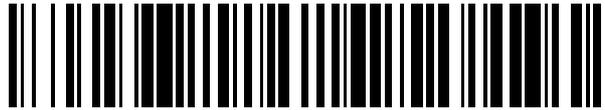


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 024**

51 Int. Cl.:

C40B 40/12 (2006.01)

C40B 50/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2009 E 09798721 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2318832**

54 Título: **Matrices de glucano sobre portaobjetos de vidrio revestidos con aluminio de tipo PTFE y métodos relacionados**

30 Prioridad:

15.07.2008 US 80931 P
22.10.2008 US 107624 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2014

73 Titular/es:

ACADEMIA SINICA (100.0%)
128, Sec 2, Academia Road Nankang
Taipei 11529, TW

72 Inventor/es:

WONG, CHI-HUEY;
WU, CHUNG-YI y
TSENG, SUSAN Y.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 442 024 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Matrices de glucano sobre portaobjetos de vidrio revestidos con aluminio de tipo PTFE y métodos relacionados

5

Antecedentes

Las matrices de glucano sobre nuevos portaobjetos de vidrio revestidos con aluminio, incluyen portaobjetos de vidrio revestidos con aluminio poli-fluorofosfonado, permiten la caracterización por espectrometría de masas sin matriz, la evaluación de la fluorescencia de unión azúcar-proteína y la identificación y estudio de enzimas con diferente eficiencia y especificidad.

Según la base de datos de proteínas SWISS-PROT, se pronostica que más del 50 % de las proteínas humanas están glucosiladas. A menudo los carbohidratos existen en las superficies celulares como glucoproteínas o conjugados glucolipídicos y desempeñan importantes funciones estructurales y funcionales en numerosos procesos de reconocimiento biológico, por ejemplo, plegamiento, secreción y estabilización de proteínas, infección viral y bacteriana, metástasis de cáncer, respuesta inflamatoria, inmunidad innata y adaptativa y muchos otros procesos de señalización mediados por receptores. Además, existen muchos ejemplos en los que para realizar actividades biológicas se requiere glucosilación. Adicionalmente, muchos organismos, tales como plantas sésiles, han desarrollado mecanismos de glucosilación específicos para desintoxicar xenobióticos exógenos y dañinos.

A pesar del mayor conocimiento del significado biológico de los carbohidratos, el estudio de interacciones carbohidrato-proteína aún entraña mucha dificultad, principalmente debido a la complejidad estructural y a la dificultad sintética de los carbohidratos y a la baja afinidad de sus interacciones con proteínas de unión a glucano (GBP). Típicamente, la constante de disociación (K_D) monomérica en una interacción carbohidrato-proteína está en el intervalo milimolar; por tanto, las respuestas biológicas mediadas por carbohidratos a menudo se realizan a través de interacciones multivalentes sobre la superficie celular para conseguir alta afinidad y especificidad.

Un reto principal en la biología celular es definir la interacción de los oligosacáridos y proteínas implicados en muchos procesos biológicos. Sin embargo, es difícil obtener oligosacáridos puros y existe una necesidad de desarrollar métodos muy sensibles y a alto rendimiento para estudios de identificación y de unión de carbohidratos reconocidos por diversos receptores.

Las micromatrices de carbohidratos son una herramienta poderosa para el estudio de la glucobiología en el bioensayo a alto rendimiento de enfermedades epidémicas. Un problema fundamental de esta tecnología es cómo caracterizar y cuantificar los oligosacáridos que se unen covalentemente a la superficie. La inmovilización eficaz de azúcar sobre la superficie es esencial para la supervivencia consecutiva al lavado del sustrato cuando se evalúa la unión de azúcar-proteína. Se ha descrito que la espectrometría de masas (EM) es un método analítico útil para la caracterización a alto rendimiento de azúcares inmovilizados sobre portaobjetos de vidrio poroso.

Aunque se dispone de diversos sustratos en el comercio para matrices de glucano, éstos no son adecuados para realizar análisis de espectrometría de masas directo. Estos sustratos incluyen vidrio y polietilentereftalato (PET) recubiertos con grupos amina, carboxilato, *N*-hidroxisuccinimida (NHS), avidina, epoxi, aldehído y quelantes de níquel y etcétera. De hecho, los portaobjetos de vidrio funcionalizados con NHS se usan normalmente para la preparación de matrices de glucano. Un ejemplo típico es el de antígenos de azúcar inmovilizados sobre la superficie del portaobjetos de vidrio, después de lo cual un anticuerpo monovalente de unión a azúcar y un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia se incuban para estudios de interacción proteína-carbohidrato. Aunque eficaces, estos portaobjetos de vidrio no son ideales para su uso para caracterizar los azúcares unidos por espectrometría de masas.

Los sustratos seleccionados para EM de desorción-ionización por láser asistida por matriz en tiempo de vuelo (MALDI-TOF) deben ser conductores o semiconductores de manera que se produzca un campo eléctrico uniforme a alto vacío. Las placas de acero inoxidable convencionales son normalmente la elección para cargar los analitos.

En la EM MALDI, la energía del rayo láser pulsátil se absorbe por la matriz (productos químicos orgánicos miscibles) para impedir la fragmentación de la muestra. La EM MALDI-TOF es una herramienta excelente para analizar biomoléculas de alto peso molecular. Sin embargo, los productos químicos en la matriz orgánica interfieren con oligosacáridos de bajo peso molecular (típicamente menor de 2000 Da); por tanto como sustrato se selecciona silicio poroso para el análisis de biomoléculas por EM sin la adición de compuestos químicos de matriz. En la EM de desorción-ionización sobre silicio (DIOS), se identificaron biomoléculas de peso molecular relativamente bajo en base a la proporción *m/z* del pico pseudoaparente de EM.

El documento US2004259142 desvela una matriz de moléculas de carbohidrato reductoras marcadas terminalmente inmovilizadas en un soporte.

65

El documento WO2006055925 desvela el uso micromatrices para investigar las especificidades de unión de carbohidratos de bacterias, para detectar patógenos y para explorar agentes terapéuticos contra la adhesión. El documento US2005221337 desvela una matriz que comprende una pluralidad de aplicaciones sobre un soporte sólido, en el que cada aplicación comprende independientemente un sustrato unido a dicho soporte sólido, en el que cada sustrato unido a dicho soporte sólido es independientemente una molécula que contiene carbohidrato.

El documento EP1208909 desvela un soporte de micromatriz biomolecular para soluciones de aplicación que contienen biomoléculas sonda sobre la superficie e inmovilización de las biomoléculas sonda en las soluciones hacia la superficie, en el que una pluralidad de aplicaciones que pueden unirse a las biomoléculas sonda de pequeño tamaño se disponen en matrices en una disposición regular sobre la superficie del soporte.

Chiari M et al.: J. Chromatogr. B.; 866; 1-2 (2008) desvelan ejemplos de moléculas invitadas en solución entre reconocimiento molecular mediado por polímeros y moléculas huésped localizadas en la fase sólida.

15 Sumario

La presente invención proporciona lo siguiente:

(1) Una matriz de carbohidratos inmovilizada sobre un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio (de tipo politetrafluoroetileno (PTFE)) polifluorado, comprendiendo la matriz:

una pluralidad de carbohidratos inmovilizados en localizaciones específicas sobre una superficie del sustrato sólido no transparente revestido con aluminio, de tal manera que:

- (a) los carbohidratos inmovilizados pueden caracterizarse por espectroscopía de masas (EM), y
- (b) puede realizarse análisis de reacciones de unión entre los carbohidratos y las moléculas que presuntamente se unen específicamente a los carbohidratos,

en la que el aluminio se reviste sobre un primer sustrato sólido transparente a un espesor mayor de 100 nm para convertir el primer sustrato sólido transparente en un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio de tipo PTFE polifluorado, y en el que la superficie del revestimiento de aluminio sobre el sustrato sólido está anodizada para formar una capa porosa de óxido de aluminio de un espesor menor de 5 nm.

(2) La matriz de (1), en la que el sustrato es conductor o semiconductor de un campo eléctrico.

(3) La matriz de (1), en la que el sustrato sólido transparente es vidrio.

(4) La matriz de (1), en la que el carbohidrato es un glucano.

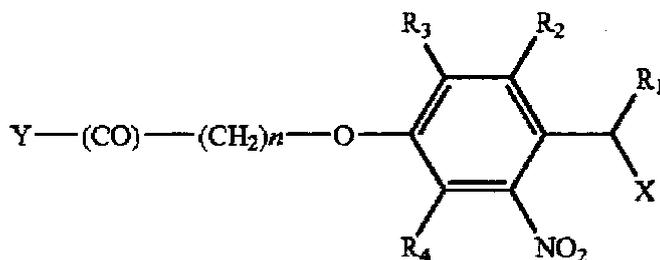
(5) La matriz de (1), en la que los carbohidratos están inmovilizados mediante un enlace no covalente o mediante un enlace covalente.

(6) La matriz de (5), en la que los carbohidratos están polifluorados con una cola $-C_nF_{2n+1}$ ($n \geq 4$).

(7) La matriz de (6), en la que los carbohidratos polifluorados se aplican sobre la superficie del sustrato sólido transparente revestido con aluminio de tipo PTFE.

(8) La matriz de (5), en el que los carbohidratos se modifican con un grupo funcional de ácido fosfónico, en el que los carbohidratos fosfonilados se inmovilizan sobre la superficie del sustrato por una interacción quelante entre el grupo de ácido fosfónico y el óxido de aluminio sobre la superficie del sustrato sólido transparente revestido con aluminio; o en el que los carbohidratos se modifican con un conector fotoescindible y un grupo funcional silano.

(9) La matriz de (8), en la que el conector fotoescindible tiene la fórmula general:



en la que R^1 es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo; cada uno de R^2 y R^4 son independientemente hidrógeno, C_1-C_8 alcoxi; R^3 es C_1-C_8 alcoxi; X es O (CO) N- $(CH_2)_n-R^5$, en el que $n \geq 3$, R^5 es carbohidrato, Y es el soporte sólido, de tipo portaobjetos ACG (Vidrio Revestido con Aluminio, por las siglas *Aluminium Coated Glass*)

5 (10) La micromatriz de (1), en la que la caracterización por espectroscopía de masas de los carbohidratos inmovilizados comprende una espectrometría de masas en tiempo de vuelo (EM-TOF), opcionalmente seleccionada de una espectrometría de masas de desorción-ionización por láser asistida por matriz en tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

10 (11) La matriz de (10) en la que los carbohidratos son polisacáridos, u oligosacáridos, o partes de carbohidrato de un glucoconjugado, o celobiosa, o celotriosa, o celotetraosa o GloboH o Gb5.

15 (12) La matriz de (11), en la que la caracterización por espectroscopía de masas de los carbohidratos inmovilizados comprende la caracterización de los productos carbohidrato de una reacción enzimática de celulasa.

20 (13) La matriz de (12), en la que la reacción enzimática de celulasa se realiza sobre carbohidratos inmovilizados en la superficie de la matriz, en la que la enzima celulasa se supone que puede degradar los polisacáridos, u oligosacáridos, o partes de carbohidrato de un glucoconjugado o celobiosa, o celotriosa o celotetraosa o GloboH o Gb5 inmovilizados.

(14) Un método para la caracterización de carbohidratos inmovilizados sobre un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio de tipo PTFE, comprendiendo el método:

25 (a) proporcionar una matriz que comprenda una pluralidad de carbohidratos inmovilizados en localizaciones específicas sobre una superficie de un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio de tipo PTFE fluorado de acuerdo con (1); y
 30 (b) realizar análisis de espectroscopía de masas para caracterizar los carbohidratos inmovilizados en cada localización específica.

(15) El método de (14), en el que la caracterización por espectroscopía de masas de los carbohidratos inmovilizados comprende una espectrometría de masas en tiempo de vuelo (EM-TOF).

35 (16) El método de (14), que adicionalmente comprende:

(c) realizar después un análisis de unión de los supuestos restos de unión a carbohidrato.

40 (17) El método de (16), en el que los supuestos restos de unión a carbohidrato son proteínas de celulasa.

(18) El método de (17), que adicionalmente comprende:

45 (d) incubar las proteínas de celulasa con los carbohidratos unidos inmovilizados sobre la superficie de la matriz en condiciones adecuadas para que las celulasas hidrolicen los carbohidratos.

(19) El método de (18), que adicionalmente comprende:

50 (e) caracterizar los productos de las restantes proteínas de celulasa inmovilizados sobre la superficie de la matriz después de hidrólisis por las celulasas, y en el que las celulasas se seleccionan del grupo que consiste en 1, 4- β -glucosidasas, exoglucanasas (1, 4- β - D glucano celobiohidrolasas) y endoglucanasas (1, 4- β - D glucano glucanohidrolasas).

(20) Un método para el análisis de reacciones de unión entre los carbohidratos y las moléculas que supuestamente que se unen específicamente a los carbohidratos, comprendiendo el método:

55 (a) proporcionar una matriz que comprenda una pluralidad de carbohidratos inmovilizados en localizaciones específicas sobre una superficie de un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio de tipo PTFE de acuerdo con (1);
 60 (b) poner en contacto la matriz con una o más moléculas que se supone que se unen a una o más de una pluralidad de carbohidratos inmovilizados sobre la superficie de la matriz; e
 (c) identificar la presencia o la ausencia de reacciones de unión en una o más localizaciones específicas sobre la superficie de la matriz.

65 (21) El método de (20), en el que las moléculas que se supone que se unen específicamente a los carbohidratos son proteínas marcadas con un marcador de detección, opcionalmente en el que los marcadores de proteínas comprenden colorantes fluorescentes que incluyen colorantes de cianina reactivos con amina.

(22) El método de (20), en el que la unión de una molécula a un carbohidrato sobre la matriz es representativa de un proceso biológico seleccionado del grupo que consiste en plegamiento de proteínas, secreción de proteínas, estabilización de proteínas, infección viral, infección bacteriana, metástasis de cáncer, respuesta inflamatoria, inmunidad innata, inmunidad adaptativa, un proceso de señalización mediado por receptores y producción de biocombustible.

(23) Un método para fabricar una matriz de carbohidratos inmovilizada sobre un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio de tipo PTFE, comprendiendo el método:

- (a) proporcionar una primera superficie sólida transparente;
- (b) revestir el primer sustrato sólido transparente con aluminio a un espesor mayor de 100 nm para convertir un primer sustrato sólido transparente en un sustrato sólido no transparente revestido de aluminio;
- (c) anodizar la superficie del sustrato sólido revestido con aluminio para formar una capa porosa de óxido de aluminio de un espesor menor de 5 nm;
- (d) opcionalmente polifluorar la superficie del sustrato sólido revestido con aluminio; e
- (e) inmovilizar una pluralidad de carbohidratos en localizaciones específicas sobre una superficie de un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio de tipo PTFE mediante un enlace covalente o no covalente,

en el que el sustrato es conductor o semiconductor de un campo eléctrico.

(24) El método de (23), en el que los carbohidratos están polifluorados y/o modificados con un grupo funcional de ácido fosfónico.

(25) Una matriz para su uso en el diagnóstico de enfermedades y descubrimiento de fármacos, en el que la matriz se fabrica mediante el método de acuerdo con (23).

Dibujos

Las características y objetos de la presente descripción mencionados anteriormente llegarán a ser más evidentes con referencia a la siguiente descripción tomada en su conjunto con los dibujos adjuntos en los que los mismos números de referencia indican los mismos elementos y en los que:

La Fig.1 es un diagrama de bloque de implementaciones y técnicas experimentales con portaobjetos de vidrio revestidos de aluminio (ACG) y técnicas experimentales relacionadas;

la Fig. 2 es un esquema que muestra una implementación de la síntesis de ACG manosa y ACG lactosa con un conector fotoescindible;

la Fig. 3 son fotografías al microscopio de implementaciones de portaobjetos de vidrio revestidos con aluminio;

la Fig. 4 son gráficos de datos experimentales que ilustran la composición superficial de portaobjetos ACG fabricados mediante diversos métodos;

la Fig. 5 son representaciones visuales de implementaciones de las propiedades ópticas del micro portaobjetos de vidrio, del portaobjetos ACG semitransparente y del portaobjetos ACG (no transparente) totalmente reflectante;

la Fig. 6 son gráficos de implementaciones de datos experimentales que muestran espectros ATR/FTIR de Al-OH sobre un portaobjetos ACG;

la Fig. 7 son fotografías de ángulo de contacto de agua sobre portaobjetos ACG que demuestran la eficacia de la activación;

la Fig. 8 es una implementación de un esquema para la escisión de unión selectiva y detección de un derivado de azúcar (manosa) por espectrometría de masas TOF ultraflex;

la Fig. 9 muestra implementaciones de datos de espectrometría de masas sobre una placa de aluminio puro y un portaobjetos ACG;

la Fig. 10 muestra implementaciones de ensayos de unión a proteína de portaobjetos ACG formados por evaporación por arco catódico tras el tratamiento con a) plasma de oxígeno (Al-1), b) plasma de argón (Al-2) y c) una mezcla de plasma de oxígeno y argón (Al-3) antes de injertar APDMES;

la Fig. 11 son fotografías de implementaciones de un ensayo de unión a proteína marcado con fluorescencia de manosa inmovilizada sobre un portaobjeto de vidrio y un portaobjetos ACG;

- 5 la Fig. 12 son gráficos de implementaciones de datos experimentales que muestran comparaciones de las intensidades pico del espectro de masas TOF ultraflex de manosa con un conector fotoescindible (PCL, por las siglas *Linker Photo Cleavable*) injertado en portaobjetos ACG con las intensidades de fluorescencia del portaobjetos de ACG unido a proteína-manosa formadas por termo revestimiento seguido por anodización electroquímica sobre la superficie del portaobjetos;
- 10 la Fig. 13 muestra datos relacionados con implementaciones de utilización de superficies NH₂-ACG modificadas a través de la conversión en NHS-ACG por tratamiento con disuccinimidil suberato (DSS) en DMF y diisopropiletilamina;
- 15 la Fig., 14 son fórmulas químicas de estructuras de compuestos utilizadas en experimentos de espectroscopía de masas-ACG;
- la Fig. 15 es un diagrama de bloque de una implementación de la creación de una matriz de glucano unida por enlace no covalente sobre el portaobjetos ACG de tipo PTFE;
- 20 la Fig. 16 es un esquema que ilustra la síntesis de implementaciones de 4-7 carbohidratos polifluorados;
- la Fig. 17 son representaciones de implementaciones de datos experimentales usando los portaobjetos ACG de tipo PTFE que tienen carbohidratos polifluorados unidos a los mismos;
- 25 la Fig. 18 son gráficos de implementaciones de datos experimentales de espectros de masas de Globo H sobre portaobjetos ACG usando diferentes velocidades de fluencia láser sin adición de matriz;
- 30 la Fig. 19 son gráficos de implementaciones de datos experimentales de espectros de masas de Globo H sobre portaobjetos ACG usando diferentes velocidades de fluencia láser con matriz;
- la Fig. 20 son gráficos de implementaciones de datos EM-TOF experimentales de hidrólisis enzimática de celobiosa poli-fluorada en solución e inmovilizada sobre portaobjetos ACG de tipo PTFE con las proteínas celulasa de *A. niger*, *T. reeseiy* *T. viride*;
- 35 la Fig. 21 son estructuras químicas y gráficos de implementaciones de datos experimentales que muestran el efecto de las celulasas sobre celotriosa;
- la Fig. 22 es un gráfico de una implementación de datos EM-TOF experimentales de hidrólisis enzimática de celobiosa poli-fluorada (A), celotriosa poli-fluorada (B) y celotetraosa poli-fluorada (C) en solución;
- 40 la Fig. 23 es un gráfico de una implementación de datos EM-TOF experimentales de hidrólisis enzimática de celobiosa poli-fluorada (A), celotriosa poli-fluorada (B) y celotetraosa poli-fluorada (C) sobre un portaobjetos de vidrio ACG;
- 45 la Fig. 24 es un esquema para la síntesis del derivado de manosa 21;
- la Fig. 25 es un diagrama de bloque de una implementación de un método de creación de una matriz de glucano de unión covalente sobre el portaobjetos ACG;
- 50 la Fig. 26 son gráficos de implementaciones de datos experimentales que caracterizan portaobjetos ACG de tipo PTFE basado en silano por EM-TOF y unión proteína-azúcar;
- 55 la Fig. 27 son gráficos de implementaciones de datos experimentales que caracterizan portaobjetos ACG de tipo PTFE basado en ácido fosfórico por EM-TOF y unión proteína-azúcar;
- la Fig. 29 son gráficos de implementaciones de datos experimentales de un espectro FTIR del Compuesto 3 Puro (HDFDPA, ácido 3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, -9, 9, 10, 10, 10-heptadecafluorodecilsulfónico) y espectro FTIR del compuesto 3 injertado en la superficie ACG.

Descripción detallada

60 En la siguiente descripción detallada de las realizaciones de la presente descripción, se hace referencia a los dibujos adjuntos en los que las mismas referencias indican elementos similares y en los que de manera ilustrativa se muestran realizaciones específicas en las que puede llevarse a la práctica la presente descripción. Estas realizaciones se describen con detalle suficiente para permitir a los expertos en la técnica llevar a la práctica la presente descripción y debe entenderse pueden utilizarse otras realizaciones y que pueden realizarse cambios lógicos, mecánicos, eléctricos, funcionales y otros sin alejarse del ámbito de presente descripción. Por lo tanto, la siguiente descripción detallada no debe considerarse en un sentido limitante, y su ámbito sólo viene definido por las reivindicaciones que se adjuntan. Como se usa en la presente descripción, el término "o" deberá entenderse que se

define como una disyunción lógica y no deberá indicar una disyunción exclusiva salvo que se indique expresamente como tal o se indique como "xo."

Como se usa en el presente documento, el término Teflón o PTFE se refiere a politetrafluoroetileno.

5 La adhesión eficaz entre las moléculas de azúcar y las superficies sustrato puede conseguirse a través de unión covalente. La adsorción física de derivados de azúcar sobre superficies fluoradas puede ser factible para una adhesión suficiente. Las placas porosas de silicio también actúan como una matriz en EM DIOS, y los espectros de masas se obtienen sin fragmentación con una alta proporción de señal con respecto a interferencia (S/N). La
10 preparación de placas porosas de silicio requiere el uso de ácido corrosivo, que no es ecológico, y la calidad de las placas es difícil de controlar. Por otro lado, el óxido de aluminio poroso existe naturalmente sobre la superficie del aluminio; la anodización electroquímica de portaobjetos de vidrio revestidos con aluminio (ACG) puede realizarse una solución acuosa ligeramente ácida. Las reacciones de sililación sobre superficies de silicio también pueden usarse sobre superficies de aluminio en condiciones apropiadas. La superficie recién cortada de la placa de aluminio
15 tiene una textura metálica brillante. Cuando se expone al aire, la superficie se oxida gradualmente y se vuelve opaca ya que se forma una capa de óxido de aluminio (denominada óxido nativo). El óxido de aluminio nativo (NAO, *Native Aluminium Oxide*) formado sobre superficies de aluminio no tiene orientación en comparación con el óxido de aluminio anodizado (AAO, *Anodized Aluminium Oxide*). El espesor del NAO sobre superficies de aluminio es de tan solo algunos nanómetros. Por otro lado, el espesor del AAO podría aumentar rápidamente (a los 15-20 min) en el
20 intervalo micrométrico alineándose la dirección en crecimiento con un campo eléctrico aplicado. En algunos experimentos de ensayo, se fabricaron placas de aluminio puro (con un espesor de 1 mm), y el AAO se volvió no conductor (como la cerámica) y no fue adecuado para el presente estudio. Sin embargo, en todos los casos, las capas amorfas de óxido sobre las superficies de aluminio podrían modificarse químicamente, y el sustrato podría seguir siendo eléctricamente conductor solo cuando el espesor de la capa de óxido sobre la superficie estuviese en
25 el intervalo nanométrico.

A continuación se describen determinadas características de la matriz (1):

30 De acuerdo con una característica de la presente descripción, la caracterización por EM-TOF puede realizarse sin añadir matriz.

De acuerdo con una característica de la presente descripción, puede realizarse un ensayo de unión de carbohidratos sobre la matriz aproximadamente 15 minutos después de una caracterización por EM-TOF.

35 De acuerdo con una característica de la presente descripción, las moléculas que supuestamente se unen específicamente a carbohidratos son proteínas.

De acuerdo con una característica de la presente descripción, las proteínas son celulasas.

40 De acuerdo con una característica de la presente descripción, las celulasas se seleccionan del grupo que consiste en 1,4- β glucosidasas, exogluconasas (1, 4- β -D glucano celobiohidrolasas) y endoglucanasas (1,4- β -D glucano glucanohidrolasas).

45 De acuerdo con una característica de la presente descripción, las proteínas analizadas para la unión a los carbohidratos inmovilizados sobre la matriz se marcan con un marcador de detección.

De acuerdo con una característica de la presente descripción, los marcadores de proteína comprenden colorantes fluorescentes.

50 De acuerdo con una característica de la presente descripción, los colorantes fluorescentes comprenden colorantes reactivos a amina.

De acuerdo con una característica de la presente descripción, se describe un medio legible por ordenador que comprende datos que representan la caracterización de carbohidratos inmovilizados sobre la superficie de la matriz o datos que representan el análisis de reacciones de unión de carbohidratos sobre la superficie de la matriz o ambas cosas.
55

A continuación se describen determinadas características del método (20):

60 De acuerdo con una característica de la presente descripción, la unión de una molécula a un carbohidrato sobre la matriz es representativa de un proceso biológico.

A continuación se describen determinadas características del método (23):

65 De acuerdo con una característica de la presente descripción, los carbohidratos se inmovilizan mediante un enlace no covalente.

De acuerdo con una característica de la presente descripción, los carbohidratos se inmovilizan mediante un enlace covalente.

5 De acuerdo con una característica de la presente descripción, el método comprende adicionalmente realizar una caracterización de carbohidratos inmovilizados sobre la superficie de la matriz por espectrometría de masas, en el que la observación de una o más de una alta proporción de señal/interferencia (S/N), baja velocidad de fluencia láser o una baja fragmentación de señal, en una ausencia de material de matriz es indicativa de que la matriz es adecuada para realizar la caracterización por espectroscopia de masas de los carbohidratos inmovilizados.

10 De acuerdo con una característica de la presente descripción, el método comprende adicionalmente realizar un ensayo de unión de carbohidratos sobre la matriz poniendo en contacto la matriz con una proteína de unión a carbohidratos, en el que la detección de unión específica en una o más localizaciones específicas sobre la matriz es indicativa de que la matriz es adecuada para realizar análisis de reacciones de unión entre los carbohidratos y las moléculas que se supone que se unen específicamente a los carbohidratos.

15 De acuerdo con una característica de la presente descripción, el carbohidrato se selecciona de un azúcar, o una glicoproteína, o un glucolípido, o manosa, comprendiendo cada uno de ellos grupos internos o no reducidos terminales de alfa-manosilo y la molécula de unión es Concanavalina A.

20 En una realización de la presente invención se refiere a una matriz de glucano con un conector fotoescindible sobre una matriz de vidrio revestida con aluminio (ACG) que puede producirse oxidando un portaobjetos de ACG y haciéndolo reaccionar con un alquil monoetoxisilano funcionalizado para formar un asa covalente, seguido de acoplamiento con un glucano que contiene el conector fotoescindible. Esta matriz de glucano con un conector fotoescindible sobre las superficies portaobjetos ACG puede caracterizarse por espectrometría de masas en tiempo de vuelo (EM-TOF) sin matriz, y usarse para la evaluación de unión de proteínas marcadas con fluorescencia. La intensidad de fluorescencia del complejo azúcar-proteína sobre portaobjetos ACG es mayor que sobre portaobjetos de vidrio. Por lo tanto, se desvela un nuevo método para fabricar portaobjetos de ACG poli-fluorados estables (denominados también de tipo PTFE), y el uso de estos portaobjetos para glucanos de matriz no covalente como sustratos para el estudio de actividades celulasa usando, como detector, espectrometría de masas. Además, usando la propiedad del ácido fosfórico de quelarse fácilmente con la superficie de óxido de aluminio, puede usarse un carbohidrato con un conector de ácido fosfórico para crear una matriz de glucano con unión covalente.

35 De acuerdo con implementaciones se proporciona una nueva generación de matrices de carbohidratos sobre portaobjetos ACG de tipo PTFE para la inmovilización de azúcares. En una realización, la matriz comprende manosa y lactosa con un conector fotoescindible incorporado inmovilizado sobre las superficies del portaobjetos ACG. Cuando se somete a análisis de EM MALDI para caracterizar el peso molecular de los azúcares inmovilizados, se observa una correlación proporcional entre la cantidad de manosa (m/z) y la intensidad de fluorescencia de su proteína de unión. En ensayos de unión a proteína de portaobjetos ACG-manosa y ACG-Globo H, se observa una mayor intensidad de fluorescencia y sensibilidad que con los portaobjetos de vidrio, debido quizá a las propiedades materiales, morfologías superficiales y arquitecturas en sitios de unión entre las proteínas y los azúcares inmovilizados sobre las superficies sólidas.

45 Con espectrometría de masas, la matriz de glucano descrita anteriormente puede usarse como una herramienta analítica eficaz para identificar y diferenciar diversos tipos de celulasas y su eficacia. Las propiedades exclusivas de los portaobjetos de vidrio revestidos con óxido de aluminio hacen que sea posible glucanos de matriz unidos de manera covalente o no covalente convenientemente mediante química fosfonato y la matriz de glucano puede caracterizarse con espectrometría EM sin el uso de matriz.

50 A continuación se describen realizaciones particulares de la presente invención con referencia a las figuras adjuntas.

De acuerdo con implementaciones ilustradas en la Fig. 1, se fabricaron diversos sustratos nuevos con una capa fina de óxido de aluminio sobre la superficie de portaobjetos ACG en un intento de caracterizar el peso molecular del oligosacáridos injertado en la superficie y simultáneamente examinar su capacidad de unión a azúcar-proteína. Se sintetizaron derivados de manosa y lactosa diseñados con un conector fotoescindible (PCL) incorporado y se unieron covalentemente a los portaobjetos ACG activados, como se ilustra de acuerdo con implementaciones mostradas en la Fig. 2.: Sin adición de una matriz orgánica miscible, los portaobjetos ACG inmovilizados sobre azúcar se sometieron a identificación de peso molecular y evaluación a unión a proteínas.

60 Las celulasas son de interés habitual debido a su aplicación para la producción de biocombustible. La celobiosa o celotriosa con grupos fluorogénicos o cromogénicos se usan normalmente como sustratos para la investigación de la actividad y especificidad de la celulasa. Sin embargo, durante la hidrólisis enzimática, el grupo saliente fluorogénico o cromogénico generado en la reacción muestra señal solo a pH alto, si bien las celulasas presentan su actividad óptima a pH bajo (4-6). La celobiosa poli-fluorada se inmovilizó de modo no covalente sobre los portaobjetos de ACG de tipo PTFE y se realizó la hidrólisis enzimática a pH de 4-6 *in situ*. Los productos hidrolizados que quedaron sobre la superficie del portaobjetos se identificaron después mediante EM-TOF.

- De acuerdo con implementaciones, la Fig. 1 ilustra un nuevo portaobjetos de ACG experimental y métodos relacionados para experimentación en los mismos. En a), se crea un derivado de azúcar tal como manosa con un conector fotoescindible incorporado de acuerdo con implementaciones. En b) se muestra un portaobjetos de ACG (75,5 x 25,4 x 1 mm³) con capas de óxido de aluminio (>5 nm) sobre la superficie y aluminio puro (>100 nm) revestidos sobre el portaobjetos de vidrio (1 mm). En c) el portaobjetos de ACG se activó opcionalmente y los derivados de azúcar se inmovilizaron (dispuestos en micromatrices y aplicados manualmente) sobre la superficie. El portaobjetos se sometió a identificación de peso molecular del azúcar por espectrometría de masas en d) o se evaluó adicionalmente con respecto a su unión a azúcar-proteína mediante un escáner de fluorescencia en e).
- 10 De acuerdo con implementaciones y como se ilustra en la Fig. 2, se muestra un esquema de la síntesis de manosa-ACG y lactosa-ACG con un conector fotoescindible; DIPEA=N,N-diisopropiletilamina, DSC=N,N'-disuccinimidil carbonato, HBTU= hexafluorofosfato de 2-(1-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio, TBFA=fluoruro de tetra-n-butilamonio, TEA=triethylamina).
- 15 De acuerdo con implementaciones y como se ilustra en la Fig. 15, se muestra un diagrama de bloque de una implementación de la creación de una matriz de glucano unida no covalentemente sobre el portaobjetos de ACG de tipo PTFE. De acuerdo con la implementación, los azúcares se unen reversiblemente mediante una cola polifluorada a un portaobjetos de ACG. Después se realizaron diversos experimentos de espectroscopía de masas. Por ejemplo, la EM-TOF se realiza en un ensayo de unión a azúcar, o la EM-TOF puede realizarse en un ensayo de actividad y especificidad de celulosa.

Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente tanto la utilidad de los aparatos descritos en el presente documento, así como los diversos métodos experimentales basados en los Ejemplos y otras descripciones proporcionadas en el presente documento. Dichos dispositivos y métodos se contemplan expresamente en la presente descripción.

Ejemplos

Ejemplo 1: Propiedades de la superficie de los portaobjetos ACG

Usando diversas técnicas de revestimiento, tales como pulverización con magnetrón, evaporación por arco catódico, y termo-revestimiento los micro portaobjetos se revistieron con una capa de aluminio puro (99,999 %) de un espesor de al menos 100 nm. Estos portaobjetos se utilizaron sin manipulación adicional o se anodizaron eléctricamente antes de su uso. De acuerdo con implementaciones, la Fig. 3 muestra su morfología, composición y rugosidad superficial, determinada por microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) y espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) de un portaobjetos ACG. La Fig. 3A muestra aluminio depositado por evaporación por arco catódico, la Fig. 3B muestra un revestimiento de aluminio depositado por pulverización con magnetrón y la Fig. 3C muestra portaobjetos AAO/ACG de aluminio obtenidos por termo-revestimiento seguido de anodización electroquímica en superficie.

Como puede observarse, el portaobjetos ACG producido por evaporación por arco catódico tiene un revestimiento de grandes granúlos y una alta rugosidad superficial. Los portaobjetos con alta rugosidad superficial repercuten sobre las propiedades de humectación superficial. El portaobjetos ACG pulverizado con magnetrón proporciona una rugosidad de superficie aceptable; sin embargo, esto requiere un tiempo de revestimiento prolongado para conseguir el espesor de revestimiento deseado y solo se usó en las etapas iniciales de este estudio. Los portaobjetos ACG termo-revestidos consiguieron el espesor de recubrimiento deseado en un tiempo relativamente corto. Esto proporcionó la superficie más lisa con una rugosidad superficial de 10 nm. Con un tratamiento posterior de anodización superficial, el portaobjetos ACG proporcionó una superficie estable para el injerto. Únicamente las superficies de los portaobjetos anodizados se revistieron con óxido de aluminio al 100 %, como se muestra en la Fig. 4.

De acuerdo con implementaciones de datos experimentales mostrados en la Fig. 4, se muestran espectros XPS de la composición superficial de a) un portaobjetos NAO/ACG obtenido por evaporación por arco catódico, b) un portaobjetos NAO/ACG obtenido por pulverización con magnetrón y c) un portaobjetos AAO/ACG obtenido por termo-revestimiento seguido de anodización en superficie. Se utilizaron energías de unión para C (1S) a 284,5 eV y O (1S) a 531 eV para calibrar la energía de unión de estos espectros. La resistencia eléctrica del portaobjetos ACG (distancia de extremo a extremo) se midió entre 1,6 y 4 Ω . Estos portaobjetos se volvieron no conductores eléctricamente cuando la capa de óxido aumentó de espesor. La profundidad de penetración para XPS fue de 20-50 Å, y el espesor de la capa de óxido (NAO o AAO) en este estudio se estimó a partir de la sección transversal que no era mayor de 5 nm.

El espesor del aluminio revestido sobre el portaobjetos de vidrio ha de ser >100 nm de tal manera que el sustrato no sea transparente en la región visible. Cuando se usó un sustrato no transparente, parte de la luz fluorescente pasó a través del sustrato y el escáner solo detectó una parte de la fluorescencia Cy3. El instrumento detectó más luz fluorescente cuando como sustrato de fondo se usó un portaobjetos de ACG no transparente.

La Fig. 5 muestra datos de las propiedades ópticas de portaobjetos de ACG en comparación con los micro portaobjetos de vidrio. El espesor de aluminio revestido sobre los portaobjetos de ACG semitransparentes fue de tan solo algunos nanómetros, y el de los portaobjetos de ACG reflectantes fue de aproximadamente 300 nm. La Fig. 5 muestra las propiedades ópticas de los micro portaobjetos de vidrio, de los portaobjetos de ACG semitransparentes y de los portaobjetos de ACG totalmente reflectantes (no transparentes). En la Fig. 5A, se aplicó una serie de soluciones de estreptavidina = Cy3 de 1 mg/ml diluidas a 1000X, 2000X, 5000X, 10000X y 20000X sobre cada uno de estos portaobjetos, se secó al aire y se analizó con un espectrómetro de fluorescencia arrayWoRx. El instrumento proporcionó una fuente de luz de longitud de onda de 540 nm. Se emitió fluorescencia de longitud de onda de 595 nm desde la superficie del portaobjetos y se detectó por el detector. El escáner detectó la fluorescencia solo hasta una dilución de 5000X para el micro portaobjetos de vidrio transparente, pero hasta de 10000X y 20000X veces de dilución, respectivamente, para el portaobjetos de ACG semitransparente y el portaobjetos de ACG totalmente reflectante, en el que el espesor del aluminio revestido varió de algunos nanómetros en el primero a más de 100 nm en el último. La Fig. 5B muestra implementaciones de datos experimentales en los que se muestra la intensidad de fluorescencia calculada real de cada sustrato.

Ejemplo 2: Activación de la superficie

En los experimentos de exploración, plasma de oxígeno, argón y gases mixtos de oxígeno y argón se ensayaron con respecto a la activación de la superficie del portaobjetos. Los restos (CO, CO₂ y H₂O) se retiraron al vacío. Es la retirada de esta contaminación superficial la que contribuye al éxito del injerto químico de los compuestos orgánicos deseados. La superficie se midió con un espectrómetro de infrarrojo de transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR/FTIR). El espectro ATR/FTIR mostró picos Al-OH de aproximadamente 800-1100 cm⁻¹, como se ilustra en la Fig. 6, lo que indica que la superficie se ha convertido en Al-OH después del proceso de limpieza de la superficie. De acuerdo con implementaciones, el tratamiento con plasma, utiliza solo la suficiente energía de plasma para limpiar y “rozar” la superficie del portaobjetos de ACG para retirar la contaminación orgánica, pero aún manteniendo la capa de alúmina sin decapar la superficie subyacente. El proceso de activación se completó satisfactoriamente usando un mero de 6,8 W (a 680 V) de energía durante 10 min a una presión de flujo de gas de 270-300 mTorr. El plasma de argón resultó ser el más eficaz para injertar derivados de azúcar, según se observa en experimentos posteriores. Como se muestra en la Fig. 6, la intensidad de pico Al-OH en la región 800-1100 cm⁻¹ disminuyó significativamente de 25 a 99 min después del tratamiento con plasma.

La superficie hidrófila después de tratamiento con plasma se hizo gradualmente hidrófoba, posiblemente porque la capa de óxido sobre la superficie se reforma. La desaparición de Al-OH de la superficie del sustrato se rastreó por espectroscopía ATR/FTIR. La intensidad de pico Al-OH en la región 800-1100 cm⁻¹ disminuyó significativamente en cuestión de horas, como se muestra en la Fig. 6. De acuerdo con implementaciones, los portaobjetos de ACG se activaron con 3-aminopropil-dimetil-etoxisilano (APDMES) inmediatamente después de tratamiento con plasma. Esta superficie de ACG activada se usó para inmovilizar el derivado de azúcar de manosa y lactosa con un PCL en la siguiente etapa de reacción.

Como se muestra en la Fig. 7, el ángulo de contacto de agua sobre la superficie cambió durante la activación de la superficie. De acuerdo con la Fig. 7, se muestran los cambios típicos en el ángulo de contacto de agua para los portaobjetos de ACG. La Fig. 7A muestra un portaobjetos de ACG limpiado con disolvente; la Fig. 7B muestra un portaobjetos de ACG tratado con plasma; la Fig. 7C muestra un portaobjetos de ACG activado con 3-amino-propil-dimetil-etoxisilano. Estas muestras se realizaron y se midieron como un ejemplo con el portaobjetos de ACG no transparente pulverizado con magnetrón. Por tanto, la medición del ángulo de contacto puede usarse como un control rápido de la finalización del proceso de activación. Los sustratos con una alta rugosidad superficial tienden a proporcionar ángulos de contacto más pequeños.

Ejemplo 3: Manosa con PCL inmovilizado sobre la superficie activada del portaobjetos de ACG

Como se muestra en la Fig. 2, se sintetizó el compuesto **27**, que tiene un grupo carboxilo funcional. Una solución de HBTU y el compuesto **27** se aplicaron manualmente y se dispuso en micro matriz sobre la superficie activada del portaobjetos de ACG. La formación de amida sobre la superficie del portaobjetos de ACG se produjo durante la noche a temperatura ambiente. Todos los restos salinos, así como los derivados de manosa no unidos se lavaron cuidadosamente con metanol y con agua desionizada. Después de todas estas preparaciones, la sustancia estaba lista para la identificación de masa y evaluación de unión a proteína.

Ejemplo 4: Análisis por espectrometría de masas del derivado de azúcar injertado sobre portaobjetos de ACG

Las superficies porosas de silicio sin matriz (DIOS) produjeron picos de iones-moleculares con fragmentación de muestra insignificativa. Las dimensiones de los portaobjetos de ACG (75,5 x 25,4 x 1 mm³) se adaptan bien en el instrumento de espectrometría de masas ultraflex; se analizaron los portaobjetos en cada etapa de tratamiento, como se muestra en las Figs. 8 y 9.

La Fig. 8 es una implementación de un esquema de la escisión de unión y detección selectiva de un derivado de azúcar (manosa) por espectrometría de masa ultraflex.

Las Figs. 9A y 9B muestran los datos EM para los experimentos tempranos de una placa de aluminio pura y portaobjetos ACG, en el que las intensidades pico de manosa eran relativamente bajas. La Fig. 9A muestra el espectro de masas TOF Ultraflex de manosa con PCL injertado sobre (A) una placa de aluminio puro al 99,999 % (1 mm de espesor) y (B) un portaobjetos ACG formado por evaporación por arco catódico. (C) representa la señal de fondo para la evaporación por arco catódico del portaobjetos de ACG. La Fig. 9B muestra el espectro de masas TOF Ultraflex de la Fig. 9A en la región m/z de interés.

La Fig. 9C muestra el espectro de masas TOF de manosa con PCL injertado sobre un portaobjetos de ACG formado por evaporación por arco catódico en la región m/z de interés. Más específicamente, la Fig. 9C muestra los datos de EM del portaobjetos de ACG producido por evaporación por arco catódico, para el cual las condiciones de activación de superficie se optimizaron y la intensidad de pico del derivado de manosa era alta. Aunque los sustratos proporcionaron grandes picos de fondo a m/z 415 y 451 (Figs. 9A y 9C), el peso molecular del derivado de manosa (265) se detectó muy fácilmente con sus aductos con protones (m/z 266), iones de litio (m/z 272), de sodio (m/z 288) y algunas veces de potasio (m/z 304).

Se llega a la teoría de que a un vacío alto, la energía láser de excimeros UV evapora grupos de óxido de aluminio a la fase gaseosa; la ionización fotónica ultravioleta produce espectros de masa dispersos con grupos de óxido de aluminio relativamente ligeros. La mayoría de los grupos de óxido en la fase gaseosa al vacío consisten en Al (Al₂O₃)_n, aunque incluso podrían existir grupos de óxido de aluminio en muchas formas diferentes. En las Figs. 9A y 9C, los grandes picos de fondo que se producen a m/z 451 y 415 se especula que pertenecen a grupos de óxido [(Al₂O₃)₄ + Li]⁺ y [AlO (Al₂O₃)₄]⁺.

Ejemplo 5: Comparación semicuantitativa del contenido de manosa con su capacidad de unión a proteína

La optimización del tratamiento con gas plasma sobre el mismo tipo de portaobjetos de ACG se evaluó por la intensidad de fluorescencia de la unión de proteína-azúcar inmovilizado. La Fig. 10 se obtuvo seleccionando el tipo de gas utilizado para la limpieza del plasma. Los portaobjetos de ACG producidos por evaporación por arco catódico se expusieron a oxígeno, argón o a una mezcla de óxido y gases de plasma argón antes del injerto de aminosilano. Un bloque de 10 x 10 (100 aplicaciones) del derivado de manosa (solución de complejo de azúcar, 160 nm) se dispuso en micromatriz sobre las superficies del sustrato. La solución de complejo de azúcar también se aplicó manualmente en cada uno de estos portaobjetos (1 ml por aplicación) específicamente para la identificación de la masa. Por lo tanto, estos portaobjetos se analizaron primero por espectrometría de masas y después se sometieron a unión con ConA biotinilada seguido de detección con estreptavidina marcada con Cy3. La Fig. 10A a-d) muestra los ensayos de unión a proteína de los portaobjetos dispuestos en matriz; la Figura 10C muestra las intensidades de fluorescencia de sustratos frente a las de los portaobjetos disponibles en el comercio. La diferencia de intensidad mostrada en la Fig. 5 demuestra el efecto absoluto de las propiedades físicas del sustrato. La diferencia de intensidad de la Fig. 10C resulta de los efectos de las dos propiedades físicas de los sustratos específicos y de las arquitecturas del sitio de unión entre el azúcar inmovilizado y sus proteínas de unión. Los dos conjuntos de datos indican que el tratamiento con plasma argón de la superficie del portaobjetos de ACG produce el mejor sustrato para el injerto de manosa, por tanto la unión de manosa-proteína.

Las Figs. 10A muestran ensayos de unión a proteína de portaobjetos de ACG formados por evaporación por arco catódico después del tratamiento con a) plasma oxígeno (Al-1), b) plasma argón (Al-2) y c) una mezcla de plasma oxígeno y argón (Al.3) antes de injertar ADPMES. En d), se muestra un ensayo de unión a proteína del portaobjetos de vidrio NH₂ disponible en el comercio de Corning Class (Nº 40004). La Fig. 10B muestra las intensidades de señal de espectros de masa MALDI para la identificación de la masa del azúcar. Los espectros de máxima intensidad (fluencia del 70 %) observados a partir de cada sustancia se usaron para crear los espectros de la Fig. 10B. La Fig. 10C muestra intensidades de fluorescencia de a)-d) con errores típicos calculados con un espectrómetro de fluorescencia arrayWoRx. La matriz se realizó en cuatro bloques por portaobjetos con 10 x 10 (100) aplicaciones por bloque de la misma solución acuosa del complejo de azúcar. Solamente se seleccionó el mejor bloque de cada portaobjetos (como se muestra en b)-d)); entre los mejores bloques se eliminaron aplicaciones grandes para realizar cálculos de intensidad de fluorescencia.

En las Figs. 11 y 12 se proporciona una comparación semicuantitativa del contenido de la manosa inmovilizada y de la capacidad de unión de proteína-manosa. Se utilizaron dos tipos diferentes de sustratos portaobjetos para inmovilizar la manosa con el PCL incorporado, es decir, el portaobjetos de vidrio funcionalizado con NH₂ y los portaobjetos de ACG-NH₂ activados con APDMES que se termo-revistieron con aluminio seguido de tratamiento de anodización superficial. El portaobjetos de ACG - manosa se sometió primero a análisis de EM para identificación de peso molecular y después para evaluación de unión a proteína junto con el portaobjetos de vidrio-manosa. La Fig. 11 muestra los datos de unión a proteína resultantes de los dos tipos de sustratos portaobjetos diferentes. Claramente se indica que el portaobjetos de ACG-manosa (Figura 11 b)) mostró mayor fluorescencia de Cy3 con una mejor sensibilidad que el portaobjetos de vidrio (Fig. 11 a)). La intensidad de fluorescencia del portaobjetos de ACG se calculó y se proporciona en la Fig. 12B.

Las diferencias en intensidad en fluorescencia de la Fig. 11 se produjeron por la diferencia en cuanto a las propiedades físicas de los sustratos portaobjetos y la diferencia en el grado de unión de manosa-ConA y Cy3-estreptavidina. A su vez, esta diferencia implica una variación en la densidad de injerto de manosa sobre la superficie de sustrato. Una reciente publicación indica que la interacción entre ConA y manosa se debilita cuando la intensidad de manosa sobre la superficie del sustrato es de aproximadamente 100 Å de diferencia, reflejando por lo tanto el grado de interacción polivalente.

Un análisis de EM del mismo portaobjetos de ACG-manosa (Fig. 11 b)) reveló el pico parental (m/z 265) así como los aductos protones (m/z 266) y litio (m/z 272). Analizando este portaobjetos, cada muestra aplicada manualmente (en la serie de diluciones) se midió seis veces con 500 disparos por medición. La intensidad pico promedio con desviación típica se proporciona en la Fig. 12A, que demuestra que la EM podría aún identificar el azúcar, incluso cuando la concentración de la solución para el injerto se diluyó a 15,6 nM. Las intensidades de señal medidas por EM (Fig. 12A) se compararon adicionalmente con las intensidades de fluorescencia mostradas en la Fig. 12B. Las tendencias descendientes de estas dos mediciones diferentes son similares. Aparentemente, la cantidad de azúcar inmovilizado refleja su capacidad de unión a proteína.

La Fig. 11 son fotografías de implementaciones de un ensayo de unión a proteína marcado con fluorescencia de manosa inmovilizada sobre un portaobjetos de vidrio y un portaobjetos de ACG. El portaobjetos de vidrio funcionalizado con NH₂ se adquirió en Corning Glass (Nº 40004). El portaobjetos de ACG se termo-revistió con aluminio puro y después se anodizó electroquímicamente. La matriz se realizó en un bloque de 10 x 6 (60) aplicaciones. La solución del complejo azúcar-HBTU (156 mM) se preparó a una dilución de 100X y 10000X. Cada solución se aplicó en dos columnas (20 aplicaciones) en el bloque para injerto. El sustrato a) muestra señales hasta las sexta columna (dilución 10000X de la solución de partida del complejo de azúcar).

La Fig. 12 son gráficos de implementaciones de datos experimentales que muestran la comparación de las intensidades pico de los espectros de masas TOF ultraflex de manosa con PCL injertado en portaobjetos de ACG con las intensidades de fluorescencia de portaobjetos de ACG unido a proteína-manosa formados por termo-revestimiento seguido por anodización electroquímica sobre la superficie del portaobjetos. La concentración de la solución de manosa varió de 156 mM a 102 (1,56 mM) y dilución 104X (15,6 nM). En la Fig. 12A, se muestran intensidades pico promedio de aductos espectrométricos de masa de manosa obtenidos a m/z 265,1 [M]⁺, 266,1 [M + 1]⁺ y 272,1 [M + Li]⁺. En la Fig. 12B, se muestran intensidades de fluorescencia correspondientes de la misma muestra de portaobjetos de ACG -manosa obtenidas a partir del ensayo de unión a proteína marcada con fluorescencia.

Ejemplo 6: Utilidad de los portaobjetos de ACG en micromatrices de carbohidrato

Usando la vía sintética mostrada en la Fig. 2, también se inmovilizó lactosa con PCL sobre un portaobjetos de ACG, como se muestra en la Fig. 13A. Como se observa en el análisis de EM de esta muestra (Fig. 13B), la interferencia se produce como resultado de los picos de óxido de aluminio dispersos a 415 y 451. Sin embargo, el peso molecular del derivado de lactosa (m/z 427) aún podría identificarse claramente por sus aductos con protones (m/z 428), iones de sodio (m/z 450) y de potasio (m/z 466).

Para utilización adicional de este sustrato recién fabricado, la superficie de ACG-NH₂ se modificó mediante conversión en NHS-ACG por tratamiento con disuccinimidil suberato (DSS) en DMF y diisopropiltilamina. Con portaobjetos de vidrio como referencia, se dispuso en micromatriz un derivado de Globo H con un grupo amina funcional sobre el portaobjetos de ACG-NHS (Fig. 13C) y se sometió a evaluación de unión a proteína VK9 (un anticuerpo monoclonal anti-Globo H de IgG de ratón). Los resultados de las Figs. 13D y 13E indican que el portaobjetos de ACG muestra la mayor intensidad de fluorescencia entre las tres muestras.

La Fig. 13A muestra portaobjetos de ACG-Lactosa con PCL. La Fig. 13B muestra espectros de masas TOF Ultraflex obtenidos del portaobjetos de ACG-Lactosa con PCL. La Fig. 13C muestra portaobjetos de ACG-Globo H sin PCL. La Fig. 13D muestra un ensayo de unión a proteína marcada con fluorescencia de Globo H inmovilizado sobre el portaobjetos de vidrio NHS, portaobjetos de vidrio modificado con NH₂ (Corning Nº 40004) y portaobjetos de ACG-NHS. Finalmente, la Fig. 13E muestra intensidades de fluorescencia correspondientes calculadas en la Fig. 13D con un escáner de fluorescencia GenePix 4000.

Ejemplo 7: Factores que afectan a las propiedades de intensidad de fluorescencia del sustrato y a la morfología superficial

Las propiedades ópticas de los sustratos afectan aparentemente a la intensidad de fluorescencia. La fluorescencia (Cy3) es la única fuente de luz en un ensayo de unión a proteínas. El vidrio así como el silicio poroso atraviesa y refleja la luz a diferentes grados.

Por el contrario, pueden fabricarse portaobjetos revestidos de aluminio de tal manera que se hagan completamente no transparentes y minimicen el "consumo" de luz proporcionado por la fuente luminosa.

La morfología superficial del sustrato podría afectar a la densidad de injerto en azúcares inmovilizados. La superficie NAO solo mostró un contenido de óxido del 75 %. Por el contrario, la superficie AAO contiene un 100 % de óxido de aluminio, proporcionando de este modo una superficie estable y conduciendo a una densidad de inmovilización constante del portaobjetos final para el ensayo.

La estabilidad del sustrato también estar afectada por el modo en el que se trata químicamente la superficie. Un ejemplo es la superficie con aminos reticuladas frente a la de con una monocapa de grupos amina funcionales, ambas de las cuales se prepararon activando el portaobjetos de ACG con 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES) o 3-aminopropil-dimetil-etoxisilano (APDMES). Se están investigando diversos tratamientos químicos de la superficie de portaobjetos de ACG.

Ejemplo 8: Factores que afectan a la arquitectura del sitio de unión-intensidad de fluorescencia/interacciones de proteínas con azúcares inmovilizados sobre la superficie del sustrato

En las condiciones experimentales de la presente invención, tanto la concanavalina A como la estreptavidina existen como tetrámeros de sus estructuras cuaternarias. La proporción de las dimensiones de manosa con respecto a ConA es de aproximadamente 1:400 (correspondiente a su peso molecular de 265 frente a 104 kDa). Debido a la limitación geométrica, solamente se dispone de dos sitios de unión por tetrámero de ConA biotinilada para la unión a manosa sobre la superficie. Sobre la superficie de la matriz de manosa de alta densidad, cada tetrámero de ConA uniría dos moléculas de manosa, y las dos moléculas de manosa probablemente se injertarían sobre la superficie no muy distantes entre sí. Dado que la longitud de la cadena del derivado de manosa aumenta, la manosa injertada se alejaría adicionalmente del sustrato, y se podría producirse un alto grado de aleatoriedad de la interacción cuando aumenta tanto la densidad de injerto como la cantidad de unión proteína-azúcar inmovilizado. Además, se permitiría el acoplamiento flexible del complejo estreptavidina-Cy3 con ConA biotinilada. También puede ilustrarse una restricción geométrica para Globo H, anticuerpo de IgG monoclonal VK9 (de ratón) y su proteína anti-IgG de ratón de cabra. La arquitectura del sitio de unión entre el azúcar y las proteínas puede afectar a la densidad de la proteína marcada con fluorescencia y, por tanto, a la intensidad de fluorescencia en el ensayo de unión azúcar-proteína.

Un objetivo para estudiar la inmovilización de azúcares en superficie es simular interacciones de ligandos que se producen sobre la superficie celular de entidades biológicas, por ejemplo, la existencia y sobreexpresión del antígeno de azúcar Globo H sobre las superficies de células normales y tumorales. Cuando se hay una población excesiva de antígenos de azúcar sobre las superficies celulares, podrían producirse interacciones masivas de carbohidrato-proteína polivalentes e impactar enormemente en la función biológica proporcionada de las entidades vivas. Este estudio proporciona una medición cuantitativa y una comparación más exacta de dicho sistema biológico.

Ejemplo 9: Preparación de portaobjetos de ACG de tipo PTFE

Para preparar los portaobjetos de ACG de tipo PTFE, se sintetizaron derivados de trietoxisilano **1** y de ácido fosfónico **3** y se utilizaron para la reacción con la superficie de aluminio oxidada. La fabricación de portaobjetos basados en silano implica una reacción química de dos etapas. La primera etapa fue funcionalizar la superficie de óxido de aluminio a grupos amino usando el compuesto **1** (Fig. 14) como un reactivo de injertación. Esta etapa se realizó en un entorno sin humedad para impedir que se produjesen reacciones secundarias. En la segunda etapa, la formación de enlace amida tuvo lugar entre el compuesto **2** de hidrocarburo de polifloruro activado por NHS (Fig. 14) y el grupo amino sobre la superficie del portaobjetos. Por otro lado, el portaobjetos de ACG de tipo PTFE basado en ácido fosfónico se preparó en una reacción química de una etapa. Una solución acuosa de **3** reaccionó por tratamiento con ultrasonido con la superficie de óxido de aluminio limpia para formar una monocapa de perfluorofosfonato unida covalentemente sobre la superficie. La formación de enlace covalente del ácido fosfónico puede confirmarse por FTIR y ángulo de contacto, como se muestra en la Fig. 28B. Estos dos tipos de portaobjetos se comprobaron con espectrometría EM-TOF para ensayos de fondo, y los dos mostraron una línea basal de fondo limpia del portaobjetos. Los picos de óxido de aluminio dispersos inesperados observados en los portaobjetos de ACG anteriores no se observaron con este método (véanse las Figs. 26 y 27).

En la Fig. 28A se ilustra un espectro FTIR del Compuesto **3** Puro (HDFDPA, ácido 3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 10- heptadecafluorodecilsulfónico) y un espectro de FTIR del compuesto **3** injertado en la superficie ACG. La Fig. 28B ilustra la imagen del Ángulo de Contacto de agua ($\approx 120^\circ$) de la superficie del portaobjetos de ACG fosfonado.

Como se muestra en la Fig. 14, los compuestos son los siguientes: aminopropil-trietoxisilano (APTES, **1**); N-succinimidil 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, -11, 11, 11- heptadecafluoroundecil carbonato **2**; (ácido 3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 10- heptadecafluorodecil) sulfónico (HDFDPA, **3**), de **4** a **10** son derivados polifluorados de manosa (**4**), lactosa (**5**), Gb5 (**6**), Globo H (**7**), celobiosa (**8**), celotriosa (**9**) y celotetraosa (**10**).

Ejemplo 10: Creación de la matriz de glucano de enlace no covalente sobre los portaobjetos de ACG de tipo PTFE

Con este resultado alentador, el portaobjetos basado en ácido fosfónico se usó para crear la matriz de glucano para los procedimientos experimentales señalados en la Fig. 15. La manosa con un conector amino **11** reaccionó con el compuesto **2** para sintetizar la cola poli-fluorada ($-C_8F_{17}$) **4** y se utilizó como el compuesto modelo, como se ilustra mediante el esquema mostrado en la Fig. 16. Una solución de este derivado de azúcar se aplicó robóticamente sobre la superficie del portaobjetos de ACG de tipo PTFE. Después de la incubación, los portaobjetos se enjuagaron repetidamente con agua destilada y se sometieron a análisis de EM-TOF. Se obtuvo un espectro de masas muy claro. El espectro de masas de esta monocapa revela picos a 806 y 822 para los aductos de sodio y potasio, respectivamente. Después del análisis de EM, se usó el mismo portaobjetos para realizar el análisis de unión a proteínas usando Concanavalina A marcada con Alexa 488 como una fuente de proteína. Para ampliar adicionalmente el alcance de este tipo de matriz de glucano, se usan los compuestos **12-14** que se sintetizaron en el laboratorio previamente como materiales de partida. El Gb5 poli-fluorado **5**, la lactosa **6** y Globo H **7** se sintetizaron, como se ilustra en la Fig. 16 y se inmovilizaron sobre la superficie del portaobjetos de ACG de tipo PTFE para análisis de masa y ensayos de unión a proteínas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Como se muestra en implementaciones experimentales ilustradas por los datos mostrados en la Fig. 17A, sin adición matriz adicional, no se encontró señal fragmentada, incluso con el uso de dicho azúcar lábil como Globo H. La Fig. 17A ilustra datos de análisis de espectrometría de masa MALDI de Globo H polifluorado **7** (PM 1604,40), Gb5 **5** (PM 1458,39) y lactosa **6** (PM 932,21) inmovilizados sobre el portaobjetos de ACG de tipo PTFE como sus aductos de sodio $[M+Na]^+$ a 1627,44, 1481,39 y 954,39, respectivamente. La velocidad de fluencia es de 12 % sin adición de matriz.

De acuerdo con implementaciones de datos experimentales en la Fig. 17B, estas matrices de glucano conservan sus patrones de unión proteína-azúcar. La Fig. 17B es un ensayo de unión a proteínas de GloboH/VK9/anti-VK9-Cy3. La Fig. 17C es un ensayo de unión a proteínas de Gb5/anti-SSEA3-A488. La matriz era una matriz de 10 x 10 (100 aplicaciones) de Globo H perfluorado (4 columnas a la izquierda), lactosa (5ª y 6ª columnas, que sirvieron como un control negativo) y Gb5 (4 columnas a la derecha).

El efecto de la velocidad de fluencia láser y matriz de esta nueva superficie también se investigó. Tomando como ejemplo el carbohidrato lábil Globo H, este a menudo pierde un resto de mucosa cuando se usa en EM-MALDI. Usando espectrometría de masas como un detector, los resultados se muestran en la tabla 1. Sin la adición de matriz, se observó una alta proporción de señal con respecto a interferencia (S/N) (22) en velocidad de fluencia láser muy baja (9 %), y bajo esta velocidad de fluencia láser baja, no se encontró señal fragmentada. Cuando la velocidad de fluencia aumenta al 10 %, la proporción S/N mejora a 40 sin ninguna fragmentación. La Fig. 18 ilustra los datos de espectroscopía de masa resultantes bajo diversas condiciones de fluencia láser sin matriz añadida.

La Fig. 19 ilustra los mismos experimentos, pero con matriz. Se añadió DHB como una matriz para controlar el efecto de la matriz sobre la superficie de ACG. La proporción S/N es solo de 7,3 cuando la velocidad de fluencia es del 11 %. Para aumentar la velocidad de fluencia al 13 %, la proporción S/N es del 61 %, con señal de fragmentación del 6 %. Por lo tanto, la matriz DBH no mejora la señal S/N cuando se usa una velocidad de fluencia láser baja. Sin embargo, puede desempeñar una función para mejorar la proporción S/N y reducir la fragmentación cuando la velocidad de fluencia sobrepasa el 25 % como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Proporción S/N de Globo H a diferentes velocidades de fluencia láser con o sin adición de matriz. (Fluencia: la potencia láser (o velocidad de fluencia) aplicada sobre la superficie del portaobjetos; GH S/N: la proporción Señal/Interferencia para globo H; Frag. S/N: la proporción Señal/Interferencia para el pico de fragmentación de globo H).

Desorción/Ionización asistida por matriz			Desorción/Ionización sin matriz		
Velocidad de fluencia	GH S/N	Frag. S/N	Velocidad de fluencia	GH S/N	Frag. S/N
11 %	7,3	0	9 %	22	0
13 %	61	6	10 %	40	0
14 %	157	13	12 %	218	5
15 %	316	25	16 %	275	10
18 %	1690	87	18 %	375	17
19 %	1956	108	19 %	741	64
25 %	3128	168	25 %	2184	356
35 %	1445	125	35 %	1514	373

Ejemplo 11: Estudios de actividad celular

A partir de los estudios anteriores, el carbohidrato poli-fluorado inmovilizado sobre el portaobjetos de ACG de tipo PTFE se ioniza/desorbe fácilmente por energía láser baja. Por lo tanto se obtiene un espectro de masas S/N alto sin fragmentación, haciendo que los dispositivos de la presente descripción sean adecuados para estudios de especificidad y actividad de glucosidasa.

La hidrólisis enzimática de la celobiosa poli-fluorada inmovilizada **8** (véase la Fig. 14) se realizó primero *in situ* sobre la superficie del portaobjetos de ácido fosfónico. Se prepararon tres celulasas disponibles en el comercio, *Aspergillus niger* (*A. niger*), *Trichoderma reesei* (*T. reesei*) y *Trichoderma viride* (*T. viride*) por separado a 5 U/ml en una solución tampón de acetato de sodio (25 mM) (pH 5) y se cargaron sobre el portaobjetos funcionalizado que se había dividido en 16 pocillos usando cámaras de reacción Fast Frame. Para comparar, se añadió una alícuota de solución enzimática (100 μ l) a la solución de celobiosa fluorada (100 μ l de 0,5 mM) en eppendorfs para realizar las reacciones de hidrólisis enzimática en solución. Después de la reacción, esto se transfirió a pocillos vacíos del mismo portaobjetos. Cada pocillo se enjuagó por separado tres veces con agua desionizada y el portaobjetos se secó de nuevo a alto vacío antes de someter a análisis de EM-TOF.

En el análisis de EM-TOF, la línea basal de fondo limpia permitió el cálculo del porcentaje de componentes hidrolizados para cada muestra. Como se muestra en los resultados de EM-TOF en la Figura 20, los porcentajes de productos hidrolizados se calculan a partir de las intensidades máximas de cada espectro. De acuerdo con implementaciones de datos experimentales mostrados en la Figura 20, se muestran datos de EM-TOF de hidrólisis enzimática de celobiosa-polifluorada en solución en la Figura 20A e inmovilizada en portaobjetos de ACG de tipo PTFE en la Figura 20B. El control son las mismas condiciones experimentales procesadas sin enzimas en (a); (b), (c) y (d) son condiciones experimentales con las proteínas de celulasa de *A. niger* (b), *T. reesei* (c) y *T. viride* (d).

Estos resultados (Figura 20) muestran la tasa de hidrólisis en la superficie de portaobjetos de ACG frente a hidrólisis en solución. La celobiosa no hidrolizada en solución fue del 64 %, 7 % y 3 % en comparación con las de 100 %, 69 % y 77 % en el portaobjetos de ACG que reacciona con la celulasa de *A. niger*, *T. reesei* y *T. viride*, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2: Hidrólisis enzimática de celobiosa poli-fluorada **8**, el porcentaje mostró patrones hidrolizados de la reacción en solución/en el portaobjetos de ACG

	Triosa	Biosa	Glucosa	Cola F
<i>A. niger</i>	18/0	64/1	18/0	0/0
<i>T. reesei</i>	0/0	7/69	93/25	0/7
<i>T. viride</i>	0/0	3/77	58/17	38/6

De acuerdo con implementaciones de los datos experimentales mostrados en la Figura 21A, los fragmentos hidrolizados de derivados de celotriosa permanecieron en superficie de portaobjetos de ACG de tipo PTFE. La Figura 21A muestra los diversos derivados que son posibles, junto con sus pesos moleculares. La Figura 21B muestra implementaciones de datos de EM-TOF experimental de hidrólisis enzimática de celotriosa poli-fluorada del ciclo de control sin enzimas (a), y con las proteínas de celulasa de *A. niger* (b), *T. reesei* (c) y *A. virile* (d).

La enzima de *T. viride* actúa mejor para celobiosa en solución, y la de *T. reesei* hidrolizó el disacárido más eficazmente entre las tres fuentes de enzima en el portaobjetos. En soluciones, la enzima de *A. niger* parece actuar también como una sintetasa de modo que la reacción global produjo 8 % de celotriosa (PM 1093) detectada como aducto sódico a m/z de 1116,3 [M + Na]⁺. La enzima de *A. niger* se caracterizó como una típica celulosa de tipo *endo* que escindió cinco unidades de glucosa de longitud a la vez. No hidrolizó ni celobiosa ni *p*-nitrofenil- β -D-glucósido. Para entender mejor el modo de acción, se sometió celotriosa **9** polifluorada (C-8 F₁₇) (Figura 14) a hidrólisis enzimática en solución.

Usando el mismo procedimiento analítico, los resultados (Figura 21B) indicaron que la enzima de *T. reesei* hidrolizó el sustrato de celotriosa más eficazmente entre las enzimas de tres especies diferentes. Para *A. niger*, el resultado mostrado en la Figura 20 y Figura 21 indicó que esta enzima no actúa bien en la hidrólisis de celobiosa o celotriosa. Sin embargo, en solución, hidrolizó la celobiosa poli-fluorada **8** y celotriosa **9** con una unidad de glucosa cada vez a una velocidad de reacción muy lenta. Puesto que esta enzima comercial no es pura, este fenómeno puede deberse a la contaminación de una pequeña cantidad de β -glucosidasa en la mezcla.

La celulasa de *T. viride* podría degradar eficazmente el material de periódico y *T. reesei* podría hidrolizar la forma cristalina de celulosa. En general, la hidrólisis enzimática de la superficie de portaobjetos de ACG es más específica de sitio pero mucho más lenta que la de solución, como se indica por los datos mostrados en la Figura 20.

Ejemplo 12: Estudios de especificidad de celulasa y definición del tipo de celulasas usando matriz de glucano combinada con espectrometría de masas

Las celulasas se dividen habitualmente en varias subclases de isozimas basándose en su función: 1,4- β -glucosidasas [EC 3.2.1.74], que escinden celobiosa en moléculas de glucosa individuales, exoglucanasas (1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa [CE 3.2.1.91]), que escinde unidades de celobiosa desde el extremo de la cadena de celulosa, y endoglucanasas (1,4- β -D-glucano glucanohidrolasa [EC 3.2.1.6]), que escinden la cadena aleatoriamente en posiciones internas, creando nuevos extremos para exoglucanasas. El análisis por HPLC de los productos de hidrólisis de MUF-glucósidos se usa con frecuencia para determinar la especificidad hidrolítica de estas enzimas purificadas. A partir de los resultados anteriores, los dispositivos y métodos de la presente divulgación actúan como

otra plataforma para estudiar la especificidad de diversos tipos de celulasas.

Para verificar, las exoglucanasas (L3) y endoglucanasa (44A) se prepararon de acuerdo con métodos bien conocidos en la bibliografía con modificaciones menores. En primer lugar, se realizaron reacciones de hidrólisis enzimática en solución con las enzimas purificadas usando sustratos **8**, **9** y **10**. Al terminar la reacción, las mezclas de solución se transfirieron a portaobjetos de ACG de tipo PTFE, y se prepararon usando los mismos procedimientos de lavado antes de someterse a ensayo de EM-TOF.

La Figura 22 muestra datos de EM-TOF de hidrólisis enzimática de celobiosa poli-fluorada (A), celotriosa poli-fluorada (B) y celotetraosa poli-fluorada (C) en solución. Para cada carbohidrato, se añadió una enzima específica: (a) es el ciclo de control sin enzimas, (b) es exoglucanasa L3 y (c) es endoglucanasa 44A. La Figura 23 muestra datos de EM-TOF de hidrólisis enzimática de celobiosa poli-fluorada (A), celotriosa poli-fluorada (B) y celotetraosa poli-fluorada (C) en un portaobjetos de vidrio ACG. Para cada carbohidrato se añadió una enzima específica: (a) es el ciclo de control sin enzimas, (b) es exoglucanasa L3 y (c) es endoglucanasa 44A.

Como se muestra de acuerdo con las implementaciones de datos experimentales mostrados en la Figura 22, la exoglucanasa L3 escinde unidades de celobiosa lentamente desde el extremo del sustrato **8** y escinde celobiosa rápidamente cuando el compuesto **9** o **10** es el sustrato, lo que es coherente con la definición de la exoglucanasa. La endoglucanasa 44A no puede aceptar el sustrato de celobiosa **8** o sustrato de celotriosa **9**, pero escinde la unidad de trisacárido o tetrasacárido de sustrato de celotetraosa **10**.

Para comparación y como se ilustra de acuerdo con implantaciones mostradas en la Figura 23, el sustrato **8**, **9** y **10** se inmovilizó en la superficie de ACG de tipo PTFE y se llevó a cabo la hidrólisis de celulasa en la superficie directamente, después de los mismos procedimientos de lavado, estos portaobjetos se sometieron a ensayo de EM-TOF. Como se muestra en la Figura 20B, la exoglucanasa L3 solamente escindió una fracción de sustrato de celobiosa **8** después de 24 horas de incubación y escindió la celobiosa rápidamente cuando el compuesto **9** o **10** es el sustrato. La endoglucanasa 44A no puede aceptar el compuesto **8** o **9** como un sustrato. Sin embargo, escindió celotetraosa rápidamente cuando el compuesto **10** es un sustrato. A diferencia del ciclo de reacción de hidrólisis en solución, la endoglucanasa 44A escindió celotetraosa en una vez y no escindió celotriosa cuando la celotetraosa **10** es un sustrato. A partir de los resultados anteriores, el sustrato de celotetraosa **10** fue el mejor carbohidrato para crear una matriz en la superficie de ACG de tipo PTFE para los experimentos realizados. Usando esta matriz, puede examinarse la actividad y especificidad de celulasa desconocida.

Ejemplo 13: Creación de matriz de glucanos de enlace covalente en portaobjetos de ACG de tipo PTFE.

Hay varios portaobjetos de vidrio funcionalizados disponibles en el mercado para matrices de glucano, por ejemplo, portaobjetos de vidrio revestidos con: amina, carboxilato, N-hidroxisuccinimida (NHS), avidina, epoxi, aldehído, grupo quelante de níquel, etc. Cuando se crea una matriz de glucanos en estas superficies, se necesitan tampón adecuado y etapas de bloqueo y lavado repetidas. De acuerdo con las implementaciones, los sustratos con un grupo funcional de ácido fosfónico son fáciles de quelar en el portaobjetos de ACG y pueden tolerar etapas de lavado repetidas. En consecuencia, se desvela por la presente un nuevo método para preparación de matrices de glucano eficaz.

Se sintetizó manosa con compuesto de ácido fosfónico **21** mediante el esquema ilustrado en la Figura 24. El compuesto disponible en el mercado **15** se protegió con grupo TBDPS, y después se cambió bromuro a fosfonato usando reacción de Arbuzov. Después de desililación, se obtuvo el compuesto **18** para la siguiente reacción de glicosilación. Usando $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ como un promotor, se usó el compuesto **19** como el donante de azúcar, lo que produjo moléculas de manosa con el derivado del grupo fosfonato **20**. Después de desprotección global, se obtuvo manosa con un compuesto de ácido fosfónico **21**.

El compuesto **21** se disolvió en metanol. Se aplicó puntualmente de forma robótica una solución de este derivado de azúcar en la superficie de portaobjetos de ACG de tipo PTFE. Después de incubación, sin bloqueo, los portaobjetos se aclararon repetidas veces con agua destilada, y se usaron para análisis de unión de proteínas usando Concanavalina A marcada con Alexa 488 como una fuente proteica. Se evaluaron diferentes tiempos de incubación y se determinó que 15 minutos era suficiente para que el derivado de azúcar se quelara en el portaobjetos de ACG. También se aplicaron puntualmente diferentes concentraciones del compuesto **21** en el portaobjetos de ACG donde el resultado fue un portaobjetos de ACG comparable con el portaobjetos de vidrio revestido con NHS, como se ilustra en la Figura 25.

Ejemplo 14: Materiales y Métodos

Todos los productos químicos y disolventes anhídridos se obtuvieron de una fuente comercial y se usaron sin purificación adicional. Los tamicos moleculares (TM) para glicosilación fueron AW-300 (Aldrich). Se obtuvo cartucho SPE FluoroFlash® de Sigma. Las reacciones se controlaron con cromatografía en capa fina analítica (TLC) en placas F254 con gel de sílice EM 60 y se visualizaron en UV (254 nm) y/o por tinción con KMnO_4 o p-Anisaldehído. Se registraron espectros de RMN de ^1H en un espectrómetro Bruker ULTRASHIELD-600 PLUS (600 MHz) a 298K.

Se asignaron desplazamientos químicos (en ppm) de acuerdo con la señal de patrón interno de CDCl_3 ($\delta = 7,24$ ppm). Se obtuvieron espectros de RMN de ^{13}C con espectrómetro Bruker ULTRASHIELD-600 PLUS y se calibraron con CDCl_3 ($\delta = 77,00$ ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se presentan en hercios (Hz). Se describen los patrones de desintegración usando las siguientes abreviaturas: s, singlete; brs, singlete ancho, doblete; t, triplete, m, multiplete.

Materiales de sustrato

Se limpiaron micro portaobjetos de vidrio ($75,5 \times 25,4 \times 1 \text{ mm}^3$) en solución de piraña, una mezcla de H_2SO_4 concentrado y H_2O_2 30 % (70:30 v/v), a 120°C durante 30 minutos, se aclararon con abundancia de agua desionizada hasta pH 7, y se secaron con purga con gas nitrógeno de alta calidad. Se obtuvieron dianas de aluminio de alta pureza (99,999 % puras) de Summit-Tech Resource Corp. (Hsin-Chu, Taiwán). Estas materias primas se proporcionaron a los proveedores Cheng-Jen Corp. (Kao-Hsiung, Taiwán) y Yujay-Tech Corp. (Chin-Ju, Taiwán) para la fabricación de portaobjetos de ACG usando diferentes técnicas de revestimiento tales como magnetrón de pulverización por bombardeo iónico, evaporación de arco catódico y evaporación térmica. Los portaobjetos de ACG fabricados se usaron directamente o se anodizaron con una corriente DC a 20 V (modelo Keithley 2400) a 48°C en ácido oxálico acuoso 0,3 M durante 60-90 segundos. Las propiedades de superficie de los portaobjetos de ACG fabricados se muestran en la Figura 1. Las superficies se metalizaron por bombardeo atómico con oro y se examinaron por SEM (FEI XL30 SFEG, FEI Company). La rugosidad y el grosor de la superficie del revestimiento de aluminio se midieron por AFM (Dimension 3100 Veeco Instruments, Inc.). Las composiciones de superficie de estos portaobjetos se analizaron por XPS usando un espectrómetro Omicron ESCA con una fuente de rayos X monocromática de $\text{Al}_{K\alpha}$ (1486,6 eV) en vacío ultra alto (1×33^{-12} Pa). Todos los espectros se calibraron mediante el espectro de carbono 1s a 284,5 eV y el espectro de oxígeno 1s a 532 eV.

Fabricación de portaobjetos de NH_2 -ACG

El portaobjetos de ACG se lavó con acetona y agua consecutivamente en un multiagitador (FMS2 FINEPCR) durante 2-3 minutos, se secó con purga con gas nitrógeno de alta pureza, y se secó adicionalmente en un horno a 100°C durante 10-15 minutos. Se realizó activación de superficie por un limpiador de plasma (Harrick PDC 32 G, 26,6-79,8 Pa) con oxígeno, argón o gases mixtos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Inmediatamente después del tratamiento con plasma, se colocó APDMES (0,8 ml) uniformemente en la superficie (a granel), que se recubrió con una placa de Petri sellada y se calentó directamente en una placa caliente a 658°C durante 40 minutos-1 hora. Cuando se completó la reacción, el portaobjetos de muestra se aclaró exhaustivamente, se sonicó en metanol durante 3 minutos (20 % de potencia), y se secó con purga con gas nitrógeno de alta pureza. La superficie con sustrato con injerto de aminosilano se usó para formación de enlaces de amida *in situ* con el compuesto derivado de manosa 27 y HBTU. Los portaobjetos de vidrio- NH_2 (Nº 40004 de Coming Inc.) se usaron para comparación de unión de proteínas.

Fabricación de portaobjetos de NHS-ACG

Los portaobjetos de ACG revestidos por evaporación térmica se anodizaron adicionalmente en ácido oxálico 0,2 M durante 90 segundos, se aclararon con agua desionizada, y se activaron por plasma de argón como se realiza habitualmente. Sin ninguna contaminación, el portaobjetos se ensambló en una celda de reacción transferible por calor, sellada con PTFE diseñada, y se añadió inmediatamente APTES (1 ml, a granel) a la celda. La celda de PTFE se cubrió con una placa de vidrio. En condiciones sin humedad, la celda se calentó a 658°C durante 30 minutos y se aclaró exhaustivamente con cloruro de metileno y metanol. Los portaobjetos se secaron con purga con gas nitrógeno. Previamente, se preparó una solución saturada de DSS (0,5 g; CAS Nº 68528-80-30) en DMF (4 ml) y diisopropiltilamina (220 ml). Se añadió una parte (1,33 ml) de esta solución saturada a cada celda de reacción. El portaobjetos de NHS-ACG se formó en un periodo de 3 horas con agitación constante a temperatura ambiente. El portaobjetos se aclaró exhaustivamente con etil acetato y se secó con purga con gas nitrógeno de alta calidad. Después de secarse y desensamblarse la celda de PTFE, el portaobjetos estaba listo para micromatriz de H- NH_2 Globo.

Preparación de portaobjetos de ACG-fabricación de los portaobjetos de ACG de tipo PTFE basados en silano

En unas condiciones sin humedad, se hizo reaccionar el portaobjetos de ACG activado por plasma de argón con 3-aminopropiltriethylsilano a granel a 65°C durante 30 minutos, después se lavó con cloruro de metileno exhaustivamente y se secó por gas nitrógeno en condiciones atmosféricas. El portaobjetos de ACG silanado se sumergió en una mezcla de disolvente (DMF/IPA/DIPEA relación de volumen 12/6/1) de solución de N-succimidil 3-perfluorooctilpropionato (0,05 % p) durante dos horas a temperatura ambiente. Después de la reacción, el portaobjetos se aclaró con IPA exhaustivamente, y se secó con purga con gas nitrógeno. Se comprobó rápidamente la medición del ángulo de contacto del agua ($\geq 115^\circ$) para la compleción de la fabricación del portaobjetos.

Preparación de portaobjetos de ACG-fabricación de los portaobjetos de ACG de tipo PTFE basados en ácido fosfórico

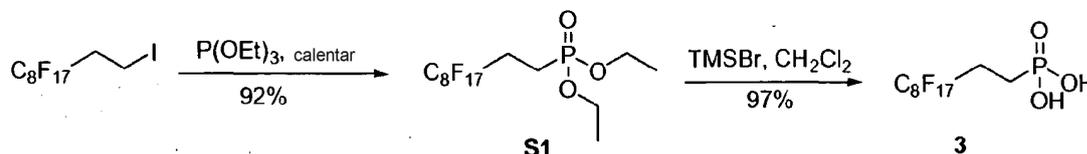
El portaobjetos de vidrio revestido con aluminio se lavó con acetona y agua tres veces, y después se secó mediante aire limpio seco. El portaobjetos limpio se activó después y se limpió por plasma de oxígeno (plasma Harrick, PDC-32G) durante 15 minutos. Después de la activación, el portaobjetos se sumergió en solución de ácido 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecilsfosfónico (HDFDPA) **3** (1 M, 2-propanol 65 % en H₂O, pH = 6,17) inmediatamente. La solución se hizo vibrar por sonicación suave (50 W) durante 15 minutos. Después del tratamiento con ultrasonidos, el portaobjetos se retiró de la solución y después se sumergió en otra solución de 2-propanol pura durante 15 minutos. La solución también se sonicó para ayudar a la retirada del exceso de ácido fosfónico en la superficie de portaobjetos. El portaobjetos se secó por nitrógeno seco y presión reducida. Tras la compleción de la reacción, el portaobjetos se lavó exhaustivamente con IPA, y se secó con purga de nitrógeno. Se comprobó rápidamente la medición del ángulo de contacto del agua ($\geq 115^\circ$) para la compleción de la fabricación del portaobjetos.

Portaobjetos de vidrio-NHS controlados por referencia

Se usaron directamente portaobjetos de vidrio-NHS (de SCHOTT, Norteamérica). El portaobjetos de vidrio-NH₂ (N° 40004 de Corning, Inc.) se modificó usando el mismo método de preparación para el portaobjetos de ACG-NHS. El portaobjetos se ensambló en una celda de reacción transferible por calor, sellada con PTFE diseñada. Se añadió una parte (1,33 ml) de solución de DSS saturada para reacción con la superficie de vidrio-NH₂. Después de agitación constante a temperatura ambiente durante 3 horas, el portaobjetos se aclaró exhaustivamente con etil acetato y se secó con purga con gas nitrógeno de alta calidad. Después de secarse y desensamblarse la celda de PTFE, los portaobjetos estaban listos para micromatriz de H-NH₂ Globo.

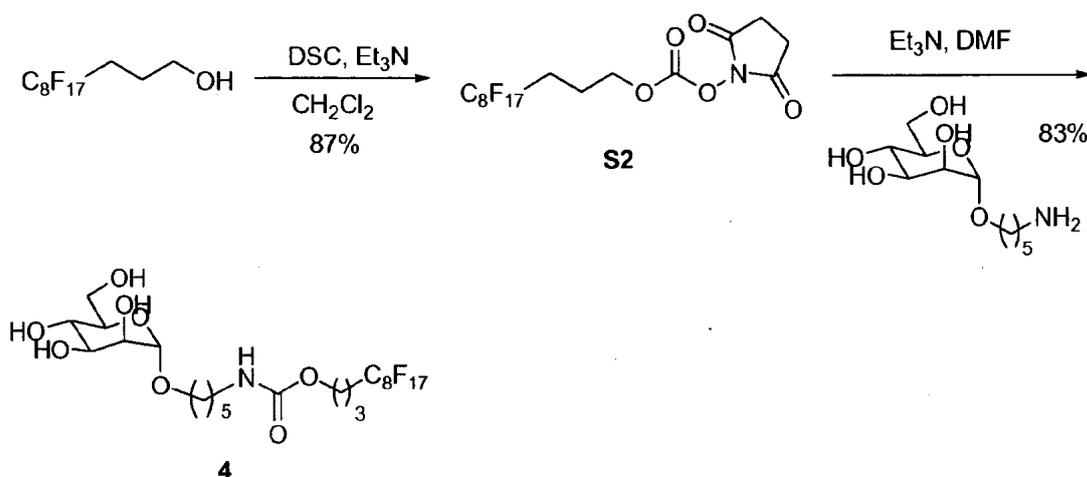
Materiales químicos

Todos los productos químicos empleados en la síntesis de **6** se obtuvieron de Aldrich o las compañías químicas individuales especificadas y se usaron sin ninguna purificación adicional.

Síntesis**Preparación de **3**.**

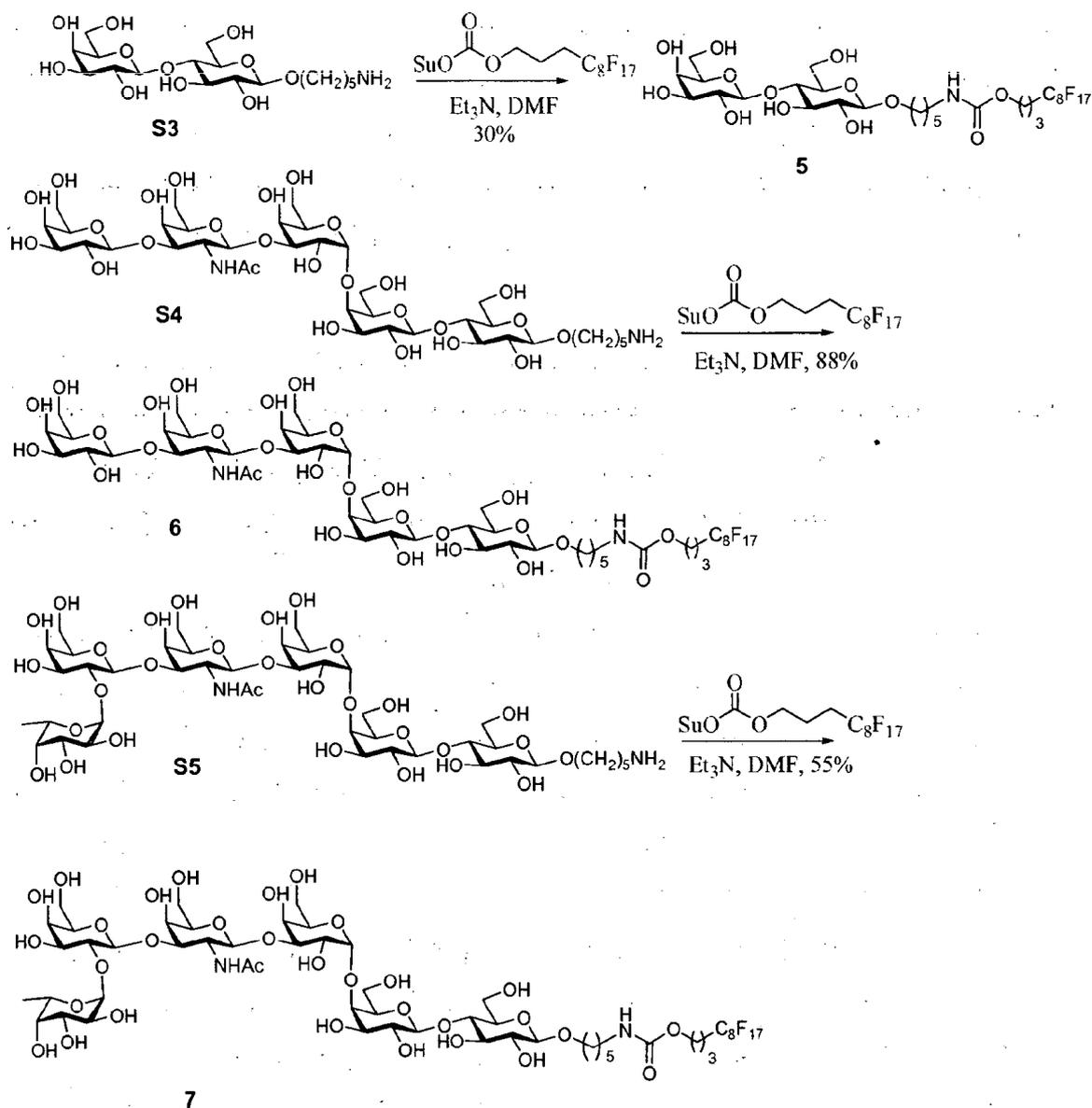
Dietil-3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecilsfosfonato (S1): se añadió 1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-heptadecafluoro-10-yododecano (1,02 g, 1,78 mmol) y P(OEt)₃ (15 ml, exceso) a un matraz de fondo redondo de 50 ml. La mezcla se calentó a 120 °C con nitrógeno durante 40 horas y después se purificó con cartucho SPE FluoroFlash®. El aceite amarillo claro restante se sometió a cromatografía con etil acetato/hexano para producir producto. (0,96 g, 92 %). RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 4,10-4,00 (m, 4H, CH₂CH₃), RMN de ¹³C (150 MHz CDCl₃) 2.35-2.23 (m, 2H, CH₂ CF₂), 1,92-1,86 (m, 2H, PCH₂), 1,25 (t, J = 7,2 Hz, 6H, CH₂ CH₃ (150 MHz, CDCl₃)): δ (ppm) 121-106 (m, acoplamiento de C-F no resuelto), 62,28 (d, ²J_{cp} = 6 Hz, CH₂ CH₃), 25,33 (t, ²J_{CF} = 23 Hz, CH₂ CF₂), 17,24 (d, ²J_{cp} = 148 Hz, PCH₂), 16,38, ³J_{cp} = 6 Hz, CH₂ CH₃). HRMS calculado para C₁₄H₁₄F₁₇O₃P: [M + H]⁺, 585,0487; hallado 585,0433.

Ácido 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecilsfosfónico (3): se añadió bromotrimetilsilano (0,74 ml, 5,75 mmol) mediante jeringa a una solución de **S1** (1,12 g, 1,92 mmol) en CH₂Cl₂ anhídrido (15 ml) con nitrógeno. La mezcla se agitó durante 30 horas. Los volátiles se retiraron en vacío completamente para proporcionar un polvo blanco. El polvo blanco puede usarse para el siguiente experimento directamente sin purificación adicional. (0,99 g, 97 %). RMN de ¹H (600 MHz, MeOD): δ (ppm) 2,48-2,42 (m, 2H, CH₂ CF₂), 1,99-1,96 (m, 2H, PCH₂) RMN de ¹³C (150 MHz, MeOD): δ (ppm) 121-106 (m, acoplamiento de CF no resuelto), 25,55 (t, ²J_{CF} = 23 Hz, CH₂ CF₂), 18,26 (d, ²J_{cp} = 143 Hz, PCH₂). HRMS calculado para C₁₀H₅F₁₇O₃P: [M-H]⁻, 526,9699; hallado 526,9669



Preparación de manosa polifluorada 4.

- 5 **2,5-dioxopirrolidin-1-il 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluoro-undecil carbonato (S2):** A una solución agitada de 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluoroundecan-1-ol (214 mg, 0,45 mmol) y DSC (184 mg, 0,72 mmol) en acetonitrilo se añadió trietilamina (0,5 ml, 3,60 mmol) a 0 °C con nitrógeno y después la solución se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. La reacción se lavó con H₂O tres veces. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida para proporcionar un sólido blanco. (242 mg, 87 %) RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 4,40 (t, 2H, J = 6,3 Hz, CH₂O), 2,83 (s, 4H), 2,27- 2,18 (m, 2H, CH₂ CH₂F), 2,10-2,05 (m, 2H, FCH₂). RMN de ¹³C (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 168,73 (NCO), 151,65 (OCO), 121-106 (m, acoplamiento de CF no resuelto), 69,87 (OCH₂), 25,66 (FCH₂), 20,12 (FCH₂CH₂).
- 10
- 15 **[(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonadecafluorododecoxicarbonil-amino) pentil] α-D-manopiranosido (4):** A una solución agitada de **S2** (250 mg, 0,40 mmol) y 5-aminopentil α-D-mano-piranosido (112 mg, 0,39 mmol) en CH₂Cl₂ se añadió trietilamina (0,2 ml) a 0 °C con nitrógeno y después se retiró el baño de hielo. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. El disolvente se retiró en vacío y el producto se purificó por cartucho SPE FluoroFlash® y cromatografía ultrarrápida para proporcionar un sólido blanco. (253 mg, 83 %). RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,97 (s, 1H, NH), 4,72 (d, J = 1,6 Hz, 1H, 1-H de Man), 4,10 (t, J = 6,2 Hz, 2H, O-CH₂), 3,82-3,80 (m, 1H), 3,77-3,76 (m, 1H), 3,73-3,70 (m, 2H), 3,69-3,66 (m, 1H), 3,59 (t, J = 9,6 Hz, 1H), 3,52-3,49 (m, 1H), 3,42-3,38 (m, 1H), 3,08 (t, J = 7,1 Hz, 1H, O-CH₂), 2,32 -2,23 (m, 2H, CH₂ CH₂ F), 1,94-1,89 (m, 2H, FCH₂), 1,63-1,54 (m, 2H), 1,51-1,46 (m, 2H), 1,42-1,32 (m, 4H). RMN de ¹³C (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 157,44 (NCO), 120-105 (m, acoplamiento de CF no resuelto), 100,12 (1-C de Man), 73,19, 71,25, 70,87, 67,22, 67,04, 62,80, 61,51, 40,27 (CH₂N), 29,41, 19,10, 26,20, 25,63, 24,86, 20,07. HRMS calculado para C₂₃H₂₈F₁₇ NO₈: [M + Na]⁺, 806,1598; hallado: 806,1643.
- 20
- 25



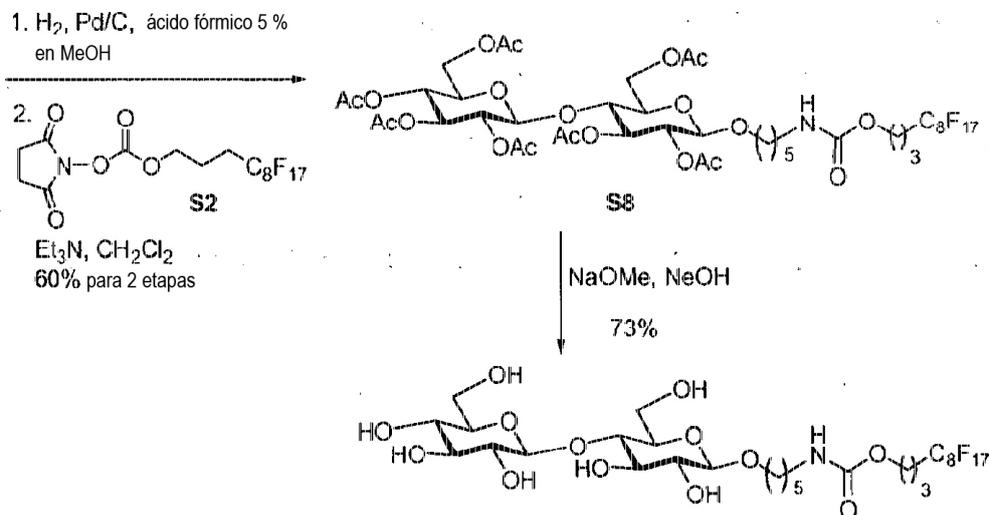
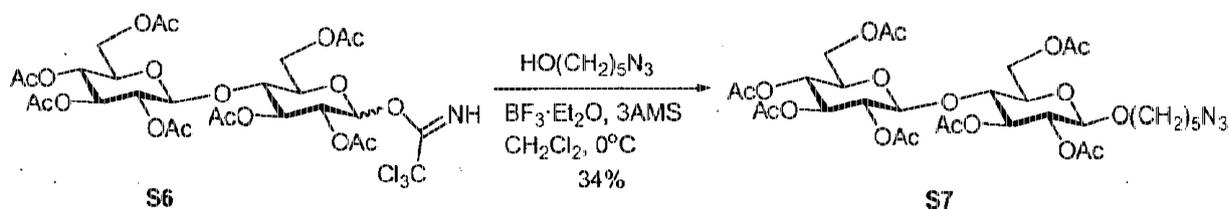
Síntesis de 5, 6 y 7 polifluorados.

- 5 **[(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonadecafluorododecoxycarbonil-amino)pentil] β-D-lactósido(5):** se añadió a la solución de **S3** (44 mg, 0,10 mmol) y **S2** (76 mg, 0,12 mmol) en DMF (5 ml) Et₃N (28 μl, 0,20 mmol) a 0 °C. Después de agitar a temperatura ambiente durante una noche, la mezcla de reacción se concentró en vacío y se purificó por cromatografía en columna y cartucho SPE FluoroFlash® para proporcionar **5** como un sólido espumoso blanco (29 mg, 30 %). R_f: 0,68 (EtOAc: MeOH=5: 1). RMN de ¹H (600 MHz, MeOD): δ 84,36 (d, J=7,6 Hz, 1H), 4,27 (d, J=7,8 Hz, 1H), 4,15 (bt, 1H), 4,10 (t, J=6,0 Hz, 2H), 3,90-3,40 (m, 12H), 3,39 (m, 1H), 3,25 (t, J=8,1 Hz, 1H), 3,09 (t, J=6,9 Hz, 2H), 2,31-2,26 (m, 2H), 1,93-1,90 (m, 2H), 1,64-1,62 (m, 2H), 1,52-1,49 (m, 2H), 1,42-1,40 (m, 2H). RMN de ¹³C (150 MHz, MeOD): δ 157-53, 120,62-110,33 (m, acoplamiento de C-F no resuelto), 103,79, 102,93, 79,38, 75,79, 75,16, 75,13, 73,52, 73,46, 71,26, 69,00, 62,90, 61,19, 60,62, 40,36, 29,29, 29,05, 27,33 (t), 22,96, 20,18. MS (ESI) calculado para C₂₉H₃₈F₁₇NO₁₃Na⁺: 954,1970 [M+Na]⁺; hallado: 954.1964.

- 15 **[(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonadecafluorododecoxycarbonil-amino)pentil]β-D-galactopiranosil-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→3)-α-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosido (6):** el compuesto **6** se preparó a partir del compuesto **S4** de acuerdo con el procedimiento como se describe para **5** en rendimientos del 55 % después de purificación por cromatografía en columna y cartucho SPE FluoroFlash®. R_f: 0,18 (EtOAc: MeOH=1:1). Sólido espumoso blanco. RMN de ¹H (600 MHz, MeOD): δ 4,72 (d, J=8,4 Hz, 1H), 4,44 (d, J=7,0 Hz, 1H), 4,37 (d, J=7,4 Hz, 1H), 4,31 (d, J=7,7 Hz, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,19 (d, J=2,1 Hz, 1H), 4,13 (t, d, J=6,0 Hz, 2H), 4,09 (m, 1H), 4,01 (bs, 1H), 3,95-3,67 (m, 20H), 3,60-3,42 (m, 11H), 3,26 (t, J=8,6 Hz, 1H), 3,12 (t, J=7,0 Hz, 2H), 2,34-2,26 (m,2H), 2,01 (s, 3H), 1,98-1,91 (m,2H), 1,69- 1,64

(m, 2H), 1,55-1,52 (m, 2H), 1,46- 1,43 (m, 2H). RMN de ^{13}C (150 MHz, MeOD): δ 173,69, 157,44, 120,11-108,43 (m, acoplamiento de C-F no resuelto), 105,22, 104,06, 102,91, 102,80, 101,38, 80,11, 79,83, 79,34, 78,55, 75,38, 75,11, 75,05, 74,97, 74,94, 73,46, 73,24, 73,17, 71,17, 71,07, 71,00, 69,31, 69,21, 68,87, 68,14, 68,07, 62,81, 61,21, 60,50, 60,16, 51,98, 40,26, 29,22, 28,97, 22,87, 21,95, 20,08, 19,47. MS (MALDI) calculado para $\text{C}_{49}\text{H}_{71}\text{F}_{17}\text{N}_2\text{O}_{28}\text{Na}^+$: 1481,382 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; hallado: 1481,452.

[(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12-nonadecafluorododecoxycarbonil-amino)pentil] α -L-fucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido (7): el compuesto **7** se preparó a partir del compuesto **S5** de acuerdo con el procedimiento como se describe para **5** en rendimientos del 88 % después de purificación por cromatografía en columna y cartucho SPE FluoroFlash®. R_f: 0,18 (EtOAc: MeOH=1:1). Sólido espumoso blanco. RMN de ^1H (600 MHz, MeOD): δ 5,26 (d, $J=3,8$ Hz, 1H), 4,96 (d, $J=3,8$ Hz, 1H), 4,58 (d, $J=7,9$ Hz, 1H), 4,44 (d, $J=7,0$ Hz, 1H), 4,30 (d, $J=7,6$ Hz, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,17-4,10 (m, 5H), 4,01 (bs, 1H), 3,93-3,69 (m, 24H), 3,68-3,53 (m, 8H), 3,44-3,41 (m, 1H), 3,26 (t, $J=8,6$ Hz, 1H), 3,12 (t, $J=7,0$ Hz, 2H), 2,32-2,28 (m, 2H), 2,04 (s, 3H), 1,97-1,93 (m, 2H), 1,69-1,64 (m, 2H), 1,56-1,52 (m, 2H), 1,47-1,42 (m, 2H), 1,27 (d, $J=6,5$ Hz, 3H). RMN de ^{13}C (150 MHz, MeOD): δ 173,17, 157,55, 104,07, 102,93, 102,59, 101,54, 99,78, 80,05, 79,26, 78,81, 77,83, 76,82, 75,50, 75,21, 75,09, 74,23, 73,56, 73,41, 72,25, 71,33, 71,22, 70,25, 69,41, 69,32, 69,09, 68,37, 68,33, 66,83, 62,91, 61,31, 61,26, 60,65, 60,25, 51,82, 40,37, 29,32, 29,07, 22,97, 22,18, 20,19, 15,40. MS (MALDI) calculado para $\text{C}_{55}\text{H}_{81}\text{F}_{17}\text{N}_2\text{O}_{32}\text{Na}^+$: 1627,440 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; hallado: 1627,526.



Síntesis de polifluoro-celobiosido **8**.

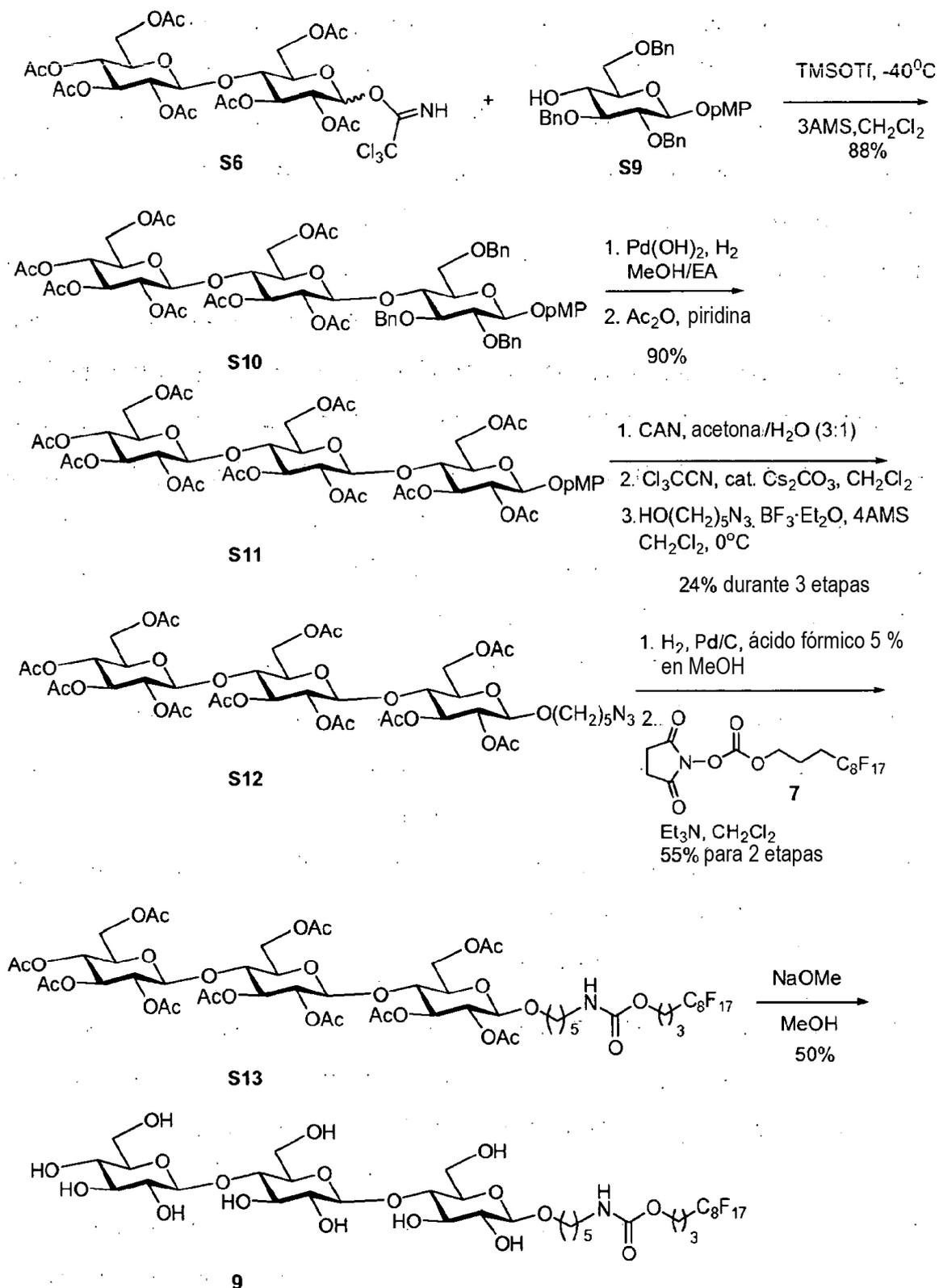
5-Azidopentil 2,3,6,2,3,4,6'-hepta-O-acetil- β -D-celobiosido (S7): se agitó una suspensión del compuesto **S6** (1,01 g, 1,29 mmol), 5-azido-1-pentanol (0,84 g, 6,47 mmol) y tamices moleculares de 3Å en CH_2Cl_2 (10 ml) a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se trató en gotas con $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (33 μl , 0,26 mmol). Después de agitar a 0 °C durante 2 h, se añadió NaHCO_3 acuoso saturado y la mezcla de reacción se filtró con Celite. La mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 y después se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó el disolvente y se purificó por cromatografía (Hexano: EtOAc = 3:1 \rightarrow 2:1 \rightarrow 1:1) para proporcionar **S7** como un sólido espumoso blanco (330 mg, 34 %). R_f: 0,48 (Hexano:EtOAc =1:1), RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ 5,16 (t, $J=9,4$ Hz, 1H), 5,13 (t, $J=9,4$ Hz, 1H), 5,04 (t, $J=9,7$ Hz, 1H), 4,91-4,85 (m, 2H), 4,50-4,47 (m, 2H), 4,42 (d, $J=8,2$ Hz, 1H), 4,34 (dd, $J=12,5$, 4,3 Hz, 1H), 4,06 (dd, $J=12,0$, 4,7 Hz, 1H), 4,01 (dd, $J=12,3$, 1,9 Hz, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,74 (t, $J=9,5$ Hz, 1H), 3,64-3,62 (m, 1H), 3,56 (m, 1H), 3,43 (m, 1H), 3,23 (t, $J=6,8$ Hz, 2H), 2,10 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,98 (s, 3H), 1,96 (s, 3H), 1,59-1,54 (m, 4H), 1,40-1,35 (m, 2H), RMN de

^{13}C (150 MHz, CDCl_3): δ 170,54, 170,34, 170,26, 169,86, 169,60, 169,34, 169,08, 100,81, 100,64, 76,51, 72,94, 72,67, 72,49, 71,96, 71,61, 71,56, 69,73, 67,76, 61,84, 61,54, 51,33, 28,94, 28,52, 23,14, 21,08, 20,90, 20,69, 20,57. HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_{18}\text{Na}^+$: 770,2590 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; hallado: 770,2570.

5 **[(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonadecafluorododecoxycarbonil-amino)pentil]2,3,6,2,3,4,6'-hepta-O-acetil- β -D-celobiósido (S8)**: se agitó una suspensión de **S7** (50 mg, 0,07 mmol), cantidad catalítica de Pd/C en ácido fórmico 5 % en MeOH (5 ml) con globo de H_2 durante 2 h. después de filtración a través de Celite, la torta de filtrado se lavó con MeOH. El filtrado se evaporó y se coevaporó con tolueno. El resto se sometió a la siguiente etapa sin purificación.

10 El resto descrito anteriormente se disolvió en CH_2Cl_2 (5 ml) y después se añadió el compuesto **S2** (50 mg, 0,08 mmol). La mezcla se enfrió a 0 °C. Se añadió trietilamina (19 μl , 0,13 mmol) y la solución continuó agitándose a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla de reacción se concentró y se purificó por cromatografía (Hexano:EtOAc = 1:1) para proporcionar **S8** como un sólido espumoso blanco (49 mg, 60 % en dos etapas). RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ 5,14 (t, $J=9,5$ Hz, 1H), 5,11 (t, $J=9,5$ Hz, 1H), 5,03 (t, $J=9,5$ Hz, 1H), 4,91- 4,84 (m, 2H), 4,76 (br, 1H), 4,50 (dd, $J=12,0, 1,7$ Hz, 1H), 4,48 (d, 7,9 Hz, 1H), 4-40 (d, 8,0 Hz, 1H), 4,34 (dd, $J=12,5, 4,3$ Hz, 1H), 4,09 (t, $J=6,1$ Hz, 2H), 4,05 (dd, $J=12,0, 4,9$ Hz, 1H), 4,01 (dd, $J=12,5, 2,2$ Hz, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,73 (t, $J=9,5$ Hz, 1H), 3,64- 3,61 (m, 1H), 3,55-3,53 (m, 1H), 3,43 (m, 1H), 3,12 (m, 2H), 2,18-2,13 (m, 2H), 2,09 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,00 (2XS, 6H), 1,98 (s, 3H), 1,97 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 1,92-1,88 (m, 2H), 1,56-1,52 (m, 2H), 1,49-1,44 (m, 2H), 1,34-1,29 (m, 2H). RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3): δ 170,51, 170,35, 170,25, 169,84, 169,62, 169,33, 169,06, 156,25, 120,18-108,01 (m, acoplamiento de C- F no resuelto), 100,78, 100,62, 76,47, 72,91, 72,68, 72,45, 71,94, 71,60, 71,56, 69,77, 67,74, 63,17, 61,76, 61,52, 40,83, 29,68, 29,49, 28,92, 27,99, 27,84, 27,69, 23,02, 21,03, 20,84, 20,64, 20,53, 20,33. HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{F}_{17}\text{NO}_{20}\text{Na}^+$: 1248,2703 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; hallado: 1248,2675.

25 **[(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonadecafluorododecoxycarbonil-amino)pentil] β -D-celobiósido (8)**: la solución de **S8** (222 mg, 0,18 mmol) y NaOMe (50 mg, 0,09 mmol) en MeOH (7 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se neutralizó con resina de intercambio iónico Amberlyst-15 durante 5 min y se filtró a través de un embudo sinterizado empaquetado con Celite. El elemento de filtro se aclaró con metanol después de filtración. Los filtrados combinados se concentraron bajo presión reducida y después se purificaron por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc:MeOH = 10:1 \rightarrow 8:1) para proporcionar **8** como un sólido blanco (123 mg, 73 %). R_f: 0,47 (EtOAc:MeOH = 5:1). RMN de ^1H (600 MHz, MeOD): δ 4,40 (d, $J=7,9$ Hz, 1H), 4,27 (d, $J=7,8$ Hz, 1H), 4,10 (t, $J=6,1$ Hz, 2H), 3,89-3,86 (m, 4H), 3,65 (dd, $J=11,8, 5,7$ Hz, 1H), 3,57-3,53 (m, 2H), 3,50 (t, $J=9,0$ Hz, 1H), 3,39-3,32 (m, 3H), 3,30 (m, 1H), 3,22 (m, 2H), 3,09 (t, $J=6,7$ Hz, 2H), 2,32-2,23 (m, 2H), 1,94-1,89 (m, 2H), 1,66-1,61 (m, 2H), 1,53-1,48 (m, 2H), 1,43-1,38 (m, 2H). RMN de ^{13}C (150 MHz, MeOD): δ 157,51, 120,11-108,43 (m, acoplamiento de C-F no resuelto), 103,20, 102,79, 79,31, 76,69, 76,43, 75,03, 73,47, 69,95, 69,29, 61,00, 60,74, 60,42, 40,32, 29,52, 28,95, 27,36, 27,21, 27,07, 22,86, 20,07. HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{F}_{17}\text{NO}_{13}\text{Na}^+$: 954,1964 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; hallado: 954,1966.



Síntesis de polifluoro-celotriósido **9**.

- 5 *para*-metoxifenil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-bencil- β -D-glucopiranosido (**S10**): de acuerdo con procedimientos similares presentados por Vesalla, se agitó una suspensión de **S6** (1,68 g, 2,16 mmol), **S9** (1,0 g, 1,8 mmol) y tamices moleculares de 3Å en CH_2Cl_2 (20

ml) a temperatura ambiente durante 1h. La mezcla de reacción se enfrió a -40 °C y se trató en gotas con TMSOTf (98 µl, 0,54 mmol). Después de agitar a -40 °C durante 2 h, se añadió NaHCO₃ acuoso saturado y la mezcla de reacción se filtró con Celite. La mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ y después se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó el disolvente y se purificó por cromatografía (Hexano:EtOAc = 3:1→2:1→1:1) para proporcionar **S10** como un sólido espumoso blanco (1,86 g, 88 %). R_f: 0,55 (Hexano: EtOAc = 1:1). RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 7,38-7,25 (m, 15H), 7,00 (d, J=9,1Hz, 2H), 6,81 (d, J=9,1 Hz, 2H), 5,10- 5,05 (m, 2H), 5,00-4,98 (m, 2H), 4,94-4,91 (m, 2H), 4,85-4,82 (m, 2H), 4,78 (d, J=11,6 Hz, 1H), 4,72 (d, J=11,6 Hz, 2H), 4,64 (d, J=8,2 Hz, 1H), 4,49 (d, J=12,0 Hz, 1H), 4,39 (d, J=7,9 Hz, 1H), 4,37 (dd, J=12,5, 4,3 Hz, 1H), 4,23 (dd, J=12,0, 2,0 Hz, 1H), 4,01 (dd, J=12,0, 2,2 Hz, 1H), 3,95 (t, J=9,2 Hz, 1H), 3,90 (dd, J=12,0, 4,6 Hz, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,78-3,62 (m, 6H), 3,46-3,44 (m, 1H), 3,19-3,16 (m, 1H), 2,08 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,98 (s, 3H), 1,97 (s, 3H), 1,95 (s, 3H). RMN de ¹³C (150 MHz, CDCl₃): δ 170,71, 170-46, 170,42, 170,01, 169,68, 169,53, 169,22, 155,53, 151,64, 139,42, 138,34, 138,01, 128,79, 128-48, 128,38, 128,35, 128,26, 128,20, 127,86, 127,40, 127,13, 118,70, 114,71, 102,91, 101,04, 100,15, 82,77, 81,60, 76,39, 75,20, 74,92, 74,89, 73,85, 73,11, 72,67, 72- 37, 72,09, 71,65, 67,99, 67-93, 61,98, 61,70, 55,85, 20,93, 20,88, 20,75. HRMS (ESI) calculado para C₆₀H₇₀O₂₄Na⁺: 1197-4149 [M+Na]⁺; hallado: 1197-4142.

para-metoxifenil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosido (S11): se agitó una suspensión de **S10** (1,01 g, 0,86 mmol), cantidad catalítica de Pd (OH)₂ en MeOH/EA (1/1, 10 ml) en globo de H₂ durante 12 h. Después de filtración a través de Celite, la torta de filtrado se lavó con MeOH. El filtrado se evaporó y el resto se sometió a la siguiente etapa sin purificación.

El resto descrito anteriormente se disolvió en piridina (5 ml) y anhídrido acético (5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió MeOH a la solución para destruir el exceso de anhídrido acético y después se concentró en vacío. Se añadió CH₂Cl₂ y la mezcla de reacción se lavó con HCl acuoso 1 M, NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ concentrado y purificado por cromatografía (Hexano:EtOAc = 1:1) para proporcionar **S11** como un sólido espumoso blanco (794 mg, 90 % en dos etapas). R_f: 0,24 (Hexano:EtOAc =1:1). RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 6,88 (d, J=9,0 Hz, 2H), 6,76 (d, J=9,0 Hz, 2H), 5,19 (t, J=9,2 Hz, 1H), 5,11-5,07 (m, 3H), 5,02 (t, J=9,7 Hz, 1H), 4,88-4,81 (m, 4H), 4,50 (dd, J=12,0, 2,0 Hz, 1H), 4,46 (d, J=8,0 Hz, 1H), 4,44 (d, J=8,0 Hz, 1H), 4,37 (dd, J=12,0, 2,0 Hz, 1H), 4-32 (dd, J=12,5, 4,3 Hz, 1H), 4,10-4,06 (m, 2H), 4,00 (dd, J=12,5, 2,0 Hz, 1H), 3,80 (t, J=9,5 Hz, 1H), 3,73 (t, J=9,5 Hz, 1H), 3,72 (s, 3H), 3,67-64 (m, 1H), 3,61-3,55 (m, 2H), 2,11 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,97 (2S, 6H), 1,96 (s, 3H), 1,94 (s, 3H). RMN de ¹³C (150 MHz, CDCl₃): δ 170,53, 170,27, 170,23, 169,79, 169,57, 169,32, 169,10, 155,77, 150,88, 118,69, 114,53, 100,80, 100,57, 100,07, 76,44, 76,13, 72,89, 72,81, 72,77, 72,65, 72,41, 72,02, 71,75, 71,55, 71,52, 67,70, 62,15, 61,49, 55,67, 20,86, 20,80, 20,70, 20,57, 20,50. HRMS (ESI) calculado para C₄₅H₅₈O₂₇Na⁺: 1053,3058 [M+Na]⁺; hallado: 1053,3051.

5-azidopentil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosido (S12): se disolvió el compuesto **S11** (866 mg, 0,84 mmol) en acetona-H₂O (20 ml 3:1), y la mezcla se enfrió (baño en agua helada). Se añadió una solución de CAN (2,3 g, 4,20 mmol) en acetona/H₂O (10 ml 3:1), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se concentró a un volumen de 10 ml, se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. El resto se disolvió después en CH₂Cl₂, y se trató con tricloroacetnitrilo (1,0 ml) y Cs₂CO₃ (250 mg, 0,77 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 12 h, la reacción se lavó con agua, salmuera, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. Se agitó una suspensión del compuesto de tricloroacetimidato, 5-azido-1-pentanol (0,54 g, 4,20 mmol) y tamices moleculares de 3Å (1,5 g) en CH₂Cl₂ (10 ml) a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se trató en gotas con BF₃-Et₂O (0,11 ml, 0,84 mmol). Después de agitar a 0 °C durante 2 h, se añadió NaHCO₃ acuoso saturado y la mezcla de reacción se filtró con Celite. La mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ y después se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó el disolvente y se purificó por cromatografía (Hexano:EtOAc = 3:1→2:1→1:1) para proporcionar **S12** como un sólido espumoso blanco (210 mg, 24 % en tres etapas). R_f: 0,31 (Hexano: EtOAc = 1:1). RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 5,12-5,05 (m, 3H), 5,00 (t, J=9,7 Hz, 1H), 4,87-4,79 (m, 3H), 4,48 (dd, J=11,8, 2,0 Hz, 1H), 4,43 (d, J=7,9 Hz, 1H), 4,42 (d, J=7,9 Hz, 1H), 4,38 (d, J=8,0 Hz, 1H), 4,35 (dd, J=12,0, 2,0 Hz, 1H), 4,31 (dd, J=12,5, 4,3 Hz, 1H), 4,07 (dd, J=12,1, 5,2 Hz, 1H), 3,99 (dd, J=12,5, 2,0 Hz, 1H), 3,80-3,74 (m, 1H), 3,71 (dt, J=10,0, 9,5 Hz, 2H), 3,60-3,58 (m, 2H), 3,55-3,52 (m, 2H), 3,45-3,40 (m, 1H), 3,21 (t, J=6,8 Hz, 2H), 2,09 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,98 (s, 3H), 1,97 (s, 3H), 1,96 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 1,94 (2xs, 6H), 1,60-1,52 (m, 4H), 1,42-1,33 (m, 2H). RMN de ¹³C (150 MHz, CDCl₃): δ 170,52, 170,31, 170,21, 169,82, 169,79, 169,54, 169,31, 169,10, 100,79, 100,59, 100,55, 76,49, 76,14, 72,87, 72,67, 72,41, 71,75, 71,62, 71,53, 67,72, 62,14, 61,72, 61,48, 51,34, 28,91, 28,50, 23,12, 20,87, 20,68, 20,55, 20,48. HRMS (ESI) calculado para C₄₃H₆₁N₃O₂₆Na⁺: 1058,3436 [M+Na]⁺; hallado: 1058,3419.

[(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonadecafluorododecoxycarbonil-amino)pentil] 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosido (S13): el compuesto **S12** se preparó a partir del compuesto **S12** de acuerdo con el procedimiento como se describe para **S8** en rendimientos del 55 % (dos etapas) después de cromatografía en columna (Hexano:EtOAc = 1:1→2:3). Sólido blanco. R_f: 0,41 (Hexano:EtOAc =1:1). RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 5,13-

de cabra marcado con Cy3-antirratón para VK9 a la celda, y las mezclas se incubaron, con agitación en oscuridad durante 1 h. los portaobjetos unidos a proteína se lavaron cinco veces cada uno con tampón de PBST (pH 7,4), tampón de PBS (pH 7,4) y agua y después se secaron con purga con gas de nitrógeno.

5 **Análisis de EM-TOF y preparación de matriz de glucanos de análisis de 4-EM-TOF de la manosa polifluorada adsorbida en los portaobjetos de ACG de tipo PTFE**

El compuesto 4 se disolvió en mezcla de disolvente de metanol/agua (6/4) a aproximadamente 10 mM, 1 mM, 100 μ M en serie. Las soluciones (1 μ l cada una) se aplicaron puntualmente de forma manual y además se dispusieron en micromatrices en los portaobjetos con el instrumento BioDot AD3200 (Agilent Technology) por pinza robótica (Array it, SMP4), una deposición de aproximadamente 1,1 nl de la solución por aplicaciones de la matriz. Los portaobjetos se almacenaron en una cámara al 30 % de humedad durante una noche y después se analizaron por espectroscopia de masas. Los portaobjetos de manosa polifluorada y blancos, que contenían portaobjetos de ACG tanto basados en silano como basados en ácido fosfónico, se analizaron con espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker Ultraflex equipado con un láser por pulsos de nitrógeno (355 nm). Se mezcló un volumen igual de solución digerida con tripsina BSA (1 pmol/ μ l) homogéneamente con solución de DHB (ácido dihidroxibenzoico, 10 mg en acetonitrilo/agua 1:1), y se usó como el patrón para la calibración de masas de EM-TOF. Cada punto de datos se recogió a la media de 500 descargas del haz de láser, y se aplicó la fluencia de láser entre 2 y 20 %. La mayoría de los experimentos se llevaron a cabo en campo eléctrico polarizado positivo.

La Figura 26A y Figura 27A muestran los resultados de fondo de EM-TOF de estos portaobjetos de ACG de tipo PTFE de nueva fabricación. La Figura 26A, (a) representa un resultado de EM-TOF del fondo de ACG de tipo PTFE basado en silano; (b) representa un resultado de EM-TOF de manosa polifluorada adsorbida en el portaobjetos de ACG anterior. La Figura 27A, (a) representa un resultado de EM-TOF del fondo de ACG de tipo PTFE basado en ácido fosfónico y (b) representa el resultado de EM-TOF de manosa polifluorada adsorbida en el portaobjetos de ACG anterior. Se observaron iones moleculares de derivados de manosa (Pm 783) a 806 [M+Na]⁺ y 822 [M+K]⁺ con línea basal muy limpia puesto que los productos químicos orgánicos no se adhieren a la superficie de portaobjetos de ACG de tipo PTFE.

La Figura 26B y la Figura 27B proporcionan los resultados de portaobjetos basados en ácido fosfónico y basados en silano de manosa polifluorada. La Figura 26B representa implementaciones de una micromatriz de portaobjetos de ACG de tipo PTFE basado en silano. Las soluciones de manosa (1,1 μ l/aplicación) variaron en concentración (de 12 mM, 1,2 mM a 120 μ M). De forma similar, 27B muestra una micromatriz de un portaobjetos de ACG de tipo PTFE basado en ácido fosfónico. Las soluciones de manosa (1,1 μ l/aplicación) variaron en concentración (de 14 mM, 1,4 mM a 140 μ M). La unión de Con A-Manosa marcada con fluorescencia donde los derivados de manosa se dispusieron en micromatrices en el portaobjetos de ACG de tipo PTFE.

Unión de manosa/Con A marcado con fluorescencia de la manosa polifluorada adsorbida en los portaobjetos de ACG de tipo PTFE.

Se aplicaron 100 μ l de Concanavalina A marcada con Alexa 488 en tampón de BSA-fosfato (25 μ g/ml, pH 6,5) en la superficie de portaobjetos de ACG inmovilizada con derivado de manosa. Estos portaobjetos con solución de Con A se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Después de la incubación, los portaobjetos se lavaron tres veces cada uno con 12 ml de tampón de fosfato-BSA, tampón PBST, y agua desionizada en placas de petri con agitación suave. Después se secaron con purga de nitrógeno y se analizaron por Array WoRx (Applied Precisión) en modo reflectante del explorador de luz fluorescente a 530 nm. La Figura S1(c) y Figura S2(c) muestran los resultados de estos bioensayos.

Análisis en microplaca por MALDI-TOF (Ultra-Flex II) (reacción en eppendorf)

Se preparó celulasa (5 U/ml en solución de tampón de NaOAc 25 mM pH 5,05). También se disolvió sustrato en solución de tampón NaOAc (25 mM, pH 5,05) para proporcionar solución de sustrato 0,5 mM. Añadir 100 μ l de solución de celulasa a 100 μ l de solución de sustrato en eppendorf para tener una solución de celulasa 2,5 unidades/ml con sustrato 0,25 mM. Esta solución se incubó a 37 °C durante 18 horas. Añadir 100 μ l de solución incubada en el portaobjetos cargado en el Armazón FAST[®]. Poner el portaobjetos en caja seca para retirar el agua, y después usar alto vacío para retirar trazas de agua. Se usaron 100 μ l de agua para aclarar cada pocillo de la placa de múltiples portaobjetos de Armazón FAST[®] y retirar la sal de la solución de tampón. Retirar cualquier agua residual en la placa por alto vacío y después analizar el portaobjetos por MALDI-TOF Ultra-Flex II.

Análisis en microplaca por MALDI-TOF (Ultra-Flex II) (reacción directamente en microplaca)

Se preparó celulasa (5 U/ml en solución de tampón de NaOAc 25 mM pH 5,05). También se disolvió sustrato en solución de tampón NaOAc (25 mM, pH 5,05) para proporcionar solución de un sustrato 0,5 mM. Añadir 50 μ l de solución de celulasa a 50 μ l de solución de sustrato en el portaobjetos de vidrio que se cargó en la placa de múltiples portaobjetos del Armazón FAST[®] para tener una solución de celulasa 2,5 U/ml con sustrato 0,25 mM. El pocillo de la

placa se selló y el ensamblaje completo se incubó a 37 °C durante 18 horas. Poner el portaobjetos en caja seca para retirar el agua, y después usar alto vacío para retirar trazas de agua. Se usaron 100 µl de agua para aclarar cada pocillo de la placa de múltiples portaobjetos de Armazón FAST[®] para disolver y retirar la sal de la solución de tampón. Retirar cualquiera agua residual en la placa por alto vacío y después analizar el portaobjetos por MALDI-TOF Ultra-Flex II.

Purificación de celulasa y análisis por EM-TOF de la actividad celulasa. Clonación, expresión y purificación de exoglucanasa y endoglucanasa

- Se obtuvo el ADN genómico de *Sulfolobus solfataricus* (ATCC 35092) y *Clostridium thermocellum* (ATCC 27405) del centro de recursos biológicos de ATCC. El fragmento génico *Ss07d* (número de referencia de NCBI: AAK42090) se amplificó directamente del genoma de *Sulfolobus solfataricus* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores directo 5' GGAATTCATATGGCAACAGTAAAGTTCAAG 3' (SEC ID N°: 1) e inverso 5' CGGGATCCCTTCTTTTGTCTCTAACATTTG 3' (SEC ID N°: 2). El producto de PCR que codifica *Ss07d* se digirió con *NdeI* y *BamHI* y posteriormente se clonó en el vector de expresión pET-28a (Novagen) para generar pET-28-Ss07d. Se insertó un conector de dos extremos adhesivos, generado por desnaturalización e hibridación con cebadores 5' GATCTGATCTGTACGACGATGACGATAAGGGATCTATCGAAGGTCGTG 3' (SEC ID N°: 3) y 5' GATCCACGACCTTCGATAGATCCGTTATCGTCATCGTCGTACAGATCA 3' (SEC ID N°: 4), se insertó en el pET-28-Ss07d escindido con *BamHI* para generar pET-28-Ss07d-Fxa. Los dominios funcionales del fragmento génico *CtCbhA* (número de referencia de NCBI: X80993) se amplificó directamente a partir del genoma de *Clostridium thermocellum* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores directo 5' GAAGATCTATACTTCCGCAGCCTGATG 3' (SEC ID N°: 5) e inverso 5' ACGCGTCGACTTAGGTTTCACTGTCTGTGTAAGT 3' (SEC ID N°: 6). El producto de PCR que codifica *CtCbhA* se digirió con *BglII* y *Sall* y se clonó posteriormente en pET-28-Ss07d-Fxa escindido con *BamHI* y *Sall* para generar pET-28-Ss07d-Fxa-CtCbhA. Los dominios funcionales del fragmento génico *CtCel44A* (número de referencia de NCBI: D83704) se amplificaron directamente a partir del genoma de *Clostridium thermocellum* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores directo 5' GAAGATCTGAACCTGCAAAAGTGGTTGAC 3' (SEC ID N°: 7) e inverso 5' CGCGTCGACTTAGGGCTCCGCAGCTTCAAGCAC 3' (SEC ID N°: 8).
- El producto de PCR que codifica *CtCel44A* se digirió con *BglII* y *Sall* y se clonó posteriormente en pET-28-Ss07d-Fxa escindido con *BamHI* y *Sall* para generar pET-28-Ss07d-Fxa-CtCel44A. Todas las construcciones de ADN se verificaron por secuenciación de nucleótidos. Las construcciones correctas se usaron para transformar células competentes de *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) para expresión proteica. Los 10 ml de cultivo de una noche de un único transformante se usaron para inocular 1 litro de medio LB nuevo que contenía kanamicina 30 µg/ml a 30 °C. La temperatura incubada se cambió a 16 °C hasta que las células se cultivaron a $A_{600\text{ nm}} = 0,8 - 1$. Una hora después se añadió isopropilo β-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,5 mM. Después de 16 horas, las células se recogieron por centrifugación a 7.000 xg durante 15 minutos para recoger la pasta celular. El sedimento celular se resuspendió inmediatamente en el tampón de lisis que contenía Tris-HCl 20 mM, NaCl 400 mM, imidazol 10 mM, pH 7,5. La suspensión celular se rompió por el Sistema de Rotura Celular Constant (CONSTANT SYSTEM Ltd., Reino Unido) y se centrifugó a 17.000 xg para retirar los residuos celulares. El extracto sin células se cargó en una columna de Ni²⁺-NTA, que se había equilibrado previamente con tampón de lisis. La columna se lavó con tampón de lisis, posteriormente la proteína marcada con His₆ se eluyó por un gradiente lineal de imidazol 10 mM a 300 mM. Las proteínas *CtCbhA* y *CtCel44A* de fusión con *Ss07d* marcada con His₆ purificadas se concentraron y se cambiaron a tampón almacenado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) por membrana de tamaño de punto de corte 30 kDa de Amicon-Ultra-15 (Millipore, MA, Estados Unidos) para almacenamiento a -80 °C.

De acuerdo con las implementaciones, los dispositivos y métodos (por ejemplo, espectroscopia de masas) de la presente divulgación son operativos en un ambiente que comprende numerosos sistemas o configuraciones informáticas para fines generales o fines especiales. Los ejemplos de sistemas, ambientes o configuraciones informáticas bien conocidos que pueden ser adecuados para su uso con la invención incluyen, pero sin limitación, ordenadores personales, ordenadores servidores, dispositivos de mano o portátiles, sistemas multiprocesador, sistemas basados en microprocesador, cajas de conexión, electrónica de consumo programable, PC en red, miniordenadores, ordenadores centrales, sistemas de telefonía, ambientes informáticos distribuidos que incluyen cualquiera de los sistemas o dispositivos anteriores, y similares.

Los dispositivos y métodos de la presente divulgación pueden describirse en el contexto general de instrucciones ejecutables por ordenador, tales como módulos de programa, que se ejecutan por un ordenador. En general, los módulos de programa incluyen rutinas, programas, objetos, componentes, estructuras de datos, etc., que realizan tareas particulares o implementan tipos de datos abstractos particulares. El sistema también puede practicarse en ambientes informáticos distribuidos en los que las tareas se realizan por dispositivos de procesamiento remotos que están ligados mediante una red de comunicaciones. En un ambiente informático distribuido, los módulos de programa pueden localizarse en medios de almacenamiento informático tanto locales como remotos incluyendo dispositivos de almacenamiento de memoria. Los programas informáticos se almacenan en un medio de memoria o medio de almacenamiento o pueden proporcionarse a una unidad de procesamiento a través de una red o bus I/O.

En un aspecto, los dispositivos y métodos de la presente divulgación incluyen al menos una unidad de procesamiento central (CPU) o procesador. La CPU puede acoplarse a una memoria, ROM o medio leíble por ordenador que contenga las instrucciones ejecutables por ordenador. Los medios leíbles por ordenador pueden ser cualquier medio disponible al que puede accederse por el sistema e incluyen medios tanto volátiles como no volátiles, medios desmontables y no desmontables implementados en cualquier método o tecnología para almacenamiento de información tal como instrucciones leíbles por ordenador, estructuras de datos, módulos de programa u otros datos. Los medios de almacenamiento informáticos incluyen, pero sin limitación, RAM, ROM, EEPROM, memoria flash, memoria portátil u otra tecnología de memoria, CD-ROM, discos versátiles digitales (DVD) u otro almacenamiento de disco óptico, cassetes magnéticas, cinta magnética, almacenamiento de disco magnético u otros dispositivos de almacenamiento magnético, o cualquier otro medio que pueda usarse para almacenar la información deseada y a la que puede accederse por los sistemas de generación y detección de huella digital. Los medios de comunicación típicamente incluyen instrucciones leíbles por ordenador, estructuras de datos, módulos de programa u otros datos en una señal de datos modulada tal como una onda portadora u otro mecanismo de transporte e incluye cualquier medio de envío de información. Como ejemplo, y sin limitación, los medios de comunicación incluyen medios alámbricos tales como red alámbrica o conexión alámbrica directa y medios inalámbricos tales como medios acústicos, RF, infrarrojos y otros inalámbricos. Las combinaciones de cualquiera de los anteriores también deberían incluirse dentro del alcance de medios leíbles por ordenador. Los medios leíbles por ordenador pueden almacenar instrucciones o datos que implementan todo o parte del sistema descrito en el presente documento.

Aunque el aparato y el método se han descrito con respecto a lo que se considera en la actualidad que son las realizaciones más prácticas y preferidas, debe entenderse que no es necesario que la divulgación se limite a las realizaciones desveladas. Se pretende abarcar diversas modificaciones y disposiciones similares incluidas dentro de las reivindicaciones. La presente divulgación incluye todas y cada una de las realizaciones de las siguientes reivindicaciones.

Listado de secuencias

<110> Wu, Chung-Yi Wong, Chi-Huey

<120> MATRICES DE GLUCANO SOBRE PORTAOBJETOS DE VIDRIO REVESTIDOS CON ALUMINIO DE TIPO PTFE Y MÉTODOS RELACIONADOS

<130> 37919.60451

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 1
ggaattccat atggcaacag taaagtcaa g 31

<210> 2
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 2
cgggatccct tcttttgctt ctctaacatt tg 32

<210> 3
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 442 024 T3

<220>
 <223> Conector

 <400> 3
 5 gatctgatct gtacgacgat gacgataagg gatctatcga aggtcgtg 48

 <210> 4
 <211> 48
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Conector

 <400> 4
 15 gatccacgac cttcgataga tcccttatcg tcatcgtcgt acagatca 48

 <210> 5
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 25
 <400> 5
 gaagatctat acttccgcag cctgatg 27

 <210> 6
 <211> 34
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 35
 <400> 6
 acgcgtcgac ttaggtttca ctgtctgtg actg 34

 <210> 7
 <211> 29
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 45
 <400> 7
 50 gaagatctga acctgcaaaa gtggtgac 29

 <210> 8
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 8
 60 acgcgtcgac ttagggctcc gcagcttcaa gcac 34

REIVINDICACIONES

1. Una matriz de carbohidratos inmovilizados en un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio polifluorado (de tipo politetrafluoroetileno (PTFE)), comprendiendo la matriz:

una pluralidad de carbohidratos inmovilizados en localizaciones específicas en una superficie del sustrato sólido no transparente revestido con aluminio, de modo que:

- (a) los carbohidratos inmovilizados pueden **caracterizarse por** espectroscopia de masas (EM) y
 (b) puede realizarse análisis de reacciones de unión entre los carbohidratos y moléculas que se sospecha que se unen específicamente con los carbohidratos,

donde el aluminio se usa para revestir un primer sustrato sólido transparente a un grosor mayor de 100 nm para convertir el primer sustrato sólido transparente en un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio de tipo PTFE polifluorado y donde la superficie del revestimiento de aluminio en el sustrato sólido se anodiza para formar una capa de óxido de aluminio porosa de un grosor menor de 5 nm.

2. La matriz de la reivindicación 1, donde el sustrato es conductor o semiconductor de un campo eléctrico.

3. La matriz de la reivindicación 1, donde el sustrato sólido transparente es vidrio.

4. La matriz de la reivindicación 1, donde el carbohidrato es un glucano.

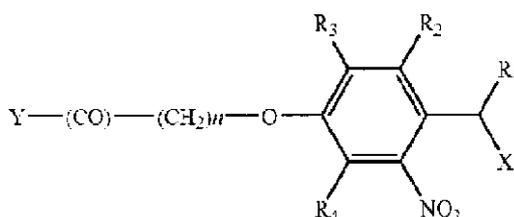
5. La matriz de la reivindicación 1, donde los carbohidratos se inmovilizan por un enlace no covalente o por un enlace covalente.

6. La matriz de la reivindicación 5, donde los carbohidratos están polifluorados con un cola de $-C_nF_{2n+1}$ ($n \geq 4$).

7. La matriz de la reivindicación 6, donde los carbohidratos polifluorados se aplican puntualmente en la superficie del sustrato sólido transparente revestido con aluminio de tipo PTFE.

8. La matriz de la reivindicación 5, donde los carbohidratos se modifican con un grupo funcional de ácido fosfónico, donde los carbohidratos fosfonilados están inmovilizados en la superficie del sustrato por una interacción quelante entre el grupo de ácido fosfónico y el óxido de aluminio en la superficie del sustrato sólido transparente revestido con aluminio; o donde los carbohidratos se modifican con un conector fotosensible y un grupo funcional de silano.

9. La matriz de la reivindicación 8, donde el conector fotoescindible tiene la fórmula general:



en la que R^1 es hidrógeno, alquilo C_1-C_8 ; R^2 y R^4 son cada uno de forma independiente hidrógeno, alcoxi C_1-C_8 ; R^3 es alcoxi C_1-C_8 ; X es O (CO) N-(CH_2) $n-R^5$ en la que $n \geq 3$, R^5 es carbohidrato, Y es el soporte sólido, como portaobjetos de ACG.

10. La matriz de la reivindicación 1, donde la caracterización espectroscópica de masas de los carbohidratos inmovilizados comprende una espectrometría de masas de tiempo de vuelo (EM-TOF), opcionalmente seleccionada de una espectrometría de masas de deserción-ionización por láser asistida por matriz - tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

11. La matriz de la reivindicación 10, donde los carbohidratos son polisacáridos, u oligosacáridos, o partes de carbohidratos de un glucoconjugado, celobiosa, celotriosa, celotetraosa, GloboH o Gb5.

12. La matriz de la reivindicación 11, donde la caracterización espectroscópica de masas de los carbohidratos inmovilizados comprende caracterización de los productos de carbohidratos de una reacción enzimática de celulasa.

13. La matriz de la reivindicación 12, donde la reacción enzimática de celulasa se realiza en carbohidratos inmovilizados en la superficie de la matriz, donde se sospecha que la enzima celulasa es capaz de degradar los polisacáridos inmovilizados, oligosacáridos, partes de carbohidratos de un glucoconjugado, celobiosa, celotriosa, celotetraosa, GloboH o Gb5.
- 5
14. Un método para la caracterización de carbohidratos inmovilizados en un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio de tipo PTFE comprendiendo el método:
- 10
- (a) proporcionar una matriz que comprende una pluralidad de carbohidratos inmovilizados en localizaciones específicas en una superficie de un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio de tipo PTFE polifluorado de acuerdo con la reivindicación 1; y
- (b) realizar análisis espectroscópico de masas para caracterizar los carbohidratos inmovilizados en cada localización discreta.
- 15
15. El método de la reivindicación 14, donde la caracterización espectroscópica de masas de los carbohidratos inmovilizados comprende una espectrometría de masas de tiempo de vuelo (EM-TOF).
- 20
16. El método de la reivindicación 14 que comprende además:
- (c) realizar después un análisis de unión de restos que se sospecha que se unen a carbohidratos.
- 25
17. El método de la reivindicación 16, donde los restos que se sospecha que se unen a carbohidratos son proteínas de celulasa.
- 30
18. El método de la reivindicación 17, que comprende además:
- (d) incubar las proteínas de celulasa con los carbohidratos unidos inmovilizados en la superficie de la matriz en condiciones adecuadas para que las celulasas hidrolicen los carbohidratos.
- 35
19. El método de la reivindicación 18, que comprende además:
- (e) caracterizar los productos de las proteínas de celulasa que permanecen inmovilizados en la superficie de la matriz después de hidrólisis por las celulasas, y donde las celulasas se seleccionan del grupo que consiste en 1,4-β-glucosidasas, exoglucanasas (1,4-β-D glucano celobiohidrolasas) y endoglucanasas (1,4- β-D glucano glucanohidrolasas).
- 40
20. Un método para análisis de las reacciones de unión entre los carbohidratos y moléculas que se sospecha que se unen específicamente a los carbohidratos, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar una matriz que comprende una pluralidad de carbohidratos inmovilizados en localizaciones específicas en una superficie de un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio de tipo PTFE de acuerdo con la reivindicación 1;
- (b) poner en contacto la matriz con una o más moléculas que se sospecha que se unen a uno o más de la probabilidad de carbohidratos inmovilizados en la superficie de la matriz; y
- (c) identificar la presencia o ausencia de las reacciones de unión en una o más localizaciones específicas en la superficie de la matriz.
- 45
21. El método de la reivindicación 20, donde las moléculas que se sospecha que se unen específicamente con los carbohidratos son proteínas marcadas con un marcador detectable, opcionalmente donde los marcadores proteicos comprenden colorantes fluorescentes que incluyen colorantes de cianina sensibles a amina.
- 50
22. El método de la reivindicación 20, donde la unión de una molécula con un carbohidrato en la matriz es representativa de un proceso biológico seleccionado del grupo que consiste en plegamiento proteico, secreción de proteínas, estabilización de proteínas, infección viral, infección bacteriana, metástasis de cáncer, respuesta inflamatoria, inmunidad innata, inmunidad adaptativa, un proceso de señalización mediado por receptor y producción de biocombustibles.
- 55
23. Un método para fabricar una matriz de carbohidratos inmovilizados en un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio de tipo PTFE, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar una primera superficie sólida transparente;
- (b) revestir el primer sustrato sólido transparente con aluminio a un grosor de más de 100 nm para convertir el primer sustrato sólido transparente en un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio;
- (c) anodizar la superficie del sustrato sólido revestido con aluminio para formar una capa de óxido de aluminio
- 60
- 65

porosa de grosor menor de 5 nm;

(d) opcionalmente polifluorar la superficie del sustrato sólido revestido con aluminio; y

- 5 (e) inmovilizar una pluralidad de carbohidratos en localizaciones específicas en una superficie de un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio o un sustrato sólido no transparente revestido con aluminio de tipo PTFE mediante un enlace covalente o no covalente,

donde el sustrato es conductor o semiconductor de un campo eléctrico.

- 10 24. El método de la reivindicación 23, donde los carbohidratos están polifluorados y/o modificados con un grupo funcional de ácido fosfónico.

25. Una matriz para uso en diagnóstico de enfermedad y descubrimiento de fármacos, donde la matriz se fabrica por el método de acuerdo con la reivindicación 23.

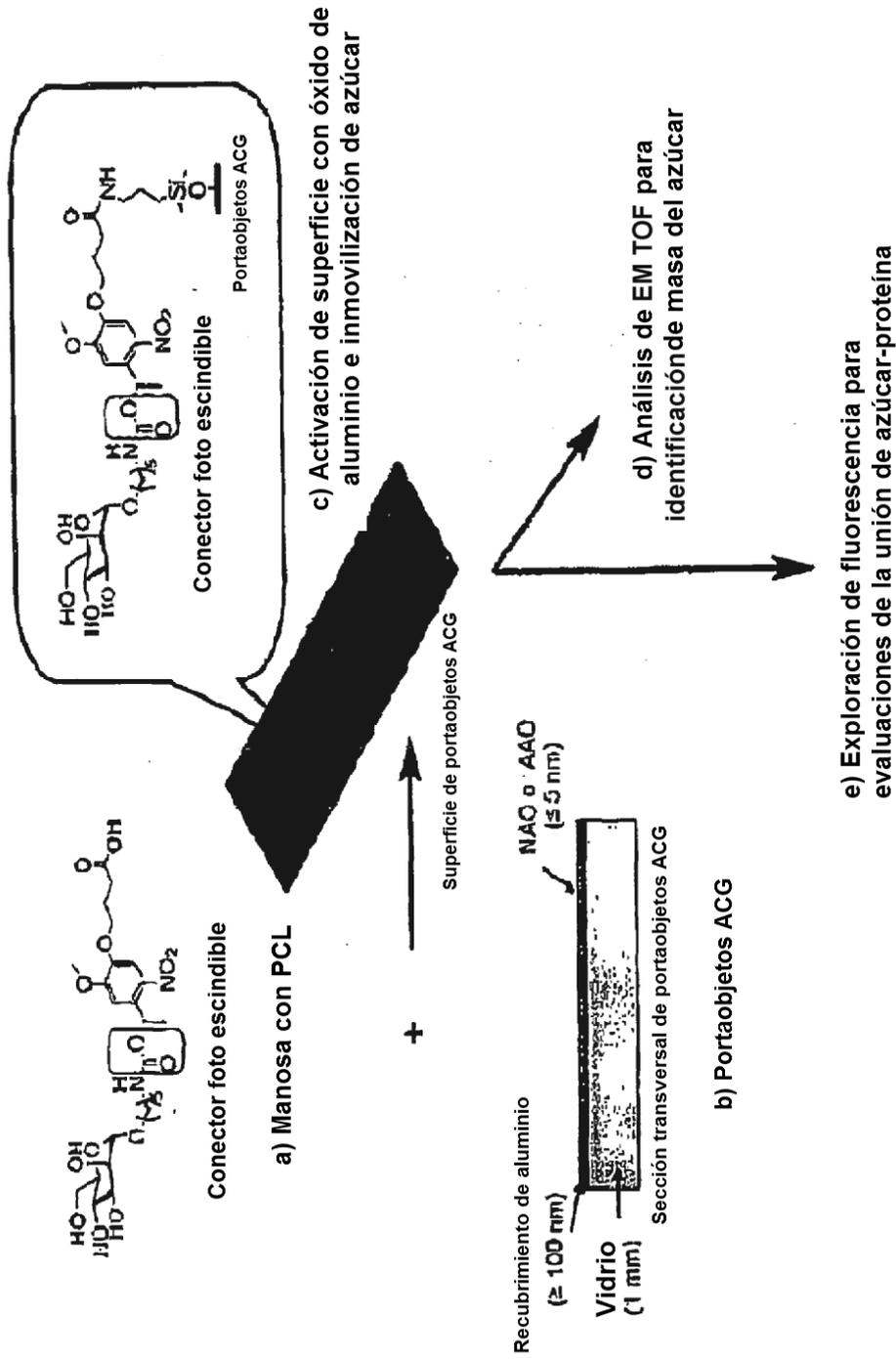


Fig. 1

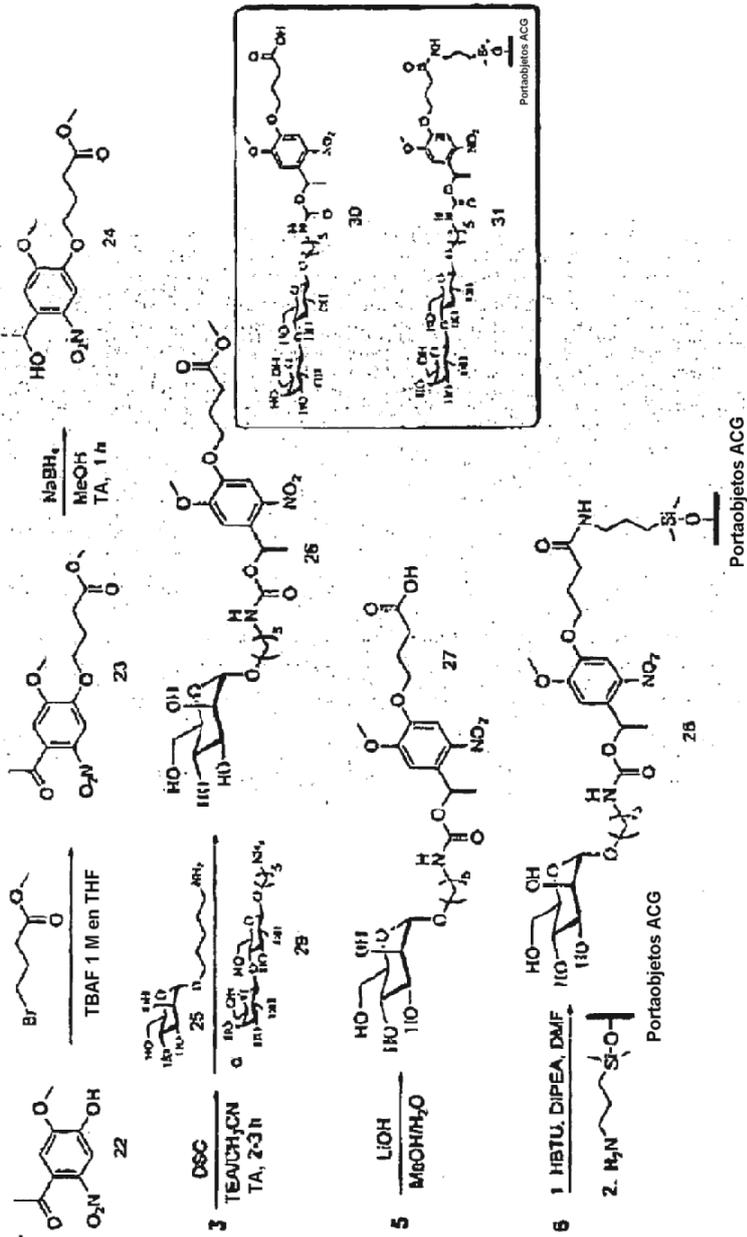


Fig. 2

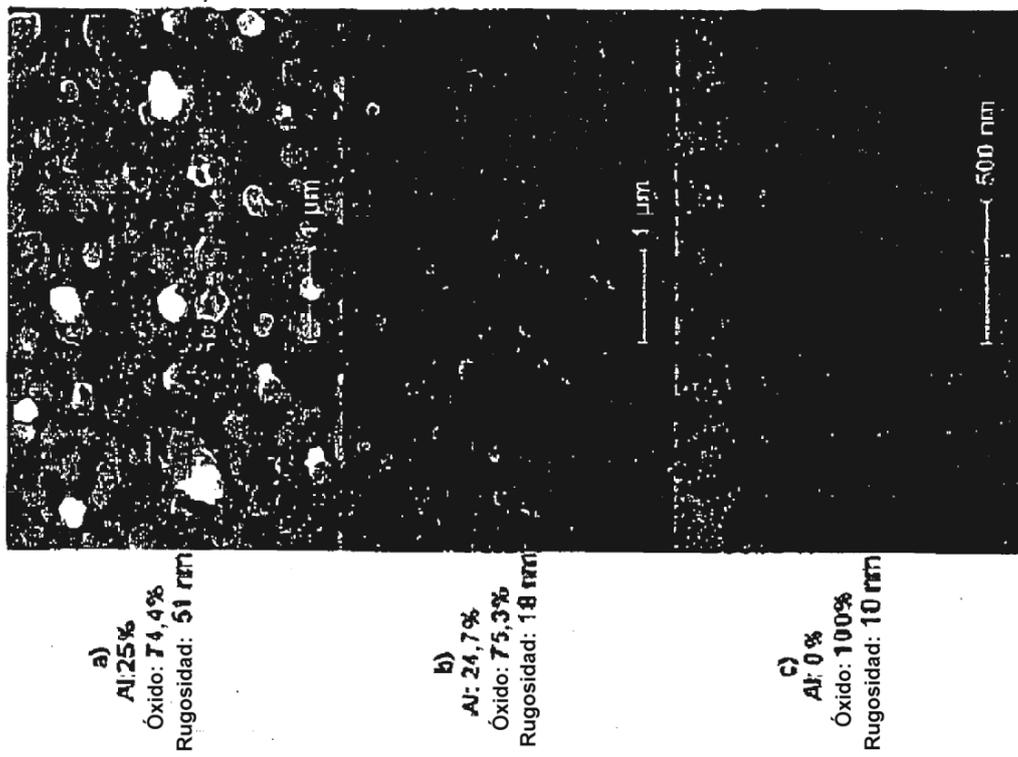


Fig. 3

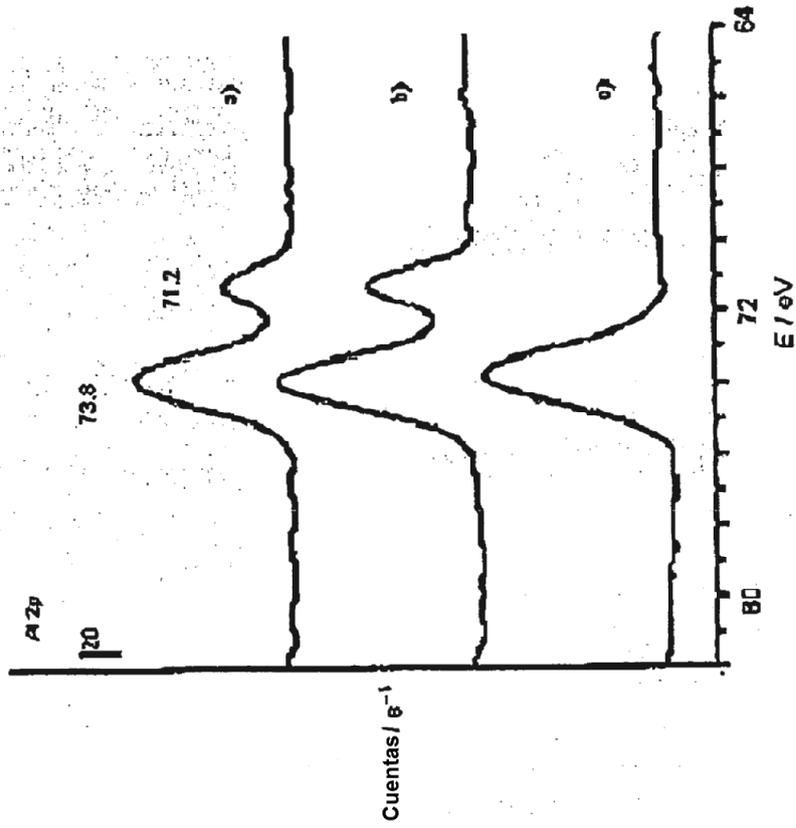


Fig. 4

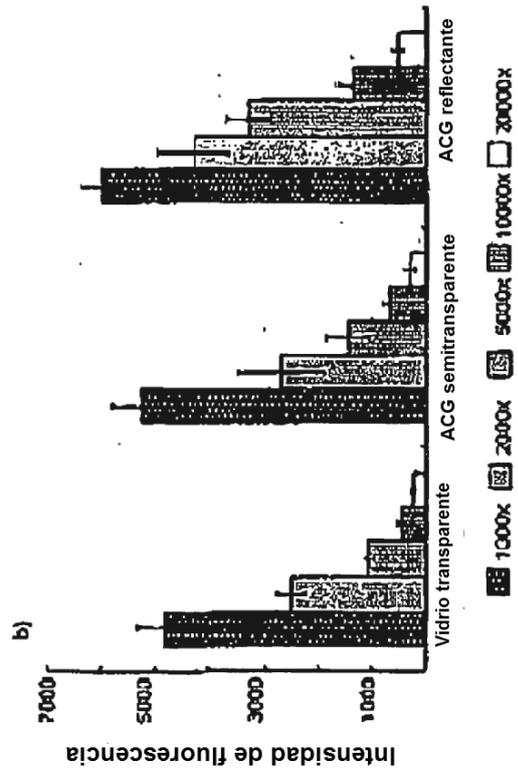
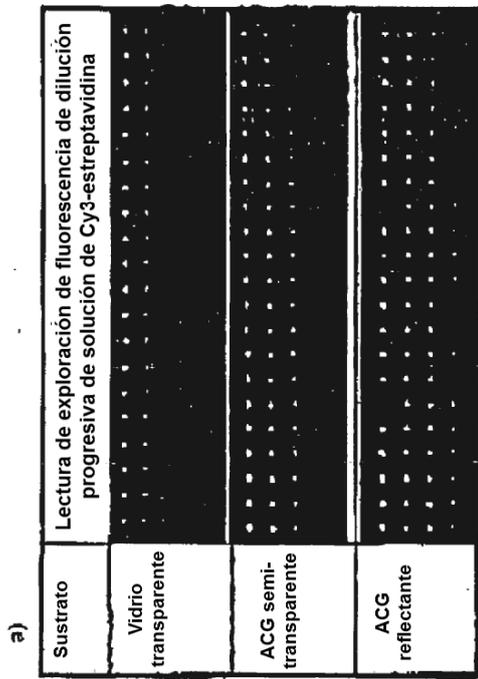


Fig. 5

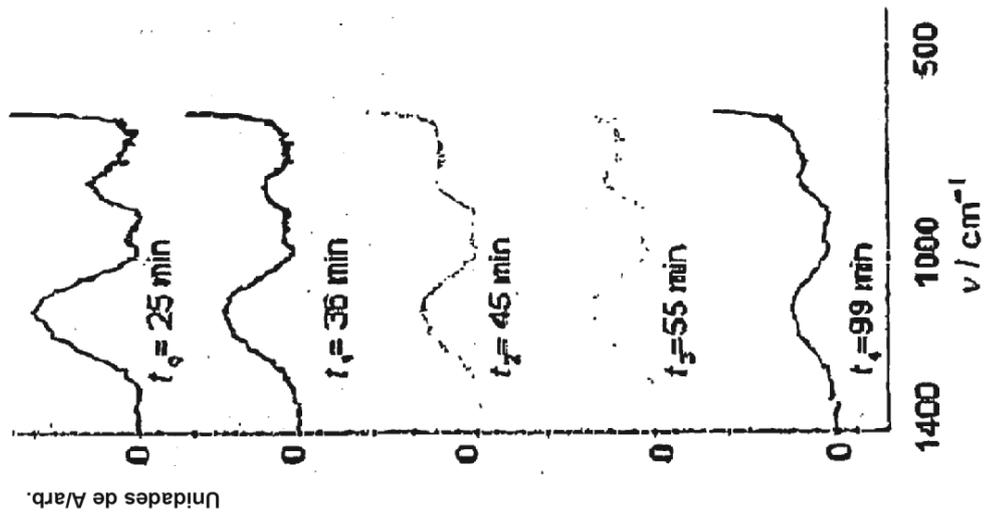


Fig. 6

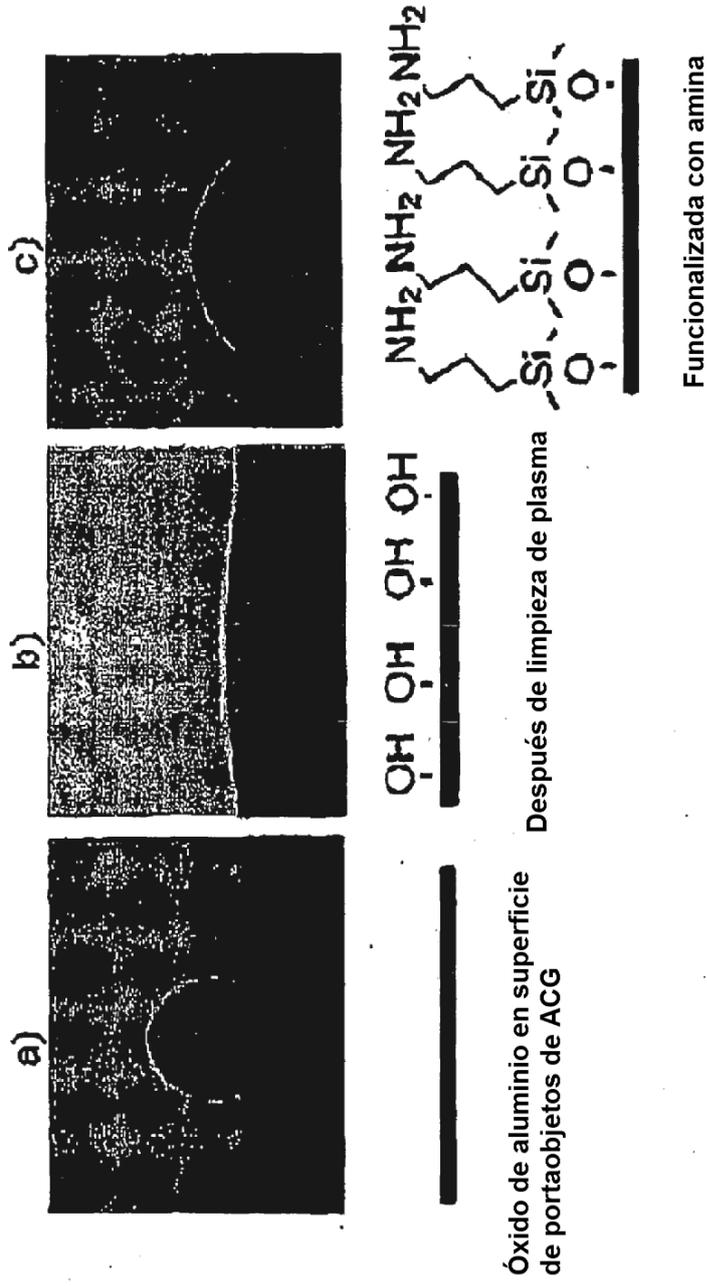


Fig. 7

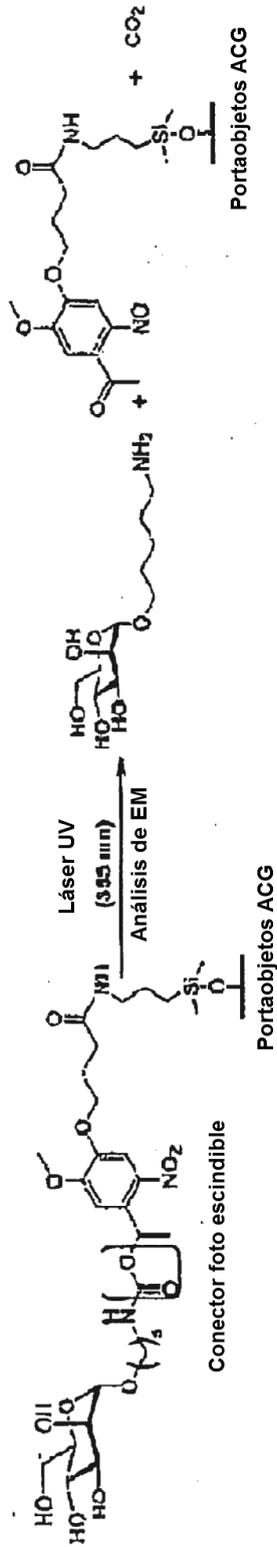


Fig. 8

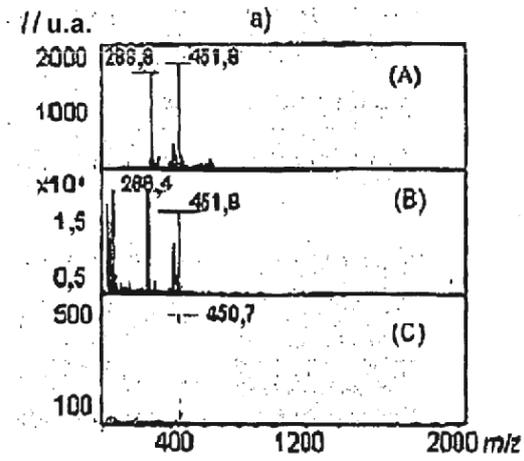


Fig. 9A

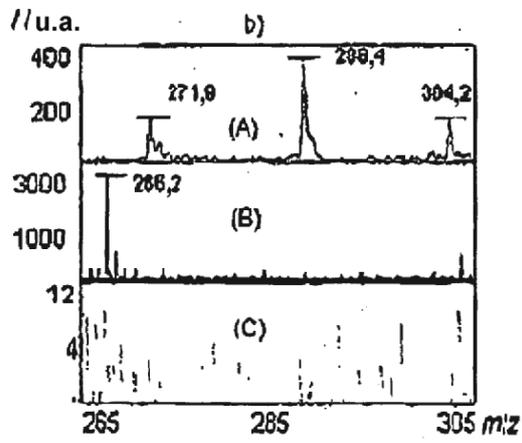


Fig. 9B

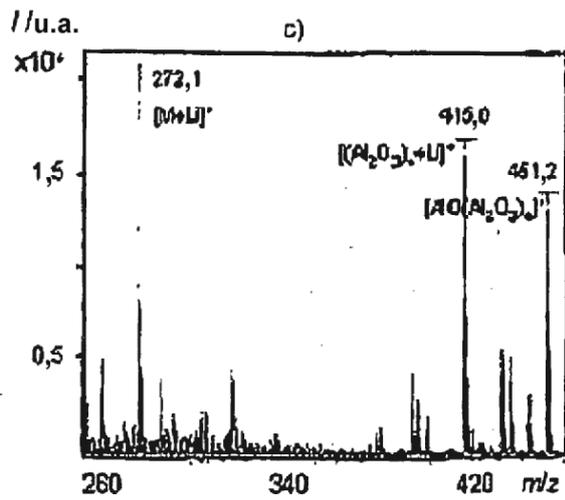


Fig. 9C

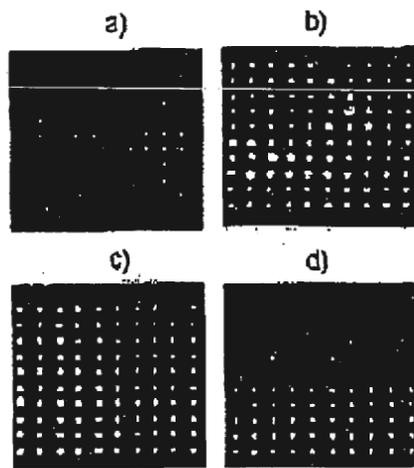


Fig. 10A

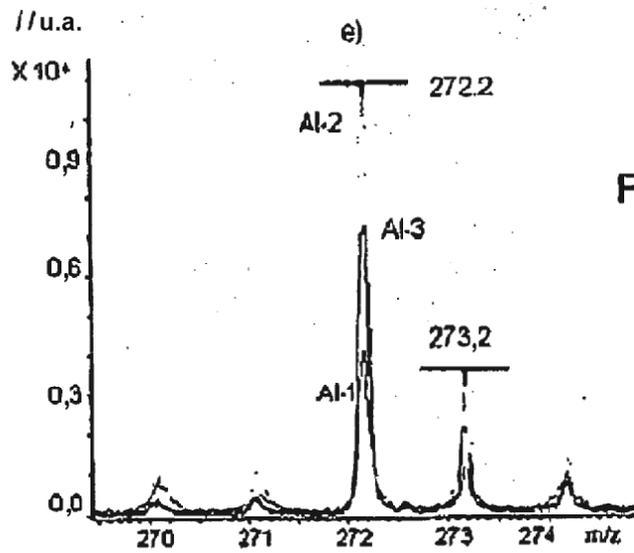


Fig. 10B

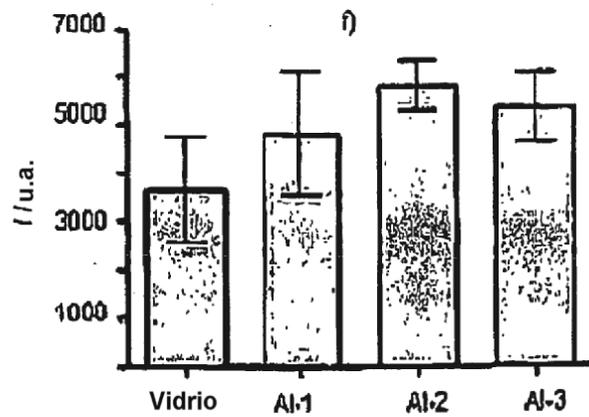


Fig. 10C

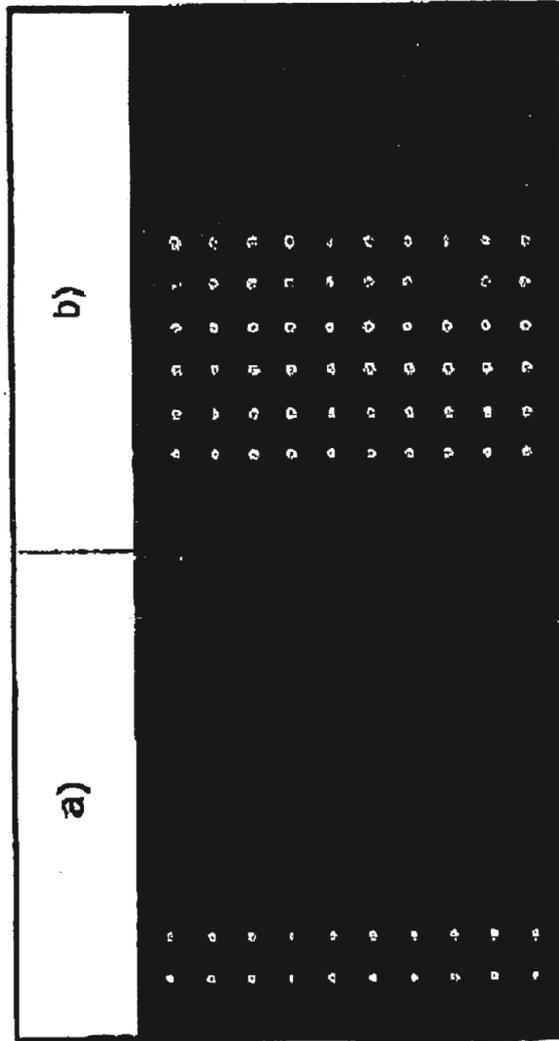
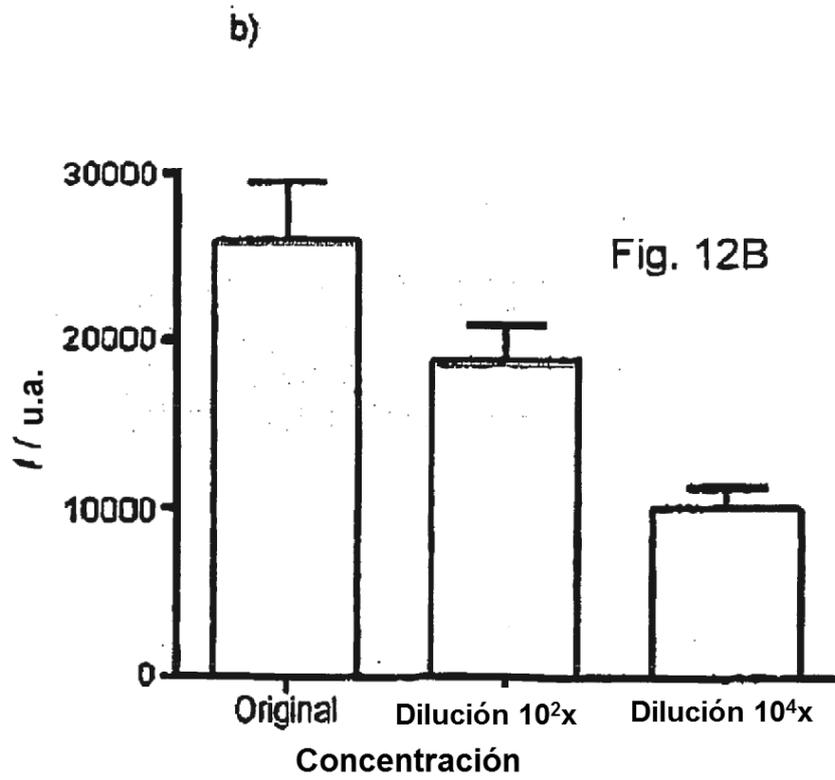
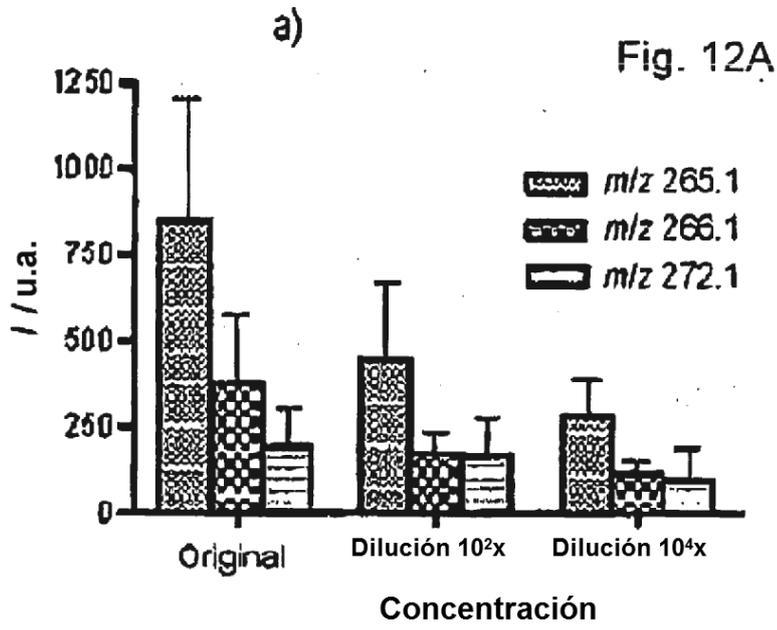


Fig. 11



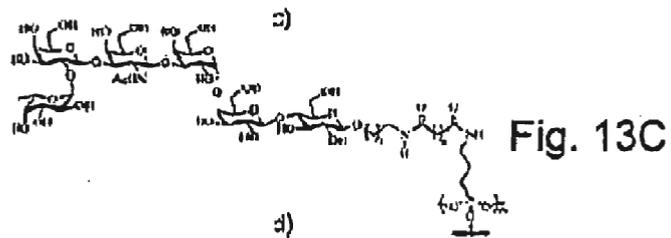
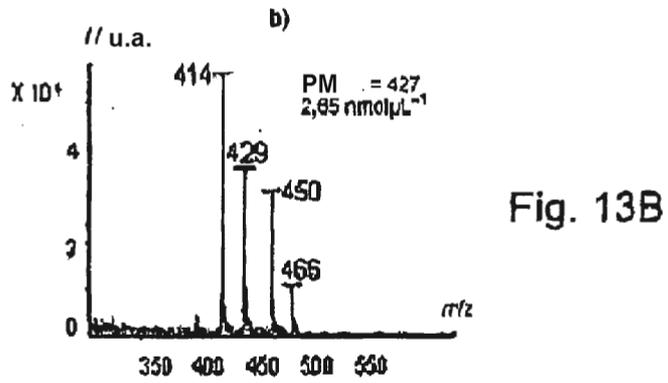
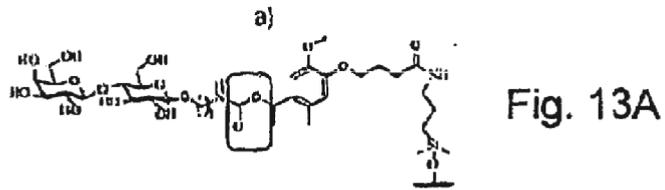
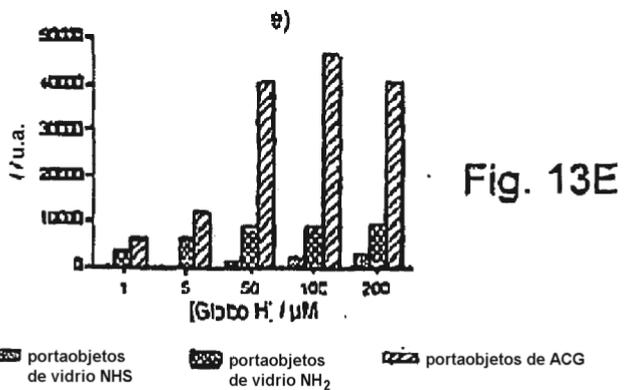
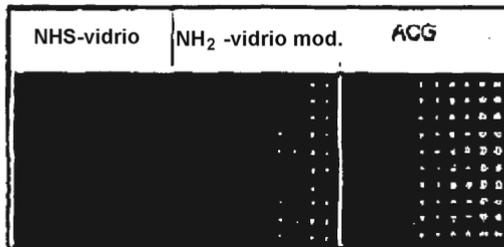


Fig. 13D



portaobjetos de vidrio NHS
 portaobjetos de vidrio NH₂
 portaobjetos de ACG

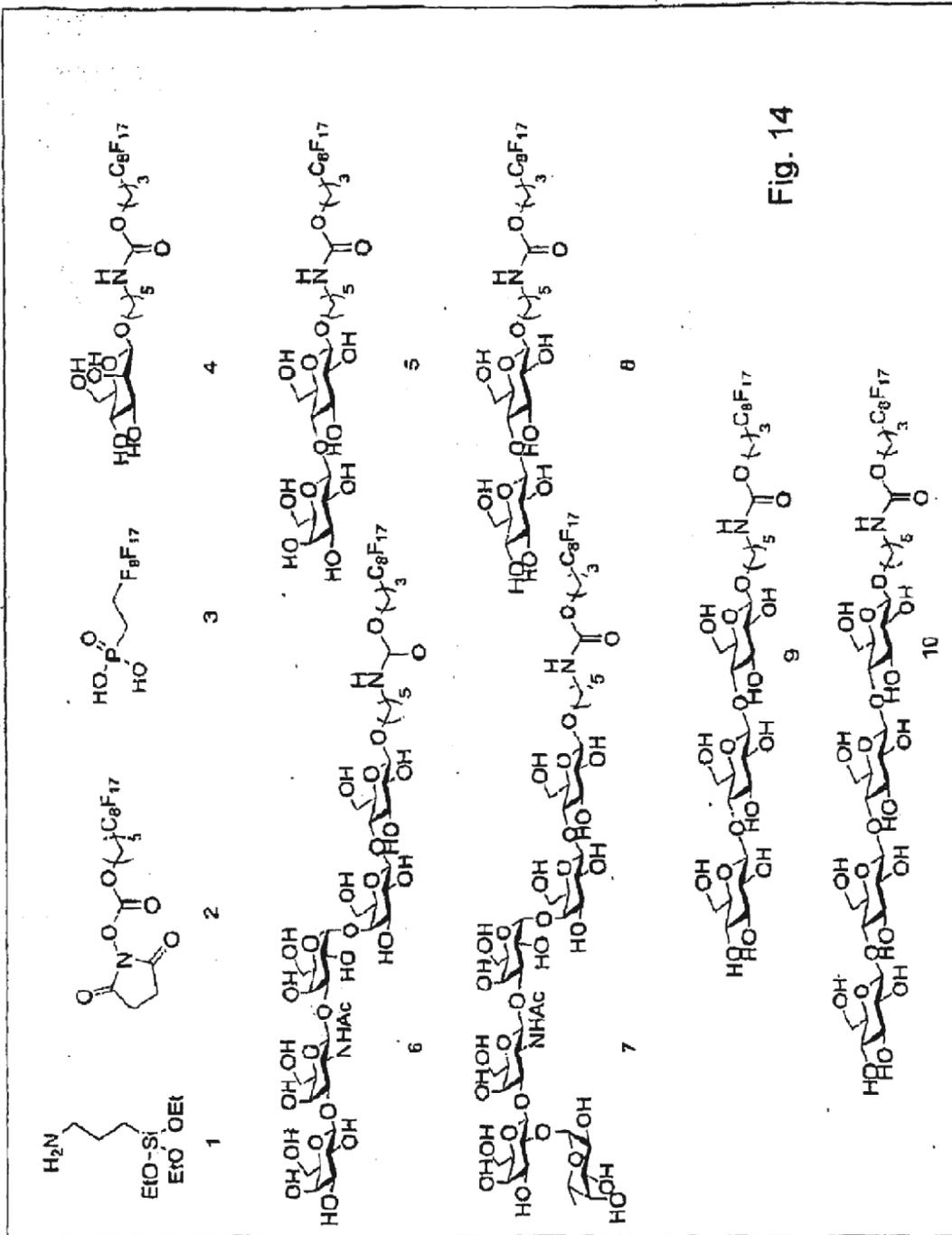


Fig. 14

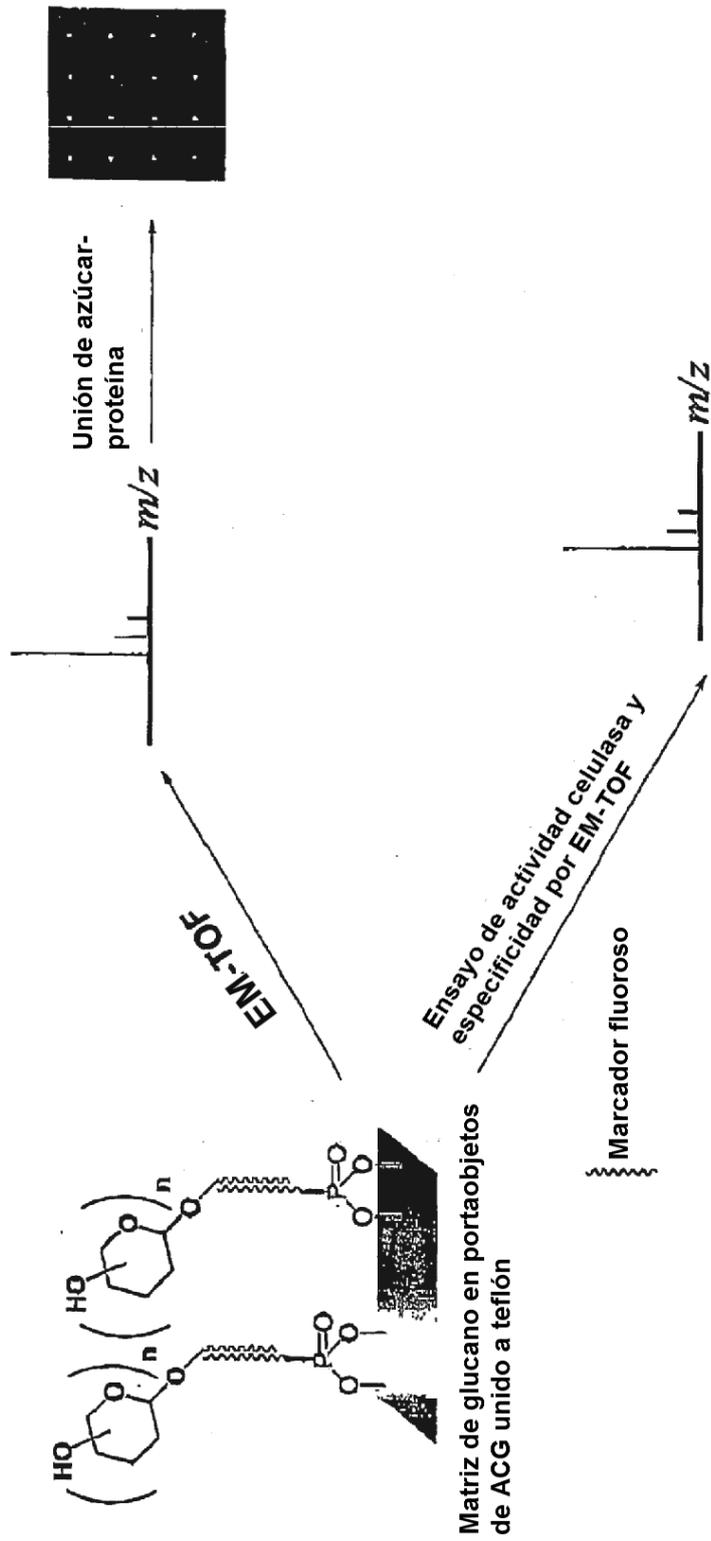


Fig. 15

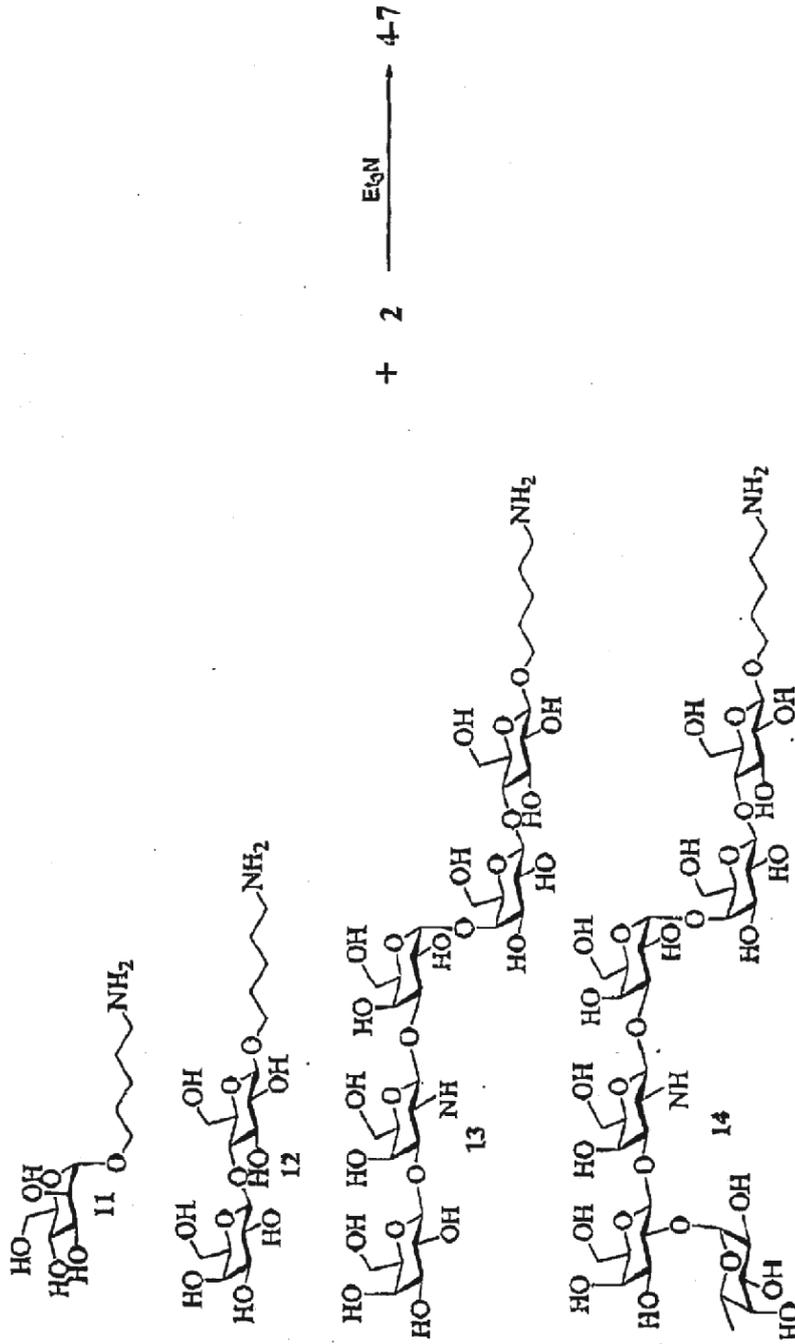


Fig. 16

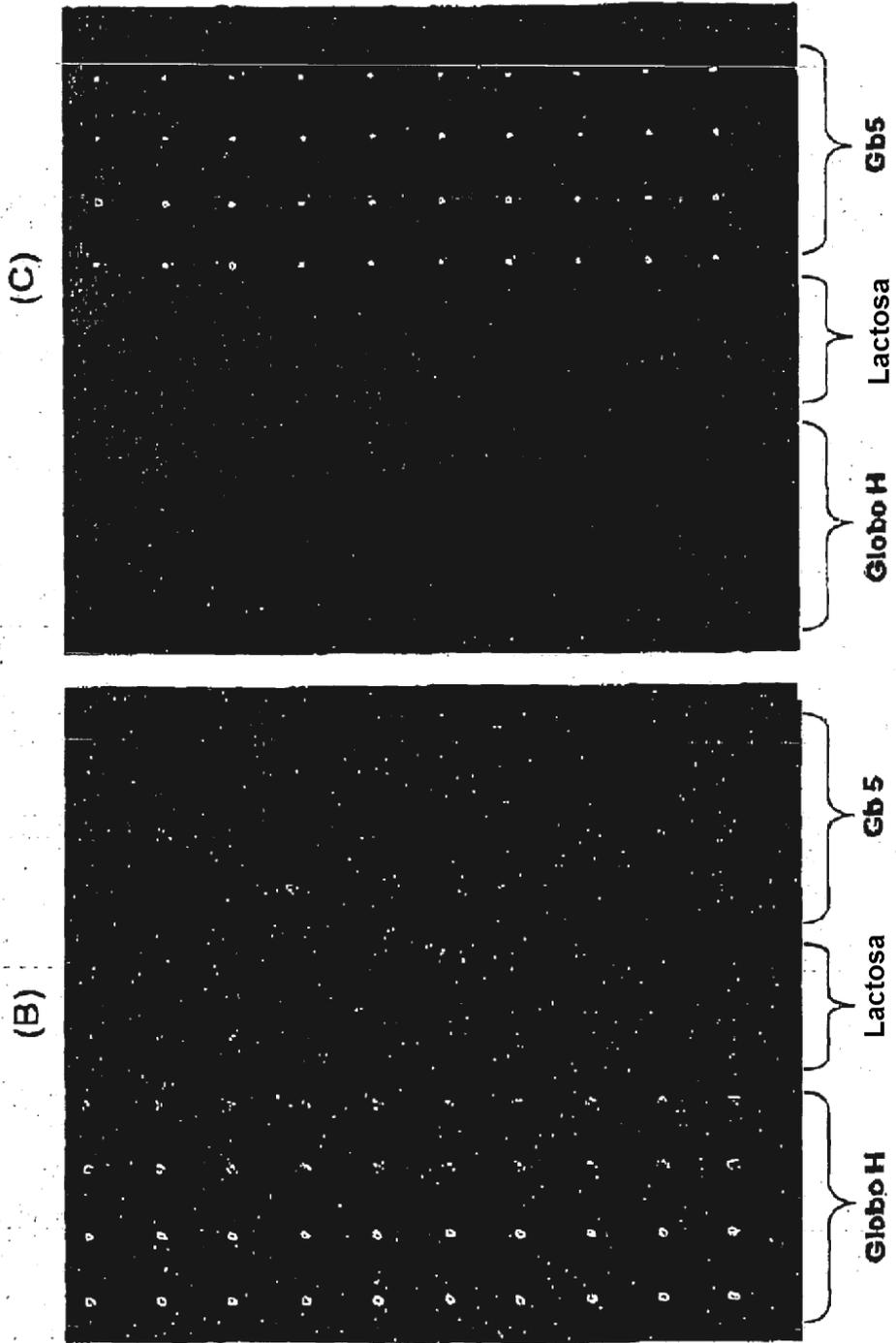


Fig. 17C

Fig. 17B

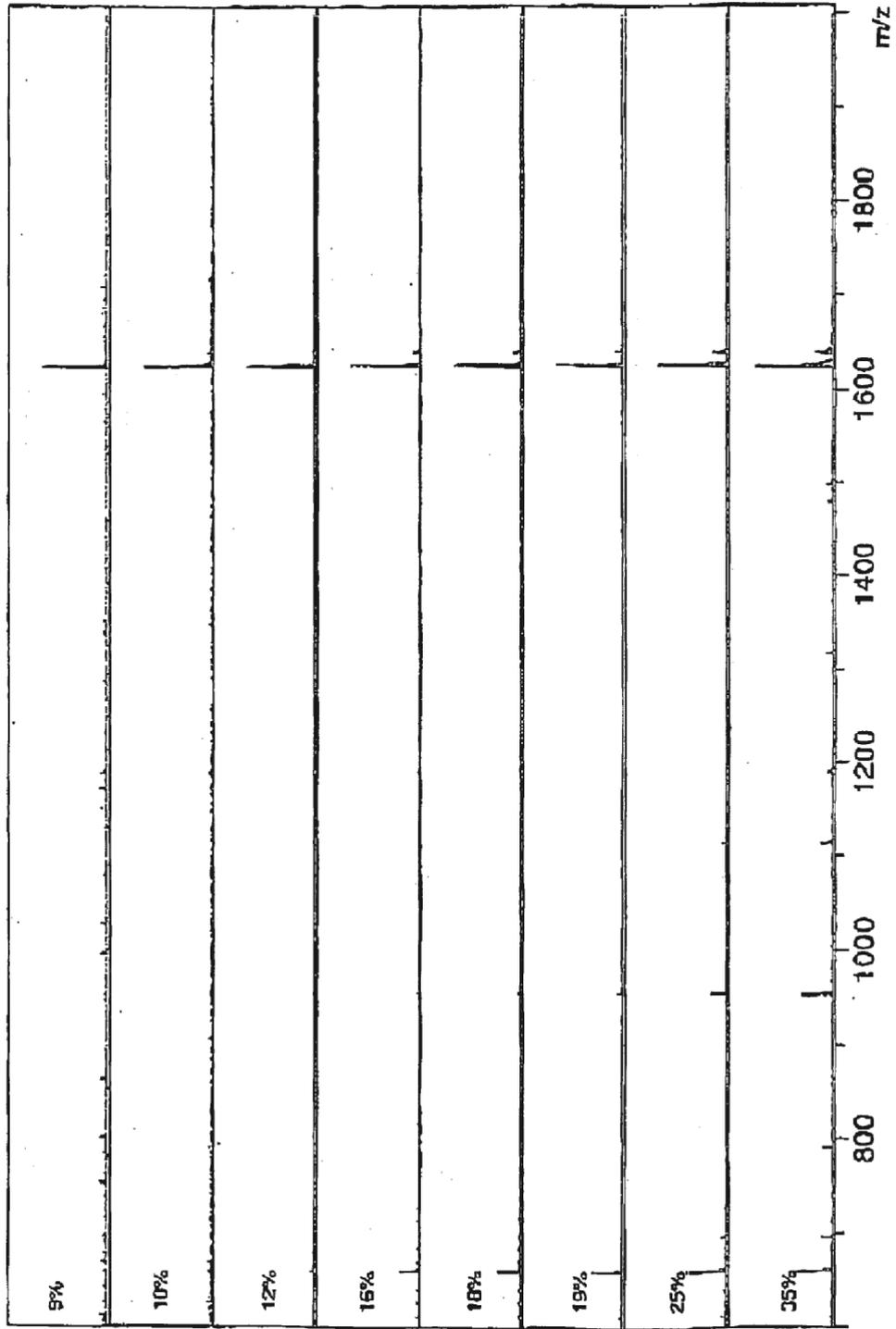


Fig. 18

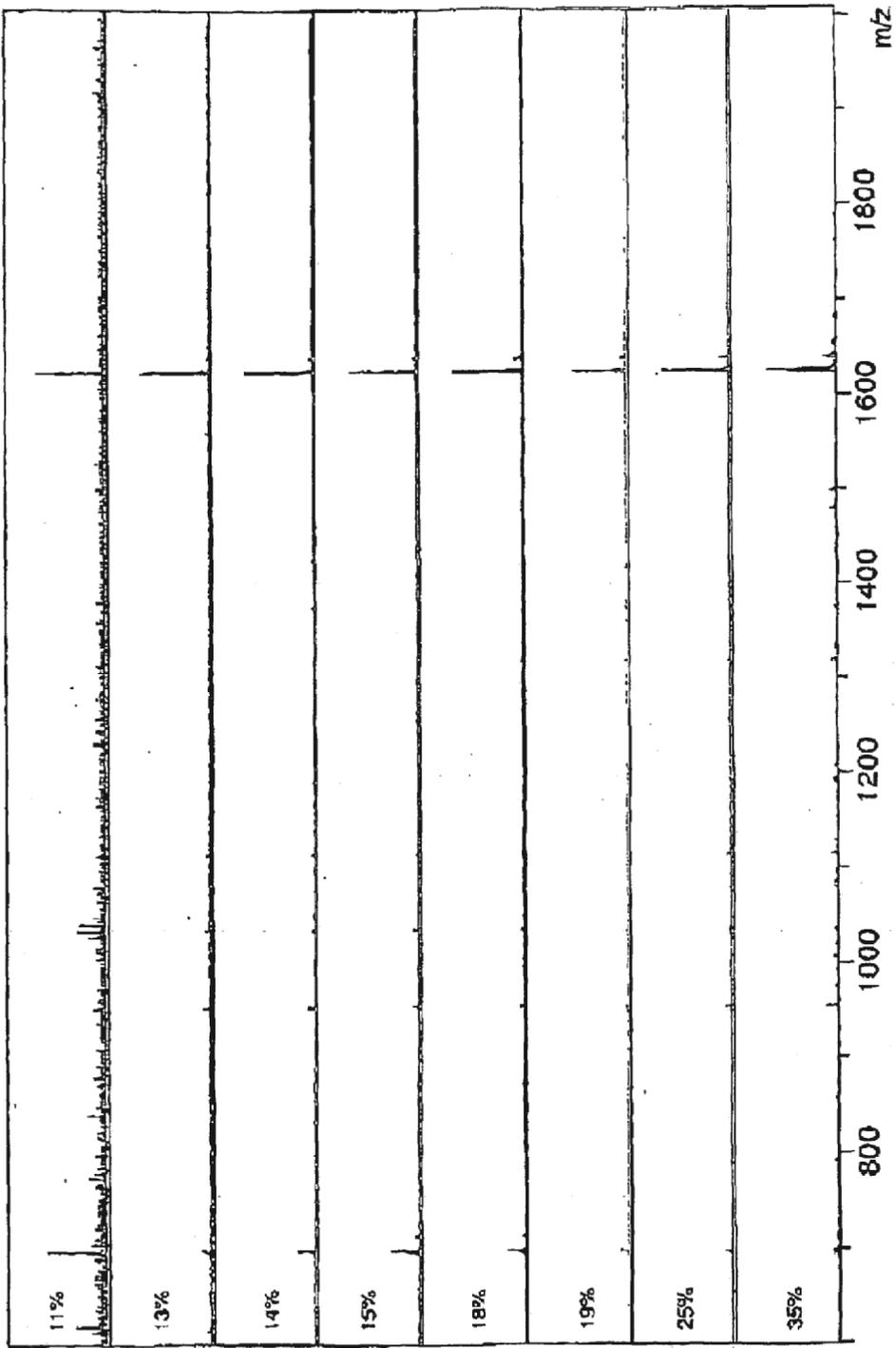


Fig. 19

Fig. 21A

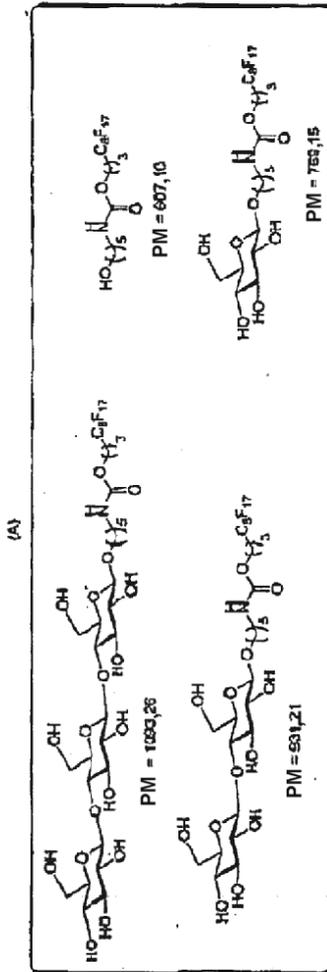
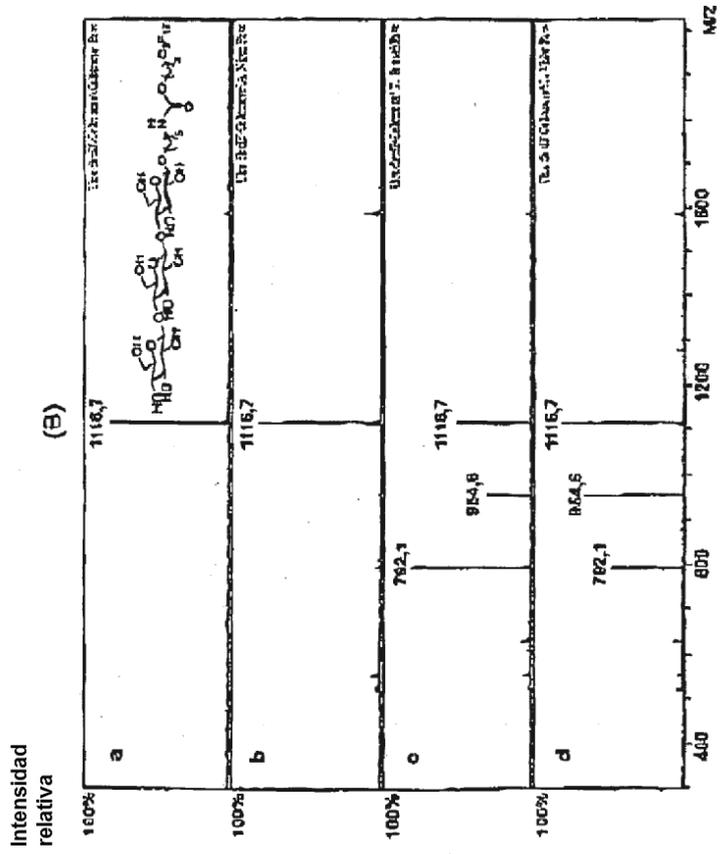


Fig. 21B



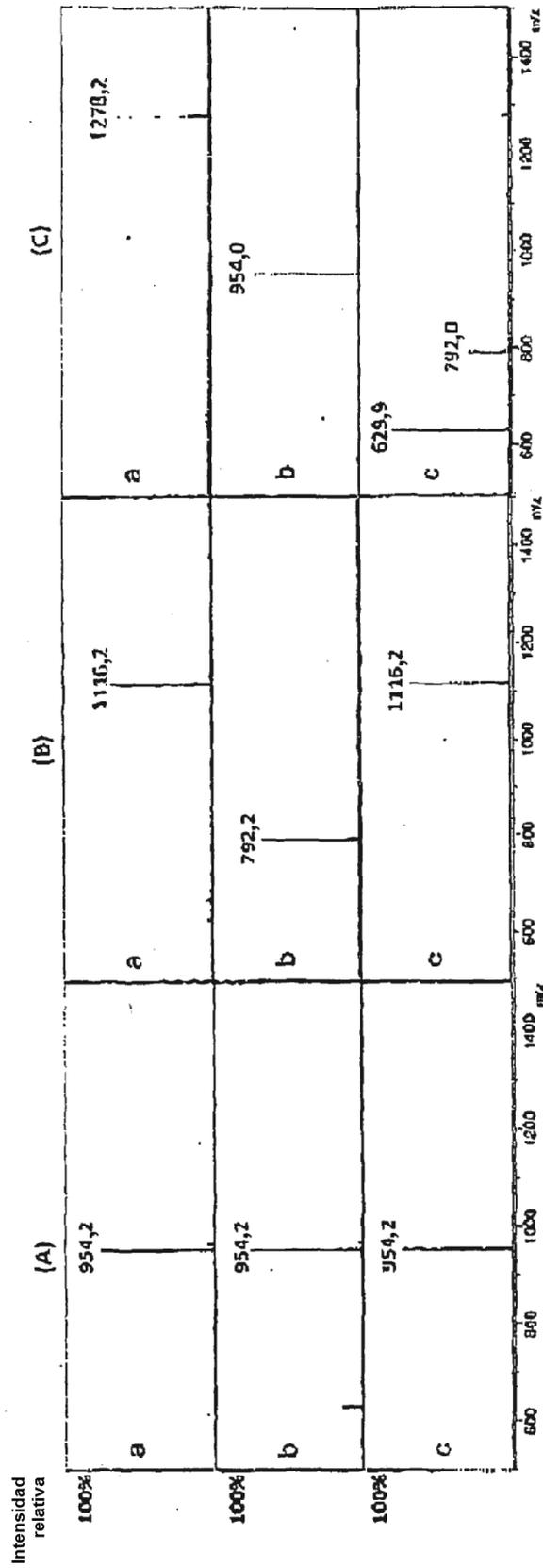


Fig. 22

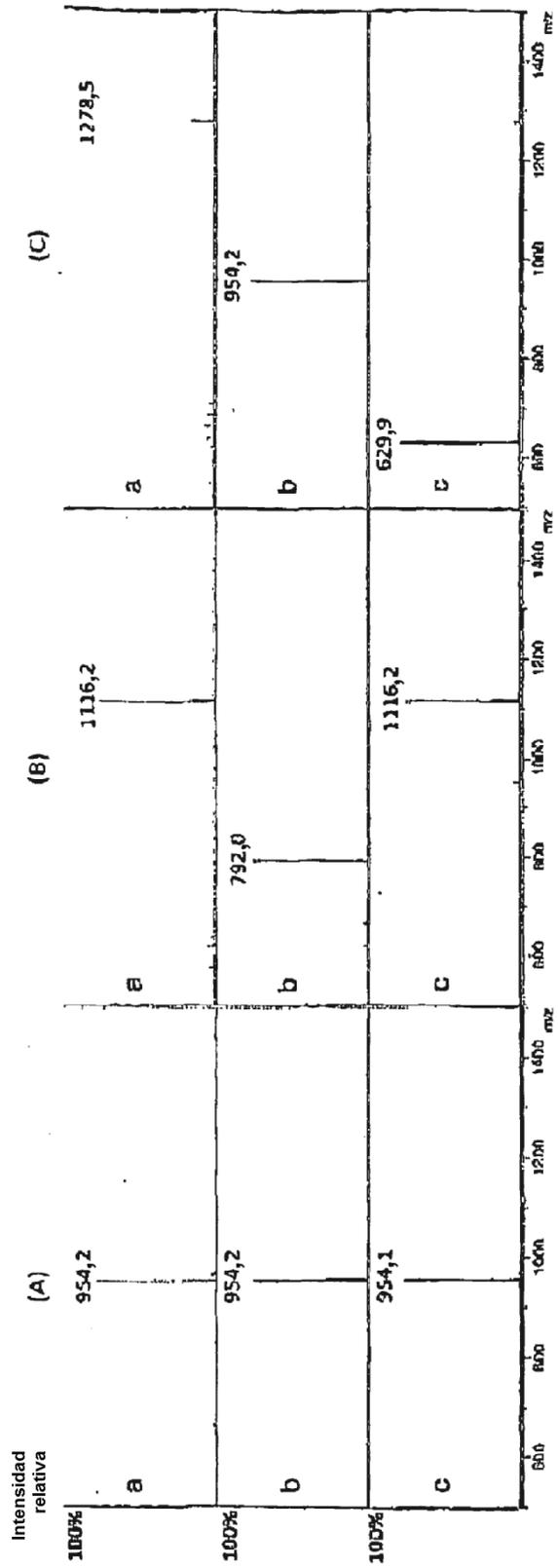


Fig. 23

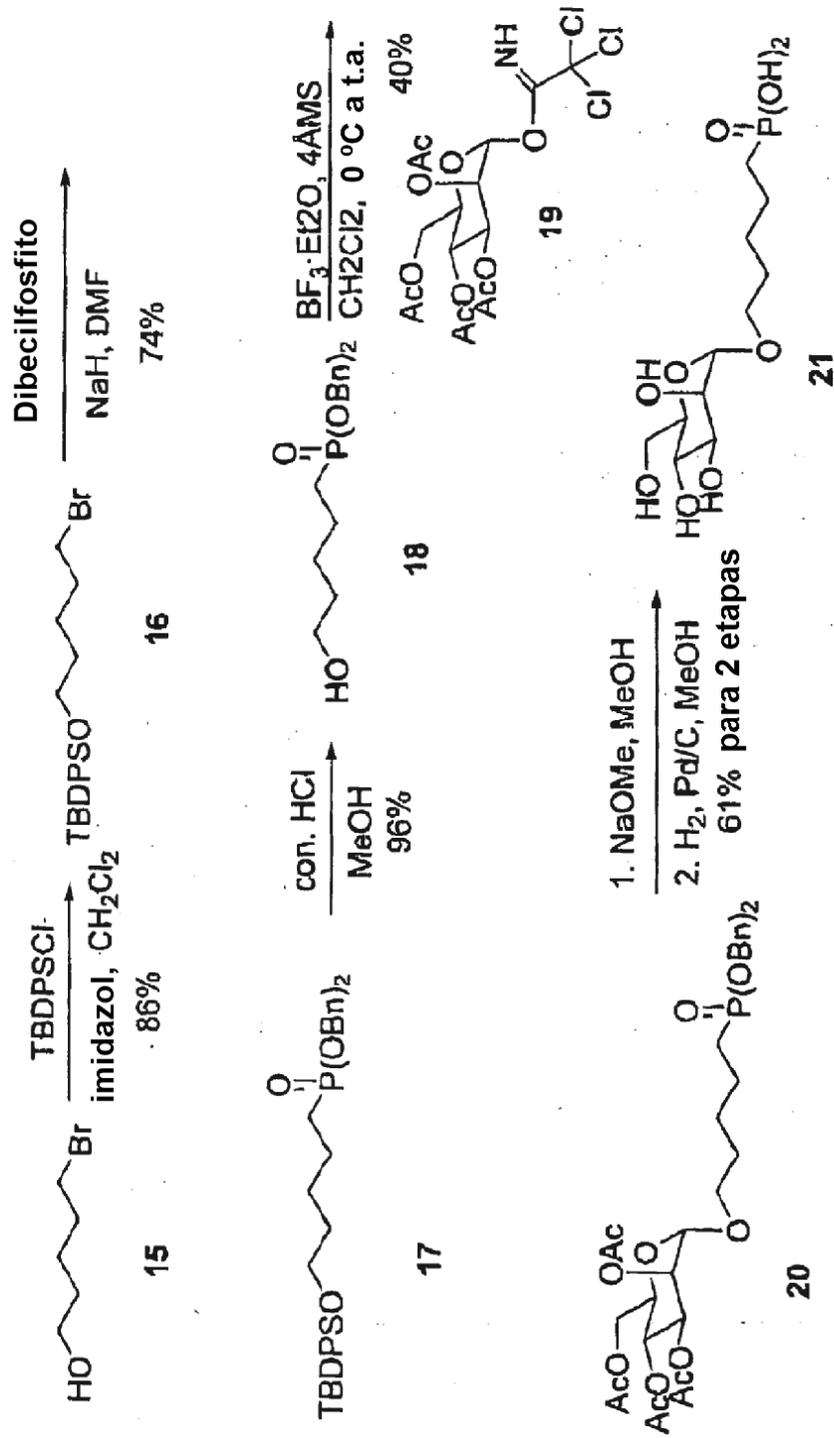


Fig. 24

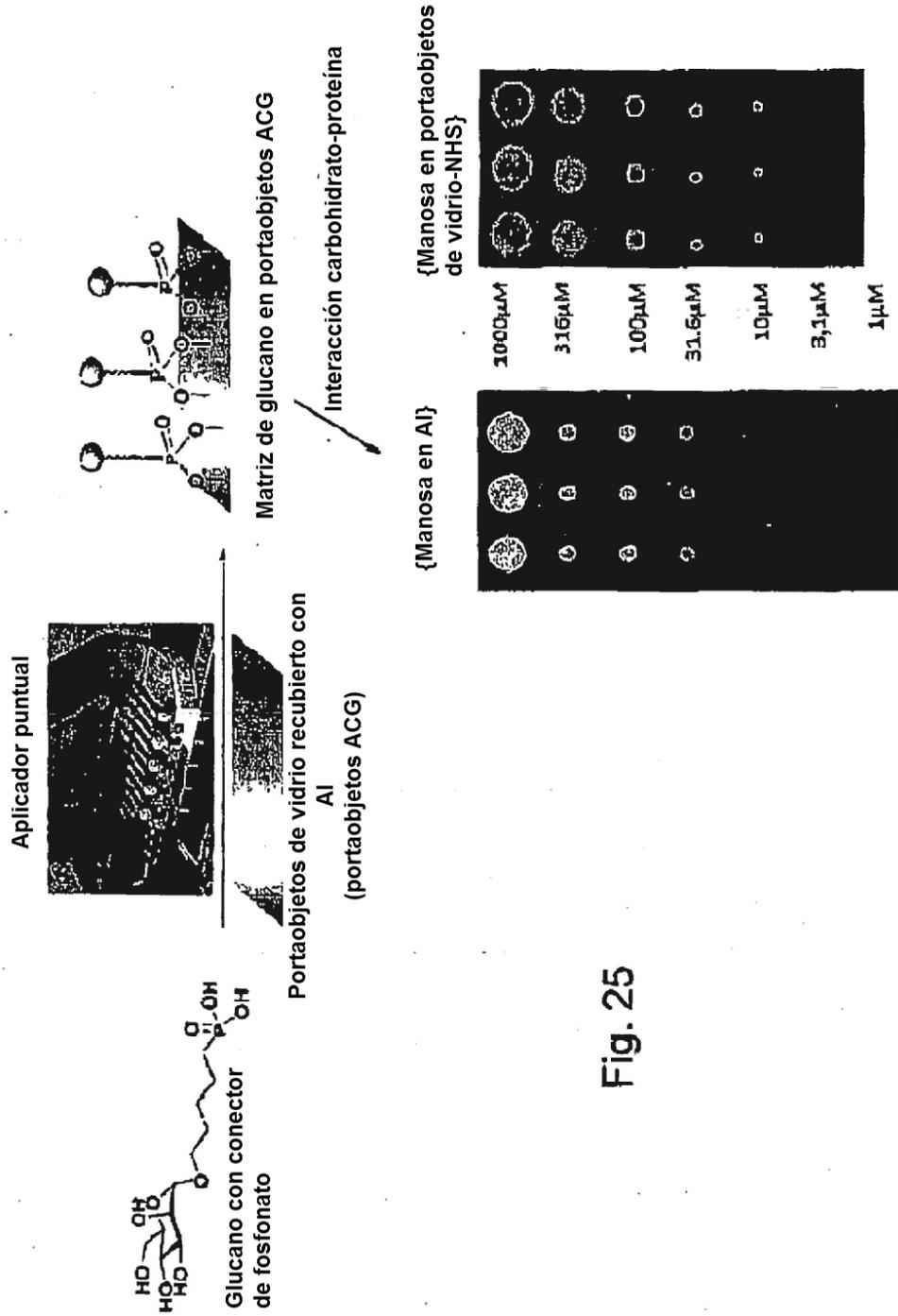


Fig. 25

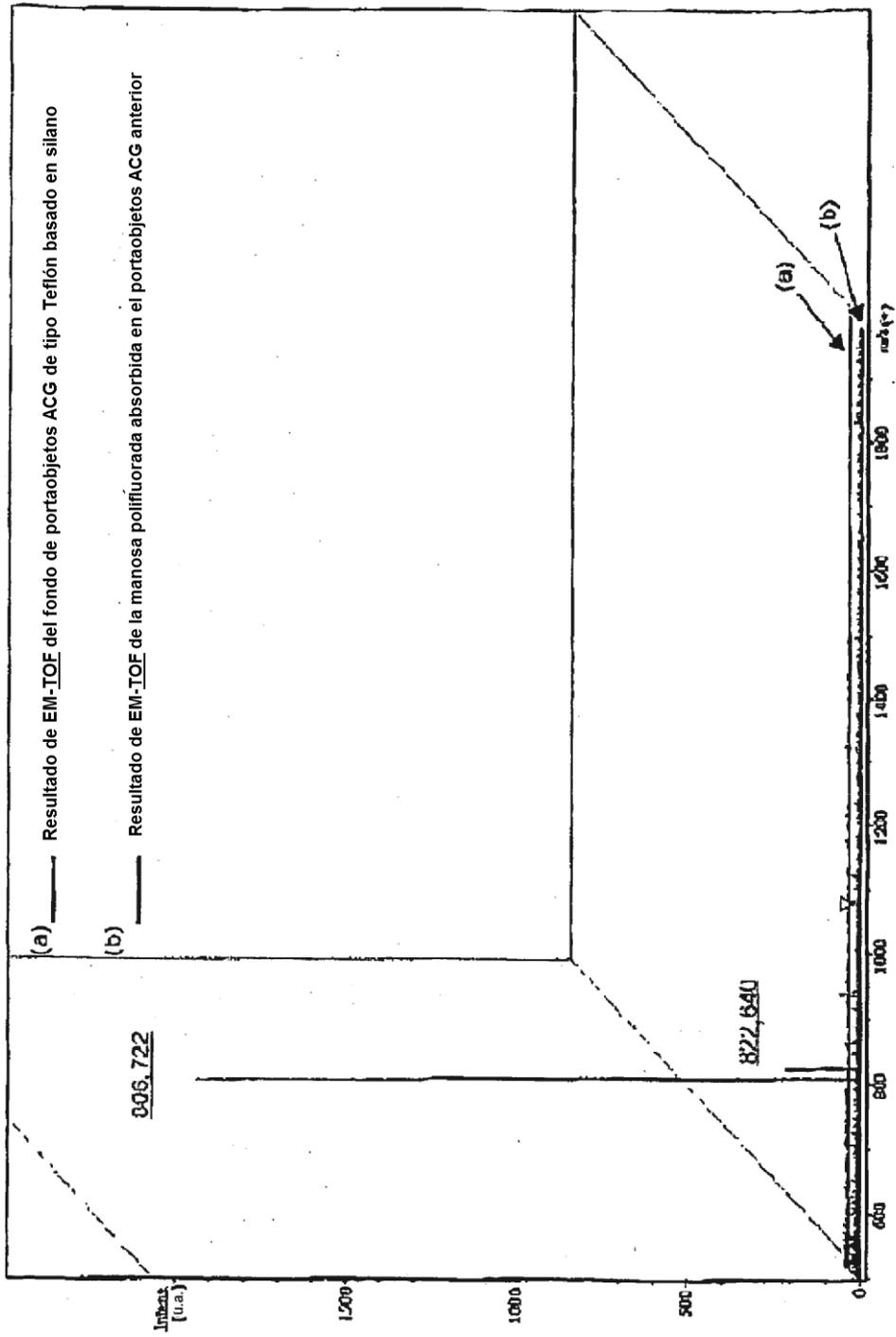


Fig. 26A

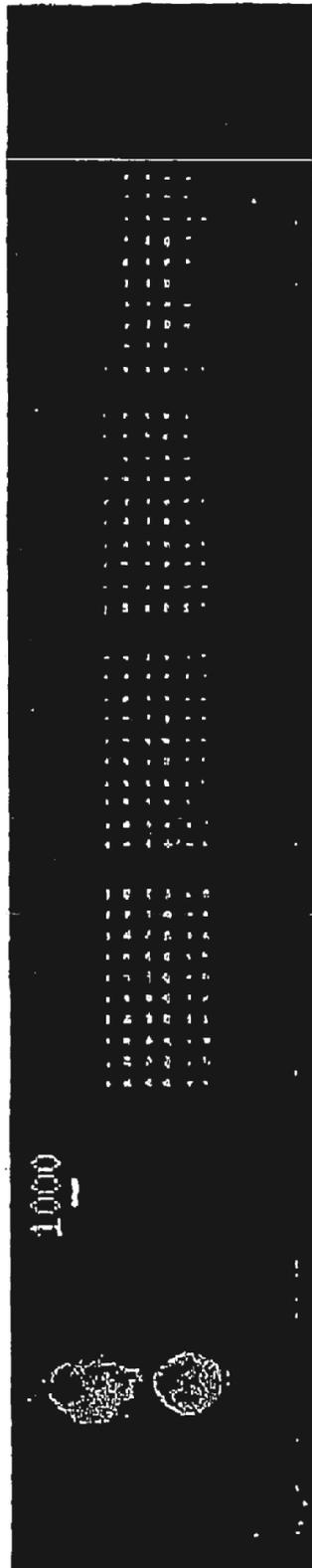


Fig. 26B

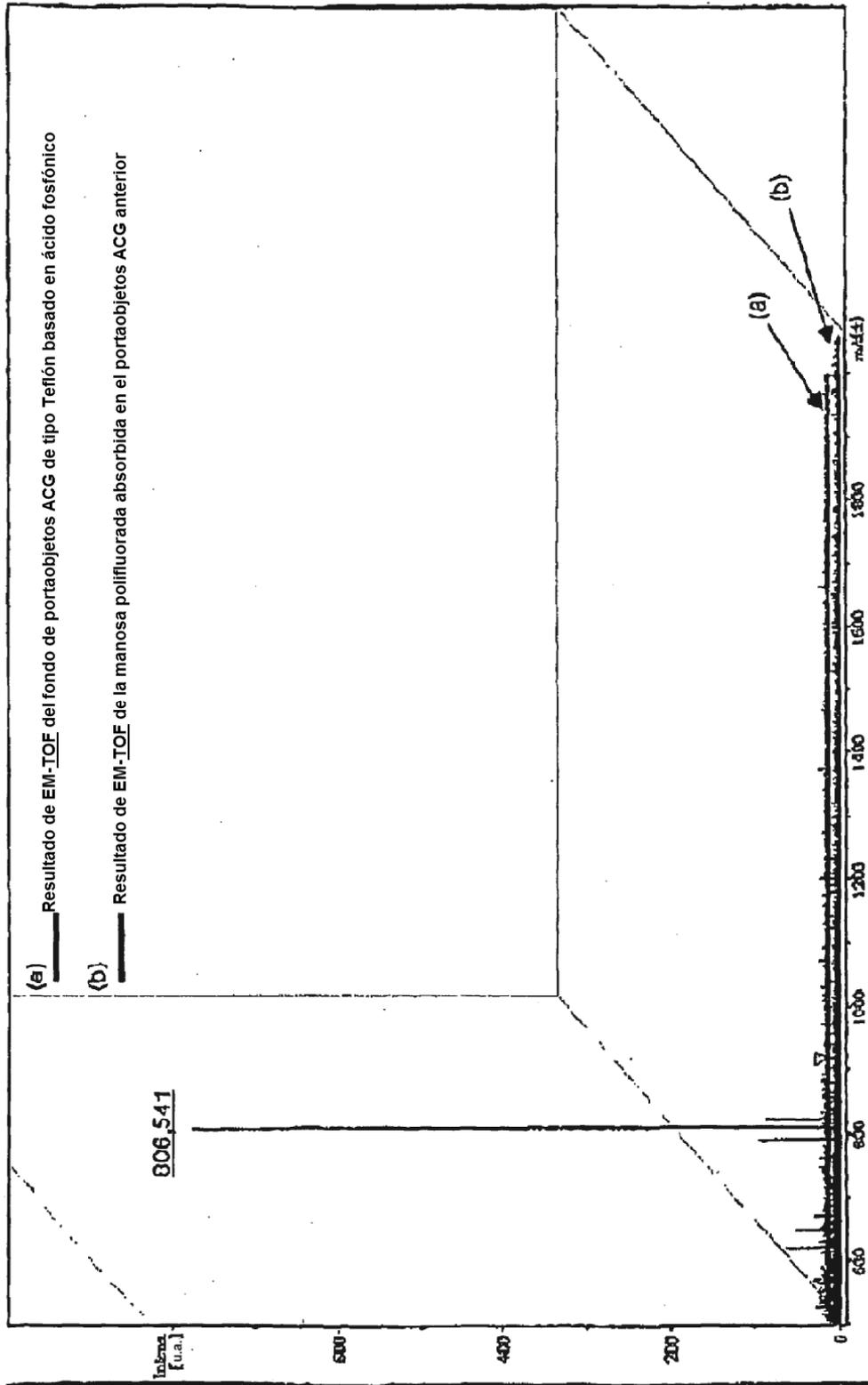


Fig. 27A



Fig. 27B

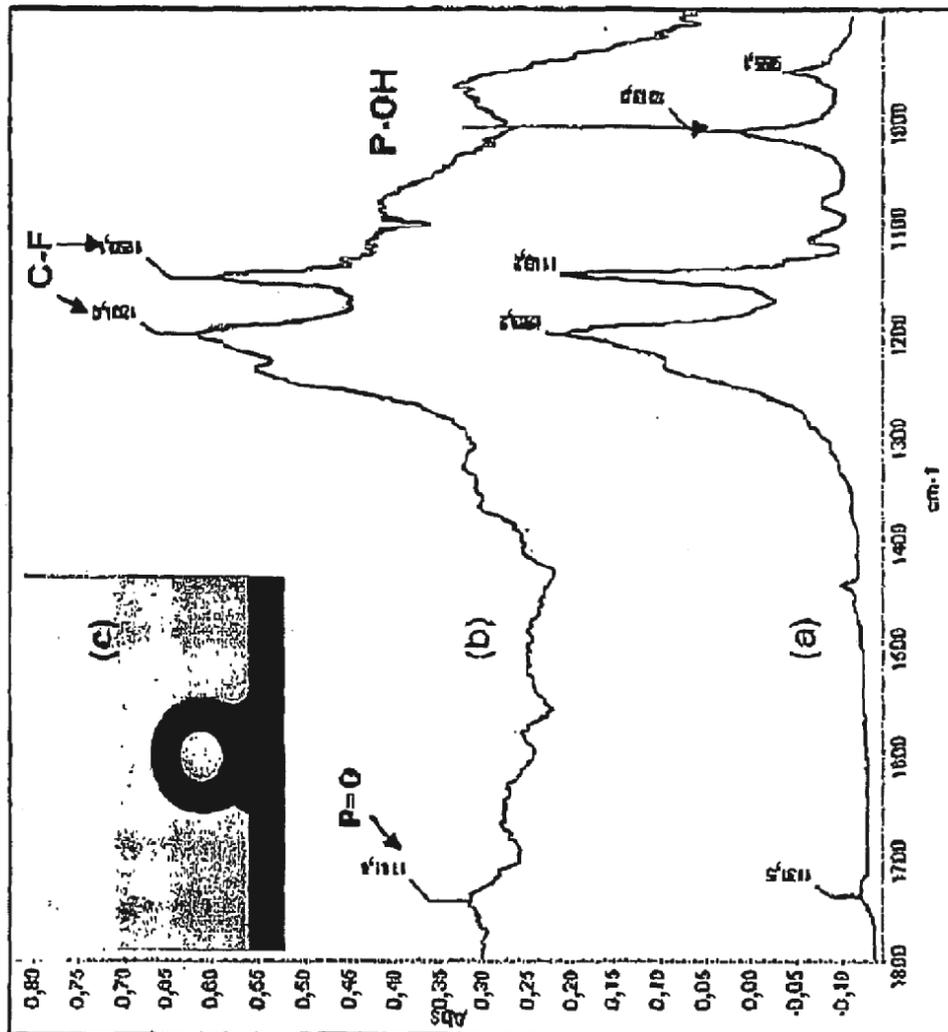


Fig. 28