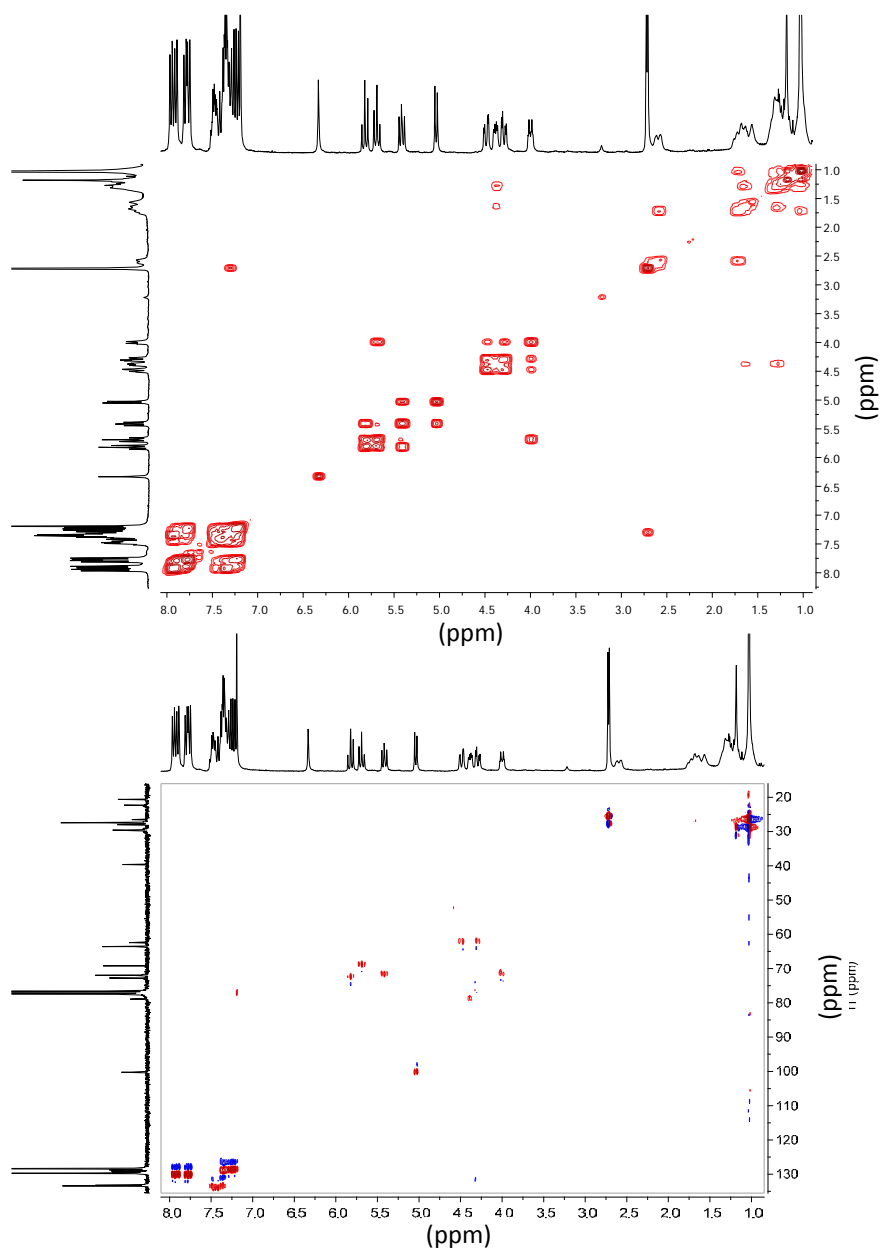
Compound 22



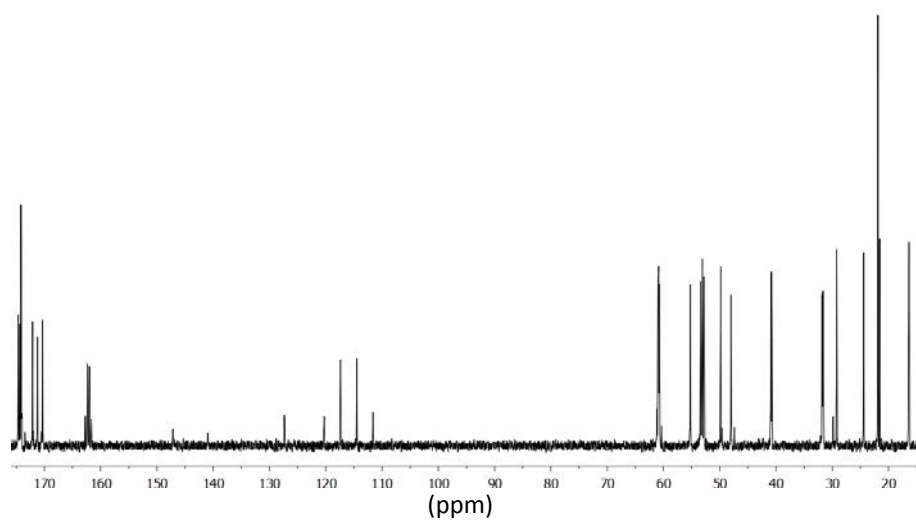
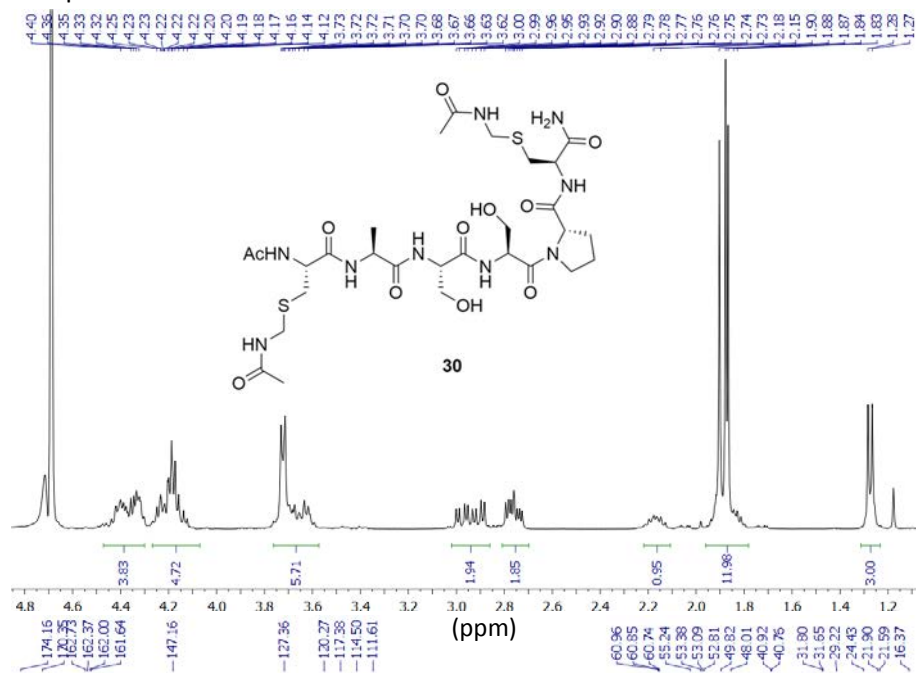


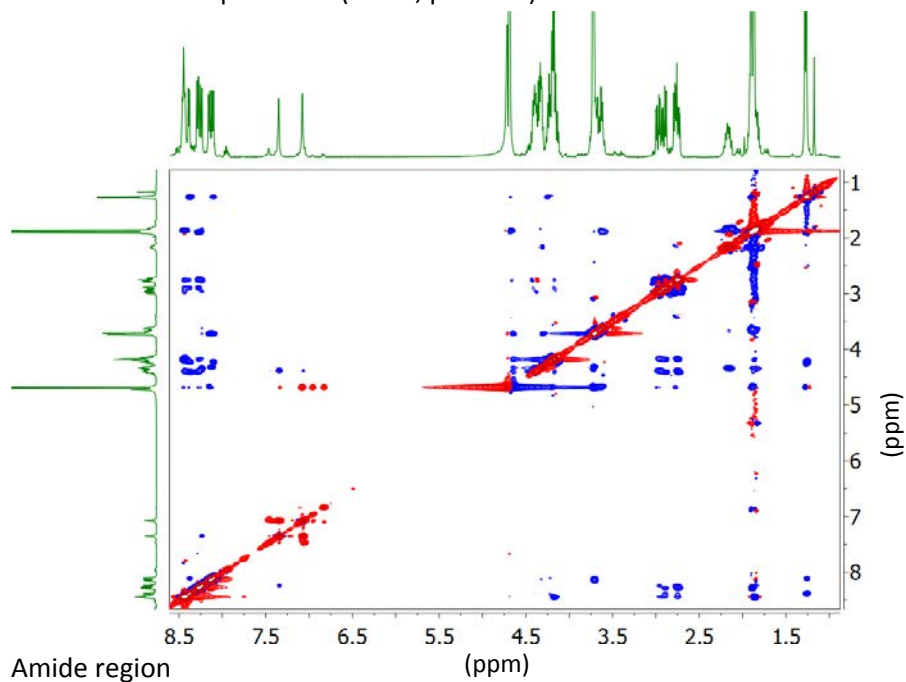
Compound 23



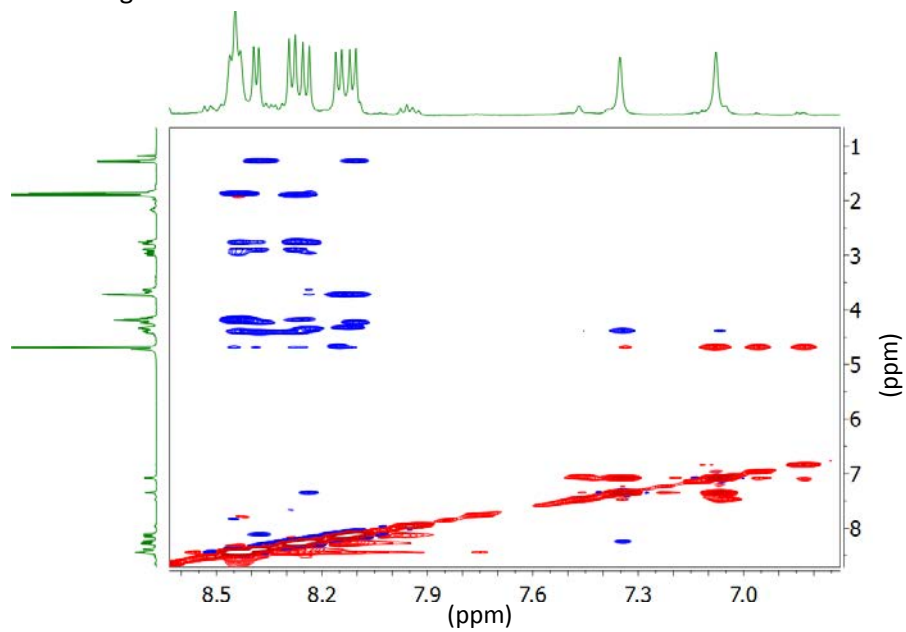


Compound 30

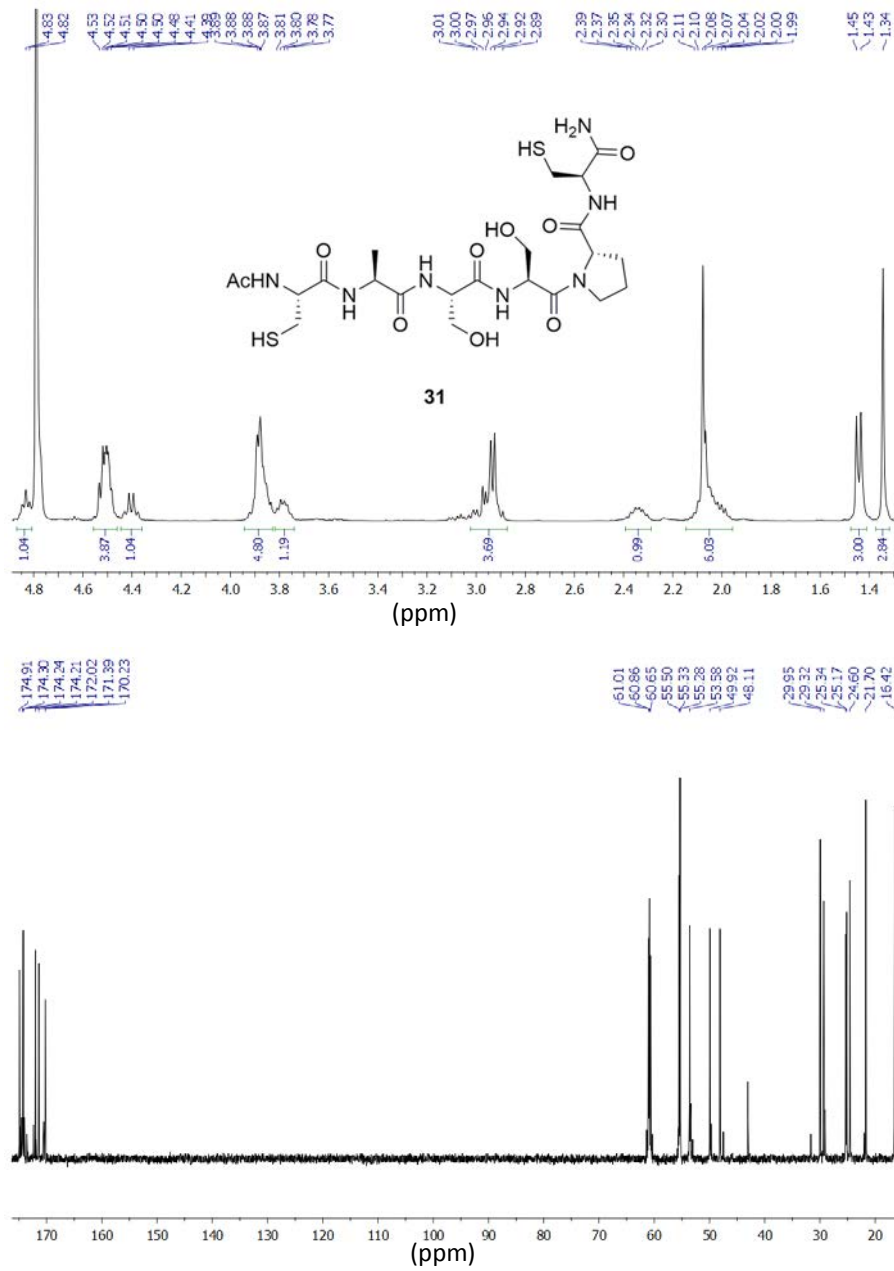


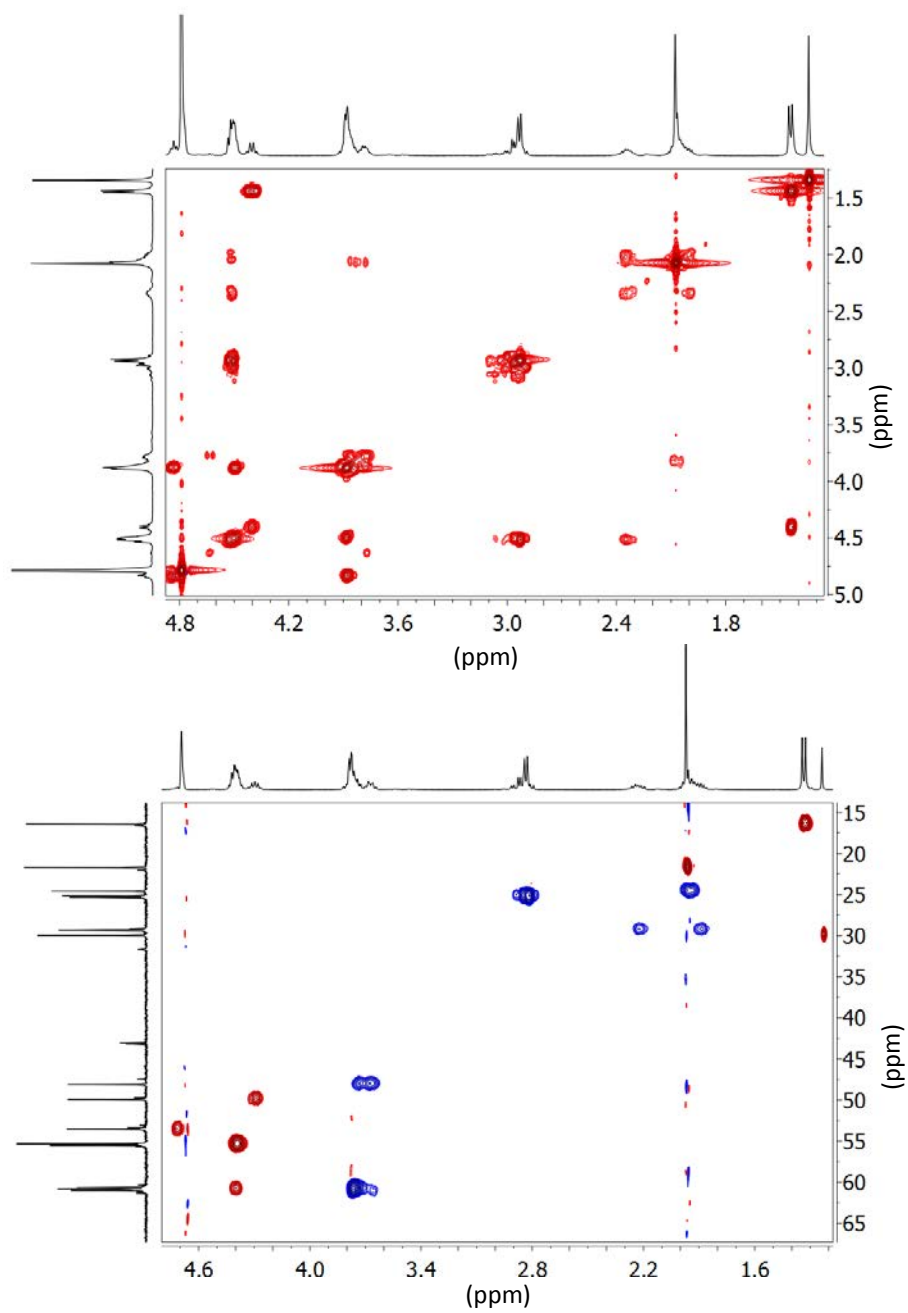
2D NOESY of compound **30** (298 K, pH = 5.2)

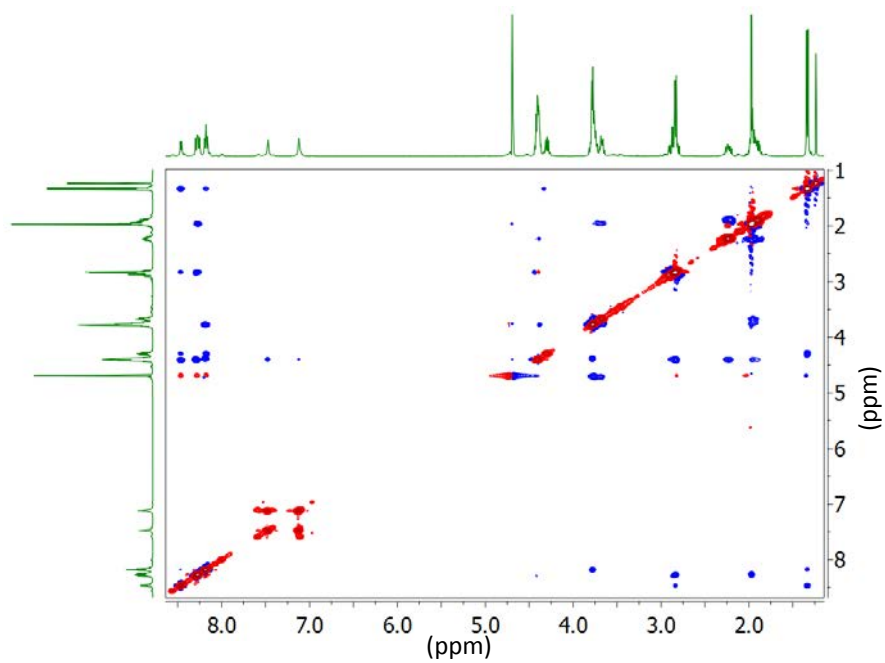
Amide region



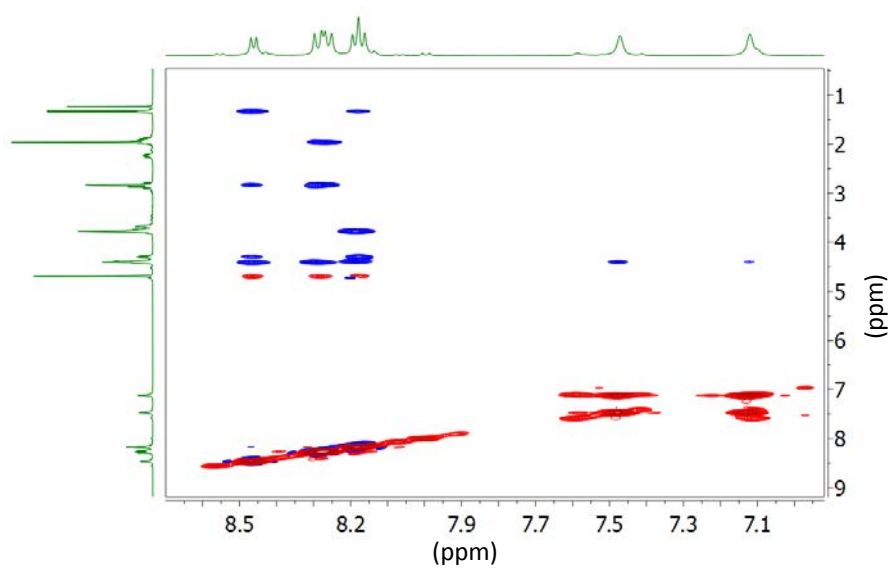
Compound 31



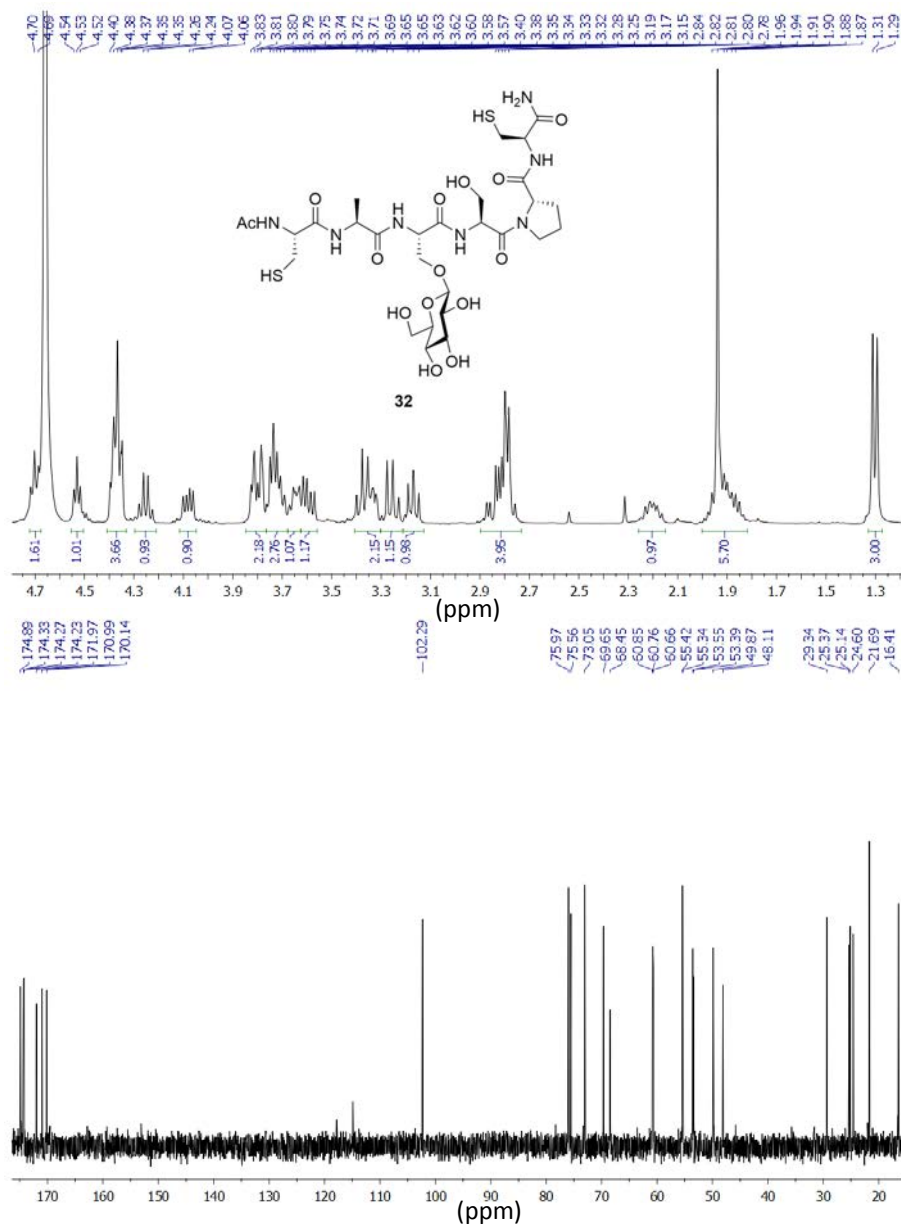


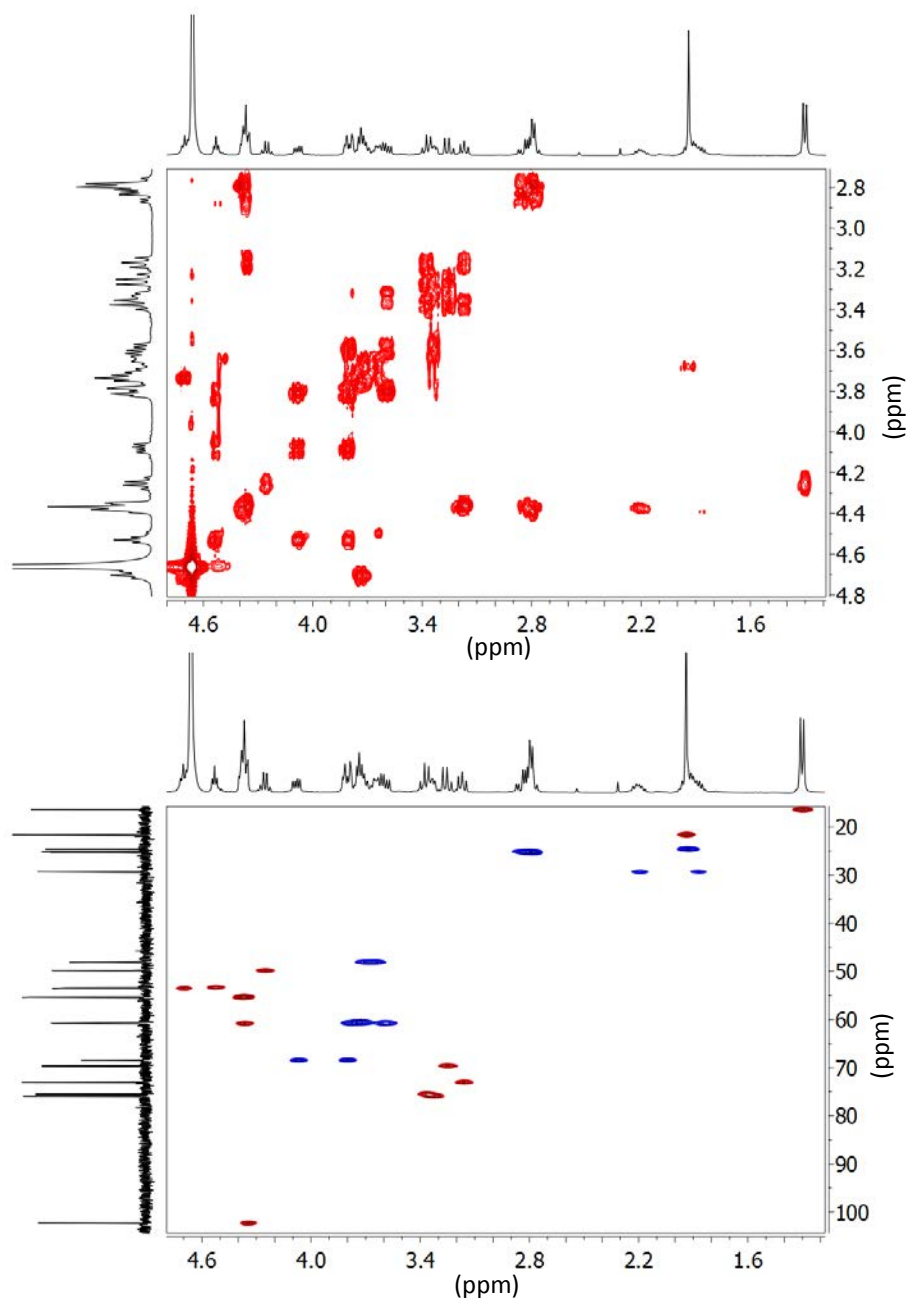
2D NOESY of compound **31** (298 K, pH = 5.1)

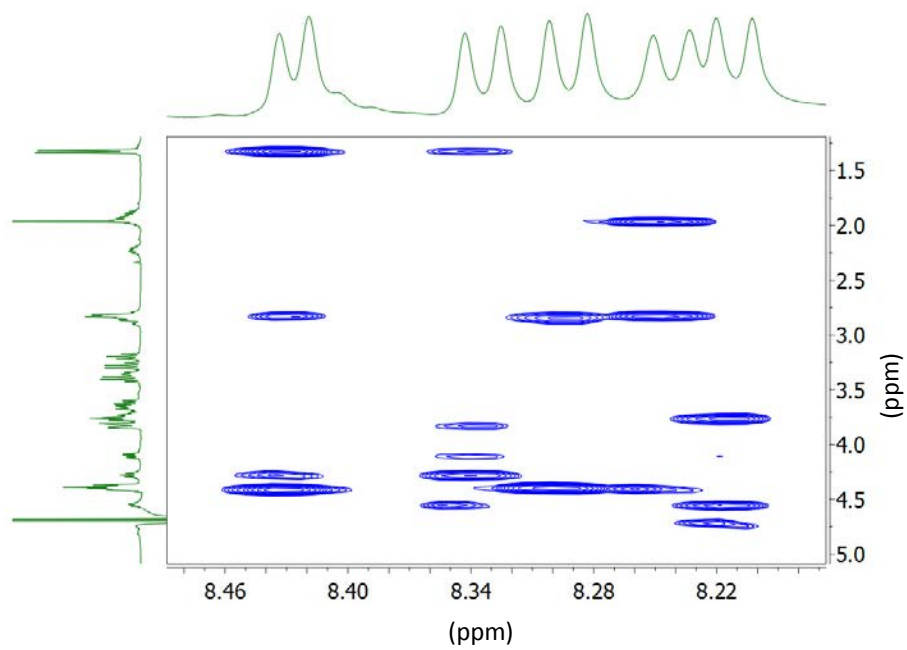
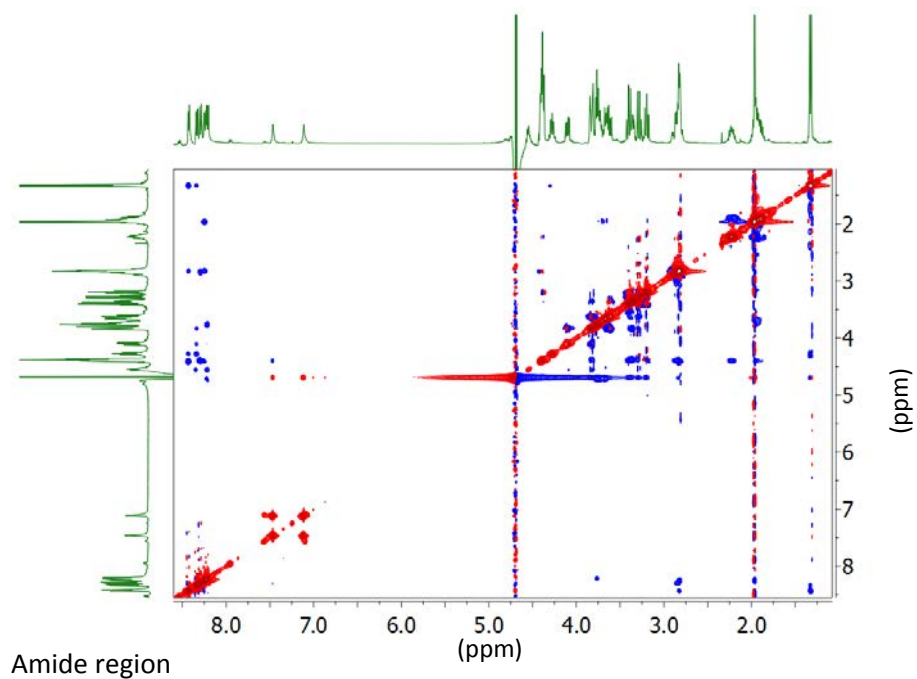
Amide region



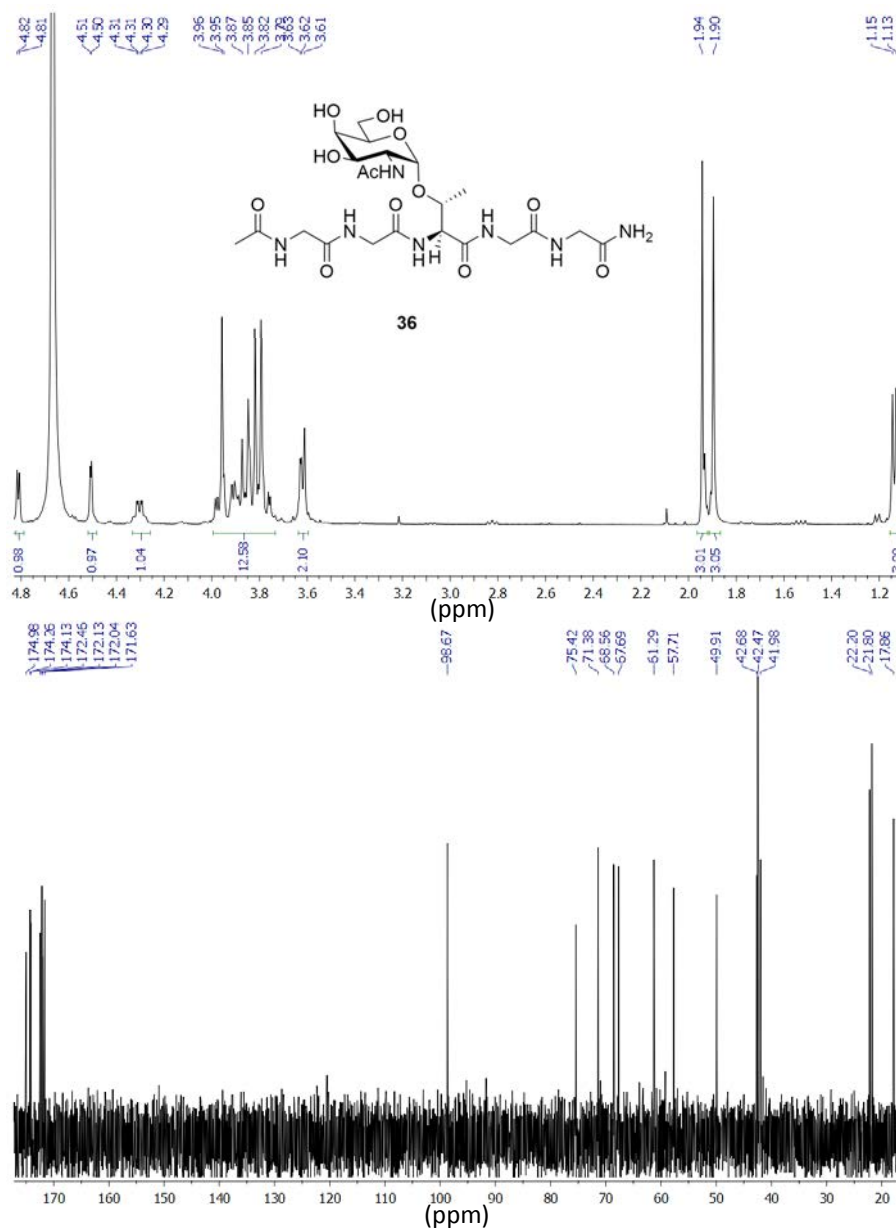
Compound 32

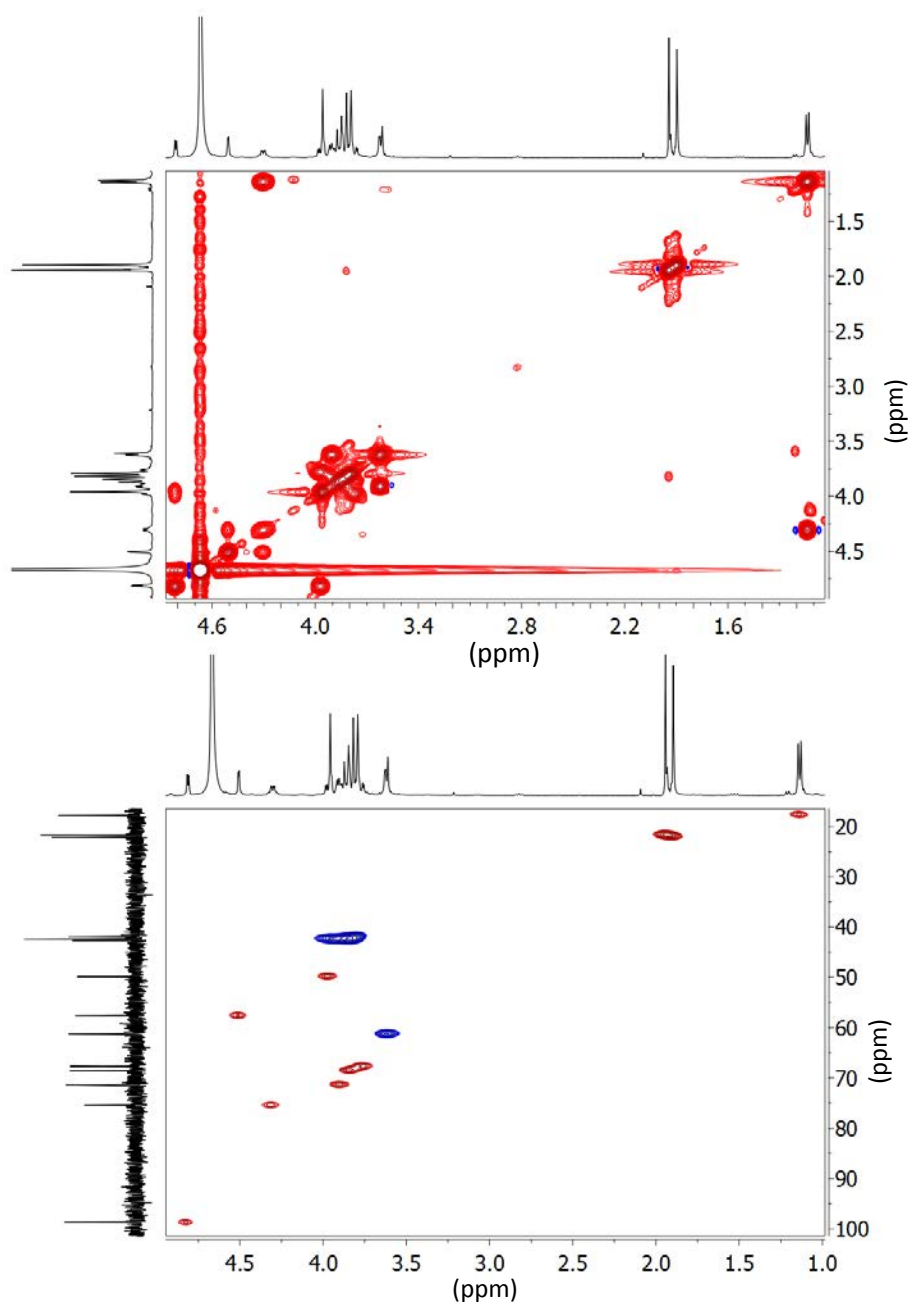




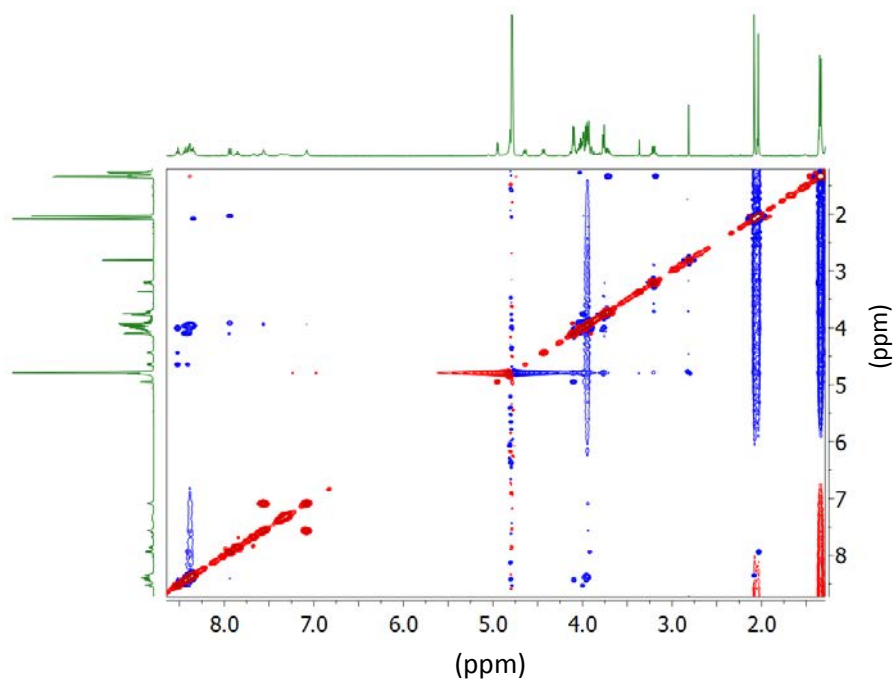
2D NOESY of compound **32** (298 K, pH = 5.4)

Compound 36

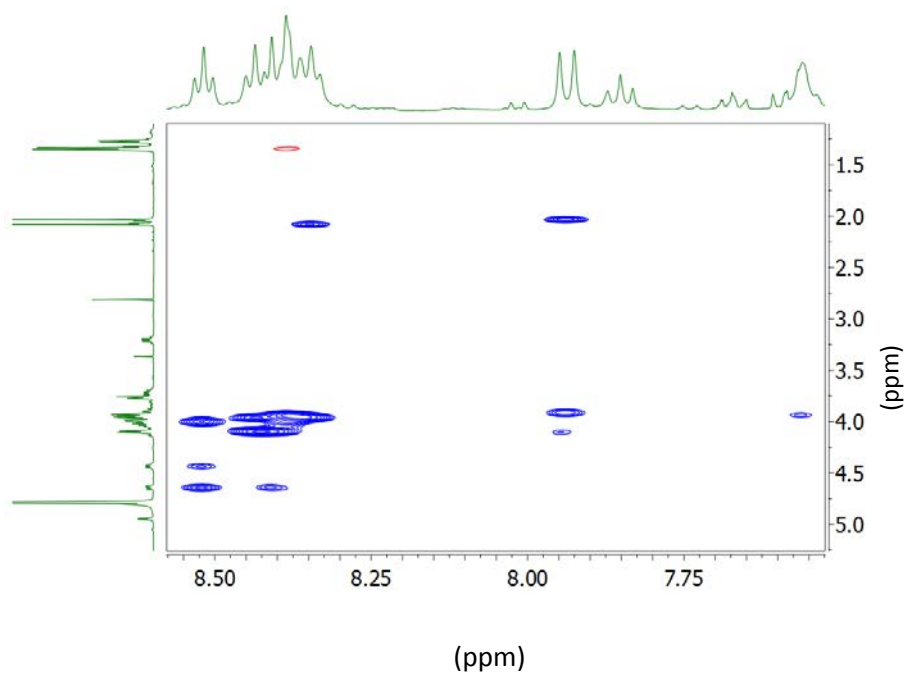




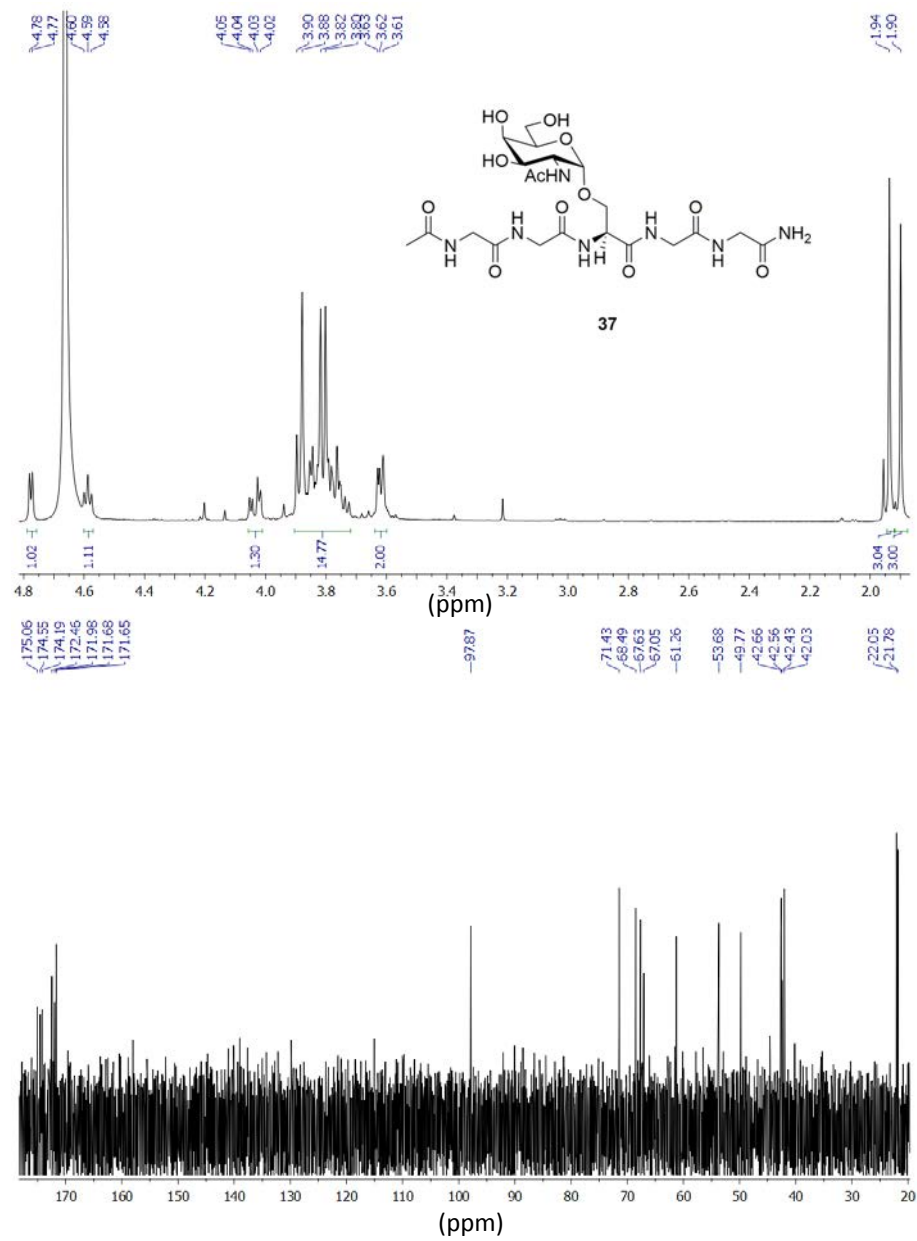
2D NOESY of compound **36** (298 K, pH = 5.1)

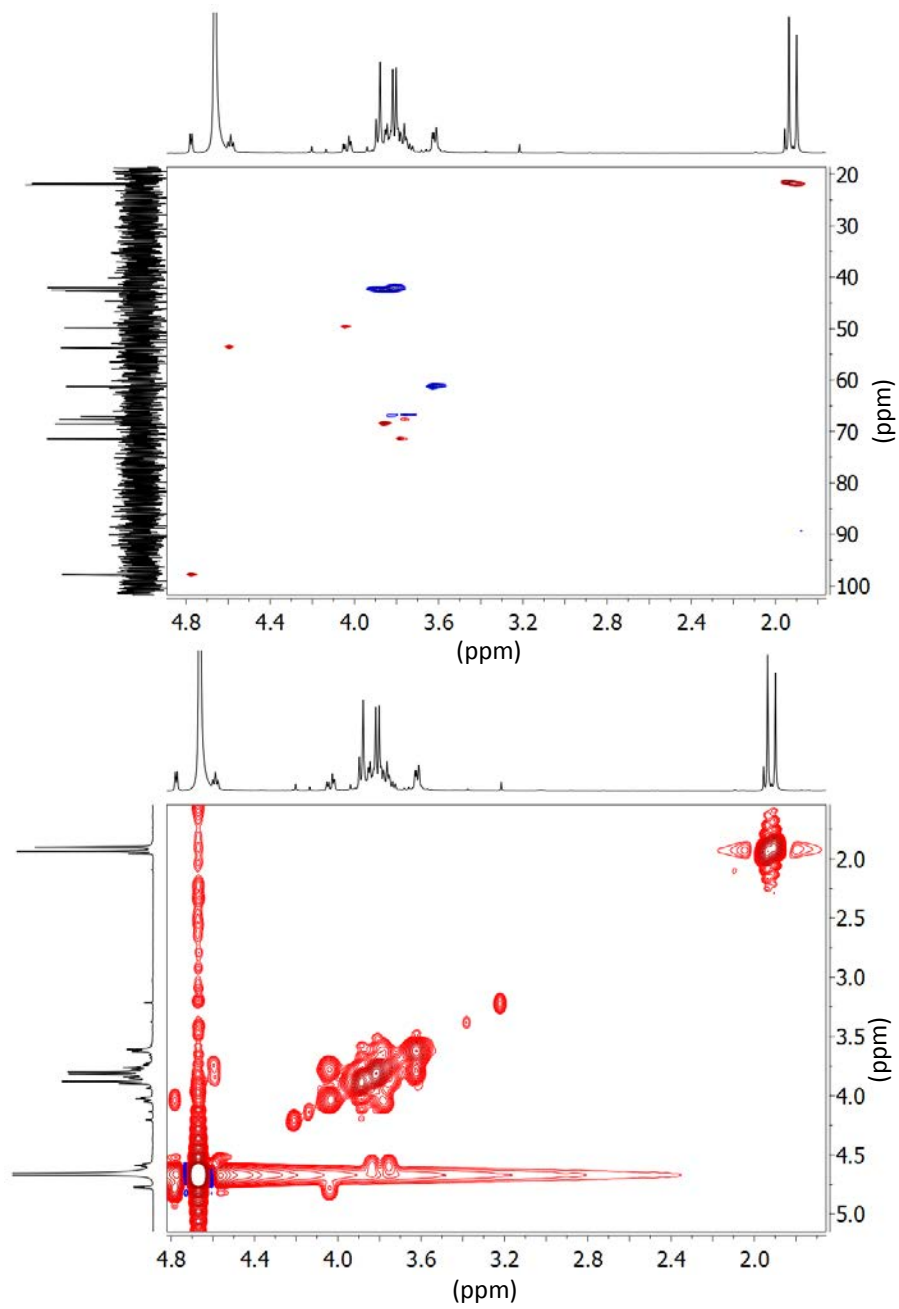


Amide region



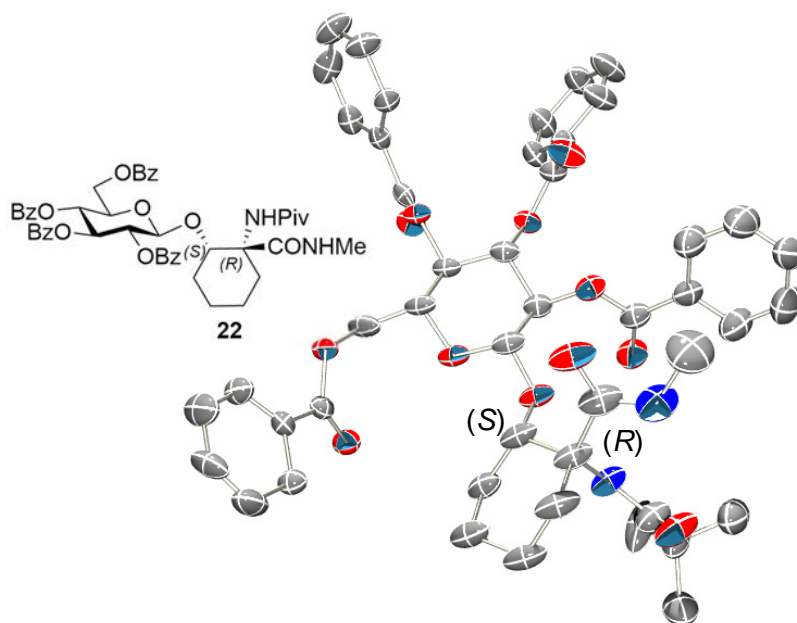
Compound 37



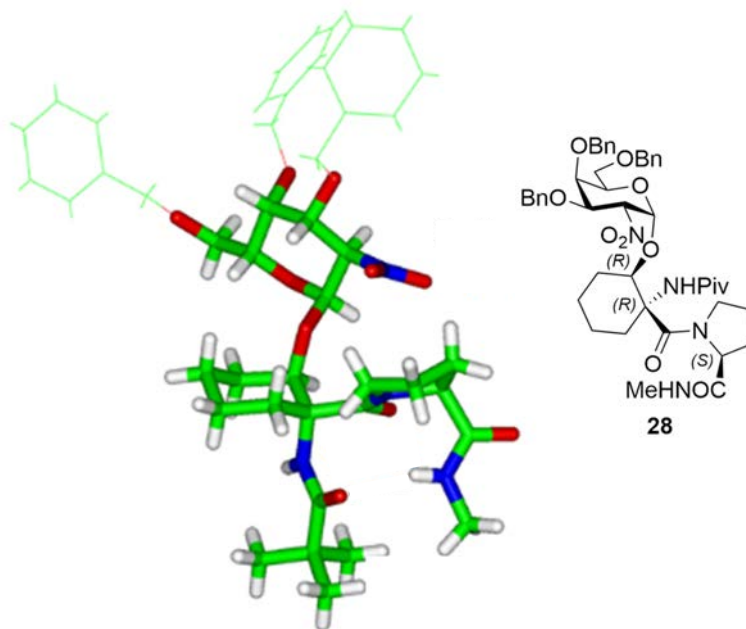


8.7. X-Ray diffraction

Molecular and crystal structure analysis of Piv-(*R,S*)-*c*₆Ser-[β -*O*-D-Glc(Bz₄)]-NHMe (**22**)



X-Ray diffraction analysis.^[5] Crystal data for compound **22**: C₄₇H₅₀N₂O₁₂, *M*_w = 834.89, colourless prism of 0.25 x 0.25 x 0.22 mm, *T* = 173 K, monoclinic, space group *P*2₁/*c*, *Z* = 2, *a* = 13.5848(4) Å, *b* = 11.7140(3) Å, *c* = 14.9527(4) Å, β = 112.8678(10)°, *V* = 2192.44(10) Å³, *d*_{calc} = 1.265 g cm⁻³, *F*(000) = 884, λ = 0.71073 Å (Mo, K α), μ = 0.091 mm⁻¹, Nonius kappa CCD diffractometer, θ range 3.43–28.15°, 18857 collected reflections, 9792 unique, full-matrix least-squares (SHELXL97),^[6] *R*₁ = 0.0535, ω *R*₂ = 0.1128, (*R*₁ = 0.0874, ω *R*₂ = 0.1302 all data), goodness of fit = 1.014, residual electron density between 0.23 and –0.245 e Å⁻³. Hydrogen atoms fitted at theoretical positions

Molecular and crystal structure analysis of compound **28**

X-Ray diffraction analysis.^[5] Crystal data for compound **28·Et₂O**: C₄₉H₆₈N₄O₁₁, $M_w = 889.08$, colourless prism of 0.27 x 0.15 x 0.12 mm, $T = 173$ K, monoclinic, space group $P2_1$, $Z = 2$, $a = 12.2297(6)$ Å, $b = 15.0023(8)$ Å, $c = 13.3856(5)$ Å, $\beta = 98.902(3)^\circ$, $V = 2426.3(2)$ Å³, $d_{\text{calc}} = 1.217$ g cm⁻³, $F(000) = 956$, $\lambda = 0.71073$ Å (Mo, K α), $\mu = 0.086$ mm⁻¹, Nonius kappa CCD diffractometer, θ range 2.05–28.08°, 21769 collected reflections, 5820 unique, full-matrix least-squares (SHELXL97),^[30] $R_1 = 0.0618$, $\omega R_2 = 0.0990$, ($R_1 = 0.1254$, $\omega R_2 = 0.1166$ all data), goodness of fit = 1.047, residual electron density between 0.293 and –0.179e Å⁻³. Hydrogen atoms fitted at theoretical positions.

8.8. References

- [1] A. Avenoza, C. Cativiela, J. H. Busto, M. A. Fernandez-Recio, J. M. Peregrina, F. Rodriguez, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 545–548.
- [2] A. Avenoza, J. I. Barriobero, C. Cativiela, M. A. Fernández-Recio, J. M. Peregrina, F. Rodríguez, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2745–2755.
- [3] Y. Huang, S. Dey, X. Zhang, F. Sönnichsen, P. Garner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4626–4640.
- [4] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem* **1979**, *57*, 1244–1251.
- [5] CCDC-846723 (compound **22**) and CCDC-854932 (compound **28**) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [6] G. M. Sheldrick, *University of Göttingen* **1997**.



9. Anexos

Anexo I. Síntesis de péptidos y glicopéptidos en fase sólida

Anexo II. Técnicas de RMN

Anexo III. Cálculos de dinámica molecular (DM)

Anexo IV. Microcalorimetrías

Anexo V. Bibliografía

La mayor parte de los anexos que se presentan a continuación son un extracto de la Tesis Doctoral de Nuria Martínez Sáez. Se han querido añadir para facilitar la lectura de este trabajo de investigación.

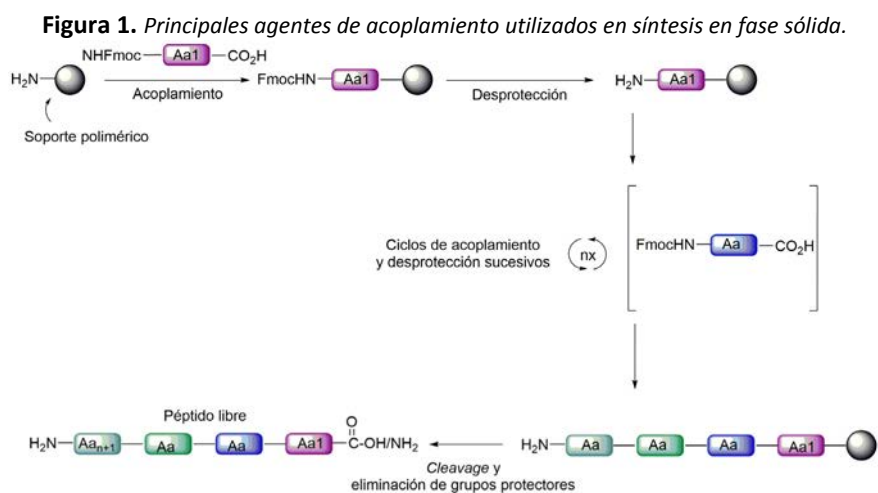
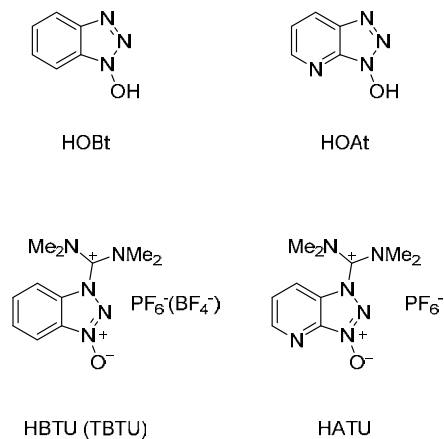
Anexo I. Síntesis de péptidos y glicopéptidos en fase sólida

Hasta principios de los años 60 la síntesis peptídica fue llevada a cabo en disolución, fue entonces cuando Merrifield^[1] describió por primera vez el concepto de síntesis en fase sólida. Desde entonces, dicha metodología ha ido ganando importancia a lo largo de las últimas décadas y en la actualidad es el método más utilizado para la síntesis de péptidos y proteínas en el laboratorio.

Mediante esta síntesis los aminoácidos permanecen unidos covalentemente a un soporte sólido insoluble, mientras se produce el crecimiento secuencial de la cadena peptídica. Una vez obtenida la secuencia, el péptido es liberado. El primer residuo que se acopla a dicho soporte, que suele ser una resina polimérica, lo hace mediante un enlace tipo éster o amida entre su grupo carbonilo y la resina. Posteriormente, la cadena peptídica va incrementándose desde el extremo del grupo carbonilo (C-terminal) al grupo amino (N-terminal) mediante la adición sucesiva de aminoácidos, los cuales presentan el grupo ácido libre, mientras que las cadenas laterales y el extremo amino se encuentran protegidos. Así, una vez que el primer residuo se encuentra unido a la resina, el grupo protector de su extremo amino es eliminado selectivamente. Posteriormente, se lleva a cabo el acoplamiento con el siguiente aminoácido N-prottegido. Dichos acoplamientos peptídicos se realizan utilizando exceso de aminoácido, el cual se encuentra previamente activado mediante agentes de acoplamiento (figura 1), que lo hacen susceptible de reaccionar con el amino libre de la cadena del péptido

creciente. Estos ciclos de acoplamiento y desprotección se repiten hasta obtener la secuencia deseada.

Una vez completada la secuencia peptídica, los grupos protectores de las cadenas laterales son eliminados, generalmente, al mismo tiempo que se produce el *cleavage* o liberación del péptido del soporte sólido (esquema 1).



Esquema 1.

Las principales ventajas de esta metodología frente a la síntesis en disolución son las siguientes:

- El rendimiento obtenido es muy elevado, debido a que se utiliza un exceso de aminoácido. Además, los acoplamientos están optimizados por sofisticados agentes de acoplamiento y desprotección.
 - No es necesario llevar a cabo purificaciones de los productos intermedios, ya que éstas se reducen a procesos de lavado y filtrado de la resina. Así, el exceso, tanto del aminoácido como de los reactivos, se separa de los productos unidos a la resina de una manera sencilla y rápida.
 - Se evitan posibles problemas de solubilidad, como los que podemos encontrar en la síntesis en disolución a medida que se va incrementando la cadena peptídica, ya que los intermedios se encuentran unidos a la resina.
- Esta metodología es idónea para su automatización, incrementando la velocidad de los procesos sintéticos. Por ello, se han diseñado sintetizadores peptídicos automáticos, lo cual ha permitido un gran desarrollo de esta técnica, haciéndola más predecible y reproducible.

A pesar del gran desarrollo de esta técnica, existen algunos inconvenientes derivados de este tipo de síntesis. Ejemplos de esto son las diversas reacciones laterales^[7-12] que pueden producirse durante la síntesis o el *cleavage* (liberación de la resina) del péptido, la desprotección parcial del grupo amino^[13,14] y también es frecuente la obtención de péptidos de baja pureza y en ocasiones con fallos en la obtención de su secuencia peptídica,^[15] especialmente cuando los péptidos comienzan a tener un gran número de aminoácidos. Ello suele ser debido al impedimento estérico y la formación de agregaciones intra- e intermoleculares.

Por ello, en los últimos años se ha trabajado mucho para mejorar los problemas derivados de esta metodología. Se han ido introduciendo pequeñas modificaciones para minimizar las posibles reacciones laterales, dedicándose grandes esfuerzos para mejorar tanto los grupos protectores^[16] como los métodos de activación de los diferentes aminoácidos.^[17] En este sentido, han aparecido nuevos y más sofisticados soportes sólidos^[18] y se han automatizado protocolos.^[19]

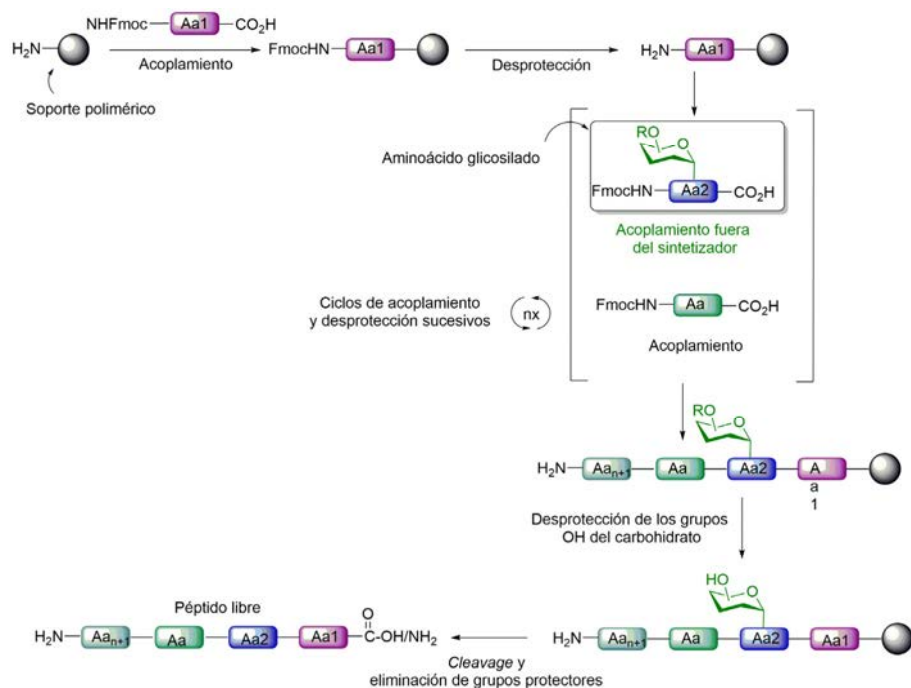
Por ejemplo, calentar la mezcla de reacción ha emergido como un parámetro adicional en la síntesis en fase sólida con el fin de reducir dichas agregaciones; además de reducir los tiempos de acoplamiento y mejorar la eficacia de los acoplamientos. De hecho, durante los años 90 cuando comenzó a extenderse el uso de la tecnología microondas para calentar las reacciones en síntesis orgánica como un nuevo parámetro para mejorar tanto la velocidad como el rendimiento de las reacciones. En este sentido, comenzaron a fabricarse instrumentos de tecnología microondas destinados específicamente a la síntesis orgánica. Erdély and Gogoll demostraron que este tipo de reactores microondas podían ser utilizados para mejorar la velocidad y pureza en la síntesis en fase sólida sin dañar el soporte sólido.^[20] Posteriormente, ha quedado demostrado que la velocidad tanto de los acoplamientos como de las *N*-desprotecciones, así como la pureza de los productos finales ha mejorado notablemente respecto a la síntesis en fase sólida convencional.^[21] De este modo, aplicando microondas se ha conseguido obtener péptidos y proteínas de hasta 109 aminoácidos.

Generalmente, esta técnica usa temperaturas para los acoplamientos entre 50-80 °C, excepto para aminoácidos que presenten riesgos de epimerización, con los cuales se trabaja con temperaturas por debajo de 50 °C. Los agentes

de acoplamiento que se utilizan son los mismos que en síntesis en fase sólida convencional. Sin embargo, es necesario una mayor precaución durante la *N*-desprotección cuando se calienta con microondas, ya que puede darse epimerización, formación de aspartimida, β -eliminación u otras reacciones laterales no deseadas.^[22]

Síntesis de glicopéptidos:

La síntesis de *O*-glicopéptidos puede ser llevada a cabo utilizando las mismas técnicas que se utilizan en la síntesis en fase sólida, de hecho esta metodología es la estrategia más utilizada y fiable en este tipo de moléculas. En el esquema 2 se muestra la estrategia utilizada para la incorporación del correspondiente glicosilaminoácido en la cadena peptídica mediante la síntesis en fase sólida. El procedimiento más habitual es la formación del enlace *O*-glicosídico entre el carbohidrato y el grupo hidroxilo de la Ser o la Thr seguida de su incorporación a la cadena peptídica creciente.



Esquema 2.

Habitualmente este procedimiento se lleva a cabo fuera del sintetizador, con el fin de minimizar el número de equivalentes de *building block* y aumentando los tiempos de reacción.

Esta estrategia requiere rutas efectivas de glicosilación de los aminoácidos que serán utilizados como *building blocks*. La síntesis de los *building blocks* necesarios para la utilización de la estrategia Boc ha sido optimizada con éxito.^[23] Sin embargo, el tratamiento repetido con TFA para las desprotecciones, seguido del uso de fluoruro de hidrogeno para la liberación del péptido de la resina, conduce a una pérdida de una pequeña fracción de carbohidrato. En cambio, los aminoácidos protegidos con Fmoc/*tert*-Bu proporcionan una ruta más sencilla para la síntesis de *O*-glicopéptidos. Este

método es más suave, demostrándose que bases como la piperidina y la DBU no causan β -eliminación^[24] o epimerización de los estereocentros de la serina y treonina glicosiladas del péptido durante la desprotección del Fmoc.

Los grupos hidroxilo del carbohidrato suelen estar protegidos como acetatos o benzoatos. Una vez que la síntesis del glicopéptido ha terminado, estos ésteres se hidrolizan en condiciones básicas. La hidrólisis de los acetatos suele ser un proceso más fácil, sin reacciones laterales,^[25,26] mientras que la de los benzoatos requiere una mayor concentración de base, pudiendo dar lugar a productos no deseados.

Actualmente, la síntesis del *building block*, mediante la *O*-glicosilación de aminoácidos protegidos con Fmoc, y su posterior incorporación en la secuencia peptídica, usando la síntesis en fase sólida, supone la ruta más eficiente para la preparación de *O*-glicopéptidos. Además, esta síntesis puede ser llevada a cabo igualmente utilizando la tecnología microondas.^[27,28]

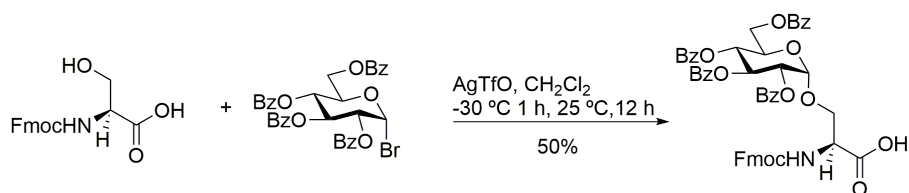
En cuanto a la formación del enlace glicosídico, para la obtención de los *building blocks* existen diversas metodologías.^[29-33] A continuación, se describirán algunas de las metodologías más habituales para la formación del enlace β -*O*-glicosídico, con glucosa.

Metodología de Koenigs-Knorr

El método Koenigs-Knorr es uno de los procedimientos más antiguos de glicosilación.^[34] Se basa en el empleo de haluros derivados de carbohidratos, como grupos dadores, y del alcohol correspondiente, como grupo aceptor. Existen diversas variaciones de esta metodología, pudiendo obtenerse

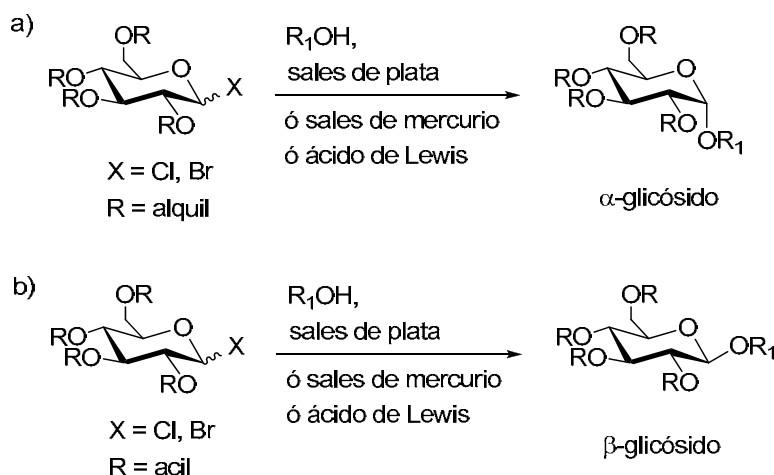
aminoácidos α o β glicosilados en función de los grupos protectores y reactivos utilizados.

Una modificación de esta metodología se ha utilizado en la presente Tesis para la obtención mayoritaria del anómero β .^[35] Dicha metodología emplea bromuros de glicopiranosilo y sales de plata para la síntesis de los correspondientes glicopéptidos, se utilizó por su sencillez desde el punto de vista metodológico (Esquema 3).



Esquema 3.

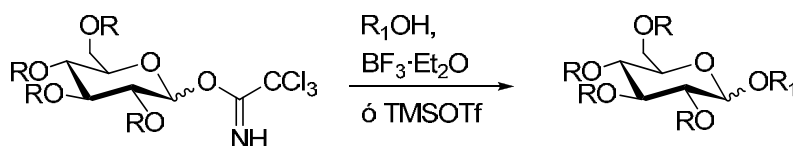
Conviene destacar que utilizando esta metodología, como en la mayoría de las reacciones de glicosilación, la estereoquímica resultante en el centro anomérico viene determinada por la naturaleza del sustituyente en el C2. Cuando el oxígeno unido al C2 está protegido con un grupo alquilo o bencilo el efecto anomérico es el que domina y se forma preferentemente el anómero α (esquema 4a). La misma configuración se obtiene con “2-desoxiglicosiladores”. Sin embargo, cuando la posición C2 está ocupada por un grupo como un éster (esquema 4b), un feniltio, o un grupo fenilseleno, la estereoquímica obtenida (α o β) es la contraria a la del sustituyente en C2 y el producto formado es el *1,2-trans*.^[36] Esto es debido a la ayuda anquimérica que ofrece el grupo en el C2.



Esquema 4.

Método del tricloroacetimidato

Las síntesis de glicósidos basadas en imidatos *O*-glicosilados, especialmente tricloroacetimidatos (denominada a menudo “glicosidación de Schmidt”), es probablemente una de las estrategias sintéticas desarrolladas hasta la fecha más populares. Este procedimiento de glicosilación a través del intermedio tricloroacetimidato (esquema 5), introducido por Schmidt y col.^[37] en 1980, es un método muy potente y ha sido ampliamente utilizado en la síntesis de moléculas complejas.



Esquema 5.

Estos tricloroacetimidatos *O*-glicosilados muestran unas excelentes propiedades como dadores en términos de facilidad de preparación,

reactividad y aplicabilidad general. Normalmente, se obtienen buenos rendimientos y una alta estereoselectividad en los productos de reacción. La configuración del centro anomérico en el glicósido resultante viene determinada por la configuración anomérica del tricloroacetimidato *O*-glicosilado (inversión o retención), la asistencia anquimérica, la influencia del disolvente y/o efectos termodinámicos o cinéticos. Estos compuestos pueden prepararse fácilmente mediante la adición, catalizada por base, del grupo hidroxilo anomérico a Cl_3CCN en presencia de una base inorgánica (NaH) u orgánica (DBU). Estos “glicosil-dadores” se activan mediante ácidos, normalmente ácidos de Lewis, siendo $\text{TMSOTf}^{[38]}$ y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}^{[37]}$ los catalizadores más comúnmente usados. También se investigó AgOTf y resultó ser un catalizador suave y en algunos casos más eficiente, sobre todo en las reacciones de glicosidación sensibles a TMSOTf.^[39]

Anexo II. Técnicas de RMN

Los estudios estructurales de RMN en glicoproteínas constan, en general, de tres fases. La primera es la adquisición de espectros; la segunda consiste en la asignación y extracción de información estructural útil y la tercera consiste en el “modelado” de la molécula, de acuerdo con la información experimental. Estas tres etapas no son totalmente independientes. Así, a veces puede ser necesario realizar cálculos preliminares para ayudar en la asignación, o adquirir experimentos en diferentes condiciones para discernir alguna restricción que puede resultar clave en el cálculo de la/s estructura/s. Las principales fuentes de información estructural de las que disponemos con la técnica de RMN son las medidas de efecto nuclear Overhauser (NOE),^[40] las constantes de acoplamiento escalar (3J), tanto homo- como

heteronucleares,^[41-43] y los desplazamientos químicos (δ). Los valores de todos estos parámetros obtenidos del espectro son resultado del promedio de todas las posibles conformaciones presentes en disolución.

La principal fuente de información estructural en esta Tesis viene dada por las distancias obtenidas de los espectros de NOE.^[40] La intensidad del NOE entre dos protones está relacionada con la distancia promedio que los separa. En general, los protones situados a más de 5 Å de distancia proporcionan una señal demasiado débil para ser observada. En este trabajo se llevaron a cabo experimentos 2D-NOESY en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1) para poder obtener las distancias interprotónicas en las que están involucrados los protones de las amidas. La manera de obtener las distancias en los 1D-NOESY es a partir de las curvas de crecimiento NOE, que representan los valores de NOE para dos protones a distintos tiempos de mezcla. Estas curvas están relacionadas con las correspondientes distancias interprotónicas,^[44] aplicando la aproximación de espines aislados (ISPA, del Inglés: Isolated Spin-Pair Approximation). Por otro lado, el método para obtener las distancias en un 2D-NOESY es semicuantitativo, por integración de los correspondientes picos de cruce en el espectro. De este manera, obtenemos una gran cantidad de distancias promedio interprotónicas, importantes para elucidar la estructura del compuesto.

Patrones NOE característicos

Sin duda alguna, los NOEs secuenciales, es decir NOEs entre los protones de aminoácidos unidos directamente en la secuencia peptídica, son claves en el análisis estructural de péptidos y proteínas. De hecho, la observación de NOEs NH(*i*), H α (*i*) es característico de conformaciones plegadas tipo hélice α .

Por el contrario, la presencia de un NOE intenso $\text{NH}(i)$, $\text{H}\alpha(i+1)$, junto con la ausencia de NOE $\text{NH}(i)$, $\text{NH}(i+1)$, sugiere la existencia de conformaciones extendidas tipo lámina β .^[45] En la figura 2 se recogen algunos de los NOEs relevantes para el análisis conformacional de péptidos.

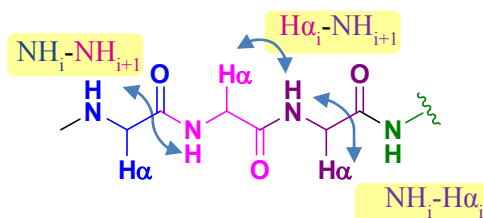


Figura 2. NOEs relevantes en el análisis estructural de péptidos y proteínas.

Como ya se ha comentado, los datos de RMN representan un *promedio* de todas las conformaciones presentes en disolución. En estos casos no existe un procedimiento sencillo para determinar sus geometrías y sus poblaciones relativas. De hecho, la interpretación directa de NOEs en moléculas flexibles puede conducir a la determinación de conformaciones virtuales de alta energía.^[46] En este caso es necesaria la utilización de cálculos computacionales para explicar correctamente los datos experimentales provenientes de RMN. En este sentido, la Dinámica Molecular (*MD*), y en particular, la *MD* con restricciones promediadas en el tiempo (*MD-tar*, del Inglés *molecular dynamics simulations with time-averaged restraints*) permite introducir *flexibilidad* a la hora de interpretar los datos experimentales, por lo que ha sido empleada con éxito en numerosos estudios conformacionales.^[47,48] A continuación, en el anexo III se describen las características generales de la *MD*.

Anexo III. Cálculos de Dinámica molecular (*MD*)

La *MD* es una herramienta para el estudio teórico de propiedades dinámicas de las moléculas que ha tenido un gran desarrollo en el ámbito de las biomoléculas durante la década de los 80. Al igual que en mecánica molecular (*MM*), los átomos se consideran esferas rígidas con una carga puntual centrada y los enlaces como muelles. De esta forma, el orden de enlace está relacionado con una constante elástica (figura 3).^[49-51]

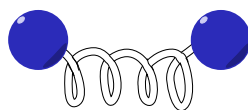


Figura 3. En *MM* y *MD* los átomos son considerados como esferas y los enlaces como muelles.

Uno de los aspectos más importantes en este tipo de cálculos es el llamado campo de fuerzas. Éste está formado por las ecuaciones matemáticas que describen la energía del sistema en función de las coordenadas atómicas y por un conjunto de parámetros necesarios para describir de forma correcta dicha energía (figura 4). Los parámetros se obtienen de datos experimentales (rayos X, IR...) o bien de cálculos *ab initio*.

$$\text{Energía}(E) = E_{\text{términos enlazantes}} + E_{\text{términos no enlazantes}}$$

$$\begin{aligned} \text{Energía}(E) &= \sum_{\text{enlaces}} K_{\text{enlace}} (r - r_o)^2 && \mathbf{E}_{\text{enlaces}} \\ &+ \sum_{\text{ángulos}} K_{\text{ángulo}} (\theta - \theta_o)^2 && \mathbf{E}_{\text{ángulos}} \\ &+ \sum_{\text{diedros}} \frac{E'}{2} (1 + \cos n\varphi - \gamma) && \mathbf{E}_{\text{diedros}} \\ &+ \sum_{m,n} \frac{q_m q_n}{\varepsilon(r_{mn})r_{mn}} && \mathbf{E}_{\text{electrostatica}} \\ &+ \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) && \mathbf{E}_{\text{vanderWaals}} \end{aligned}$$

Figura 4. Ecuación general de un campo de fuerzas.

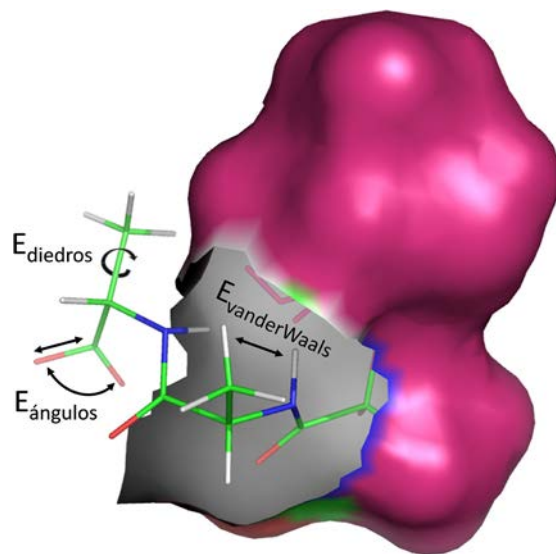


Figura 5. Representación de algunas de las energías del campo de fuerzas.

La misión del campo de fuerzas es deducir la estructura de un amplio conjunto de moléculas a partir de los datos empíricos de que dispone (parámetros). Es, por tanto, muy importante que el campo de fuerzas elegido disponga de parámetros adecuados para la molécula en cuestión. En nuestro caso, se usará el campo de fuerzas AMBER,^[52] ya que posee los parámetros adecuados para simular correctamente el comportamiento conformacional de péptidos y proteínas. Además, para modelar la parte carbohidrato de los glicopéptidos, el campo de fuerzas AMBER se complementa con el GLYCAM-06.^[53]

El método de *MD* consiste en resolver la ecuación de movimiento de Newton para un sistema de partículas. En este caso, la fuerza viene dada por el gradiente de la energía potencial del sistema con respecto a las coordenadas atómicas ($F_i = \delta E / \delta x_i$).

Los cálculos de *MD* suelen hacerse a temperatura constante y presión constante. En cuanto al tratamiento del disolvente, en los métodos de *MD* existen diversas aproximaciones. Éstas van desde considerarlo simplemente como una constante dieléctrica, usar un modelo de disolvente continuo^[54] o incluir explícitamente las moléculas de disolvente.^[55]

Cabe destacar que los cálculos de *MD* identifican bastante bien las conformaciones de baja energía para una molécula dada, pero éstos generalmente fallan a la hora de predecir sus poblaciones relativas, en especial cuando se emplea el campo de fuerzas AMBER, que tiende a sobreestimar la estructura α -hélice para péptidos pequeños.^[56,57]

Para mejorar los resultados obtenidos con este método es conveniente introducir los datos experimentales de los que disponemos como restricciones promediadas en el tiempo (*MD-tar*),^[58,59] con el objetivo de

obtener una distribución de conformeros de baja energía capaces de reproducir de forma cuantitativa los datos de RMN. Así, este procedimiento elimina las limitaciones inherentes a ambas técnicas y proporciona un camino para estudiar la flexibilidad de pequeñas moléculas mediante la interpretación de los datos de RMN.

Las restricciones estructurales (generalmente distancias H-H y constantes de acoplamiento 3J) se introducen en la ecuación del campo de fuerzas utilizado en MD para forzar al sistema a ajustarse a estas propiedades, a saltar barreras de potencial y a explorar más eficientemente el espacio conformacional. Así, la nueva función de potencial consta de dos partes.

$$E_{Total} = V_{teorico} + V_{experimental}$$

La primera parte, $V_{teórico}$, es el potencial habitual del campo de fuerzas, mientras que $V_{experimental}$ es un potencial que representa la información experimental que se pretende ajustar y que contiene las distintas restricciones. Este potencial es del tipo:

$$V_{rest} = K_{rest} \cdot (R_{ij} - R_{experimental})^2$$

cuya función es obligar a la estructura a satisfacer una distancia determinada ($R_{experimental}$), mediante una penalización energética. Si queremos que las restricciones sean satisfechas no por una única estructura, sino por todas las integrantes de una trayectoria dinámica en *promedio*, bastaría por sustituir la ecuación anterior por:

$$V_{rest} = K_{rest} \cdot (\langle R_{ij} \rangle - R_{experimental})^2$$

Dado que los NOEs dependen no de $\langle R \rangle$ sino de $\langle R^{-6} \rangle$, la expresión correcta para una distancia *promediada* en el tiempo sería:

$$E_{rest} = K_{rest} \cdot \left(\langle R_{ij}^{-6} \rangle^{-1/6} - R_{\text{experimental}} \right)^2$$

$$\langle R_{ij}^{-6} \rangle^{-1/6} = \frac{\left(\sum_0^t R(t)^{-6} \right)^{-1/6}}{N}$$

En esta expresión:

donde N es el número total de *frames* en la trayectoria. Un *frame* en MD es la congelación de una conformación particular, a un tiempo dado, del conjunto de conformaciones que componen la dinámica completa.

Experimentalmente se ha visto que esta última expresión para una distancia promediada en el tiempo, tiene la desventaja de requerir tiempos de simulación excesivamente largos para garantizar que nuestras restricciones se satisfacen en *promedio* por todo el conjunto de estructuras representativo de la trayectoria. Con objeto de reducir los tiempos de simulación, la expresión utilizada para el *promedio* de distancias es en realidad:

$$\langle R_{ij}^{-6} \rangle^{-1/6} = \frac{\left(\sum_0^t R(t)^{-6} \cdot e^{(t-t')/\tau} \right)^{-1/6}}{N}$$

En esta última expresión, la constante τ que aparece en la función exponencial es un parámetro ajustable empíricamente, con objeto de garantizar una rápida convergencia de las distancias promedio a los valores experimentales.

Ecuaciones similares pueden deducirse para las restricciones de constantes de acoplamiento $^3J_{H,H}$ promediadas en el tiempo (aunque, como es lógico, en este caso el promediado es lineal).

Por tanto, la introducción de restricciones promediadas en el tiempo tiene en cuenta el hecho de que las restricciones de RMN representan un *promedio*

entre distintas conformaciones. De esta manera, el sistema no tiene que satisfacer todas las restricciones simultáneamente en cada instante de la trayectoria, sino que es el conjunto de estructuras el que lo hace.

Anexo IV. Microcalorimetrías

Conocidas también como Calorimetría Isoterma de Titulación o ITC (de sus siglas en inglés Isothermal Titration Calorimetry). Es una técnica usada para calcular de manera directa los parámetros termodinámicos de una interacción en disolución. En la mayoría de los casos, se usa para estudiar la unión de pequeñas moléculas (ligandos) con macromoléculas como por ejemplo glicoproteínas.^[60]

Los parámetros termodinámicos que podemos medir con esta técnica son la constante de afinidad (K_a) (es importante destacar que en realidad se calcula la constante de disociación K_d), los cambios de entalpía (ΔH), así como la estequiometría de la interacción (n), es decir el número de ligandos que se unen a cada glicoproteína. Además con estas medidas, también podemos calcular las variaciones en los valores de la energía libre de Gibbs (ΔG) y de la entropía (ΔS), usando la siguiente ecuación: $\Delta G = RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S$ (donde R es la constante de los gases ideales y T es la temperatura absoluta)

Instrumental

Un equipo para llevar a cabo microcalorimetrías está compuesto de dos celdas idénticas que están hechas de un material con una alta eficacia para conducir el calor y que además es químicamente inerte, por ejemplo oro. Estas celdas se encuentran rodeadas por una camisa adiabática.^[61] Otro componente son los circuitos, se utilizan circuitos termopila/termopar para

detectar las diferencias de temperatura entre las celdas, una tiene agua o buffer y la otra la macromolécula. Antes de añadir el ligando, se aplica una potencia constante (menor de 1 mW). De esta manera, un circuito de retroalimentación activa un calentador en la celda que contiene la muestra y también en la celda de referencia. Durante el experimento, el ligando se valora en la celda de la muestra (receptor) en alícuotas con concentraciones perfectamente conocidas. Cuando la interacción entre las dos moléculas (ligando-receptor) se produce podemos medir si la variación de calor es positiva o negativa, dependiendo de la naturaleza de la interacción. Las medidas se realiza directamente sobre la potencia de entrada, es decir, el microcalorímetro mantiene la temperatura constante en ambas celdas, por lo tanto, si el proceso es exotérmico, la temperatura en la celda aumentará y entonces el circuito debe disminuir la potencia para que se mantenga la igualdad de temperatura entre ambas celdas. Si por el contrario el proceso es endotérmico, la potencia que se aplica debe aumentar.

Las medidas se representan como la potencia necesaria para mantener la misma temperatura en ambas celdas con respecto al tiempo. Como resultado, los datos experimentales consisten en una serie de picos de flujo de calor (que está relacionada con la potencia), y cada uno de ellos corresponde a una adición de ligando. Estos adiciones o pulsos ocurren durante un tiempo, al final se obtiene una cantidad total de calor intercambiada por cada alícuota de ligando.

Del patrón de estos efectos de calor, representado como una función de la proporción molar $[\text{ligando}]/[\text{macromolécula}]$, se extraen los parámetros termodinámicos de la interacción que se está estudiando.

Estudio de microcalorimetría realizado en la presente tesis doctoral

En esta tesis en particular, se ha empleado el equipo Microcal AUTO-ITC200 para medir constantes de disociación entre los ligandos **36** y **37** y las macromoléculas SBA y HPA. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C con concentraciones de lectinas entre 10 y 20 μM , y las concentraciones de glicopéptidos se encontraban entre 300 μM y 1 mM, en 10 nM de Tris, y a pH 7.5. Para el procesamiento de los datos, integración, corrección y análisis se usó el Origin 7 (Microcal). La estequiometría en este caso fue 1.

Bibliografía

- [1] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [2] R. B. Merrifield, *Biochemistry* **1964**, *3*, 1385–1390.
- [3] C.-D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. P. Protein Res.* **1978**, *11*, 246–249.
- [4] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard, B. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, *0*, 537–539.
- [5] C.-D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. D. Haug, *Int. J. P. Protein Res.* **1980**, *15*, 59–66.
- [6] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404–3409.
- [7] J. Martinez, J. C. Tolle, M. Bodanszky, *Int. J. P. Protein Res.* **1979**, *13*, 22–27.
- [8] J. Martinez, J. C. Tolle, M. Bodanszky, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3596–3598.
- [9] J. Martinez, M. Bodanszky, *Int. J. P. Protein Res.* **1978**, *12*, 277–283.
- [10] M. Bodanszky, J. C. Tolle, S. S. Deshmane, A. Bodanszky, *Int. J. P. Protein Res.* **1978**, *12*, 57–68.
- [11] M. Bodanszky, J. Martinez, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3071–3073.
- [12] M. Bodanszky, J. Z. Kwei, *Int. J. P. Protein Res.* **1978**, *12*, 69–74.
- [13] B. D. Larsen, A. Holm, *Int. J. P. Protein Res.* **1994**, *43*, 1–9.
- [14] J. D. Fontenot, J. M. Ball, M. A. Miller, C. M. David, R. C. Montelaro, *Pept Res* **1991**, *4*, 19–25.
- [15] J. Bedford, C. Hyde, T. Johnson, W. Jun, D. Owen, M. Quibell, R. C. Sheppard, *Int. J. P. Protein Res.* **1992**, *40*, 300–307.
- [16] F. Albericio, *Biopolymers* **2000**, *55*, 123–139.
- [17] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447–2467.
- [18] D. Hudson, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 333–360.
- [19] B. Merrifield, in *Methods in Enzymology*, *Methods Enzymol.*, **1997**, pp. 3–13.
- [20] M. Erdélyi, A. Gogoll, *Synthesis* **2002**, 1592–1596.
- [21] S. Park, S. Gunasekera, T. L. Aboye, U. Göransson, *Int J Pept Res Ther* **2010**, *16*, 167–176.
- [22] S. L. Pedersen, A. P. Tofteng, L. Malik, K. J. Jensen, *Chem. Soc. Rev.*

- 2012**, *41*, 1826–1844.
- [23] S. Lavielle, N. C. Ling, R. Saltman, R. C. Guillemin, *Carbohydr. Res.* **1981**, *89*, 229–236.
- [24] T. Vuljanic, K.-E. Bergquist, H. Clausen, S. Roy, J. Kihlberg, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 7983–8000.
- [25] M. Meldal, T. Bielfeldt, S. Peters, K. J. Jensen, H. Paulsen, K. Bock, *Int. J. P. Protein Res.* **1994**, *43*, 529–536.
- [26] M. Elofsson, L. A Salvador, J. Kihlberg, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 369–390.
- [27] T. Matsushita, H. Hinou, M. Kurogochi, H. Shimizu, S.-I. Nishimura, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 877–880.
- [28] T. Matsushita, H. Hinou, M. Fumoto, M. Kurogochi, N. Fujitani, H. Shimizu, S.-I. Nishimura, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3051–3063.
- [29] C. M. Taylor, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11317–11362.
- [30] G.-J. Boons, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 1095–1121.
- [31] B. G. Davis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 2137–2160.
- [32] G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2839–2876.
- [33] C. Brocke, H. W. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3085–3112.
- [34] W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957981.
- [35] S. Hanessian, J. Banoub, *Carbohydr. Res.* **1977**, *59*, 261–267.
- [36] R. U. Lemieux, J.-I. Hayami, *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 2162–2173.
- [37] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1980**, *19*, 731–732.
- [38] R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 212–235.
- [39] G. Wei, G. Gu, Y. Du, *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, *22*, 385–393.
- [40] D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH Publishers, New York, **1989**.
- [41] S. S. Wijmenga, M. Mooren, C. W. Hilbers, *NMR of Macromolecules: A Practical ...* **1993**, Oxford, UK (1993): 217–288.
- [42] D. A. Case, H. J. Dyson, P. E. Wright, *Meth. Enzymol.* **1994**, *239*, 392–416.
- [43] S. Seip, J. Balbach, H. Kessler, *Journal of Magnetic Resonance, Series B* **1994**, *104*, 172–179.

- [44] T. Haselhorst, T. Weimar, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10705–10714.
- [45] H. J. Dyson, P. E. Wright, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 519–538.
- [46] D. A. Cumming, J. P. Carver, *Biochemistry* **1987**, *26*, 6664–6676.
- [47] S. A. Adcock, J. A. McCammon, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1589–1615.
- [48] P. I. Koukos, N. M. Glykos, *J. Comput. Chem.* **2013**, *34*, 2310–2312.
- [49] Machida K. “Principles of Molecular Mechanics” , Kodansha/John Wiley & Sons, Tokyo/New York, 1999.
- [50] J. M. Haile, *Molecular Dynamics Simulation: Elementary Methods*, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1992**.
- [51] A. D. Mackerell, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1584–1604.
- [52] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179–5197.
- [53] R. J. Woods, R. A. Dwek, C. J. Edge, B. Fraser-Reid, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 3832–3846.
- [54] A. Onufriev, D. Bashford, D. A. Case, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3712–3720.
- [55] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- [56] S. Gnanakaran, A. E. Garcia, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 12555–12557.
- [57] R. B. Best, N.-V. Buchete, G. Hummer, *Biophys. J.* **2008**, *95*, L07–9.
- [58] D. A. Pearlman, *J Biomol NMR* **1994**, *4*, 279–299.
- [59] A. P. Nanzer, W. F. van Gunsteren, A. E. Torda, *J Biomol NMR* **1995**, *6*, 313–320.
- [60] M. M. Pierce, C. S. Raman, B. T. Nall, *Methods* **1999**, *19*, 213–221.
- [61] R. O'Brien, B. Z. Chowdry, J. E. Ladbury, *Oxford University Press* **2001**.

