



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE FÁRMACOS
ANTIVIRALES: VACUNA CONTRA EL VIH**

Autores: Cabrera Pineda, María

D.N.I.:53766470Z

del Castillo-Olivares Gómez, Doda Inés D.N.I.:48081778W

Martín González, Leticia

D.N.I.: 15501977T

Tutor: M^a José Hernáiz Gómez-Degano

Convocatoria: Junio 2016

Resumen

El síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA) es un problema en la salud pública a nivel mundial al que se destinan recursos tanto económicos como humanos. Por este motivo es importante tener distintos métodos para atajar esta enfermedad, desde un tratamiento hasta la prevención de la infección por medio de una vacuna. Hasta ahora se han llevado a cabo diversos estudios sobre la posible obtención de una vacuna eficaz. Sin embargo este campo sigue siendo bastante desconocido a pesar de los avances realizados. En la actualidad una de las estrategias más prometedoras es la producción mediante métodos químico-enzimáticos de glicoproteínas que formarán parte de la vacuna.

Abstract

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is a major problem in public health all over the world, so lots of economic and human resources are assigned. That is why is important to have different methods to face this disease, from a treatment to a way of prevention by a vaccine. Until now numerous studies have been made about the possible efficient vaccine. However this field is still very unknown despite the progresses achieved. Nowadays chemoenzymatic synthesis highlights to obtain glycoproteins to be part of the vaccine.

Abreviaturas

VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), SINVIH (sistema de información sobre nuevos diagnósticos de VIH), SIDA (Síndrome De Inmunodeficiencia Humana), OMS (Organización Mundial de la Salud), CAZy (Carbohydrate-active enzyme), GH (glicosidasas), GT (glicosiltransferasas), Man (manosa), GlcNAc (N-acetilglucosamina), ENGasa (endoglicosidasa), SPPS (síntesis peptídica de fase sólida), HATU ((1-H-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroniohexafluorofosfato), Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo), Endo-A (endo- β -N-acetil glucosaminidasa de *Arthrobacter*), Endo-D (endo- β -N-acetil glucosaminidasa de *S. pneumoniae*), RNAasa B (ribonucleasa B bovina), Et3N (trietanolamina), DMC (cloruro de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolina).

INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el responsable del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). A nivel mundial, la OMS estima que alrededor de 35 millones de personas viven con el VIH.¹ En España este virus afecta a 84000 personas aproximadamente según datos del Ministerio de Sanidad y Seguridad Social e Igualdad (MSSSI) del 2013.² Gracias a programas de vigilancia epidemiológica, como el sistema de información sobre nuevos diagnósticos de VIH (SINVIH), se ha conseguido estabilizar el número de nuevos casos de infectados no aumentando así la incidencia de esta enfermedad. Debido al tratamiento antirretroviral para el VIH, en las últimas décadas, se ha logrado reducir de manera considerable la aparición de nuevos casos, sin embargo, este descenso se ha mantenido por lo que es necesario buscar nuevos métodos para el tratamiento de esta enfermedad. Recientemente, se ha optado por otra vía que consiste en prevenir la infección con una vacuna profiláctica, la cual significaría una opción para contener la epidemia mundial.

OBJETIVOS

La vacuna para el VIH estará conformada por moléculas miméticas de las que forman parte de la cubierta protectora del virus que protege a las proteínas más importante para su ciclo vital. Entre estas proteínas destacan la proteína de transmembrana gp41 y la proteína de superficie gp120 (trímero heterodimérico de gp120 y gp41), que participan en la fase de unión del ciclo del VIH, y que tienen en su cubierta protectora restos glicosídicos altamente conservados que hacen innaccesible la parte proteica para las células del sistema inmune del huésped.^{3,4,5} Por un lado, que sean carbohidratos implica una baja inmunogenicidad, pero al ser secuencias altamente conservadas, se deduce que son de vital importancia para el virus y con ello buenas dianas. Esas secuencias son mayoritariamente *N*-glicosilados, si bien podemos encontrar también *O*-glicosilados.^{6,7,8}

A partir de algunos anticuerpos monoclonales encontrados en el suero de pacientes infectados por este virus se han realizado estudios para conocer los epítomos reconocidos por los anticuerpos durante la infección vírica, y se ha visto que estos son los oligosacáridos de manosa presentes en la superficie de las glicoproteínas gp120 y gp41. A raíz de la estructura de estos epítomos, se ha logrado sintetizar moléculas

glicosiladas miméticas a esos oligosacáridos de manosa que resultan ser incluso de mayor afinidad por esos anticuerpos que el epítipo que forma parte del virus.^{4,7,9,10,11,12}

Hasta el 2004 la síntesis química constituía el único método de obtención de glicopéptidos capaces de ser la base del desarrollo de una vacuna contra el VIH. Esto implicaba gran cantidad de pasos con el consiguiente elevado coste económico, la posibilidad de que se cometiesen más errores y el bajo rendimiento obtenido. Sin embargo, en los últimos años, nuevos estudios han puesto en práctica el desarrollo de diferentes síntesis químico-enzimáticas, que facilitarían en muchos aspectos la obtención de las moléculas y con ello se aceleraría la investigación para obtener finalmente la vacuna contra el VIH.^{3,12,13,14}

No obstante el desarrollo de esta vacuna es aún difícil de alcanzar debido a la variabilidad antigénica del virus y a la poca inmunogenicidad del dominio proteico de la cubierta al estar muy glicosilada. Por ello la vacuna tiene como diana las glicoproteínas del VIH.^{3,7,10,15,16}

METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de distintos artículos científicos y reviews sobre la síntesis enzimática de carbohidratos. También se ha consultado información sobre las principales enzimas implicadas en el metabolismo de los mismos consultando bases de datos como CAZy (Carbohydrate Active Enzymes), especialmente en la síntesis de las oligoestructuras que aparecen en las glicoproteínas de la cubierta del virus VIH y sus glicomiméticos. La información utilizada data de los últimos 15 años.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biocatálisis

La biocatálisis, también llamada catálisis enzimática o biotransformación, consiste en el uso de enzimas (biocatalizadores) para llevar a cabo reacciones químicas. A parte de aumentar la velocidad de reacción presentan numerosas ventajas frente a los catalizadores químicos, como metales pesados, que son muy contaminantes para el medio ambiente.

- Las enzimas son catalizadores que presentan una alta eficacia, ya que aumentan la velocidad de reacción en mayor medida que los catalizadores químicos, pudiéndose emplear en concentraciones más bajas.
- Presentan una alta selectividad, tanto regio-, quimio- y enantioselectividad. Esto reduce el uso de grupos protectores¹⁷ disminuyendo el número de pasos en las reacciones de síntesis, aumentando el rendimiento y limitando la producción de sustancias contaminantes.
- Los biocatalizadores son eficientes al presentar condiciones de uso moderadas¹⁷ como el pH (5-8), la temperatura (20-40°C) y la presión, reduciendo así los efectos producidos por las reacciones llevadas a cabo con catalizadores químicos. Por otro lado, los procesos que catalizan se llevan a cabo a través de reacciones que ocurren en medios más respetuosos con el medio ambiente gracias a estas condiciones de uso.
- Las enzimas son económicamente eficientes al reducir los costes de la síntesis química y al poder producirse de forma masiva. Además tienen una gran especificidad por los sustratos.
- A diferencia de los metales pesados, las enzimas son biodegradables siendo pues compatibles con el medio ambiente (Química Verde).¹⁸
- Se pueden utilizar estrategias de inmovilización que consisten en el aislamiento de una o varias enzimas en un determinado espacio, aumentando así el rendimiento del proceso.
- La acción ajustada de varias enzimas que actúan secuencialmente presenta grandes ventajas ya que se puede desplazar el equilibrio de la reacción hacia el producto deseado o incluso convertir una reacción irreversible en un proceso reversible.

Dentro del concepto de respetuosidad con el medio ambiente, surgió en el año 1991 el término de “Química Verde” que según la US Environmental Protection Agency (EPA)¹⁸ la define como el “uso de la química para la prevención de la contaminación, y el diseño de productos químicos y procesos benéficos para el medio ambiente”. Así, dentro de la Química y en especial de la Química Orgánica, el uso de rutas alternativas para la síntesis de compuestos es una herramienta de la Química Verde que plantea 12 principios (Figura 1) para conseguir sus objetivos.



Figura 1. Doce principios de la Química Verde.¹⁸

Desde 1998 CAZy¹⁹ realiza un análisis de la información genómica, estructural y bioquímica de las enzimas encargadas de la síntesis y degradación de los carbohidratos. Las principales enzimas que están implicadas en la hidrólisis de carbohidratos son las glicosidohidrolasas (glicosidasas) y las que están implicadas en su síntesis son: glicosiltransferasas y aldolasas.²⁰ En este trabajo nos centraremos en las glicosidasas y en menor medida en las glicosiltransferasas.

Glicosidasas

Las glicosidasas^{21,22} (GH) son enzimas que pertenecen al grupo de las hidrolasas y se encargan del catabolismo de los carbohidratos. Van a catalizar la hidrólisis del enlace glicosídico de los glicanos (oligosacáridos y polisacáridos) y de los glicoconjugados (glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos). Se clasifican en función del carbohidrato que hidrolizan (glucosidasas, galactosidasas, manosidasas...), de la orientación del enlace glicosídico (α y β) y de la zona del azúcar en la que actúan (exoglicosidasas si hidrolizan residuos de los extremos, o endoglicosidasas si hidrolizan residuos centrales).

El mecanismo hidrolítico (Figura 2) está catalizado por dos residuos de aminoácidos que se encuentran en el centro catalítico del enzima (ácido glutámico y ácido aspártico). La hidrólisis puede ser vía retención de la estereoquímica o inversión de ésta.²³

- El proceso de retención ocurre en dos pasos en los que intervienen dos residuos carboxílicos, uno actuando como ácido/base y el otro como nucleófilo. En el primer paso de la reacción, denominado glicosilación, el nucleófilo ataca al carbono anomérico a la vez que el residuo ácido/base actuando como ácido, protona el oxígeno glicosídico. Se forma así en el estado de transición el ión oxocarbonio con configuración anomérica invertida. Esta molécula, en el segundo paso de la reacción, denominada desglicosilación, es hidrolizada por una molécula de agua y ahora el residuo ácido/base actuando como base desprotona una molécula de agua que ataca de nuevo al carbono anomérico desplazando al grupo saliente y recuperando la configuración inicial.²¹
- El proceso de inversión de la configuración ocurre sin embargo en un solo paso. En este caso uno de los residuos catalíticos del enzima actúa como ácido protonando el oxígeno glicosídico y el otro residuo actúa como base desprotonando una molécula de agua provocando el ataque nucleofílico al carbono anomérico eliminándose el grupo saliente con la consiguiente inversión de la estereoquímica.²¹

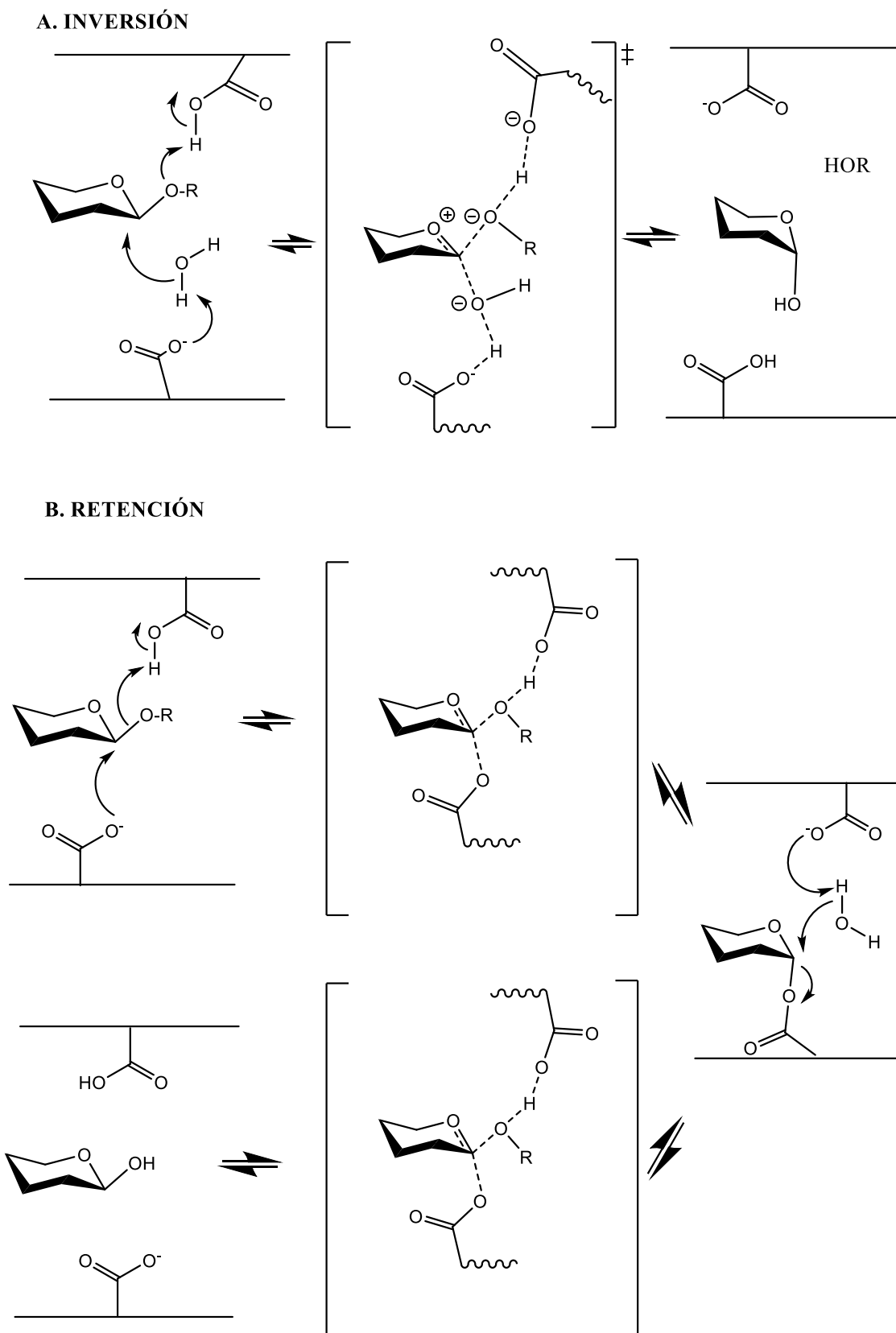


Figura 2. Mecanismo hidrolítico de glicosidasas con inversión de la configuración (A) y con retención de la configuración (B).

Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas¹⁹ (GT) son las enzimas encargadas de la síntesis de los carbohidratos. Van a catalizar la formación del enlace glicosídico requiriendo la presencia de dos sustratos: un dador de azúcar y un aceptor. Cabe destacar las sialiltransferasas que se van a encargar de sialilación de sustratos.²⁴

VIH

Existen distintos anticuerpos que se unen a la cubierta del virus.^{9,10,25} En esta cubierta están las glicoproteínas gp120 y gp41. Los anticuerpos que más se han mencionado en la literatura son 2G12, PG9 y PG16,^{4,6,9,26} que se van a unir a la gp120.

Estos anticuerpos se unen a un oligosacárido presente en la superficie de gp120. Esos oligosacáridos están unidos a la parte proteica en sitios de N-glicosilación con gran cantidad de manosas y presencia de asparraginas. En las glicoproteínas humanas es poco frecuente encontrar gran cantidad de manosas, por lo que una estrategia sería sintetizar moléculas con alta densidad de manosas para que el sistema inmune lo reconozca como algo extraño.^{3,15,25,27}

Dado que la farmacocinética de los oligosacáridos de elevada densidad de manosa no favorece a su administración en la vacuna; para realizar la síntesis de una vacuna eficaz, necesitamos glicomiméticos de dichos oligosacáridos de gran cantidad de manosas que se encuentran en la glicoproteína gp120, que presenten una afinidad igual o superior al antígeno del virus.^{4,28}

El glicomimético que reconoce el anticuerpo 2G12 es entre 46 y 210 veces más afín que la glicoproteína del VIH, gracias a la unidad $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$.^{6,28} Se ha comprobado que el anticuerpo PG9 tiene mayor afinidad por las moléculas que tienen $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$.^{8,9,24,26,29} Sin embargo, el anticuerpo PG16 es más afín por las moléculas que además tienen $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$ sialilado. La sialilación es un proceso químicamente complicado que precisa de muchos pasos por lo que también se puede realizar con sialiltransferasas, que pertenecen a la familia de glicosiltransferasas.^{8,24,29}

Esta mayor afinidad por estas estructuras oligosacarídicas es debida por un lado a la gran densidad de manosas y por otro a que la mayoría de esas manosas presentan varios enlaces $\alpha 1,2$ ($\text{Man}-\alpha(1\rightarrow 2)-\text{Man}$)^{4,26,28} (Figura 3).

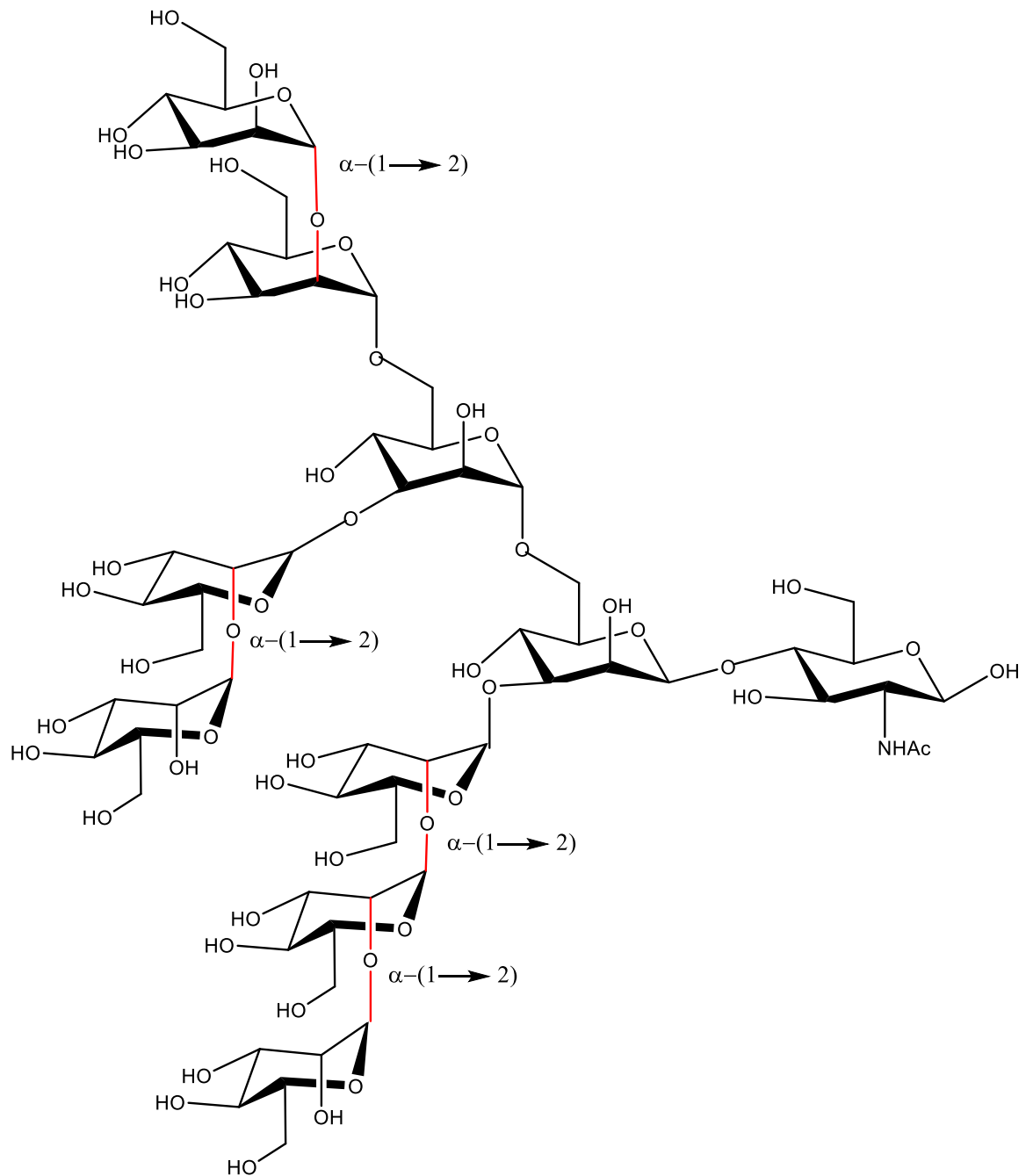


Figura 3. Estructura de una *O*-glicoproteína con alta densidad de manosas y varios enlaces Man- α -(1 \rightarrow 2)-Man: Man₉- β -GlcNAc-péptido.

SÍNTESIS

A. Síntesis tradicional

A.1 Síntesis química de GlcNAc-péptido

La síntesis química de GlcNAc-péptido por el método de síntesis peptídica en fase sólida (SPPS), se consigue mediante la unión de una resina (fase sólida) a distintos aminoácidos protegidos con Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo). Estos aminoácidos se unen secuencialmente mediante HATU ((1-H-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroniohexafluorofosfato) y se desprotegen de Fmoc con piperidina. Esta secuencia se repite hasta conseguir el péptido deseado. A continuación se introduce el aminoácido Fmoc-Asn-(Ac₃GlcNAc)-OH para conseguir GlcNAc-péptido-resina y finalmente se libera GlcNAc-péptido (Figura 4).⁸

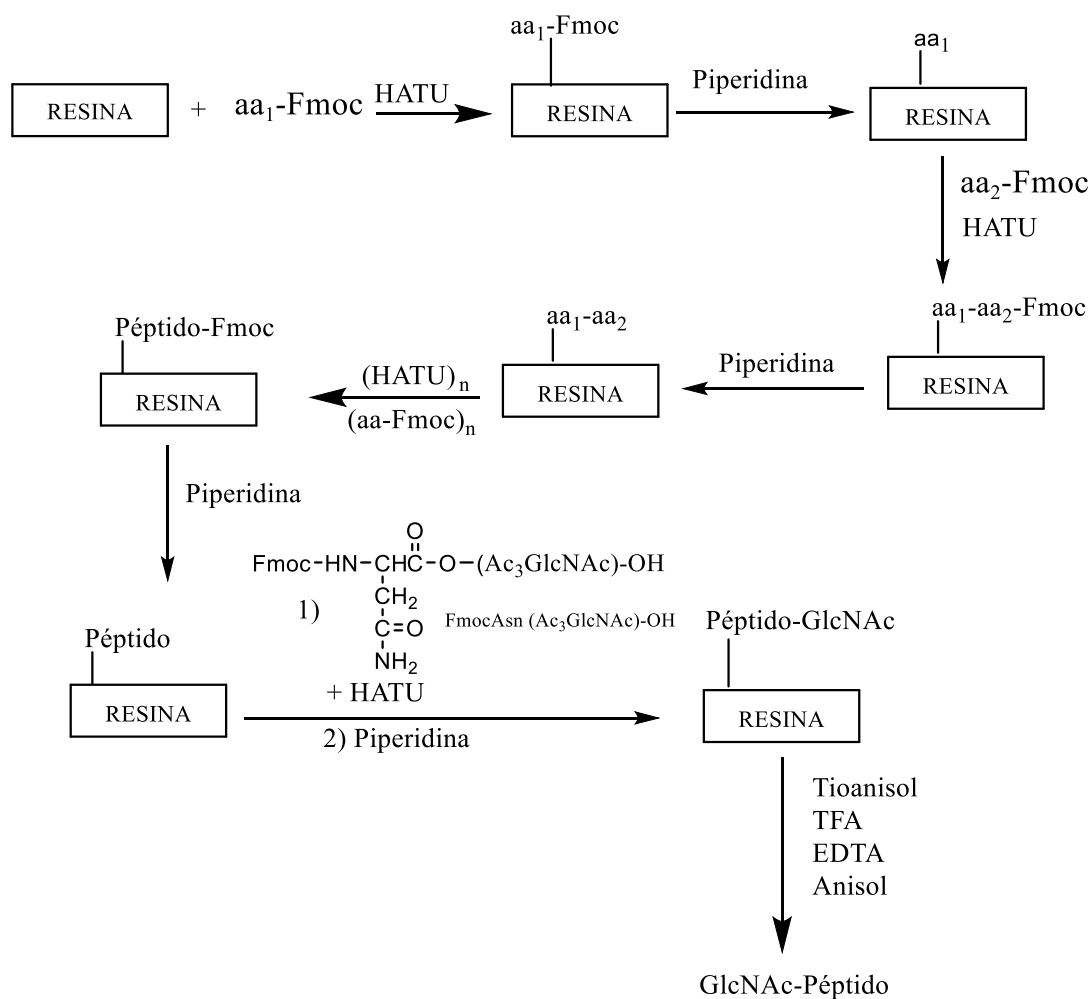


Figura 4. Síntesis química de GlcNAc-péptido.

A.2 Síntesis enzimática de restos de manosa

Por otro lado, para obtener los oligosacáridos de manosa se utiliza como sustrato la aglutinina de soja que tratada con pronasa purificada (mezcla comercial de proteasas) y la Endo-H (endo- β -N-acetilglucosaminidasa H) extraída de *Streptomyces griseus* da lugar a $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$. A continuación se hidrolizan algunos enlaces α de las manosas con la α -manosidasa murina, según el mecanismo de retención de las glicosidasas de la Figura 2B, dando $\text{Man}_6(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$ y a continuación $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$ (Figura 5).²⁵

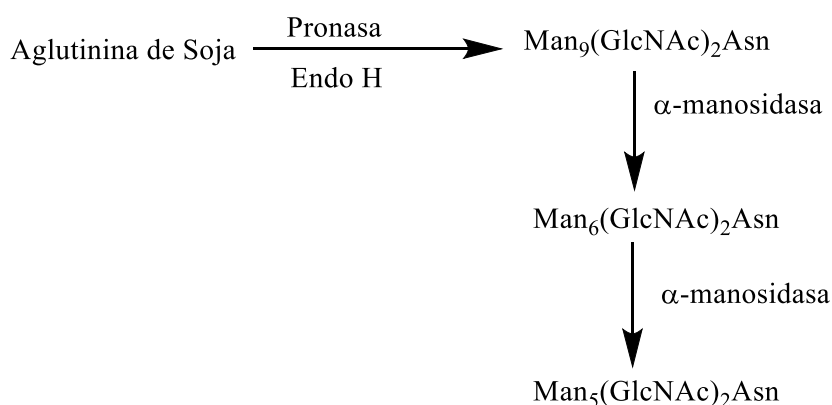


Figura 5. Síntesis enzimática de sintones de manosa.

A.3 Unión manosas-GlcNAc-péptido

Por último se sintetiza $\text{Man}_{5-9}(\text{GlcNAc})_2$ -péptido a partir de los productos obtenidos en la fase A.1 y A.2 mediante la endo- β -N-acetilglucosaminidasa de *Arthrobacter* (Endo-A).^{6,8} Esta enzima sigue el mecanismo de la Figura 2B manteniendo la configuración β del enlace 1,4 de las N-acetilglucosaminas $(\text{GlcNAc})_2$ (Figura 6).^{30,31}

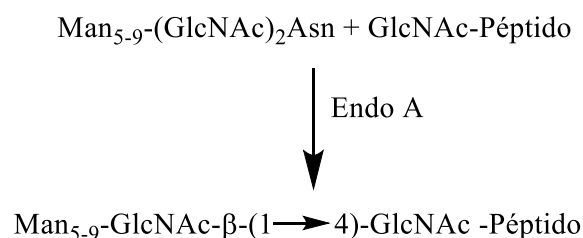


Figura 6. Obtención de $\text{Man}_{5-9}(\text{GlcNAc})_2$ -péptido mediante el mecanismo descrito en la Figura 2B.

B. Síntesis novedosa

Inicialmente, esta primera síntesis químico-enzimática era poco eficiente, con un rendimiento bajo (alrededor del 28%) y además existía riesgo de hidrólisis de los oligosacáridos de manosa (unidos Man- α -(1 \rightarrow 2)-Man). Esto se subsanó mediante una estrategia que consiste en el uso de un glicomimético (la oxazolina glicosídica sintética) como sustrato donador, aumentando la eficiencia y cumpliendo con los Principios de La Química Verde (Figura 1).^{6,30,32} Otra manera de aumentar la eficiencia es usar enzimas endoglicosidasas modificadas (Endo-D, Endo-A, Endo-M) para poder usar la oxazolina glicosídica como sustrato donador y sin producir hidrólisis.^{6,30,32}

B.1 Síntesis química de GlcNAc-péptido

La obtención de GlcNAc-péptido se lleva a cabo de la misma forma que en la síntesis tradicional (Figura 4).

B.2 Obtención químico-enzimática de la oxazolina glicosídica

La oxazolina glicosídica se obtiene por semisíntesis químico-enzimática.³² La ribonucleasa B bovina (RNAasa B) se trata con α -manosidasa murina para dar lugar a glicofomas de Man_{5,9}(GlcNAc)₂. Estas glicofomas son tratadas con endo- β -N-acetilglucosaminidasa (Endo-D) de *Streptococcus pneumoniae* obteniendo las unidades de Man_{5,9}GlcNAc manteniendo la configuración β del GlcNAc. Esas unidades en agua, con Et₃N y DMC, dan como producto Man_{5,9}GlcNAc-oxazolina⁸ (Figura 7.1) por la reacción de la Figura 7.

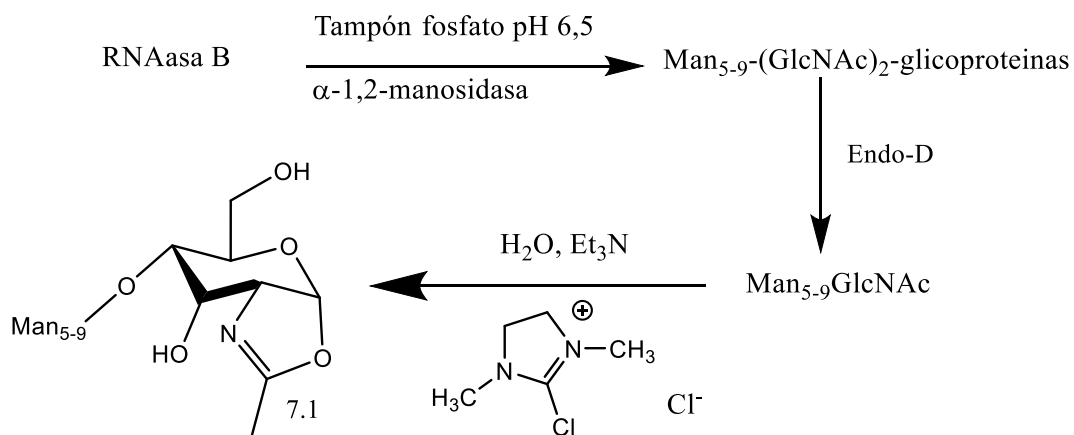


Figura 7. Síntesis químico-enzimática de Man_{5,9}GlcNAc-oxazolina (7.1).

B.3 Unión manosas de oxazolina glicosídica-GlcNAc-péptido

Así la oxazolina glicosídica (Figura 7.1) junto con el GlcNAc-péptido (Figura 8.1) tratados con una endoglicosidasas modificadas (Endo A/D/M) daría el $\text{Man}_{5-9}(\text{GlcNAc})_2$ -péptido (Figura 8.2). Esta es la alternativa utilizada actualmente dado que el rendimiento de esta reacción es superior, alrededor del 75% (Figura 8).³²

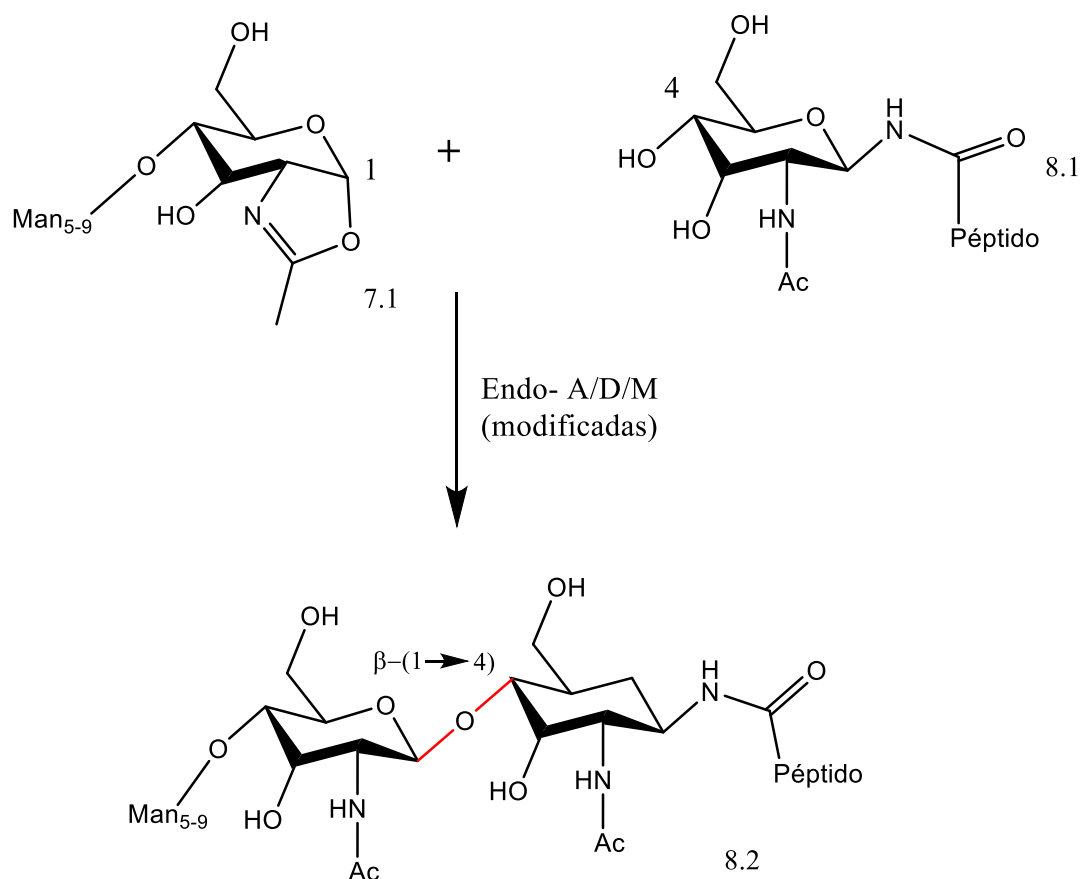


Figura 8. Obtención de $\text{Man}_{5-9}\text{-GlcNAc-}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)-GlcNAc-peptido}$ (8.2) a partir de oxazolina glicosídica (7.1) y GlcNAc-péptido (8.1).

CONCLUSIONES

La síntesis enzimática o químico-enzimática para la obtención de glicomiméticos peptídicos que se puedan utilizar en la vacuna contra el VIH, constituye un método más respetuoso con el medio ambiente respecto a la síntesis química. Además la vía de obtención del $\text{Man}_{5-9}(\text{GlcNAc})_2$ -péptido a través de la síntesis novedosa basada en la reacción de la oxazolina glicosídica, supone un mayor acercamiento a los Principios de la Química Verde representados en la Figura 1.

De las estrategias descritas para la obtención de estas vacunas, destaca la más novedosa que consta de tres pasos:

- 1) Síntesis química de GlcNAc-péptido por el método de síntesis peptídica en fase sólida (SPPS).
- 2) Obtención químico-enzimática de un glicomimético sin péptido ($\text{Man}_{5,9}\text{-GlcNAc-oxazolina}$).
- 3) Síntesis enzimática de un glicomimético peptídico ($\text{Man}_{5,9}\text{-(GlcNAc)}_2\text{-péptido}$).

Esta última etapa es la responsable de la mejora del rendimiento, cumple con los principios de la Química Verde o Química Sostenible y en ella se utiliza una endoglicosidasa tipo retención de la configuración y modificada especialmente para utilizar la oxazolina glicosídica como sustrato donador.

Aunque hasta ahora no se ha logrado que la eficacia obtenida con las moléculas sintetizadas sea la adecuada, se avanza con la continua investigación y con nuevas líneas de estudio. El trabajo en el futuro, en el caso del VIH, debería centrarse en innovaciones de la síntesis de las moléculas precisas para obtener una vacuna eficaz, y queda claro con la experiencia ilustrada, que la síntesis químico-enzimática es una buena opción para lograrlo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 OMS: Organización Mundial de la Salud. Ginebra: OMS; **2007**. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr61/es/>
- 2 Ministerio de Sanidad, Segicis Sociales e Igualdad; Ministerio de Economía y Competitividad; Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia epidemiológica del VIH/SIDA en España. Madrid: **2013**. Disponible en: http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/InformeVIHSida_Junio2013.pdf
- 3 Mandal, M.; Dudkin, V.Y.; Geng, X.; Danishefsky, S.J. In pursuit of carbohydrate-based HIV vaccines, part 1: The total synthesis of hybrid-type gp120 fragments. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**; 43(19): 2557-2561.
- 4 Wang, L.X. Synthetic carbohydrate antigens for HIV vaccine design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**; 17(6): 997-1005.
- 5 Doores, K.J.; Fulton, Z.; Hong, V.; Patel, N.K.; Scanlan, C.N.; Wormald, M.R.; Finn, M.G.; Burton, D.R.; Wilson, I.A.; Davis, B.G. A nonself sugar mimic of the HIV glycans shield shows enhanced antigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2010**; 107: 17107-17112.
- 6 Wang, L.X. Carbohydrate-based vaccines against HIV/AIDS. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**; 932: 133-160.
- 7 Burton, D.R.; Ahmed, R.; Barouch, D.H.; Butera, S.T.; Crotty, S.; Godzik, A.; Kaufmann, D.E.; McElrath, M.J.; Nussenzweig, M.C.; Pulendran, B. et al. A blueprints for HIV vaccine discovery. *Cell Host Microbe.* **2012**; 12:396-407.
- 8 Amin, M.N.; McLellan, J.S.; Huang, W.; Orwenyo, J.; Burton, D.R.; Koff, W.C.; Kwong, P.D.; Wang, L.X. Synthetic glycopeptides reveal the glycan specificity of HIV-neutralizing antibodies. *Nat. Chem. Biol.* **2013**; 9(8): 521-526.
- 9 Walker, M.L.; Phogat, S.K.; Chan-Hui, P.Y.; Wagner, D.; Phung, P.; Goss, J.L.; Wrin, T.; Simek, M.D.; Fling, S.; Mitcham, J.L. et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science.* **2009**; 326: 285-289.

- 10** Walker, L.M.; Huber, M.; Doores, K.J.; Falkowska, E.; Pejchal, R.; Julien, J.P.; Wang, S.K.; Ramos, A.; Chan-Hui, P.Y.; Moyle, M. et al. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature*. **2011**; 477:466-470.
- 11** Pejchal, R.; Doores, K.J.; Walker, L.M.; Khayat, R.; Huang, P.S.; Wang, S.K.; Stanfield, R.L.; Julien, J.P.; Ramos, A.; Crispin, M. et al. A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycans shield. *Science*. **2011**; 334: 1097-1103.
- 12** Walker, L.M.; Burton, D.R. Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. *Curr. Opin. Immunol.* **2010**; 22: 358-366.
- 13** Muthana, S.; Cao, H.; Chen, X. Recent progress in chemical and chemoenzymatic synthesis of carbohydrates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**; 13: 573-581.
- 14** Aussedat, B.; Vohra, Y.; Park, P.K.; Fernandez-Tejada, A.; Alam, S.M.; Dennison, S.M.; Jaeger, F.H.; Anasti, K.; Stewart, S.; Blinn, J.H. et al. Chemical synthesis of highly congested gp120 V1V2 N-glycopeptide antigens for potential HIV-1-directed vaccines. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**; 135: 13113-13120.
- 15** Kong, L.; Lee, J.H.; Doores, K.J.; Murin, C.D.; Julien, J.P.; McBride, R.; Liu, Y.; Marozsan, A.; Cupo, A.; Klasse, P.J. et al. Supersite of immune vulnerability on the glycosylated face of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**; 20: 796-803.
- 16** Astronomo, R.D.; Kaltgrad, E.; Udit, A.K.; Wang, S.K.; Doores, K.J.; Huang, C.Y.; Pantophlet, R.; Paulson, J.C.; Wong, C.H.; Finn, M.G. et al. Defining criteria for oligomannose immunogens for HIV using icosahedral virus capsid scaffolds. *Chem. Biol.* **2010**; 17: 357-370.
- 17** Riva, S. Biocatalytic modification of natural products. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**; 5: 106-111.
- 18** United States Environmental Protection Agency. Green Chemistry. Disponible en: <https://www.epa.gov/greenchemistry>
- 19** Carbohydrate-Active enZYmes Database. Disponible en: <http://www.cazy.org/>
- 20** Schmaltz, R.M.; Hanson, S.R.; Wong, C.H. Enzymes in the synthesis of glycoconjugates. *Chem. Rev.* **2011**; 111: 4259-4307.

21 Glycoside Hydrolase family classification. Disponible en:

<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>

22 Vasella, A.; Davis, G.J.; Böhm, M. Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6:619-629

23 Rye, C.S.; Withers, S.G. Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**; 4: 573-580.

24 Shivatare, S.S.; Chang, S.H.; Tsai, T.I.; Ren, C.T.; Chuang, H.Y.; Hsu, L.; Lin, C.W.; Li, S.T.; Wu, C.Y.; Wong, C.H. Efficient convergent synthesis of bi-, tri-, and tetra-antennary complex type N-glycans and their HIV-1 antigenicity. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**; 135(41): 15382-15391.

25 Li, H.; Wang, L.X. Design and synthesis of a template-assembled oligomannose cluster as an epitope mimic for human HIV-neutralizing antibody 2G12. *Org. Biomol. Chem.* **2004**; 2(4): 483-488.

26 McLellan, J.S.; Pancera, M.; Carrico, C.; Gorman, J.; Julien, J.P.; Khayat, R.; Louder, R.; Pejchal, R.; Sastry, M.; Dai, K. et al. Structure of HIV-1 gp120 V1V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature.* **2011**; 480: 336-343.

27 Geng, X.; Dudkin, V.Y.; Mandal, M.; Danishefsky, S.J. In pursuit of carbohydrate-based HIV vaccines, part 2: The total synthesis of high-mannose-type gp120 fragments-evaluation of strategies directed to maximal convergence. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**; 43(19): 2562-2565.

28 Ni, J.; Song, H.; Wang, Y.; Stamatou, N.M.; Wang, L.X. Toward a carbohydrate-based HIV-1 vaccine: synthesis and immunological studies of oligomannose-containing glycoconjugates. *Bioconjug. Chem.* **2006**; 17(2): 493-500.

29 Doores, K.J.; Burton, D.R. Variable loop glycans dependency of the broad and potent HIV-1- neutralizing antibodies PG9 and PG 16. *J. Virol.* **2010**; 84: 10510-10521.

30 Wang, L.X. Chemoenzymatic synthesis of glycopeptides and glycoproteins through endoglycosidase-catalyzed transglycosylation. *Carbohydr. Res.* **2008**; 343: 1509-1522.

31 Ochiai, H.; Huang, W.; Wang, L.X. Expedient chemoenzymatic synthesis of homogeneous N-glycoproteins carrying defined oligosaccharide ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**; 130: 13790-13803.

32 Li, B.; Zeng, Y.; Hauser, S.; Song, H.; Wang, L.X. Highly efficient endoglycosidase-catalyzed synthesis of glycopeptide using oligosaccharide oxazolines as donor substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**; 127: 9692-9693.