

SÍNTESIS DE HIDRATOS DE CARBONO PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS Y TEST DE DIAGNÓSTICOS PARA LEISHMANIASIS

C. Touloumdjian, E. Elhalem, M.J. Comin, L. Gandolfi Donadío
Programa de Fortalecimiento de la Cadena de Valor de la Industria Farmacéutica y Farmaquímica
INTI Química
ctoulou@inti.gov.ar

Introducción

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades causadas por el tripanosomátido *Leishmania*. Según la OMS se encuentran entre las enfermedades más desatendidas en todo el mundo con incidencia predominantemente en los países tropicales y subtropicales más pobres. En 2010 se extendía a 14 millones de personas en el mundo y se estima que hay de 1,5 a 2 millones de nuevos casos por año. ("Control de las leishmaniasis", 2010). La gravedad de la problemática y la falta de interés de la industria farmacéutica por avanzar en el desarrollo de nuevas terapias contra esta enfermedad exigen que desde el Estado se promuevan políticas que permitan erradicar la enfermedad.

En Argentina, la leishmaniasis ha sido endémica desde principio de siglo, siendo la leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) la enfermedad predominante en la región.

Si bien existen tratamientos para la enfermedad, su alto costo, la aparición de efectos adversos y el desarrollo de resistencia, sumado a que pueden presentarse recaídas, hacen que resulte indispensable el desarrollo de nuevas quimioterapias y vacunas para erradicar la enfermedad. Asimismo, se requiere de un test de diagnóstico sensible y específico que permita obtener resultados precisos para la detección temprana.

Este trabajo es parte de un proyecto de desarrollo del Laboratorio de Síntesis Orgánica que pretende sintetizar una amplia librería de oligosacáridos constitutivos de glicoconjugados antigénicos de la superficie del parásito a fin de identificar un epítopo específico mediante un *screening* contra sueros infectados. La idea es realizar un diseño racional del epítopo y seleccionar la mínima unidad estructural capaz de ser reconocida por el sistema inmune del hospedador de manera de minimizar la complejidad sintética. Una vez seleccionado el epítopo podrá utilizarse como **base para el desarrollo de vacunas contra *Leishmania* y/o test de diagnósticos para la detección temprana de la enfermedad.**

Este trabajo fue planteado de manera interdisciplinaria como parte del Programa de

Fortalecimiento de la Cadena de Valor de la Industria Farmacéutica y Farmaquímica. La síntesis de los nuevos oligosacáridos está a cargo del Laboratorio de Síntesis Orgánica (INTI-Química) y la evaluación de la inmunogenicidad de los galactofuranosidos estará a cargo de los Centros INTI-Procesos Superficiales y de Micro y Nanoelectrónica del Bicentenario.

Objetivo

Sintetizar los compuestos **1** y **2** (Figura 1) que forman parte de la estructura interna de glicoconjugados antigénicos de superficie de *Leishmania* como base para el desarrollo de vacunas y/o test de diagnóstico.

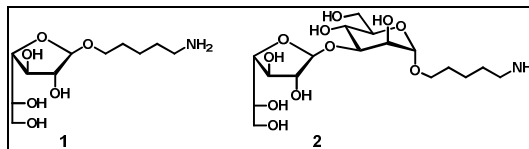


Figura 1: galactofuranósidos **1** y **2** objetos de síntesis.

Descripción

La síntesis de hidratos de carbono (H.C.) presenta una dificultad superior a la de otras biomoléculas asociada a su complejidad estructural. Las cadenas de los oligosacáridos pueden ser lineales o ramificadas, los enlaces entre los monómeros se pueden dar entre el C (carbono) anomérico de uno de ellos y cualquiera de los C del otro azúcar involucrado. Por último, la estereoquímica del enlace puede ser α o β dando lugar a una gran variedad estructural. Para lograr estructuras bien definidas, se necesita sintetizar los bloques constructores de monosacáridos funcionalizados a partir del correspondiente azúcar libre y elegir un método de glicosidación adecuado que permita unir los distintos monómeros de manera regio y estereoselectiva.

Para la síntesis de los compuestos **1** y **2** se sintetizaron los bloques constructores **3** y **4** precursores de la unidad de Galf y manopiranososa (Manp) respectivamente, según métodos descritos. (Gandolfi-Donadío et al, 2002; Zhang et al, 2003) Por otro lado, se

sintetizó el compuesto **5** para introducir el *linker* (Figura 2).

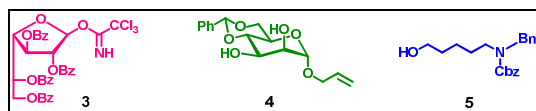
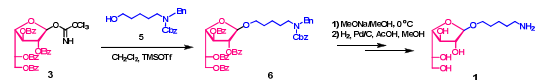


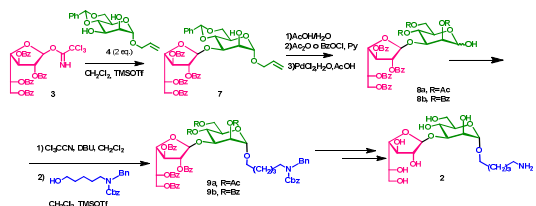
Figura 2: bloques constructores para la síntesis de **1** y **2**.

El método del tricloroacetimidato fue el utilizado como método de glicosidación compatible con los grupos protectores de todos los bloques constructores y con la unión galactofuranosídica presente en los intermediarios.

La estrategia de síntesis utilizada se describe en los Esquemas 1 y 2. Cada uno de los intermediarios de síntesis fue aislado, purificado y luego caracterizado estructuralmente por RMN, lo que permitió confirmar el curso planteado de la síntesis.



Esquema 1: esquema sintético de obtención de **1**.



Esquema 2: esquema sintético de obtención de **2**.

Resultados

Síntesis del galactofuranósido **1**:

El primer paso en esta síntesis consistió en la formación del enlace glicosídico entre el precursor de Galf **3** y el *linker* protegido **5** utilizando trimetilsililtriflato (TMSOTf) como catalizador para dar el glicósido **6** con muy buen rendimiento. El RMN ¹H del producto **6** confirmó la formación del enlace β por asistencia anquimérica del grupo éster en C-2 de **3** (Figura 3). La desprotección de **6** por tratamiento en medio básico y posterior hidrogenólisis permitió obtener el compuesto deseado **1** con un rendimiento del 70% a partir de **3**.

Síntesis del galactofuranósido **2**:

Para obtener el enlace glicosídico Galf-β-(1-3)-Man_p, se llevó a cabo la glicosidación entre el precursor **3** con un exceso del manósido **4**. La regioselectividad de la reacción a favor del enlace β(1-3) se confirmó por acetilación y

posterior análisis por RMN del producto obtenido. La mayor reactividad del OH-3 del manósido **4** se debe a efectos estéricos. De esta forma, se obtuvo **7** con un rendimiento del 59%.

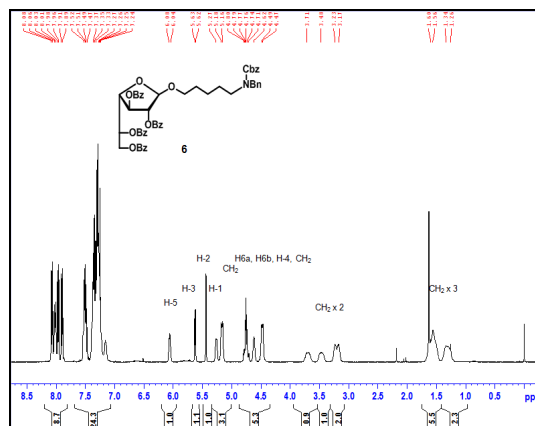


Figura 3: Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **6**.

Para la síntesis de **2**, se evaluaron dos estrategias de protección de los OH-2, OH-5 y OH-6 de la unidad de manosa de **7**. En primer lugar se utilizaron grupos acetatos (OAc) pero, como se hidrolizaron parcialmente durante el proceso de purificación de **9a**, se cambiaron a benzoatos (OBz). Este cambio de grupos protectores resultó satisfactorio permitiendo purificar el disacárido **9b** con buen rendimiento. De esta forma se construyeron todas las uniones glicosídicas presentes en **2**. La hidrólisis de los grupos protectores conducirá al producto de interés **2**. En la actualidad nos encontramos trabajando en el último paso de desprotección de la síntesis.

Conclusiones

Se sintetizó por primera vez el glicósido **1** y se avanzó en la síntesis de **2**, ambas unidades constitutivas del LPG y GIPLs de *Leishmania*. Los glicósidos sintéticos se contrastarán contra sueros infectados para evaluar su inmunogenicidad.

Bibliografía

- Control de las leishmaniasis. (2010). OMS, *Serie de Informes Técnicos*.
- Gandolfi-donadio, L., Gallo-rodriguez, C., & Lederkremer, R. M. (2002). Synthesis of α-D-Galp-(1-3)-β-D-Galf-(1-3)-D-Man, a terminal trisaccharide of *Leishmania* Type-2 Glycoinositolphospholipids. *Journal of Organic Chemistry*, 67(11), 4430–4435.
- Zhang, J., Ma, Z., & Kong, F. (2003). Synthesis of a mannose nonasaccharide existing in the exopolysaccharide of *Cryphonectria parasitica*. *Carbohydrate Research*, 338(17), 1711–1718. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00267-2