

Nanotecnología sobre virus: Una plataforma supramolecular, natural y accesible para la Química Orgánica

Resumen: Los virus, situados entre lo vivo y lo inerte, se engloban dentro de la gran variedad de sistemas moleculares funcionales, de distintos tamaños y con capacidad de autoorganización que la naturaleza nos ofrece. Muchos pueden obtenerse en grandes cantidades y manipularse a nivel genético gracias al conocimiento de su estructura por rayos X; ofreciendo a los químicos una oportunidad única de expandir el repertorio de materiales de partida para aplicaciones sintéticas y catalíticas. Topológicamente análogos a los dendrímeros pero de mucho mayor tamaño y fácil acceso, los virus se presentan como una nueva plataforma nanométrica y accesible para la química orgánica. **Palabras Clave:** Virus, nanotecnología, química.

Introducción

El concepto de nanotecnología engloba aquellos campos de la ciencia y la técnica en los que se estudian, se fabrican y/o manipulan de manera controlada materiales, sustancias y dispositivos con dimensiones comprendidas entre 1 y 100 nanómetros.^[1] Su desarrollo está dirigido, al menos en parte, por la existencia de bloques de construcción moleculares de distintos tamaños que tienen la capacidad de autoorganizarse formando superestructuras sumamente delicadas. El conocimiento estructural a nivel atómico de dichos bloques de construcción permite un control preciso de sus reactividades.^[2]

Los virus son uno de estos sistemas nanométricos que la naturaleza generosamente nos ofrece. Se trata de agentes infecciosos formados por un ácido nucleico rodeado de una envoltura proteica autoensamblada, que se reproducen utilizando el material y la maquinaria de una célula huésped provocando cambios genéticos en la misma. No poseen metabolismo ni organización celular, por lo que se les sitúa en el límite entre lo vivo y lo inerte, siendo objeto de importantes investigaciones en la biología, la bioquímica, la evolución y la medicina. Los virus constituyen uno de los ejemplos más impresionantes de reconocimiento molecular dirigido por múltiples interacciones no covalentes. Gracias a las técnicas de cristalografía de rayos X y microscopía electrónica se ha podido examinar, con resolución prácticamente atómica, uno de los más fascinantes procesos que la naturaleza ha desarrollado para llevar a cabo numerosas funciones biológicas: el autoensamblaje de bloques estructurales para formar una superestructura funcional.

Debido a que ciertos tipos de virus pueden obtenerse en grandes cantidades y ser manipulados genéticamente, éstos ofrecen una excelente oportunidad para los químicos de expandir el repertorio de materiales de partida naturales para aplicaciones sintéticas y catalíticas. El Prof. Finn y su grupo de investigación han sido pioneros en los estudios sobre el uso de sistemas polivalentes en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico empleando como prototipo de plataforma química el virus del mosaico de la *Vigna sinensis*, una planta trepadora tropical del género Dolichos que se cultiva para



David Díaz Díaz¹



M. G. Finn²

enriquecer el terreno y para alimentar al ganado con su semilla (*guisante ojinegro*) (Figura 1). CPMV, del inglés *CowPea Mosaic Virus*, es la abreviación que utilizaremos por comodidad para referirnos a este virus.

Obtención, estructura y caracterización del CPMV

CPMV es un virus de origen vegetal que posee una sólida estructura icosaédrica de aproximadamente 30 nm de diámetro y una masa molecular de $5,6 \times 10^6$ Da (Figura 2).^[3] Este virus, inocuo hacia el resto de los organismos vivos, puede considerarse topológicamente análogo a un dendrímero pero de mucho mayor tamaño y fácil acceso, ya que puede aislarse mediante un simple protocolo con rendimientos de 1–2 g por cada kilogramo de hojas de *Vigna sinensis* infectada (1 mg virus $\approx 10^{14}$ partículas). CPMV presenta una marcada estabilidad bajo una gran variedad de condiciones; por ejemplo, son estables durante varios días a valores de pH entre 3 y 9,5; también mantiene su integridad a temperaturas incluso superiores a 60 °C, y en presencia de disolventes orgánicos tales como DMSO o DMF. De esta manera, y como veremos a continuación, pueden llevarse a cabo alteraciones químicas del virus tanto en una disolución tampón como en una mezcla DMSO-disolución tampón (>2:1), lo que hace que el uso de reactivos orgánicos, normalmente muy hidrofóbicos, no sea un inconveniente.

La estructura del CPMV, determinada a una resolución de 2,8 Å,^[4] está compuesta de 60 copias idénticas de dos subunidades proteicas asimétricas que se encuentran ensambladas alrededor de un RNA genómico monocatenario^[5] (Figura 2). La subunidad de 23 kDa se denomina "subunidad menor" y está constituida por el dominio A y, la otra subunidad de 41 kDa, denominada "subunidad mayor", está formada por los dominios B + C. Una de las grandes ventajas que presenta esta partícula es que a través de la manipulación genética pueden insertarse secuencias específicas de aminoácidos en diversos lugares de ambas subunidades, generando quimeras de la partícula nativa.^[6]

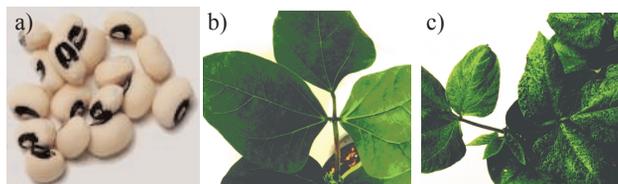


Figura 1. a) Guisante ojinegro de la *Vigna sinensis* (www.google.es). b) *Vigna sinensis* sana. c) *Vigna sinensis* infectada por CPMV. b) y c) son fotografías tomadas por M.G. Finn.

¹Departamento de Química Orgánica, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, *direc. actual:* The Dow Chemical Company; Bachtobelstrasse 3 CH 8810 Horgen, Switzerland
C-e: DDiaz-Diaz@dow.com

²Department of Chemistry and The Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, CA 92037
Recibido 31/10/2006. Aceptado 12/04/2007

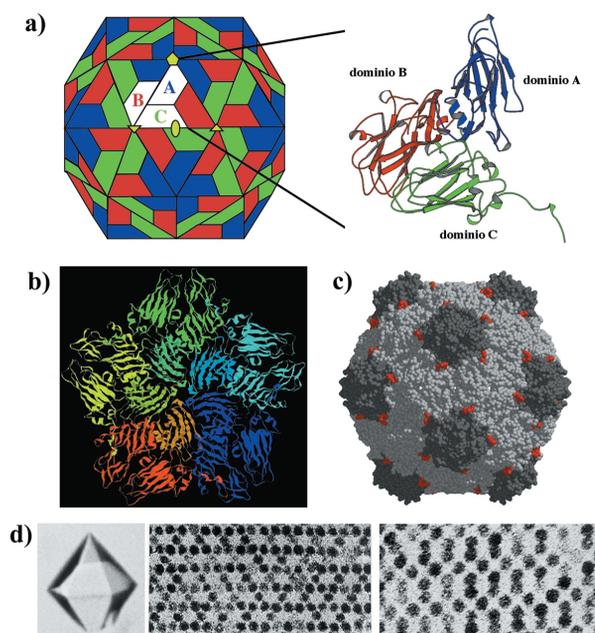


Figura 2.[9] Estructura del CPMV y sus cristales. a) Representación del CPMV mostrando la distribución de las dos subunidades que componen la "unidad asimétrica". Los trapezoides en rojo y en verde representan los dos dominios de la unidad mayor distribuida alrededor de un eje de simetría de orden 3. Los trapezoides azules representan la subunidad menor alrededor de los ejes de simetría de orden 5. b) Organización de 5 unidades asimétricas en un pentámero centrado alrededor de un pequeño orificio en cada eje de simetría de orden 5. c) Esquema de la estructura del virus CPMV obtenida a partir de difracción de rayos X. d) Izquierda: un cristal hexagonal del CPMV. Fotografías de microscopía electrónica de los cristales seccionados perpendicularmente al eje *c* (centro) y al eje *a* (derecha). Un cristal típico contiene 10^{13} partículas.

La determinación de la concentración del virus en disolución se calcula a partir de una curva de calibrado fabricada midiendo la absorción a 260 nm de varias disoluciones a distintas concentraciones conocidas; así por ejemplo, para una concentración de CPMV de 0,1 mg/ml se obtiene un valor de absorbancia de 0,8. Por último, la caracterización de las partículas virales se lleva a cabo mediante la combinación de una serie de técnicas experimentales entre las que cabe destacar: la cromatografía líquida de exclusión rápida (FPLC), la ultracentrifugación de gradiente de sacarosa y la microscopía electrónica de transmisión.

Reactividad general del CPMV

Desde el punto de vista de la utilidad y aplicación de estas plataformas naturales, la reactividad química de los residuos de cisteína y lisina determina los aspectos más interesantes del CPMV.

Reactividad de los residuos de lisina

Tal y como se observa en la Figura 3, tanto *N*-ésteres succinimídicos **1** como isotiocianatos derivados de fluoresceína **2** reaccionan selectivamente con los residuos de lisina expuestos al medio.[7] La fluoresceína absorbe a 494 nm mientras que la proteína lo hace a 260 nm, observándose bandas sin solapamiento y con unas absorciones molares bien establecidas. Así, comparando las intensidades de estas ban-

das y midiendo los valores de absorción a distintas concentraciones de una disolución de las partículas químicamente modificadas es posible calcular el número de residuos modificados en el virus. El proceso exige un protocolo concreto para eliminar aquellas interacciones no específicas del colorante con el virus que de otro modo afectarían a los valores de absorción medidos.

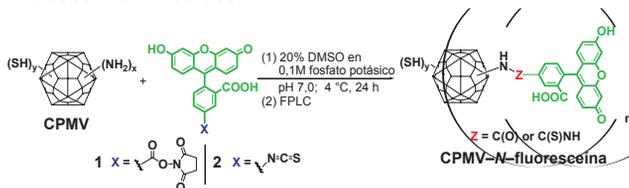


Figura 3. Reacciones de ligación sobre partículas de CPMV.

De esta forma, se ha llegado a incorporar entre 60 y 70 moléculas de **1** sobre el CPMV a pH neutro y empleando una proporción colorante:proteína = 200:1 (Figura 4). Este resultado sugiere que tan solo un residuo de lisina en cada unidad asimétrica es reactivo bajo dichas condiciones. Una reactividad algo mayor se observa a pH 8,3, siendo posible introducir cerca de 90 moléculas de colorante por partícula viral. Sin embargo, utilizando una proporción colorante:proteína = 4000 se puede obtener una carga máxima de 240 moléculas de colorantes por partícula viral a ambos valores de pH, lo que demuestra que cuatro residuos de lisina por cada unidad asimétrica son accesibles bajo condiciones extremas. Por otro lado, el isotiocianato **2** presenta una menor reactividad, y como consecuencia una mayor selectividad, requiriendo el uso de aproximadamente 1000 equivalentes para poder incorporar 60 moléculas de colorantes por partícula viral, siendo muy difícil incrementar dicho número. La electroforesis bajo condiciones desnaturizantes de las partículas conjugadas de CPMV muestra que en el caso de la reacción con isotiocianatos, las lisinas reactivas están asociadas a la subunidad menor (Figura 5). Sin embargo, con *N*-ésteres succinimídicos se observa también incorporación en algunos residuos de la subunidad mayor.[7]

Como ya se ha mencionado, las partículas decoradas con moléculas de colorante son caracterizadas mediante sedi-

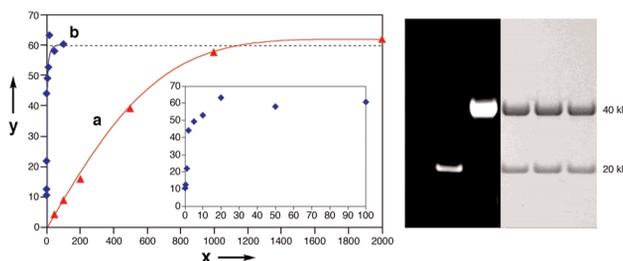


Figura 4. a) Número de moléculas de colorante unidas covalentemente al (a) CPMV nativo y (b) CPMV-mutante con cisteínas adicionales insertadas genéticamente (ver debajo), en función de la relación creciente de reactivo **1** a virus (*x* = equivalentes colorante-maleimida por unidad asimétrica; *y* = colorantes unidos por partícula). b) Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): (VN) CPMV nativo; a) conjugado CPMV-1 con 17 moléculas de colorantes ancladas a la cápside; b) mutante CPMV-1 con 60 colorantes ancladas a la cápside. A la izquierda (fondo negro), gel visualizado bajo luz UV mostrando la fluorescencia de emisión localizada en la subunidad menor del virus nativo y en la mayor del mutante. A la derecha, el gel visualizado bajo tinción con azul de Coumassie, mostrando ambas subunidades.

mentación de gradiente de sacarosa, microscopía electrónica y cromatografía líquida rápida de intercambio iónico (Figura 5). Las dos primeras son usadas para verificar que las partículas conjugadas permanecen intactas, exhibiendo las mismas velocidades de sedimentación que las partículas virales iniciales. La última pone en evidencia que una única sustitución por cada unidad asimétrica afecta dramáticamente a las propiedades de la partícula, en este caso su interacción con una columna de intercambio iónico. Esto se deduce claramente de la excelente separación de los picos asociados a las partículas conjugadas y a las de partida, y de la aparición de la absorbancia de la fluoresceína vinculada solamente al segundo pico (partículas conjugadas).^[7]

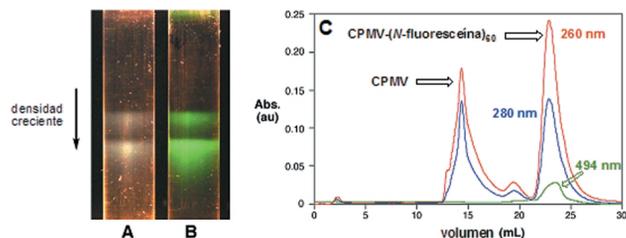


Figura 5. Análisis de las partículas CPMV decoradas con colorante. Ultracentrifugación a través de gradientes de sacarosa del a) CPMV nativo y b) CPMV-(*N*-fluoresceína)₆₀ preparado con **1**. Las dos bandas en cada muestra contienen partículas virales que encapsulan dos componentes del RNA genómico de distinto tamaño, lo que hace que las partículas tengan distintas densidades. c) FPLC de intercambio iónico de una mezcla de CPMV nativo y CPMV-(*N*-fluoresceína)₆₀.

Mediante esta estrategia se han conseguido preparar conjugados CPMV-(biotina)_n que han mostrado una gran afinidad por partículas de poliestireno modificadas con avidina dando lugar a la formación específica de agregados cuando se mezclan ambos sistemas.^[7]

Reactividad de los residuos de cisteína

Para aumentar la versatilidad del virus como plataforma química, sería de gran utilidad tener residuos de cisteína expuestos al medio que pudieran ser modificados químicamente. Sin embargo, la estructura resuelta de rayos X muestra que CPMV no posee dichos residuos accesibles en la superficie de su cápside. No obstante, gracias a las técnicas de mutagénesis dirigida, es posible preparar mutantes del CPMV con cisteínas expuestas en una de las dos posiciones exteriores de la unidad asimétrica. De esta manera, ha sido posible insertar 5 residuos de cisteína entre las posiciones 98 y 99 de la subunidad mayor.^[8] Un aspecto destacable de esta estrategia es que ha permitido la formación de agregados a través de enlaces disulfuros en ausencia de agentes reductores. Además, estos residuos de cisteína son más reactivos, reaccionando más rápidamente con los reactivos específicos para estos grupos tales como maleimidas y bromoacetamidas. Esta característica ha permitido introducir unas 60 moléculas de colorante en la subunidad menor. Por otro lado, algunos lugares de la subunidad mayor pueden, también, modificarse bajo condiciones experimentales determinadas (Figura 6).^[8-9] Es muy importante resaltar que no sólo los residuos de lisina y cisteína son modificados independientemente sino que el residuo interno de cisteína permanece activo en la partícula mutada, de modo que las dos posiciones quedan química-

mente diferenciadas bajo condiciones de reacción específicas. Por ejemplo, la reacción con 50 equivalentes de **4**, seguido de purificación y posterior reacción con 1000 equivalentes de 5-maleimida tetrametilrodamina **5**, dio como resultado partículas de CPMV decoradas con 55 fluoresceínas y 49 rodaminas por partícula viral, según confirmaron los análisis mediante espectroscopía UV/vis.^[8]

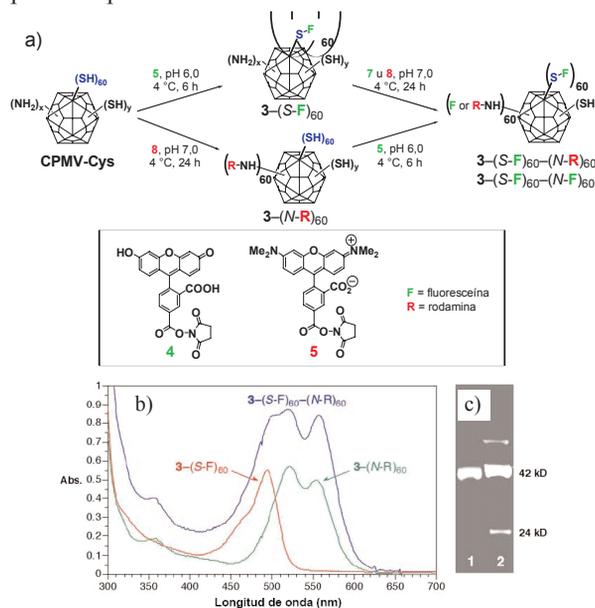


Figura 6. a) Rutas sintéticas. b) Espectro de absorbancia UV/visible de los conjugados virus-colorantes indicados. c) Gel de proteínas desnaturizante mostrando el marcaje específico de las subunidades menor y mayor, visualizado directamente bajo luz UV: carril 1, 3-(*S-F*)₆₀; carril 2, 3-(*S-F*)₆₀-(*N-F*)₆₀.

Por último, la unión de partículas de oro a los residuos de cisteína se ha llevado también a cabo exitosamente, con la formación de viriones de absorbancia característica a 420 nm (Figura 7).^[9]

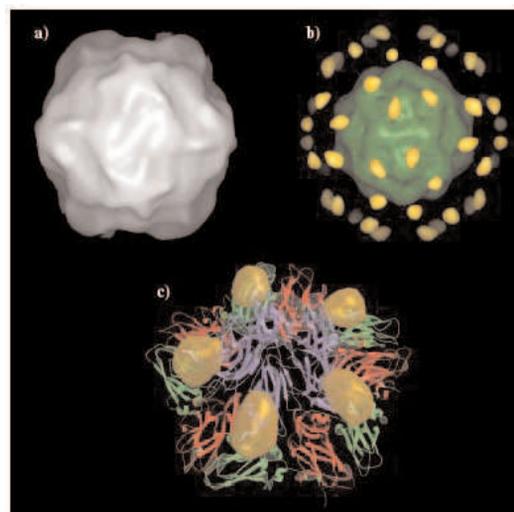


Figura 7.^[9] Análisis por microscopía crio-electrónica del mutante de cisteína del CPMV. a) Reconstrucción en 3D y resolución de 29 Å de las partículas marcadas con grupos de nano-oro de 1,4 nm de diámetro. b) Mapa de densidad mostrando el ácido nucleico (en verde) y las partículas de oro (en amarillo). c) Sección pentamérica alrededor del eje de simetría de orden 5 exponiendo el oro anclado al sitio de la mutación de cisteína.

Esta reactividad proporciona un claro ejemplo de instalación de estructuras químicas en posiciones específicas de un sistema proteico, generando así un híbrido funcional altamente versátil para diversas aplicaciones.

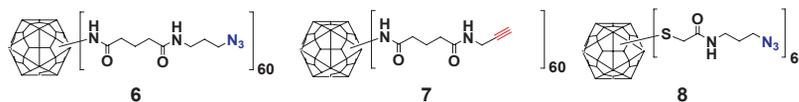


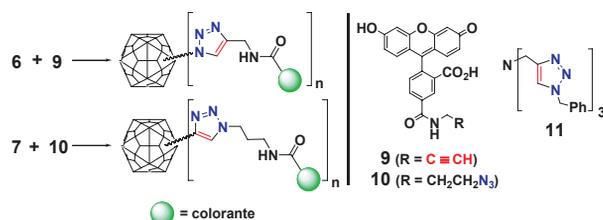
Figura 8. CPMV decorado con grupos azidas y acetilenos.

Cicloadiación [3+2] de alquinos y azidas sobre CPMV

La reacción de cicloadiación de Huisgen entre azidas y alquinos^[10] para generar 1,2,3-triazoles, es un proceso irreversible y termodinámicamente favorable (30–35 kcal/mol) que ha adquirido un gran interés en los últimos años. Sharpless y colaboradores^[11] descubrieron recientemente que la adición de sales de Cu(I) a esta reacción, no sólo aumenta la velocidad de la reacción sino que además hace que transcurra de manera regioselectiva generando exclusivamente el isómero de triazol 1,4-disustituido. La naturaleza poco reactiva tanto de las azidas como de los alquinos, su fácil introducción en compuestos orgánicos, su pequeño tamaño y su compatibilidad con los grupos funcionales presentes en biomoléculas, es lo que ha hecho de la cicloadiación entre azidas y alquinos catalizada por Cu(I) (CuAAC) un proceso químico que ha encontrado un gran número de aplicaciones en síntesis orgánica, ciencia de los materiales y biología molecular.^[12]

Esta versátil reacción ha sido también aplicada con éxito sobre el virus CPMV estableciéndose como una estrategia útil y novedosa para modificar biomoléculas complejas (Figura 8). Así, aprovechando la reactividad química discutida en el apartado anterior se pueden instalar de manera modular las unidades estructurales de azidas y alquinos para formar las partículas conjugadas del tipo **6**, **7** y **8**.^[13]

Tabla 1. Cicloadiación [3+2] entre CPMV-azidas/alquinos **6–8** con colorante-alquino **9** y colorante-azida **10**.^[a]



entrada	reactivos ^[b]	CuSO ₄ (mM)	11 (mM)	TCEP (mM)	Cu	carga ^[c] (rend %)
1	6+9	2,0	2,0	2,0	–	<1 (94)
2	6+9	1,0	2,0	–	–	<1 (80)
3	6+9	1,0	–	–	+	23 (87)
4	6+9	1,0	2,0	–	+	60 (94)
5	6+9	1,0	2,0	2,0	–	60 (96)
6	6+9	1,0	–	2,0	+	17 (95)
7	6+9	1,0	–	2,0	–	10 (94)
8	6+9	1,0	2,0	2,0	+	60 (86)
9	6+9	1,0	2,0	–	+	22 (87)
10	6+9	–	–	–	–	2 (100)
11	7+10	1,0	2,0	–	+	10 (96)
12	7+10	2,0	2,0	2,0	–	48 (80)
13	7+10	2,0	2,0	2,0	+	43 (75)

[a] Condiciones: 2.0 mg/mL de **6–8**, 117 equivalentes de **9**, 234 equivalentes de **10**; pH = 8,0 (disolución tampón de fosfato potásico conteniendo 5% de *tert*-butanol), 4 °C, 16 horas, [b] El uso del virus **8** dio los mismos resultados que el **6** dentro del error experimental, [c] Número de moléculas ancladas por virión.

La eficacia de la CuAAC sobre los conjugados virus-N₃ **6** y **8**, y virus-acetileno **7** queda reflejada en la reacción con derivados de fluoresceína conteniendo grupos complementarios. Como se observa en la Tabla 1, la reacción de acoplamiento no tiene lugar en ausencia de Cu(I) (entrada 1) o agente reductor (entrada 2), demostrando la necesidad de dicho metal en su estado de oxidación 1.^[13]

Las especies de Cu(I) se generan fácilmente mediante reducción *in situ* de CuSO₄ con cobre metálico (entrada 3). Por otro lado, para que la CuAAC sea efectiva a temperaturas suaves y en condiciones diluidas se requiere la presencia de un ligando capaz de estabilizar el estado de oxidación 1 del metal. De esta manera, la adición de ligandos como el tris(triazol)amina **11** aumenta la velocidad de la reacción considerablemente estabilizando el estado de oxidación del Cu(I) en agua, y permitiendo así la transformación de todos los grupos azidas sobre el virus a los correspondientes triazoles (entrada 4). Tris(carboxietil)fosfina (TCEP), un agente reductor soluble en agua utilizado para proteger los residuos de cisteína en proteínas de acoplamientos oxidativos, también permite la reacción en presencia de **11** (entrada 5) pero no en su ausencia (entradas 6 y 7). En general, una concentración mínima de 0,5 mM de CuSO₄ es necesaria para mantener una alta eficiencia del proceso. Aunque CPMV es estable a una concentración de 20 mM en Cu(II) y 10 mM en Cu(I), en presencia de cualquier combinación de TCEP, alquino, y azida; la formación de los triazoles enlazados a la cápside en presencia de Cu(II) produce la descomposición del virus, a menos que el ligando **11** esté presente. Dicho ligando inhibe el acoplamiento oxidativo de acetilenos terminales catalizado por Cu(II) para generar dienos.

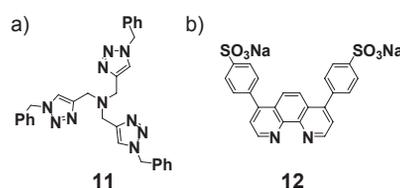


Figura 9. Ligandos a) **11** y b) **12** para CuAAC solubles en disolventes orgánicos y en agua respectivamente.

TCEP reacciona sólo muy lentamente con azidas alifáticas, sin embargo, sí se enlaza fuertemente a centros de cobre con lo que una alta proporción TCEP/Cu puede llegar a ser inhibitoria del proceso. Aunque el ligando **11** acelera mucho la reacción cuando ésta es homogénea, la falta de solubilidad del ligando en agua hace que la reacción en medios acuosos sea demasiado lenta y obliga al uso de grandes excesos de reactivo. Recientemente se publicó una mejora de la reacción en fase acuosa^[13] que utiliza el ligando, sulfonato de batofenantrolinea **12** que es soluble en agua (Figura 9). Con esta alternativa se pudo realizar la reacción de CuAAC sobre la superficie viral con una efectividad y rendimientos muy superiores a los obtenidos con el ligando **11**.^[14]

Esta nueva estrategia ha supuesto una revolución en lo que respecta a la funcionalización efectiva y quimioselectiva del

virus con bloques estructurales de importancia biológica tales como oligosacáridos, péptidos, polímeros, ADN/RNA e incluso proteínas (Figura 10).^[14]

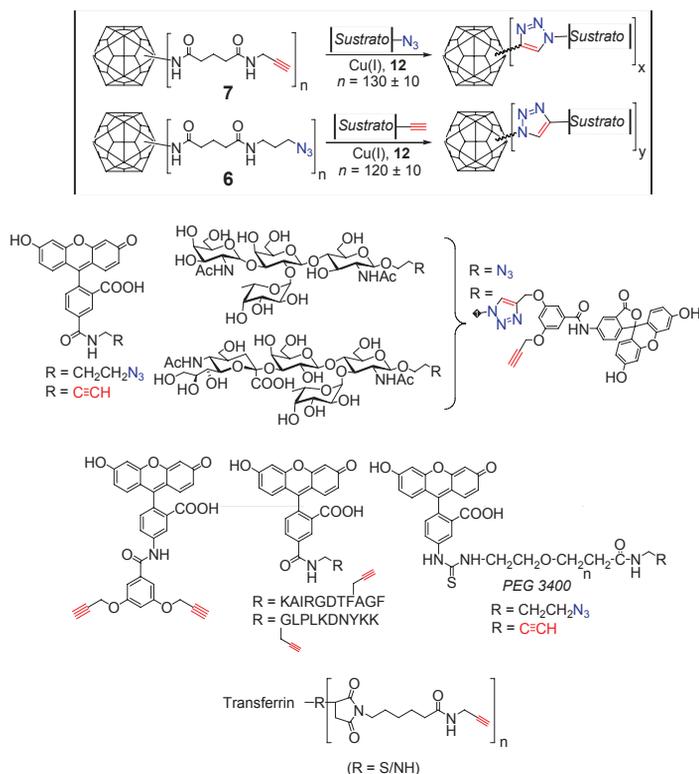


Figura 10. Reacción CuAAC entre distintos sustratos conteniendo grupos alquinos o azidas y CPMV funcionalizados con grupos azidas o alquinos respectivamente.

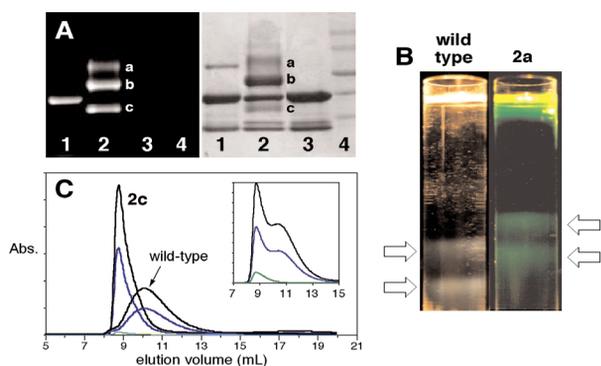
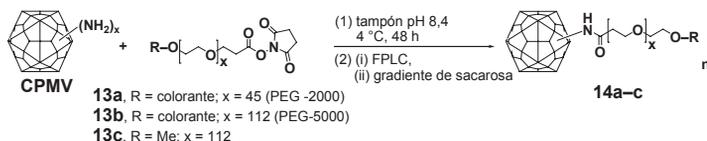


Figura 11. Ruta sintética para la construcción de derivados CPMV-PEG. a) Análisis SDS-PAGE de la reacción: gel visualizado bajo luz UV (fondo negro) y gel teñido con azul de Coomassie (fondo claro). Carril 1: CPMV-*N*-fluoresceína con el colorante enlazado a la subunidad mayor; carril 2: **14b**, con 29 ± 3 unidades de PEG-fluoresceína por cápside; carril 3: CPMV nativo; carril 4: marcador de proteínas por tamaño. b) Ultracentrifugación de gradiente de sacarosa del CPMV nativo y **14a** ($n = 29 \pm 3$), mostrando el característico color verde de los PEG conteniendo fluoresceína. c) Cromatogramas FPLC solapados de CPMV nativo y **14c** ($n = 29 \pm 3$), mostrando el menor tiempo de retención del último. En el recuadro interior: FPLC de una mezcla de CPMV nativo y **14b** ($n = 29 \pm 3$). Absorbancia a 260 nm (negro), 280 nm (azul) y 495 nm (verde).

Polímeros y carbohidratos sobre CPMV

Conjugados CPMV-polímeros

En el año 2003 se describió la síntesis de los primeros híbridos virus-polímeros^[15] mediante bioconjugación de polietilenglicoles (PEGs), utilizando como reactivos fluoresceína-PEG *N*-succinimida **13a-b** (PM 2000 y 5000) y metoxi-PEG *N*-succinimida **13c** (PM 2000 y 5000) a pH = 8,4 como se muestra en la Figura 11. El número de cadenas de polietilenglicol introducidas en el virus, así como la caracterización de los nuevos conjugados virales se llevó a cabo mediante las técnicas ya mencionadas. Alrededor de 60 cadenas de PEG-2000 y 29 de PEG-5000 por partícula viral se unieron covalentemente bajo condiciones extremas. Estos conjugados CPMV-PEGs poseen la habilidad de provocar una respuesta inmune, lo que constituye un aspecto muy importante de este apartado ya que la modulación de dicha respuesta en mamíferos es esencial para la aplicación de los virus como vectores en la liberación de fármacos incluyendo la terapia génica.

Por último, la combinación de la reacción de polimerización radicalaria con transferencia de átomo (ATRP)^[16] y la reacción de cicloadición entre azidas y alquinos, ambas catalizadas por Cu (I), ha permitido el anclaje de restos glicopoliméricos sobre el virus de una manera altamente eficiente (Figura 12).^[17]

Tal y como se muestra en la Figura 13, la elución más rápida de **16** en FPLC es indicativa de un aumento sustancial del tamaño de la partícula. Por otro lado, la absorbancia del colorante a 495 nm sólo aparece para **16** lo que confirma el éxito de la reacción de bioconjugación. La naturaleza ancha de las bandas obtenidas por electroforesis (Figura 13b) proviene de la polidispersidad de los polímeros.

Conjugados CPMV-carbohidratos

La multivalencia es la propiedad de la que la naturaleza ha hecho uso para aumentar la eficiencia en los procesos biológicos dirigidos por interacciones no covalentes débiles. Los sistemas polivalentes de carbohidratos basados en polímeros lineales y dendrímeros son unas excelentes herramientas para el estudio de procesos celulares basados en receptores de azúcares. Por otro lado, y debido a que estos sistemas multivalentes proporcionan una mayor respuesta bioquímica cuando se comparan con azúcares monoméricos en disolución,^[18] proporcionan una interesante estrategia en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

En esta línea, se ha llevado a cabo la unión covalente de azúcares al CPMV mediante la reacción con α -D-manopiranosilfenil-isotiocianato **17**, tal y como se muestra en la Figura 13, obteniéndose 42 ± 5 azúcares por virion.^[19]

Si se utiliza una quimera de CPMV con residuos de cisteína insertados genéticamente, es posible llevar a cabo la reacción primero con fluoresceína bromoacetamida **19** sobre dichos residuos y utilizar las

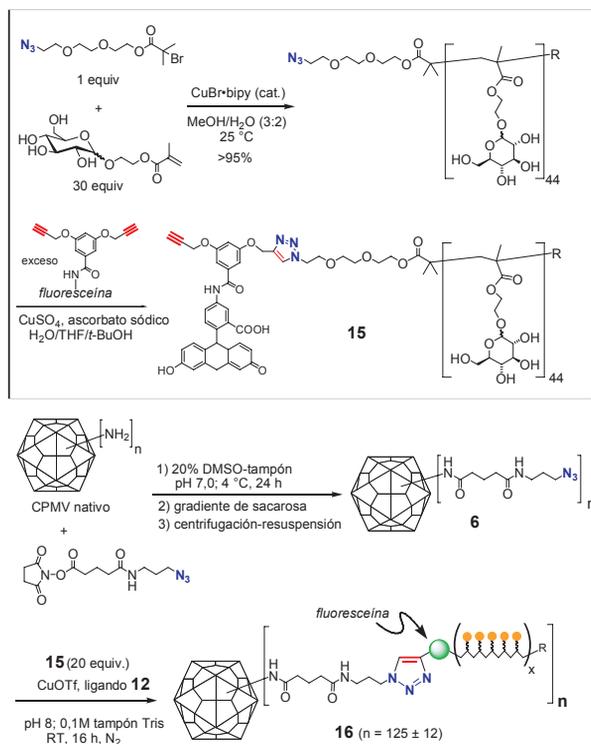


Figura 12. Síntesis de glicopolímeros y conjugados virus-polímero.

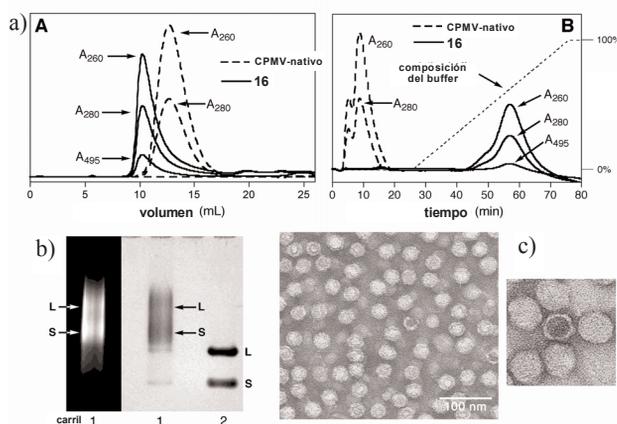


Figura 13. a) FPLC en una columna (con-A)-sefarosa del CPMV nativo y del conjugado **16** con un tampón the composición: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,15mM NaCl, 0,1 mM Ca^{2+} y 0,1 mM Mn^{2+} (solución A) y 1M glucosa (solución B). b) Electroforesis (SDS-PAGE) de **16** (carril 1) y CPMV nativo (carril 2). Izq.: Gel bajo luz UV, dcha.: gel teñido con azul de Coomassie. c) Fotografía mediante microscopía de transmisión electrónica (MET) de **16** y ampliación captando una partícula CPMV-nativa rodeada de **16**.

partículas modificadas posteriormente para decorarlas con carbohidratos utilizando ahora los residuos de lisina (Figura 14).^[19]

El efecto multivalente cooperativo que existe en el virus puede utilizarse de forma beneficiosa para inhibir la aglutinación de eritrocitos. Éste es un proceso de gran importancia que se lleva a cabo mediante el uso de la concavalina-A (con-A). Esta lectina vegetal existe en disolución tampón de fosfato como un tetrámero capaz de asociarse en presencia de iones Ca^{2+} y Mn^{2+} a cuatro unidades de α -D-manopiranosidos o α -D-glucopiranosidos dando lugar a geles formados por agregados dendríticos de glicósidos. De esta forma, este fenómeno de aglutinación se puede observar también cuando se incubaba

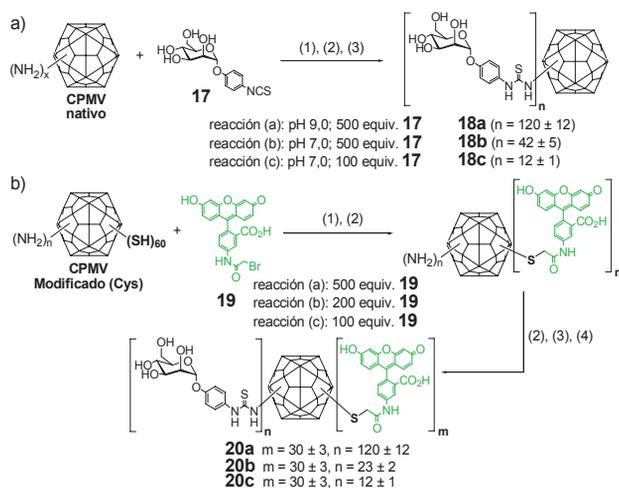


Figura 14. a) 1) 20% DMSO en tampón, 4 °C, 48 h; 2) diálisis; 3) FPLC. b) 1) 20% DMSO en tampón, pH 7,0; 4 °C, 48 h; 2) FPLC; 3) 20% DMSO en tampón, pH 9,0; 4 °C, 48 h; 4) diálisis; 5) FPLC.

la con-A con una disolución del conjugado CPMV-**18a** en presencia de Ca^{2+} y Mn^{2+} (0,1 M) (Figura 15). Los resultados de estos ensayos de aglutinación demostraron que las unidades de manosa presentes en el virus fueron entre 690 y 890 veces más efectivas que la manosa monomérica en el proceso de inhibición de aglutinación de eritrocitos. Dichos datos son comparables con aquellos publicados para dendrímeros como el PAMAM conteniendo entre 95 y 172 azúcares^[20] y glicopolímeros de alto peso molecular.^[21]

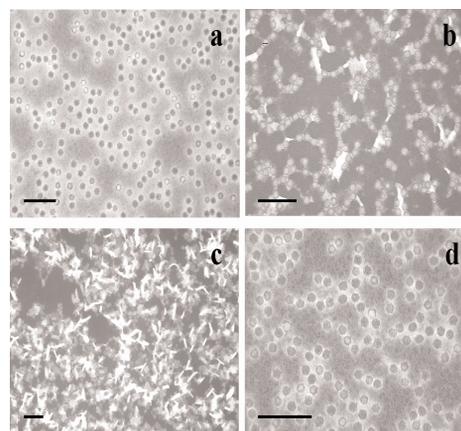


Figura 15.^[19] Imágenes MET (barra de escala = 200 nm). a) Virus **18a**; b) Aglutinación entre **18a** y con-A en presencia de Ca^{2+} y Mn^{2+} después de 30 minutos a temperatura ambiente; c) muestra *d* después de 12 horas a 4 °C; d) adición de glucosa a la muestra *c*.

Organización supramolecular del CPMV mediante interacciones covalentes y no covalentes

Conjugados CPMV-oligonucleótidos

Las partículas virales pueden también ser inducidas a autoensamblarse en virtud del reconocimiento de bases complementarias de ácidos desoxirribonucleótidos anclados a su superficie.^[22] Así lo ha demostrado un estudio reciente donde se anclaron al CPMV aproximadamente 30 oligonucleótidos complementarios –por su extremo 5'– compuestos de secuencias de tres pares de base ricas en GC. Para ello se utilizaron

tanto los residuos de lisina como de cisteína introducidos genéticamente (Figura 16). Experimentos de dispersión de luz dinámica a múltiples ángulos demostraron que las estructuras conjugadas poseen un radio hidrodinámico sustancialmente mayor que el virus nativo. Cuando se incuban partículas en las que se han incorporado oligonucleótidos complementarios ocurre un fenómeno de agregación dirigido por el reconocimiento molecular entre bases nucleicas complementarias (Figura 15).^[22]

Dicho proceso es termoreversible, siendo posible destruir los agregados al aumentar la temperatura a 45 °C o bien al añadir oligonucleótidos competitivos como se muestra en la Figura 17. El emparejamiento de bases complementarias es esencial para dicha agregación, ya que ésta no se observa al incubar virus no modificados con virus que posean una secuencia oligonucleótida. Este reconocimiento supramolecular de los virus conjugados con oligonucleótidos complementarios posee una gran importancia en campos como el estudio de transferencias energéticas en contextos biológicos. Así por ejemplo, el reconocimiento entre A (partículas decoradas con un colorante dador (fluoresceína)) y B (otras decoradas con uno aceptor (carboxirodamina)) permite su acercamiento recíproco a una distancia suficientemente próxima (radio de Förster, $R_0 = 55 \text{ \AA}$) como para permitir una transferencia de energía detectable.^[22]

Oxidación de los residuos de tirosina

Otra estrategia para generar agregados de partículas virales consiste en la oxidación y posterior acoplamiento de los residuos de tirosina. De este modo, cuando CPMV es incubado en

presencia del tripéptido NH₂Gly-Gly-His-COOH (GGH), acetato de níquel y un peróxido oxidante (magnesio monoperóxido -MMPP-), se produce una unión covalente a través de los límites de cada subunidad pentamérica.^[23] La cadena peptídica proporciona un ambiente de coordinación favorable para el centro metálico Ni, y un intermedio de Ni(III) cuya existencia se ha propuesto actúa abstrayendo un electrón del anillo aromático de un residuo accesible de tirosina, dejando un radical tirosil después de la pérdida de un protón. Este intermedio radicalario, altamente reactivo, induce el acoplamiento de tirosinas adyacentes generando aductos interconectados con propiedades químicas y biológicas destacables (Figuras 18–19). Dicho proceso puede inducirse también de manera altamente efectiva en condiciones fotoquímicas si se lleva a cabo en presencia de determinados complejos de rutenio.

Conclusiones y perspectivas

Analizando los resultados expuestos en este manuscrito, resulta evidente que los virus forman un verdadero matrimonio entre Biología y Química. Están ubicados en los límites de separación entre la materia viva y la inerte, y su estructura de rayos X es conocida en numerosos casos. Estas características han hecho de ellos una novedosa nanoplatforma sobre la que llevar a cabo reacciones químicas de una manera controlada y altamente efectiva. Dichas reacciones pueden realizarse tanto en la superficie como en el interior del virus de manera diferenciada, haciendo uso de los residuos expuestos de lisina, cisteína o bien a través de grupos carboxilatos.^[24] En complemento a las modificaciones químicas realizadas en el

CPMV hasta la fecha, hay que considerar también a los conjugados porfirínicos, análogos de los dendrímeros, que han sido fabricados para mimetizar la catálisis y transporte electrónico de diversas proteínas. Igualmente importantes son los complejos de gadolinio elaborados para el desarrollo de nuevos agentes de contraste para resonancia magnética.^[25] La posibilidad de controlar la reactividad del virus mediante manipulación genética, el hecho de localizar una gran concentración de moléculas en su vecindad, así como unir covalentemente dos estructuras moleculares diferentes y a distancias específicas sobre un mismo virus, ofrece líneas de actuación muy interesantes, no sólo en síntesis orgánica y en ciencias de los materiales sino también en el diseño y desarrollo de nuevas vacunas y antivirales terapéuticos. En la actualidad ya se están llevando a cabo estudios para investigar el destino de las partículas CPMV *in vivo* tras su administración oral en animales,^[26] donde los resultados preliminares están mostrando, por ejemplo, que el virus es capaz de mantenerse estable en el tracto gastrointestinal (37 °C y valores bajos de pH) y diseminarse sistemáticamente a tejidos muy diversos. Por otro lado, dentro del campo de los biosensores, el diseño de sistemas modelos para el estudio de las interacciones receptor-ligando en la interfase célula-sustrato se ha convertido

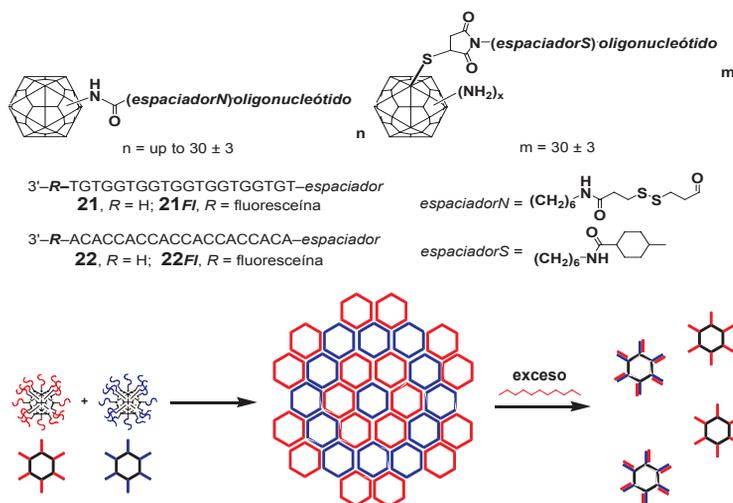


Figura 16. Agregación reversible de los conjugados CPMV-oligonucleótidos. Virus marcados **21** y **21FI** contienen la secuencia oligonucleótida complementaria a **22** y **22FI**.

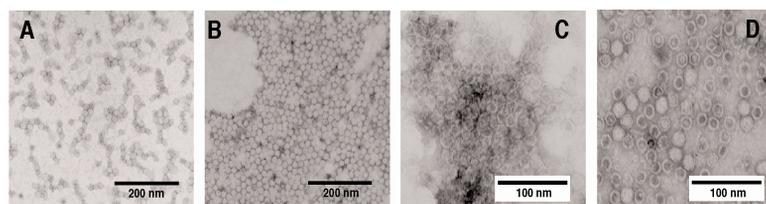


Figura 17.^[22] Dependencia de la agregación de los conjugados CPMV-oligonucleótidos complementarios con la temperatura. a) 4 °C, 16 h, b) temperatura ambiente, 16 h c) 40 °C, 16 h, d) 45 °C, 12 h.

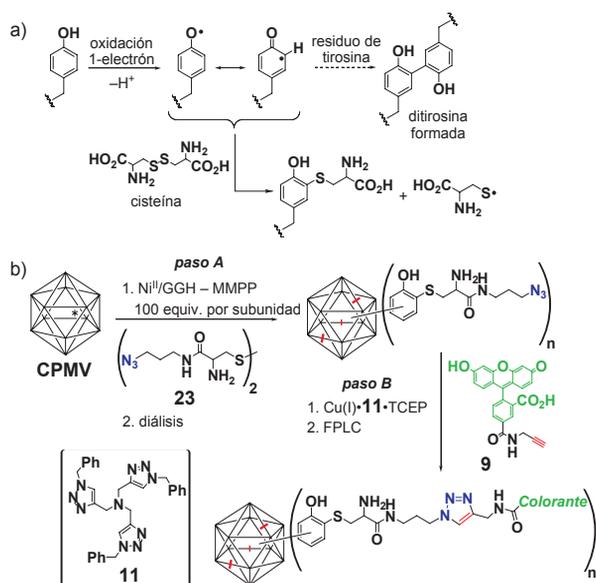


Figura 18. (a) Mecanismo propuesto para la interconexión e inhibición por cisteína. (b) Inhibición de la reacción de interconexión por **23** y reacción de los sitios modificados mediante CuAAC para poder ser detectados mediante electroforesis en gel.

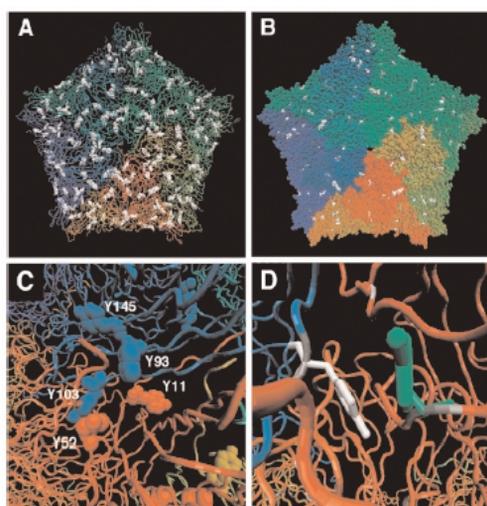


Figura 19.^[23] Estructura cristalina: a) Superficie exterior de la unidad asimétrica alrededor del eje de simetría de orden 5, con los residuos de tirosina en blanco y el esqueleto carbonado de la unidad en diferentes colores. b) Las tirosinas se muestran en blanco, las unidades asimétricas se muestran en representación CPK para mostrar los residuos expuestos en la superficie. c) Imagen expandida del espacio entre las subunidades pequeñas en azul y rojo, mostrando el esqueleto proteico. d) Imagen expandida mostrando la cercanía de las tirosinas Y52 (verde) y la Y103 (blanca) de las subunidades adyacentes. 3.81 Å se-paran el carbono *ipso* (para al OH) de Y52 de los carbonos *orto* al OH de Y103.

en un área de gran interés, ya que la habilidad de generar colecciones de biomoléculas con características nanométricas bien definidas sin alterar su bioactividad es de suma importancia en el campo de la nanobiotecnología. En este sentido, la inmovilización quimioselectiva de quimeras del CPMV ha sido también posible mediante técnicas de nanolitografía.^[27]

Resulta obvio que la combinación de una información estructural detallada, un control genético de la secuencia proteica, y las técnicas de síntesis orgánica permitirá en esta

nueva era la creación de un número considerable de interesantes estructuras funcionales a partir de partículas virales, las cuales han estado confinadas, prácticamente desde su descubrimiento, a los límites de la biología molecular. Su fácil aislamiento y estabilidad adentra ahora a los virus en los confines de la química; y sin duda, las aplicaciones más destacables surgirán de aprovechar las características de polivalencia y autoensamblado de estas fascinantes partículas naturales.

Agradecimientos

D. D. D. agradece al MEC de España la concesión de un contrato Ramón y Cajal, al comité editorial de *An. Quim.* la invitación para escribir este artículo, al Dr. Rafael Z. Méndez (IUBO-ULL) por sus correcciones y al Prof. José Juan M. Tellado (IUBO-ULL) por su apoyo, confianza e inestimable ayuda en la culminación de este trabajo. Igualmente, agradecemos al censor de este manuscrito por sus acertados comentarios.

Bibliografía

- [1] G. Ozin, A. Arsenault, *Nanochemistry: A Chemical Approach to Nanomaterials*, Royal Society of Chemistry, London, 2005.
- [2] J. G. Martínez, *An. Quim.* **2006**, *102*, 5–11.
- [3] T. Lin, Z. Chen, R. Usha, C. Stauffacher, J. Dai, T. Schmidt, J. Johnson, *Virology* **1999**, *265*, 20–34.
- [4] J. White, J. E. Johnson, *Virology* **1980**, *101*, 319–324.
- [5] J. E. Johnson, J. Speir, *J. Mol. Biol.* **1997**, *269*, 665–675.
- [6] C. S. Porta, V. E. Spall, J. Loveland, J. E. Johnson, P. J. Barker, G. P. Lomonosoff, *Virology* **1994**, *202*, 949–955.
- [7] Q. Wang, E. Kaltgrad, T. Lin, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 805–811.
- [8] Q. Wang, T. Lin, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 813–819.
- [9] Q. Wang, T. Lin, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 459–462.
- [10] a) R. Huisgen en *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, (Ed. A. Padwa), Wiley: New York, **1984**; Capítulo 1, pp. 1–176; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [11] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [12] Q. Wang, S. Chittaboina, H. N. Barnhill, *Lett. Org. Chem.* **2005**, *2*, 136–138, y referencias citadas.
- [13] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193.
- [14] S. S. Gupta, J. Kuzelka, P. Singh, W. G. Lewis, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1572–1579.
- [15] K. S. Raja, Q. Wang, M. J. Gonzalez, M. Manchester, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 472–476.
- [16] K. Matyjaszewski, J. Xia, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2921–2990.
- [17] (a) S. S. Gupta, K. S. Raja, E. Kaltgrad, E. Strable, M. G. Finn, *Chem. Commun.* **2005**, 4315–4317. (b) E. Kaltgrad, S. S. Gupta, D. D. Díaz, M. G. Finn, manuscrito en preparación.
- [18] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *110*, 2908–2953.
- [19] K. S. Raja, Q. Wang, M. G. Finn, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1348–1351.

- [20] E. K. Woller, M. J. Cloninger, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 7–10.
[21] M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9931–9932.
[22] E. Strable, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1385–1389.
[23] S. Meunier, E. Strable, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 319–326.
[24] N. F. Steinmetz, G. P. Lomonosoff, D. J. Evans, *Langmuir* **2006**, *22*, 3488–3490.
[25] Referencias y detalles adicionales pueden obtenerse directamente de los autores.
[26] C. S. Rae, I. W. Khor, Q. Wang, G. Destito, M. J. Gonzalez, P. Singh, D. M. Thomas, M. N. Estrada, E. Powell, M. G. Finn, Manchester, *M. Virology* **2005**, *343*, 224–235.
[27] J. C. Smith, K.-B. Lee, Q. Wang, M. G. Finn, J. E. Johnson, M. Mrksich, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 883–886.



V PREMIOS *Lilly* de INVESTIGACIÓN para ALUMNOS DE DOCTORADO

3 Premios de 1.500 €
para alumnos de doctorado de las Áreas de
Química Orgánica, Farmacéutica y Analítica

14 de septiembre de 2007
Finaliza el plazo para la recepción de solicitudes.
19 de octubre de 2007
Entrega de premios en las instalaciones de Lilly de Alcobendas (Madrid).

Bases de los premios y otros datos en www.lilly.es, sección I+D/Investigación Básica

Eli Lilly es una compañía farmacéutica global, con centros de investigación en EEUU y Europa, líder en el descubrimiento, desarrollo y comercialización de nuevos medicamentos. El centro de I+D en Alcobendas, dedicado a Química Médica, Orgánica y Analítica, a través del Comité Europeo para Relaciones Académicas (EUACC), se complace en convocar en España los V Premios de Investigación para alumnos de doctorado.

Eli Lilly en Europa:

España: Alcobendas, www.lilly.es Reino Unido: Windlesham, www.lilly.co.uk Irlanda: Kinsale, www.lilly.ie



Respuestas que importan.