







**GLICONANOPARTÍCULAS DE ORO:  
MIMÉTICOS DE LA GLICOPROTEINA gp120  
DEL VIH PARA EL ESTUDIO DE LA  
INTERACCIÓN CON EL RECEPTOR DC-SIGN**

Olga María Martínez Ávila  
Sevilla, 2009

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
CIC biomagUNE  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
QUÍMICAS



NANOMATERIALES  
BIOFUNCIONALES



DEPARTAMENTO DE  
QUÍMICA ORGÁNICA

**GLICONANOPARTÍCULAS DE ORO:  
MIMÉTICOS DE LA GLICOPROTEINA gp120  
DEL VIH PARA EL ESTUDIO DE LA  
INTERACCIÓN CON EL RECEPTOR DC-SIGN**

Directora de la Tesis

Soledad Penadés Ullate

Doctorando

Olga María Martínez Ávila

D<sup>a</sup> SOLEDAD PENADÉS ULLATE, Prof de Investigación del  
C.S.I.C. y Group Leader de CIC biomaGUNE

CERTIFICA: Que el presente trabajo titulado: "Gliconanopartículas de oro: miméticos de la glicoproteína gp120 del VIH para el estudio de la interacción con el receptor DC-SIGN" ha sido realizado bajo mi dirección y asesoramiento entre los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (Sevilla) y los laboratorios de la Unidad de Nanomateriales Biofuncionales de CIC biomaGUNE (San Sebastián) durante los años académicos 2004-2008, constituyendo la Memoria que presenta la Lcda. Olga María Martínez Ávila para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

San Sebastian, Marzo de 2009

Fdo.: Soledad Penadés Ullate

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo con ayuda de una beca del proyecto europeo EMPRO (LHSP-CT-2003-503558, IP Prof. Penadés), con becas EPO e I3P financiadas por el CSIC, y con un contrato con cargo al proyecto GLYCO-HIV del Grupo de Carbohidratos (CTQ2005-07993-C02-01/BQU, IP Prof Martín-Lomas).

*A mis Padres,*

*La Tesis Doctoral que se presenta en las siguientes páginas ha sido realizada “a caballo” entre el Grupo de Carbohidratos del IIQ-CSIC en Sevilla, y la Unidad de Nanomateriales Biofuncionales de CIC biomaGUNE en San Sebastián bajo la dirección de la Prof. Soledad Penadés Ullate, a quien quiero expresar mi más sincera gratitud por toda su ayuda, apoyo y confianza durante estos años, así como por transmitirme su pasión por la ciencia.*

*Agradezco también al Prof. Manuel Martín-Lomas por todos los consejos y apoyo prestados durante estos años, y por la financiación económica de esta Tesis.*

*Al Prof. Manuel Gómez Guillén, Catedrático del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de Universidad de Sevilla, haber aceptado ser tutor de esta Tesis.*

*Esta Tesis no hubiera podido realizarse sin la ayuda de la Dr. Caroline Clavel, en la etapa sevillana, o el Dr. Marco Marradi en la etapa donostiarra. Durante este tiempo habéis sido mi punto de apoyo dentro y fuera del laboratorio. Gracias por apoyarme siempre y por enseñarme todo lo que sé. Gracias por vuestra amistad.*

*Gracias también a Daniel Padró y a Pedro Miguel Enriquez por su ayuda en el diseño de la portada de esta Tesis.*

*Pero sin duda, esta Tesis no hubiera sido tan enriquecedora sin la ayuda de las colaboraciones y estancias que realicé durante la misma. Gracias al Prof Charles Kelly y a la Dra Karolin Hijazi del King's College, por enseñarme a trabajar con el Biacore y por su calurosa acogida en Londres durante mi estancia: gracias Karolin. Gracias también al Prof. Robin Shattock y a Martha Stefanidou del St. George's University de Londres, por mi primera incursión al laboratorio de microbiología y mis primeros pasos trabajando con células y con el VIH. Y un especial agradecimiento al Prof José Alcamí y al Dr Luis Miguel Bedoya del Instituto de Salud Carlos Tercero en Majadahonda, donde se realizaron todos los estudios de trans-infección con el VIH que tan buenos*

*resultados dieron y que constituyen una parte vital de esta tesis. Gracias Pepe por haberme aceptado en vuestros laboratorios con el peligro que supone una “nanoterrorista”..... y por todo lo que he aprendido allí durante mi estancia, por el super buen ambiente que tenéis en vuestro grupo y por haberme acogido tan tan bien. Un millón de gracias a Luismi, porque me convertí en tu sombra durante esos meses, te di la lata (y aún sigo) con millones de preguntas de biología, y siempre estás disponible para mi ayudándome siempre con suma paciencia, gracias de corazón.*

*Como ya he dicho, esta Tesis se ha realizado “a caballo” entre Sevilla y San Sebastián. El traslado fue duro en lo personal, pero me ha dado la genial oportunidad de crecer en un ambiente más multidisciplinar y pasarme a lo “bio” que tanto me apasiona ahora.....y por eso tengo el doble de agradecimientos y he ganado el doble de amigos.*

*En el Grupo de Carbohidratos, el equipo Sevillano, no podré olvidar a Jose Juan y David, mis becarios preferidos (ya eminentes doctores), a Caroline, Rafa Ojeda, Javi Rojo, Pedro Nieto, y a mis resonantes favoritos Jesús Angulo y Pedro Miguel (mushas gracias mi arma!!): merci por vuestro apoyo y por todos los buenos momentos que pasamos dentro y fuera del laboratorio. Gracias también a todos los miembros del Grupo, del presente y del pasado, por hacer que mi estancia sevillana fuese tan agradable, gracias a África, con quien di mis primeros pasos en la Gliconanotecnología, y gracias por Londres; gracias a Jesús, Natalia, Olimpia, Olivia, Isabel, Carmencita, Sara, Javier Lopez, Julia, Macarena, Andrea, Marco, Juan Carlos, María del Mar e Irene.*

*En la última etapa en BiomaGUNE, el equipo donostiarra, tampoco podré olvidar a Isabel García (mi gran descubrimiento) y Elena Martines de mi laboratorio, y a Mihaela Delcea de la segunda planta: gracias por la complicidad y por las interminables charlas, por todos los buenos y malos momentos que hemos compartido, gracias por vuestra amistad. Gracias a todos los miembros de la Unidad de Materiales Biofuncionales en San Sebastián: quiero agradecer a Marco y a Paolo por aguantarme no solo en el*

*lab sino también en casa, a mis chicas del laboratorio de células Nuria y, especialmente Blanca, que continua trabajando con mis “nanos”, a Ainhoa y a Juanito, a Shengtai, a Maria José y a la loquita de Yaiza, y también a los que empiezan, Fabrizio y Griselda.*

*Esta tesis no hubiera podido realizarse sin el apoyo de tantas y tantas personas que he conocido durante estos años en Sevilla y en San Sebastián, en Londres y en Majadahonda, pero tampoco hubiera podido acabarse sin el apoyo de toda mi gente de siempre, ni por supuesto sin el apoyo incondicional de mi familia.*

*Gracias a mis amigos de siempre de Torrejón y Alcalá: gracias por seguir ahí a pesar de la distancia y por alegrarme la vida con todas vuestras visitas a Sevilla y a San Sebastián. Por intentar entenderme, que ya se que es difícil y por todas las cosas que hemos compartido juntas y por todas las que seguro vendrán: mil gracias Lucia.*

*Gracias a Mikael, por querer compartir tu vida conmigo a pesar de las dificultades, por conseguir siempre que sea fácil lo que me parece imposible y por todo lo que nos depare nuestra nueva etapa: “gracias del fondo del corazón”.*

*Y gracias a mi padre, a mi madre y a mi hermano Jose Luis, porque sabéis que no hubiera llegado hasta aquí sin vosotros. Esta Tesis también es vuestra.*

# INDICE GENERAL

<b>Introducción, antecedentes y objetivos.....</b>	<b>1</b>
1. Sistemas modelo multivalentes de carbohidratos.....	3
2. Patogénesis del virus de inmunodeficiencia humano (VIH).....	10
2.1. Mecanismo de infección del VIH por transmisión sexual.....	13
2.2. Células dendríticas.....	14
2.3. DC-SIGN.....	15
3. Objetivos.....	20
4. Bibliografía.....	23

## **CAPÍTULO 1. Diseño y síntesis de gliconanopartículas funcionalizadas con (oligo)manósidos (*manno*-GNPs)..... 31**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>31</b>
<b>2. Resultados y discusión.....</b>	<b>37</b>
2.1. Síntesis de oligosacáridos de manosa.....	37
2.2. Síntesis de espaciadores. ....	41
2.3. Síntesis de neoglicoconjugados por glicosidación directa.....	44
2.4. Síntesis de neoglicoconjugados por acoplamiento peptídico.....	45
2.5. Síntesis de neoglicoconjugados por acoplamiento tiourea.....	47
2.6. Síntesis y caracterización de <i>manno</i> -gliconanopartículas de oro.....	49
2.6.1. Síntesis de <i>manno</i> -GNPs con neoglicoconjugados de manosa sintetizados por glicosidación directa. Familia A.....	50
2.6.2. Síntesis de <i>manno</i> -GNPs con neoglicoconjugados de mono-, di- y trisacáridos unidos por acoplamiento peptídico. Familia B.....	54
2.6.3. Síntesis de <i>manno</i> -GNPs con neoglicoconjugados de mono-, di-, tri-tetra-, penta- y heptasacáridos de manosa unidos por acoplamiento tiourea. Familia C.	56
2.6.3.1. Síntesis de <i>manno</i> -GNPs fluorescentes.....	61
<b>3. Conclusiones.....</b>	<b>64</b>
<b>4. Parte experimental.....</b>	<b>66</b>
4.1. Métodos generales.....	66
4.2. Síntesis de oligosacáridos de manosa.....	67
4.2.1. Síntesis de aceptores.....	67
4.2.2. Procedimiento general para las glicosidaciones: Síntesis de los compuestos <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> , <b>23</b> y <b>24</b> .....	69
4.2.3. Procedimiento general para las desprotecciones: síntesis de los compuestos <b>25</b> , <b>26</b> , <b>27</b> , <b>28</b> y <b>29</b> .....	74
4.3. Síntesis de espaciadores.....	78
4.4. Síntesis de neoglicoconjugados por glicosidación directa.....	83

4.5. Síntesis de neoglicoconjugados por acoplamiento peptídico.....	88
4.6. Síntesis de neoglicoconjugados por acoplamiento de tiourea.....	90
4.7. Síntesis de GNPs funcionalizadas con (oligo)manósidos y GNPs de control.....	97
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>111</b>

## **CAPÍTULO 2. Estudios de inhibición de la unión DC-SIGN/gp120 por gliconanopartículas funcionalizadas con (oligo)manósidos mediante biosensores con detección por resonancia del plasmón de superficie (SPR)..... 115**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>115</b>
<b>2. Resultados y discusión.....</b>	<b>116</b>
2.1. Experimentos de inhibición de la interacción DC-SIGN/gp120 mediante <i>Manno</i> GNPs.....	119
2.1.1. Oligosacáridos.....	120
2.1.2. <i>Gliconanopartículas de (oligo)manósidos</i> .....	121
2.2. Evaluación de la unión directa entre GNPs y DC-SIGN-ECD o gp120.....	125
2.2.1. Unión de <i>manno</i> -GNPs a DC-SIGN-ECD.....	126
2.2.2. Unión de <i>manno</i> -GNPs a gp120.....	127
<b>3. Conclusiones.....</b>	<b>129</b>
<b>4. Parte experimental.....</b>	<b>131</b>
4.1. Métodos generales.....	131
4.2. Método general de inmovilización de proteínas.....	131
4.3. Ensayos de inhibición de la unión DC-SIGN/gp120 mediante <i>manno</i> -GNPs.....	132
4.4. Ensayos de unión directa de GNPs a DC-SIGN o gp120.....	132
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>132</b>

## **CAPÍTULO 3. Estudios de inhibición de la *trans*-infección del VIH mediante *manno*-GNPs..... 135**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>135</b>
<b>2. Resultados y discusión.....</b>	<b>142</b>
2.1. Viabilidad celular en células Raji DC-SIGN+, PBMCs y C33-A .....	143
2.2. Inhibición por <i>manno</i> -GNPs de la infección en <i>trans</i> de PBMCs a través de células Raji DC-SIGN+.....	145
2.3. Ensayos de neutralización del VIH por <i>manno</i> -GNPs.....	151
2.4. Inhibición de la infección directa por <i>manno</i> -GNPs.....	152
<b>3. Conclusiones.....</b>	<b>153</b>
<b>4. Parte experimental.....</b>	<b>155</b>
4.1. Métodos generales.....	155

4.1.1. Medios de cultivo.....	155
4.1.2. Cultivos celulares primarios y líneas celulares.....	155
4.1.3. Stocks virales y plásmidos.....	156
4.2. Inhibición por <i>manno</i> -GNPs de la infección en <i>trans</i> de PBMCs a través de células Raji DC-SIGN+.....	157
4.3. Ensayos de neutralización.....	157
4.4. Ensayos de infección directa.....	158
4.5. Ensayo de viabilidad celular .....	158
4.5.1 Células Raji DC-SIGN+ y PBMCs.....	158
4.5.2 Células C33-A.....	159
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>159</b>

## **CAPÍTULO 4. Estudios de la interacción de *manno*-GNPs fluorescentes con líneas celulares y con células dendríticas inmaduras..... 165**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>165</b>
<b>2. Resultados y discusión y resultados.....</b>	<b>167</b>
2.1. Ensayo de viabilidad celular en células Raji, Raji DC-SIGN y iDCs.....	168
2.2. Estudio de internalización y exocitosis de <i>manno</i> -GNPs por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia .....	169
<b>3. Conclusiones.....</b>	<b>176</b>
<b>4. Parte experimental.....</b>	<b>177</b>
4.1. Cultivos celulares primarios y líneas celulares.....	177
4.2. Viabilidad celular en células Raji, Raji DC-SIGN y en iDCs.....	179
4.3. Experimentos de internalización y exocitosis de GNPs con iDCs, Raji y Raji DC-SIGN+.....	180
4.3.1. Citometría de flujo.....	180
4.3.1.1. Ensayos de internalización.....	180
4.3.1.2. Ensayos de exocitosis.....	181
4.3.2. Microscopía de fluorescencia.....	181
4.3.2.1. Ensayos de endocitosis mediada por DC-SIGN.....	181
4.3.2.2. Ensayos de internalización y exocitosis.....	182
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>182</b>

### **ANEXOS**

<b>1. Selección de espectros de RMN.....</b>	<b>185</b>
<b>2. Selección de GNPs.....</b>	<b>195</b>
<b>3. Cálculo de IC50 por SPR.....</b>	<b>210</b>

## ABREVIATURAS

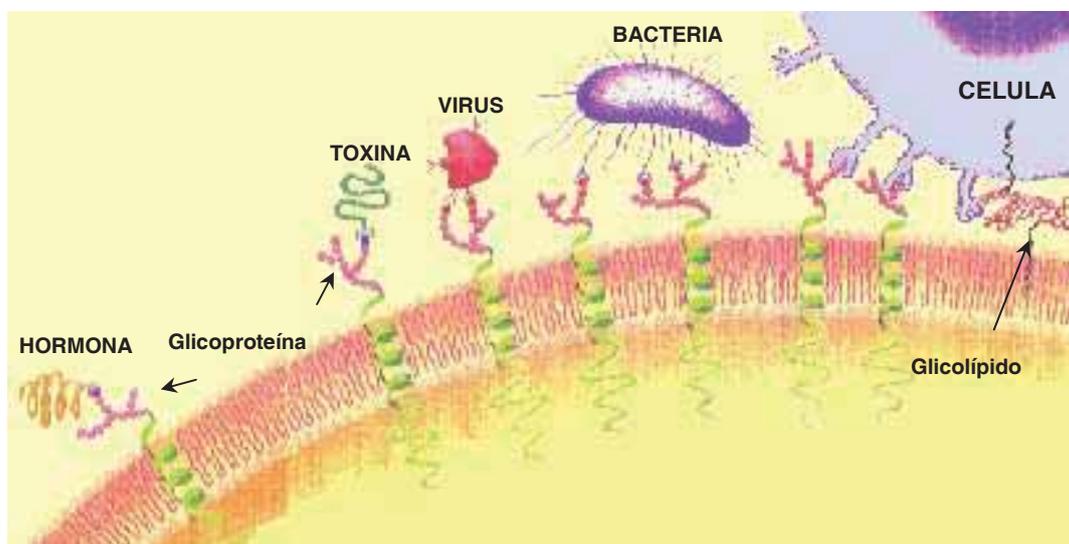
Ac	acetilo
AIBN	2,2-azobis(isobutironitrilo)
APCs	<i>antigen presenting cells</i>
ATP	adenosín trifosfato
a.u.	<i>Arbitrary units</i>
Bn	bencilo
BCS	suero bovino fetal
CLRs	<i>carbohydrate lectin receptors</i>
COSY	Experimento bidimensional de correlación protón-protón
CSA	ácido canforsulfónico
CRD	dominio de reconocimiento de carbohidratos
d	doblete
DCs	células dendríticas
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non integrin</i>
$\delta$	desplazamiento químico (en partes por millón)
d	doblete
dd	doblete de dobletes
DIC	diisopropilcarbodiimida
DMAP	dimetilaminopiridina
DMEM	medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
ECD	<i>extracellular carbohydrate domain</i>
EDC	N-etil, N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ESI-MS	Espectrometría de Masas de Ionización por Electrospray
FCS	suero vacuno fetal
FI	fluorescence intensity
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GNP	Gliconanopartícula
HBS-P	Bufer HEPES de Biacore®
HEPES	ácido 2-(4-hidroximetil)1-piperazina-1-il)etanosulfónico
HMQC	Experimento bidimensional de correlación protón-carbono
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
IC50	concentración que reduce la actividad luciferasa al 50%
ICAM-3	molécula de adhesión intercelular-3
iDCs	células dendríticas inmaduras
iPr	isopropilo
IR-FT	Infrarrojo con transformada de Fourier

J	constante de acoplamiento (en Hz)
JR-Renilla	VIH con tropismo CCR5
$K_D$	constante de disociación
kDa	kilodalton
$\lambda_{em}$	longitud de onda de emisión
$\lambda_{exc}$	longitud de onda de excitación
m	multiplete
Manno-GNPs	Gliconanopartículas de (oligo)manósidos
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Me	metilo
MTT	bromuro de 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difeniltetrazol
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol
MW	<i>Molecular Weight</i>
$m/z$	relación masa carga
$\nu$	frecuencia de tensión de enlace (en $\text{cm}^{-1}$ )
ND	no determinado
$\text{NEt}_3$	trietilamina
NIS	N-iodosuccinimida
NHS	N-hidroxisuccinimida
NL4.3-Renilla	VIH con tropismo CXCR4
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	tampón fosfato
Ph	fenilo
$\text{PPh}_3$	trifenilfosfina
ppm	partes por millón
PTSA	ácido p-toluensulfónico
py	piridina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RLUs	<i>Relative Luminescence Units</i>
RUs	<i>Response Units</i>
s	singlete
SAMs	monocapas autoensambladas de alcanotioles de oro.
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
t	triplete
T	temperatura
t.a.	temperatura ambiente
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
tBu	tertbutilo
TBAF	fluoruro de tetrabutil amonio
TEA	trietilamina
TEM	<i>Transmisión Electrón Microscopy</i>

TfOH	ácido trifluorometanosulfónico
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TMS	trimetilsililo
TMSOTf	triflato de trimetilsililo
tol	tolilo
UV-vis	Ultravioleta Visible
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humano
Z	benciloxycarbonilo

## Introducción, antecedentes y objetivos

Los hidratos de carbono (carbohidratos) son, junto con ácidos nucleicos y proteínas moléculas muy importantes para la vida, y aunque se sabe mucho acerca de la estructura, interacción y función de ácidos nucleicos y proteínas, el papel de los carbohidratos es menos conocido. Es muy difícil predecir a priori la función de un carbohidrato, debido a que un mismo carbohidrato puede estar implicado en diferentes procesos en un mismo organismo, y porque además, las funciones de los carbohidratos normalmente están mediadas por secuencias específicas con diversas modificaciones. El lento desarrollo en la investigación en torno al papel de los hidratos de carbono se debe a su elevada complejidad estructural, que presentan estructuras muy ramificadas y con múltiples sitios de unión. Esta complejidad estructural aumenta mediante modificaciones post-translacionales en la que grupos hidroxilo del carbohidrato pueden sufrir fosforilaciones, sulfataciones, acetilaciones u oxidaciones generando distintas actividades biológicas.<sup>1, 2</sup>



**Figura 1.** Implicación del glicocalix en diversos procesos naturales e infecciosos de reconocimiento (adaptado de Scientific American 1993).

La superficie de la mayoría de las células de mamíferos está cubierta de una densa capa de carbohidratos que se denomina glicocalix<sup>3, 4</sup> (Figura 1). En el glicocalix, los carbohidratos se presentan principalmente conjugados a

proteínas o lípidos, en forma de glicoproteínas, glicolípidos o proteoglicanos, y son estos glicoconjugados los que desarrollan la función biológica. Los glicolípidos y glicoproteínas que constituyen el glicocalix están implicados en diversos procesos biológicos y, durante mucho tiempo se les atribuyó una función estructural, estabilizante y protectora para la célula frente a agentes externos. Así por ejemplo, la capa de oligosacáridos presente en muchas glicoproteínas les sirve para proteger la cadena polipeptídica del reconocimiento de proteasas o anticuerpos. Pero esta función del glicocalix no es capaz de explicar la gran diversidad y complejidad que la naturaleza ha desarrollado en estos glicoconjugados.

Hoy se sabe que la gran diversidad y complejidad que la naturaleza ha desarrollado en estos glicoconjugados esta relacionada con procesos de adhesión y de reconocimiento celular como son la embriogénesis,<sup>5</sup> la diferenciación celular,<sup>6</sup> el proceso inflamatorio,<sup>7</sup> o la metástasis.<sup>8</sup> De este modo, la célula emplea los glicoconjugados como receptores específicos en su mecanismo para la comunicación celular, pero en contrapartida, toxinas, bacterias y virus aprovechan estos glicoconjugados para acceder a la célula e infectarla.

El proceso de adhesión celular sucede a través de interacciones fuertes proteína-proteína, pero también a través de interacciones proteína-carbohidrato y carbohidrato-carbohidrato.<sup>9</sup> Las interacciones proteína-carbohidrato son mucho mas específicas y están implicadas en numerosos procesos biológicos, en su mayoría dependientes de cationes divalentes como el calcio, pero son mas débiles (constantes de disociación en el rango milimolar), que la interacción proteína-proteína. Esta baja afinidad es compensada en la naturaleza con una presentación multivalente de los glicoconjugados y del receptor. Multiplicar el número de interacciones débiles ya existentes es la forma energéticamente más favorable que utiliza un sistema biológico para aumentar la afinidad en lugar de crear una nueva interacción. La interacción simultanea entre dos o más carbohidratos y su receptor se conoce con el nombre de interacción multivalente. La interacción simultanea entre dos o más carbohidratos y su receptor se conoce con el nombre de interacción

multivalente <sup>10</sup> y fue por primera vez denominada por Lee y col. como efecto cluster. <sup>11</sup>

Las interacciones multivalentes presentan ventajas respecto a las monovalentes proporcionando un mecanismo eficaz para el reconocimiento, que aumenta la afinidad pero también la especificidad. Un mecanismo multivalente es también utilizado por la mayoría de patógenos que presentan en su superficie múltiples copias de su epítipo para su reconocimiento, pero a su vez es un mecanismo de defensa porque los macrófagos son capaces de reconocer partes de un patógeno cuando éste se une a muchos anticuerpos, pero no son capaces de reconocer al patógeno entero si estuviera unido a un solo anticuerpo. <sup>10</sup>

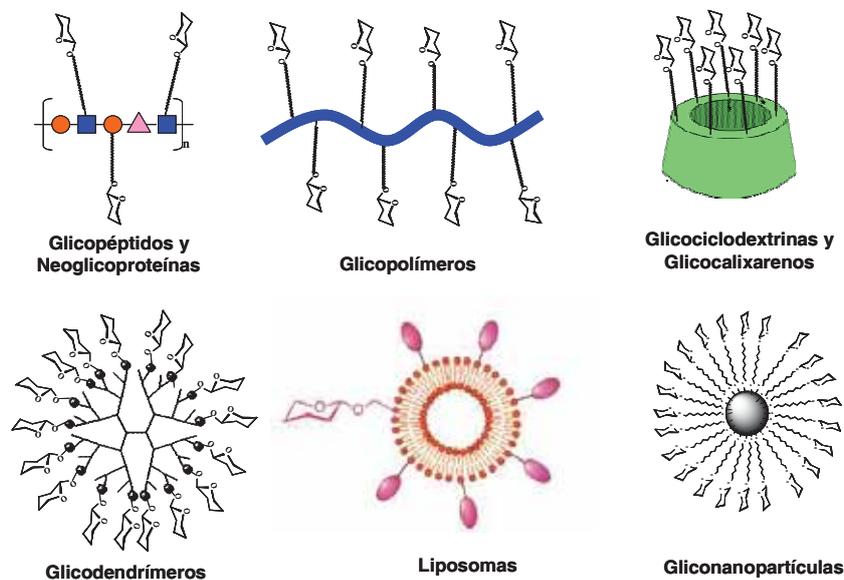
La gran complejidad de sistemas biológicos donde los glicoconjugados desarrollan su papel hace difícil el estudio de su funcionamiento en el entorno natural, por ello se han desarrollado diversas estrategias para poder estudiar y comprender mejor su funcionamiento. Una de ellas exige disponer de estos sistemas de forma bien definida y con alto grado de pureza. <sup>12</sup> Pero, lamentablemente, la obtención de sistemas multivalentes de carbohidratos de origen natural se complica por la dificultad de aislarlos puros y de mantener, una vez aislados, la actividad que presentan en su sistema natural. La dificultad de disponer de estos sistemas naturales junto con la gran importancia de estas interacciones multivalentes ha impulsado el desarrollo de una gran diversidad de sistemas modelo multivalentes de carbohidratos <sup>13</sup> que permiten estudiar parcialmente su funcionamiento.

## **1. Sistemas modelo multivalentes de carbohidratos**

El diseño de sistemas multivalentes artificiales de carbohidratos está basado en la imitación de los glicoconjugados naturales presentes en la superficie celular que están implicados en los procesos de reconocimiento y de adhesión celular. Estos sistemas están formados por una plataforma a la que se unen varias moléculas de carbohidratos dando lugar a una presentación multivalente de los mismos. La unión entre el carbohidrato y el soporte se

establece a través de un espaciador, que proporciona una separación necesaria entre el soporte y el ligando. Los ligandos multivalentes sintéticos ofrecen ciertas ventajas que no presentan los ligandos multivalentes naturales. Su diseño y preparación nos permite modular la naturaleza del soporte multivalente o de los espaciadores pudiendo así acceder a un mayor número de compuestos, de mayor pureza y con mayor control estructural.

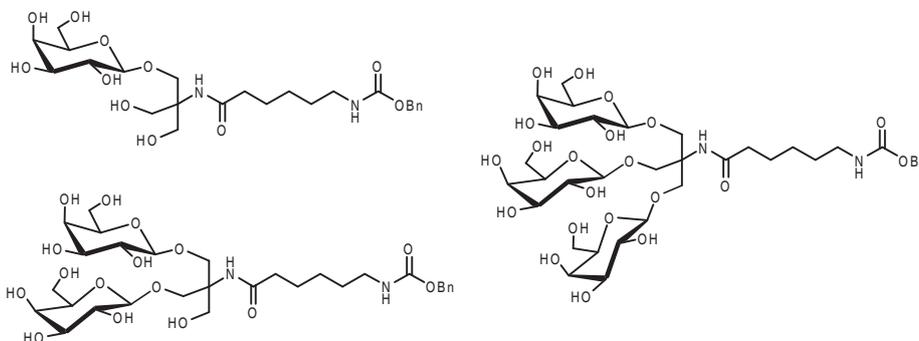
Los sistemas modelo multivalentes se pueden clasificar por la distinta naturaleza del soporte. En la Figura 2 se muestran algunos de los sistemas modelo multivalente de carbohidratos más significativos que han utilizado péptidos (neoglicopéptidos), proteínas (neoglicoproteínas), liposomas, dendrímeros (glicodendrímeros), calixarenos, ciclodextrinas y polímeros (glicopolímeros) como soporte para unir a ellos las estructuras oligosacáridicas de interés. Finalmente hay que nombrar a las gliconopartículas, que fueron preparadas por primera vez en nuestro laboratorio.



**Figura 2.** Sistemas multivalentes de carbohidratos

Los primeros **neoglicoconjugados multivalentes** fueron obtenidos por el grupo de YC Lee a finales de los años 70 (Figura 3).<sup>14, 15</sup> Aquí, el carbohidrato se une a un soporte peptídico mimetizando la presentación del mismo en una glicoproteína. Glicoclusters constituidos por dos o tres moléculas

de galactosa presentaron un aumento logarítmico de su afinidad por lectinas hepáticas multiméricas con respecto al glicoconjugado monovalente. Este hecho se bautizó como “efecto cluster glicosídico”.<sup>11a</sup>



**Figura 3.** Primeros glicoclusters sintetizados por Y.C. Lee y colaboradores.<sup>14</sup>

Las **ciclodextrinas** son oligosacáridos cíclicos de glucosa unidos mediante enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ , mientras que los **calixarenos** son oligómeros cíclicos de anillos aromáticos sustituidos. Estos dos soportes tienen características comunes y ambos presentan un interior hidrófobo, que es capaz de atrapar pequeñas moléculas; y un exterior hidrófilo, que puede ser funcionalizado con un pequeño número de carbohidratos. Estas características les confieren propiedades adicionales con respecto a otros glicoclusters, y muchos glicocalixarenos<sup>16, 17</sup> y glicodextrinas<sup>18</sup> se han preparado con la idea de transportar fármacos.

Los **dendrimeros** son polímeros altamente ramificados que permiten la obtención de compuestos con un número de valencias mayor que los primeros glicoclusters. El primer glicodendrímico fue preparado por Roy y col. y consistía en una oligolisina muy ramificada que presentaba 16 moléculas de ácido siálico y resultó ser un potente inhibidor de la hemoaglutinación del virus de la gripe.<sup>19</sup> Desde entonces se han preparado una gran variedad de glicodendrimeros con diversas aplicaciones.<sup>20, 21</sup>

Los **liposomas** son uno de los sistemas multivalentes que mejor mimetizan la presentación de glicoesfingolípidos en la membrana plasmática.

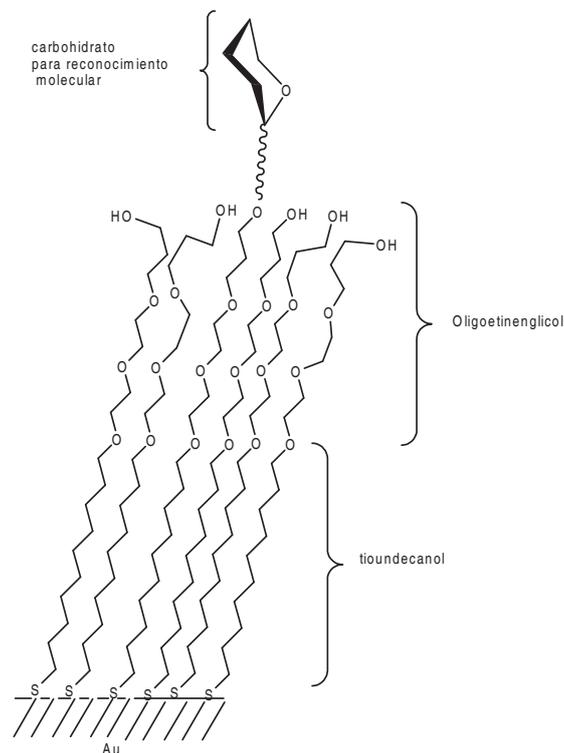
Son vesículas artificiales ampliamente utilizadas como transportadores de fármacos y como modelo para estudiar la fusión de virus en la superficie celular. Whitesides y col. estudiaron la inhibición de la aglutinación del virus de la gripe con liposomas que contenían ácido siálico.<sup>22</sup> Además, el grupo de Hakomori preparó liposomas que contenían diversos glicosfingolípidos (GM3, Gg3, lactoCer, Le<sup>x</sup>) para demostrar que una interacción carbohidrato-carbohidrato era responsable de la metástasis de melanoma en pulmón de ratón.<sup>23</sup>

Otro sistema multivalente son los llamados **glicopolímeros**, que son polímeros funcionalizados con carbohidratos cuya síntesis permite controlar el peso molecular del polímero y la densidad del ligando deseado en su estructura principal. Los glicopolímeros presentan gran multivalencia pero también una alta polidispersidad, es decir, no presentan sus ligandos de manera definida, y por tanto, el número de interacciones es a menudo desconocido. En los últimos años, el grupo de Kiessling desarrolló la metodología ROMP (Ring Opening Methathesis Polymerization) que permite un excelente control de la composición y longitud del glicopolímero. Uno de los ejemplos fueron los polímeros de 3',6-disulfo Le<sup>x</sup> que resultaron ser potentes inhibidores de L-selectina, una glicoproteína muy importante en procesos de inflamación.<sup>24</sup>

Las **neoglicoproteínas** son uno de los sistemas multivalentes más ampliamente utilizados. Estos modelos son proteínas de origen natural que han sido sintéticamente modificadas para introducir carbohidratos en su estructura. Este método nos permite controlar el número de carbohidratos que introducimos y nos proporciona sistemas con alta multivalencia. Sin embargo, tiene algunas limitaciones debido a que los puntos de glicosilación no están definidos estrictamente y esto produce una gran variedad de glicofomas. Para solucionar este problema, BG Davis y col han introducido residuos de cisteína en posiciones determinadas de la secuencia proteica por mutagénesis dirigida.<sup>25</sup> Esto permite la unión quimioselectiva de oligosacáridos funcionalizados con metanotiosulfonato por reacción con el grupo tiol de las cisteínas. La mutagénesis dirigida también ha permitido introducir aminoácidos no naturales funcionalizados con grupos azida, alquino, etc., que hacen posible

llevar a cabo la denominada “*click chemistry*” uniendo carbohidratos mediante reacciones de cicloadición o de tipo Staudinger.

Otro sistema multivalente que mimetiza la presentación de carbohidratos en la superficie celular son las **monocapas autoensambladas de alcanotioles de oro (SAMS)**. Estas monocapas se forman espontáneamente por absorción de alcanotioles en solución sobre una superficie limpia de oro (Figura 4). El inconveniente de las SAMs es que no permite realizar estudios en disolución, pero en contraposición presenta ventajas frente a otros modelos, y son especialmente utilizadas para el estudio de interacciones multivalentes en la interfase. La síntesis de SAMs permite controlar a nivel molecular la estructura, la densidad y el entorno de los ligandos. La introducción de grupos etilenglicol en las cadenas dota a la monocapa de un entorno inerte frente a la absorción no específica de proteínas, lo que ha facilitado su uso para el estudio de interacciones específicas carbohidrato-proteína.<sup>26</sup>



**Figura 4.** Arquitectura de monocapas de alcanotioles en oro

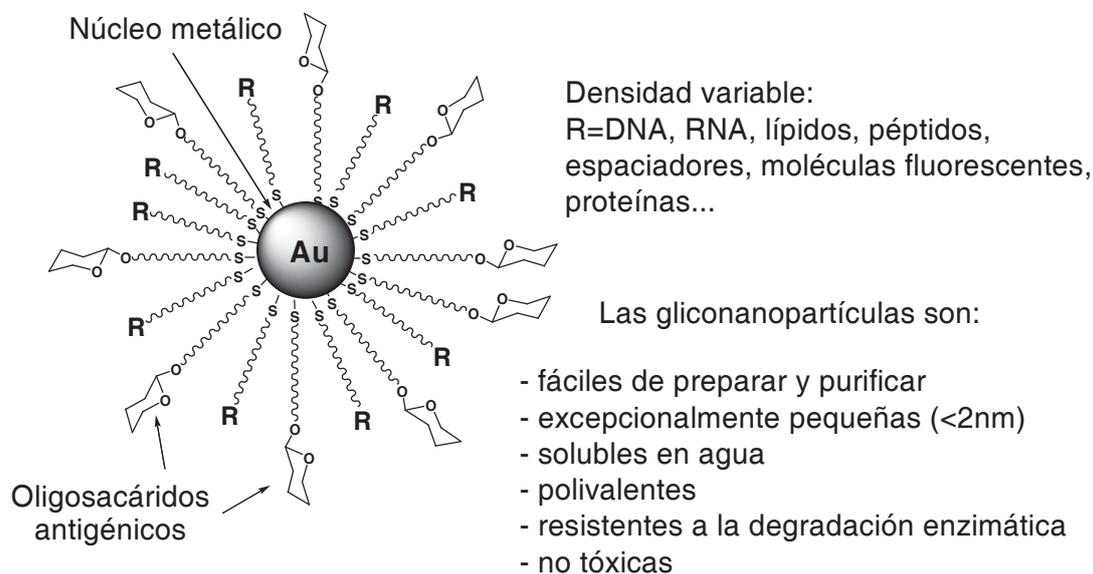
Una característica intrínseca de todos los modelos multivalentes que se han descrito es que no presentan a los carbohidratos en su entorno celular.

Una de las aproximaciones desarrollada para compensar esta limitación se basa en la modificación enzimática de células de mamíferos para que expresen carbohidratos no naturales.<sup>27, 28</sup> De este modo, el grupo de Palcic empleó una  $\alpha(1\rightarrow3/4)$ fucosil transferasa para transferir este trisacárido a la superficie de eritrocitos.<sup>29</sup> Otra aproximación desarrollada por Bertozzi y col hace uso de la maquinaria enzimática de la propia célula para presentar carbohidratos modificados en la superficie celular.<sup>30</sup> Con esta estrategia, el enzima responsable de la síntesis de ácido siálico es capaz de procesar un derivado de N-acetilmanosamina sustituido con un grupo cetónico en lugar de un grupo acetilo. El ácido siálico modificado resultante se presenta en la superficie celular, donde puede ser selectivamente modificado mediante grupos nucleófilos como azida, aminooxi o tiosemicarbazida. Aunque esta brillante metodología es muy selectiva y esta limitada a rutas biosintéticas que toleren grupos funcionales no naturales, estos modelos celulares se están desarrollando mucho durante la última década y pueden ser, en un futuro próximo, herramientas muy útiles para modificaciones complejas de la superficie celular.<sup>31</sup>

El último de los sistemas modelo multivalentes de carbohidratos que vamos a mencionar son las denominadas **gliconanopartículas (GNPs)**, que es parte fundamental de esta Tesis Doctoral, y que fue desarrollado por Penadés y col. en el año 2000 (Figura 5). Estas gliconanopartículas constituyen un sistema polivalente de presentación de carbohidratos basado en nanoclusters de oro,<sup>32</sup> donde los carbohidratos se unen al núcleo metálico mediante espaciadores de distinta naturaleza, proporcionando nanoclusters de pequeñas dimensiones con diámetros menores de 2 nm. Las gliconanopartículas, son fáciles de preparar<sup>33</sup> y de purificar, solubles en agua, estables en disolución, fáciles de manejar y resistentes a la degradación enzimática.

La metodología para preparar estas nanopartículas se ha denominado *Gliconanotecnología*, e integra el diseño y la preparación de modelos multivalentes que incorporan carbohidratos (gliconanopartículas) con actividad biológica<sup>34</sup> junto con el uso de técnicas analíticas como la microscopía de transmisión electrónica (TEM) y de fuerzas atómicas AFM,<sup>35</sup> los biosensores

con detección por SPR,<sup>36</sup> la microcalorimetría<sup>37</sup> y las espectroscopias de RMN, de UV-VIS o fluorescencia para abordar el estudio de las interacciones donde los carbohidratos juegan un papel esencial.



**Figura 5.** Gliconanopartículas como un sistema multivalente y multifuncional.

Basado en esta metodología se ha confirmado y cuantificado la existencia de fuerzas de adhesión entre hidratos de carbono antigénicos como el trisacárido Le<sup>x</sup>,<sup>34, 35</sup>, se ha conseguido inhibir *ex vivo* hasta en un 70% el proceso de metástasis de células de melanoma en pulmón de ratón,<sup>38</sup> y ha permitido el diseño de nuevos materiales,<sup>39</sup> algunos de ellos dotados de un magnetismo permanente.<sup>40</sup> Además, la metodología de preparación de gliconanopartículas ha permitido la incorporación de otras moléculas tales como ARN, péptidos o moléculas fluorescentes que acompañan al carbohidrato en su presentación multivalente.<sup>41</sup> La *Gliconanotecnología* también permite variar la naturaleza del núcleo metálico dotando a la nanopartícula de propiedades semiconductoras (glico-quantum dots)<sup>42</sup> o magnéticas.<sup>43</sup>

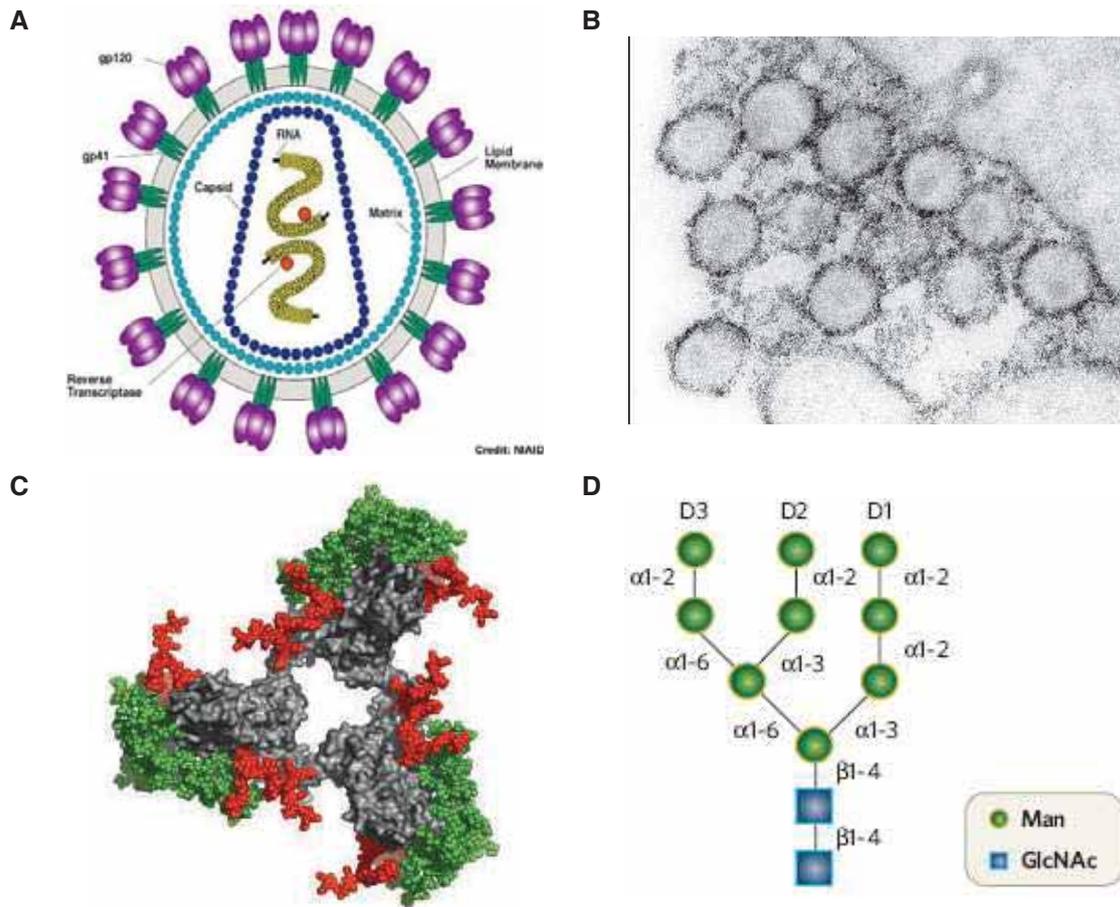
Las GNPs con su presentación globular de las moléculas de carbohidratos constituyen una excelente herramienta para intervenir en procesos de reconocimiento molecular. Por ello hemos utilizado esta herramienta para estudiar la interacción que se aborda en el desarrollo de esta

Tesis Doctoral, y que está relacionado con el mecanismo de transmisión sexual del virus de inmunodeficiencia humano (VIH). En dicho mecanismo interviene una interacción carbohidrato-proteína multivalente entre el receptor tipo lectina DC-SIGN (Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non integrin) de las células dendríticas y los oligosacáridos de tipo “*high mannose*” de la glicoproteína gp120 de la envuelta del VIH.

## 2. Patogénesis del virus de inmunodeficiencia humano (VIH)

El virus de inmunodeficiencia humano fue descubierto e identificado, en 1983, por Luc Montaigner en Francia, y Robert Gallo en Estados Unidos. El VIH origina una enfermedad crónica que puede adquirirse a través de tres mecanismos: la transmisión vertical o de madre a hijo; la transmisión por vía parenteral; y la transmisión por vía sexual. La infección por VIH, debido a su tropismo preferente por linfocitos CD4, origina una destrucción progresiva e irreversible del sistema inmunitario que tiene como expresión clínica final el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Para analizar la inmunopatología del SIDA hay que considerar tres aspectos esenciales: el mecanismo de entrada del VIH y destrucción de su célula diana (linfocitos T CD4+); la respuesta que activa el sistema inmunitario contra el VIH; y los mecanismos que permiten al virus eludir la respuesta inmune.<sup>44, 45</sup>

El virus de la inmunodeficiencia humana (Figura 6) es un retrovirus que pertenece a la subfamilia de lentivirus y tiene un tamaño pequeño, de aproximadamente unos 80-100 nm de diámetro. El virión del VIH presenta dos capas: la membrana lipídica, en la que se insertan de 9 a 10 glicoproteínas virales gp160, constituida por la glicoproteína transmembrana gp41, necesaria para la fusión del virus, y la glicoproteína gp120 involucrada en la unión del virus a la membrana celular y su reconocimiento; y la cápside interna de naturaleza proteica cuyo interior contiene el ARN viral, y otras enzimas como la transcriptasa reversa, la proteasa o la integrasa, que son vitales para la replicación del virus.<sup>44</sup>

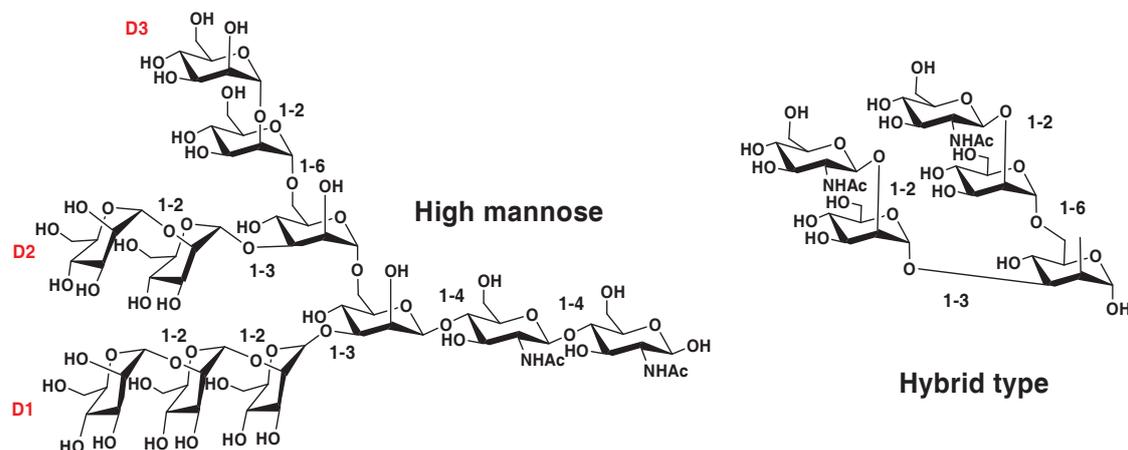


**Figura 6.** A) Representación esquemática del virión del VIH; B), Micografía del VIH: el dominio externo de gp120 aparece marcado con Rutenio (negro). C), La superficie glicosídica de la gp120: glicanos tipo “*high mannose*” (verde) organizados en la parte externa; glicanos complejos (rojo), D), Representación de la estructura del undecasacárido  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  de los glicanos tipo “*high mannose*”.<sup>46</sup>

La entrada del virus en la célula hospedadora constituye el primer paso del ciclo biológico y representa un proceso de extrema complejidad, que implica la interacción secuencial del virus a través de la glicoproteína gp120 con dos tipos de receptores en la célula: el receptor primario CD4, que es utilizado por todas las variantes del VIH; y los correceptores CCR5 y CXCR4.<sup>47</sup> En función del correceptor que utiliza el VIH éste se clasifica en tres tipos: con tropismo R5, que utilizan el correceptor CCR5; con tropismo X4, que utilizan el correceptor CXCR4 y con tropismo dual R5X4 que pueden utilizar ambos. Una vez producida la interacción el receptor CD4 de la célula, la glicoproteína gp120 del VIH experimenta cambios conformacionales que permiten su unión a

los correceptores <sup>48</sup> e inducen la fusión de la membrana viral con la membrana celular y la internalización del cápside viral en el citoplasma de la célula huésped. En este momento, la transcriptasa reversa, que es una enzima característica de todos los retrovirus, retrotranscribe la información genética del VIH en ADN proviral, que se transportará al núcleo donde se integrará en el genoma de la célula hospedadora.

Durante la infección por VIH, las glicoproteínas de la envuelta viral son sintetizadas en un primer paso como un precursor polipeptídico. Después, en el aparato de Golgi, la proteína se oligomeriza y glicosila extensamente. Este proceso de glicosilación es necesario para que la glicoproteína viral se pliegue y se establezca conformacionalmente, y este proceso implica la unión de N-glicanos tipo “*high mannose*” al esqueleto proteico. Mientras que la glicoproteína es transportada por el Golgi, varias enzimas celulares se encargan de modificar los glicanos que son accesibles. <sup>49</sup> Estas modificaciones generan los oligosacáridos “*complex type*”, mientras que los glicanos que no son accesibles conservan su patrón de glicosilación tipo “*high mannose*” (Figura 7).



**Figura 7.** Estructuras de oligosacáridos tipo “*high mannose*” o “*hybrid type*” involucrados en la infección por VIH.

Uno de los principales obstáculos para la neutralización del VIH por el sistema inmune es la envuelta viral de carbohidratos (gp120) que protege los antígenos de la superficie del virus. <sup>46, 48, 50</sup> La distribución de glicanos de

manosa se encuentra organizada en forma de clusters entorno a los sitios de unión que utiliza la gp120 para unirse a sus receptores específicos y a la interfase que se crea cuando la proteína trimeriza. El mapa antigénico de gp120 divide la proteína en tres regiones: la cara neutralizante, la cara no neutralizante, y la cara silenciosa que se encuentra fuertemente glicosilada. Los glicanos tipo “*high mannose*” son más abundantes que los de tipo “*hybrid type*”, y además, se localizan principalmente en la cara silenciosa. Muchos de los motivos de carbohidratos presentes en la gp120 del VIH tienen propiedades inmunológicas. Existe una clara relación entre el patrón de glicosilación y el tropismo viral, así pues, cambios en el patrón de glicosilación de las regiones variables (V1/V2 y V3) están directamente relacionados con un cambio en el tropismo de CCR5 o CXCR4 sobre el que actúa.<sup>51</sup>

Hoy en día, el VIH constituye una de las pandemias más importantes ya que afecta a más de 36 millones de personas de las cuales el 80% se infectaron por transmisión sexual, 2/3 partes viven en el África subsahariana y de las cuales el 60% son mujeres según la UNAIDS.<sup>52</sup>

## **2.1. Mecanismo de infección del VIH por transmisión sexual.**

La infección por VIH<sup>52</sup> sucede principalmente por transmisión sexual y tiene “rostro de mujer” especialmente en los países subdesarrollados. Por esto, existe una urgencia en el desarrollo de vacunas, microbicidas, u otras estrategias preventivas para detener la transmisión del VIH a la mujer. Dadas las dificultades en el desarrollo de una vacuna anti-VIH,<sup>53</sup> es necesario abordar otras estrategias centradas en bloquear los estados primarios de la infección mediante el desarrollo de microbicidas.<sup>54</sup> Un microbicida puede definirse como un medicamento antiinfeccioso formulado para la auto-administración por vía tópica previa a las relaciones sexuales.

Para que se produzca la infección por transmisión sexual, el virus primero debe cruzar la barrera epitelial presente en el epitelio vaginal. Una vez superada esta barrera, el virus se encuentra con la primera barrera inmunológica, las células dendríticas. Estas células son una población celular migratoria, que reconoce a los antígenos del VIH (gp120) mediante el receptor DC-SIGN,<sup>55, 56</sup> y

lo transporta hasta los nódulos linfáticos donde hay abundantes células T que el virus puede infectar. De este modo, unas 2-3 semanas después de la transmisión sexual a través de la mucosa, el virus se acumula en el tejido linfático que constituye su reservorio, sitio de almacenaje, producción y persistencia. Inhibir la unión del virus a los receptores de las células dendríticas es de vital importancia para bloquear los estados primarios de la infección por VIH, y este trabajo, que se enmarca dentro del proyecto europeo EMPRO<sup>54a</sup> (European Microbicide Project), está enfocado también a obtener inhibidores capaces de llevar a cabo este bloqueo.

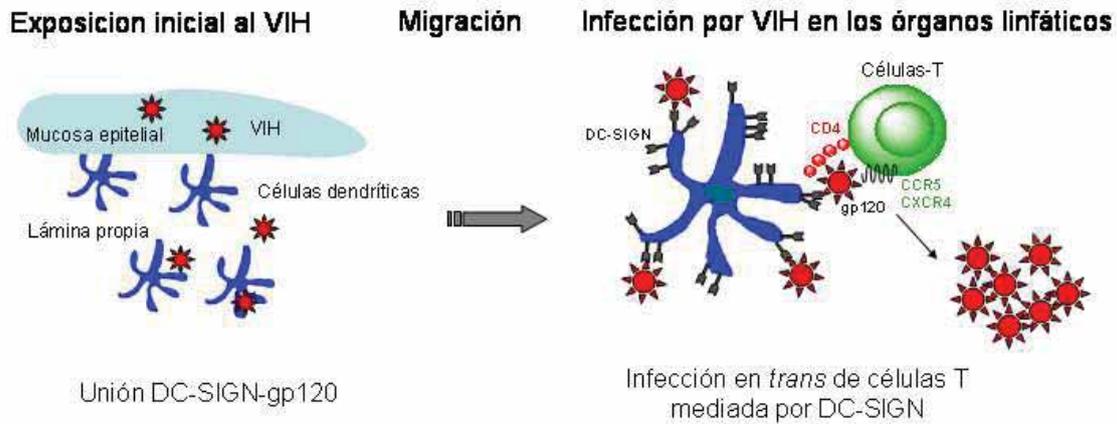
## 2.2. Células dendríticas

Las células dendríticas son una población migratoria que pertenece al grupo de células presentadoras de antígenos (APC) y tienen un papel crucial en la inducción de la respuesta inmune. En la mucosa, las células dendríticas inmaduras suponen nuestra defensa frente a los patógenos. Se encargan de reconocer, procesar e internalizar fragmentos antigénicos, lo que provoca la maduración de las células dendríticas y su posterior migración hacia órganos linfáticos secundarios donde abundan las células T. Aquí, las células dendríticas maduras presentan los antígenos procesados en forma de complejos MHC II a las células T provocando la respuesta inmune adaptativa contra el patógeno.<sup>57</sup> Por lo tanto, estas células son fundamentales para el inicio y la modulación de la respuesta inmune.

El receptor DC-SIGN se expresa principalmente en la superficie de células dendríticas inmaduras, que se localizan en el tejido periférico de la mucosa, y constituyen nuestra barrera epitelial natural. De este modo, DC-SIGN tiene un papel crucial en uno de los mecanismos de defensa que utiliza nuestro organismo para el reconocimiento y captura de patógenos, y la activación de la respuesta inmune.<sup>58</sup>

Van Kooyk y col. demostraron que el virus de inmunodeficiencia humano (VIH) es capaz de secuestrar este mecanismo de defensa de las DCs y

utilizarlo en su propio beneficio para alcanzar las células T y promover la infección en *trans* del VIH (Figura 8).



**Figura 8.** Mecanismo de infección por VIH en *trans* mediada por el receptor DC-SIGN.

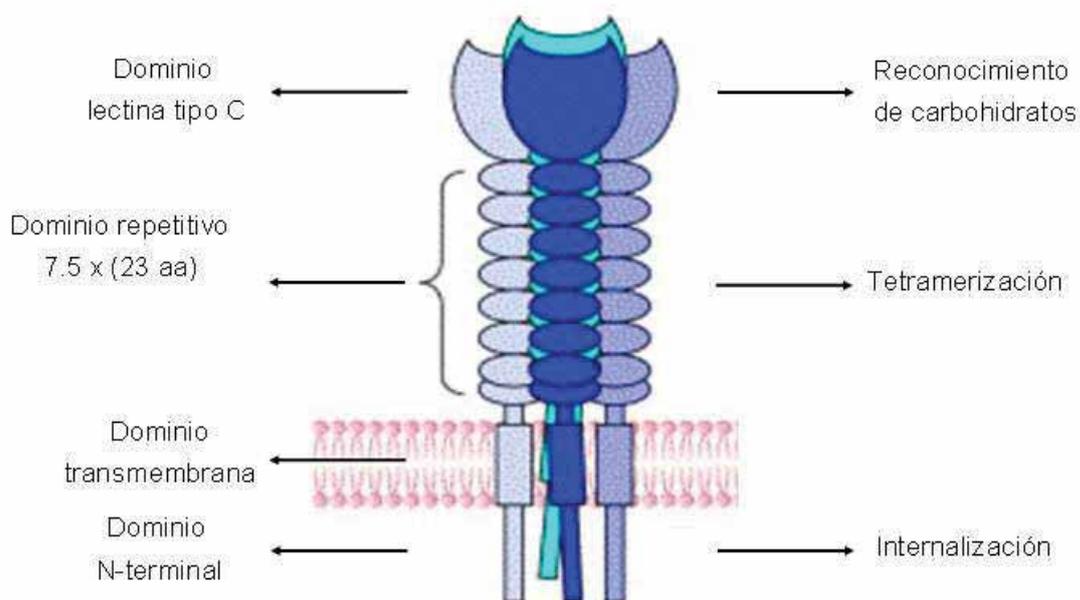
Es decir, las células dendríticas capturan al VIH mediante la interacción entre la glicoproteína gp120 de la envuelta viral y el receptor DC-SIGN, migran al tejido linfático, y en lugar de producir una respuesta inmune contra el VIH, las células dendríticas facilitan la transmisión del VIH a las células T en el tejido linfático.<sup>59</sup>

A partir de este descubrimiento, numerosos grupos de investigación demostraron que el receptor DC-SIGN reconoce a multitud de proteínas altamente glicosiladas que recubren la superficie de muchos patógenos además del VIH. Así pues, se ha descubierto que DC-SIGN, interacciona con glicoproteínas de virus (VIH-2, VIH-2, VIS-1, Ébola, hepatitis C, SARS, citomegalovirus o Denge), bacterias (*Helicobacter pylory*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacteria tuberculosis*), hongos (*Candida Albicans*) y parásitos (*Leishmania pifanoi*, *Schistosoma mansoni*).<sup>60</sup>

### 2.3. DC-SIGN

DC-SIGN (Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non integrin) es una proteína no integrina que reconoce específicamente la molécula de adhesión

intercelular-3 (ICAM-3) implicada en la adhesión celular.<sup>61</sup> DC-SIGN es una proteína de membrana tipo II presente en las células dendríticas inmaduras (iDC) y pertenece a la familia de lectinas tipo C, que reconocen carbohidratos mediante interacciones dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (carbohydrate lectin receptors, CLR). DC-SIGN (Figura 9) presenta tres dominios bien diferenciados: un dominio intracelular o extremo N-terminal de la proteína, que está implicado en procesos de internalización y de señalización intracelular; un dominio transmembrana; y un dominio extracelular. El dominio extracelular presenta un cuello formado por un fragmento peptídico de 23 aminoácidos que se repite 7.5 veces y que es el responsable de la oligomerización de DC-SIGN en homotetrámeros.<sup>62</sup> Por último, el extremo C-terminal, donde se encuentra el dominio de lectina tipo C o dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que es responsable de la interacción selectiva con proteínas altamente manosiladas como ICAM-2, ICAM-3, gp120 (VIH),<sup>63</sup> GP1 (Ebola), etc. DC-SIGN fue descubierta por B.M. Curtis y colaboradores en 1992,<sup>64</sup> pero hubo que esperar al año 2000 para que el grupo de van Kooyk descubriese su importantísimo papel en la infección por VIH.<sup>55, 56, 65</sup>

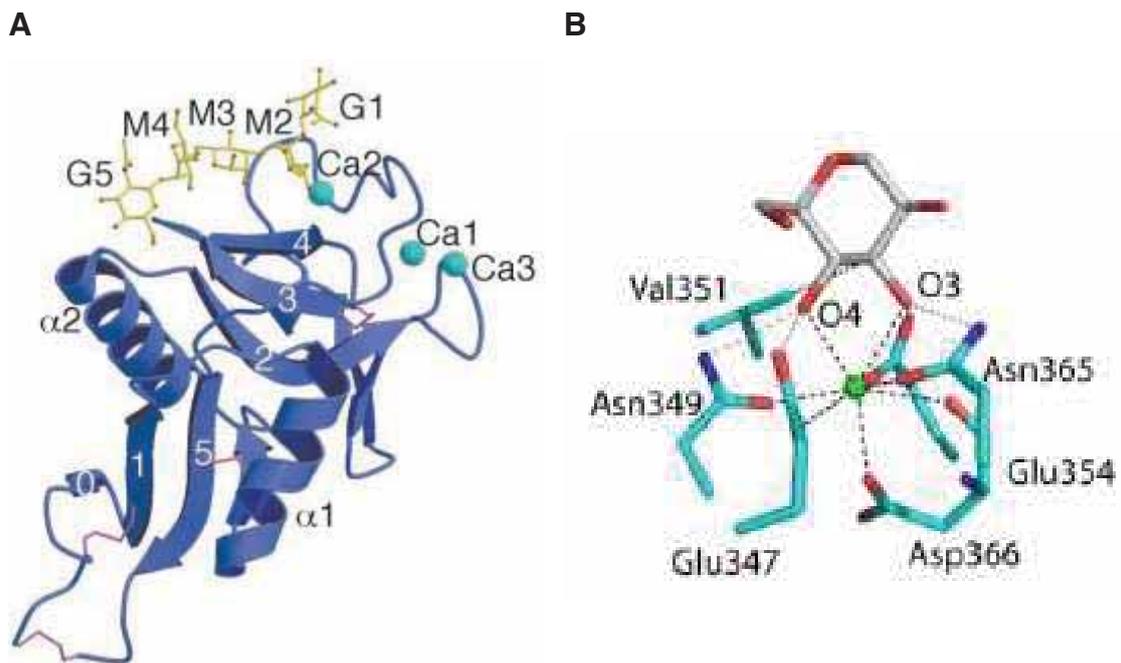


**Figura 9.** Representación esquemática de los dominios y funciones del receptor DC-SIGN (dibujo adaptado de<sup>61</sup>).

El dominio extracelular de cada molécula de DC-SIGN es un tetrámero estabilizado por un cuello de  $\alpha$ -hélice con cuatro dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD). Cada CRD posee gran afinidad por oligosacáridos que contienen manosa. La unión de DC-SIGN con gp120 puede ser inhibida con manano, manosa o quelantes como EDTA debido a que la unión de los manósidos al CRD se produce de manera dependiente de calcio. DC-SIGN, al igual que otras lectinas de tipo C, tiene preferencia por monosacáridos con hidroxilos ecuatoriales en posición C-3 y C-4, así como por monosacáridos que presentan el sustituyente N-Acetil en posición axial en C-2. Además, la unión de DC-SIGN a carbohidratos se rige por el efecto cluster, mostrando mayor afinidad por ligandos multivalentes de oligomanósidos que por los correspondientes carbohidratos simples (monoméricos).<sup>66</sup>

Las glicoproteínas virales que son reconocidas por DC-SIGN presentan densos clusters de oligosacáridos, y principalmente contienen dos tipos de estructuras de carbohidratos:<sup>67</sup> los “*high mannose*” y los “*hybrid type*” (Figura 7). Los “*high mannose*” contienen el undecasacárido  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , que es uno de los ligandos más activos en la interacción con la gp120 del VIH y cuyo residuo terminal es el disacárido  $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha$ . En la estructura de los “*high mannose*” se encuentra la ramificación interna de  $\text{Man}\alpha 1-3[\text{Man}\alpha 1-6]\text{Man}\alpha$ , que también forma parte de los “*hybrid type*” que presentan otros monosacáridos además de manosa, como en el pentasacárido  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ .

No existe mucha información a nivel molecular sobre el mecanismo de reconocimiento de los oligosacáridos presentes en la gp120 del VIH por el CRD de DC-SIGN. Sin embargo, tres trabajos importantes de W.I. Weis y col. desvelan parte de las bases estructurales del reconocimiento de oligosacáridos por este receptor.<sup>57b, 62, 68</sup> La primera estructura de rayos X obtenida en 2001 fue un complejo formado por el pentasacárido  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  y el CRD de DC-SIGN (Figura 10).<sup>62</sup> Posteriormente se obtuvieron estructuras cristalinas de complejos de DC-SIGN con oligosacáridos fucosilados como el trisacárido Lewis<sup>x</sup>, o diversos oligosacáridos de manosa que forman parte de la estructura tipo “*high mannose*” y que van desde el undecasacárido  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  hasta el simple disacárido  $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha$ .<sup>68</sup>



**Figura 10.** A) Representación de la estructura cristalina del CRD de DC-SIGN unido al pentasacárido  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ <sup>62</sup>; B) Representación de la unión del disacárido  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha$  a través de  $\text{Ca}^{2+}$  en el complejo  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha/\text{DC-SIGN-CRD}$ .<sup>68</sup> Estructuras obtenidas por difracción de rayos X.

La característica principal de la unión entre lectinas y carbohidratos es la coordinación directa entre el calcio que se encuentra en el centro de unión primario ( $\text{Ca}2$ ) y grupos hidroxilos vecinales del anillo de piranosa, la cual también forma enlaces de hidrogeno con aminoácidos de la cadena lateral que a su vez actúan como ligandos  $\text{Ca}^{2+}$ . Así por ejemplo, la Figura 10A muestra la estructura cristalina del CRD de DC-SIGN unido al pentasacárido  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , donde la manosa interna con unión  $\alpha(1\rightarrow3)$  (M2) se une al  $\text{Ca}2$  mediante los hidroxilos ecuatoriales en posición 3 y 4 del residuo de manosa (Figura 10). Weis y col. sugirieron que la presencia de la unidad de  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha$  en el extremo no reductor de los oligosacáridos de manosa podría aumentar la afinidad por CDR debido a la interacción de este residuo con un sitio de unión secundario. Estudios de inhibición han demostrado que el pentasacárido  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  inhibe la interacción de la gp120 con el receptor DC-SIGN.<sup>62</sup> Además, existe un paralelismo con el mecanismo por el cual el anticuerpo neutralizante 2G12 del VIH se une específicamente a los residuos terminales de  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha$  presentes en el undecasacárido  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . La estructura cristalina<sup>69</sup> de  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  formando un complejo con el

anticuerpo 2G12, muestra que los sitios de unión convencionales están ocupados por el brazo D1 (Figura 7) del undecasacárido, y que los residuos de Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  contribuyen al 85% de los contactos con la proteína.<sup>70, 71</sup> Estos resultados parecen indicar que el disacárido terminal juega un papel importante en la interacción.

En la bibliografía existen ya datos sobre la interacción de la lectina DC-SIGN con diferentes monosacáridos, oligosacáridos, y con sistemas multivalentes de carbohidratos con la lectina DC-SIGN. Sin embargo, la diversidad de técnicas empleadas en dichos estudios tales como ELISA, biosensores, microarrays, etc. en dichos estudios así como la diversidad estructural de ligandos empleados (Tabla 1), hacen difícil una comparación sistemática de dichos datos, que ayudarían a la correcta elección de los mejores oligosacáridos que bloqueen la interacción entre DC-SIGN y la glicoproteína viral gp120 del VIH.

Los escasos estudios que existen sobre la interacción DC-SIGN con modelos multivalentes de carbohidratos<sup>66, 71-75</sup> y algunos resultados contradictorios en cuanto a la especificidad de las estructuras implicadas indican la necesidad de una investigación más sistemática dirigida a desarrollar nuevos sistemas multivalentes para esclarecer las bases moleculares de la interacción entre el receptor DC-SIGN y la glicoproteína gp120. Por ejemplo, oligosacáridos complejos de manosa o de tipo Lewis que incorporan fucosa interaccionan con DC-SIGN con constantes de afinidad que no son mucho más altas que las de interacción con estructuras oligosacáridicas más sencillas. Esta diferencia podría incluso compensarse presentando los oligosacáridos más sencillos de forma multivalente. Por otra parte, el desarrollo de nuevos inhibidores oligosacáridicos que unan a la DC-SIGN con mayor afinidad que la gp120 abriría nuevas perspectivas al diseño de microbicidas que eviten la infección.

**Tabla 1.** Datos sobre la interacción de diferentes carbohidratos y sistemas multivalentes de carbohidratos con la lectina DC-SIGN.

Tipo de compuesto / Nombre	Multivalencia	Tipo de ensayo o técnica	Afinidad con DC-SIGN
Monosacárido / Manosa <sup>66</sup>	monovalente	Ensayo de competición con <sup>125</sup> I-Man <sub>30</sub> -BSA	K <sub>i</sub> =13.1 mM
Monosacárido / Galactosa <sup>66</sup>	monovalente	Ensayo de competición con <sup>125</sup> I-Man <sub>30</sub> -BSA	K <sub>i</sub> =72 mM
Monosacárido / Glucosa <sup>66</sup>	monovalente	Ensayo de competición con <sup>125</sup> I-Man <sub>30</sub> -BSA	K <sub>i</sub> =23 mM
Disacárido / L-Fucosa <sup>66</sup>	monovalente	Ensayo de competición con <sup>125</sup> I-Man <sub>30</sub> -BSA	K <sub>i</sub> =6.7 mM
Oligosacárido / Man <sub>9</sub> NacGlc <sub>2</sub> <sup>66</sup>	monovalente	Ensayo de competición con <sup>125</sup> I-Man <sub>30</sub> -BSA	K <sub>i</sub> =0.21 mM
Glicopéptido / DiMan-Melan-A <sup>72</sup>	Man $\alpha$ 1-6Man $\alpha$ 4 unidades	Biacore/Binding directo	K <sub>a</sub> = 6.2 · 10 <sup>6</sup> (M <sup>-1</sup> )
Glicopéptido / Lewis a/x-Melan-A <sup>72</sup>	Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNac Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNac (4 unidades en total)	Biacore/Binding directo	K <sub>a</sub> = 5.3 · 10 <sup>7</sup> (M <sup>-1</sup> )
Poliacrilamida / PPA-Lewis x <sup>73</sup>	Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNac (~20% de sustitución)	ELISA	IC <sub>50</sub> =5 $\mu$ g/ml K <sub>d</sub> =1.74 $\mu$ M
Poliacrilamida / PPA-Lewis a <sup>73</sup>	Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNac (~20% de sustitución)	ELISA	IC <sub>50</sub> =2.4 $\mu$ g/ml
Poliacrilamida / PPA-Mantrio <sup>73</sup>	Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-6)Man (~20% de sustitución)	ELISA	IC <sub>50</sub> =5.9 $\mu$ g/ml
Dendrímero / Man <sup>74</sup>	Man / 32 unidades	Ensayo de competición con gp120/Biacore	IC <sub>50</sub> =50 $\mu$ M
Dendrímero / Man <sub>4</sub> <sup>75</sup>	Man <sub>4</sub> / 9 unidades	Microarray de glicanos/ELISA de competición con gp120	IC <sub>50</sub> =0.16 $\mu$ M IC <sub>50</sub> =0.02 $\mu$ M
Dendrímero / Man <sub>9</sub> <sup>75</sup>	Man <sub>9</sub> / 9 unidades	Microarray de glicanos/ELISA de competición con gp120	IC <sub>50</sub> =0.026 $\mu$ M IC <sub>50</sub> =0.008 $\mu$ M

### 3. Objetivos

Las gliconanopartículas (GNPs) como sistemas multivalentes que presentan las moléculas de carbohidratos en forma globular, constituyen una excelente herramienta para intervenir en procesos de reconocimiento molecular. El trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral ha utilizado esta herramienta para abordar un aspecto concreto de la problemática general de la infección por VIH que acabamos de exponer. Dentro de este problema complejo, hemos elegido intervenir en la interacción entre la glicoproteína gp120 del virus y el receptor DC-SIGN pensando que gliconanopartículas incorporando un gran número de los oligosacáridos tipo “*high mannose*”

(*manno*-GNPs) podrían mimetizar la presentación multivalente de estos en la gp120 de la envuelta del virus, ser capaces de bloquear los estadios primarios de la infección por vía sexual impidiendo la unión del virus al receptor DC-SIGN de las células dendríticas y en consecuencia inhibir la infección en *trans* de células T.

Por tanto el objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio a nivel molecular de la interacción entre DC-SIGN y gp120 mediante nuestro sistema multivalente de presentación de oligosacáridos: las gliconanopartículas. Con ello pretendemos contribuir al esclarecimiento de las bases estructurales de la interacción DC-SIGN/gp120, y establecer los requerimientos a nivel molecular necesarios para el desarrollo de buenos inhibidores capaces de bloquear la unión del VIH a las células dendríticas. Por otra parte, este trabajo se ha llevado a cabo, en parte, dentro del marco del proyecto europeo EMPRO<sup>54a</sup> (European Microbicide Project) cuya meta esencial es desarrollar microbicidas tópicos que bloqueen la entrada del virus en la mucosa vaginal o penil. Por tanto, la obtención de *manno*-GNPs capaces de presentar actividad microbicida sería un objetivo muy deseable.

Para conseguir el objetivo fundamental que nos propusimos hemos desarrollado los objetivos concretos siguientes:

I) La preparación y caracterización de una pequeña librería de gliconanopartículas de oro (*manno*-GNPs) que incorporan de forma multivalentes motivos estructurales de los oligosacáridos “*high mannose*” de la gp120 que nos permitieran intervenir y estudiar la interacción DC-SIGN/gp120. Se han preparado gliconanopartículas con distinta densidad de oligomanosidos y distintos tamaños del cluster de oro para estudiar su influencia en la interacción. Así mismo, se han incorporado a las gliconanopartículas marcadores fluorescentes para estudiar su interacción con sistemas celulares mediante microscopia de fluorescencia y citometría de flujo.

II) Se ha estudiado dicha librería como inhibidores de la unión de DC-SIGN a gp120 para identificar aquellas *manno*-GNPs con la mejor actividad

inhibidora mediante experimentos con biosensores por detección de la resonancia del plasmón de superficie (SPR)

III) Se ha estudiado, en modelos celulares, la capacidad de las mejores GNPs para inhibir la infección en *trans* por el VIH de células T humanas.

IV) Se ha evaluado la citotoxicidad de las gliconanopartículas y se ha estudiado la interacción de las GNPs fluorescentes con líneas celulares que expresan DC-SIGN y con células dendríticas inmaduras para confirmar si nuestro sistema multivalente interacciona específicamente con este receptor.

La presentación de la memoria se ha dividido en una introducción general, que incluye antecedentes y los objetivos de esta Tesis Doctoral, y cuatro capítulos más. En el Capítulo 1 se describe en detalle la síntesis y caracterización de las gliconanopartículas. El Capítulo 2 presenta los estudios de inhibición con las *manno*-GNPs de la interacción gp120/DC-SIGN mediante SPR. El Capítulo 3 presenta los estudios virológicos de la inhibición de la *trans*-infección por las *manno*-GNPs. Finalmente, el Capítulo 4 resume los estudios de interacción de las *manno*-GNPs fluorescentes con líneas celulares y con células dendríticas inmaduras que se realizó por citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia.

El desarrollo de esta Tesis ha tenido lugar en distintos centros de investigación. La síntesis de neoglicoconjugados y nanopartículas se llevó a cabo entre 2004-2006 en los laboratorios del grupo de Carbohidratos del Instituto de Investigaciones Químicas de Sevilla; y desde 2007 en los laboratorios de la Unidad de Nanomateriales Biofuncionales de CIC BiomaGUNE en San Sebastián. Una serie de colaboraciones establecidas con distintos laboratorios ha hecho posible la realización de muchos de los experimentos que han enriquecido esta Tesis Doctoral. Los experimentos con Biacore se realizaron en el King's College, London, UK, bajo la supervisión del Prof. Charles Kelly y la Dr Karolin Hijazi; los estudios virológicos se han realizado en la Unidad de Inmunopatología del Sida, en el Centro Nacional de

Microbiología en el Instituto de Salud Carlos III en Majadahonda, bajo la supervisión del Prof. José Alcamí y el Dr Luis Miguel Bedoya; y finalmente, los estudios de interacción con células se realizaron en CIC BiomaGUNE en colaboración con la Dr Blanca Arnaiz.

#### 4. Bibliografía

<sup>1</sup> Varki, A.C., R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J. (1999). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

<sup>2</sup> Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3, 97-130.

<sup>3</sup> Soler, M., Desplat-Jego, S., Vacher, B., Ponsonnet, L., Fraterno, M., Bongrand, P., Martin, J.M., and Foa, C. (1998). Adhesion-related glycoalyx study: quantitative approach with imaging-spectrum in the energy filtering transmission electron microscope (EFTEM). *FEBS Lett*, 429, 89-94.

<sup>4</sup> Dwek, R.A. (1996). Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem Rev*, 96, 683-720.

<sup>5</sup> Muramatsu, T. (1988). Developmentally regulated expression of cell surface carbohydrates during mouse embryogenesis. *J Cell Biochem*, 36, 1-14.

<sup>6</sup> Hakomori, S. (1981). Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem*, 50, 733-764.

<sup>7</sup> Lasky, L.A. (1995). Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem*, 64, 113-139.

<sup>8</sup> Muramatsu, T. (1993). Carbohydrate signals in metastasis and prognosis of human carcinomas. *Glycobiology*, 3, 291-296.

<sup>9</sup> a) de la Fuente, J.M., and Penades, S. (2004). Understanding carbohydrate-carbohydrate interactions by means of glyconanotechnology. *Glycoconj J*, 21, 149-163; b) Hakomori, S. (1991). Carbohydrate-Carbohydrate Interaction as an Initial Step in Cell Recognition. *Pure Appl Chem*, 63, 473-482; c) Hakomori, S. (2002). The glycosynapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 225-232; d) Yu, S., Kojima, N., Hakomori, S., Kudo, S., Inoue, S., and Inoue, Y. (2002). Binding of rainbow trout sperm to egg is mediated by strong carbohydrate-to-carbohydrate interaction between (KDN)GM3 (deaminated neuraminyl ganglioside) and Gg3-like epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2854-2859.

<sup>10</sup> Mammen, M.C., S-K.; Whitesides, G.M. (1998). Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implication for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew Chem Int Ed*, 37, 2754-2794.

<sup>11</sup> a) Lundquist, J.J., and Toone, E.J. (2002). The cluster glycoside effect. *Chem Rev*, 102, 555-578; b) Lee, Y.C., and Lee, R.T. (1995). Carbohydrate-Protein Interactions - Basis of Glycobiology. *Acc Chem Res*, 28, 321-327; c) Lee, R.T., and Lee, Y.C. (2000). Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconj J Glycoconjugate Journal*, 17, 543-551.

<sup>12</sup> Lee, Y.C. (1992). Biochemistry of carbohydrate-protein interaction. *Faseb J*, 6, 3193-3200.

- 
- <sup>13</sup> Houseman, T.B., and Mrksich, M. (2002). *Model Systems for Studying Polyvalent Carbohydrate Binding Interactions in Topics in Current Chemistry*. S. Penades (ed). Springer-Verlag Berlin, Berlin, vol 218, 1-44
- <sup>14</sup> Lee, Y.C., Lee, R.T., Rice, K., Ichikawa, Y., and Wong, T.-C. (1991). Topography of binding sites of animal lectins: ligands' view. *Pure Appl Chem*, 63, 499-506.
- <sup>15</sup> Stowell, C.P., and Lee, Y.C. (1978). The binding of D-glucosyl-neoglycoproteins to the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem*, 253, 6107-6110.
- <sup>16</sup> Aoyama, Y., Matsuda, Y., Chuleerarak, J., Nishiyama, K., Fujimoto, K., Fujimoto, T., Shimizu, T., and Hayashida, O. (1998). Molecular delivery systems using macrocyclic sugar clusters. *Pure Appl Chem*, 70, 2379-2384.
- <sup>17</sup> Hayashida, O., Shimizu, C., Fujimoto, T., and Aoyama, Y. (1998). Surface plasmon resonance study on the interaction of immobilized macrocyclic sugar clusters with lectins and water-soluble polymers. *Chem Lett*, 13-14.
- <sup>18</sup> a) Duchene, D., Ponchel, G., and Wouessidjewe, D. (1999). Cyclodextrins in targeting. Application to nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, 36, 29-40; b) Fulton, D.A., and Stoddart, J.F. (2000). An efficient synthesis of cyclodextrin-based carbohydrate cluster compounds. *Org Lett*, 2, 1113-1116; c) Garcia-Lopez, J.J., Hernandez-Mateo, F., Isac-Garcia, J., Kim, J.M., Roy, R., Santoyo-Gonzalez, F., and Vargas-Berenguel, A. (1999). Synthesis of per-glycosylated beta-cyclodextrins having enhanced lectin binding affinity. *J Org Chem*, 64, 522-531; d) Gattuso, G., Nepogodiev, S.A., and Stoddart, J.F. (1998). Synthetic Cyclic Oligosaccharides. *Chem Rev*, 98, 1919-1958; e) Ortiz-Mellet, C., Benito, J.M., Fernandez, J.M.G., Law, H., Chmurski, K., Defaye, J., O'Sullivan, M.L., and Caro, H.N. (1998). Cyclodextrin-scaffolded glycoclusters. *Chem Eur J*, 4, 2523-2531; f) Baussanne, I., Benito, J.M., Mellet, C.O., Fernandez, J.M.G., Law, H., and Defaye, J. (2000). Synthesis and comparative lectin-binding affinity of mannosyl-coated beta-cyclodextrin-dendrimer constructs. *Chem Comm*, 1489-1490.
- <sup>19</sup> Roy, R., Zanini, D., Meunier, S.J., and Romanowska, A. (1993). Solid-phase synthesis of dendritic sialoside inhibitors of influenza virus hemagglutinin. *J Chem Soc Chem Comm*, 1869-1872.
- <sup>20</sup> Baek, M.G., Rittenhouse-Olson, K., and Roy, R. (2001). Synthesis and antibody binding properties of glycodendrimers bearing the tumor related T-antigen. *Chem Comm*, 257-258.
- <sup>21</sup> Kim, Y., and Zimmerman, S.C. (1998). Applications of dendrimers in bio-organic chemistry. *Curr Opin Chem Biol*, 2, 733-742.
- <sup>22</sup> Kingerywood, J.E., Williams, K.W., Sigal, G.B., and Whitesides, G.M. (1992). The agglutination of erythrocytes by influenza virus is strongly inhibited by liposomes incorporating an analog of sialyl gangliosides. *J Am Chem Soc*, 114, 7303-7305.
- <sup>23</sup> Otsuji, E., Park, Y.S., Tashiro, K., Kojima, N., Toyokuni, T., and Hakomori, S.I. (1995). Inhibition of B16 melanoma metastasis by administration of G(M3)- or Gg3- liposomes blocking adhesion of melanoma cells to endothelial cells (adhesion therapy) via inhibition of G(M3)-GG3cer or G(M3) laccase interaction. *Int J Oncol*, 6, 319-327.
- <sup>24</sup> a) Gestwicki, J.E., and Kiessling, L.L. (2002). Inter-receptor communication through arrays of bacterial chemoreceptors. *Nature*, 415, 81-84; b) Gestwicki, J.E., Strong, L.E., Cairo, C.W., Boehm, F.J., and Kiessling, L.L. (2002). Cell aggregation by scaffolded receptor clusters. *Chem Biol*, 9, 163-169; c) Gordon, E.J., Sanders, W.J., and Kiessling, L.L. (1998). Synthetic ligands point to cell surface strategies. *Nature*, 392, 30-31; d) Gordon, E.J., Strong, L.E., and Kiessling, L.L. (1998). Glycoprotein-inspired materials promote the proteolytic release of cell surface L-selectin. *Bioorg Med Chem*, 6, 1293-1299.

- 
- <sup>25</sup> a) Davis, B.G. (2002). Synthesis of glycoproteins. *Chem Rev*, 102, 579-601; b) Davis, B.G. (2004). Biochemistry. Mimicking posttranslational modifications of proteins. *Science*, 303, 480-482; c) Van Kasteren, S.I., Kramer, H.B., Gamblin, D.P., and Davis, B.G. (2007). Site-selective glycosylation of proteins: creating synthetic glycoproteins. *Nat Protoc*, 2, 3185-3194.
- <sup>26</sup> Mrksich, M. (2000). A surface chemistry approach to studying cell adhesion. *Chem Soc Rev*, 29, 267-273.
- <sup>27</sup> Ohrlein, R. (1999). *Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of non-natural oligosaccharides in Topics in Current Chemistry*. F. WD (ed). Springer-Verlag Berlin, Berlin, vol 200, 227-254
- <sup>28</sup> Takayama, S., and Wong, C.H. (1997). Chemo-enzymatic approach to carbohydrate recognition. *Curr Org Chem*, 1, 109-126.
- <sup>29</sup> Srivastava, G., Kaur, K.J., Hindsgaul, O., and Palcic, M.M. (1992). Enzymatic transfer of a preassembled trisaccharide antigen to cell surfaces using a fucosyltransferase. *J Biol Chem*, 267, 22356-22361.
- <sup>30</sup> a) Jacobs, C.L., Yarema, K.J., Mahal, L.K., Nauman, D.A., Charters, N.W., and Bertozzi, C.R. (2000). Metabolic labeling of glycoproteins with chemical tags through unnatural sialic acid biosynthesis. *Methods Enzymol*, 327, 260-275; b) Mahal, L.K., Yarema, K.J., and Bertozzi, C.R. (1997). Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis. *Science*, 276, 1125-1128; c) Saxon, E., and Bertozzi, C.R. (2000). Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science*, 287, 2007-2010.
- <sup>31</sup> a) Dube, D.H., Prescher, J.A., Quang, C.N., and Bertozzi, C.R. (2006). Probing mucin-type O-linked glycosylation in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 4819-4824; b) Prescher, J.A., and Bertozzi, C.R. (2005). Chemistry in living systems. *Nat Chem Biol*, 1, 13-21; c) Prescher, J.A., Dube, D.H., and Bertozzi, C.R. (2004). Chemical remodelling of cell surfaces in living animals. *Nature*, 430, 873-877.
- <sup>32</sup> Hostetler, M.J., Wingate, J.E., Zhong, C.J., Harris, J.E., Vachet, R.W., Clark, M.R., Londono, J.D., Green, S.J., Stokes, J.J., Wignall, G.D., Glish, G.L., Porter, M.D., Evans, N.D., and Murray, R.W. (1998). Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir*, 14, 17-30.
- <sup>33</sup> Barrientos, A.G., de la Fuente, J.M., Rojas, T.C., Fernandez, A., and Penades, S. (2003). Gold glyconanoparticles: synthetic polyvalent ligands mimicking glycocalyx-like surfaces as tools for glycobiological studies. *Chem Eur J*, 9, 1909-1921.
- <sup>34</sup> de La Fuente, J.M., Barrientos, A.G., Rojas, T.C., Rojo, J., Canada, J., Fernandez, A., and Penades, S. (2001). Gold Glyconanoparticles as Water-Soluble Polyvalent Models To Study Carbohydrate Interactions *Angew Chem Int Ed*, 40, 2257-2261.
- <sup>35</sup> Tromas, C., Rojo, J., De La Fuente, J.M., Barrientos, A.G., Garcia, R., and Penades, S. (2001). Adhesion Forces between LewisX Determinant Antigens as Measured by Atomic Force Microscopy. *Angew Chem Int Ed*, 40, 3052-3055.
- <sup>36</sup> Hernaiz, M.J., de la Fuente, J.M., Barrientos, A.G., and Penades, S. (2002). A model system mimicking glycosphingolipid clusters to quantify carbohydrate self-interactions by surface plasmon resonance. *Angew Chem Int Ed*, 41, 1554-1557.
- <sup>37</sup> de la Fuente, J.M., Eaton, P., Barrientos, A.G., Menendez, M., and Penades, S. (2005). Thermodynamic evidence for Ca<sup>2+</sup>-mediated self-aggregation of Lewis X gold glyconanoparticles. A model for cell adhesion via carbohydrate-carbohydrate interaction. *J Am Chem Soc*, 127, 6192-6197.

- 
- <sup>38</sup> Rojo, J., Diaz, V., de la Fuente, J.M., Segura, I., Barrientos, A.G., Riese, H.H., Bernad, A., and Penades, S. (2004). Gold glyconanoparticles as new tools in antiadhesive therapy. *Chembiochem*, 5, 291-297.
- <sup>39</sup> Rojas, T.C., de la Fuente, J.M., Barrientos, A.G., Penades, S., Ponsonnet, L., and Fernandez, A. (2002). Gold glyconanoparticles as building blocks for nanomaterials design. *Adv Mater*, 14, 585-588.
- <sup>40</sup> Crespo, P., Litran, R., Rojas, T.C., Multigner, M., de la Fuente, J.M., Sanchez-Lopez, J.C., Garcia, M.A., Hernando, A., Penades, S., and Fernandez, A. (2004). Permanent magnetism, magnetic anisotropy, and hysteresis of thiol-capped gold nanoparticles. *Phys Rev Lett*, 93, 87204.
- <sup>41</sup> Ojeda, R., de Paz, J.L., Barrientos, A.G., Martin-Lomas, M., and Penades, S. (2007). Preparation of multifunctional glyconanoparticles as a platform for potential carbohydrate-based anticancer vaccines. *Carbohydr Res*, 342, 448-459.
- <sup>42</sup> de la Fuente, J.D.M., and Penades, S. (2005). Glyco-quantum dots: a new luminescent system with multivalent carbohydrate display. *Tetrahedron Asymmetry*, 16, 387-391.
- <sup>43</sup> de la Fuente, J.M., Alcantara, D., Eaton, P., Crespo, P., Rojas, T.C., Fernandez, A., Hernando, A., and Penades, S. (2006). Gold and gold-iron oxide magnetic glyconanoparticles: synthesis, characterization and magnetic properties. *J Phys Chem B*, 110, 13021-13028.
- <sup>44</sup> Stevenson, M. (2003). HIV-1 pathogenesis. *Nat Med*, 9, 853-860.
- <sup>45</sup> Alcami, J. (2004). Advances in the immunopathology of HIV infection. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 22, 486-496.
- <sup>46</sup> Scanlan, C.N., Offer, J., Zitzmann, N., and Dwek, R.A. (2007). Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature*, 446, 1038-1045.
- <sup>47</sup> Berger, E.A., Murphy, P.M., and Farber, J.M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*, 17, 657-700.
- <sup>48</sup> Wyatt, R., and Sodroski, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, 280, 1884-1888.
- <sup>49</sup> Pantophlet, R., and Burton, D.R. (2006). GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu Rev Immunol*, 24, 739-769.
- <sup>50</sup> Wyatt, R., Kwong, P.D., Desjardins, E., Sweet, R.W., Robinson, J., Hendrickson, W.A., and Sodroski, J.G. (1998). The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*, 393, 705-711.
- <sup>51</sup> Pollakis, G., Kang, S., Kliphuis, A., Chalaby, M.I.M., Goudsmit, J., and Paxton, W.A. (2001). N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem*, 276, 13433-13441.
- <sup>52</sup> <http://www.unaids.org>.
- <sup>53</sup> [http://www.merck.com/newsroom/press\\_releases/research\\_and\\_development/2007\\_0921.html](http://www.merck.com/newsroom/press_releases/research_and_development/2007_0921.html).
- <sup>54</sup> a) <http://www.empro.org.uk/>; b) Greenhead, P., Hayes, P., Watts, P.S., Laing, K.G., Griffin, G.E., and Shattock, R.J. (2000). Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. *Journal of Virology*, 74, 5577-5586; c) Hu, Q., Frank, I., Williams, V., Santos, J.J., Watts, P., Griffin, G.E., Moore, J.P., Pope, M., and Shattock, R.J. (2004). Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue. *J Exp Med*, 199, 1065-1075; d) Stone, A. (2002). Microbicides: A new

---

approach to preventing HIV and other sexually transmitted infections. *Nat Rev Drug Discov* 1, 977-985.

<sup>55</sup> Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, 100, 587-597.

<sup>56</sup> Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, 100, 575-585.

<sup>57</sup> a) van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*, 3, 697-709; b) Guo, Y., Feinberg, H., Conroy, E., Mitchell, D.A., Alvarez, R., Blixt, O., Taylor, M.E., Weis, W.I., and Drickamer, K. (2004). Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 591-598; c) Engering, A., Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Wijers, M., van Liempt, E., Demareux, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C.G., Piguet, V., and van Kooyk, Y. (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*, 168, 2118-2126.

<sup>58</sup> Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252.

<sup>59</sup> Wu, L., and KewalRamani, V.N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*, 6, 859-868.

<sup>60</sup> a) Tassaneeritthep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trunpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D.L., Steinman, R.M., Schlesinger, S., and Marovich, M.A. (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*, 197, 823-829; b) Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J.L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L.P., Gluckman, J.C., Lagrange, P.H., Gicquel, B., and Neyrolles, O. (2003). DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med*, 197, 121-127; c) Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol*, 77, 4070-4080; d) Maeda, N., Nigou, J., Herrmann, J.L., Jackson, M., Amara, A., Lagrange, P.H., Puzo, G., Gicquel, B., and Neyrolles, O. (2003). The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between Mycobacterium species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J Biol Chem*, 278, 5513-5516; e) Lozach, P.Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Fong, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Altmeyer, R. (2003). DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem*, 278, 20358-20366; f) Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houles, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity*, 17, 653-664; g) Geijtenbeek, T.B., Van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B., and Van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*, 197, 7-17; h) Colmenares, M., Puig-Kroger, A., Pello, O.M., Corbi, A.L., and Rivas, L. (2002). Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for Leishmania amastigotes. *J Biol Chem*, 277, 36766-36769; i) Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J.M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G.J., Netea, M.G., Kullberg, B.J., Romani, L., and Figdor, C.G. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for Candida albicans on dendritic cells. *Eur J Immunol*, 33, 532-538; j) Alvarez, C.P., Lasala, F., Carrillo, J., Muniz, O., Corbi, A.L., and Delgado, R. (2002). C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol*, 76, 6841-6844.

- 
- <sup>61</sup> Pohlmann, S., Baribaud, F., and Doms, R.W. (2001). DC-SIGN and DC-SIGNR: helping hands for HIV. *Trends Immunol*, 22, 643-646.
- <sup>62</sup> Feinberg, H., Mitchell, D.A., Drickamer, K., and Weis, W.I. (2001). Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science*, 294, 2163-2166.
- <sup>63</sup> Botos, I., and Wlodawer, A. (2005). Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog Biophys Mol Biol*, 88, 233-282.
- <sup>64</sup> Curtis, B.M., Scharnowske, S., and Watson, A.J. (1992). Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 8356-8360.
- <sup>65</sup> Steinman, R.M. (2000). DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell*, 100, 491-494.
- <sup>66</sup> Mitchell, D.A., Fadden, A.J., and Drickamer, K. (2001). A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem*, 276, 28939-28945.
- <sup>67</sup> Mizuochi, T., Matthews, T.J., Kato, M., Hamako, J., Titani, K., Solomon, J., and Feizi, T. (1990). Diversity of oligosaccharide structures on the envelope glycoprotein gp 120 of human immunodeficiency virus 1 from the lymphoblastoid cell line H9. Presence of complex-type oligosaccharides with bisecting N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem*, 265, 8519-8524.
- <sup>68</sup> Feinberg, H., Castelli, R., Drickamer, K., Seeberger, P.H., and Weis, W.I. (2007). Multiple modes of binding enhance the affinity of DC-SIGN for high mannose N-linked glycans found on viral glycoproteins. *J Biol Chem*, 282, 4202-4209.
- <sup>69</sup> 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., and Wilson, I.A. (2003). Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science*, 300, 2065-2071.
- <sup>70</sup> Scanlan, C.N., Pantophlet, R., Wormald, M.R., Saphire, E.O., Calarese, D., Stanfield, R., Wilson, I.A., Katinger, H., Dwek, R.A., Burton, D.R., and Rudd, P.M. (2003). The carbohydrate epitope of the neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12. *Glycobiology and Medicine*, 535, 205-218.
- <sup>71</sup> Sanders, R.W., Venturi, M., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Katinger, H., Lloyd, K.O., Kwong, P.D., and Moore, J.P. (2002). The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *Journal of Virology*, 76, 7293-7305.
- <sup>72</sup> Srinivas, O., Larrieu, P., Duverger, E., Boccaccio, C., Bousser, M.T., Monsigny, M., Fonteneau, J.F., Jotereau, F., and Roche, A.C. (2007). Synthesis of glycocluster-tumor antigenic peptide conjugates for dendritic cell targeting. *Bioconj Chem*, 18, 1547-1554.
- <sup>73</sup> van Liempt, E., Bank, C.M., Mehta, P., Garcia-Vallejo, J.J., Kwar, Z.S., Geyer, R., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., Kooyk, Y., and van Die, I. (2006). Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Lett*, 580, 6123-6131.
- <sup>74</sup> Tabarani, G., Reina, J.J., Ebel, C., Vives, C., Lortat-Jacob, H., Rojo, J., and Fieschi, F. (2006). Mannose hyperbranched dendritic polymers interact with clustered organization of DC-SIGN and inhibit gp120 binding. *FEBS Lett*, 580, 2402-2408.

---

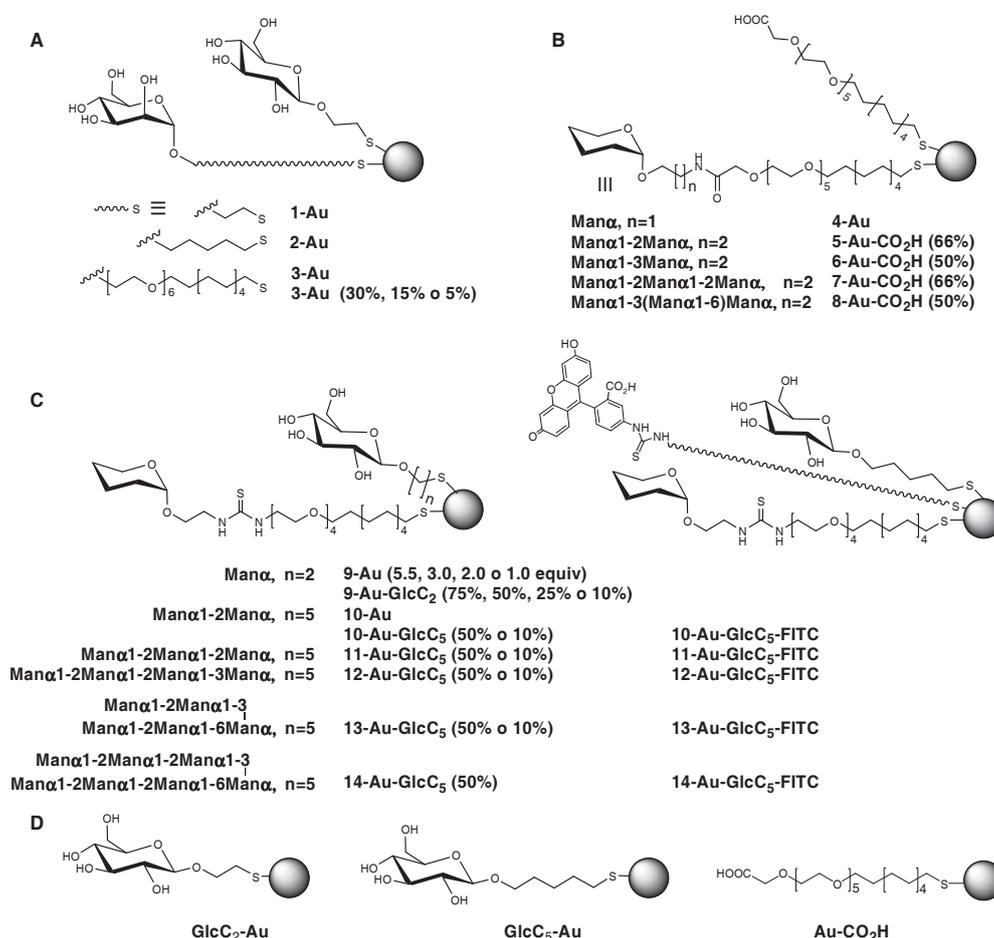
<sup>75</sup> Wang, S.K., Liang, P.H., Astronomo, R.D., Hsu, T.L., Hsieh, S.L., Burton, D.R., and Wong, C.H. (2008). Targeting the carbohydrates on HIV-1: Interaction of oligomannose dendrons with human monoclonal antibody 2G12 and DC-SIGN. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 3690-3695.



# CAPÍTULO 1. Diseño y síntesis de gliconanopartículas funcionalizadas con (oligo)manósidos (*manno*-GNPs)

## 1. Introducción

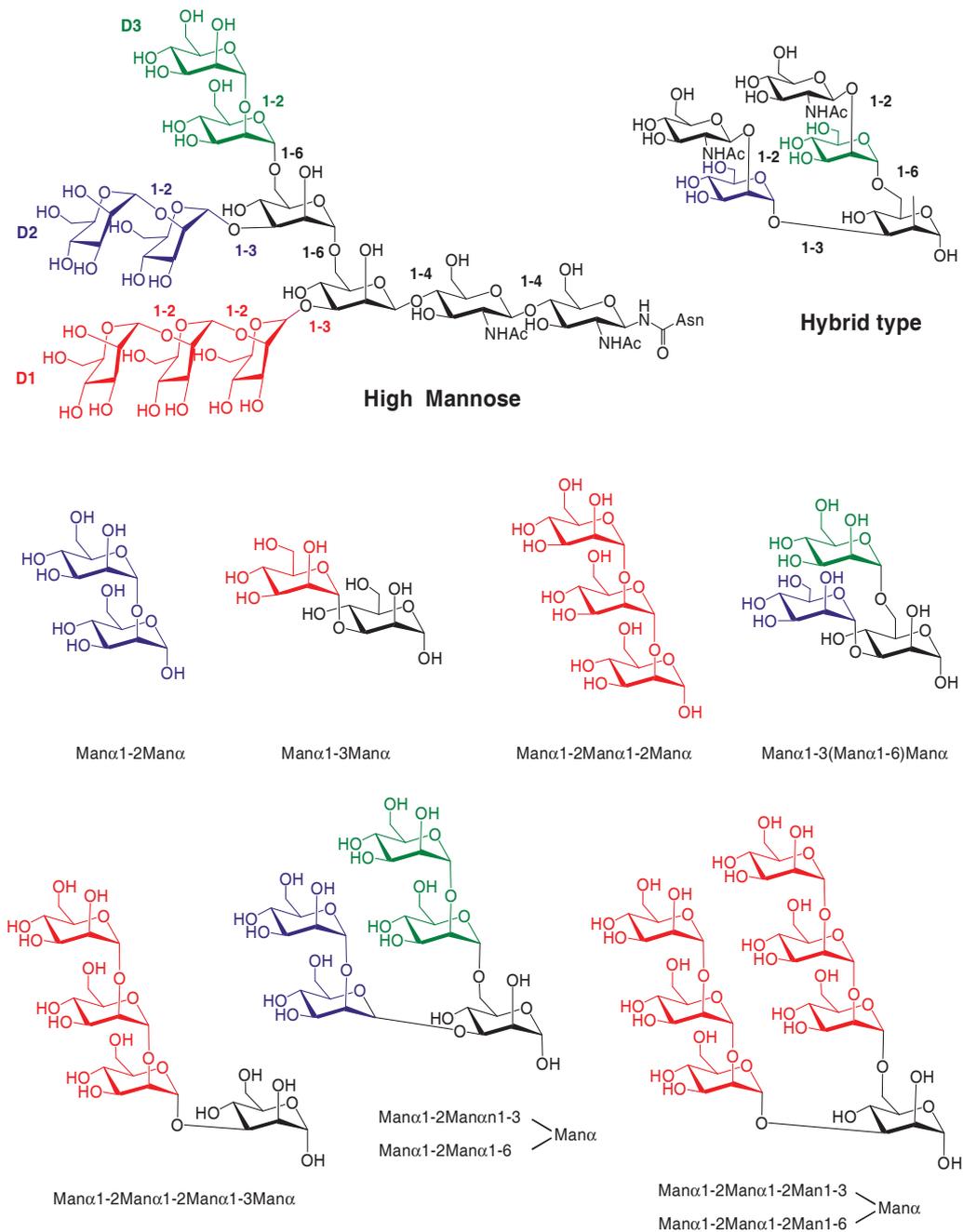
En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos en el diseño, síntesis y caracterización de nanopartículas de oro funcionalizadas con (oligo)manósidos (*manno*-GNPs) que mimetizan la presentación de estos carbohidratos en la gp120, la proteína de la envuelta viral del VIH. Todas las GNPs preparadas en esta Tesis están representadas en la Figura 1.



**Figura 1.** Representación esquemática de todas las *manno*-GNPs preparadas en esta Tesis Doctoral.

La estructura molecular del undecasacárido tipo “*high mannose*” y del pentasacárido “*hybrid type*” que presenta la glicoproteína gp120 del VIH es

esencial en la interacción del virus con el receptor tipo lectina DC-SIGN de las células dendríticas, y están representadas en la Figura 2. Esta interacción constituye uno de los mecanismos más importantes de la infección del VIH por vía sexual.



**Figura 2.** Oligosacáridos tipo “*high mannose*” o “*hybrid type*” de la gp120 involucrados en la infección por VIH y estructuras parciales seleccionadas en esta Tesis.

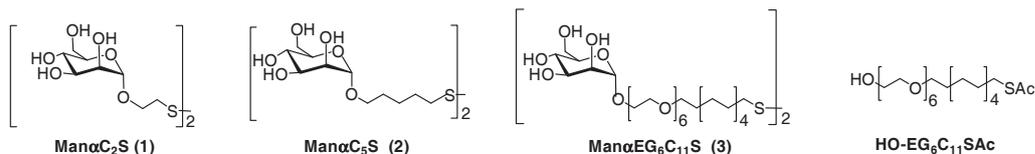
El resto de (oligo)manósidos representados en la Figura 2 son estructuras parciales del nonasacárido  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  de tipo “*high mannose*” y abarcan desde el monosacárido manosa, que es el azúcar terminal no reductor de estas estructuras, hasta di-, tri-, tetra-, penta- y heptasacáridos de manosa, que constituyen los residuos terminales o estructuras parciales que componen los diferentes brazos D1, D2 o D3 del nonasacárido  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . Todos estos oligosacáridos han sido sintetizados y utilizados en la preparación de las *manno*-GNPs, en un intento de diseccionar la contribución de cada una de estas estructuras a la interacción carbohidrato-proteína entre la lectina DC-SIGN y la gp120.

Las estructuras elegidas en orden creciente de complejidad son: el disacárido terminal  $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha$  de los brazos D1, D2 y D3; el trisacárido terminal  $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha$  del brazo D1; el disacárido  $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\alpha$  y el trisacárido  $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\alpha$  del esqueleto interno del nonasacárido; el tetrasacárido  $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\alpha$  que forma parte del brazo D1 del nonasacárido; el pentasacárido  $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\alpha$  que constituye el brazo D2 y D3 del nonasacárido, y el heptasacárido  $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\alpha$  formado por el tetrasacárido D1 y que presenta el trisacárido  $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha$  en posición 6 de la manosa reductora del tetrasacárido anterior (Figura 2).

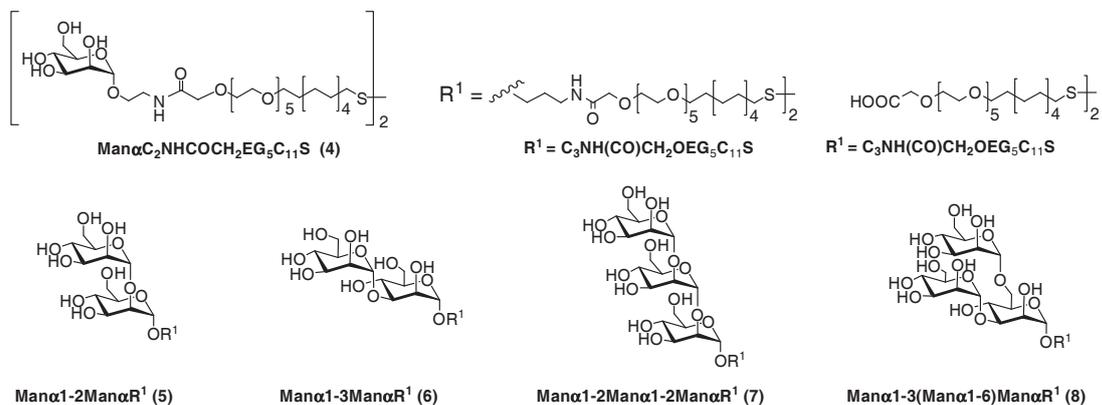
Estos oligosacáridos se han conseguido por dos vías. Los más sencillos a través de un proyecto integrado europeo (*European Microbicide Project, EMPRO*)<sup>1</sup> y los más complejos se han sintetizado en nuestro laboratorio mediante la síntesis en un solo paso descrita por Wong y colaboradores.<sup>2</sup>

Con estos oligosacáridos se han preparado una serie de neoglicoconjugados que han sido utilizados en la preparación de las gliconanopartículas (*manno*-GNPs). Todos los neoglicoconjugados de (oligo)manósidos y los correspondientes espaciadores bifuncionales que se han sintetizado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral están recogidos en la Figura 3.

A. Neoglicoconjugados de manosa sintetizados por glicosidación directa



B. Neoglicoconjugados de manosa sintetizados por acoplamiento peptídico



C. Neoglicoconjugados de manosa sintetizados por acoplamiento de tiourea

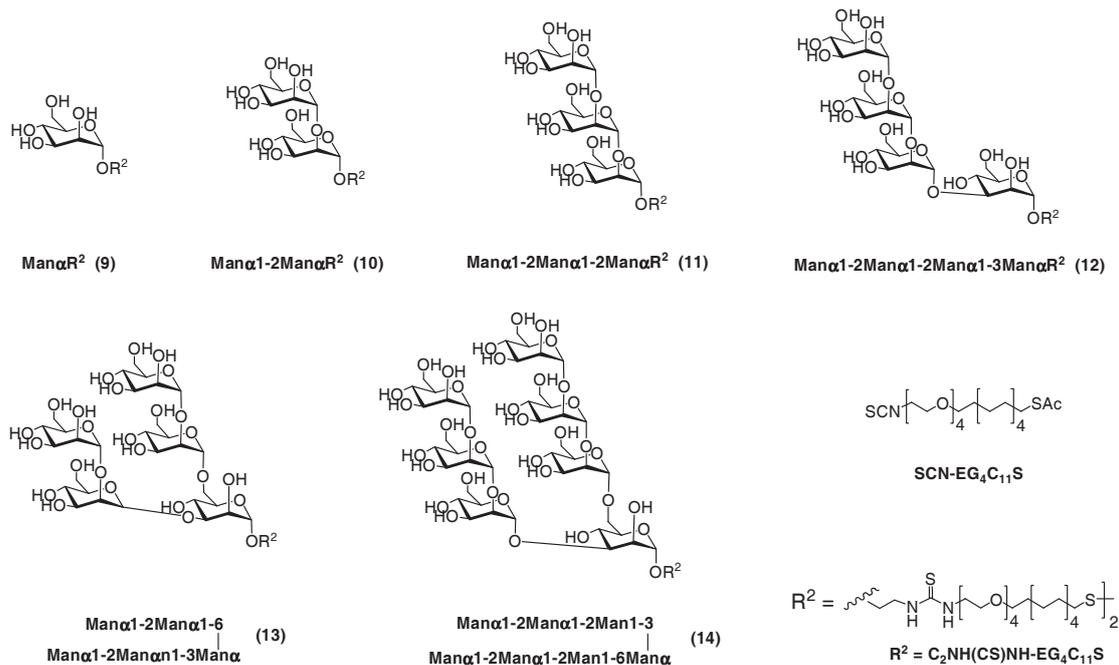
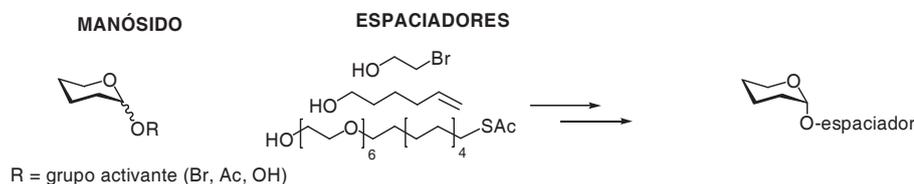


Figura 3. Tres familias de neoglicoconjugados de manosa sintetizados en esta Tesis Doctoral.

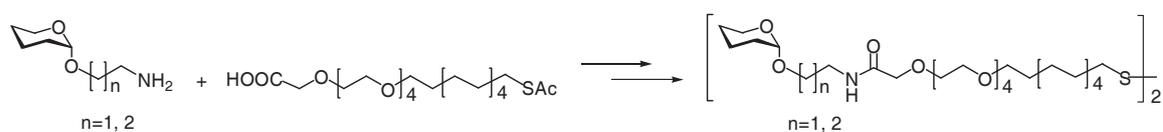
Uno de los puntos más importantes para la síntesis de GNPs es la elección de los espaciadores bifuncionales, que se utilizarán para preparar los neoglicoconjugados que se unirán a la superficie del oro, y su conjugación con

el oligosacárido. Hemos utilizado tres tipos distintos de acoplamiento entre el espaciador y el oligosacárido (Figura 4).

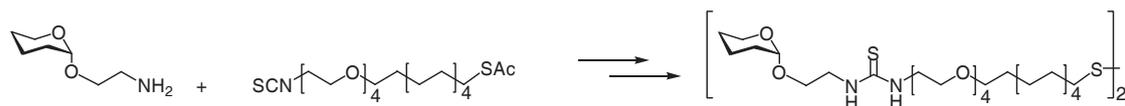
#### A. GLICOSIDACIÓN DIRECTA



#### B. ACOPLAMIENTO PEPTÍDICO



#### C. ACOPLAMIENTO TIUREA



**Figura 4.** Métodos y espaciadores empleados para la preparación de los neoglicoconjugados.

El primer acoplamiento, ya desarrollado en nuestro laboratorio para la preparación de neoglicoconjugados consiste en la **glicosidación directa** entre el donador de glicosilo, previamente protegido, y el aceptor de glicosilo funcionalizado con un grupo tiol o un grupo susceptible de convertirse en tiol (Figura 4A).<sup>3</sup> Sin embargo, la experiencia nos ha demostrado que con oligosacáridos más complejos como los que se han utilizado en esta Tesis, esta metodología presenta serios inconvenientes como es el uso restringido de grupos protectores que no pueden ser utilizados en presencia de los grupos tioles, esenciales en el espaciador.

Por este motivo, se cambió la estrategia sintética partiendo de oligosacáridos, que llevan como aglicón un alquilamino que está protegido con un grupo benciloxycarbonil compatible con todos los grupos protectores que se usan en la síntesis de oligosacáridos. Esta estrategia nos ha permitido preparar

oligosacáridos más complejos utilizando métodos clásicos de la química de carbohidratos. Oligosacáridos así funcionalizados se han acoplado con los espaciadores de cadena mixta funcionalizados con un grupo carboxílico para llevar a cabo un **acoplamiento amídico** (Figura 4B).

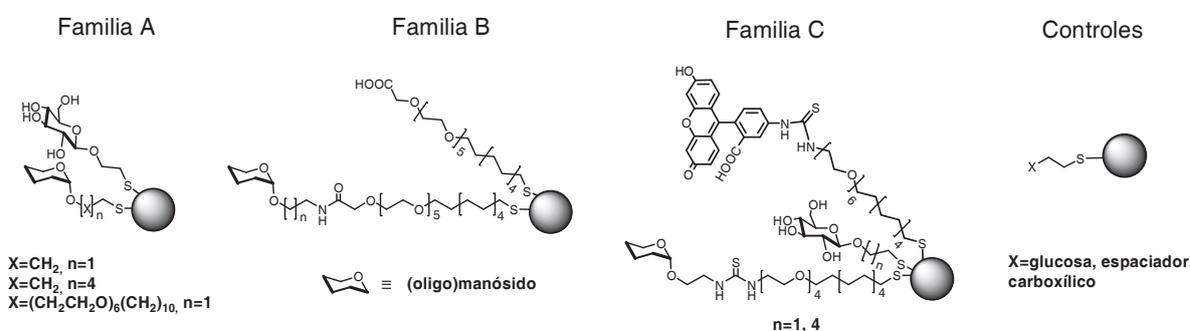
Sin embargo, las condiciones clásicas empleadas para este acoplamiento condujeron a diversos problemas de purificación y aislamiento que nos llevó a la elección de otro método de acoplamiento más cuantitativo y sencillo, en el que los oligosacáridos funcionalizados con alquilaminos se acoplaron con espaciadores de cadena mixta funcionalizados con un grupo isotiocianato llevando a cabo un **acoplamiento tiourea** (Figura 4C).

La elección de la naturaleza del espaciador es de vital importancia para la síntesis de gliconanopartículas. Según la experiencia de nuestro laboratorio, la lipofilia del espaciador es esencial para la formación y el control de la composición química de las GNPs, que requiere que el grupo tiol vaya siempre unido a una cadena alifática que permita la formación de monocapas autoensambladas en su unión a la superficie de oro. La naturaleza del espaciador influye en el mayor empaquetamiento o accesibilidad al carbohidrato una vez unido a la superficie de oro.<sup>4, 5</sup>

Los neoglicoconjugados preparados pueden agruparse en tres familias diferentes dependiendo del método de conjugación elegido para la síntesis del neoglicoconjugado. La primera familia se ha preparado por glicosidación directa del monosacárido de manosa convenientemente protegido (Figura 3A). La segunda y tercera familia se han preparado siguiendo una estrategia en dos pasos: síntesis de series de aminoalquil derivados de (oligo)manosa, y posterior acoplamiento peptídico (Figura 3B) o tiourea (Figura 3C) con espaciadores funcionalizados respectivamente con un grupo carboxílico o un grupo isotiocianato.

Con estos neoglicoconjugados se han preparado las correspondientes familias de *manno*-GNPs (Figura 1, Figura 5). La primera familia de GNPs

(Figura 5A) se ha preparado incorporando distintas densidades (5, 15, 30, 100%) de los neoglicoconjugados obtenidos por glicosidación directa. Para la síntesis de gliconanopartículas de densidad variable en (oligo) manósido se utilizó el neoglicoconjugado de 2'-mercaptoetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (**GlcC<sub>2</sub>**) como componente inerte o de relleno “no antigénico”.<sup>6,7</sup> La segunda familia de GNPs (Figura 5B) incorpora los neoglicoconjugados preparados por acoplamiento peptídico. La mayoría contienen aproximadamente un 50-66% del glicoconjugado y el resto es el espaciador ácido 29-mercapto-3,6,9,12,15,18-hexaoxonacontan-1-oico (espaciador carboxílico). La tercera familia (Figura 5C) incorpora en distintas densidades (10, 50, 100%) los neoglicoconjugados obtenidos por acoplamiento tiourea, y el resto corresponde a los glicoconjugados **GlcC<sub>2</sub>** o 5'-mercaptopentil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (**GlcC<sub>5</sub>**). De esta familia se han preparado también GNPs que incorporan un espaciador fluorescente, preparado por acoplamiento de un espaciador con un derivado de fluoresceína. Como control negativo también se han preparado nanopartículas que incorporan 100% densidad del espaciador carboxílico o de los glicoconjugados de glucosa **GlcC<sub>2</sub>** o **GlcC<sub>5</sub>** (Figura 5D).



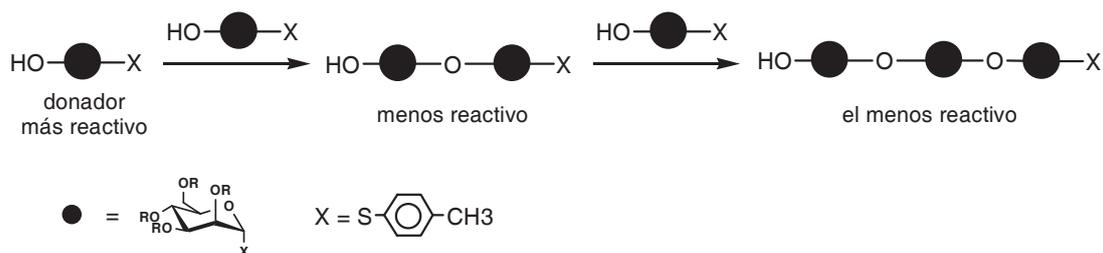
**Figura 5.** Familias de *manno*-GNPs con distinta densidad en (oligo)manósidos y GNPs de control sintetizadas en esta Tesis Doctoral.

## 2. Resultados y discusión

### 2.1. Síntesis de oligosacáridos de manosa

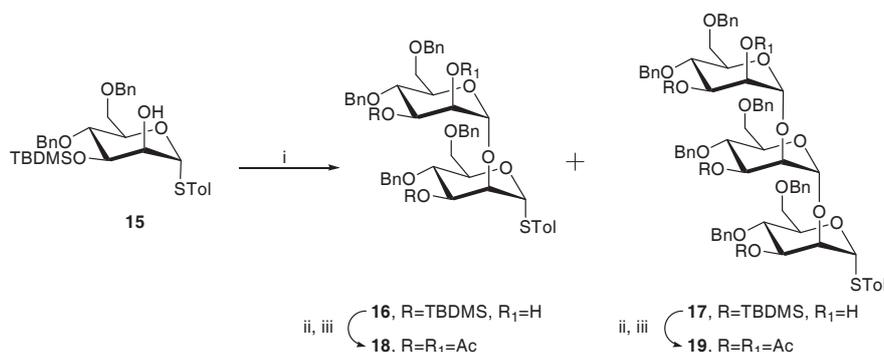
La síntesis de los oligosacáridos empleados en esta Tesis se ha llevado a cabo mediante la metodología de Wong,<sup>2</sup> que permite la autocondensación en

un solo paso (one-pot) partiendo de un solo monosacárido convenientemente protegido (Figura 6). Mediante esta estrategia, el monómero más reactivo es capaz de autocondensarse formando un dímero que es menos reactivo, y este dímero a su vez, podrá volver a condensarse con el monómero formando un trímero que será aún menos reactivo. La síntesis de Wong ha sido aplicada a la síntesis de varios oligosacáridos de importancia biológica como son Globo H,<sup>8</sup> Lewis Y,<sup>9</sup> oligómeros de N-acetilactosamina,<sup>10</sup> y fucosil GM1.<sup>11</sup>



**Figura 6.** Esquema de auto-condensación en un solo paso para la síntesis de (oligo)manósidos según Wong y col.<sup>2</sup>

La síntesis del monosacárido de partida 1-S-tolil-3-O-*tert*butildimetilsilil-4,6-di-O-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosido (**15**) (Esquema 1) se realizó siguiendo la ruta sintética en siete pasos descrita por Wong y col.<sup>2, 12</sup> La metodología de Wong permite que en la reacción de glicosidación el monosacárido de partida **15** actúe como donador y como aceptor en una reacción de autocondensación formando el dímero **16**, que es menos reactivo. Éste actuará como aceptor de glicosilo para otra molécula del donador **15** permitiendo la formación del trímero **17**. En estas glicosilaciones se emplea N-iodosuccinimida (NIS) y ácido trifluorometanosulfónico (TfOH) como promotores, y la temperatura y el tiempo son las claves para el éxito y el grado de condensación de la reacción. La autocondensación del aceptor **15** en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco en presencia de NIS/TfOH a  $-40^\circ\text{C}$  nos proporcionó, en un solo paso, una mezcla del disacárido **16** (40%) y del trisacárido **17** (27%) (Esquema 1).



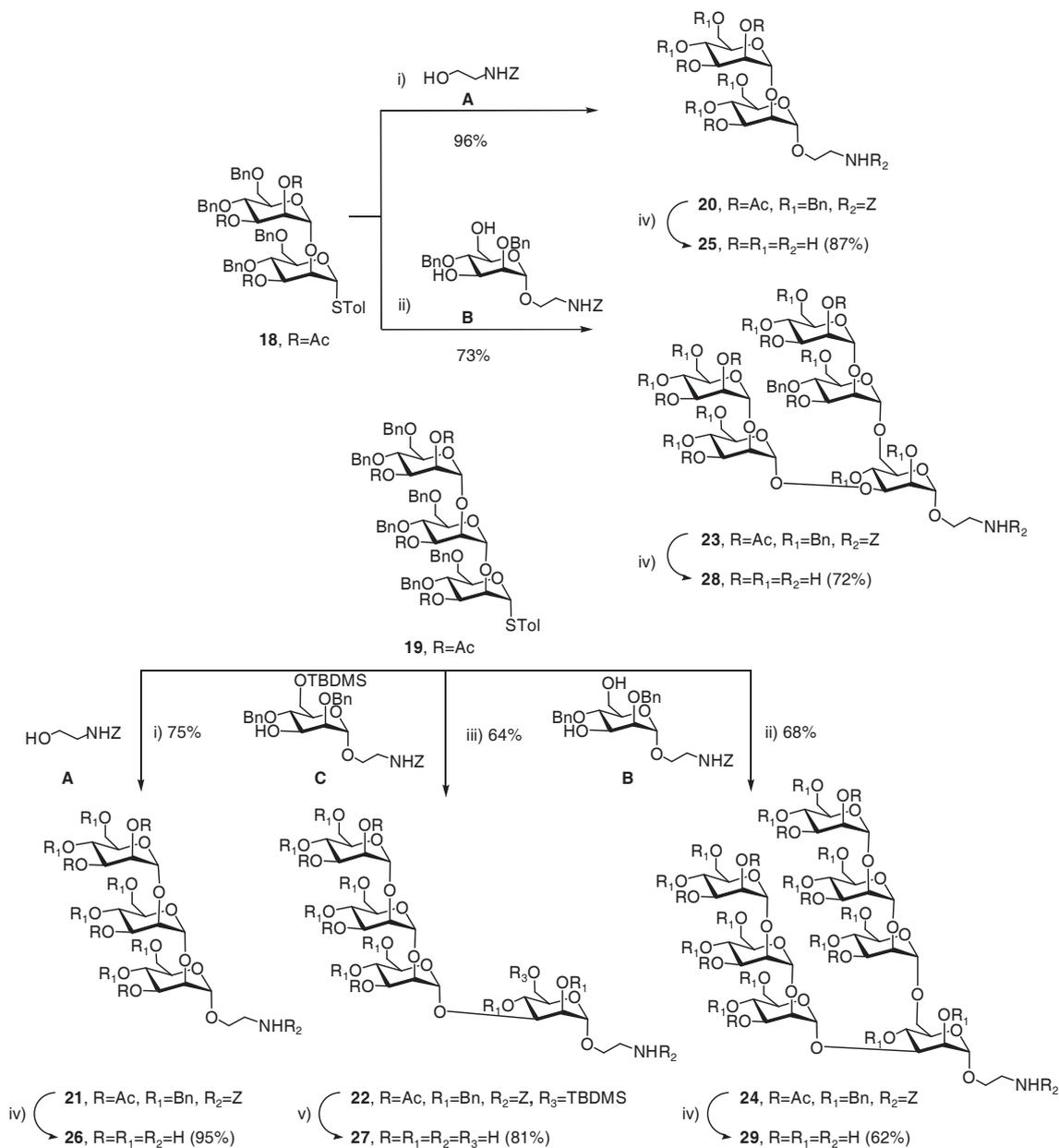
**Esquema 1.** Reactivos y condiciones: i) NIS, TfOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-40^\circ\text{C}$ , 68% global; ii) TBAF, THF, t.a., 2h; iii)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . 49% y 66% respectivamente (dos pasos).

Desprotección de los grupos *tert*-butildimetilsililo con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) y posterior acetilación proporcionó el disacárido **18** y el trisacárido **19** respectivamente con buenos rendimientos. Estos dos compuestos serán los donadores de glicosilo en las reacciones de glicosilación con los aceptores convenientemente protegidos 2'-*N*-benciloxicarbonilaminoetanol (**aceptor A**), 2'-*N*-benciloxicarbonilaminoetil 2,4-di-*O*-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosido (**aceptor B**) y 2'-*N*-benciloxicarbonilaminoetil 2,4-di-*O*-bencil-6-*O*-*tert*butildimetilsilil- $\alpha$ -D-manopiranosido (**aceptor C**) (Esquema 2).

Para la síntesis del aceptor **B**, que presenta dos hidroxilos libres en posición 3 y 6, y del aceptor **C**, que presenta un hidroxilo libre en posición 3, se siguió también la estrategia descrita por Wong,<sup>2</sup> pero se introdujo una cadena con dos átomos de carbono en lugar de cinco (ver esquema en parte experimental) en un intento de mejorar los rendimientos y de establecer analogías con la familia **B** de neoglicoconjugados.

El Esquema 2 muestra la ruta sintética que se ha seguido para la obtención de los oligosacáridos di- (**25**), tri- (**26**), tetra- (**27**), penta- (**28**), y heptamanósidos (**29**). Glicosidación de **18** con el aceptor 2-(*N*-benciloxicarbonil)aminoetanol proporcionó el disacárido **20** con un rendimiento excelente del 96%. Desacetilación en condiciones de Zemplen<sup>13</sup> seguida por

eliminación mediante hidrogenación catalítica sobre Pd/C de los grupos bencilos y benciloxycarbonil dio el disacárido desprotegido **25** con 87% de rendimiento.



**Esquema 2.** Síntesis de los 2-aminoetil oligomanósidos. Reactivos y condiciones: i) HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHZ, NIS, TfOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -20°C ii) aceptor **B**, NIS, TfOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -20/-10°C iii) aceptor **C**, NIS, TfOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -10°C iv) MeONa, MeOH seguida por H<sub>2</sub>, Pd-C; v) AcOH 80%; después MeONa, MeOH seguida por H<sub>2</sub>, Pd-C.

Para obtener el derivado **26** se ha seguido la misma ruta glicosidando el trisacárido donador **19** con el mismo espaciador 2'-N-

benciloxicarbonilaminoetanol obteniéndose el compuesto **21** con 75% de rendimiento, que se desprotegió para dar el trisacárido **26** con rendimientos semicuantitativos.

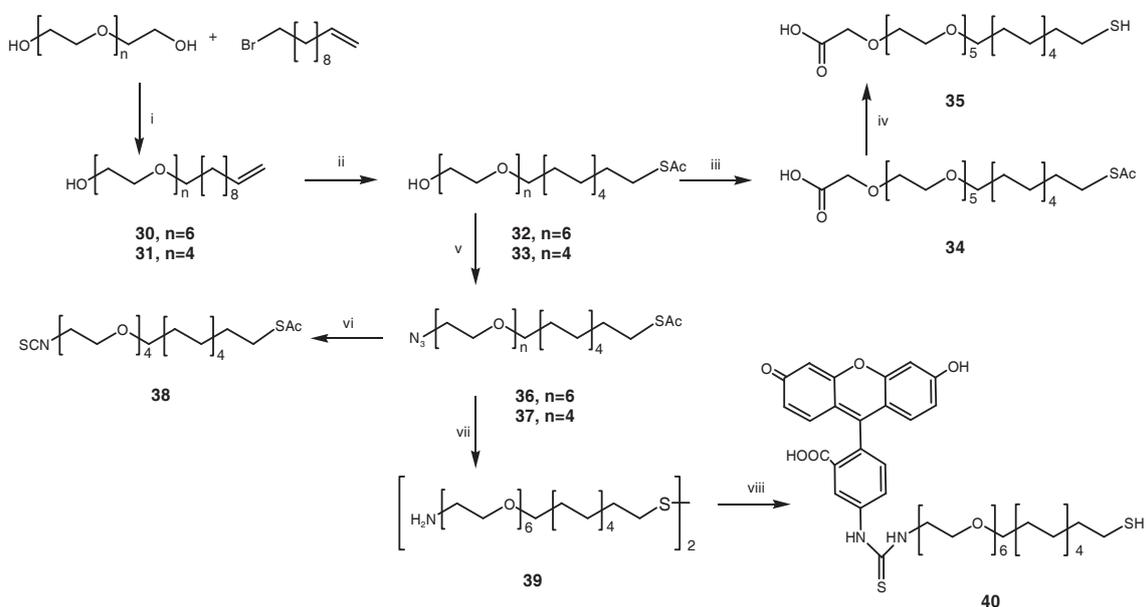
La glicosidación del hidroxilo en posición 3 del **aceptor C** con el trisacárido **19** a  $-10^{\circ}\text{C}$  proporcionó el tetrasacárido **22** con rendimientos del 64%, que por desprotección dió el tetrasacárido libre **27** con rendimientos del 81%

La reacción de glicosidación en posición 3 y 6 del **aceptor B** con los donadores **18** o **19** a  $-20$  o  $-10^{\circ}\text{C}$  respectivamente, nos permitió obtener el pentasacárido **23** y el heptasacárido **24**, que por desprotección total nos condujo al pentasacárido **28** y al heptasacárido **29** con buenos rendimientos.

## 2.2. Síntesis de espaciadores.

Para la síntesis de los neoglicoconjugados hemos utilizado lo que denominamos espaciadores de cadena mixta que están constituidos por un derivado de etilenglicol y una cadena alifática de once átomos de carbono (Esquema 3). Su síntesis comienza con la conjugación de hexaetilenglicol o tetraetilenglicol con 11-bromo undeceno en NaOH al 50%<sup>14, 15</sup> para dar las correspondientes olefinas **30** y **31**. La adicción radicalaria de ácido tioacético al doble enlace se realizó en THF empleando AIBN como catalizador. De este modo se obtienen los correspondientes tioacetil derivados **32** y **33** con buenos rendimientos. Sus espectros de  $^1\text{H}$  RMN confirman las estructuras de estos compuestos donde las señales correspondientes al doble enlace ( $\delta \approx 5.8$ . ppm) desaparecen tras la adicción de tioacético al doble enlace, con la consiguiente aparición de un singlete característico que corresponde al metilo del tioacetato entorno a  $\delta \approx 2.3$  ppm y un triplete a  $\delta \approx 2.8$  ppm que corresponde al metileno unido al azufre. El compuesto **32** se empleó posteriormente como aceptor de glicosilo en la reacción de glicosidación con el bromuro de acetil manosa para obtener uno de los neoglicoconjugados de manosa de la familia A (Figura 3A).

La oxidación del alcohol primario del espaciador **32** a grupo carboxílico con el reactivo de Jones <sup>16</sup> proporcionó el espaciador **34** con rendimientos aceptables. La aparición de un singlete característico a  $\delta \approx 3.93$  ppm correspondiente al metileno unido al grupo carbonilo, y una señal a  $\delta \approx 177.3$  ppm que corresponde al carbonilo C=O en sus espectros de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN confirman la estructura. La desacetilación en condiciones Zemplén <sup>13</sup> del espaciador **34** proporcionó el correspondiente disulfuro **35** con buenos rendimientos. El triplete a 2.70 ppm correspondiente al metileno unido al átomo de azufre indica la formación del grupo disulfuro (S-S) y excluye al grupo tiol (S-H) que aparece a campo más alto, alrededor de 2.48 ppm.



**Esquema 3.** Síntesis de espaciadores. Reactivos y condiciones: i) NaOH aq (50%), 100°C 66%; ii) CH<sub>3</sub>COSH, AIBN, THF, 100°C, 86%; iii) CrO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50%; iv) MeONa 100%; v) NaN<sub>3</sub>, PPh<sub>3</sub>, BrCCl<sub>3</sub>, DMF, 50°C; vi) PPh<sub>3</sub>, CS<sub>2</sub>, 77%; vii) PPh<sub>3</sub>, HCl 0.2M, THF, 86%; viii) FITC, NEt<sub>3</sub>, MeOH.

El espaciador **34**, funcionalizado con un grupo carboxílico se ha utilizado para la síntesis de los glicoconjugados de (oligo)manosa de la familia B (Figura 3B) mediante acoplamiento peptídico entre los correspondientes amino derivados.

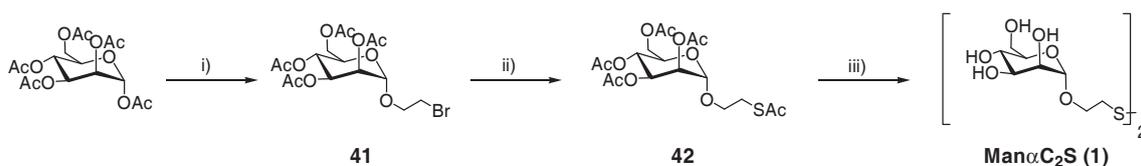
Para la síntesis de glicoconjugados de (oligo)manósidos de la familia C (Figura 3C) que presentan un grupo tiourea se ha preparado el espaciador **38**, funcionalizado con un grupo isotiocianato (Esquema 3). La conversión del grupo alcohol de **32** y **33** en grupo azida para dar los espaciadores **36** y **37** se llevó a cabo mediante una variante de la reacción de Mitsunobu,<sup>17</sup> que utiliza trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) y bromotriclorometano (BrCCl<sub>3</sub>) para formar primero el intermedio bromo derivado, que sin purificación se sometió a la reacción de sustitución nucleofílica con azida sódica.<sup>18, 19</sup> La estructura de los espaciadores **36** y **37** se confirmó por la aparición de un triplete a  $\delta \approx 3.39$  ppm en su espectro <sup>1</sup>H RMN que corresponde al metileno unido a la azida y por una señal a 50.6 ppm en su espectro de <sup>13</sup>C RMN su corresponde a dicho metileno. La aparición de una banda  $\nu_{\max}$  a 2104 cm<sup>-1</sup> en su espectro de infrarrojo confirma la presencia del grupo azida. Para la síntesis del espaciador isotiocianato no fue necesario aislar la correspondiente azida, y el crudo se trató directamente con disulfuro de carbono (CS<sub>2</sub>) y PPh<sub>3</sub> obteniéndose el espaciador **38** con buenos rendimientos.<sup>20</sup> En su espectro de <sup>13</sup>C RMN una señal a  $\delta \approx 132.0$  ppm que corresponde al grupo isotiocianato N=C=S y otra señal a  $\delta \approx 45.1$  ppm correspondiente al metileno contiguo al grupo isotiocianato confirmaron su estructura.

Para la síntesis del espaciador fluorescente **40** se ha utilizado una metodología diferente a la descrita anteriormente por nuestro grupo de investigación,<sup>3</sup> en la que una reducción de Staudinger en medio ácido, transforma directamente la azida **36** en la amina **39** y desprotege el grupo tioacetato en un solo paso.<sup>21</sup> La presencia del grupo amino en el espaciador **39** se confirmó por la aparición de un multiplete a  $\delta \approx 3.17$  ppm que corresponde al metileno en alfa al grupo amino. La formación del disulfuro se puso de manifiesto por la aparición de un triplete a  $\delta \approx 2.70$  ppm que corresponde al metileno unido a un grupo disulfuro. El acoplamiento tiourea<sup>22</sup> de la amina **39** con el derivado isotiocianato de la fluoresceína se llevó a cabo tamponando la amina con bicarbonato de sodio (pH 8-9) durante 12 horas antes de adicionar el derivado isotiocianato. El espaciador fluorescente **40** se ha caracterizado por sus espectros de <sup>1</sup>H RMN y de <sup>13</sup>C RMN.

### 2.3. Síntesis de neoglicoconjugados por glicosidación directa

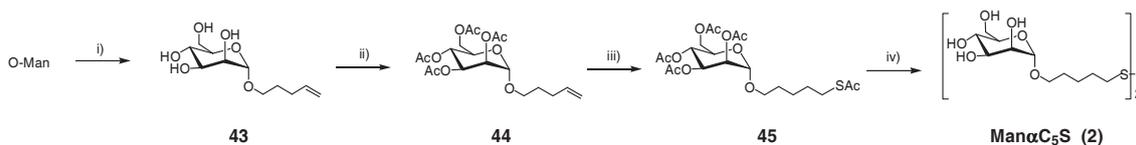
La síntesis de los neoglicoconjugados de manosa de la familia A (Figura 3A) se llevó a cabo por glicosidación directa de los aceptores de glicosilo **32**, 4-pentenol o 2-bromo etanol (Figura 4A) en presencia de un promotor.

Para la síntesis del neoglicoconjugado **1**, funcionalizado con un espaciador tioetilo, se empleó un método en tres pasos distinto (Esquema 4) al ya descrito en la literatura para este compuesto.<sup>23</sup> Partiendo del pentaacetato de manosa se obtuvo el bromoetil derivado **41** con  $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$  como promotor. Desplazamiento nucleofílico del bromuro con tioacetato de potasio en DMF nos proporcionó el compuesto **42**. Finalmente, la desacetilación en condiciones Zemplén proporcionó el neoglicoconjugado **1** con buenos rendimientos.



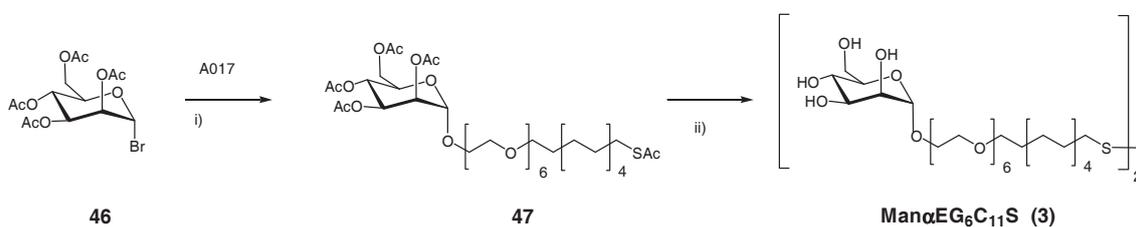
**Esquema 4.** Síntesis del neoglicoconjugado **1**. Reactivos y condiciones: i)  $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 71%; ii)  $\text{KSAc}$ , DMF, 93%; iii)  $\text{MeONa}$ ,  $\text{MeOH}$ , cuantitativo.

Para la síntesis del neoglicoconjugado **2**<sup>24</sup> funcionalizado con tiopentanil (Esquema 5) se utilizó el método de Fraser-Reid<sup>25</sup> inspirado en la glicosidación de Fisher,<sup>26</sup> obteniendo el derivado **43** con buenos rendimientos. La acetilación con anhídrido acético en piridina nos proporcionó el derivado **44**. La adición radicalaria de ácido tioacético al doble enlace proporciona el correspondiente tioderivados **45** cuyo espectro de protón mostró la señal de un singlete característico que corresponde al grupo metilo del tioacetato entorno a  $\delta \approx 2.32$  ppm y un triplete que corresponde al metileno unido al azufre a  $\delta \approx 2.87$  ppm. La desacetilación en condiciones Zemplén proporcionó cuantitativamente el neoglicoconjugado **2** como disulfuro.



**Esquema 5.** Síntesis del neoglicoconjugado **2**. Reactivos y condiciones: i) 4-penten-1-ol, CSA, 90-100°C, 69%; ii)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , DMAP, py, 97%; iii) AcSH, AIBN, THF, reflujo, 74%; iv) MeONa, MeOH, cuantitativo.

Finalmente, la síntesis del neoglicoconjugado **3** se realizó en dos pasos según el Esquema 6. El compuesto **47** se obtuvo por glicosidación directa<sup>27</sup> empleando la acetobromomanosa<sup>28</sup> **46** como donador de glicosilo y el espaciador **32** como aceptor en presencia del promotor  $\text{Hg}(\text{CN})_2$ . El compuesto aislado **47** se caracterizó por su espectro de  $^1\text{H}$  RMN en el que aparecen todas las señales que corresponden a la cadena mixta (ver parte experimental) que muestra. El derivado acetilado **47** se desprotegió proporcionando el neoglicoconjugado **3** como tiol con buenos rendimientos. La estructura de estos compuestos se caracterizó por sus espectros de  $^1\text{H}$  RMN.



**Esquema 6.** Síntesis del neoglicoconjugado **3**. Reactivos y condiciones: i)  $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 53%; ii) MeONa, MeOH, cuantitativo.

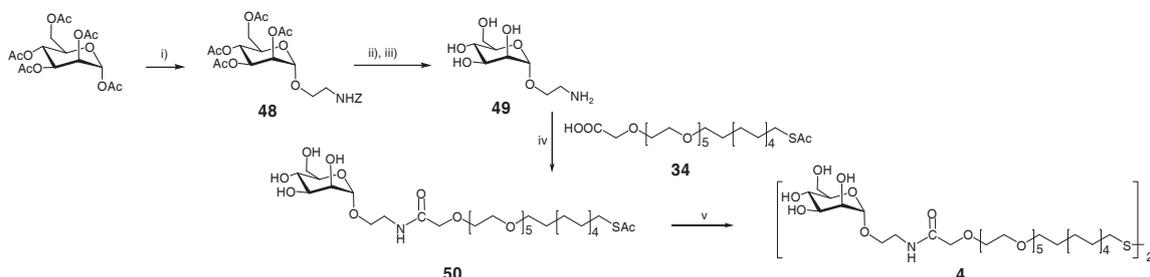
Los neoglicoconjugados de glucosa **GlcC<sub>2</sub>** o **GlcC<sub>5</sub>**, muy utilizados en nuestro laboratorio, se prepararon por glicosidación directa de la glucosa convenientemente protegida y los donadores 2-bromoetanol o 5-pentenol.<sup>6, 7, 29</sup>

## 2.4. Síntesis de neoglicoconjugados por acoplamiento peptídico.

La síntesis de los neoglicoconjugados de (oligo)manosa de la familia B se realizó mediante acoplamiento peptídico (Figura 4B) entre el correspondiente amino derivado de manosa y el espaciador **34** en presencia de

1-hidroxibenzotriazol (HOBT) y diisopropilcarbodiimida (DIC) en DMF.<sup>30</sup> La desprotección en condiciones Zemplen proporcionó los correspondientes neoglicoconjugados (Figura 3B).

Para poner a punto las condiciones de este acoplamiento se utilizó el etilamino derivado de manosa (**48**)<sup>31,32,33</sup> que se preparó según la ruta que indica el Esquema 7. El compuesto **48** se obtuvo por glicosidación directa de manosa peracetilada con 2-(*N*-benciloxycarbonil)aminoetanol en presencia de  $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$  como promotor. El compuesto **49** se obtuvo por desprotección de los grupos acetilos seguido por la hidrogenación del grupo benciloxycarbonilo (*Z*) empleando Pd/C como catalizador. Acoplamiento peptídico entre la amina **49** y el espaciador **34** y la purificación por columna de Sephadex LH20 del crudo de reacción nos permitió obtener el tioglicoconjugado **50** con buenos rendimientos y alto grado de pureza. Por desprotección del tioacetilo en condiciones Zemplen se obtuvo el neoglicoconjugado como una mezcla de disulfuro y tiol que se dejó oxidar totalmente al disulfuro **4** (Esquema 7).



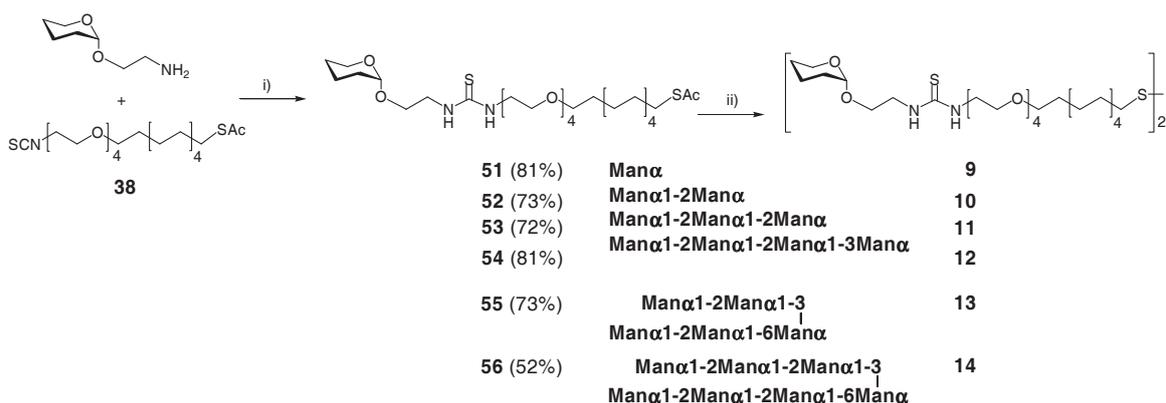
**Esquema 7.** Síntesis del neoglicoconjugado **4**. Reactivos y condiciones: i)  $\text{NHZCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , reflujo; ii)  $\text{MeONa}$ ,  $\text{MeOH}$ ; iii)  $\text{H}_2$ , 10% Pd/C,  $\text{MeOH}$ , (3 pasos, 70%); iv) HOBT, DIC,  $\text{NEt}_3$ , DMF, 88%; v)  $\text{MeONa}$ ,  $\text{MeOH}$ , cuantitativo.

La síntesis de los neoglicoconjugados **5**, **6**, **7** y **8** se llevó a cabo a partir de las correspondientes sales de acetato de los propilamino oligomanósidos proporcionados por el consorcio EMPRO<sup>1</sup> y el espaciador **34** mediante acoplamiento peptídico (Esquema 8). El propilaminoderivado en exceso se eliminó por purificación por Sephadex LH20. La integral del singlete del grupo acetilo ( $\delta \approx 2.3$  ppm) en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN fue en todos los casos menor de la esperada, indicando que en este caso, las condiciones de reacción habían



ya descrito en la literatura <sup>34</sup> tiene lugar con rendimientos casi cuantitativos cuando se emplea trietilamina como base.

La síntesis de los neoglicoconjugados **9-14** se llevó a cabo por acoplamiento entre los (oligo)manósidos **49, 25, 26, 27, 28** y **29** y el espaciador isotiocianato **38** (Esquema 9). El acoplamiento tiourea se puso a punto con el 2-aminoetil manósido **49**. Una vez encontradas las mejores condiciones se llevó a cabo el acoplamiento de disacárido **25** y del tetrasacárido **27** en metanol en presencia de trietilamina. Estas reacciones son rápidas y suceden con buenos rendimientos para estos tres neoglicoconjugados. El neoglicoconjugado **51** del monosacárido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice obteniendo un rendimiento del 81 %, mientras que los neoglicoconjugados **52** y **54** del disacárido y del tetrasacárido se purificaron por columna de Sephadex LH20 para dar rendimientos del 73% y 81% respectivamente.



**Esquema 9.** Síntesis de neoglicoconjugados por acoplamiento tiourea. Reactivos y condiciones: i)  $\text{NEt}_3$ , MeOH; ii)  $\text{NEt}_3$ ,  $^i\text{PrOH}:\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  1:1:1.

Desafortunadamente, estas condiciones no funcionaron en la reacción de acoplamiento con el tri- (**26**), penta- (**28**) y heptamanósido (**29**) debido a su baja solubilidad en metanol. La reacción en tampón  $\text{NaHCO}_3$  (pH~9) <sup>34</sup> que se empleó para acoplar la fluoresceína isotiocianato con el espaciador amino, tampoco funcionó. El tri-, penta- y heptamanósido se acoplaron con el espaciador isotiocianato utilizando como disolvente una mezcla de agua, isopropanol y acetonitrilo en proporción 1:1:1 y ajustando el pH~8-9 con trietilamina, en la que tanto los oligosacáridos como el espaciador son solubles.

Estas reacciones evolucionan lentamente pero los rendimientos son aceptables. En estos tres casos, la purificación se llevó a cabo evaporando el disolvente, y triturando el crudo con dietil eter para eliminar el espaciador que no ha reaccionado. Finalmente, purificación por columna cromatográfica de Sephadex LH20 dio el trisacárido **53**, el tetrasacárido **54** y el heptasacárido **56** con rendimientos del 72%, 73% y 52% respectivamente.

Desprotección del grupo tioacetato de todos los neoglicoconjugados proporcionó los compuestos **9**, **10**, **11**, **12**, **13** y **14** que fueron aislados como mezclas de disulfuro y tiol (Esquema 9).

## 2.6. Síntesis y caracterización de *manno*-gliconanopartículas de oro.

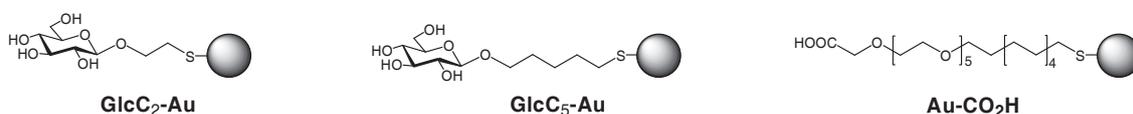
Para la preparación de nanoclústeres biofuncionales de oro, se utilizó una reacción en un solo paso que fue puesta a punto en nuestro laboratorio<sup>35</sup> inspirada en el procedimiento de Brust.<sup>36, 37</sup> El **procedimiento general** para la preparación de gliconanopartículas consiste en añadir una disolución acuosa de ácido tetracloroaurico (0.025 M, 1 equiv) sobre una disolución de los disulfuros (0.012 M, 5.5-1 equiv) en MeOH. A continuación se añade lentamente bajo agitación una disolución acuosa de NaBH<sub>4</sub> (1N, 22 equiv). La mezcla de reacción se agita durante 2 horas más, y después el sobrenadante se eliminó por decantación o concentración a sequedad. El residuo se disolvió en la mínima cantidad de agua NANOPURE y se purificó por filtración a través de una membrana de corte MW 10000 o mediante diálisis con una membrana de corte MW 3500 para eliminar las sales y el exceso de tioles. La disolución acuosa se liofilizó para dar la GNP como un sólido de color variable (desde beige hasta marrón) dependiendo del tamaño del cluster de oro. Todas las gliconanopartículas se caracterizaron por resonancia magnética de protón (<sup>1</sup>H RMN), espectroscopía ultravioleta y visible (UV-vis), microscopía de transmisión electrónica (TEM) y análisis elemental.

El tamaño de las nanopartículas de oro normalmente varía en función de la relación tiol:oro. Normalmente se añade un exceso de tiol para impedir el crecimiento de cristales de oro y estabilizar el núcleo mediante recubrimiento

con tioles. Las nanopartículas sintetizadas se obtuvieron a partir de una relación tiol:oro de 5.5-2:1 equivalentes. Proporciones menores condujeron a GNPs de mayor tamaño que resultaron insolubles en medio acuoso. Las nanopartículas que se obtienen por esta metodología presentan tamaños muy pequeños, normalmente entre 1 y 2 nanómetros.

Se han preparado tres familias distintas de *manno*-gliconanopartículas (*manno*-GNPs) de oro (Figura 1 y Figura 5) dependiendo del método de conjugación empleado para obtener el neoglicoconjugado, ya sea por **glicosidación directa, acoplamiento amídico o acoplamiento tiourea**. Las gliconanopartículas preparadas incorporan los neoglicoconjugados de manosa en densidades que van desde 100 hasta 5%, siendo el porcentaje restante el espaciador carboxílico **35** o los neoglicoconjugados de glucosa **GlcC<sub>2</sub>** o **GlcC<sub>5</sub>** (Figura 1). También se han preparado una serie de *manno*-GNPs de la familia C marcadas fluorescentemente con el espaciador **40** (Esquema 3) para poder estudiar la interacción nanopartícula-célula mediante fluorescencia.

Como sistema de control para los estudios de inhibición por SPR y los estudios con modelos celulares que se van a llevar a cabo con todas las GNPs preparadas y que constituyen los siguientes capítulos de esta Tesis Doctoral, se han preparado también gliconanopartículas funcionalizadas con el neoglicoconjugado de glucosa GlcC<sub>5</sub>, GlcC<sub>2</sub> o el espaciador carboxílico **35** (Figura 7).

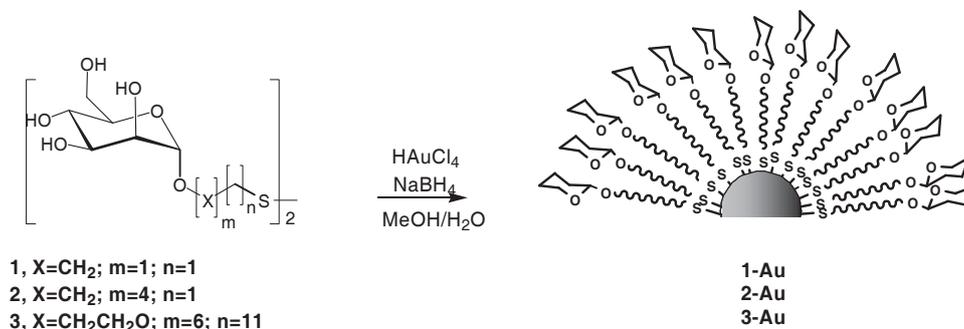


**Figura 7.** Nanopartículas de oro preparadas como sistemas de control.

### 2.6.1. Síntesis de *manno*-GNPs con neoglicoconjugados de manosa sintetizados por glicosidación directa. Familia A.

La reducción de la sal de oro (HAuCl<sub>4</sub>) para la obtención de las gliconanopartículas se realizó en presencia de un exceso (5.5 equiv) de los

neoglicoconjugados **1**, **2** y **3** de la familia A (Figura 1A) descritos en la sección anterior. Como reductor se empleó un gran exceso de borhidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ). El Esquema 10 resume la síntesis de las gliconanopartículas **1-Au**, **2-Au** y **3-Au** de 100% densidad en carbohidrato.

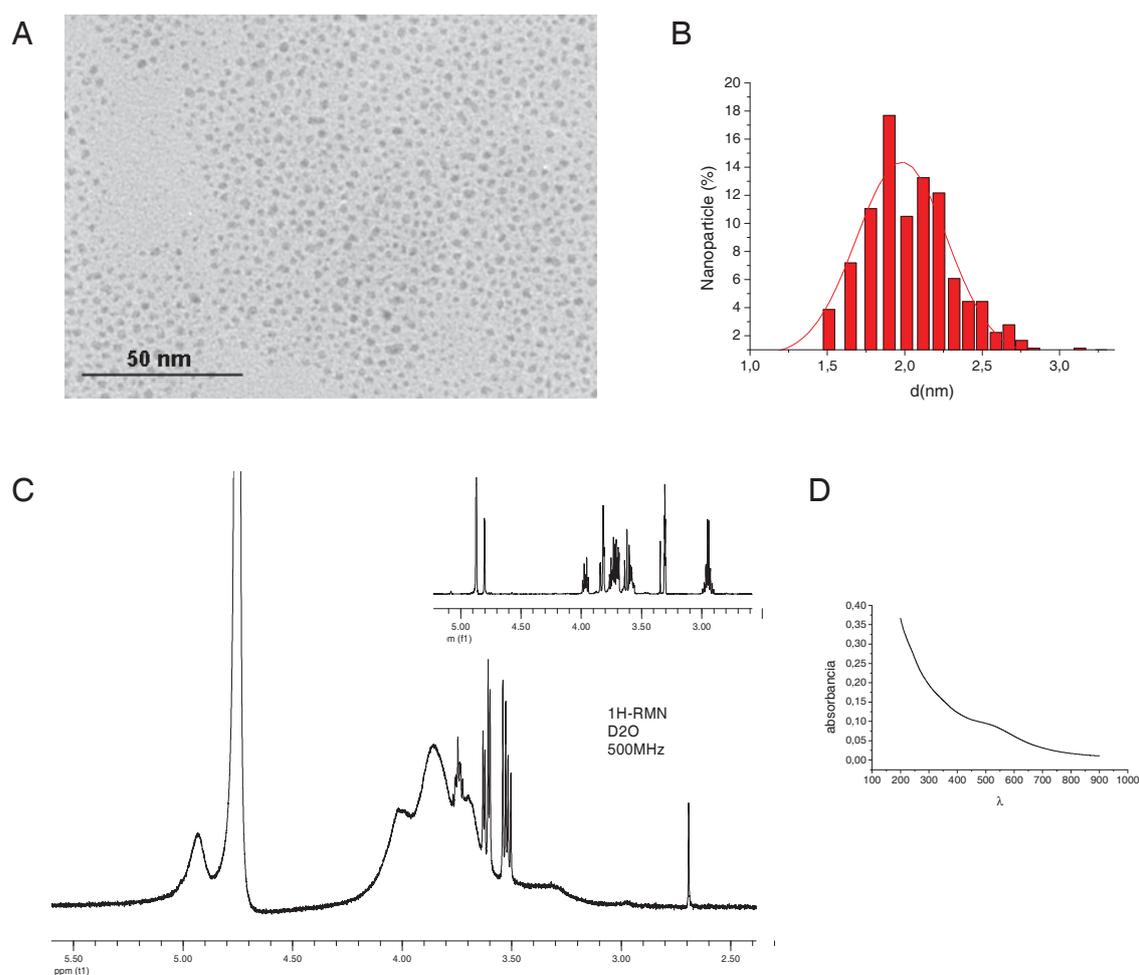


**Esquema 10.** Síntesis de *manno*-GNPs **1-Au**, **2-Au** y **3-Au** funcionalizadas con los neoglicoconjugados de manosa **1**, **2** y **3**.

La caracterización de todas las gliconanopartículas preparadas se llevó a cabo por TEM, <sup>1</sup>H RMN y UV visible. Un ejemplo de caracterización se muestra en la Figura 8 para la nanopartícula **1-Au**.

**1-Au** presenta una distribución estrecha y homogénea de tamaños con un diámetro medio de  $2 \pm 0.6$  nm, que corresponde según los datos de la bibliografía<sup>38, 39</sup> a un cluster de oro de 225 átomos. El análisis elemental de **1-Au** confirma una relación de 121 moléculas del glicoconjugado **1** por 225 átomos de oro, lo que corresponde a un peso molecular aproximado de 82 kD. Más adelante veremos como este cálculo no es tan fácil de aplicar cuando las GNPs tienen distintas densidades.

Su espectro de <sup>1</sup>H RMN muestra el ensanchamiento característico de las señales del neoglicoconjugado en comparación con el neoglicoconjugado libre. Este ensanchamiento es característico de macromoléculas, pero en este caso la unión al cluster de oro hace que la señal del metileno unido al azufre desaparezca totalmente.



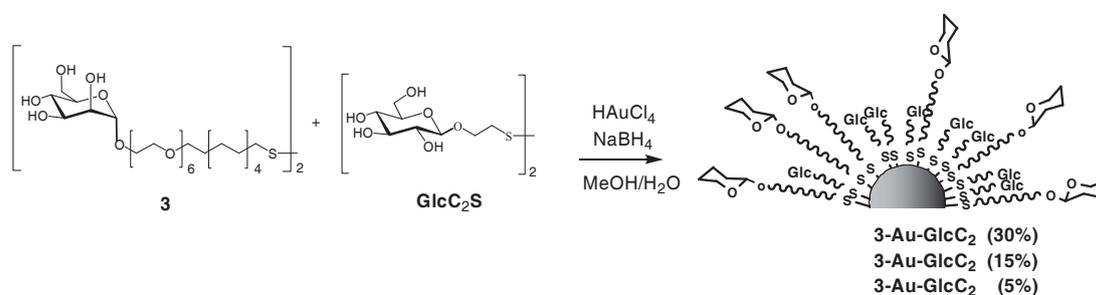
**Figura 8.** Caracterización de **1-Au**: A) Micrografías de TEM; B) Histograma; C) Espectros de  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{D}_2\text{O}$  de la nanopartícula (inferior) y su correspondiente neoglicoconjugado en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (superior); D) Espectro de UV-visible en agua NANOPURE.

La nanopartícula **1-Au** presenta una banda de plasmón de superficie entorno a 520 nm en su espectro de UV-Vis, que, como veremos más adelante, está relacionado con el tamaño de la GNP y puede desplazarse a mayores longitudes de onda al aumentar el tamaño o incluso desaparecer cuando la nanopartícula tiene un tamaño muy pequeño.

Además de las GNPs de 100% densidad en neoglicoconjugado **3** hemos preparado GNPs que incorporan distintas densidades (5, 15, 30%) del mismo (Esquema 11) y que emplean **GlcC<sub>2</sub>** como relleno.

La influencia de la presentación y la densidad del ligando en los sistemas multivalentes naturales y sus interacciones con otros sistemas

biológicos es esencial para su actividad biológica. Contribuir a su esclarecimiento es uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral. La metodología general para la preparación de las nanopartículas híbridas o de densidad variable es la misma que se ha explicado anteriormente, pero empleando, en este caso, una mezcla de los disulfuros de (oligo)manosa y el correspondiente componente inerte, **GlcC<sub>2</sub>**, **GlcC<sub>5</sub>** en la proporción molar deseada. La relación de oligomanósidos y espaciador inerte introducido en la GNP se determina por integración de los protones anoméricos de la manosa respecto al protón anomérico de **GlcC<sub>2</sub>** o **GlcC<sub>5</sub>**, en los espectros de <sup>1</sup>H RMN del sobrenadante o de la GNP.<sup>7, 40</sup>



**Esquema 11.** Síntesis de *manno*-GNPs de distinta densidad con el neoglicoconjugado **3**.

Las nanopartículas **3-Au-GlcC<sub>2</sub> (5%)**, **3-Au-GlcC<sub>2</sub> (15%)** y **3-Au-GlcC<sub>2</sub> (30%)**, que incorporan el manósido **3** y el glucósido **GlcC<sub>2</sub>** en distintas densidades, presentan diámetros promedios de 1.4, 1.7 y 1.7 nm respectivamente mayores que el diámetro promedio de 1 nm de la nanopartícula **3-Au**, que incorpora **3** con 100% densidad. Los números entre paréntesis indican el porcentaje de (oligo)manósido en la nanopartícula. Los datos completos de la caracterización de las nanopartículas de la familia A se indican en la Tabla 1.

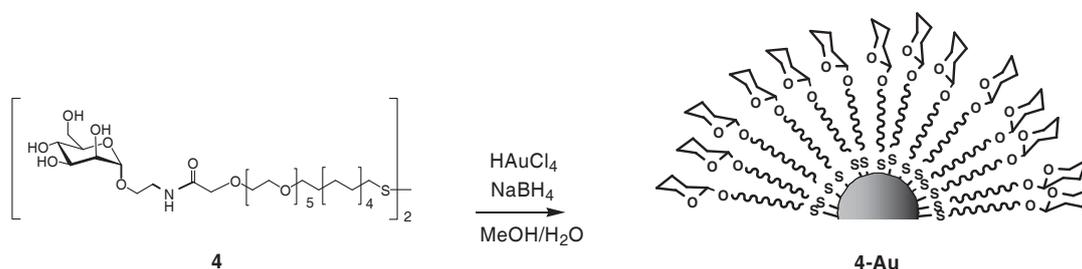
**Tabla 1.** Características físicas de las gliconanopartículas de manosa de la familia A

<i>Manno</i> -GNP	D(nm)	Nº de átomos de oro	Nº de cadenas total	Nº de cadenas de manosa	Fórmula molecular	MW
<b>1-Au<sup>a</sup></b>	2.0 ± 0.6	225	121	121	(C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>121</sub> Au <sub>225</sub>	82544
<b>2-Au<sup>a</sup></b>	1.6 ± 0.5	140	73	73	(C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>53</sub> Au <sub>140</sub>	48166
<b>3-Au</b>	2.1 ± 0.9	314	91	91	(C <sub>29</sub> H <sub>58</sub> O <sub>12</sub> S) <sub>91</sub> Au <sub>314</sub>	119161
<b>3-Au-GlcC<sub>2</sub> (5%)</b>	1.4 ± 0.4	116	53	3	(C <sub>29</sub> H <sub>58</sub> O <sub>12</sub> S) <sub>3</sub> (C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>50</sub> Au <sub>116</sub>	36689
<b>3-Au-GlcC<sub>2</sub> (15%)</b>	1.7 ± 0.5	201	71	10	(C <sub>29</sub> H <sub>58</sub> O <sub>12</sub> S) <sub>10</sub> (C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>61</sub> Au <sub>201</sub>	60466
<b>3-Au-GlcC<sub>2</sub> (30%)</b>	1.7 ± 0.5	201	71	21	(C <sub>29</sub> H <sub>58</sub> O <sub>12</sub> S) <sub>21</sub> (C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>50</sub> Au <sub>201</sub>	64760

El número de átomos de oro, las formulas moleculares y los pesos moleculares se calcularon según el tamaño del cluster de oro obtenido por TEM<sup>38</sup>. <sup>a</sup> Valores confirmados por análisis elemental.

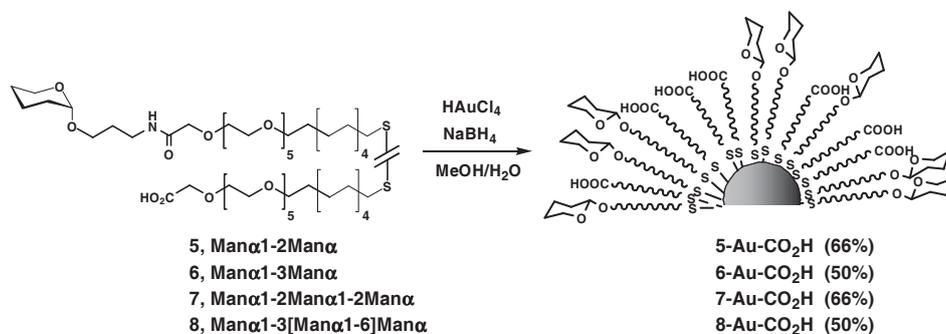
### 2.6.2. Síntesis de *manno*-GNPs con neoglicoconjugados de mono-, di- y trisacáridos unidos por acoplamiento peptídico. Familia B.

Con la misma metodología hemos preparado las GNPs de la familia B (Figura 1B). El neoglicoconjugado de manosa **4** se ha empleado para la síntesis de GNPs de 100% densidad en carbohidrato, obteniendo la GNP **4-Au** como un sólido de color beige claro (Esquema 12). Esta GNP, al igual que todas las que unen el carbohidrato al cluster de oro mediante un espaciador mixto, ya sea por acoplamiento peptídico o tiourea presentan diámetros promedio entorno a 1-1.2 nm, que corresponde a 79 átomos de oro, resultando unas de las nanopartículas más pequeñas sintetizadas en nuestro laboratorio.

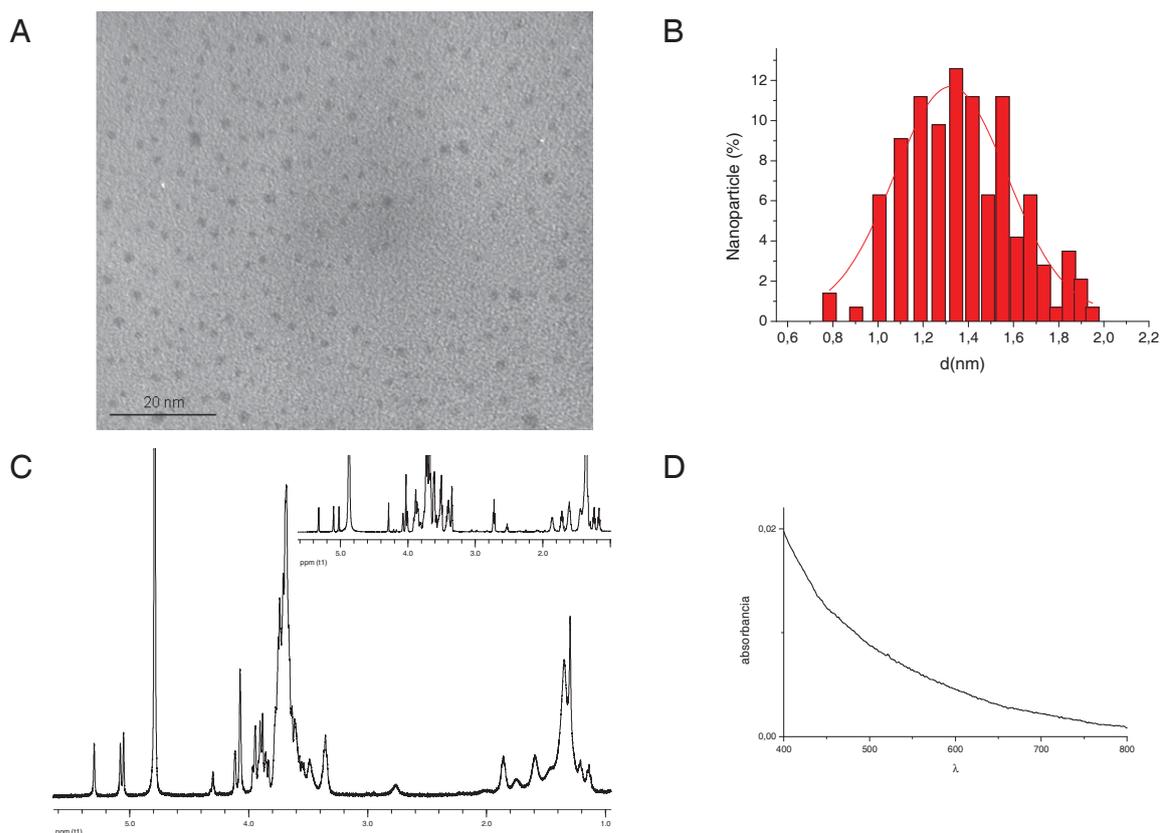
**Esquema 12.** Síntesis de la GNPs **4-Au** funcionalizada con el neoglicoconjugado **4**.

Las mezclas de los disulfuros mixtos **5**, **6**, **7** y **8** (Esquema 8) de di- y trisacáridos de manosa obtenidos por acoplamiento peptídico se han empleado en la síntesis de las nanopartículas **5-Au-CO<sub>2</sub>H** (66%), **6-Au-CO<sub>2</sub>H** (50%), **7-Au-**

**CO<sub>2</sub>H (66%) y 8-Au-CO<sub>2</sub>H (50%)** (Esquema 13) respectivamente. Debido a que las GNPs con espaciador mixto proporcionan espectros de <sup>1</sup>H RMN muy bien resueltos, se confirmó que la relación inicial de neoglicoconjugado:espaciador libre ~2:1 o ~1:1 se mantuvo en todas las GNPs preparadas, que fueron caracterizadas por las técnicas ya descritas.



**Esquema 13.** Síntesis de *manno*-GNPs de distinta densidad funcionalizadas con los disulfuros mixtos **5**, **6**, **7** y **8**.



**Figura 9.** Caracterización de **7-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**: A) Micrografías de TEM; B) Histograma; C) Espectros de <sup>1</sup>H RMN en D<sub>2</sub>O de la nanopartícula y la correspondiente mezcla de neoglicoconjugados en CD<sub>3</sub>OD; D) Espectro de UV-vis en agua NANOPURE.

La Figura 9 muestra la caracterización de la gliconanopartícula **7-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**, que incluye una micrografía de TEM y su correspondiente histograma, un espectro de <sup>1</sup>H RMN y un espectro de UV-visible.

**7-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)** presenta una distribución homogénea de tamaños con un diámetro promedio de 1.3 nm, lo que correspondería a 79 átomos de oro y 38 cadenas.<sup>38</sup> Su espectro de UV-Vis no presenta banda de plasmón de superficie, y su espectro de <sup>1</sup>H RMN indica que se conserva la proporción de la mezcla de disulfuros mixto **7** inicial en proporción ~2:1 se conserva en la GNP.

Los datos completos de la caracterización de las nanopartículas de la familia B se indican en la Tabla 2.

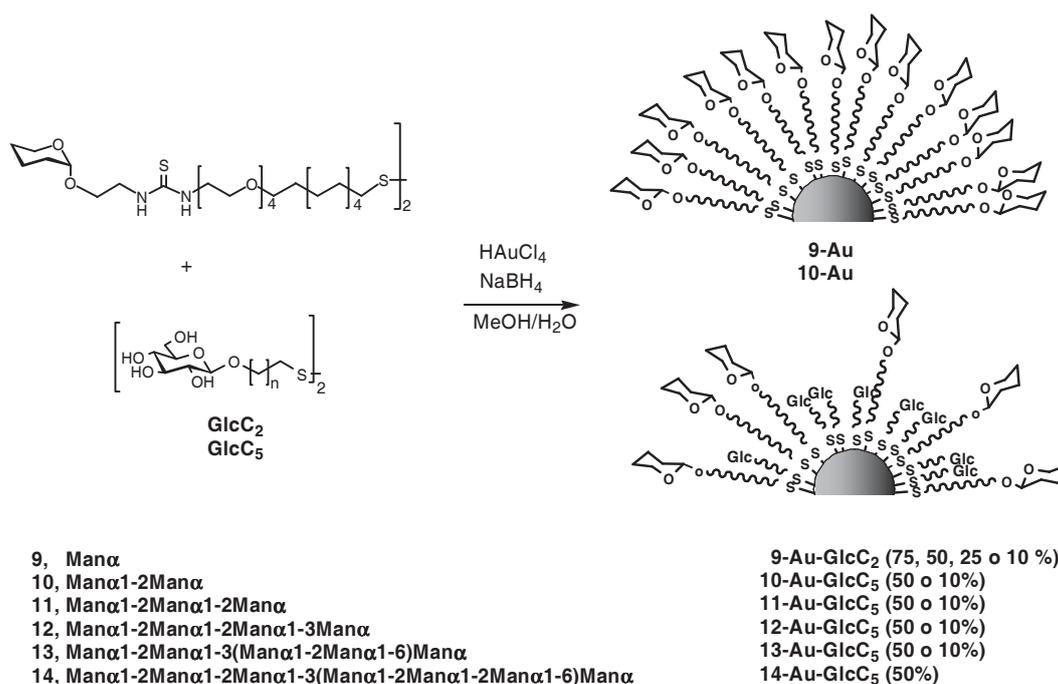
**Tabla 2.** Características físicas de las gliconanopartículas de la familia B.

<i>Manno</i> -GNP	D(nm)	Nº de átomos de Oro	Nº de cadenas total	Nº de cadenas de manosa	Fórmula molecular	MW
<b>4-Au<sup>a</sup></b>	1.3 ± 0.4	79	155	155	(C <sub>32</sub> H <sub>62</sub> NO <sub>12</sub> S) <sub>155</sub> Au <sub>79</sub>	121720
<b>5-Au-CO<sub>2</sub>H(66%)</b>	1.3 ± 0.6	79	38	25	(C <sub>38</sub> H <sub>72</sub> NO <sub>18</sub> S) <sub>25</sub> (C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> O <sub>8</sub> S) <sub>13</sub> Au <sub>79</sub>	43398
<b>6-Au-CO<sub>2</sub>H(50%)</b>	1.0 ± 0.4	79	38	19	(C <sub>38</sub> H <sub>72</sub> NO <sub>18</sub> S) <sub>19</sub> (C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> O <sub>8</sub> S) <sub>19</sub> Au <sub>79</sub>	41376
<b>7-Au-CO<sub>2</sub>H(66%)</b>	1.3 ± 0.5	79	38	25	(C <sub>44</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>23</sub> S) <sub>25</sub> (C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> O <sub>8</sub> S) <sub>13</sub> Au <sub>79</sub>	47451
<b>8-Au-CO<sub>2</sub>H(50%)</b>	1.3 ± 0.5	79	38	19	(C <sub>44</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>23</sub> S) <sub>19</sub> (C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> O <sub>8</sub> S) <sub>19</sub> Au <sub>79</sub>	44190

El número de átomos de oro, las formulas moleculares y los pesos moleculares se calcularon según el tamaño del cluster de oro obtenido por TEM<sup>38</sup>. <sup>a</sup> Valores confirmados por análisis elemental.

### 2.6.3. Síntesis de *manno*-GNPs con neoglicoconjugados de mono-, di-, tri-, tetra-, penta- y heptasacáridos de manosa unidos por acoplamiento tiourea. Familia C.

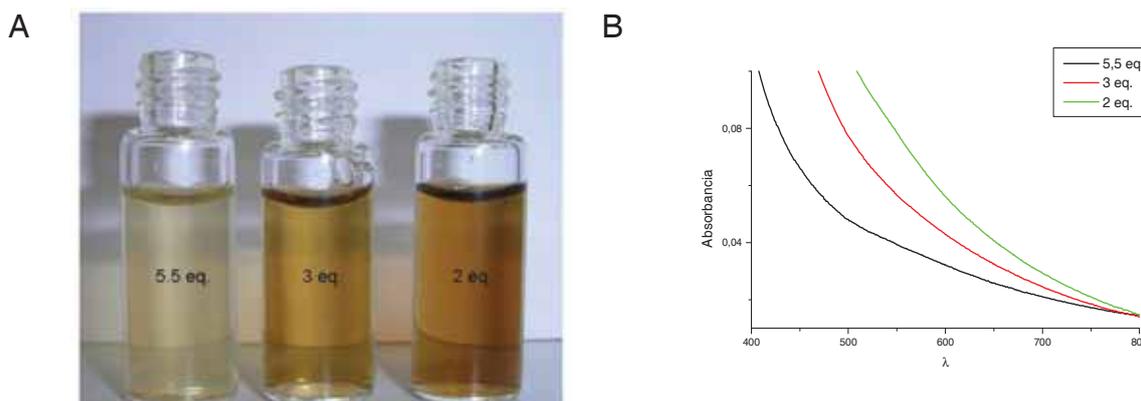
Las GNPs se obtuvieron por el mismo método que las anteriores. En este caso, tratamos de modular el tamaño de la GNP disminuyendo la relación tiol:oro en la reacción usando 5.5, 3.0, 2.0 o 1.0 equivalentes del neoglicoconjugado **9**. Se obtuvieron las correspondientes nanopartículas **9-Au (5.5, 3.0, 2.0 y 1.0 equiv)** con buenos rendimientos (Esquema 14).



**Esquema 14.** Síntesis de GNPs funcionalizadas los neoglicoconjugados de la familia C

El tamaño del cluster de oro formado aumenta al disminuir el número de equivalentes desde 1.1 nm (5.5 equiv) hasta 1.5 nm (1 equiv). Los rendimientos obtenidos aumentan al pasar de 5.5.equiv hasta 3.0 o 2.0 equivalentes de neoglicoconjugado. Sin embargo, el empleo de 1.0 equivalente de **9** proporcionó una gran fracción de GNP insoluble. Por ello se escogió la proporción de tiol:oro 3:1 para la síntesis de todas las GNPs de la familia C que se recojen en el Esquema 14, y que da buenos rendimientos y emplea menor cantidad del oligomanósidos.

Las disoluciones de **9-Au (5.5, 3.0 y 2.0 equiv)** a concentraciones de 1mg/mL cambian de color desde beige claro para la **9-Au (5.5 equiv.)** hasta marrón para la **9-Au (2.0 equiv)**. En sus espectros de UV visible el plasmón de superficie debería desplazarse a mayores longitudes de onda al aumentar el tamaño, pero estas GNPs se caracterizaron por la ausencia la banda de plasmón a 520 nm. Sin embargo, se observó un desplazamiento de todo el espectro a mayores longitudes de onda al aumentar el tamaño del cluster. (Figura 10).



**Figura 10.** A) Disoluciones acuosas (1 mg/mL) de las nanopartículas **9-Au** preparadas con 5.5, 3.0 y 2.0 equiv de glicoconjugado **9** y B) Sus espectros de UV-Visible.

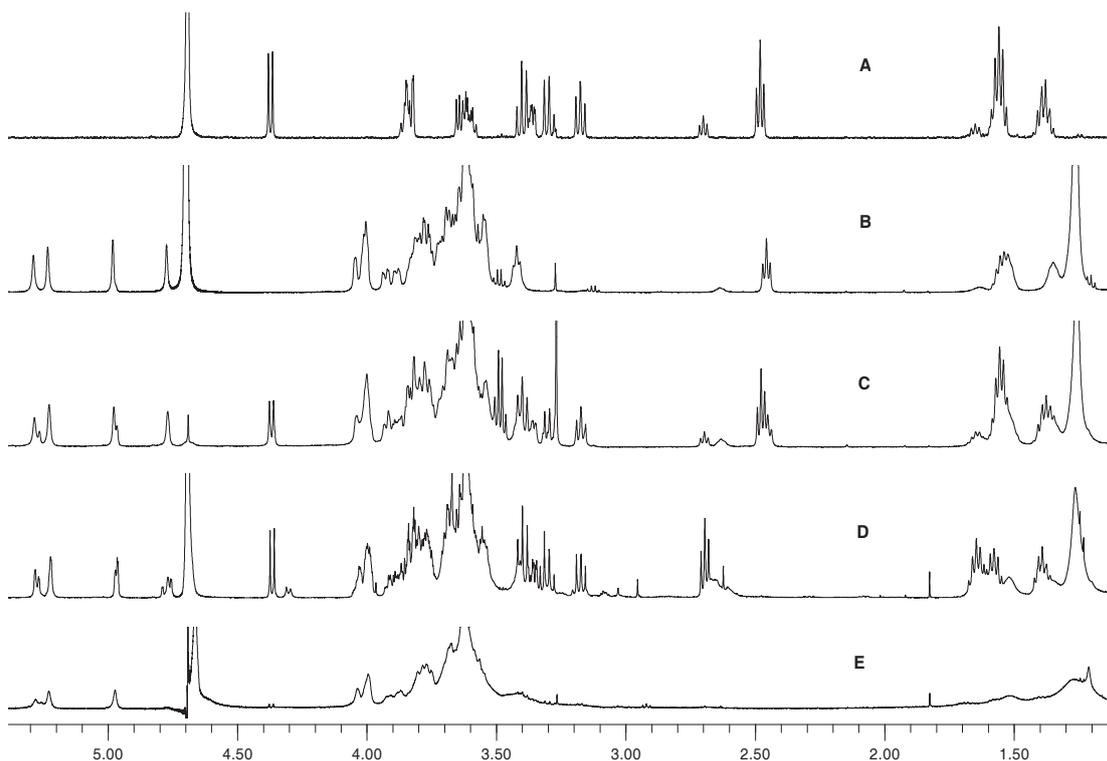
Estas GNPs tras su liofilización se disuelven lentamente en agua (~10h), posiblemente debido a la formación de una densa red de puentes de hidrógeno característicos del grupo tiourea, que dificulta la hidratación de las moléculas unidas a la superficie de oro.

GNPs de 100% densidad en (oligo)manósidos solo se prepararon con el monosacárido **9** y el disacárido **10** porque se consideró que al aumentar la complejidad del (oligo)manósido el impedimento estérico aumentaría haciendo menos accesibles a los oligosacáridos para su unión a los receptores específicos.

Por ello se prepararon gliconanopartículas con densidades variables en manósidos y el conjugado **GlcC<sub>2</sub>** como componente de relleno. De este modo se obtuvieron las nanopartículas **9-Au-GlcC<sub>2</sub>**, que incorporan densidades del 10, 25, 50 o 75 % en monosacárido. El resto de GNPs que incorporan azúcares más complejos se prepararon con densidades del 10 y 50% (Esquema 14) obteniéndose buenos rendimientos.

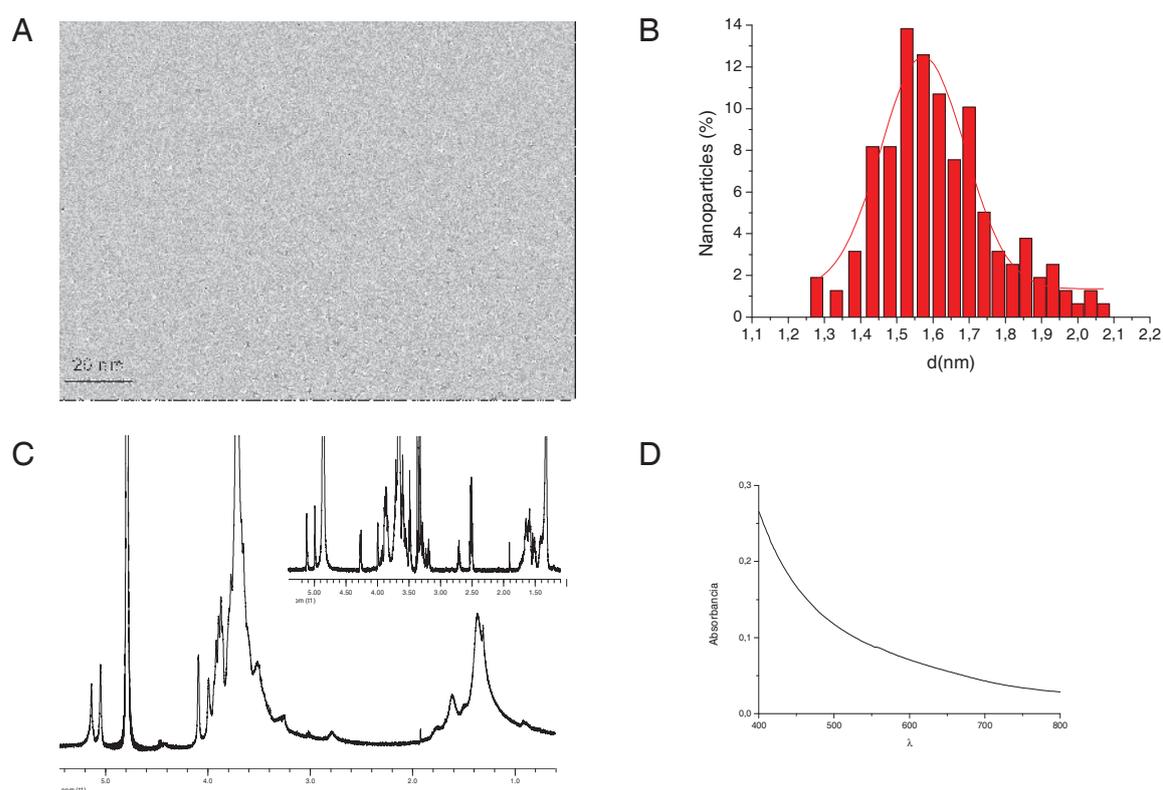
Con los neoglicoconjugados de di- (**10**), tri- (**11**), tetra- (**12**), penta- (**13**) y heptasacárido (**14**) respectivamente y **GlcC<sub>5</sub>** como componente de relleno en una proporción 1:9 o 1:1 se obtuvieron las GNPs que incorporan un 10 o un 50% de densidad en oligomanósidos (Esquema 14).

La proporción de ligandos incorporados en las nanopartículas se determinó mediante la integración de las señales de los protones anoméricos de glucosa y de manosa en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN. La Figura 11 muestra los espectros de resonancia que se registraron para evaluar la relación de los ligandos en el caso de la síntesis de la nanopartícula **12-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)**. Para ello, se registró primero el espectro de protón de la mezcla de neoglicoconjugados **12** y **GlcC<sub>5</sub>** en proporción 1:1 (Figura 11C) que se utilizó para la preparación de la GNP. Se sintetizó la GNP y se recogió el sobrenadante del cual, tras su purificación por columna de Sephadex LH 20 para eliminar las sales formadas durante la reacción, se registró su espectro (Figura 11D). En muchos casos no es posible obtener la proporción de neoglicoconjugados incorporados a partir del espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la nanopartícula (Figura 11E), debido al ensanchamiento de las señales y la dificultad para integrar las mismas.



**Figura 11.** Evaluación por  $^1\text{H}$  RMN de la proporción de ligandos incorporados en la nanopartícula **12-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)**. Espectros en  $\text{D}_2\text{O}$  de: A) Conjugado **GlcC<sub>5</sub>**; B) Tetrasacárido conjugado **12**; C) Mezcla 1:1 de los glicoconjugados utilizados para la preparación de la GNP; D) Mezcla de glicoconjugados presentes en el sobrenadante tras la preparación de la GNP; E) GNP **12-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)**.

La Figura 12 resume como ejemplo las técnicas empleadas para la caracterización de todas las gliconanopartículas. La GNP **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)** presenta una distribución homogénea de tamaños con un diámetro promedio de 1.3 nm, que corresponden a 79 átomos de oro y 59 cadenas.<sup>38</sup> Su espectro de UV-Vis no presenta banda de plasmón de superficie.



**Figura 12.** Caracterización de **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)**: A) Micrografías de TEM; B) Histograma; C) Espectros de <sup>1</sup>H RMN en D<sub>2</sub>O de la nanopartícula (inferior) y la correspondiente mezcla de neoglicoconjugado en CD<sub>3</sub>OD (superior); D) Espectro de UV-visible en agua NANOPURE.

Los datos completos de la caracterización de las nanopartículas de la familia C se indican en la Tabla 3.

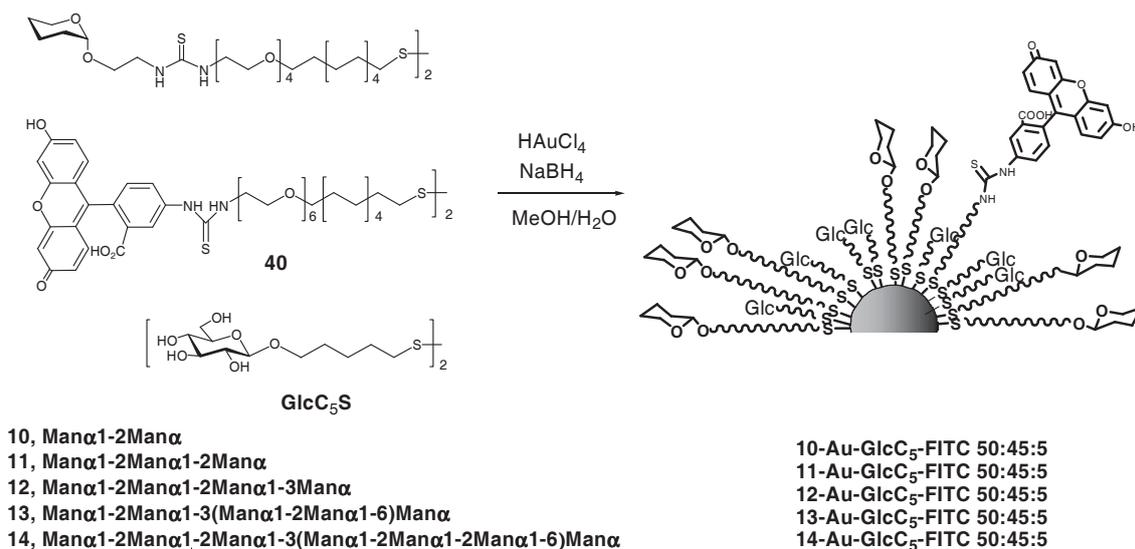
**Tabla 3.** Características físicas de las gliconanopartículas de la familia C

<i>Manno</i> -GNP	D(nm)	Nº átomos de Oro	Nº de cadenas total	Nº de cadenas de manosa	Fórmula molecular	MW
<b>9-Au (5.5 equiv)</b>	1.1 ± 0.2	79	38	38	(C <sub>28</sub> H <sub>55</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>38</sub> Au <sub>79</sub>	40027
<b>9-Au (3 equiv)<sup>a</sup></b>	1.3 ± 0.4	79	40	40	(C <sub>28</sub> H <sub>55</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>40</sub> Au <sub>79</sub>	41315
<b>9-Au (2 equiv)<sup>a</sup></b>	1.5 ± 0.3	116	59	59	(C <sub>28</sub> H <sub>55</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>59</sub> Au <sub>116</sub>	60833
<b>9-Au (1 equiv)<sup>a</sup></b>	1.5 ± 0.4	116	66	66	(C <sub>28</sub> H <sub>55</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>66</sub> Au <sub>116</sub>	65344
<b>9-Au-GlcC<sub>2</sub> (10%)<sup>a</sup></b>	1.3 ± 0.7	79	47	5	(C <sub>28</sub> H <sub>55</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> (C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>42</sub> Au <sub>79</sub>	28829
<b>9-Au-GlcC<sub>2</sub> (25%)<sup>a</sup></b>	1.4 ± 0.4	116	90	23	(C <sub>28</sub> H <sub>55</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>23</sub> (C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>67</sub> Au <sub>116</sub>	53688
<b>9-Au-GlcC<sub>2</sub> (50%)<sup>a</sup></b>	1.4 ± 0.4	116	80	40	(C <sub>28</sub> H <sub>55</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>40</sub> (C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>40</sub> Au <sub>116</sub>	58174
<b>9-Au-GlcC<sub>2</sub> (75%)<sup>a</sup></b>	1.4 ± 0.4	116	100	75	(C <sub>28</sub> H <sub>55</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>75</sub> (C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>25</sub> Au <sub>116</sub>	77120
<b>10-Au-GlcC<sub>5</sub> (10%)<sup>a</sup></b>	2.0 ± 0.5	225	90	9	(C <sub>34</sub> H <sub>65</sub> N <sub>2</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> (C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>64</sub> Au <sub>225</sub>	74360
<b>10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)<sup>a</sup></b>	1.3 ± 0.4	79	44	22	(C <sub>34</sub> H <sub>65</sub> N <sub>2</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>22</sub> (C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>22</sub> Au <sub>79</sub>	39482
<b>10-Au<sup>a</sup></b>	1.2 ± 0.5	79	59	59	(C <sub>34</sub> H <sub>65</sub> N <sub>2</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>59</sub> Au <sub>79</sub>	63058
<b>11-Au-GlcC<sub>5</sub> (10%)<sup>a</sup></b>	1.8 ± 0.4	201	135	13	(C <sub>40</sub> H <sub>75</sub> N <sub>2</sub> O <sub>20</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> (C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>22</sub> Au <sub>201</sub>	86500
<b>11-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)<sup>a</sup></b>	1.6 ± 0.4	140	124	62	(C <sub>40</sub> H <sub>75</sub> N <sub>2</sub> O <sub>20</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>62</sub> (C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>62</sub> Au <sub>140</sub>	105044
<b>12-Au-GlcC<sub>5</sub> (10%)<sup>a</sup></b>	1.4 ± 0.7	116	66	7	(C <sub>46</sub> H <sub>85</sub> N <sub>2</sub> O <sub>25</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> (C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>59</sub> Au <sub>116</sub>	47359
<b>12-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)<sup>a</sup></b>	1.9 ± 0.5	225	122	56	(C <sub>46</sub> H <sub>85</sub> N <sub>2</sub> O <sub>25</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>56</sub> (C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>56</sub> Au <sub>225</sub>	123369
<b>13-Au-GlcC<sub>5</sub> (10%)<sup>a</sup></b>	1.8 ± 0.3	201	48	5	(C <sub>52</sub> H <sub>95</sub> N <sub>2</sub> O <sub>30</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> (C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>43</sub> Au <sub>201</sub>	58150
<b>13-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)<sup>a</sup></b>	2.1 ± 1.5	309	56	28	(C <sub>52</sub> H <sub>95</sub> N <sub>2</sub> O <sub>30</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>28</sub> (C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>28</sub> Au <sub>309</sub>	104928
<b>14-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)<sup>a</sup></b>	1.8 ± 0.4	201	116	58	(C <sub>64</sub> H <sub>115</sub> N <sub>2</sub> O <sub>40</sub> S <sub>2</sub> ) <sub>58</sub> (C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> S) <sub>58</sub> Au <sub>201</sub>	149602

El número de átomos de oro, las formulas moleculares y los pesos moleculares se calcularon según el tamaño del cluster de oro obtenido por TEM<sup>38</sup>. <sup>a</sup> Valores confirmados por análisis elemental.

### 2.6.3.1. Síntesis de *manno*-GNPs fluorescentes

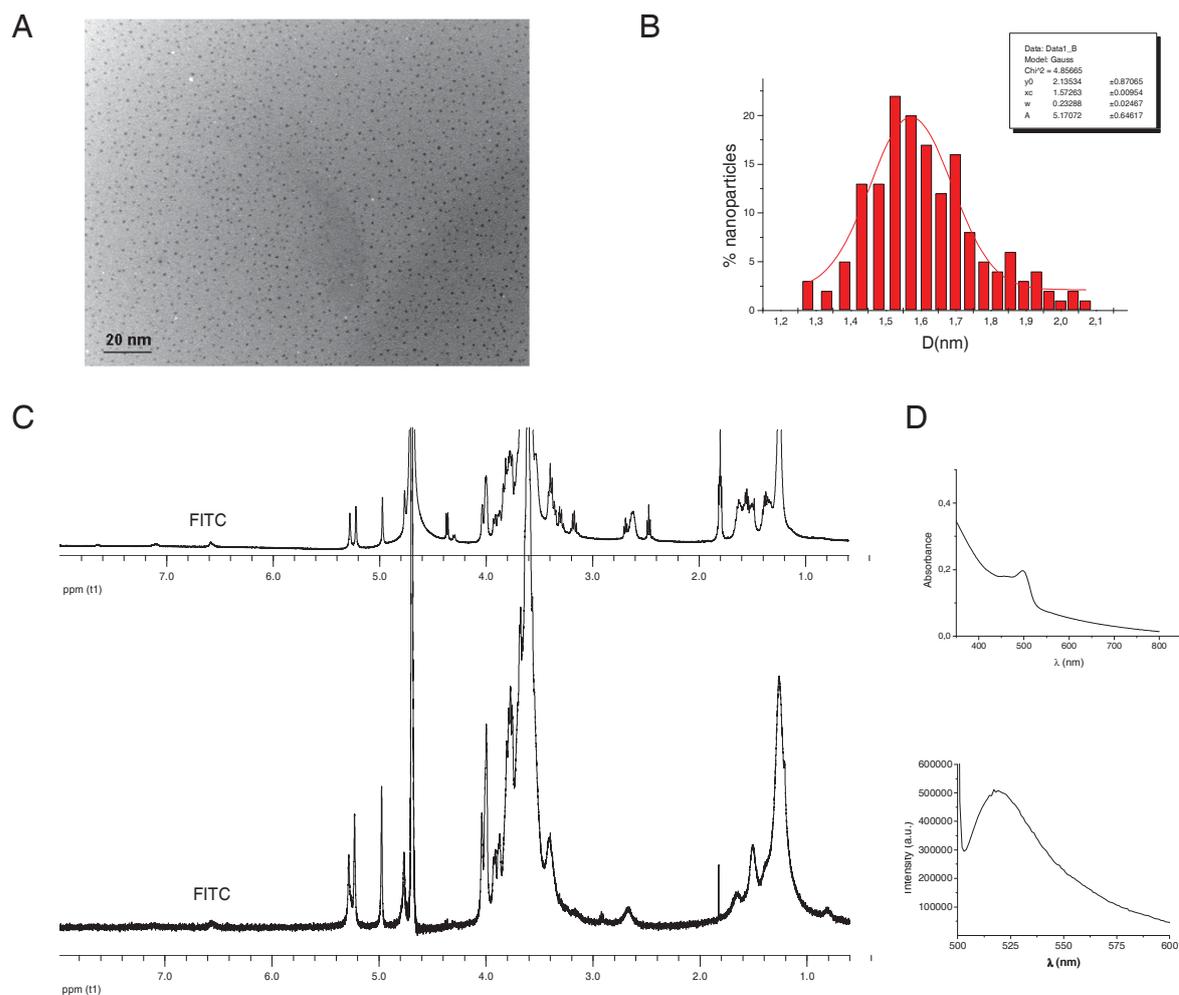
Basándonos en la misma metodología, hemos preparado gliconanopartículas fluorescentes análogas de **10-Au-GlcC<sub>5</sub>**, **11-Au-GlcC<sub>5</sub>**, **12-Au-GlcC<sub>5</sub>**, **13-Au-GlcC<sub>5</sub>** y **14-Au-GlcC<sub>5</sub>** por incorporación adicional de un 5% del conjugado de fluoresceína **40** previamente preparado (Esquema 3). Partiendo de una mezcla en proporción molar 50:45:5 de oligomanósido:glucósido:espaciador fluorescente se obtuvieron las nanopartículas **10-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**, **11-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**, **12-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**, **13-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC** y **14-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC** respectivamente (Esquema 15).



**Esquema 15.** Síntesis de GNPs fluorescentes preparadas con (oligo)manósidos, glucósido y espaciador fluorescente en proporción 50:45:5.

Las gliconanopartículas fluorescentes son solubles en agua y se han caracterizado, al igual que las anteriores por TEM, UV-Vis,  $^1\text{H}$  RMN y por su espectro de fluorescencia. La fluorescencia de cada nanopartícula se determinó a partir de una disolución estandar (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) excitando a 485 nm.

La Figura 13 resume la caracterización de la gliconanopartícula **12-Au-Glc $_5$ -FITC**. Su espectro de UV-Vis presenta una banda absorción a  $\lambda=497$  nm que no se observó en el espectro de la correspondiente GNP sin marcar (**12-Au-Glc $_5$  (50%)**). En su espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observa la presencia de las señales correspondientes a los neoglicoconjugados **12** y **Glc $_5$**  y se intuyen las señales de protones aromáticos de la fluoresceína. La presencia del fluoróforo en la GNP se confirma por su espectro de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 490$  nm) que presenta una banda ancha a 516 nm que corresponde a la banda de emisión de la fluoresceína.



**Figura 13.** Caracterización de **12-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**: A) Micrografías de TEM; B) histograma; C) Espectros de <sup>1</sup>H RMN de la mezcla de ligandos (superior) en CD<sub>3</sub>OD y de la correspondiente nanopartícula (inferior) en D<sub>2</sub>O; D) Espectro de UV-vis y de fluorescencia en agua NANOPURE.

Las *manno*-nanopartículas presentadas en este capítulo van a ser utilizadas para el estudio de la inhibición de la interacción DC-SIGN/gp120 por SPR, los estudios de inhibición de la infección en *trans* del VIH y el estudio de interacción con células que expresan el receptor DC-SIGN que se presentan en los capítulos siguientes.

### 3. Conclusiones.

- Se han sintetizado y caracterizado tres familias de neoglicoconjugados de manosa funcionalizados con un grupo tiol en la posición final del espaciador mediante una secuencia sintética que implicó:
  - La preparación de una serie de aminoalquil glicósidos de mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, y hepta- oligomanósidos
  - La preparación de los espaciadores mixtos bifuncionales protegidos con un grupo tioacetilo en un extremo y con un hidroxilo, carboxilo o isotiocianato en el extremo contrario.
  - La preparación de los correspondientes glicoconjugados de mediante tres metodologías diferentes:
    - **Glicosidación directa** entre el monosacárido de manosa protegido y espaciadores de distinta naturaleza. Esta estrategia proporcionó glicoconjugados con rendimientos aceptables pero inferiores al acoplamiento peptídico o tiourea.
    - **Acoplamiento peptídico** entre alquilamino (oligo)manósidos de mono y di- o trisacáridos y un espaciador funcionalizado con un grupo carboxílico. Éste método condujo a problemas de purificación y aislamiento, con la consecuente formación de disulfuros mixtos, los cuales, se utilizaron para la preparación de las nanopartículas de esta familia.
    - **Acoplamiento tiourea entre** alquilamino (oligo)manósidos de mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, y heptasacáridos y un espaciador funcionalizado con un grupo isotiocianato. El acoplamiento tiourea proporcionó el método más sencillo y con mejores rendimientos para la síntesis de conjugados de (oligo)manosa.
  - Desprotección de los grupos acilos y acetilos y el aislamiento de los glicoconjugados como tioles o disulfuros.
- Se ha sintetizado una pequeña librería de *manno*-GNP solubles en agua agrupadas en tres familias dependiendo del neoglicoconjugado utilizado, y se

han caracterizado por RMN, TEM, banda de plasmón de superficie (UV), espectros de fluorescencia y análisis elemental.

- Síntesis de *manno*-GNPs funcionalizadas con glicoconjugados de manosa obtenidos por glicosidación directa. Se prepararon GNPs **1-Au**, **2-Au** y **3-Au**, funcionalizadas los neoglicoconjugados **1**, **2** y **3**. Siguiendo la misma metodología se prepararon las GNPs **3-Au-GlcC<sub>2</sub>** (**5**, **15** y **30%**) que incorporan densidad variable en **3** y emplean **GlcC<sub>2</sub>** como relleno.
- Síntesis de *manno*-GNPs funcionalizadas con glicoconjugados de mono-, di- y trisacáridos de (oligo)manosa obtenidos por acoplamiento peptídico. Se preparó la nanopartícula **4-Au**, funcionalizadas con el glicoconjugados **4**. Las mezclas de disulfuros mixtos **5**, **6**, **7** y **8** se emplearon para la síntesis de las nanopartículas **5-Au-CO<sub>2</sub>H** (**66%**), **6-Au-CO<sub>2</sub>H** (**50%**), **7-Au-CO<sub>2</sub>H** (**66%**) y **8-Au-CO<sub>2</sub>H** (**50%**), que incorporan los (oligo)manósidos en densidades variables.
- Síntesis de *manno*-GNPs funcionalizadas con neoglicoconjugados de mono-, di-, tri-, tetra-, penta- y heptasacáridos obtenidos por acoplamiento tiourea. Se moduló el tamaño de la GNP disminuyendo la relación tiol: oro, obteniendo así las nanopartículas **9-Au** (**5.5**, **3.0**, **2.0** y **1.0 equiv**) Se prepararon las nanopartículas **9-Au** y **10-Au** funcionalizadas con 100% densidad de glicoconjugados **9** y **10**. Siguiendo la misma metodología se prepararon GNPs **9-Au-GlcC<sub>2</sub>** (**75**, **50**, **25** o **10%**), **10-Au-GlcC<sub>5</sub>** (**50** o **10%**), **11-Au-GlcC<sub>5</sub>** (**50** o **10%**), **12-Au-GlcC<sub>5</sub>** (**50** o **10%**), **13-Au-GlcC<sub>5</sub>** (**50** o **10%**) y **10-Au-GlcC<sub>5</sub>** (**50** %), que incorporan densidad variable en **9**, **10**, **11**, **12**, **13** y **14** y contienen **GlcC<sub>2</sub>** o **GlcC<sub>5</sub>** como relleno, y nanopartículas fluorescentes análogas **10-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**, **11-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**, **12-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**, **13-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**, y **14-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**, que incorporan un 50% del (oligo)manósido correspondiente y un 5% adicional del espaciador fluorescente.

## 4. Parte experimental.

### 4.1. Métodos generales

#### *Disolventes y reactivos*

Todos los disolventes orgánicos anhidros empleados se secaron siguiendo los procedimientos descritos (Perrin D.D., Armarego W.L.F., *Purification of laboratory chemicals*, 1996, Editorial Butterworth-Heinemann, Oxford). THF y tolueno se destilaron sobre Na/benzofenona bajo atmósfera de nitrógeno inmediatamente antes de su utilización. Se utilizó DMF comercial de pureza analítica secada sobre tamiz molecular de 4 Å y mantenida bajo argón. Diclorometano se destiló sobre CaH<sub>2</sub> bajo atmósfera de nitrógeno inmediatamente antes de su utilización. Se adquirió metanol de pureza analítica para los ensayos con dicho disolvente. Todos los reactivos empleados en esta Tesis Doctoral se adquirieron a distintas firmas comerciales (Aldrich, Fluka, Lancaster, Panreac, Acros, etc.).

#### *Técnicas y aparatos*

El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina (CCF o TLC indistintamente) empleando cromatofolios de aluminio de gel de sílice tipo 60 F<sub>254</sub> (Merck). Para la detección de los productos se utilizó luz UV ( $\lambda=254$  nm) y/o los reveladores H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/EtOH (1/9, v/v), anisaldehído (450 mL etanol, 25 mL anisaldehído, 25 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mL ácido acético), ninhidrina (100 mL etanol, 0.25 mL ninhidrina), ácido fosfomolibdico (13 g fosfomolibdico, 10 g Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·10 H<sub>2</sub>O, 60 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 940 mL H<sub>2</sub>O). La cromatografía en columna se realizó sobre gel de sílice 60 (Merck) de diversos tamaños de partícula (0.2-0.5 mm; 0.2-0.063 mm; 0.040-0.015 mm) o sobre Sephadex LH20 (Sigmaaldrich). La composición del eluyente empleado se especifica en cada caso.

Para la neutralización por intercambio iónico se empleó resina Amberlist IR 120-H o Dowex 50W 8.

Los valores de rotación óptica se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 341. En cada caso se indica el disolvente y la concentración de la muestra sobre la que se llevó a cabo la medida.

Las micrografías de TEM se llevaron a cabo en un microscopio Philips CM200 de Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla o en un microscopio Philips JEOL JEM-2100F de CIC biomaGUNE de San Sebastián trabajando ambos a 200 kV. Se depositó una sola gota (10  $\mu$ L) de una disolución acuosa de gliconanopartícula (0.3 mg/ml) sobre una rejilla de cobre recubierta por una película de carbono, dejándola secar al aire durante varias horas a

temperatura ambiente. La distribución de tamaño del cluster de oro se evaluó analizando varias micrografías mediante el software Imagen (W. Rasband, NIH, USA) con analizador de partículas automático. El número de partículas analizadas fue 200-300 conduciendo a una estadística de distribución de tamaño fiable.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se midieron en los espectrómetros Bruker DRX-500, DRX-400 y DRX-300 del Instituto de Investigaciones Químicas de Sevilla o en el espectrómetro Bruker AVANCE-500 de CIC biomaGUNE en San Sebastián. Los espectros se realizaron en el disolvente deuterado que se indica y los desplazamientos químicos se expresan en ppm ( $\delta$ ), usando como referencia la señal residual del disolvente empleado. Los espectros se registraron a temperatura ambiente. Para la asignación de señales se han utilizado experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY) y protón-carbono (HMQC) usando las secuencias de pulsos estándar.

Los espectros de UV fueron realizados en un espectrómetro UV/vis Perkin Elmer Lambda 12 o en un espectrómetro Beckman Coulter DU 800 empleando agua Milli Q como disolvente.

Los espectros de fluorescencia se obtuvieron en un espectrómetro de fluorescencia Fluorolog de Horiba Jobin Yvon empleando agua Milli Q como disolvente.

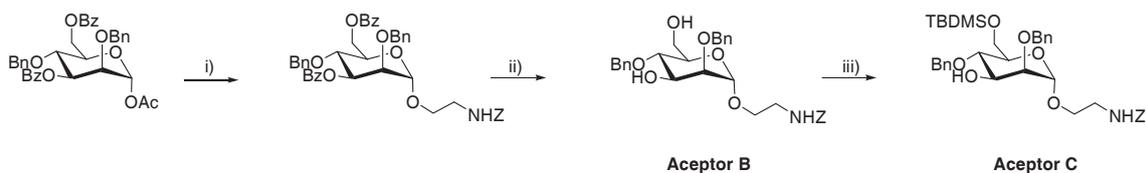
Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron desde 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  en un espectrómetro Nicolet 6700 FT-IR.

Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro Esquire ESI-MS Bruker Daltonics del Instituto de Investigaciones Químicas de Sevilla, o en un espectrómetro MALDI-TOF Applied Biosystems acoplado a un analizador 4700 Proteomics del SIDI de la Universidad Autónoma de Madrid

Los análisis elementales se llevaron a cabo en el servicio de microanálisis CAI de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid con un aparato Leco CHNS-932, trabajando bajo las normas de calidad ISO 9001:2000. Los resultados se expresan en tanto por ciento.

## **4.2. Síntesis de oligosacáridos de manosa.**

### **4.2.1. Síntesis de aceptores.<sup>2</sup>**



**Esquema 16.** i) HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHZ, BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 69%; ii) a-MeONa, MeOH, b-Amberlita IR120, 49%; iii) TBDMSO, imidazol, THF 77%.

### 2'-*N*-benciloxycarbonilaminoetil 3,6-di-*O*-benzoil-2,4-di-*O*-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosido.

Sobre una disolución de acetil 3,6-di-*O*-benzoil-2,4-di-*O*-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosido <sup>2,41</sup> (387 mg, 0.63 mmol, 1 equiv) y 2-*N*-benciloxycarbonilaminoetanol (248 mg, 1.27 mmol, 2 equiv) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) se añadió BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O (399  $\mu$ L, 3.15 mmol, 5 equiv). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 2 horas, se diluyó en AcOEt y se lavó con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>. El extracto orgánico se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh., se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por columna cromatográfica en gel de sílice (Hexano/AcOEt 9/1 hasta 75/25) obteniéndose el producto de glicosilación como un aceite incoloro (326 mg, 0.44 mmol, 69%). R<sub>f</sub>=0.50 (Hexano/AcOEt 6:4).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ =8.05-7.35 (m, 10H; H<sub>Ar</sub>-Bz), 7.32-7.12 (m, 15H, H<sub>Ar</sub>-Bn), 5.54 (dd,  $J$ =3.3, 9.3 Hz, 1H; H-3), 5.22 (s, 1H; NH), 5.07 (s, 2H; CH<sub>2</sub>-Z), 4.91 (s, 1H; H-1), 4.64 (m, AB system, 2H; CH<sub>2</sub>-Bn), 4.60 (m, AB system, 2H; CH<sub>2</sub>-Bn), 4.54-4.52 (m, 2H; H-6), 4.23 (t,  $J$ =9.5 Hz, 1H; H-4), 4.03-3.99 (m, 2H; H-2 and H-5), 3.82-3.74 (m, 1H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.58-3.50 (m, 1H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.49-3.32 (m, 2H; CH<sub>2</sub>NH).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ =166.3 (s; (CO)Ph), 165.8 (s; (CO)Ph), 156.3 (s; NH(CO)), 137.8 (s; Bn), 137.3 (s; Bn), 136.5 (s; Bn), 133.4 (s; Bz), 133.1 (s; Bz), 129.8-127.5 (d, 25C; Ar), 98.0 (d; C-1), 76.1 (d; C-2), 73.3 (t; CH<sub>2</sub>-Bn), 75.1 (t; CH<sub>2</sub>-Bn), 74.3 (d; C-3), 73.1 (d; C-4), 70.3 (d; C-5), 67.2 (t; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 66.8 (t; CH<sub>2</sub>-Z), 63.6 (t; C-6), 40.7 (t; CH<sub>2</sub>NH).

**2'-*N*-benciloxycarbonilaminoetil 2,4-di-*O*-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosido (Aceptor B).** Sobre una disolución agitada de 2'-*N*-benciloxycarbonilaminoetil 3,6-di-*O*-benzoil-2,4-di-*O*-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosido (20.5 g, 27.5 mmol, 1 equiv.) en MeOH (150 mL) se añadió MeONa sólido (2.97 mg, 55 mmol, 2 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, la mezcla se neutralizó con resina ácida Amberlita IR-120, se filtró, se concentró a vacío y se purificó columna cromatográfica (gradiente de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH hasta 98:2) obteniendo el **Aceptor B** como una aceite incoloro (7.2 g, 13.5 mmol, 49%). R<sub>f</sub>=0.26 (Hexano/AcOEt 50:50).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ =7.36-7.26 (m, 15H; H<sub>Ar</sub>), 5.19 (s, 1H; NH), 5.07 (s, 2H; CH<sub>2</sub>-Z), 4.82 (brs, 1H; H-1), 4.75-4.63 (m, 4H; CH<sub>2</sub>-Bn), 3.93 (dt,  $J$ =3.7, 9.5 Hz, 1H; H-3), 3.80 (dd,  $J$ =2.6, 11.9 Hz, 1H; H-6), 3.72 (dd,  $J$ =4.6, 11.9 Hz, 1H; H-6), 3.69 (dd,  $J$ =1.4, 3.7 Hz, 1H; H-2),

3.65 (t,  $J=9.5$  Hz, 1H; H-4), 3.56 (ddd,  $J=2.8, 4.4, 9.5$  Hz, 1H; H-5), 3.68-3.47 (m, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.25-3.43 (m, 2H;  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.48 (d,  $J=9.5$  Hz, 1H; OH), 2.26 (m, 1H; OH).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=156.3$  (s;  $\text{NH}(\text{CO})$ ), 138.1 (s; Bn), 137.5 (s; Bn), 136.3 (s; Bn), 128.5-127.7 (d, 15C; Bn), 97.25 (d; C-1), 78.23 (d; C-2), 76.19 (d; C-4), 74.8 (t;  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 73.1 (t;  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 71.7 (d; C-5), 71.4 (d; C-3), 66.7 (t, 2C;  $\text{CH}_2\text{-Z}$  and  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 61.9 (t; C-6), 40.6 (t;  $\text{CH}_2\text{NH}$ ).

#### 2'-*N*-benciloxicarbonilaminoetil manopiranosido (Aceptor C).

#### 2,4-di-*O*-bencil-6-*O*-*tert*butildimetilsilil- $\alpha$ -D-

Sobre una disolución del **Aceptor B** (300 mg, 0.56 mmol, 1 equiv) en THF (10 mL) se añadió imidazol (76 mg, 1.12 mmol, 2 equiv) y TBDMSCl (cloruro de *tert*butildimetilsililo) (126 mg, 0.84 mmol; 1.5 equiv). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, se diluyó en  $\text{Et}_2\text{O}$  y se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$ . El extracto orgánico se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anh., se filtró y se concentró a presión reducida. El crudo se purificó por columna cromatográfica en gel de sílice (gradiente de hexano/ $\text{Et}_2\text{O}$  hasta 6:4) para dar el **Aceptor C** como un aceite incoloro (281 mg, 0.43 mmol, 77 %).  $R_f=0.59$  (Hexano/ $\text{AcOEt}$  5:5).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=7.35$ -7.25 (m, 15H;  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 5.17-5.12 (m, 1H; NH), 5.08 (s, 2H;  $\text{CH}_2\text{-Z}$ ), 4.84 (s, 1H; H-1), 4.73 (m, AB system, 2H;  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4.61 (m, AB system, 2H;  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ); 3.93 (td,  $J=3.7, 9.2$  Hz; 1H; H-3), 3.83 (dd,  $J=1.8, 11.2$  Hz, 1H; H-6), 3.79 (dd,  $J=4.9, 11.2$  Hz, 1H; H-6), 3.69 (dd,  $J=1.4, 3.7$  Hz, 1H; H-2), 3.61 (t,  $J=9.2$  Hz, 1H; H-4), 3.55-3.51 (m, 1H; H-5), 3.44-3.26 (m, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.30 (d,  $J=9.2$  Hz, 1H; OH), 0.87 (s, 9H;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.03 (s, 3H;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.04 (s, 3H;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=156.3$  (s;  $\text{NH}(\text{CO})$ ), 138.5 (s; Bn), 137.7 (s; Bn), 136.5 (s; Bn), 128.5-127.7 (d, 15C; Bn), 97.05 (d; C-1), 78.50 (d; C-2), 76.40 (d; C-4), 74.82 (t;  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 72.8, 72.6, 71.6 (d; C-3), 67.0 (t;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 66.7 (t;  $\text{CH}_2\text{-Z}$ ), 62.6 (d; C-6), 40.8 (t;  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 25.9 (q, 3C;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 18.3 (s;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 5.4 (q;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ), -5.2 (q;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ).

#### 4.2.2. Procedimiento general para las glicosidaciones:<sup>2</sup> síntesis de los compuestos 20, 21, 22, 23 y 24.

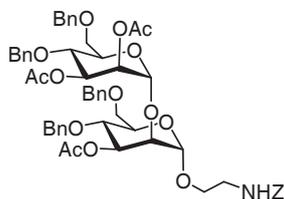
Una disolución del donador de glicosilo (1 equiv.) y el correspondiente aceptor (1.2 equiv.) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (3 mL) se agitó a temperatura ambiente en presencia de tamiz molecular de 4Å (~peso en mg de donador) durante 2-5 horas. Después, la mezcla de reacción se enfrió a -20/-10°C y se añadieron consecutivamente NIS (1.3 equiv.) y una cantidad catalítica de TfOH. Después de 10-20 minutos, la reacción se neutralizó con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (ac). La mezcla de reacción se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se filtró sobre celita. La fase orgánica se lavó con una disolución saturada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (ac) y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .anh. El disolvente

se eliminó a presión reducida y el crudo se purificó por columna cromatográfica proporcionando los correspondientes manósidos protegidos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Condiciones de reacción para las glicosidaciones.

compuesto	T (°C)	t(min)	Nº equiv. TfOH	Rendimiento (%)
<b>20</b>	-20	10	0.13	86
<b>21</b>	-20	20	0.39	75
<b>22</b>	-10	15	0.13	64
<b>23</b>	-20	25	0.26	73
<b>24</b>	-10	15	0.26	68

**2'-N-benciloxycarbonilaminoetil 2,3-di-O-acetil-4,6-di-O-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-O-acetil-4,6-di-O-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosido (20).**



A partir del donador **18**<sup>2</sup> (517 mg, 0.55 mmol, 1 equiv.) y 2-*N*-Z-etanolamina (130 mg, 0.66 mmol, 1.2 equiv.) se obtuvo **20** como una espuma blanca (476 mg, 0.47 mmol, 86%).  $R_f=0.20$  (tolueno/AcOEt 7:3).

$[\alpha]_D^{24}+28.7$  (c=0.506; MeOH).

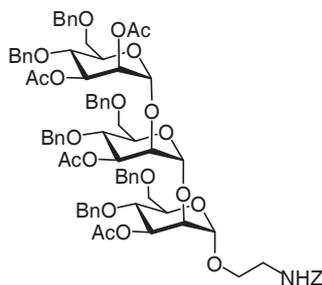
<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta=7.33-7.14$  (m, 25H; H<sub>Ar</sub>), 5.46-5.41 (m, 1H; NH), 5.38 (dd,  $J=3.5$ , 10.0 Hz, 1H; H-3'), 5.34-5.31 (m, 1H; H-2'), 5.20 (dd,  $J=3.0$ , 8.0 Hz, 1H; H-3), 5.11-5.02 (m, 2H; CH<sub>2</sub>-Z), 4.91 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H; H-1), 4.86 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H; H-1'), 4.68-4.42 (m, 8H; CH<sub>2</sub>-Bn), 4.09-4.04 (m, 1H; H-5'), 4.04 (t,  $J=3.0$  Hz, 1H; H-2), 3.84 (t,  $J=10.0$  Hz, 1H; H-4'), 3.87-3.80 (m, 2H), 3.76 (dd,  $J=5.0$ , 11.0 Hz, 1H; H-6'a), 3.70 (dd,  $J=1.5$ , 10.5 Hz, 1H; H-6'b), 3.66-3.57 (m, 3H), 3.52-3.44 (m, 1H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.36-3.23 (m, 2H; CH<sub>2</sub>NH), 2.14 (s, 3H; OAc), 2.03 (s, 3H; OAc), 2.00 (s, 3H; OAc).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta=170.6$  (s; (CO)Me), 170.2 (s; (CO)Me), 169.9 (s; (CO)Me), 156.7 (s; NH(CO)), 138.2 (s; Bn), 138.09 (s, 2C; Bn), 138.03 (s; Bn), 136.7 (s; Bn-Z), 128.6-127.6 (d, 25C; Bn), 99.5 (d; C-1'), 98.8 (d; C-1), 74.9 (d; C-2), 73.7 (2C), 73.4, 73.3, 73.0, 72.0, 71.8, 71.7, 71.5, 70.3, 69.0 (t; C-6), 68.9 (t; C-6'), 68.0 (t; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 66.7 (t; CH<sub>2</sub>-Z), 41.0 (t; CH<sub>2</sub>NH), 21.05 (q; OAc), 21.02 (q, 2C; OAc).

ATR-IR:  $\tilde{\nu}=3354$ , 3063, 3030, 2930, 1748, 1521, 1497, 1454, 1367, 1224, 1135, 1093 cm<sup>-1</sup>.

HRMS:  $m/z$ : calcd para C<sub>56</sub>H<sub>63</sub>NO<sub>16</sub>Na<sup>+</sup> [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>: 1028.4039; encontrado: 1028.4067.

**2'-*N*-Benciloxicarbonilaminoetil 2,3-di-*O*-acetil-4,6-di-*O*-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-*O*-acetil-4,6-di-*O*-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-*O*-acetil-4,6-di-*O*-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosido (21).**



A partir del donador **19**<sup>2</sup> (230 mg, 0.174 mmol, 1 equiv.) y 2-*N*-Z-etanolamina (40.8 mg, 0.209 mmol, 1.2 equiv.) se obtuvo **21** como un aceite (183 mg, 0.132 mmol, 75%).  $R_f=0.61$  (tolueno/AcOEt 7:3)

$[\alpha]_D^{24}+40.6$  (c=0.47; MeOH)

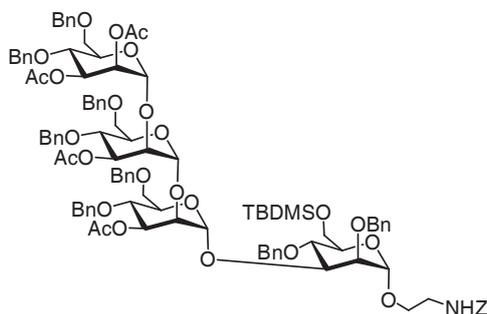
<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta=7.40-7.12$  (m, 35H, H<sub>Ar</sub>), 5.49-5.45 (brm, 1H; NH), 5.43 (dd,  $J=3.5, 9.5$  Hz, 1H; H3''), 5.38-5.35 (m, 1H; H-2''), 5.32 (dd,  $J=3.0, 8.0$  Hz, 1H), 5.26-5.20 (m; 1H), 5.10-5.06 (m, 2H; CH<sub>2</sub>-Z), 4.98 (d,  $J=2$  Hz, 1H; H-1), 4.97 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1'), 4.93 (s, 1H; H-1''), 4.73-4.44 (m, 15H), 4.18 (t,  $J=2.5$  Hz, 1H; H-2''), 4.12-4.05 (m, 3H), 4.05-4.01 (m, 1H), 3.80-3.88 (m, 3H; 3xH-6), 3.72-3.62 (m, 3H, 3xH-6), 3.59-3.52 (m, 1H; CH<sub>2</sub>O), 3.45-3.36 (m, 1H; CH<sub>2</sub>O), 3.32-3.23 (m, 2H; CH<sub>2</sub>NH), 2.19 (s, 3H; OAc), 2.10 (s, 3H; OAc), 2.04 (s, 3H; OAc), 2.02 (s, 3H; OAc).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta=170.4$  (s; (CO)Me), 170.3 (s; (CO)Me), 170.1 (s; (CO)Me), 169.8 (s; (CO)Me), 156.4 (s; NH(CO)), 138.14 (s; Bn), 138.08 (s; Bn), 137.96 (s, 2C; Bn), 137.93 (s; Bn), 137.87 (s; Bn), 136.7 (s; Bn-Z), 128.4-127.5 (d, 35C; Bn), 100.3 (d; C-1''), 99.0 (d; C-1), 98.8 (d; C-1''), 74.9, 74.6, 74.4, 73.8, 73.7, 73.4, 73.3, 72.86, 71.83, 71.9, 71.7, 71.62, 71.57, 70.1 (d; C-2''), 69.4 (t; C-6), 69.0 (t; C-6), 68.3 (t; C-6), 67.8 (t; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 66.5 (t; CH<sub>2</sub>-Z), 40.9 (CH<sub>2</sub>NH), 21.03 (q; OAc), 20.97 (q, 2C; OAc), 20.91 (q; OAc).

ATR-IR:  $\tilde{\nu}=3357, 3062, 3030, 2924, 1746, 1521, 1496, 1453, 1366, 1239, 1134, 1061$  cm<sup>-1</sup>.

HRMS:  $m/z$ : calcd para C<sub>78</sub>H<sub>87</sub>NO<sub>22</sub>Na<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 1412.5612; encontrado: 1412.5634.

**2'-N-Benciloxycarbonilaminoetil 2,3-di-O-acetil-4,6-di-O-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-O-acetil-4,6-di-O-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-O-acetil-4,6-di-O-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosil (1 $\rightarrow$ 3)-2,4-di-O-bencil-6-O-*tert*butildimetilsilil- $\alpha$ -D-manopiranosido (22).**



A partir del donador **19**<sup>2</sup> (370 mg, 0.28 mmol, 1.2 equiv.) y el **aceptor 2** (152.5 mg, 0.234 mmol, 1 equiv.) se obtuvo **22** como una espuma (277 mg, 0.15 mmol, 64%).  $R_f=0.39$  (AcOEt/tolueno 2:8).

$[\alpha]_D^{24}+30.3$  (c=0.54;  $\text{CHCl}_3$ ).

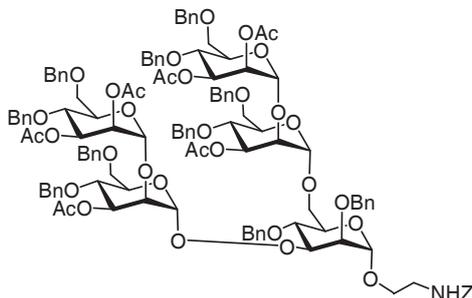
<sup>1</sup>H RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=7.30$ - $7.04$  (m, 45H;  $\text{H}_{Ar}$ ), 5.37-5.34 (m, 2H), 5.29 (dd,  $J=1.8, 3.3$  Hz, 1H), 5.28 (brs, 1H; H-1), 5.24 (dd,  $J=3.3, 8.2$  Hz, 1H), 5.20 (brs, NH); 5.03-4.98 (m, 2H;  $\text{CH}_2$ -Z), 4.91 (d,  $J=2.4$  Hz, 1H; H-1), 4.84 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H; H-1), 4.69 (s, 1H; H-1), 4.61-4.26 (m, 16H), 4.12-4.07 (m, 2H), 4.05-3.90 (m, 6H), 3.86-3.77 (m, 3H), 3.69-3.39 (m, 11H), 3.25-3.13 (m, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.11 (s, 3H; OAc), 2.01 (s, 3H; OAc), 1.96 (s, 3H; OAc), 1.94 (s, 3H; OAc), 0.81 (s, 9H;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ), -0.04 (s, 3H,  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ), -0.05 (s, 3H,  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=170.4$  (s; (CO)Me), 170.3 (s; (CO)Me), 170.1 (s; (CO)Me), 169.7 (s; (CO)Me), 156.4 (s; NH(CO)), 138.5-136.6 (s, 9C; Bn), 128.4-127.3 (d, 45C; Bn), 100.7 (d; C-1), 100.6 (d; C-1), 99.2 (d; C-1), 97.4 (d; C-1), 77.8, 77.5, 75.1, 74.78, 74.43, 73.6, 73.5, 73.3, 72.9, 72.8, 72.4, 72.2, 71.9, 71.8, 71.6, 70.1, 69.4, 68.5, 68.1, 67.6 (t;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 66.5 (t;  $\text{CH}_2$ -Z), 62.7, 40.9 (t;  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 25.9 (q, 4C; OAc), 20.99 (q;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 20.95 (q;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 20.87 (q;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 18.3 (s;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ), -5.3 (q;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ), -5.4 (q;  $^t\text{BuSi}(\text{CH}_3)_2$ ).

IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\tilde{\nu}=3621, 3014, 2976, 2896, 1747, 1711, 1364, 1224, 1047 \text{ cm}^{-1}$ .

HRMS:  $m/z$ : calcd para  $\text{C}_{104}\text{H}_{124}\text{NO}_{27}\text{Si}^+$  [ $M+\text{H}$ ]<sup>+</sup>: 1846.8125; encontrado: 1846.8130.

**2'-*N*-Benciloxicarbonilaminoetil Bis[2,3-di-*O*-acetil-4,6-di-*O*-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-*O*-acetil-4,6-di-*O*-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosil]-(1 $\rightarrow$ 3,6)-2,4-di-*O*-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosido (23).**



A partir del donador **18**<sup>2</sup> (287 mg, 0.31 mmol, 2.2 equiv.) y el **aceptor 1** (74 mg, 0.14 mmol, 1 equiv.) se obtuvo **23** como una espuma (219 mg, 0.10 mmol, 73%).  $R_f=0.40$  (AcOEt/tolueno 3:7).

$[\alpha]_D^{24} +40.5$  ( $c=0.55$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

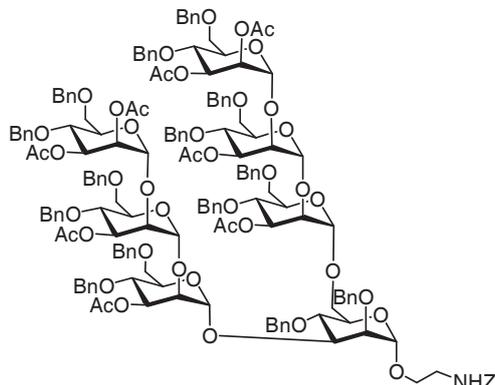
<sup>1</sup>H RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=7.31-7.10$  (m, 55H;  $H_{Ar}$ ), 5.43-5.38 (m, 1H; NH), 5.37 (dd,  $J=3.3$ , 9.6 Hz, 1H), 5.36-5.31 (m, 2H), 5.31-5.26 (m, 2H), 5.22 (dd,  $J=3.0$ , 9.7 Hz, 1H), 5.19 (s, 1H; H-1), 5.00 (s, 2H;  $\text{CH}_2\text{-Z}$ ), 4.89 (s, 1H; H-1), 4.81-4.55 (m, 10H), 4.75 (s, 1H; H-1), 4.70 (s, 1H; H-1), 4.68 (s, 1H; H-1), 4.52-4.41 (m, 10H), 4.05-3.94 (m, 9H), 3.91-3.80 (m, 3H), 3.77 (dd,  $J=3.0$ , 9.7 Hz, 1H), 3.71-3.60 (m, 5H), 3.60-3.53 (m, 5H), 3.50 (d,  $J=9.5$  Hz, 1H), 3.45 (d,  $J=11.0$  Hz, 1H), 3.42-3.20 (m, 1H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.30-3.20 (m, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H; OAc), 1.97 (s, 3H; OAc), 1.95 (s, 3H; OAc), 1.94 (s, 3H; OAc), 1.90 (s, 3H; OAc).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=170.5$  (s; (CO)Me), 170.3 (s; (CO)Me), 170.0 (s; (CO)Me), 170.0 (s; (CO)Me), 169.74 (s; (CO)Me), 169.68 (s; (CO)Me), 156.5 (s; NH(CO)), 138.4-136.8 (s, 11C; Bn), 128.4-127.3 (d, 55C; Bn), 100.7 (d; C-1), 99.5 (d; C-1), 99.4 (d; C-1), 98.0 (d; C-1), 97.0 (d; C-1), 77.9, 77.72, 77.66, 77.34, 77.30, 77.26, 77.08, 77.05, 77.01, 76.80, 75.1, 75.0, 74.8, 74.68, 74.67, 74.6, 73.48, 73.42, 73.3, 73.10, 72.9, 72.8, 73.3, 72.1, 71.8, 71.67, 71.5, 70.7, 70.2, 70.1, 69.2, 68.6, 68.5, 68.3, 66.6, 66.4, 60.4 (t;  $\text{CH}_2\text{-Z}$ ), 40.5 (t;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 29.71 (q; OAc), 29.68 (q; OAc), 29.38 (q; OAc), 20.96 (q; OAc), 20.91 (q; OAc), 20.85 (q; OAc).

IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\tilde{\nu}=3621$ , 3011, 2975, 2895, 1745, 1712, 1449, 1366, 1230, 1047  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS:  $m/z$ : calcd para  $\text{C}_{122}\text{H}_{138}\text{NO}_{34}^{3+}$  [ $\text{M}/2+3\text{H}$ ]<sup>3+</sup>: 720.3033; encontrado: 720.3028.

**2'-N-Benciloxycarbonilaminoetil Bis[2,3-di-O-acetil-4,6-di-O-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-O-acetil-4,6-di-O-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosil]-(1 $\rightarrow$ 3,6)-2,4-di-O-bencil- $\alpha$ -D-manopiranosido (24)**



A partir del donador **19**<sup>2</sup> (299 mg, 0.23 mmol, 2.2 equiv.) y el **aceptor 1** (55 mg, 0.10 mmol, 1 equiv.) se obtuvo **23** como una espuma (202 mg, 0.068 mmol, 68%).  $R_f=0.41$  (AcOEt/tolueno 3:7).

$[\alpha]_D^{24}+39.3$  (c=0.50;  $\text{CHCl}_3$ ).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=7.45\text{-}6.93$  (m, 75H;  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 5.44-5.39 (m, 1H; NH), 5.38-5.32 (m, 3H), 5.30 (brs, 2H), 5.27 (s, 1H; H-1), 5.26-5.18 (m, 3H), 4.97 (s, 2H;  $\text{CH}_2\text{-Z}$ ), 4.91 (s, 1H; H-1), 4.89 (s, 1H; H-1), 4.87 (s, 1H; H-1), 4.84 (s, 2H; 2xH-1); 4.78 (m, 1H), 4.64 (s, 1H; H-1), 4.65-4.22 (m, 27H), 4.11 (brs, 2H), 4.06-3.79 (m, 18H), 3.76-3.70 (m, 1H), 3.68-3.31 (m, 15H), 3.27-3.17 (m, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.12 (s, 6H; OAc), 2.02 (s, 6H, OAc), 1.96 (s, 3H, OAc), 1.95 (s, 3H, OAc), 1.93 (s, 3H, OAc), 1.86 (s, 3H, OAc).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=170.51$  (s; (CO)Me), 170.45 (s; (CO)Me), 170.38 (s; (CO)Me), 170.2 (s; (CO)Me), 170.1 (s, 2C; (CO)Me), 169.68 (s; (CO)Me), 169.66 (s; (CO)Me), 156.4 (s; NH(CO)), 138.5-136.8 (s, 15C; Bn), 128.4-127.3 (d, 90C; Bn), 100.8 (d; C-1), 100.7 (d; C-1), 100.5 (d; C-1), 99.2 (d, 2C; C-1), 99.15 (d; C-1), 99.07 (d; C-1), 74.79, 74.74, 74.41, 73.5, 73.39, 73.36, 73.13, 73.03, 72.9, 72.8, 72.2, 71.96, 71.90, 71.88, 71.80, 71.68, 71.63, 71.42, 71.39, 70.1, 69.29, 68.82, 68.68, 68.52, 68.3, 68.2, 68.1, 66.51, 68.45, 66.36, 40.4 (t;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 29.7-20.9 (q, 8C; OAc).

IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\tilde{\nu}=3621, 3013, 2976, 2896, 1745, 1452, 1391, 1246, 1047\text{ cm}^{-1}$ .

HRMS:  $m/z$ . calcd para  $\text{C}_{166}\text{H}_{184}\text{NO}_{46}^{2+}$ ,  $[\text{M}/2+2\text{H}]^+$ : 1464.1080; encontrado: 1464.1078.

#### 4.2.3. Procedimiento general para las desprotecciones: síntesis de los compuestos **25**, **26**, **27**, **28** y **29**. 2

Desprotección. a) El tetrasacárido **22** se disolvió en una disolución de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (ac) al 80% y se agitó durante 4 horas. Se eliminó el disolvente y se continuó con la parte b) (únicamente

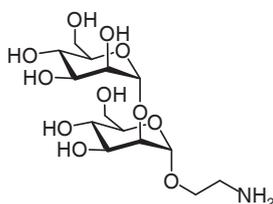
para este compuesto); b) Sobre una disolución agitada del glicósido protegido (1 equiv.) en MeOH (3-10 mL) se añadió MeONa sólido (1 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante 2-20 horas a temperatura ambiente, se neutralizó con resina ácida Amberlita IR-20, se filtró, se concentró a vacío.

**Hidrogenación.** El crudo se disolvió en MeOH/HCOOH 95:5 y se añadió la misma masa en peso de Pd al 10% soportado sobre carbono. La mezcla de reacción se purgó 3 veces con H<sub>2</sub> y se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de H<sub>2</sub> durante 24 horas. La mezcla de reacción se neutralizó con NH<sub>4</sub>OH (30% wt% en agua) y se filtró sobre celita. El residuo se purificó por columna de Sephadex LH20 (MeOH/H<sub>2</sub>O) y se liofilizó obteniendo el oligomanósido desprotegido correspondiente como un sólido blanco. (Tabla 5)

**Tabla 5.** Condiciones de reacción para las desprotecciones

compuesto	Tiempo Hidrogenación (h)	Sephadex LH20 MeOH/H <sub>2</sub> O	Rendimiento (%)
<b>25</b>	24	1:1	87
<b>26</b>	24	1:1	100
<b>27</b>	48	9:1	81
<b>28</b>	48	5:1	72
<b>29</b>	48	5:1	62

**2-aminoetil  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosido (25).**



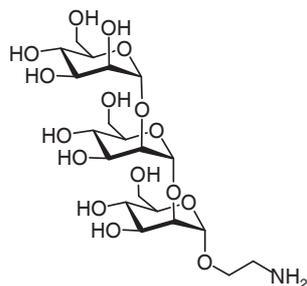
A partir del disacárido **20** (315 mg, 0.31 mmol, 1 equiv.) se obtuvo el disacárido desprotegido **25** (104 mg, 0.27 mmol, 87%) como una espuma blanca.  $R_f=0.71$  (iPrOH/NH<sub>3</sub> 1:1).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta=5.13$  (s,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1), 5.04 (s,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1'), 4.09 (dd,  $J=1.5, 3.0$  Hz, 1H; H-2'), 4.02-3.99 (m, 1H; H-2), 3.95 (dd,  $J=3.5, 9.0$  Hz, 1H; H-3), 3.93-3.91 (m, 1H; H-6), 3.91-3.89 (m, 1H; H-6), 3.85 (dd,  $J=3.0, 9.5$  Hz, 1H; H-3'), 3.82-3.59 (m, 7H), 3.57-3.51 (m, 1H; CH<sub>2</sub>O), 2.93-2.76 (m, 2H; CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta=102.3$  (d; C-1), 98.2 (d; C-1'), 78.7 (d; C-2), 73.3, 72.7, 70.3 (d; C-3'), 70.2 (d; C-3), 69.9 (d; C-2'), 68.9, 67.0, 66.9 (t; CH<sub>2</sub>O), 61.1 (t; C-6), 60.9 (t; C-6'), 39.9 (t; CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

HRMS:  $m/z$ . calcd para C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>11</sub><sup>+</sup> [ $M+H$ ]<sup>+</sup>: 386.1657; encontrado: 386.1643.

**Formiato de 2-aminoetil  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosido (26)**



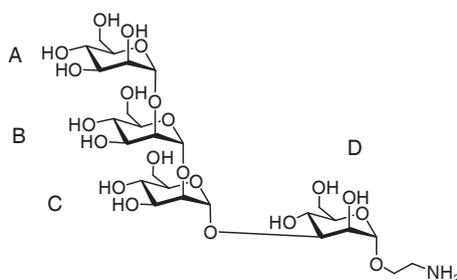
A partir del trisacárido **21** (162.5 mg, 0.117 mmol, 1 equiv.) se obtuvo el trisacárido desprotegido **26** (69 mg, 0.117 mmol, quantitative) como una espuma blanca.  $R_f=0.32$  (PrOH/NH<sub>3</sub> 1:1).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta=$  8.38 (s, 1H; HCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), 5.30 (s, 1H; H-1), 5.14 (s, 1H; H-1'), 5.04 (s, 1H; H-1''), 4.11-4.10 (m, 1H; H-2), 4.07-4.06 (m, 1H; H-2''), 4.99-3.61 (m, 6H), 3.83 (dd,  $J=3.5, 9.5$  Hz, 1H; H-3''), 3.70-3.52 (m, 10H), 3.03-2.87 (m, 1H; CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.86-2.74 (m, 2H; CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta=$  169.0 (s, HCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), 102.2 (d; C-1''), 100.6 (d; C-1), 98.3 (d; C-1'), 78.7, 78.5, 73.27, 73.21, 73.0, 70.3, 69.95, 69.91 (2C), 67.1, 66.8 (2C), 63.5 (t; CH<sub>2</sub>O), 61.2 (t; C-6), 61.1 (t; C-6), 60.0 (t; C-6), 48.8 (t; CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 39.0 (t; CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

HRMS:  $m/z$ : calcd para C<sub>20</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>17</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 570.2005; encontrado: 570.1998.

**2-aminoetil  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-manopiranosido (27).**<sup>42, 43</sup>



A partir del tetrasacárido **22** (380 mg, 0.205 mmol, 1 equiv.) se obtuvo el tetrasacárido desprotegido **27** (118 mg, 0.166 mmol, 81%) como una espuma.

$[\alpha]_D^{24}+48.1$  (c=0.51; H<sub>2</sub>O).

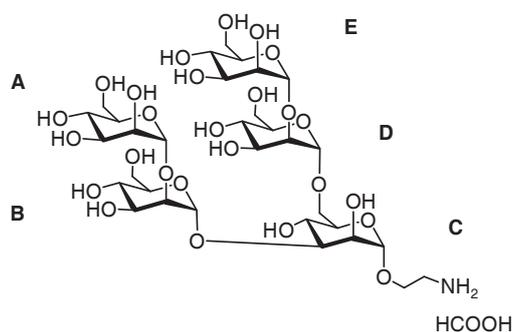
<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta=$ 5.38 (s, 1H, H-1C), 5.32 (s, 1H, H-1B), 5.06 (s, 1H, H-1A), 4.87 (s, 1H, H-1D), 4.13-4.12 (m, 2H), 4.09-4.08 (m, 2H), 4.04-3.84 (m, 9H), 3.82-3.63 (m, 12H), 3.59-3.52 (m, 1H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.95-2.84 (m, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=102.2$  (C-1A), 100.7 (C-1C), 100.6 (C-1B), 99.8 (C-1D), 78.6 (C-2C), 78.5 (2C; C-2B, C-3D), 73.2 (3C; C-5A, C-5B, C-5C), 73.1 (4C; C-5D), 70.3 (C-3A), 70.0 (2C; C-3B, C-3C), 69.9 (C-2A), 69.4 (C-2D), 67.3 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 67.0 (C-4B), 66.9 (C-4C), 66.8 (C-4A), 65.9 (C-4D), 60.9 (2C; C-6B, C-6D), 60.8 (2C; C-6A, C-6C), 41.9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ).

IR (KBr):  $\tilde{\nu}=3394$  (ancha), 2925, 2856, 1594, 1455, 1131, 1058  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS:  $m/z$ . calcd para  $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{NO}_{21}^+$  [ $M+\text{H}$ ] $^+$ : 710.2713; encontrado: 710.2738.

**Formiato de 2-aminoetil Bis( $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3,6)- $\alpha$ -D-manopiranosido (28).** <sup>42, 43</sup>



A partir del pentasacárido **23** (62.6 mg, 0.029 mmol, 1 equiv.) se obtuvo el pentasacárido desprotegido **28** (19.2 mg, 0.021 mmol, 72%) como un sólido blanco.

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} +65.7$  ( $c=0.825$ ;  $\text{H}_2\text{O}$ ).

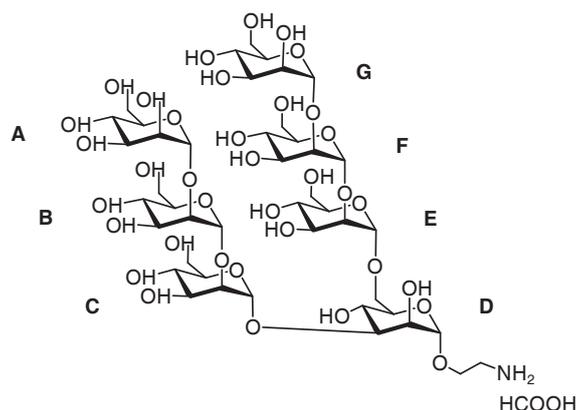
$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=8.45$  (s, 1H,  $\text{HCO}_2^-$ ), 5.37 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1B), 5.16 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1D), 5.05 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1A), 5.04 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1E), 4.79 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1C), 4.18-4.14 (m, 1H), 4.13-4.10 (m, 1H), 4.09-4.06 (m, 2H), 4.03-3.83 (m, 12H), 3.83-3.60 (m, 16H), 3.31-3.24 (m, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=170.4$  ( $\text{HCOO}^-$ ), 102.3 (C-1E), 102.2 (C-1A), 100.8 (C-1B), 100.0 (C-1C), 97.9 (C-1D), 78.9 (C-3C), 78.7 (C-2D), 78.5 (C-2B), 73.3 (C-5A), 73.2 (2C, C-5B, C-5E), 72.7 (C-5D), 71.3 (C-5C), 70.3 (2C, C-3A, C-3E), 70.2 (C-3D), 70.0 (C-3B), 69.9 (2C, C-2A, C-2E), 69.4 (C-2C), 66.9 (2C, C-4B, C-4D), 66.8 (2C, C-4A, C-4E), 65.4 (C-4C), 65.3-60.9 (5C, 5xC-6), 63.4 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 39.1 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ).

IR (KBr):  $\tilde{\nu}=3402$  (ancha), 2925, 2851, 1596, 1354, 1132, 1060  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS:  $m/z$ . calcd para  $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{NO}_{26}^+$  [ $M+\text{H}$ ] $^+$ : 872.3242; encontrado: 872.3218.

**Formiato de 2-aminoetil Bis( $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3,6)- $\alpha$ -D-manopiranosido (29).** <sup>42, 43</sup>



A partir del heptasacárido **24** (150 mg, 0.051 mmol, 1 equiv.) se obtuvo el heptasacárido desprotegido **29** (39.4 mg, 0.032 mmol, 62%) como un sólido blanco.

$[\alpha]_D^{25} +73.8$  (c=0.78; H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$ =8.47 (s, 1H; HCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), 5.37 (s, 1H; H-1C), 5.32 (s, 1H; H-1B), 5.31 (s, 1H; H-1F), 5.15 (s, 1H; H-1E), 5.06 (s, 2H; H-1A and H-1G), 4.88 (s, 1H; H-1D), 4.25-3.57 (m, 44H), 3.35-3.22 (m, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N)

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$ =señal de HCOO<sup>-</sup> no detectada, 102.3 (C-1G), 102.2 (C-1A), 100.8 (C-1C), 100.6 (2C, C-1B, C-1F), 100.0 (C-1D), 97.9 (C-1E), 78.9 (C-3D), 78.7 (C-2E), 78.5 (d, 3C, C-2B, C-2C, C-2F), 73.3 (C-5A), 73.2 (d, 4C, C-5B, C-5C, C-5F, C-5G), 72.7 (C-5E), 71.3 (C-5D), 70.3 (2C, C-3A, C-3G), 70.2 (C-3E), 70.0 (d, 3C, C-3B, C-3C, C-3F), 69.9 (d, 2C, C-2A, C-2G), 69.4 (C-2D), 67.0 (d, 2C, C-4B, C-4F), 66.9 (d, 2C, C-4C, C-4E), 66.8 (d, 2C, C-4A, C-4G), 65.4 (2C, C-4D, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 65.3-60.9 (7C, 7xC-6), 39.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N).

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$ =3386 (ancha), 2928, 2863, 1131, 1058 cm<sup>-1</sup>.

HRMS: *m/z*: calcd para C<sub>44</sub>H<sub>78</sub>NO<sub>36</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 1196.4298; encontrado: 1196.4350.

### 4.3. Síntesis de espaciadores

#### Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 30 y 31.

Sobre una disolución de hexa o tetraetilenglicol (4.3-5 equiv.) y NaOH al 50% (1 equiv.) agitada a 100°C durante 30 minutos, se añadió 11-bromo-undeceno (1 equiv.) y se agitó a reflujo durante 14 horas. Después la mezcla se enfrió, se extrajo con hexano 6 veces y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se concentró y se purificó por columna cromatográfica (AcOEt) dando lugar al producto deseado.

**3,6,9,12,15,18-hexaoxa-nonacos-28-en-1-ol (30).**

A partir de hexaetilenglicol (8.87 mL, 34.3 mmol, 5 equiv.) y 11-bromo-undeceno (1.57 mL, 6.87 mmol, 1 equiv.) se obtuvo **30** (2.0 g, 4.46 mmol, 65%) como un aceite amarillo.  $R_f=0.36$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95:5).

$^1\text{H}$  RMN (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=5.81$  (m, 1H;  $-\text{CH}=\text{}$ ), 4.94 (m, 2H;  $\text{CH}_2=\text{}$ ), 3.74-3.55 (m, 24H), 3.44 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.07-2.00 (m, 2H;  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 1.60-1.54 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 1.39-1.23 (m, 12H).

**3,6,9,12-tetraoxatricos-22-en-1-ol (31).**

A partir de tetraetilenglicol (18.6 mL, 95.7 mmol, 4.3 equiv.) y 11-bromo-undeceno (4.8 mL, 22.1 mmol, 1 equiv.) se obtuvo **31** (5.8 g, 16.7 mmol, 76%) como un aceite amarillo.  $R_f=0.35$  ( $\text{AcOEt}/\text{tolueno}$  9:1).

$^1\text{H}$  RMN (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=5.79$  (m, 1H;  $-\text{CH}=\text{}$ ), 4.6 (m, 2H;  $\text{CH}_2=\text{}$ ), 3.76-3.55 (m, 24H), 3.42 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.13 (m, 2H;  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 1.58 (m, 2H;  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 1.39-1.23 (m, 12H).

**Procedimiento general para la síntesis de los tioacetil derivados 32 y 33.**

Sobre una disolución 0.17M de las olefinas **30** y **31** (1 equiv) en THF se añadió ácido tioacético (4 equiv) y una cantidad catalítica de AIBN. La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 18 h. Una vez terminada la reacción se concentró y se purificó por columna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1) para dar los compuestos **32** y **33** respectivamente.

**29-tioacetil-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-nonacosan-1-ol (32).**

A partir de la olefina **30** (1.46 g, 3.36 mmol) se obtuvo **32** (1.36 g, 2.65 mmol, 79%) como un sirupo.  $R_f=0.28$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95:5).

$^1\text{H}$  RMN (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=3.70$ -3.54 (m, 24H), 3.42 (t,  $J=6.7$  Hz, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.84 (t,  $J=7.3$  Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{SAC}$ ), 2.30 (s, 3H; SAC), 1.51 (m, 4H), 1.45-1.25 (m, 14H).

**23-tioacetil-3,6,9,12-tetraoxatricosan-1-ol (33).**

A partir de la olefina **31** (4.8 mL, 67 mmol) se obtuvo **33** (5.7 g, 13.5 mmol, 81%) como un sirupo.  $R_f=0.26$  ( $\text{AcOEt}/\text{tolueno}$  9:1).

$^1\text{H}$  RMN (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=3.76$ -3.51 (m, 16H), 3.42 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.83 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{SAC}$ ), 2.29 (s, 3H; SAC), 1.55 (m, 4H), 1.40-1.17 (m, 14H).



**1-azido-29-tioacetil-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-nonanosano (36).**

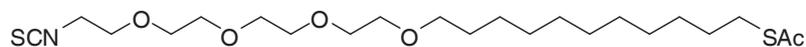
Sobre una disolución de **32** (0.7 g, 1.37 mmol, 1 equiv), NaN<sub>3</sub> (178 mg, 2.74 mmol, 2 equiv), PPh<sub>3</sub> (540 mg, 2.05 mmol, 1.5 equiv) en DMF (7 mL) se añadió BrCCl<sub>3</sub> gota a gota (408 mg, 203 µL, 2.05 mmol, 1.5 equiv) y la mezcla se agitó durante 12 horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (50 mL) y se lavó con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh, se concentró y se purificó por columna cromatográfica (AcOEt/Tolueno 9:1) para obtener **36** como un aceite incoloro (610 mg, 1.14 mmol, 83%). R<sub>f</sub>=0.71 (AcOEt/MeOH 95:5).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=3.53-3.73 (m, 22H), 3.44 (t, *J*=6.9 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.39 (t, *J*=5.1 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.86 (t, *J*=7.4 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>SAc), 2.32 (s, 3H; SAc), 1.54 (m, 4H), 1.22-1.39 (m, 14H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=196.1 (s; CO), 71.5 (d; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 70.72, 70.70, 70.67, 70.66, 70.64, 70.59, 70.55, 70.54, 70.1, 70.05, 70.03, 50.7 (d; CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 30.6 (d; CH<sub>2</sub>SAc), 29.65, 29.63, 29.54, 29.51, 29.49, 29.46, 29.44, 29.14, 29.11, 29.10, 28.0, 26.1.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$ =2926.1, 2856.1, 1692.1, 1118.6 cm<sup>-1</sup>.

ESI-MS: *m/z*: calcd C<sub>25</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>SN<sup>+</sup> [M+Na]: 558.3; encontrado: 558.3.

**1-isotiocianato-3,6,9,12-tetraoxa-29-tioacetil-tricosano (38).<sup>20</sup>**

El alcohol **33** (942 mg, 2.23 mmol, 1 equiv), PPh<sub>3</sub> (1.5 equiv) y NaN<sub>3</sub> (2 equiv) se disolvieron en DMF (10 mL) y se adicionó BrCCl<sub>3</sub> (1.5 equiv) gota a gota. La mezcla se agitó 30 minutos a temperatura ambiente hasta observar el consumo total del alcohol (TLC: Hexano/AcOEt 8:2), y 30 minutos más a 40°C, hasta observar el consumo total del intermedio de bromo (TLC: Tolueno). La mezcla se diluyó en Et<sub>2</sub>O, se lavó con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh, y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en tolueno (5 mL) y se añadió PPh<sub>3</sub> (1.5 equiv) y CS<sub>2</sub> (20 equiv). La mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 4h, se concentró a presión reducida, y se purificó por columna cromatográfica (gradiente en hexano/AcOEt hasta 95:5) para obtener **38** como un aceite incoloro (746 mg, 1.61 mmol, 72%). R<sub>f</sub>=0.71 (AcOEt/MeOH 95:5).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=3.69-3.55 (m, 16H), 3.44 (t, *J*=7.0 Hz, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.86 (t, *J*=7.5 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>SAc), 2.32 (s, 3H; SAc), 1.60-1.52 (m, 4H), 1.36-1.24 (m, 14H).

<sup>13</sup>C RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=195.7 (s; C=O), 131.9 (s; NCS), 71.3, 70.6, 70.55, 70.51, 70.45, 69.9, 69.2, 45.1 (d; CH<sub>2</sub>NCS), 30.5 (q; CH<sub>3</sub>CO), 29.5, 29.40, 29.37, 29.35, 29.31, 29.0, 28.96, 28.66, 25.9.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$ =2113, 2186  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS:  $m/z$ : calcd. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{NO}_5\text{S}_2\text{Na}$   $[M+\text{Na}]^+$ : 486.2318; encontrado: 486.2329.

**29-29'-ditio-bis[1-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-nonanosano] (39).**<sup>21</sup>

Sobre una disolución de la azida **36** (300 mg, 0.56 mmol, 1 equiv) en THF (3 mL) se añadieron  $\text{PPh}_3$  (587 mg, 2.24 mmol, 4 equiv) y una disolución acuosa de HCl 0.2N (50  $\mu\text{L}$ ). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró. El crudo se disolvió en AcOEt (100 mL) y se lavó con una disolución acuosa de HCl al 10%. La fase acuosa se concentró a presión reducida para obtener el compuesto **39** como un aceite (221 mg, 0.47 mmol, 86%).  $R_f=0.17$  (<sup>i</sup>PropOH/MeOH 4:1).

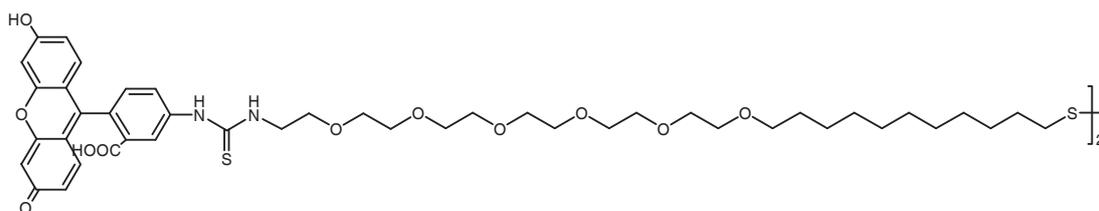
$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ =3.78-3.64 (m, 22H), 3.50 (t,  $J=7.0$  Hz, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.17 (m, 2H;  $\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ), 2.70 (t,  $J=7.0$  Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{SS}$ ), 1.69 (m, 2H;  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.60 (m, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.50-1.25 (m, 14H).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ =72.4 (d;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 71.5, 71.44, 71.42, 71.35, 71.31, 71.28, 71.2, 71.16, 71.11, 70.9, 70.7, 67.8 (d;  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ), 40.4 (d;  $\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ), 39.7 (d;  $\text{CH}_2\text{SS}$ ), 30.7, 30.63, 30.61, 30.58, 30.3, 30.2, 29.4, 27.2.

ESI-MS:  $m/z$ : calcd para  $\text{C}_{23}\text{H}_{50}\text{NO}_6\text{S}^+$   $[M+\text{H}]^+$ : 468.4; encontrado: 467.4.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$ =2103, 2181  $\text{cm}^{-1}$ .

**Bis[N-fluorescein-N'-(29-mercapto-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-nonacosanil) tiourea] (40).**<sup>34</sup>



Sobre una disolución del disulfuro **39** (109 mg, 0.233 mmol, 1 equiv) en agua (10 mL) se añadió  $\text{NaHCO}_3$  sólido hasta pH 8-9 y se agitó durante 12 horas. El isotiocianato de fluoresceína (97.7 mg, 0.245 mmol, 1.05 equiv) se disolvió en 3 mL de acetona:metanol 1:1 y se añadió sobre la disolución agitada del espaciador amina hasta su consumo total (1hr). El crudo se concentró a vacío, se disolvió en metanol, se filtró para eliminar las sales de  $\text{NaHCO}_3$  y se purificó mediante columna de Sephadex LH20 en metanol para obtener el producto **40** puro como un sólido liofilizado naranja (123 mg, 0.143 mmol, 62%).  $R_f=0.5$  (<sup>i</sup>propOH/ $\text{NH}_3$  4:1).

$^1\text{H}$  RMN (500MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ =7.88 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; FITC), 7.77 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H; FITC), 7.21 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H; FITC), 7.16 (d,  $J=9.5$  Hz, 2H; FITC), 6.56 (dd,  $J=2.0, 9.0$  Hz, 2H; FITC), 6.51 (d,  $J=2.0$  Hz, 2H; FITC), 3.86 (brs, 2H; NH), 3.77-3.54 (m, 24H), 3.46 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H;

OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.67 (t, *J*=7.5 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>SS), 1.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.56 (m, 2H), 1.45-1.25 (m, 14H).

<sup>13</sup>C RMN (500MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ=182.5 (s; C=O, FITC), 182.3 (s; C=S), 173.6 (s; COOH), 160.3, 132.6, 131.7, 131.0, 124.9, 123.9, 113.4, 104.4, 72.4, 71.3, 71.0, 70.4, 45.5 (d; CH<sub>2</sub>NH), 39.8 (d; CH<sub>2</sub>SS), 30.8, 30.69, 30.65, 30.3, 30.2, 29.5, 27.2.

#### 4.4. Síntesis de neoglicoconjugados por glicosidación directa

##### 2-bromoetil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-manopiranosido (41).<sup>23</sup>

Sobre una disolución agitada de penta-O-acetil-α-D-manopiranosido (15.0 g, 38.4 mmol, 1 equiv) y 2-bromoetanol (5.7 mL, 76.8 mmol, 2 equiv) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (250 mL) se añadió boro trifluoroeterato (24.4 mL, 192.2 mmol, 5 equiv). La reacción se agitó en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 12 horas. La mezcla de reacción se diluyó en acetato de etilo y se lavó con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La disolución se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh., se filtró y concentró a vacío. El producto se precipitó de una mezcla Et<sub>2</sub>O/Hexano obteniendo el compuesto **41** como un polvo blanco (12.4 g, 27.3 mmol, 71%). R<sub>f</sub>=0.67 (hexano/AcOEt 40:60).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=5.33 (dd, *J*=3.4, 10.2 Hz, 1H; H-3), 5.24-5.29 (m, 2H; H-2, H-4), 4.86 (d, *J*=1.6 Hz, 1H; H-1), 4.26 (dd, *J*=6.0, 12.8 Hz, 1H; H-6), 4.13-4.09 (m, 2H; H-5, H-6), 3.99-3.84 (m, 2H; CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br), 3.50 (t, *J*=6.0 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br), 2.14 (s, 3H; OAc), 2.09 (s, 3H; OAc), 2.03 (s, 3H; OAc), 1.98 (s, 3H; OAc).

##### 2-tioacetiletil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-manopiranosido (42).<sup>23</sup>

Sobre una disolución agitada de **41** (5 g, 11.0 mmol, 1 equiv) en DMF seca (40 mL) se añadió tioacetato de potasio (1.5 g, 13.18 mmol, 1.2 equiv) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se filtró, se diluyó en acetato de etilo y se lavó con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La mezcla se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh, se filtró y se concentró a presión reducida. El crudo se purificó por columna cromatográfica (gradiente hexano/AcOEt hasta 7:3) para obtener el compuesto **42** como un aceite amarillo (4.6 g, 10.2 mmol, 93%). R<sub>f</sub>=0.67 (hexano/AcOEt 40:60).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>): δ=5.35-5.23 (m, 3H), 4.83 (d, *J*=1.5 Hz, 1H; H-1), 4.27 (dd, *J*=5.4, 12.0 Hz, 1H; H-6), 4.11 (dd, *J*=2.4, 12.0 Hz, 1H; H-6), 4.08-3.99 (m, 1H; H-5), 3.82-3.74 (m, 1H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.68-3.58 (m, 1H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.12 (t, *J*=6.3 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>SAC), 2.36 (s, 3H; SAC), 2.15 (s, 3H; OAc), 2.10 (s, 3H; OAc), 2.05 (s, 3H; OAc), 2.00 (s, 3H; OAc).

##### 1-(pent-4'-enil)-α-D-manopiranosido (43).<sup>25</sup>

Sobre una disolución agitada de 4-penten-1-ol (8.25 mL, 77.5 mmol, 14 equiv) se añadió D-manosa (1 g, 5.55 mmol, 1 equiv) y ácido canforsulfónico (15 mg). La mezcla se agitó a 90-100

°C en atmósfera de argón durante 12 horas. El crudo de pentenol se coevaporó varias veces con tolueno a presión reducida y el residuo se purificó por columna cromatográfica en gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 7:1) obteniendo **43** como un sirupo amarillo (0.956 g, 3.85 mmol, 69%). R<sub>f</sub>=0.25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 7:1).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ=5.76 (m, 1H; CH=), 4.96 (m, 2H; =CH<sub>2</sub>), 4.79 (s, 1H; H-1), 3.73-3.91 (m, 5H), 3.64 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.49 (m, 1H), 3.38 (m, 1H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.08 (m, 2H; CH<sub>2</sub>CH=), 1.63 (m, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

#### **Pent-4-enil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-manopiranosido (44).**<sup>24,44</sup>

Sobre una disolución agitada de **43** (0.956 g, 3.85 mmol, 1 equiv) en piridina (5.5 mL) se añadió anhídrido acético (3.3 mL, 34.9 mmol, 9 equiv) y dimetilaminopiridina (DMAP) en cantidad catalítica. La disolución se agitó durante 12 horas, se diluyó en AcOEt (20 mL), se lavó con agua (20 mL), HCl 10% (20 mL) y con una disolución saturada de NaHSO<sub>4</sub> (20 mL). La fase orgánica se secó sobre NaSO<sub>4</sub> anh, se filtró y se concentró a vacío. El crudo se purificó por columna cromatográfica en gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5) obteniendo **44** como un sirupo (1.56 g, 3.73 mmol, 97%). R<sub>f</sub>=0.37 (hexano/AcOEt 50:50).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ=5.89-5.71 (m, 1H; CH=), 5.36-5.24 (m, 3H), 5.11-4.63 (m, 2H; =CH<sub>2</sub>), 4.79 (s, 1H; H-1), 4.34-4.21 (m, 1H; H-6), 4.09 (m, 1H; H-6), 4.04-4.39 (m, 1H; H-5), 3.76-3.62 (m, 1H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.52-3.39 (m, 1H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.15 (s, 3H; OAc), 2.10 (s, 3H; OAc), 2.04 (s, 3H; OAc), 1.99 (s, 3H; OAc), 1.74-1.62 (m, 4H).

#### **5-tioacetilpentanil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-manopiranosido (45).**<sup>24</sup>

Sobre una disolución agitada de **44** (800 mg, 1.92 mmol, 1 equiv) en THF seco se añadió ácido tioacético (4 equiv) y una cantidad catalítica de AIBN. La mezcla se agitó a reflujo durante 12 horas. El crudo se concentró y se purificó por columna cromatográfica en gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5) para obtener **45** como un sirupo (0.72 g, 1.46 mmol, 74%). R<sub>f</sub>=0.30 (hexano/AcOEt 1:1).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ=5.36-5.22 (m, 3H), 4.79 (s, 1H; H-1), 4.28 (dd, *J*=5.1, 12.0 Hz, 1H; H-6), 4.17-4.05 (m, 1H; H-6), 4.03-3.92 (m, 1H; H-5), 3.77-3.59 (m, 1H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.54-3.37 (m, 1H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.87 (t, *J*=6.9 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>SAc), 2.32 (s, 3H; SAc), 2.15 (s, 3H; OAc), 2.10 (s, 3H; OAc), 2.04 (s, 3H; OAc), 2.00 (s, 3H; OAc), 1.74-1.50 (m, 6H).

#### **Bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-manopiranosido (46).**<sup>28</sup>

Sobre una disolución de D-manosa (5 g) en anhídrido acético se añadió HBr/HAc glacial (30% w/v) hasta que la disolución se torna color naranja. Después se añadieron 37 mL más de HBr/HAc y se agitó durante 3 horas. La mezcla de reacción se disolvió en tolueno y se coevaporó a presión reducida eliminando Ac<sub>2</sub>O. El crudo se disolvió en AcOEt, se extrajo con

agua, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anh y se concentró a vacío obteniendo **46** como un sirupo marrón.  $R_f=0.71$  (Hexano/AcOEt 1:1).

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=6.29$  (s, 1H; H-1), 5.72 (dd,  $J=3.3, 10.2$  Hz, 1H; H-3), 5.45 (dd,  $J=1.5, 3.3$  Hz, 1H; H-2), 5.37 (t,  $J=10.1$ , 1H; H-4), 4.33 (dd,  $J=4.7, 12.2$  Hz;  $\text{H}_{6_{a/b}}$ ), 4.22 (m, 1H; H-5), 4.11 (m, 1H;  $\text{H}_{6_{a/b}}$ ).

**29'-tioacetil-3',6',9',12',15',18'-hexaoxa-nonacosil manopiranosido (47).**<sup>27</sup>

**2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-**

Una disolución de **46** (500 mg, 1.21 mmol, 1 equiv) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) seco y el espaciador **32** (935 mg, 1.83 mmol, 1.5 equiv) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) seco se añadió sobre una mezcla que contiene  $\text{Hg}(\text{CN})_2$  (1.05 equiv, 321 mg, 1.28mmol) y tamiz molecular de 4Å MS (0.5g) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 24 horas, se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se filtró sobre celita. El filtrado se lavó con una disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , con agua, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anh y se concentró. El crudo se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hex 1:1) y se obtuvo **47** (540 mg, 0.64 mol, 53%) como un sirupo.  $R_f=0.51$  (AcOEt).

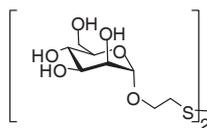
$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=5.47$  (d,  $J=2.5$  Hz, 1H; H-1), 5.26 (t,  $J=9.5$  Hz, 1H; H-4), 5.13 (dd,  $J=4.0, 10.0$  Hz, 1H; H-3), 4.58 (dd,  $J=3.0, 4.0$  Hz, 1H; H-2), 4.22 (dd,  $J=5.0, 12.0$  Hz, 1H;  $\text{H}_{6_{a/b}}$ ), 4.13-4.12 (m, 1H;  $\text{H}_{6_{a/b}}$ ), 3.70-3.52 (m, 25H), 3.42 (t,  $J=7.0$  Hz, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.81 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{SAc}$ ), 2.30 (s, 3H; SAc), 2.15 (s, 3H; OAc), 2.10 (s, 3H; OAc), 2.05 (s, 3H; OAc), 2.00 (s, 3H; OAc), 1.59-1.49 (m, 4H), 1.35-1.20 (m, 14H).

$^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=195.9$  (s;  $\text{S}(\text{CO})\text{Me}$ ), 171.0, 170.5, 170.2, 169.4 (s, 4C;  $\text{CO})\text{Me}$ ), 97.3 (d; C-1), 76.3, 71.47, 71.38, 70.55, 70.53, 70.50, 70.37, 69.98, 69.84, 65.5, 62.3, 61.8, 60.3, 30.5, 29.57, 29.48, 29.43, 29.40, 29.38, 29.08, 29.04, 28.74, 26.0, 24.4, 20.9, 14.1.

Análisis elemental calcd (%) para  $\text{C}_{39}\text{H}_{68}\text{O}_{17}\text{S}$  (840.4): C 55.70, H 8.15, S 3.81; encontrado: 53.23, H 7.76, S 3.66.

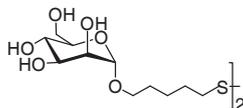
**Procedimiento general para las desacetilaciones: Síntesis de los compuestos 1, 2 y 3.**

Sobre una disolución 0.1M de **42**, **45** y **47** (1 equiv) en MeOH se añadió 1 equiv de una solución metanólica de MeONa 1N. La reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se neutralizó con resina ácida Amberlita IR-20, se filtró, se concentró a sequedad y el crudo se purificó columna cromatográfica de sephadex LH20 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1:1).

**2,2'-ditio bis (etil  $\alpha$ -D-manopiranosido) (1).**<sup>23</sup>

A partir de **42** (4.6 g, 10.2 mmol) se obtuvo el compuesto **1** como una espuma blanca (2.04 g, 8.47 mmol, 83%).  $R_f=0.60$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  7:3).

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=4.81$  (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1), 3.56-3.88 (m, 8H), 2.72 (t,  $J=6.3$  Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{SS}$ ).

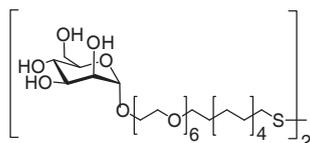
**5,5'-Ditiobis (pentanil  $\alpha$ -D-manopiranosido) (2).**<sup>24</sup>

A partir de **45** (0.49 g, 1 mmol) se obtuvo el compuesto **2** obtuvo como sirupo mezcla de tiol y disulfuro (280 mg, 1.0 mmol, cuantitativo).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=4.75$  (s, 1H; H-1), 3.83 (dd,  $J=2.0, 11.5$  Hz, 1H; H-6), 3.80-3.42 (m, 7H), 2.71 (t,  $J=7.5$  Hz, 1H;  $\text{CH}_2\text{SS}$ ); 2.52 (t,  $J=7.5$  Hz, 1H;  $\text{CH}_2\text{SH}$ ), 1.77-1.45 (m, 6H).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=99.7$  (C-1), 72.8, 70.8, 70.5, 66.8, 61.1, 59.7 (C-6), 37.8 ( $\text{CH}_2\text{SS}$ ), 33.2, 28.4, 28.2, 24.4, 23.1 ( $\text{CH}_2\text{SH}$ ).

Análisis elemental calcd (%) para  $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{S}$  (282.1): C 46.79, H 7.85, S 11.36; encontrado: 47.21, H 7.65, S 9.48.

**29,29'-Ditio bis (3',6',9',12',15',18'-hexaoxa-nonacosil  $\alpha$ -D-manopiranosido) (3)**

A partir de **47** (130 mg, 0.15 mmol) se obtuvo el compuesto **3** (97 mg, 0.15 mmol, cuantitativo) como un sirupo.  $R_f=0.71$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  5:1).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=5.48$  (d,  $J=2.5$  Hz, 1H; H-1), 4.49 (dd,  $J=2.5, 3.5$  Hz, 1H; H-2), 3.86 (dd,  $J=2.5, 12.0$  Hz, 1H; H-6), 3.76-3.60 (m, 28H), 3.49 (t,  $J=6.5$  Hz, 1H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.29-3.22 (m, 1H; H-5), 2.79 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{SS}$ ), 1.74-1.66 (m, 1H), 1.64-1.57 (m, 3H), 1.47-1.28 (m, 14H).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=99.2$  (d; C-1), 81.2, 77.0, 73.31, 73.29, 72.4, 71.53, 71.51, 71.49, 71.48, 71.47, 71.41, 71.39, 71.2, 71.1, 68.6, 62.9, 62.6 (t; C-6), 39.9 (t;  $\text{CH}_2\text{SS}$ ), 30.76, 30.72, 30.68, 30.65, 30.63, 30.3, 30.2, 29.5, 27.2, 25.8.

Análisis elemental calcd (%) para ( $\text{C}_{29}\text{H}_{58}\text{O}_{12}\text{S}$  (630.3): C 55.21, H 9.27, S 5.08; encontrado: 53.86, H 8.48, S 4.18.

#### **2-N-benciloxicarbonilaminoetil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranosido (48)**

Sobre una disolución agitada de penta-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranosido (2 g, 5.12 mmol, 1 equiv) y 2-(N-benciloxicarbonil)aminoetanol (2.0g, 10.24 mmol, 2 equiv) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) se añadió  $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$  (3.2 mL, 25.6 mmol, 5 equiv). La mezcla de reacción se agito a reflujo durante 12 horas, se diluyó con acetato de etilo, se lavó con una disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anh y se concentró. El crudo se purificó por columna cromatográfica en gel de sílice (Hexano/AcOEt 7:3) aislando **48** como un aceite incoloro (2.0 g, 3.78 mmol, 74%).  $R_f=0.55$  (hexano/AcOEt 40:60).

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta=7.39\text{-}7.37$  (m, 5H;  $\text{H}_{Ar}$ ), 5.35-5.14 (m, 4H), 5.11 (s, 2H;  $\text{CH}_2\text{-Z}$ ), 4.82 (d,  $J=1.8$  Hz, 1H; H-1), 4.24 (dd,  $J=5.7$ , 12.3 Hz, 1H; H-6), 4.10-4.03 (m; H-6), 3.99-3.92 (m, 1H; H-5), 3.82-3.32 (m, 4H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.15 (s, 3H; OAc), 2.08 (s, 3H; OAc), 2.03 (s, 3H; OAc), 1.99 (s, 3H; OAc).

#### **2-aminoetil $\alpha$ -D-manopiranosido (49)**

Sobre una disolución agitada de **32** (1 g, 1.9 mmol, 1 equiv) en  $\text{MeOH}/\text{HCO}_2\text{H}$  95:5 (10 mL) se añadió Pd/C 10% (500 mg). La mezcla de reacción se purgó con  $\text{H}_2$  y se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de  $\text{H}_2$  durante 2 horas. La mezcla de reacción se neutralizó con  $\text{NEt}_3$ , se filtró y se concentro a sequedad. El residuo se disolvió en  $\text{MeOH}$  (50 mL) y se añadió  $\text{MeONa}$  (103 mg, 1.9 mmol, 1 equiv). La disolución se agitó durante 20 minutos y se neutralizó con resina ácida amberlita IR-20, se filtró y se concentró a sequedad. El crudo se purificó por columna cromatográfica DOWEX 50W8 ( $\text{H}^+$ ) obteniendo **49** como una espuma amarilla (280 mg, 1.25 mmol, 66%).  $R_f=0.42$  ( $\text{NH}_4\text{OH}/\text{PrOH}$  1:1).

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz): 4.78 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H, H-1), 3.88-3.77 (m, 3H), 3.74-3.66 (m, 2H), 3.64-3.47 (m, 3H), 2.93-2.87 (m, 2H;  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ).

ESI-MS:  $m/z$  calcd para  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{NO}_6^+$  [ $M+\text{H}$ ] $^+$ : 224.11; encontrado: 224.03;  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_6\text{Na}^+$  [ $M+\text{Na}$ ] $^+$ : 246.09; encontrado: 246.01.

#### 4.5. Síntesis de neoglicoconjugados por acoplamiento peptídico

##### Procedimiento general para el acoplamiento peptídico.

Sobre una disolución de espaciador **34** (1 equiv), HOBT (3 equiv) y DIC (3 equiv) en DMF seca se añadió una disolución del aminoalquil derivado (1.2 equiv) en DMF seca. La reacción se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 32 horas. El crudo se purificó mediante columna cromatográfica de Sephadex LH20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 1:1). Las mezclas resultantes se desprotegeron con una disolución 1 N de MeONa (1 equiv) en metanol (4 horas, t.a.), se neutralizaron con una disolución acuosa de HCl 0.1 N y se purificaron por columna de Sephadex LH20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 1:1). La integración de las señales correspondientes a los protones anoméricos de los manósidos y de los protones metilénicos en alfa al grupo carboxilo de los espectros de <sup>1</sup>H RMN se utilizaron para determinar la proporción manósido/carboxílico de las mezclas. En la interpretación del espectro de masas 2M=disulfuro del manoconjugado y 2L=disulfuro del linker **35**.

##### (32-tioacetil-3-amino-6,9,12,15,18,21-hexaoxa-4-oxo-etil)dotriacontano $\alpha$ -D-manopiranosido (**50**).

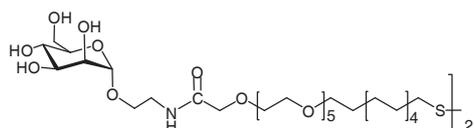
A partir de la amina **49** (35 mg, 0.157 mmol) y el espaciador **34** (69 mg, 0.131 mmol) se obtuvo el compuesto **50** como un sirupo incoloro (84 mg, 0.115 mmol, 88%). R<sub>f</sub>=0.60 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 5:1).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$ =4.83 (s, 1H; H-1), 4.05 (s, 2H; HNCH<sub>2</sub>CO), 3.89-3.83 (m, 3H), 3.77-3.56 (m, 27H), 3.52 (t, *J*=6.5 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.91 (t, *J*=7.0 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>SAc), 2.36 (s, 3H; SAc), 1.60 (m, 4H), 1.47-1.30 (m, 14H).

<sup>13</sup>C RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$ =197.8 (s; C=O), 173.0 (s; NHCO), 101.6 (d; C-1), 74.8, 72.5, 72.4, 72.1, 72.06, 71.98, 71.52, 71.49, 71.3, 71.2, 71.1, 68.5, 66.9, 62.9 (t; C-6), 39.7 (d; CH<sub>2</sub>NHCO), 30.71, 30.68, 30.66, 30.58, 30.53, 30.1, 29.8, 29.7, 27.1.

HRMS: *m/z* calcd para C<sub>33</sub>H<sub>63</sub>NO<sub>14</sub>SNa<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 752.3861; encontrado 752.3881.

##### 32,32'-ditio bis [(3-amino-6,9,12,15,18,21-hexaoxa-4-oxo-etil)dotriacontano- $\alpha$ -D-manopiranosido] (**4**).



El compuesto **50** (16 mg, 0.021mmol, 1 equiv.) se desprotegió con una disolución 1 N de MeONa (1 equiv). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se neutralizó con una disolución 0.1 N de HCl, y el crudo se purificó por columna de Sephadex LH20

(rendimientos cuantitativos) obteniendo el compuesto **4** obtuvo un sirupo incoloro (15 mg, 0.02 mmol, cuantitativo).  $R_f=0.68$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  5:1).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=4.78$  (s, 1H; H-1), 4.03 (s, 2H;  $\text{HNCH}_2\text{CO}$ ), 3.87-3.76 (m, 3H), 3.75-3.50 (m, 27H), 3.47 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.68 (t,  $J=7$  Hz, 0.5H;  $\text{CH}_2\text{SS}$ ), 2.50 (t,  $J=6.5$  Hz, 1.5H;  $\text{CH}_2\text{SH}$ ), 1.74-1.53 (m, 4H), 1.50-1.30 (m, 14H).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=173.0$  (s;  $\text{NHCO}$ ), 101.6 (d; C-1), 74.7, 72.5, 72.4, 72.0, 71.7, 71.34, 71.26, 71.1, 71.0, 70.9, 68.5 (d;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 62.8 (t; C-6), 39.8 (d;  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 35.2 (d;  $\text{CH}_2\text{SS}$ ), 30.7, 30.6, 30.2, 29.4, 27.2, 24.9.

HRMS:  $m/z$  calcd para  $\text{C}_{31}\text{H}_{61}\text{NO}_{13}\text{SNa}^+$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ : 710.3756; encontrado 710.3752.

### Mezcla de disulfuros mixtos 5

A partir del acetato de 2-aminopropil  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosido (126 mg, 0.274 mmol) y el espaciador **34** (120 mg, 0.229 mmol) se obtuvieron 146 mg de la mezcla **5** en proporción manósidos:carboxílico 2:1.  $R_f=0.51$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  5:1).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=5.09$  (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1), 5.00 (d,  $J=1.0$  Hz, 1H; H-1'), 4.27 (s, 1H;  $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ), 4.02 (s, 2H;  $\text{HNCH}_2\text{CO}$ ), 4.00 (m, 1H; H-2'), 3.95-3.35 (m, 48H), 2.71 and 2.52 (t,  $J=7.0$  Hz, 3H;  $\text{CH}_2\text{SS}$  and  $\text{CH}_2\text{SH}$  respectively), 1.85 (m, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.60 (m, 4H), 1.48-1.29 (m, 21H).

ESI-MS:  $m/z$  calcd para  $\text{C}_{38}\text{H}_{73}\text{NO}_{18}\text{SNa}^+$  [ $\text{MH}+\text{Na}$ ] $^+$ : 886.44; encontrado: 886.38; HRMS:  $m/z$ : calcd para  $\text{C}_{38}\text{H}_{73}\text{NO}_{18}\text{SNa}^+$  [ $\text{MH}+\text{Na}$ ] $^+$ : 886.4441; encontrado: 886.4406; calcd para  $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{O}_8\text{SNa}^+$  [ $\text{L}+\text{Na}$ ] $^+$ : 504.2727; encontrado: 504.2717; calcd para  $\text{C}_{26}\text{H}_{51}\text{NO}_8\text{SNa}^+$  [ $\text{M}-\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{10}+\text{Na}$ ] $^+$ : 560.3228; encontrado; 560.3605.

### Mezcla de disulfuros mixtos 6

A partir del acetato de 2-aminopropil  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-manopiranosido (25 mg, 0.054 mmol) y del espaciador **34** (23.8 mg, 0.045 mmol) se obtuvieron 28 mg de la mezcla **6** en proporción manósidos:carboxílico 1:1.  $R_f=0.46$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  5:1).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=5.09$  (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1), 4.74 (d,  $J=1.0$  Hz, 1H; H-1'), 4.12 (s, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ), 4.06 (m, 1H; H-2'), 4.00 (s, 2H;  $\text{HNCH}_2\text{CO}$ ), 3.98 (m, 1H; H-2), 3.90-3.35 (m, 60H), 2.70 (t,  $J=7.0$  Hz, 4H;  $\text{CH}_2\text{SS}$ ), 1.85 (m, 2H), 1.69 (m, 4H), 1.58 (m, 5H), 1.44-1.27 (m, 27H).

ESI-MS:  $m/z$  calcd para  $\text{C}_{76}\text{H}_{144}\text{N}_2\text{O}_{36}\text{S}_2\text{Na}_2^{2+}$  [ $2\text{M}+2\text{Na}$ ] $^{2+}$ : 885.4; encontrado: 885.4.

**Mezcla de disulfuros mixtos 7**

A partir del acetato de 2-aminoetil ( $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-manopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-manopiranosido (91 mg, 0.144 mmol) y el espaciador **35** (63.2 mg, 0.120 mmol) se obtuvieron 103.7 mg de la mezcla **7** en proporción manósidos:carboxílico 2:1.  $R_f=0.46$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  5:1).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=5.32$  (s, 1H; H-1), 5.10 (s, 1H; H-1'), 5.02 (s, 1H; H-1''), 4.28 (s, 1H;  $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ), 4.07 (m, 1H), 4.03 (s, 2H;  $\text{HNCH}_2\text{CO}$ ), 4.01 (m, 1H), 3.94-3.37 (m, 53H), 2.73 and 2.53 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{SS}$  and  $\text{CH}_2\text{SH}$ , respectively), 1.86 (m, 2H), 1.72 (m, 2H), 1.60 (m, 4H), 1.52-1.27 (m, 21H).

ESI-MS:  $m/z$  calcd para  $\text{C}_{88}\text{H}_{164}\text{N}_2\text{O}_{46}\text{S}_2\text{Na}_2^{2+}$  [ $2M+2\text{Na}$ ] $^{2+}$ : 1047.5; encontrado: 1047.6; calcd para  $\text{C}_{26}\text{H}_{51}\text{NO}_8\text{SNa}^+$  [ $M\text{-C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{15}+\text{Na}$ ] $^+$ : 560.32; encontrado; 560.33.

**Mezcla de disulfuros mixtos 8**

A partir de acetato de 2-aminopropil  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosido (26 mg, 0.041mmol) y el espaciador **34** (18.0 mg, 0.034 mmol) se obtuvieron 40 mg de la mezcla **8** en proporción manósidos:carboxílico 1:1.  $R_f=0.20$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  2:1).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=5.09$  (s, 1H; H-1; H-1), 4.84 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1), 4.72 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1), 4.26 (s, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ), 4.07 (m, 1H), 4.02 (s, 2H;  $\text{HNCH}_2\text{CO}$ ), 3.99 (m, 1H), 3.80-3.36 (m, 63H), 2.71 (t,  $J=7.5$  Hz, 3H;  $\text{CH}_2\text{SS}$ ), 2.51 (t,  $J=7.5$  Hz, 1H;  $\text{CH}_2\text{SH}$ ), 1.87 (m, 2H), 1.70 (m, 3H), 1.59 (m, 6H), 1.52-1.27 (m, 27H).

ESI-MS:  $m/z$  calcd para  $\text{C}_{44}\text{H}_{83}\text{NO}_{23}\text{SNa}^+$  [ $MH+\text{Na}$ ] $^+$ : 1048.5; encontrado: 1048.0.

**4.6. Síntesis de neoglicoconjugados por acoplamiento de tiourea****Procedimiento general para el acoplamiento de tiourea.**

Acoplamiento: Método 1) Sobre una disolución 0.013 M del aminoazúcar **49**, **25** o **27** (1 equiv) en metanol se añadió una disolución 0.020 M del espaciador isotiocianato **38** (2 equiv) en metanol y  $\text{NEt}_3$  hasta un pH~8. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por columna de Sephadex LH20 (excepto el compuesto **38** que se purificó por columna cromatográfica en gel de sílice); Método 2) Sobre una disolución 0.013 M del aminoazúcar **26**, **28**, o **29** (1 equiv) en  $\text{H}_2\text{O}/\text{PrOH}/\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1:1) se añadió una disolución 0.020 M del espaciador isotiocianato **38** (2 equiv) en  $\text{H}_2\text{O}/\text{PrOH}/\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1:1) y  $\text{NEt}_3$  hasta un pH~8. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. El crudo se concentro a presión reducida y se trituró con  $\text{Et}_2\text{O}$  para eliminar el exceso de espaciador. El sólido insoluble se purificó por columna cromatográfica en Sephadex LH20.

**Desprotección.** El producto de acoplamiento se desprotegió con una disolución 1 N de MeONa (1 equiv). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se neutralizó con una disolución 0.1 N de HCl, y el crudo se purificó por columna de Sephadex LH20 (rendimientos cuantitativos)

***N*-(etil  $\alpha$ -D-manopiranosil),*N'*-(3,6,9,12-tetraoxa-23-tioacetil-tricosanil) tiourea. (51)**

El neoglicoconjugado **51** (125 mg, 0.181 mmol, 81%) se obtuvo como un sirupo incoloro a partir de la amina **49** (50 mg, 0.226 mmol), el espaciador **38** (207.0 mg, 0.448 mmol) y 100  $\mu$ L de NEt<sub>3</sub> (3.2 equiv). Tiempo de reacción: 1 hora; eluente para la columna cromatográfica en gel de sílice: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2. R<sub>f</sub>=0.63 (AcOEt/MeOH 4:1).

$[\alpha]_D^{24} +19.1$  (c=0.435; MeOH).

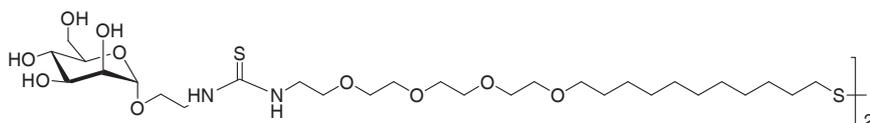
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$ =4.83 (s, 1H; H-1), 3.89-3.55 (m, 26H), 3.50 (t, *J*=6.6 Hz, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.90 (t, *J*=7.2 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>SAc), 2.35 (s, 3H; SAc), 1.59-1.57 (m, 4H), 1.50-1.20 (m, 14H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$ =197.5 (s; C=O), 183.9 (brs; C=S), 101.6 (d; C-1), 74.6, 72.4, 72.3, 71.9, 71.4, 71.2, 71.0, 70.6, 68.4 (t; NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 67.3 (t; CHOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 62.7 (t; C-6), 45.2 (brt, 2C; CH<sub>2</sub>NH), 30.70, 30.66, 30.61, 30.58, 30.5, 30.1, 29.8, 29.7, 27.1.

ATR-IR:  $\tilde{\nu}$ =3334 (ancha), 2924, 2854, 1692, 1555, 1458, 1351, 1293, 1100 cm<sup>-1</sup>.

HRMS: *m/z*. calcd para C<sub>30</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> [*M*+Na]<sup>+</sup>: 709.3374; encontrado: 709.3406.

**23,23'-Ditio bis[*N*-(etil  $\alpha$ -D-manopiranosil),*N'*-(3,6,9,12-tetraoxa-tricosanil) tiourea] (9).**



R<sub>f</sub>=0.78 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 5:1).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$ =4.78 (s, 1H; H-1), 3.90-3.51 (m, 26H), 3.47 (t, *J*=6.6 Hz, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.69 (t, *J*=6.9 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>SS), 1.72-1.64 (m, 2H), 1.61-1.53 (m, 2H), 1.47-1.20 (m, 14H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$ = (C=S) undetected, 101.8 (d; C-1), 74.8, 72.6, 72.4, 72.1, 71.6, 71.4, 71.2, 70.7, 68.6, 67.4 (t; NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 62.9 (t; C-6), 45.3 (brt, CH<sub>2</sub>NHCS), 39.9 (t; CH<sub>2</sub>SS), 30.8, 30.7, 30.6, 30.36, 30.27, 29.5, 27.3.

ATR-IR:  $\tilde{\nu}$ =3331 (ancha), 2924, 2854, 1647, 1560, 1458, 1348, 1294, 1097 cm<sup>-1</sup>.

HRMS:  $m/z$ . calcd para  $C_{28}H_{56}N_2O_{10}S_2Na^+$   $[M+Na]^+$ : 667.3269; encontrado: 667.3273.

***N*-(etil  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil),*N'*-(3,6,9,12-tetraoxa-23-tioacetil-tricosanil) tiourea (52).**

El neoglicoconjugado **52** (40.2 mg, 0.047 mmol, 73%) se obtuvo como un sirupo incoloro a partir de la amina **25** (25.0 mg, 0.065 mmol), el espaciador **38** (60.1 mg, 0.130 mmol) y 150  $\mu$ L de  $NEt_3$  (16.7 equiv) Tiempo de reacción: 3 horas; eluyente para la purificación por columna de Sephadex LH20: MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1.  $R_f=0.34$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 5:1).

$[\alpha]_D^{24} = +34.1$  (c=0.2; MeOH).

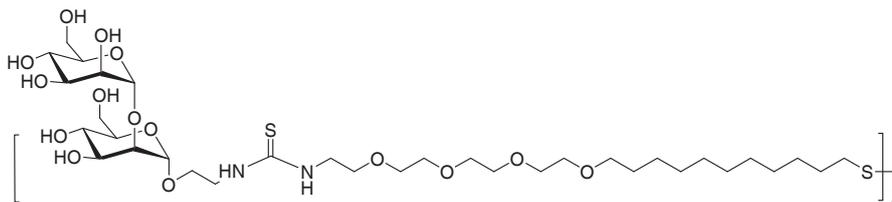
<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta=5.13$  (s, 1; H-1), 4.99 (s, 1H; H-1'), 4.04-3.96 (m, 1H; H-2'), 3.91-3.82 (m, 5H), 3.79-3.59 (m, 25H), 3.57-3.52 (m, 1H), 3.49 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.89 (t,  $J=7.0$  Hz, 2H; CH<sub>2</sub>SAC), 2.33 (s, 3H; SAC), 1.64-1.52 (m, 4H), 1.45-1.23 (m, 14H).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta=$  (C=S) undetected, 197.6 (s; C=O), 104.2 (d; C-1'), 100.1 (d; C-1), 80.5 (d; C-2), 75.1, 74.8, 72.44, 72.41, 72.1, 71.9, 71.5, 71.3, 71.1 (t; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 70.7, 69.0, 68.9, 67.4, 63.2 (t; C-6), 63.0 (t; C-6'), 45.5 (brt, 2C; CH<sub>2</sub>NH), 30.75, 30.72, 30.69, 30.6, 30.56, 30.51, 30.2, 29.9, 29.8, 27.2.

ATR-IR:  $\tilde{\nu}=3346$  (ancha), 2925, 2854, 1692, 1558, 1457, 1352, 1295, 1247, 1103, 1059 cm<sup>-1</sup>.

HRMS:  $m/z$ . calcd para  $C_{36}H_{69}N_2O_{16}S_2^+$   $[M+H]^+$ : 849.4083; encontrado: 849.4089.

**23,23'-ditio bis[*N*-(etil  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil),*N'*-(3,6,9,12-tetraoxa-tricosanil) tiourea] (10).**



$R_f=0.34$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 5:1).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta=5.11$  (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1), 4.97 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1'), 3.98-3.96 (m, 1H; H-2'), 3.90-3.80 (m, 5H), 3.75-3.50 (m, 26H), 3.47 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.69 (t,  $J=7$  Hz, 2H; CH<sub>2</sub>SS), 1.72-1.63 (m, 2H), 1.61-1.53 (m, 2H), 1.44-1.28 (m, 14H).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = (C=S) undetected, 104.2 (d; C-1), 100.1 (d; C-1'), 80.5 (d; C-2), 75.1, 74.8, 72.4, 72.1, 71.9, 71.6, 71.3, 71.1, 70.7, 69.0, 68.8, 67.4, 63.2 and 63.0 (t, 2C; C-6 and C-6'), 45.3 (brt;  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 39.8 (t;  $\text{CH}_2\text{SS}$ ), 30.7, 30.6, 30.6, 30.3, 30.2, 29.4, 29.4, 27.2.

ATR-IR:  $\tilde{\nu}$ =3330 (ancha), 2923, 2853, 1645, 1556, 1456, 1348, 1297, 1057  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS:  $m/z$ : calcd para  $\text{C}_{34}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{S}_2\text{Na}^+$  [ $M+\text{Na}$ ] $^+$ : 829.3797; encontrado: 829.3802.

***N*-(etil  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil),*N*-(3,6,9,12-tetraoxa-23-tioacetil-tricosanil) tiourea (53).**

El neoglicoconjugado **53** (25.9 mg, 0.026 mmol, 72%) se obtuvo como un sirupo incoloro a partir de la amina **26** (21.4 mg, 0.036 mmol), el espaciador **38** (33.0 mg, 0.071 mmol) y 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{NEt}_3$  (2 equiv) usando  $^i\text{PrOH}:\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  como disolvente. Tiempo de reacción: 7 horas; eluyente para la purificación por columna de Sephadex LH20:  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  9:1.  $R_f=0.57$  ( $^i\text{PrOH}/\text{NH}_3$  2:1).

$[\alpha]_{\text{D}}^{24}=+46.7$  (c=0.4;  $\text{MeOH}$ ).

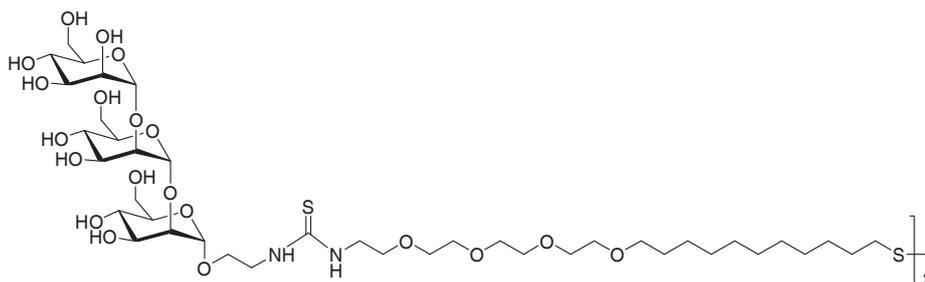
$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ =5.31 (d,  $J=1.0$  Hz, 1H; H-1), 5.13 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1'), 5.00 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1''), 4.07-4.02 (m, 1H; H-2), 4.01-3.95 (m, 1H; H-2''), 3.91-3.81 (m, 7H), 3.78-3.52 (m, 29H), 3.49 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.88 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{SAc}$ ), 2.32 (s, 3H; SAc), 1.65-1.51 (m, 4H), 1.45-1.30 (m, 14H).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ = (C=S) undetected, 104.1 (d; C-1''), 102.5 (d; C-1), 100.0 (d; C-1'), 80.7 (d; C-2'), 80.3 (d; C-2), 75.0, 74.8, 72.5, 72.4, 72.1, 71.95, 71.91, 71.6, 71.3, 71.1, 70.7, 69.2, 69.0, 68.8, 67.4 (t; C-6), 63.3 (t; C-6), 63.0 (t; C-6), 45.2 (brt, 2C;  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 30.72, 30.69, 30.60, 30.56, 30.51, 30.2, 29.86, 29.78, 27.2.

ATR-IR:  $\tilde{\nu}$ =3346 (ancha), 2925, 2854, 1692, 1558, 1456, 1367, 1291, 1247, 1129, 1057  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS:  $m/z$ : calcd para  $\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}_{21}\text{S}_2^+$  [ $M+\text{H}$ ] $^+$ : 1011.4611; encontrado: 1011.4603.

**23,23'-ditio bis[*N*-(etil  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil),*N'*-(3,6,9,12-tetraoxa-tricosanil) tiourea] (11).**



$R_f=0.34$  (iPrOH/NH<sub>3</sub> 2:1).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta=5.28$  (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1), 5.10 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1'), 4.98 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H; H-1''), 4.05-4.02 (m, 1H; H-2), 3.99-3.95 (m, 1H; H-2''), 3.89-3.80 (m, 6H), 3.76-3.50 (m, 30H), 3.47 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.69 (t,  $J=7.0$  Hz, 0.3H; CH<sub>2</sub>SS), 2.49 (t,  $J=7.5$  Hz, 1.7H; CH<sub>2</sub>SH), 1.63-1.53 (m, 4H), 1.45-1.35 (m, 14H).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = (C=S) undetected, 104.1 (d; C-1''), 102.5 (d; C-1), 100.0 (d; C-1'), 80.6 (d; C-2'), 80.2 (d; C-2), 75.02, 75.00, 74.7, 72.43, 72.40, 72.0, 71.92, 71.87, 71.5, 71.3, 71.1, 70.7, 69.2, 69.0, 68.8, 67.4; 63.3, 63.2 and 62.9 (t, 3C; 3xC-6), 45.2 (brt; CH<sub>2</sub>NH), 35.2 (t; CH<sub>2</sub>SS), 30.69, 30.63, 30.5, 30.2, 29.4, 27.2, 25.0 (t; CH<sub>2</sub>SH)

HRMS:  $m/z$ : calcd para C<sub>40</sub>H<sub>76</sub>N<sub>2</sub>O<sub>20</sub>S<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>: 991.4325; encontrado: 991.4330.

***N*-(etil  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-manopiranosil),*N'*-(3,6,9,12-tetraoxa-23-tioacetil-tricosanil) tiourea (54).**

El neoglicoconjugado **54** (83.0 mg, 0.0708 mmol, 81%) se obtuvo como un sólido blanco liofilizado a partir de la amina **27** (62.0 mg, 0.0874 mmol), el espaciador **38** (81.0 mg, 0.175 mmol) y 0.6 mL de NEt<sub>3</sub> (50 equiv) usando MeOH como disolvente. Tiempo de reacción: 5 horas; eluyente para la purificación por columna de Sephadex LH20: MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1.  $R_f=0.15$  (iPrOH/NH<sub>3</sub> 2:1).

$[\alpha]_D^{24}=+36.6$  (c=1.1; H<sub>2</sub>O).

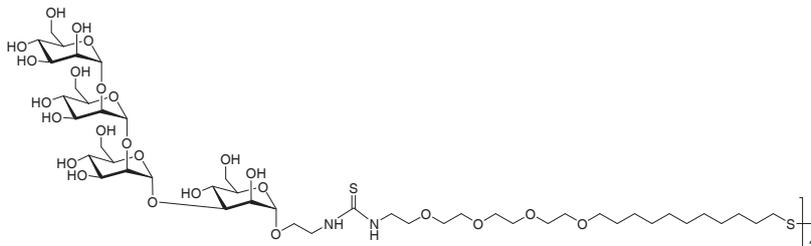
<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta=5.37$  (s; H-1), 5.32 (s; H-1), 5.06 (s; H-1), 4.86 (s; H-1), 4.13-3.62 (m, 44H), 3.49 (brt, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.87 (t,  $J=7.0$  Hz, 2H; CH<sub>2</sub>SAC), 2.35 (s, 3H; SAC), 1.64-1.56 (m, 4H), 1.39-1.27 (m, 14H).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = (C=S) undetected, 195.7 (C=O), 102.2 (d; C-1), 100.6 (d; C-1), 100.6 (d; C-1), 99.8 (d; C-1), 78.4, 78.1, 73.3, 73.23, 73.18, 72.9, 71.1, 70.35, 70.29, 70.1, 70.0, 69.9, 69.7, 69.3, 69.1, 66.91, 66.87, 66.80, 66.0, 61.0, 60.9, 60.7, 43.7 (brt, 2C; CH<sub>2</sub>NH), 30.4, 29.76, 29.71, 29.63, 29.59, 29.47, 29.2, 29.0, 28.9, 26.1.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$ =3379 (ancha), 2924, 2854, 1692, 1647, 1558, 1458, 1352, 1129, 1056  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS:  $m/z$ : calcd para  $\text{C}_{48}\text{H}_{88}\text{N}_2\text{O}_{26}\text{S}_2\text{Na}^+ [M+\text{Na}]^+$ : 1195.4959; encontrado: 1195.4966.

**23,23'-ditiobis[*N*-(etil  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-manopiranosil),*N'*-(3,6,9,12-tetraoxa-tricosanil) tiourea] (12).**



$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ =5.38 (s, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.07 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.13-3.59 (m, 44H), 3.51 (brt, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.73 (t,  $J$ =7.1 Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{SS}$ ), 1.78-1.56 (m, 4H), 1.49-1.28 (m, 14H).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ = (C=S) undetected, 102.2, 100.62 (overlapped), 99.7, 78.4, 78.1, 73.3, 73.23, 73.17, 72.9, 71.2, 70.3, 70.0, 69.9, 69.7, 69.2, 66.9, 66.8, 65.9, 61.0, 60.9, 60.7, 43.7 (brt;  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 39.0, 34.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 28.5, 26.1.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$ =3361 (ancha), 2926, 2856, 1646, 1556, 1459, 1352, 1296, 1131, 1058.

HRMS:  $m/z$ : calcd para  $\text{C}_{46}\text{H}_{86}\text{N}_2\text{O}_{25}\text{S}_2\text{Na}^+ [M+\text{Na}]^+$ : 1153.4853; encontrado: 1153.4879.

***N*-(etil (bis( $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3,6)- $\alpha$ -D-manopiranosil),*N'*-(3,6,9,12-tetraoxa-23-tioacetil-tricosanil) tiourea. (55).**

El neoglicoconjugado **55** (20.1 mg, 0.0151 mmol, 73% se obtuvo como un sólido blanco liofilizado a partir de la amina **28** (18.9 mg, 0.0206 mmol), el espaciador **38** (19.1 mg, 0.041 mmol) y 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{NEt}_3$  (3.5 equiv). Tiempo de reacción: 12 horas; eluyente para la purificación por columna de Sephadex LH20:  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  9:1.  $R_f$ =0.44 ( $i\text{PrOH}/\text{NH}_3$  1:1).

$[\alpha]_D^{24}$  = +59.1 (c=1.0;  $\text{H}_2\text{O}$ ).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ =5.38 (d; H-1), 5.16 (d; H-1), 5.08 (d; H-1), 5.06 (d; H-1), 4.86 (d; H-1), 4.13-3.64 (m, 50H), 3.52 (brt, 2H;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.90 (t,  $J$ =7.1 Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{SAC}$ ), 2.37 (s, 3H; SAC), 1.64-1.56 (m, 4H), 1.43-1.30 (m, 14H).

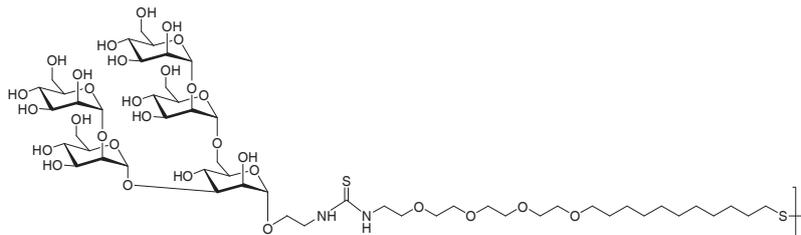
$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ = (C=S) undetected, 196.3 (s; C=O), 102.2 (d, 2C; C-1), 100.7 (d, 2C; C-1), 99.7 (d; C-1), 78.7, 78.4, 73.2, 72.7, 71.2, 71.1, 70.4, 70.3, 70.1, 70.0, 69.9, 69.7,

66.9, 66.7, 61.1, 61.04, 60.97, 44.9, 43.6 (brt, 2C; CH<sub>2</sub>NH), 30.4, 29.7, 29.64, 29.58, 29.4, 29.2, 29.0, 28.8, 26.0.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$ =3411 (ancha), 2927, 2857, 1691, 1647, 1553, 1458, 1357, 1133, 1059 cm<sup>-1</sup>.

HRMS: *m/z*: calcd para C<sub>54</sub>H<sub>98</sub>N<sub>2</sub>O<sub>31</sub>S<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> [*M*+Na]<sup>+</sup>: 1357.5487; encontrado: 1357.5483.

**23,23'-ditiobis[*N*-(etil bis(α-D-manopiranosil-(1→2)-α-D-manopiranosil-(1→3,6))-α-D-manopiranosil)),*N'*-(3,6,9,12-tetraoxa-23-tioacetil-tricosanil) tiourea] (13).**



<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta$ =5.38 (s, 1H), 5.16 (s, 1H), 5.08 (s, 1H), 5.06 (s, 1H), 4.86 (s, 1H); 4.16-3.60 (m, 50H), 3.52 (brt, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.73 (brt, 0.7H; CH<sub>2</sub>SS), 2.55 (t, 1.3H, *J*=6.9 Hz; CH<sub>2</sub>SH); 1.80-1.56 (m, 4H), 1.49-1.26 (m, 14H).

<sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 125 MHz)  $\delta$ = (C=S) undetected, 102.3, 102.3, 100.7, 100.0, 98.0, 78.7, 78.4, 73.2, 72.7, 72.0, 71.1, 70.8, 70.4, 70.3, 69.9, 69.7, 69.2, 69.1, 66.9, 66.7, 65.9, 65.6, 65.3, 61.1, 60.9, 43.7 (brt, 2C; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 39.0 (t; CH<sub>2</sub>SS), 34.0, 29.72, 29.69, 29.5, 29.4, 29.2, 28.4, 26.1, 26.0, 24.3 (t; CH<sub>2</sub>SH).

IR (KBr) 3386 (ancha), 2926, 2854, 1642, 1556, 1462, 1366, 1301, 1131, 1057.

HRMS: *m/z*: calcd para C<sub>52</sub>H<sub>96</sub>N<sub>2</sub>O<sub>30</sub>S<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> [*M*+Na]<sup>+</sup>: 1315.5382; encontrado: 1315.5380.

***N*-(etil bis(α-D-manopiranosil-(1→2)-α-D-manopiranosil-(1→2)-α-D-manopiranosil)-(1→3,6)-α-D-manopiranosil),*N'*-(3,6,9,12-tetraoxa-23-tioacetil-tricosanil) tiourea. (56).**

El neoglicoconjugado **56** (11.8 mg, 0.0072 mmol, 52 %) se obtuvo como un sólido blanco liofilizado a partir de la amina **29** (17.2 mg, 0.0138 mmol), el espaciador **38** (12.8 mg, 0.0276 mmol) y 20  $\mu$ L de NEt<sub>3</sub> (10.4 equiv) usando H<sub>2</sub>O-*i*-PrOH-CH<sub>3</sub>CN como disolvente. Tiempo de reacción: 48 horas; eluyente para la purificación por columna de Sephadex LH20: MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1. R<sub>f</sub>=0.35 (*i*-PrOH/NH<sub>3</sub> 1:1).

$[\alpha]_D^{24}$  = +61.4 (c=0.6; H<sub>2</sub>O).



disolución acuosa de  $\text{NaBH}_4$  (1M, 22 equiv) en pequeñas porciones y con rápida agitación, apareciendo una suspensión marrón oscura. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas más. A continuación se eliminó el sobrenadante por decantación o concentración a sequedad. El residuo se disolvió en la mínima cantidad de agua NANOPURE y se purificó por: 1) *Centrifugación* (CENTRIPLUS 10000 MWCO, 1h, 3000xg): el residuo que quedó en el filtro CENTRIPLUS se disolvió en agua, se centrifugó para eliminar partículas en suspensión y se liofilizó; 2) *Diálisis*: la disolución se introdujo en una membrana de SnakeSkin<sup>®</sup> pleated dialysis tubing (Pierce, 3500 MWCO), y se dializó con agua destilada (3 L) bajo agitación reemplazando con agua fresca cada 5-9 horas durante 3 días. El dializado se recogió de la membrana de diálisis y se liofilizó. La fórmula molecular de las GNPs se calculó a partir de los datos obtenidos del TEM<sup>38</sup> y se confirmó por análisis elemental.

### **Procedimiento general para la preparación de gliconanopartículas de diferente densidad.**

Sobre una mezcla de los tiolderivados de manosa y los correspondientes componentes inertes tiol derivados de glucosa **GlcC<sub>2</sub>**, **GlcC<sub>5</sub>**, del *espaciador carboxílico 35* o del espaciador fluorescente **40** en diferentes relaciones molares (0.012 M, 3-5.5 equiv) en MeOH se añadió una disolución acuosa de ácido tetracloroaúrico (0.025 M, 1 equiv). Sobre esta disolución se añadió una disolución acuosa de  $\text{NaBH}_4$  (1M, 22 equiv) en pequeñas porciones y con rápida agitación, apareciendo una suspensión marrón oscura. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas más. A continuación el sobrenadante se eliminó por decantación o concentración a sequedad. El residuo se disolvió en la mínima cantidad de agua NANOPURE y se purificó por centrifugación o por diálisis por el procedimiento explicado anteriormente. La proporción molar de los ligandos en la GNP se calculó mediante <sup>1</sup>H RMN por la integración de las señales correspondientes a los protones anoméricos de la manosa con respecto a las señales que corresponden a: el protón anomérico de la glucosa **GlcC<sub>2</sub>**, **GlcC<sub>5</sub>**, el metileno directamente unido al grupo carboxílico o grupo tiol del espaciador **35**, o **40**, o respecto a las señales aromáticas en el espaciador **40**. El contenido aproximado en fluoresceína de las GNPs se calculó midiendo la señal de fluorescencia de disoluciones de GNPs a concentración 1µg/mL en un lector multiplate GENios Pro (TECAN) ( $\lambda_{\text{ex}}$ =485 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ =535 nm).

#### **1-Au.**

A partir del disulfuro **1** (45.0 mg, 0.187 mmol),  $\text{HAuCl}_4$  (1.38 mL, 0.025 M) y  $\text{NaBH}_4$  (760 µL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **1-Au** (5.8 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $2.0 \pm 0.6$  nm, 225.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$ =4.95 (s, 1H; H-1), 4.4-3.5 (m, 10H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL):  $\lambda = 520$  nm, banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para  $(C_8H_{15}O_6S)_{121}Au_{225}$  (73269): C 15.87, H 2.50, S 5.30; encontrado: 15.89, H 3.0, S 5.12.

### 2-Au

A partir del disulfuro **2** (50mg, 0.177 mmol),  $HAuCl_4$  (1.29 mL, 0.025 M) y  $NaBH_4$  (686  $\mu$ L, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **2-Au** (3.6 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.6 \pm 0.5$  nm, 140.

$^1H$  RMN (500 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta=4.70$  (s, 1H; H-1), 4.05-3.00 (m, 6H), 2.11-1.02 (m, 8H).

UV/Vis ( $H_2O$ , 0.1 mg/mL):  $\lambda = 530$  nm, banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para  $(C_{11}H_{22}O_6S)_{73} Au_{140}$  (48166): C 20.01, H 3.36, S 4.86; encontrado: C 20.16, H 3.22, S 4.70.

### 3-Au

A partir del disulfuro **3** (45 mg, 0.071 mmol),  $HAuCl_4$  (520 mL  $\mu$ L, 0.025 M) y  $NaBH_4$  (686  $\mu$ L, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **3-Au** (1.2 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.0 \pm 0.9$  nm, 79.

$^1H$  RMN (500 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta=5.60$  (s, 1H; H-1), 4.61 (s, 1H; H-2), 3.90-3.41 (m, 31 H), 2.78-2.69 (m, 2H), 1.69-1.55 (m, 2H), 1.46-1.36 (m, 16H).

UV/Vis ( $H_2O$ , 0.1 mg/mL):  $\lambda = 525$  nm, banda de plasmón de superficie.

### 3-Au-GlcC<sub>2</sub> (30 %)

A partir de una mezcla 3:7 de **3** (30.0 mg, 0.048 mmol) y **GlcC<sub>2</sub>** (26.0 mg, 0.108mmol),  $HAuCl_4$  (1.3 mL, 0.025 M) y  $NaBH_4$  (620  $\mu$ L 1 N) se obtuvo la nanopartícula **3-Au-GlcC<sub>2</sub> (30 %)** (4.1 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.7 \pm 0.5$  nm, 201.

$^1H$  RMN (500 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta=4.98$  (brs, 0.3H; H-1), 4.53 (brm, 1H; H-1 glucosa), 4.13-3.25 (brm, 20H), 1.96-1.08 (brm, 5.4H).

UV/Vis ( $H_2O$ , 0.1 mg/mL):  $\lambda = 525$  nm, banda de plasmón de superficie.

**3-Au-GlcC<sub>2</sub> (15 %)**

A partir de una mezcla 15:85 de **3** (19.0 mg, 0.030 mmol) y **GlcC<sub>2</sub>** (41.0 mg, 0.171 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (1.46 mL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (800 µL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **3-Au-GlcC<sub>2</sub> (15 %)** (7.5 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.7 ± 0.5 nm, 201.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=4.98 (brs; H-1), 4.53 (brm, 1H; H-1 glucosa), 4.35-3.12 (brm, 13H), 1.77-1.17 (brm, 2.7H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): λ = 525 nm, banda de plasmón de superficie.

**3-Au-GlcC<sub>2</sub> (5 %)**

A partir de una mezcla 5:95 de **3** (6.0 mg, 0.0095 mmol) y **GlcC<sub>2</sub>** (43.0 mg, 0.179 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (1.37 mL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (980 µL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **3-Au-GlcC<sub>2</sub> (5 %)** (8.2 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.4 ± 0.4 nm, 116

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=5.02 (brs; H-1), 4.54 (brm, 1H; H-1 glucosa), 4.21-3.35 (brm, 10H), 1.62-1.10 (brm, 0.9H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): λ = 525 nm, banda de plasmón de superficie.

**4-Au**

A partir del disulfuro **4** (64.0 mg, 0.093 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (679 µL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (373 µL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **4-Au** (3.9 mg) como un polvo beige.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.2 ± 0.4 nm, 79.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=4.88 (s, 1H; H-1), 4.10 (s, 2H; NHCH<sub>2</sub>CO), 3.93-3.48 (m, 27H), 2.72 (brm; CH<sub>2</sub>S), 1.73 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.45-1.35 (m, 14H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.3 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para (C<sub>32</sub>H<sub>62</sub>NO<sub>12</sub>S)<sub>155</sub> Au<sub>79</sub> (121720): C 48.90, H 7.96, N 1.78, S 4.10; encontrado: C 50.62, H 7.97, N 1.68, S 3.78.

**5-Au-CO<sub>2</sub>H (66 %)**

A partir de la mezcla de disulfuros **5** (29.2 mg, 0.039 mmol) en proporción manósido:carboxílico 2:1, HAuCl<sub>4</sub> (288 µL 1 N) y NaBH<sub>4</sub> (158 µL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66 %)** (7.1 mg) como un sólido marron claro soluble en metanol.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.3 ± 0.6 nm, 38.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=5.10 (s, 1H; H-1), 5.04 (s, 1H; H-1'), 4.32 (s, 1H; CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 4.09 (s, 3H), 4.01-3.32 (brm, 53H), 2.73 (brm; CH<sub>2</sub>S), 1.95-1.26 (brm, 29H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

**6-Au-CO<sub>2</sub>H (50 %)**

A partir de la mezcla de disulfuros **6** (17.9 mg, 0.024 mol) en proporción manósido:carboxílico 1:1, HAuCl<sub>4</sub> (177 µL 1 N) y NaBH<sub>4</sub> (97 µL 1 N) ) se obtuvo la nanopartícula **6-Au-CO<sub>2</sub>H (50 %)** (3.2 mg) como un polvo marrón.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.0 ± 0.4 nm, 38.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=5.14 (s, 1H; H-1), 4.83 (s, 1H; H-1'), 4.13-4.06 (brm, 4H), 3.99-3.32 (brm, 58H), 2.71 (brm; CH<sub>2</sub>S), 1.98-1.19 (brm, 38H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

**7-Au-CO<sub>2</sub>H (66 %)**

A partir de la mezcla de disulfuros **7** (30.4 mg, 0.036 mmol) en proporción manósido:carboxílico 2:1, HAuCl<sub>4</sub> (262 µL 1 N) y NaBH<sub>4</sub> (143 µL 1 N) se obtuvo la nanopartícula **7-Au-CO<sub>2</sub>H (66 %)** (3.5 mg) como un polvo marrón.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.3 ± 0.5 nm, 79.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=5.29 (s, 1H; H-1), 5.08 (s, 1H; H-1'), 5.05 (s, 1H; H-1''), 4.31 (s, 1H; CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 4.11 (s, 1H), 4.07 (s, 3H), 3.99-3.32 (brm, 53H), 2.76 (brs; CH<sub>2</sub>S), 1.96-1.04 (brm, 30H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

**8-Au-CO<sub>2</sub>H (50 %)**

A partir de la mezcla de disulfuros **8** (53.5 mg, 0.077 mmol) en proporción manósido:carboxílico 1:1, HAuCl<sub>4</sub> (563 µL 1 N) y NaBH<sub>4</sub> (309 µL 1 N) se obtuvo la nanopartícula **8-Au-CO<sub>2</sub>H (50 %)** (7.1 mg) como un polvo marrón.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.3 ± 0.5 nm, 79.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=5.13 (s, 1H; H-1), 4.91(s, 1H; H-1'), 4.83(s, 1H; H-1''), 4.31 (s, 2H; CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 4.18-3.44 (brm, 68H), 2.79 (brs; CH<sub>2</sub>S), 1.96-1.26 (brm, 38H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

**9-Au (5.5 equiv)**

A partir del disulfuro **9** (34.0 mg, 0.053 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (756 µL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (210 µL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **9-Au (5.5 equiv)** (2.0 mg) como un polvo color beige.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.1 ± 0.2 nm, 79.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ= señal de H-1 solapada por el disolvente, 3.96 (brs, 1H; H-2), 3.90-3.15 (m, 27H), 2.76 (brm, 2H; CH<sub>2</sub>S), 1.86-0.95 (m, 18 H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

**9-Au (3 equiv)**

A partir del disulfuro **9** (78.1 mg, 0.121 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (1.61 mL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (885 µL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **9-Au (3 equiv)** (11.1 mg) como un polvo marron claro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.3 ± 0.4 nm, 79.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=4.89 (s, 1H; H-1), 3.98 (brs, 1H; H-2), 3.94-3.37 (m, 27H), 2.74 (brs; CH<sub>2</sub>S), 1.91-0.99 (m, 18 H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.3 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para (C<sub>28</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>)<sub>40</sub> Au<sub>79</sub> (41315): C 32.56, H 5.37, N 2.71, S 6.21; encontrado: C 32.67, H 5.32, N 2.75, S 7.36.

**9-Au (2 equiv)**

A partir del disulfuro **9** (78.1 mg, 0.121 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (2.42 mL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (1.33 mL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **9-Au (2 equiv)** (21.4 mg) como un polvo marron.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.5 \pm 0.3$  nm, 116.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=4.85$  (s, 1H; H-1), 3.96 (brs, 1H; H-2), 4.05-3.10 (m, 27H), 2.75 (brm, 2H;  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 2.05-1.00 (m, 18 H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para  $(\text{C}_{28}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2)_{59} \text{Au}_{116}$  (60836): C 32.61, H 5.38, N 2.72, S 6.22; encontrado: C 32.59, H 5.32, N 2.77, S 7.21.

### 9-Au (1 equiv)

A partir del disulfuro **9** (74.0 mg, 0.115 mmol),  $\text{HAuCl}_4$  (4.6 mL, 0.025 M) y  $\text{NaBH}_4$  (2.52 mL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **9-Au (1 equiv)** (9.9 mg) como un polvo marron.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.5 \pm 0.5$  nm, 116.

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=4.89$  (s, 1H; H-1), 3.96 (brs, 1H; H-2), 3.93-3.40 (m, 27H), 2.76 (brs;  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.90-1.20 (m, 18 H).

Análisis elemental calcd (%) para  $(\text{C}_{28}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2)_{66} \text{Au}_{116}$  (65344): C 33.97, H 5.60, N 2.83, S 6.48; encontrado: C 33.93, H 5.63, N 2.83, S 7.09.

### 9-Au-GlcC<sub>2</sub> (10%)

A partir de una mezcla 1:9 de **9** (14.0 mg, 0.022 mmol) y **GlcC<sub>2</sub>** (46.9 mg, 0,195 mmol),  $\text{HAuCl}_4$  (4.34 mL, 0.025 M) y  $\text{NaBH}_4$  (2.38 mL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **9-Au-GlcC<sub>2</sub> (10%)** (29.0 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.3 \pm 1.3$  nm, 79.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=4.91$  (brs; H-1), 4.55 (brm, 1H; H-1 glucosa), 4.46-3.12 (m, 14H), 1.98-1.08 (m, 2H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/mL):  $\lambda = 535$  nm, banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para  $(\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_6\text{S})_{42}(\text{C}_{28}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2)_5 \text{Au}_{79}$  (28828): C 19.83, H 3.16, N 0.49, S 5.78; encontrado: C 19.58, H 3.32, N 0.83, S 5.60.

**9-Au-GlcC<sub>2</sub> (25 %)**

A partir de una mezcla 1:3 de **9** (30.0 mg, 0.046 mmol) y **GlcC<sub>2</sub>** (33.0 mg, 0.139 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (3.68 mL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (2.0 mL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **9-Au-GlcC<sub>2</sub> (25%)** (21.0 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.4 ± 0.4 nm, 116.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=4.89 (s, H-1); 4.53 (brm; H-1 glucosa), 4.26-3.24 (m, 15H), 1.83-1.15 (m, 5H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): λ = 540 nm, banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para (C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>6</sub>S)<sub>67</sub>(C<sub>28</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>)<sub>23</sub> Au<sub>116</sub> (53688): C 26.40, H 4.26, N 1.20, S 6.75; encontrado: C 26.49, H 4.41, N 1.98, S 5.96.

**9-Au-GlcC<sub>2</sub> (50 %)**

A partir de una mezcla 1:1 de **9** (52.0 mg, 0.087 mmol) y **GlcC<sub>2</sub>** (20.8 mg, 0.087 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (3.47 mL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (1.9 mL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **9-Au-GlcC<sub>2</sub> (50%)** (21.0 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.4 ± 0.4 nm, 116.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=4.89 (s, 1H; H-1), 4.53 (m, 1H; H-1 glucosa), 4.15 (m, 1H; H-2), 4.03-3.43 (m, 42H), 1.75-1.12 (m, 18H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): λ = 540 nm, banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para (C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>6</sub>S)<sub>40</sub>(C<sub>28</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>)<sub>40</sub> Au<sub>116</sub> (58174): C 29.73, H 4.85, N 1.93, S 6.61; encontrado: C 29.58, H 4.90, N 2.49, S 6.03.

**9-Au-GlcC<sub>2</sub> (75 %)**

A partir de una mezcla 3:1 de **9** (21.0 mg, 0.032 mmol) y **GlcC<sub>2</sub>** (2.6 mg, 0.011 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (867 μL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (478 μL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **9-Au-GlcC<sub>2</sub> (75%)** (18.4 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.4 ± 0.4 nm, 116.

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): λ = 550 nm, banda de plasmón de superficie.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=4.90$  (s, 0.75H; H-1 manosa), 4.04-3.51 (m, 27H), 2.78 (brm;  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.87-1.18 (m, 14H).

### 10-Au

A partir del disulfuro **10** (30.0 mg, 0.037 mmol),  $\text{HAuCl}_4$  (495  $\mu\text{L}$ , 0.025 M) y  $\text{NaBH}_4$  (271  $\mu\text{L}$ , 1 N) se obtuvo la nanopartícula **10-Au (3 equiv)** (9.0 mg) como un polvo marron claro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.2 \pm 0.5$  nm, 79.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=5.14$  (s, 1H; H-1), 5.05 (s, 1H; H-1'), 4.09 (m, 1H; H-2'), 4.05-3.45 (brm, 33 H), 2.73 (brm;  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.74 (brm, 2H), 1.62 (brm, 2H), 1.55-1.25 (brm, 14H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/mL):  $\lambda = 519$  nm, banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para  $(\text{C}_{34}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{S}_2)_{59}\text{Au}_{79}$  (63058): C 38.17, H 6.08, N 2.62, S 5.99; encontrado: C 38.24, H 6.23, N 2.46, S 6.63.

### 10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50 %)

A partir de una mezcla 1:1 de **10** (22.9 mg, 0.028 mmol) y **GlcC<sub>5</sub>** (8.0 mg, 0,028 mmol),  $\text{HAuCl}_4$  (756  $\mu\text{L}$ , 0.025 M) y  $\text{NaBH}_4$  (415  $\mu\text{L}$ , 1 N) se obtuvo la nanopartícula **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)** (9.4 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.3 \pm 0.4$  nm, 79.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=5.14$  (s, 1H; H-1), 5.05 (s, 1H; H-1'), 4.96-4.37 (brm, 1H; H-1 glucosa), 4.09 (s, 1H; H-2'), 4.04-3.21 (brm, 41H), 2.78 (brm;  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.89-0.81 (brm, 24H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para  $(\text{C}_{34}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{S}_2)_{22}(\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{S})_{22}\text{Au}_{79}$  (39482): C 30.12, H 4.83, N 1.56, S 5.36; encontrado: C 29.93, H 4.88, N 1.80, S 5.93.

### 10-Au-GlcC<sub>5</sub> (10 %)

A partir de una mezcla 1:9 de **10** (19.0 mg, 0.024 mmol) y **GlcC<sub>5</sub>** (59.7 mg, 0.211 mmol),  $\text{HAuCl}_4$  (3.14 mL, 0.025 M) y  $\text{NaBH}_4$  (1.72 mL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **10-Au-18 (10%)** (22.5 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $2.0 \pm 0.5$  nm, 225.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=5.14$  (brs, 1H; H-1), 5.04 (s, 1H; H-1'), 4.47 (d,  $J=8.0$  Hz, 9H; H-1 glucosa), 4.09 (brs, 2H; H-2'), 4.03-3.22 (brm, 105H), 2.79 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.88-1.28 (brm, 72H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/mL):  $\lambda = 527\text{nm}$ , banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para  $(\text{C}_{34}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{S}_2)_9(\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{S})_{81}\text{Au}_{225}$  (74360): C 19.33, H 3.10, N 0.34, S 4.27; encontrado: C 19.31, H 3.16, N 0.69, S 4.96.

#### **11-Au-GlcC<sub>5</sub> (50 %)**

A partir de una mezcla 1:1 de **11** (13.0 mg, 0.013 mmol) y **GlcC<sub>5</sub>** (3.7 mg, 0.013 mmol),  $\text{HAuCl}_4$  (358  $\mu\text{L}$ , 0.025 M) y  $\text{NaBH}_4$  (196  $\mu\text{L}$ , 1 N) se obtuvo la nanopartícula **11-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)** (4.6 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.6 \pm 0.4$  nm, 140.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=5.31$  (s, 1H; H-1), 5.12 (s, 1H; H-1'), 5.07 (s, 1H; H-1''), 4.52-4.21 (brm, 1H; H-1 glucosa), 4.13-3.31 (brm, 48H), 2.76 (brm;  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.90-1.08 (brm, 24H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para  $(\text{C}_{40}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_{20}\text{S}_2)_{62}(\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{S})_{61}\text{Au}_{140}$  (105044): C 36.13, H 5.71, N 1.66, S 5.66; encontrado: C 36.21, H 5.79, N 1.93, S 5.76.

#### **11-Au-GlcC<sub>5</sub> (10 %)**

A partir de una mezcla 1:9 de **11** (6.8 mg, 0.007 mmol) y **GlcC<sub>5</sub>** (17.8 mg, 0.063 mmol),  $\text{HAuCl}_4$  (756  $\mu\text{L}$ , 0.025 M) y  $\text{NaBH}_4$  (513  $\mu\text{L}$ , 1 N) se obtuvo la nanopartícula **11-Au-GlcC<sub>5</sub> (10%)** (10.0 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.8 \pm 0.4$  nm, 201.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 25°C):  $\delta=5.32$  (s, 1H; H-1), 5.13 (s, 1H; H-1'), 5.06 (s, 1H; H-1''), 4.45 (brm, 9H; H-1 glucosa), 4.19-3.23 (brm, 112H), 2.18-1.08 (brm, 72H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para  $(\text{C}_{40}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_{20}\text{S}_2)_{13}(\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{S})_{122}\text{Au}_{140}$  (86500): C 25.85, H 4.12, N 0.42, S 5.49; encontrado: C 25.89, H 4.26, N 0.54, S 5.92.

**12-Au-GlcC<sub>5</sub> (50 %)**

A partir de una mezcla 1:1 de **12** (16.9 mg, 0.015 mmol) y **GlcC<sub>5</sub>** (4.23 mg, 0.015 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (398 μL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (218 μL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **12-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)** (6.0 mg) como un polvo marrón.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.9 ± 0.5 nm, 225.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=5.38 (brs, 1H), 5.33 (brs, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.47 (d, J=7.5 Hz, 1H; H-1 glucosa), 4.24-3.31 (brm, 54H), 1.81-1.13 (brm, 24H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): λ = 520 nm, banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para (C<sub>46</sub>H<sub>85</sub>N<sub>2</sub>O<sub>25</sub>S<sub>2</sub>)<sub>56</sub>(C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub>S)<sub>56</sub>Au<sub>225</sub> (123369): C 31.08, H 4.85, N 1.27, S 4.37; encontrado: C 31.23, H 5.09, N 1.94, S 4.63.

**12-Au-GlcC<sub>5</sub> (10 %)**

A partir de una mezcla 1:9 de **12** (11.4 mg, 0.010 mmol) y **GlcC<sub>5</sub>** (25.6 mg, 0.090 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (1.344 mL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (738 μL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **12-Au-GlcC<sub>5</sub> (10%)** (13.0 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.4 ± 0.7 nm, 116 (pequeño porcentaje de distribución bimodal de diámetro promedio de 4.7 nm).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=5.28 (brs, 1H), 5.23 (brs, 1H), 4.97 (brs, 1H), 4.71 (brs, 1H, partially overlapped by water signal), 4.36 (brm, 9H; H-1 glucosa), 4.10-3.13 (brm, 118 H), 1.87-1.10 (brm, 72H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): λ = 527 nm, banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para (C<sub>46</sub>H<sub>85</sub>N<sub>2</sub>O<sub>25</sub>S<sub>2</sub>)<sub>7</sub>(C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub>S)<sub>59</sub>Au<sub>116</sub> (47359): C 24.63, H 3.90, N 0.41, S 4.94; encontrado: C 24.40, H 4.36, N 0.77, S 4.53.

**13-Au-GlcC<sub>5</sub> (50 %)**

A partir de una mezcla 1:1 de **13** (14.0 mg, 0.011 mmol) y **GlcC<sub>5</sub>** (3.05 mg, 0.011 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (288 μL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (158 μL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **13-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)** (4.4 mg) como un polvo marrón.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 2.1 ± 1.5 nm, 309.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=5.37$  (s, 1H), 5.16 (s, 1H), 5.08 (s, 1H), 5.06 (s, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.43 (brm, 1H, H-1 glucosa), 4.23-3.18 (brm, 60H), 2.75 (brm;  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.89-1.13 (brm, 24H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para  $(\text{C}_{52}\text{H}_{95}\text{N}_2\text{O}_{30}\text{S}_2)_{28}(\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{S})_{28}\text{Au}_{309}$  (104928): C 20.19, H 3.12, N 0.71, S 2.57; encontrado: C 20.12, H 3.53, N 0.89, S 3.03.

### **13-Au-GlcC<sub>5</sub> (10 %)**

A partir de una mezcla 1:9 de **13** (5.75 mg, 0.0044 mmol) y **GlcC<sub>5</sub>** (11.3 mg, 0.0400),  $\text{HAuCl}_4$  (593  $\mu\text{L}$ , 0.025 M) y  $\text{NaBH}_4$  (326  $\mu\text{L}$ , 1 N) se obtuvo la nanopartícula **13-Au-GlcC<sub>5</sub> (10%)** (5.3 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.8 \pm 0.3$  nm, 201. (pequeño porcentaje de distribución bimodal de diámetro promedio de 5 nm).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=5.37$  (s, 1H), 5.17 (s, 1H), 5.08 (s, 1H), 5.06 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.42-4.33 (brm, 9H; H-1 glucosa), 4.19-3.90 (brm, 124H), 2.12-1.26 (brm, 72H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie).

Análisis elemental calcd (%) para  $(\text{C}_{52}\text{H}_{95}\text{N}_2\text{O}_{30}\text{S}_2)_5(\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{S})_{43}\text{Au}_{201}$  (58150): C 15.14, H 2.39, N 0.24, S 2.92; encontrado: C 14.96, H 2.80, N 0.35, S 2.93.

### **14-Au-GlcC<sub>5</sub> (50 %)**

A partir de una mezcla 1:1 de **14** (10.49 mg, 0.0065 mmol) y **GlcC<sub>5</sub>** (1.83 mg, 0.0065 mmol),  $\text{HAuCl}_4$  (173  $\mu\text{L}$ , 0.025 M) y  $\text{NaBH}_4$  (95  $\mu\text{L}$ , 1 N) se obtuvo la nanopartícula **14-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)** (6.2 mg) como un polvo marrón.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.8 \pm 0.4$  nm, 201.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=5.37$  (s, 1H), 5.32 (brs, 2H), 5.14 (s, 1H), 5.07 (s, 2H) (one anomeric overlapped by the solvent signal), 4.21-3.16 (brm, 72H), 2.77 (brm;  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.88-1.13 (brm, 24H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/mL): no se observa banda de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para  $(\text{C}_{52}\text{H}_{95}\text{N}_2\text{O}_{30}\text{S}_2)_{58}(\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{S})_{58}\text{Au}_{201}$  (149602): C 34.91, H 5.31, N 1.09, S 3.73; encontrado: C 34.93, H 5.75, N 1.66, S 3.51.

**10-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**

A partir de una mezcla 50:45:5 de **10** (14.41 mg, 0.0178 mmol), **GlcC<sub>5</sub>** (4.53 mg, 0.0161 mmol) y **40** (1.53 mg, 0.0018 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (740 μL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (405 μL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **10-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC** (6.8 mg) como un polvo marrón.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.6 ± 0.5 nm, 140.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=7.18, 6.57 (brm; H<sub>ar</sub> FITC), 5.13 (s, 1H; H-1), 5.04 (s, 2H; H-1'), 4.43 (brm, 1H; H-1, glucosa), 4.06 (s, 1H; H-2'), 4.05-3.37 (m, 45H), 2.73 (brm; CH<sub>2</sub>S), 1.88-1.09 (m, 24H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): λ = 459 nm, banda ancha de plasmón de superficie; λ<sub>max</sub> = 496 nm, banda de plasmón de superficie.

Fluorescencia (H<sub>2</sub>O): λ<sub>ex</sub>=480 nm; λ<sub>em</sub>=514 nm.

**11-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**

A partir de una mezcla 50:45:5 de **11** (13.57 mg, 0.0140 mmol), **GlcC<sub>5</sub>** (3.56 mg, 0.0126 mmol) y **40** (1.2 mg, 0.0014 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (374 μL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (205 μL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **11-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC** (9.5 mg) como un polvo marrón.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.7 ± 0.4 nm, 201.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=7.23, 6.73 (brm, H<sub>ar</sub>, FITC), 5.31 (s, 1H; H-1), 5.12 (s, 1H; H-1'), 5.07 (s, 1H; H-1''), 4.44 (brm, 1H; H-1 glucosa), 4.13 (s, 1H), 4.09 (s, 1H), 4.05-3.39 (m, 50H), 2.76 (brm; CH<sub>2</sub>S), 1.86-1.16 (m, 24H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): λ = 460 nm, banda ancha de plasmón de superficie; λ<sub>max</sub> = 496 nm, banda de plasmón de superficie.

Fluorescencia (H<sub>2</sub>O): λ<sub>ex</sub>=480 nm; λ<sub>em</sub>=514 nm.

**12-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**

A partir de una mezcla 50:45:5 de **12** (9.34 mg, 0.0083 mmol), **GlcC<sub>5</sub>** (2.1 mg, 0.0074 mmol) y **40** (0.71 mg, 0.0008 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (221 μL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (121 μL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **12-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC** (4.3 mg) como un polvo marrón.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.6 ± 0.2 nm, 140.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=6.66$  (brm;  $\text{H}_{\text{ar}}$ , FITC), 5.37 (s, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.07 (s, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.46 (brm; H-1 glucosa), 4.19-3.42 (m, 58H), 2.77 (brm;  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.86-1.07 (m, 24H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/mL):  $\lambda = 459$  nm, banda ancha de plasmón de superficie;  $\lambda_{\text{max}} = 497$  nm, banda de plasmón de superficie.

Fluorescencia ( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $\lambda_{\text{ex}}=480$  nm;  $\lambda_{\text{em}}=514$  nm.

### **13-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC.**

A partir de una mezcla 50:45:5 de **13** (9.36 mg, 0.0072 mmol), **GlcC<sub>5</sub>** (1.84mg, 0.0065 mmol) y **40** (0.62 mg, 0.0007 mmol),  $\text{HAuCl}_4$  (193  $\mu\text{L}$ , 0.025 M) y  $\text{NaBH}_4$  (106  $\mu\text{L}$ , 1 N) se obtuvo la nanopartícula **13-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC** (4.8 mg) como un polvo marrón.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.8 \pm 0.3$  nm, 201.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=7.22$ , 6.70 (brm;  $\text{H}_{\text{ar}}$ , FITC), 5.38 (s, 1H), 5.16 (s, 1H), 5.08 (s, 1H), 5.06 (s, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.43 (brm, 1H; H-1 glucosa), 4.19-3.42 (m, 64H), 2.77 (brm;  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.85-1.16 (m, 24H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/mL):  $\lambda = 458$  nm, banda ancha de plasmón de superficie;  $\lambda_{\text{max}} = 493$  nm, banda de plasmón de superficie.

Fluorescencia ( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $\lambda_{\text{ex}}=480$  nm;  $\lambda_{\text{em}}=514$  nm.

### **14-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC**

A partir de una mezcla 50:45:5 de **14** (7.7 mg, 0.00476 mmol), **GlcC<sub>5</sub>** (1.21 mg, 0.00428 mmol) y **40** (0.41 mg, 0.000476 mmol),  $\text{HAuCl}_4$  (127  $\mu\text{L}$ , 0.025 M) y  $\text{NaBH}_4$  (70  $\mu\text{L}$ , 1 N) se obtuvo la nanopartícula **14-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC** (3.6 mg) como un polvo marrón.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro):  $1.9 \pm 0.3$  nm, 225.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=7.10$ , 6.53 (brm;  $\text{H}_{\text{ar}}$ , FITC), 5.28 (s, 1H), 5.23 (s, 2H), 5.05 (s, 1H), 4.98 (s, 2H), 4.77 (s, 1H), 4.40 (brm, 1H; H-1 glucosa), 4.13-3.25 (m, 70H), 2.65 (brm;  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.78-1.01 (m, 24H).

UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/mL):  $\lambda = 456$  nm, banda ancha de plasmón de superficie;  $\lambda_{\text{max}} = 488$  nm, banda de plasmón de superficie.

Fluorescencia ( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $\lambda_{\text{ex}}=480$  nm;  $\lambda_{\text{em}}=514$  nm.

### Au-CO<sub>2</sub>H

A partir del disulfuro **35** (24.0 mg, 0.0497 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (664 μL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (365 μL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **Au-CO<sub>2</sub>H** (4.5mg) como un polvo marrón.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 2.7 ± 0.5 nm, 807.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ= 4.26 (brs, 2H; CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 3.87-3.57 (m, 20H), 3.94 (s, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.74 (brs, 2H; CH<sub>2</sub>S), 1.75 (brs, 2H), 1.61 (brs, 2H), 1.54-1.27 (m, 18H).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): λ = 541 nm, banda ancha de plasmón de superficie.

### GlcC<sub>5</sub>-Au

A partir del disulfuro **GlcC<sub>5</sub>** (25.31 mg, 0.09 mmol), HAuCl<sub>4</sub> (1.19 mL, 0.025 M) y NaBH<sub>4</sub> (627 μL, 1 N) se obtuvo la nanopartícula **GlcC<sub>5</sub>-Au** (5.6 mg) como un polvo marrón oscuro.

TEM (diámetro promedio y número de átomos de oro): 1.6 ± 0.4 nm, 140

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=4.48-4.33 (m, 1H; H-1), 4.04-3.81 (m, 2H), 3.80-3.56 (m, 2H), 3.55-3.35 (m, 3H), 3.34-3.19 (m, 1H), 2.01-1.38 (m, 6H)

UV/Vis (H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/mL): λ = 520 nm, banda ancha de plasmón de superficie.

Análisis elemental calcd (%) para (C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub>S)<sub>35</sub>Au<sub>140</sub> (37422): C 12.36, H 1.98, S 3.00; encontrado: C 12.13, H 2.13, S 4.21

## 5. Bibliografía

<sup>1</sup> <http://www.empro.org.uk/>.

<sup>2</sup> 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., and Wong, C.H. (2004). Reactivity-based one-pot synthesis of oligomannoses: defining antigens recognized by 2G12, a broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody. *Angew Chem Int Ed*, 43, 1000-1003.

<sup>3</sup> Barrientos, A.G., de la Fuente, J.M., Rojas, T.C., Fernandez, A., and Penades, S. (2003). Gold glyconanoparticles: synthetic polyvalent ligands mimicking glycocalyx-like surfaces as tools for glycobiological studies. *Chem Eur J*, 9, 1909-1921.

<sup>4</sup> Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G., and Whitesides, G.M. (2005). Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev*, 105, 1103-1169.

<sup>5</sup> Mrksich, M., and Whitesides, G.M. (1996). Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 25, 55-78.

<sup>6</sup> Alcántara, D. (2008). *Diseño y síntesis de gliconopartículas magnéticas. Aplicaciones como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen*. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.

<sup>7</sup> Ojeda, R., de Paz, J.L., Barrientos, A.G., Martin-Lomas, M., and Penades, S. (2007). Preparation of multifunctional glyconanoparticles as a platform for potential carbohydrate-based anticancer vaccines. *Carbohydr Res*, 342, 448-459.

<sup>8</sup> Burkhart, F., Zhang, Z., Wacowich-Sgarbi, S., and Wong, C.H. (2001). Synthesis of the Globo H Hexasaccharide Using the Programmable Reactivity-Based One-Pot Strategy *Angew Chem Int Ed*, 40, 1274-1277.

- <sup>9</sup> Mong, K.K., and Wong, C.H. (2002). Reactivity-based one-pot synthesis of a Lewis Y carbohydrate hapten: a colorectal cancer antigen determinant. *Angew Chem Int Ed*, 41, 4087-4090.
- <sup>10</sup> Mong, T.K., Huang, C.Y., and Wong, C.H. (2003). A new reactivity-based one-pot synthesis of N-acetyllactosamine oligomers. *J Org Chem*, 68, 2135-2142.
- <sup>11</sup> Mong, T.K., Lee, H.K., Duron, S.G., and Wong, C.H. (2003). Reactivity-based one-pot total synthesis of fucose GM1 oligosaccharide: a sialylated antigenic epitope of small-cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 797-802.
- <sup>12</sup> Ogawa, T., Katano, K., Sasajima, K., and Matsui, M. (1981). Synthetic Studies on Cell-Surface Glycans .3. Branching Pentasaccharides of Glycoprotein. *Tetrahedron*, 37, 2779-2786.
- <sup>13</sup> Zemplén, G. (1927). Decomposition of reducing disaccharides, VII Determination of the constitution of maltose. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 60, 1555-1564.
- <sup>14</sup> Houseman, B.T., and Mrksich, M. (1998). Efficient Solid-Phase Synthesis of Peptide-Substituted Alkanethiols for the Preparation of Substrates That Support the Adhesion of Cells. *J Org Chem*, 63, 7552-7555.
- <sup>15</sup> Palegrosdemange, C., Simon, E.S., Prime, K.L., and Whitesides, G.M. (1991). Formation of Self-Assembled Monolayers by Chemisorption of Derivatives of Oligo(Ethylene Glycol) of Structure HS(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OH on Gold. *J Am Chem Soc*, 113, 12-20.
- <sup>16</sup> Frisch, B., Boeckler, C., and Schuber, F. (1996). Synthesis of short polyoxyethylene-based heterobifunctional cross-linking reagents. Application to the coupling of peptides to liposomes. *Bioconj Chem*, 7, 180-186.
- <sup>17</sup> Mitsunobu, O. (1981). The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural-Products. *Synthesis-Stuttgart*, 1-28.
- <sup>18</sup> Koziara, A. (1989). A Facile, One-Pot Conversion of Primary Alcohols into Amines. *J Chem Res-S*, 296-297.
- <sup>19</sup> Reddy, G.V.S., Rao, G.V., Subramanyam, R.V.K., and Iyengar, D.S. (2000). A new novel and practical one pot methodology for conversion of alcohols to amines. *Synthetic Communications*, 30, 2233-2237.
- <sup>20</sup> Chu, C., Ramamurthy, A., Makriyannis, A., and Tius, M.A. (2003). Synthesis of covalent probes for the radiolabeling of the cannabinoid receptor. *J Org Chem*, 68, 55-61.
- <sup>21</sup> Knouzi, N., Vaultier, M., and Carrie, R. (1985). Reduction of Azides with Triphenylphosphine in the Presence of Water - a General and Chemoselective Method for the Synthesis of Primary Amines. *Bulletin De La Societe Chimique De France*, 815-819.
- <sup>22</sup> Smiljanic, N., Moreau, V., Yockot, D., Benito, J.M., Fernandez, J.M.G., and Djedaini-Pilard, F. (2006). Supramolecular control of oligosaccharide-protein interactions: Switchable and tunable ligands for concanavalin A based on cyclodextrin. *Angew Chem Int Ed*, 45, 5465-5468.
- <sup>23</sup> Revell, D.J., Knight, J.R., Blyth, D.J., Haines, A.H., and Russell, D.A. (1998). Self-assembled carbohydrate monolayers: Formation and surface selective molecular recognition. *Langmuir*, 14, 4517-4524.
- <sup>24</sup> Lin, C.C., Yeh, Y.C., Yang, C.Y., Chen, C.L., Chen, G.F., Chen, C.C., and Wu, Y.C. (2002). Selective binding of mannose-encapsulated gold nanoparticles to type 1 pili in Escherichia coli. *J Am Chem Soc*, 124, 3508-3509.
- <sup>25</sup> Fraser-Reid, B., Udodong, U.E., Wu, Z., Ottosson, H., Merritt, J.R., Rao, C.S., Roberts, C., and Madsen, R. (1992). n-Pentenyl Glycosides in Organic Chemistry: A Contemporary Example of Serendipity. *Synlett*, 927-942.
- <sup>26</sup> Fischer, E. (1893). Ueber die Glucoside der Alkohole. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 26 2400-2412.
- <sup>27</sup> Garcia-Barrientos, A., Garcia-Lopez, J.J., Isac-Garcia, J., Ortega-Caballero, F., Uriel, C., Vargas-Berenguel, A., and Santoyo-Gonzalez, F. (2001). Synthesis of beta-cyclodextrin, per-O-glycosylated through an ethylene glycol spacer arm. *Synthesis-Stuttgart*, 1057-1064.
- <sup>28</sup> Kartha, K.P.R., and Jennings, H.J. (1990). A Simplified, One-Pot Preparation of Acetobromosugars from Reducing Sugars. *J Carbohydr Chem*, 9, 777-781.
- <sup>29</sup> Buskas, T., Soderberg, E., Konradsson, P., and Fraser-Reid, B. (2000). Use of n-pentenyl glycosides as precursors to various spacer functionalities. *J Org Chem*, 65, 958-963.
- <sup>30</sup> Arce, E., Nieto, P.M., Diaz, V., Castro, R.G., Bernad, A., and Rojo, J. (2003). Glycodendritic structures based on Boltorn hyperbranched polymers and their interactions with Lens culinaris lectin. *Bioconj Chem*, 14, 817-823.
- <sup>31</sup> Lindhorst, T.K., Kotter, S., Krallmann-Wenzel, U., and Ehlers, S. (2001). Trivalent alpha-D-mannoside clusters as inhibitors of type-1 fimbriae-mediated adhesion of Escherichia coli: structural variation and biotinylation. *J Chem Soc-Perkin Transactions 1*, 823-831.

- 
- <sup>32</sup> Strong, L.E., and Kiessling, L.L. (1999). A general synthetic route to defined, biologically active multivalent arrays. *J Am Chem Soc*, *121*, 6193-6196.
- <sup>33</sup> Jayaraman, N., and Stoddart, J.F. (1997). Synthesis of carbohydrate-containing dendrimers .5. Preparation of dendrimers using unprotected carbohydrates. *Tetrahedron Lett*, *38*, 6767-6770.
- <sup>34</sup> Gomez-Garcia, M., Benito, J.M., Rodriguez-Lucena, D., Yu, J.X., Chmurski, K., Mellet, C.O., Gallego, R.G., Maestre, A., Defaye, J., and Fernandez, J.M.G. (2005). Probing secondary carbohydrate-protein interactions with highly dense cyclodextrin-centered heteroglycoclusters: The heterocluster effect. *J Am Chem Soc*, *127*, 7970-7971.
- <sup>35</sup> de La Fuente, J.M., Barrientos, A.G., Rojas, T.C., Rojo, J., Canada, J., Fernandez, A., and Penades, S. (2001). Gold Glyconanoparticles as Water-Soluble Polyvalent Models To Study Carbohydrate Interactions *Angew Chem Int Ed*, *40*, 2257-2261.
- <sup>36</sup> Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, D.J., and Kiely, C. (1995). Synthesis and Reactions of Functionalized Gold Nanoparticles. *J Chem Soc Chem Comm*, 1655-1656.
- <sup>37</sup> Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D.J., and Whyman, R. (1994). Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System. *J Chem Soc Chem Comm*, 801-802.
- <sup>38</sup> Hostetler, M.J., Wingate, J.E., Zhong, C.J., Harris, J.E., Vachet, R.W., Clark, M.R., Londono, J.D., Green, S.J., Stokes, J.J., Wignall, G.D., Glish, G.L., Porter, M.D., Evans, N.D., and Murray, R.W. (1998). Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir*, *14*, 17-30.
- <sup>39</sup> Whetten, R.L., Khoury, J.T., Alvarez, M.M., Murthy, S., Vezmar, I., Wang, Z.L., Stephens, P.W., Cleveland, C.L., Luedtke, W.D., and Landman, U. (1996). Nanocrystal gold molecules. *Adv Mater*, *8*, 428-433.
- <sup>40</sup> Barrientos, A.G. (2003). *Gliconanopartículas de Oro: un Nuevo Sistema Multivalente para el Estudio de las Interacciones Biológicas de los Carbohidratos*. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- <sup>41</sup> T. Ogawa, K. Katano, K. Sasajima, M. Matsui, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2779-2786.
- <sup>42</sup> Clavel, C., Canales, A., Gupta, G., Canada, F.J., Penades, S., Surolia, A., and Jimenez-Barbero, J. (2007). NMR investigation of the bound conformation of natural and synthetic oligomannosides to banana lectin. *Eur J Org Chem*, 1577-1585.
- <sup>43</sup> Clavel, C., Canales, A., Gupta, G., Santos, J.I., Canada, F.J., Penades, S., Surolia, A., and Jimenez-Barbero, J. (2007). NMR studies on the conformation of oligomannosides and their interaction with banana lectin. *Glycoconj J*, *24*, 449-464.
- <sup>44</sup> R. T. Lee, Y. C. Lee, *Carbohydr. Res.* **1995**, *271*, 131-136.



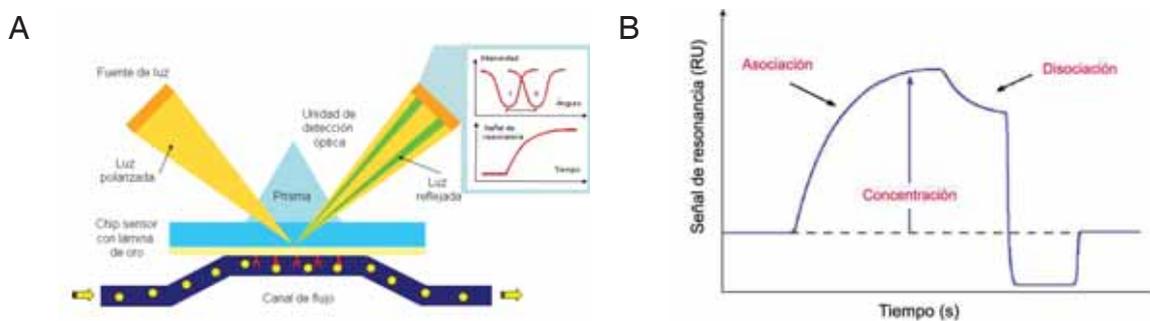
## **CAPÍTULO 2. Estudios de inhibición de la unión DC-SIGN/gp120 por gliconanopartículas funcionalizadas con (oligo)manósidos mediante biosensores con detección por resonancia del plasmón de superficie (SPR)**

### **1. Introducción**

Para evaluar la potencialidad de las nanopartículas de (oligo)manósido (*manno*-GNPs) como inhibidores de la interacción entre DC-SIGN y gp120 y obtener datos cinéticos sobre su afinidad por DC-SIGN y gp120 hemos utilizado biosensores con detección por resonancia del plasmón de superficie. Estas medidas se han llevado a cabo en un biosensor de dos canales BIAcoreX (BIAcore AB) <sup>1</sup> en colaboración con la Dra Karolin Hijazi del laboratorio del Profesor Charles Kelly del King's College en Londres.

Los biosensores con detección por resonancia del plasmón de superficie (SPR) proporcionan información sobre la cinética y afinidad de la interacción de un analito con un ligando en tiempo real. <sup>2</sup> El SPR es un fenómeno óptico que sucede en una superficie de oro cuando existe un cambio en el índice de refracción entre dos medios distintos (Figura 1A). Los biosensores contienen dos medios distintos: un prisma y una disolución acuosa. La interfase es una capa de oro muy fina (chip) que está cubierta de una matriz de dextranos sobre la que se inmoviliza la biomolécula cuya interacción se desea estudiar. Una vez inmovilizado el ligando en la superficie<sup>3</sup> se fluye el analito sobre la misma, teniendo lugar la interacción o asociación, provocando un aumento de la señal hasta que se estabiliza cuando alcanza el equilibrio. En este momento se inicia la etapa de disociación del analito que será más o menos lenta dependiendo de la fuerza de la interacción (Figura 1). La superficie del chip puede regenerarse eliminando todo el analito y restaurando la línea base. De este modo el chip está preparado para el siguiente experimento. Las variaciones del analito que se acumula en el chip producen cambios en el índice de refracción provocando un cambio en la resonancia del plasmón de superficie (SPR). El seguimiento de estas interacciones nos proporciona unas curvas que se llaman sensorgramas

sobre las cuales podemos obtener información de la cinética de la interacción en tiempo real (Figura 1B).



**Figura 1.** Biosensor por detección de la resonancia del plasmón de superficie (SPR). <sup>1</sup> A) Esquema general del sistema. B) Esquema de un sensorgrama ideal.

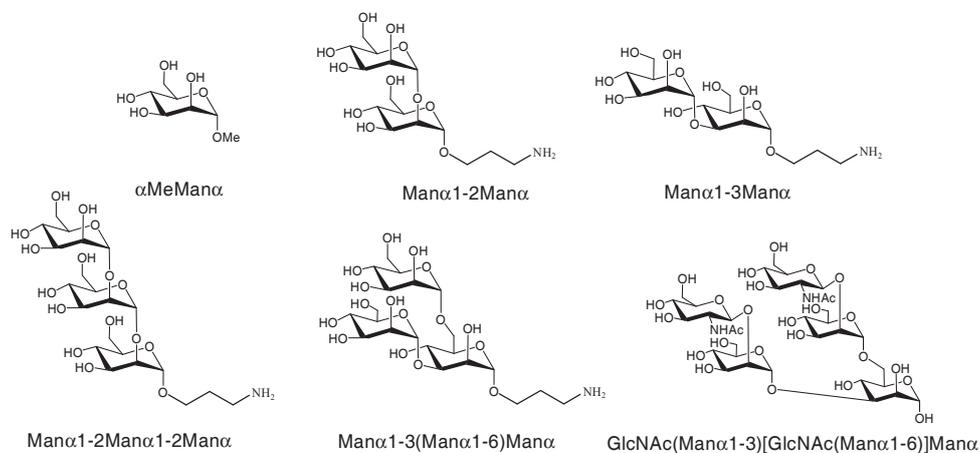
La cinética de la interacción se obtiene a partir de curvas de asociación obtenidas a distintas concentraciones del analito ajustando los datos a un modelo cinético mediante el programa informático BIAevaluation 4.1. de Biacore. <sup>1</sup>

## 2. Resultados y discusión

Mediante estos biosensores, se evaluó la actividad inhibidora de una serie *manno*-GNPs frente a la unión del dominio de reconocimiento de carbohidratos (DC-SIGN-CRD) o del dominio extracelular (DC-SIGN-ECD) a la glicoproteína gp120 inmovilizada en la superficie del chip. Se determinó también la actividad de una serie de oligosacáridos de manosa para evaluar la contribución de la multivalencia en las GNPs.

Los oligosacáridos libres que se utilizaron (Figura 2) se obtuvieron a través del proyecto EMPRO y van desde el monosacárido sencillo metil- $\alpha$ -D-manopiranosido hasta estructuras basadas en el nonasacárido del oligomanósido  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , como el disacárido  $\text{Man}\alpha 1\text{-}3\text{Man}\alpha$  y el trisacárido  $\text{Man}\alpha 1\text{-}3(\text{Man}\alpha 1\text{-}6)\text{Man}\alpha$ , que constituyen las estructuras parciales de las ramificaciones internas del nonasacárido y el pentasacárido tipo híbrido  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ; y el disacárido  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha$ , residuo terminal común a los

brazos D1, D2 y D3, y el trisacárido  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha$ , que es el residuo terminal del brazo D1 del nonasacárido.



**Figura 2.** Oligosacáridos utilizados en los experimentos de SPR.

Las gliconanopartículas probadas en estos ensayos se muestran en la Figura 3. Se eligieron las nanopartículas **1-Au**, **2-Au** y **4-Au** de 100% densidad en manosa; nanopartículas **3-Au-GlcC<sub>2</sub>** (**5%**), **3-Au-GlcC<sub>2</sub>** (**15%**), y **3-Au-GlcC<sub>2</sub>** (**30%**) que contienen 5, 15 o 30 % de densidad en el manósido, y que contienen neoglicoconjugados de glucosa **GlcC<sub>2</sub>** como componente de relleno; nanopartículas que contienen ~50-66% de los disacáridos  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha$  (**5-Au-CO<sub>2</sub>H** (**66%**)) o  $\text{Man}\alpha 1\text{-}3\text{Man}\alpha$  (**6-Au-CO<sub>2</sub>H** (**50%**)) o de los trisacáridos  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha$  (**7-Au-CO<sub>2</sub>H** (**66%**)) y  $\text{Man}\alpha 1\text{-}3(\text{Man}\alpha 1\text{-}6)\text{Man}\alpha$  (**8-Au-CO<sub>2</sub>H** (**50%**)) y que contienen el espaciador carboxílico como relleno; y por último se probaron GNPs funcionalizadas con 100% (**10-Au**) o 50% (**10-Au-GlcC<sub>5</sub>** (**50%**)) del disacárido  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha$ , y que contienen **GlcC<sub>5</sub>** como componente inerte (Figura 3).

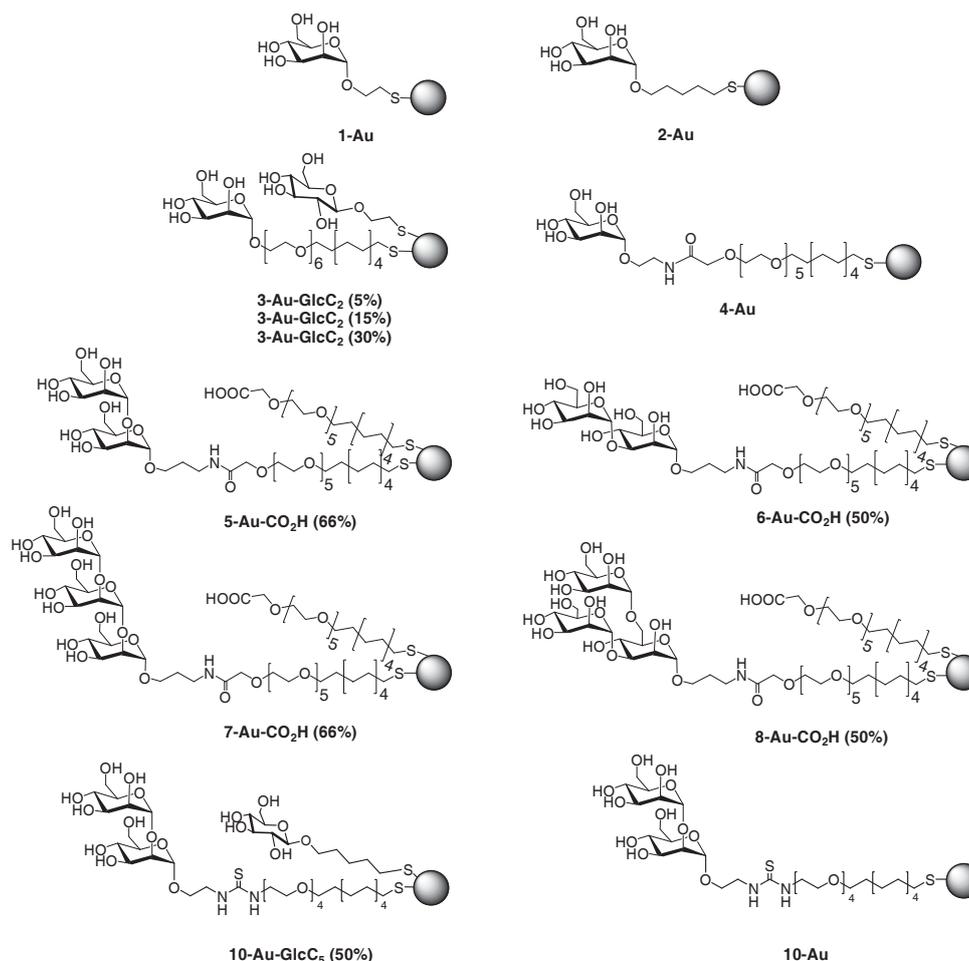


Figura 3. Manno-GNPs utilizadas en los experimentos de SPR.

Como control para los experimentos de inhibición se utilizaron las nanopartículas **Au-CO<sub>2</sub>H**, funcionalizadas con el espaciador carboxílico, y las nanopartículas **GlcC<sub>2</sub>-Au** o **GlcC<sub>5</sub>-Au**, funcionalizadas con glucosa (Figura 4).

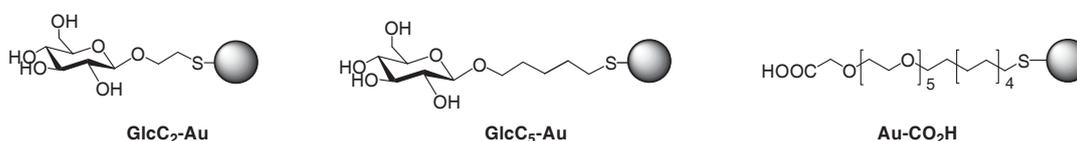
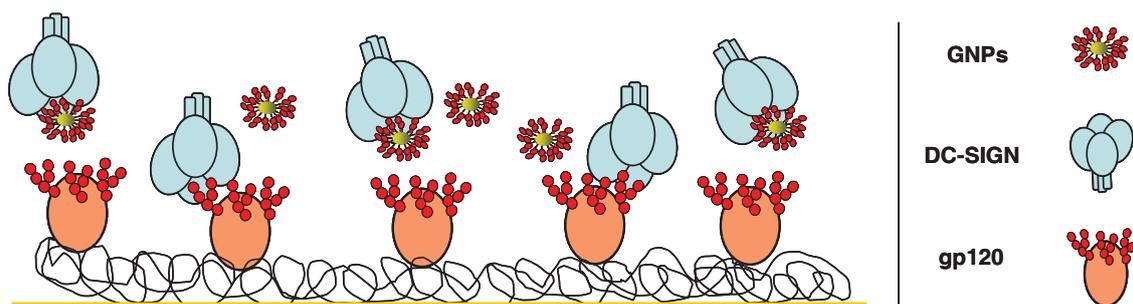


Figura 4. Nanopartículas de control utilizadas en los experimentos de SPR.

## 2.1. Experimentos de inhibición de la interacción DC-SIGN/gp120 mediante *manno*-GNPs.

Todos los experimentos de inhibición se llevaron a cabo inmovilizando la glicoproteína gp120 (CN54) en un chip CM5, recubierto de una capa de carboxidextrano, mediante el tradicional acoplamiento amídico.<sup>3</sup> Primero se activaron los grupos carboxílicos del carboxidextrano con una mezcla de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Se fluyó la gp120 en el canal 2 (Fc2) hasta inmovilizar la cantidad de proteína suficiente para obtener una respuesta de ~700 RU (response units). El canal 1 (Fc1) se dejó como referencia. Finalmente se inyectó etanol amina en ambos canales hasta obtener una respuesta constante de RUs, eliminando los grupos activados que no se unen a la proteína, y desplazando la proteína que no se ha unido covalentemente. La unión específica de DC-SIGN con la gp120 se determinó como la resta Fc2-Fc1, sustrayendo las interacciones no específicas de la proteína con el canal de referencia la matriz. Para los experimentos de inhibición (Figura 5) se inyectaron distintas disoluciones en tampón HBS-P<sup>1</sup> conteniendo 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 50 nM de DC-SIGN (CRD o ECD) y concentraciones variables de los inhibidores en un rango entre 0.05 y 2 mM para los oligosacáridos, y entre 20 μM y 200 pM para las nanopartículas.



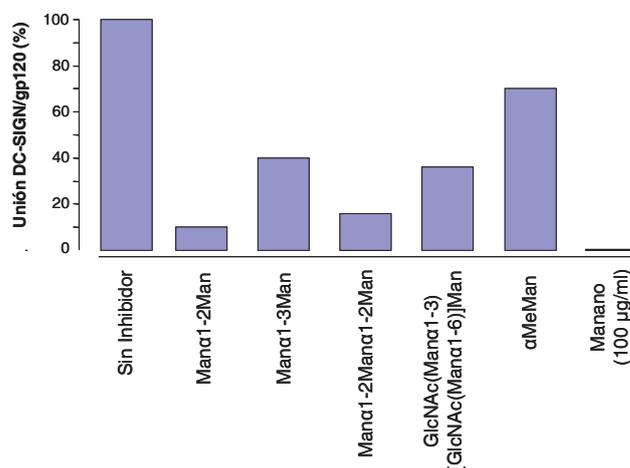
**Figura 5.** Esquema experimental de ensayos de inhibición de la interacción DC-SIGN/gp120 mediante *manno*-gliconanopartículas.

Todos los compuestos, oligosacáridos y GNP, mostraron inhibición de la unión DC-SIGN/gp120 dependiente de la concentración. Como control positivo se utilizó el polisacárido manano, que bloquea la unión DC-

SIGN/gp120. <sup>4</sup> Las nanopartículas utilizadas como control (Figura 4) no fueron capaces de inhibir la interacción.

### 2.1.1. Oligosacáridos.

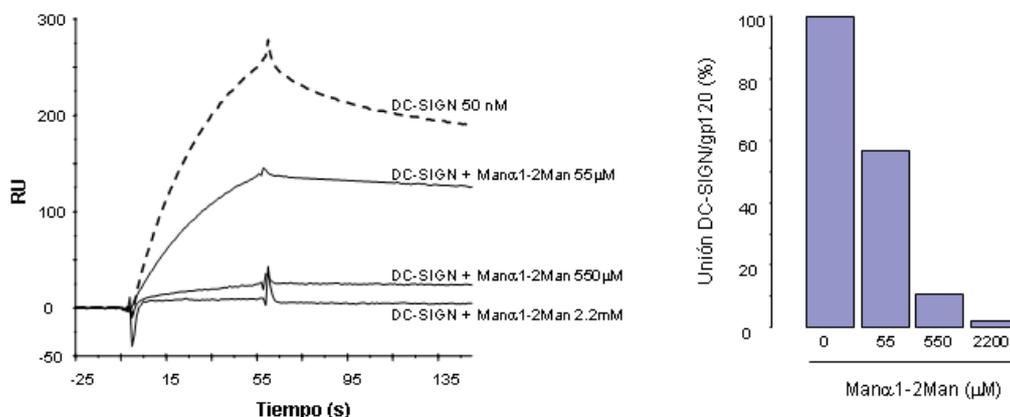
Los oligosacáridos libres basados en las estructuras de los carbohidratos tipo “*high mannose*” o tipo “*hybrid type*” (Figura 2), así como el metil- $\alpha$ -D-manopiranosido son capaces de inhibir la unión DC-SIGN-CRD/gp120 a una concentración 500  $\mu$ M (Figura 6, Tabla 1). El monosacárido metil- $\alpha$ -D-manopiranosido es el menos activo de los inhibidores (inhibición del 25%). El disacárido Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  y el trisacárido Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  inhibieron esta unión hasta un 90 y 85% respectivamente siendo mejores inhibidores que el pentasacárido Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> que inhibió solamente un 64% a dicha concentración. Este resultado indica que un aumento en la complejidad del oligosacárido no siempre contribuye al bloqueo de la interacción DC-SIGN/gp120. El disacárido Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  fue mejor inhibidor que el disacárido Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ , sugiriendo una preferencia de DC-SIGN-CRD por las uniones  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2 en los oligosacáridos de manosa. <sup>5</sup>



**Figura 6.** Diagrama de barras comparativo de la inhibición de la unión DC-SIGN-CRD/gp120 (CN54) por los oligosacáridos libres a concentración de 500 mM.

El disacárido Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  fue el inhibidor más potente consiguiendo el 100% de inhibición a concentración 2.2 mM (Figura 7), lo que indica que

Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  podría ser un buen candidato para presentarlo de forma multivalente en la nanopartícula.



**Figura 7.** Sensorgramas y diagrama de barras de la inhibición de la interacción DC-SIGN-CRD/gp120 (CN54) por el disacárido Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> a distintas concentraciones.

La potencia inhibidora de los oligosacáridos frente a la inhibición de la interacción DC-SIGN-ECD/gp120 presentó un patrón similar siendo también el disacárido Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  el inhibidor más potente.

### 2.1.2. Gliconanopartículas de (oligo)manósidos.

La capacidad inhibitoria de las nanopartículas de manosa **1-Au**, **2-Au**, **4-Au** (Figura 3) alcanzó su máximo (100%) a concentraciones  $\sim$ 20  $\mu$ M. La naturaleza del distinto espaciador en las GNPs no parece ejercer una influencia significativa en la eficacia de inhibición.

La nanopartícula **2-Au**, que presenta aproximadamente 73 cadenas del monosacárido, inhibió la interacción DC-SIGN-CRD/gp120 a concentración 20  $\mu$ M, lo que representa un factor de inhibición 1000 veces mayor respecto al metil- $\alpha$ -D-manopiranosido, que necesitó una concentración 25 mM para conseguir inhibición del 100%. El efecto multivalente de **2-Au** se puso de manifiesto al comparar la concentración de manósido en la GNP. Esta nanopartícula presenta un promedio de 73 cadenas del manósido, lo que corresponde a una concentración 1.4 mM en carbohidrato. Esta concentración

fue capaz de inhibir el 100% de la interacción mientras que el metilmanósido necesitó una concentración 17 veces mayor para obtener el mismo efecto.

Las nanopartículas que contienen un ~50-66% de los disacáridos Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  (**5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**), y Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$  (**6-Au-CO<sub>2</sub>H (50%)**), o de los trisacáridos Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  (**7-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**) y Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-6)Man $\alpha$  (**8-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**) (Figura 3) inhibieron la interacción el 100% a concentraciones entre 0.006 y 4.040  $\mu$ M, resultando mejor inhibidores de la unión de DC-SIGN-CRD/gp120 que las nanopartículas funcionalizadas con el monosacárido (inhibición del 100% a concentración ~20  $\mu$ M) (Tabla 1)

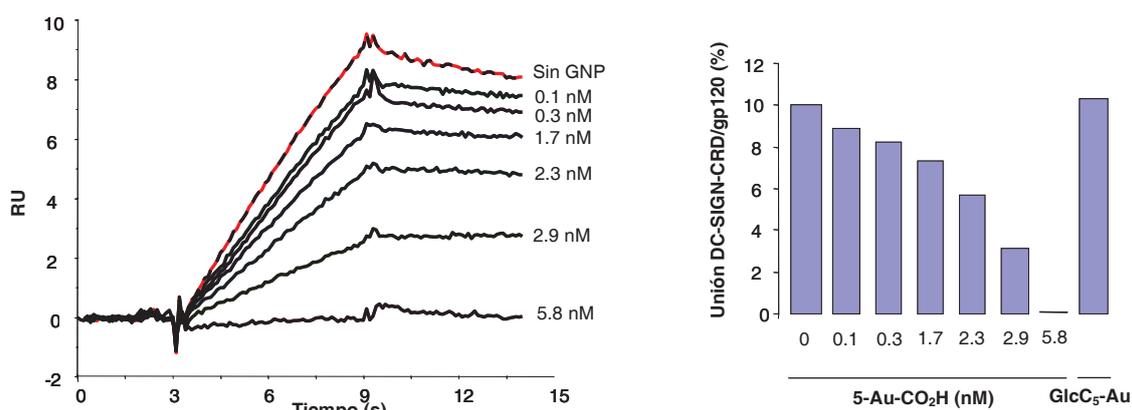
**Tabla 1.** Oligosacáridos y *manno*-gliconanopartículas como inhibidores de la unión de DC-SIGN-CRD/gp120.

Inhibidor	Manosido	Man/GNP	(100%) <sup>a</sup> , $\mu$ M		IC50 <sup>b</sup> , $\mu$ M	
			Por GNP	Por Manosido	Por GNP	Por manósido
metil- $\alpha$ -D-manopiranosido	Man	1	-	500 (25%)	-	ND
Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ C <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$	1	-	500 (90%)	-	ND
Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ C <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$	1	-	500 (40%)	-	ND
Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ C <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$	1	-	500 (85%)	-	ND
<b>5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)</b>	Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$	25	0.0057	0.142	0.002	0.052
<b>6-Au-CO<sub>2</sub>H (50%)</b>	Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$	19	3.04	57.7	0.720	13.7
<b>7-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)</b>	Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$	25	2.92	73.0	0.139	2.6
<b>8-Au-CO<sub>2</sub>H (50%)</b>	Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-6)Man $\alpha$	19	4.34 (70%)	82.6 (70%)	0.665	12.6

<sup>a</sup> Concentración de nanopartícula o manósidos que inhibe la unión DC-SIGN-CRD/gp120 al 100%, los números en paréntesis indican la máxima concentración probada; <sup>b</sup> IC50 es la concentración de nanopartícula o manósidos que inhibe la unión DC-SIGN-CRD/gp120 al 50%.

La concentración de manósidos necesaria para inhibir la unión DC-SIGN-CRD/gp120 al 50% (IC50) se calculó por interpolación en la curva exponencial que representa el porcentaje de inhibición obtenido frente a distintas concentraciones de nanopartícula. Los IC50 calculados en molaridad de nanopartícula se expresaron también en concentración de (oligo)manósido, teniendo en cuenta el número aproximado de cadenas que contienen las GNPs y su peso molecular, calculado según los datos obtenidos por TEM y la tabla de Murray <sup>6, 7</sup>

La nanopartícula **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**, que presenta aproximadamente 25 cadenas del disacárido Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  y un peso molecular de ~43 kDa fue el mejor inhibidor (Figura 8). Ésta nanopartícula inhibió la interacción hasta el 100% a concentración ~6 nM en nanopartícula y 142 nM en carbohidrato. Sin embargo, el disacárido libre Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  necesitó una concentración de 2.2 mM para conseguir el mismo efecto, lo que significa que una concentración mucho menor del disacárido en la superficie de la nanopartícula es 15000 veces más potente que el disacárido libre. Esto confirma que la presentación multivalente del carbohidrato es esencial para aumentar su actividad como inhibidor de la interacción entre DC-SIGN-CRD y gp120. Los valores de IC<sub>50</sub><sub>GNP</sub> de 2 nM en concentración de GNP y de IC<sub>50</sub><sub>Man</sub> de 52 nM en concentración de disacárido, indican que esta GNP es 327 veces más potente que el resto de las GNPs (**6-Au-CO<sub>2</sub>H**, **7-Au-CO<sub>2</sub>H** y **8-Au-CO<sub>2</sub>H**), que presentaron actividades en el rango micromolar (Tabla 1).



**Figura 8.** Sensorgramas y diagramas de barras de la inhibición de la unión DC-SIGN-CRD/gp120 (CN54) mediante concentraciones variables de la nanopartícula **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**.

Estos resultados indican también una preferencia clara de la proteína por la unión Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  con respecto a la unión Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$  de los oligosacáridos. La introducción adicional de una segunda unidad de manosa en posición 2 para dar el trisacárido Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  no mejoró la capacidad inhibitoria en la nanopartícula **7-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**. Existen antecedentes indicando que la presencia de residuos Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  aumenta la afinidad de oligomanósidos por DC-SIGN<sup>5</sup> y que además éstos son

responsables del 85% de los contactos entre el undecasacárido  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  de la gp120 y el anticuerpo 2G12.<sup>8</sup> Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestros experimentos y explican que el aumento en la complejidad del oligosacárido con otras uniones no contribuye significativamente al bloqueo de la interacción DC-SIGN/gp120. Las nanopartículas **GlcC<sub>5</sub>-Au** y **GlcC<sub>2</sub>-Au** que se utilizaron como control no presentaron actividad inhibidora a una concentración 50  $\mu\text{M}$ , indicando la selectividad de la interacción por oligosacáridos de manosa.

Para evaluar la influencia de la densidad del disacárido  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha$  en la GNP se estudió su capacidad para inhibir la unión DC-SIGN-ECD/gp120 de las nanopartículas **10-Au** y **10-Au-GlcC**, con 100% y 50% densidad en disacárido y la nanopartícula anterior **5-Au-CO<sub>2</sub>H**, con 66% densidad en disacárido (Figura 3). El dominio extracelular de DC-SIGN (DC-SIGN-ECD) es un tetrámero, lo que le confiere una mayor afinidad por la gp120. La potencia inhibidora de **10-Au**, que incorpora un 100% del disacárido fue similar a la observada para las nanopartículas **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)** y **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)** que presentan respectivamente un 66% y un 50% del mismo, indicando que el aumento en la densidad del disacárido no mejora la actividad inhibidora de la GNP (Tabla 2). Los grupos carboxílicos, presentes en un ~35 % en la nanopartícula **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)** podrían contribuir a su capacidad inhibitoria mediante interacciones electrostáticas entre los mismos y la región positiva V3 de la gp120.<sup>9, 10, 11</sup> Sin embargo, la nanopartícula **Au-CO<sub>2</sub>H**, que contiene solo el espaciador carboxílico inhibió el 27 % de la interacción a una concentración ~100 veces mayor que **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**, indicando que su presencia no parece contribuir a la actividad de la GNP.

Tampoco el neoglicoconjugado **GlcC<sub>5</sub>** presente en la nanopartícula **10-Au-GlcC<sub>5</sub>** contribuye a la inhibición. La nanopartícula **GlcC<sub>5</sub>-Au**, necesitó una concentración 17 veces mayor (46.7  $\mu\text{M}$  en glucósido) que la que necesita **10-Au-GlcC<sub>5</sub>** (2.8  $\mu\text{M}$  en glucósido) para conseguir el mismo efecto (Tabla 2), indicando que es el disacárido  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha$  el responsable de la inhibición.

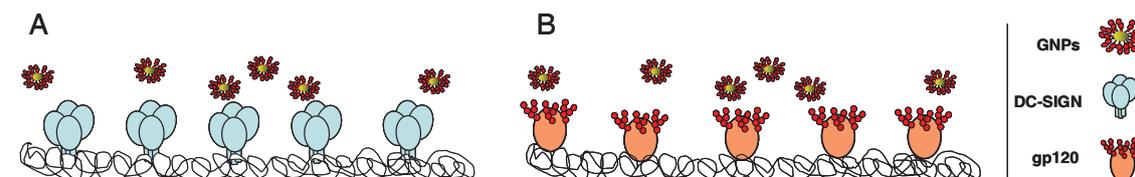
**Tabla 2.** *Manno*-GNPs como inhibidores de la unión de DC-SIGN-ECD/gp120.

Compuesto	Manosido	Man/GNP	(100%) <sup>a</sup> , $\mu\text{M}$		IC50 <sup>b</sup> , $\mu\text{M}$	
			Por GNP	Por Manosido	Por GNP	Por manosido
<b>5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)</b>	Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$	25	0.11	2.9	0.009	0.234
<b>10-Au</b>	Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$	59	0.08	4.7	0.008	0.497
<b>10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)</b>	Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$	22	0.12	2.8	0.069	0.153
<b>GlcC<sub>5</sub>-Au</b>	-	-	1.36	46.7 <sup>c</sup>	ND	ND
<b>Au-CO<sub>2</sub>H</b>	-	-	0.28 (27%)	37.5(27%) <sup>d</sup>	ND	ND

<sup>a</sup> Concentración de nanopartícula o manósidos que inhibe la unión DC-SIGN-ECD/gp120 al 100%, los números en paréntesis indican la máxima concentración probada; <sup>b</sup> IC50 es la concentración de nanopartícula o manósidos que inhibe la unión DC-SIGN-ECD/gp120 al 50%; <sup>c</sup> referido a la concentración de glucósido; <sup>d</sup> referido a la concentración de espaciador carboxílico.

## 2.2. Evaluación de la unión directa entre GNPs y DC-SIGN-ECD o gp120.

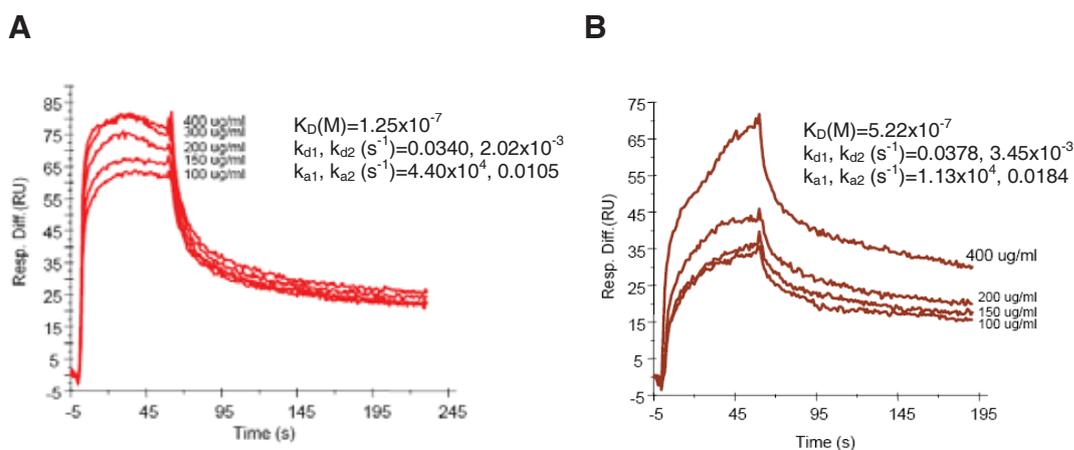
Para demostrar que la inhibición de la interacción DC-SIGN-ECD/gp120 por las *manno*-GNPs sucede a través de su interacción con DC-SIGN se evaluó la unión directa de **Au-CO<sub>2</sub>H**, **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)**, **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**, **GlcC<sub>5</sub>-Au** y **10-Au** con DC-SIGN-ECD y con gp120 inmobilizadas en la superficie del chip, y se determinó las constantes de disociación  $K_D$ . Las proteínas se inmobilizaron sobre la superficie del chip mediante acoplamiento amídico según el protocolo descrito anteriormente. Para los experimentos de unión directa (Figura 9) se inyectaron concentraciones variables de las nanopartículas (100-400  $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia de 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . Los sensorgramas que se obtuvieron se utilizaron para evaluar la cinética de afinidad de los ligandos ajustando los datos al mejor modelo (menor  $\text{Chi}^2$ ) utilizando el software BIAevaluation 4.1.<sup>1</sup>



**Figura 9.** Esquema de la unión directa de las gliconanopartículas con: A) Dominio extracelular de DC-SIGN-ECD; B) gp120 (CN54).

### 2.2.1. Unión de *manno*-GNPs a DC-SIGN-ECD

Las curvas de unión de las nanopartículas a DC-SIGN-ECD presentaron una fase de asociación y de disociación rápidas. La unión de GNPs a DC-SIGN-ECD tiene lugar a concentraciones de nanopartículas entre 20 y 80 veces mayores (100 y 400  $\mu\text{g/ml}$ ) que las concentraciones para inhibir al 100% la interacción DC-SIGN-ECD/gp120 (Figura 10).



**Figura 10.** Sensorgrama de la unión de GNPs/DC-SIGN-ECD. A) **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)**; B) **GlcC<sub>5</sub>-Au**.

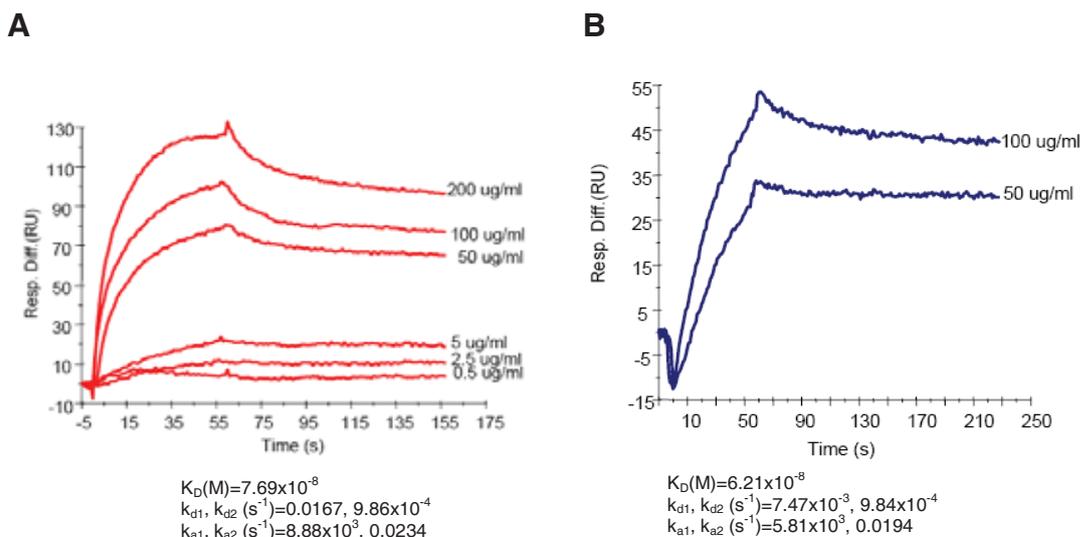
La afinidad de unión de las nanopartículas **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)** y **10-Au**, con distintas densidades de  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha$  por DC-SIGN-ECD fue similar a la observada para **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**, que contiene 66% del mismo disacárido, y con  $K_D$  ( $\sim 10^{-7}$ ) en el rango submicromolar. La nanopartícula **GlcC<sub>5</sub>-Au**, que incorpora glucosa también presentó afinidad por la proteína, en el mismo rango ( $K_D \sim 10^{-7} \text{M}$ ) que las de manosa. **Au-CO<sub>2</sub>H**, con espaciador carboxílico, no presentó ninguna afinidad por la proteína, coincidiendo con los resultados de inhibición anteriores (Tabla 3).

**Tabla 3.** Costantes cinéticas de afinidad de GNPs a DC-SIGN-ECD.

GNP	$K_{a1} (M^{-1}s^{-1})$	$K_{d1}(s^{-1})$	$K_{a2}(M^{-1}s^{-1})$	$K_{d2}(s^{-1})$	$K_D (M)$
<b>5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)</b>	$2.21 \times 10^4$	0.1715	0.01505	$1.40 \times 10^{-3}$	$6.64 \times 10^{-7}$
<b>10-Au</b>	$4.24 \times 10^4$	0.0954	$8.52 \times 10^{-3}$	$2.77 \times 10^{-3}$	$5.48 \times 10^{-7}$
<b>10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)</b>	$4.40 \times 10^4$	0.034	0.0105	$2.02 \times 10^{-3}$	$1.25 \times 10^{-7}$
<b>GlcC<sub>5</sub>-Au</b>	$1.13 \times 10^4$	0.0378	0.01845	$3.45 \times 10^{-3}$	$5.22 \times 10^{-7}$

### 2.2.2. Unión de *manno*-GNPs a gp120

Un resultado inesperado se obtuvo en los experimentos de unión directa de las *manno*-GNPs a la proteína gp120. Las curvas de unión de las nanopartículas con gp120 presentaron fases de asociación y de disociación lentas (Figura 11).



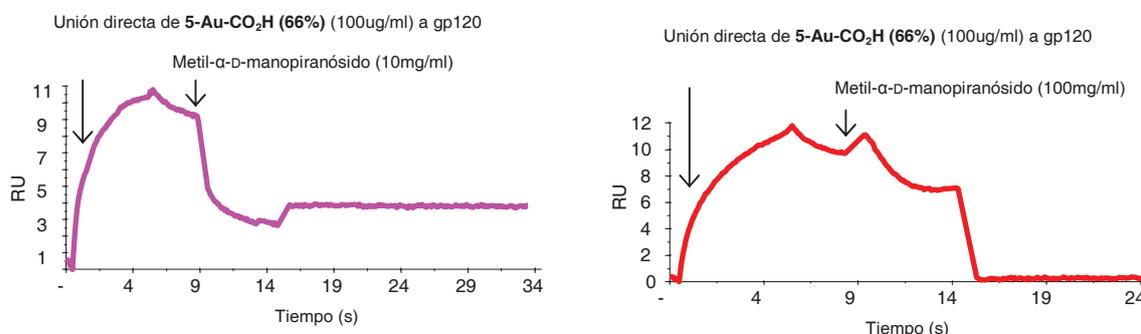
**Figura 11.** Sensorgrama de la unión de GNPs a gp120 (CN54). A) **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)**; B) **GlcC<sub>5</sub>-Au**.

Las constantes de disociación  $K_D$  obtenidas en presencia de calcio a partir de los sensorgramas, fueron del orden de  $\sim 10^{-8}$  M para las GNPs **Au-CO<sub>2</sub>H**, **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)**, **GlcC<sub>5</sub>-Au** y **10-Au** excepto para la nanopartícula **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**, cuya afinidad por gp120 fue 100 veces mayor que la del resto.

**Tabla 4.** Costantes cinéticas de afinidad de GNPs a gp120(CN54).

GNP	$Ka_1 (M^{-1}s^{-1})$	$Kd_1 (s^{-1})$	$Ka_2 (M^{-1}s^{-1})$	$Kd_2 (s^{-1})$	$K_D (M)$
<b>5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)</b>	$1.83 \times 10^4$	$1.53 \times 10^{-2}$	$2.04 \times 10^{-2}$	$1.89 \times 10^{-6}$	$7.2 \times 10^{-11}$
<b>10-Au</b>	$2.84 \times 10^4$	0.03905	0.02305	$1.01 \times 10^{-3}$	$5.17 \times 10^{-8}$
<b>10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)</b>	$8.88 \times 10^3$	0.0167	0.0234	$9.86 \times 10^{-4}$	$7.69 \times 10^{-8}$
<b>GlcC<sub>5</sub>-Au</b>	$5.81 \times 10^3$	$7.47 \times 10^{-3}$	0.0194	$9.84 \times 10^{-4}$	$6.21 \times 10^{-8}$
<b>Au-CO<sub>2</sub>H</b>	$9.93 \times 10^4$	0.0386	0.014	$1.54 \times 10^{-3}$	$3.86 \times 10^{-8}$

La especificidad de unión de las nanopartículas a la gp120 se confirmó al desplazar totalmente la GNP **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)** totalmente con concentraciones muy elevadas de metil- $\alpha$ -D-manopiranosido. En el experimento primeramente se inyectó la nanopartícula a concentración 100  $\mu$ g/ml, y, tras la fase de disociación, se inyectó metil- $\alpha$ -D-manopiranosido a concentración 10 mg/mL, que desplazó el ~50% de la nanopartícula. Concentraciones de 100 mg/ml del monosacárido fueron suficientes para desplazar completamente la interacción (Figura 12).

**Figura 12.** Sensorgramas comparando la influencia de la concentración de metil- $\alpha$ -D-manopiranosido en el desplazamiento de la unión **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**-gp120.

Las interacciones inespecíficas con el oro se descartaron porque la nanopartícula **1-Au**, funcionalizada con manosa, no mostró afinidad por gp120 a concentración 1  $\mu$ M, utilizándose como control negativo.

La afinidad de las nanopartículas **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)** y **Au-CO<sub>2</sub>H**, que incorporan densidades del 66% o 100% del espaciador carboxílico, podría

justificarse por interacciones electrostáticas entre la GNP cargada negativamente y la región positiva V3 de la gp120.<sup>9, 10, 11</sup>

La afinidad de las nanopartículas **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)** y **10-Au** que contienen Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ , y de la nanopartícula **GlcC<sub>5</sub>-Au**, que incorpora solo glucosa, es difícil de interpretar. Las interacciones proteína-carbohidrato o carbohidrato-carbohidrato que dependen de Ca<sup>2+</sup> podrían ser la base de este efecto. Sin embargo solo se ha descrito recientemente la actividad lectina en la gp41, la cual reconoce galactosil ceramidas en células epiteliales.<sup>12</sup> Por otro lado, la gp120 es una de las proteínas con más alto grado de glicosilación, y su interacción con las GNPs podría ser del tipo carbohidrato-carbohidrato como ya ha sido demostrado que tiene ligar entre nanopartículas de Lewis X,<sup>13, 14</sup> o entre los glicoesfingolípidos y la integrina  $\alpha_5\beta_1$ .<sup>15</sup>

### 3. Conclusiones

- Los oligosacáridos de manosa inhiben la interacción DC-SIGN-CRD/gp120 10 veces mejor que metil- $\alpha$ -D-manopiranosido. El disacárido Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  fue el inhibidor más potente mostrando que la complejidad del oligosacárido no parece mejorar la potencia inhibidora del mismo.
- Las *manno*-GNPs **1-Au**, **2-Au** y **4-Au**, funcionalizadas con manosa fueron inhibidores hasta 1000 veces mejores que el metil- $\alpha$ -D-manopiranosido en la interacción DC-SIGN-ECD/gp120. El efecto multivalente de **2-Au** se demostró porque se necesitó una concentración de manósido en esta nanopartícula 17 veces menor a la que necesitó el metilmanósido para inhibir la interacción al 100%.
- En la inhibición de la unión DC-SIGN/gp120, las *manno*-GNPs **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**, **6-Au-CO<sub>2</sub>H (50%)**, **7-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)** y **8-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**, funcionalizadas con di- y trisacáridos fueron al menos 5 veces más potentes que las *manno*-GNPs funcionalizadas con manosa. La nanopartícula **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)** fue el mejor inhibidor, mostrando una preferencia por las uniones  $\alpha(1\rightarrow2)$ . El efecto multivalente de **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)** se demostró

porque una menor concentración del disacárido en la GNP fue hasta 15000 veces más potente frente a CRD y hasta 750 veces más potente frente a ECD que el disacárido libre Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ .

- La potencia inhibidora de **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**, **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)** y **10-Au (100%)** fue similar, indicando que el aumento de la densidad del disacárido Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  en la GNP no mejora la capacidad de la misma para inhibir la interacción. La influencia del espaciador que une el disacárido Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  a la GNP también se descartó al mostrar **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)** y **9-Au** actividades comparables
- En la inhibición de DC-SIGN/gp120, la contribución del espaciador carboxílico en las GNPs que lo contienen como relleno se descartó porque la nanopartícula **Au-CO<sub>2</sub>H**, funcionalizada solo con el espaciador carboxílico, inhibió el 27% a concentraciones 100 veces mayores que **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**. La contribución del glicoconjugado de glucosa a la actividad inhibidora de **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)** se descartó porque la nanopartícula **GlcC<sub>5</sub>-Au**, recubierta solo con glucosa, necesitó concentraciones hasta 17 veces mayores para inhibir la interacción.
- La inhibición de DC-SIGN-ECD/gp120 por GNPs sucede a través de su interacción con la lectina DC-SIGN, como se demostró por la afinidad de las nanopartículas **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**, **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)** y **10-Au**, funcionalizadas con distintas densidades del disacárido Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$  por esta lectina. La nanopartícula funcionalizada con glucosa **GlcC<sub>5</sub>-Au** presentó similar afinidad por la proteína que las GNPs de manosa. La GNP **Au-CO<sub>2</sub>H**, solo con el espaciador carboxílico no presentó ninguna afinidad por DC-SIGN-ECD, coincidiendo con los experimentos de inhibición.
- Las nanopartículas **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)**, **10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)**, **10-Au (100%)**, **Au-CO<sub>2</sub>H** y **GlcC<sub>5</sub>-Au** presentaron afinidad por la glicoproteína gp120, con valores del orden submicromolar para todas, mientras que **Au-CO<sub>2</sub>H** presentó una afinidad por gp120 100 veces mayor que las otras GNPs. La especificidad de la unión de GNPs por gp120 se probó

desplazando la nanopartícula **5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)** con concentraciones muy elevadas de metilmanósido. Las interacciones inespecíficas con el oro se descartaron porque la nanopartícula **1-Au**, funcionalizada con manosa, no mostró afinidad por gp120 a concentración elevada.

#### 4. Parte experimental

Los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un instrumento BIAcore X (Biacore AB, Uppsala) a 25°C en colaboración con el Prof Charles Kelly y la Dr. Karolin Hijazi del departamento de Oral Immunology del King's College London Dental Institute del Guy's Hospital en Londres.

##### 4.1. Métodos generales

**Oligosacáridos, proteínas y anticuerpos.** Los oligosacáridos sintéticos fueron donados por Colin Campion (Carbohydrate, Synthesis Ltd, Abingdon). La glicoproteína gp120 del VIH, expresada en baculovirus a partir de la cepa CN54, fue generosamente proporcionada por Prof. Ian Jones (University of Reading, UK). DC-SIGN-CRD expresada en *E. coli* fue proporcionada por Prof. Arne Skerra (Technical Universitat of Munich). DC-SIGN-ECD expresada en *E. coli* fue proporcionada por Dr. Karolin Hijazi (King's Collage, UK).<sup>16, 17</sup>

**4.2. Método general de inmovilización de proteínas.** La proteína se acopló en la célula 1 (Fc1) sobre la capa de carboximetil dextrano del chip CM5 mediante acoplamiento directo de amida.<sup>3</sup> Para la inmovilización, los grupos carboxilo de la superficie del chip presentes en Fc1 y en la célula 2 (Fc2), fueron activados con una disolución de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 0.2 M, y N-hidroxisuccinimida (NHS) 0.05 M en buffer HBS-P (10mM HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.005% vol/vol surfactant P20) suplementado con CaCl<sub>2</sub> 10 mM. Se realizaron inyecciones de 7 minutos a velocidad de flujo 5 µL/min. A continuación se inyectó la proteína gp120 (CN54) o DC-SIGN (2 µg/ml en buffer acetato 10 mM, pH 4) en Fc2. Este procedimiento permite acoplamientos de gp120 (CN54) y de DC-SIGN-ECD de hasta 700-1000 RU. Finalmente, se inyectó en ambos canales una disolución de etanolamina 1N, pH

8.5 para bloquear los grupos activados restantes y eliminar los ligandos unidos no covalentemente. Fc1 se utilizó como canal de referencia.

**4.3. Ensayos de inhibición de la unión DC-SIGN/gp120 mediante *manno*-GNPs.** se realizaron inyectando una solución de DC-SIGN CRD o ECD (50nM) con concentraciones variables de carbohidratos libres (0.05-2.00 mM) o gliconanopartículas (200 pM-20 µM) (en buffer HBS-P suplementado con CaCl<sub>2</sub> 10 mM) sobre la proteína inmovilizada en la superficie del chip CM5. La unión específica del ligando sobre la proteína inmovilizada en el chip es determinada como la diferencia entre Fc2-Fc1 sustrayendo las interacciones inespecíficas con la capa de dextrano y etanolamina del canal de referencia.

**4.4. Ensayos de unión directa de GNPs a DC-SIGN o gp120** se realizaron inyectando sobre la proteína inmovilizada sobre el chip CM5 concentraciones variables de las nanopartículas en buffer HBS-P suplementado con calcio 10 mM. Todas las inyecciones se realizaron durante 1 minuto a velocidad de flujo de 20 µl/min. Posteriormente, la superficie del chip se regeneró con Pierce Gentle Elution Buffer (Pierce) en pulsos de 15 s. La unión específica del ligando sobre la proteína inmovilizada en el chip es determinada como la diferencia entre Fc2-Fc1. El índice de inhibición se expresa como el porcentaje de disminución respecto de la actividad de unión del ligando en ausencia de inhibidor. Los sensorgramas que se obtuvieron se utilizaron para evaluar la cinética de afinidad de los ligandos. Las curvas se ajustaron al mejor modelo utilizando el software BIAevaluation 4.1. (Tabla 3 y Tabla 4)

## 5. Bibliografía

---

<sup>1</sup> <http://www.biacore.com>.

<sup>2</sup> a) Jonsson, U., Fagerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Lofas, S., Persson, B., Roos, H., Ronnberg, I., Sjolander, S., Stenberg, E., Stahlberg, R., Urbaniczky, C., Ostlin, H., and Malmqvist, M. (1991). Real-Time Biospecific Interaction Analysis Using Surface-Plasmon Resonance and a Sensor Chip Technology. *Biotechniques*, 11, 620-627; b) Malmqvist, M. (1993). Biospecific Interaction Analysis Using Biosensor Technology. *Nature*, 361, 186-187; c) Haseley, S.R., Talaga, P., Kamerling, J.P., and Vliegthart, J.F.G. (1999). Characterization of the carbohydrate binding specificity and kinetic parameters of lectins by using surface plasmon resonance. *Anal Biochem*, 274, 203-210; d) Ernst, B., Hart, G., and Sinaý, P. (2000). *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, A Comprehensive Handbook. Series, vol 4 B. Ernst,

---

G. Hart, and P. Sinaÿ. Wiley-VCH, Weinheim;e) Rich, R.L., and Myszka, D.G. (2000). Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr Opin Biotech*, 11, 54-61;f) McDonnell, J.M. (2001). Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr Opin Chem Biol* 5, 572-577; g) Homola, J. (2003). Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal Bioanal Chem*, 377, 528-539.

<sup>3</sup> Johnsson, B., Lofas, S., and Lindquist, G. (1991). Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem*, 198, 268-277.

<sup>4</sup> Turville, S.G., Arthos, J., Donald, K.M., Lynch, G., Naif, H., Clark, G., Hart, D., and Cunningham, A.L. (2001). HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood*, 98, 2482-2488.

<sup>5</sup> Feinberg, H., Castelli, R., Drickamer, K., Seeberger, P.H., and Weis, W.I. (2007). Multiple modes of binding enhance the affinity of DC-SIGN for high mannose N-linked glycans found on viral glycoproteins. *J Biol Chem*, 282, 4202-4209.

<sup>6</sup> Hostetler, M.J., Wingate, J.E., Zhong, C.J., Harris, J.E., Vachet, R.W., Clark, M.R., Londono, J.D., Green, S.J., Stokes, J.J., Wignall, G.D., Glish, G.L., Porter, M.D., Evans, N.D., and Murray, R.W. (1998). Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir*, 14, 17-30.

<sup>7</sup> Ojeda, R., de Paz, J.L., Barrientos, A.G., Martin-Lomas, M., and Penades, S. (2007). Preparation of multifunctional glyconanoparticles as a platform for potential carbohydrate-based anticancer vaccines. *Carbohydr Res*, 342, 448-459.

<sup>8</sup> 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., and Wilson, I.A. (2003). Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science*, 300, 2065-2071.

<sup>9</sup> Callahan, L.N., Phelan, M., Mallinson, M., and Norcross, M.A. (1991). Dextran sulfate blocks antibody binding to the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 without interfering with gp120-CD4 interactions. *J Virol*, 65, 1543-1550.

<sup>10</sup> Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P.D., and Sattentau, Q.J. (2000). Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol*, 74, 1948-1960.

<sup>11</sup> Neurath, A.R., Strick, N., and Li, Y.Y. (2002). Anti-HIV-1 activity of anionic polymers: a comparative study of candidate microbicides. *BMC Infect Dis*, 2, 27.

<sup>12</sup> Alfsen, A., and Bomsel, M. (2002). HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J Biol Chem*, 277, 25649-25659.

<sup>13</sup> de La Fuente, J.M., Barrientos, A.G., Rojas, T.C., Rojo, J., Canada, J., Fernandez, A., and Penades, S. (2001). Gold Glyconanoparticles as Water-Soluble Polyvalent Models To Study Carbohydrate Interactions *Angew Chem Int Ed*, 40, 2257-2261.

<sup>14</sup> de la Fuente, J.M., and Penades, S. (2006). Glyconanoparticles: types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochim Biophys Acta*, 1760, 636-651.

<sup>15</sup> Wang, X., Sun, P., Al-Qamari, A., Tai, T., Kawashima, I., and Paller, A.S. (2001). Carbohydrate-carbohydrate binding of ganglioside to integrin  $\alpha_5$  modulates  $\alpha_5\beta_1$  function. *J Biol Chem*, 276, 8436-8444.

---

<sup>16</sup> Mitchell, D.A., Fadden, A.J., and Drickamer, K. (2001). A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem*, 276, 28939-28945.

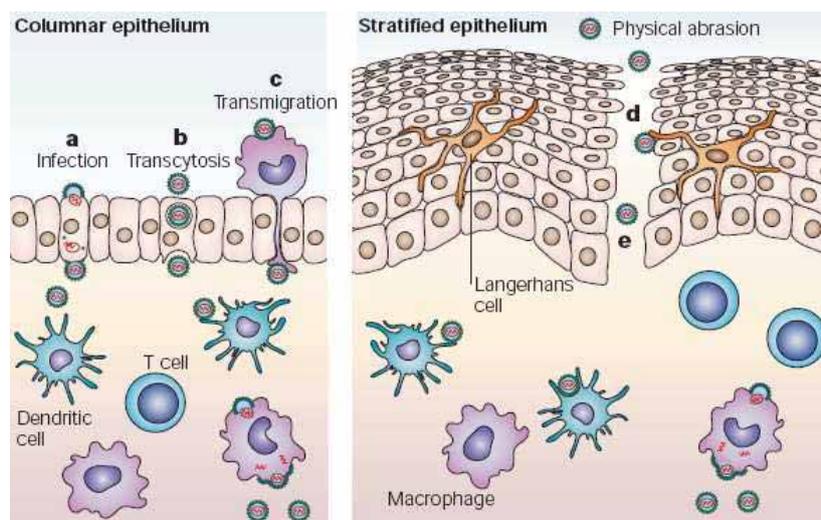
<sup>17</sup> Lozach, P.Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Fong, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Altmeyer, R. (2003). DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem*, 278, 20358-20366.

## CAPÍTULO 3. Estudios de inhibición de la *trans*-infección del VIH mediante *manno*-GNPs.

### 1. Introducción

En este capítulo se describen los resultados obtenidos en la inhibición en *trans* de la infección por VIH con las gliconanopartículas de (oligo)manósidos (*manno*-GNPs) y que se han llevado a cabo gracias a la colaboración con el laboratorio del Dr. Alcamí del Centro de Salud Carlos III.

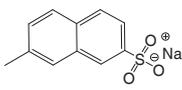
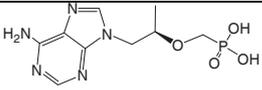
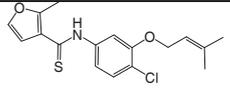
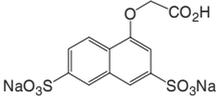
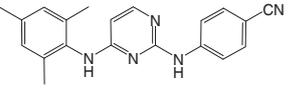
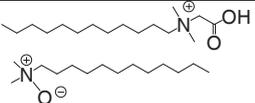
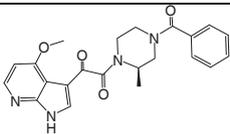
El VIH es un virus de transmisión sexual, por lo que antes de infectar al nuevo huésped, debe cruzar la barrera epitelial de la mucosa. Se han descrito varios mecanismos por los que el virus supera esta barrera (Figura 1), como son la infección directa de células epiteliales, la transcitosis a través de dichas células, la transmigración de células infectadas a través del epitelio, como ocurre en la infección por células de Langerhans o la entrada del virus a través de fisuras en el epitelio. Una vez superada esta barrera, el virus debe enfrentarse a las defensas innatas del huésped. Dentro de estas defensas, las células presentadoras de antígeno (APCs) juegan un papel fundamental. Especial importancia presentan las células dendríticas (DCs), que reconocen los antígenos de la glicoproteína de la envuelta (gp120) del VIH mediante el receptor tipo lectina DC-SIGN. Esta interacción desencadena su activación migrando desde la mucosa hasta los tejidos linfoides secundarios, donde presentan el VIH a los linfocitos CD4, comenzando el proceso de infección.<sup>1,2</sup> Este mecanismo de infección a través del receptor DC-SIGN de las células dendríticas, se conoce como infección en *trans*.<sup>3</sup>



**Figura 1.** Mecanismos del VIH para cruzar la barrera epitelial (Adaptado de<sup>1</sup>)

El desarrollo de esta tesis doctoral está enmarcado dentro del proyecto europeo EMPRO,<sup>4</sup> que tiene como objetivo el desarrollo de microbicidas que bloqueen la infección del VIH a través de la mucosa.<sup>5</sup> El proceso mediante el que el VIH se une a sus células diana y se fusiona es ampliamente conocido. Por ello, el desarrollo de microbicidas se ha enfocado hacia los distintos pasos del proceso de entrada viral, que van desde el bloqueo de esta unión mediante la desestructuración de la envuelta viral o de los receptores que utiliza el virus para su unión, hasta estadios más avanzados como son el proceso de fusión a la célula hospedadora o la retrotranscripción. En los párrafos siguientes se revisan algunos ejemplos de compuestos con actividad antiviral que actualmente están en fase preclínica o clínica, según su mecanismo de acción: actuando sobre el virus como diana o actuando sobre las células como diana. Así mismo se revisan los compuestos que han fallado en fase clínica avanzada porque no demostraron eficacia en la prevención de la transmisión del VIH o aumentaron el riesgo de infección. La Tabla 1 muestra esta selección de compuestos indicando el tipo de molécula, el mecanismo de inhibición de la infección por VIH y el rango de concentraciones efectivas.

**Tabla 1.** Lista de microbicidas en fase clínica o preclínica y fracasos.

NOMBRE	FÓRMULA MOLECULAR/ DESCRIPCIÓN	MW	MECANISMO DE ACCIÓN	ACTIVIDAD ANTI- HIV IN VITRO	FASE CLÍNICA
PRO 2000/5	 Polímero de ácido naftaleno sulfónico	5 kDa	Inhibidor de la entrada/fusión	IC50=2.75µg/mL X4 en PBMCs IC50=9.5µg/mL R5 en macrófagos	III
PMPA (Tenofovir)	 Nucleósido de adenosina monofosfato	287.2	Inhibidor de la retrotranscripción	IC50 = 6.3 µM HIV-1IIIb en células MT2	II/IIB
Combinación PRO 2000/5 +BufferGel	Polisulfonato+espermicida	-	Inhibidor de la entrada/fusión/es permicida	-	II/IIB
UC-781	 tiocarboxianilida no nucleosido	335.5	Inhibidor de la retrotranscripción	IC50 = 23 nM HIV-1 IIIb en células CEM T	I
SPL7013 viva gel	 Dendrímero de 32 unidades	16.6 kDa	Inhibidor de la entrada/fusión	IC50 = 0.73 µg/mL con virus subtipo B en PBMCs	I
Dapivirine (TMC120)	 Diarilpirimidina no nucleosido	329.1	Inhibidor de la retrotranscripción	IC50 = 24 nM HIV-1IIIb en células CEM T	I
C31G (SAVVY)	 Surfactante	581.8	espermicida	0.00625% inactiva el HIV-IIIb al 84%	III/No inhibe/ tóxico
Carrageenan	Mezcla de polisacáridos sulfatados de la alga marina roja/Polianión	ND	Bloquea la migración de macrófagos	IC50 = 12µg/mL HTLV IIIb en células MT-4	III/No inhibe
Sulfato de celulosa	Polisacárido sulfatado de residuos de glucosa β(1→4)/polianión	NE	Inhibidor de la entrada/fusión/ contraceptivo	IC50 = 10 µg/mL X4 en PBMCs	III/aumentó la infección
CV-N cianovirina	Proteína procedente de cianobacteria	11 kDa	Inhibidor de la fusión	EC50=0.1-36.8 nM para varios subtipos de HIV	Preclínica
BMS-378806 o BMS-806	 Piperazina	406	Inhibidor de la entrada	EC50~0.04 µM para varios subtipos de HIV	Preclínica
T20	CH <sub>3</sub> COYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL ELDKWASLWNWFNH <sub>2</sub> / Péptido de 36 residuos	4492	Inhibidor de la entrada/fusión	IC50 = 5.1-10.5 nM en varios subtipos de HIV	Preclínica
PSC RANTES	L-Thia-Pro <sup>2</sup> , L-α-cyclohexyl-Gly <sup>3</sup> NNY- RANTES/Proteína sintética derivada de la citoquina CCL5 o RANTES	7.8 kDa	Inhibidor de la entrada/fusión	IC50 = 8 pM R5 en PBMC activados	Preclínica

**El virus como diana.** Esta estrategia implica actuar directamente sobre el virión, bien desestructurando la membrana viral o bien interfiriendo con las glicoproteínas insertas en ella.

Los *surfactantes* fueron la primera generación de microbicidas y su mecanismo de acción consiste en destruir la estructura de la membrana viral. La primera formulación microbicida que se ensayó estaba basada en el surfactante nonoxynol-9 (N-9), que es el principio activo de muchos espermicidas debido a su capacidad para disgregar la membrana lipídica de los espermatozoides. Desgraciadamente, N-9 no solo atacaba la membrana viral del VIH, sino que también destruía la membrana de las células epiteliales presentes en la mucosa, que es la barrera de defensa natural ante los patógenos externos, incluyendo al VIH. Los ensayos clínicos con N-9 demostraron que no solo no protegía de la infección por VIH, sino que además aumentaba la probabilidad de contraer la infección en las mujeres que lo utilizaban varias veces al día.<sup>6</sup> Este fracaso estimuló la búsqueda de otros compuestos que bloqueasen mecanismos más específicos implicados en la transmisión del VIH, sin dañar los propios mecanismos de defensa.<sup>1,7</sup>

Los compuestos que se unen a la glicoproteína gp120<sup>8</sup> del VIH tienen una acción mucho más específica. Existen tres tipos como son: los anticuerpos monoclonales (mAbs) o péptidos que se unen a secuencias específicas del esqueleto proteico de la gp120 o la gp41; las moléculas polianiónicas o polímeros que reconocen regiones cargadas positivamente en la gp120; y los mAbs y proteínas que interaccionan con los residuos oligosacarídicos que protegen la secuencia peptídica de la gp120.

La primera familia son los denominados *inhibidores de la fusión*. Los anticuerpos monoclonales (mAbs) b12, 2G12 y 2F5<sup>9</sup> se unen a secuencias específicas de la gp120 o de la gp41 y son capaces de neutralizar la mayoría de cepas del VIH. Estos mAbs no impiden la unión del virus al receptor, pero son capaces de inhibir los cambios conformacionales que se producen tras su unión a gp41, necesarios para la fusión de la membrana viral y celular. También son inhibidores de la fusión los péptidos como el T-20<sup>10,11</sup>

(Enfuvirtida®) que está basado en la secuencia peptídica de la gp41 e interacciona con ella impidiendo la fusión.<sup>12</sup>

La segunda familia de antivirales está formada por los *compuestos polianiónicos* de tipo polisulfato, polisulfonato o policarboxilato como son la 2-sulfato-dextrina, el sulfato de celulosa,<sup>13</sup> PRO-2000,<sup>13</sup> SPL7013,<sup>14</sup> o el Carrageenan,<sup>15</sup> que recientemente ha fallado en fase III de investigación clínica al demostrarse que aunque no tiene efectos citotóxicos en humanos no impide la transmisión del VIH de hombre a mujer en comparación con el placebo.<sup>16</sup> Estos polianiones se caracterizan por presentar carga negativa a pH neutro. Su actividad como antivirales se basa en interacciones entre sus cargas negativas y la región V3 de la gp120, que está cargada positivamente, aunque su mecanismo no está aún bien descrito.<sup>17</sup>

La última familia está basada en compuestos que se *unen a los residuos oligosacáridos* de la gp120. Pertenecen a esta familia la proteína de cianobacteria cianovirina-N (CV-N) que se une al disacárido terminal Man $\alpha$ 1-2Man<sup>18,19</sup> de los oligosacáridos tipo “*high mannose*”, y las lectinas de plantas HHA y GNA que tienen especificidad por los residuos de manosa  $\alpha$ 1-3 y  $\alpha$ 1-6 internos y/o terminales.<sup>20</sup>

Además de estas tres familias se han descubierto las llamadas “*small molecules*” como BMS-806 y sus derivados, que se unen a la gp120 en el mismo sitio que el receptor CD4 bloqueando esta interacción e inhibiendo la replicación del VIH *in vitro*.<sup>21,22</sup>

**Las células como diana.** Esta estrategia para inhibir la entrada del VIH a través de la mucosa consiste en bloquear los receptores celulares a los que el virus se une. Los más importantes son el receptor CD4 y los correceptores CXCR4 y CCR5 de los linfocitos CD4, así como el receptor DC-SIGN de las células dendríticas.

CD4 es el receptor primario en el proceso de entrada viral. Aunque muchos compuestos polianiónicos han demostrado bloquear la unión de gp120

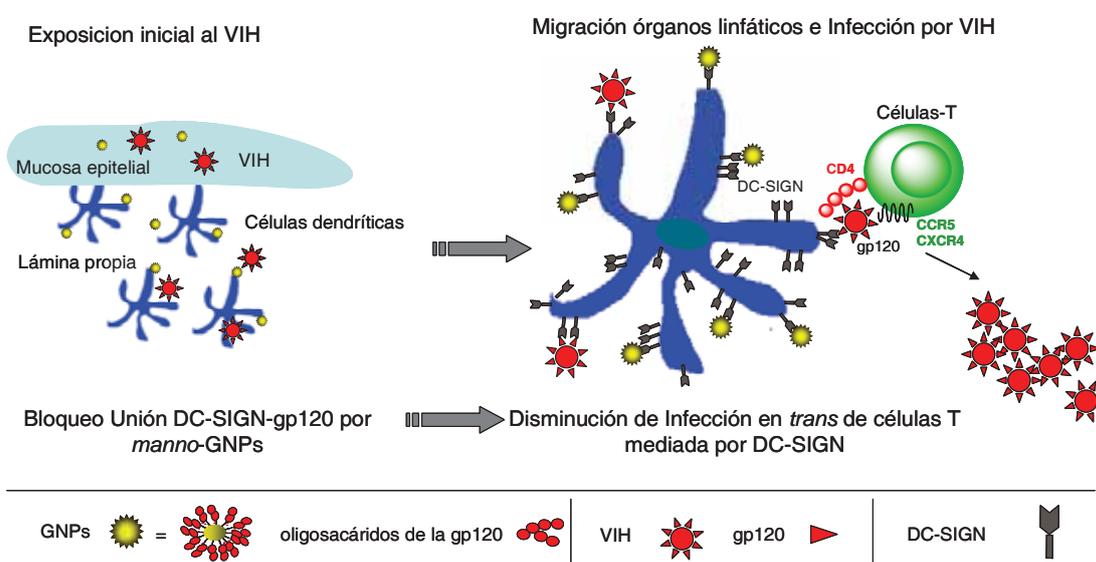
al receptor CD4, esta inhibición no es específica. Lo más razonable sería encontrar un anticuerpo monoclonal anti-CD4, pero la mayoría de éstos no se han desarrollado como antivirales porque también podrían causar inmunosupresión del sistema inmune.<sup>23</sup>

Los *inhibidores de los correceptores CCR5 y CXCR4* incluyen mAbs, quimiocinas y “*small molecules*” que se unen a dichos correceptores impidiendo la entrada del virus.<sup>24</sup> Como ejemplo está la quimiocina sintética PSC-RANTES que actualmente es un candidato a microbicida en ensayos preclínicos.<sup>25</sup>

La interacción entre el receptor DC-SIGN de las células dendríticas y los carbohidratos de la glicoproteína gp120 del VIH, y la internalización de viriones por las DCs,<sup>26,27</sup> y la posterior migración de estas células al tejido linfático tienen un papel muy importante en la transmisión por vía sexual. DC-SIGN tiene una función doble: como receptor de adhesión uniéndose al receptor ICAM-2 de las células epiteliales promoviendo la migración de las DCs o uniéndose al receptor ICAM-3 de las células T contribuyendo a la activación celular y a la presentación eficiente de antígenos por parte de las DCs.<sup>28,29</sup> Como receptor de reconocimiento de patógenos, DC-SIGN se une a la gp120 del VIH facilitando el transporte de viriones a los nódulos linfáticos donde ocurre la infección. Por esto, evitar la unión del virus a las DCs sería crucial en el desarrollo de un microbicida.<sup>3b</sup> Sin embargo, anticuerpos monoclonales anti DC-SIGN no conseguirían evitar la infección porque el virus puede utilizar otros receptores específicos de manosa o lectinas tipo C (MCLR) existentes en las DCs que también pueden estar implicados en la infección.<sup>30</sup>

Además de las dos estrategias anteriores existe una tercera consistente en la ***inhibición de la replicación del VIH***. Pertenecen a esta familia varios antiretrovirales que se desarrollaron con fines terapéuticos y que se ensayan actualmente como microbicidas por su capacidad para inhibir el proceso de replicación como son el PMPA, UC781 y TMC120 que son moléculas pequeñas basadas o no en nucleósidos.<sup>31,32,33</sup> Esta estrategia está siendo muy discutida debido a la posible aparición de resistencias frente a fármacos que se utilizan habitualmente en clínica.<sup>34</sup>

La estructura de todos estos compuestos en general está basada en “*small molecules*”, péptidos pequeños, proteínas, dendrímeros, polímeros o polisacáridos, de los cuales muchos son compuestos aromáticos, presentan cargas de tipo fosfato, sulfato, o sulfónico, o tienen una presentación multivalente. La multivalencia es fundamental en la interacción proteína-carbohidrato entre DC-SIGN y la gp120 del virus. Por ello, mimetizar la estructura altamente glicosilada del virus mediante sistemas multivalentes está surgiendo como una estrategia en el desarrollo de microbicidas, antivirales o vacunas anti-VIH basados en carbohidratos.<sup>35</sup>

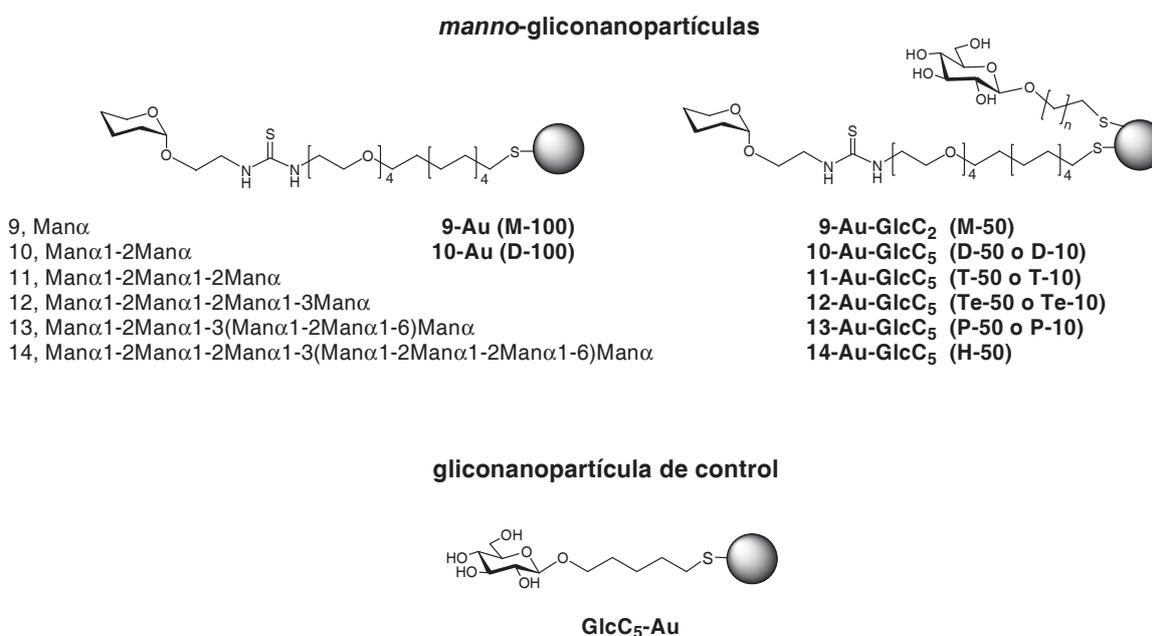


**Figura 2.** Estrategia de inhibición por *manno*-GNPs de la infección en *trans* mediada por DC-SIGN.

Nuestra aportación al problema de la infección por VIH está basada en gliconanopartículas, sistemas multivalentes de carbohidratos, capaces de inhibir la entrada del VIH a través de la mucosa. Nuestra estrategia se ha dirigido al bloqueo de la unión del virus al receptor DC-SIGN de las células dendríticas mediante gliconanopartículas funcionalizadas con los motivos estructurales de los oligosacáridos tipo “*high mannose*” de la gp120. Las gliconanopartículas de (oligo)manosa (*manno*-GNPs), con su presentación multivalente de carbohidratos imitan la densa capa glicosilada que protege la membrana viral evitando potencialmente su unión a DC-SIGN e inhibiendo el mecanismo de infección en *trans* (Figura 2).

## 2. Resultados y discusión

Las *manno*-GNPs se han utilizado en experimentos *in vitro* para estudiar su capacidad como inhibidores de la infección en *trans* por VIH de linfocitos T. Además se ha estudiado su potencialidad para neutralizar el virus y para inhibir la infección directa de linfocitos T por el VIH. Estos experimentos se llevaron a cabo previa determinación de la citotoxicidad de las GNPs frente a las células implicadas en dichos experimentos. En la Figura 3 se recogen las *manno*-GNPs que han sido evaluadas. Para mayor claridad la nomenclatura dada anteriormente a estas GNPs se ha simplificado y su nueva designación aparece entre paréntesis en esta figura. **M-100** significa GNP funcionalizada con 100% densidad del monosacárido, etc.



**Figura 3.** *Manno*-GNPs utilizadas como inhibidores de la infección en *trans* y gliconanopartícula de glucosa como control.

Se han evaluado las GNPs que se prepararon por acoplamiento tiourea (capítulo I, esquema 14). GNPs funcionalizadas con distintas densidades (100, 50 o 10%) de mono- (**M-100**, **M-50**), di- (**D-100**, **D-50**, **D-10**), tri- (**T-50**, **T-10**), tetra- (**Te-50**, **Te-10**), penta- (**P-50**, **P-10**), y heptasacáridos (**H-50**) se han medido como inhibidores de la infección en *trans* de PBMCs (peripheral blood

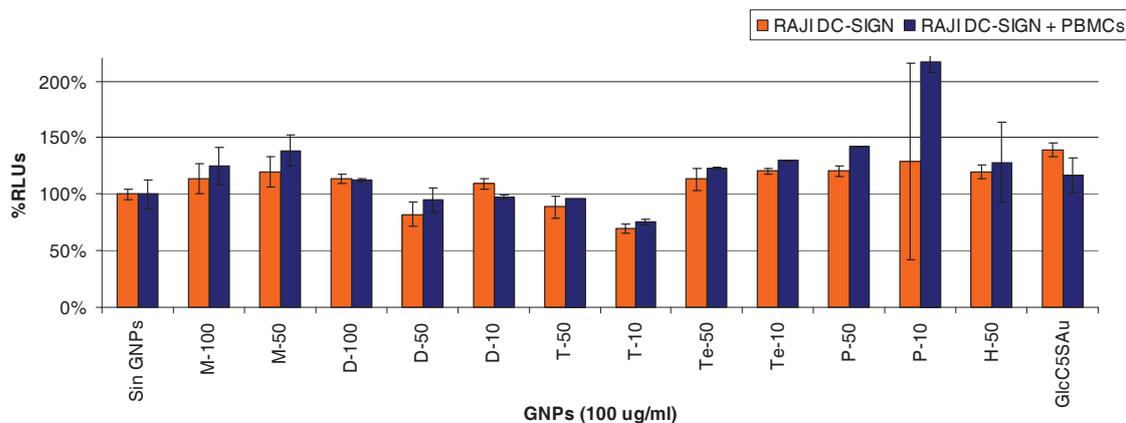
mononuclear cells) a través de células que expresan DC-SIGN. Se ha calculado los IC50 para los inhibidores más potentes. Además, se ha estudiado la actividad de las GNPs como inhibidores *in vitro* de la infección directa que no ocurre a través de APCs y como agentes neutralizantes del VIH. Estos experimentos se han realizado con los virus recombinantes JR-Renilla y NL4.3-Renilla mediante un ensayo de replicación viral, que utiliza clones de VIH que incorporan el gen reportador de la luciferasa renilla y producen ciclos múltiples de replicación.<sup>36</sup>

La aplicación de estas gliconanopartículas a modelos biológicos *in vitro* ha sido precedida por meticulosos estudios de citotoxicidad. Se ha evaluado la citotoxicidad de las *manno*-GNPs en líneas celulares de cervix C33, así como en líneas celulares de linfoblastos B Raji DC-SIGN+ y en PBMCs

### **2.1. Viabilidad celular en células Raji DC-SIGN+, PBMCs y C33-A.**

El ensayo de viabilidad celular se realizó tanto en células Raji DC-SIGN+, una línea linfoblastoide B que expresa de forma estable el receptor DC-SIGN, como en PBMCs activados. El ensayo se llevó a cabo utilizando el kit comercial CellTiter-Glo® Luminiscent cell viability assay (Promega), que cuantifica la actividad mitocondrial celular. La citotoxicidad en células Raji DC-SIGN+ se evaluó incubándolas con 100 µg/mL de *manno*-GNPs. El ensayo de viabilidad en PBMCs se realizó mediante un protocolo idéntico al utilizado para la evaluación de la infección mediada por DC-SIGN. Para ello, células Raji DC-SIGN+ se preincubaron durante 3 horas con las gliconanopartículas a 100 µg/mL y posteriormente se lavaron con tampón fosfato y se co-cultivaron con los PBMCs durante el tiempo deseado. En ambos ensayos, la viabilidad celular se cuantificó trascurridas 48 horas midiendo la actividad luciferasa, que es proporcional a la cantidad de ATP (directamente relacionada con la presencia de células metabólicamente activas) en el lisado celular. Los porcentajes de viabilidad celular se expresan en RLUs (Relative Luminescence Units, Figura 4) y son valores relativos con respecto a un 100% atribuido al control de células incubadas en ausencia de nanopartículas. Concentraciones de 100 µg/mL de *manno*-GNPs no presentaron ningún efecto de citotoxicidad en células Raji DC-

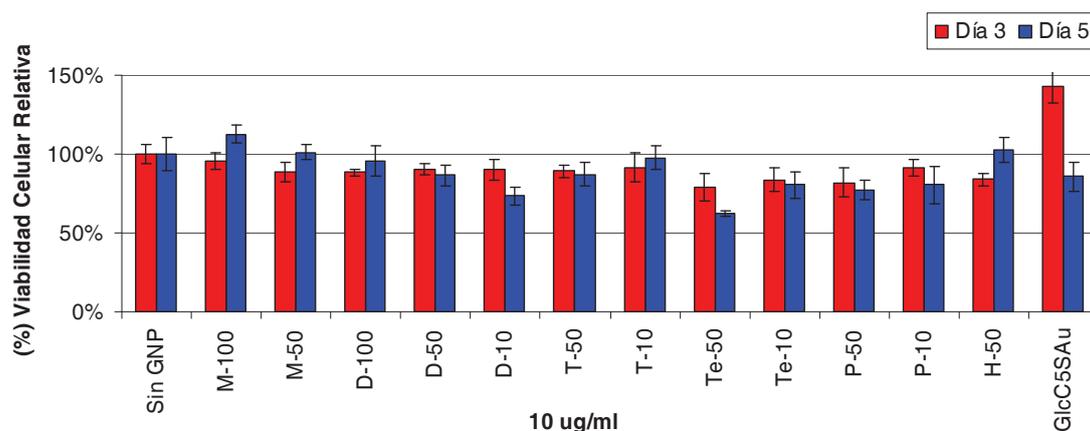
SIGN+ ni en PBMCs a las 48 horas de incubación. Esta concentración, como veremos más adelante, es 100 veces mayor que la menor concentración de *manno*-GNPs capaz de inhibir la infección en *trans*.



**Figura 4.** Evaluación de la citotoxicidad de *manno*-GNPs (100µg/mL) en células Raji DC-SIGN+ y en PBMCs activados. Las células Raji DC-SIGN+ se incubaron con las GNP durante 48 horas (barra naranja). Las células Raji DC-SIGN+ se incubaron con las GNP durante 3 horas, se lavaron con PBS y se co-cultivaron con PBLs durante 48 horas (barra azul). La viabilidad se cuantificó por la actividad luciferasa. Los resultados se expresan como porcentaje de RLUs con respecto a un control de células sin tratar.

Resultados similares se obtuvieron cuando se evaluó la citotoxicidad de las GNP en C33-A, línea celular cancerosa de cervix utilizando un método diferente. Éste ensayo se llevó a cabo por el método clásico del MTT (bromuro de 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difeniltetrazol),<sup>37</sup> que mide también la actividad metabólica celular. Este ensayo está basado en la reducción metabólica del MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, dando formazán como cristales de color azul, que se cuantifican midiendo su absorbancia a 550 nm.<sup>37</sup> Para ello, se sembraron las células C33-A en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. Después se añadieron concentraciones crecientes de GNP (0.1, 1, 10 y 25µg/mL) y se incubaron durante 3 o 5 días. Se añadió el MTT y a las 4 horas, los cristales de formazán formados se disolvieron en DMSO y se midió su absorbancia a 550 nm. El valor obtenido es directamente proporcional al número de células que sobreviven a la presencia de las diferentes concentraciones de GNP. Los porcentajes de viabilidad celular obtenidos son relativos al 100% atribuido a células incubadas en ausencia de nanopartículas (Figura 5). Las *manno*-GNPs a la concentración más alta que se

ha probado (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no presentaron ningún efecto citotóxico en células C33-A, incluso después de 3 o 5 días de incubación.



**Figura 5.** Evaluación por el método del MTT de la citotoxicidad de *manno*-GNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en líneas celulares cancerosas de cervix C33-A. Las *manno*-GNPs se incubaron con las C33-A durante 3 (barra roja) o 5 días (barra azul). La viabilidad se cuantificó por su actividad metabólica celular. Los resultados se expresan como porcentaje de absorbancia con respecto a un control de células sin tratar.

De estos experimentos, podemos concluir que las *manno*-GNPs pueden considerarse sistemas no tóxicos apropiados para llevar a cabo estudios biológicos en modelos celulares.

## 2.2. Inhibición por *manno*-GNPs de la infección en *trans* de PBMCs a través de células Raji DC-SIGN+

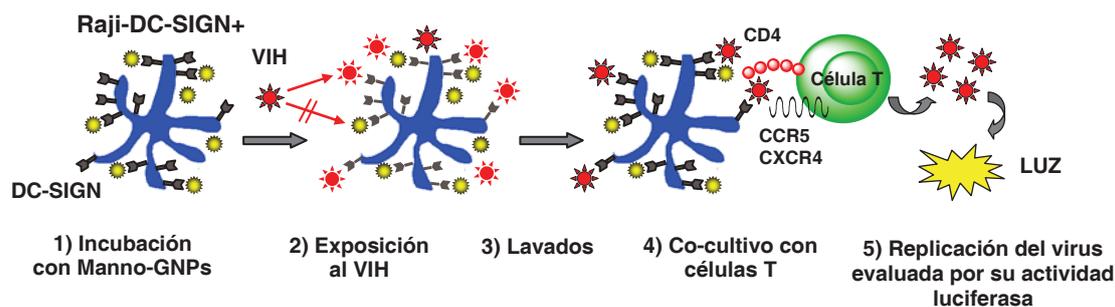
La actividad anti-VIH de los potenciales microbicidas frente a diferentes cepas y subtipos de VIH ha sido bien descrita en la literatura para distintas líneas celulares y humanas como se indica en la Tabla 1. La mayoría de ellos bloquean el VIH al unirse específicamente a la parte proteica de la gp120 o la gp41, al interactuar con la región cargada V3 de la gp120,<sup>17</sup> o al unirse a residuos oligosacarídicos específicos de la gp120. Este mecanismo de bloqueo del VIH a través de la gp120 hace que la mayoría de estos compuestos también sean buenos inhibidores de la infección en *trans* del VIH. La habilidad de algunos de estos compuestos para inhibir la infección en *trans* de células que expresan DC-SIGN a células T ya ha sido descrita en la literatura en modelos celulares y en modelos de explantes. Algunos ejemplos de ello son el

descrito por Pope y col.,<sup>11</sup> donde el péptido de fusión T20 (Enfuvirtida®) es capaz de inhibir la transferencia a través de células dendríticas inmaduras (iDCs) de los virus R5 HIV-1<sub>JR-FL</sub>, HIV-1<sub>SF162</sub>, HIV-1<sub>Case C 1/85</sub> a PBMCs, con IC50s de 0.4, 19 o 15 nM respectivamente. Las lectinas de plantas HHA, GNA y NPA de Balzarini *et al*<sup>38</sup> también resultaron buenos inhibidores de la transferencia a través de Raji DC-SIGN+ de HIV-1<sub>IIIB</sub> (X4) a la línea celular C8166, con EC50s de 32, 42 o 0.9 µg/mL respectivamente. Estas tres lectinas también fueron capaces de inhibir la infección mediada por DCs del virus R5 HIV-1<sub>BaL</sub> a PBMCs con una EC50~4 µg/mL. En un estudio comparativo con otros inhibidores, la proteína CV-N y los anticuerpos monoclonales 2G12 y 9205 resultaron los mejores inhibidores con EC50 inferiores a 0.04, 0.9 y 0.005 µg/mL respectivamente [57]. Los polianiones PRO2000 y dextran sulfato (DxS), en fase III de investigación clínica, demostraron una potente actividad para inhibir la infección en *trans* de células PM-1 por el virus HIV-1<sub>BaL</sub>(R5) en el modelo de explantes cervicales desarrollado por Shattock,<sup>39,40</sup> con EC50 de 29.1 y 62.4 µg/mL respectivamente.<sup>41</sup> Por último, citaremos un estudio reciente de Terrazas-Aranda<sup>42</sup> donde evalúan la actividad de una familia de inhibidores de transferencia de la hebra (integrase strand transfer inhibitors (InSTIs)) que son capaces de inhibir la infección a través de DCs de HIV-1<sub>BaL</sub>(R5) a PBMCs, con EC50s de entre 1 y 50 µM. La gran diversidad de métodos, concentraciones, virus y líneas celulares empleadas hace difícil la comparación de todos estos resultados.

Las *manno*-GNPs (Figura 3) se han evaluado como inhibidores de la infección en *trans* de PBMCs por los virus recombinantes JR-Renilla (R5) y NL4.3-Renilla (X4) a través de células Raji DC-SIGN+. Estos virus recombinantes incorporan en el lugar de *nef* el gen indicador renilla y son capaces de realizar ciclos múltiples de replicación, lo que permite cuantificar la replicación viral, midiendo la actividad renilla-luciferasa en los cultivos celulares previamente infectados.<sup>36</sup>

El experimento que se llevó a cabo simula el fenómeno de la infección en *trans* mediante el cual el virus utiliza las células dendríticas como transportadoras o ruta de acceso para llegar a los linfocitos T de los nodulos

linfáticos. Al comienzo de éste proceso, las únicas células que se han unido al virus o se han infectado son las células migratorias y por lo tanto es esta población la única que puede transferir el virus a los linfocitos. Se necesitan al menos 12 horas<sup>43</sup> desde la infección hasta la detección de nuevas partículas virales. Éste virus es el que se cuantifica, y para ello es necesario un periodo de al menos 48 horas desde el comienzo del ensayo.

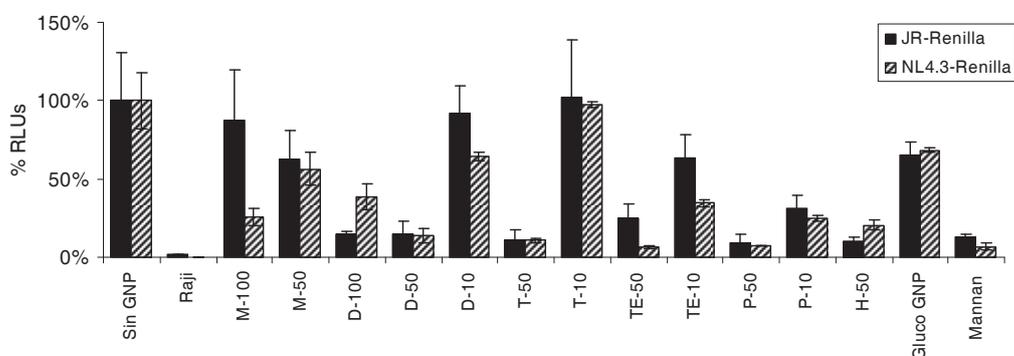


**Figura 6.** Diseño experimental de la inhibición de la infección en *trans* de PBMCs a través de células que expresan DC-SIGN.

En este experimento (Figura 6), las células Raji DC-SIGN+ se preincubaron durante 1 hora con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de *manno*-GNPs, tiempo suficiente para bloquear el receptor DC-SIGN. El cultivo se incubó durante 2 horas con los virus JR Ren o NL 4.3 y después de este tiempo se lavó repetidas veces para eliminar tanto el virus como las *manno*-GNPs no adsorbidas. Posteriormente el cultivo se resuspendió en medio fresco y se co-cultivaron a 37°C con los PBMCs previamente activados durante 48 horas para, finalmente, determinar la replicación viral midiendo la actividad luciferasa del lisado en un luminómetro. Como control positivo se utilizó manano, que se une inespecíficamente a todas las lectinas específicas de manosa (MCLR)s<sup>30</sup> y bloquea la unión gp120/DC-SIGN. Se utilizaron células Raji que no expresan DC-SIGN como control para evaluar la transferencia viral que no depende de DC-SIGN.

Los resultados se expresan como porcentajes de unidades relativas de luminiscencia (RLUs) respecto a un control de células no tratadas con GNPs y los resultados se resumen en la Figura 7. La mayoría de las *manno*-GNPs son buenos inhibidores de la infección de PBMCs, con valores de inhibición

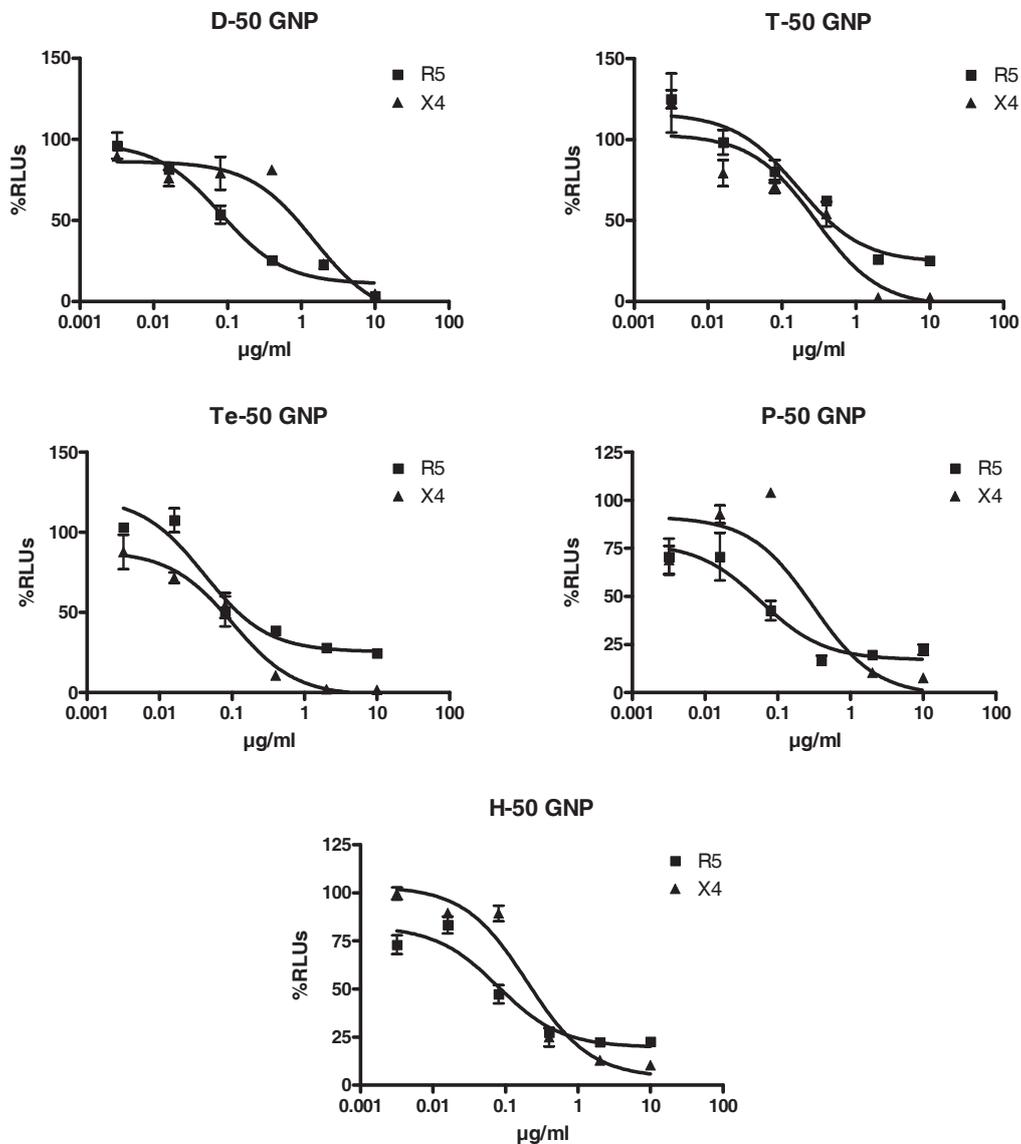
semejantes para los virus de tropismo R5 y X4. La nanopartícula de glucosa, que presenta 100 % densidad del glucoconjugado, diseñada como control negativo, consiguió inhibir la infección solamente el 34 %. En general, cuando se comparan las GNPs con 10 y 50 % de densidad en (oligo)manósido, se observó que las nanopartículas que contienen el 50 % de oligosacárido eran más potentes que las que contienen un 10 % de densidad. Los mejores inhibidores a concentraciones de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fueron las GNPs que contenían 50% de disacárido (**D-50**), trisacárido (**T-50**), tetrasacárido (**Te-50**), pentasacárido (**P-50**) y heptasacárido (**H-50**) inhibiendo la infección en *trans* por el virus JR Ren o NL4.3 Ren entre un 75 y un 93 %.



**Figura 7.** Inhibición de la infección en *trans* de PBMCs por *manno*-GNPs (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La transferencia de los virus R5 JR Renilla o X4 NL4.3 Renilla a PBMCs tiene lugar a través de células Raji DC-SIGN+. Las células Raji o Raji DC-SIGN+ se incubaron con *manno*-GNPs durante 1 hora, y se infectaron con los virus R5 JR Renilla (barra negra) o X4 NL4.3 Renilla (barra rallada) durante 2 horas. El cultivo se lavó con PBS, se resuspendió y se co-cultivó con PBMCs previamente activados. La replicación viral se evalúa por la actividad luciferasa del lisado a las 48 horas. Los resultados se expresan como porcentaje de RLUs con respecto a un control de células sin tratar.

Para poder comparar mejor la potencia de las cinco GNPs más potentes se calcularon las IC50, definido como la concentración de GNP necesaria para inhibir el 50% de la infección en *trans*. Para ello se llevaron a cabo experimentos de inhibición en *trans* con ambos virus en presencia de seis concentraciones diferentes de GNPs (10, 2, 0.4, 0.08, 0.016 y 0.032  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para obtener las correspondientes curvas de inhibición concentración-RLUs. En cada experimento se incluyó la nanopartícula de glucosa como control negativo. Los datos obtenidos de estas curvas se analizaron mediante una

regresión no lineal de una curva dosis-respuesta sigmoidea con el programa GraphPad Prism 4, lo que permitió calcular los IC50 en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de las GNPs (Figura 8).



**Figura 8.** Curvas sigmoideas de la inhibición de la infección en *trans* de PBMCs por células Raji DC-SIGN+ preincubadas con los virus R5 (JR-Renilla) o X4 (NL4.3-Renilla) obtenidas a distintas concentraciones de *manno*-GNPs. ■ R5 (JR-Renilla); ▲ X4 (NL 4.3.Renilla).

Los valores de IC50 obtenidos en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se calcularon también en molaridad de nanopartícula ( $\text{IC}_{50\text{GNP}}$ ) y de manósido ( $\text{IC}_{50\text{MAN}}$ ) teniendo en cuenta el número de cadenas de (oligo)manósido que contengan las GNPs. La Tabla 2 recoge estos valores así como la potencia relativa de cada GNP

referida a la nanopartícula con el menor valor de  $IC_{50_{MAN}}$ . Todas las nanopartículas de manosa son más potentes frente a la infección por el virus R5 (JR-Ren) que frente a X4 (NL4.3-Ren) posiblemente debido a que la expresión del correceptor CCR5 en PBMCs activados es mucho menor que la expresión del correceptor CXCR4 utilizado por virus X4 y por ello necesita una mayor concentración de GNPs para inhibir la infección en *trans*. Las GNPs **D-50**, **T-50**, **Te-50**, **P-50** y **H-50** presentan valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) muy buenos comparados con los previamente descritos para otros compuestos descritos en la literatura.<sup>38,41</sup>

**Tabla 2.** Actividad inhibidora de *manno*-GNPs en la *trans*-infección de PBMCs a través de Raji DC-SIGN+ preincubadas con los virus R5 JR- Ren o X4 NL4.3-Ren.

GNPs	MW aprox. (kDa)	Unidades de manosa / GNP	$IC_{50_{GNP}}$ , ng/mL		$IC_{50_{GNP}}$ , nM		$IC_{50_{Man}}$ , nM		Potencia Relativa <sub>Man</sub>	
			JR	NL	JR	NL	JR	NL	JR	NL
<b>D-50 GNP</b>	39	22	80.5	1469.0	2.04	37.2	44.9	818.5	3.7	1
<b>T-50 GNP</b>	105	62	166.0	286.7	1.58	2.7	197.9	169.2	1	7.1
<b>Te-50 GNP</b>	123	56	41.6	102.6	0.34	0.8	18.9	46.6	8.8	19.2
<b>P-50 GNP</b>	105	28	58.5	305.6	0.56	2.9	15.6	81.5	7.7	9.6
<b>H-50 GNP</b>	150	58	79.2	199.4	0.53	1.3	30.7	77.3	3.2	7.2

$IC_{50}$ , concentración de nanopartícula o manósido que reduce la actividad luciferasa al 50%; Potencia relativa referida al peor inhibidor.

Para poder comparar las GNPs se utilizaron los valores de  $IC_{50}$  expresados en molaridad. Las GNPs tienen pesos moleculares promedio comprendidos entre 40 y 150 kDa y éstos se utilizaron para calcular la molaridad. Las GNPs presentaron un  $IC_{50}$  para JR-Ren en el rango nanomolar entre 0.34 y 2.04 nM mientras que para NL4.3-Ren presentaron valores mayores entre 0.83 y 37.2 nM. Las GNP **Te-50**, **P-50** y **H-50** resultaron los mejores inhibidores de JR-Ren y NL4.3-Ren cuando se comparan con la nanopartícula del disacárido **D-50**, que resultó ser el peor inhibidor. **Te-50**, **P-50** y **H-50** mostraron potencias comparables en ambos virus.

Cuando se compara el  $IC_{50}$  referido a la concentración de cadenas de manósidos la GNP **Te-50**, que presenta 56 cadenas de tetrasacárido y un peso molecular ~123 kDa, y la GNP **P-50**, con 28 cadenas de pentasacárido y un

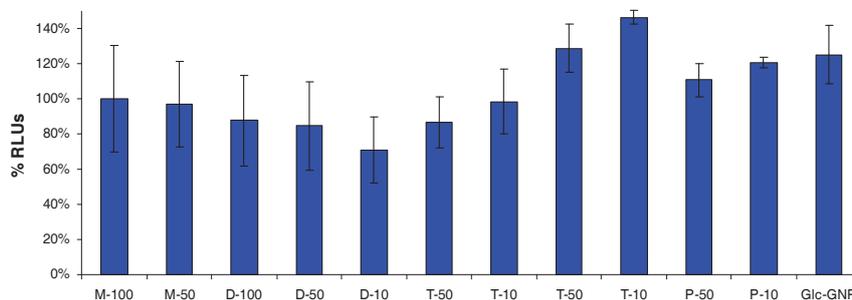
peso molecular de ~105 kDa resultaron los mejores inhibidores en ambos virus. La nanopartícula **Te-50** es 4 veces más potente frente a JR-Ren que frente a NL4.3-Ren con valores de  $IC_{50_{GNP}}$  de 0.34 y 0.83 nM en concentración de GNP, y de  $IC_{50_{Man}}$  de 18.9 y 46.6 nM en concentración del tetrasacárido de manosa respectivamente. Estos valores indican que una mayor complejidad del oligomanósido presente en la GNP no parece contribuir significativamente a su actividad como inhibidor.

La eficacia de la presentación multivalente de los oligosacáridos se puso de manifiesto evaluando por separado la capacidad inhibitoria del etilamino derivado del tetrasacárido **27** y del glicoconjugado del mismo tetrasacárido **12**. El  $IC_{90}$  calculado para **Te-50** en concentración de carbohidrato fue de 82 nM para el virus JR y 361 nM para el virus NL4.3., mientras que a la misma concentración, los derivados monovalentes **27** y **12** no fueron capaces de inhibir la infección. Estos resultados confirman que la presentación multivalente del mismo oligosacárido en la GNPs es esencial para aumentar su unión con DC-SIGN y la subsiguiente inhibición de la infección en *trans*.

### 2.3. Ensayos de neutralización del VIH por *manno*-GNPs

Otra de las estrategias para inhibir el mecanismo de infección en *trans* es bloquear directamente el virus. Las *manno*-GNPs no han sido diseñadas con este objetivo, pero también se ha evaluado su potencialidad como agentes neutralizantes del virus NL4.3-Ren antes de infectar células MT-2, una línea celular linfoblastoide. El experimento de neutralización se realizó preincubando durante una hora el virus NL4.3-Ren con las GNPs. Una alícuota de la mezcla preincubada se utilizó para infectar células MT-2 y evaluar la actividad neutralizante a las 48 de infección. En paralelo, se llevó a cabo un experimento donde las células MT-2 se infectaron directamente con el virus en presencia de las GNPs, para confirmar que la inhibición de la replicación del virus es debida a su neutralización por las GNPs. La replicación viral se evaluó midiendo la actividad luciferasa del lisado a las 48 horas, del mismo modo descrito en el apartado anterior. Los resultados expresados como porcentajes de RLU respecto al control no tratado con GNPs indicaron que ninguna nanopartícula

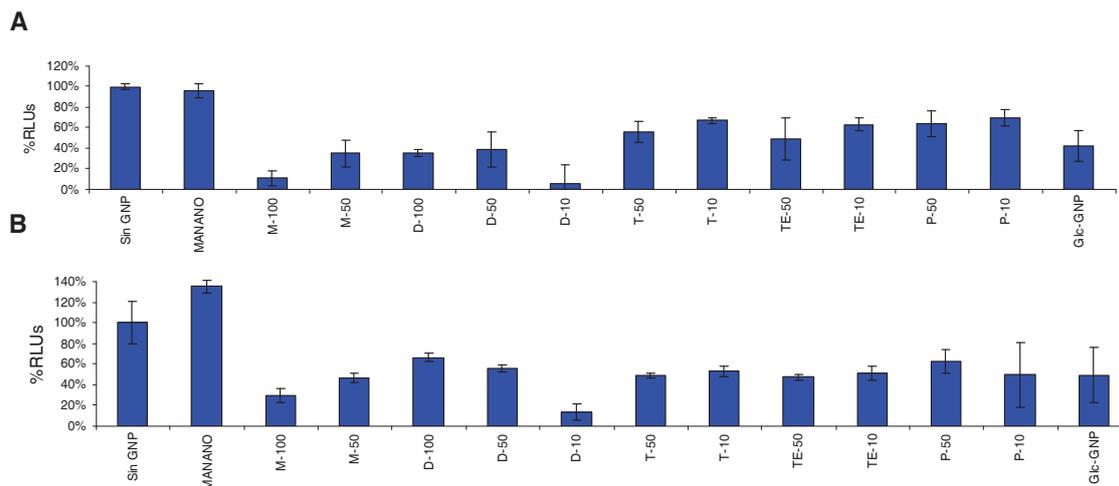
es capaz de neutralizar el virus a concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que todas las *manno*-GNPs inhibieron la infección en *trans* a esta concentración (Figura 9).



**Figura 9.** Experimentos de neutralización de NL4.3-Renilla por *manno*-GNPs a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### 2.4. Inhibición de la infección directa por *manno*-GNPs

Las *manno*-GNPs se han utilizado para evaluar su actividad antiviral en experimentos de infección directa de PBMCs por los virus JR-Ren y NL4.3-Ren. Este experimento se realizó preincubando concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de GNPs con PBMCs durante 1 hora. Después el cultivo se infectó con el virus y se cuantificó la replicación viral a las 48 horas midiendo la actividad luciferasa en el lisado celular según el protocolo descrito anteriormente. Los resultados expresados como porcentajes de RLUs respecto al control de células incubadas en ausencia de nanopartículas se resumen en la Figura 10. Las *manno*-GNPs a concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fueron capaces de inhibir la infección directa de PBMCs por ambos virus entre un 30 y un 60 %. Esta concentración es 100 veces mayor que la menor concentración activa de estas GNPs capaz de inhibir la infección en *trans*. El manano, que se utiliza como control positivo en los experimentos de inhibición en *trans* por su unión inespecífica a lectinas de tipo C, no inhibió la infección directa, mientras que las nanopartículas de glucosa fueron capaces de inhibir más de un 50 % la infección directa en JR Ren y NL4.3 Ren.



**Figura 10.** Experimentos de infección directa. Los PBMCs se preincubaron con las *manno*-GNPs durante 1 hora. El cultivo se infectó con los virus JR-Ren o NL4.3 Ren. La replicación viral se evalúa por actividad luciferasa del lisado a las 48 horas. Los resultados se expresan como porcentaje de RLUs con respecto a un control de células sin tratar. A) JR-Ren; B) NL4.3-Ren.

Es difícil explicar este efecto en vista de los resultados obtenidos en la neutralización, sin embargo la concentración de GNPs en la infección directa es 20 veces mayor que en los experimentos de neutralización, lo que puede dar lugar a interacciones inespecíficas, y una investigación más detallada sería necesaria para aclarar el origen de este efecto.

### 3. Conclusiones

- Las *manno*-GNPs funcionalizadas con 10, 50 o 100 densidad de (oligo)manósido sintetizados por acoplamiento tiourea, tienen una baja toxicidad en células Raji DC-SIGN+ y en PBMCs activados, a concentración elevada (100µg/mL).
- Las *manno*-GNPs (1µg/mL) han demostrado ser buenos inhibidores de la infección en *trans* de PBMCs por los virus R5 JR-Renilla y X4 NL4.3-Renilla, con potencias de inhibición semejantes. Los mejores inhibidores

a 1  $\mu\text{g/mL}$  fueron las GNPs que contenían 50% densidad de oligomanósido **D-50**, **T-50**, **Te-50**, **P-50** y **H-50**.

- En general, las nanopartículas que contienen el 50 % de oligosacárido son mejores inhibidores de la infección en *trans* frente a ambos virus R5 y X4 que las que contienen solo el 10 % de densidad. Este resultado indica que el aumento de densidad influye favorablemente en la actividad inhibidora de la GNP
- Las *manno*-GNPs **D-50**, **T-50**, **Te-50**, **P-50** y **H-50** presentaron IC50 entre 41-166 ng/mL frente a JR-Ren y entre 102.6-1469 ng/mL frente a NL4.3-Ren. Comparando en molaridad, las *manno*-GNPs presentaron IC50 en el rango nanomolar en concentración de de nanopartícula, con valores entre 0.34-2.04 nM frente a JR-Ren y entre 0.8-37.2 nM frente a NL4.3-Ren. Las *manno*-GNPs **Te-50**, **P-50** y **H-50** resultaron los mejores inhibidores de JR-Ren y NL4.3-Ren indicando que una mayor complejidad del oligomanósido en la GNP no parece contribuir significativamente a su actividad inhibidora.
- Comparándolas por su potencia relativa a su concentración en carbohidrato, se puede establecer el siguiente orden de actividad para JR-Ren: **Te-50** ~ **Pe-50** > **D-50** ~ **H-50** > **T-50**; y para NL4.3-Ren: **Te-50** > **P-50** ~ **H-50** ~ **T-50** > **D-50**.
- La nanopartícula **Te-50** resultó uno de los inhibidores más potentes, y el efecto multivalente de la GNP se demostró, porque los derivados monovalentes del tetrasacárido **27** y de su glicoconjugado **12** no inhibieron la infección en *trans* a la concentración del IC90 en tetrasacárido, calculado para la nanopartícula **Te-50**. Este resultado demuestra que la presentación multivalente del oligosacárido en la GNP es esencial para aumentar su afinidad por DC-SIGN e inhibir la consiguiente infección en *trans*.
- Las *manno*-GNPs a 100 $\mu\text{g/mL}$  no mostraron actividad neutralizante significativa de NL4.3-Renilla.

- Las *manno*-GNPs y la nanopartícula GlcC<sub>5</sub>-Au a 100µg/mL fueron capaces de inhibir la infección directa no mediada por DC-SIGN de virus R5 y X4 en un amplio rango de actividades, efecto que puede ser atribuido a interacciones de tipo inespecífico.

## **4. Parte Experimental**

### **4.1. Métodos generales**

Los estudios virológicos se realizaron en un laboratorio P2 del Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) en Madrid, en colaboración con el Prof José Alcamí Pertejo y el Dr Luis Miguel Bedoya del Olmo. La actividad luciferasa se midió en un luminómetro para microplatos de 96 pocillos Orion, Berthold Detection Systems, (Oak Ridge, TN, USA).

#### **4.1.1 Medios de cultivo.**

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron RPMI 1640 y DMEM (Biowhitaker, Walkersville, MD). Todos los medios fueron completados con 10% de BCS (suero bovino fetal) y 2mM de glutamina y antibióticos: penicilina (100U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL) excepto el medio RPMI para dendríticas que no se completó con antibióticos. Todos los cultivos de células primarias y líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera controlada con CO<sub>2</sub> al 5%.

#### **4.1.2. Cultivos celulares primarios y líneas celulares.**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron a partir de buffy coats de donantes sanos mediante gradiente de Lymphoprep (Sigma-Aldrich) según los procedimientos estándar PBMCs autólogos se activaron mediante tratamiento con PHA (5 µg/mL) e IL-2 (300 IU/mL, Chiron) durante 48 horas y se mantuvieron añadiendo IL-2 (R&D) a la misma concentración cada 48 horas.

Raji es una línea celular de linfoblastos B, donada por el Dr. Toraño del

Centro Nacional de Microbiología del ISCIII. Raji DC-SIGN<sup>+</sup> es una línea celular obtenida a partir de células Raji que expresan establemente el receptor DC-SIGN y fue donada por el Dr. Arenzana-Seisdedos del Instituto Pasteur (París). Estas dos líneas celulares se cultivaron en medio RPMI completo. El medio de cultivo se renovó cada dos días, y se crecieron a una densidad de  $5 \cdot 10^5$ /mL.

293T es una línea celular embrionaria de riñón que expresa el antígeno T de SV-40. Las células 293T se cultivaron a una densidad de  $5 \cdot 10^5$ /mL en medio DMEM completo.

MT-2<sup>44</sup> es una línea celular linfoblastoide. Esta línea celular se cultivó a una densidad de  $5 \cdot 10^5$ /mL en medio RPMI completo.

#### 4.1.3. Stocks virales y plásmidos.

El plásmido **pNL4-3**<sup>45</sup> es un clon recombinante de las cepas NY5 (5') y LAV (3') que contiene el genoma completo del VIH-1 y genera una progenie infecciosa tras su infección en numerosas líneas celulares y también en linfocitos CD4<sup>+</sup>.

El plásmido **pNL4-3.Luc.R-E**<sup>46</sup> es un clon proviral derivado del plásmido anterior que contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga insertado en el lugar del gen *nef*. Posee dos cambios en el marco de lectura, de tal forma que no expresa los genes *env* y *vpr*. Por tanto, este plásmido requiere cotransfectarse con un vector de expresión de *env* para generar virus infecciosos.

El vector **pNL4-3Ren**<sup>36</sup> se generó sustituyendo el gen *nef* del plásmido pNL4-3 por el gen de la luciferasa Renilla en las posiciones Not I (8797, introducida por mutagénesis dirigida) y Xho I (8887).

El plásmido **pJRRen**<sup>47</sup> se obtuvo clonando la envuelta del clon viral con tropismo R5 JR<sub>CSF</sub> sustituyendo la envuelta del plásmido pNL4.3-Ren.

Los **sobrenadantes** infecciosos se obtuvieron a partir de la transfección de células 293T con el plásmido pNL4-3Ren o pJRRen mediante el método del fosfato cálcico. El sobrenadante que contiene el virus se recogió dos días

después, y se preservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización en los ensayos de evaluación de la actividad antiviral de las GNPs.

#### **4.2. Inhibición por *manno*-GNPs de la infección en *trans* de PBMCs a través de células Raji DC-SIGN+**

Las células Raji DC-SIGN+ ( $5 \times 10^5$ /criotubo) se preincubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con las GNPs ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) o los controles manano ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>30</sup> o PBS 1x. Después, el preincubado se infectó con los virus JR-Renilla (R5) o NL4.3-Renilla (X4) ( $150 \text{ ng p24}/\text{pocillo}$ ) de durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los criotubos se lavaron repetidas veces con PBS ( $4 \times 1 \text{ mL}$ ), las células se resuspendieron en  $500 \mu\text{L}$  de medio RPMI fresco, se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo redondo ( $100 \mu\text{L}/\text{pocillo}$ ) donde se co-cultivaron con PBMCs activados ( $2.5 \times 10^5$ /pocillo/ $100 \mu\text{L}$ ) a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para evaluar el bloqueo de la transferencia de virus por las células Raji DC-SIGN+, las células se lisaron después de 48 horas y se evaluó la actividad luciferasa del lisado con el kit Renilla Luciferase Assay (Promega) en un luminómetro. Los valores vienen dados como la media de triplicados  $\pm$  S.D. Los controles usados en el experimento fueron: manano (control positivo), PBS 1x (control negativo), control sin virus (control negativo) y células Raji que no expresan el receptor DC-SIGN ( $5 \times 10^5$ /criotubo, control negativo o background).

Para calcular los IC50 de las GNPs los experimentos de inhibición de la infección en *trans* se hicieron a seis concentraciones diferentes de GNPs (10, 2, 0.4, 0.08, 0.016 y  $0.032 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). El ajuste de datos a una curva dosis-respuesta sigmoideal mediante el programa Graph Pad Prism 3.0 nos proporcionó los IC50.

#### **4.3. Ensayos de neutralización.**

Las GNPs ( $20 \mu\text{L}$ ,  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) se preincubaron con el virus NL 4.3-Ren ( $20 \mu\text{L}$ ,  $120 \text{ ng p24}$ ) durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después,  $10 \mu\text{L}$  de esta incubación ( $30 \text{ ng}$  de p24) se utilizó para infectar células MT-2 ( $1 \times 10^5$ /pocillo/ $190 \mu\text{L}$ ), diluyéndose la concentración de GNPs 20 veces hasta

una concentración final de 5 µg/mL. Como control, células MT-2 ( $1 \times 10^5$ ) se infectaron directamente con el NL 4.3-Ren en presencia de GNPs a 100 µg/mL. A las 48 horas se evaluó la replicación del virus midiendo la actividad luciferasa de los lisados celulares por el protocolo descrito en el apartado 4.2. Los valores vienen dados como la media de triplicados  $\pm$  S.D

#### 4.4. Ensayos de infección directa.

En placas de 96 pocillos de fondo redondo se pre-incubaron PBLs ( $2.5 \times 10^5$ /pocillo) con las GNPs (100 µg/mL), o con los controles manano (100 µg/mL) o PBS durante 1 hora. Después, el cultivo se infectó con virus JR Renilla o NL4.3 Renilla (120 ng de p24/pocillo) la actividad anti VIH se cuantificó a las 48 horas midiendo la actividad luciferasa del lisado mediante el protocolo descrito en el apartado 4.2.

#### 4.5. Viabilidad celular

##### 4.5.1. Células Raji DC-SIGN+ y PBMCs

El ensayo de viabilidad se realizó mediante un protocolo exactamente igual al utilizado para la evaluación de la infección mediada por DC-SIGN empleando el kit CellTiter-Glo® Luminiscent cell viability assay (Promega) que mide la actividad mitocondrial. Raji DC-SIGN+: las células Raji DC-SIGN+ ( $5 \times 10^5$ /criotubo) se preincubaron con las GNPs (100 µg/mL) o PBS 1x a 37°C durante 48 horas; PBMCs: las células Raji DC-SIGN+ ( $5 \times 10^5$ /criotubo) se preincubaron durante 3 horas con las GNPs (100 µg/mL) o PBS 1x. Posteriormente, los criotubos se lavaron con PBS (4x1mL), las células se resuspendieron en 500 µL de medio RPMI fresco, se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo redondo (100 µL/pocillo) y se co-cultivaron con los PBMCs activados ( $2.5 \times 10^5$ /pocillo en 100 µL de medio RPMI) a 37°C durante 48 horas. La actividad luciferasa del lisado se evaluó siguiendo las instrucciones del fabricante del kit CellTiter-Glo® según el protocolo descrito en el apartado 4.2.

#### 4.5.2 Células C33-A<sup>37</sup>

Las células C33-A (5000-1000 por pocillo) se preincubaron durante 24 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en placas de 96 pocillos. Después se añadieron las GNPs (10, 1 o 0.1 µg/mL) y se incubaron durante 3 o 5 días. Se añadieron 20 µL/pocillo de una disolución de MTT (5mg/mL en tampón salino, pH=7.4, Sigma). Después de 4 horas de incubación se eliminó el medio y los cristales de formazán formados se disolvieron en 200 µL de DMSO. La absorbancia (Abs) se detectó en un multi plate reader (GENios Pro, TECAN) a 550 nm. La viabilidad celular relativa (%) respecto al control en ausencia de nanopartículas está calculada como  $[Abs]_{GNP}/[Abs]_{control} \times 100$ . Los valores vienen dados como la media de cuadruplicados  $\pm$  S.D.

## 5. Bibliografía

<sup>1</sup> Shattock, R.J., and Moore, J.P. (2003). Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*, 1, 25-34.

<sup>2</sup> Hladik, F., and McElrath, M.J. (2008). Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol*, 8, 447-457.

<sup>3</sup> a) Nobile, C., Petit, C., Moris, A., Skrabal, K., Abastado, J.P., Mammano, F., and Schwartz, O. (2005). Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J Virol*, 79, 5386-5399; b) Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A., and Littman, D.R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*, 16, 135-144; c) Burleigh, L., Lozach, P.Y., Schiffer, C., Staropoli, I., Pezo, V., Porrot, F., Canque, B., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Amara, A. (2006). Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol*, 80, 2949-2957; d) Arrighi, J.F., Pion, M., Wiznerowicz, M., Geijtenbeek, T.B., Garcia, E., Abraham, S., Leuba, F., Dutoit, V., Ducrey-Rundquist, O., van Kooyk, Y., Trono, D., and Pignatelli, V. (2004). Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. *J Virol*, 78, 10848-10855; e) Arrighi, J.F., Pion, M., Garcia, E., Escola, J.M., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B., and Pignatelli, V. (2004). DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med*, 200, 1279-1288.

<sup>4</sup> <http://www.empro.org.uk/>

<sup>5</sup> Stone, A. (2002). Microbicides: A new approach to preventing HIV and other sexually transmitted infections. *Nat Rev Drug Discov* 1, 977-985.

<sup>6</sup> Van Damme, L., Ramjee, G., Alary, M., Vuylsteke, B., Chandeying, V., Rees, H., Sirivongrangson, P., Mukenge-Tshibaka, L., Ettiegne-Traore, V., Uaheowitchai, C., Karim, S.S., Masse, B., Perriens, J., and Laga, M. (2002). Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *Lancet*, 360, 971-977.

- 
- <sup>7</sup> Pope, M., and Haase, A.T. (2003). Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med*, *9*, 847-852.
- <sup>8</sup> Poignard, P., Saphire, E.O., Parren, P.W., and Burton, D.R. (2001). gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol*, *19*, 253-274.
- <sup>9</sup> Parren, P.W., and Burton, D.R. (2001). The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Adv Immunol*, *77*, 195-262.
- <sup>10</sup> <http://www.fda.gov/>
- <sup>11</sup> Ketas, T.J., Frank, I., Klasse, P.J., Sullivan, B.M., Gardner, J.P., Spencehauer, C., Nesin, M., Olson, W.C., Moore, J.P., and Pope, M. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 attachment, coreceptor, and fusion inhibitors are active against both direct and trans infection of primary cells. *J Virol*, *77*, 2762-2767.
- <sup>12</sup> Kilby, J.M., Hopkins, S., Venetta, T.M., DiMassimo, B., Cloud, G.A., Lee, J.Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M.R., Nowak, M.A., Shaw, G.M., and Saag, M.S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med*, *4*, 1302-1307.
- <sup>13</sup> Scordi-Bello, I.A., Mosoian, A., He, C.J., Chen, Y.B., Cheng, Y., Jarvis, G.A., Keller, M.J., Hogarty, K., Waller, D.P., Profy, A.T., Herold, B.C., and Klotman, M.E. (2005). Candidate sulfonated and sulfated topical microbicides: Comparison of anti-human immunodeficiency virus activities and mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother*, *49*, 3607-3615.
- <sup>14</sup> McCarthy, T.D., Karellas, P., Henderson, S.A., Giannis, M., O'Keefe, D.F., Heery, G., Paull, J.R.A., Matthews, B.R., and Holan, G. (2005). Dendrimers as drugs: Discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. *Mol Pharm*, *2*, 312-318.
- <sup>15</sup> Baba, M., Snoeck, R., Pauwels, R., and Declercq, E. (1988). Sulfated Polysaccharides Are Potent and Selective Inhibitors of Various Enveloped Viruses, Including Herpes-Simplex Virus, Cytomegalo-Virus, Vesicular Stomatitis-Virus, and Human Immunodeficiency Virus. *Antimicrob Agents Chemother*, *32*, 1742-1745.
- <sup>16</sup> <http://www.popcouncil.org/microbicides/index.html>
- <sup>17</sup> Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P.D., and Sattentau, Q.J. (2000). Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol*, *74*, 1948-1960.
- <sup>18</sup> Boyd, M.R., Gustafson, K.R., McMahon, J.B., Shoemaker, R.H., Okeefe, B.R., Mori, T., Gulakowski, R.J., Wu, L., Rivera, M.I., Laurencot, C.M., Currens, M.J., Cardellina, J.H., Buckheit, R.W., Nara, P.L., Pannell, L.K., Sowder, R.C., and Henderson, L.E. (1997). Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: Potential applications to microbicide development. *Antimicrob Agents Chemother*, *41*, 1521-1530.
- <sup>19</sup> Bewley, C.A. (2001). Solution structure of a cyanovirin-N:Man alpha 1-2Man alpha complex: structural basis for high-affinity carbohydrate-mediated binding to gp120. *Structure*, *9*, 931-940.
- <sup>20</sup> Balzarini, J., Hatse, S., Vermeire, K., Princen, K., Aquaro, S., Perno, C.F., De Clercq, E., Egberink, H., Vanden Mooter, G., Peumans, W., Van Damme, E., and Schols, D. (2004). Mannose-specific plant lectins from the Amaryllidaceae family qualify as efficient microbicides for prevention of human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, *48*, 3858-3870.

- 
- <sup>21</sup> Lin, P.F., Blair, W., Wang, T., Spicer, T., Guo, Q., Zhou, N., Gong, Y.F., Wang, H.G., Rose, R., Yamanaka, G., Robinson, B., Li, C.B., Fridell, R., Deminie, C., Demers, G., Yang, Z., Zadjura, L., Meanwell, N., and Colonno, R. (2003). A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*, 11013-11018.
- <sup>22</sup> Ketas, T.J., Schader, S.M., Zurita, J., Teo, E., Polonis, V., Lu, M., Klasse, P.J., and Moore, J.P. (2007). Entry inhibitor-based microbicides are active in vitro against HIV-1 isolates from multiple genetic subtypes. *Virology*, *364*, 431-440.
- <sup>23</sup> Moore, J.P., and Sweet, R.W. (1993). The HIV gp120-CD4 interaction: A target for pharmacological or immunological intervention. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, *1*, 253-250.
- <sup>24</sup> a) Dragic, T. (2001). An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function. *J Gen Virol*, *82*, 1807-1814; b) Moore, J.P., and Stevenson, M. (2000). New targets for inhibitors of HIV-1 replication. *Nat Rev Mol Cell Bio*, *1*, 40-49; c) O'Hara, B.M., and Olson, W.C. (2002). HIV entry inhibitors in clinical development. *Curr Opin Pharm*, *2*, 523-528.
- <sup>25</sup> a) Pastore, C., Picchio, G.R., Galimi, F., Fish, R., Hartley, O., Offord, R.E., and Mosier, D.E. (2003). Two mechanisms for human immunodeficiency virus type 1 inhibition by N-terminal modifications of RANTES. *Antimicrob Agents Chemother*, *47*, 509-517; b) Torre, V.S., Marozsan, A.J., Albright, J.L., Collins, K.R., Hartley, O., Offord, R.E., Quinones-Mateu, M.E., and Arts, E.J. (2000). Variable sensitivity of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates to inhibition by RANTES analogs. *Journal of Virology*, *74*, 4868-4876; c) Kawamura, T., Bruce, S.E., Abrahama, A., Sugaya, M., Hartley, O., Offord, R.E., Arts, E.J., Zimmerman, P.A., and Blauvelt, A. (2004). PSC-RANTES blocks R5 human immunodeficiency virus infection of langerhans cells isolated from individuals with a variety of CCR5 diplotypes. *Journal of Virology*, *78*, 7602-7609.
- <sup>26</sup> Hladik, F., Lentz, G., Akridge, R.E., Peterson, G., Kelley, H., McElroy, A., and McElrath, M.J. (1999). Dendritic cell-T-cell interactions support coreceptor-independent human immunodeficiency virus type 1 transmission in the human genital tract. *Journal of Virology*, *73*, 5833-5842.
- <sup>27</sup> Cambi, A., de Lange, F., van Maarseveen, N.M., Nijhuis, M., Joosten, B., van Dijk, E.M., de Bakker, B.I., Fransen, J.A., Bovee-Geurts, P.H., van Leeuwen, F.N., Van Hulst, N.F., and Figdor, C.G. (2004). Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell Biol*, *164*, 145-155.
- <sup>28</sup> Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, *100*, 587-597.
- <sup>29</sup> Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, *100*, 575-585.
- <sup>30</sup> Turville, S.G., Cameron, P.U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R.W., and Cunningham, A.L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* *3*, 975-983.
- <sup>31</sup> Mulato, A.S., and Cherrington, J.M. (1997). Anti-HIV activity of adefovir (PMEA) and PMPA in combination with antiretroviral compounds: in vitro analyses. *Antiviral Research*, *36*, 91-97.
- <sup>32</sup> Van Herrewege, Y., Michiels, J., Van Roey, J., Fransen, K., Kestens, L., Balzarini, J., Lewi, P., Vanham, G., and Janssen, P. (2004). In vitro evaluation of nonnucleoside reverse

---

transcriptase inhibitors UC-781 and TMC120-R147681 as human immunodeficiency virus microbicides. *Antimicrob Agents Chemother*, *48*, 337-339.

<sup>33</sup> Hossain, M.M., and Parniak, M.A. (2006). In vitro microbicidal activity of the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) UC781 against NNRTI-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, *80*, 4440-4446.

<sup>34</sup> Martinez, J., Coplan, P., and Wainberg, M.A. (2006). Is HIV drug resistance a limiting factor in the development of anti-HIV NNRTI and NRTI-based vaginal microbicide strategies? *Antiviral Research*, *71*, 343-350.

<sup>35</sup> a) Wang, S.K., Liang, P.H., Astronomo, R.D., Hsu, T.L., Hsieh, S.L., Burton, D.R., and Wong, C.H. (2008). 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*, *105*, 3690-3695; b) Dudkin, V.Y., Orlova, M., Geng, X., Mandal, M., Olson, W.C., and Danishefsky, S.J. (2004). Toward fully synthetic carbohydrate-based HIV antigen design: on the critical role of bivalency. *J Am Chem Soc*, *126*, 9560-9562; c) Wang, J., Li, H., Zou, G., and Wang, L.X. (2007). Novel template-assembled oligosaccharide clusters as epitope mimics for HIV-neutralizing antibody 2G12. Design, synthesis, and antibody binding study. *Org Biomol Chem*, *5*, 1529-1540; d) Tabarani, G., Reina, J.J., Ebel, C., Vives, C., Lortat-Jacob, H., Rojo, J., and Fieschi, F. (2006). Mannose hyperbranched dendritic polymers interact with clustered organization of DC-SIGN and inhibit gp120 binding. *FEBS Lett*, *580*, 2402-2408; e) Ni, J., Song, H., Wang, Y., Stamatou, N.M., and Wang, L.X. (2006). Toward a carbohydrate-based HIV-1 vaccine: synthesis and immunological studies of oligomannose-containing glycoconjugates. *Bioconj Chem*, *17*, 493-500; f) Frison, N., Taylor, M.E., Soilleux, E., Bousser, M.T., Mayer, R., Monsigny, M., Drickamer, K., and Roche, A.C. (2003). Oligolysine-based oligosaccharide clusters: selective recognition and endocytosis by the mannose receptor and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin. *J Biol Chem*, *278*, 23922-23929; g) 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., and Wilson, I.A. (2005). Dissection of the carbohydrate specificity of the broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*, 13372-13377; h) Adams, E.W., Ratner, D.M., Seeberger, P.H., and Hachohen, N. (2008). Carbohydrate-mediated targeting of antigen to dendritic cells leads to enhanced presentation of antigen to T cells. *Chembiochem*, *9*, 294-303.

<sup>36</sup> Garcia-Perez, J., Sanchez-Palomino, S., Perez-Olmeda, M., Fernandez, B., and Alcamí, J. (2007). A new strategy based on recombinant viruses as a tool for assessing drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1. *J Med Virol*, *79*, 127-137.

<sup>37</sup> a) Pauwels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., Schols, D., Herdewijn, P., Desmyter, J., and De Clercq, E. (1988). Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J Virol Methods*, *20*, 309-321; b) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, *65*, 55-63; c) Lim, H.Y., Ahn, M., Chung, H.C., Gardner, T.A., Kao, C., Lee, S.J., and Kim, S.J. (2004). Tumor-specific gene therapy for uterine cervical cancer using MN/CA9-directed replication-competent adenovirus. *Cancer Gene Ther*, *11*, 532-538; d) Bernabei, P.A., Santini, V., Silvestro, L., Dal Pozzo, O., Bezzini, R., Viano, I., Gattei, V., Saccardi, R., and Rossi Ferrini, P. (1989). In vitro chemosensitivity testing of leukemic cells: development of a semiautomated colorimetric assay. *Hematol Oncol*, *7*, 243-253.

<sup>38</sup> Balzarini, J., Van Herrewege, Y., Vermeire, K., Vanham, G., and Schols, D. (2007). Carbohydrate-binding agents efficiently prevent dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-directed HIV-1 transmission to T lymphocytes. *Mol Pharmacol*, *71*, 3-11.

<sup>39</sup> Greenhead, P., Hayes, P., Watts, P.S., Laing, K.G., Griffin, G.E., and Shattock, R.J. (2000). Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. *Journal of Virology*, *74*, 5577-5586.

- 
- <sup>40</sup> Hu, Q., Frank, I., Williams, V., Santos, J.J., Watts, P., Griffin, G.E., Moore, J.P., Pope, M., and Shattock, R.J. (2004). Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue. *J Exp Med*, 199, 1065-1075.
- <sup>41</sup> Fletcher, P.S., Wallace, G.S., Mesquita, P.M.M., and Shattock, R.J. (2006). Candidate polyanion microbicides inhibit HIV-1 infection and dissemination pathways in human cervical explants. *Retrovirology*, 3, 46.
- <sup>42</sup> Terrazas-Aranda, K., Van Herrewege, Y., Hazuda, D., Lewi, P., Costi, R., Di Santo, R., Cara, A., and Vanham, G. (2008). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integration: a potential target for microbicides to prevent cell-free or cell-associated HIV-1 infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 2544-2554.
- <sup>43</sup> Bermejo, M., Sanchez-Palomino, S., Usan, L., and Alcamí, J. (2004). Dynamics of HIV replication in lymphocytes and the efficacy of protease inhibitors. *J Med Virol*, 73, 502-507.
- <sup>44</sup> Harada, S., Koyanagi, Y., and Yamamoto, N. (1985). Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science*, 229, 563-566.
- <sup>45</sup> Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., and Martin, M.A. (1986). Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol*, 59, 284-291.
- <sup>46</sup> Connor, R.I., Chen, B.K., Choe, S., and Landau, N.R. (1995). Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology*, 206, 935-944.
- <sup>47</sup> Izquierdo, N., and Alcamí, J., Unpublished work.



## **CAPÍTULO 4. Estudios de la interacción de *manno*-GNPs fluorescentes con líneas celulares y con células dendríticas inmaduras**

### **1. Introducción**

Uno de los problemas que se plantean con el uso de nanomateriales biofuncionales cuando se aplican a sistemas biológicos o celulares es saber cómo estos materiales interactúan con ellos, y qué camino siguen en su interacción. Las *manno*-GNPs fueron diseñadas y preparadas como inhibidores de la adhesión del VIH al receptor DC-SIGN de las células dendríticas. En el capítulo anterior demostramos que las *manno*-GNPs son capaces de inhibir la infección en *trans* mediada por DC-SIGN y el siguiente paso ha sido estudiar cómo estas *manno*-GNPs interactúan con células que expresan DC-SIGN, incluyendo a las células dendríticas presentes en la mucosa, que son la barrera de defensa natural frente al virus.

Las células dendríticas (DCs) son células profesionales presentadoras de antígenos que están especializadas en el reconocimiento de patógenos y tienen un papel crucial en la inducción de respuesta inmune.<sup>1</sup> Las células dendríticas inmaduras (iDCs) que residen en los tejidos periféricos se encargan del reconocimiento, la internalización en orgánulos especializados y del procesamiento en compartimentos ácidos de los antígenos para su presentación en forma de complejos MHC II y I. El reconocimiento de algunos antígenos o productos microbianos y de inflamación, induce la maduración y migración de iDCs a los órganos linfáticos donde presentan el antígeno a los linfocitos T e inducen la respuesta inmune adaptativa.<sup>2</sup> Las DCs presentan una gran variedad de receptores de reconocimiento de patógenos.<sup>3</sup> Algunos de ellos pertenecen a la familia de los “toll like receptors”,<sup>4</sup> que reconocen una amplia gama de ligandos y activan la señalización intracelular. Otros pertenecen a la familia de receptores de carbohidrato tipo lectina (CLRs),<sup>5</sup> los cuales, a través del reconocimiento específico de residuos de carbohidratos en los patógenos, los internalizan para degradarlos en los lisosomas, iniciando el proceso de

presentación de antígenos. La unión de CLR<sub>s</sub> a carbohidratos es de tipo multivalente, dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y sucede a través del dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD).<sup>6</sup> En el año 2000 Geijtenbeek y col.<sup>7</sup> descubrieron el papel de DC-SIGN (CD209) como el principal CLR presente en iDC<sub>s</sub> y responsable del reconocimiento y unión del VIH a través de la interacción con la gp120 del virus. Se ha demostrado que la organización en microdominios de DC-SIGN actúa como portales de entrada del virus en las células dendríticas.<sup>8</sup> Sin embargo, existen otros CLR<sub>s</sub><sup>9</sup> que pueden tener un papel importante en la patogénesis del VIH, como son el receptor de manosa (MR o CD206)<sup>10,11,12</sup> y el receptor inmune de células dendríticas (DCIR o CD205),<sup>13</sup> o la langerina (CD207), presente en células de Langerhans (LCs)<sup>14,15,16</sup> que también tiene un papel importante en la transmisión del VIH. También se ha demostrado que algunos patógenos como el VIH pueden aprovechar la presencia de microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y glicoesfingolípidos, las denominadas balsas lipídicas, como puntos de entrada en la célula.<sup>17,18,19</sup>

Para la entrada del virus existen varios mecanismos de endocitosis<sup>20</sup> que conducen a su presentación en complejos MHC II, como son la macropinocitosis (invaginación no específica) o la endocitosis mediada CLR<sub>s</sub>, aunque no todos los CLR<sub>s</sub> son capaces de llevar a la presentación del antígeno en los complejos MHC II.<sup>21</sup> El mecanismo de internalización influye en la eficiencia de procesado y la presentación del antígeno. De este modo, la macropinocitosis requiere de una mayor concentración de antígeno endocitado para una eficiente presentación<sup>22</sup> mientras que la endocitosis mediada por receptores específicos de membrana como DC-SIGN origina un proceso de presentación más eficiente.<sup>23</sup> Los procesos de internalización que dependen de la envuelta viral constituyen el 50% de las presentaciones del virus y están mediados por la lectina DC-SIGN, aunque otros CLR<sub>s</sub> también podrían estar implicados.<sup>24</sup>

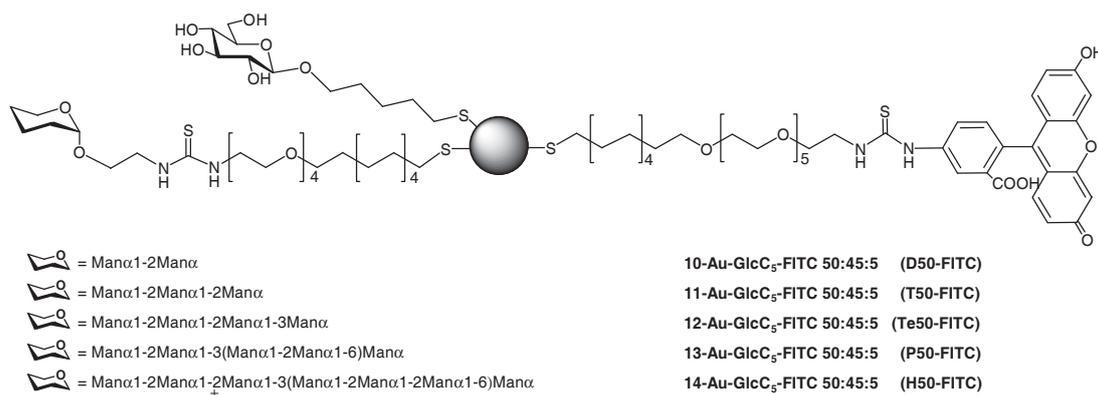
La importancia de CLR<sub>s</sub> es crítica en el desarrollo de antivirales capaces de bloquear la transmisión del VIH en la fase temprana. Nuestra aproximación para bloquear la unión del virus a las células dendríticas vía CLR<sub>s</sub> se ha

dirigido a la síntesis de nanopartículas de oligomanósidos (*manno*-GNPs) que presentan motivos estructurales de los oligomanósidos que glicosilan la gp120 del virus. El estudio su efecto en la viabilidad celular y las rutas intracelulares de endocitosis y exocitosis de *manno*-GNPs cobran una importancia vital para entender su comportamiento y para una futura aplicación como agentes terapéuticos.

El transporte intracelular de nanopartículas<sup>25</sup> puede ocurrir de forma inespecífica por difusión, fagocitosis o pinocitosis, o de forma selectiva, mediante endocitosis a través de receptores. Cualquiera de estos mecanismos, excepto el de difusión, consumen ATP. Las *manno*-GNPs pueden ser internalizadas por cualquiera de estos mecanismos, incluido la endocitosis a través de DC-SIGN u otros CLRs que se expresen en la superficie celular.

## 2. Resultados y discusión

La capacidad de *manno*-GNPs fluorescentes, que incorporan 50% de densidad en di- (**D50-FITC**), tri- (**T50-FITC**), tetra- (**Te50-FITC**), penta- (**P50-FITC**) o heptasacáridos de manosa (**H50-FITC**) (Figura 1) para ser internalizadas y excitadas por células dendríticas inmaduras, o por células Raji DC-SIGN+, se ha evaluado mediante el uso de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Células Raji que carecen de el receptor DC-SIGN se han utilizado como control. El mecanismo de internalización de las *manno*-GNPs fluorescentes en las células vía DC-SIGN u otros CLRs se ha evaluado con distintos experimentos: inhibiendo la producción celular de ATP por incubación de las células con GNP a 4°C, para discernir entre endocitosis y difusión; hidrolizando las proteínas de la superficie celular con tripsina, después de su incubación con las nanopartículas, para evaluar la GNP que ha sido internalizada por la célula; inhibiendo la unión de nanopartículas a receptores dependientes de Ca<sup>2+</sup> con agentes quelantes como EDTA, para evaluar la entrada de *manno*-GNPs por receptores CLRs. En base a los resultados obtenidos se pudo comparar el comportamiento de las diferentes *manno*-GNPs frente a los sistemas celulares.



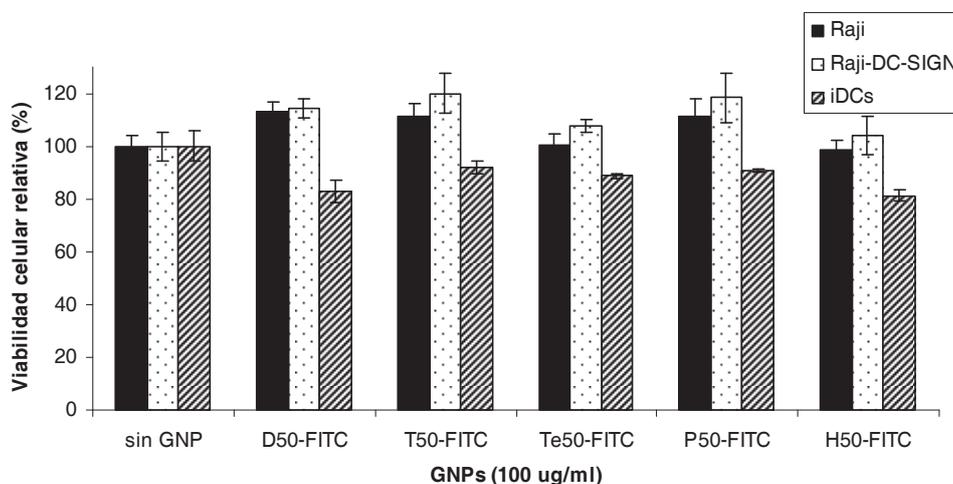
**Figura 1.** *Manno*-GNPs fluorescentes utilizadas en los estudios celulares de endocitosis y exocitosis.

Previamente a los experimentos de internalización, se determinó la citotoxicidad de *manno*-GNPs fluorescentes en líneas celulares de linfoblastos B (Raji o Raji DC-SIGN+), y en células dendríticas inmaduras (iDCs).

## 2.1. Ensayo de viabilidad celular en células Raji, Raji DC-SIGN+ y iDCs.

El ensayo de viabilidad celular se llevó a cabo por el método del MTT (descrito en el capítulo 3, apartado 2.1) en el caso de las iDCs, o por el método del MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol)<sup>26</sup> en el caso de las células Raji y Raji DC-SIGN+ que crecen en suspensión. Para ello, se sembraron las células Raji, Raji DC-SIGN+ o iDCs en placas de 96 pocillos y se incubaron con concentraciones crecientes de GNPs (10, 25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 horas. Se añadieron los indicadores metabólicos MTS o MTT y se cuantificó la viabilidad celular midiendo su absorbancia a 492 nm o a 595 respectivamente. Éste valor es directamente proporcional al número de células que sobreviven a la presencia de las diferentes concentraciones de GNPs. Los porcentajes de viabilidad celular dados son relativos al 100% atribuido a células incubadas en ausencia de *manno*-GNPs fluorescentes (Figura 2). Ninguna de ellas a concentración 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  presentó citotoxicidad significativa en células Raji, Raji DC-SIGN+ o iDCs transcurridas 24 horas. Esta concentración, como veremos más adelante,

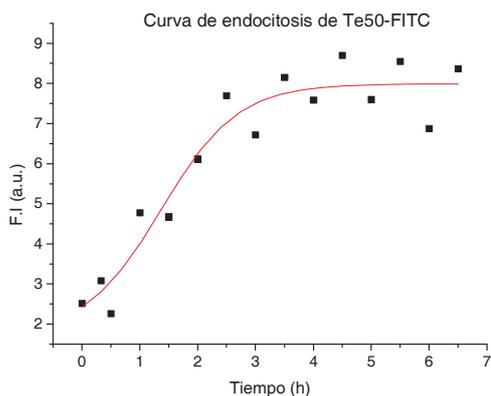
es 4 veces mayor que la empleada a posteriori en los experimentos de internalización y exocitosis.



**Figura 2.** Evaluación por el método del MTT o MTS de la citotoxicidad de *manno*-GNPs fluorescentes (100µg/mL) en líneas celulares de linfoblastos B (Raji o Raji DC-SIGN+) y en células dendríticas inmaduras (iDCs). Las GNP se incubaron con las células durante 24 horas. La viabilidad se cuantificó por su actividad metabólica celular. Los resultados se expresan como porcentaje de absorbancia con respecto a un control de células sin tratar.

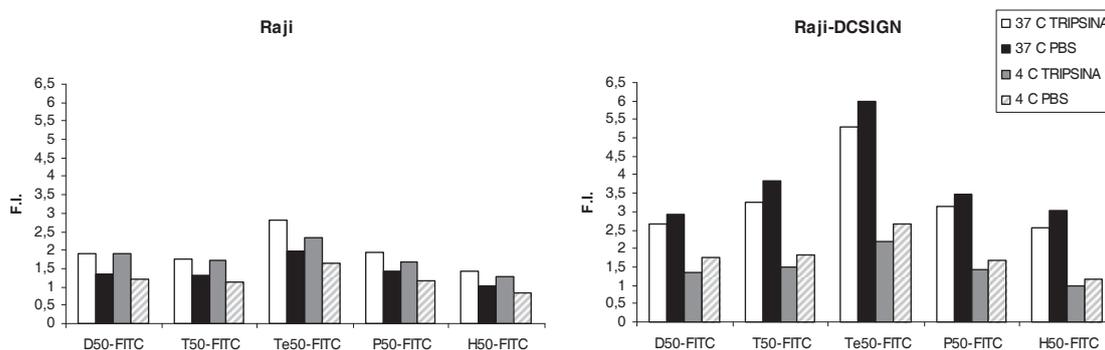
## 2.2 Estudio de internalización y exocitosis de *manno*-GNPs fluorescentes por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

Los ensayos de internalización se llevaron a cabo incubando a 37°C las células con concentraciones 25 µg/mL de *manno*-GNPs fluorescentes. A distintos tiempos se recogieron alícuotas, las nanopartículas no internalizadas se eliminaron por centrifugación y se midió la fluorescencia media de las células en el citómetro de flujo, obteniéndose las curvas de internalización en Raji DC-SIGN+ de algunas *manno*-GNPs fluorescentes (Figura 3). La intensidad de fluorescencia aumentó con el tiempo de incubación, siguiendo un patrón similar para todas las GNP, alcanzando su saturación en torno a tres horas.



**Figura 3.** Curva de tiempos de la internalización de nanopartículas **Te50-FITC** en células Raji DC-SIGN+. Las células Raji DC-SIGN+ se incubaron con las **Te50-FITC** (25 µg/mL) a 37°C

En base a las curvas de internalización, se escogió en todos los experimentos tres horas como tiempo óptimo de incubación para obtener una señal máxima de fluorescencia. Las *manno*-GNPs fluorescentes se incubaron con células Raji y Raji DC-SIGN+ durante 3 horas a 37°C o a 4°C. A 37°C (Figura 4, barra negra) se observó para todas las GNPs una intensidad de fluorescencia mayor en células Raji DC-SIGN+, que en células Raji. Este resultado indica que el receptor DC-SIGN+ contribuye decisivamente a la endocitosis.



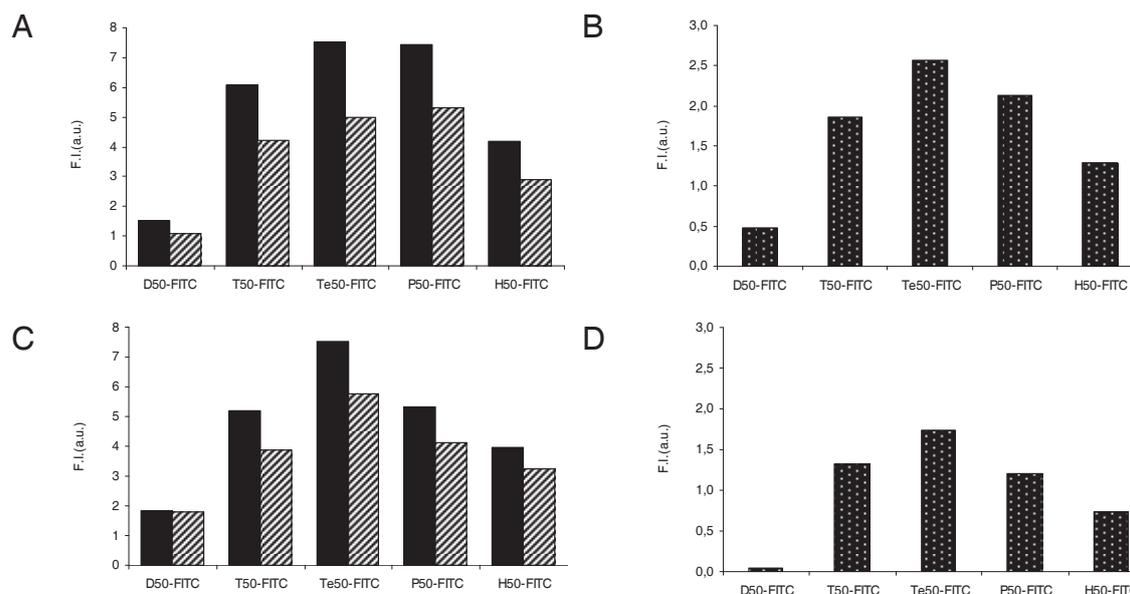
**Figura 4.** Efecto de la temperatura y la tripsina en la internalización de *manno*-GNPs fluorescentes en presencia y en ausencia del receptor DC-SIGN. Las células Raji o Raji DC-SIGN+ se incubaron con las *manno*-GNPs fluorescentes (25 µg/mL) durante 1 hora a 37°C (barra negra) o a 4°C (barra rallada). Después de la incubación las células se trataron con tripsina (barra blanca, incubación a 37°C; barra gris, incubación a 4°C).

Para confirmar la endocitosis dependiente de ATP, se incubaron las células en presencia de las *manno*-GNPs fluorescentes a 4°C (Figura 4, barra rallada), observándose una reducción del 50% en la fluorescencia de Raji DC-SIGN+ con respecto a Raji. Este resultado indicó la entrada de las GNPs vía DC-SIGN. Aunque las GNPs fueron también internalizadas en las dos líneas

celulares por mecanismos de transporte pasivo (independiente de ATP), como indicó la presencia de fluorescencia en ambas células incubadas a 4°C, las *manno*-GNPs fluorescentes se internalizaron claramente en mayor proporción en células que expresan DC-SIGN (Figura 4, barra negra).

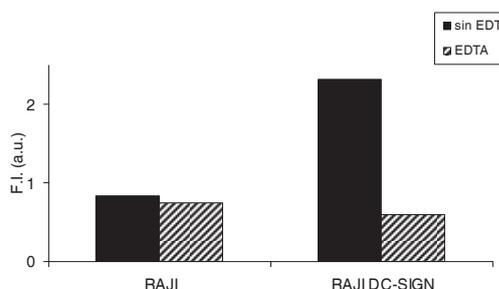
Se llevaron también a cabo experimentos donde después de tres horas de incubación con *manno*-GNPs a 37°C (Figura 4, barra blanca) o 4°C (Figura 4, barra gris), las células se trataron con tripsina para digerir las proteínas de la membrana celular. La tripsinización, que elimina los receptores extracelulares como DC-SIGN y en consecuencia las GNP adsorbidas a ellos, provocó una disminución de la intensidad de fluorescencia del ~15% en Raji DC-SIGN+ a las dos temperaturas. Sin embargo, esta reducción no se produjo en células Raji, indicando la ausencia de GNP “adsorbidas” a receptores extracelulares. En el caso de Raji DC-SIGN+ estos resultados parecen indicar que una mayor proporción de GNP ha sido endocitada (~85%) mientras que solo el ~15% ha permanecido unido en la superficie celular.

La interacción de los carbohidratos que presentan las *manno*-GNPs fluorescentes con los receptores DC-SIGN o CLR es dependiente de calcio. Para demostrar que las GNP se unen y son endocitadas por la célula a través de estos receptores se llevaron a cabo experimentos en presencia y en ausencia de calcio, preincubando las células Raji, Raji DC-SIGN+ o iDCs con EDTA antes de añadir las GNP. La internalización en ausencia de EDTA (Figura 5, barra negra) en Raji DC-SIGN+ y en iDCs presentó la misma tendencia (Figura 5A y 5C). EDTA inhibió significativamente la endocitosis de *manno*-GNPs vía DC-SIGN o CLR (Figura 5, barra rallada), mostrando una reducción de la señal de fluorescencia alrededor de un ~30%. Restando las señales obtenidas en presencia y en ausencia de calcio obtenemos una señal de fluorescencia que se asigna a las GNP unidas y endocitadas a través de receptores dependientes de Ca<sup>2+</sup> (CLR) (Figura 5B y D, barra punteada).



**Figura 5.** Efecto de EDTA en la interacción de *manno*-GNPs fluorescentes con células Raji DC-SIGN+ (A y B) y con células dendríticas inmaduras (C y D). Las células Raji DC-SIGN+ o iDCs se incubaron con las *manno*-GNPs fluorescentes (25 µg/mL) durante 3 hora a 37°C en presencia (barra rallada) y en ausencia de EDTA (barra negra). Los niveles de fluorescencia obtenidos al restar las intensidad de fluorescencia media obtenidas en presencia y en ausencia de EDTA (barra punteada) indican la interacción de las GNP's vía CLR's.

En células que no expresan DC-SIGN no se observó ninguna inhibición en presencia de EDTA. Estos resultados demuestran que la internalización de *manno*-GNPs en células Raji DC-SIGN+ y iDCs está facilitada por endocitosis mediada por el receptor DC-SIGN (Figura 6).

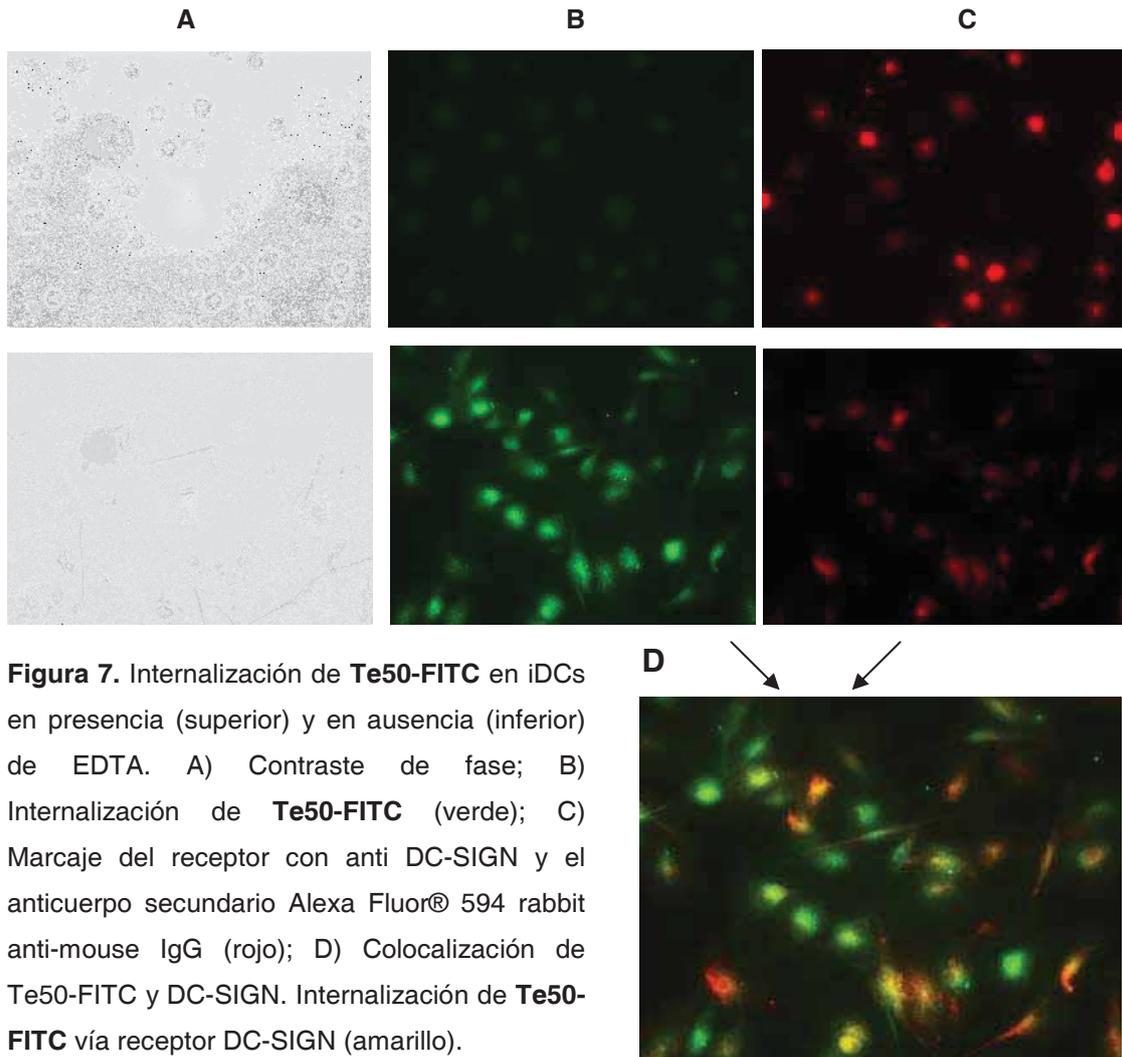


**Figura 6.** Efecto de EDTA en la interacción de **D50-FITC** con células Raji y Raji DC-SIGN+.

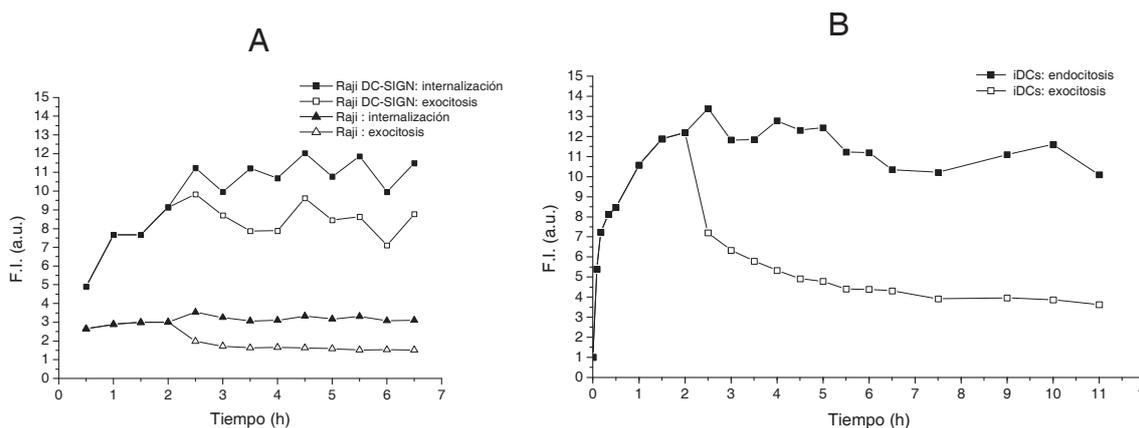
De entre todas, la nanopartícula **Te50-FITC**, que incorpora en un 50% el tetrasacárido  $\text{Man}\alpha 1\text{-2Man}\alpha 1\text{-2Man}\alpha 1\text{-2Man}1\text{-3}\alpha$  fue la que mostró niveles mayores de endocitosis vía CLR's. Las GNP's con oligosacáridos más complejos como el pentasacárido (**P50-FITC**) o el heptasacárido (**H50-FITC**), o aquellas que presentan el disacárido (**D50-FITC**) o el trisacárido (**T50-FITC**)

fueron internalizadas en menor proporción. Parece que la estructura del oligosacárido presente en la GNP contiene cierta selectividad por los CLRs. En todo caso, oligosacáridos más complejos que un disacárido parecen mejores ligandos de CLRs, y en especial de DC-SIGN (Figura 4). Un comportamiento similar se observó en el caso de la infección en *trans* mediada por DC-SIGN (Capítulo 3, página 152), donde la nanopartícula **Te-50** resultó ser mejor inhibidor que la **D-50** y **T-50**, y tan bueno como las nanopartículas **P-50** y **H-50** con oligosacáridos más complejos.

La endocitosis de la nanopartícula **Te50-FITC** en células dendríticas inmaduras y su inhibición con EDTA también se demostró por microscopía de fluorescencia (Figura 7). Para ello, las células se incubaron durante 3 horas con **Te50-FITC** en presencia y en ausencia de EDTA, y una muestra se observó por microscopía de epi-fluorescencia. En presencia de EDTA (Figura 7B, superior) las células internalizaron muy pocas GNPs, como se muestra en la figura, donde la intensidad de fluorescencia (verde) es mucho más baja que la que mostraron las células no tratadas con EDTA (Figura 7B, inferior). Para identificar la presencia del receptor DC-SIGN, tras la incubación con GNP las células se tiñeron con un anticuerpo primario anti-DC-SIGN y un secundario Alexa 594 IgG (Figura 7C, rojo). La superposición de las imágenes de la incubación de la nanopartícula (verde) y de la tinción con anti-DC-SIGN (rojo) mostró colocalización de la nanopartícula **Te50-FITC** y del receptor DC-SIGN. (Figura 7D, amarillo).



La habilidad de las células Raji, Raji DC-SIGN<sup>+</sup> e iDCs para exocitar GNPs se evaluó utilizando la nanopartícula **Te50-FITC** como modelo. Las células se incubaron con una concentración 25  $\mu\text{g/mL}$  de **Te50-FITC** a 37°C durante 7-11 horas. Después de dos horas, la mitad del cultivo se lavó con PBS para eliminar la GNP no internalizada, las células se resuspendieron en medio fresco y se volvieron a incubar para facilitar la exocitosis. La endocitosis, así como la exocitosis se siguió en paralelo midiendo la fluorescencia de las células a distintos intervalos de tiempo por citometría de flujo (Figura 8).

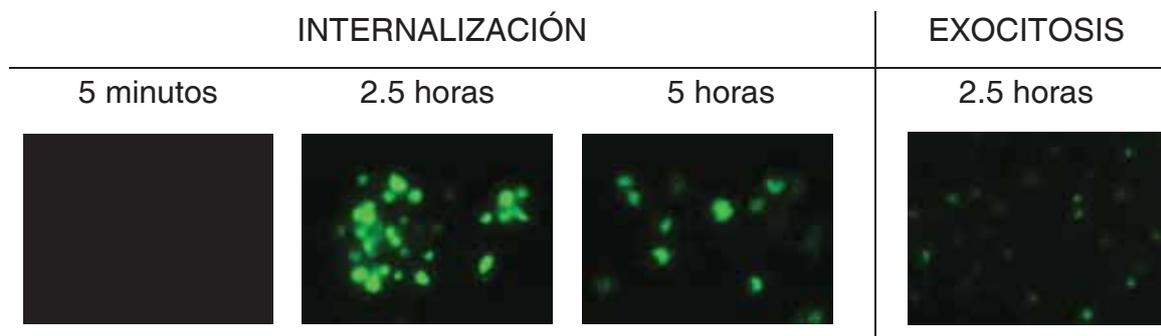


**Figura 8.** Curva de tiempos de la internalización y exocitosis de la nanopartícula **Te50-FITC**. A) Células Raji y Raji DC-SIGN+; B) iDCs. Las células Raji, Raji DC-SIGN+ y iDCs se incubaron con **Te50-FITC** (25  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 7-11 horas. Después de 2 horas de incubación, la GNP no internalizada se eliminó del medio y las células se resuspendieron en medio fresco y se dejó exocitar.

El máximo de internalización de **Te50-FITC** se alcanzó en células Raji DC-SIGN+ o iDCs a las 2-3 horas, mientras que en células Raji la señal de fluorescencia permaneció constante a lo largo del tiempo, mostrando solo una fluorescencia residual, posiblemente debida al transporte pasivo de **Te50-FITC**. El máximo de exocitosis de **Te50-FITC** se alcanzó alrededor de las 3 horas para células Raji DC-SIGN+ y a las 5-6 horas para iDCs. Sin embargo, las iDCs exocitaron hasta el 50% de la nanopartícula en tan solo treinta minutos, mientras que las células Raji DC-SIGN+ presentaron un comportamiento distinto, exocitando más lentamente (2-3 horas) y en cantidades mucho menores. La señal de fluorescencia que se mantiene en Raji DC-SIGN+ durante 3-7 horas de exocitosis podría atribuirse a un proceso continuo de endo/exocitosis donde participaría el receptor DC-SIGN que está sobreexpresado en la célula.

La ruta “endocítica-exocítica” de **Te50-FITC** en iDCs también se siguió por microscopía de fluorescencia tomando imágenes a los 5 minutos, 2.5 y 5 horas de internalización, y a las 2.5 horas de exocitosis (Figura 9). Las imágenes de microscopía muestran cualitativamente el aumento de la señal de fluorescencia durante la internalización, y una reducción significativa de la

fluorescencia durante la exocitosis. Los resultados obtenidos por microscopía están de acuerdo con de citometría de flujo obtenidos anteriormente (Figura 8).



**Figura 9.** Cambio de la señal de fluorescencia con el tiempo durante la internalización y exocitosis de **Te50-FITC** en células dendríticas inmaduras.

### 3. Conclusiones

- Las *manno*-GNPs fluorescentes no son citotóxicas en células Raji, Raji DC-SIGN+ y en iDCs a concentración 100µg/mL.
- Las *manno*-GNPs fluorescentes a concentración 25µg/mL son internalizadas por células Raji DC-SIGN+ o iDCs más eficientemente que por células Raji que no expresan el receptor DC-SIGN.
- Se han observado dos tipos de internalización de *manno*-GNPs fluorescentes, una dependiente de ATP (endocitosis) y otra por transporte pasivo (difusión), como indicó la reducción en un 50% de la señal de fluorescencia en Raji DC-SIGN+ incubadas a 4°C en comparación con Raji.
- La unión de *manno*-GNPs fluorescentes a DC-SIGN en la membrana plasmática se demostró por tripsinización a 37°C de las células incubadas con GNPs, que disminuyó la señal de fluorescencia hasta en un 15% en células Raji DC-SIGN+, mientras que en células Raji no se observó este efecto

- Las *manno*-GNPs fluorescentes presentaron un patrón de internalización similar en células Raji DC-SIGN+ y iDCs. La interacción entre *manno*-GNPs y las células Raji DC-SIGN+ o iDCs es dependiente de calcio, como mostró la reducción de un 30% de internalización en presencia de EDTA. Esta reducción no se observó en células que no expresan DC-SIGN (Raji).
- La nanopartícula **Te50-FITC** es endocitada en células Raji DC-SIGN+ y iDCs en mayor proporción a través de receptores de manosa que dependen de calcio. Su endocitosis en iDCs mediada por el receptor DC-SIGN se demostró por co-localización con DC-SIGN por microscopía de fluorescencia
- Se evaluó la habilidad de células Raji, Raji DC-SIGN+ e iDCs para exocitar la nanopartícula **Te50-FITC**. La exocitosis sucede más rápidamente en iDCs que en células Raji DC-SIGN+. Las iDCs exocitan en 30 minutos el doble de GNP que lo que lo hacen las células Raji DC-SIGN+ en 2-3 horas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por microscopía de fluorescencia en la endo/exocitosis de **Te50-FITC** en iDCs.

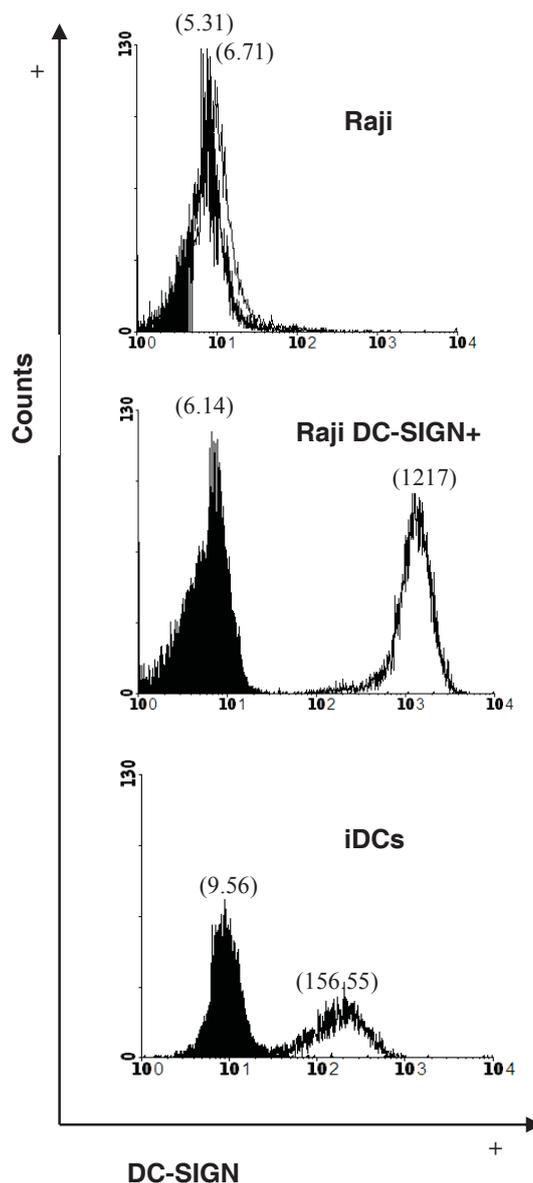
#### 4. Parte experimental

Los estudios de interacción GNP-célula se llevaron a cabo en CIC BiomaGUNE en colaboración con la Dr Blanca Arnaiz, utilizando un lector multiplate GENios Pro (TECAN), un citómetro de flujo BD Canto II (BD Pharmigen), y un microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000B.

##### 4.1. Cultivos celulares primarios y líneas celulares.

Se emplearon las líneas celulares Raji y Raji DC-SIGN+ ya descritas en el capítulo 3, apartado 4.1.2. Las células dendríticas (DCs) se diferenciaron a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) provenientes de buffy coats de donantes sanos, proporcionados por el Banco de sangre de

Guipuzcoa gracias al Dr Jose Manuel Cárdenas. Brevemente, los PBMCs se obtuvieron de buffy coats mediante centrifugación por gradiente de densidad empleando Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Premium (GE, Heathcare, Uppsala, Sweden). Los monocitos se aislaron por marcaje selectivo de células que expresan CD14 mediante Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Las células dendríticas inmaduras (iDCs) se generaron a través de un protocolo ampliamente descrito en la literatura.<sup>27,28</sup> Los monocitos se cultivaron durante 6 días en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de BCS (suero bovino fetal) bajo en endotoxinas, 2mM de L-glutamina, penicilina (50 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y 2.5 µg/mL de anfotericina B en presencia de citoquinas IL-4 y GM-CSF (1000U/mL). El medio y las citoquinas se reemplazaron cada dos días. Para el análisis de la expresión de DC-SIGN, las células Raji, Raji DC-SIGN+ e iDCs se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-DC-SIGN humano (clon DCN46 conjugado con ficoeritrina (PE), 50 µg/mL) durante 15 minutos a 4°C, se lavó con PBS frío (2x1mL) y se analizó por citometría de flujo. Como control isotópico se utilizó el anticuerpo de ratón IgG2b conjugado con PE (Figura 1) Todos los anticuerpos descritos en este apartado se obtuvieron de BD Pharmigen.



**Figura 1.** Expresión de DC-SIGN en células Raji, Raji DC-SIGN+ and iDCs. Las células se tiñeron con PE-anti-DC-SIGN mAb (histogramas blancos) y PE-isotípico mAb (histograma negro) y se analizaron por citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media se indica en paréntesis. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

#### 4.2. Viabilidad celular en células Raji, Raji DC-SIGN+ y en iDCs

Las células iDCs ( $4 \cdot 10^5$ /pocillo), Raji o Raji DC-SIGN+ ( $2 \cdot 10^5$ /pocillo) se incubaron con concentraciones crecientes de FITC\_GNPs (10, 25, 50 o 100  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. A continuación, 4 horas antes de medir la absorbancia se añadieron 20  $\mu\text{L}$ /pocillo de una disolución 5mg/mL en

tampón salino pH=7.4 de MTS (CellTiter96™ AQueous Assay, Promega) para los ensayos con células Raji, o de MTT (Sigma) para los ensayos con iDCs. La absorbancia se detectó en un multi plate reader (GENios Pro, TECAN) a 492 nm o 550 nm respectivamente. Los valores vienen dados como la media de cuadruplicados  $\pm$  S.D.

### **4.3. Experimentos de internalización y exocitosis de GNPs con iDCs, Raji y Raji DC-SIGN+**

#### **4.3.1. Citometría de flujo.**

En el citómetro de flujo, las muestras se excitaron con un laser a 488 nm y se empleó un filtro de paso alto de 502 nm y uno de paso de banda de 530/30 nm. La señal de fluorescencia se evaluó mediante la proporción entre el valor medio de fluorescencia de la muestra que contiene GNP y el valor de la muestra control que no contiene GNP. Los valores se normalizaron de acuerdo con el contenido en FITC de cada GNP.

**4.3.1.1. Ensayos de internalización.** Las células iDCs, Raji DC-SIGN+ o Raji ( $10^5/300 \mu\text{L}$  de medio RPMI-1640 completo) se incubaron con las GNPs **D50-FITC**, **T50-FITC**, **Te50-FITC**, **P50-FITC** o **H50-FITC** ( $25 \mu\text{g/mL}$ ) a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . A distintos intervalos de tiempo (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5...horas) se tomaron alícuotas de  $300 \mu\text{L}$ , se eliminó la GNP no internalizada o unida a la superficie celular mediante dos lavados con PBS ( $2\text{mM NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $8\text{mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.7 \text{mM KCl}$ ,  $137 \text{mM NaCl}$ , pH 7.4) y se evaluó su fluorescencia mediante citometría de flujo. Para inhibir la endocitosis dependiente de ATP, las células Raji o Raji DC-SIGN+ se incubaron con las GNPs durante 3 horas a  $4^\circ\text{C}$  y se evaluó su fluorescencia en el citómetro. Para eliminar la GNP unida a receptores celulares, después de tres horas de incubación con las GNPs a  $37$  o  $4^\circ\text{C}$  el cultivo se trató con tripsina ( $1\text{mg/mL}$ ) durante 15 min a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , y se evaluó su fluorescencia en el citómetro. Para inhibir la endocitosis de GNPs a través de receptores de manosa que dependen de calcio (CLRs) las células se preincubaron con EDTA (concentración final de  $50 \text{mM}$ ) en medio RPMI-1640 completo durante 30 min

a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Se añadieron las GNPs (concentración final 25 µg/mL) y el cultivo se incubó durante 3 horas anterior a su adquisición por citometría de flujo.

**4.3.1.2. Ensayos de exocitosis.** Las células iDCs, Raji DC-SIGN+ o Raji (10<sup>5</sup>/300 µL) se incubaron con las GNPs durante 2 horas. La GNP no internalizada se eliminó con dos lavados con PBS, y las células se resuspendieron en medio RPMI fresco y se dejó exocitar entre 7 y 11 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. A distintos intervalos de tiempo (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5....horas) se tomaron alícuotas de 300 µL, se lavaron las células, y se evaluó su fluorescencia mediante citometría de flujo.

### **4.3.2. Microscopía de fluorescencia**

La imagen se registró en un microscopio invertido (Leika DMI6000B) en configuración epifluorescente con un objetivo de aceite de inmersión (apertura numérica (NA) = 4, objetivo de 40X, Leica) empleando una cámara (Hamamatsu, Sewickley, PA, USA) con dispositivo de cargas interconectadas (CCD). Los fluoróforos FITC y Alexa Fluor® 594 se excitaron con una lámpara de mercurio (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany),

**4.3.2.1. Ensayos de endocitosis mediada por DC-SIGN.** Las células iDCs se incubaron con la nanopartícula **Te50-FITC** (25 µg/mL) durante 2.5 horas en presencia y en ausencia de EDTA (50mM). Tras la incubación se realizó la tinción de DC-SIGN por inmunofluorescencia. Para ello, las células se incubaron durante una hora en cubres recubiertos de polilisina y se fijaron con 1% de paraformaldehído durante 15 min a 37°C. El cubre se lavó tres veces con PBS y se bloqueó con BSA en PBS al 1 % durante 30 min a 37°C. Después, se añadió sobre las células el anticuerpo de ratón CD 209 (anti DC-SIGN humano, BD Pharmigen, 0.5 mg/mL al 1% de BSA en PBS) a dilución 1:100 en PBS y se incubó a 37°C durante 2 horas. A continuación se añadió el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 594 rabbit anti-mouse IgG (Invitrogen, 2mg/mL al 1% de BSA en PBS) a dilución 1:5000 en PBS y se incubó a 37°C durante 1 hora. Después de cada paso, las células se lavaron con 0.5% de Tween-20 en PBS. Tras la tinción, las células se observaron en el microscopio

de epi-fluorescencia. Para la detección de FITC se emplearon filtros de paso de banda de excitación de 480/40 nm y de emisión de 527/30 nm. Para la detección de Alexa Fluor® 594 se emplearon filtros de paso de banda de excitación de 560/40 nm y de emisión de 645/75 nm. Las imágenes se registraron a tiempos de exposición de 10 y 0.5 segundos. Para observar la colocación de las GNPs y el receptor DC-SIGN, las imágenes tomadas con los dos filtros fueron superpuestas empleando el programa Adobe PhotoShop 7.0.

**4.3.2.2. Ensayos de internalización y exocitosis.** Para observar la internalización las células iDCs ( $10^5/300 \mu\text{L}$ ) se incubaron con la nanopartícula **Te50-FITC** (25  $\mu\text{g/mL}$ ) a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ . A distintos intervalos de tiempo (5 minutos, 1, 2.5 o 5 horas) se tomaron alícuotas de 300  $\mu\text{L}$  y se incubaron en cubres recubiertos de polilisina con 1% de paraformaldehído en PBS durante 30 min a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  y se lavaron tres veces con PBS antes de tomar la imagen en el microscopio. Para observar la exocitosis, después de 2.5 horas de internalización, se eliminó el medio que contiene GNPs, se reemplazó por medio fresco y se dejó exocitar a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ . A las 2.5 horas se fijaron las células con el procedimiento anterior y se tomaron las imágenes en el microscopio. Para la detección de FITC se emplearon filtros de paso de banda de excitación de 480/40 nm y de emisión de 527/30 nm. Las imágenes se registraron a tiempos de exposición de 10 y 0.5 segundos.

## 5. Bibliografía

---

<sup>1</sup> Mellman, I., and Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106, 255-258.

<sup>2</sup> Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252.

<sup>3</sup> Turville, S.G., Cameron, P.U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R.W., and Cunningham, A.L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 3, 975-983.

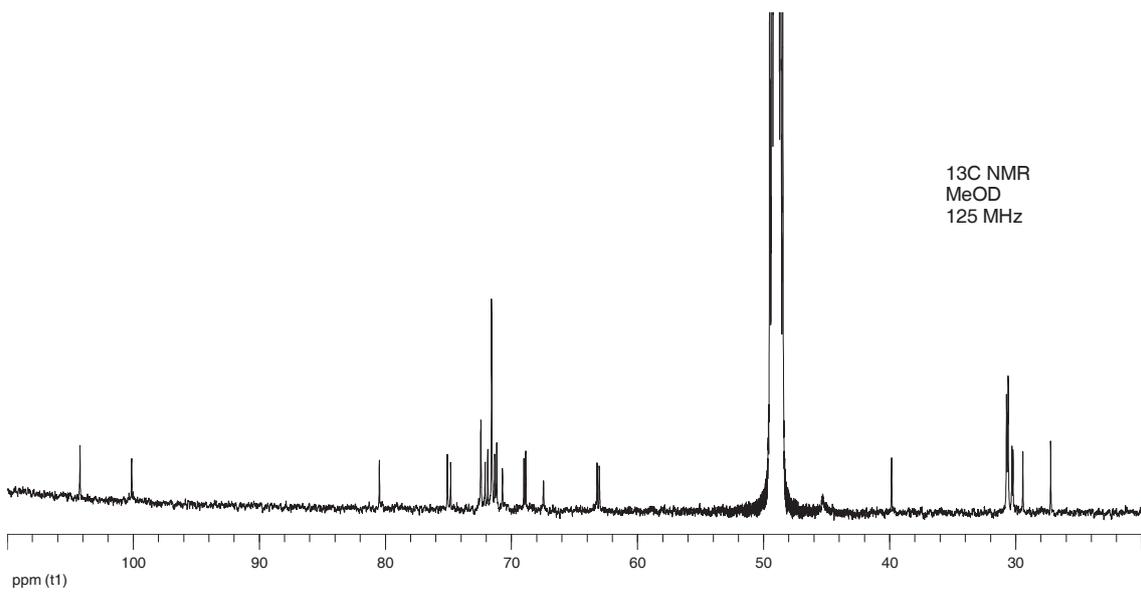
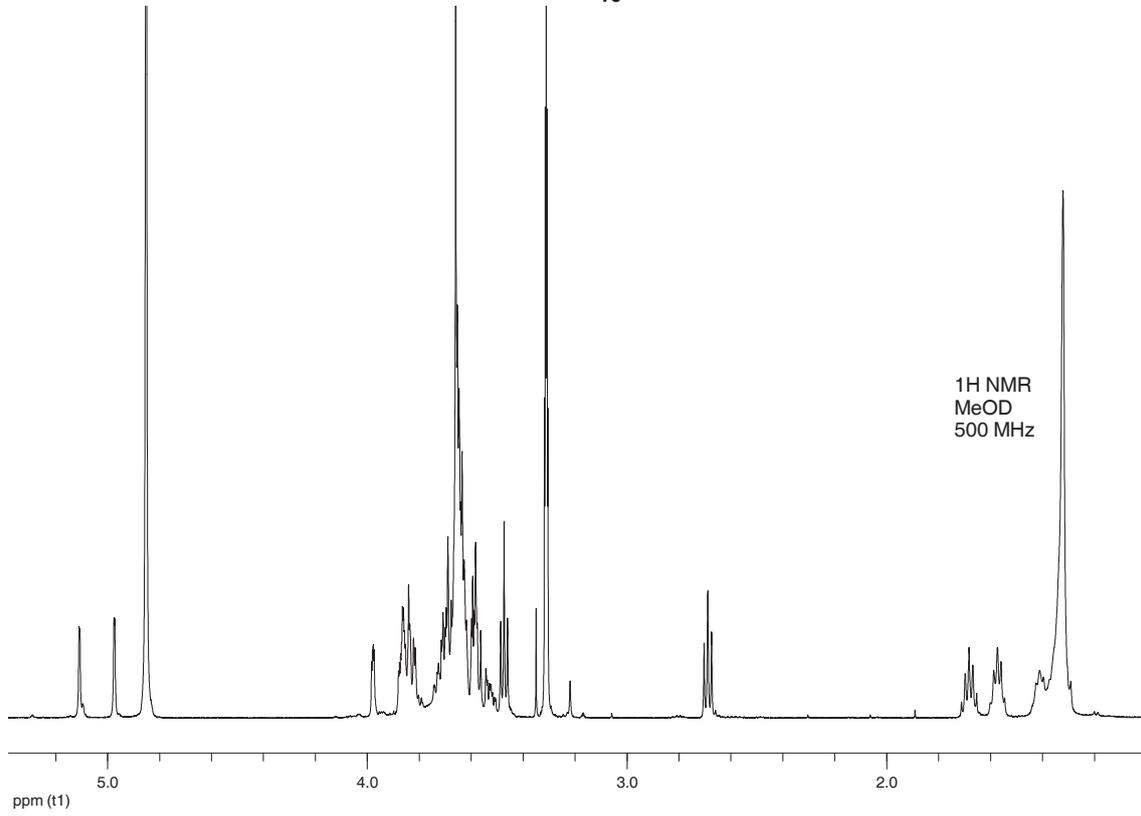
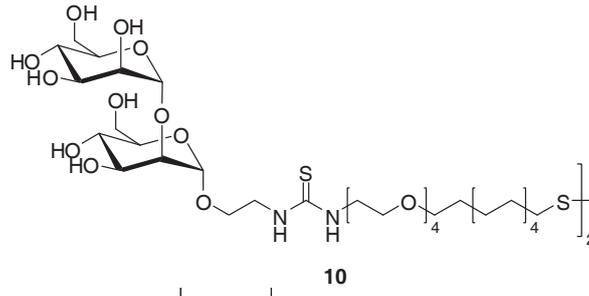
<sup>4</sup> Akira, S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 15, 5-11.

<sup>5</sup> Figdor, C.G., van Kooyk, Y., and Adema, G.J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*, 2, 77-84.

- 
- <sup>6</sup> Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struc Biol*, 9, 585-590.
- <sup>7</sup> Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, 100, 587-597.
- <sup>8</sup> Cambi, A., de Lange, F., van Maarseveen, N.M., Nijhuis, M., Joosten, B., van Dijk, E.M., de Bakker, B.I., Fransen, J.A., Bovee-Geurts, P.H., van Leeuwen, F.N., Van Hulst, N.F., and Figdor, C.G. (2004). Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell Biol*, 164, 145-155.
- <sup>9</sup> Boggiano, C., Manel, N., and Littman, D.R. (2007). Dendritic cell-mediated trans-enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity is independent of DC-SIGN. *J Virol*, 81, 2519-2523.
- <sup>10</sup> Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, 182, 389-400.
- <sup>11</sup> Trujillo, J.R., Rogers, R., Molina, R. M., Dangond, F., McLane, M. F., Essex, M., Brain, J. D. (2007). Noninfectious entry of HIV-1 into peripheral and brain macrophages mediated by the mannose receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5097-5102.
- <sup>12</sup> Lopez-Herrera, A., Liu, Y., Rugeles, M.T., He, J.J. (2005). HIV-1 interaction with human mannose receptor (hMR) induces production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) through hMR-mediated intracellular signaling in astrocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 1741, 55-64.
- <sup>13</sup> Lambert, A.A., Gilbert, C., Richard, M., Beaulieu, A.D., and Tremblay, M.J. (2008). The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood*, 112, 1299-1307.
- <sup>14</sup> Chatwell, L., Holla, A., Kaufer, B.B., and Skerra, A. (2008). The carbohydrate recognition domain of Langerin reveals high structural similarity with the one of DC-SIGN but an additional, calcium-independent sugar-binding site. *Mol Immunol*, 45, 1981-1994.
- <sup>15</sup> de Witte, L., Nabatov, A., and Geijtenbeek, T.B. (2008). Distinct roles for DC-SIGN<sup>+</sup>-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends Mol Med*, 14, 12-19.
- <sup>16</sup> de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M.A., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2007). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med*, 13, 367-371.
- <sup>17</sup> Gatfield, J., and Pieters, J. (2000). Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*, 288, 1647-1650.
- <sup>18</sup> Manes, S., del Real, G., Lacalle, R.A., Lucas, P., Gomez-Mouton, C., Sanchez-Palomino, S., Delgado, R., Alcami, J., Mira, E., and Martinez, C. (2000). Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *Embo Reports*, 1, 190-196.
- <sup>19</sup> Rosenberger, C.M., Brumell, J.H., and Finlay, B.B. (2000). Microbial pathogenesis: Lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol*, 10, 823-825.
- <sup>20</sup> Burgdorf, S., and Kurts, C. (2008). Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, 20, 89-95.

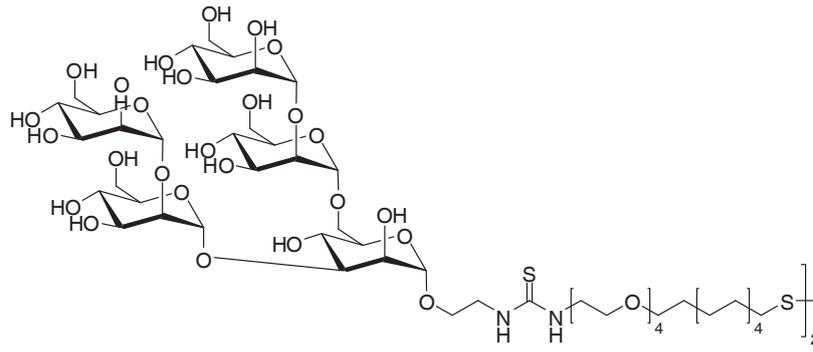
- 
- <sup>21</sup> Napper, C.E., and Taylor, M.E. (2004). The mannose receptor fails to enhance processing and presentation of a glycoprotein antigen in transfected fibroblasts. *Glycobiology*, *14*, 7C-12C.
- <sup>22</sup> Watts, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol*, *15*, 821-850.
- <sup>23</sup> Lanzavecchia, A. (1996). Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol*, *8*, 348-354.
- <sup>24</sup> Moris, A., Pajot, A., Blanchet, F., Guivel-Benhassine, F., Salcedo, M., and Schwartz, O. (2006). Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood*, *108*, 1643-1651.
- <sup>25</sup> a) Verma, A., Uzun, O., Hu, Y., Hu, Y., Han, H.S., Watson, N., Chen, S., Irvine, D.J., and Stellacci, F. (2008). Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat Mater*, *7*, 588-595; b) Park, J.S., Han, T.H., Lee, K.Y., Han, S.S., Hwang, J.J., Moon, D.H., Kim, S.Y., and Cho, Y.W. (2006). N-acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: Endocytosis, exocytosis and drug release. *J Control Release*, *115*, 37-45; c) Niikura, K., Sekiguchi, S., Nishio, T., Masuda, T., Akita, H., Matsuo, Y., Kogure, K., Harashima, H., and Ijro, K. (2008). Oligosaccharide-mediated nuclear transport of nanoparticles. *ChemBiochem*, *9*, 2623-2627; d) Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C.H., Tang, X.W., Cory, D., Scadden, D.T., and Weissleder, R. (2000). Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*, *18*, 410-414; e) Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., and Chan, W.C. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*, *6*, 662-668; f) Chithrani, B.D., and Chan, W.C. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett*, *7*, 1542-1550; g) Connor, E.E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C.J., and Wyatt, M.D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, *1*, 325-327; h) Leroueil, P.R., Hong, S.Y., Mecke, A., Baker, J.R., Orr, B.G., and Holl, M.M.B. (2007). Nanoparticle interaction with biological membranes: Does nanotechnology present a janus face? *Acc Chem Res*, *40*, 335-342.
- <sup>26</sup> Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A., and Cory, J.G. (1991). Use of an Aqueous Soluble Tetrazolium Formazan Assay for Cell-Growth Assays in Culture. *Cancer Communications*, *3*, 207-212.
- <sup>27</sup> Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D., and Schuler, G. (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods*, *196*, 137-151.
- <sup>28</sup> Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, *179*, 1109-1118.



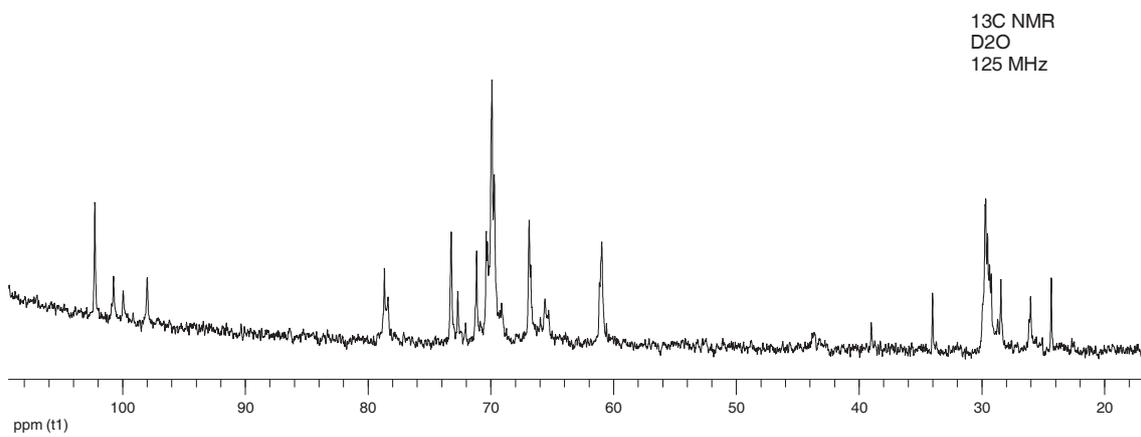
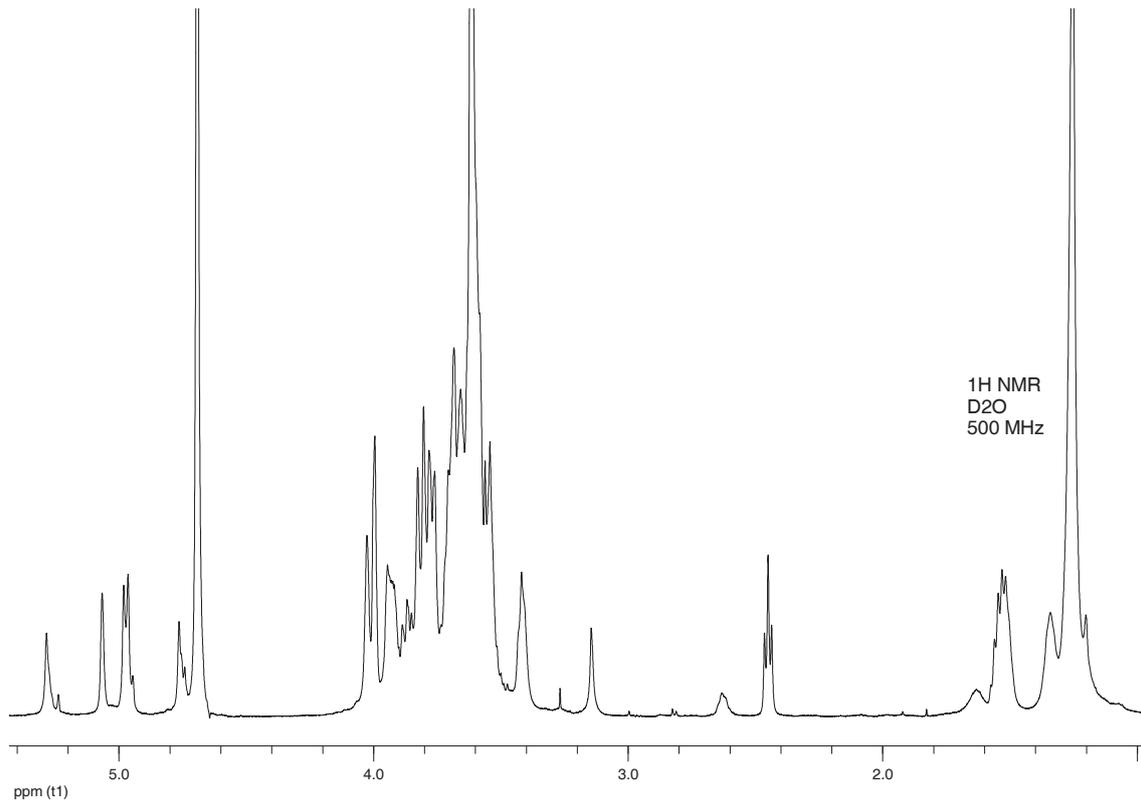




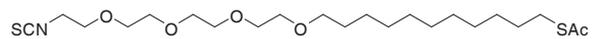
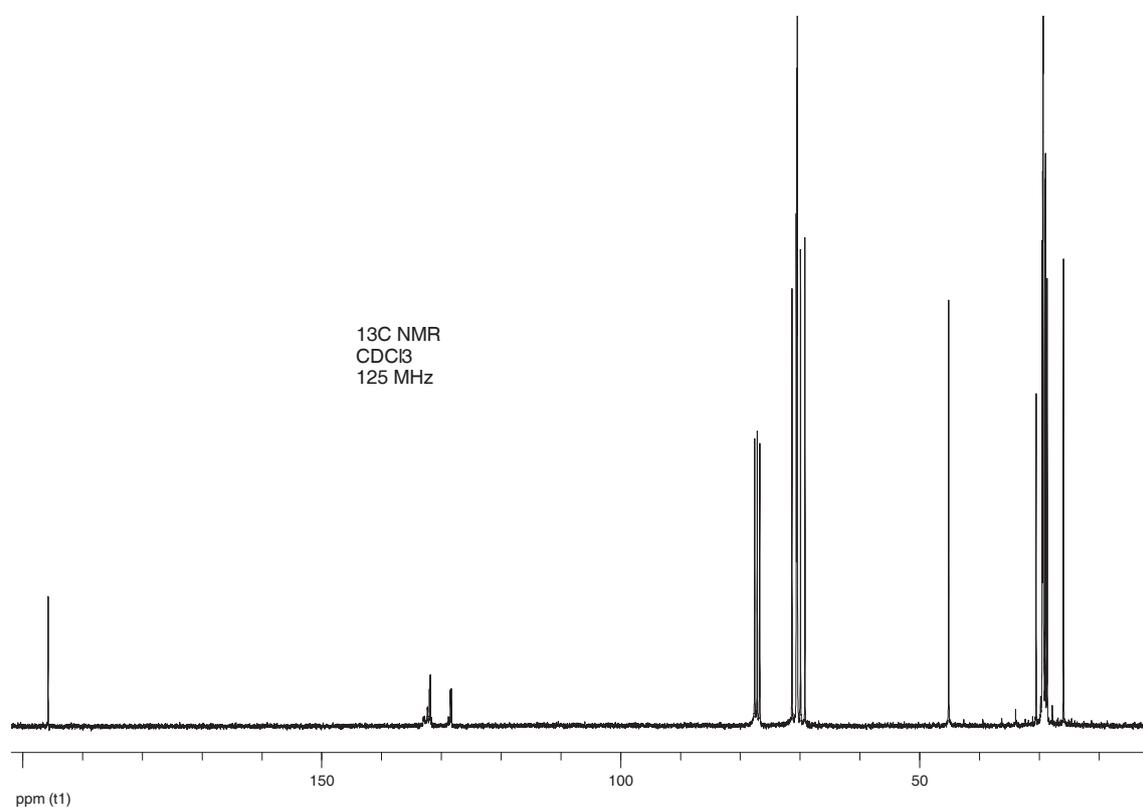
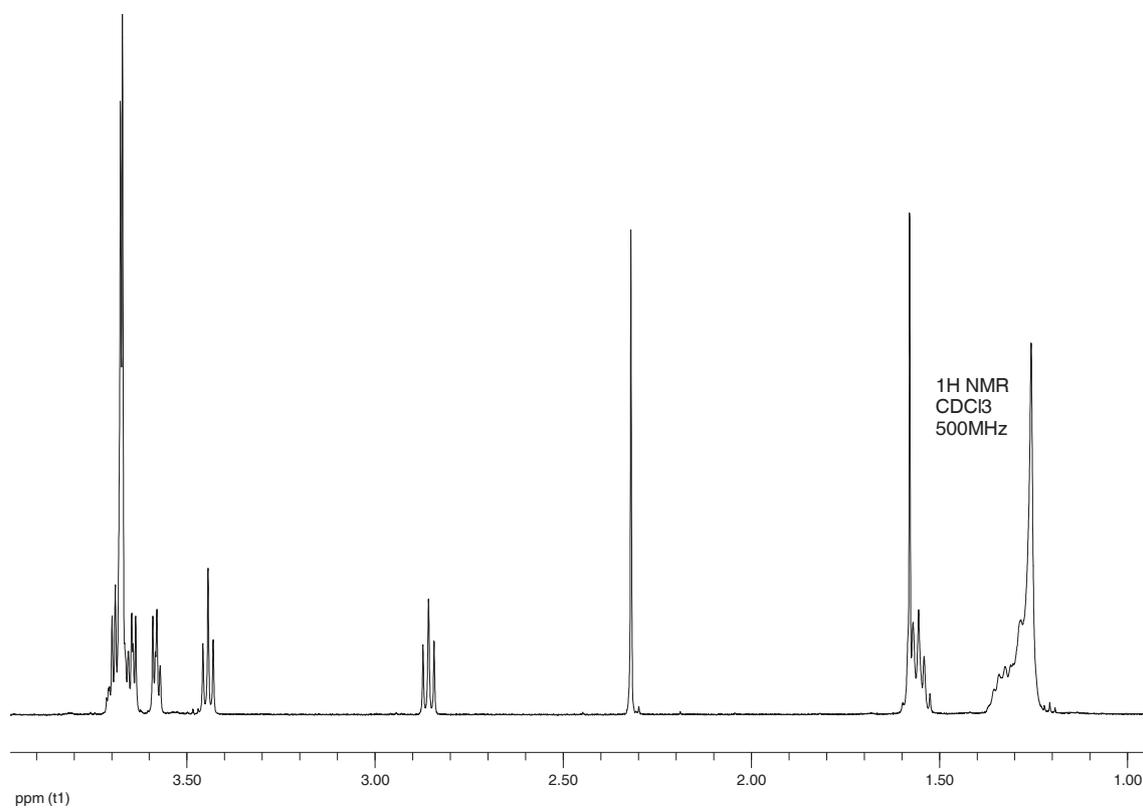


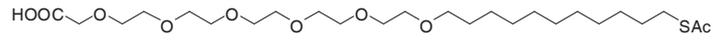


13

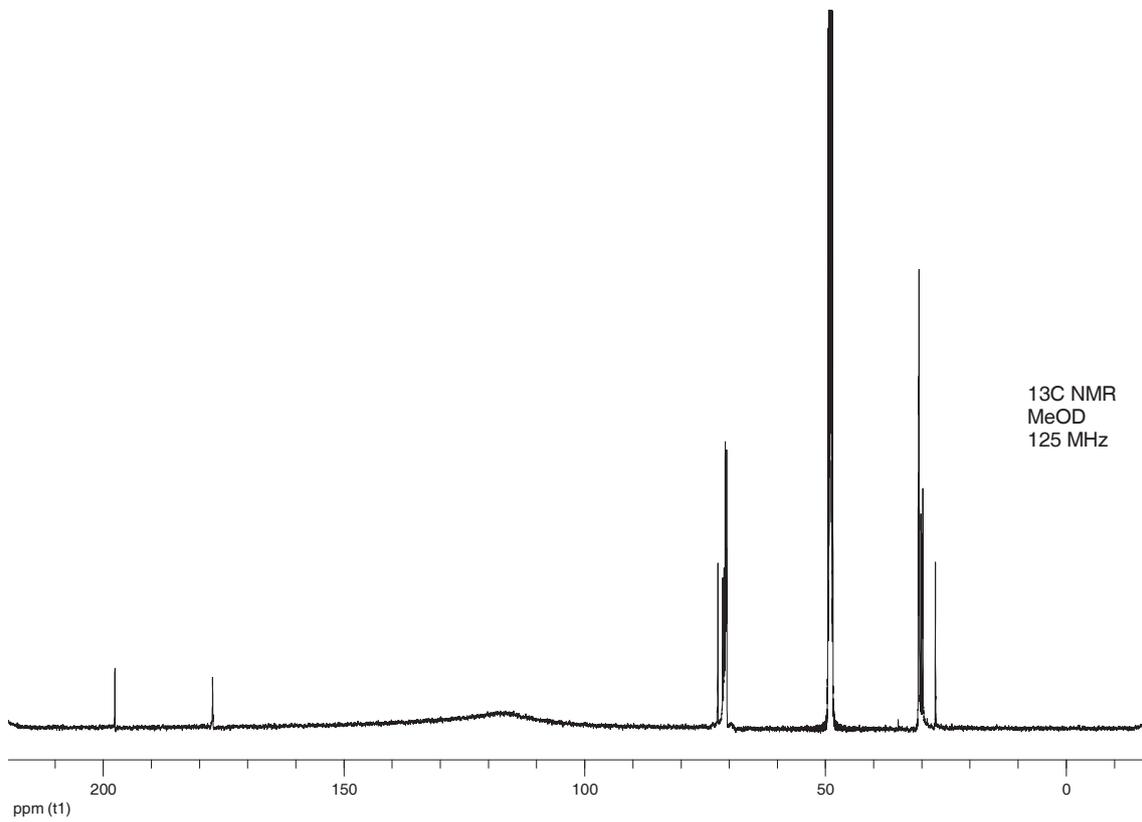
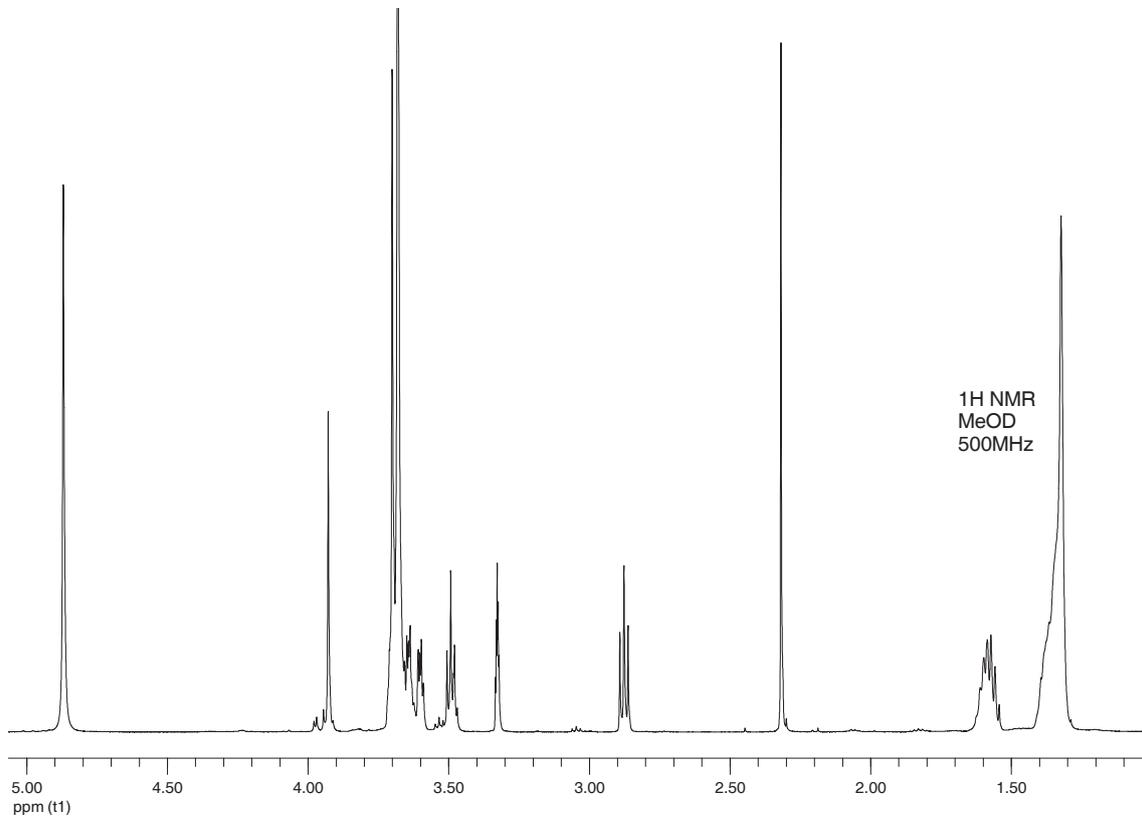




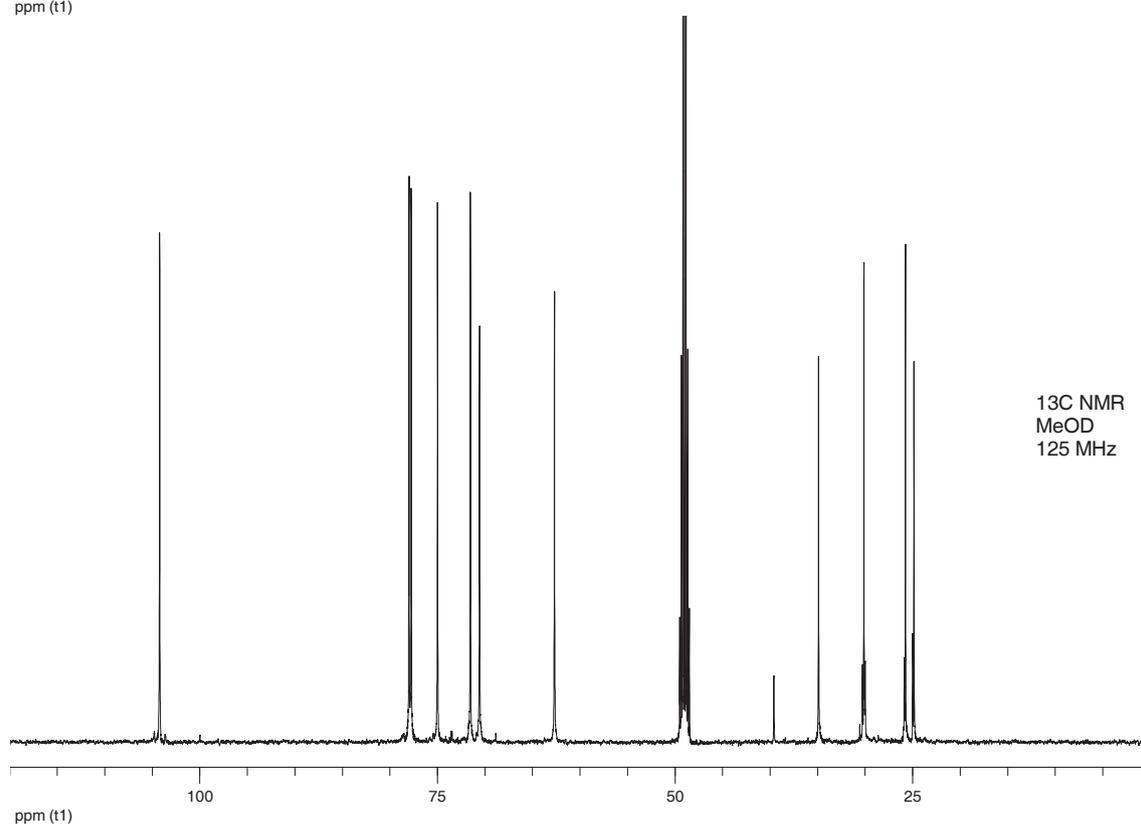
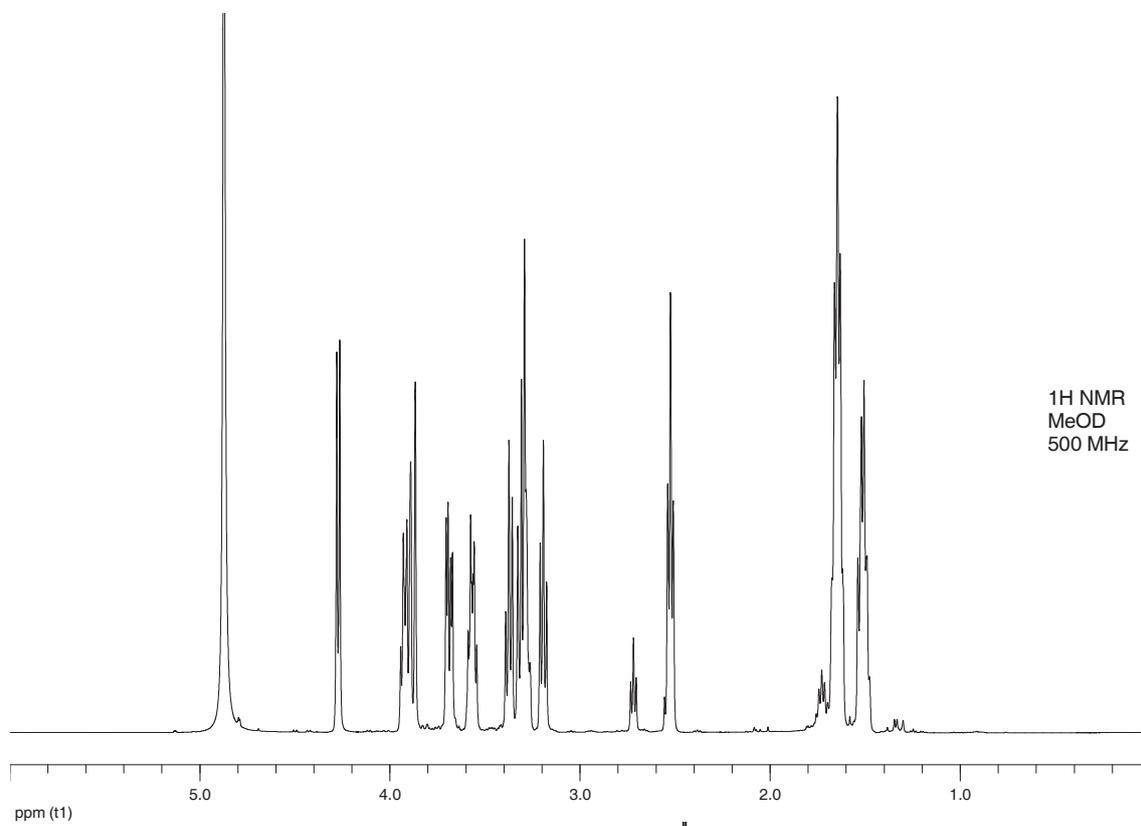
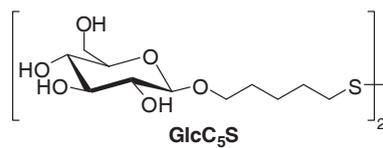
**38**



34

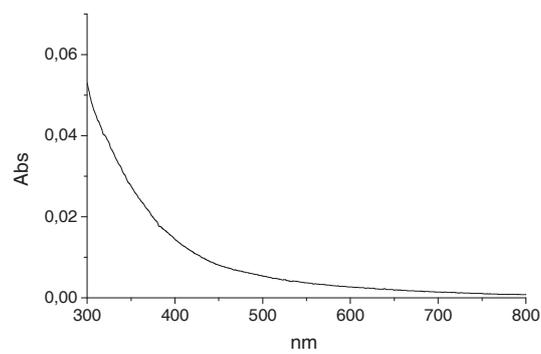
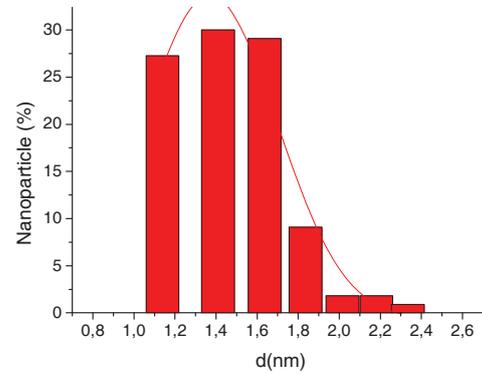
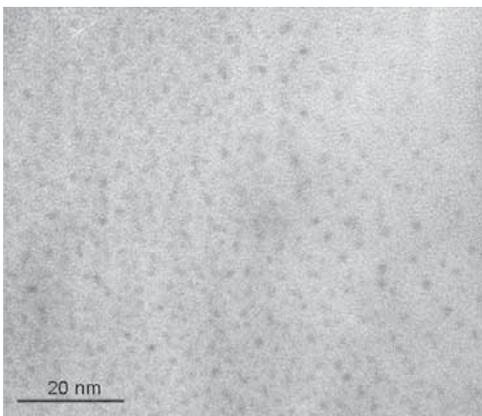
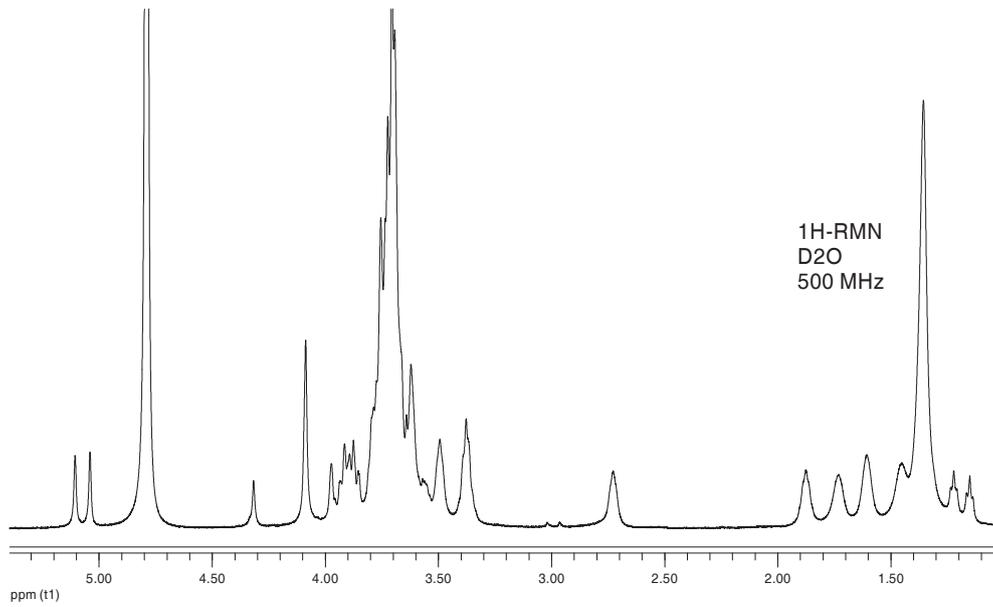
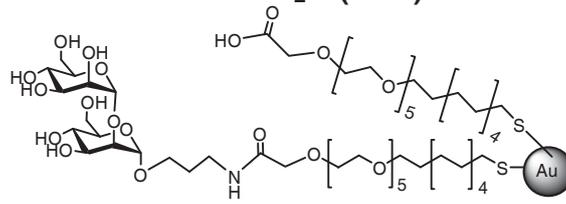




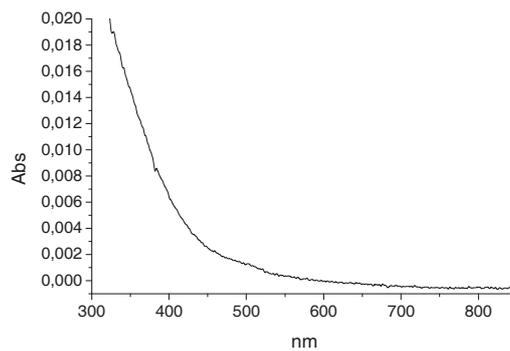
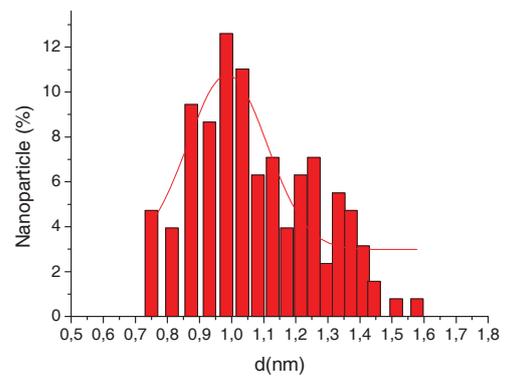
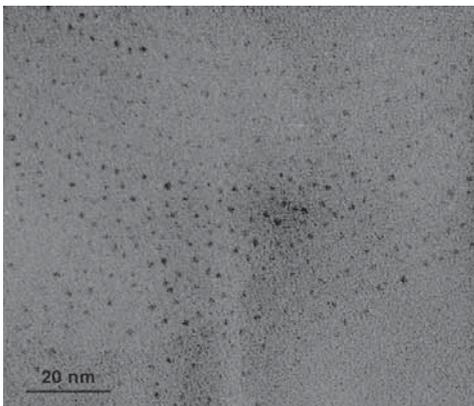
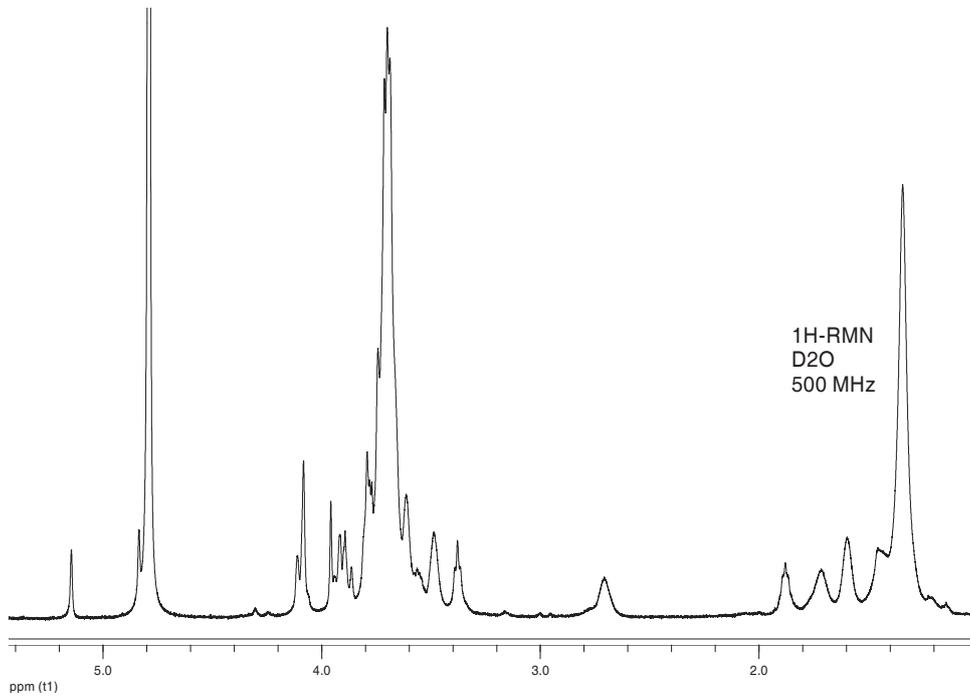
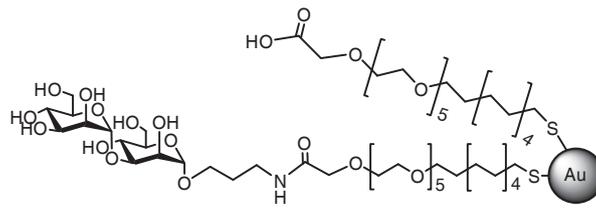


## 2. Selección de GNPs

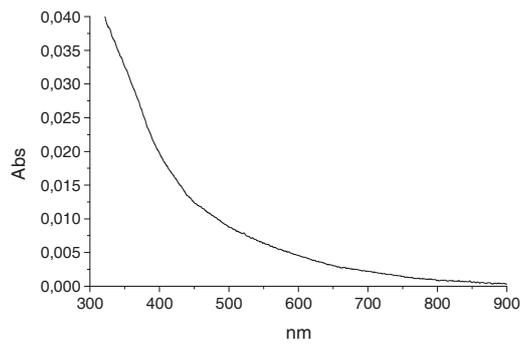
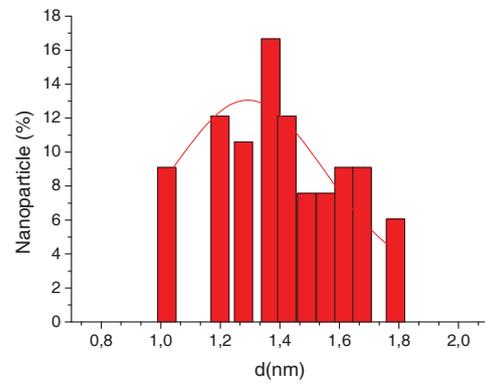
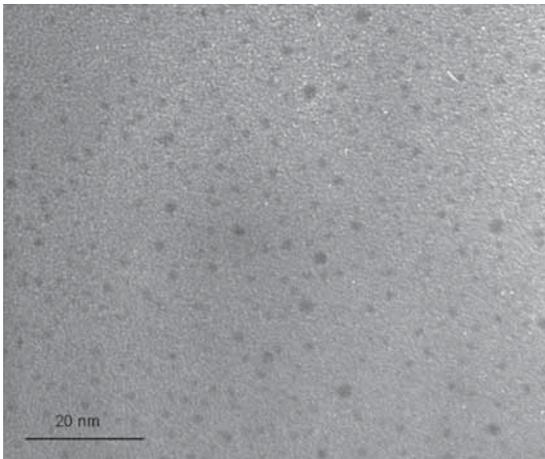
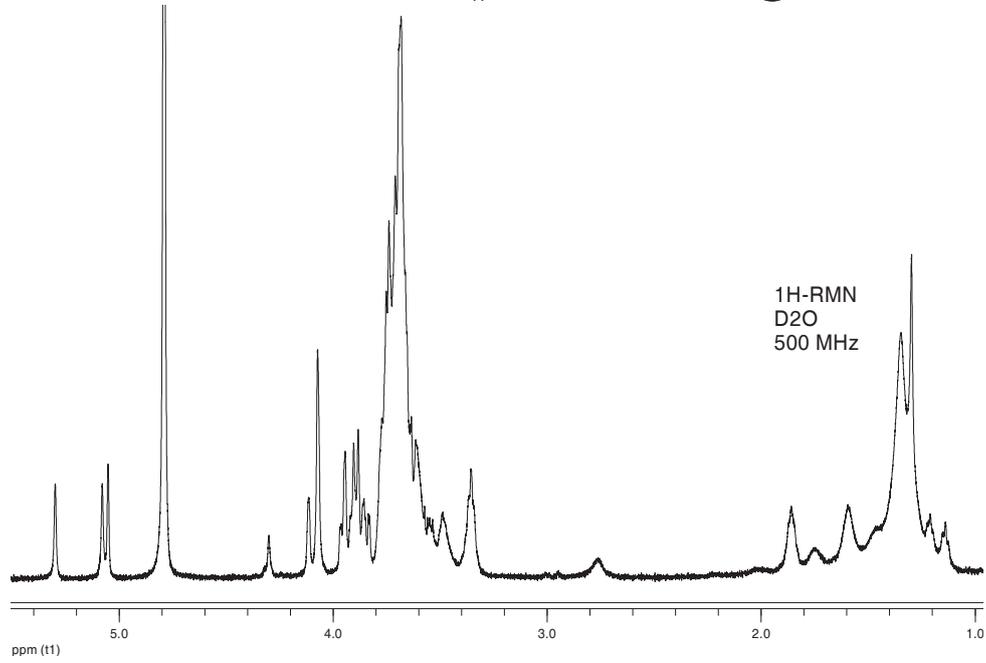
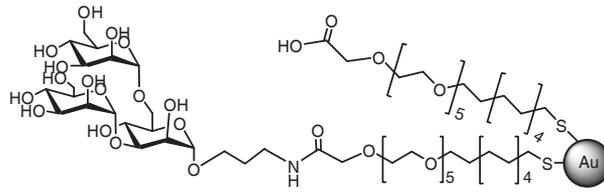
### 5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%)



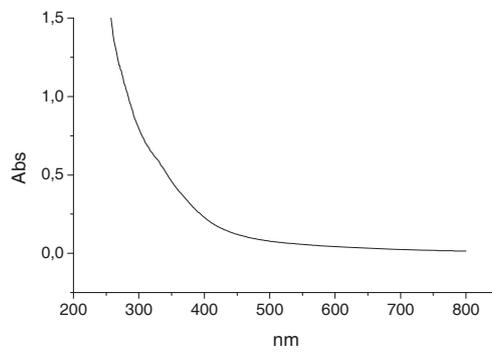
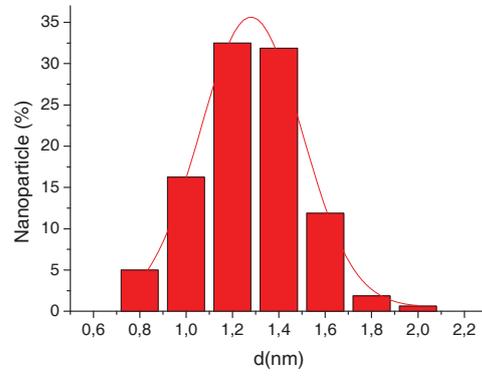
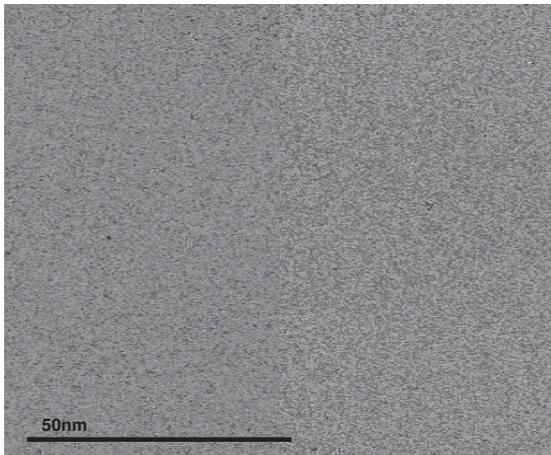
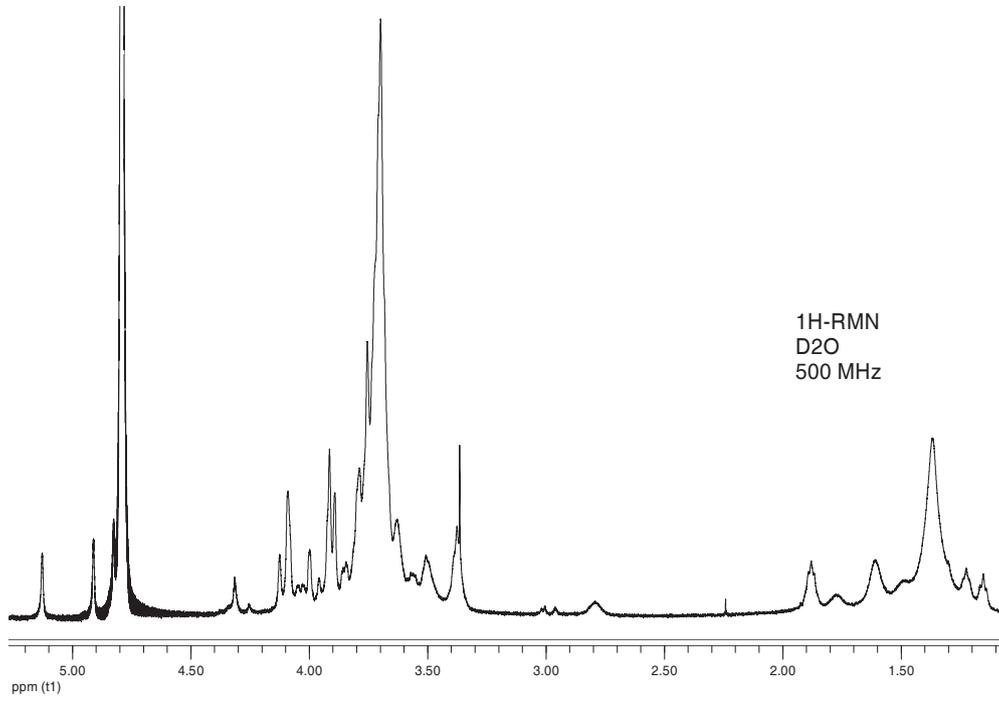
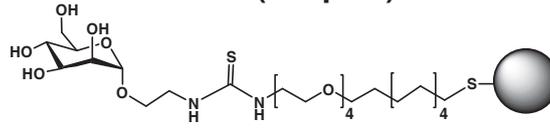
**6-Au-CO<sub>2</sub>H (50%)**



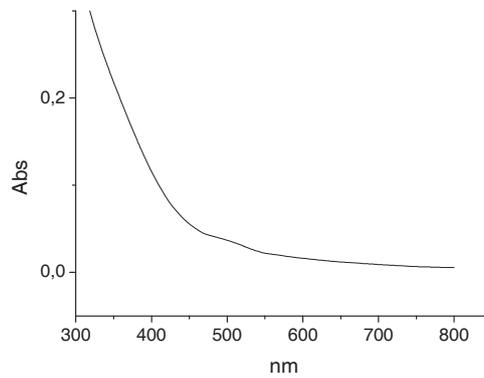
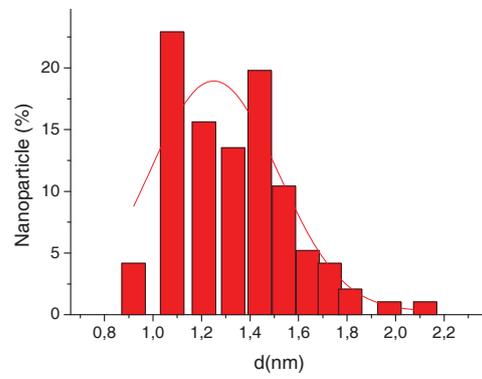
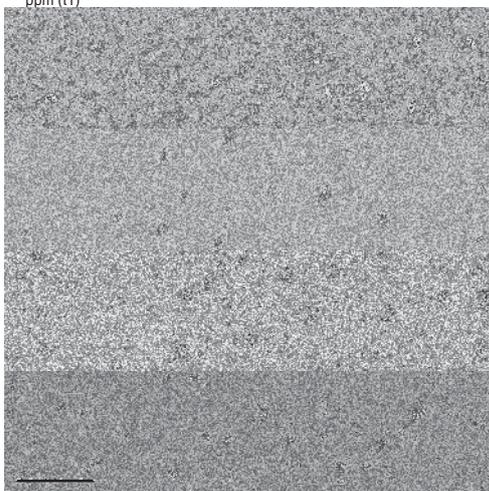
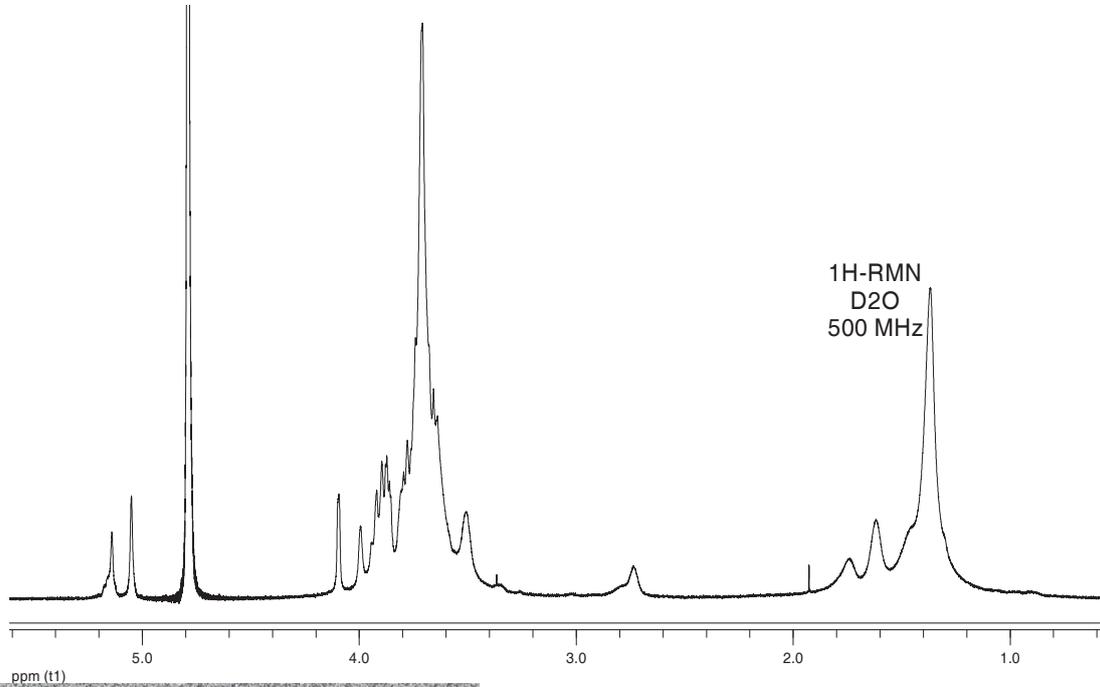
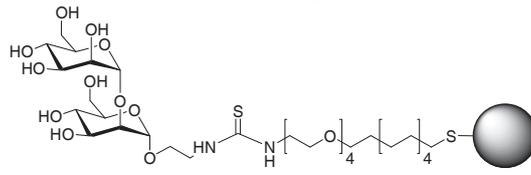
**8-Au-CO<sub>2</sub>H (50%)**



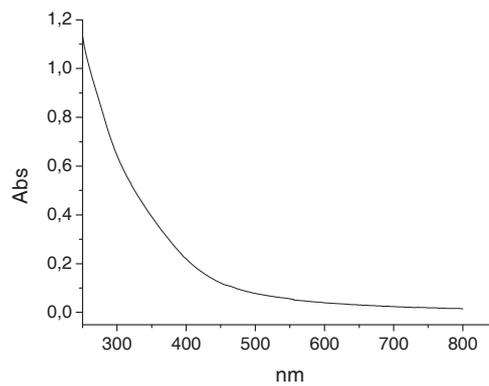
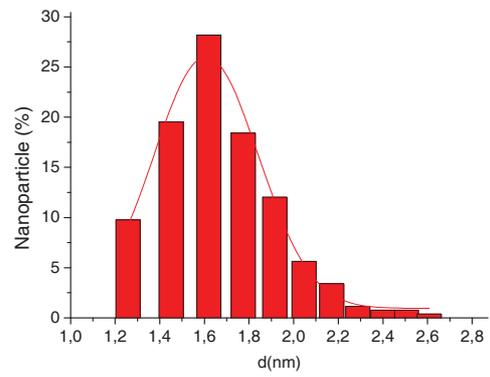
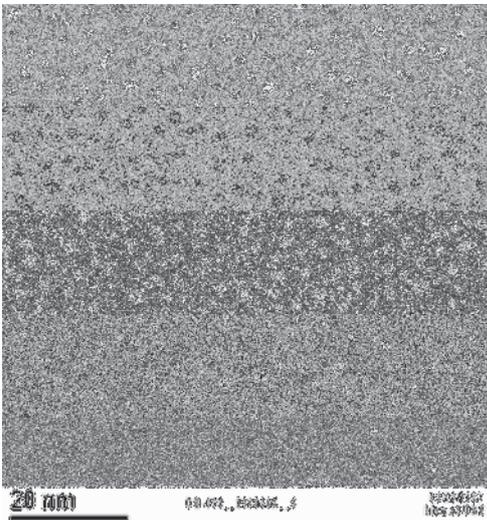
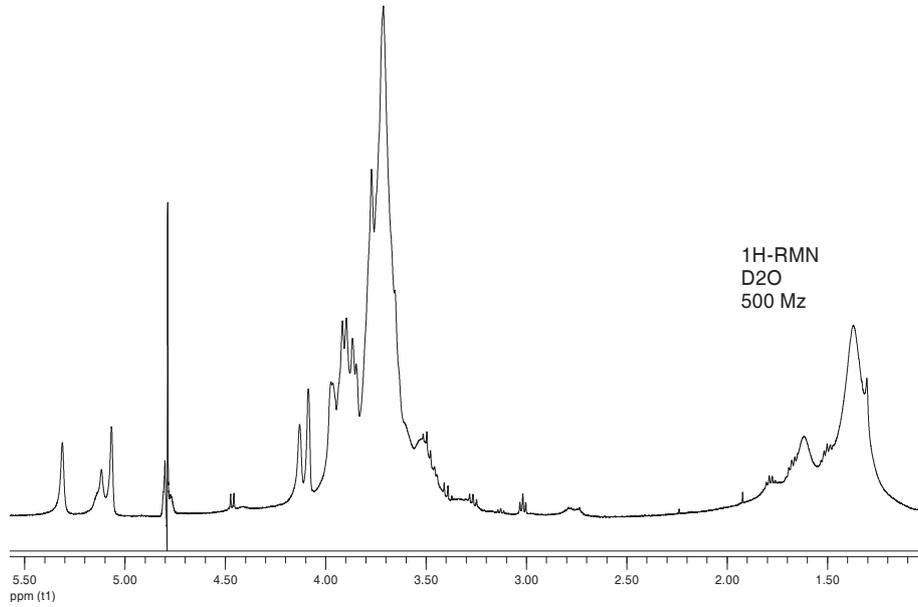
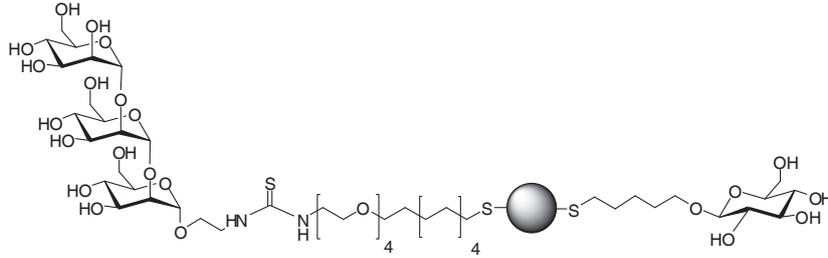
**9-Au (3 equiv.)**



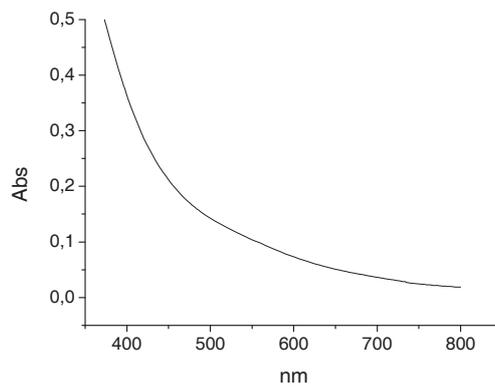
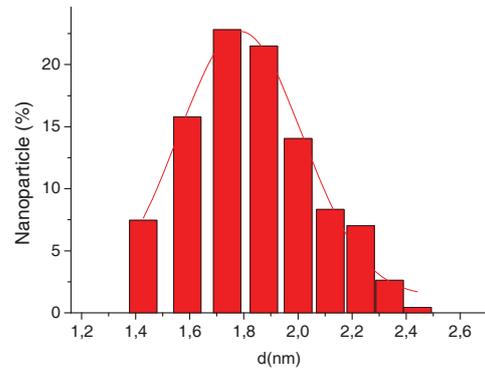
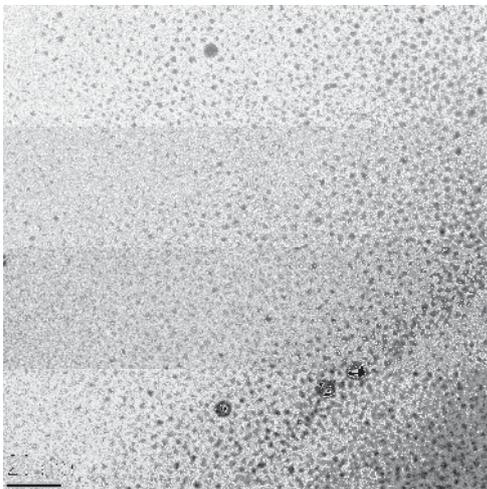
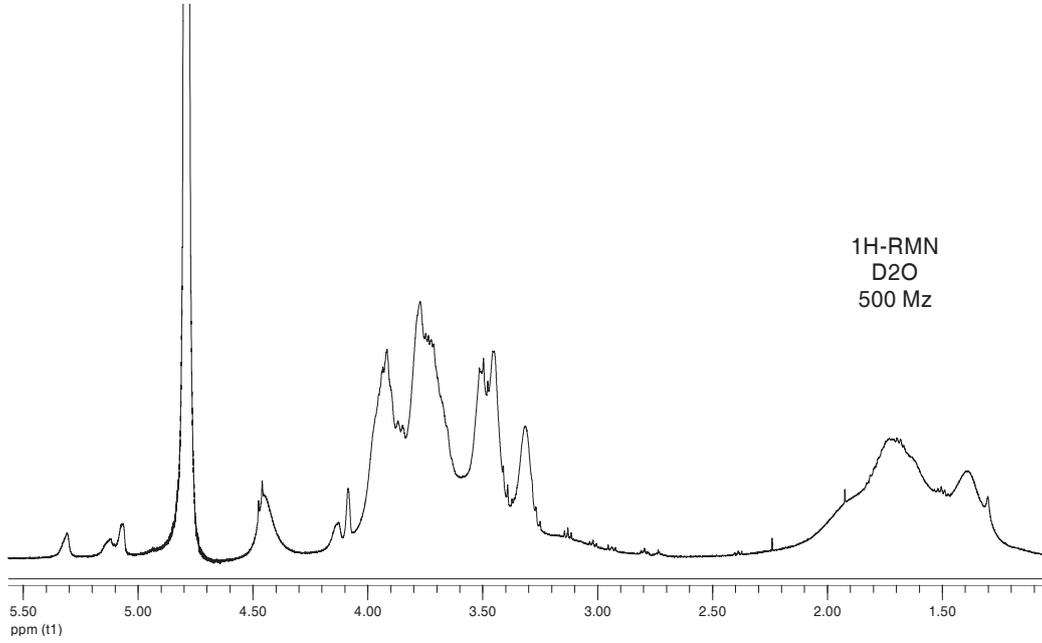
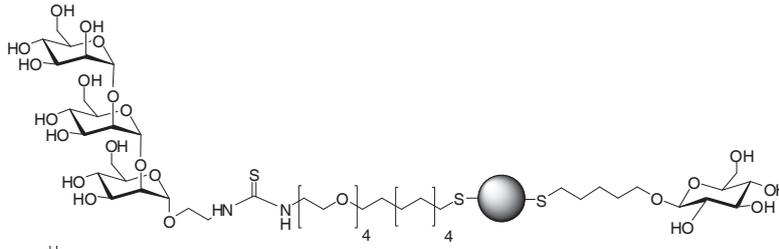
**10-Au**



### 11-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)

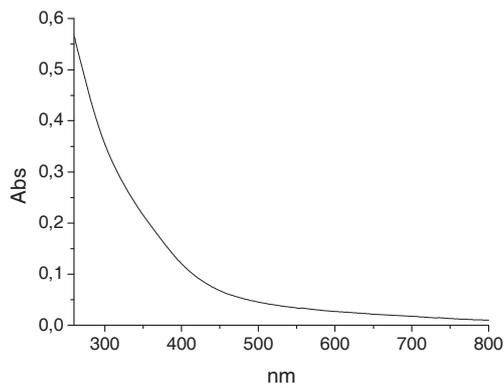
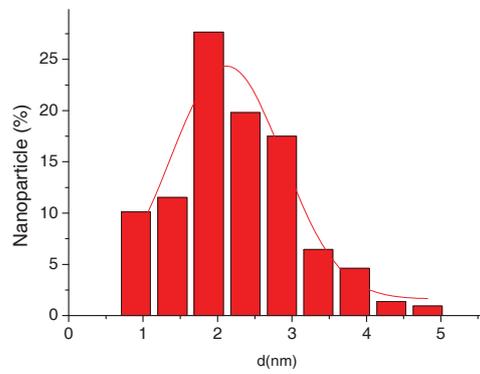
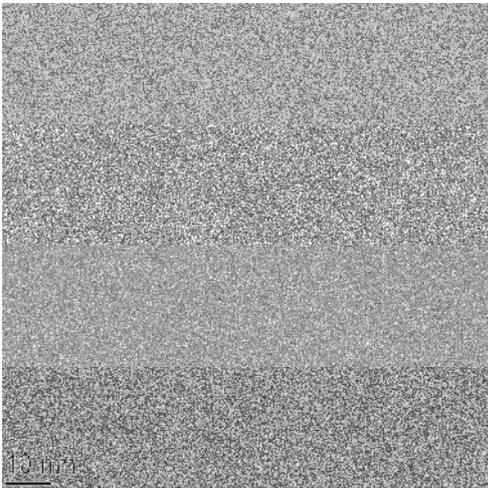
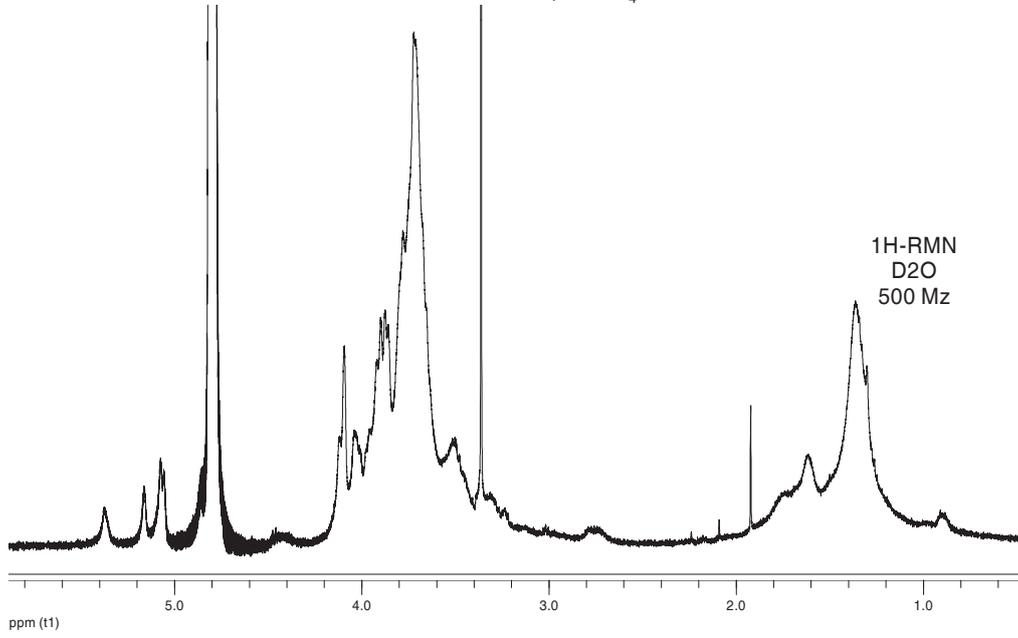
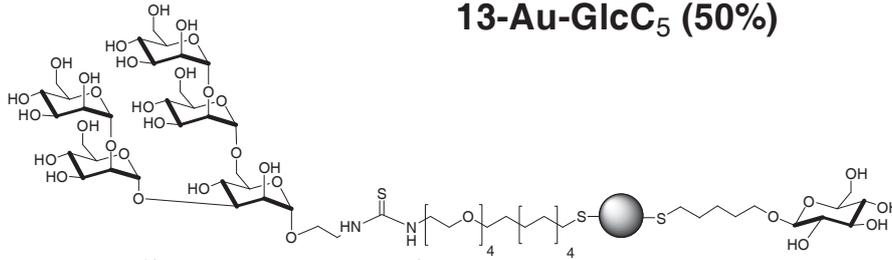


**11-Au-GlcC<sub>5</sub> (10%)**

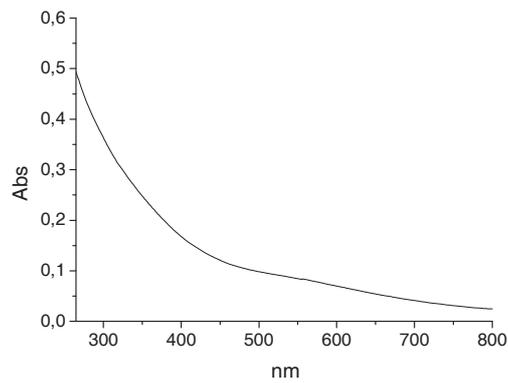
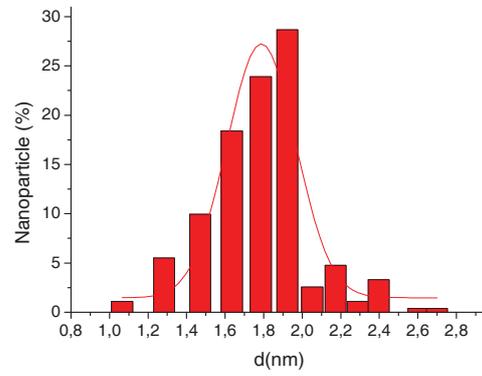
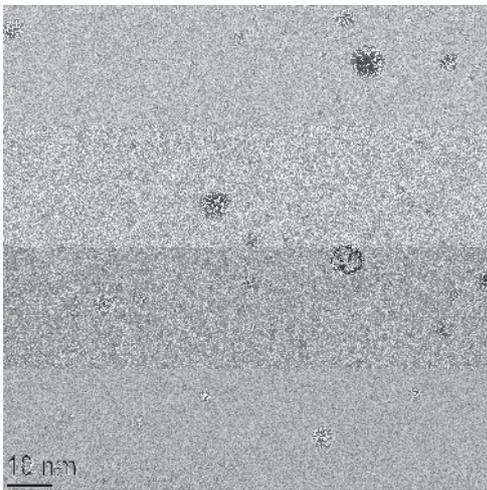
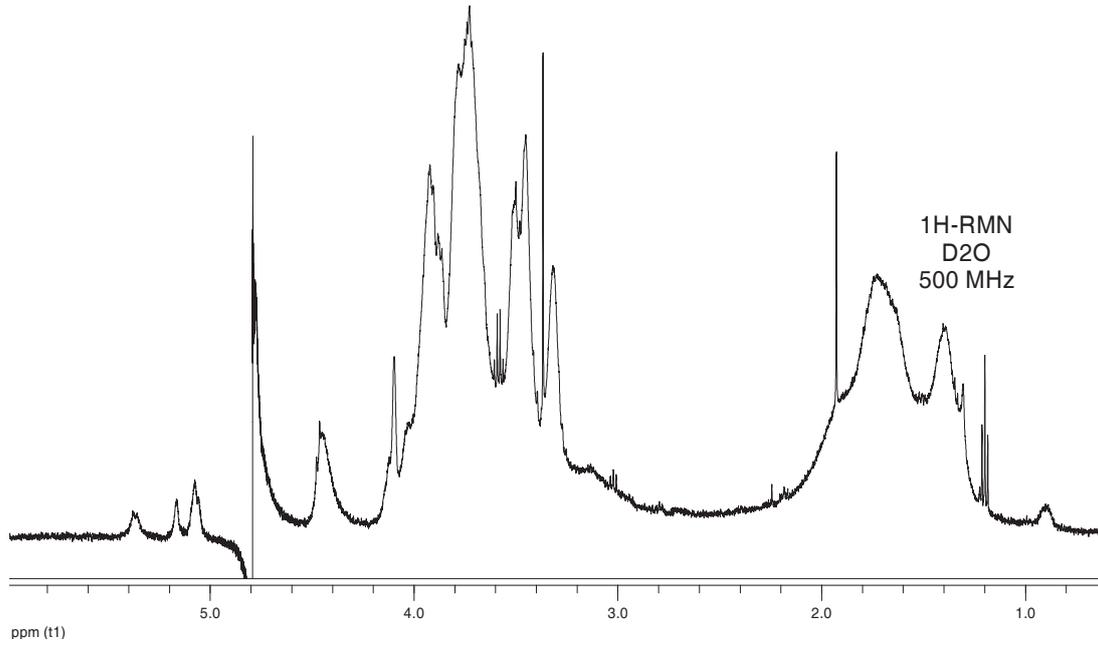
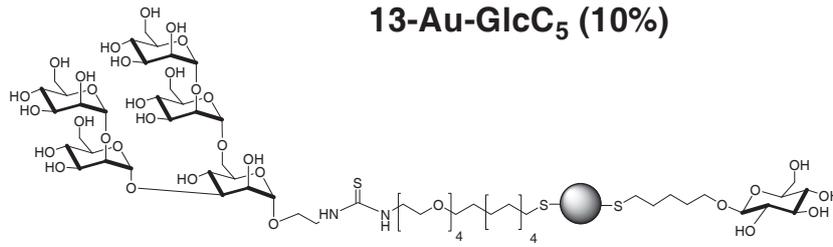




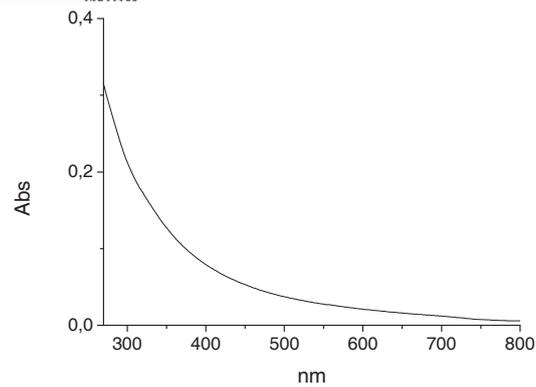
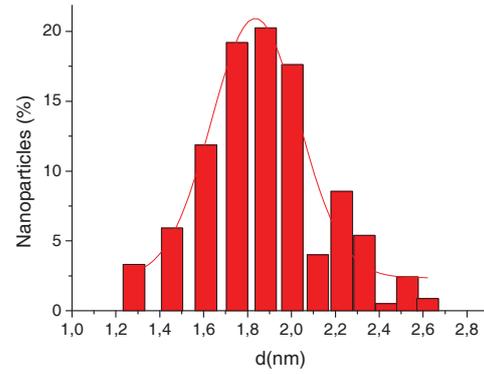
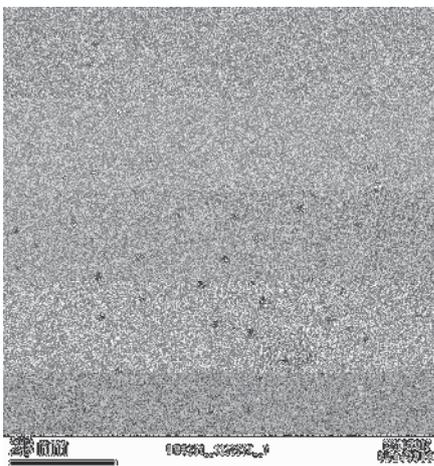
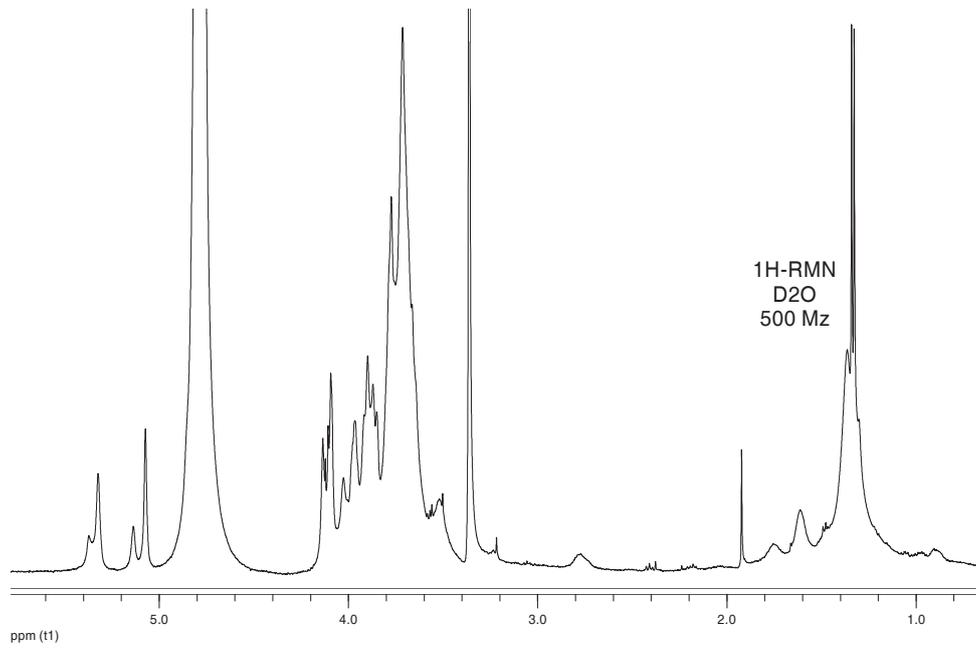
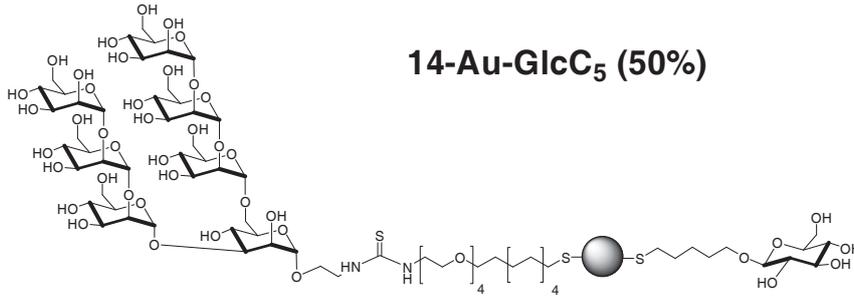
### 13-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)



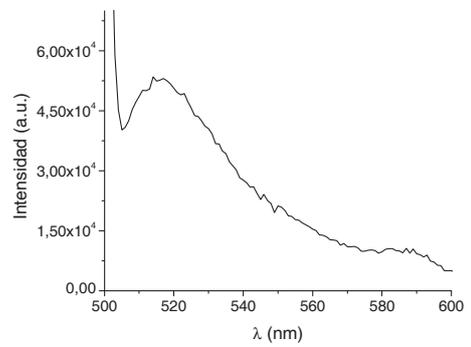
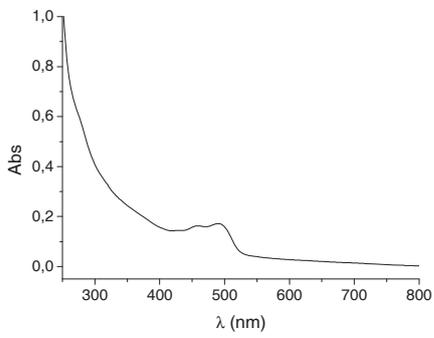
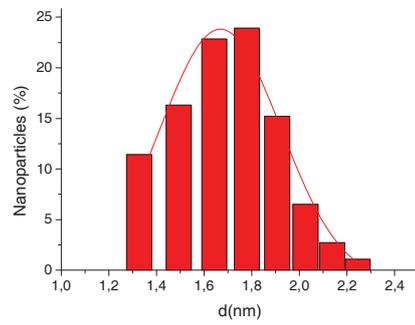
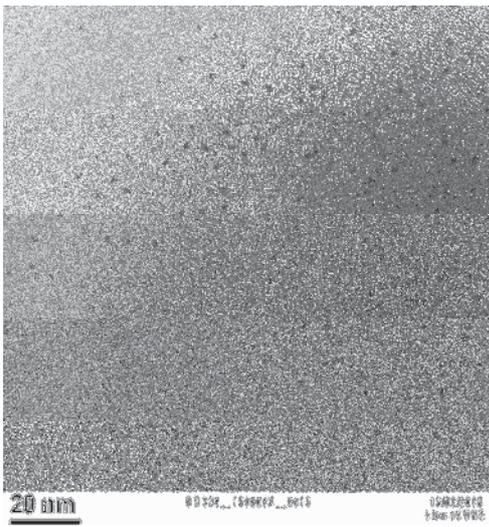
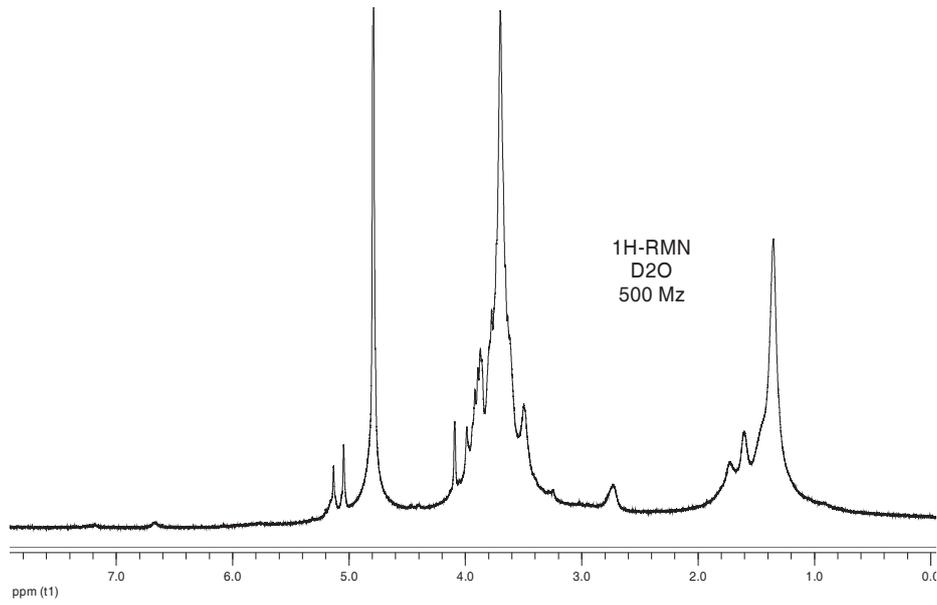
### 13-Au-GlcC<sub>5</sub> (10%)



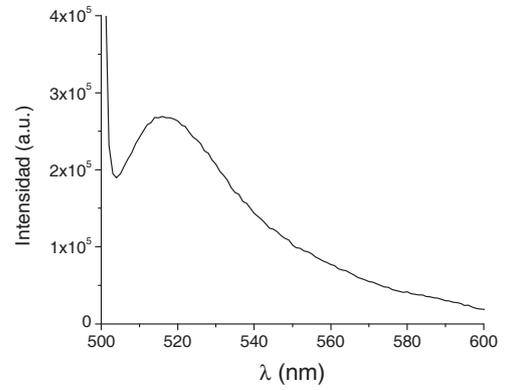
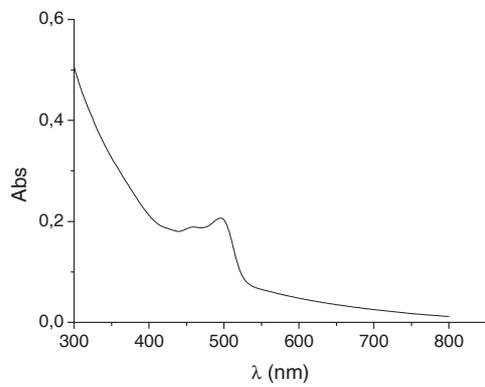
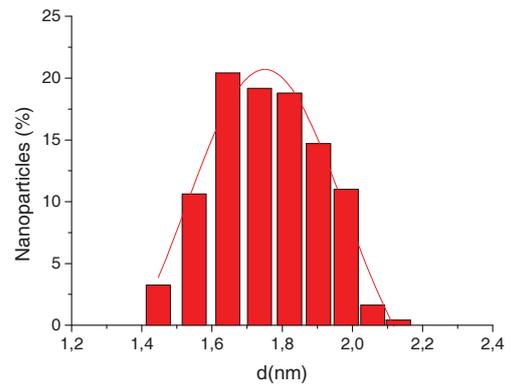
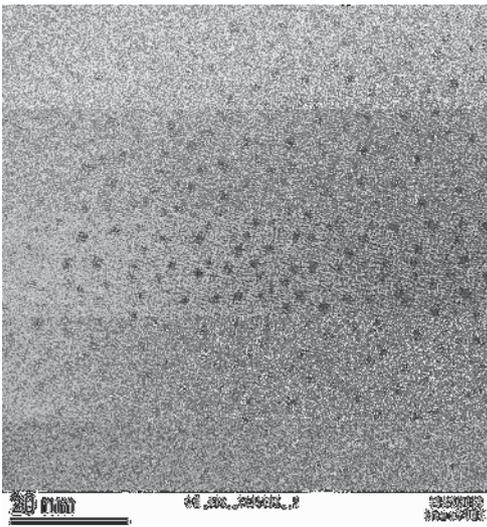
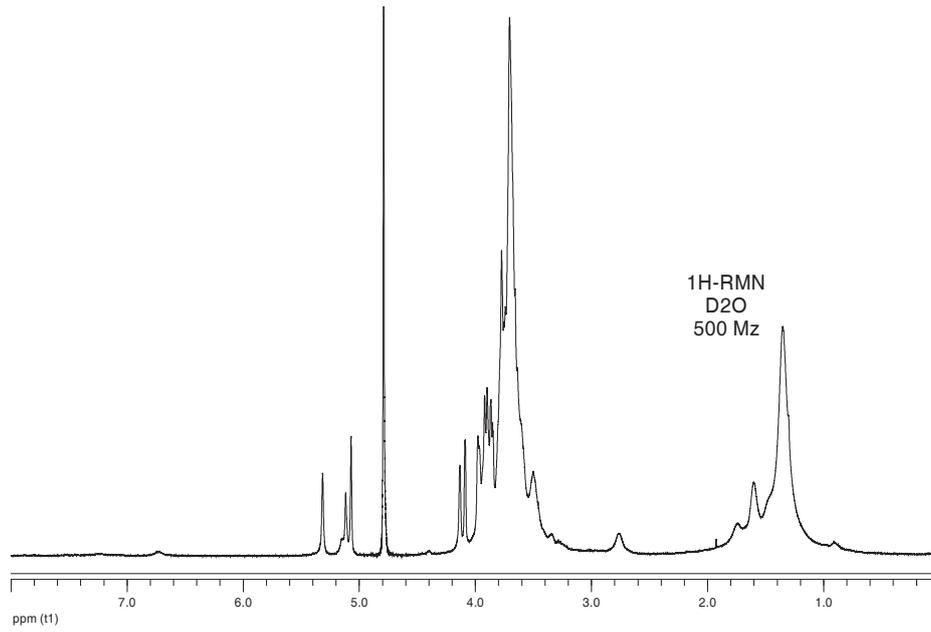
**14-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%)**



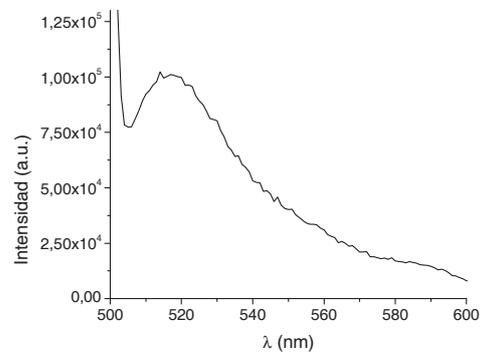
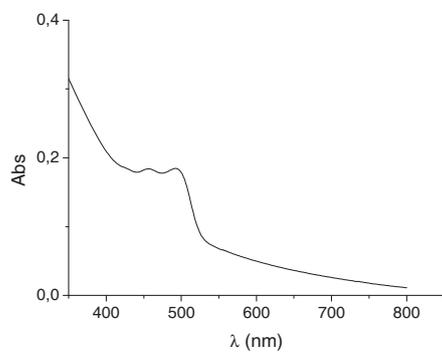
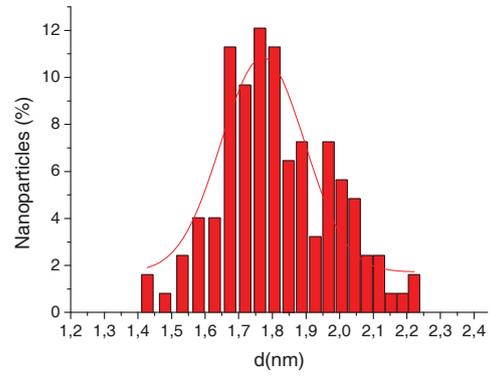
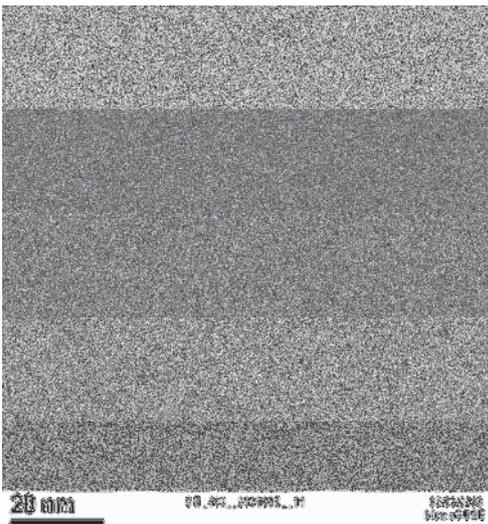
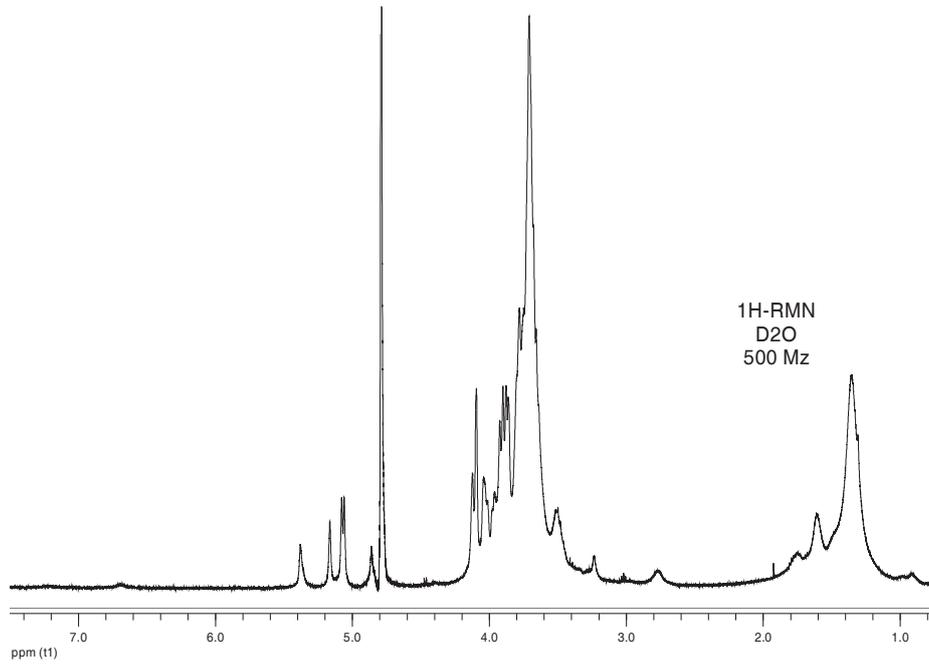
### 10-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC



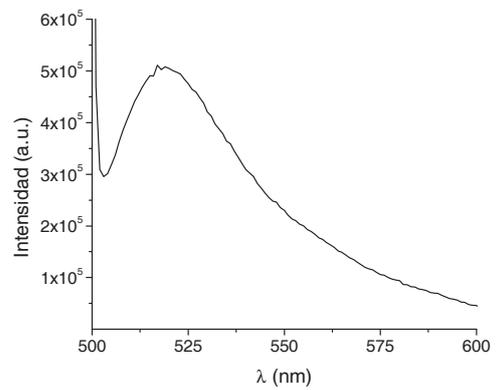
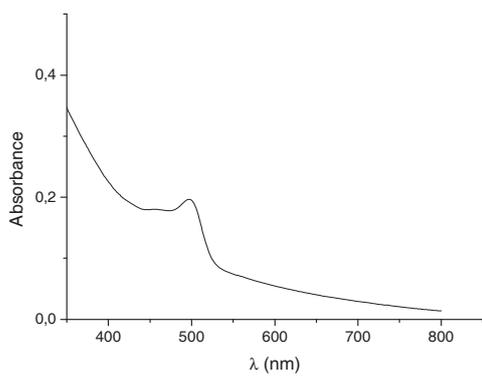
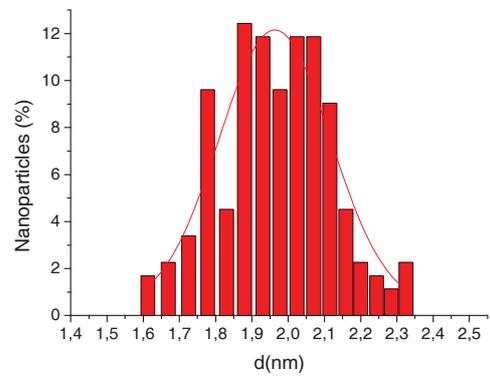
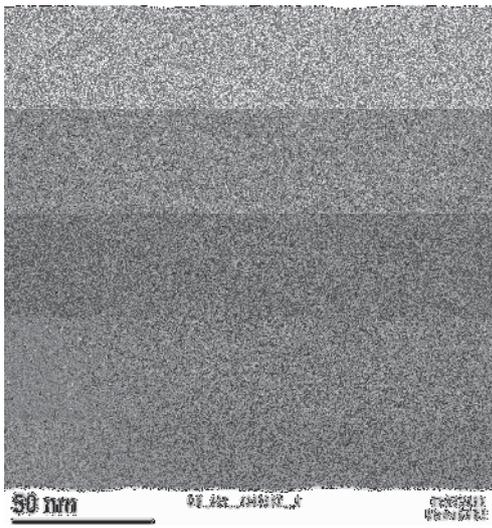
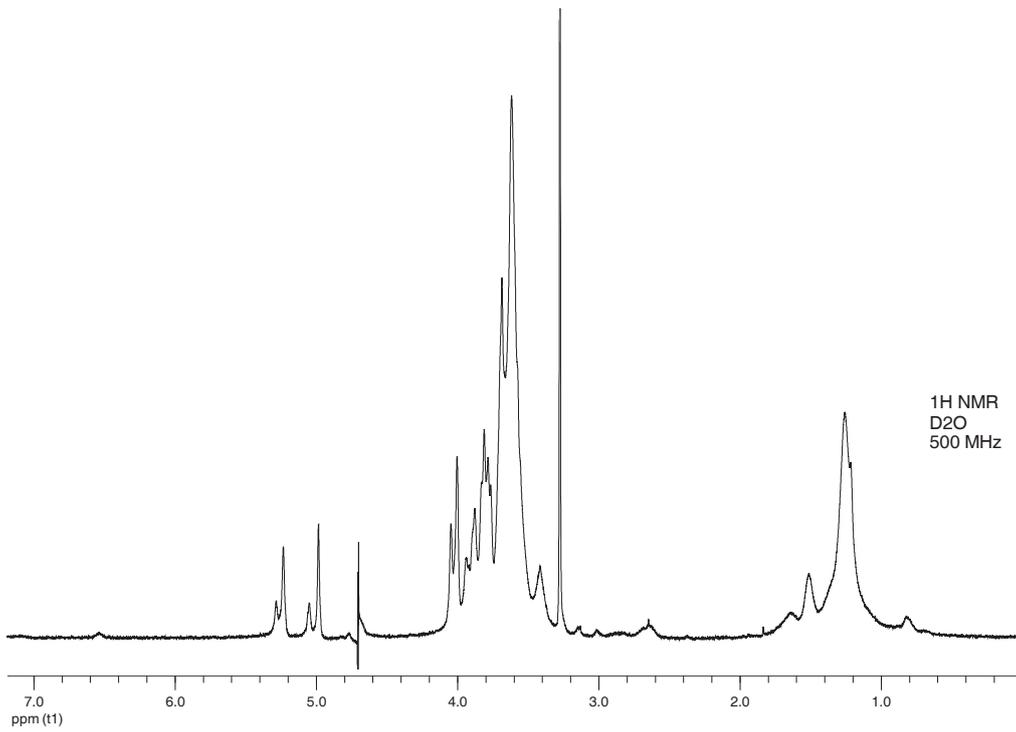
### 11-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC



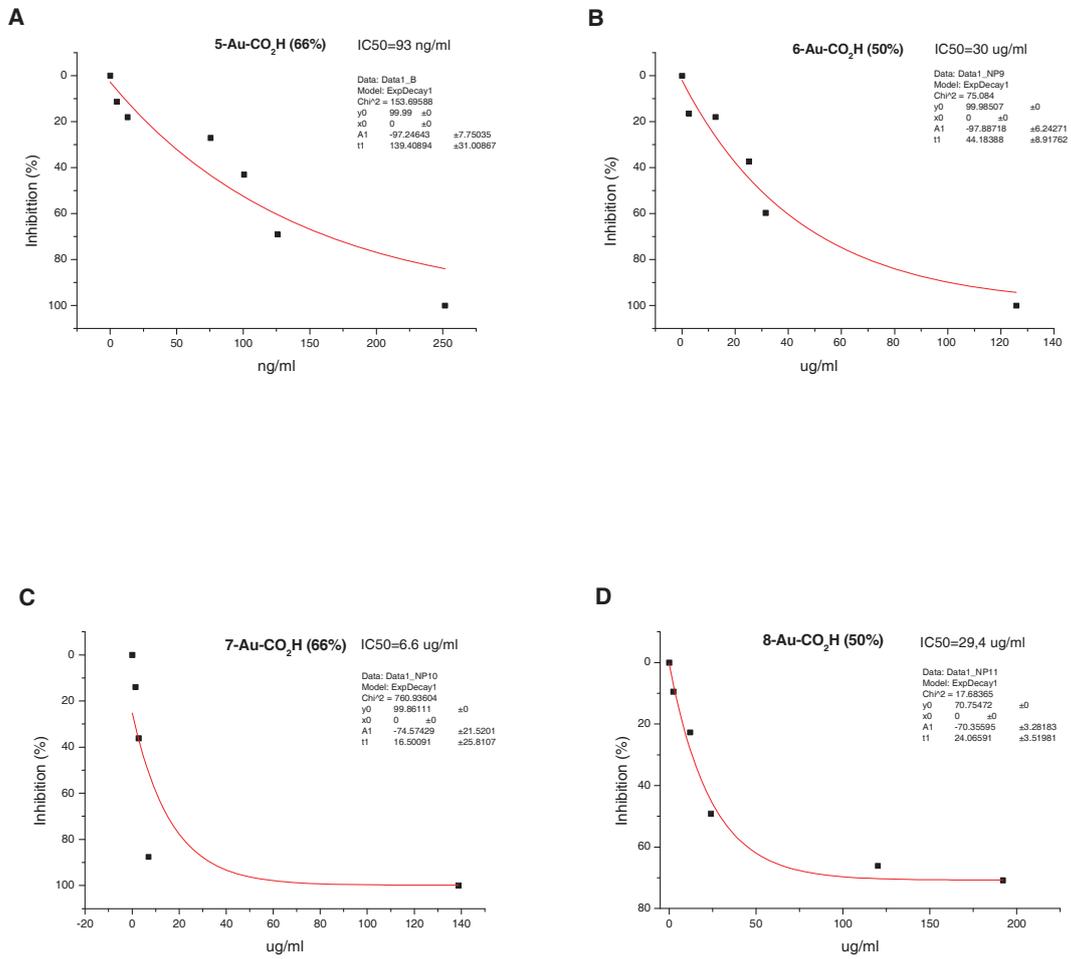
### 13-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC



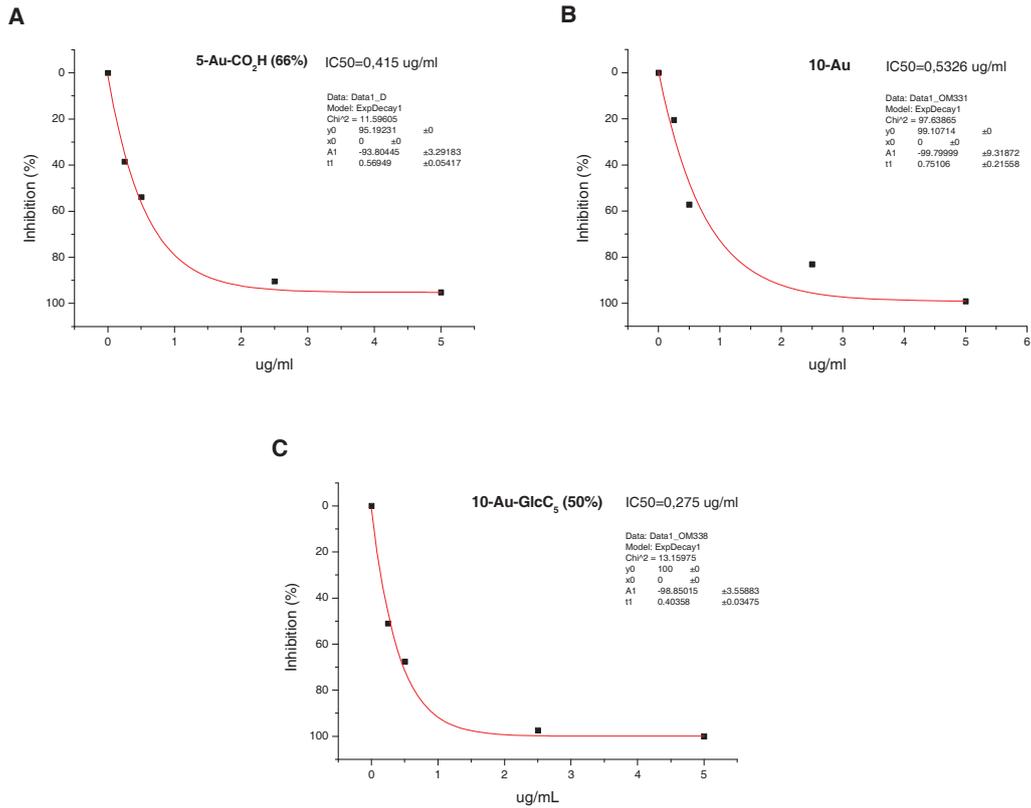
### 14-Au-GlcC<sub>5</sub>-FITC



### 3. Cálculo de IC50 por SPR



**Figura 1.** Concentración de *manno*-GNP que inhibe la unión DC-SIGN-CRD al 50%. A) 5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%); B) 6-Au-CO<sub>2</sub>H (50%); C) 7-Au-CO<sub>2</sub>H (66%); 8-Au-CO<sub>2</sub>H (50%).



**Figura 1.** Concentración de *manno*-GNP que inhibe la unión DC-SIGN-ECD al 50%. A) 5-Au-CO<sub>2</sub>H (66%); B) 10-Au; C) 10-Au-GlcC<sub>5</sub> (50%).





