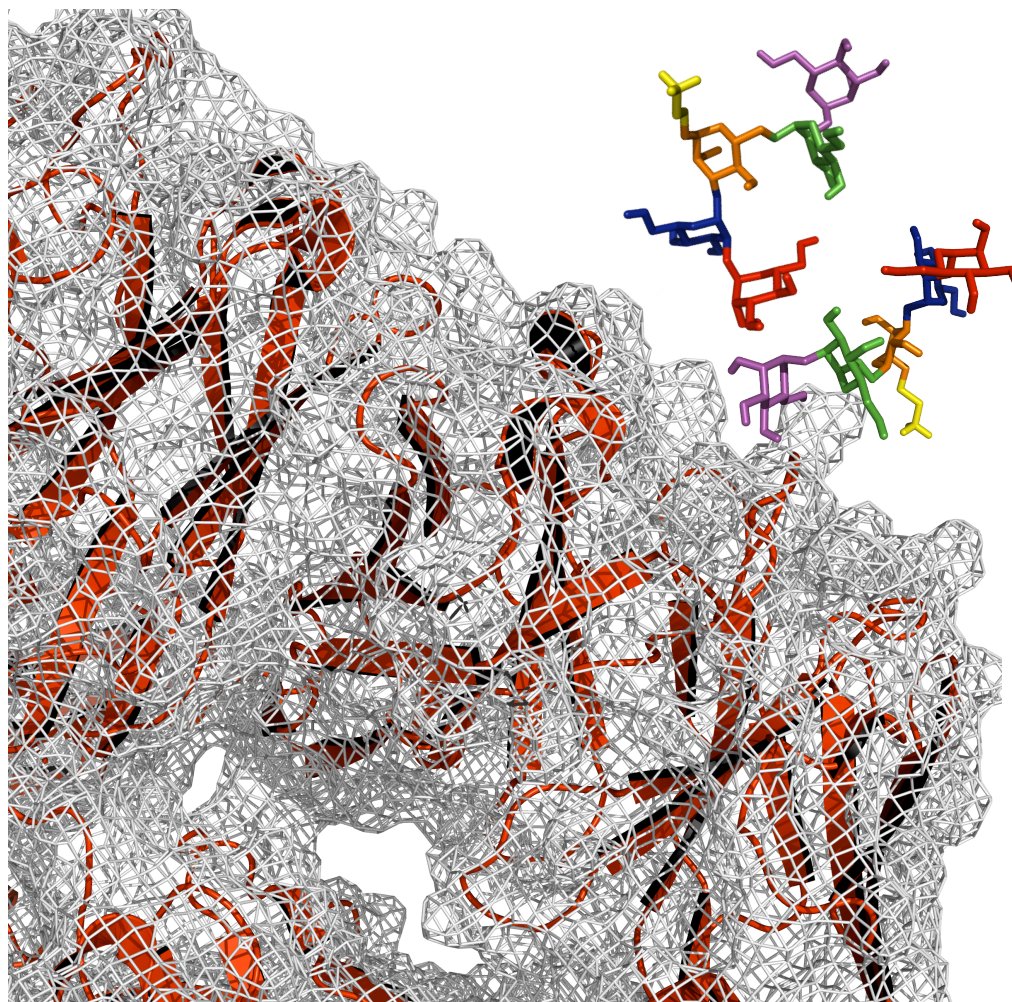


INTERACCIONES DE OLIGOMANÓSIDOS CON EL ANTICUERPO 2G12 (ANTI VIH-1)

ESTUDIOS POR RMN Y MODELIZACIÓN MOLECULAR

Unidad de Nanomateriales Biofuncionales (CIC biomaGUNE)



Pedro Miguel Enríquez-Navas

Tesis Doctoral

Sevilla, 2011



INTERACCIONES DE OLIGOMANÓSIDOS CON EL ANTICUERPO 2G12 (ANTI VIH-1). ESTUDIOS POR RMN Y MODELIZACIÓN MOLECULAR

Pedro Miguel Enríquez-Navas
Sevilla, 2011

CICbiomaGUNE
CSIC-Universidad de Sevilla



Nanomateriales Biofuncionales

**Instituto de Investigaciones
Químicas – Departamento de
Bioquímica y Biología
Vegetal**

**INTERACCIONES DE OLIGOMANÓSIDOS
CON EL ANTICUERPO 2G12 (ANTI VIH-1).
ESTUDIOS POR RMN Y MODELIZACIÓN
MOLECULAR**

Director de la Tesis

Doctorando

Jesús Angulo Álvarez

Pedro Miguel Enríquez-Navas

D. Jesús Angulo Álvarez, Investigador Ramón y Cajal del CSIC

CERTIFICA: Que el presente trabajo titulado: *“Interacciones de oligomanósidos con el anticuerpo 2G12 (anti VIH-1). Estudios por RMN y modelización molecular”* ha sido realizado bajo mi dirección y asesoramiento en los laboratorios de la Unidad de Nanomateriales Biofuncionales de CIC biomaGUNE (San Sebastián) y los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas de CIC Cartuja (Sevilla) durante los años académicos 2007-2011, constituyendo la Memoria presentada por el Lcdo. Pedro Miguel Enríquez-Navas para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Sevilla, Febrero del 2011

Fdo. Jesús Angulo Álvarez

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en la Unidad de Nanomateriales Biofuncionales (CIC biomaGUNE) y los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas (CIC Cartuja) con financiación del laboratorio de la Prof. Soledad Penadés concedida por el Centro de Investigaciones Cooperativas en Biomateriales (CIC biomaGUNE), en el marco del proyecto CTQ2008–04638 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN).

A mis padres y a mi hermano.

A Clara.

*Solo se pierde cuando se deja de luchar
¿Vais a dejar de luchar?*

Agradecimientos

Sevilla, 31 de Enero de 2011

Me gustaría empezar estos agradecimientos con Carmen Diago que, el primer día del curso de COU (clase de Biología, 1997) nos preguntó ¿Qué es la vida? Fue ese día, durante ese curso, cuando ella despertó en mí las ganas de investigar, las ganas de saber el por qué de las cosas. Fue la base de que hoy esté escribiendo estos agradecimientos.

En primer lugar me gustaría agradecer a Soledad Penadés por su apuesta en este proyecto, en esta idea, y por confiármelo, tanto a nivel científico como económico. Espero que sigas conservando esa energía durante mucho tiempo. Gracias.

De Jesús Angulo solo puedo decir que ha sido mi padre en este mundo. Hemos pasado tantas horas juntos, tantas ilusiones y desilusiones, que al final más que al mejor jefe, me llevo de él un amigo que, espero y confío, sigamos con nuestra amistad por mucho tiempo. Al final *We work it out*. Y, como no, a Esther, por *endulzarnos* tantas tardes de duro trabajo.

A Pedro M. Nieto, quiero agradecerle que me haya acogido en su grupo que, a pesar de la *especial* situación contractual en que me encontraba, me trató como uno más. Junto con Jesús, me ha enseñado todo lo que sé del mundo de RMN y construyó el (sub)grupo de *Estructurólogos* del grupo de Carbohidratos del IIQ que, me enorgullece decir, cada día crece más y mejor.

A Manolo Martín-Lomas, quiero agradecerle sus silencios, sus consejos, su forma de exigirme y, sin duda, su humor. Él, sin haber estado directamente involucrado en mis proyectos, ha sido la persona más exigente con los mismos. Gracias por esa exigencia y por todo lo que has hecho por la ciencia.

A Antonio Díaz-Quintana, quiero agradecerle el haber aceptado la tutoría de la tesis. Gracias por esto y por los consejos protocolarios.

Marco "El Capo" Marradi ha sido mi hermano mayor, sobre todo en esta última fase *terminal* de la tesis. Una persona que exige tanto como el que da merece más que este párrafo, pero espero que mi trabajo te haya compensado algo más. También agradecerle parte de la síntesis de los productos que he utilizado en este trabajo.

Respecto a la síntesis de los productos que he utilizado en este trabajo, de la cual depende fundamentalmente esta Tesis, quiero agradecerle a los *sintéticos* Olga Martínez-Ávila y a Fabrizio Chiodo, los buenos productos y la rapidez con lo que han hecho todos los productos que he utilizado para el desarrollo de esta Tesis.

A las chicas y chico que han pasado por el grupo de estructura del IIQ quiero agradecerles algo que a lo mejor ellos no saben o, quizás, no haya yo conseguido, algo bastante difícil, aprender a enseñar. Quiero recordarles que la evolución consiste en que las próximas generaciones sean mejores que las actuales. Gracias

Lara, Norcaris, Cinzia y Juan Carlos, por vuestra paciencia y por soportar mi (mal)humor durante el tiempo que os tuve que enseñar algo... Lo conseguí? No sé, a lo mejor os enseñé como *no* hacer las cosas.

En un ámbito mucho más distendido, quiero agradecer a todas las personas que compusieron y componen el grupo de Carbohidratos de Sevilla (IIQ). Seguro que se me olvida alguien, pero fue un grupo tan dinámico y trabajador y, al mismo tiempo, tan divertido que, algunas de las jornadas más duras de trabajo con ellos eran de *sol a sol*, literalmente. O acaso algún jefe duda que cuando salimos no seguimos hablando de trabajo. Gracias Javi, Juan Carlos, José Luis, Ricardo, Jesús, Andrea, David, Caroline, Rafa, Javi López, Susana, Macarena, Ainhoa, Oli, Beppe, (la) Mari (que al final me voy antes que tú...pero vaya si hemos vivido! Jejeje), José Juan (gracias por el *cálido* recibimiento en Milán), etc. Sé que me dejo a muchos... pero los que me han acompañado en este periodo han influido mi y, por ende, en esta Tesis. Gracias a todos y perdón a los que me dejo.

A Pablo Bernal y Diego Fort gracias por la compañía durante estos años y por los consejos durante esos *últimísimos* momentos antes de depositar la tesis.

De mi etapa en el IIQ no quiero olvidar a Alberto Escudero y Patricia Balbuena. Dos buenos amigos que siempre han sido un referente para mi en este oficio, desde la época de la universidad. Gracias por los consejos y por ser como sois.

Habré pasado poco tiempo, pero los miembros del laboratorio de Nanomateriales Biofuncionales (CIC biomaGUNE) han hecho que las estancias en Donostia hayan sido igualmente fructíferas como agradables. A Paolo, Ainhoa, Nuria, Juan, Isa, Blanca, incluso Mónica (la auténtica *Txeli*) y Gwladys, gracias por hacer este periodo mucho más fácil.

Como no, a mis compañeros Dres. con los que comparto mi *Student room*, a veces ruidosos, a veces los mejores consejos que he recibido en este periodo final, pero siempre divertidos! Juan, Antonio, Pawel, Sandra, etc. Gracias.

A Sonia le quiero agradecer la compañía que me ha hecho alrededor del mundo, o casi, al final no salí de Europa... Muchas gracias por esos momentos en los congresos y por los consejos al final e, igualmente, por alojarme en tu casa durante un tiempo... Bueno, gracias a ti y a Mikel por ese cuarto.

En el ámbito familiar, quiero agradecer en general a toda mi familia el apoyo a lo largo de estos cinco años, pero sobre todo cuando las cosas no iban bien, cuando volvía con un resultado que no me gustaba e incluso cuando las cosas con compañeros o jefes no iban bien. Especialmente, en particular, mis padres han sido los que me mejores consejos me han dado y sobre todo al final, que es cuando más largo se hace y más desanimado estaba. El mejor consejo sin duda: *Cuando tu jefe te dice que no te preocupes, empieza a preocuparte*. Esto aligeró mucho los procesos (cualquiera), al menos en mi cabeza.

A mi hermano y a los que vengan en el futuro decirles algo que he aprendido al final: la recompensa no es esta Tesis, no es este documento, la recompensa es el camino que he recorrido hasta llegar al final. Por duro que sea, la satisfacción de

haber superado tantos obstáculos es lo realmente gratificante. Así que, ¡aplícate el cuento!

A Dimas, gracias por enseñarme a comunicarme sin palabras. Sin duda mucha gente debería de ver lo que es la fidelidad, cariño y comunicación en un mismo ser y, todo esto, sin palabras.

A mis amigos César y Alzoray (también científicos), por una relación que cada vez es más fuerte y con los que literalmente he redescubierto el *nuevo mundo*. Gracias por los grandes momentos vividos juntos, a un lado y otro del *charco* y por enseñarme que *menos es más*.

A (Manuel) *Morta* y (Fernando) Solis, amigos que conservo desde el instituto y que han *sufrido* todas mis quejas a lo largo de sesiones de almuerzos en el *Foster's Hollywood*. Y también a mis *moter@s*, ducatistas y no-ducatistas, que también más de uno ha tenido que sufrir mis explicaciones de “¿pero tú a qué te dedicas?” Ya que Ducati Corse tiene a *Il Doctore*, el *DCA* tendrá un doctor. Gracias por ser mis amigos.

Y, por último, pero no menos importante, a Clara, la mujer con la que lo comparto todo, lo bueno y lo menos bueno. Si algo he aprendido a lo largo de estos cinco años de investigación es que si difícil es ser investigador, más difícil es ser pareja de un investigador. Así que, por tu paciencia, por conocerme, por comprenderme y por hacerlo todo mucho más fácil, Muchas Gracias.

Donostia, 5 de Febrero de 2011.

Índice

Capítulo 1: Introducción

1. Introducción	1
1.1. Objetivos de la presente Tesis Doctoral	3
2. Bases estructurales de las interacciones carbohidrato- proteína	4
3. Introducción al estudio de las interacciones carbohidrato- proteína por resonancia magnética nuclear	8
3.1. Métodos basados en el estudio de las señales del ligando	10
3.1.1. Observación de la transferencia de saturación	11
4. Modelización molecular de complejos ligando/proteína. Docking ligando/proteína	21
4.1. Algoritmos de Docking	22
4.2. Docking de proteína flexible	23
4.3. Funciones de Scoring	24
4.4. Capacidades y limitaciones	24
5. Bibliografía	26

Capítulo 2: Interacción 2G12/Oligomanósidos. Estudios por RMN y Cálculos Teóricos

1. Introducción al sistema biológico estudiado	29
1.1. SIDA y VIH. Fracasos en el desarrollo de una vacuna eficiente	29

1.2.	Características estructurales del VIH. Glicoproteínas de la envoltura. Estructuras <i>high-mannose</i>	30
1.3.	Anticuerpo 2G12. Interacciones con glicanos <i>high-mannose</i> . Antecedentes estructurales	32
2.	Resultados y discusión	39
2.1.	STD NMR y cálculos de epítomos	39
2.2.	Conformaciones enlazadas de los ligandos: Experimentos de NOE transferido	57
2.3.	Estudio de los fragmentos de los ligandos ramificados.....	63
3.	Materiales y Métodos	70
3.1.	Compuestos	70
3.2.	Espectroscopía de RMN	70
3.3.	Cálculos con CORCEMA-ST.....	71
3.4.	Cálculos de Docking	73
4.	Bibliografía	73

Capítulo 3: Determinación de K_D a partir de las pendientes iniciales de las curvas de crecimiento de STD

1.	Introducción	76
2.	Resultados y discusión	78
2.1.	Análisis de los factores que afectan a la determinación de las constantes de disociación proteína-ligando por titulaciones con experimentos STD NMR	78
2.1.1.	Efecto del tiempo de saturación en los experimentos de STD NMR	79

2.1.2. Efecto de la intensidad de las señales de STD NMR.....	84
2.1.3. Efecto de la fracción de ligando enlazado	87
2.2. Discusión de Factores	90
2.3. Isotermas de afinidad a partir de las pendientes iniciales de las curvas de saturación de los factores de amplificación de STD	97
2.4. Determinación de la afinidad de las interacciones 2G12/oligomanósidos mediante la aproximación de las pendientes iniciales de los factores de amplificación de STD	103
3. Materiales y Métodos	109
3.1. Espectroscopía de RMN	109
3.2. Isotermas de asociación a partir de los factores de amplificación de STD	109
3.3. Isotermas de asociación a partir de las pendientes iniciales de los STD-AF	110
4. Bibliografía	112

Capítulo 4: Interacción 2G12/GNPs. Estudios por RMN

1. Introducción	113
2. Resultados y discusión	115
3. Materiales y Métodos	124

3.1. Espectroscopía de RMN	124
3.2. Constantes de inhibición	124

4. Bibliografía	125
------------------------------	------------

Conclusiones

Anexo

Capítulo 1:

Introducción

1. Introducción

Esta tesis doctoral aborda el estudio, mediante técnicas de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en disolución, de las interacciones de oligomanósidos presentes en la glicoproteína gp120 de la envuelta del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), implicada en el proceso de infección, y el anticuerpo monoclonal anti-HIV-1 humano 2G12.^{1, 2, 3}

La espectroscopía de RMN es una técnica particularmente apropiada para obtener información estructural a nivel atómico de interacciones ligando-proteína caracterizadas por cinéticas de asociación-disociación relativamente rápidas ($k_{\text{off}} > 10^3$ Hz),⁴ como suele ser el caso de las interacciones proteína-carbohidrato. Este tipo de interacciones parecen tener lugar entre la gp120 del VIH y el anticuerpo 2G12^{2, 3} aislado de pacientes con VIH que no desarrollan el Síndrome de Inmunodeficiencia Humana Adquirida (SIDA).¹ En particular, las técnicas de RMN basadas en la observación de las señales del ligando, moduladas por el intercambio químico entre los estados libre y enlazado, tales como la diferencia de transferencia de saturación (STD NMR),⁵ el NOE transferido,⁶ WaterLOGSY,⁷ y DOSY⁸, permiten obtener información estructural y dinámica del estado enlazado del ligando, incluso en aquellos casos de proteínas de elevado peso molecular (mayor de 30 kDa). Estas técnicas en disolución complementan la información que proporcionan otras técnicas físicas como la difracción de rayos X, y a su vez se pueden complementar con técnicas computacionales, como los cálculos teóricos de docking, mecánica, y dinámica molecular, para la caracterización de las interacciones en sistemas multimoleculares de interés biológico.

Entre los sistemas biológicos estudiados de mayor interés están aquellos que implican a los carbohidratos (también denominados hidratos de carbono o glicanos), o sus conjugados (glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos), y sus receptores específicos, sistemas que controlan multitud de procesos celulares.⁹ Las interacciones carbohidrato/receptor controlan procesos intra-, e intercelulares, endocitosis e inflamación. También pueden regular la adhesión, migración y crecimiento celular, así como la apoptosis. Contribuyen a la respuesta inmune contra patógenos, pero a su vez pueden ayudar al patógeno a evitar la respuesta del sistema inmune.¹⁰

Concretamente, las interacciones glicano-anticuerpo están involucradas en el reconocimiento del VIH por parte del anticuerpo 2G12, el cual es capaz de bloquear un amplio espectro de tipos de virus VIH, y que ha sido aislado de pacientes infectados por el VIH pero que no han desarrollado el SIDA^{1, 11}. El anticuerpo 2G12 interactúa con los glicanos de la gp120, específicamente con aquellos que presentan estructuras denominadas “*high-mannose*”,¹ y que se presentan de forma agrupada (clusters) en la superficie de la proteína (figura 1).

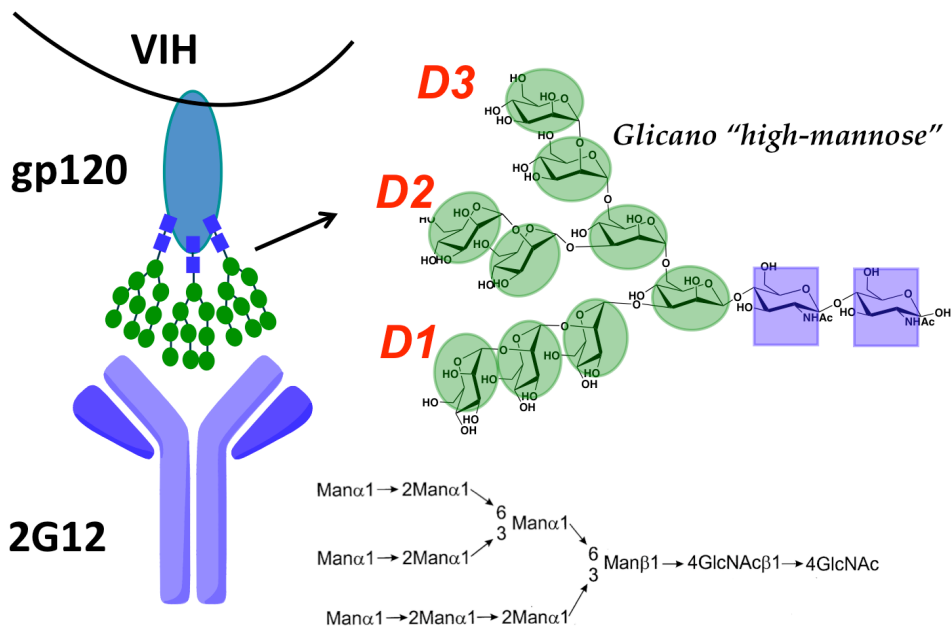


Fig. 1: Esquema indicando la interacción de los “clusters” de glicanos tipo *high-mannose* y el anticuerpo 2G12, y la estructura del undecasacárido N-glicano que se encuentra covalentemente unido a la gp120 a través de cadenas laterales de residuos de asparraginas. D1, D2, y D3, indican la nomenclatura de cada uno de los tres “brazos” constituyentes del glicano.

El aislamiento de anticuerpos neutralizantes de pacientes portadores del virus que no desarrollan el SIDA ha proporcionado información para abordar una aproximación inversa (“retro-vaccinología”) a aquellas tradicionales en el desarrollo de vacunas, como son el uso de antígenos desactivados (bacterias y cápsides de virus, etc.) para generar una respuesta inmune. Conocer las bases moleculares de la interacción antígeno/anticuerpo puede aportar información sobre los requerimientos estructurales óptimos del anticuerpo para diseñar nuevas estructuras antigénicas y crear la mejor vacuna posible.¹² Después de 25 años de investigación, y a pesar del enorme esfuerzo que llevan a cabo numerosos grupos de investigación, no se ha sido capaz de prevenir la infección por VIH (vacunas/microbicidas) o erradicarla una vez que ha tenido lugar (antivirales).¹³ La falta de un conocimiento exacto de los mecanismos de infección y de reproducción que usa el virus puede estar en el origen de este fracaso.¹⁴

Una de las líneas de investigación de nuestro grupo intenta desarrollar sistemas multivalentes basados en nanopartículas de oro funcionalizadas con estructuras parciales de los glicanos tipo *high-mannose* de la gp120.¹⁵ Estas gliconopartículas están diseñadas para bloquear la adhesión del VIH a la mucosa (microbicida) y/o para generar una respuesta inmune (vacunas) contra el virus. Previamente, gliconopartículas que incorporaban el tetramanósido “D1” (Man α 1,2Man α 1,2Man α 1,3Man, figura 1) han demostrado ser capaces de inhibir la infección

de linfocitos por el virus en un modelo celular que mimetiza la ruta natural de infección por el VIH a través de células dendríticas.¹⁶ Aunque los resultados son muy esperanzadores, no conocemos cuales son las bases moleculares que controlan estos resultados. Entender las bases moleculares de la inhibición de la infección por nanopartículas en este modelo celular, puede ser esencial para comprender mejor los mecanismos de infección y poder desarrollar posibles vacunas, microbicidas y/o agentes antivirales.

1.1 Objetivos de la presente Tesis Doctoral

En esta tesis doctoral, se ha abordado el estudio de las interacciones en disolución entre una serie de oligomanósidos, que representan estructuras parciales del glicano tipo *high-mannose*, y el anticuerpo 2G12, y la evaluación de sus afinidades. Para ello se han empleado, de forma extensiva, técnicas de RMN (fundamentalmente STD NMR⁵ y NOE-transferido¹⁷) basadas en el análisis de las señales espectroscópicas del ligando (oligomanósidos) cuando éste interacciona con su receptor (2G12).

Mediante estas técnicas, nos propusimos, como **primer objetivo**, identificar a nivel atómico aquellos contactos oligomanósido/anticuerpo que resultan claves en la interacción 2G12/gp120, tratando de abordar el sistema natural desde un punto de vista reduccionista en el que dichas interacciones se analizan haciendo uso de oligomanósidos sintéticos de composición química definida, que se han seleccionado de la “plantilla” de los glicanos *high-mannose* naturales (figura 1). La determinación de la estructura de los epítomos del antígeno resulta de interés para el desarrollo de futuros agentes inmunogénicos capaces de generar la producción de anticuerpos tipo-2G12 en el organismo humano. El desarrollo de este objetivo esta descrito en el **capítulo 2** de esta tesis.

Una vez establecidos los modos de asociación entre el 2G12 y los distintos oligomanósidos, nos planteamos el problema concreto de la determinación de sus constantes de afinidad en disolución, mediante titulaciones de un solo ligando monitorizadas por espectroscopía de STD NMR. La caracterización de las afinidades de los diferentes ligandos por el anticuerpo 2G12 ha requerido de un estudio detallado de los factores que afectan a esta clase de medidas en disolución mediante dicha técnica espectroscópica. Cuando comenzamos este trabajo, no era posible la determinación precisa de valores de afinidad ligando-proteína por dicha técnica. El **segundo objetivo** que nos propusimos en esta Tesis fue, por tanto, hacer un estudio de los distintos parámetros que afectan a las medidas, utilizando para ello sistemas modelo de interacción ligando/proteína, y diseñar protocolos apropiados para poder cancelar dichos factores, cuya influencia puede repercutir en un incremento considerable de los errores experimentales de las medidas. Así, esperábamos obtener las constantes de afinidad

2G12/oligomanósidos mediante la técnica STD NMR con la mayor precisión posible. El desarrollo de este objetivo y sus resultados se presentan en el **capítulo 3**.

En un marco más amplio, y gracias a la experiencia del grupo en la síntesis de gliconanopartículas con núcleo metálico,¹⁸ hemos utilizado gliconanopartículas de oro funcionalizadas con los mismos oligomanósidos, para estudiar las interacciones entre éstas y el anticuerpo 2G12 con la ayuda de experimentos de inhibición competitiva. Las gliconanopartículas constituyen sistemas multivalentes¹⁵ que mimetizan las agrupaciones de los glicanos tipo *high-mannose* de la gp120, y que probablemente sean el origen de la respuesta del sistema inmune que genera el 2G12 frente al VIH. Los resultados obtenidos en el desarrollo de este **tercer objetivo** se describen en el **capítulo 4** de esta tesis.

Hemos creído conveniente en este primer capítulo introducir, en primer lugar, de forma breve, las bases moleculares de las interacciones carbohidrato/proteína en las que se centra esta tesis, y, por último, una descripción de las técnicas de RMN y cálculos teóricos que se han utilizado a lo largo de este trabajo de investigación.

2. Bases estructurales de las interacciones carbohidrato-proteína

El conocimiento de las bases estructurales del reconocimiento molecular carbohidrato/proteína ayuda a la comprensión global de este tipo de interacciones, que se fundamentan en fuerzas intermoleculares que se establecen entre ligando y receptor, y que presentan diferentes características. Históricamente las proteínas que reconocen carbohidratos se conocen como lectinas.¹⁹ Aunque, como en el caso de 2G12, objeto de la presente tesis doctoral, algunos anticuerpos también reconocen carbohidratos, discutiremos los elementos característicos de los procesos de reconocimiento molecular de carbohidratos en lectinas, con el fin de darle a la discusión la mayor generalidad posible. A continuación se exponen brevemente los tipos de fuerzas que gobiernan estas interacciones.

a) Enlace de hidrógeno directo

El enlace de hidrógeno cooperativo, en el que los grupos hidroxilos actúan como donadores y como aceptores de hidrógeno, es característico en las interacciones de los grupos funcionales de los residuos de aminoácidos de las lectinas con los hidroxilos de los azúcares. El grupo hidroxilo, debido a su configuración electrónica, puede actuar aceptando dos enlaces de hidrógeno y donando uno solamente. Respecto a las lectinas, generalmente, una cadena lateral ácida es la que suele actuar como aceptor de uno o dos hidroxilos procedentes del azúcar. Por el contrario, los donadores de enlace de hidrógeno principalmente proceden de las amidas de

la cadena principal, o de las presentes en las cadenas laterales de las asparraginas y, menos frecuentemente, de las glutaminas. Existen casos en los que cambios en la conformación del anillo de piranosa del azúcar dan lugar a otros posibles enlaces de hidrógeno, por lo que este factor hay que tenerlo en cuenta. Por otro lado, los grupos funcionales particulares que tenga cada azúcar y que formen enlaces de hidrógeno con la lectina serán aquellos necesarios para el reconocimiento específico y la discriminación de otros azúcares, siendo aquellas posiciones que no son usadas como elementos de reconocimiento las que quedan expuestas al disolvente. El uso de donadores y aceptores de enlace de hidrógeno fijos es importante en la especificidad pero, por ejemplo, el grupo hidroxilo presente en la serina le concede a las lectinas algo de plasticidad en el reconocimiento ya que, debido a la flexibilidad de la cadena lateral, puede no ser capaz de discriminar entre hidroxilos epiméricos²⁰

En general, los enlaces de hidrógeno formados entre la lectina y las zonas determinantes en el azúcar están protegidos del disolvente, por lo que estas interacciones tienen lugar en un ambiente muy poco dieléctrico y son, probablemente, a nivel entálpico, más fuertes que las interacciones con el agua.²⁰

b) Enlaces de hidrógeno mediados por agua

Estos enlaces de hidrógeno pueden ser igual de fuertes que los enlaces de hidrógeno directos. En algunos casos, comparando el sitio de reconocimiento de algunas lectinas en estructuras cristalográficas correspondientes a ambos estados, enlazado y no-enlazado, se comprueba que algunas moléculas de agua aparecen tanto en presencia como en ausencia del azúcar (ligando), formando enlaces de hidrógeno con la lectina. En este caso, las moléculas de agua actúan como elementos estructurales fijos y, por lo tanto, pueden ser consideradas como una parte de la arquitectura del sitio de reconocimiento, contribuyendo así a la asociación del ligando.²⁰

c) Papel de los cationes divalentes²⁰

Muchos tipos de lectinas requieren de un catión divalente para desarrollar su función. Dependiendo del tipo de interacción de dicho catión con el ligando, podemos distinguir:

Efectos indirectos: las lectinas leguminosas usan Ca^{2+} y Mn^{2+} para estabilizar su sitio de reconocimiento y fijar las posiciones de los aminoácidos que interaccionarán con los ligandos sacarídicos. Los cationes también fijan los aminoácidos presentes en la segunda barrera de elementos que componen el sitio de reconocimiento.

Interacciones directas: las lectinas tipo-C son singulares, entre todas las lectinas que han sido estructuralmente caracterizadas, puesto que en todas ellas el catión Ca^{2+} forma

enlaces de coordinación directamente con el azúcar que actúa como ligando. Sin embargo, no todas las lectinas que requieren Ca^{2+} son tipo-C (p. ej. Calnexina, y calreticulina).

d) Interacciones no-polares. Interacción “carbohidrato-aromático”

Normalmente, estas interacciones surgen del empaquetamiento entre zonas relativamente hidrofóbicas del azúcar y cadenas laterales hidrofóbicas de la proteína, usualmente cadenas aromáticas. No es habitual la presencia de cadenas laterales alifáticas en las interacciones no-polares con azúcares, lo cual sugiere que la interacción con la nube electrónica deslocalizada del anillo aromático es energéticamente significativa más allá de la complementariedad entre superficies apolares. Más aún, se ha podido demostrar que la fuerza directriz de la interacción es la proximidad de los protones tipo C-H del azúcar (enlaces polarizados por la presencia de un oxígeno de hidroxilo unido a dicho carbono), lo que conlleva una carga parcial netamente positiva, y la nube de los electrones π del anillo aromático, con una carga neta negativa. Esto ha llevado a la descripción de “enlaces de hidrógeno no-convencionales” en el contexto de la interacción “carbohidrato-aromático”, de importancia capital en los procesos de reconocimiento molecular de carbohidratos por proteínas en disolución.²¹

e) Sitios extendidos²⁰

Algunas lectinas son específicas en el reconocimiento de una sola unidad de carbohidrato y no discriminan lo que esté unido a esta unidad de reconocimiento monosacáridica. Por el contrario, en otros casos, se observa un aumento de la afinidad cuando otros azúcares están unidos al primario y determinante, incluso cuando la lectina no tiene especial afinidad por el segundo carbohidrato como unidad monosacáridica simple. El término *sitio extendido* es útil para describir sitios de reconocimiento que interaccionan específicamente con más de un residuo de azúcar para, de esta forma, causar un incremento en la afinidad.

f) Sitios secundarios²⁰

Algunas lectinas pueden tener dos sitios activos claramente separados y termodinámicamente independientes en un mismo protómero (cada una de las cadenas polipeptídicas de una proteína). Los sitios secundarios son más significativos en términos del enlace multivalente, ya que múltiples enlaces independientes pueden aumentar enormemente la afinidad cuando se trata de algunos ligandos multivalentes. Sin embargo, en ningún caso se ha descrito cooperatividad molecular en lectinas, en términos de que la unión de un ligando induzca, o desfavorezca, la unión de otro.

g) Cambios conformacionales tras la asociación del azúcar²⁰

Las lectinas experimentan pocos cambios conformacionales después de enlazar el azúcar. En ningún caso han sido observados cambios globales. No obstante, se pueden producir pequeños movimientos en la zona más cercana al azúcar. Así, la unión del ligando reduce la gran cantidad de variabilidad conformacional en disolución de ciertos residuos, ya que de esta forma se optimizan los contactos necesarios para el enlace. De hecho, el sitio de reconocimiento de las lectinas parece estar “preformado” con moléculas de agua del disolvente que forman enlaces de hidrógeno con la proteína no-enlazada, en un modelo que mimetiza perfectamente los enlaces de hidrógeno de los grupos hidroxilos del azúcar. Sin embargo, los carbohidratos sí que pueden llegar a modificar bastante su conformación al interactuar con el sitio de reconocimiento de la proteína.

h) Solvatación/desolvatación. Papel del agua

El agua interviene en todas las asociaciones biológicas jugando un papel central, ya que las interacciones entre sus moléculas se perturban con las superficies moleculares, ordenándolas o forzándolas. Esta energía es clave para ayudar a dirigir las interacciones biológicas específicas. El agua acompaña a los reactivos para que se encuentren el uno con el otro, actuando como una chaperona. Así, un ligando que es complementario al sitio de reconocimiento de la proteína, puede desplazar rápidamente las moléculas de agua del sitio activo de la proteína para facilitar la formación del complejo adecuado. Esta energía de solvatación/desolvatación (hidratación/deshidratación, en el caso del agua) es clave en la termodinámica de las interacciones carbohidrato/proteína.²²

En resumen, podríamos decir que el enlace de hidrógeno es parte fundamental de las interacciones proteína/carbohidrato, y que el carácter direccional de éste es el que confiere a las proteínas la habilidad de diferenciar entre azúcares epímeros en una sola posición (por ejemplo glucosa y galactosa), ya que el cambio de configuración de un solo centro estereogénico puede llevar a la pérdida de un enlace de hidrógeno proteína-ligando “clave” en la estabilización del complejo (concepto de “grupos polares clave” introducido por el Prof. Raymond Lemieux). La mayoría de los enlaces de hidrógeno están formados por grupos cargados o grupos polares, aceptores o donadores, pertenecientes a residuos de la cadena polipeptídica, y los hidroxilos del azúcar. Por otro lado, el empaquetamiento hidrofóbico y los enlaces de coordinación azúcar-Ca²⁺, en las lectinas tipo C, contribuyen sustancialmente a la afinidad.²⁰

En la actualidad sigue existiendo un hueco fundamental entre las estructuras observadas y nuestro entendimiento termodinámico de las bases del reconocimiento selectivo de azúcares. La combinación de estudios estructurales con mutagénesis de la proteína y estudios de

asociación usando varios azúcares modificados dan una clara evidencia de qué residuos de aminoácidos y de qué parte del azúcar son fundamentales para el reconocimiento selectivo del ligando. No obstante, estos experimentos por sí solos no nos aportan información sobre qué tipo de interacción contribuye a la energía total de enlace y en qué cantidad. Esta dificultad se hace mucho más acusada cuando se comparan lectinas con una estructura similar pero con distinta especificidad de enlace, sabiendo que la diferencia en la especificidad observada no puede ser predicha a partir de las diferencias en los aminoácidos cercanos al sitio activo de esas proteínas. Establecer la conexión entre las estructuras y la termodinámica para las interacciones azúcar/proteína es uno de los mayores retos actuales.²⁰

3. Introducción al estudio de las interacciones carbohidrato-proteína por resonancia magnética nuclear

El reconocimiento molecular de ligandos de tamaño pequeño/medio está presente en el seno de los procesos biológicos. A nivel molecular se puede decir que una parte importante de las actividades biológicas se reducen al reconocimiento de moléculas pequeñas, o de tamaño medio, por parte de macromoléculas, principalmente proteínas. En los últimos años una de las técnicas más utilizada para el estudio de estos procesos ha sido la espectroscopía RMN.¹⁰ De hecho, una gran cantidad de publicaciones describen estudios de interacciones entre proteínas y ligandos usando RMN de muy diversas formas.^{23, 24} Una de las ventajas de la RMN para el estudio de estas interacciones es que se puede extender su aplicabilidad hasta valores de afinidades en el rango milimolar (en términos de constantes de disociación), una región no muy accesible para otras técnicas físicas.²⁵

El objeto de estudio de la RMN, en términos de la observación de señales, puede ser el ligando, la proteína, o ambos. En la práctica sólo una de las especies será elegida para la observación, y solo en determinadas condiciones apropiadas ambas especies serán analizadas conjuntamente. Cuando se esté observando el ligando, el experimento de RMN tendrá que estar optimizado para diferenciar entre el ligando en el estado libre (no enlazado a la proteína) y el ligando en el estado enlazado al receptor. Por otro lado, cuando el parámetro observado dependa de la proteína, el experimento tiene que estar optimizado para diferenciar entre la cantidad de proteína libre y aquella formando el complejo proteína-ligando.²⁵



Esquema 1: Equilibrio en una asociación entre una proteína y un ligando dados y definición de las constante de disociación a partir de la concentración de las especies involucradas en el equilibrio y de las constantes cinéticas que gobiernan los procesos de asociación y disociación.

Cualquier proceso de reconocimiento molecular en disolución está caracterizado por una condición de equilibrio que viene como resultado del balance entre las energías puestas en juego en los sucesos de asociación y disociación entre las distintas especies participantes, regidos por constantes cinéticas, k_{on} y k_{off} , respectivamente (esquema 1). Los complejos proteína-ligando son sistemas dinámicos y, por lo tanto, las proporciones de las formas libre y enlazada de los componentes del complejo, que dependerá de las condiciones experimentales, así como la velocidad a la que se intercambien, son fundamentales para la optimización de los experimentos de RMN. Desde el punto de vista cinético, para un sistema con un intercambio lento en la escala de desplazamientos químicos (k_{off} mucho menor que la diferencia de desplazamientos químicos entre los estados libre y enlazado, en Hz), el espectro presentará señales diferentes para los estados libre y enlazado del ligando, y las concentraciones de las especies “ligando libre” y “ligando enlazado” podrían obtenerse directamente monitorizando la evolución de las señales de la molécula pequeña. Sin embargo, en la práctica, la condición de intercambio lento va asociada a valores de K_D en el orden sub-micromolar, lo que supone la integración de señales en ese orden de concentraciones ($< \mu\text{M}$) en un espectro con un elevado número de señales (la proteína estaría en concentración parecida), pudiendo resultar muy complicado, tanto por el mayor solapamiento entre las señales a integrar como por la baja relación señal ruido de estas señales.²⁵

Para un sistema con intercambio rápido (k_{off} mucho mayor que la diferencia de desplazamientos químicos entre los estados libre y enlazado, en Hz) la señal de RMN observada es un promedio ponderado de las señales de los estados libres y enlazados, dependiente, por tanto, de las fracciones de ligando en cada uno de los dos estados²⁴. Así:

$$M_{obs} = X_{libre} \cdot M_{libre} + X_{enlazado} \cdot M_{enlazado} \quad (\text{ecuación 1})$$

donde X_j es la fracción molar de especie j en cada estado, M_{obs} es la magnitud (intensidad) de la señal de RMN medida, y se cumple que: $X_{libre} + X_{enlazado} = 1$.

Nuestro trabajo se apoyará en los métodos basados en la observación de las señales del ligando, por dos motivos principales: (i) las interacciones proteína-carbohidrato tienden, en general, a caer en un rango de afinidades que pueden ser consideradas débiles, con cinéticas (k_{off}) rápidas en comparación con las variaciones de desplazamientos químicos; y (ii) el sistema objeto de estudio implica una proteína de muy elevado peso molecular (~145 kDa), lo que hace prácticamente inabordable su estudio directo por RMN. Los métodos de RMN de observación de ligando más usuales serán introducidos a continuación.

3.1. Métodos basados en el estudio de las señales del ligando

El desarrollo de potentes, y relativamente simples, experimentos de RMN basados en la detección y análisis de las señales de la molécula pequeña (ligando), para el estudio de interacciones proteína-ligando en disolución, ha supuesto un renacido interés en las aplicaciones de la RMN en la caracterización de dichas interacciones sin tener que recurrir a una tediosa resolución estructural completa del complejo. Precisamente este hecho ha llevado a la RMN a constituirse en una técnica poderosa en el campo del descubrimiento de fármacos, aportando información clave tanto en las etapas iniciales de cribado, como en subsiguientes procesos de optimización. De particular interés han sido las técnicas como el NOE transferido y aquellas basadas en la transferencia de saturación intermolecular. Ambos tipos de experimentos han sido diseñados para la detección de la interacción entre el ligando y la proteína. No obstante, a lo largo de la descripción de los diferentes métodos veremos cómo se puede obtener más información de valor estructural a partir del análisis de las señales del ligando.²⁵

En estos experimentos la especie observada es el ligando, y casi siempre será titulada en presencia de la proteína hasta que esté en una condición óptima para los experimentos a realizar, en la gran mayoría de los casos en un exceso significativo respecto a la cantidad de proteína en la disolución. Es conveniente considerar los experimentos como de dos tipos: uno en los que se medirán parámetros convencionales como desplazamientos químicos, anchos de línea y tiempos de relajación, que nos darán información sobre la condición del equilibrio en disolución; y otros basados en la observación de transferencia de magnetización intermolecular, que, como veremos, potencialmente nos pueden dar mayor cantidad de información sobre la interacción, y los cuales se han venido haciendo más populares en los últimos tiempos.²⁵

Una ventaja fundamental en el estudio de las interacciones ligando-proteína a través de las señales del ligando es que no hay límite superior respecto al tamaño de la proteína, por lo que no hay necesidad de enriquecerla isotópicamente (a efectos prácticos, en estos experimentos podemos decir que la proteína no se observa). Una premisa asumida es que el complejo proteína-ligando presenta intercambio químico rápido en la escala de tiempos de la RMN, de modo que el parámetro observado será proporcional al promedio ponderado en las fracciones molares de los estados libre y enlazado. Para muchos complejos la constante de asociación (k_{on}) se puede considerar limitada por fenómenos de difusión, sin cometer mucho error, teniendo, pues, un valor que estará comprendido entre 10^7 - 10^8 $M^{-1}s^{-1}$.²⁵ Si el ligando interacciona fuertemente con la proteína, se dará la condición de intercambio lento y se podrán observar señales por separado para el ligando libre y enlazado. En cambio, para ligandos con una afinidad más débil, tendrá lugar la condición de intercambio rápido y la señal observada

será el promedio de los valores correspondientes a los estados libre y enlazado compensados por la fracción molar en cada estado. Sin embargo, el efecto de una desviación de estas condiciones sobre las medidas finales puede ser significativo. Así, por ejemplo, en la determinación de constantes de disociación, asumiendo este tipo de intercambio se puede cometer un error de hasta dos órdenes de magnitud si resultara que el intercambio no fuera rápido.²⁵

En la presente tesis doctoral, de entre todas las técnicas de RMN basadas en el ligando (observación en la variación de los desplazamientos químicos del ligando, observación en la variación de los tiempos de relajación del ligando, observación en la variación de difusión traslacional, etc.)²⁵ se han utilizado fundamentalmente aquellas basadas en procesos de transferencia de la proteína al ligando, bien de magnetización (STD NMR y NOEs intermoleculares), bien de NOE intramolecular (NOE transferido), que a continuación se describen de una forma resumida.

3.1.1. Observación de la transferencia de magnetización

Desde el año 2000, dos métodos relativamente novedosos para el estudio de los complejos proteína-ligando están disponibles, *Saturation Transfer Difference* (STD) NMR⁵ y *Water Ligand Observation with Gradient Spectroscopy* (WaterLOGSY).⁷ Ambas técnicas están basadas en la observación de la cantidad de magnetización que queda en el ligando libre en disolución a partir de una etapa previa de transferencia al ligando durante el estado enlazado, proveniente de los protones de la proteína, o bien de éstos y de las moléculas de agua de la disolución, en el caso del WaterLOGSY. Esto se consigue a través de la excitación selectiva de los protones de la proteína mediante un tren de pulsos blandos (STD NMR)²³ o perturbando exclusivamente la magnetización del disolvente mediante un pulso selectivo de 180° a la señal del agua (WaterLOGSY).²⁶ Las respuestas a los experimentos de transferencia de magnetización no son parámetros clásicos de RMN como desplazamientos químicos o tiempos de relajación, sino que, aunque de hecho son parámetros promediados por el intercambio entre los estados libre y enlazado, sus magnitudes no se determinan simplemente a partir de las respectivas poblaciones y los parámetros de RMN de los estados libres y enlazados, por lo que la ecuación 1 (página 9) no puede ser aplicada. Las respuestas físicas observadas no tienen valores absolutos, son adimensionales y están afectadas por los parámetros de los experimentos, además de depender de la concentración del ligando en el estado enlazado.²⁵

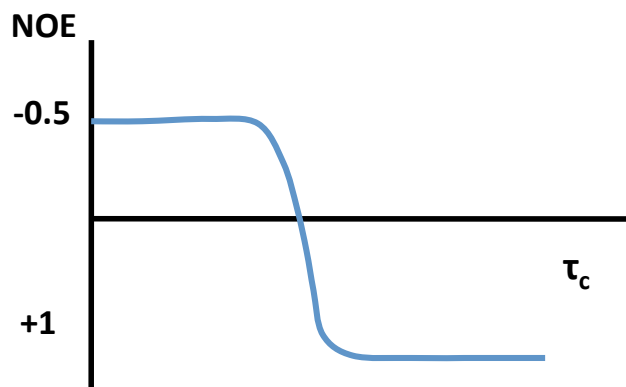


Fig. 2: Signo del NOE en función del tiempo de correlación de la molécula (τ_c), que está directamente correlacionado con el peso molecular.

La base de los experimentos que se describen aquí es el efecto Overhauser nuclear (NOE) intermolecular en sistemas que presentan intercambio químico. Normalmente una molécula pequeña (ligando) se caracteriza por un tiempo de correlación (τ_c) corto y pequeños valores de NOE de signo positivo (figura 2; el tiempo de correlación es el tiempo que caracteriza la difusión rotacional de la molécula en disolución, y que a efectos prácticos se puede aproximar como el tiempo que invertiría la molécula en girar un radián, mediante los procesos estocásticos y aleatorios que caracterizan dicha difusión rotacional). Por el contrario, una molécula grande (como una proteína) se caracteriza por un tiempo de correlación largo y valores de NOE grandes en valor absoluto y de signo negativo (figura 2).²⁷ Para un sistema ligando/proteína dado donde el ligando esté en exceso y se cumpla la condición de intercambio químico rápido en la escala de tiempos de RMN, el ligando adquirirá un NOE negativo cuando se encuentre en el sitio activo de la proteína, ya que durante el tiempo de residencia en el estado enlazado adquirirá transitoriamente las propiedades hidrodinámicas de difusión de la molécula grande, pudiendo dicho NOE sobrepasar en valor absoluto al pequeño valor positivo del NOE del ligando en el estado libre (figura 2). Por ello, la respuesta observada será fuertemente dependiente de la fracción de ligando enlazado, entre otros muchos factores, como son el tiempo de mezcla del experimento, los tiempos de correlación del ligando libre y enlazado, y otras contribuciones a la velocidad de relajación del ligando. Si la fracción de ligando libre se eleva demasiado durante una titulación del sistema, al final las propiedades del ligando correspondientes al estado enlazado quedarán “diluidas” por la gran contribución de las propiedades del estado libre.

El experimento WaterLOGSY, que intrínsecamente implica un fenómeno físico similar al de STD NMR, se basa en la transferencia de magnetización, en este caso desde el agua en el seno de la disolución hasta el agua presente en la interfaz ligando-proteína, la cual transferirá magnetización a los protones del ligando a través de dos procesos: NOE intermolecular e intercambio químico de los protones lábiles.²⁶ Esta técnica aporta información similar a la que

se puede obtener por STD NMR, solo que aventaja considerablemente a ésta última para aquellos casos de complejos donde tanto el ligando como el receptor están altamente hidratados y el receptor tiene poca densidad de protones en el sitio de reconocimiento, como es el caso de las interacciones entre los ácidos nucleicos y sus ligandos. En la presente tesis doctoral, al tratarse de una proteína bien estructurada, compacta y, por lo tanto con una densidad de protones interna apropiada para los procesos de difusión de espín, todos los estudios se han realizado por espectroscopía STD NMR, cuyos fundamentos se describen a continuación.

a) Experimentos de diferencia de transferencia de saturación (STD NMR)

Los experimentos STD NMR fueron diseñados para detectar interacciones de moléculas pequeñas con sus receptores en presencia de otras moléculas que no interaccionasen, lo que permitió cribar colecciones de ligandos por su actividad frente a una proteína dada (*screening* de ligandos).²³ La transferencia de saturación en este caso se da a través de un mecanismo, que muy resumidamente podemos clasificar en tres etapas: (i) la magnetización original selectivamente generada en protones específicos de la proteína se difunde de forma eficaz por toda la proteína muy rápidamente a través de los espines activos del sistema (mecanismo conocido como difusión de espín, en general la saturación tarda en distribuirse por toda la proteína entre 50 y 200 ms); (ii) dicha magnetización se transfiere a aquellos protones del ligando que estén a distancias suficientemente cortas de los protones de la proteína durante el tiempo de residencia en el estado enlazado, y (iii) acumulación de la magnetización transferida en disolución ya que, cuando el ligando deja la proteína, éste lo hace con información del estado enlazado, en forma de polarización de espín, recobrando en el seno de la disolución su característica de molécula pequeña y, por lo tanto, de señales finas (figura 3). Como las moléculas pequeñas presentan de forma general tiempos de relajación muy largos en el estado libre, y como el NOE intermolecular proteína-ligando durante el estado enlazado es considerablemente de mayor magnitud que en el estado libre, la información del estado enlazado dura en el seno de la disolución un tiempo suficientemente largo como para poder ser detectada.²⁵ Esto se cumple siempre y cuando los ligandos que se reasocian al receptor hayan relajado completamente los niveles de saturación, durante el tiempo de residencia en el estado libre. Si esta condición no se da, entran en juego los fenómenos implicados en la reasociación rápida del ligando, que serán extensamente estudiados en el capítulo 3 del presente trabajo. La técnica de STD NMR se puede aplicar al estudio de interacciones que presenten una constante de disociación (K_D) comprendida entre de 10 nM (relativamente fuertes) y 10 mM (muy débiles).²³

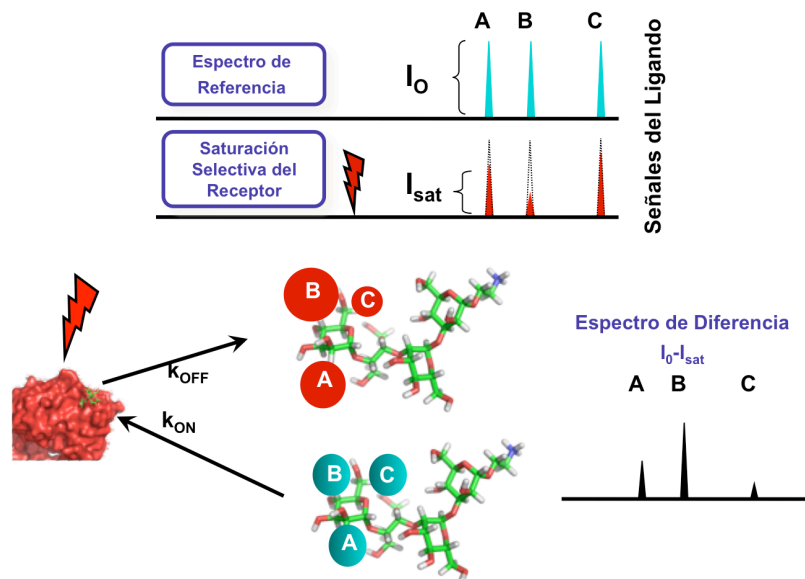


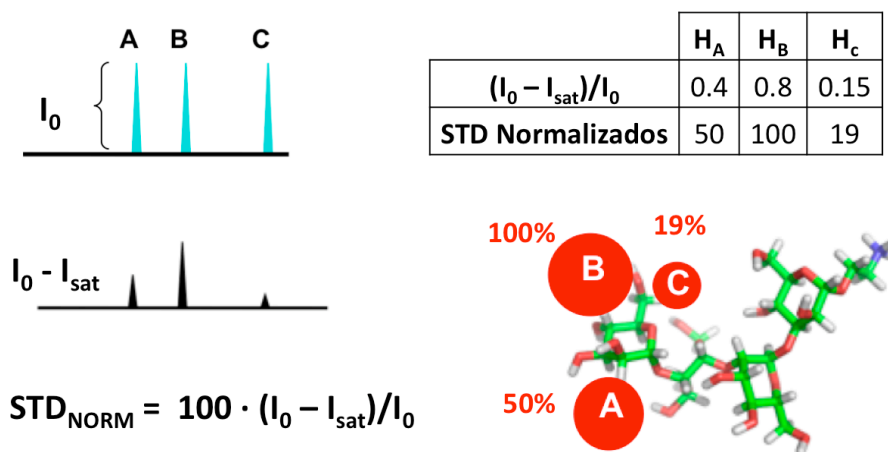
Fig. 3: Esquema representativo de la técnica de STD NMR. El NOE intermolecular negativo en el estado enlazado (NOE proteína-ligando) hace que las señales del ligando reduzcan su intensidad en el experimento ^1H RMN en el que se satura selectivamente la proteína (experimento *on-resonance*). La diferencia entre ambos experimentos (off-on) revela exclusivamente las señales de las moléculas que se asociaron a la proteína (ligandos), con valores de intensidad que reflejan la proximidad de los contactos del ligando con la proteína

Un intercambio rápido entre los estados libre y enlazado, en la escala de tiempos de RMN, transferirá rápidamente la información del estado enlazado al seno de la disolución. Si, además, hay un gran exceso de ligando sobre la concentración de proteína, un solo sitio de reconocimiento puede saturar una gran cantidad de moléculas de ligando en pocos segundos, aumentando la proporción de ligando saturado en el seno de la disolución durante el tiempo de saturación, y así la información del estado enlazado se amplifica, por lo que se requiere normalmente muy poca cantidad de proteína para la obtención de señales con información acerca de la interacción.²³ Sin embargo, hay que tener en cuenta que los ligandos libres en disolución sufren fenómenos de relajación transversal y longitudinal que están en el orden del segundo, por lo que irán perdiendo paulatinamente la información que portan del estado enlazado. Por el contrario, si el intercambio entre los estados libre y enlazado del ligando es muy lento (la interacción ligando-proteína es muy fuerte), el experimento no será eficiente ya que la información del estado enlazado no pasará al seno de la disolución porque el ligando relajará eficazmente en el propio sitio de reconocimiento, y puede además que no abandone el estado enlazado durante el tiempo de la secuencia de pulsos, con lo que no habrá acumulación de la magnetización transferida en el seno de la disolución.

En un experimento STD NMR se adquieren dos espectros (normalmente de ^1H) monodimensionales de forma alterna (figura 3). En uno (experimento *on-resonance*) se saturan selectivamente los protones de la proteína (mediante la irradiación con radiofrecuencias a baja

potencia de una zona del espectro en la que sólo debe haber señales de la proteína). En el otro (experimento *off-resonance*), la irradiación se fija en una zona de frecuencias que esté libre de señales de cualquiera de las especies presentes en la muestra (normalmente valores de desplazamiento químico por encima de 20 ppm). La diferencia entre ambos espectros mostrará exclusivamente la respuesta de las moléculas pequeñas que hayan estado enlazados a la proteína (ligandos), que atenuaron sus señales (NOE intermolecular proteína-ligando negativo) en el experimento *on-resonance* (figura 3). Las señales de todas las moléculas que no interaccionen con la proteína serán canceladas en el espectro diferencia, ya que sus intensidades eran exactamente iguales en ambos experimentos (*on* y *off*). En estos experimentos, resulta ventajoso aplicar un filtro tipo "bloqueo de espines" (*spin-lock*, $T1\rho$) para eliminar las señales anchas (de la proteína) que pudieran interferir en la integración de las señales del ligando.²³

La sensibilidad de la técnica es excelente para diferenciar compuestos que son ligandos de otros que no lo son, en una mezcla multi-compuestos. En concreto, una de las primeras aplicaciones del experimento STD NMR fue la identificación de posibles ligandos para la aglutinina del germen de trigo (WGA) en una librería de carbohidratos.⁵ Al mismo tiempo se demostró que la técnica STD NMR puede ser empleada efectivamente para la determinación de las regiones de un ligando que están en contacto directo con el receptor en el estado enlazado, lo que se conoce como epítipo del ligando, información que es muy importante para el desarrollo de fármacos.⁵ Estas zonas del ligando serán las que mayor grado de saturación reciban (Esquema 2).



Esquema 2: Determinación del epítipo del ligando a partir de los valores de STD. La intensidad fraccional de cada señal STD se convierte en una escala relativa de porcentajes, asignando arbitrariamente un valor de 100 % a la señal más intensa. De esta forma, los porcentajes se pueden interpretar como una "escala de proximidad" de las distintas zonas de la estructura del ligando a la superficie de la proteína que, por tanto, proporciona información del epítipo de la interacción a nivel atómico.

Adicionalmente, una de las mayores ventajas que tiene la técnica STD NMR es que puede ser combinada con cualquier otra secuencia de pulsos multidimensional, con el potencial de

generar una cantidad de experimentos tipo-STD como son STD-TOCSY o STD-HSQC. Estos experimentos aumentan la información obtenida, permitiendo, como en el caso particular del STD-TOCSY, realizar el cribado de una librería de posibles ligandos y, al mismo tiempo, obtener el epítipo del ligando identificado.²³

En la resolución de librerías de compuestos, las intensidades de las señales de los ligandos en los experimentos de STD NMR no presentan una proporcionalidad simple respecto de la fuerza de la interacción con el receptor, aunque los efectos de STD NMR dependen fuertemente de la constante cinética de disociación del complejo. Así, cuando la interacción se vuelve muy débil, la probabilidad de que el ligando se encuentre en el sitio de reconocimiento del receptor se vuelve muy baja y, por tanto, las intensidades de las señales en el experimento STD NMR son muy bajas. Si la interacción está próxima al límite del intercambio lento, la relajación del ligando en el estado enlazado puede hacer que las intensidades STD finales sean igualmente pequeñas. Es decir, a no ser que se disponga de un conocimiento profundo del sistema objeto de estudio, y bajo condiciones muy controladas, no se pueden correlacionar directamente las intensidades de los distintos ligandos con sus correspondientes afinidades por el receptor. Asimismo, las intensidades de las señales de STD, dependen también del tiempo de saturación y del exceso de ligando empleado. Mientras mayor sea la cantidad de ligando enlazado y mayor sea el tiempo de saturación mayor señal de STD se obtendrá. Normalmente se obtienen valores aceptables de STD con un tiempo de saturación de 2 segundos y un exceso de ligando de 100 veces sobre la concentración de proteína. El exceso de ligando tiene como consecuencia una mejor relación señal-ruido en las señales del ligando pero el valor de STD será menor, ya que la proporción de ligandos enlazados a la proteína respecto al total será menor.²³

Los datos de los experimentos STD NMR se pueden cuantificar teóricamente mediante cálculos de matriz de relajación completa, utilizando el programa CORCEMA-ST,²⁸ si se dispone de modelos moleculares (coordenadas cartesianas) del complejo ligando-proteína, ya sea obtenidos directamente de experimentos de cristalografía de rayos X, de RMN, o mediante cálculos de modelización molecular (donde los programas más usuales son AutoDock²⁹ o FlexiDock, que es parte del paquete de informático Sybyl).³⁰ Los datos de STD teóricos así obtenidos se comparan cuantitativamente con los datos experimentales, mediante un factor matemático de ajuste (factor R-NOE), que nos indicará cómo de bien la estructura del modelo explica los datos experimentales obtenidos en disolución. De hecho, haciendo procesos cíclicos de cálculos de CORCEMA-ST y refinamiento del modelo molecular del complejo, se puede llegar a obtener la estructura del complejo proteína/ligando en disolución, llegando a aquella estructura que nos dé el factor R-NOE más bajo.

El estudio teórico de los experimentos STD NMR a través de este programa ha permitido demostrar que las intensidades de las señales del ligando en este tipo de experimentos son

fuertemente dependientes de varios factores: (i) el tiempo de saturación, (ii) la posición de los protones de la proteína que son saturados respecto a la posición de los protones del ligando, (iii) la conformación en la interfase ligando-proteína, (iv) los tiempos de correlación tanto del ligando como de la proteína, (v) la cinética de formación del complejo ligando-proteína y (vi) la proporción ligando-proteína en la muestra.²⁸ Todos estos parámetros tienen que ser determinados a la hora de analizar el complejo mediante CORCEMA-ST, por lo que si pueden ser obtenidos a través de otras técnicas experimentales será beneficioso, ya que habrá menos variables a la hora de deducir el complejo teórico.

Teniendo en cuenta la alta sensibilidad de las intensidades de las señales en el experimento STD NMR respecto a cambios en la conformación del ligando en el estado enlazado, se ha desarrollado una mejora de CORCEMA-ST: SICO (*STD-NMR Intensity-restrained CORCEMA Optimization*),³¹ con la que se puede determinar la conformación que sea un mínimo energético y sea compatible con los datos experimentales de STD NMR. El protocolo de SICO utiliza un refinamiento en el que se incluyen los cálculos con CORCEMA-ST seguido de un Templado Simulado (SA, *simulated annealing*) para refinar los ángulos de torsión del ligando enlazado.

Por otro lado, la técnica de STD NMR puede emplearse para la determinación de constantes de asociación, si se llevan a cabo experimentos de competición, mediante la titulación de un ligando de afinidad desconocida en presencia de un complejo ligando/proteína de afinidad conocida, con el requerimiento de que ambos ligandos tienen que competir por el mismo sitio de reconocimiento. Así, se puede obtener la constante de asociación del otro ligando por el ajuste matemático a un modelo de competición por un sitio de reconocimiento (ecuación de Cheng-Prussif).²³

b) Experimentos de NOE transferido por intercambio (trNOE)

En los experimentos de efecto Overhauser nuclear, en general se pueden distinguir entre los experimentos de NOE transitorios y los de estado-estacionario. Ambos experimentos se pueden aplicar para la observación de NOEs transferidos por intercambio. A continuación nos centraremos en los experimentos de NOE transitorio. En el caso de trNOE transitorio se utilizan pulsos cortos y de alta potencia (pulsos duros) para generar un estado de no-equilibrio de las magnetizaciones que, durante el periodo de mezcla, volverán al estado de equilibrio por relajación. Los NOEs son generados durante este periodo de mezcla. Normalmente, el experimento bidimensional NOESY es el utilizado para detectar los trNOEs transitorios (figura 4).²³

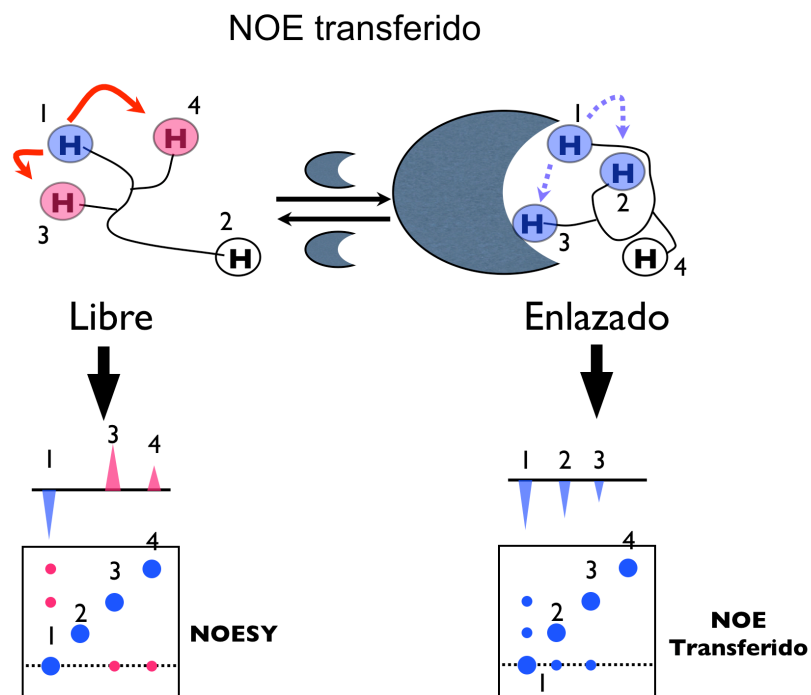


Fig. 4: Esquema del NOE transferido. Los picos rojos corresponden a señales positivas (molécula pequeña) mientras que los azules son negativos (moléculas grandes y todos los picos de la diagonal). El enlace puede identificarse por el cambio de signo en las señales de los picos de cruce del ligando en presencia y ausencia de la proteína.

Las moléculas orgánicas de bajo peso molecular presentan NOEs positivos que alcanzan su máximo valor con tiempos de mezcla del orden de varios segundos (figura 5). Sin embargo, las moléculas grandes, como las proteínas, tienen NOEs negativos y, normalmente, alcanzan su máximo valor con tiempos de mezcla del orden de décimas de segundo (figura 5). En los experimentos de NOE transferido, un ligando pequeño en disolución en presencia de un receptor de alto peso molecular también presentará NOEs negativos (NOEs “transferidos”, figura 4). Así, las características del movimiento del ligando en el estado enlazado son llevadas al seno de la disolución y detectadas a través de las señales del ligando libre. Estrictamente, lo que se transfieren son las variaciones de poblaciones que se producen durante el tiempo de residencia en el estado enlazado. Estas transferencias de poblaciones están determinadas, en el estado enlazado, por la relajación mucho más eficaz de las moléculas grandes (NOE negativo e intenso), por lo que cuando el ligando sale y se acumula en el seno de la disolución tiene cambios muy grandes en las poblaciones que superan con creces los cambios en las poblaciones de las moléculas del ligando en el estado libre (NOE positivo y poco intenso, para moléculas pequeñas).

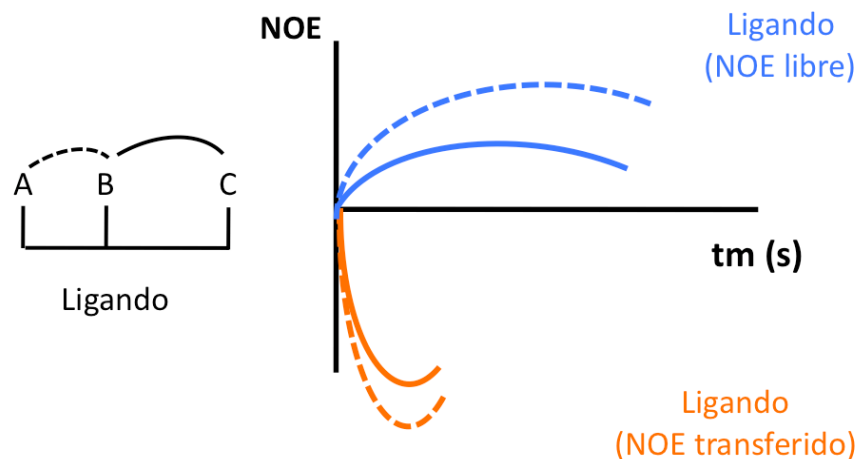


Fig. 5: Crecimiento del NOE con el tiempo de mezcla (t_m). La curva azul corresponde al ligando en el estado libre mientras que la curva naranja corresponde al estado enlazado (condiciones de relajación de molécula grande).

Así, la discriminación entre las moléculas que presenten interacción y las que no la presenten se basa en el signo de los trNOEs, siendo de signo opuesto al del estado libre (signo negativo) en el caso de que haya interacción y, además, que el máximo valor de éste se alcance a un tiempo de mezcla mucho menor. A partir de esta última observación está claro que el tiempo de mezcla es un parámetro crítico a optimizar: debe ser lo suficientemente corto como para que la contribución de las señales de NOE del ligando libre sean mínimas, pero lo suficientemente largo como para que se pueda acumular un espectro NOE con suficiente intensidad. La proporción entre ligandos y receptores también es un parámetro crítico a optimizar siendo, en este caso, mejor mientras mayor es la fracción de ligando enlazado, ya que la señal observada será un promedio entre los estados libre y enlazado del ligando.

Un problema fundamental en el uso de la transferencia de NOE para el estudio del estado enlazado del ligando es que, como las señales que forman parte del promedio tienen signos contrarios, puede ocurrir que alcancemos unas condiciones en la que las diferentes señales se compensen y estemos en una situación en la que no tengamos señales. O que, si la fracción de ligando enlazado es muy baja (por ejemplo en casos de afinidad baja y altas relaciones ligando-proteína), los NOEs que se observen correspondan prácticamente al estado libre (NOEs pequeños y positivos). Por lo tanto, para tener la seguridad de que se están observando las propiedades del estado enlazado, es fundamental que nuestras condiciones experimentales aseguren la validez de la desigualdad matemática:

$$f_{bound}^{ligand} \cdot \sigma_{bound}^{ligand} \gg f_{free}^{ligand} \cdot \sigma_{free}^{ligand}$$

donde f es la fracción del ligando en el estado indicado (libre o enlazado) y σ es la constante de relajación cruzada longitudinal (“sigma-noe”) en cada estado.

El experimento de trNOE, de forma general, funciona apropiadamente para ligandos que presenten una constante de disociación en un rango de micro- a milimolar. Para asociaciones más fuertes ($K_D < \mu\text{M}$) el experimento de trNOE estará limitado, porque no habrá intercambio suficiente entre los estados libre y enlazado del ligando durante el tiempo de mezcla, y la información del estado enlazado no pasará al seno de la disolución (figura 6).²³

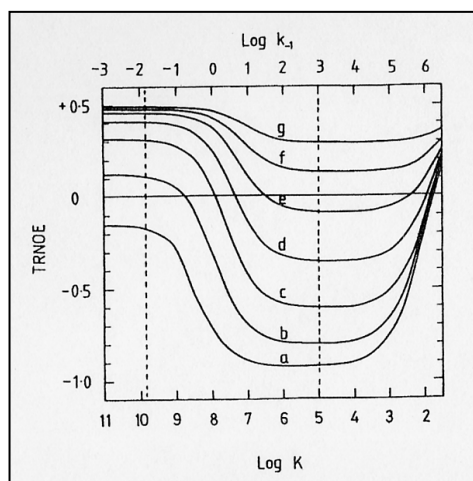


Fig. 6: Dependencia del crecimiento del trNOESY en función de la k_{off} y de la ratio ligando-proteína $[L]/[P]$ = (a) 2, (b) 4, (c) 8, (d) 16, (e) 32, (f) 64, (g) 128. Para todas las curvas $k_{\text{on}} = 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. $[P] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Las líneas verticales punteadas dividen las zonas de intercambio lento, intermedio y rápido (de izquierda a derecha, respectivamente). Reproducido de la ref. 25.

En el análisis de la conformación del estado enlazado de compuestos de bajo peso molecular usando experimentos de trNOE se ha comprobado que, además de la difusión de espín dentro del propio ligando, hay dos efectos, la difusión de espín y la pérdida de magnetización hacia la proteína, que pueden interferir en el análisis de la conformación del ligando en el estado enlazado, siempre y cuando el tiempo de residencia de éste en el sitio de reconocimiento del receptor sea lo suficientemente largo. Estos efectos son el resultado de los NOEs intermoleculares entre la proteína y el ligando. En el caso de la difusión de espín, se podría obtener una falsa conformación distorsionada, ya que si los contactos intramoleculares (ligando) presentan distancias cortas (distancia menor de $2,5 \text{ \AA}$, NOEs intensos) los trNOEs se atenúan y se obtienen estructuras ligeramente expandidas; para distancias mayores ($3\text{-}3,5 \text{ \AA}$) los trNOEs se hacen más intensos y se obtienen estructuras comprimidas. Además, cuando ocurre la pérdida de magnetización hacia la proteína, que normalmente suele ocurrir cuando el tiempo de mezcla es muy largo, se obtienen estructuras del ligando ligeramente expandidas. Estos efectos ayudan, pues, solamente cuando se trata de detectar la interacción y no caracterizar la conformación del ligando en el estado enlazado, ya que observaríamos el cambio de signo en los NOEs del ligando, pero la información de la conformación en el estado enlazado estaría distorsionada.²³

Una dificultad inherente a nuestro sistema objeto de estudio la constituye el solapamiento de la

mayoría de las señales de los protones de los carbohidratos ya que, exceptuando los protones anoméricos (H_1), que presentan frecuencias característicamente a campo bajo respecto al resto de los protones del anillo debido a la retirada de electrones a causa de la electronegatividad del oxígeno (O_5) intra-anular, adyacente al H_1 , el resto de las señales de los protones (tipo CH) presentarán desplazamientos químicos muy parecidos y todos en un rango espectral muy estrecho (normalmente comprendido entre 3 y 4 ppm), complicando así la asignación de las diferentes señales de cada espectro de RMN.

4. Modelización molecular de complejos ligando/proteína. Docking ligando/proteína

La modelización molecular y en concreto el *docking* molecular trata de predecir la estructura de los complejos intermoleculares formados por dos o más moléculas, tratando de discernir la posición, o posiciones, de un ligando en el sitio activo de una proteína, basándose en criterios de energía potencial, aunque con inclusiones, en algunos casos, de términos que tienen en cuenta la solvatación de forma implícita, así como términos que consideran las variaciones en la entropía del sistema durante el proceso de asociación intermolecular. Este tipo de estudios vienen siendo empleados desde principios de los 80's.³²

Las técnicas de docking son aplicadas en varios estadios en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos. Esto es, prediciendo los modos de asociación de ligandos activos conocidos, identificando nuevos ligandos usando el cribado virtual, y prediciendo la afinidad de ligandos relacionados con uno del cual se conoce su actividad. De estas tres aplicaciones es en la primera donde los procesos de docking han tenido más éxito.³³

Los primeros cálculos de docking trataban tanto al ligando como a la proteína como cuerpos rígidos. Hoy día, sin embargo, los cálculos han evolucionado hasta un nivel que permite que todo, o al menos una parte importante del ligando, sea tratado como una molécula flexible. Por el contrario, uno de los mayores retos en el campo del docking sigue siendo el tratamiento de la flexibilidad en el receptor. Es más, la localización del sitio (o sitios) de reconocimiento en la proteína y la orientación del ligando en el sitio activo de la proteína pueden ser altamente influenciados por la flexibilidad de la proteína. De hecho, la determinación de los complejos ligando-proteína por rayos X, revelan entre un 70 y un 100 % de la superficie del ligando embebida en la proteína, lo cual sólo se puede explicar debido a la flexibilidad de la proteína.³²

La teoría de *llave-cerradura* ha dejado su lugar a teorías más modernas que confieren más peso al concepto de la flexibilidad del receptor. De todas formas, hay que tener en cuenta que la conformación más poblada de la proteína en el estado libre no tiene por qué coincidir con la conformación más poblada del receptor en el complejo ligando-proteína. En términos de

docking, estos aspectos implican que en vez de buscar la conformación de un ligando en presencia de un receptor, uno debería, idealmente, buscar la conformación más poblada que se obtiene a partir del conjunto de soluciones provenientes de diferentes conformaciones del complejo ligando-proteína.³²

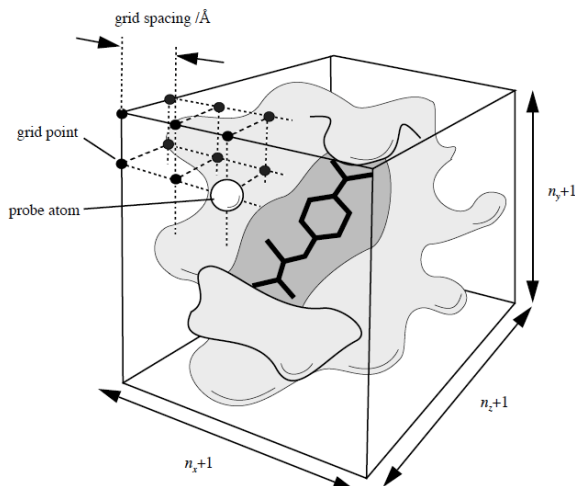


Fig. 7: Representación de un proceso de Docking usando el programa AutoDock. Imagen extraída del manual de AutoDock v. 3.0.5.³⁴

Por ello, los protocolos de docking (figura 7) pueden ser descritos como una combinación de algoritmos de búsqueda y una función de *scoring*, la cual predice la afinidad de la interacción ligando/receptor. A medida que avanzan las técnicas computacionales, el número de algoritmos y de funciones de *scoring* disponibles va aumentando considerablemente. Los algoritmos de búsqueda deben permitir que los grados de libertad del complejo proteína-ligando sean los mínimos para que el sistema sea lo suficientemente muestreado como para incluir los modos de asociación genuinos. Dos elementos críticos en los algoritmos de búsqueda son la velocidad de cálculo y la eficacia a la hora de cubrir el espacio conformacional relevante. Entre otros requerimientos, la función de *scoring* debería representar la termodinámica de la interacción del sistema ligando/proteína de forma adecuada para diferenciar el modo de interacción correcto de los demás modos explorados y clasificarlos adecuadamente. Es más, debería ser lo suficientemente rápido para que se pudiera aplicar a la determinación de un gran número de posibles soluciones en un tiempo razonable y de esta forma poder hacer un cribado de ligandos de forma virtual.³²

4.1. Algoritmos de Docking

El éxito del algoritmo de docking en predecir la conformación de un ligando, en un complejo proteína-ligando cuya estructura se conoce experimentalmente, se mide normalmente en términos de desviación de la raíz cuadrática media (*Root Mean Square Deviation*, RMSD) entre

las posiciones experimentales de los átomos pesados y las posiciones predichas por el algoritmo. La flexibilidad del sistema es el mayor reto a la hora de la búsqueda de la conformación correcta. El número de grados de libertad incluidos en el cálculo para el ligando es un aspecto fundamental a la hora de determinar la eficacia de la búsqueda.

En un sistema biológico real, el sistema incluiría como mínimo el ligando, el receptor y las moléculas de disolvente. En el sistema teórico, a causa del gran número de grados de libertad asociados al disolvente, las moléculas de este son normalmente excluidas del problema o, en casos especiales, el efecto de disolvente es incluido implícitamente en la función de *scoring*.³²

Hay diferentes niveles de aproximación. El más básico es la aproximación de los cuerpos rígidos, muy popular en los inicios de los cálculos de docking (y aún hoy aplicado en los problemas de docking entre proteínas) y que sólo explora los seis grados de libertad correspondientes a las traslaciones y rotaciones, excluyendo cualquier tipo de flexibilidad. Hoy día, la aproximación más común es el modelado de la flexibilidad del ligando mientras se asume que la proteína es rígida, considerando únicamente el espacio conformacional del ligando. Idealmente, la flexibilidad de la proteína también debe ser tenida en cuenta y algunas aproximaciones han ido desarrollando este aspecto, como es el caso de la versión 4.0 de AutoDock.³⁴

En los casos de docking con ligando flexible podemos encontrar los siguientes métodos:³²

a) Sistemáticos: métodos de búsqueda conformacional, aproximación de fragmentación y métodos de bases de datos.

b) Algoritmos estocásticos o aleatorios: método de Monte Carlo (MC), métodos de algoritmo genéticos (GA) y métodos de búsqueda de Tabu.

c) De simulación: dinámicas moleculares y minimización de energía.

4.2. Docking de proteína flexible

Los procesos de docking que tienen el ligando como molécula flexible alcanzan buenos resultados en, aproximadamente, la mitad de los sistemas a los que son aplicados.³⁵ Este éxito viene fundamentalmente sustentado en aquellos casos en que la proteína es relativamente rígida y la estructura cristalográfica de la misma está disponible y, como consecuencia de dicha rigidez, ésta es representativa de la estructura de la proteína en el estado enlazado. Sin embargo, muchos sistemas presentan movimientos durante o tras la asociación del ligando (estado enlazado), como pueden ser ajustes de las cadenas laterales de aminoácidos o movimientos de bucles (ajuste inducido). Estos movimientos no son reproducibles en los resultados de docking.³²

El desarrollo de métodos que tengan en cuenta cambios conformacionales de la proteína está dando sus primeros pasos, pero al menos algunas aproximaciones se han hecho introduciendo flexibilidad parcial en la proteína. Algunas de estas aproximaciones incluyen dinámicas moleculares y métodos tipo Monte Carlo, librerías de rotámeros, modelado suave del receptor y conjuntos de coordenadas de la proteína.

4.3. Funciones de Scoring

La evaluación y clasificación de las conformaciones del ligando predichas por el algoritmo de búsqueda es un aspecto crítico en el protocolo de docking. Ser capaces de generar la conformación correcta no es suficiente, también es necesario reconocerla. La función de *scoring* debe distinguir entre los modos de asociación correctos y los que no lo son. Por otro lado, un número considerable de asunciones y simplificaciones tienen que tenerse en cuenta para reducir la complejidad de la función de *scoring*, con el consecuente coste negativo en la precisión. Por esta razón, en términos de función de *scoring*, el factor limitante en los procesos de docking es la compensación entre precisión y tiempo.³²

Las funciones de *scoring* pueden ser divididas en tres clases principales: funciones basadas en el campo de fuerzas, funciones basadas en datos empíricos y funciones basadas en el conocimiento.³²

4.4. Capacidades y limitaciones

A día de hoy, los procesos de docking han llegado a una fase de madurez, pero están lejos de ser perfectos. La mayoría de los programas de docking llegan a predecir el complejo ligando-proteína con una precisión media que está entre 1.5 y 2 Å, con éxito en el 70-80% de los casos estudiados.³⁶ Las imperfecciones en la función de *scoring* continúan siendo el mayor factor limitante. Las funciones de *scoring* que normalmente usan los programas de docking hacen un número de simplificaciones y asunciones que permiten una evaluación computacional más eficaz de la afinidad del ligando, pero con el consiguiente coste en la precisión. De hecho, un gran número de factores que tienen lugar en el reconocimiento molecular son completamente anulados o, como mínimo, parcialmente obviados en muchas funciones de *scoring* actuales. La entropía es un ejemplo de factores anulados y/u obviados.³²

Además de los problemas en las funciones de *scoring*, otros aspectos suman complejidad a la resolución de las problemáticas en los procesos de docking. El efecto del disolvente, la participación directa de las moléculas de agua en la interacción ligando/proteína, la limitada resolución de las estructuras cristalográficas de las proteínas y, más aún, la flexibilidad de la proteína.³²

Por otro lado, la mayoría de los éxitos en los procesos de docking, están basados en estructuras de proteínas relativamente rígidas que tienen estructuras cristalográficas que son una representación adecuada de la conformación de la proteína en el estado enlazado. Sin embargo, una gran cantidad de sistemas sufren ajustes en la conformación de la proteína una vez que el ligando ha sido enlazado. No obstante, el éxito en predecir cambios conformacionales en la proteína durante la interacción es complicado y, actualmente no hay ningún método que abarque este problema con un tiempo de trabajo razonable.³²

Actualmente, la línea de mejora de los procesos de docking están encaminados a la inclusión de términos de solvatación y contribución entrópica en la función de *scoring*, y a la mejora de los algoritmos de búsqueda que permitan describir y muestrear correctamente el espacio conformacional del complejo ligando-proteína con un receptor flexible.³²

Los programas de cálculos de docking más populares en la actualidad son: AutoDock²⁹, GOLD³⁷ y FlexX³⁸. En el presente trabajo los cálculos de docking se harán utilizando el programa AutoDock.

AutoDock 3.0 utiliza un algoritmo genético Lamarckiano (LGA), aunque también están implementados el *annealing (templado)* simulado tipo Monte Carlo, y el algoritmo genético tradicional. No obstante, estos dos últimos algoritmos no son tan eficientes y fiables como el LGA. El programa usa una función de campo de fuerzas basada (ecuación 2), aproximadamente, en el campo de fuerza de AMBER compuesta de cinco términos: el término de dispersión 12-6 de Lennard-Jones; un término de enlace de hidrógeno direccional 12-10; un potencial electrostático Coulombiano; un término entrópico; y un término de desolvatación por parejas.²⁹

$$\Delta G = \Delta G_{vdW} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \Delta G_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + \Delta G_{tor} N_{tor} + \Delta G_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{\left(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2 \right)} \quad (\text{ecuación 2})$$

El factor de escalado de estos términos (ΔG_x) está empíricamente calibrado mediante un conjunto de 30 complejos proteína-ligando estructuralmente conocidos, cuyas afinidades han sido experimentalmente determinadas. La buena precisión y la alta versatilidad del programa, han hecho que sea un programa que sea utilizado ampliamente, lo que explica el gran número de publicaciones que hay con este programa. La nueva versión de AutoDock (4.0) añade a las funciones anteriormente descritas la flexibilidad de las cadenas laterales en el receptor.³²

5. Bibliografía

1. Trkola, A.; Purtscher, M.; Muster, T.; Ballaun, C.; Buchacher, A.; Sullivan, N.; Srinivasan, K.; Sodroski, J.; Moore, J. P.; Katinger, H., Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **1996**, *70* (2), 1100-1108.
2. Sanders, R. W.; Venturi, M.; Schiffner, L.; Kalyanaraman, R.; Katinger, H.; Lloyd, K. O.; Kwong, P. D.; Moore, J. P., The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J. Virol.* **2002**, *76* (14), 7293-305.
3. Scanlan, C. N.; Pantophlet, R.; Wormald, M. R.; Ollmann Saphire, E.; Stanfield, R.; Wilson, I. A.; Katinger, H.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M.; Burton, D. R., The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J. Virol.* **2002**, *76* (14), 7306-21.
4. Lepre, C. A.; Moore, J. M.; Peng, J. W., Theory and applications of NMR-based screening in pharmaceutical research. *Chem Rev* **2004**, *104* (8), 3641-76.
5. Mayer, M.; Meyer, B., Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie Int. Ed.* **1999**, *38* (12), 1784-1788.
6. Gradwell, M. J.; Feeney, J., Validation of the use of intermolecular NOE constraints for obtaining docked structures of protein-ligand complexes. *J Biomol NMR* **1996**, *7* (1), 48-58.
7. Dalvit, C.; Pevarello, P.; Tato, M.; Veronesi, M.; Vulpetti, A.; Sundstrom, M., Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water. *J Biomol NMR* **2000**, *18* (1), 65-8.
8. Hadjuk, P. J.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W., One-Dimensional Relaxation- and Diffusion-Edited NMR Methods for Screening Compounds That Bind to Macromolecules. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (50), 12257-12261.
9. Varki, A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, *3* (2), 97-130.
10. Kogelberg, H.; Solis, D.; Jimenez-Barbero, J., New structural insights into carbohydrate-protein interactions from NMR spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol* **2003**, *13* (5), 646-53.
11. (a) Trkola, A.; Pomales, A. B.; Yuan, H.; Korber, B.; Maddon, P. J.; Allaway, G. P.; Katinger, H.; Barbas, C. F., 3rd; Burton, D. R.; Ho, D. D.; et al., Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J Virol* **1995**, *69* (11), 6609-17; (b) Botos, I.; Wlodawer, A., Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog Biophys Mol Biol* **2005**, *88* (2), 233-82.
12. Mandavilli, A., Dennis Burton. *Nat Med* **2003**, *9* (4), 380.
13. Burton, D. R.; Desrosiers, R. C.; Doms, R. W.; Koff, W. C.; Kwong, P. D.; Moore, J. P.; Nabel, G. J.; Sodroski, J.; Wilson, I. A.; Wyatt, R. T., HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* **2004**, *5* (3), 233-6.
14. Desrosiers, R. C., Prospects for an AIDS vaccine. *Nat Med* **2004**, *10* (3), 221-3.

15. Martinez-Avila, O.; Hijazi, K.; Marradi, M.; Clavel, C.; Campion, C.; Kelly, C.; Penades, S., Gold manno-glyconanoparticles: multivalent systems to block HIV-1 gp120 binding to the lectin DC-SIGN. *Chemistry* **2009**, *15* (38), 9874-88.
16. Martinez-Avila, O.; Bedoya, L. M.; Marradi, M.; Clavel, C.; Alcamí, J.; Penades, S., Multivalent Manno-Glyconanoparticles Inhibit DC-SIGN-Mediated HIV-1 Transinfection of Human T Cells. *ChemBioChem* **2009**, *10* (11), 1806-1809.
17. NI, F., RECENT DEVELOPMENTS IN TRANSFERRED NOE METHODS. *Prooress in NMR Spectroscopy* **1994**, *26*, 517-606.
18. de la Fuente, J. M.; Penades, S., Glyconanoparticles: types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1760* (4), 636-51.
19. Sharon, N., Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem* **2007**, *282* (5), 2753-64.
20. Weis, W. I.; Drickamer, K., Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem* **1996**, *65*, 441-73.
21. del Carmen Fernandez-Alonso, M.; Canada, F. J.; Jimenez-Barbero, J.; Cuevas, G., Molecular recognition of saccharides by proteins. Insights on the origin of the carbohydrate-aromatic interactions. *J Am Chem Soc* **2005**, *127* (20), 7379-86.
22. Lemieux, R. U., How Water Provides the Impetus for Molecular Recognition in Aqueous Solution. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *1996* (29), 373-380.
23. Meyer, B.; Peters, T., NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angewnadte Chemie* **2003**, *42* (8), 864-891.
24. Carlomagno, T., Ligand-target interactions: what can we learn from NMR? *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2005**, *34*, 245-66.
25. Fielding, L., NMR Methods for the Determination of Protein-Ligand Dissociation Constants. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2007**, *51* (4), 219-242.
26. Dalvit, C.; Fogliatto, G.; Stewart, A.; Veronesi, M.; Stockman, B., WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability. *J Biomol NMR* **2001**, *21* (4), 349-59.
27. Neuhaus, D.; Williamson, M. P., *The Nuclear Overhauser Effect in Structuraland Conformational Analysis*. Wiley-VCH: 2000.
28. Jayalakshmi, V.; Krishna, N. R., Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *J Magn Reson* **2002**, *155* (1), 106-18.
29. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J., Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *Journal of Computational Chemistry* **1999**, *19* (14), 1639-1662.
30. Tripos SYBYL, 2009.
31. Jayalakshmi, V.; Rama Krishna, N., CORCEMA refinement of the bound ligand conformation within the protein binding pocket in reversibly forming weak complexes using STD-NMR intensities. *J Magn Reson* **2004**, *168* (1), 36-45.
32. Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J., Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins* **2006**, *65* (1), 15-26.

33. Leach, A. R.; Shoichet, B. K.; Peishoff, C. E., Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. *J Med Chem* **2006**, *49* (20), 5851-5.
34. AutoDock The Scripps Research Institute.
35. Erickson, J. A.; Jalaie, M.; Robertson, D. H.; Lewis, R. A.; Vieth, M., Lessons in molecular recognition: the effects of ligand and protein flexibility on molecular docking accuracy. *J Med Chem* **2004**, *47* (1), 45-55.
36. (a) Kellenberger, E.; Rodrigo, J.; Muller, P.; Rognan, D., Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins* **2004**, *57* (2), 225-42; (b) Westhead, D. R.; Clark, D. E.; Murray, C. W., A comparison of heuristic search algorithms for molecular docking. *J Comput Aided Mol Des* **1997**, *11* (3), 209-28; (c) Bursulaya, B. D.; Totrov, M.; Abagyan, R.; Brooks, C. L., 3rd, Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking. *J Comput Aided Mol Des* **2003**, *17* (11), 755-63.
37. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C., Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol* **1995**, *245* (1), 43-53.
38. Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G., A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol* **1996**, *261* (3), 470-89.

Capítulo 2:

Interacción 2G12/Oligomanósidos.

Estudios por RMN y Cálculos Teóricos

1. Introducción al sistema biológico estudiado

Como se ha expuesto en la breve descripción del capítulo 1 de esta tesis, el presente trabajo se centra en el estudio de la interacción entre el anticuerpo *anti-HIV-1* 2G12 y la glicoproteína de la envoltura vírica gp120. A lo largo de esta introducción se profundizará en el contexto biológico en el que se encuentra esta interacción y por qué es científicamente relevante.

1.1. SIDA y VIH. Fracasos en el desarrollo de una vacuna eficiente

Hoy en día una de las mayores enfermedades a la que se enfrenta la humanidad es el síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA, *AIDS* en inglés). De hecho, esta enfermedad es considerada una epidemia a nivel mundial, por el alto grado de infección y de expansión que tiene.

Las causas principales de la gran expansión de esta enfermedad son, por un lado, la desinformación existente sobre las causas de contagio y, por otro, el alto precio de los tratamientos que hay actualmente. El contagio se produce fundamentalmente por contacto con fluidos humanos o membranas de mucosas infectados, a través de tres mecanismos generales: la transmisión vertical, o de madre a hijo; la transmisión por vía parenteral; y la transmisión por vía sexual. En cuanto a los tratamientos, que suponen un alto coste de producción, en su mayoría están basados en antirretrovirales, cuya finalidad es parar la maquinaria de replicación del virus en la célula hospedadora, y así suprimir la extensión posterior del virus por el organismo infectado.¹

A nivel mundial se está consiguiendo que haya una mayor información y control sobre la pandemia, y que el número de contagiados haya entrado en fase estacionaria en los últimos años (figura 1). Sin embargo, el número de infectados por el virus sigue siendo tan alto que hay una imperiosa necesidad social de estudiar esta enfermedad para controlarla, curarla y erradicarla.

El SIDA no es más que el conjunto de síntomas que total o parcialmente desarrolla el organismo humano al ser infectado por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH, *HIV* en inglés).² Este virus tiene como una de sus principales dianas a los linfocitos T CD4+ y, utilizando sus receptores celulares CD4 y correceptores de quimioquinas (CCR5 y/o CXCR4), habilita cambios conformacionales en las glicoproteínas de la cubierta del virus, que permiten la fusión entre las membranas, inyectando el material genético y proteico del interior del virus al citoplasma de la célula hospedadora, necesario para la replicación del virus por la maquinaria celular (figura 2). Esta sucesión de eventos culmina en el proceso de infección, que terminará por extenuar total o

parcialmente el sistema inmune humano de forma irreversible, quedando el individuo, por tanto, debilitado y expuesto a cualquier tipo de infección.³

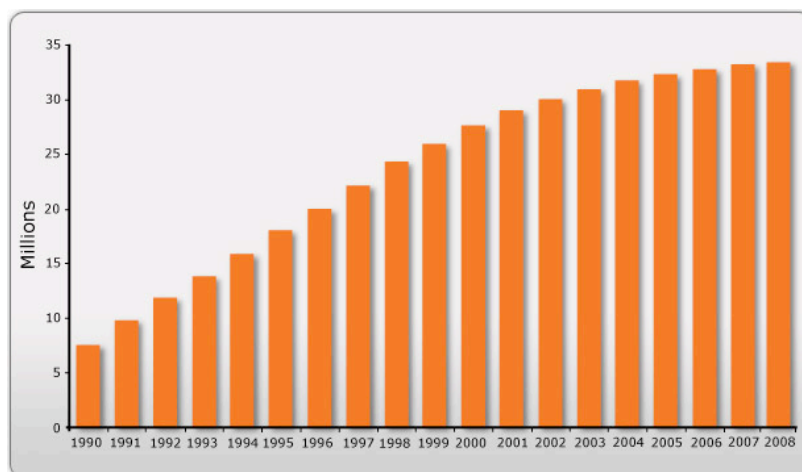


Fig. 1: Personas infectadas por VIH mundialmente. Fuente: UNAIDS Noviembre 2009.

A día de hoy no se ha encontrado un tratamiento efectivo, lo que está llevando a algunos líderes en el campo a cuestionarse si, con la información que se tiene a día de hoy, es posible conseguir la vacuna contra el VIH.⁴ Y es que, entre los problemas fundamentales para el diseño efectivo de una vacuna están, la elevada tasa de mutación que presenta el virus al ser replicado por la célula hospedadora, y el alto grado de glicosilación que presentan las proteínas de anclaje a la célula hospedadora. Además, la tasa de mutación es mucho más rápida y eficaz que en la mayoría de los restantes virus, rapidez que no es correspondida por la adaptación que el sistema inmune debería presentar para una neutralización eficaz, cambiando el aspecto proteico del virus con cada replicación. Esta mutagénesis vírica no es aleatoria, si no que actúa sobre los aminoácidos a los que se van a unir las grandes moléculas oligosacáridicas que el virus conseguirá por la acción de las enzimas glicosiltransferasas de la célula hospedadora, de modo que se obstruyen las regiones de reconocimiento de los anticuerpos de forma estérica.⁵

1.2. Características estructurales del VIH. Glicoproteínas de la envoltura. Estructuras *high-mannose*

El SIDA ha sido estudiado desde los años 80, cuando en 1983 Luc Montaigner, en Francia, y Robert Gallo, en Estados Unidos, identificaron y aislaron por primera vez y de forma paralela el VIH.

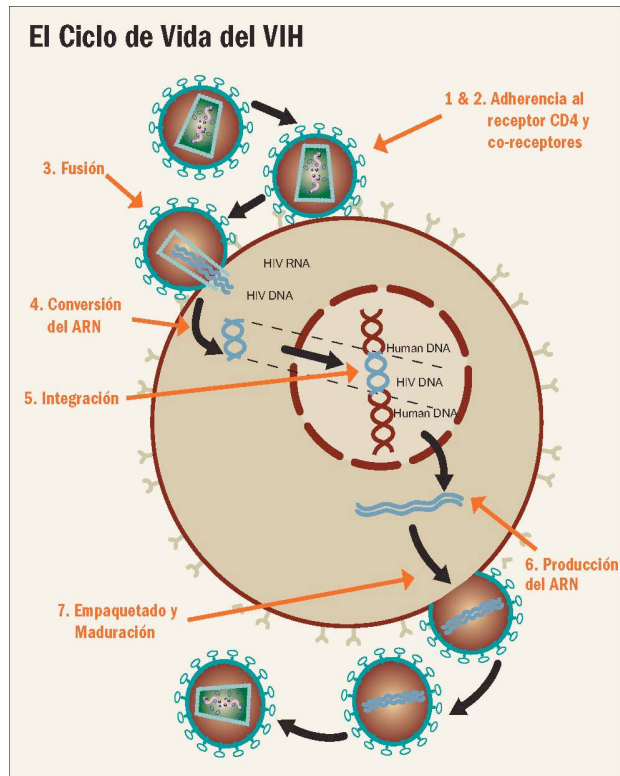


Fig. 2: Ciclo vital resumido del VIH. (Fuente: InfoRed SIDA)

El VIH es un retrovirus que pertenece a la familia de los lentivirus y tiene un tamaño pequeño, de aproximadamente unos 120 nm de diámetro. El virión del VIH presenta dos capas: la membrana lipídica, en la que se encuentran las *espigas* involucradas en el reconocimiento celular; y la cápside interna de naturaleza proteica cuyo interior contiene el RNA viral y otras enzimas, como la transcriptasa inversa, la proteasa o la integrasa, que son fundamentales para la replicación del virus.^{3a} En la membrana lipídica se insertan, aproximadamente, 14 *espigas*⁶ constituidas cada una por un trímero de dos glicoproteínas, gp41 y gp120, donde la glicoproteína de transmembrana gp41 es necesaria para la fusión del virus, y la glicoproteína gp120 está involucrada en la unión del virus a la membrana celular y su reconocimiento (figura 3).

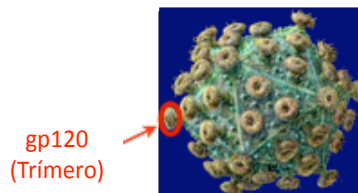


Fig. 3: Dibujo que ilustra la localización del trímero de gp120 en la cubierta del VIH. (Adaptado de rkm.com.au)

Concretamente, la gp120 está recubierta por una densa capa de glicanos que representa hasta el 50% del peso total de la glicoproteína. Esta glicoproteína está unida de forma no covalente a la glicoproteína de membrana gp41, y es importante durante el proceso de infección del virus, ya que es, junto con la gp41, el primer punto de contacto entre el VIH y la célula hospedadora. La distribución de glicanos de manosa en la gp120 se encuentra organizada en agrupaciones en torno a los sitios de unión a los receptores específicos y a la interfase que existe entre los diferentes monómeros que conforman el trímero superficial. El mapa antigénico de la gp120 divide la glicoproteína en tres regiones: la cara neutralizante, la cara no neutralizante y la cara “silenciada” (“*silent face*”) que se encuentra densamente glicosilada. Uno de estos glicanos es el conocido como “*high-mannose*” (figura 4). Así, de los 24 posibles sitios de glicosilación de la gp120, 11 corresponden a estructuras *high-mannose*.⁷

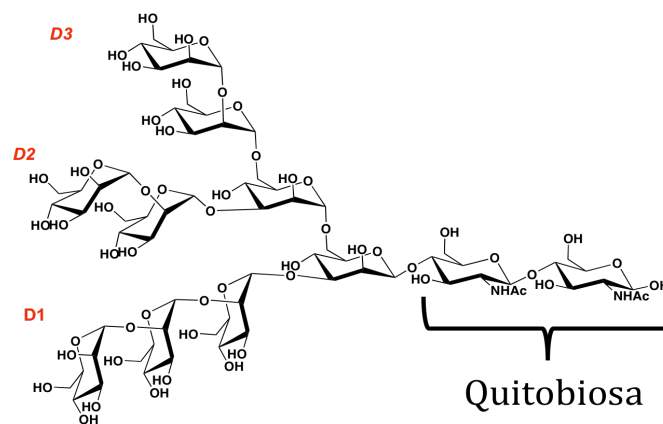


Fig. 4: Esquema de la estructura de los glicanos “*high-mannose*” presentes en la glicoproteína vírica gp120. La unión a la parte polipeptídica ocurre a través de la unidad de quitobiosia. En rojo se indica la nomenclatura de cada ramificación.

1.3. Anticuerpo 2G12. Interacciones con glicanos *high-mannose*. Antecedentes estructurales

Un aspecto interesante de esta enfermedad, desde el punto de vista inmunológico, es que hay personas que, aun siendo infectadas por el VIH, no llegan a desarrollar la enfermedad del SIDA. Este sorprendente hallazgo llevó al descubrimiento de que estos individuos son capaces de desarrollar una serie de anticuerpos de amplio espectro de neutralización que interactúan con el virus y lo mantienen inactivo. El principal inconveniente es que estos anticuerpos están tan sólo presentes en un número muy reducido de humanos frente al total de los infectados.

Sin embargo, todas estas observaciones han supuesto un impulso muy fuerte a todas aquellas estrategias científicas encaminadas al desarrollo de posibles vacunas para el VIH que puedan estimular la producción de potentes anticuerpos de amplio espectro de neutralización.

De todos estos anticuerpos de amplio espectro de neutralización, el 2G12 es uno de ellos, e *in vitro* ha demostrado tener una actividad neutralizante contra un amplio espectro de aislados del tipo 1 del VIH, incluyendo aquellos provenientes de diferentes cepas.⁸ Curiosamente, este anticuerpo interacciona con la parte glicosídica de la glicoproteína gp120. Particularmente, el 2G12 reconoce los glicanos tipo *high-mannose* presentes en la densa capa de azúcares que rodea a la gp120.⁹

Un aspecto importante en la obtención de un posible agente antigénico contra el VIH, basado en las interacciones del anticuerpo 2G12 con los azúcares presentes en la superficie de la glicoproteína gp120 de la cubierta del VIH (denominados “*high-mannose*”), es la determinación estructural de los distintos complejos anticuerpo-ligando. De esta forma se pueden caracterizar cuáles son los contactos necesarios para que haya una correcta interacción entre los ligandos y el receptor. A pesar de la existencia de trabajos anteriores en los que se estudiaron estas interacciones por diferentes técnicas (rayos X, microarrays, etc.),¹⁰ no se ha podido aún determinar la geometría óptima de un ligando tipo oligomanósido que presente máxima afinidad por el anticuerpo, y que elicitte la producción de anticuerpos contra los glicanos de la proteína gp120 del VIH.

Por lo tanto, un paso clave en el camino hacia una vacuna capaz de activar eficazmente una respuesta inmune puede consistir en la identificación a nivel atómico de los mínimos requerimientos estructurales en la interacción del anticuerpo 2G12 con la glicoproteína vírica gp120. De esta forma, se podría construir algún tipo de sistema inmunogénico capaz de generar la producción de anticuerpos tipo-2G12 que neutralicen potentemente el VIH (figura 5).¹¹ La presente tesis doctoral pretende caracterizar las interacciones de ligandos naturales y modificados con el anticuerpo 2G12, a fin de aportar información clave que permita abordar dicho reto estructural.

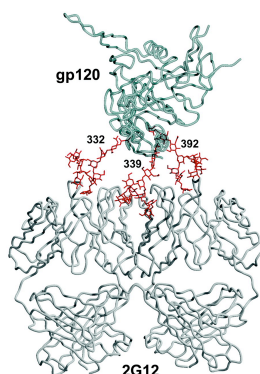


Fig. 5: Modelo de la interacción entre gp120 y 2G12. En rojo, 3 oligosacáridos tipo “*high-mannose*” de la gp120 interaccionando por los dos sitios de alta afinidad (extremos) y por uno de los de baja afinidad (centro) del anticuerpo (adaptado de Calarese, D. A. *et al.* Science 2003, 300 (5628), 2065-71).

En la resolución de dicho problema estructural, varios trabajos han sido publicados por diferentes autores. Dos trabajos consecutivos, de Alexandra Trkola y colaboradores,⁸ intentaron resolver el epítipo y ciertas consideraciones estructurales de la interacción del anticuerpo 2G12 con el VIH. Así, se llegó a la conclusión de que el anticuerpo interactuaba con una parte de las glicoproteínas de la envoltura del VIH-1, esencialmente la gp120 o gp160, siendo el único, entre una amplia variedad de anticuerpos de amplio rango de neutralización, cuyos ligandos naturales estaban basados en las glicoproteínas, indicando que el epítipo del 2G12 no era especialmente inmunogénico.^{8a} En un trabajo posterior^{8b} se definió que el epítipo del 2G12 era heterogéneo y dependiente de los N-glicanos unidos a la gp120, por lo que sería un buen candidato para combinarlo con otro anticuerpo y así hacer más efectiva la respuesta del sistema inmune contra el VIH.

Posteriormente, R. W. Sanders y colaboradores,^{9a} publicaron un trabajo en el que se continuó investigando el epítipo del 2G12 y se indicó que este no solo es dependiente de los glicanos de la gp120, e independiente de la parte peptídica de la glicoproteína, si no que la presencia de residuos de manosa en estos glicanos es esencial para la interacción. Asimismo, se definieron los glicanos importantes para la interacción como aquellos en las posiciones aminoácidas 295, 332, 392, 386 y 448, siendo estos dos últimos los únicos que se pueden eliminar sin afectar el reconocimiento molecular de la gp120 por 2G12.^{9a} En dicha publicación también se aportaron una serie de datos que indicaban que el anticuerpo 2G12 no era un anticuerpo convencional: primero, porque era específico de la glicoproteína gp120 del VIH-1, no siéndolo, por ejemplo, de la gp120 del virus de inmunodeficiencia simia (*SIV*, en inglés); segundo, porque era necesario que estuviesen presentes los glicanos de manosas, pero en una determinada disposición, ya que con la glicoproteína desnaturalizada el 2G12 se volvía inefectivo; y tercero, porque el epítipo del 2G12 estaba compuesto por motivos que están presentes en las propias glicoproteínas de las células del organismo hospedador, por lo que el 2G12, para evitar la auto-reacción, no debería interactuar con alta afinidad con uno de estos epítopos, mientras que sí lo haría con los oligosacáridos de manosas que pertenecieran a la gp120, que se encuentran formando agrupaciones. Sin embargo, en este trabajo se postuló que el 2G12 era un buen anticuerpo para neutralizar el VIH-1 ya que interactuaba con la parte conservada y expuesta al disolvente de la gp120, los glicanos, lo que podría ser muy útil en el diseño de una vacuna eficaz.

Posteriormente, en un trabajo de C. N. Scanlan y colaboradores^{9b}, se concluyó que el motivo Man α 1,2Man era necesario para el epítipo del 2G12 y que las cadenas de glicanos unidas a las asparraginas 295, 332 y 392 eran fundamentales en la interacción con el anticuerpo, sin involucrar la cadena polipeptídica en la interacción. Además, se abrió la posibilidad de que el 2G12 reconociera dos cadenas polisacarídicas vecinas.

Por otro lado, aportaciones estructurales clave han venido del campo de la cristalografía. Así, la

novedosa estructura tridimensional del anticuerpo 2G12, y las de sus complejos con ciertos oligomanósidos derivados de los glicanos *high-mannose* presentes en la gp120, algunos de ellos estudiados en el presente trabajo por RMN (di-, tetra-, y pentamanósido; PDB: 1OP3, 1ZLS, 1ZLU, respectivamente), han sido resueltos experimentalmente por la técnica de difracción de rayos X.^{10a, 12} Estos estudios han puesto de manifiesto la conformación atípica de este anticuerpo, que presenta una estructura en la que los dominios variables de alto peso molecular se han intercambiado (V_H en figura 6a).^{10a} Dichas estructuras cristalográficas han arrojado información fundamental sobre el reconocimiento de los oligomanósidos por parte del anticuerpo en los complejos, confirmándose el motivo principal de reconocimiento como el disacárido terminal $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ en el extremo no reductor de las cadenas oligosacáridicas (figura 6b). De hecho, la ramificación implicada (D1) en la interacción del anticuerpo con un nonamanósido típico de las estructuras *high-mannose* (véase la figura 4) en esta estructura cristalográfica efectúa hasta el 85% de los contactos que presenta el nonamanósido, mientras que el dimanósido del extremo no reductor por sí solo, sólo presenta 50 veces menos afinidad por el 2G12 que el nonamanósido.¹²

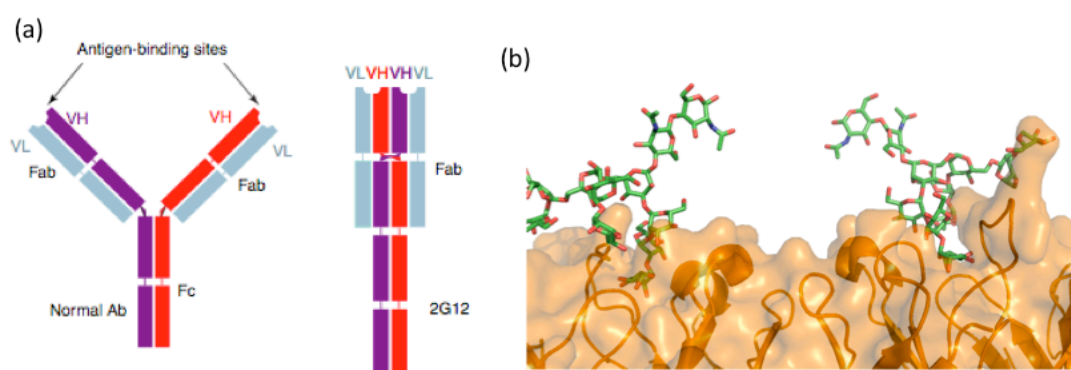


Fig. 6: Características del anticuerpo monoclonal 2G12: a) Esquema del novedoso intercambio de dominios que presenta este anticuerpo (adaptado de ¹³). b) Esquema de la interacción de los sitios de reconocimiento del anticuerpo 2G12 con los nonamanósidos ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) de la cubierta de la gp120 (PDB: 1OP5).

Sin embargo, varios aspectos del reconocimiento molecular de los antígenos por parte del anticuerpo 2G12 no quedaron totalmente aclarados por estas estructuras en estado sólido. En lo que respecta al anticuerpo, la estructura cristalográfica en presencia del nonamanósido natural, $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ postulaba la existencia de dos nuevos sitios de reconocimiento para este ligando justo en el centro del entrecruzamiento de ambos dominios variables de alto peso molecular (figura 5, entre los sitios de reconocimiento principal, que en el modelo está ocupado por el glicano unido a la asparragina 339). No obstante, estos dos nuevos sitios de reconocimiento, que se postulan como de baja afinidad, no han sido corroborados por ningún trabajo posterior, surgiendo la pregunta de si dichas interacciones solamente ocurren en estado sólido, como consecuencia del empaquetamiento cristalino o si son realmente sitios de interacción específicos del anticuerpo.

Por otro lado, para los ligandos superiores al dimanósido (tetra-, y pentamanósido), los residuos que establecían menos contactos con la proteína, aquellos que en disolución cabría esperar que estuvieran expuestos al disolvente, aparecían mal definidos. Al analizar el correspondiente archivo del banco de datos de proteína (Protein DataBank, PDB) de la estructura cristalográfica se observaron elevados factores térmicos en los átomos de dichos residuos (p.ej. archivo 1ZLS^{10a} del PDB, en el que se observa el complejo del 2G12 en presencia del tetramanósido Man α 1,2Man α 1,2Man α 1,3Man α 1), confirmando la menor precisión de la estructura cristalográfica para estos residuos. En general, dichos residuos de manosa presentaban distorsiones en los anillos de hexopiranosos, con conformaciones claramente desviadas respecto a la energéticamente más favorable (silla ⁴C₁).¹⁴

Esta distorsión se ve incrementada en los casos de oligomanósidos ramificados, con dos extremos no reductores conteniendo el motivo terminal Man α 1,2Man, en los que las estructuras cristalográficas (penta-, y nonamanósido) mostraban un sólo modo de reconocimiento, involucrando a una sola de las ramas, mientras que los otros motivos terminales Man α 1,2Man quedaban totalmente expuestos al disolvente, sin hacer contactos con la proteína. Además, la alta movilidad que presentan los oligomanósidos en disolución hace pensar que estos ligandos no presenten una sola conformación al enlazarse al anticuerpo, y más en los oligomanósidos superiores, que presentan monómeros expuestos total o parcialmente al disolvente.¹⁴ La importancia que un conocimiento de estos aspectos puede tener para el desarrollo racional de agentes inmunogénicos motivó a nuestro grupo a llevar a cabo un estudio estructural en más profundidad, en nuestro caso en disolución, haciendo una mayor aproximación al sistema biológico estudiado.

Ninguno de los trabajos mencionados anteriormente empleó la espectroscopía de RMN, una técnica en disolución isotrópica que ha demostrado una particular idoneidad para el estudio, a resolución atómica, de las características estructurales de complejos de biomoléculas responsables de procesos de reconocimiento molecular claves en determinados procesos biológicos naturales o patológicos. Por ello, en la presente tesis doctoral, la caracterización estructural de las interacciones de los ligandos oligosacáridicos con el anticuerpo 2G12 se ha efectuado por técnicas de RMN de alta resolución, apoyadas por cálculos teóricos, con el fin de obtener una imagen tridimensional de las interacciones de este tipo de ligandos.

Como se ha mencionado anteriormente, la estructura de los ligandos en esta tesis se basa en la "plantilla" natural de los glicanos *high-mannose* (Man₉(GlcNAc)₂, figura 7), que están unidos mediante enlaces covalentes a la cadena polipeptídica de la gp120, principalmente a través de residuos de asparragina.¹⁵ En este capítulo nos centraremos en la determinación estructural de las interacciones de los diferentes ligandos (di-, tri-, tetra-, y pentamanósido naturales, y heptamanósido no natural, figura 7) con el anticuerpo 2G12 en disolución.

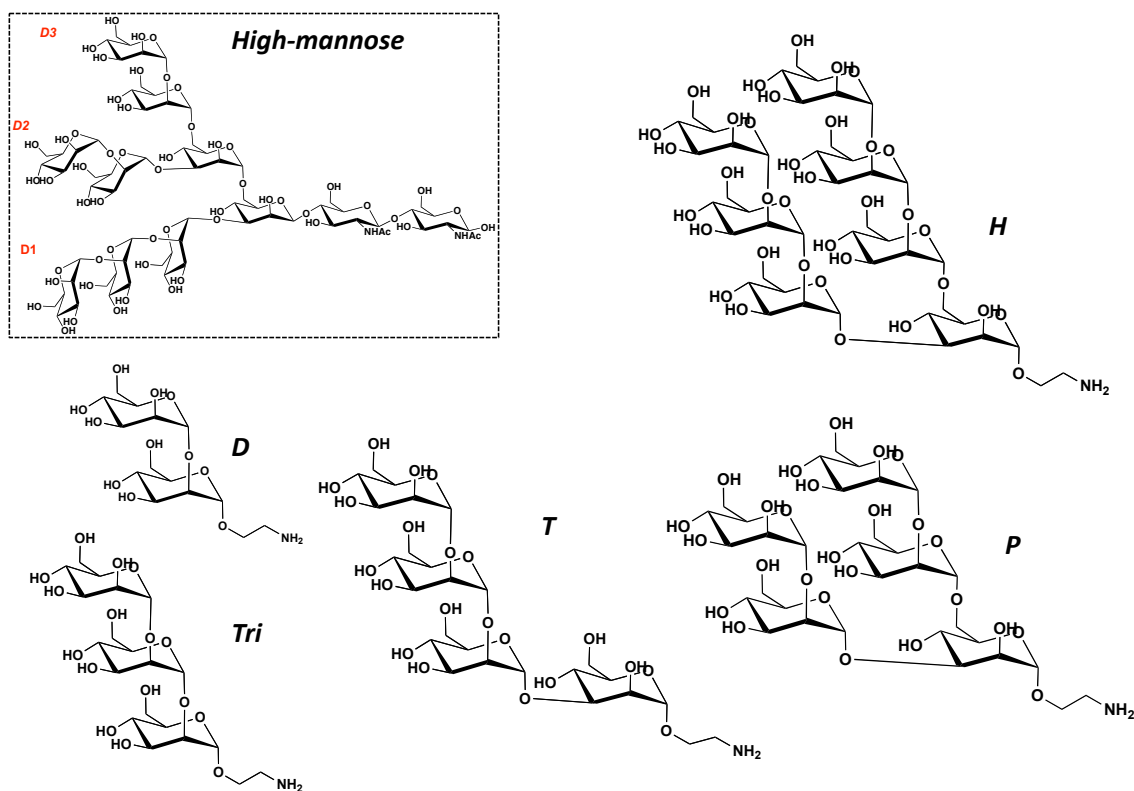


Fig. 7: Oligomanósidos sintéticos estudiados en el presente trabajo. D, Tri, T y H, representan di-, tri-, tetra-, penta- y heptamanósido. La configuración anomérica α de cada oligomanósido ha sido prefijada con un espaciador etilenoamino. En el recuadro de la figura se muestra la estructura del glicano *high-mannose* natural.

El dimanósido ($\text{Man}\alpha_{1,2}\text{Man}1\alpha(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3$, **D**, figura 7), ha sido elegido por ser la unidad mínima de reconocimiento del anticuerpo, como puede comprobarse en varias estructuras cristalográficas y en varias pruebas biológicas descritas con anterioridad a este trabajo.^{10a} Al ligando se le une en la posición anomérica (C1) del azúcar del extremo reductor una cadena alifática de dos unidades. Esta terminación alifática es común a todos los ligandos estudiados, lineales y ramificados, y, como demostraremos más adelante, no influye en las interacciones de los ligandos con el anticuerpo.

El trimanósido ($\text{Man}\alpha_{1,2}\text{Man}\alpha_{1,2}\text{Man}1\alpha(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3$, **Tri**, figura 7) se ha escogido por ser la extensión natural del ligando anterior, sin llegar a ser el brazo D1 completo del nonamanósido natural (figura 7, recuadro). Hasta donde sabemos, este ligando no ha sido estudiado, pero fue elegido por la posibilidad de ser un buen candidato a la hora de estudiar los diferentes contactos del brazo principal del *high-mannose* natural reconocido por el anticuerpo (brazo D1). Además, el estudio de su afinidad podría revelar la importancia de la unión de diferentes residuos de manosa al mínimo epítipo (disacárido) del anticuerpo, al tratarse de un caso intermedio entre éste y el oligomanósido que presentaba más afinidad de los estudiados aquí (tetramanósido), en estudios previos.¹²

El tetramanósido ($\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3\text{Man}1\alpha(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3$, **T**, figura 7) se ha escogido por ser un mimético de la rama D1 completa del nonamanósido *high-mannose*. Esta ramificación parece ser fundamental en el reconocimiento del oligomanósido natural de la gp120 por el anticuerpo 2G12, ya que es la ramificación que establece el mayor número de contactos con el anticuerpo en la estructura cristalográfica.^{10a} Asimismo, se ha demostrado en estudios anteriores que el anticuerpo presenta una gran afinidad por este ligando en superficies multivalentes.^{10b}

Por otro lado, se han estudiado oligomanósidos sintéticos que presentan ramificaciones en su estructura: un pentamanósido presente en el nonamanósido natural, y un heptamanósido no-natural. En ambos casos, aparte de estudiar la interacción particular de cada ligando, en general se pretendió dilucidar cómo afecta la presentación de dos estructuras tipo dimanósido lineal en un mismo ligando, en el caso del pentamanósido, o dos estructuras tipo trimanósido lineal en un mismo ligando, en el caso del heptamanósido no-natural.

Así, el interés por el pentamanósido ($\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}1\alpha(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3$, figura 7 **P**) radica en que en su estructura se incluyen los brazos D2 y D3 del *high-mannose* natural. Además, analizando la estructura cristalográfica del 2G12 en presencia del undecasacárido natural ($\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$), se observa un segundo modo de reconocimiento implicando, en este caso, el brazo D2 del *high-mannose*. No obstante, este segundo modo de reconocimiento, que se postula que sea de baja afinidad, sólo ha sido descrito en esta estructura cristalográfica,^{10a} por lo que sería conveniente estudiar esta interacción por RMN, para intentar sacar algún tipo de información adicional en disolución.

Por el contrario, en el caso del estudio de la interacción del 2G12 con el heptamanósido no-natural ($\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}1\alpha(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3$, figura 7 **H**), el interés viene de que, en este ligando, ambas ramificaciones presentan la estructura del trimanósido lineal antes descrito. Además, una de estas ramificaciones es un mimético exacto del brazo D1 del *high-mannose* natural (estructura que también presenta el ligando lineal tetramanósido **T** antes descrito). Con este ligando se espera obtener un beneficio en la interacción con el anticuerpo 2G12, por el hecho de tener dos estructuras tipo-trimanósido-lineal en el ligando (c.f. figura 7 **Tri** y **H**).

Estos estudios de interacción los haremos haciendo uso de técnicas de RMN como STD NMR y NOE transferido. La primera técnica va a ser la base de los estudios que hagamos en el presente trabajo, y la descripción completa de la técnica está descrita tanto en la introducción de la presente tesis doctoral como en la publicación seminal de B. Meyer y M. Mayer.¹⁶

2. Resultados y discusión

2.1. STD NMR y cálculo de epítomos

Antes de proceder con los experimentos de interacción se llevaron a cabo los correspondientes experimentos de asignación de las señales de protón de los diferentes oligomanósidos (^1H , COSY¹⁷, TOCSY¹⁸, NOESY¹⁹, HSQC²⁰). Esta asignación se confirmó comparándola con la existente en la literatura.²¹

Se realizaron experimentos de STD NMR a los ligandos en ausencia de 2G12 para comprobar que no recibían saturación indirecta cuando, en los experimentos en presencia del receptor, se irradiaran tanto la zona alifática como aromática del anticuerpo. En todos los casos, los experimentos de STD NMR confirmaron que ninguno de los ligandos recibía saturación al irradiar en la zona espectral donde más tarde el anticuerpo sería irradiado selectivamente (0.86 ppm y 7 ppm para irradiar las zonas alifática y aromática, respectivamente).

a) Ligando lineales

Al efectuar los experimentos de STD NMR de los diferentes ligandos lineales en presencia del anticuerpo, e irradiando tanto en la zona alifática como aromática del mismo, se pudo observar como cada uno de ellos presentaba señales claras en el espectro diferencia (figura 8). Esto confirmó que cada uno de estos ligandos lineales interacciona con el anticuerpo 2G12 en disolución y que el proceso de reconocimiento es rápido en la escala de tiempos de la RMN. Previamente, en la literatura, se había demostrado por técnicas de microarray que las magnitudes de estas interacciones están en un rango de K_D de μM ,^{10b} lo que está de acuerdo con el rango de afinidades adecuado para la obtención de señales en los experimentos de STD NMR.

La figura 8 muestra los espectros de STD NMR de los ligandos lineales al tiempo de saturación más bajo que se ha utilizado en este trabajo, 0.5 s. A bajos tiempos de saturación las intensidades de los picos en el espectro de diferencia pueden ser directamente relacionadas con los contactos que efectúan cada uno de los ligandos, es decir, los contactos ^1H - ^1H intermoleculares en el estado enlazado

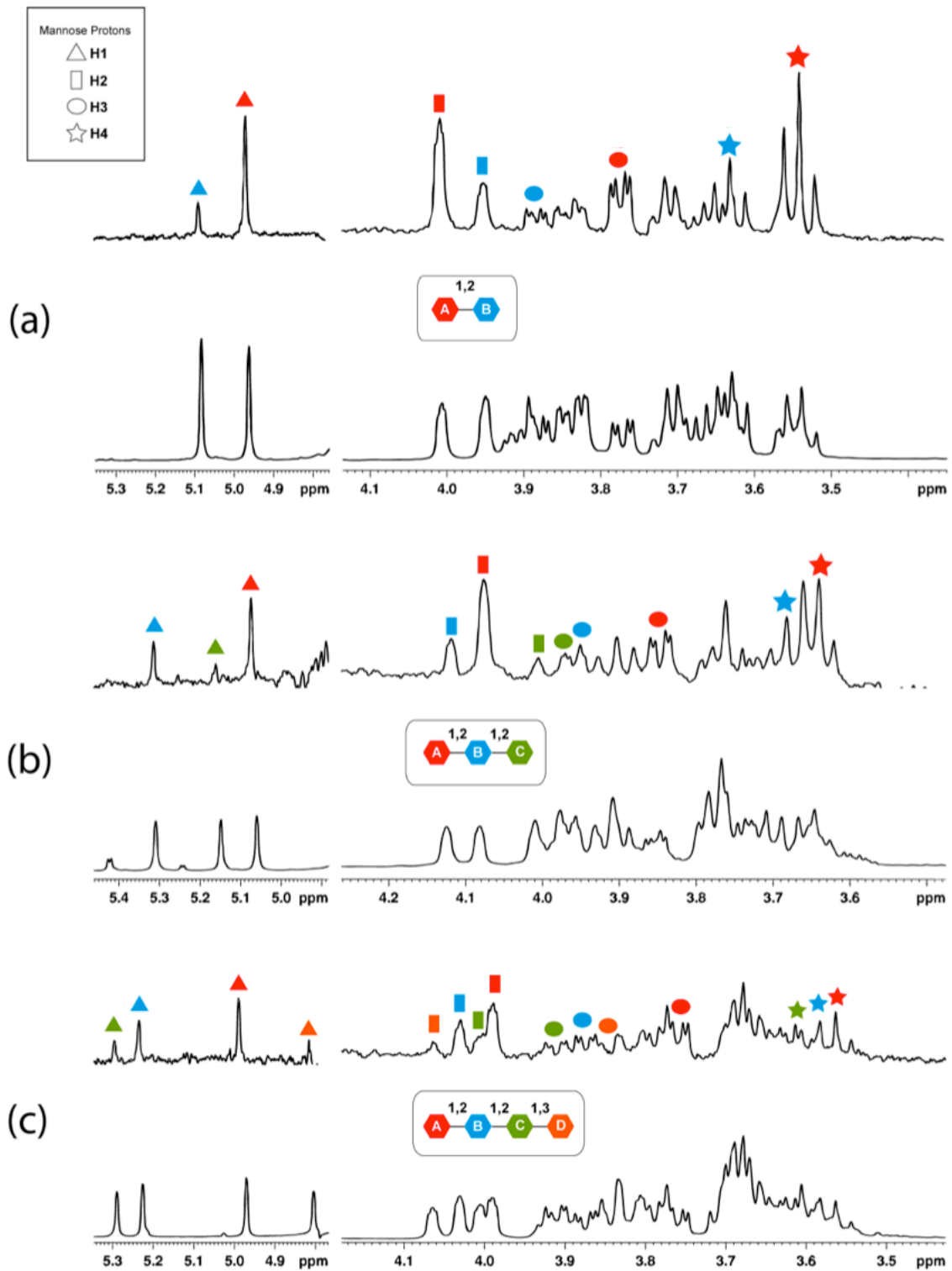


Fig. 8: Interacción de los ligandos lineales (a) $\text{Man}\alpha 1,2\text{ManOR}$, (b) $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{ManOR}$, y (c) $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3\text{ManOR}$ ($\text{R} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), con el anticuerpo 2G12 en disolución, detectada por espectroscopía STD NMR. Para cada ligando el espectro inferior muestra el espectro de referencia ^1H NMR, mientras que el superior corresponde al espectro diferencia ^1H STD NMR (500 MHz, 25°C , tiempo de saturación 0.5 s, frecuencia *on-resonance* 0.86 ppm, *off-resonance* 40 ppm). Los espectros de STD NMR muestran la saturación recibida por cada protón tras la interacción de cada ligando con el sitio activo del anticuerpo. Los símbolos coloreados (triángulos H1, rectángulo H2, elipse H3, estrella H4), se utilizan para distinguir los diferentes residuos de manosa (dibujos esquemáticos).

A través del análisis de estos espectros podemos obtener información estructural de la interacción de los oligomanósidos lineales con el anticuerpo 2G12 en disolución. La simple comparación de los espectros de STD con las intensidades en los espectros de referencia resalta la precisa distribución de la saturación transferida desde los protones del anticuerpo a los de los diferentes ligandos en el estado enlazado. En todos los casos, los protones que reciben la mayor cantidad de magnetización, y que, por tanto, son los que hacen los contactos más próximos con superficie del anticuerpo en el complejo, son los del residuo de manosa en el extremo no reductor de cada oligomanósido (manosa A, símbolos rojos en la figura 8). Si nos centramos en el análisis de las señales de STD en dicho residuo terminal de cada oligomanósido, podemos observar una distribución similar en las intensidades de los STD en los tres oligomanósidos lineales: los protones que reciben la mayor cantidad de saturación son H4, H2 y H3 (figura 8). Del mismo modo, se puede observar un decaimiento en las intensidades de los STDs en dirección al residuo terminal reductor de cada oligomanósido sistemáticamente (en el sentido B→C→D, figura 8). Este efecto se hace más evidente observando la distribución de intensidades de STD en la región espectral característica de los protones anoméricos (H1, triángulos), los cuales aparecen bien resueltos (figura 8, entre 4.8 y 5.3 ppm).

Las variaciones de las intensidades de los STD entre los diferentes residuos que componen cada oligomanósido es particularmente más pronunciada en el dimanósido que en los casos del tri- y tetramanósido (figura 8), lo cual indica, cualitativamente, la existencia de diferentes afinidades del anticuerpo por cada ligando. Los ligandos débiles (k_{off} alta) normalmente muestran mayores diferencias en las intensidades relativas de STD (%) entre sus protones, ya que su tiempo de residencia en el estado enlazado sólo permite que se saturen eficazmente aquellos protones que estén muy cerca de la proteína en el sitio de reconocimiento del receptor.

Para obtener un mapa cuantitativo de los epítomos de los oligomanósidos, así como para comprobar la reproducibilidad del patrón de intensidades de STD, se realizaron, para cada oligosacárido, series de experimentos STD NMR variando el tiempo de saturación del experimento desde 0.5 s hasta 3.0 s, construyendo en cada caso las correspondientes curvas de crecimiento de la saturación. Este método permite una comparación más fiable de los epítomos obtenidos de los experimentos de STD NMR para diferentes ligandos de un mismo receptor.²²

El análisis matemático de las curvas de crecimiento de STD experimentales permitió obtener las pendientes iniciales del crecimiento del STD (que denominaremos STD_0) para cada protón del ligando. Estas pendientes, correspondientes a los valores de STD en el límite de tiempo de saturación cero, permiten obtener información más precisa del estado enlazado a partir de los experimentos de STD NMR. Su uso ha sido propuesto para eliminar cualquier posible interferencia de las diferentes propiedades de relajación de cada protón en la determinación del

epítopo de los ligandos. Evidencias, tanto teóricas como experimentales,²³ han demostrado que las curvas de saturación de STD pueden ser ajustadas a una función mono-exponencial asintótica dada por la ecuación:

$$STD(t_{sat}) = STD_{max} \cdot (1 - e^{(k_{sat} \cdot t_{sat})})$$

donde t_{sat} es el tiempo de saturación, mientras que STD_{max} y k_{sat} son parámetros ajustables. Después del ajuste matemático, la pendiente inicial del STD (STD_0) es obtenida como producto de dos parámetros: $STD_{max} \cdot k_{sat}$.

La tabla 1 muestra los valores de STD_0 obtenidos para los protones de los ligandos lineales cuyas intensidades pudieron ser medidas con precisión, al no presentar solapamiento con otras señales. Para cada uno de los ligandos se determinó cuantitativamente el mapa del epítopo calculando los porcentajes de STD_0 respecto al valor máximo de STD_0 . De esta forma, las regiones de cada ligando más cercanas al receptor en el sitio de reconocimiento, se identifican fácilmente por mostrar valores cercanos al máximo (100 %).

Tabla 1. Pendientes iniciales de STD (STD_0)^a y mapas de los epítomos^b de los ligandos lineales di-, tri-, y tetramanósido, en su interacción con el anticuerpo 2G12.

	Dimanósido (D)		Trimanósido (Tri)		Tetramanósido (T)	
	STD_0	Epítomo STD (%) ^b	STD_0	Epítomo STD (%) ^b	STD_0	Epítomo STD (%) ^b
H1A	7.9	56	1.2	65	2.4	78
H2A	12.0	84	1.8	100	2.8	92
H3A	11.3	79	1.5	82	3.0	100
H4A	14.2	100	1.8	99	3.0	100
H1B	2.3	16	0.6	35	1.6	54
H2B	5.0	35	0.8	45	2.0	65
H3B	3.0	21	-- ^c	--	1.7	58
H4B	4.5	32	--	--	--	--
H1C			0.3	16	1.1	37
H2C			0.3	16	1.6	54
H3C			--	--	1.2	27
H1D					0.7	24
H2D					0.7	24

(a) Pendientes iniciales obtenidas a partir de las curvas de crecimiento del STD.

(b) Normalizados, para cada ligando, cada STD_0 al mayor obtenido y después multiplicados por 100.

(c) Señales no medidas debido a solapamiento entre señales.

La figura 9 muestra gráficamente los resultados, resumidos en rangos relativos de STD_0 , acotando así los niveles de saturación recibida por cada residuo de azúcar, e ilustrando, por tanto, la proximidad espacial de los diferentes residuos al sitio activo del anticuerpo en el estado enlazado. El patrón característico de las señales de STD para cada ligando se observa a todos los tiempos de saturación estudiados, como se ve en las curvas de saturación de STD de las señales de los protones anoméricos (H1) de los ligando lineales (figura 9).

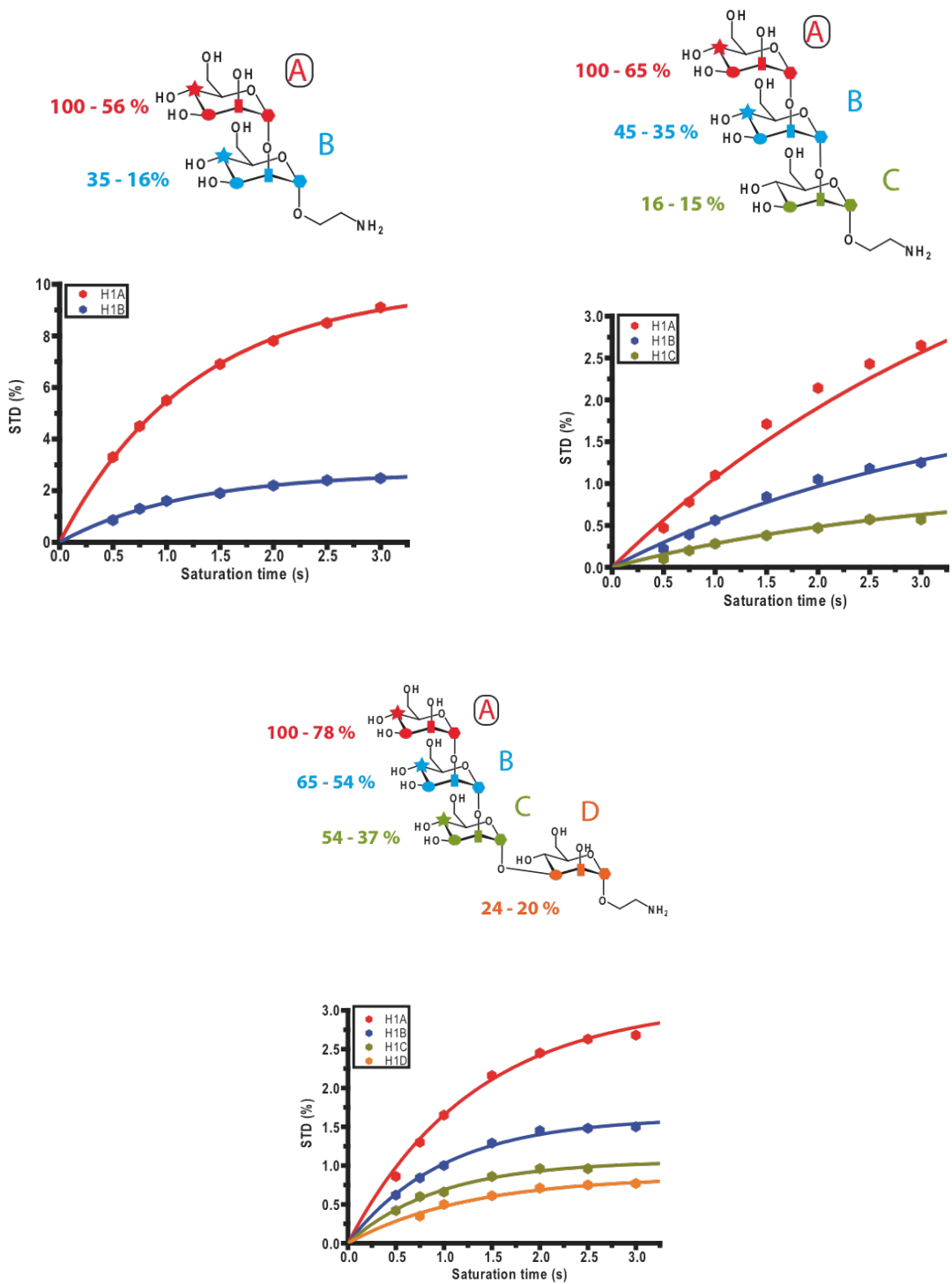


Fig. 9: Mapas (%) de los niveles de saturación recibida por residuo (ilustrando los contactos proteína-ligando en el estado enlazado) para los ligandos di- (sup. izqda.), tri- (sup. dcha.), y tetrasacárido (inf.). Los colores de los símbolos (hexágono H1, rectángulo H2, elipse H3, estrella H4) distinguen los diferentes residuos de manosa. Para cada ligando se muestran las curvas de saturación con el tiempo de saturación para el protón anomérico (H1, hexágono) de cada residuo de manosa. Los símbolos representan los datos experimentales, mientras que las líneas muestran el ajuste matemático.

Los mapas de los epítomos obtenidos a partir de los STD₀ para los ligandos lineales (tabla 1 y figura 9) muestran que, en los tres casos, la mayor parte de saturación transferida desde el anticuerpo se produjo en el residuo terminal de manosa no-reductor (manosa A, curvas color rojo en la figura 9). Además, para los ligandos tri- y tetramanósido, hay un evidente decaimiento de la saturación transferida desde el extremo no-reductor hasta el reductor, como se puede observar en las curvas de crecimiento de STD de los H1 en la figura 9. Los estudios de RMN muestran, pues, que para los ligandos lineales la unión al 2G12 ocurre mediante un mismo modo de reconocimiento, que implica la interacción específica a través del extremo no-reductor de la molécula (residuos de manosa A y B en la figura 9).

Estos resultados de RMN en disolución están de acuerdo, cualitativamente, con las estructuras de rayos X existentes de los complejos del 2G12 en presencia de di- y tetramanósido (PDB 1OP3 y 1ZLS, respectivamente), similares a los ligandos di- y tetramanósido estudiados en el presente trabajo. En las estructuras cristalográficas se observó un único modo de asociación, en el que el motivo terminal disacárido, Man α 1,2Man, en el extremo no-reductor, es íntimamente reconocido por la proteína. La estructura de rayos X del complejo entre el 2G12 y el disacárido Man α 1,2Man se ajusta razonablemente bien al patrón observado de las señales en nuestros experimentos de STD del residuo de manosa no-reductor (A).

Asimismo, basándonos en la estructura del cristal (complejo 2G12-dimanósido), se llevaron a cabo cálculos de matriz de relajación completa e intercambio conformacional para predecir teóricamente las intensidades de los experimentos STD, utilizando el programa COCERMA-ST.^{23a, 24} Estos cálculos nos permiten validar un modelo molecular dado de un complejo ligando-proteína (a partir de rayos X, RMN, construcción por homología, etc.) mediante la comparación de los valores predichos teóricamente con las intensidades experimentales de STD en disolución. Como ya se indicó en el capítulo de introducción, a menor valor del factor R-NOE, mayor similitud habrá entre los datos teóricos predichos para el modelo del complejo dado, y los datos experimentales obtenidos en los experimentos STD NMR.

En el caso de la estructura de rayos X del complejo dimanósido-2G12 (PDB 1ZLS), los cálculos dieron un ajuste razonable con lo observado experimentalmente, incluso sin necesidad de un refinamiento energético de la estructura. Esto confirmó que el anticuerpo 2G12 reconoce en disolución al dimanósido en un modo de reconocimiento similar a aquel descrito en la estructura cristalográfica (figura 10a). Esto es, la manosa terminal en el extremo no-reductor (manosa A, figura 9) es la parte fundamental del ligando para el reconocimiento molecular en el sitio de reconocimiento del anticuerpo 2G12.

Asimismo, se realizaron los cálculos con CORCEMA-ST para los complejos del tri- y del tetramanósido en presencia del 2G12 (figuras 10b y c). En este último caso, se utilizó la estructura cristalográfica publicada (PDB 1ZLS), mientras que en el caso del trimanósido, al no

existir estructura cristalográfica, se usó la parte del tetramanósido que corresponde a la misma estructura del trimanósido.

En los tres casos, la comparación de los resultados teóricos con los experimentales arrojó valores de R-NOE bastante aceptables (figura 10). Podemos concluir que, en disolución, los tres ligandos interactúan con el anticuerpo 2G12 de una forma similar a la que se muestra en las estructuras de rayos X, mostrando todos el mismo modo de asociación. En este modo, el disacárido terminal Man_{1,2}Man en el extremo no-reductor es que el establece los contactos más cercanos con el sitio de reconocimiento del anticuerpo.

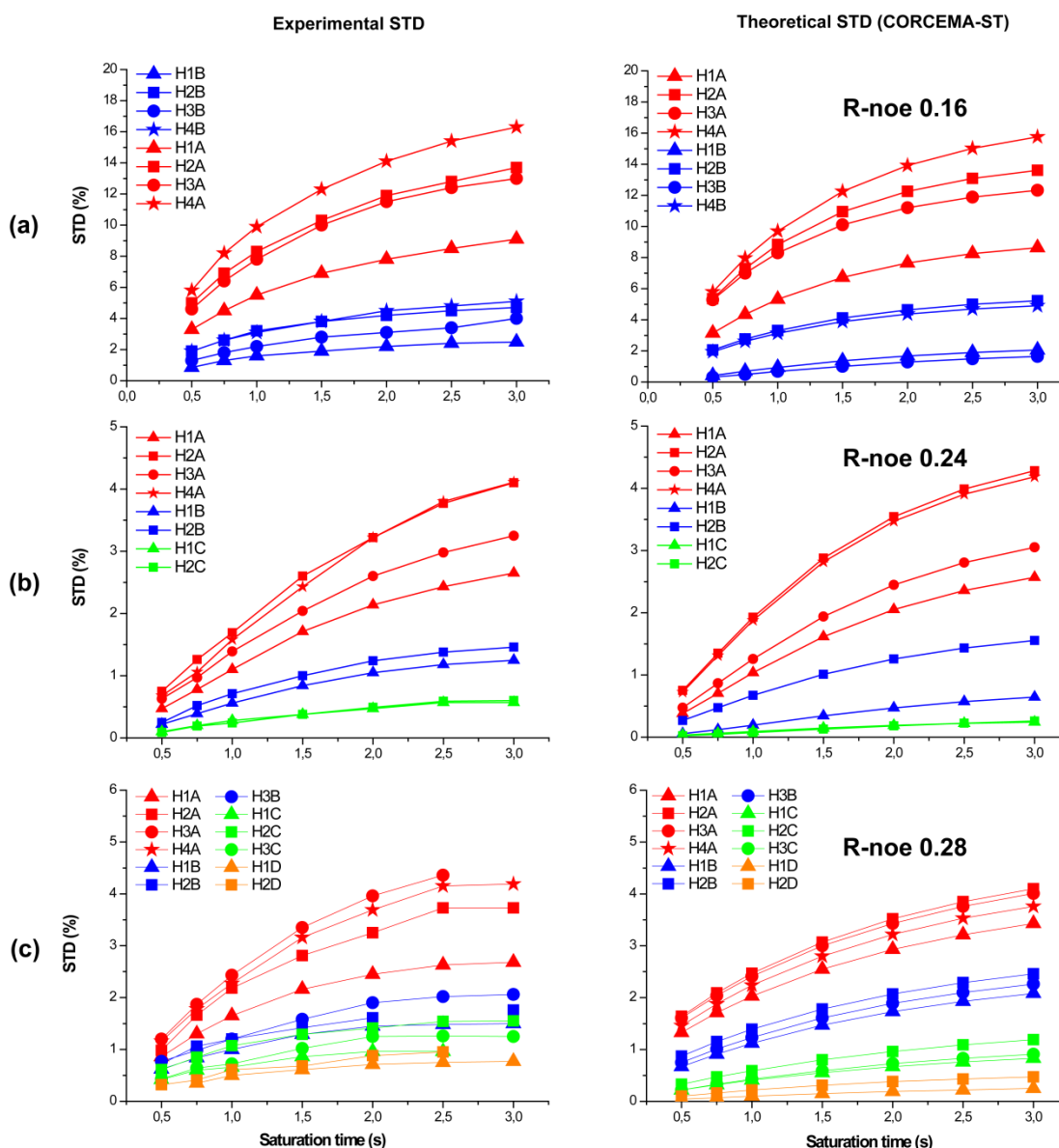


Fig. 10: Curvas de crecimiento de STD experimentales (derecha) y teóricas (izquierda) de (a) dimanósido, (b) trimanósido y (c) tetramanósido (ver figura 7 para las estructuras). Las intensidades teóricas de STD fueron calculadas usando el programa CORCEMA-ST, basándose en estructuras cristalográficas existentes (1OP3 para el dimanósido y 1ZLS para el tri-, y tetramanósido).

b) Ligando ramificados

Las interacciones del anticuerpo 2G12 y los oligomanósidos ramificados también fueron estudiadas mediante la técnica de STD NMR. Como en el caso de los ligandos lineales, se obtuvieron señales claras en los espectros de muestras que contenían el anticuerpo y el oligomanósido ramificado correspondiente, signo inequívoco de la interacción entre las biomoléculas en disolución (figura 11).

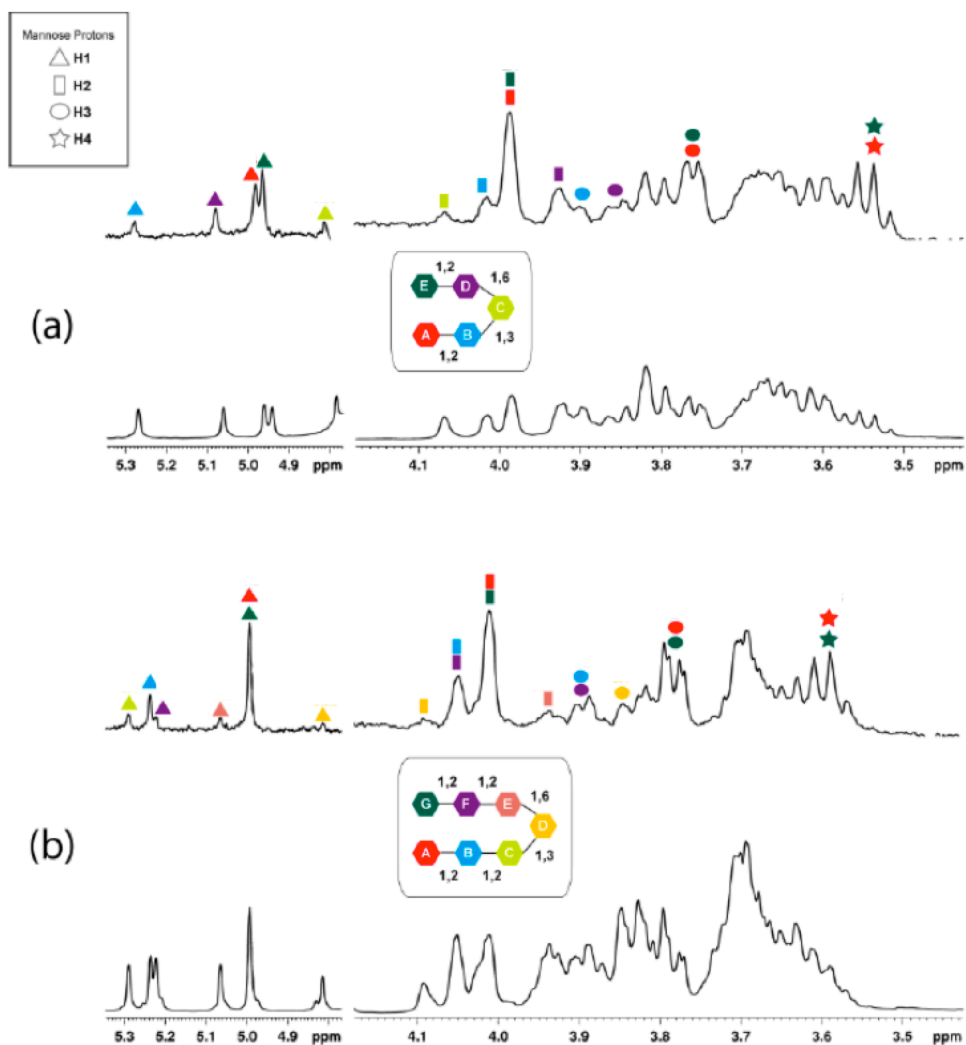


Fig. 11: Interacción de los ligandos ramificados (a) $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}1\alpha\text{OR}$, y (b) $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3[\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,6]\text{Man}1\alpha\text{OR}$ ($\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{NH}_3$) con el anticuerpo 2G12 en disolución, detectada por STD NMR. Para cada ligando, el espectro inferior muestra el espectro de ^1H de referencia, mientras que el superior es el correspondiente ^1H STD NMR (tiempo de saturación 0.5 s, frecuencia *on-resonance* 0.86 ppm, *off-resonance* 40 ppm). Los colores de los símbolos (H1 triángulo, H2 rectángulo, H3 elipse, H4 estrella) distinguen los diferentes residuos de manosa (dibujo esquemático insertado).

En la figura 11 se muestran los espectros resultantes, adquiridos con el menor de los tiempos de saturación usados (0.5 s). En ambos casos la resolución de los espectros se ve comprometida por un aumento en el solapamiento de señales (mayor número de señales en estos ligandos superiores) y un ensanchamiento de las señales debido a la interacción con el anticuerpo. Esto afecta de forma particular al análisis de la zona espectral correspondiente a las señales tipo CH de carbohidrato (3.5 – 4.1 ppm). Afortunadamente, en el caso del pentamanósido, los cinco protones anoméricos muestran diferentes desplazamientos químicos (figura 11a, 4.7 – 5.3 ppm), y la resolución espectral a 500 MHz es lo suficientemente buena como para permitir medidas individuales de ambos residuos de manosa terminales (A y E).

Así como en el caso de los oligomanósidos lineales, se midieron las curvas de crecimiento de STD de las señales de los ligandos ramificados que pudieron ser integradas sin ambigüedad. A partir de estas curvas, se obtuvieron las pendientes iniciales (STD_0) y se normalizaron al máximo valor, resultando en los correspondientes mapas de los epítomos (tabla 2 y figura 12).

Tabla 2. Pendientes iniciales de STD (STD₀)^a y mapas de los epítomos^b de los ligandos penta- y heptamanósido, en la interacción con el anticuerpo 2G12.

	Pentamanósido (P)		Heptamanósido (H)	
	STD ₀ ^a	Epítomo STD (%) ^b	STD ₀ ^a	Epítomo STD (%) ^b
H1A	3.6	43	--	--
H2A	5.9	71 ^d	--	--
H3A	4.9	59 ^d	--	--
H4A	5.9	71 ^d	--	--
H1B	1.2	15	1.97	38
H2B	3.0	36	--	--
H1C	1.0	13	1.06	20
H2C	1.5	19	--	--
H1D	2.2	27	0.87	17
H2D	-- ^c	--	0.7	13
H3D	--	--	0.84	16
H1E	5.1	61	0.78	15
H2E	8.3	100 ^d	0.8	15
H3E	6.9	83 ^d	--	--
H4E	8.3	100 ^d	--	--
H1F			0.87	17
H2A+H2G			5.21	100

(a) Pendientes iniciales obtenidas a partir de las curvas de crecimiento del STD.

(b) Normalizados, por ligando, cada STD₀ al mayor obtenido y después multiplicados por 100.

(c) Señales no medidas debido a solapamiento entre señales.

(d) Observadas como promedios de los residuos A y E. Los valores en la tabla han sido obtenidos asumiendo una relación 60:40 deducida de la relación de intensidades STD H1E:H1A.

Desafortunadamente, las señales de los residuos terminales A y G del heptamanósido aparecían al mismo desplazamiento químico, excluyendo cualquier tipo de medida independiente para sus señales de STD. Así, la señal STD de mayor intensidad en el heptamanósido no pudo ser adscrita a un único protón y, por lo tanto, no se pudo determinar un epítomo preciso para toda la molécula. No obstante, sí fue posible establecer una comparación de los diferentes niveles de saturación recibidos para los residuos de manosa de los ligandos ramificados (figura 12 y tabla 2).

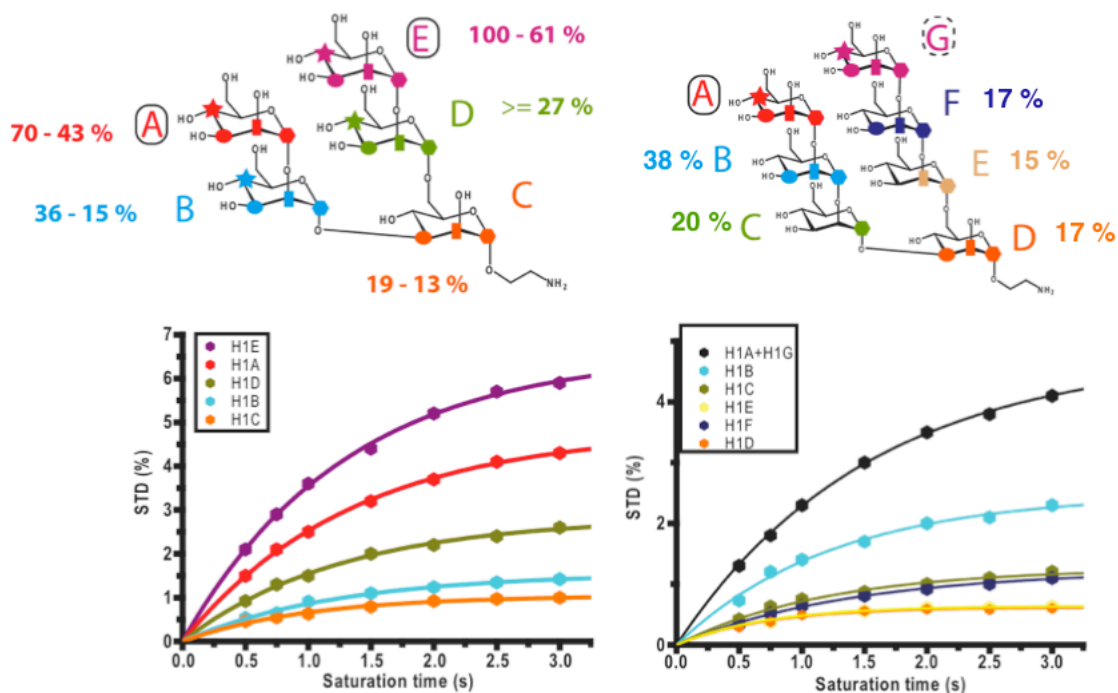


Fig. 12: Mapas de niveles (%) de intensidad de saturación transferida para cada residuo de manosa para el penta- (izqda.), y heptamanósido (dcha.). Para el heptamanósido sólo la intensidad de los H1 de los residuos B-F ha sido considerada (relacionadas con un 100 % de STD para los residuos terminales de manosa A y G), debido al solapamiento del resto de las señales. Se muestran las curvas de crecimiento de STD con el tiempo de saturación para los protones anoméricos (H1) de cada residuo de manosa. Los símbolos corresponden a los valores experimentales, mientras que las líneas muestran el ajuste matemático. Para el heptamanósido los símbolos negros representan el promedio experimental de STD para los residuos terminales de manosa A y G.

El análisis de los espectros de STD NMR para el pentamanósido reveló unos resultados muy interesantes (figuras 11a y 12 izqda.). En primer lugar, en la región espectral de CH de carbohidrato (3.5 – 4.1 ppm), la distribución de intensidades de las señales de STD mostraban algunas similitudes con los espectros de STD previamente analizados para los ligandos lineales (figuras 8 y 9). Por ejemplo, las señales de STD más intensas podían ser asignadas a protones específicos del azúcar, concretamente H4 (3.57 ppm), H3 (3.78 ppm), y H2 (4.0 ppm) de alguno de los residuos de manosa en ambos extremos (terminación “no-reductora”, figura 11a, símbolos rojo y verde). Sin embargo, no fue posible esclarecer si la transferencia de saturación ocurría en los protones de la manosa A ó E, o de ambos, debido a la degeneración de sus desplazamientos químicos. De hecho, la integración en la región anomérica (figura 11a, hexágonos rojo y verde, entre 4.7 y 5.3 ppm), confirmó que las intensidades de estas señales de STD provienen de contribuciones de ambos residuos de manosa terminales (A y E). Las señales de H1 de ambos residuos terminales mostraron las mayores intensidades entre los protones anoméricos. Además, también se evidenció una reducción de la saturación transferida en los restantes residuos a lo largo de cada ramificación de este ligando.

Es decir, ambas ramificaciones del pentamanósido, consideradas independientemente, presentaban un epítipo similar al de los ligandos lineales. Sin embargo, a pesar de que el anticuerpo cuenta con dos sitios de interacción, el pentamanósido no puede interactuar con ambos sitios al mismo tiempo ya que la distancia entre estos sitios de interacción ($\sim 35.5 \text{ \AA}$) es mucho mayor que la máxima distancia posible entre los residuos terminales de ambas ramificaciones ($\sim 14.7 \text{ \AA}$).

Por otro lado, en el complejo cristalográfico de un pentamanósido, similar al estudiado en este trabajo, y el 2G12¹² (PDB 1ZLU), se observó un único modo de asociación para este ligando ramificado. En esta estructura, sólo la ramificación Mana1,2Mana1,6 (equivalente al brazo D3 del glicano *high-mannose* natural) era reconocida por el anticuerpo en el sitio de reconocimiento. La otra ramificación, equivalente al brazo D2, estaba apuntando hacia fuera de la superficie de la proteína, por lo que en disolución estaría dirigida hacia el seno del disolvente, sin hacer contactos con la proteína. Sin embargo, el análisis de los espectros de STD NMR del pentamanósido en presencia del 2G12 (figura 11a) claramente reveló que esta no era la situación en disolución. En los espectros STD NMR, los protones H1 de ambos residuos de manosa no-reductores terminales del pentamanósido (A y E, figura 12 izqda.), recibían una cantidad significativa de saturación de la proteína, con un poco más de saturación en el caso de la manosa E. Este comportamiento se confirmó a todos los tiempos de saturación estudiados, como se muestra en las curvas de crecimiento de la saturación de la figura 12-izquierda. Asimismo, el protón H1A recibía más saturación que el H1D, indicando que el residuo de manosa A establece contactos más próximos en el sitio de reconocimiento del anticuerpo que el residuo de manosa D, lo que estaba en clara disconformidad con el modo de asociación indicado en la estructura de rayos X (compárense las figuras 12 izqda. y 13).

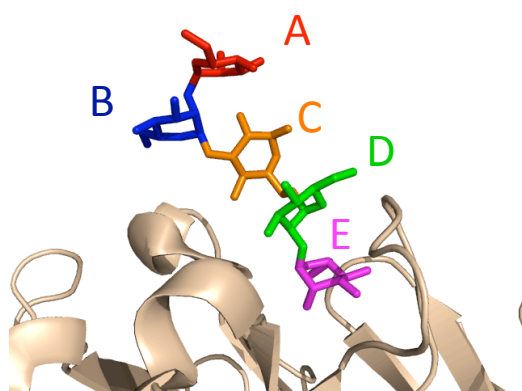


Fig. 13: Complejo cristalográfico 2G12/pentamanósido (PDB 1ZLU¹²). Para facilitar la comparación entre la estructura cristalográfica y los datos de RMN en disolución, el esquema de colores de los cinco residuos de manosa se ha mantenido como en la figura 11-izqda.

Las observaciones de RMN en disolución indicaban una situación diferente al único modo de asociación descrito en el complejo cristalográfico. Para realizar un análisis cuantitativo de los datos espectroscópicos, se utilizaron los cálculos de matriz de relajación e intercambio conformacional (CORCEMA-ST) para predecir los valores de STD del ligando a partir de la estructura cristalográfica, como ya se hizo en el caso de los complejos del anticuerpo 2G12 con los oligomanósidos lineales. En este caso, se tuvo que llevar a cabo una optimización geométrica previa (minimización energética mediante cálculos de mecánica molecular, indicados en la parte experimental del presente capítulo) de las conformaciones de algunos anillos de las manosas expuestas al disolvente (residuos equivalentes a las manosas A, B y C, figura 12-izqda.), ya que estaban distorsionados en la estructura cristalográfica. Así, a estos residuos se les asignó su conformación característica de silla 4C_1 .

Los resultados de CORCEMA-ST indicaron que la estructura en estado sólido no es capaz de explicar los datos de STD NMR en disolución (figura 14). Así, los cálculos teóricos predijeron que, a diferencia de los resultados experimentales, el protón H1 del residuo de manosa terminal A del pentamanósido debería recibir la menor cantidad de saturación entre los cinco protones anoméricos (figura 14, símbolos rojos).

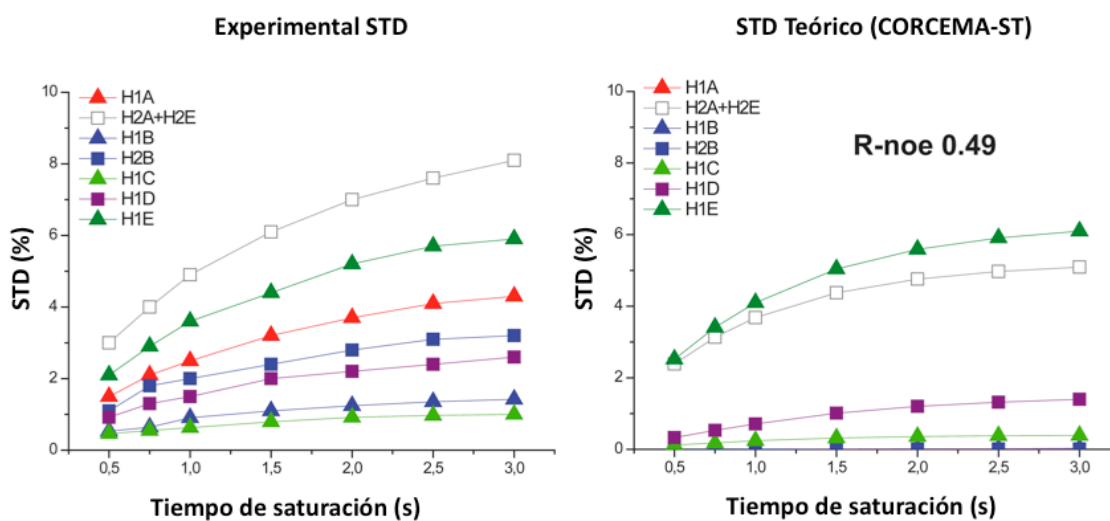


Fig. 14: Curvas de crecimiento de la saturación, experimentales (izquierda) y teóricas (derecha), del pentamanósido. Las intensidades teóricas de STD fueron calculadas usando el programa CORCEMA-ST, basándose en la estructura cristalográfica (1ZLU).

Además, la estructura cristalográfica presentaba factores térmicos (factores B) para los anillos del pentamanósido que iban aumentando a medida que éstos se alejaban del sitio de reconocimiento del anticuerpo (figura 15). Si bien esto parece lógico, ya que los residuos que estén embebidos en el sitio de reconocimiento de la proteína tendrán movimientos más restringidos, mientras que los residuos expuestos al disolvente tendrán más libertad conformacional, los elevados valores indicaban cualitativamente que solamente la unidad

disacáridica $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ directamente en contacto con la proteína estaba suficientemente bien resuelta.

Teniendo esto en cuenta, así como la similitud entre ambas ramificaciones del ligando, decidimos probar la posibilidad de que la técnica de rayos X no hubiese sido capaz de diferenciar otros posibles modos de asociación en los que el ligando interaccionase por la otra ramificación, ya que la densidad electrónica del ligando no debería ser muy diferente, y fundamentalmente igual en la región de máxima resolución (disacárido terminal).

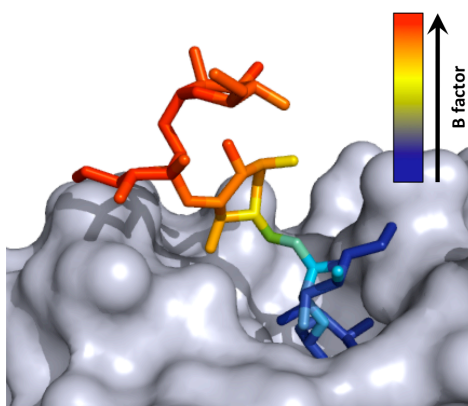


Fig. 15: Factores térmicos del pentamanósido en el complejo cristalográfico con el anticuerpo 2G12 (PDB 1ZLU). Como se observa, a medida que los residuos de manosa están más expuestos al disolvente, el valor del factor térmico aumenta, con lo que aumenta la indeterminación en la estructura de esa región del ligando.

Así, se decidió efectuar un cálculo de CORCEMA-ST con un complejo 2G12/pentamanósido en el cual solo cambiamos la orientación del pentamanósido de modo que la interacción con el sitio activo del anticuerpo se realizara a través de la ramificación tipo D2 (manosas A y B, figura 12 izqda). Este complejo se pudo obtener gracias a cálculos de Docking realizados con el programa AutoDock (versión 3.0). La conformación resultante, si bien era igual a la cristalográfica en la región del sitio de reconocimiento ($\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$), difería en los restantes residuos respecto de la estructura de rayos X, de ahí el interés en comprobar si sus intensidades STD teóricas podrían explicar mejor las observadas experimentalmente.

Sin embargo, en este nuevo cálculo tampoco se obtuvo un ajuste bueno con los datos experimentales. Al contrario que en el caso anterior, ahora era la manosa A la que recibía más saturación (indicativo de la interacción por la ramificación D2) mientras que la manosa E (extremo no-reductor de la ramificación tipo D3) no recibía, lo cual estaba en desacuerdo con los datos experimentales (figura 16).

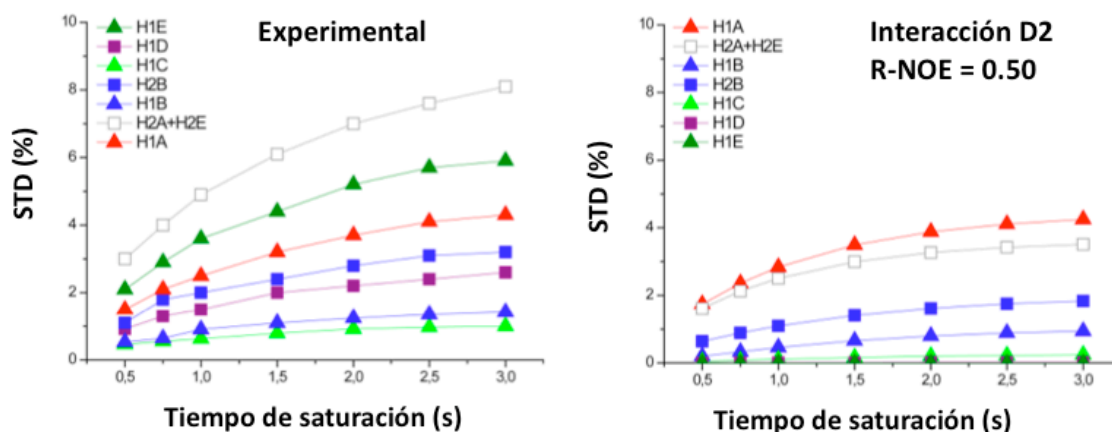


Fig. 16: Comparación de los valores de STD, experimentales (izquierda) y teóricos (derecha), obtenidos aplicando el programa CORCEMA-ST a un complejo 2G12/pentamannosido, en el que el ligando está interactuando por la ramificación tipo D2 (Man α 1,2Man α 1,3, fig. 12-izqda).

Como se ha mencionado anteriormente, la distribución relativa de intensidades STD dentro de cada rama seguía un patrón similar, y equivalente al obtenido en el caso de los ligandos lineales (interacción fundamentalmente con el anillo terminal no-reductor, y reducción de intensidades hacia el otro extremo). Cualitativamente, esto indicaba que ambas ramas podrían estar interactuando en el mismo sitio de reconocimiento, ocupándolo de forma alternada, es decir, de forma que el pentamannosido, formalmente, *pivotara* por la manosa central (manosa C, figura 12-izqda) para interactuar por cada una de las ramificaciones con el sitio activo del anticuerpo.

Por ello, se llevaron a cabo cálculos teóricos de STD en los que se considerase esta posibilidad. Partiendo de los valores de STD experimentales de cada manosa en los extremos terminales (A y E) se pudo estimar la fracción de ligando que estaba enlazado por cada una de las ramificaciones (60 y 40 % por rama D3 y D2, respectivamente). A partir de estos datos se pudieron calcular las contribuciones teóricas, con CORCEMA-ST, de cada modo de reconocimiento en las condiciones experimentales. Después, se hizo una suma aritmética de cada una de las contribuciones, obteniéndose una distribución de intensidades de STD teóricas, que representaban una situación de asociación bimodal del ligando en el mismo sitio de reconocimiento (figura 17).

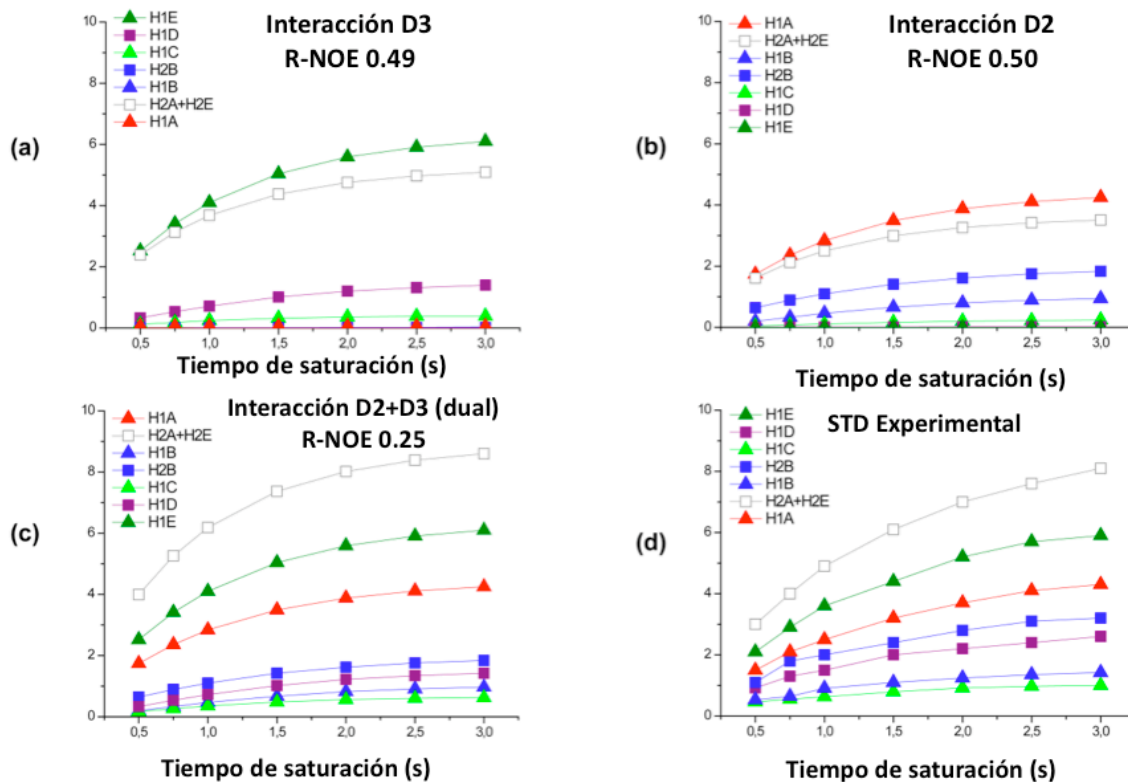


Fig. 17: Cálculos de CORCEMA-ST para diferentes modelos de interacción entre el pentamanósido y el anticuerpo 2G12. En todos los casos se han analizado los protones anoméricos de las cinco manosas que componen el ligando. (a) Cálculos para el complejo 2G12/pentamanósido (rama D3). (b) Cálculos para el complejo 2G12/pentamanósido (rama D2). (c) Cálculos para el complejo 2G12/pentamanósido considerando asociación bimodal (60 % D3, 40 % D2). (d) Distribución experimental de intensidades de STD.

La simple inspección de las curvas resultantes demuestra el acuerdo entre los datos de STD teóricos y los experimentales. Es decir, los datos experimentales de STD NMR del pentamanósido, confirmados por cálculos teóricos con CORCEMA-ST, sustentan con claridad que ambas ramificaciones, D2 y D3, son reconocidas por el anticuerpo 2G12 en disolución (figura 17). Este resultado corrobora, por un lado, la estructura cristalográfica del complejo, en la que el anticuerpo sólo reconoce la ramificación tipo D3 del pentamanósido, como uno sólo de los modos de asociación que contribuyen al complejo 2G12-pentamanósido, pero por otro lado indica que la imagen en estado sólido no es completa, según los datos en disolución. Una población muy significativa del ligando (40 %) se asocia al sitio de reconocimiento específico a través de la rama D2.

Según nuestros datos, esta sería la primera confirmación experimental del reconocimiento molecular de este brazo (D2) del glicano tipo *high-mannose*, que en la literatura había sido considerado como no participante en la interacción con el anticuerpo 2G12, basándose en datos de cristalografía y *glycoarrays*. En este novedoso reconocimiento bimodal del pentamanósido, el residuo de manosa C, en el extremo no-reductor del ligando, está siempre

expuesto al disolvente, y por lo tanto recibe la menor cantidad de saturación de entre todos los anillos de manosa que componen el ligando (figuras 11a y 12 izqda).

En lo que respecta al estudio de la interacción entre el anticuerpo y el heptamanósido **H** (figura 7), el análisis de los datos de RMN (figuras 11b y 12 dcha.) fue mucho más complicado que en el caso del pentamanósido, debido fundamentalmente al incremento en el solapamiento de señales. La región espectral mejor resuelta (protones anoméricos, figura 11b, 4.8 – 5.3 ppm) mostró que los protones H1A y H1G tenían el mismo desplazamiento químico, pero el resto de los protones anoméricos (H1B – H1F) pudieron ser independientemente integrados. Además, se confirmó que todas las señales de los residuos A y G estaban solapadas, por lo que no se pudieron analizar estos residuos independientemente.

Analizando el espectro en su totalidad, la mayor cantidad de saturación transferida ocurre en los protones de los residuos de manosa terminales del heptamanósido (figura 11b, símbolos rojo y verde). Sin embargo, a diferencia del pentamanósido, en este caso no es posible determinar cuál de los dos residuos de manosa terminales, A o G, hace los contactos más próximos con la proteína en el estado enlazado. No obstante, la integración individual de los valores de STD de los protones H1B – H1F, mostró que el protón H1B, localizado en la ramificación tipo D1, recibía significativamente más saturación que el protón H1F, localizado en la ramificación no-natural (figura 12 dcha). Asimismo, se observó un decaimiento en la intensidad de los valores de las señales de STD de los protones H1C y H1E (figura 12 dcha).

Estos resultados indican que el anticuerpo 2G12 reconoce preferentemente la ramificación natural tipo D1 ($\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3\text{Man}$) del ligando, de forma que es capaz de diferenciar entre ambas ramificaciones del heptamanósido en disolución. Este efecto es significativo dada la estructura química del ligando, ya que ambas ramificaciones del heptamanósido son muy similares ($\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$), diferenciándose solamente en el tipo de unión glicosídica al residuo de manosa terminal D ($\alpha 1,3$ ó $\alpha 1,6$, figura 12 dcha.), la cual está lejos del sitio de reconocimiento del anticuerpo, por lo que queda expuesto al disolvente, como lo indican los datos de STD NMR. Si bien harían falta más datos para confirmarlo experimentalmente, nuestra hipótesis de trabajo es que dicha selección de la ramificación D1 del ligando se debe al mayor coste entrópico que supondría la interacción con la otra rama. En ese hipotético modo de asociación, cualquier contacto adicional del ligando con la proteína alrededor del residuo D llevaría a una reducción de los grados de libertad conformacionales accesibles al enlace glicosídico $\alpha 1,6$, enlace característicamente flexible en el estado libre en disolución.

En el caso del complejo 2G12/heptamanósido, no había publicada ninguna estructura de rayos X, por lo que, para los cálculos de STD teóricos, se consideró que, como el anticuerpo 2G12 parecía reconocer preferentemente la ramificación tipo-D1, se podrían comparar los resultados

experimentales con los teóricos de CORCEMA-ST tomando como modelo molecular el correspondiente a la interacción 2G12/tetramanósido, pero incluyendo las condiciones experimentales correspondientes al heptamanósido. El buen ajuste entre los datos teóricos y los datos experimentales de STD corroboró la selectividad del anticuerpo 2G12 hacia la ramificación tipo-D1 del heptamanósido en disolución (figura 18).

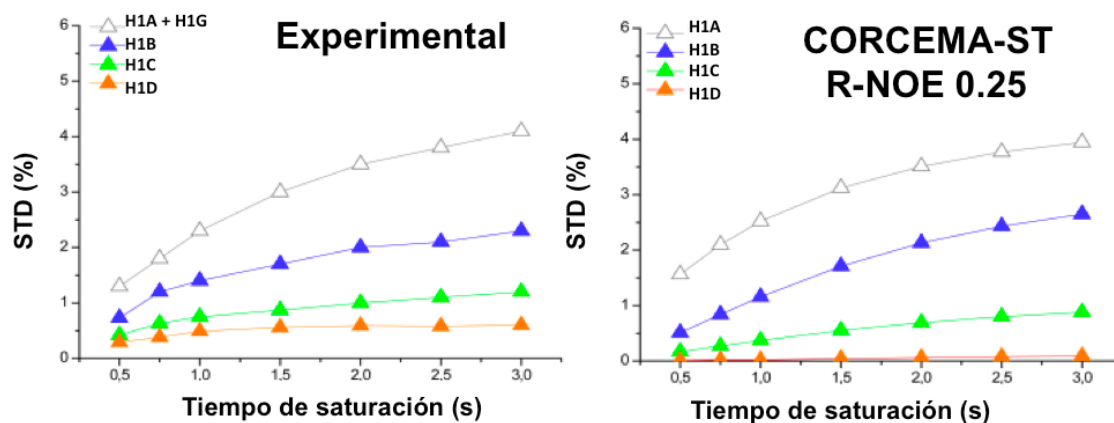


Fig. 18: Comparación entre los datos STD experimentales (izquierda) de la interacción 2G12/heptamanósido (sólo protones anoméricos de la rama D1) y los cálculos teóricos (derecha) por CORCEMA-ST tomando el complejo 2G12/tetramanósido como modelo molecular, que equivale a la interacción entre el anticuerpo 2G12 y la ramificación tipo-D1 del heptamanósido. Se indica el factor R-noe que compara los datos teóricos con los experimentales.

2.2. Conformaciones enlazadas de los ligandos: Experimentos de NOE transferido

a) Experimentos de NOE transferido de los ligandos lineales

Los experimentos de NOE transferido representan una buena aproximación para complementar los estudios de interacción por STD NMR.²⁵ Estos experimentos nos dan la conformación bioactiva de un ligando enlazado a un receptor, en aquellos casos en los que el intercambio entre los estados libre y enlazado sea rápido en la escala de tiempo de relajación de la RMN. Además, comparándolos con experimentos NOESY del ligando en ausencia del receptor, permiten la identificación de diferencias entre la conformación del ligando en el estado libre y enlazado al receptor.

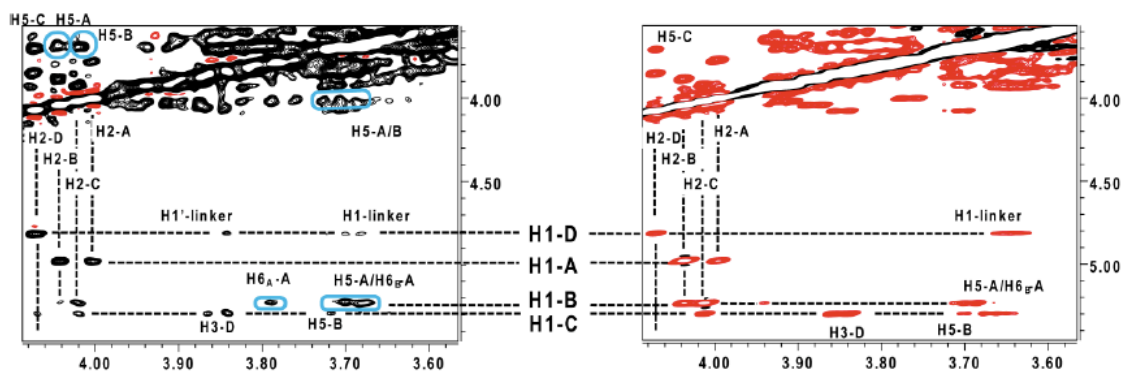


Fig. 19: Interacción del tetramanósido (T, figura 7) con el anticuerpo 2G12 monitorizada por experimentos de NOE transferido. La figura muestra secciones importantes de los experimentos bidimensional NOESY llevados a cabo en presencia (izquierda; 35 °C, 500 MHz, tiempo de mezcla 400 ms, 42 μ M de proteína, 12:1 ratio molar ligando-proteína) y en ausencia (derecha; 25 °C, 500 MHz, 400 ms de tiempo de saturación, 5 mM en tetramanósido) de 2G12. Nos centramos en los NOEs inter-residuales que involucran los protones anoméricos (H1), los cuales determinan la conformación del tetramanósido tanto en el estado libre como enlazado. En los experimentos de NOE transferido, los picos de cruce muestran el mismo signo que la diagonal, indicando la interacción en disolución. Los NOEs transferidos claves que crecen en el estado enlazado (H6_AA-H1B, H5A-H1B, H5A-H2B, y H5B-H2C) están resaltados por círculos celestes.

Se hicieron experimentos bidimensionales de NOE transferido (NOESY) a los ligandos lineales (D, Tri y T, figura 7) en presencia del anticuerpo 2G12. Los espectros mostraron picos de cruce NOE negativos e intensos, del mismo signo que los picos de la diagonal, para todos los ligandos, en una relación molar superior a 10:1 ligando-proteína. Esto contrastaba con la observación de picos de cruce NOE débilmente positivos, opuestos al signo de la diagonal, para los ligandos en ausencia de la proteína (figura 19). El cambio en los signos de los picos de cruce, tras la adición de proteína, es una observación fundamental que indica que el experimento está dando información de NOE (distancias interatómicas) de la conformación del ligando en el estado enlazado.

Para la discusión de los resultados de NOE transferido en la presente tesis doctoral, nos centraremos en el análisis del tetramanósido, ya que los resultados para los restantes ligandos lineales (di- y trimanósido) fueron equivalentes para las uniones Man α 1,2Man. Podemos destacar que, en el estado enlazado, se observan de forma intensa los picos de cruce NOE interresiduales H5A – H2B y H5B – H2C, a lo largo de las uniones glicosídicas A – B y B – C del tetramanósido (figura 19, izquierda; la nomenclatura de las manosas es la misma que en la figura 9). Los mismos picos eran extremadamente débiles (cerca del límite de detección) en los espectros NOESY del tetramanósido libre (figura 19, derecha). También, se pudo observar un incremento moderado de las intensidades los NOEs interglicosídicos H5A – H1B y H5B – H1C en los experimentos de NOE transferido. En el caso particular del enlace A – B, los picos NOE entre los protones H1B y H6A (pro-R y pro-S) se observaron claramente, los cuales no se

detectaron en el estado libre (figura 19). Por otro lado, no se detectaron los contactos entre H1A – H1B y H1B – H1C.

Todos los datos indican, pues, que el anticuerpo 2G12 induce un ligero cambio en el equilibrio conformacional en las dos uniones glicosídicas Man α 1,2Man del tetramanósido enlazado. En el estado libre, los datos de NOE indican que los ángulos interglicosídicos Ψ (C1'-O1'-C2-H2) están en equilibrio entre valores positivos y negativos, como estaba descrito previamente.^{21a} Sin embargo, los picos NOE observados en el estado enlazado muestran que el anticuerpo selecciona los confórmeros con valores de Ψ negativos, con una fuerte influencia en el extremo terminal no-reductor (enlace glicosídico A – B). Para los ligandos lineales de menor tamaño (di- y trimanósido), se obtuvieron resultados similares.

La unión Man α 1,3Man (C – D) del tetramanósido, no mostró ningún signo de cambio conformacional en presencia del anticuerpo. Los contactos característicos de NOE indicaron la prevalencia de conformaciones con valores Ψ negativos en ambos estados, libre y enlazado, del ligando. En ambas situaciones, la intensidad del pico NOE interglicosídico H5C – H2D es mayor que la del H1C – H2D. Esta observación está en un magnífico acuerdo con el estudio realizado por STD NMR, corroborando que el residuo de manosa D del tetramanósido está expuesto al disolvente en el estado enlazado y hace muy pocos contactos con la superficie de la proteína.

b) Experimentos de NOE transferido de los ligandos ramificados

También se realizaron experimentos de NOE transferido de los ligandos ramificados en presencia del anticuerpo 2G12. A 30 °C se obtuvieron picos de cruce NOE muy débiles para ambos oligosacáridos ramificados en el estado libre. Esta situación es la deseada para llevar a cabo experimentos de NOE transferido, ya que los experimentos en presencia del receptor estarán exentos de señales del ligando en el estado libre, y contendrán puramente información sobre el estado enlazado.

Después de añadir el anticuerpo, se observaron picos de cruce de NOE transferido. Sin embargo, no se pudo llevar a cabo una caracterización estructural completa de los ligandos debido, principalmente, a las bajas relaciones señal-ruido que originaron estos experimentos, y al solapamiento entre señales. No obstante, se pudo obtener información estructural fundamental del NOE para ambos ligandos que resultó de relevancia cuando se correlacionó con la obtenida a partir de los experimentos de STD NMR. Para el pentamanósido, la asociación con el anticuerpo 2G12 se caracterizó por un aumento significativo en las intensidades de los picos de cruce NOE fundamentales a lo largo de los enlaces glicosídicos en los dos motivos disacáridos terminales de ambas ramificaciones, A – B y E – D (ver figura 12 izqda. para la nomenclatura de las manosas). Los picos de cruce NOE H5A(E) – H1B(D) y H6A(E) – H1B(D) crecieron significativamente en el estado enlazado (figura 20), mientras que

los picos de cruce NOE de H1A(E) – H1B(D) fueron muy débiles o nulos. Como en el caso de los ligandos lineales, los NOEs observados en el estado enlazado mostraron que el anticuerpo selecciona conforméromos con valores de Ψ negativos (conformación extendida) para los enlaces interglucosídicos α 1,2, afectando la conformación de los motivos terminales Man α 1,2Man en ambas ramificaciones del pentamanósido (uniones A – B y E – D). Los datos de NOE transferido del pentamanósido apoyan, en concordancia con los datos de STD NMR, que ambos residuos terminales de las ramificaciones tipo D2 y D3 (figura 7) son reconocidos específicamente en disolución por el anticuerpo 2G12 en el sitio de reconocimiento primario.

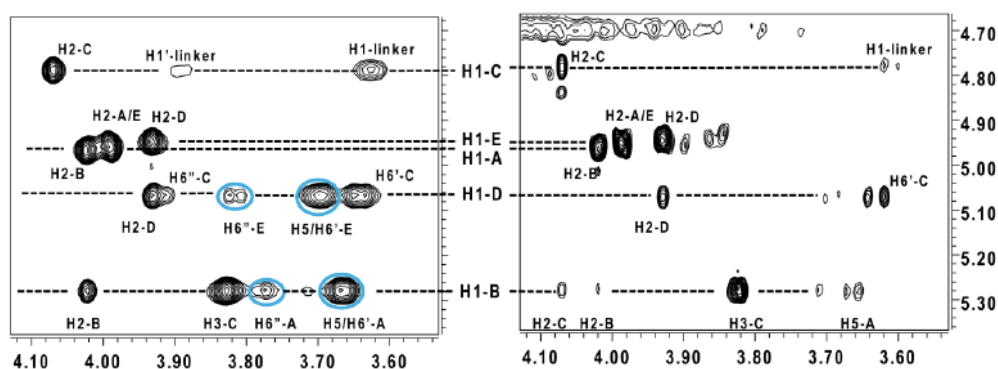


Fig. 20: Interacción del pentamanósido con el anticuerpo 2G12 estudiado por NOE transferido. Izquierda: espectro NOESY del pentamanósido en presencia del anticuerpo (30 °C, tiempo de mezcla 150 ms, 50 μ M en 2G12 y una relación molar 12:1 ligando-proteína). Derecha: espectro ROESY del pentamanósido en el estado libre (30 °C, 300 ms de tiempo de mezcla, 0.5 mM). Los NOEs claves que crecieron en el estado enlazado (H6(A/E)-H1(B/D), H5(A/E)-H1(B/D)) están resaltados con un círculo celeste. La interacción del pentamanósido con el anticuerpo 2G12 afecta a las conformaciones glucosídicas del motivo terminal Man α 1,2Man de ambas ramificaciones del ligando (enlaces A-B y E-D).

En el caso del heptamanósido (figura 21), un incremento significativo en las intensidades de los picos de cruce de NOE caracterizaba los conforméromos con valores de Ψ negativos para las uniones glucosídicas α 1,2 en la unión glucosídica terminal A – B, en la ramificación tipo D1. Un efecto mucho menor se observa en el caso de la otra unión final G – F. Por lo tanto, los datos de NOE transferido del heptamanósido concuerdan con el reconocimiento preferencial de la ramificación del ligando tipo D1 del anticuerpo, propuesta a partir de los resultados previos de STD NMR.

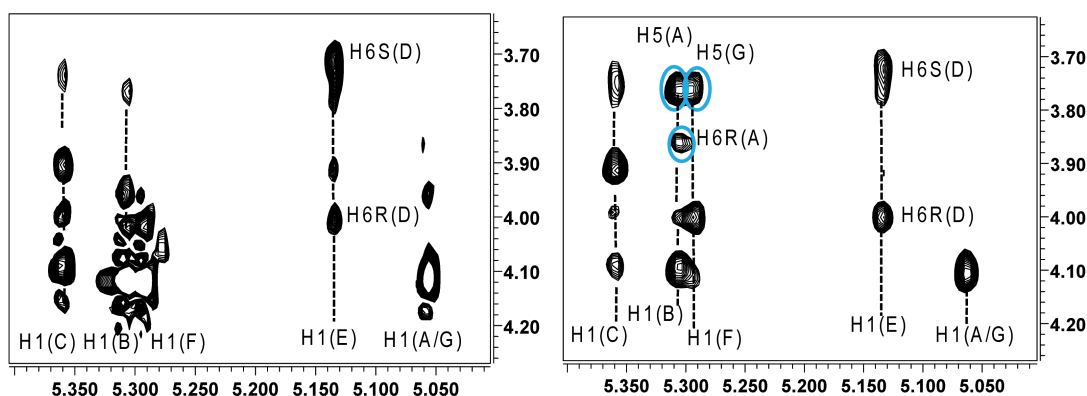


Fig. 21: Interacción del heptamanósido con el anticuerpo 2G12 estudiado por NOE transferido. Izquierda: espectro ROESY del heptamanósido en el estado libre (33 °C, 400 ms de tiempo de mezcla, 0.5 mM). Derecha: espectro NOESY del heptamanósido en presencia del anticuerpo (33 °C, tiempo de mezcla 150 ms, 50 μ M en 2G12 y una relación molar 12:1 ligando-proteína. Los NOEs claves que crecieron en el estado enlazado están resaltados con un círculo celeste, incluyendo el dimanósido terminal Man(A)-Man(B) del brazo tipo D1, así como el otro dimanósido terminal Man(G)-Man(F), pero con mucho mayor efecto en el disacárido A-B, sugiriendo un reconocimiento preferencial de la ramificación tipo D1, lo que está de acuerdo con los datos de STD NMR.

c) Orientación de las ramificaciones del pentamanósido en el estado enlazado: NOEs Intermoleculares

Todos los datos de RMN (STD NMR y trNOE) sugerían un modo de reconocimiento bimodal del pentamanósido por parte del anticuerpo 2G12 en disolución, donde cada uno de los modos de reconocimiento implica una ramificación del ligando, de forma alternada. Por el contrario, para el heptamanósido el reconocimiento era fundamentalmente monomodal, con reconocimiento preferencial del brazo “natural”. Estos resultados nos impulsaron a emprender más estudios de NOE sobre el sistema 2G12-pentamanósido. Como la cantidad de información accesible a partir de los experimentos de NOE transferido en un espectrómetro de 500 MHz estaba limitada por la baja relación señal-ruido accesible, se llevaron a cabo experimentos de RMN con un campo magnético más intenso (espectrómetro de 800 MHz equipado con criosonda). Se realizaron una serie de experimentos de NOE transferido a diferentes tiempos de mezcla (50, 75, 150, 250, 400, 600, 1000, y 1500 ms) con una baja relación ligando-proteína (5:1). Desafortunadamente, en estas condiciones resulta inevitable la contribución de los NOEs del ligando en el estado libre, ya que a dicho campo magnético intenso los propios picos de cruce de NOE del ligando son de signo negativo (mismo signo que la diagonal). Por otra parte, los espectros mostraron NOEs intraligando mediados por los protones de la proteína, debidos al fenómeno conocido como difusión de espín, desaconsejando un análisis cuantitativo directo de las intensidades observadas. No obstante, el aumento de sensibilidad y la difusión de espín en este campo magnético tan intenso, y la baja relación ligando-proteína empleada, hizo posible la observación de NOEs intermoleculares entre el 2G12 y el pentamanósido en los experimentos NOESY (figura 22).

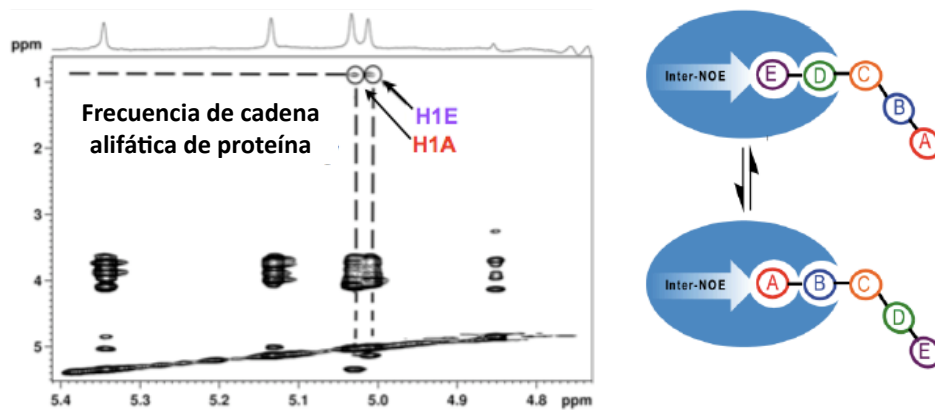


Fig. 22: Izquierda: Experimento NOESY del pentamanósido en presencia del anticuerpo 2G12 (ratio ligando-proteína 5:1, 800 MHz, 25 °C, tiempo de mezcla 150 ms). Los NOEs intermoleculares ligando-proteína indican contactos entre cadenas laterales alifáticas de aminoácidos del 2G12 y ambos protones anoméricos (H1) de los residuos terminales de manosa A y E (resaltados con círculos). Derecha: Ilustración de la interacción bimodal en el reconocimiento del pentamanósido por parte del anticuerpo 2G12, deducido de los estudios de RMN (STD y trNOE).

Asimismo, se realizaron experimentos NOESY, en las mismas condiciones experimentales, a muestras que contenían bien el anticuerpo solo, o bien el pentamanósido solo. En éstos no se observaron los picos de cruce referidos anteriormente, lo que nos permitió verificar que los picos correspondían a NOEs intermoleculares proteína-ligando. Estos picos de cruce, normalmente difíciles de observar en complejos ligando-proteína débiles, sólo aparecen para aquellas distancias intermoleculares más cortas en el complejo (estado enlazado). Los picos de cruce NOE proteína-ligando más intensos indicaban la existencia de distancias cortas entre algunos protones alifáticos de la proteína (no asignados) y los protones H2A(E), H3A(E), y H4B(D) del ligando pentasacárido. La asignación espectral de RMN de los protones de una proteína como el anticuerpo 2G12, de unos 145 kDa, es una tarea a día de hoy inabordable, por lo que no se pudo especificar a qué cadena lateral correspondían los protones alifáticos. Sin embargo, incluso en ausencia de asignación específica, estos NOEs explicaban la gran cantidad de saturación transferida, observada en los experimentos de STD NMR, a dichos protones de los residuos terminales de las manosas A y E (figura 12 izqda). Al igual que ocurrió en los experimentos STD NMR, debido a la degeneración de los desplazamientos químicos de las señales de RMN del pentamanósido, no fue posible determinar la contribución individual de cada residuo terminal de manosa (A y E) a estos NOEs intermoleculares.

En estos experimentos NOESY, a partir de tiempos de mezclas superiores a 150 ms, se detectaban dos picos de cruce de NOEs proteína-ligando intermoleculares bien aislados en la región espectral de los protones anoméricos del ligando (figura 22). Estos NOEs resultaron claves para poder determinar la orientación de ambas ramificaciones del pentamanósido en el sitio de reconocimiento del 2G12. Los picos de cruce indicaban que una cadena lateral alifática de un aminoácido de la proteína (0.9 ppm) estaba en contacto espacial próximo

simultáneamente tanto con el protón anomérico H1 del residuo de manosa A, como con el protón H1 del residuo de manosa E. Al igual que en el caso de los experimentos STD NMR, en este caso el NOE de la manosa E estaba de acuerdo con la asociación simple descrita en la estructura cristalográfica, mientras que el NOE de la manosa A involucraba protones bastante lejanos en dicha estructura, ya que la manosa A estaba expuesta al disolvente, lejos de la superficie proteica. La detección de estos contactos espaciales de la proteína con los residuos de manosa A y E corroboran experimentalmente la asociación bimodal propuesta para el pentamanósido en el sitio de reconocimiento del 2G12.

La combinación de espectros STD NMR y datos de experimentos NOE transferido, han permitido identificar que ambas ramificaciones del pentamanósido (tipo D2 y tipo D3, figura 7) son específicamente reconocidas por el mismo sitio de reconocimiento del anticuerpo en dos modos alternados de asociación. El modo de reconocimiento molecular del pentamanósido por el anticuerpo 2G12 está esquemáticamente representado en el lado derecho de la figura 22. El complejo cristalográfico existente obtenido a partir de los datos de rayos X solamente aportó una de estas dos conformaciones en el estado enlazado, aquella en la que la ramificación tipo brazo D3 estaba interaccionando con el anticuerpo. La espectroscopía de RMN nos ha permitido caracterizar un nuevo modo de asociación del pentamanósido con el anticuerpo 2G12 en disolución, en el que la ramificación tipo brazo D2 del ligando esta interaccionando con el anticuerpo, mientras que la ramificación tipo brazo D3 está expuesta al disolvente.

2.3. Estudio de los fragmentos de los ligandos ramificados

El estudio de los ligandos ramificados (penta- y heptamanósido) y su comparación con los lineales, aportó información clave y complementaria a otras técnicas estructurales sobre cómo interacciona el anticuerpo 2G12 con las ramificaciones del glicano *high-mannnose* presente en la cubierta del virus del SIDA. Esta información resulta de especial relevancia en el contexto de un futuro desarrollo de agentes antigénicos para neutralizar el VIH.

Como se ha visto, el papel de cada ramificación de este tipo de ligandos en la interacción con el anticuerpo es diferente. Con estos antecedentes, parecía especialmente interesante estudiar por separado cada una de las estructuras químicas que formalmente constituyen estas ramificaciones. De esta forma, se podrían obtener datos particulares que permitieran concluir acerca del efecto de cada rama a nivel individual, así como determinar posibles diferencias estructurales o energéticas (afinidades) entre las ramas individuales y los oligosacáridos ramificados originales.

En primer lugar se estudiaron las ramificaciones derivadas del pentamanósido: la ramificación tipo brazo D3 (Man α 1,2Man α 1,6Man1 α); la ramificación tipo brazo D2

(Man α 1,2Man α 1,3Man1 α); y el trisacárido central o *core* interno del pentamanósido (Man α 1,3[Man α 1,6]Man, *core-penta*) (figura 23).

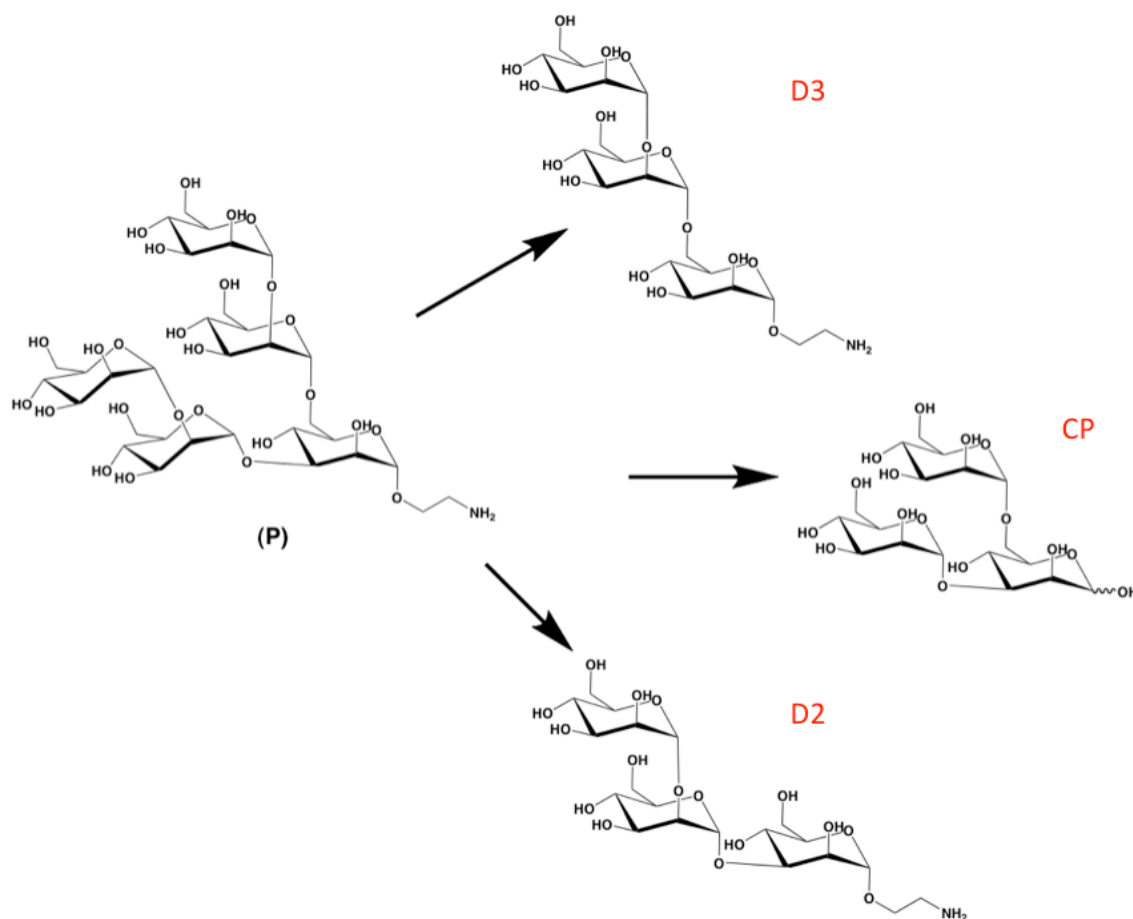


Fig. 23: Esquema de los ligandos que mimetizan las ramificaciones del pentamanósido. P es el pentamanósido; D3 es el trimanósido de la ramificación tipo-D3 (Man α 1,2Man α 1,6Man α OR); CP es el *core* del pentamanósido (*core-penta*, Man α 1,3[Man α 1,6]Man α); D2 es el trimanósido de la ramificación tipo-D2 (Man α 1,2Man α 1,3Man α OR). (OR = O(CH₂)₂NH₃).

El trisacárido *core-penta*, al contrario que los otros dos ligandos, no fue sintetizado en nuestro laboratorio, sino que se adquirió directamente de una casa comercial,²⁶ por lo que no presenta espaciador alifático unido al carbono anomérico en el residuo reductor de manosa, lo que hace que en disolución estén presentes los dos anómeros posibles, α y β , intercambiándose mediante un equilibrio de mutarrotación. No obstante, como se vio en los estudios por RMN de los ligandos anteriores, el espaciador no interacciona con el anticuerpo, lo que hace que todos los ligandos considerados sean adecuados para aportar información estructural acerca del sistema estudiado.

Para las ramificaciones del pentamanósido, se siguió el mismo protocolo que en el caso del oligomanósido ramificado original. En la figura 24 se muestran los experimentos STD de las

interacciones de los oligomanósidos, que mimetizan las ramificaciones del pentamanósido **P**, con el anticuerpo 2G12. Se realizaron curvas de crecimiento de STD (figura 25) aumentando el tiempo de saturación desde 0.5 hasta 3 s y en las mismas relaciones ligando-proteína que en el caso del pentamanósido, obteniéndose los valores de las pendientes iniciales de las curvas (STD_0) a partir de las cuales se construyeron los epítomos (figura 25).

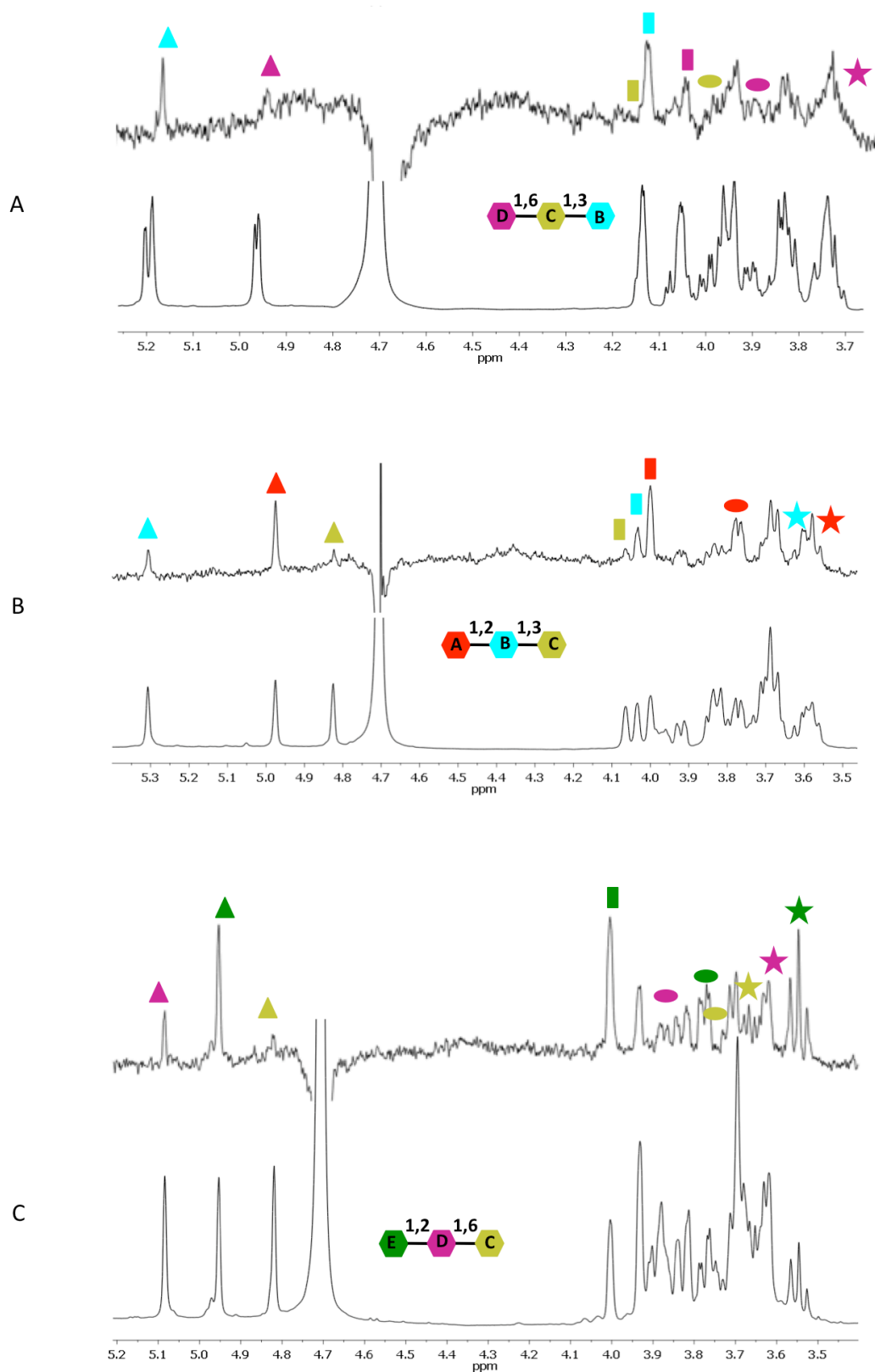


Fig. 24: Interacción de los ligandos ramificaciones del pentamanósido (A) $\text{Man}\alpha_{1,3}[\text{Man}\alpha_{1,6}]\text{Man}$, (B) $\text{Man}\alpha_{1,2}\text{Man}\alpha_{1,3}\text{Man}1\alpha\text{OR}$, y (C) $\text{Man}\alpha_{1,2}\text{Man}\alpha_{1,6}\text{Man}1\alpha\text{OR}$ ($\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{NH}_3$) con el anticuerpo 2G12 en disolución, detectada por STD NMR. Para cada ligando el espectro inferior muestra el espectro de saturación de ^1H de referencia, mientras que el superior es el correspondiente ^1H STD NMR (tiempo de saturación 0.5 s frecuencia *on-resonance* 0.86 ppm, *off-resonance* 40 ppm). Los colores de los símbolos (H1 triángulo, H2 rectángulo, H3 elipse, H4 estrella) distinguen los diferentes residuos de manosa (dibujo esquemático insertado).

En todos los casos los epítomos se conservaron a lo largo de todos los tiempos de saturación, lo que excluyó posibles problemas de interpretación de los datos de STD NMR por diferencias en las relajaciones de los protones del ligando (figura 25).

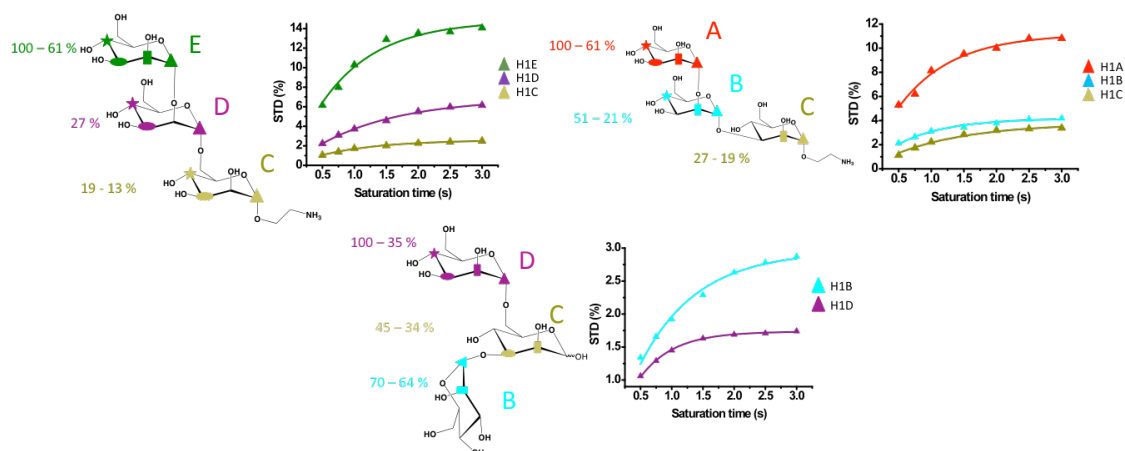


Fig. 25: Epítomos de los ligandos miméticos de las ramas del pentamanósido P. (Sup. izqda.) Mimético de la ramificación tipo-D3, (inferior) *core-penta* y (sup. dcha.) trisacárido mimético de la ramificación tipo-D2. Se muestran las curvas de crecimiento de STD con el tiempo de saturación para los protones anoméricos (H1) de cada residuo de manosa (triángulos). Los símbolos corresponden con los valores experimentales, mientras que las líneas muestran el ajuste matemático. En el caso del *core-penta* no se pudo obtener un único valor para el H1 de la manosa central C ya que había mutarrotación.

Los epítomos determinados experimentalmente estaban en muy buen acuerdo con los experimentos realizados con el pentamanósido, confirmando que cada una de las ramificaciones (D2 y D3) son reconocidas por el anticuerpo 2G12 a través del motivo Man α 1,2Man de la zona no reductora del ligando (figura 25). Asimismo, se confirmó con estos epítomos, que ambas ramificaciones deberían interactuar a través del mismo modo de asociación y por el mismo sitio de reconocimiento del anticuerpo, ya que la distribución de saturación a lo largo de los epítomos era muy similar. Lo cual quiere decir, por otro lado, que la unión glicosídica (α 1,3 ó α 1,6 en estos casos) con el residuo reductor no influye de manera decisiva en la interacción de cada ramificación con el anticuerpo.

En el caso del trisacárido *core-penta*, los espectros de RMN presentaron un gran solapamiento de señales (figura 24 a), lo que impidió obtener un epítopo fidedigno. No obstante, del análisis de los espectros STD NMR pudimos concluir que este interactúa con el anticuerpo 2G12, principalmente, por el residuo de manosa que presenta un enlace α 1,3 al terminal reductor (figura 24, comparar intensidades de los símbolos celestes y morados). Este dato no queda fielmente representado en la figura 25, ya que el protón H4B no pudo ser correctamente integrado, mientras que el protón H4D, que sí lo fue, presentó los valores más altos de STD, de ahí que esta manosa (D) presente los mayores valores de STD (en tanto por cien). En cambio

si comparamos los valores de los H2 (B y D) podemos ver cómo la manosa B recibe más saturación que la manosa D (figura 24).

Asimismo, llevamos a cabo el estudio de las interacciones de las ramificaciones del heptamanósido no natural con el anticuerpo 2G12. En este caso concreto, una de sus ramificaciones ya había sido estudiada, ya que el tetramanósido lineal (T, figura 7) se corresponde con la ramificación del heptamanósido tipo brazo D1, siendo la ramificación que más contactos hace con el anticuerpo como se ha visto tanto por cristalografía de rayos X como por STD NMR en disolución. No obstante, nos pareció interesante estudiar la otra ramificación (Man α 1,2Man α 1,2Man α 1,2Man α 1,6), que llamamos no natural por no estar presente en la estructura del glicano *high-mannose* natural (comparar figura 7 y 26), ya que, a pesar de contener en su estructura la del trimanósido lineal (al igual que la ramificación tipo brazo D1), esta ramificación era débilmente reconocida por el anticuerpo 2G12. En el contexto de desarrollo de posibles agentes antigénicos, la repetición de motivos de reconocimiento (por ejemplo, trimanósidos Man α 1,2Man α 1,2Man) en estructuras químicas multivalentes es una solución con gran potencial para incrementar las afinidades de las interacciones por efecto clúster, por lo que nos pareció interesante elucidar el reconocimiento molecular de la rama no natural en el heptamanósido, a fin de racionalizar la selectividad observada en el reconocimiento del ligando ramificado por el anticuerpo.

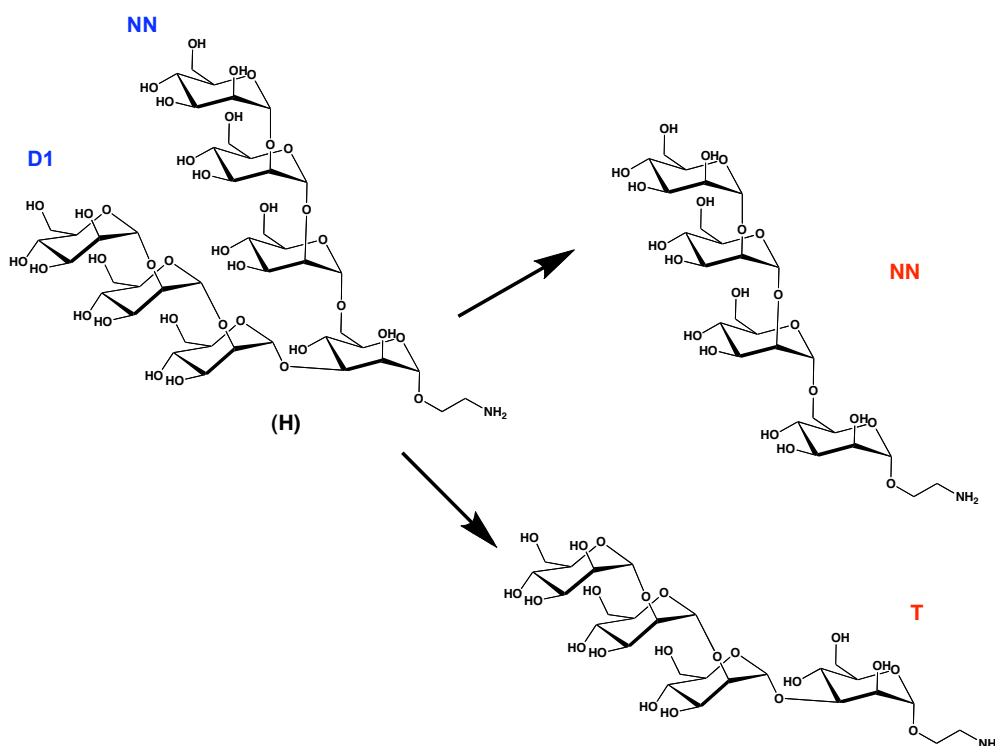


Fig. 26: Esquema de los ligandos procedentes de las ramificaciones del heptamanósido. (H) es el heptamanósido; NN es el tetramanósido correspondiente a la ramificación no-natural, ya que no está presente en el *high-mannose* natural (Man α 1,2Man α 1,2Man α 1,6ManO(CH₂)₂NH₂; T es el tetramanósido de la ramificación tipo-D1, y que ya ha sido estudiado en este mismo trabajo como ligando lineal (figura 7).

Se llevaron a cabo idénticos experimentos (figura 27) a los realizados con los ligandos anteriores, es decir, curvas de crecimiento de STD NMR variando el tiempo de saturación desde 0,5 hasta 3 segundos con las mismas relaciones ligando-proteína.

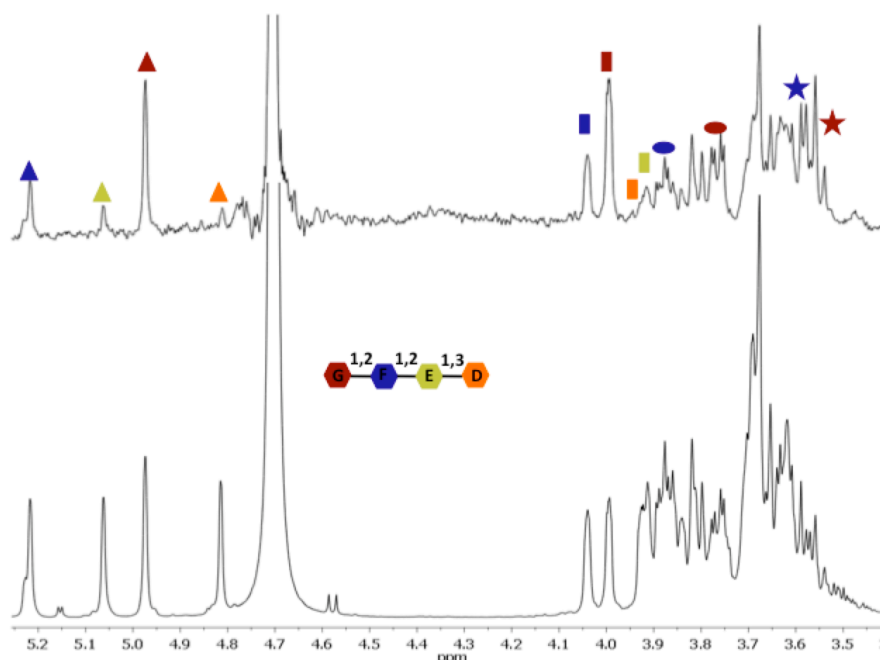


Fig. 27: Interacción del ligando ramificación no-natural del heptamanósido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,6\text{Man}\alpha 1\alpha\text{OR}$ ($\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{NH}_3$) con el anticuerpo 2G12 en disolución detectada por STD NMR. El espectro inferior muestra el espectro de ^1H de referencia, mientras que el superior es el correspondiente ^1H STD NMR (tiempo de saturación 0.5 s frecuencia *on-resonance* 0.86 ppm, *off-resonance* 40 ppm). Los colores de los símbolos (H1 triángulo, H2 rectángulo, H3 elipse, H4 estrella) distinguen los diferentes residuos de manosa (dibujo esquemático insertado).

Con esto se obtuvo un epítipo del ligando, que se mantuvo a lo largo de las curvas (figura 28).

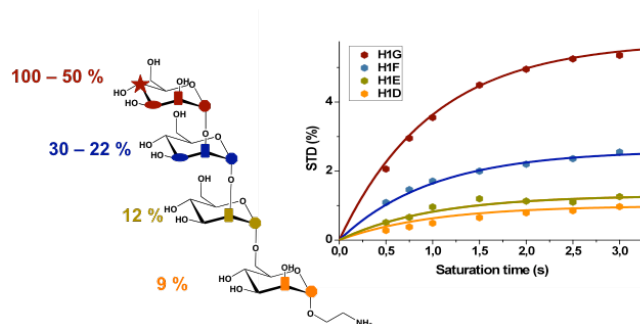


Fig. 28: Epítipo del tetramanósido no-natural, procedente del heptamanósido H. Se muestran las curvas de crecimiento de STD con el tiempo de saturación para los protones anoméricos (H1) de cada residuo de manosa. Los símbolos corresponden con los valores experimentales, mientras que las líneas muestran el ajuste matemático.

El oligomanósido **NN** es reconocido por el anticuerpo a través del dimanósido ($\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$) del extremo no reductor del oligomanósido (figura 28), de manera similar a los ligandos lineales

estudiados anteriormente, lo que indica que este tetramanósido interacciona en el sitio de reconocimiento primario del anticuerpo. Este resultado confirmó que en el caso de la interacción entre el heptamanósido **H** y el anticuerpo 2G12, éste es capaz de seleccionar una de las dos ramificaciones, la ramificación tipo brazo D1 del glicano *high-mannose*, ya que cuando las estructuras químicas que formalmente constituyen el heptamanósido se estudian por separado, ambas son capaces de interaccionar con el anticuerpo. Este resultado, bastante sorprendente, ya que las dos ramificaciones del anticuerpo se diferencian en el enlace que une la manosa del extremo reductor al trimanósido lineal (comparar tetramanósidos en la figura 26), supone un fuerte apoyo experimental a la hipótesis de la penalización entrópica para la selección de la rama más flexible del heptamanósido **H** por parte del anticuerpo 2G12 (la rama no natural Man α 1,2Man α 1,2Man α 1,2Man α 1,6). Si se comparan los epítomos de ambos tetramanósidos (comparar figura 28 y figura 9, inferior) se puede observar como en el caso del tetramanósido natural (figura 9) la distribución de saturación interna es más “homogénea”, ya que los azúcares próximos al extremo reductor reciben más saturación del anticuerpo en comparación con el caso del tetramanósido no-natural (figura 28). Esto, con toda probabilidad, está relacionado con las diferentes afinidades de cada ligando y lo estudiaremos a fondo en el capítulo posterior donde se determinarán las afinidades proteína-ligando por un nuevo método basado en la espectroscopía STD NMR desarrollado en el contexto de la presente tesis doctoral.

3. Materiales y Métodos

3.1. Compuestos

La síntesis de los oligomanósidos fue realizada como se ha descrito previamente,²⁷ siguiendo el protocolo descrito por Wong *et al.*²⁸ El anticuerpo 2G12 fue donado por Polymun Scientific (Viena, Austria). Los osmolitos presentes en el stock del anticuerpo (maltosa) fueron eliminados y la muestra fue intercambiada en buffer, simultáneamente, a través de un proceso de diálisis utilizando una membrana de 20 kDa de tamaño de poro (Sprectra/Por®, Medicell International Ltd.). Todos los ligandos fueron liofilizados e intercambiados con D₂O al 99.9 % de pureza en deuterio, en dos ocasiones, más una última vez con D₂O 99.99% de pureza (Sigma-Aldrich). Todas las muestras fueron preparadas en una solución buffer 10 mM fosfato en agua deuterada a pH 6.7.

3.2. Espectroscopía de RMN

Las señales de ¹H NMR de cada ligando fueron asignadas utilizando una combinación de experimentos COSY,¹⁷ TOCSY,¹⁸ NOESY,¹⁹ y HSQC²⁰, realizados en un espectrómetro Bruker DRX 500 MHz. Las asignaciones estuvieron en perfecto acuerdo con los datos previamente publicados.^{21a} Para los experimentos STD NMR la temperatura fue optimizada para obtener la

mejor relación señal-ruido; para todos ellos esta temperatura fue de 298 K, excepto para el heptamanósido **H** que fue de 306 K. Los experimentos fueron realizados sin supresión de la señal residual de HDO. Las señales anchas del anticuerpo fueron eliminadas añadiendo a la secuencia de pulsos un filtro $T_{1\rho}$. Todos los experimentos STD NMR se realizaron con 1 K *scans*. Las curvas de crecimiento STD NMR fueron obtenidas usando siete tiempos de saturación (0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 s) variando el *delay* de relajación (d_1) inversamente al tiempo de saturación en cada experimento (con un mínimo de 0.1 s), manteniendo constante el tiempo total del experimento. Cada tiempo de saturación estuvo compuesto por un tren de pulsos Gaussianos de 50 ms cada uno. Se aplicó una frecuencia *off-resonance* de $\delta = 40$ ppm mientras que la *on-resonance* fue de $\delta = 0.86$ ppm (para la zona alifática de la proteína) y $\delta = 6.82$ ó 7.2 ppm (para la zona aromática de la proteína).

Para los experimentos de saturación, las relaciones proteína-ligando utilizadas fueron desde 1:10 hasta 1:200 añadiendo diferentes alícuotas de ligando a la muestra de RMN, a partir de una muestra muy concentrada de cada ligando, para evitar efectos de dilución. Para cada relación se calculó una curva de crecimiento de STD, para así obtener las pendientes iniciales (STD_0) por el ajuste matemático a una ecuación monoexponencial de crecimiento asintótico:

$$STD(t_{sat}) = STD_{max} \cdot (1 - e^{(k_{sat} \cdot t_{sat})})$$

Los epítomos de los ligandos fueron obtenidos a la mayor relación proteína-ligando. Para ello, los valores de $STD-AF_0$ ($STD_0 \cdot [L]_0/[P]_0$) de cada ligando fueron normalizados frente al mayor, para el que, arbitrariamente, se le dio un valor de 100 %.

Los experimentos de NOE transferido (2D NOESY) se realizaron en un espectrómetro Bruker DRX 500 MHz y, en el caso del pentamanósido, en un Bruker 800 MHz equipado con criosonda. Los experimentos fueron adquiridos con States-TPPI para el método de cuadratura en F1. Normalmente, se empleó una matriz de datos de 2 K x 256 (en los experimentos a 500 MHz) y 2 K x 400 (en los experimentos a 800 MHz) para digitalizar el ancho espectral de 10 ppm (en el 500 MHz) y 12 ppm (en el 800 MHz). A 500 MHz el número de *scans* utilizado fue 80 mientras que, en el espectrómetro 800 MHz, 16. En ambos casos, antes de la transformada de Fourier, se aplicó *zero filling* en la dimensión indirecta (F1) para expandir los datos hasta 2 K x 1 K. Se aplicaron correcciones de línea base en ambas dimensiones. Los experimentos se realizaron con tiempos de mezcla de 50, 75, 150, 250, 400, 600, 1000, y 1500 ms.

3.3. Cálculos con CORCEMA-ST

Las predicciones teóricas de los valores de STD fueron realizadas mediante cálculos de la matriz de relajación completa e intercambio conformacional, como está implementada en el programa CORCEMA-ST (v3.8). Las coordenadas de los complejos fueron tomadas de las

estructuras de rayos X existentes para los ligandos **D**, **T**, y **P** (PDB: 1OP3, 1ZLU, y 1ZLS, respectivamente). Para el ligando **Tri**, el complejo fue construido a partir de las coordenadas del complejo de **T**, tomando solamente el motivo Man α 1,2Man α 1,2Man. Para el ligando **H**, las coordenadas del complejo del tetramanósido **T** (brazo tipo D1 del heptamanósido) fueron suficientes para reproducir los datos experimentales. Para el segundo modo de asociación del pentamanósido **P**, que implica el brazo tipo D2 de **P**, diferente al descrito por la estructura de rayos X, el modelo fue construido a partir de cálculos de Docking, tras una selección de aquellas soluciones que eran compatibles con los datos experimentales de NOE transferido. Para todas las estructuras de los complejos, los átomos de hidrógeno (no disponibles a partir de datos de difracción de rayos X) fueron añadidos utilizando el programa SYBYL,²⁹ a lo que siguió un proceso de minimización energética *suave* (500 pasos de gradientes conjugados, 0.1 Kcal·mol⁻¹·Å⁻¹), solamente a dichos átomos. En los cálculos de CORCEMA-ST, para reducir el tamaño de las matrices, se utilizó una distancia umbral de corte de 8 Å alrededor del ligando, de forma que sólo aquellos residuos incluidos en esta distancia fueron utilizados en los cálculos. La selección de los protones de la proteína instantáneamente saturados (*on-resonance*) fue realizada por el programa basándose en una tabla de los desplazamientos químicos predichos para el 2G12 realizada por el programa SHIFTX.³⁰ El rango de irradiación que dio una mejor concordancia con los valores de STD experimentales fue de 0.6 a 1.8 ppm. Se asumió una típica cinética de asociación controlada por la difusión ($k_{on} = 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), asignando un valor razonable de 0.85 para el parámetro de S^2 de los metilos de la proteína con tiempo de correlación interno (τ_m) de 10 ps. Diferentes tiempos de correlación fueron probados para la difusión rotacional de la proteína (τ_p), obteniendo los mejores resultados con $\tau_p = 27.5$ ns. Para los ligandos, los tiempos de correlación en el estado libre fueron 1, 1.2, 1.5, 1.6, y 1.8 ns, para **D**, **Tri**, **T**, **P**, y **H**, respectivamente. Para simular la relajación no-específica por oxígeno paramagnético presente en la disolución, utilizamos unos valores de pérdidas (ρ_{leak}) de 0.1-0.3 s⁻¹ para todos los protones en los estados libre y enlazado (se ajustó manualmente dependiendo de las condiciones particulares de cada muestra de RMN). Los valores teóricos de STD fueron comparados matemáticamente mediante el valor de R-NOE:

$$R - NOE = \sqrt{\frac{\sum W_k (I_{STD}^{exp} - I_{STD}^{calc})^2}{\sum W_k (I_{STD}^{exp})^2}}$$

donde W_k es la función de compensación (proporcional a $1/I_{STD}^{exp}$) para cada valor individual de STD, y tiene como significado hacer el factor R-NOE sensible a las desviaciones significativas de los valores de STD muy intensos y/o muy débiles; I_{STD} es la intensidad de STD experimental (exp, valor proveniente del espectro de RMN) o calculada (calc, valor teórico) para cada protón.

3.4. Cálculos de Docking

Para la estructura del pentamanósido **P** interaccionando con el anticuerpo 2G12 por el brazo tipo D2, se realizaron cálculos de Docking. Para ello se utilizó la estructura existente de rayos X del complejo 2G12/pentamanósido (PDB 1ZLS), que se preparó y optimizó para estos cálculos usando las herramientas de preparación de biomoléculas incluidas en el programa SYBYL,²⁹ y una estructura de **P** construida con el mismo programa, con la ramificación tipo brazo D2 en el sitio de reconocimiento primario del anticuerpo, en una orientación similar a la descrita para la ramificación tipo brazo D3 en la estructura cristalográfica. En este sentido, la orientación global del ligando es básicamente una inversión de 180° respecto a la descrita por la estructura cristalográfica. Los cálculos se realizaron utilizando el programa AutoDock³¹ El *grid-box* se centró en uno de los dos sitios de reconocimiento primarios del anticuerpo, donde el ligando fue inicialmente colocado, con 16 puntos para cada lado y un espaciado entre cada punto de 0.25 Å. La constante dieléctrica para el cálculo de *grid-map* (mapas de afinidades) fue de 80. Se realizaron 100 *runs* de algoritmo genético Lamarckiano, con una población inicial de 300 individuos y un máximo de $3.5 \cdot 10^6$ de evaluaciones. Las opciones restantes se dejaron por defecto. Después del cálculo, se realizó un *re-clustering* con un criterio de RMSD (desviación de la raíz cuadrática media de las coordenadas) de 2 Å. Las soluciones del ligando fueron elegidas teniendo como criterio la energía de Docking así como el acuerdo con los datos experimentales de NOEs interglucosídicos transferidos, obteniendo un total de cinco posibles soluciones. Los cálculos de CORCEMA-ST fueron realizadas con estas soluciones y la estructura final fue la que menor valor de R-NOE obtuvo.

4. Bibliografía

1. www.UNAIDS.org.
2. Weiss, R. A., How does HIV cause AIDS? *Science* **1993**, *260* (5112), 1273-9.
3. (a) Stevenson, M., HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* **2003**, *9* (7), 853-60; (b) Alcami, J., [Advances in the immunopathology of HIV infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2004**, *22* (8), 486-96.
4. Walker, B. D.; Burton, D. R., Toward an AIDS vaccine. *Science* **2008**, *320* (5877), 760-4.
5. Wei, X.; Decker, J. M.; Wang, S.; Hui, H.; Kappes, J. C.; Wu, X.; Salazar-Gonzalez, J. F.; Salazar, M. G.; Kilby, J. M.; Saag, M. S.; Komarova, N. L.; Nowak, M. A.; Hahn, B. H.; Kwong, P. D.; Shaw, G. M., Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **2003**, *422* (6929), 307-12.
6. Zhu, P.; Liu, J.; Bess, J., Jr.; Chertova, E.; Lifson, J. D.; Grise, H.; Ofek, G. A.; Taylor, K. A.; Roux, K. H., Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **2006**, *441* (7095), 847-52.

7. Leonard, C. K.; Spellman, M. W.; Riddle, L.; Harris, R. J.; Thomas, J. N.; Gregory, T. J., Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **1990**, *265* (18), 10373-82.
8. (a) Trkola, A.; Pomales, A. B.; Yuan, H.; Korber, B.; Maddon, P. J.; Allaway, G. P.; Katinger, H.; Barbas, C. F., 3rd; Burton, D. R.; Ho, D. D.; et al., Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J Virol* **1995**, *69* (11), 6609-17; (b) Trkola, A.; Purtscher, M.; Muster, T.; Ballaun, C.; Buchacher, A.; Sullivan, N.; Srinivasan, K.; Sodroski, J.; Moore, J. P.; Katinger, H., Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **1996**, *70* (2), 1100-1108.
9. (a) Sanders, R. W.; Venturi, M.; Schiffner, L.; Kalyanaraman, R.; Katinger, H.; Lloyd, K. O.; Kwong, P. D.; Moore, J. P., The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J. Virol.* **2002**, *76* (14), 7293-305; (b) Scanlan, C. N.; Pantophlet, R.; Wormald, M. R.; Ollmann Saphire, E.; Stanfield, R.; Wilson, I. A.; Katinger, H.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M.; Burton, D. R., The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J. Virol.* **2002**, *76* (14), 7306-21.
10. (a) Calarese, D. A.; Scanlan, C. N.; Zwick, M. B.; Deechongkit, S.; Mimura, Y.; Kunert, R.; Zhu, P.; Wormald, M. R.; Stanfield, R. L.; Roux, K. H.; Kelly, J. W.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Katinger, H.; Burton, D. R.; Wilson, I. A., Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* **2003**, *300* (5628), 2065-2071; (b) Wang, S. K.; Liang, P. H.; Astronomo, R. D.; Hsu, T. L.; Hsieh, S. L.; Burton, D. R.; Wong, C. H., Targeting the carbohydrates on HIV-1: Interaction of oligomannose dendrons with human monoclonal antibody 2G12 and DC-SIGN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (10), 3690-5.
11. Pantophlet, R.; Burton, D. R., GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu Rev Immunol* **2006**, *24*, 739-69.
12. Calarese, D. A.; Lee, H. K.; Huang, C. Y.; Best, M. D.; Astronomo, R. D.; Stanfield, R. L.; Katinger, H.; Burton, D. R.; Wong, C. H.; Wilson, I. A., Dissection of the carbohydrate specificity of the broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (38), 13372-7.
13. Rudd, P. M.; Wormald, M. R.; Dwek, R. A., Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system. *Trends Biotechnol* **2004**, *22* (10), 524-30.
14. Woods, R. J.; Pathiaseril, A.; Wormald, M. R.; Edge, C. J.; Dwek, R. A., The high degree of internal flexibility observed for an oligomannose oligosaccharide does not alter the overall topology of the molecule. *Eur J Biochem* **1998**, *258* (2), 372-86.
15. Botos, I.; Wlodawer, A., Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog Biophys Mol Biol* **2005**, *88* (2), 233-82.
16. Mayer, M.; Meyer, B., Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie Int. Ed.* **1999**, *38* (12), 1784-1788.
17. Davis, A. L.; Laue, E. D.; Keeler, J.; Moskau, D.; Lohman, J., *Journal of Magnetic Resonance* **1991**, *94*, 637-644.
18. Bax, A.; Davis, D. G., *Journal of Magnetic Resonance* **1985**, (65), 355-360.
19. Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K., *Biochem Biophys Res Co* **1980**, (96), 1-6.

20. Bodenhausen, G.; Ruben, D. J., *Chem Phys Lett* **1980**, (69), 185-189.
21. (a) Clavel, C.; Canales, A.; Gupta, G.; Santos, J. I.; Canada, F. J.; Penades, S.; Surolia, A.; Jimenez-Barbero, J., NMR studies on the conformation of oligomannosides and their interaction with banana lectin. *Glycoconj J* **2007**, *24* (8), 449-64; (b) Clavel, C.; Canales, A.; Gupta, G.; Cañada, F. J.; Penadés, S.; Surolia, A.; Jiménez-Barbero, J., NMR Investigation of the Bound Conformation of Natural and Synthetic Oligomannosides to Banana Lectin. *Eur. J. Org. Chem* **2007**, *2007* (10), 1577–1585.
22. Angulo, J.; Langpap, B.; Blume, A.; Biet, T.; Meyer, B.; Krishna, N. R.; Peters, H.; Palcic, M. M.; Peters, T., Blood group B galactosyltransferase: insights into substrate binding from NMR experiments. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (41), 13529-38.
23. (a) Jayalakshmi, V.; Krishna, N. R., Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *J Magn Reson* **2002**, *155* (1), 106-18; (b) Mayer, M.; James, T. L., NMR-based characterization of phenothiazines as a RNA binding scaffold. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (13), 4453-60.
24. Jayalakshmi, V.; Rama Krishna, N., CORCEMA refinement of the bound ligand conformation within the protein binding pocket in reversibly forming weak complexes using STD-NMR intensities. *J Magn Reson* **2004**, *168* (1), 36-45.
25. Meyer, B.; Peters, T., NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angewandte Chemie* **2003**, *42* (8), 864-891.
26. www.DEXTRAUK.com.
27. Martinez-Avila, O.; Hijazi, K.; Marradi, M.; Clavel, C.; Campion, C.; Kelly, C.; Penades, S., Gold manno-glyconanoparticles: multivalent systems to block HIV-1 gp120 binding to the lectin DC-SIGN. *Chemistry* **2009**, *15* (38), 9874-88.
28. Lee, H. K.; Scanlan, C. N.; Huang, C. Y.; Chang, A. Y.; Calarese, D. A.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M.; Burton, D. R.; Wilson, I. A.; Wong, C. H., Reactivity-based one-pot synthesis of oligomannoses: defining antigens recognized by 2G12, a broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43* (8), 1000-3.
29. Tripos SYBYL, 2009.
30. Neal, S.; Nip, A. M.; Zhang, H.; Wishart, D. S., Rapid and accurate calculation of protein ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shifts. *J Biomol NMR* **2003**, *26* (3), 215-40.
31. AutoDock The Scripps Research Institute.

Capítulo 3:

Determinación de K_D a partir de las pendientes iniciales de las curvas de crecimiento de STD

1. Introducción

Las interacciones específicas entre biomoléculas regulan procesos esenciales de la vida, de ahí que el estudio e investigación de éstas sea de alto interés científico. Así, por ejemplo, este interés se refleja especialmente en el elevado número de estudios de interacciones de pequeños ligandos con receptores macromoleculares para el diseño de nuevos compuestos activos útiles en la investigación farmacéutica.¹ Una faceta fundamental en este tipo de investigaciones es, sin duda alguna, la caracterización energética de dichas interacciones (afinidades ligando-receptor) en condiciones experimentales que se aproximen en la mayor medida a las propias condiciones físico-químicas de las matrices biológicas en las que tienen lugar dichos procesos (citoplasma, matriz extracelular,...).¹

Las afinidades ligando-receptor se suelen expresar en términos de la constante de disociación (K_D), que para una interacción simple entre un ligando (L) y su receptor (P , proteína), como la descrita en el equilibrio (1), bien dada por el cociente entre la constante cinética de asociación (k_{on}) y la correspondiente de disociación (k_{off}). Por lo tanto podemos definirla según la ecuación (2).

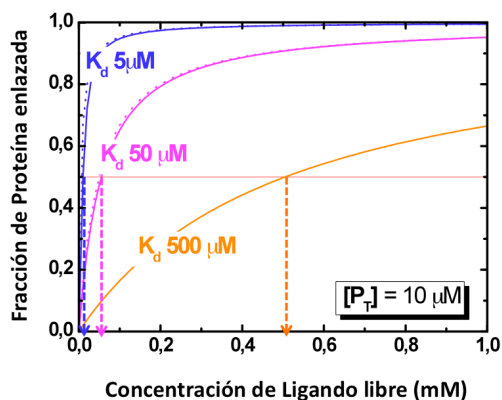
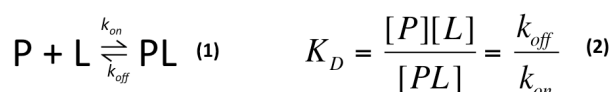


Fig. 1: Gráfico que representa la fracción de proteína enlazada en función de la concentración de ligando libre en la muestra (isoterma de asociación). Se han monitorizado tres interacciones ficticias con diferentes constantes de disociación (K_D). La concentración total de proteína en cada una de las muestras es de 10 μM . Con flechas punteadas está representado el valor de K_D para cada interacción.

Este tipo de interacciones se puede monitorizar gráficamente siguiendo la fracción de proteína enlazada en función de la concentración de ligando libre (figura 1). Para una interacción ligando-proteína que pueda describirse por un modelo de “un solo sitio de reconocimiento”,

dicha fracción seguirá una curva de saturación tipo rama de hipérbola descrita por la ecuación de la isoterma de Langmuir:

$$f_{PB} = \frac{[L]}{K_D + [L]}$$

En el gráfico de la figura 1 se han monitorizado tres posibles interacciones con diferentes constantes de disociación. La constante de disociación coincide matemáticamente con la cantidad de ligando libre que es necesaria para que la fracción de la proteína enlazada sea exactamente 50 %, por lo que se puede localizar gráficamente su valor de una forma sencilla (esto está representado mediante líneas punteadas verticales en la figura 1). Cuanto más débil sea una interacción, mayor concentración de ligando será necesaria para alcanzar dicha semisaturación de la proteína (figura 1).

En las últimas décadas, la espectroscopía RMN ha demostrado ser una poderosa técnica en este tipo de estudios, y entre las técnicas de RMN basadas en la observación de señales del ligando, el experimento STD NMR ha demostrado, particularmente, una alta sensibilidad y robustez, necesitando muy poca cantidad de receptor (sin marcaje isotópico), y siendo válido también para complejos en los que el receptor tiene un alto peso molecular², como ya se ha visto en el capítulo anterior.

A partir de los principios básicos de la técnica STD NMR, puede deducirse que las intensidades de las señales de un experimento STD NMR contienen información de las concentraciones de los complejos proteína-ligando en disolución y, por lo tanto, la afinidad de la interacción ligando-proteína se podría obtener a partir de experimentos de titulación usando esta técnica. Para facilitar la interpretación de los datos, se introduce el factor de amplificación del STD (STD-AF)³, que se define como se describe en la ecuación (3).

$$STD - AF = STD \cdot \varepsilon = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \cdot \frac{[L_T]}{[P_T]} \quad (3)$$

donde **STD** corresponde al valor fraccional de STD para un protón dado y ε es el exceso del ligando sobre la proteína. Este factor se puede utilizar para comparar el efecto de STD en dos ligandos diferentes, incluso si la concentración de proteína no es idéntica en ambas muestras de RMN.³ Para los objetivos del presente capítulo, el aspecto más interesante del factor de amplificación del STD es que, a diferencia del factor STD simple, es directamente proporcional a la fracción de proteína enlazada, por lo que si monitorizamos dicho factor (para un protón determinado del ligando) en función de la concentración de ligando añadido, podremos construir la isoterma de asociación de la interacción objeto de estudio.

Sin embargo, aproximaciones directas recogidas en la literatura han fallado en la obtención de valores correctos de K_D a partir de titulaciones de STD NMR, ya que se ha demostrado que la magnitud de la constante aparente determinada depende de la señal de STD que escojamos para construir la correspondiente curva isoterma de asociación.⁵ Por ello, el potencial inicial de esta técnica para la determinación simple de afinidades proteína-ligando no se ha desarrollado en su totalidad, debido a dicha incertidumbre aparentemente inherente a la determinación de la K_D por STD NMR.

Una forma de superar estos inconvenientes ha sido el uso de experimentos de competición, en los que la K_D de un ligando es determinada monitorizando el desplazamiento de éste del sitio activo del receptor cuando se aumenta la concentración de un segundo ligando de referencia, de afinidad conocida, usando la ecuación de Cheng-Prusoff.⁶ La aplicabilidad y robustez de esta aproximación ha sido ampliamente demostrada,^{3, 7} e incluso se ha diseñado una modificación de la secuencia de pulsos para poder incluir ligandos que estén isotópicamente marcados y eliminar así el problema ocasional debido al solapamiento de señales.⁸ No obstante, el mayor inconveniente de esta técnica es la necesidad de un inhibidor del cual se conozca su afinidad por otra técnica, y que sea competitivo con nuestro ligando.

En este capítulo se desarrolla una nueva aproximación para la obtención de la constante de disociación de un equilibrio proteína-ligando por STD NMR, mediante la titulación de un solo ligando. Esta nueva aproximación se ha desarrollado como consecuencia de un estudio espectroscópico minucioso de STD NMR realizado sobre sistemas modelo proteína-ligando, con el objetivo de esclarecer cuáles son las variables experimentales que influyen sobre la medida final, y si dichas variables se pueden optimizar para cancelar sus efectos sobre las medidas, mediante la ejecución de un protocolo apropiado. Los dos sistemas elegidos, bien caracterizados y estudiados en la literatura, son: la interacción de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N,N'-diacetilglucosamina (GlcNAc β 1,4GlcNAc, quitobiosa) con la aglutinina del germen de trigo (WGA),⁹ y la interacción del aminoácido L-Triptófano (L-Trp) con la albúmina del suero bovino (BSA).¹⁰ Finalmente, la nueva aproximación nos ha permitido caracterizar con precisión las afinidades de los ligandos de interés en el sistema proteína-ligando 2G12-oligomanósidos, objeto principal de estudio en la presente tesis doctoral.

2. Resultados y discusión

2.1. Análisis de los factores que afectan a la determinación de las constantes de disociación proteína-ligando por titulaciones con experimentos de STD NMR

Fundamentalmente, la intensidad de una señal STD es dependiente de dos factores: la eficiencia de la transferencia de saturación desde los protones de la proteína a los del ligando, durante el tiempo de residencia en el estado enlazado (NOEs intermoleculares proteína-ligando), y la proporción de acumulación de moléculas de ligando saturado en el estado libre a lo largo de todo el tiempo de saturación. Mientras que el primer factor depende fundamentalmente de la estructura tridimensional del complejo ligando-proteína, el segundo está más relacionado con las cinéticas del sistema, y depende del tiempo de saturación, las concentraciones, la relación ligando-proteína, la temperatura, etc.¹² Por tanto, es sobre este segundo factor sobre el que es esperable que podamos actuar, de modo que los parámetros podrían ser, en principio, optimizados en un protocolo experimental apropiado.

En la presente tesis doctoral se ha analizado la dependencia de la K_D , medida a partir de STD-AF, de varios factores: el tiempo de saturación de los experimentos, la cantidad de saturación transferida (intensidad STD, y, por ende, valor de STD-AF), y la fracción de ligando enlazado (concentración de proteína).

2.1.1. Efecto del tiempo de saturación en los experimentos de STD NMR

El tiempo de saturación (t_{sat}) en espectroscopía STD NMR es un parámetro muy importante en relación, fundamentalmente, con la sensibilidad de los experimentos. Tiempos de saturación muy cortos (< 200 ms) van a llevar a experimentos con problemas significativos tanto de relación señal-ruido, como de saturación ineficaz de la proteína. Tiempos de saturación muy largos, asegurarán la saturación máxima de la proteína, y llevarán a incrementos considerables en las intensidades STD, pero sólo hasta un determinado límite que, además, va a depender del protón del ligando considerado.

En una interacción proteína-ligando, las intensidades de las señales STD del ligando crecen con el t_{sat} , hasta un punto donde se llega a un estado estacionario a tiempos de saturación muy largos (por ejemplo, $t_{\text{sat}} > 5$ s). Esto se debe a que, para tiempos de saturación cortos (suficientemente cortos en comparación con los tiempos de relajación selectivos de los protones del ligando en el estado libre), al incrementar el tiempo de saturación se incrementa el número de sucesos de asociación-disociación que tienen lugar en la muestra, y por tanto se va

acumulando una cantidad creciente de moléculas de ligando con las poblaciones α, β de sus protones perturbadas por la transferencia de saturación ocurrida en el estado enlazado previo.

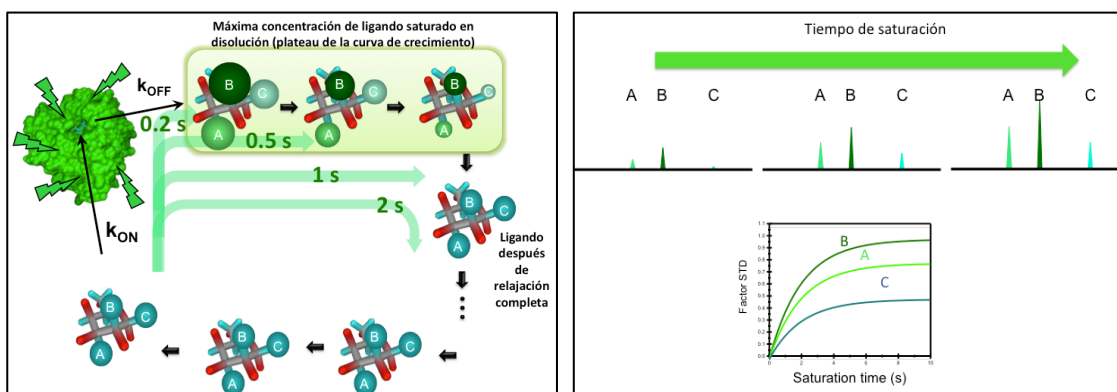


Fig. 2: Esquema explicativo de las variaciones de las señales de STD de un ligando con el tiempo de saturación. Izquierda: representación esquemática de un ciclo completo hipotético de asociación-disociación de una molécula de ligando. Las cantidades de saturación transferidas se corresponden con el tamaño de las esferas de color verde sobre los protones A, B, y C. Al crecer el tiempo de saturación (los valores son meramente representativos) crece la cantidad de moléculas de ligando saturado en disolución. Sin embargo, transcurrido un tiempo de saturación muy largo (varios segundos) las primeras moléculas que se enlazaron habrán perdido su saturación por relajación, y ya no se acumulará más ligando (se habrá alcanzado la máxima concentración de ligando saturado en disolución). Derecha: representación de espectros STD a tiempos de saturación crecientes. Abajo se muestran las curvas de saturación resultantes.

Esto está esquemáticamente representado en la figura 2 (izquierda). Por otro lado, cuando el tiempo de saturación empieza a ser del orden de magnitud de los tiempos de relajación del ligando, las poblaciones habrán empezado a retornar significativamente hacia sus valores de equilibrio iniciales (relajación) para las moléculas de ligando en el estado libre, es decir, en ausencia del estímulo producido por la proteína en el estado enlazado. Así, el crecimiento de la acumulación de saturación en disolución (pendiente de la curva), que inicialmente era lineal, empieza a disminuir, mostrando una pendiente cada vez menor, lo que se representa esquemáticamente en las curvas de crecimiento de la figura 2 (derecha). De hecho, transcurrido un tiempo de saturación suficientemente largo (teóricamente mayor de 5 veces el T_1 -selectivo del protón considerado), la saturación (para ese protón concreto) deja de acumularse en disolución y alcanza su estado estacionario. En este estado, la saturación transferida por el colectivo de proteínas al colectivo de moléculas de ligando en disolución es exactamente compensada por la relajación de los protones del ligando en el estado libre, y se alcanza por tanto el valor máximo de STD posible (*plateau* de la curva de crecimiento), que se corresponde con la máxima concentración de moléculas de ligando saturadas que se puede conseguir en disolución bajo las condiciones experimentales dadas.

En la mayoría de las aplicaciones de la espectroscopía STD NMR se utiliza como tiempo de saturación estándar un valor de 2 s. Un aspecto que nos resultó bastante interesante al iniciar este estudio es que no existían trabajos en la literatura en los que se hubieran realizado

medidas de afinidad por STD NMR (titulación de un solo ligando) a diferentes tiempos de saturación para analizar el posible efecto de dicho parámetro. Nuestro planteamiento inicial era que, desde el punto de vista teórico, no deberían producirse variaciones en las constantes medidas si los experimentos se realizaban a diferentes tiempos de saturación. Por ejemplo, en la figura 3, se representan las curvas de asociación (isotermas) teóricas para un sistema proteína-ligando con K_D 100 μM . Se representan dos curvas de asociación teóricas obtenidas con diferentes tiempos de saturación del experimento STD NMR (1 s, azul; y 5 s, roja); a su vez, se representan estas curvas para dos protones diferentes del ligando (A y B). Se han simulado dos comportamientos de relajación muy diferentes para estos dos protones; el protón A posee un tiempo de relajación, T_1 selectivo, considerablemente mayor que el del protón B. Esto se refleja en que las curvas de crecimiento del STD alcanzan el *plateau* más tarde en el caso del protón A, es decir, se acumula más saturación en disolución, y esto se cumple para todas las concentraciones del ligando.

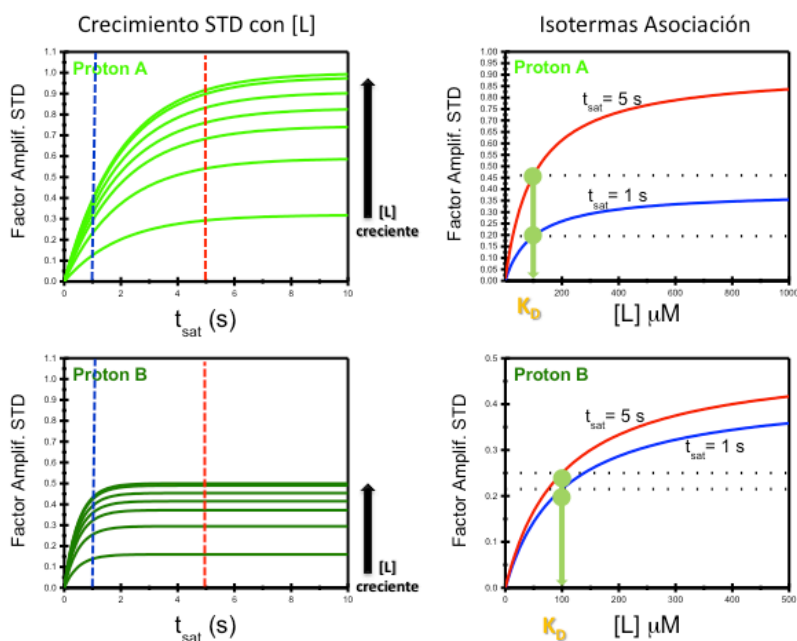
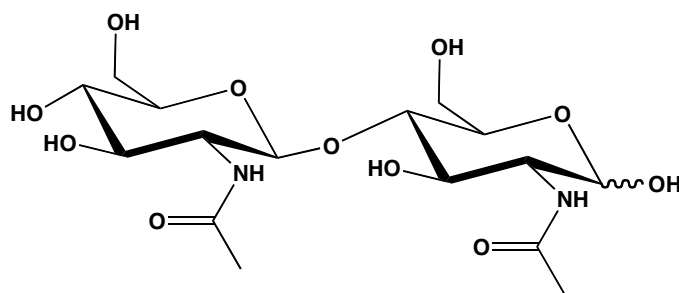


Fig. 3: Curvas de asociación teóricas para dos protones (A y B) de un hipotético ligando con K_D 100 μM . Para cada protón se representan las curvas de crecimiento del STD (izquierda), obtenidas para concentraciones crecientes de ligando. Las curvas evidencian una relajación mucho más eficaz en el caso del protón B, ya que alcanzan el valor máximo a tiempos de saturación más cortos. A la derecha se representan las curvas de asociación (isotermas) obtenidas a partir de los valores de STD-AF a dos tiempos de saturación diferentes (1 y 5 s; curvas azul y roja, respectivamente). En todos los casos, el 50 % de la curva de asociación se alcanza a un valor de concentración de ligando de 100 μM , indicando que el valor de la constante de disociación que se obtiene, teóricamente, debería ser independiente del tiempo de saturación, así como del tipo de protón del ligando monitorizado.

Las curvas de asociación que se obtienen considerando los valores de STD-AF a dos tiempos de saturación diferentes (figura 3, derecha, t_{sat} 1 y 5 s), claramente indican que el 50 % del valor máximo de la curva (asíntota horizontal) se alcanza a un valor de la concentración de

ligando libre de 100 μM , con independencia del protón elegido (A o B), o del tiempo de saturación. Es decir, teóricamente, el ajuste a una isoterma de Langmuir de cualquiera de las cuatro curvas de asociación originaría un valor de la constante de disociación de 100 μM , por lo que la medida debería ser independiente, al menos teóricamente, tanto del tiempo de saturación como del tipo de protón del ligando elegido para medir los valores de STD-AF. Como en la literatura ya existían precedentes de que, de hecho, esto último no era cierto (las constantes aparentes obtenidas dependen del protón elegido), nos decidimos a investigar si el tiempo de saturación puede tener o no influencia sobre la medida de las constantes de disociación por STD NMR.

Así, se ha estudiado la influencia de t_{sat} en las isothermas finales de asociación y, consecuentemente, en la determinación final de la constante de disociación. Para dicho propósito se realizó una titulación del disacárido quitobiosa (esquema 1) en una muestra que contenía 42 μM de WGA (aglutinina del germen de trigo). Se construyeron cuatro isothermas de asociación diferentes, cada una con diferentes valores del tiempo de saturación (1, 2, 3, y 4 s) en los correspondientes experimentos de STD NMR (figura 4).



Esquema 1: Estructura de la quitobiosa (GlcNAc β 1,4GlcNAc), ligando de la lectina WGA.

Las isothermas de asociación de STD-AF ($t_{\text{sat}} = 1, 2, 3, 4$ s) de la señal del metilo del anillo reductor de GlcNAc de la quitobiosa se muestran en la figura 4. Cuanto mayor es el tiempo de saturación del experimento mayores son los valores STD-AF, los cuales dan un alto valor de *plateau* de las curvas (α_{STD} , factor de escalado adimensional que representa el mayor valor de STD-AF para una señal monitorizada) y, por lo tanto, resultarán en una mejor sensibilidad de los experimentos (figura 4b). A fines meramente de una mejor visualización del efecto del tiempo de saturación sobre las diferentes curvas, todas se normalizaron mediante la división de todos los valores STD-AF por el máximo de cada curva (α_{STD}). Esto tiene como consecuencia la obtención de nuevas curvas que contienen la misma información de K_D pero que varían sistemáticamente entre 0 y 1 (figura 4c). Los valores normalizados del STD-AF (figura 4c) demuestran el impacto del tiempo de saturación en las isothermas de asociación, ya que el incremento de t_{sat} da lugar a un crecimiento más lento de los valores del STD-AF con la concentración del ligando. Este efecto tiene como consecuencia un incremento en el valor de la

K_D aparente (figura 4c, ampliación en el interior), es decir, se necesita una mayor concentración de ligando para alcanzar el 50 % del valor de STD-AF máximo.

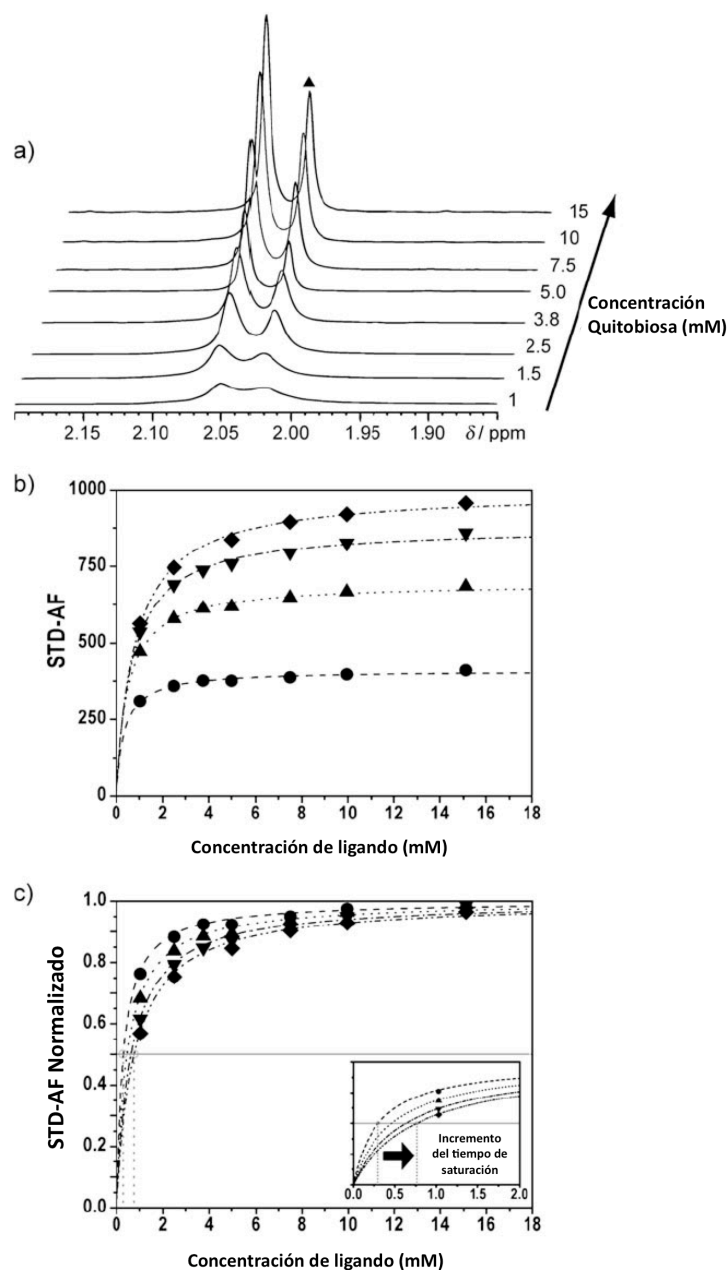


Fig. 4: Efecto del tiempo de saturación de los experimentos STD NMR en la determinación de afinidades proteína-ligando. (a) Representación apilada de los espectros 1D STD NMR a un tiempo de saturación ($t_{\text{sat}} = 2$ s, 15 °C) en la región espectral de los grupos metilo de acetamida, durante la titulación de una muestra de $46 \mu\text{M}$ de WGA con quitobiosa. La señal monitorizada está marcada con un triángulo. (b) Isothermas de asociación de los valores de STD-AF de los protones del metilo de acetamida del residuo reductor de la quitobiosa, obtenidos usando diferentes tiempos de saturación (\bullet 1 s, \blacktriangle 2 s, \blacktriangledown 3 s, \blacklozenge 4 s). (c) Isothermas normalizadas respecto a su valor de *plateau* (α_{STD}). El valor de concentración del ligando para la semi-saturación del sitio activo de la proteína (STD-AF = 0.5) corresponde gráficamente al valor de K_D . La ampliación muestra la parte primera de la curva de Langmuir, y el rango de variación de la K_D está delimitado por las líneas punteadas verticales. En todos los casos hubo un buen ajuste matemático a un modelo de un sitio de reconocimiento (líneas punteadas y discontinuas).

Las magnitudes de las constantes de disociación aparentes determinadas por el ajuste a la ecuación de Langmuir para un modelo de un solo sitio de reconocimiento están recogidas en la Tabla 1. El valor de la K_D aparente aumenta sistemáticamente con el t_{sat} , subestimando de esta forma la afinidad proteína-ligando para tiempos de saturación largos. Es interesante observar cómo el valor más próximo a la constante de disociación determinada por calorimetría de titulación isoterma ($200 \mu\text{M}$)⁹, se corresponde con la K_D aparente determinada con el menor tiempo de saturación (1 s, $300 \mu\text{M}$).

Tabla 1: K_D aparente para la asociación de quitobiosa a la lectina WGA utilizando los valores STD-AF de las titulaciones de STD NMR, en función del tiempo de saturación (t_{sat}) a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ y $46 \mu\text{M}$ en WGA.

Tiempo de saturación (s)	K_D aparente [μM]
1.0	300
2.0	460
3.0	630
4.0	730

Estos resultados no sólo demuestran el impacto significativo que puede tener el tiempo de saturación sobre las medidas de constantes de disociación, sino que indican que la mejor aproximación al valor “termodinámico” es aquel obtenido con el menor tiempo de saturación. Dicho de otra forma, si buscamos las mejores condiciones para aumentar la sensibilidad del experimento STD NMR, es decir, utilizamos tiempos de saturación largos, los errores cometidos en la determinación de la constante de disociación serán mayores.

2.1.2. Efecto de la intensidad de las señales de STD NMR

En los experimentos STD NMR, la mejor relación señal-ruido corresponderá a las señales de STD más intensas (a igualdad de número de protones), por lo que sería conveniente usar estas señales para construir la isoterma de asociación para la determinación de constantes de disociación. Para estudiar el efecto de las intensidades de las señales STD sobre dicha determinación, se seleccionó el sistema proteína-ligando constituido por la albúmina del suero bovino (BSA) y el aminoácido natural L-triptófano. Este sistema, que se ha convertido en un estándar para los experimentos de RMN de observación de ligando, origina señales intensas en experimentos STD NMR, y su afinidad está muy bien caracterizada en la literatura.

En la figura 5 se muestran las curvas de crecimiento de los valores de STD-AF respecto al tiempo de saturación para cuatro protones seleccionados del L-triptófano (H_α , $H\delta 1$, $H\epsilon 3$, y $H\zeta 2$) en una muestra 1 mM en L-Trp y $20 \mu\text{M}$ en BSA. Los protones $H\zeta 2$ y $H\delta 1$ mostraron la mayor

transferencia de saturación, mientras que $H\alpha$ la menor, deduciéndose que la región del ligando que tiene contactos más cercanos con el sitio activo de la proteína es la zona comprendida entre los protones $H\zeta 2$ y $H\delta 1$, dejando la región más polar del aminoácido expuesta al disolvente. Esta situación nos permite analizar sobre un mismo ligando el efecto de las diferencias de intensidades STD sobre la medida de la constante de disociación.

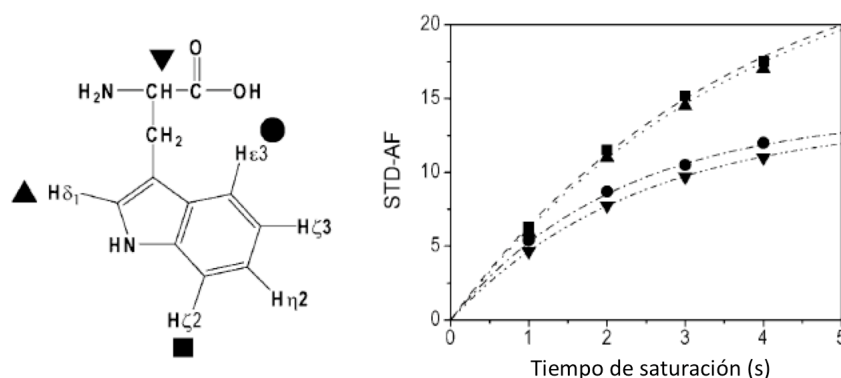


Fig. 5: Valores de STD-AF de protones seleccionados del aminoácido L-Trp (■ $H\zeta 2$, ▲ $H\delta 1$, ● $H\epsilon 3$, ▼ $H\alpha$) en función del tiempo de saturación (curvas de crecimiento). La muestra contenía 1 mM de ligando y 20 μM de BSA. Los símbolos representan los datos experimentales, mientras que las líneas el resultado del ajuste matemático a una función mono-exponencial asintótica.

Las curvas de asociación a partir de los valores STD-AF a un solo tiempo de saturación ($t_{\text{sat}} = 3$ s) de los protones seleccionados del L-Trp se muestran en la figura 6. La comparación de los resultados reveló variaciones significativas en el comportamiento de las curvas isothermas de STD-AF, dependiendo del protón elegido. Es notable cómo, si se comparan las curvas isothermas normalizadas en la figura 6, con las curvas de crecimiento de STD-AF, en la figura 5, se observa una dependencia inversa de la velocidad de crecimiento de la isoterma, para una señal dada, respecto a la magnitud del STD. Es decir, los protones con el valor de STD-AF más alto, y por tanto con el STD más intenso ($H\zeta 2$ y $H\delta 1$, figura 5), muestran curvas de asociación con un crecimiento inicial menor (figura 6), lo que originaría un valor de K_D aparente mayor en un ajuste tipo Langmuir, es decir, una subestimación de la afinidad, de nuevo. Por otra parte, las isothermas de los protones que reciben menos saturación ($H\alpha$, por ejemplo) muestran los mayores valores de crecimiento inicial y, por lo tanto, originarían el menor valor de K_D .

El análisis cuantitativo de las curvas dio lugar a los valores de K_D aparente que se muestran en la Tabla 2. En este caso, las curvas no sólo se obtuvieron para diferentes protones del ligando, sino que, al igual que antes, también a diferentes valores del tiempo de saturación del experimento STD NMR. Hay dos aspectos muy interesantes de estos resultados: (i) al igual que se describió anteriormente para el sistema WGA-quitobiosa, en este caso también se observa una clara influencia del tiempo de saturación (influencia, además, similar, ya que para todos los protones del ligando la afinidad aparente disminuye con el aumento del tiempo de saturación

(tabla 2, columnas), y (ii) para todos los tiempos de saturación, la mayor K_D aparente se obtiene a partir de aquellos protones que reciben las mayores cantidades de saturación (mayor intensidad STD; como referencia, en la tabla 2 se incluyen los valores STD-AF de los distintos protones a 4 s de tiempo de saturación).

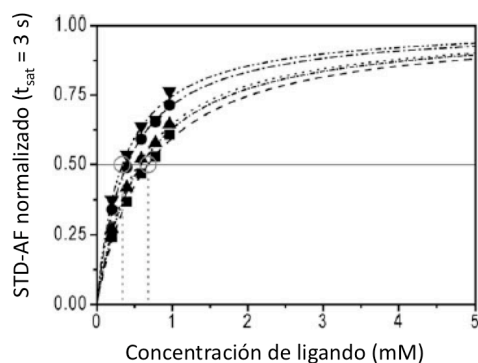


Fig. 6: Efecto de la magnitud individual de la transferencia de saturación (intensidades de STD) en la determinación de la afinidad de la interacción entre BSA y L-triptófano. Se muestran las isoterma de asociación de los valores de STD-AF ($t_{sat} = 3$ s) de diferentes protones del ligando (■ H ζ 2, ▲ H δ 1, ● H ϵ 3, ▼ H α) normalizados respecto a sus correspondientes valores máximos de *plateau* (α_{STD}). La muestra contenía 20 μ M de BSA. Las líneas verticales punteadas corresponden gráficamente al rango de variación del valor de K_D .

Comparando los datos experimentales en la Tabla 2 con el valor de K_D que recoge la literatura para la interacción de L-Trp con BSA ($K_D = 125 - 230 \mu$ M),¹⁰ se puede deducir que el valor más cercano de la K_D aparente para un protón dado del ligando es, una vez más, el obtenido utilizando el menor tiempo de saturación. Además, en relación con las intensidades de STD, las isoterma que más se aproximan al valor de K_D recogido en la literatura, son aquellas que se construyen usando la señal de STD menos intensa.

Tabla 2: Constantes de disociación aparentes para la interacción entre L-Triptófano y BSA a partir de titulaciones analizadas con experimentos STD NMR, en función del tiempo de saturación (t_{sat}), monitorizando las señales de diferentes protones del ligando. Condiciones 25 °C y 20 μ M en BSA. Como referencia se incluyen en la última fila los valores de STD-AF a 4 s de cada protón.

K_D aparente (μ M)				
Tiempo de saturación (s)	Protón H ζ 2	Protón H δ 1	Protón H ϵ 3	Protón H α
1.0	340	220	230	140
2.0	510	420	290	260
3.0	680	550	400	340
4.0	950	730	560	430
STD-AF (4 s)	17.5	17.0	12.0	11.0

Desafortunadamente, una vez más, nuestros resultados muestran que las mejores condiciones para obtener una buena relación señal-ruido en los espectros y, por tanto, para una mejor precisión en la medida experimental de K_D , como es el caso de las señales con mayor valor de STD, originarán una mayor desviación en la determinación de las constantes de disociación.

2.1.3. Efecto de la fracción de ligando enlazado

La tendencia creciente de la K_D aparente tanto con t_{sat} como con la intensidad de las señales STD (tablas 1 y 2), es una consecuencia de una subestimación de los valores de STD-AF en los puntos iniciales del experimento de titulación (figuras 4 y 6), que hace que el plateau de la curva de asociación (100 % de receptor enlazado) se alcance a concentraciones de ligando cada vez mayores. Estos puntos iniciales de la titulación, en la región de bajas relaciones ligando-proteína, corresponden a las mayores fracciones de ligando enlazado durante el experimento. De todo esto se deduce que es bajo las condiciones de altas fracciones de ligando enlazado cuando los valores de STD-AF de los protones de ligando se ven alterados (disminuidos) respecto a los valores que deberían obtenerse en condiciones de mayores fracciones de ligando libre. Cualquier titulación de un ligando sobre una muestra de proteína se puede llevar a cabo bajo condiciones generales de mayores o menores fracciones de ligando enlazado (mayor o menor concentración de proteína), por lo que decidimos estudiar el efecto de este parámetro sobre la determinación de afinidades en titulaciones monitorizadas por STD NMR.

Para ello, se llevaron a cabo experimentos de titulación con el sistema BSA/L-Trp, en las mismas condiciones que en los estudios anteriores (apartado 2.2) pero modificando la fracción de ligando enlazado incrementando la concentración de receptor. En este caso, la K_D de la asociación de L-Trp fue medida con una concentración tres veces superior de BSA (60 μM), manteniendo la misma concentración del ligando añadido en las titulaciones como en los casos anteriores (figura 6). Las influencias de t_{sat} y de la intensidad de la señal se vieron una vez más (figura 7, superior). Sin embargo, las magnitudes de las desviaciones de la K_D aparente fueron diferentes a las previas (20 μM BSA), siendo significativamente mayores en los experimentos realizados con la mayor concentración de proteína ($[\text{BSA}] = 60 \mu\text{M}$) o, lo que es lo mismo, con mayor fracción de ligando enlazado durante toda la titulación (comparar figura 6 y figura 7 superior).

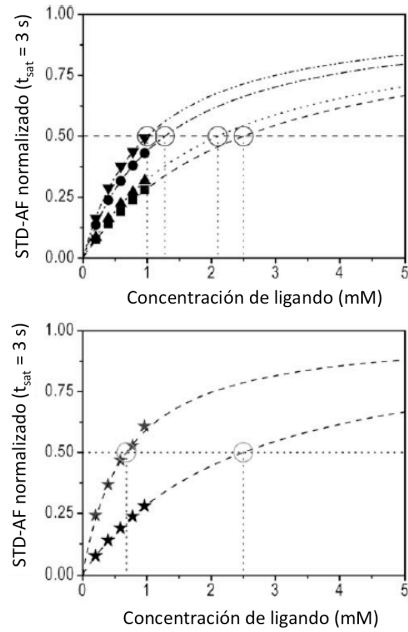


Fig. 7: Efecto de la fracción de ligando enlazado en la determinación de la afinidad en la interacción entre BSA y L-triptófano. Superior: isotermas de asociación de los valores de STD-AF ($t_{\text{sat}} = 3 \text{ s}$) normalizadas a sus correspondientes valores máximos de *plateau* (α_{STD}) de los protones seleccionados del L-triptófano (■ H ζ 2, ▲ H δ 1, ● H ϵ 3, ▼ H α). La muestra contenía 60 μM en BSA. Inferior: comparación de las isotermas de asociación de los valores de STD-AF para el protón H ζ 2 del L-triptófano ($t_{\text{sat}} = 3 \text{ s}$), para dos concentraciones diferentes de BSA (★ 60 μM , ★ 20 μM), siendo el resto de condiciones experimentales las mismas. En ambas figuras el rango de variación de K_D está gráficamente representado por líneas verticales punteadas.

Esto se hace evidente en la figura 7 (inferior), en la que se muestran las isotermas resultantes de la normalización de los valores STD-AF del protón H ζ 2 del L-Trp para las dos titulaciones llevadas a cabo con ambas concentraciones de BSA (20 y 60 μM). La Tabla 3 muestra las constantes de disociación aparentes obtenidas de los experimentos de STD NMR para la muestra con 60 μM de BSA. El efecto del tiempo de saturación y de la intensidad de la señal en la afinidad aparente es mayor al aumentar la concentración de proteína (comparar con Tabla 2).

El mismo efecto en la K_D aparente con el aumento de la fracción de ligando enlazado se observó en los experimentos de titulación de STD NMR con el sistema WGA/quitobiosa, utilizando dos concentraciones de proteína (18 y 46 μM).

Tabla 3: Constantes de disociación aparentes, K_D (μM), para la interacción entre L-Triptófano y BSA a partir de titulaciones analizadas con STD NMR, en función del tiempo de saturación (t_{sat}), monitorizando las señales de diferentes protones del ligando. Condiciones 25 °C y 60 μM en BSA.

Tiempo de saturación (s)	K_D aparente (μM)			
	Protón H ζ 2	Protón H δ 1	Protón H ϵ 3	Protón H α
1.0	560	490	420	360
2.0	1580	1200	1010	710
3.0	2500	2100	1270	990
4.0	3300	2700	1600	1060

La fracción de ligando enlazado (a igualdad de concentraciones totales de las especies) también es función de la constante de afinidad intrínseca y, para probar la influencia de ésta en las determinaciones experimentales de K_D , también se realizaron estudios adicionales con la lectina WGA y N-acetilglucosamina (GlcNAc) como ligando, para evaluarla frente a la interacción con quitobiosa (GlcNAc β 1,4GlcNAc), descrita anteriormente, ya que ambos ligandos difieren en sus constantes de afinidad en un orden de magnitud (K_D 2.5 mM, y 0.2 mM respectivamente).⁹ Esta comparación debería determinar si las desviaciones de la K_D con el tiempo de saturación también dependen de la propia magnitud de la afinidad proteína-ligando que se esté analizando.

La Tabla 4 muestra las constantes de disociación obtenidas a partir de las isothermas de asociación de los valores de STD-AF para los protones del grupo metilo del grupo acetamida a varios tiempos de saturación. Las variaciones de K_D con el tiempo de saturación siguen la misma tendencia que en el caso de la quitobiosa, es decir mayores tiempos de saturación dan mayores constantes de disociación aparentes. Y, una vez más, los valores más cercanos a la constante de disociación determinada por calorimetría corresponden a aquellos obtenidos a partir de los tiempos de saturación más cortos (1 s). Interesantemente, la diferencia en la constante de disociación aparente con los tiempos de saturación, de 1 a 4 s, para el ligando GlcNAc es menor (1.25 veces) que en el caso de la quitobiosa (2.50 veces). Así, la comparación de los resultados en las interacciones de la GlcNAc y la quitobiosa con la lectina WGA, indicó que las sobreestimaciones de los valores de la K_D con el tiempo de saturación del experimento STD NMR, son proporcionales a las propias afinidades de los sistemas proteína-ligando bajo estudio.

Tabla 4: Constante de disociación aparente para la interacción de GlcNAc con WGA a partir de las titulaciones de STD NMR en función del tiempo de saturación (t_{sat}). Condiciones: 15 °C, 42 μM de WGA.

Tiempo de saturación (s)	K_D aparente (mM)
1.0	2.4
2.0	2.7
3.0	2.7
4.0	3.0

2.2. Discusión de los factores

Todos los resultados que se han mostrado en los apartados 2.1.1-2.1.3 demuestran, experimentalmente, la elevada sensibilidad que pueden presentar las medidas de afinidad por experimentos de titulación de STD NMR a distintos factores experimentales. Se han identificado factores que introducen nuevas dependencias en los valores de STD-AF que dificultan su relación directa con la concentración de complejo, disminuyendo considerablemente la precisión en la determinación de las constantes de disociación.

Por un lado, al aumentar el tiempo de saturación aumenta el número de “eventos” de asociación-disociación en la muestra, que será proporcional al cociente entre el tiempo de saturación y el tiempo de residencia en el estado enlazado ($\tau_{\text{sat}}/\tau_{\text{res}}$). Este último parámetro es inversamente proporcional a la constante de rapidez de disociación, off-rate, k_{off} , por lo que la proporcionalidad quedaría como: $\tau_{\text{sat}} \cdot k_{\text{off}}$. Esta simple relación nos indicaría que cuanto menor sea la afinidad intrínseca del sistema proteína-ligando que estemos estudiando (mayor k_{off}), mayor sería la acumulación de ligando saturado en disolución. Sin embargo, ya hemos visto que la relajación de los protones del ligando en el estado libre hace que dicha linealidad se vaya perdiendo a medida que aumenta el tiempo de saturación, de forma que al final se alcanza un estado estacionario en la acumulación de ligando saturado en disolución (véanse figuras 2 y 3). Por otro lado, a menor afinidad, menor será también el tiempo de residencia en el estado enlazado ($1/k_{\text{off}}$), lo que hará que la cantidad de transferencia de magnetización por efecto NOE intermolecular sea también proporcionalmente menor. Es decir, para una interacción muy débil, aumentos en el tiempo de saturación acumularán *mucho* ligando saturado, pero con *poca* saturación; por el contrario, para interacciones más fuertes, aumentos en el tiempo de saturación acumularán *poco* ligando, pero con *mucha* saturación. El límite de afinidad lo daría aquella k_{off} que lleva a un tiempo de residencia en el estado enlazado mucho mayor que los tiempos de relajación del ligando, por lo que sus protones relajarían antes de poderse acumular en disolución.

Así pues, las intensidades de STD resultantes están relacionadas con la “*acumulación de saturación en el seno de la disolución*”, que depende sensiblemente del tiempo de saturación y del tiempo de residencia en el estado enlazado. En una titulación, al aumentar la concentración de ligando, manteniendo constante la de proteína, el valor STD-AF aumenta, como consecuencia del aumento en la fracción de proteína enlazada. Sin embargo, para que la curva STD-AF (frente a la concentración de ligando) represente de forma precisa la isoterma de asociación, los aumentos de STD-AF con la concentración de ligando deben ser proporcionales *exclusivamente* a los incrementos en la fracción de proteína enlazada, y no estar afectada por ningún otro factor. Sin embargo, como se ha demostrado (figura 7 y tabla 3), cuanto mayor sea la fracción de ligando enlazado durante la titulación, tanto mayor será la desviación en la K_D medida, tanto con el tiempo de saturación como con la intensidad STD. Este hecho nos está indicando que fracciones de ligando enlazado grandes pueden afectar significativamente a la capacidad de acumular saturación del ligando en el seno de la disolución con el tiempo de saturación.

Un aspecto clave que hasta ahora no se ha considerado es que un ciclo completo de asociación-disociación-asociación va a venir caracterizado no sólo por el tiempo de residencia en el estado enlazado, τ_{res}^B , sino también por el tiempo de residencia característico del ligando en el estado libre, τ_{res}^F . Si bien el primero depende exclusivamente de la afinidad de la interacción ($1/k_{off}$), el segundo es inversamente proporcional a la concentración de proteína no enlazada ($1/(k_{on} \cdot [P])$). Puesto que la curva de asociación ligando-proteína tipo Langmuir sigue una expresión de una rama de hipérbola, la concentración de proteína no enlazada sólo alcanzaría el valor nulo para una concentración teóricamente infinita de ligando (es decir para una fracción nula de ligando enlazado), por lo que el tiempo de residencia del ligando en el estado libre es siempre un número finito, y que además puede ser considerablemente pequeño si la concentración de proteína no enlazada en la muestra es suficientemente grande. Dicho de otra forma, cuanto mayor sea la fracción de ligando enlazado, para una concentración de proteína total fija, mayor será a su vez $[P]$, y por tanto menor será el tiempo de residencia en el estado libre del ligando.

De esta forma, se puede ver que el tiempo de residencia del ligando en el estado libre es, de hecho, inversamente proporcional a la fracción de ligando enlazado en la muestra. Es decir, se podría intuir que el efecto de la fracción de ligando enlazado sobre la determinación de K_D por STD NMR, observado en nuestros experimentos, está relacionado con el tiempo característico del ciclo de asociación-disociación-asociación del ligando en la muestra. A partir de ahora, a este ciclo lo denominaremos simplemente como “ciclo de reasociación” del ligando. Fracciones de ligando enlazado altas van a llevar, pues, a tiempos de reasociación cortos; si estos tiempos de reasociación son menores que los tiempos de relajación longitudinal (T_1) selectivos de los protones del ligando, ya no sería válido el esquema presentado anteriormente en la figura 2. En

dicho esquema se asumía que el ligando se encontraba en el estado libre, después de la interacción con la proteína, el tiempo suficiente como para que todos sus protones relajasen y alcanzasen el estado de equilibrio, de nuevo, antes de reasociarse a la proteína. Sin embargo, si el tiempo de residencia del ligando en el estado libre es muy corto (en comparación con los tiempos de relajación), el esquema del ciclo de reasociación sería el representado en la figura 8.

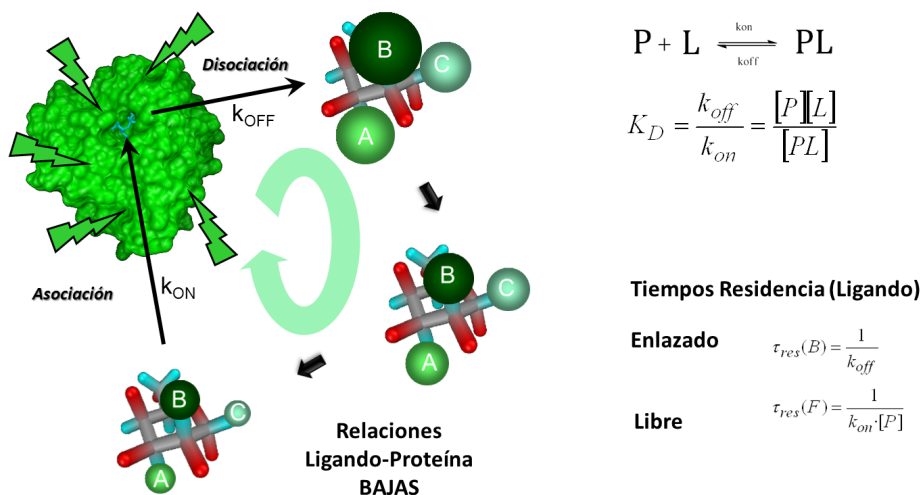


Fig. 8: Representación esquemática de un ciclo de “reasociación” de una molécula de ligando, cuando el tiempo de residencia en el estado libre es inferior a los tiempos característicos de relajación de los protones de las moléculas de ligando. Las cantidades de saturación transferidas se corresponden con el tamaño de las esferas de color verde sobre los protones A, B, y C. Como se indica, cuando el ligando entra de nuevo en el sitio de reconocimiento de la proteína, las poblaciones de los niveles de sus protones no se corresponden con las de equilibrio (el ligando está todavía perturbado por la etapa de asociación que ocurrió previamente). Dicho ligando reducirá su “capacidad” de recibir magnetización por NOE intermolecular en el estado enlazado a la proteína, lo que, en suma, llevará a una reducción significativa de la acumulación de saturación en el seno de la disolución (compárese con la figura 2).

En estas condiciones, las moléculas de ligando que se reasocian a la proteína, tras una etapa de asociación previa, entran en el sitio de reconocimiento con parte de la saturación previamente recibida, que no ha desaparecido completamente en el estado libre. Así, la cantidad de magnetización (saturación) que se puede transferir durante el tiempo de residencia en el estado enlazado es menor que en el caso en el que el ligando partiese de intensidades de protón de equilibrio¹¹ (situación que se representó en la figura 2). De acuerdo con este análisis, en una muestra donde tenga lugar dicho proceso de reasociación rápido, habrá una reducción de las intensidades de las señales de STD de los protones del ligando (se reducirá la acumulación de saturación en el seno de la disolución), proporcional al grado de reasociación, en comparación con una muestra en la que no haya este proceso de reasociación. Esto se representa en la figura 9, donde se muestran curvas teóricas que pretenden además ilustrar el hecho de que cuanto mayor sea el tiempo de saturación, mayor será el ligando saturado

acumulado en disolución, y por lo tanto mayor será también el efecto de la reasociación. Gráficamente, el efecto de la reasociación rápida del ligando en la escala de relajación se puede describir como una mayor rapidez en alcanzar el *plateau* de la curva de crecimiento del STD, por lo que se podría asimilar *formalmente* a una disminución del tiempo de relajación del protón considerado.

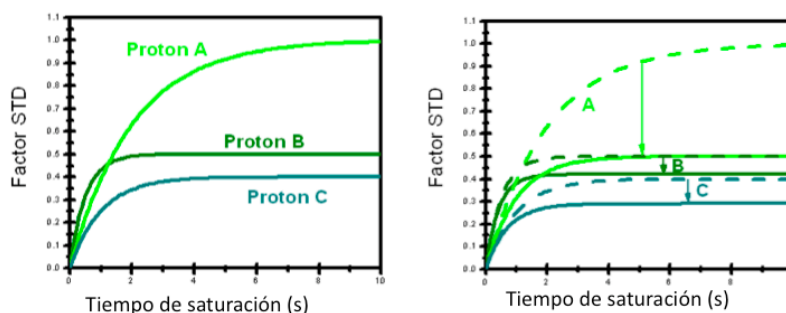


Fig. 9: Curvas de crecimiento de STD-AF teóricas en condiciones de baja fracción de ligando enlazado (izquierda), y de alta fracción de éste (derecha). En estas últimas curvas se indican las disminuciones que se producirían en los valores de STD-AF debido a la reasociación rápida del ligando en la escala de relajación de las magnetizaciones de la molécula pequeña.

Supongamos que hiciésemos dos titulaciones de un mismo sistema ligando-proteína en condiciones significativamente diferentes de fracciones de ligando enlazado (tal y como se hizo en el caso L-Trp/BSA), una sin efecto de la reasociación rápida (fracción de ligando enlazado baja), y otra con un importante efecto de ésta (fracción alta). Si consideramos una determinada concentración de ligando correspondiente a las etapas iniciales de las dos titulaciones (que se corresponden con las etapas de la titulación de mayores fracciones de ligando enlazado), si registrásemos curvas de crecimiento STD, las situaciones serían similares a las representadas en la figura 9. Ahora bien, si estuviésemos construyendo las isotermas de asociación, digamos que a un t_{sat} de 4 s (figura 9), por ejemplo, lo que ocurriría es que en el caso en el que hay reasociación rápida, los valores de STD-AF estarían subestimados, y serían inferiores a los que se obtendrían en ausencia de reasociación. De esta forma, como el efecto es mucho mayor para dichas primeras etapas de la titulación, lo que se observaría es que la curva de asociación crecería de forma más lenta. Además, como la cantidad de saturación residual de un determinado protón del ligando durante las etapas de reasociación dependerá de la intensidad STD original, esto es, cuanto mayor sea la transferencia de saturación inicial (STD intenso), tanto mayor será el efecto de la reasociación, lo que se representa en la figura 9 derecha, donde la disminución de STD-AF es considerablemente mayor para el protón A, que para el resto de protones (B y C). Esto explica la dependencia observada en las determinaciones de K_D con el protón del ligando elegido. Protones con STDs intensos, y protones con tiempos de relajación largos son los que estarán más afectados por los efectos de la reasociación rápida. Por otro lado, como al aumentar el tiempo de saturación, en condiciones de fracciones altas de

ligando enlazado, aumenta el efecto de la reasociación (figura 9, derecha), la disminución del crecimiento inicial de la curva de asociación será tanto más acusada cuanto mayor sea el tiempo de saturación. Esto está representado en las curvas teóricas de la figura 10.

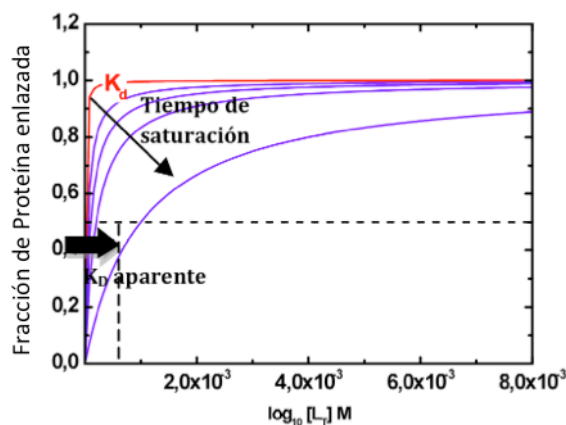


Fig. 10: Efecto de la reasociación rápida del ligando en la escala de tiempos de relajación. En rojo se representa la isoterma de asociación "termodinámica". Las curvas azules se corresponden con isothermas teóricas a partir de valores de STD-AF procedentes de una titulación seguida por STD NMR, con diferentes tiempos de saturación. Al aumentar dicho tiempo de saturación aumenta el efecto de la reasociación de ligando saturado, y el efecto de subestimación de los valores STD-AF en las etapas iniciales es considerablemente mayor, lo que, finalmente lleva a una medida de K_D superior a la "termodinámica" (se corresponde con la concentración de ligando para un 50 % de proteína enlazada; línea vertical de puntos).

A partir de las ecuaciones de asociación ligando-proteína es bastante sencillo hacer una estimación de los valores de tiempos característicos de residencia en los estados enlazado y libre (τ_{res}^B y τ_{res}^F) de un ligando cualquiera en condiciones típicamente encontradas en los experimentos de STD NMR estándar. Así, en la tabla 5 se recogen los valores para 2 concentraciones de ligando, cuatro concentraciones de proteína, y cinco constantes de disociación diferentes, todos valores que pueden considerarse razonables en muestras típicas para espectroscopía STD NMR. Excepto en la primera entrada de la tabla (K_D 1 μM , proteína 1 μM , y ligando 1 mM), en todos los casos los valores de τ_{res}^F son inferiores a los valores típicos de relajación longitudinal de protón de molécula pequeña (escala de segundos). Es decir, de forma general, podemos afirmar que en las condiciones estándar de STD NMR, en la gran mayoría de las ocasiones, las medidas van a estar afectadas por los efectos de la reasociación del ligando rápida en la escala de relajación.

El grado de influencia sobre los valores de STD-AF del ligando no va a venir dado exclusivamente por el tiempo de residencia en el estado libre, sino que, toda vez que dicho tiempo sea menor que los tiempos de relajación de protón característicos del ligando, las influencias serán tanto mayores cuanto mayor sea el tiempo de residencia en el estado enlazado, τ_{res}^B , ya que para un τ_{res}^F constante, cuanto mayor sea τ_{res}^B mayor será la

transferencia de saturación por NOE intermolecular y, por tanto, mayor será la saturación residual con la que el ligando se reasociará a la proteína. Esto predice, tal y como se observa experimentalmente, que cuanto mayor sea la afinidad intrínseca del sistema bajo estudio, mayor serán las desviaciones en las medidas. Al mismo tiempo, cuanto más próximos estén los protones del ligando a los protones de la proteína (protones con los STDs más intensos), mayor será la transferencia de saturación por efecto NOE intermolecular, lo que explica las mayores desviaciones en las medidas para dichos protones del ligando.

Tabla 5. Estimaciones de tiempos característicos de residencia de un ligando (en ms) en los estados enlazado (τ^B_{res}) y libre (τ^F_{res}) para dos concentraciones diferentes de ligando y cinco valores diferentes de la constante de disociación (K_D). Se han supuesto valores típicamente encontrados en experimentos de STD NMR.

[L]_T 1 mM										
Constante de disociación K_D (μM)										
1 10 100 1000 10000										
Tiempos característicos de residencia (ms)										
[P]_T (μM)	(a)									
1	10	10000	1	1009	0.1	110	0.01	20.0	0.001	11.0
10		991		100		11		2.0		1.1
50		190		19		2		0.4		0.2
100		90		9		1		0.2		0.1
[L]_T 0.1 mM										
Constante de disociación K_D (μM)										
1 10 100 1000 10000										
Tiempos característicos de residencia (ms)										
[P]_T (μM)										
1	10	1000	1	109	0.1	20	0.01	11	0.001	10
10		91		10		2		1		1
50		10		1		0.4		0.2		0.2
100		1		0.4		0.2		0.1		0.1

(a) se asumió una etapa de asociación (*on-rate*) controlada por la difusión ($k_{on} = 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). τ^B_{res} viene dado por $1/k_{off}$ y τ^F_{res} por $1/(k_{on}\cdot[P])$, donde [P] (concentración de proteína libre) se calculó a partir de las concentraciones totales de ligando y proteína ($[L]_T$ y $[P]_T$) mediante las ecuaciones de equilibrio químico de una interacción proteína-ligando de “un solo sitio de reconocimiento”.

Así, de forma genérica, podemos afirmar que los valores de K_D se verán tanto más afectados cuanto mayor sea el tiempo de residencia en el estado enlazado (τ^B_{res}) en comparación con el

tiempo total del ciclo de reasociación ($\tau_{res}^F + \tau_{res}^B$). Esto explica perfectamente la dependencia de las medidas con la fracción de ligando enlazado, de hecho, dicha fracción ($[PL]/[L_T]$) se puede expresar matemáticamente como:

$$f_{L_B} = \frac{[PL]}{[L]_T} = \frac{\tau_{res}^B}{\tau_{res}^B + \tau_{res}^F}$$

Como ejemplo, en la tabla 5 se han marcado algunas condiciones concretas, para reflejar lo comentado anteriormente. Se corresponden con tres condiciones experimentales para las que, teóricamente, el ligando presentaría el mismo tiempo de residencia en el estado libre (2 ms). Sin embargo, en el primer caso (50 μ M proteína, 1 mM ligando, K_D 100 μ M), el tiempo de residencia en el estado enlazado sería 10 veces mayor que en el segundo caso (10 μ M proteína, 1 mM ligando, K_D 1 mM). Así, el efecto de la reasociación rápida del ligando será mucho mayor en el primer caso, que presentará una fracción de ligando enlazado mucho mayor, a pesar de que el ligando relaja durante el mismo tiempo en el estado libre. En el tercer caso (10 μ M proteína, 100 μ M ligando, K_D 100 μ M), a pesar de las diferentes condiciones, presentará un efecto similar debido a la reasociación, ya que presentará tanto τ_{res}^B como τ_{res}^F iguales, y por lo tanto la fracción de ligando enlazado será la misma.

Todo lo anterior explica el incremento en la K_D aparente observado cuando se incrementó la concentración total de proteína (BSA), manteniendo la misma concentración de ligando (L-Trp) (Tablas 2 y 3). La mayor K_D determinada para la muestra que contenía 60 μ M de BSA, comparada con la muestra menos concentrada (20 μ M de BSA), mostró una fuerte reducción en los STDs macroscópicos en las partes iniciales de la isotermas (figura 7), en las que, a consecuencia de las mayores fracciones de ligando enlazado, hay más probabilidad de que ocurran procesos de reasociación rápidos.

Además, considerando la intensidad de las señales, aquellos protones del ligando con mayor intensidad de STD serán los que dejen el sitio de reconocimiento de la proteína con las poblaciones de espín mayormente perturbadas. Bajo condiciones de rápida reasociación del ligando, los consiguientes procesos de asociación añadirán significativamente menos saturación a esas señales del ligando que en los sucesos previos de asociación, dejando proporcionalmente mayores reducciones en los STDs macroscópicos comparados con aquellos protones del ligando con menores intensidades de STD.¹¹ Esto fue observado en el caso de la interacción del L-Trp con la BSA (figuras 6 y 7) en ambas muestras (20 y 60 μ M de BSA).

Los procesos rápidos de reasociación no empezarán a tener un efecto significativo sobre la acumulación de saturación en disolución hasta que el número de ligandos saturados sea lo suficientemente alto en el seno de la disolución como para que se haga probable el encuentro proteína/“ligando-saturado”. Este número es proporcional al tiempo de saturación del experimento STD NMR y a la constante de disociación intrínseca (k_{off}) de la interacción

proteína-ligando bajo estudio. Incrementando el tiempo de saturación se amplificará el número de moléculas de ligandos saturadas. Esta es la razón de la subestimación generalizada de la afinidad al incrementar el tiempo de saturación en todos los sistemas proteína-ligando estudiados en este capítulo (figura 2 dcha., y tablas 1, 2, 3 y 4).

Los estudios llevados a cabo en la presente tesis doctoral demuestran que la K_D determinada a partir de las titulaciones de STD NMR basadas en los valores del STD-AF depende de los tiempos de saturación, la concentración del receptor, y la intensidad de la señal monitorizada. Desafortunadamente, cualquier intento de optimización de estas condiciones, para minimizar los efectos sobre la K_D (por ejemplo, usar tiempos de saturación cortos y mínimas fracciones de ligando enlazado), dejaría muy probablemente en serio compromiso la relación señal-ruido del experimento, aumentando, en este sentido, los errores en la medida de la afinidad.

2.3. Isotermas de afinidad a partir de las pendientes iniciales de las curvas de crecimiento de los factores de amplificación de STD

Como se ha mencionado con anterioridad, se ha encontrado una clara correlación entre el tiempo de saturación y los efectos anteriormente mencionados en la determinación de las constantes de disociación por STD NMR; los valores más próximos al termodinámico se consiguen con tiempos de saturación lo suficientemente cortos como para obtener una señal observable, e integrable. Esta correlación sugiere que tales desviaciones están relacionadas con los procesos de reasociación rápida del ligando que, por lo tanto, juegan un papel fundamental en las incertidumbres de la determinación de la afinidad por titulaciones de STD NMR.

Si estos procesos de reasociación son los causantes de dichas desviaciones en las determinaciones experimentales de K_D por STD NMR, sus efectos deberían ser mínimos o nulos en el límite de tiempo de saturación cero, donde ningún ligando podría reasociarse con el receptor (de hecho, no habría posibilidad de acumulación de saturación en el seno de la disolución). Así, todas las isotermas derivadas de los STD-AF serían esencialmente independientes de las condiciones experimentales (sólo de la fracción de proteína enlazada), y la “verdadera” K_D se extraería a partir del análisis matemático de cualquiera de ellas.

A tiempos de saturación próximos a cero, los problemas prácticos son claros: (i) no hay acumulación de ligando saturado en disolución, por lo que las señales STD son prácticamente nulas, y, (ii) para tiempos típicamente por debajo de 200 – 300 ms la radiofrecuencia de saturación de la proteína se ha aplicado durante un tiempo tan corto que prácticamente no hay difusión de espín dentro de ésta, por lo que la cantidad de saturación global en el receptor es prácticamente nula también. Aunque a tiempo de saturación exactamente cero, las

intensidades de STD son todas nulas, sí podemos determinar a dicho tiempo la velocidad de crecimiento del STD (pendiente inicial). Si bien las pendientes iniciales de curvas de crecimiento de valores STD-AF no representan, estrictamente hablando, “factores de amplificación” de STD (dimensionalmente se corresponderían con frecuencias, en unidades de Hz), contienen exactamente la misma información sobre la fracción de ligando enlazado que los valores de STD-AF a cualquier tiempo de saturación, pero con la ventaja de que se han eliminado todas las contribuciones de reasociaciones rápidas del ligando en presencia de tiempos de relajación largos. Es por esto que si monitorizamos las pendientes iniciales de las curvas de crecimiento STD-AF (las denominaremos STD-AF₀) en función de la concentración de ligando, obtendremos isothermas en las que estarán contenidas las informaciones de las fracciones de proteína enlazada (aunque multiplicadas por algún factor), de las se podrán extraer las constantes de disociación mediante ajuste a una ecuación de Langmuir, con independencia del protón del ligando considerado, así como del resto de condiciones experimentales.

La determinación de las pendientes iniciales de las curvas de crecimiento de los STD-AF se puede realizar ajustando la curva experimental completa a una función matemática apropiada para, después, extrapolarla al límite de tiempo de saturación cero. Como se vio en el capítulo anterior, tanto la teoría de la matriz de relajación,^{12b} como evidencias experimentales,⁴ han demostrado que el crecimiento de las intensidades de STD con el tiempo de saturación puede ser descrito de forma apropiada mediante una ecuación mono-exponencial asintótica:

$$STD(t) = STD_{\max} (1 - \exp(-k_{\text{sat}} \cdot t_{\text{sat}}))$$

donde STD_{max} representa el máximo valor de STD alcanzable para un protón dado y k_{sat} es la constante de saturación (es proporcional a la velocidad con la que se alcanza el *plateau* en la curva de saturación y está relacionado con la relajación longitudinal selectiva promediada entre los estados libre y enlazado, aunque también puede estar influenciada por la reasociación). La pendiente inicial es fácilmente obtenida por el producto de estos dos factores (STD_{max} · k_{sat}).

La aproximación propuesta supuso, pues, la determinación de una curva de crecimiento por cada concentración de ligando, y la determinación de la correspondiente pendiente inicial mediante el ajuste matemático anterior, valor que se monitorizó en función de la concentración de ligando añadido. Dicha aproximación se aplicó a las interacciones quitobiosa/WGA, y L-Trp/BSA (figura 11). En ambos casos, las isothermas construidas con el nuevo protocolo (curvas negras) convergen a los valores de K_D recogidos en la literatura (curvas punteadas). Es más, todas las desviaciones dependientes de los protones en el protocolo clásico STD NMR (curvas grises) son canceladas y las isothermas resultantes convergen al mismo comportamiento (ver el caso del L-Trp, figura 11, inferior). Estos resultados demuestran que las medidas de afinidad a

partir de las pendientes iniciales de los STD-AF resultan independientes del protón considerado o de las condiciones experimentales.

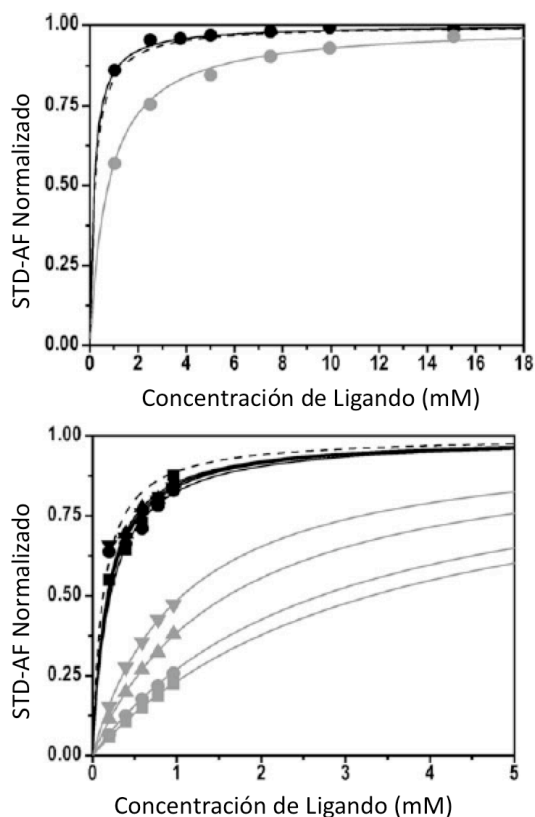


Fig. 11: Isotermas de asociación a partir de la aproximación de las pendientes iniciales de los STD-AF. Las curvas color negro muestran las isotermas resultantes de la aproximación de las pendientes iniciales de STD-AF de: (superior) protones metálicos de la quitobiosa (●) en la interacción con WGA (46 μM); (inferior) diferentes protones del L-triptófano (■ H ζ 2, ▲ H δ 1, ● H ϵ 3, ▼ H α) en la interacción con BSA (60 μM). Las curvas discontinuas representan las isotermas matemáticas utilizando la ecuación de Langmuir con valores de K_D tomados de la literatura. También, para resaltar los beneficios de la aproximación propuesta, las isotermas de asociación obtenidas de los valores de STD-AF mediante la aproximación clásica de experimentos de titulaciones, utilizando un tiempo de saturación de 4 s, han sido incluidas (curvas grises). Los símbolos representan datos experimentales mientras que las líneas representan ajustes matemáticos.

Las constantes de disociación se determinaron para todos los sistemas proteína-ligando anteriormente estudiados siguiendo el protocolo propuesto (Tabla 6). Como era de esperar, según los factores que se han discutido con anterioridad, los valores de las constantes de disociación estimados a partir del crecimiento inicial de los valores de STD-AF con el tiempo de saturación (Tablas 1-4) convergen en un único valor (un mínimo) en el límite de tiempo de saturación cero. Este valor determinado a partir del STD-AF₀ (Tabla 6), equivale a la K_D en el límite de tiempo de saturación cero, y hay que resaltar que es comparable en todos los casos a los valores de referencia (Tabla 6). En este sentido, para la interacción de los ligandos de la WGA, el protocolo permitió la determinación de valores de la K_D en perfecto acuerdo con los valores publicados en la literatura: 2.4 mM para la GlcNAc y 170-200 μM para la quitobiosa.

Esto significa un aumento en la precisión con respecto al método estándar de las titulaciones de STD NMR, particularmente en el caso de los ligandos muy afines (como es la quitobiosa en este caso, compárese con Tabla 1).

Tabla 6: Constantes de disociación calculadas a partir de los valores de las pendientes iniciales de los STD-AF para los sistemas proteína-ligando estudiados en este capítulo.

Sistema Ligando-Proteína	K_D (a partir de STD-AF ₀)		K_D publicada	
WGA + GlcNAc	2.4 ± 0.3 mM		2.5 ± 0.15 mM ^[a]	
WGA + GlcNAcβ1,4GlcNAc	[WGA] 46 μM	170 ± 20 μM	200 ± 10 μM ^[a]	
	[WGA] 18 μM	200 ± 10 μM		
BSA + L-Trp	[BSA] 60 μM	Protón Hζ2	190 ± 50 μM	125 ± 60 μM ^[b]
		Protón Hδ1	170 ± 50 μM	230 ± 90 μM ^[b]
		Protón Hδ3	210 ± 50 μM	
		Protón Ha	180 ± 60 μM	
		<u>Media</u>	<u>190 ± 20 μM</u>	
	[BSA] 20 μM	Protón Hζ2	210 ± 50 μM	
		Protón Hδ1	200 ± 20 μM	
		Protón Hδ3	220 ± 50 μM	
		Protón Ha	110 ± 60 μM	
		<u>Media</u>	<u>185 ± 20 μM</u>	

[a] Referencia 9

[b] Referencia 10

En los casos donde el mismo sistema fue medido utilizando señales de diferentes protones o varias concentraciones de proteína, la aplicación de la aproximación de las isothermas construidas a partir de las pendientes iniciales llevó a resultados que convergían en un mismo valor, dentro del error experimental de la técnica. Así, por ejemplo, para la asociación del L-Trp con la BSA, los valores de K_D calculados para los cuatro protones están en el rango de 180-220

μM , lo cual significa que los factores que interferían en el cálculo de la K_D en función del protón monitorizado han sido esencialmente eliminados (compárese con Tablas 2 y 3). Asimismo, los efectos de la concentración de proteína también son eliminados (ver Tabla 5, entradas para 60 y 20 μM de BSA).

La mejora en la determinación de la afinidad mediante el nuevo protocolo es evidente: todos los valores están dentro del promedio con la consiguiente desviación estándar (11 % para la muestra de 60 μM de BSA, promedio 190 μM , y 27 % para la muestra de 20 μM de BSA, promedio 185 μM). Por otra parte, estos valores de la desviación dan una imagen de la precisión propia de la espectroscopía STD NMR para la determinación de la afinidad de complejos proteína-ligando. El mayor error en la muestra que contiene menor cantidad de BSA se puede atribuir a la menor relación señal-ruido de la muestra.

La constante de disociación de la interacción entre el L-Trp y la BSA obtenida por el protocolo aquí descrito es ligeramente superior a la descrita mediante la técnica de las medidas de anchos de líneas por RMN.¹⁰ Sin embargo, es cercana a las medidas realizadas para la misma muestra mediante la técnica de RMN de WaterLOGSY ($K_D = 230 \mu\text{M}$).⁹ Esta incertidumbre en la determinación de la afinidad en el sistema BSA-ligando parece ser una característica particular en la interacción de las moléculas pequeñas con albúminas ya que éstas últimas, adicionalmente al sitio de reconocimiento selectivo, tienen un sitio de reconocimiento menos específico, pero que puede ser accesible al ligando a altas concentraciones (de hecho, este sitio fue detectado por nuestros experimentos en concentraciones superior a 1 mM de ligando, donde la interacción se vuelve inespecífica).

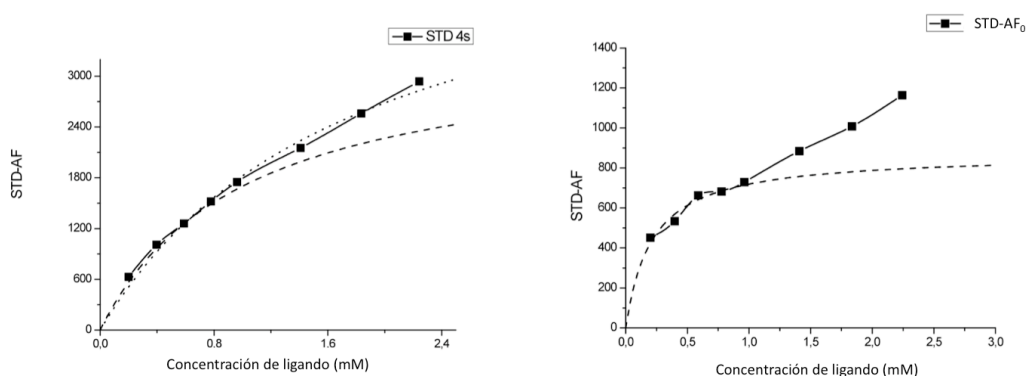


Fig. 12: Isotermas de asociación del aminoácido L-triptófano a la albúmina BSA (20 μM) a partir de valores STD-AF del protón H ζ 2 del ligando: (izquierda) siguiendo el valor STD-AF a un tiempo de saturación de 4 s, y, (derecha) siguiendo la aproximación de las pendientes iniciales de crecimiento de STD-AF, a cada concentración de ligando. Los símbolos representan los valores experimentales, mientras que la línea de guiones la correspondiente curva de Langmuir con el valor de K_D determinado experimentalmente (ver tablas 2 y 5). En la figura de la derecha se puede observar una clara desviación de la especificidad para concentraciones por encima de 1 mM de ligando. En la figura de la izquierda, se muestra una hipotética curva de Langmuir que podría ajustar relativamente bien (línea de puntos) a una interacción más débil, si se ajustasen todas las concentraciones de ligando.

En particular, para este sistema ligando-proteína concreto, la aproximación de pendientes iniciales demostró también ser mucho más apropiada para caracterizar interacciones inespecíficas del ligando a concentraciones relativamente altas. En la figura 12 se muestra cómo una isoterma de STD-AF siguiendo una titulación estándar de STD NMR a 4 s de tiempo de saturación, podría originar una curva que se ajustase relativamente bien a un modelo de un sitio tipo Langmuir, que llevara a una constante de disociación exageradamente aumentada (afinidad muy subestimada). Por el contrario, para el mismo sistema, cuando se monitorizan las pendientes iniciales (figura 12, derecha), el ajuste a un modelo de un sitio tipo Langmuir sólo puede llevarse a cabo si se descartan todos los puntos de STD-AF₀ para concentraciones por debajo de 1 mM. De hecho, la simple inspección de la curva delata la desviación de la especificidad a partir de dicha concentración.

Nuestros resultados han demostrado que la constante de disociación (K_D) puede obtenerse por STD NMR con una precisión muy aceptable, para cualquier sistema proteína-ligando, siguiendo el protocolo descrito. Por el contrario, las titulaciones clásicas de STD NMR de un ligando dado, dan valores de afinidad que pueden ser hasta de un orden de magnitud mayor que el valor termodinámico real; por ejemplo, el L-Trp puede ser considerado un ligando milimolar ($K_D^{\text{ap}} = 3.3 \text{ mM}$), monitorizando la señal del protón H ζ 2 (señal STD más sensible), en la muestra con 60 μM de BSA usando los valores de STD NMR a 4 s de tiempo de saturación. Hasta donde sabemos, este trabajo supone también la primera confirmación experimental de que la constante de disociación obtenida por experimentos STD NMR, en condiciones estándar, va a constituir en todo caso una “cota superior” de la constante termodinámica. Esto es interesante, puesto que si una determinada afinidad mostrada por un ligando en condiciones estándar de STD NMR (sin el protocolo de las pendientes iniciales) es suficiente como para continuar, por ejemplo, un estudio de optimización estructural de un determinado ligando, dicha determinación será útil, mientras que si esta afinidad es inferior a la mínima deseada, entonces el problema podría ser que se descartase un determinado ligando de forma errónea, como consecuencia de una subestimación de la afinidad por los factores descritos en este capítulo. Además, para ligandos con protones que tengan una relajación muy lenta, como la mayoría de los presentes en residuos aromáticos, que suelen aparecer con frecuencia en esqueletos moleculares de moléculas candidatas a fármacos en las etapas iniciales de desarrollo de las industrias farmacéuticas, todos los factores aquí descritos tendrán mayores consecuencias si se utiliza el protocolo clásico de titulaciones de STD NMR. Sin embargo, si se utiliza el protocolo de las pendientes iniciales, el valor de K_D obtenido será independiente del protón monitorizado (Tabla 6), representando la mejor aproximación al valor termodinámico que podremos obtener por STD NMR y, permitiendo usar condiciones experimentales que aumentan la sensibilidad y reduzcan el tiempo experimental, sin compromiso añadido en la precisión de la medida de la afinidad.

2.4. Determinación de la afinidad de las interacciones 2G12/oligomanósidos mediante la aproximación de las pendientes iniciales de los factores de amplificación de STD

Una vez establecido el protocolo de las pendientes iniciales de los factores de amplificación del STD para la determinación de las constantes de afinidad, y demostrado que funciona apropiadamente para sistemas que previamente habían sido ampliamente estudiados y descritos en la literatura, se decidió aplicar esta aproximación al sistema objeto de estudio en la presente tesis doctoral: la interacción del anticuerpo anti-HIV-1 2G12 con los oligomanósidos derivados de los glicanos tipo *high-mannose* presentes en la glicoproteína de la envoltura viral gp120.

En este caso, se prepararon muestras entre 35 y 40 μM en anticuerpo, y la concentración de cada ligando se varió entre 1 y 8 mM. Tanto las secuencias de pulsos como los tiempos de saturación usados fueron los mismos que en los estudios descritos en el capítulo anterior.

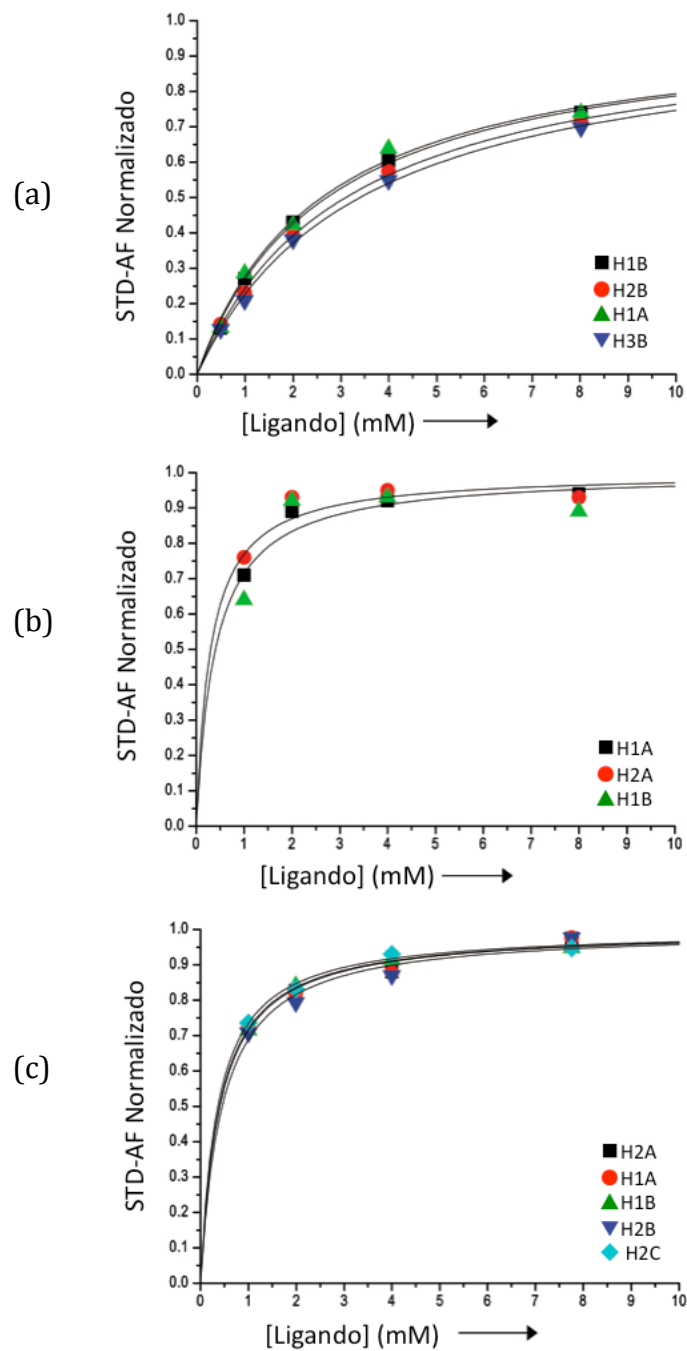


Fig. 13: Isotermas de asociación de (a) di-, (b) tri-, y (c) tetramanósido con el anticuerpo 2G12, monitorizando las pendientes iniciales de crecimiento de STD-AF, a cada concentración de ligando, de diferentes protones de los ligandos. En los tres casos la convergencia de las isotermas de diferentes protones fue excelente.

En la figura 13 se muestran las isotermas de STD-AF₀ obtenidas para los oligosacáridos lineales (di-, tri-, y tetramanósido). En la figura 14, se muestran las correspondientes a los dos oligosacáridos ramificados (penta- y heptamanósido). Un aspecto interesante de estas curvas es que, efectivamente, se pudo comprobar la independencia de las medidas de afinidad con el tipo de protón del ligando seleccionado para construir la isoterma experimental; excepto en el

caso de los protones del heptamanósido (figura 14b). En este caso particular, las isothermas construidas a partir de protones de la rama “natural” (tipo-D1) convergen muy bien, originando un solo valor de la constante de disociación; sin embargo, aquellas curvas de asociación construidas con protones de la otra rama (no-natural), originan curvas que se desviaron mucho de las anteriores, y que convergían mal entre ellas mismas. La justificación de este comportamiento se basa en dos hechos experimentales: (i) la baja relación señal ruido de las intensidades de STD de protones de dicha rama, y, (ii) la probable presencia de contactos inespecíficos de dicha rama con la proteína, tal y como se pudo deducir de los estudios recogidos en el capítulo anterior. En cierta medida, esta observación se puede considerar como una corroboración de la presencia de dichos contactos inespecíficos en la interacción del heptamanósido con el anticuerpo.

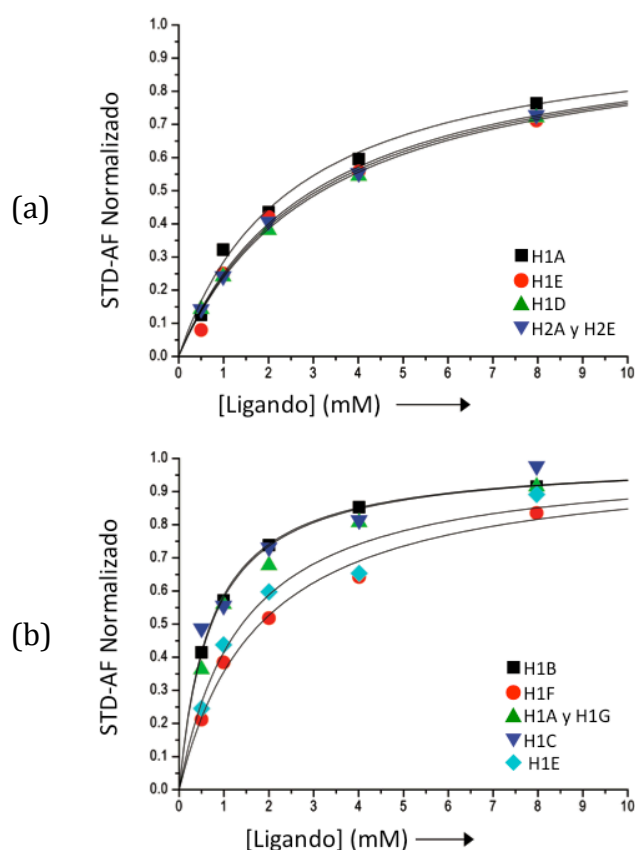


Fig. 14: Isothermas de asociación de penta- y heptamanósido con el anticuerpo 2G12, monitorizando las pendientes iniciales de crecimiento de STD-AF, a cada concentración de ligando, de diferentes protones de los ligandos. Sólo en el caso del pentamanósido hubo una convergencia muy buena de todas las isothermas de diferentes protones; para el heptamanósido dicha convergencia sólo se observó en las isothermas de los protones pertenecientes a la rama natural tipo-D1.

A partir de estas isothermas experimentales, se obtuvieron las afinidades de los cinco ligandos (tabla 7), información muy útil en el diseño de agentes antigénicos con el objetivo de inducir la generación de anticuerpos tipo 2G12 en el organismo.

Tabla 7: Afinidades de los oligomanósidos estudiados, determinadas haciendo uso de la aproximación de las pendientes iniciales de las curvas de crecimiento de los valores de STD-AF.

Ligando	K_D (mM)
diManósido	2.9 ± 0.2
triManósido	0.4 ± 0.1
tetraManósido	0.4 ± 0.1
pentaManósido	3.0 ± 0.2
heptaManósido	0.80 ± 0.08

Como se puede observar, el anticuerpo 2G12 presenta mayor afinidad por los ligandos lineales tri- y tetramanósido. Esto parece indicar que el residuo de manosa terminal del extremo reductor en el tetramanósido (unido por un enlace glicosídico α 1,3) no aporta nada en la interacción. Como era de esperar respecto al dimanósido, podemos observar que su afinidad es la menor de entre los ligandos lineales. Es decir, aunque la estructura terminal $\text{Man}\alpha$ 1,2Man sea el epítipo fundamental para el reconocimiento de glicanos tipo *high-mannose* por el anticuerpo 2G12, la adición de un residuo de manosa a través del extremo reductor mediante un enlace glicosídico α 1,2 aumenta la afinidad hasta en un orden de magnitud. De hecho, en la estructura cristalográfica del complejo 2G12-tetramanósido, se observa cómo el tercer residuo de manosa presenta hasta tres enlaces de hidrógeno con la proteína (dos de ellos mediados por moléculas de agua).¹³

Por otro lado, interesantemente, respecto a los ligandos ramificados, en los que se esperaba un aumento en la afinidad debido a la disposición dual del epítipo reconocido por el anticuerpo (dos unidades tipo dimanósido en el pentamanósido y dos unidades tipo trimanósido en el heptamanósido), se obtuvo lo contrario: la afinidad del anticuerpo 2G12 por ambos ligandos ramificados era menor que por sus ramificaciones respectivas, cuando estos se encontraban como ligandos lineales.

En el caso del pentamanósido observamos una afinidad similar al dimanósido lineal, lo cual nos confirma los datos anteriormente obtenidos mediante RMN. A pesar de su duplicidad en cuanto a la presentación del epítipo básico para el anticuerpo 2G12 ($\text{Man}\alpha$ 1,2Man), en un determinado “evento” de asociación, el pentamanósido sólo puede interaccionar con una de sus ramificaciones, ya que la distancia máxima entre ambas ramificaciones (1.5 nm, aproximadamente, por modelización molecular) no es lo suficientemente amplia como para interaccionar con los dos sitios de reconocimientos primarios del anticuerpo (3.6 nm, aproximadamente, según la estructura de rayos X). Además, los dos motivos tipo dimanósidos

que presenta el pentamanósido en su estructura interaccionan con el anticuerpo de la misma forma, por lo que se puede decir que el pentamanósido presenta dos ramificaciones que se auto-inhiben, de ahí que la afinidad del anticuerpo para este ligando sea como si sólo tuviera una ramificación. En este caso, al ser un ligando con tan baja afinidad, el efecto de la posible reasociación estadística de un mismo ligando pero alternando las ramificaciones, contribuye muy poco o nada al incremento de la afinidad, por lo que parece inexistente. Es decir, el posible efecto multivalente del ligando por presentar en ambas ramificaciones el motivo estructural del dimanósido, parece ser nulo.

También se determinaron las afinidades de los oligosacáridos lineales sintéticos que representan las estructuras químicas de cada ramificación de penta- y heptamanósido. En el caso del pentamanósido, ambas ramificaciones mostraron, de forma aislada, una afinidad muy similar por el anticuerpo 2G12 (tabla 8), en perfecto acuerdo con las observaciones experimentales de STD NMR y experimentos de NOE transferido descritas en el capítulo anterior.

Tabla 8: Afinidades de los trimanósidos correspondientes a las ramificaciones del pentamanósido (D2, D3 y *corePenta*) determinadas por la aproximación de las pendientes iniciales de las curvas de crecimiento de los valores de STD-AF.

Ligando	K _D (mM)
Man α 1,2Man α 1,3Man α O(CH ₂)NH ₂ (tipo brazo D2)	3.0 \pm 1
Man α 1,2Man α 1,6Man α O(CH ₂)NH ₂ (tipo brazo D3)	3.8 \pm 0.3
Man α 1,3[Man α 1,6]Man α (<i>corePenta</i>)	3.0 \pm 0.5

Como puede observarse, las afinidades de las ramificaciones individuales están próximas a la del pentamanósido, confirmándose así que la posible multivalencia que podría tener el ligando ramificado es inexistente. Interesantemente, se puede observar como la ramificación tipo brazo D2, que en el epítipo del pentamanósido mantenía menos contactos próximos con el anticuerpo, parece ser la que mejor es reconocida por el anticuerpo. Este dato apunta a que cuando ambas ramificaciones están unidas, conformando el ligando ramificado pentamanósido, el anticuerpo muestra una ligera preferencia por el reconocimiento de la ramificación tipo brazo D3, como así se vio en el estudio del epítipo del ligando ramificado. Como ninguna de las uniones del dimanósido terminal (Man α 1,2Man) al residuo de manosa en el extremo reductor se corresponde con una unión α 1,2 (que es la que hemos visto anteriormente que confiere mayor afinidad), parece razonable que el enlace glicosídico α 1,6, más flexible que el α 1,3, ofrezca menos efectos estéricos que impidan un ajuste correcto del dimanósido terminal (extremo no-reductor) en el sitio de reconocimiento del anticuerpo.

Por el contrario, el caso del heptamanósido parece ser un caso que implica la termodinámica de cada ramificación para definir la afinidad de estas y del ligando completo. El heptamanósido no-natural, presenta en su estructura dos unidades tipo trimanósido lineal, una en cada ramificación. Como se ha demostrado con anterioridad, de entre los ligandos estudiados la estructura tipo trimanósido lineal es el ligando que preferentemente es reconocido por el anticuerpo 2G12, de ahí su alta afinidad. Sin embargo, en el caso particular del cálculo del epítipo del heptamanósido, se observó que la ramificación no natural, esto es la que presenta la unión interglucosídica $\alpha 1,6$ en el extremo reductor, prácticamente no establecía contactos con el anticuerpo o estos contactos eran no-específicos, por lo que su participación en el epítipo del heptamanósido era mínima. A partir de estos datos, se dedujo que el anticuerpo selecciona selectivamente la ramificación mimética del brazo D1 del *high-mannose* de la gp120 (la ramificación natural, que presenta un enlace glucosídico $\alpha 1,3$). Por todo ello, el valor de la K_D (0.8 mM) para el heptamanósido, obtenido por la aproximación de las pendientes iniciales de las curvas de crecimiento de los valores de STD-AF₀ con el ligando, está muy de acuerdo con los datos anteriormente apuntados.

Para llegar a una mayor comprensión de lo que ocurre en la interacción entre el 2G12 y la rama no-natural del heptamanósido, se estudió la afinidad del tetramanósido sintético que representa la estructura química de dicha rama. Se realizaron los mismos experimentos que en los casos anteriores y, usando la aproximación de las pendientes iniciales, se obtuvieron los valores que se describen en la tabla 9.

Tabla 9: Afinidades de las ramificaciones del heptamanósido en su interacción con el 2G12. Las afinidades fueron determinadas utilizando la aproximación de las pendientes iniciales de STD-AF.

Ligando	K_D (mM)
Tetramanósido	0.4 ± 0.1
Man $\alpha 1,2$ Man $\alpha 1,2$ Man $\alpha 1,6$ Man α O(CH ₂)NH ₂ (no-natural)	2.2 ± 0.3
Heptamanósido	0.8 ± 0.08

A partir de estos valores podemos confirmar lo que experimentalmente se observó en los experimentos de STD NMR, es decir, que el anticuerpo es capaz de diferenciar entre los dos tetramanósidos que formalmente componen el heptamanósido, y que solamente se diferencian en la unión del último residuo de manosa ($\alpha 1,3$ para el tetramanósido tipo D1 y $\alpha 1,6$ para el no-natural). Además, se confirma que la afinidad del ligando ramificado está entre las afinidades que presentan ambas ramificaciones por separado. Por lo tanto, al igual que en el caso del

pentamanósido, el ligando ramificado no obtiene ningún beneficio de la duplicidad del motivo estructural trimanósido lineal ($K_D = 0.4 \pm 0.1$ mM)

3. Materiales y Métodos

3.1. Espectroscopía de RMN

Todos los experimentos de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance DRX 500 MHz equipado con una sonda de 5 mm inversa de triple resonancia. Las muestras de RMN fueron preparadas en 500 μ l de agua deuterada con un 99.99 % en D_2O , en 50 mM de buffer fosfato sódico a pH 7.4, para las muestras de BSA, o con 50 mM de fosfato sódico/50 mM de KCl a pH 7.0, para las muestras de WGA. Tanto las proteínas como GlcNAc se obtuvieron de Sigma-Aldrich, mientras que la quitobiosa fue obtenida de los Laboratorios Dextra.

Para los experimentos de STD NMR, se utilizó una versión pseudo-2D con las adquisiciones de los espectro *on-* y *off-resonance* intercaladas. Para la saturación selectiva se utilizó un tren de pulsos Gaussianos con una duración de 49 ms y 50 dB de atenuación, con un delay entre ellos de 1 ms.³ La frecuencia *on-resonance* fue aplicada a 0.86 ppm, para la muestra BSA/L-Trp y 7.35 ppm para las muestras de WGA/GlcNAc y BSA/Quitobiosa. La frecuencia *off-resonance* se aplicó siempre a 40 ppm. En todos los casos se hizo el pertinente experimento blanco, en ausencia de proteína, para comprobar que no había efectos de saturación directa sobre los protones del ligando. Los tiempos de saturación de los experimentos de STD NMR para obtener las curvas de crecimiento fueron 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, y 4 s. La duración total de cada scan en los experimentos fue de 6.5 s. Normalmente, el número de scans fue de 64, pero para muestras menos concentradas en proteína, se incrementó este número hasta los 256-512 scans, para obtener una mejor relación señal-ruido que beneficiase la integración de las señales.

3.2. Isotermas de asociación a partir de los factores de amplificación de STD

Las concentraciones de las proteínas fueron 18 o 46 μ M de WGA, para las titulaciones de quitobiosa; 42 μ M de WGA para la de GlcNAc; y 20 o 60 μ M para los experimentos del L-Trp. Los ligandos fueron titulados en las correspondientes muestras de proteína a partir de disoluciones stock muy concentradas para minimizar los efectos de la dilución. En los experimentos de titulación de STD NMR, a una concentración dada del ligando, la intensidad de STD (η_{STD}) de un protón dado puede ser considerada directamente proporcional a la fracción del ligando enlazado, $f_B^L = [PL]/[L]_0$. Un parámetro derivado de éste, el factor de amplificación del STD (STD-AF), definido por Mayer y Meyer³ como el producto de η_{STD} por el

exceso de ligando ($\varepsilon = [L]_0/[P]_0$), hace dependiente η_{STD} de la fracción de proteína enlazada, f_B^P [Eq. (1)].

$$STD - AF = \varepsilon(I_0 - I_{sat})/I_0 = \varepsilon \cdot \eta_{STD} \quad (1)$$

Así, representando los valores de STD-AF a concentraciones crecientes de ligando se obtiene una curva tipo Langmuir hiperbólica dependiente de la dosis, descrita por la ecuación (2):¹⁴

$$STD - AF([L]) = (\alpha_{STD}[L])/([L] + K_D) \quad (2)$$

El ajuste matemático origina ambos parámetros: la constante de disociación en el equilibrio, K_D , y α_{STD} (un factor adimensional que representa el máximo valor de STD-AF para la señal monitorizada).

Se obtuvieron curvas de crecimiento de STD-AF para cada concentración del ligando. Para determinar los valores de K_D se siguió el procedimiento normal, los valores de STD-AF (a un tiempo de saturación determinado) de un protón del ligando fueron representados en función de la concentración del ligando y la curva resultante fue matemáticamente ajustada a la ecuación descrita arriba, para así obtener la K_D . Estos son valores "aparentes" de K_D . Después de los resultados de ajuste todas las curvas fueron normalizadas dividiendo los valores de STD-AF por el parámetro α_{STD} . En este sentido, todas las isotermas crecían entre 0 y 1, independientemente del protón elegido, siendo posible así superponer las curvas para comprobar gráficamente los diferentes comportamientos.

6.3. Isotermas de asociación a partir de las pendientes iniciales de los STD-AF

Las isotermas de asociación fueron construidas a partir de los valores de las pendientes iniciales de los factores de amplificación del STD ($STD-AF_0$) calculados para cada una de las concentraciones del ligando a lo largo de la titulación. Cada valor de $STD-AF_0$ fue obtenido ajustando la evolución del STD-AF con el tiempo de saturación a las ecuación:⁴

$$STD - AF(t) = a(1 - e^{(-bt)})$$

como el producto de los coeficientes $a \cdot b$ (aquí se ha usado una ecuación exponencial para la determinación de las pendientes iniciales de STD, pero el crecimiento inicial también podría obtenerse por regresión lineal usando tiempos de saturación suficientemente cortos, si se asume linealidad). Los valores de $STD-AF_0$ fueron representados en función de la concentración del ligando, y la isoterma resultante de las pendientes iniciales fue matemáticamente ajustada a una ecuación de Langmuir para obtener la constante de disociación.

4. Bibliografía

1. Carlomagno, T., Ligand-target interactions: what can we learn from NMR? *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2005**, *34*, 245-66.
2. Mayer, M.; Meyer, B., Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie Int. Ed.* **1999**, *38* (12), 1784-1788.
3. Mayer, M.; Meyer, B., Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* **2001**, *123* (25), 6108-17.
4. Mayer, M.; James, T. L., NMR-based characterization of phenothiazines as a RNA binding scaffold. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (13), 4453-60.
5. (a) Pickhardt, M.; Larbig, G.; Khlistunova, I.; Coksezen, A.; Meyer, B.; Mandelkow, E. M.; Schmidt, B.; Mandelkow, E., Phenylthiazolyl-hydrazide and its derivatives are potent inhibitors of tau aggregation and toxicity in vitro and in cells. *Biochemistry* **2007**, *46* (35), 10016-23; (b) Neffe, A. T.; Bilanz, M.; Gruneberg, I.; Meyer, B., Rational optimization of the binding affinity of CD4 targeting peptidomimetics with potential anti HIV activity. *J Med Chem* **2007**, *50* (15), 3482-8.
6. Cheng, Y.; Prusoff, W. H., Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **1973**, *22* (23), 3099-108.
7. (a) Szczepina, M. G.; Zheng, R. B.; Completo, G. C.; Lowary, T. L.; Pinto, B. M., STD-NMR studies suggest that two acceptor substrates for GlfT2, a bifunctional galactofuranosyltransferase required for the biosynthesis of Mycobacterium tuberculosis arabinogalactan, compete for the same binding site. *Chembiochem* **2009**, *10* (12), 2052-9; (b) Yuan, Y.; Bleile, D. W.; Wen, X.; Sanders, D. A.; Itoh, K.; Liu, H. W.; Pinto, B. M., Investigation of binding of UDP-Galf and UDP-[3-F]Galf to UDP-galactopyranose mutase by STD-NMR spectroscopy, molecular dynamics, and CORCEMA-ST calculations. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (10), 3157-68.
8. Feher, K.; Groves, P.; Batta, G.; Jimenez-Barbero, J.; Muhle-Goll, C.; Kover, K. E., Competition saturation transfer difference experiments improved with isotope editing and filtering schemes in NMR-based screening. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (50), 17148-53.
9. Bains, G.; Lee, R. T.; Lee, Y. C.; Freire, E., Microcalorimetric study of wheat germ agglutinin binding to N-acetylglucosamine and its oligomers. *Biochemistry* **1992**, *31* (50), 12624-8.
10. Fielding, L.; Rutherford, S.; Fletcher, D., Determination of protein-ligand binding affinity by NMR: observations from serum albumin model systems. *Magn Reson Chem* **2005**, *43* (6), 463-70.
11. Neuhaus, D.; Williamson, M. P., *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. Wiley-VCH: 2000.
12. (a) Meyer, B.; Peters, T., NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angewandte Chemie* **2003**, *42* (8), 864-891; (b) Jayalakshmi, V.; Krishna, N. R., Complete relaxation and

conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *J Magn Reson* **2002**, *155* (1), 106-18.

13. Calarese, D. A.; Lee, H. K.; Huang, C. Y.; Best, M. D.; Astronomo, R. D.; Stanfield, R. L.; Katinger, H.; Burton, D. R.; Wong, C. H.; Wilson, I. A., Dissection of the carbohydrate specificity of the broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (38), 13372-7.

14. Lepre, C. A.; Moore, J. M.; Peng, J. W., Theory and applications of NMR-based screening in pharmaceutical research. *Chem Rev* **2004**, *104* (8), 3641-76.

Capítulo 4:

Interacción 2G12/GNPs. Estudios por RMN

1. Introducción

En el marco de un proyecto más amplio del grupo de investigación, enfocado al desarrollo de gliconanopartículas con propiedades antigénicas (anti-VIH-1) capaces de generar una respuesta inmune contra el VIH, se ha estudiado la interacción entre nanopartículas de oro funcionalizadas, que presentan los oligomanósidos anteriormente estudiados (Capítulo 2) de forma multivalente, y el anticuerpo 2G12. Con estas nanopartículas se pretendió mimetizar las agrupaciones de glicanos que existen en la gp120,¹ y así simular la interacción natural entre el anticuerpo 2G12 y las agrupaciones de glicanos, tipo *high-mannose*, existentes en la gp120.² Para estudiar la interacción carbohidrato/proteína distintos grupos han preparado sistemas modelo que presentan los carbohidratos de forma multivalentes, y que pueden clasificarse por la naturaleza del soporte en: glicopéptidos y glicoproteínas (soporte peptídico), glicoliposomas, glicodendrimeros (soporte polimérico altamente ramificado), glicocalixarenos (oligómeros cíclicos de anillos aromáticos sustituidos), glicociclodextrinas (oligosacáridos cíclicos de glucosa unidos mediante enlaces α 1,4), y glicopolímeros (figura 1).

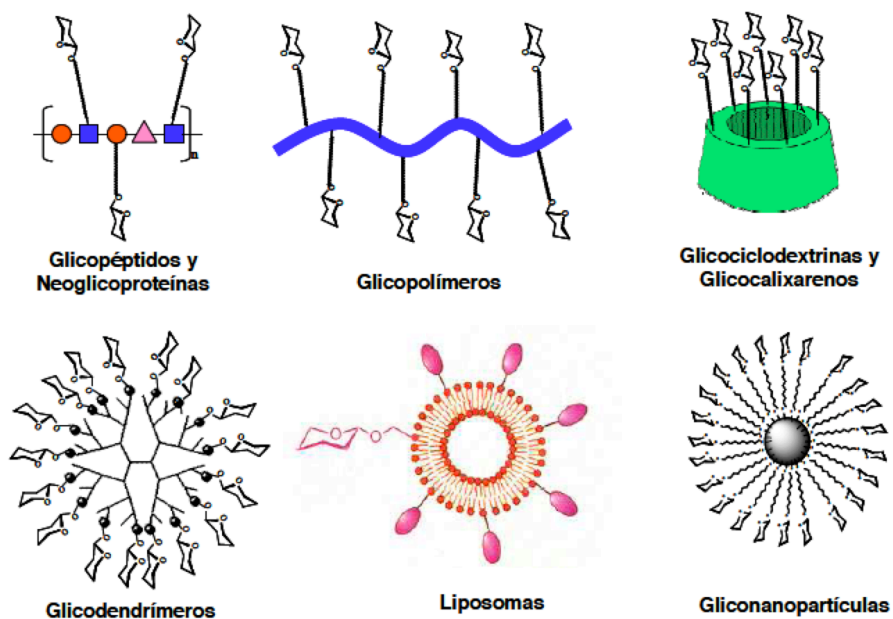


Fig. 1: Sistemas multivalentes de carbohidratos.

Además de estos sistemas, hay que nombrar las gliconanopartículas (GNPs) de oro que han sido preparadas en el laboratorio de la Prof. Soledad Penadés.³ Estas últimas son las que utilizaremos para estudiar sus interacciones con el anticuerpo 2G12.

La interacción 2G12/gp120 ya había sido estudiada utilizando diferentes tipos de plataformas multivalentes basadas en carbohidratos,⁴ dendrímeros⁵ y péptidos,⁶ a los que se unían oligomanósidos de la gp120. En todos los casos se intentó obtener una respuesta inmune al VIH, pero solo se obtuvieron anticuerpos monoclonales que no neutralizaban el virus.

Las nanopartículas de oro ofrecen una plataforma versátil que puede ser funcionalizada con ligandos celulares o virales. La química de formación de nanopartículas biofuncionalizadas permite variar la naturaleza y tamaño, tanto del soporte multivalente, como de las cadenas espaciadoras que unen los ligandos al soporte. Además, la posibilidad de modificar tanto la longitud como la flexibilidad de estos espaciadores, va a permitir la obtención de construcciones que se asemejen lo más posible a las agrupaciones (clusters) moleculares típicamente presentes en la superficie celular,⁷ en un intento de mimetizar diferentes sistemas de gran interés biológico.

Basándose en la gliconanotecnología desarrollada en nuestro laboratorio se han creado nanopartículas biofuncionales que mimetizan la superficie de la glicoproteína gp120.¹ Recientemente el inmenso desarrollo de la nanotecnología está generando herramientas nanométricas que están resultando bastante prometedoras en cuanto a su aplicación a la prevención y el tratamiento contra el VIH-SIDA.⁸

En nuestro caso, se han escogido las GNPs con oligomanósidos, cuyas preparación, funcionalización, purificación, y caracterización, están muy bien establecidas en el laboratorio. Además, frente a otros sistemas multivalentes, la utilización de estas nanopartículas presenta ciertas ventajas: son fáciles de preparar y de purificar, solubles en agua, estables en disolución, resistentes a la degradación enzimática, y pueden ser manejadas como macromoléculas solubles en agua a la hora de ser utilizadas en espectroscopía de RMN. Las GNPs son sistemas multivalentes que presentan los carbohidratos unidos a un núcleo, o *core*, de átomos metálicos (en nuestro caso oro) mediante un espaciador que puede ser de diferente naturaleza. De esta forma pueden obtenerse GNPs con un tamaño (1.8 – 2.2 nm) adecuado para el uso en RMN y, a su vez, para mimetizar las agrupaciones de glicanos que hay en la gp120, cuya cadena polipeptídica mide aproximadamente 5.5 nm (PDB 3JWD).⁹

Estudios realizados en nuestro laboratorio mediante la técnica de Surface Plasmon Resonance (SPR) demostraron que GNPs funcionalizadas con diferentes tipos de oligomanósidos eran capaces de inhibir la interacción entre la glicoproteína gp120 y la proteína DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), una lectina de las células dendríticas implicada en la infección por VIH mediante sus interacciones con los oligomanósidos de la gp120.¹

Motivados por estos resultados, decidimos estudiar la interacción entre estas GNPs y el anticuerpo 2G12. Intentábamos, así, estudiar el efecto de la disposición multivalente de los

oligomanósidos en este tipo de plataformas, tratando de aproximarnos lo más posible al sistema natural, y compararlo con los estudios anteriores que hemos llevado a cabo con los oligomanósidos monovalentes y el 2G12 (capítulo 2). Para ello, se sintetizaron GNPs con diferentes densidades de los oligomanósidos en la superficie de oro, pero conteniendo un solo tipo de oligomanósido en cada nanopartícula. Para unir los oligomanósidos al núcleo metálico se prepararon en primer lugar los neoglicoconjugados correspondientes por formación de un grupo de tiourea entre 1-aminoetil α -oligomanósido y una cadena compuesta por cuatro unidades de etilenglicol y una cadena alifática de once metilenos terminada en un grupo tiol, que va a unirse al núcleo de oro por un enlace tipo Au-S. Para completar el total de la superficie de la GNP se ha utilizado el 5-mercaptopentil β -D-glucopiranosido (Glc(CH₂)₅S) (figura 2).

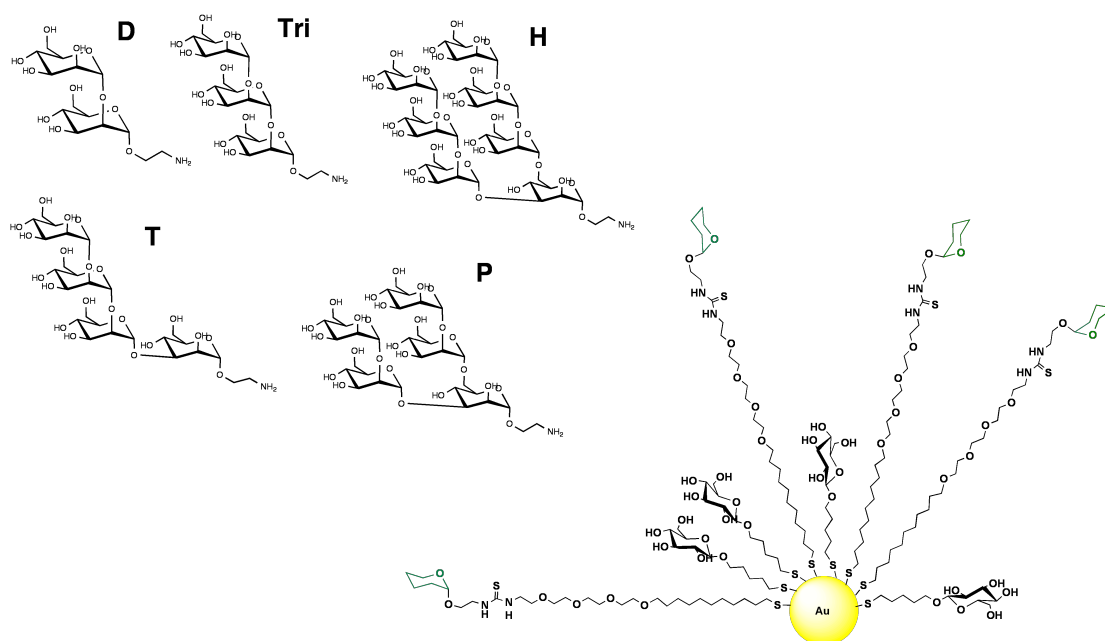


Fig. 2: Estructura de los oligomanósidos, motivos parciales del glicano *high-mannose*, utilizados en la preparación de las gliconanopartículas y esquema representativo de las gliconanopartículas multivalentes utilizadas para estudiar la interacción con 2G12. En color verde se indican las posiciones de los diferentes oligomanósidos. Modificando la proporción de los diferentes neoglicoconjugados se puede modular la densidad superficial del oligomanósido activo.

2. Resultados y discusión

Para estudiar el efecto de la presentación multivalente de los oligomanósidos en las GNPs sobre sus afinidades por el anticuerpo 2G12, elegimos un experimento de competición entre las GNPs y los oligomanósidos monovalentes por el sitio de reconocimiento de carbohidratos del anticuerpo 2G12 (realmente son dos sitios, pero ya se ha visto en el capítulo 2 que se comportan independientemente, y de manera equivalente, sin alosterismo). Para ello, se llevaron a cabo titulaciones competitivas en las que a una muestra que contuviera anticuerpo 2G12 y oligomanósido monovalente libre a una concentración suficiente para saturar los sitios

activos del anticuerpo (ocupar más del 90 % de los sitios activos), se añadieron cantidades crecientes de la gliconanopartícula estudiada (figura 3).

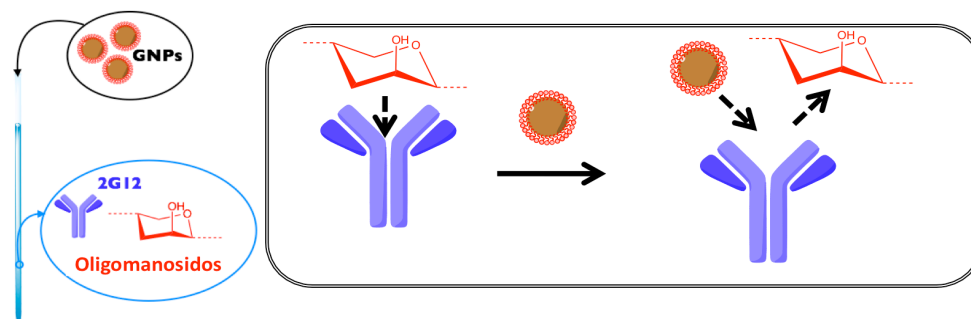


Fig. 3: Esquema representativo del experimento competitivo entre los oligomanósidos y las GNPs funcionalizadas con los mismos oligomanósidos en presencia del anticuerpo 2G12.

Las GNPs que se han utilizado en estos experimentos, se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Gliconanopartículas utilizadas en las titulaciones competitivas con los oligomanósidos monovalentes en presencia del anticuerpo 2G12. En la columna de la izquierda se indica la gliconanopartícula utilizada, en la columna central el oligomanósido correspondiente y en la columna de la derecha el número de oligomanósidos por nanopartícula.

Gliconanopartícula- Densidad de oligomanósido	Oligomanósido	Número de moléculas de oligomanósido ^(a)
GNP-D10%	Man α 1,2Man α	9
GNP-D50%		22
GNP-Tri10%	Man α 1,2Man α 1,2Man α	13
GNP-Tri50%		62
GNP-T10%	Man α 1,2Man α 1,2Man α 1,3Man α	7
GNP-T50%		56
GNP-P10%	Man α 1,2Man α 1,6[Man α 1,2Man α 1,3]Man α	5
GNP-P50%		28
GNP-H10%	Man α 1,2Man α 1,2Man α 1,6[Man α 1,2Man α 1,2Man α 1,3]Man α	5
GNP-H50%		35

^(a) Número de oligomanósidos sobre la superficie de oro calculado en base al tamaño y el análisis elemental de cada GNP.

Las síntesis y caracterización (TEM, UV/vis, RMN y análisis elemental) de estas gliconanopartículas se llevaron a cabo siguiendo métodos establecidos, que confirmaron el tamaño del núcleo metálico así como la composición de la cubierta orgánica, teniendo todas un

tamaño de núcleo de aproximadamente 2 nm.¹ Teniendo en cuenta las dimensiones de los neoglicoconjugados (figura 4), el tamaño final de la GNPs esta en el rango nanométrico (~ 10 nm) de la gp120 de la envuelta del virus.

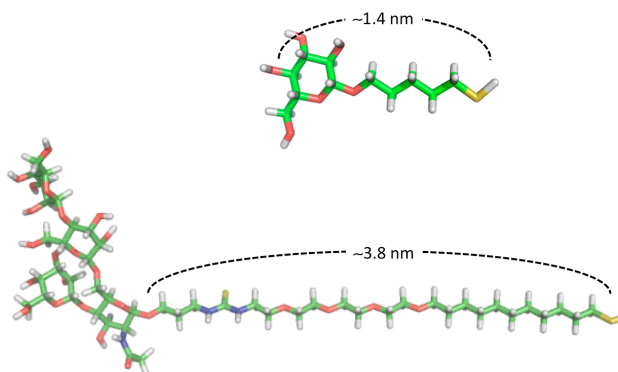


Fig. 4: Tamaño del neoglicoconjugado de glucosa y la cadena mixta que une los diferentes oligomanósidos a las GNPs. Modelización molecular de las conformaciones “totalmente extendidas” realizada mediante el programa SYBYL.¹⁰

Para optimizar los experimentos de competición por RMN y conseguir saturación de los sitios activos del anticuerpo, y a la vez excluir las interacciones inespecíficas debidas al uso de concentraciones altas de oligomanósido, hemos utilizado tri-, tetra-, y heptamanósido no-natural, que tienen las afinidades más altas ($K_D < 800 \mu\text{M}$) por el 2G12, tal y como se determinó en el capítulo anterior.

En los experimentos de inhibición competitiva se sigue la intensidad de la señal de STD NMR del oligomanósido libre que, en principio, decrecerá debido a la mayor afinidad esperada para la GNP multivalente, que desplazará al oligomanósido *monovalente* de los sitios activos del 2G12. Al seguir esta señal, el error en la medida será menor, ya que son señales más finas (molécula pequeña) y más intensas que las señales de las GNPs (tamaño elevado). Los experimentos de STD NMR se realizaron usando la misma potencia de irradiación y los mismos anchos espectrales que en el estudio de las curvas de saturación de los oligomanósidos. La irradiación selectiva se llevó a cabo en la zona de los protones aromáticos del 2G12 (~7 ppm). Puesto que se sigue la señal de un ligando (el oligosacárido monovalente) que durante toda la titulación presenta una relación ligando-proteína muy alta, dicha señal no va a estar afectada por procesos de reasociación rápidos en la escala de tiempos de relajación de RMN. De esta forma, la monitorización de la curva se puede llevar a cabo empleando un solo tiempo de saturación (compárese con las medidas en el capítulo anterior). Así, se utilizó un tiempo de saturación de 2 s para construir las curvas de inhibición, un valor que se utiliza con frecuencia en los estudios que emplean la técnica STD NMR.¹¹

El hecho de elegir la zona aromática del espectro (~7 ppm) para la irradiación es debido a que las GNPs presentan señales en la zona alifática que pueden verse afectadas por la irradiación en esa región lo que a su vez puede afectar el análisis de las señales del ligando monovalente, que presenta señales en la zona de carbohidrato como las GNPs.

Previamente, se comprobó que, bajo las condiciones de los experimentos de competición (irradiación en la zona aromática), los resultados de STD (epítomos) eran idénticos a los obtenidos en las condiciones utilizadas en el capítulo 2 (irradiación en la zona alifática). La similitud de los epítomos al cambiar la zona de irradiación del anticuerpo indica que el mecanismo de difusión de espín, en el caso del anticuerpo 2G12, de alto peso molecular (MW = 145 kDa), es bastante eficaz, y en pocos milisegundos se consigue su saturación uniforme, irradiando tanto los protones alifáticos como los aromáticos (0.86 ó 7.0 ppm, respectivamente). A pesar de la eficacia del mecanismo de difusión de spin, se observó una menor intensidad en las señales del ligando libre debido a que, al irradiar en la zona aromática del anticuerpo (menor número de cadenas laterales aromáticas), se transfiere menor cantidad de saturación, en comparación con la irradiación de cadenas alifáticas (mayor número de estas). Además, bajo estas condiciones, la irradiación indirecta recibida por las GNPs puede considerarse despreciable frente a la recibida por el anticuerpo como puede observarse en los espectros (figura 5). No obstante, para eliminar de los espectros de STD NMR las señales anchas provenientes tanto de las GNPs como del 2G12, que podrían dificultar el correcto análisis de las señales finas del ligando, se implementó en la secuencia de pulsos un filtro $T_{1\rho}$.

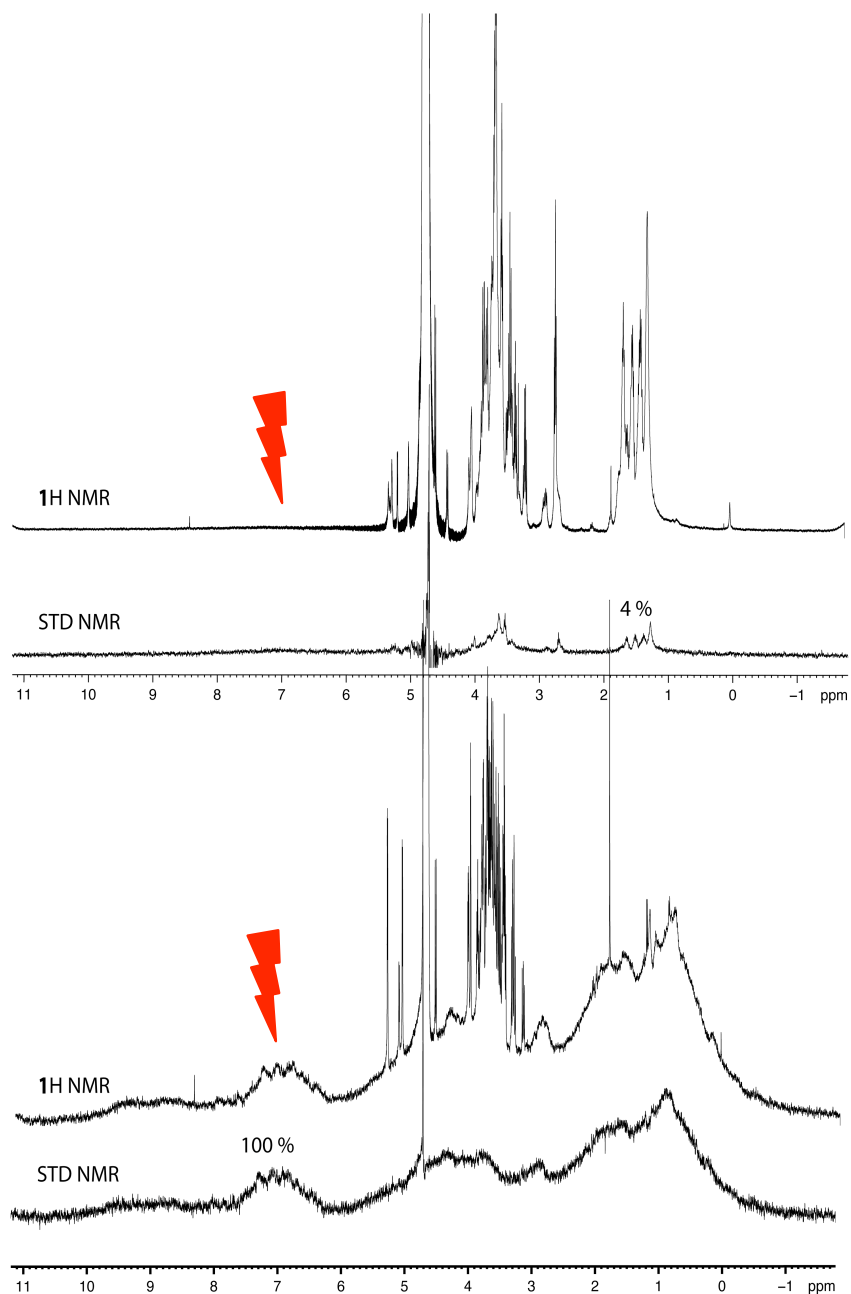


Fig. 5: Comparación de la saturación del anticuerpo 2G12 (25 μ M, espectro inferior) y la gliconopartícula GNP-T10% (0.4 mg/ml, espectro superior) al irradiar a 7 ppm (en rojo) con la misma potencia y el mismo tiempo de saturación. El anticuerpo 2G12 se satura al 100 % en la zona aromática y más de un 90 % en la zona alifática. La saturación de la GNP fue como máximo un 4 % en los protones alifáticos del espaciador (en los protones anoméricos del tetramanósido no se percibe saturación). En el espectro de referencia del 2G12 se observan señales finas que corresponden al estabilizante (maltosa) que, como se comprueba en el espectro de STD NMR, no interacciona con el anticuerpo.

Siguiendo las variaciones en la/s intensidad/es de alguna/s señal/es de STD del oligomanósido monovalente, y ajustando los valores a la ecuación-1,¹² obtendremos la constante de inhibición del oligomanósido inmovilizado sobre la GNP estudiada. Esta aproximación se basa en el uso

de la ecuación original de Cheng y Prusoff¹³ modificada para experimentos STD NMR, donde se asume que el primer punto de la titulación se corresponde con los valores de STD en condiciones tales que los sitios activos de la proteína estén saturados por el ligando monovalente (100 % ocupación).

$$I_{STD} = 100 \cdot \left[1 - \frac{\left(\frac{K_D}{L_0} \right) \cdot \left(\frac{I_0}{K_I} \right)}{\left(1 + \left(\frac{K_D}{L_0} \right) \right) \cdot \left(1 + \left(\frac{I_0}{K_I} \right) \right)} \right] \quad (\text{Ecuación 1})$$

I_{STD} es la intensidad de la señal de STD observada; K_D es la constante de disociación del oligomanósido libre; L_0 es la concentración total del oligomanósido; I_0 es la concentración total del oligomanósido en la GNP ; y K_I es la constante de inhibición a determinar.

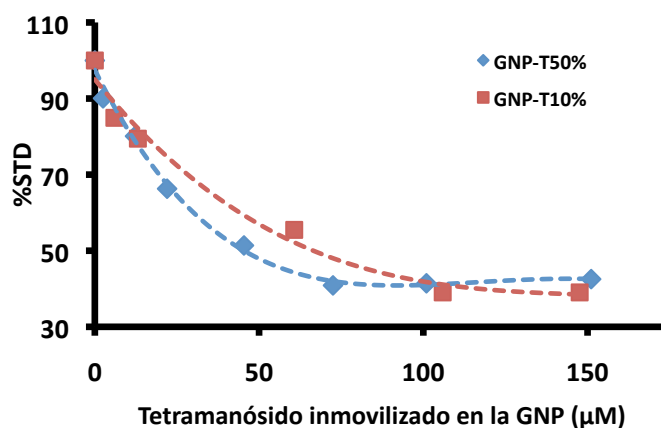
Experimentos previos, realizados mediante la técnica de SPR, demostraron que, entre las GNPs probadas, aquellas que interaccionan de una forma más eficaz con el anticuerpo 2G12 son GNP-T10% y GNP-T50%, con afinidades muy similares, calculadas en base al tetramanósido inmovilizado. Este resultado indica que variaciones en la densidad de ligando activo sobre la GNP (tabla 1) no siempre implicarán una variación proporcional en la fortaleza de la interacción con el anticuerpo 2G12. Además, experimentos de inhibición de la interacción 2G12/gp120 por SPR con estas dos GNPs, indicaron que la GNP-T10%, de menor densidad, fue la más efectiva.

Si bien estos resultados nos dieron una indicación acerca de qué GNP podría ser el mejor inhibidor, las condiciones experimentales de RMN difieren bastante de las de SPR. En el caso de los experimentos de SPR, una de las moléculas está inmovilizada sobre una superficie y la interacción observada, multivalente o no, puede estar sensiblemente modulada por la orientación de la misma. Sin embargo, en RMN, las moléculas están en condiciones isotrópicas en disolución, lo que deja total libertad traslacional y rotacional a las moléculas implicadas en la interacción.

En base a los resultados de SPR, los primeros experimentos de titulación competitiva por STD NMR se hicieron con las GNPs funcionalizadas con tetramanósido (GNP-T10% y GNP-T50%), cuyas disoluciones se añadieron a una disolución conteniendo una concentración de tetramanósido libre 8 mM y de 2G12 40 μ M (80 μ M en sitios activos) en condiciones adecuadas para la estabilidad del anticuerpo (fosfato potásico 10 mM a pH 6.7).

Tras la adición de cantidades crecientes de GNP-T10% o GNP-T50% en cada muestra, se pudieron observar disminuciones claras de la intensidad de la señal del tetramanósido libre, debido a su desplazamiento por las GNPs de los sitios activos del anticuerpo. Estas disminuciones indican que existe una inhibición competitiva entre las GNPs y el ligando

monovalente. Ajustando matemáticamente las curvas resultantes a la *ecuación-1* se pudo obtener una constante de inhibición, K_i , de aproximadamente $3.5 \mu\text{M}$ para el tetramanósido inmovilizado en la superficie de ambas GNPs (figura 6, tabla inferior).



Ligando	K_D (μM)
Tetramanósido (T)	400 ± 100
T en GNP-T10%	$3,5 \pm 0,4$
T en GNP-T50%	$3,6 \pm 0,6$

Fig. 6: Curvas de la inhibición competitiva de las GNPs funcionalizadas con tetramanósido T obtenidas siguiendo la señal de STD del tetramanósido monovalente (H1A). Los símbolos rojos son para la titulación con GNP-T10% y los azules para la correspondiente a GNP-T50%. Los símbolos corresponden a datos experimentales y las líneas punteadas al ajuste matemático. La tabla inferior muestra la afinidad del tetramanósido como ligando libre y las constantes de inhibición K_i para el tetramanósido inmovilizado en ambas GNPs. Se observa un incremento de dos órdenes de magnitud en la afinidad del tetramanósido por el 2G12 cuando se encuentra inmovilizado en la GNP.

El incremento de afinidad del tetramanósido en las GNPs, de aproximadamente dos órdenes de magnitud respecto al ligando monovalente (figura 6 y tabla), indica que el anticuerpo presenta mayor afinidad por las GNPs funcionalizadas que por el tetramanósido monovalente, lo que confirma la ventaja termodinámica de presentar el tetramanósido en forma multivalente. Este resultado apoya el uso efectivo de la multivalencia para incrementar la afinidad, usualmente débil, de las interacciones entre carbohidratos y sus proteínas receptoras (lectinas). Además, este dato confirma los obtenidos mediante la técnica de SPR, de los que se dedujo que tanto la GNP-T10% como la GNP-T50% interaccionan con el anticuerpo 2G12 con la misma afinidad. Sin embargo, el dato más importante es la obtención del mismo beneficio de afinidad anticuerpo-gliconanopartícula tanto con un grado de multivalencia del 10 % como del 50 % (expresado en términos de densidad de ligando activo inmovilizado), corroborando que, para una adecuada interacción multivalente, es necesaria solamente una cantidad definida de

ligando, que satisfaga los requerimientos estructurales óptimos para una disposición geométrica adecuada de los ligandos activos respecto de los sitios receptores multivalentes.

Experimentos de SPR y RMN, en las mismas condiciones que las titulaciones competitivas anteriores, demostraron que una nanopartícula funcionalizada en su totalidad con el neoglicoconjugado de glucosa (GlcC₅S) no interacciona con el anticuerpo 2G12, excluyendo, por tanto, el efecto del neoglicoconjugado de glucosa y del núcleo de oro en la interacción con el 2G12. La presencia de glucosa en las GNPs es esencial para conseguir una buena solubilidad en agua o en tampones fisiológicos.

Asimismo, el resto de GNPs, medidas en las mismas condiciones experimentales que las anteriores, no inhibieron la interacción del 2G12 con el correspondiente oligomanósido monovalente. Las GNPs con trimanósido, o con heptamanósido no-natural inmovilizado GNP-Tri10%, Tri50%, H10% y H-50%, tanto en 10 % como 50 % de densidad superficial, apenas inhibieron la interacción de los oligomanósidos monovalentes respectivos (**Tri** y **H**, figura 2) con el anticuerpo 2G12 (figura 7 y 8 izquierda), a las mismas concentraciones que las GNPs anteriores funcionalizadas con tetramanósido. Sin embargo, estos mismos oligomanósidos como ligandos monovalentes presentaban considerable afinidad por el 2G12, con una K_D^{Tri} de 400 μ M, en el caso del trimanósido, e igual a la del tetramanósido, y de 800 μ M, en el caso del heptamanósido no-natural, e inferior a la del tetramanósido, pero en el entorno del mismo orden de magnitud.

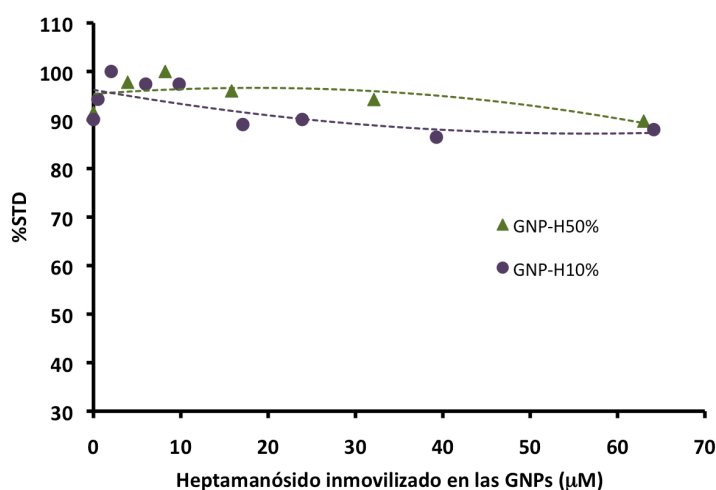


Fig. 7: Curva de la inhibición competitiva de las GNPs funcionalizadas con heptamanósido obtenidas a partir de la variación de la señal de STD (H1A) del heptamanósido monovalente. Los círculos corresponden a los valores experimentales de la GNP-H10% y los triángulos a los de la GNP-H50%. Las líneas punteadas se corresponden con el ajuste matemático. No se observa inhibición de la interacción 2G12/heptamanósido por las GNPs.

En el caso de las GNPs funcionalizadas con heptamanósido no-natural, a pesar de que este oligosacárido incluye en su estructura la del tetramanósido (figura 2), parece que la orientación

de los oligomanósidos sobre la superficie de la GNP no es la adecuada para una interacción efectiva con el 2G12.

En el caso de las GNPs funcionalizadas con trimanósido (figura 8), resulta sorprendente que un ligando con la misma afinidad ($K_D^{T, Tri} = 400\mu M$) y similar estructura que el tetramanósido (figura 2 **T** y **Tri**) pierda su capacidad para interaccionar con el 2G12 (figura 8, izquierda) al inmovilizarlo en la superficie de las nanopartículas. Para confirmar que los experimentos con GNP-Tri10% y 50% estaban correctamente hechos, a las muestras con las que se llevaron a cabo las titulaciones de las GNPs Tri10% y 50%, se les añadió la misma cantidad de GNP-T10% que se empleó en el caso del tetramanósido (figura 6). La intensidad de la señal de STD del trimanósido monovalente disminuyó hasta un valor similar al obtenido en la titulación competitiva del tetramanósido. (comparar figura 8 derecha y figura 6).

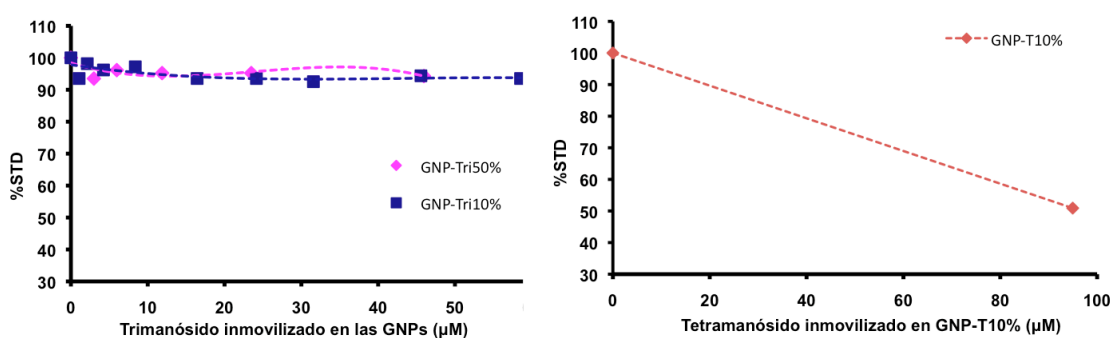


Fig. 8: (Izquierda) Curva de la inhibición competitiva de las GNPs funcionalizadas con trimanósido obtenidas a partir de la variación de la señal de STD (H1A) del trimanósido monovalente. Los cuadrados corresponden a los valores experimentales de la GNP-Tri10% y los rombos a los de la GNP-Tri50%. Las líneas punteadas representan el ajuste matemático. No se observa inhibición de la interacción 2G12/trimanósido por las GNPs. (Derecha) Disminución de la señal de STD del trimanósido al añadir GNP-T10% a la muestra anterior.

Estos resultados indican que tri-, y tetramanósido presentan la misma afinidad por el anticuerpo 2G12, ya que la intensidad de la señal de STD del trimanósido disminuye igual que la del tetramanósido cuando se añade la misma cantidad de GNP-T10%, confirmando lo expuesto ya en el capítulo anterior. Asimismo, y de mayor relevancia, verifican la importancia de la orientación y empaquetamiento de los ligandos activos en una superficie multivalente, que deben ser apropiados para la correcta interacción con su receptor específico. Ligandos monovalentes con una determinada afinidad por un receptor pueden llegar a disminuir su afinidad cuando se presentan en forma multivalente, si la orientación final y el empaquetamiento en la superficie de la nanopartícula llegan a dificultar la exposición apropiada de los elementos de reconocimiento molecular esenciales para la interacción con el receptor.

3. Materiales y Métodos

La síntesis de los oligomanósidos, neoglicoconjugados, y las correspondientes gliconanopartículas, se llevó a cabo con los métodos establecidos en nuestro laboratorio.¹ El anticuerpo 2G12 fue donado por Polymun Scientific (Viena, Austria). El anticuerpo fue purificado por diálisis en tampón fosfato (100 mL, 15 mM, pH 6,7) utilizando una membrana de 20 kDa de tamaño de poro (Sprectra/Por®, Medicell International Ltd.) para eliminar la maltosa que contenía. Después de siete ciclos de diálisis, se volvió a dializar tres veces con el mismo tampón en agua deuterada como disolvente, y se liofilizó. Todos los oligomanósidos y las nanopartículas se liofilizaron e intercambiaron dos veces con D₂O al 99.9 % de pureza en deuterio, más una última vez con D₂O 99.99% de pureza (Sigma-Aldrich). Todas las muestras se prepararon en una solución tampón 10 mM fosfato en agua deuterada a pH 6.7.

3.1. Espectroscopía de RMN

La asignación de las señales de protón de las gliconanopartículas no se pudo llevar a cabo debido a las señales excesivamente anchas que se observan. Para los experimentos STD NMR se optimizó la temperatura a 298 K, para obtener la mejor relación señal-ruido; excepto en los experimentos con el heptamanósido no-natural que la temperatura fue de 306 K. Los experimentos fueron realizados sin supresión de la señal residual de HDO. Las señales anchas del anticuerpo y de las gliconanopartículas se eliminaron añadiendo a la secuencia de pulsos un filtro T_{1ρ} (no es más que un bloqueo de espines de corta duración, unos 10-15 ms, que elimina aquellas señales con una relajación transversal muy rápida, como las de moléculas de elevado peso molecular). Las curvas de inhibición se obtuvieron con experimentos STD NMR de 1 K *scans* con un tiempo de saturación de 2 s, y añadiendo cantidades crecientes de la GNP (hasta 1.47 mg/ml). El tiempo de saturación consistió en un tren de pulsos Gaussianos de 50 ms cada uno. Se aplicó una frecuencia *off-resonance* de $\delta = 40$ ppm mientras que la *on-resonance* fue de $\delta = 7$ ppm.

3.2. Constantes de inhibición

Las constantes de inhibición de los diferentes oligomanósidos inmovilizados sobre las GNPs fueron obtenidas ajustando matemáticamente la disminución del valor de la señal de STD del oligomanósido monovalente (de afinidad conocida) a la ecuación:¹²

$$I_{STD} = 100 \cdot \left[1 - \frac{\left(\frac{K_D}{L_0} \right) \cdot \left(\frac{I_0}{K_I} \right)}{\left(1 + \left(\frac{K_D}{L_0} \right) \right) \cdot \left(1 + \left(\frac{I_0}{K_I} \right) \right)} \right]$$

donde I_{STD} es la intensidad de la señal de STD monitorizada; K_D es la constante de disociación del ligando de afinidad conocida; L_0 es la concentración total de ligando de afinidad conocida; I_0 es la concentración total de inhibidor, de afinidad no conocida; y K_i es la constante de inhibición del inhibidor. El ajuste matemático se hizo mediante el programa Origin 8.1 hasta obtener un valor mínimo de χ^2 , indicativo del mejor ajuste posible de una curva teórica a los valores experimentales.

4. Bibliografía

1. Martinez-Avila, O.; Hijazi, K.; Marradi, M.; Clavel, C.; Campion, C.; Kelly, C.; Penades, S., Gold manno-glyconanoparticles: multivalent systems to block HIV-1 gp120 binding to the lectin DC-SIGN. *Chemistry* **2009**, *15* (38), 9874-88.
2. (a) Rudd, P. M.; Wormald, M. R.; Dwek, R. A., Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system. *Trends Biotechnol* **2004**, *22* (10), 524-30; (b) Botos, I.; Wlodawer, A., Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog Biophys Mol Biol* **2005**, *88* (2), 233-82; (c) Roux, K. H.; Zhu, P.; Seavy, M.; Katinger, H.; Kunert, R.; Seamon, V., Electron microscopic and immunochemical analysis of the broadly neutralizing HIV-1-specific, anti-carbohydrate antibody, 2G12. *Mol Immunol* **2004**, *41* (10), 1001-11; (d) Calarese, D. A.; Scanlan, C. N.; Zwick, M. B.; Deechongkit, S.; Mimura, Y.; Kunert, R.; Zhu, P.; Wormald, M. R.; Stanfield, R. L.; Roux, K. H.; Kelly, J. W.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Katinger, H.; Burton, D. R.; Wilson, I. A., Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* **2003**, *300* (5628), 2065-2071; (e) Huskens, D.; Van Laethem, K.; Vermeire, K.; Balzarini, J.; Schols, D., Resistance of HIV-1 to the broadly HIV-1-neutralizing, anti-carbohydrate antibody 2G12. *Virology* **2007**, *360* (2), 294-304.
3. (a) Barrientos, A. G.; de la Fuente, J. M.; Rojas, T. C.; Fernandez, A.; Penades, S., Gold glyconanoparticles: synthetic polyvalent ligands mimicking glycocalyx-like surfaces as tools for glycobiological studies. *Chemistry* **2003**, *9* (9), 1909-21; (b) de La Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; Rojas, T. C.; Rojo, J.; Canada, J.; Fernandez, A.; Penades, S., Gold Glyconanoparticles as Water-Soluble Polyvalent Models To Study Carbohydrate Interactions This work was supported by the DGICYT (PB96-0820), J.M.F. thanks the MEC for a predoctoral fellowship. A.G.B. thanks CSIC for financial support. We thank Prof. Martin-Lomas for his scientific and financial support. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40* (12), 2257-2261.
4. Wang, L. X.; Ni, J.; Singh, S.; Li, H., Binding of high-mannose-type oligosaccharides and synthetic oligomannose clusters to human antibody 2G12: implications for HIV-1 vaccine design. *Chem Biol* **2004**, *11* (1), 127-34.
5. Wang, S. K.; Liang, P. H.; Astronomo, R. D.; Hsu, T. L.; Hsieh, S. L.; Burton, D. R.; Wong, C. H., Targeting the carbohydrates on HIV-1: Interaction of oligomannose dendrons with human monoclonal antibody 2G12 and DC-SIGN. *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**, *105* (10), 3690-5.
6. (a) Wang, J.; Li, H.; Zou, G.; Wang, L. X., Novel template-assembled oligosaccharide clusters as epitope mimics for HIV-neutralizing antibody 2G12.

- Design, synthesis, and antibody binding study. *Org Biomol Chem* **2007**, *5* (10), 1529-40; (b) Krauss, I. J.; Joyce, J. G.; Finnefrock, A. C.; Song, H. C.; Dudkin, V. Y.; Geng, X.; Warren, J. D.; Chastain, M.; Shiver, J. W.; Danishefsky, S. J., Fully synthetic carbohydrate HIV antigens designed on the logic of the 2G12 antibody. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (36), 11042-4; (c) Dudkin, V. Y.; Orlova, M.; Geng, X.; Mandal, M.; Olson, W. C.; Danishefsky, S. J., Toward fully synthetic carbohydrate-based HIV antigen design: on the critical role of bivalency. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (31), 9560-2; (d) Joyce, J. G.; Krauss, I. J.; Song, H. C.; Opalka, D. W.; Grimm, K. M.; Nahas, D. D.; Esser, M. T.; Hrin, R.; Feng, M.; Dudkin, V. Y.; Chastain, M.; Shiver, J. W.; Danishefsky, S. J., An oligosaccharide-based HIV-1 2G12 mimotope vaccine induces carbohydrate-specific antibodies that fail to neutralize HIV-1 virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (41), 15684-9.
7. de la Fuente, J. M.; Penades, S., Glyconanoparticles: types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1760* (4), 636-51.
 8. das Neves, J.; Amiji, M. M.; Bahia, M. F.; Sarmiento, B., Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev* **2010**, *62* (4-5), 458-77.
 9. Pancera, M.; Majeed, S.; Ban, Y. E.; Chen, L.; Huang, C. C.; Kong, L.; Kwon, Y. D.; Stuckey, J.; Zhou, T.; Robinson, J. E.; Schief, W. R.; Sodroski, J.; Wyatt, R.; Kwong, P. D., Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107* (3), 1166-71.
 10. Tripos SYBYL, 2009.
 11. Mayer, M.; Meyer, B., Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie Int. Ed.* **1999**, *38* (12), 1784-1788.
 12. Benie, A. J.; Moser, R.; Bauml, E.; Blaas, D.; Peters, T., Virus-ligand interactions: identification and characterization of ligand binding by NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (1), 14-5.
 13. Cheng, Y.; Prusoff, W. H., Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **1973**, *22* (23), 3099-108.

Conclusiones

1. Se han caracterizado estructuralmente las interacciones de 9 oligomanósidos, modelos de las distintas regiones potencialmente antigénicas del glicano natural “high-mannose”, con el anticuerpo monoclonal humano 2G12 (anti-HIV-1), en disolución, mediante técnicas espectroscópicas de RMN de observación de ligando (STD NMR y NOE transferido).
2. Se han determinado experimentalmente los epítomos de los ligandos para la interacción con el anticuerpo 2G12, a resolución atómica. Se han cuantificado teóricamente los datos en disolución, comparándolos, en los casos en los que fue posible, con algunas estructuras existentes en la literatura provenientes de cristalografía de rayos X. La cuantificación se ha realizado mediante cálculos de matriz de relajación completa e intercambio conformacional, implementados en el programa CORCEMA-ST. Todos los datos sugieren que los oligomanósidos, como ligandos monovalentes, interaccionan exclusivamente con los sitios primarios de reconocimiento del anticuerpo. Los oligomanósidos *lineales* son reconocidos por el extremo no reductor de la cadena oligosacárida, verificando la importancia del resto disacárido Man α 1,2Man en dicho extremo. Los ligandos *ramificados* interaccionan de forma diferente: el pentasacárido (formalmente una repetición del disacárido Man α 1,2Man) interacciona mediante dos modos de asociación que se alternan en el sitio de reconocimiento primario, involucrando cada una de las dos ramas, con afinidades en el mismo orden de magnitud; por el contrario, el heptasacárido, no natural (formalmente una repetición del trisacárido Man α 1,2Man α 1,2Man), interacciona de forma preferente mediante la rama natural (tipo D1).
3. Se ha verificado que el anticuerpo 2G12 es capaz de reconocer la ramificación D2 del glicano “high-mannose”, mediante estudios de STD NMR de las interacciones de dos ligandos miméticos de cada una de las ramas (D2 y D3) constituyentes del pentasacárido. Estos datos han confirmado experimentalmente la validez de la interpretación de los datos de RMN de la interacción del pentamanósido, en términos de una asociación dual. Este modo de interacción no se había detectado en los estudios de cristalografía de rayos X descritos en la literatura.
4. Se ha llevado a cabo un estudio minucioso de los factores experimentales que tienen una influencia marcada en las determinaciones experimentales de constantes de disociación ligando-proteína mediante titulaciones de un solo ligando detectadas por espectroscopía STD NMR. Se ha demostrado la elevada influencia en el resultado final que tienen los parámetros: tiempo de saturación, intensidad STD, y fracción de ligando enlazado.
5. Se han caracterizado los fenómenos físico-químicos que son responsables en las desviaciones de las medidas de constantes de disociación por STD NMR. En condiciones de fracciones de ligando enlazado elevadas, la reasociación del ligando tiene lugar en una escala de tiempos muy inferior a los tiempos característicos de relajación (selectivos) de los protones del ligando en el estado libre, y se produce una subestimación de los factores STD-AF que lleva a una sobreestimación final de la constante de disociación determinada.
6. Se ha desarrollado un protocolo experimental: “Isoterma de asociación de pendientes iniciales de crecimiento de los factores STD”, que se ha demostrado capaz de cancelar los efectos de los factores anteriormente identificados. Mediante dicho protocolo las medidas de constantes de disociación por STD NMR son comparables a las de otras técnicas (microcalorimetría de titulación isotérmica, ...) y no presentan todos los problemas que se han identificado en la presente tesis doctoral, y algunos de los cuales ya habían sido descritos en distintos trabajos a lo largo de la literatura.

7. Se ha aplicado el nuevo protocolo a las medidas de las constantes de disociación de los oligomanósidos y el anticuerpo 2G12. El mínimo elemento estructural constituyente del glicano “high-mannose” que confiere mayor afinidad por el anticuerpo 2G12 es el trimanósido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$. El tetramanósido tipo D1 presenta la misma afinidad, y el dimanósido $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ presenta una afinidad considerablemente inferior. Los ligandos ramificados presentan diferentes afinidades: el pentamanósido una afinidad similar al dimanósido básico $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$, y el heptamanósido mayor afinidad que éste, pero inferior a las de tri- y tetramanósido D1.
8. Se ha verificado la preferencia de reconocimiento molecular de la ramificación D1 del heptamanósido no natural por el anticuerpo 2G12, a pesar de que ambas ramas contienen el elemento estructural trimanósido identificado como requerimiento mínimo para la afinidad por el anticuerpo. Un estudio mediante STD NMR para el ligando independiente mimético de la ramificación no natural ha demostrado una caída de cinco veces en la afinidad, respecto a la ramificación D1 natural.
9. Se ha estudiado el efecto de la disposición espacial *multivalente* de los ligandos oligomanósidos sobre las afinidades respectivas por el anticuerpo 2G12. A tal efecto se han utilizado nanopartículas de oro funcionalizadas con los distintos ligandos (gliconanopartículas), y sus afinidades se han determinado mediante titulaciones competitivas con los correspondientes oligomanósidos monovalentes. En el caso del tetramanósido D1 ($\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$), se ha demostrado el beneficio termodinámico de la disposición multivalente del oligomanósido, incrementando la afinidad hasta dos órdenes de magnitud.

Anexo

Publicaciones

Carbohydrate–Carbohydrate Interaction Prominence in 3D Supramolecular Self-Assembly

Martina Fuss,[†] Mónica Luna,^{*,†} David Alcántara,[‡] Jesús M. de la Fuente,^{‡,§}
Pedro M. Enríquez-Navas,[‡] Jesús Angulo,[⊥] Soledad Penadés,[‡] and Fernando Briones[†]

Instituto de Microelectrónica de Madrid (IMM-CSIC), C/ Isaac Newton 8, E-28760 Tres Cantos, Madrid, Spain, Laboratory of Glyconanotechnology, CIC-BiomaGUNE, CIBER-BBN and IIQ-CSIC, Paseo Miramón 182, Parque Tecnológico, E-20009 San Sebastián, Spain, and Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ-CSIC), C/Américo Vespucio 49, E-41092, Sevilla, Spain

Received: May 12, 2008; Revised Manuscript Received: July 11, 2008

Self-association in water of biologically significant carbohydrate molecules is a controversial topic due to the strong solvation of these molecules in this solvent and the difficulty to experimentally detect these very weak intermolecular forces by biophysical techniques. Herein we report the tremendous ability of amphiphilic carbohydrate molecules to form complex three-dimensional architectures. We have experimentally observed the 3D self-assembly into multilayers of disaccharide neoglycolipid dimers on graphite by means of noncontact AFM and we have also theoretically modeled the interaction between two dimers in order to learn about the structure and composition of these layers. A simple bilayer structure as observed for many amphiphilic lipids was discarded by the experiments. Instead, based on the good agreement between experiments and calculations, we propose that multilayer formation takes place through the assembly of building blocks consisting of two dimers each. The fundamental key in the formation of this supramolecular structure is the complementarity between the van der Waals surfaces of the amphiphilic carbohydrate molecules, a result which differs from the most common idea that H-bonding interactions are prominent in carbohydrate-mediated interactions.

Introduction

Self-assembly driven by water is a natural process relevant for a large range of chemical, biological and physical phenomena. Weak intermolecular forces (van der Waals contacts, H-bonding) and hydration effects are responsible for self-assembly processes, but understanding and quantifying them in simple terms has been difficult. Hydrophobic effects seem to offer the best answer to explain the intermolecular attraction between lipophilic surfaces in view of the large excess of water. However, it is difficult to accept that only this effect influences the association of more complicated systems, including biological structures, which can be considered as polyamphiphilic surfaces. In the association of these molecules, water plays the most important role and other forces than hydrophobic effects have to be considered.¹ There is a need to understand the molecular forces at work in the formation of soft surfaces and interfaces in detail and to control them.²

Stable engineered artificial surfaces with specifically designed chemical or physical properties are of great interest in a broad number of fields such as catalysis, electrochemistry, corrosion, wettability, lubrication, adhesion, biocompatibility, etc. One example of stable self-assembly on surfaces is the spontaneous formation of organic molecule monolayers chemisorbed on gold (typically thiols) or on silicon (i.e.: silanes).³ In contrast to chemisorption, in physisorption, the adlayers are bonded weakly to the surface. Physisorbed lipid layers can be used as model systems to mimic biological membranes, therefore gaining

information about complex biomolecule-biomolecule and substrate-biomolecule interactions and, in general, about the structure and the formation process of the assemblies.⁴ Carbohydrate–carbohydrate interactions are implied in biological phenomena as important as the cellular adhesion or the morula compacting.^{5,6} Interaction between carbohydrates in water is usually considered to be nonstabilizing due to the strong solvation of these molecules by the excess of water. Recently, it has been demonstrated that the interaction between multiple carbohydrate molecules is specific and stabilizing,⁷ however, these molecules were chemisorbed on gold surfaces. Herein we report on the formation of physisorbed carbohydrate multilayers on graphite based only on weak interactions.

The experimental investigation of weakly attached physisorbed adlayers requires the use of minimally invasive and stable techniques capable of high-resolution imaging. Noncontact dynamic AFM⁸ has proven over the last years to be a successful method to study delicate adsorbents and highly deformable samples, including liquid droplets⁹ and films.¹⁰ This method advantages the most widely used mode of intermittent contact, also known as “tapping”, by the fact that the tip usually does not make any contact with the surface during each oscillation cycle, thus minimizing the interaction of the tip with the sample. Parameters such as cantilever driving oscillation amplitude, force constant, resonance frequency and oscillation amplitude set point are optimized for this specific operation mode. In noncontact mode the images are taken at a typical distance of about 1–5 nm from the surface.¹¹

In this work we have experimentally observed the 3D self-assembly of maltose neoglycolipid dimers **1** (Figure 1) on graphite by means of noncontact AFM and we have also theoretically modeled the interaction between two dimers in order to learn about the structure and composition of the layers. We report, for the first time, the tremendous ability of am-

* E-mail: mluna@imm.cnm.csic.es.

[†] Instituto de Microelectrónica de Madrid.

[‡] Laboratory of Glyconanotechnology.

[§] Current Address: Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), University of Zaragoza, Edificio Interfacultativo II, C/ Pedro Cerbuna 12, E-50009 Zaragoza, Spain.

[⊥] Instituto de Investigaciones Químicas.

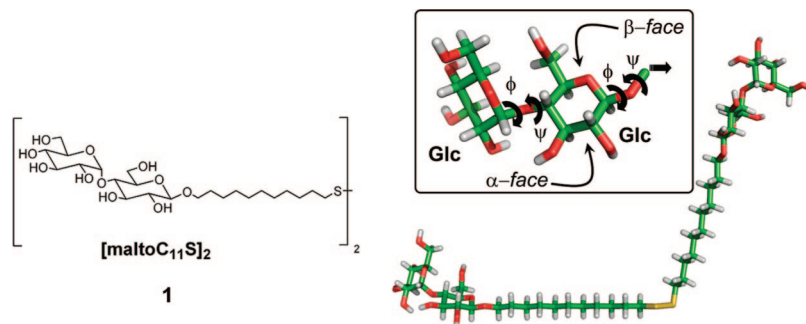


Figure 1. Left: Formula of the neoglycoconjugate 11,11'-dithio-bis[undecyl- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside] (**1**). Right: Energy minimized conformation of the neoglycoconjugate. As inset a maltose unit is magnified, and the interglycosidic dihedral angles ϕ and ψ determining the conformation of the disaccharide are indicated. The optimum values for ϕ , ψ , and the disulfide C-S-S-C torsion (in yellow) were localized from systematic relaxed energy maps.

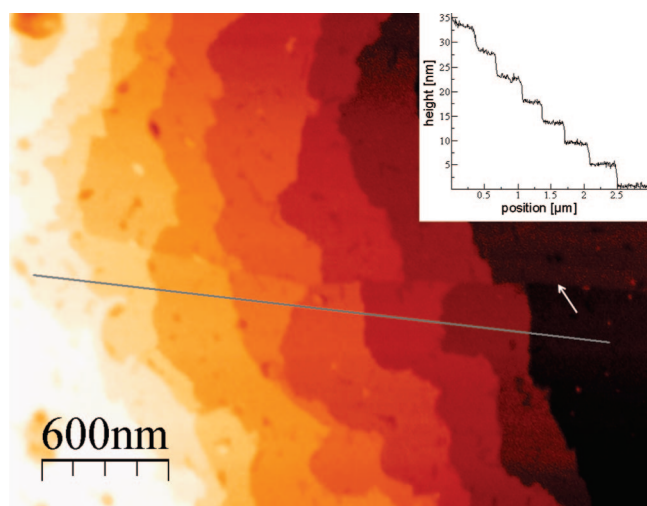


Figure 2. (maltoC₁₁S⁻)₂ molecules self-assembled into multilayers on graphite (HOPG) imaged by noncontact AFM. A graphite terrace (indicated by the arrow) can be seen crossing the image from side to side under at least nine layers of maltose disulfide molecules formed from the (maltoC₁₁S⁻)₂ solution. In the inset, a profile drawn just below the graphite terrace (gray line) shows the uniform height of the multilayers. The apparent slight inclination of the last two layers is an effect of the piezo scanner.

philic carbohydrate disulfides to form three-dimensional architectures of multilayers. As far as we know, such long-range associations between amphiphilic carbohydrates in water have never been observed. We propose that, in addition to hydrophobic effects and van der Waals interactions between alkyl chains, carbohydrate-carbohydrate interactions are a fundamental key in the organization of this supramolecular structure. Moreover, the results indicate that H-bonding does not play an important role in this carbohydrate-carbohydrate interaction.

There are a few examples in the literature where multilayers of organic molecules formed on graphite are observed, such as phthalocyanines,¹² oligothiophenes,¹³ or unsaturated fatty acid amides.¹⁴ However, most studies of self-assembled organic molecules physisorbed on graphite focus on two-dimensional assemblies.¹⁵ These monolayers of flat-lying molecules show a height low enough to be able to characterize them with STM.

Experimental Methods

Preparation of Neoglycolipid 11,11'-Dithiobis[undecyl- β -maltoside]. Compound **1** was prepared as already described¹⁶ by glycosylation of the conveniently protected maltose disaccharide (α -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranose) trichloroacetimidate with the 11-thioacetylundecanol and subsequent

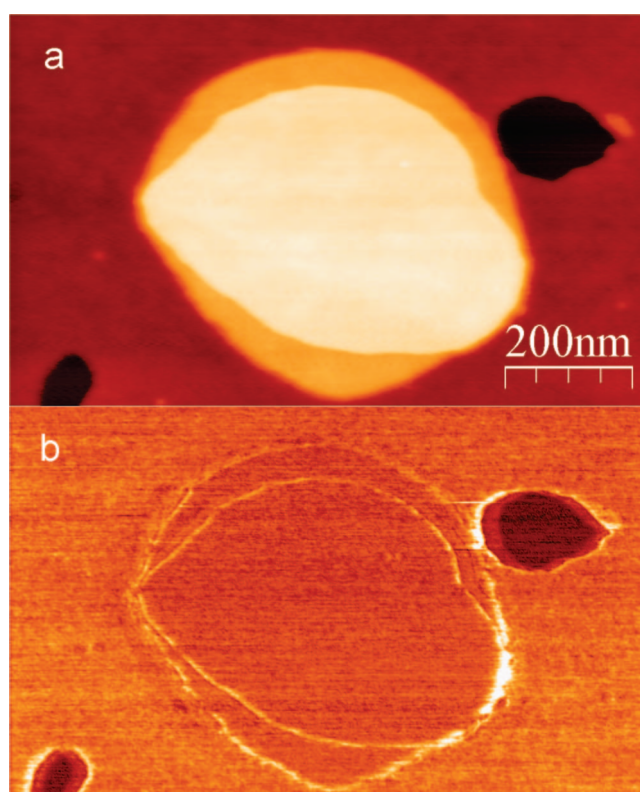


Figure 3. Using cantilevers of force constant as low as 0.05 N/m, we were able to obtain images of the multilayers in contact mode without apparent damage to the sample. In this experiment, topography (a) and a friction (b) images of an area exposing both organic multilayers and graphite were simultaneously obtained. In part a, the underlying graphite is only seen in two small dark areas which represent holes in the first neoglycolipid layer. The rest of the areas of the image consist of a total of three organic layers: one, three and the last visible layer (lightest color) is four building blocks high. In the friction image, graphite is clearly distinguished due to its lower friction force, whereas the maltoside layers have a uniform friction value (5.6 times larger). An interesting point to notice is that friction is the same for all layers of the multilayer. This result supports the hypothesis that the surface chemical composition of each layer is identical.

deprotection and purification. The product was isolated as a white solid that after washing with cold ethanol gave the disulfide **1**.

Sample Preparation for AFM Analysis. A droplet (10 μ L) of an aqueous solution of maltose neoglycolipid **1** (70–150 μ g/ml) was deposited on freshly cleaved graphite which is a reproducible and well characterized, atomically flat hydrophobic surface. These samples were then left to dry at about 6 $^{\circ}$ C during

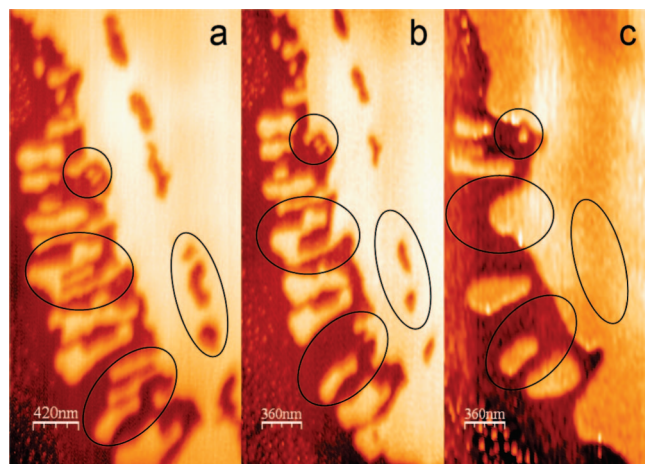


Figure 4. Noncontact AFM images of a single (maltoC₁₁S⁻)₂ layer taken at (a) 64%, (b) 82%, and (c) 90% relative humidity. The temperature remained at 23 °C for all images. It can be seen that the mobility of the islands increases with relative humidity. At 80% small rearrangements are already observed: smaller islands form larger ones, island contours get smoother and holes start to fill. At 90% RH, a general smoothing effect of all features is observed. By this rounding of the planar features, a minimum of the layer's perimeter or step edge energy is reached.

24 h, allowing a slow evaporation of the water. AFM imaging took place at normal ambient conditions (23 °C and 35% RH) unless otherwise stated.

AFM Operation. The microscopy studies were performed using an AFM from Nanotec Electrónica (www.nanotec.es) and the AFM topographic images obtained were processed using the WSxM program.¹⁷ For the operation in dynamic noncontact mode, the nominal force constants of the cantilevers¹⁸ were 0.73 N/m with a resonance frequency around 71 KHz. The peak-to-peak oscillation amplitude during imaging was about 5 nm.

Molecular Modeling. We have carried out molecular modeling calculations to study the intermolecular interactions between two maltose neoglycolipid dimers **1**. The molecular models were created with Sybyl 7.3 (Tripos Inc.). For calculations, the Tripos force field was used, with Gasteiger-Huckel charges, a non-bonded cutoff of 1.5 nm, and a dielectric constant of 80. The energy minimization process involved a maximum of 1000 iterations of conjugated gradients with a termination gradient value of 0.01 kcal/mol·Å. In all the cases convergence was reached before the maximum number of iterations. To simplify the calculations we considered a canonical zigzag “all anti” conformation for the hydrophobic spacers. The force-field based methodology for calculating the molecular conformations, and the intermolecular interactions within the neoglycolipid dimers followed a two step protocol: first, systematic relaxed energy maps for the dihedral torsions corresponding to the disulfide bond (C–S–S–C), and to the glycosidic torsions ϕ (H1'–C1'–O1–C4) and ψ (C1'–O1–C4–H4) were calculated for an isolated neoglycolipid (systematic increments of 20° were applied to any given torsion, and an energy minimization was done for each conformer as described above, which finally involved the determination of the molecular mechanics energy of 324 conformers for a pair of torsions; e.g., ϕ and ψ) and the corresponding energy minima regions were localized (Figure 5b) from the isocontour plot of energy versus torsion angles. Second, to calculate the interaction between two different neoglycolipids we carried out energy minimization calculations following an α -face/ β -face approach of their corresponding maltose units, as observed in the crystal structure of α -maltose, with their molecular global conformations as determined previ-

ously, in a way that the corresponding spacer tails point toward opposite directions. To check the possibility of multiple minima a conformational search around the minimum was done by applying 15 translation steps of 0.1 nm to one of the two disulfide units along the axis containing the two contacting neoglycolipid tails, as well as three rotation steps (60°) around the same axis. Finally, the conformation with optimum geometry resulting from this molecular mechanics protocol, not only showed the lowest total energy of the whole set of generated conformers but also the lowest value of the corresponding van der Waals energy term of the force field, indicating the importance of this kind of nonbonded interaction in the stabilization of the dimer structure (though molecular mechanics energies cannot be directly correlated to experimental energy observables, comparison between conformers are physically meaningful).

Results and Discussion

The deposition of a droplet of a water solution of (maltoC₁₁S⁻)₂ molecules **1** on recently cleaved HOPG resulted in the self-assembly of the organic material into multiple layers (Figure 2). Areas with more than 14 layers were observed. Only noncontact operation succeeded in imaging the multilayers with cantilevers of 0.7 N/m force constant. Contact operation with these cantilevers produced complete disassembling and disruption of the layers. Even at minimum loads, the AFM tip “brushed” the organic dimers away. On the other hand, the layers were stable for periods of at least a year under normal ambient conditions. It is interesting to note that the assembly of the layers found seems to be linked to the existence of a hydrophobic surface underneath since the same experiment carried out on recently cleaved hydrophilic mica surface did not result in any organization of the organic material.

On some occasions, graphite terraces can be seen beneath the maltoside multilayers. In the example shown in Figure 2, one such graphite step crosses the image from side to side and at least nine layers of (maltoC₁₁S⁻)₂ cover the step preserving its height. Since the crystal structure of graphite¹⁹ is very well-known (biatomic step height: 0.67 nm), graphite steps can be useful for fine-calibrating the height of the maltoside layers (see Supporting Information). The average height value for a single layer determined in that way is 4.2 ± 0.5 nm.

No difference in height was noted between the lower and upper organic layers, nor between the first and subsequent layers, in images of multiple layers. AFM experiments where friction (Figure 3) and electrostatic forces (see Supporting Information) were measured gave the same property values for all layers and different values for the exposed graphite surface, indicating that the surface chemical composition of each layer is the same. These results imply in particular that a typical symmetric bilayer structure (hydrophilic parts outward, hydrophobic parts inward in a polar medium) as formed by cylindrical amphiphilic biomolecules has to be excluded in the present case. In a symmetric bilayer structure only the rather hydrophilic sugar would be located at the interface with water but then the first layer should be a monolayer with the hydrophobic alkyl chains located at the interface with graphite and present only half the height of the remaining layers. On the other hand, if both the hydrophobic (alkyl chain) and hydrophilic (maltose) parts could be on top of the layers so that single monolayers were observable—possibly after water evaporation—a chemical alternation for the surface of each layer should be observed but it is not (see Figure 3 and Supporting Information).

In order to study the effect of water on the organic multilayers we acquired consecutive noncontact AFM images of the same

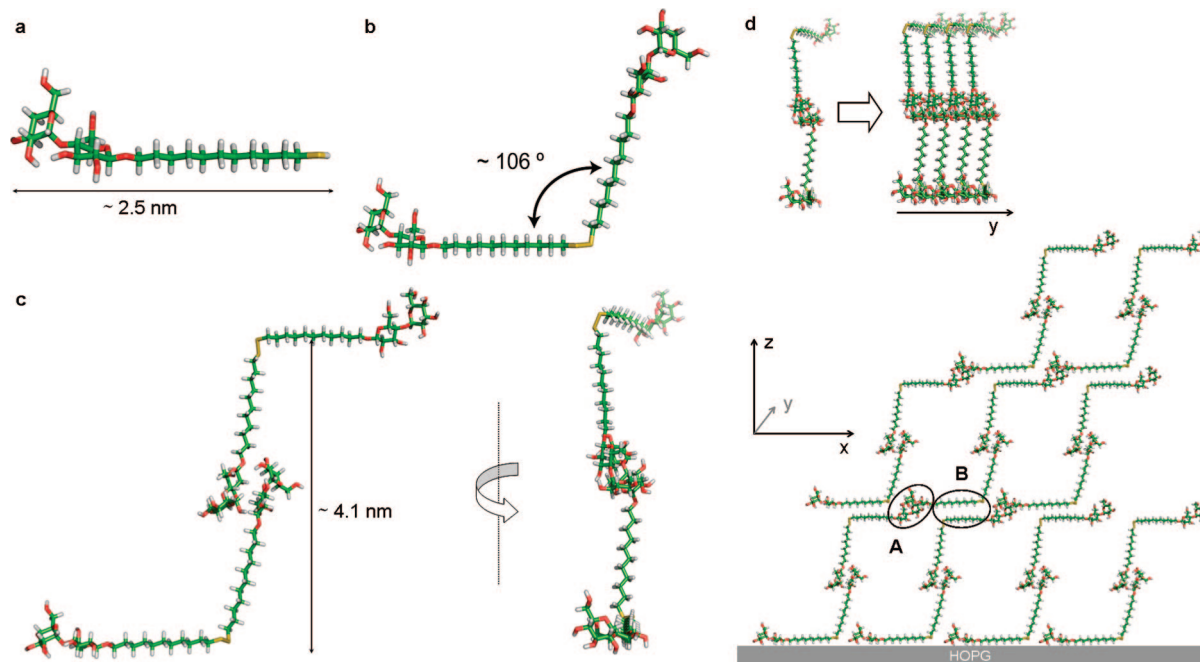


Figure 5. (a–c) Conformations calculated for (a) the maltose neoglycolipid and (b) the corresponding dimer (maltoC₁₁S₋)₂ (**1**). (c) Repetitive unit (“building block”) obtained by theoretical calculations based on an α -face/ β -face approach, showing the interactions between two neoglycolipid dimers. In this minimum energy configuration, intermolecular interactions take place between the two disaccharide units leading to a bottom-to-top distance of 4.1 nm. (d) Cartoon of the proposed model for the multilayer formation of **1** on graphite. In y -direction, pairs of dimers as shown in part c align in a parallel fashion. A suggested assembly in the x - z -plane is shown in the lower part of part d. Hydrophobic forces between the alkyl spacers and further carbohydrate interactions between the maltose units are thought to be responsible for the self-assembling in all three directions. Together, they could provide the cohesion necessary both in x -direction and between layers (vertically) through the interactions at A and B.

area while the relative humidity (RH) was progressively increased from 0% to 95%. We observed that the organic layer step height remained the same for all RH values and that the mobility of the (maltoC₁₁S₋)₂ molecules increased as the relative humidity (RH) was risen above 60% RH (Figure 4a). High relative humidity (about 80%) triggered a surface migration and rearrangement of the observed features: small islands got together forming larger ones and holes were covered (Figure 4b). At 90% RH (Figure 4c) all planar features showed rounded shapes. The imaging of an area larger than the one studied in Figure 4 was performed immediately after the image of Figure 4c, also at this high RH (90%), to check that the increase in mobility described was present everywhere on the surface and was not just a phenomenon induced by the scanning of the tip. The organic layer’s height is preserved independently of the ambient relative humidity, implying that the interaction between molecules is not affected by the presence of water. This result indicates desolvation forces of the van der Waals surfaces as the predominant contribution to interaction between the neoglycolipid units. If polar interactions such as hydrogen bonding would play an important role, the increase of the RH would have the opposite effect: the layers would disassemble as water molecules would compete for possible hydrogen binding sites.

In an attempt to understand the formation of the three-dimensional multilayers on graphite we have modeled the conformation of the isolated disulfide dimers and the interaction between them. Parts a and b of Figure 5 show the preferred conformation obtained for the isolated maltose neoglycolipid and for the corresponding disulfide. To calculate the interaction between two maltose molecules from different neoglycolipids **1**, we performed energy minimization calculations following an α -face/ β -face approach of the corresponding maltose units, as observed in the crystal structure of α -maltose,²⁰ in a way that the corresponding spacer tails point toward opposite

directions. The molecular mechanics calculations (Figure 5c) indicate that indeed this mode of interpenetration of two maltose molecules from different neoglycolipids is energetically favorable due to the presence of weak intermolecular interactions between the disaccharide units as also observed for maltose anomers.²¹ The theoretical results point out that there are good complementarities between the van der Waals surfaces of both interacting maltose molecules. Moreover, mapping the lipophilic potential on each interacting surface shows that the matching is also good: the most lipophilic part of the maltose is located at the α -face of “reducing” glucose residue that makes a covalent bond with the alkyl chain, and in both interacting maltose molecules these are the residues presenting the highest number of contacts. Intermolecular hydrogen bonding between the maltose molecules seems less relevant.

In this model (Figure 5c), carbohydrate-carbohydrate association leads to about 0.9 nm of a maltose moiety (a little less than the length of a typical disaccharide, 1 nm) buried under the other disaccharide unit resulting in a distance between top and bottom alkyl chains of 4.1 nm from a total length of about 5 nm corresponding to twice the size of a neoglycolipid monomer (Figure 5a). The configuration obtained for the disulfide neoglycolipid interaction (Figure 5c) allows the alkyl chain and the α -face of the reducing glucose residue to maximize hydrophobic contacts with the HOPG surface and to orient the rest of the molecule in a standing-up position. Thus, according to this model, the step height of each layer is ~ 4.1 nm which agrees very well with the observed experimental value (4.2 nm). This orientation would not be possible on a hydrophilic surface which is in accordance with the experimental observation that this organic compound does not organize three-dimensionally on mica.

The good correspondence between the experimental step height value (~ 4.2 nm) and the theoretical distance between

top and bottom alkyl chains (~4.1 nm) lead us to believe that the organic layers observed are formed by the lateral assembly (Figure 5d, upper part) of "building blocks" in the configuration obtained from our calculations (Figure 5c). This model is supported by the results from the increasing RH experiment where the self-assembled layer reorganizes in order to decrease the number of molecules exposed to the humid environment, pointing out that hydrophobic forces are relevant in the lateral packing of the organic layer. The interactions between neighboring alkyl chains, dominated by hydrophobic forces, are excellent candidates for the lateral self-assembly of the "building blocks" in the configuration shown in Figure 5d, upper part. Manual lateral docking of two "building blocks" to the closest possible distance without interpenetration of the carbohydrates, leads to a minimum distance between protons of the alkyl chains of about 2.7 Å which falls within the attractive van der Waals potential well for hydrogen atoms. Moreover, to facilitate their interaction, the intrinsic flexibility of the glycosidic bonds could produce small reorientations of the disaccharides, allowing the alkyl chains to get even closer, toward the minimum of the van der Waals potential well (2.4 Å) and reinforcing the interaction between the sugar moieties.

We propose a model for the multilayer formation of **1** on graphite (Figure 5d). In the upper part of figure 5d, a cartoon of the lateral assembly in *y*-direction is shown: the building blocks obtained theoretically are arranged in a parallel way. In the lower part of figure 5d, we suggest a configuration in the *x-z*-plane which presents important advantages with respect to other possible alternatives since this model maximizes the cohesion energy between different layers by means of two different interactions, justifying the long-range order of the layers we observed. This model favors carbohydrate interactions between the maltose units of one layer and the ones from the next (upper) layer as shown in Figure 5d (encircled under A), as well as the interactions between aliphatic chains (hydrophobic effect) (encircled under B). Besides from facilitating growth vertically, this configuration also contributes to lateral cohesion in *x*-direction since each building block from the upper layer would then interact with two different building blocks from the lower layer: with one of them, through the respective aliphatic chains, and with the other, through their disaccharide units (carbohydrate interactions). Such a double interaction of every building block would act like a zip fastener between two layers of assembled dimers.

We have also performed a control experiment which consisted in repeating the previous experiment with different molecules. We used the disulfide of a mixed linker built by an aliphatic chain of 11 methylene groups and an hexa-ethylene glycol (HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)₆OH). Thus we substituted the carbohydrate part of the previous maltose neoglycoconjugate by 6 ethylene glycol groups to observe the effect of the absence of the carbohydrate-carbohydrate interaction. The results show that the structure obtained is not based on a "standing up" configuration as in the previous maltose neoglycoconjugate experiment but, instead, on a "lying down" configuration (see Supporting Information).

Conclusions

By noncontact AFM, we have observed that the physisorption of maltose neoglycolipid disulfide on HOPG produces self-assembling of the organic molecules into a multilayer structure which is stable in time. It has been found^{22,23} that the self-assembly process of dialkyl disulfides on graphite results in monolayers, the molecules lying flat on the surface, unlike

maltose neoglycolipid molecules where the layer height (4.2 nm) suggests a standing-up configuration for one alkyl chain. We also have observed that the substitution of the carbohydrate part of the molecule by a 6-ethylene glycol resulted in a lying-down configuration. The theoretical calculations of the interaction between two maltose dimers resulted in a configuration that accurately reproduces the thickness of the organic layer. An important point to note is that the experimental height (4.2 nm) found for the maltoside layers can only be explained on the base of carbohydrate-carbohydrate interactions between two disaccharide molecules from different neoglycolipid dimers. AFM experiments and qualitative analysis of the theoretical results indicate that desolvation forces of the complementary van der Waals surfaces are predominant between the amphiphilic carbohydrates, a result that differs from the most common idea that H-bonding interactions are prominent in carbohydrate-mediated interactions. We can conclude that the driving forces underlying the formation of this 3D supramolecular structure are the confluence of hydrophobic interactions between the lipophilic alkyl chains of the neoglycolipid and the hydrophobic substrate HPOG, along with carbohydrate-carbohydrate interactions between the maltose disaccharides.

Acknowledgment. This work has been supported by the Ministry of Education and Science of Spain (MEC) through the projects: CTQ2005-07993-C02-02/BQU, CTQ2005-07993-C02-01/BQU, NAN2004-09125-C07-01 and NAN2004-09125-C07-02. M.F. acknowledges financial support from the MEC. J.M.d.I.F. and M.L. acknowledge financial support from the MEC through the Ramon & Cajal program. J.A. acknowledges support from the MEC through the Juan de la Cierva program.

Supporting Information Available: Experimental results and figures from three further AFM measurements. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) (a) Ball, P. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 74–108. (b) Lemieux, R. U. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 373–380. (c) Kornyshev, A. A.; Leikin, S. *Am. Phys. Soc.* **1989**, *40*, 6431–6437.
- (2) (a) Allara, D. L. *Nature* **2005**, *437*, 638–639. (b) Chandler, D. *Nature* **2005**, *437*, 640–647. (c) Tanaka, M.; Sackman, E. *Nature* **2005**, *437*, 656–663. (d) Barth, J. V.; Costantini, G.; Kern, K. *Nature* **2005**, *437*, 671–679.
- (3) (a) Ulman, A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533–1554. (b) Mrksich, M. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 267–273. (c) Diez-Perez, I.; Luna, M.; Teheran, F.; Ogletree, D. F.; Sanz, F.; Salmeron, M. *Langmuir* **2004**, *20*, 1284–1290.
- (4) (a) Richter, R. P.; Him, J. L. K.; Tessier, B.; Tessier, C.; Brisson, A. R. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 3372–3385. (b) Reviakine, I.; Bergsma-Schutter, W.; Brisson, A. J. *Struct. Biol.* **1998**, *121*, 365–361.
- (5) Rojo, J.; Morales, J. C.; Penadés, S. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *218*, 45–92.
- (6) Hakomori, S.-I. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 473–482.
- (7) (a) de la Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; Rojas, T. C.; Rojo, J.; Cañada, J.; Fernández, A.; Penadés, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2258–2261. (b) Tromas, C.; Rojo, J.; de la Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; García, R.; Penadés, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 3052–3055. (c) Hernáiz, M. J.; de la Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; Penadés, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1554–1557. (d) de la Fuente, J. M.; Eaton, P.; Barrientos, A. G.; Menéndez, M.; Penadés, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6192–6197.
- (8) (a) Anczykowski, B.; Krüger, D.; Babcock, K. L.; Fuchs, H. *Ultramicroscopy* **1996**, *66*, 251–259. (b) Kühle, A.; Sørensen, A. H.; Bohr, J. *J. Appl. Phys.* **1997**, *81*, 6562–6569. (c) Luna, M.; Colchero, J.; Baró, A. M. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 9576–9581.
- (9) Luna, M.; Colchero, J.; Gómez-Herrero, J.; Baró, A. M. *Appl. Surf. Sci.* **2000**, *157*, 285–289.
- (10) Gil, A.; Colchero, J.; Luna, M.; Gómez-Herrero, J.; Baró, A. M. *Langmuir* **2000**, *16*, 5086–5092.

- (11) (a) Luna, M.; Colchero, J.; Baró, A. M. *Appl. Phys. Lett.* **1998**, *72*, 3461–3463. (b) de Pablo, P. J.; Colchero, J.; Luna, M.; Gómez-Herrero, J.; Baró, A. M. *Phys. Rev. B* **2000**, *61*, 14179–14183.
- (12) Bottari, G.; Olea, D.; Gómez-Navarro, C.; Zamora, F.; Gómez-Herrero, J.; Torres, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2026–2031.
- (13) Leclère, P.h.; Surin, M.; Viville, P.; Lazzaroni, R.; Kilbinger, A. F. M.; Henze, O.; Feast, W. J.; Cavallini, M.; Biscarini, F.; Schenning, A. P. H. J.; Meijer, E. W. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4452–4466.
- (14) Miyashita, N.; Möhwald, H.; Kurth, D. G. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 4259–4262.
- (15) De Feyter, S.; De Schryver, F. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 4290–4302.
- (16) Barrientos, A. G.; de la Fuente, J. M.; Rojas, T. C.; Fernández, A.; Penadé, S. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1909–1921.
- (17) Horcas, I.; Fernández, R.; Gómez-Rodríguez, J. M.; Colchero, J.; Gómez-Herrero, J.; Baró, A. M. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, *78*, 1–8, 013705/.
- (18) Olympus Optical LDT, Japan.
- (19) Pauling, L. *The nature of the chemical bond*, 3rd ed.; Cornell University Press: Ithaca, NY, 1960; p 235.
- (20) Takusagawa, F.; Jacobson, R. A. *Acta Crystallogr.* **1978**, *B34*, 213–218.
- (21) Yates, J. R.; Pham, T. N.; Pickard, C. J.; Mauri, F.; Amado, A. M.; Gil, A. M.; Brown, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10216–10220.
- (22) Noh, J.; Hara, M. *Langmuir* **2000**, *16*, 2045–2048.
- (23) Tao, F.; Bernasek, S. L. *Langmuir* **2007**, *23*, 3513–3522.

JP804191J

Ligand–Receptor Binding Affinities from Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy: The Binding Isotherm of STD Initial Growth Rates

Jesús Angulo,^{*,[a]} Pedro M. Enríquez-Navas,^[b] and Pedro M. Nieto^{*,[a]}

Dedicated to Professor Jesús Jiménez-Barbero on the occasion of his award of the Whistler International Award in Carbohydrate Chemistry

Abstract: The direct evaluation of dissociation constants (K_D) from the variation of saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy values with the receptor–ligand ratio is not feasible due to the complex dependence of STD intensities on the spectral properties of the observed signals. Indirect evaluation, by competition experiments, allows the determination of K_D , as long as a ligand of known affinity is available for the protein under study. Herein, we present a novel protocol based on STD NMR spectroscopy for the direct measurements of receptor–ligand dissociation constants (K_D) from single-ligand titration experiments. The influence of several experimental factors on STD values has been studied in detail, confirming the marked impact on standard determinations of protein–ligand affinities by STD NMR spectroscopy. These factors, namely, STD

saturation time, ligand residence time in the complex, and the intensity of the signal, affect the accumulation of saturation in the free ligand by processes closely related to fast protein–ligand rebinding and longitudinal relaxation of the ligand signals. The proposed method avoids the dependence of the magnitudes of ligand STD signals at a given saturation time on spurious factors by constructing the binding isotherms using the initial growth rates of the STD amplification factors, in a similar way to the use of NOE growing rates to estimate cross relaxation rates for distance evaluations. Herein, it is demonstrated that the effects of these factors are cancelled out by analyzing

the protein–ligand association curve using STD values at the limit of zero saturation time, when virtually no ligand rebinding or relaxation takes place. The approach is validated for two well-studied protein–ligand systems: the binding of the saccharides GlcNAc and GlcNAc β 1,4GlcNAc (chitobiose) to the wheat germ agglutinin (WGA) lectin, and the interaction of the amino acid L-tryptophan to bovine serum albumin (BSA). In all cases, the experimental K_D measured under different experimental conditions converged to the thermodynamic values. The proposed protocol allows accurate determinations of protein–ligand dissociation constants, extending the applicability of the STD NMR spectroscopy for affinity measurements, which is of particular relevance for those proteins for which a ligand of known affinity is not available.

Keywords: binding constants • binding isotherms • dissociation constants • NMR spectroscopy • proteins

[a] Dr. J. Angulo, Dr. P. M. Nieto
Department of Bioorganic Chemistry
Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC - US)
Américo Vespucio 49, 41092, Sevilla (Spain)
Fax: (+34) 954460565
E-mail: jesus@iiq.csic.es
pedro.nieto@iiq.csic.es

[b] P. M. Enríquez-Navas
Laboratory of GlycoNanotechnology, CIC biomaGUNE
CIBER-BBN, Paseo Miramón 182, Parque Tecnológico
20009 San Sebastián (Spain)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200903528>.

Introduction

Nowadays, there is great interest in investigating the nature of the molecular recognition processes between biomolecules, since their specific interactions regulate essential processes of life. This interest reflects the relevance of their biomedical applications, particularly the major importance of molecular recognition processes of small ligands by biological receptors for the design of new active compounds in pharmaceutical research. Consequently, the structural and energetic characterization of these interactions at a molecu-

lar level constitutes an indispensable facet of this activity. To this aim, NMR spectroscopy has been proven to be a powerful technique and a large amount has been published on NMR spectroscopy investigations of protein–ligand interactions.^[1] An important number of NMR spectroscopy applications have also been widely used to characterize the equilibrium binding constant for small-molecule–biomolecule complexes by means of both, receptor- and/or ligand-observed methods.^[2]

In particular, among the ligand-observed NMR spectroscopy methods, saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy experiments have proven to provide high sensitivity and robustness, requiring little amounts of unlabeled macromolecules, and being valid to study complexes involving receptors with high molecular weight.^[3] Briefly, the method consists of applying a selective radiofrequency irradiation to saturate only the macromolecule NMR signals. Difference spectroscopy then detects the transfer of this saturation by intermolecular NOE to any small molecule that is bound to the macromolecule under conditions of fast chemical exchange. The magnitude of any transferred saturation is related to the proximity of the ligand proton to the protein surface, so of particular interest is its ability to get information at the atomic level about the ligand-binding epitope.^[4] Recently, the scope of STD NMR spectroscopy experiments was extended to allow the quantitative analysis of bound ligand conformation within the protein binding pocket by full-matrix relaxation approaches (CORCEMA-ST and SICO procedures).^[5]

From its basic principles, it can be inferred that the intensity of an STD signal (η_{STD}) corrected by the excess of ligand (STD amplification factor, STD-AF) gives indirect information about the concentrations of protein–ligand complexes in solution,^[4,6] and therefore, STD NMR spectroscopy results from titration experiments might be employed to derive ligand–receptor binding affinities. However, direct approaches have failed to give correct values of equilibrium dissociation constants (K_{D}) from STD NMR spectroscopic titrations, since it has been demonstrated that the magnitudes of the determined constants depend on the particular STD signals of the ligand chosen to build the corresponding binding isotherms.^[7] Thus, there is a relatively large uncertainty that is apparently inherent to the determination of K_{D} by STD NMR spectroscopy which precludes the use of this technique for accurate measurements of protein–ligand affinities in solution. As a way of overcoming those difficulties, accurate K_{D} values have been determined by competition studies,^[4,8] in which the unknown K_{D} of a ligand is determined by monitoring its displacement from the protein binding site while a reference ligand of known affinity is titrated over the same sample, using the Cheng–Prusoff equation.^[9] The applicability and robustness of this competitive approach have been broadly demonstrated,^[4,8,10] and even novel modified pulse sequences using isotopically labeled ligands have been devised to avoid possible problems of signal overlap.^[11] Nevertheless, the main drawback is the need for a reference competitive inhibitor

for which the affinity must be previously known by other technique.

We are engaged in STD NMR spectroscopy quantitative studies of protein–ligand interactions, some of which involve multimodal binding of the same ligand on one binding site, in which STD intensities can be perceptively affected by ligand cross-rebinding processes.^[12] We have shown that such multimodal systems can be quantitatively treated by an appropriate analysis of STD NMR experiments based on STD initial growth rates. Thus, the experimental system can be deconvoluted as a simple sum of the contributions from each mode.^[12]

This approach is justified by considering the effects of fast ligand rebinding during the receptor saturation in the STD experiment. If there is a certain probability that a given ligand molecule reenters into the binding site after a preceding binding event (and this rebinding is fast enough related to the relaxation properties), then the ligand spin populations would be partially perturbed due to the previous transfer step, and hence, its capacity to receive more transfer of saturation from the receptor will be different than that from a fresh ligand molecule.^[13] Consequently, the amount of magnetization transferred to the free ligand would be smaller. To the best of our knowledge, the effects of this rebinding process in STD have not been considered before, probably because typical experimental conditions for standard STD NMR spectroscopy (i.e., for binding detection, screening, and determination of ligand group epitopes) disfavor ligand rebinding because it uses high ligand-to-protein ratios.^[1b] In contrast, protein–ligand titration experiments can involve large fractions of bound ligand, during the low ligand-to-protein ratio regions of the experimental isotherm, increasing then the likelihood of rebinding events. Indeed, we demonstrate herein that rebinding is one of the main causes of errors in the determination of affinities by STD NMR spectroscopic titration experiments.

Herein, we show that STD NMR spectroscopic titration experiments can deliver accurate equilibrium dissociation constants K_{D} of protein–ligand interactions, if those factors that are affecting the accumulation of the ligand proton saturation in the bulk solution are removed by an appropriated experimental setup. This can be done by constructing the binding (Langmuir) isotherm as a function of the ligand concentration in the sample using the initial growth rates of the STD amplification factors (STD-AF₀), instead of the STD-AF factors at a given saturation time.^[14] The initial growth rate corresponds to the STD-AF value at the limit of zero t_{sat} , when virtually no ligand turnover takes place, therefore, avoiding the potential effects of fast protein–ligand rebinding processes. They are analogous to the STD initial slopes used to remove relaxation biases in the determination of ligand epitopes.^[15] The feasibility of the binding isotherm of STD initial growth rates approach for obtaining accurate experimental values of ligand–receptor dissociation constants is demonstrated for two well-studied protein–ligand systems, affinities of which have been reported in the literature: the binding of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)

and *N,N'*-diacetylglucosamine (GlcNAc β 1,4GlcNAc, chitobiose) to the plant lectin wheat germ agglutinin (WGA),^[16] and the interaction of L-tryptophan to bovine serum albumin (BSA).^[17]

Results and Discussion

According to the dependence of STD intensities on the bound ligand concentration, STD-NMR might be used to estimate binding affinities. Unfortunately, there are several well-known factors intrinsic to the STD experiment that affect to STD signals and have precluded their use to derive dissociation constants from titration experiments.^[7] The intensity of an STD signal (and hence the magnitude of STD-AF) reflects mainly two factors: the efficiency of saturation transfer from protein protons during the bound state (intermolecular protein–ligand NOEs) and the rate of accumulation of saturated ligand molecules in the free state during the saturation time. Whereas the first factor is intrinsic to the system under study, since it depends on the 3D geometry of the protein–ligand complex, the second is related to the kinetics of the system, and depends on saturation time, concentrations, protein to ligand ratio, temperature, and so forth.^[1b,5d] The influence of these parameters on the accumulation of saturated ligand is the source of K_D values bias. However, these factors are susceptible to optimization by an appropriate experimental setup. Therefore, it is of great interest to determine the impact of these parameters on the final outcome.

First, we analyzed the dependence of the K_D measured from STD-AF on several factors: 1) the saturation time of the STD NMR experiment, 2) the amount of saturation transfer, and 3) the fraction of bound ligand (concentration of protein). We have reproduced the reported dependences of K_D values on the monitored ligand proton STD signal^[7] and describe the dependence of new factors, such as saturation time and the residence time in the bound state. We also discuss the key role of fast rebinding processes in the final outcome of the titration experiments. Finally, we have applied an alternative protocol using the STD-AF initial growth rates to build the binding isotherms, showing how all of the observed deviations are cancelled out, and the values from the different ligand protons converge towards one single value, which is the best approximation to the thermodynamic value of K_D by STD NMR spectroscopy.

Analysis of the factors affecting the determination of ligand–receptor dissociation constants by STD NMR titration experiments

Effect of STD NMR saturation time (t_{sat}): Typical STD NMR spectroscopic titration experiments monitor the evolution of STD-AF^[4] as a function of the total increasing concentration of ligand by recording series of STD experiments at different ligand-to-receptor ratios. A key experimental variable of the STD NMR spectroscopy experiment is the saturation

time (t_{sat}), since it affects the intensities of the peaks and, therefore, the sensitivity of the experiments. In fact, for any given ligand concentration, STD intensities will grow with t_{sat} , up to a point at which a steady state is reached for long saturation times (e.g., $t_{\text{sat}} > 5$ s). Although t_{sat} can be adjusted for each case, in most of the STD applications saturation times of 2 s are typically used.

We have studied the influence of the saturation time, t_{sat} , of the STD NMR spectroscopy experiment on the final binding isotherm and, consequently, in the final determination of the dissociation constant. To that aim, we carried out a titration of chitobiose in a sample containing 46 μM of the lectin WGA and constructed four different binding isotherms from the dependence of the STD-AF values with the ligand concentration, each one made from values obtained at different saturation times (1–4 s) in the corresponding STD NMR spectroscopy experiments (Figure 1).

The binding isotherms based on the STD-AF values ($t_{\text{sat}} = 1, 2, 3, 4$ s) of the methyl signal (acetamide) of the reducing GlcNAc ring of chitobiose (Figure 1a) upon binding to WGA are shown in Figure 1b. For larger saturation times, higher values of STD-AF are obtained, which in turn leads to higher plateau values of the curves (the parameter α_{STD} , see the Experimental Section), and better sensitivity of the experiments. The normalized STD-AF curves (Figure 1c) demonstrate the impact of saturation time on the binding isotherm, as an increase of t_{sat} leads to a slower growth of STD-AF values with ligand concentration. This effect leads to an increase of the “apparent” K_D value (Figure 1c, inset).

The magnitudes of apparent dissociation constants determined from fitting to a one-site Langmuir equation are gathered in Table 1. The apparent K_D increases monotonically with t_{sat} , underestimating the protein–ligand affinity for long saturation times. Interestingly, the best agreement with the dissociation constant determined by isothermal titration calorimetry (200 μM)^[16], corresponds to the apparent K_D determined at the lowest saturation time (1 s, 300 μM). These results highlight the disadvantages of making use of large saturation times for achieving better signal-to-noise ratios, since the deviations in the determinations of K_D values by STD NMR spectroscopy are, disappointingly, greater under these conditions.

Effect of STD NMR signal intensity: Because the best signal-to-noise ratio corresponds to the most intense STD signal, it would be advantageous to use these signals to monitor the binding isotherm for the determination of dissociation constants. However, if rebinding of a previously polarized ligand is fast in the relaxation (T_1) timescale, the most intense STD signals will be the most affected by interference caused by consecutive binding steps and therefore subject to larger errors in the determination of K_D . To analyze this issue, we have studied the binding of L-tryptophan to BSA at several saturation times by following the same methodology as before.

The STD-AF buildup with saturation time for four selected protons (H α , H δ 1, H ϵ 3, and H ζ 2) of L-tryptophan

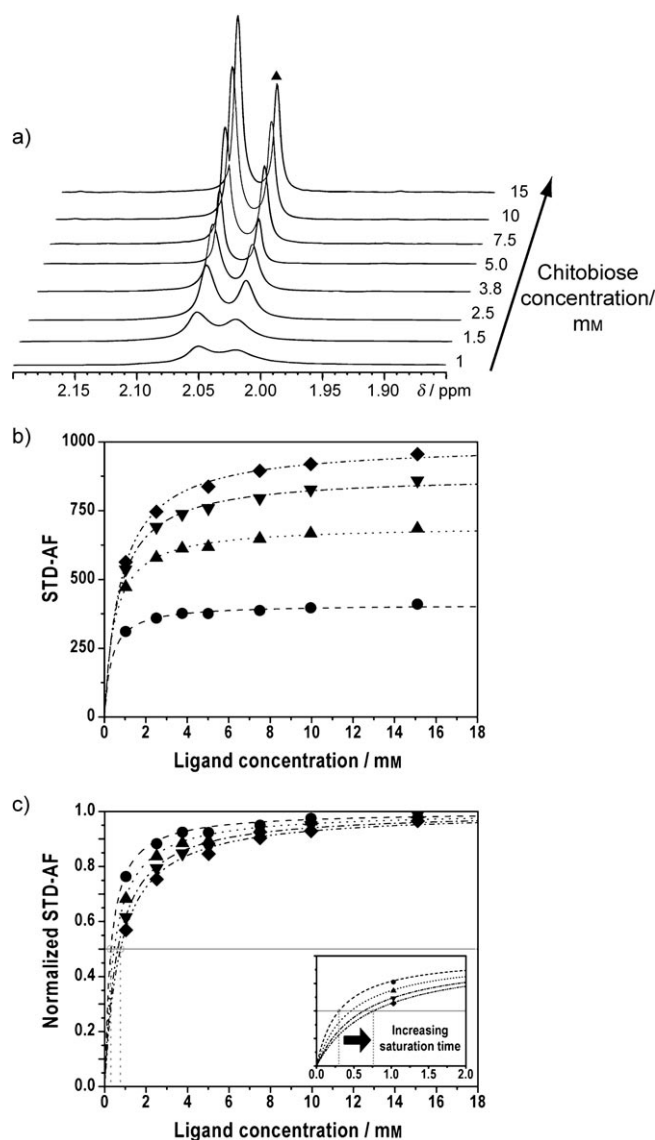


Figure 1. Effect of the saturation time of the STD NMR experiments on the determination of protein–ligand binding affinity. a) Stacked plot of the acetamide spectral region of 1D STD NMR spectra recorded at a single saturation time ($t_{\text{sat}} = 2$ s, 15°C) during the titration of a sample of $46\ \mu\text{M}$ of WGA with chitobiose. Labeled with a black triangle is the signal monitored in the isotherms below. b) Binding isotherms of STD-AF values of the acetamide methyl proton of the reducing sugar ring of chitobiose obtained by using different saturation times (1 (●), 2 (▲), 3 (▼), and 4 s (◆)). c) Isotherms normalized against their corresponding plateau values (a_{STD}). Note that the ligand concentration for semisaturation of the protein binding site (STD-AF=0.5) corresponds graphically to the K_D value. The inset shows an expansion of the first part of the Langmuir curve and the range of variation of K_D is graphically delimited by the vertical dotted lines. The dashed and dotted straight lines correspond to the mathematical fitting of the data and in all cases there was good fitting to a one-site Langmuir isotherm equation.

(1 mM) upon binding to BSA ($20\ \mu\text{M}$) are shown in Figure 2. H ζ 2 and H δ 1 show the largest saturation transfer, whereas H α is the lowest one, depicting that the region of the ligand spanning H ζ 2 and H δ 1 (Figure 2) is making the closest con-

Table 1. Apparent equilibrium dissociation constant for the binding of chitobiose to WGA using STD-AF from STD NMR spectroscopic titrations, as a function of the saturation time (t_{sat}).^[a]

Saturation time [s]	Apparent K_D [μM]
1.0	300
2.0	460
3.0	630
4.0	730

[a] 15°C , $46\ \mu\text{M}$ WGA

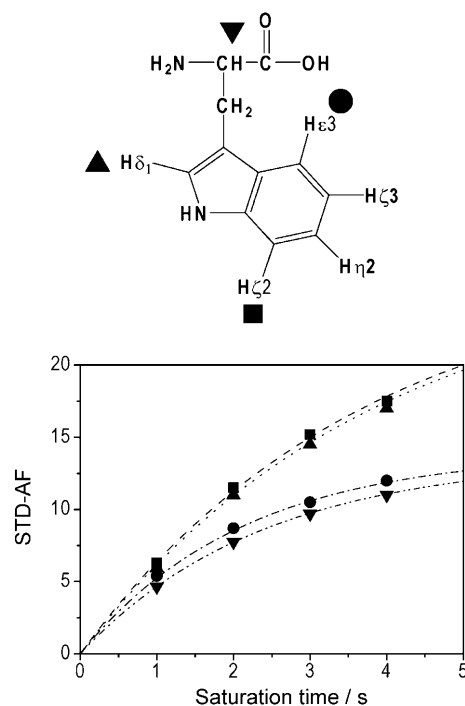


Figure 2. STD-AF values of selected protons of L-tryptophan (H ζ 2 (■), H δ 1 (▲), H ϵ 3 (●), H α (▼)) as a function of the saturation time. The sample contained 1 mM of ligand and $20\ \mu\text{M}$ BSA. Symbols represent the experimental values and the lines are the mathematical fit to a monoexponential asymptotic function.

tacts with the protein binding site, whereas the polar amino acid region is more solvent exposed.

To highlight the different behavior of the association curves as a function of the chosen proton, the isotherms of normalized STD-AF ($t_{\text{sat}} = 3$ s) of four protons of L-tryptophan were constructed (Figure 3). The comparison of the results reveals variations in K_D measurements depending on the observed signal of the L-tryptophan (see normalized STD-AF binding isotherms in Figure 3, and compare with Figure 2). A dependence of the growing rate of the isotherm for a given signal with the magnitude of the STD-AF can be observed. Those protons corresponding to the largest STD-AF (H ζ 2 and H δ 1 see Figure 2) show binding curves with slower initial growing rates (Figure 3), giving rise to a larger apparent K_D ; on the other hand, the isotherms of the least saturated protons (H ϵ 3 and H α) show the largest initial slopes and hence the lowest apparent K_D .

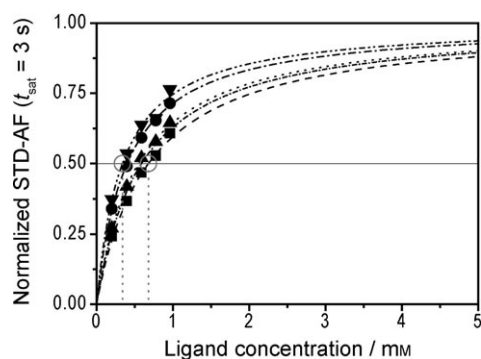


Figure 3. Effect of the individual magnitudes of saturation transfer (STD intensities) of different protons (H ζ 2 (■), H δ 1 (▲), H ϵ 3 (●), H α (▼)) on the determination of L-tryptophan–BSA binding affinity. Binding isotherms of STD-AF values normalized to their corresponding maximum plateau value (α_{STD}) of selected protons of L-tryptophan ($t_{\text{sat}}=3$ s). The sample contained 20 μM BSA. Vertical dotted lines graphically represent the range of variation in the determination of K_{D} .

Quantitative analysis of the curves yielded the apparent K_{D} values shown in Table 2.^[18] These results are also compatible with the mentioned influence of saturation time be-

Table 2. Apparent equilibrium dissociation constant K_{D} [μM] for the binding of L-Trp to BSA from STD NMR spectroscopic titrations, as a function of the saturation time (t_{sat}), following STD signals from different ligand protons.^[a]

Saturation time [s]	Apparent K_{D} [μM]			
	Proton H ζ 2	Proton H δ 1	Proton H ϵ 3	Proton H α
1.0	340	220	230	140
2.0	510	420	290	260
3.0	680	550	400	340
4.0	950	730	560	430
STD-AF [4 s]	17.5	17.0	12.0	11.0

[a] 25°C, 20 μM BSA

cause, for all ligand protons, there is a monotonic decrease of apparent protein–ligand affinity with increasing times (see Table 2). In addition, the results also evidence the dependence of the measured K_{D} on the degree of saturation of the considered proton (see Table 2). The signals of the protons receiving the largest amounts of saturation yield the largest apparent K_{D} and vice versa for all the saturation times measured.

Comparing the experimental data in Table 2 with the K_{D} value reported in the literature for the interaction of L-tryptophan with BSA ($K_{\text{D}}=125\text{--}230\ \mu\text{M}$)^[17], it can be inferred that 1) the closest apparent K_{D} measured from a given ligand proton STD is again the one obtained by using the lowest saturation time and 2) related to STD intensities, the isotherms yielding the best approximation to the reported values of K_{D} are those constructed by using the least intense STD signal. Once more, unfortunately, our results show that the best conditions for better signal-to-noise ratio, and hence, for more accurate determination of K_{D} , that is, the

most intense STD signals, give, in fact, the largest deviations in the determination of the dissociation constant.

Effect of the fraction of bound ligand: It can be inferred from previous results (Tables 1 and 2 and Figure 1c) that the bias of K_{D} using STD-AF at a single t_{sat} reflects an underestimation of STD-AF values at the initial points of the titration experiment. These points, in the region of low ligand-to-protein ratios, correspond to the largest fractions of bound ligand during the experiment. Remarkably, under these conditions, there is an increased likelihood of fast ligand rebinding taking place on the relaxation timescale (see the Supporting Information).

To test this issue, we carried out further titration experiments with the BSA–L-tryptophan system, modifying the fraction of bound ligand by increasing the receptor concentration. In this case, if ligand rebinding causes the bias in the determination of K_{D} , the effect should be stronger when using a higher receptor concentration. When the K_{D} for L-tryptophan binding was measured at 60 μM of BSA, keeping the same experimental conditions and the same total concentrations of added ligand as before (20 μM of BSA), the values of apparent K_{D} were larger (Tables 2 and 3). To highlight this issue, in Figure 4 (bottom) we compare the result-

Table 3. Apparent equilibrium dissociation constant [μM] for the binding of L-Trp to BSA (concentrated sample) from STD NMR spectroscopic titrations, as a function of the saturation time (t_{sat}) following STD signals from different ligand protons.^[a]

Saturation time (s)	Apparent K_{D} [μM]			
	Proton H ζ 2	Proton H δ 1	Proton H ϵ 3	Proton H α
1.0	560	490	420	360
2.0	1580	1200	1010	710
3.0	2500	2100	1270	990
4.0	3300	2700	1600	1060

[a] 25°C, 60 μM BSA

ing isotherms of normalized STD-AF values from the same proton of L-tryptophan (H ζ 2) for two STD NMR titrations carried out with 20 and 60 μM of BSA. Consistent with the expected influence of the fraction of bound ligand, the effects of saturation time and signal intensity on the values of K_{D} are also amplified for larger concentrations of protein (compare Tables 2 and 3). This is also noted when comparing the dispersion of the apparent affinities among the different signals of L-tryptophan, which is wider for the experiments performed with the largest fraction of bound ligand during the whole titration ($[\text{BSA}]=60\ \mu\text{M}$, see Figures 3 and 4 (top)). Finally, the same effect on the apparent K_{D} upon increasing the fraction of bound ligand was observed in STD NMR spectroscopic titration experiments carried out on the WGA–chitobiose sample when using two different protein concentrations (18 and 46 μM ; see Supporting Information)

Because the fraction of bound ligand is also a function of the intrinsic affinity, different protein–ligand systems will have different sensitivities to the mentioned error sources.

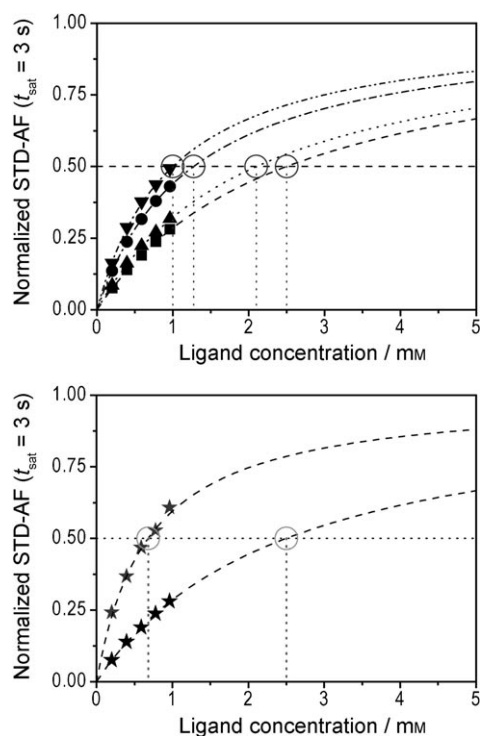


Figure 4. Effect of the fraction of bound ligand on the determination of L-tryptophan–BSA binding affinity. Top: binding isotherms of STD-AF values ($t_{\text{sat}}=3$ s) normalized to their corresponding maximum plateau value (a_{STD}) of selected protons of L-tryptophan (H ζ 2 (■), H δ 1 (▲), H ϵ 3 (●), H α (▼)). The sample contained 60 μM BSA. Bottom: comparison of the binding isotherms of STD-AF of proton H ζ 2 of L-tryptophan ($t_{\text{sat}}=3$ s), for two different concentrations of BSA protein (20 (★), 60 μM (★)) all the remaining experimental conditions being the same. In both figures, the range of deviations in K_D is graphically represented by the vertical dotted lines.

We have performed an additional study with the lectin WGA and N-acetylglucosamine (GlcNAc) to evaluate the binding of chitobiose, since they differ in affinity constants by an order of magnitude (K_D 2.5 mM, and 0.2 mM, respectively)^[16]. This comparison should determine whether the extent of the deviation of K_D with the saturation time also depends on the magnitude of the protein–ligand affinity.

Table 4 shows the dissociation constants obtained from binding isotherms of STD-AF values of the methyl protons of the acetamide group at several saturation times. The variation of the calculated K_D with saturation time follows the same trend as in the case of chitobiose: longer saturation times yield larger apparent dissociation constant. Once

Table 4. Apparent equilibrium dissociation constant for the binding of GlcNAc to WGA from STD NMR spectroscopic titrations, as a function of the saturation time (t_{sat}).^[a]

Saturation time [s]	Apparent K_D [mM]
1.0	2.4
2.0	2.7
3.0	2.7
4.0	3.0

[a] 15°C, 42 μM WGA.

again, the closest value to the equilibrium dissociation constant determined by calorimetry corresponds to that obtained by using the shortest saturation time (1 s). Interestingly, the difference between the apparent dissociation constants at 1 and 4 s is smaller in the case of GlcNAc (1.25 times) than in the case of chitobiose (2.50 times). Thus, a comparison of the results for the interactions of chitobiose or GlcNAc with the lectin WGA indicates that the t_{sat} -dependent overestimation of K_D values is proportional to protein–ligand affinities.

Discussion of the effects

All the results shown above demonstrate and experimentally characterize the high sensitivity of the measurements of affinity by STD NMR spectroscopic titration experiments to factors related to the accumulation of saturated ligand in solution. The identified factors introducing additional dependence on STD-AF that obscure the direct relationship between STD-AF values and the concentration of complex, precluding the accurate calculation of dissociation constants. In particular, it must be considered that for experimental conditions leading to high fractions of bound ligands the probability that a given ligand molecule binds the protein on two (or more) occasions during t_{sat} cannot be neglected.

Rebinding will have an effect on the accumulation of saturated ligand in solution if its residence time in the free state ($\tau_{\text{res}}^{\text{F}}$) is shorter than the T_1 of the ligand proton considered (see the Supporting Information for estimates of the probability of fast ligand rebinding for a one-site bimolecular protein–ligand interaction). In this case, the extent of its influence will depend on the fraction of time that the ligand spend in the free state ($\tau_{\text{res}}^{\text{F}}$) in comparison to the characteristic time of the total rebinding cycle ($\tau_{\text{res}}^{\text{F}} + \tau_{\text{res}}^{\text{B}}$), in which $\tau_{\text{res}}^{\text{B}}$ is the residence time of the ligand in the bound state. This proportion ($\tau_{\text{res}}^{\text{F}} / (\tau_{\text{res}}^{\text{F}} + \tau_{\text{res}}^{\text{B}})$) corresponds to the fraction of free ligand and, accordingly, low fractions of free ligand will favor rebinding and its influence on the accumulation of saturated ligand in the bulk. For experimental conditions typically found in STD NMR studies, $\tau_{\text{res}}^{\text{F}} < T_1$ and rebinding takes place fast on the relaxation (T_1) timescale (see the Supporting Information). Under these conditions, the delay between the binding events is not long enough to allow a complete relaxation of magnetizations, so that the protons of the rebound ligand have a lower capacity to receive saturation from the receptor.^[13] Therefore, they contribute to the macroscopic intensities (STD-AF) with less saturation transfer than fresh ligands. In fact, all of the previously reported biases in K_D determinations are in perfect agreement with the expected effects of fast rebinding processes.

According to this analysis, when fast protein–ligand rebinding is taking place, there will be a reduction in the STD-AF values of the ligand protons proportional to the degree of rebinding. This explains the increase in apparent K_D observed when the total concentration of the protein (BSA) was increased (Tables 3 and 4 or Figure 4, bottom). Increasing the total protein concentration increases the free

protein concentration, enhancing the likelihood of fast rebinding processes (reduction of $\tau_{\text{res}}^{\text{F}}$, see the Supporting Information).

The effect of STD intensities on apparent K_{D} values can also be explained by taking into account rebinding effects. Those ligand protons with larger saturation transfer will, after a first protein–ligand encounter, leave the protein binding site with stronger perturbed spin populations. Under fast ligand rebinding conditions, the ulterior binding events, characterized by the rebinding cycle time $\tau_{\text{res}}^{\text{F}} + \tau_{\text{res}}^{\text{B}}$, will add significantly less saturation to these ligand signals than in the previous binding events, leading to proportionally larger reductions in macroscopic STD-AF compared with those ligand protons with lower intensities. This was observed in the case of the binding of L-tryptophan to BSA (Figures 3 and 4) in both samples (20 and 60 μM BSA).

Fast rebinding processes will not have a measurable impact on the accumulation of saturation in solution until the number of saturated ligand molecules in the bulk increases enough to make probable the existence of “protein-saturated ligand” reencounters. This number is proportional to both the saturation time of the STD NMR spectroscopy experiment, and the intrinsic off rate (k_{off}) of the protein–ligand interaction under study. Increasing the saturation time will amplify the number of saturated ligand molecules in the bulk, enhancing the probability of fast rebinding processes involving previously saturated ligand molecules. This is the reason for the generalized underestimation of affinities upon increasing the saturation time, observed in all the protein–ligand systems studied herein.

Our study has demonstrated that K_{D} values calculated from STD NMR spectroscopic titrations based on STD-AF are sensitive to saturation time, receptor concentration, and intensity of the monitored signal. Unfortunately, the optimization of these conditions to minimize the effects on K_{D} (e.g., short saturation times and minimum fractions of bound ligand) would lead to a serious compromise of the signal-to-noise outcome of the experiment, transferring large errors to the affinity measurement.

The binding isotherm of initial growth rates of STD-AF

We have found a strong correlation between the saturation time and the effects of the above-mentioned factors (i.e., the fraction of bound ligand, the relaxation properties, or the magnitude of the saturation transfer to the ligand protons), since the estimated dissociation constants seem to converge and approach their thermodynamic value at short enough saturation times. This correlation strongly suggests that such deviations are related to fast ligand rebinding processes, which play a key role in the reported uncertainties of affinity determinations by STD NMR spectroscopic titrations. If these rebinding processes were the cause of the deviations, the effects of the described factors should be cancelled out in the limit of zero saturation time, since no ligand turnover would be possible. At this limit, all of the STD-AF isotherms would be essentially the same, independ-

ent of the experimental conditions, and the “true” dissociation constant, K_{D} , could be derived from mathematical analysis of any of them.

To check this hypothesis, we constructed the binding isotherms using the initial growth rates of the ligand STD-AF values (STD-AF₀) at each ligand concentration along the titration instead of the experimental STD-AF at a given saturation time, as done before. The determination of the initial slopes of the STD-AF buildup curves can be done by fitting the whole experimental curve to an appropriate mathematical equation and extrapolating it to the limit of zero saturation time. Matrix relaxation theory^[5d] and experimental evidence^[15] have demonstrated that the growth of STD-AF values with saturation time can be appropriately described by a monoexponential asymptotic equation: $\text{STD-AF}(t_{\text{sat}}) = \text{STD-AF}_{\text{max}}[1 - \exp(-k_{\text{sat}}t_{\text{sat}})]$, in which $\text{STD-AF}_{\text{max}}$ represents the maximum STD-AF achievable for a given proton (i.e., for very long saturation times), and k_{sat} is its saturation rate constant. After the fit, the initial slope (STD-AF₀) was easily obtained by the product $\text{STD-AF}_{\text{max}}k_{\text{sat}}$.

The protocol for protein–ligand affinity determinations by STD NMR spectroscopy is illustrated in Figure 5, for the L-tryptophan-BSA system. As an example, the STD-AF values of proton H ζ 2 are monitored, but any other ligand proton can be used (see below). The growth of STD-AF₀ with ligand concentration leads to a hyperbolic Langmuir-like behavior which, after mathematical fit (Figure 5C) gives the best approximation to the thermodynamic K_{D} (210 μM , see table 5 below). The number of data points for obtaining accurate STD-AF₀ values (build-up curves) at each ligand concentration will much depend on the intrinsic signal-to-noise ratio of the protein–ligand system under scrutiny, as it happens in distance determinations from cross relaxation rates. From our experience, even the minimum of three data points per ligand concentration is feasible, as long as the first and the last saturation time used are chosen to sample adequately the growth and the plateau regions of the build-up curve.

The analysis of the saturation rate, k_{sat} , provides additional evidence of the presence of fast rebinding. This parameter, that determines how fast the plateau of the STD-AF build-up curve is reached, is not constant through the titration, decreasing with ligand concentration (Figure 5). This means that a steady state is reached at shorter saturation times for low ligand concentrations, as a consequence of the decrease of maximum STD-AF caused by rebinding. This phenomenon is observed for all ligand protons of the studied systems and the effect is more dramatic upon increasing the protein concentration, since fast rebinding is favored (see the Supporting Information). In addition, for the weakest system studied (GlcNAc and WGA), in which rebinding is slower, there was essentially no variation of k_{sat} with ligand concentration, which was reflected in smaller deviations of K_{D} determined by standard STD NMR spectroscopic titrations (Table 4).

The accuracy of the proposed approach was demonstrated for the binding of chitobiose to WGA and the binding of L-

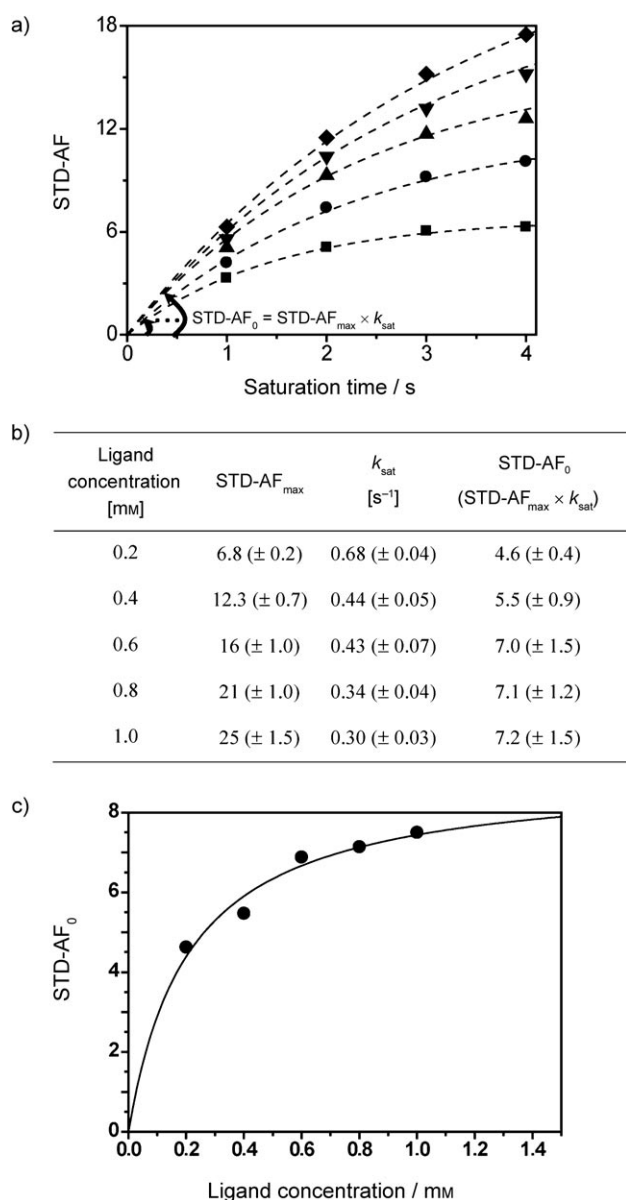


Figure 5. The binding isotherm of STD-AF initial growth rates approach. The new protocol for protein–ligand affinity measurements by STD NMR spectroscopy is illustrated for the L-tryptophan–BSA system (20 μM in protein) by taking the proton H ζ 2 of the ligand as an example. a) For each ligand (L-Trp) concentration (0.2 (■), 0.4 (●), 0.6 (▲), 0.8 (▼), and 1.0 mM (◆)), STD-AF values (H ζ 2 proton) are obtained at different saturation times (1, 2, 3, and 4 s) and fit by using the equation $\text{STD-AF}(t_{\text{sat}}) = \text{STD-AF}_{\text{max}}[1 - \exp(-k_{\text{sat}}t_{\text{sat}})]$ (----). b) Each STD-AF buildup curve is fitted to the equation $\text{STD-AF}(t_{\text{sat}}) = \text{STD-AF}_{\text{max}}[1 - \exp(-k_{\text{sat}}t_{\text{sat}})]$, and the initial slopes, STD-AF₀, are obtained from $\text{STD-AF}_0 = \text{STD-AF}_{\text{max}}k_{\text{sat}}$; errors are given in brackets. c) The initial slopes are represented as a function of the ligand concentration, and the mathematical fit to a Langmuir isotherm ($y = B_{\text{max}}x/(K_D + x)$; $B_{\text{max}} = 9.0 (\pm 0.5)$) delivers the thermodynamic K_D value of 0.210 (± 0.05) (cf. Table 5).

tryptophan to BSA (Figure 6). In both cases the isotherms built by the new protocol (black curves) converge to the isotherms corresponding to the K_D values reported in the literature (dashed curves).^[16–17] Moreover, all the signal-dependent deviations observed in classical STD NMR spectro-

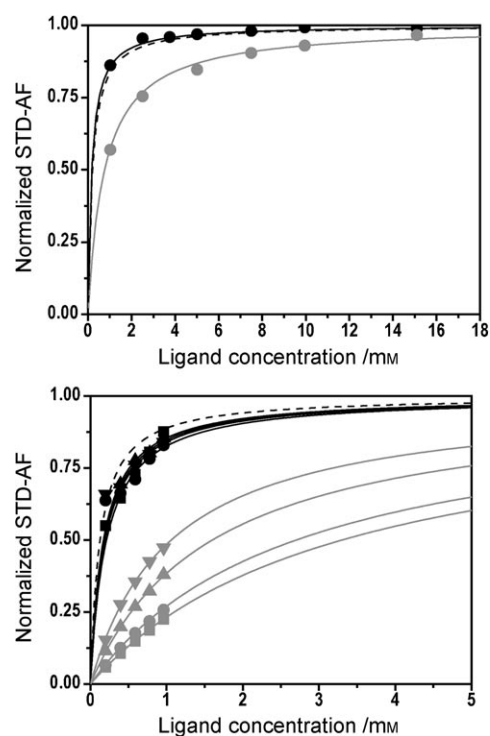


Figure 6. The binding isotherm of STD-AF initial growth rates approach. Black curves show the resulting binding isotherms by using the initial slopes of the STD-AF values of the methyl protons of chitobiose (●) upon binding to WGA (46 μM) (top) and different protons of L-tryptophan (H ζ 2 (■), H δ 1 (▲), H ϵ 3 (●), H α (▼)) upon binding to BSA (60 μM) (bottom). Dashed curves are the mathematical isotherms obtained by using the Langmuir equation with the K_D values reported in the literature. To highlight the benefits of the proposed approach, the binding isotherms of STD-AF values from classical STD NMR titration experiments using a saturation time of 4 s are also included (gray curves). Symbols represent experimental data; solid lines are the mathematical fits.

scopic titrations (gray curves) are cancelled out, and the resulting isotherms converge, showing the same behavior (see the case of L-tryptophan Figure 6, bottom). Therefore, building the binding isotherm from the initial growth rates of STD-AF yields results that are independent of the considered proton or experimental conditions.

We have calculated the dissociation constants of all of the protein–ligand systems under study herein by following the proposed protocol (Table 5). As expected from the reasons discussed above, the values of dissociation constants calculated from STD-AF₀ (Table 5) correspond to the limit at zero saturation time of K_D estimated from STD-AF (Tables 1–4). Note that the K_D values estimated by the protocol based on STD-AF₀ are comparable to the reference values (Table 5). In this way, for the binding of WGA ligands, the protocol allowed the determination of K_D values that are in good agreement with the literature: 2.4 mM for GlcNAc and 170–200 μM for chitobiose. This means a significant enhancement in accuracy compared with a standard STD NMR spectroscopic titration setup, particularly for the strongest binder, chitobiose (cf. Table 1). The dissociation constant for the binding of L-tryptophan to BSA obtained

Table 5. Dissociation constants calculated by isotherms of initial growth rates of STD-AF values of the protein–ligand systems studied herein.

Protein–ligand system	K_D (from STD-AF initial slopes) [μM]	Reported K_D [μM]			
WGA + GlcNAc	2400 (± 0.3)	2500 (± 0.15) ^[a]			
WGA + GlcNAc β 1,4GlcNAc	[WGA] 46	170 (± 20)			
	[WGA] 18	200 (± 10)			
BSA + L-Trp	[BSA] 60	proton H ζ 2	190 (± 50)	125 (± 60) ^[b]	
		proton H δ 1	170 (± 20)		230 (± 90) ^[b]
		proton H δ 3	210 (± 50)		
		proton H α	180 (± 60)		
		average	190 (± 20)		
	[BSA] 20	proton H ζ 2	210 (± 50)		
		proton H δ 1	200 (± 20)		
		proton H ϵ 3	220 (± 50)		
		proton H α	110 (± 60)		
		average	185 (± 20)		

[a] From reference [16]. [b] From reference [17].

by the STD NMR spectroscopy protocol described herein is slightly larger than that reported from NMR line width measurements. However, it is close to the result on the same system by NMR spectroscopy using WaterLOGSY ($K_D = 230 \mu\text{M}$). This uncertainty in the determination of K_D for a BSA–ligand system seems to be a particular characteristic of the thermodynamic of the interactions of small molecules with this albumin that, additionally to the specific binding site, has a less specific Sudlow site I that can be accessible to the ligand at high concentrations (in fact, it was detected in our experiments above 1 mM ligand, see the Supporting Information).

In the cases in which the same system was measured by using signals from different protons, or by using several protein concentrations, the application of the isotherm of initial slopes approach led to convergence to a single value within the experimental error of the technique. Thus, for L-tryptophan binding to BSA, the K_D values calculated for the four protons (H α , H δ 1, H ϵ 3, and H ζ 2) are well clustered around 180–220 μM , meaning that the factors leading to the large differences in K_D as a function of the monitored proton have been essentially cancelled out. Moreover, the effects of protein concentration can also be removed (see Table 5 entries at 60 and 20 μM BSA).

The accuracy of affinity determination by the new protocol is reflected in the standard deviations from the average (11% for the 60 μM BSA sample, average 190 μM , and 27% for the 20 μM BSA sample, average 185 μM). On the other hand, these deviation values give an indication of the intrinsic accuracy of the STD NMR spectroscopic technique for the determination of protein–ligand affinities.

Conclusion

In the context of a wider study about the application of STD-NMR spectroscopy to estimate binding constants, we have performed a detailed experimental analysis of the factors that may influence the magnitude of STD-AF, masking its dependence on the concentration of the complex, con-

cluding that they are proportional to the STD saturation time and hence could be cancelled out at zero time. These experimental factors, saturation time, intensity of STD, and fraction of bound ligand, lead to unacceptable deviations in the calculation of K_D . This dispersion is evident when K_D values are calculated simultaneously from different protons of the same ligand. The impact is worse for ligands with very slowly relaxing protons, such as those present in most aromatic residues, which are common

building blocks of hit and lead molecules for drug discovery. A likely optimization of the conditions would use a short saturation time, low complex concentration, and minimum signal intensity. Unfortunately, such experimental conditions also correspond to low signal-to-noise ratios, implying the use of long experimental times, and compromising the accuracy of the measurement.

The analysis of the effects of saturation time and other factors on the estimated K_D , together with the consideration of the kinetics and thermodynamics of the system, reveals that ligand rebinding cannot be discarded in titration conditions with high bound-ligand proportions. The macroscopic consequence of rebinding of previously saturated ligand molecules will be a decrease in the STD-AF magnitude and, as a result, an underestimation of K_D proportional to the saturation time. Therefore, the extrapolation of STD-AF to zero time (STD-AF₀, initial growth rate), when there are no previously saturated molecules, affords a magnitude insensitive to rebinding effects and proportional to the fraction of complex, allowing the K_D value to be calculated by means of the corresponding binding isotherm.

We have developed a suitable protocol for measuring dissociation constants of ligand–receptor interactions from titration experiments using STD NMR spectroscopy to monitor the variation of complex concentration at different ligand-to-protein ratios. In this method, the ligand–receptor binding isotherm is constructed by using the initial growth rates of STD amplification factors (STD-AF₀), instead of the amplification factors (STD-AF) themselves at a given saturation time. We have demonstrated that by using this approach those factors that cause large errors in titrations based on STD amplification factors are efficiently cancelled out. The present protocol increases the known applications of STD NMR spectroscopy, significantly improving its accuracy in the determination of dissociation constants from single ligand titrations, which will be of particular interest for those protein–ligand systems for which a competitive inhibitor of known affinity is not available. We also envisage the feasibility of this approach to obtain thermodynamic parameters of binding (ΔH and ΔS) from variable temperature

STD NMR spectroscopic titrations and studies to explore this issue are currently underway.

Experimental Section

NMR spectroscopy: All NMR spectroscopy experiments were performed on a Bruker Avance DRX 500 MHz spectrometer equipped with a 5 mm inverse triple-resonance probe head. NMR samples were prepared in 500 μL of 99.9% D_2O buffer containing 50 mM sodium phosphate pH 7.4 (uncorrected for D_2O), for the BSA samples, or containing 50 mM sodium phosphate/50 mM KCl at pH 7.0, for the WGA samples. Pure protein samples and GlcNAc were obtained from Sigma–Aldrich, and chitobiose was from Dextra Laboratories.

For STD NMR experiments, a pseudo-2D version of the STD NMR sequence was used for the interleaved acquisition of on- and off-resonance spectra. For selective saturation, cascades of Gaussian pulses with a length of 49 ms and 50 dB of attenuation were employed, with an inter-pulse delay of 1 ms.^[4] The on-resonance frequency was set to 0.86 ppm, for the BSA–L-tryptophan samples, and 7.35 ppm for the WGA–GlcNAc or WGA–chitobiose samples, whereas in all cases the off-resonance frequency was 40 ppm. In all cases appropriate blank experiments, in the absence of protein, were performed to test the lack of direct saturation to the ligand protons. Saturation times to obtain the STD buildup curves were 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, and 4 s. The total duration of each experiment was 6.5 s. Typically, the number of scans was 64, though for the least concentrated protein samples, an increase to a range of 256–512 was beneficial for signal integration.

Binding isotherms from STD amplification factors: The concentrations of protein were 18 or 46 μM of WGA, for the chitobiose titration; 42 μM of WGA for GlcNAc; and 20 or 60 μM of BSA for L-tryptophan binding. Ligands were titrated onto the corresponding protein samples from concentrated stock solutions to minimize dilution effects. In STD NMR spectroscopic titration experiments, at a given ligand concentration, the STD intensity (η_{STD}) of a given proton can be considered to be directly proportional to the fraction of bound ligand, $f_{\text{B}}^{\text{L}} = [\text{PL}]/[\text{L}]_0$. STD-AF, defined by Mayer and Meyer^[4] as the product of η_{STD} by the ligand excess ($\varepsilon = [\text{L}]_0/[\text{P}]_0$), makes η_{STD} dependent on the fraction of bound protein, f_{B}^{P} [Eq. (1)].

$$\text{STD-AF} = \varepsilon(I_0 - I_{\text{sat}})/I_0 = \varepsilon\eta_{\text{STD}} \quad (1)$$

Thus, plotting STD-AF values at increasing [L] gives rise to a Langmuir hyperbolic dose-response curve as described by Equation (2).^[6]

$$\text{STD-AF}([\text{L}]) = (\alpha_{\text{STD}}[\text{L}]) / ([\text{L}] + K_{\text{D}}) \quad (2)$$

Mathematical fitting yields both parameters: the equilibrium dissociation constant, K_{D} , and α_{STD} (a dimensionless scaling factor representing the maximum STD amplification for the monitored signal).

For each ligand concentration, STD-AF buildup curves were recorded. To determine K_{D} values following the standard procedure, the STD-AF values (at a given saturation time) of a ligand proton were plotted as a function of the concentration of ligand, and the resulting curve was mathematically fitted to the dose-response equation described above, to yield the K_{D} . We named these values “apparent” K_{D} . After the fitting results, all of the curves were normalized by dividing all the STD-AF values by the parameter α_{STD} . In this way, all of the isotherms grow between 0 and 1, independent of the chosen proton, making it possible to superimpose the curves to check graphically the different outcomes.

Binding isotherms from initial slopes of STD amplification factors: The binding isotherms were constructed from initial slopes of STD amplification factors (STD-AF_0) calculated at every ligand concentration along the titration. Each value of STD-AF_0 was obtained by fitting the STD-AF evolution with the saturation time to the equation $\text{STD-AF}(t) = a(1 - \exp(-bt))$ ^[15] as the product of the coefficients ab .^[19] The STD-AF_0 values were then plotted as a function of the concentration of ligand, and

the resulting isotherm of initial slopes was mathematically fitted to a Langmuir equation to obtain the dissociation constant.

Acknowledgements

We thank the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant CTQ2006–01123) and Junta de Andalucía (grant P07-FQM-02969) for financial support. J.A. acknowledges support from a M.E.C “Ramón y Cajal” fellowship. P.M.E is supported by a CIC biomaGUNE Ph.D. fellowship.

- [1] a) J. Feeney, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 298–321; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 290–312; b) B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 890–918; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864–890.
- [2] L. Fielding, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *51*, 219–242.
- [3] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902–1906; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788.
- [4] M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108–6117.
- [5] a) V. Jayalakshmi, T. Biet, T. Peters, N. R. Krishna, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8610–8611; b) V. Jayalakshmi, N. R. Krishna, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14080–14084; c) V. Jayalakshmi, N. R. Krishna, *J. Magn. Reson.* **2004**, *168*, 36–45; d) V. Jayalakshmi, N. R. Krishna, *J. Magn. Reson.* **2002**, *155*, 106–118.
- [6] C. A. Lepre, J. M. Moore, J. W. Peng, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3641–3675.
- [7] a) M. Pickhardt, G. Larbig, I. Khlistunova, A. Coksezen, B. Meyer, E. M. Mandelkow, B. Schmidt, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2007**, *46*, 10016–10023; b) A. T. Neffe, M. Bilang, I. Gruneberg, B. Meyer, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3482–3488.
- [8] M. G. Szczepina, R. B. Zheng, G. C. Completo, T. L. Lowary, B. M. Pinto, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2052–2059.
- [9] Y. Cheng and W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- [10] Y. Yuan, D. W. Bleile, X. Wen, D. A. Sanders, K. Itoh, H. W. Liu, B. M. Pinto, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3157–3168.
- [11] K. Feher, P. Groves, G. Batta, J. Jimenez-Barbero, C. Muhle-Goll, K. E. Kover, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17148–17153.
- [12] J. Angulo, I. Díaz, J. J. Reina, G. Tabarani, F. Fieschi, J. Rojo, P. M. Nieto, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2225–2227.
- [13] D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [14] Langmuir isotherms require the use of concentrations of “free” ligand in solution. Nevertheless, due to the range of low affinities accessible by STD NMR spectroscopy, the “total” concentration of ligand can be used instead, without introducing large errors in the determination of affinities.
- [15] M. Mayer, T. L. James, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4453–4460.
- [16] G. Bains, R. T. Lee, Y. C. Lee, E. Freire, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12624–12628.
- [17] L. Fielding, S. Rutherford, D. Fletcher, *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 463–470.
- [18] In contrast to the WGA-ligand systems, in this case, at ligand concentrations above 1 mM, nonspecific behavior of the binding was observed from the isotherms (see the Supporting Information). Fortunately, the quality of the data in the initial growing region of the curve allowed a quantitative analysis satisfactory enough as to give good mathematical fitting to a one-site Langmuir binding isotherm equation.
- [19] Herein, we have used an exponential equation for the determination of the STD initial slopes, but the initial growth rates could also be obtained by linear regression analysis using short saturation times, if linearity is assured.

Received: December 22, 2010
Published online: May 21, 2010

A Solution NMR Study of the Interactions of Oligomannosides and the Anti-HIV-1 2G12 Antibody Reveals Distinct Binding Modes for Branched Ligands*

Pedro M. Enríquez-Navas,^[a] Marco Marradi,^[a, b] Daniel Padro,^[a] Jesús Angulo,^{*[c]} and Soledad Penadés^[a, b]

Abstract: The structural and affinity details of the interactions of synthetic oligomannosides, linear (di-, tri-, and tetra-) and branched (penta- and hepta-), with the broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12 (HIV = human immunodeficiency virus) have been investigated in solution by using ligand-based NMR techniques, specifically saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy and transferred NOE experiments. Linear oligomannosides show similar binding modes to the antibody, with the non-reducing terminal disaccharide Man α -(1 \rightarrow 2)Man (Man = mannose) making the closest protein/ligand contacts in the bound state. In contrast, the branched pentamannoside shows two alternate binding modes, involving both ligand arms (D2- and D3-like), a

dual binding description of the molecular recognition of this ligand by 2G12 in solution that differs from the single binding mode deduced from X-ray studies. On the contrary, the antibody shows an unexpected selectivity for one arm (D1-like) of the other branched ligand (heptamannoside). This result explains the previously reported lack of affinity enhancement relative to that of the D1-like tetramannoside. Single-ligand STD NMR titration experiments revealed noticeable differences in binding affinities among the linear and branched ligands

in solution, with the latter showing decreased affinity. Among the analyzed series of ligands, the strongest 2G12 binders were the linear tri- and tetramannosides because both show similar affinity for the antibody. These results demonstrate that NMR spectroscopic techniques can deliver abundant structural, dynamics, and affinity information for the characterization of oligomannose-2G12 binding in solution, thus complementing, and, as in the case of the pentamannoside, extending, the structural view from X-ray crystallography. This information is of key importance for the development of multivalent synthetic gp120 high-mannose glycoconjugate mimics in the context of vaccine development.

Keywords: carbohydrates • mannose • molecular recognition • NMR spectroscopy • protein-carbohydrate interactions

[a] P. M. Enríquez-Navas, Dr. M. Marradi, Dr. D. Padro, Prof. Dr. S. Penadés

Laboratory of GlycoNanotechnology
Biofunctional Nanomaterial Unit, CIC biomaGUNE
Parque Tecnológico, Paseo de Miramón 182
20009 San Sebastián (Spain)

[b] Dr. M. Marradi, Prof. Dr. S. Penadés
CIBER-BBN

Parque Tecnológico, Paseo de Miramón 182
20009 San Sebastián (Spain)

[c] Dr. J. Angulo

Department of Bioorganic Chemistry
Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC - US)
Américo Vespucio 49, 41092, Sevilla (Spain)
Fax: (+34) 954460565
E-mail: jesus@iiq.csic.es

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201002519>. HIV = human immunodeficiency virus.

Introduction

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is caused by the infection of the human immunodeficiency virus (HIV).^[1] Currently, it is estimated that more than 30 million people are infected worldwide, thus turning it into a massive global health problem.^[2] Recent findings have boosted hope for the development of a HIV vaccine, as it has been demonstrated in macaques models that it is not necessary, as previously believed, to induce high levels of neutralizing antibodies because much lower levels, when present continuously, seem to be effective in limiting or preventing the infection.^[3] A remarkable feature of HIV is the dense carbohydrate arrangement surrounding its exposed envelope glycoprotein

gp120. The glycans account for about 50% mass of this viral protein.^[4]

Recently, the rarely occurring human monoclonal antibody 2G12, isolated from some infected individuals, has demonstrated a broad neutralization profile. Antibody 2G12 recognizes a conserved carbohydrate epitope^[5] that corresponds to a unique cluster of high-mannose glycans on the viral-coat glycoprotein gp120.^[6] In this way, these oligomannose clusters on gp120 have turned out to be of fundamental importance for a potential vaccine-development strategy that follows a reverse approach, or retrovaccinology, that is, going from the antibody to the vaccine. To that aim, the structural characterization of the ligand specificity of 2G12 is of primary magnitude, which clearly benefits from the use of chemically well-defined oligomannoses and related synthetic oligosaccharides. Several groups have delivered important structural and biochemical data on oligomannose/2G12 interactions.^[6c,7] The crystal structure of Fab 2G12 revealed an unconventional architecture of this antibody in which the two fragment antigen binding (Fab) units of the immunoglobulin G (IgG) assemble into an interlocked V_H domain-swapped dimer, thus providing an extended surface with additional secondary binding sites for multivalent interactions with the conserved clusters of oligomannose sugars on gp120.^[6c] Several reports have confirmed the critical role of the Man α (1 \rightarrow 2)Man disaccharide in the 2G12 epitope, yet the optimal form of an efficient synthetic carbohydrate mimetic of the epitope remains undefined.^[7b-d,f,h,8]

We are involved in the study of the interactions of multivalent mannose-containing glyconanoparticles with biologically relevant targets in the context of HIV-1 infection.^[9] As part of this project, we are interested in applying NMR techniques to analyze these interactions to characterize the bioactive structures and dynamics of the saccharides bound to their protein receptor partners and to obtain affinity data of these molecular-recognition processes in solution.

Herein, we report a detailed systematic study of the molecular recognition of five synthetic oligomannosides **1–5** in solution (see Scheme 1) by the antibody 2G12 with saturation transfer difference (STD)^[10] NMR spectroscopy and transferred NOE experiments.^[11] STD NMR spectroscopy, transferred NOE experiments, and ligand STD NMR titration experiments allowed us to dissect the structural requirements of the sugars involved in the HIV/2G12 interactions and to compare the binding affinities of linear and branched ligands toward 2G12 in solution. The signals in the STD NMR spectra are caused by magnetization transfer from the protein to the protons of the molecule that interact with the protein. This process only occurs during the residence time of the smaller molecule in the binding pocket of the large receptor so that only those molecules that bind to the macromolecular receptor show signals in the resulting spectrum.^[10] Moreover, those ligand protons in close contact with the protein yield more intense signals than remote protons, thus allowing the regions of the small molecule that are specifically recognized in the binding site of the receptor in the bound state (binding epitope) to be depicted.^[12] Fur-

thermore, the STD NMR technique has been demonstrated to characterize multiple modes of binding of a ligand to the same protein binding site.^[13] Transferred NOE experiments^[11] deliver the conformations of the ligands in the bound state and, in favorable cases, allow the observation of intermolecular protein/ligand NOE contacts, thus affording key data on the bound orientation of the ligand within the protein binding pocket.

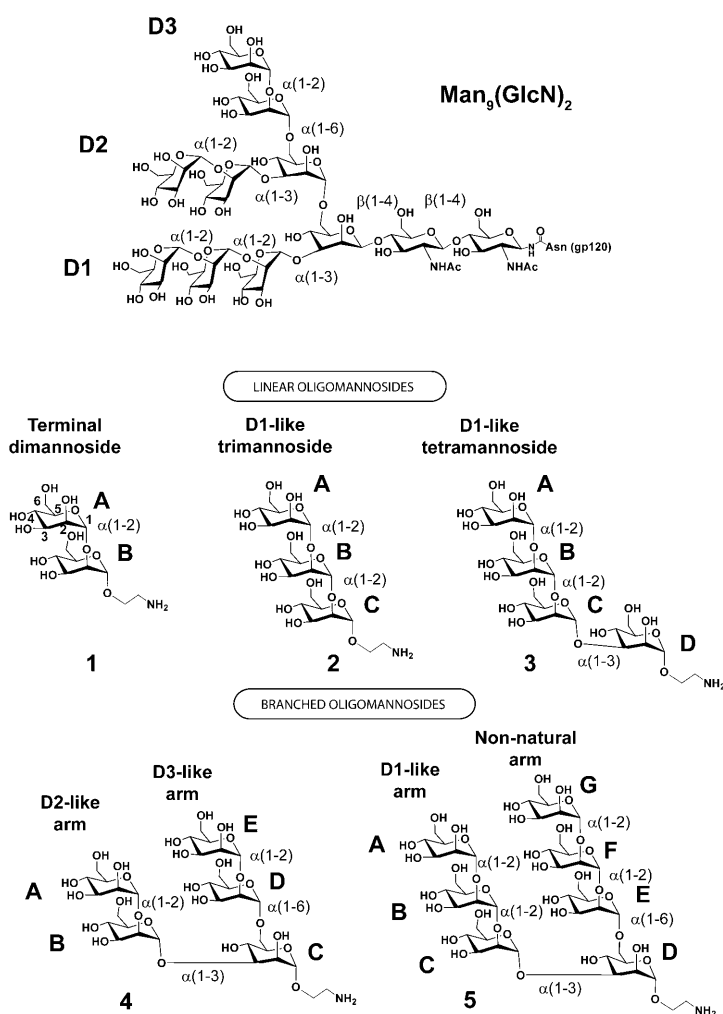
The binding modes of linear and branched oligomannosides **1–3**, **4**, and **5** have been studied and their affinities and structural features (collected herein) related to existing data from competition assays (i.e., enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and glycan microarrays)^[6c,7a,b,e,14] and X-ray crystallography.^[6c,7b]

Results and Discussion

NMR spectroscopy has been used to investigate the interactions of five synthetic linear di-, tri-, and tetraoligomannosides and branched penta- and heptaoligomannosides (**1–5**, respectively) in solution with the broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12. The oligosaccharides are structural motifs of the natural *N*-linked high-mannose undecasaccharide Man₉(GlcNAc)₂ (GlcNAc = *N*-acetylglucosamine), except heptamannoside **5**, which results from the formal addition of two terminal mannose residues to pentamannoside **4** (Scheme 1).

STD NMR experiments of linear saccharides 1–3: We carried out STD NMR experiments with linear oligosaccharides (di-, tri-, and tetramannosides **1–3**) in the presence of the antibody 2G12. All of them showed clear STD signals in their corresponding spectra (Figure 1). This outcome indicates that their recognition processes by 2G12 in solution are characterized by exchange kinetics that are fast on the NMR relaxation time scale; therefore, these oligosaccharides are suitable for STD NMR spectroscopic analysis. Figure 1 shows the STD NMR spectra carried out at the lowest saturation time (0.5 s) used along the series of experiments performed in the present study. At this short saturation time, raw intensities in the spectra closely relate to spatial contacts of the ligand with the protein surface (intermolecular ¹H–¹H distances) in the bound state.^[15]

By comparing each STD spectrum (top spectra in Figure 1a–c) with its corresponding reference experiment (bottom spectra in Figure 1a–c), precise specific distributions of saturation transferred from the antibody to the ligands protons can be traced. Thus, the STD NMR spectra report structural insight into the molecular recognition of linear oligomannosides **1–3** by the antibody 2G12. Integration of STD signals allows quantitative mapping of the levels of saturation along the residues of each oligomannoside ligand (binding epitope). To that aim, we carried out series of STD NMR experiments that varied the saturation time from 0.5 to 3.0 seconds to obtain STD buildup curves (see Figure S1 in the Supporting Information). This method



Scheme 1. Natural undecasaccharide $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ present in the HIV envelope glycoprotein gp120 and its structural motifs studied herein. Linear di-, tri-, and tetramannosides **1** and **3**, respectively, and branched penta- and heptamannosides **4** and **5**.

allows a more reliable comparison of binding epitopes from STD NMR spectroscopic analysis between ligands of the same receptor.^[15c,16] We obtained the initial slopes of STD growth (STD_0) for each ligand proton from these curves (see the Supporting Information), as the use of these initial slopes was proposed to remove possible interference from differential proton relaxation properties in the determination of ligand-binding epitopes.^[15c] The maps of ligand epitopes, or hot spots of the oligomannosides, in terms of antibody-ligand contacts were obtained by normalizing all the values of the different protons within a given ligand to the largest value, which was assigned 100% arbitrarily (Figure 1, right). The tables with relative saturation transfer per proton are included in the Supporting Information. Values near the maximum (i.e., 100%) identify those regions of the ligands closely recognized by the receptor in the bound state.

All three oligomannoside ligands share a common pattern of STD relative intensities, thus suggesting a similar mode

of recognition by the antibody 2G12. In the three cases, the protons of the mannose ring at the nonreducing end of each oligosaccharide (mannose A, black symbols in Figure 1) receive the largest amount of magnetization, thereby indicating that they make the closest contacts with the protein in the complex. By analyzing individual STD signals within those terminal sugar rings, similar distributions of STD intensities are observed for the three linear ligands: protons H4, H2, and H3 (Figure 1; for atom numbering, see residue A of **1** in Scheme 1) receive the largest amount of saturation. Besides, each ligand shows a systematic decrease in STD intensities in the direction toward the reducing end of each linear oligosaccharide (residues B–D in **1–3**, respectively), which is evident from the distribution of STD intensities at spectral regions characteristic of carbohydrate anomeric (H1) protons (Figure 1, left at $\delta = 4.8\text{--}5.3$ ppm).

Thus, the NMR data show that ligands **1–3** bind to 2G12 in solution by a common mode, specifically by interacting through the nonreducing end of the molecule (mannose residues A and B). These results of the NMR study in solution are in good agreement with the reported X-ray structures of the complexes of Fab 2G12 with a di- and tetramannoside similar to **1** and **3** studied herein.^[6c,7b] In the crystal structures, the terminal $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}$ disaccharide at the nonreducing end was intimately recognized by the protein. The X-ray structure of the complex of 2G12 and $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}^{[6c]}$ matches very well with our observed pattern of STD signals for the nonreducing mannose A. From a qualitative analysis of that structure, the most intense STD signals of **1** (Figure 1) result from ligand–protein short distances of protons H4, H3, and H2 of the nonreducing mannose ring with protons of the side chains of lysine 95 and leucine 100.

CORCEMA-ST prediction of STD intensities – comparison of X-ray and solution data of **1–3:** We wanted to substantiate our previous interpretations quantitatively by comparing our experimental data in solution with existing X-ray structures.^[6c,7b] Full-matrix relaxation calculations were carried out as implemented in the program CORCEMA-ST to predict theoretical ligand STD effects from Cartesian co-ordinates of the complexes. These calculations allow the validation of a given molecular model of a protein/ligand complex (from X-ray studies, NMR spectroscopy, homology building, and so forth) by comparing the theoretical predictions with the experimental STD intensities in solution. We calculated theoretical STD intensities from the crystal structures of the 2G12/dimannoside^[6c] and 2G12/tetramannoside complexes.^[7b] Hydrogen atoms were added, and soft energy minimization was applied to relax bad steric contacts (see the Experimental Section). For the 2G12/trimannoside complex, the trisaccharide moiety of the tetramannoside in the previous X-ray structure was used.

The comparison of the resulting theoretical calculations with the experimental STD buildup curves of **1–3** are shown in Figure 2. The quality of the fit was measured by the R-

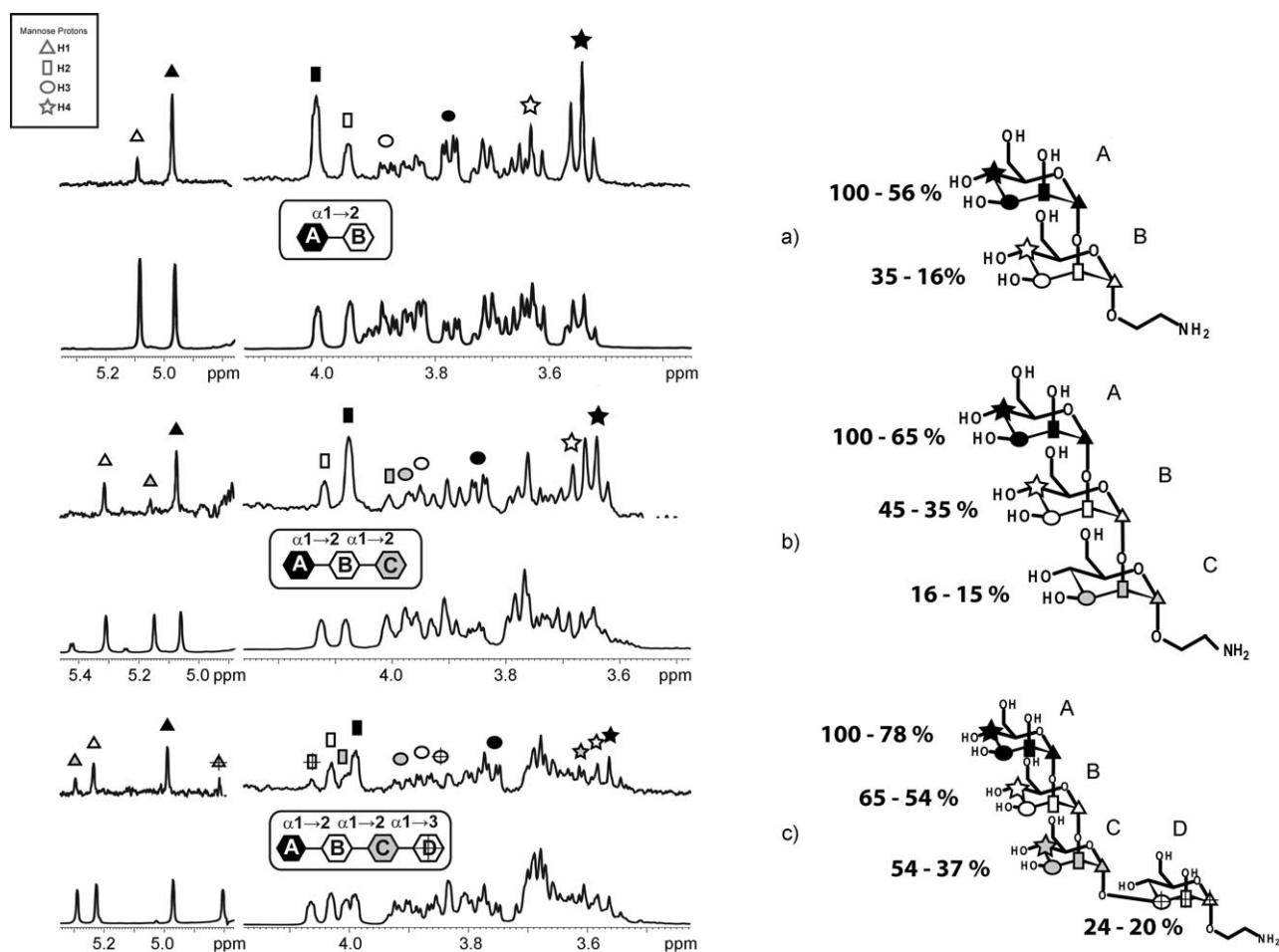


Figure 1. Binding of linear oligomannosides a) $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{ManOR}$ **1**, b) $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{ManOR}$ **2**, and c) $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{ManOR}$ **3** ($R = -\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) to the human monoclonal antibody 2G12 in solution, as detected by STD NMR spectroscopy. Each sample contained the ligand (8 mM) and 2G12 ($37\ \mu\text{M}$ ($74\ \mu\text{M}$ in regard to the binding sites) for **1** or **2** and $25\ \mu\text{M}$ ($50\ \mu\text{M}$ in regard to the binding sites) for **3**). For each ligand, on the left, the bottom spectrum shows the reference ^1H NMR equilibrium signals, whereas the top shows the corresponding ^1H STD NMR spectrum (500 MHz, 25°C , saturation time: 0.5 s, on-resonance frequency: $\delta = 0.86$ ppm, off-resonance: $\delta = 40$ ppm). The numbers on the right side show the normalized levels of saturation (%) received by each ligand residue upon binding to 2G12; the magnitude correlates with the proximity of sugar protons to the antibody-binding-pocket surface in the bound state. Different symbols (triangle: H1, rectangle: H2, ellipse: H3, star: H4) are used to distinguish the protons on the different sugar residues (inset schematic cartoons).

NOE factor (see the Experimental Section), which should be as low as possible for a good fit. By taking into account that no refinement of the bound structure of the ligands was pursued, the results indicate a significantly good agreement between the models of the complexes and the experimental STD NMR data in solution. The increase in R-NOE factor with the size of the ligand can be attributed to the larger errors in integration due to signal overlapping. This agreement quantitatively supports that the antibody 2G12 recognizes the ligands **1–3** in solution in a binding mode similar to that described in the crystal structure of the 2G12/dimanoside complex. This behavior means that the terminal $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}$ disaccharide moiety at the nonreducing end of the three linear oligomannosides (residues A and B; Scheme 1) is the key part of the ligand for molecular recognition in the specific binding pocket of the 2G12 antibody.

STD NMR experiments of branched saccharides **4** and **5**:

The interactions between the antibody 2G12 and the branched oligomannosides **4** and **5** were also studied by STD NMR spectroscopic analysis. As in the case of linear sugars, clear STD signals were observed in the spectra. Figure 3 shows the resulting spectra, recorded with the lowest saturation time used (0.5 s). The larger sizes of these branched sugars, relative to the linear sugars, were reflected in the spectra as increased signal overlapping and by some reduction in spectral resolution due to line broadening in the presence of the protein. This outcome particularly affected the analysis of the crowded C–H carbohydrate spectral region ($\delta = 3.5\text{--}4.1$ ppm). However, for pentamannoside **4**, the five anomeric signals (H1A–H1E) showed different chemical shifts (Figure 3a; $\delta = 4.7\text{--}5.3$ ppm), and the spectral resolution at 500 MHz was good enough to allow individual integration of H1 signals of terminal mannoses A and E.

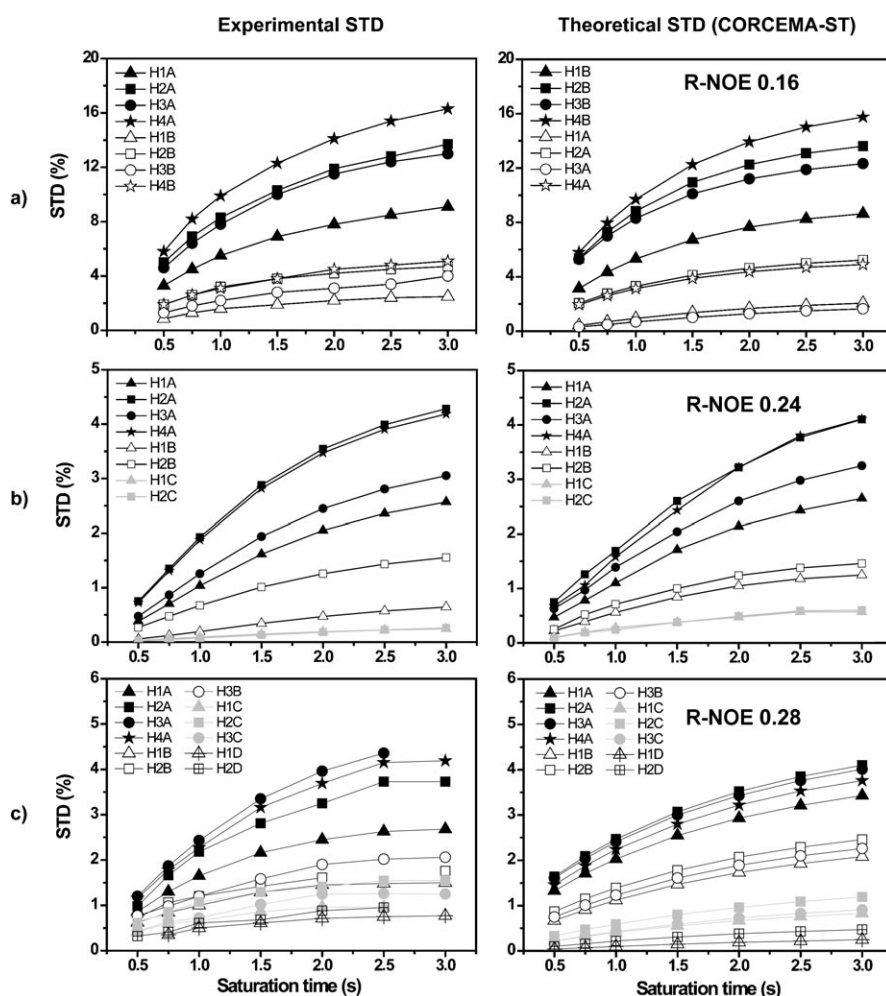


Figure 2. Linear oligomannosides **1–3** bind to the human monoclonal antibody 2G12 in a similar binding mode, which is consistent with previous X-ray studies. Experimental (left) and theoretical (right) STD buildup curves of a) $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{ManOR } \mathbf{1}$, b) $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{ManOR } \mathbf{2}$, and c) $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{ManOR } \mathbf{3}$. Theoretical STD intensities were calculated using full-matrix relaxation, as implemented in CORCEMA-ST and based on existing crystal structures (see the Experimental Section).

As for the linear oligomannosides, the buildup curves of the STD signals of **4** and **5** that could be unambiguously integrated were recorded by using different saturation times (Figure S3 in the Supporting Information). From these curves, the initial slopes (STD_0) were obtained, normalized to the largest value, and the resulting epitopes identified (Figure 3).

Unfortunately, the H1 signals of the terminal mannoses A and G of **5** appear at the same chemical shift (Figure 3), thus precluding any independent measurement of their STD effects. The most intense STD signal within **5** could not be ascribed to a given proton, and hence reliable epitope mapping could not be obtained for the whole molecule. Nevertheless, it was possible to make some comparison of the different saturation levels received by the mannose residues of ligands **4** and **5** (Figure 3).

The STD NMR spectra of pentamannoside **4** revealed very interesting results (Figure 3a). First, in the C–H spectral region ($\delta=3.5\text{--}4.1$ ppm, Figure 3a), the distribution of

STD intensities showed some similarities to the previous STD spectra of the linear oligosaccharides (see Figure 1). For example, clear prominent STD signals could be assigned to specific sugar protons, namely, H4, H3, and H2 ($\delta=3.57, 3.78,$ and 4.0 ppm), of mannose residues at a nonreducing end (Figure 3a, black and gray symbols). However, it was not possible to elucidate whether the saturation transfer takes place on protons of mannose A or E, or both, due to the degeneracy of their chemical shifts at this spectral region. In fact, the integration of the anomeric region (Figure 3a, black and gray triangles, $\delta=4.7$ and 5.3 ppm) confirms that those intense STD signals result from contributions of both terminal mannose residues (A and E). The H1 signals of both terminal sugar rings (A and E) show the strongest intensities among the five anomeric signals of pentamannoside **4** (Figure 3a).

In the complex of a pentasaccharide similar to **4** and 2G12 determined in the solid state by X-ray diffraction studies,^[7b] only the $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$ branch (equivalent to the D3 arm of the natural high-mannose $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ glycans; Scheme 1) was recognized by the antibody in the combining site. The other branch (equivalent to the D2 arm) points away from the protein surface, thus making no contact with the protein. However, analysis of the STD NMR spectra of **4** in the presence of 2G12 (Figure 3a) clearly reveals that this situation does not explain the data in solution. In the STD spectra, the H1 protons of both nonreducing terminal residues (A and E) of **4** received large saturation transfer from the protein, with a little larger saturation transfer to mannose E. This behavior was confirmed at all the saturation times studied, as shown in the experimental buildup curves in Figure 4a (left). Significantly, proton H1A received larger saturation than H1D, thus indicating that the mannose A residue makes closer contacts with the antibody in the binding pocket than residue D.

The analysis of the NMR data of heptamannoside **5** (Figures 3b and 4b, left) was much more complicated than in the case of **4** due to the increased signal overlapping. The best-resolved spectral region (anomeric protons at $\delta=4.8\text{--}$

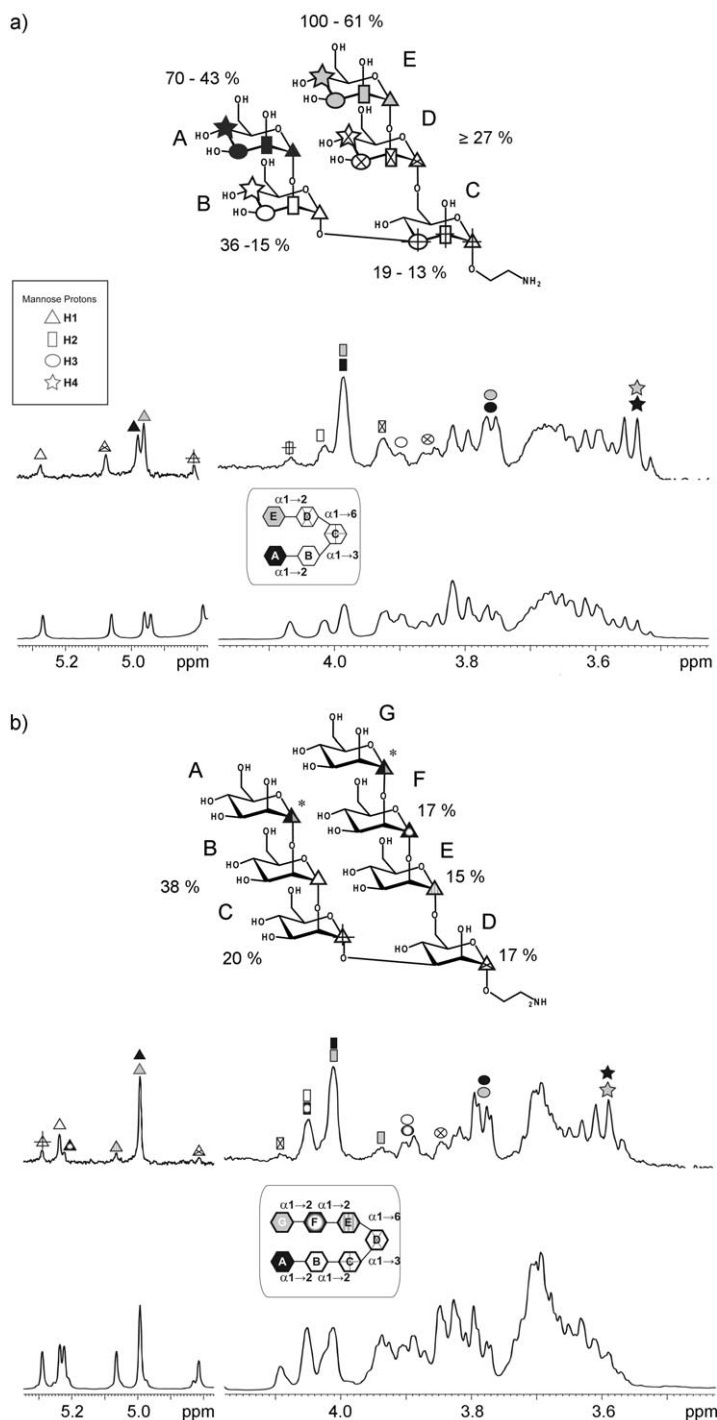


Figure 3. Binding of branched oligomannosides a) $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)-[\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)]\text{ManOR } \mathbf{4}$ and b) $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)[\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)]\text{ManOR } \mathbf{5}$ ($\text{R} = -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$) to the human monoclonal antibody 2G12 in solution, as detected by STD NMR spectroscopy. For each ligand, the bottom spectrum shows the reference ^1H NMR equilibrium signals, whereas the top shows the corresponding ^1H STD NMR spectrum (saturation time: 0.5 s, on-resonance frequency: $\delta = 0.86$ ppm, off-resonance: $\delta = 40$ ppm). Numbers on the formulae show the normalized levels of saturation (%) received by each ligand residue upon binding to 2G12; the magnitudes correlate with the proximity of sugar protons to the antibody-binding-pocket surface in the bound state. Different symbols (triangle: H1, rectangle: H2, ellipse: H3, star: H4) distinguish the different protons on the sugar residues (inset schematic cartoons).

5.3 ppm; Figure 3b) showed that H1A and H1G had degenerate chemical shifts, though all the remaining anomeric protons (H1B–H1F) could be independently integrated. By analyzing the whole spectrum, the largest transfer of protein saturation to **5** occurred to protons on a terminal mannose of the branched heptamannoside (Figure 3b, black and gray symbols). In contrast to pentamannoside **4**, it was not possible to clarify which nonreducing terminal sugar ring A or G makes the closest contacts with the protein in the bound state. On the other hand, the individual integration of anomeric STD values (H1B–H1F) showed that H1B, located at the D1-like arm, received significantly larger saturation transfer than proton H1F at the non-natural arm. An intensity decrease was also observed by comparing STD signals of H1B and H1C protons, thus meaning that the antibody 2G12 can differentiate between both arms of heptamannoside **5** in solution so that it preferentially recognizes the natural $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{Man}$ (D1-like) arm of the ligand (Scheme 1). This result is remarkable when the chemical structure of the ligand is taken into consideration. Both arms of heptamannoside **5** are quite similar and differ only in the glycosidic linkage to the reducing terminal mannose D $\alpha(1\rightarrow3)$ or $\alpha(1\rightarrow6)$ (Scheme 1), which is far from the protein binding pocket (solvent exposed) in the bound state, as indicated by the STD NMR data.

CORCEMA-ST prediction of STD intensities of branched ligands 4 and 5: The discrepancies between the NMR observations for **4** and the single binding mode described by X-ray studies were further quantitatively confirmed. As with the 2G12/linear ligand complexes, we used the X-ray structure^[7b] of the complex of 2G12 and a pentamannoside similar to **4** to predict STD intensities by theoretical calculations with the program CORCEMA-ST (Figure 4a). Only those STD signals that could be accurately integrated were considered. The results indicated that the solid-state structure could not fully explain the observed NMR data in solution (Figure 4a). The theoretical calculations gave rise to a large R-NOE factor (0.49) and predicted that, in contrast to our experimental STD NMR results, H1 of terminal mannose A of **4** should be the proton that receives the lowest amount of saturation among the five anomeric protons.

No crystal structure was available for heptamannoside **5**. To carry out CORCEMA-ST calculations we considered the experimental STD spectra, which indicated a preferential recognition of the D1-like arm (Scheme 1) that is structurally equivalent to **3**; therefore, we used the X-ray structure of the tetramannoside to calculate the theoretical STD values of the D1-like arm of **5** (Figure 4b). A good agreement between the theoretical predictions and experimental STD signals in the case of **5** corroborates the selectivity of the antibody 2G12 toward the natural D1-like arm of the heptamannoside.

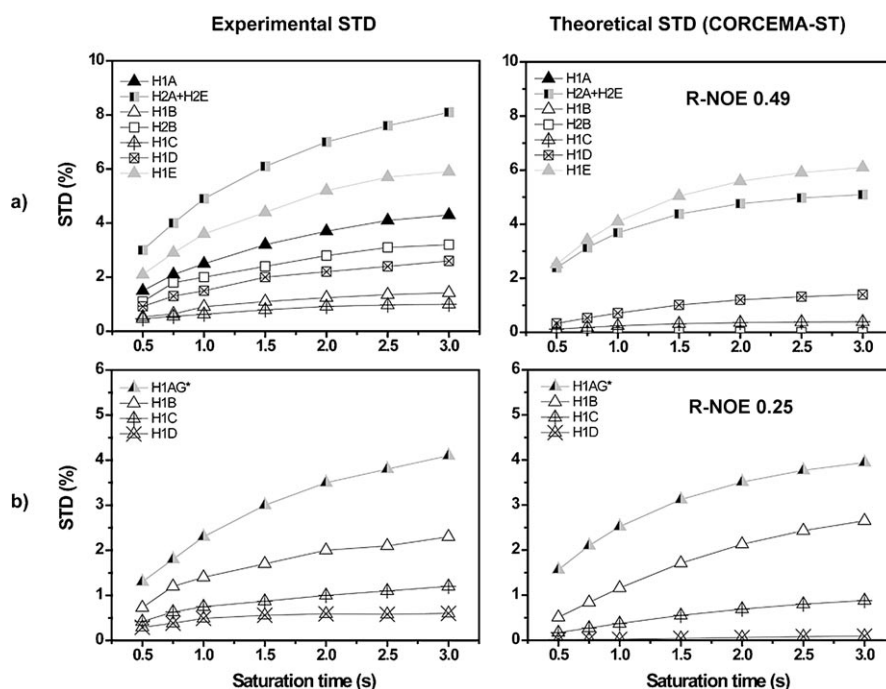


Figure 4. Branched oligomannosides **4** and **5** bind to the human monoclonal antibody 2G12 with distinct binding modes. Experimental (left) and theoretical (right) STD buildup curves of a) $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{[Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)]\text{ManOR}$ **4** and b) $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{[Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)]\text{ManOR}$ **5**. Theoretical STD intensities were calculated by using full-matrix relaxation, as implemented in CORCEMA-ST and based on the existing crystal structure of the complex of **4** (a) and the complex of a D1 tetramannoside (b) (see the Experimental Section).

Dissociation constants for the binding of 1–5 to 2G12 in solution from STD NMR titration experiments:

ELISA experiments and carbohydrate microarray analysis have been previously reported in the characterization of binding of several oligomannosides to antibody 2G12.^[6c,7a,b,e,14] We are interested in the use of NMR experiments to determine the affinities of 2G12 toward oligomannosides in solution. STD NMR spectroscopic analysis can provide information about protein/ligand binding affinities, through its intensity dependence on the concentration of the complex in solution.^[12,17] To determine the affinity of the oligomannosides for 2G12 in solution accurately, we performed STD NMR titration experiments for ligands **1–5**. To construct a binding isotherm from STD NMR experiments, we converted the experimental STD intensities into the so-called STD amplification factors (STD-AF), which are defined as the product of the measured STD intensity by the ligand-to-protein excess.^[12] Furthermore, we used a new protocol for single-ligand STD

NMR titrations based on the initial growth rates of STD-AF buildup curves (STD-AF₀) for building the binding isotherms. This protocol has been demonstrated to cancel out potential artifacts that are known to affect the measured K_D value.^[18]

Examples of the resulting binding isotherms are shown in Figure 5. These isotherms represent the normalized STD-AF₀ values (Figure 5), which give curves that vary between 0 and 1, independent of the magnitudes of the experimental STD-AF values of the chosen protons (see the Experimental Section). For the linear oligomannosides **1–3**, these curves monitor the STD-AF₀ values of the anomeric protons (H1) of their nonreducing mannose rings (mannoses A, Scheme 1). We obtained equivalent isotherms for other ligand protons (see

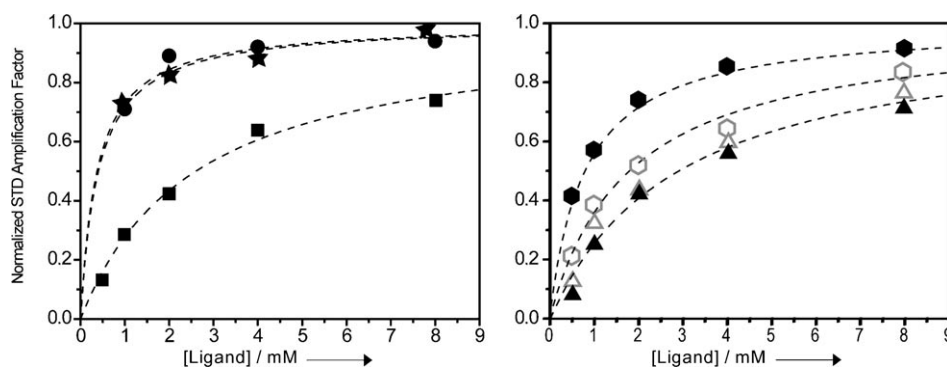


Figure 5. Left: Binding isotherms from STD NMR titration experiments of linear ligands **1** (■), **2** (●), and **3** (★) onto samples containing the human antibody 2G12. The samples contained 2G12 (37 μM (74 μM in regard to the binding sites) for **1** and **2** and 25 μM (50 μM in regard to the binding sites) for **3**). For each ligand, the anomeric signal (H1) of the nonreducing mannose ring (mannose A; Figure 1) is monitored. Right: Binding isotherms of branched ligands **4** and **5**. For these ligands, we monitored two STD signals from protons located at different branches (H1E: ▲, H1A: △ of **4** and H1B: ●, H1F: ○ of **5**).

the Supporting Information). For the branched oligomannosides **4** and **5**, the curves monitor two STD signals per ligand, thus corresponding to protons located at different branches of the oligosaccharide. In Figure 5 (right), the binding isotherms of **4** are from the anomeric protons H1A and H1E and the curves of **5** are from protons H1B and H1F. To obtain the dissociation constant of each ligand, the curves were fitted to a Langmuir equation. All the data fitted well to a one-site model, thus confirming the specific

binding of the oligosaccharides to the primary binding sites of the antibody in solution and indicating that the two specific primary binding sites of antibody 2G12 behave independently for the recognition of these oligomannosides.

The K_D values of oligomannosides **1–5** were obtained as averages from the fitting of several isotherms from different protons of the same ligand (Table 1). The lower affinity of dimannoside **1** ($K_D=2.3$ mM) relative to oligomannosides **2**, **3**, and **5** is in agreement with reported inhibition data of gp120/2G12 binding by oligomannosides in ELISA experiments.^[7b] In that study, the Man α (1 \rightarrow 2)Man disaccharide could inhibit binding, but at a much lower extent than the

Table 1. Solution dissociation constants K_D of di-, tri-, tetra-, penta-, and heptamannosides **1–5** for binding to the human monoclonal antibody 2G12.

Linear ligand	K_D [mM]	Branched ligand	K_D [mM]
dimannoside 1	2.3(\pm 0.3)	pentamannoside 4	2.9(\pm 0.3)
trimannoside 2	0.4(\pm 0.2)	heptamannoside 5	0.8(\pm 0.1)
tetramannoside 3	0.4(\pm 0.07)		

D1-like tetramannoside. The latter showed an inhibitory ability similar to that of the whole Man₉GlcNAc high-mannose oligosaccharide.^[6c,7b,e] In regard to tetramannoside **3**, the reported “surface” dissociation constant from microarrays for a D1-like tetramannoside ($K_{D,surf}=10^{-4}$ mM) was significantly lower than our result ($K_{D,surf}=0.4$ mM). Results from microarray assays cannot be easily compared to results in solution due to the known avidity enhancements that can result from pseudo-multivalency, which arises from the proximity of the surface-immobilized molecules in the chips.^[7a,b,12c] On the other hand, the dissociation constant of **3** in solution determined by STD NMR analysis herein ($K_D=0.4$ mM) is in good agreement with the K_D value obtained for a tetramannoside in solution determined by Wong and co-workers using a modified microarray assay ($K_{D,sol}=0.35$ mM).^[12d]

For the branched sugars, we were interested in analyzing the binding isotherms that resulted from STD signals of protons located at different ligand arms (Figure 5, right). Pentamannoside **4** gave a unique K_D value (2.9 mM), independent of the monitored proton (Figure 5 (right, triangles); see also the Supporting Information). However, only protons on the natural D1-like arm in heptamannoside **5** produce binding isotherms that fitted well ($K_D=0.8$ mM) to a one-site model (Figure 5 (right, black hexagons); see also the Supporting Information). This behavior is a consequence of the preferential binding of the D1-like arm of **5** to the antibody 2G12. In addition, the analysis of binding isotherms from the remaining protons of **5** indicate that both arms do not compete for the same protein binding pocket, thus suggesting that in the major bound conformation (with a D1-arm bound to 2G12) the non-natural arm makes only nonspecific contact with the antibody (see the Supporting Information).

As for the affinity of pentamannoside **4**, our data differ from the inhibition data obtained from ELISA experiments.^[7b,e] STD NMR titrations reveal an approximate sevenfold decrease in the affinity of pentamannoside **4** relative to tetramannoside **3** and an approximate fourfold lower affinity relative to the other branched oligomannoside **5**. In competition ELISA experiments,^[7b] tetra-, penta-, and heptamannosides similar to **3–5** followed the same trend as in the present study. However, the NMR data reveal much clearer differences in their affinities: tetramannoside > heptamannoside \gg pentamannoside ($K_D=0.4 > 0.8 \gg 2.9$ mM). This outcome highlights the particular sensitivity of STD NMR titrations to differences in ligand affinities, within the present range of dissociation constants, relative to competition ELISA experiments.

The intriguing higher affinity of **3** relative to **5** (0.4 versus 0.8 mM, respectively), which contains an additional trimannoside motif, was observed before by ELISA experiments.^[7e] It was proposed that the non-natural arm of **5** could force an unusual conformation of the sugar that could explain its different affinity. However, STD NMR data suggest that this heptamannoside shows no effective bivalency for 2G12 because the antibody specifically recognizes only the natural D1-like branch of **5**.

It is of note that trimannoside **2** shows the same affinity as tetramannoside **3** in solution (Table 1), thus indicating that a α (1 \rightarrow 3)Man extension to the Man α (1 \rightarrow 2)Man α (1 \rightarrow 2)Man oligosaccharide does not improve binding affinity for the antibody 2G12. This result agrees well with the solid-state structure of the complex of Fab/2G12 and a tetramannoside Man α (1 \rightarrow 2)Man α (1 \rightarrow 2)Man α (1 \rightarrow 3)Man.^[7b] In this structure, the reducing α (1 \rightarrow 3)-linked mannose ring was solvent exposed and the protein/ligand hydrogen bonds involved exclusively polar groups on the trimannoside moiety Man α (1 \rightarrow 2)Man α (1 \rightarrow 2)Man. Several approaches reported for the development of vaccines based on multivalent oligomannose platforms have focused on the affinity of the tetramannoside, which is on the same order of magnitude as the complete high-mannose nonasaccharide.^[12d,19] Our results from NMR analysis in solution indicate that the even simpler trimannoside **2** is an equally good candidate for vaccine development as tetramannoside **3** because they both show the same affinity for 2G12. From a biological point of view, the conservation of the high-mannose 2G12 epitope may be related to the mannose-dependent interaction of HIV-1 with DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin),^[6a] and inhibition by 2G12 of virus binding to cells that express DC-SIGN has been demonstrated.^[20] Within this context, glyconanoparticles decorated with **2** or **3** have proved to be similar and potent inhibitors of the DC-SIGN-mediated trans-infection of human T cells by R5 and X4 HIV.^[9b]

Transferred NOE experiments of linear oligomannosides 1–3: Transferred NOE experiments represent a very good approach to complement binding studies by STD NMR spectroscopy. These experiments yield the bioactive conforma-

tion of a ligand bound to a receptor protein in cases where the exchange between the free and bound states of the ligand is fast on the NMR relaxation timescale.^[11] In addition, comparison with NOE experiments of the ligand alone allows the identification of the differences between the conformation of the ligand bound to the receptor protein and in the free state.

We carried out transferred NOE experiments (2D NOESY) of the linear di-, tri-, and tetramannosides **1–3** in the presence of antibody 2G12. The spectra showed strong and negative ligand NOE cross peaks (same sign as the diagonal peaks) for all the ligands at ligand/protein molar ratios above 10:1. This outcome contrasts with the observations of weakly positive NOE cross peaks (opposite sign to diagonal peaks) for the oligomannosides in the absence of the protein (see Figure 6 and the Supporting Information). The change in the signs of the cross peaks is a key observation, which indicates that the experiment is reporting structural information of the ligand conformation (^1H – ^1H distances) in the bound state.

We focus the discussion on tetramannoside **3** because the results for the di- and trisaccharides **1** and **2** were equivalent to those for the $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}$ linkages of **3** (see the Supporting Information). Remarkable increases in the intensity for the inter-residual NOE cross peaks H5A–H2B and H5B–H2C across the $\alpha(1\rightarrow2)$ glycosidic linkages A–B and B–C of **3** were observed in the bound state (Figure 6, left). The same peaks were very weak (close to the detection limit) in the NOESY spectra of the free tetramannoside (Figure 6, right). A modest increase in intensity was also observed in transferred NOE experiments for the inter-glycosidic NOE cross peaks H5A–H1B and H5B–H1C. In the particular case of the A–B linkage, NOE cross peaks between the H1B and H6A protons (pro-*R* and pro-*S*) were clearly observed, which were absent in the free state (Figure 6). On the other hand, NOE contacts H1A–H1B and H1B–H1C were not detected. All the data indicated that antibody

2G12 induces a shift in the conformational equilibrium of the two $\alpha(1\rightarrow2)$ glycosidic linkages of tetramannoside **3** upon binding. In the free state, the NOE data indicated that the inter-glycosidic dihedral angles $\Psi(\text{C}1'\text{-O}1'\text{-C}2\text{-H}2)$ are in an equilibrium between positive and negative values, as previously described.^[21] However, the NOE peaks observed in the bound state showed that the antibody selects the negative Ψ conformers, with a stronger influence on the terminal nonreducing dimannoside moiety A–B. Similar results were obtained for the smaller linear oligomannosides **1** and **2**.

The $\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{Man}$ (C–D) linkage of **3** showed no sign of conformational shift upon binding to the antibody. Characteristic NOE cross peaks indicated the prevalence of negative Ψ conformations in both (bound and free) states of the ligand. In both situations, the inter-glycosidic H5C–H2D NOE intensity is stronger than that of H1C–H2D. This behavior is in perfect agreement with the STD NMR study, thus corroborating that the mannose D residue of **3** is solvent exposed in the bound state and makes very little contact with the protein surface.

Transferred NOE experiments of branched oligomannosides **4** and **5**:

We also performed transferred NOE experiments of the branched ligands **4** and **5** in the presence of antibody 2G12. Very weak NOE cross peaks were obtained at 33 °C for both oligosaccharides in the free state. These conditions are desirable to carry out transferred NOE experiments because of less contamination by residual intensities from the free ligands. After addition of the antibody, clear transferred NOE cross peaks were observed. However, full analysis of the NOE intensities of the bound ligands was not pursued mainly because of the low signal-to-noise ratio experimentally observed in the transferred NOE experiments, which precluded complete analysis by using full-matrix relaxation approaches.^[22] Nevertheless, we obtained key NOE information for both ligands that correlated well with the results obtained from STD NMR experiments. For pentamannoside **4**,

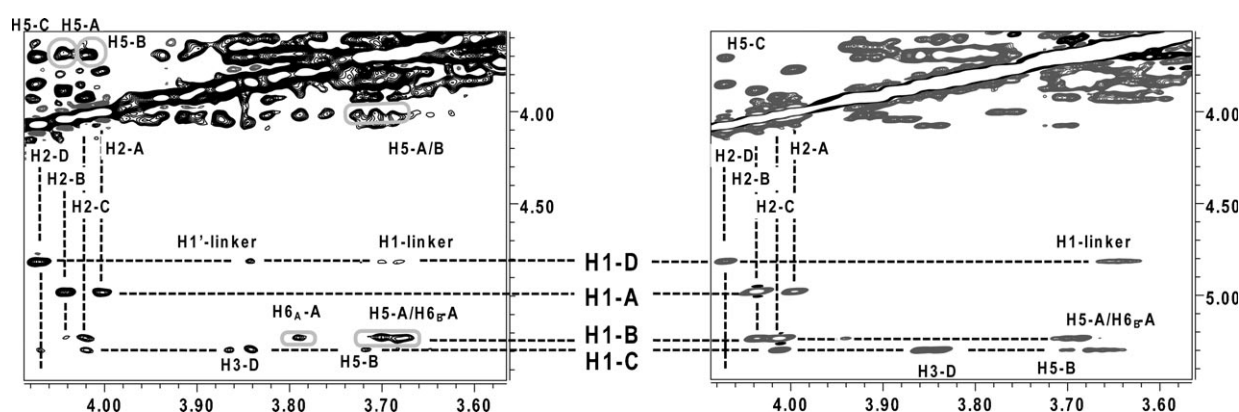


Figure 6. Binding of tetramannoside **3** to antibody 2G12 monitored by transferred NOE experiments. Relevant sections of the 2D NOESY experiments carried out in the presence (left: 35 °C, 500 MHz, mixing time: 400 ms, protein: 42 μM , **3**/2G12 ratio: 12:1) and the absence (right: 25 °C, 500 MHz, mixing time: 1000 ms, tetramannoside **3**: 5 mM) of 2G12. The focus is on inter-residual NOEs involving the anomeric protons (H1), which determine the conformation of **3**, both in the free and bound state. In the transferred NOE experiments, cross peaks show the same sign as the diagonal peaks, thus indicating binding in solution. Key transferred NOEs that involve a significant increase in NOE intensity in the bound state (H6_A–H1B, H5A–H1B, H5A–H2B, and H5B–H2C) are highlighted.

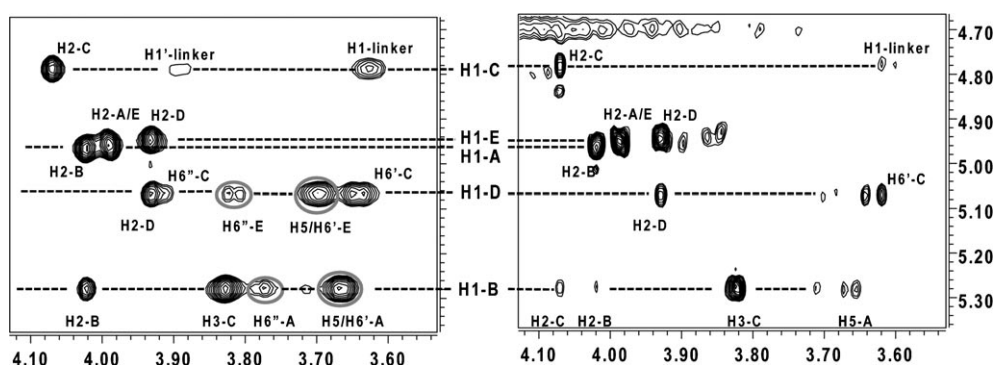


Figure 7. Binding of branched pentamannoside **4** to the human monoclonal antibody 2G12 studied by transferred NOE experiments. Left: NOESY spectrum of **4** in the presence of the antibody (30°C, mixing time: 150 ms, 2G12: 50 μ M, ligand/protein ratio at the binding sites: 5:1). Right: ROESY spectrum of **4** in the free state (30°C, mixing time: 300 ms, 0.5 mM). Key transferred NOEs that significantly increased in the bound state (H6(A/E)–H1(B/D), H5(A/E)–H1(B/D)) are highlighted. The binding of **4** to 2G12 affects the glycosidic conformations of the terminal Man α (1 \rightarrow 2)Man moieties of both ligand branches (A–B and E–D linkages).

binding to antibody 2G12 was characterized by a significant increase in key NOEs across the glycosidic linkages of the two terminal disaccharide moieties A–B and E–D of both ligand branches. The NOE cross peaks H5A(E)–H1B(D) and H6A(E)–H1B(D) considerably increased in the bound state (Figure 7). On the other hand, very weak or null H1A(E)–H1B(D) NOEs were observed. As in the cases of linear oligomannosides **1–3**, the NOE cross peaks observed in the bound state showed that the antibody selects the negative Ψ (extended) conformers of the terminal α (1 \rightarrow 2) glycosidic linkages, thus affecting the conformations of the terminal Man α (1 \rightarrow 2)Man moieties of both branches of ligand **4** (A–B and E–D linkages).

For heptamannoside **5**, a significant increase in the intensity of NOE cross peaks that characterize negative Ψ conformers of the α (1 \rightarrow 2) glycosidic linkages was observed for the terminal glycosidic linkage A–B on the D1-like arm of the ligand (see the Supporting Information). In consequence, the transferred NOE data of **5** corroborated the preferential recognition of the natural D1-like arm of the ligand by the antibody, as previously identified by the STD NMR experiments.

Intermolecular 2G12/pentamannoside (4) NOEs—dual binding mode (D2- and D3-arms): In contrast to heptamannoside **5**, all STD NMR and transferred NOE data indicated that both arms (D2- and D3-like) of the branched pentamannoside ligand **4** are affected by binding to 2G12; hence, both must make close contact with the antibody surface in the bound state. Furthermore, the prediction of STD effects from the reported X-ray structure could not explain the experimental data in solution (Figure 4a). This outcome means that a single binding mode in which pentamannoside **4** binds the antibody by only one (D3-like) arm is not justifiable by the NMR data obtained in solution.

We wanted to obtain more structural information from the bound state of **4**; therefore, we performed NMR experiments at higher magnetic field (800 MHz). A series of transferred NOE experiments at different mixing times (50, 75,

150, 250, 400, 600, 1000, and 1500 ms) were carried out for **4** at a low ligand/protein ratio (5:1). Unfortunately, a large contribution of NOE intensities from the free ligand was observed, as the ligand alone shows negative NOE cross peaks (same signs as the diagonal peaks). On the other hand, the spectra showed intraligand protein-mediated NOEs (spin diffusion), thus making it difficult to carry out an accurate quantitative analysis. Nevertheless, we could observe a set of key intermolecular NOEs between 2G12 and pentamannoside **4** in the NOESY experiments (see Figure 8 and the Supporting Information) due to enhanced sensitivity and spin diffusion at this very high magnetic field and the low ligand/protein ratio employed.

These cross peaks were absent in NOESY experiments carried out on samples containing either 2G12 only or pentamannoside **4** under the same experimental conditions, which allowed us to identify them as true intermolecular NOEs (see the Supporting Information). These cross peaks are only observable for the shortest protein/ligand distances in the bound state. The most intense protein/ligand intermolecular NOE peaks of **4** in the presence of 2G12 reported for short distances between some (unassigned) aliphatic protein protons (δ =0.89 ppm) and ligand protons H2A(E), H3A(E), and H4B(D) (see the Supporting Information). These NOEs explain the large saturation transfer from the protein to those protons of terminal residues A and E observed in the STD NMR experiments (Figure 3a). Due to chemical-shift degeneracy of the NMR signals of **4**, it was not possible to determine the individual contribution of each terminal mannose (A and E) to these intermolecular NOEs.

Importantly, key data that allowed us to determine the orientation of both arms of **4** in the binding pocket of 2G12 were obtained from NOESY experiments with mixing times above 150 ms. Two well-isolated protein/ligand intermolecular NOE cross peaks were observed at the anomeric spectral region of the ligand (Figure 8, top). These NOEs indicated that a side chain of an aliphatic protein amino acid (δ =1.25 ppm) is simultaneously in very close contact with the

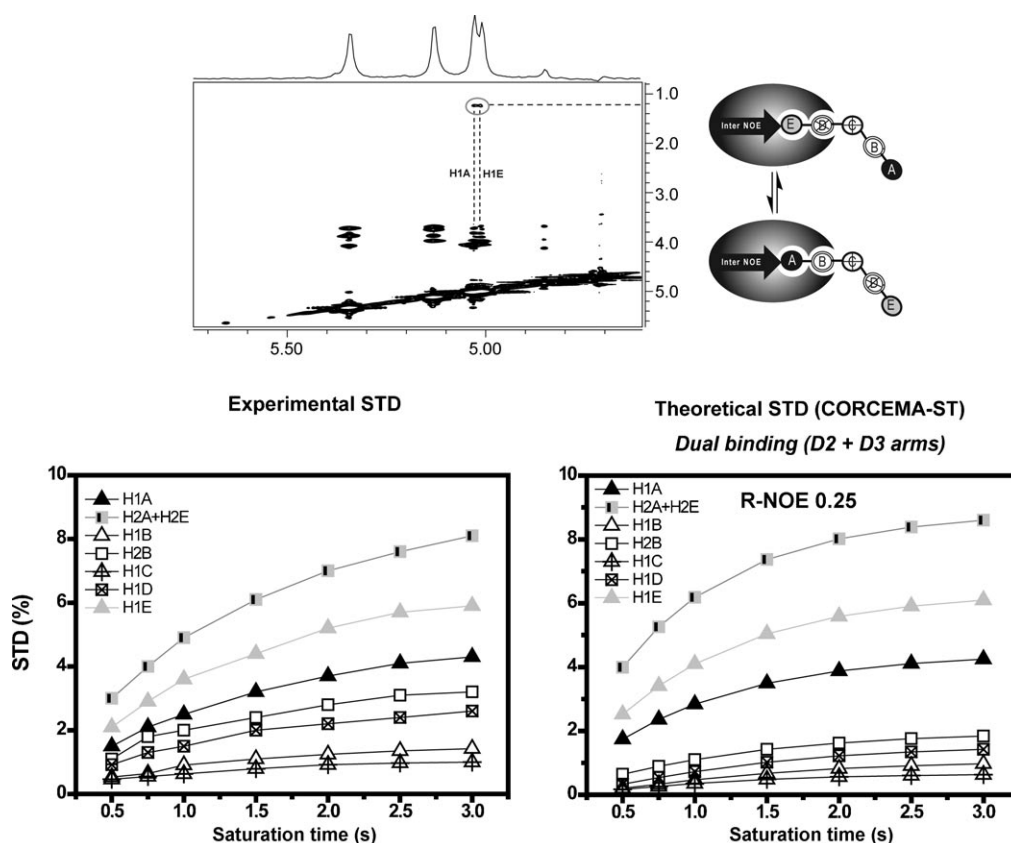


Figure 8. Both branches of pentamannoside **4** are recognized by the human antibody 2G12 in solution. Top: NOESY experiment of **4** in the presence of 2G12 (ligand/protein ratio: 5:1, 800 MHz, 25 °C, mixing time: 150 ms). Intermolecular protein/ligand NOE cross peaks involving an aliphatic amino acid side chain of 2G12 and both anomeric protons H1 of terminal nonreducing mannose rings A and E are highlighted. The cartoon shows the bimodal binding model for the molecular recognition of **4** by 2G12 as deduced from the NMR spectroscopic study. Bottom: experimental (left) and theoretical (right) STD buildup curves of **4**. The theoretical calculations were carried out by assuming contributions from two different alternate binding modes of the ligand that involve each pentamannoside branch (D2- and D3-like arms).

anomeric proton H1 of mannose A, as in the crystal structure, and with H1 of mannose E, which is far away from the antibody surface in the X-ray structure. The detection of these spatial contacts of the protein with mannoses A and E experimentally substantiate a model of binding of pentamannoside **4** to antibody 2G12 in which both arms (D2- and D3-like) of the ligand interact specifically with the same binding pocket in two alternate, different binding modes. This model is schematically represented in the right side of Figure 8 (top).

NMR spectroscopic data in those cases in which multiple binding modes are suspected must be considered to provide average information, the deconvolution of which is intrinsically difficult. Nevertheless, the observation of the above-mentioned intermolecular NOEs encouraged us to try to analyze the experimental STD intensities of this protein/ligand system as the result of a three-state system (one free and two different bound conformations that involve each ligand arm). We carried out full-matrix relaxation calculations by considering the existing X-ray structure as one of the bound states (D3- bound), whereas the other bound conformation (D2-bound) was obtained by docking calculations (see the

Experimental Section). Only those STD signals that could be accurately integrated were included in the analysis (all the anomeric protons H1A–E and H2B and the average intensity of H2A and H2E; Figure 8 (bottom)).

The results of the CORCEMA-ST calculations indicated that, as in the case of the X-ray structure (Figure 4 a, R-NOE=0.49), the bound conformation of ligand **4** in which the D2-like arm is within the binding pocket (from docking calculations) could not explain the STD NMR data obtained in solution (see the Supporting Information; R-NOE factor=0.50). However, STD theoretical calculations including contributions from both binding modes (see the Supporting Information for a description of the calculations), that is, considering the observed STD signal as the simple sum of the STD intensities of the D3- and D2-bound conformations of **4**, led to a very good agreement between the predicted and experimental STD buildup curves (Figure 8 (bottom); R-NOE factor=0.25).

X-ray crystallography studies reported only one of these bound conformations with the D3-like arm bound to the antibody. However, NMR spectroscopic analysis in solution allowed us to characterize an additional binding mode of pen-

tamannoside **4** to antibody 2G12, in which the D2-like arm of the ligand is bound to the antibody, whereas the D3-like arm is solvent exposed.

Conclusion

The results of the present study have delivered significant structural information at the atomic level about the molecular recognition of synthetic linear **1–3** and branched **4** and **5** oligomannosides, respectively, in solution by the broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12 by means of ligand-based NMR spectroscopic techniques. The present study complements and extends the existing view obtained by X-ray crystallography in the solid state.^[6c,7b]

Linear oligosaccharides **1–3** are recognized in a similar single binding mode, in which the nonreducing terminal Man α (1 \rightarrow 2)Man moiety is the region of the ligand intimately recognized by the protein. This outcome is in agreement with the crystal structures of the complexes between 2G12 and similar oligomannosides.^[6c,7b] For a branched pentamannoside similar to **4**, the X-ray study described a single binding mode, in which the D3-like arm of the ligand binds to the antibody binding pocket.^[7b] However, key antibody/pentamannoside **4** spatial contacts detected by STD NMR spectroscopy and transferred NOE experiments have allowed us to characterize two alternate binding modes for the branched pentamannoside **4** in solution. Thus, besides the D3-bound conformation observed in the solid-state, an additional binding mode contributes significantly to the protein/ligand complex in which the antibody recognizes the D2-like branch of pentamannoside **4**, whereas its D3-like arm is solvent exposed. The ability of the antibody 2G12 to recognize the D2-like arm of the pentamannoside present in the natural nonamannoside Man₉(GlcNAc)₂ in its primary binding site is reported here for the first time. In contrast, in the case of the other branched oligosaccharide heptamannoside **5**, the antibody preferentially recognizes its D1-like arm, even though the structural motif for affinity trisaccharide **2** is repeated in both arms.

STD NMR titration experiments have revealed significant differences in affinities for 2G12 among the linear and branched oligomannosides. Higher oligosaccharides **4** and **5** showed lower affinities than linear ligands **2** and **3**. Pentamannoside **4** showed roughly the same affinity as dimannoside **1**, even though it contained the same disaccharide motif twice. This outcome indicates that repetition of binding motifs or increased complexity of the oligomannosides do not necessarily involve enhancement of affinity. Furthermore, heptamannoside **5** showed less affinity for the antibody than tetramannoside **3**. In this case, nonspecific contacts of the non-natural arm of **5**, as detected by STD NMR analysis, may prevent the natural D1-like arm of the ligand from optimizing its bound orientation. Our results reveal that the trisaccharide Man α (1 \rightarrow 2)Man α (1 \rightarrow 2)Man seems to be the minimum structural requirement for conferring binding affinity toward the antibody 2G12.

The results presented herein demonstrate that STD NMR spectroscopy and transferred NOE experiments are appropriate to obtain key structural information of 2G12 ligands, which could be essential in the selection of binders to be immobilized onto multivalent platforms to gain higher affinity from cluster effects. These NMR techniques are particularly suitable for weak ligands (dissociation constants in the mM range), for which other techniques might meet their own detection limits. In the context of HIV therapeutic development, it has already been demonstrated that the fine-tuning of weak binders can be translated into highly active drugs by appropriate conjugation to gold nanoparticles.^[9,23] We are studying the binding of antibody 2G12 to gold glyconanoparticles coated with multiple copies of tri- and tetramannosides **2** and **3**.

Experimental Section

Compounds: The synthesis of the oligomannosides was carried out as previously reported^[9a] following the protocol described by Wong and co-workers.^[7e] Antibody 2G12 was a gift from Polymun Scientific (Vienna, Austria). The osmolytes (maltose) were removed and the sample buffer exchanged by dialysis with a membrane of 20 kDa (Spectra/Por, Medicell International Ltd.). All the ligands were lyophilized against 99% D₂O twice and once with 99.99% D₂O from Sigma-Aldrich. All the samples were prepared in 10 mm phosphate deuterated buffer solution at pH 6.7.

NMR spectroscopy: The ¹H NMR signals of each ligand were assigned by employing a combination of COSY,^[24] TOCSY,^[25] NOESY,^[26] and HSQC^[27] experiments performed on a Bruker DRX (500 MHz) spectrometer. The ¹H NMR assignments of the signals were in perfect agreement with previously reported data.^[21] For STD NMR experiments, the temperature was optimized for best signal-to-noise ratios, which was 298 K for all experiments, except for heptamannoside **5** which was at 306 K. The experiments were performed without suppression of the residual HDO signal. The broad signals of the large antibody were eliminated by adding a T_{1ρ} filter to the pulse sequence. All the STD NMR experiments were carried out with 1 K scans and 32 dummies scans. The buildup curves were obtained by using seven saturation times (0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, and 3 s) varying the relaxation delay (with a minimum of 0.1 s) inversely to the saturation time for each experiment to keep the total experimental time constant. Each saturation time was composed by a train of Gaussian-shaped pulses of 50 ms. Off- and on-resonance frequencies of $\delta=40$ and 0.86 ppm (protein aliphatic region) and $\delta=6.82$ and 7.2 ppm (for the protein aromatic region) were applied, respectively.

For the titration experiments, protein/ligand molar ratios were increased from 1:11 to 1:200 by adding different aliquots of the ligand to the NMR sample from high concentration stocks of each ligand. For each ratio an STD “buildup” curve was calculated to obtain the initial slopes (STD₀) by mathematical fitting to a monoexponential asymptotic growing equation, $STD(t_{\text{sat}}) = STD_{\text{max}} \times [1 - \exp(-k_{\text{sat}} \times t_{\text{sat}})]$. Dissociation constants K_D for each oligomannoside were obtained by fitting every isotherm made of initial slopes from the STD NMR “buildup” curves to a Langmuir equation of the kind $(B_{\text{max}} \times [L]) / (K_D + [L])$.^[18,28] After fitting, each experimental isotherm was divided by its corresponding parameter B_{max} to ease the graphical comparison of the isotherms of the different ligands. This result homogeneously scales all the association curves to be within a range between 0 and 1, instead of letting each proton association curve to reach different maximum STD-AF values due to the differences in STD intensities. The binding epitopes of the ligands were obtained at the largest protein/ligand ratios reached in the experimental setup by normalizing the STD-AF₀ values for each ligand against the largest value, to which a value of 100% was arbitrarily assigned.

Transferred NOE experiments (2D NOESY) were carried out on a Bruker DRX 500 MHz spectrometer, except for the pentamannoside which used a Bruker 800 MHz spectrometer with a cryoprobe. The experiments were acquired with the States-TPPI method for quadrature method in F1. Typically, a data matrix of 2 K × 256 (in the 500 MHz experiments) and 2 K × 400 (in the 800 MHz experiments) were employed to digitize spectral widths of 10 and 12 ppm (at 500 and 800 MHz, respectively). The number of scans used was 80 and 16 at 500 and 800 MHz, respectively. In both cases, prior to Fourier transformation, zero filling was performed in F1 to expand the data to 2 K × 1 K. Baseline correction was applied in both dimensions. The experiments were carried out with mixing times of 50, 75, 150, 250, 400, 600, 1000, and 1500 ms.

CORCEMA-ST calculations: Theoretical predictions of STD intensities were carried out by full-matrix relaxation calculations as implemented in the program CORCEMA-ST (v3.8). Co-ordinates of the complexes were taken from existing X-ray structures for ligands **1**, **3**, and **4** (pdb entries: 1op3, 1zlu, and 1zls). For ligand **2**, the complex was built from the co-ordinates of the complex of **3** by taking only the Man α (1→2)Man α (1→2)Man moiety. For ligand **5**, the co-ordinates of the complex of the tetramannoside (D1-arm of the heptamannoside) were sufficient to reproduce the experimental data (see main text). For pentamannoside **4**, a second binding mode of the ligand, different from the X-ray structure and involving the D2-like arm, was built from docking calculations filtered by the experimental transferred-NOE data. For all the structures of the complexes, hydrogen atoms were added using SYBYL suite program, and soft energy minimizations (500 steps, conjugate gradients: 0.01 Kcalmol⁻¹ Å⁻¹) were performed. By starting with these structures and to reduce the dimensions of the matrices, distance cutoffs of 8 Å from the ligands were used, and only those protein residues within that distance were included in the calculations. The selection of the instantaneously saturated protein protons ("on resonance") was carried out by the program based on a table of predicted chemical shifts of 2G12 carried out by the program SHIFTX.^[29] An irradiation range from $\delta=0.6$ to 1.8 ppm led to the best agreements with experimental STD intensities in our calculations. We assumed a diffusion-controlled association on rate of $k_{on}=10^8$ M⁻¹ s⁻¹, a reasonable value of 0.85 for S² for protein methyl groups, with an internal correlation time of $\tau_m=10$ ps. Several correlation times of the protein τ_p were tried and the best results were obtained for $\tau_p=27.5$ ns. The free correlation times for the ligands were 1, 1.2, 1.5, 1.6, and 1.8 ns, for **1–5**, respectively. To mimic nonspecific leakage relaxation with paramagnetic oxygen present in solution, we used uniform leakage relaxation values of 0.1–0.3 s⁻¹ (depending on the sample for NMR analysis) for all the protons in their free and bound states. Theoretical STD values were compared mathematically to the experimental results by the R-NOE factor:

$$NOE(R - factor) = \sqrt{\frac{\sum W_k(I_{STD}^{exp} - I_{STD}^{calc})^2}{\sum W_k(I_{STD}^{exp})^2}}$$

Docking calculations: For the structure of pentamannoside **4** bound to 2G12 by the D2 branch, docking calculations were performed by using the X-ray structure of 2G12/pentamannoside (1zls) optimized for these calculations with the SYBYL suite program (biopolymer preparation) and a starting structure of **4** constructed with the same program, with the Man α (1→2)Man (A-B) branch (D2-like arm) located within the primary antibody binding pocket in an orientation similar to that of the E-D disaccharide of the ligand in the crystal structure (1zls). In this way, the global orientation of the ligand relative to the protein was about 180° inversion related to that of the crystal structure. The calculations were carried out with the AutoDock 4 program. The grid box was centered in one of the two binding sites of the antibody, in which the ligand was initially placed with 126 points for each side and the spacing between points set to 0.25 Å. The dielectric constant for the grid map was 80. A total of 100 runs of the Lamarckian genetic algorithm were carried out for the calculations, with an initial population size of 300 individuals and 3.5 × 10⁶ of maximum number of evaluations. Other options were set as default. After the calculation, reclustering of 2 Å of RMSD (root mean square deviation) was carried out. The solutions of the ligand were chosen by

considering the docking energy and the agreement with the experimental inter-glycosidic transferred NOEs as the criteria, thus obtaining a total of five possible solutions. The CORCEMA-ST calculations were carried out on all of these solutions, and the final structure gave rise to the lowest total value of the R-NOE factor.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN, grant CTQ2008–04638) and by the Department of Industry of the Basque Country (grant ETORTEK). We thank Dr. Dietmar Katinger (Polymun Scientific, Vienna, Austria) for the gift of antibody 2G12, Dr. Pedro Nieto for scientific support and helpful discussions, Dr. Margarida Gairi for help with the high-field measurements, and Prof. Rama Krishna (University of Alabama, USA) for making the CORCEMA-ST program available to us. Access to the 800 MHz facilities of CIC bioGUNE and the Unitat de RMN d'alt camp of the University of Barcelona are acknowledged. P.M.E.-N. acknowledges financial support from CIC biomaGUNE. J.A. acknowledges financial support from the MICINN through the Ramon y Cajal program.

- [1] R. C. Gallo, L. Montagnier, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2283–2285.
- [2] J. Cohen, *Science* **2007**, *318*, 1360–1361.
- [3] a) P. R. Johnson, B. C. Schnepp, J. Zhang, M. J. Connell, S. M. Greene, E. Yuste, R. C. Desrosiers and K. Reed Clark, *Nat. Med.* **2009**, *15*, 901–906; b) A. J. Hessel, P. Poignard, M. Hunter, L. Hangartner, D. M. Tehrani, W. K. Bleeker, P. W. H. I. Parren, P. A. Marx, D. R. Burton, *Nat. Med.* **2009**, *15*, 951–954.
- [4] F. Barin, M. F. McLane, J. S. Allan, *Science* **1985**, *228*, 1094–1096.
- [5] A. Trkola, M. Purtscher, T. Muster, C. Ballaun, A. Buchacher, N. Sullivan, K. Srinivasan, J. Sodroski, J. P. Moore, H. Katinger, *J. Virol.* **1996**, *70*, 1100–1108.
- [6] a) R. W. Sanders, M. Venturi, L. Schiffner, R. Kalyanaraman, H. Katinger, K. O. Lloyd, P. D. Kwong, J. P. Moore, *J. Virol.* **2002**, *76*, 7293–7305; b) C. N. Scanlan, R. Pantophlet, M. R. Wormald, E. Ollmann Saphire, R. Stanfield, I. A. Wilson, H. Katinger, R. A. Dwek, P. M. Rudd, D. R. Burton, *J. Virol.* **2002**, *76*, 7306–7321; c) D. A. Calarese, C. N. Scanlan, M. B. Zwick, S. Deechongkit, Y. Mimura, R. Kunert, P. Zhu, M. R. Wormald, R. L. Stanfield, K. H. Roux, J. W. Kelly, P. M. Rudd, R. A. Dwek, H. Katinger, D. R. Burton, I. A. Wilson, *Science* **2003**, *300*, 2065–2071.
- [7] a) M. C. Bryan, F. Fazio, H. K. Lee, C. Y. Huang, A. Chang, M. D. Best, D. A. Calarese, O. Blixt, J. C. Paulson, D. Burton, I. A. Wilson, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8640–8641; b) D. A. Calarese, H. K. Lee, C. Y. Huang, M. D. Best, R. D. Astronomo, R. L. Stanfield, H. Katinger, D. R. Burton, C. H. Wong, I. A. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13372–13377; c) V. Y. Dudkin, M. Orlova, X. Geng, M. Mandal, W. C. Olson, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9560–9562; d) X. Geng, V. Y. Dudkin, M. Mandal, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2616–2619; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2562–2565; e) H. K. Lee, C. N. Scanlan, C. Y. Huang, A. Y. Chang, D. A. Calarese, R. A. Dwek, P. M. Rudd, D. R. Burton, I. A. Wilson, C. H. Wong, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1018–1021; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1000–1003; f) M. Mandal, V. Y. Dudkin, X. Geng, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2611–2615; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2557–2561; g) D. M. Ratner, P. H. Seeberger, *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 173–183; h) L. X. Wang, J. Ni, S. Singh, H. Li, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 127–134.
- [8] a) J. Ni, H. Song, Y. Wang, N. M. Stamatou, L.-X. Wang, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 493–500; b) J. G. Joyce, I. J. Krauss, H. C. Song, D. W. Opalka, K. M. Grimm, D. D. Nahas, M. T. Esser, R. Hrin, M. Feng, V. Y. Dudkin, M. Chastain, J. W. Shiver, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15684–15689.

- [9] a) O. Martínez-Ávila, K. Hijazi, M. Marradi, C. Clavel, C. Campion, C. Kelly, S. Penades, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9874–9888; b) O. Martínez-Ávila, L. M. Bedoya, M. Marradi, C. Clavel, J. Alcamí, S. Penades, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1806–1809.
- [10] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902–1906; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788.
- [11] a) F. Ni, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, *26*, 517–606; b) *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis* (Eds.: D. Neuhaus, M. P. Williamson), Wiley-VCH, New York, **2000**; c) *NMR Spectroscopy of Glycoconjugates* (Eds.: J. Jimenez-Barbero, T. Peters), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [12] a) E. W. Adams, D. M. Ratner, H. R. Bokesch, J. B. McMahon, B. R. O’Keefe, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 875–881; b) I. J. Krauss, J. G. Joyce, A. C. Finnefrock, H. C. Song, V. Y. Dudkin, X. Geng, J. D. Warren, M. Chastain, J. W. Shiver, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11042–11044; c) P. H. Liang, S. K. Wang, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11177–11184; d) S.-K. Wang, P.-H. Liang, R. D. Astronomo, T.-L. Hsu, S.-L. Hsieh, D. R. Burton, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3690–3695.
- [13] M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108–6117.
- [14] J. Angulo, I. Díaz, J. J. Reina, G. Tabarani, F. Fieschi, J. Rojo, P. M. Nieto, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2225–2227.
- [15] a) V. Jayalakshmi, N. R. Krishna, *J. Magn. Reson.* **2002**, *155*, 106–118; b) J. L. Yan, A. D. Kline, H. P. Mo, M. J. Shapiro, E. R. Zartler, *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 270–276; c) M. Mayer, T. L. James, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4453–4460.
- [16] J. Angulo, B. Langpap, A. Blume, T. Biet, B. Meyer, N. R. Krishna, H. Peters, M. M. Palcic, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13529–13538.
- [17] a) B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 890–918; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864–890; b) C. A. Lepre, J. M. Moore, J. W. Peng, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3641–3675.
- [18] J. Angulo, P. M. Enríquez-Navas, P. M. Nieto, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7803–7812.
- [19] a) J. Wang, H. Li, G. Zou, L. X. Wang, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1529–1540; b) R. D. Astronomo, H.-K. Lee, C. N. Scanlan, R. Pantofolet, C.-Y. Huang, I. A. Wilson, O. Blixt, R. A. Dwek, C.-H. Wong, D. R. Burton, *J. Virol.* **2008**, *82*, 6359–6368.
- [20] a) J. M. Binley, S. Ngo-Abdalla, P. Moore, M. Bobardt, U. Chatterji, P. Gallay, D. R. Burton, I. A. Wilson, J. H. Elder, A. de Parseval, *Retrovirology* **2006**, *3*, 39; b) P. W. P. Hong, S. Nguyen, S. Young, S. V. Su, B. Lee, *J. Virol.* **2007**, *81*, 8325–8336.
- [21] C. Clavel, A. Canales, G. Gupta, J. I. Santos, F. J. Canada, S. Penades, A. Suroliá, J. Jimenez-Barbero, *Glycoconj. J.* **2007**, *24*, 449–464.
- [22] a) N. R. Krishna, H. N. B. Moseley, *Biol. Magn. Reson.* **1999**, *17*, 223–307; b) H. N. B. Moseley, E. V. Curto, N. R. Krishna, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1995**, *108*, 243–261.
- [23] M. C. Bowman, T. E. Ballard, C. J. Ackerson, D. L. Feldheim, D. M. Margoli, C. Melander, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6896–6897.
- [24] A. L. Davis, E. D. Laue, J. Keeler, D. Moskau, J. Lohman, *J. Magn. Reson. (1969–1992)* **1991**, *94*, 637–644.
- [25] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson. (1969–1992)* **1985**, *65*, 355–360.
- [26] A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1–6.
- [27] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185–189.
- [28] Langmuir isotherms require the use of concentrations of ‘free’ ligand in solution, which are very difficult to determine; nevertheless, due to the range of rather low affinities accessible by STD NMR spectroscopy, the ‘total’ concentration of the ligand can be used instead, without introducing large errors in the determination of affinities.
- [29] S. Neal, A. M. Nip, H. Zhang, D. S. Wishart, *J. Biomol. NMR* **2003**, *26*, 215–240.

Received: August 31, 2010
Published online: January 5, 2011