



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo  
análogo de antígeno tumoral, com possíveis  
aplicações terapêuticas em câncer**

**Marcelo Fiori Marchiori**

**Ribeirão Preto**

**2018**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

Marcelo Fiori Marchiori

Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer

Ribeirão Preto

2018

MARCELO FIORI MARCHIORI

**Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivone Carvalho

**Coorientadora:** Dr<sup>a</sup> Vanessa Leiria Campo

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 16/08/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Marchiori, Marcelo Fiori

Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer. Ribeirão Preto, 2018.

154 p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho.

Coorientadora: Dra. Vanessa Leiria Campo.

1. Câncer; 2. Antígenos tumorais; 3. Mucina tumoral; 4. Análogo de STn, 5. Síntese de carboidratos; 6. *Click chemistry*.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcelo Fiori Marchiori

Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovado em:

### BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus amados pais, Odair e Vergínia,  
pelo amor incondicional, amparo e incentivo constantes, além de serem exemplos de  
integridade e dedicação;*

*À minha irmã, Gianna,  
pelo carinho, apoio e momentos de descontração;*

*Aos meus avós, Gian e Alcindo,  
por todos os ensinamentos passados ao longo da vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Dr.<sup>a</sup> Vanessa L. Campo, coorientadora desse trabalho, pelos anos de orientação que embasou minha formação científica, pela fundamental contribuição nesse estudo, pelas discussões acadêmicas, idéias e amizade decorrente desse convívio.*

*À professora Dr.<sup>a</sup> Ivone Carvalho, orientadora desse trabalho, pelos conhecimentos compartilhados, pela confiança, paciência, constante incentivo e respeito.*

*Aos queridos companheiros do grupo de pesquisa em Química Farmacêutica da FCFRP: Ana Hartmann, Analu, Maris, Michelle, Paulo, Peterson, Susi e Talita, pelos momentos de alegria e frustração compartilhados e também pela prontidão em ajudar uns aos outros.*

*Aos queridos amigos do 1º andar do bloco M da FCFRP: Fukuda, Barbie, Carla, Fer, Gabi, Margot, Maraina 1, Maraina 2, Paixã, Primona e Ritouner, que contribuíram com amizade, café e momentos de diversão, minha eterna gratidão.*

*Aos meus amigos: Combs, Er, Lu, Pepê, Neném, Saritcha, Naty, André e Rébs, pelo apoio nos dias difíceis, pelos inesquecíveis anos de amizade, por não permitirem que o tempo e a distância afetassem nossa relação, e pela torcida sempre sincera.*

*Aos técnicos dos laboratórios da FCFRP e FFCLRP, José Luís Capelari, Marcelo Carvalho, Luís Otávio, Vinicius Palaretti, Claudia Macedo, José Carlos Tomaz, pela ajuda e gentileza.*

*À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro (Processo: 2016/04699-7).*

## **EPÍGRAFE**

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”*

(Robert Collier)



## RESUMO

MARCHIORI, M. F. **Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer.** 154f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, que tem como característica fundamental a ligação entre o açúcar  $\alpha$ GalNAc e resíduos de aminoácidos de Ser/Thr ( $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr). Em tumores, a biossíntese de mucinas encontra-se desregulada, com conseqüente alteração nos padrões de *O*-glicosilação de suas glicoproteínas. Como resultado, formam-se glicanas anormais e incompletas, as quais são continuamente expressas nas células tumorais e geralmente ausentes nos tecidos saudáveis, sendo assim denominadas de Antígenos de Carboidratos Associados a Tumor (“TACAs”), tais como os antígenos Tn ( $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr), sialil-Tn (Neu5Ac $\alpha$ 2,6- $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr) e TF ( $\beta$ Gal1-3 $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr). Dentre as mucinas tumorais, a MUC1 é a mais investigada, sendo constituída por regiões repetidas em *tandem* da sequência HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, com cinco sítios potenciais para *O*-glicosilação (*O*- $\alpha$ GalNAc). Uma vez constatada a importância dos “TACAs”, estes começaram a ser utilizados em ensaios clínicos como vacinas terapêuticas, mas com limitado sucesso devido à sua baixa imunogenicidade. Sendo assim, glicopeptídeos sintéticos que mimetizem a sequência peptídica imunogênica do tipo MUC1 (PDTRP) e que contenham análogos de TACAs apresentam elevado potencial de aplicação no desenvolvimento de novas vacinas antitumorais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a síntese do glicopeptídeo Pro-Asp-[Neu5Ac $\alpha$ / $\beta$ 2-triazol-6- $\beta$ GalNAc-Thr]-Arg-Pro-GlyOH **19B  $\alpha/\beta$** , mimetizando mucina do tipo MUC1 de tumores e contendo análogo do antígeno STn. Para preparação do glicopeptídeo **19B  $\alpha/\beta$**  foi necessária a síntese prévia do glicoaminoácido triazólico Neu5Ac- $\alpha/\beta$ 2-triazol-6- $\beta$ GalNAc-ThrOH **20B  $\alpha/\beta$**  por reações sequenciais de CuAAC (*click chemistry*) entre os blocos **68 e 24  $\alpha/\beta$**  e hidrogenólise. O precursor azido N<sub>3</sub>-6- $\beta$ GalNAc-ThrOBn **68** foi obtido por duas rotas sintéticas assim como o intermediário alcino Neu5Ac $\alpha/\beta$ -2,3-prop-2-inil **24  $\alpha/\beta$** , porém, este último não sendo obtido como anômero puro. O emprego de **20B  $\alpha/\beta$**  em reações de acoplamento com aminoácidos (*SPPS*) forneceu o glicopeptídeo **19B  $\alpha/\beta$**  após purificação por CLAE. Também foi realizada a síntese e purificação do glicopeptídeo modelo NHAcPro-Asp-[ $\alpha$ GalNAc]Thr-Arg-Pro-GlyOH **21**, contendo o antígeno natural Tn. Futuras etapas de conjugação de **19B  $\alpha/\beta$**  e **21** à proteína carreadora BSA e ensaios de imunização em camundongos (BALB/c) serão realizadas para avaliação da capacidade de indução de resposta imunológica destes glicopeptídeos.

**Palavras-chave:** 1. Câncer; 2. Antígenos tumorais; 3. Mucina tumoral; 4. Análogo de STn, 5. Síntese de carboidratos; 6. *Click chemistry*.

## ABSTRACT

MARCHIORI, M. F. **Synthesis of mucin glycopeptide, containing tumor antigen analog, with possible therapeutic applications in cancer.** 154p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Mucins are high molecular weight glycoproteins that keep as fundamental characteristic the linkage between  $\alpha$ GalNAc sugar and amino acid residues of Ser/Thr ( $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr). In tumors, mucin production is dysregulated once their biosynthetic mechanisms are impaired with consequent alteration in the *O*-glycosylation patterns. As a result, abnormal and incomplete glycans are formed, which are continuously expressed in tumor cells and generally absent in healthy tissues. The continual exposure of these glycans gives them the name of Tumor Associated Carbohydrates Antigens ("TACAs"), such as Tn ( $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr), sialyl-Tn (Neu5Ac $\alpha$ 2,6- $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr) and TF ( $\beta$ Gal1-3 $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr) antigens. Among tumor mucins, MUC1 is the most extensively investigated and is composed by tandem repeat regions HGVTSA $\beta$ DRPAPGSTAPPA sequence with five potential sites for *O*-glycosylation (*O*- $\alpha$ GalNAc). In view of the importance of "TACAS" as tumor markers of clinical significance, they started to be used in clinical trials as therapeutic vaccines, but with limited success due to their low immunogenicity. Thus, considering their constant presence in tumor mucins such as MUC1, synthetic glycopeptides that not only mimic the peptide sequence of the MUC1 type (PDTRP), but also possess TACAS analogs linked to their peptide chain have high potential for application in the development of anti-tumor vaccines. Thus, the aim of this study was the synthesis of glycopeptide Neu5Ac $\alpha$ 2-triazole-6- $\alpha$ GalNAc-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-GlyOH **19B**  $\alpha/\beta$ , mimicking mucin MUC1 type tumors and owing STn analogue. In order to obtain glycopeptide **19B**  $\alpha/\beta$  it was firstly necessary to synthesize the triazole glycoamino acid Neu5Ac- $\alpha/\beta$ 2-triazol-6- $\beta$ GalNAc-ThrOH **20B**  $\alpha/\beta$  by sequential reactions of CuAAC ('*click chemistry*') between the building blocks **68** and **24**  $\alpha/\beta$  and hydrogenolysis. The azide precursor N<sub>3</sub>-6- $\beta$ GalNAc-ThrOBn **68** was obtained by two different synthetic routes, as well as the intermediate alkyne. The use of **20B**  $\alpha/\beta$  in coupling reactions with amino acid (SPPS) provided the glycopeptide **19B**  $\alpha/\beta$  after HPLC purification. The synthesis and purifications of the glycopeptide model NHAcPro-Asp-[ $\alpha$ GalNAc]Thr-Arg-Pro-GlyOH **21**, which owns the natural Tn antigen was also performed. Future steps of conjugation of **19B**  $\alpha/\beta$  e **21** to carrier protein BSA and immunization assays with mice (BALB/c) will be made to evaluate the ability of these glycopeptides to induce immune response.

**Keywords:** 1. Cancer; 2. Tumor antigens; 3. Tumoral mucin; 4. STn analogue; 5. Carbohydrate synthesis; 6. Click chemistry.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac<sub>2</sub>O: anidrido acético  
AcOEt: acetato de etila  
AgOTf: triflato de prata  
Arg: arginina  
arom: aromático  
Bn: benzil  
BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O: eterato de trifluoreto de boro  
BSA: albumina sérica bovina  
CAN: nitrato cérico de amônio  
CCC: cromatografia em coluna clássica  
CCD: cromatografia em coluna delgada  
CCP: cromatografia em camada preparativa  
CDCl<sub>3</sub>: clorofórmio deuterado  
CD<sub>3</sub>OD: metanol deuterado  
DCE: 1,2-dicloroetano  
DCM: diclorometano  
DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina  
DMF: *N,N*-dimetilformamida  
D<sub>2</sub>O: água deuterada  
2,2 DMP: 2,2 dimetoxipropano  
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético  
ESI: ionização por *electrospray*  
Fmoc: 9-fluorenilmetoxycarbonil  
Gal: galactose  
GalNAc: *N*-acetil-galactosamina  
Hex: hexano  
HOBt: hidroxibenzotriazol  
HRMS: espectrometria de massas de alta resolução  
MeCN: acetonitrila  
MHC: complexo de histocompatibilidade principal  
MHz: mega-Hertz  
MO: micro-ondas

Pro: prolina

PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidino-fosfônio

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

$\delta$ : deslocamento químico

ap.: aparente

d: duplete

dd: duplo duplete

ddd: duplo duplo duplete

dt: duplo tripleto

J: constante de acoplamento

m: multiplete

s: simpleto

t: tripleto

Ser: serina

TACA: antígeno de carboidrato associado a tumor

TFA: ácido trifluoroacético

Tf<sub>2</sub>O: anidrido trifílico

THF: tetrahidrofurano

Thr: treonina

TMS: trimetilsilila

Tol: tolueno

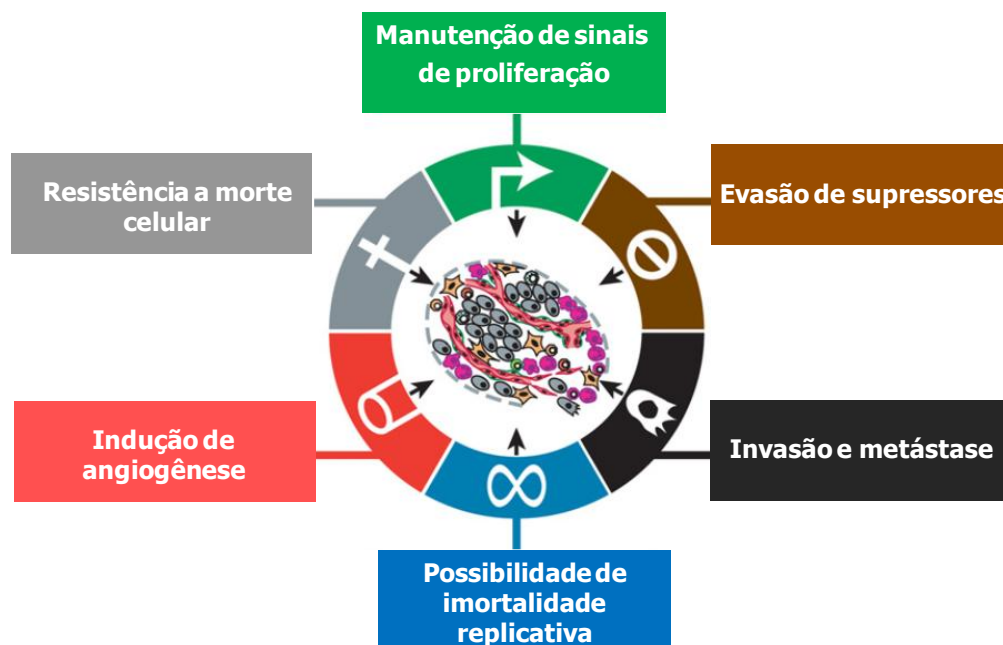
TsCl: Cloreto de tosila

*p*-TSOH: ácido *p*-toluenossulfônico

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CÂNCER: UM PROBLEMA DE SAÚDE MUNDIAL

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 enfermidades que tem em comum o crescimento anormal e desordenado de uma população de células, podendo invadir tecidos e órgãos adjacentes além de difundir-se para outras regiões do corpo. Tal desequilíbrio ocorre à medida que células normais adquirem, progressivamente, uma sucessão de habilidades marcantes, tais como: capacidade de sustentar a sinalização proliferativa, evitar estímulos supressores de crescimento, resistir à morte celular programada (apoptose), permitir imortalidade replicativa e induzir a angiogênese e metástase (Figura 1) (HANAHAN & WEINBERG, 2000; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018).

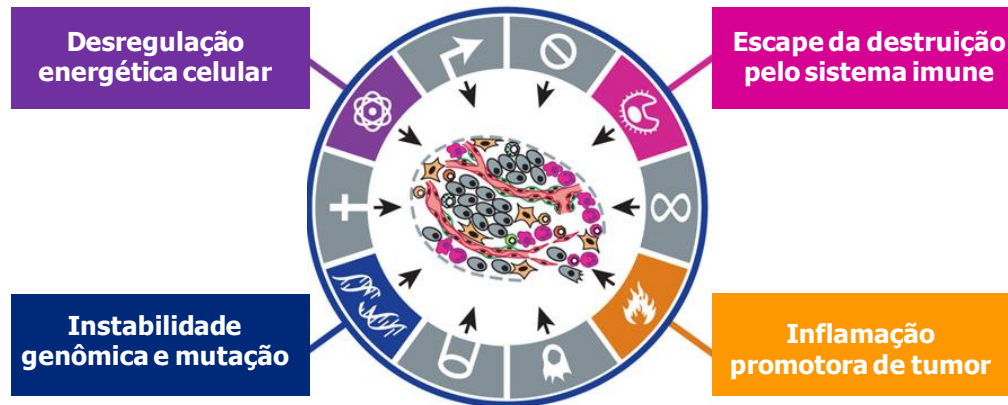


**Figura 1.** Primeiras capacidades biológicas adquiridas pelas células tumorais durante seu desenvolvimento (adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2000).

Na última década, esse quadro geral de características foi atualizado, compreendendo agora quatro novas capacidades facilitadoras que uma célula normal pode possuir ao iniciar seu processo de malignização, sendo estas:

1. a capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular, aumentando a eficácia na sua proliferação;
2. conseguir escapar do sistema imunológico, em particular dos linfócitos T e B, macrófagos e células *natural killer*, aumentando a sua sobrevivência celular;
3. apresentar instabilidade genômica, ou seja, mutabilidade, a qual confere às células alterações genéticas randômicas e impulsionam a progressão do tumor;

- encontrar-se constantemente em ambiente de inflamação, geralmente proporcionada por células do sistema imunológico, a qual facilita o fornecimento de substâncias como fatores de crescimento e pró-angiogênicos, além de espécies reativas de oxigênio (EROs), que aceleram o processo de malignização (Figura 2) (HANAHAN & WEINBERG, 2011).



**Figura 2.** Quadro atualizado das quatro novas capacidades biológicas adquiridas pelas células que facilitam sua malignização (adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011).

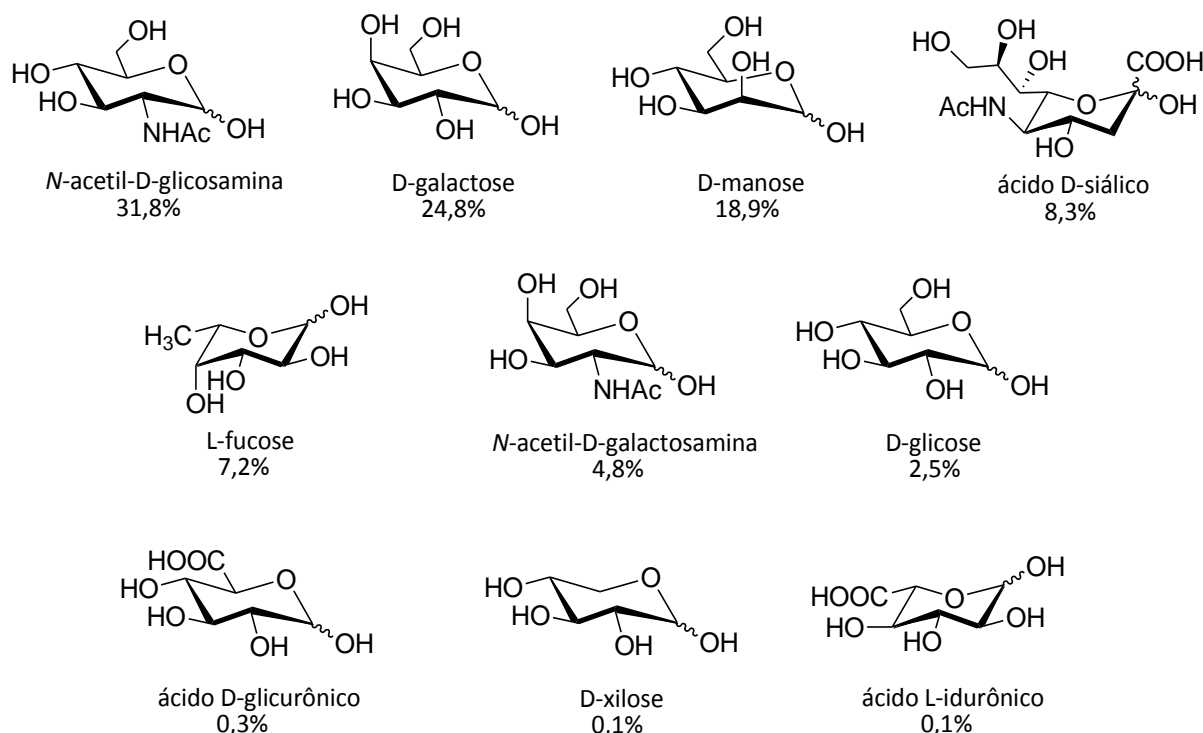
Tal disfunção tem tomado proporções alarmantes na sociedade moderna e mostra-se um problema de saúde pública, sendo os tipos de câncer mais incidentes no mundo os de pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão) (FERLAY et al., 2015). No ano de 2012, calculou-se cerca de 14,1 milhões de casos mundiais, um crescimento de 20% quando comparado com a década anterior. Estima-se, para o Brasil, no biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer para cada ano (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018). Vale ressaltar ainda que estudos preveem um aumento de 9,9 milhões de casos para 2035, uma ascensão de mais de 70% em relação aos valores de 2012 (WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL, 2018).

O impacto econômico do câncer também deve ser destacado visto seu significativo custo global de aproximadamente US \$ 1,16 trilhão em 2010. Estimativas de aumento desse valor para as décadas seguintes foram feitas vistos os expressivos esforços que foram e estão sendo feitos para desenvolver novas estratégias que possam erradicar seletivamente tumores sem efeitos prejudiciais às células saudáveis (STEWART & WILD, 2014).

## **1.2. IMPORTÂNCIAS BIOLÓGICA E TERAPÊUTICA DE CARBOIDRATOS E GLICOCONJUGADOS**

A abundância de carboidratos na natureza e suas diversas funções nos sistemas biológicos justificam a importância dos estudos direcionados à química e à biologia dessas moléculas. Os carboidratos são encontrados como monossacarídeos, oligossacarídeos, ou sob a forma de glicoconjugados, estruturas nas quais as glicanas encontram-se acopladas a biomoléculas de outras naturezas, principalmente proteínas e lipídios (HOLEMANN & SEEBERGER, 2004; SEEBERGER & WERZ, 2007).

Além de suas funções energéticas e estruturais, vastamente conhecidas e exploradas, os carboidratos e glicoconjugados estão envolvidos em diferentes eventos fisiológicos e patológicos relacionados a processos de reconhecimento, sinalização e diferenciação celular, crescimento tecidual, adesão, metástase, infecção por vírus, bactérias e protozoários, e resposta imune. A diversidade de funções e estruturas dos carboidratos está diretamente relacionada ao seu caráter polifuncional, com capacidade de acoplamento a outros monossacarídeos, aminoácidos, nucleotídeos e cadeias lipídicas em diferentes posições. Adicionalmente, outros fatores que agregam complexidade estrutural aos carboidratos e glicoconjugados são a estereoquímica dos centros quirais, tipo de ligação glicosídica formada e configuração anomérica (HOLEMANN & SEEBERGER, 2004; DOORES; GAMBLIN; DAVIS, 2006). Dessa forma, ao considerar apenas os dez monossacarídeos mais abundantes em mamíferos (Figura 3), mais de 100 mil estruturas trissacarídicas distintas são, teoricamente, viáveis, número esse que cresce significativamente com a extensão da cadeia (SEEBERGER & WERZ, 2007).



**Figura 3.** Monossacarídeos mais abundantes em glicoconjugados de mamíferos (SEEBERGER & WERZ, 2007).

### 1.2.1 GLICOPROTEÍNAS DE MUCINAS

Glicosilação é um mecanismo de modificação pós-traducional de proteínas fundamental para definir a estrutura, estabilidade e função protéicas. A maior parte dos carboidratos está ligada em glicoproteínas por meio de ligações *O*-glicosídicas a cadeias laterais de serina ou treonina (*OH*), e, mais raramente, de tirosina (*OH-arom.*), ou através de ligações *N*-glicosídicas a cadeias laterais de resíduos de asparagina ( $NH_2$ ) (DOORES; GAMBLIN; DAVIS, 2006; OSINAGA, 2007). Desse modo, a variabilidade de aminoácidos glicosilados e a extensão da glicosilação possibilitam a existência de uma vasta diversidade de glicoproteínas, exercendo grande impacto sobre suas propriedades (WONG, 2003).

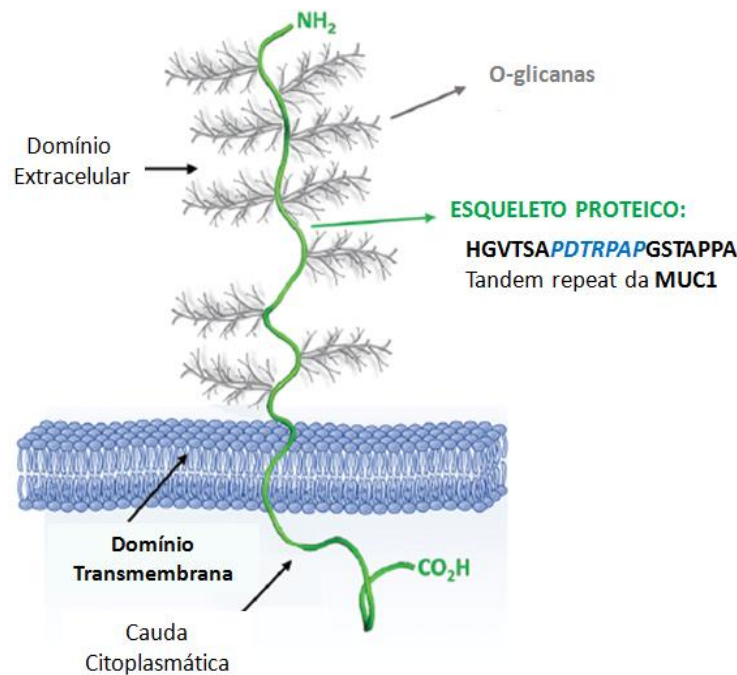
Mucinas são *O*-glicoproteínas densamente glicosiladas de elevado peso molecular (1000 kDa), contendo até 80% da massa total em carboidratos estando presentes na superfície celular - glicocálix - de numerosos tipos de tecidos epiteliais. Tais estruturas estão envolvidas em funções primárias de proteção, hidratação e lubrificação, além de processos biológicos complexos como renovação, diferenciação, sinalização e adesão celular, fertilização, infecções e inflamação (WINTERFELD; KHODAIR; SCHMIDT, 2003, ANDRIANIFAHANANA; MONIAUX; BATRA, 2006; BUSCAGLIA et al, 2006). Estas glicoproteínas possuem motivos repetidos em *tandem* típicos, ricos em resíduos de



aminoácidos de serina (Ser) e treonina (Thr), os quais, como descrito acima, representam potenciais sítios para *O*-glicosilação (GAIDZIK; WESTERLIND; KUNZ, 2013; WITCZAK & BIELSKI, 2013).

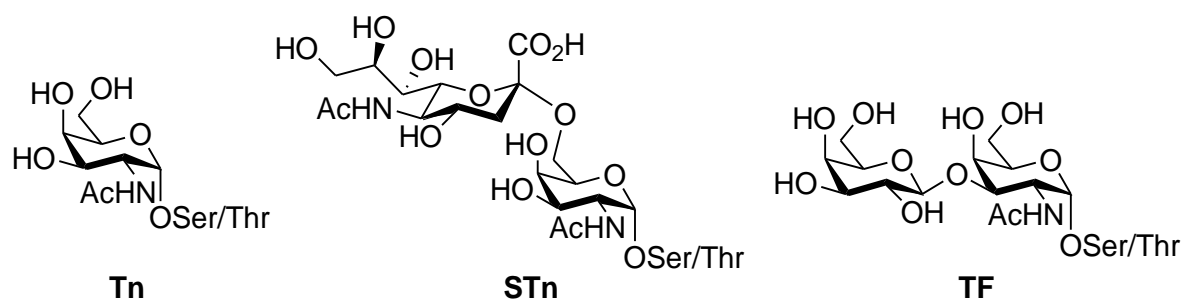
### 1.2.1.1 MUCINAS TUMORAIS

O metabolismo desregulado de mucinas está associado a processos inflamatórios e a muitos tipos de câncer, de tal forma que determinadas classes, tal como MUC1, são empregadas como marcadores tumorais de relevância clínica. A MUC1 é a mucina mais estudada e um marcador para câncer de mama, próstata e pulmão. Trata-se de uma glicoproteína transmembrana caracterizada por um domínio N-terminal extracelular e uma cauda citoplasmática C-terminal que estão ligadas na membrana celular por um domínio único. Além disso, é constituída por várias repetições (20-125) em *tandem* da seqüência de 20 aminoácidos HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, a qual apresenta cinco potenciais sítios de *O*-glicosilação (Thr/Ser), sendo o motivo peptídico PDTRPAP glicosilado considerado o epítipo imunodominante dessa classe (Figura 4). Outra característica das mucinas tumorais é a primeira ligação do açúcar  $\alpha$ GalNAc aos resíduos de Ser/Thr da cadeia peptídica, o que promove a formação do derivado  $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr (DZIADEK; KOWALCZYK; KUNZ, 2005, MARTINÉZ-SÁEZ, PEREGRINA, CORZANA, 2017).



**Figura 4.** Representação esquemática de mucina MUC1 sendo descrita a seqüência em *tandem* dos 20 aminoácidos e o epítipo imunodominante PDTRPAP destacado em azul (Adaptado de MARTINÉZ-SÁEZ, PEREGRINA, CORZANA, 2017).

Ademais, uma vez que as células cancerígenas apresentam alteração no padrão de *O*-glicosilação de mucinas, há como resultado uma alta frequência de glicanas anormais, incompletas e/ou precocemente terminadas por adição de ácido siálico na porção sacarídica (sialilação). Assim, glicanas com cadeias encurtadas como  $\alpha$ GalNAc (Tn), Neu5Ac $\alpha$ 2-6 $\alpha$ GalNAc (STn) e  $\beta$ Gal-1-3 $\alpha$ GalNAc (TF) são abundantes e continuamente expressas nas células tumorais, além da exposição de epítomos peptídicos, que são mascarados em células saudáveis. Suas constantes exposições ao meio extracelular dão a elas a denominação de Antígenos Carboidratos Associados a Tumor (TACAs) (Figura 5), com propriedades funcionais de adesão, invasão e metástase celular (WINTERFELD; KODAIR; SCHMIDT, 2003; McDONALD; BYRNE; PAYNE; 2015). O envolvimento destes antígenos na indução de imunidade ativa e a limitada ocorrência dos mesmos em tecidos normais os tornaram potenciais alvos para uma imunoterapia contra tumores.



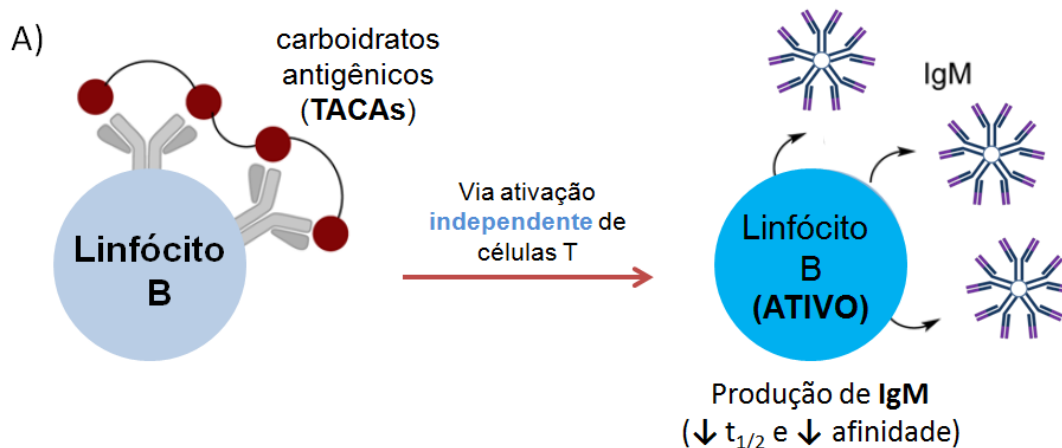
**Figura 5.** Representação dos principais Antígenos Carboidratos Associados a Tumor (“TACAs”).

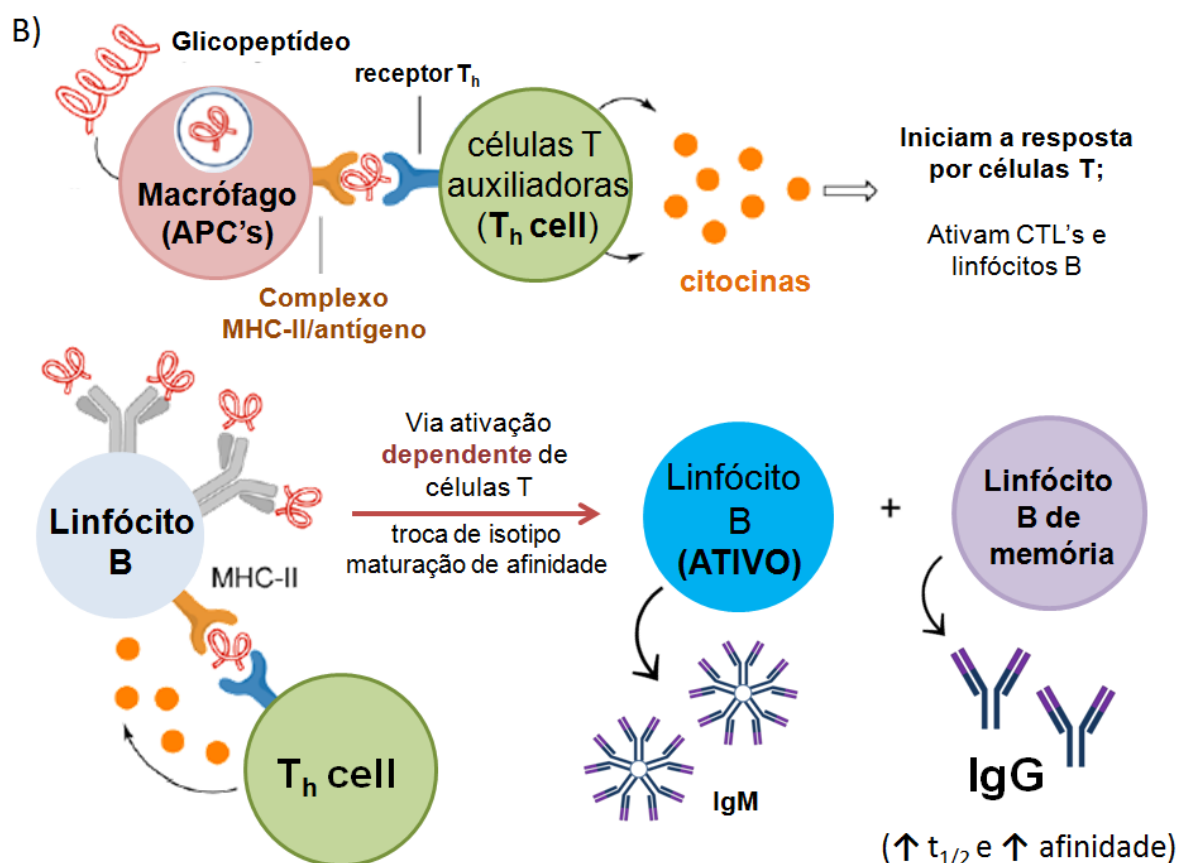
### 1.2.2 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS ANTITUMORAIS SINTÉTICAS A PARTIR DE ANÁLOGOS DE TACAS

Por mais de um século, o emprego de técnicas de imunização tem contribuído significativamente para a saúde humana. No Brasil, há vacinas contra diversas doenças como Caxumba, Sarampo, Rubéola (tríplice viral), Poliomielite, Coqueluche, Influenza, Hepatites A e B, Tétano, Febre Amarela, de forma que representa um dos tratamentos médicos mais bem sucedidos já desenvolvidos (ANVISA, 2018). A vacinação consiste em ativar o sistema imunológico para produzir anticorpos contra determinado(s) antígeno(s), de forma que, quando o sistema imune do paciente entra em contato novamente com este(s), a resposta gerada será mais eficaz, evitando reinfecção e/ou desenvolvimento de sintomas. Fundamentando-se nesse conceito, a vacinação tornou-se uma das abordagens imunoterápicas mais almejadas no tratamento do câncer.

Os primeiros esforços na utilização de carboidratos isolados como antígenos mostrou apenas a ativação da resposta imune independente de células T por meio da ativação direta de linfócitos B, resultando na produção de imunoglobulinas unicamente da classe das IgM, com

baixa vida útil e afinidade, sendo portanto, insuficiente para o ataque direcionado à células cancerígenas (CHANG-CHENG, 2012) (Figura 6A). Desse modo, para viabilizar sua aplicação como possíveis vacinas, haptenos sacarídicos tiveram sua complexidade estrutural aumentada ao serem conjugados a peptídeos ou proteínas carreadores imunogênicos como BSA (*Bovine Serum Albumin*) e/ou KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*), favorecendo a estimulação dos linfócitos T, os quais são sensibilizados por fragmentos peptídicos antigênicos processados e expostos por células apresentadoras de antígenos (APC's), como macrófagos, monócitos e células B via MHC de classe II (*Major Histocompatibility Complex*) (XU et al, 2005, FRANCO, 2005; CHANG-CHENG & YE 2012; MARTINÉZ-SÁEZ, PEREGRINA, CORZANA, 2017). Ao complexo "antígeno/MHC-II" formado ligam-se células T auxiliaadoras (*Helper T-Th cell*) as quais liberam citocinas que promovem a ativação de células T citotóxicas (*CTL's*) além de iniciar a resposta por células T. Além disso, a associação de células *Th* ativadas a células B é crucial para ativação completa destas e promover a maturação de afinidade das imunoglobulinas produzidas, resultando na troca de isotipo de IgM em imunoglobulinas da classe IgG, de alta afinidade e tempo de meia vida. Essa completa ativação também promove a maturação de células B em células B de memória (*memory B cells*) que permanecem ativas mesmo após o término da resposta imune e, no caso de uma reinfecção, têm capacidade de gerar uma resposta mais rápida e secretar anticorpos de maior afinidade (IgG), sendo assim uma resposta imunológica efetiva e duradoura (Figura 6B), (WILSON & DANISHEFSKY, 2013). Como resultado, linfócitos T citotóxicos e anticorpos direcionados contra antígenos tumorais sintéticos devem ser capazes de reconhecer os correspondentes epítomos nativos em células malignas circulantes e metastáticas, promovendo a erradicação das mesmas e protegendo contra crescimento e recorrência tumoral, comprovando o potencial de vacinas sintéticas de carboidratos para o combate ao câncer.



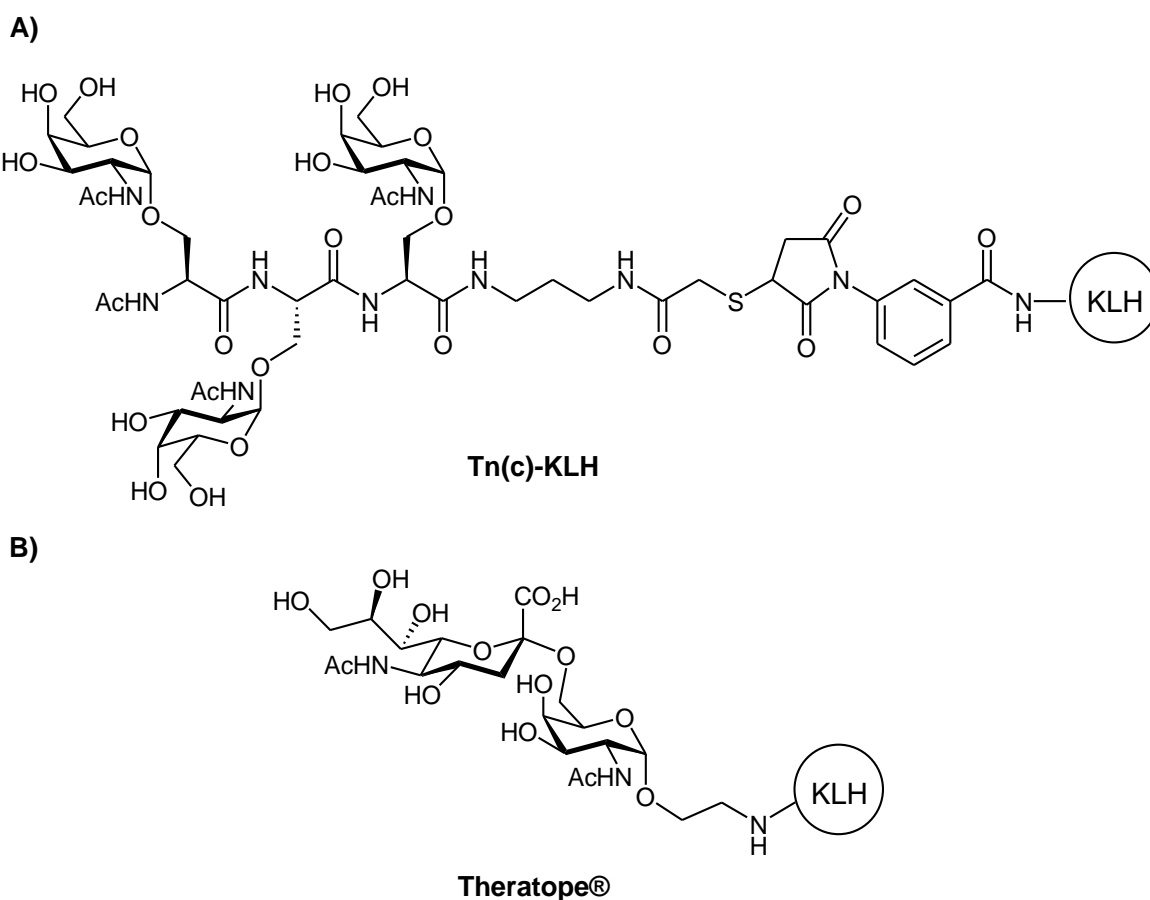


**Figura 6.** Representação comparativa da resposta imune quando utilizando: **A)** TACAS isolados: desencadeamento de uma resposta células T-independente, ativando somente linfócitos B, com produção de anticorpos do tipo IgM. **B)** TACAS conjugados: desencadeamento de uma resposta imune células T-dependente, com produção de anticorpos do tipo IgG (Adaptado de WILSON & DANISHEFSKY, 2013)

Ensaio clínico já atestaram o potencial de vacinas sintéticas de carboidratos para a terapia do câncer, como a Tn(c)-KLH, que atualmente encontra-se em ensaio clínico de Fase II e em sua estrutura possui uma seqüência de três antígenos Tn ( $\alpha$ GalNAc-Thr) ligados seqüencialmente como trímero e conjugados com a proteína carreadora KLH através de um linker (Figura 7A). Em ensaio clínico de fase I, pacientes com câncer de próstata bioquimicamente com recidiva foram imunizados com a TN(c)-KLH na presença do adjuvante imunológico QS-21. A diminuição dos níveis de PSA (marcador bioquímico para câncer de próstata) por vários meses após término das vacinações, em comparação com o período de pré-tratamento, pôde ser correlacionado com possível retardo da progressão tumoral (SLOVIN et al, 2003).

Tal abordagem foi corroborada quando uma vacina anti-tumoral constituída pelo antígeno natural STn conjugado a proteína carreadora KLH, Theratope®, (Figura 7B), direcionada para o tratamento do câncer de mama, foi sintetizada e testada clinicamente

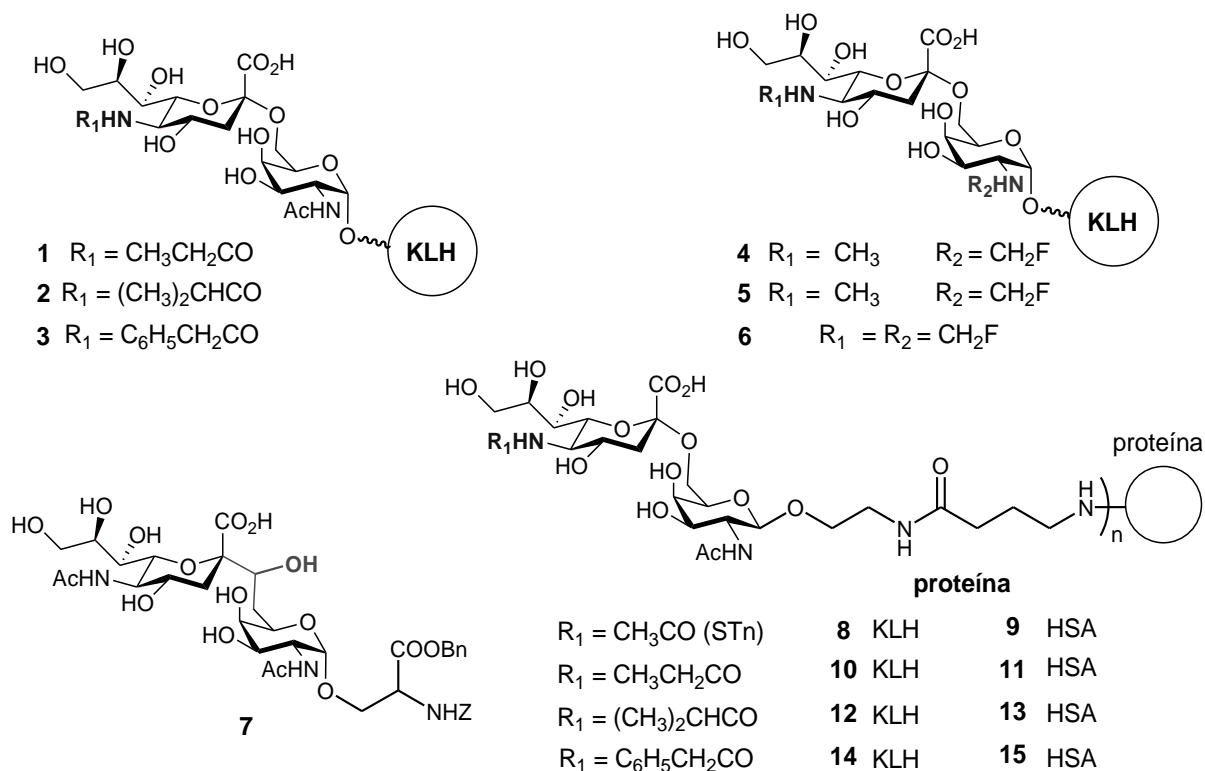
(1996-2003), conseguindo passar com sucesso em ensaios clínicos de fase I e II. No entanto, a Theratope® falhou em estágios clínicos de fase III, tendo sua pesquisa descontinuada. Anos depois, notou-se que a falta de seleção dos pacientes foi uma possível explicação na falha da Theratope®, visto que o STn é expresso em cerca de 50% dos tumores de mama e não foi avaliada a expressão deste antígeno na população de pacientes. Apesar disso, os resultados globais coletados foram úteis ao levantar questões sobre como melhorar uma abordagem imunoterápica antitumoral a partir de TACAs (JULIEN; VIDEIRA; DELANNOY, 2012).



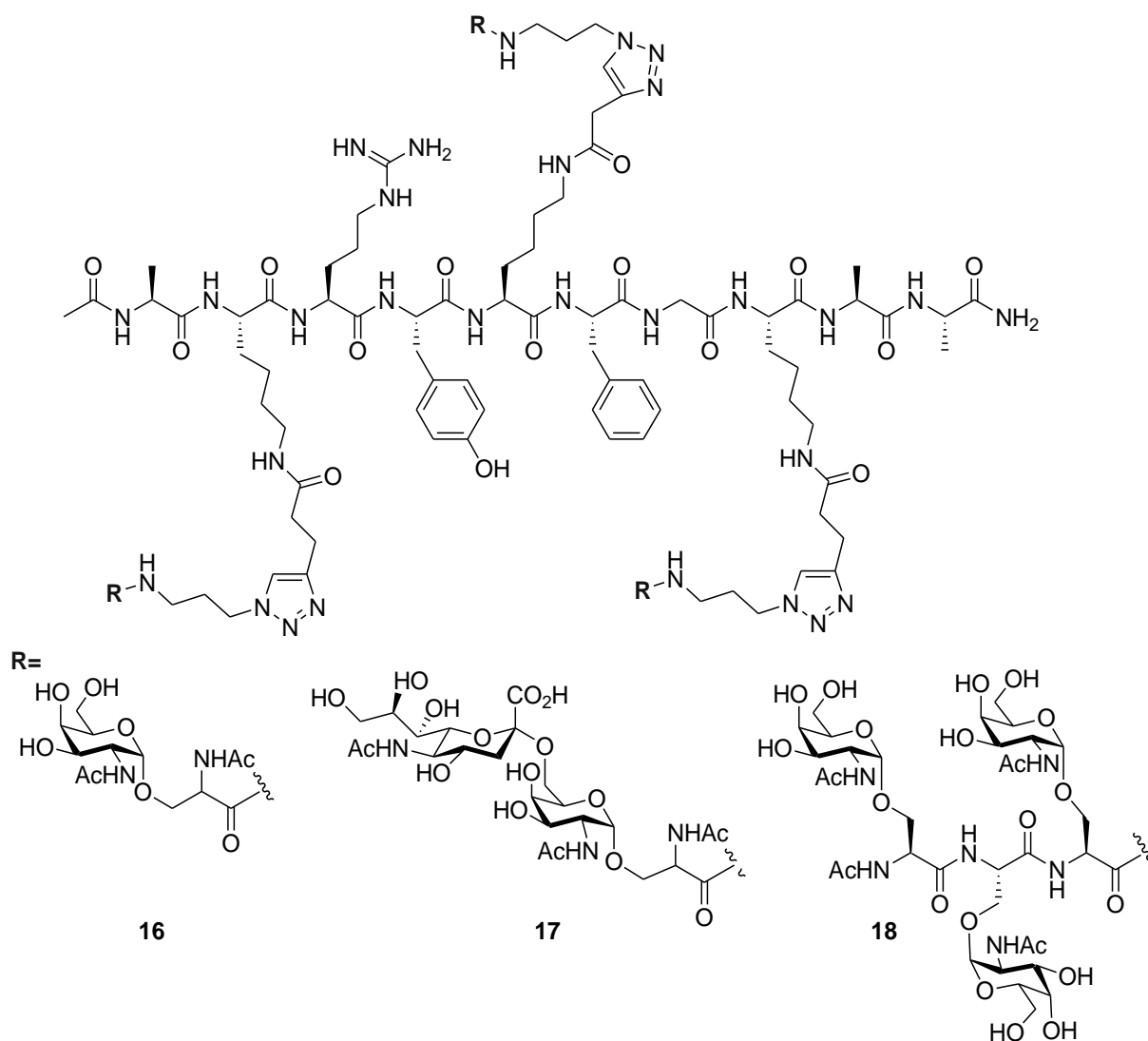
**Figura 7.** Representação estrutural de vacinas sintéticas. **A)** Cluster com três antígenos Tn ligados a proteína KLH por um linker. **B)** Theratope®, visando uma abordagem imunoterápica anti-STn.

Uma potencialização da resposta imunológica pode ser alcançada através da co-administração com adjuvantes imunológicos, tais como hidróxido de alumínio, saponina QS-21, algumas citocinas como IL-2 e IL-12. Contudo, a ocorrência da tolerância imunológica que o organismo possui para com suas biomoléculas dificulta a utilização de TACAs para desencadear um efeito terapêutico desejado de relevância clínica, visto que estes são formados por substâncias endógenas (WANG & GUO, 2012 ; WU & GUO, 2006 ; LOUREIRO et al, 2015). Desta forma, para contornar tal obstáculo, novas estratégias para a imunoterapia contra

o câncer foram desenvolvidas, como a utilização de análogos de TACAs. O interesse de vários grupos de pesquisa em sintetizá-los provém da possibilidade de manter a capacidade de reconhecimento do antígeno natural e aumentar expressivamente a imunogenicidade do composto final, uma vez que TACAs modificados podem ser considerados exógenos pelo sistema imune e, assim, estimular uma resposta mais efetiva do que os naturais, quebrando a tolerância imune (KUBERAN et al, 2003). Dentre os análogos já sintetizados, vemos que há um maior foco em mimetizar os antígenos Tn e STn. No ultimo caso, as principais modificações observadas foram na função amida (-NHAc) do ácido siálico **1-3** (WU & GUO, 2006; CHANG-CHENG & YE, 2012; WANG & GUO, 2012) ou no açúcar  $\alpha$ GalNAc **4-6** (WU & GUO, 2006), na ligação  $\alpha$ 2-6 entre estas porções glicosídicas, gerando análogos C-glicosídicos **7** (KUBERAN, 2003), além da conjugação com diferentes proteínas carreadoras por meio de linker **8-15** (LOUREIRO, 2015) (Figura 8). Ademais, observa-se a utilização do grupo triazol como linker entre os antígenos tumorais e uma porção peptídica, gerando novos glicoconjugados **16-18** (WITCZAK & BIELSKI, 2013), sendo estes análogos representados na Figura 9.



**Figura 8.** Representação geral de estruturas de análogos de Antígenos Carboidratos Associados a Tumor (“TACAs”) já descritos na literatura, focando em análogos do antígeno STn.



**Figura 9.** Representação geral de glicopeptídeos que exploraram a utilização do grupo triazol como parte de um linker entre os TACAs e a cadeia peptídica

Desse modo, tendo em vista a importância dos Antígenos de Carboidratos Associados a Tumor (TACAs) como marcadores tumorais de relevância clínica, aliada à presença constante destes em mucinas tumorais, tal como MUC1, anticorpos contra os antígenos Tn e/ou STn podem ser utilizados para direcionar o sistema imune contra células tumorais ou com potencial de malignização. No entanto, mesmo com o grande avanço no desenvolvimento de anticorpos contra estes antígenos nas últimas décadas, a utilização destes para uso em ensaios clínicos obteve sucesso limitado até o presente momento, o que nos estimula a procurar novos antígenos como imunógenos para o desenvolvimento de vacinas e obtenção de anticorpos monoclonais anti-TACAs.

Por fim, merece destaque as principais vantagens que as vacinas sintéticas apresentam quando comparadas com os outros tipos de vacinas (exs, de microrganismos vivos atenuados, inativos, de DNA, de subunidades ou de vetores recombinantes), como a alta homogeneidade estrutural, o que implica em menor probabilidade de efeitos colaterais, além da não necessidade de armazenamento sob refrigeração (MCGEARY; JABLONKAI; TOTH, 2002).

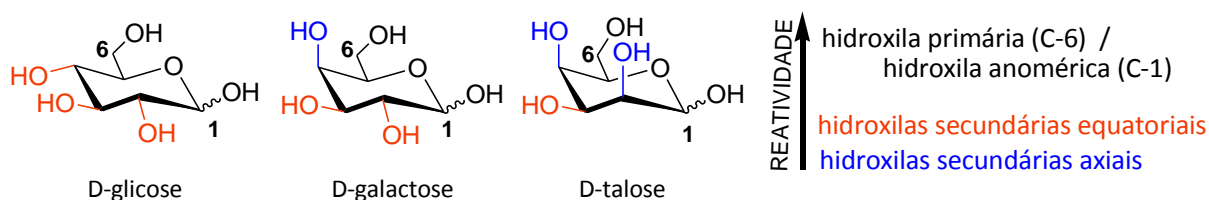
### 1.3. ASPECTOS GERAIS DA QUÍMICA DE CARBOIDRATOS

A síntese de derivados sacarídicos e/ou glicoconjugados envolve, freqüentemente, dois pontos essenciais:

- I. A manipulação rigorosa e diferenciação de hidroxilas que possuem reatividade similar, exigindo o emprego de estratégias de proteção e desproteção altamente seletivas e ortogonais. Geralmente, tal fato conduz ao aumento do número de etapas da rota sintética;
- II. A obtenção de produtos régios e estereosseletivos, uma vez que a cada glicosilação é gerado um novo centro estereogênico (SEEBERGER & HAASE, 2000).

#### 1.3.1 ESTRATÉGIAS DE PROTEÇÕES SELETIVAS EM CARBOIDRATOS

Apesar de não haver uma regra geral para discriminar a reatividade das hidroxilas de piranoses, uma vez que esta é dependente de sua configuração no anel e das condições reacionais, sabe-se que as hidroxilas primária (C-6) e anomérica (C-1) são mais reativas que as secundárias (C-2, C-3, C-4). Além disso, as em posição equatorial possuem menor impedimento estérico em relação às axiais, sendo, portanto, mais acessíveis e tendem a reagir mais rapidamente (Figura 10) (FERRIER & COLLINS, 1996).



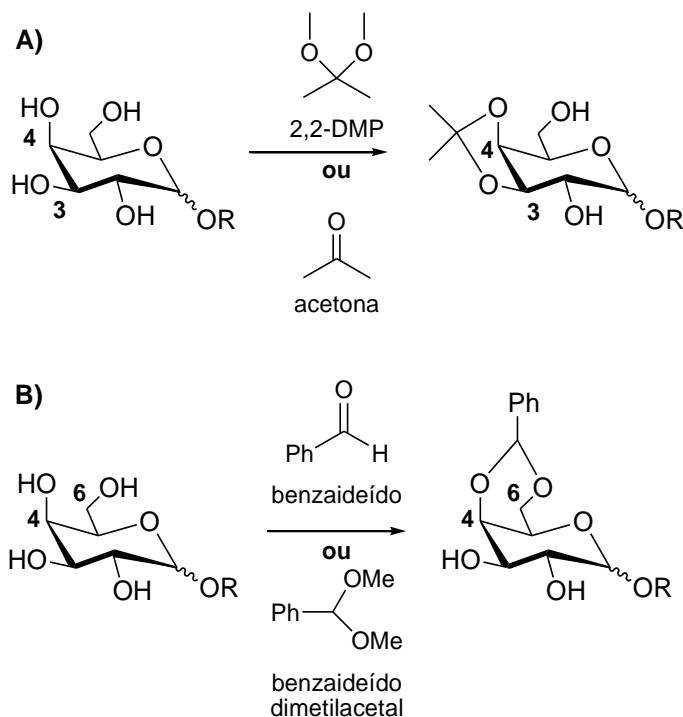
**Figura 10.** Estruturas químicas de glicose e seus epímeros, evidenciando as diferenças de configuração de algumas ligações e reatividade de suas hidroxilas.

Desse modo, a utilização de grupos protetores e condições reacionais para introduzi-los ou removê-los seletivamente é fundamental para que as reações com carboidratos sejam régio e estereosseletivas. As classes de grupos protetores mais comuns utilizados na química de carboidratos são: acetais (isopropilideno e benzilideno), ésteres (acetato e benzoato), éteres



(benzila, tritila e alila), éteres de silila (trimetilsilila - TMS, t-butildimetilsilila - TBDMS, t-butildifenilsilila - TBDPS) e estanilenos (óxido de dibutilestanho - DBTO) (PÉTURSSON, 1997; PEI et al., 2007).

Geralmente, grupos protetores mais volumosos, como TBDPS, TBDMS, tritila e tosila, protegem de forma regioseletiva a hidroxila primária (C-6), com menor impedimento estérico. Já em relação às hidroxilas secundárias de piranosídeos, a proteção com (a)cetais baseia-se na proteção simultânea, seletiva e com altos rendimentos de hidroxilas adjacentes (das posições 1,2, 3,4 ou 4,6) pela formação de anéis de 5 (isopropilideno - Esquema 1A) ou 6 membros (benzilideno - Esquema 1B). Para isso, utiliza-se 2,2 dimetoxipropano (2,2-DMP) ou acetona, e benzaldeído ou benzaldeído dimetil acetal, respectivamente. A remoção desses grupos, por sua vez, pode ser realizada por hidrólise ácida com ácido *p*-toluenossulfônico (*p*-TSOH), ácido acético sob aquecimento ou com ácido trifluoroacético a 0 °C (PÉTURSSON, 1997).

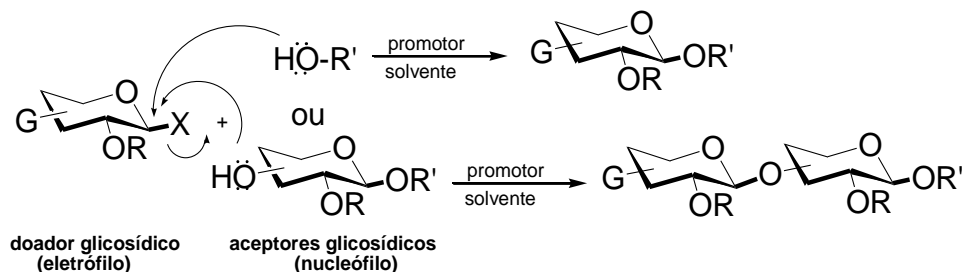


**Esquema 1.** Proteção seletiva das hidroxilas 3,4 (A) e 4,6 (B) de D-galactose através da formação de acetais.

### 1.3.2 A ESTEREOSELETIVIDADE NA SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS

Uma ligação *O*-glicosídica é formada pela substituição nucleofílica de um grupo abandonador (X) ligado à posição anomérica da molécula de açúcar por um álcool ROH ou por um grupo OH de outra molécula, podendo ser um açúcar parcialmente protegido ou até mesmo aminoácidos como treonina (Thr) ou serina (Ser) (Esquema 2). Denomina-se o composto que

“fornece” a unidade glicosídica de *doador glicosídico*, e o que a recebe de *acceptor glicosídico*. Essa reação geralmente é realizada na presença de um promotor, cuja função é favorecer a saída do grupo abandonador, sendo normalmente empregado em quantidade catalítica, embora possa ser utilizado estequiometricamente em alguns casos (BONGAT & DEMCHENKO, 2007).



**Esquema 2.** Representação de formação da ligação *O*-glicosídica.

Uma das estratégias mais frequentes para a obtenção de glicoaminoácidos é a utilização de reações de *Koenigs-Knorr* envolvendo o uso de haletos glicosídicos como cloreto, brometo e iodeto, juntamente com o emprego de catalisadores como sais de mercúrio ( $\text{HgBr}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ), sais de prata ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3/\text{AgClO}_4$ ,  $\text{AgOTf}$ ), triflato de trimetilsilil ( $\text{TMSOTf}$ ) e triflato de dimetil(metil)sulfônio ( $\text{DMTST}$ ). Tais catalisadores aumentam a velocidade da reação, pois são efetivos em promover a saída de grupos haletos abandonadores por complexação (JACOBSSON; MALMERG; ELLERVIK, 2006; WELL; KARKKAINEN; KARTHA, 2006).

Tratando-se da obtenção estereosseletiva de glicoaminoácidos de glicose e galactose com configurações  $\alpha$  (1,2-*cis*-glicosídeos) ou  $\beta$  (1,2-*trans*-glicosídeos), é necessária a utilização de doadores glicosídicos adequados, uma vez que a determinação de sua configuração dependerá da influência de dois principais fatores: o '*efeito anomérico*' e '*assistência anquimérica*' (JACOBSSON; MALMERG; ELLERVIK, 2006; WELL; KARKKAINEN; KARTHA, 2006).

### 1.3.2.1 O EFEITO ANOMÉRICO

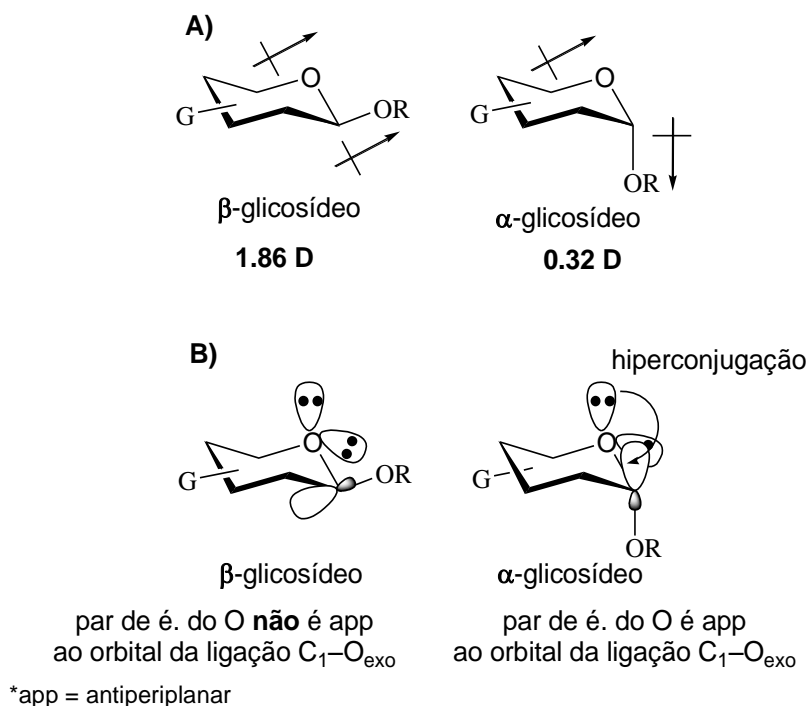
O efeito anomérico, descreve a tendência do substituinte em C-1 em adotar orientação axial ( $\alpha$ ) ao invés da equatorial ( $\beta$ ) e pode ser explicado como a soma de dois outros efeitos, um de caráter eletrostático e outro da ação de orbitais moleculares (CAREY & SUNDBERG, 2007).

O efeito de origem eletrostática surge da repulsão entre os pares de elétrons isolados dos átomos de oxigênio endo e exocíclico. Assim, caso o aceitador glicosídico se ligue equatorialmente ao doador haverá o alinhamento entre dois vetores de dipolos, o que gera um maior momento dipolo molecular na estrutura (1.82 D). Isto acarreta em uma maior separação

de cargas o que é energeticamente desfavorável para o sistema em solventes com baixa constante dielétrica. Em contra partida, os dipolos ficam 'opostos' no caso do substituinte estar na posição axial (em  $\alpha$ ), existindo, assim, menor momento dipolo molecular na estrutura (0.32 D) representando um sistema energeticamente mais estável (Figura 11A) (CAREY & SUNDBERG, 2007 ; VAN VRANKEN, 2012).

O outro componente do efeito anomérico envolve uma possível estabilização eletrônica adicional promovida pelo fenômeno de hiperconjugação entre um dos pares de elétrons isolados do átomo de oxigênio endocíclico (orbitais antiligantes preenchidos) com o orbital sigma anti-ligante  $\sigma^*$  vazio da ligação C<sub>1</sub>-O exocíclico axial. Esta deslocalização eletrônica, por sua vez, só é possível quando o par de elétrons estiver em posição antiperiplanar ao orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) da ligação C<sub>1</sub>-O anomérico, o que ocorre apenas quando esta encontra-se na posição axial (Figura 11B).

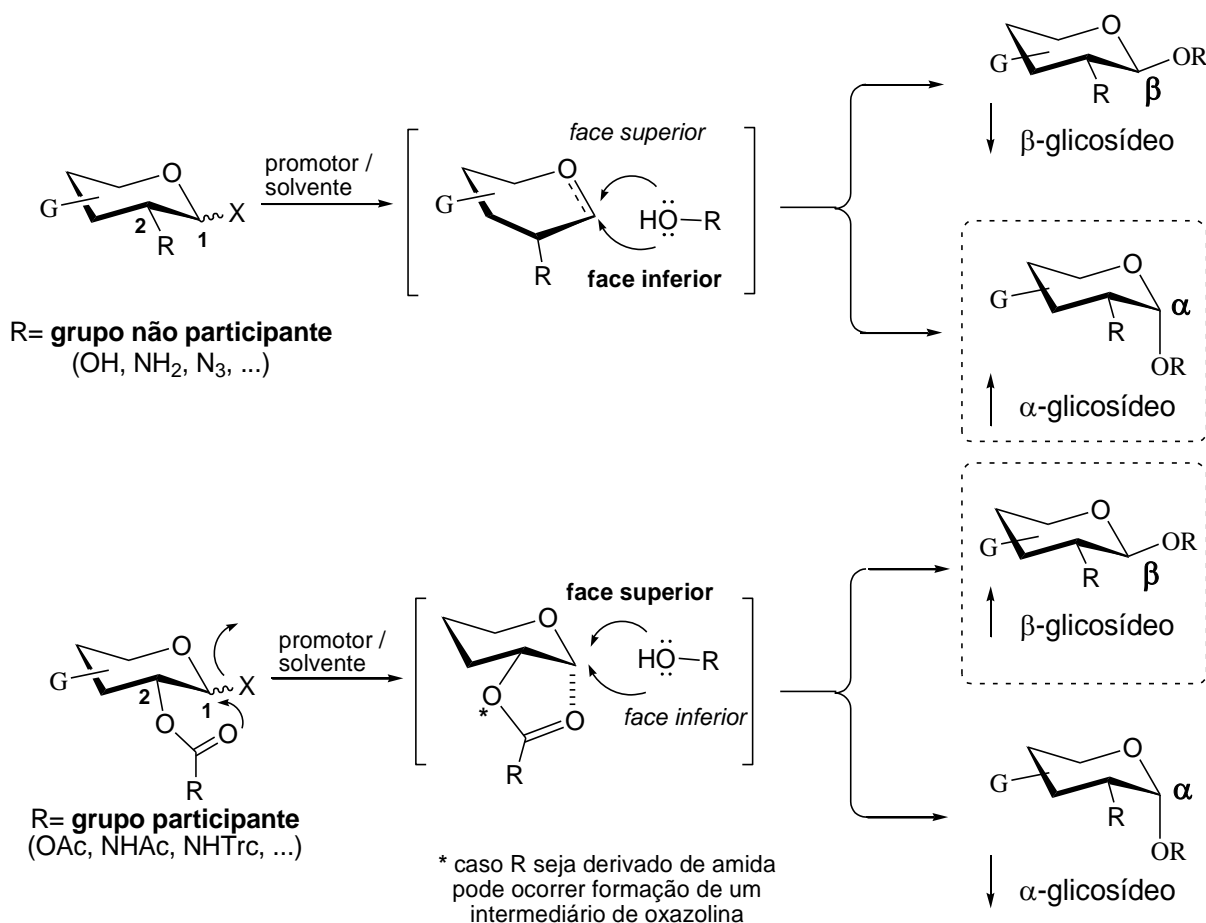
Ademais, vale ressaltar que a magnitude do efeito anomérico depende do tipo de substituinte ligado ao carbono anomérico, dos outros substituintes ligados ao anel e até mesmo do solvente (CAREY & SUNDBERG, 2007; VAN VRANKEN, 2012).



**Figura 11.** Representação dos constituintes do efeito anomérico. **A)** Influência dos dipolos presentes na estrutura para determinar a orientação do substituinte na posição anomérica. **B)** Representação da deslocalização de um par de elétrons isolado do oxigênio endocíclico para o orbital sigma antiligante ( $\sigma^*$ ) da ligação C<sub>1</sub>-O<sub>exo</sub>, favorecida no confôrmero axial.

### 1.3.2.2 A ASSISTÊNCIA ANQUIMÉRICA

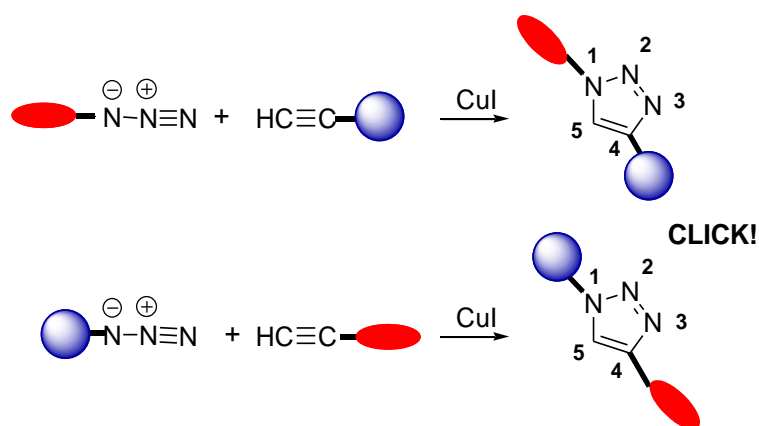
Já a assistência anquimérica, também conhecida por “participação de grupo vizinho”, é definida pela capacidade de grupos ligados no carbono 2 do anel pirano de influenciar a face de ataque do aceptor glicosídico (nucleófilo). Assim, para a síntese de  $\beta$ -glicosídeos, doadores contendo grupos participantes em C-2, como OAc, NHAc e *N*-Troc (*N*-tricloroetoxicarbonil) devem ser utilizados, uma vez que, o oxigênio carbonílico presente no grupo em C-2 é capaz de interagir ou até atacar o carbono anomérico, dificultando o ataque do aceptor pela face inferior e favorecendo a formação do produto  $\beta$ -substituído. Já a preparação de  $\alpha$ -glicosídeos exige o emprego de doadores com grupo substituinte não participante em C-2, tal como grupo azido ( $N_3$ ), os quais favorecem a obtenção do produto  $\alpha$ -substituído (Esquema 3) (JACOBSSON; MALMERG; ELLERVIK, 2006; WELL; KARKKAINEN; KARTHA, 2006).



**Esquema 3.** Representação do efeito da *assistência anquimérica* na formação da ligação *O*-glicosídica. Cada quadro pontilhado representa o anômero formado em maior proporção na reação de glicosilação.

#### 1.4. A ESTRATÉGIA DE “CLICK CHEMISTRY”

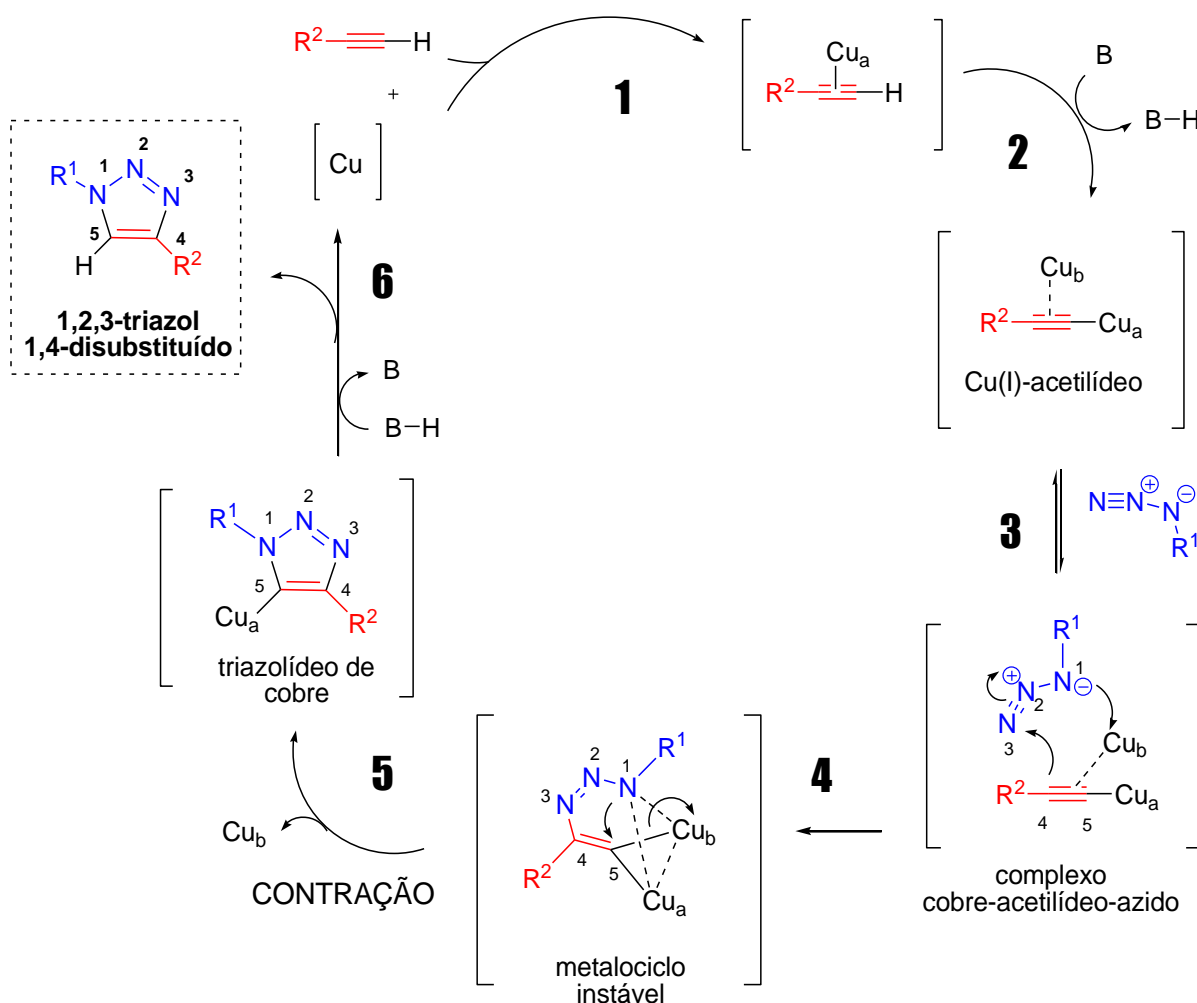
A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar (“*click chemistry*”) catalisada por Cu(I) - CuAAC foi descrita de forma independente pelos grupos de Sharpless e Meldal (2002), e emprega um alcino terminal e um grupo azido para fornecer, de maneira rápida e regioseletiva, o produto 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído (ARAGÃO-LEONETI et al, 2010). Outra vantagem dessa estratégia reside na possibilidade de inversão dos grupos azido e alcino nos blocos construtores, alterando, assim, a posição dos substituintes no anel triazólico formado (Esquema 4).



**Esquema 4.** Representação esquemática da reação de “CuAAC” resultando em um composto 1,4-triazólico.

O mecanismo pelo qual a reação ocorre foi primeiro proposto pelo grupo de Sharpless, em 2002, e desde então revisado com a inclusão de diferentes metalocíclicos. A proposta aqui detalhada foi apresentada por BOCK e colaboradores (2016) e sugere a participação de dois átomos de cobre. No primeiro momento (etapa 1), há a formação de uma estrutura de Cu(I)-acetilídeo através de um complexo  $\pi$  entre Cu(I) e o alcino terminal; a participação do segundo átomo de cobre parece estar relacionada a ativação do grupo azido, todavia a espécie de Cu(I)-acetilídeo poderia também se complexar a outro átomo de cobre, sendo difícil a proposição de apenas uma estrutura (etapa 2). Na seqüência, ocorre a aproximação do grupo azido formando o complexo cobre-acetilídeo-azido, com dois átomos de cobre (etapa 3). Isto permite que o grupo azido fique mais susceptível ao ataque nucleofílico do carbono C-4 do alcino ao nitrogênio terminal N-3, gerando um metalociclo (etapa 4). Este metalociclo posiciona o azido de forma que o par de elétrons não compartilhado do nitrogênio N-1 se associe ao orbital  $\pi^*$  (antiligante) do carbono C-5, promovendo contração do ciclo, liberando um átomo de Cu e formando uma espécie triazolídeo de cobre mais estável (etapa 5). Por fim, a protonação da espécie de triazolídeo de cobre, seguida de dissociação, leva ao produto 1,2,3-triazol 1,4-disubstituído e a regeneração do catalisador (etapa 6). Estas etapas estão

representadas no Esquema 5 (BOCK, HIEMSTRA & VAN MAARSEVEEN, 2006; TIWARI et al, 2016).

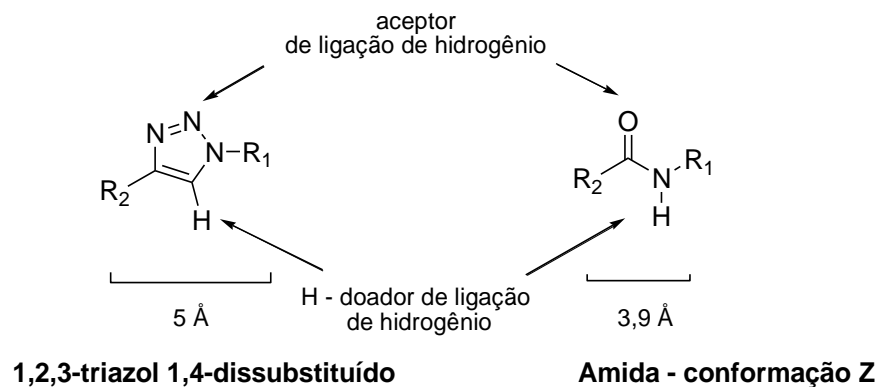


**Esquema 5.** Mecanismo proposto para a reação de CuAAC (Adaptado de BOCK, HIEMSTRA & VAN MAARSEVEEN, 2006).

A fonte de sais de Cu (I) mais utilizada envolve a redução de sulfato de cobre (II) por ascorbato de sódio, embora outras condições igualmente eficientes sejam descritas, tais como complexos orgânicos, sais e derivados estabilizados de Cu (I), nanoclusters e também fio de cobre (GIL et al., 2007).

Neste contexto, há de considerar as vantajosas propriedades físico-químicas do anel triazólico se comparada à ligação *O*-glicosídica ou a uma ligação amida, de forma que a unidade triazol mantém os átomos de carbono ligados nas posições 1,4 a uma distância de 5 Å mimetizando a ligação amida (em que a distância é 3,9 Å), e diferentemente desta, não pode ser oxidada, reduzida ou clivada por hidrólise química ácida ou básica. No meio biológico, o anel 1,2,3-triazol é estável a degradação metabólica e atua como acceptor e/ou doador de ligações de hidrogênio, podendo ainda estabelecer ligações adicionais do tipo dipolo-dipolo e

$\pi$  stacking (Figura 12). Tais propriedades bem como sua inerente rigidez estrutural instigam a síntese de neoglicopeptídeos triazólicos como potenciais imunógenos contra tumores (ARAGÃO-LEONETI et al, 2010).



**Figura 12.** Similaridade estrutural entre uma ligação amida e anel 1,2,3-triazol.

## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados descritos, cerca de 30 compostos relativos a carboidratos, glic aminoácidos e glicopeptídeos foram sintetizados e devidamente caracterizados. Dentre estes, 7 são compostos inéditos na literatura (**59**, **56**, **60**, **68**, **77 $\alpha/\beta$** , **20B  $\alpha/\beta$** , **19B  $\alpha/\beta$** ).

Os blocos de construção inicialmente propostos (Neu5Ac $\alpha$ 2-N<sub>3</sub> **22**, 3-prop-2-inil-6- $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **23** e 6-N<sub>3</sub>- $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **25**) não foram possíveis de serem obtidos via as estratégias empregadas, sendo que durante as investigações para síntese de **23** e **25**, o antígeno natural Tn ( $\alpha$ GalNAcThr) **52** foi sintetizado por duas rotas distintas. Após reproduções de algumas rotas já descritas, bem como realizando modificações de metodologias sempre que necessário, o bloco 6-N<sub>3</sub>- $\beta$ GalNAc-ThrOBn **68** foi obtido por uma rota de 12 etapas em baixo rendimento. Assim, esta foi otimizada, sendo o derivado polifuncionalizado **68** obtido após apenas 6 etapas, poupando tempo e economizando reagentes. Já o bloco Neu5Ac $\alpha$ -2-3-prop-2-inil **24** foi sintetizado por duas rotas distintas, porém ambas resultaram em mistura de anômeros  $\alpha/\beta$  (**24  $\alpha/\beta$** ) em proporções de 0,25:0,75 e 0,45:0,55.

O acoplamento azido-alcino por meio de reação CuAAC foi efetivo e o glic aminoácido triazólico protegido **77 $\alpha/\beta$**  obtido em bom rendimento (61,4%). A purificação dessa mistura por CLAE foi realizada empregando o equipamento Shimadzu Shim-PaK e coluna C18 de fase reversa, o que forneceu os anômeros puros  $\alpha$  **77 $\alpha$**  e  $\beta$  **77 $\beta$** , mas em baixa quantidade. Assim, fez-se necessária a utilização da mistura **77  $\alpha/\beta$**  para obtenção do bloco **20B  $\alpha/\beta$**  e posterior emprego em *SPPS*.

Finalmente, os glicopeptídeos NHAcPro-Asp-[(5-acetamido-3,5-didesóxi-4',7',8',9'-tetra-*O*-acetil-D-glicero- $\alpha/\beta$ -D-galacto-2-nonulopiranosonato)-(2 $\rightarrow$ 6)-1,2,3-triazol-1,4)-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetil-2,6-didesóxi- $\beta$ -D-galactopiranosila)}Thr-Arg-Pro-GlyOH **19B  $\alpha/\beta$**  e NHAcPro-Asp-[ $\alpha$ GalNAc]Thr-Arg-Pro-GlyOH **21** foram obtidos após sequenciais etapas de acoplamento com aminoácidos e glic aminoácidos (**20B  $\alpha/\beta$**  e **52**) usando síntese em fase sólida e purificação por CLAE.

Visto o laborioso trabalho envolvendo a realização e otimização de inúmeras rotas sintéticas, além do tempo despendido durante esse período, não foi possível realizar as conjugações de **19B  $\alpha/\beta$**  e **21** à proteína carreadora BSA. Desse modo, esta última etapa e os posteriores ensaios biológicos de imunogenicidade serão realizados futuramente.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Bulário eletrônico. Disponível em : [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/index.asp](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp) [acessado em 01 de junho de 2018]

ANDRIANIFAHANANA, M.; MONIAUX, N.; BATRA, S. K. *Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases*. **Biochim Biophys Acta**, v.1765(2), p. 189-222, 2006.

ARAGÃO-LEONETI, V.; CAMPO, V.L.; GOMES, A.S.; FIELD, R. A.; CARVALHO, I. *Application of copper(I)-catalysed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) “click chemistry” in carbohydrate drug and neoglycopolymers synthesis*. **Tetrahedron**, v. 66, p. 9475-9492, 2010.

BEST, D.; CHAIRATANA, P.; GLAWAR, A. F. G.; CRABTREE, E.; BUTTERS, T. D.; WILSON, F. X.; YU, C-Y.; WANG, W-B.; JIA, Y-M.; ADACHI, I.; KATO, A.; FLEET, G. W. J. *Synthesis of 2-acetamido-1,2-dideoxy-D-galacto-nojirimycin [DGJNAc] from D-glucuronolactone: the first sub-micromolar inhibitor of  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidases*. **Tetrah. Lett.**, v. 51, p. 2222-2224, 2010.

BOCK, V. D.; HIEMSTRA, H.; VAN MAARSEVEEN, J. H. *CuI-Catalyzed Alkyne–Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective*. **Eur. J. Org. Chem.** p.51-68, 2006.

BONGAT, A. F.; DEMCHENKO, A. V. *Recent trends in the synthesis of O-glycosides of 2-amino-2-deoxysugars*. **Carbohydr. Res.** v. 342, p. 374-406, 2007.

BRISTER, M. A.; PANDEY, A. K.; BIELSKA, A. A.; ZONDLO, N. J. *OGlcNAcylation and Phosphorylation Have Opposing Structural Effects in tau: Phosphothreonine Induces Particular Conformational Order*. **J. Am. Chem. Soc.**, v.136, p. 3803-3816, 2014.

BROCKE, C.; KUNZ, H. *Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens*. **Bio. Med. Chem.**, v. 10, p. 3085-3112, 2002.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C. C.; Di NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity*. **Nature Rev. Microbiol.**, v.4, p. 229-236, 2006.

CAI, L.; GUAN, W.; WANG, W.; ZHAO, W.; KITAOKA, M.; SHEN, J.; O'NEIL, C.; WANG, P. G. *Substrate specificity of N-acetylhexosamine kinase towards N-acetylgalactosamine derivatives*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, p.5433–5435, 2009a.

CAI, L.; GUAN, W.; KITAOKA, M.; SHEN, J.; XIA, C.; CHENA, W.; WANG, P. G. *A chemoenzymatic route to N-acetylglucosamine-1-phosphate analogues: substrate specificity investigations of N-acetylhexosamine 1-kinase*. **Chem. Commun.**, v. 20, p. 2944–2946, 2009b.

CAI, H.; HUANG, Z-H; SHI, L.; ZOU, P.; ZHAO, Y-F; KUNZ, H.; LI, Y-M. *Synthesis of Tn/T Antigen MUC1 glycopeptide BSA conjugates and their evaluation as vaccines*. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 3685-3689, 2011.

CAMPO, V. L. ; RIUL, T. B. ; BORTOT, L. O.; MARTINS-TEIXEIRA, M. B.; MARCHIORI, M. F.; IACCARINO, E.; RUVO, M.; DIAS-BARUFFI, M.; CARVALHO, I. *A Synthetic MUC1 Glycopeptide Bearing GalNAc-Thr as a Tn Antigen Isomer Induces the Production of Antibodies against Tumor Cells.* **Chem. Bio. Chem.**, v. 18, p. 527-538, 2017.

CAMPO, V. L., RIUL, T. B., CARVALHO, I., BARUFFI, M. D. *Antibodies against Mucin-Based Glycopeptides Affect Trypanosoma cruzi Cell Invasion and Tumor Cell Viability.* **Chem. Bio. Chem.**, v. 15, p. 1495-1507, 2014.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. *Synthesis of glycosyl-amino acids of biological interest.* **Química Nova**, v. 31, p. 1027-1033, 2008.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I.; ALLMAN, S.; DAVIS, B.G.; FIELD, R. A. *Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycosyl-amino acids and glycopeptides related to Trypanosoma cruzi mucins.* **Org. Biomol. Chem.**, v. 16, pp. 2645-2657, 2007.

CAMPO, V. L.; IVANOVA, I. M.; CARVALHO, I.; LOPES, C. D.; CARNEIRO, Z. A.; SAALBACH, G.; SCHENKMAN, S.; DA SILVA, J. S.; NEPOGODIEV, S. A.; FIELD, R. A. *Click chemistry oligomerisation of azido-alkyne-functionalised galactose accesses triazole-linked linear oligomers and macrocycles that inhibit Trypanosoma cruzi macrophage invasion.* **Tetrahedron**. v.71, p. 7344-7353, 2015.

CAREY, Francis A.; SUNDBERG, Richard J. *Advanced organic chemistry: part A: structure and mechanisms.* 5ª edição, Springer Science & Business Media, 2007.

CARVALHO, I.; ANDRADE, P.; CAMPO, V. L.; GUEDES, P. M. M.; SESTI-COSTA, R.; SILVA, J. S.; SCHENKMAN, S.; DEDOLA, S.; HILL, L.; REJZEK, M.; NEPOGODIEV, S. A.; FIELD, R. A. *'Click chemistry' synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against Trypanosoma cruzi and its cell surface trans-sialidase.* **Bioorg. Med. Chem.**, v. 18, p. 2412–242, 2010.

CHAN, W. C. WHITE, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press, p. 9-31, 2000.

CHANG-CHENG, L.; YE X-S. *Carbohydrate-based cancer vaccines: target cancer with sugar bullets.* **Glycoconj. J.**, v. 29, p. 259–271, 2012.

DOORES, K. J.; GAMBLIN, D. P.; DAVIS, B. G. *Exploring and exploiting the therapeutic potential of glycoconjugates.* **Chem. Eur. J.**, v. 12, n. 3, p. 656-665, 2006.

DZIADEK, S.; KOWALCZYK, D.; KUNZ, H. *Synthetic vaccines consisting of tumor-associated MUC1 glycopeptide antigens and bovine serum albumin.* **Angew. Chem. Int. Ed.**, v.44, p. 7624-7630, 2005.

FERRIER, R. J.; COLLINS, P. M. *Monosaccharides, their chemistry and their roles in natural products.* New York: Wiley, p.594, 1996.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. . *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. **Int. J. Cancer**, v. 136, p. 359-386, 2015.

FERNÁNDEZ, E. M. S., NAVO, C. D.; MARTÍNEZ-SÁEZ, N.; RITA GONÇALVES-PEREIRA, R.; SOMOVILLA, V. J.; AVENOZA, A.; BUSTO, J. H.; BERNARDES, G. J. L.; JIMÉNEZ-OSÉS, G.; CORZANA, F.; FERNÁNDEZ, J. M. G.; MELLET, C. O.; PEREGRINA, J. M. *Tn Antigen Mimics Based on sp<sup>2</sup>-Iminosugars with Affinity for an anti-MUC1 Antibody*. **Org. Lett.**, v. 18, p. 3890–3893, 2016.

FRANCO, A. *Tumor-associated carbohydrate antigens: A possible avenue for cancer prevention*. **Scand. J. Immunol.**, v. 61, p. 391-39, 2005.

GIL, M. V.; AREVALO, M. J.; LOPEZ, O. *Click Chemistry — What's in a Name? Triazole Synthesis and Beyond*. **Synthesis**, v. 11, p. 1589-1620, 2007.

GAIDZIK, N.; WESTERLIND, U.; KUNZ, H. *The development of synthetic antitumour vaccines from mucin glycopeptide antigens*. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 4421–4442. 2013.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HOLEMANN, A.; SEEBERGER, P. H. *Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.15, n. 6, p. 615-622, 2004.

HUANG, L.; WANG, Z.; HUANG, X. *One-Pot Oligosaccharide Synthesis: Reactivity Tuning by Post-Synthetic Modification of Aglycon*. **Chem. Commun.**, v. 17, p. 1960-1961, 2004.

JACOBSSON, M.; MALMERG, J.; ELLERVIK, U. *Aromatic O-glycosylation*. **Carbohydr. Res.** v. 341, p. 1266-1281, 2006.

JULIEN, S.; VIDEIRA, P. A.; DELANNOY, P. *Sialyl-Tn in Cancer: (How) Did We Miss the Target?* **Biomolecules**, v. 2, p. 435-466, 2012.

KÄRKKÄINEN, T. S.; KARTHA, K. P. R.; MACMILLAN, D.; FIELD, R. A. *Iodine-mediated glycosylation en route to mucin-related glyco-aminoacids and glycopeptides*. **Carbohydr. Res.**, v. 343, p. 1830-1834, 2008.

KUBERAN, B.; SIKKANDER, S. A.; TOMIYAMA, H.; LINHARDT, R. J. *Synthesis of a C-glycoside analogue of sTn: an HIV- and tumor-associated antigen*. **Angew. Chem.**, v. 42, p. 2073-2075, 2003.

KUMAR, A. P.; SARMA, S. P.; SAMUELSON, A. G. *Mechanistic Studies on the Diazo Transfer Reaction*. **Tetrahedron Lett.** v. 55, p. 2917-2920, 2014.

LOUREIRO, L. R.; CARRASCAL, M. A.; BARBAS A.; RAMALHO, J. S.; NOVO, C.; DELANNOY, P.; VIDEIRA, P. A. *Challenges in Antibody Development against Tn and Sialyl-Tn Antigens*. **Biomolecules**, v. 5, p. 1783-1809, 2015.

LUO, X.; SUGIURA, T.; NAKASHIMA, R.; KITADE, Y. *Synthesis of oligonucleotides with glucosamine at the 3'-position and evaluation of their biological activity.* **Bioor. Med. Chem. Lett.**, v. 23, p. 4157-4161, 2013.

MARCHIORI, M. F.; SOUTO, D. E.; BORTOT, L. O.; PEREIRA, J. F.; KUBOTA, L. T.; CUMMINGS, R. D.; DIAS-BARUFFI, M.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L. *Synthetic 1,2,3-triazole-linked glycoconjugates bind with high affinity to human galectin-3.* **Bioorg. Med. Chem.**, v. 23, p. 414-3425, 2015.

MARCOTULLIO, M. C.; CAMPAGNA, V.; STERNATIVO, S.; CONSTANTINO, F.; CURINI, M. A. *New, Simple Synthesis of N-Tosyl Pyrrolidines and Piperidines.* **Synthesis**, v. 16, p. 2760-2766, 2006.

MARTÍNEZ-SÁEZ, N.; PEREGRINA, J.M.; CORZANA, F. *Principles of mucin structure: implications for the rational design of cancer vaccines derived from MUC1-glycopeptides.* **Chem Soc Rev.**, 27;46(23),7154-7175, 2017.

McDONALD, D. M.; BYRNE, S. N.; PAYNE, R. J. *Synthetic self-adjuvanting glycopeptide cancer vaccines.* **Frontiers in Chemistry**, v. 3, p. 1-8, 2015.

McGEARY, R. P.; JABLONKAI, I.; TOTH, I. *Towards synthetic vaccines built on carbohydrate cores.* **Lett. Pep. Sci.**, v. 8, p. 273-276, 2002.

NIKSERESHT, A. *SnCl<sub>4</sub>: An Efficient and Inexpensive Promoter for Synthesis of  $\omega$ -Functionalized Alkyl 1,2-trans-Glycosides from 1-O-Pivaloyl Donor.* **Russian Journal of General Chemistry**, v. 86, p. 167-172, 2016.

NYFFELER, P. T.; LIANG, C-H.; KOELLER, K. M.; WONG, C-H. *The Chemistry of Amine-Azide Interconversion: Catalytic Diazotransfer and Regioselective Azide Reduction.* **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, p.10773-10778, 2002.

OSINAGA, E. *Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites.* **IUBMBLife**, v. 59, p. 269-273, 2007.

PADRÓN, J. I.; MORALES, E. Q.; VÁZQUES, J. T. *Alkyl Galactopyranosides: Rotational Population Dependence of the Hydroxymethyl Group on the Aglycon and Its Absolute Configuration and on the Anomeric Configuration.* **J. Org. Chem.**, v. 63, p. 8247-8258, 1998.

PANCHADHAYEE, R.; MISRA, A. K.. *Efficient Iodine-Catalyzed Preparation of BenzylideneAcetals of Carbohydrate Derivatives.* **J. Carb. Chem.**, v. 27, p. 148-155, 2008.

PEI, Z.; DONG, H.; CARABALLO, R.; RAMSTRÖM, O. *Synthesis of positional thiol analogs of  $\beta$ -D galactopyranose.* **Eur. J. Org. Chem.** v. 29, p. 4927-4934, 2007.

PÉTURSSON, S. *Protecting groups in carbohydrate chemistry.* **J. Chem. Educ**, v. 11, p. 1297-1303, 1997.

ROJAS-OCÁRIZ, V.; COMPAÑÓN, I.; AYDILLO, C.; CASTRO-LÓPEZ, J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; HURTADO-GUERRERO, R.; AVENOZA, J.; ZURBANO, M. M.; PEREGRINA, J. M.; BUSTO, J. H.; CORZANA, F. *Design of  $\alpha$ -S-Neoglycopeptides Derived from MUC1 with a Flexible and Solvent-Exposed Sugar Moiety*. **J. Org. Chem.**, v. 81, p. 5929–5941, 2016.

SEEBERGER, P. H.; HAASE, W. C. *Solid-phase oligosaccharide synthesis and combinatorial carbohydrate libraries*. **Chemical Reviews**. v. 100, p. 4349-4394, 2000.

SEEBERGER, P. H.; WERZ, D. B. *Synthesis and medical applications of oligosaccharides*. **Nature**, v. 446, p. 1046-1051, 2007.

SILVA, J. A. G. *Estimativa 2018: Incidência do câncer no Brasil*. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf> (Acesso: 03/04/2018).

SLOVIN, S. F.; RAGUPATHI, G.; MUSSELLI, C.; OLKIEWICZ, K.; VERBEL, D.; KUDUK, S. D.; SCHWARZ, J. B.; SAMES, D.; DANISHEFSKY, S.; LIVINGSTON, P. O.; SCHER, H. I. *Fully synthetic carbohydrate-based vaccines in biochemically relapsed prostate cancer: clinical trial results with alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine conjugate vaccine*. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, p. 4292-4298, 2003.

TROPPER, F. D.; ANDERSSON, F. O.; BRAUN, S.; ROY, R. *Phase transfer catalysis as a general and stereoselective entry into glycosylazides from glycosyl halides*. **Synthesis**, p. 618-620, 1991.

TIWARI, V. K.; MISHRA, B. B.; MISHRA, K. B.; MISHRA N.; SINGH, A. S.; CHEN, X. *Cu-Catalyzed Click Reaction in Carbohydrate Chemistry*. **Chem. Rev.**, v. 116, p. 3086-3240, 2016.

VAN VRANKEN, David; WEISS, Gregory. *Introduction to bioorganic chemistry and chemical biology*. Garland Science, 2012.

WANG, Q.; GUO, Z. *Synthetic and Immunological Studies of sTn Derivatives Carrying Substituted Phenylacetylsialic Acids as Cancer Vaccine Candidate*. **ACS Med. Chem. Lett.**, v.2,p. 373-378, 2012.

WEIWER, M.; CHEN, C.; KEMP, M. M.; LINHARDT, R. J. *Synthesis and Biological Evaluation of Non-Hydrolyzable 1,2,3-Triazole-Linked Sialic Acid Derivatives as Neuraminidase Inhibitors*. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 2611–2620, 2009.

WELL, R. M. V.; KARKKAINEN, T. S.; KARTHA, K. P. R.; FIELD, R. A. *Contrasting reactivity of thioglucoside and selenoglucoside donors towards promoters: implications for glycosylation stereocontrol*. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 1391-1397, 2006.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. *A Vision for Vaccines Built from Fully Synthetic Tumor-Associated Antigens: From the Laboratory to the Clinic*. **J. Am. Chem. Soc.** v. 135, p.14462–14472, 2013.

WINTERFELD, G. A.; KHODAIR, A. I.; SCHMIDT, R. R. *O-glycosyl amino acids by 2-nitrogalactal concatenation — synthesis of a mucin-type O-glycan*. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 6, p. 1009-1021, 2003.

WITCZAK, Z. J.; BIELSKI, R. *Click Chemistry in Glycoscience: New Developments and Strategies*. Publicado por: John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, 2010.

WITCZAK, Z. J.; BIELSKI, R. *Click Chemistry in Glycoscience: New Developments and Strategies*, Hoboken, New Jersey, Part IV, Chapter 13, 2013.

WONG, C-H. *Carbohydrate-based Drug Discovery*, 1st ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 2003.

World Cancer Research Fund International. *Cancer statistics: worldwide*. Disponível em: [http://www.wcrf.org/cancer\\_statistics/world\\_cancer\\_statistics.php](http://www.wcrf.org/cancer_statistics/world_cancer_statistics.php) (Acesso: 03/04/2018).

WU, J.; GUO, Z. *Improving the Antigenicity of STn Antigen by Modification of Its Sialic Acid Residue for Development of Glycoconjugate Cancer Vaccines*. **Bioconjug. Chem.**, v. 17, p. 1537–1544, 2006.

XU, Y.; SETTE, A.; SIDNEY, J.; GENDLER, S. J.; FRANCO, A. *Tumor-associated carbohydrate antigens: A possible avenue for cancer prevention*. **Immunol. Cell Biol.**, v. 83, p. 440-448. 2005

YANG, W.; LIU, X.; PENG, X.; LI, P.; WANG, T.; TAI, G.; LI, J.; ZHOU, Y. *Synthesis of novel N-acetylneuraminic acid derivatives as substrates for rapid detection of influenza virus neuraminidase*.