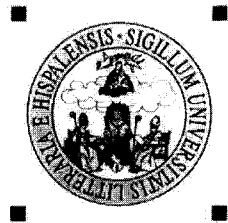


T/901



**GLICONANOPARTÍCULAS DE ORO:
UN NUEVO SISTEMA MULTIVALENTE PARA EL ESTUDIO DE
LAS INTERACCIONES BIOLÓGICAS DE LOS
CARBOHIDRATOS**

María de África García Barrientos

Sevilla, 2003

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio...063...número...208...del libro
correspondiente.

Sevilla...5 de Diciembre de 2002

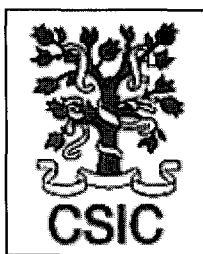
El Jefe del Departamento de Teoría

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

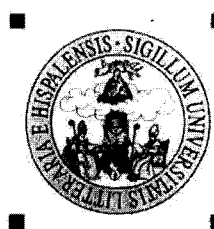
Depositado en Dpto. Quím. Orgánica
de la Facultad de Ciencias
de esta Universidad desde el día 13 de
hasta el día 15 mes

Sevilla 12 de diciembre de 2002

EL DIRECTOR DEL Dpto



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICAS



DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA ORGÁNICA

CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS ISLA DE LA CARTUJA

**GLICONANOPARTÍCULAS DE ORO:
UN NUEVO SISTEMA MULTIVALENTE PARA EL ESTUDIO DE
LAS INTERACCIONES BIOLÓGICAS DE LOS
CARBOHIDRATOS**

Directora de la tesis

Fdo. Dra. Soledad Penadés Ullate

Doctorando

Fdo. María de África García Barrientos

D^a SOLEDAD PENADÉS ULLATE, Investigadora del C.S.I.C.

CERTIFICA: Que el presente trabajo titulado: "Gliconanopartículas de oro: un nuevo sistema multivalente para el estudio de las interacciones biológicas de los carbohidratos" ha sido realizado bajo mi dirección y asesoramiento en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (Sevilla) durante los años académicos 1999-2000, 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003 constituyendo la Memoria que presenta el Lcda. María de África García Barrientos para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Sevilla, Diciembre de 2002



Fdo.: Soledad Penadés Ullate

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo con ayuda de becas EPO y I3P financiada por el CSIC-Rademacher Group y con becas con cargo a proyectos del Grupo de Carbohidratos. El trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (proyecto PB96-0820).

I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.- Ejemplos de interacciones multivalentes de carbohidratos en sistemas de interés biológicos

1.1.- Adhesión de virus a la superficie celular del huésped: Gripe y células epiteliales bronquiales.

1.2.- Adhesión de bacterias a la superficie celular: E. Coli y células epiteliales de la uretra.

1.3.- Interacción de células con otras células: Neutrófilos y células endoteliales arteriales.

1.4.- Adhesión celular mediada por interacción carbohidrato-carbohidrato

2.4.1.- Adhesión de células de esponjas

2.4.2.- Adhesión de células eucariotas: Células embrionarias y células de teratocarcinoma (Le^x - Le^x); células de espermatozoide-células de óvulo (KDN(GM3)-Gg3); células tumorales-células endoteliales (Gb4-nLc4Cer y GM3-Gg3/GM3-lactoCer)

2.- Sistemas modelos multivalentes de carbohidratos.

II.-OBJETIVOS

III.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Síntesis de neoglicoconjugandos de lactosa, maltosa y espaciadores.

1.1.- Espaciadores

1.2.- Donadores de glicosilo

1.3.- Neoglicoconjugados de lactosa y maltosa

2.- Preparación y caracterización de los sistemas multivalentes de carbohidratos.

2.1.- Gliconopartículas de oro.

2.2.- Gliconopartículas de oro de distinta densidad en carbohidratos.

3.- Aplicación de Gliconopartículas al estudio carbohidrato-proteína

3.1.- Estudios enzimáticos: Hidrólisis enzimática con β -galactosidasa.

3.2.- Estudios de afinidad con lectinas:

3.2.1.- Ensayos de inhibición de la unión de VAA a su ligando utilizando gliconopartículas.

3.2.2.- Estudio de la afinidad de lectinas con gliconopartículas y SAMs utilizando SPR.

3.3.- Estudios de afinidad con toxinas AB₅: Subunidad B de la cólera toxina

3.3.1.- Valoración de la interacción con fluorescencia

3.3.2.- Estudio de la afinidad de la CTB utilizando un ensayo de inhibición con gliconopartículas, de la unión de la CTB a distintos ligandos.

4.- Aplicación de las gliconopartículas de oro al estudio de la interacción carbohidrato-carbohidrato.

4.1.- Estudio de la interacción lactosa-lactosa utilizando AFM

4.2.- Estudio de la interacción lactosa-lactosa utilizando SPR.

5.- Validación *in vivo* de las gliconopartículas: Inhibición de adhesión de células de tumorales a células endoteliales.

IV.- CONCLUSIONES

V.- PARTE EXPERIMENTAL

1.- Métodos Generales

2.- Síntesis de neoglicoconjugados

3.- Preparación y caracterización de gliconopartículas.

4.-Aplicación de gliconopartículas de oro al estudio de interacción carbohidrato-proteína

5.-Aplicación de gliconopartículas de oro al estudio de la interacción carbohidrato-carbohidrato

6.- Validación *in vivo* de las gliconopartículas

VI.- ANEXOS

ABREVIATURAS

λ_{em}	longitud de onda de emisión
λ_{exc}	longitud de onda de excitación
Ac	acetilo
AF	Factor de agregación
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AIBN	azoisobutilonitrilo
BCECF/AM	acetoximetil éster de 2,7-bil-carboximetil-5(6) carboxifluoresceína.
BSA	albúmina del suero bovino
Bu ^t	terc-butilo
Bz	benzoilo
CID	<i>Collision Induced Decomposition</i>
d	doblete
DBU	Diazabicycloundeceno
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EDX	Análisis por energías dispersivas de rayos X
EELS	Espectroscopía de pérdida de energía de los electrones.
EFTEM	Microscopio electrónico de transmisión de imágenes filtradas de energía
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
FC	<i>field coupling</i>
FCS	suero vacuno fetal
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

GP	Glicoproteína
GSL	Glicoesfingolípido
H	campo aplicado
Hepes	ácido 2-[4-hidroximetil piperazina-1-il] etanesulfónico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICP	<i>Inductively Coupled Plasma-atomic Emission Spectrometry</i>
IR-FT	infrarrojo con transformada de Fourier
IS-MS	<i>Ion Spray Mass Spectrometry</i>
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
m	multiplete
MTT	bromuro de 3-[4,5-dimetiltriazol-2-il]2,5-difeniltetrazoilo
NIS	N-iodo-succinimida
PBS	buffer de fosfato
Ph	fenilo
Phth	ftalimido
PNP	<i>p</i> -nitrofenilo
PTSA	ácido <i>p</i> -toluensulfónico
py	piridina
QD	<i>quantum dots</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RU	unidades de resonancia
s	singlete
SAM	<i>Self Assembled Monolayer</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
SQUID	<i>Superconducting Quantum Interference Device</i>

Sulfo-SMCC	4-(N-malrimidometil)ciclohexano-1-carboxílico	3-sulfo-n-hidroxisuc-
	cinimida	
t	triplete	
T	temperatura	
t.a.	temperatura ambiente	
T _B	temperatura de bloqueo	
TEA	trietilamina	
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>	
TfOH	ácido triflico	
THF	tetrahidrofurano	
TMS	trimetilsililo	
TMSOTf	triflato de trimetilsililo	
UV-vis	ultravioleta-visible	
WAC	<i>Weak Affinity Chromatography</i>	
ZFC	<i>zero field couling</i>	

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La superficie de las membranas celulares está cubierta por carbohidratos complejos (proteoglicanos, glicoproteínas y glicolípidos) que forman la mayor parte de la matriz extracelular y de la parte exterior de la membrana plasmática. Al conjunto de todas estas moléculas se le denomina glicocálix. Durante mucho tiempo se atribuyó al glicocálix el papel de protección de la célula frente a agentes externos mediante interacciones repulsivas. Sin embargo, este papel tan simple no explica porqué la naturaleza ha desarrollado un trabajo tan especializado para obtener la gran diversidad y complejidad de los glicoconjugados. Su localización en la parte más externa de la célula indica que estos glicoconjugados deben estar implicados de alguna forma en la adhesión celular y en procesos de reconocimiento basados en interacciones tanto repulsivas como atractivas¹. La adhesión de una célula a otra tiene lugar a través de interacciones fuertes proteína-proteína pero además existe otra interacción entre proteínas y carbohidratos (proteína-carbohidrato), más débil², que está implicada en muchos procesos biológicos. Esta interacción en la mayoría de los casos es multivalente y dependiente de cationes divalentes, y además es mucho más específica que la interacción proteína-proteína.

La mayoría de los glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos) en la superficie celular son receptores específicos para comunicarse con otras células y a través de los cuales las toxinas, bacterias y virus inician su interacción con la célula para infectarla (figura 1).

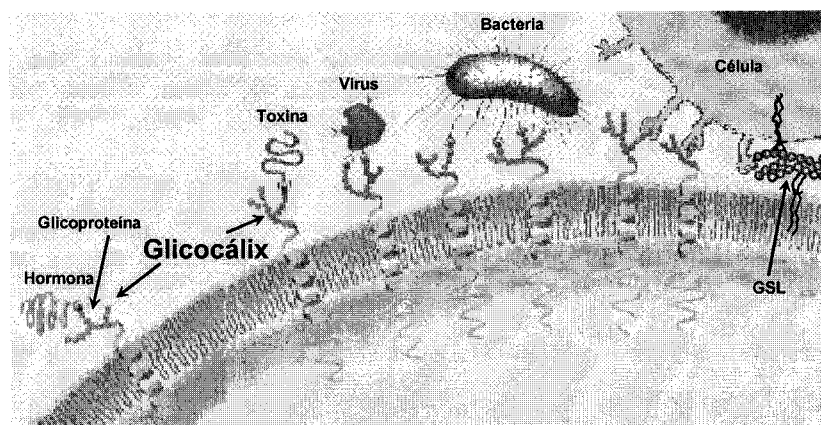


Figura 1.- Los glicoconjugados de la superficie celular (glicoproteínas y glicolípidos) actúan en numerosos procesos tanto naturales como infecciosos.

¹ Sler, M.; Desplat-Jego, S.; Vacher, B.; Ponsoonnet, L.; Fraterno, M.; Bongrad, P.; Martin J-M. ; Foa, C.; *FEBS Lett*, 1998, 429, 89.

² Varki, A. *Glycobiology*, 1993, 3, 97.

Las interacciones entre carbohidratos y proteínas definen y regulan muchos fenómenos biológicos, desde la adhesión de leucocitos a células endoteliales a la migración de conos de crecimiento neuronal durante el desarrollo^{2,3,4}. En estos procesos el glicocáliz sirve de ligando multivalente para los receptores de la superficie, que interaccionan con estos carbohidratos en un proceso más o menos específico. Estos receptores se llaman lectinas o selectinas⁵.

En los últimos años han surgido propuestas a favor de un nuevo tipo de mecanismo de adhesión celular donde los hidratos de carbono (carbohidratos) interaccionan entre sí, esta interacción se le puede denominar interacción carbohidrato-carbohidrato. Esta interacción es mucho más débil que la anterior carbohidrato-proteína y es también dependiente de cationes divalentes y necesita una presentación multivalente de los carbohidratos implicados para que tenga lugar. Las interacciones entre carbohidratos (interacción entre proteoglicanos y glicosaminoglicanos) se conocían en el contexto de la formación estructural de la matriz extracelular (ECM) y la pared celular de las plantas. Sin embargo, de la que aquí hablamos está implicada en procesos de reconocimiento celular donde la especificidad y flexibilidad son esenciales para el desarrollo correcto del proceso de reconocimiento.

El desarrollo de la investigación para el entendimiento del mecanismo, la estructura y la función de los hidratos de carbono es más tardío que el de los otros dos grupos de biomoléculas probablemente debido a su complejidad y a un posterior descubrimiento de su importancia en los sistemas biológicos. Mientras que las otras clases de biopolímeros, los ácidos nucleicos y las proteínas, tienen una disposición lineal de unidades repetidas, los azúcares tienen muchos sitios de unión, dando lugar a estructuras muy ramificadas y ricas esteroquímicamente. Esta complejidad estructural se aumenta por modificaciones post-sintéticas como son las fosforilaciones, sulfataciones, acetilaciones u oxidaciones que generan actividades biológicas distintas⁶. Así, los carbohidratos sulfatados funcionan como mediadores potentes en la inflamación⁷,

³ Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683.

⁴ Koeller, K.M.; Wong, C.H. *Nat. Biotech.* **1999**, *18*, 835.

⁵ Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637.

⁶ Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H. Hart, G.; Marth, J. (eds) *Essentials of glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**.

⁷ Rosen, S.D.; Bertozzi, C.R. *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 261

mientras que los fosfoazúcares juegan un papel muy importante en la transducción de señal celular y metabolismo⁸.

Una segunda dificultad en el estudio de las interacciones de carbohidratos son las bajas afinidades con que éstos se unen a sus ligandos (K_d en el rango de milimolar)⁹. En biología, esta baja afinidad se compensa por la combinación de múltiples interacciones entre dos o más carbohidratos y el correspondiente receptor multimérico. Estas interacciones, llamadas multivalentes, tienen varios mecanismos y ventajas funcionales sobre las monovalentes. Además, estas interacciones tienen la capacidad de crear contactos conformales entre grandes superficies biológicas, también producen respuestas graduales con un único tipo de interacción y aumentan la especificidad de una interacción¹⁰.

1.- Ejemplos de interacciones multivalentes en sistemas de interés biológico.

En este apartado se van a comentar algunos ejemplos en los que intervienen los glicoconjugados, que aparecen en la naturaleza donde las interacciones sistema-receptor se consideran multivalentes.

1.1.- Adhesión de virus a la superficie celular del huésped: Virus de la gripe y células epiteliales bronquiales.

En el primer paso de la infección, el virus ataca a la superficie de las células epiteliales de los bronquios¹¹. El ataque comienza por una interacción entre trímeros de una lectina llamada hemaglutinina (HA), que se encuentra expresada en gran cantidad en la superficie del virus, unas 600-1000/virus y múltiples copias de ácido acetilneuramínico (NeuAc α 2; ácido siálico, SA), que es el azúcar terminal de muchas glicoproteínas de las células epiteliales. Una vez que estos trímeros interactúan con unidades de ácido siálico, el virus se anexiona a la célula y posteriormente se produce la invasión y replicación (figura 2).

⁸ Vaulont, S.; Kahn, A. *FASEB J.* **1994**, *8*, 28.

⁹ Lee, Y.C. ; Lee, R.T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321.

¹⁰ Mammen, M.; Choi, S-K.; Whitesides, G.M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2754.

¹¹ a) Lees, W.J.; Spaltenstein, A.; Kingery, W.J.E.; Whitesides, G.M. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3419-3433.
b) Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G.M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179-4190.

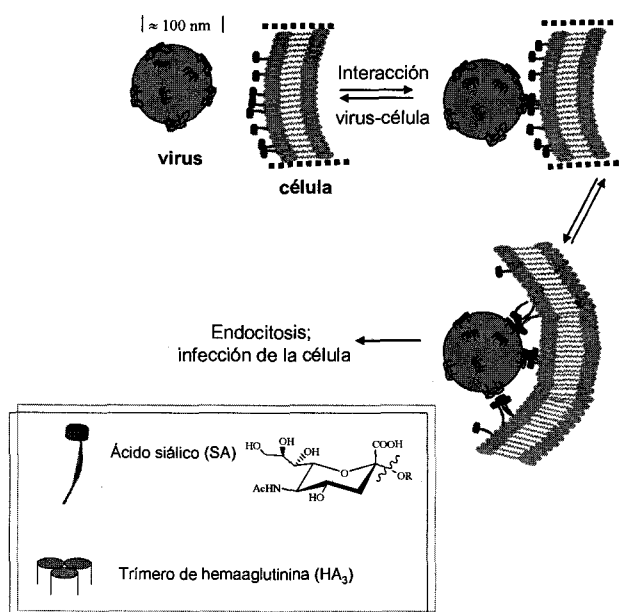


Figura 2.- Ataque del virus de la gripe a células por interacción de trímeros de hemaglutinina y ácido siálico¹¹.

1.2.- Adhesión de bacterias a la superficie celular: *Escherichia coli* y células epiteliales de la uretra.

Las cepas uropatogénicas de la bacteria *E. coli* atacan tanto directa como indirectamente a la superficie de células epiteliales en la uretra y en la vejiga a través de interacciones multivalentes.

Las proteínas bacterianas que interaccionan con este tipo de tejido son dos: la P-fimbrae (que contiene una proteína G) y la fimbrae tipo I (que contiene una adhesina llamada FimH), ambas localizadas en la superficie celular de la bacteria¹². Vamos a ilustrar la polivalencia en este sistema utilizando las proteínas tipo P-fimbrae (figura 3). La bacteria utiliza una adhesina lectina-tipo proteína G, localizada en las puntas de sus filamentos P-fimbriales para adherirse a múltiples copias del antígeno Pk (Gal α 4gal).

¹² Connell, I.; Agace, W.; Klemm, P.; Schembri, M.; Marild, S.; Svanborg, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996, 93, 9827-9832.

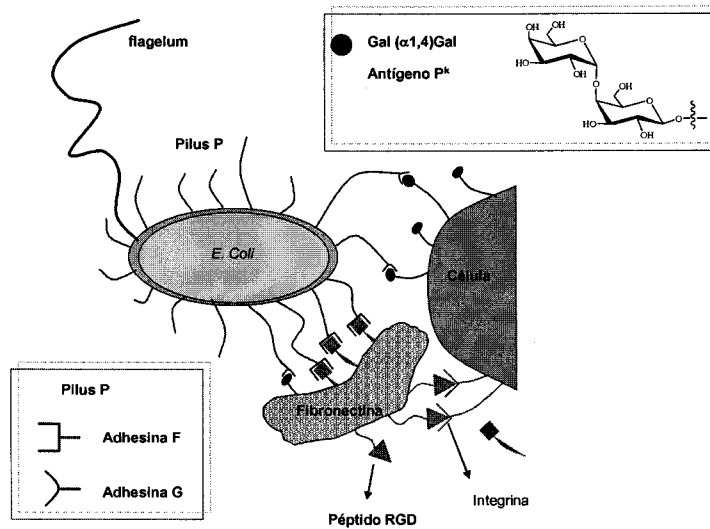


Figura 3.- Ataque de la bacteria uropatógena de *E. coli* a células epiteliales de la uretra¹⁰.

Este antígeno forma parte de un glicolípido presente en la superficie de células epiteliales del tracto urinario¹³. En un segundo paso, la adhesina tipo F de la superficie de *E. coli* ataca polivalentemente a la fibronectina, una glicoproteína soluble. Esta fibronectina lleva múltiples copias del péptido Arg-Gly-Asp (RGD) que interacciona de forma polivalente a la integrina de la superficie de células epiteliales. De esta forma, la bacteria puede concentrarse en muchos tejidos del tracto urinario causando fácilmente la infección. En general, las bacterias pueden unirse a una superficie celular o a moléculas en la matriz extracelular de los tejidos e interactuar tanto con carbohidratos como con proteínas.

1.3.- Interacción de células con otras células: Neutrófilos y células endoteliales arteriales.

Un ejemplo de proceso que ocurre a través de interacciones multivalentes entre carbohidratos y proteínas es la adhesión de los neutrófilos que se encuentran en el torrente sanguíneo a células endoteliales durante el proceso de inflamación¹⁴.

Una vez que se produce la inflamación (ver figura 4), los neutrófilos transportados (1) se adhieren a la superficie celular del endotelio (2) y empiezan a rodar

¹³ Westerlund, B.; Korhonen, T.K. *Mol. Microbiol.* **1993**, *9*, 687-694.

¹⁴ a) Varki, A. *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 158-162. b) Lowe, J.B; Ward, P.A. *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 822-826. c) Gimbrone, M.A.; Nagel, T.; Topper, J.N. *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 2062-2070.

lentamente (10-20 $\mu\text{m}/\text{min}$). Este movimiento se produce por interacción entre selectinas E y P de la superficie celular de las células endoteliales (las selectinas normalmente no aparecen, pero son inducidas por citoquinas durante la inflamación) y glicoproteínas que llevan sialil- Le^x , presentes en el neutrófilo.

Además la L-Selectina del neutrófilo también interacciona con el sialil- Le^x (NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 4[Fuc α 3]GlcNAc) presente en las células endoteliales. De esta forma, el neutrófilo va rodando por la superficie de las células endoteliales mediante múltiples interacciones, hasta que se adhiere y se extravasa hacia el interior del tejido hasta el sitio de infección. Después de adherirse (3) los neutrófilos cambian su forma y son ayudados por las integrinas para extravasarse del endotelio (4).

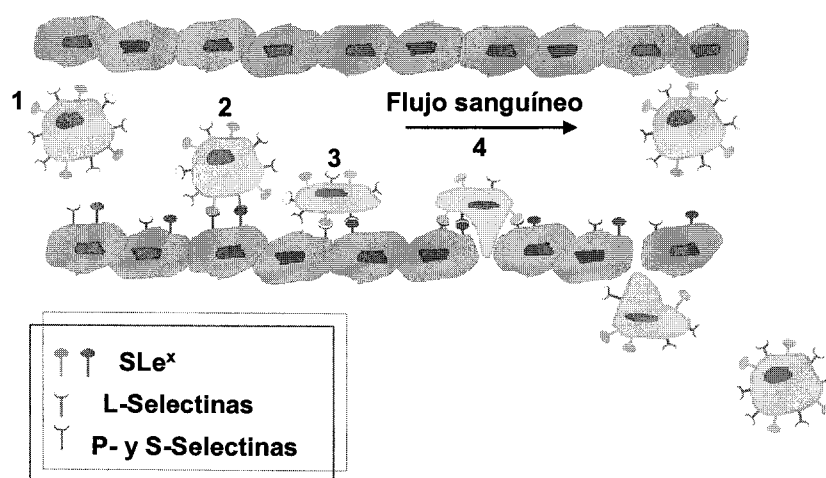


Figura 4.- Interacción de neutrófilos con células endoteliales durante el proceso de inflamación¹⁰.

1.4.- Adhesión celular mediada por interacción carbohidrato-carbohidrato.

Hasta ahora se han comentado algunos ejemplos que aparecen en la naturaleza como es el caso de la adhesión de virus o bacterias a células para producir la infección o la circulación de neutrófilos durante la inflamación, donde intervienen carbohidratos y proteínas con interacciones multivalentes. Pero más recientemente, han aparecido pruebas a favor de un nuevo tipo de interacción en procesos de adhesión celular que implica la interacción entre carbohidratos (carbohidrato-carbohidrato), un proceso que también es multivalente y dependiente de cationes divalentes. Esta interacción es muy

débil comparada con otras y hasta ahora ha resultado muy difícil su observación y caracterización¹⁵.

La interacción carbohidrato-carbohidrato ha sido demostrada por Misevic y Burger¹⁶ en la agregación celular especie-específica de esponjas marinas y por el grupo de Hakomori en procesos como la compactación de la mórula, la metástasis de linfoma, melanoma y teratocarcinoma en ratones¹⁷ y en la interacción óvulo-espermatozoide de la trucha Arcoiris (*Orcorhynchus mykiss*)^{17c}.

1.4.1.-Adhesión celular especie-específica de esponjas marinas

La adhesión de células de esponjas marinas disociadas se estudió por primera vez en 1907¹⁸ y se observó que se trataba de una adhesión especie-específica. En 1963, se aisló por primera vez de la *Microciona Parthena* y otras esponjas¹⁹, una macromolécula responsable de su agregación celular, llamada factor de agregación (AF). El proceso de adhesión celular a través del factor de agregación (AF) de la esponja de *Microciona* tiene dos mecanismos necesarios para que esta agregación celular sea especie-específica: 1) una unión especie-específica del AF no dependiente de calcio, al receptor de la superficie celular y 2) una interacción AF-AF dependiente de calcio, entre células adyacentes (figura 5).²⁰ En este factor de agregación se han aislado dos glicanos, uno de bajo peso molecular (g60, 60 kD), responsable de la interacción no dependiente de calcio con la superficie celular y otro glicano de mayor peso molecular (g200, 200 kD) que es el responsable de la agregación a través de una interacción hemofílica y multivalente dependiente de calcio, el cual es capaz de acercar las dos células entre sí mediante una interacción carbohidrato-carbohidrato, para dar lugar a la adhesión propiamente dicha. Este último glicano ha sido aislado y un análisis de su estructura indica que está formado mayoritariamente por unidades repetitivas de un trisacárido piruvilado (Pyr-4,6-Galβ1-4GlcNAcβ1-3Fuc) y un disacárido sulfatado

¹⁵ a) Spillmann, D.; Burguer, M.M. *Carbohydrate-Carbohydrate Interactions*. In: Ernst, B.; Hart, G.W.; Sinaý, P. (eds). *Carbohydrates in chemistry and biology*. 2000. Wiley-VCH, Weinheim, vol 2, p 1061. b) Bovin, N.V. *Carbohydrate-carbohydrate Interactions*. In: Gabius, H.J.; Gabius, S. (eds). *Glycoscience: status and perspectives*. 1997 Chapman and Hall, Weinheim, p 277. c) Spillmann, D.; Burguer, M.M. *J. Cell. Biochem.* 1996, 61, 562.

¹⁶ Misevic, G.N.; Burger, M.M. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 4922.

¹⁷ a) Hakomori, S.-I. *Pure Appl Chem.* 1991, 63, 473. b) Hakomori, S.-I. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002, 99, 225. c) Yu, S.; Kojima, N.; Hakomori, S.-I.; Kudo, S.; Inoue, S.; Inoue, Y, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 2854-2859.

¹⁸ Wilson, H.V. *J. Exp Zool.* 1907, 5, 245

¹⁹ Humphreys, T. *Dev Biol.* 1963, 8, 27

²⁰ Burkat, W.; Burger, M.M. *J Biol Chem.* 1986, 261, 2853

(3SO₃GlcNAcβ1-3Fuc) (figura 4)^{21,22} que son considerados los epítomos responsables de esta interacción.

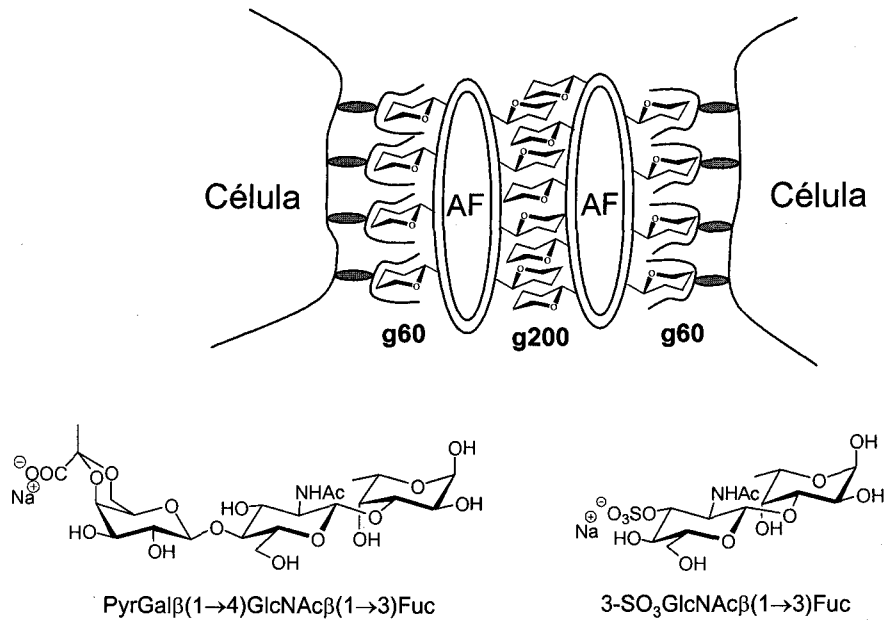


Figura 5.- Esquema del proceso de adhesión de dos células de esponja basado en el factor de agregación (AF). Estructura de los epítomos tri- y disacarídicos del proteoglicano responsable de la adhesión de *Microciona prolifera*.

1.4.2.- Adhesión de células eucariotas

-Células embrionarias: Interacción Le^x-Le^x

Hakomori estudió la expresión de diferentes tipos de carbohidratos antigénicos (normalmente glicoesfingolípidos) en la superficie de células eucariotas y sus implicaciones en procesos de adhesión celular a través de interacciones carbohidrato-carbohidrato.

El antígeno Le^x (Galβ4[Fucα3]GlcNAc) se ha identificado en un gran número de diferentes células eucariotas²³. Este epítomo se expresa en gran cantidad en la superficie celular durante estadios tempranos del desarrollo embrionario de ratón después de la

²¹ Spillmann, D.; Hard, K.; Thomas-Oates, J.E.; Vliegthart, J.F.G.; Misevic, G.; Burger, M.M.; Finne, J. *J Biol Chem*, **1993**, *268*, 13378

²² Spillmann, D.; Hard, K.; Thomas-Oates, J.; Van Kuik, J.A.; Vliegthart, J.F.G.; Misevic, G.; Burger, M.M.; Finne, J. *J Biol Chem*, **1995**, *270*, 5089

²³ Yoshida-Noro, C.; Heasman, J.; Goldstone, K.; Vickers, L.; Wylie, C. *Glycobiology*, **1999**, *9*, 1323 y referencias citadas.

tercera división en 8-16 células en la formación de la mórula. La aparición de Le^x en este estadio coincide aproximadamente en el tiempo con el comienzo de la compactación y su expresión declina rápidamente después de ésta, indicando un papel del Le^x durante la compactación, cuando las interacciones intercelulares están maximizadas (figura 7)²⁴. Hakomori propuso a la interacción Le^x-Le^x mediada por Ca²⁺ responsable de este proceso de compactación.

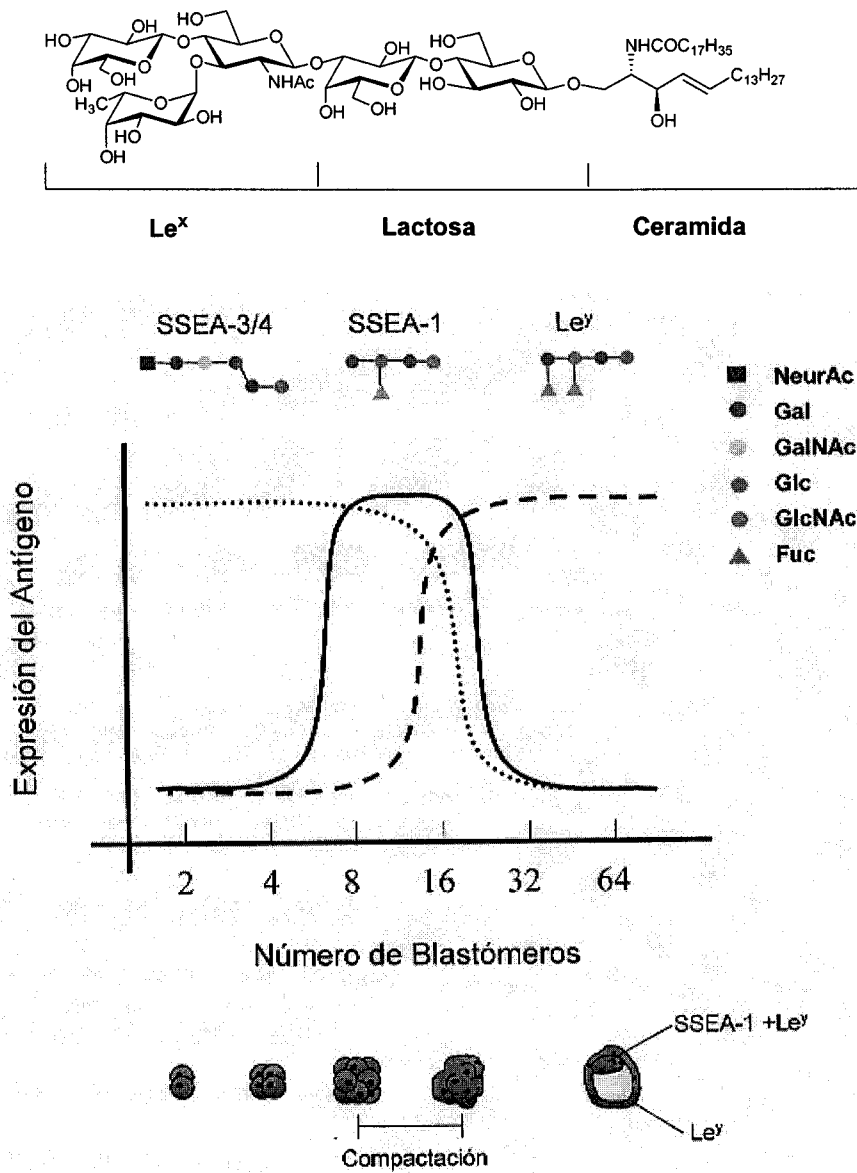


Figura 6.- Estructura del glicosfingolípido (GSL) Le^xCer y cambios en la expresión en la superficie celular de los antígenos oligosacarídicos durante pre-implantación²⁴.

²⁴ Fenderson, B.A.; Eddy, E.M.; Hakomori, S-I. *BioEssays*, 1990, 12, 173

-Células embrionarias: Interacción Gb4-nLc4.

Muchas células embrionarias humanas, particularmente en el estado no diferenciado, muestran una alta expresión de glicosfingolípidos de la serie globo, sobre todo nLc4 ($\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$), GalGb4 ($\text{Gal}\beta 3\text{GalNAc}\beta 3\text{Gal}\alpha 4\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$) y Gb4 ($\text{GalNAc}\beta 3\text{Gal}\alpha 4\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$) (figura 7)²⁵. Todas estas estructuras están implicadas en la adhesión de estas células, y por lo tanto puede suponerse que el mismo proceso de adhesión que se da en embriones de ratón debe de estar implicado en la compactación de los embriones humanos. Experimentalmente, se ha demostrado que existe una interacción fuerte entre el Gb4 y nLc4, y una más débil en el caso de Gb4 y GalGb4 ó Le^x , interacción que no es dependiente de cationes divalentes. Con todos los datos, el grupo de Hakomori ha propuesto que el proceso de adhesión celular en el estado embrionario humano está mediado por una interacción específica carbohidrato-carbohidrato entre nLc4 o GalGb4 y el Gb4.

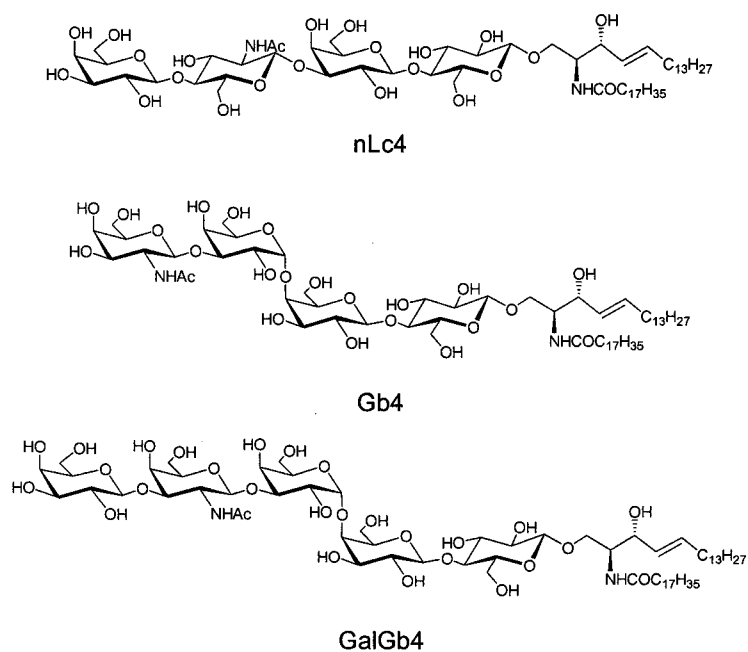


Figura 7.- Estructuras de los GSLs nLc4, Gb4 y GalGb4

-Células de espermatozoide-células de óvulo. Interacción (KDN)GM3-Gg3).

²⁵ Song, Y.; Withers, D.A.; Hakomori, S-I., *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 2517-2525

El (KDN)GM3 (KDN α 2-3Gal β 4Glc β 1Cer) es el GSL más expresado en la cabeza de los espermatozoides de trucha Arcoiris (figura 8). El grupo de Hakomori^{17c} ha propuesto que una interacción específica carbohidrato-carbohidrato en el proceso de unión del espermatozoide al óvulo, es la base de la fertilización en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). La unión del espermatozoide al óvulo ocurre a través de una interacción específica entre el (KDN)GM3 y el epítipo Gg3, expresado en la superficie de las células de los óvulos. Esta interacción es muy específica, donde el epítipo del Gg3 debe organizarse de forma polivalente. La presencia de Mn²⁺ aumenta considerablemente esta interacción. Aunque este estudio está limitado al caso de la trucha arcoiris, abre la posibilidad de que las bases biológicas de otros procesos de fertilización utilicen la interacción carbohidrato-carbohidrato como un mecanismo de adhesión del espermatozoide al óvulo

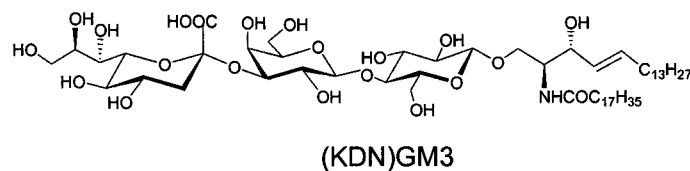


Figura 8- Estructura del (KDN)GM3

-Células tumorales a células endoteliales: Interacción GM3-Gg3 y lactosilceramida (lacCer).

Las células de melanoma B16 expresan altos niveles de GM3 (sialil β 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer) en la membrana celular e interaccionan con células no activadas de endotelio humano y de ratón, en cuya superficie los glicosfingolípidos más abundantes son lactosilceramida (lacCer) y Gg3 (GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer) (figura 9). Experimentos de inhibición de esta adhesión con liposomas que incorporan lacCer y Gg3 parece indicar que esta adhesión celular está mediada por la interacción GM3-lacCer o GM3-Gg3 y la interacción mejora bajo condiciones en flujo, las cuales mimetizan las condiciones de los sistemas naturales y la asociación GM3-lactoCer o Gg3.

^{17c} Yu, S.; Kojima, N.; Hakomori, S-I.; Kudo, S.; Inoue, S.; Inoue, Y, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 2854-2859.

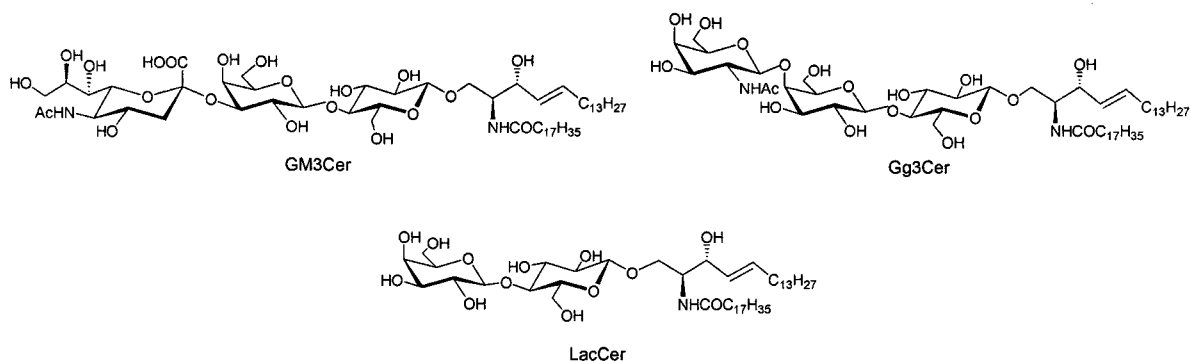
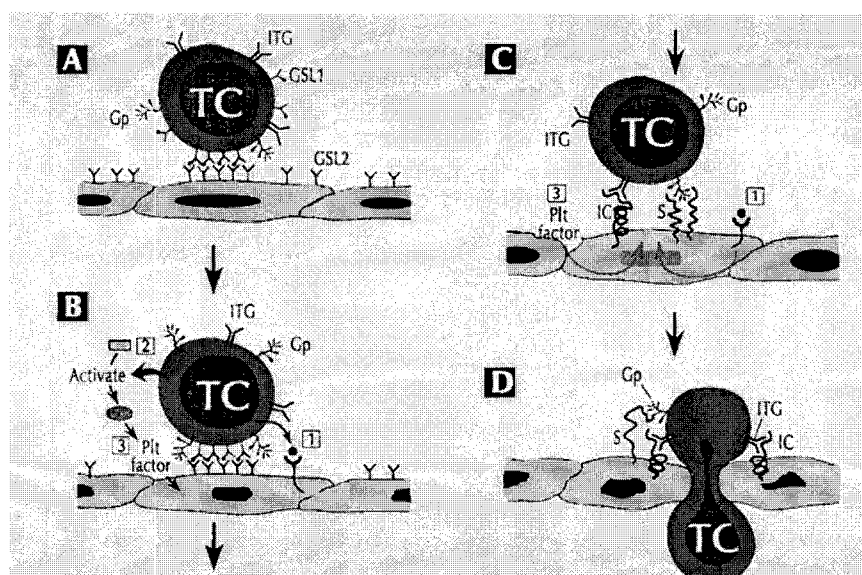


Figura 9.- Estructuras de los GSLs GM3Cer, Gg3Cer y LacCer.

De hecho, el grupo de Hakomori ha sugerido que el proceso inicial en la metástasis de células tumorales bajo condiciones de flujo dinámico puede ser debido a una interacción carbohidrato-carbohidrato (A)²⁶. Después de esta interacción, las células endoteliales se activan y expresan selectinas, que interaccionan con carbohidratos específicos (interacción carbohidrato-proteína) de la superficie de las otras células, induciéndose así un segundo paso en la adhesión celular (B). La interacción entre proteínas (inmunoglobulinas e integrinas) afianza la adhesión de las superficies celulares (C). A través de interacciones más complejas, la célula tumoral se trasvasa el endotelio y migra para generar otro foco tumoral (D) (figura 10).



EC=Célula endotelial; TC=Célula tumoral; GSL=Glicoesfingolípido; Gp=Glicoproteína;
IC=Familia de las inmunoglobulinas.; ITG=Integrina; S=Selectina; PTL factor=factor de plaquetas.

²⁶ Kojima, N.; Hakomori, S-I. *J Biol Chem*, 1989,264, 20159

Figura 10.-Mecanismo propuesto por Hakomori y col. para el proceso de metástasis²⁷.

La inhibición de las interacciones GM3-Gg3 o GM3-*lacto*Cer en la adhesión de las células de melanoma con las células endoteliales puede representar una terapia anti-adhesiva para procesos de metástasis tumoral. Hakomori demostró que la metástasis espontánea de tumores crecidos subcutáneamente se reducía si se inyectaban liposomas de GM3 o Gg3 durante el desarrollo tumoral, sin embargo, el tratamiento con otros paraglobósidos no presentó efecto alguno²⁷. Por lo tanto y resumiendo se puede decir, que los GSLs juegan un papel muy importante en este caso concreto de la adhesión de células tumorales a células endoteliales.

En todos los casos descritos anteriormente hemos visto que las interacciones donde intervienen los carbohidratos es muy débil pero esta baja afinidad es compensada porque los ligandos que interaccionan se organizan en microdominios como es el caso de los GSLs o en otra organización multivalente como es el caso de los glicoproteínas. Ejemplos que enfatizan la necesidad de la multivalencia en los procesos biológicos.

Todas estas características, junto a la compleja naturaleza e inmensa importancia de las interacciones multivalentes, han dado lugar al desarrollo químico de **sistemas modelos multivalentes** para el estudio de interacciones donde los carbohidratos estén implicados, desde el punto de vista químico

2. Sistemas modelos multivalentes.

En los últimos años se han desarrollado una gran diversidad de sistemas modelos multivalentes que incorporan carbohidratos. La mayoría de ellos están recogidos en una revisión bastante reciente²⁸. El diseño de los mismos está basado en la imitación de los glicoconjugados naturales de la superficie celular, que están involucrados en los procesos de reconocimiento y adhesión celular. Estos sistemas consisten en plataformas a las que se unen varias moléculas de carbohidratos originando una presentación multivalente de los mismos. La unión del carbohidrato a la plataforma casi siempre se establece a través de un brazo espaciador. En la siguiente figura, se muestran algunos de estos sistemas multivalentes (figura 11).

²⁷ Otsuji, E.; Park, Y.S.; Tashiro, K.; Kojima, N.; Toyokuni, T.; Hakomori, S-I. *Int J Oncol*, **1995**, *6*, 319

²⁸ Houseman, T.B.; Mrksich, M. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *218*, 1.

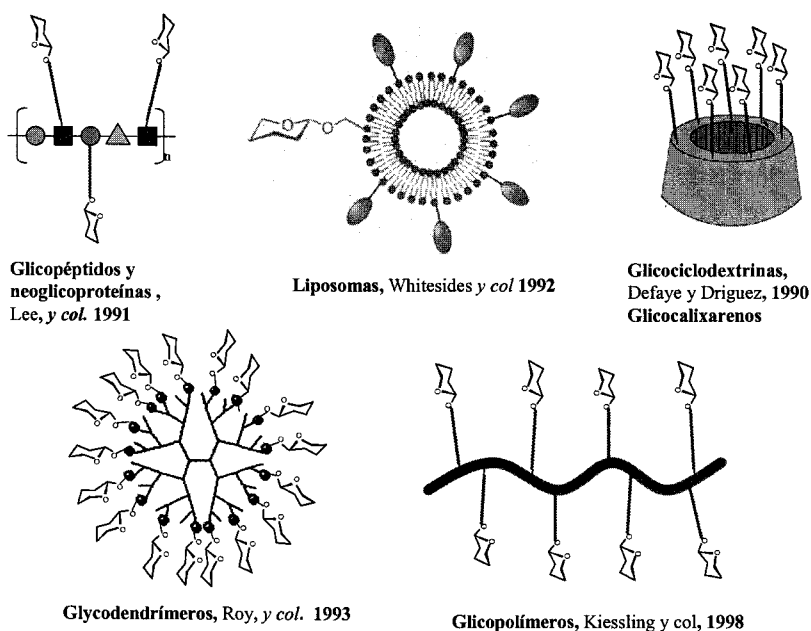


Figura 11.- Algunos sistemas multivalentes de carbohidratos

Los ligandos multivalentes sintéticos ofrecen un gran número de ventajas. A menudo se obtienen de una forma más sencilla que los ligandos naturales. Además las rutas sintéticas utilizadas nos permiten la preparación de sistemas que varían en el tamaño, naturaleza y la valencia de los carbohidratos.

Los primeros **neoglicoconjugados oligovalentes** fueron obtenidos por el grupo de Y.C. Lee (figura 12). En este caso, el carbohidrato se unía a un soporte tipo peptídico mimetizando la presentación del carbohidrato en una glicoproteína. Con estos agrupamientos ("clusters") de glicósidos constituidos de una a tres moléculas de carbohidratos, se observó un aumento logarítmico en la afinidad de lectinas hepáticas multiméricas^{9,29} con respecto al ligando monovalente. Este hecho se conoce hoy en día como "efecto cluster glicosídico". Basados en estos glicoclusters, se han preparado un gran número de sistemas basados en carbonos cuaternarios, carbohidratos, péptidos y soportes aromáticos²⁸.

⁹ Lee, Y.C.; Lee, R.T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321

²⁹ Lee, Y.C.; Lee, R.T.; Rice, K.; Ichikawa, Y.; Wong, T.C., *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 499.

²⁸ Houseman, T.B.; Mrksich, M. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *218*, 1

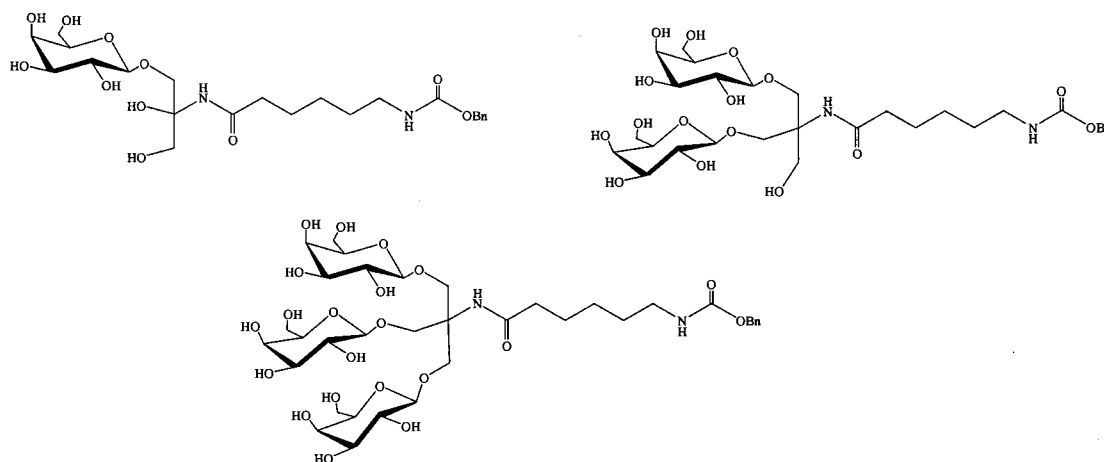


Figura 12.- Glycoclusters con los que se observó por primera vez el efecto cluster glicosídico²⁹.

Otros sistemas más alejados de los glicoconjugados naturales, llevan un pequeño número de moléculas de carbohidratos unidos a **ciclodextrinas** y **calixarenos**, que presentan un interior hidrofóbico que es capaz de atrapar pequeñas moléculas orgánicas, y un exterior hidrofílico que se puede funcionalizar con carbohidratos^{30,31}. Estas características les confiere propiedades especiales con respecto a otros glycoclusters y muchos de las glicociclodextrinas y glicocalixarenos sintetizados se han utilizado como transportadores de fármacos además de utilizarlos como inhibidores para estudiar las interacciones carbohidrato-proteína^{32,33}.

Los dendrímeros³⁴ también se han utilizado como moldes para el diseño de ligandos polivalentes ya que permite la obtención de compuestos con valencias comprendidas entre los glycoclusters y los sistemas modelos que presentan un gran número de carbohidratos. El primer ejemplo de **glicodendrímico** fue presentado por Roy y col. que consistía en una oligolisina hiperramificada con 16 moléculas de ácido siálico y que fue un potente inhibidor de la hemoaglutinación del virus de la gripe³⁵.

³⁰ Duchene, D.; Ponchel, G.; Wouessidjewe, D. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 29.

³¹ a) Gattuso, G.; Nepogodiev, S.A.; Stodart, J. F. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1919. b) García-Fernández, J. M.; Ortiz-Mellet, C. *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **2000**, *55*, 35.

³² a) García-Barrientos, A.; García-López, J.J.; Isac-García, J.; Ortega-Caballero, F., Uriel, C. Vargas-Verenguel, A., Santoyo-González, F. *Synthesis*, **2001**, *7*, 1057-1064. b) García-López, J.J.; Hernández-Matero F.; Isac-García, J.; Kim, J.M.; Roy, R.; Santoyo-González, F.; Vargas-Berenguel, A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 522. c)

³³ a) Aoyama, Y.; Matsuda, Y.; Chuleerarak, J.; Mishiyama, K.; Fujimoto, K.; Fujimoto, T.; Shimizu, T.; Hayashida, O.; *Pure App. Chem.* **1999**, *64*, 522. b) Roy, R.; Kim, J.M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 369.

³⁴ Kim, Y.; Zimmerman, S.C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 733.

³⁵ Roy, R.; Zanini, D; Meunier, S.J.; Romanowska, A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1896.

Algunos de los sistemas multivalentes más eficaces con valencia no muy alta en carbohidrato han sido diseñados teniendo en cuenta una información estructural detallada del enlace entre el carbohidrato y la proteína. Este es el caso del grupo de toxinas que son las responsables de la mayoría de las infecciones en el mundo: las toxinas AB₅³⁶ en las que se incluyen la toxina del cólera (CT), la enterotoxina de *E. coli* (LT) y las toxinas de *Shigella dysenteriae* (SHT) y otras toxinas similares a las SHTs, de *E. coli*, también conocidas como verotoxinas (SLT). Estas toxinas son proteínas que están constituidas por dos subunidades, la subunidad A, responsable de la infección y la subunidad B, que es pentamérica y es la que reconoce el sitio de enlace en la célula. Los receptores que los une a la célula son el glicosfingolípido GM1 (NeuAc para el caso de la CT y la LT) y el glicolípido Gb3 (Gal α 4Gal β 4Glc β OCer) cuya unidad terminal es la galactosa. Basándose en la estructura cristalina de la LT con galactosa³⁷, Fan y colaboradores preparan un sistema pentavalente de galactosa basado en un núcleo de pentaciclano (figura 13) donde cinco galactosas se encuentran en una disposición adecuada para interactuar con el pentámero de la toxina³⁸. El análogo más potente analizado posee una afinidad de 10⁵ veces mayor con respecto a la galactosa.

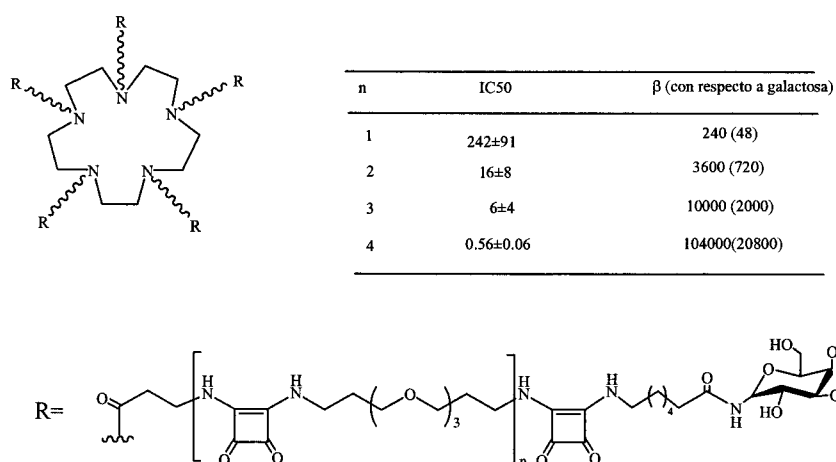


Figura 13.- Estructura de un inhibidor pentavalente de la enterotoxina de *E. coli* (LT)³⁸.

³⁶ Fan, E.; Merritt, E.A.; Verlinde, C.L.M.J.; Hol, W.G.J. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 680.

³⁷ a) Sixma, T.K.; Pronk, S.E.; Kalk, K.H.; Van Zanten, B.A.; Berghuis, A.M.; Hol, W.G.J. *Nature* **1992**, *355*, 561. b) Merritt, E. A.; Sarfaty, S.; Feil, I.K.; Hol, W.G.J. *Structure*, **1997**, *5*, 1485.

³⁸ Fan, E.; Zhang, Z.; Minke, W.E.; Hou, Z.; Verlinde, C.L.M.J.; Hol, W.G.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663-2664.

Apoyándose en la estructura cristalina del complejo entre el pentámero de la toxina SLT con el trisacárido Gb3³⁹ (el trisacárido determinante del glicolípido Gb3), el grupo de Bundle utiliza un núcleo de glucosa para acoplar 10 copias del antígeno P^k (Gal α 4Gal β 4Glc β OMe), también ligando de la toxina de SLT⁴⁰. En este sistema, cada espaciador lleva en un extremo dos copias del trisacárido, obteniendo un sistema decavalente. El inhibidor más activo, llamado **STARFISH**, fue 10⁶ veces más activo que el carbohidrato monovalente ($\beta=10^6$). Una afinidad comparable a la del ligando natural de la toxina, el glicolípido Gb3 (figura 14).

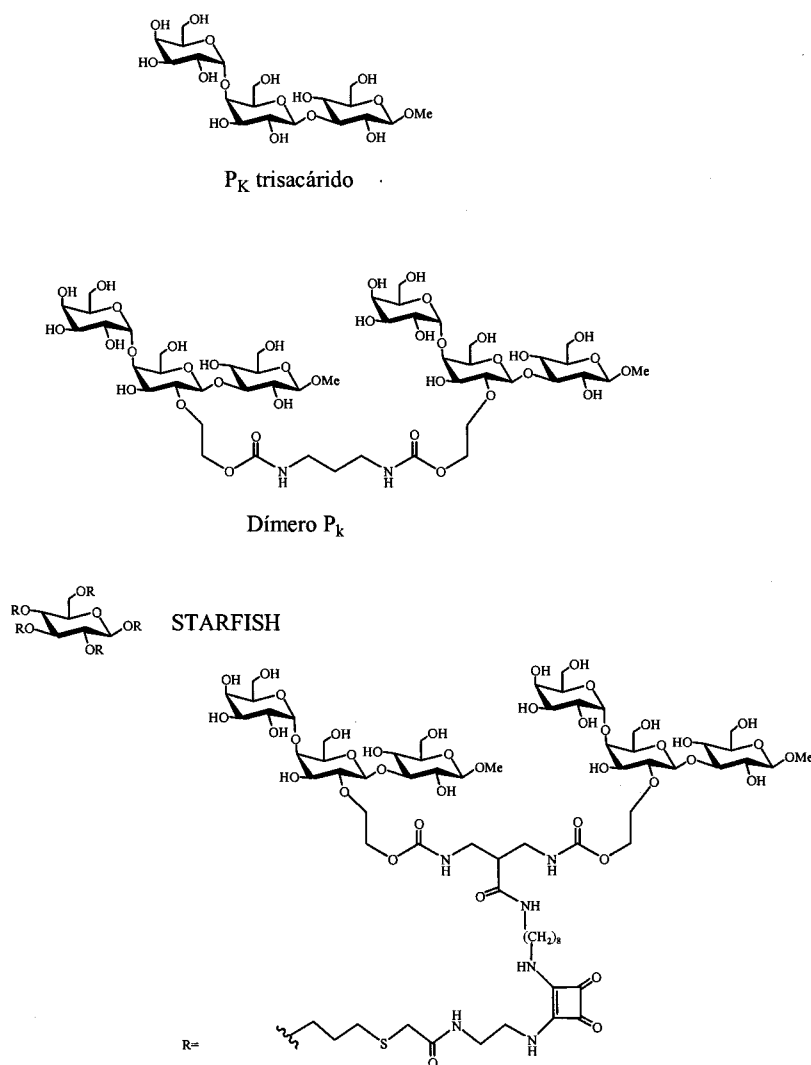


Figura 14.- Estructura de STARFISH, un inhibidor decavalente de la toxina SLT⁴⁰.

³⁹ Ling, H.; et al. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 1777.

⁴⁰ Kitov, P.I.; Sadowska, J.M.; Mulvey, G.; Armstrong, G. D.; Ling, H.; Pannu, N.S.; Read, R.J.; Bundle, D.R. *Nature* **2000**, *403*, 669-672.

Muchas aplicaciones en glicobiología necesitan de sistemas modelos que presenten un gran número de carbohidratos, como por ejemplo, la vacunación⁴¹, cromatografía⁴² e interacciones célula-célula o célula-patógeno^{43,44}.

Sistemas multivalentes con un mayor número de ligandos se han obtenido utilizando diferentes plataformas como las membranas y liposomas^{45,27}, polímeros y telómeros⁴⁶.

Los **liposomas** representan uno de los mejores sistemas modelo para mimetizar las agrupaciones de glicoesfingolípidos en la membrana plasmática, también para estudiar la fusión de virus a la superficie de células y como transportadores de fármacos. Así, por ejemplo, Hakomori preparó liposomas que contenían distintos glicoesfingolípidos (GM3, Gg3, *lactoCer*, Le^x) para estudiar la interacción carbohidrato-carbohidrato²⁷. Whitesides y col. realizaron estudios de inhibición de la aglutinación del virus de la gripe con liposomas que contenían ácido siálico^{45b}.

En los últimos años también se han sintetizado un grupo de **glicopolímeros** utilizando la metodología ROMP (Ring-opening metathesis polymerization), desarrollado con el grupo de Kiessling. Utilizando esta metodología este grupo ha preparado muchos glicopolímeros y los han funcionalizado también con otras **moléculas** como marcadores fluorescentes. Uno de los ejemplos son los polímeros de 3',6-disulfo Le^x que han resultado ser potentes inhibidores de L-selectina, una glicoproteína muy importante en procesos de inflamación. Además estos glicopolímeros actúan como *efectores*, puesto que provocan la liberación de L-selectina al medio⁴⁷.

Otro ejemplo más reciente utilizado para mimetizar la presentación de los carbohidratos sobre la superficie celular son las **monocapas autoensambladas de alcanotioles en oro** (SAMs). Las SAMs constituyen una clase de sistema modelo estudiado para los estudios de enlace multivalente en interfases⁴⁸. Estas monocapas se

⁴¹ Kuberan, B.; Lindhart, R.J. *Curr. Opin. Chem.* **2000**, *4*, 653.

⁴² Caron, M.; Seve, A.P.; Bladier, K.; Joubert-Caron, R. *J. Chromatogr. B.* **1998**, *715*, 153.

⁴³ Varki, A. *FASEB. J.* **1999**, *111*, 248

⁴⁴ An, Y.H.; Friedman, R.J. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *43*, 338.

⁴⁵ a) Spevak, W.; Foxall, C.; Charych, D.H.; Dasgupta, F.; Nagy, J.O. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1018. b) Kingery-Wood, J.E.; Williams, K.W.; Sigal, G.B.; Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7303.

²⁷ Otsuji, E.; Park, Y.S.; Tashiro, K.; Kojima, N.; Toyokuni, T.; Hakomori, S-I. *Int J Oncol*, **1995**, *6*, 319

⁴⁶ a) Kobayashi, K.; Akaike, T.; Usui, T. *Methods Enzymol.* **1994**, *34*, 151. b) Lee, R.T.; Lee, Y.C. *Methods Enzymol.* **1982**, *34*, 151.

⁴⁷ a) Gordon, E.J.; Sanders, W.J.; Kiessling, L.L. *Nature*, **1998**, *392*, 30. b) Gordon, E.J.; Sanders, W.J.; Kiessling, L.L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *6*, 1293.

⁴⁸ Mrksich, M. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 267.

forman espontáneamente por adsorción de alcanotioles en solución sobre una superficie limpia de oro (figura 15). Las monocapas que llevan grupos derivados de polietilenglicol poseen la ventaja adicional de ser resistentes a la absorción no específica de proteínas, lo cual permite la caracterización específica de las interacciones carbohidrato-proteína.

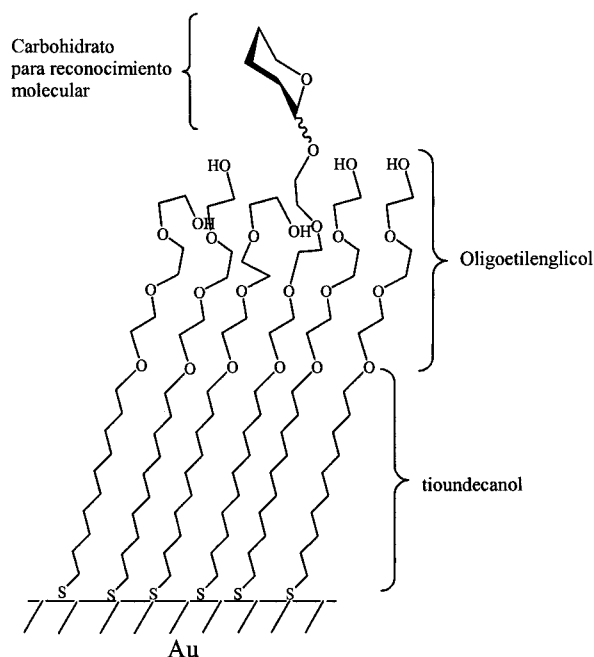


Figura 15.- Arquitectura de monocapas de alcanotioles en oro

Para los estudios de multivalencia, las monocapas tienen algunas ventajas sobre otros modelos, ya que se puede controlar a nivel molecular la estructura, la densidad y el entorno de los ligandos, sin embargo no pueden utilizarse en estudios en disolución.

Una característica intrínseca de los sistemas modelos multivalentes aquí descritos, es que no presentan a los carbohidratos en su entorno celular, sin embargo existen varias aproximaciones que intentan resolver este problema. Una de estas aproximaciones se basa en la modificación enzimática de **células** de mamíferos para que expresen carbohidratos no naturales⁴⁹. El grupo de Palcic por ejemplo, utilizan una $Le^x\alpha$ (1-3,4)-fucosiltransferasa para transferir el trisacárido a la superficie de eritrocitos^{49c}. Más recientemente y dentro de esta aproximación, el grupo de Bertozzi aprovecha la propia

⁴⁹ a) Ohrlein, R. *Top. Curr. Chem.* **2000**, *200*, 217. b) Takayama, S.; Wong, C.H. *Curr. Org. Chem.* **1997**, *1*, 109. c) Srivastava, G.; Kaur, K.J.; Hindsgaul, O. Palcic, M. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22356.

maquinaria de la célula para que ésta modifique los carbohidratos sobre su superficie celular⁵⁰. En este método, la N-acetilmanosamina que es procesada por las enzimas responsables de la síntesis del ácido siálico es sustituida con un grupo cetónico (levunílico) en lugar de un grupo acetilo. El ácido siálico modificado se transporta a la superficie celular donde puede ser modificado selectivamente usando grupos nucleófilos como azida, aminooxi o tiosemicarbazida. Aunque este método es muy selectivo, está limitado a unas pocas rutas biosintéticas celulares que puedan tolerar grupos funcionales no naturales. Sin embargo, los resultados obtenidos por Bertozzi y col. hacen pensar que estos modelos celulares pueden llegar a ser en un futuro herramientas muy útiles.

Todos los ejemplos que se han descrito aquí sobre los procesos multivalentes demuestran la diversidad y la naturaleza compleja de las interacciones multivalentes. Debido a la complejidad de los sistemas biológicos y las múltiples interacciones que coexisten en ellos, muchos grupos de investigación se han ayudado de sistemas modelos más sencillos que los naturales para facilitar la comprensión de las bases moleculares de estos mecanismos. Así, en el estudio de la interacción carbohidrato-proteína se han preparado muchos sistemas multivalentes. Hemos visto además, que se pueden preparar modelos de baja valencia en carbohidrato para investigar los requerimientos geométricos y estructurales de la interacción, como los clusters y ciclodextrinas. Otros se han desarrollado para estudiar la interacción entre grandes superficies, intentando mimetizar la membrana celular. Los polímeros de Kiessling⁴⁷, los dendrímeros de Roy^{34,35} y las monocapas de Whitesides y Mrksich⁴⁸, han contribuido enormemente al estudio y al entendimiento de la interacción carbohidrato-proteína. En todo caso todos los esfuerzos enfatizan la necesidad del desarrollo de nuevas herramientas analíticas, nuevos métodos sintéticos y sistemas modelos más sofisticados, que faciliten la comprensión de sistemas más complejos como son los biológicos.

El desarrollo de estas líneas de investigación y sus aplicaciones en las últimas décadas ha dado lugar a una nueva disciplina, llamada **glicobiología**, que abarca el

⁵⁰ a) Jacobs, C.L.; Yarema, K.J.; Mahal, L.K.; Nauman, D.A.; Charters, N.W.; Bertozzi, C.R. *Methods Enzymol.* **2000**, 327, 260. b) Mahal, L.K.; Yarema, K.J.; Bertozzi, C.R. *Science* **1997**, 276, 1125. c) Saxon, E.; Bertozzi, C.R. *Science* **2000**, 287, 2007.

⁴⁷ a) Gordon, E.J.; Sanders, W.J.; Kiessling, L.L. *Nature*, **1998**, 392, 30. b) Gordon, E.J.; Sanders, W.J.; Kiessling, L.L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 6, 1293.

³⁴ Kim, Y.; Zimmerman, S.C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 733

³⁵ Roy, R.; Zanini, D.; Meunier, S.J.; Romanowska, A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1896.

⁴⁸ Mrksich, M. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 267.

estudio y la comprensión de los mecanismos celulares donde fundamentalmente las interacciones entre carbohidratos y proteínas juegan un papel decisivo. A esta nueva disciplina puede ahora añadirse el estudio de la interacción carbohidrato-carbohidrato como mecanismo inicial de la adhesión celular.

El trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral trata fundamentalmente sobre el diseño y la preparación de un nuevo sistema multivalente que hemos denominado *Gliconanopartículas de oro* y que nuestro laboratorio ha desarrollado con el objetivo de estudiar la interacción carbohidrato-carbohidrato, pero como veremos a lo largo de esta Memoria ha demostrado un gran potencial para el estudio de otras interacciones donde los hidratos de carbono juegan un papel fundamental.

En la bibliografía existen trabajos que describen la preparación y aplicación de nanopartículas de oro funcionalizadas con proteínas y ácidos nucleicos⁵¹, sin embargo nuestro grupo ha sido el primero en preparar *bionanoconjugados* con carbohidratos de importancia biológica para estudios básicos de interacciones receptor-ligando y para su aplicación en sistemas biológicos tanto *in vitro* como *in vivo*.

⁵¹ a) Mucic, R.C; Storhoff, J.J.; Mirkin, C.A.; Letsinger, R.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12674. b) Niemeyer, C.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 154128.

II. OBJETIVOS

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral forma parte del proyecto de investigación del Grupo de Carbohidratos del Instituto de Investigaciones Químicas que trata de la búsqueda y la elucidación de los requerimientos estructurales de la interacción carbohidrato-carbohidrato en la que el trisacárido antigénico Le^x y los fragmentos oligosacáridicos del factor de agregación (AF) de las esponjas marinas son los responsables.

La idea era: a) identificar la interacción entre estos epítomos; b) elucidar qué número de epítomos (multivalencia) es necesario para que exista adhesión y selectividad; c) qué diferencias en las estructuras de estos oligosacáridos determinan la afinidad y selectividad de la interacción *in vitro*; d) obtener valores termodinámicos y cinéticos de la interacción, así como su dependencia de los grupos funcionales y de la multivalencia; e) investigar el papel de los cationes divalentes esenciales para esta interacción.

A pesar de que la interacción carbohidrato-carbohidrato fue propuesta ya en los años ochenta en células eucariotas^{52,24} y en células de esponjas marinas,⁵³ diez años más tarde solo existían datos cualitativos obtenidos con sistemas modelos (liposomas, bicapas, soportes de afinidad e incluso líneas celulares) que apoyaban su existencia. Nuestro grupo fue el primero que aportó datos termodinámicos de esta interacción, demostrando que la interacción en agua entre superficies lipófilas de los monosacáridos componentes de pequeños receptores sintéticos (a los que denominamos glicofanos⁵⁴) y de glicósidos aromáticos contribuían hasta con 2 Kcal/mol a la energía libre de unión entre el receptor y el ligando⁵⁵.

La interacción carbohidrato-carbohidrato se da entre dos superficies de glicosfingolípidos en el caso de las células eucariotas. Para evaluar esta interacción es necesario disponer de modelos que puedan mimetizar esta organización de GSLs en las células. Está claro que los glicoclusters y las ciclodextrinas no podrían ser útiles, sin embargo una organización de carbohidratos sobre superficies como las monocapas autoensambladas sobre oro (SAMs), sí que se acerca más a la presentación de los GSLs

⁵² a) Eggens, I.; Fenderson, B.; Toyokuni, T.; Dean, B.; Stroud, M.; Hakomori, S-I *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*(16), 9476-9484.

²⁴ Fenderson, B.A.; Eddy, E.M.; Hakomori, S-I *BioEssays*, **1990**, *12*, 173

⁵³ Misevic, G.N.; Finne, J.; Burger, M.M. *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 5870.

⁵⁴ Coterón, J.M.; Vicent, C.; Bosso, C.; Penadés, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 10066-10076.

⁵⁵ Jiménez-Barbero, J.; Junquera, E.; Martín-Pastor, M.; Sharma, S.; Vicent, C.; Penadés, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 11198-11204

en la membrana plasmática. El modelo de SAMs sobre superficies de oro bidimensionales no es válida cuando se quiere aplicar a ensayos *in vivo* o en disolución y tiene limitada su aplicación en los ensayos *in vitro*. Por otro lado, los liposomas funcionalizados con glicoesfingolípidos fueron un sistema muy adecuado para abordar el estudio de la interacción carbohidrato-carbohidrato²⁷. En primer lugar mimetiza bien la membrana plasmática y se puede aplicar en ensayos en disolución, pero tiene varios inconvenientes: a veces no es posible determinar su composición química y los glicoconjugados se encuentran en un entorno heterogéneo. Además de ser un sistema en equilibrio, poseen una baja estabilidad. Por otra parte, su aplicación *in vivo* tiene la desventaja de su fácil degradación por los sistemas enzimáticos.

Con todos estos antecedentes, desarrollamos dos aproximaciones sencillas basadas en monocapas autoensambladas (SAMs), en las que neoglicoconjugados de los epítopos naturales a estudiar se unen a superficies de oro bidimensionales (2D) o a nanopartículas tridimensionales (3D, gliconanopartículas) obteniéndose una organización polivalente en la que los carbohidratos mimetizan su presentación en la membrana celular (figura 16).

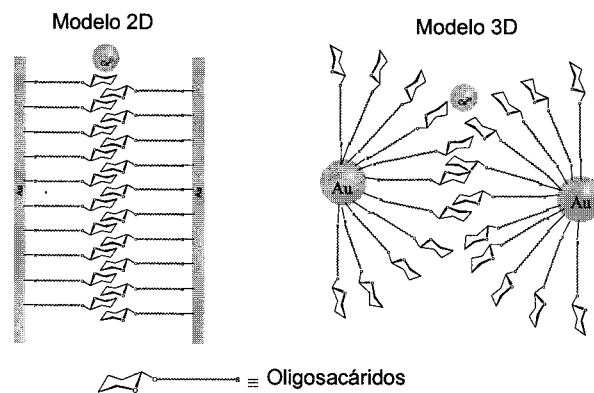


Figura 16.- Disposiciones de carbohidratos polivalentes 2D y 3D sobre superficies de oro para el estudio de interacciones carbohidrato-carbohidrato.

Los modelos tridimensionales (3D) multivalentes, a los que denominamos *gliconanopartículas* y en cuyo desarrollo se ha centrado esta Tesis pueden describirse como un sistema polivalente que presenta un número determinado de moléculas de azúcar organizadas sobre un soporte o núcleo central metálico (oro) de dimensiones

²⁷ Otsuji, E.; Park, Y.S.; Tashiro, K.; Kojima, N.; Toyokuni, T.; Hakomori, S-I. *Int J Oncol*, 1995, 6, 319

nanométricas a través de un espaciador. Este sistema se puede conseguir haciendo reaccionar un neoglicoconjugado del azúcar derivatizado con un grupo tiol terminal, con una sal de oro. El tiolderivado se puede obtener por glicosidación del azúcar con un tioalcohol. El núcleo de oro se puede obtener a partir de la reducción de una sal de oro con borohidruro sódico.

Uno de los objetivos que se pretenden en esta Tesis es el estudio de la influencia de la multivalencia y del efecto cluster frente a sistemas biológicos, como enzimas, lectinas o incluso frente a otros carbohidratos (carb-carb). Para ello, se necesitan sistemas en los que se pueda controlar el número o cantidad de carbohidrato, así como la densidad, espaciado entre ligandos y la flexibilidad siendo las gliconanopartículas un buen modelo donde se puedan controlar todos estos factores. En la siguiente figura (figura 17), se muestra un esquema de lo que consiste las gliconanopartículas de oro.

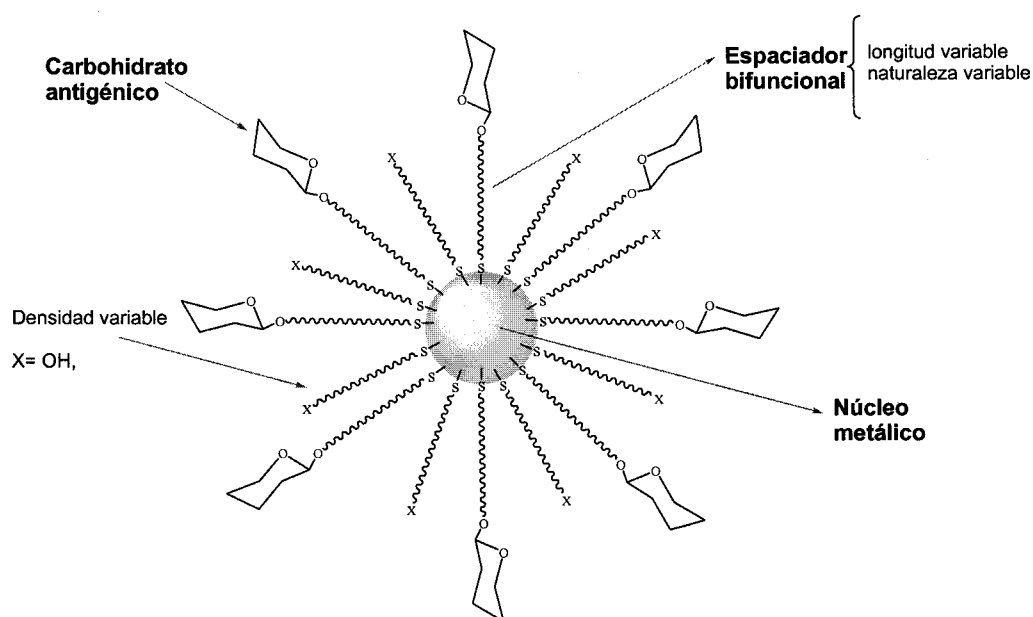


Figura 17- Esquema de una gliconanopartícula de oro

La estrategia sintética desarrollada para la preparación de las *gliconanopartículas* permite, de forma sencilla, todas estas variaciones. Como núcleo o soporte se eligió el oro, que se prevé no tenga toxicidad en sistemas biológicos. Aunque en esta tesis sólo se ha preparado nanopartículas (nanoclusters) de oro, en una tesis paralela desarrollada en nuestro laboratorio, se han preparado también

gliconanopartículas semiconductoras con núcleos de CdS y ZnS y otras de aleaciones Au/Fe con propiedades magnéticas.

Como azúcar se ha elegido el disacárido lactosa (Gal β 4Glc), un azúcar que constituye parte de la estructura glicídica de muchos glicoesfingolípidos (GSLs) de la membrana²⁴. El glicoesfingolípido Le^x por ejemplo, está constituido por el trisacárido determinante Le^x (Gal β 4[Fuc α 3]GlcNAc) y la lactosilceramida (ver figura 18). El estudio de la interacción homofílica Le^x-Le^x es uno de los objetivos de nuestro laboratorio⁵⁶, que pretende clarificar las bases moleculares que intervienen en esta interacción. Existen evidencias en la bibliografía en las que el trisacárido Le^x es el epítipo responsable de dicha interacción, siendo poco influyente el epítipo de lactosa.

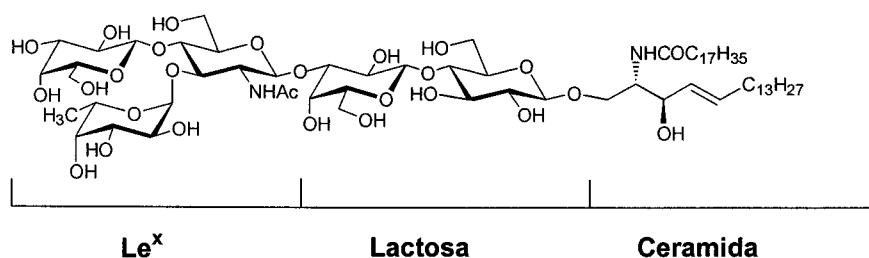


Figura 18.-Estructura del glicoesfingolípido Le^x.

Se eligió el neoglicoconjugado de lactosa en principio por dos razones: primera, confirmar la contribución de la lactosa a la interacción Le^x-Le^x propuesta como responsable de la compactación de la mórula y de la agregación de teratocarcinoma y en segundo lugar como molécula control para compararla con el trisacárido Le^x, el otro componente del GSL Le^x.

Por otro lado, la lactosilceramida (*lactoCer*) se expresa en membranas de células endoteliales en vasos sanguíneos de órganos como el pulmón. Existen varios precedentes que indican que estos GSLs participan en procesos de adhesión de determinadas células tumorales como las de melanoma murino a endotelio de ratón. Se ha propuesto que la *lactoCer* interacciona de forma adhesiva con gangliósidos como el GM3 (NeuAc β 2-3Gal β 4GlcOCer) que se expresan en gran cantidad en la membrana de células de melanoma B16²⁷. De esta forma, con las lactonanopartículas de oro

²⁴ Fenderson, B.A.; Eddy, E.M.; Hakomori, S-I *BioEssays*, **1990**, *12*, 173

⁵⁶ de la Fuente, J.M. *Tesis Doctoral*, **2003**, Universidad de Sevilla.

²⁷ Otsuji, E.; Park, Y.S.; Tashiro, K.; Kojima, N.; Toyokuni, T.; Hakomori, S-I. *Int J Oncol*, **1995**, *6*, 319

dispondríamos de un modelo multivalente mimetizando la lactosilceramida en el endotelio para los estudios de inhibición de la metástasis de células tumorales B16.

Pero además construir sistemas multivalentes de lactosa o de otro azúcar antigénico no sólo puede servirnos para estudiar la interacción entre carbohidratos, sino también como la influencia de la multivalencia frente a determinados sistemas biológicos como por ejemplo, enzimas o lectinas que reconozcan azúcares.

En todos los estudios biológicos es necesario disponer de un control o blanco con lo que también nos propusimos como objetivo de esta Tesis la síntesis de un glicoconjugado de maltosa. La maltosa ($\text{Glc}\alpha\text{4Glc}$) es un disacárido que no está implicado en los procesos anteriormente mencionados y que ha sido utilizado como sistema control por no mostrar adsorción específica con proteínas.

Siguiendo el esquema dado para las *gliconanopartículas* el otro elemento necesario para preparar estos sistemas son los espaciadores, que en este caso son de espaciadores bifuncionales, con un grupo tiolato en un extremo que les permita unirse al oro y un grupo hidroxilo que pueda establecer el enlace glicosídico con la lactosa. Estos espaciadores son el 11-tioacetilundecanol, el 11-tioacetil-3,6,9-trioxa-undecanol, y un espaciador “mixto”, constituido por una parte de una cadena de 11 átomos de carbono y por otra, un derivado de hexaetilenglicol cuya síntesis se detallará en el apartado de discusión y resultados. Con este juego de espaciadores de distinta naturaleza y longitud, se podrá estudiar la flexibilidad y la presentación del ligando en la superficie. La utilización de espaciadores derivados de oligoetilenglicol evita las interacciones inespecíficas y aumenta la solubilidad en el sistema.

La figura 19 resume los neoglicoconjugados y espaciadores sintetizados que se van a utilizar en la preparación de las *gliconanopartículas* objetivo. Los neoglicoconjugados preparados deberían poder utilizarse indistintamente en la formación de los modelos bidimensionales (2D) como en los tridimensionales (3D).

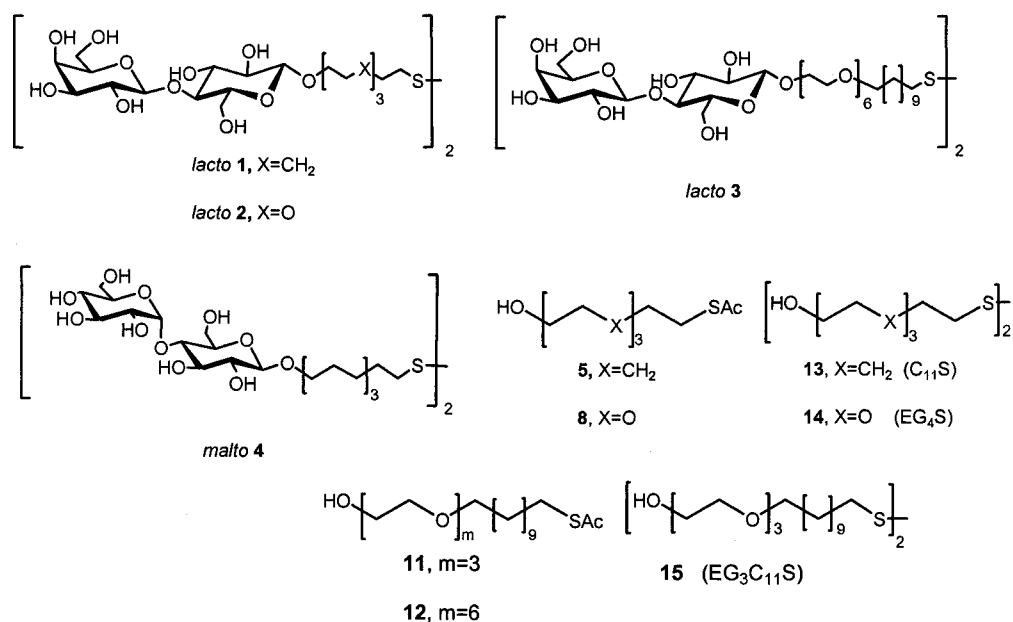


Figura 19- Moléculas sintetizadas en esta Tesis Doctoral

Las gliconanopartículas que nos propusimos preparar con estos neoglicoconjugados se exponen en esta figura (figura 20).

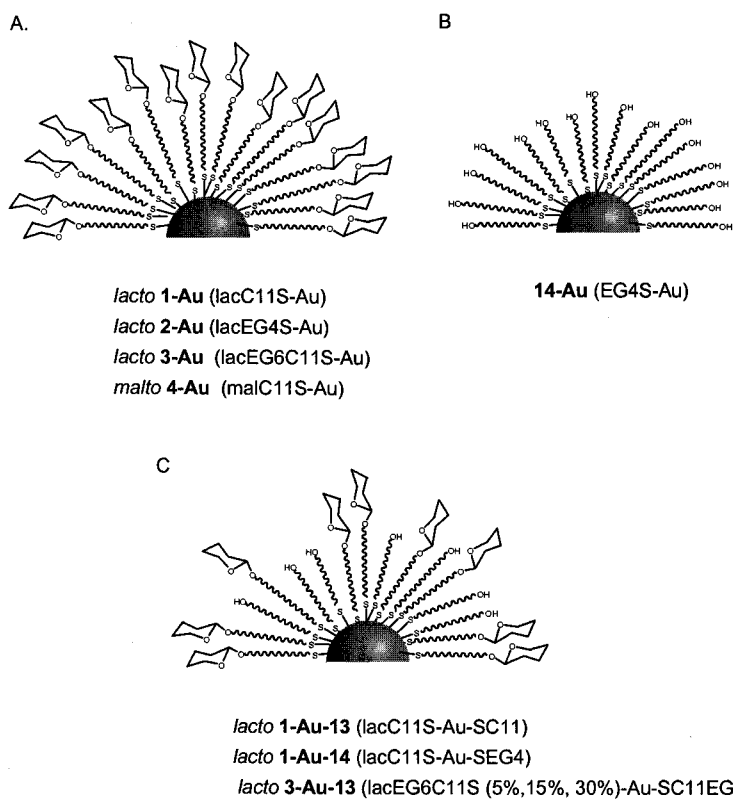


Figura 20.- Gliconanopartículas de oro preparadas durante esta Tesis.

Las lactonanopartículas **1-Au**, **2-Au** y **3-Au** son un buen modelo para mimetizar la lactosilceramida en la superficie celular. Estos gliconanoconjugados además se diferencian en el espaciador que llevan, por lo que se puede estudiar la capacidad de los neoglicoconjugados para formar monocapas autoensambladas sobre oro. Además constituyen modelos multivalentes con distinta presentación de ligando. La lactonanopartícula **1-Au** fue preparada por ser un modelo rígido de forma que los receptores encuentren a la lactosa con una presentación fija. La naturaleza hidrofílica del tetraetilenglicol (espaciador tipo **14**) en la lactonanopartícula **2-Au** aumentaría la solubilidad en el gliconanoconjugado, además de que no presentaría adsorción no específica con proteínas. Para obtener un sistema más flexible, nos propusimos la síntesis de la lactonanopartícula **3-Au**, cuyo neolactoconjugado **3** lleva un espaciador de tipo mixto (espaciador tipo **12**), de forma que llevaría las propiedades presentadas en las anteriores, pero además, la longitud y la flexibilidad del espaciador, daría lugar a un sistema multivalente donde la lactosa se encontraría alejada del núcleo y además podría ser más accesible a los receptores proteínicos (figura 20 A). También como sistema multivalente de control en los posteriores estudios con sistemas biológicos se prepararon las nanopartículas de maltosa **4-Au** y la nanopartícula **14-Au**, preparada a partir del espaciador **14** derivado del tetraetilenglicol y que por lo tanto no incorpora azúcar (figura 20 B).

En todos los procesos de patogénesis viral o bacteriana, y en general en los procesos de reconocimiento y adhesión celular, es muy importante aparte de la presentación, la densidad de ligando en la superficie celular, así una misma proteína puede interactuar con un ligando que presente una alta densidad y tener un comportamiento distinto cuando interactúa con un ligando que se encuentre con una densidad más baja⁵⁷. Sin embargo, no es fácil disponer de sistemas multivalentes donde se pueda controlar el número de ligandos. Como objetivo de esta Tesis Doctoral, también se intentará solucionar este problema, sintetizando *gliconanopartículas de distinta densidad en ligando* **1-Au-9**, **1-Au-14** y **3-Au-15** (figura 20 C). La obtención de esta clase de gliconanopartículas consistiría en mezclar diferentes ligandos (neoglicoconjugados y otras moléculas como son los espaciadores) en iguales o distintas proporciones y unirlos al soporte de oro. La síntesis y preparación de todas las gliconanopartículas será detallada en el apartado de discusión y resultados

⁵⁷ Houseman, B.T.; Mrksich, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 782.

Un importante punto de aplicación de nuestro modelo a la investigación de los procesos de adhesión celular *in vivo*, es su estabilidad a la degradación enzimática. El impedimento estérico de los carbohidratos sobre la superficie de la nanopartícula puede inhibir su reconocimiento y degradación por las enzimas⁵⁶ []. Por este motivo, como objetivo de este trabajo, se pretende estudiar la estabilidad de las gliconopartículas frente a enzimas que degradan carbohidratos, en este caso, lactosa. El estudio se basa en la hidrólisis enzimática de este sistema con β -galactosidasa. Esta enzima reconoce el extremo galactosídico e hidroliza el enlace glicosídico. La galactosa liberada puede ser observada por RMN, Cromatografía de gases, UV... En este trabajo se estudia por RMN y por un ensayo acoplado a una galactosa deshidrogenasa (GDH).

Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral es el estudio de la multivalencia y el efecto cluster glicosídico que posee estas *gliconopartículas*. Para ello, se ha diseñado un experimento basado en una inhibición de la unión de una lectina a su ligando. Como posibles inhibidores se utilizarán las *gliconopartículas* y sus correspondientes ligandos monovalentes y divalentes. La lectina elegida es la *Viscum Album Aglutinina*, más conocida como viscumina, lectina que tiene dos centros de unión que reconoce lactosa. El ensayo para estudiar la interacción consiste en una clase de ensayo ELLA, pero donde la lectina está marcada con I-125. También se realizará un estudio con la subunidad B de la toxina del cólera, cuyo receptor es otro glicoesfingolípido distinto a la lactosa, pero que al ser una toxina pentavalente, sería un buen modelo para estudiar la multivalencia. Todos estos ensayos y experimentos se realizarán en colaboración con el Instituto de Química-Física "Rocasolano".

También como es comentado al principio, una de las razones de elegir el neoglicoconjugado de lactosa fue para utilizarla como control y ver cuál su contribución a la interacción homofílica de Le^x , vía carbohidrato-carbohidrato. Para la cuantificación y el estudio de la interacción lactosa-lactosa, se han utilizado las lactonopartículas y sus correspondientes lactoconjugados y se ha medido las fuerzas de adhesión con la técnica de Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM). Las constantes cinéticas de la interacción han sido calculadas utilizando biosensores con detección de resonancia de plamon de superficie (SPR). También utilizando la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), se ha podido visualizar esta interacción.

Uno de los objetivos más ambiciosos que se desea realizar en esta Tesis Doctoral es la aplicación de las *gliconanopartículas* a la terapia antiadhesiva, utilizándolas como inhibidores de la adhesión de células de melanoma a células endoteliales, adhesión cuya fase inicial está mediada por la interacción carbohidrato-carbohidrato. Para ello se ha diseñado un experimento basado en líneas celulares de melanoma B16F10 en ratones. Estas células expresan una gran cantidad de GM3 en su superficie que se adhieren con microdominios de Gg3 y LacCer existentes en las células endoteliales de vasos sanguíneos. Si se administra *gliconanopartículas* de cualquiera de estos glicoesfingolípidos es posible bloquear la adhesión de las células de melanoma al endotelio, inhibiendo el desarrollo tumoral de manera similar a los trabajos obtenidos por Hakomori usando liposomas de glicoesfingolípidos. Este experimento de inhibición será llevado a cabo en colaboración con el Centro Nacional de Biotecnología de Madrid.

Esperamos que todos estos resultados pongan de manifiesto la utilidad de este nuevo sistema multivalente de carbohidratos en el estudio de interacciones presentes en sistemas biológicos.

En concreto, los objetivos que se han llevado a cabo en esta Tesis Doctoral se resumen en cuatro puntos principales:

1. Síntesis y preparación de neogliconjugados de lactosa y espaciadores de naturaleza y longitud variable.
2. Síntesis de un nuevo sistema modelo multivalente de carbohidratos, y su caracterización por diversas técnicas. El desarrollo y la aplicación de este sistema, denominado *gliconanopartículas de oro*, une la glicobiología y la nanotecnología, dando lugar a una nueva disciplina que hemos llamado *gliconanotecnología*.
- 3.- Estudio del comportamiento de este nuevo gliconanoconjugado multivalente frente a receptores específicos de lactosa como la enzima galactosidasa de *E.coli*, la lectina *viscum album aglutinina* y la subunidad B de la toxina del cólera.

- 4.- Evaluación y cuantificación de la interacción lactosa-lactosa utilizando la técnica de Microscopia de Fuerzas Atómicas (AFM) y la técnica basada en biosensores con detección de la banda de plasmon de resonancia (SPR).

- 5.- Su aplicación concreta como herramienta antiadhesiva a un modelo de metástasis de pulmón de melanoma de ratón.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La complejidad y diversidad de las interacciones multivalentes carbohidrato-proteína o carbohidrato-carbohidrato, hace difícil estudiar el mecanismo de las mismas. Por este motivo, se necesita de nuevas herramientas sintéticas y analíticas para superar este problema. El trabajo de esta tesis se basa fundamentalmente en el diseño y preparación de un nuevo sistema multivalente, al que hemos denominado *Gliconanopartículas*, su caracterización y su aplicación al estudio de las interacciones carbohidrato-proteína y carbohidrato-carbohidrato.

A la hora de diseñar nuestro sistema multivalente hay que tener en cuenta 3 partes: el soporte, la molécula que se quiere estudiar que en este caso es el carbohidrato y un nexo de unión entre ellos que se denomina *espaciador*. El soporte elegido será el oro (Au), bien como superficie (monocapa de oro) o bien como nanopartícula.

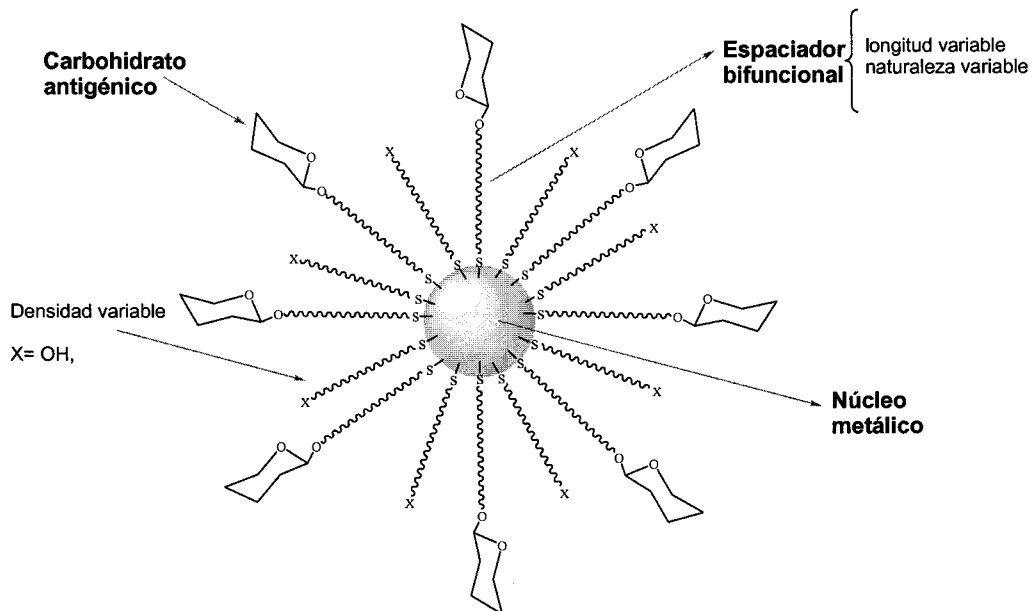


Figura 21.- Esquema general de una gliconanopartícula de oro

El espaciador puede ser de distinta naturaleza hidrofóbica y longitud variable dependiendo de cómo queramos presentar el oligosacárido. Debido a que es un nexo entre dos moléculas, este espaciador debe ser bifuncional, es decir, por un extremo estará funcionalizado con un grupo tiol (SH) para unirse al oro, y por otra parte un grupo hidroxilo (OH) para unirse al carbohidrato. Pero además, en su elección debe

tenerse en cuenta su carácter neutral (ausencia de interacciones con el objetivo a estudiar), su solubilidad y su capacidad para formar monocapas autoensambladas en su unión a la superficie de oro.

Los carbohidratos elegidos son el disacárido lactosa ($\text{Glc}\beta 1\rightarrow 4\text{Gal}$) y el disacárido maltosa ($\text{Glc}\alpha 1\rightarrow 4\text{Gal}$). La lactosa se eligió por dos razones: la primera porque forma parte de todos los glicoesfingolípidos y concretamente del glicoesfingolípido Le^x , molécula objetivo de nuestro laboratorio para estudiar y evaluar la interacción carbohidrato-carbohidrato. La segunda porque la lactosilceramida es un GSL que encuentra en las células endoteliales e interacciona con microdominios de GM3 y Gg3 en el paso inicial de adhesión de células tumorales a endoteliales en ratones. La maltosa se eligió para tener un control o blanco que no interfiera con las interacciones que queremos estudiar, que es un antígeno no natural y se prevé que no presente actividad antigénica.

1. Síntesis de neoglicoconjugados de lactosa y maltosa. Síntesis de espaciadores.

En primer lugar, se han sintetizado los neoglicoconjugados de lactosa y maltosa, a partir de glicosidaciones entre un donante de glicosilo (lactosa y maltosa) y el alcohol bifuncional (espaciadores). Los neoglicoconjugados se unirán al soporte metálico, mediante una reducción in situ de una sal de oro dando lugar a las gliconanopartículas de oro. Mezclando distintos ligandos en la reacción se pueden obtener además, *gliconanopartículas de densidad variable en ligando*.

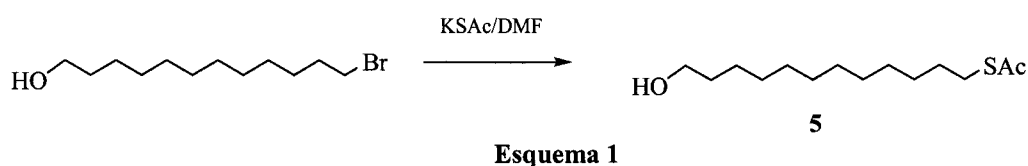
Una vez definido el sistema, vamos a comentar la síntesis de cada una de las partes y los resultados más significativos. Comenzaremos con la síntesis de los **espaciadores**.

1.1 Espaciadores.

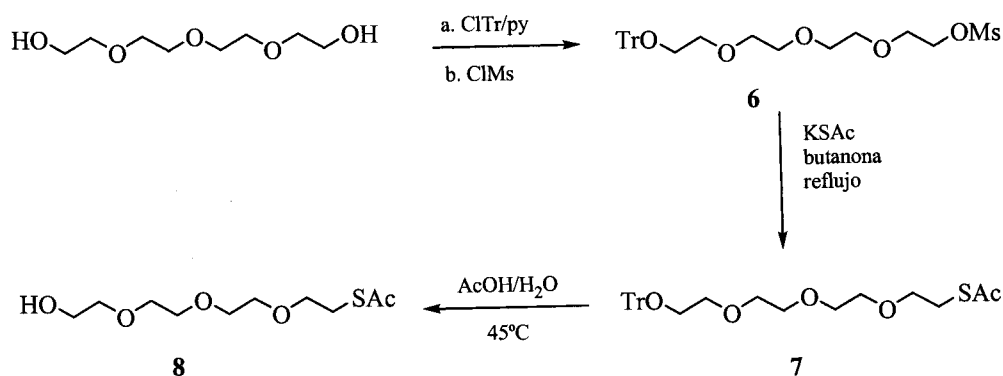
Como se ha comentado anteriormente los espaciadores pueden ser de distinta naturaleza y longitud. En nuestro caso, se han elegido tres: un derivado alifático, 11-tioacetil undecanol **5**, un derivado de etilenglicol 11-tioacetil, 3,6,9-trioxa-undecanol **8** y los espaciadores “mixtos” constituido por la cadena alifática y por una parte más hidrófila, derivada del tri y hexa (etilenglicol), **11** y **12**. De esta forma, con estos tres

tipos distintos, podemos estudiar como su distinta naturaleza influye en la reactividad y cinética en la formación de monocapas autoensambladas sobre superficies de oro en 2D y nanopartículas en 3D. También estudiar el efecto que se produce a la hora de evaluar las interacciones y la importancia en la multivalencia y el efecto cluster.

El tioacetildervado **5** se obtuvo por tratamiento de 11-bromoundecanol (comercial) con tioacetato potásico (KSAc) en dimetilformamida (DMF), tal y como se indica en el esquema 1:



En cuanto al espaciador **8** (11-tioacetil-3,6,9-trioxa-undecanol), se obtuvo como se indica en el esquema sintético (esquema 2) a partir del tetraetilenglicol comercial.



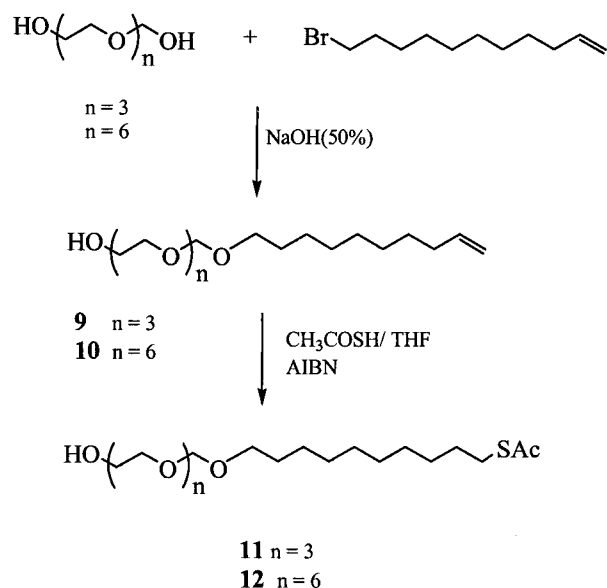
La monotritilación convencional del tetraetilenglicol se lleva a cabo mediante el tratamiento con 1.1 eq. de cloruro de tritilo en piridina. El procesamiento habitual de la reacción permite la obtención de un sirupo que sin purificación posterior se somete seguidamente a mesilación con cloruro de mesilo, obteniéndose tras purificación el mesiltrilito **6**, como puede observarse en su espectro de RMN en el que se muestra entre otras señales, la señal correspondiente al grupo mesilo a 3.01 ppm así como la presencia del grupo tritilo y la falta de simetría de la molécula. La sustitución del grupo mesilo por tioacetato (SAc), dio lugar al tioacetiltrilito **7**. El establecimiento de la estructura del compuesto se realizó a partir de los espectros de H-

RMN donde desaparece las señales del grupo mesilo y la aparición de las señales del grupo metilo del tioacetato a 2.30 ppm (s) y el desplazamiento a campo alto del metileno unido al azufre a δ 3.20 ppm en comparación con el correspondiente metileno del compuesto **6** a 4.36 ppm

La destilación del producto **7** se lleva a cabo con AcOH y agua al 70% a 45° C. En este caso se obtiene el hidroxilderivado **8** en un 60 % de rendimiento. En su espectro (espectro 1) se puede observar la desaparición de las señales correspondientes a los aromáticos del grupo tritilo.

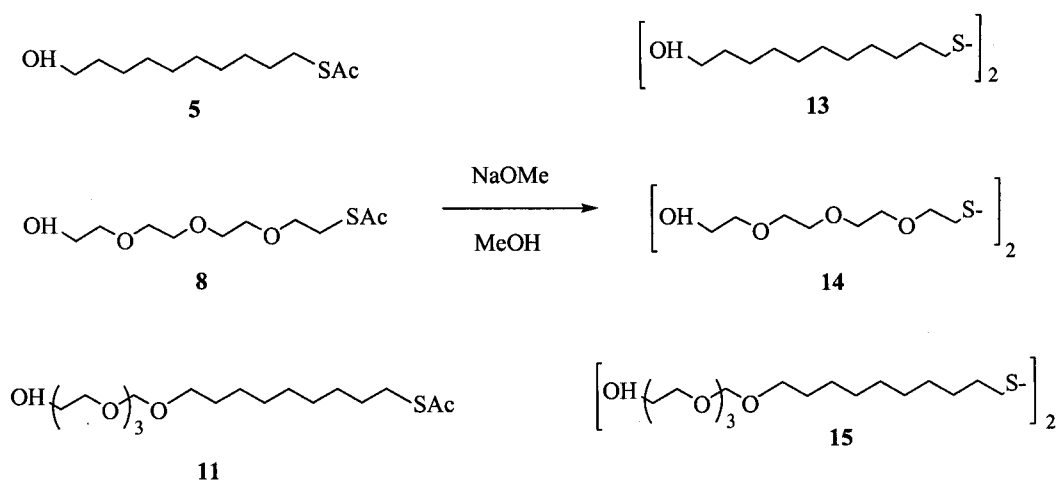
El espaciador de cadena mixta está constituido por una parte de un derivado del etilenglicol y una cadena alifática de once átomos de carbono. Se han sintetizado dos espaciadores de este tipo, que se diferencian en el número de unidades de etilenglicol: por una parte el espaciador **11**, que lleva trietilenglicol y el espaciador **12** constituido por una molécula de hexaetilenglicol. Ambos compuestos se obtuvieron por la ruta sintética que se indica a continuación (Esquema 3) y que parte de tri y hexaetilenglicol y 11-bromoundec-1eno disponibles comercialmente⁵⁸.

La conjugación del trietilenglicol o el hexaetilenglicol con el 11-bromoundec-1eno se realiza con NaOH al 50%, obteniéndose las correspondientes olefinas **9** y **10**. En sus espectros de RMN, se pueden observar las señales correspondientes a los hidrógenos del doble enlace a $\delta \approx 5.80$ ppm y las correspondientes a la parte del etilenglicol entre 3.70 ppm y 3.50 ppm. La adición al doble enlace de tioacetato se realiza con tioacético en THF y con una cantidad catalítica de AIBN. De esta forma se obtiene los tioacetilderivados **11** y **12** con buen rendimiento. La desaparición de las señales correspondiente al doble enlace y la aparición del metilo del tioacetato a 2.04 ppm y 2.28 ppm respectivamente, confirma las estructuras de estos compuestos. También es importante destacar los tripletes correspondientes al metileno unido al azufre a 2.58 y 2.82 ppm, para **11** y **12** respectivamente.



Esquema 3

Los espaciadores **5**, **8** y **12** se han utilizado como aceptores de glicosilo en la obtención de los neoglicoconjugados de lactosa y maltosa. Para la preparación de las nanopartículas es necesario eliminar el grupo acetilo y formar el grupo tiol para después conjugarlo al oro. Por esta razón, se realizó una des-S-acetilación convencional con metóxido sódico en metanol, dando lugar a los compuestos **13**, **14** y **15** (Esquema 4). En sus espectros de ^1H -RMN se observa la total desaparición del metilo correspondiente al grupo acetilo. El desplazamiento a campo alto del grupo metileno desde 2.82 ppm a 2.68 ppm indicó la formación del disulfuro y no del grupo tiol (SH) que aparece a 2.48 ppm aproximadamente. La formación de tioles, debido a la fácil oxidación del grupo tiol, se conseguía si la desprotección se llevaba a cabo en ausencia total de oxígeno.



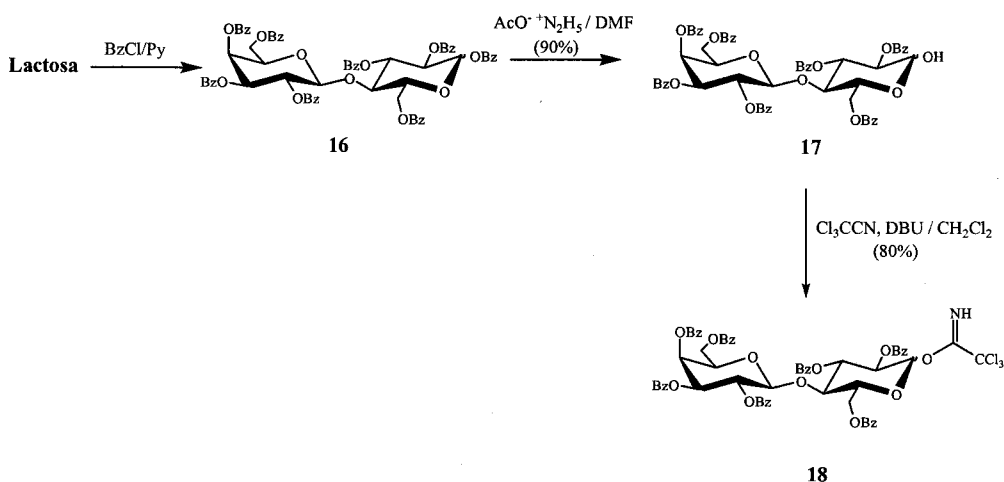
Esquema 4

1.2. Donadores de glicosilo: Tricloroacetimidatos

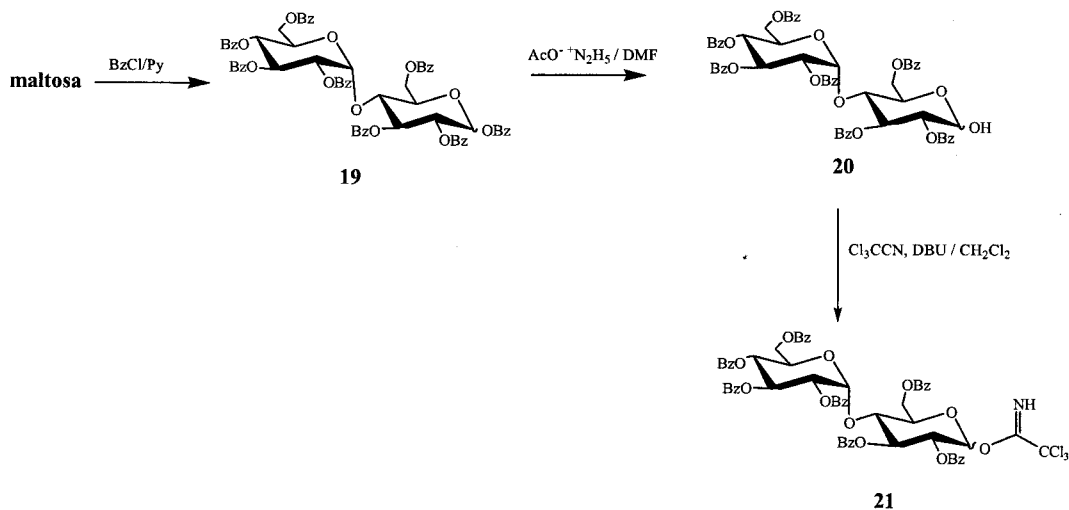
Las reacciones de glicosidación consisten en un acoplamiento de un donante de glicosilo con un aceptor de glicosilo (en nuestro caso los alcoholes **5**, **8** y **12**) en presencia de un promotor, cuya función es la de actuar sobre el grupo saliente del donante, activando de esta forma el carbono anomérico del mismo.

Se han sintetizado los siguientes donores de glicosilo: el tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- β -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 4) 2,3,6-tri-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo (**18**) y el tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 4) 2,3,6-tri-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo (**21**), obtenidos como se indica en el esquema 5, a partir de lactosa y maltosa respectivamente (esquema 5a y 5b).

a)



b)



Esquema 5

La benzoilación convencional de maltosa o lactosa con cloruro de benzoilo (ClBz) y piridina dio lactosa benzoilada (**16**) y maltosa perbenzoilada (**19**) como mezcla de anómeros α y β . La desbenzoilación selectiva en el carbono anomérico (C-1) se realizó con acetato de hidracina en DMF a 60° C⁵⁹. La cromatografía en capa fina (ccf) (AcOEt : Hexano 1: 1), muestra la desaparición del producto de partida (compuesto **16** y **19**) y la aparición de un producto de rf menor. Tras purificación, los compuestos **17** y **20** se tratan con tricloroacetitrilo y DBU como base en CH₂Cl₂ según procedimiento descrito por Schmidt y co⁶⁰., obteniéndose los tricloroacetimidatos **18** y **21** con excelente rendimiento. En sus espectros de RMN se observa entre otras señales, la aparición de un singulete a 8.5 ppm correspondiente al grupo NH del tricloroacetimidato.

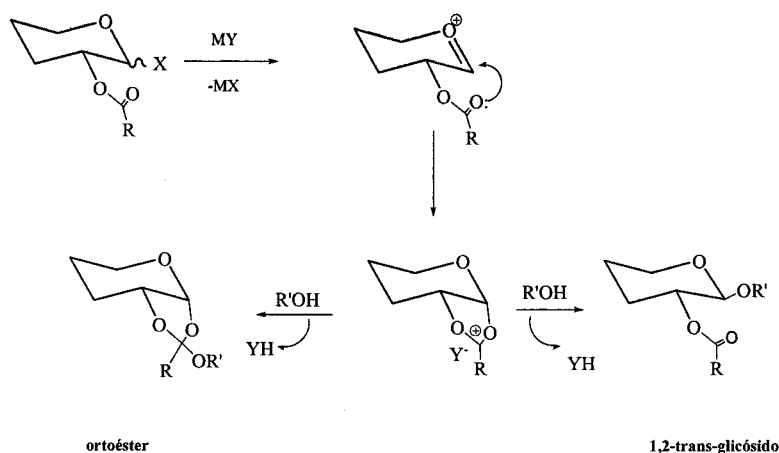
1.3. Glicosidaciones. Síntesis de neoglicoconjugados de lactosa 1,2,3 y de maltosa 4.

La glicosidación es el paso clave en la síntesis y hay que tener en cuenta dos factores: en primer lugar la formación del enlace glicosídico y en segundo lugar la manipulación de grupos protectores que conlleva a secuencias de protección y desprotección hasta llegar al producto deseado.

En nuestro caso se han elegido como donantes de glicosilo, los tricloroacetimidatos **18** y **21** y como aceptores los alcoholes **5**, **8** y **12**. Se han elegido los tricloroacetimidatos porque las condiciones de reacción son suaves y la reacción es rápida y fácil de procesar. La estereoquímica de la reacción viene dada por la presencia o ausencia de un grupo acilo participante sobre el C-2 del donante de glicosilo. Para la obtención del glicósido β es necesaria la presencia del grupo acilo participante.

⁵⁹ Excoffier, G., Gagnaire, D.; Utile, J-P. *Carbohydrate Research*, **1975**, 39 365-373.

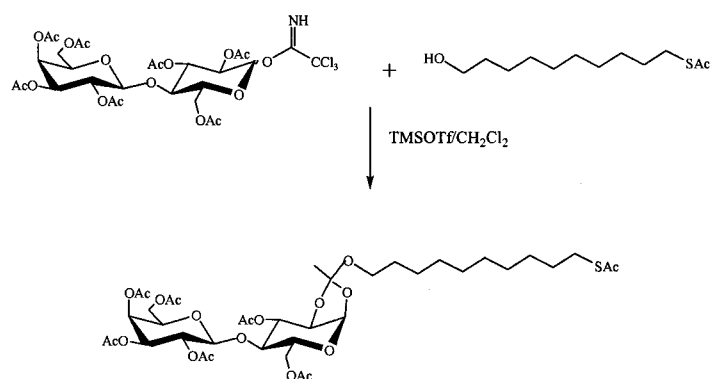
⁶⁰ Schmidt, R. R., *Adv. Carbohydrate. Chem. Biochem.* **1994**, 50, 21-123.



Esquema 6

El grupo acilo elegido ha sido el benzoilo pero en un primer momento se utilizó el grupo acetilo⁶⁰. Sin embargo, en la reacción de glicosidación, se obtuvo el ortoéster

a:

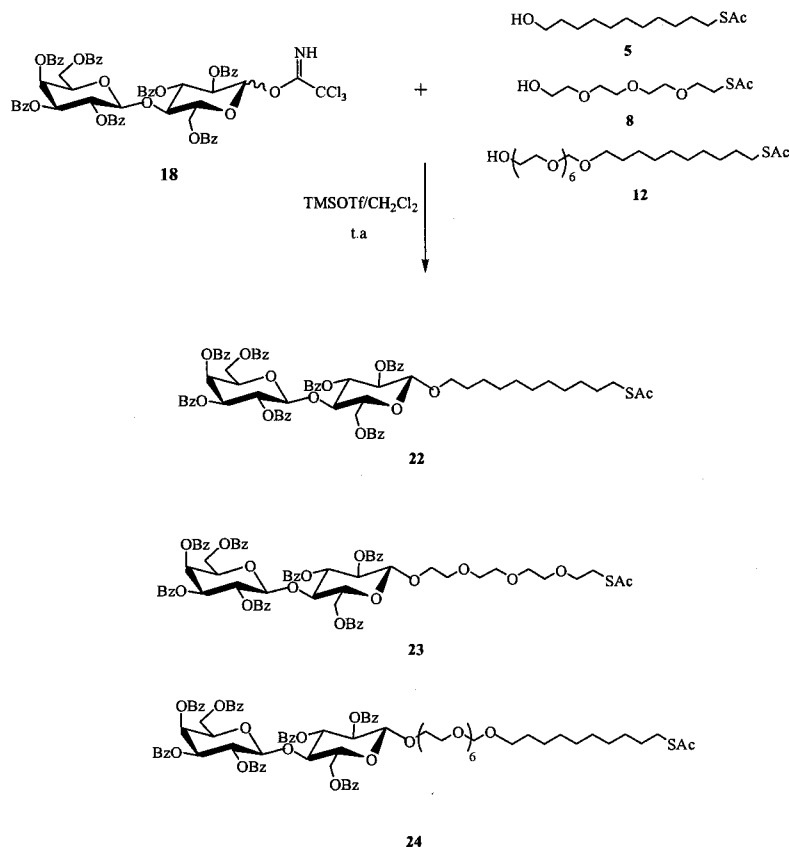


Esquema 7

La elucidación estructural de este compuesto se realizó mediante su espectro de ¹H-RMN donde un doblete a 5.01 ppm con una $J = 3.5$ Hz corresponde al glicósido α y no β como se deseaba. Entre los grupos acilos más utilizados el orden de formación de ortoéster es el siguiente: $\text{AcO} > \text{BzO} > \text{PivO}$; por esta razón se eligió el grupo benzoilo que como veremos a continuación dio buenos resultados. Como promotor en la glicosidación se ha utilizado el triflato de trimetilsililo (TMSOTf).

⁶⁰ Elofsson, M.; Broddefalk, Ekberg, T.; Kihlberg, J. *Carbohydrate Research*, **1994**, 258, 123-133.

Cuando se realizan las correspondientes glicosidaciones con el tricloroacetimidato de lactosa **18** y los espaciadores **5**, **8** y **12**, se obtuvieron los correspondientes glicósidos con rendimientos que van de buenos a excelentes (ver parte experimental) (esquema 8).

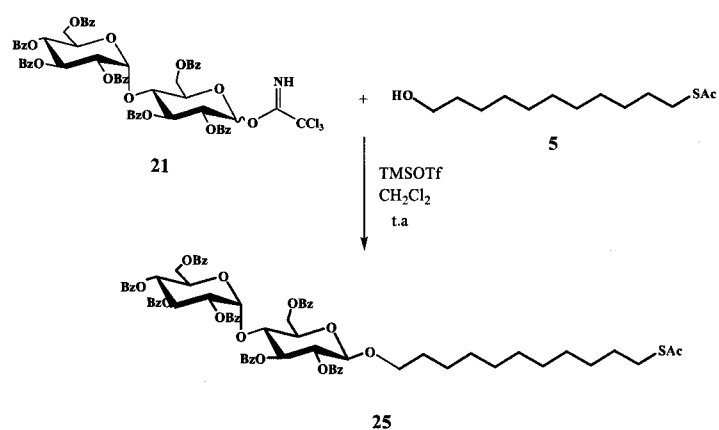


Esquema 8

La estereoquímica β de los lactósidos **22**, **23** y **24** fue confirmada por sus espectros de ¹H-RMN. En el espectro de ¹H-RMN, la señal correspondiente al H-1 aparece a 4.85 ppm como doblete con $J=7.8$ Hz indicando una disposición 1,2-transecuatorial entre los protones H-1 y H-2. También se observa la desaparición del tricloroacetimidato y la aparición de un triplete a 2.83 ppm correspondiente al metileno unido al S del correspondiente espaciador en el caso de los glicósidos **22** y **24**, y a 3.06 ppm en el caso del lactósido **23**, que lleva un espaciador derivado del tetraetilenglicol. En cuanto a sus espectros de ¹³C se puede destacar la señal correspondiente al C-1 a 101.1 ppm y la señal correspondiente al tiocarbonilo a 196.1 ppm en todos los lactósidos. Toda esta elucidación también ha sido apoyada por sus espectros de RMN en 2D COSY. El análisis de masas y análisis elemental confirma el peso y la fórmula molecular de los mismos.

La glicosilación para obtener el neoglicoconjugado de maltosa **25**, también fue con buen rendimiento (70%). La estereoquímica β se confirmó con sus espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, donde el doblete correspondiente al H-1 aparece a 4.71 ppm con una $J=7.5$ Hz correspondiente a una disposición 1,2-transdiecuatorial. También se observa a 2.83 ppm el triplete correspondiente al CH_2S .

En su espectro de ^{13}C -RMN aparece a 197 ppm el tiocarbonilo correspondiente al grupo acetilo del espaciador **5** y el C-1 a 101.0 ppm, igual que ocurre en los lactósidos anteriores.

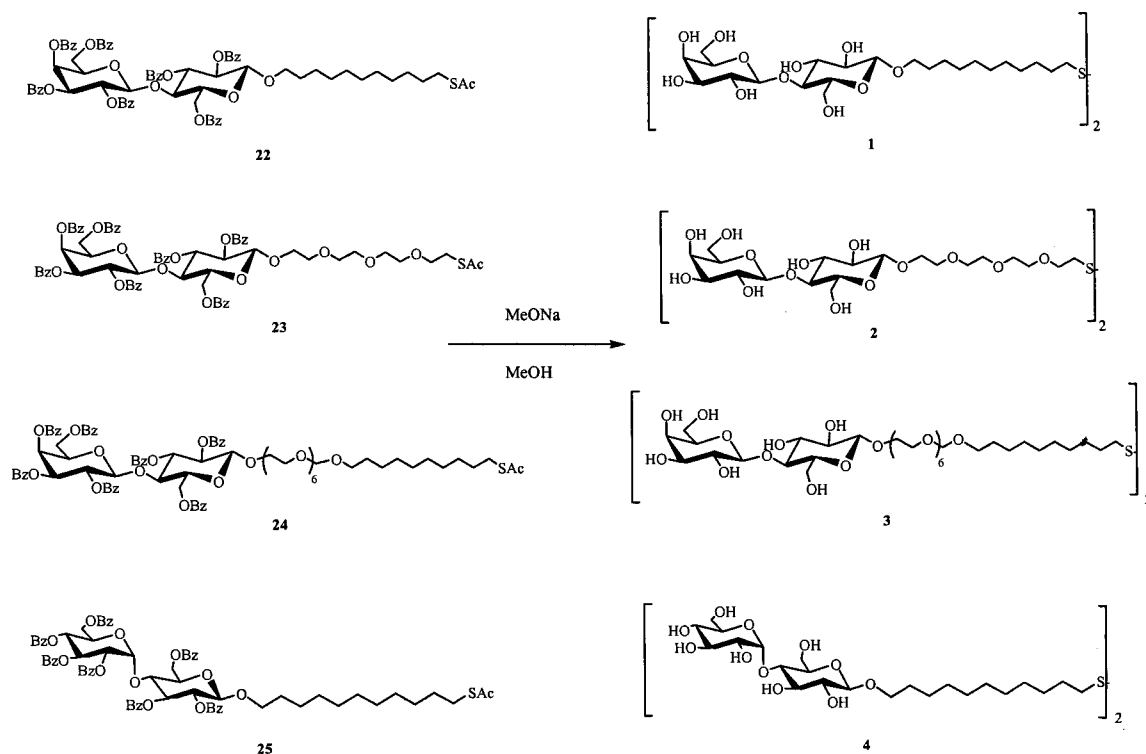


Esquema 9

El siguiente paso es la desprotección de los grupos Bz y el acetilo del SAc. Para ello a disoluciones de los lactósidos **19**, **20** y **21**, y del maltósido **18** en MeOH (en el caso de **18** y **19** ayudado de mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ al 10%) se le añadieron le añadió una disolución metanólica de NaOMe 1N. Esta reacción se deja bastante tiempo para poder aislar los compuestos como disulfuro, ya que no se pudieron aislar como tioles libres debido a la fácil oxidación de este grupo⁶¹. La purificación se llevó a cabo neutralizando con resinas ácidas y concentrando el producto a sequedad. Lavando con éter se elimina el benzoato de metilo y precipita un sólido blanco que corresponde a los derivados **1**, **2**, **3** y **4**. El desplazamiento a campo alto del triplete de CH_2SAc de 2.83 ppm a 2.68 ppm y la desaparición de señales de aromáticos y del metilo del tioacetato a 2.00 ppm nos confirma la eliminación de los grupos benzoato y tioacetato. La aparición

⁶¹ Kasuya, C.M.; Wang, L.X.; Lee, Y.C.; Mitsuki, M.; Nakajima, H.; Miura, Y.; Sato, T.; Hatanaka, K.; Yamagata, S.; Yamagata, T. *Carbohydrate Research*, **2000**, 329, 755-763.

del triplete del CH_2S a 2.68 ppm nos confirma que los productos están como disulfuros y no como tiolderivados ya que si fuese así este triplete debería aparecer a 2.48 ppm tal como se indica en las tablas de elucidación estructural.



Esquema 10

2.- Preparación y caracterización de los sistemas multivalentes de carbohidratos

2.1.- Gliconanopartículas de oro presentando solo carbohidratos.

El siguiente paso en la síntesis del sistema multivalente es la conjugación de los neglicoconjugados anteriormente preparados, a las nanopartículas de oro. Esta conjugación se realiza reduciendo una sal de oro en este caso, ácido tetracloroaúrico (HAuCl_4), en presencia de un exceso de los neoglicoconjugados 1, 2, 3 y 4 descritos en la sección anterior. El tiolhidroxiderivado 14 se ha utilizado también para la preparación de nanopartículas control que no presenta carbohidratos en su superficie. Como reductor se empleó el borohidruro sódico (NaBH_4) en un gran exceso (22 eq con respecto al oro).

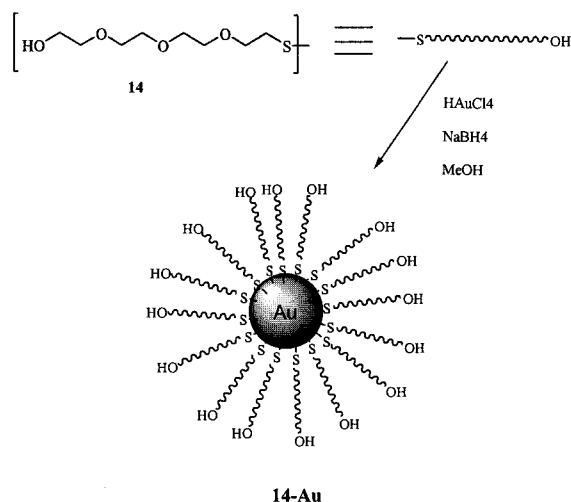
Esta reacción se puede hacer de dos formas: bien utilizando dos fases⁶² o una sola⁶³ como es en este caso. El primer procedimiento consiste en disolver el tiol en un disolvente orgánico (tolueno, diclorometano) y añadir la disolución de oro. Para poner en contacto el tiol con la disolución de sal de oro se añade un catalizador de transferencia de fase. En nuestro caso, los neoglicoconjugados son solubles en metanol, disolvente miscible con el agua y por lo tanto esta reacción se hará en una sola fase.

El tamaño de la nanopartícula va a variar en función de la relación tiol: oro. Normalmente se añade un gran exceso de tiol, para impedir el crecimiento de cristales de oro y obligar que los núcleos de oro formados se estabilicen recubriéndose de los tioles. En este caso, las nanopartículas sintetizadas se realizaron con una relación de tiol: oro, 5.5 eq: 1, una cantidad mayor implicaría una gran cantidad de tiol sintetizado y una menor, podríamos obtener partículas demasiado grandes y posiblemente insolubles. También mencionar que esta relación se hace en base a moléculas de tiol y no disulfuros, es decir, que suponemos siempre que nuestros compuestos son tioles libres.

En la manipulación de esta reacción los matraces deben estar completamente limpios: se limpian primero con una disolución de agua regia y posteriormente con “piraña” a base de mezclas de sulfúrico y agua oxigenada ($7\text{H}_2\text{SO}_4$: H_2O_2), para eliminar cualquier resto de materia orgánica. La reacción debe hacerse en ausencia de luz, ya que la disolución de oro, se descompone con la exposición directa de la luz. El esquema 11 resume la obtención del sistema multivalente denominado **gliconanopartículas de oro** y las gliconanopartículas que hemos preparado en esta Tesis Doctoral.

⁶² Brust, M., Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D.J.; Whyman R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801-802.

⁶³ Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, J.; Kiely, C *J. Chem. Soc.; Chem. Commun.* **1995**, 1655-1656



Esquema 12.

Comentamos a continuación las características y propiedades más interesantes de estas **gliconanopartículas**:

Solubilidad:

Aunque existen muchos ejemplos en bibliografía de coloides de oro y de CdS que se dispersan en agua, hay muy pocos donde las nanopartículas de oro solubles en agua, se aíslan y se redissuelven⁶⁴. Las gliconanopartículas son solubles en agua y son estables en disolución durante meses. Sin embargo, no son solubles en otros disolventes como metanol, tolueno, diclorometano, etc, excepto la nanopartícula **14-Au** que es soluble en metanol y en agua. Esta diferencia en solubilidad en agua y metanol en la mayoría de las gliconanopartículas nos permite purificarlas fácilmente, ya que precipitan de la solución metanólica de la reacción y por lo tanto, se decantan y se purifican por filtración. Algunas de ellas presentan solubilidad en DMSO como es el caso de las lactonanopartículas **1-Au** y **2-Au** y la maltonanopartícula **4-Au**. Esta propiedad que poseen algunas de ellas, nos permite realizar espectros de RMN en este disolvente y poder caracterizarlas mejor, como veremos más adelante.

Las disoluciones acuosas tienen color, característico del núcleo metálico. Las nanopartículas **1-Au**, **2-Au** y **4-Au** poseen un color marrón oscuro. La disolución de **3-Au** tiene un color azulado y las **14-Au** tiene un color violeta muy intenso.

⁶⁴ Templeton, A.C.; Shaowei, C.; Gross, S.; Murray, R.W. *Langmuir*, **1999**, *15*, 66-76.

Caracterización de las gliconanopartículas por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

La microscopía electrónica ha dado mucha información sobre los clusters de oro sintetizados. Así por ejemplo, en nanopartículas funcionalizadas con alcanotiolatos [], los datos obtenidos por microscopía electrónica y la espectroscopía de masas de desorción/ionización de láser (LDI) junto a los datos combinados de cálculos teóricos, han descrito que la forma más probable que posee el núcleo de oro de estas nanopartículas, es la de un octaedro truncado. Las imágenes de TEM nos dan información sobre el tamaño del núcleo, la dispersión y sobre las distancias entre nanopartículas.

En esta memoria se ha utilizado el TEM para determinar el tamaño del núcleo de oro, la forma y la distribución del tamaño de las partículas. El microscopio electrónico lleva acoplado un espectrómetro de energías dispersivas de rayos X (EDX) que permite analizar la composición química de la muestras. La observación de las muestras por TEM se llevó a cabo depositando una gota de una disolución acuosa de 0.1 mg/ ml sobre una rejilla de cobre recubierto de una película de carbón. La gota se deja secar al aire varias horas y se introduce en el microscopio. En la figura se observan estas imágenes obtenidas por TEM de las nanopartículas. Los puntos negros que se observan en en las micrografías (Ver figura 22) corresponden a los núcleos de oro. En la figura 22a se observa una micrografía representativa de una muestra de oro pero sin recubrir de tioles (u otros estabilizantes). En este caso, las nanopartículas de oro al no estar estabilizados crecen hasta alcanzar un tamaño de partícula energéticamente estable (unos 15-20 nm). Estas nanopartículas están enlazadas unas a otras formando racimos y como se observa no son homogéneas, ni se encuentran dispersas y además no son solubles en agua. En la figura 22b es la micrografía correspondiente a la nanopartícula **1-Au**, es decir nanopartículas recubiertas con el neoglicoconjugado **1** (lacC11S). En este caso los núcleos de oro están dispersos en toda la rejilla, además de ser solubles en agua como hemos comentado anteriormente.

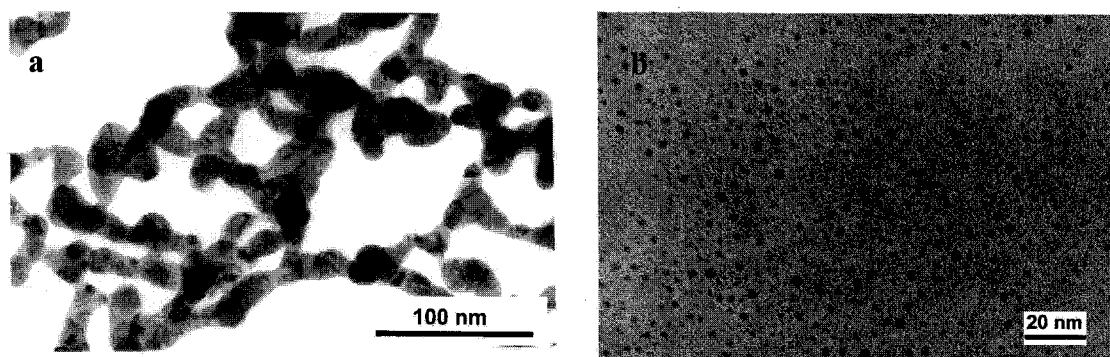


Figura 22.-TEM de a) partículas de oro y b) nanopartículas de oro funcionalizadas con lactoC₁₁S (1).

El análisis químico de unas diez nanopartículas 1-Au obtenido por EDX (figura 23) refleja la presencia de Au y de otros elementos como Cl y K.

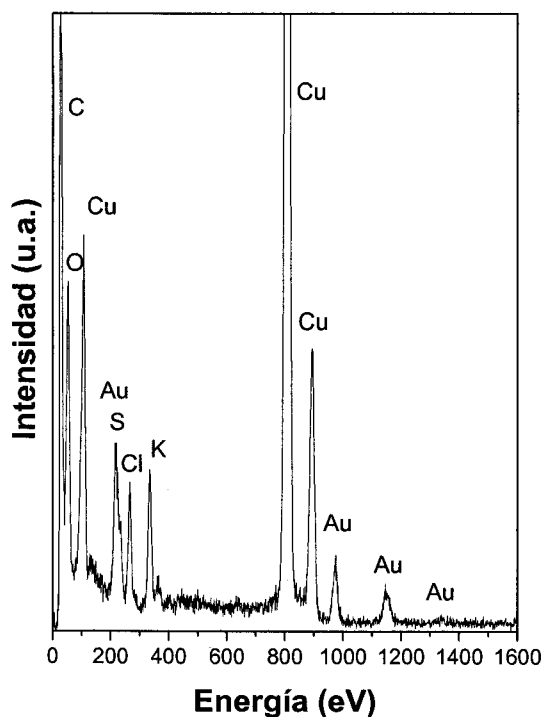


Figura 23.- Análisis químico obtenido por EDX de las gliconopartículas de oro 1-Au.

El análisis estadístico de tamaño de los núcleos de oro, se ha llevado a cabo mediante el programa de análisis de imágenes: global Lab Image 3.1, Data Translation Inc & Acurty Imaging, Inc. El número de partículas consideradas para la estimación del tamaño oscila entre las 300 y 400 tomadas de diferentes micrografías TEM. El histograma de distribución de tamaño de partícula se ha ajustado bajo curvas de tipo log-normal. Con este análisis, se ha determinado el tamaño medio de los núcleos de oro

de las gliconanopartículas. Las nanopartículas **1-Au** y **2-Au** poseen un diámetro medio de 1.8 ± 0.5 nm y las de **3-Au** son de 2.2 ± 0.5 nm. Las nanopartículas de maltosa (**4-Au**) son las más pequeñas sintetizadas, de 1-1.5 nm de diámetro. En las **14-Au** aparecen claramente dos tipos de tamaño. 7.0 nm y 1.5 nm aproximadamente. Este caso es particular y lo comentaremos más adelante. Con estos datos y con una serie de cálculos teóricos realizados sobre núcleos de oro, podemos obtener información sobre el número de átomos de oro que lleva el núcleo de las nanopartículas⁶⁴ (tabla 1).

Tabla 1.

Nanopartícula	Diámetro	Nº de átomos en el núcleo
1-Au (lactoC₁₁S)	1.8 nm	201
2- Au (lactoEG₄S)	1.8 nm	201
3-Au (lactoEG₆C₁₁S)	2.2 nm	201/225
4- Au (maltoC₁₁S)	< 1.3 nm	< 79*

* según datos recogidos de la bibliografía⁶⁴.

La distribución de tamaño de los núcleos de oro en el caso de la lactonanopartículas **3-Au** (lacEG6C11S-Au) y de la maltonanopartícula **4-Au** (malC11S-Au) está representada en la figura siguiente (figura 24). Esta distribución es bastante estrecha y resulta de un tamaño medio de 2.2 nm para el caso de la nanopartícula **3-Au** que corresponde según datos extraídos de la bibliografía a un núcleo de oro de unos 201-225 átomos de oro. Si observamos la distribución, también hay otros tamaños de núcleos pero aparecen en menor medida. En el caso de las nanopartículas de maltosa **4-Au** el tamaño medio de los núcleos de oro es de 1.5 ± 0.5 nm. A simple vista se observa un tamaño menor que el resto de las gliconanopartículas presentadas. Debido a que el tamaño del núcleo es tan pequeño, el error cometido en el análisis del conteo era de la misma magnitud que la nanopartícula. Por lo que no podemos aseverar un diámetro exacto de estas nanopartículas, con lo que tendríamos una de las nanopartículas más pequeñas preparadas con esta metodología, más pequeñas de la

⁶⁴ Hostetler, M.J.; Wingate, J.E.; Zhong, C.-Z.; Harris, J.E.; Vachet, R.W.; Clark, M.R.; Londono, J.D.; Green, S.J.; Stokes, J.J.; Wignall, G.D.; Clish, G.L.; Porter, M.D.; Evans, N.D.; Murray, R.W. *Langmuir*, 1998, 14, 17-30.

bibliografía. La distribución de nanopartículas de oro en esta última muestra también es homogénea, como puede observarse en el histograma.

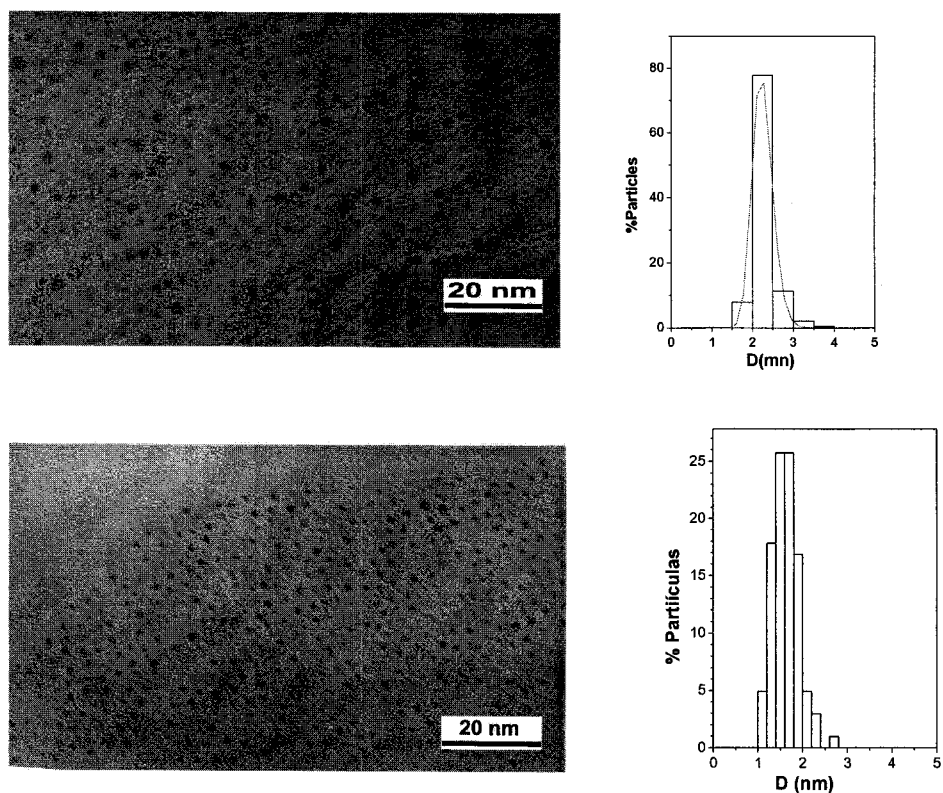


Figura 24.- Imágenes de HR-TEM de: **a.** Tamaño y distribución de partículas de lactosa, **3-Au** (*lacEG6C11S-Au*) y **b.** Nanopartículas de maltosa, **4-Au** (*malC11S-Au*)

La gran estabilidad y solubilidad en agua de las gliconanopartículas de oro, permite una selección de tamaños de las nanopartículas mediante filtración por centrifugación⁶⁵. Después de un filtrado sucesivo, se puede obtener un enriquecimiento de las nanopartículas más pequeñas. En esta figura, se exponen micrografías de TEM de este experimento. La figura 25 se trata de la muestra original de *lacC11S-Au* (**1-Au**). Las siguientes micrografías muestran las partículas que se mantienen en el filtro después de pasar una solución a través de filtros con un determinado corte de membrana (b, 100000; c) MW 50000; d) MW 30000). Como se puede observar existe un enriquecimiento de las nanopartículas más pequeñas a medida que se baja el corte de membrana. Así, en el filtro de 30000, se pueden distinguir nanopartículas de hasta 0.5 nm de diámetro. Después del filtro de 30000, no se detectan lactonanopartículas. Los histogramas de distribución del tamaño de partícula de estas nanopartículas tan pequeñas que no se pudieron medir con precisión.

⁶⁵ Rojas, T.C.; de la Fuente, J.M.; Barrientos, A.G.; Penadés, S.; Ponsonnet, L.; Fernández, A. *Adv.Mater.* **2002**, *14*, 585-588.

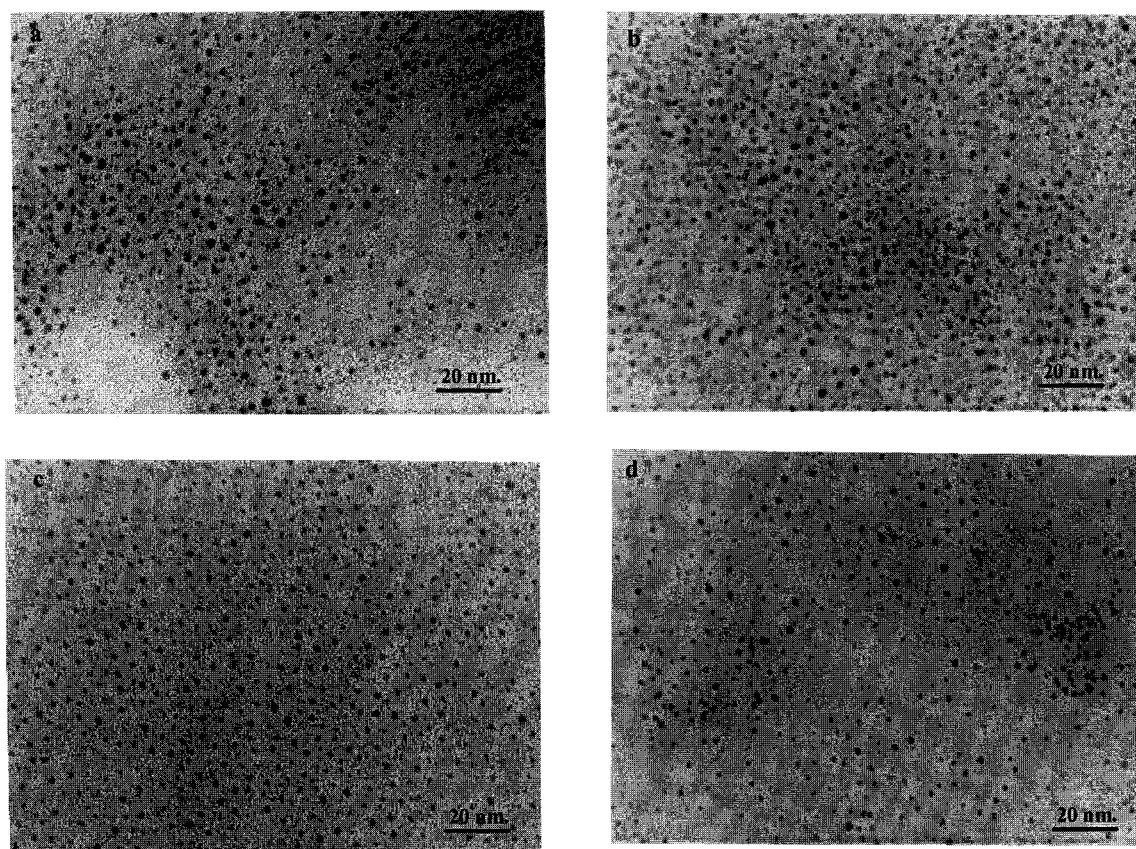


Figura 25.- Micrografías de TEM de lacC11S-Au (1-Au): a) muestra original; b) filtrado MW 100000; c) filtrado MW50000; d) filtrado 30000.

En un primer análisis de las nanopartículas **14-Au**, se observó una distribución bimodal, es decir, con dos tamaños distintos (figura). Esto se explica por la cinética más lenta que presentan a la hora de formar monocapas autoensambladas⁵⁸. Para hacer un análisis de la distribución del núcleo, estas nanopartículas se sometieron a una purificación por filtración, como en el caso anterior. Utilizando tres cortes de membrana distintos (100000, 50000 y 30000 de corte molecular), se pudo separar estos tamaños. También se vio en las disoluciones filtradas una disminución del color pasando de color vino oscuro a un rosa pálido. Esto se debe a que las nanopartículas con núcleos más grandes sus disoluciones son más oscuras y las más pequeñas son más claras.

⁵⁸ Pale- Grosdemange, C.; Simon, E.S.; Prime, K.L.; Whitesides, G.M., *JACS*, 1991, 113, 12-20

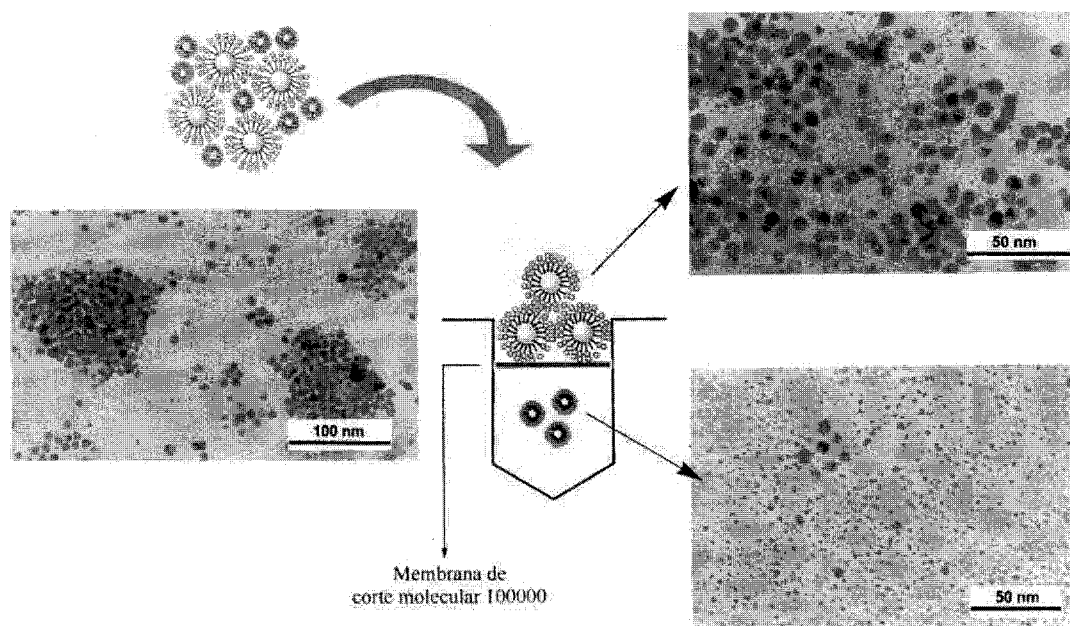


Figura 26.- Representación esquemática del proceso de separación de tamaños por filtración.

Análisis elemental.

El análisis elemental proporciona el porcentaje de carbono e hidrógeno que tiene la molécula, que corresponde a la parte orgánica de la nanopartícula. En la bibliografía están recogidos algunos trabajos en los cuales se realizan estudios del núcleo de oro en las nanopartículas sintetizadas de esta forma⁶⁶. Parece ser que el núcleo de oro se forma con un número determinado de átomos, los llamados “números mágicos”. Este número de átomos está relacionado entre muchos factores con el diámetro del núcleo. Así para un diámetro de 2 nm le corresponde un núcleo con 201 átomos de oro. Con este dato que y los porcentajes de C e H, se puede calcular la fórmula molecular de las nanopartículas. En esta tabla (tabla 2) se resumen las fórmulas moleculares de las gliconanopartículas y sus pesos moleculares.

⁶⁶ Hostetler, M.J.; Wingate, J.E.; Zhong, C.-Z.; Harris, J.E.; Vachet, R.W.; Clark, M.R.; Londono, J.D.; Green, S.J.; Stokes, J.J.; Wignall, G.D.; Clish, G.L.; Porter, M.D.; Evans, N.D.; Murray, R.W. *Langmuir*, 1998, 14, 17-30.

Tabla 2.-

Nanopartícula	diámetro (nm)	Nº átomos de Au	Nº azúcares	Fórmula molecular	Peso molecular
1-Au	1.8	201	69	(C ₂₃ H ₄₄ O ₁₁ S) ₆₉ -Au ₂₀₁	76594
2-Au	1.8	201	63	(C ₂₀ H ₃₇ O ₁₄ S) ₆₃ -Au ₂₀₁	73202
3-Au	2.2	201/225	90	(C ₃₅ H ₆₇ O ₁₇ S) ₉₀ -Au ₂₀₂	110984
4-Au	< 1.3	<79	50	(C ₂₃ H ₄₄ O ₁₁ S) ₅₀ -Au ₅₀	36200

En la mayoría de los casos, el nº de moléculas de azúcar en la nanopartícula siempre es menor que el nº de átomos en el núcleo de oro, ya que es lógico pensar que en los átomos que rellenan el interior del núcleo no reaccionan con los tiolderivados. De ahí que la proporción de azúcar a oro sea de 1:3 o de 1: 1.5. Ya se ha comentado anteriormente que las nanopartículas de maltosa son las más pequeñas sintetizadas. En varios trabajos podemos encontrar que el núcleo de oro más pequeño estudiado es el de 0.65 nm de radio, es decir, 1.3 nm de diámetro. A este tamaño le corresponde 79 átomos. Las nanopartículas de maltosa parecen ser de un diámetro menor a 1.3 nm. Cuando se realiza el análisis elemental de estas, la proporción de azúcar a oro, es de 1:1, lo cual es lógico, puesto que cuanto más pequeño sea el núcleo, menos átomos hay en el interior, y por lo tanto la proporción de átomos en la superficie de oro y de azúcar se parecerán más. Por esto mismo, se ha considerado que el núcleo de oro en las nanopartículas de maltosa es de 50 átomos y que llevan 50 moléculas del neoconjugado de maltosa 4.

Resonancia Magnética Nuclear

Con esta técnica se tiene acceso a la parte orgánica que recubre las nanopartículas, es decir el neoglicoconjugado. En un típico espectro de RMN en agua se pueden observar bandas muy anchas correspondientes a las señales del glicoconjugado. Esta anchura es característica de los grandes conjugados. La señal del metileno unido al azufre, es decir el CH₂ más cercano al oro, se ensancha tanto que casi desaparece. En los espectros siguientes vemos la diferencia de los neoglicoconjugados 1 y 2 y las

lactonanopartículas **1-Au** y **2-Au**, como se observa las bandas se ensanchan mucho con respecto al glicoconjugado en agua. El metileno más cercano al oro (triplete a 2.68 ppm en el caso de **1** (fig 27a) y multiplete a 2.8-2.9 ppm en el espectro de **2** (fig 27c)) desaparecen en el espectro de la nanopartícula **1-Au** (fig 27c) y **2-Au** (fig 27d) respectivamente.

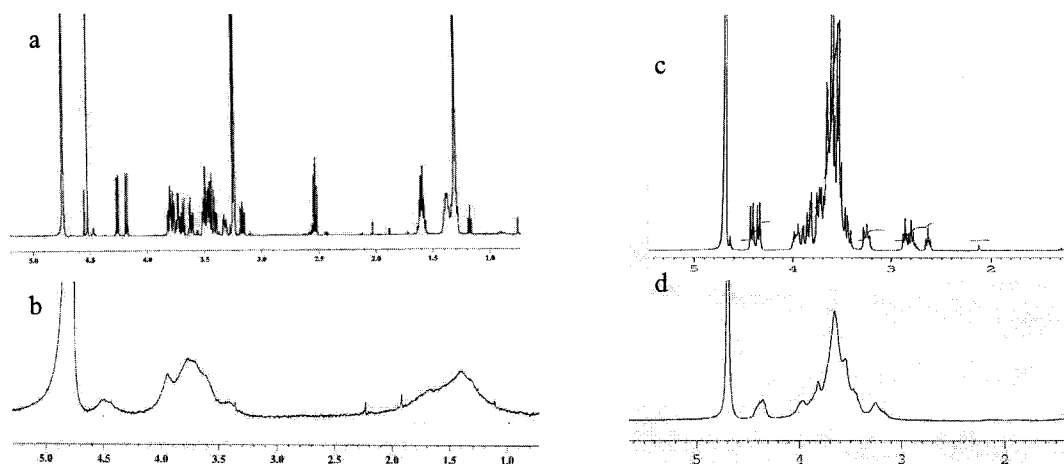


Figura 27.- Espectro de ^1H -RMN en D_2O de: a) lactoC11S (**1**); b) lactoC11S-Au (**1-Au**); c) lactoEG4S (**2**); d) lactoEG4S-Au (**2-Au**).

La nanopartícula **3-Au**, que fue sintetizada por ser un modelo menos rígido a la hora de estudiar interacciones, muestra esta flexibilidad en su espectro de RMN de protón. En la figura c se observa que las señales más cercanas al oro, se ensanchan y en cambio las señales más lejanas se van afinando incluso resolviéndose totalmente como ocurre con los protones anómicos H-1 y H-1' (figura 28).

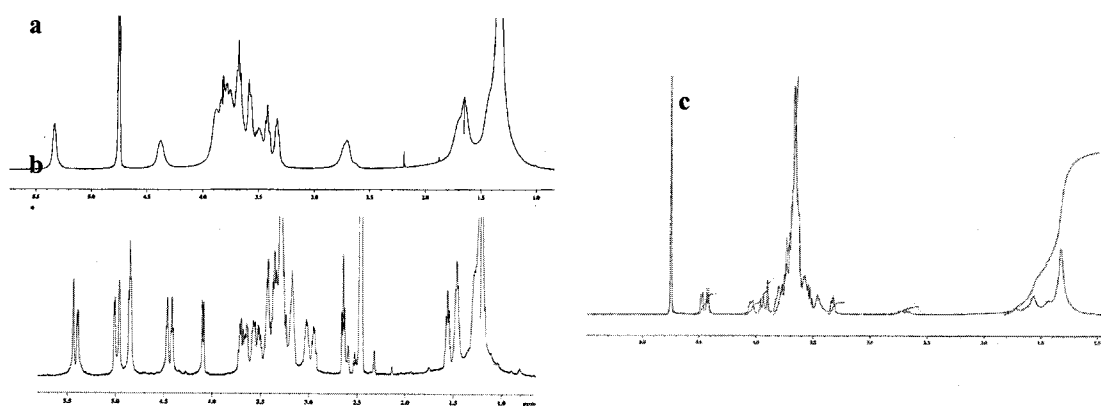


Figura 28.- a. Espectro de ^1H -RMN de D_2O de maltosa-Au (**4-Au**). b. Espectro en DMSO de maltosa-Au (**4-Au**). c. Espectro de ^1H -RMN en D_2O de lactosa-Au (**3-Au**).

Espectro de UV-Visible. Banda de surface plasmon.

El espectro de UV-Visible de las nanopartículas posee varias características. La fuerte absorción ultravioleta del núcleo de oro decae exponencialmente en el visible, con una banda ancha de surface plasmon en los 500 nm aproximadamente⁵⁸. Esta banda disminuye ligeramente la intensidad y la energía a medida que disminuye el tamaño del núcleo. Así en las nanopartículas con diámetros de núcleos comprendidos entre 1.1 y 1.9 nm, tienen bandas de SP pequeñas, indicativas de que poseen propiedades más cercanas a las de moléculas orgánicas. En la figura se observa los espectros UV de las nanopartículas. Como se observa, las nanopartículas **1, 2, 3 y 4-Au** tienen surface plasmon similares (ver anexos), en cambio, la nanopartícula **14-Au**, tiene una banda de SP de intensidad considerable, como es lógico pensar ya que el diámetro medio de cada agregado, puede ser de unos 100 nm (figura 29)

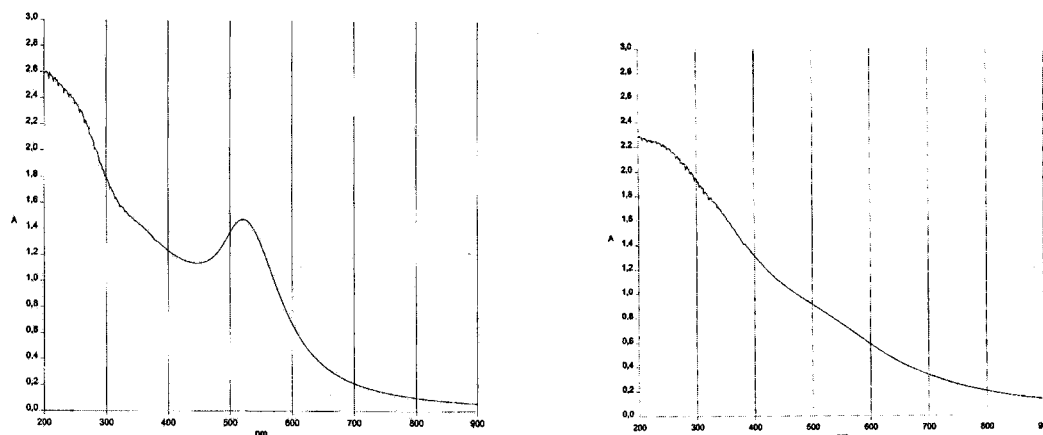


Figura 29.- Espectro UV-visible de a. Nanopartículas de tetraetilenglicol (**14-Au**) y b. nanopartículas de maltosa **4-Au**.

Espectro de IR.

El espectro de IR de las nanopartículas y los tioles son similares (figura 30), lo que indica que el tiol forma parte del compuesto.

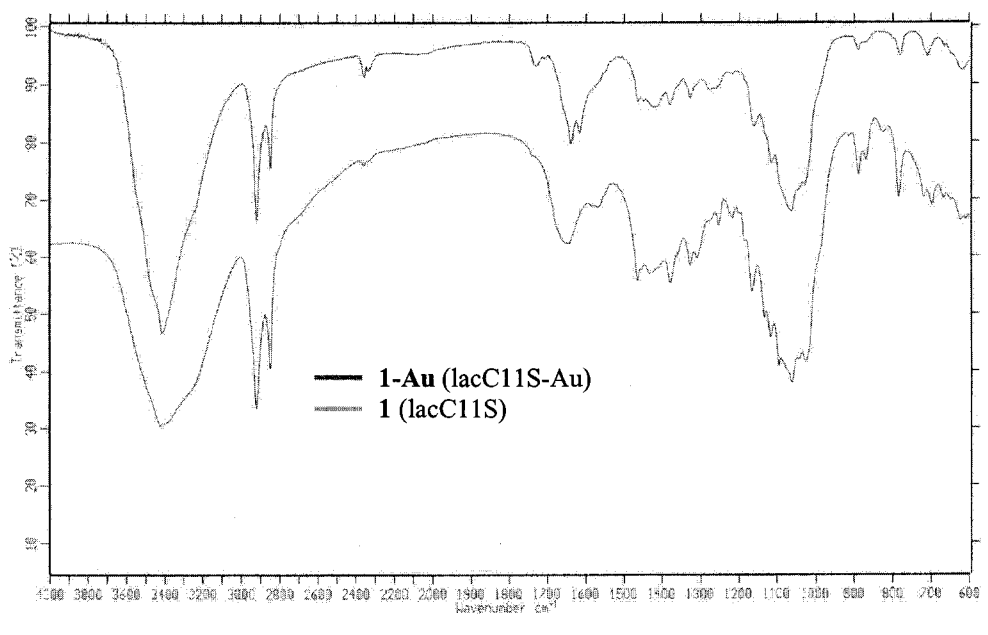


Figura 30.- Espectro de IR de la gliconanopartícula 1-Au y el neoglicoconjugado 1.

2.2.- Gliconanopartículas de distinta densidad o de densidad variable en ligando.

El estudio de la influencia de la presentación y la densidad de ligando en los sistemas multivalentes frente a sus interacciones con otros sistemas biológicos, es uno de los objetivos de esta tesis doctoral.

En la mayoría de los sistemas multivalentes definidos en la sección de antecedentes, para controlar la presentación y la densidad del ligando en el sistema, hay que saber a priori cómo van a interactuar las moléculas con sus receptores. Son los diseños basados en una información estructural.

Puesto que se ha definido un nuevo sistema multivalente, habría que estudiar las posibilidades que ofrecen las nanopartículas para obtener sistemas en los que se pueda controlar el número de ligandos, la homogeneidad del sistema y la presentación del carbohidrato en la superficie de la nanopartícula. Ya se ha visto que el número de moléculas en las nanopartículas puede variar dependiendo del espaciador que lleve el neoglicoconjugado. Sin embargo, la densidad de azúcar en la nanopartícula sigue siendo del 100%. También se puede controlar la flexibilidad del sistema, cambiando el espaciador. Así las nanopartículas 1-Au (*lacto*C11S-Au) y 4-Au (*malto*C11S-Au)

constituyen sistemas rígidos y las nanopartículas **2-Au** (*lactoEG4S-Au*) y **3-Au** (*lactoEG6C11S-Au*), que llevan un neoglicoconjugado con un espaciador derivado del etilenglicol, son sistemas más flexibles.

En bibliografía, el grupo de Murray, ha estudiado las propiedades químicas y reactivas que poseían las nanopartículas de alcanotiolatos. Este grupo descubrió que las nanopartículas eran susceptibles de intercambio⁶⁷. Figura. Seminario. Estas reacciones parecen en un principio reacciones de sustitución nucleofílica SN2, donde eligiendo un ligando más nucleófilo, podemos desplazar un tiol integrado en la nanopartícula por otro. Aunque no se sabe con certeza cual es el mecanismo con el que estos tioles se intercambian, estos autores sugieren que no es una reacción SN2, sino que en la superficie del núcleo de la nanopartícula presenta pequeñas imperfecciones en vértices o esquinas, donde el S no se encuentra anclado perfectamente, de ahí, que en estos sitios pueda intercambiarse unos ligandos por otros^{67c}. Estas reacciones requieren varios días de reacción y la cantidad de ligando intercambiado puede calcularse en su espectro de resonancia por la integración de señales correspondientes a un ligando u a otro. Además los disulfuros no dan este tipo de reacción.

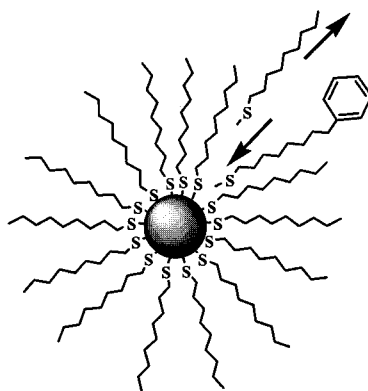
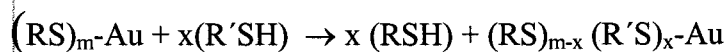


Figura 31.- Reacción de intercambio de alcanoilatos en nanopartículas de oro

Por otra parte, el grupo de Mrkich⁵⁷ prepara monocapas de oro mixtas. Estas superficies se preparan mezclando cantidades equivalentes de distintos

⁶⁷ a) Hostetler, M.J.; Green, S.J.; Stokes, J.J.; Murray, R.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4212-4213. b) Ingram, R.S.; Hostetler, M.J., Murray, R.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9175. c) Hostetler, M.J.; Templeton, A.C.; Murray, R.W. *Langmuir*, **1999**, *15*, 3782-3789.

⁵⁷ Houseman, B.T; Mrkich, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 755.

tiolderivados y se dejan depositar en la superficie de oro. La cantidad de ligando que queda en la superficie es igual a la cantidad añadida. Con estas superficies, este grupo ha estudiado la influencia de la densidad de ligando frente a sistemas biológicos concretos, como enzimas o proteínas, donde han comprobado que las interacciones receptor-ligando, depende de la densidad del ligando en la superficie. Sin embargo, este tipo de sistemas en dos dimensiones son muy útiles para estudiar interacciones en interfase, pero no para estudios *in vivo* o en disolución. Apoyándonos en el modelo de monocapas mixtas, se ha diseñado un sistema multivalente basado en nanopartículas de oro, donde la densidad de ligando que se quiere estudiar, un carbohidrato por ejemplo, puede variar. Mezclando cantidades distintas o iguales de ligandos que van a formar parte en la nanopartícula se pueden preparar nanopartículas a las que hemos denominado *Gliconanopartículas de distinta densidad* (figura 32).

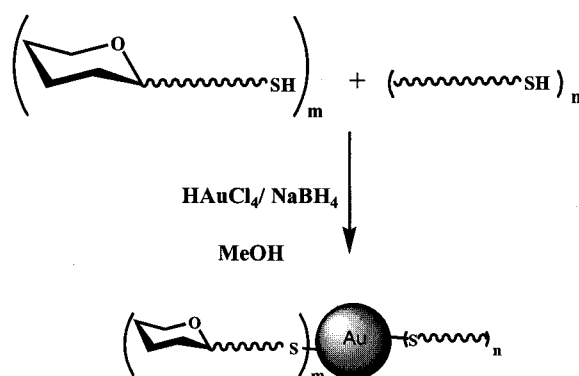


Figura 32.- Síntesis de nanopartículas de distinta densidad de ligando.

En un primer intento se mezcló cantidades del lactósido derivado **1** y de la cadena alifática **13**, dando lugar a la nanopartícula **1-Au-13** (figura 33). En este caso, se obtuvieron nanopartículas de un diámetro medio de 2 nm, igual que las anteriores, pero que eran insolubles en agua, pero solubles en DMSO. En su espectro de ^1H -RMN (ver anexo), se puede observar que las integrales correspondientes a la señales de los metilenos de la cadena alifática y los protones anoméricos de la lactosa, corresponden a una relación 1: 1, igual que la proporción añadida en la mezcla antes de la reducción de la sal de oro.

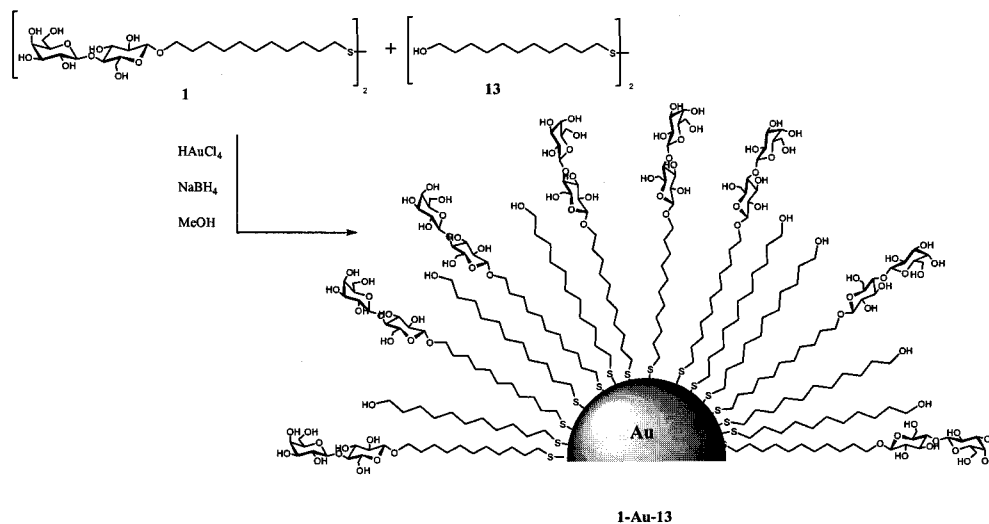


Figura 33.- Síntesis de gliconopartículas 1-Au-13

En sus espectros de RMN en DMSO (figura 34), se puede observar que el triplete correspondiente al metileno unido al S, a 2.68 ppm, integra al doble en el espectro de RMN de la lactonanopartícula 1-Au-13, indicando que hay una mezcla 1:1 de lacC11S (1) y el espaciador C11S (13).

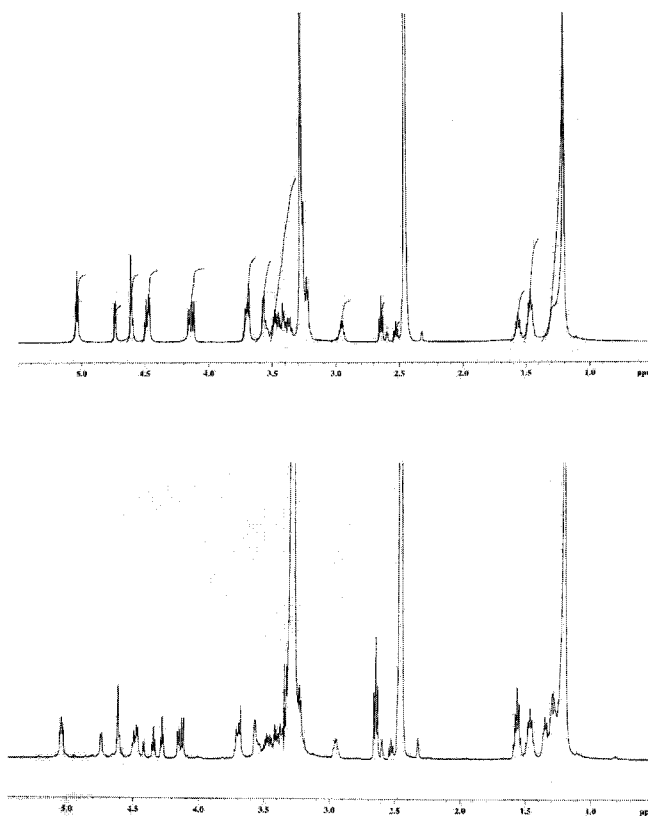


Figura 34.- Espectros de ^1H -RMN en DMSO de: arriba) lactoC11S-Au (1-Au) abajo) lactoC11S-Au-S-C11 (1-Au-13)

Por una parte, se han obtenido nanopartículas de distinta densidad en ligando cuya cinética y características eran similares a las obtenidas anteriormente, pero por otra no eran solubles, por lo que no se podrían utilizar en los posteriores estudios de interacción, donde se necesita condiciones fisiológicas.

Para aumentar la solubilidad en el sistema, se intentó preparar este tipo de nanopartículas mezclando el lactósido **1** y el espaciador **14**, que se trata de un espaciador derivado de tetraetilenglicol. La reacción se realizó igual que la preparación anterior, dando lugar a la nanopartícula **1-Au-14** (figura 35).

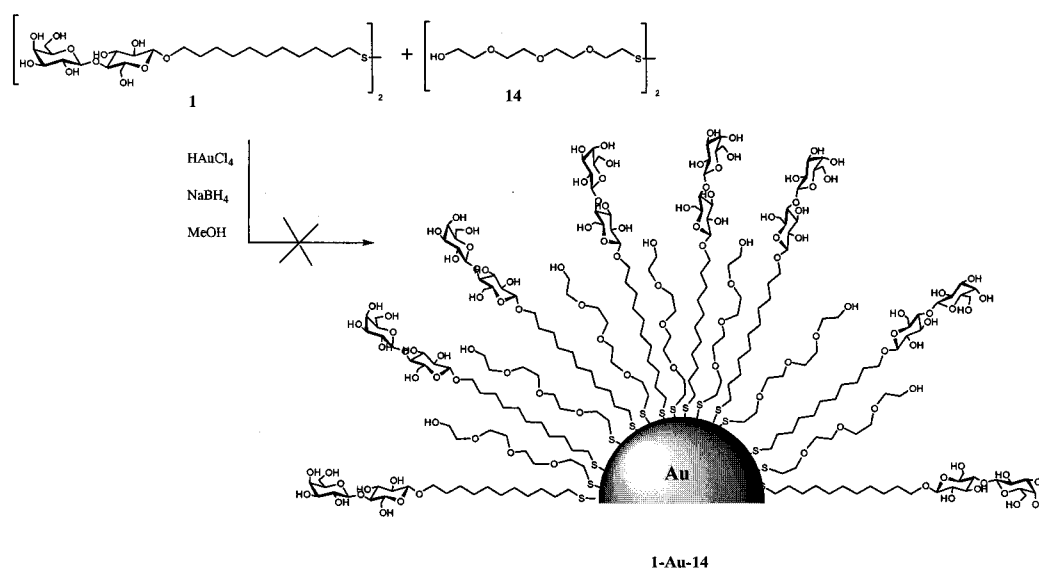


Figura 35.- Síntesis de las gliconopartículas 1-Au-14

En este caso, se obtuvieron nanopartículas con una distribución heterogénea con tamaños comprendidos entre los 2 y los 4 nm aproximadamente. Son solubles en agua y también en DMSO, pero la cantidad de uno y otro ligando no se pudo determinar. En su espectro de RMN, las señales correspondientes al tetraetilenglicol se solapan con la banda de DMSO. Pero sí parece claro, que la cantidad de tetraetilenglicol en la posible nanopartícula, no corresponde a la cantidad inicial añadida. Esto se puede explicar, porque la cinética del derivado de tetraetilenglicol **14**, es distinta a la de la cadena alifática que lleva el lactósido **1**. Los derivados alcanotiolatos forman nanopartículas más uniformes, de ahí que en el espectro de RMN, aparezcan más señales

correspondientes a la cadena alifática que al tetraetilenglicol, cuando la cantidad inicial en la mezcla era la misma (ver figura 36).

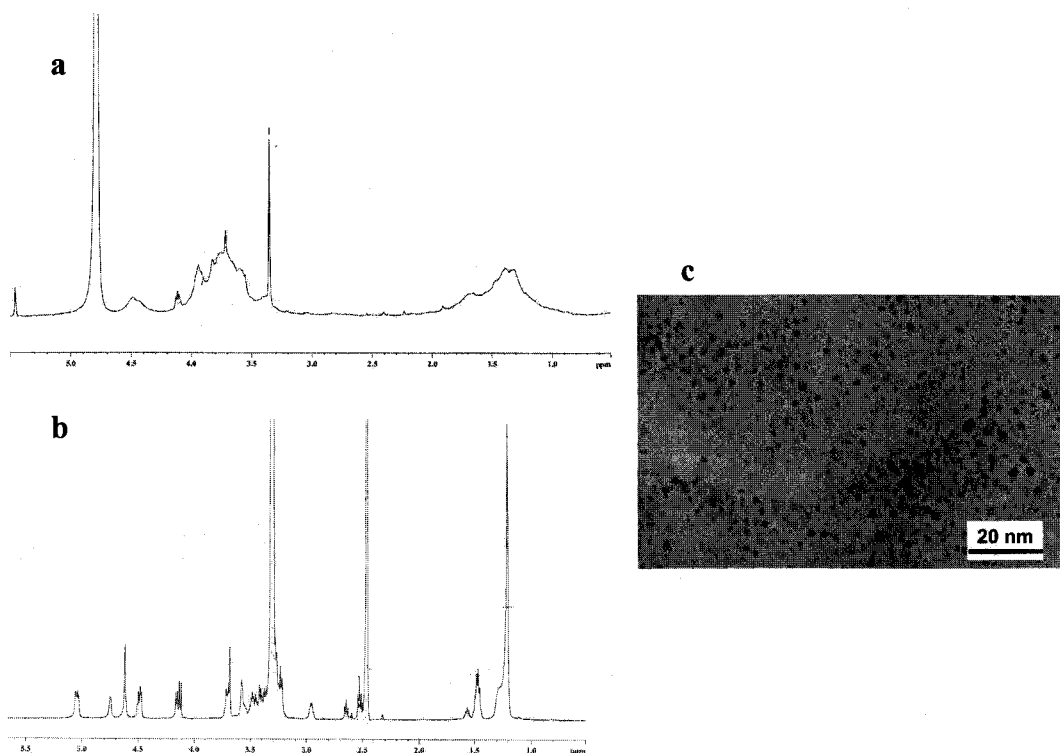


Figura 37.- Caracterización de la nanopartícula 1-Au-14 (lactoC11S-Au-SEG4): a. Espectro de ^1H -RMN en D_2O . b. Espectro de ^1H -RMN en d_6 -DMSO. c. TEM

Resumiendo se tiene que los derivados alifáticos forman nanopartículas más homogéneas, pero más insolubles, problema que se puede solucionar añadiendo derivados de etilenglicol. Por esta razón, se diseñó un nuevo espaciador “mixto” compuesto por un alcanotiolato y un derivado del etilenglicol. La síntesis también permite obtener espaciadores mixtos donde varía el número de moléculas de etilenglicol, como es el caso de la síntesis de los espaciadores 11 y 12, que llevan trietilenglicol y hexaetilenglicol respectivamente. Mezclando el lactósido 3 (que lleva el espaciador 12) y el disulfuro 15, se pueden obtener nanopartículas que poseen varias características: en primer lugar, como llevan en una parte alifática, se pueden obtener nanopartículas homogéneas. La introducción de etilenglicol aumenta la solubilidad, y al variar la longitud en el espaciador, también se puede variar la presentación del ligando en la superficie de la nanopartícula. Se han preparado 3 nanopartículas de distinta

densidad en lactosa, con un 5%, 15% y 30% en lactosa. En la siguiente figura se representan estas nanopartículas:

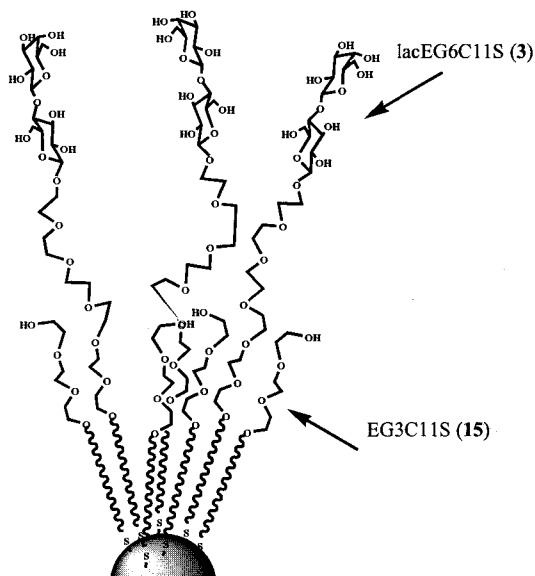


Figura 38.- Representación de las gliconanopartículas de distinta densidad (3-Au-15)

En sus espectros de RMN (figura 39) en agua se puede integrar las señales correspondientes a los protones anoméricos de la lactosa y el correspondiente al trietilenglicol, y la proporción en la nanopartícula corresponde aproximadamente igual a la cantidad inicial en la mezcla. En las micrografías de TEM, se puede observar que el tamaño y la distribución de nanopartículas son uniformes (ver anexos).

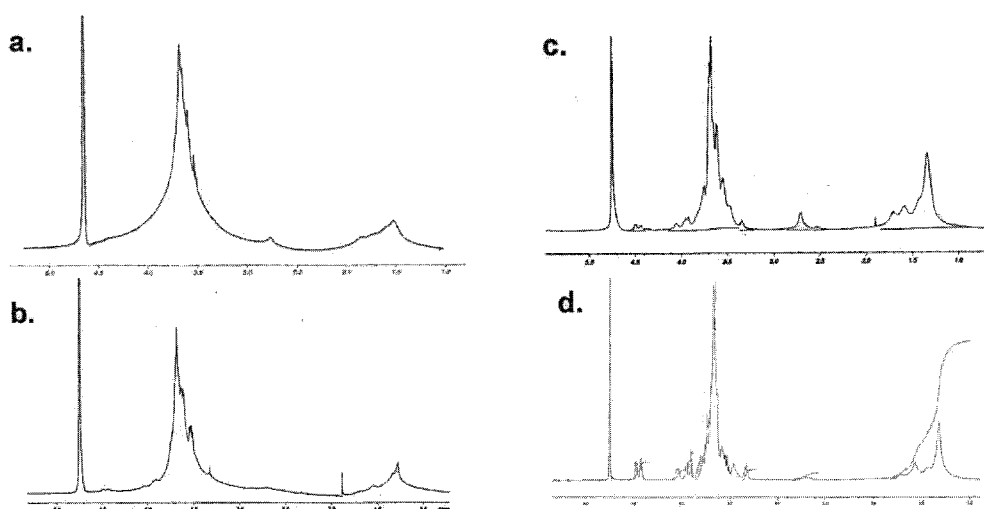


Figura 39.- Espectros de ^1H -RMN en D_2O de gliconanopartículas de distinta densidad: a) 3-Au-15 (5% en lactosa); b) 3-Au-15 (15%); c) 3-Au-15 (30%); d) 3-Au (100%).

Estas gliconanopartículas son solubles en agua, excepto las gliconanopartículas que llevan un 5% en lactosa, y que son solubles en mezclas de agua/metanol. Las disoluciones son de un color beige, y son sólidos blanquecinos. Con ellas, se ha realizado un estudio enzimático con beta-galactosidasa y un ensayo de inhibición de la unión de lectinas a su ligando, que será detallado en el apartado siguiente.

El tamaño de las mismas es muy pequeño, de 1.66 nm de diámetro, que corresponden según datos recogidos en la bibliografía a un núcleo constituido por 140 átomos de oro. También se ha observado una distribución bimodal, aunque la diferencia entre las dos distribuciones de tamaño es mucho menor que en el caso de las nanopartículas de tetraetilenglicol, **14-Au**. Para separar ambos tamaños, también se ha realizado el mismo experimento de filtración sucesiva a través de filtros con un determinado corte de membrana.

Los espectros de RMN muestran un ensanchamiento de las bandas, al igual que los anteriores de otras gliconanopartículas, pero podemos apreciar la aparición de los anómeros de lactosa, a medida que aumentamos la cantidad de la misma en la nanopartícula. Teniendo en cuenta que el afinamiento de las señales se puede mejorar con el espectro de RMN en DMSO, pensamos en integrar de una forma más exacta las señales correspondientes a los anómeros de lactosa y a los de trietilenglicol, sin embargo, estas gliconanopartículas al igual que la lactonanopartícula **3-Au**, no son solubles en DMSO. También son significativas las bandas de plasmon de superficies que poseen estas gliconanopartículas. En su espectro de UV-visible se puede observar una banda a 400 nm (ver anexos).

Esta Tesis ha presentado como uno de sus objetivos, la preparación y caracterización de esta clase de *gliconanopartículas*, sin embargo esta metodología nos permite también obtener *gliconanopartículas híbridas* en general. Podemos preparar gliconanopartículas que lleven otras moléculas como fluoróforos, biotina y péptidos. En otra Tesis paralela a ésta se ha llevado a cabo la preparación de *gliconanopartículas fluorescentes*, añadiendo a la mezcla un neoconjugado de fluoresceína. Estas gliconanopartículas han resultado tener las mismas características que las anteriores pero además poseen fluorescencia⁶⁵.

⁶⁵ Rojas, T.C.; de la Fuente, J.M.; Barrientos, A.G.; Penadés, S.; Ponsonnet, L.; Fernández, A. *Adv.Mater.* **2002**, *14*, 585-588.

3.- Aplicación de Gliconanopartículas al estudio de la interacción carbohidrato-proteína

Con el fin de estudiar la interacción con proteínas con estos nuevos sistemas multivalentes de carbohidratos, nos propusimos como objetivo de esta Memoria, un estudio enzimático con la β -galactosidasa de *E.Coli*, y un ensayo de inhibición con la lectina *viscum album aglutinina*. Ambas proteínas reconocen lactosa. También se ha realizado un estudio preliminar con la subunidad B de la toxina del cólera.

3.1.- Estudios enzimáticos: Hidrólisis enzimática con β -galactosidasa.

La β -galactosidasa es una enzima que reconoce el extremo terminal de la lactosa, es decir la galactosa, y corta el enlace glicosídico, liberándose galactosa al medio. Esta galactosa se puede observar por distintas técnicas como por cromatografía de gases, RMN o bien acoplando esta hidrólisis con otro ensayo con una galactodehidrogenasa. En esta tesis doctoral se ha elegido dos de estas técnicas. La H-RMN y el ensayo acoplado con la galactodehidrogenasa.

En este caso concreto, la ^1H -RMN es una técnica muy útil para visualizar la hidrólisis de las nanopartículas. Como se ha comentado anteriormente, los espectros de las gliconanopartículas presentan bandas muy anchas. Teniendo en cuenta esto, si en la hidrólisis de las lactonanopartículas se libera galactosa, en el espectro deberían aparecer las señales correspondientes a α -galactosa y β -galactosa. Como estas moléculas no estarán unidas al oro, las señales correspondientes a los anómeros α y β , deberían aparecer como dos dobletes con constantes de acoplamiento J , de 3-4 Hz para α y 7-8 Hz para β .

Para este experimento se eligió la enzima β -galactosidasa de *E.Coli*, adquirida en SIGMA. Esta enzima tiene una actividad de 300-600 unidades por mg de enzima, lo que supone que en un minuto la enzima libera de 300-600 μmoles de ortonitrofenol, cuando se incuba con ortonitrofenilgalactopiranosido. Con la lactosa, que es su sustrato natural, esta actividad es mucho menor, del 5-10% de la actividad presentada con el ortonitrofenilderivado⁶⁸. Las gliconanopartículas testadas fueron dos: la lactonanopartícula **1-Au** y la **2-Au**, es decir, la **1-Au** lleva un lactósido con una cadena alifática (lacC11S) y la **2-Au** (lacEG4S) lleva el lactósido con el tetractilenglicol.

⁶⁸ Distler, J.J; Jourdian, G.W. *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 6672.

En este experimento, se añadió una concentración de enzima de 0.1 mg/mL a una disolución de estas lactonanopartículas 2mM en lactosa. Esta concentración de enzima es suficiente como para hidrolizar bastante lactosa y que la galactosa liberada se pueda observar en el espectro. La incubación se realizó a 37°C en un 500 MHz, y se fueron adquiriendo espectros a distintos tiempos. Como blanco o control se utilizó la lactonanopartícula sin enzima, y se añadió el mismo volumen de NaPi. Los espectros de estos experimentos se resumen en esta figura. (figura 40).

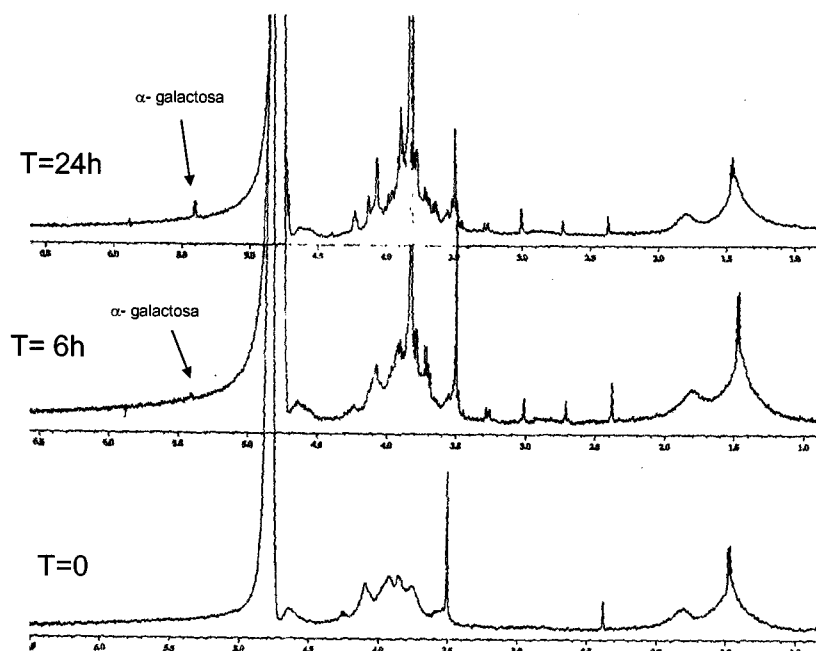


Figura 40.- Espectro de H-RMN de la hidrólisis enzimática de la nanopartícula 1-Au

Como se puede observar, prácticamente no se hidroliza nada de estas nanopartículas incluso en dejando mucho tiempo de incubación (hasta 24 horas). Este resultado puede parecer que el sistema no funciona, o bien que el impedimento estérico que ofrece la superficie de lactosa en la nanopartícula es tan grande que impide que el centro activo de la enzima se acerque a la lactosa (ver figura.41).

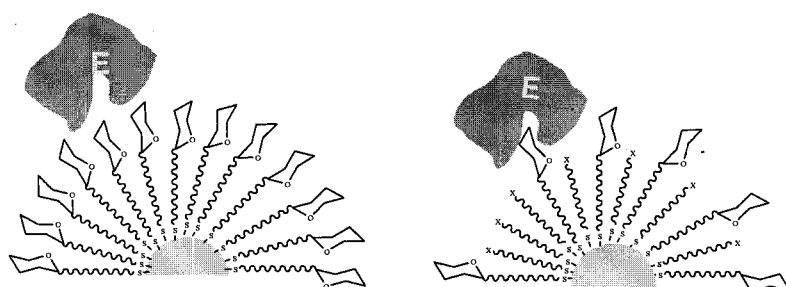


Figura 41.- Esquema del impedimento estérico de las gliconopartículas

La hidrólisis enzimática acoplada a un ensayo con una galactodeshidrogenasa se resume en el siguiente esquema.

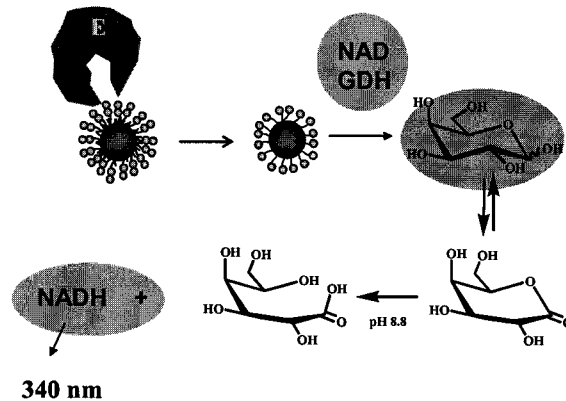


Figura 42.- Representación esquemática del ensayo acoplado a galactodeshidrogenasa

La galactodeshidrogenasa (GDH) en presencia de NAD (nicotín adenínucleótido) oxida la galactosa liberada y se produce NADH. El NADH se puede observar en su espectro de UV-visible a 340 nm. De esta forma se puede seguir bastante bien la reacción. La cantidad de NADH es proporcional a la cantidad de galactosa liberada y por tanto también está relacionada con la actividad específica de la enzima β -galactosidasa.

$$Act.específica : \frac{\Delta Abs \times Volumentede detecció n}{\epsilon(NADH) \times tiempo dereacción \times mg de Enzima}$$

En primer lugar, se realizó un calibrado de la enzima galactodeshidrogenasa utilizando distintas concentraciones de galactosa y una misma cantidad de NAD. La formación de NADH es proporcional a la cantidad de galactosa por lo que se puede hacer una recta de calibrado. El blanco consiste en añadir el mismo volumen del tampón en lugar de galactosa. La pendiente de esta recta es el coeficiente de extinción de NADH (ϵ) que en este caso salió 7.19 M^{-1} y que el teórico es 6.22 M^{-1} . Las curvas de detección y el cálculo de la pendiente de la recta se muestran en la siguiente figura (figura 43)

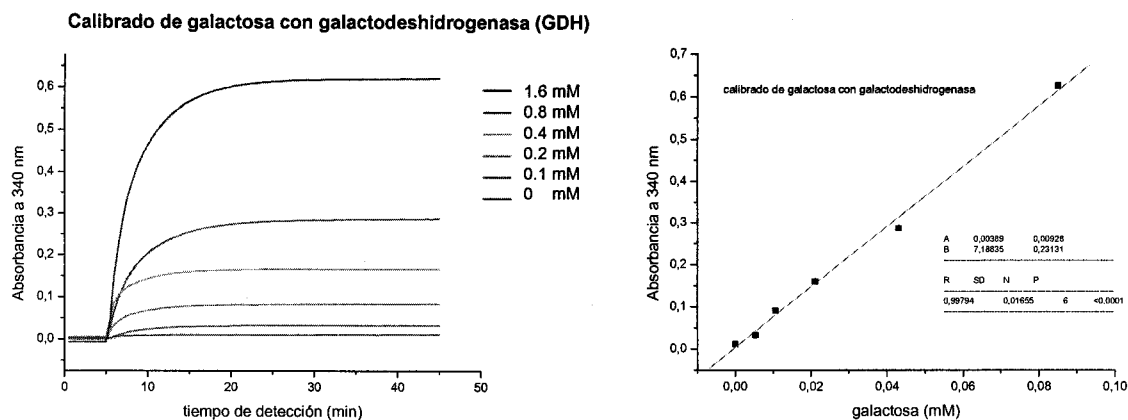


Figura 43.- Calibrado y recta de calibrado con la enzima galactodeshidrogenasa.

En un primer experimento de hidrólisis enzimática se probaron los lactósidos **1** (*lactoC11S*), **2** (*lactoEG4S*) y **3** (*lactoEG6C11S*) y las gliconanopartículas, **1-Au**, **2-Au**. La incubación se realizó a 37°C durante 30 minutos. La concentración de los lactósidos que se añadió fue 2 mM en lactosa. En el caso de los lactósidos se añadió 10 μ L de una concentración de enzima 0.01 mg/mL y en el caso de las gliconanopartículas 10 μ L de una concentración 0.1 mg/mL de enzima galactosidasa, ya que habíamos observado en RMN que con esta cantidad de enzima las gliconanopartículas no se hidrolizaban. En las siguientes figuras se muestra la comparación de la hidrólisis de estos compuestos. (figura 44).

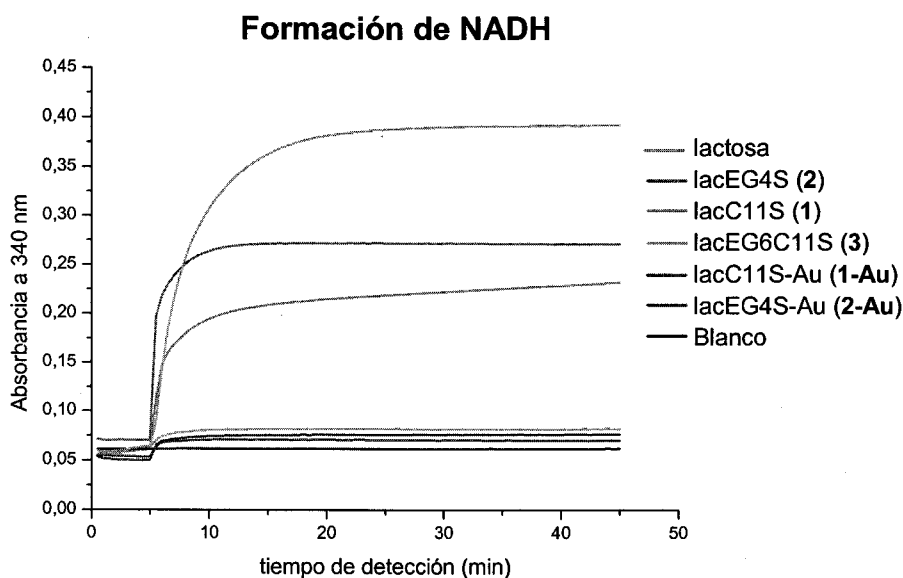


Figura 44.- Curvas de formación de NADH, después de incubar con β -galactosidasa.

Como se puede observar el lactoconjugado 3 que lleva un espaciador “mixto” tiene muy poca actividad (prácticamente igual que las gliconanopartículas). Para comprobar si era hidrolizado se aumento la concentración de enzima (10 veces más) y el tiempo de incubación a una hora. La gliconanopartícula 3-Au también se incubó en estas condiciones. Cuando se realizó estas incubaciones, se observó que el lactósido sí se hidrolizaba mientras que su correspondiente nanopartícula 3-Au no. (figura 45).

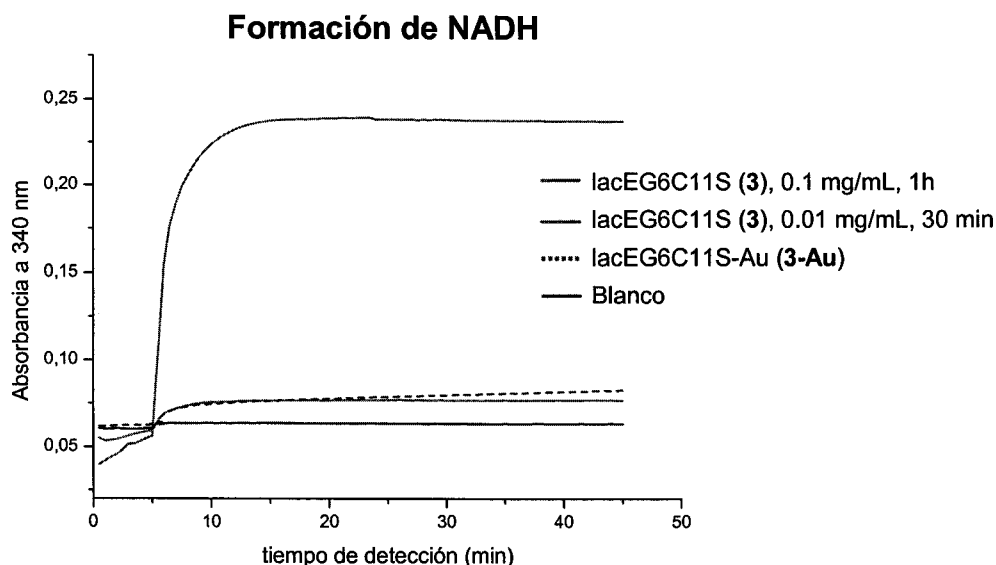


Figura 45.- Curva de absorbancia después de incubar 3 y 3-Au a una hora. Estas curvas traducidas a actividades específicas.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 3.- Resultados de la hidrólisis enzimática de los lactósidos 1, 2 y 3

lactósido	Δ Abs	Actividad específica (μ mol/min.mgE)
Blanco	0.001	0.02
lactosa	0.4	6.5
lacC11S (1)	0.2	3.26
LacEG4S(2)	0.265	4.33
Blanco	0.003	0.002
LacEG6C11S(3)	0.2	0.186

Tabla 4.- Hidrólisis enzimática de los compuestos 1-Au, 2-Au y 3-Au

Nanopartícula	Δ Abs	Actividad específica (μ mol/min.mgE)
Blanco	0.001	0.002
lacC11S-Au (1-Au)	0.045	0.07
LacEG4S-Au (2-Au)	0.01	0.02
Blanco(2)	0.003	0.002
LacEG6C11S-Au (3-Au)	0.05	0.055

Y en estos gráficos se comparan los porcentajes de hidrólisis referenciados a lactosa:

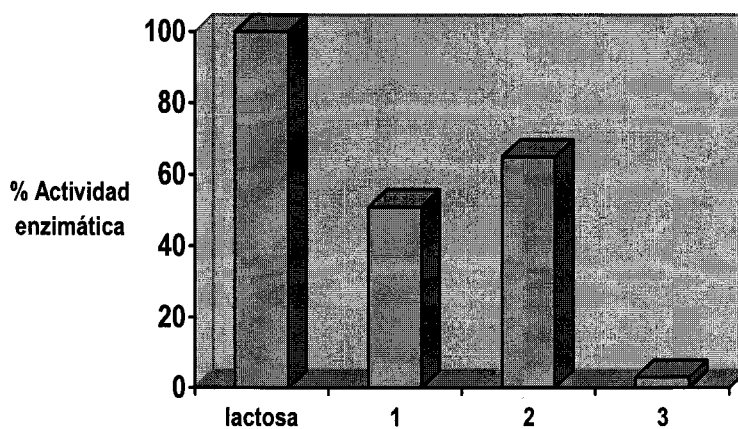


Gráfico 1.- Hidrólisis enzimática de los lactósidos 1, 2 y 3 y lactosa

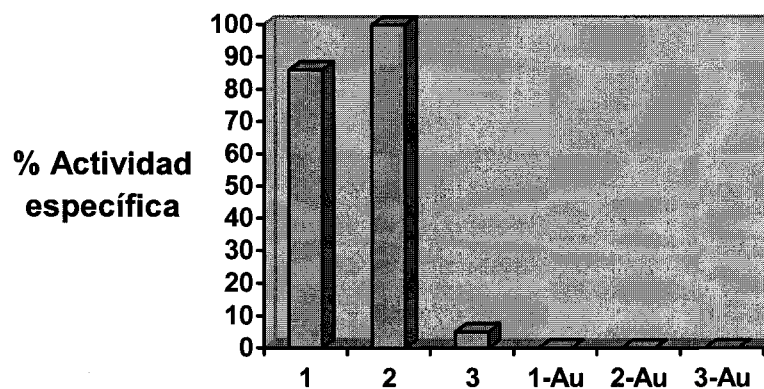


Gráfico 2.- Hidrólisis enzimática de los lactósidos 1, 2 y 3 y sus correspondientes nanopartículas 1-Au, 2-Au y 3-Au.

Como se observa, los lactósidos tienen actividades parecidas a la propia lactosa, sin embargo, no se produce hidrólisis de las gliconanopartículas, lo cual concuerda con lo observado en el experimento de RMN. Este resultado no ha sido muy llamativo a la hora de estudiar interacción con proteínas, pero esta no-degradación de las *lactonanopartículas* por enzimas galactosidasas, fue la base para la aplicación de las gliconanopartículas como agentes antiadhesivos en estudios *in vivo* con células de melanoma y linfoma en ratones.

Para comprobar si este efecto se debe al impedimento estérico, se testó también la hidrólisis de la nanopartícula **3-Au-15** (*lacto*EG6C11S-Au-SC11EG3OH), con un 30 % en lactosa. Así de esta forma, al bajar la densidad de lactosa en la superficie de la nanopartícula, la enzima puede acceder más fácilmente a la lactosa, al encontrarse menos impedida. Las curvas correspondientes a NADH liberado, después de incubar una hora con β -galactosidasa.

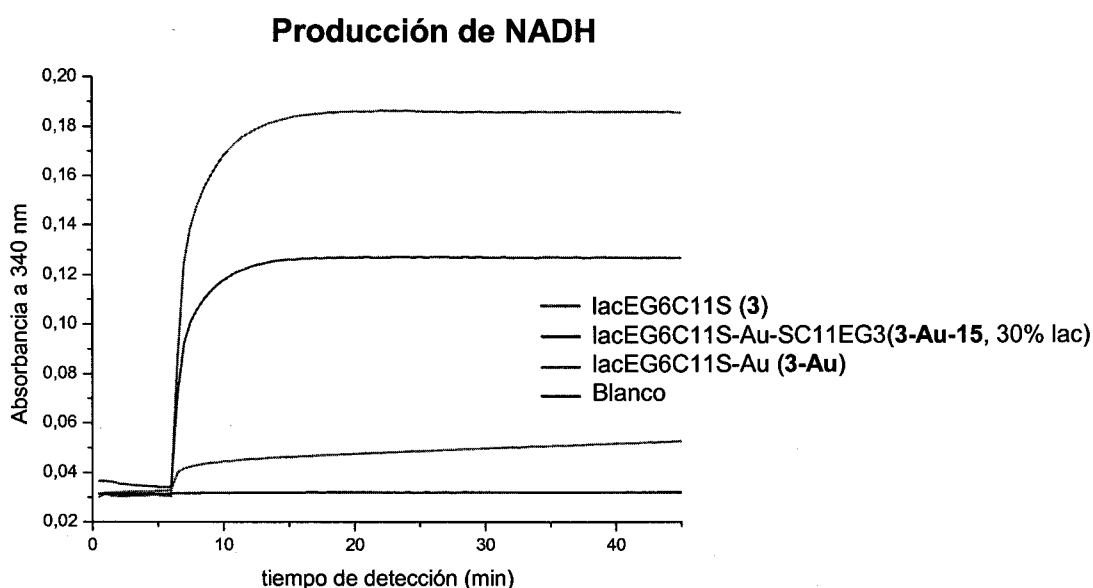


Figura 46 .- Hidrólisis enzimática de gliconanopartículas de distinta densidad.

Aunque como se observa en la gráfica (figura 46), hay producción de NADH, este experimento se realizó aumentando mucho las condiciones, es decir, añadiendo mucha cantidad de enzima e incubando una hora. No obstante, sí que hemos conseguido una diferencia en absorbancia en estos compuestos. Por lo tanto, estos valores de absorbancia traducido a actividad específica, dan lugar a valores muy bajos. En estos gráficos y tablas se resumen todos los resultados.

Tabla 5.- Datos y resultados sobre la hidrólisis enzimática de compuestos con distinta densidad.

Compuesto (1mM en lactosa)	Volumen de reacción (μL)	Volumen de detección (μL)	ΔAbs	Actividad específica (μmol/min.mgE)
Blanco	55	390	0.01	0.005
LacEG6C11S (3)	46	450	0.160	0.108
LacEG6C11S-Au- SC11EG3OH (3-Au-15,30% lac)	55	450	0.1	0.067
LacEG6C11S-Au (3-Au)	54	450	0.01	0.005

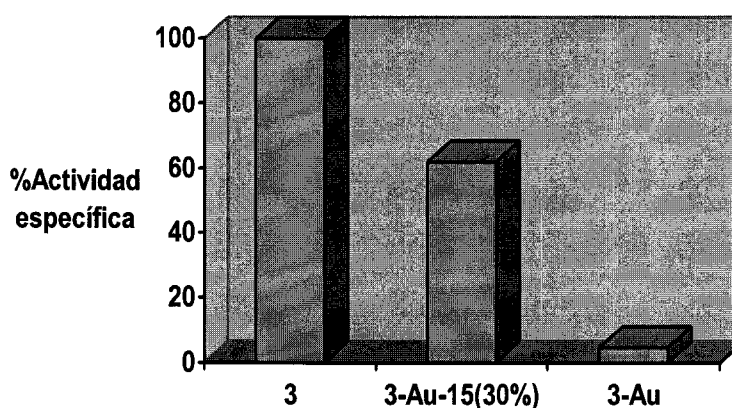


Gráfico 3.- Comparación de la hidrólisis entre compuestos que presentan distinta densidad en lactosa.

De todos estos experimentos se puede resaltar lo siguiente: en primer lugar, los lactósidos 1 y 2 presentan actividades similares a la propia lactosa, el sustrato natural de la enzima, mientras que el lactósido 3, es mucho menos activo. Para conseguir una absorbancia observable (producción de NADH) se tiene que aumentar las condiciones (mucha cantidad de enzima y aumento en el tiempo de incubación). En segundo lugar, las nanopartículas 1-Au, 2-Au y 3-Au, no son degradadas por la enzima galactosidasa, aunque la cantidad de enzima se aumente en 10 veces más. Finalmente, al bajar la densidad de lactosa en la nanopartícula (3-Au-15, 30% lac) se observa una absorbancia correspondiente a la liberación de galactosa. Este último resultado es muy interesante, puesto que demuestra que la presentación y la densidad de ligando influye a la hora de estudiar interacciones con este tipo de sistema biológico, tal y como predice Mirsch en su ensayo de incorporación de galactosa mediante una galactotransferasa a monocapas de distinta densidad en carbohidrato⁵⁷. En este experimento, estos autores confirman que la cantidad de galactosa transferida a monocapas con distinta densidad en

glucosamina depende de la densidad en la monocapa. Así para fracciones molares de $X=0.2$ se incorpora la misma cantidad que para una monocapa con $X=1$. La máxima actividad de transferencia de la enzima ocurre cuando la $X=0.7$.

3.2.- Estudios de afinidad con lectinas

3.2.1.- Ensayo de inhibición de la unión de la viscum album aglutinina (VAA) a asialofetuina (ASF).

La viscum album aglutinina (VAA) pertenece al grupo de lectinas citotóxicas, que comparten una estructura proteínica y una organización de subunidades similar. Están compuestas por dos subunidades distintas: la subunidad A, que tiene actividad citotóxica y la subunidad B, que es ligeramente mayor que la A y que reconoce y se une a galactosas]. En este grupo de lectinas se incluye la ricina, abrina y la modicina, además de la viscumina, y se encuentran en semillas de plantas. Todas ellas se unen más fuertemente a galactosa que a galactosamina al contrario que las lectinas de mamíferos (como la lectinas hepáticas) que se enlazan más a galactosamina que galactosa. La subunidad B tiene dos sitios de unión a galactosa y se encuentran en la superficie de la subunidad B a una distancia de 73 Å.

Se va a estudiar la especificidad de enlace de esta lectina utilizando ligandos monovalentes, divalentes y multivalentes. En este caso, como ligando monovalente se utilizará la lactosa, como divalente los lactósidos 1, 2 y 3 y como sistemas multivalentes las lactonanopartículas. Como control negativo se utilizará el disulfuro de maltosa y su correspondiente nanopartícula (compuestos 4 y 4-Au).

El tipo de experimento elegido es la inhibición de la unión de la lectina a un ligando multivalente inmovilizado que en este caso es la asialofetuina, una glicoproteína que lleva lactosa. Todos estos experimentos se llevaron a cabo en colaboración con la Dr. Dolores Solís del Instituto de Química-Física, "Rocasolano". La lectina está marcada con I-125 y el ensayo consiste en lo siguiente (figura 47).

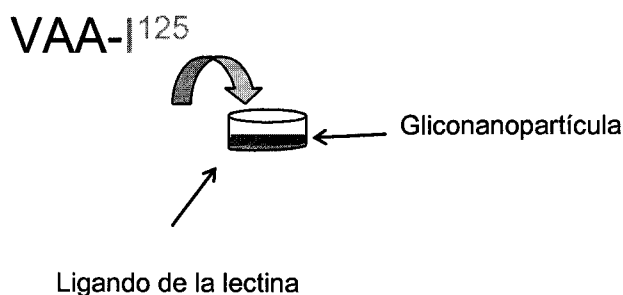


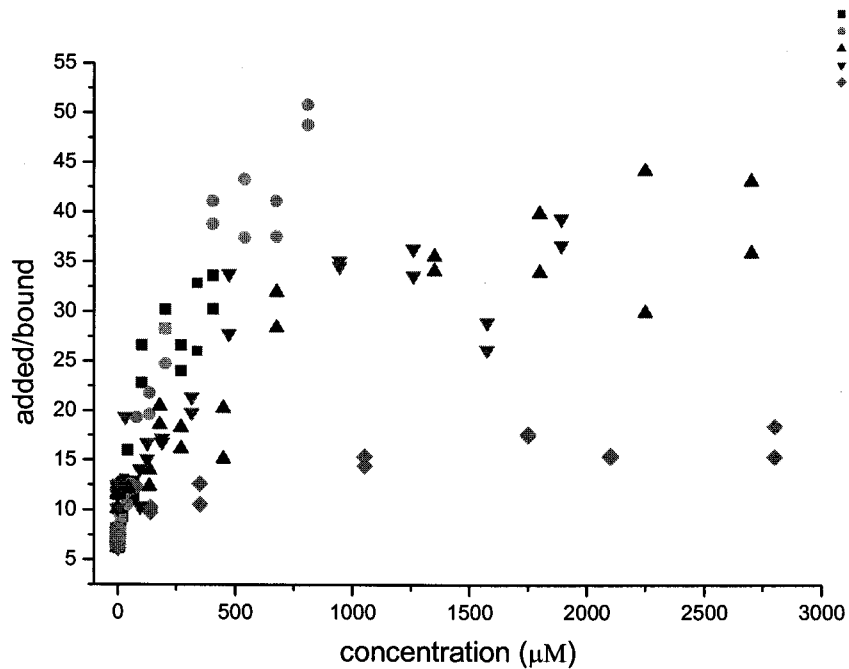
Figura 47.- Ensayo de inhibición

En placas de microtitulación de PVC, se inmoviliza la AFeT y se añade distintas concentraciones de los posibles inhibidores, a continuación se añade una cantidad de lectina marcada que lleva un número de cuentas de radiactividad (unas 20000 cpm) y se deja incubar un tiempo. Transcurrido el mismo, se lava y se detectan en un lector de rayos γ las cuentas de radiactividad que queden en los pocillos. En este experimento, cuántas menos cuentas queden en el pocillo, más poder de inhibición tendrá el compuesto.

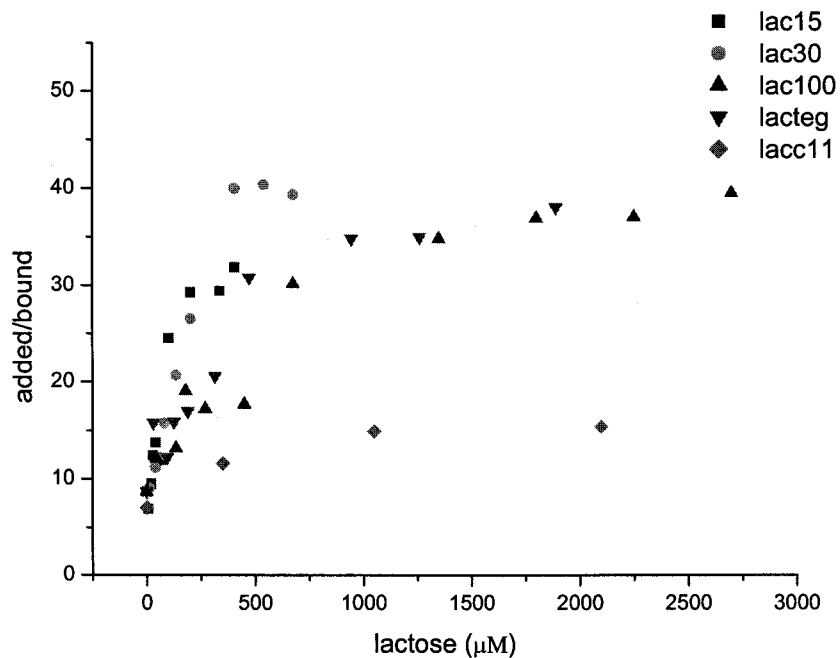
-Experimento utilizando las gliconopartículas. Cálculo del IC50.

El índice 50 se define como la concentración de inhibidor necesaria para que se produzca el 50 % de inhibición. Para este cálculo, se representa la concentración en lactosa frente al cociente entre cpm añadidas/cpm unidas.

En los gráficos siguientes se presentan los resultados por duplicado y medias de los resultados de la inhibición.



En este gráfico no está representada la nanopartícula de maltosa, que no dio ningún de inhibición como cabría esperar. En este gráfico se representan las medias de los distintos experimentos donde se puede observar las distintas tendencias de las nanopartículas:



Se ven claramente tres comportamientos distintos, las nanopartículas con densidades distintas en lactosa, es decir, las del 15% y 30 % en lactosa, las

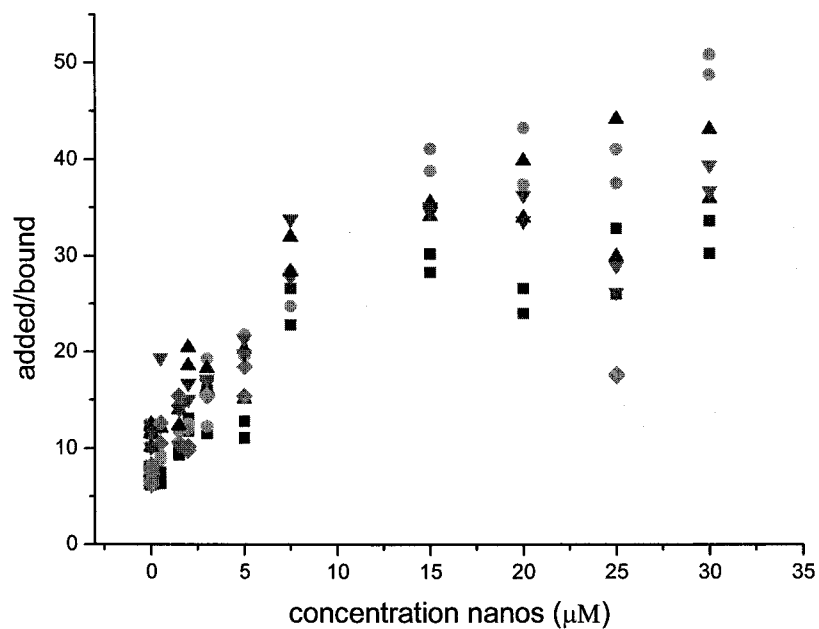
nanopartículas con espaciadores flexibles, **2-Au** y **3-Au** y la nanopartícula **1-Au**, que posee una cadena alifática.

Para calcular el índice 50, se representa la primera parte de la curva que es lineal, obteniéndose las siguientes rectas donde el r^2 fue siempre mayor de 0.9.

Tabla 6.- Valores IC_{50} obtenidos para las gliconanopartículas

Nanopartícula	IC_{50} (μM)
3-Au -15 (15%)	4.7 (64)
3Au-15 (30%)	3,6 (96.5)
3-Au	3.5 (345)
2-Au	3.6 (228)
1-Au	14 (1000)

Los números entre paréntesis corresponden a la concentración correspondiente a lactosa. Cuando se representa en concentración de lactosa, concentración real en nanopartícula, se obtiene el siguiente gráfico:



Hasta una concentración de 7 μM en nanopartícula, todas llevan el mismo comportamiento, de ahí que el IC50 sea el mismo (3-4 μM), excepto la de lactosa con cadena alifática que es de 14 μM .

Sin embargo a partir de esta concentración, las nanopartículas se comportan diferentes, de hecho, parece ser que las que más inhiben son las nanopartículas con un 30 % en lactosa.

Por esta razón, vamos a definir un parámetro más: el IC75, que es la concentración necesaria para inhibir el 75 % de la unión. Para ellos representamos como si de una línea recta se tratara, la última parte de la gráfica, es decir la correspondiente a la saturación.

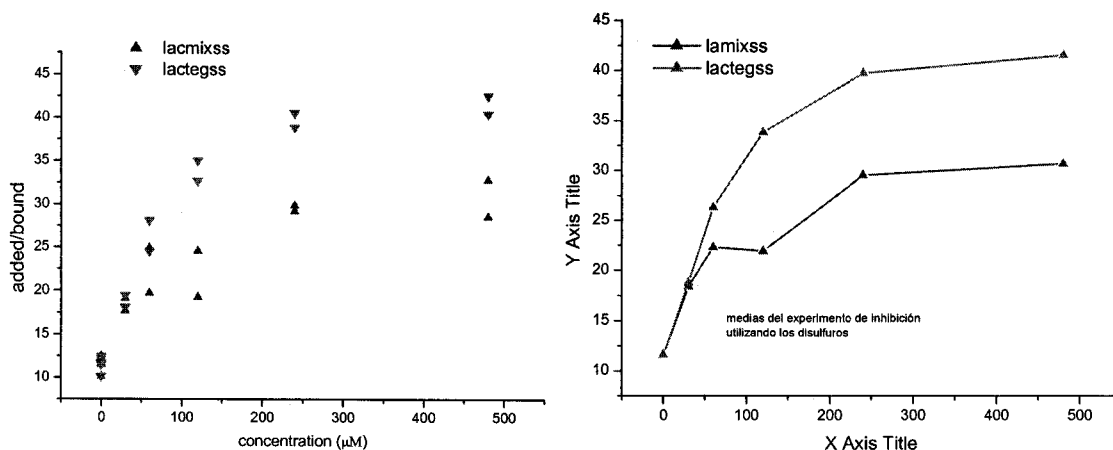
	Nº lactosas	IC50 (μM)	pot rel	IC75 ((μM))
lactosa	1	600	1	-
AFeT	9	1600		
3-Au-15 (15%lac)	13	4.7 (64)	127.6(10)	39 (527)
3-Au-15 (30% lac)	27	3.6 (96.5)	166.6(6)	7.7 (207.9)
3-Au	90	3.5 (345)	171.4(2)	21 (1890)
2-Au	63	3.6 (228)	166.6(3)	25 (1575)
1-Au	70	14 (1000)	43(0.6)	-----

La potencia relativa se calcula dividiendo el IC50 de la lactosa entre el IC50 del inhibidor. Los números entre paréntesis representan la potencia relativa con respecto el número de lactosas que presenta la nanopartícula.

Ensayo de inhibición utilizando los neoglicoconjugados 2 (lacEG4S) y 3 (lacEG6C11S). Cálculo del IC50.

Los neoglicoconjugados utilizados en este ensayo fueron los lactósidos 2 y 3, ya que son los que presentan mayor solubilidad en el tampón utilizado. Como blanco se utilizó el maltósido de maltosa 4, que no dio efecto alguno.

Se trata de un ensayo exactamente igual que los anteriores pero en lugar de utilizar nanopartículas como inhibidores, se añade distintas concentraciones de los compuestos arriba mencionados. Los resultados se muestran en este gráfico:

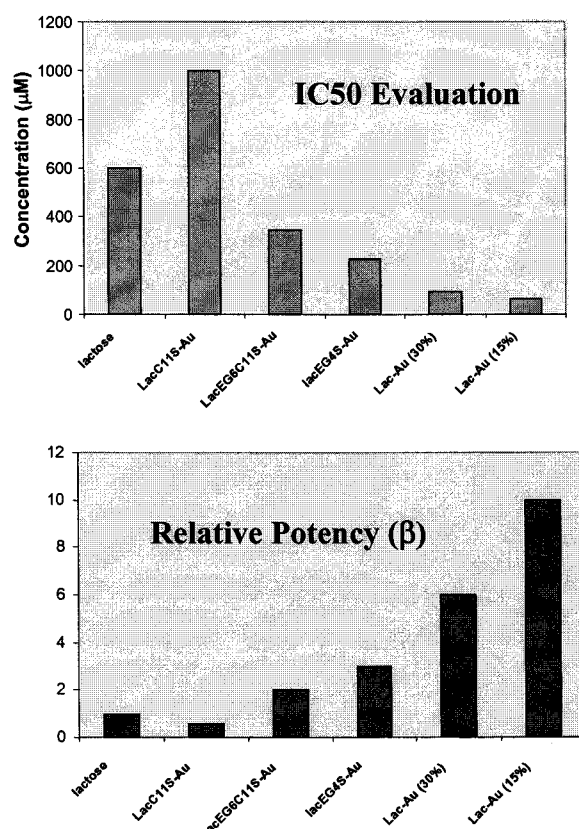


Representando el cociente added/bound frente a concentración de lactosa en el disulfuro, se obtiene las siguientes gráficas, y rectas de calibrado para el índice 50. Cogiendo los primeros puntos de la gráfica, se puede obtener una recta de calibrado, y obtener el índice 50 como en el caso de las nanopartículas:

Inhibidor	Unidades lactosa	IC50 (μM)	pot. Rel.
Lactosa	1	600	1
lacEG4S (2)	2	32.15 (64.3)	18.6 (9)
lacEG6C11S (3)	2	32.7 (65.9)	18.3 (9)

Como se resumen en estos gráficos, tanto las nanopartículas como los disulfuros de lactosa presentan una inhibición mayor que la lactosa, llegando a ser unas 10 veces más activo que la propia lactosa en el caso de las nanopartículas de menor densidad (**3-Au-15**, 15 % y 30% en lactosa) y los correspondientes neoglicoconjugados **2** y **3**. Cuando se pasa de una molécula de lactosa a dos como en el caso de los lactósidos **2** y **3** se ve un aumento de 9 veces en la capacidad inhibitoria, pero cuando pasamos de 2 a 13 moléculas de lactosa (nanopartícula **3-Au-15** con un 15% de lactosa) este aumento es de 10, debido a que la probabilidad de que la lectina encuentre dos lactosas a la distancia de los dos sitios de unión es mayor. Al aumentar el número de lactosas en la nanopartícula el poder inhibitorio va disminuyendo. Este hecho puede ser debido a que una lectina interacciona con una sola

nanopartícula, es decir con dos lactosas presentes en la superficie de la nanopartícula desperdiciando el resto de las lactosas. Esta explicación se refleja en los datos numéricos ya que el aumento de enlace es grande (de 100 a 200 veces) pero disminuye al normalizar este aumento con el número de lactosas por nanopartícula (números entre paréntesis en la tabla). En estos gráficos se representan las tendencias y la potencia de inhibición de las nanopartículas:



Estos experimentos están de acuerdo con la tendencia obtenida por el grupo de Pieters⁶⁹. Este grupo realiza también inhibiciones de la unión de la viscumina a asialofetina utilizando unos dendrímeros que llevan 2, 4 y 8 lactosas, como inhibidores. En el experimento observaron que el dendrímero de 4 lactosas, tiene un efecto de inhibición de 2000 veces mayor al obtenido con 2 lactosas, pero cuando se utiliza el dendrímero de 8 lactosas, este efecto es muy menor (200 veces). Se pone de nuevo de manifiesto la importancia de la presentación del ligando y la geometría de la interacción.

⁶⁹ Andre, S.; Pieters, R.J.; Vrasidas, I.; Kaltner, H.; Kuwabara, I.; Fu-Tong, L.; Kiskamp, R.M.J.; Gabius, H.-J. *ChemBiochem*, **2001**, *2*, 822-830

Por lo tanto, se puede decir, que en este caso, no es tan necesaria la multivalencia en esta interacción, puesto que con un sistema divalente (disulfuros) se obtiene el mismo efecto que con un sistema que posee 13 moléculas de lactosa, como es el caso de la nanopartícula con un 15% en lactosa (3-Au-15, 15% lac)

3.3.- Estudios de afinidad con toxinas AB₅: Subunidad B de la toxina del cólera

La cólera toxina es una proteína tipo lectina que pertenece al grupo de toxinas pentaméricas AB₅, es decir que tienen dos subunidades: una subunidad B que reconoce los oligosacáridos en la superficie celular y una la subunidad A que es la responsable de la infección. La subunidad B de la CT se une específicamente a la porción oligosacáridica del gangliósido GM1, cuya ceramida está embebida en la parte más interna de la membrana plasmática. El oligosacárido GM1 es un pentasacárido ramificado que posee una secuencia Gal β (1 \rightarrow 3) GalNAc β (1 \rightarrow 4)[Neu5Ac α (2 \rightarrow 3)]Gal β (1 \rightarrow 4) Glc, con todos los azúcares con configuración; donde la Glc se encuentra unida a la ceramida.

La CTB se une al GM1 a través de los dos azúcares terminales galactosa y ácido siálico, mientras que el resto de los azúcares sólo sirven de linkers.

Los estudios de interacción utilizando valoración calorimétrica isoterma (ITC), han dado una constante de afinidad de la CTB por el GM1 de $K_d = 952 \text{ nM}$ a 37°C , mientras los fragmentos monosacáridicos (Gal, Glc, NeuAc, etc.) no afectan a la unión de la CTB al GM1, incluso en concentraciones mayores a 40 mM . Sólo se ha visto que la galactosa puede inhibir esta unión en un 20%⁷⁰. En vista de estos antecedentes, se ha enfocado más en la interacción entre la galactosa y la CT que con otros azúcares.

Como objetivo de esta tesis doctoral, hemos propuesto la aplicación de las gliconanopartículas al estudio de interacción de carbohidratos con toxinas, para comprobar si la toxina presenta afinidad por este nuevo nanoglicoconjugado multivalente. Los resultados obtenidos con la lectina viscumina no fueron muy espectaculares debido a que esta lectina sólo posee dos sitios de unión para la lactosa y no es una lectina multivalente. La subunidad B de la cólera posee cinco sitios de unión para su ligando y teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el estudio de afinidad con galactosa y lactosa, nos planteamos el estudio de interacción de las lactonanopartículas con la cólera toxina.

⁷⁰ Cuatrecasas, P. *Biochemistry*, 1973, 12, 3547-3558.

Los ensayos utilizados para determinar la afinidad de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) por los glicoconjugados y sus correspondientes gliconanopartículas fueron la espectroscopia de fluorescencia y el ensayo de unión de la ^{125}I -CTB a ligandos inmovilizados.

3.3.1.- Valoración de la fluorescencia de la interacción CTB con lactoconjugados y gliconanopartículas.

La CTB contiene un grupo triptófano (Trp 88) cuya fluorescencia puede ser afectada cuando se la toxina se une a carbohidratos⁷¹. El ensayo consiste en una valoración. Se añaden cantidades crecientes del ligando que se quiere estudiar a una disolución que contiene la CT, hasta que se llega a la saturación. El cambio en la intensidad de fluorescencia está relacionado con la concentración, y por lo tanto con una constante de asociación. El grado con el que ocurre este fenómeno depende enormemente de la naturaleza del ligando. En primer lugar se hicieron valoraciones utilizando lactosa, lactosa-OMe y *lactoEG4S* (2). Se utilizó también el disacárido maltosa como control. Otro control consiste en añadir en lugar del azúcar, el tampón utilizado. En la figura siguiente se muestra los azúcares utilizados en este ensayo y las constantes de afinidad aparente obtenidas después del análisis de la curva.

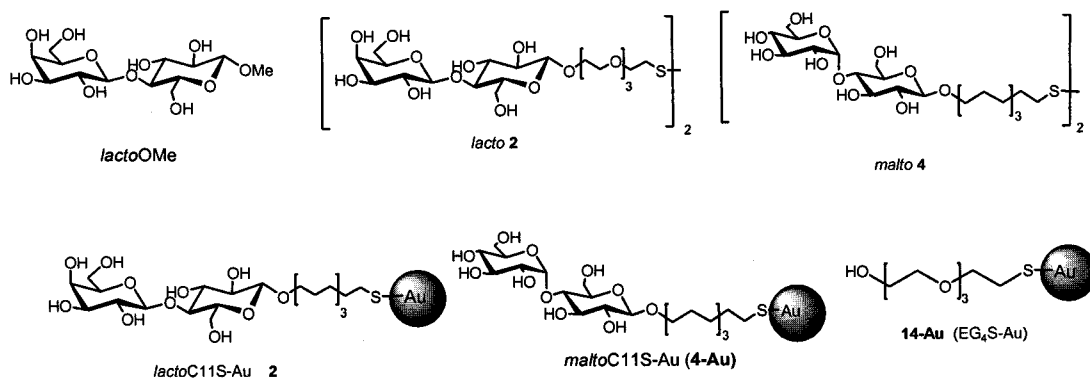


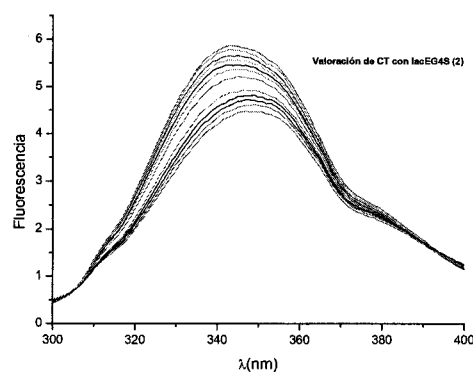
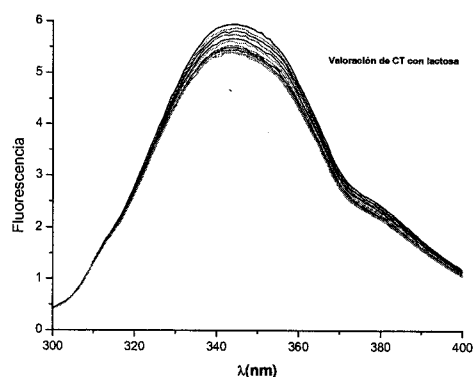
Figura 48.- Moléculas utilizadas en la valoración de la fluorescencia de la CT

⁷¹ Mertz, J.A.; McCann, J.A.; Picking, W.D. *Biochem. Biophys. Res. Res. Comm.* **1996**, *226*, 140.

Tabla 7.- Valores de K_d y n obtenido del análisis de las curvas de valoración

Molécula	K_d	n
Lactosa	3.9 mM	0.6
Maltosa	-----	
LacOMe	7.5 mM	0.9
LactoEG4S (2)	9.8 mM	1.0
maltoC11S(4)	33 mM	0.8
LactoC11S-Au (1-Au)	117 μ M	1.1
maltoC11S-Au (4-Au)	100 μ M	1.0

Las constantes son en el caso de los lactósidos son del orden mM, excepto en los dos controles, donde no se observa cambios significativos en la fluorescencia. Sin embargo, la introducción de la cadena alifática en la maltosa, es decir el maltósido 4 (maltoC₁₁S), afecta de alguna forma a la fluorescencia intrínseca de la CTB, obteniéndose una constante K_d de 33 mM, muy parecida a las anteriores. En todos estos casos, la fluorescencia disminuye, y se observa algún desplazamiento batocrómico de 4 nm (en el caso de LacEG4S (2)) del máximo de emisión (figura -b)). Cuando se analizó la interacción entre la toxina y las gliconanopartículas 1-Au (figura 1d) y 4-Au (ver anexo) se observó la fluorescencia desaparece completamente. La K_d en este caso llega al rango de micromolar.



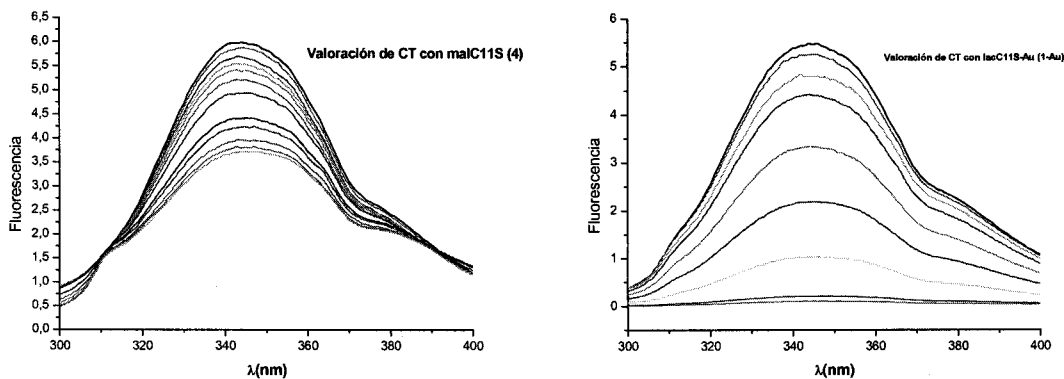


Figura 49.- Espectro de emisión a 346 nm de las valoraciones de CT con: a. lactosa; b. lacEG4S (2); c)malC11S (4); d. lacC11S-Au (1-Au).

Para comprobar si el efecto de quenching es debido al azúcar, se intentó valorar la disminución de la fluorescencia de otro fluoróforo con nanopartículas, en este caso, fluoresceína y nanopartículas de tetraetilenglicol (14-Au). Cuando se realizó este ensayo se observó que la adición de cantidades crecientes de 14-Au a una disolución de fluoresceína tenía el mismo efecto (figura). Por lo tanto el efecto de disminución de la fluorescencia en el triptófano de la toxina no era debido al azúcar sino al oro. El oro tiene una gran absorbancia en la banda de emisión del triptófano, a 350 nm. Debido a estos resultados, este tipo de experimento se abandonó por no ser adecuado para estimar afinidades de toxinas con azúcares.

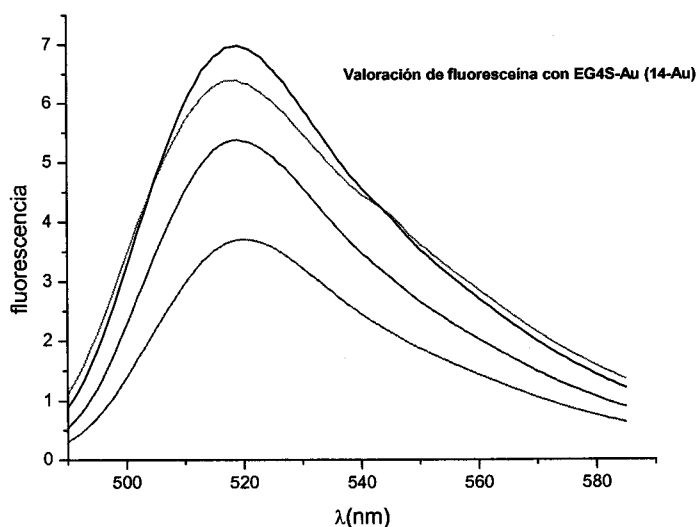


Figura 50.- Espectro de emisión a 514 nm de fluoresceína cuando se valora con nanopartículas EG4S-Au (14-Au).

3.3.2.- Ensayo de inhibición de la unión de la subunidad B de la cólera toxina a distintos ligandos.

Una de las estrategias más utilizadas para inhibir la adhesión de la toxina del cólera a la superficie celular de la célula huésped, es bloquear la interacción que se produce entre la subunidad B de la toxina y su receptor en la superficie, el oligosacárido GM1. Por este motivo, desarrollamos una estrategia para inhibir esta unión utilizando las gliconanopartículas como agente antiahesivo (figura 51).

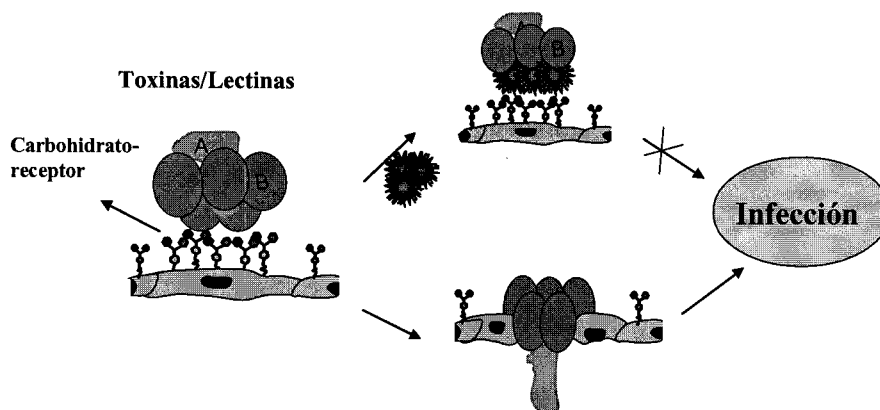
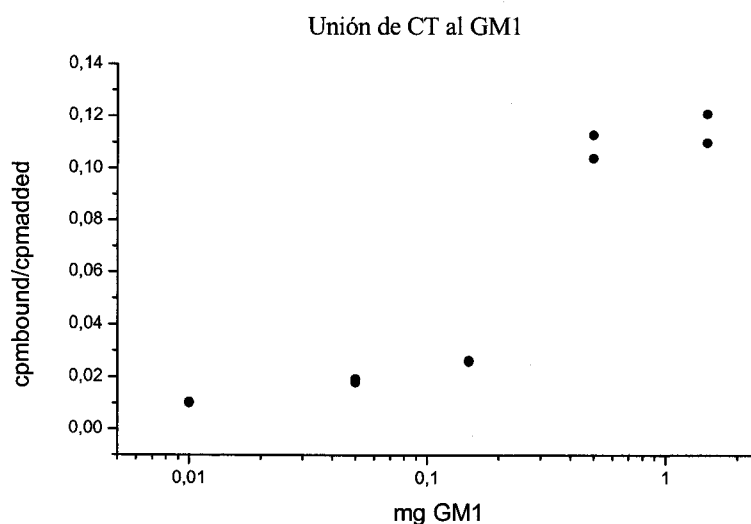


Figura 51.- Aplicación de las gliconanopartículas para inhibir la unión de la toxina a su receptor

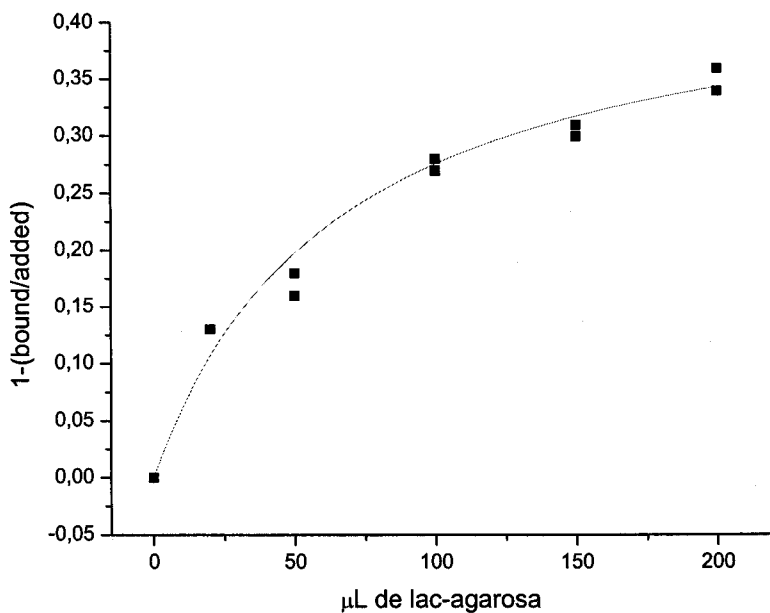
En un primer lugar se diseñó un experimento similar a la inhibición de la unión de la viscumina a la asialofetuina, pero en este caso con la CTB y como ligando el GM1. La curva de unión de este experimento:



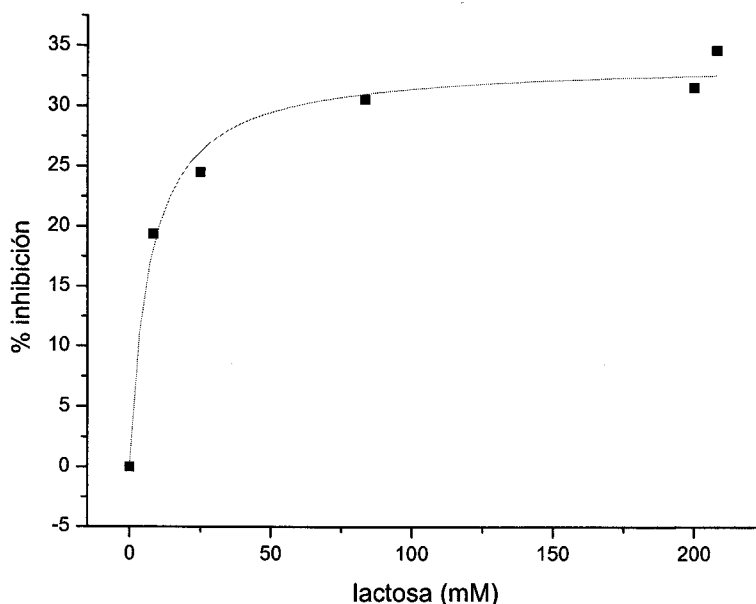
Sin embargo, cuando se realizó el experimento de inhibición con lactosa, no fuimos capaces de inhibir la unión. El único ligando que inhibe la unión de la CT al

GM1, es el GM1. Este resultado nos indica que este experimento no es muy adecuado para estudiar las interacciones con ligandos que van a dar afinidades mucho más bajas que el ligando de la proteína.

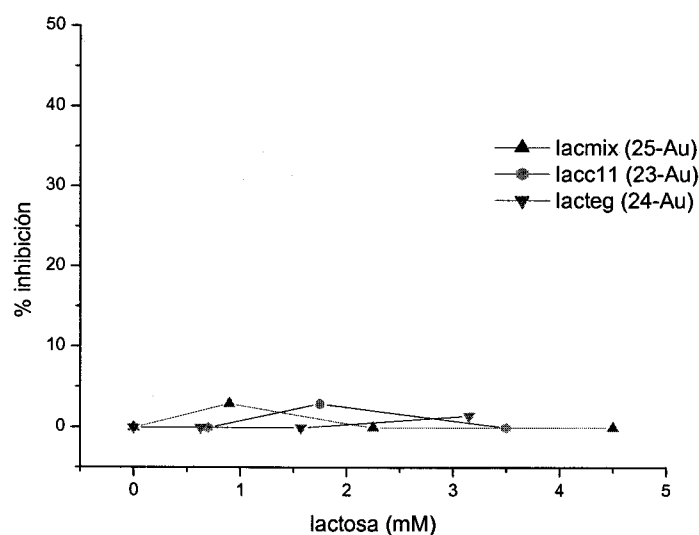
Por esta razón, se intentaron realizar curvas de unión de la CT con otras glicoproteínas como asialofetuina, fetuina, mucina y otras, pero no se obtuvo ningún resultado satisfactorio. También se intentó aumentar la cantidad de ligando, utilizando la formación de coágulos de fibrinógeno y asialofibrinógeno, pero la CT no se unía a ninguna de las glicoproteínas mencionadas. Más tarde, desarrollamos un sistema basado en Lactosa-agarosa, donde se puede llegar a aumentar la cantidad de ligando en concentraciones muy altas. Este sistema consiste añadir cantidades de CT marcada radiactivamente a eppendorfs que llevan un volumen determinado de lacagarosa. La curva de unión que se obtuvo fue la siguiente.



El siguiente experimento fue intentar inhibir tal unión. Se añadió cantidades crecientes de lactosa de hasta 0,2M y se obtuvo la siguiente curva de inhibición.



Para estudiar la interacción de las gliconanopartículas con la CT, se realizó un ensayo de inhibición basado en este sistema. Teniendo en cuenta que con una concentración de 0.2M de lactosa, llegamos a una inhibición del 30%, se utilizó como posibles inhibidores las gliconanopartículas más multivalentes, es decir las que posee el mayor número de lactosas, en concentraciones crecientes llegando a una concentración máxima de 5 mM en lactosa. Cuando se realizó este experimento, no obtuvimos ningún resultado, como se observa el gráfico:



Como primeras conclusiones a este trabajo preliminar, podemos decir que las nanopartículas no presentan multivalencia frente a la CT, puesto que con una concentración de 5mM en lactosa, no observamos ningún efecto en la inhibición de la

unión, o bien que para que se observe algún efecto multivalente es necesario, la otra unidad de azúcar presente en la interacción, el ácido siálico. De todas formas, hay mucha controversia en los resultados de interacción con la CT con lactosa. El grupo de Verlinde⁷² sí obtiene un efecto de inhibición con lactosa y con galactosa, pero Cuatrecasas, no obtiene ninguna inhibición cuando utiliza lactosa como inhibidor. También hay estudios realizados sobre la importancia del grupo carboxílico del ácido siálico en el enlace del GM1 con la CTB⁷³. En este trabajo modifican el carboxílico transformándolo en alcohol, amidas o amidas, y se observó que estas modificaciones cambian la capacidad de enlace del GM1 a la proteína, reduciendo la capacidad de enlace drásticamente. Otro trabajo relacionado con la importancia del ácido carboxílico del ácido siálico es el que presenta el grupo de Bernardi⁷⁴. Este grupo sintetizan miméticos de GM1, donde en lugar de llevar ácido siálico llevan un ácido láctico. Cuando valoran la interacción con CTB con fluorescencia, observan que estos miméticos tienen una constante Kd del rango micromolar, en cambio, otros compuestos como el derivado Gal β 3GalNAcOAlil, que no lleva ácido láctico, presentan una Kd del rango mM, al igual que ocurre con nuestros resultados obtenidos con los lactoneoglicoconjugados, lactosaOMe y lacEG4S (2).

⁷² Minke, E. W. ; Roach, C.; Hol, W.G.J.; Verlinde, C.L.M.J. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 5684-5692.

⁷³ Lanne, B.; Schierbeck, B.; Karlsson, K-A.; *J. Biochem*, **1994**, *116*, 1269-1274.

⁷⁴ Bernardi, A.; Carretón, L.; Grosso, A; Monti, D.; Sonnino, S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *40*, 2197.

4.- Aplicación de las gliconanopartículas de oro y sus correspondientes neoglicoconjugados al estudio de la interacción carbohidrato-carbohidrato.

La interacción entre carbohidratos se define como una interacción de baja afinidad y dependiente de calcio. Estas características hacen de su estudio un gran desafío para investigar y evaluar esta interacción que parece estar implicada en la adhesión especie-específica de algunas esponjas y en los procesos de adhesión y reconocimiento de células eucariotas. Hakomori estudió la expresión de diferentes tipos de carbohidrato antígenos (la mayoría glicoesfingolípidos) en la superficie de células eucariotas y sus implicaciones en procesos de adhesión celular a través de interacciones carbohidrato-carbohidrato. Uno de los antígenos implicados es el glicoesfingolípido Le^x , cuya interacción homotípica parece ser la responsable de la compactación de la morula y adhesión de células cancerosas. Otro de los sistemas donde se estudió este fenómeno, es la interacción entre microdominios de glicoesfingolípidos de GM3 de células tumorales y glicoesfingolípidos de Gg3 o lacCer que se organizan en células endoteliales.

Por otra parte, en el contexto biológico las interacciones carbohidrato-carbohidrato, coexisten con otras interacciones como las carbohidrato-proteína y proteína-proteína. Esta complejidad hace difícil diseccionar y analizar las contribuciones individuales de cada sistema que interacciona. Como ocurre en el estudio de otras interacciones biológicas se necesita de sistemas modelos que puedan ayudarnos a superar estos problemas.

El desarrollo de esta tesis se ha realizado dentro de un proyecto más amplio que donde se pretende estudiar y evaluar la interacción carbohidrato-carbohidrato en los tres sistemas antes mencionados y son el objetivo de varias tesis doctorales. Como objetivo de esta Tesis Doctoral, nos propusimos estudiar y evaluar la interacción lactosa-lactosa. La lactosa es un disacárido que forma parte de muchos glicoesfingolípidos como el Le^x , cuya interacción homofílica parece ser responsable de la compactación de la morula y la agregación de células de teratocarcinoma. Parece ser que en esta interacción contribuye en gran medida el trisacárido Le^x , siendo muy poco influyente el epitopo de lactosa.

Para evaluar esta interacción se han utilizado dos neoglicoconjugados derivados con un grupo tiol terminal, el trisacárido le^x y el lactoconjugado 1. Con estos dos compuestos podemos formar bien, monocapas sobre oro, bien en 2D o bien en 3D, que

hemos denominado *gliconanopartículas de oro*, y cuya preparación y desarrollo es el objetivo fundamental de esta Tesis. De esta forma, tenemos un juego de sistemas en el que se pueden medir interacciones individuales homofilicas (lac-lac o Le^x-le^x) o bien cruzadas (Lex-lac) o también realizar un estudio con sistemas multivalentes en 3D y en 2D.

Para cuantificar y evaluar la interacción la técnica de AFM y SPR. Los resultados obtenidos sirvieron como referencia para los estudios de interacción de Le^x-Le^x y dieron una idea de cómo de fuerte es esta interacción con respecto a la esperada débil lactosa-lactosa.

4.1.- Evaluación de la interacción lactosa-lactosa mediante AFM

El microscopio de fuerza atómica (AFM) es una modificación del microscopio de barrido de efecto túnel, pero que presenta la ventaja con respecto a éste, de que también se puede emplear con muestras no conductoras. El Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) es un instrumento mecánico-óptico que detecta fuerzas a nivel atómico (del orden de los nanonewton) a través de la medición óptica del movimiento sobre una superficie de una micropalanca, la cual termina es una punta de forma piramidal de SiN_4 . La fuerza atómica que aparece cuando la micropalanca está muy próxima a la superficie de la muestra, se detecta mediante la torsión de la micropalanca. Esta torsión se detecta, mediante la variación en la dirección de un haz láser que se incide sobre la micropalanca. El seguimiento óptico de la torsión de la micropalanca puede proporcionarnos una imagen topográfica, o una curva fuerza-distancia (figura 52).

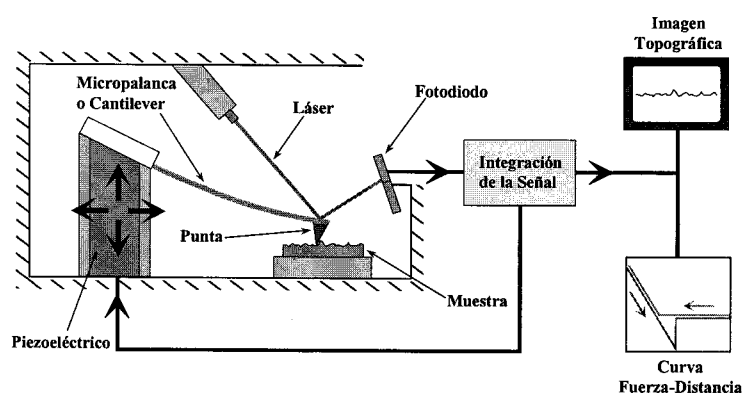
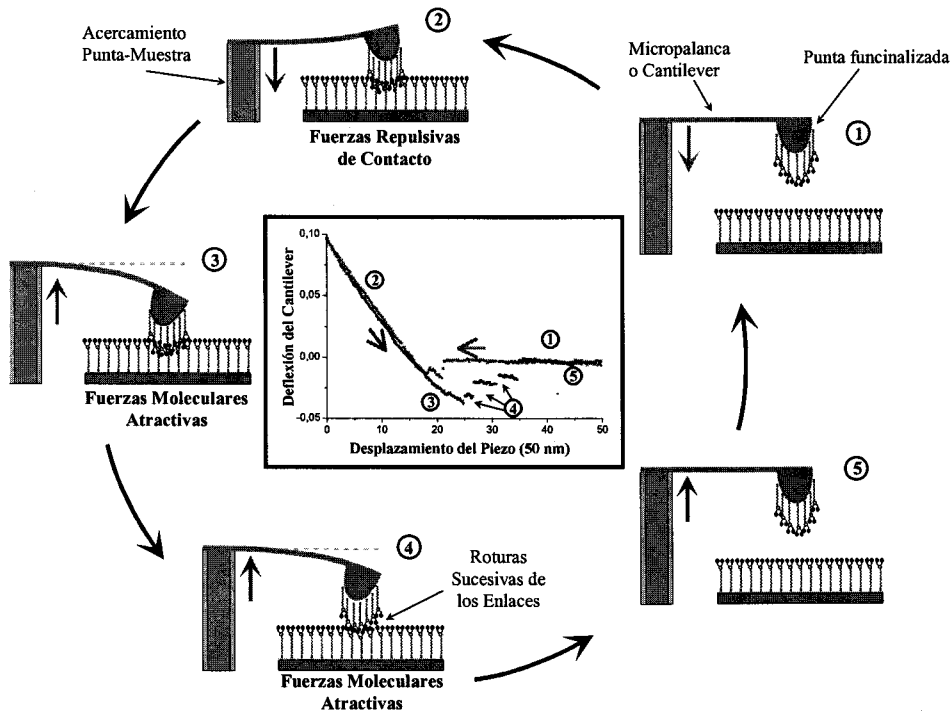


Figura 52.- Esquema de un microscopio de fuerzas atómicas (AFM).

El AFM permite la caracterización topográfica de superficies, la medida de fuerzas entre ellas y su manipulación, por lo que este microscopio se convierte en un

instrumento ideal para poder caracterizar superficies a nivel molecular y medir sus interacciones. La medida de las fuerzas de adhesión entre superficies se obtiene a partir de las curvas que relacionan la fuerza generada con la distancia existente entre la punta de la micropalanca y la muestra (curvas fuerza-distancia). Una curva de fuerza se obtiene realizando ciclos de atracción-retracción (figura 53).



Se han estudiado la interacción de lactósidos sintetizados, los neoglicoconjugados 1 (lacC11S) y 2 (lacEG4S). La medida se siguió el siguiente procedimiento: se recubrió las superficies de oro y mica de los tips del AFM con estas moléculas. Estos experimentos se realizaron en agua y en una disolución de calcio en condiciones fisiológicas (figura 55a).

En estas figuras se resumen las curvas de fuerza-distancia en los experimentos lactosa-lactosa: En el caso del lactósido 1 (lacC11S) (figura 55b y 55c) no se observa ninguna interacción específica. Esto demuestra claramente que no hay fuerzas de adhesión específicas lactosa-lactosa, tanto en agua como en calcio. Cuando se repite el mismo experimento en agua utilizando el lactósido 2 (lacEG4S), tampoco se observa fuerza alguna cuando el experimento se realizó en agua. Sin embargo, en disolución de calcio si que se obtiene curvas distancia-fuerzas que son características de interacciones intermoleculares (Figura 55d).

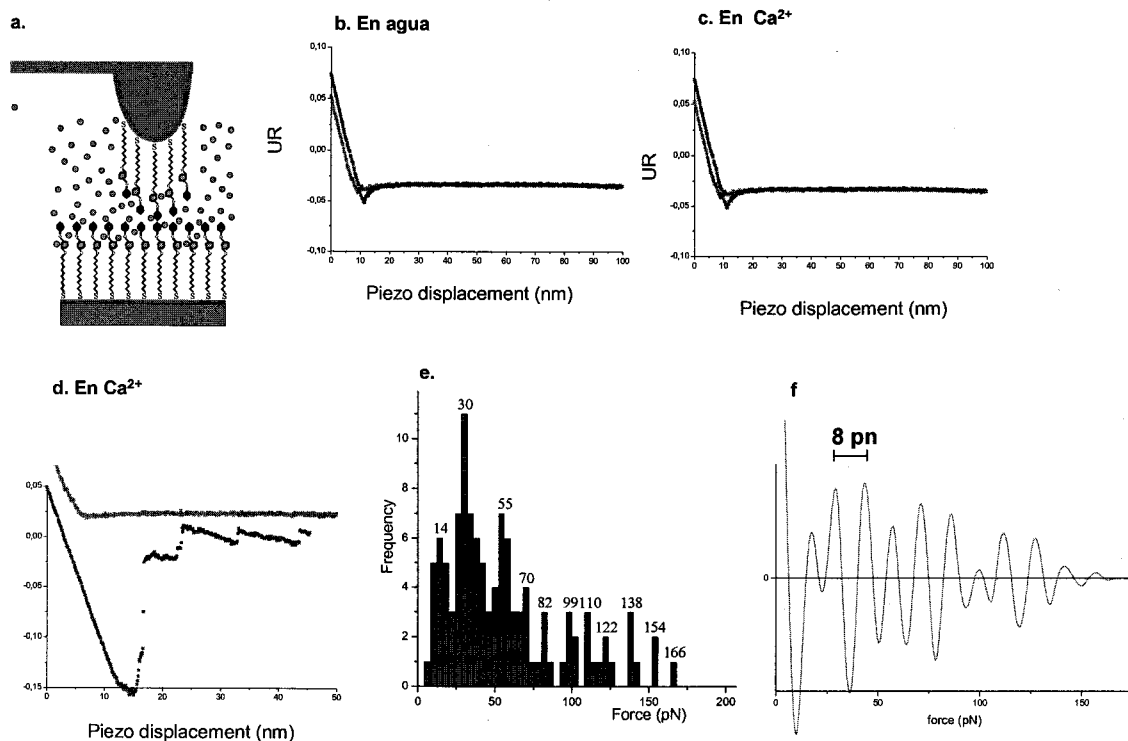


Figura 55.- a. Esquema de la estrategia. b y c. curvas de fuerza-distancia del experimento *lacc11S* con *lacc11S*. d. Curva de fuerza-distancia del experimento *LacEG4S* con *LacEG4S*.en Ca^{2+} . e. Histograma de la distribución de fuerzas. F. Función de autocorrelación

El análisis de la distribución de las fuerzas medidas y la aplicación de la función de autocorrelación (figura 55e y 55f) se obtuvo una fuerza de 8 ± 2 pN. La periodicidad se atribuye a la fuerza de interacción entre dos moléculas del lactósido 2.

Los experimentos realizados con el lactósido *lactoC11S* (1) no muestra la existencia de interacción entre moléculas de lactosa. Las fuerzas de adhesión observadas en el caso del lactósido *lactoEG4S* (2) no se pueden atribuir por tanto a una interacción carbohidrato-carbohidrato. La única diferencia entre estas moléculas es el espaciador. Recordemos que el lactósido 1 (*lacC11S*) lleva un espaciador de naturaleza alifática y el lactósido 2 (*lacEG4S*) lleva un espaciador derivado del tetraetilenglicol. Entonces las fuerzas de adhesión obtenidas se deben a una interacción entre el azúcar y el espaciador o entre una interacción entre los espaciadores. Para confirmar esta hipótesis, se realizaron dos experimentos de control tanto en agua como en calcio. La punta se funcionalizó en este caso con el espaciador 14 (**OHEG4S**), mientras que la muestra se funcionalizó con el espaciador en un caso y con el lactósido 2 en el otro. Las fuerzas de adhesión se observaron en el experimento control entre el lactósido 2 y el espaciador 14 en disolución de calcio (figura 56).

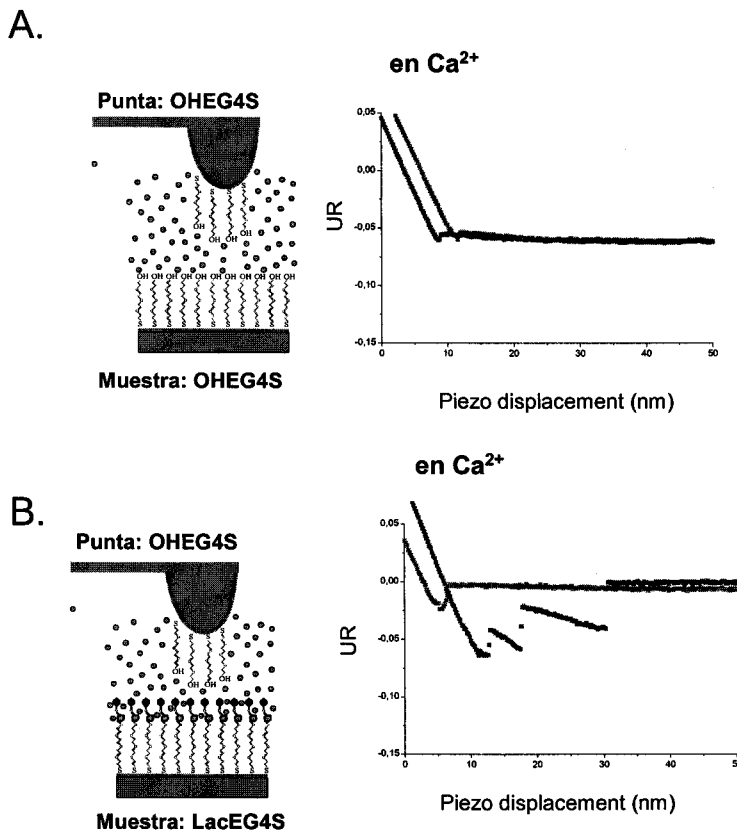


Figura 56.- Fuerzas de adhesión entre el espaciador EG4S (14) y el lactósido 2 (lactoEG4S).

La distribución de fuerzas y la correspondiente función de autocorrelación se resumen en las siguientes figuras. El valor observado de 9 ± 2 pN coincide con el valor obtenido en el experimento entre dos moléculas de lactósido 2. Estos resultados confirman que las fuerzas de adhesión medidas entre las moléculas del lactósido 2 no se deben a una interacción carbohidrato-carbohidrato específica sino a una interacción entre moléculas de lactosa y de tetraetilenglicol.

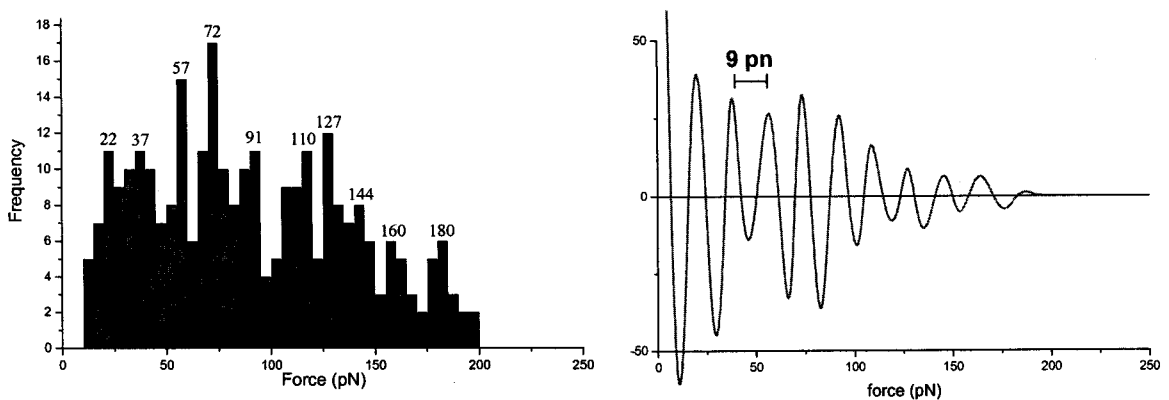


Figura 57.- Análisis de la distribución de fuerzas de no enlaces entre las moléculas de lactósido 2 y espaciador 14: derecha: Histograma de la distribución de fuerzas, izquierda: Función de autocorrelación. Se observa una fuerza de 9 pN.

Este mismo experimento se aplicó de control para la medida de fuerzas de interacción específica entre moléculas de lex, donde se ha obtenido que la fuerza de adhesión entre dos moléculas de Le^x es de 20 pN tanto en agua como en calcio, lo que demuestra la capacidad y la selectividad del Le^x antígeno por el autoreconocimiento⁷⁵ []].

4.2.- Evaluación de la interacción lactosa-lactosa utilizando SPR.

Utilizando biosensores con detección por resonancia de plasmón de superficie (SPR) se han obtenido datos cinéticos sobre la interacción Lex-Lex y lactosa-lactosa.

Estos biosensores pueden dar información de la cinética y afinidad de la interacción de un ligando con un analito a tiempo real⁷⁶ y ha llegado a ser un método standard para el estudio de las interacciones biológicas. La resonancia de plasmón de superficie es un fenómeno óptico que tiene lugar en una superficie metálica cuando existe un cambio de índice de refracción entre dos medios distintos (figura 58).

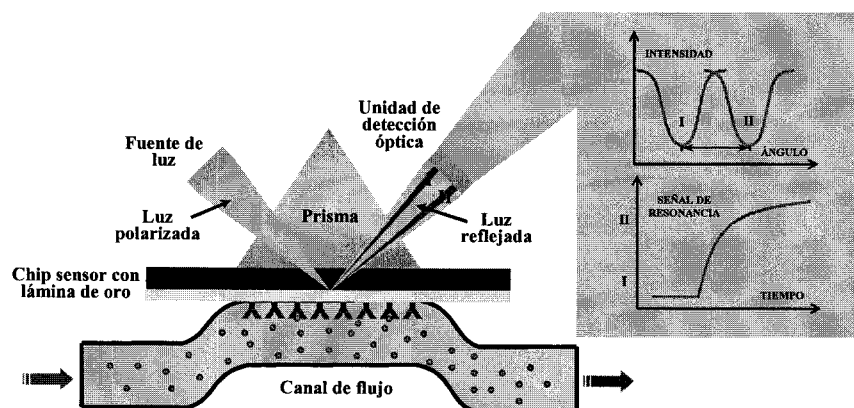


Figura 58.- Esquema general del sistema de detección de un biosensor por resonancia de plasmón de superficie (SPR).

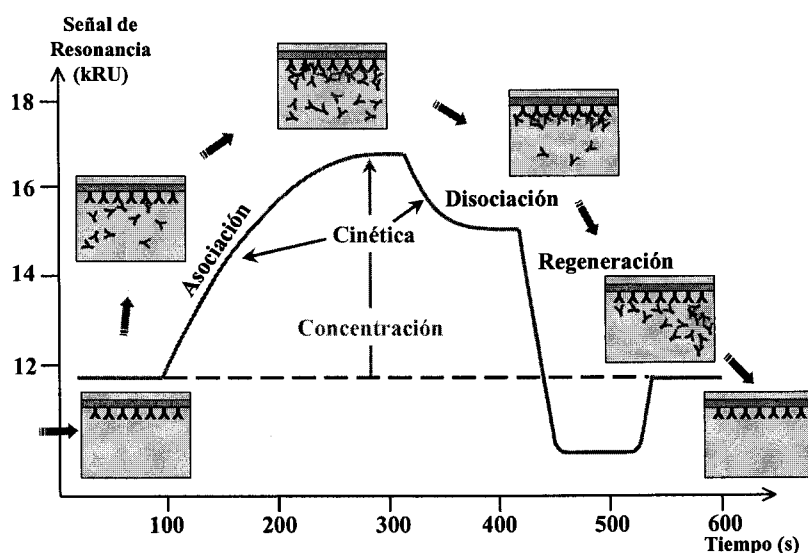
Los biosensores basados en esta técnica de detección de resonancia de plasmón de superficie, contienen un prisma como uno de los medios y una solución acuosa como el otro medio. La interfase es una capa muy fina de oro (chip) que se cubre con una

⁷⁵ Tromas, C.; Rojo, J.; de la Fuente, J.M.; Barrientos, A.G.; García, R.; Penadés, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3052.

⁷⁶ a) Szabo, A.; Stolz, L.; Granzow, R. *Curr Opin Struct Biol*, **1995**, *5*, 699-705; b) Jäger, W. *Carbohydrates in chemistry and biology*, Ed. Ernst, B.; Hart, G.W.; Sinay, P. Wiley-VCH, **2000**, *2(1)*, 1045; c) McDonnell, J.M. *Curr Opin Struct Biol*, **2001**, *5*, 572-577; d) Haseley, S.R.; Kamerling, J.P.; Vliegthart, J.F.G. *Topic Curr Chem*, **2002**, *218*, 93.

matriz a la que se une la biomolécula para estudiar su interacción. Un sistema integrado suministra un flujo continuo de tampón o de las muestras a estudiar sobre el chip. La inyección de muestra y su medida está automatizada. El sistema de detección reacciona directamente con la sustancia acumulada y la señal que se origina depende del peso molecular y concentración de las muestras que se inyectan, así como del número de centros de unión presentes en la matriz.

La respuesta a la unión del ligando al receptor, medida en unidades de respuesta (RU), representa la cantidad de materia unida a la superficie ($1000 \text{ RU} = 1 \text{ nmol L}^{-1} \text{ mm}^2$ en el caso de proteínas). La relación entre RU y el tiempo da lugar al sensorgrama. La cinética de la interacción se obtiene con el cambio de la respuesta con el tiempo. Un sensorgrama como el representado en la figura se obtiene de la siguiente manera: una vez inmovilizado el ligando a la superficie, se fluye el analito sobre la misma, teniendo lugar la interacción y provocando un aumento de la señal hasta llegar a un punto en que la superficie se encuentra saturada (situación de equilibrio) y la señal se estabiliza. En este momento se inicia la fase de la disociación del analito que será más o menos lenta dependiendo de la fuerza de la interacción. Por último, se lleva a cabo la regeneración de la superficie del chip eliminando todo el analito, con lo cual queda lista para una nueva medida. La cinética de la interacción se sigue por la curva de asociación y disociación que va variando a lo largo del tiempo.



Nuestro laboratorio ha desarrollado un sistema modelo para estudiar y cuantificar usando SPR la interacción carbohidrato-carbohidrato. Este modelo consiste en una monocapa autoensamblada (SAM) de los neoglicoconjugados objeto de estudio

sobre un chip de oro (J1 de BIAcore), sobre la que se fluye el ligando, bien como sistema monovalente (metil glicósido) o como polivalente (gliconanopartículas).

La originalidad de nuestro modelo reside en el uso de SAMs de los oligosacáridos unidas directamente a la superficie de oro del biosensor, lo que incrementa la sensibilidad de la respuesta, además de minimizar las interacciones inespecíficas y controlar perfectamente la naturaleza del ligando, su concentración y su densidad en la superficie de oro.

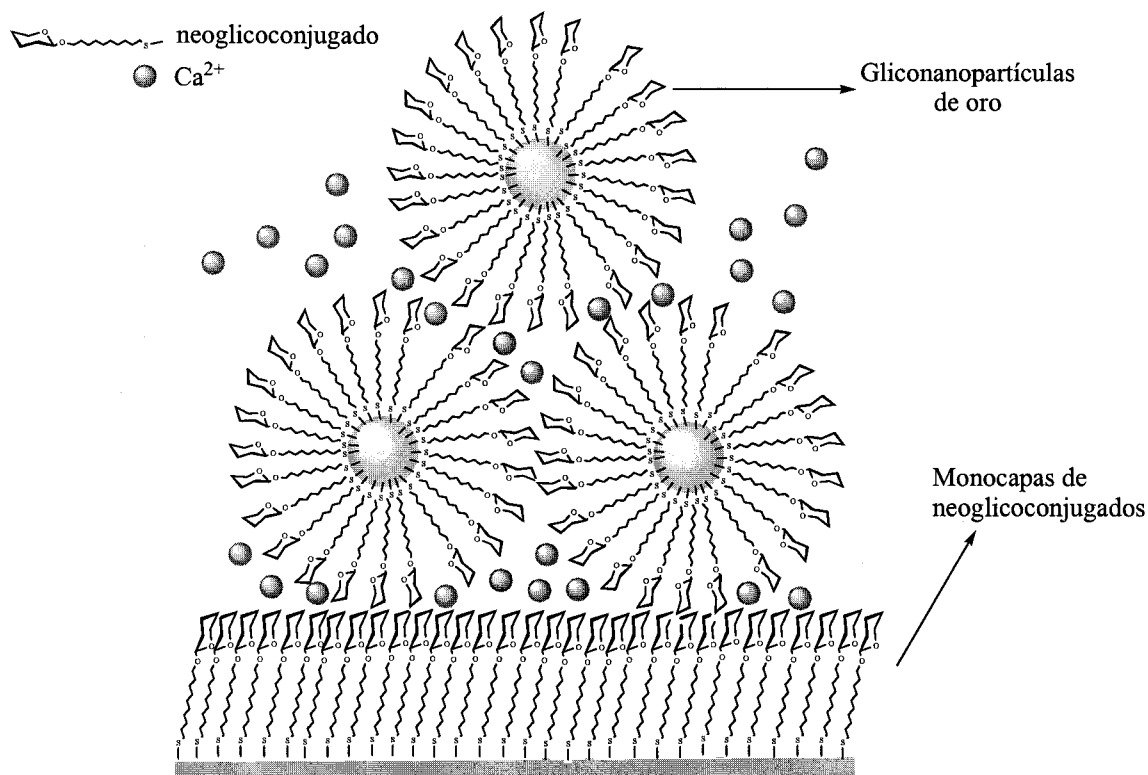


Figura 59.- Esquema de nuestra estrategia para el estudio de interacción con biosensores.

Los neoglicoconjugados de lactosa utilizados poseen una cadena terminada en un grupo tiol, el cual posibilita como hemos comentado anteriormente, la preparación de las lactonanopartículas (*lactoC11S-Au*) que se emplearán como analitos, y sirven también para la formación de las SAMs de los neoglicoconjugados en las superficies de oro del biosensor, usándolas así como sustrato. Se emplearon también el metil glicósido de lactosa que se utilizó como sistema monovalente. Se emplearon también chips funcionalizados con SAMs de 11-tio-3,6,9-trioxaundecanol (compuesto 14) y de 11-tioundecanol (compuesto 13) como superficies control.

Los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un instrumento BIAcore (BIA-sens AB, Uppsala) a 25 °C. Se emplearon chips J1 sobre los cuales se funcionalizó los neoglicolípidos lactosa a una velocidad de flujo de 3 $\mu\text{L min}^{-1}$ hasta respuesta constante de SPR. Para cubrir los posibles huecos sobre la superficie de oro, se continuó la inmovilización por inyección de una disolución de metanol (50 %) de 11-tio-3,6,9-trioxaundecanol (**14**) (2 mg mL^{-1}). En otra célula de flujo, se inmovilizó esta cadena para eliminar así posibles interacciones inespecíficas entre la cadena y los carbohidratos. Una tercera célula de flujo del chip se trató con tampón solo para servir como un segundo control.

La unión *lactoC11S*-Au (**1-Au**) y del correspondientes metil lactósido a las SAMs de lactosa, se midieron en tampón Hepes en presencia y en ausencia de iones calcio. Los sensogramas para la interacción entre *lactoC11S*-Au y los correspondientes metil glicósidos a los neoglicolípidos lactosa se muestran en la figura 59. La constante de afinidad aparente K_d se dan en la tabla.

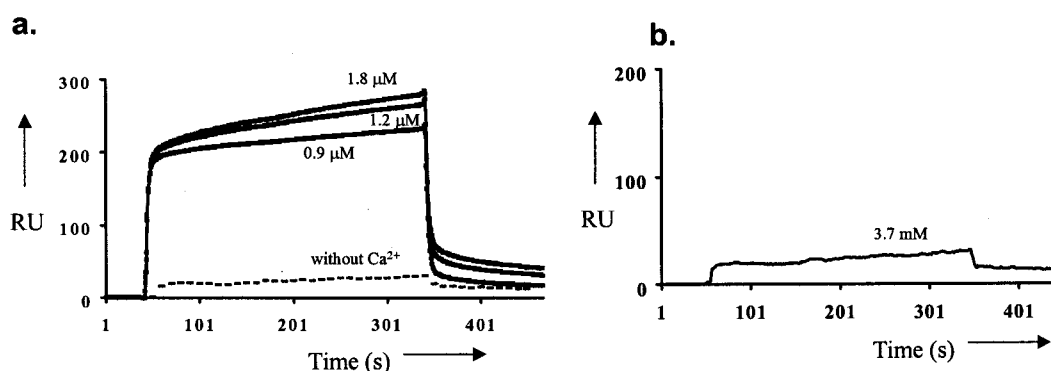


Figura 60.- Sensorgrama de SPR para la interacción de: a. *lactoC11S*-Au (**1-Au**) a monocapas de lactósido **1**. b. Me-lactósido a monocapas de lactósido **1** (*lactoC11S*).

En las curvas de unión de las lactonanopartículas **1-Au** a las SAM del neoglicoconjugado de lactosa **1**, se observa una fase de asociación rápida con una respuesta de 274 U y una fase de disociación muy rápida. El valor de K_d es de $1.5 \cdot 10^{-5}$ M. Cuando se fluye el metil lactósido sobre las monocapas de lactosa, no se observa ningún efecto, tal y como se aprecia en la figura b. Cuando se fluye en ausencia de calcio tampoco se observa respuesta alguna. Esto indica dos cosas: en primer lugar la presencia de calcio es necesaria para que tenga lugar la interacción y por otra parte, es necesario también una presentación multivalente de la lactosa (gliconopartículas) que

fluye para que se observe algún efecto. En esta tabla se resumen los valores obtenidos de estas curvas:

Tabla 8.- Datos cinéticos (K_d) y energías de unión (ΔG) para los ligandos monovalentes y polivalentes a 25 °C.^[a]

Sustrato	Analito	K_d (M)	$-\Delta G$ (Kcal/mol)
Lactósido 1	Lacto-Au (1-Au)	1.5×10^{-5}	6.5
Lactósido 1	Me-lactósido	[a]	[a]

[a] Después de eliminar los datos de interacciones no específicas del oro y de la cadena empleada como control la señal estaba por debajo de 10 RU.

Como hemos comentado anteriormente, este experimento se aplicó de control para la evaluación de la cinética y la constante de asociación de la interacción específica entre moléculas de Le^x , donde se ha demostrado la capacidad y la selectividad del Le^x antígeno por el autoreconocimiento⁷⁷. En este caso, la constante de asociación K_d es $5.4 \cdot 10^{-7}$ M empleando las gliconanopartículas de Le^x (Le^x -Au) como ligando y de K_d $5.7 \cdot 10^{-3}$ M, en el caso del ligando monovalente (Le^x -OMe), cuando estos experimentos se realizan en presencia de calcio. En cualquier caso, la magnitud de la constante es mucho mayor que para la lactosa, lo cual confirma que en el proceso de autoreconocimiento del Le^x , el trisacárido epítipo es el que contribuye con más peso a la interacción.

⁷⁷ Hernáiz, M.J.; de la Fuente, J.M.; Barrientos, A.G.; Penadés, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1554

5.- Validación *in vivo* de las gliconanopartículas: inhibición de adhesión de células tumorales a células endoteliales.

Inhibición de la adhesión de células de melanoma de ratón a células endoteliales de ratón utilizando nanopartículas de lactosa: Interacción GM3-lac

Lo que hace difícil al cáncer de erradicar es su alto poder metastático. La metástasis es un proceso en el cual las células tumorales se desprenden del tumor madre, viajan por el torrente sanguíneo y llegan al tejido endotelial. Una vez allí, estas células interactúan con el tejido endotelial y son capaces de adherirse y extravasarse para invadir otro tejido. Esta adhesión se debe a las interacciones entre proteínas y carbohidratos y entre proteínas de ambas células (selectinas, glicoproteínas, fibronectinas, integrinas). El grupo de Hakomori ha estudiado durante años el modelo de adhesión entre células de melanoma y células endoteliales de los vasos sanguíneos. Las células de melanoma expresan en su superficie celular el glicoesfingolípido (GSL) GM3, mientras que las células endoteliales expresan los GSLs Gg3 y LacCer. Cuando se administra en ratones liposomas que llevan Gg3, LacCer y/o GM3 (Figura 5), se produce una inhibición de la metástasis y una reducción de del tamaño de los tumores. Con estos resultados, Halomori y col. han propuesto que el primer paso para la adhesión entre las células tumorales y las células endoteliales comienza con una interacción carbohidrato-carbohidrato entre los GSLs que se encuentran en las membranas de ambas células. Este primer reconocimiento celular desencadena el resto de interacciones (proteína-carbohidrato, proteína-proteína) provocando la adhesión y posteriormente la invasión y metástasis. Los sistemas multivalentes de GSLs pueden utilizarse por lo tanto como agentes antiadhesivos y de esta forma bloquear la interacción de los GSIs de células tumorales con GSLs de células endoteliales. Este bloqueo detendría toda la adhesión posterior, inhibiendo la invasión y la metástasis.

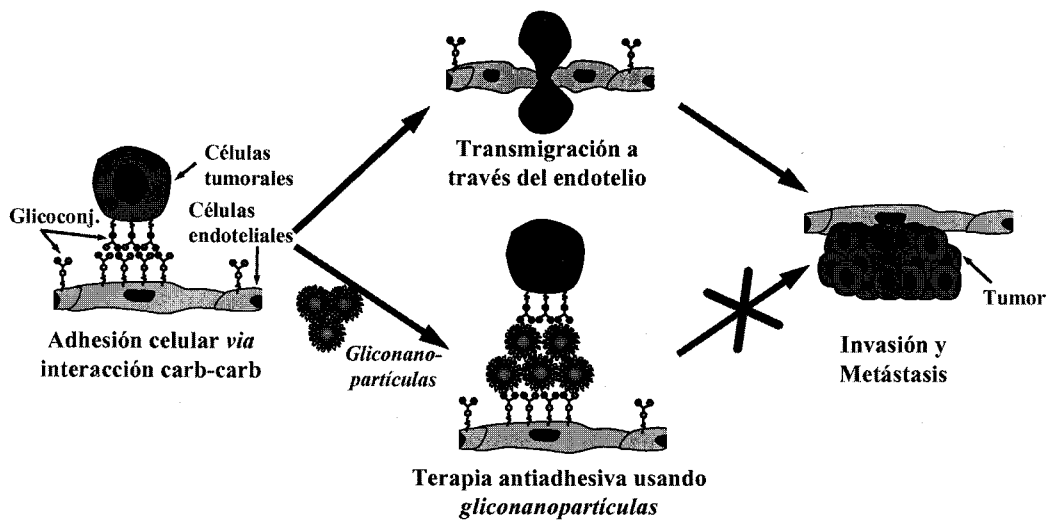


Figura 61. Aplicación de gliconanopartículas a la terapia antiadhesiva.

Sin embargo, uno de los problemas que tiene la utilización de carbohidratos como fármacos, es que son fácilmente degradados por las glicosidasas y son eliminados del torrente sanguíneo

Con el ensayo de hidrólisis con galactosidasas, hemos comprobado que las nanopartículas no son degradadas por las enzimas. Las nanopartículas de lactosa podrían constituir entonces un buen modelo para inhibir el primer paso de la adhesión de las células de melanoma a células endoteliales, sin que fueran en principio hidrolizadas por las enzimas.

La aplicación de estas gliconanopartículas a modelos biológicos ha estado precedida por estudios meticulosos de citotoxicidad *in vitro*. Los estudios de citotoxicidad de *lactoC11S-Au* (**1-Au**), *lactoEG4S-Au* (**2-Au**), *lactoEG6C11S-Au* (**3-Au**), *maltoC11S-Au* (**4-Au**) y *glucoEG4S-Au* (*gluco-Au*) se llevaron a cabo usando la línea celular B16F10. La incubación de estas células con *lactoC11S-Au* y *gluco-Au* durante 24 horas no mostró ningún cambio significativo en la viabilidad de las células⁷⁸.

Para evaluar el efecto antimetastático *in vivo* de la nanopartícula de lactosa (**1-Au**) se añadieron junto con la línea celular B16F10, inyectadas vía intravenosa en ratones C57/BL6. Basado en los resultados previos obtenidos por Hakomori y col. usando liposomas que contienen lactosa, se ha diseñado un experimento *ex vivo*, usando lactonanopartículas y células de melanoma B16F10. El diseño experimental (figura) incluye una comparación *in vivo* de la capacidad que posee la línea celular B16F10 para generar metástasis espontánea en el pulmón, durante una preincubación corta (5

⁷⁸ De la Fuente, J.M. Tesis Doctoral, 2003, Universidad de Sevilla.

min, 37°C), con *lactonanopartícula* (1-Au) o *gluconanopartículas* en grupos experimentales de diez animales. Para el experimento se usaron cinco grupos de ratones. A uno de los grupos, C, se le inyectó sólo solución Hank's como control, a un segundo grupo (TC) se le inoculó vía intravenosa en la cola del ratón, una dosis única de 10^5 de células de melanoma B16F10 en 200 μ L de solución de Hank's. Los otros tres grupos se trataron con dosis de células B16F10 (10^5 células en 200 μ L de solución de Hank's) preincubadas 5 minutos a 37°C con 90 μ M de las nanopartículas control (*gluconanopartículas*) y 30 ó 90 μ M de *lactonanopartículas*. Durante esta inoculación no se observó ningún efecto secundario. Como control experimental interno, una alícuota de la suspensión de células B16F10 inyectadas, se lavaron con PBS, y se mantuvieron en medio de cultivo durante una semana adicional para controlar la cinética de crecimiento. Tampoco en este caso se observa ningún efecto extraño debido a la preincubación con *lactonanopartículas* o *gluconanopartículas*. El proceso metastático se deja desarrollando durante tres semanas y en ese tiempo se sacrifican los animales, se cogen muestras de diferentes órganos y los dos pulmones se evalúan contando los tumores mediante la observación con microscopio óptico.

Todos los animales incluidos en este experimento se inspeccionaron cuidadosamente durante el todo el periodo para la detección de cualquier síntoma anómalo que pudiera ser consecuencia de la inoculación de nanopartículas. Algunos animales presentan en los primeros días el pelo erizado pero no se observó otro fenómeno patológico. Tampoco se encontraron alteraciones en las muestras recogidas de otros órganos. Estos datos demuestran claramente que la inoculación de nanopartículas (tanto de *lacto-Au* como de *gluco-Au*, a concentraciones de hasta 90 μ M) no produce ningún efecto tóxico relevante o cualquier otra manifestación histopatológica en animales vivos.

La inspección visual directa de los pulmones de los animales donde se inyectaron *lactonanopartículas*, en comparación con los pulmones de los animales inoculados con células B16F10 o células B16F10 preincubadas con *gluconanopartículas* muestra que cuando se inyectan *lactonanopartículas* se produce un fuerte efecto inhibitorio frente a la metástasis (figura 63). El recuento de núcleos metastáticos en los pulmones indican que el grupo experimental tratado con la línea celular B16F10 y con células B16F10 preincubadas con *gluconanopartículas* a concentración de 90 μ M desarrollan un gran número (98 ± 40 / pulmón) de nuevos núcleos tumorales en pulmones

(mórula negra clásica, ver figura 63). Sin embargo, el grupo de ratones tratado con células B16F10 preincubadas con lactonanopartículas en las dos concentraciones diferentes (30-90 μM) presentan una inhibición moderada del proceso metastático a 30 μM y cerca del 70% de inhibición media (92-53% de rango de inhibición) en el caso de administrar la concentración más alta. A concentraciones bajas la capacidad de inhibición de las *lactonanopartículas* es más evidente en los núcleos metastáticos de diámetro $< 1\text{mm}$ (30% de reducción) en comparación con los núcleos más grandes de $> 1\text{mm}$ (0-2% de inhibición) mientras que a concentraciones mayores, lo dos tipos de tumores disminuyen. La dispersión y la variación de núcleos metastáticos entre distintos animales fue bastante alta (figura) pero en algunos animales (5-7) quedaron casi protegidos totalmente frente a la metástasis. Este experimento muestra un claro efecto dosis-dependiente de las *lactonanopartículas* en la inhibición experimental de metástasis agresiva de pulmón producida por las células de melanoma B16F10.

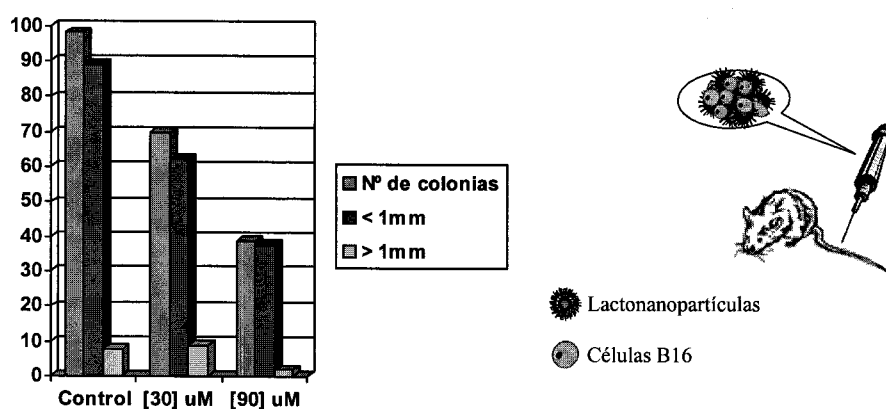


Figura 62.-Ensayos in vivo: Inhibición de células de melanoma por nanopartículas.

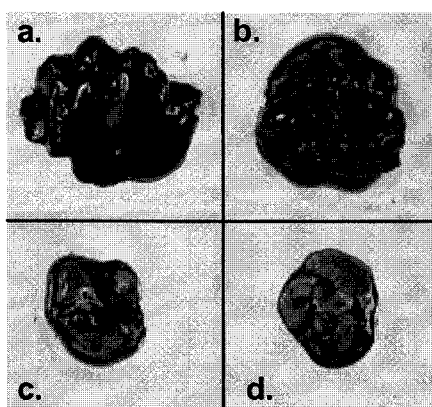


Figura 63 .- Pulmones de ratón después de : a. Inyección con células B16F10. b. Coinfección con B16F10 y nanopartículas de Glucosa. C. Sin administración de células tumorales. D. Coinfección de células tumorales y nanopartículas de lactosa.

Estos resultados demuestran que las lactonanopartículas son capaces de inhibir sustancialmente la metástasis de pulmón en ratones (70%), pero no erradica totalmente el fenómeno. Este resultado se esperaba ya que en primer lugar, la interacción que se supone que interviene entre los GSLs GM3 en las células tumorales y la lactosa es muy débil, y posiblemente administrando gliconanopartículas con otro glicoesfingolípido como el Gg3, podría disminuir aún más la metástasis. En segundo lugar, en este complicado proceso se ha demostrado que además de los GSLs de la superficie celular también intervienen otros factores como integrinas y selectinas. Sin embargo, esta es la primera vez que se preparan gliconanopartículas específicas y se evalúan *in vivo* como moléculas terapéuticas o como vehículos terapéuticos.

IV.CONCLUSIONES

Conclusiones:

1.- Se han sintetizado los siguientes glicósidos de lactosa y maltosa funcionalizados con un grupo tiol en la posición final del espaciador mediante una secuencia sintética que implica:

a. La preparación de los espaciadores 11-tioacetil-undecanol (**5**) 11-tioacetil-3,6,9-trioxa-undecanol (**8**), y 1-[tioacetil-undec-11-il]hexa(etilenglicol) (**12**) y los disulfuros 11, 11'-ditio bis (undecanol) (**13**) y 1,1'-ditio bis (undeca-11-il)trietilenglicol (**15**).

b. La glicosidación de los tricloroacetimidatos de lactosa y maltosa con los siguientes espaciadores bifuncionales: 11-tioacetil-undecanol (**5**), 11-tioacetil-3,6,9-trioxa-undecanol (**8**) y 1-[tioacetil-undec-11-il]hexa(etilenglicol) (**12**).

b. La desprotección de los grupos acilos y el aislamiento de los compuestos como disulfuros para obtener: 11, 11'-ditio-bis [undecanil (β -D-galactopiranosil) (1 \rightarrow 4) β -D-glucopiranosido] (**1**), 11,11'-ditio bis [3,6,9-trioxa-undecanil (β -D-galactopiranosil) (1 \rightarrow 4) β -D-glucopiranosido] (**2**) 29, 29'-ditio bis [3,6,9,12,15,18 -hexaoxa-undecanil (β -D-galactopiranosil) (1 \rightarrow 4) β -D-glucopiranosido] (**3**) 11, 11'-ditio bis [undecanil (α -D-glucopiranosil) (1 \rightarrow 4) β -D-glucopiranosido] (**4**).

2.- Se ha desarrollado una metodología para preparar por primera vez sistemas polivalentes que presentan carbohidratos en forma globular unidos a través de un espaciador a nanoclusters de oro y a los que hemos denominado *gliconanopartículas*. Las gliconanopartículas preparadas han sido: *lactoC11S-Au* (**1-Au**), *lactoEG4S-Au* (**2-Au**), *lactoEG6C11S-Au* (**3-Au**), *maltoC11S-Au* (**4-Au**) y *EG4S-Au* (**14-Au**), a partir de la reducción de una sal de oro en presencia de los neoglicoconjugados de lactosa y maltosa antes mencionados y el 11, 11'-ditio-bis (3, 6, 9-trioxa-undecan-1-ol) (**14**) para el caso de **14-Au**. Estas gliconanopartículas han sido que pueden ser manipuladas como macromoléculas orgánicas, han sido caracterizadas por RMN, TEM, banda de plasmon de superficie (UV) y análisis elemental. Además, presentan una gran solubilidad y estabilidad en agua y en medios fisiológicos y constituyen un nuevo sistema multivalente de carbohidratos.

3.- Siguiendo la metodología anterior, se han sintetizado las gliconanopartículas de oro de distinta densidad en ligando: *lactoC11S-Au-SC11* (**1-Au-13**) con un 50% de lactosa,

y *lactoEG6C11S-Au-SC11EG3* (**3-Au-15**), con un 5%, 15% y 30% en lactosa, a partir de la reducción de la mezcla de neoglicoconjugados de lactosa **1** y **3** y los espaciadores **11**, **11'**-ditio bis (undecanol) (**13**) y **1,1'**-ditio bis (undeca-11-il)trietilenglicol (**15**) respectivamente. También han sido caracterizadas como las anteriores y cuyas propiedades igualan a las anteriores. Además, la distinta naturaleza y longitud de los espaciadores permiten que los azúcares posean una determinada presentación en la superficie de la nanopartícula.

4.- Se ha realizado la hidrólisis enzimática de los neolactoconjugados *lactoC11S* (**1**), *lactoEG4S* (**2**) y *lactoEG6C11S* (**3**) y sus correspondientes gliconanopartículas **1-Au** (*lactoC11S-Au*), **2-Au** (*lactoEG4S-Au*) y **3-Au** (*lactoEG6C11S-Au*), con β -galactosidasa de *E.coli*. La enzima procesa a los lactósidos **1** y **2** (5-4 $\mu\text{mol}/\text{min.mgE}$), de igual forma que su sustrato natural la lactosa, (6 $\mu\text{mol}/\text{min.mgE}$); sin embargo el lactósido **3** presenta una menor actividad (0.19 $\mu\text{mol}/\text{min.mgE}$). Las gliconanopartículas **1-Au**, **2-Au**, **3-Au** no son hidrolizadas por la enzima, incluso aumentando la concentración de enzima y el tiempo de incubación. Esta resistencia a la degradación es debida probablemente al impedimento estérico que ofrecen los azúcares en la superficie de la nanopartícula al centro activo de la enzima, ya que cuando la densidad del azúcar disminuye como en el caso de la gliconanopartícula híbrida *lactoEG6C11S-Au-C11EG3*, **3-Au-15** (30% en lactosa), sí que se observa hidrólisis (0.11 $\mu\text{mol}/\text{min.mgE}$).

5.- Se han llevado a cabo estudios sobre la inhibición de la unión de la lectina *Viscum Album Agglutinina* (VAA) a Asialofetaina (AsFeT), utilizando como inhibidores las gliconanopartículas **1-Au**, **2-Au**, **3-Au**, **3-Au-15** (15% en lactosa) y **3-Au-15** (30% en lactosa) y los neoglicoconjugados de lactosa **2** y **3**. Todos ellos inhiben la unión de la lectina a su ligando, siendo los neoglicoconjugados **2** y **3** y las gliconanopartículas **3-Au-15**, que incorporan un 15% y un 30% en lactosa, los que presentan un IC50 menor. Las gliconanopartículas de maltosa (**4-Au**) así como su neoglicoconjugado de maltosa (**4**) no inhiben la unión.

6.- Se han llevado a cabo estudios de afinidad por espectroscopia de fluorescencia y por ensayos tipo ELLA, de las gliconanopartículas **1-Au**, **2-Au**, **3-Au**, **4-Au**, **3-Au-15** (15% en lactosa) y **3-Au-15** (30% en lactosa) y las nanopartículas **14-Au** con el pentámero de

la toxina del cólera (CTB). En los ensayos de fluorescencia se observa una disminución de la fluorescencia de la toxina con la concentración de las gliconanopartícula de lactosa **1-Au** y con la gliconanopartícula de maltosa **4-Au**, atribuyéndose esta disminución a un efecto inespecífico debido a los “nanoclusters” de oro. Los ensayos de inhibición de la unión de la toxina a los ligandos: el glicosfingolípido GM1 y a un derivado de azarosa (lactoAgar) se realizaron con las gliconanopartículas **1-Au**, **2-Au**, **3-Au**, **4-Au**, **3-Au-15** (15% en lactosa) y **3-Au-15** (30% en lactosa) En este ensayo de inhibición de la unión de la toxina a GM1, no se observa inhibición cuando se utilizan las gliconanopartículas. Los mismos resultados se obtuvieron en la inhibición de la toxina a lacto-Agarosa.

7.- Los neoglicoconjugados de lactosa **1** (*lactoC11S*) y su correspondiente gliconanopartícula **1-Au** (*lactoC11S-Au*) se han utilizado como control en la evaluación y cuantificación de la interacción homofílica Le^x-Le^x , mediante medidas de AFM y SPR. En los estudios con AFM no se observó ninguna fuerza de adhesión entre moléculas de lactosa tanto en presencia como en ausencia de calcio, confirmando la selectividad del antígeno Le^x en su autoreconocimiento. En las medidas de interacciones utilizando SPR, la constante de asociación aparente para la interacción entre las gliconanopartículas de lactosa (**1-Au**) y monocapas del neolactoconjugado **1**, en presencia de Ca^{2+} , fue de $1.5 \cdot 10^{-5}M$. Esta afinidad fue de dos órdenes de magnitud más pequeña que la encontrada en la interacción Le^x-Le^x ($5.4 \cdot 10^{-7}M$).

8.- Se han validado las gliconanopartículas de lactosa como herramientas con gran potencialidad para interferir en procesos de adhesión celular. Se ha evaluado la capacidad antiadhesiva de las gliconanopartículas (**1-Au**) *in vivo* en el modelo biológico de adhesión de células tumorales de melanoma B16F10 a endoteliales. Se ha demostrado que las gliconanopartículas son capaces de inhibir la formación de núcleos metastáticos en pulmón en ratones hasta un 75%, cuando las células tumorales B16F10 se incubaron con una concentración de 90 μM de **1-Au**, previamente a la inyección en ratones. Como sistema control para este experimento *in vivo* se emplearon las gliconanopartículas de glucosa (**Glc-Au**) que no produjeron ninguna inhibición en la metástasis.

V. PARTE EXPERIMENTAL

1. Métodos generales

Disolventes y reactivos

Todos los disolventes orgánicos anhidros empleados se secaron siguiendo procedimientos descritos (Perrin, D.D.; Armarego, W.L:F., Purification of laboratory chemicals, 1996, Editorial Butterworth-Heinemann, Oxford), según se indica a continuación: THF y éter etílico se destilaron sobre Na/benzofenona bajo atmósfera de nitrógeno inmediatamente antes de su utilización. DMF se destiló sobre BaO y se conservó sobre tamiz molecular de 4 Å bajo atmósfera de argón. Acetonitrilo y diclorometano se destilaron sobre CaH₂ bajo atmósfera de nitrógeno inmediatamente antes de su utilización. Metanol se destiló sobre (MeO)₂Mg/I₂ y se almacenó bajo atmósfera de argón.

Todos los reactivos empleados en la realización de esta Tesis Doctoral fueron de alta pureza y se adquirieron a distintas firmas comerciales (Aldrich, Fluka, Lancaster, Panreac, etc.).

La enzima β-galactosidasa (EC 3.2.1.23), galactodehidrogenasa (EC 1.1.1.48) y NAD (nicotina adenina dinucleótido) fueron adquiridos en SIGMA-ALDRICH. La subunidad B de la toxina del cólera (CTB) fue suministrada en SIGMA y purificada por filtración en Amicones de un determinado corte de membrana. La lectina Viscum Album Aglutinina fue donada por el laboratorio de Dra.Dolores Solís del Instituto de Química-Física "Rocasolano".

Técnicas y aparatos

El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina (CCF) empleando cromatofolios de aluminio de gel de sílice tipo 60 F₂₅₄ (Merk). Para la detección de los productos se utilizó luz UV ($\lambda = 254$ nm) y/o el revelador de H₂SO₄/EtOH (1/9, v/v) o ácido fosfomolibdico / (SO₄)₂Ce/SO₄H₂. La cromatografía en columna se realizó sobre gel de sílice Merck tipo60, de diversos tamaños de partícula (0.2-0.5 mm, 0.2-0.63 mm, 0.040-0.015). La composición del eluyente empleado se detalla en cada caso.

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

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se midieron en los espectrómetros Bruker DRX-500, DRX-5400 y DPX-300. Los espectros se realizaron en el disolvente deuterado que se indica y los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), usando como referencia la señal residual del disolvente empleado. Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente en los casos donde no se especifica la temperatura.

Los análisis elementales se llevaron a cabo con un aparato Leco CHNS-932, después de secar las muestras sobre pentóxido de fósforo durante 24 h. Los resultados se expresan en tanto por ciento en todos los casos.

Para la cromatografía de intercambio iónico se empleó resina Amberlist IR-H.

Los espectros de ultravioleta-visible fueron realizados en un espectrómetro UV/vis Perkin Elmer Lambda 12.

Los experimentos y caracterización de gliconopartículas por Microscopia de Electrónica de Transmisión (TEM) se realizaron en un microscopio Philips CM200, ubicado en el Instituto de Ciencias de los Materiales de Sevilla (ICMSE-CSIC). Los análisis de energías dispersivas de Rayos X (EDX), se realizaron en un equipo Philips DX4 acoplado al microscopio.

Los análisis de fluorescencia así como las valoraciones utilizando cambios de fluorescencia se realizaron en un espectrómetro de luminiscencia Aminco-Bowman Series 2 de Spectronic Instruments.

Los evaluación de las fuerzas de adhesión se realizaron en un Microscopio de Fuerzas Átomicas (AFM) PicoSPM (Molecular Imaging), con una célula de líquidos Teflón, sito el Instituto de Microelectrónica de Madrid.

Los experimentos realizados con detección de resonancia de plasmón de superficie (SPR) se llevaron a cabo en un instrumento BIAcore (BIA sensor AB,

Uppsala), ubicado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid (CNB-CSIC)

2. Síntesis de espaciadores y neoglicoconjugados de lactosa y maltosa

2.1.- Síntesis de espaciadores

11-tioacetilundecanol (5)

A una solución de 11-bromoundecanol comercial (2.5g, 10mmol, 1 eq) en DMF (10 mL) se le añade tioacetato potásico (1.4g, 12 mmol, 1.2 eq). Después de dos horas la mezcla de reacción se diluye con acetato de etilo (100 mL) y se lava con H₂O (3 x 25 mL). La fase orgánica se seca sobre NaSO₄ anhidro, se filtra y se concentra. El crudo de reacción se purifica en columna de gel de sílice (Hexano: AcOEt 4: 1) obteniéndose 5 (2.1g, 10.3 mmol, cuantitativo).

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 3.98 (t, 2H, *J*= 6.9 Hz) 2.79 (t, 1H, *J*= 7.2 Hz) 2.63 (m, 2H) 1.93 (s, 3H, SAc) 1.64-1.44 (m, 4H, CH₂CH₂) 1.32-1.20 (m, 12 H, -CH₂CH₂-).

1-*O*- Metanosulfonil-11-*O*-tritol-3,6,9-trioxa-undecan-1-,11-diol (6)

A una solución de cloruro de tritilo (20g, 71 mmol, 1.1 eq) en piridina (30 mL) se le añade tetraetilenglicol (12.9g, 65 mmol, 1 eq). La mezcla de reacción se agita a 0°C durante 12 horas. La CCF muestra la aparición de un nuevo producto de R_f 0.4 (éter). A continuación se añade cloruro de metanosulfonilo (8 mL, 97.4 mmol, 1.5 eq). La mezcla de reacción se deja agitando 12 horas más a temperatura ambiente. La mezcla se diluye con AcOEt (200 mL) y se lava con H₂O (2 x 75 mL), con una solución de HCl (35%) (2 x 75 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 75 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra. El crudo se purifica por cromatografía en gel de sílice (éter) obteniéndose 6 como un sirupo (12 g, 24 mmol, 30%).

^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.48- 7.22 (m, 15 H, -Ph) 4.36 (t, 1H, $J= 4.6$ Hz) y 4.36 (dd, 1H, $J= 6.2, 2.7$ Hz) [CH_2OMs] 3.76 (t, 1H, $J=4.6$ Hz) y 3.76 (dd, 1H, $J= 6.2, 2.7$ Hz) [$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OMs}$] 3.71 (m, 10H, $-\text{CH}_2\text{O}$) 3.28 (t, 2H, $J=5.1\text{Hz}$, $-\text{CH}_2\text{OTr}$) 3.01 (s, 3H, -Ms).

11-tioacetil-1-*O*-tritol-3,6,9-trioxa-undecanol (7)

El compuesto **6** (4g, 7.36 mmol, 1 eq) se disuelve en butanona (50 mL) y se añaden pequeñas porciones tioacetato potásico (1.6g, 14.7 mmol, 2 eq). La mezcla se calienta a reflujo. Después de 2 horas, la CCF (hexano: AcOEt 2:1) muestra la aparición de un nuevo producto de Rf 0.5. El crudo de reacción se disuelve en AcOEt y se lava con H_2O (25 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se concentra. La purificación en cromatografía de columna (hexano: AcOEt 2:1) dio lugar a **7** como un sirupo (3.5g, 7.1 mmol, 96%).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.48- 7.19 (m, 15 H, -Ph) 3.68-3.58 (m, 12H, $-\text{CH}_2\text{O}$) 3.24 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) 3.07 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{SAC}$) 2.31 (s, 3H, SAC).

11-tioacetil- 3,6,9-trioxa-undecan-1-ol (8)

Una solución de **7** (5.5g, 11.1 mmol) en ácido acético glacial (70 mL) se dejó agitar a 45°C durante 10'. Cuando la CCF (AcOEt) muestra la aparición de un nuevo producto de Rf menor (Rf 0.2), la reacción se trata con agua (30 mL) y el ácido acético se elimina coevaporando con tolueno. El crudo de la reacción se purifica en columna (AcOEt) y se obtuvo **8** (1.7g, 6.7 mmol, 60%) como un sirupo.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.72-3.57 (m, 14H, $-\text{CH}_2\text{O}$) 3.08 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{S}$) 2.61 (s, 1H, OH) 2.35 (s, 3H, SAC).

Procedimiento general para la conjugación de cadena alifática y oligoetilenglicol. Síntesis de los espaciadores 9 y 10.

Una mezcla de una disolución acuosa de hidróxido sódico (4.3 mmol) y de hexaetilenglicol o trietilenglicol (21 mmol) se deja agitando durante 30' en un baño a 100°C. A continuación se añade 11-bromoundec-1-eno (4.3 mmol). Después de 24 horas, la mezcla de reacción se enfría y se extrae 6 veces con hexano. Las fases orgánicas se concentran dando lugar a un aceite amarillo. La purificación en cromatografía en columna dio lugar al producto deseado.

Undec-1-en-11-iltri(etilenglicol) (9)¹

Partiendo de trietilenglicol (3.2 g, 21 mmol) y de 11-bromo-undec-1-eno (1g, 4.3 mmol) se obtuvo un crudo de reacción que se purificó en columna (AcOEt) para dar **5** (900 mg, 3.00 mmol) con un 70% de rendimiento.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 5.82-5.73 (m, 1H, CH=) 4.98-4.88 (m, 2H, CH₂=) 3.71-3.54 (m, 10H, -CH₂O) 3.42 (t, 2H, J= 6.6 Hz), 2.04-1.97 (m, 2H) 1.57-1.53 (m, 3H) 1.35-1.17 (m, 17H).

Undec-1-en-ilhexa(etilenglicol) (10)¹

A partir hexaetilenglicol (5.4 g, 21mmol) y de 11-bromoundec-1-eno (1g, 4.3 mmol) se obtuvo un crudo de reacción que se purificó en columna (AcOEt) para dar **6** (1.11 mg, 2.58 mmol) con un 65% de rendimiento.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 5.88-5.74 (m, 1H, CH=) 5.01-4.91 (m, 2H, CH₂=) 3.71-3.57 (m, 22H, CH₂O) 3.44 (t, 2H, J= 6.6 Hz), 2.73 (s, 1H, OH) 2.04-1.99 (m, 2H) 1.84 (s, 1H) 1.56 (=m, 2H) 1.25-1.17 (m, 12H).

¹ Pale- Grosdemange, C.; Simon, E.S.; Prime, K.L.; Whitesides, G.M., *JACS*, **1991**, *113*, 12-20.

Procedimiento general para la obtención de 1-(tioacetil-undec-11-il)oligoetilenglicol derivados. Síntesis de los espaciadores 11 y 12.

A distintas disoluciones de las olefinas **9** y **10** (2-4 mmol, 1 eq) en THF (20 mL) se le añade ácido tioacético (4 eq) y una cantidad catalítica de AIBN. La mezcla se deja agitando a reflujo 12 horas. Una vez terminada la reacción se concentra y se purifica en cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt para **5** y CH₂Cl₂ : MeOH al 5 % para **6**.

1-[tioacetil-undec-11-il] tri(etilenglicol) (11)¹

Partiendo de 0.90 g de olefina **9** (3.00 mmol) se obtuvo **11** como un sirupo (0.83g, 2.16 mmol, 72 %).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 3.43-3.25 (vm, 12H) 3.17 (t, 2h, *J* = 7.0 Hz) 3.17 (t, 2H, *J*= 7.0 Hz) 2.58 (t, 2H, *J*= 7.5 Hz, CH₂SAc) 2.04 (s, 3H, SAc) 1.31-1.26 (m, 4H) 1.06-0.97 (m, 16H).

1-[tioacetil-undec-11-il]hexa(etilenglicol) (12)¹

Partiendo de 1.11 g de olefina **10** (2.55 mmol) se obtuvo **12** como un sirupo (1.31g, 2.55 mmol, 100 %).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 3.68-3.53 (m, 24H) 3.40 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz) 2.82 (t, 2H, *J*= 7.0 Hz, CH₂SAc) 2.28 (s, 3H, SAc) 1.58-1.49 (m, 4H) 1.30-1.22 (m, 14H).

Procedimiento general para la desacetilaciones de los espaciadores 5, 8 y 11.

A una disolución de los espaciadores **5**, **8** o **11** (1 eq) en MeOH (10 mL) se le añadió 0.2 mL una solución metanólica de MeONa (1N) recién preparada. La reacción se deja agitar a temperatura ambiente durante 12 horas para completar la oxidación del grupo tiol. A continuación, se diluye con MeOH y se neutraliza con resinas ácidas

(Amberlist IR-20). El crudo de reacción se filtra y se concentra a sequedad aislando los compuestos como disulfuros.

11, 11'-ditio bis (undecanol) (13)

A partir de **5** (2 g, 10 mmol, 1 eq.) se obtiene **13** (2 g, 9.5 mmol, 95 %) como un sólido amorfo.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 2.57 (t, 2H, $J= 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{S}$) 1.45-1.37 (m, 2H) 1.06-0.89 (m, 18H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2$).

11, 11'-ditio-bis (3, 6, 9-trioxa-undecan-1-ol) (14)

A partir de **8** (1.5 g, 6 mmol, 1 eq) se obtiene **14** (1.2 g, 5.6 mmol, 93 %) como un sirupo.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3.71 (t, 2H, $J= 6.5$ Hz), 3.65-3.60 (m, 10H) 2.88 (t, 2H, $J= 6.0\text{Hz}$, CH_2S).

1,1'-ditio bis (undeca-11-il)trietilenglicol (15)

A partir de **11** (0.8 g, 2.16 mmol, 1 eq) se obtiene **15** (0.70 g, 2.07 mmol, 93 %) como un sirupo

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 3.75-3.45 (sm, 12H) 3.43 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz) 3.17 (t, 2H, $J= 7.0$ Hz) 2.68 (t, 2H, $J= 7.5$ Hz, CH_2S) 1.31-1.26 (m, 4H) 1.06-0.97 (m, 16H).

2.2.- Síntesis de los neoglicoconjugados de lactosa y maltosa.

Procedimiento general para la perbenzoilación de lactosa y maltosa. Compuestos 16 y 19.

A una solución de maltosa o lactosa (10 g, 27.7 mmol, 1 eq) en piridina (100 mL) a 0 °C, se le añade BzCl (40 mL, 332 mmol, 12 eq.) y una cantidad catalítica de DMAP. La reacción se deja agitando durante 20 h. hasta que en la CCF (AcOEt: hexano 1:1) aparezca un nuevo producto de Rf 0.5 según la CCF. La mezcla de reacción se diluye con AcOEt (500 mL) y se lava con agua (1 x 100 mL) con una disolución 2N de H₂SO₄ (1 x 100 mL) y una disolución saturada de NaHCO₃ (1 x 100 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra.

Benzoil (2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-β-D-galactopiranosil) (1→4) 2,3,6-tri-*O*-benzoyl-α-D-glucopiranosido (16): lactosa benzoilada

La purificación en cromatografía en gel de sílice (AcOEt: hexano 1:1) dio lugar a **16** (32 g, 27.7 mmol, cuantitativo).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.72-7.17 (m, 40H, Bz) 6.76 (d, 1H, *J*=3.6 Hz, H-1) 6.21 (dd, 1H, *J*= 10.2, 9.0 Hz, H-3) 5.80-5.74 (m, 2H, H-2', H-4') 5.62 (dd, 1H, *J*= 10.2, 3.6 Hz, H-2) 5.39 (dd, 1H, *J*=10.2, 3.3 Hz, H-3') 4.96 (d, *J*= 7.8 Hz, H-1') 4.56 (s, 2H, H-6a, H-6b) 4.40 (t, 1H, *J*= 9.0 Hz, H-4) 4.31(m, 1H, H-6') 3.92 (m, 1H, H-6') 3.83-3.73 (m, 2H, H-5, H-5').

Benzoil (2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-α-D-glucopiranosil) (1→4) 2,3,6-tri-*O*-benzoil-D-glucopiranosido (19): maltosa benzoilada

La columna de cromatografía (AcOEt: hexano 1:1) dio **19** (32 g, 27.7 mmol, cuantitativo) como una mezcla de anómeros α, β 1:1.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ= 8.25-7.10 (m, 80H; α+β Bz), 6.25 (d, 1H, *J*=7.0 Hz, H_β-1) 6.16 (t, 1H, *J*=10.0 Hz) 6.08 (m, 2H) 5.94 (d, 1H, *J*=3.5 Hz, H_α-1) 5.83 (t,

1H, $J=8.5$ Hz) 5.76 (d, 1H, $J=4.0$ Hz, H-1') 5.72 (t, 1H, $J=10.0$ Hz) 5.63 (m, 2H) 5.40 (dd, 1H $J=10.5$, 4.0 Hz) 5.25 (m, 2H) 4.88 (dd, 1H, $J=12.0$ Hz, 1.5 Hz) 4.78 (m, 2H) 4.66-4.56 (m, 3H) 4.49 (dd, 1H, $J=12.5$ Hz, 3.0 Hz) 4.43-4.35 (m, 4H) 4.22 (dd, 1H, $J=12.5$, 3.5 Hz) 4.09-4.06 (m, 3H).

Procedimiento general para las des-O-benzoilaciones selectivas en el carbono anomérico: Compuestos 17 y 20.

Los productos 16 o 19 (25 g, 21 mmol, 1 eq.) se disuelven en DMF (100 mL) y se le añade acetato de hidrazinio (5.9, 25.6 mmol, 1.2 eq.) en varias porciones. La reacción se calienta a 60°C y la reacción se controla por CCF (hexano: acetato de etilo 1:1) hasta que aparezca un nuevo producto de Rf menor. El crudo se diluye con AcOEt (200 mL) y se lava con agua (3 x 60 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra.

2,3,4,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactopiranosil (1→4) 2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranososa (17)

El crudo se purifica por cromatografía de columna (hexano: AcOEt 2: 1) dando lugar al compuesto deseado que se identificó como 17 (21g, 19.6 mmol, 90%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.07-7.25 (m, 35 H, Bz) 6.14 (t, 1H, $J= 9.6$ Hz, H-3) 5.77-5.68 (m, 2H, H-2', H-4') 5.62 (d, 1H, $J= 3.6$ Hz, H-1) 5.40 (dd, 1H, $J= 10.3$ Hz, 3.4 Hz, H-2) 5.24 (dd, 1H, $J= 7.2$, 3.6 Hz, H-3') 4.94 (d, 1H, $J= 7.8$ Hz, H-1') 4.59 (m, 1H, H-6a) 4.51 (dd, 1H, $J= 9.1$, 3.3 Hz, H-6b) 4.24 (t, 1H, $J= 9.6$ Hz, H-4) 3.94-3.67 (m, 2H, H-5, H-5').

2,3,4,6-tetra-O-benzoil-α-D-glucopiranosil (1→4) 2,3,6-tri-O-benzoil-D-glucopiranososa (20)

El crudo se purifica en una columna de gel de sílice usando como eluyente (hexano: AcOEt 2: 1) obteniéndose **20** (21 g, 19.6 mmol, 90 %) como una mezcla α , β 1:1.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.09-7.15 (m, 70 H, $\alpha+\beta$ Bz) 6.21- 6.16 (m, 1H) 6.14 (t, 1H, $J= 9.5$ Hz) 6.09 (t, 1H, $J= 8.0$ Hz) 6.08 (t, 1H, $J= 10.0$ Hz) 6.06 (t, 1H, $J= 10.0$ Hz) 5.92 (m, 1H) 5.77 (d, 1H, $J= 3.5$ Hz, H-1) 5.72 (t, 1H, $J= 10.0$ Hz) 5.69-5.62 (m, 2H) 5.51(d, 1H, $J= 3.5$ Hz, H-1') 5.42-5.38 (m, 1H) 5.25 (m, 2H) 4.61-4.50 (m, 4H) 4.47-4.31 (m, 4 H) 4.24 (dd, 1H, $J= 12.5$ Hz, 4.5 Hz) 3.96-3.91 (m, 1H)

Procedimiento general para la obtención de imidatos: Compuestos 18 y 21.

A una solución de **17** o **20** (10 g, 9.34 mmol, 1 eq.) en CH_2Cl_2 (40 mL) se añadió tricloroacetnitrilo (14 mL, 140 mmol, 15 eq.) y 2mL de un solución de DBU en CH_2Cl_2 (5 mL/10 mL). Después de 2h., la CCF (AcOEt: hexano 1:1) mostró la aparición de un nuevo producto de Rf 0.6.

Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- β -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 4) 2,3,6-tri-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo (18).

La mezcla de reacción se concentró a sequedad y se cromatografió en columna de gel de sílice usando como eluyente hexano: AcOEt 2:1 obteniéndose **18** (9.0 g, 7.47 mmol, 80%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.56 (s, 1H, NH) 8.03-7.16 (m, 35 H, Bz) 6.70 (d, 1H, $J= 3.6$ Hz, H-1) 6.15 (m, 1H, H-3) 5.74 (m, 2H, H-2',H-4') 5.54 (dd, 1H, $J= 10.3$ Hz, 3.4 Hz, H-2) 5.39 (dd, 1H, $J= 7.2, 3.6$ Hz, H-3') 4.94 (d, 1H, $J= 7.8$ Hz, H-1') 4.57 (m, 2H, H-6a ,H-6b) 4.34 (m, 2H, H-6'a,H-6'b,) 4.24 (t, 1H, $J= 9.6$ Hz, H-4) 3.92-3.67 (m, 2H, H-5, H-5').

Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 4) 2,3,6-tri-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo (21)

La mezcla se concentró a sequedad y se purificó en columna de gel de sílice usando como eluyente (hexano: AcOEt 2:1) obteniéndose **21** (9.0 g, 7.47 mmol, 80%).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.55 (s, 1H, NH) 8.10-7.21 (m, 35 H, Bz) 6.67 (d, 1H, $J= 3.5$ Hz, H-1') 6.12 (t, 1H, $J= 10.0$ Hz, H-3') 5.80 (d, 1H, $J= 3.5$ Hz, H-1) 5.70 (t, 1H, $J= 10.0$ Hz, H-4') 5.51 (dd, 1H, $J= 10.5$ Hz, 4.0Hz, H-2) 5.44 (dd, 1H, $J= 10.5$ Hz, 4.0 Hz) 4.86 (dd, 1H, $J= 7.5$, 1.0 Hz) 4.77 (dd, 1H, $J= 7.5$ Hz, 4.0 Hz, H-6) 4.45-4.37 (m, 3H) 4.15 (dd, 1H, $J= 7.5$ Hz, 3.5 Hz, H-6)

Procedimiento general para las glicosidaciones: Síntesis de los compuestos 22, 23 y 25.

A una solución de tricloroacetimidato **18** o **21** (1 eq.) y el aceptor **5**, **8** o **14** (1.5 eq) en CH_2Cl_2 anhidro (20 mL) se le añadió TMSOTf (0.04 eq) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después de 15 min., el crudo de reacción se concentró a sequedad y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice.

11-tioacetilundecanil 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- β -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 4) 2,3,6-tri-*O*-benzoil- β -D-glucopiranosido (22).

A partir del tricloroacetimidato **18** (3.5 g, 2.91 mmol) y el aceptor **5** (0.75 g, 3.5 mmol) se obtuvo el glicósido **22**. La cromatografía de columna (hexano: AcOEt 3:1) dio lugar al compuesto **22** (2.64 g, 2.03 mmol, 70%) como un sólido amorfo.

$[\alpha]_{\text{D}} + 49.2^\circ$ (c 1, CHCl_3)

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.20-7.10 (m, 35 H, Bz) 5.78 (t, 1H, $J= 9.5$ Hz, H-3) 5.70 (m, 2H, H-2', H-4') 5.43 (dd, 1H, $J= 10.0$, 8.0 Hz, H-2) 5.36 (dd, 1H, $J= 10.5$, 3.5 Hz, H-3') 4.85 (d, $J= 8.0$ Hz, H-1) 4.66 (d, 1H, $J= 8.0$ Hz, H-1') 4.58 (dd, 1H, $J= 10.5$, 2.0 Hz, H-6a) 4.47 (dd, 1H, $J= 12.3$, 4.3 Hz, H-6b) 4.23 (t, 1H, $J= 9.5$ Hz, H-4)

3.88-3.78 (m, 3H, H-5, H-5', CH₂O) 3.72 (dd, 1H, $J=11.0, 6.5$ Hz, H-6'a) 3.66 (dd, 1H, $J=11.2, 6.7$ Hz, H-6'b) 3.41 (m, 1H, -OCH₂) 2.83 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, CH₂S) 2.30 (s, 3H, SAc) 1.50-1.07 (m, 18H, CH₂CH₂).

¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃) δ : 196.1 (COS) 165.8, 165.5, 165.3, 165.1, 164.7 (Bz) 133.4, 133.3, 133.1, 129.9, 129.7, 129.6, 129.3, 128.7, 128.4, 128.2 101.1, 100.8 (C-1, C-1') 76.0, 12.9, 71.3, 70.2, 69.8, 62.4 (C-6) 61.0 (C-6') 31.8 (CH₃COS), 30.6, 29.6, 29.4, 29.1, 29.0, 28.7.

MALDI-TOF: 1320 [M+Na]⁺.

Anal. Calculado para C₇₄H₇₂O₁₉S (1297): C 68.4, H 5.6. Encontrado: C 68.3 H 5.6.

11-tioacetil-3,6,9-trioxa-undecanil 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 4) 2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosido (23).

A partir del tricloroacetimidato **18** (3.5 g, 2.91 mmol) y el aceptor **8** (0.86g, 3.49 mmol) se obtuvo **23**. La purificación en cromatografía de columna usando como eluyente (hexano: AcOEt 3:2) dio lugar **23** (3.4 g, 2.63 mmol, 80%) como un sólido amorfo.

$[\alpha]_D + 32.0^\circ$ (c 1, CHCl₃)

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.07-7.19(m, 35H, Bz) 5.76 (t, 1H, $J=9.5$ Hz, H-3) 5.70-5.66 (m, 2H, H-2', H-4') 5.42 (dd, 1H, $J=9.5, 8.0$ Hz, H-2) 5.33 (dd, 1H, $J=10.5, 3.5$ Hz, H-3') 4.84 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, H-1) 4.81 (d, 1H, $J=8.1$ Hz, H-1') 4.60 (m, 1H, H-6) 4.48 (m, 1H, H-6) 4.25 (t, 1H, $J=9.6$ Hz, H-4) 3.93-3.81 (m, 4H, H-5, H-5', H-6', H-6') 3.76-3.33 (m, 12H, 3 x CH₂O) 3.06 (t, 1H, $J=6.3$ Hz, CH₂S) 2.34 (s, 3H, SAc).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ : 171.1, 165.8, 165.4, 165.1, 165.2, 164.8, 133.5, 133.4, 133.1, 130.0, 129.7, 129.6, 130.0, 129.7, 129.6, 128.5, 128.3, 128.2, 101.2, 101.0 (C-1, C-1'), 76.1, 73.0, 71.8, 71.4, 70.6, 70.5, 70.4, 69.9, 69.7, 60.3, 67.5, 62.4, 61.1 (C-6, C-6') 60.4, 29.7 (CH₂S) 28.8 (SAc).

MALDI-TOF: 1327 [M + Na]⁺.

Anal. Calculado para C₇₁H₆₈O₂₂S. ½ H₂O (1313): C 64.6, H 5.3. Encontrado: C 64.6, H 5.3.

29-tioacetil- 3, 6, 9, 12, 15, 18 -hexaoxa-nonacosil 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactopiranosil (1→4) 2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosido (24).

A partir del tricloroacetimidato **18** (1.74 g, 1.45 mmol) y el aceptor **12** (1 g, 1.74 mmol) se obtuvo **24**. La purificación en cromatografía de columna usando como eluyente (hexano: AcOEt 3:2) dio lugar **24** (1.6 g, 1.01 mmol, 70%) como un sólido amorfo.

[α]_D + 20.0° (c 1, CHCl₃)

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.08-7.20 (m, 35H, Bz) 5.77 (t, 1H, *J*=10.0 Hz, H-3) 5.70-5.67 (m, 2H, H-2', H-4') 5.43 (t, 1H, *J*= 8.5 Hz, H-2) 5.34 (dd, 1H, *J*= 10.5, 3.0 Hz, H-3') 4.84 (d, 1H, *J*= 7.5 Hz, H-1) 4.67 (d, 1H, *J*= 8.1 Hz, H-1') 4.57 (d, 1H, *J*= 12.0 Hz, H-6) 4.45 (dd, 1H, *J*= 12.0, 4.5 Hz, H-6) 4.22 (t, 1H, *J*= 9.5 Hz, H-4) 3.90-3.78 (m, 2H) 3.70-3.30 (m, 28H) 2.83 (t, 2H, *J*= 7.0 Hz, CH₂S) 2.29 (s, 3H, SAc) 1.54-1.50 (m, 4H) 1.23 (s, 16H).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 1.97 (COS) 165.9 165.6 165.4 165.3 165.2 164.8 (Bz) 133.4 133.2 130.0 129.8 129.7 128.6 128.4 128.2 101.3 101.0 (C-1,C-1') 76.07 73.0 71.8 71.5 71.4 70.6 69.9 69.4 67.5 62.4 61.1 (C-6, C-6') 30.6 29.5 28.8 26.1.

MALDI-TOF (1562): 1587 [M + Na]⁺.

Anal. Calculado para C₈₆H₉₈O₂₅S. (1562): C 66.0, H 6.3. Encontrado: C 65.5, H 6.5.

11-tioacetilundecanil 2, 3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D- glucopiranosil (1 \rightarrow 4)- 2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosido (25).

A partir del tricloroacetimidato **21** (3.5g, 2.91 mmol) y el aceptor **5** (0.75g, 3.5 mmol) se obtiene el glicósido **25**. La columna de cromatografía (hexano: AcOEt 3:1) dio lugar a **18** (2.60 g, 2.03 mmol, 70%) como un sólido amorfo.

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.20-7.17 (m, 35H, Bz) 6.06 (t, 1H, $J= 10.0$ Hz, H-3') 5.73 (t, $J= 9.0$ Hz, H-3) 5.71 (d, 1H, $J= 3.5$ Hz, H-1') 5.62 (t, 1H, $J=10.0$ Hz, H-4') 5.28 (dd, 1H, $J= 10.0, 7.5$ Hz, H-2) 5.23 (dd, 1H, $J= 10.5$ Hz, 9.5 Hz, H-2') 4.89 (dd, 1H, $J= 12.0$ Hz, 2.5 Hz, H-6') 4.75 (d, 1H, $J= 7.5$ Hz, H-1) 4.72 (dd, $J= 12.5, 4.5$ Hz, H-6) 4.48 (t, $J= 9.0$ Hz, H-4) 4.44 (m, 1H, H-5') 4.37 (dd, 1H, $J= 12.0, 3.0$ Hz, H-6) 4.24 (dd, 1H, $J= 12.0$ Hz, 4.50-4.44 (m, 1H, H-5') 4.37 (dd, 1H, $J= 12.0, 3.0$ Hz, H-6) 4.24 (dd, 1H, $J= 12.0$ Hz, 4.5 Hz, H-6) 4.11- 4.06 (m, 2H, H-6, H-5) 3.85 (m, 1H, CH_2O) 3.46 (m, 1H, CH_2O) 2.81 (t, 2H, $J= 7.5$ Hz, CH_2S) 2.32 (t, 3H, SAc) 1.70-0.92 (m, 18 H, CH_2CH_2).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ : 196.0 (COS) 165.6, 165.0 (Bz) 133.3 133.2 133.0 129.9 129.8 129.7 129.5 128.9 128.5 128.3 128.1 128.0 100.7 96.3 (C-1, C-1') 75.0 73.2 72.3 70.8 70.1 69.9 69.0 63.5 62.5 (C-6, C-6') 30.6 (CH_2O) 29.3 29.1 20.0 28.7 (CH_2CH_2)

MALDI-TOF: 1320 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Procedimiento general para las desacilaciones: Síntesis de los compuestos 1, 2, 3 y 4.

A una solución de **22**, **23**, **24** o **25** (1 eq.) en MeOH seco (25 mL) se le añade 2 eq de una solución metanólica de NaOMe 1N. La reacción se deja agitando durante 24 horas sin atmósfera de argon para completar la oxidación del grupo tiol. Después de este tiempo, la CCF (CH_2Cl_2 : MeOH 30-35 %) muestra la aparición de un nuevo producto Rf 0.5. La reacción se neutraliza con resinas Amberlist IR-120, se filtra y se concentra a sequedad. El residuo se lava con éter (15 mL) para eliminar el benzoato de metilo.

11, 11'-ditio-bis [undecanil (β -D-galactopiranosil) (1 \rightarrow 4) β -D-glucopiranosido] (1).

Partiendo de **22** (3 g, 2.31 mmol) se obtiene el compuesto **1**. El producto precipita como un sólido blanco que se lava con etanol frío obteniéndose el disulfuro **1** (0.97 g, 1.84 mmol, 80%).

$[\alpha]_D - 5.3^\circ$ (c 0.9, MeOH)

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, MeOD) δ : 4.35 (d, 1H, $J=7.5$ Hz, H-1) 4.27 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H-1') 3.90-3.86 (m, 2H) 3.83 (dd, 1H) 3.80 (dd, 1H, $J=3.5, 0.5$ Hz, H-4') 3.76 (dd, 1H, $J=11.5, 8.0$ Hz, H-6) 3.68 (dd, 1H, $J=11.5, 5.0$ Hz, H-6') 3.38 (m, 1H, H-5) 3.22 (dd, 1H, $J=8.9, 8.0$ Hz, H-4') 2.57 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, CH_2S) 1.64-1.28 (m, 19 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, MeOD) δ : 105.9, 105.1, (C-1, C-1') 81.5, 77.9, 77.3, 75.6, 73.4, 71.8, 71.2, 63.4, 62.9, 56.6, 32.7, 31.9, 31.5, 31.1, 30.7, 28.0.

MALDI-TOF: 1096 $[\text{M} + \text{K}]^+$ 597.3 $[\text{M}/2 + 3 \text{Na}]^+$.

Anal. Calculado para $(\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{O}_{11}\text{S})_2$ (1054): C 52.0, H 8.3. Encontrado: C 51.7, H 8.3.

11,1'-ditio bis [3,6,9-trioxa-undecanil (β -D-galactopiranosil) (1 \rightarrow 4) β -D-glucopiranosido] (2)

Partiendo **23** (3 g, 2.68 mmol) se obtiene **2**. El producto precipita como un sólido blanco que se lava con etanol frío obteniéndose el disulfuro **2** (1.14 g, 2.14 mmol, 80%).

$[\alpha]_D - 4.0^\circ$ (c 0.7, MeOH)

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, D_2O) δ : 4.51 (d, 1H, $J=8.1$ Hz, H-1') 4.45 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, H-1) 4.04-4.00 (m, 1H, H-5) 3.98 (m, 1H, H-6) 3.92 (d, 1H, $J=3.0$ Hz, H-4) 3.38-3.20 (m, 1H, H-5') 2.98-2.71 (sm, 2H, CH_2S).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, MeOD) δ : 105.9, 105.1 (C-1, C-1') 81.5 (C-4) 77.9, 77.3, 77.1, 75.7, 75.6, 73.4 (C-2'), 72.8, 72.4, 72.1, 70.6 (CH_2O) 63.3, 62.8 (C-6', C-6).

MALDI-TOF: 1089 $[M + Na]^+$ 601 $[M/2 + 3Na]^+$.

Anal. Calculado para $(C_{20}H_{38}O_{14}S)_2 \cdot H_2O$ (1084): C 44.2 H: 7.2. Encontrado: C 44.0 H 7.7

29, 29'-ditio bis [3,6,9,12,15,18 -hexaoxa-undecanil (β -D-galactopiranosil) (1 \rightarrow 4) β -D-glucopiranosido] (3)

A partir del compuesto **24** (0.8 g, 0.5 mmol) se obtiene **3**. El producto precipita como un sólido blanco que se lava con etanol frío obteniéndose el disulfuro **3** (0.34 g, 0.42 mmol, 85%).

$[\alpha]_D -6.4^\circ$ (c 0.7, MeOH)

1H -RMN (500 MHz, D_2O) δ : 4.47 (d, 1H, $J= 8.0$ Hz, H-1') 4.41 (d, 1H, $J= 7.5$ Hz, H-1) 4.03 (m, 1H) 3.94 (m, 1H, H-6) 3.90 (d, 1H, $J= 3.0$ Hz, H-4') 3.82- 3.62 (m, 30H) 3.57- 3.50 (m, 4H) 3.46-3.43 (m, 2H,) 3.32 (t, 1H, $J=8.5$ Hz, H-4) 2.60-2.55 (m, 2H, CH_2S) 1.60-1.55 (m, 4H) 1.38-1.30 (m, 14H).

^{13}C -RMN (125 MHz, D_2O) δ : 102.6, 101.8 (C-1, C-1') 78.1 75.0 74.9 74.4 74.0 72.4 72.2 70.7 70.6 69.6 69.5 69.4 69.3 68.3 68.2 60.6 59.8(C-6, C-6') 30.5 29.5 29.3 29.2 29.0 28.9 28.5 25.8 25.7

MALDI-TOF: 1620 $[M + K]^+$ 860 $[M/2 + 3Na]^+$.

Anal. Calculado para $(C_{35}H_{67}O_{17}S)_2 \cdot H_2O$ (809): C 51.9 H: 8.5. Encontrado: C 51.8 H 8.9

11, 11'-ditio bis [undecanil (α -D-glucopiranosil) (1 \rightarrow 4) β -D-glucopiranosido] (4)

Partiendo de **25** (3 g, 2.31 mmol) se obtiene **4**. El producto precipita como un sólido blanco que se lava con etanol frío para dar el disulfuro **4** (0.97g, 1.84 mmol, 80%).

$[\alpha]_D + 57.3^\circ$ (c 1 MeOH)

^1H -RMN (500 MHz, MeOD) δ : 5.13 (d, 1H, J = 3.5 Hz, H-1') 4.24 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H-1) 3.41 (dd, 1H, J = 9.5, 3.5 Hz, H-2') 3.20 (t, 1H, J = 9.2 Hz, H-2) 2.65 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH_2S) 1.66-1.57 (m, 4H, CH_2CH_2) 1.38-1.29 (m, 14 H, CH_2CH_2).

^{13}C -RMN (125 MHz, MeOD) δ : 101.0, 99.6 (C-1, C-1') 78.0 74.5 73.3 71.4 70.8, 68.2 67.7 59.4 58.9 (C-6, C-6') 27.5 27.3 27.0 26.09 26.2 26.1 23,8

MALDI-TOF: 1077 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 595. $[\text{M}/2 + 3 \text{Na}]^+$.

Anal. Calculado para $(\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{O}_{11}\text{S})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1144): C 48.40, H 8.3. Encontrado: C 48.4, H 7.8.

3. Síntesis de gliconopartículas de oro

3.1. Procedimiento general para la síntesis de gliconopartículas de oro sólo con carbohidratos. Síntesis de las gliconopartículas 1-Au, 2-Au, 3-Au, 4-Au y 14-Au.

Una solución de tiolderivado (0.012M, 5.5 eq) en MeOH se le añade otra disolución de ácido tetracloroaurico (0.025 M, 1 eq). Se prepara una disolución de NaBH_4 (1 M, 22 eq) y se añade a la anterior en pequeñas porciones con rápida agitación. Aparece una suspensión negra y la reacción se agita durante 2 horas más. A continuación, se elimina el disolvente, bien decantando o concentrando el disolvente a sequedad. El sólido formado o el crudo de la reacción se purifica por filtración centrifugada (CENTRIPLUS MW 30000, 1h, 3000 x g), lavando con agua NANOPURE y con MeOH. El proceso se repite hasta que desaparezcan las sales y el material de partida (ausencia de señales de disulfuros y de Na^+ en ^1H -RMN y en ^{23}Na -RMN). El residuo que queda en el filtro del centriplus se disuelve en agua (2 mL) y se liofiliza. La fórmula molecular de las nanopartículas se calcula a partir de los datos obtenidos del TEM y de análisis elemental.

LactoC₁₁SAu. (1-Au).

A partir del disulfuro 1 (200 mg, 0.19 mmol) y HAuCl_4 (25mg, 0.073 mmol), se obtiene la nanopartícula 1-Au (17 mg, 2.22×10^{-4} mmol) como un polvo marrón oscura.

Diámetro medio y número de átomos de oro: 1.8 nm, 201.

UV (H₂O, λ = 520 nm, banda de surface plasmon)

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3414, 2921, 2850, 2360, 1639, 1425 1065. ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ : 4.50-4.42 (m, 2H, H-1, H-1') 4.1-3.3 (m, 11 H) 2.0-1.1 (m, 12H)

¹H-RMN (500 MHz, d₆- DMSO) δ : 5.04 (m, 2H) 4.73 (d, 1H, J = 4.5 Hz) 4.60 (m, 2H) 4.50-4.46 (m, 2H) 4.15 (d, 1H, J = 6.5 Hz, H-1) 4.12 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H-1') 3.70 (m, 2H) 3.56 (m, 2H) 3.49-3.26 (m, 5H) 2.95 (m, 1H, H-5) 2.64 (t, 1.2 H, J =7.0 Hz) y 2.52 (t, 0.7H, J = 7.0 Hz) [-CH₂S] 1.58-1.45 (m, 4H, CH₂CH₂) 1.25 (m, 16H, CH₂CH₂).

Anal. Calculado para (C₂₃H₄₄O₁₁S)₇₀Au₂₀₁ (76594): C 25.2, H 4.05. Encontrado C 25.1 H 4.40.

LactoEG₄SAu (2-Au)

A partir del disulfuro **2** (100 mg, 0.09 mmol) y HAuCl₄ (13.6 mg, 0.04 mmol) se obtiene **2-Au** (8 mg, 1.09 x10⁻⁴ mmol) como un polvo marrón oscuro. Diámetro medio y número de átomos de oro: 1.8 nm, 201. UV (H₂O, λ = 520 nm, banda de surface plasmon)

¹H-RMN (300MHz, D₂O) δ : 4.50-4.30 (bm, 2H, H-1, H-1') 4.10-3.35 (bm, 21 H) 3.26 (bm, 2H)

¹H-RMN (500 MHz, d₆-DMSO) δ : 5.06 (bm, 2H) 4.75 (bm, 1H) 4.65 (m, 2H) 4.18 (bm, 2H, H-1, H-1') 3.86 (m, 2H) 3.58-3.37 (m, 18H) 3.01 (bm, 1H) 2.61 (t, J =4.5Hz, CH₂S)

Anal. Calculado para (C₂₀H₃₇O₁₄S)₆₃Au₂₀₁ (73203) : 20.6, H 3.2. Encontrado C 20.7 H 3.6.

LactoEG6C11SAu (3-Au)

A partir del disulfuro **3** (70 mg, 0.088mmol) y HAuCl_4 (5.42 mg, 0.016 mmol) se obtiene **3-Au** (9 mg, 8.11×10^{-5} mmol) como un polvo negro.

Diámetro medio y número de átomos de oro: 2.2 nm, 201.

UV (H_2O , $\lambda = 520$ nm, banda de surface plasmon).

^1H -RMN (500MHz, D_2O) δ : 4.47 (d, 1H, $J = 7.5\text{Hz}$, H-1) 4.42 (d, 1H, $J = 7.5\text{Hz}$, H-1') 4.05-3.89 (m, 3 H) 3.82-3.46 (m, 35H) 3.34-3.31 (m, 1H) 2.73-2.67 (m, 0.8H) 1.72-1.04 (m, 16H).

Anal. Calcd para $(\text{C}_{35}\text{H}_{67}\text{O}_{17}\text{S})_{90}\text{Au}_{202}$ (110984) : C 34.0, H 5.43 Encontrado C 33.40 H 5.6

MaltoC₁₁SAu (4-Au).

A partir del compuesto **4** (50 mg, 0.1 mmol) y HAuCl_4 (6.16mg, 0.018 mmol), se obtiene **4-Au** (12 mg, 2.09×10^{-4} mmol) como un polvo marrón.

El diámetro medio y el número de átomos de oro fue <1.3 nm, <79 átomos. UV (H_2O , $\lambda = 520$ nm, banda de surface plasmon)

^1H -RMN(500 MHz, D_2O) δ : 5.33 (bs, 1H, H-1') 4.37 (bs, 1H, H-1) 3.87- 3.33 (m, 15H) 2.70 (bs, 2H CH_2S) 1.65-1.33 (bm, 19H)

^1H -RMN (500 MHz, d_6 -DMSO) δ : 5.44 (s, 1H) 4.39 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz) 5.00 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz) 4.96 (s, 1H) 4.85 (m, 2H) 4.47-4.40 (m, 2H) 4.09 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-1) 3.72-3.64 (m, 2H) 3.57-3.50 (m, 3H) 3.02-2.92 (m, 3H) 2.64 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH_2S) 1.57-1.44 (m, 4H, CH_2CH_2) 1.10 (m, 16H, CH_2CH_2).

Anal. Calculado para $(\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_{11}\text{S})_n \text{Au}_n$ ($n < 79$, $n \cdot 724$) : C 39.0. H 6.07. Encontrado C 39.5 H 6.07.

EG₄-SAu (14-Au).

Partiendo del disulfuro **14** (50 mg, 0.21 mmol) y H₂AuCl₄ (21.7 mg, 0.06 mmol) se obtiene **14-Au** (16mg) como un polvo violeta oscuro.

Diámetro medio y n° de átomos de oro: 2 y 7 nm.

UV (H₂O, λ= 515 nm, banda de surface plasmon)

¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ: 4.00-3.00 (bm, 14H).

¹H-RMN (500 MHz, d₆-DMSO) δ: 4.50 (bm, 1H), 4.00-3.00 (bm, 14H).

3.2. Procedimiento general para la síntesis de gliconanopartículas de diferente densidad. Gliconanopartículas 1-Au-13, 1-Au-14, y 3-Au-13 (5%, 15% y 30% en lactosa).

Una mezcla de los tiolderivados en diferentes concentraciones (5.5 eq) se disuelve en MeOH y se le añade una disolución de ácido tetracloroaurico (1 eq). A continuación se añade NaBH₄ (22 eq) en varias porciones agitando rápidamente. La reacción se deja agitando durante 2 horas más. Al cabo de este tiempo se decanta o se evapora el disolvente. El residuo (20- 50 mg de crudo) se disuelve en 10 mL agua NANOPURE y se purifica por filtración centrifugada (CENTRIPLUS MW >10000, 1h, 3000 x g). El proceso se repite hasta que las nanopartículas no tengan sales o restos de producto de partida (ausencia de señales de disulfuro y de Na⁺ in ¹H a-RMN and ²³Na-RMN). El residuo que queda en el filtro se disuelve en agua (2 mL) y se liofiliza. La proporción molar entre los dos lípidos en la nanopartícula se calcula por integración de la señales correspondiente al los protones anoméricos del azúcar y los correspondientes a la otra molécula.

Lacto-C₁₁-S-Au-SC₁₁OH (1-Au-13)

A partir de **1** (53mg, 0.1 mmol) y **5** (17 mg, 0.1 mmol) en una relación 1:1, y H₂AuCl₄ (13.6 mg, 0.04 mmol) se obtiene **1-Au-13** (11.2 mg).

Diámetro medio y número de átomos de oro: 2nm, 201-225.

UV (DMSO, $\lambda = 524$ nm, banda surface plasmon)

La relación **1/9** fue 1:1.2 calculada por integración entre las señales correspondientes a los protones anoméricos de la lactosa y el triplete correspondiente al metileno más cercano al oro. Esta nanopartícula es insoluble en agua pero es soluble en DMSO.

^1H -RMN (500 MHz, d_6 -DMSO) δ : 5.03 (m, 2H) 4.59 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz) 4.61 (m, 2H) 4.51-4.47 (m, 2H) 4.36-4.33 (m, 1H) 4.15 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz, H-1) 4.12 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz, H-1') 3.71-3.68 (m, 2H) 3.50-3.42 (sm, 8H) 2.96 (m, 1H) 2.65 (t, 4 H, $J = 7.0$ Hz, CH_2S) 1.59-1.54 (m, 4H) 1.48-1.45 (m, 4H) 1.35-1.21 (m, 37H).

Lacto- $\text{C}_{11}\text{S-Au-SEG}_4$ (1-Au-14)

A partir de **1** (40mg, 0.075 mmol) y **14** (16 mg, 0.075 mmol) en una proporción 1:1, y HAuCl_4 (9.75 mg, 0.03 mmol) se obtiene **1-Au-14** (11.2 mg).

Diámetro medio y número de átomos de oro (2-5 nm).

UV (DMSO, $\lambda = 524$ nm, banda surface plasmon).

La relación **1/14** no se pudo determinar debido a que las señales correspondientes al tetraetilenglicol se solapan con las señales del disolvente den el espectro.

^1H -RMN (500 MHz, D_2O) δ : 4.50-4.42 (m, 2H, H-1, H-1') 4.1-3.3 (m, 11 H) 2.0-1.1 (m, 12H).

^1H -NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) δ : 5.04 (m, 2H) 4.75 (bm, 1H) 4.62 (bs, 2H) 4.51-4.47 (m, 2H) 4.15 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-1) 4.12 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-1') 3.72-3.68 (m, 3H) 3.50-3.36 (sm, 6H) 2.95 (m, 1H, H-5) 2.64 (t, 0.6 H, $J = 7.5$ Hz) 2.53 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH_2S) 1.58-1.45 (m, 4H, CH_2CH_2) 1.25 (m, 16H, CH_2CH_2).

Lacto-EG₆C₁₁S- Au-SC₁₁EG₃OH (3-Au-15).

Se prepararon tres nanopartículas distintas que difieren en la cantidad de lactosa que llevan: Nanopartículas con un 5 %, 15 % y un 30 % en lactosa. La cantidad de lactosa en la nanopartícula fue estimada como la cantidad inicial añadida.

3-Au-15 (5% lacto).

A partir de **3** (12 mg, 0.015 mmol) y **15** (100 mg, 0.300 mmol) en una proporción de 5: 95 y H_{Au}Cl₄ (19.55 mg, 0.057 mmol) se obtiene **3-Au-15** (5.2 mg) manteniendo la relación inicial, 5% en lactosa. La relación pudo ser determinada aproximadamente por la integración de las señales correspondientes al los protones anoméricos de la lactosa y los protones correspondientes a la parte de trietilenglicol. Son de un color beige, soluble en mezclas de H₂O: MeOH.

Diámetro medio y número de átomos de oro: 1.66 nm, 140 átomos.

UV ($\lambda = 400$ nm, banda de surface plasmon)

¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ : 4.05-3.54 (sm,) 3.34 (m, 3H) 1.89-1.34 (bm).

3-Au-15 (15% lacto).

A partir de **3** (12 mg, 0.015 mmol) y **15** (33 mg, 0.100 mmol) en una proporción de 15: 85, y H_{Au}Cl₄ (7.05 mg, 0.021 mmol) se obtiene **3-Au-15** (5.2 mg) con la misma relación inicial, 15 % en lactosa. La relación pudo ser determinada aproximadamente por la integración de las señales correspondientes a los protones anoméricos de la lactosa y los protones correspondientes a la parte de trietilenglicol. Son de un color beige, y tienen una disolución transparente. Solubles en H₂O.

Diámetro medio y número de átomos de oro: 1.5 nm, 116 átomos.

UV ($\lambda = 400$ nm, banda de surface plasmon)

^1H -RMN (500 MHz, D_2O) δ : 4.50-4.43 (2d, 2H, H-1, H-1') 4.05-3.54 (sm, 100 H) 3.34 (m, 3H) 1.89-1.34 (bm).

3-Au-15 (30% lacto).

A partir de **3** (10.7 mg, 0.014 mmol) y **15** (15 mg, 0.045 mmol) en una proporción de 30: 70 y HAuCl_4 (7.54 mg, 0.016 mmol de oro) se obtiene **3-Au-15** (12.6 mg) en la misma relación inicial, 30% en lactosa. La relación pudo ser determinada aproximadamente por la integración de las señales correspondientes al los protones anoméricos de la lactosa y los protones correspondientes a la parte de trietilenglicol. Son de un color beige, y tienen una disolución transparente.

Diámetro medio y número de átomos de oro (1.5 nm, 116 átomos).

UV($\lambda = 400$ nm, banda de surface plasmon) ^1H -RMN (500 MHz, D_2O) δ : 4.50-4.43 (2d, 2H, H-1, H-1') 4.05-3.54 (sm, 168 H) 3.34 (m, 3H) 2.70 (bs, 9H) 1.89-1.34 (bm, 94H).

4.- Aplicación de las gliconanopartículas al estudio de interacción carbohidrato-proteína

4.1.- Estudios enzimáticos: Hidrólisis enzimática de los neoglicoconjugados y las gliconanopartículas correspondientes con β -galactosidasa.

4.1.1- Calibrado de galactosa con la enzima galactohidrogenasa

Se prepara una disolución stock de galactosa (gal) 10 mM en tampón NaPi y se preparan disoluciones: 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 mM.

En una cubeta se añade 35 μ L de cada una de estas disoluciones, 70 μ L de una disolución 10mM de NAD en Tris pH 8.8 y 550 μ L de Tris 100mM pH 8.8, y se mide la formación de NADH a $\lambda = 340$ nm durante 45 min.

4.1.2.- Hidrólisis enzimática de los lactósidos 1, 2, 3 y sus correspondientes lactonanopartículas 1-Au, 2-Au y 3-Au. Hidrólisis enzimática de nanopartículas con distinta densidad en lactosa.

Método de ensayo.- Se trata de la hidrólisis de compuestos que llevan una unidad galactosa utilizando la enzima β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) de *E. Coli*. La liberación de galactosa se determina por un ensayo acoplado a la enzima galactosadeshidrogenasa².

Determinación enzimática de la liberación de galactosa.

Reactivos y tampones.

1.- 1mM MgCl₂, tampón NaPi (tampón fosfato) 50mM, pH 7.2

2.- tampón Tris-HCl (tris(hidroximetil)aminometano)), 0.1 M, pH 8.8

3.- NAD (nicotín adenina dinucleótido) 0.01 M

² Distler, J.J.; Jourdan. G.W., *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 6772-6780.

4.- Galactodeshidrogenasa (E.C. 1.1.1. 48) de *Pseudomonas fluorescens*, 1.1 mg/mL.

Procedimiento.- Un volumen de una preparación de enzima β -galactosidasa (300- 600 unidades) (0.01-0.1 mg/mL) se añade a un volumen del sustrato galactosídico (35-45 μ L). La reacción se deja incubando 30 minutos a 37°C y se para añadiendo Tris-HCl frío. A continuación se añade una disolución de NAD 10 mM en Tris.HCl a pH 8.8 y se trasvasa todo a una cubeta. Se deja atemperar 5 minutos a 30°, y se añade 7 μ L de galactodeshidrogenasa (GDH) (1mg/1mL). La producción de NADH se sigue midiendo la absorbancia a 340 nm durante 40 minutos más hasta que se consiga la oxidación completa de la galactosa liberada. En el caso donde los sustratos son las lactonanopartículas, una vez que termine la reacción, se añade el tampón tris y se filtra a través de membranas de corte molecular 30000. El volumen filtrado se trasvasa a una cubeta y se determina la liberación de galactosa de la misma forma que para los sustratos anteriores. El control se realizó añadiendo tampón NaPi, en lugar del sustrato galactosídico. La actividad específica de la enzima se determina por la siguiente fórmula donde ϵ es la pendiente obtenida en el calibrado de galactosa realizado con la enzima galactodeshidrogenasa.

$$Act.específica : \frac{\Delta Abs \times V_t}{\epsilon(NADH) \times t_r \times mgE}$$

V_r = volumen de detección

t_r = tiempo de reacción

mgE = miligramos de enzima

En la siguiente tabla aparecen los sustratos galactosídicos y los volúmenes tanto de reacción como de detección utilizados en estos experimentos.

Sustrato (2 mM en lactosa)	Volumen de sustrato (μL)	β -galactosidasa (μL)	Vreacción (μL)	Volumen de detección	Tiempo de incubación	GDH (μL)
Lactosa	35	5 (0.01 mg/mL)	40	347	30	7
lacC11S 1	35	10 (0.01 mg/mL)	45	352	30	7
lacEG4S 2	35	10 (0.01 mg/mL)	45	352	30	7
lacEG6C11S 3	35	10 (0.1 mg/mL)	45	352	60	7
1-Au	45	10 (0.1 mg/mL)	55	397	30	7
2-Au	45	10 (0.1 mg/mL)	55	397	30	7
3-Au	45	10 (0.1 mg/mL)	55	397	60	7

En el experimento de hidrólisis enzimática con nanopartículas de distinta densidad se utilizaron los siguientes sustratos y cantidades:

Sustrato (1 mM en lactosa)	β -galactosidasa (μL)	Vreacción (μL)	Volumen de detección	Tiempo de incubación	GDH (μL)
lacEG6C11S 3	20 (0.1 mg/mL)	46	450	60	7
3-Au-15 (30%)	20 (0.1 mg/mL)	55	450	60	7
3-Au	20 (0.1 mg/mL)	55	450	60	7

4.2.- Inhibición de la unión de lectinas a sus ligandos utilizando los neoglicoconjugados y las gliconanopartículas como inhibidores.

4.2.1. Marcaje de las lectinas: *Viscum Album* Aglutinina (VAA) y toxina del cólera subunidad B (CT) con ^{125}I .

La lectina se marca con I^{125} utilizando Yodo-gen (Pierce). En un eppendorf se prepara una película de iodogen añadiendo 100 μL de una solución de éste en cloroformo (0.5 mg/mL) y evaporando totalmente el disolvente en un desecador a vacío. Inmediatamente antes de su utilización la película se lavó con 100 μL de una disolución de PBS y se añadieron 100 μL de la solución de lectina en PBS que contenía lactosa 0.1 M (en el caso de la VAA) o de galactosa 0.1 M en el caso de CT y 10 μL de una solución de 125-I en NaOH (20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$).

Después de 15 min a temperatura ambiente, con agitación ocasional, la mezcla se separó del reactivo de yodación y se añadieron 100 μL de yoduro potásico 2.75 mM para diluir el 125-I no incorporado. El yodo libre se separó de la proteína en una columna de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia) equilibrada primero con 5 mL de PBS conteniendo BSA al 3% y en segundo lugar con 20 mL de PBS.

Para comprobar el estado de la ^{125}I -VAA, la fracción de proteína marcada se sometió a SDS-PAGE. El gel, una vez seco, se puso en contacto con una película Cronex 4, en una pantalla intensificadora Dupont Cronex y se mantuvo a -70°C durante el tiempo necesario.

4.2.2. Inhibición de la unión de la VAA a asialofetaina utilizando los tiolderivados y las correspondientes nanopartículas.

La afinidad de la lectina por diferentes ligandos se ha calculado determinando la capacidad de éstos para inhibir la unión de la ^{125}I -VAA a asialofetuina (ASFe). La asialofetuina se inmoviliza en placas de microtitulación PVC (polivinilcloruro, Flow). En cada pocillo se añade 50 μL de una solución de ASFe (0.1 mg/mL) en PBS y se incuban a 4 °C durante 16 horas. A esta concentración de ASFe la unión de la lectina ha alcanzado un valor máximo y no varía apreciablemente con pequeños cambios en la concentración de ASFe inmovilizado en el pocillo. Los pocillos se lavan cinco veces con PBS y se bloquean a 37°C durante 1 hora con 0.2 mL de BSA al 3% (w/v) en PBS. Transcurrido este tiempo se retira la solución de BSA y los pocillos se incuban a 20°C durante 2 horas con 10 μL de ^{125}I -VAA (20000 cpm) en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de los diferentes inhibidores. La placa se lava cinco veces con PBS y se mide la cantidad de ^{125}I -VAA unida al pocillo. El porcentaje de unión no específica determinado en presencia de lactosa 0.1M fue siempre menor del 2%.

Ensayo de inhibición.

Se realizó ensayos de inhibición de la unión de la lectina a su ligando con las nanopartículas **1**, **2**, **3** y **4-Au** y los neoglicoconjugados de lactosa **2** y **3**. Se utilizaron distintas concentraciones en tres experimentos distintos y los resultados se pueden incluir en las mismas gráficas por lo que se puede considerar el experimento como reproducible. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y utilizando como blanco el 100% de unión de la VAA a ASFe.

Para calcular la potencia relativa a la lactosa, se calculó el IC_{50} y el IC_{75} que se definen como la concentración necesaria para inhibir el 50 o el 75 % de la unión de la lectina a ASFe. Estos parámetros fueron determinados representando la zona lineal de la curva correspondiente a esa concentración. El cálculo de los parámetros se ha comentado en la sección de Discusión y resultados.

4.3. Inhibición de la unión de la ct a ligandos utilizando las nanopartículas. estudios preliminares.

4.3. 1.- Valoración de la unión de la CTB con los glicoconjugados y nanopartículas

Una disolución (1000 μL) de la CTB (0.5 μM) en tampón Tris·HCl 50 mM, pH 7.5, 0.15 M NaCl) se trasvasa a una cubeta (1 x 1cm). Se realiza un barrido del espectro de fluorescencia entre 300 y 400 nm, usando una longitud de onda de excitación de 282 nm manteniendo la temperatura a 23°C. A continuación se añadieron a esta disolución, adiciones crecientes (>10 puntos) de una solución que contiene lactosa (o derivados) y CTB (0.5 μM) hasta llegar a un 75% de saturación. El espectro de fluorescencia se barrió con una velocidad de cuatro scans de 50 nm/ min. Todas las valoraciones se realizaron por duplicado. Las muestras se dejan incubar durante 10 minutos después de cada adición y antes de cada medida. Los datos de fluorescencia a 346 nm se utilizaron para determinar la constante de afinidad aparente (K_d) obtenida a partir del análisis de la curva.

4.3.2.- Marcaje radiactivo de la CTB (ver parte 4.2).

4.3.3- Curva de unión de ^{125}I -CTB al glicosfingolípido GM1.

La afinidad de la cólera por su receptor GM1 se estimó por la capacidad que tiene ésta de unirse a dicho glicosfingolípido inmovilizado en pocillos. La inmovilización se realizó añadiendo 50 μL de distintas concentraciones de GM1 en cada pocillo. El glicosfingolípido se disuelve en una mezcla de cloroformo: metanol (1:1) y las diluciones se llevan con etanol. Una vez añadido, se deja evaporar el etanol a 37°C durante una noche. Los pocillos se lavan cinco veces con PBS y se bloquea con 200 μL de una solución de BSA al 3% (w/v) en PBS. Se deja una hora incubando a 37°C. Transcurrido este tiempo se retire el BSA y se añaden 50 μL de una disolución de CT (20000 cpm). La placa se deja incubando dos horas a temperatura ambiente y a continuación se lava cinco veces con PBS y se mide la cantidad de ^{125}I -CT unida al pocillo. En este ensayo, los datos se representan como el cociente entre las cpm unidas/cpm añadidas frente a los μg de GM1 inmovilizados en los pocillos (ver discusión y resultados).

4.3.4.- Estudios de unión de la ^{125}I -CT a lactosa-agarosa. Estudios de inhibición.

La afinidad de la cólera por la lactosa y las nanopartículas se estimó por la determinación de la cantidad de ^{125}I -CT unida a lactosa-agarosa en presencia de distintas concentraciones de azúcar. La lactosa se inmovilizó en agarosa (5mg/mL, SIGMA). Se recoge un volumen determinado de lactosa-agarosa (dilución 1:5) en PBS y se introducen en eppendorf y se centrifugan 3 min a 2500 rpm. A continuación se elimina un volumen determinado del sobrenadante y se añaden otro volumen de distintas concentraciones del posible inhibidor. Se añade 10 μL de una disolución que lleva ^{125}I -CT en PBS y 0.5 % de Tween al 10 % (w/v). La mezcla se deja incubar dos horas a 20 °C agitando ocasionalmente. Transcurrido este tiempo, se centrifuga 3 min. a 13000 rpm, se recogen un volumen del sobrenadante y se mide la cantidad de CT no unida a la lac-agarosa. La curva de unión se realiza representando 1-cpmunidas/cpmañadidas frente a concentración de lactosa, o bien el % de inhibición frente a concentración de lactosa.

Curva de unión ^{125}I -CT con lactosa-agarosa.

Se cogen varios eppendorf con un volumen determinado de lactosa-agarosa con una dilución 1: 5 en PBS. Estos volúmenes son. 1mL, 0,75 mL, 0,5 mL, 0,250 mL y 0,100 mL de lactosa-Agarosa. Se centrifuga unos minutos y se elimina un volumen determinado para que el volumen final sea de 0.5 mL. A es volumen final se le añade 10 μL de una disolución que lleva ^{125}I -CT (60000 cpm), Tween 10 % y PBS. Se deja incubando 2 horas con agitación ocasional. Transcurrido este tiempo, se centrifuga y se recogen 10 μL del sobrenadante y se cuenta. Se representa 1-(cpmunidas /cpmañadidas) (que representa la unión a lac-agarosa) frente los μL de lactosa-agarosa añadidos.

Curva de inhibición de la unión de 125 -CT a lactosa-agarosa, utilizando lactosa como inhibidor:

Se cogen varios eppendorfs y se añade 0.5 mL de lactosa-agarosa, se centrifuga unos minutos y se elimina del sobrenadante el volumen necesario añadir un volumen igual de distintas concentraciones de lactosa. Estas concentraciones son: 0, 8,3 mM, 25mM, 83,3 mM, 200 mM y 208 mM. A continuación se le añade 10 μ L de una disolución que lleva 125 I-CT, Tween 10 % y PBS. Se deja incubar 2 horas a 20°C agitando ocasionalmente. Al cabo de este tiempo, se centrifuga, se recogen 10 μ L del sobrenadante y se cuenta en un lector de rayos γ .

Curva de inhibición de la unión de 125 -CT a lactosa-agarosa, utilizando nanopartículas 1-Au, 2-Au y 3-Au.

Varios eppendorfs que llevan 50 μ L de lac-agarosa, se centrifugan y se quitan 25 μ L de sobrenadante y se añaden 25 de distintas concentraciones de las nanopartículas **1-Au, 2-Au y 3-Au**. y 10 μ L de una solución de 125 -CT(60000 cpm), Tween 10 % y PBS. Estas concentraciones que se añadieron de los inhibidores fueron 10, 25 y 50 μ M en nanopartícula. Se deja incubando con agitación ocasional dos horas a 20°C. Al cabo de este tiempo, se centrifuga y se recogen 10 μ L del sobrenadante y se cuenta. La curva se realiza representado el % inhibición frente a concentración de lactosa en nanopartícula

5.- Aplicación de las gliconanopartículas al estudio de interacción carbohidrato-carbohidrato.

5.1.-Evaluación de la interacción carbohidrato-carbohidrato mediante AFM.

Los experimentos se realizaron con un microscopio de fuerzas atómicas PicoSPM (Molecular Imaging), con una célula de líquidos Teflon.

Para la preparación de las superficies de oro, se crecieron películas de oro sobre soportes de mica (1.2 x 1 cm) recién exfoliada, por el método de evaporación térmica. La mica se mantiene 2 h a 300 °C con el fin de desorber los contaminantes de la superficie y después se evaporan 200 nm de oro a la misma temperatura con un ritmo de deposición de 0.1 nm/s. Se somete a la superficie a un recocido a 300 °C, obteniéndose superficies de oro con terrazas planas. Después se limpian estas placas con 5 mL de EtOH y se secan con N₂. Se sumergen los soportes de oro en 5 mL de una disolución 1 mM de los neoglicoconjugados (**1** (*lacto*C₁₁S) y **2** (*lacto*EG4S)) y del espaciador **14** (EG4S) en EtOH durante 24 h. Se secan los soportes seguidamente, se lavan con 5 mL de EtOH y se secan con N₂.

Se emplearon micropalanca comerciales de nitruro de silicio (Olympus) que tienen forma rectangular de 200 µm de longitud con una constante de resorte nominal de 0.05 N m⁻¹. Esta constante de resorte real se calibró de acuerdo al comportamiento dinámico de la micropalanca y al teorema de equipartición.^{3,4} Las puntas fueron recubiertas con una capa de 5 nm de grosor de cromo y después con una capa de 25 nm de grosor de oro y se funcionalizaron de una manera similar a la presentada anteriormente.

5.2. Estudio de la interacción carbohidrato-carbohidrato por biosensores basados en resonancia del plasmón de superficie (SPR).

Los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un instrumento BIAcore (BIA sensor AB, Uppsala) a 25 °C en el Departamento de Inmunología y Oncología del

³ Hutter, J.L.; Bechhoefer, J. *Rev Sci Instrum*, **1993**, *64*, 1868-1873

⁴ Walters, D.A.; Cleveland, J.P.; Thomson, N.H.; Hansma, P.K.; Wendman, M.A.; Gurley, G.; Elings, V. *Rev Sci Instrum*, **1996**, *67*, 3583-3590

Centro Nacional de Biotecnología de Madrid. Se emplearon chips J1 sobre los cuales se funcionalizó el neoglicoconjugado de lactosa 1 (*lactoC₁₁S*) a una velocidad de flujo de 3 $\mu\text{L min}^{-1}$ hasta respuesta constante de SPR 794 RU. Para cubrir los posibles huecos sobre la superficie de oro, se continuó la inmovilización por inyección de una disolución de metanol (50 %) de 11-tio-3,6,9-trioxaundecanol (**14**) (2 mg mL⁻¹). En otra célula de flujo, se inmovilizó esta cadena para eliminar así posibles interacciones inespecíficas entre la cadena y los carbohidratos. En una última célula de flujo del chip se trató con tampón solo para servir como un segundo control.

En un experimento típico, una inyección de 15 μL de ligando a diferentes concentraciones (3.7, 3.1, 2.4, 2.0, 1.5, 1.0 mM para los ligandos monovalentes y 1.8, 1.2, 0.9, 0.4, 0.1 μM para las gliconanopartículas) en Hepes (10 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl sin y con 10 mM CaCl₂) a una velocidad de flujo de 3 $\mu\text{L min}^{-1}$. Al final de cada inyección de muestra, la superficie del chip se lavó continuamente con tampón para producir la disociación. Después de la fase de disociación la superficie del chip se regeneró para la siguiente muestra de ligando por tres inyecciones secuenciales (10 μL de EDTA 10 mM, 70 % metanol en agua, y Hepes). La respuesta se monitorizó como una función del tiempo (sensorgrama) a 25 °C. Los datos de las células de control se usaron para estimar la contribución de las interacciones no específicas con las superficies de oro y de cadenas. Los parámetros cinéticos se determinaron mediante el software Biacore BIAevaluation de Biacore (Versión 3.0.2, 1999).

6.- Validación de las gliconanopartículas como herramienta antiadhesiva a un modelo de metástasis de pulmón de melanoma de ratón.

Líneas celulares y condiciones de cultivo.

La línea celular B16F10 de melanoma de ratón se adquirió en American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se mantuvo en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Life Technologies, Inc), que contiene un 10% de suero fetal vacuno (FCS; Gibco-BRL; Gaithersburg, MD), 1% L-glutamina (Merck, Darmstadt, Germany), estreptomina (0.1mg/mL, Sigma, St. Louis, MO), penicilina (100 U/ mL,

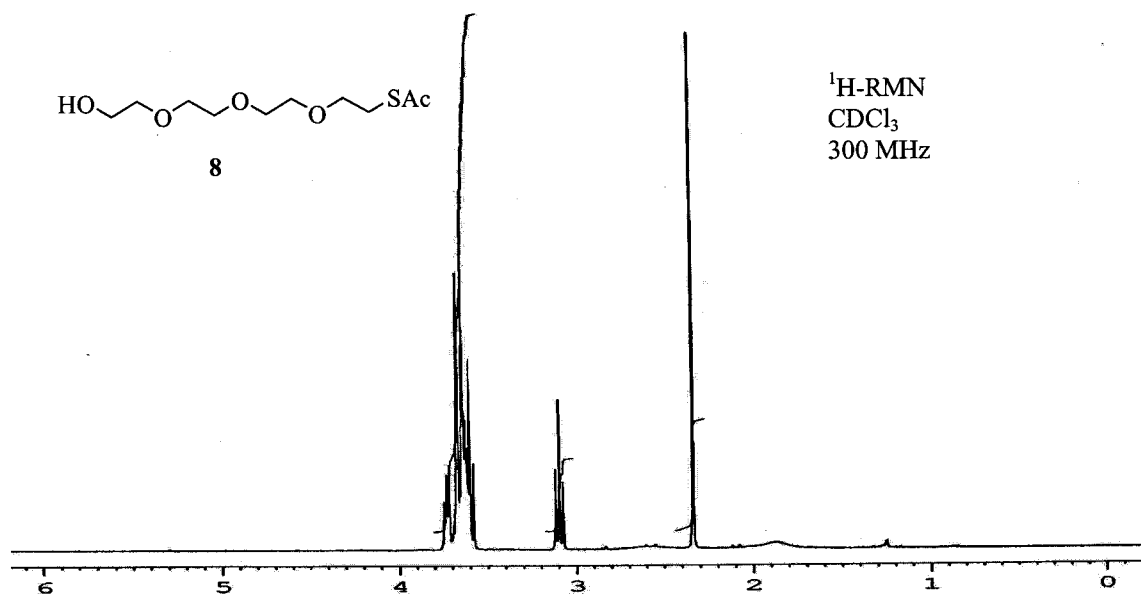
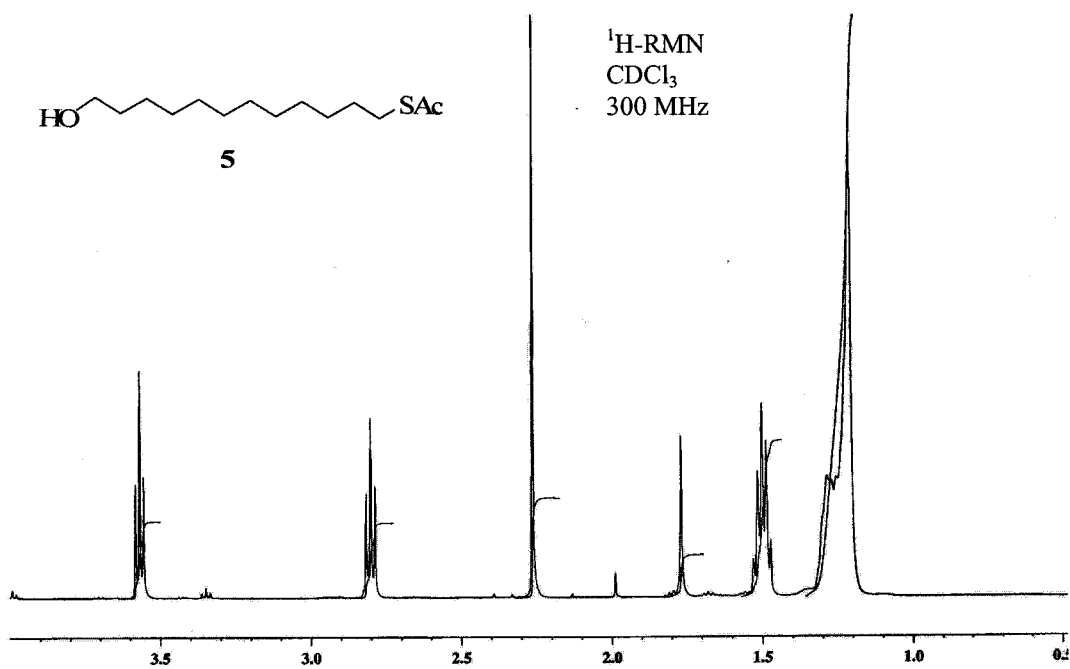
Sigma), 1% piruvato sódico (Sigma), 1% de aminoácidos no esenciales (Bio-Wittaker, Walkersville, MD) y β -mercaptoetanol. La línea celular se creció en un incubador humidificado a 37°C con un 5% de CO₂ y se testó la ausencia de microplasma mediante kits específicos comerciales.

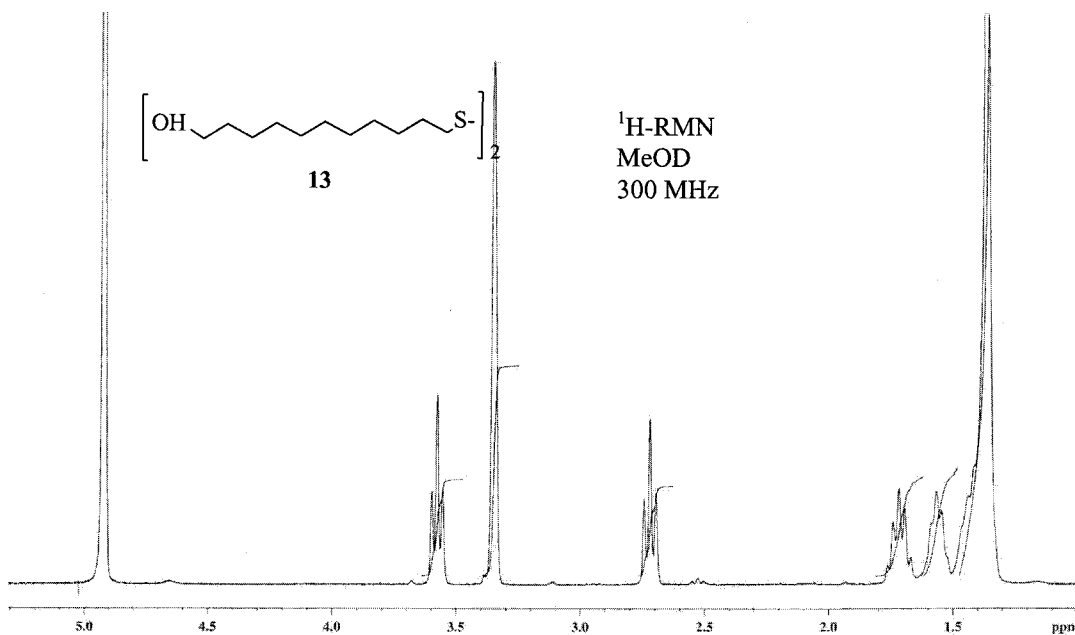
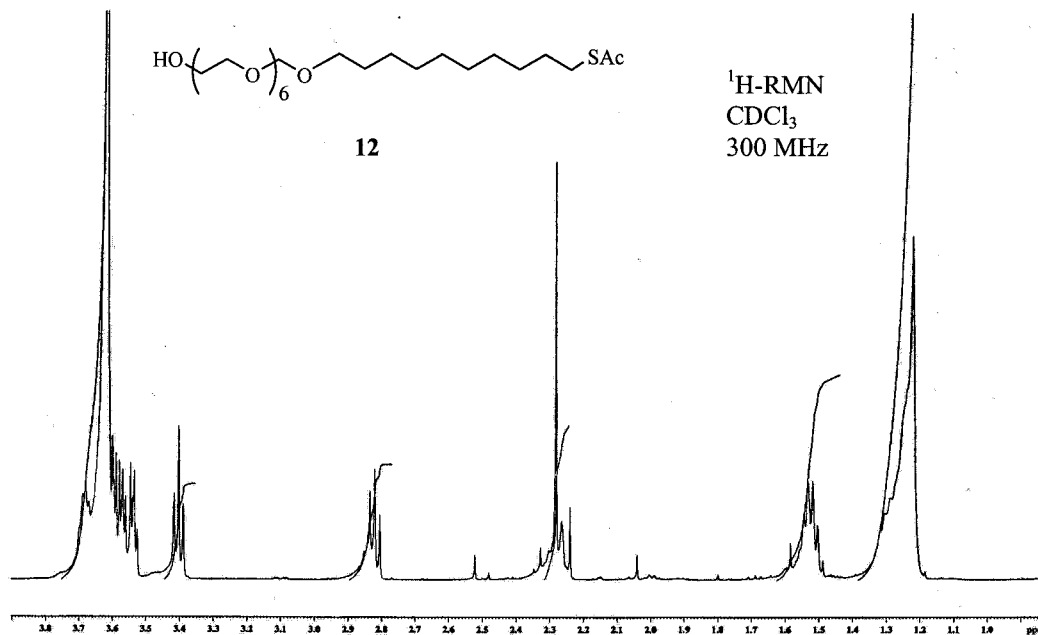
Ensayos in vivo del modelo tumoral para la metástasis en pulmón.

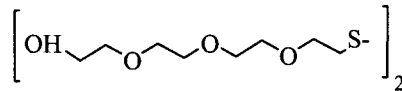
Los ratones C57BL/6 fueron adquiridos en Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales libres de patógenos. Todos los procedimientos se diseñaron de acuerdo con las recomendaciones de "The guide for care and use of laboratory animals, National Research Council, National Academic Press, 1996.

La formación del tumor in vivo, se produjo por inyección vía intravenosa de células B16F10 (1×10^5) a ratones hembra C57BL/6 de 8 a 12 semanas de edad en 200 μ L de solución Hanks, inoculada por vía intravenosa en la cola del ratón. La administración de lactonanopartículas (1-Au) se realizó preincubando las células B16F10 con distintas concentraciones de lactonanopartículas durante 5 minutos a 37°C e inyectando todo vía intravenosa. Los controles utilizando glucosa-nanopartículas se realizó de igual forma. Después de tres a cuatro semanas y siempre antes de que aparezcan síntomas patológicos, los animales se sacrifican, se extraen los pulmones y se fijan en solución Tellayeniczky (44% etanol, 31% AcOH y 2.3 % formaldehído). De esta forma se inspecciona cuidadosamente y se recuentan los núcleos tumorales.

VI. ANEXOS

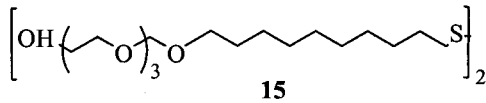
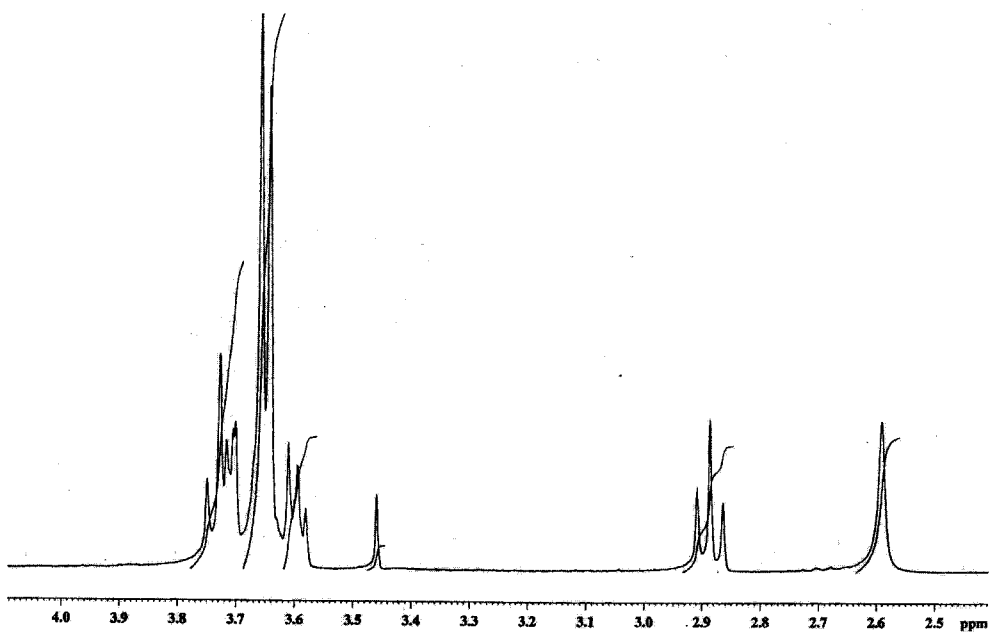






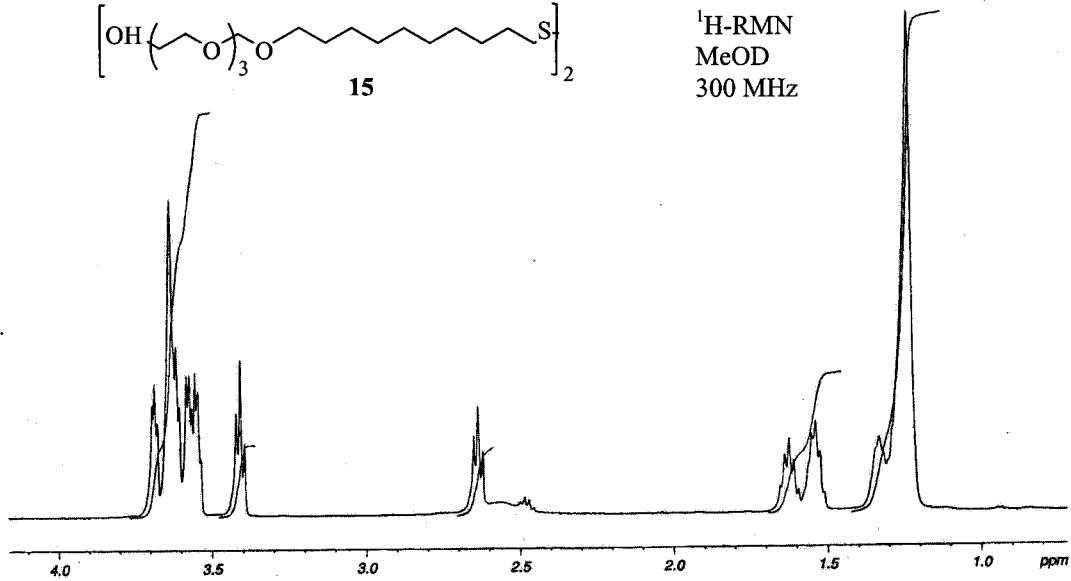
14

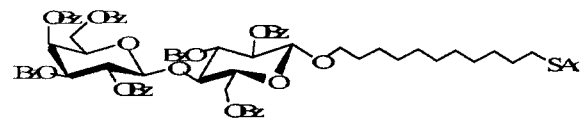
¹H-RMN
MeOD
300 MHz



15

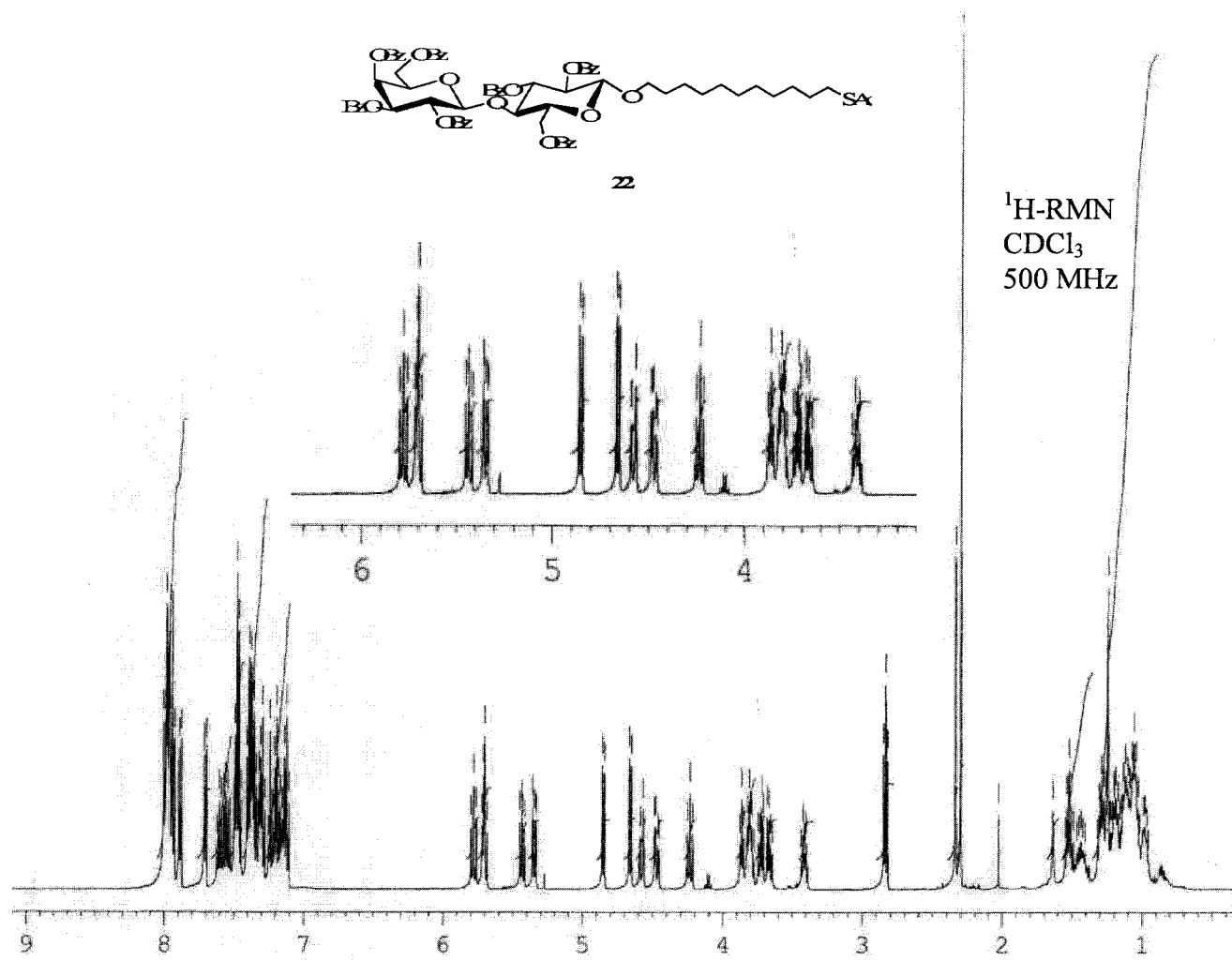
¹H-RMN
MeOD
300 MHz

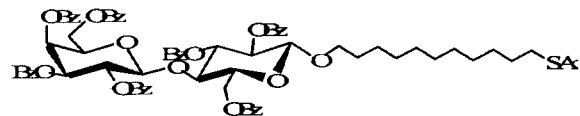




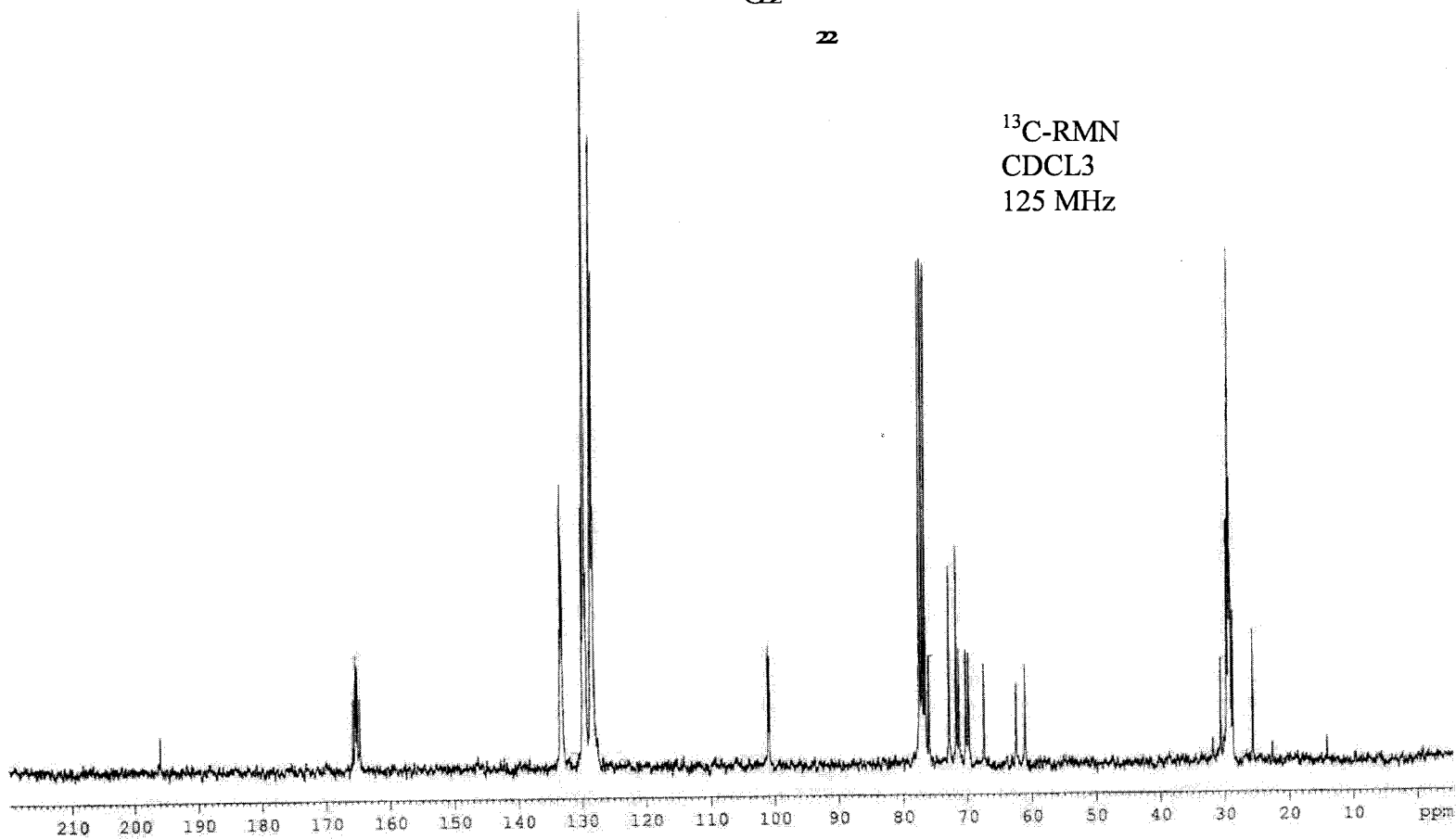
2

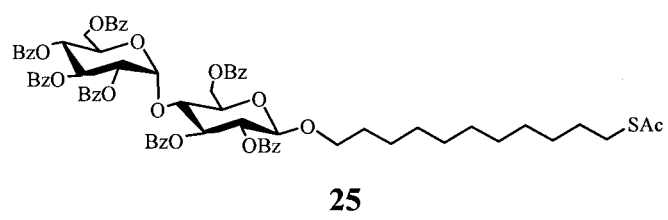
¹H-RMN
CDCl₃
500 MHz



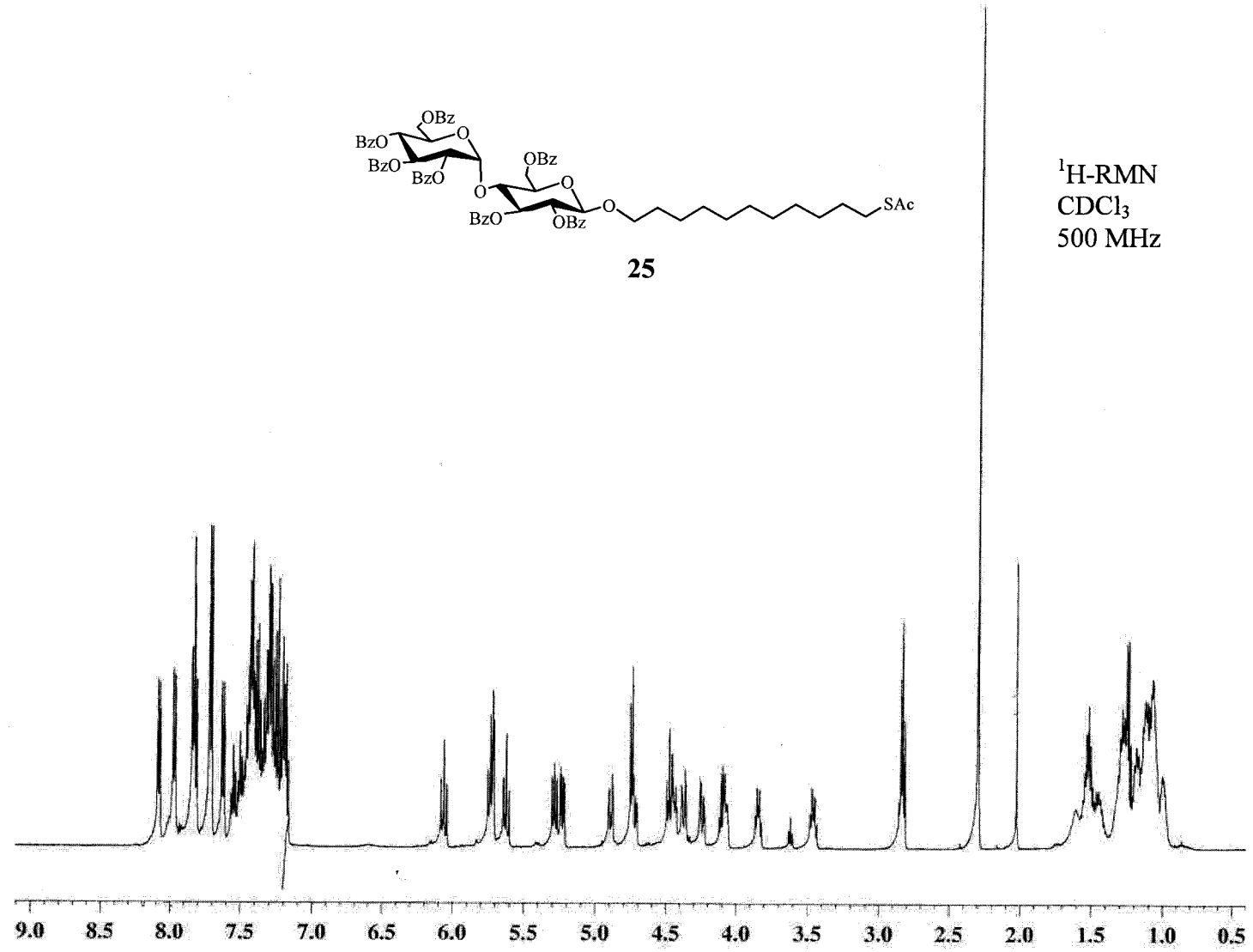
**22**

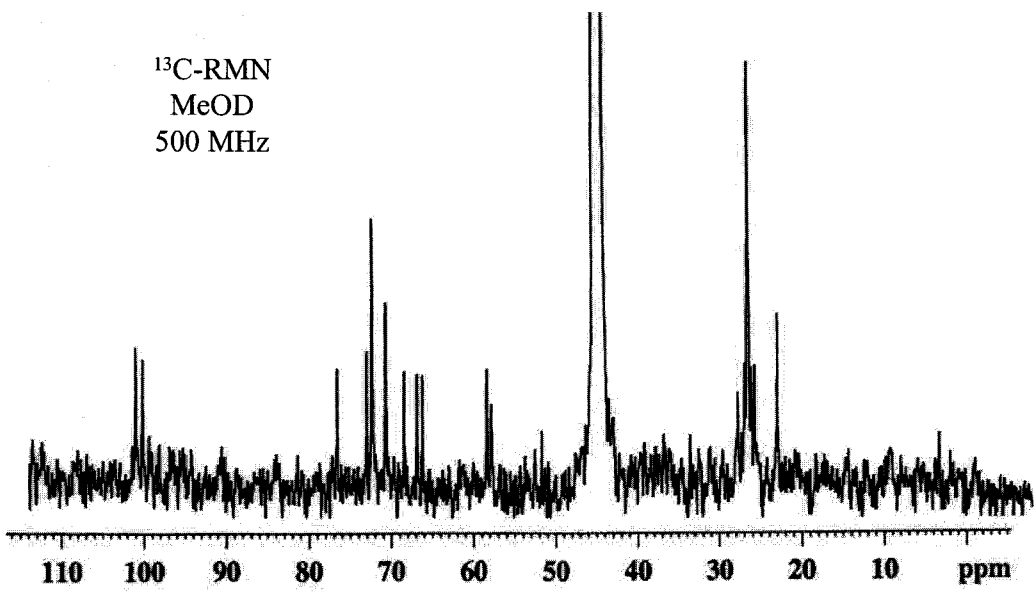
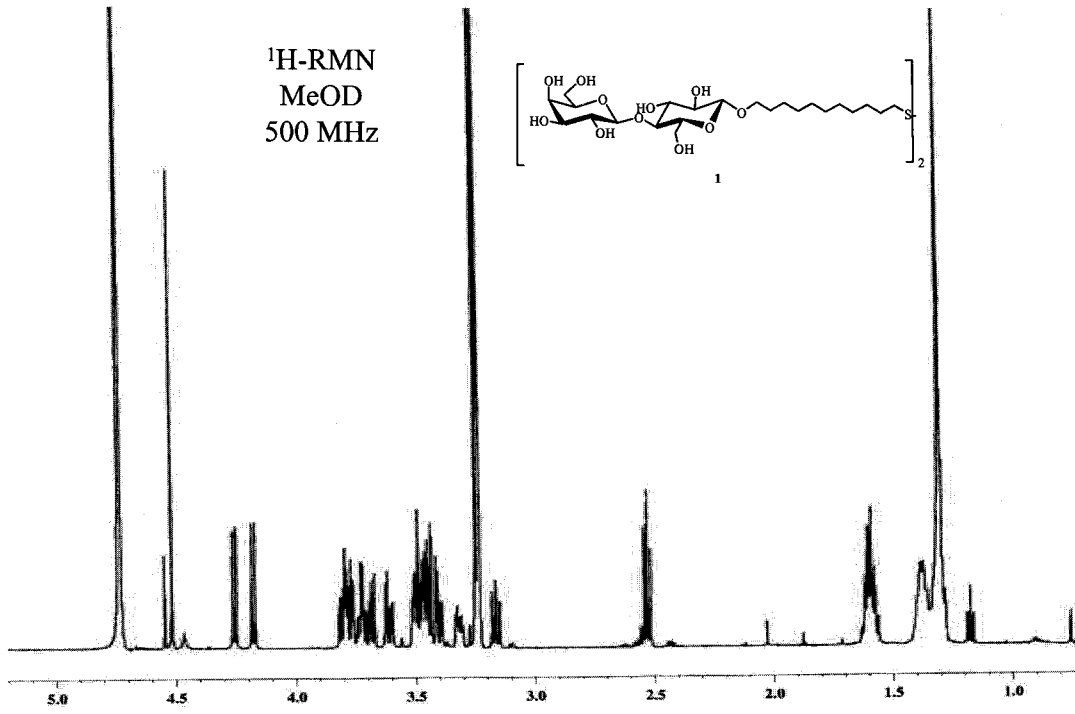
^{13}C -RMN
CDCL₃
125 MHz

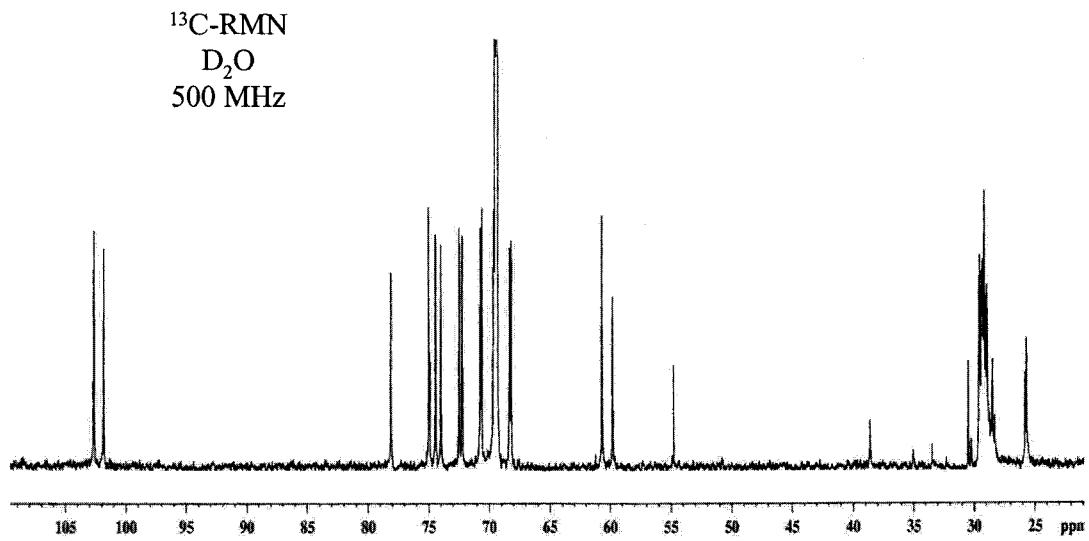
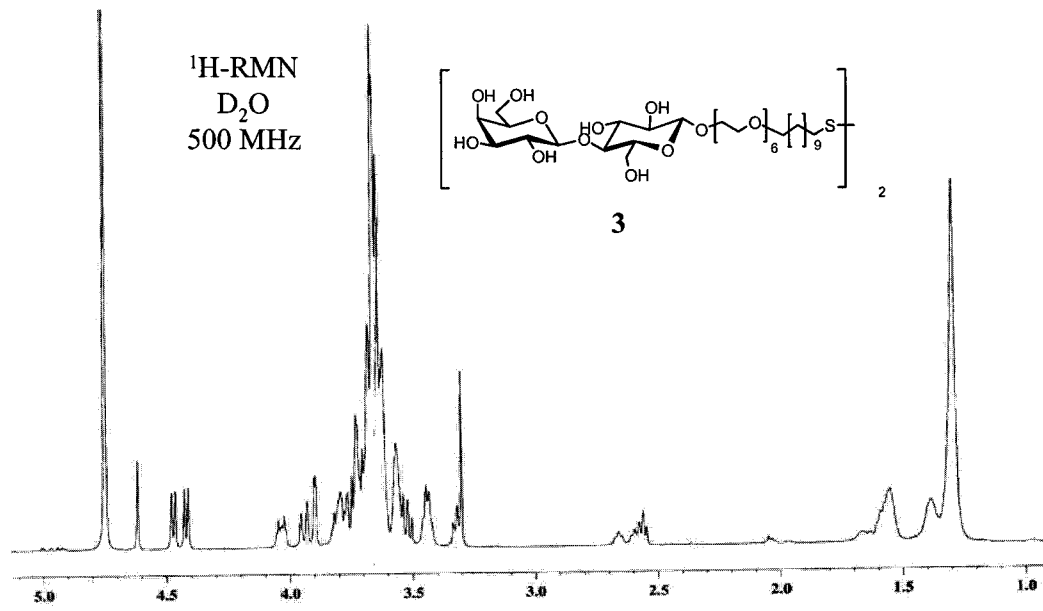


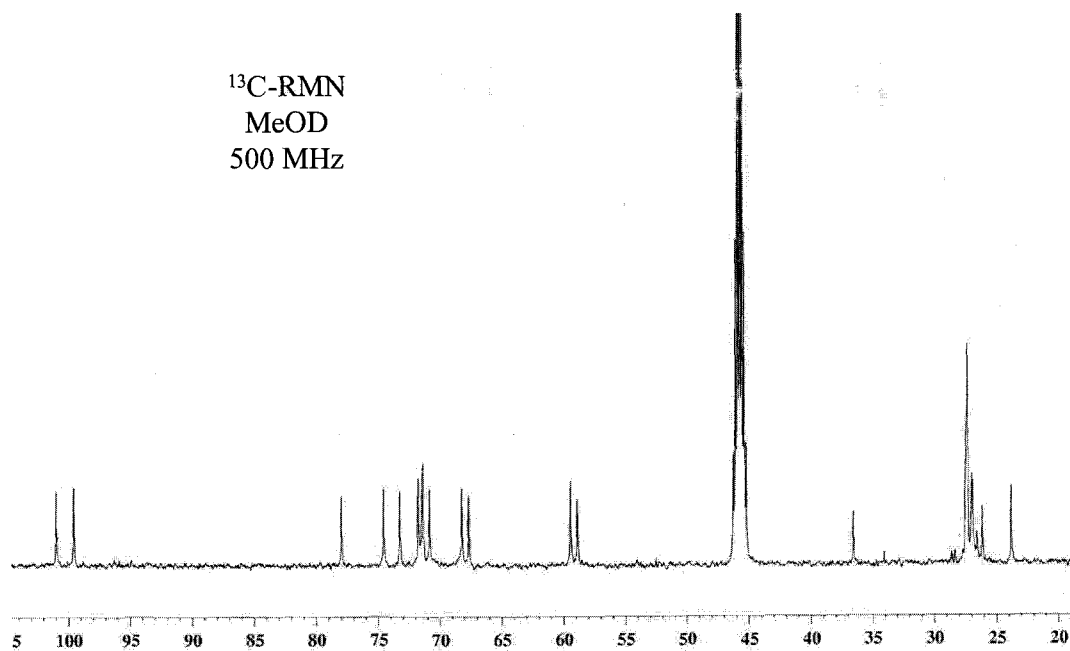
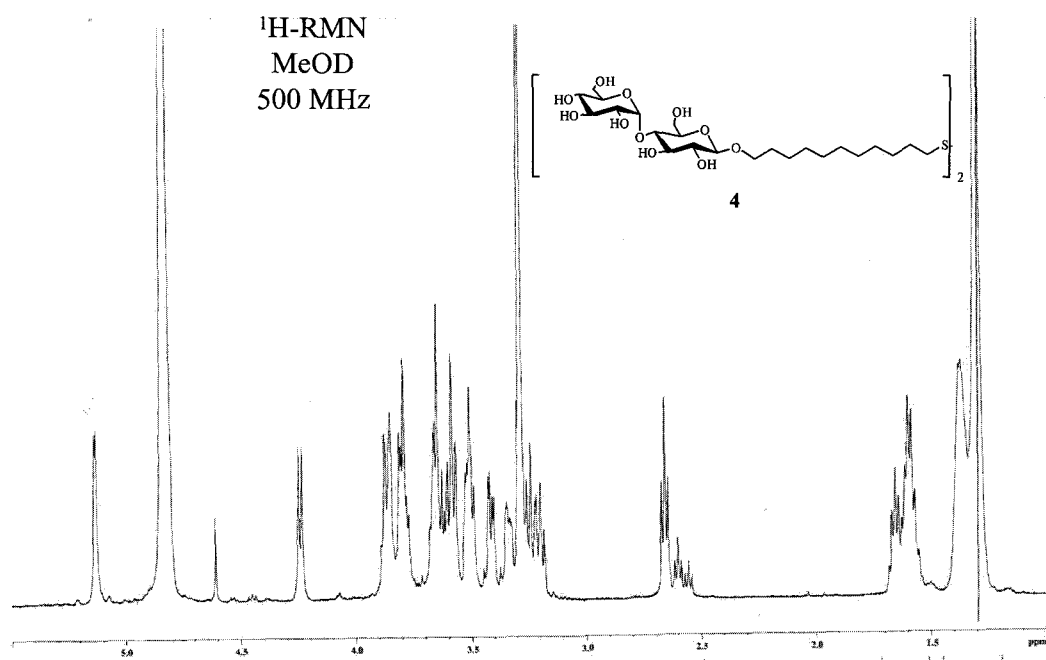


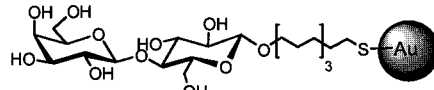
¹H-RMN
CDCl₃
500 MHz





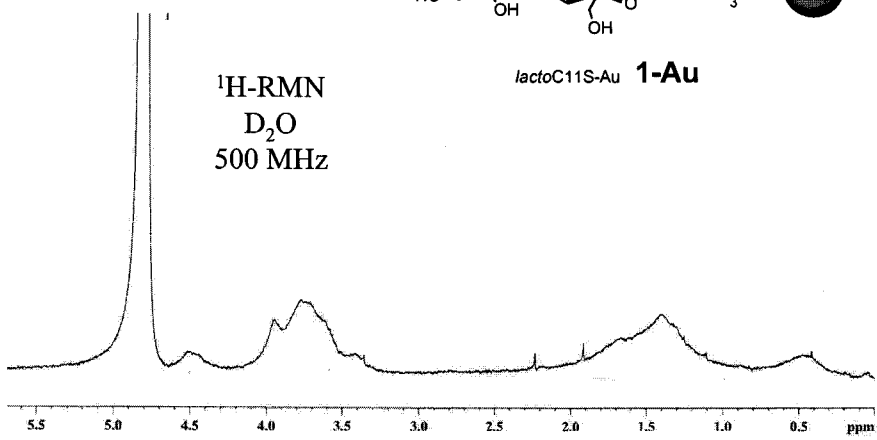




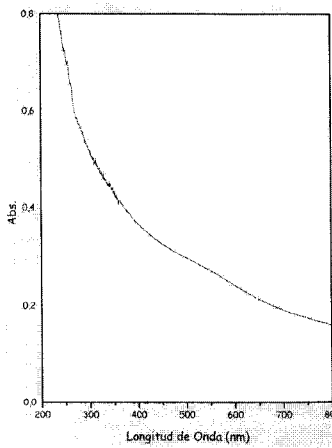
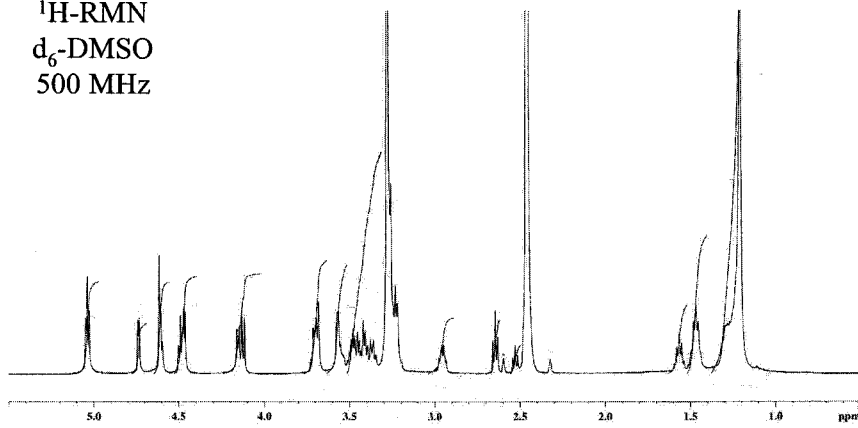


¹H-RMN
D₂O
500 MHz

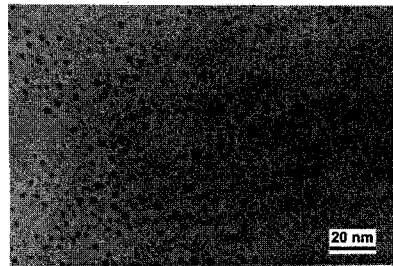
lactoC11S-Au **1-Au**



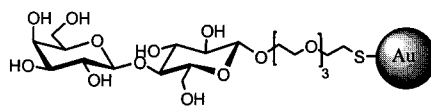
¹H-RMN
d₆-DMSO
500 MHz



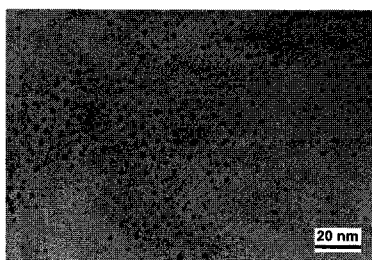
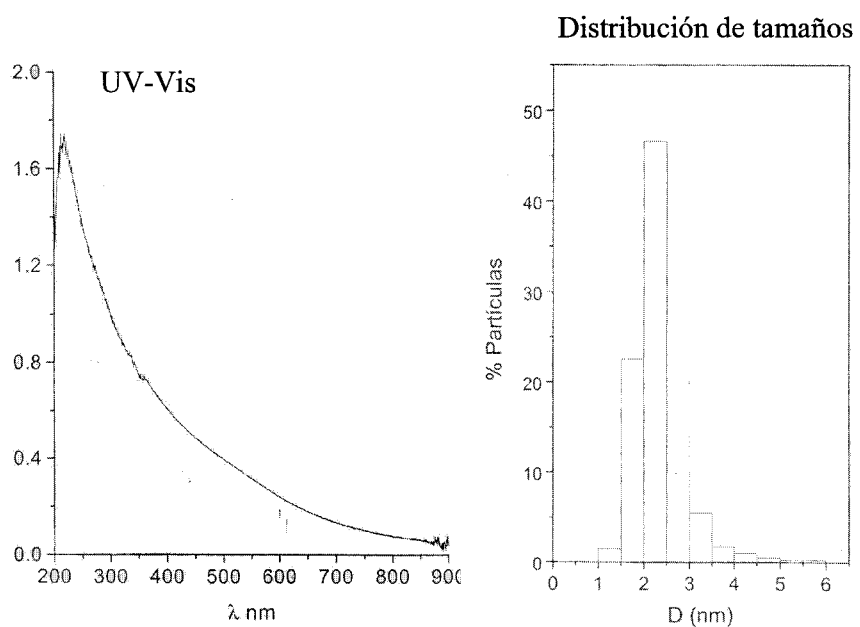
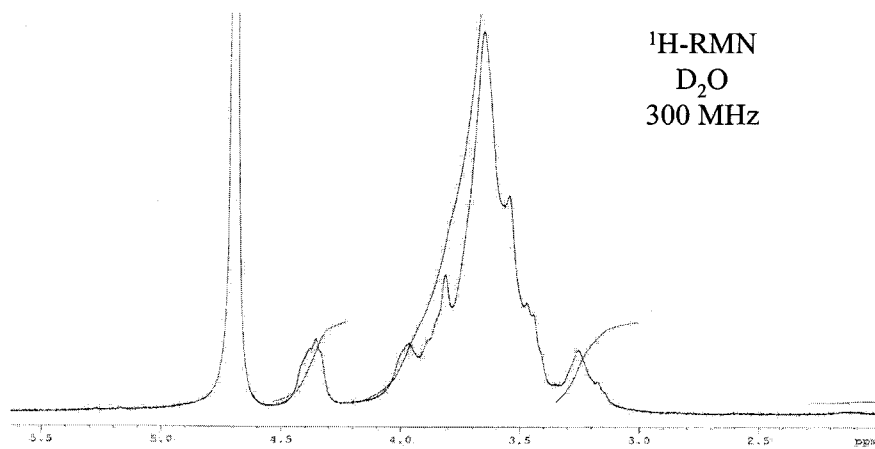
UV-Vis



TEM

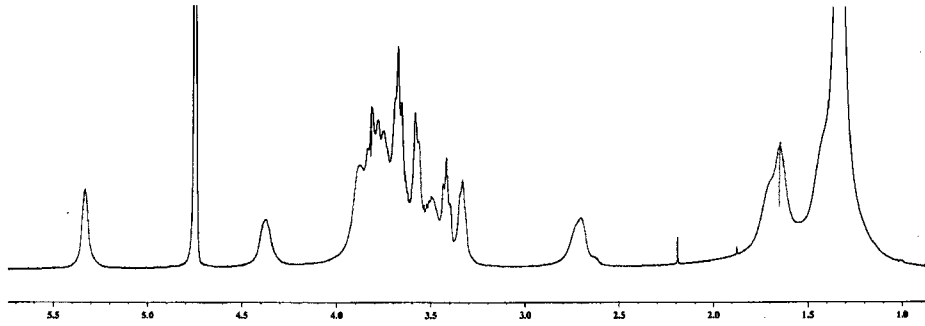
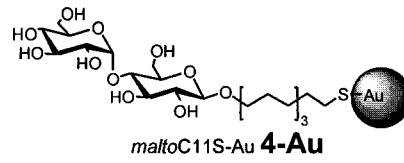


lactoEG4S-Au **2-Au**

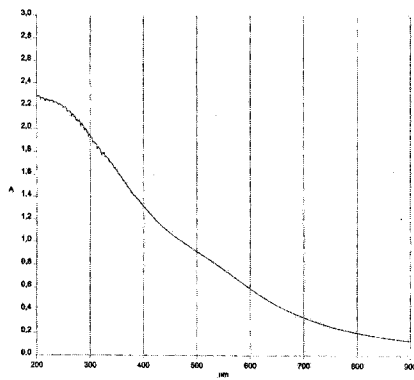
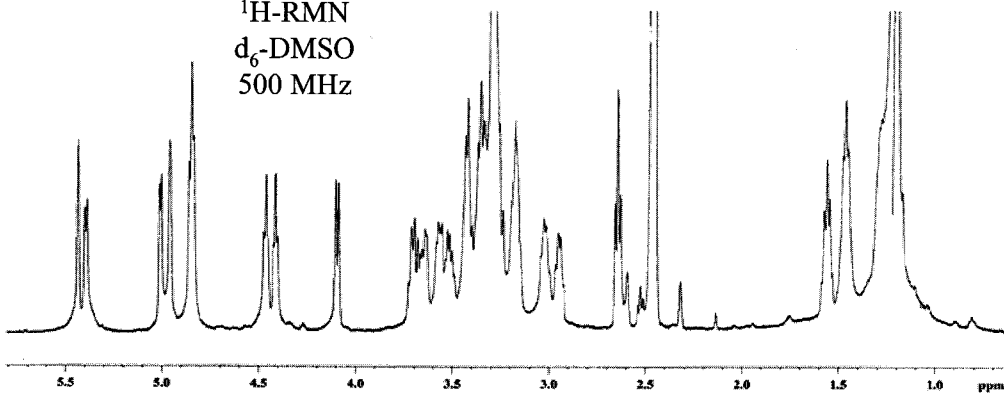


TEM

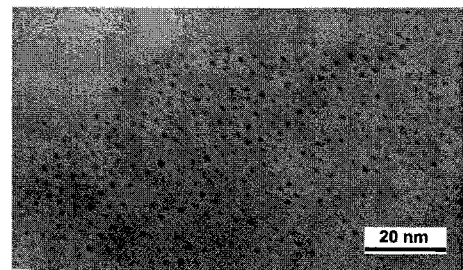
^1H -RMN
 D_2O
500 MHz



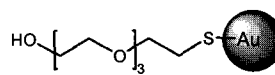
^1H -RMN
 d_6 -DMSO
500 MHz



UV-Vis

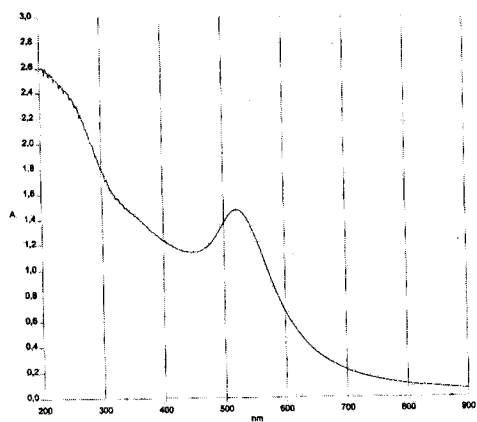
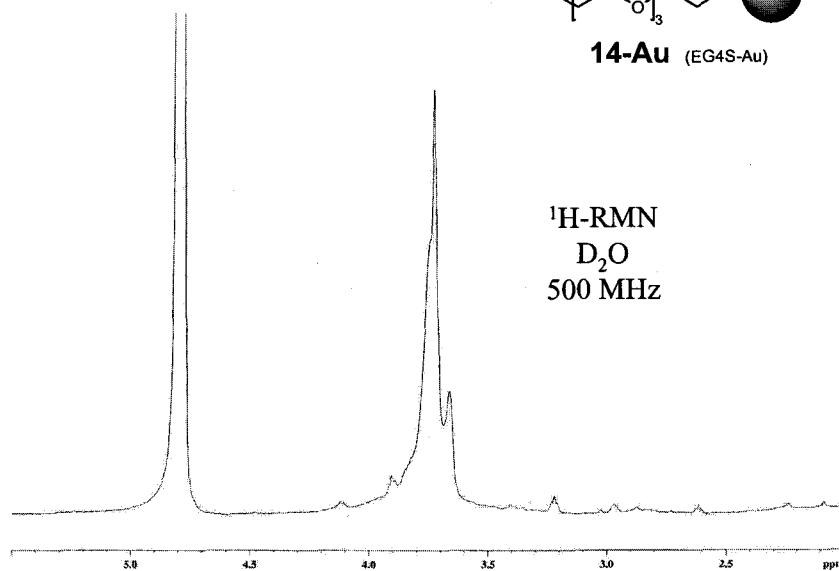


TEM

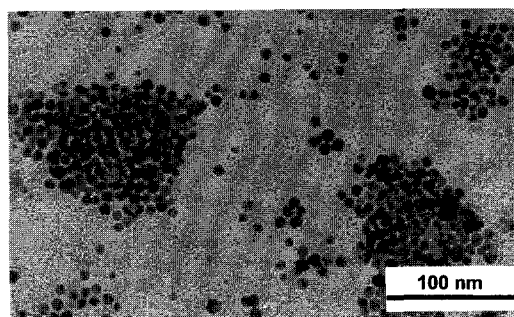


14-Au (EG4S-Au)

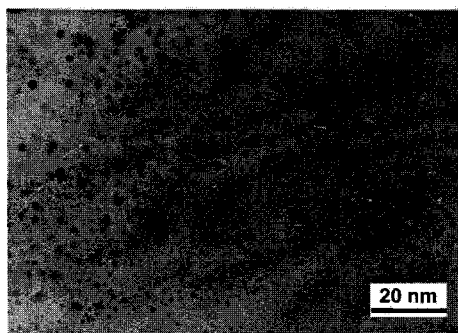
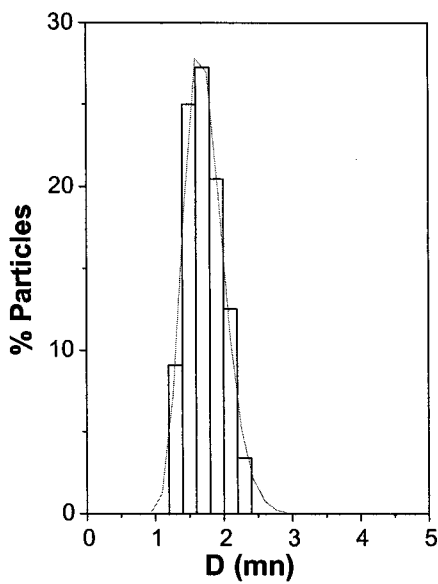
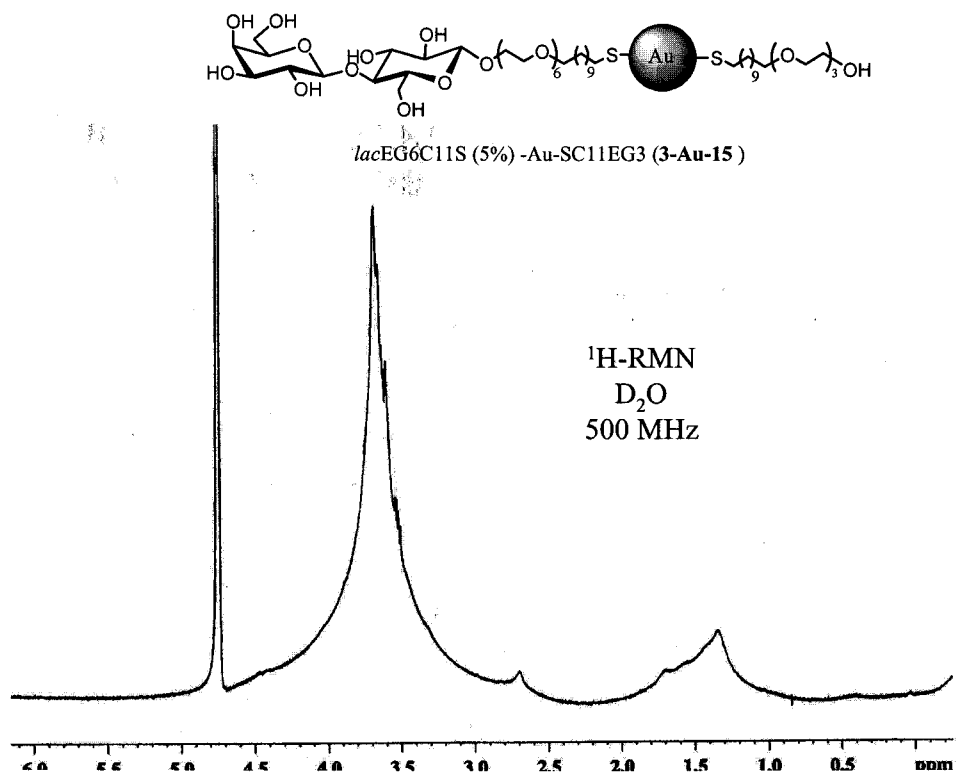
¹H-RMN
D₂O
500 MHz



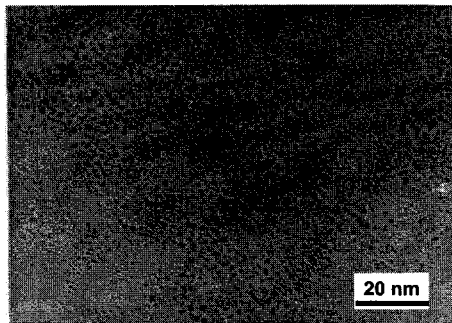
UV-Vis



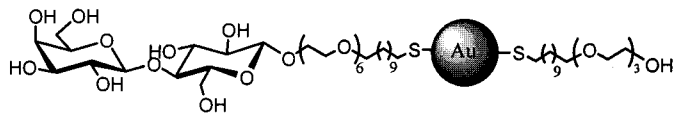
TEM



TEM, MW >100000

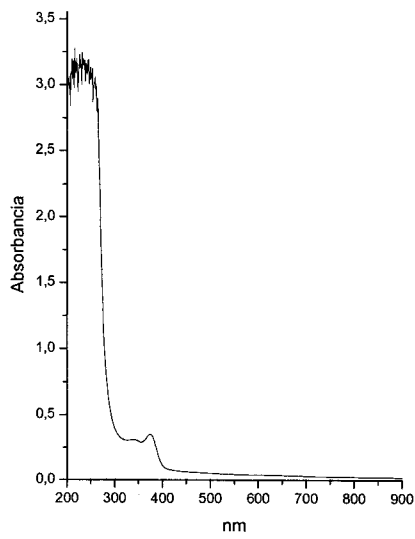
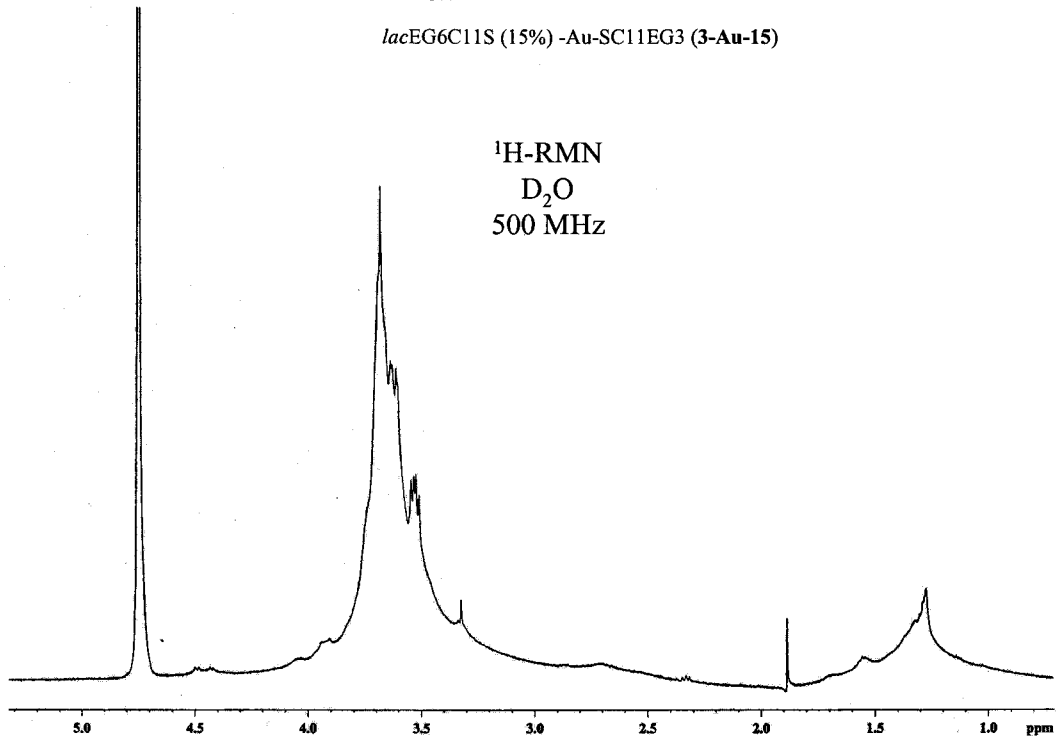


TEM, MW <100000

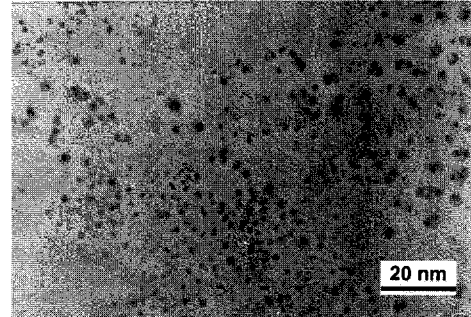


lacEG6C11S (15%) -Au-SC11EG3 (3-Au-15)

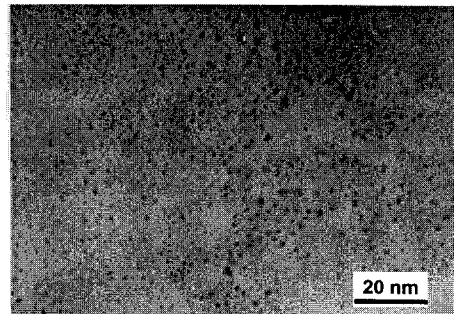
¹H-RMN
D₂O
500 MHz



UV-Vis



TEM, MW >100000



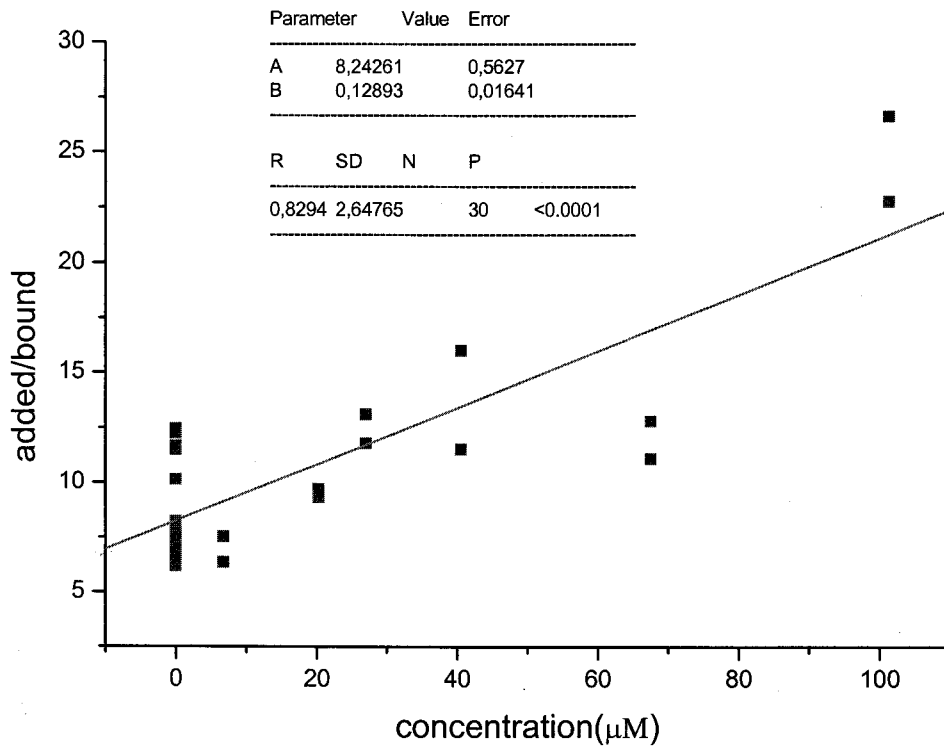
TEM, MW <100000

Cálculos del IC₅₀ del ensayo de inhibición de la unión de la *Viscum Album* aglutinina a asialofetuina.

$$y = y_0 + mx$$

$$IC_{50} = \frac{2y_0 - y_o}{m}$$

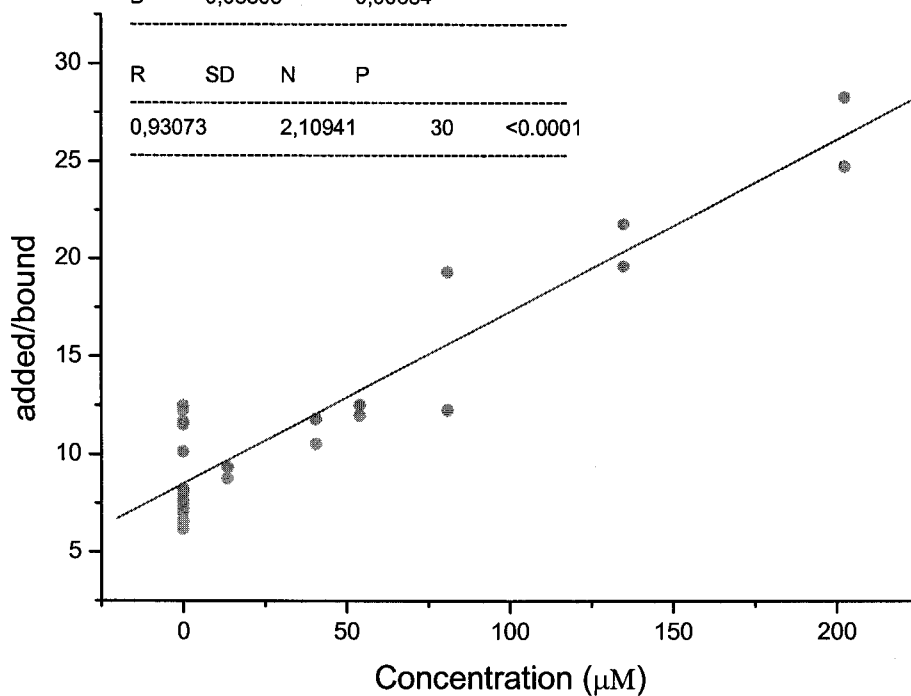
1. Cálculo del IC₅₀ de la gliconopartícula 3-Au-15 (15% lacto).



2. Cálculo del IC₅₀ de la gliconanopartícula 3-Au-15 (30% lacto)

Parameter	Value	Error
A	8,49022	0,44831
B	0,08805	0,00654

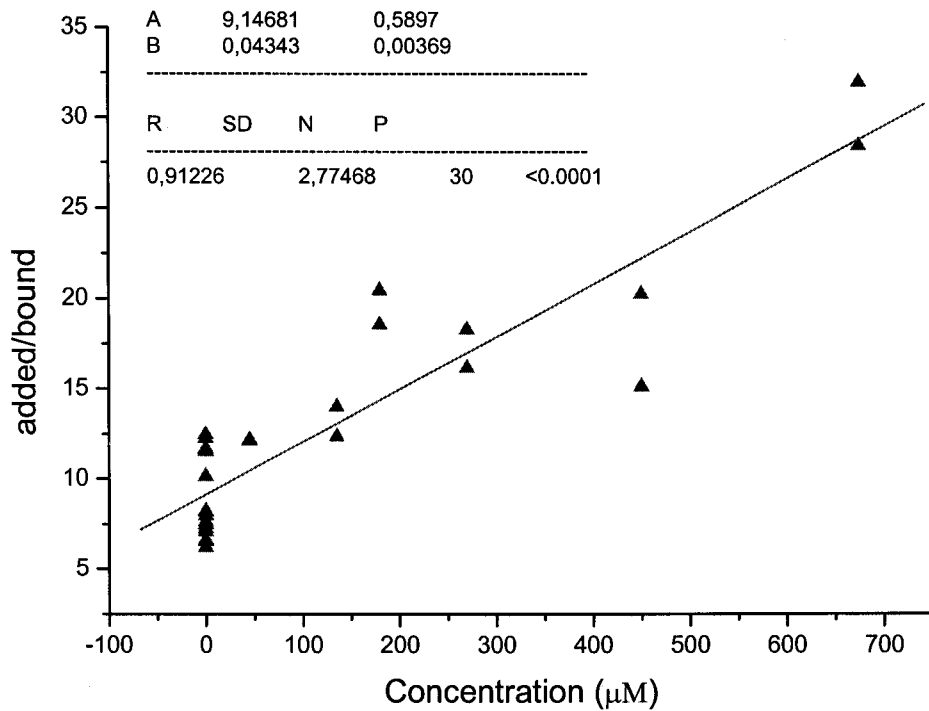
R	SD	N	P
0,93073	2,10941	30	<0.0001



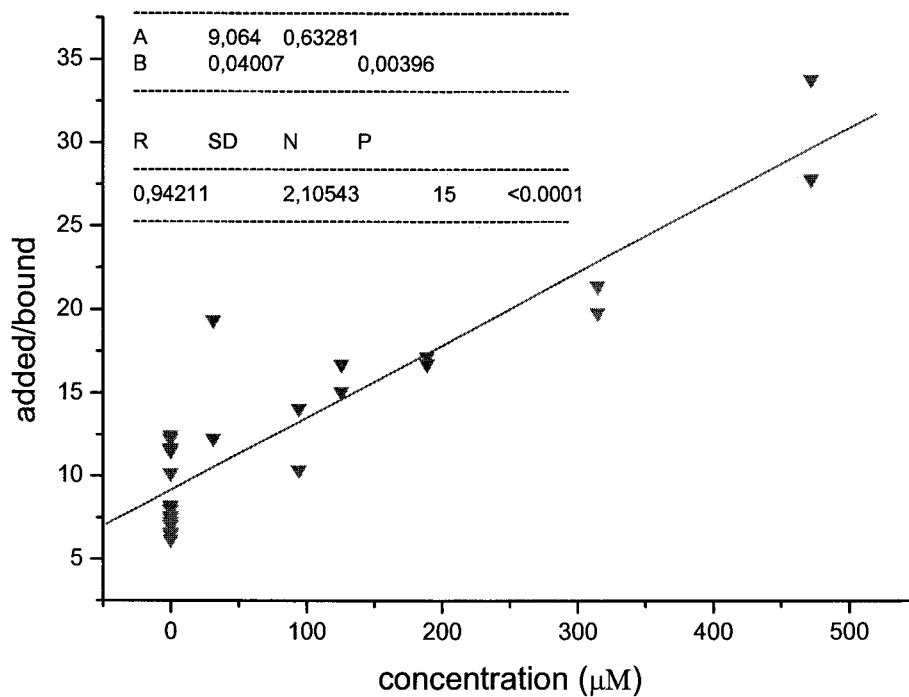
3. Cálculo del IC₅₀ de la gliconanopartícula 3-Au

Parameter	Value	Error
A	9,14681	0,5897
B	0,04343	0,00369

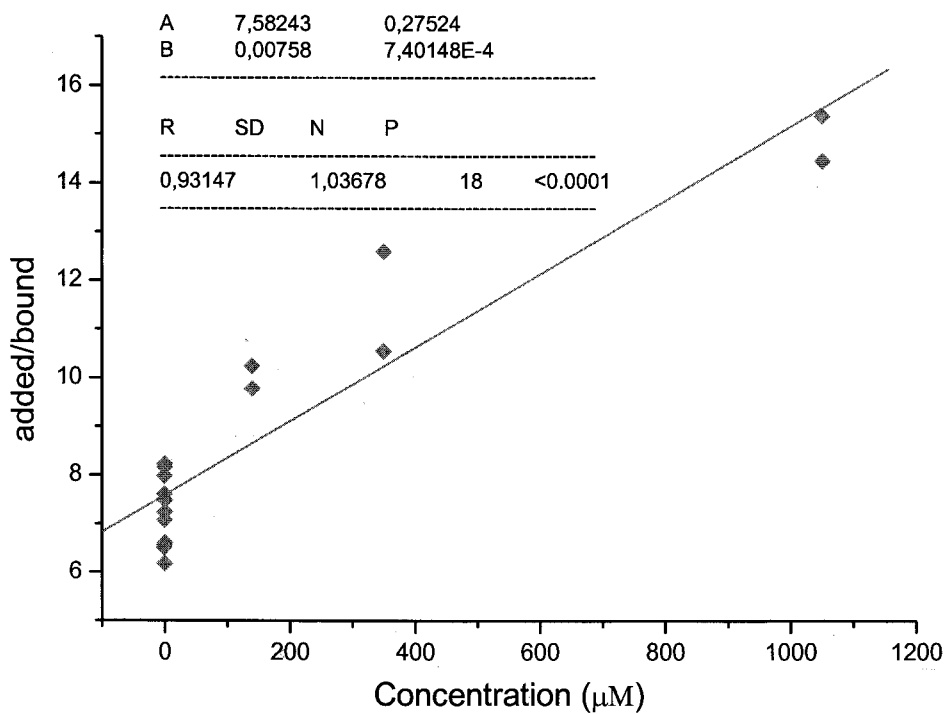
R	SD	N	P
0,91226	2,77468	30	<0.0001



4. Cálculo del IC₅₀ de la gliconanopartícula 2-Au



5. Cálculo del IC₅₀ de la gliconanopartícula 1-Au



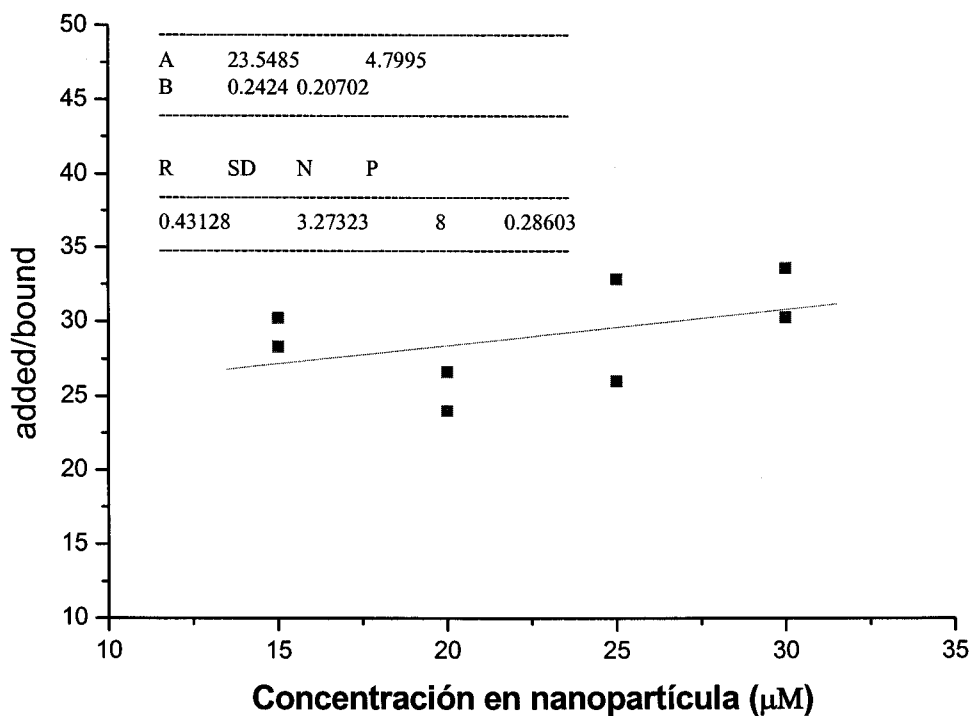
Cálculos del IC₇₅ del ensayo de inhibición de la unión de la *Viscum Album* aglutinina a asialofetulina.

$$y = y'_o + m'x$$

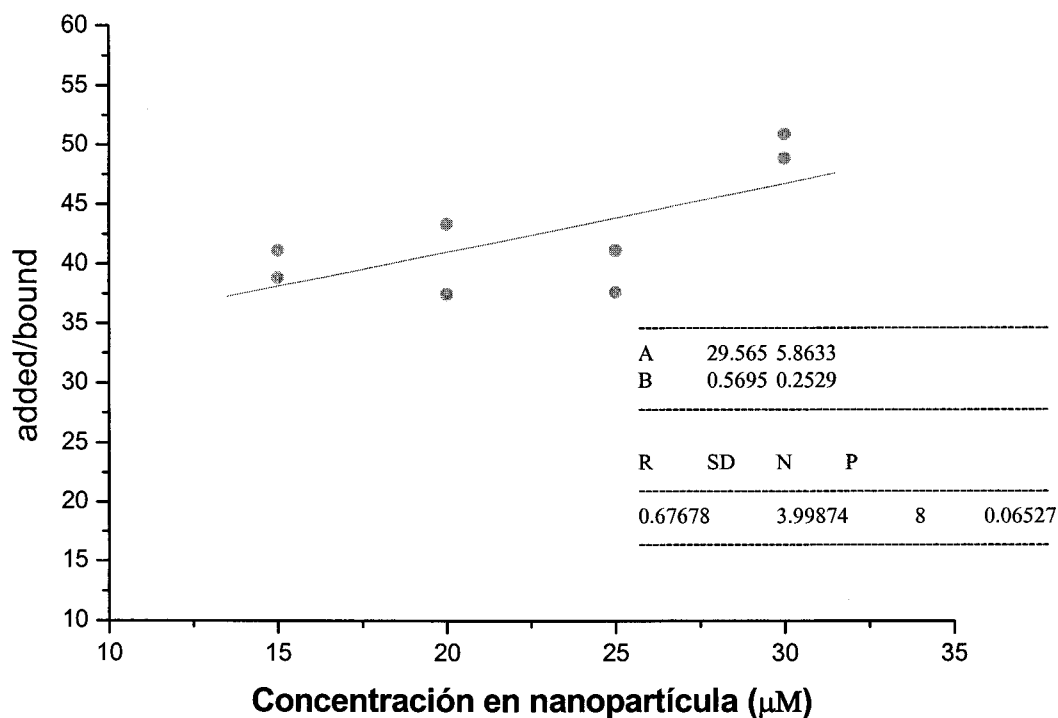
$$IC_{75} = 4 \cdot y'_o - y'_o/m$$

Siendo y'_o la ordenada en el origen del IC₅₀, calculado anteriormente.

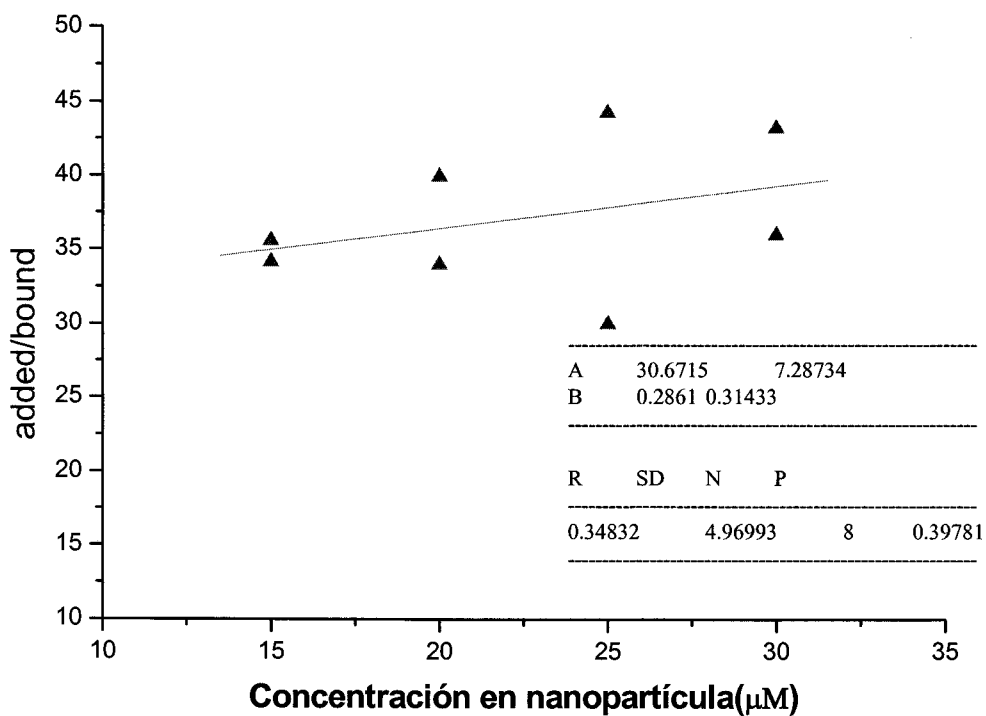
1.- Cálculo de IC₇₅ de la gliconanopartícula 3-Au-15 (15% lacto)



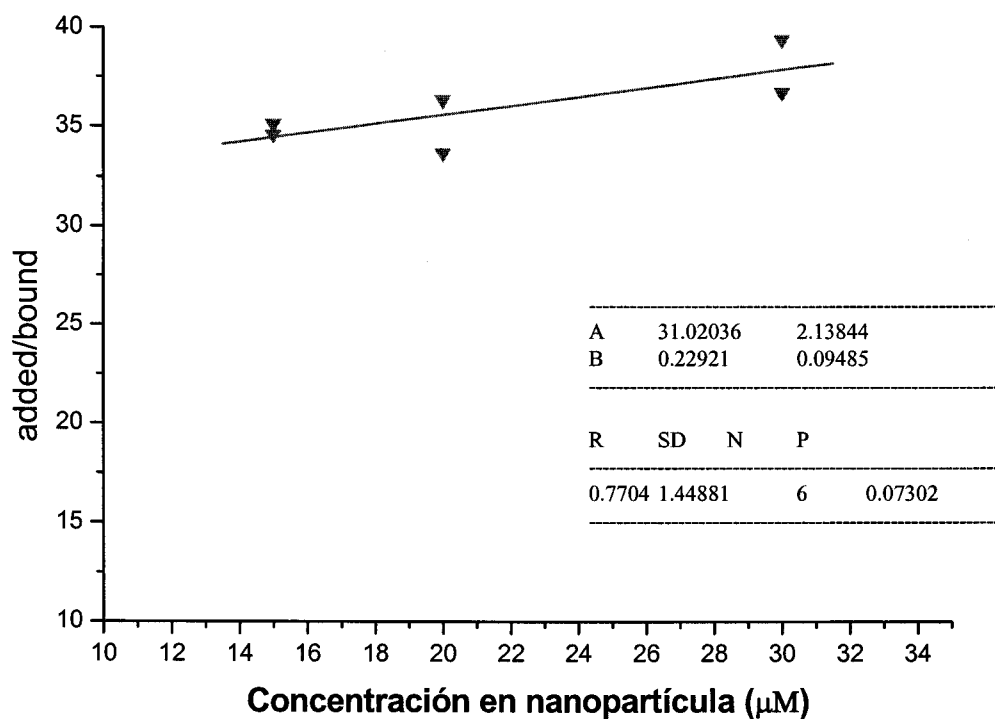
2.- Cálculo de IC₇₅ de la gliconanopartícula 3-Au-15 (30% lacto)



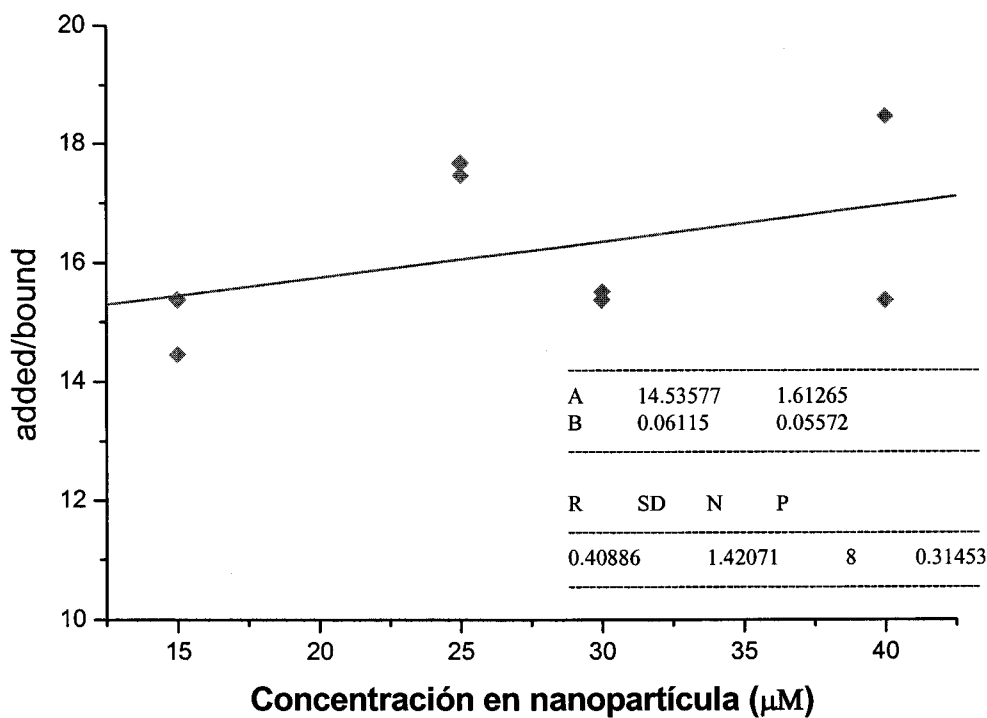
3.- Cálculo de IC₇₅ de la gliconanopartícula 3-Au



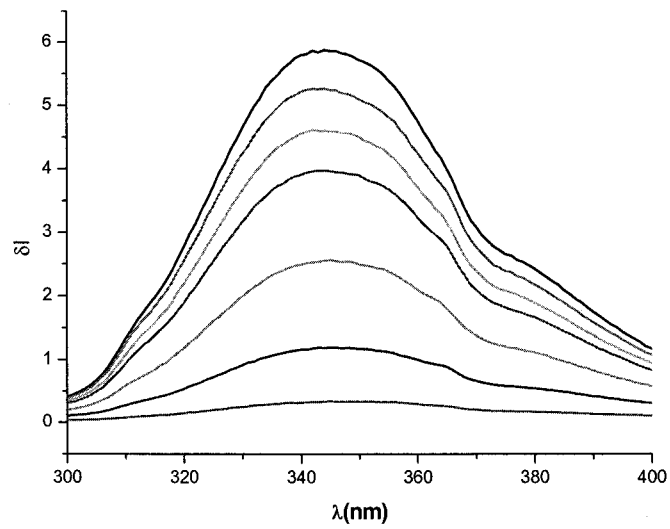
4.- Cálculo de IC₇₅ de la gliconanopartícula 2-Au



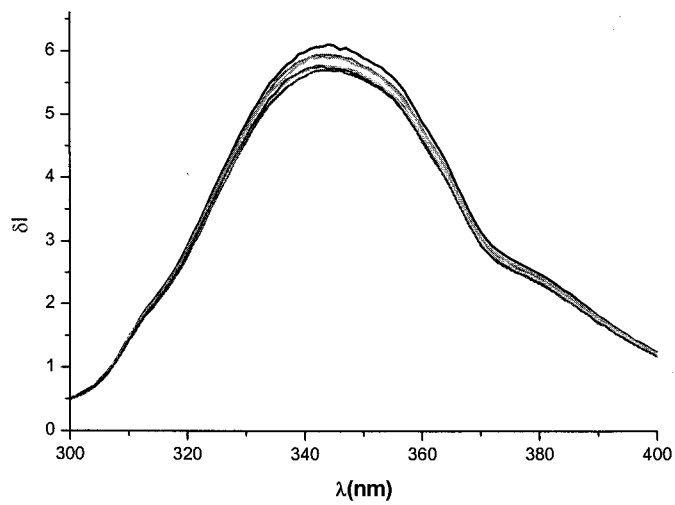
5.- Cálculo de IC₇₅ de la gliconanopartícula 1-Au



Curvas de fluorescencia de la valoración del pentámero de la toxina del cólera (CTB₅) con gliconanopartículas y neoglicoconjugados.



Valoración de la nanopartícula *maltoC11S*-Au (4-Au) con CT



Valoración de maltosa con CT

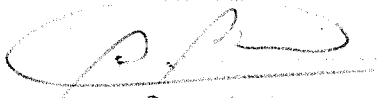
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal de Grado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

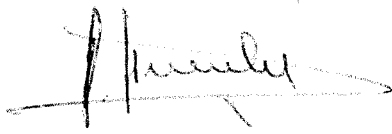
D. Alicia García Benítez
titulada Elio-receptáculos de oro: un nuevo sistema multivalente para el estudio de las interacciones biológicas de los subultrabaterios
acordó otorgarle la calificación de sobresaliente "cum laude" por unanimidad.

Sevilla, 14 de marzo, 2003

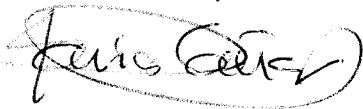
El Vocal,



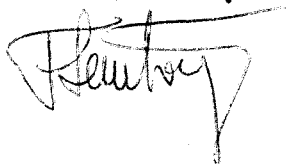
EL PRESIDENTE



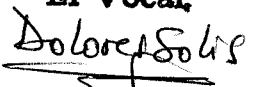
El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,

