Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

Síntesis y evaluación del trisacárido Gal*p*(α1→3)Gal*p*(β1→4)Glc*p*, como análogo del epítope αGal para el desarrollo de nuevos reactivos de diagnóstico para la enfermedad de Chagas basados en neoglicoconjugados

TESIS DE LICENCIATURA

TORO MELGAREJO, LINDA A.

Directora: **Dra. Marino, M. Carla.**

Departamento de Química Orgánica, FCEyN, UBA.

MARZO 2019

Resumen

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, la parasitosis humana de mayor prevalencia en América Latina, para la cual no existen vacunas o drogas apropiadas. El diagnóstico rutinario de esta enfermedad se basa en la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* mediante técnicas serológicas convencionales que presentan limitaciones en cuanto a su reproducibilidad, sensibilidad y especificidad, por lo cual, el desarrollo de nuevas herramientas y/o estrategias para la optimización del diagnóstico de la infección por *T. cruzi* es de interés prioritario.

El trisacárido D-Gal*p*(α1→3)-D-Gal*p*(β1→4)-D-GlcNAc conocido como αGal es considerado uno de los *gold* standard para el serodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos y para la determinación de la eficacia de drogas tripanocidas. En el marco de esta tesis de grado se planteó como objetivo específico la síntesis de un análogo de αGal en el cual la unidad terminal de GlcNAc es reemplazada por una unidad de Glc*p*.

Para la síntesis de dicho trisacárido se utilizó como material de partida lactosa, que ya contiene una de las uniones glicosídicas presentes en el producto. Luego de una secuencia de reacciones de protección selectiva de lactosa, se obtuvo un aceptor de glicosilo con la posición 3' libre, el cual se glicosidó con el tricloroacetimidato de tetra-*O*-Bn-α-D-Gal*p* para dar tolil D-Gal*p*(α1→3)-D-Gal*p*(β1→4)-1-desoxi-tio-D-Glc*p*. Posteriormente, se elaboró el extremo reductor para introducir un brazo espaciador con un grupo amino, para facilitar la posterior conjugación con proteínas o péptidos, y así dar lugar a neoglicoconjugados.

Así, se sintetizó el trisacárido 6-aminohexil D-Gal*p*(α1→3)-D-Gal*p*(β1→4)-D-Glc*p* mediante una secuencia de reacciones simple y eficiente. Este azúcar se conjugó utilizando el método del escuarato, por un lado, a BSA (albumina de suero bovino) y por otro a un péptido sintético antigénico. Con los neoglicoconjugados obtenidos se realizaron ensayos inmunológicos que permitieron la caracterización funcional de los mismos, y los señalan como muy apropiados para el desarrollo de herramientas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Synthesis and evaluation of Gal*p*-(α1→3)-Gal*p*-(β1→4)-Glc*p* as an analog of αGal epitope for the development of new diagnostic reagents for Chagas disease based on neoglycoconjugates

Abstract

Trypanosoma cruzi is the etiological agent for Chagas disease, the most prevalent parasitosis in Latin America, for which there isn't vaccines or appropriate drugs. The primary methods for diagnosing this disease are serological, based on antibody detection targeting *T. cruzi*, but these tests need for improvement in terms of reproducibility, sensitivity and specificity. Therefore, the development of new techniques and/ or strategies for the optimization of *T. cruzi* infection diagnosis is a priority issue.

The trisaccharide D-Gal*p*(α1→3)-D-Gal*p*(β1→4)-D-GlcNAc known as αGal is considered one of the gold standards for serological diagnosis of chronic phase patients and monitoring efficiency of antitrypanosomal drugs. This dissertation had as specific goal the synthesis of an analog of αGal in which GlcNAc terminal unit is replaced with a Glc*p* unit.

Lactose was used as starting material for the synthesis of this compound. After a sequence of selective protective reactions of lactose, a glycoside acceptor with free 3' position was obtained, which was then glycosylated with tetra-*O*-Bn-α-D-Gal*p* trichloroacetimidate resulting in tolyl D-Gal*p*(α1→3)-D-Gal*p*(β1→4)-1-deoxy-1-thio-D-Glc*p*. This trisaccharide was later activated for the introduction of a 6-aminohexyl linker as aglycone for further bioconjugation leading to neoglycoconjugates.

Thus, trisaccharide 6-aminohexyl D-Gal*p*-(α1→3)-D-Gal*p*-(β1→4)-D-Glc*p* was synthesized by a simple and efficient reaction sequence. This glycoside was conjugated using the squarate method, on the one hand to BSA (ovine serum albumin), and on the other to an antigenic synthetic peptide. With the neoglycoconjugates obtained, immunological tests were performed that allowed the functional characterization of them and they point them as very appropriate for the development of diagnostic tools for Chagas disease.

Índice

Resumen 2

Abstract 3

Abreviaturas 5

Introducción 7

Síntesis de glicósidos, oligosacáridos y glicoconjugados 9

Estereoselectividad de la reacción de glicosidación 11

Grupos protectores del donor: efecto del grupo participante 11

Efecto anomérico 12

Participación del solvente 14

Regioselectividad de la reacción de glicosidación 14

Antecedentes 16

Objetivos 21

Materiales y métodos 22

Cromatografía en capa delgada (c.c.d.) 22

Cromatografía en columna fase normal 22

Cromatografía en fase reversa 22

Cromatografía en columna de grafito 22

Poder rotatorio 22

Resonancia Magnética Nuclear 22

Espectros de Masa de Alta Resolución 23

Síntesis y caracterización 24

Preparación de geles para SDS-PAGE 38

Estudios inmunológicos 39

Soluciones 39

Detección colorimétrica 40

ELISA a punto final 40

Resultados y Discusión 43

Síntesis de 6-aminohexil α-D-Gal*p*-(1→3)-β- D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Glc*p* (8) 43

Conjugación de 6-aminohexil D-Gal*p*-(α1→3)-Gal*p*-(β1→4)- Glc*p* (8) 51

Conclusiones 65

A futuro 65

Bibliografía 66

Agradecimientos 72

Abreviaturas

ANOVA: análisis de varianza

APS: persulfato amónico

Ar: Argón

BF_3Et_2O: trifluoro boro eterato

BSA: albumina de suero bovino

Bu_2SnO: óxido de dibutil estaño

BzCl: cloruro de benzoilo

c.c.d: cromatografía en capa delgada

CH_2Cl_2: diclorometano

CH_3CN: acetonitrilo

CH_3OH / MeOH: metanol

DDQ: 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: ditiotreitol

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

ESI: ionización por electrospray

Et_3N: trietilamina

EtOAc: acetato de etilo

Gal*p*: galactopiranosa

GlcNAc: N-acetilglucosamina

Glc*p*: glucopiranosa

H_2O_2: agua oxigenada

HAI: hemaglutinación indirecta

HCl: ácido clorhídrico

HRP: peroxidasa de rabanito

IFI: inmunofluorescencia indirecta

MALDI-TOF: desorción/ionización láser asistida por matriz

MS: espectrometría de masa

Na_2CO_3: carbonato de sodio

$Na_2S_2O_4$: hidrosulfito de sodio

Na_2SO_4: sulfato de sodio

$NaHCO_3$: bicarbonato de sodio

NaOAc: acetato de sodio

NaOMe: metóxido de sodio

NBu_4I: ioduro de tetra-n-butilamonio

NIS: N-iodosuccinimida

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAS: periodic acid Schiff

PBS: tampón fosfato salino

PBS-T: PBS conteniendo 0,05% de Tween 20

Pd/C: paladio sobre carbono

PMBCl: cloruro de 4-metoxibencilo

Py: piridina

Rf: relación de frente

RMN: resonancia magnética nuclear

SD: desvío estandar

SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.

SN: sustitución nucleofílica

ss: solución saturada

TBDPS: tert-butildifenllsililo

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

TfOH: ácido trifluorometansulfónico

THF: tetrahidrofurano

TMB: 3,3'-tetra-metilbencidina

TMSOTf: trimetilsililtriflato

Introducción

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, la parasitosis humana de mayor prevalencia en América Latina, para la cual no existen vacunas o drogas apropiadas [1]. Esta enfermedad está incluida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre de las 13 enfermedades tropicales desatendidas. En la actualidad, afecta a unos 8 millones de personas en 21 países y se propaga a través de la migración a varias regiones no endémicas, siendo un problema importante para la salud publica en Latinoamérica [2].

La Enfermedad de Chagas es trasmitida o bien por el contacto con el insecto vector infectado (hemípteros de la subfamilia *Triatominae,* popularmente conocidos como vinchucas), congénitamente, por trasplante de órganos o transfusión de sangre de un donante infectado o, en casos aislados, por ingesta de alimentos o bebidas contaminadas por el parasito [3].

La enfermedad de Chagas presenta dos etapas o fases clínicas: la fase aguda y la fase crónica. Inicialmente la infección con *T. cruzi* dura alrededor de 4-8 semanas y la fase crónica persiste por el resto de la vida del portador. Ambas etapas pueden ser asintomáticas para los portadores.

Los métodos de diagnóstico de la enfermedad varían según la etapa clínica. Durante la fase aguda los pacientes presentan parasitemia, por lo que los estudios se centran en la búsqueda y reconocimiento del *T. cruzi* mediante la observación de sangre fresca al microscopio o por un frotis de sangre. Por otro lado, durante la etapa crónica la replicación del parásito se mantiene controlada mediante el sistema inmune [4]. La detección directa del mismo resulta dificultosa, costosa y lenta, ya que requiere métodos de amplificación biológica (PCR cuantitativa, hemocultivo y xenodiagnóstico) además de infraestructura con condiciones de bioseguridad adecuadas [5]. Más importante aún es señalar que estos métodos proveen resultados positivos solo en una proporción de los pacientes positivos por ensayos serológicos, lo cual limita su utilidad para diagnóstico de la enfermedad o monitoreo de la eficacia del tratamiento.

Debido a las limitaciones que presentan las técnicas parasitológicas y moleculares, el diagnóstico rutinario de esta enfermedad se basa en la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* mediante técnicas serológicas convencionales, como son la

inmunofluorescencia indirecta (IFA), la hemaglutinación indirecta (HAI) y el ELISA [5]. Los test existentes, sin embargo, tienen limitaciones en cuanto a su reproducibilidad, sensibilidad y especificidad, y en algunos casos no son aplicables [5]. En este contexto, el desarrollo de nuevas herramientas y/o estrategias para la optimización del diagnóstico de la infección por *T. cruzi* es de interés prioritario [6].

Las mucinas son las glicoproteínas más abundantes en la superficie de *T. cruzi*, tanto en los estadios del insecto como en las formas tripomastigote. *T. cruzi* dispone de una serie de características biológicas que lo hacen particularmente atractivo para el desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico, como ser: i) los glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos) constituyen las moléculas más abundantes y funcionalmente relevantes de su cubierta antigénica [7,8], ii) los oligosacáridos presentes en estos glicoconjugados son blancos atractivos para la intervención, ya que presentan estructuras, y en algunos casos también biogénesis, diferenciales respecto de los del hospedador humano [9] y iii) algunos de los oligosacáridos presentes en la cubierta de *T. cruzi* son muy inmunogénicos [10].

El trisacárido D-Gal*p*-(α1→3)-D-Gal*p*-(β1→4)-D-GlcNAc (**1**), conocido como αGal, es la estructura antigénica mínima encontrada en mucinas de las formas tripomastigote. Se ha demostrado que los anticuerpos contra αGal representan el 1 % de los IgG en humanos. A diferencia de otros mamíferos los humanos no expresan el epítope αGal libre en sus células, por lo cual es un epítope altamente inmunogénico. El mismo se encuentra también en bacterias Gram negativas de la flora intestinal, lo que explica por qué algunos pacientes sanos presentan un cierto título de estos anticuerpos. No obstante, los sueros de chagásicos muestran un título mucho mayor de los anticuerpos producidos contra el epítope terminal αGal presente en GPI-mucinas únicamente del estadio tripomastigote de *T. cruzi* [11].

A pesar de esta aparente 'baja especificidad', αGal es considerado uno de los *Gold standard* para el serodiagnóstico de pacientes chagásicos crónicos y para la determinación de la eficacia de drogas tripanocidas [5]. Más importante aún, la presencia de anticuerpos anti-αGal tiene implicancias funcionales en la infección [12,13]. La necesidad de disponer de grandes cantidades de formas infectivas de *T. cruzi* y la utilización de costosos y laboriosos protocolos de purificación desalientan la utilización de este reactivo a escala más allá de la experimental [8].

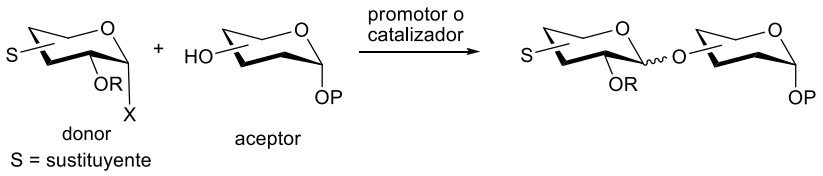
Recientemente, se demostró que neo-glicoconjugados conformados por un epítope αGal sintético acoplado a seroalbúmina bovina (BSA) o distintas plataformas 'carrier' (partículas tipo virales o VLP, esferas electromagnéticas, etc.) tienen un alto potencial para el desarrollo de reactivos diagnósticos y vacunas contra la enfermedad de Chagas y otras enfermedades relevantes causadas por protozoarios [14–16]. Por ejemplo, en un estudio reciente se evaluaron disacáridos de α-D-galactopiranosilo sintéticos con sueros de pacientes chagásicos crónicos y confirmaron por ELISA que el disacárido D-Gal*p*-(α1→3)-D-Gal*p* es un glicótopo inmunodominante [11].

A su vez una neoglicoproteína resultante de la conjugación de **1** y BSA (D-Gal*p*-(α1→3)-D-Gal*p*-(β1→4)-α-D-GlcNAc-BSA) se utilizó recientemente en ensayos de inmunización de ratones knock out para α-1,3-galactosiltransferasa que no expresan el epítope terminal αGal en sus células, obteniendo anticuerpos líticos contra dicho epítope. Más aún, se realizaron estudios en donde se determinó que dichos anticuerpos sólo reconocen al trisacárido de **1**, pero no a sus versiones truncadas de Galp(β1-4)GlcNAc-BSA y GlcNAc-BSA, determinándose entonces que la unidad terminal αGal es crucial para la inmugenicidad [17].

Síntesis de glicósidos, oligosacáridos y glicoconjugados

El reconocimiento del rol que los oligosacáridos y glicoconjugados juegan en los procesos biológicos ha llevado a una demanda de procedimientos confiables para su síntesis. La síntesis de glicósidos, oligosacáridos y glicoconjugados involucra la formación de uniones glicosídicas. Esto presenta más dificultades que la formación de uniones entre los monómeros de otras biomoléculas, como las proteínas o los ácidos nucleicos, pues deben tener una regioquímica y una estereoquímica particular.

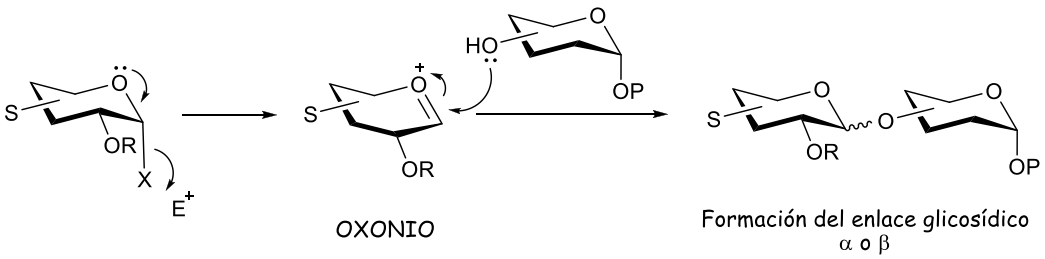
En las reacciones de glicosidación un donor de glicosilo reacciona con un aceptor, que puede ser un alcohol u otro azúcar, para formar un enlace glicosídico (Esquema 1).



Esquema 1

En el Esquema 2 se describe el mecanismo comúnmente aceptado para la reacción de glicosidación. Generalmente la reacción ocurre sobre un carbono secundario (el C-1 del donor), con la participación de un nucleófilo débil, el OH del azúcar aceptor, por lo que suele seguir un mecanismo S_N1. Sin embargo, dependiendo de la capacidad del donor para estabilizar la carga positiva desarrollada en el intermediario oxonio, y de las condiciones de reacción, la reacción puede cursar un mecanismo S_N2. En general se acepta que el mecanismo de cualquier reacción de glicosidación está incluido en el continuo entre una S_N1 y una S_N2 [18].

En ocasiones la salida del sustituyente de C-1 debe ser asistida por un promotor o catalizador, dependiendo del precursor de glicosilo que se utilice, para dar lugar a la formación del ion oxonio intermediario. En este intermediario el carbono anomérico posee una hibridización sp^2, por lo que el ataque del nucleófilo o aceptor puede suceder con igual probabilidad tanto por la cara β como por la cara α, dando lugar a enlaces glicosídicos 1,2-*trans* o 1,2-*cis*, respectivamente [19]. El sustituyente del carbono anomérico del donor puede transformarse en otro cuya salida esté más favorecida, y de esta forma activarlo para la reacción de glicosidación, o transformarlo en un donor activado. De las distintas formas de activar el precursor, y de los distintos donores de glicosilo, surgen los diferentes métodos de glicosidación.



Esquema 2

Estereoselectividad de la reacción de glicosidación

La estereoquímica del producto de glicosidación será resultado del método de glicosidación que se utilice, además de otros factores como ser: los grupos protectores del donor, el solvente utilizado, las características del aceptor utilizado (grupos protectores, posición del OH libre, etc.), el promotor o catalizador, la temperatura de la reacción, entre otros. A continuación, se desarrollarán brevemente algunos de estos factores, considerados los más relevantes.

Grupos protectores del donor: efecto del grupo participante

Los donores de glicosilo pueden clasificarse en aquellos que poseen un grupo participante y los que poseen un grupo no participante en el OH-2. En la mayoría de los casos, un activante, ya sea promotor o catalizador, asiste la salida del grupo saliente anomérico para formar un catión glicosilo **I**. En ausencia de un grupo participante en C-2, la única posibilidad de estabilizar intramolecularmente este catión formado es por deslocalización de los electrones del O del heterociclo, dando lugar al ion oxocarbenio **II** (Figura 1). Los grupos no participantes más comúnmente utilizados son bencilos (OBn) para azúcares neutros y azidas (N_3) para 2-amino-2-desoxi azúcares.

Los enlaces 1,2-*trans* pueden formarse estereoselectivamente en virtud de la asistencia anquimérica o participación de un grupo vecino. Generalmente se utiliza un residuo acilo como *O*-acetilo (OAc), *O*-benzoílo (OBz), 2-ftalimido (NPhth) y otros [20–22]. En este tipo de glicosidaciones se postula la existencia de un ion aciloxonio tipo 1,2 dioxolano (**V**) como una tercera estructura de resonancia. En este caso el ataque de un nucleófilo (alcohol, aceptor glicosídico) sólo es posible por la cara opuesta al anillo dioxolano, formando el glicósido 1,2-*trans*. Ocasionalmente, también se forman cantidades apreciables de glicósidos 1,2-*cis*, principalmente cuando se utilizan como aceptores alcoholes poco reactivos o el grupo participante presente en C-2 es un nucleófilo débil.

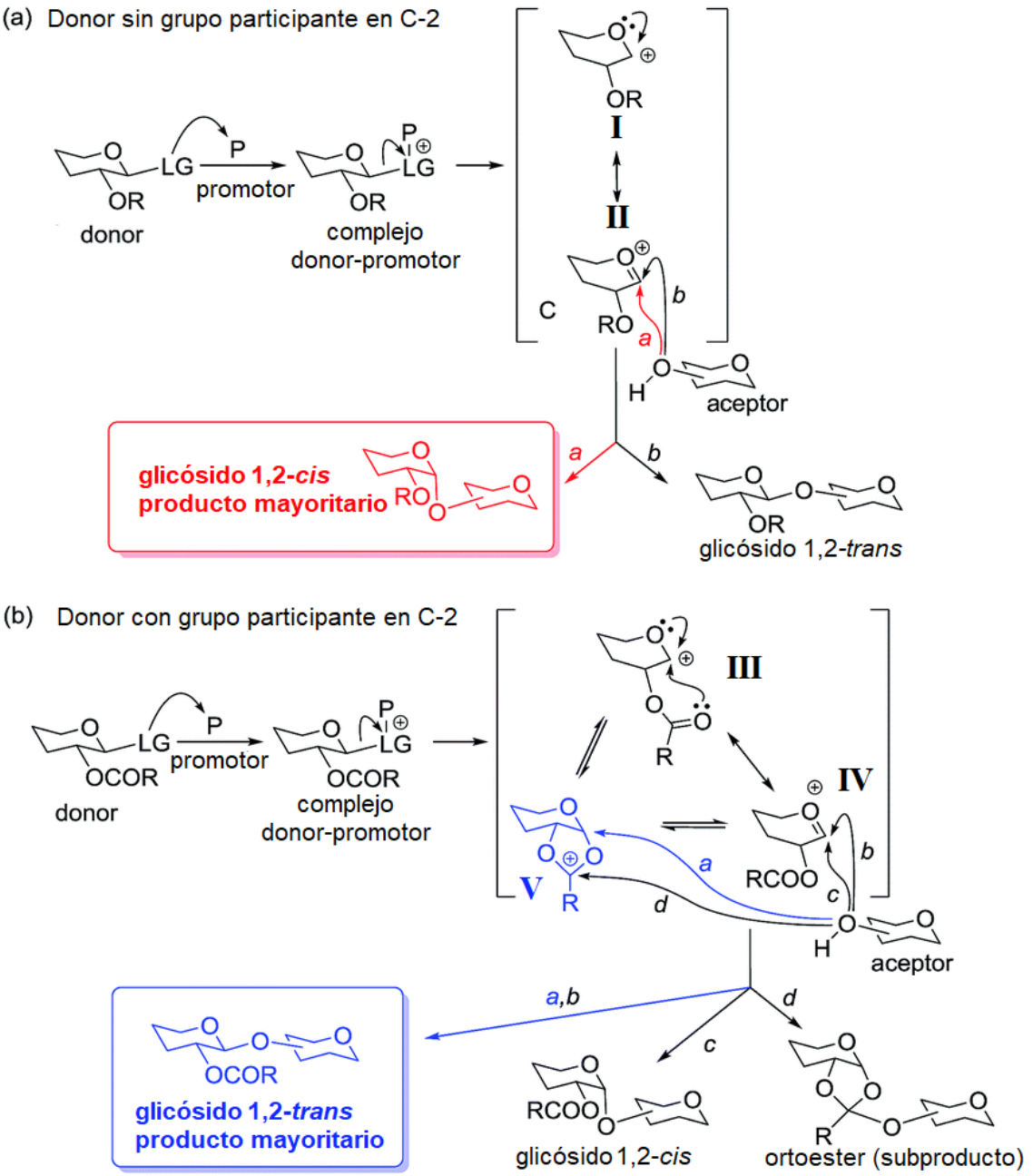


Figura 1 – Mecanismos de glicosidación para donores con grupo participante o no participante en C-2.

Efecto anomérico

El análisis conformacional de un ciclo de seis miembros indica que una conformación con un sustituyente en posición ecuatorial está favorecida energéticamente frente a una con el sustituyente en posición axial. Esto se debe a las interacciones 1,3-diaxiales del sustituyente con los hidrógenos del anillo, que son más desestabilizantes aun cuando el sustituyente es más voluminoso. Sin embargo, en

piranósidos esto sólo se observa en el caso de los hemiacetales, donde la orientación β del sustituyente anomérico está favorecida por la estabilización debida a un puente de hidrógeno intramolecular con el O-5. Por el contrario, cuando hay un sustituyente electronegativo distinto a OH en el centro anomérico, la orientación preferida es la axial. Esta tendencia de los sustituyentes electronegativos de C-1 de piranósidos a ocupar preferentemente una posición axial fue descripta por primera vez por Edward y luego por Lemieux y Chü, y se denomina "efecto anomérico" [23]. La influencia del efecto anomérico en los productos de glicosidación ha sido discutida en numerosos estudios [24–26]. Se han propuesto varios modelos para explicar el efecto anomérico, uno de los cuales propone que su origen sería la desestabilización de los sustituyentes ecuatoriales debido a interacciones dipolo-dipolo desfavorables, causadas por los pares de electrones no compartidos del oxígeno del anillo y del heteroátomo en C-1 (Figura 2-a) [27]. Una visión alternativa es la estabilización debido a un solapamiento favorable entre el orbital que posee el par de electrones no compartido del oxígeno del ciclo y el orbital σ* del enlace entre C-1 y el sustituyente electronegativo (Figura 2-b) [28,29]. También se ha sugerido un efecto hiperconjugativo, que podría explicar las longitudes del enlace levemente reducidas entre el O del anillo y el C anomérico (Figura 2-c) [30]. Dado que el C-1 posee dos átomos de oxígeno, se ha sugerido también un efecto exo-anomérico [31] en base al mismo tipo de razonamiento (Figura 2-e).

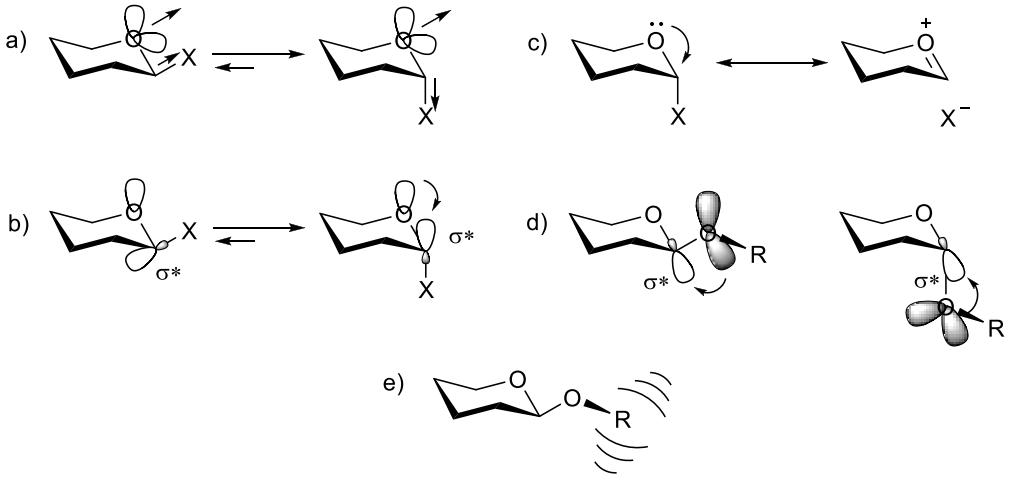
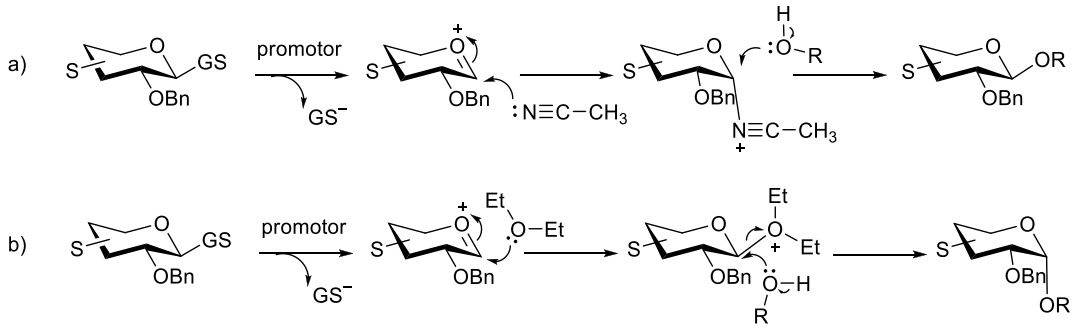


Figura 2 – Efecto anomérico

Participación del solvente

El efecto del solvente sobre la estereoselectividad de la reacción es particularmente de interés en los casos donde en C-2 se encuentra un grupo no participante. En general, se observa que cuando se utilizan solventes poco polares aumenta la selectividad en favor del anómero α por facilitarse una anomerización *in situ* y desfavorecerse la formación de iones oxocarbenio como intermediarios de la reacción. Por otro lado, existen solventes, como el dietiléter y el acetonitrilo, que pueden formar complejos con el ion oxocarbenio afectando la relación anomérica en el producto de la glicosidación. Si la reacción se lleva a cabo en acetonitrilo, el catión nitrilo formado *in situ* adopta exclusivamente una posición axial, permitiendo la formación estereoselectiva de glicósidos sustituidos ecuatorialmente (Esquema 3-a). Esta estrategia permitiría obtener glicósidos 1,2-*trans* aun cuando no se cuente con un grupo participante en C-2. Por el contrario, solventes de reacción tipo éter, como éter etílico, THF o dioxano, también pueden participar en el proceso de glicosidación. En estos casos, se forma preferentemente un intermediario ecuatorial, dando lugar a la formación del enlace glicosídico axial (Esquema 3-b).



Esquema 3 – Efecto de la participación del solvente en la reacción de glicosidación.

Regioselectividad de la reacción de glicosidación

La regioselectividad de las reacciones es un gran desafío, tanto en la química orgánica en general, como en la química de los hidratos de carbono en particular, ya que estos contienen varios grupos hidroxilo de reactividad similar. Sin embargo, pequeñas diferencias en la reactividad pueden, utilizarse para lograr un patrón de protección determinado.

La regioselectividad de la reacción de glicosidación se basa en el uso de un aceptor de glicosilo protegido selectivamente. En una aproximación clásica se utiliza un derivado que presenta todos los hidroxilos sustituidos temporalmente, salvo aquel a través del cual se busca establecer la unión glicosídica. En ocasiones, esto requiere una secuencia de reacciones bastante laboriosa. Con el objetivo de simplificar esto, se han desarrollado mucho estudios utilizando aceptores de glicosilo con más de un OH libre [32], y fundamentado en cuestiones estéricas o estereoelectrónicas, en muchos casos han sido efectivos para conducir a un único regioisómero. El estudio de la regioselectividad con que se glicosidan estos aceptores es valioso para predecir el curso de reacciones análogas y planificar estrategias sintéticas simplificadas.

Antecedentes

En el marco de un proyecto general que se desarrolla en el laboratorio, se lleva a cabo la síntesis del trisacárido αGal (**1**), de algunos análogos y de oligosacáridos control, con el objetivo de conjugarlos a péptidos antigénicos identificados en sueros provenientes de pacientes congénitos, agudos y crónicos con la enfermedad de Chagas. La identificación de los péptidos antigénicos es parte de un proyecto FONARSEC titulado: "Identificación y validación de moléculas de *T. cruzi* para el mejoramiento del diagnóstico de Chagas", que llevan a cabo investigadores de la Universidad Nacional de General San Martin (UNSAM), con los cuales hemos establecido una colaboración. La idea general del proyecto es mejorar o maximizar la performance de ciertos antígenos proteicos, actualmente utilizados como reactivos para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, a través de la unión química al epítope sacarídico (αGal), el cual mostró una gran sensibilidad en ensayos de serodiagnóstico. De esta forma se generarían reactivos serológicos mixtos conteniendo simultáneamente epítopes peptídicos y sacarídicos. Se considera que la conjugación de ambas moléculas, el glicano y el péptido, podría mejorar la inmunodiagnosis. La importancia de anticuerpos dirigidos a ambos ha sido reconocida también para el desarrollo de vacunas [33].

Si bien la síntesis del trisacárido **1** ya ha sido descripta, el requerimiento de cantidades importantes para afrontar los estudios inmunológicos exige desarrollar un procedimiento simple, eficiente y fácilmente escalable, que permita disponer de manera continua del antígeno. Las dificultades de la síntesis de este trisacárido están relacionadas con la baja reactividad que presentan los derivados de GlcNAc, tanto al utilizarlos como donores o como aceptor de glicosilo [34]. En nuestro laboratorio estamos desarrollando la síntesis de dicho trisacárido y de oligosacáridos relacionados, adecuadamente funcionalizados, para conjugarlos a péptidos y utilizarlos en los estudios bioquímicos e inmunológicos. Se eligió como funcionalización la *O*-glicosidación a una cadena alquílica de seis carbonos con un grupo amino terminal. Así, se planteó la síntesis del derivado de αGal **2**, cuyo análisis retrosintético señaló a los derivados **4**-**6** como precursores convenientes (Figura 3).

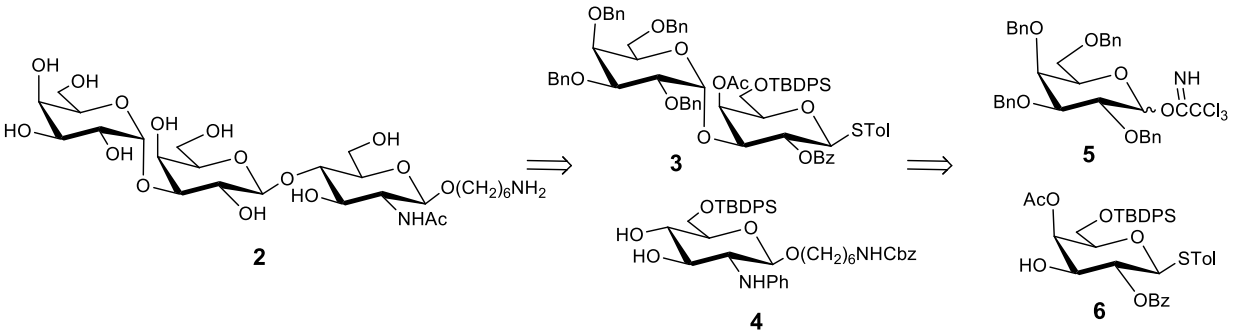
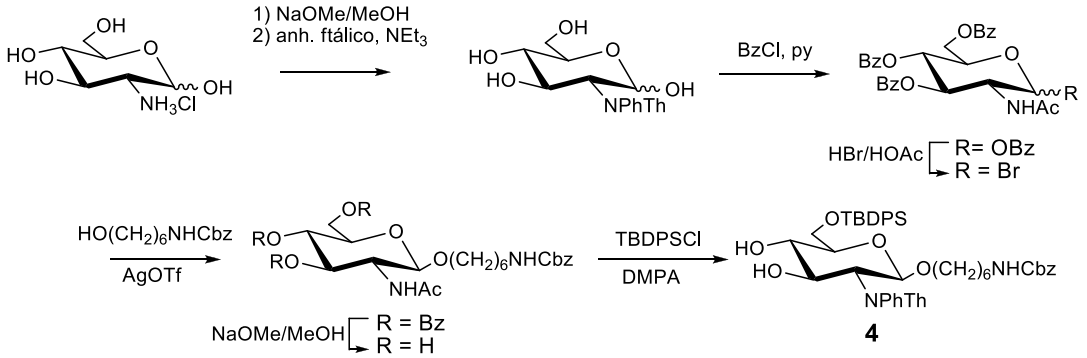


Figura 3 - Precursores sintéticos del trisacárido **2**

El aceptor **6** se preparó a partir de tolil β-D-1-*S*-Gal*p* a través de una secuencia de reacciones que no requirió purificaciones intermedias. Por glicosidación de **5** con **6** se obtuvo, con buen rendimiento el disacárido **3**. Esta glicosidación fue estereoselectiva en favor del anómero α, en virtud de la presencia del grupo protector bencilo, no participante, en el C-2 de **5.** El disacárido **3** es apropiado para la glicosidación por activación con NIS/TfOH con un derivado de GlcNAc, o alternativamente un derivado más reactivo de glucosamina, como por ejemplo **4**. El precursor *N*-ftalilado **4** se diseñó considerando que al análogo *N*-acetilado resultó extremadamente ineficiente como donor y como aceptor de glicosilo, y que su glicosidación sería regioselectiva en el OH-4, debido al impedimento estérico que produce el grupo voluminoso TBDPS en el HO-6. Se obtuvo de acuerdo con la siguiente secuencia sintética (Esquema 4):



Esquema 4 - Síntesis del aceptor de glicosilo 4, precursor de la unidad de GlcNAc de **2**.

En el marco de esta tesis de grado se planteó como objetivo específico la síntesis de **7**, un análogo de **1** en el cual la unidad terminal de GlcNAc es reemplazada por una unidad de Glc*p*. Este análogo presenta frente a anticuerpos α-antiGal de sueros de chagásicos una reactividad muy similar al trisacárido antigénico natural **1** [35].

Se decidió sintetizar el 6-aminohexil glicósido **8**, es decir el trisacárido D-Gal*p*-(α1→3)-D-Gal*p*-(β1→4)-D-Glc (**7**) derivatizado de manera análoga a αGal, para facilitar la posterior conjugación con los péptidos, dando lugar a neoglicoconjugados del tipo **8-R** (Figura 4). La síntesis de este trisacárido **8** es mucho más sencilla que la del derivado análogo de αGal, por el solo hecho de no presentar la unidad de GlcNAc, por lo cual, se planeó realizar las mismas pruebas biológicas que a αGal, y en caso de que mostrara las propiedades inmunogénicas similares sería muy conveniente utilizarlo en su reemplazo para el desarrollo de herramientas de diagnóstico, dada la mayor facilidad sintética.

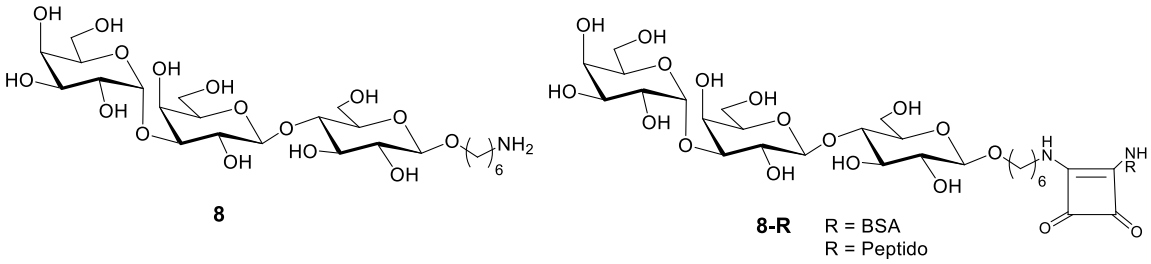


Figura 4

En general, la síntesis de oligosacáridos involucra la preparación de precursores monosacarídicos convenientemente derivatizados y la formación de cada una de las uniones glicosídicas, con la regio y estereoselectividad anomérica (α ó β) buscadas. Para la síntesis del compuesto **8** se planeó utilizar como material de partida lactosa, un disacárido económico y de fácil acceso que ya presenta el motivo D-Gal*p*-(β1→4)-D-Glc*p*, lo cual simplificaría mucho la síntesis total.

Luego de una secuencia de reacciones de protección selectiva de lactosa, se podría disponer de un aceptor de glicosilo con la posición 3' libre, como por ejemplo **10**, el cual se glicosidaría con el tricloroacetimidato de tetra-*O*-Bn-α-D-Gal*p* **5** para dar **9** (Figura 5) [36]. Posteriormente, se elaboraría el extremo reductor para introducir el

brazo espaciador con el grupo amino, de manera similar a lo previamente realizado en el laboratorio con los análogos de **1** y con otros oligosacáridos [37].

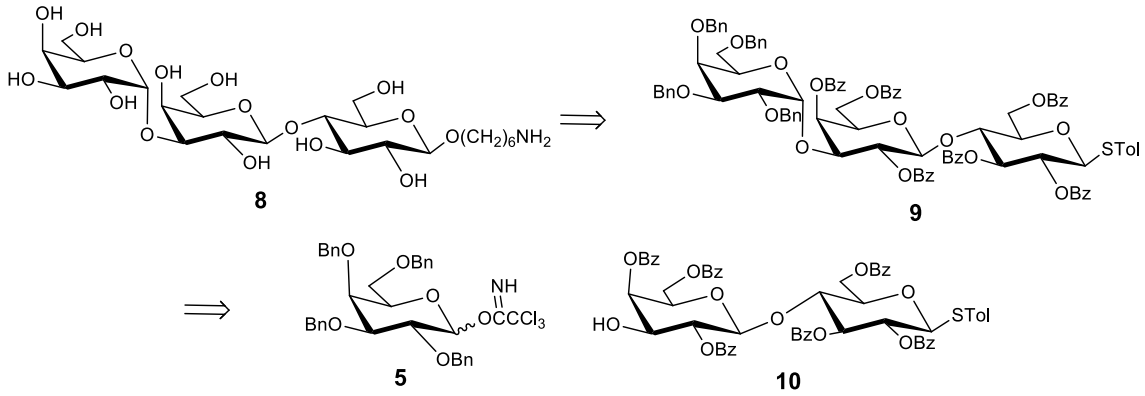


Figura 5 - Análisis retrosíntetico del trisacárido **8**.

Antecedentes en la síntesis de derivados de 7

En 2006 Ye y col. [38] describieron la síntesis de metil D-Gal*p*(α1→3)-D-Gal*p*(β1→4)-β-D-Glc (VI) utilizando una estrategia secuencial, desde el extremo no reductor al reductor. La estereoselectividad de glicosidación de la unidad α-Gal*p* se logró utilizando como donor el tioglicósido bencilado **VII**, con un grupo no participante en C-2, el cual se hizo reaccionar con el 4,6-di-*O*-bencilidén-2-*O*-benzoil derivado **VIII** como aceptor. Como precursor del extremo reductor se utilizó el tri-*O*-bencil derivado **IX**, obtenido a partir del correspondiente bencilidén derivado. Establecieron condiciones para realizar la secuencia con un procedimiento "one pot" (Figura 6).

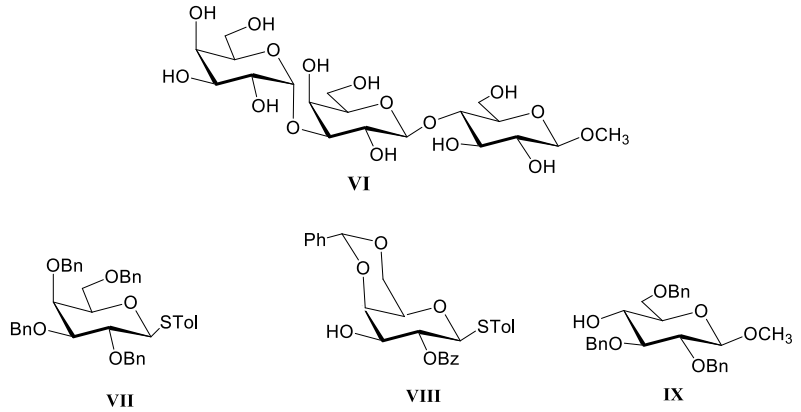


Figura 6 - Análisis retrosíntetico de **VI** [38]

Otros autores, en lugar de realizar una síntesis secuencial utilizaron lactosa como material de partida, la cual ya contiene el motivo D-Gal*p*(β1→4)-D-Glc*p*. En el caso de Stocker y col. [39] describieron la síntesis de **7** derivatizado como la isoglobotrihexosilceramida **X**. Para obtener el precursor **XII** se preparó un derivado 3',4'-diisopropilidénico, se instaló la aglicona, luego se removío el grupo isopropilidénico y se introdujo el acetato en OH-4' mediante la apertura regioselectiva de un grupo ortoacetato en los OH-3' y 4'. La configuración de la unidad α-D-Gal*p* se logró utilizando como donor el tricloroacetimidato bencilado **XI** (Figura 7).

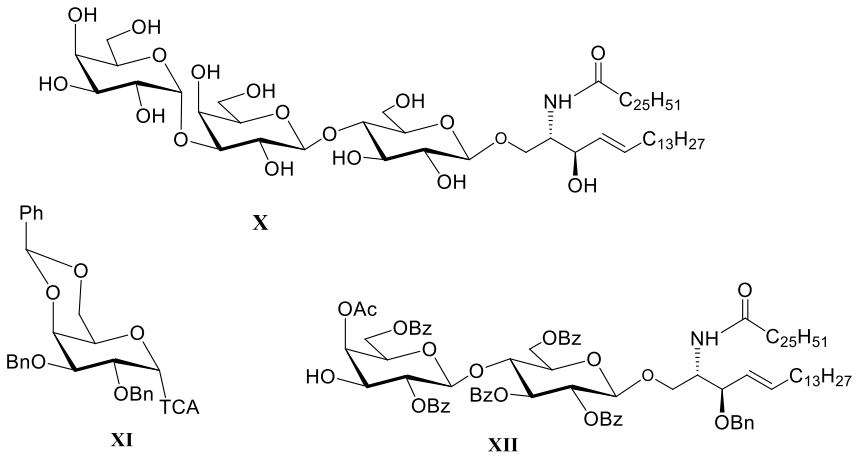


Figura 7 - Análisis retrosíntetico de **X** [39]

El grupo de Almeida [11] basó su estrategia en el aceptor **XV**, preparado a partir de un acetal organoestánico intermediario, cuya apertura regioselectiva permite diferenciar la posición 3' del resto. En esta tesis se decidió utilizar el mismo tipo de derivado organometálico, y el fundamento de la regioquímica se desarrollará más adelante. La estereoquímica de la unidad α-Gal*p* se basó en el efecto estérico del donor **XIV** (Figura 8).

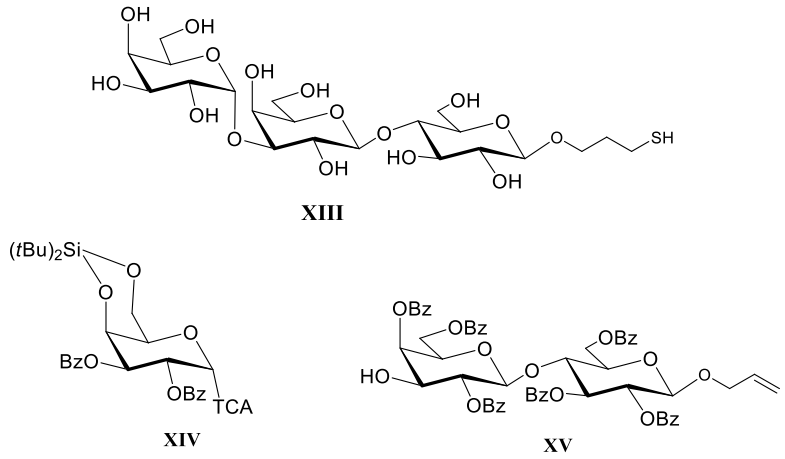


Figura 8 - Precursores de XIII [11]

Objetivos

- Síntesis de un análogo de αGal, en el que se reemplaza la unidad de GlcNAc por Glc: análogo **8**
- Conjugación de dicho análogo con BSA
- Evaluación de respuesta inmunológica de **8-BSA**

Materiales y métodos

Cromatografía en capa delgada (c.c.d.)

Se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas con sílica gel 60 F254 (Merck) de 0,2 mm de espesor. Los sistemas de solventes empleados se indican en cada caso. El revelado se efectuó por exposición a la luz ultravioleta (λ = 254 nm) y/o inmersión en una solución de H_2SO_4 (5% (v/v) en etanol con un 0,01% de p-anisaldehído) y posterior calentamiento a 150°C. Los compuestos aminados se detectaron por inmersión en reactivo de ninhidrina (250 mg de ninhidrina en 100 ml de acetona con una gota de piridina) y calentamiento a 150°C.

Cromatografía en columna fase normal

Se realizaron sobre sílica gel 60 Å, malla 200-400 (Merck™ y Aldrich™) y los solventes de elución se indicaron en cada caso.

Cromatografía en fase reversa

Se utilizaron cartuchos de RP-18 (55 µm, 70 Å) de 2 g/12ml Strata™ (Phenomenex). Los sistemas de solventes empleados se indican en cada caso.

Cromatografía en columna de grafito

Se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida (SPE Carbon) de 500 mg/8ml 30p Extract-Clean™. Los sistemas de solventes empleados se indican en cada caso.

Poder rotatorio

Se midieron con un polarímetro Perkin-Elmer modelo 343, en celdas de 1 dm de longitud, a temperatura ambiente y empleando una lámpara de sodio (λ = 589 nm). Los solventes y concentraciones utilizadas se indica en cada caso.

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) se adquirieron con un espectrómetro Bruker AM-500 a 500 MHz. Las constantes de acoplamiento aparentes (expresadas en Hz) se determinaron por medición directa de la separación de las líneas en el espectro de RMN ^1H. Los espectros de RMN ^{13}C se realizaron en el mismo equipo a 125,8 MHz, y se adquirieron con desacoplamiento de banda ancha. El solvente utilizado se indica en cada caso. Los desplazamientos químicos (δ) se

expresaron en partes por millón (ppm) respecto al tetrametilsilano (TMS) cuando se realizaron en $CDCl_3$.

La asignación de los espectros de RMN ^{1}H y ^{13}C de los compuestos se realizó utilizando una combinación de técnicas mono y bidimensionales de experimentos de correlación heteronuclear (HSQC-DEPT) y homonuclear (COSY-45).

Espectros de Masa de Alta Resolución

Los espectros de masa de alta resolución se realizaron con un espectrómetro BRUKER micrOTOF-Q II con fuente de ionización electrospray (ESI), UMYMFOR (UBA-CONICET), Universidad de Buenos Aires.

Los espectros de masa por ionización con láser asistidos por la matriz y analizador de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se realizaron con un espectrómetro 4800 Plus Maldi TOF-TOF de AB-Sciex, LANAIS PROEM, (UBA-CONICET), Universidad de Buenos Aires. Se utilizó como matriz al ácido sinapínico (10μg/μl) y se sembraron 150 picomoles.

Purificación de solventes

Todos los solventes se purificaron por destilación. En algunos casos requirieron tratamientos adicionales para emplearlos en reacciones que requerían estrictas condiciones anhidras.

Diclorometano anhidro (CH_2Cl_2)

Se secó por reflujo sobre P_2O_5 y se destiló inmediatamente antes de su uso, ó se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å activados.

Acetonitrilo anhidro (CH_3CN)

Se secó por reflujo sobre P_2O_5, se destiló y se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å, activados.

Metanol anhidro (CH_3OH)

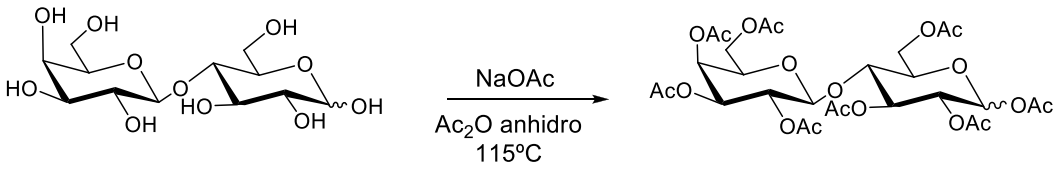
Se reflujó sobre virutas de magnesio, se destiló y se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å, activados.

Éter etílico anhidro

Se pasaron por alúmina, se secaron y se liberaron de oxígeno por reflujo sobre sodio-benzofenona bajo atmósfera de nitrógeno purificado, y luego se destilaron a partir de la solución azul, inmediatamente antes de ser empleados.

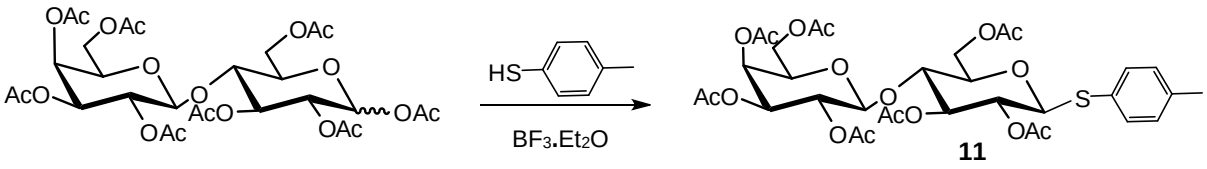
Síntesis y caracterización

1,2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil-(1→4)-1,2,3,6-tri-*O*-acetil-β-D-glucopiranosa



Una solución de D-lactosa (5,00 g; 14,62 mmol) y NaOAc (1,25 g) en anhídrido acético (20 ml) se calentó a reflujo en baño de arena a 115°C, en condiciones de exclusión de humedad, durante 3 horas. La solución se volcó sobre un baño de hielo/agua (50 ml), se observó la formación de un sólido amorfo y se agregó $NaHCO_3$ (10 g). La mezcla resultante se extrajo con CH_2Cl_2 (250 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con $NaHCO_3$ ss (25 ml) y H_2O hasta neutralidad. Se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a presión reducida. El análisis por c.c.d del jarabe obtenido mostró un solo producto de R_f 0,75 (CH_2Cl_2-Acetona 9:1). Por adición de etanol (5 ml) se obtuvo la octoacetillactosa (8,66 g, 87,5%) como un producto cristalino, cuyas propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas coincidieron con las descritas en la literatura.[40]

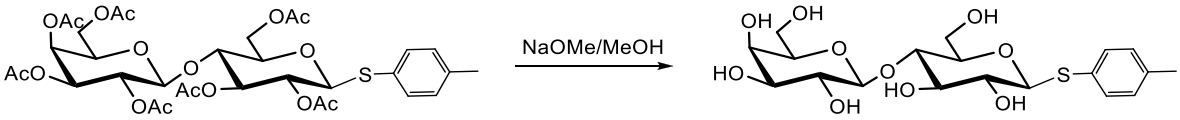
4-Metilfenil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetil-1-tio-β-D-glucopiranósido (11)



11

A una solución de octoacetillactosa (5,65 g; 8,32 mmol) y tiocresol (1,23 g; 1,2 eq) en CH_2Cl_2 anhidro (20 ml), enfriada a 0°C, se agregó BF_3**.**Et_2O (1,65 ml; 1,6 eq). Luego de 18 h de agitación en atmósfera de Ar, a temperatura ambiente, se observó por c.c.d. la desaparición del compuesto de partida (R_f 0,75; CH_2Cl_2-acetona 9:1) y la formación de un producto de R_f 0,78. La solución se diluyó con CH_2Cl_2 (10 ml) y se lavó sucesivamente con H_2O (50 ml), $NaHCO_3$ ss (50 ml) y nuevamente con H_2O (2 x 50 ml). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y se evaporó el solvente a presión reducida. El jarabe obtenido (**11**; 6,09 g; 97,9%) presentó las mismas propiedades físicas que las descriptas, pf: 148-150 ºC. RMN ^1H ($CDCl_3$, 200 MHz): δ 5,03 (d; $J_{1,2}$ 9,8 Hz; 1H; H-1). [41].

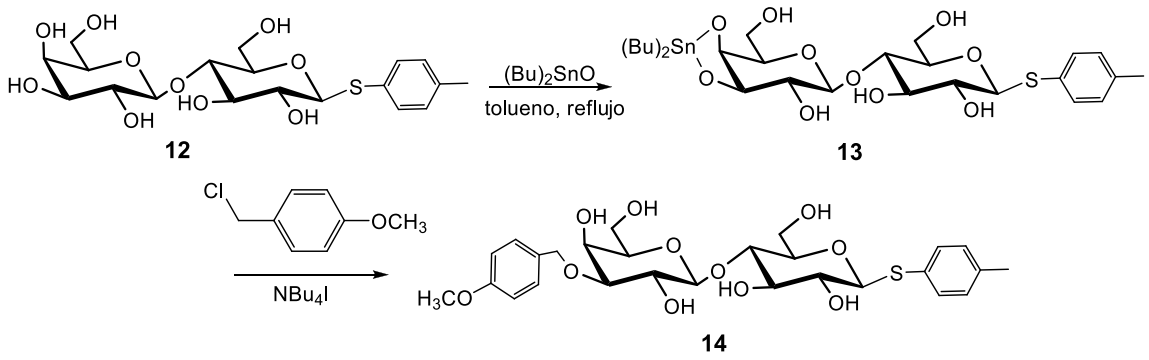
4-Metilfenil β-D-galactopiranosil-(1→4)-1-tio-β-D-glucopiranósido (12)



11 **12**

A una solución de **11** (6,09 g; 8,146 mmol) en CH_2Cl_2(10 ml) se le agregó una solución 25 mM de NaOMe en MeOH anhidro (30,0 ml). La mezcla de reacción se agitó mientras se dejó evolucionar la temperatura de 0°C a temperatura ambiente. Luego de 1 h se observó por c.c.d. la desaparición del compuesto de partida y un producto con Rf 0,08 (CH_2Cl_2-MeOH 9:1). Se redujo el volumen de la solución por evaporación a presión reducida para remover el CH_2Cl_2. La solución concentrada se desionizó por elución con MeOH a través de una columna de resina de intercambio iónico ácida (Amberlite IR120 PLUS). El eluato se evaporó para dar el compuesto **12** (3,29 g; 90 %) y se utilizó sin purificación adicional para la siguiente reacción.

4-Metilfenil 3-*O*-(4-metoxibencil)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-1-tio-β-D-glucopiranósido (15)



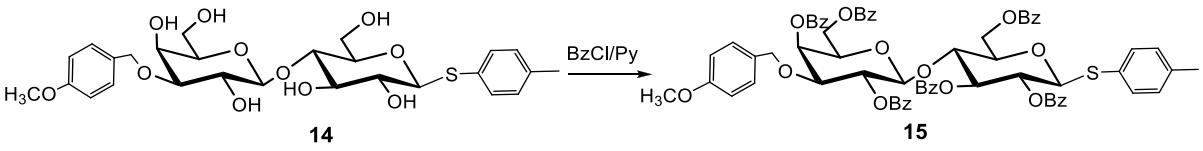
A una suspensión de **12** (1,5 g; 3,34 mmol) en tolueno anhidro (80 mL) se agregó Bu_2SnO (1,66 g; 2 equiv.) y se calentó a reflujo utilizando a una trampa de Dean-Stark para remover el agua generada. Luego de 4 hs., se observó la completa solubilización del material de partida. La solución se llevó a temperatura ambiente y se agregaron NBu_4I (0,14 g; 0,45 equiv.) y cloruro de 4-metoxibencilo (0,13 mL; 4 mmol; 1,2 equiv.). Luego, se calentó a reflujo (80 °C) durante una noche, utilizando un refrigerante convencional. El análisis por c.c.d. mostró entonces un producto de R_f 0,33 (CH_2Cl_2-MeOH 9:1) y material de partida **12** (R_f 0,08). La reacción se llevó a temperatura ambiente, se filtró y se concentró *in vacuo* y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (CH_2Cl_2-MeOH 9:1). Por evaporación de las fracciones de R_f 0,33 se obtuvo el compuesto **14** (0,754 g; 43 %), $[a]_D$: -14 (c 1; MeOH).

RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 500 MHz): δ 7.38-6.87 (m, 8H, arom.), 4.60 (d, 1H, *J* 11.9 Hz, OC*H*$_{2a}$Ar), 4.58 (d, 1H, *J* 10.1 Hz, H-1), 4.46 (d, 1H, *J* 11.7 Hz, OC*H*$_{2b}$Ar), 4.25 (d, 1H, *J* 7.8 Hz, H-1´), 3.88 (d, 1H, *J* 3.4 Hz, H-4´), 3.74-3.53 (m, 4H, H-6a, H-6b, H-6´a, H-6´b), 3.73 (s, 3H, CH_3O), 3.43-3.30 (m, 4H, H-3, H-4, H-5 and H-5´), 3.23 (dd, 1H, *J* 9.6, 3.1 Hz, H-3´), 3.08 (td, 1H, *J* 8.8, 6.0 Hz, H-2´), 2.27 (s, 3H, C*H*$_3$Ar) ppm.

RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO): δ 158.7, 136.5, 131.1, 130.9, 130.3, 129.6, 129.4, 113.6 (aromatics), 103.7(C-1´), 87.1(C-1), 80.8 (C-3'), 80.1, 78.8, 76.4, 75.5 (C-3, C-4, C-5 and C-5´), 72.2 (C-2), 70.0 (*C*H_2OAr), 69.7 (C-2´), 64.7 (C-4´), 60.5, 60.4 (C-6 and C-6´), 55.2 (CH_3O), 20.7 (*C*H_3Ar) ppm.

ESIMS: m/z calculado para $C_{27}H_{36}O_{11}Sna$ $[M+Na]^+$ 591,1875. m/z encontrada: 591,1882.

4-Metilfenil 2,4,6-tri-*O*-benzoil-3-*O*-(4-metoxibencil)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-benzoil-1-tio-β-D-glucopiranósido (15)



14 15

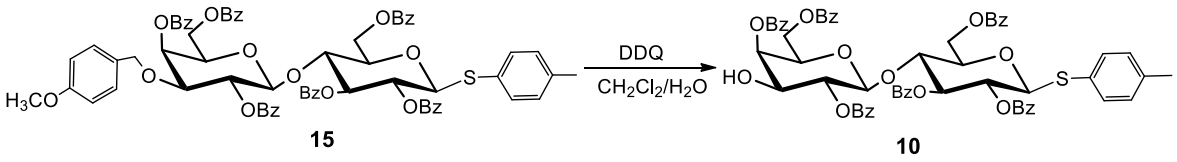
A una solución de **14** (0,754 g; 1,43 mmol) en piridina anhidra (9 ml) enfriada a 0°C, se agregó BzCl anhidro (3 ml; 4,8 equiv.) y se la agitó durante una noche a temperatura ambiente. El análisis por c.c.d. mostró la completa conversión en un producto de mayor movilidad (R_f 0,72; hexano-EtOAc 1:1). Se agregó agua (1 mL) y se agitó durante 30 min. Luego se diluyó la mezcla de reacción con CH_2Cl_2 (50 ml) y la solución se lavó sucesivamente con HCl 5% (2 x 50 ml), $NaHCO_3$ ss (2 x 50 ml) y H_2O (3 x 50 ml). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró y se co-evaporó a presión reducida con tolueno. El jarabe resultante (**15;** 1,39 g; 85 %) se utilizó para la siguiente reacción sin purificaciones adicionales, $[\alpha]_D$: +29,3 (c 1; $CHCl_3$).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz): δ 8.13-6.51 (m, 38 H, arom.), 5.74 (t, 1H, *J* 9.3 Hz, H-3), 5.61 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, H-4'), 5.41 (dd, 1H, *J* 9.7, 7.7 Hz, H-2'), 5.38 (dd, 1H, J 9.7 Hz, H-2), 4.82 (d, 1H, *J* 10.0 Hz, H-1), 4.61 (d, 1H, *J* 8.0 Hz, H-1'), 4.56 (dd, 1H, *J* 11.9, 1.9 Hz, H-6a), 4.52 (d, 1H, *J* 12.5 Hz, OCH_{2a}Ph), 4.41 (dd, 1H, *J* 11.9, 5.4 Hz, H-6b), 4.29 (d, 1H, *J* 12.5 Hz, OCH_{2b}Ph), 4.04 (t, 1H, *J* 9.5 Hz, H-4), 3.82 (ddd, 1H, *J* 9.9, 5.3, 2.0 Hz, H-5), 3.71 (dd, 1H, *J* 11.2, 5.8 Hz, H-6'a), 3.68 (m, 1H, H-5'), 3.67 (s, 3H, CH_3O), 3.59 (dd, 1H, *J* 10.0, 3.3 Hz, H-3'), 3.51 (dd, 1H, *J* 10.8, 6.5 Hz, H-6'b), 2.23 (s, 3H, CH_3Ar) ppm.

RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$): δ 165.8, 165.7, 165.5, 165.4, 165.2, 164.7 (*C*OBz), 159.1, 138.3, 133.7, 133.6, 133.3, 133.25, 133.20, 133.1, 133.0, 130.2, 130.1, 129.9, 129.8, 129.79, 129.71, 129.6, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.6, 128.4, 128.1, 127.8, 113.6 (aromaticos), 101.1 (C-1'), 86.0 (C-1), 77.2 (C-5), 76.0 (C-4), 75.7 (C-3'), 74.1 (C-3), 71.4 (C-5'), 71.3 (C-2'), 70.4 (O*C*H_2Ph), 70.3 (C-2), 66.0 (C-4'), 62.7 (C-6), 61.5 (C-6'), 55.1 (CH_3O), 21.1 (*C*H_3Ar) ppm.

ESIMS: calculado para $C_{69}H_{60}O_{16}SNa$ $[M+Na]^+$: 1215,34489; encontrado: 1215,3402.

4-Metilfenil 2,4,6-tri-*O*-benzoil-β-D-galactopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-benzoil-1-tio-β-D-glucopiranósido (10)



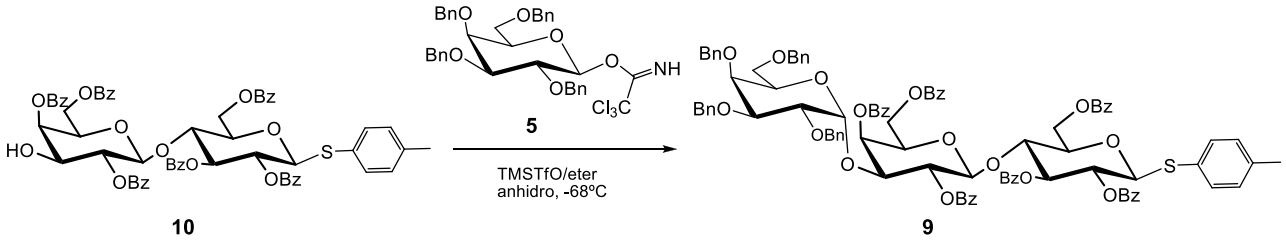
A una solución de **15** (0,942 g; 0,828 mmol) en CH_2Cl_2-H_2O (22:1; 23 ml) se agregó DDQ (0,77 g; 3,4 mmol) y se la agitó a temperatura ambiente y al abrigo de la luz durante 16 hs. El análisis de la reacción por c.c.d. mostró la formación de un producto de R_f 0,41 (hexano-EtOAc 2:1) y material de partida (R_f 0,28), por lo cual se agregaron 0,02 g de DDQ. A las 2 h la reacción se completó. Luego, la mezcla de reacción se lavó con $NaHCO_3$ ss/CH_2Cl_2 (2 x 50 ml) y H_2O (2 x 50 ml). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó a presión reducida. El jarabe obtenido se purificó por cromatografía en una columna de sílica gel (hexano- EtOAc 3:1) obteniéndose 0,64 g del producto **10** (0,59 mmol, 72 %) $[\alpha]_D$: +26,4 (c 1,18; $CHCl_3$).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz): δ 8.11-6.91 (m, 34 H, H-arom.), 5.72 (t, 1H, *J* 9.4 Hz, H-3), 5.49 (d, 1H, *J* 3.4 Hz, H-4'), 5.41 (t, 1H, *J* 9.8 Hz, H-2), 5.29 (dd, 1H, *J* 10.0, 7.8 Hz, H-2'), 4.83 (d, 1H, *J* 10.0 Hz, H-1), 4.72 (d, 1H, *J* 7.9 Hz, H-1'), 4.70 (d, 1H, *J* 1.9, 12.0 Hz, , H-6a), 4.57 (dd, 1H, J 12.0, 5.2 Hz, H-6b), 4.11 (t, 1H, *J* 9.6 Hz, H-4), 3.95 (dd, 1H, *J* 10.0, 3.5 Hz, H-3'), 3.88 (ddd, 1H, *J* 10.0, 5.1, 1.9 Hz, H-5), 3.77-3.65 (m, 2H, H-5'and H-6'a), 3.52-3.43 (m, 1H, H-6'b), 2.25 (s, 3H, C*H*$_3$Ar) ppm.

RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$): δ 166.5, 165.9, 165.8, 165.6, 165.5, 165.1 (CO), 138.4, 133.8, 133.5, 133.4, 133.3, 133.0, 130.15, 130.1, 129.9, 129.62, 129.56, 128.8, 128.62, 128.57, 128.5, 128.45, 128.37, 128.1, 127.7 (aromatics), 100.6 (C-1`), 86.1 (C-1), 77.1 (C-5), 75.9 (C-4), 74.0 (C-3), 73.7 (C-2'), 71.9 (C-3'), 71.5 (C-5'), 70.2 (C-2), 70.0 (C-4'), 62.8 (C-6), 61.3 (C-6'), 21.2 (*C*H_3Ar) ppm.

ESIMS: calculado para $C_{61}H_{52}O_{16}SNa$ $[M+Na]^+$: 1095,2874; encontrado: 1095,2871

4-Metilfenil 2,3,4,6-tetra-*O*-bencil-α-D-galactopiranosil-(1→ 3-)2,4,6-tri-*O*-benzoil-β-D-galactopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-benzoil-1-tio-β-D-glucopiranósido (9)



Una solución de 2,3,4,6-tetra-*O*-bencil-β-D-galactopiranosa (0,395 g, 0,73 mmol) y Cl_3CCN (328,8 µl; 3,28 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (4 ml) enfriada a 0°C con agitación se agregó lentamente DBU (30,4 µl; 0,22 mmol). Luego de 2hs de reacción se agregaron 20 µl adicionales de DBU. Dos horas más tarde la solución se evaporó a presión reducida con 2 ml de tolueno y el residuo se purifico por cromatografía en una columna corta de sílica gel (hexano-EtOAc 4:1 con 3% TEA), obteniéndose 0,452 g (90%) de tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-*O*-bencil-β-D-galactopiranósido (**5**) como un sólido amorfo [36].

Una suspensión conteniendo el tricloroacetimidato **5** (0,452 g; 0,66 mmol), el compuesto **10** (0,562 g; 0,52 mmol) y polvo de tamices moleculares (4 Å) recién activados en éter etílico anhidro (20 ml), se agitó vigorosamente a temperatura ambiente. Luego de 10 min., la suspensión se enfrió a -68°C, se agregó TMSOTf (38 µl; 0,21 mmol) y se dejó agitando durante la noche bajo atmósfera de Ar. Posteriormente, se agregó Et_3N y la suspensión se filtró, se diluyó con CH_2Cl_2 (25 ml) y se lavó sucesivamente con $NaHCO_3$ ss (25 ml) y H_2O hasta pH 7 (2 x 30 ml). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano-EtOAc 7:2). Por evaporación del solvente de las fracciones de R_f 0,29 se obtuvieron 0,68 g de **9** (65 %). $[\alpha]_D$: +12,57 (c 1; $CHCl_3$).

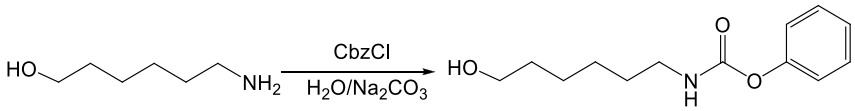
RMN ^1H ($CDCl_3$, 500 MHz): δ 8.05-6.88 (m, 54 H, H-arom.), 5.75 (t, 1H, *J* 9.3 Hz, H-3), 5.61 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, H-4'), 5.58 (dd, 1H, *J* 10.1, 7.9 Hz, H-2'), 5.39 (t, 1H, *J* 9.7 Hz, H-2), 5.06 (d, 1H, *J* 3.4 Hz, H-1''), 4.83 (d, 1H, *J* 9.9 Hz, H-1), 4.65 (d, 1H, *J* 11.5 Hz, OC*H*$_2$Ph), 4.60 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, H-1' and H-6a), 4.46 (dd, 1H, *J* 11.9, 5.2 Hz, H-6b), 4.41 (dd, 2H, *J* 12.0, 4.4 Hz, OC*H*$_2$Ph), 4.36 - 4.33 (m, 2H, OC*H*$_2$Ph), 4.23 (d, 3H, *J* 11.7 Hz, OC*H*$_2$Ph),

4.04 (t, 1H, *J* 9.5 Hz, H-4), 3.98 (dd, 1H, *J* 10.1, 3.3 Hz, H-3'), 3.85 (dd, 1H, *J* 10.3, 5.0 Hz, H-5), 3.80 (dd, 1H, *J* 10.1, 3.4 Hz, H-2''), 3.74- 3.68 (m, 2H, H-5'' and H-6'a), 3.59 (t, 1H, *J* 6.5 Hz, H-5'), 3.44 (dd, 1H, *J* 10.1, 2.8 Hz, H-3''), 3.38 (dd, 1H, *J* 11.3, 6.9 Hz, H-6'b), 3.22 (dd, 1H, *J* 9.2, 6.5 Hz, H-6''a), 3.19 (d, 1H, *J* 2.9 Hz, H-4''), 3.11 (dd, 1H, *J* 9.3, 6.1 Hz, H-6''b), 2.23 (s, 3H, C*H*$_3$Ar) ppm.

RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$): δ 165.7, 165.6, 165.5, 165.4, 165.1, 164.4 (CO), 138.7, 138.4, 138.3, 138.2, 133.7, 133.29, 133.22, 133.18, 132.8, 130.1, 129.8, 129.7, 129.63, 129.57, 129.5, 129.3, 129.1, 128.9, 128.6, 128.5, 128.41, 128.38, 128.35, 128.31, 128.2, 128.1, 128.05, 128.02, 128.0, 127.9, 127.8, 128.7, 127.67, 127.60, 127.4, 127.3, 127.2, 127.1, 127.0 (aromatics), 101.2 (C-1'), 94.6 (C-1''), 85.9 (C-1), 78.5 (C-3''), 77.2 (C-5), 76.0 (C-4), 75.1 (C-2''), 74.8 (C-4''), 74.4 (O*C*H$_2$Ph), 74.1 (C-3), 73.2 (O*C*H$_2$Ph), 73.1 (O*C*H$_2$Ph), 73.0 (C-3'), 72.3 (O*C*H$_2$Ph), 71.6 (C-5'), 71.1 (C-2'), 70.2 (C-2), 69.8 (C-5''), 68.8 (C-6''), 65.7 (C-4'), 62.6 (C-6), 61.3 (C-6'), 21.1 (*C*H$_3$Ar) ppm.

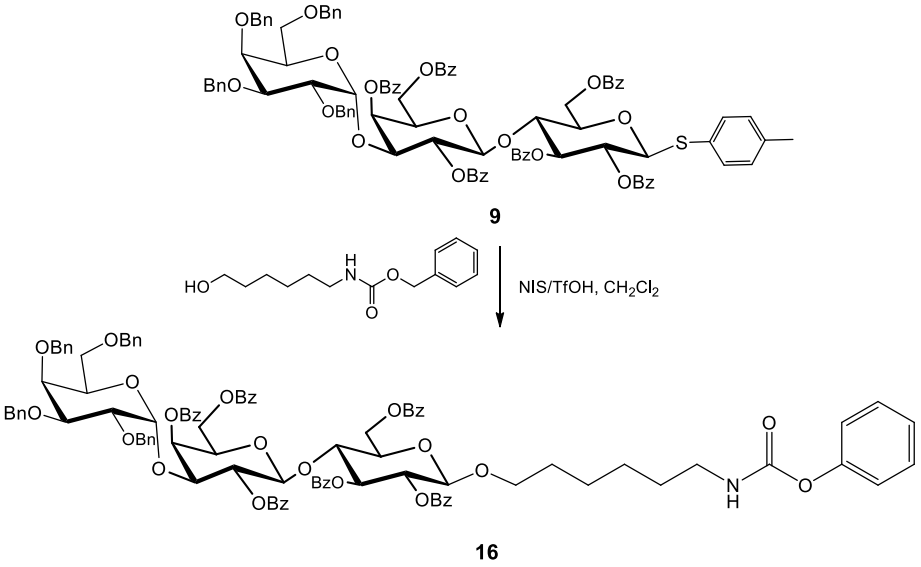
ESIMS: m/z calculado para $C_{95}H_{86}NaO_{21}S$ $[M+Na]^+$: 1617,52800; encontrado: 1617,52009.

6-Benciloxicarbonilaminohexanol



A una solución de 6-aminohexanol (0,54 g; 4,60 mmol) en H_2O (5,00 ml), se adicionaron Na_2CO_3 (0.47 g; 5,52 mmol) y cloruro de carboxibencilo (CbzCl, 0,80 ml; 5,52 mmol) a 0°C y la mezcla resultante se agitó durante 2 hs a temperatura ambiente. El precipitado formado se filtró y se concentró a presión reducida. El análisis por c.c.d. mostro un producto cromatográficamente homogéneo (0.63 g; 60%) que se identificó como benciloxicarbonilamino-1-hexanol ($OH(CH_2)_6NHCbz$); R_f 0.65 (EtOAc-hexano; 4:1), y se utilizó sin más purificación en la siguiente reacción.

6-Benciloxicarbonilaminohexil 2,3,4,6-tetra-*O*-bencil-α-D-galactopiranosil-(1→ 3)-2,4,6-tri-*O*-benzoil-β-D-galactopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-benzoil-β-D-glucopiranósido (16)



En un balón conteniendo el compuesto **9** (0,261g; 0,164 mmol), benciloxicarbonilamino-1-hexanol (0,058 g; 0,228 mmol; 1,4 equiv.), NIS (0,0527 g; 0,180 mmol; 1,1 equiv) y tamices moleculares recién activados se agregaron 5 ml de CH_2Cl_2. La mezcla resultante se agitó durante 10 min bajo atmósfera de Ar, se enfrió en un baño de hielo/agua y se le agregó ácido trifluorometansulfónico (TfOH; 5,85 µl; 0,016 mmol; 0,1 equiv.). Luego de 12 hs, se agregó Et_3N y la suspensión se filtró. El filtrado se diluyó con CH_2Cl_2 (25 ml) y se lavó sucesivamente con $Na_2S_2O_4$ (25 ml), $NaHCO_3$ ss (25 ml) y H_2O hasta pH 7 (2 x 30 ml). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró y evaporó a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel; tolueno-EtOAc 15:2) rindiendo 0,291 g de **16** (74 %).

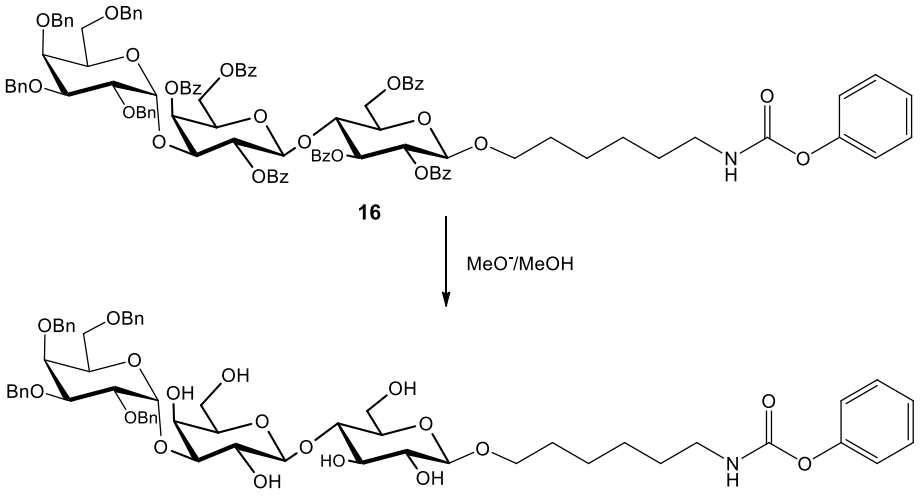
RMN ^1H ($CDCl_3$, 500 MHz): δ 8.07-6.94 (55 H, H-arom.), 5.76 (t, 1H, *J* 9.5 Hz, H-3), 5.61 (d, 1H, *J* 2.8 Hz, H-4'), 5.59 (dd, 1H, *J* 8.0, 10 Hz, H-2'), 5.42 (dd, 1H, *J* 9.9, 7.9 Hz, H-2), 5.07 (s, 2H, CH_2Cbz), 5.05 (d, 1H, *J* 3.4 Hz, H-1''), 4.66-4.62 (m, 3H, H-1, H-1' and OC*H*$_2$Ph), 4.58-4.54 (m, 2H, H-6a and N*H*Cbz), 4.45 (dd, 1H, *J* 12.1, 4.7 Hz, H-6b), 4.41 (dd, 2H, *J* 11.9, 4.9 Hz, OC*H*$_2$Ph), 4.34 (d, 2H, *J* 11.7 Hz, OC*H*$_2$Ph), 4.22 (dd, 3H, *J* 11.7, 6.2 Hz, OC*H*$_2$Ph), 4.14 (t, 1H, *J* 9.5 Hz, H-4), 3.96 (dd, 1H, *J* 10.1, 3.3 Hz, H-3'), 3.82-3.70 (m, 5H, H-2'', H-5, H-5'', H-6'a and OCH_2a), 3.59 (t, 1H, *J* 6.5 Hz, H-5'), 3.44 (d, 1H, *J* 2.8, 10 Hz, H-3''), 3.43 (d, 1H, *J* 2.8 Hz,), 3.42-3.39 (m, 2H, OCH_2b and H-6'b), 3.19 (m, 2H,

H-6''a and H-4''), 3.11 (dd, 1H, *J* 9.3, 6.2 Hz, H-6''b), 2.98 (q, 2H, *J* 6.6 Hz, C*H*$_2$N), 1.48-1.38 (m, 2H, C*H*$_2$), 1.20-1.07 (m, 6H, C*H*$_2$) ppm.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 126 MHz): δ 165.8, 165.6, 165.5, 165.4, 165.1, 164.5 (CO), 138.8, 138.5, 138.2, 133.4, 133.23, 133.20, 130.1, 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 129.4, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 127.3, 127.0 (aromatics), 101.2 (C-1'), 101.1 (C-1), 94.7 (C-1''), 78.6 (C-3''), 76.0 (C-4), 75.1 (C-2''), 74.9 (C-4''), 74.4 (O*C*H$_2$Ph), 73.3, 73.1, 73.0 (C-5, C-3' and 2 O*C*H$_2$Ph), 72.8 (C-3), 72.3 (O*C*H$_2$Ph), 71.7 (C-2), 71.6 (C-5'), 71.1 (C-2'), 70.0 (*C*H$_2$O), 69.8 (C-5''), 68.7 (C-6''), 66.5 (*C*H$_2$Cbz), 65.8 (C-4'), 62.5 (C-6), 61.4 (C-6'), 40.8 (*C*H$_2$N), 29.6, 29.1, 26.1 and 25.4 (4 CH$_2$) ppm.

ESIMS: m/z calculado para $C_{102}H_{99}NNaO_{24}$ $[M+Na]^+$: 1744,6516; encontrado: 1744,64547.

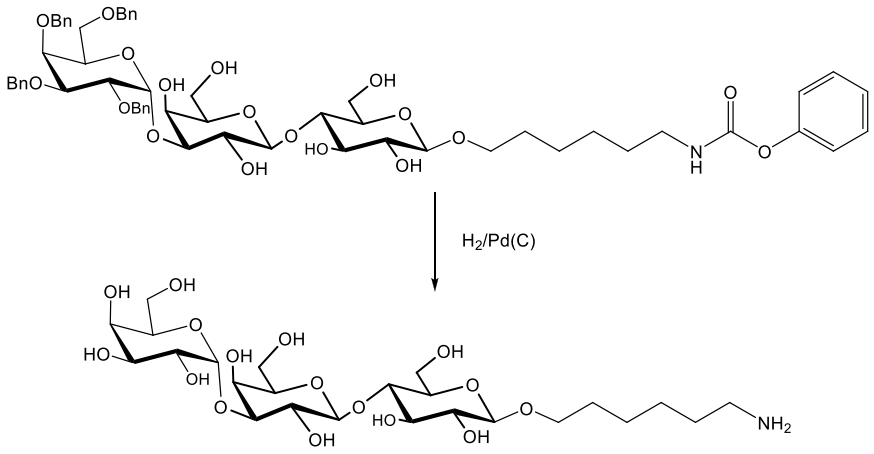
6-Benciloxicarbonilaminohexil 2,3,4,6-tetra-*O*-bencil-α-D-galactopiranosil-(1→3)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranósido



A una suspensión de **16** (0,1646 g; 0,095 mmol) en CH_2Cl_2(1 ml) se le agregó una solución 0,11 M de MeONa en MeOH anhidro (8 ml). La mezcla de reacción se agitó mientras se dejó evolucionar la temperatura de 0 °C a temperatura ambiente. Luego de 3 h se observó por c.c.d. la completa conversión de **16** (R_f 0,46; CH_2Cl_2-MeOH 9:0,3) en un producto de R_f 0,15. Se redujo el volumen de la solución por evaporación presión reducida, para remover el CH_2Cl_2. La solución concentrada se desionizó por

elución con MeOH a través de una columna de resina de intercambio iónico ácida [Amberlite IR120(PLUS)]. El eluato se concentró al vació, para dar el producto parcialmente desprotegido (0,098 g; 93%) que se utilizó directamente en la siguiente reacción; $[\alpha]_D$ +28 (*c* 1, $CHCl_3$).

6-Aminohexil α-D-galactopiranosil(1→3)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-D-glucopiranósido (8)



8

A una solución del producto de la reacción anterior (0,098 g; 0,09 mmol) en MeOH (9,5 ml) conteniendo 5% de ácido fórmico, se agregó Pd/C 10% (0,02 g). La suspensión se hidrogenó a 55 p.s.i. y se monitoreó periódicamente el progreso de la reacción por c.c.d. Luego de 52 hs se observó la completa conversión del compuesto de partida (R_f 0,3; CH_2Cl_2-MeOH 9:0.5) en un producto de R_f 0,23 (CH_2Cl_2-MeOH-NH_4OH 3:2:0,1). La solución se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en agua, se sembró en una columna de fase reversa RP-18 (2 g) y se eluyó con cantidades crecientes de MeOH (MeOH: 0 % → 100 %). Por evaporación de las fracciones de Rf 0,23, se obtuvo el compuesto **8** (0,047 g; 98 %).

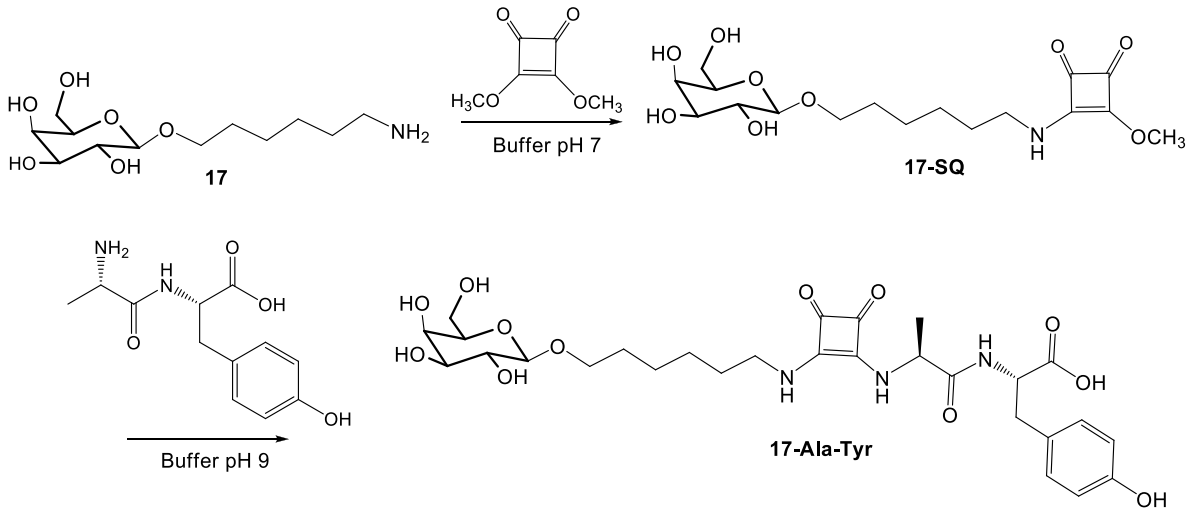
RMN ^1H (D_2O, 500 MHz): δ 5.15 (d, 1H, *J* 3.9 Hz, H-1''), 4.52 (d, 1H, *J* 7.8 Hz, H-1'), 4.49 (d, 1H, *J* 8.0 Hz, H-1), 4.21-4.18 (d, 2H, H-5'' and H-4'), 4.03- 3.90 (m, 4H, H-4'', H-6a, H-3'' and OC*H*$_2$a), 3.87 (dd, 1H, *J* 10.4, 3.8 Hz, H-2''), 3.83-3.57 (m, 12H, H-6b, H-6'a, H-

6’b, H-6’’a, H-6’’b, H-5, H-5’, H-4, H-3, H-3’, H-2’ and OC*H*$_2$b), 3.31 (td, 1H, *J* 8.0, 2.4 Hz, H-2), 3.00 (t, 2H, *J* 7.6 Hz, NC*H*$_2$), 1.66 (dp, 4H, 2 CH$_2$), 1.41 (p, 4H, 2 CH$_2$) ppm.

RMN ^{13}C (D_2O, 126 MHz): δ 102.8 (C-1’), 102.0(C-1), 95.4 (C-1’’), 78.7, 77.2, 75.0, 74.7, 74.5, 69.6 (C-4, C-3’, C-5, C-3, C-2’ and C-5’), 72.80 (C-2), 70.8 (C-5’’), 70.4 (*C*H$_2$), 69.3 (C-3’’), 69.1 (C-4’’), 68.2 (C-2’’), 64.8 (C-4’), 61.0, 60.9, 60.2 (C-6, C-6’ and C-6’’), 39.4 (*C*H$_2$N), 28.4, 26.6, 25.2, 24.5 (*C*H$_2$) ppm.

ESIMS: m/z calculado para $C_{24}H_{46}NO_{16}$ $[M+H]^+$: 604,2816; encontrado: 604,2803.

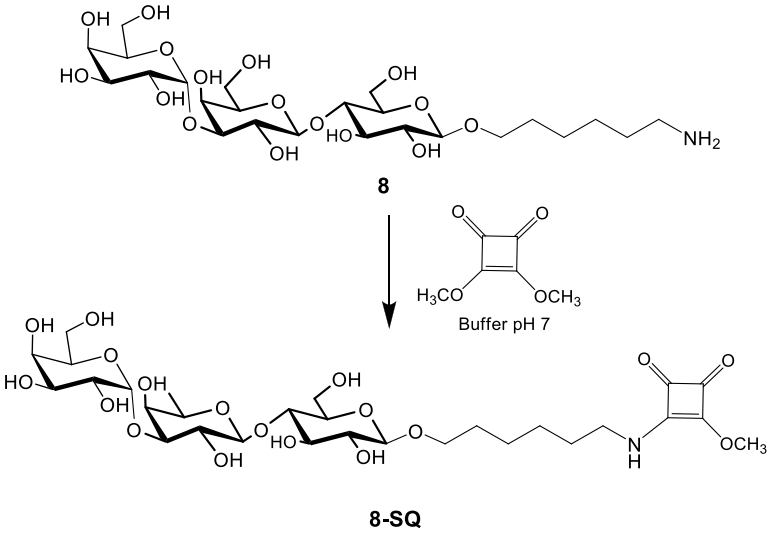
1-[6-aminohexil β-D-galactopiranosil]-2-[Ala-Tyr]-ciclobuteno-3,4-diona (17-Ala-Tyr)



A una solución de 6-aminohexil β-D-galactopiranósido **17** (10 mg; 0,036 mmol) en buffer KH_2PO_4-NaOH 0,1 M (pH 7; 3,57 ml) se le agregó escuarato de dimetilo (10 mg; 0,09 mmol) [42] y se la agitó a temperatura ambiente. El pH 7 se mantuvo mediante el agregado de 10 µl de Et_3N. Luego de 72 hs se observó por c.c.d. la desaparición del material de partida **17** (R_f 0,03; CH_2Cl_2-MeOH-NH_4OH 3:2:0,1) y la formación de un compuesto de mayor movilidad (R_f 0,4). Se evaporó el solvente a presión reducida y el residuo se purificó a través de una columna de fase reversa RP-18 para separar las sales y productos de hidrolización del escuarato. La muestra se sembró disuelta en agua y se eluyó con gradientes de MeOH-H_2O. Por concentración a presión reducida de las fracciones con 30 % de MeOH se obtuvo el compuesto 6-aminohexil β-D-galactopiranósido-2-metoxiciclobuteno-3,4-diona (**17-SQ**; 8 mg; 0,02 mmol; 55%).

Posteriormente, se disolvió el dipéptido Ala-Tyr (5,2 mg; 0,02mmol) en buffer borax 0,05 M-KH_2PO_4 0,1 M (pH 9; 1 ml) y esta solución se agregó sobre el balón conteniendo **17-SQ**. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 48 hs. Se controló el pH y se mantuvo en 9 por el agregado de solución borax (0,15 ml). En el transcurso de ese tiempo se observó por c.c.d. la paulatina conversión del compuesto de partida (R_f 0,67; CH_2Cl_2-MeOH-AcOH 6:2:0,1) en componentes de R_f 0,09, presumiblemente el conjugado. Se evaporó el solvente a presión reducida y se purificó con una columna RP-18. La muestra se sembró disuelta en agua y por concentración de las fracciones 6-13 se obtuvo el compuesto **17-Ala-Tyr** (8 mg, 66%).

1- [6-Aminohexil α-D-galactopiranosil(1→ 3)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-D-glucopiranósido]-2-metoxiciclobuteno-3,4-diona (8-SQ)



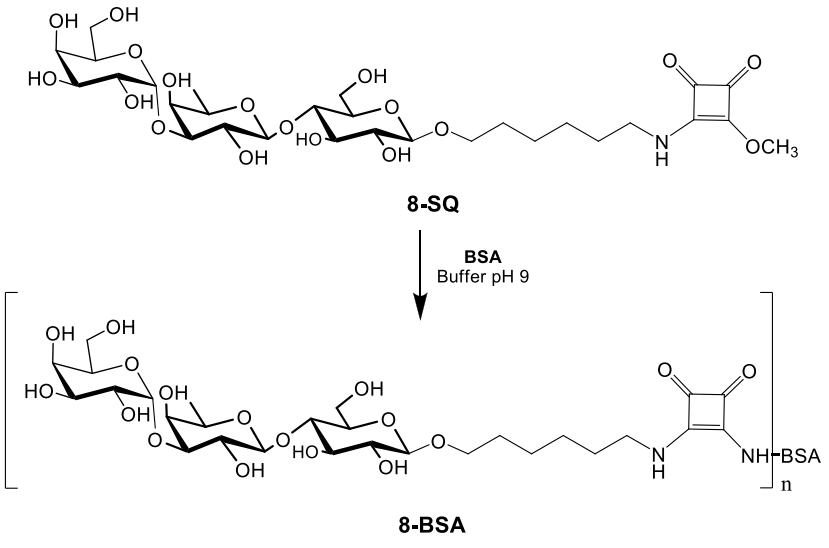
A una solución de **8** (0,024 g; 0,045 mmol) en buffer KH_2PO_4-NaOH 0,1 M (pH 7, 3,57 ml) se agregó escuarato de dimetilo (10 mg; 0,09 mmol) y se la agitó a temperatura ambiente. El pH 7 se mantuvo mediante el agregado de 10 µl de Et_3N. Luego de 24 h se observó por c.c.d. la desaparición del material de partida **8** (R_f 0,23; CH_2Cl_2-MeOH-NH_4OH 3:2:0,1) y la formación de un compuesto de mayor movilidad (R_f 0,43; CH_2Cl_2-MeOH-NH_4OH 3:2:0,1). Se evaporó el solvente a presión reducida y el residuo se purificó a través de una columna de carbono activado (Extract Clean 500 mg 30p) para separar las sales. La muestra se sembró disuelta en agua y se eluyó con gradientes de

acetonitrilo-H_2O. Por concentración a presión reducida de las fracciones con 40 % de acetonitrilo se obtuvo el compuesto **8-SQ** (7 mg; 0,0098 mmol; 21,7%).

RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz): δ 5.15 (d, 1H, *J* 3.9 Hz, H-1''), 4.53 (d, 1H, *J* 7.8 Hz, H-1'), 4.48 (d, 1H, *J* 8.0 Hz, H-1), 4.38-4.36 (m, 3H, CH_3O-squarate$_a$ and CH_3O-Ssquarate$_b$), 4.23-4.18 (m, 2H, H-5'' and H-4'), 4.03-3.89 (m, 4H, H-4'', H-6a, H-3'' and OC*H*$_2$a), 3.87 (dd, 1H, *J* 10.4, 3.8 Hz, H-2''), 3.83-3.57 (m, 7H, H-6'a, H-6b, H-6'b, H-6''a, H-6''b, H-4, H-3', H-5, H-2', H-3, H-5' and OC*H*$_{2b}$, NHC*H*$_2$-squarate$_a$), 3.48 (t, 1H, *J* 6.8 Hz, NHC*H*$_2$-squarate$_b$), 3.33-3.28 (m, 1H, H-2), 1.64 (d, 4H, *J* 6.9 Hz, 2 C*H*$_2$), 1.41-1.36 (m, 4H, 2 C*H*$_2$) ppm.

RMN ^{13}C (D_2O, 126 MHz,): δ 189.2, 183.2, 183.0, 177.6, 177.1, 172.9 (ciclobuteno), 102.8 (C-1'), 102.0 (C-1), 95.4 (C-1''), 78.6, 77.2, 75.0, 74.7, 74.5, 69.6 (C-2', C-3, C-3', C-4, C-5 and C-5'), 72.8 (C-2), 70.8 (C-5''), 70.5 (O*C*H$_2$), 69.3 (C-3''), 69.1 (C-4''), 68.2 (C-2''), 64.8 (C-4'), 61.0, 60.9, 60.8, 60.7, 60.2 (C-6, C-6', C-6'', *C*H$_3$O$_a$ and *C*H$_3$O$_b$), 44.5, 44.3 (*C*H$_2$N), 29.7, 29.4, 28.5 x 2, 25.2, 25.1, 24.6, 24.5 (4 CH$_2$, señales duplicadas) ppm.

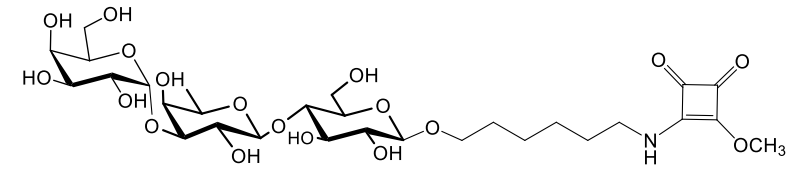
1-[6-Aminohexil α-D-galactopiranosil(1→ 3)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-D-glucopiranósido]-2-[BSA]-ciclobuteno-3,4-diona (8-BSA)



Una solución de **8-SQ** (7 mg, 0,0098 mmol) y BSA (0,013 g, 1,96x10^{-4} mmol) en relación molar 50:1, en buffer borax 0,05 M-KH_2PO_4 0,1 M (pH 9, 980 µl), se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. Se controló el pH y se mantuvo en 9 mediante

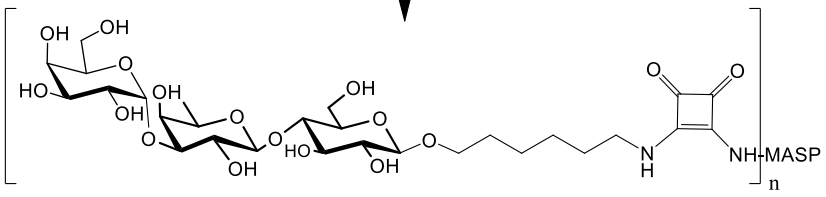
el agregado de 10 µl de Et_3N. Para optimizar el protocolo de reacción se tomaron alícuotas de 10 µl de la mezcla de reacción a las 24 y 48 horas de incubación, para ser analizados por SDS-PAGE. En el transcurso de ese tiempo se observó por c.c.d. la paulatina conversión del compuesto de partida **8-SQ** (R_f 0,43 CH_2Cl_2-MeOH-NH_4OH 3:2:0,1) en componentes de movilidad nula, presumiblemente el conjugado **8-BSA** que se visualizaba con el revelador de ácido sulfúrico y el exceso de BSA. La solución se dializó contra agua, utilizando una membrana Spectrum™ Spectra/Por™ 2 RC 12,000-14,000 Dalton MWCO y luego se liofilizó, obteniéndose 13,4 mg de **8-BSA** (eficiencia de la conjugación 99,4 %). La eficiencia de conjugación se calculó considerando como el peso molecular el valor promedio obtenido por MALDI-TOF-MS sobre el peso molecular teórico si se hubiesen acoplado los azúcares a 30 lisinas de BSA.

1-[6-Aminohexil α-D-galactopiranosil(1→ 3)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-D-glucopiranósido]-2-[MASP]-ciclobuteno-3,4-diona (8-MASP)



8-SQ

MASP
Buffer pH 9



8-MASP

Se procedió de la misma forma que para el conjugado **8-BSA**, utilizando el péptido sintético MASP.

Una solución de **8-SQ** (10 mg, 0,014 mmol) y MASP (3 mg, $1,47x10^{-3}$ mmol) en relación molar 10:1, en buffer Borax 0,05 M-KH_2PO_4 0,1 M (pH 9, 980 µl) se agitó a temperatura ambiente, manteniendo el pH en 9 mediante el agregado de Et_3N, cuando fue necesario. Luego de 24 hs de reacción la solución se dializó contra agua, utilizando una

membrana Spectrum™ Spectra/Por™ 1000 MWCO y luego se liofilizó, obteniéndose 4,40 mg (99% eficiencia de la conjugación) de **8-MASP.**

Preparación de geles para SDS-PAGE

Se prepararon geles de poliacrilamida (10%) para el análisis de las muestras de interés por SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes.

Reactivos	Gel concentrador (stacking gel)	Reactivos	Gel separador (resolving gel)
H_2O	4,2 ml	H_2O	5,4 ml
Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)	1 ml	Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)	6,7 ml
Tris HCl 1 M pH 6,8	0,76 ml	Tris HCl 1 M pH 8,8	7,5 ml
SDS 10 %	60 µl	SDS 10 %	200 µl
APS 10 %	36 µl	APS 10 %	20 µl
TEMED	6 µl	TEMED	8 µl

- Buffer de desarrollo concentrado: Tris (12 g), Glicina (57,6 g), H_2O hasta 1000 ml, pH 8,3. A esta solución concentrada se la diluyó 4 veces y se le agregaron 10 ml de SDS 10% (por cada 1000 ml de solución final) para obtener el buffer de desarrollo.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las muestras se sembraron con buffer de muestra (100 mM Tris- HCl pH: 6,8, 2 % SDS, DTT 200 mM, glicerol 20% y azul de bromofenol 0,1%). Las electroforesis se desarrollaron en cubas electroforéticas a un voltaje constante de 130 V durante una 1 h 30 minutos. Luego fueron teñidos con Coomassie Blue y/o PAS (Periodic Acid Schiff).

Reveladores para geles de poliacrilamida.
Revelado de proteínas con Coomassie Brilliant Blue R-250

Método:

Luego del desarrollo de las electroforesis los geles se incubaron durante 2hs en la solución colorante y se decoloraron durante 12hs.

Reactivos:

SOLUCIÓN COLORANTE	SOLUCIÓN DECOLORANTE
45% metanol destilado	10% ácido acético
10 % ácido acético glacial	30% metanol
45% agua Milli-Q	60% agua Milli-Q
3 g/L Coomassie Brilliant Blue R250	

Revelado de hidratos de carbono con PAS (Periodic Acid Schiff)

Método:

El gel de 1mm de espesor se sumergió durante 2hs en solución de fijación. Luego se trató con solución de periodato (50ml) durante 1h. Pasado el tiempo, se enjuagó levemente en agua y se agregaron 25 ml de solución de metasulfito de sodio. Luego de 5-10 min se cambió a una solución fresca de metabisulfito (25 ml) y se incubó durante otros 10 minutos. Por último, se colocó el gel en el reactivo de Schiff y se incubó hasta que se visualizaron las bandas color fucsia (60-80min).

Reactivos:

- ✓ Solución de fijación: ácido acético-metanol-agua (10:35:55)
- ✓ Solución de periodato: disolver 0,7 g de ácido periódico (H_5IO_6) en 100ml de ácido acético 5% (v/v) PREPARAR EN EL MOMENTO
- ✓ Solución de metabisulfito: disolver 2 g de metabisulfito de sodio ($Na_2S_2O_5$) en 100 ml de ácido acético 5% (v/v) PREPARAR EN EL MOMENTO
- ✓ Reactivo de Schiff: Se disolvieron 4 g de fucsina básica en 800 ml de agua casi en punto de hervor. Luego, la solución se enfrió a 50 °C en baño de hielo. Se agregaron 80 ml de HCl 1 M, y luego de mezclar, se dejó enfriando hasta 25 °C. Posteriormente, se agregan 6,8 g de metasulfito de sodio, se mezcló y se dejó decantar la solución, en oscuridad, a 4 °C, durante toda una noche. Al día siguiente se agregaron 20 g de carbón activado y se dejó sedimentar para el posterior filtrado a través de una placa filtrante de vidrio fritado con lecho de celite. El filtrado, ligeramente rosado, se guardó en botellas color caramelo a 4 °C.

Estudios inmunológicos

Soluciones

Buffer Bicarbonato (10X; 0,5 M, pH 9,5-9,6):
1,6 g Na_2CO_3
2,4 g $NaHCO_3$ (no autoclavar)
100 ml H_2O bidestilada

Buffer Citrato (1X, 0,1 M, pH 4,2):
1,92 g ácido cítrico monohidrato
100 ml H_2O bidestilada

Solución de bloqueo: PBS-T con % de leche descremada
Solución de revelado: 1 mg de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina Sigma-Aldrich), 333 µl de DMSO y 120 µl de H_2O_2 (30 volúmenes) en 10 ml de buffer citrato 0,1 M pH 4,2.
Solución de finalización: ácido sulfúrico 2 M.

Las soluciones de revelado y finalización fueron idénticas para todos los ensayos de ELISA.

Detección colorimétrica
La detección colorimétrica en los ensayos ELISA se realizaron con el sistema FilterMax F5 Multimode Microplate Reader (Molecular-Devices).

ELISA a punto final

Se sensibilizó la placa con los azúcares sintetizados en el laboratorio acoplados a BSA a placas de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp) en buffer bicarbonato 0,05M pH 9,6 a 4°C, durante 22 horas [43]. A continuación, se bloqueó tratando la placa con leche descremada 4% en PBS conteniendo 0.05% Tween 20 (PBS-T), durante una hora a 37°C. Sin lavar la placa, se incubó con sueros de pacientes chagásicos con infección crónica diluidos con la solución de bloqueo 1:5000 , durante 1h a 37 ºC. Pasado el tiempo de incubación, se lavó 3 veces con PBS-T. Se incubó una hora con anticuerpos anti-IgG humanos acoplados a HRP (Sigma) 1:5000 en solución de bloqueo; luego se lavó el anticuerpo secundario 4 veces con PBS-T y una vez con PBS. Finalmente, se procedió con el revelado que consiste en incubar los pocillos con 100 µl de la solución de revelado (TMB) y agregando posteriormente 100 µl de la solución de finalización de la reacción, para luego medir la absorbancia a 450 nm. En todos los casos los sueros se analizaron por duplicado.

ELISA POR DESPLAZAMIENTO [44]
Se procedió de un modo similar al ELISA convencional. La diferencia consistió en la incubación durante 30 minutos de los sueros con el agente desplazante, en este caso los distintos 6-aminohexilglicosidos, en un volumen de 10 µl.

Para poder cuantificar el desplazamiento se ensayaron incubaciones con 4 concentraciones distintas de los 6-aminohexilglicosidos **8, 17, 18** (10 µg/well, 1 µg/well, 0,1 µg/well y 0,01 µg/well, Figura 22).

Para el desplazamiento con 6-aminohexil-β-galactopiranósido se utilizó la concentración más elevada (10 µg/well). La absorbancia de estas muestras, procesadas de igual manera que las mencionadas anteriormente, fue tomada como el control negativo que presenta el 100 % de reactividad (0% de inhibición). Cada muestra fue ensayada por duplicado.

ELISA DE AFINIDAD

Se procedió igual que con el ELISA convencional, la única diferencia consistió en que las muestras de suero fueron lavadas tres veces con PBS-T durante 5 minutos y 3 veces con PBS-T suplementado con urea 6 M, antes de la incubación con el anticuerpo secundario. Las muestras procesadas fueron lavadas con el mismo buffer sin urea. Cada muestra fue ensayada por duplicado. El índice de avidez [45] fue calculado como la OD promedio de los pocillos lavados con el buffer con urea sobre el promedio de los valores de OD para los pocillos lavados con el buffer control (PBS-T). El valor cut-off fue determinado usando los valores obtenidos en los pocillos sensibilizados por BSA procesados en paralelo.

Criterios de positividad y negatividad en los ensayos de ELISA

Para los ELISAS que fueron revelados con sueros de chagásicos crónicos, se utilizaron como control dos sueros negativos del mismo grupo etario. Los sueros analizados se consideraron:

- Positivos para cierto antígeno si la media de la absorbancia de la muestra menos 3 SD era mayor a la media del valor obtenido para el mismo antígeno con los sueros negativos más 3 SD.
- Negativos si la media de la absorbancia de la muestra menos 3 SD era menor a la media del valor obtenido para el mismo antígeno con los sueros negativos más 3 SD.

Análisis estadístico

Las muestras se llevaron a cabo por duplicado y los datos fueron analizados y representados por GraphPad Prism 6 empleando ANOVA de dos factores seguido del análisis de comparaciones múltiples de Bonferroni con un nivel de confianza de 95%.

Paneles de sueros utilizados

El panel de sueros de pacientes Chagásicos crónicos asintomáticos fue provisto por el Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chabén” (con resultados positivos para las técnicas IFI, HAI y ELISA comerciales) y el Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutierrez” (con resultados positivos para las técnicas ELISA y HAI comerciales). Los sueros negativos se obtuvieron de la Fundación Hemocentro Buenos Aires.

Resultados y Discusión

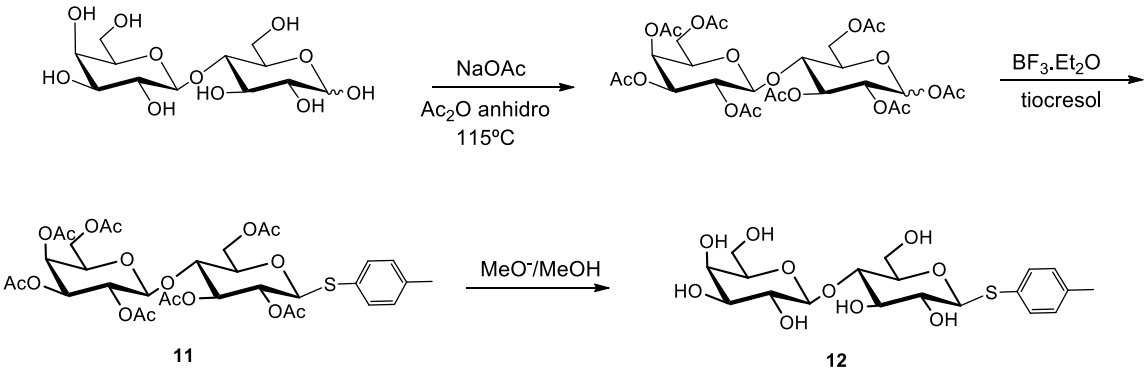
Síntesis de 6-aminohexil α-D-Gal*p*-(1→3)-β- D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Glc*p* (8)

La síntesis de **8** presenta como primer desafío la obtención del disacárido precursor derivado de lactosa **10**, el cual posee el OH-3' libre, de modo de poder ser utilizado como aceptor de glicosilo de una unidad de α-D-Gal*p* (Figura 5). Por otro lado, posee la funcionalidad -STol en la posición anomérica, que puede activarse para introducir posteriormente una cadena de 6-aminohexanol. Este método de glicosidación se conoce como el método del tioglicósido [46,47], y es uno de los más difundidos y robustos[19].

Para la síntesis de **10** en primera instancia se peracetiló la lactosa. El método más utilizado para obtener azúcares per-*O*-acilados es la reacción de Schotten-Baumann, que consiste en el tratamiento del azúcar con un gran exceso de anhídrido o de cloruro de acilo, utilizando piridina como solvente y activador de la esterificación. Sin embargo, la piridina es muy tóxica y presenta olor desagradable [48,49]. Tratando de utilizar un procedimiento más benigno se acetiló la lactosa utilizando anhídrido acético y acetato de sodio como reactivos [40] obteniéndose la octoacetillactosa con buen rendimiento (Esquema 5).

El derivado per-*O*-acetilado se sometió a una glicosidación utilizando BF_3**.**Et_2O como promotor y tiocresol como aceptor de glicosilo. Se obtuvo **11,** que recristalizado de etanol presentó en el espectro de RMN ^{1}H una señal correspondiente al H-1 que se observa como un doblete a δ 5,03 con una $J_{1,2}$ 9,8 Hz. Esto indicó una relación *trans* entre H-1 y H-2, y por lo tanto la configuración β, comportamiento esperado dada la presencia de un grupo participante en C-2.

Por tratamiento de **11** con NaMeO/MeOH en CH_2Cl_2 anhidro, se obtuvo el tolil glicósido **12** con 77% de rendimiento a partir de lactosa.



Esquema 5

Se procedió a la protección selectiva de **12** para obtener **10**. Esto se logró por protección selectiva temporaria del OH-3', para luego sustituir el resto de las posiciones con un grupo protector ortogonal y finalmente desproteger el OH-3'. Para este fin, se utilizó la formación de un acetal de estaño intermediario, seguido de una bencilación con cloruro de 4-metoxibencilo. Las protecciones regioselectivas mediadas por derivados organostánicos, han sido muy utilizadas para obtener en un solo paso derivados selectivamente protegidos, simplificando significativamente las secuencias sintéticas. Sin embargo, el origen de la regioselectividad observada no está completamente elucidado [50].

Al tratar un diol con Bu_2SnO se produce la formación de un acetal cíclico. Para esto, se requiere una configuración *cis*- entre dos OH vecinos, y en el caso de lactosa, esa situación se dá entre los OH-3' y 4'. Así, por tratamiento de **12** con Bu_2SnO a reflujo en tolueno, utilizando una trampa de Dean-Stark para remover el agua formada, se observó una paulatina solubilización del material de partida, lo cual se considera indicativo de la formación del acetal, ya que se trata de un producto menos polar y más afín al tolueno. Este acetal **13** se utilizó directamente para la bencilación del OH-3', la cual ocurre regioselectivamente debido a la mayor reactividad del hidroxilo ecuatorial involucrado en el acetal de estaño. Como agente bencilante se utilizó cloruro de 4-metoxibencilo, pues el éter resultante se puede hidrolizar selectivamente en condiciones oxidativas muy suaves. Por tratamiento del acetal organostánico **13** con PMBCl en presencia de ion ioduro, que favorece la reacción de sustitución nucleofílica, se obtuvo **14** con 43 % de rendimiento, luego de una purificación por cromatografía en columna (Esquema 6). En el espectro de RMN ^{13}C de **14** (Figura 9) se observó la

desprotección de la señal correspondiente al C-3’ (80,8 ppm) en comparación con la señal análoga en lactosa (72,6 ppm) [51].

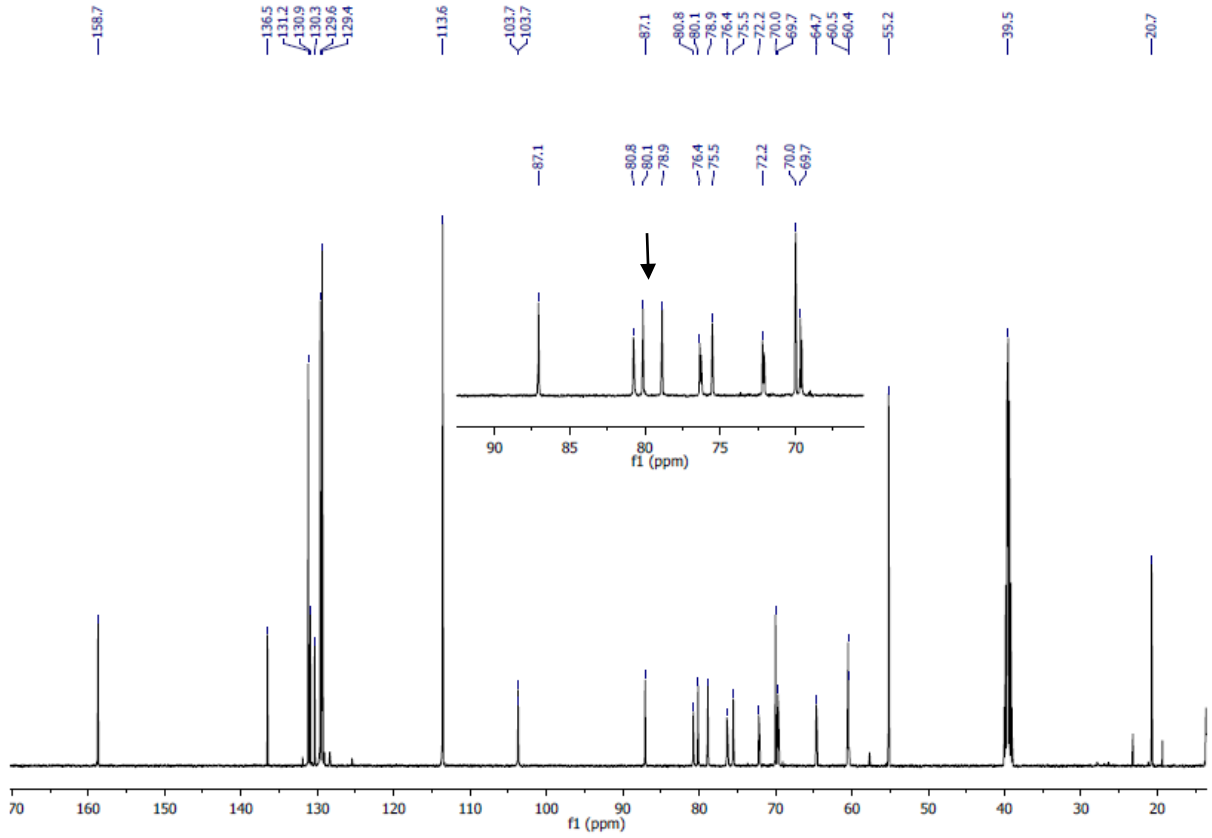
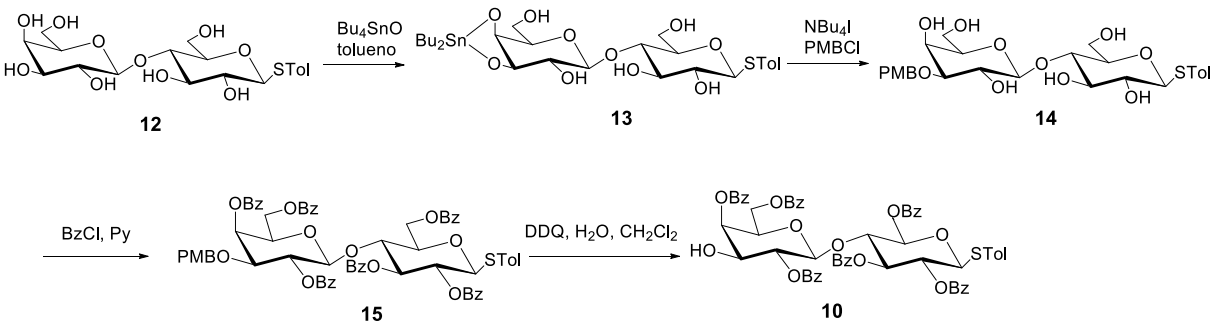


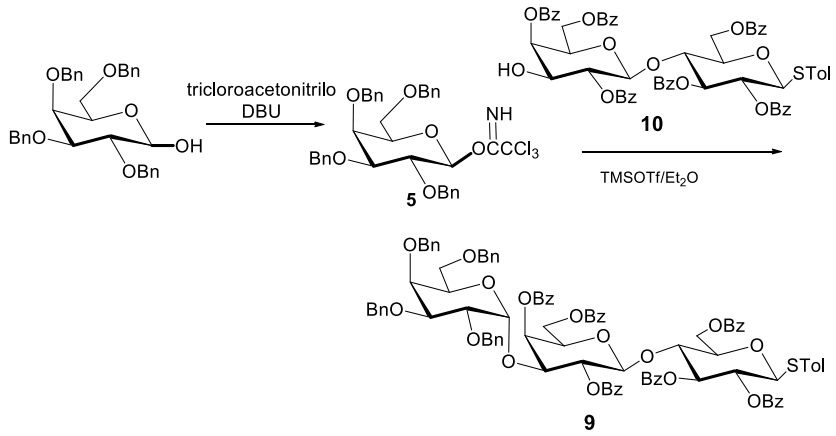
Figura 9 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$-d_6) de **14**

Por tratamiento de **14** con cloruro de benzoílo en piridina, seguido de desbencilación mediada por DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona), se obtuvo **10** con 26% de rendimiento a partir de **12**. Si bien el rendimiento global de obtención de **12** fue bajo, el material de partida es muy accesible y en una breve secuencia de reacciones se logró diferenciar el OH-3’ de otros seis hidroxilos.



Esquema 6

El siguiente paso consistió en utilizar el derivado **10** como aceptor en una reacción de glicosidación, empleando un donor convenientemente activado derivado de D-Gal*p.* Dado que la unión a establecer debía tener la configuración 1,2-*cis*, se eligió utilizar el tricloroacetimidato per-*O*-bencilado **5** [52], que no presenta grupo participante, y éter etílico como solvente para que prime el efecto anomérico, con participación del solvente (Esquema 7).



Esquema 7

Desde su desarrollo, el método del tricloroacetimidato ha sido muy utilizado porque tiene la ventaja, respecto a otros métodos, de requerir como activante cantidades catalíticas de un ácido de Lewis, por lo cual es un método suficientemente suave como para preservar otras uniones glicosídicas presentes tanto en el aceptor como en el donor y es compatible con una gran variedad de grupos protectores [52].

Por tratamiento de tetra-*O*-bencil-galactosa comercial con tricloroacetonitrilo en presencia de DBU se obtuvo el tricloroacetimidato **5** [36], el cual, luego de haberlo purificado por cromatografía en columna, se condensó con **10,** y así se obtuvo **9** (65 %). El espectro de RMN ^{1}H de **9** (Figura 10) permitió confirmar la configuración 1,2-*cis* de la nueva unión glicosídica (δ 5.06, J=3.4 Hz, H-1''); mientras que en la región anomérica del espectro de RMN ^{13}C, además de señales análogas a las presentes en **9** (ver Materiales y Métodos), se observó adicionalmente una señal a 94.6 ppm, característica de la configuración α-D-Gal*p*, correspondiente a C-1'' (Figura 11).

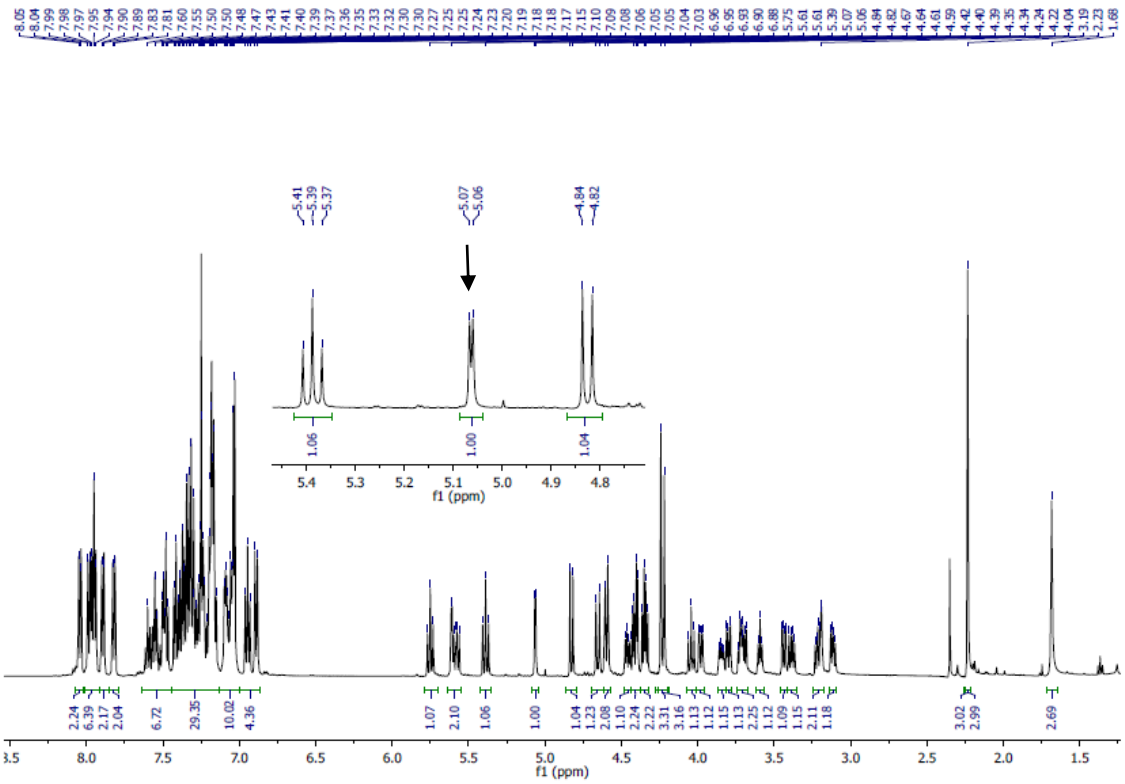


Figura 10 - Espectro RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de **9**

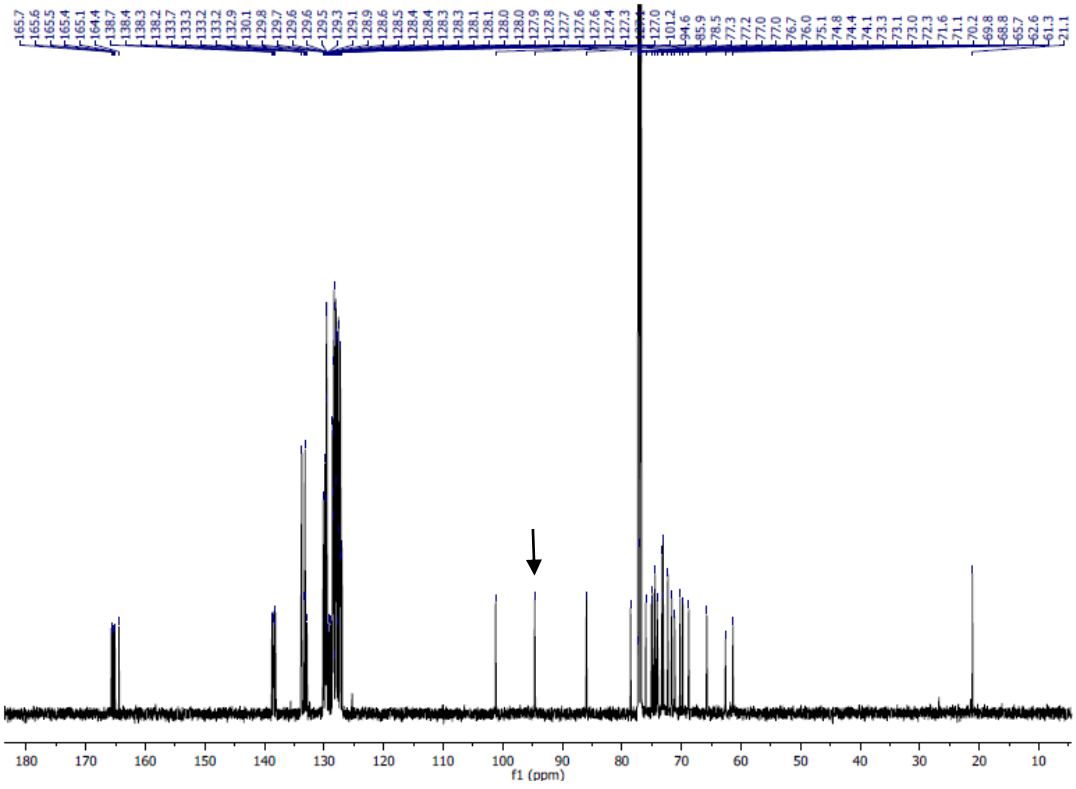


Figura 11 - Espectro RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) de **9**.

Una vez sintetizado **9**, el siguiente paso consistió en la instalación de la cadena alquílica funcionalizada con el grupo amino, para su posterior conjugación. Se decidió utilizar 6-aminohexanol, el cual debía protegerse convenientemente en el grupo amino, dado el mayor carácter nucleofílico respecto al grupo hidroxilo. Esta mayor nucleofília justamente facilitó la protección: por tratamiento de 6-aminohexanol con cloroformiato de bencilo en medio acuoso alcalino, se obtuvo el derivado benciloxicarbonilamino-1-hexanol ($OH(CH_2)_6NHCBz$).

Por activación de **9** con NIS/HOTf a temperatura ambiente [47], en presencia de 6-benciloxicarbonilamino-1-hexanol se obtuvo el glicósido **16** con 74 % de rendimiento (Esquema 8). Si bien en el espectro de RMN ^1H no se encuentra resuelta la señal correspondiente a la nueva unión glicosídica, por superposición con otras señales, se confirmó que la reacción efectivamente ocurrió por la presencia de las señales correspondientes al brazo espaciador a δ 2,98 (m, 2H, CH_2N), 1.48-1.38 (m, 2H, CH_2), y 1.20-1.07 (m, 6H, CH_2) ppm (Figura 12). En el espectro de RMN ^{13}C se observaron las señales anoméricas a δ 101.18 (C-1'), 101.12 (C-1), 94.7 (C-1''), confirmando la configuración β de C-1 así como también las señales correspondientes al brazo espaciador a δ 40.8 CH_2N), 29.6, 29.1, 26.2 y 25.4 (4 CH_2)ppm (Figura 13).

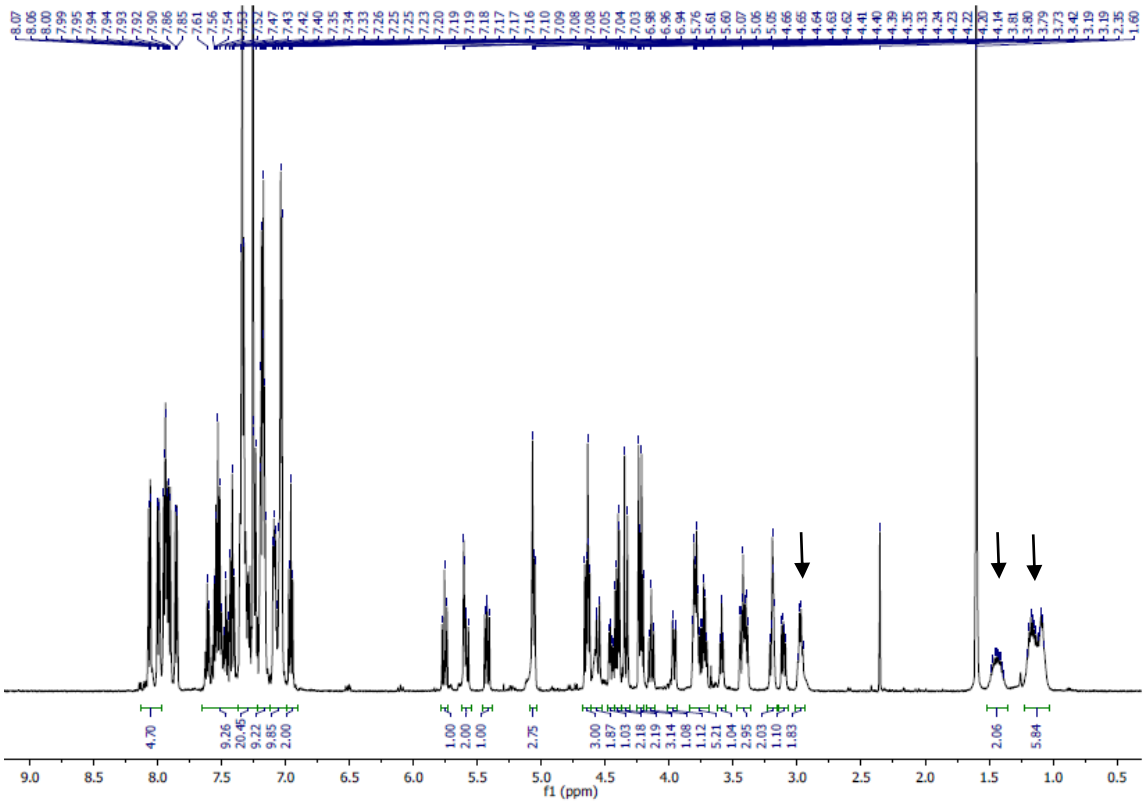


Figura 12 - Espectro RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) de **16**.

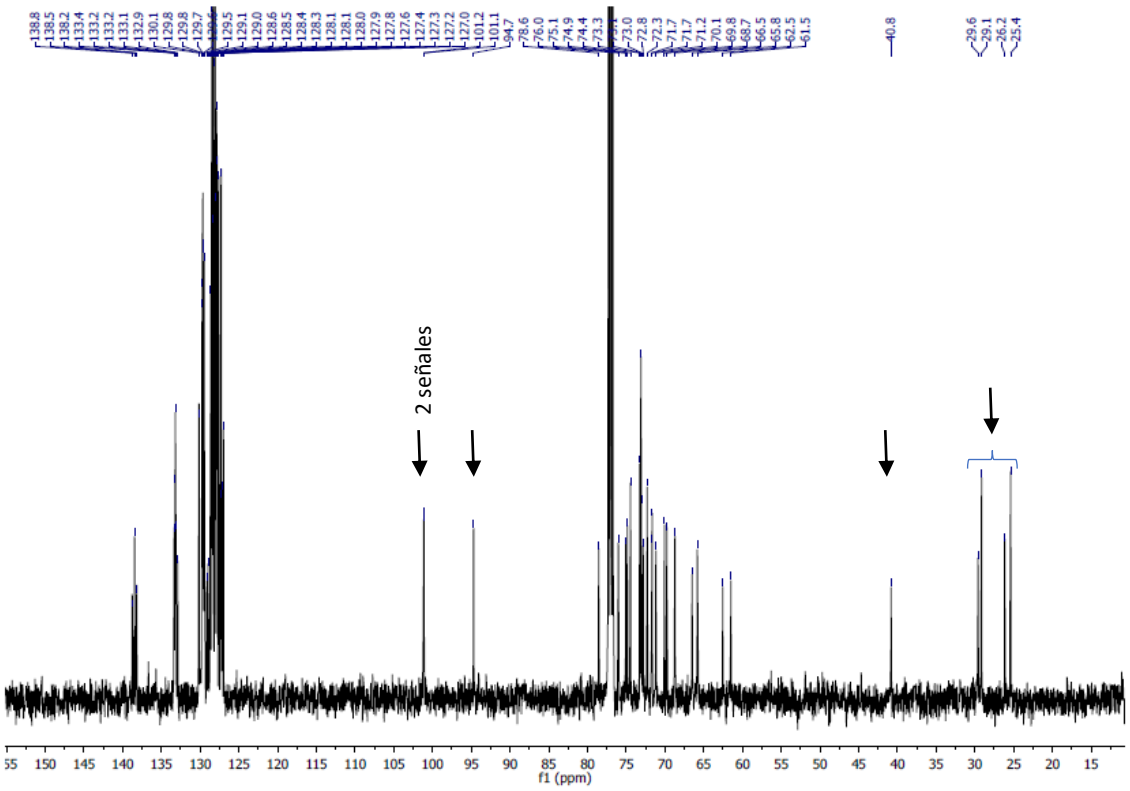
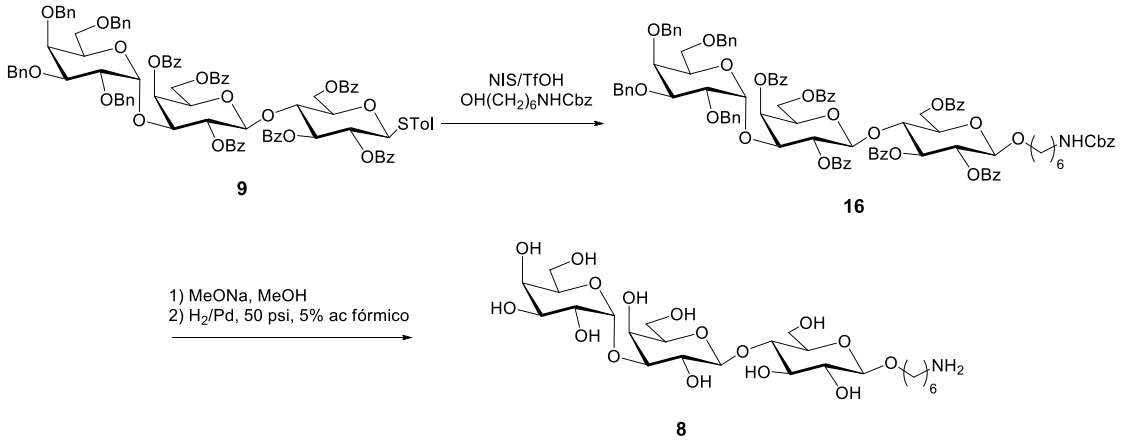


Figura 13 - Espectro RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) de **16**.

La desprotección total de **16** se realizó con metóxido de sodio en metanol, para remover los grupos benzoilos, seguido de hidrogenólisis catalítica sobre Pd/C en medio ácido para producir la desbencilación, tanto de los hidroxilos como el del grupo amino. Así, se obtuvo el trisacárido libre **8** con 91% de rendimiento global para los dos pasos de desprotección (Esquema 8). Tanto en el espectro de RMN ^{1}H como ^{13}C se observó la desaparición de las señales aromáticas confirmando la reacción de desprotección. Por otro lado, se observaron los hidrógenos anoméricos como dobletes a δ 5.15 (J=3.9 Hz, H-1''), 4.53 (J=7.8 Hz, H-1') y 4.49 (J=8.0 Hz, H-1) ppm (Figura 14) y las señales correspondientes a los carbonos anoméricos a 102.8 (C-1'), 102.0 (C-1) y 95.4 (C-1'') ppm (Figura 15). La estructura de **8** fue confirmada por el valor m/z 604,2803 (M+H) obtenido por HR ESIMS, coincidente con la masa exacta calculada para dicha molécula.



9 **16** **8**

Esquema 8

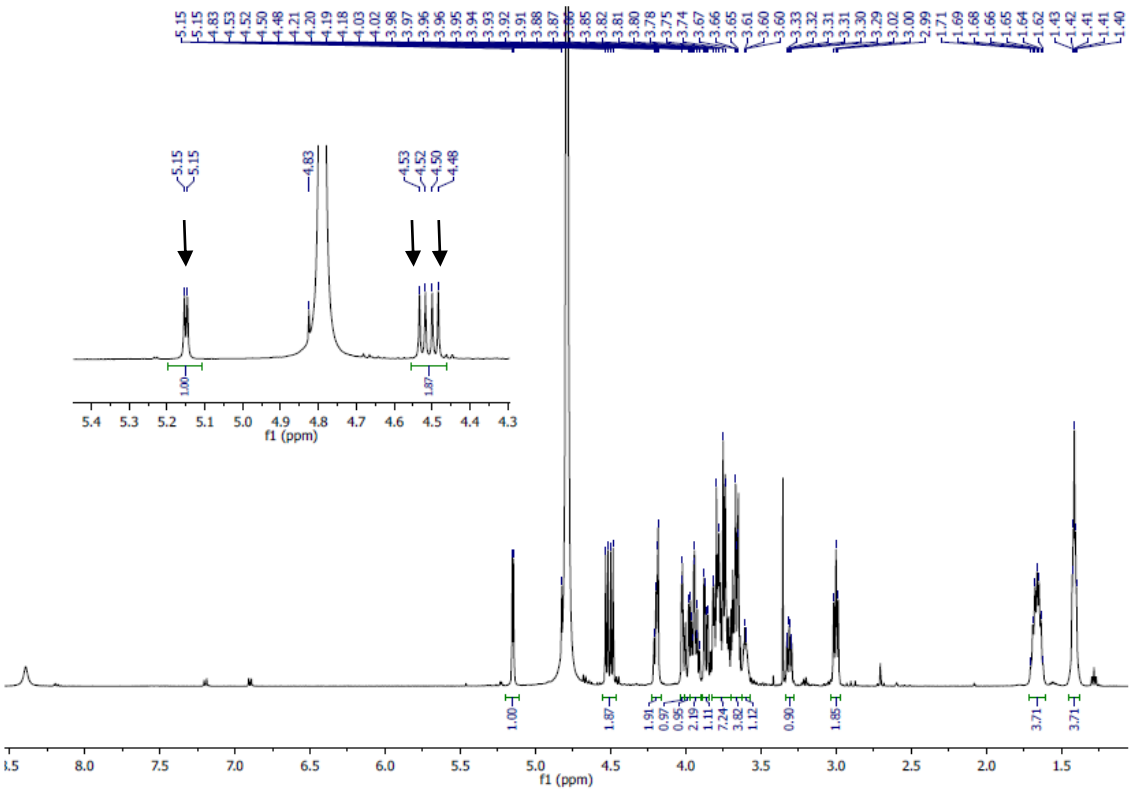


Figura 14 - Espectro RMN ^{1}H (500 MHz, D_2O) de **8**.

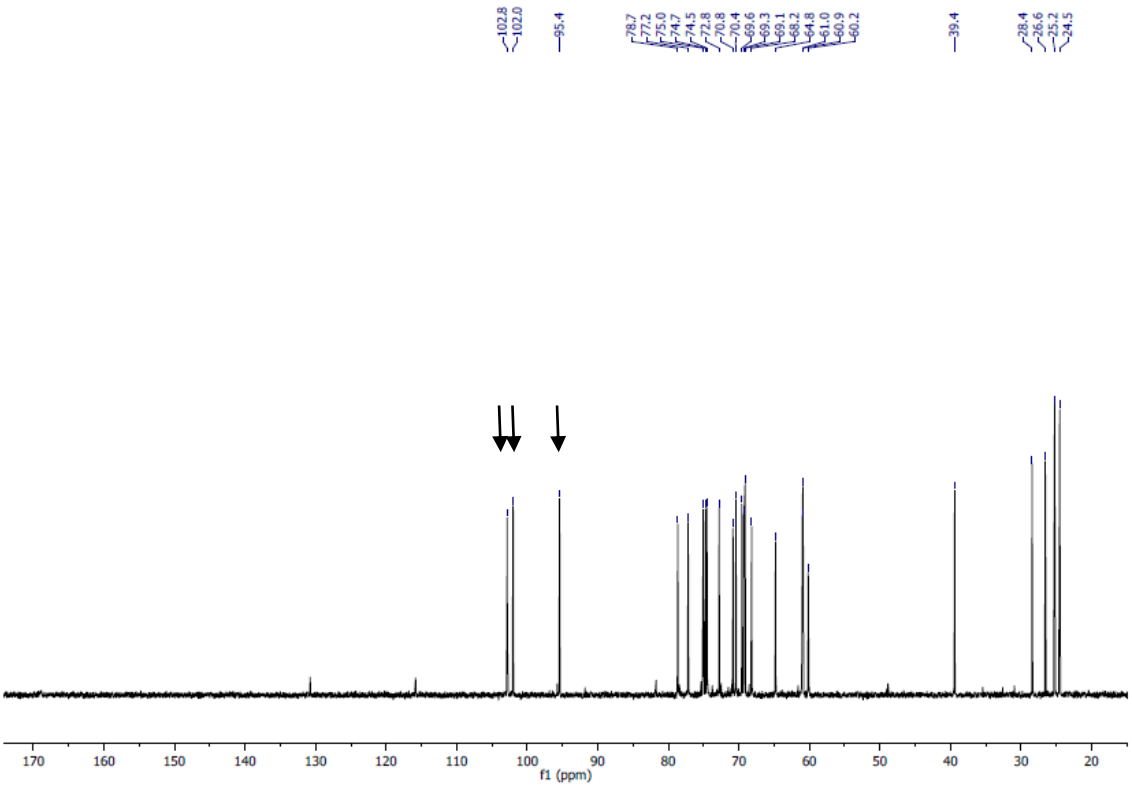
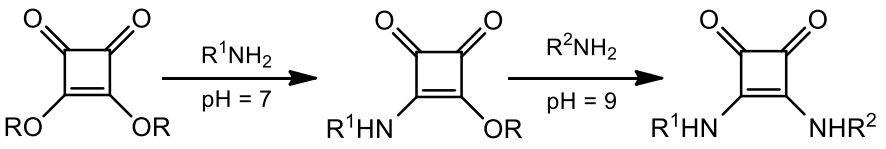


Figura 15 - Espectro RMN ^{13}C (126 MHz, D_2O) de **8**.

Conjugación de 6-aminohexil D-Gal*p*-(α1→3)-Gal*p*-(β1→4)- Glc*p* (8)

Para la conjugación de oligosacáridos a péptidos y proteínas se han utilizado distintos métodos [53,54]. Sin embargo, muchos de estos emplean condiciones oxidativas o reductoras que pueden alterar la estructura del oligosacárido a conjugar, así como también se dificulta el monitoreo del progreso de la reacción de conjugación. En nuestro caso se decidió utilizar el "método del escuarato" desarrollado por Kovac [42]. Este consiste en acoplar dos aminas por medio de un residuo de ácido escuárico. Utilizando condiciones de reacción apropiadas, se puede acoplar primero el grupo amino de un oligosacárido convenientemente derivatizado, obteniendo un producto intermediario comúnmente llamado "monoamida monoéster"[55] seguido del acoplamiento a grupos amino naturalmente presentes en proteínas. Esta secuencialidad se logra empleando distintas condiciones de pH (Esquema 9).

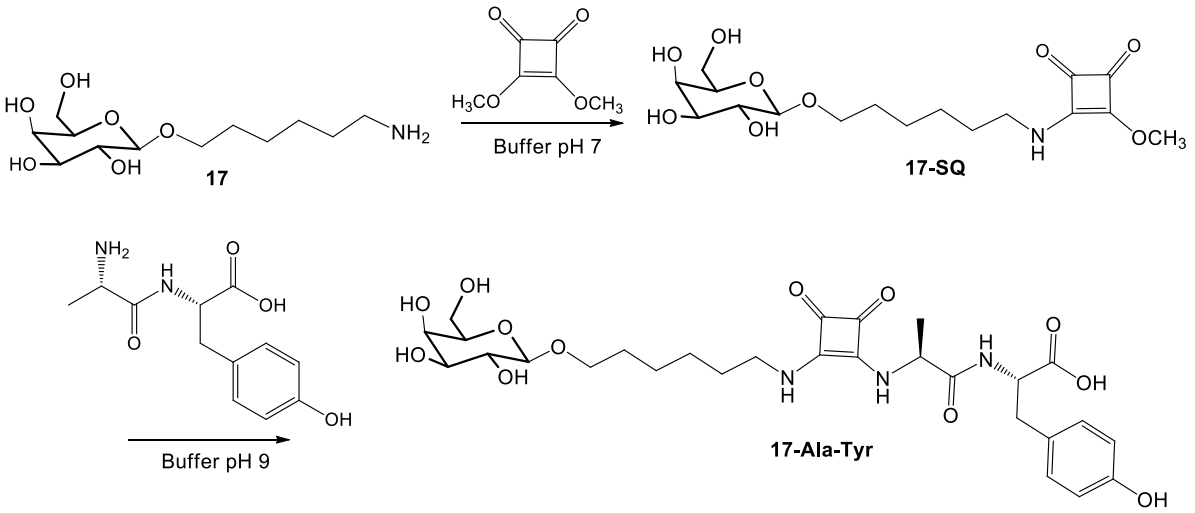


R: grupo alquilo

Esquema 9 – Mecanismo de conjugación de aminas por medio de un diéster de ácido escuárico [55].

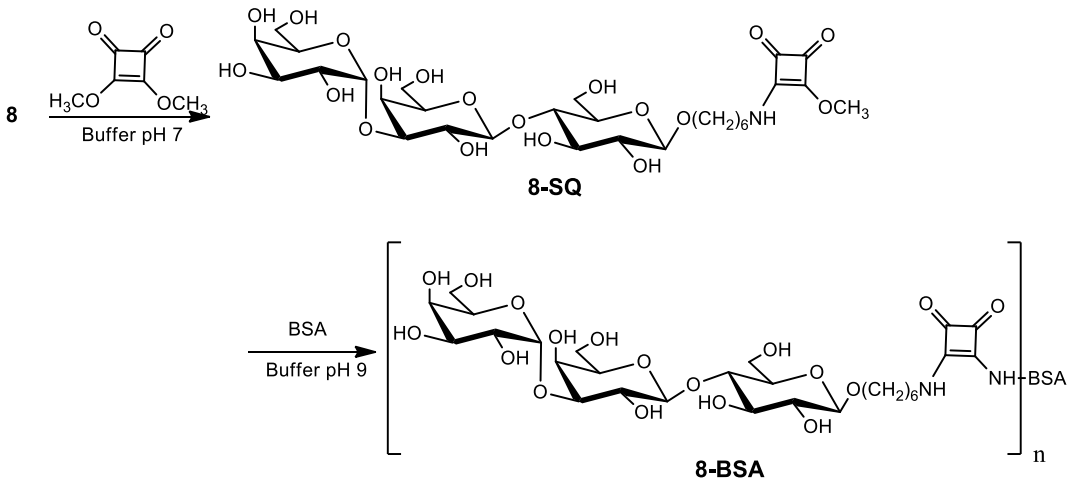
Por otro lado, se han utilizado deferentes derivados de ac. escuárico y se determinó que el reactivo más conveniente es el escuarato de dimetilo. [55]

Para optimizar la reacción de conjugación de los azúcares a la BSA o a péptidos mediante el método del escuarato, primeramente, se decidió conjugar el 6-aminohexil β-D-Gal*p* con el dipéptido Ala-Tyr (Esquema 10).



Esquema 10

Se realizó la reacción de **17** con escuarato de dimetilo en buffer fosfato 0,1M pH 7, utilizando un exceso de escuarato (2 equiv.) para obtener **17-SQ**. Este se purificó mediante una columna de fase reversa RP-18, que permitió separar las sales, el excedente de dimetil escuarato y sus productos de descomposición monometil escuarato y dihidroxiescuarato. Este monometiléter **17-SQ** se acopló con Ala-Tyr a pH 9 utilizando un buffer bórax-fosfato 0,1M. El producto de la conjugación se purificó con una columna de fase reversa RP-18 obteniendo el compuesto **17-Ala-Tyr** con un 66% de rendimiento.



Esquema 11

Para las conjugaciones posteriores se preparó **8-SQ** en mayor cantidad y resultó más eficiente purificarlo cromatográficamente utilizando una columna de carbón activado, en lugar de una columna de fase reversa RP-18.

El derivado **8-SQ** se acopló con BSA de manera análoga a la obtención de **17-Ala-Tyr,** aunque en este caso el producto de conjugación se sometió a una diálisis que permitió separar el excedente de **8-SQ** y las sales. Por liofilización de la solución resultante se obtuvo **8-BSA** (99 %) cuyo espectro MALDI mostró que se trataba de una estructura mayoritaria de PM promedio 86356 Da, que no contenía BSA libre (Figura 16).

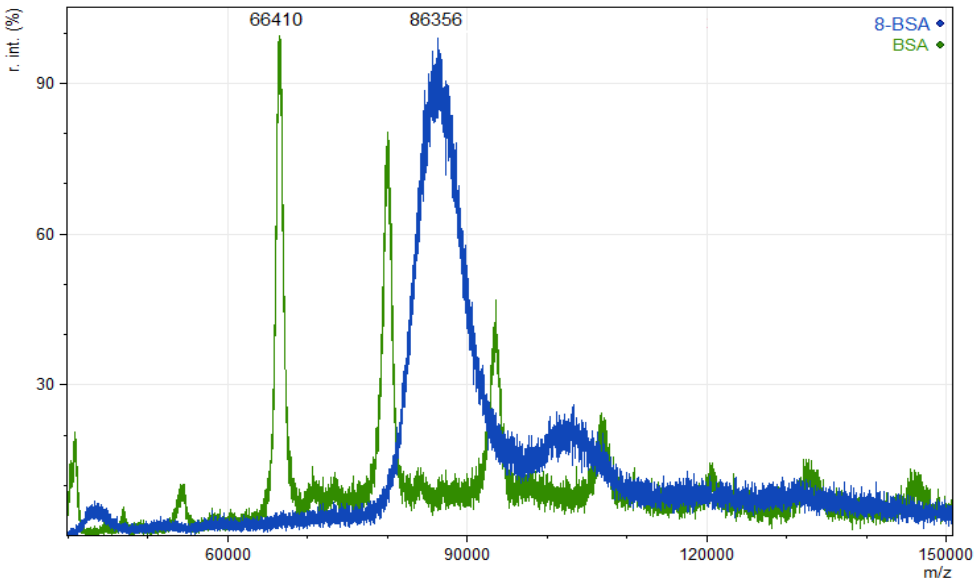
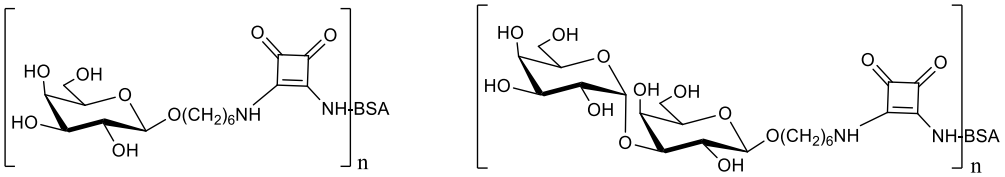


Figura 16 – Espectros de MS MALDI-TOF de **8-BSA** (azul) liofilizado y BSA (verde) liofilizada. Nótese que para BSA se observan clusters adicionales.

Para los estudios inmunológicos también se realizó la síntesis de los 6-aminohexilglicósidos de β-D-Gal*p* y α-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Gal*p* (no se describe su síntesis) con BSA (Figura 17) de manera análoga a la síntesis de **8**.



17-BSA **18-BSA**

Figura 17

El análisis por SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes de alícuotas de las reacciones de conjugación con BSA a 24 y 48 hs permitió, por un lado, confirmar que a las 24 h la reacción se había completado, ya que no se observaba BSA libre (Figura 18). Por otro lado, mostró que los productos de conjugación eran homogéneos, pues se observaba para cada producto una banda estrecha con diferencias de PM acordes al grado de conjugación deducido por MS MALDI-TOF.

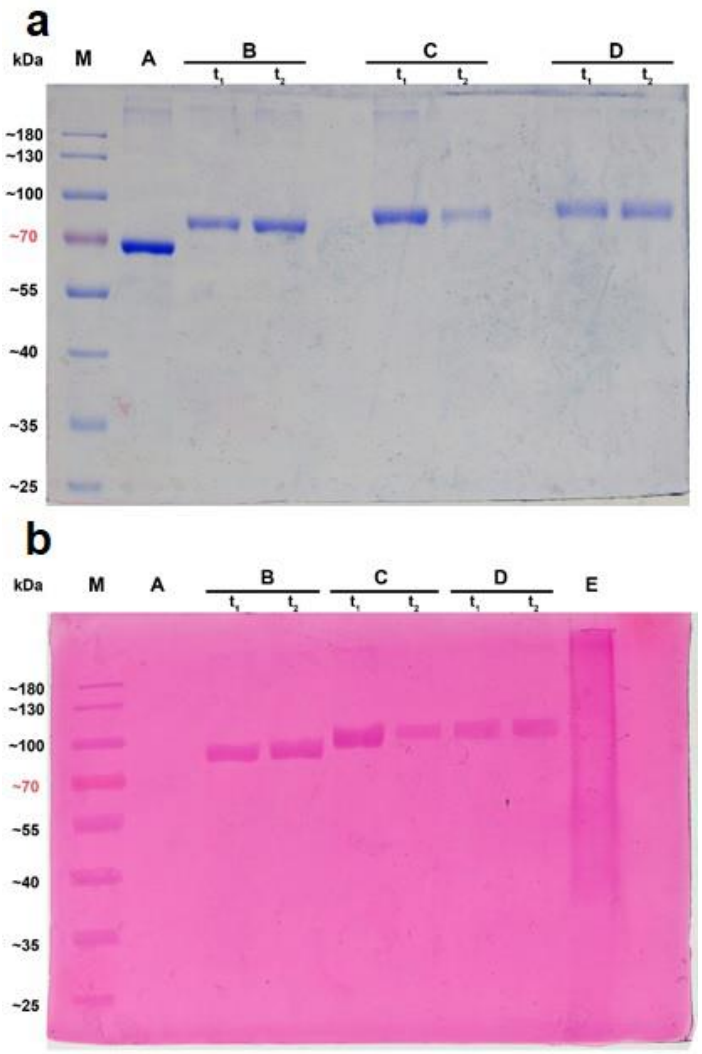


Figura 18 – SDS-PAGE 10 % de azúcares sintéticos conjugados a BSA. a) teñido con Coomassie Blue R-250 y b) teñido con PAS. Siendo M: patrón de pesos moleculares, A: BSA liofilizada, B: **17-BSA**, C: **18-BSA**, D: **8-BSA**, E: homogenato de tripomastigotes, t_1: muestra extraída a las 24 hs de reacción y t_2: muestra extraída a las 48 hs de reacción

La "carga de azúcar" de los conjugados se estimó en bases a la información obtenida por espectrometría de masas MALDI-TOF (Tabla 1). Se calculó restando la masa molecular promedio de BSA a la masa molecular promedio de cada conjugado y dividiendo esto por la masa molecular nominal del azúcar, considerando la pérdida de átomos (ver Esquema 11). Así, se estimó que en promedio los conjugados **8-BSA**, **17-BSA** y **18-BSA** presentan 35, 38 y 29 unidades de **8**, **17** y **18**, respectivamente. La BSA utilizada contiene 59 unidades de lisina por molécula [56]. Por lo tanto se alcanzó un grado de glicosilación que si bien no es completo, es similar al obtenido por otros autores [42].

	PM promedio (g/mol)	masa de azúcar (g/mol)	PM azúcar (g/mol)	1 mg de conjugado contiene	CARGA DE AZÚCAR
BSA	66410	-	-	-	-
17-BSA	78880	12470	389	0,16 mg de **17**	35
18-BSA	86342	19932	551	0,23 mg de **18**	38
8-BSA	86356	19972	713	0,23 mg de **8**	29

Tabla 1 – Resultados obtenidos a partir de la información de MS MALDI-TOF-MS.

Por otro lado, se realizó la conjugación del monometil éter **8-SQ** con el péptido antigénico sintético MASP (Esquema 12) provisto por el grupo del Dr. Carlos Buscaglia:

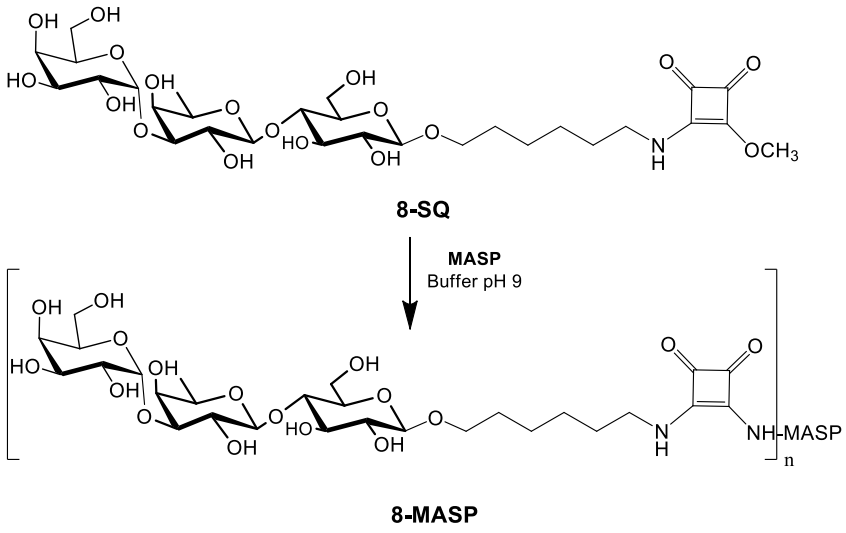
H-KKKLQVAGTKTTTATTGDSDGSC-NH_2 (forma amida)

que responde al siguiente diseño general utilizado para la síntesis de una variedad de péptidos antigénico [43,57]:

Lis-Lis-Lis-Espaciador (2-3aa)-Epitope (15-20 aa)-Espaciador (2-3 aa)-Cisteina

Las 3 Lis del extremo N-terminal constituyen los sitios de acople del oligosacárido funcionalizado con el brazo espaciador con un grupo amino, en el proceso de conjugación. La cisteína del grupo COOH terminal, permite acoplar el glicopéptido a una proteína carrier comercial (BSA). A su vez, se agregaron una serie de aa flanqueantes al epitope central para minimizar un posible efecto estérico del glicano o de la proteína carrier en su reconocimiento por los anticuerpos específicos.

La reacción de conjugación con MASP se realizó a partir de **8-SQ**, de manera análoga a la conjugación con BSA, ajustando el tiempo de reacción en base a la información obtenida por SDS-Page (28 h), para dar **8-MASP** (99%).



Esquema 12

Estudios inmunológicos

Con la premisa de que los pacientes chagásicos crónicos presentan un título alto de anticuerpos contra el epítope αGal [10], se realizaron ensayos de ELISAs con neoglicoconjugados sintetizados. Para ello, se utilizaron microplacas de ELISA NUNC MaxiSorp™ y se midió la respuesta de unión a anticuerpo [43].

Se evaluó la antigenicidad de los azúcares **8**, **17** y **18** conjugados a BSA (**8-BSA**, **17-BSA** y **18- BSA)** frente a sueros de pacientes chagásicos crónicos y sueros de pacientes sanos (negativo) de Argentina. La respuesta de estos compuestos se comparó con la respuesta del Antígeno 2 conjugado a BSA (Ag2-BSA), antígeno utilizado para la detección de Chagas, y la BSA utilizada para la conjugación de azúcares (sometida a los mismos procesos de purificación que los conjugados, por ejemplo: diálisis). No se espera que los sueros presenten inmunoglobulinas contra BSA por lo que la señal observada corresponde al reconocimiento inespecífico de inmunoglobulinas.

Para este primer ensayo se midió la presencia de inmunoglobulinas G (IgG) mediante el uso de anticuerpos secundarios anti-IgG humana acoplados a HRP por medio de la técnica de ELISA. Como se puede observar en la Figura 19, la reactividad de anticuerpos IgG para **8-BSA** y **18-BSA** similar frente a los distintos sueros de pacientes chagásicos crónicos, mientras que **17-BSA** no muestra reactividad contra ninguno de los sueros analizados. Los sueros con mayor reactividad, tanto frente a

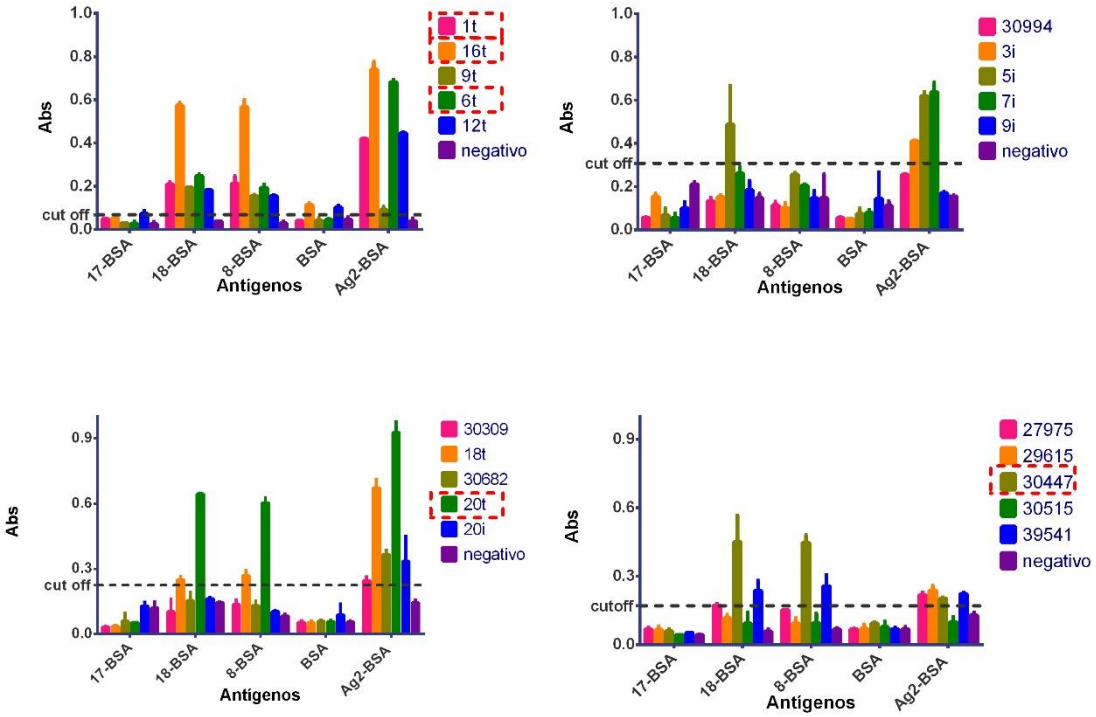


Figura 19 –ELISAs indirectos para IgG que reconocen los antígenos adsorbidos en los wells (pocillos) de la placa. Los sueros que presentaban alta reactividad contra **8-BSA** se encuentran recuadrados. En cada pocillo se sembró 1 µg de los azúcares conjugados y BSA y para Ag2-BSA se sembró 0,5 µg. Cada suero fue diluido 1:500. En cada caso el cut-off se calculó como la media de los sueros negativos más 3 SD de este. Anticuerpo secundario anti-IgG humana acoplado a HRP.

8-BSA, como a **18-BSA** y Ag 2-BSA fueron: 1t, 16t, 6t, 20t y 30447. Al observar que la respuesta de **18-BSA** fue muy similar a la de **8-BSA**, se continuó rastreando sueros que contuvieran IgG contra **18-BSA**. Los resultados se observan en la Figura 20. Se identificaron los sueros RM21 y RM33 como sueros con una reactividad alta frente a **18-BSA**.

A su vez, se realizó un ensayo equivalente al anterior, o sea con los mismos 20 sueros chagásicos crónicos y el suero negativo para la enfermedad de Chagas, sólo que en este caso el anticuerpo secundario utilizado no fue anti-IgG acoplado a HRP, sino anti-IgM humana acoplado también a HRP. En la Figura 21, se observa que la respuesta de los anticuerpos IgM de sueros de pacientes chagásicos presenta la misma tendencia que los anticuerpos IgG, se trata de una reactividad baja, por debajo del cut-off.

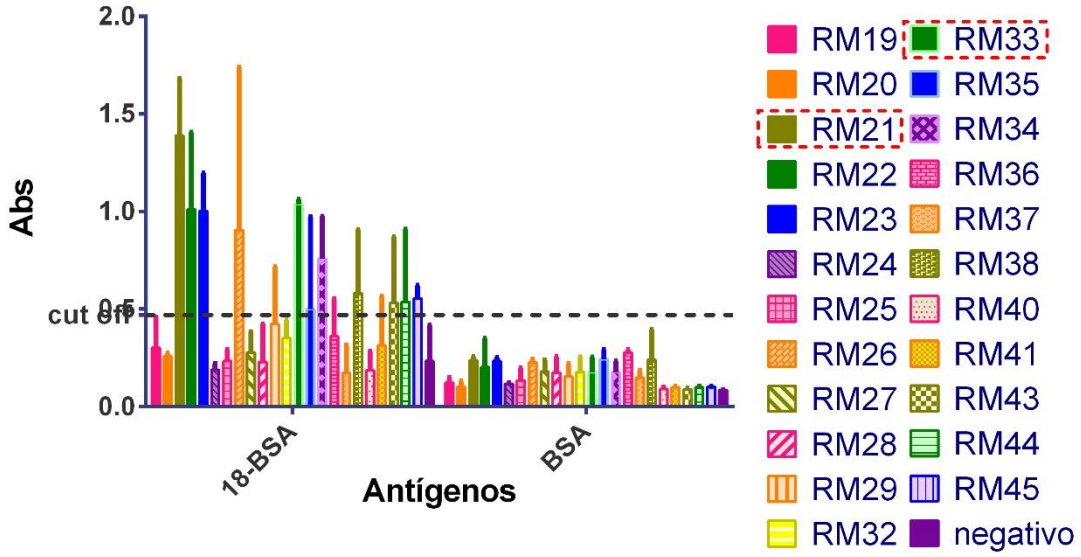


Figura 20 – ELISAs para IgG que reconocen los antígenos adsorbidos en los pocillos de la placa. Los sueros que presentaban alta reactividad contra **18-BSA** se encuentran recuadrados. En cada caso el cut-off se calculó como la media de los sueros negativos más 3 SD de este. En cada pocillo se sembró 1 µg de **18-BSA** y BSA. Cada suero fue diluido 1:500.

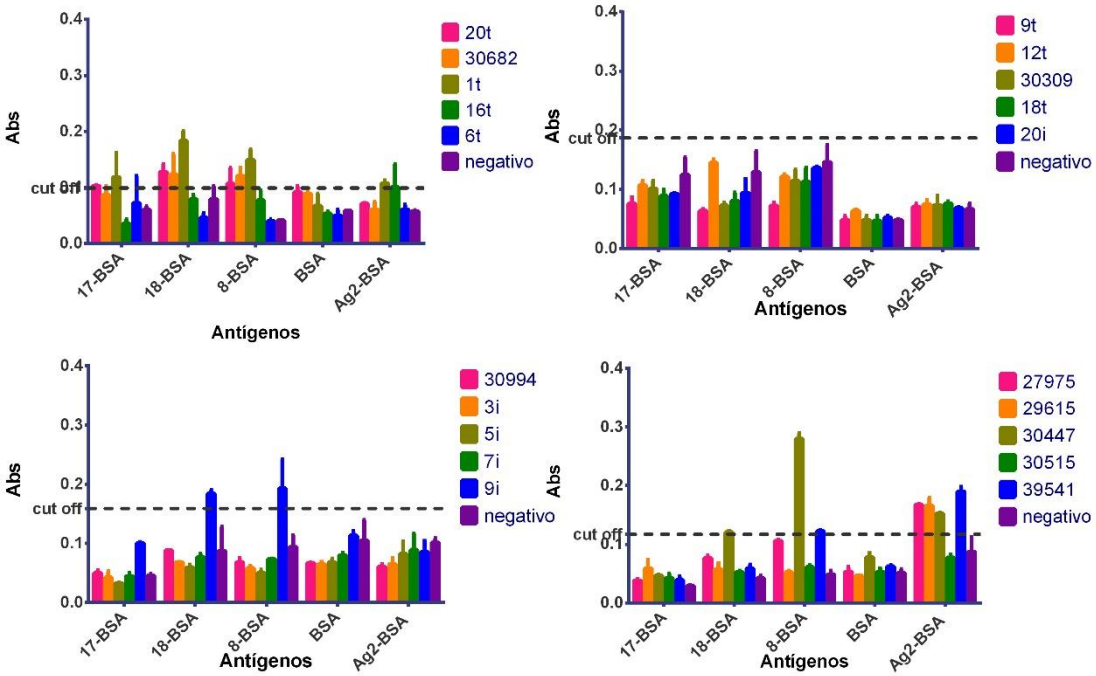


Figura 21 – ELISAs para IgM que reconozcan los antígenos adsorbidos en los wells de la placa. En cada caso el cut-off se calculó como la media de los sueros negativos más 3 SD de este. En cada well se sembró 1 µg de los azúcares conjugados y 0,5 µg de Ag2-BSA. Cada suero fue diluido 1:500.

Esto puede deberse a la corta vida media de las IgM (5 días vs 20 días de IgG) [58]. Por este motivo, no se siguió evaluando la reactividad de IgM, sino solo la de anticuerpos IgG.

Con el objeto de mostrar mayor evidencia de la reactividad y especificidad antigénica de **8-BSA** se realizaron ensayos de ELISA de desplazamiento. Esto se llevó a cabo mediante preincubaciones de sueros chagásicos: 20t (a y d), 16t (b), y 6t (c) con distintas diluciones de los 6-aminohexilglicósidos mostrados en la Figura 22, a modo de establecer la concentración óptima de desplazamiento. Estos sueros fueron seleccionados porque presentaban una respuesta elevada contra **18**-**BSA**, **8-BSA** y comparable con la respuesta contra el Antígeno 2.

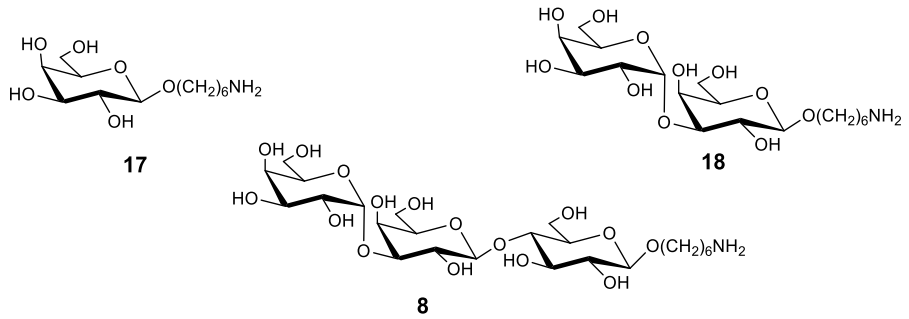


Figura 22 – 6-aminohexilglicósidos utilizados para los ELISAs de desplazamiento.

Al ser un ensayo ELISA indirecto, se esperaba que la preincubación de los sueros con los 6-aminohexilglicósidos disminuyera la absorbancia a mayor concentración del epitope, si este era reconocido por anticuerpos IgG. La preincubación con la concentración máxima de **17** se utilizó a modo de control negativo. Como se puede observar en la Figura 19, los sueros seleccionados no presentaban reactividad para **17-BSA**. Por esta razón, no se espera ver una disminución de la señal IgG-**8-BSA.** En la Figura 23 se observa que a concentraciones menores a 10 µg/µl no hubo modificaciones en la unión **8-BSA**-IgG. El mayor desplazamiento se obtuvo con la concentración máxima de 6-aminohexilglicósidos, la que denominaremos concentración óptima de desplazamiento.

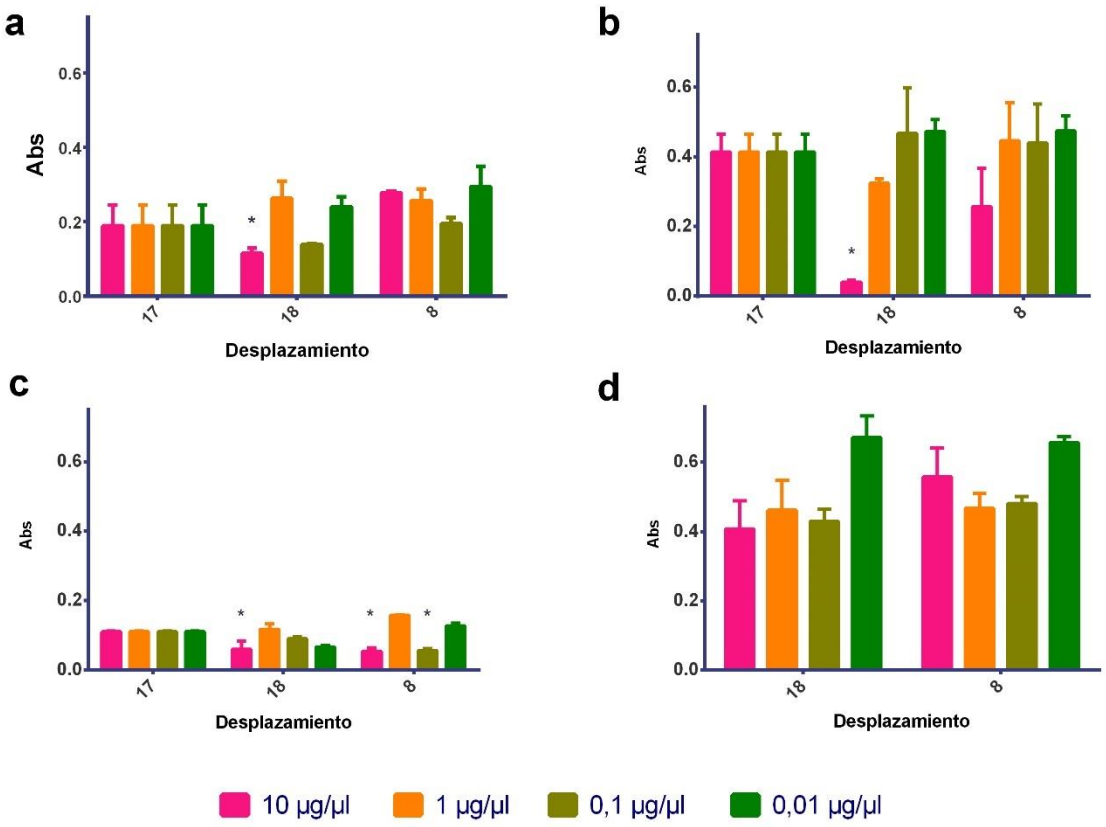


Figura 23 – ELISA de desplazamiento. Al momento de sensibilizar la placa, se sembró 1 µg de **8-BSA** (a, b y c) y 0,5 µg de Ag2-BSA (d). Cada suero fue diluido 1:500 y preincubado por 30 minutos con diluciones indicadas en la figura de los 6-aminohexilglicósidos. Los sueros chagásicos seleccionados fueron: 20t (a y d), 16t (b), y 6t (c). En el eje x indica el azúcar utilizado para cada desplazamiento. La leyenda muestra las concentraciones utilizadas en el desplazamiento. Test de Bonferroni (ANOVA de dos factores), (*): test de desplazamiento estadísticamente significativo (p<0.001).

Se realizaron ensayos de desplazamiento con la concentración óptima de desplazamiento incluyendo un "control de binding inespecífico" (BSA) y controles de reactividad (Figura 24).

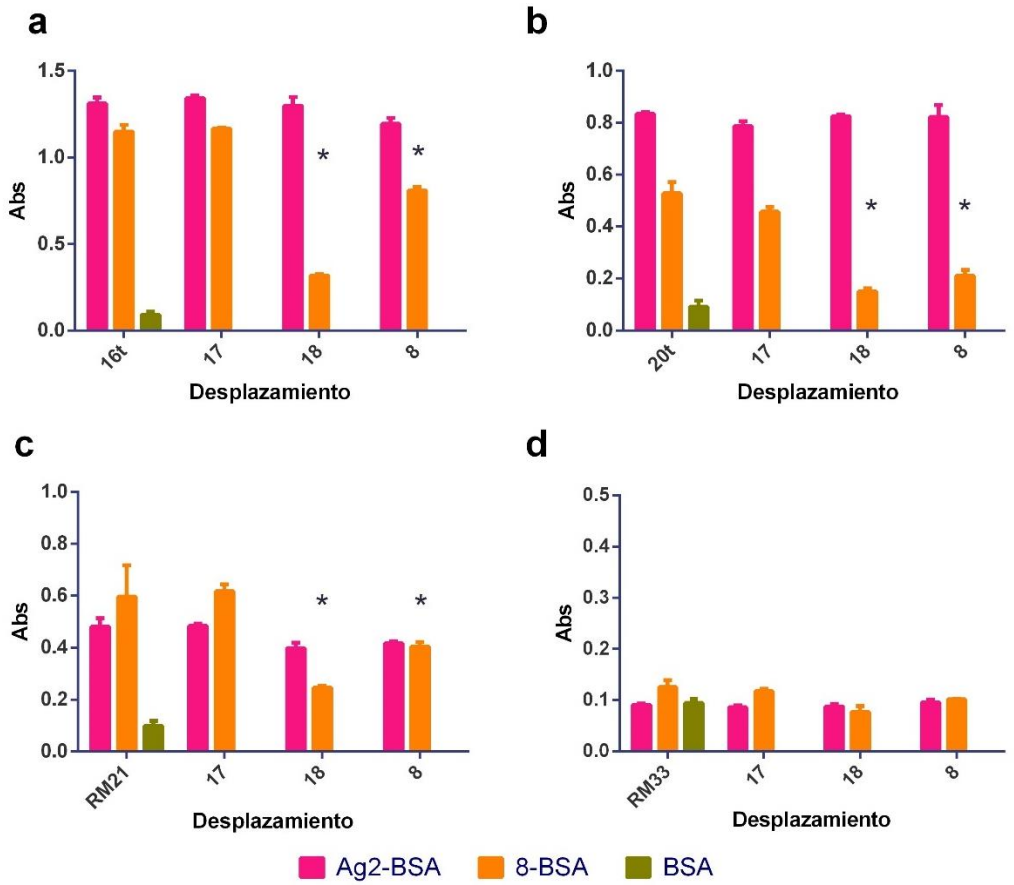


Figura 24 – ELISA de desplazamiento. Al momento de sensibilizar la placa, se sembró 1 µg de **8-BSA** y BSA y 0,5 µg de Ag2-BSA. La leyenda muestra con qué fue sensibilizada la placa. Los sueros chagásicos seleccionados fueron: 16t (a), 20t (b), RM21 (c) y RM33 (d). Cada suero fue diluido 1:500 y preincubado durante 30 minutos con las diluciones indicadas en la figura de los 6-aminohexilglicósidos. El eje x indica con qué azúcar se realizó el desplazamiento; si no se incubó con un azúcar se denomina igual que el suero utilizado. Test de Bonferroni (ANOVA de dos factores), (*): test de desplazamiento estadísticamente significativo (p<0.001).

Los resultados obtenidos por el ELISA de desplazamiento muestran que los sueros utilizados presentan IgG reactivos a **8-BSA** y Ag2-BSA. Al evaluar la reactividad de BSA, la señal observada fue baja. Como se esperaba, la señal de Ag2-BSA no se ve afectada por la presencia de los azúcares, ya que son epítopes distintos y por lo tanto no compiten por los mismos anticuerpos en el suero, corroborando la especificidad de los resultados obtenidos previamente.

Por otro lado, **8-BSA** presentó una disminución de señal cuando se preincubaron los sueros con **8** y **18**, en comparación con la señal observada sin el paso de preincubación. El suero RM33, es el único que no presentó resultados claros para analizar ya que la reactividad del control negativo (BSA) no es estadísticamente distinta a la reactividad de **8-BSA.** Esto puede deberse a la variabilidad de los sueros.

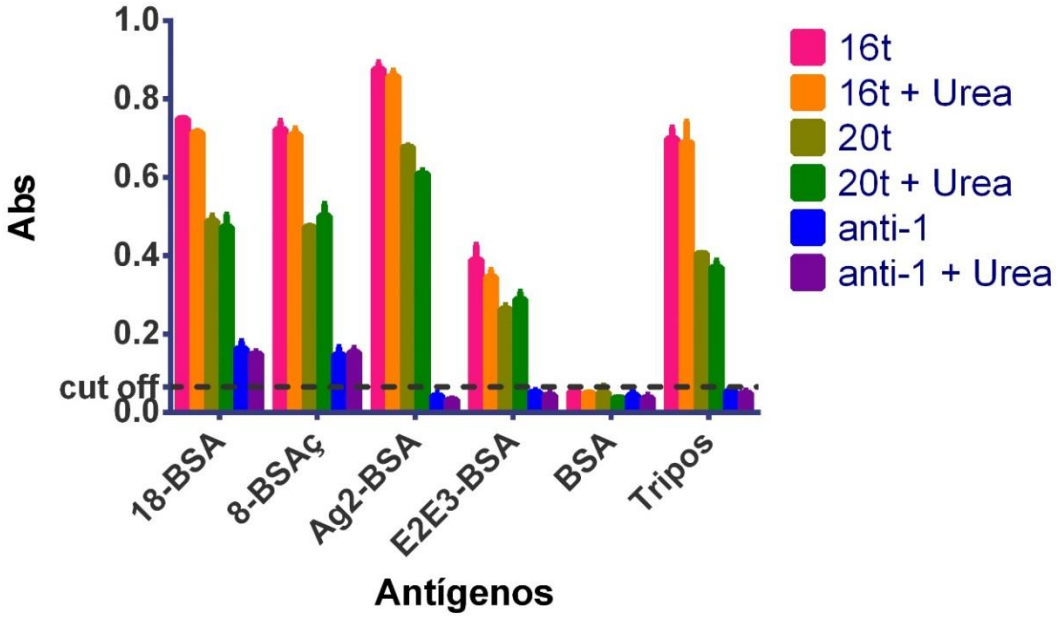


Figura 25 – ELISA de afinidad. Al momento de sensibilizar la placa, se sembró 1 µg de los azúcares conjugados y 0,5 µg de los péptidos Ag2-BSA y E2E3-BSA. Los sueros 16t y 20t fueron diluidos 1:500 y el anticuerpo purificado anti-**1** fue diluido 1:200. En el eje x se describe lo que se utilizó para sensibilizar la placa, siendo Tripos: homogenato de tripomastigotes (*T. cruzi*).

Por último, se realizó un ensayo para determinar la afinidad de los anticuerpos contra los distintos epítopes (**8-BSA**, **18-BSA**, Ag2-BSA, E2E3-BSA, BSA) presentes en los distintos sueros [45]. Para ello, a un set de pocillos se le realizaron lavados con urea en el paso previo a la incubación con el anticuerpo secundario. Los resultados obtenidos (Figura 25) se analizaron empleando un ANOVA de dos factores, seguido del análisis de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observó que el lavado con urea en ninguno de los casos modificó significativamente el "binding" de los anticuerpos al epítope analizado. Se puede observar que la reactividad de los anticuerpos purificados **anti**-**1** fue mucho menor que 16t y 20t; esto puede deberse al bajo rendimiento de la purificación de los anticuerpos por lo que no había grandes cantidades en solución. Este ensayo se podría repetir con una dilución 1:100 en vez de 1:200 para el anticuerpo **anti-1** para demostrar fehacientemente que la reactividad no significativa de este anticuerpo frente Ag2 y E2E3 se debe a que no reconoce estos antígenos.

Luego, se procedió a calcular el índice de avidez de los anticuerpos (ver materiales y métodos) para aquellos sueros con antigenicidad significativamente distinta a BSA.

ANTIGENO	16T	20T	ANTI-1
18-BSA	0,953 ± 0,004	0,979 ± 0,062	0,919 ± 0,096
8-BSA	0,981 ± 0,035	1,059 ± 0,047	1,039 ± 0,152
AG2-BSA	0,979 ± 0,025	0,900 ± 0,011	--
E2E3-BSA	0,886 ± 0,095	1,095 ± 0,074	--
TRIPOS	0,986 ± 0,081	0,914 ± 0,030	--

Tabla 2 – Índice de Avidez obtenidos a partir de los resultados descriptos en la Figura 17 para los distintos sueros utilizados. (--): la reactividad de estos epítopes no fue significativamente distinta a la reactividad de BSA.

Los resultados contenidos en la Tabla 2 demuestran que la afinidad antígeno-anticuerpo para **8-BSA** y **18-BSA** es similar entre sí para los sueros ensayados y, en el caso particular de los anticuerpos purificados **anti-1,** la afinidad por **8-BSA** es levemente mayor que por **18-BSA,** dando una mayor evidencia de que **8-BSA** es un buen análogo de **1**. Todos estos resultados indican que los neoglicoconjugados sintetizados son reconocidos por anticuerpos de alta afinidad, y dada la mayor simplicidad de su síntesis, resultan muy apropiados para utilizarlos en reemplazo de conjugados del trisacárido **1**.

Conclusiones

- ✓ Se sintetizó el trisacárido **8** mediante una secuencia de reacciones simple y eficiente.
- ✓ Se realizó la conjugación de **8** a BSA y a un péptido sintético antigénico por el método del escuarato. Se optimizó el procedimiento sintético y el monitoreo de la reacción, para aplicarlo próximamente a la conjugación con otros péptidos antigénicos.
- ✓ Se caracterizaron los conjugados sintetizados mediante diferentes métodos espectroscópicos
- ✓ Se realizó un análisis de la respuesta inmunológica de los neoglicoconjugados sintetizados, demostrando la potencialidad de **8-BSA** para el desarrollo de herramientas de diagnóstico de la Enfermedad de Chagas y otros estudios inmunológicos.

A futuro

- ✓ Comparar la reactividad inmunológica de **8-BSA** con la del trisacárido **1** sintético conjugado de manera análoga.
- ✓ Estudiar reactividad inmunológica de **8-MASP** y **8-R** (siendo R: otros péptidos antigénicos) en comparación con conjugados análogos de **1.**
- ✓ Elucidar si la conjugación del azúcar con un péptido antigénico genera un efecto antagonista, aditivo o sinérgico en la sensibilidad del ELISA para el uso de los neoglicoconjugados como herramientas de diagnóstico o, a futuro, como vacunas para prevenir la Enfermedad de Chagas.

Bibliografía

[1] J. Clayton, Chagas' disease: pushing through the pipeline, Nature. 465 (2010) S12.

[2] A.J. Rassi, A. Rassi, J.A. Marin-Neto, Chagas disease, Lancet. 375 (2010) 1388–1402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X.

[3] Comité de Expertos de la OMS en el Control de la Enfermedad de Chagas, Control de la Enfermedad de Chagas. Informa de un Comité de Expertos de la OMS., (1991). http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38610/1/924320811_spa.pdf.

[4] R.L. Tarleton, CD8+T cells in Trypanosoma cruzi infection, Semin. Immunopathol. 37 (2015) 233–238. doi:10.1007/s00281-015-0481-9.

[5] V. Balouz, F. Agüero, C.A. Buscaglia, Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps, Adv. Parasitol. 97 (2017) 1–45. doi:10.1016/bs.apar.2016.10.001.

[6] Y.M. Gomes, V.M.B. Lorena, A.O. Luquetti, Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?, Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104 Suppl (2009) 115–21. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753466.

[7] J. Mucci, A.B. Lantos, C.A. Buscaglia, M.S. Leguizamón, O. Campetella, The Trypanosoma cruzi Surface, a Nanoscale Patchwork Quilt, Trends Parasitol. 33 (2017) 102–112. doi:10.1016/j.pt.2016.10.004.

[8] C.A. Buscaglia, V.A. Campo, A.C.C. Frasch, J.M. Di Noia, Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity, Nat. Rev. Microbiol. 4 (2006) 229–236. doi:10.1038/nrmicro1351.

[9] R.M. de Lederkremer, R. Agusti, Chapter 7 Glycobiology of Trypanosoma cruzi, 2009. doi:10.1016/S0065-2318(09)00007-9.

[10] I.C. Almeida, M.A. Ferguson, S. Schenkman, L.R. Travassos, Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of Trypanosoma cruzi., Biochem. J. 304 (Pt 3 (1994) 793–802. sftp://cerca@192.168.2.5/home/cerca/Desktop/data/laptop_files/info/biologia/parasitas/cruzi/immuno_and_immuno_evasion/almeida_travassos_1994_antibodies_agains_glycans_tcruzi.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/90113123-41E0-408F-B950-D81075E9D73C.

[11] R.A. Ashmus, N.S. Schocker, Y. Cordero-Mendoza, A.F. Marques, E.Y. Monroy, A. Pardo, L. Izquierdo, M. Gállego, J. Gascon, I.C. Almeida, K. Michael, Potential use of synthetic α-galactosyl-containing glycotopes of the parasite Trypanosoma cruzi as diagnostic antigens for Chagas disease, Org. Biomol. Chem. 11 (2013)

5579–5583. doi:10.1039/c3ob40887f.

[12] L.L. Pedersen, S.J. Turco, Galactofuranose metabolism: A potential target for antimicrobial chemotherapy, Cell. Mol. Life Sci. 60 (2003) 259–266. doi:10.1007/s000180300021.

[13] D.C. Crick, S. Mahapatra, P.J. Brennan, Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of Mycobacterium tuberculosis, Glycobiology. 11 (2001) 107–118. doi:10.1093/glycob/11.9.107R.

[14] C.R.N. Brito, C.S. McKay, M.A. Azevedo, L.C.B. Santos, A.P. Venuto, D.F. Nunes, D.A. D'Ávila, G.M. Rodrigues Da Cunha, I.C. Almeida, R.T. Gazzinelli, L.M.C. Galvão, E. Chiari, C.A. Sanhueza, M.G. Finn, A.F. Marques, Virus-like Particle Display of the α-Gal Epitope for the Diagnostic Assessment of Chagas Disease, ACS Infect. Dis. 2 (2016) 917–922. doi:10.1021/acsinfecdis.6b00114.

[15] E. Iniguez, N.S. Schocker, K. Subramaniam, S. Portillo, A.L. Montoya, W.S. Al-Salem, C.L. Torres, F. Rodriguez, O.C. Moreira, A. Acosta-Serrano, K. Michael, I.C. Almeida, R.A. Maldonado, An α-Gal-containing neoglycoprotein-based vaccine partially protects against murine cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major, PLoS Negl. Trop. Dis. 11 (2017) 1–25. doi:10.1371/journal.pntd.0006039.

[16] K.S. Subramaniam, V. Austin, N.S. Schocker, A.L. Montoya, M.S. Anderson, R.A. Ashmus, M. Mesri, W. Al-Salem, I.C. Almeida, K. Michael, A. Acosta-Serrano, Anti-α-Gal antibodies detected by novel neoglycoproteins as a diagnostic tool for Old World cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major, Parasitology. 145 (2018) 1758–1764. doi:10.1017/S0031182018000860.

[17] N.S. Schocker, S. Portillo, C.R.N. Brito, A.F. Marques, I.C. Almeida, K. Michael, Synthesis of Galα(1,3)Galβ(1,4)GlcNAcα-, Galβ(1,4)GlcNAcα- and GlcNAc-containing neoglycoproteins and their immunological evaluation in the context of Chagas disease, Glycobiology. 26 (2015) 39–50. doi:10.1093/glycob/cwv081.

[18] H.M. Osborn, Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance. Edited by Alexei V. Demchenko., ChemBioChem. 9 (2008) 1671–1671. doi:10.1002/cbic.200800392.

[19] A. V. Demchenko, General Aspects of the Glycosidic Bond Formation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance, Handb. Chem. Glycosylation Adv. Stereoselectivity Ther. Relev. (2008) 1–27. doi:10.1002/9783527621644.ch1.

[20] L. Goodman, Neighboring-Group Participation in Sugars, Adv. Carbohydr. Chem. 22 (1967) 109–175. doi:10.1016/S0096-5332(08)60152-6.

[21] T.H. Fife, R. Bembi, R. Natarajan, Neighboring carboxyl group participation in the hydrolysis of acetals. Hydrolysis of o-carboxybenzaldehyde cis- and trans-1,2-cyclohexanediyl acetals, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 12956–12963. doi:10.1021/ja953362t.

[22] T. Nukada, A. Berces, M.Z. Zgierski, D.M. Whitfield, Exploring the mechanism of

neighboring group assisted glycosylation reactions, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 13291–13295. doi:10.1021/ja981041m.

[23] J.T. Edward, The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects, Copyright, 1993 Advisory Board, Foreword, in: M.J. Comstock, M.J. Comstock (Eds.), Anomeric Eff. Assoc. Stereoelectronic Eff., 1993: pp. i–vi. doi:10.1021/bk-1993-0539.fw001.

[24] E.L. Eliel, C.A. Giza, Conformational Analysis. XVII. 2-Alkoxy- and 2-Alkylthiotetrahydropyrans and 2-Alkoxy-l,3-dioxanes. The Anomeric Effect, J. Org. Chem. 33 (1968) 3754–3758. doi:10.1021/jo01274a015.

[25] G.J. Boons, Organic Synthesis with Carbohydrates, Sheffield Academic Press Ltd, Sheffield, UK, 2002. doi:10.1002/9780470760321.

[26] E. Juaristi, G. Cuevas, Recent studies of the anomeric effect, Tetrahedron. 48 (1992) 5019–5087. doi:10.1016/S0040-4020(01)90118-8.

[27] R.U. Lemieux, A.A. Pavia, J.C. Martin, K.A. Watanabe, Solvation effects on conformational equilibria. Studies related to the conformational properties of 2-methoxytetrahydropyran and related methyl glycopyranosides, Can. J. Chem. 47 (1969) 4427–4439. doi:10.1139/v69-731.

[28] T. In, Topics in Stereochemistry, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 1969. doi:10.1002/9780470147139.

[29] S. Wolfe, W. Myung-Hwan, D.J. Mitchell, On the magnitudes and origins of the “anomeric effects”, “exo-anomeric effects”, “reverse anomeric effects”, and CX and CY bond -lengths in XCH2YH molecules, Carbohydr. Res. 69 (1979) 1–26. doi:10.1016/S0008-6215(00)85747-X.

[30] U. Ellervik, G. Magnusson, Anomeric Effect in Furanosides. Experimental Evidence from Conformationally Restricted Compounds, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 2340–2347. doi:10.1021/ja00085a013.

[31] J.-P. Praly, R.U. Lemieux, Influence of solvent on the magnitude of the anomeric effect, Can. J. Chem. 65 (1987) 213–223. doi:10.1139/v87-034.

[32] M.B. Cid, F. Alfonso, I. Alonso, M. Martín-Lomas, On the origin of the regioselectivity in glycosylation reactions of 1,2-diols, Org. Biomol. Chem. 7 (2009) 1471. doi:10.1039/b819452a.

[33] U. Westerlind, Synthetic glycopeptides and glycoproteins with applications in biological research, Beilstein J. Org. Chem. 8 (2012) 804–818. doi:10.3762/bjoc.8.90.

[34] D. Crich, V. Dudkin, Why are the hydroxy groups of partially protected N-acetylglucosamine derivatives such poor glycosyl acceptors, and what can be done about it? A comparative study of the reactivity of N-acetyl-, N-phthalimido-, and 2-azido-2-deoxy-glucosamine derivatives , J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 6819–6825. doi:10.1021/ja010086b.

[35] Z.J. Witczak, R. Bielski, Coupling and Decoupling of Diverse Molecular Units in Glycosciences, 2017. doi:10.1007/978-3-319-65587-1.

[36] B. Wegmann, R.R. Schmidt, The application of the trichloroacetimidate method to the synthesis of α-d-gluco- and α-d-galactopyranosides1, J. Carbohydr. Chem. 6 (1987) 357–375. doi:10.1080/07328308708057926.

[37] M.E. Giorgi, R. Lopez, R. Agusti, C. Marino, R.M. de Lederkremer, Synthesis of a model trisaccharide for studying the interplay between the anti α-Gal antibody and the trans-sialidase reactions in Trypanosoma cruzi, Carbohydr. Res. 450 (2017) 30–37. doi:10.1016/j.carres.2017.08.007.

[38] C. Wang, Q. Li, H. Wang, L.H. Zhang, X.S. Ye, A new one-pot synthesis of Gb3 and isoGb3 trisaccharide analogues, Tetrahedron. 62 (2006) 11657–11662. doi:10.1016/j.tet.2006.09.058.

[39] J.M.H. Cheng, E.M. Dangerfield, M.S.M. Timmer, B.L. Stocker, A divergent approach to the synthesis of iGb3 sugar and lipid analogues via a lactosyl 2-azido-sphingosine intermediate, Org. Biomol. Chem. 12 (2014) 2729–2736. doi:10.1039/c4ob00241e.

[40] P. Xu, J.Y. Yang, P. Kováč, Observations on the preparation of β-lactose octaacetate, J. Carbohydr. Chem. 31 (2012) 711–720. doi:10.1080/07328303.2012.739230.

[41] A.K. Choudhury, A.K. Ray, N. Roy, Synthesis Of Tetrasaccharide Repeating Unit Of The K-Antigen From Klebsiella Type-16, J. Carbohydr. Chem. 14 (1995) 1153–1163. doi:10.1080/07328309508005401.

[42] A. Chernyak, A. Karavanov, Y. Ogawa, P. Kováč, P. Kova, Conjugating oligosaccharides to proteins by squaric acid diester chemistry: Rapid monitoring of the progress of conjugation, and recovery of the unused ligand, Carbohydr. Res. 330 (2001) 479–486. doi:10.1016/S0008-6215(01)00018-0.

[43] V. Balouz, M.L.M. De Cámara, G.E. Cánepa, S.J. Carmona, R. Volcovich, N. Gonzalez, J. Altcheh, F. Agüero, C.A. Buscaglia, Mapping antigenic motifs in the trypomastigote small surface antigen from Trypanosoma cruzi, Clin. Vaccine Immunol. 22 (2015) 304–312. doi:10.1128/CVI.00684-14.

[44] P. Srinivasan, E. Ekanem, A. Diouf, M.L. Tonkin, K. Miura, M.J. Boulanger, C.A. Long, D.L. Narum, L.H. Miller, Immunization with a functional protein complex required for erythrocyte invasion protects against lethal malaria, Proc. Natl. Acad. Sci. 111 (2014) 10311–10316. doi:10.1073/pnas.1409928111.

[45] V.A. Campo, C.A. Buscaglia, J.M. Di Noia, A.C.C. Frasch, Immunocharacterization of the mucin-type proteins from the intracellular stage of Trypanosoma cruzi, Microbes Infect. 8 (2006) 401–409. doi:10.1016/j.micinf.2005.07.008.

[46] P. Konradsson, D.R. Mootoo, R.E. Mcdevitt, B. Fraser-reid, Iodonium Ion generated, J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1990) 270–272.

[47] G.H. Veeneman, S.H. van Leeuwen, J.H. van Boom, Iodonium ion promoted reactions at the anomeric centre. II An efficient thioglycoside mediated approach toward the formation of 1,2-trans linked glycosides and glycosidic esters, Tetrahedron Lett. 31 (1990) 1331–1334. doi:10.1016/S0040-4039(00)88799-7.

[48] G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, 4-Dialkylaminopyridines as Highly Active Acylation Catalysts. [New synthetic method (25)], Angew. Chemie Int. Ed. English. 17 (1978) 569–583. doi:10.1002/anie.197805691.

[49] E.F. V. Scriven, 4-Dialkylaminopyridines: super acylation and alkylation catalysts, Chem. Soc. Rev. 12 (1983) 129. doi:10.1039/cs9831200129.

[50] M. Giordano, A. Iadonisi, Tin-mediated regioselective benzylation and allylation of polyols: Applicability of a catalytic approach under solvent-free conditions, J. Org. Chem. 79 (2014) 213–222. doi:10.1021/jo402399n.

[51] K. Bock, C. Pedersen, H. Pedersen, Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Data for Oligosaccharides, in: Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1984: pp. 193–225. doi:10.1016/S0065-2318(08)60125-0.

[52] R.R. Schmidt, W. Kinzy, Anomeric-oxygen activation for glycoside synthesis: The trichloroacetimidate method, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 50 (1994) 21–123. doi:10.1016/S0065-2318(08)60150-X.

[53] S.F. Slovin, G. Ragupathi, S. Adluri, G. Ungers, K. Terry, S. Kim, M. Spassova, W.G. Bornmann, M. Fazzari, L. Dantis, K. Olkiewicz, K.O. Lloyd, P.O. Livingston, S.J. Danishefsky, H.I. Scher, Carbohydrate vaccines in cancer: Immunogenicity of a fully synthetic globo H hexasaccharide conjugate in man, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (1999) 5710–5715. doi:10.1073/pnas.96.10.5710.

[54] J. Zhang, P. Kováč, Studies on vaccines against cholera. Synthesis of neoglycoconjugates from the hexasaccharide determinant of Vibrio cholerae O:1, serotype Ogawa, by single-point attachment or by attachment of the hapten in the form of clusters, Carbohydr. Res. 321 (1999) 157–167. doi:10.1016/S0008-6215(99)00185-8.

[55] P. Xu, M.N. Trinh, P. Kováč, Conjugation of carbohydrates to proteins using di(triethylene glycol monomethyl ether) squaric acid ester revisited, Carbohydr. Res. 456 (2018) 24–29. doi:10.1016/j.carres.2017.10.012.

[56] ThermoFisher Scientific, User Guide: Imject BSA OVA and mcKLH, (n.d.). https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?id=man0011175&version=a.0&pdfurl=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011175_Imject_BSA_OVA_mcKLH_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogIEltamVjdCBCU0EgT1ZBIGFu (accessed March 17, 2019).

[57] S.J. Carmona, M. Nielsen, C. Schafer-Nielsen, J. Mucci, J. Altcheh, V. Balouz, V.

Tekiel, A.C. Frasch, O. Campetella, C.A. Buscaglia, F. Agüero, Towards High-throughput Immunomics for Infectious Diseases: Use of Next-generation Peptide Microarrays for Rapid Discovery and Mapping of Antigenic Determinants, Mol. Cell. Proteomics. 14 (2015) 1871–1884. doi:10.1074/mcp.M114.045906.

[58] L. Fainboim, J. Geffner, Introducción a la Inmunología humana, 6th ed., PANAMERICANA, 2011. https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/4367/Introduccion-a-la-Inmunologia-Humana.html.

Agradecimientos

A mis padres por su apoyo incondicional en todo lo que me propongo hacer, en especial estos últimos 6 años viviendo en Capital, por su esfuerzo y por estar en cualquier momento a pesar de la distancia.

A mis hermanos, Abel y Valentina, por acompañarme siempre. Los amo.

A Carla Marino por incorporarme en la investigación, formarme como profesional y su paciencia al enseñarme.

A Eugenia Giorgi por transmitirme su conocimiento, alegría y consejos todo el tiempo compartido.

A Carlos Buscaglia por recibirme en su laboratorio y brindarme sus conocimientos acerca de los aspectos biológicos de nuestro tema de investigación.

A Milagros Camara por ser una gran guía en los ensayos inmunológicos, proveer un enfoque distinto a mi tesina y su buena predisposición dentro y fuera del laboratorio.

A Ro, Pablín "el niño solvente", Rosy, Andy, la doctora Lederkremer, Carola, Carmen, Rodri y Lauti por estar disponibles para consultar aspectos experimentales como también compartir un café y charlar de la vida.

A Ivi con quién compartí los últimos ensayos, excelentes charlas en el tren y muchas risas.

A las Resi Girls por compartir centenares de anécdotas por vivir en la misma residencia de *señoritas*. A las OG por estar desde el día uno de la vida en la Gran Ciudad, no sé qué hubiese sido de mi psiquis los primeros años de la carrera si no las hubiese conocido. A todas por ser mi *rilas* después de estar todo el día en la facultad, por las noches de estudio en el comedor y las juntadas tipo ciber en las distintas habitaciones, fueron los mejores 5 años de mi vida y seguro quedan muchos más porque de la residencia me llevé hermanas.

A la gente de que conocí en la facultad: Huguín, Rochex, Cami, Camal, Lolo y Marú por estar desde el día 1 en mi camino como bióloga. Clari, Julián, Vane, Lu, Daniel, Iván y Lucas personas del bien que conocí más adelante en la carrera, pero no los hace menos importante. Agradezco todas las risas, llantos, comidas, veces que me despertaron en clase, juntadas de estudio, ping-pong de preguntas antes del parcial, charlas existenciales y simplemente estar ahí. Y a todos los que conocí por X, Y razón en la facu porque somos de EXACTAS.

A Silvi por acogerme en tu casa innumerable veces y hacerme sentir parte de tu familia.

Y a todos los que estuvieron, están y estarán en mi camino a pesar de las distancias, la situación en que nos conocimos o las veces que cancelé porque tenía que estudiar.