Universidad de Santiago de Compostela

Departamento de Química Inorgánica

Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares

DISEÑO Y SÍNTESIS DE METALOPÉPTIDOS Y SU APLICACIÓN COMO AGENTES DE UNIÓN AL ADN

Memoria que, para optar al grado de Doctor en Química por la Universidad de Santiago de Compostela, presenta

Gustavo Rama Martínez

2014

D. MIGUEL VÁZQUEZ LÓPEZ, PROFESOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Y **D. MARCO EUGENIO VÁZQUEZ SENTÍS**, PROFESOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA,

CERTIFICAN: que la memoria adjunta titulada **"*Diseño y síntesis de metalopéptidos y su aplicación como agentes de unión al ADN*"** que, para optar al grado de Doctor en Química, presenta D. GUSTAVO RAMA MARTÍNEZ, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Química Inorgánica y del Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS) de la Universidad de Santiago de Compostela.

Considerando que constituye trabajo de Tesis, autorizamos su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela a 27 de Febrero de 2014

Fdo. Prof. Miguel Vázquez López Fdo. Prof. M. Eugenio Vázquez Sentís

ÍNDICE

ÍNDICE V
AGRADECIMIENTOS IX
ABREVIATURAS XI
1. INTRODUCCIÓN 1
1.1 QUÍMICA DE COORDINACIÓN 3
1.1.1 Algunos conceptos básicos 3
1.1.2 Estabilidad de los compuestos de coordinación 4
1.1.3 Cinética de los compuestos de coordinación 9
1.1.4 Isomería en los compuestos de coordinación 10
1.2 METALOPÉPTIDOS 16
1.2.1 Aminoácidos, péptidos y proteínas 16
1.2.2 Estructura de las proteínas 18
1.2.3 Metaloproteínas 20
1.2.4 Metalopéptidos artificiales 23
1.3 HELICATOS METALOSUPRAMOLECULARES 37
1.3.1 Química Supramolecular 37
1.3.2 Definición, características estructurales y clasificación de los helicatos metalosupramoleculares. 41
1.3.3 Quiralidad de los helicatos 44
1.3.4 Antecedentes de helicatos peptídicos en Química Supramolecular 46
1.3.5 Aplicaciones de los helicatos 47
1.4 LUMINISCENCIA 49
1.4.1 Conceptos generales 49
1.4.2 Sensores fluorescentes sensibles a la polaridad del medio 50
1.4.3 Propiedades fotofísicas de los complejos polipiridínicos de Ru(II). 51
1.5 QUÍMICA BIOLÓGICA INORGÁNICA 57
1.5.1 Química Biológica: la frontera entre la Química y la Biología ... 57
1.5.2 Utilización de los complejos metálicos en la exploración y manipulación de la biología celular 59
1.5.3 Sondas fluorescentes para la imagen médica óptica 63
1.6 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL ADN 66
1.6.1 Estructura del ADN y sus implicaciones en el reconocimiento 66
1.6.2 Expresión génica 69
1.6.3 La transcripción génica y su regulación 70
1.6.4 Factores de transcripción y su interacción con el ADN 71
1.7 INTERACCIÓN ENTRE MOLÉCULAS PEQUEÑAS Y EL ADN 71

1.7.1 Modos de unión de moléculas pequeñas al ADN..... 72
1.7.2 Agentes de unión al ADN basados en moléculas pequeñas 77

2. OBJETIVOS 111
2.1 OBJETIVOS 113
- *Generales 113*
- *Helicatos Peptídicos 114*
- *Metalopéptidos de Ru(II) 114*

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS 115
3.1 PLANTEAMIENTO SINTÉTICO GENERAL 117
3.1.1 SÍNTESIS DE LOS FRAGMENTOS COORDINANTES BASADOS EN EL LIGANDO Bpy 118
3.1.2 Ruta I: Síntesis del aminoácido derivado del ácido [2,2'-bipiridina]-5,5'-dicarboxílico (5, 5´-Bpda) 118
3.1.3 Ruta II: Síntesis de los dipéptidos coordinantes derivados del ácido 5'-amino-2,2'-bipiridina-5-carboxílico (5Bpy) 120
3.2 HELICATOS PEPTÍDICOS 124
3.2.1 Síntesis, caracterización y estudio estructural 124
3.2.2 Estudio de la interacción de los helicatos peptídicos de Fe^{II} y el ADN de doble cadena 160
3.2.3 Ensayos de internalización celular 168
3.3 METALOPÉPTIDOS DE RUTENIO 171
3.3.1 Síntesis, caracterización y estudio estructural 171
3.3.2 Estudio de las propiedades de unión al ADN 175

4. CONCLUSIONES 191
4.1 CONCLUSIONES 193
4.1.1 Síntesis de los fragmentos coordinantes 193
4.1.2 Puesta a punto de la metodología SPPS para la obtención de los ligandos peptídicos basados en el ligando bpy 193
4.1.3 Helicatos peptídicos 194
4.1.4 Metalopéptidos dinucleares de Ru(II) 202

5. PARTE EXPERIMENTAL 205
5.1 PARTE GENERAL 207
5.1.1 Reactivos 207
5.2 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES 207
5.2.1 RMN 207
5.2.2 Espectrometría de masas (MS) 209
5.2.3 Dicroísmo circular (CD) 209

5.2.4 Espectroscopia UV/Vis.....210
5.2.5 Espectroscopia de fluorescencia.....211
5.2.6 HPLC.....212
5.2.7 Hibridación de oligonucleótidos para formar las dobles hebras.213
5.2.8 Estudios de internalización celular.....215
5.2.9 Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).....215
5.2.10 Cálculo de los coeficientes de extinción.....219
5.2.11 Microscopía de fuerzas atómicas (AFM).....219
5.3 SÍNTESIS.....221
5.3.1 Síntesis del aminoácido no natural derivado del ácido 2,2'-bipiridina-5,5'-dicarboxílico.....221
5.3.2 Síntesis de los aminoácidos derivados del ácido 5'-amino-2,2'-bipiridina-5-carboxílico.....237
5.3.3 Síntesis de los péptidos y metalopéptidos derivados del aminoácido Fmoc-O1Pen-5Bpy-OH (16).....259
5.3.4 Síntesis de los precursores de rutenio(II).....270
5.3.5 Síntesis de los péptidos y metalopéptidos derivados del aminoácido Fmoc-β-Ala-5Bpy-OH (15).....273
6. ANEXOS 279
6.1 ANEXO I: ASIGNACIONES.....281
6.1.1 Aminoácido (12).....281
6.1.2 Aminoácido (13).....283
6.1.3 Aminoácido (15).....284
6.1.4 Aminoácido (16).....285
6.2 ANEXO II: CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA DE LA RESINA Y DEL ACOPLAMIENTO.....269
6.3 ANEXO III. ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR 271
6.4 ANEXO IV: DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD MEDIANTE FLUORESCENCIA.....273

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todo el mundo que ha contribuido a que esta tesis haya sido posible.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis tutores Miguel Vázquez López y M. Eugenio Vázquez Sentís la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral. Muchas gracias por vuestra paciencia, vuestros consejos y todo lo que me habéis enseñado a lo largo de estos años.

A los profesores José Luis Mascareñas, Juan Granja, Fernando López y Concepción González Bello por su ayuda durante todos estos años, sobre todo en los seminarios comunes para pulir más los detalles de este trabajo.

Muchas gracias a la Dra. Ana Ardá y al Dr. Jesús Jiménez Barbero por su importantísima colaboración en los sistemas bisbipiridínicos y por haberme enseñado "algo" de RMN. Muchas gracias también a Javier Cañada, Ángeles, Luis, Virginia, Pilar, Álvaro…por vuestra ayuda y haberme hecho sentir como en casa.

Muchas gracias al Dr. Jean Didier Marechal por aportar los valiosos datos de modelización molecular.

Muchas gracias a los profesores José Martínez Costas y Javier Benavente por su colaboración en los ensayos de internalización celular.

Gracias al Dr. Victor Sánchez Pedregal por su colaboración en los estudios de RMN.

Muchas gracias al Dr. Patrick Gámez y Rosa F. Brissos por su colaboración con la microscopía de fuerzas atómicas.

Muchas gracias a la Dra. Ilaria Gamba por su colaboración en esta Tesis Doctoral.

Quiero dar las gracias también a Ángeles Sánchez su ayuda, paciencia, enseñanzas y apoyo desde mis primeros pasos en investigación.

Muchas gracias a Sergio Piñeiro y Adrián Jiménez por estos años de buenos ratos, por haberme enseñado tantas cosas y por haberme ayudado siempre que lo necesité. Gracias también a Olalla Vázquez por haberme ayudado y enseñado tanto durante mis primeros años.

Muchísimas gracias a mis compañeras de laboratorio Ilaria Gamba e Iria Salvadó, gracias por vuestra valiosa ayuda y amistad; gracias también a

Pablo, Miriam, María y José Manuel. También quiero dar las gracias al resto de mis compañeros de fatigas en el CIQUS, Cris, Mateo, Suso, Elena, Paloma, Jesica, Isaac, Helio, Marisel, Noel, Lara, Jorge, Javi, Rebeca, María J. Rey…y todos los que no he nombrado pero que habéis ayudado a que esta tesis sea posible.

Muchas gracias a Antía Sedes por estos doce añitos de compañerismo y amistad.

A Celia Sánchez, Ángel Nievas, Cristina Jiménez muchas gracias por vuestra ayuda, ánimo, apoyo y amistad desde siempre, sin duda de lo mejor que me ha pasado durante esta etapa.

Para terminar me gustaría dar las gracias a mi familia, por todo, sin vosotros nada hubiese sido posible.

ABREVIATURAS[1]

5Bpy	ácido 5´-amino-2,2´-bipiril-5-carboxílico
β	constante de formación global
δ	desplazamiento químico
ε	coeficiente de extinción molar
µL	microlitro
µM	micromolar
θ	elipticidad molar
ºC	grado Celsius
A	Adenina
aa	aminoácido
Ac_2O	anhídrido acético
AcN	acetonitrilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
AEDT	ácido etilendiaminotetraacético
AFM	*Atomic Force Microscopy*
Boc	*tert*-butoxicarbonilo
bpy	2,2´-bipiridina
br	banda ancha (espectroscopia)
C	Citosina
CD	*Circular Dichroism*
COSY	*COrrelation SpectroscopY*
c.p.s	cuentas por segundo
d	doblete
DCM	diclorometano
DI	desionizada
DIC	*differential interference contrast*
DIEA	N,N'-diisopropiletilamina
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMF	N,N'-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DOSY	*Diffusion Ordered SpectrocopY*
EB	*Ethidium Bromide*
equiv	equivalente
ESI	*Electro-Spray Ionization*
EtOH	etanol
FID	*Fluorescent Intercalator Displacement*
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
G	Guanina
h	hora
H	helicato
HATU	hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino) 1H-1,2,3-triazol[4,5-b]piridin-1-il-metilen]-N-metilmetanaminio
HBTU	hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il) dimetilamino metilen]-N-metilmetanaminio
HPLC	*High Perfomance Liquid Cromatography*
Hz	Hertzio
ICD	*Induced Circular Dicrhoism*
J	constante de acoplamiento
K	grado Kelvin
K_a	constante de asociación
K_{app}	constante de afinidad aparente
K_d	constante de disociación
K_f	constante de formación
M	molar
MALDI	*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*
MeOH	metanol
mdeg	*millidegrees*

mg	miligramo
MHz	MegaHertzio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimol
MQ	milli-Q®
MS	*Mass Spectrometry*
m/z	relación masa/carga
nm	nanometro
nM	nanomolar
NOESY	*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
O1Pen	ácido 5-amino-3-oxapentanoico
pb	pares de bases
PBS	*phosphate buffer solution*
ppm	partes por millón
ps	picosegundo(s)
q	cuarteto
RP	*Reverse Phase*
s	singlete (RMN), segundo(s)
SPPS	síntesis de péptidos en fase sólida
SV	Stern-Volmer
t	triplete
T	Timina
TOF	*Time Of Flight*
t_R	tiempo de retención
TRIS	disolución tampón de tris(hidroximetil)aminometano
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TFA	ácido trifluoroacético

THF	tetrahidrofurano
TIS	triisopropilsilano
TOCSY	*TOtal Correlation SpectroscopY*
UV/Vis	Ultravioleta/visible
x_i	fracción molar

[1] J. Davis, *Organic letters*, **2014**, 1–31.

1. Introducción

1.1 Química de Coordinación

1.1.1 ALGUNOS CONCEPTOS BÁSICOS

Los **compuestos de coordinación** o **complejos metálicos**[2] son moléculas neutras o cargadas que presentan al menos una entidad de coordinación en su estructura. Una entidad de coordinación[3] está usualmente constituida por un átomo central (generalmente un ión metálico) y un conjunto de átomos o grupos de átomos que lo rodean y a los que se encuentra unido, denominados **ligandos**.

Los ligandos se caracterizan por su carga y por el número de átomos dadores directamente unidos al átomo central a través de enlaces coordinados, pudiendo ser aniónicos o neutros según el primer criterio y mono o polidentados según el segundo. Los ligandos polidentados pueden clasificarse a su vez en lineales, podandos y macrociclos, atendiendo a su estructura.

Los ligandos quelatos son aquellos ligandos polidentados que coordinan a un mismo ión central a través de dos o más átomos dadores.

El **número de coordinación**[4] del átomo central es el número de átomos dadores a los que se encuentra coordinado. Los ligandos se disponen alrededor del átomo central adoptando una geometría determinada, denominada **poliedro de coordinación**. Cada número de coordinación puede dar lugar a unas geometrías de coordinación determinadas, según la simetría y energía de los orbitales que intervienen en el enlace. Por ejemplo, para una especie $[ML_4]$ existen dos posibles geometrías, tetraédrica o una geometría plano cuadrada. La discriminación entre una y otra va a venir marcada por la configuración electrónica del átomo central M y las propiedades del ligando L.

La formación de los compuestos de coordinación puede entenderse como la reacción entre un ácido (átomo central) y una base (ligando) de Lewis. Los ácidos y bases de Lewis pueden clasificarse en duros y blandos según el criterio de Pearson[5] (HSAB, *Hard and Soft Acids and Bases*). Son duras las especies de pequeño tamaño, gran carga (estados de oxidación elevados para los ácidos y átomos donadores muy electronegativos para los ligandos) y poco polarizables. En cambio, blandas son aquellas especies de mayor tamaño y fácilmente polarizables.

1.1.2 ESTABILIDAD DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN

1.1.2.1 Constante de formación de los complejos metálicos

Cuando se hacen reaccionar en disolución un aceptor (átomo central, M) y un dador de electrones (ligando, L) para formar un compuesto de coordinación, se produce la sustitución en la esfera de coordinación de M de una molécula de disolvente por una de L.

Así en el caso del H_2O, tendremos el siguiente equilibrio:

$$[M(H_2O)_n]^{m+}_{(aq)} + L_{(aq)} \rightleftarrows [ML(H_2O)_{n-1}]^{m+}_{(aq)} \quad (1)$$

Si el aceptor M tiene todavía sitios de coordinación disponibles, entonces ML también será una especie aceptora y podrá seguir reaccionando con L tantas veces como pueda:

$$[ML(H_2O)_{n-1}]^{m+}_{(aq)} + L_{(aq)} \rightleftarrows [ML_2(H_2O)_{n-2}]^{m+}_{(aq)} \quad (2)$$

$$[ML_2(H_2O)_{n-2}]^{m+}_{(aq)} + L_{(aq)} \rightleftarrows [ML_3(H_2O)_{n-3}]^{m+}_{(aq)} \quad (3)$$

$$[ML_3(H_2O)_{n-3}]^{m+}_{(aq)} + L_{(aq)} \rightleftarrows [ML_4(H_2O)_{n-4}]^{m+}_{(aq)} \quad (4)$$

y así sucesivamente. En todos estos procesos consideramos que L es un ligando monodentado neutro.

De manera general, tendremos el siguiente proceso de formación:

$$[ML_{n-1}(H_2O)_{n-n}]^{m+}_{(aq)} + L_{(aq)} \rightleftarrows [ML_n]^{m+}_{(aq)} \quad (5)$$

cuya constante de equilibrio será:

$$K = [ML_n]\cdot[H_2O]/[L]\cdot[ML_{n-1}] \quad (6)$$

Normalmente se suele hacer referencia a constantes aparentes, que ignoran la presencia del disolvente. De esta manera el equilibrio (1) quedaría:

$$M^{m+} + L \rightleftarrows [ML]^{m+} \quad (7)$$

cuya constante de equilibrio será:

$$K = [ML]/[L]\cdot[M] \quad (8)$$

Las ecuaciones 2-4 se reescribirán de igual manera, y cada una de ellas tendría su propia constante del equilibrio:

$$K_2 = [ML_2]/[L][ML] \quad (9)$$

$$K_3 = [ML_3]/[L][ML_2] \quad (10)$$

$$K_4 = [ML_4]/[L][ML_3] \quad (11)$$

y así sucesivamente.

De manera general, la constante de equilibrio para la formación del compuesto $[ML_n]^{m+}$ a partir de $[ML_{n-1}]^{m+}$ será:

$$K_n = [ML_n]/[L]\ [ML_{n-1}] \quad (12)$$

Las constantes K_1, K_2,… Kn se denominan constantes de equilibrio parciales.

Habrá **n** equilibrios de este tipo, donde **n** representa el número de coordinación máximo del átomo central M.

La ecuación del proceso global sería:

$$M^{m+} + nL \rightleftarrows [ML_n]^{m+} \quad (13)$$

Si se quiere calcular la constante de equilibrio del producto final $[ML_n]^{m+}$, se debe utilizar la constante de formación global, β_n (o K_f):

$$\beta_n = K_f = [ML_n]/[L]\cdot[ML]^n \quad (14)$$

que es numéricamente igual al producto de las constantes de formación por etapas 9-12:

$$\beta_n = K_f = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot \ldots K_n \quad (15)$$

Cuanto mayor sea el valor de K_f más probable será que se forme el complejo $[ML_n]^{m+}$ por lo tanto más estable será el mismo en el disolvente correspondiente. La inversa de K_f es la llamada constante de disociación, K_d.

1.1.2.2 Factores que afectan a la estabilidad de los complejos

Existe relación entre la constante de formación (K_f) y otros parámetros termodinámicos como ΔG, ΔH y ΔS. En la estabilidad de los complejos en disolución son muy importantes los términos entálpicos y entrópicos.

El factor entálpico más importante es la formación del enlace entre el átomo central y el ligando. Otro elemento importante es la "neutralización de la carga", cuando se forma un complejo entre un catión metálico y ligandos aniónicos. Existen también componentes

entálpicos de sentido opuesto, como por ejemplo la energía de desolvatación o las repulsiones entre los ligandos coordinados simultáneamente al átomo central.

Los efectos entrópicos son debidos a la combinación de especies aisladas (iones metálicos y ligandos) que implican cambios en el movimiento y libertad de las especies en disolución. Generalmente el ligando tiene mucha menos libertad una vez coordinado al átomo central, disminuyendo así su entropía.

Tabla 1.1: Factores que influyen en la estabilidad de los compuestos de coordinación en disolución.

FACTORES ENTÁLPICOS ΔH	FACTORES ENTRÓPICOS ΔS
Variación de la fuerza del enlace con el carácter HSAB de Pearson	Número y tamaño de los anillos quelato
Efectos del campo de los ligandos	Entropía de los ligandos y del centro metálico en disolución
Factores estéricos y electrostáticos entre los ligandos	Cambios de solvatación en la formación del complejo
Entalpía de desolvatación del ión metálico y de los ligandos al formarse el complejo	Variaciones en la entropía de los ligandos no coordinados
Efectos de entalpía relacionados con la conformación del ligando no coordinado y coordinado	Diferente entropía en función de la configuración de los ligandos en el compuesto de coordinación

Hay elementos que influyen en la formación y estabilidad de los compuestos de coordinación, algunos de ellos debido a las propiedades del átomo central (nº de electrones, si es duro o blando…) y otros debidos a las del ligando (basicidad, efecto quelato, preorganización e impedimentos estéricos).

El ión metálico y su carga

Para un metal y un ligando dados, la estabilidad del correspondiente complejo es mayor si el estado de oxidación (EO) del metal es +3 que cuando es +2. Además la estabilidad de los compuestos de coordinación derivados de iones metálicos divalentes de la primera serie de transición, independientemente del ligando implicado, varía normalmente según la denominada serie de Irving-Williams.

$$Mn(II) < Fe(II) < Co(II) < Ni(II) < \mathbf{Cu(II)} > Zn(II)$$

Estas observaciones son consistentes con el hecho de que, al menos para los iones metálicos divalentes y trivalentes, el enlace covalente coordinado tiene un carácter fundamentalmente electrostático.

La relación entre átomo dador y aceptor

En 1954 Chatt y Ahrland observaron que los iones metálicos de la primera serie de transición en estados de oxidación altos, tendían a formar complejos con un cierto tipo de ligandos equipados con átomos dadores de N, O, F.[6] Además, también advirtieron que los iones metálicos de metales pesados en EO bajos formaban complejos estables con otro tipo de ligandos equipados con átomos dadores de P, S. Llamaron a los primeros metales de tipo **a** y a los segundos metales de tipo **b**. Según sus preferencias por un tipo u otro de iones, los ligandos se clasificaron en **a** y **b**. En 1963 Pearson propuso el término *duro* y *blando* para sustituir las denotaciones de Chatt y Ahrland. De aquí nació la clasificación de ácidos y bases de Lewis duros y blandos de Pearson (*Tabla 1.2*).

Esta clasificación permite predecir de una forma cualitativa, pero a la vez precisa, la estabilidad de un hipotético compuesto de coordinación: la formación del mismo será más favorable cuanto más parecido sea el carácter duro o blando de los ácidos y bases enfrentados.

Tabla 1.2: Clasificación de Pearson para ácidos y bases de Lewis (HSAB).

	DUROS	INTERMEDIOS	BLANDOS
ÁCIDOS	H^+, Li^+, Na^+, K^+, Be^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cr^{2+}, Cr^{3+}, Al^{3+}	Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}	Cu^+, Ag^+, Au^+, Tl^+, Hg^+, Pd^{2+}, Cd^{2+}, Pt^{2+}, Hg^{2+}
BASES	F^-, OH^-, H_2O, NH_3, CO_3^{2-}, NO_3^-, O^{2-}, SO_4^{2-}, PO_4^{3-}, ClO_4^-	NO_2^-, SO_3^{2-}, Br^-, N_3^- N_2, C_6H_5N, SCN^-	H^-, R^-, CN^-, CO, I^-, SCN^-, R_3P, C_6H_6, R_2S
	Asp, Glu	His, Tyr, Cys	Met

Efecto quelato

Se refiere al incremento de la estabilidad de un complejo quelato[7] respecto de su análogo formado con ligandos monodentados (*Figura 1.1*). El valor de ΔH^o_f es prácticamente el mismo en el caso de dos ligandos monodentados que en el de uno bidentado quelato estructuralmente equivalente, de lo que se deduce que la diferencia de energía en el proceso es debida al término entrópico.

Además de este factor entrópico, hay que tener en cuenta que, una vez coordinado el primer átomo dador, la coordinación intramolecular del segundo de ellos se ve favorecida por su cercanía al átomo central. Los ligandos quelatos que dan lugar a complejos más estables son los que tienen anillos aromáticos (bpy, phen) o que presentan una deslocalización de carga al formar el complejo metálico (acac). Por otro lado, se observa que un aumento en el tamaño del anillo quelato conduce a una disminución de la estabilidad del complejo. Los anillos quelato más estables son los de 5 y 6 eslabones.

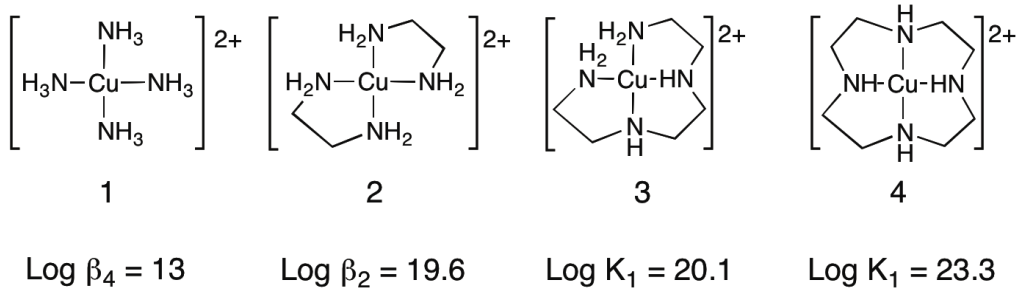


Figura 1.1: Variación de la constante de formación para (1) ligando monodentado; (2) ligando bidentado quelato; (3) ligando tetradentado quelato; (4) ligando macrocíclico.

Factores estéricos

Los ligandos equipados con grupos voluminosos tienden a debilitar el enlace M-L.

En el año 1977 Tolman define el concepto de ángulo cónico para las fosfinas, que cuantifica el efecto estérico en este tipo de ligandos dadores de fósforo (*Figura 1.2*). Este concepto se puede aplicar a cualquier tipo de ligando.

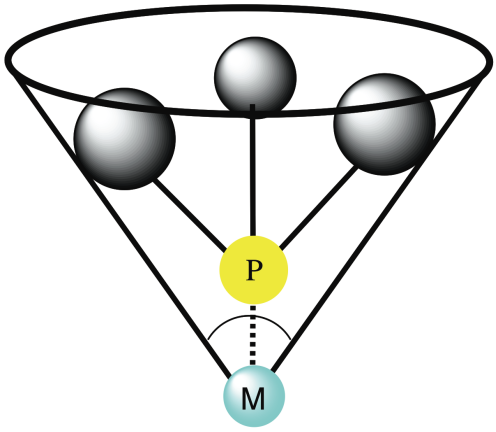


Figura 1.2: Modo en el que se traza el ángulo cónico para la trimetilfosfina.

1.1.3 CINÉTICA DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN

Los complejos metálicos pueden alcanzar el equilibrio con sus componentes a distintas velocidades y en función de su valor pueden clasificarse en *inertes* o *lábiles*. La cinética de la formación de los compuestos de coordinación viene definida por la energía de activación: a mayor energía de activación más inerte es el complejo metálico. Existe un criterio para discernir entre complejos lábiles e inertes: si un compuesto

de coordinación se forma a partir de sus componentes a 25 ºC y 0.1 M en menos de 1 minuto se considera lábil e inerte si necesita más tiempo.

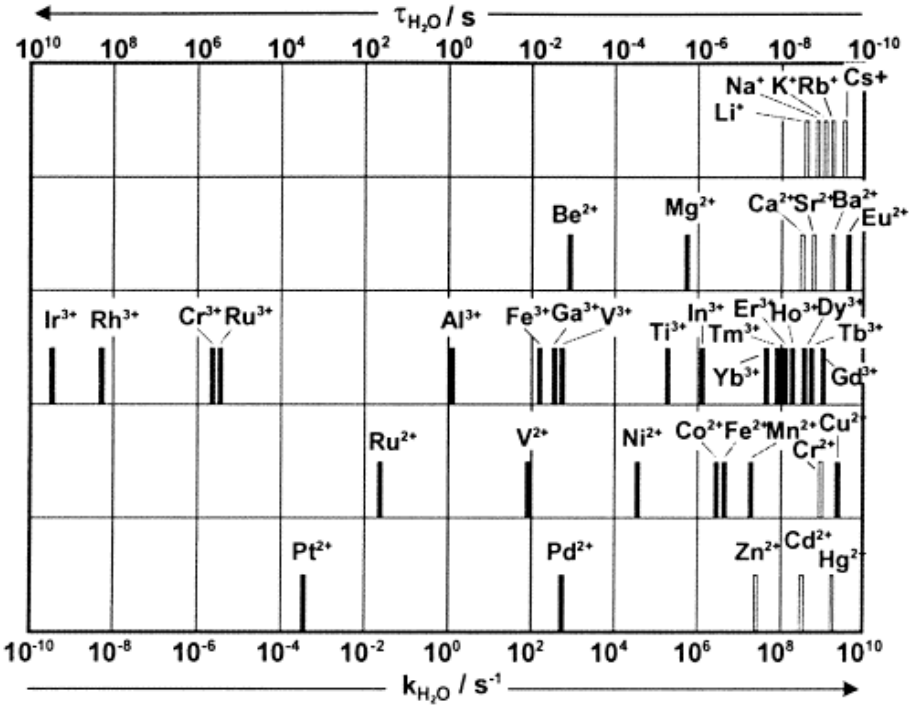


Figura 1.3: Constantes de velocidad del intercambio de moléculas de agua coordinadas a diversos iones metálicos y tiempo de vida medio para dicho proceso.

Hay diversos factores que influyen en la velocidad de reacción de los compuestos de coordinación, siendo el más importante de ellos la configuración electrónica del átomo central. Los iones metálicos que presentan configuraciones de alto espín dan reacciones de intercambio lento, mientras que los que tienen configuraciones de bajo espín sufren reacciones de intercambio rápido. Ejemplos de intercambio lento son los complejos de Ir^{3+}, Cr^{3+}, Pt^{2+} o Ru^{2+}.

Los compuestos de coordinación inertes que presentan velocidades de intercambio comparables a las de los procesos celulares son muy útiles en el campo de la Química Biológica.[8]

1.1.4 ISOMERÍA EN LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN

El término isómero hace referencia a compuestos con la misma fórmula molecular pero con propiedades químicas y/o físicas diferentes.

Se pueden dividir en dos grandes grupos:

a) Isómeros constitucionales
b) Estereoisómeros

Los primeros son aquellos complejos que poseen la misma fórmula molecular pero que difieren en la forma en que sus ligandos están conectados al átomo central. Los segundos presentan la misma conectividad pero diferente disposición de los ligandos en el espacio (*Figura 1.4*).

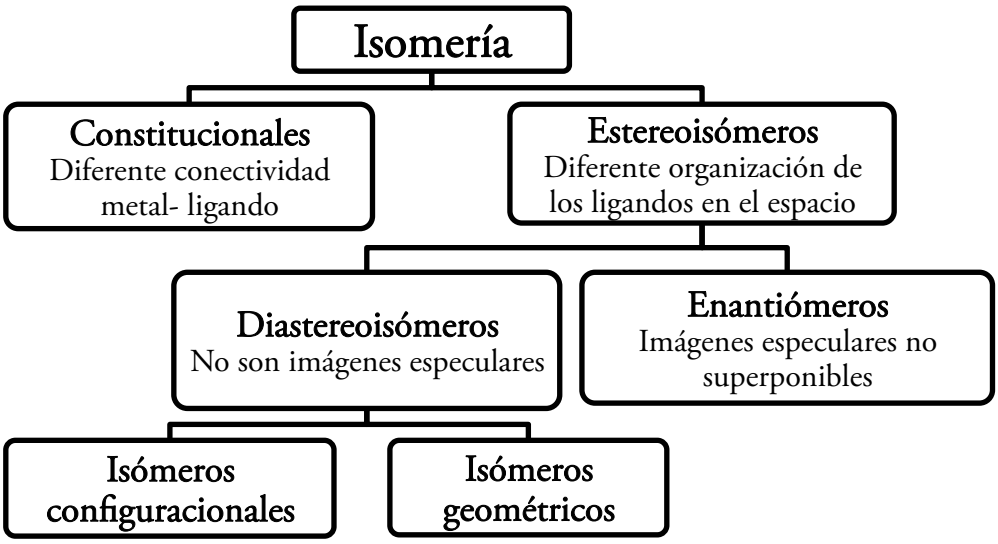


Figura 1.4: Posibles isomerías en compuestos de coordinación.

Los estereoisómeros se pueden dividir a su vez en diastereoisómeros y enantiómeros.

1.1.4.1 Diastereoisómeros

Son compuestos que difieren en la distribución espacial de sus ligandos. No presentan actividad óptica: la imagen especular de la molécula es la propia molécula. Se pueden subdividir en isómeros geométricos e isómeros configuracionales, atendiendo al nivel de la barrera energética existente entre isómeros. Cuando ésta es tan grande que impide la existencia de un equilibrio entre isómeros (por lo que tendrían existencia propia) estaremos hablando de isómeros geométricos.

Las más habituales son *cis/trans* y *fac/mer*. La primera es típica de complejos plano cuadrados del tipo $[MA_2B_2]$ y octaédricos $[MA_4B_2]$,

donde A y B pueden ser ligandos monodentados, bidentados o una combinación de dos monodentados con un bidentado. La segunda está restringida a compuestos de coordinación octaédricos del tipo $[MA_3B_3]$ donde A y B serían ligandos monodentados, tridentados quelato o una combinación de tres monodentados y un tridentado. Los isómeros *fac* presentan los tres átomos dadores ocupando una de las caras triangulares del octaedro, mientras que en los isómeros *mer* éstos se disponen ocupando tres posiciones del plano ecuatorial (*Figura 1.5*).

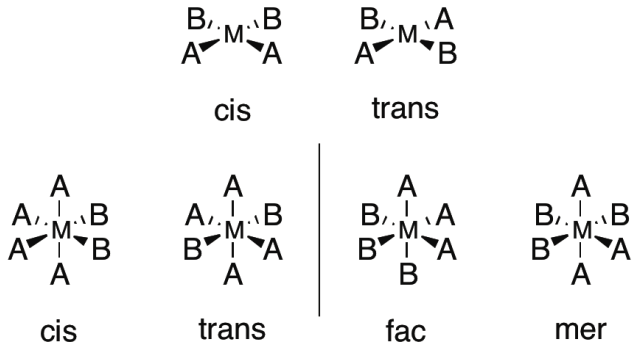


Figura 1.5: Arriba, isomería *cis/trans* para un complejo plano cuadrado. Abajo, isomería *cis/trans* y *fac/mer* para un complejo metálico de geometría octaédrica

1.1.4.2 Enantiómeros

Las moléculas quirales son compuestos ópticamente activos que desvían el plano de luz polarizada en un determinado grado [α]. Una molécula quiral existe en dos formas, siendo una la imagen especular de la otra. Cada una de las formas se denomina enantiómero. Éstos pueden coexistir conjuntamente en cualquier proporción.

La quiralidad en los compuestos de coordinación puede tener diversas causas. La más obvia es que todos los ligandos sean diferentes. También puede darse por el uso de ligandos quirales o mediante la coordinación de ligandos proquirales, es decir, ligandos aquirales que una vez coordinados al centro metálico se convierten en quirales. Otra posible causa es la existencia de ligandos en la esfera de coordinación que rompan la simetría de otros ligandos.

En esta memoria nos centraremos en la quiralidad de los compuestos de coordinación de geometría tetraédrica y octaédrica.

Complejos tetraédricos

Existen dos posibilidades, que tenga su esfera de coordinación ocupada por cuatro ligandos monodentados diferentes (*Figura 1.6*a) o dos bidentados quelato con todos sus átomos dadores diferentes (*Figura 1.6*b).

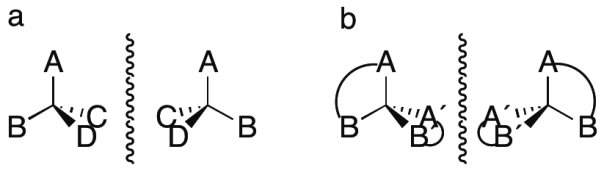


Figura 1.6: Posibles geometrías de coordinación tetraédricas con isomería óptica: a) cuatro ligandos monodentados y b) dos ligandos bidentados quelatos con los cuatro átomos dadores no equivalentes.

En este caso de isomería se emplea el criterio CIP (Cahn-Ingold-Prelog) para asignar el signo.[9] Se mira el complejo siguiendo el vector formado por el enlace M-D, donde D es el ligando menos prioritario. Si los ligandos se disponen de más a menos importante en sentido horario nos encontramos frente al isómero R y si el sentido es anti-horario el isómero que tenemos es el S (*Figura 1.7*)

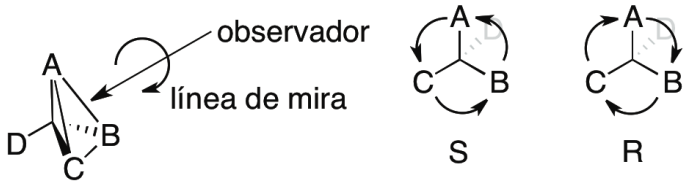


Figura 1.7: Definición de isómeros S o R siguiendo el criterio CIP.

Complejos octaédricos

Para que exista quiralidad, la esfera de coordinación del átomo central ha de estar compuesta por tres ligandos bidentados ($[M(L\text{-}L)_3]^{n+}$) o un mínimo de dos bidentados con dos monodentados iguales en posición *cis* (*cis*-$[M(L\text{-}L)_2L_2]^{n+}$). Existen dos posibles isómeros ópticos para los complejos metálicos con geometría octaédrica, Δ y Λ (*Figura 1.8*).

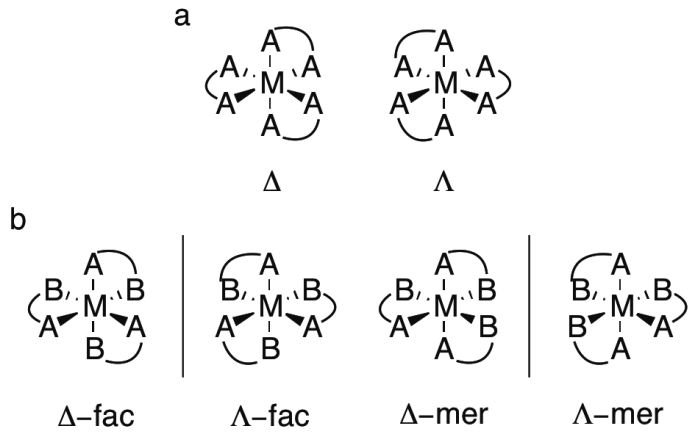


Figura 1.8: a) Posibles isómeros para un complejo octaédrico con tres ligandos bidentados iguales. b) Posibles isómeros en el caso de complejos octaédricos con ligandos bidentados con átomos dadores no equivalentes.

La manera más sencilla e intuitiva de formular la quiralidad en los complejos $[M(L\text{-}L)_3]^{n+}$ o *cis*-$[M(L\text{-}L)_2L_2]^{n+}$ consiste en realizar una analogía con una hélice de tres palas (*Figura 1.9*).

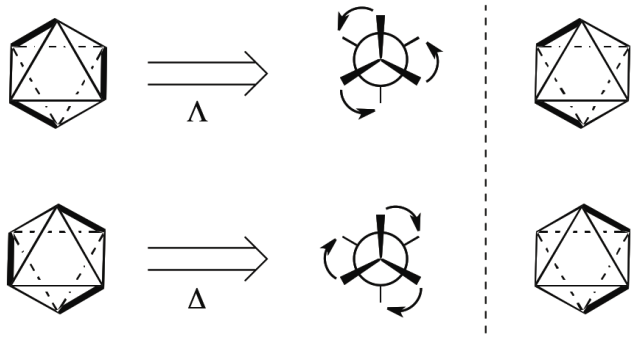


Figura 1.9: Sentido de avance de las hélices para determinar la quiralidad en complejos octaédricos de tipo $[M(L\text{-}L)_3]^{n+}$.

Si la hélice al avanzar gira en sentido contrario a las agujas del reloj (levógira) tendremos el isómero Λ. En cambio, si la hélice avanza en sentido horario (dextrógira), tendremos el isómero Δ.

Separación de complejos quirales

Las propiedades fisicoquímicas de los isómeros ópticos son iguales salvo en un entorno quiral, por lo que, su separación no es sencilla. Para esta operación se suelen emplear moléculas quirales, ya sea para obtener un par iónico que cristalice, para eluir a través de una resina iónica o para extraer a otro disolvente no miscible.[10,11] Lo más fácil y cómodo es el empleo de columnas quirales para equipos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), dado que proporcionan una mejor separación y

permite cuantificar el exceso enantiomérico existente en la mezcla de reacción.

Aplicación de los complejos quirales en síntesis enantioselectiva

Existe mucha literatura acerca del empleo de catalizadores quirales en síntesis enantioselectiva de compuestos orgánicos. El primer catalizador quiral fue desarrollado por Snowles, quien sustituyó las trifenilfosfinas del catalizador de Wilkinson por una fosfina quiral (P(Ph)(Me)(Pr)) para hidrogenaciones enantioselectivas. Para que sea posible la catálisis el substrato y el receptor han de estar en contacto. Las interacciones entre catalizador y substrato son diferentes en función de la quiralidad del catalizador, por lo que sólo se podrá acercar de manera efectiva en una conformación determinada. Se sigue investigando mucho en este campo, habiéndose conseguido catalizadores quirales de uso diario para múltiples reacciones, entre ellas por ejemplo para hidrogenaciones,[12] hidroformilaciones[13] o epoxidaciones,[14] todas ellas de forma asimétrica.

Importancia de la quiralidad en el medio biológico

Las biomoléculas son en su gran mayoría quirales: diecinueve de los veinte aminoácidos naturales son quirales, los azúcares son moléculas quirales, el ADN (en todas sus formas) es un biopolímero quiral… El desarrollo de agentes de unión para cualquiera de estas biomoléculas implica por lo tanto la discriminación quiral, dado que la magnitud de la interacción va a venir determinada en gran medida por la distribución espacial (quiralidad) de los grupos funcionales. Más adelante se hablará con mayor detalle de la interacción enantioselectiva entre los compuestos de coordinación y el ADN, ya que este punto es un tema central de esta memoria.

1.2 Metalopéptidos

1.2.1 AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

Las proteínas son biomoléculas constituidas por secuencias lineales de aminoácidos denominados polipéptidos (o simplemente péptidos) conectados a través de enlaces amida. Los aminoácidos son moléculas que poseen un grupo amino y un grupo ácido unidos a través del denominado Cα, al cual también está unido la cadena lateral del aminoácido, **R**, que es la que le confiere sus propiedades físico-químicas características (*Figura 1.10*).

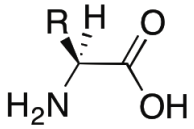


Figura 1.10: Estructura básica de un (L)-aminoácido.

Habitualmente se consideran 20 aminoácidos naturales como los bloques que conforman la mayoría de las proteínas: glicina (Gly, G), alanina (Ala, A), valina (Val, V), leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P), triptófano (Trp, W), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), metionina (Met, M), cisteína (Cys, C), glutamina (Gln, Q), asparagina (Asn, N) , tirosina (Tyr, Y), ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E), lisina (Lys, K), histidina (His, H) y arginina (Arg, R). Los aminoácidos se pueden nombrar de dos maneras: mediante tres letras [Ala (Alanina), Gly (Glicina),…] o a través de un código de sola letra [R (Arginina), Q (Glutamina),…].

Los aminoácidos naturales se pueden clasificar en función de las propiedades de su cadena lateral (*Figura 1.11*). Así, podemos agruparlos en *no polares* (G, A, V, L, I, M, F, P, W), *polares* (S, T, N, Q, Y, C), *ácidos* (D, E) y *básicos* (K, R, H).

Debido a las propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos, los péptidos y las proteínas no se encuentran en forma lineal en disolución, sino que adoptan una estructura tridimensional termodinámicamente estable que determina sus propiedades y funciones biológicas.

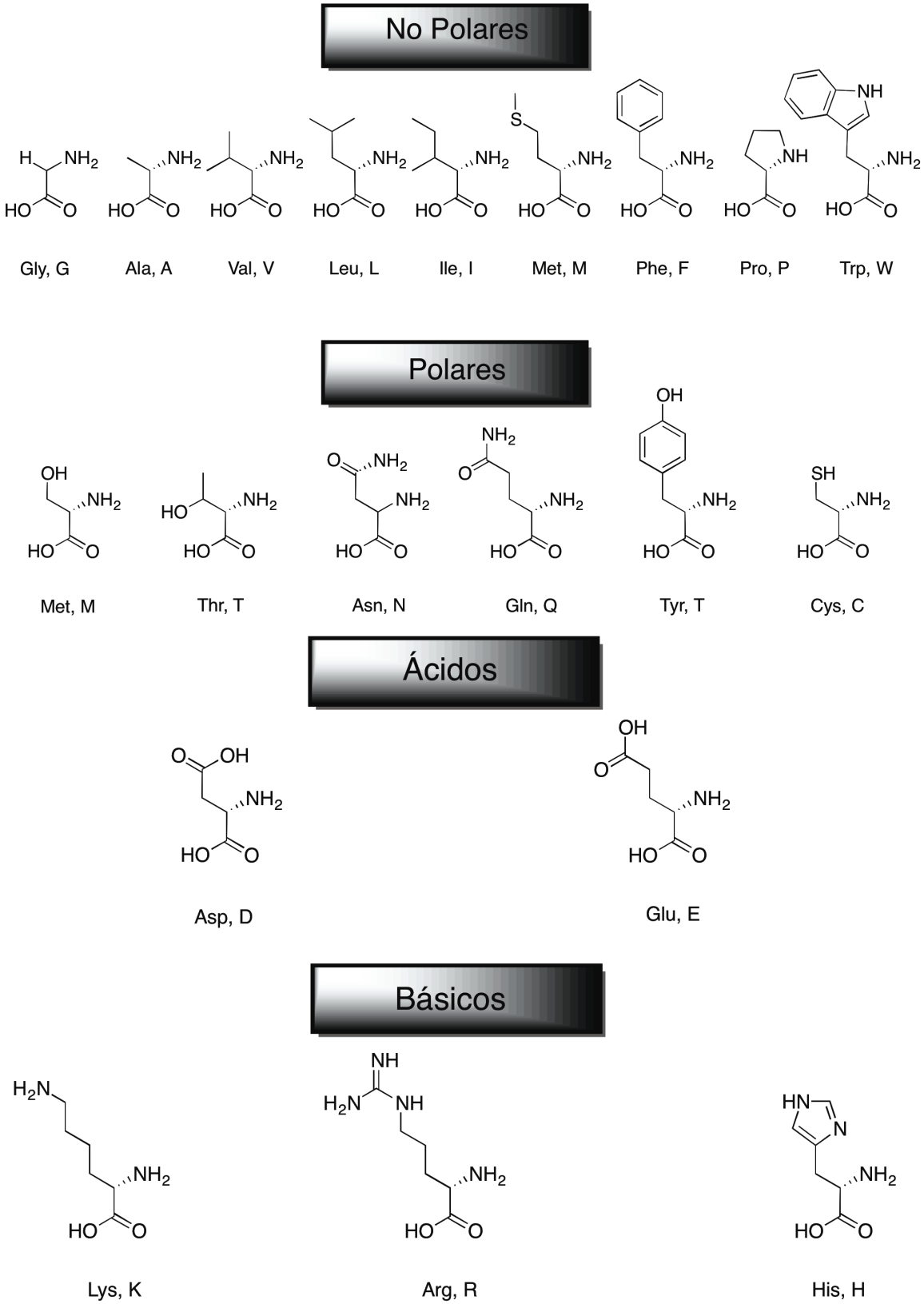


Figura 1.11: Clasificación de los aminoácidos naturales en función de las propiedades de su cadena lateral.

1.2.2 ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

La *estructura primaria* de las proteínas es la secuencia lineal de aminoácidos que forma la cadena proteica. Da información únicamente sobre el número y el orden de los aminoácidos presentes en la proteína.

Las cadenas peptídicas de las proteínas tienden a plegarse localmente siguiendo unos patrones conocidos[15]: hélices α, giros, láminas β, etc. (*Figura 1.12*). El conjunto de estos elementos estructurales es lo que se conoce como la *estructura secundaria* de la proteína.[16] Dos de estos elementos, las hélices α y las láminas β, fueron predichas por Linus Pauling y Robert Corey en 1951 basándose en criterios de formación de enlaces de hidrógeno y criterios de cooperatividad.[17] Estas estructuras modelo fueron confirmadas posteriormente con las primeras estructuras cristalinas con resolución atómica.[18]

Se denomina *estructura terciaria* a la forma en la que los elementos de estructura secundaria se pliegan sobre sí mismos, dando lugar a una organización espacial concreta. La estructura terciaria es, por tanto, hace referencia a la conformación tridimensional de la proteína completa e indica la manera en la que los diferentes elementos de estructura secundaria se asocian en dominios estables. Esta conformación se origina como resultado del establecimiento de interacciones no covalentes (enlaces de hidrógeno, electrostáticas, hidrofóbicas y/o de van der Waals) entre segmentos distantes de la proteína.

Un *dominio* es una sección de la proteína estructuralmente independiente que puede llevar a cabo una función biológica, tal como la unión a un sustrato o a otra proteína por ejemplo. En algunos casos puede que una proteína esté formada por un único dominio, pero lo normal es que posean varios dominios que pueden llevar a cabo diferentes funciones.

Cuando la proteína está formada por varias subunidades conectadas de forma no covalente, la *estructura cuaternaria* refleja la forma en la que se agrupan dichas subunidades unas con otras.

Muchas proteínas consiguen un ordenamiento superior gracias a interacciones más fuertes, como los enlaces disulfuro[19] o la formación de enlaces covalentes coordinados con iones metálicos.[20] Las proteínas que

incluyen en su estructura iones metálicos coordinados se denominan *metaloproteínas*.

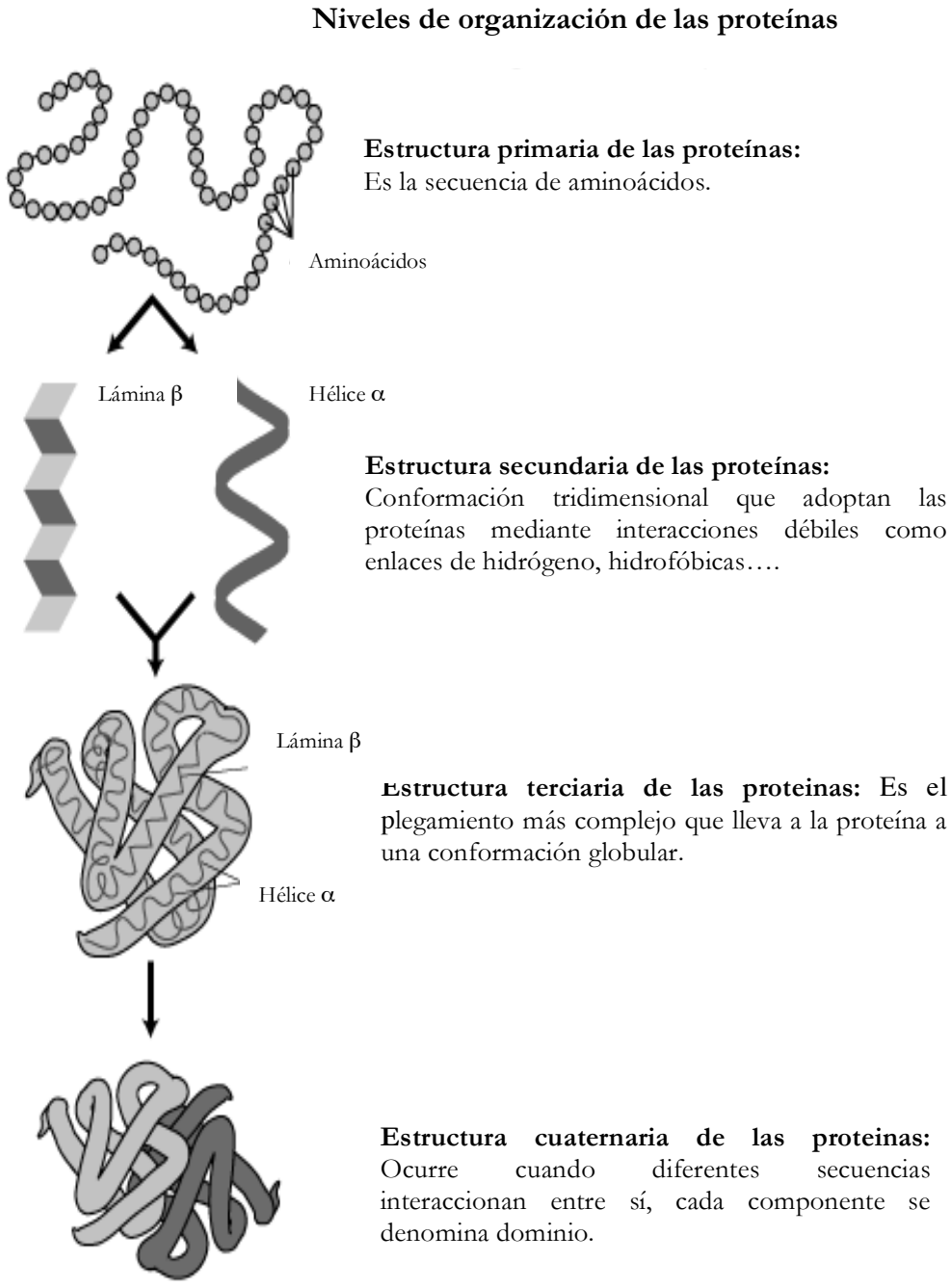


Figura 1.12: Grados de plegamiento de las proteínas.

1.2.3 METALOPROTEÍNAS

1.2.3.1 Aminoácidos coordinantes naturales

Los aminoácidos naturales que pueden dar lugar a enlaces coordinados con iones metálicos son aquellos que presentan en su cadena lateral grupos funcionales coordinantes como el imidazol de la histidina, el tiolato de la cisteína, el carboxilato de los ácidos aspártico y glutámico o el fenolato de la tirosina (*Figura 1.13*).

Se puede realizar una clasificación de las metaloproteínas en función de las características termodinámicas y cinéticas de la interacción ion metálico-proteína. La estabilidad puede variar mucho de un sistema a otro y depende en gran medida de en que parte de la macromolécula se encuentra coordinado el ión metálico. Así pues, si un ión metálico se coordina en una parte superficial de la proteína fácilmente accesible para el disolvente, el complejo formado será normalmente más inestable y cinéticamente lábil. Este tipo de sistemas se denominan *proteínas activadas por iones metálicos* o *complejos metal-proteína.*

Por otro lado, si el ión metálico se encuentra enterrado en el interior de la proteína, poco o nada accesible para el disolvente, el complejo formado será normalmente termodinámica y cinéticamente inerte. Este tipo de sistemas se denominan *metaloproteínas verdaderas*.

Hay que resaltar que, a diferencia de lo que ocurre en un compuesto de coordinación corriente, el ión metálico no puede organizar a su alrededor la esfera de coordinación que más le acomoda, sino que debe adaptarse al entorno que le ofrece la proteína. Se utiliza el término *entático* para designar el *estado de tensión estereoquímica* al que está sometido el ión metálico en una metaloproteína. El estado entático produce una disminución en la energía de activación, y por lo tanto, un aumento en la velocidad de reacción. Esto explica la mayor reactividad de las metaloproteínas en comparación con los complejos análogos estructuralmente más sencillos.[21]

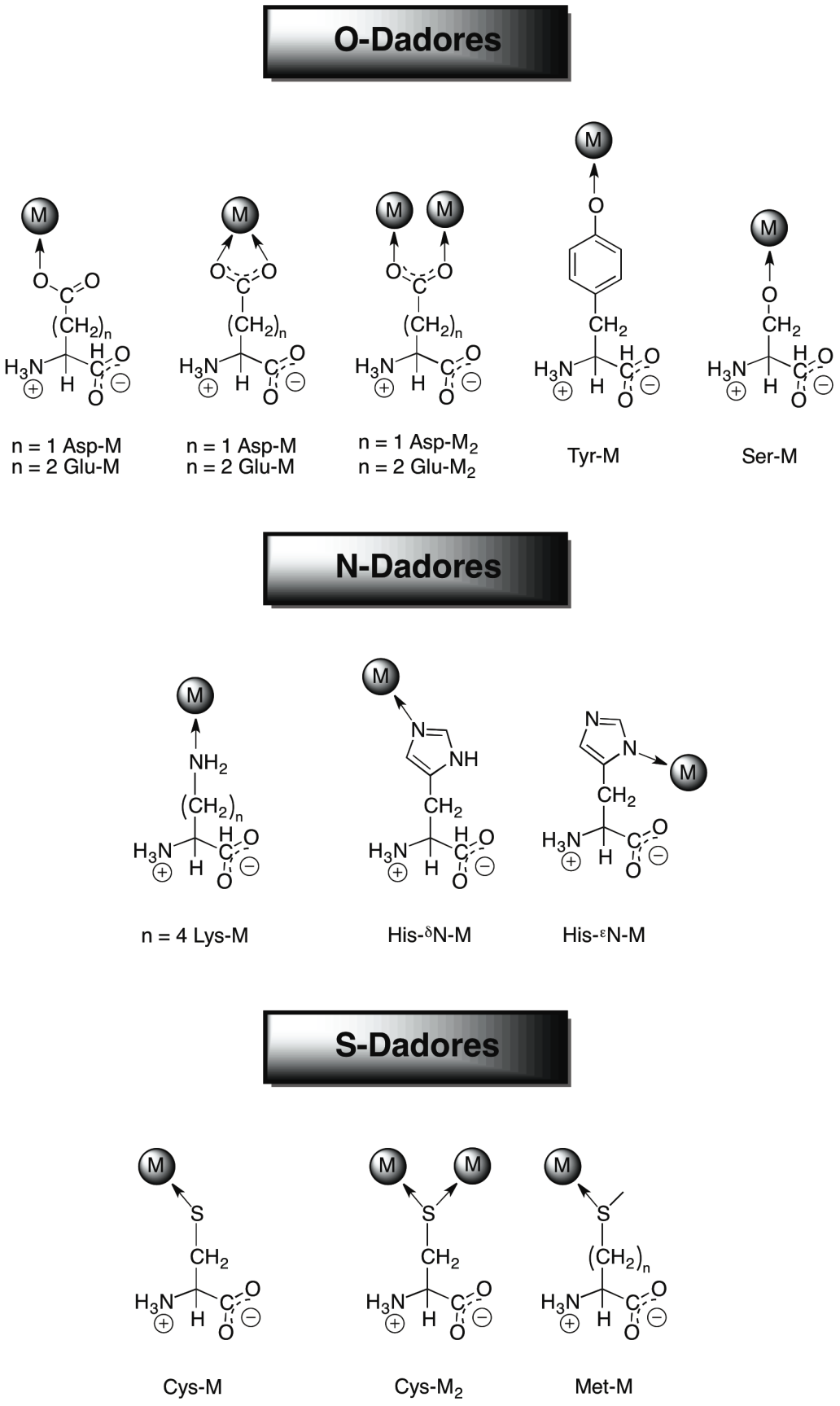


Figura 1.13: Modos de enlace ión metálico/cadena lateral de aminoácido natural coordinante.

1.2.3.2 Funcionalidad de los iones metálicos en las metaloproteínas

El catión metálico puede presentar diferentes funciones dentro de las metaloproteínas:

a) Función catalítica: Prácticamente todas las reacciones químicas que tienen lugar en sistemas biológicos están catalizadas enzimáticamente. Casi sin excepción (ribozimas) todos los enzimas conocidos son proteínas y aproximadamente un tercio de estos enzimas son metaloproteínas (metaloenzimas). Este dato convierte a esta función en la más importante desempeñada por las metaloproteínas en el organismo. Las metaloenzimas pueden catalizar reacciones ácido-base (hidrólisis, condensación), reacciones redox (transferencia electrónica) y reacciones de reorganización o isomerización. Un ejemplo de metaloenzima es la *termolisina*, una endopeptidasa que contiene iones Zn(II) y Ca(II) y cuya función es romper enlaces peptídicos dentro de la secuencia de una proteína.

b) Función de transporte: Algunas especies pueden unirse de forma reversible al ión metálico sin sufrir ningún cambio químico neto, lo que convierte a estas metaloproteínas en una especie adecuada para el transporte dentro del organismo. La metaloproteína de transporte más conocida es la hemoglobina, que es la responsable de llevar el oxígeno molecular desde los alveolos hasta cualquier tejido del organismo.

c) Función estructural: Los iones metálicos juegan muchas veces un papel fundamental en la estabilidad estructural de las proteínas debido a la fortaleza y versatilidad geométrica de los enlaces coordinados. Los dedos de cinc son un claro ejemplo de la influencia que puede tener la coordinación de un ión metálico sobre el plegamiento y funcionalidad de una proteína[22]. En este caso el plegamiento se produce por la coordinación simultanea de dos residuos de cisteína y dos de histidina a un ión Zn(II) (*Figura 1.14*).

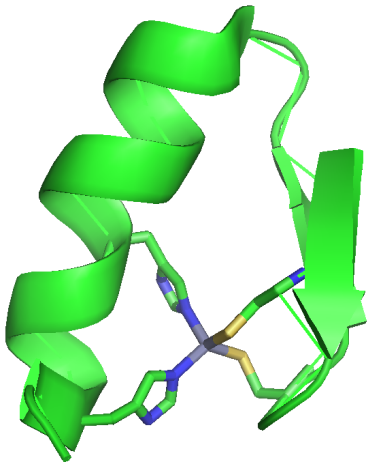


Figura 1.14: Dedo de cinc (PDB: 1ZNF).

1.2.4 METALOPÉPTIDOS ARTIFICIALES

El diseño "*de novo*" de metaloproteínas y metaloproteínas implica el ensamblaje de secuencias de polipéptidos con una estructura definida y con potenciales propiedades funcionales.[23]

La estructura secundaria y terciaria de las proteínas está estabilizada por interacciones no covalentes como efecto hidrofóbico, apilamientos π–π, electrostáticas, enlaces de hidrógeno y, a veces, por enlaces coordinados metal-ligando. Los péptidos, al ser más pequeños que las proteínas, son inherentemente más flexibles, ya que dichas interacciones estabilizadoras no covalentes pierden importancia, por lo que una posible alternativa para la construcción de péptidos estructurados es explotar los enlaces metal-ligando. La idea es construir secuencias peptídicas que posean cadenas laterales con la capacidad de coordinar iones metálicos en las posiciones adecuadas. Para ellos podemos hacer uso de los siete aminoácidos naturales con propiedades coordinantes (*Figura 1.13*), o bien de aminoácidos coordinantes artificiales. La ventaja fundamental de los aminoácidos coordinantes artificiales sobre los naturales es que los primeros pueden orientar más de un átomo dador hacia el mismo ión metálico, actuando como ligandos quelato. Existen en la literatura numerosos ejemplos de metalopéptidos artificiales que presentan diferentes funcionalidades, muchas de ellas relacionadas con la Química Biológica: agentes de unión al ADN [24] y proteínas, [25] agentes antitumorales, [26] sondas para imagen molecular,[27] sensores,[28] agentes de contraste, [29] catalizadores, [30] materiales moleculares, [31] etc. En esta

introducción describiremos algunos ejemplos de metalopéptidos artificiales, pero sólo desde un punto de vista estructural y sintético.

1.2.4.1 Aminoácidos coordinantes derivados de macrociclos

Un ligando muy empleado en química de metalopéptidos es el azamacrociclo DOTA, compuesto por un anillo ciclen funcionalizado con cuatro brazos carboxilato. Al poseer cuatro grupos ácidos se puede acoplar a través de uno de ellos al aminoácido/péptido (*Figura 1.15*), manteniendo al mismo tiempo múltiples átomos dadores. El ligando DOTA se utiliza fundamentalmente para coordinar iones trivalentes de metales lantánidos [Eu(III), Nd(III),…].[32]

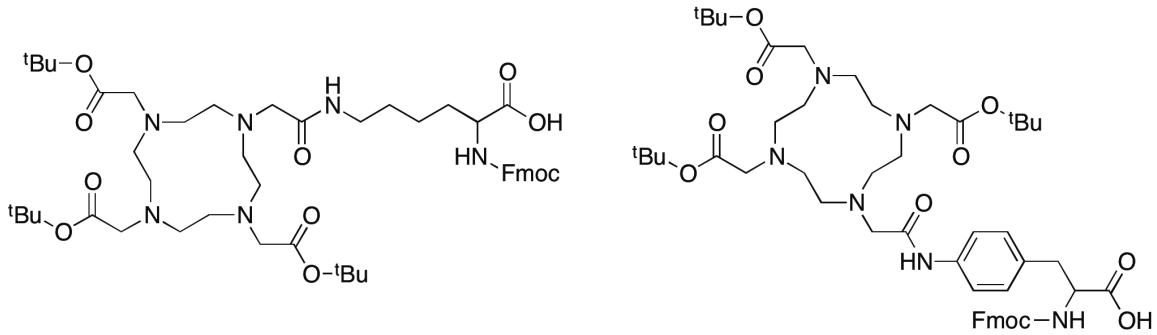
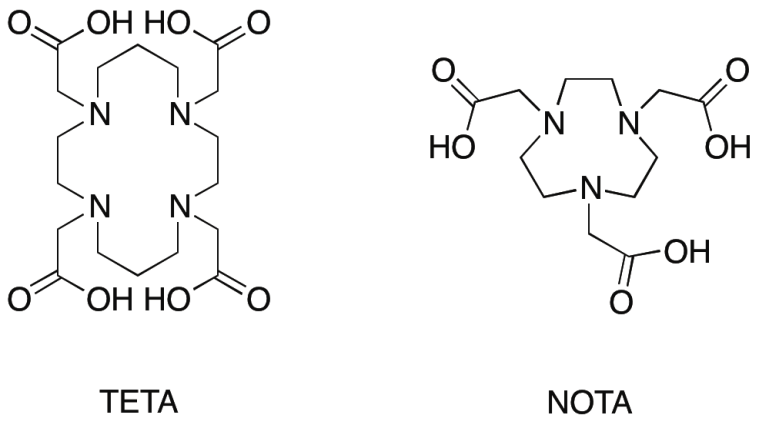


Figura 1.15: Estructura de dos aminoácidos derivados de DOTA empleados en la síntesis de precursores de metalopéptidos. [33]

Además de DOTA se han utilizado otros azamacrociclos equipados con brazos carboxilato como por ejemplo TETA y NOTA (*Figura 1.16*). Este último ha resultado ser especialmente útil en la síntesis de metalopéptidos de $^{68}Ga^{III}$ con aplicación en tomografía de emisión positrónica (PET). [34,35,36]



TETA NOTA

Figura 1.16: Estructura de dos azamacrociclos TETA y NOTA, que ha sido empleados en la síntesis de precursores de metalopéptidos.[31,32]

Se han utilizado azamacrociclos equipados con un único brazo carboxilato para la síntesis de precursores de metalopéptidos derivados de iones metálicos divalentes de la primera serie de transición. Es el caso del macrociclo CPTA, empleado en la síntesis de metalopéptidos de ^{64}Cu para su uso en radioimagen (*Figura 1.17*).[37]

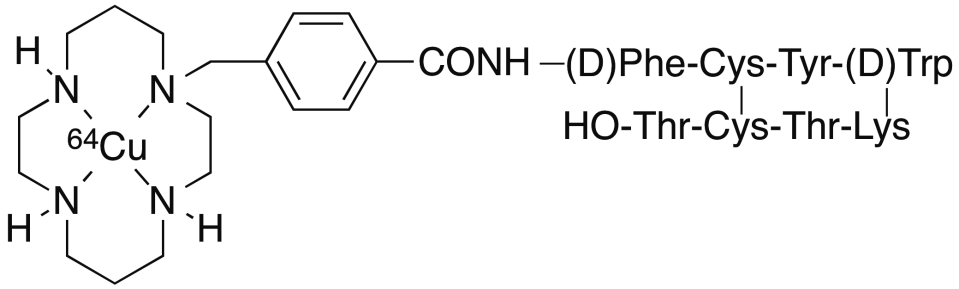


Figura 1.17: Metalopéptido de $^{64}Cu^{2+}$ derivado del macrociclo CPTA y conjugado a un mimético de la somatostatina, una hormona proteica utilizada en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.[33]

1.2.4.2 Aminoácidos coordinantes derivados de catecoles

El ligando bidentado quelato catecol o 1,2-dihidroxibenceno, es una base de Lewis dura según la clasificación de Pearson, por lo que coordina preferentemente ácidos duros como los cationes Fe(III) o Ti(IV).

Este grupo coordinante suele ser acoplado normalmente a los extremos C-terminal[38] o N-terminal de la secuencia peptídica en la síntesis de precursores de metalopéptidos.[39] También puede ser acoplado a ambos extremos del péptido con el objetivo de formar metalociclopéptidos o helicatos (*Figura 1.18*),[40,41] un tipo de arquitectura supramolecular de la que hablaremos en detalle más adelante.

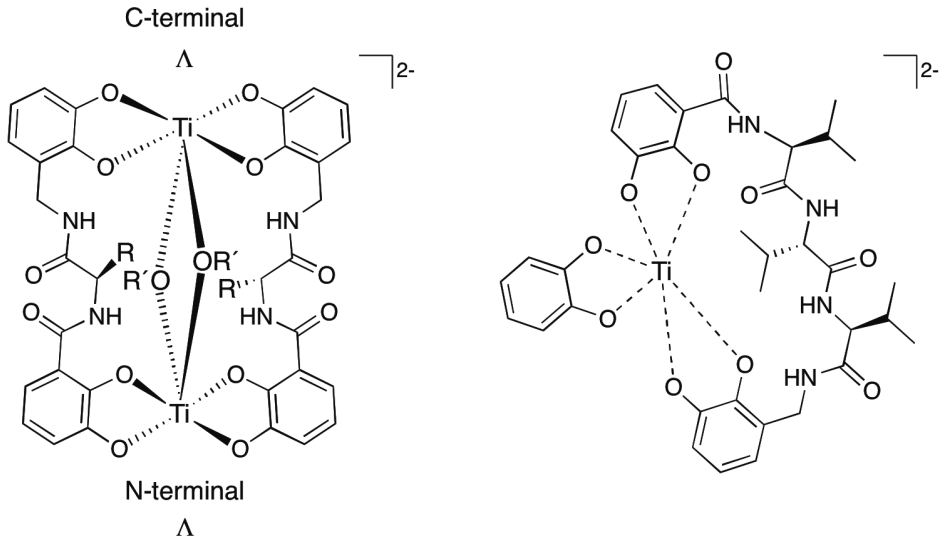


Figura 1.18: Helicato (izquierda) y metalociclo (derecha) de Ti(IV) derivados de ligandos peptídicos funcionalizados con grupos catecol en los extremos N- y C-terminales.[37,38]

1.2.4.3 Aminoácidos coordinantes derivados de 2,2´:6´,2´´-terpiridina (tpy)

Existen pocos ejemplos de metalopéptidos funcionalizados con la tpy como grupo coordinante,[42] probablemente debido a que la química sintética de este ligando es complicada.[43]

El ligando tpy, funcionalizado con un ácido carboxílico, se puede acoplar al extremo N-terminal de una secuencia peptídica,[44] pero también a los extremos N- y C- terminales de un mismo péptido, dando lugar a precursores de metalociclopéptidos.[45] Si la secuencia peptídica entre el grupo N- y C- terminal no es lo suficientemente larga como para formar el ciclopéptido, la coordinación al ión metálico dará como resultado un polímero.[46]

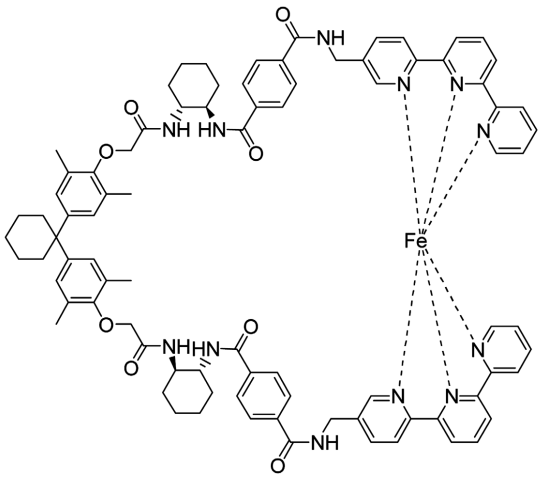


Figura 1.19: Estructura de un metalociclopéptido de Fe(II) derivado de tpy.[47]

Recientemente se ha publicado la utilización de un compuesto de coordinación de tpy ([Pt(tpy)Cl]Cl) como grupo protector de cisteínas en la síntesis de ciclopéptidos.[48] Este método representa una alternativa a los grupos protectores orgánicos que requieren condiciones de desprotección más complejas.

1.2.4.4 Aminoácidos coordinantes derivados de 2,2´-bipiridina (bpy)

La bpy es uno de los ligandos más utilizados en Química de Coordinación.[49] Los compuestos de coordinación derivados de bpy presentan generalmente altas constantes de formación debido al efecto quelato y a su capacidad de actuar como π–aceptores.[50] Presentan un carácter base de Lewis frontera, por lo que forma complejos estables con casi todos los metales de transición. Algunos de los compuestos formados son cinéticamente inertes y muchos de ellos presentan propiedades fotofísicas muy interesantes.

Dadas las ventajas que presenta la bpy frente a las cadenas laterales de aminoácidos coordinantes naturales, se ha utilizado con frecuencia en la formación de metalopéptidos artificiales. La introducción del grupo bpy en secuencias peptídicas puede realizarse siguiendo diferentes estrategias.

Bpy en la cadena lateral del aminoácido

El ligando 2,2´-bipiridina se puede funcionalizar en las posiciones 4, 5 ó 6 de uno de sus anillos aromáticos de forma relativamente sencilla, obteniéndose de esta forma aminoácidos con una cadena lateral equipada con un grupo bpy (*Figura 1.20*a).[51] Esta metodología se puede aplicar a otros ligandos polipiridínicos.[52]

Existen pocos antecedentes del empleo de este tipo de aminoácidos para la obtención de metalopéptidos.[53] Un ejemplo podría ser el desarrollado en el grupo de Imperiali, quienes emplearon el aminoácido 6Bpa en la modulación de la estructura secundaria de un péptido (*Figura 1.20*b).[54]

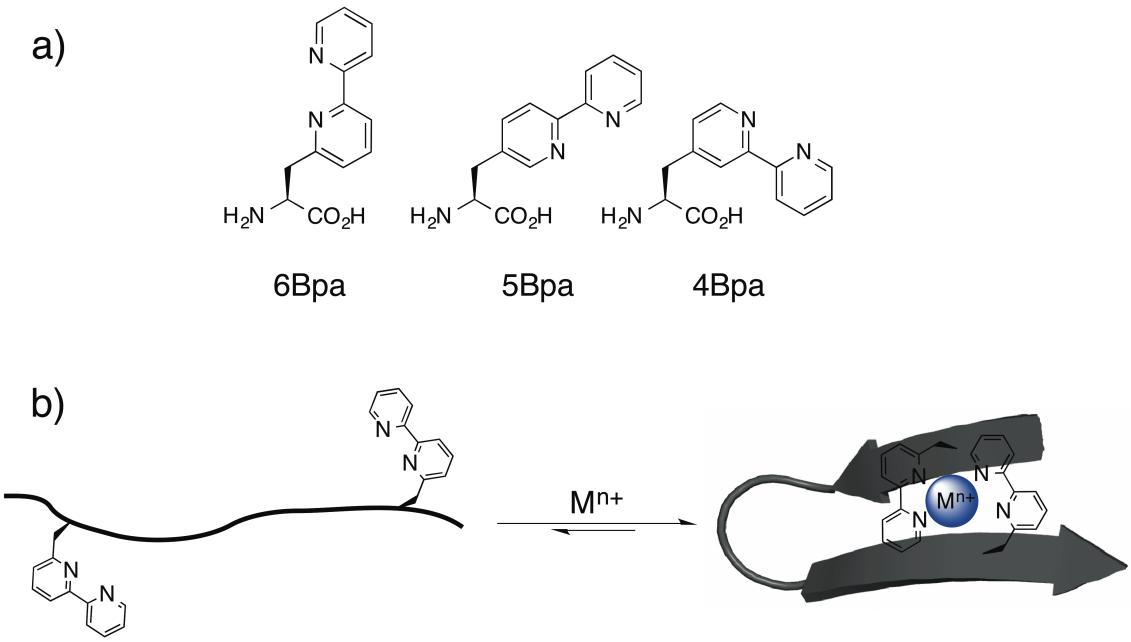


Figura 1.20: a) Aminoácidos equipados con ligandos bpy en la cadena lateral. b) Equilibrio entre el estado *random coil* y la estructura secundaria adoptada por el péptido AcNH-6Bpa-Thr-Pro-(D)Ala-Val-6Bpa-$CONH_2$ en presencia del ión metálico M^{n+}.[51]

Bpy monosustituidas con un ácido carboxílico (Bpac)

Se puede funcionalizar el ligando bpy con un grupo ácido carboxílico en cuatro posiciones diferentes (*Figura 1.21*). Existen bastantes ejemplos de precursores de metalopéptidos derivados de Bpac, aunque los más utilizados son 4Bpac[55] y 5Bpac.[56]

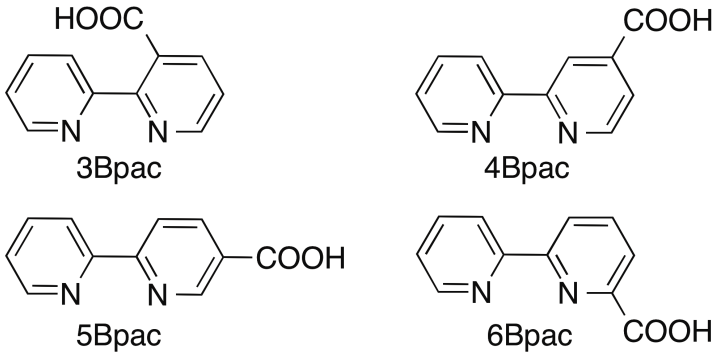


Figura 1.21: Ligandos bpy funcionalizados con un grupo ácido.

En 1992 el grupo de M. R. Ghadiri desarrolló un péptido de 15 aminoácidos equipado con una unidad de 5Bpac en su extremo N-terminal. Estos investigadores demostraron que tras la coordinación de tres unidades de este péptido a un ión metálico divalente [Fe(II), Ni(II) o Ru(II)] se producía un cambio conformacional en las cadenas peptídicas, originalmente desordenadas, guiado por interacciones hidrofóbicas. En

concreto, encontramos que tras la coordinación al ión metálico los péptidos adquirían una estructura de hélice α (*Figura 1.22*).[57]

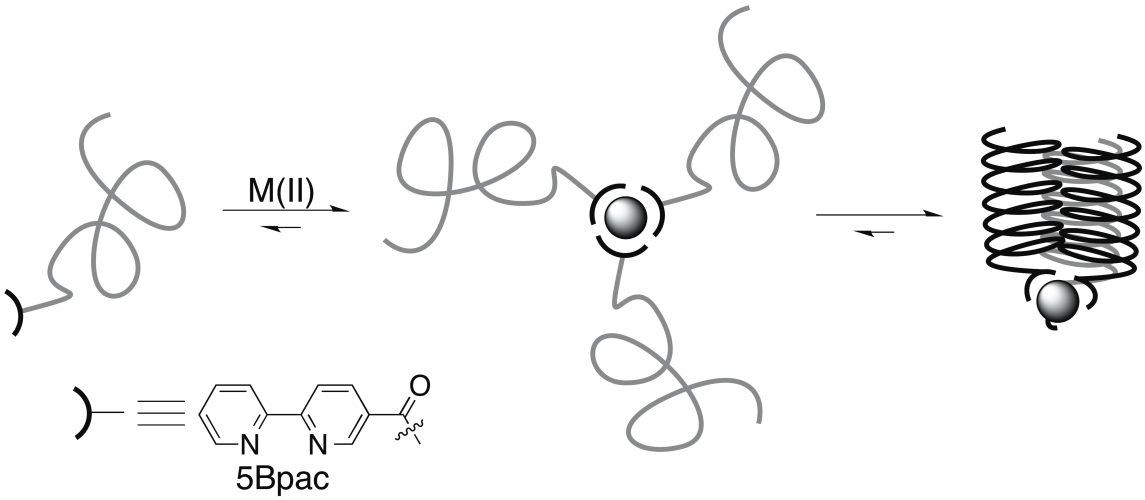


Figura 1.22: Cambio conformacional inducido por la interacción entre las hebras después de la coordinación simultánea a un ión metálico divalente M^{2+} (M = Fe, Ni o Ru) a través de los grupos 5Bpac de tres monómeros.[52]

Aprovechando esta misma idea conceptual, McLendon *et al.* utilizaron la cavidad hidrofóbica existente entre las hélices α como receptor de moléculas poco polares, como el hexafluorobenceno.[58]

Recientemente, Yashima *et al.* han sintetizado un helicato dinuclear de Fe(II) derivado de un ligando peptídico equipado con una unidad de 5Bpac en cada uno de sus extremos (*Figura 1.23*) y cuya quiralidad cambia en función del disolvente.[59]

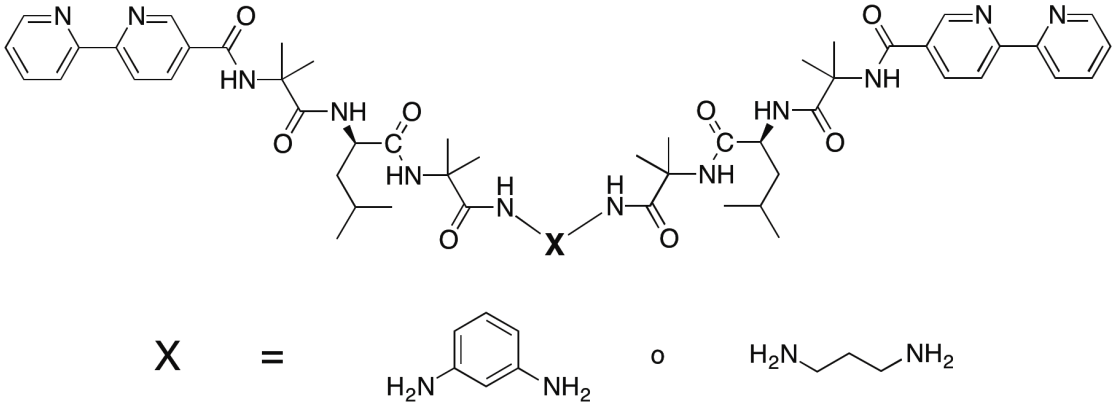


Figura 1.23: Estructura del helicando peptídico derivado de 5Bpac desarrollado por Yashima *et al.*[59]

Bipiridinas disustituidas con ácidos carboxílicos

El uso del diácido de la bpy (Bpda) en la síntesis de metalopéptidos es relativamente común. Debido a restricciones estéricas no es posible funcionalizar simultáneamente las posiciones *3* y *3´*.[60] Sin embargo, la funcionalización simétrica en las otras posiciones no presentan ninguna dificultad (*Figura 1.24*).[61,62]

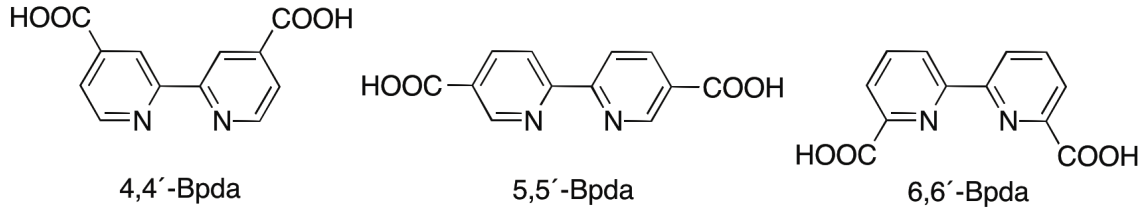


Figura 1.24: Bpy disustituidas con grupos ácido carboxílico en las posiciones más habituales.

Los ligandos Bpda se suelen utilizar a modo de puente entre dos cadenas peptídicas.[63] Un ejemplo de este uso es un trabajo recientemente realizado en nuestro grupo de investigación acerca de las propiedades fotofísicas de complejos heterometálicos Ln^{III}-Ru^{II} derivados de 5,5´-Bpda funcionalizadas con macrociclos DOTA (*Figura 1.25*).[32]

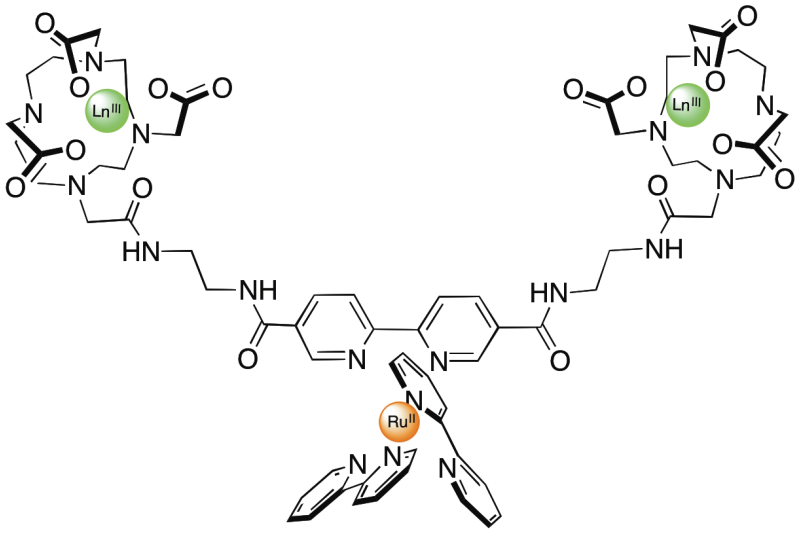


Figura 1.25: Estructura de la 5,5´-Bpda conjugada a dos complejos $[Ln^{III}(DOTA)]$.[32]

Aunque normalmente la reacción entre los grupos Bpda y los péptidos se suelen realizar en disolución, éstos también pueden ser acoplados a los extremos N-terminales de secuencias peptídicas utilizando la metodología de síntesis en fase sólida.

Recientemente, Yashima *et al.* han descrito la síntesis de un metalopéptido dendrítico con un núcleo de $[Fe(5,5'\text{-Bpda})_3]^{2+}$. Este sistema adopta una quiralidad determinada en el centro metálico en función de los aminoácidos empleados.[64] (*Figura 1.26*)

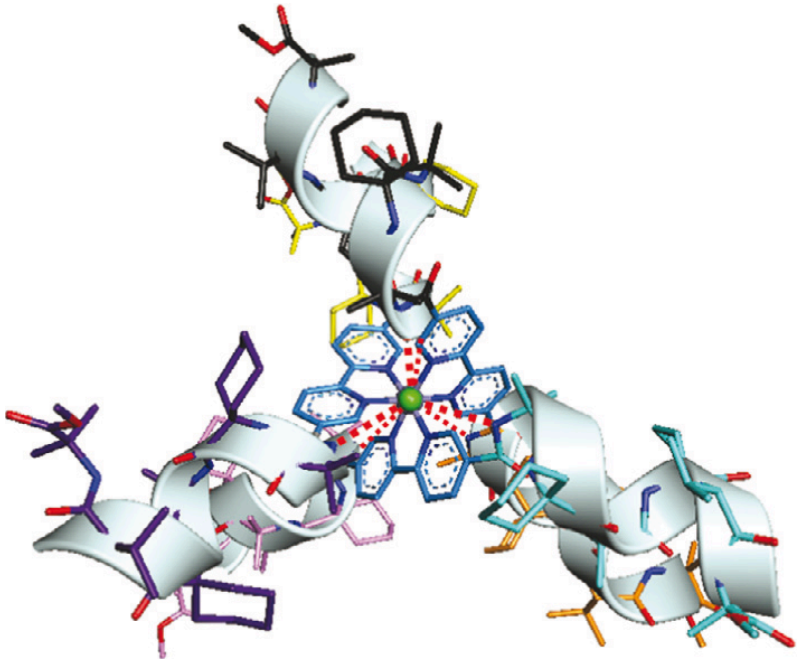


Figura 1.26: Metalopéptido dendrítico de Fe(II) derivado de 5,5´-Bpda.[60]

Bipiridina disustituida asimétricamente (ácido 5´-amino-5-carboxibipiridina)

La única vía para insertar el ligando bpy en la propia cadena peptídica es que la misma bpy actúe a modo de aminoácido, funcionalizada con un ácido carboxílico y un grupo amino a la vez. Las ventajas de este tipo de estrategia respecto de las vistas anteriormente son: a) una mayor integración estructural de la bpy en la secuencia peptídica y en consecuencia b) una mayor control estructural sobre la geometría de coordinación del ión metálico y del metalopéptido resultante.

Existen unos pocos ejemplos en los que la bpy se encuentra disustituida en las posiciones 4,4´ (con el grupo metilamino),[65] pero la disustitución en las posiciones 5,5´es más frecuente (*Figura 1.27*). En cualquier caso, existen pocos antecedentes bibliográficos sobre metalopéptidos derivados de este tipo de aminoácidos coordinantes.[66]

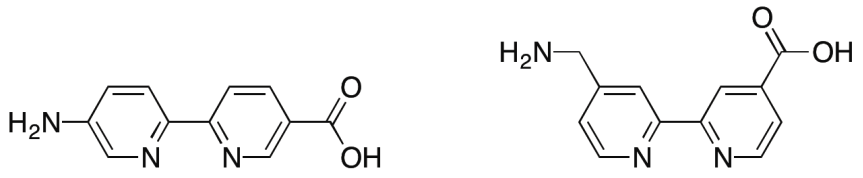


Figura 1.27: Estructuras de bipiridinas disustituidas asimétricamente con un grupo ácido y un grupo amino.

El aminoácido coordinante 5Bpy fue sintetizado por primera vez en 1996 por el grupo de B. Imperiali. La ruta sintética diseñada por este grupo consistió en un acoplamiento de Stille de dos derivados de piridina que dan lugar a la bipiridina asimétrica funcionalizada con un grupo nitro y un grupo éster metílico. Este precursor, tras una reducción con hidrógeno en presencia del catalizador Pd/C y el posterior acoplamiento de Boc-Gly-OH, da lugar al aminoácido Boc protegido. Sobre esta especie se lleva a cabo la hidrólisis del grupo éster en medio básico, para posteriormente cambiar el grupo protector por Fmoc (*Figura 1.28*).[67]

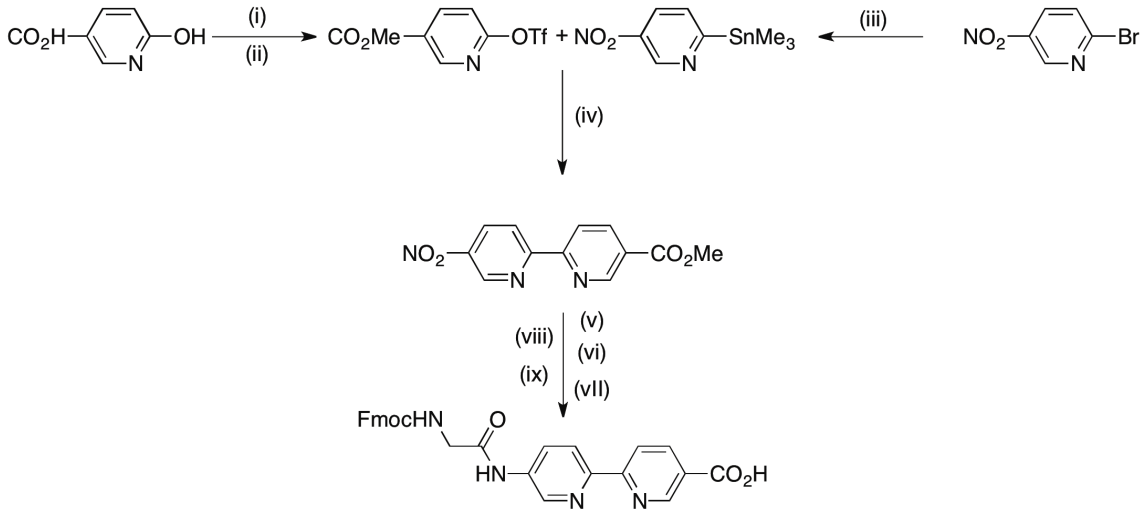


Figura 1.28: Esquema sintético para la obtención de la 5Bpy diseñado por B. Imperiali *et al.* (i) $(CH_3)_3SiCHNH_2$, MeOH/Benceno(ii) $(CF_3SO_2)NPh$, CH_2Cl_2, Et_3N (iii) $(Me_3)_2Sn_2$, $Pd(PPh_3)_4$, benceno (iv) LiCl, $Pd(PPh_3)_4$, dioxano (v) H_2, Pd/C, EtOH (vi) BocGlyOH, TFFH, DIEA, CH_2Cl_2 (vii) 0.1 N NaOH, dioxano (viii) TFA/CH_2Cl_2 (ix) Fmoc-OSu, dioxano, 10 % Na_2CO_3.[63]

Posteriormente, George R. Newkome desarrolló otra ruta sintética para la obtención de 5Bpy en la que partía del éster del ácido nicotínico. El primer paso de la misma consiste en la dimerización del éster etílico del ácido nicotínico en presencia Pd/C. La asimetrización de la bipiridina disustituida se realiza mediante reacción con hidracina y la precipitación

selectiva del monoderivado. Posteriormente la oxidación con nitrito sódico y transposición de Curtius da lugar al carbamato precursor del 5Bpy. Finalmente la hidrólisis del carbamato da lugar al producto deseado con un rendimiento global del 21 % (*Figura 1.29*).[68]

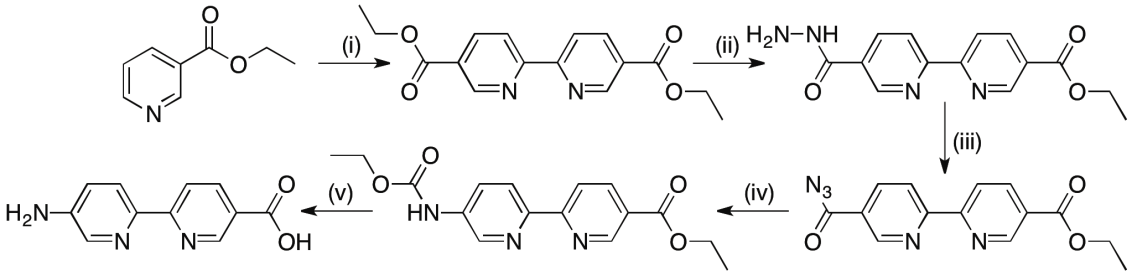


Figura 1.29: Ruta sintética para la obtención del aminoácido 5Bpy desarrollada por Newkome *et al.* (i) 10 % Pd/C (ii) NH_2NH_2, EtOH/Tolueno 80 ºC (iii) $NaNO_2$, HCl(C) (iv) EtOH/Xileno (v) NaOH 2.5 N/EtOH.[68]

Recientemente, el grupo de T. Darbre diseñó una ruta para la obtención del aminoácido 5Bpy, convenientemente protegido con Fmoc, para su empleo en una metodología sintética en fase sólida de péptidos. Darbre toma la 5,5´-dimetil-2,2´-bipiridina como precursor que es oxidada, esterificada y posteriormente asimetrizada mediante la hidrólisis de uno de sus grupos éster y posterior reacción con un grupo azida. A partir de ahí la síntesis transcurre de forma similar a la descrita por Newkome protegiendo finalmente el grupo amino con Fmoc (*Figura 1.30*).[69]

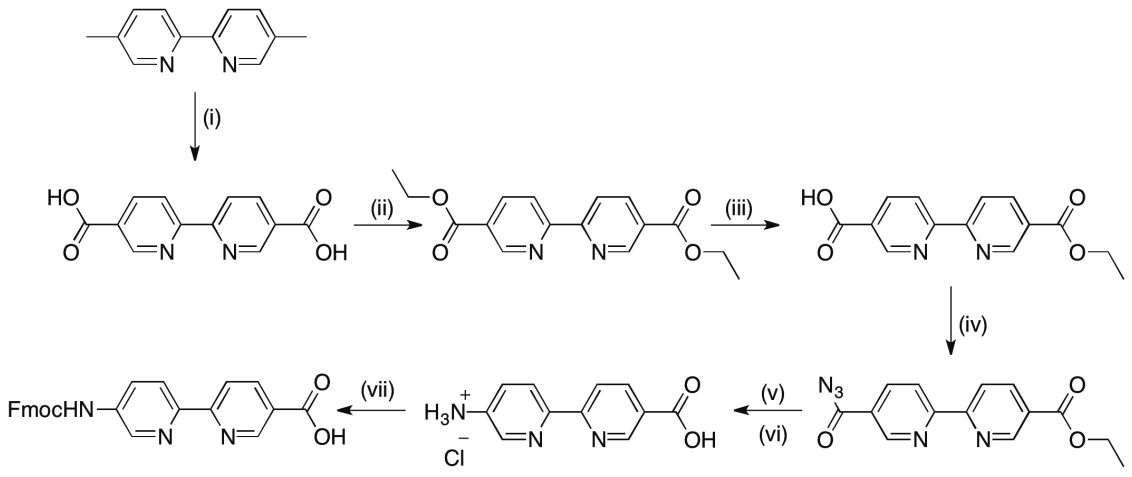


Figura 1.30: Esquema de la síntesis diseñada por Darbre *et al.* del aminoácido Fmoc-5Bpy-OH;[65] (i) $KMnO_4$ (ii) $EtOH/H_2SO_4$ (iii) KOH (1 equiv.) DCM/^{t}BuOH (iv) DPPA, DIEA, DMF (v) Tolueno 120 ºC (vi) HCl 6N, 110 ºC (vii) Fmoc-Cl, $NaHCO_3$, H_2O/Dioxano.[69]

El aminoácido 5Bpy se ha utilizado en la síntesis de metalopéptidos que presentan interesantes propiedades, aunque los

antecedentes son más bien escasos.[70] Por ejemplo, Imperiali ha utilizado este aminoácido en la obtención de precursores de metalopéptidos que actúan como sensores fluorescentes de iones metálicos divalentes de la primera serie de transición.[67] Los péptidos coordinantes derivados de 5Bpy, están equipados con un fluoróforo y un *quencher* en cada uno de los extremos de la secuencia peptídica. Como consecuencia de la coordinación del ión metálico se produce un cambio conformacional en el péptido, que deja al fluoróforo y al *quencher* muy próximos espacialmente uno del otro, favoreciendo de esta manera un proceso de *quenching* de la fluorescencia por transferencia electrónica fotoinducida (PET)(*Figura 1.31*).

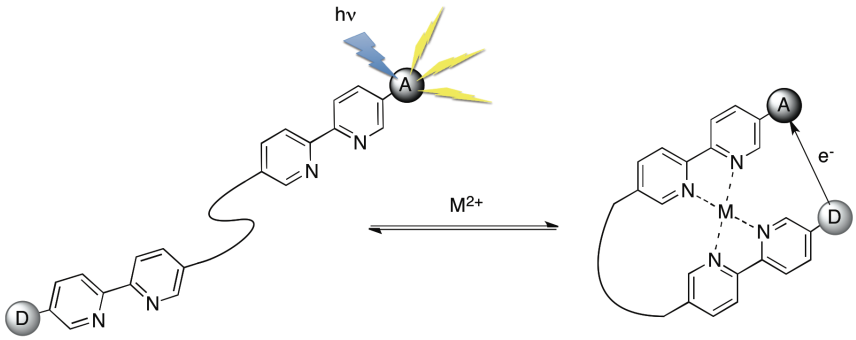


Figura 1.31: Sensor fluorescente de iones metálicos divalentes basado en péptidos coordinantes derivados de 5Bpy, desarrollado por Imperiali *et al.*[67]

Darbre utilizó recientemente este aminoácido en la síntesis de dendrímeros metalopeptídicos de Fe(II) (*Figura 1.32*).[69]

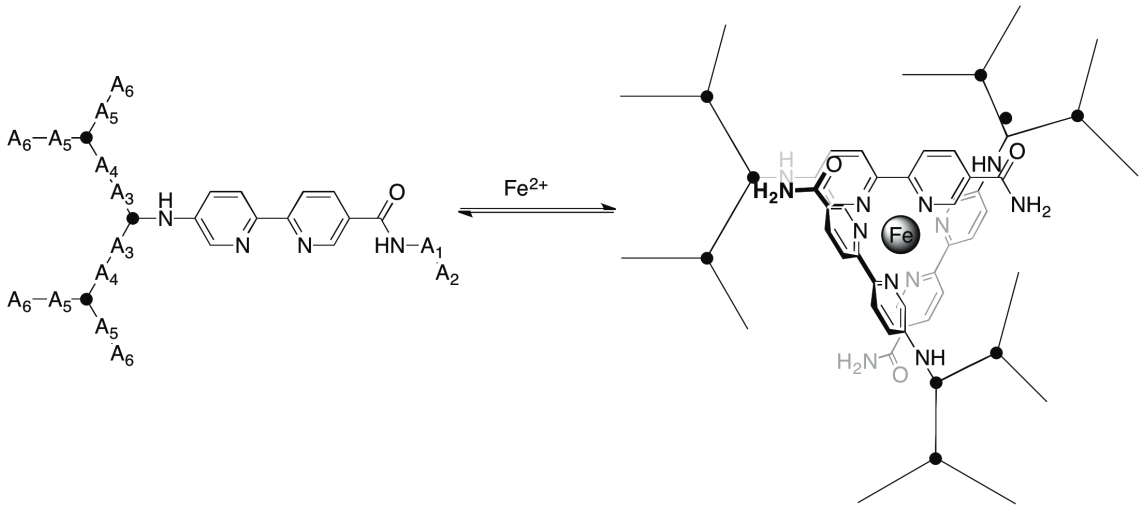


Figura 1.32: Ensamblaje de un dendrímero metalopeptídico dirigido por la coordinación al Fe^{2+}.[69]

H. Ishida *et al.* también utilizaron este aminoácido coordinante para la construcción de metalopéptidos trisbipiridínicos de Ru^{2+}, los

cuales presentan interesantes propiedades fotofísicas.[71] Posteriormente, estos mismos investigadores acoplaron tres unidades de 5Bpy en una misma secuencia peptídica utilizando como espaciadores secuencias cortas aminoácidos inductoras de giros β. Estos ligandos fueron utilizados en la obtención de los correspondientes metalopéptidos de Ru^{2+} (*Figura 1.33*).[72]

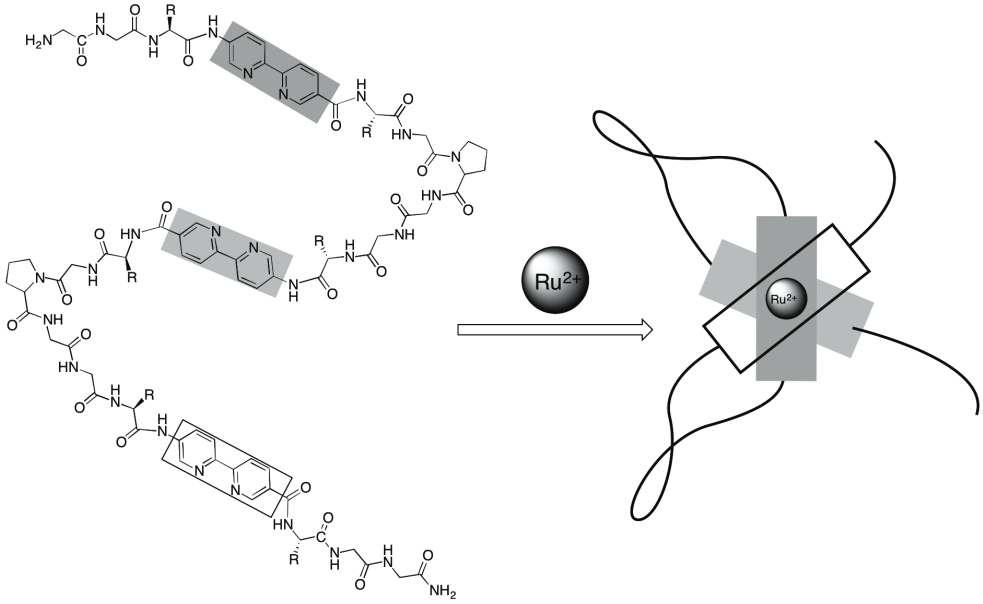


Figura 1.33: Metalopéptidos trisbipiridínicos de Ru^{2+} desarrollados por Ishida *et al.* R representa la cadena lateral de la fenilalanina ($CH_2C_6H_5$).[72]

La asimetría que presentan estos ligandos peptídicos y la inercia cinética de los compuestos trisbipiridínicos de Ru^{2+} provoca que en las condiciones de síntesis utilizadas se obtengan los correspondientes metalopéptidos como mezclas complejas de enantiómeros y diastereoisómeros difícilmente separables por técnicas cromatográficas. Para resolver este problema, Ishida acopló grupos voluminosos en el grupo amino del aminoácido 5Bpy, con la idea de reducir el número de isómeros posibles por efectos estéricas(*Figura 1.34*).[73,74]

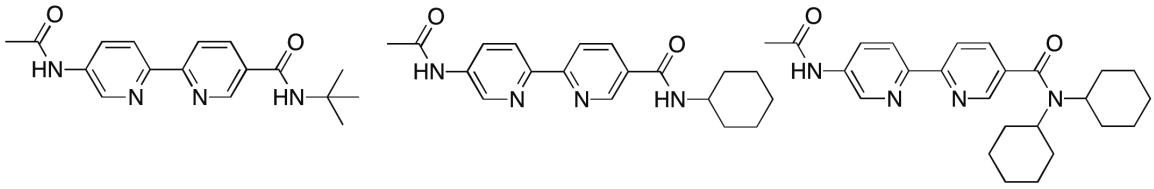


Figura 1.34: Ligandos derivados del aminoácido 5Bpy desarrollados por Ishida *et al.* para la obtención de complejos de Ru^{2+} enantioméricamente puros.[74]

Recientemente, el aminoácido 5Bpy ha sido utilizado por este mismo grupo de investigación en la síntesis de metalopéptidos derivados

de $[Ru(bpy)_2Cl_2]$ equipados con grupos funcionales dadores y aceptores de electrones (*Figura 1.35*).[75]

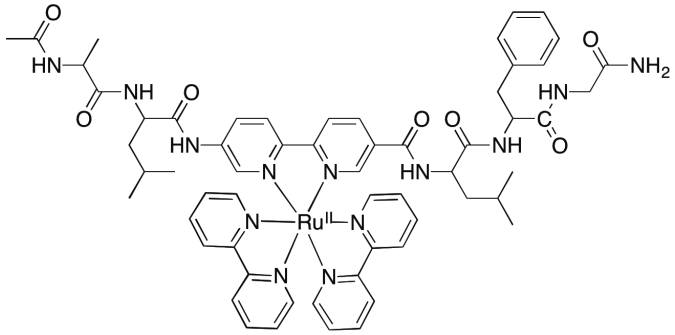


Figura 1.35: Metalopéptido trisbipiridínico de Ru(II).[75]

1.3 Helicatos metalosupramoleculares

1.3.1 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

El término Química Supramolecular[76] fue introducido en 1978 por Jean Marie Lehn (Premio Nobel de Química en 1987, junto a Pedersen y Cram,[77] por sus estudios en este campo) quien la definió como la química de los ensamblajes moleculares y de los enlaces intermoleculares. En la actualidad esta definición es más completa, y hace referencia a la organización de entidades de gran complejidad que resultan de la asociación de dos o más especies químicas unidas por interacciones no covalentes.[78]

Los compuestos supramoleculares pueden dividirse en dos grandes grupos: a) las *supermoléculas*, que son especies discretas oligomoleculares obtenidas de la asociación intermolecular de unos pocos componentes (un receptor y un sustrato) a través del reconocimiento molecular; y b) las *supramoléculas autoensambladas*, entidades oligo o polimoleculares, discretas o poliméricas, que son resultado de la asociación espontánea de un número indefinido de componentes.

1.3.1.1 Tipos de interacciones no-covalentes

La Química Supramolecular explora y explota las fuerzas intermoleculares, también llamadas interacciones no covalentes. Éstas son, fundamentalmente:[79]

a) Enlaces de hidrógeno

b) Apilamiento π aromático o interacciones "*π-stacking*"

c) Interacciones hidrofóbicas o solvatofóbicas

d) Fuerzas de van der Waals

e) Interacciones electrostáticas

La energía de un enlace covalente sencillo típico es de alrededor de 350 $kJmol^{-1}$, elevándose hasta los 942 $kJmol^{-1}$ si se trata de un triple enlace estable como el de la molécula de N_2. Las interacciones utilizadas en la Química Supramolecular son, en general, mucho más débiles, con valores que oscilan entre los 2 $kJmol^{-1}$ (fuerzas de dispersión) y 250 $kJmol^{-1}$ (interacciones electrostáticas *Figura 1.36*), pasando por los 20

$kJmol^{-1}$ de un enlace de hidrógeno.[80] Esto quiere decir que la fortaleza de las interacciones supramoleculares radica en la combinación efectiva de múltiples enlaces relativamente débiles.

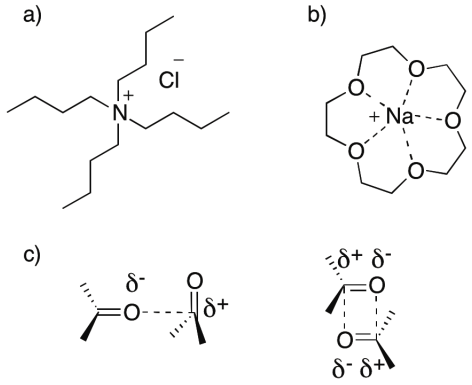


Figura 1.36: Ejemplos de interacciones electrostáticas: a) interacción ión-ión en el cloruro de tetrabutilamonio; b) interacción ión-dipolo en el complejo formado entre el Na^+ y el [15]corona-5; c) interacción dipolo-dipolo presentes en la acetona.[79]

La donación de dos electrones de un átomo dador a un ión metálico para formar un enlace covalente coordinado no es, como su propio nombre indica, una interacción de naturaleza no covalente. Sin embargo, este tipo de enlace es una de las herramientas más versátiles disponibles para la construcción de entidades supramoleculares. La explicación a este hecho hay que buscarla en la relativa labilidad que presentan los enlaces metal-ligando. Esta labilidad o reversibilidad es crítica en los procesos de autoensamblaje, ya que permite que el sistema se encuentre bajo control termodinámico y alcance espontáneamente su estado de menor energía.

Por último, las interacciones de repulsión estérica entre moléculas, que provocan el debilitamiento de las interacciones supramoleculares, juegan un papel fundamental en los procesos de autoensamblaje y de reconocimiento molecular.

1.3.1.2 Reconocimiento molecular

El reconocimiento molecular se define como la energía y la información derivada del enlace y selección del sustrato por una molécula receptora (receptor). [81] Este proceso debe producirse a través de interacciones intermoleculares. El enlace de un sustrato a un receptor forma un complejo o supermolécula caracterizado por su estabilidad y selectividad, es decir, por la cantidad de energía y de información implicada en su reconocimiento. Los componentes de la supermolécula

son el *receptor* y el *sustrato*, siendo normalmente éste el de menor tamaño. Se utiliza esta terminología por las analogías existentes con las interacciones receptor-sustrato en los sistemas biológicos.[82]

La información del proceso de reconocimiento molecular puede estar almacenada en la arquitectura del receptor, en sus posiciones de enlace o en la parte del ligando que rodea al enlace, y debe ser complementaria al sustrato para poder dar lugar a la formación de la supermolécula de forma efectiva. El receptor está caracterizado por el tamaño, la forma, la dimensión (1D, 2D, 3D), la conectividad y el orden cíclico de su estructura. Las posiciones enlazantes se caracterizan por sus propiedades electrónicas, tamaño, número, reactividad, forma y su localización en la estructura del receptor.

Además de la complementariedad de grupos funcionales, el reconocimiento molecular necesita también de una complementariedad geométrica entre receptor y sustrato. El proceso mediante el cual el receptor modifica su estructura o conformación ante la proximidad o presencia del sustrato se denomina preorganización. Ello significa que el receptor debe invertir una determinada cantidad de energía para adoptar la forma más adecuada para recibir al sustrato. En el proceso de preorganización está implícita la información que se transmite entre sustrato y receptor.

1.3.1.3 Autoensamblaje supramolecular

El concepto de autoensamblaje se utiliza en Química Supramolecular para designar la evolución a través de interacciones espontáneas de un número limitado de componentes en entidades discretas o poliméricas.[83] El autoensamblaje implica autoorganización y reversibilidad y, por lo tanto, labilidad cinética e interacciones relativamente débiles. Es por ello que estos procesos deben estar dirigidos por interacciones supramoleculares, incluyendo en ellas los enlaces covalentes coordinados metal-ligando.[84]Las unidades participantes en los procesos de autoensamblaje se denominan "*building blocks*". Este concepto ha traspasado las fronteras de la Química Supramolecular y también es utilizado en otras áreas, como la síntesis orgánica.[85]

Autoensamblaje dirigido por iones metálicos

Entran dentro de este grupo las estructuras metalosupramoleculares generadas espontáneamente a partir de ligandos orgánicos e iones metálicos. Los iones metálicos pueden ser considerados como centros que mantienen a los ligandos unidos y orientados en determinadas direcciones. [86] La formación de cualquier complejo metálico a partir de un ligando orgánico y un ión metálico es, en principio, un proceso que ocurre espontáneamente. La dificultad de estos procesos radica en el diseño adecuado de los ligandos y en la elección de los iones metálicos apropiados con el objetivo de conseguir estructuras supramoleculares definidas de un modo controlado y reproducible.

Los iones metálicos poseen propiedades únicas muy útiles en los procesos de autoensamblaje. Entre ellas destacan:

1-Las preferencias geométricas de un ión metálico dependen de su carga, tamaño, estructura electrónica y, obviamente, de la naturaleza de los ligandos con los que se va a coordinar para producir el autoensamblaje.

2-Existe un amplio rango de fortalezas termodinámicas y estabilidades cinéticas en los enlaces metal-ligando, pudiéndose utilizar esta diversidad para estabilizar diferentes tipos de estructuras y organizar jerárquicamente los procesos de autoensamblaje.

3-Los iones metálicos poseen propiedades fotoquímicas, electroquímicas y reactivas únicas.

4-Los enlaces covalentes coordinados posibilitan procesos de ensamblaje reversibles (ensamblaje-desensamblaje).

5-Los iones metálicos son extraordinariamente versátiles y constituyen centros de interacción potencialmente variables, por interconversión entre estados de oxidación o entre geometrías de coordinación.

El resultado es que cada ion metálico posee unas propiedades electrónicas y coordinativas específicas que le permiten controlar la geometría del ensamblaje molecular de manera precisa, posibilitando, en determinadas ocasiones, la reversibilidad del proceso y la elasticidad de la estructura supramolecular de la que forma parte.

Existen muchas clases de sistemas metalosupramoleculares autoensamblados como, por ejemplo, los polímeros de coordinación,[87] los catenanos[88] y nudos metálicos,[89,90] los rotaxanos,[91] los polígonos[92,93] y poliedros metalosupramoleculares[94,95] o los helicatos. De este último tipo de arquitectura supramolecular hablaremos a continuación con mayor detalle.

1.3.2 DEFINICIÓN, CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y CLASIFICACIÓN DE LOS HELICATOS METALOSUPRAMOLECULARES.

El término *helicato* fue introducido por Jean Marie Lehn en 1987 para describir a un complejo polimetálico de doble hebra con estructura helicoidal.[96]

Un helicato metalosupramolecular es un complejo helicoidal constituido por una o más hebras orgánicas enrolladas y coordinadas alrededor de dos o más cationes metálicos que definen el eje de la hélice. [97] El concepto de helicato incluye desde compuestos de coordinación clásicos hasta complicadas supermoléculas helicoidales.[98] Sin embargo, todos ellos deben cumplir una serie de requisitos para ser considerados como tales:

1) Una o más hebras orgánicas acíclicas deben estar enrolladas y coordinadas a cationes metálicos a través de enlaces coordinados (enlaces dativos). Esto excluye aquellas estructuras helicoidales que se generan a través de enlaces de hidrógeno (como, por ejemplo, el ADN y estructuras similares) y estructuras helicoidales cíclicas (nudos, macrociclos helicoidales, etc.).

2) El eje de la hélice debe estar compuesto por, al menos, dos cationes, formando un oligómero polinuclear discreto.

Aunque también se consideran helicatos a las estructuras helicoidales en donde el eje de la hélice está formado por aniones,[99] aquí no las consideraremos. Cuando hablemos de helicatos, sin especificar, siempre estaremos haciendo referencia a helicatos de cationes metálicos.

Los helicatos se pueden clasificar, en primer lugar, en función del número de hebras enrolladas alrededor de los centros metálicos. Dependiendo si están compuestos de una, dos o tres hebras se

denominarán monohelicatos, dihelicatos o trihelicatos, respectivamente (*Figura 1.37*).[100] Dependiendo del número de centros metálicos se clasifican en dinucleares, trinucleares o polinucleares.

La constitución básica de una hebra es de dos dominios de unión separados mediante un espaciador. Los helicatos también se pueden clasificar en homolépticos y heterolépticos, en función de si los dominios coordinantes de la hebra son iguales (hebra homotópica) o no (heterotópica).[101, 102] Por otra parte, los helicatos pueden presentar diferentes iones metálicos en su estructura, clasificándose así en homonucleares y heteronucleares. Si los dominios enlazantes ocupan todas las posiciones de coordinación posibles de los centros metálicos tendremos helicatos saturados y, en caso contrario, helicatos insaturados (*Figura 1.38*).

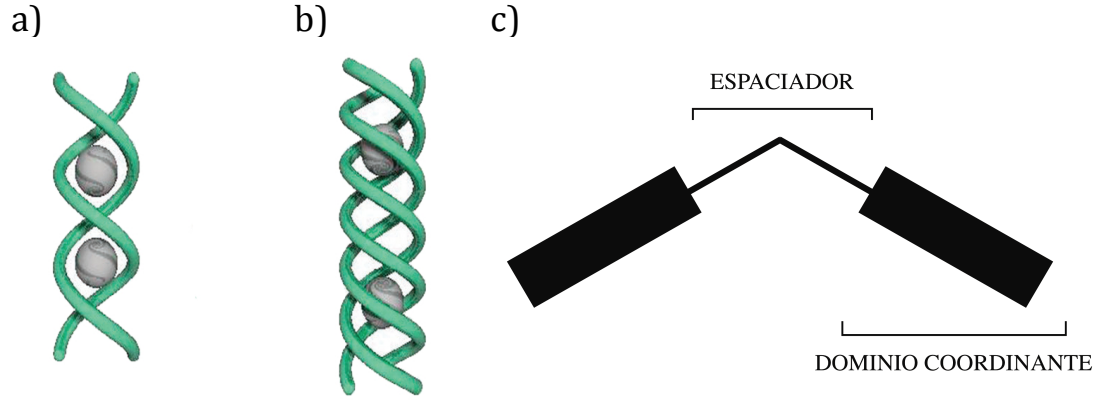


Figura 1.37: a) dihelicato dinuclear; b) trihelicato dinuclear; c) esquema de una hebra precursora de helicatos supramoleculares.[100]

Existe una gran cantidad de complejos mononucleares helicoidales obtenidos por reacción de iones metálicos con ligandos acíclicos.[103] Aunque este tipo de complejos no entran dentro de la definición de helicatos, pueden ser considerados como precursores de dihelicatos.[104] La introducción de grupos voluminosos terminales en el ligando hace que se intensifiquen las interacciones estéricas entre los extremos del ligando, favoreciendo la formación de este tipo de complejos.[105, 106] Los monohelicatos propiamente dichos son complejos polinucleares, en donde una sola hebra molecular se enrolla alrededor de dos o más iones metálicos.[107]

La mayoría de los dihelicatos dinucleares publicados son complejos de Fe(II),[108] Co(II),[108a,109] Ni(II),[108b,110] Cu(II),[111] Zn(II),[105c,112] Ag(I)[113] y Cu(I),[114] siendo menos numerosos los de Cd(II). La mayoría son

derivados de ligandos del tipo polipiridínico,[115] aunque también se han utilizado ligandos tipo base de Schiff.[116] En estos complejos los iones metálicos pueden encontrarse tetra, penta o hexacoordinados. Se han publicado ejemplos de dihelicatos trinucleares[117] y polinucleares. [117a,118]

Los trihelicatos dinucleares más frecuentes son los de Fe(II),[119] Co(II)[120] y Ni(II),[120a,121] aunque también existen ejemplos de trihelicatos de Ru(II).[122] En todos ellos los iones metálicos están hexacoordinados y poseen geometrías de coordinación pseudooctaédricas. La mayoría son derivados de ligandos polipiridínicos[123] y derivados de ligandos tipo base de Schiff.[124] Existen también ejemplos de trihelicatos trinucleares[125] y polinucleares.[126]

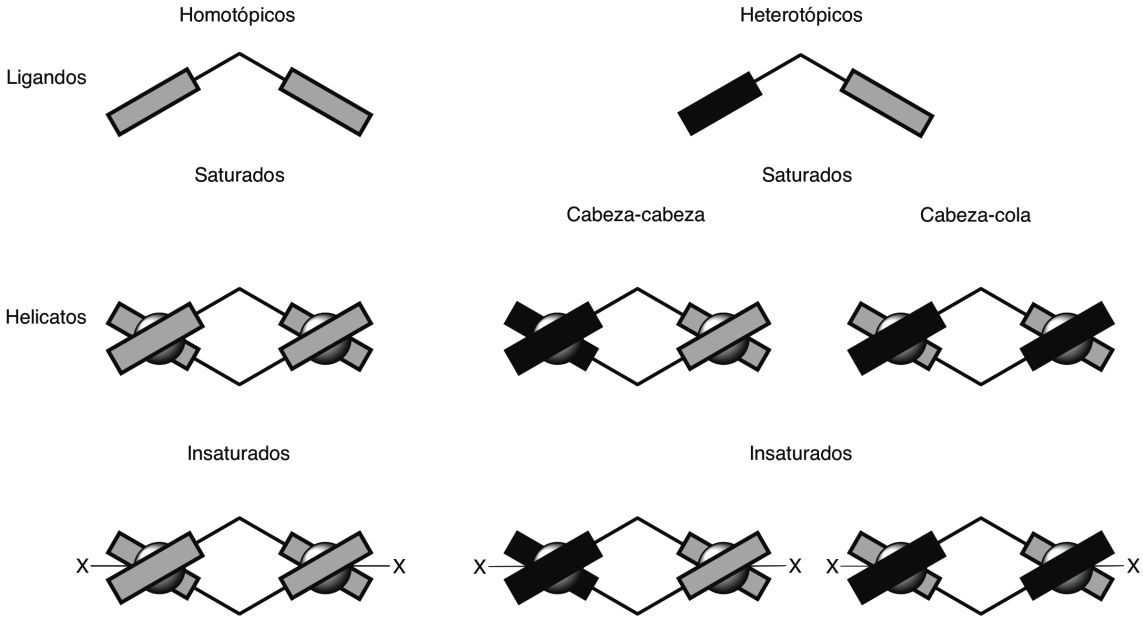


Figura 1.38: Clasificación de los helicatos en función de sus dominios coordinantes y esferas de coordinación.[101]

Existen clases especiales de helicatos que presentan ciertas peculiaridades estructurales como son los helicatos tipo *hairpin* (básicamente un tipo de monohelicato),[127] los helicatos clúster (presentan una o varias interacción/es directa/s entre los centros metálicos)[128] y los helicatos circulares (*Figura 1.39*).[129]

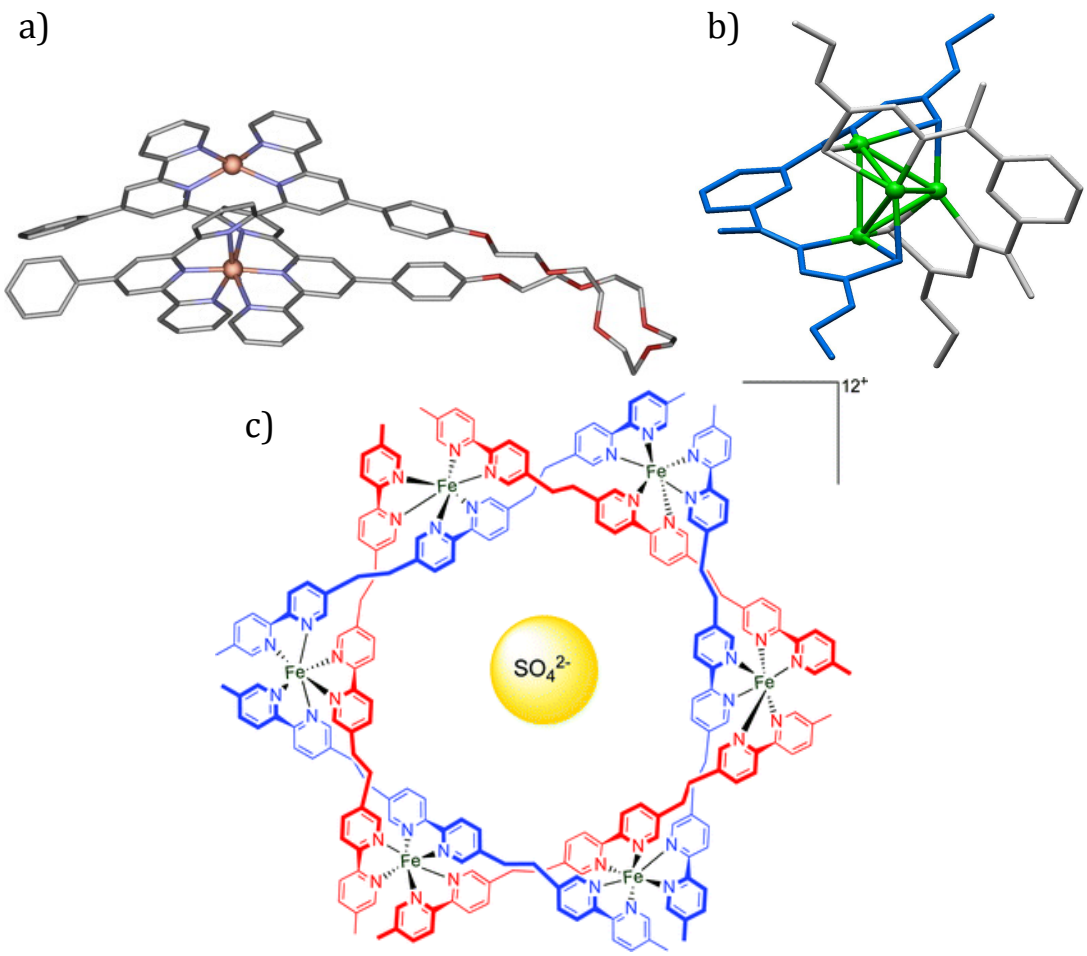


Figura 1.39: Helicatos a) *hairpin*;[127] b) clúster;[130] c) circulares.[129]

1.3.3 QUIRALIDAD DE LOS HELICATOS

Una hélice se caracteriza por el eje, la quiralidad y el campo (relación entre las propiedades lineales y angulares de la hélice). Geométricamente hablando, una hélice es la figura generada por el movimiento de un punto alrededor y a lo largo de una línea: el eje de la hélice. Este movimiento angular y lineal produce un volumen cilíndrico de área A, que es el área que genera un giro de la hélice alrededor de su eje, y de altura L (campo de la hélice), que es la proyección de los dos extremos de hélice sobre el eje. La hélice puede ser de mano derecha (P, plus) o de mano izquierda (M, minus) dependiendo si el giro es en el sentido o en contra de las agujas del reloj (*Figura 1.40*), respectivamente (siempre desde el punto de vista del observador).

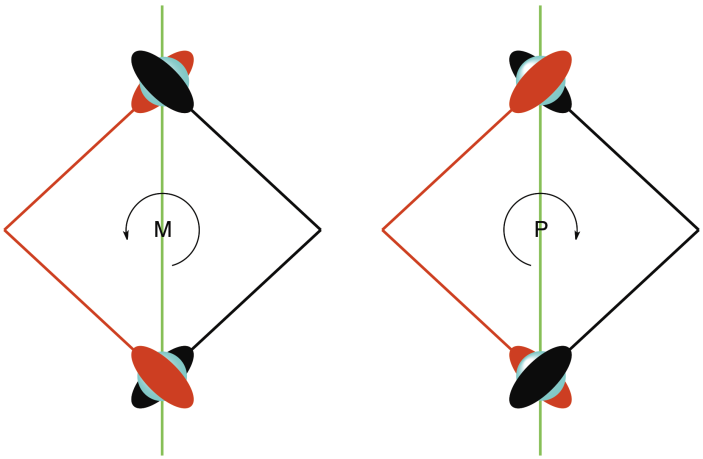


Figura 1.40: Posibles enantiómeros de un dihelicato dinuclear homotópico.[79]

El producto $A \times L$ nos da el volumen de la hélice V definido por una hebra (*Figura 1.41*). La helicidad neta es la diferencia entre los volúmenes generados por las hélices P y M, y la helicidad absoluta viene dada por el volumen total del dominio de la hélice.

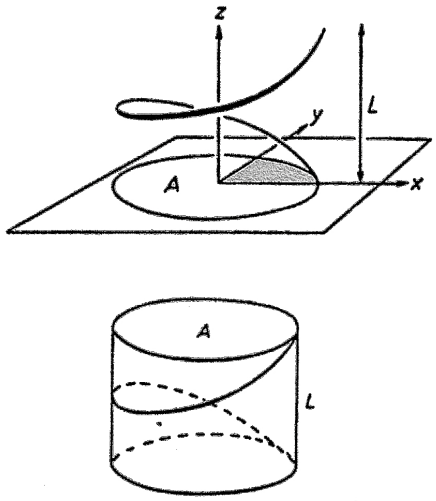


Figura 1.41: Helicidad molecular.

En el caso de ligandos homotópicos, si el autoensamblaje no lleva consigo el entrecruzamiento de las hebras, la especie que se origina se denomina *mesocato*. Para un mismo ligando homotópico la diferencia química fundamental entre los mesocatos y los helicatos derivados es que, en aquellos, la configuración absoluta de los centros metálicos no es la misma y por lo tanto no existe helicidad. En un mesocato las configuraciones de los centros metálicos son diferentes ($\Delta\Lambda$), lo que implica que el complejo es aquiral. Por el contrario, en un helicato homotópico las configuraciones absolutas de los centros metálicos son iguales, por lo que el compuesto es una especie quiral.

1.3.4 ANTECEDENTES DE HELICATOS PEPTÍDICOS EN QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

Existen muy pocos ejemplos de helicatos peptídicos en la bibliografía. El Prof. Markus Albretch describió por primera vez el empleo de aminoácidos naturales en la construcción de trihelicatos dinucleares de Ti(IV) derivados de hebras constituidas por dos grupos catecol como unidades enlazantes terminales y separadas por un aminoácido apolar (valina).[40] Posteriormente, los mismos autores estudiaron el efecto que tiene un espaciador de mayor tamaño (2 ó 3 aminoácidos) en la formación de los helicatos (*Figura 1.42*).[41]

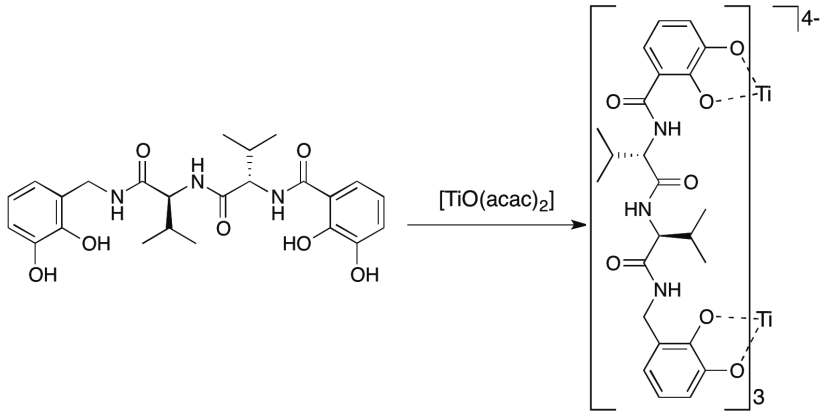


Figura 1.42: Formación de un trihelicato peptídico de Ti(IV).[40]

Recientemente, Yashima *et al.* sintetizaron trihelicatos dinucleares de Fe(II) derivados de hebras constituidas por dos grupos bpy (introducidos como 5Bpac) como unidades enlazantes terminales y separadas por una diamina acoplada a un tripéptido [Aib-(L)Leu-Aib] a través de cada uno de sus átomos de N (*Figura 1.43*). [59]

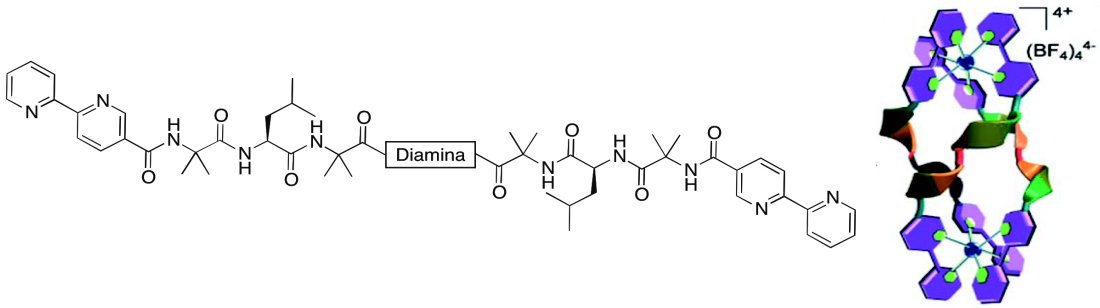


Figura 1.43: Hebra y helicato peptídico desarrollado por Yashima *et al.*[59]

Hannon *et al.* exploraron la posibilidad de acoplar péptidos a cilindros supramoleculares para intentar conseguir agentes de unión al ADN al surco mayor que presentasen mayor especificidad de secuencia. Con esa idea conjugaron una secuencia de tres aminoácidos (Gly-Gly-Ser-$CONH_2$) a los extremos de un helicando bisbipiridilimínico, obteniéndose trihelicatos de Fe(II) y dihelicatos de Cu(I) y Ag(I). Las glicinas fueron incluidas para actuar como espaciador por su menor impedimento estérico, por otro lado, la serina fue elegida para el extremo C-terminal por ser un aminoácido muy común en motivos de reconocimiento proteína-ADN.[131]

Por otra parte, el uso de aminoácidos quirales ha demostrado ser útil para la obtención de helicatos ópticamente puros y también para modificar sus propiedades. Hannon *et al.* acoplaron un residuo de L/D-Arg en los extremos de un helicando bispiridilimínico, obteniendo así helicatos de Fe(II) solubles en agua, cuyo giro (M o P) está definido por la quiralidad de la arginina (L o D) (*Figura 1.44*).[132]

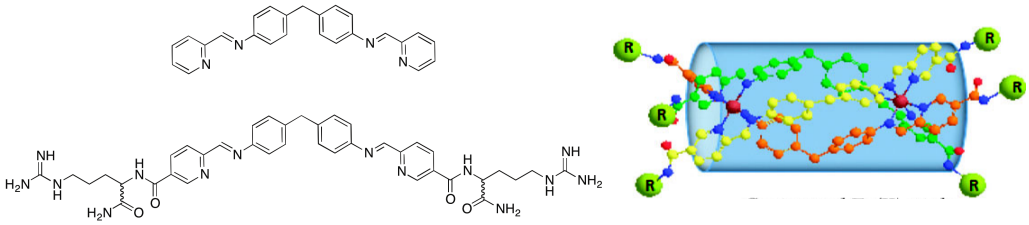


Figura 1.44: A la izquierda comparativa entre la estructura del ligando básico (arriba) y del ligando funcionalizado con arginina; a la derecha, estructura del helicato enantioméricamente puro.[132]

En todos los casos arriba descritos, la síntesis de los helicandos peptídicos se llevó a cabo en disolución y no a través de una metodología sintética de péptidos en fase sólida, y en ningún caso se construyeron de forma modular desde su extremo N-terminal al C-terminal. Por otra parte, dos de los cinco ejemplos encontrados contienen un único aminoácido en su estructura, por lo que ni tan siquiera pueden ser considerados de forma estricta como helicatos peptídicos.

1.3.5 APLICACIONES DE LOS HELICATOS

Las propiedades de los helicatos están definidas por los iones metálicos y los ligandos que los conforman. Seleccionando cuidadosamente los *building blocks* podemos definir o modular las

características químicas o estructurales de estas metalosupramoléculas para que puedan ejecutar determinadas funciones.

Los helicatos son sistemas muy versátiles, y presentan potenciales aplicaciones como sensores, [133] cristales líquidos, [134] máquinas moleculares, [135] puertas lógicas, [136] materiales magnéticos [137] o catalizadores.[138] También se les han encontrado aplicaciones en el campo de la Química Biológica como sondas fluorescentes o como agentes de unión al ADN, de las que hablaremos más adelante.

1.4 Luminiscencia

1.4.1 CONCEPTOS GENERALES

La utilización de técnicas luminiscentes en investigación biológica ha aumentado considerablemente durante los últimos años debido a su simplicidad, a su alta sensibilidad y especificidad y la posibilidad de obtener información espacial y temporal con gran resolución. Estas técnicas han encontrado aplicación tanto en el estudio de la estructura y dinámica de las biomoléculas como de sus funciones e interacciones.[139]

Se denomina luminiscencia a la emisión de fotones desde especies electrónicamente excitadas. Existen diferentes tipos de luminiscencia que se clasifican en función del modo de excitación:

- *Fotoluminiscencia*: (fluorescencia y fosforescencia), cuando las moléculas se excitan por absorción de luz (fotones).
- *Electroluminiscencia*: cuando las especies se excitan a través de un campo eléctrico.
- *Quimioluminiscencia*: cuando las moléculas se excitan por procesos químicos.[140]
- *Bioluminiscencia*: cuando las moléculas llegan al estado excitado mediante reacciones químicas producidas en organismos vivos.[141]

Cuando una molécula se excita por absorción de un fotón se produce el tránsito de un electrón desde su estado fundamental a un estado cuántico excitado. Estos tránsitos deben cumplir determinadas reglas. La molécula, desde su estado excitado, suele regresar al estado fundamental mediante la emisión de fluorescencia, pero también son posibles otras vías de desactivación, como la conversión interna (que origina la vuelta al estado fundamental sin emisión de fluorescencia), el cruce intersistema (que posiblemente esté seguido por la emisión de fosforescencia) o las interacciones con otras moléculas de su entorno dando lugar a procesos de transferencia electrónica o formación de excímeros o excíplejos. Los procesos de desactivación más importantes están recogidos en el diagrama de Perrin-Jablonski (*Figura 1.45*).[142]

Generalmente, la emisión de fluorescencia se produce entre los niveles $S_1 \rightarrow S_0$. La emisión de fosforescencia se debe a la transición entre

los niveles $T_1 \rightarrow S_0$ y es un proceso prohibido que generalmente no se observa a temperatura ambiente y en disolución, ya que son más rápidos otros procesos de desactivación no emisivos. En cambio, a bajas temperaturas y/o en medios rígidos, puede observarse la emisión de fosforescencia. Además, el tiempo de vida en el estado triplete es suficientemente largo como para que pueda producirse la emisión durante segundos, minutos o más tiempo. Se define el rendimiento cuántico de fluorescencia (φ) como la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones empleados en la excitación.

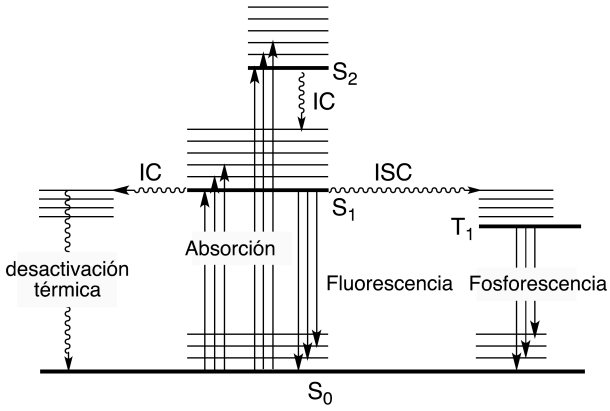


Figura 1.45: Diagrama de Perrin-Jablonski de los principales procesos que se pueden producir cuando una molécula absorbe un fotón y pasa a un estado excitado. La molécula también puede volver al estado fundamental mediante un proceso de desactivación no radiante o intercambiar su estado excitado de singlete a triplete en un proceso conocido como cruce intersistemas.

En un proceso de emisión de fotoluminiscencia, el espectro, el rendimiento cuántico y el tiempo de vida se ven afectados por las interacciones que se producen entre la molécula excitada y sus proximidades, lo que permite obtener información sobre el microentorno de la molécula fotoluminiscente. El estado excitado puede evolucionar a través de multitud de procesos que influirán en los parámetros de luminiscencia.

1.4.2 SENSORES FLUORESCENTES SENSIBLES A LA POLARIDAD DEL MEDIO

La polaridad del medio juega un papel muy importante en numerosos fenómenos físicos, químicos, bioquímicos y biológicos. Desde 1862 se conoce la influencia que los disolventes tienen sobre la velocidad de las reacciones y sobre el equilibrio químico.[143] Esta dependencia del

disolvente también se observa en espectros realizados a distintas especies mediante diferentes técnicas espectrofotométricas (UV/Vis, IR, fluorescencia, RMN, etc.).[144]

Los cambios en las bandas de absorción o emisión de una especie pueden ser producidos por cambios en la composición del disolvente. Estos cambios se conocen como cambios solvatocrómicos y son evidencia experimental de un cambio en la energía de solvatación. En otras palabras, cuando una molécula de soluto está rodeada de moléculas de disolvente, su estado fundamental y su estado excitado se encuentran más o menos estabilizados en función de las interacciones que se producen entre el soluto y el disolvente. Se denominan compuestos solvatocrómicos a aquellos cuyos espectros de absorción o emisión dependen de la polaridad del disolvente.[145]

Existen numerosos compuestos sensibles a la polaridad del medio. Normalmente son compuestos que emiten débilmente en medios polares y en disolventes próticos pero que, sin embargo, presentan un rendimiento cuántico de emisión elevado cuando se encuentran en disolventes hidrofóbicos o se transfieren a entornos apolares, como en membranas plasmáticas, en bolsillos apolares de proteínas o en los surcos del ADN, donde se encuentran menos expuestos al disolvente. No obstante, se conocen también moléculas que presentan mayor emisión en medios polares que apolares.[146]

1.4.3 PROPIEDADES FOTOFÍSICAS DE LOS COMPLEJOS POLIPIRIDÍNICOS DE RU(II)

Los compuestos polipiridínicos de Ru(II) presentan, debido a sus importantes propiedades fotofísicas, multitud de aplicaciones en el campo de la Química Biológica. En esta introducción comentaremos algunas de sus propiedades fotofísicas más importantes y discutiremos brevemente las diferencias existentes entre los compuestos tris-bidentados, como por ejemplo el $[Ru^{II}(bpy)_3]^{2+}$, y los complejos bis-tridentados, como el $[Ru(tpy)_2]^{2+}$, con el objeto de ilustrar la gran influencia que tiene la estructura de los compuestos sobre sus propiedades fotofísicas.

1.4.3.1 Estados excitados de los complejos polipiridínicos de Ru(II)

En la *Figura 1.46* se representan los posibles estados excitados de este tipo de complejos, incluyendo los diferentes procesos de desactivación de esos estados excitados, y las reacciones fotoquímicas que pueden tener lugar, incluyendo procesos radiantes, no radiantes y procesos activados. [147,148]

Tras la excitación electrónica, se puebla el estado excitado de menor energía ^{1}MLCT. Debido al efecto del átomo pesado, ocurre una interconversión de espín en menos de 1 ps al estado triplete ^{3}MLCT, con un rendimiento cuántico cercano a la unidad. Se cree que este estado excitado consiste en un clúster de tres estados excitados muy próximos en energía. Los tres estados tienen propiedades similares pero no idénticas. Sin embargo, a 77 K, los tres estados pueden considerarse un único estado ^{3}MLCT.

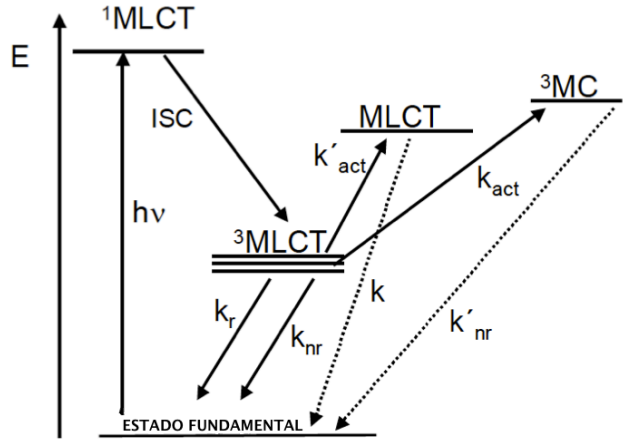


Figura 1.46: Esquema de los estados excitados para los compuestos polipiridínicos de Ru(II). Se denota por la letra k las constantes de velocidad para cada uno de los procesos: radiante (r), no radiante (nr), proceso activado (act).

En ausencia de cualquier tipo de *quencher* externo, la desactivación desde el estado ^{3}MLCT ocurre principalmente mediante emisión de radiación electromagnética, desactivación no radiante o por un proceso de activación térmica a un estado excitado de mayor energía, como por ejemplo el ^{3}MC u otros estados MLCT. La existencia de un cuarto nivel MLCT es ideal para medidas de emisión polarizada, como para estudios de emisión dependientes de la temperatura. Se cree que este estado excitado de alta energía MLCT es un singlete con menor tiempo de vida

media que los estados ^{3}MLCT. La diferencia de energía entre este estado singlete y el estado excitado de menor energía (^{3}MLCT) está comprendida entre 400 y 1000 cm^{-1}.

Dependiendo de la diferencia de energía y de la distribución de los estados ^{3}MLCT y ^{3}MC, la activación térmica puede resultar en que se establezca el equilibrio entre el estado de menor energía ^{3}MLCT y el estado de mayor energía, o en que se produzca una activación térmica irreversible y posterior desactivación a través del estado ^{3}MC. Una vez en el estado ^{3}MC, la desactivación no radiante suele ser muy rápida debido a la gran distorsión estructural con respecto al estado fundamental. Si la diferencia de energía entre el estado radiante ^{3}MLCT y el estado ^{3}MC es pequeña, se observará una disminución significativa en el tiempo de vida de dicho estado. La especie $[Ru^{II}(tpy)_2]^{2+}$ y compuestos análogos con ligandos tridentados, generalmente presenta una diferencia de energía entre los estados ^{3}MLCT y ^{3}MC más pequeña que los derivados bipiridínicos $[Ru^{II}(bpy)_3]^{2+}$, y como consecuencia unos tiempos de vida menores a temperatura ambiente. Consecuentemente, la distribución de los estados excitados, como la diferencia de energía entre ellos, es muy importante para las propiedades y comportamiento fotofísico de los derivados polipiridínicos de Ru(II). [149]

Aunque la descripción que se lleva a cabo en la *Figura 1.46* es generalmente cierta para los compuestos polipiridínicos de Ru(II), existen excepciones cuando cobran importancia los estados electrónicos centrados en el ligando (LC), los denominados estados de transferencia de carga "oscuros", como los derivados del ligando dppz.

1.4.3.2 Estabilidad

La estabilidad es una propiedad muy importante en los complejos fluorescentes con aplicaciones en Química Biológica. Aunque el compuesto prototipo $[Ru^{II}(bpy)_3]^{2+}$ se considera generalmente fotoestable, existe una considerable degradación del complejo durante la exposición a la radiación electromagnética. Una vez poblado el nivel ^{3}MC, puede producirse la rotura de enlaces Ru-N, dando como resultado especies pentacoordinadas. Estas especies pueden volver a dar la especie octaédrica, o bien, cuando existen aniones coordinantes en el medio, formar una especie hexacoordinada con uno de los ligandos bpy coordinado únicamente a través de un átomo de N. Esta última especie

puede evolucionar mediante un mecanismo de reordenamiento de los ligandos, dando lugar así a la especie tris-bidentada, o bien, perder completamente el ligando bpy monodentado. Normalmente los complejos bis-tridentados de Ru(II) son más resistentes a la fotosustitución, dado que cada ligando tiene tres enlaces Ru-N en lugar de dos. Esto también explica la baja estabilidad de los compuestos de coordinación de Ru(II) con ligandos monodentados como la piridina (py).[150]

1.4.3.3 Propiedades de absorción

Cuando ligandos aceptores π, como los ligandos polipiridínicos, se encuentran coordinados al Ru(II), [151] el complejo en su estado fundamental puede mostrar intensas bandas MLCT en la región del espectro visible. Este comportamiento es común tanto para complejos bis-tridentados como para tris-bidentados, aunque en los primeros se suele observar un desplazamiento de la banda a longitudes de onda mayores (desplazamiento hacia el rojo). En el espectro electrónico también se pueden observar transiciones MC y LC para estos compuestos. El resto de cationes divalentes del grupo VIII también presentan estos mismos tránsitos electrónicos, pero la diferente distribución energética explica sus diferentes propiedades fotofísicas: que los complejos de Fe(II) no son fluorescentes y los de Os(II) presenten tiempos de vida menores.[152]

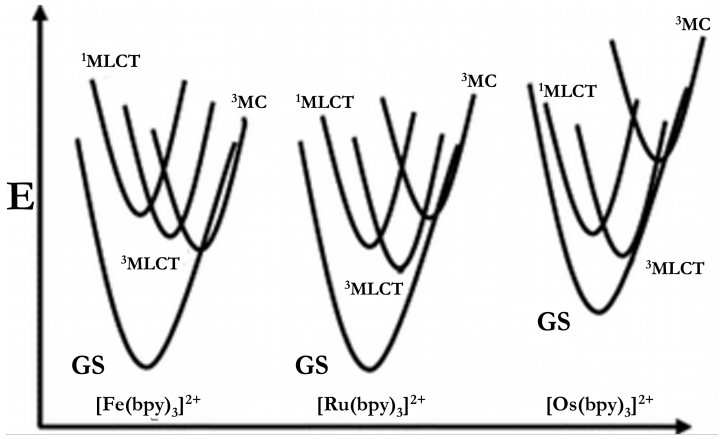


Figura 1.47: Distribución y energía de los diferentes estados electrónicos para los compuestos trisbipiridínicos del grupo VIII (M^{II}), con configuración electrónica d^6.[152]

Las posibles transiciones electrónicas y el correspondiente espectro de absorción para la especie $[Ru^{II}(bpy)_3]^{2+}$ se muestran en la *Figura 1.48*.[153] El coeficiente de extinción para el tránsito electrónico al estado

[1]MLCT depende de la capacidad para deslocalizar el electrón excitado sobre uno de los ligandos. Estos complejos presentan por lo general coeficientes de extinción altos. [154]

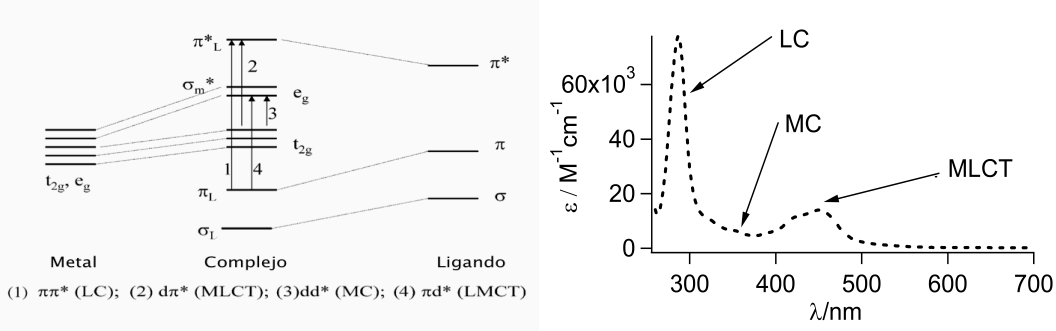


Figura 1.48: A la izquierda, posibles tránsitos electrónicos en los compuestos trisbipiridínicos de Ru(II); a la derecha, espectro de absorción correspondiente a la especie $[Ru^{II}(bpy)_3]^{2+}$.[153]

1.4.3.4 Propiedades de emisión

Las propiedades de emisión de los compuestos polipiridínicos de Ru(II) nos dan mucha información sobre la naturaleza del estado excitado de menor energía, generalmente el estado [3]MLCT, el cual es importante en su función como sonda fluorescente.[155] Por lo general estos complejos presentan bandas de emisión intensas centradas en el visible o infrarrojo cercano.

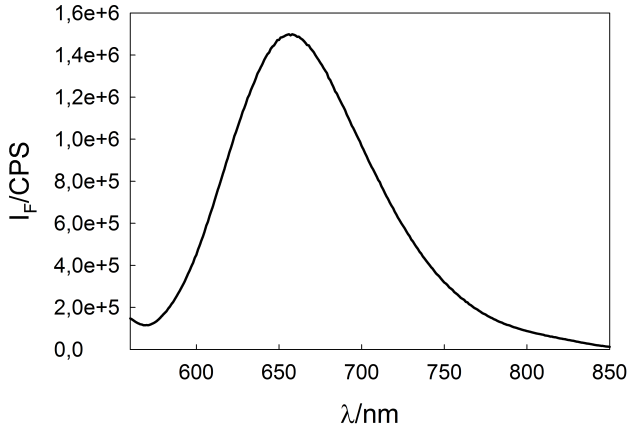


Figura 1.49: Típico espectro de emisión de un complejo trisbipiridínico de Ru(II) en H_2O.

Los tiempos de vida observados a temperatura ambiente en los complejos polipiridínicos de Ru(II) varían en el rango de picosegundos (ps) a microsegundos (μs). Los dos factores más importantes que influyen en el tiempo de vida son la energía de campo de los ligandos y la diferencia de energía entre el estado fundamental y el excitado. Esto

significa que cuanto más octaédrico sea un complejo, mayor tiempo de vida presentará su estado excitado. Esto explica que el complejo $[Ru^{II}(tpy)_2]^{2+}$ (τ_{em} 0.25 ns) presente menor tiempo de vida que su análogo $[Ru^{II}(bpy)_3]^{2+}$ (τ_{em} 1s), debido a que, generalmente, los ligandos tridentados otorgan una mayor rigidez estructural que los bidentados. Existen diversas estrategias para incrementar el tiempo de vida de los complejos con ligandos bidentados.

La distribución de los niveles energéticos es considerablemente diferente para las especies modelo $[Ru^{II}(bpy)_3]$ y $[Ru^{II}(tpy)_2]$. La energía de activación (ΔE_a) necesaria para la transición entre los estados electrónicos ^{3}MCLT y ^{3}MC es considerablemente más baja en el caso del derivado terpiridínico, haciendo que este tipo de compuestos sea más susceptible a una desactivación no radiante desde su estado excitado ^{3}MC (*Figura 1.50*).[156]

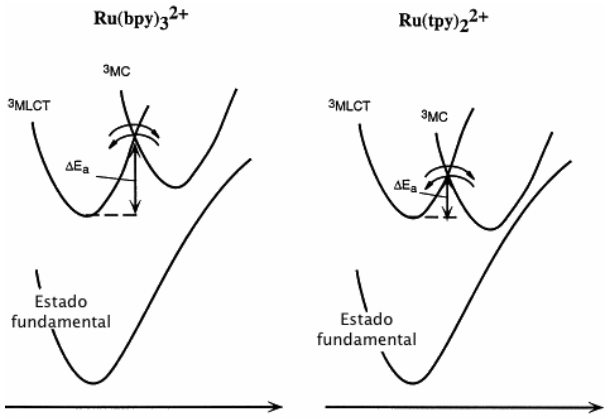


Figura 1.50: Distribución y energía de los diferentes estados electrónicos para los compuestos $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ y $[Ru(tpy)_2]^{2+}$.[156]

1.5 Química Biológica Inorgánica

1.5.1 QUÍMICA BIOLÓGICA: LA FRONTERA ENTRE LA QUÍMICA Y LA BIOLOGÍA

Hasta hace poco las disciplinas tradicionales de la química y la biología crecieron y evolucionaron de forma separada y diferente. La química parecía mantenerse en una postura más conservadora, analítica y cerrada; los químicos centraban su interés únicamente en las moléculas y en la obtención de datos exactos. Por el contrario, la biología, que en aquel momento era fundamentalmente fenomenológica, se interesaba por los procesos que ocurrían en las células y en los organismos, usando técnicas menos precisas, por lo que podríamos considerarla como una disciplina más ecléctica.

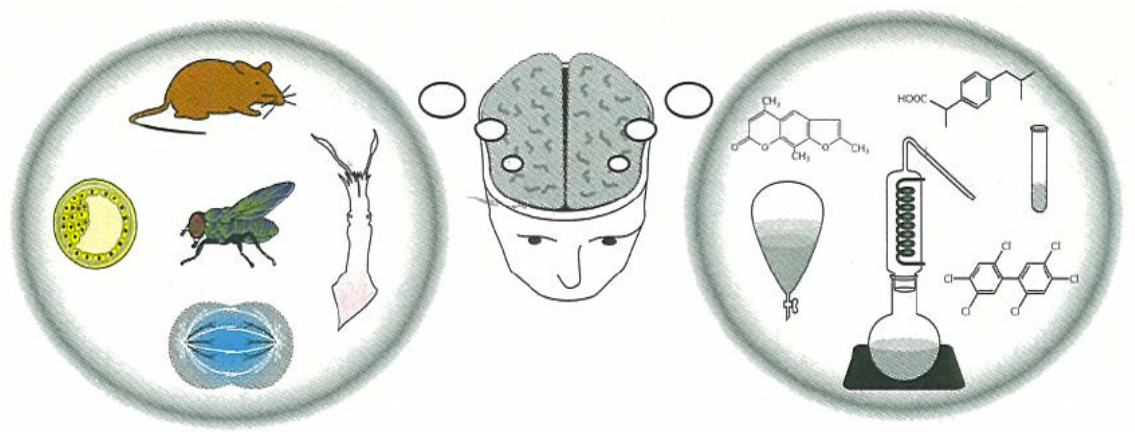


Figura 1.51. Representación clásica de la diferencia entre la biología y la química.

Con el nacimiento de la bioquímica y la aparición de la genética en el siglo XIX hubiera podido esperarse que se forjase un puente entre de las dos disciplinas. Sin embargo, paradójicamente, la química y la biología continuaron evolucionando de forma separada. Cabe destacar que esta postura reduccionista de la ciencia tuvo éxito en su momento al limitar la complejidad de los sistemas biológicos, los cuales no podrían ser abordados de otra manera con las técnicas de la época.

Las transformaciones ocurridas en la segunda mitad del siglo XX crearon un punto de inflexión en las ciencias de la vida gracias a las aportaciones de los químicos: desde el desciframiento del código genético humano y la determinación de la estructura y la relación íntima entre numerosas biomacromoléculas importantes,[157] hasta el desarrollo de la

metodología adecuada para sintetizar moléculas de relevancia biológica, tanto moléculas pequeñas, como macromoléculas o (bio)polímeros (proteínas[158] y ácidos nucleicos[159]). Estos avances, junto con el desarrollo de nuevas técnicas de análisis, como la secuenciación de ADN, la tecnología de *arrays*, los ensayos masivos, PCR... y los avances en las técnicas de difracción de rayos X, RMN, análisis de masas, e imagen, permitieron estudiar con detalle los procesos biológicos y bioquímicos, *in vitro*, *in vivo* e, incluso, en organismos vivos. Todos estos acontecimientos impulsaron el desvanecimiento de las fronteras clásicas de la ciencia y ahora la química se presenta como el lenguaje esencial para entender de forma racional las transformaciones que ocurren en los seres vivos,[160] ya que los procesos biológicos no son más que procesos químicos y por tanto, pueden y deben ser estudiados a nivel molecular.

La acción conjunta de la química y la biología en la elucidación de las bases moleculares de los procesos biológicos conlleva una serie de ventajas. Así, por ejemplo, a pesar del incuestionable valor del desciframiento del código genético, este hito no ha hecho más que poner sobre la mesa una serie de nuevos retos. El conocimiento de los genes es muy relevante, pero no suficiente para interpretar toda esa información en un contexto celular y relacionarlo con las consecuencias bioquímicas últimas. De hecho, dicho conocimiento no determina qué proteínas serán expresadas, ni bajo qué condiciones, ni tampoco el destino final de la célula. En este contexto la química juega un papel fundamental al proporcionar las herramientas para entender las interacciones entre biomoléculas y para intentar manipularlas de forma programada.

Otra limitación de los métodos biológicos y bioquímicos clásicos reside en las grandes dificultades para estudiar en tiempo real los cambios celulares, aunque no por ello estos métodos deben ser menospreciados, dado la utilidad que tuvieron en el descubrimiento de las rutas bioquímicas. Los sistemas vivos son dinámicos y las aproximaciones químicas mediante el uso de moléculas sintetizadas a medida como, por ejemplo, compuestos enmascarados (*caged*) o modulables mediante señales externas, permiten introducir parámetros de control espacial y temporal para estudiar los fenómenos biológicos.[161]

En la actualidad existe un gran interés por la disciplina denominada *Química Biológica (Chemical Biology)*,[162] que puede ser entendida como la rama de la ciencia enfocada al desarrollo y uso de

técnicas químicas para estudiar los fenómenos biológicos.[163] De todos modos, es importante resaltar que esta definición debe entenderse de forma sinérgica, como el uso de la química para avanzar en el entendimiento molecular de la biología y el aprovechamiento de los conocimientos biológicos adquiridos para avanzar en los estudios de tipo químico. [164] El carácter interdisciplinar de esta ciencia hace muy complicado establecer un campo exacto de acción.[165] Abarca materias tan diversas como el reconocimiento biomolecular, la catálisis enzimática, la señalización celular, los procesos de internalización y transporte, la síntesis de biomoléculas o la regulación de la expresión genética.

El concepto de química biológica parece algo totalmente novedoso y una prueba contundente del impacto y potencial de este área en la actualidad es la aparición, a partir de la década de los noventa, de varias revistas especializadas en esta temática tales como: *Chemistry & Biology*, *ChemBioChem*, *Current Opinion in Chemical Biology* y otras aun más recientes como *ACS Chemical Biology* y *Nature Chemical Biology*. Asimismo, se han incorporado programas específicos de formación en universidades, [166] incluso algunos departamentos de gran relevancia mundial han cambiado su nombre para incluir el nuevo término *Chemical Biology*. De todos modos, dicho concepto no es algo completamente original de nuestros tiempos, pues la misma idea básica ya se había puesto en práctica a finales del siglo XVIII.[167] El primer químico biológico, puede que haya sido el descubridor del óxido de nitroso, Joseph Priestley, (1733–1804) quien para aumentar los conocimientos de la química de dicho gas, incubaba ratones con él. Durante el siglo XIX hubo algunos investigadores más que siguieron esta filosofía interdisciplinar de la ciencia.

1.5.2 UTILIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS METÁLICOS EN LA EXPLORACIÓN Y MANIPULACIÓN DE LA BIOLOGÍA CELULAR

Como indicamos anteriormente, el deseo de entender de qué manera las moléculas individuales que forman parte de la organización celular, interaccionan y se comunican dentro de organismo vivo, han dado lugar al floreciente campo de la Química Biológica. Estas moléculas pequeñas, ya sean sintéticas o naturales, pueden por ejemplo unirse al ADN para influir en la expresión de proteínas,[168] unirse a proteínas para

inhibir su función,[169] interaccionar con lípidos para alterar la integridad de la membrana celular,[170] o bien, emitir una señal fluorescente como respuesta a un proceso metabólico.[171] Dado que estas moléculas pequeñas pueden afectar a funciones bioquímicas, hay un claro vínculo entre la Química Biológica, la Farmacología y la Medicina. Las moléculas usadas generalmente suelen ser de naturaleza orgánica y, por el contrario, los compuestos inorgánicos se han quedado un poco al margen de la Química Biológica. Sin embargo, los iones y los complejos metálicos, debido a sus particulares propiedades químicas, electrónicas y fotofísicas, pueden ser muy útiles en una amplia gama de aplicaciones biológicas.

¿Cuáles son las propiedades que hacen tan útiles para la biología a los iones y a los complejos metálicos? Se puede hacer un breve resumen de las mismas:

- *Carga*: Los iones metálicos están cargados positivamente en disolución acuosa, y esta carga puede ser manipulada en función del entorno de coordinación, obteniéndose complejos catiónicos, aniónicos o neutros.
- *Interacciones con ligandos*: Los iones metálicos pueden unirse a ligandos mediante interacciones generalmente fuertes y selectivas. Los ligandos otorgan su propia funcionalidad y pueden ser modulados haciendo que cada compuesto de coordinación sea único en propiedades. Las propiedades cinéticas y termodinámicas de las interacciones metal-ligando tienen mucha importancia en las reacciones de intercambio de ligandos.
- *Estructura y enlace*: Los compuestos de coordinación presentan multitud de geometrías de coordinación lo que les da formas únicas en comparación con las moléculas orgánicas. Las distancias, ángulos de enlace y número de coordinación varían en función del metal y del estado de oxidación del mismo.
- *Carácter ácido de Lewis*: Los iones metálicos con gran afinidad electrónica pueden polarizar significativamente grupos funcionales que se encuentren coordinados a él, facilitando reacciones de hidrólisis.
- *Orbitales d parcialmente ocupados*: Para los metales de transición, la variedad en el número de electrones en la capa d (o f para lantánidos) confiere propiedades electrónicas y magnéticas únicas a los compuestos de coordinación.

- *Actividad redox*: Muchos metales de transición pueden dar lugar a reacciones redox.

Tabla 1.3: Papeles biológicos de diversos elementos metálicos.

Función	Elemento Metálico	Ejemplo representativo
Balance de cargas	Na, K, Ca	Canales de potasio responsables de la propagación del impulso nervioso
Estructura (macro)	Ca, Si, Zn	Biominerales en hueso, dientes, conchas y caparazones, etc.
Estructura (proteína)	Zn, Ca	Dedos de Zn, proteínas extracelulares de Ca^{2+}
Estructura (señalización en la estructura del ADN)	Mg, Mn Ca, NO, Zn	Mg^{2+} estabiliza la estructura del tRNA, la ribozima cabeza de martillo responde al Ca^{2+}, Zn^{2+} y NO
Catálisis (ácido-base)	Zn, Fe, Ni, Mn, Mg	Reacciones de hidrólisis llevadas a cabo por las carboxipeptidasas, ureasa, arginasa, etc.
Catálisis (redox)	V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, W	Enzimas involucradas en el metabolismos del O_2, fijación de N_2, formación de radicales
Transferencia de grupos o átomos	V, Fe, Co, Ni, Cu, Mo, W	Transporte de O_2, alquilantes (cobalamina)
Transferencia de electrones	Fe, Cu, Mo	Proteínas Fe-S, citocromos, proteínas azules de Cu

La Biología ha aprovechado las propiedades químicas de muchos iones metálicos y les ha asignado papeles muy importantes. Por ejemplo, los metales alcalinos y alcalinotérreos (Na^+, K^+, Ca^{2+}) son muy estables en disolución acuosa, por los que son ideales para mantener balances de cargas y conductividad eléctrica. Por otro lado, las distintas arquitecturas que se pueden alcanzar mediante la interacción metal-ligando

proporciona a los metales una labor estructural muy importante en muchas metaloproteínas. La cinética de intercambio de ligandos también está presente en la señalización celular: diferentes proteínas liberan o captan diferentes cationes (Ca^{2+} y Zn^{2+} entre otros) como señales bioquímicas. La reversibilidad de la unión metal-ligando también se explota en el transporte de moléculas fundamentales para la vida, como el O_2, que se encuentra unido de forma reversible a la hemoglobina. Por último, las propiedades de ácido de Lewis y carácter redox de muchos metales han hecho que la naturaleza los haya elegido como centros activos de metaloenzimas, encargadas de incrementar en gran medida la velocidad de procesos químicos imprescindibles para la vida.

A la hora de utilizar complejos metálicos en el campo de la Biología, no existe una limitación en función de la biodisponibilidad de los iones metálicos. Esto quiere decir que se pueden utilizar las propiedades de elementos metálicos exóticos, incluyendo no sólo iones de la segunda y tercera serie de transición, sino también los lantánidos.[27-29] Además, los compuestos de coordinación pueden conferir a los sistemas funcionalidades adicionales que no se encuentran en la naturaleza (propiedades magnéticas, fotofísicas o radiactivas) que hacen posible estudios basados en luminiscencia, resonancia magnética o radioactividad.[172]

En consecuencia, se han desarrollado herramientas químicas para Química Biológica basadas en complejos metálicos,[173] como agentes antitumorales,[174] proteasas artificiales,[175] inhibidores enzimáticos,[176] transportadores de Ca^{2+},[177] sondas para demostrar el transporte de carga en el ADN,[178] transportadores de CO y NO,[179] sondas y etiquetas para imagen molecular,[180] radiofármacos[181] entre otras. Todas estas aplicaciones biológicas que emplean complejos metálicos conforman y definen la Química Biológica Inorgánica.

Tabla 1.4: Ejemplos de elementos metálicos utilizados en Química Biológica.

Función	Elemento Metálico	Ejemplo representativo
Estructura	Ru, Rh, Pt	Actúan como andamiaje estructural en biomoléculas de forma inerte.
Señalización	Ca, NO	Compuestos que detectan Ca, NO u otras moléculas involucradas en los procesos de señalización
Luminiscencia	Tb, Eu, otros Ln	Agentes de imagen subcelular
RMI	Gd, Mn	Agentes empleados en resonancia magnética de imagen
Imagen radiactiva	^{99m}Tc, ^{64}Cu, otros	PET, SPECT
Transferencia electrónica	Rh, Ru	Transferencia electrónica fotoinducida como fotooxidantes
Redox	Fe, Cu, otros	Degradación oxidativa de proteínas, ADN; quelación para manipular la actividad redox

Sin embargo, las contribuciones de la Química de Coordinación a la Química Biológica son mucho menos abundantes si las comparamos a las aportadas por otras disciplinas como, por ejemplo, la Química Orgánica. Una de las posibles razones de este infradesarrollo podría ser la dificultad para integrar los complejos metálicos en sistemas biológicos debido a las grandes diferencias funcionales y estructurales existentes entre las biomoléculas y la mayoría de los ligandos utilizados en Química de Coordinación. Como veremos más adelante, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral es proponer una solución a este problema.

1.5.3 SONDAS FLUORESCENTES PARA LA IMAGEN MÉDICA ÓPTICA

Durante muchos años se han utilizado técnicas de imagen para ver lo que es invisible para el ojo humano. La microscopía, que empezó a utilizarse en el siglo XVI, es hoy capaz de visualizar, identificar, seguir y

manipular moléculas individuales sobre superficies, en disolución o, incluso, dentro de una célula. En medicina, la obtención de imágenes mediante rayos X o por resonancia magnética ha permitido profundizar en el conocimiento del organismo y detectar enfermedades en una etapa temprana de su desarrollo. Sin embargo, áreas como la nanotecnología, el desarrollo de nuevos materiales, o la comprensión de la función celular en estados normales y patológicos demandan la visualización de la estructura molecular, la composición química y las interacciones moleculares en espacio y tiempo reales.

En el campo de las ciencias biomédicas, esta necesidad ha tenido como consecuencia la aparición de un nuevo campo de investigación, la *imagen molecular*.[182] En él se fusionan los conceptos de la biología molecular con tecnologías no invasivas de imagen biomédica. Utilizando esta disciplina, muchos de los ensayos originalmente establecidos para estudiar sistemas bioquímicos en soluciones homogéneas o en células aisladas pueden trasladarse a una situación *in vivo*, lo que permite demostrar o refutar hipótesis biomédicas en el organismo intacto.

Un concepto clave de este campo es el de *sonda para imagen molecular*. Se llama así a cualquier compuesto capaz de proporcionar, por una parte, un componente de afinidad o especificidad que se unirá a una determinada diana biológica y, por otra parte, un componente que permite su detección externa mediante diferentes técnicas de imagen.

Dentro de la imagen molecular se agrupan cinco modalidades diferentes: la ecografía, la imagen nuclear, la tomografía de rayos x, la imagen de resonancia magnética y la imagen óptica. La imagen óptica es probablemente la técnica más extendida actualmente en la investigación biomédica para su uso *in vitro* y *ex vivo*, debido a su sencillez y a su bajo coste.[183] La imagen óptica presenta la ventaja de ofrecer una alta resolución temporal y una extraordinaria sensibilidad, que puede llegar a detectar concentraciones picomolares. Sin embargo, su aplicación *in vivo* ha estado siempre limitada por las propias propiedades físicas de la radiación luminosa. Las mayores complicaciones derivan de la dificultad que supone la detección de la luz emitida en el interior del organismo vivo en estudio, dado que el tejido biológico es parcialmente opaco en longitudes de onda UV y visible cercano.[¡Error! Marcador no definido.]

Uno de los mecanismos fotofísicos más utilizados en imagen óptica es la fluorescencia. Dado que en la fluorescencia la emisión de luz

depende de la luz incidente y no se origina como consecuencia de una reacción química, el tejido de interés deberá contener una sustancia que absorba la luz de excitación y que genere una emisión de luz como resultado. Lógicamente, la excitación ha de ser capaz de atravesar todos los tejidos intermedios hasta llegar al lugar de interés, y la emisión generada también debe ser capaz de llegar al exterior del cuerpo para poder ser detectada. Normalmente, cuando se diseñan estas sondas para uso *in vivo*, se procura que las emisiones se localicen alrededor del infrarrojo cercano (NIR, *near infrared*), dado que en esas longitudes de onda (de 600 a 900 nm, aproximadamente) la penetración en el tejido biológico es mayor. Esto hace que exista un creciente interés en el desarrollo de sondas y contrastes con fluorescencia en el NIR.[184] Muchos de estas sondas fluorescentes que trabajan en el NIR son complejos de iones metálicos lantánidos [185] y compuestos de coordinación y organometálicos de iones metálicos de la segunda y tercera serie de transición.[186]

1.6 Estructura y función del ADN

La naturaleza de los organismos vivos está determinada por sus genes, esto es, por secuencias concretas de ácidos nucleicos que codifica la síntesis de proteínas.[187] La transferencia de esta información genética de una generación a la siguiente es una cuestión fundamental para la vida. El flujo de la información genética fue postulado por Francis Crick en la reunión internacional de la *Society of Experimental Biology* en 1957 y se publicó un año después. [188] La idea básica de este postulado es el denominado *Dogma Central de la Biología* (*Figura 1.52*). [189]

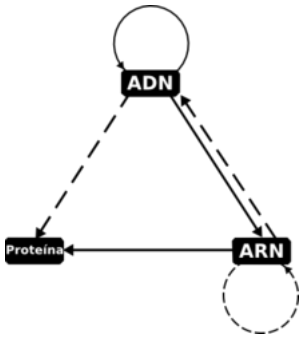


Figura 1.52: Esquema original publicado por Francis Crick: las líneas continuas representan transferencias permitidas, las punteadas posibles y la ausencia de líneas define las prohibidas según el dogma central.[188]

Según el esquema de Francis Crick la información genética se transcribe de manera unidireccional desde el ADN hasta las proteínas a través del ARN. El dogma central otorgaba al ADN un papel clave en la biología y tuvo una gran repercusión ya que sirvió como un punto de referencia para los defensores de la nueva biología molecular a finales de la década de 1950. No obstante, también fue objeto de muchas críticas, puesto que, de acuerdo con su planteamiento, la información se traduce en proteínas y éstas no pueden ser modificadas, ni afectar a los genes. La unidireccionalidad del proceso fue y sigue siendo uno de los temas de mayor controversia provocando, incluso, que el propio Crick tuviera que explicar su interpretación en un artículo completo.[190]

1.6.1 Estructura del ADN y sus implicaciones en el reconocimiento

El ADN es un biopolímero derivado de nucleótidos caracterizado por un esqueleto fosfatado altamente cargado negativamente. Se

caracteriza por tener una estructura regular de doble hélice en la que las cadenas se mantienen unidas gracias a los enlaces de hidrógeno complementarios e interacciones hidrofóbicas entre las bases nitrogenadas. Se ha observado que la doble hélice adopta diferentes conformaciones dependiendo de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, disolvente, etc.). La conformación más relevante bajo condiciones fisiológicas es la llamada B–ADN. Ésta es la conformación reconocida por la mayoría de los factores de transcripción, por lo que es conveniente resaltar algunas de sus características estructurales.[191] El B–ADN tiene un diámetro aproximado de 20 Å con 10 pares de bases por vuelta. La distancia entre los pares de bases consecutivos es de 3.4 Å y la rotación por residuo de 36º. A pesar de que se trata de una estructura bastante regular y uniforme, presenta una cierta variabilidad y existen desviaciones en los ángulos de torsión con respecto a la media. Estas variaciones son dependientes de la secuencia e importantes en las interacciones específicas con las proteínas.[192]

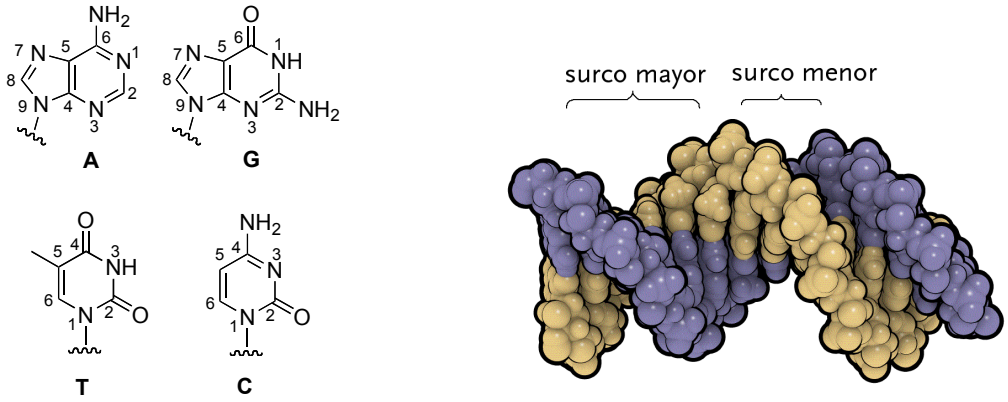


Figura 1.53: Izquierda: estructura de las cuatro bases nitrogenadas del ADN. Derecha: estructura de ADN donde se observan el surco mayor y el menor.

En la estructura de B–ADN se pueden distinguir dos surcos de distinto tamaño y con atributos geométricos diferentes. El surco mayor es ancho y relativamente poco profundo, mientras que el surco menor es estrecho y profundo. La anchura del surco menor viene determinada en gran medida por la secuencia y en general, las regiones ricas en A/T son más estrechas que las G/C. Recientemente diversos estudios sobre la hidratación de los surcos muestran diferencias desde el punto de vista termodinámico muy importantes. Se ha encontrado que la asociación en el surco mayor es un proceso dirigido principalmente por la entalpía mientras que la unión en el surco menor se caracteriza por una desfavorable entalpía compensada por la contribución entrópica.[193]

Por otra parte, analizando la estructura idealizada del B–ADN se observa que la variabilidad funcional del surco mayor es más elevada que la del surco menor. De hecho, en el surco menor los pares de bases A/T son degenerados en relación a su habilidad para formar enlaces de hidrógeno, mientras que en el surco mayor las cuatro combinaciones de los pares de bases presentan un patrón de reconocimiento diferente.[194] La suma de estos factores, junto con las diferencias en el tamaño y la hidratación, justifican el hecho de que las proteínas reconozcan el ADN preferentemente a través del surco mayor.

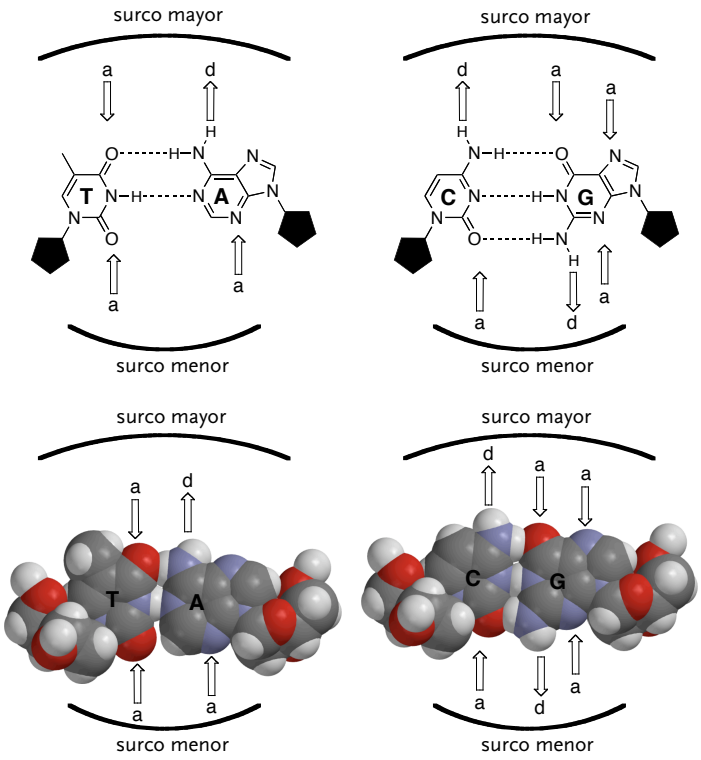


Figura 1.54: Representación del patrón de dadores (d) y aceptores (a) de puentes de hidrógeno en los pares de bases del ADN, mostrando la diferencia entre los surcos mayor y menor.

El genoma celular está organizado en cromosomas y cada uno de ellos contiene una única molécula de ADN lineal (10^7–10^9 pb). A diferencia de lo que ocurre en los organismos procariotas, los cromosomas eucariotas normalmente no se encuentran libres en el citoplasma, sino que están separados mediante la membrana o envoltura nuclear formando una masa enmarañada de fibras de un complejo proteína–ADN denominado *cromatina*. El *nucleosoma* es la unidad estructural mínima de la cromatina y está constituido por una secuencia de ADN (146 pb) enrollado a un octámero de proteínas denominadas

histonas (dos moléculas de cada histona: H2A, H2B, H3 y H4). Además del papel estructural de compactación del ADN, la cromatina también juega un papel fundamental en la regulación de la expresión facilitando o restringiendo el acceso de la maquinaria transcripcional a las cadenas de ADN y consecuentemente desencadenando o inhibiendo el proceso de la transcripción.[195]

1.6.2 EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión génica es el proceso mediante el cual la célula descodifica la información contenida en la secuencia de nucleótidos de un gen para generar una proteína. La expresión génica incluye el proceso de *transcripción*, en el que la secuencia de nucleótidos de una porción apropiada de la molécula de ADN se copia para dar lugar a una molécula de ARN, y el de *traducción*, mediante el cual el ARN se utiliza como molde para la síntesis de proteínas (*Figura 1.55*).

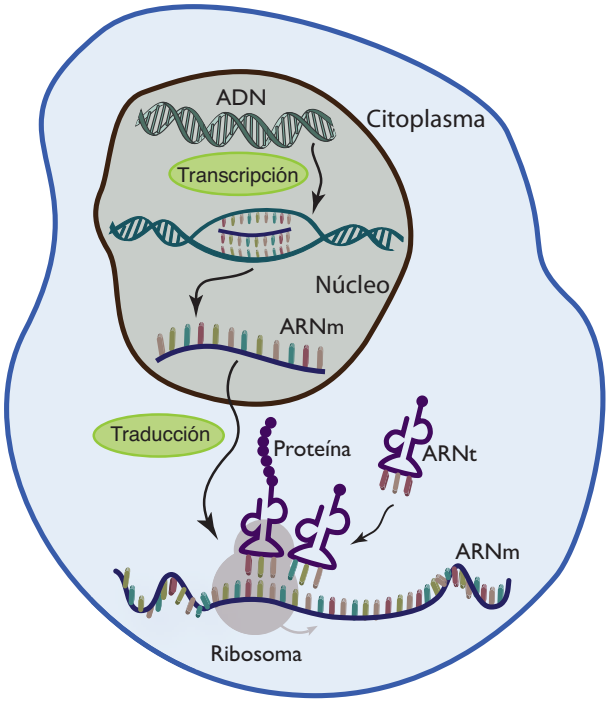


Figura 1.55: Representación del proceso de expresión génica.

En algunos casos, el producto final de la expresión génica es el propio ARN pero en la mayoría de los casos los genes determinan la síntesis de una proteína determinada. El ARN copiado de estos últimos se denomina ARN mensajero (ARNm). En células eucariotas, los transcritos de ARN (pre-ARNm) están sujetos a un procesamiento en el

núcleo (modificaciones, corte y empalme) antes de dar lugar al ARNm maduro que será transportado al citosol para su traducción.[196] El flujo de información genética en las células se produce, por tanto, desde el ADN al ARN y de este hacia las proteínas.[197]

La expresión génica es un proceso perfectamente regulado en el espacio y en el tiempo, y sigue un patrón específico en cada célula, lo que determina su morfología y función. Este control puede producirse en cualquiera de sus etapas, pero en la mayor parte de los casos la regulación de la expresión génica se produce en la etapa de la transcripción.[198]

1.6.3 LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA Y SU REGULACIÓN

Como se ha señalado anteriormente, la transcripción génica es el proceso de transmisión de la información genética del ADN al ARN. Una de las cadenas sencillas del ADN actúa como hebra molde (hebra codificante) y determina el orden en que los monómeros de ribonucleósido trifosfato se incorporan para formar la cadena de ARN complementaria. Las bases de dichos monómeros se aparean con las bases de la hebra molde del ADN y se unen en una reacción de polimerización catalizada por el enzima ARN polimerasa.[199]

La regulación del proceso de transcripción génica se produce fundamentalmente durante la etapa de iniciación requiriendo para ello un complejo que contiene la ARN polimerasa y proteínas conocidas como *factores de transcripción* (*FT*).[200] Este complejo se une al ADN en la zona promotora, migra a un lugar de iniciación e incorpora los primeros nucleótidos.[201] La transcripción de los genes varía en función del conjunto de factores de transcripción que se expresan y se activan en cada tipo de célula y en cada momento, lo que supone que la actividad de los factores de transcripción debe estar estrictamente regulada. De hecho muchos factores de transcripción regulan procesos de expresión de genes responsables de controlar diferentes etapas del ciclo celular, por lo que si se encuentran continuamente activos pueden dar lugar a una proliferación celular incontrolada.

1.6.4 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y SU INTERACCIÓN CON EL ADN

El reconocimiento específico de secuencias de ADN por los factores de transcripción se basa en la complementariedad química y estructural de sus superficies moleculares. En la mayoría de los casos, la unión de factores de transcripción al ADN no afecta al apareamiento de las bases del ADN, puesto que el reconocimiento tiene lugar a través de interacciones entre los grupos funcionales expuestos de las bases y los de las cadenas laterales de los aminoácidos. Un análisis simple de los grupos funcionales muestra que el patrón dador-aceptor del surco mayor es más variable y contiene más información que en el surco menor.[202] De hecho, los patrones de los pares A/T y T/A en el surco menor son degenerados. La mayoría de los factores de transcripción reconocen secuencias específicas del ADN. Esta especificidad está fundamentalmente determinada por las interacciones a través del surco mayor del ADN.

1.7 Interacción entre moléculas pequeñas y el ADN

Uno de los campos más activos en Química Biológica y en Química Médica es el desarrollo de moléculas con utilidad terapéutica, incluyendo las que tienen el ADN como diana. En este contexto, la reciente aprobación del uso del agente de reconocimiento del surco menor *trabectedina* (Yondelis) para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos y del cáncer de ovario, ha hecho resurgir el interés por las moléculas pequeñas que interaccionan con el ADN.[203]

Por otra parte, el descubrimiento del origen genético de múltiples enfermedades, así como la influencia del genotipo en la respuesta a medicamentos, hace que la detección de secuencias específicas del ADN tenga un enorme potencial diagnóstico y clínico.[204] Actualmente la mayor parte de los métodos de detección específica de secuencias de ADN se basan en la hibridación de fragmentos de ADN de cadena sencilla utilizando secuencias complementarias apropiadamente modificadas con grupos fluorescentes.[205, 206] A pesar de los enormes esfuerzos en esta área, el reconocimiento de secuencias específicas del ADN es todavía un problema que no ha sido resuelto por la Química Biológica.[207] Sin embargo, además de la búsqueda de moléculas con

exquisita selectividad,[208] tambíen se ha encontrado que los fármacos moderadamente selectivos también pueden tener importantes aplicaciones prácticas.

Entre los agentes clásicos de reconocimiento específico del ADN destacan los compuestos de coordinación de metales pesados y las moléculas orgánicas pequeñas que reconocen el surco menor del ADN. Los compuestos estudiados hasta la fecha presentan muchas limitaciones, entre las que destacan los problemas de especificidad en la secuencia de unión de ADN, y la consiguiente toxicidad, los problemas en la estabilidad química y en la internalización celular, que dificultan su aplicación terapéutica, o que están restringidos casi en su totalidad al surco menor del ADN, menos interesante que el mayor por ser este en donde se producen los procesos de transcripción genética. Por otra parte, los estudios sobre agentes metálicos de unión al ADN son poco clarificadores, en parte por la deficiente biocompatibilidad de sus ligandos precursores, por su elevada labilidad en medio fisiológico y también porque su derivatización estructural es sintéticamente complicada, lo que dificulta enormemente la realización de estudios sistemáticos.

1.7.1 MODOS DE UNIÓN DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS AL ADN

En general estos compuestos pueden interaccionar con los ácidos nucleicos de cinco formas diferentes.[209]

1.7.1.1 Interacción electrostática externa

La superficie polianiónica del ADN puede interaccionar con cationes metálicos del grupo I y II, confiriendo dicha unión estabilidad a la conformación plegada del ADN. Del mismo modo existen moléculas orgánicas catiónicas (espermina, espermidina, etc.) que estabilizan el ADN al evitar las fuerzas repulsivas entre los fosfatos y provocando la liberación de contraiones, lo que proporciona una contribución entrópica a la energía del enlace.[210] Estas uniones poseen cinéticas de complejación rápidas ($Ka \sim 10^8$–$10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$) pero son no específicas en términos de secuencia. Un ejemplo reciente de compuestos que interaccionan de este modo son los oligómeros trinucleares de Pt(II), los cuales, al no poseer

grupos reactivos, solamente puede interaccionar con el ADN a través de interacciones electrostáticas y enlaces de hidrogeno (*Figura 1.56*).[211]

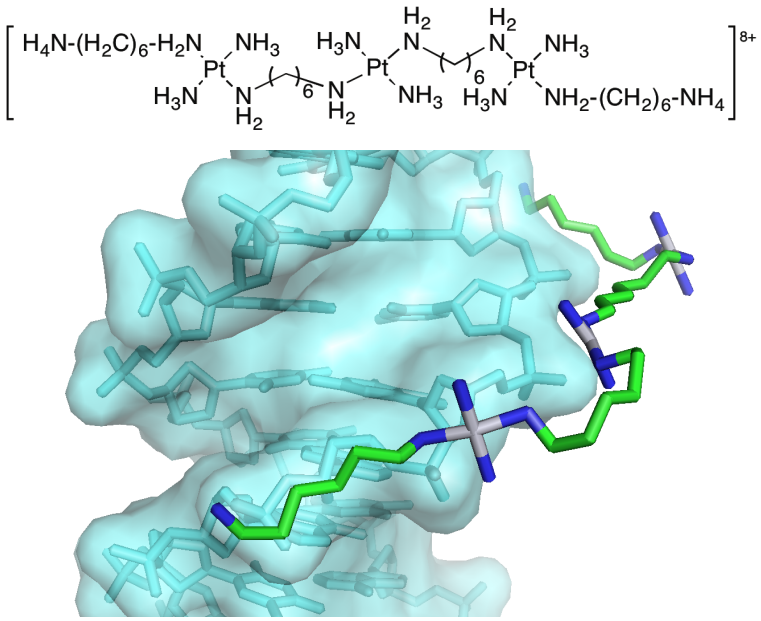


Figura 1.56: Arriba, estructura del complejo octacatiónico de Pt(II); abajo, representación del modo de interacción con el ADN a través de enlaces de hidrógeno y fuerzas electrostáticas (PDB: 2DYW).[211]

1.7.1.2 Intercalación

Un intercalante es un compuesto aromático que se puede situar entre los pares de bases de un ácido nucleico. Una característica estructural común de todos los agentes intercalantes es que son sistemas aromáticos π–deficientes de dos o más anillos de seis eslabones (el naftaleno constituye la superficie mínima). Las interacciones de apilamiento π junto con las interacciones que pueden surgir entre el resto de la molécula y el ADN (interacciones de transferencia de carga, enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas) ayudan a que la estabilidad de estos aductos sea en algunos casos comparables a un enlace covalente, como el caso del cisplatino.[212] Estas interacciones se pueden producir con ciertos pares de bases pero, dado que el número de contactos es menor que en el caso de agentes que se unen a los surcos, es más difícil conseguir un reconocimiento de secuencia.[213,214]

Un ejemplo típico de intercalante es el bromuro de etidio, que se utiliza de forma habitual en el marcaje fluorescente de ADNs y en la determinación de constantes de afinidad por competición (FID: *Fluorescent Intercalator Displacement*).[215]

También existen ejemplos de compuestos de coordinación que se unen de esta misma forma al ADN. El complejo de rodio Δ-[Rh(Me2Trien)Phi]$^{3+}$, intercala su anillo de fenantrenoquinona entre dos pares de bases del biopolímero (*Figura 1.57*).[216] Estos compuestos metalointercalantes poseen propiedades características (fotofísicas, redox, etc.) que las convierte en una herramienta muy útil para el estudio y modificación de sistemas biológicos.

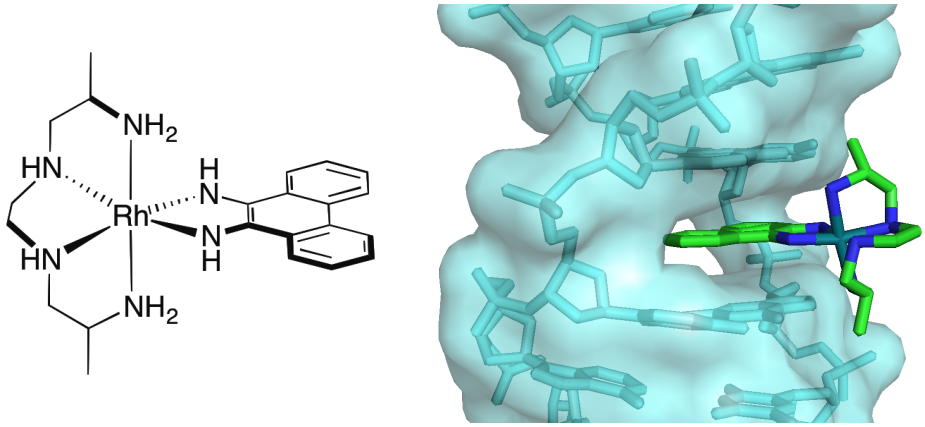


Figura 1.57: Complejo Δ-[Rh(Me2Trien)Phi]$^{3+}$ Izquierda) Estructura; Derecha) intercalando su anillo aromático entre los pares de bases del ADN (PDB: 454D).[216]

En los últimos años, la estructura clásica de los intercalantes se ha vuelto cada vez más compleja y se ha combinado, por ejemplo, con otra unidad intercalante, (bisintercalantes) con objeto de mejorar la afinidad de la interacción,[217] o derivatizado con sustituyentes que mejoran sus propiedades de especificidad y estabilidad termodinámica.[218]

1.7.1.3 Inserción

Este modo de interacción es exclusivo de los compuestos de coordinación. En el ADN pueden existir zonas concretas con pares de bases no complementarias. Esta anomalía está provocada por errores en la replicación o modificaciones químicas de las bases nitrogenadas y suele ser reparada por la célula con una colección de enzimas dedicadas a ello. Sin embargo, se sabe que el sistema de reparación se ve inutilizado en ciertos casos de cáncer de colon y de pecho. Estos desajustes pueden ser reconocidos por complejos metálicos equipados con ligandos que, dado su tamaño, no pueden intercalarse entre los pares de bases nitrogenadas, pero que sí pueden insertarse entre el par no complementario, estabilizando el apilamiento. Un ejemplo de representativo de este modo de unión es el complejo de rodio Δ-[Rh(3Mbpy)$_2$(chrisy)]$^{3+}$. El ligando

chrysi presenta una superficie demasiado grande para actuar como agente intercalante pero perfecta para insertarse entre pares de bases no complementarias (K_b = 3.4 × 10^7 M^{-1}) (*Figura 1.58*).[219]

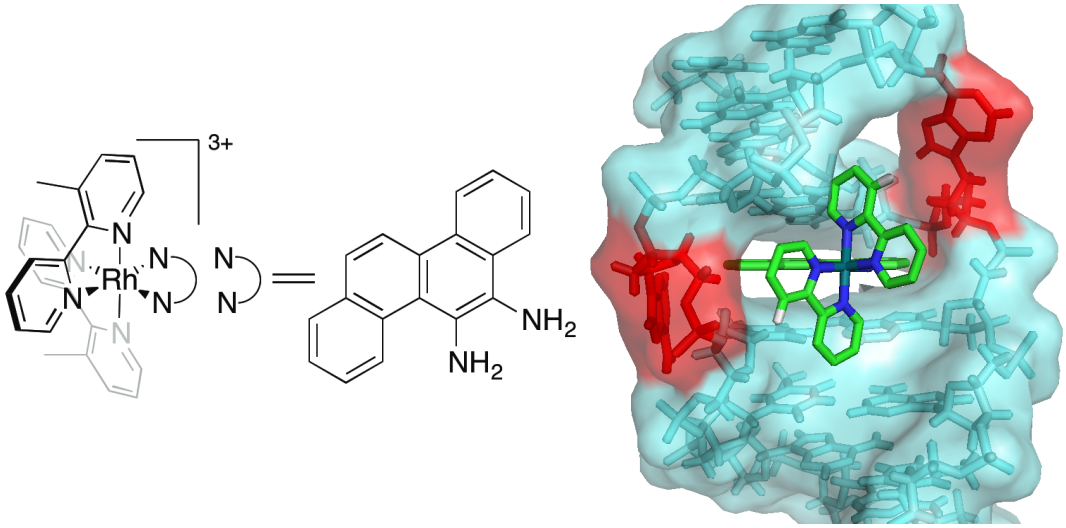
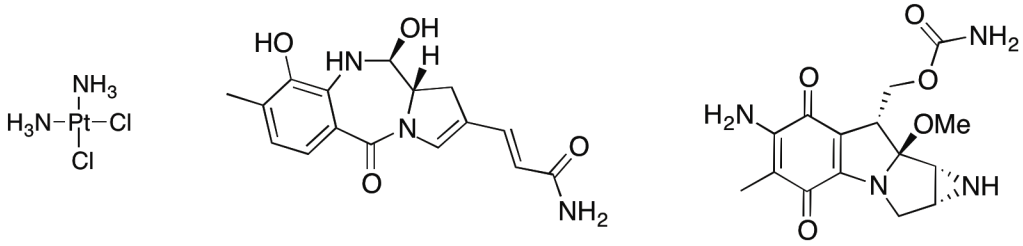


Figura 1.58: Izquierda, estructura del compuesto de coordinación de Rh(III) que se inserta en el espacio que ocuparía un par de bases complementarias; derecha, estructura cristalina del mismo complejo Δ-[Rh(3Mbpy)$_2$(chrisy)]$^{3+}$ insertado en la doble hebra del ADN (PDB: 3GSK)

Recientemente se ha descubierto un comportamiento dual del complejo Δ-[Ru(bpy)$_2$(dppz)]$^{2+}$, el cual actúa como metaloinserto cuando existen pares de bases no complementarias y como metalointercalante cuando no.[220]

1.7.1.4 Interacción covalente (agentes alquilantes)

Las moléculas que se unen o modifican covalentemente al ADN se conocen con el nombre de agentes alquilantes. Las posiciones del ADN más favorables para sufrir modificaciones son la posición N_7 y el C_2–NH_2 de la guanina y los átomos de nitrógeno N_3 y N_7 de la adenina. Dentro de este grupo se encuentran los antitumorales *cis*–platino y los antibióticos con actividad antitumoral antramicina y mitomicina A (*Figura 1.59*).



cis-platino *Antramicina* *Mitomicina A*

Figura 1.59: Estructura de algunos agentes alquilantes característicos.

1.7.1.5 Inserción en los surcos del ADN

Se ha observado que existen algunos oligonucleótidos pequeños (~ 10–20 pb) que son capaces de formar una triple hélice interaccionando a través del surco mayor del ADN. Dicho tipo de interacción se establece a través de formación de pares de bases tipo Hoogsteen.[221] Esta interacción es específica de secuencia y únicamente se observa cuando el ADN presenta una región de purinas amplia e ininterrumpida. Los agentes de unión al surco mayor se han usado para regular la expresión genética, ya que pueden alterar la funcionalidad de los factores de transcripción, que utilizan este surco para activar o silenciar genes.[222]

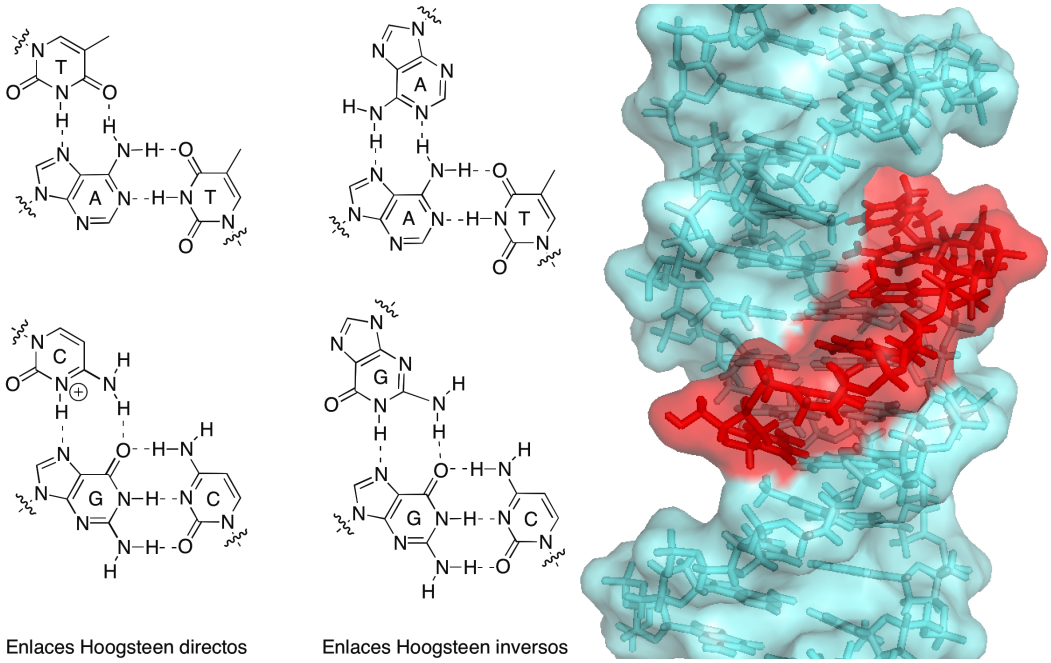
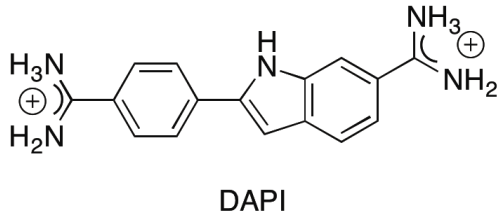


Figura 1.60: Izquierda: representación de los enlaces de Hoogsteen directos e inversos. Derecha: estructura cristalográfica de una triple hélice (PDB: 1BWG).[223]

A diferencia de lo que ocurre con los factores de transcripción, las moléculas de tamaño relativamente pequeño presentan una predisposición para unirse con selectividad de secuencia al surco menor. Los primeros productos naturales donde se observó una interacción selectiva de este tipo eran compuestos de tipo dicatiónico.[224] La interacción en el surco menor viene determinada por la formación de enlaces de hidrógeno, enlaces de van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Otro hecho común, aunque no imprescindible para la interacción, es la complementariedad de la forma (isohelicidad).[225]

En la mayoría de los casos estas moléculas son selectivas a las regiones A/T debido a que los surcos menores en esas regiones son más estrechos y profundos que en regiones ricas en pares G/C, lo que favorece la inserción al maximizar las interacciones de van der Waals. Por el contrario, en las regiones ricas en pares G/C el grupo amino de las guaninas sobresale en el fondo del surco menor, interfiriendo con la inserción.[226] Dentro de este grupo de agentes de unión al ADN se encuentran compuestos como DAPI, un agente antiparasitario cuyos efectos secundarios han impedido su uso clínico. Su uso más frecuente hoy en día es en el campo de la microscopía de fluorescencia como marcador de los núcleos celulares.



DAPI

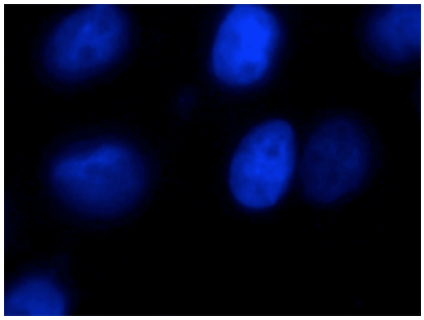


Figura 1.61: Izquierda: estructura de DAPI; derecha: núcleos de células teñidos con DAPI.

1.7.2 AGENTES DE UNIÓN AL ADN BASADOS EN MOLÉCULAS PEQUEÑAS

En este apartado nos centraremos sólo en aquellas familias de agentes de unión relevantes para esta Tesis Doctoral.

1.7.2.1 Helicatos

En el año 1995, el Prof. J. M. Lehn *et al*. describieron por primera vez las propiedades de unión al ADN de una familia de helicatos polinucleares de Cu(I) derivados de hebras polibipiridínicas. En esta comunicación pionera, el Prof. Lehn sugirió que el modo de unión de este tipo de complejos era por inserción en el surco mayor del ADN, que se trata de una interacción no covalente, que ésta podría ser específica y que la afinidad de la misma era claramente dependiente del tamaño y forma de los helicatos.[227]

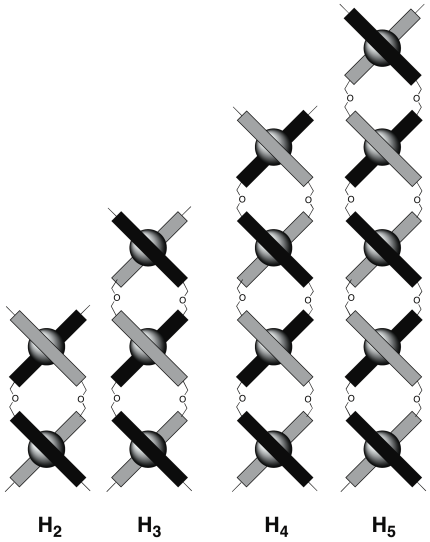


Figura 1.62: Esquema de la familia de helicatos polinucleares de Cu(I) que presentan propiedades de unión al ADN desarrollados por Lehn *et al.*[227]

Posteriormente, el Prof. M. J. Hannon describió las propiedades de un trihelicato dinuclear de Fe(II) derivado de una hebra piridilimínica capaz de unirse al ADN a través del surco mayor y plegar significativamente la doble hélice del ADN. En este trabajo quedó demostrado que la quiralidad intrínseca de los helicatos tiene consecuencias directas sobre sus propiedades de unión, ya que el isómero M de el trihelicato de Fe(II) se adaptaba al surco mayor, mientras que el isómero P lo hacía al surco menor.[228,229]

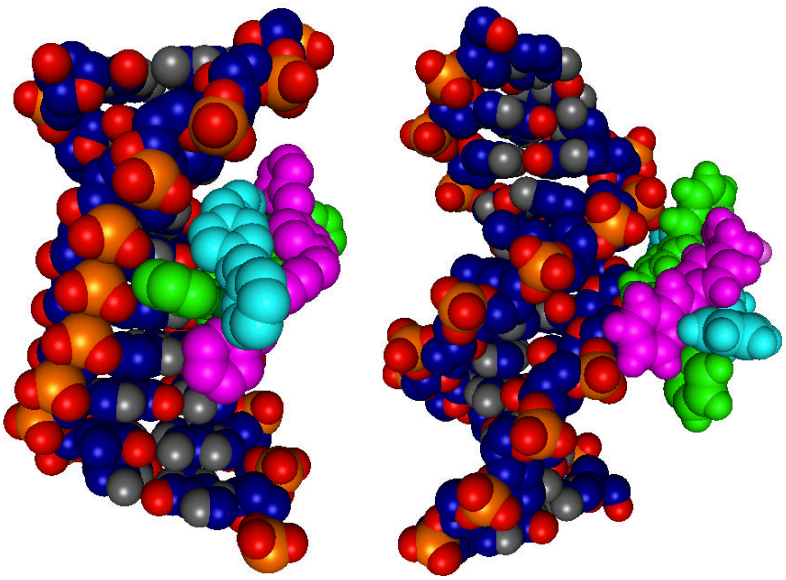


Figura 1.63: Izquierda, inserción del isómero M del trihelicato de Fe(II) desarrollado por Hannon *et al.* en el surco mayor del B–ADN; derecha, interacción del isómero P del trihelicato de Fe(II) con el surco menor del B–ADN.[229]

En el año 2006, Hannon *et al*. publicaron una estructura cristalina de rayos X que mostraba la interacción de su trihelicato de Fe(II) con una forma poco convencional de ADN, [230] el ADN "Y", que consiste en la unión de tres hebras con extremos complementarios y que dejan un hueco central en forma de prisma en donde el helicato encaja a la perfección (*Figura 1.64*). [231]

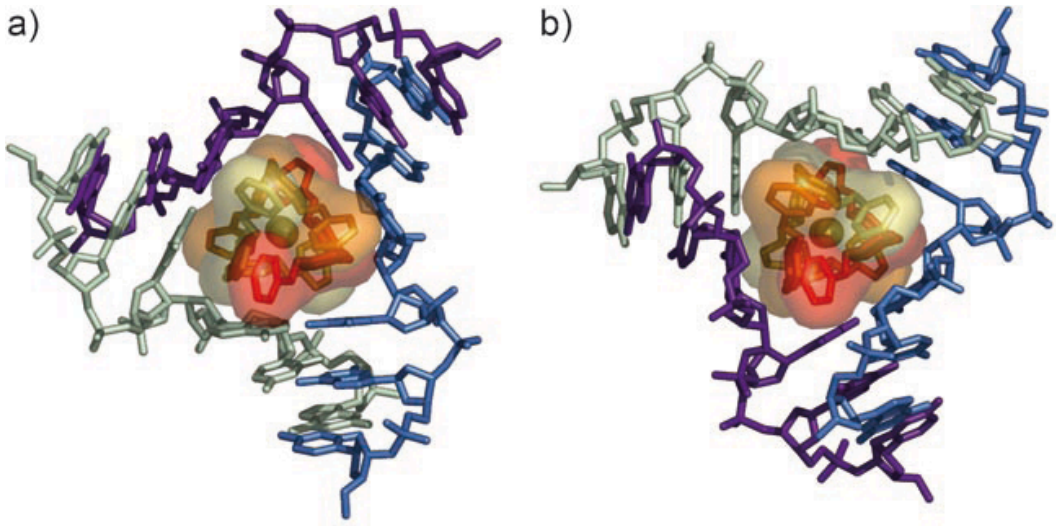


Figura 1.64: a) Estructura del trihelicato de Fe(II) desarrollado por Hannon *et al*. encajado en el hueco en forma de prisma trigonal existente en el Y-ADN; b) la misma estructura rotada 180º.[231]

Estudios posteriores revelaron que estos cilindros supramoleculares presentan una gran actividad frente a diferentes líneas tumorales. Su mecanismo de acción no es genotóxico como el caso del cisplatino, sino que actúa reduciendo la actividad mitocondrial, inhibiendo el crecimiento celular.[232]

Los helicatos también se han utilizado los helicatos como sondas fluorescentes para el estudio de la estructura celular. J.-C. G. Bünzli *et al*. desarrollaron trihelicatos dinucleares de Eu(III) y Tb(III) que atraviesan la membrana celular por endocitosis, en concentraciones muy bajas.[233] Las aplicaciones de esta clase de helicatos va desde la imagen celular,[234] hasta el ensamblaje de chips para el reconocimiento de células cancerosas (*Figura 1.65*).[235]

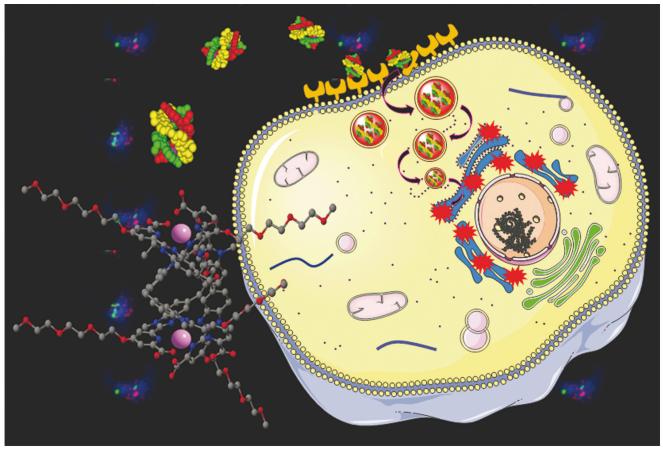


Figura 1.65: Esquema del camino que siguen los helicatos lipófilos de Eu(III) y Tb(III) desarrollados por J.-C. G. Bünzli *et al.* hasta el interior de la célula.

Anteriormente se indicó la importancia que tiene la quiralidad de los helicatos en el proceso de reconocimiento del ADN. Utilizando esta propiedad, Motti *et al.* consiguieron separar los isómeros P y M de un trihelicato dinuclear de Ru(II). El método consiste en el empleo de un dodecanucleótido anclado a una fase estacionaria, a través de la cual se eluye la mezcla racémica del helicato. El isómero P, que interacciona con el surco mayor del ADN de una forma más fuerte, queda retenido en la fase estacionaria, mientras que el isómero M se eluye prácticamente con el frente del disolvente.[236]

Más recientemente, Mishra *et al.* sintetizaron un trihelicato trinuclear de Zn(II), en el que los átomos coordinantes y los tres iones Zn(II) se organizan formando un macrociclo de nueve miembros.[237] Este compuesto presenta ciertas propiedades como nucleasa, siendo el único ejemplo mimético con un centro catalítico tan complejo.[238]

Tal vez, el paso más importante en la aplicación farmacológica de los helicatos ha sido dado por el grupo de investigación del Prof. P. Scott. En un trabajo reciente, estos investigadores describieron la síntesis de trihelicatos de Fe(II) ópticamente puros, solubles y estables en agua y cuya producción puede llevarse a cabo a "gran escala". Estos helicatos se unen al surco mayor del ADN con unas constantes de disociación del orden de nM, presentando preferencia por secuencias ricas en pares A-T (*Figura 1.66*). Su actividad frente a bacterias de membrana gram + (*S. aureus*) y gram – (*E. coli*), y frente al nematodo *C. elegans*, indican un alto grado de inhibición del crecimiento bacteriano y una escasa toxicidad frente al nematodo.[239]

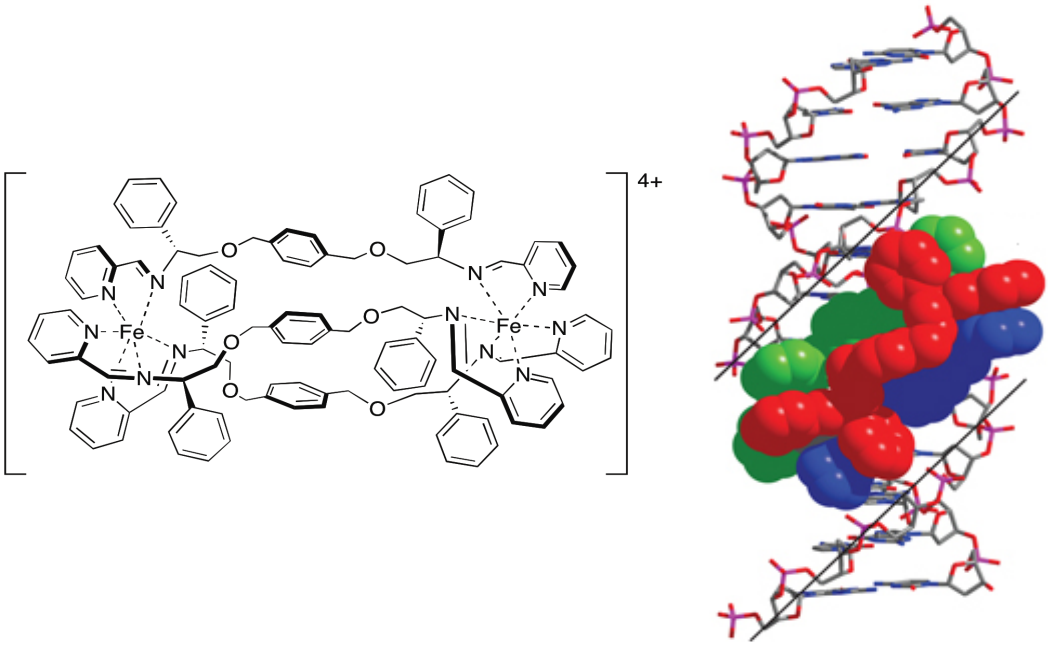


Figura 1.66: Derecha, estructura del helicato de Fe(II) desarrollado por Peter Scott *et al.*; izquierda representación del modo de interacción de este helicato con el ADN.[239]

1.7.2.2 Complejos polipiridínicos de Ru(II)

La aplicación de complejos metálicos polipiridínicos en la elucidación estructural de biomoléculas o su interacción con ellas tiene sus orígenes en las observaciones realizadas por Dwyer *et al.* en los años 50 acerca de la actividad biológica de los complejos trifenantrolínicos de Fe^{II}, Ni^{II}, Ru^{II}, Os^{II}, Co^{II} y Zn^{II}.[240]

De entre toda esta amplia familia de complejos metálicos, los derivados de Ru(II) son las especies más estudiadas en un contexto biológico, debido a sus propiedades fotofísicas y a que su química de coordinación es bien conocida. Los complejos polipiridínicos de Ru(II) son, por lo general, solubles en agua y cinéticamente inertes, por lo que su interacción con los ácidos nucleicos es de naturaleza no covalente. Además, los complejos derivados de ligandos bidentados (phen, bpy,…), presentan quiralidad intrínseca, que puede ser utilizada para modular sus propiedades de unión. Por otra parte, estos complejos presentan bandas de absorción (450 nm) y de emisión (600-700 nm) centradas en la región visible del espectro y altamente sensibles a interacciones con ácidos nucleicos, lo que los convierte en unos potenciales sensores de ácidos nucleicos.[241]

Complejos mononucleares

Los complejos polipiridínicos mononucleares de rutenio han sido muy estudiados en relación a sus propiedades de unión al ADN.[242] La interacción con el ADN de este tipo de complejos se produce fundamentalmente a través de interacciones no covalentes: electrostática ($[Ru(bpy)_3]^{2+}$),[243] unión al surco (Λ-$[Ru(phen)_3]^{2+}$) o intercalación (Δ-$[Ru(phen)_3]^{2+}$).[244] La enantioselectividad de estos complejos frente a la forma B del ADN se debe principalmente a impedimentos estéricos entre los anillos aromáticos y la doble cadena de fosfatos. Los que se unen al ADN de un modo no intercalante suelen insertarse a través del surco menor del ADN con una fuerte preferencia por secuencias ricas en pares A-T.[245]

Las propiedades de unión al ADN pueden ser moduladas variando la estructura de los ligandos del complejo. De esta manera se puede, por ejemplo, incrementar la constante de unión, [246] cambiar la enantioselectividad[247] o modificar la selectividad de secuencia.[248] Otra característica muy importante de este tipo de compuestos de coordinación es la capacidad de romper el ADN mediante excitación lumínica.[249]

Recientemente, Martí *et al.* han empleado el complejo de Ru(II) $[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$ para detectar la formación de agregados peptídicos involucrados en enfermedades neurodegenerativas tan importantes como el Parkinson o la enfermedad de Huntington. Este método de detección ha demostrado ser viable tanto *in vitro* como *in vivo* (*Figura 1.67*). [250]

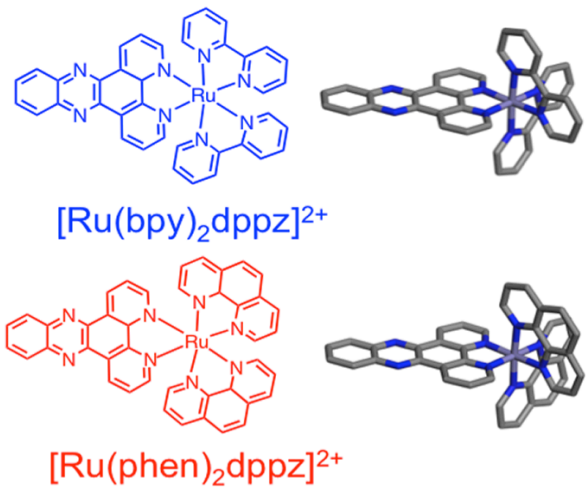


Figura 1.67: Estructura de los complejos empleados por Martí *et al.* en la detección de agregados peptídicos.[250]

Complejos dinucleares

El interés por el desarrollo de agentes de unión basados en complejos metálicos dinucleares tuvo su origen en un estudio pionero acerca de un agente bis-intercalante orgánico formado por dos cromóforos unidos mediante un conector flexible poliamina/alcano. Los estudios realizados indicaron que el dímero se unía al ADN con una constante de afinidad superior a la del monómero.[251]

Los complejos di o polinucleares presentan dos ventajas muy claras con respecto a sus análogos mononucleares:

a) La carga: aumentando el número de iones Ru(II) se consigue un incremento proporcional en la carga formal del complejo que favorece la interacción con el ADN por atracción electroestática con la cadena de polifosfatos del ADN. Los compuestos mononucleares presentan generalmente constantes de unión bajas (10^4-10^5 M^{-1}), salvo los equipados con complejos intercalantes como el dppz. Consecuentemente son desplazados de los ácidos nucleicos en condiciones de fuerza iónica baja, lo que limita su aplicación *in vivo*.[252] Kelly *et al*. llevaron a cabo un exhaustivo estudio comparativo de las propiedades de unión de compuestos dinucleares frente a sus análogos mononucleares. Las conclusiones a las que llegaron fueron que los compuestos bimetálicos presentan una mayor afinidad y también mayor eficiencia a la hora de romper el ADN mediante fotoexposición.[253]

b) El reconocimiento específico de secuencia:[254] cuanto mayor sea el número de bases con las que pueda establecer contactos el agente de unión, mayor será la especificidad de la interacción. Al incluir más pares de bases en el reconocimiento, mayor será el número de posibles combinaciones en el orden de las mismas, lo que reduce el número de secuencias idénticas en el ADN.

Tabla 1.5: Relación existente entre el número de pares de bases que ocupa un ligando y el número de secuencias distintas que pueden reconocer.[254]

Nº pb	Combinaciones posibles
2	10
3	32
4	136
5	512
6	2,080
7	8,192
8	32,896
9	131,072
10	524,800

El conector entre las unidades metálicas puede ser de naturaleza flexible o rígida.[255,256] Aunque los complejos dinucleares que poseen un conector rígido presentan mayor afinidad que sus análogos mononucleares,[257] muchas veces la interacción es sólo a través de uno de los centros metálicos, ya que la rigidez de la estructura no permite prolongar la interacción a lo largo de la curvatura del surco menor. [258] La existencia de un conector más flexible permite que ambos núcleos metálicos interaccionen simultáneamente con el surco menor. [259]

Recientemente, F. M. McDonnel *et al*. estudiaron la actividad frente a determinadas líneas tumorales de unos complejos dinucleares de Ru(II), que presentan al ligando rígido *tatpp* como conector entre los dominios metálicos (*Figura 1.68*). Estos complejos presentan una alta citotoxicidad celular para líneas cultivadas de células tumorales *in vitro*, y una excelente inhibición del crecimiento celular del tumor *in vivo.* Estos compuestos presentan la ventaja de no sufrir ningún proceso de degradación metabólica en el organismo, además de no presentar ningún

efecto adverso sobre órganos involucrado en la excreción como los riñones.[260]

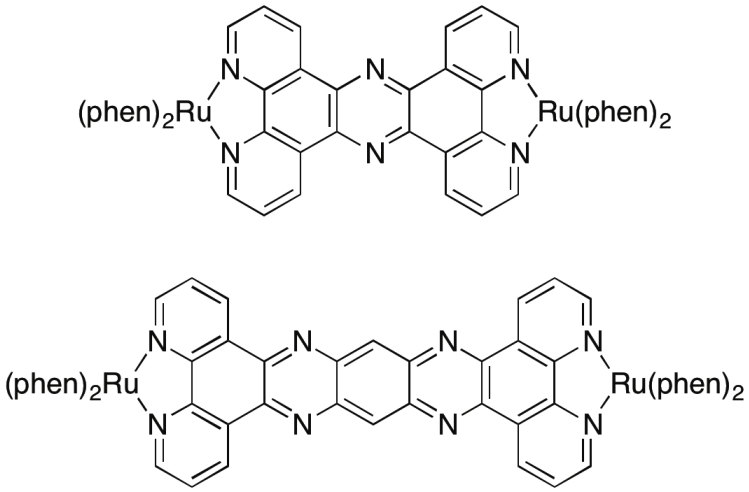


Figura 1.68: Estructura de los complejos dinucleares de Ru(II) desarrollados por McDonnel *et al*. derivados del ligando *tatpp*.[260]

Por otro lado, Ke-Zhi Wang *et al*. diseñaron y sintetizaron un complejo de Ru(II) que presenta gran sensibilidad a los cambios de pH y además propiedades de unión al ADN (*Figura 1.69*). Aunque el modo de unión no está claro, probablemente se establezca a través de una intercalación parcial. En ensayos citotóxicos sólo presentó actividad frente a líneas celulares de cáncer de pulmón y de hígado.[261]

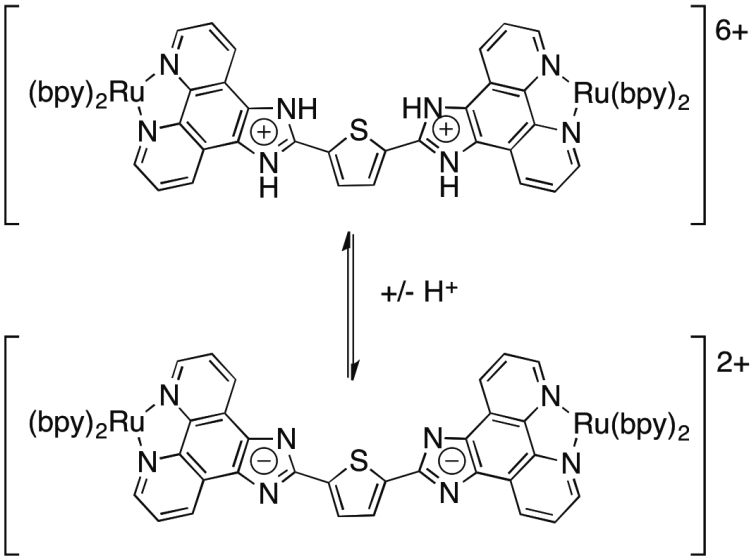


Figura 1.69: Esquema de las especies derivadas de los complejos dinucleares de Ru(II) diseñados y sintetizados por Wang *et al*.[261]

A pesar de estos ejemplos se puede decir que la investigación sobre los compuestos polipiridínicos dinucleares de Ru^{II} es todavía un campo

muy abierto, posiblemente debido a las dificultades que conlleva la síntesis y las modificaciones estructurales de los propios ligandos precursores de estos complejos a través de métodos sintéticos clásicos.

1.7.2.3 Metalopéptidos

Los péptidos pueden estar equipados con los mismos dominios de unión utilizados por las proteínas en el proceso de reconocimiento del ADN. Se pueden sintetizar de una forma sencilla y sus estructuras pueden ser modificadas con facilidad con el objetivo de modular sus propiedades biológicas y químicas.

Los péptidos pueden combinarse con iones metálicos dando lugar a metalopéptidos, que pueden presentar interesantes propiedades muy útiles en el área de los agentes de unión al ADN.[262] De forma general se puede decir que, los metalopéptidos combinan las propiedades de unión al ADN de los complejos metálicos a través de interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals y/o unión covalente, con las posibilidades de unión específica que ofrecen los péptidos a través de contactos específicos entre las cadenas laterales del esqueleto peptídico y los pares de bases del ADN.

Fundamentalmente, se ha empleado dos estrategias para la construcción de metalopéptidos de unión al ADN. La primera de ellas implica que los iones metálicos se enlacen directamente a la cadena peptídica a través de aminoácidos coordinantes naturales, modificando de esta manera la estructura de la secuencia.[263] En este sentido, se conocen algunas secuencias cortas (tres o cuatro aminoácidos) que coordinan metales de una forma muy eficiente. Uno de los dominios más empleados son los miméticos del extremo N-terminal de la albúmina sérica H_2N-Gly-Gly-His (GGH).[264] Los complejos de Zn(II), Cu(II) y Ni(II) de este péptido presentan alta afinidad por el ADN y además actividad nucleasa.[265] Análogos de estos tripéptidos (H_2N-Orn-Gly-His, H_2N-Arg-Gly-His, H_2N-Pro-Lys-His) se unen a regiones ricas en A/T a través del surco menor, estableciendo enlaces de hidrógeno entre las bases nitrogenadas y los grupos polares de los aminoácidos.[266]

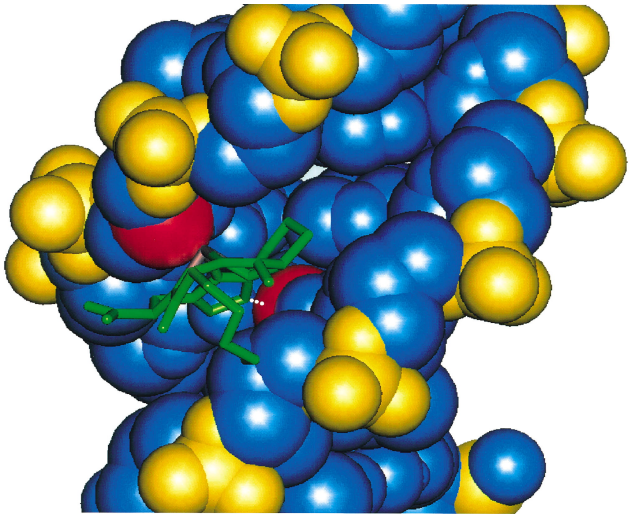


Figura 1.70: Estructura del metalopéptido [Ni^{II}(Pro-Lys-His)] interaccionando a través del surco menor con una secuencia de ADN rica en pares A/T.[267]

Los metalopéptidos pueden conjugarse a otros dominios de unión que modulen sus propiedades de reconocimiento. Un ejemplo de ello es el metalopéptido de Eu(III) desarrollado por Delangle *et al.* El sistema está constituido por dos subunidades, un dominio de unión al lantánido (*lanthanide-binding peptide*, LBP) y una molécula de proflavina, que actúa como agente intercalante y que mejora su afinidad por el ADN (*Figura 1.71*).[268]

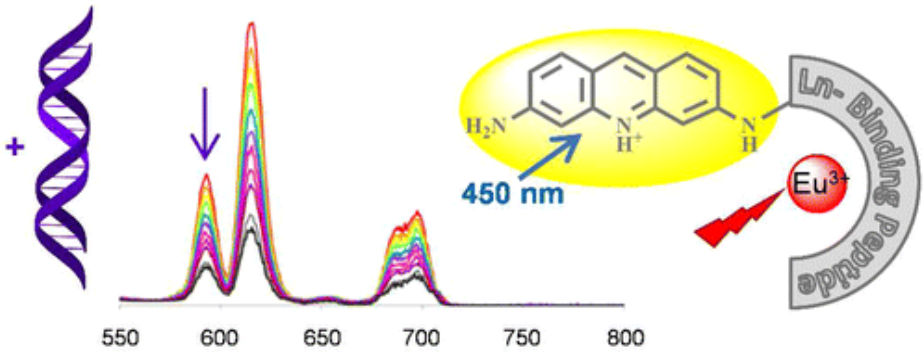


Figura 1.71: Estructura del metalopéptido de Eu(III) conjugado a la molécula de proflavina. Se observa como la intensidad de la emisión del ión lantánido disminuye al unirse al ct- ADN.[268]

La segunda estrategia consiste en conjugar un complejo metálico o compuesto organometálico a la cadena lateral de uno de los aminoácidos de la secuencia peptídica o a uno de los extremos de la misma.[269] Normalmente el complejo metálico acoplado suele tener propiedades de unión al ADN mientras que el péptido aporta alguna propiedad con utilidad biológica.[270]

Las poliargininas son secuencias cortas de 8-11 residuos de arginina capaces de atravesar la membrana celular. La funcionalización de complejos metálicos con poliargininas se ha utilizado para lograr la internalización celular de compuestos que de por sí no llegarían al citoplasma. J. K. Barton *et al*. funcionalizaron un ligando bpy con una poliarginina y lo utilizaron para sintetizar el correspondiente complejo polipiridínico de Ru(II) derivado de dppz, logrando de esta manera la entrada en la célula del compuesto. Posteriormente, acoplaron una fluoresceína al extremo N-terminal de la octaarginina, logrando de esta manera redireccionar el complejo de Ru(II) hacia el núcleo de la célula. (*Figura 1.72*).[271]

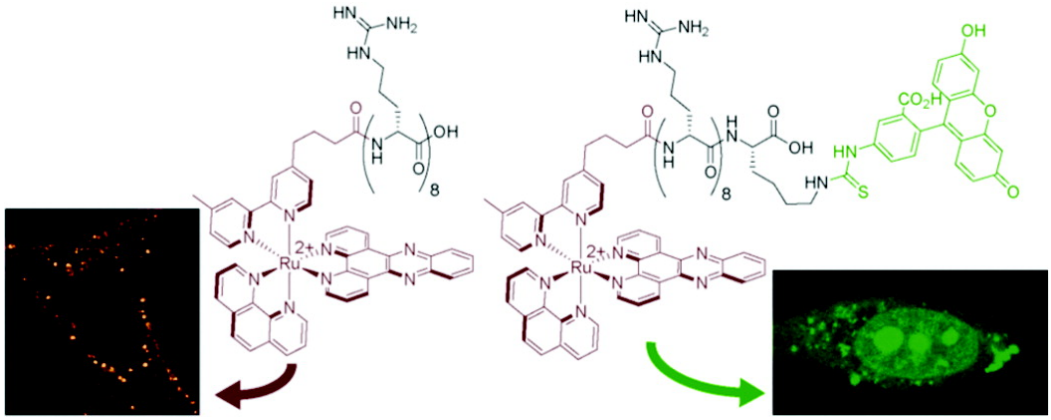


Figura 1.72: Distribución celular del conjugado de octaarginina (izquierda) y del conjugado de octaarginina funcionalizado con fluoresceína (derecha).[271]

Los péptidos también pueden tener otro tipo de funcionalidad distinta a la internalización. Por ejemplo, Marchán *et al*. emplearon un péptido capaz de reconocer proteínas de membrana de células cancerosas, funcionalizado con un ligando piridina en uno de sus extremos, en la construcción de un compuesto organometálico de Ru(II) fotosensible. Este complejo es liberado al medio por irradiación en la forma de un aquo-complejo capaz de formar aductos con el ADN a través de enlaces coordinados con las guaninas de la doble hebra (*Figura 1.73*).[24]

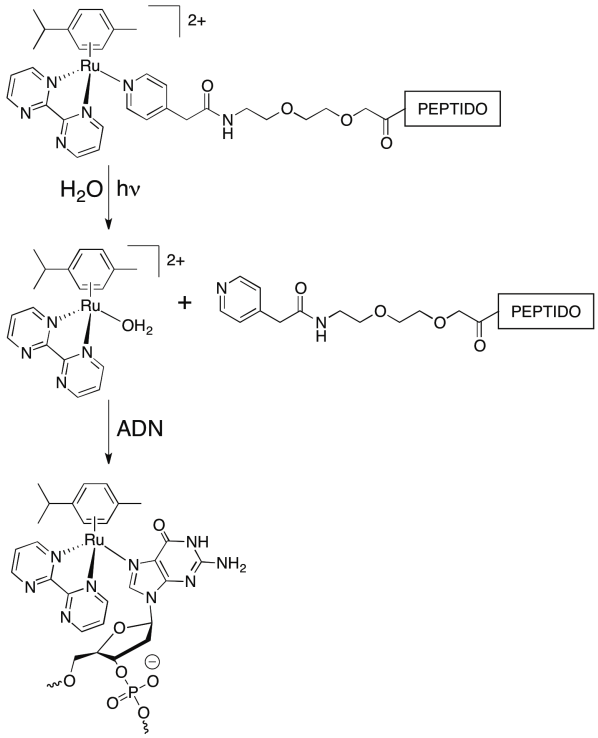


Figura 1.73: Proceso de formación del aducto con el ADN del complejo de Ru(II) desarrollado por Marchán *et al.* [24]

Existe una tercera estrategia para construir metalopéptidos de unión al ADN, que en realidad es la conjunción de las dos anteriores. J. K. Barton *et al.* diseñaron un metalopéptido constituido por una secuencia de 16 aminoácidos que presenta una estructura secundaria de α-hélice estabilizada a través de la coordinación a un ión Zn(II) y de un puente salino. Este metalopéptido está conjugado a un compuesto de coordinación de rodio $[Rh(phi)_2(bpy')]^{3+}$ a través de una bipiridina funcionalizada con un grupo ácido (bpy′). Este complejo se une al ADN y es capaz de romper la doble hebra mediante fotoactivación. Se trata de un ejemplo de nucleasa artificial, donde el metalopéptido actuaría como la región encargada del reconocimiento y el complejo de rodio como el centro activo del enzima artificial (*Figura 1.74*).[272]

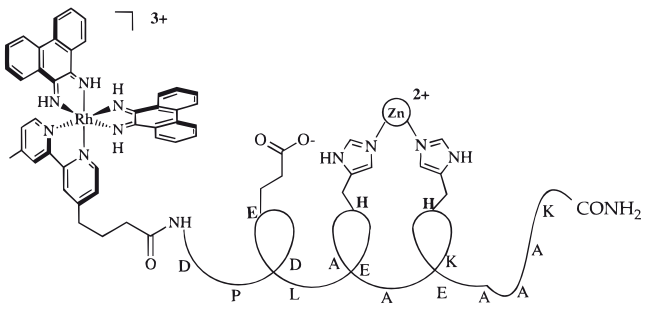


Figura 1.74: Nucleasa artificial diseñada por Barton *et al.*[272]

[2] A. D. McNaught, A. Wilkinson, IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, 1997.

[3] N. G. Connelly, T. Damhus, *Nomenclature of inorganic chemistry IUPAC Recommendations, RSC publishing,* 2005.

[4] J. Lewis, *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, *Wiley*, 15th ed., 2007.

[5] R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.,* **1963**, *85*, 3533–3539.

[6] S. Ahrland, J. Chatt, N. R. Davies, *Quart. Rev.,* **1958**, *12*, 265

[7] Gold Book, *IUPAC,* 2012, 1–1670.

[8] J. Reedijk, *Platinum Metals Rev.,* **2008**, *52*, 2–11.

[9] R. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **1966**, *5*, 385–415.

[10] S. D. Bergman, R. Frantz, D. Gut, M. Kol, J. Lacour, *Chem. Commun.,* **2006**, *42*, 850–852.

[11] A. Auffrant, A. Barbieri, F. Barigelletti, J. Lacour, P. Mobian, J. P. Collin, J. P. Sauvage, B. Ventura, *Inorg. Chem.,* **2007**, *46*, 6911–6919.

[12] J. P. Genet, *Pure Appl. Chem.* **2002**, *73*, 77–83.

[13] S. H. Chikkali, R. Bellini, B. de Bruin, J. I. van der Vlugt, J. N. Reek, *J. Am. Chem. Soc.,* **2012**, *134*, 6607–6616.

[14] W. Zhang, J. L. Loebach, S. R. Wilson, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.,* **1990**, *112*, 2801–2803.

[15] H. Rehm, *Protein Biochemistry and Proteomics*, Elsevier, 2006.

[16] R. M. Roat-Malone, *Bioinorganic chemistry: a short course*, John Wiley & Sons, 2002.

[17] L. Pauling, R. B. Corey, *PNAS,* **1951**, 37, 729.

[18] D. M. Webster, *Protein Structure Prediction*, Humana Press, 2003.

[19] Y. J. David, D. S. King, J. Chmielewski, S. Singh, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.,* **1991**, *113*, 9391-9395.

[20] N. Metzler-Nolte, U. Schatzschneider, *Bioinorganic Chemistry: A practical Course*, Walter de Gruyter, 2009.

[21] M. Vallet, J. Faus, E. García-España, J. Moratal, *Introducción a la Química Inorgánica*, Ed. Síntesis, 2003.

[22] J. M. Berg, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6513–6516.

[23] a) F. Rabanal, W. F. DeGrado, P. L. Dutton, *J. Am. Chem. Soc.,* **1996**, *118*, 473–474; b) L. Regan, N. D. Clarke, *Biochem.* **1990**, *29*, 10878–10883; c) L. Regan, *Trends in Biochemical Sciences* **1995**, *20*, 280–285.

[24] F. Barragán, P. López-Senín, L. Salassa, S. Betanzos-Lara, A. Habtemarian, V. Moreno, P. J. Sadler, V. Maschón, *J. Am. Chem. Soc.,* **2011**, *133*, 14098-14108.

[25] E. Pazos, D. Torrecilla, M. Vázquez López, L. Castedo, J. L. Mascareñas, A. Vidal, M. E. Vázquez, *J. Am. Chem. Soc.,* **2008**, *130*, 9652–9653.

[26] J. C. Neubi, *Endocrine Rev.,* **2003**, *24*, 389-427.

[27] T. Yoshihara, Y. Yamaguchi, M. Hosaka, T. Takenchi, S. Tobita, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2012**, *51*, 1-5.

[28] J. Kuil, P. Staunenberj, P. T. K. Chin, J. Oldenburg, K. Jalink, A. H. Velders, F. W. B. Van Leenwen, *ChemBioChem.,* **2011**, *12*, 1897-1903.

[29] M. D. Robihard, A. Rob, P. M. Valentijn, Nico J.Mauvenoord, G. A. Van der Marel, J. H. Van Boom, J. Reedik, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2000**, *39*, 3096-3099.

[30] R. Sambasivan, Z. T. Ball, *J. Am. Chem. Soc.,* **2010**, *132*, 9289-9291.

[31] N. Uhlich, P. Sommer, C. Bühr, S. Schürch, J. L. Reynord, T. Barbie, *Chem. Commun.,* **2009**, *45*, 6237-6239.

[32] M. Vázquez López, S. V. Eliseeva, J. M. Blanco, G. Rama, M. R. Bermejo, M. E. Vázquez, J. -C. G. Bünzli, *Eur. J. Inorg. Chem.,* **2010**, *2010*, 4532–4545.

[33] L. M. de León-Rodriguez, Z. Kovacs, G. R. Dieckmann, A. D. A. Sherry, *Chem. Eur. J.,* **2004**, *10*, 1149–1155.

[34] D. Shetty, J. M. Jeong, C. H. Ju, Y. J. Kim, J. Y. Lee, Y. S. Lee, D. S. Lee, J. K. Chung, M. C. Lee, *Bioorg. Med. Chem.,* **2010**, *18*, 7338–7347.

[35] C. J. Anderson, L. A. Jones, L. A. Bass, E. L. C. Sherman, D. W. McCarthy, P. D. Cutler, M. V. Lanahan, M. E. Cristel, J. S. Lewis, S. W. Schwarz, *J. Nucl. Med.,* **1998**, *39*, 1944–1951.

[36] C. J. Anderson, T. S. Pajeau, W. B. Edwards, E. L. C. Sherman, B. E. Rogers, M. J. Welch, *J. Nucl. Med.,* **1995**, *36*, 2315–2325.

[37] J. S. Lewis, A. Srinivasan, M. A. Schmidt, C. J. Anderson, *J. Nucl. Med. Bio.,* **1999**, *26*, 267–273.

[38] a) E. J. Enemark, T. D. P. Stack, *Inorg. Chem.,* **1996**, *35*, 2719–2720; b) A. K. Duhme, Z. Dauter, R. C. Hider, S. Pohl, *Inorg. Chem.,* **1996**, *35*, 3059–3061.

[39] a) M. Albrecht, P. Stortz, R. Nolting, *Synthesis,* **2003**, *9*, 1307–1320; b) E. J. Enemark, T. D. P. Stack, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **1995**, *34*, 996–998; c) M. Albrecht, M. Napp, M. Schneider, P. Weis, R. Frohlich, *Chem. Commun.,* **2001**, 409–410.

[40] M. Albrecht, M. Napp, M. Schneider, P. Weis, R. Frohlich, *Chem. Eur. J.,* **2001**, *7*, 3966–3975.

[41] M. Albrecht, O. Spiess, M. Schneider, P. Weis, *Chem. Commun.,* **2002**, *38*, 786–787.

[42] E. C. Constable, C. E. Housecroft, S. Mundwiler, *Dalton Trans.,* **2003**, *32,* 2112–2114.

[43] R. Annunziata, M. Benaglia, A. Puglisi, L. Raimondi, F. Cozzi, *Eur. J. Org. Chem.,* **2008**, *73*, 3976–3983.

[44] a) E. C. Constable, E. L. Dunphy, C. E. Housecroft, M. Neuburger, S. Schaffner, F. Schaper, S. R. Batten, *Dalton Trans.,* **2007**, *36*, 4323–4332; b) K. Ohr, R. L. McLaughlin, M. E. Williams, *Inorg. Chem.,* **2007**, *46*, 965–974; c) S. Poupart, C. Boudou, P. Peixoto, M. Massonneau, P. Y. Renard, A. A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.,* **2006**, *4*, 4165–4177; d) A. Ito, T. A. Okamura, K. K. Masui, M. Kaneko, R. Masui, K. Ake, S. Kuramitsu, M. Yamaguchi, H. Kuyama, E. Ando, *Analyst,* **2007**, *132*, 358–364; e) K. Heinze, M. Beckmann, K. Hempel, *Chem. Eur. J.,* **2008**, *14*, 9468–9480; f) K. Heinze, K. Hempel, *Chem. Eur. J.,* **2009**, *15*, 1346–1358.

[45] a) M. B. Coppock, M. T. Kapelewski, H. W. Youm, L. A. Levine, J. R. Miller, C. P. Myers, M. E. Williams, *Inorg. Chem.,* **2010**, *49*, 5126–5133; b) C. Y. Lee, K. H. Lee, S. Yoon, *Bull. Kor. Chem. Soc.,* **2005**, *26*, 1843–1845; c) M. B. Coppock, M. T. Kapelewski, H. W. Youm, L. A. Levine, J. R. Miller, C. P. Myers, M. E. Williams, *Inorg. Chem.,* **2010**, *49*, 5126–5133.

[46] T. A. Okamura, T. Iwamura, S. Seno, H. Yamamoto, N. Ueyama, *J. Am. Chem. Soc.,* **2004**, *126*, 15972–15973.

[47] E. C. Constable, C. E. Housecroft, S. Mundwiler, *Dalton Trans.,* **2003**, *32*, 2112–2114.

[48] K. Tanaka, M. Shionoya, K. Shigemori, *Chem. Commun.,* **1999**, *45*, 2475–2476.

[49] W. W. Brandt, *Chem. Rev*. **1954**, *54*, 959-1011.

[50] F. A. Cotton, G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, Jonh Wiley & Sons, 1988.

[51] a) B. Imperiali, S. L. Fisher, *J. Org. Chem.,* **1992**, *57*, 757–759; b) B. Imperiali, T. J. Prins, S. L. Fisher, *J. Org. Chem.,* **1993**, *58*, 1613–1616.

[52] N. D. Jabre, T. Respondek, S. A. Ulku, N. Korostelova, J. J. Kodanko, *J. Org. Chem.,* **2010**, *75*, 650–659.

[53] a) D. J. Wilger, S. E. Bettis, C. K. Materese, M. Minakova, G. A. Papoian, J. M. Papanikolas, M. L. Waters, *Inorg. Chem.,* **2012**, *51*, 11324–11338; b) N. Park, J. Ryu, S. Jang, H. S. Lee, *Tetrahedron,* **2012**, *68*, 4649–4654; c) T. H. D. Nguyen, K. Ozawa, M. Stanton-Cook, R. Barrow, T. Huber, G. Otting, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2011**, *50*, 692–694; d) H. S. H. Lee, P. G. P. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.,* **2008**, *130*, 13194–13195; e) J. J. Xie, W. W. Liu, P. G. P. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2006**, *46*, 9239–9242; f) K. L. Haas, K. J. Franz, *Chem. Rev.,* **2009**, *109*, 4921–4960; g) S. R. Wilson, A. Yasmin, Y. Wu, *J. Org. Chem.,* **1992,** *57*, 6941-6945.

[54] R. P. Cheng, S. L. Fisher, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.,* **1996**, *118*, 11349–11356.

[55] a) W. S. W. Aldridge, B. J. B. Hornstein, S. S. Serron, D. M. D. Dattelbaum, J. R. J. Schoonover, T. J. T. Meyer, *J. Org. Chem.,* **2006**, *71*, 5186–5190; b) T. Koide, M. Yuguchi, M. Kawakita, *J. Am. Chem. Soc.,* **2002**, *124,* 9388-9389; c) D. G. McCafferty, B. M. Bishop, C. G. Wall, S. G. Hughes, *Tetrahedron,* **1995**, *51,* 1093-1106; d) D. J. Wilger, S. E. Bettis, C. K. Materese, M. Minakova, G. A. G. Papoian, J. M. Papanikolas, M. L. Waters, *Inorg. Chem.,* **2012**, *51*, 11324–11338; e) I. Hamachi, S. Tanaka, S. Tsukiji, S. Shinkai, S. Oishi, *Inorg. Chem.,* **1998**, *37*, 4380–4388; f) J. G. Vos, J. M. Kelly, *Dalton Trans.,* **2006**, *35*, 4869–4883; g) G. Dirscherl, B. König, *Eur. J. Org. Chem.,* **2008**, *2008*, 597–634.

[56] a) L. Roy, M. A. Case, *J. Phys. Chem. B,* **2011**, *115*, 2454–2464; b) A. J. Doerr, G. L. McLendon, *Inorg. Chem.,* **2004**, *43*, 7916–7925; c) M. H. Filby, J. Muldoon, S. Dabb, N. C. Fletcher, A. E. Ashcroft, A. J. Wilson, *Chem. Commun.,* **2011**, *47*, 559–561; d) H. K. Munch, S. T. Heide, N. J. Christensen, T. Hoeg-Jensen, P. W. Thulstrup, K. J. Jensen, *Chem. Eur. J.,* **2011**, *17*, 7198–7204.

[57] M. R. Ghadiri, C. Soares, C. Choi, *J. Am. Chem. Soc.,* **1992**, *114*, 825–831.

[58] a)M. A. M. Case, G. L. G. McLendon, *Acc. Chem. Res.,* **2004**, *37*, 754–762; b) A. J. A. Doerr, M. A. M. Case, I. I. Pelczer, G. L. G. McLendon, *J. Am. Chem. Soc.,* **2004**, *126*, 4192–4198.

[59] N. Ousaka, Y. Takeyama, E. Yashima, *Chem. Sci.,* **2012**, *3*, 466-469.

[60] a) M. Y. Ogawa, A. B. Gretchikhine, S.-D. Soni, S. M. Davis, *Inorg. Chem.,* **1995**, *34*, 6423–6424; b) J. Kovács, E. Jentzsch, A. Mokhir, *Inorg. Chem.,* **2008**, *47*, 11965–11971.

[61] a) K. H. Chang, J. H. Liao, C. T. Chen, B. K. B. Mehta, P. T. Chou, J. M. Fang, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2026–2032; b) M. Lieberman, T. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.,* **1991**, *113*, 1470–1471; c) J. Ohkanda, R. Satoh, N. Kato, *Chem. Commun.,* **2009**, *45,* 6949-6951; d) D. Hesek, Y. Inoue, S. R. L. Everitt, H. Ishida, M. Kunieda, M. G. B. Drew, *Inorg. Chem.,* **2000**, *39*, 308–316; e) H. Ishida, Y. Inoue, *Biopolymers,* **2000**, *55*, 469–478; f) J. G. Vos, J. M. Kelly, *Dalton Trans.,* **2006**, *35*, 4869–4883; g) H. Mürner, P. Belser, A. von Zelewsky, *J. Am. Chem. Soc.,* **1996**, *118*, 7989–7994; h) S. Watanabe, O. Onogawa, Y. Komatsu, K. Yoshida, *J. Am. Chem. Soc.,* **1998**, *120*, 229–230.

[62] a) R. Schobert, B. Biersack, S. Knauer, M. Ocker, *Bioorg. Med. Chem.,* **2008**, *16*, 6–9; b) D. R. Ahn, T. W. Kim, J. I. Hong, *J. Org. Chem.,* **2001**, *66*, 5008–5011; c) E. C. Constable, E. L. Dunphy, C. E. Housecroft, M. Neuburger, S. Schaffner, F. Schaper, S. R. Batten, *Dalton Trans.,* **2007**, *36*, 4323–4332.

[63] K. Triantafillidi, K. Karidi, J. Malina, A. Garoufis, *Dalton Trans.,* **2009**, *38*, 6403-6407.

[64] N. Ousaka, Y. Takeyama, H. Iida, E. Yashima, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 856–861.

[65] a) B. M. Bishop, D. G. McCafferty, B. W. Erickson, *Tetrahedron,* **2000**, *56*, 4629–4638. b) K. Heinze, K. Hempel, *Chem. Eur. J.,* **2009**, *15*, 1346–1358.

[66] G. R. Newkome, J. Gross, A. K. Patri, *J. Org. Chem*., **1997**, *62*, 3013–3014.

[67] A. Torrado, B. Imperiali, *J. Org. Chem*., **1996**, *61*, 8940–8948.

[68] G. R. Newkome, J. Gross, A. K. Patri, *J. Org. Chem*., **1997**, *62*, 3013–3014.

[69] N. A. Uhlich, P. Sommer, C. Bühr, S. Schürch, J.L. Reymond, T. Darbre, *Chem. Commun.,* **2009**, *45*, 6237-6241.

[70] a) M. Kyakuno, S. Oishi, H. Ishida, *Chem. Lett.,* **2005**, *34*, 1554–1555; b) M. Albrecht, P. Stortz, *Chem. Soc. Rev.,* **2005**, *34*, 496–506; c) M. Albrecht, P. Stortz, R. Nolting, *Synthesis,* **2003**, *9*, 1307–1320.

[71] H. Ishida, Y. Inoue, *Biopolymers,* **2000**, *55*, 469–478.

[72] H. Ishida, Y. Maruyama, M. Kyakuno, Y. Kodera, T. Maeda, S. Oishi, *ChembioChem.,* **2006**, *7*, 1567–1570.

[73] H. Ishida, M. Kyakuno, S. Oishi, *Biopolymers,* **2004**, *76*, 69–82.

[74] M. Kyakuno, S. Oishi, H. Ishida, *Inorg. Chem.,* **2006**, *45*, 3756–3765.

[75] Y. Shiina, S. Oishi, H. Ishida, *Tetrahedron Lett.,* **2012**, *53*, 1249–1252.

[76] a) F. M. F. Menger, *PNAS,* **2002**, *99*, 4818–4822; b) J. Vicens, Q. Vicens, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.,* **2009**, *65*, 221–235; c) J.-M. Lehn, *Eur. Rev.,* **2009**, *17*, 263–280.

[77] J. M. Lehn, *Acc. Chem. Res.,* **1978**, *11*, 49–57.

[78] a) J. H. van Esch, *Nature,* **2010**, *466*, 193–194; b) J. M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.,* **2007**, *36*, 151-160; c) L. Lestel, I. Tkatchenko, *Eur. J. Org. Chem.,* **2007**, *72*, 3064–3067; d) J. M. Lehn, in *Nobel Lecture Series : Chemistry 1981-1990* (Ed.: B.G. Malmström), Singapore World Scientific, **1992**, 444–491.

[79] J. W. Steed, *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*; John Wiley & Sons, Ltd., 2007, pp. 1–322.

[80] a) L. Pauling, *The Nature of Chemical Bond*, Cornell University Press, 1939; b) T. Moore, S. T. F. Winmill, *J. Chem. Soc., Trans.,* **1912**, *101*, 1635–1676.

[81] S. H. Gellman, *Chem. Rev.,* **1997**, *97*, 1231–1232.

[82] J. Grunenberg, *Phys. Chem. Chem. Phys.,* **2011**, *13*, 10136–10146.

[83] D. Philp, J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **1996**, *35*, 1154–1196.

[84] K. Ariga, J. P. Hill, M. V. Lee, A. Vinu, *Sci. Technol. Adv. Mater.,* **2008**, *9*, 1–96.

[85] V. K. Aggarwal, *Nat. Chem.*, **2009**, *1*, 433–434..

[86] a) E. C. Constable, *Pure Appl. Chem.,* **1996**, *68*, 253–260; b) E. Constable, *Chem. Commun.,* **1997**, *33*, 1073–1080; c) P. J. Steel, *Chemistry in New Zeeland,* **2011**, *75*, 194–197.

[87] a) J. Adisoejoso, Y. Li, J. Liu, P. N. Liu, N. Lin, *J. Am. Chem. Soc.,* **2012**, *134*, 18526–18529; b) K. M. Fromm, *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, *252*, 856–885.

[88] D. B. Amabilino, J. F. Stoddart, *Chem. Rev.*, **1995**, *95*, 2725-2743.

[89] a) O. Lukin, F. Vögtle, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2005**, *44*, 1456–1477; b) O. Safarowsky, M. Nieger, R. Fröhlich, F. Vögtle, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2000**, *39*, 1616–1618; c) P. E. Barran, H. L. Cole, S. M. S. Goldup, D. A. Leigh, P. R. McGonigal, M. D. Symes, J. Wu, M. Zengerle, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2011**, *50*, 12280–12284; d) J.-F. Ayme, J. E. Beves, D. A. Leigh, R. T. McBurney, K. Rissanen, D. Schultz, *Nat. Chem.,* **2011**, *4*, 15–20.

[90] A. M. Albrecht-Gary, M. Meyer, C. O. Dietrich-Buchecker, J. P. Sauvage, J. Guilhem, C. Pascard, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas,* **1993**, *112*, 427–428.

[91] a) C. O. Dietrich-Buchecker, J. P. Sauvage, *Bioorg. Chem. Frontiers,* **1991**, *2*, 195-197; b) C. Dietrich-Buchecker, J-P. Sauvage, *Chem. Commun.,,* **1999**, *35*, 615-617; c) J. Rebek Jr., *Acc. Chem. Res.,* **1999**, *32*, 278-289.

[92] a) D. L. Caulder, K. N. Raymond, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **1997**, *36*, 1440-1443; b) M. Fujita, F. Ibukuro, H. Hagihara, K. Ogura, *Nature,* **1994**, *367*, 720-722; c) C. M. Hartshorn, P. J. Steel, *Inorg. Chem.,* **1996**, *35*, 6902-6905; d) M. J. Hannon, C. L. Painting, W. Errington, *Chem. Commun.,* **1997**, 1805-1809.

[93] M. J. Hannon, C. L. Painting, W. Errington, *Chem. Commun.,* **1997**, *33*, 307-309.

[94] a) B. Olenyuk, A. Fechtenkötter, P. J. Stang, *Dalton Trans.,* **1998**, *27*, 1707-1710; b) D. L. Caulder, K. N. Raymond, *Dalton Trans.,* **1999**, *28*, 1185-1191.

[95] J. R. Li, H. C. Zhou, *Nat. Chem.,* **2010**, *2*, 893–898.

[96] J. M. Lehn, A. Rigault, J. Siegel, J. Harrowfield, B. Chevrier, D. Moras, *PNAS,* **1987**, *84*, 2565–2569.

[97] C. Piguet, G. Bernardinelli, G. Hopfgartner, *Chem. Rev.,* **1997**, *97*, 2005–2062.

[98] D. S. Lawrence, T. Jiang, M. Levett, *Chem. Rev*., **1995**, *95*, 2229-2260.

[99] J. Sánchez-Quesada, C. Seel, P. Prados, J. de Mendoza, *J. Am. Chem. Soc.,* **1996**, *118*, 277-278.

[100] H. Miyake, H. Tsukube, *Chem. Soc. Rev.,* **2012**, *41*, 6977–6991.

[101] C. Piguet, G. Bernardinelli, G. Hopfgartner, *Chem. Rev.,* **1997**, *97*, 2005–2062.

[102] M. Albrecht, *Chem. Rev.,* **2001**, *101,* 3457–3498.

[103] M. Vázquez López, G. Zaragoza, M. Otero, R. Pedrido, G. Rama, M. R. Bermejo, *Crystal Growth & Design,* **2008**, *8*, 2083–2086.

[104] E. C. Constable, R. Martínez-Mañez, A. M. W. Cargill Thompson, J. V. Walker, *Dalton Trans.,* **1994**, *13*, 1585-1591.

[105] a) M. Vázquez, M. R. Bermejo, J. Sanmartín, A. M. García-Deibe, C. Lodeiro, J.Mahía, *Dalton Trans.,* **2002**, 870-877; b) M. R. Bermejo, M. Vázquez, J. Sanmartín, A. M. García-Deibe, M. Fondo, C. Lodeiro, *New J. Chem.,* **2002**, *26*, 1365-1370; c) M. Vázquez, M. R. Bermejo, M. Fondo, A. M. García-Deibe, A. M. González, R. Pedrido, *Eur. J. Inor. Chem.,* **2002**, 465-472; d) M. Vázquez, M. R. Bermejo, M. Fondo, A. M. García-Deibe, J. Sanmartín, R. Pedrido, L. Sorace, D. Gatteschi, *Eur. J. Inor. Chem.,* **2003**, 1128-1135.

[106] a) T. W. Bell, H. Jousselin, *J. Am. Chem. Soc.,* **1991**, *113*, 6283-6290; b) C. Deuschel-Cornioley, H. Stoeckli-Evans, A. von Zelewsky, *Chem. Commun.,* **1990**, *26*, 121-124.

[107] a) C. J. Cathey, E. C. Constable, M. J. Hannon, D. A. Tocher, M. D. Ward, *Chem. Commun.,* **1990**, *33,* 621-623; b) D. A. Bardwell, F. Barigetelli, R L. Clearly, L. Flamigni, M. Guardigli, J. C. Jeffery, M. D. Ward, *Inorg. Chem.,* **1995**, *34*, 2438-2445; c) V. Balzani, A. Juris, M. Venturi, S. Campagna. S. Serroni, *Chem. Rev.* **1996***, 96*, 759-801.

[108] a) K. T. Potts, K. M. Keshavarz, F. S. Tham, H. D. Abruña, C. Arana, *Inorg. Chem.,* **1993**, *32*, 4436-4441; b) G. Rapenne, B. T. Patterson, J-P. Sauvage, F. R. Keene, *Chem. Commun.,* **1999**, 1853-1855.

[109] a) E. C. Constable, M. Neuburguer, D. Smith, M. Zehnder, *Chem. Commun.,* **1996**, 1917-1923; b) E. C. Constable, A. J. Edwards, R. Martínez-Manez, P. R. Raithby, *Dalton Trans.* **1995**, 3253-3263.

[110] a) M. Vazquez, M. R. Bermejo, M. Fondo, A. M. Gonzalez, J. Mahía, L. Sorace, D. Gatteschi, *Eur. J. Inorg. Chem.,* **2001**, 1863–1868; b) B. Hasenknoptz, J-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta*, **1996**, *79*, 1643-1650; c) A. Bylik, M. M. Harding, P. Turner, T. W. Hambley, *Dalton Trans.* **1995**, 2549-2555; d) E. C. Constable, M. D. Ward, D. A. Tocher, *J. Am. Chem. Soc.,* **1990**, *112*, 1256-1258; e) G. Paolucci, S. Stelluto, S. Sitran, D. Ajo, F. Benetollo, A. Polo, G. Bombieri, *Inorg. Chim. Acta*, **1992**, *193*, 57-65.

[111] J. Sanmartín, M. R. Bermejo, A. García-Deibe, O. Piro, E. E. Castellano, *Chem Commun*. **1999**, 1953-1955.

[112] M. Vázquez, M. R. Bermejo, M. Licchelli, A. M. González-Noya, *Eur. J. Inor. Chem.* **2005**, 3479-3490.

[113] a) E. C. Constable, S. M. Elser, M. J. Hannon, A. Martin, P. R. Raithby, D. A. Tocher, *Dalton Trans.* **1996**, *25*, 2423-2429; b) N. K. Solanki, A. E. H. Wheatley, S. Radojevic, M. McPartlin, M. A. Halcrow, *Dalton Trans.* **1999**, *28*, 521-562; c) H. Oshio, M. Yamamoto y T. Ito, *Dalton Trans.* **1999**, *28*, 2641-2648.

[114] G. Baum, E. C. Constable, D. Fenske, C. E. Housecroft, T. Kulke, M.. Neuburger, M. Zehnder, *Dalton Trans.* **2000**, *29*, 945-951.

[115] a) B. Hasenknopf, J-M. Lehn, G. Baum, D. Fenske, *PNAS,* **1996**, *93*, 1397-1403; b) M-H. Shu, W-Y. Sun, C-Y Duan, Y-J. Fun, W-J. Zhang, W-X. Tang, *Dalton Trans.* **1999**, *28*, 729-735; c) E. C. Constable, M. Neuburguer, D. R. Smith y M. Zehnder, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1996**, *25*, 4207-4215.

[116] L. Carbonaro, M. Isola, V. Liuzzo, F. Marchetti, F. Balzano, C. S. Pomelli, A. Raffaelli, *Eur. J. Inorg. Chem.,* **2001**, 353; b) G. C. van Stein, G. van Koten, H. Passenier, O. Steinebach, *Inorg. Chim. Acta*, **1984**, *89*, 79-85; c) G. Paolucci, S. Stelluto, S. Sitran, D. Ajo, F. Benetollo, A. Polo, G. Bombieri, *Inorg. Chim. Acta*, **1992**, *193*, 57-66.

[117] a) B. Schoentjes, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta,* **1995**, *78,* 1-47; b) B. Hasenknopf, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta,* **1996**, *79,* 1643-1653; c) J. Tang, J. S. Costa, G. Aromí, I. Mutikainen, U. Turpeinen, P. Gamez, J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.,* **2007**, 4119–4122.

[118] X. Bao, W. Liu, J.-L. Liu, S. Gómez-Coca, E. Ruiz, M.-L. Tong, *Inorg. Chem.,* **2013**, *52*, 1099–1107.

[119] a) S. Ferrere, M. C. Elliot, *Inorg. Chem.,* **1995**, *34*, 5818-5824; b) S. L. Larson, S. M. Hendrikson, S. Ferrere, D. L. Derr, C. M. Elliot, *J. Am. Chem. Soc.,* **1995**, *117*, 5881-5883.

[120] a) H. Cheng, D. Chun-ying, F. Cheng-jie, M. Qing-jin, *Dalton. Trans.,* **2000**, 2419-2430; b) C. Piguet, G. Benardinelli, B. Bocquet, O. Schaad, A. F. Williams, *Inorg. Chem.,* **1994**, *33*, 4112-4119.

[121] a) R. Kramer, J-M. Lehn, A. DeCian, J. Fischer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, *32*, 704-709; b) M. J. Hannon, C. L. Painting, A. Jackson, J. Hamblin, W. Errington, *Chem. Commun.,* **1997**, 1807-1812.

[122] J. Malina, M. J. Hannon, V. Brabec, *Chem. Eur. J.,* **2008**, *14*, 10408–10414.

[123] J.-M. Lehn, A. A. Rigault, J. Siegel, J. Harrowfield, B. Chevrier, D. Moras, *PNAS*, **1987**, *84*, 2565–2569.

[124] a) H. Cheng, D. Chun-ying, F. Cheng-jie, M. Qing-jin, *Dalton. Trans.,* **2000**, 2419-2423; b) C. Piguet, G. Benardinelli, B. Bocquet, O. Schaad, A. F. Williams, *Inorg. Chem.,* **1994**, *33*, 4112-4125; c) R. Kramer, J-M. Lehn, A. DeCian, J. Fischer, *Angew. Chem. Int., Ed.*, **1993**, *32*, 704-709; d) M. J. Hannon, S. Bunce, A. J. Clarke, N. W. Alcock, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **1999**, *38*, 1277–1278; e) L. K. Thompson, C. J. Matthews, L. Zhao, C. Wilson, M. A. Leech, J. A. K. Howard, *Dalton Trans.,* **2001**, 2258–2262.

[125] a) X. Zhu, C. He, D. Dong, Y. Liu, C. Duan, *Dalton Trans.,* **2010**, *39*, 10051–10055; b) T. Riis-Johannessen, G. Bernardinelli, Y. Filinchuk, S. Clifford, N. D. Favera, C. Piguet, *Inorg. Chem.,* **2009**, *48*, 5512–5525; c) T. Riis-Johannessen, N. D. Favera, T. K. Todorova, S. M. Huber, L. Gagliardi, C. Piguet, *Chem. Eur. J.,* **2009**, *15*, 12702–12718.

[126] N. D. Favera, J. Hamacek, M. Borkovec, D. Jeannerat, F. Gumy, J. -C. G. Bünzli, G. Ercolani, C. Piguet, *Chem. Eur. J.,* **2007**, *14*, 2994–3005.

[127] E. C. Constable, E. E. Figgemeier, I. A. Hougen, C. E. Housecroft, M. Neuburger, S. Schaffner, L. A. Whall, *Dalton Trans.,* **2005**, *34*, 1168–1175.

[128] a) M. R. Bermejo, A. M. Gonzalez-Noya, R. Pedrido, M. J. Romero, M. Vázquez, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2005**, *44*, 4182-4187; b) M. R. Bermejo, A. M. González-Noya, M. Martínez-Calvo, R. Pedrido, M. J. Romero, M. Vázquez López, *Eur. J. Inorg. Chem.,* **2008**, 3852-3863; c) S. Z. Zhan, M. Li, J. Z. Hou, J. Ni, D. Li, X. C. Huang, *Chem. Eur. J.,* **2007**, *14*, 8916–8921; d) B. Wang, Z. Zang, H. Wang, W. Dou, X. Tang, W. Liu, Y. Shao, J. Ma, Y. Li, J. Zhou, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2013**, *52*, 1-5.

[129] a) J. F. Ayme, J. E. Beves, D. A. Leigh, R. T. McBurney, K. Rissanen, D. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.,* **2012**, *134*, 9488–9497; b) B. Hasenknopf, J. M. Lehn, B. O. Kneisel, G. Baum, D. Fenske, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **1996**, *35*, 1838–1840; c) H. B. Tanh Jeazet, K. Gloe, T. Doert, O. N. Kataeva, A. Jäger, G. Geipel, G. Bernhard, B. Büchner, K. Gloe, *Chem. Commun.,* **2010**, *46*, 2373–2375.

[130] V. Vreshch, M. El Sayed Moussa, B. Nohra, M. Srebro, N. Vanthuyne, C. Roussel, J. Autschbach, J. Crassous, C. Lescop, R. Réau, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2013**, *52*, 1968–1972.

[131] L. Cardo, M. J. Hannon, *Inorganica Chimica Acta*, **2009**, *362,* 784–792.

[132] L. Cardo, V. Sadovnikova, S. Phongtongpasuk, N. J. Hodges, M. J. Hannon, *Chem. Commun.,* **2011**, *47*, 6575–6577.

[133] a) S. Goetz and P. E. Kruger, *Dalton Trans.,* **2006**, *35*, 1277–1284; b) G. Bokolinis, T. Riis-Johannessen, L. P. Harding, J. C. Jeffery, N. McLay, C. R. Rice, *Chem. Commun.,* **2006**, *42*, 1980–1982; c) X. Zhu, C. He, D. Dong, Y. Liu, and C. Duan, *Dalton Trans.,* **2010**, *39*, 10051–10055.

[134] a) K. Binnemans, K. Lodewyckx, T. Cardinaels, T. N. Parac-Vogt, C. Bourgogne, D. Guillon, B. Donnio, *Eur. J. Inorg. Chem.,* **2006**, *2006*, 150–157; b) K. Binnemans, Y. G. Galyametdinov, R. Van Deun, D. W. Bruce, S. R. Collinson, A. P. Polishchuk, I. Bikchantaev, W. Haase, A. V. Prosvirin, L. Tinchurina, I. Litvinov, A. Gubajdullin, A. Rakhmatullin, K. Uytterhoeven, L. Van Meervelt, *J. Am. Chem. Soc.,* **2000**, *122*, 4335–4344; c) A. El-ghayoury, L. Douce, A. Skoulios, R. Ziessel, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **1998**, *37*, 2205–2208.

[135] a) F. Cardinali, H. Mamlouk, Y. Rio, N. Armaroli, and J. F. Nierengarten, *Chem. Commun.,* **2004**, 1582–1583; b) D. Schultz, F. Biaso, A. R. M. Shahi, M. Geoffroy, K. Rissanen, L. Gagliardi, C. J. Cramer, J. R. Nitschke, *Chem. Eur. J.,* **2008**, *14*, 7180–7185.

[136] M. Vázquez López, M. E. Vázquez, C. Gómez-Reino, R. Pedrido, M. R. Bermejo, *New J. Chem.,* **2008**, *32*, 1473.

[137] a) M. Vázquez, A. Taglietti, D. Gatteschi, L. Sorace, C. Sangregorio, A. M. González, M. Maneiro, R. M. Pedrido, M. R. Bermejo, *Chem. Commun.,* **2003**, 1840-1841; b) R. Pedrido, M. Vázquez López, L. Sorace, A. M. González-Noya, M. Cwiklinska, V. Suárez-Gómez, G. Zaragoza, M. R. Bermejo, *Chem. Commun.,* **2010**, *46*, 4797–4799; c) C. J. Matthews, S. T. Onions, G. Morata, L. J. Davis, S. L. Heath, D. J. Price, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 3166–3169.

[138] a) C. Dietrich-Buchecker, G. Rapenne, *Chem. Commun.,* **1997**, *33*, 2053–2054; b) M. Martínez-Calvo, M. Vázquez López, R. Pedrido, A. M. González-Noya, M. R. Bermejo, E. Monzani, L. Casella, L. Sorace, *Chem. Eur. J.,* **2010**, *16*, 14175–14180.

[139] E. Pazos, O. Vázquez, J. L. Mascareñas, M. E. Vázquez, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 3348-3359.

[140] B. Valeur, *Molecular fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH: Weinheim, 2001, 3-19.

[141] J. W. Hastings, *J. Mol. Evol.*, **1983**, *19*, 309–321.

[142] B. Valeur, Jean-Claude Brochon, *New Trends in Fluorescence Spectroscopy: Applications to Chemical and Life Sciences*, Springer, 2001.

[143] C. Reichardt, *Solvent Effects on the Position of Homogeneous Chemical Equilibria. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2003

[144] a) E. J. Kosower, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 3253-3255; b) Haidekker, M. A.; Brady, T. P.; D. Lichlyter, E. A. Theodorakis, *Bioorg. Chem.*, **2005**, *33*, 415-418.

[145] B. Valeur, *Effect of polarity on fluorescence emission. Polarity probes. Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH: Weinheim, 2001.

[146] S. Uchiyama, K. Takehira, T. Yoshihara, S. Tobita, T. Ohwada, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 5869-5874.

[147] D. Meisel , M. S. Matheson, *J. Am. Chem. Soc.,* **1977**, *99*, 6577–6581.

[148] A. Juris, V. Balzani, *Coord. Chem. Rev.,* **1988**, *84*, 85–277.

[149] H. Yersin, A. Vogler, *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds*, Springer-Verlag, 1987.

[150]S. Campagna, F. Puntoriero, F. Nastasi, G. Bergamini, V. Balzani, *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Ruthenium*, Springer Berlin Heidelberg, 2007, *vol. 280*.

[151] J. G. Vos, J. M. Kelly, *Dalton Trans.,* **2006**, *35*, 4869–4883.

[152] W. R. Browne, J. J. McGarvey, *Coord. Chem. Rev.,* **2006**, *250*, 1696–1709.

[153] K. L. Haas, K. J. Franz, *Chem. Rev.,* **2009**, *109*, 4921–4960.

[154] D. Kuang, S. S. Ito, B. Wenger, C. Klein, J. E. Moser, R. Humphry-Baker, S. M. Zakeeruddin, M. Grätzel, *J. Am. Chem. Soc.,* **2006**, *128*, 4146–4154.

[155] M. R. Gill, J. Garcia-Lara, S. J. Foster, C. Smythe, G. Battaglia, J. A. Thomas, *Nat. Chem.,* **2009**, *1*, 662–667.

[156] L. De Cola, P. Belser, *Coord. Chem. Rev.,* **1998**, *177*, 301–346.

[157] a) J. C. Venter, *Science,* **2001**, *291*, 1304–1351. b) E. Pennisi, *Science,* **2003**, *300*, 409-412. c) International Human Genome Sequencing Consortioum. *Nature*, **2004**, *431*, 931–945.

[158] J. P. Pellois, T. W. Muir, *Curr. Opin. Chem. Biol.,* **2006**, *39*, 3–22.

[159] a) S. A. Narang, *Tetrahedron,* **1986**, *10*, 487–491.

[160] a) A. Kornberg, *Biochemistry,* **1987**, *26*, 6888–6891. b) A. Kornberg, *Chem. Biol.,* **1996**, *3*, 3–5.

[161] B. Imperiali, *Nat. Chem,* **2009**, *1*, 9–10

[162] a) S. L. Schreiber, *Chem. Eng. News*, **1992**, *70*, 22–32. b) M. Famulok, H. Waldmann, *ChemBioChem.,* **2001**, *2*, 3–6.

[163] H. Waldmann, P. Janning, *Chemical Biology: a practical course*, WILEY–VCH, 2004.

[164] Nat. Chem. Biol., **2005**, *1*, 3.

[165] K. H. Altmann, J. Buchner, H. Kessler, F. Diederich, B. Kräutler, S. Lippard, R. Liskamp, K. Müller, E. M. Nolan, B. Samorì, G. Schneider, S. L. Schreiber, H. Schwalbe, C. Toniolo, C. A. A. van Boeckel, H. Waldmann, C. T. Walsh, *ChemBioChem.,* **2009**, *10*, 16–29.

[166] H. A. Godwin, B. L. Davis, *Nat. Chem. Biol.,* **2005**, *1*, 176–179.

[167] a) K. L. Morrison, Weiss, G. A. *Nat. Chem. Biol.,* **2006**, *2*, 3–6. b) G. Quinkert, H. Wallmeier, N. Windhab, D. Reichert, *Chemical Biology: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design*, WILEY–VCH, 2007, 3–67.

[168] M. Maw, J. Fujimoto, T. Tamaya, *BMC Cancer*, **2008**, *9*, 430–430.

[169] R. L. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification CRC Press Inc.,* 2004.

[170] J. M. Gutteridge, *Clinical Chemistry*, **1995**, *41*, 1819–1828.

[171] Y. Zhao, J. Jin, Q. Hu, H. M. Zhou, J. Yi, Z. Yu, L. Xu, X. Wang, Y. Yang, J. Loscalzo, *Cell Metab*., **2011**, *14*, 545-554.

[172] K. L. Haas, K. J. Franz, *Chem. Rev.,* **2009**, *109*, 4921–4960.

[173] S. J. Lippard, *Nat. Chem. Biol.,* **2006**, *2*, 504-516.

[174] P. C. A. Bruijnincx, P. J. Sadler, *Curr. Opin. Chem. Biol.,* **2008**, *12*, 229-287.

[175] G. Gasser, N. Metzle-Nolte, *Metal Compounds as Enzyme Inhibitors, Bioinorganic Medicinal Chemistry,* Wiley-VCH, 2011.

[176] I. M. Bennett, H. M. V. Farfano, F. Bogani, A. Primak, P. A. Liddell, L. Otero, L. Sereno, J. J. Silber, A. L. Moore, T. A. Moore, D. Gust, *Nature,* **2002**, *420*, 398-402.

[177] E. J. Merino, A. K. Boal, J. K. Barton, *Curr. Opin. Chem. Biol.,* **2008**, *12*, 229

[178] B. E. Mann *Carbon Monoxide: An Essential Signaling Molecule, Organometallic Chemistry, Vol. 32*, Springer, 2010.

[179] M. J. Rose, P. K. Mascharak, *Curr. Opin. Chem. Biol.,* **2008**, *12*, 238-252.

[180] a) A. Ruggi, D. N. Reinhoudt, A. H. Velders, *MRI Contrast Agents: State of the Art and New Trends: Bioinorganic Medicinal Chemistry,* Wiley-VCH, 2011, 223-251; b) A. Ruggi, D. N. Reinhoudt, A. H. Velders, *Biomedical Applications of Metal-Containing Luminophores: Bioinorganic Medicinal Chemistry,* Wiley-VCH, 2011, 383-406.

[181] R. Alberto, *Metal-Based Radiopharmaceuticals: Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, 2011, pp. 235-305.

[182] W. Semmler, M. Schwaiger, *Handbook of Experimental Pharmacology, Volume 185/I & II: Molecular Imaging I & II,* Springer, Verlag, 2008.

[183] *Biomedical Optical Imaging*, Oxford University Press, 2009.

[184] a) C. Piguet, J.-C. G. Bünzli, in *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 2010; b) S. I. Klink, H. Keizer, F. C. J. M. van Veggel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 4319-4324.

[185] J.-C. G. Bünzli, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2729-2755

[186] K. L. Haas, K. J. Franz, *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 4921-4960.

[187] H. Lodish, A. Berk, L. S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, **2000**; *capítulo 9, págs. (pp 351-403)*.

[188] F. H. C. Crick, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **1958**, *12,* 138–163.

[189] "*The Central Dogma: this states that once information has passed into protein it cannot get out again. In more detail, the transfer of information from nucleic acid to protein may be possible, but transfer from protein to protein, or from protein to nucleic acid is impossible. Information means here the precise determination of sequence, either of bases in the nucleic acid or of amino–acid residues in the protein.*" (Francis Crick, **1957**)

[190] F. H. C. Crick, *Nature,* **1970**, *227,* 561–563.

[191] G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, RSC Publishing, Cambridge, **2006**.

[192] a) Z. Otwinowski, R. W. Schevitz, R–G. Zhang, C. L. Lawson, A. Joachimiak, R. Q. Marmorstein, B. F. Luisi, P. B. Sigler, *Nature,* **1988**, *335*, 321–329. b) R. E. Dickerson, H. R. Drew, *J. Mol. Biol.* **1981**, *149*, 761–786.

[193] P. L. Privalov, A. I. Dragan, C. Crane–Robinson, K. J. Breslauer, D. P. Remeta, C. A. S. A. Minetti, *J. Mol. Biol.,* **2007**, *365*, 1–9.

[194] N. M. Luscombe, J. Laskowski, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, *Nucleic Acids Res.,* **2000**, *28*, 235–242.

[195] a) Y. J. Li, X. H. Fu, D. P. Liu, C. C. Liang, *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. **2004**, *36,* 1411–1423. b) S. Khorasanizadeh, *Cell,* **2004**, *116,* 259–272.

[196] C. K. Mathews, K. E. van Holde, K. G. Ahern, Los genes eucariotas y su expresión. *Bioquímica*, 3 ed.; Pearson Educación: Madrid, **2002**; pp 1205-1258.

[197] B. Alberts, A. Jonhson, J. Lewis, M. Raff, K.; Roberts, P. Walter, How cells read the genome: from ADN to protein. *Molecular Biology of the Cell*, 4 ed.; Garland Science: New York, **2001**; pp 299-374.

[198] B. Alberts, A. Jonhson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Control of gene expression. *Molecular Biology of the Cell*, 4 ed.; Garland Science: New York, **2001**; pp 375-466.

[199] C. K. Mathews, K. E. van Holde, K. G. Ahern, Lectura de la información: transcripción. *Bioquímica*, 3 ed.; Pearson Educación: Madrid, **2002**; pp 1105-1158.

[200] D. S. Latchman, Families of ADN binding transcription factors. *Eukariotic Transcription Factors*, 4 ed.; Elsevier: London, 2004; pp 77-134.

[201] D. S. Latchman, RNA polymerases and the basal transcriptional complex. *Eukariotic Transcription Factors*, 4 ed.; Elsevier: London, 2004; pp 55-76.

[202] N. M. Luscombe, J. Laskowski, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, *Nucl. Acids Res.,* **2000**, *28*, 235.

[203] X.Cai, P. J. Gray Jr, D. Von Hoff, *Cancer Treatment Rev.,* **2009**, *35*, 437-450.

[204] a) B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002; b) W.T. Mason, *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity – A practical guide to technology for*

quantitative real-time analysis; Academic Press, 1999; c) E. Pazos, O. Vázquez, J. L. Mascareñas, M. E. Vázquez, *Chem. Soc. Rev*. **2009**, *38*, 3348; d) B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science*, **2006**, *312*, 217; e) S. B. VanEngelenburg, A. E. Palmer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, *12*, 60-82.

[205] I. Ghosh, C.I. Stains, D.J. Segal, *Mol. Biosyst.*, **2006**, *2*, 551-561.

[206] a) P. E. Nielsen, *Curr. Med. Chem.*, **2001**, *8*, 545; b) J. M. Levsky, R.H. Singer, *J. Cell Sci.*, **2003**, *116*, 2833; c) L. Bissonnette, M. G. Bergeron, *Expert. Rev. Mol. Diagn*. **2006**, *6*, 433; d) K. K. Jain, *Expert. Rev., Mol. Diagn*. **2003**, *3*, 153; e) R. Zhao, *Clin. Lab. Sci.*, **2005**, *18*, 254.

[207] a) S. Janssen, T. Durussel, U. K. Laemmli, *Mol. Cell,* **2000**, *6*, 999; b) K. Maeshima, S. Janssen, U. K. Laemmli, *EMBO J.,* **2001**, *20*, 3218; c) V. C. Rucker, S. Foister, C. Melander, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 1195; d) V. C. Rucker, A. R. Dunn, S. Sharma, P. B. Dervan, H. B. Gray, J. *Phys. Chem. B,* **2004**, *108*, 7490; e) C. L. Warren, N. C. S. Kratochvil, K. E. Hauschild, S. Foister, M. L. Brezinski, P. B. Dervan, G. N. Phillips, A. Z. Ansari, *PNAS,* **2006**, *103*, 867.

[208]a) M. E. Vázquez, M. A. Caamaño, J. Martínez-Costas,; L. Castedo, J. L. Mascareñas, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2001**, *40*, 4723; b) Vázquez, O.; Vázquez, M. E.; Blanco, J. B.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2007**, *46*, 6886; c) Pazos, E.; Mosquera, J.; Vázquez, M. E.; Mascareñas, J. L. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1958.

[209] a) L. M. Wilhelmsson, P. Lincoln, B.Nordén, *Sequence–specific ADN Binding Agents*, RSCPublishing, **2006**. b) A. Lorente, M. J. Fernández, *An. Quím.,* **2008**, *104*, 280–289. c) M. J. Hannon, *Chem. Soc. Rev.,* **2007**, *36*, 280–295.

[210] H. Deng, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, G. J. Thomas Jr, *Nucl. Acids Res.,* **2000**, *28*, 3379–3385.

[211] R. Boer, A. Canals and M. Coll, *Dalton Trans.*, **2009**, 399-414.

[212] B. A. D. Neto, A. A. M. Lapis, *Molecules,* **2009**, *14*, 1725–1746.

[213] B. M. Zeglis, V. C. Pierre, J. K. Barton, *Chem. Commun.,* **2007**, 4565–4579.

[214] H.-K. Liu, P. J. Sadler, *Acc. Chem. Res.,* **2011**, *44*, 349–359.

[215] W. C. Tse, D. L. Boger, *Acc. Chem. Res.,* **2004**, *37*, 61–69.

[216] A. H. Krotz, B. P. Hudson, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.,* **1993**, *115*, 12577–12578.

[217] N. Berthet, J. Michon, J. Lhomme, M. P. Teulade–Fichou, J–P. Vigneron, J–M. Lehn, *Chem. Eur. J.,* **1999**, *5*, 3625–3630.

[218] J. Davies, E. J. Dodson, M. H. Moore, *Biochemistry,* **1995**, *34*, 415–425.

[219] a) B. M. Zeglis, V. C. Pierre, J. T. Kaiser, J. K. Barton, *Biochemistry*, **2009**, *48*, 4247–4253; b) A. C. Komor, C. J. Schneider, A. G. Weidmann, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.,* **2012**, *134*, 19223–19233.

[220] H. Song, J. T. Kaiser, J. K. Barton, *Nat. Chem.,* **2012**, 1–6.

[221] D. Praseuth, A. L. Guieysse, C. Hélène, *Biochim. Biophys. Acta,* **1999**, *1489*, 181–206.

[222] T. Da Ros, G. Spalluto, M. Prato, T. Saison–Behmoaras, A. Boutorine, B. Cacciari, *Curr. Med. Chem.,* **2005**, *12*, 71–88.

[223] Zhang, J., Zhang, F., Li, H., Liu, C., Xia, J., Ma, L., Chu, W., Zhang, Z., Chen, C., Li, S.,Wang, S., *Current Medicinal Chemistry,* 19, **2012**, 2957-2975.

[224] a) D. E. Wemmer, *Proc. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.,* **2000**, *29*, 439–461. b) S. M. Nelson, L. R. Ferguson, W. A. Denny, *Mutation Research*, **2007**, *623*, 24–40.

[225] B.; Nguyen, M. P. H. Lee, D. Hamelberg, A. Joubert, C. Bailly, R. Brun, S. Neidle, D. W. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.,* **2002**, *124*, 13680–13681.

[226] D. Hamelberg, L. D. Williams, W. D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.,* **2001**, *123*, 7745–7755.

[227] B. Schoentjes, J.-M. Lehn, *Helv, Chim. Acta,* **1995**, *78*, 1–12.

[228] J. M. C. A. Kerckhoffs, J. C. Peberdy, I. Meistermann, L. J. Childs, C. J. Isaac, C. R. Pearmund, V. Reudegger, S. Khalid, N. W. Alcock, M. J. Hannon, *Dalton Trans.,* **2007**, 734.

[229] I. Meistermann, V. Moreno, M. J. Prieto, E. Moldrheim, E. Sletten, S. Khalid, P. M. Rodger, J. C. Peberdy, C. J. Isaac, A. Rodger, M. J. Hannon, *PNAS,* **2002**, *99*, 5069–5074.

[230] M. J. Hannon, V. Moreno, M. J. Prieto, E. Moldrheim, E. Sletten, I. Meistermann, C. J. Isaac, K. J. Sanders, A. Rodger, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2001**, *40*, 879–884.

[231] A. Oleksi, A. G. Blanco, R. Boer, I. Usón, J. Aymami, A. Rodger, M. J. Hannon, M. Coll, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2006**, *45*, 1227–1231.

[232] A. C. G. Hotze, N. J. Hodges, R. E. Hayden, C. Sanchez-Cano, C. Paines, N. Male, M.-K. Tse, C. M. Bunce, J. K. Chipman, M. J. Hannon, *Chem. Biol.*, **2008**, *15*, 1258–1267.

[233] B. Song, C. D. B. Vandevyver, A.-S. Chauvin, J.-C. G. Bünzli, *Org. Biomol. Chem.,* **2008**, *6*, 4125.

[234] a) A.-S. Chauvin, S. Comby, B. Song, C. D. B. Vandevyver, J.-C. G. Bünzli, *Chem. Eur. J.,* **2008**, *14*, 1726–1739; b) A.-S. Chauvin, S. Comby, B. Song, C. D. B. Vandevyver, F. Thomas, J.-C. G. Bünzli, *Chem. Eur. J.,* **2007**, *13*, 9515–9526; c) J.-C. G. Bünzli, A.-S. Chauvin, C. D. B. Vandevyver, S. Bo, S. Comby, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2008**, *1130*, 97–105.

[235] a) V. Fernández-Moreira, B. Song, V. Sivagnanam, A.-S. Chauvin, C. D. B. Vandevyver, M. Gijs, I. Hemmilä, H.-A. Lehr, J.-C. G. Bünzli, *Analyst*, **2010**, *135*, 42–52. b) J.-C. G. Bünzli, *Chem. Rev.,* **2010**, *110*, 2729–2755.

[236] C. R. K. Glasson, G. V. Meehan, J. K. Clegg, L. F. Lindoy, J. A. Smith, F. R. Keene, C. Motti, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 10535–10538.

[237] R. K. Mishra, K. K. Upadhyay, S. Shukla, R. Mishra, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 4238–4240.

[238] L. J. Childs, J. Malina, B. E. Rolfsnes, M. Pascu, M. J. Prieto, M. J. Broome, P. M. Rodger, E. Sletten, V. Moreno, A. Rodger, M. J. Hannon, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 4919–4927.

[239] S. E. Howson, A. Bolhuis, V. Brabec, G. J. Clarkson, J. Malina, A. Rodger, P. Scott, *Nat. Chem.*, **2012**, *4*, 31–36.

[240] F. P. Dwyer, E. C. Gyarfas, *Nature*, **1952**, *170*, 190–191.

[241] J. M. Kelly, A. B. Tossi, D. J. McConnell, C. OhUigin, Nucl. Acids Res. **1985**, *13*, 6017-6034.

[242] J. Reedijk, *Platinum Metals Review*, **2008**, *52*(1), 2–11.

[243] C. V. Kumar, J. K. Barton, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 5518-5521.

[244] J. K. Barton, *Science*, **1986**, *233*, 727–734.

[245] J. R. Aldrich-Wright, I. D. Greguric; C. H. Y. Lau, P. Pellegrini, J. G. Collins, Inorg. Chem., **1998**, *37*, 3133-3141.

[246] S. Delaney, M. Pascaly, P. K. Bhattacharya, K. Han, J. K. Barton, *Inorg. Chem.,* **2002**, *41*, 1966–1974.

[247] A. E. Friedman, C. V. Kumar, N. J. Turro, J. K. Barton, *Nucl. Acids Res.,* **1991**, *19*, 2595–2602.

[248] Y. Jenkins, A. E. Friedman, N. J. Turro, J. K. Barton, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 10809–10816.

[249] J. K. Barton, J. M. Goldberg, C. V. Kumar, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 2081–2088.

[250] N. P. Cook, K. Kilpatrick, L. Segatori, A. A. Martí, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *134*, 20776–20782.

[251] A. N. Glazer, H. S Rye, *Nature*, **1992**, *359* , 859 – 861

[252] F. M. O'Reilly, J. M. Kelly, *New J. Chem.*, **1998**, *22*, 215–217.

[253] a) F. O'Reilly, J. M. Kelly, A. K. Mesmaeker, *Chem. Commun.*, **1996**, 1013–1014; b) F. M. O'Reill, J. M. Kelly, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, *104*, 7206–7213.

[254] S. Neidle, Principles of Nucleic Acid Structure, *Academic Press*, 2008, pp 132-203.

[255] J. L. Morgan, C. B. Spillane, J. A. Smith, D. P. Buck, J. G. Collins, F. R. Keene, *Dalton Trans.*, **2007**, *36*, 4333–4342.

[256] J. A. Smith, J. L. Morgan, A. G. Turley, J. G. Collins, F. R. Keene, *Dalton Trans.*, **2006**, *38*, 3179–3187.

[257] U. McDonnell, J. M. C. A. Kerchoffs, R. P. M. Castiñeiras, M. R. Hicks, A. C. G. Hotze, M. J. Hannon, A. Rodger, *Dalton Trans.*, **2008**, 667–675.

[258] C. Rajput, R. Rutkaite, L. Swanson, I. Haq, J. A. Thomas, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 4611–4619.

[259] C.-C. Ju, A.-G. Zhang, C.-L. Yuan, X.-L. Zhao, K.-Z. Wang, *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, *105*, 435–443.

[260] A. Yadav, T. Janaratne, A. Krishnan, S. S. Singhal, S. Yadav, A. S. Dayoub, D. L. Hawkins, S. Awasthi, F. M. MacDonnell, *Mol Cancer Ther*, **2013**, *26*, 643–651.

[261] X.-L. Zhao, Z.-S. Li, Z.-B. Zheng, A.-G. Zhang, and K.-Z. Wang, *Dalton Trans.*, **2013**, *42*, 5764–5777.

[262] S. Negi, M. Imanishi, M. Matsumoto, Y. Sugiura, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 3236–3249.

[263] a) A. Jacques, B. B. Mettra, V. Lebrun, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 3921–3931; b) A. Jacques, M. Clémancey, G. Blondin, V. Fourmond, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 2915–2917.

[264] D. F. Shullenberger, P. D. Eason, E. C. Long, *J. Am. Chem. Soc.,* **1993**, *115*, 11038–11039.

[265] S. Melino, M. Gallo, E. Trotta, F. Mondello, M. Paci, R. Petruzzelli, *Biochemistry*, **2006**, *45*, 15373–15383.

[266] a) Y. Y. Fang, B. D. Ray, C. A. Claussen, K. B. Lipkowitz, E. C. Long, *J. Am. Chem. Soc.,* **2004**, *126*, 5403–5412; b) Y. Y. Fang, C. A. Claussen, K. B. Lipkowitz, E. C. Long, *J. Am. Chem. Soc.,* **2006**, *128*, 3198–3207.

[267] E. C. Long, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, *32*, 827–836.

[268] L. Ancel, C. Gateau, C. Lebrun, P. Delangle, *Inorg. Chem.,* **2013**, *52*, 552–554.

[269] A. Myari, N. Hadjiliadis en *Metal Complex-ADN Interaction*, Wiley, 2009.

[270] a) A. C. Komor, C. J. Schneider, A. G. Weidmann, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 19223–19233; b) C.-H. Leung, H.-J. Zhong, D. S.-H. Chan, D.-L. Ma, *Coord. Chem. Rev.*, **2013**, *257*, 1764–1776; c) M. R. Gill, J. A. Thomas, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 3179–3192; d) K. Triantafillidi, K. Karidi, O. Nováková, J. Malina, A. Garoufis, *Dalton Trans.*, **2011**, *40*, 472–483; e) J. Brunner, J. K. Barton, *Biochemistry*, **2006**, *45*, 12295–12302.

[271] C. A. Puckett, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 8738–8739.

[272] M. P. Fitzsimons, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 3379–3380.

2. Objetivos

2.1 Objetivos

En la introducción se hablo de la importancia que tienen los compuestos de coordinación en el campo de la Química Biológica y de las dificultades asociadas con su inclusión práctica en este área. En esta Tesis Doctoral proponemos el uso de la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida como alternativa a la síntesis covalente clásica como vía de obtención de complejos con utilidad en Química Biológica. En concreto, nos planteamos la síntesis de aminoácidos no naturales basados en bpy para la obtención de dos tipos de metalopéptidos artificiale: helicatos peptídicos y metalopéptidos de rutenio (II). y el estudio de sus propiedades de unión al ADN.

a) Los helicatos son supramoléculas con interesantes propiedades de unión al ADN. Sin embargo, el número de trabajos sobre este tema es relativamente escaso. Este infradesarrollo es fundamentalmente debido a cuatro razones principales: 1) los helicatos son normalmente difíciles de sintetizar; 2) sus disoluciones normalmente contienen mezclas de los enantiómeros P y M; 3) son difíciles de optimizar para fines biológicos debido a la rigidez de las metodologías sintéticas clásicas utilizadas en la construcción de las hebras orgánicas, y 4) son normalmente poco solubles en agua. Nuestra propuesta de utilizar la metodología sintética en fase sólida de péptidos en la construcción de las hebras precursoras de helicatos pretende dar una solución a estos problemas.

b) Los complejos polipiridínicos de Ru(II) son una familia de compuestos ampliamente estudiado en un contexto biológico debido a sus interesantes propiedades fotofísicas y a que su química de coordinación es bien conocida. No obstante, la modificación química de estos sistemas es complicada, lo que perjudica notablemente su desarrollo. En esta Tesis Doctoral planteamos una alternativa sintética para la obtención de agentes de unión al ADN de rutenio (II) basado en la metodología en fase sólida de síntesis de péptidos.

Los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral son:

– GENERALES

I Desarrollo de una ruta sintética para la obtención de fragmentos coordinantes basados en bpy aptos para su integración en la

metodología sintética de péptidos en fase sólida siguiendo la estrategia Fmoc/Boc.

II Desarrollo y optimización de una metodología sintética en fase sólida (SPPS) para la obtención de ligandos peptídicos derivados de los fragmentos coordinantes basados en bpy.

– HELICATOS PEPTÍDICOS

I Síntesis y optimización estructural a través de una metodología SPPS de las hebras precursoras de helicatos peptídicos dinucleares de los fragmentos coordinantes basados en bpy.

II Síntesis y estudio estructural de los helicatos peptídicos dinucleares derivados de estas hebras.

III Estudio de las propiedades de unión de los helicatos peptídicos al ADN.

– METALOPÉPTIDOS DE RU(II)

I Síntesis a través de una metodología SPPS de ligandos precursores de metalopéptidos dinucleares de Ru(II) derivados de los fragmentos coordinantes basados en bpy.

II Síntesis y estudio estructural de los metalopéptidos dinucleares de Ru(II) derivados de estos ligandos.

III Estudio de las propiedades de unión de estos metalopéptidos de Ru(II) al ADN.

3. Discusión de resultados

3.1 PLANTEAMIENTO SINTÉTICO GENERAL

En esta Tesis Doctoral planteamos la síntesis a gran escala de aminoácidos no naturales basados en 2,2´-bipiridina (bpy), para la síntesis de péptidos siguiendo una metodología en fase sólida (SPPS) a través de la estrategia Fmoc. De esta manera podremos acceder a ligandos peptídicos de manera rápida y eficiente, pudiendo variar sus propiedades químicas y estructurales de forma sencilla a través de la modificación de la secuencia peptídica. Hemos diseñado y optimizado dos rutas sintéticas basadas en los trabajos realizados por Whittle[273], Newkome *et al.*,[274] Drueckhammer *et al.*[275] y Elliot *et al.*[276] El precursor comercial para las dos rutas es la 5,5´-dimetil-2,2´-bipidiridina (**1**) y los dos primeros pasos son comunes para ambas. En las dos rutas el paso fundamental es la asimetrización de la bpy.

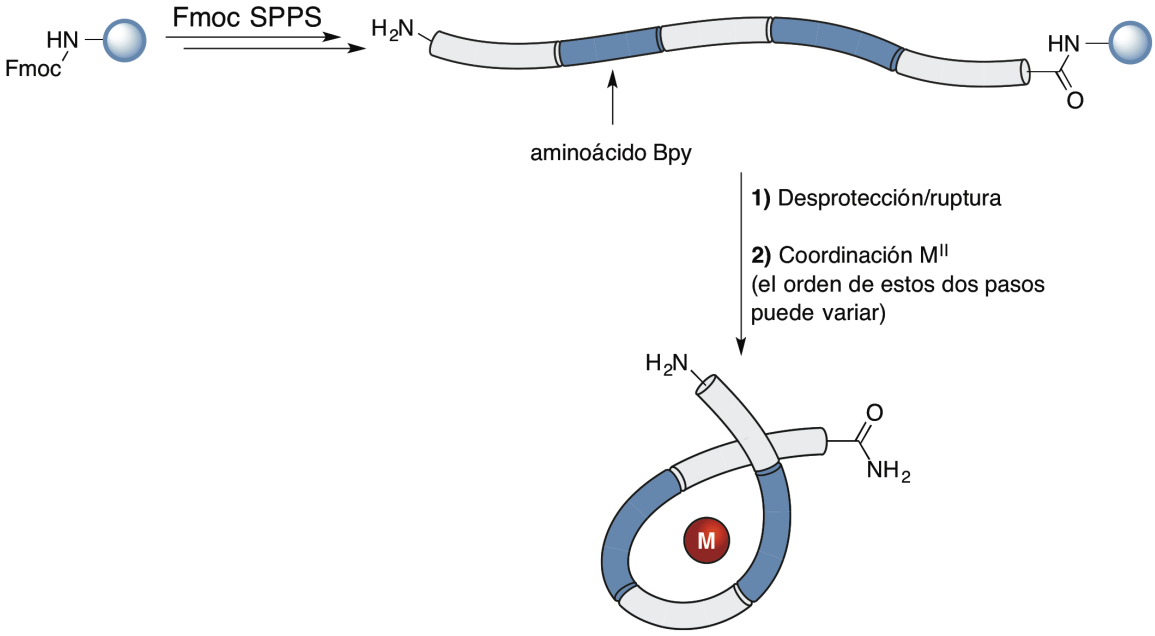


Figura 3.1: Planteamiento general para la síntesis de los ligandos peptídicos y sus metalopéptidos derivados. Los cilindros claros representan secuencias de aminoácidos no coordinantes y los azules los aminoácidos derivados de bpy.

3.1.1 SÍNTESIS DE LOS FRAGMENTOS COORDINANTES BASADOS EN EL LIGANDO BPY

3.1.2 RUTA I: SÍNTESIS DEL AMINOÁCIDO DERIVADO DEL ÁCIDO [2,2'-BIPIRIDINA]-5,5'-DICARBOXÍLICO (5, 5´-BPDA)

Los dos primeros pasos de esta ruta son una modificación de lo publicado por Whittle[273] y Elliot *et al.*[276] El paso correspondiente a la monohidrólisis del diéster **3** ha sido publicado previamente por Drueckhammer *et al.*[275] (*Figura 3.2*).

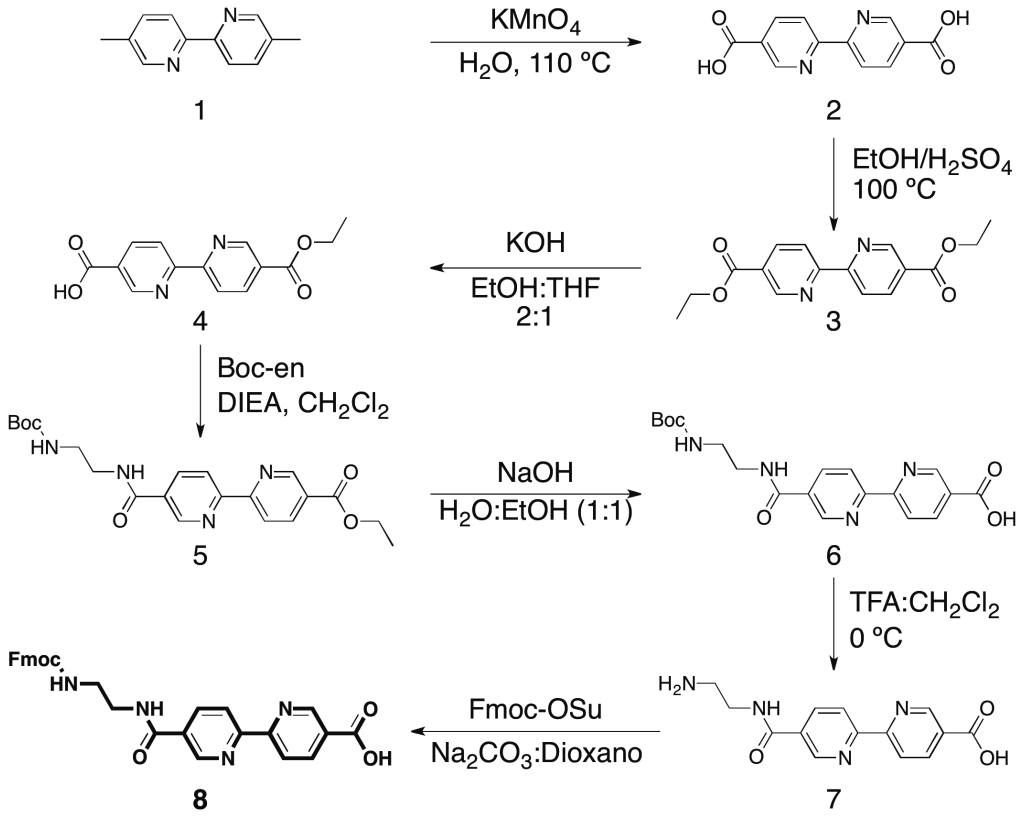


Figura 3.2: Esquema sintético de la ruta I

El primer paso de esta ruta es la oxidación de los metilos de la 5,5´-dimetil-2-2´-bipiridina (**1**) con $KMnO_4$ en disolución acuosa para dar el diácido **2** (5,5´-Bpda). A continuación, se lleva a cabo la esterificación del diácido **1** en etanol en presencia de ácido sulfúrico para dar el diéster **3**, que precipita en agua como un sólido blanco.

La asimetrización de la bpy se llevó a cabo a través de la monohidrólisis de uno de los grupos éster del diéster **3** empleando una mezcla 2:1 de etanol y THF como disolvente y KOH como base. Una vez asimetrizada la bpy, el grupo amino se introduce mediante la reacción entre el grupo ácido del monoéster **4**, debidamente activado como cloruro de acilo, y la 1,2-etilendiamina mono-Boc en diclorometano y en presencia de DIEA como base, para dar el compuestos **5**. Se introduce la diamina Boc-protegida en vez de Fmoc-protegida debido a que posteriormente es necesario realizar una hidrólisis básica del grupo éster en α a la bpy, condiciones que el grupo Fmoc no es capaz de resistir. El aminoácido **6** se obtiene mediante la hidrólisis en medio alcalino del grupo éster de **5**. A continuación se realiza un cambio de grupo protector, Boc por Fmoc. Se obtiene así el aminoácido Fmoc-en-Bpy-OH (**8**), un sólido blanco muy insoluble en todos los disolventes (*Figura 3.3*). La pureza de **8** se comprobó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de masas (*Figura 3.4*).

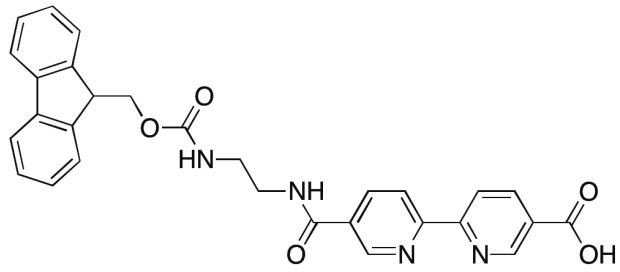


Figura 3.3: Estructura del aminoácido Fmoc-en-Bpy-OH (**8**)

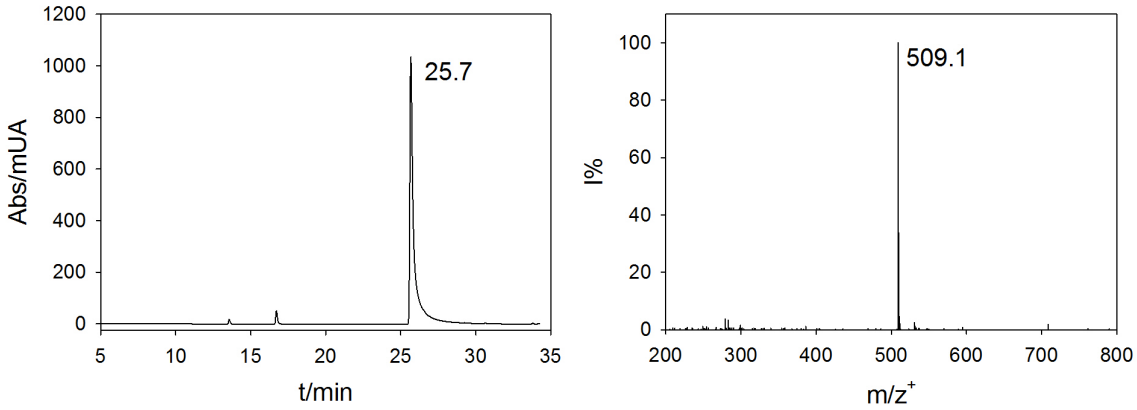


Figura 3.4: Izquierda, cromatograma del aminoácido **8**; derecha, espectro de masas correspondiente al pico cromatográfico de t_R 25.7 $[M+H]^+$ 509.1.

La síntesis de este aminoácido es sencilla y de alto rendimiento global (83 %). Lamentablemente, dada su bajísima solubilidad, no fue posible su utilización en la síntesis de péptidos. Se emplearon diferentes

vías de activación, desde la formación de halogenuros de acilo hasta la formación de ésteres activos mediante el uso de agentes activantes (carbodiimidas y sales de uronio y de fosfonio). En ningún caso se consiguió un acoplamiento superior al 5 % empleando 5 equivalentes de aminoácido por mmol de resina. Este fue el motivo que nos llevó a modificar su estructura.

3.1.3 RUTA II: SÍNTESIS DE LOS DIPÉPTIDOS COORDINANTES DERIVADOS DEL ÁCIDO 5'-AMINO-2,2'-BIPIRIDINA-5-CARBOXÍLICO (5BPY)

3.1.3.1 Primera parte: síntesis del ácido 5´-amino-2,2´-bipiridina-5-carboxílico

Los pasos descritos en esta ruta son una modificación de lapublicada por Newkome *et al.*[274] En ella se consigue la asimetrización de la bpy haciendo reaccionar el diéster **3** con un equivalente de hidracina monohidratada en una mezcla etanol:tolueno (3:1) a 80 ºC durante 30 h. La asimetrización es el paso más crítico de la ruta dado que la mezcla de disolventes y la temperatura son parámetros fundamentales para la evolución de la reacción. Una mezcla más rica en tolueno hace que el compuesto **9** no precipite una vez formado, lo que hace disminuir notablemente el rendimiento. Por otra parte, una temperatura más elevada tiene como consecuencia la disustitución de la bpy. El rendimiento global de este paso se optimizó hasta un 90 %. Posteriormente, el grupo hidracina del compuesto **9** se oxidó con $NaNO_2$ en ácido clorhídrico concentrado como disolvente, para dar la azida **10**. A continuación, se realiza una transposición de Curtius en una mezcla 1:1 etanol y xileno, obteniéndose el carbamato **11**. Los dos grupos éster de **11** se hidrolizan en una mezcla 1:1 de etanol y sosa 2.5 M. El ácido carbámico generado se descompone al acidificar, obteniéndose el aminoácido **12** como un sólido amarillo muy brillante.

Hay que indicar que el grupo amino del aminoácido **12** es susceptible de oxidarse en presencia de luz y O_2, dando lugar al correspondiente nitrocompuesto. Para evitar la oxidación es necesario guardarlo en nevera bajo atmósfera de argón. Por esta razón se decidió almacenar estos derivados en forma de carbamato (**11**), su forma más

estable y avanzada en la ruta sintética. La hidrólisis del mismo se realizó en función de la demanda.

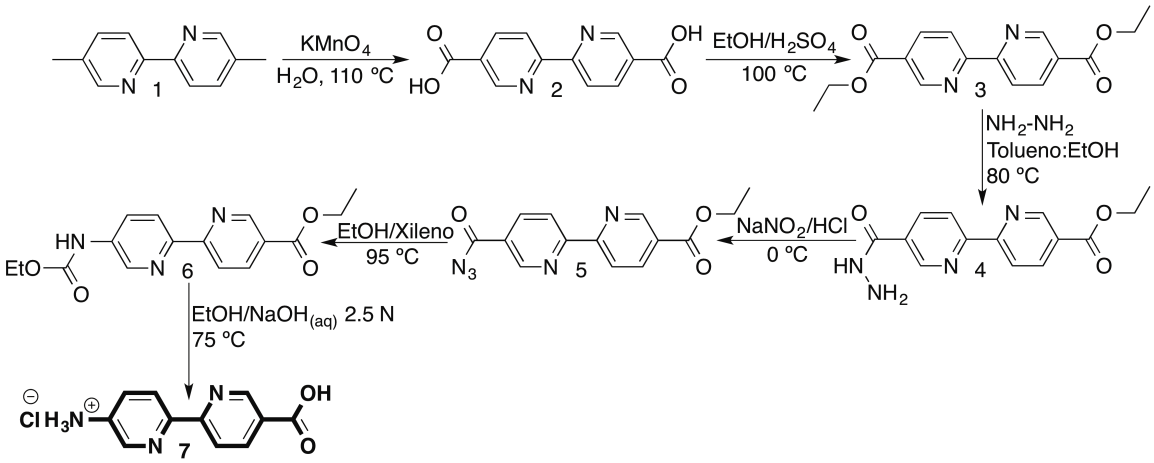


Figura 3.5: Esquema sintético correspondiente a la primera parte de la ruta II.

3.1.3.2 Segunda parte: Acoplamiento de aminoácidos alifáticos al ácido 5′-amino-2,2′-bipiridina-5-carboxílico

El grupo amino del aminoácido **12** es poco reactivo y por lo tanto no es válido para utilizarlo en la metodología SPPS. Para solucionar este inconveniente nos planteamos acoplar un aminoácido alifático a **12** a través de su grupo amino siguiendo una metodología clásica en disolución.

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es la obtención de metalopéptidos enantioméricamente puros y por este motivo decidimos que el aminoácido seleccionado para el acoplamiento con **12** no aportase ningún estereocentro adicional a la secuencia peptídica. Con esta idea, se optimizó la síntesis de los "dipéptidos" derivados de glicina (**13**), ácido 3-aminoisobutírico (**14**), β-alanina (**15**) y ácido 5-amino-3-oxapentanoico [O1Pen] (**16**), todos ellos debidamente protegidos con el grupo protector Fmoc (*Figura 3.6*).

El acoplamiento de los aminoácidos (AA) al aminoácido bipiridínico **12** se llevo a cabo a través de la formación del correspondiente cloruro de acilo por reacción $SOCl_2$. El disolvente utilizado en los acoplamientos depende del aminoácido involucrado: se emplea diclorometano para los compuestos **13**, **15** y **16**, mientras que en el caso de **14** la reacción se realiza en cloroformo. En todos los casos se emplea DIEA como base. Los dipéptidos Fmoc-AA-5Bpy-OH (**13-16**) son poco solubles en la mezcla de reacción y precipitan a medida que se van formando.

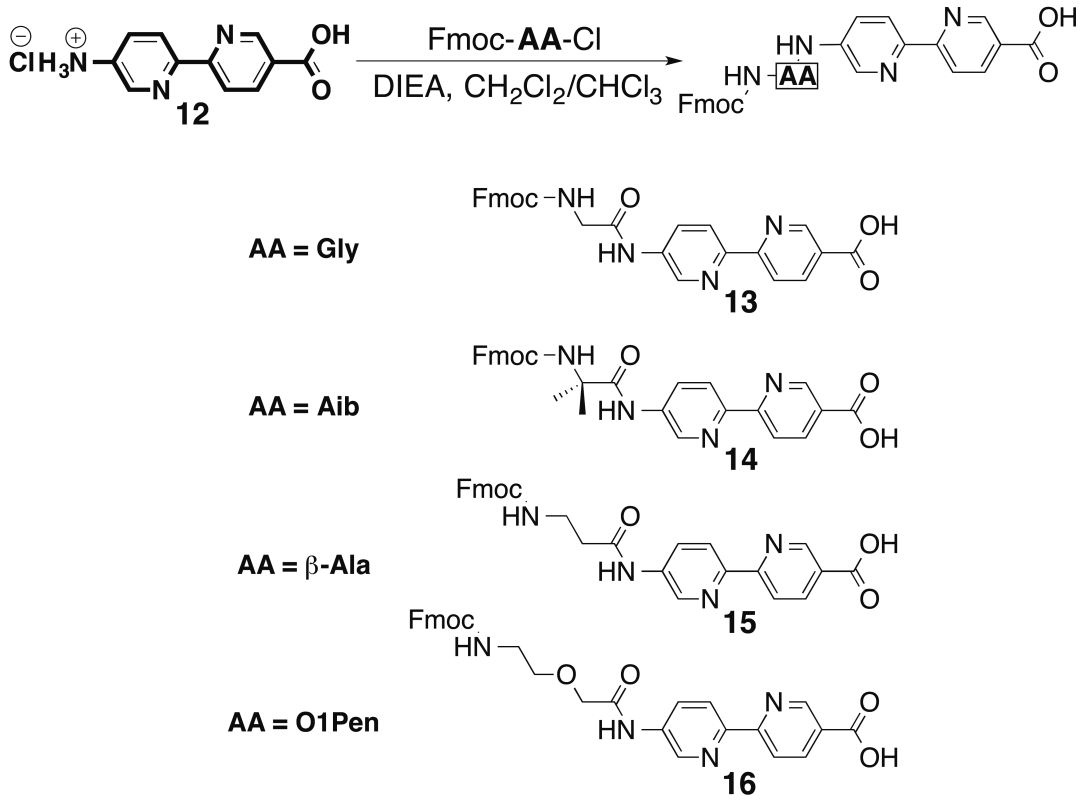


Figura 3.6: Esquema sintético correspondiente a la segunda parte de la ruta II.

Los rendimientos de estos últimos pasos varían entre un 75 y un 86 % en función del aminoácido. Los dipéptidos así formados son aptos para su uso en síntesis de péptidos en fase sólida sin ninguna purificación posterior (*Figura 3.7*).

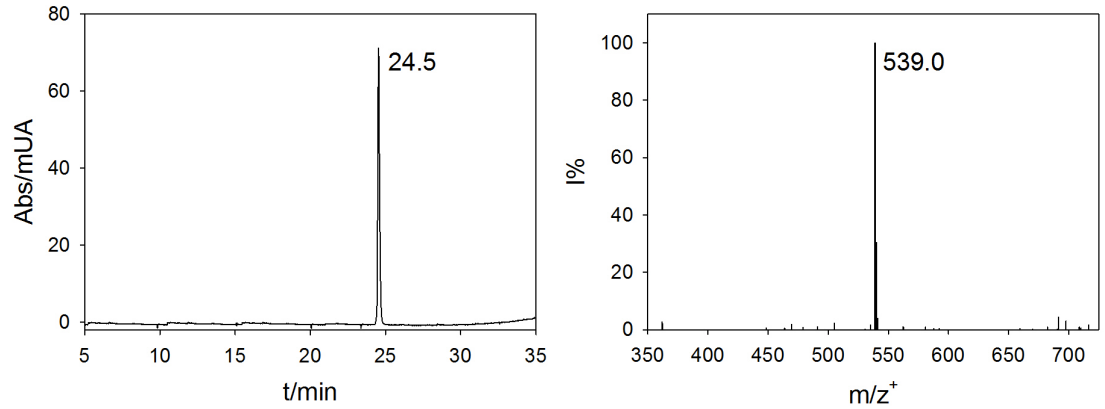


Figura 3.7: Izquierda, cromatograma correspondiente al dipéptido Fmoc-O1Pen-5Bpy-OH (**16**); derecha, espectro de masas correspondiente al pico cromatográfico de t_R 24.5 $[M+H]^+$ 539.0

De los cuatro dipéptidos o fragmentos coordinantes sintetizados, seleccionamos el compuesto **15** para la síntesis de metalopéptidos de Ru(II) y el **16** para la sintetizar los sistemas precursores de los helicatos. Se

seleccionó el compuesto **15** por el bajo precio de la Fmoc-β-Ala-OH y su buena solubilidad en comparación con el derivado de Aib. La prioridad en el caso de las hebras precursoras de los helicatos era utilizar un dipéptido que le confiriese a las mismas una buena solubilidad en agua. Encontramos que las hebras derivadas de los dipéptidos **13**, **14** y **15** presentaban baja solubilidad en agua, por lo que decidimos utilizar el dipéptido **16** que incluye un grupo polar adicional en su estructura.

Una vez optimizados todos los pasos de la ruta II el rendimiento global está comprendido entre el 42 y el 46 % en función del aminoácido implicado.

3.2 HELICATOS PEPTÍDICOS

Una vez optimizada la ruta sintética de los fragmentos coordinantes derivados de bpy, nuestro siguiente objetivo fue el desarrollo de las hebras peptídicas precursoras de helicatos dinucleares, la síntesis de dichos helicatos y el posterior estudio de sus propiedades de unión al ADN. A continuación describiremos detalladamente los estudios realizados.

3.2.1 SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO ESTRUCTURAL

3.2.1.1 Diseño de los helicatos peptídicos y estrategia de estudio

Un helicato es un complejo metálico constituido por una o más hebras orgánicas enrolladas helicoidalmente alrededor de dos o más centros metálicos, que definen el eje de la hélice. Nuestra propuesta se basa en la síntesis de hebras a través de una metodología sintética de péptidos en fase sólida (SPPS) y para conseguirlo es necesario tener claro el orden y la naturaleza de los aminoácidos que van a formar parte de la secuencia peptídica.

En el autoensamblaje de helicatos es muy importante controlar la conformación de las hebras en disolución, con el objeto de favorecer su coordinación helicoidal alrededor de los centros metálicos y a la vez evitar la formación tanto de polímeros de coordinación como de sistemas discretos no deseados.[277] Pensamos que para dirigir de manera más efectiva el autoensamblaje de un helicato peptídico es importante que todas las unidades coordinantes necesarias para la formación del complejo estén integradas en una única hebra peptídica. En el caso particular de helicatos peptídicos dinucleares con centros hexacoordinados, los seis residuos de bpy necesarios para su formación deben encontrarse organizados en tres grupos de dos unidades separados entre sí por dos conectores. Estos grupos de dos unidades de bpy, a los que denominaremos sub-hebras, serán los responsables de que las hebras peptídicas sean potencialmente dinucleantes. Los conectores entre las sub-hebras tendrán como función que éstas se orienten entre sí para favorecer la formación de complejos discretos de estructura helicoidal. El diseño secuencial de los ligandos nos permitirá, además, modificar de forma individual cada una de las 3 sub-

hebras que los conforman. Hay que indicar que la inmensa mayoría de los helicatos publicados son homohebrados y que existen pocos ejemplos de sistemas heterohebrados. Esta escasez de precedentes se debe principalmente a que no es fácil controlar el ensamblaje de los helicatos heterohebrados. Nuestra propuesta podría significar, por lo tanto, una solución a este problema sintético (*Figura 3.8*).

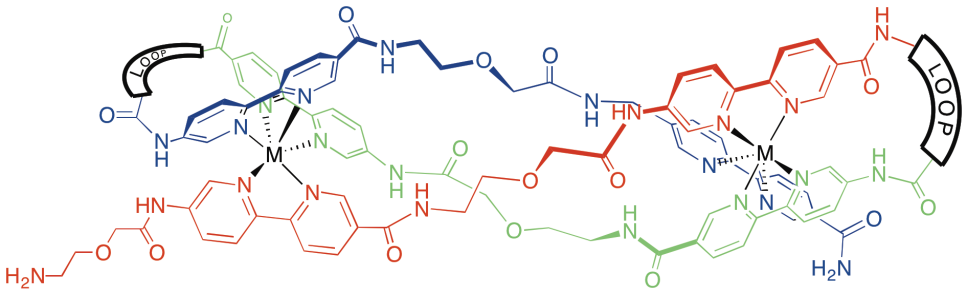


Figura 3.8: Diseño propuesto para los helicatos peptídicos. En los recuadros se resaltan los conectores o *"loops"* que otorgarán la preorganización adecuada a las hebras para su ensamblaje en helicatos en presencia de iones metálicos.

El diseño propuesto es estructuralmente complejo y el control sobre la preorganización de la hebras peptídicas complicado. Por ello pensamos que, antes de centrarnos en la síntesis de los helicatos peptídicos dinucleares, sería más práctico comenzar con sistemas metalopeptídicos más sencillos y utilizar los datos obtenidos en el diseño final de las hebras precursoras de los helicatos. Así, nuestro primer objetivo fue el estudio de una familia de metalopéptidos mononucleares derivados de ligandos peptídicos bisbipiridínicos, que nos sirvieron para optimizar el diseño del conector entre los dominios coordinantes. La información estructural recogida durante el estudio de los metalopéptidos mononucleares fue clave a la hora de diseñar y sintetizar con éxito los helicatos peptídicos que aparecen descritos en esta memoria.

En el desarrollo de los ligandos bisbipiridínicos y de las hebras peptídicas se utilizó el fragmento coordinante **16**, debido a que en los ensayos iniciales comprobamos que las hebras derivadas de este dipéptido eran más solubles que las basadas en los fragmentos **13**, **14** ó **15**.

3.2.1.2 Nomenclatura de los ligandos y hebras peptídicas

Los ligandos peptídicos se nombrarán en función del tamaño y la naturaleza de los conectores entre unidades de bpy o entre sub-hebras, en el caso de los helicatos. La descripción de los sistemas se realizará siempre

desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de la secuencia peptídica.

En los sistemas bisbipiridínicos se empleará una nomenclatura basada en dos letras y un superíndice (**XB^n**). La primera letra (**X** = D o L) indica la quiralidad del residuo de prolina localizado en el espacio entre las dos unidades de bpy. La segunda letra (**B**) hace referencia a que es un ligando bisbipiridínico. El superíndice indica el número de aminoácidos que conforman la secuencia peptídica del conector existente entre los dos fragmentos coordinantes.

En los helicatos hay dos conectores entre las tres sub-hebras que constituyen la secuencia peptídica. En la nomenclatura de estos sistemas se incluye una letra para cada conector (**XXH**). La letra **H** hace referencia a que se tratan de ligandos precursores de helicatos. En los helicandos los dos conectores entre sub-hebras son idénticos en tamaño (tres residuos) y ambos poseen una Pro como aminoácido central. La nomenclatura de estos metalopéptidos será, por lo tanto, **XXH**, en donde **X** = D o L.

3.2.1.3 Metalopéptidos derivados de ligandos peptídicos bisbipiridínicos

Diseño, síntesis y optimización de los ligandos bisbipiridínicos

Los ligandos bisbipiridínicos constan de dos fragmentos coordinantes unidos por un espaciador o conector. A este conector lo llamaremos *loop*, debido a que tiene como función principal imprimir un giro en la secuencia peptídica, cuestión que se analizará en detalle a continuación. El objetivo principal del estudio de los sistemas bisbipiridínicos es optimizar la estructura de este *loop* para después usarlo en el diseño de las hebras precursoras de helicatos peptídicos.

Diseño del loop: giro y quiralidad

En cualquier ligando equipado con dos unidades enlazantes, el espaciador es el encargado de la orientación relativa de una respecto de la otra. De la rigidez/flexibilidad de este espaciador y de la orientación que imprima en los dominios coordinantes depende la naturaleza de la especie metalosupramolecular resultante del proceso de ensamblaje entre el ligando y los iones metálicos.

La formación de especies mononucleares derivadas de ligandos bisbipiridínicos se verá favorecido si el espaciador es capaz de mantener a las unidades de bpy próximas entre sí en disolución y en ausencia de iones metálicos en el medio. En este contexto, los giros β (*Figura 3.9*) son secuencias cortas de aminoácidos muy comunes en proteínas, capaces de imponer un giro brusco de 180º a la cadena principal polipeptídica.[278] Este tipo de estructura suele contener la secuencia Pro-Gly en su estructura primaria y es idónea para ser utilizada como *loop* en los ligandos peptídicos bisbipiridínicos, preorganizando los dos dominios bpy para la coordinación simultánea al mismo centro metálico. [279]

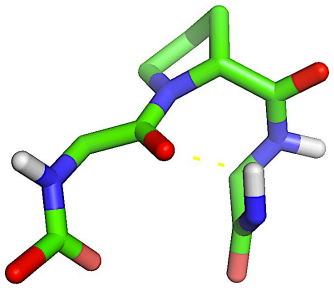


Figura 3.9: Representación de un giro β.[279]

La prolina es un aminoácido natural cuya estructura básica es un anillo de pirrolidina equipado con un grupo ácido carboxílico en su posición 2. Al igual que ocurre con el resto de aminoácidos proteicos (excepto la glicina) su carbono α es un carbono asimétrico, por lo que se trata de una molécula quiral. La prolina presenta dos isómeros con diferente comportamiento frente a la luz polarizada: uno de ellos desviará el plano de luz polarizada hacia la derecha (isómero D), mientras que su imagen especular lo hará hacia la izquierda (isómero L) (*Figura 3.10*).[280]

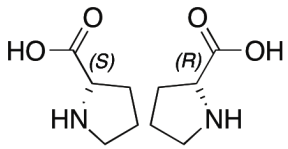


Figura 3.10: Estructura de la pareja de enantiómeros L-Pro/D-Pro.[280]

En nuestros ligandos peptídicos bisbipiridínicos, la dirección del giro dependerá de la quiralidad del residuo Pro integrado en el loop. Al no contener en su estructura primaria otros residuos quirales, los ligandos que contienen D-Pro serán imágenes especulares de los que contienen L-Pro. Nuestra intención es que esta preorganización quiral se transmita de los ligandos a sus metalopéptidos derivados, pudiendo así controlar termodinámicamente la quiralidad de los mismos.

Optimización del loop: longitud

Una característica estructural importante es el tamaño del *loop*. Éste debe contener una secuencia Pro-Gly capaz de imprimir el giro característico al ligando, pero el número de residuos que debe incluir no está fijado de antemano.

La estrategia seguida para determinar su tamaño óptimo consistió en diseñar tres ligandos peptídicos bisbipiridínicos derivados del dipéptido coordinante **16**, diferenciados únicamente en el número de residuos de Gly contenidos en el *loop* y denominados **LB³**, **LB⁴** y **LB⁵** (*Tabla 3.1*).

Tabla 3.1: Secuencias de los péptidos **LB³**, **LB⁴** y **LB⁵** diseñados para evaluar la longitud óptima del *loop*. En los recuadros están resaltados los residuos contenidos en los loops de cada uno de los ligandos.

Péptido	Secuencia de los metalopéptidos
LB^3	H_2N-O1Pen-5Bpy-Gly-Pro-Gly-O1Pen-5Bpy-$CONH_2$
LB^4	H_2N-O1Pen-5Bpy-Gly-Gly-Pro-Gly-O1Pen-5Bpy-$CONH_2$
LB^5	H_2N-O1Pen-5Bpy-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-O1Pen-5Bpy-$CONH_2$

A continuación se realizaron cálculos semiempíricos de los correspondientes metalopéptidos mononucleares de Zn(II) con el programa Hyperchem 8.0.7 (*Figura 3.11*). Las energías calculadas para cada uno de los metalopéptidos derivados de **LB³**, **LB⁴** y **LB⁵** son -1293.42 kJ/mol, -1335.68 kJ/mol y -1378.22 kJ/mol, respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la flexibilidad del *loop* aumenta al incrementar el número de residuos, lo que favorece la formación de un mayor número de enlaces de hidrógeno intramoleculares y la consiguiente estabilización de la estructura.

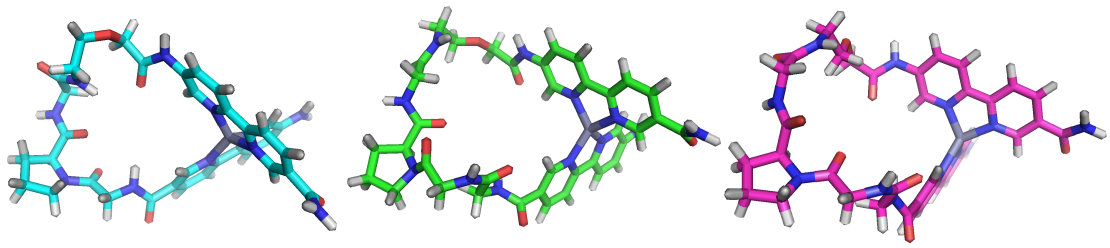


Figura 3.11: De izquierda a derecha, estructuras minimizadas de los metalopéptidos de Zn^{II} derivados de **LB³**, **LB⁴** y **LB⁵**. Los confórmeros más estables fueron calculados aplicando el método semiempírico ZINDO/1 ejecutado en el programa Hyperchem 8.0.7

El siguiente paso fue la obtención de datos experimentales sobre la estabilidad termodinámica de los complejos de Zn(II), Co(II) y Ni(II) derivados de los ligandos **LB³**, **LB⁴** y **LB⁵**. Con este objetivo sintetizamos en primer lugar los ligandos peptídicos y posteriormente calculamos y comparamos las constantes de formación de sus correspondientes complejos calculados mediante valoraciones UV/Vis.

Síntesis y caracterización de los ligandos LB³, LB⁴ y LB⁵

La síntesis de los ligandos **LB³**, **LB⁴** y **LB⁵** se llevó a cabo siguiendo una metodología sintética de péptidos en fase sólida (SPPS) a través de la estrategia Fmoc. Como soporte sólido se empleo una resina de PEG-PS, equipada con un conector de tipo Fmoc-PAL. La rotura de la resina equipada con este tipo de conector generará un grupo amida en el extremo C-terminal del péptido (*Figura 3.12*).

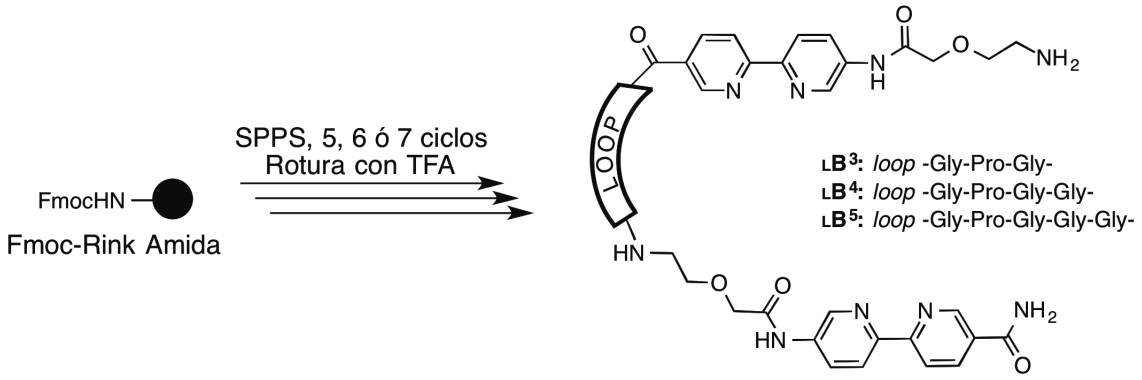
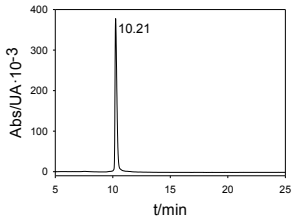
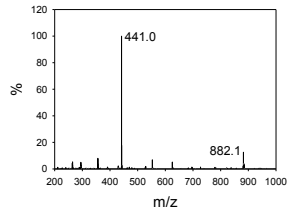
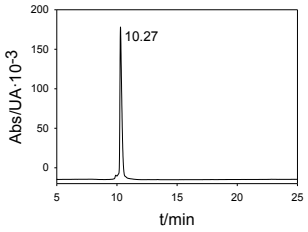
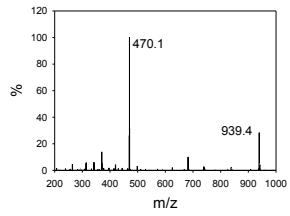
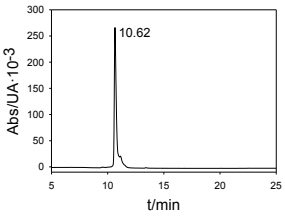
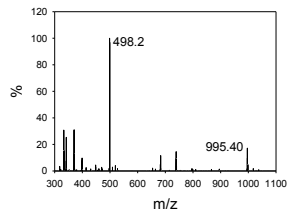


Figura 3.12: Síntesis de los ligandos peptídicos **DB³** y **LB³**.

El agente activante seleccionado para los acoplamientos fue el HBTU para los aminoácidos naturales y el HATU para el dipéptido **16**. La purificación de los ligandos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (C_{18}). Los ligandos purificados se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (C_{18}) a escala analítica, en un cromatógrafo equipado con un detector de espectrometría de masas.

Tabla 3.2: Cromatogramas y espectros de masas (ESI) de los ligandos **LB³**, **LB⁴** y **LB⁵**.

Péptido	HPLC-MS		
LB³ GPG		$C_{45}H_{52}N_{15}O_{12}$ = 881.38 $[M+H]^+$ 882.10 $[M+2H]^{2+}$ 441.00	
LB⁴ GPGG		$C_{43}H_{50}N_{14}O_{11}$ = 938.38 $[M+H]^+$ 939.40 $[M+2H]^{2+}$ 470.10	
LB⁵ GPGGG		$C_{45}H_{52}N_{15}O_{12}$ = 994.38 $[M+H]^+$ 995.40 $[M+2H]^{2+}$ 498.10	

Una vez purificados y caracterizados se procedió a calcular las constantes de formación de los metalopéptidos de Zn(II), Co(II) y Ni(II) derivados de estos tres ligandos.

*Síntesis, caracterización y cálculo de las constantes de formación de los metalopéptidos de Zn(II), Co(II) y Ni(II) derivados de **LB³**, **LB⁴** y **LB⁵***

La síntesis de los metalopéptidos se llevó a cabo empleando como disolvente tampón fosfato [NaH_2PO_4-Na_2HPO_4] a pH 5.1. Sobre una disolución del correspondiente ligando peptídico se realizaron adiciones de alícuotas de disoluciones de Co(II), Ni(II) o Zn(II) siguiendo la formación del correspondiente metalopéptido mediante espectroscopia UV/Vis (*Figura 3.13*).

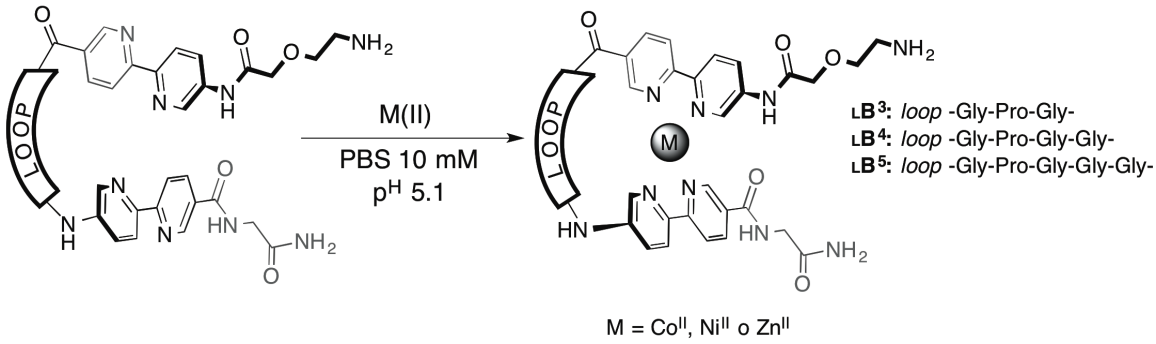


Figura 3.13: Esquema de la síntesis de los metalopéptidos donde M = Co(II), Ni(II) o Zn(II).

El espectro de absorción del ligando libre presenta un máximo de absorción a 309 nm característico, de la bpy asimétrica. Esta banda disminuye inicialmente su intensidad con la adición de las primeras alícuotas de M(II), para a continuación volver a aumentar a medida aumenta la concentración de metal en el medio. El máximo de absorción de la banda centrada a 309 nm se desplaza hacia el rojo durante las valoraciones. El conjunto de los espectros UV/Vis presentan un punto isobéstico característico para cada metalopéptido (*Figura 3.14*).

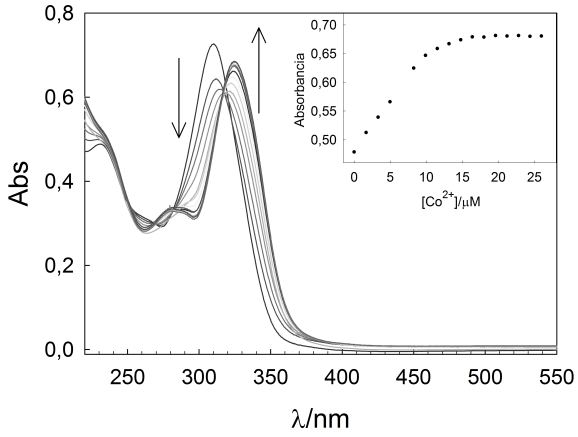


Figura 3.14: Valoración del ligando **LB³** (13 μM) con $Co(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ en tampón fosfato 10 mM pH 5.1 a 20 ºC. En el recuadro interior, perfil correspondiente a la formación del metalopéptido $[Co(\mathbf{LB^3})]^{2+}$.

La especie predominante a bajas concentraciones de metal es la denominada como ML_2, en la cual dos ligandos diferentes se encuentran coordinados al mismo centro metálico. Al aumentar la concentración de M(II) en la disolución, la contribución de esta especie se reduce hasta casi desaparecer, mientras que aumenta la de la especie mayoritaria y más estable ML, correspondiente a la especie monomérica formada por un centro metálico y una única molécula de ligando (*Figura 3.15*).

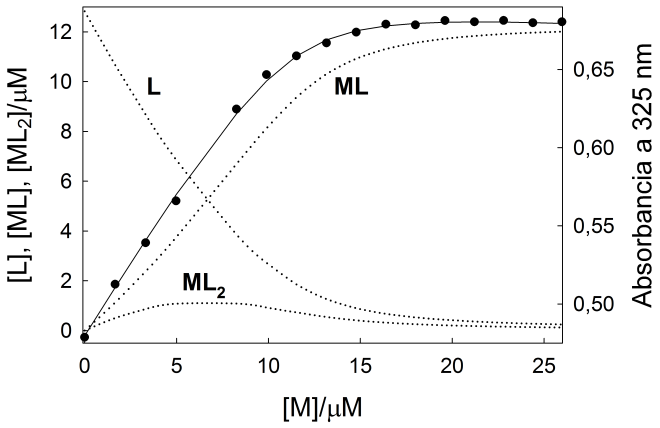


Figura 3.15: Representación de las especies existentes en el equilibrio de formación del metalopéptido $[Co(LB^3)]^{2+}$. Los puntos negros son el perfil de la valoración a 325 nm y la línea negra el ajuste del perfil calculado con el programa SPECTFIT/32.

Las constantes de formación para los metalopéptidos se determinaron empleando un programa de ajuste global (SPECTFIT/32), obteniéndose los valores indicados en la tabla *Tabla 3.3*.

Tabla 3.3: Valores de las constantes de formación de los metalopéptidos derivados de los ligandos bisbipiridínicos LB^n.

Péptido	$Log\beta_{mn}$[a]	Co(II)	Ni(II)	Zn(II)
LB^3	$log\beta_{11}$	7.16 (0.15)	6.51 (0.05)	6.23 (0.11)
	$log\beta_{12}$	11.92 (0.39)	11.95 (0.13)	11.08 (0.33)
LB^4	$log\beta_{11}$	6.75 (0.05)	6.51 (0.03)	6.08 (0.05)
	$log\beta_{12}$	11.87 (0.14)	11.91 (0.08)	11.74 (0.13)
LB^5	$log\beta_{11}$	5.18 (0.25)	6.02 (0.04)	3.33 (1.15)
	$log\beta_{12}$	11.79 (0.33)	11.97 (0.10)	8.87 (0.23)

[a] $\beta_{mn} = [M_m(LB^x)_n]/[M]^m[LB^x]^n$

Se observa que las constantes más altas corresponden al ligando con el espaciador más corto. En cuanto a los metales, los datos sugieren que los metalopéptidos de Co(II) son los más estables, seguidos de los de Ni(II) y por último de los de Zn(II). Esta tendencia no es seguida por LB^5, probablemente debido a que la gran flexibilidad de su *loop* perjudica la preorganización del ligando para formar metalopéptidos de estequiometría ML con algunos iones metálicos, como Co(II) o Zn(II).

Hay que resaltar que los datos obtenidos experimentalmente son opuestos a los datos obtenidos en los cálculos teóricos previos de los

metalopéptidos de Zn^{II}. Sin embargo parece claro que el conector más corto otorga una preorganización más adecuada para la formación de los complejos (*Figura 3.16*).

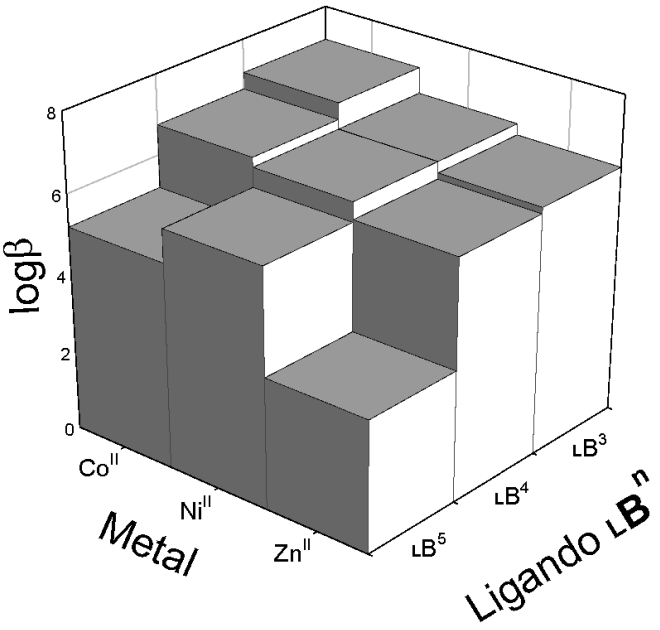
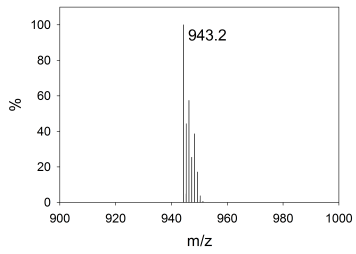
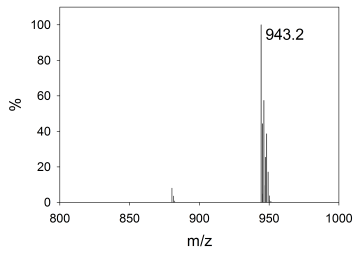
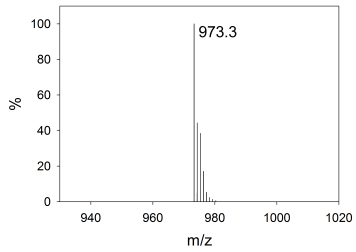
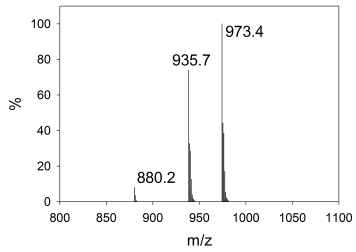
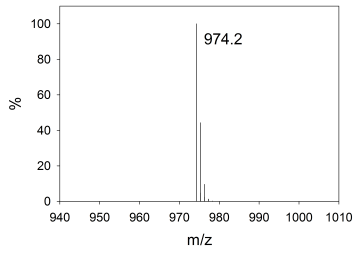
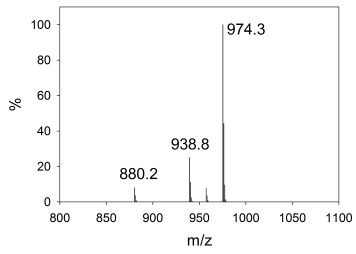


Figura 3.16: Representación en barras de los valores de las constantes de formación para cada uno de los metalopéptidos derivados de los ligandos bisbipiridínicos $\mathbf{LB^n}$.

Se intentaron realizar valoraciones espectrofotométricas de los ligandos con Fe(II), pero los complejos formados eran muy inestables frente a la oxidación por lo que no se pudieron llevar a cabo con éxito.

Se realizaron los espectros de MALDI-TOF de las disoluciones procedentes de las valoraciones espectrofotométricas para confirmar la formación de especies de estequiometría 1:1. Los perfiles isotópicos encontrados para los metalopéptidos coinciden con los resultados de las simulaciones realizadas.

Tabla 3.4: Espectros de masas MALDI-TOF para los metalopéptidos derivados de **LB³**.

Metalopéptido	Simulación	Encontrado
[Zn(LB³)] $C_{41}H_{46}N_{13}O_{10}Zn$ 943.19		
[Ni(LB³)(H₂O)₂] $C_{41}H_{50}N_{13}NiO_{12}$ 973.33		
[Co(LB³)(H₂O)₂] $C_{41}H_{50}CoN_{13}O_{12}$ 974.29		

Estudio de los metalopéptidos de Zn(II), Co(II) y Ni(II) derivados de LB³ y DB³

Caracterización estructural en disolución

La caracterización estructural en disolución de los metalopéptidos derivados de **L/DB³** se llevó a cabo a través de cálculos mecano-cuánticos, estudios de RMN y de UV/Vis. Decidimos realizar un *screening* pHmétrico previo por RMN para determinar el rango de pH más adecuado para el estudio de estos sistemas. Se observó que en el rango de pH 5-6 estos ligandos peptídicos no sufren procesos de agregación-precipitación a la concentración de estudio (0.2 mM), por lo que se decidió realizar todas las medidas espectroscópicas en esta ventana de pH.

Metalopéptidos de Zn^{II}

- Cálculos teóricos[†]

Se emplearon dos métodos de modelización molecular para estudiar las propiedades energéticas y estructurales de los ligandos libres ($\mathbf{LB^3}$ y $\mathbf{DB^3}$) y de los correspondientes metalopéptidos de Zn(II). Para minimizar el número de átomos y así reducir el tiempo de cálculo no se tuvo en cuenta el residuo O1Pen del extremo N-terminal ni la glicina del extremo C-terminal.

La modelización de los ligandos peptídicos se realizó mediante una simulación Montecarlo usando el *Macromodel* (*Schrödinger*) [281] y empleando la función de potencial OPLS-AA. [282] Se obtuvieron 250 mínimos de energía en un rango de -21 kJ/mol para ambos isómeros (*Figura 3.17*).

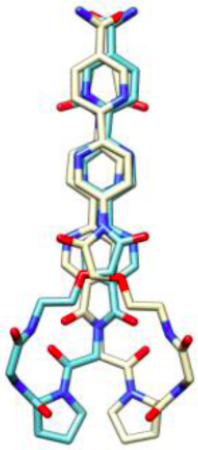


Figura 3.17: Estructuras superpuestas para los ligandos peptídicos $\mathbf{LB^3}$ y $\mathbf{DB^3}$.

Las estructuras más estables son perfectamente simétricas e isoenergéticas ($E_{\mathbf{LB^3}}$ = -1186.141 kJ/mol; $E_{\mathbf{DB^3}}$ = -1186.148 kJ/mol) y en ellos los residuos de prolina se encuentran en conformación *cis*, estableciéndose un enlace de hidrógeno aparente entre el carbonilo de la prolina y la glicina. Los anillos aromáticos de bpy se encuentran casi paralelos, con los átomos de nitrógeno en disposición *trans* pero ligeramente cruzados (≈10º). Existe una clara interacción π-π entre los anillos de bpy que, sumada al débil enlace de hidrógeno, estabiliza la estructura.

[†] Estudios realizados por el Dr. Jean Didier Maréchal (UAB)

La minimización de la estructura correspondiente a los metalopéptidos de Zn(II) ($[Zn(\mathbf{LB}^3)]^{2+}$ y $[Zn(\mathbf{DB}^3)]^{2+}$) se realizó mediante un método híbrido Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular (QM/MM) ONIOM,[283] usando el software *Gaussian 09.*[284]

Se parte de un entorno tetraédrico para el ión Zn(II), de tal manera que se encuentra coordinado simultáneamente a las dos unidades de bpy de $\mathbf{LB}^3$. Se observa como la interacción π-π entre los anillos de bpy y el enlace de hidrógeno entre los residuos de prolina y la segunda glicina (G_2) ha desaparecido. Los átomos de nitrógeno de ambas bpy están en disposición *cis* y sus planos se encuentran prácticamente perpendiculares entre sí. Al igual que ocurría en el caso de los ligandos libres, la pareja de isómeros son prácticamente imágenes especulares. Las estructuras son enantioméricamente puras, obteniéndose la conformación R para el ligando equipado con L-Pro y S para el ligando con D-Pro. Hay que resaltar que todos los intentos de obtener el centro metálico con la quiralidad invertida sin modificar la quiralidad del residuo de prolina resultaron inútiles (*Figura 3.18*).

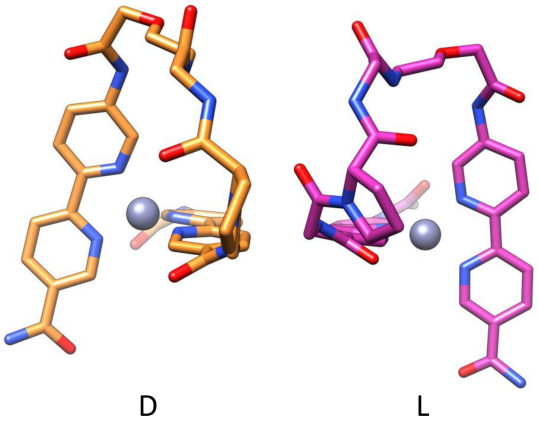


Figura 3.18: Estructuras obtenidas mediante el método híbrido MM/MD ONIOM para los metalopéptidos $[Zn(\mathbf{DB}^3)]^{2+}$ y $[Zn(\mathbf{LB}^3)]^{2+}$.

- Estudios RMN‡

Los complejos de Zn^{II} son diamagnéticos, por lo que se estudió la conformación tridimensional del metalopéptido $[Zn(\mathbf{LB}^3)]^{2+}$ en disolución mediante RMN. Debido a la baja solubilidad del ligando los estudios se

‡ Estudios realizados junto con la Dra. Ana Ardá en el grupo del Dr. Jesús Jiménez Barbero (CIB-CSIC)

realizaron a una concentración de ligando de 0.2 mM, en ausencia y en presencia de 1.2 equivalentes de $ZnSO_4$ y a una temperatura de 280 K.

Se realizaron espectros DOSY (**D**iffusion **O**rdered **S**pectrosco**Y**) para determinar si la estequiometría de la especie ensamblada era [1:1], descartando así la posibilidad de formación agregados. Un espectro DOSY típico consiste en una representación bidimensional en donde el eje X representa el espectro de RMN clásico del compuesto o de una mezcla de compuestos, mientras que el eje Y nos da el valor del coeficiente de difusión de cada uno de los componentes de la mezcla. El valor de su coeficiente de difusión nos da una idea del tamaño de la molécula, por lo que podemos emplear los datos obtenidos en este estudio para comprobar si los metalopéptidos ensamblados contienen más de una molécula de ligando. Los valores de los coeficientes de difusión del ligando **LB³** y para el metalopéptido $[Zn^{II}(\mathbf{LB^3})]$ son idénticos ($10^{-9.78}$ m^2s^{-1}), lo que indica que no se produce agregación alguna (*Figura 3.19*).

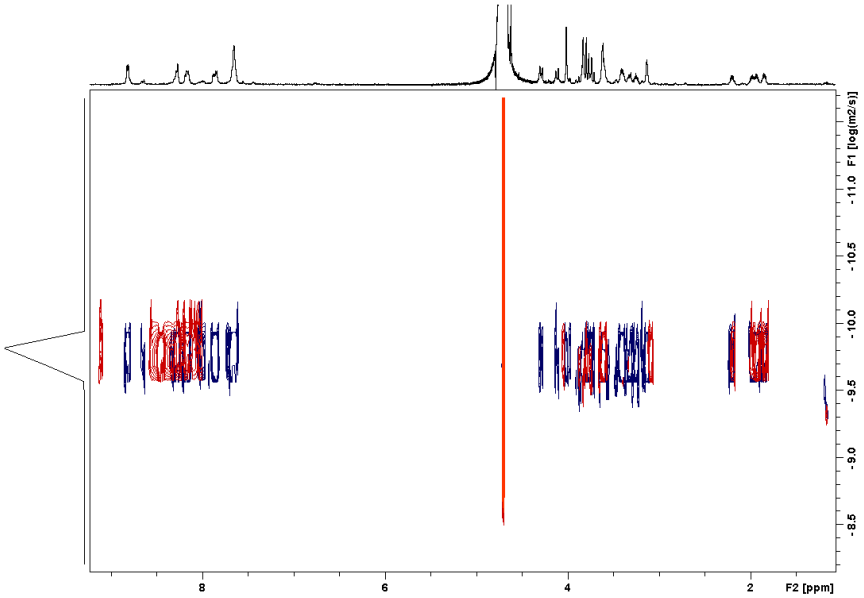


Figura 3.19: Espectros DOSY superpuestos: en azul, el ligando libre **LB³** (su espectro de ^1H es el mostrado arriba) y en rojo el del complejo $[Zn(\mathbf{LB^3})]^{2+}$. Las medidas fueron realizadas en D_2O PBS pH=5.8 a 293K, las concentraciones utilizadas fueron: 0.2 mM de **LB³** y 0.2 mM de **LB³** + 0.24 mM $ZnSO_4$.

Se emplearon experimentos TOCSY (**TO**tal **C**orrelation **S**pectrosco**Y**) para la asignación de todos y cada uno de los protones del ligando **LB³** y de su correspondiente metalopéptido de Zn. Esta técnica se utiliza frecuentemente para la elucidación estructural de péptidos y oligosacáridos dado que permite observar las correlaciones entre protones lejanos, pudiendo así identificar los diferentes residuos de forma

individual. Para obtener información sobre la disposición espacial relativa de cada protón se realizaron experimentos NOE-2D (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect [o **E**nhancement]).

Debido a la naturaleza dipolar de la transferencia de la magnetización, el efecto nuclear Overhauser está limitado por el espacio, en una relación inversamente proporcional a la distancia elevada a la sexta potencia (r^{-6}). Puede existir transferencia de magnetización entre dos núcleos que se encuentren a menos de 5 Å de distancia (r < 5 Å).

$$NOE \propto \langle r^{-6} \rangle \times f(\tau_C)$$

El tiempo de correlación (τ_C) es el tiempo que le lleva a una molécula moverse un radián. El valor del τ_C depende directamente de la masa molecular del compuesto y de la densidad del disolvente en el que se encuentra. La masa molecular del péptido **LB³** y del metalopéptido $[Zn(\mathbf{LB^3})]^{2+}$ están dentro del rango de la zona denominada de NOE = 0 (*Figura 3.20*). En esta zona la intensidad de los NOEs es prácticamente nula por lo que no sacaríamos ninguna información del experimento. Existe otra técnica para estudiar el efecto Overhauser, el ROESY (**R**otating frame **O**verhauser **E**ffect [o **E**nhancement] **S**pectroscop**Y**), cuyo resultado es independiente de la masa molecular del compuesto. Un inconveniente de este experimento es que no toda la magnetización se transfiere por relajación cruzada, por lo que, además de picos de cruce por interacción dipolar, veríamos "artefactos" correspondientes a picos de cruce por interacción escalar (relajación longitudinal).

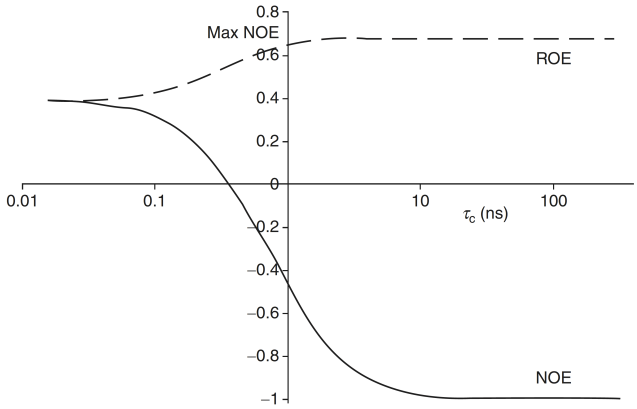


Figura 3.20: Variación de la intensidad de la señal en experimentos NOE (línea continua) y para experimentos ROESY (línea punteada) en función de τ_C. Se observa el valor de NOE se aproxima a 0.38 para moléculas pequeñas y llega hasta -1 para moléculas más grandes. Las señales ROESY siempre son negativas y varían entre 0.4 y 0.68.

Como ya se ha mencionado, el tiempo de correlación molecular depende del tamaño de la molécula y de la viscosidad del disolvente en el que se encuentra. A su vez, la viscosidad del disolvente depende de la temperatura ($\log\mu \propto 1/T$), por lo que disminuyendo la misma podemos aumentar el tiempo de correlación. Bajando la temperatura buscamos que el tiempo de correlación rotacional aumente lo suficiente como para salir de la zona de NOE = 0, de ahí que las medidas se hayan realizado a 280 K.

El ligando peptídico está compuesto por dos dominios bpy separados por un *loop*. Las dos unidades de bpy, además de ser asimétricas, no son químicamente equivalentes, por lo que hay que localizar los protones aromáticos de manera independiente. Hemos empleado una nomenclatura numérica en función de la posición de cada protón en la bpy. Hay que discernir entre los protones del anillo aromático funcionalizado con el grupo carbonilo (6´, 4´, 3´), y los protones del anillo aromático funcionalizado con el grupo amino (6, 4, 3). Además, hemos utilizado colores para facilitar la distinción entre la bpy más próxima al extremo N-terminal (en verde) y la bpy más próxima al extremo C-terminal (en azul) (*Figura 3.21*).

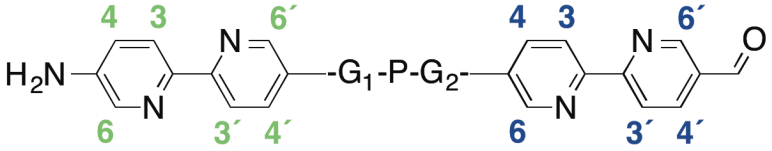


Figura 3.21: Numeración de los protones aromáticos para el ligando **LB³**.

El ligando **LB³** y el metalopéptido $[Zn(\mathbf{LB^3})]^{2+}$ fueron estudiados de forma independiente.

LB^3

Se registraron espectros TOCSY para la asignación de los protones del ligando. En el espectro se observan dos zonas bien diferenciadas: la zona alifática, correspondiente a los aminoácidos que conforman el *loop* y los residuos de O1Pen, y la zona aromática, correspondiente a los protones de los dos dominios bpy. Para una primera aproximación, el experimento se llevó a cabo en D_2O para anular las señales de los protones de las amidas (comprendidos entre 7 y 9 ppm). Se observan en la zona alifática los picos de cruce correspondientes a la Pro y a los residuos de O1Pen. En la zona aromática se observan correlaciones a larga distancia (^5J), entre los protones de las posiciones 6 y 3 de los cuatro anillos. Hay que resaltar que

a 60 ms de tiempo de mezcla, el pico de cruce para la correlación entre los protones 6´- 3´es más intenso que para la correlación entre los protones 6´- 4´,más próximos en el espacio. Si empleamos tiempos de mezcla de 25 ms esta relación se invierte, permitiéndonos así la asignación (*Figura 3.22*).

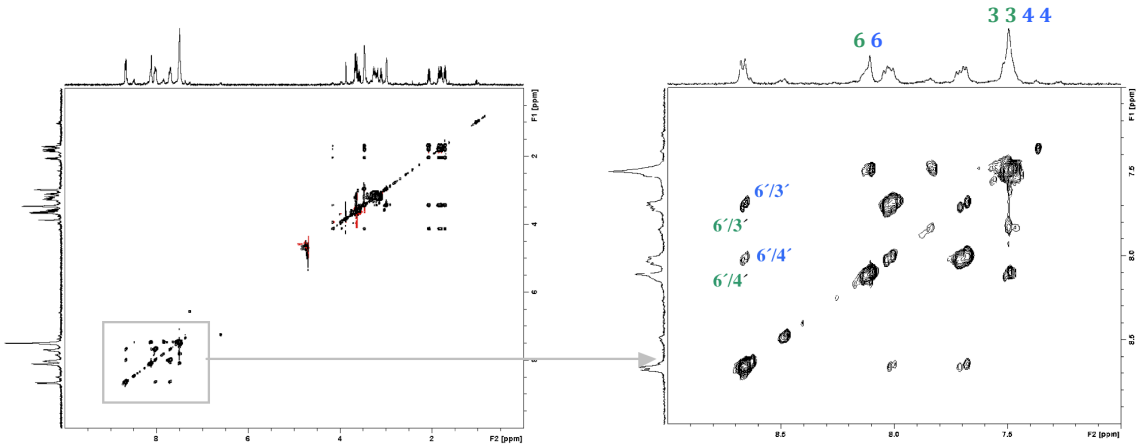


Figura 3.22: Izquierda, espectro TOCSY correspondiente al péptido **LB³** a 280 K en D_2O; a la derecha, sección ampliada de la zona aromática con la asignación de los picos de cruce. Los espectros fueron registrados en D_2O PBS pH 5.6.

El espectro NOESY, registrado en las mismas condiciones, sólo nos muestra un pico de cruce en la zona aromática, correspondiente a la interacción dipolar entre los protones 3´- 4´ que son los únicos protones que están a menos de 5 Å. La correlación entre los protones 3 - 4 no se observa debido a que se encuentran solapados a 7.5 ppm. El hecho de no observarse pico NOE entre los protones 3–3´ pertenecientes al mismo dominio bpy es indicativo de que los átomos de nitrógeno de los anillos se encuentran en disposición *trans* (*Figura 3.23*).

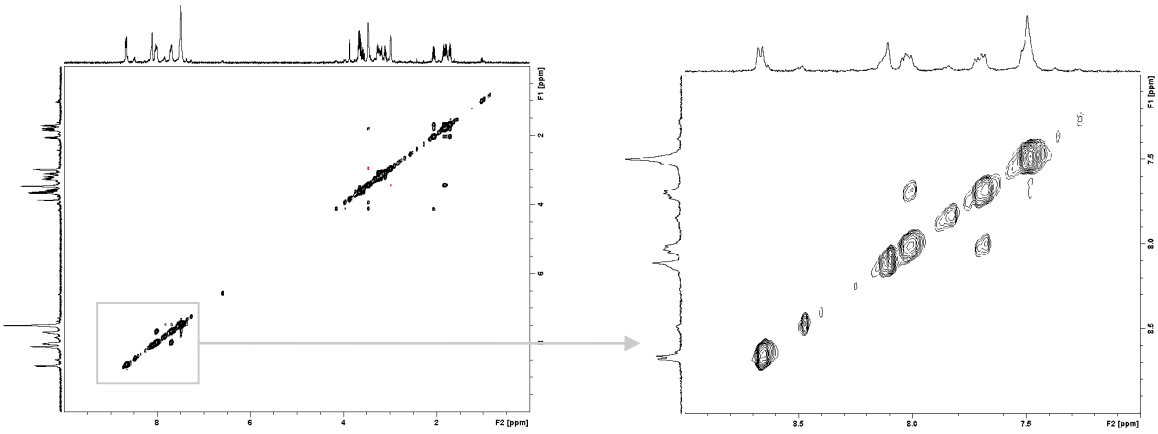


Figura 3.23: Izquierda, espectro NOESY correspondiente al péptido **LB³** a 280 K; a la derecha, sección ampliada de la zona aromática. Los espectros fueron registrados en D_2O PBS pH 5.6.

*Metalopéptido [Zn(**LB³**)]²⁺*

Una vez asignados los protones del péptido **LB³**, el siguiente paso fue el estudio del metalopéptido [Zn(**LB³**)]²⁺.

La coordinación de los dominios bpy al Zn^{II} provoca una disminución de la simetría del ligando peptídico. Los protones sufren un desplazamiento a campo bajo debido al descenso de la densidad de carga en el anillo. Esta variación en el desplazamiento químico no es lineal para todos los protones si no que es independiente para cada uno (*Figura 3.24*).

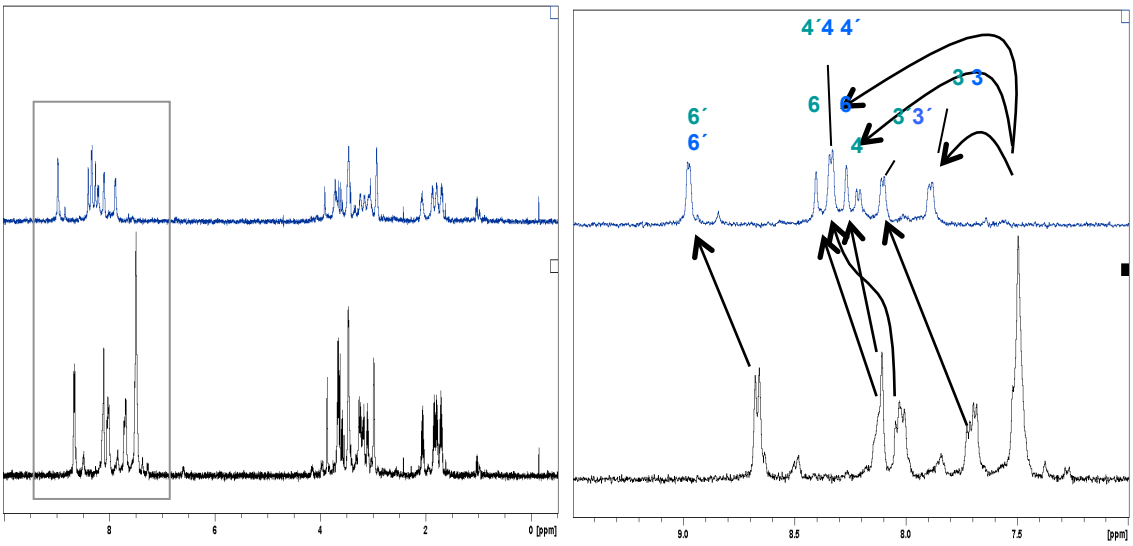


Figura 3.24: Espectro ^{1}H-RMN del ligando **LB³** (abajo) y del metalopéptido [Zn(**LB³**)]²⁺ (arriba). Las flechas indican los desplazamientos de los protones aromáticos. Los espectros fueron registrados en D_2O PBS pH 5.6 en ausencia (negro) y en presencia (azul) de 1.2 equiv. de Zn(II).

La asignación de los protones del metalopéptido se realizó mediante la interpretación de su espectro TOCSY, registrado en las mismas condiciones que el del ligando libre. En el espectro NOESY se sigue observando el pico de correlación entre los protones 3´- 4´de ambas unidades de bpy, al igual que ocurría en el caso del péptido **LB³**. También se observa la correlación entre los protones 3 - 4, que ahora no aparecen superpuestos. Al contrario de lo que ocurría en el caso del ligando libre, la existencia del pico de correlación entre los protones 3 – 3´indica que estos se encuentran en disposición *cis* (*Figura 3.25*).

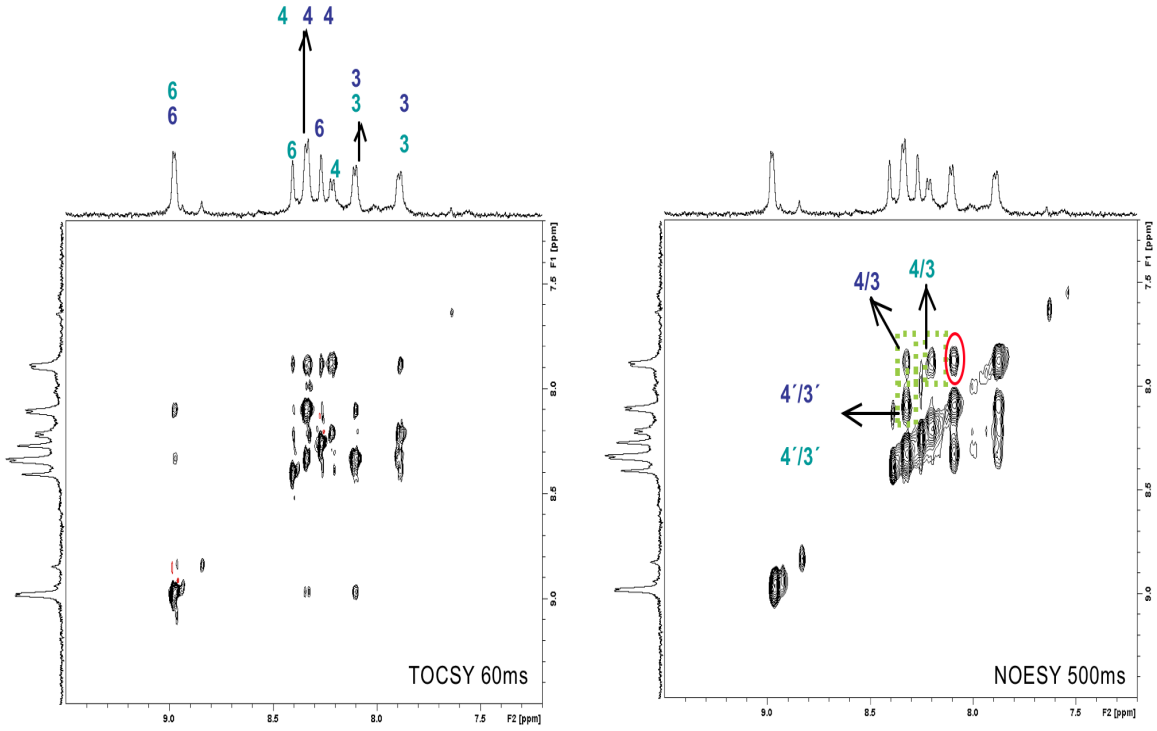


Figura 3.25: Izquierda, región aromática del espectro TOCSY del metalopéptido $[Zn(\mathbf{LB^3})]^{2+}$; a la derecha, región aromática del espectro NOESY del metalopéptido $[Zn(\mathbf{LB^3})]^{2+}$. Los espectros fueron registrados en D_2O PBS pH 5.6 en presencia de 1.2 equiv. de Zn(II).

Se registraron espectros TOCSY y NOESY en una mezcla 9:1 H_2O:D_2O para estudiar la disposición espacial de las amidas en el péptido $\mathbf{LB^3}$ y en el metalopéptido $[Zn(\mathbf{LB^3})]^{2+}$. Existen correlaciones entre varios protones del *loop*:

NH G_1 – H4

Hδ P – Hα G_1

NH G_2 – Hα P

NH O1Pen$_2$ – Hα G2

La intensidad de estas correlaciones nos da información acerca de las distancias entre los protones y también sobre su disposición espacial. Para que exista correlación entre los protones NH G_2 – Hα P, estos han de estar en disposición *cis*, algo que también ocurre en el caso de la correlación entre los protones Hδ P – Hα G_1. La combinación de todas las correlaciones NOE observadas indican que el péptido se encuentra cerrado a modo de pinza sobre el centro metálico (*Figura 3.26*).

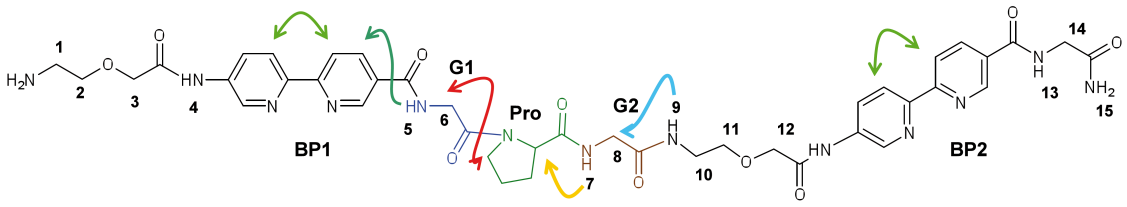


Figura 3.26: Estructura del ligando **LB³**, las flechas de colores indican las correlaciones dipolares existentes en el metalopéptido $[Zn(\mathbf{LB^3})]^{2+}$.

La ausencia de picos de correlación entre los protones de las posiciones 6 - 6´ indica que la distancia entre ellos es mayor de 5 Å, lo que encaja con una geometría de coordinación tetraédrica alrededor del centro metálico.

Los datos obtenidos mediante la técnica de RMN y mediante cálculos computacionales coinciden, lo que confirma que el metalopéptido $[Zn(\mathbf{LB^3})]^{2+}$ en disolución presenta una conformación R y que el metalopéptido $[Zn(\mathbf{DB^3})]^{2+}$ presenta una conformación S (*Figura 3.27*).

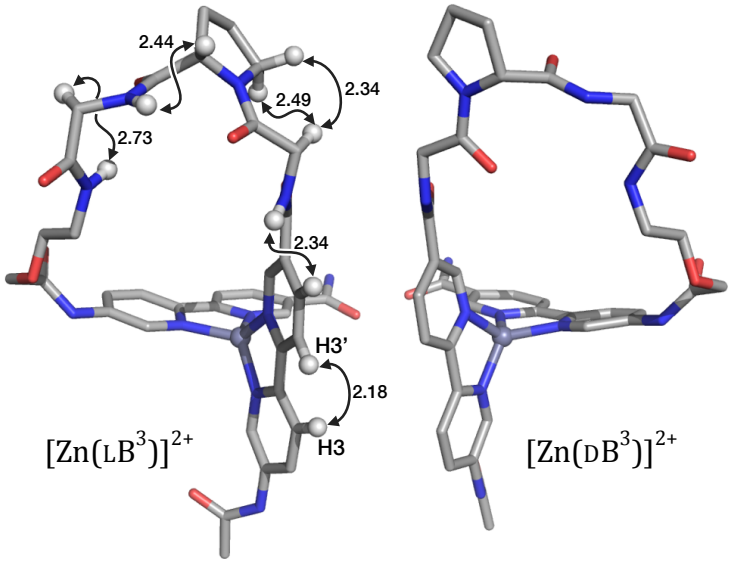


Figura 3.27: Estructuras optimizadas mediante cálculos computacionales aplicando un método QM/MM. Las flechas indican las distancias en angstroms extraídas de los valores de los NOEs determinados mediante RMN.

Se registraron espectros de ^{1}H-RMN del metalopéptido $[Ni(\mathbf{LB^3})]^{2+}$ con el fin de determinar de una forma rápida y sencilla si presentaba geometría de coordinación plano cuadrada. En el espectro se observa que las señales correspondientes a los dominios coordinantes se han desplazado mucho debido al paramagnetismo del catión metálico. Las señales correspondientes al *loop* también sufren la influencia del catión metálico, reflejado en forma de un ensanchamiento en las señales entre 2-4.5 ppm,

no obstante el efecto es mucho menor debido a que estos protones están alejados del núcleo paramagnético (*Figura 3.28*). [285] Este resultado confirma la configuración paramagnética del Ni(II), lo que descarta la posibilidad de una geometría plano cuadrada.

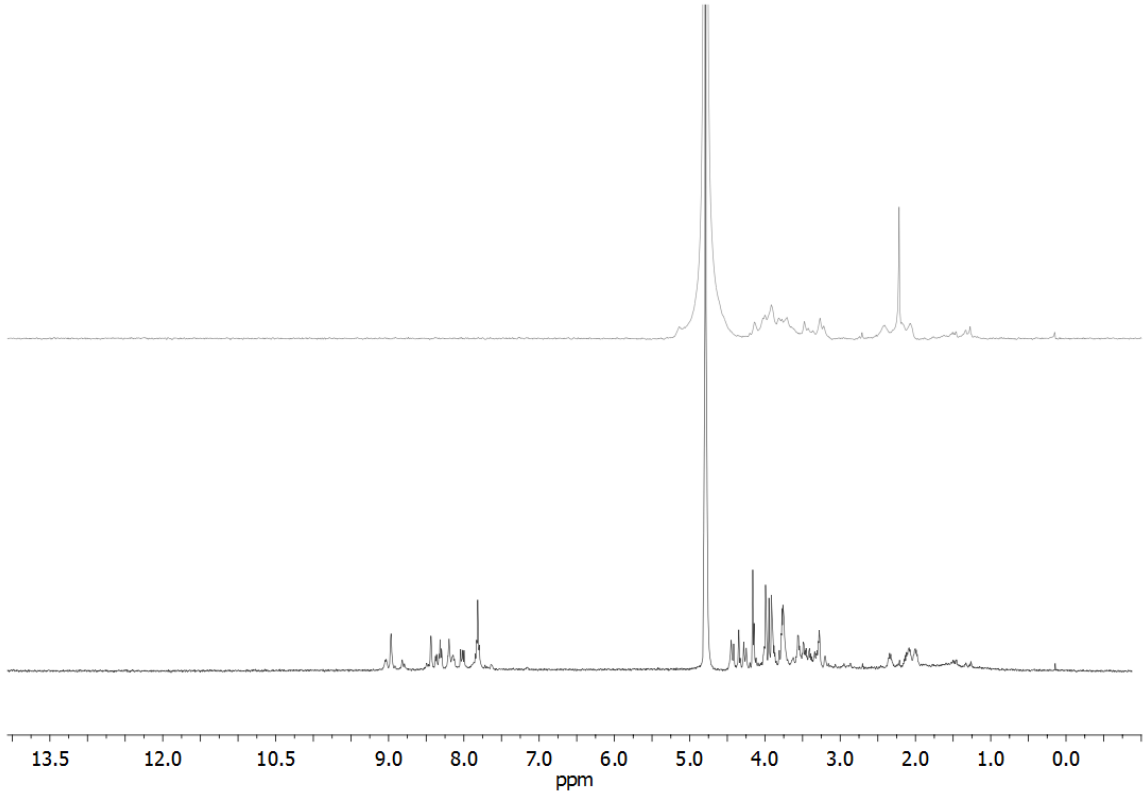


Figura 3.28: Abajo, espectro de ^{1}H-RMN del ligando **LB³** 0.05 mM en D_2O PBS pH 5.6; arriba, espectro del ligando **LB³** 0.05 mM en D_2O PBS pH 5.6 en presencia de 1.2 equiv. de $Ni(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$.

Metalopéptidos de Co^{II} y Ni^{II}

- Estudios de UV/Vis

En los compuestos de coordinación, los orbitales d de los iones metálicos no poseen todos la misma energía. El patrón de la división de estos orbitales se puede calcular a través de la Teoría de Campo Cristal y depende de la naturaleza del ión metálico, de su estado de oxidación, de la naturaleza de los ligandos y de la geometría de coordinación. Las transiciones d-d son tránsitos electrónicos que ocurren entre los orbitales d de los centros metálicos de compuestos de coordinación. Normalmente dan lugar a bandas centradas en la región visible y en el IR cercano del espectro y son las que explican el color de estos compuestos. Estas bandas son generalmente anchas y débiles (ε = 200-250 $M^{-1}cm^{-1}$) ya que

formalmente son transiciones prohibidas por simetría. Sin embargo son muy útiles dado que nos proporcionan información acerca de la estructura electrónica y geométrica del ion metálico.

Los complejos de Co^{II} y Ni^{II} pueden presentar diferentes geometrías de coordinación para el centro metálico. Las más comunes para los compuestos de coordinación de Co^{II} son la tetraédrica y la octaédrica. La geometría tetraédrica suele adoptarla con ligandos equipados con átomos dadores blandos, como el azufre o el fósforo (SCN^-, cys…).[286] Por otro lado, con ligandos frontera como el pirrol o los ligandos polipiridínicos (bpy, tpy), tienden a adoptar una geometría octaédrica.[287] El Ni^{II} presenta un abanico más amplio de geometrías de coordinación, siendo las más corrientes la plano cuadrada, la tetraédrica, y la octaédrica. La disposición plano cuadrada suele adoptarla con ligandos π–aceptores (PR3, CN^-…).[288] Hay que resaltar que si el Ni^{II} presenta esta geometría de coordinación el sistema sería diamagnético. La geometría tetraédrica suele darse con ligandos π–dadores (Cl^-, Br^-, I^-…). La coordinación octaédrica es la geometría más común para el Ni^{II}, la adopta generalmente con ligandos σ–dadores (H_2O, NH_3, etiléndiamina, bpy, phen…).

Para determinar la geometría de coordinación de los metalopéptidos de Co(II) y Ni(II) derivados de **LB³** medimos los espectros de UV/Vis a altas concentraciones de los complejos. Los complejos de Co^{II} y Ni^{II} con geometría tetraédrica suelen presentar color, esto es debido a la existencia de bandas de absorción (transiciones d-d) en la región del espectro visible. La ausencia de estas bandas d-d junto con los datos obtenidos de espectrometría de masas (MALDI-TOF) (*Tabla 3.4*), sugieren que ambos metalopéptidos presentan geometría octaédrica. (*Figura 3.29*).

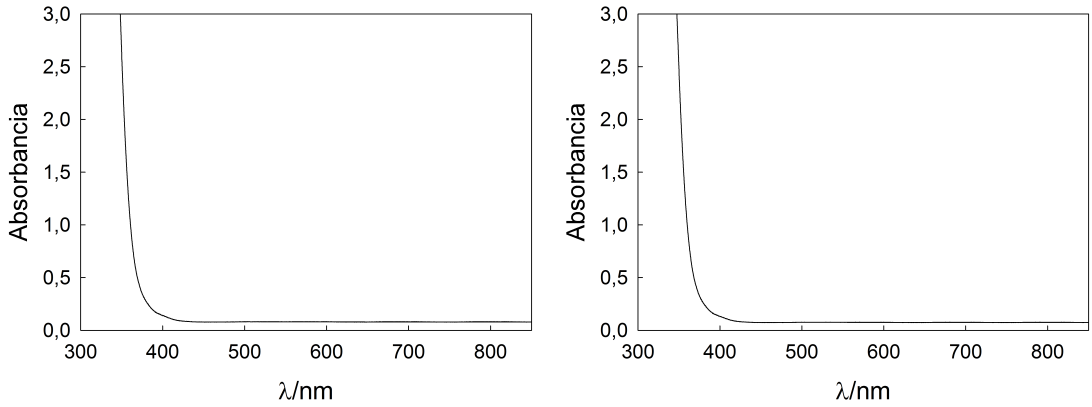


Figura 3.29: Espectros UV/Vis del ligando **LB³** 2 mM en presencia de 1.2 equivalente de metal divalente: a la izquierda $[Co(\mathbf{LB^3})]^{2+}$ y a la derecha $[Ni(\mathbf{LB^3})]^{2+}$.

Control termodinámico de la quiralidad

El dicroísmo circular es una técnica espectrofotométrica que se basa en la interacción de la radiación polarizada circularmente con una especie ópticamente activa y permite obtener información estructural relevante de sistemas orgánicos y biológicos así como de los complejos de coordinación. El espectropolarímetro de dicroísmo circular es la técnica preferida para medir datos quiroópticos y se utiliza principalmente para determinar las configuraciones absolutas de un gran número de compuestos, así como para realizar estudios conformacionales en disolución de moléculas de tamaño medio y macromoléculas, especialmente proteínas y ácidos nucleicos.

Fundamentos del dicroísmo circular y su aplicación en el análisis estructural de complejos metálicos

La espectroscopia de absorción electrónica es uno de los métodos más empleados para caracterizar los compuestos de coordinación de metales de transición. Asimismo, el dicroísmo circular también tiene mucha importancia en la caracterización estructural de complejos metálicos. Una interpretación razonada de los espectros de absorción y de CD pueden dar una información muy importante sobre la composición, estructura y propiedades electrónicas de los compuestos de coordinación. Generalmente, la aproximación más simple conlleva la asignación de bandas de absorción (MC, LMCT, MLCT…).

El análisis del acoplamiento excitónico puede revelar mucha información acerca de la geometría y de la configuración absoluta de una molécula orgánica o de un compuesto de coordinación.

Una molécula puede ser llevada desde su estado fundamental a un estado electrónico excitado mediante la absorción de un fotón de una energía concreta. La distribución de la densidad electrónica es marcadamente diferente en el estado excitado y en el fundamental. Esta diferencia crea un dipolo instantáneo, denominado momento dipolar electrónico de transición (μ) el cual está descrito por un vector que presenta la misma orientación que la dirección del desplazamiento electrónico y cuya magnitud es proporcional a la intensidad de la transición.[289] El acoplamiento es sensible a la distancia entre los dipolos y al ángulo entre los vectores de los dipolos.[290]

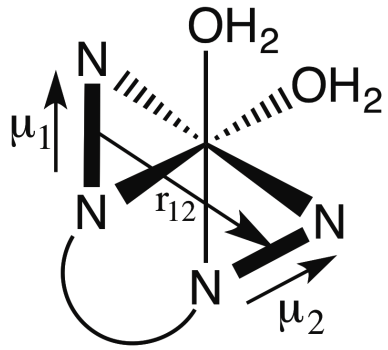


Figura 3.30: Representación esquemática de la orientación de los momentos dipolares de transición (μ_1 y μ_2) y la distancia entre sus "centros" (r_{12}) para el isómero Δ del sistema $[M(\mathbf{xB^3})]^{2+}$ {M = Co(II), Ni(II)}.[289]

Cuando varios cromóforos se disponen próximos en el espacio, como por ejemplo en la esfera de coordinación de un complejo metálico, la excitación electrónica no está confinada en un único cromóforo, si no que está deslocalizada sobre el grupo de cromóforos en conjunto. Este fenómeno, denominado acoplamiento excitónico, fue definido por M. Kasha (1964) para conceptualizar estados electrónicos que involucran la excitación de una serie de moléculas o cromóforos en vez de una excitación localizada de las especies individuales del conjunto.[291] Esto no implica que exista un intercambio electrónico entre los cromóforos, pero sí que comparten energía de excitación entre ellos. El resultado de esta interacción será una diferenciación en sus niveles de energía que tendrá como consecuencia la aparición de dos bandas distintas en el espectro de UV/Vis. En la práctica estas señales rara vez se observan separadas, dada la anchura de las bandas. Sin embargo, en los espectros de CD, las dos absorbancias acopladas muestran efectos Cotton de distinto signo, dando lugar a una curva sigmoidea.

Una configuración Δ en el centro metálico dará lugar a un acoplamiento excitónico representado por una curva sigmoidea con un pico negativo seguido de una señal positiva a medida que disminuye la longitud de onda. En el caso del isómero Λ el espectro obtenido sería la imagen especular del primero. Esta generalización se determinó de manera empírica cotejando los datos de CD con las estructuras mediante difracción de rayos X.[292] Son muy raros los casos en los que esta tendencia no se cumple.[293]

A su vez, la intensidad de las señales de CD también dependen de la intensidad de la transición electrónica por lo que es de esperar diferentes

intensidades al cambiar de centro metálico en una serie de complejos derivados del mismo ligando.

Decidimos emplear la técnica de dicroísmo circular para determinar experimentalmente la quiralidad de los metalopéptidos derivados de D/L**B**^{3}. Hay que recordar que el único residuo quiral de las secuencias peptídicas D**B**^{3} y L**B**^{3} es la Pro localizada en sus *loops*.

Los espectros de dicroísmo circular de los ligandos peptídicos L**B**^{3} y D**B**^{3} presentan una banda conservativa centrada a 316 nm. En el caso de L**B**^{3}, dicha banda presenta un mínimo a 297 nm y un máximo a 331 nm. En el caso de D**B**^{3}, las señales son idénticas pero de signo contrario, siendo ambos espectros imágenes especulares (*Figura 3.31*).

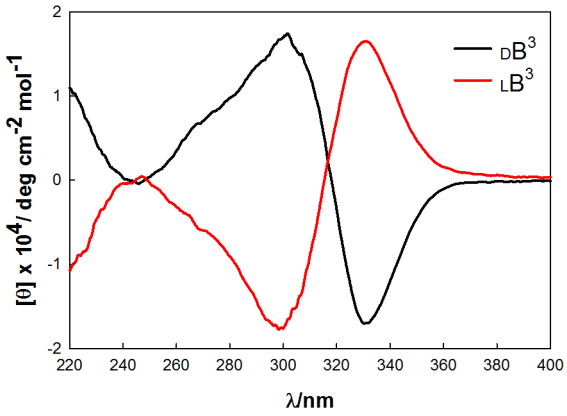


Figura 3.31: Espectros de dicroísmo circular correspondientes a los ligandos peptídicos D**B**^{3} y L**B**^{3}. Las medidas se realizaron en PBS 10 mM pH 5.1 a una concentración de ligando de 0.7 mM en una cubeta de 0.1 cm de paso óptico.

Se estudió la formación de los metalopéptidos de Zn^{II}, Co^{II} y Ni^{II} mediante dicroísmo circular. Tras la adición de los respectivos iones metálicos (3 adiciones de 0.33 equivalentes) el espectro de los ligandos se modifica considerablemente. La banda conservativa centrada a 316 nm deja de serlo y se desplaza hacia el rojo (327 nm). Las señales también se desplazan hacia el rojo sin invertir su signo (*Tabla 3.5*). Al igual que ocurría en el caso del ligando libre, los espectros de dicroísmo circular de los metalopéptido [M(L**B**^{3})]$^{2+}$ son las imágenes especulares de los espectros de sus correspondientes parejas enantioméricas [M(D**B**^{3})]$^{2+}$ (*Figura 3.32*).

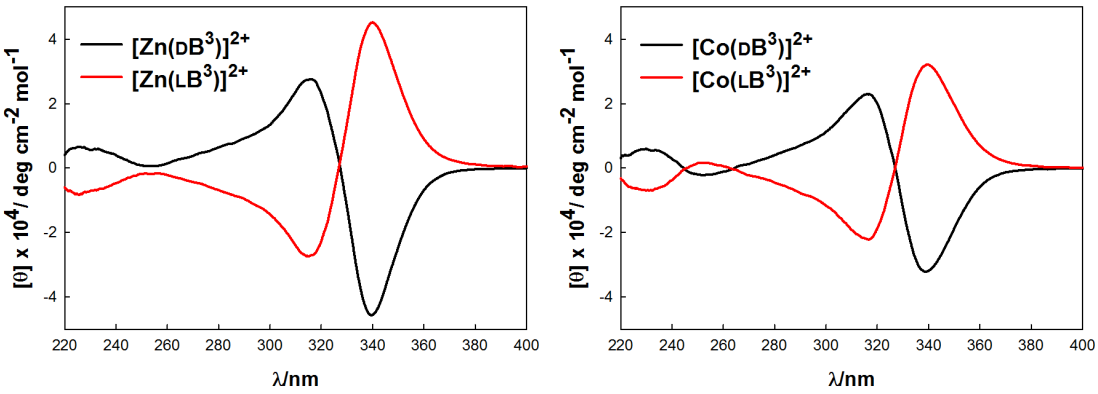


Figura 3.32: Izquierda, espectros de CD correspondiente a la formación de los metalopéptidos de Zn^{II}; derecha, espectros de CD correspondiente a la formación de los metalopéptidos de Co^{II}. Las medidas se realizaron en PBS 10 mM pH 5.1 a una concentración de ligando de 0.7 mM en una cubeta de 0.1 cm de paso óptico.

Tabla 3.5: Resultados de elipticidad molar para los péptidos y metalopéptidos derivados de **L/DB³**.

	λ_{max},nm (θ/cm^2 dmol^{-1})	λ_{max},nm (θ/cm^2 dmol^{-1})
DB³	297.0 (1.78e^4)	331.0 (-1.66e^4)
LB³	297.0 (-1.77e^4)	331.0 (1.65e^4)
[Co(**DB³**)]$^{2+}$	315.5 (2.31e^4)	339.6 (-3.34e^4)
[Co(**LB³**)]$^{2+}$	315.5 (-2.27e^4)	339.6 (3.33e^4)
[Ni(**DB³**)]$^{2+}$	317.4 (2.40e^4)	341.5 (-3.90e^4)
[Ni(**LB³**)]$^{2+}$	317.4 (-2.37e^4)	341.5 (3.87e^4)
[Zn(**DB³**)]$^{2+}$	315.2 (2.61e^4)	339.4 (-4.51e^4)
[Zn(**LB³**)]$^{2+}$	315.2 (-2.62e^4)	339.4 (4.49e^4)

Se puede apreciar que la intensidad de las señales obtenidas en las medidas de dicroísmo circular para los metalopéptidos de Zn(II) es mayor que para los de Co(II) y Ni(II). Esto puede ser debido a que los centros metálicos presentan diferente geometría de coordinación. Los datos de UV/Vis y RMN de estos metalopéptidos sugieren una geometría de coordinación tetraédrica para los iones Zn^{II} y octaédrica para los iones Co^{II} y Ni^{II}, con dos moléculas de H_2O completando sus esferas de coordinación en este último caso (*Figura 3.33*).

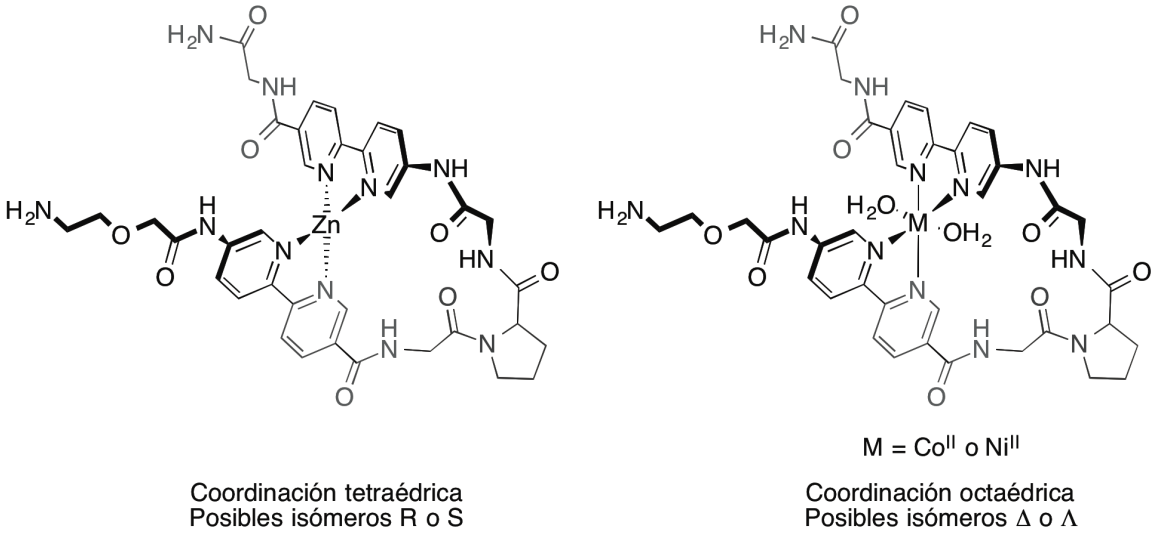


Figura 3.33: Geometrías de coordinación sugeridas para los metalopéptidos bisbipiridínicos.

La diferencia en la orientación relativa de los cromóforos en las dos geometrías hace que el acoplamiento excitónico sea mayor o menor en función del ángulo que forman las bipiridinas.[294] El valor de este acoplamiento es función del *Cos*(θ), donde θ es el ángulo relativo entre los cromóforos. De esta manera, en un compuesto tetraédrico en el que las bipiridinas se disponen completamente perpendiculares entre sí formando un ángulo de 90º, el valor de este acoplamiento es mayor. Por otra parte, en un compuesto octaédrico este ángulo es menor de 90º, por lo que el valor de dicho acoplamiento excitónico será menor.

En este capítulo de esta Tesis Doctoral hemos demostrado que es posible seleccionar la quiralidad supramolecular en metalopéptidos únicamente modificando un aminoácido de su secuencia. Esta estrategia podría aplicarse a la síntesis de compuestos bioactivos como por ejemplo, para modificar la conformación de péptidos con unidades coordinantes, modificando de esta manera sus propiedades.[295] Los estudios realizados sobre los sistemas bisbipiridínicos han sido recientemente publicados en la revista *Chemistry, A European Journal*.[296]

3.2.1.4 Metalopéptidos derivados de los helicandos peptídicos. Helicatos peptídicos

Diseño de las hebras y nomenclatura empleada

Una vez definido el tamaño óptimo de los conectores entre unidades coordinantes, nos planteamos la síntesis de las hebras precursoras de helicatos peptídicos. Para la formación de helicatos metalosupramoleculares se necesitan ligandos compuestos por dos dominios coordinantes separados entre sí por un espaciador. En el diseño de los helicatos peptídicos utilizamos las bpy como dominios coordinantes y el aminoácido O1Pen como espaciador, por lo que las hebras peptídicas contendrán tres subunidades de dos fragmentos coordinantes O1Pen-5Bpy (**16**) consecutivos.

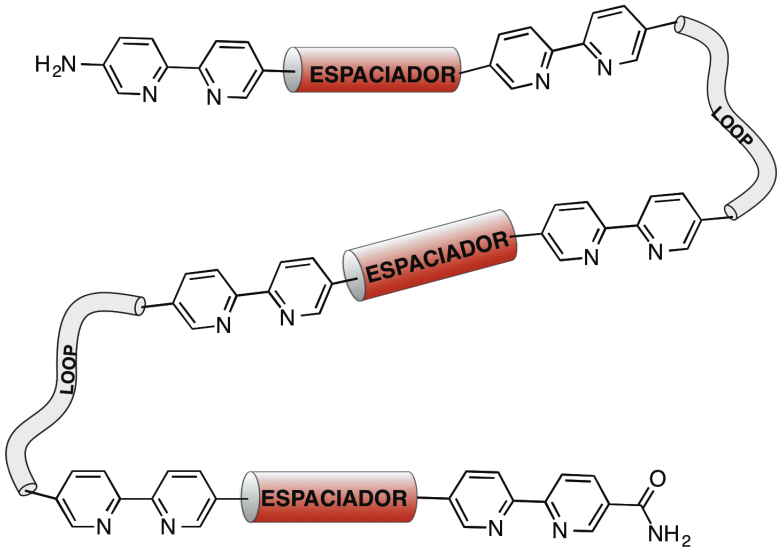


Figura 3.34: Esquema de los elementos constituyentes de los helicandos peptídicos.

Otro factor que define a los helicatos es su disposición helicoidal. Dada la experiencia adquirida acerca del control termodinámico de la quiralidad que proporciona el *loop* diseñado en el punto 3.2.1.3, las tres subunidades coordinantes estarán unidas por dos *loops* homoquirales -Gly-(L)Pro-Gly- o bien -Gly-(D)Pro-Gly-.

-Secuencia **DDH**: H_2N-O1Pen-5Bpy-O1Pen-5Bpy-**Gly-(D)Pro-Gly**-O1Pen-5Bpy-O1Pen-5Bpy-**Gly-(D)Pro-Gly**-O1Pen-5Bpy-O1Pen-5Bpy-$CONH_2$

-Secuencia **LLH**: H_2N-O1Pen-5Bpy-O1Pen-5Bpy-**Gly-(L)Pro-Gly**-O1Pen-5Bpy-O1Pen-5Bpy-**Gly-(L)Pro-Gly**-O1Pen-5Bpy-O1Pen-5Bpy-$CONH_2$

El sistema de nomenclatura en los helicatos es análogo al de los sistemas trisbipiridínicos. En los helicandos los dos conectores son idénticos en tamaño (tres residuos) y ambos poseen una prolina como aminoácido central. La nomenclatura de estos péptidos será, por lo tanto, **XXH**, en donde **X** = D o L, de manera que la primera hace referencia al residuo de prolina N-terminal y la segunda letra al C-terminal. El dipéptido coordinante empleado en la síntesis de estos ligandos fue el derivado de O1Pen (**16**).

Síntesis y caracterización de las hebras peptídicos

La síntesis de los metalopéptidos **LLH** y **DDH** (*Figura 3.34*) se llevó a cabo siguiendo la metodología sintética de péptidos en fase sólida (SPPS) mediante la estrategia Fmoc descrita previamente. Como soporte sólido se empleo una resina de PEG-PS, equipada con un conector de tipo Fmoc-PAL. La rotura de la resina equipada con este tipo de conector generará un grupo amida en el extremo C-terminal del péptido (*Figura 3.35*).

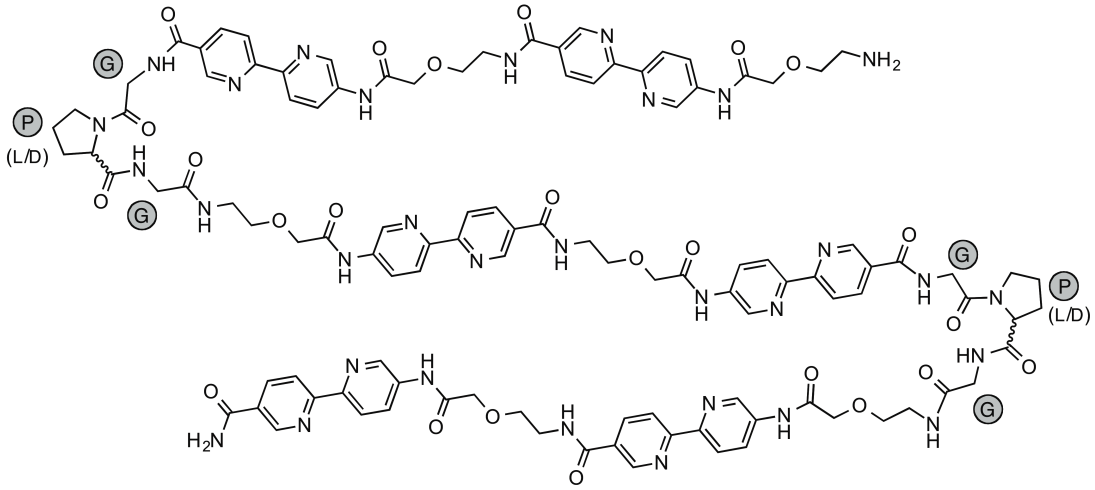
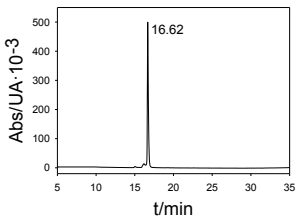
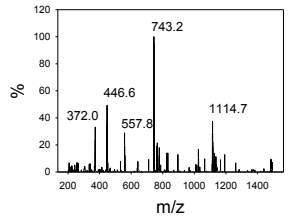
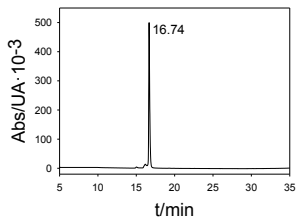
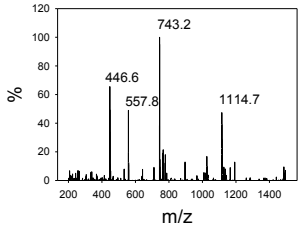


Figura 3.35: Estructura de los helicandos peptídicos **LLH** y **DDH**.

El agente activante seleccionado para los acoplamientos fue el HBTU para los aminoácidos naturales y el HATU para el dipéptido **16**. La purificación de los ligandos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (C_{18}) y se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (C_{18}) a escala

analítica, en un cromatógrafo equipado con un detector de espectrometría de masas (*Tabla 3.6*).

Tabla 3.6: Cromatogramas y espectros de masas (ESI) de los helicandos **LLH** y **DDH**.

Péptido	HPLC-MS		
LLH		$C_{108}H_{113}N_{31}O_{24}$ = 2227.86 $[M+2H]^{2+}$ 1114.7 $[M+3H]^{3+}$ 743.2 $[M+4H]^{4+}$ 557.8 $[M+5H]^{5+}$ 446.6 $[M+6H]^{6+}$372.0	
DDH		$C_{108}H_{113}N_{31}O_{24}$ = 2227.86 $[M+2H]^{2+}$ 1114.7 $[M+3H]^{3+}$ 743.2 $[M+4H]^{4+}$ 557.8 $[M+5H]^{5+}$ 446.6	

Síntesis, caracterización y cálculo de las constantes de formación de los helicatos peptídicos de Fe(II) y Co(II)

La síntesis de los metalopéptidos se llevó a cabo empleando como disolvente tampón fosfato [NaH_2PO_4-Na_2HPO_4] a pH 7.2. Sobre una disolución del ligando peptídico se realizaron adiciones de alícuotas de disoluciones estándar de Fe(II) y Co(II), siguiendo la formación del correspondiente compuesto de coordinación mediante espectroscopia UV/Vis. Dado que se iban a realizar estudios de interacción con ADN, se elgió un pH lo más cercano posible a las condiciones fisiológicas. Esto fue posible gracias a las bajas concentraciones empleadas en los estudios espectroscópicos.

El espectro de absorción de las hebras peptídicas presenta un máximo de absorción a 304 nm, característico de la bpy asimétrica. Esta banda disminuye inicialmente su intensidad con la adición de las primeras alícuotas de M(II), para a continuación hacerse más intensa a medida que aumenta la concentración de ión metálico en el medio. El máximo de absorción de la banda centrada a 304 nm se desplaza hacia el rojo durante las valoraciones. El conjunto de los espectros UV/Vis presentan un punto isobéstico característico para cada metalopéptido (*Figura 3.36*).

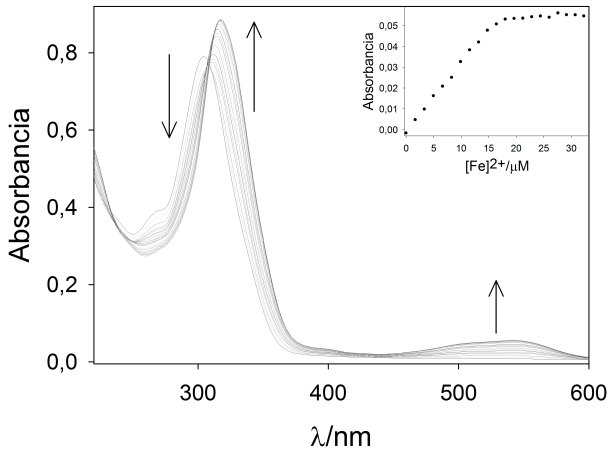


Figura 3.36: Valoración UV/Vis del helicando **LLH** con Fe(II). Las medidas se realizaron a 20 ºC en PBS pH 7.2.

La especie predominante a bajas concentraciones de metal en el medio es la denominada como **ML**, en la cual una molécula de ligando coordina únicamente un ión Fe(II). Al aumentar la concentración de M(II) en la disolución, la contribución de la especie **ML** se reduce hasta casi desaparecer, mientras que aumenta la de la especie mayoritaria y más estable **M_2L**, correspondiente al helicato peptídico formado por dos centros metálicos y una única molécula de ligando (*Figura 3.37*).

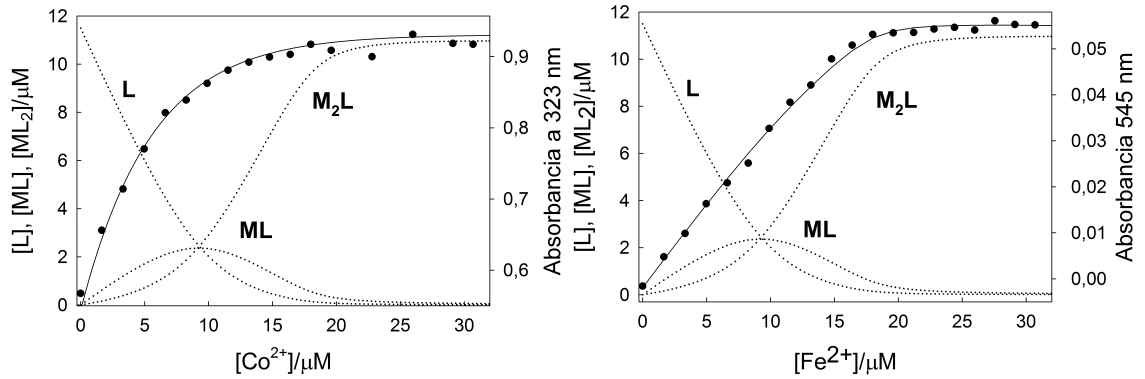


Figura 3.37: Izquierda, representación de las especies existentes en el equilibrio de formación del metalopéptido $[Co_2(\mathbf{LLH})]^{2+}$. Los puntos negros son el perfil de la valoración a 545 nm y la línea negra el ajuste del perfil calculado con el programa SPECTFIT/32. Derecha, representación de las especies existentes en el equilibrio de formación del metalopéptido $[Fe_2(\mathbf{LLH})]^{2+}$. Los puntos negros son el perfil de la valoración a 323 nm y la línea negra el ajuste del perfil calculado con el programa SPECTFIT/32. Las medidas se realizaron a 20 ºC en PBS pH 7.2.

Las constantes de formación para los metalopéptidos se determinaron empleando un programa de ajuste global (SPECTFIT/32), obteniéndose los valores indicados en la *Tabla 3.7*.

Tabla 3.7: Valores de las constantes parciales de formación calculadas para los helicatos peptídicos de Fe(II) y Co(II), empleando el programa de ajuste global Spectfit/32. Las medidas se realizaron a 20 ºC en PBS pH 7.2.

Peptido	Log$\beta_{m,n}$	Fe(II)	Co(II)
LLH	log β_{11}	10.85(0.17)	8.87 (0.10)
	log β_{21}	23.01(0.37)	19.36 (0.18)
DDH	log β_{11}	10.59(0.19)	8.86 (0.12)
	log β_{21}	23.11(0.27)	19.24 (0.16)

[a] $\beta_{mn} = [M_m(xxH)_n]/[M]^m[xxH]^n$

Para confirmar la estequiometría del helicato peptídico se realizó un Job Plot mediante espectroscopia UV/Vis. Se prepararon diez disoluciones con un gradiente en fracciones molares para el metal y para el ligando, manteniendo constante la concentración total de metal + ligando (*Tabla 3.8*).

Tabla 3.8: Relación de volúmenes adicionados para para uno de los once puntos del Job Plot. Los volúmenes indicados se adicionaron sobre 340 mL de tampón PBS 1 mM, 1 mM NaCl, pH 7.2.

	V/µL										
[LLH]	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
[Fe(II)]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

De la representación de los valores de absorbancia frente a la fracción molar se pueden ajustar dos rectas cuyo punto de cruce representa la estequiometría del compuesto.[297] Las rectas se cruzan a 0.66 de fracción molar de Fe^{II}, lo que confirma la estequiometría 2:1 (M_2L).

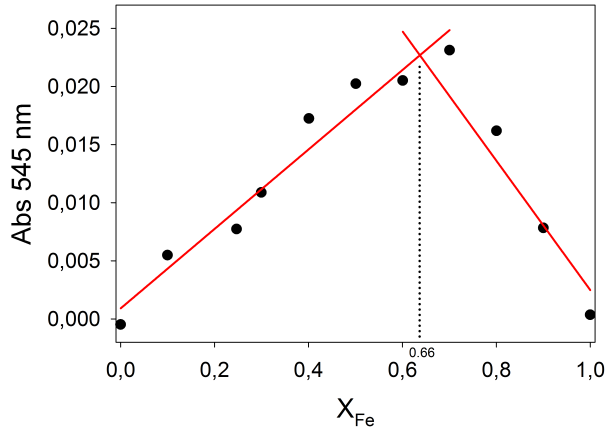
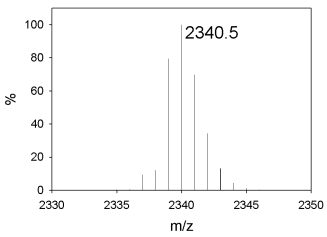
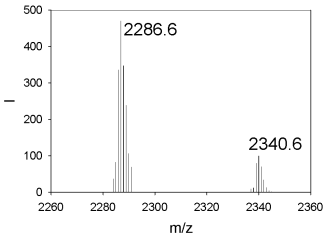
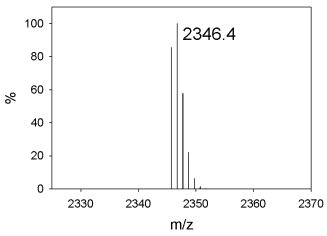
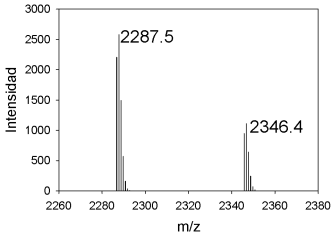


Figura 3.38: Job Plot para la formación de la especie $[Fe_2(LLH)]^{4+}$. Las medidas se realizaron a 20 ºC en PBS 1 mM, 1 mM NaCl, pH 7.2.

Se realizaron los espectros de MALDI-TOF de las disoluciones procedentes de las valoraciones espectrofotométricas. Los perfiles isotópicos encontrados para coinciden con los resultados de las simulaciones realizadas y confirman la formación de los complejos de estequiometría 2:1 (*Figura 3.38*). Hay que indicar que la observación del pico correspondiente a la especie mononuclear es un artefacto de la técnica MALDI observado comúnmente en este tipo de compuestos dinucleares.[298]

Tabla 3.9: Simulación y resultados de espectrometría de masas (MALDI-TOF) para los helicatos de Fe(II) y Co(II) derivados del péptido **LLH**.

Metalopéptido	Simulación	Encontrado
$[Fe_2(LLH)]^{4+}$ $C_{108}H_{110}Fe_2N_{31}O_{24}$ 2339.73		
$[Co_2(LLH)]^{4+}$ $C_{108}Co_2H_{110}N_{31}O_{24}$ 2345.72		

Cálculos teóricos[§]

Para obtener información estructural de estos sistemas se llevó a cabo la modelización molecular del complejo ΛΛ-$[Fe_2(LLH)]^{4+}$. Para ello se generó un modelo de partida tomando como referencia la estructura de los péptidos sintéticos monometálicos previamente discutidos; a continuación se optimizó el sistema siguiendo el siguiente protocolo: 1) simulación de dinámica molecular (MD) de los giros del metalopéptido; 2) clustering de los resultados de MD y 3) refinado mediante técnicas híbridas de Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular (QM/MM) de los clústers más representativos resultado de la dinámica. Los cálculos finales se llevaron a cabo incluyendo efectos del disolventes. Se obtuvieron así 4

[§] Estudios realizados por el Dr. Jean Didier Maréchal (UAB)

estructuras que fundamentalmente se diferencian en pequeños cambios en la geometría de los giros y en las conformacones *cis/trans* de los enlaces amida en los giros y espaciadores. La diferencia de energía potencial entre cualquiera de las estructuras fue en todos los casos menor de 20 kJ/mol, lo cual es consistente con la flexibilidad intrínseca del sistema. Como ejemplo representativo de los resultados obtenidos se discute a continuación el complejo más estable obtenido.

El model de menor energía presenta una geometría helicoidal (*Figura 3.39*) en la que los dos iones metálicos presentan una coordinación octaédrica y las seis bipiridinas se orientan uniformemente alrededor de los iones. La distancia media calculada entre los átomos de hierro y los nitrógenos coordinantes es de 2.03 Å, y las bipiridinas presentan una desviación del plano mínima (menor de 0.1 Å); todos estos datos indican que la primera esfera de coordinación del metal no se encuentra sujeta a tensiones resultantes de las preferencias conformacionales del esqueleto peptídico y que existe una buena complementariedad entre os iones metálicos y los ligandos.

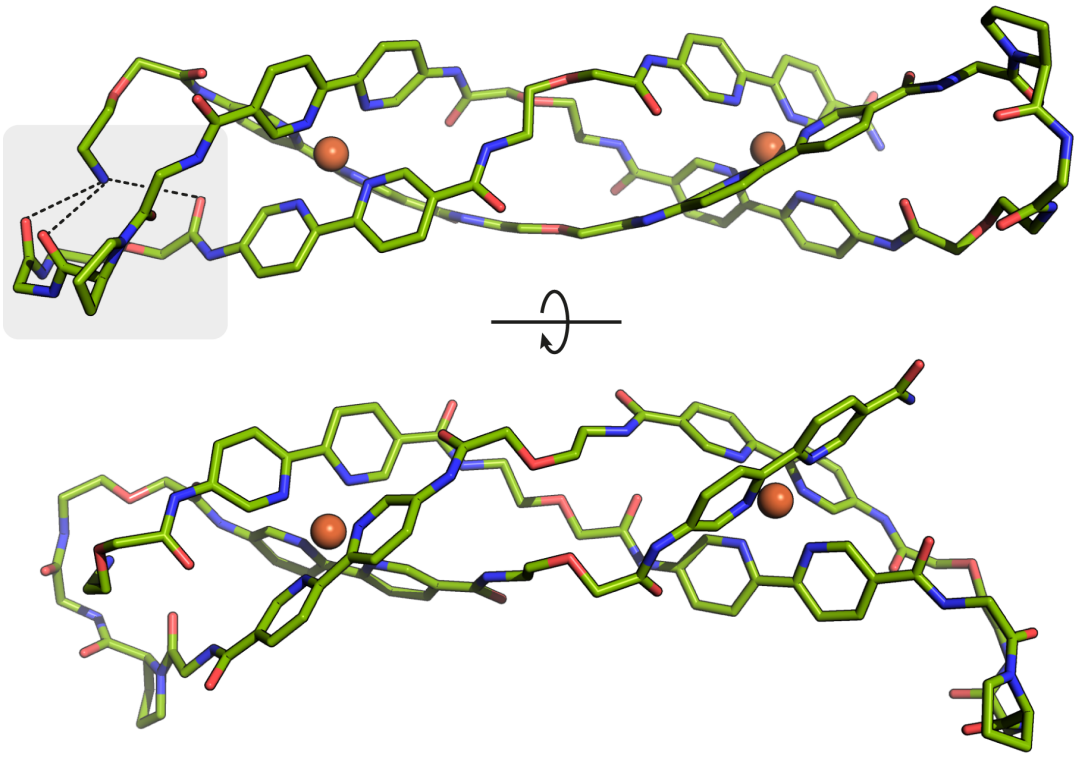


Figura 3.39: Representación de la estructura del complejo ΛΛ-[Fe_2(LLH)]$^{4+}$ en su confromación más estable. Se resalta la interacción entre el grupo amino protonado en el extremo N-terminal y el giro C-terminal del péptido. En la estructura inferior (giro de 90º a lo largo del eje definido por los centros metálicos) se observa la desviación del giro N-terminal del cilindro.

Todos los residuos de la estructura en el ligando peptídico, incluyendo las dos prolinas, presentan configuración *trans* en sus enlaces amida. A pesar de su proximidad, no se observan enlaces de hidrógeno entre los grupos amida en los espaciadores. Se observa también que el helicato no es totalmente simétrico y ambos giros están desviados hacia un lado del helicato con un ángulo aproximado de 75º con respecto al eje definido por los metales, encontrándose los dos residuos de prolina desviados uos 9 Å de ese eje. Es interesante resaltar que la prolina C-terminal esta menos desplazada y todo el giro C-terminal presenta una geometría más compacta, que se relaciona con la interacción de dos/tres grupos carbonilos en la cadena peptídica con el grupo amino N-terminal protonado; esto pone de manifiesto una cierta complejidad en la organización del metalopeptido, que llega a definir interacciones remotas entre diferentes partes de la secuencia como resultado del plegamiento de la cadena peptídica.

La optimización de los giros se hizo bajo el entorno UCSF Chimera,[299] utilizando el driver MMTK de dinámica molecular. Se utilizó el campo de fuerzas GAFF con las cargas generadas automáticamente con las herramientas de AMBER calculadas a través del método Gasteiger.[300] Teniendo en cuenta que la primera esfera de coordinación del metal no debería influir en las propiedades dinámicas de los giros, se llevaron a cabo las simulaciones de MD en ausencia de los iones metálicos y con las bipiridinas fijadas. Los cálculos de MD se realizaron con 50.000 pasos con un tiempo de integración de 1 fs y 10000 pasos de calentamiento. Las simulaciones completas fueron procesadas con NMRClust y los 4 clústers más poblados se seleccionaron para los cálculos de QM/MM.

Los cálculos híbridos de Mecánica Cuántica y Mecánica Molecular (QM/MM) se realizaron utilizando el procedimiento ONIOM implementado en Gaussian'09,[301] combinando DFT (B3LYP) y el campo de fuerzas de AMBER. Dentro de los 279 átomos, los cálculos de QM incluyen las 6 bipiridinas y los 2 iones de Fe, con un total de 110 átomos. Se utilizaron dos bases de cálculo: 6-311G* para los átomos de los grupos principales,[302] aug-cc-pVTZ para los centros metálicos.[303] Todos los cálculos se realizaron con el disolvente implícito (agua, en este caso) con el modelo CPCM,[304] e inclusión electrónica para hacer el modelo más realista.

Control termodinámico de la quiralidad de los helicatos peptídicos

Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular de los helicandos peptídicos **LLH** y **DDH** presentan una banda centrada a 300 nm. En el caso de **LLH** dicha banda presenta un máximo a 289 nm y un mínimo a 320 nm (efecto Cotton negativo), mientras que en el caso de **DDH** las señales son idénticas pero de signo contrario. Como era de esperar para especies enantioméricas, los espectros de dicroísmo circular de ambos ligandos son imágenes especulares (*Figura 3.40*).

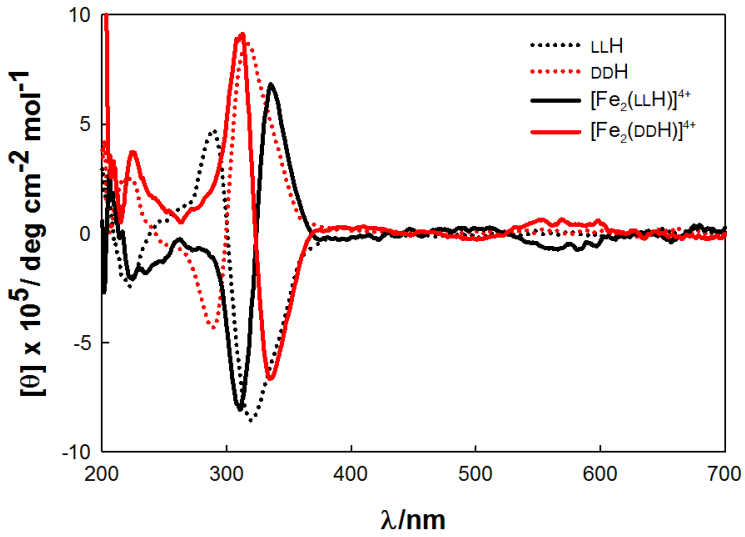


Figura 3.40: Espectros de CD de los péptidos y metalopéptidos de Fe^{II} derivados de los helicandos LLH y DDH. Las medidas se realizaron en PBS 10 mM pH 7.2 a una concentración de ligando de 50 μM en una cubeta de 0.1 cm de paso óptico.

El ensamblaje de los helicatos peptídicos en presencia de iones Fe(II) conlleva, para el caso del helicando LLH, un desplazamiento hacia el visible de las bandas del ligando hasta 310 y 335 nm con una inversión en el signo de las señales. Con el helicando DDH, sucede lo mismo, pero con señales de signos opuestos: los espectros son, por lo tanto, imágenes especulares. Por otra parte, también se observa la aparición de sendas bandas centradas a 523 nm correspondientes a las transiciones electrónicas MC.

Tabla 3.10: Resultados de elipticidad molar para helicandos y helicatos peptídicos.

	λ_{max} (θ/cm^2 dmol^{-1})	
LLH	289.0 (-8.68e^5)	320.0 (1.86e^6)
DDH	289.0 (8.77e^5)	320.0 (-1,89e^6)
$[Fe_2(\mathbf{LLH})]^{4+}$	302.0 (1.12e^5)	335.0 (-1.58e^5)
$[Fe_2(\mathbf{DDH})]^{4+}$	302.0 (-1.04e^5)	335.0 (1.51e^5)

Extrapolando la información extraída de los sistemas bis y trisbipiridínicos, es de esperar que los centros metálicos del helicato derivado de DDH presenten una configuración absoluta Δ para ambos centros metálicos. En el caso de los derivados de LLH, al ser su imagen especular, presentarán una configuración absoluta Λ. El sentido del giro de la hélice se puede deducir del signo de las señales de CD, según la teoría del acoplamiento excitónico.[305] Un efecto Cotton positivo en la señal de mayor longitud de onda corresponde al isómero P, mientras que un efecto Cotton negativo corresponde al isómero M.[306] Teniendo en cuenta el signo de las señales MC en los espectros de CD, el helicato $[Fe_2(\mathbf{LLH})]^{4+}$ poseería una helicidad acorde con el isómero M, mientras que el helicato $[Fe_2(\mathbf{DDH})]^{4+}$ presentaría una helicidad P.

El proceso de plegamiento es cinéticamente lento y la formación se puede seguir y estudiar mediante CD. Sin embargo estos estudios se encuentran ahora mismo en proceso de realización, por lo que no se discutirán en esta memoria.

3.2.2 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS HELICATOS PEPTÍDICOS DE Fe^{II} Y EL ADN DE DOBLE CADENA

Una vez estudiada la formación y la estabilidad termodinámica de los helicatos de Fe(II) se procedió al estudio de sus propiedades de unión al ADN. Se realizaron diversos experimentos mediante diferentes técnicas espectrofotométricas para determinar la afinidad y el modo de unión de los helicatos peptídicos de Fe(II) al ADN de doble cadena.

Para calcular la constante de asociación de los helicatos y el ADN se realizaron estudios de competición frente al bromuro de etidio.[307] Los ADNs utilizados en estos ensayos fueron el ct-ADN, como ejemplo de ADN genérico, y los polinucleótidos poli(dG-dC) y poli(dA-dT), para estudiar la especificidad de unión.

3.2.2.1 Determinación de la afinidad y especificidad de la unión helicato-ADN

Bromuro de etidio

El bromuro de etidio (EB) es un compuesto poliheterocíclico monocatiónico que se une al ADN mediante intercalación a través de interacciones electrostáticas y de π-stacking.[308] Se usa generalmente para marcar ácidos nucleicos debido a que sus propiedades luminiscentes dependen del entorno en el que se encuentra. El EB no es fluorescente en disolución acuosa, pero cuando se encuentra insertado entre pares de bases de los ácidos nucleicos presenta una intensa banda de fluorescencia centrada a 605 nm.

Se conocen datos de constantes de asociación del EB al ADN en diferentes condiciones de fuerza iónica y pH.[309] Esto nos permite emplearlo para calcular la constante de asociación de otras moléculas no fluorescentes y el ADN mediante un estudio de competición.

Sobre una disolución de 1.3 μM de EB y 3.9 μM de ADN de doble cadena [ct-ADN, poli(dA-dT) o poli(dG-dC)] en tampón TES (10 mM Tris, 1 mM AEDT) se realizan adiciones de helicato peptídico, midiéndose su espectro de fluorescencia después de cada adición.

Se puede extraer una relación directa entre la disminución de la intensidad de la fluorescencia en función de la concentración de molécula competidora y la constante de asociación helicato/ADN.

Cuando la emisión de fluorescencia se reduce al 50 % se cumple que:

$$[EB]\cdot K_{EB}=[H]\cdot K_{H}$$

La constante de asociación del EB varía en función de la fuerza iónica del medio y del ADN. Para las condiciones empleadas los valores de dichas constantes son conocidas: ct-ADN K_{EB} = 10 x 10^6 M^{-1}; poli (dA-dT) K_{EB} = 9.5 x 10^6 M^{-1}; poli (dG-dC) K_{EB} = 9.9 x 10^6 M^{-1}.[310]

Los valores para las constantes aparentes obtenidos mediante este método se recogen en la *Tabla 3.11*.

Tabla 3.11: Valores de las constantes de asociación calculadas para los helicatos peptídicos por desplazamiento del bromuro de etidio ($K_{app}/10^6$ M^{-1}).

	Poly(dA-dT)	Poly(dG-dC)	ct-ADN
$[Fe_2(\mathbf{LLH})]^{4+}$	140	63	66
$[Fe_2(\mathbf{DDH})]^{4+}$	100	67	62

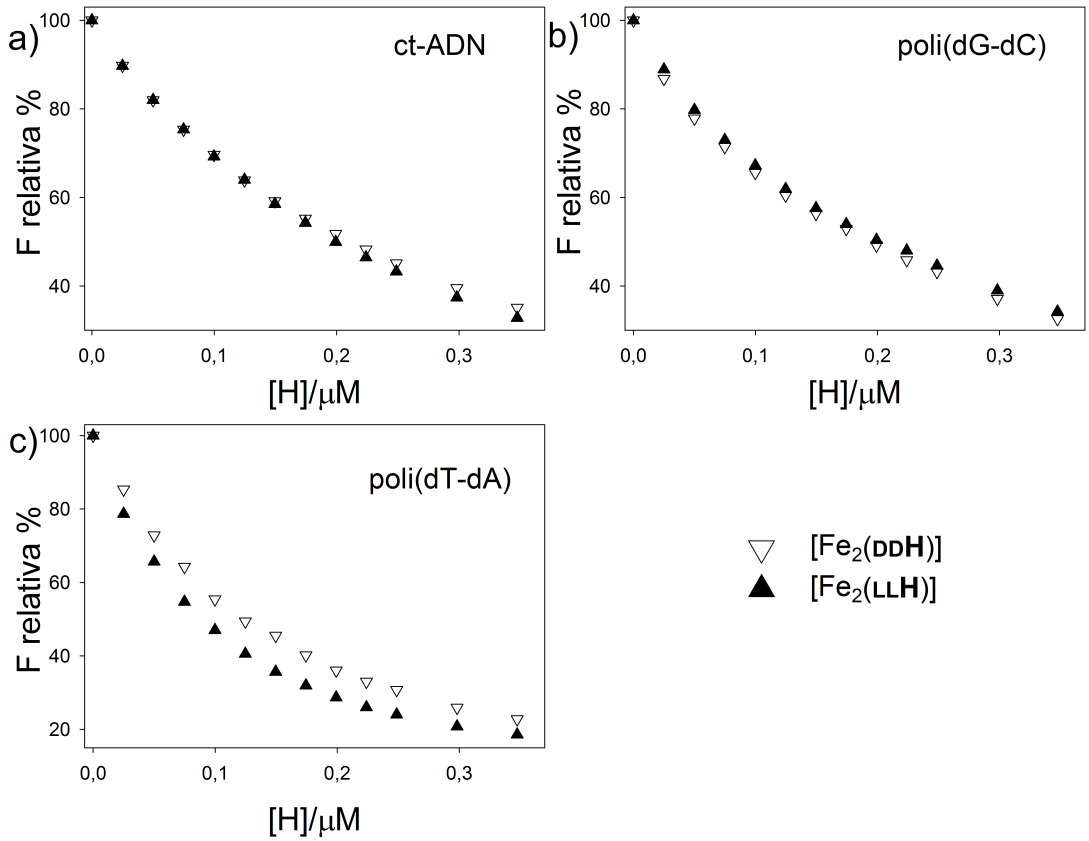


Figura 3.41: Fluorescencia relativa a 610 nm de las mezclas a) ct-ADN + EB, b) poly-GC ADN + EB y c) poly-AT ADN + EB, frente a la concentración de helicatos ΛΛ-$[Fe_2(\mathbf{LLH})]^{4+}$ y ΔΔ-$[Fe_2(\mathbf{DDH})]^{4+}$. Adiciones de 1 μL de una disolución 50 μM de helicatos ΛΛ-$[Fe_2(\mathbf{LLH})]^{4+}$ y ΔΔ-$[Fe_2(\mathbf{DDH})]^{4+}$ sobre una disolución previamente incubada de ct-ADN (3.9 μM) y EB (1.3 μM) en buffer TES.

En el caso del ct-ADN y el poli (dG-dC), los helicatos peptídicos presentan una constante de asociación muy similar, de lo que se deduce que la interacción podría ser no estereoselectiva. En cambio, en el caso del poli (dA-dT) la diferencia entre los valores de las constantes son mayores, los que sugiere una mayor estereoselectividad en el reconocimiento. Esto

podría ser debido a la morfología del poli (dA-dT), que presenta surcos más estrechos que favorecerían el reconocimiento estereoespecífico.[311]

Existen dos antecedentes importantes con los que se pueden comparar este tipo de sistemas, en los trabajos de P. Scott *et al*. y M. Hannon *et al*. emplean el mismo método para determinar su afinidad por el ADN. Las constantes aparentes calculadas por P. Scott *et al*. son: 212-80 para poli(dA-dT), 108-48 para poli(dG-dC) y 110-50 para el ct-ADN. Las calculadas para los helicatos de M. Hannon *et al*. son: 142-106 para poli(dA-dT), 89-77 para el poli(dG-dC) y 46-11 para el ct-ADN. Los helicatos peptídicos estudiados en esta Tesis Doctoral presentan la misma preferencia por el poli(dA-dT) que los precedentes de P. Scott *et al*. y M. Hannon *et al*. Las constantes aparentes obtenidas para los helicatos peptídicos presentan valores intermedios entre los determinados por ambos autores para cualquiera de los ADNs empleados.

Una vez determinada la afinidad de los helicatos peptídicos por el ADN procedimos a estudiar el modo en el que estos helicatos interaccionan con el ADN.

El discernimiento entre diferentes modos de unión es una tarea complicada que hace necesaria la realización de diferentes experimentos que deben ser interpretados de forma complementaria.

Dicroísmo circular inducido

El dicroísmo circular induce transiciones en los ligandos una vez unidos al ADN. Generalmente estas transiciones son el resultado del acoplamiento excitónico entre los momentos dipolares de transición del ligando y el de las bases nucleicas.[312] Una molécula unida al ADN, con su momento electrónico de transición orientado a lo largo del surco menor (~40º - 45º), presenta un efecto Cotton positivo intenso en la longitud de onda de absorción de dicho ligando. El discernimiento es más complicado en el caso de los agentes de unión al surco mayor dado que el signo de la señal puede ser positivo o negativo. Esto se debe a que la amplitud de dicho surco aumenta el número de posibles orientaciones dentro del ADN.[313]

Se registraron espectros de CD de ct-ADN (200 μM/pb) en presencia de los helicatos peptídicos $[Fe_2(\mathbf{LLH})]^{4+}$ y $[Fe_2(\mathbf{DDH})]^{4+}$ (10 μM). A los espectros obtenidos se les restó la contribución de los helicatos

peptídicos a la concentración de trabajo, dando como resultado los espectros de dicroísmo circular inducido que se muestran en la *Figura 3.42*.

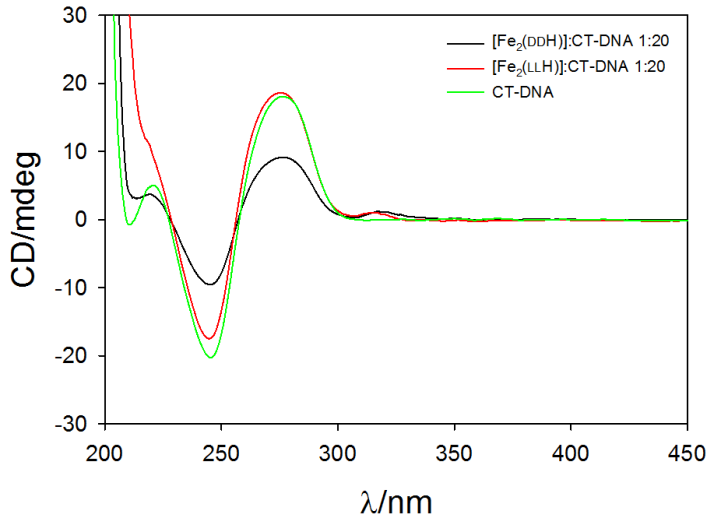


Figura 3.42: Espectros de ICD del ct-ADN (línea verde) en presencia del helicato peptídico [Fe_2(DDH)] (línea negra) y del helicato peptídico [Fe_2(LLH)] (línea roja). Los experimentos se realizaron en PBS 10 mM, 100 mM NaCl, pH 7.4, ct-ADN 200 μM/pb, [Fe_2(LLH)]$^{4+}$/ [Fe_2(DDH)]$^{4+}$ 20 μM, medidos a 20 ºC.

Los espectros de ICD de los helicatos peptídicos en presencia de ct-ADN presentan una banda conservativa centrada a 260 nm característica del ADN en su forma B (señal negativa a 240 nm y una señal positiva a 280 nm). No obstante, la intensidad de dicha banda es muy inferior en el caso del [Fe_2(DDH)]$^{4+}$. Esta banda surge del acoplamiento entre los pares de bases nitrogenadas, por lo que una disminución en su intensidad sugiere una distorsión en su apilamiento.[314] Para ambos helicatos se observa una señal positiva no muy intensa a 320 nm, lo que sugiere que la interacción es a través de la inserción en el surco mayor del ADN.

Ensayos de competición frente al catión complejo hexaamíncobaltato $[Co(NH_3)_6]^{3+}$

El catión complejo hexaamíncobaltato se une de forma selectiva al surco mayor del ADN provocando, en el caso de poli(dG-dC), una transición de la forma B a la forma Z.[315] Este cambio morfológico ha sido ampliamente estudiado y se puede analizar mediante dicroísmo circular.[316] El espectro de CD de la forma B del poli(dG-dC) se caracteriza por una señal negativa a 210 nm, otra señal negativa a 255 nm y una señal positiva a 276 nm. En cambio, cuando se produce el cambio de conformacional de

forma B a Z, se observa la inversión de la señal a 210 nm debido al cambio de dirección del giro.[317] Además presenta dos bandas, una positiva a 265 nm y una fuerte señal negativa a 292 nm (*Figura 3.43*).[318]

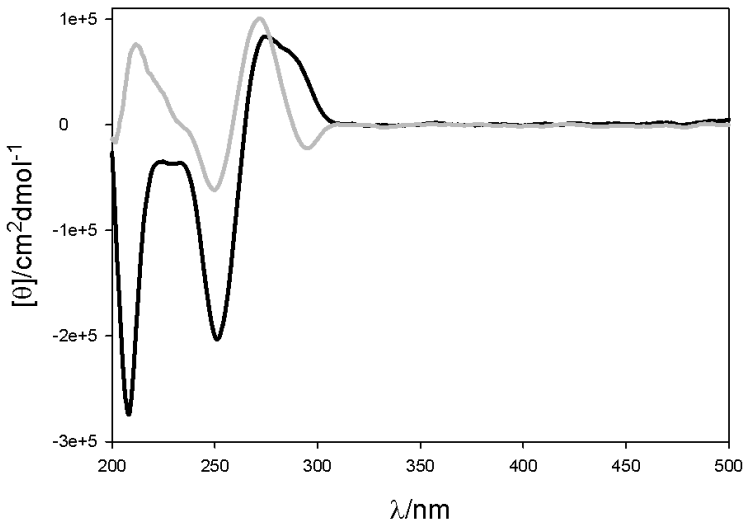


Figura 3.43: En negro, espectro de CD de poli(dG-dC) 60 μM/pb; en gris, espectro del mismo polinucleótido en presencia de 110 μM de catión complejo $[Co(NH_3)_6]^{3+}$.

El experimento consiste en incubar el polinucleótido poli(dG-dC) en presencia del helicato peptídico a estudiar y posteriormente realizar adiciones sucesivas del complejo $[Co(NH_3)_6]^{3+}$. En el caso de que el catión complejo no sea capaz de inducir el tránsito B→Z se podrá sugerir que el helicato se une a través del surco mayor del poli(dG-dC).[319]

Sobre una disolución de poli(dG-dC) (60 μM) se realizaron adiciones de una disolución 10^{-2} M de $[Co(NH_3)_6]^{3+}$, registrándose tras cada adición el correspondiente espectro de CD. Posteriormente, se prepararon muestras de polinucleótido poli(dG-dC) (60 μM) en presencia del helicato peptídico $[Fe_2(LLH)]^{4+}$ (40 μM) y del helicato peptídico $[Fe_2(DDH)]^{4+}$ (40 μM). Sobre estas disoluciones se realizaron sucesivas adiciones de una disolución 10^{-2} M de $[Co(NH_3)_6]^{3+}$, registrándose tras cada adición el correspondiente espectro de dicroísmo circular.

Para ilustrar las diferencias entre los diferentes experimentos realizados se representó la señal de dicroísmo circular a 292 nm frente a la concentración del catión complejo de Co(III) (*Figura 3.44*).

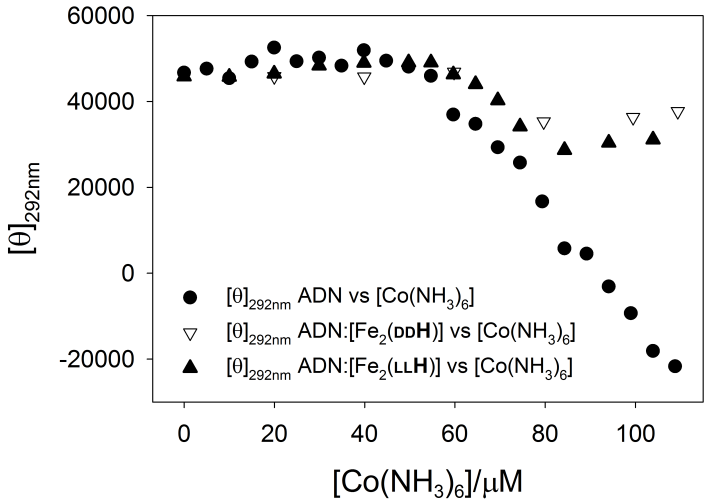


Figura 3.44: Representación del valor de la señal de CD a 292 nm frente a la concentración del catión complejo $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ en presencia y ausencia de los helicatos peptídicos $[Fe_2(\mathbf{LLH})]^{4+}$ y $[Fe_2(\mathbf{DDH})]^{4+}$ en tampón cacodilato (1mM), NaCl (50 mM) pH 7.0.

En la figura anterior se puede observar que el cambio de conformación B→Z ADN se produce una vez alcanzada una concentración de 50 μM de $[Co(NH_3)_6]^{3+}$, en el caso del poli(dG-dC), en ausencia de helicato. En cambio, en presencia de los helicatos peptídicos, se observa la estabilización de la morfología B para el polinucleótido poli(dG-dC). Estos resultados sugieren que el catión complejo $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ y los helicatos peptídicos tienen como diana la misma región del ADN: el surco mayor. Además, de los datos se puede deducir que en el caso de poli(dG-dC) parece no existir estereoespecificidad en el reconocimiento, dado que ambos helicatos estabilizan la forma B de la misma manera.

Ensayos de competición de fluorescencia frente al Hoechst 33258

El Hoechst 33258 (*Figura 3.45*) es un fluoróforo solvatocrómico que se inserta en el surco menor del ADN.[320] Es de esperar que los agentes de unión al surco mayor no afecten al aducto Hoechst 33258/ct-ADN por lo que no deberían observarse cambios en la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda del máximo de emisión del aducto (460 nm).

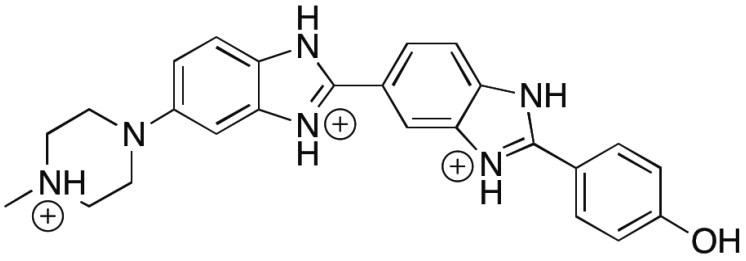


Figura 3.45: Estructura del Hoechst 33258

Se preparó una disolución de 1 mL de ct-ADN (80 μM), Hoechst 33258 (8 μM) y buffer de cacodilato (1 mM). Sobre esta mezcla se adicionaron alícuotas de los helicatos peptídicos $[Fe_2(\mathbf{LLH})]^{4+}$ y $[Fe_2(\mathbf{DDH})]^{4+}$ y se registraron los espectros de emisión después de cada adición (*Figura 3.46*).

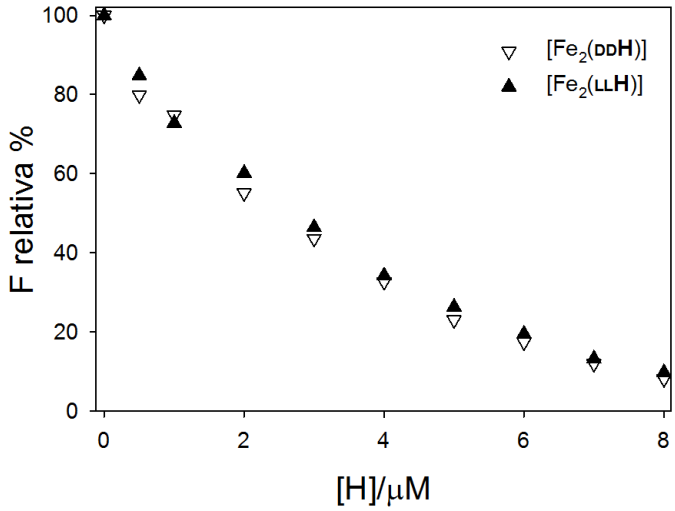


Figura 3.46: Representación del la intensidad de la señal fluorescente (460 nm) en función de la concentración de helicato peptídico.

Se observa una disminución de la intensidad de la emisión fluorescente del aducto Hoechst 33258/ct-ADN, lo que sugiere que un número indeterminado de moléculas de Hoechst 33258 son desplazadas debido a la interacción del helicato peptídico y el ADN. El desplazamiento de las moléculas de Hoechst 33258 puede ser debido a la distorsión estructural inducida al ADN por la interacción con los helicatos peptídicos a través del surco mayor.[321]

3.2.3 ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN CELULAR

Las barreras biológicas han evolucionado para evitar la entrada de tóxicos en las células, no obstante, son estas mismas barreras las que a menudo limitan la acción de los compuestos activos y por tanto, su beneficio terapéutico. La eficiencia del reconocimiento del ADN mediante moléculas sintéticas no sólo exige una puesta a punto de sus propiedades de reconocimiento, sino también la modulación de sus características físicas para que dichas moléculas puedan llegar al núcleo en un periodo de tiempo lo más corto posible. De hecho, uno de los principales obstáculos a la hora de poder utilizar compuestos con afinidad por el ADN en biología molecular, deriva de sus dificultades intrínsecas para cruzar las membranas celulares y entrar en el núcleo.

3.2.3.1 Funcionalización con de la hebra peptídica LLH con fluoresceína isotiocianato

Se decidió funcionalizar la hebra peptídica **LLH** con un grupo fluoresceína para poder estudiar el proceso de internalización de los helicatos en células por microscopía de fluorescencia.

La unidad de fluoresceína se acopló covalentemente al extremo N-terminal de la hebra **LLH** a través de un grupo isotiocianato. La nueva hebra se denotó como **LLH**-F(*Figura 3.47*).

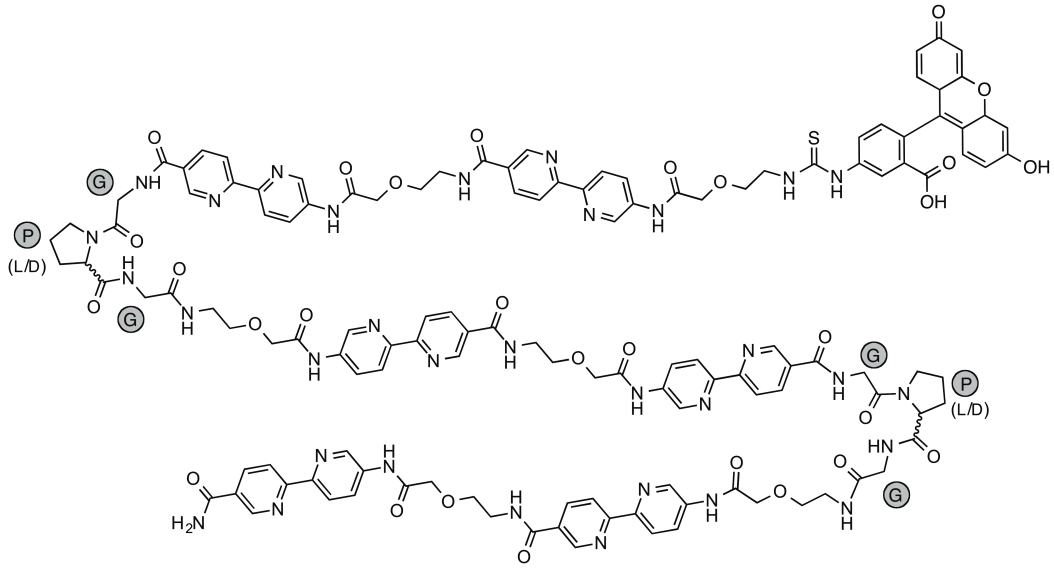
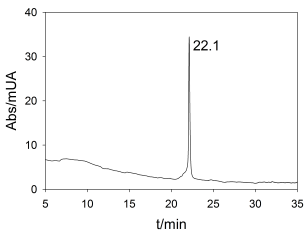
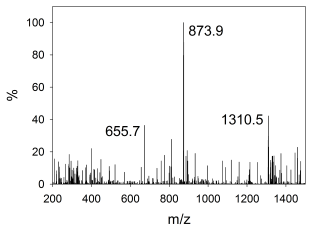


Figura 3.47: Estructura de los helicando funcionalizado con una unidad de fluoresceína en su extremo N-terminal (**LLH**-F).

La purificación de la misma se realizó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (C_{18}). Posteriormente se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (C_{18}) a escala analítica en un cromatógrafo equipado con un detector de espectrometría de masas.

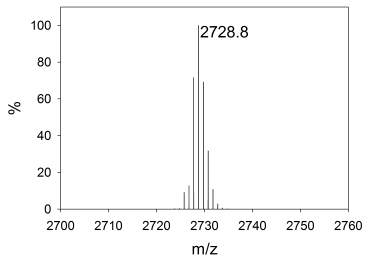
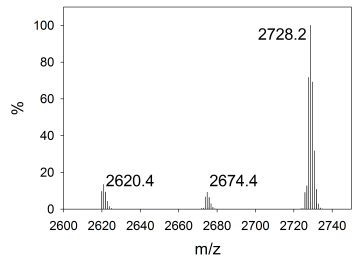
Tabla 3.12: Cromatogramas y espectros de masas (ESI) de la hebra **LLH**-F.

Péptido	HPLC-MS		
LLH-F		$C_{129}H_{126}N_{32}O_{29}S$ = 2618.91 $[M+2H]^{2+}$1310.5 $[M+3H]^{3+}$ 873.9 $[M+4H]^{4+}$ 655.7	

3.2.3.2 Síntesis del helicato peptídico funcionalizado con fluoresceína

La síntesis del correspondiente helicato peptídico de Fe(II) se llevó a cabo en una disolución de tampón fosfato [NaH_2PO_4-Na_2HPO_4] a pH 7.2. Sobre una disolución de la hebra peptídica se adicionó una alícuota de una disolución estándar de Fe(II) que contenía 2.0 equiv. de catión metálico.

Tabla 3.13: Simulación y resultados de espectrometría de masas (MALDI-TOF) para el helicato de Fe(II) derivado del péptido **LLH**-F.

Metalopéptido	Simulación	Encontrado
$[Fe_2(LLH\text{-}F)]^+$ $C_{129}H_{123}Fe_2N_{32}O_{29}S$ 2728.76		

Los helicatos peptídicos de Fe(II) derivados de **LLH**-F resultaron ser poco soluble en PBS a pH 7.2.

3.2.3.3 Estudios de internalización celular

La incorporación del fluoróforo extrínseco, la fluoresceína, en la estructura de los helicatos nos dio la oportunidad de realizar ensayos de internalización en células. Los ensayos de internalización se llevaron a cabo en células *Vero* siguiendo el procedimiento descrito en el punto 5.2.8. Transcurridos 60 min de incubación en presencia del helicato $[Fe_2(\text{LLH-F})]^{4+}$ (25 μM). Lamentablemente los resultados no fueron positivos para estos derivados, posiblemente debido a la baja solubilidad del helicato en el medio celular.

Durante la escritura de esta Tesis Doctoral otros miembros de nuestro Grupo de Investigación han sintetizado derivados de estos helicatos peptídicos con rodamina (en sustitución de la fluoresceína) con la esperanza de mejorar la solubilidad de los mismos en medio fisiológico. Se han calculado las correspondientes constantes de disociación con ADN Y (*three-way junction DNA*) a través de anisotropía de fluorescencia. Estas constantes son las primeras que se obtienen por interacción directa con el ADN (y no a través de ensayos de competición) y también son las primeras que se hacen con ADN Y. Además se han realizado ensayos de internalización en células de estos helicatos peptídicos funcionalizados con rodamina y se ha comprobado que atraviesan la membrana celular por endocitosis y que se quedan en vesículas en el citoplasma sin llegar al núcleo celular.

3.3 METALOPÉPTIDOS DE RUTENIO

3.3.1 SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO ESTRUCTURAL

Se planteó la síntesis de metalopéptidos dinucleares de rutenio (II) derivados del dipéptido coordinante **15**. El carácter apolar y la estructura plana que presentarían los metalopéptidos resultantes sugieren que podría unirse al ADN de doble cadena mediante inserción en el surco menor.

3.3.1.1 Diseño de los metalopéptidos dinucleares de Ru(II) y nomenclatura empleada

El diseño planteado para el ligando peptídico consiste en dos fragmentos coordinantes **15** consecutivos (*Figura 3.48*).

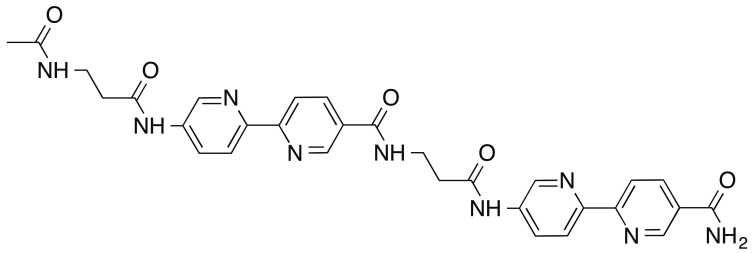


Figura 3.48: Estructura del ligando precursor de metalopéptidos dinucleares de Ru(II).

El péptido dinucleante se denotará por la letra **L**, mientras que los metalopéptidos dinucleares de rutenio (II) derivados del mismo se denotarán por la fórmula general Ru_2**L**. En el caso de los metalopéptidos enantioméricamente puros hay que tener en cuenta la quiralidad de los centros metálicos, que vendrá indicada al comienzo de la fórmula (ΛΛ-Ru_2**L** y ΔΔ-Ru_2**L**). En el caso del compuesto ópticamente no puro se empleará la fórmula general (Ru_2**L**).

Síntesis de los precursores bisbipiridínicos quirales de Ru(II)

Como ya se mencionó la introducción, la mayoría de las biomoléculas presentan quiralidad por lo que es de esperar una interacción enantioselectiva entre el ADN y los metalopéptidos de Ru(II) ópticamente puros.

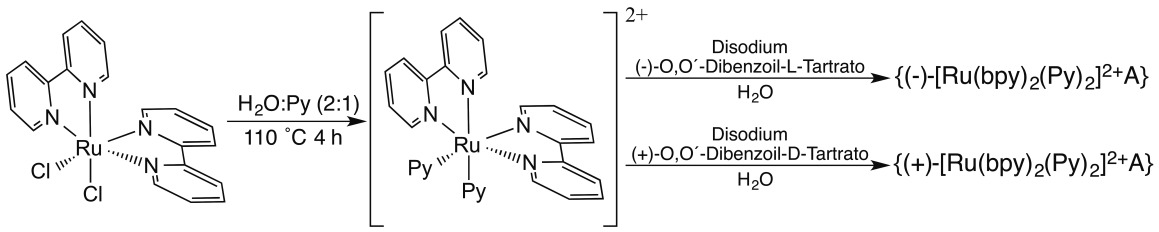


Figura 3.49: Ruta sintética para la separación quiral del precursor de Ru(II) $[Ru(bpy)_2Cl_2]$. En el esquema A = O,O´-dibenzoil-tartrato en su forma enantioméricamente pura L o D.

Si realizásemos la síntesis de los metalopéptidos utilizando un precursor de Ru(II) racémico, obtendríamos un total de cuatro isómeros (ΔΔ/ΛΛ/ΔΛ/ΛΔ) de difícil separación. Por ello decidimos llevar a cabo la separación quiral del precursor de rutenio (II). En concreto realizamos la cristalización selectiva de los diferentes enantiómeros empleando tartratos quirales. Se sintetizó el derivado de piridina $[Ru(bpy)_2(py)_2]Cl_2$ para la cristalización con los tartratos (+/-)-O,O´-dibenzoil-L/D-tartrato. La elección de los tartratos para el proceso de cristalización se justifica en base a su carga y a que se tratan de aniones que presentan anillos aromáticos en su estructura, lo que favorece el empaquetamiento cristalino a través de interacciones de tipo π–π.

En la *Figura 3.50* se muestran los espectros de dicroísmo circular de la mezcla racémica y de los isómeros Δ y Λ , que indican que la separación quiral se realizó con éxito.

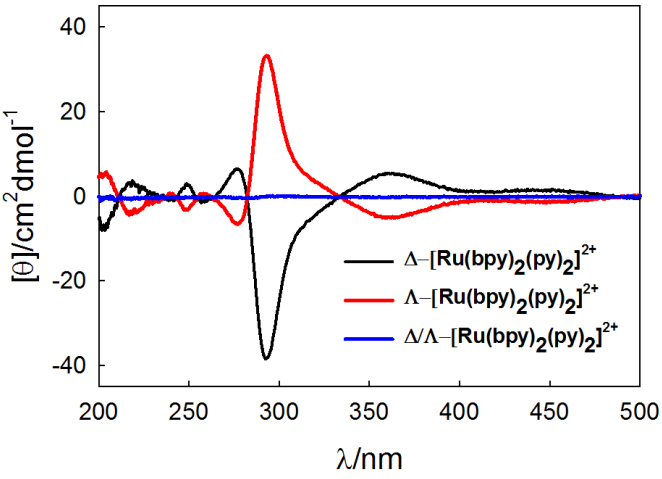


Figura 3.50: Espectros de CD de los precursores de rutenio, isómero Δ (línea roja), isómero Λ (línea negra) y la mezcla racémica (línea azul).

Síntesis y caracterización del ligando peptídico dinucleante L

La síntesis del ligando peptídico dinucleante **L** se llevó a cabo siguiendo una metodología sintética de péptidos en fase sólida (SPPS) mediante la estrategia Fmoc. Como soporte sólido se emplearon dos resinas diferentes: PEG-PS, equipada con un conector de tipo Fmoc-PAL de carga 0.18 mmol/g, y Fmoc-Rink amida, con una carga de 0.56 mmol/g. La rotura de ambas resinas con el cóctel estándar generan un grupo amida en el extremo C-terminal del péptido.

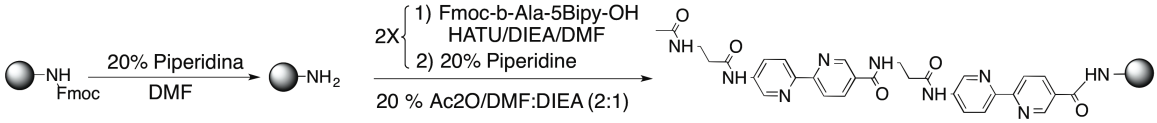


Figura 3.51: Esquema de la síntesis del ligando peptídico dinucleante **L**.

La secuencia del ligando peptídico dinucleante consiste en dos dipéptidos Fmoc-β-Ala-5Bpy-OH (**15**) consecutivos, para lo cual se realizaron dos ciclos de acoplamiento siguiendo el protocolo de SPPS. El agente activante utilizado fue el HATU (*Figura 3.51*).

El análisis del ligando se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (C_{18}) a escala analítica, en un cromatógrafo equipado con un detector de espectrometría de masas (*Figura 3.52*).

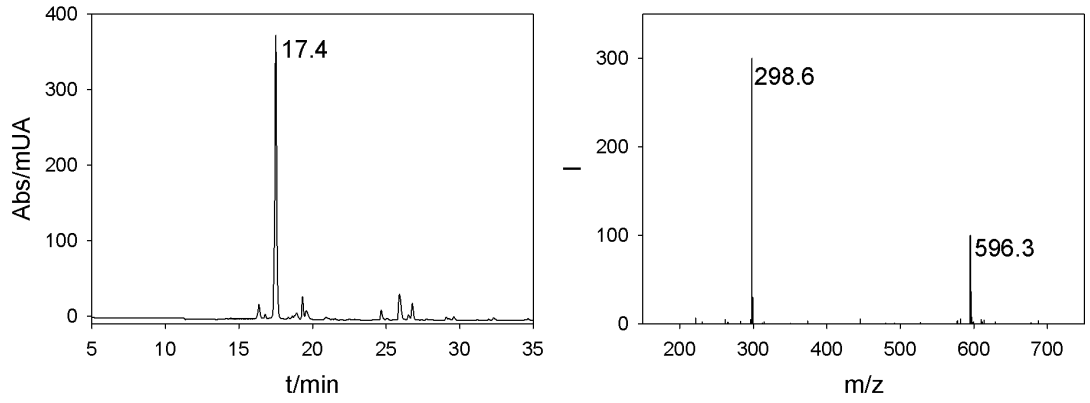


Figura 3.52: Izquierda, cromatograma correspondiente al ligando peptídico **L**; derecha, espectro de masas correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 17.4 min, donde se aprecian los pseudoiones moleculares $[M+H]^+$ = 596.3 y $[M+2H]^{2+}$ = 298.6.

3.3.1.2 Síntesis y caracterización de los metalopéptidos de Ru(II)

La síntesis de los metalopéptidos se llevó a cabo siguiendo dos metodologías diferentes: en disolución y en estado sólido. Se encontraron ciertos inconvenientes en la reacción en disolución que no se observaron en la reacción llevada a cabo en fase sólida: 1) el ligando peptídico es muy insoluble en casi todos los disolventes y 2) la purificación mediante HPLC es complicada dada la presencia del precursor de rutenio (II) en el medio, que es añadido en exceso (3.0 equiv.). Siguiendo la metodología en fase sólida se obtuvieron rendimientos muy buenos y crudos post-desprotección prácticamente puros (*Figura 3.53*).

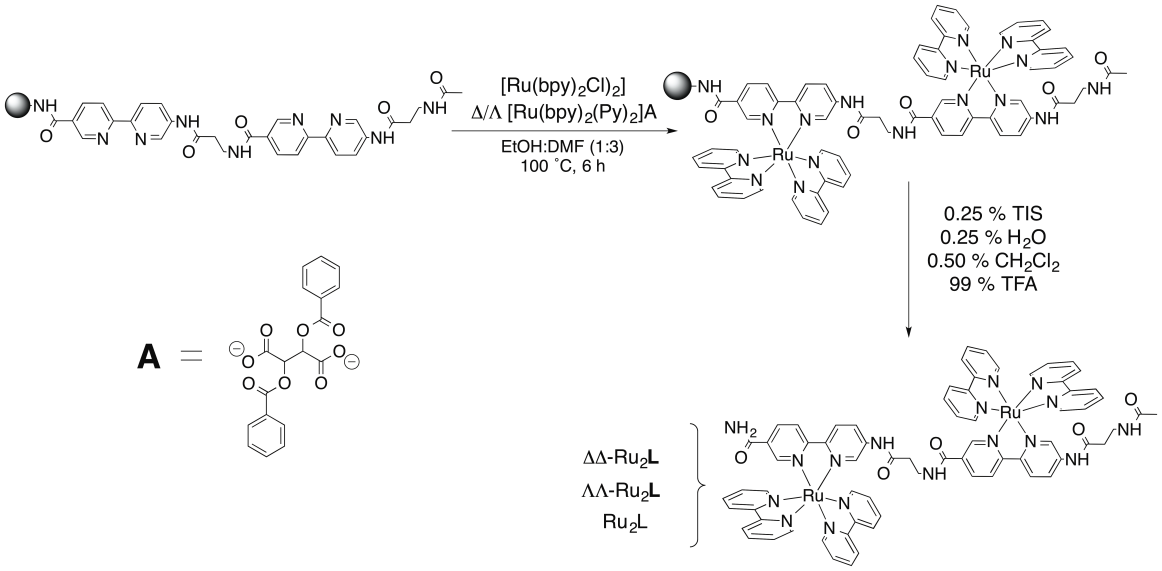


Figura 3.53: Esquema de la síntesis en fase sólida de los metalopéptidos de Ru^{II}.

Una vez sintetizado el metalopéptido, se liberó de la resina utilizando un cóctel estándar. El metalopéptido se aisló del medio de reacción tras la adición de una disolución acuosa saturada de $(NH_4)(PF_6)$ precipitando el producto deseado como un sólido naranja brillante. El sólido se separó por centrifugación y se disolvió en una mezcla 1:1 AcN:H_2O para su análisis y purificación mediante HPLC (*Figura 3.54*).

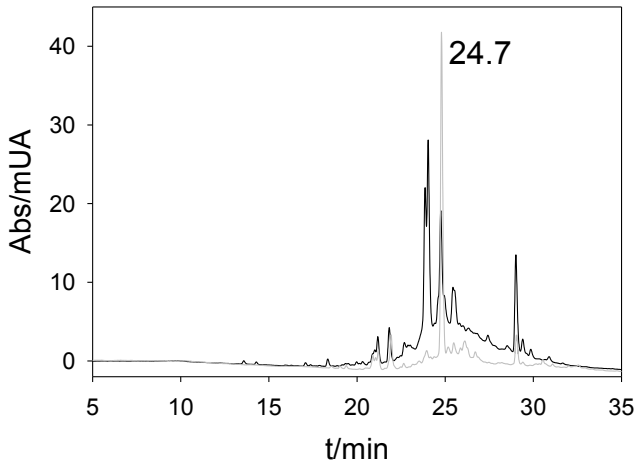


Figura 3.54: Cromatograma del crudo de reacción para la obtención del metalopéptido de rutenio (II) (t_R = 24.7 min), en negro el resultado de la síntesis en disolución y en gris el resultado de la síntesis en fase sólida. (ΔB = 5-40 % en 30 min).

Creemos que la metodología en fase sólida es más efectiva debido fundamentalmente a que el exceso de precursor de rutenio se elimina mediante lavados con DMF antes de la rotura del metalopéptido de la resina. Otro factor importante a tener en cuenta en la síntesis del metalopéptido es la carga de la resina. Se emplearon dos resinas diferentes: Fmoc-PAL-PEG-PS, con una carga de 0.18-0.22 mmol/g y Fmoc-Rink Amida, con una carga de 0.56 mmol/g y un tamaño de partícula más reducido. A la vista de los resultados obtenidos, el uso de una resina con mayor carga y menor superficie influye negativamente en el rendimiento de la reacción. Esto puede ser debido al impedimento estérico y repulsiones electrostáticas entre las diferentes cadenas de péptido y el precursor de rutenio. Estos problemas desaparecen cuando se emplea un resina con menor carga y con un tamaño de partícula mayor.

3.3.2 ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE UNIÓN AL ADN

3.3.2.1 Afinidad de la unión

El estudio de la afinidad de los metalopéptidos dinucleares de Ru(II) al ADN se llevó a cabo a través de diversos experimentos empleando diferentes técnicas espectroscópicas.

Desplazamiento del bromuro de etidio

Para determinar la constante de unión de los metalopéptidos al ADN se realizaron experimentos de fluorescencia de competición frente al bromuro de etidio.[322]

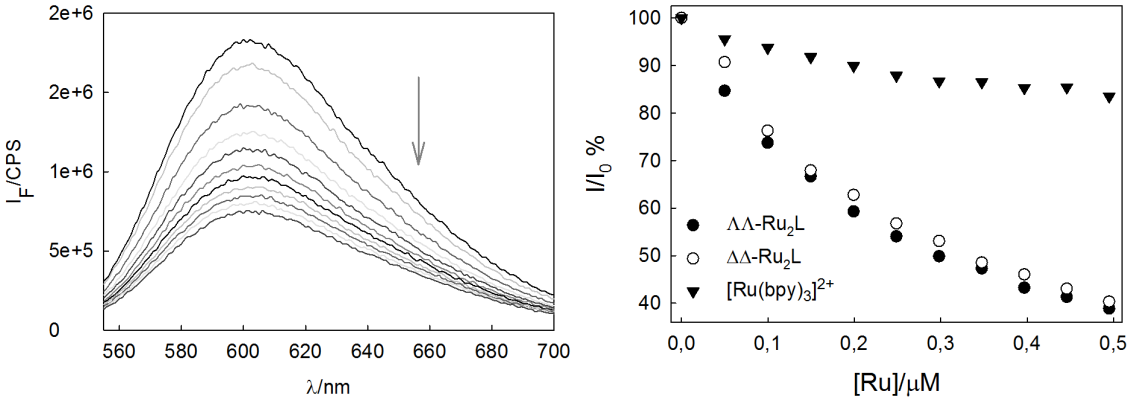


Figura 3.55: Izquierda, espectros de emisión (λ_{ex} = 510 nm) obtenidos tras adiciones consecutivas de una disolución ΛΛ-Ru_2**L** (50 μM; 1 μL) sobre una disolución previamente incubada de ct-ADN (3.9 μM) y EB (1.3 μM) en buffer TES; derecha, variación de la intensidad en el máximo de emisión (610 nm) en función de la concentración de complejo metálico.

El cálculo de las constantes aparentes se realiza del mismo modo que para los helicatos peptídicos, tal y como se explica en el capítulo anterior.

Se puede extraer una relación directa entre la disminución de la intensidad de la fluorescencia en función de la concentración de molécula competidora y la constante de asociación Ru_2L/ADN.

Cuando la emisión de fluorescencia se reduce al 50 % se cumple que:

$$[EB]\cdot K_{EB}=[Ru_2L]\cdot K_{Ru2L}$$

Las constantes de asociación para ambos isómeros se muestran en la *Tabla 3.14*. Las constantes aparentes calculadas son del orden de 10 veces más altas que sus precedentes más semejantes.[323]

A modo de control se realizó una medida con el complejo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (▼). Este complejo homoléptico se une al ADN de forma electrostática,[324] por lo que no desplaza el bromuro de etidio. Este dato sugiere que el modo de unión de los metalopéptidos ΛΛ-Ru_2L y ΔΔ-Ru_2L no es únicamente de tipo electrostático.

Tabla 3.14: Constantes de asociación para los metalopéptidos de rutenio(II) calculadas por desplazamiento de EB.

	$K_{app}/10^6\ M^{-1}$
ΛΛ-Ru_2L	43
ΔΔ-Ru_2L	38
$[Ru(bpy)_3]^{2+}$	NC

Anisotropía de fluorescencia

Mediante este técnica se puede medir la libertar rotacional de cualquier fluoróforo. La anisotropía se puede utilizar para calcular constantes de asociación en procesos de reconocimiento molecular, ya que la libertad rotacional de un fluoróforo, que forma parte de la estructura de un substrato o receptor, se ve afectado tras producirse la formación del aducto supramolecular.[325]

$$P = \frac{I \parallel - I \perp}{I \parallel + I \perp}$$

La emisión polarizada de los metalopéptidos de rutenio es muy baja dado su pequeño tamaño. Sin embargo, al interaccionar con el ct-ADN (una molécula mucho más grande), el movimiento de los metalopéptidos es mucho más lento, observándose cambios en la emisión polarizada.

La anisotropía de fluorescencia nos confirma, al igual que ocurría en el ensayo de desplazamiento de EB, que la unión de los metalopéptidos de rutenio al ct-ADN no es de naturaleza electrostática, dado que la anisotropía varía tanto para el isómero ΛΛ (○) como para el ΔΔ (●) en presencia de ADN.

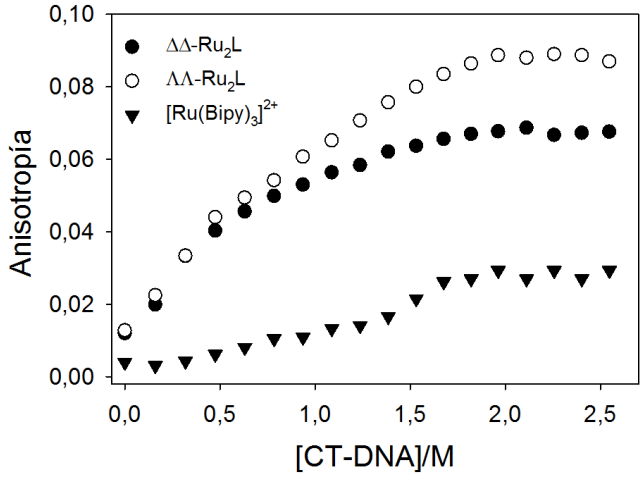


Figura 3.56: Variación de la intensidad de anisotropía de fluorescencia de los metalopéptidos de ΔΔ-Ru_2L o ΛΛ-Ru_2L (50 μM) en tampón 20 mM Tris-HCl, 100 mM de NaCl, pH 7.5 tras adiciones consecutivas de ct-ADN (1 mM).

En la *Figura 3.56* se pueden observar las variaciones de los valores de anisotropía de fluorescencia de los metalopéptidos ΔΔ-Ru_2L o ΛΛ-Ru_2L en función de la concentración de ADN (ct-ADN) en el medio. Los bajos valores de anisotropía que presenta el complejo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ es típico de agentes de unión que se unen al ADN de modo electrostático. Estos datos sugieren de nuevo que el modo de unión al ADN de los metalopéptidos ΔΔ-Ru_2L o ΛΛ-Ru_2L no es (únicamente) electrostático.[326]

Espectroscopia de RMN**

Se realizaron experimentos STD (**S**aturation **T**ransfer **D**ifference) para determinar de forma cualitativa la afinidad de la unión metalopéptido/ADN y para acumular más datos que nos permitan determinar el modo de unión. En concreto, esta técnica nos permite determinar si existe un equilibrio asociación⇋disociación entre un ligando y su receptor, siempre y cuando la constante de disociación esté dentro del rango de 10^{-3}-10^{-8} M. [327]

Los experimentos realizados confirman la unión de los metalopéptidos al ADN. En presencia de ct-ADN ambos isómeros, ΔΔ-Ru_2L y ΛΛ-Ru_2L, muestran señales STD en la región comprendida entre 7.0 y 8.5 ppm correspondientes a los protones aromáticos de los ligandos bipiridínicos. A 1.74 ppm se aprecia la señal correspondiente a los

** Estudios realizados en colaboración con el doctor Victor Sánchez Pedregal (USC)

protones del metilo correspondiente al grupo acetilo del extremo N-terminal. La ausencia de estas señales en las medidas de referencia (sin ct-ADN y con los mismos parámetros) confirman que las señales observadas en los STD se producen como resultado de la interacción íntima de los metalopéptidos y el ADN. Las intensidades de las señales para ambos isómeros son muy parecidas, lo que indica que la constante de disociación es similar.

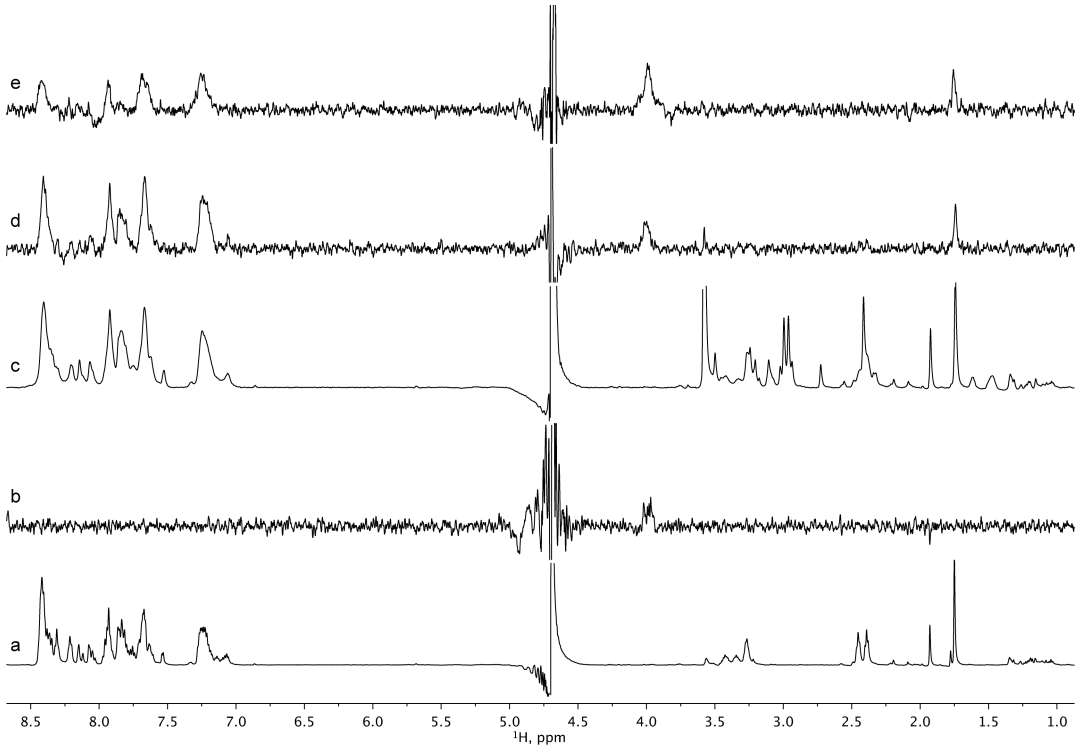


Figura 3.57: (a) Espectro ^{1}H NMR de referencia (off-resonance) de **ΔΔ–**Ru_2L (150 μM); (b) espectro STD de una muestra **ΔΔ–**Ru_2L (150 μM); (c) espectro ^{1}H NMR de referencia (off-resonance) de **ΔΔ–**Ru_2L (150 μM) en presencia de ct-ADN (150 μM/pb); (d) espectro STD de la muestra mostrada en (c); (e) espectro STD de una mezcla de 228 μM **ΛΛ–**Ru_2L y 250 μM ct-ADN. El tiempo de saturación fue de 2 s a las frecuencias de –40 ppm (referencia y off-resonance) y +4.0 ppm (STD y on-resonance).

Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)††

Se empleó la microscopía de fuerza atómica (AFM) para estudiar la interacción de los metalopéptidos dinucleares de Ru(II) y el ADN. En este ensayo se emplea un tipo de ADN circular (plásmido pBR322), debido a que es más fácil monitorizar cambios en su estructura terciaria por su pequeño tamaño.[328]

†† Estudios realizados en colaboración con el doctor Patrick Gámez (ICREA)

En la *Figura 3.58a* se presenta la imagen de AFM del plásmido pBR322 incubado durante 24 h a 37 ºC. El plásmido se encuentra en forma relajada, depositado sobre una superficie de mica, observándose muy pocos puntos de contacto (flecha roja). En cambio, en la *Figura 3.58b* se presenta la imagen del mismo plásmido en las mismas condiciones de incubación pero en presencia del metalopéptido dinuclear ΔΔ-Ru_2L. Al contrario de lo que ocurría en el caso anterior, el plásmido muestra un cambio en su morfología inicial considerable, encontrándose regiones donde las cadenas han colapsado (flechas azules) debido a la interacción con el metalopéptido de Ru(II). Esto indica que la interacción entre metalopéptidos de Ru(II) y el plásmido pBR322 es fuerte.

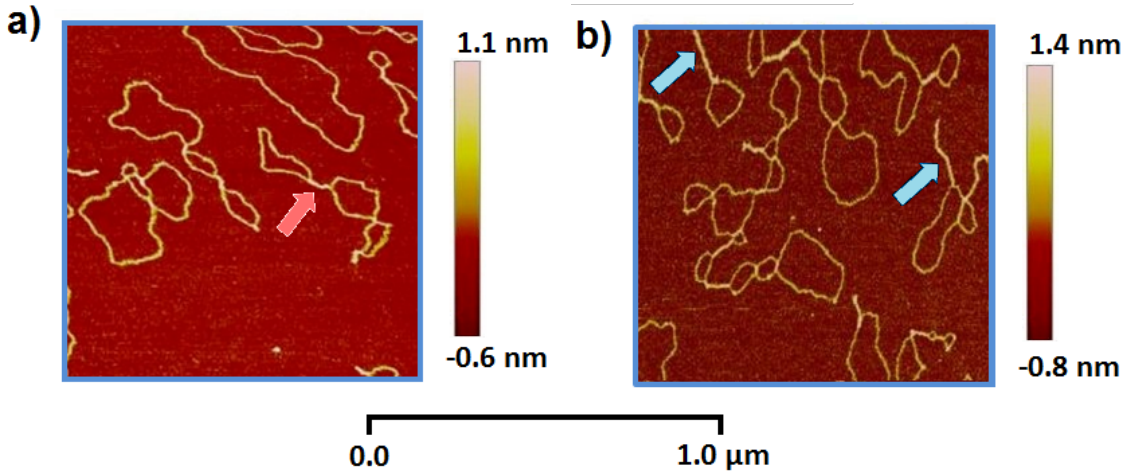


Figura 3.58: Imágenes de AFM de: a) plásmido relajado pBR322 (19 µg/mL) incubado a 37 ºC durante 24 h en tampón HEPES; b)) plásmido relajado pBR322 (19 µg/mL) incubado a 37 ºC durante 24 h en tampón HEPES en presencia del metalopéptido ΔΔ-Ru_2L (75 µg/mL).

3.3.2.2 Modo de unión

Se llevaron a cabo diferentes experimentos con el objeto de discernir entre los diferentes modos de unión al ADN que pueden presentar los compuestos de coordinación (1.7.1).

Quenching de la emisión en estado estacionario

Los compuestos de coordinación de rutenio sufren desactivación de su emisión de luminiscencia, también llamado *quenching* en disolución acuosa en presencia del anión complejo $[Fe(CN)_6]^{4-}$ mediante un mecanismo de transferencia electrónica.[329]

$$*[Ru]^{2+} + Q \longrightarrow [Ru]^{+} + Q^{+}$$

El fundamento de este ensayo es que la cadena de polifosfatos del ADN es capaz de proteger al metalopéptido de Ru(II) del *quenching* provocado por el complejo $[Fe(CN)_6]^{4-}$ a través de repulsiones electrostáticas. Sin embargo, la eficacia de esta protección varía en función del modo de unión del metalopéptido de Ru(II) al ADN.

El proceso de *quenching* se puede ajustar a la siguiente ecuación:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + kq \cdot \tau o \cdot [Q] = 1 + Ksv \cdot [Q]$$

en donde K_{SV} representa la constante de Stern-Volmer, que mide la eficiencia con la que el desactivante (*quencher*) disminuye la emisión de fluorescencia. Dado que el proceso de *quenching* para los metalopéptidos de Ru(II) sigue un mecanismo de transferencia electrónica, el *quencher* y el fluoróforo han de estar próximos en el espacio para que éste sea efectivo.

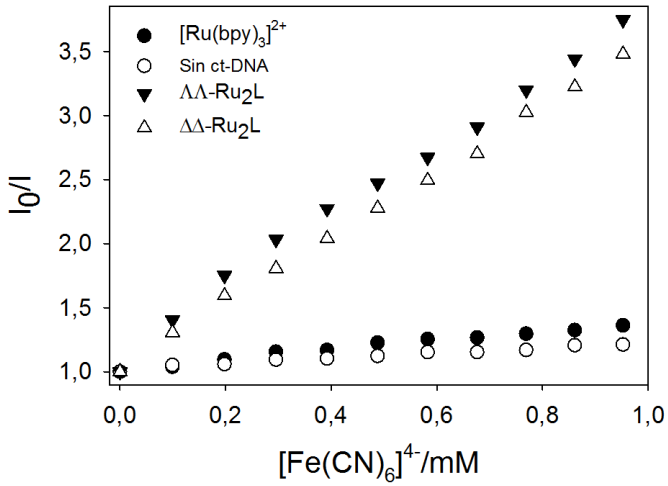


Figura 3.59: Representación de Stern-Volmer para los isómeros ΔΔ-Ru_2L (●) y ΛΛ-Ru_2L (○), para el complejo de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (▽) y para el metalopéptido en ausencia de ct-ADN (▼). Sobre una disolución de buffer Tris-HCl (20 mM, 0.1 M NaCl) que contiene ct-ADN (1.28 μM), ΛΛ-Ru_2**L**, ΔΔ-Ru_2**L** o $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (0,25 μM), se realizaron adiciones de 5 μL de una disolución de $[Fe(CN)_6]^{4-}$ (0.02 M).

En la figura *Figura 3.59* se aprecia que el *quenching* sobre los metalopéptidos en presencia del ct-ADN es poco eficiente, mientras que es mucho más efectivo en ausencia de ct-ADN. El control llevado a cabo con el catión complejo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ presenta una constante de SV muy similar a la obtenida para las medidas realizadas en ausencia de ct-ADN.

Tabla 3.15: Valores de las constantes de Stern-Volmer obtenidas mediante regresión lineal.

	$K_{SV}/10^3\ M^{-1}$
Sin ct-ADN	2.714
$[Ru(bpy)_3]^{2+}$	2.539
ΛΛ-Ru_2L	0.208
ΔΔ-Ru_2L	0.369

Estos datos sugieren que el modo de unión de los metalopéptidos de Ru(II) y el ADN no es únicamente electrostático, y que posiblemente se realice a través del surco menor del ADN.

Dicroísmo circular inducido (ICD)

El dicroísmo circular (CD) es una herramienta muy utilizada para reconocer modos de interacción entre el ADN y ligandos. Se trata de una técnica muy accesible, aunque de menor resolución que la RMN o la difracción de RX. Las interacciones ligando-ADN pueden ser estudiadas en general gracias a la interpretación de las señales de dicroísmo circular inducidas al ligando. Esta inducción es debida al acoplamiento entre los momentos eléctricos del ligando y el entorno asimétrico generado por el apilamiento de los pares de bases nucleicas. Alternativamente, también se puede estudiar la asociación por los cambios que el ligando produce en el espectro de dicroísmo circular del ADN.

El espectro de dicroísmo circular típico para un ct-ADN en su forma B consiste en una banda conservativa a 260 nm, compuesta por una señal positiva a 275 nm y otra negativa a 245 nm.

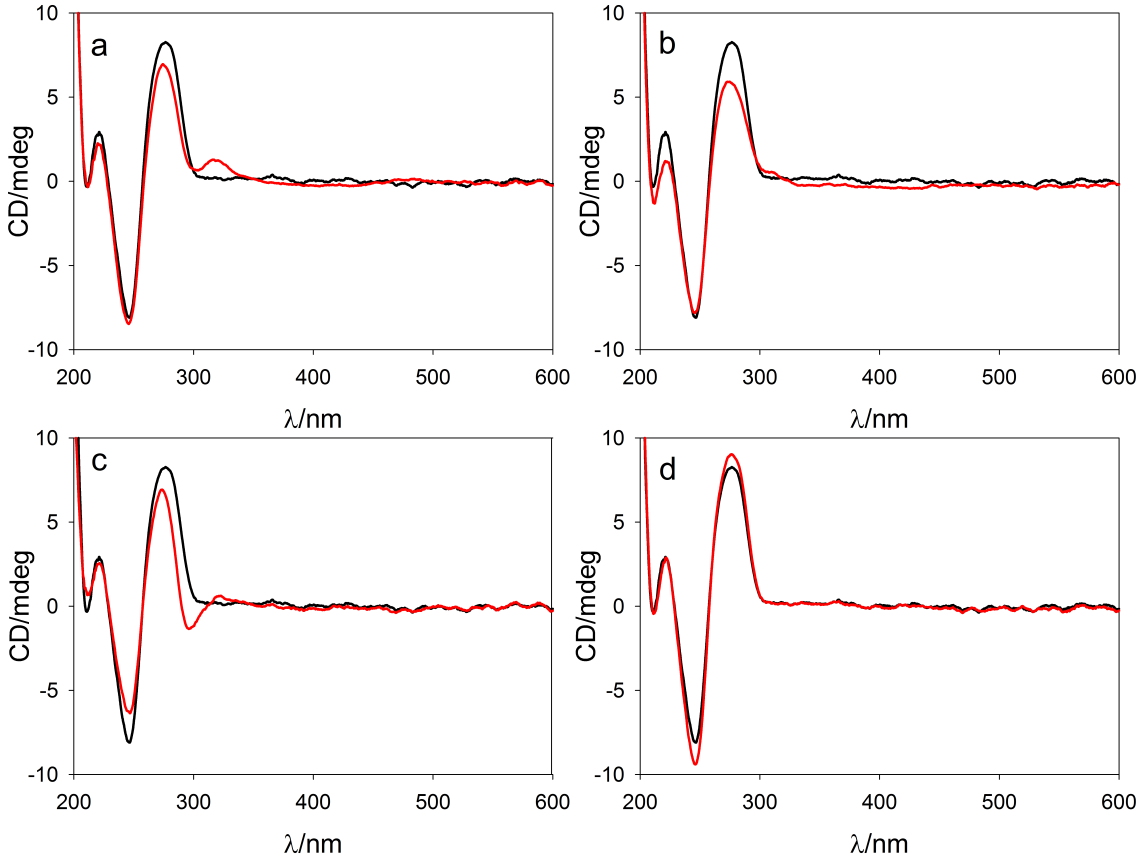


Figura 3.60: La línea negra corresponde al espectro de CD del ct-ADN, las líneas rojas representan los espectros de ICD de: a) ct-ADN en presencia del metalopéptido ΛΛ-Ru_2L; b) ct-ADN en presencia del metalopéptido ΔΔ-Ru_2L; c) ct-ADN en presencia del metalopéptido Ru_2L; d) ct-ADN en presencia del complejo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$. Las medidas se llevaron a cabo en PBS buffer 10 μM, 100 μM NaCl, pH 7.4, at 25 ºC. La concentración de ct-ADN es 1 mM y las de complejos metálicos 100 μM para los casos a, b, c y d.

La aparición de una banda positiva a 320 nm en el espectro de CDI del ct-ADN en presencia del isómero ΛΛ-Ru_2L sugiere que este metalopéptido se une al ADN a través del surco menor, que ya esta misma banda se aprecia en el caso de agentes de unión al surco menor como el Hoechst 33258[330] o la distamicina A.[331]

El tipo de interacción del isómero ΔΔ con el ADN no está clara. Aparece una señal positiva a 320 nm, al igual que ocurría en el caso anterior. El efecto Cotton positivo de la banda centrada a 270 nm reduce drásticamente su intensidad, presentando un leve hombro. El cambio en la banda centrada a 210 nm sugiere una modificación de la estructura del ct-ADN. Estos resultados pueden estar asociados a un ensanchamiento del surco menor, como consecuencia de la inserción en el mismo.[332]

También se realizó la medida de la mezcla meso frente al ct-ADN. El resultado es el esperado: una leve banda a 320 nm y una reducción significativa en el efecto Cotton positivo a 270 nm, como consecuencia de la presencia de dominios de rutenio con diferente actividad óptica.

Al contrario de lo que ocurre en el caso de los metalopéptidos, el catión complejo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, cuya unión es de naturaleza meramente electrostática, hace que la intensidad de las señales entre 250 y 270 nm del ct-ADN disminuyan muy ligeramente.

3.3.2.3 Especificidad de la unión

Los ensayos más determinantes en la caracterización de la interacción con el ADN consistieron en valoraciones frente a diferentes oligonucleótidos cortos de tipo horquilla, que nos permitieron determinar la selectividad de secuencia en el proceso de reconocimiento. Así pues, se seleccionaron oligonucleótidos ricos en pares AT o en pares GC. Por otra parte, el pequeño tamaño de estas biomoléculas nos simplifica el ajuste de las valoraciones a modelos sencillos.

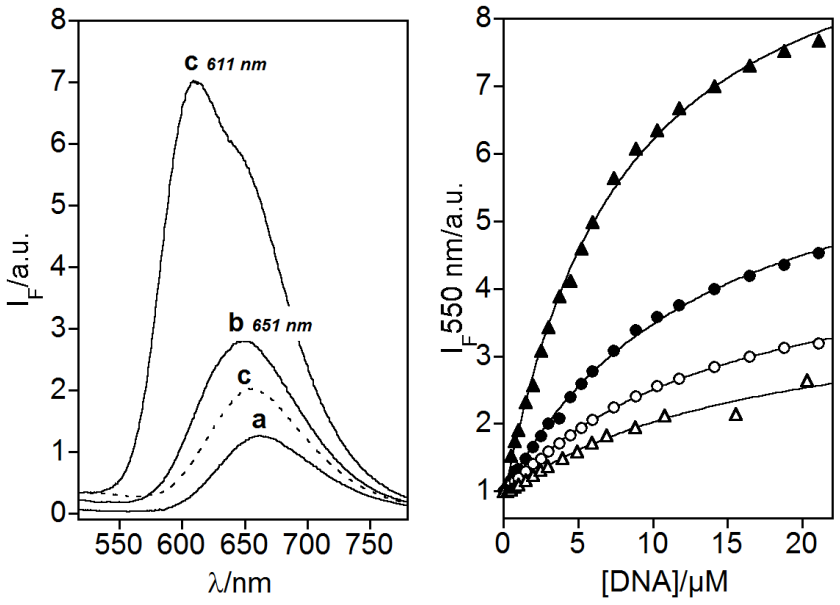


Figura 3.61: Izquierda, a) espectro de luminiscencia de disoluciones ΔΔ-Ru_2L o ΛΛ-Ru_2L (1μM) en tampón 20 mM Tris-HCl, 100 mM de NaCl, pH 7.5; b) ΛΛ-Ru_2L en presencia de 20 μM de oligonucleótido *hairpin* GGCC; c) línea continua, ΛΛ-Ru_2L en presencia de oligonucleótido AAAATTT (21 μM); c) línea punteada, ΔΔ-Ru_2L en presencia de oligonucleótido AAAATTT (21 μM). Derecha, perfiles de las valoraciones realizadas con los oligonucleótidos **AAAATTT** (▲); **AAT** (●); **AAGCTT** (○), y **GGCC** (△). Las líneas continuas representan el mejor ajuste para un modelo 1:1.

En la *Tabla 3.16* se recogen los valores obtenidos para cada uno de los isómeros frente a diferentes oligonucleótidos. Se puede apreciar como el isómero ΛΛ es el que mejor constante presenta independientemente de la secuencia y que su mayor afinidad se alcanza con un surco menor rico en ATs.

Estos datos sugieren que, en oligonucleótidos tipo horquilla, se observa un reconocimiento enantioselectivo por parte del isómero ΛΛ y preferentemente en regiones ricas en pares AT.

Tabla 3.16: Constantes de disociación calculadas para ambos isómeros frente a diferentes secuencias de oligonucleótido.

Oligonucleótido horquilla	K_d (±SD) /μM	
	ΔΔ-Ru_2L	ΛΛ-Ru_2L
AAAATTT	31.00 (7.00)	5.80 (0.75)
AAT	24.50 (3.50)	12.05 (0.65)
AAGCTT	27.00 (6.00)	13.85 (0.75)
GGCC	74.00 (5.00)	17.50 (1.50)

3.3.2.4 Propuesta de modo de unión

Los experimentos de anisotropía de fluorescencia y de *quenching* indican que la unión es más profunda que una mera interacción electrostática. Los datos obtenidos de las valoraciones frente a diferentes tipos de ADN horquilla y la dependencia de la constante de disociación (para ambos isómeros) en función de la secuencia (que se sabe asociada a una determinada geometría del ADN), nos hace pensar en que el modo de unión sea muy parecido para la pareja de enantiómeros y que este reconocimiento se realiza a través de la inserción en uno de los surcos.

Como ya se ha dicho, un ligando unida al ADN, con su momento electrónico de transición orientado a lo largo del surco menor (~45º), presenta un efecto Cotton positivo en el espectro de ICD centrado en la longitud de onda de absorción de dicho ligando. En el caso de unión a través del surco mayor, el signo de la señal puede ser tanto positivo como negativo debido a la mayor amplitud del surco.[332]

A la vista de los resultados obtenidos podemos proponer que el isómero ΛΛ-Ru_2L se une mediante inserción de la cadena peptídica en el surco menor. En el caso del isómero ΔΔ-Ru_2L, también es posible la inserción en el surco menor del ADN, posiblemente ensanchando un poco el surco debido a impedimentos estéricos, aunque en este caso es muy posible que exista más de un modo de unión a través de ambos surcos.

Estos estudios han sido recientemente publicados en la revista *Chemistry, A European Journal.*[333]

---

[273] C. P. Whittle, J. Heterocycl. Chem. **1977**, *14*, 191 – 194.

[274] G. R. Newkome, J. Gross, A. K. Patri, *J. Org. Chem.,* **1997**, *62*, 3013 – 3014.

[275] H. Huang, D. G. Drueckhammer, *Chem. Commun*., **2005**, 5196-5197.

[276] C. M. Elliot, E. J. Hersenhart, *J. Am. Chem. Soc*., **1982**, *104*, 7519-7526.

[277] a) H. Miyake, H. Tsukube, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 6977–6991; b) A. F. Williams, *CHIMIA International Journal for Chemistry*, **2000**, *54*, 585–588.

[278] S. K. Brahmachari, R. S. Bhatnagar, V. S. Ananthanarayanan, *Biopolymers,* **1982**, *21*, 1107–1125.

[279] K. C. Chou, *Analytical Biochemistry* **2000**, *286*, 1–16.

[280] C. K. Mathews, H. Ako, K. E. Van Holde, L. A. Shimeld, *Biochemistry*, Benjamin/Cummings Publishing Company, Incorporated, 1996.

[281] Schrodinger, I. Portland, Oregon, **2000**.

[282] W. Jorgensen, D. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc*. **1998**, *118*, 11225-11236.

[283] S. Dapprich, I. Komáromi, K. S. Byun, K. Morokuma and M. J. Frisch, *J. Mol. Struct. (Theochem),* **1999**, 462-472

[284] M. J. Frisch *et al.*, Gaussian09 program, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.

[285] J. P. Rehmann, J. K. Barton, *Biochemistry*, **1990**, *29*, 1710–1717.

[286] D. R. McMillin, R. C. Rosenberg, H. B. Gray, *PNAS*, **1974**, *71*, 4760–4762.

[287] E. C. Constable, *Advances in Inorganic Chemistry*, *34*, Academic Press Inc., 1989.

[288] R. Bruce King, *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Wiley, 2011.

[289] B. Bosnich, *Inorg. Chem.,* **1968**, *7*, 2379–2386.

[290] A. E. Holmes, S. A. Simpson, J. W. Canary, *Monatshefte für Chemie,* **2005**, *136*, 461–475–475.

[291] a) M. Kasha, *Rev. Mod. Phys.*, **1959**, *31*, 162–169; b) M. Kasha, *Physical Processes in Radiation Biology*, Academic Press, New York, Editon edn, 1964, pp. 17–19.

[292] S. G. Telfer, T. M. McLean, M. R. Waterland, *Dalton Trans.*, **2010**, *40*, 3097–3097.

[293] a) S. G. Telfer, R. Kuroda, T. Sato, *Chem. Commun.*, **2003**, 1064-1065; b) S. G. Telfer, N. Tajima, R. Kuroda, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 1408–1418.

[294] S. G. Telfer, N. Tajima, R. Kuroda, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 1408–1418.

[295] a) H. L. Yeung, W. Y. Wong, C. Y. Wong, H. L. Kwong, *Inorg. Chem.*, **2009**, *48*, 4108–4117; b) E. Meggers, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2011**, 2911–2926; c) Z. Lin, M. A. Celik, C. Fu, K. Harms, G. Frenking, E. Meggers, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 12602–12605.

[296] G. Rama, A. Arda, J. D. Maréchal, I. Gamba, H. Ishida, J. Jimenez-Barbero, M. E. Vázquez, M. Vázquez López, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 7030–7035.

[297] P. Job, *Ann. Chim.*, **1928**, *9*, 113-203.

[298] W. Henderson, J. S. McIndoe, *Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds*, Wiley, 2005.

[299] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin. *J. Comput. Chem.,* **2004**, *13*, 1605-12

[300] a) D. A. Pearlman, D. A. Case, J. W. Caldwell, W. S. Ross, T. E. Cheatham III, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel, P. Kollman, *Comp. Phys. Commun.*, **1995**, *91*, 1–41; b) D. A. Pearlman, B. G. Rao, *Encyclopedia of Computational Chemistry*, John Wiley, 1998.

[301] a) S. Dapprich, I. Komáromi, K. S. Byun, K. Morokuma, M. J. Frisch, *J. Mol. Struct. (Theochem),* **1999**, *462*, 1-21; b) T. Vreven, K. S. Byun, I. Komáromi, S. Dapprich, J. A. Montgomery Jr., K. Morokuma, M. J. Frisch, *J. Chem. Theory and Comput.*, **2006**, *2*, 815-26.

[302] a) A. D. McLean, G. S. Chandler, *J. Chem. Phys.*, **1980**, *72*, 5639-48; b) K. Raghavachari, J. S. Binkley, R. Seeger, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.*, **1980**, *72*, 650-54.

[303] a) R. J. Bartlett and G. D. Purvis III, Int. *J. Quantum Chem.*, **1978**, *14*, 561-81; b) T. H. Dunning Jr., *J. Chem. Phys.*, **1989**, *90*, 1007-23; c) R. A. Kendall, T. H. Dunning Jr., R. J. Harrison, *J. Chem. Phys.*, **1992**, *96*, 6796-806; d) D. E. Woon, T. H. Dunning Jr., *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 1358-71.

[304] a) V. Barone, M. Cossi, *J. Phys. Chem., A* **1998**, *102*, 1995-2001; b) V. Barone, M. Cossi, J. Tomasi, *J. Comp. Chem.*, **1998**, *19*, 404-17; c) M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone, *J. Comp. Chem.*, **2003**, *24*, 669-81.

[305] S. E. Boiadjiev, D. A. Lightner, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 2535–2550.

[306] T. E. Wood, A. C. Ross, N. D. Dalgleish, E. D. Power, A. Thompson, X. Chen, Y. Okamoto, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 9967–9974.

[307] W. C. Tse, D. L. Boger, *Acc. Chem. Res.,* **2004**, *37*, 61–69.

[308] W. Fuller, M. J. WARING, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, **1964**, *68*, 805–808.

[309] B. C. Baguley, B. C. Baguley, E. M. Falkenhaug, E.-M. Falkenhaug, *Nucl. Acids Res.*, **1978**, *5*, 151–171.

[310] M. D. Wyatt, B. J. Garbiras, M. K. Haskell, M. Lee, R. L. Souhami, J. A. Hartley, *Anti-Cancer Drug Des.*, **1994**, *1*, 511–529.

[311] B. Pullman, R. Lavery, A. Pullman, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *124*, 229–238.

[312] G. C. K. Roberts, *Encyclopedia of Biophysics*, *ADN-Ligand Circular Dichroism*, pp 484-486, Springer, 2013.

[313] N. C. Garbett, P. A. Ragazzon, J. B. Chaires, *Nat Protoc.,* **2007**, *2*, 3166–3172.

[314] C. S. Tsai, *Biomacromolecules*, John Wiley & Sons, 2007.

[315] R. V. Gessner, G. J. Quigley, A. H. J. Wang, G. A. Van der Marel, J. H. Van Boom, A. Rich, *Biochemistry,* **1985**, *24*, 237–240.

[316] A. Rodger, K. J. Sanders, M. J. Hannon, I. Meistermann, A. Parkinson, D. S. Vidler, I. S. Haworth, *Chirality*, **2000**, *12*, 221–236.

[317] C. S. Tsai, *Biomacromolecules*, John Wiley & Sons, 2007.

[318] T. J. Thomas, T. Thomas, *Nucl. Acids Res.,* **1989**, *17*, 3795–3810.

[319] J. C. Peberdy, J. Malina, S. S. Khalid, M. J. Hannon, A. Rodger, *J. Inorg. Biochem.,* **2007**, *101*, 9–9.

[320] a) R. Palchaudhuri, P. J. Hergenrother, *Current Opinion in Biotechnology*, **2007**, *18*, 497–503; b) P. E. Pjura, K. Grzeskowiak, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.*, **1987**, *197*, 257–271.

[321] J. C. Peberdy, J. Malina, S. S. Khalid, M. J. Hannon, A. Rodger, *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, *101*, 1937–1945.

[322] a) Y. M. Chen, Y. J. Liu, Q. Li, K. Z. Wang, *J. Inorg. Biochem.*, **2009**, *103*, 1395–1404; b) M. J. Han, L. H. Gao, Y.Y. Lü, K. Z. Wang, *J. Phys. Chem. B,* **2006**, *110*, 2364–2371.

[323] U. McDonnell, M. R. Hicks, M. J. Hannon, A. Rodger, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, *102*, 2052–2059.

[324] C. V. Kumar, J. K. barton, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 5518–5523.

[325] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy - Fluorescence Anisotropy, *Springer*, 2006, 353-382.

[326] No se han calculado constantes de unión mediante esta técnica dado que, empleando el ct-ADN es muy difícil obtener un ajuste adecuado.

[327] a) B. Mayer; B. Meyer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 1784–1788; b) B.Meyer, T. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 864–890.

[328] G. B. Onoa, V. Moreno, *International Journal of Pharmaceutics,* **2007**, *245*, 55–65.

[329] A. Juris, M. F. Manfrin, M. Maestri, N. Serpone, *Inorg. Chem.*, **1978**, *17*, 2258–2261.

[330] K. Triantafillidi, K. Karidi, J. Malina, A. Garoufis, *Dalton Trans* **2009**, 6403.

[331] K. E. Rao, J. W. Lown, *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, *4*, 661–669.

[332] S. Komeda, T. Moulaei, M. Chikuma, A. Odani, R. Kipping, N. P. Farrell, L. D. Williams, *Nucleic Acids Research* **2010**, *39*, 325–336.

[333] I. Gamba, I. Salvadó, G. Rama, M. Bertazzon, M. I. Sánchez, V. M. Sánchez-Pedregal, J. Martínez-Costas, R. F. Brissos, P. Gamez, J. L. Mascareñas, M. Vázquez López, M. E. Vázquez, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 13369–13375.

4. Conclusiones

4.1 Conclusiones

4.1.1 SÍNTESIS DE LOS FRAGMENTOS COORDINANTES

- Se han desarrollado dos nuevas rutas para la obtención de fragmentos coordinantes basados en el ligando 2,2'-bipiridina (bpy) modificados para su uso en una metodología sintética en fase sólida de péptidos (SPPS) siguiendo una estrategia Fmoc/tBoc.

- Utilizando estas dos rutas, hemos sintetizado cinco fragmentos coordinantes, cuatro de ellos derivados del ácido 5'-amino-2,2'-bipiridina-5-carboxílico (5Bpy) y uno derivado del ácido [2,2'-bipiridina]-5,5'-dicarboxílico (5,5'-Bpda).

- Se han optimizado las rutas hacia los fragmentos derivados de 5Bpy hasta alcanzar un 15 % de rendimiento global en escala de gramos. La optimización tanto del rendimiento como de la escala es muy importante debido a que en la metodología SPPS se consume una gran cantidad de aminoácidos Fmoc-protegidos.

4.1.2 PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA SPPS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS LIGANDOS PEPTÍDICOS BASADOS EN EL LIGANDO BPY

- Todos los fragmentos derivados de 5Bpy son bastante solubles en DMF y se han conseguido integrar de forma satisfactoria en la metodología SPPS para la obtención de ligandos peptídicos.

- Hemos encontrado que el fragmento coordinante derivado de 5,5'-Bpda es prácticamente insoluble en cualquier disolvente, lo que impide su utilización en una metodología SPPS.

- Hemos comprobado que los fragmentos coordinantes derivados de 5Bpy pueden integrarse en cualquier posición de la secuencia peptídica y que no parecen haber limitaciones en cuanto al número de fragmentos acoplados por secuencia. Este hecho

demuestra la flexibilidad y versatilidad de nuestra propuesta metodológica.

- Los fragmentos coordinantes derivados de 5Bpy, que dan lugar a secuencias peptídicas más solubles en agua son los derivados de los aminoácidos β-alanina (**15**) y O1Pen (**16**), por lo que fueron seleccionados para la construcción de los sistemas que aparecen descritos en esta memoria.

4.1.3 HELICATOS PEPTÍDICOS

- El diseño propuesto para las hebras precursoras de helicatos peptídicos dinucleares consta de tres grupos de dos fragmentos coordinantes consecutivos separados entre sí por dos *loops* peptídicos, cuya misión es preorganizar estructuralmente a la hebra para favorecer el autoensamblaje con los dos iones metálicos y a la vez controlar termodinámicamente la quiralidad de los helicatos.

- El fragmento coordinante utilizado en la síntesis de estos ligandos peptídicos fue el derivado del aminoácido O1Pen (**16**).

Diseño y optimización del *loop*

- Según nuestro diseño, el *loop* debe contener un giro β (Gly-L/D-Pro) en su secuencia, que será el encargado de preorganizar a las unidades coordinantes de bpy alrededor de un mismo centro metálico, evitando así la formación de especies metalopéptídicas poliméricas.

- La optimización del tamaño del *loop* se realizó a través del estudio de una familia de ligandos bisbipiridínicos que constan de dos fragmentos coordinantes derivados de 5Bpy separados por un *loop*. Se trata de sistemas análogo a los helicandos dinucleantes propuestos pero estructuralmente más sencillos.

- Se seleccionaron tres *loops* de diferente tamaño, con secuencias de 3, 4 y 5 aminoácidos [Gly-L/D-Pro-$(Gly)_n$, en donde n =1-3]. Los tres ligandos peptídicos bisbipiridínicos derivados de estos loops fueron denominados, respectivamente, **XB³**, **XB⁴** y

XB^5, en donde X hace referencia a la quiralidad de la Pro localizada en la secuencia del *loop* y el superíndice al número de aminoácidos que hay en la secuencia del *loop*.

- Se realizó un *screening* pHmétrico (3-7.5) mediante RMN de los ligandos **XB^3**. Estos estudios indicaron que entre pH 5 y 6 los ligandos no sufren procesos de agregación-precipitación a la concentración de estudio (0.2 mM), por lo que fue elegida como ventana de pH para el estudio de estos sistemas.

- Se sintetizaron satisfactoriamente en medio acuoso los complejos de Co(II), Ni(II) y Zn(II) derivados de **XB^3**, **XB^4** y **XB^5**. Todos los complejos son solubles y estables en agua.

- A través de valoraciones UV/vis en agua se determinó experimentalmente que los metalopéptidos más estables son los derivados de los ligandos **XB^3** y que de entre los tres iones metálicos, los más estables son los complejos de Co(II). Estos resultados indican que el tamaño adecuado para el *loop* es de tres residuos.

Estructura en disolución de los metalopéptidos derivados de XB^3

1- Cálculos teóricos[††]

- Se realizaron cálculos teóricos de los ligandos peptídicos **XB^3** mediante simulaciones Montecarlo usando el software en el *Macromodel* (*Schrödinger*) y también de los complejos de Zn(II) derivados de estos mismos ligandos mediante un método híbrido Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular (QM/MM) utilizando el procedimiento ONIOM implementado en *Gaussian'09*.

- Las estructuras teóricas calculadas para los ligandos **XB^3** muestran que los residuos de prolina del *loop* se encuentran en conformación *cis*, estableciéndose un enlace de hidrógeno aparente entre el carbonilo de la prolina y la glicina. Los anillos aromáticos de bpy se encuentran casi paralelos, con los átomos de nitrógeno en disposición *trans* pero ligeramente cruzados. Existe una clara

[††] Estudios realizados con el Dr. J. D- Marechal, UB.

interacción π–π entre los anillos de bpy que, sumada al débil enlace de hidrógeno, estabiliza la estructura.

- Las estructuras teóricas calculadas para los complejos de Zn(II) derivados de los ligandos **XB³** muestran una coordinación tetraédrica de centro metálico, que se encuentra coordinado a las dos bipiridinas de la secuencia. Además se observa como la interacción π–π entre los anillos de bpy y el enlace de hidrógeno entre los residuos de prolina y la segunda glicina del loop ha desaparecido. Los átomos de nitrógeno de ambas unidades de bpy están en disposición *cis* y sus planos se encuentran prácticamente perpendiculares entre sí.

- Los cálculos sugieren que tanto los ligandos **XB³** como sus complejos de Zn(II) son estructuralmente enantioméricos. Las estructuras son enantioméricamente puras, obteniéndose la conformación R para el metalopéptido derivado del ligando equipado con una L-Pro en el loop y S para el derivado del ligando equipado con D-Pro.

2- Estudios de RMN

- Se realizaron estudios de RMN sobre los ligandos **XB³** y sus complejos de Zn(II) con el fin de corroborar experimentalmente las estructuras teóricas propuestas.

- Los espectros NOESY de los ligandos libres **XB³** indican que los átomos de nitrógeno de los grupos bpy están en disposición *trans*.

- La adición de 1.2 equivalentes de Zn(II) a una disolución de los ligandos **XB³** provoca cambios significativos en los desplazamientos químicos de las señales de los protones aromáticos, lo que indica que los grupos bpy se coordinan al centro metálico.

- Los espectro DOSY de los metalopéptidos de Zn(II) derivados de **XB³** descartan la presencia de oligómeros en las condiciones de estudio.

- Los espectros NOESY de los metalopéptidos de Zn(II) derivados de **XB³** indica que los átomos de N de los grupos bpy

pasan de estar en una conformación *trans* en estado libre a una *cis* una vez que se coordinan al centro metálico.

- El resto de contactos NOE que aparecen en los espectros de los metalopéptidos de Zn(II) derivados de $\mathbf{xB^3}$ están totalmente de acuerdo con las distancias estimadas para la estructura tetraédrica propuesta a través de los cálculos teóricos.

- La ausencia de señal entre –1 y 13 ppm en los espectros de RMN de ^{1}H de los metalopéptidos de Ni(II) derivados de los ligandos $\mathbf{xB^3}$ indican que se trata de compuesto paramagnéticos, lo que descarta que su geometría de coordinación sea plano cuadrada.

3. Espectroscopia UV/vis y espectrometría de masas

- La ausencia de bandas d-d en los espectros UV/vis realizados sobre disoluciones concentradas de los metalopéptidos de Co(II) y Ni(II) derivados de los ligandos $\mathbf{xB^3}$ sugieren ambos presentan en disolución geometrías de coordinación octaédrica, con dos posiciones de coordinación ocupadas por moléculas de agua.

- Los espectros MALDI de los metalopéptidos de Zn(II) derivados de $\mathbf{xB^3}$ indican que la especies complejas formadas no poseen aguas de coordinación en su estructura, lo que corrobora la hipótesis de que presentan una geometría de coordinación tetraédrica. Por su parte, los espectros MALDI de los metalopéptidos de Co(II) y Ni(II) derivados de $\mathbf{xB^3}$ indican que la especies complejas formadas poseen dos aguas de coordinación en su estructura, lo que apoya la hipótesis de que todos estos complejos presentan una geometría de coordinación octaédrica con dos posiciones de coordinación ocupadas por moléculas de agua.

Control de la quiralidad en los metalopéptidos derivados de $\mathbf{xB^3}$

- Se realizaron estudios de CD sobre los metalopéptidos de Co(II), Ni(II) y Zn(II) derivados de $\mathbf{xB^3}$ con el fin de determinar la influencia de la quiralidad del residuo prolina del loop sobre la quiralidad de los complejos.

- Los espectros de CD de los ligandos $\mathbf{LB^3}$ y $\mathbf{DB^3}$, y también los de sus correspondientes complejos de Zn(II), Co(II) y Ni(II), son cualitativamente muy similares para cualquier ión metálico, y solo se observan pequeñas variaciones en la intensidad y posición de las bandas de CD.

- $\mathbf{LB^3}$ y su enantiómero, $\mathbf{DB^3}$ dan lugar a espectros de CD que son imágenes especulares, mostrando dos bandas de signo opuesto a aproximadamente 300 y 330 nm con punto de cruce a 316 nm. El espectro de $\mathbf{LB^3}$ presenta un efecto Cotton positivo y $\mathbf{DB^3}$ un efecto Cotton negativo.

- La intensidad de las bandas se incrementa notablemente tras la adición de los iones metálicos, que además inducen un desplazamiento batocrómico de las bandas a 315 y 340 nm, aproximadamente.

- El signo del efecto Cotton de los espectros de CD de los complejos se mantiene con respecto al de los ligandos libres, y es consistente con una configuración Δ para los metalopéptidos de Ni(II) y Co(II) derivados de $\mathbf{DB^3}$ y Λ para los derivados de $\mathbf{LB^3}$.

- Estos resultados experimentales están de acuerdo con las preferencias conformacionales predichas en los estudios computacionales y demuestran que la quiralidad de estos metalopéptidos se puede controlar termodinámicamente a través de la selección de un único residuo quiral localizado en sus secuencias peptídicas.

Síntesis de los helicatos peptídicos

- Se han sintetizado dos helicandos peptídicos dinucleantes, notados como **LLH** y **DDH**, que constan de tres parejas de fragmentos coordinantes **16** separados por dos *loops* de tres aminoácidos Gly-L/D-Pro-Gly. En los dos helicandos peptídicos sintetizados, ambos *loops* poseen residuos prolina con la misma quiralidad.

- Se han sintetizado satisfactoriamente en medio acuoso los correspondientes helicatos peptídicos dinucleares de Co(II) y

Fe(II) derivados de estas hebras. Todos los complejos son solubles y estables en agua.

- A través de valoraciones UV/vis en agua se determinó experimentalmente las constantes de formación de los helicatos peptídicos.

Estructura en disolución de los helicatos peptídicos

1. Espectroscopia UV/vis y espectrometría de masas

- El análisis de los datos de las valoraciones UV/vis indica que la estequiometría de los complejos es M_2L, en donde M es el ión metálico y L el helicando. Esta estequiometría se confirmó adicionalmente a través de experimentos Job Plot.

- La presencia de una intensa banda d-d en los espectros UV/vis de los helicatos de Fe(II) y la ausencia de las mismas en los espectros de los helicatos de Co(II) indican que la geometría coordinación de los centros metálicos en ambos complejos es octaédrica.

- Los espectros MALDI de los helicatos peptídicos de Fe(II) y Co(II) indican que la especies complejas formadas tienen una estequiometría M_2L, lo que corrobora la hipótesis de que presentan una geometría de coordinación octaédrica alrededor de ambos centros metálicos.

2. Cálculos teóricos[‡‡]

- Se realizaron cálculos teóricos del helicato de Fe(II) derivado de LLH por simulación de dinámica molecular (MD), *clustering* de los resultados de MD y refinamiento mediante técnicas híbridas de Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular (QM/MM) utilizando el procedimiento ONIOM implementado en *Gaussian'09.*

- El modelo de menor energía presenta una geometría helicoidal en la que los dos iones metálicos presentan una coordinación octaédrica y las seis bipiridinas se orientan uniformemente alrededor de los iones.

[‡‡] Estudios realizados con el Dr. J. D-. Marechal, UB.

- Todos los residuos de la estructura en el ligando peptídico, incluyendo las dos prolinas, presentan configuración *trans* en sus enlaces amida. Se observa también que el helicato no es totalmente simétrico. Esto pone de manifiesto una cierta complejidad en la organización del metalopéptido, que llega a definir interacciones remotas entre diferentes partes de la secuencia como resultado del plegamiento de la cadena peptídica.

Control termodinámico de la quiralidad de los helicatos peptídicos de Fe(II)

- Se realizaron estudios de CD sobre los helicatos de Fe(II) con el fin de determinar la influencia de la quiralidad del residuo prolina del *loop* sobre la quiralidad de los complejos.

- LLH y su enantiómero, DDH, dan lugar a espectros de CD que son imágenes especulares, mostrando dos bandas de signo opuesto a aproximadamente 289 y 320 nm con punto de cruce a 300 nm. El espectro de LLH presenta un efecto Cotton negativo y DDH un efecto Cotton positivo.

- La adición de los iones de Fe(II) lleva asociado un desplazamiento de los máximos de las bandas, aunque la intensidad es similar.

- El signo del efecto Cotton de los espectros de CD se invierte tras la adición de los iones de Fe(II) y es consistente con una configuración Δ para ambos centros metálicos en el helicato derivado de la hebra DDH y Λ para el derivado de LLH.

- Estos resultados experimentales demuestran que la quiralidad de estos helicatos peptídicos se puede controlar termodinámicamente a través de la selección de dos únicos residuos quirales localizados en sus secuencias peptídicas.

- El proceso de plegamiento/autoensamblaje es cinéticamente lento y complejo, pudiéndose estudiar mediante CD. Sin embargo estos estudios se encuentran ahora mismo en proceso de realización, por lo que los resultados obtenidos no se presentan en esta memoria.

Estudio de la interacción de los helicatos peptídicos de Fe(II) y ADN de doble cadena

- Se realizaron experimentos mediante diferentes técnicas espectrofotométricas para determinar la afinidad y el modo de unión de los helicatos peptídicos de Fe(II) al ADN de doble cadena.

- Los experimentos de competición con bromuro etidio en ct-ADN, poli(dG-dC) y poli(dA-dT) indican que las constante de asociación de los helicatos con el ADN son del mismo orden que las publicadas para otros helicatos supramoleculares.

- Las constantes calculadas (bromuro de etidio) con poli(dG-dC) y con ct-ADN son muy similares entre si y mucho menores que las calculadas con poli(dA-dT). Estos datos sugieren que la interacción podría ser no estereoselectiva y que la estrechez de los surcos del ADN podría favorecer el reconocimiento estereoespecífico.

- Los experimentos de dicroísmo circular inducido (ICD) con ct-ADN sugieren que el modo de unión de los helicatos es por inserción en el surco mayor del ADN.

- Los experimentos de competición con $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ en poli(dG-dC) sugieren que el catión complejo y los helicatos peptídicos tienen como diana la misma región del ADN: el surco mayor. Además, de los datos se puede deducir que en el caso de poli(dG-dC) parece no existir estereoespecificidad en el reconocimiento.

- Los experimentos de competición con Hoechst 33258 en ct-ADN indican que un número indeterminado de moléculas de Hoechst 33258 son desplazadas debido a la interacción de los helicatos peptídicos y el ADN, algo que podría ser debido a la distorsión estructural inducida al ADN por la interacción de mismo con los helicatos peptídicos a través del surco mayor.

Estudios de internalización celular

- Se funcionalizó la hebra peptídica LLH con un grupo fluoresceína en su extremo N-terminal (LLH-F) para poder

estudiar el proceso de internalización de los helicatos en células por microscopía de fluorescencia.

- Se sintetizó satisfactoriamente el correspondiente helicato dinuclear de Fe(II). El complejo es solo moderadamente soluble en medio acuoso.

- El helicato funcionalizado con fluoresceína no parece capaz de atravesar la pared celular de células tumorales *Vero*.

- Durante la escritura de esta Tesis Doctoral otros miembros de nuestro Grupo de Investigación han sintetizado derivados de estos helicatos peptídicos con rodamina (en sustitución de la fluoresceína) con la esperanza de mejorar la solubilidad de los mismos en medio fisiológico. Se han calculado las correspondientes constantes de disociación con ADN Y (*three-way junction DNA*) a través de anisotropía de fluorescencia. Estas constantes son las primeras que se obtienen por interacción directa con el ADN (y no a través de ensayos de competición) y también son las primeras que se hacen con ADN Y. Además se han realizado ensayos de internalización en células de estos helicatos peptídicos funcionalizados con rodamina y se ha comprobado que atraviesan la membrana celular por endocitosis y que se quedan en vesículas en el citoplasma.

4.1.4 METALOPÉPTIDOS DINUCLEARES DE RU(II)

- Para demostrar la versatilidad sintética de nuestra propuesta metodológica, decidimos sintetizar metalopéptidos dinucleares trisbipiridínicos de Ru(II) derivados de un ligando peptídico construido con fragmentos coordinantes derivados de 5Bpy, en concreto del fragmento derivado de β-alanina (**15**).

- Se sintetizó satisfactoriamente el ligando dinucleante (L) a través de la metodología SPPS. También se sintetizaron los correspondientes metalopéptidos en la misma resina, para después proceder a la rotura y purificación de los mismos.

- En la síntesis de los complejos se utilizaron precursores bisbipiridínicos de Ru(II) enantioméricamente puros, para poder

obtener los correspondientes isómeros, (ΔΔ-Ru_2L y ΛΛ-Ru_2L)de forma separada y pura.

Estudio de la interacción de los metalopéptidos de Ru(II) y ADN de doble cadena

- Se realizaron experimentos mediante diferentes técnicas espectroscópicas para determinar la afinidad y el modo de unión de los metalopéptidos de Ru(II) al ADN de doble cadena.

- Los experimentos de competición con bromuro etidio en ct-ADN indican que las constante de asociación de los dos isómeros con el ADN es prácticamente idéntica, lo que sugiere que la interacción podría ser no estereoselectiva. Esto fue confirmado con los estudios de RMN (STD) de los metalopéptidos y ct-ADN.

- Por los estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM) sugieren que la interacción entre los metalopéptidos de Ru(II) y el plásmido pBR322 es fuerte.

- Los estudios de quenching en estado estacionario en medio acuoso y en presencia de $[Fe(CN)_6]^{4-}$ sugieren que el modo de unión de los metalopéptidos de Ru(II) y el ADN no es únicamente electrostático, y que posiblemente se realice a través del surco menor del ADN.

- Los estudios de ICD en ct-ADN sugieren que los isómeros se unen al ADN a través del surco menor.

5. Parte experimental

5.1 Parte general

5.1.1 REACTIVOS

Los reactivos y disolventes empleados para la síntesis del ácido 5-amino-2,2´-bipiridil-5´-carboxílico fueron comprados a las casas comerciales: Acros (Disolventes deuterados: acetona-d_6, D_2O, DMSO-d_6), Aldrich (acetonitrilo HPLC, cloroformo, tolueno y xileno), Alfa Aesar (5,5´Dimetil-2,2´-bipiridina, 2,2´-bipiridina y la totalidad de las sales metálicas empleadas excepto el tricloruro de rutenio), Analema (permanganato potásico e hidróxido sódico), Fluka (hidracina monohidrato y cloruro de tionilo), Matthews Chemicals ($RuCl_3 \cdot nH_2O$), MRV (ácido trifluoroacético), Panreac (celita y nitrito sódico), Scharlau (DMF, etanol absoluto, metanol)

Para la síntesis de péptidos, los aminoácidos utilizados, los reactivos de acoplamiento y las resinas fueron suministrados por las casas comerciales *Bachem*, *Novabiochem*, *GL Biochem (Shangai)* y *Applied Biosystems*. Los aminoácidos y las resinas se adquirieron en su forma Fmoc protegidas: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-(L)Pro-OH, Fmoc-(D)Pro-OH, Fmoc-β-Ala-OH y Fmoc-O1Pen-OH; Fmoc-PAL-PEG-PS y Fmoc-Rink amida AM.

5.2 Procedimientos y Técnicas Experimentales

5.2.1 RMN

Los aparatos empleados para la caracterización mediante resonancia magnética nuclear de los compuestos obtenidos fueron:

-Espectrómetro Varian Inova 750 de 17.62 T (750 MHz resonancia ^1H)

-Espectrómetro Bruker AV600 de 14.1 T (600 MHz resonancia ^1H) equipado con criosonda Bruker Cryoprobe Prodigy.

-Espectrómetro Bruker AMX500 de 11.74 T (500 MHz resonancia ^1H)

-Espectrómetro Varian Mercury 300 de 7.04 T (300 MHz resonancia ^{1}H)

-Espectrómetro Bruker DPX250 de 5.87 T (250 MHz resonancia ^{1}H)

Los datos de RMN se escribirán siguiendo el formato recomendado por la *American Chemical Society*: **^{1}H-NMR** ($\nu(^{1}H)$ MHz, disolvente-d_n, δ) y **^{13}C-NMR** ($\nu(^{13}C)$ MHz, disolvente-d_n, δ):

Los experimentos de RMN realizados para la caracterización estructural de los compuestos sintetizados fueron:

Experimento estándar **^{1}H-NMR**: experimento rutinario en RMN para obtener datos relacionados con la estructura de los compuestos, por ejemplo desplazamientos químicos, acoplamientos spin-spin e intensidades de las señales.

Experimento estándar **^{13}C-NMR**: los experimentos de ^{13}C se midieron desacoplados de protón para obtener información sobre los desplazamientos químicos sin observar desdoblamientos.

Experimento **DEPT-135** (**D**istortionless **E**nhancement by **P**olarization **T**ransfer): los experimentos DEPT-135 se emplearon para discernir entre carbonos primarios, secundarios…

Experimento **H,H COSY** (**CO**rrelation **S**pectroscop**Y**): en este tipo de experimento bidimensional, las señales de un espectro típico de protón se correlacionan entre sí mediante acoplamientos escalares representados como puntos de cruce en un espectro 2D. Se empleó para concretar la asignación en casos de superposiciones de señales.

Experimento **TOCSY** (**TO**tal **C**orrelation **S**pectroscop**Y**): se empleó para la asignación de los protones en péptidos y metalopéptidos dado que permite observar la correlación entre protones lejanos entre sí.

Experimento **2D-NOESY** (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**): experimento que nos permite observar el efecto nuclear Overhauser, podemos ver acoplamientos dipolares entre protones alejados entre sí en el esqueleto de una molécula pero próximos en el espacio. Se empleó para la caracterización tridimensional en péptidos y metalopéptidos.

Experimento **DOSY** (**D**iffusion **O**rdered **S**pectrosco**Y**): Nos permite extraer los valores del coeficiente de difusión para una determinada molécula o moléculas. La visualización más corriente es un espectro 2D donde el eje de las X es un espectro básico de protón y el eje Y representa los valores de los coeficientes de difusión.

Experimento **STD** (**S**aturation **T**ransfer **D**ifference): Se basa en la transferencia de magnetización por difusión desde una molécula de mayor tamaño (receptor) a otra molécula de menor tamaño (ligando) unidas mediante un equilibrio dinámico, se empleó para estudiar la interacción entre los metalopéptidos de Ru(II) y el ADN. Para los estudios de RMN contamos con la colaboración de la Dra. Ana Ardá del grupo del Dr. Jesús Jiménez Barbero en el CIB-CSIC (Madrid) y del Dr. Víctor Sánchez Pedregal del Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS).

5.2.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)

Los compuestos orgánicos fueron caracterizados mediante la técnica ESI, en los equipos ***Bruker Microtof*** ESI–TOF y *Agilent LC/MSD* modelo *G1956A Quad VL*. Los compuestos de coordinación se caracterizaron mediante la técnica MALDI en un equipo ***Bruker Autoflex*** MALDI-TOF. La matriz empleada para la caracterización fue el 4-HCCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid).

La simulación de perfiles isotópicos se realizó utilizando el programa Isopro 3.0.[334]

Los datos de espectrometría de masas de los diferentes compuestos sintetizados se escribirán siguiendo el formato recomendado por la *American Chemical Society*: **MS** (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para ; encontrado

5.2.3 DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron en un *Jasco J-715* termostatizado a 20 ºC ó 40 ºC con un baño de agua *Neslab RTE-111 y* empleando dos tipos de cubeta *Hellma* en función de la concentración de la muestra a medir (*100-QS*, de 1 mm de paso óptico, *100-QS*, de 2 mm de paso óptico y *100-QS*, de 10 mm de paso óptico). Los parámetros utilizados en la medida de las muestras fueron los siguientes:

rango de adquisición 600-220 nm, ancho de banda 5.0 nm, resolución 0.2 nm, acumulación 3 barridos, sensibilidad 10 miligrados, tiempo de respuesta 0.25 s, velocidad 200 nm/min. Los espectros se representaron empleando el programa *Sigmaplot 11.0*, no se realizó ninguna operación sobre los espectros salvo la resta del blanco o la contribución del complejo metálico en los experimentos de Dicroísmo Circular Inducido (ICD).

Se realizaron dos tipos de experimentos diferentes utilizando esta técnica:

- Estudio termodinámico del proceso de formación de los metalopéptidos: se adicionaron alícuotas de una disolución de M^{2+} [$(NH4)_2Fe(SO_4)_2$; $Co(ClO_4)_2{\cdot}6H_2O$; $Ni(ClO_4)_2{\cdot}6H_2O$; $Zn(SO_4)$] sobre una disolución del péptido en tampón PBS hasta que el espectro de CD no variase. El volumen total de las alícuotas no excedió el 10 % del volumen total. En el procesado de los datos se realizó la substracción de la señal correspondiente al blanco previamente medido (tampón PBS 10 mM, 100 mM NaCl, pH 7.4).

- Estudio de la interacción de los metalopéptidos con el ADN:

Los datos de dicroísmo circular se darán por analogía al formato recomendado por la *American Chemical Society* para UV/Vis: CD (disolvente) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$)

5.2.4 ESPECTROSCOPIA UV/VIS

Las medidas de absorbancia UV/Visible se realizaron en un espectrofotómetro Jasco V-630 termostatizado con un peltier Jasco ETC-717 a 20 ºC. Para las medidas se empleó una cubeta *Hellma* 100-QS de 1 cm de paso óptico. Los parámetros de adquisición empleados en las medidas muestras fueron los siguientes: rango de adquisición 220-600 nm, resolución 0.2 nm, acumulación 1 barrido, velocidad de barrido 200 nm/min.

Se realizaron dos tipos de experimentos diferentes utilizando esta técnica:

- Estudio termodinámico del proceso de formación de los metalopéptidos:

- Estudio de la interacción de los metalopéptidos con el ADN:

Los datos de UV/Vis se escribirán siguiendo el formato recomendado por la *American Chemical Society*: UV (disolvente) λ_{max}, nm ($\varepsilon/M^{-1}cm^{-1}$).

5.2.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Las medidas de espectroscopia de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro *Jobin-Yvon Fluoromax-3 (DataMax 2.20*) termostatizado con un control de temperatura *Wavelength Electronics LFI–3751.* Para las medidas se utilizó una cubeta *Hellma* 100-QS de 1.2 mL.

Los parámetros utilizados fueron modificados para cada tipo de experimento realizado. En la medida de las muestras de los compuestos se emplearon los siguientes parámetros:

- **Desplazamiento de Bromuro de Etidio (EB):** se extrae 1 mL de una disolución que contiene, 1.3 μM de EB y 3.9 μM de ct-ADN en un tampón 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, previamente incubada durante 12 h a 4 ºC y en ausencia de luz. Sobre este mililitro se realizan adiciones de metalopéptido hasta que la fluorescencia inicial se reduzca un 60 %.

Incremento: 1.0 nm; tiempo de integración: 0.2 s; anchura de la rendija de excitación: 5.0 nm; anchura de la rendija de emisión: 5.0 barridos; longitud de onda de excitación: 480 nm; rango de adquisición: 500–750; velocidad 200 nm/s.

- **Desplazamiento del Hoescht 33258:** en una cubeta *Hellma* 100-QS de 1.2 mL se prepara una disolución de 1 mL que contiene 80 μM de ct-ADN y 8 μM de Hoescht 33258 en un tampón 50 mM de NaCl y 10 mM de cacodilato sódico. Sobre esta disolución se realizan adiciones de metalopéptido hasta completar la valoración.

Incremento: 1.0 nm; tiempo de integración: 0.2 s; anchura de la rendija de excitación: 2.0 nm; anchura de la rendija de emisión: 2.0; 1 barrido; longitud de onda de excitación: 345 nm; rango de adquisición: 360–600 nm; velocidad 200 nm/s.

- **Estudio de la interacción de los metalopéptidos de Ru(II) con el ADN**: sobre una disolución de metalopéptido de Ru(II) en tampón PBS 10 mM, 100 mM NaCl, pH 7.4, se realizan adiciones de

oligonucleótidos de concentración conocida. Se mide el espectro de fluorescencia después de cada una de las adiciones.

Incremento: 1.0 nm; tiempo de integración: 0.2 s; anchura de la rendija de excitación: 10.0 nm; anchura de la rendija de emisión: 10.0; 1 barrido; longitud de onda de excitación: 450 nm; rango de adquisición: 550–700 nm; velocidad 200 nm/s.

- **Anisotropía de fluorescencia**: sobre una disolución de metalopéptido de Ru(II) en tampón PBS 10 mM, 100 mM NaCl, pH 7.4, se realizan adiciones de oligonucleótidos de concentración conocida. Se mide la anisotropía de fluorescencia después de cada una de las adiciones, realizando tres medidas hasta que la desviación sea menor de 0.1 %. Tiempo de integración 1 s, longitud de onda de excitación 450 nm; anchura de rendija: 6.0 nm; longitud de onda de emisión 610 nm; anchura de rendija: 12 nm.

5.2.6 HPLC

5.2.6.1 HPLC-MS

Esta técnica se llevó a cabo en un cromatógrafo *AGILENT 1100 series* con un detector UV/Vis de múltiple longitud de onda acoplado a un espectrómetro de masas *Agilent LC/MSD modelo G1956A Quad VL*, con analizador de masas cuadrupolo en modo positivo. Los análisis se llevaron a cabo en fase reversa, empleando una columna *Phenomenex Luna C18* (4 μm, 4.6 Å, 250 mm). Como fase móvil se emplearon mezclas H_2O 0.1 % TFA (disolvente A) y CH_3CN 0.1 % TFA (disolvente B) en gradiente lineal en 30 minutos con un flujo de 1 mL/min. Se emplearon tres rampas de disolvente distintas (*Figura 5.1*) en función de los compuestos a analizar: una rampa de pendiente baja para los compuestos de rutenio y helicatos peptídicos (5-40 %B), un gradiente intermedio-alto para los péptidos (5-75 %B) y un gradiente más pronunciado para los derivados de bipiridina precursores del aminoácido no natural (5-95 %B) (ver apartado 5.3). En todos los métodos empleados los primeros 5 minutos de elución se realizaron en modo isocrático para eliminar el frente de elución, que contienen los disolventes empleados para solubilizar la muestra y sales no retenidas por la fase estacionaria.

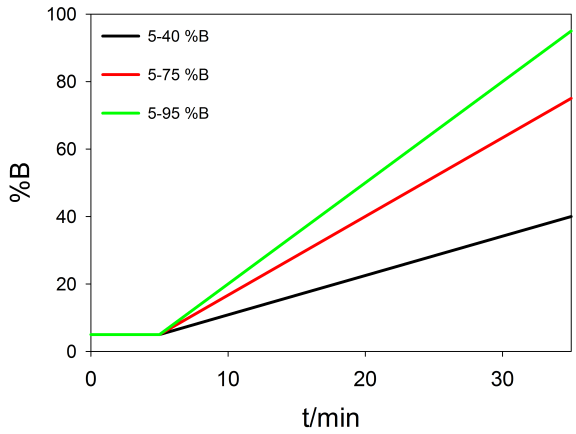


Figura 5.1: Representación de los gradientes lineales empleados en la caracterización de los compuestos por HPLC-MS.

5.2.6.2 HPLC semipreparativa

Esta técnica se llevó a cabo en un cromatógrafo *AGILENT 1100* con un detector UV/Vis de una única longitud de onda. Al igual que en el caso de los análisis mediante HPLC-MS se empleó una columna de fase reversa de *Phenomenex Luna C18* (5 µm, 100 Å, 250 X 10 mm), como fase móvil se emplearon mezclas binarias de H_2O 0.1 % TFA (disolvente A) y CH_3CN 0.1 % TFA (disolvente B) en gradiente lineal. Los gradientes en estos casos fueron más variados y dependientes de cada compuesto y fueron optimizados individualmente y los gradientes utilizados aparecen en los datos experimentales (ver apartado 5.3).

5.2.7 HIBRIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA FORMAR LAS DOBLES HEBRAS

Las secuencias (5'-3') de los oligonucleótidos de cadena sencilla empleados para la formación de los correspondientes oligonucleótidos en horquilla son las siguientes:

Tabla 5.1: Secuencias de los oligonucleótidos empleados.

	Secuencia completa (5' - 3')
AAAATTT	GGC AAAATTT CG TTTTT CG AAATTTT GCC
AAT	GGCG AAT GCAGC TTTTT GCTGC ATT CGCC
AAGCTT	GGC AAGCTT CGC TTTTT GCG AAGCTT GCC
GGCC	GGC AGGCCC AGC TTTTT GCT GGGCC TGCC

Los oligonucleótidos de cadena sencilla, así como aquellos en horquilla, provienen de *Thermo Fisher Scientific GmbH* en forma de sólidos liofilizados, se emplearon sin previa purificación. La determinación de la concentración de las disoluciones, en H_2O MQ, de estas muestras se realizan medidas de absorbancia a λ = 260 nm empleando un espectrómetro *BioRad SmartSpec Plus*. Las concentraciones se midieron por duplicado utilizando los coeficientes de extinción molar correspondientes.

La determinación de los coeficientes de extinción de los oligos es diferente dependiendo de si se trata, o no, de oligonucleótidos en horquilla. El coeficiente de extinción de los oligonucleótidos de cadena sencilla (no hibridados) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula, donde T, C, G y A hacen referencia al número de cada una de las bases en la secuencia:[335]

$$\varepsilon_{260\ nm} = \{(8.8 \times T)+(7.3 \times C)+(11.7 \times G)+(15.4 \times A)\}\times 0.9\ 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$$

La hibridación de los ADN en horquilla utilizados se realizó directamente. La disolución de ADN de concentración conocida se calentó a 90 ºC durante 10 minutos, y a continuación se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. La concentración del ADN en horquilla se determinó nuevamente midiendo la absorbancia a 260 nm. En este caso, para determinar el coeficiente de extinción molar se aplica la siguiente fórmula, donde T, C, G y A hacen referencia al número de cada una de las bases en la secuencia:

$$\varepsilon_{260\ nm}=\{(8.8 \times T) + (7.3 \times C)+(11.7 \times G)+(15.4 \times A)\}\times 0.8\ 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$$

En dicha ecuación se tiene en cuenta la disminución del coeficiente por la hibridación de las bases.

5.2.8 ESTUDIOS DE INTERNALIZACIÓN CELULAR

Las células *Vero* crecieron en un medio de DMEM con un 10% de PBS en cajas de 12 compartimentos provistos con un cubreobjetos de vidrio (15 mm). Antes de realizar los experimentos, las células se lavaron tres veces con PBS y posteriormente se añadió 1 mL de DMEM fresco sin suero añadido. A continuación se añadió sobre cada compartimento el volumen correspondiente de los diferentes compuestos a analizar para tener una concentración final de compuesto de 25 μM. Las muestras se incubaron en una atmósfera de 5% de CO_2 a 37 ºC durante 60 min.

Tras la incubación, las células se lavaron para eliminar el exceso de los compuestos tres veces con PBS y se observaron en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes de microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC) se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia *Olympus BX51*, equipado con una cámara digital *Olympus DP-50*.

5.2.9 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPPS)

El acoplamiento de los aminoácidos se realizó de forma manual en un reactor como el que se muestra en la *Figura 5.2*. Los disolventes se añaden por la parte superior del reactor. La resina se agita con la llave en la posición 1, haciendo pasar una corriente de N_2 por el sistema. Los disolventes y reactivos se filtran de **A** a **B** con la llave de tres bocas en la posición 2 y aplicando presión con N_2 desde la parte superior del reactor.

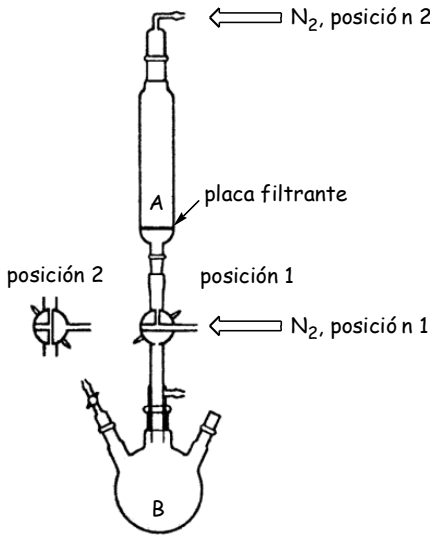


Figura 5.2: Montaje para la síntesis manual de péptidos en fase sólida.

5.2.9.1 Reactivos y disolventes utilizados en los acoplamientos

Se utilizó N,N´-Dimetilformamida (DMF) de grado adecuado para la síntesis de péptidos. Las disoluciones empleadas se prepararon al inicio de cada síntesis.

HBTU/HOBt/DMF: Se mezclan 3.8 g de HBTU y 1.35 g de HOBt en 50 mL de DMF (concentraciones finales de la disolución 0.2 M HBTU, 0.2 M HOBt).

DIEA/DMF: 3 mL de DIEA en 90 mL de DMF (0.195 M DIEA).

5.2.9.2 Preparación de la resina

Como soporte sólido se utilizaron las resinas Fmoc-PAL-PEG-PS de *Life Technologies*, con carga de 0.18-0.22 mmol/g, y la resina Fmoc-Rink amida AM de *Irish Biotech*, con carga 0.54 mmol/g. En ambas resinas la rotura final genera un grupo amida en el extremo *C*-terminal (*Figura 5.3*).

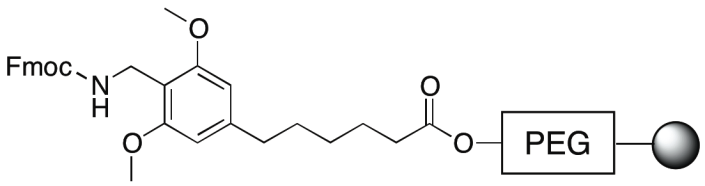


Figura 5.3: Estructura de la resina PAL-PEG-PS.

El procedimiento de preparación de la resina para iniciar la SPPS es el siguiente:

a) Anadir la resina (0.05 mmol) al matraz de reacción y lavarla con DMF (5 mL, 10 min).

b) Comprobar que el test de TNBS es negativo.

c) Desproteger el grupo amino de la resina: 20 % piperidina en DMF (5 mL durante 30 min).

d) Lavar con DMF (3 × 5 mL, 5 min).

e) Comprobar que el test de TNBS es positivo.

Completada esta secuencia, dicha resina está lista para acoplar el primer aminoácido. El proceso de la síntesis se detalla a continuación.

5.2.9.3 Proceso sintético en los acoplamientos

Los péptidos amida *C*-terminales se sintetizaron manualmente siguiendo el protocolo estándar para síntesis de péptidos según metodología Fmoc-^{t}Bu, empleando escala 0.1 mmol salvo cuando se diga lo contrario.

Acoplamiento de los aminoácidos naturales: Se disuelve el aminoácido correspondiente (0.5 mmol, 5 equivalentes) en HBTU/HOBt/DMF (1 mL, 5 equivalentes) y DIEA/DMF (3.75 mL, 6 equivalentes) y tras 2 min se añade la mezcla sobre la resina. La suspensión resultante se agita durante 30 min con corriente de N_2.

Acoplamiento de los aminoácidos derivados de 5Bpy: El acoplamiento de los dipéptidos coordinantes **15** y **16** se lleva a cabo de una forma sustancialmente distinta. En este caso se emplea un exceso de 3 equivalentes por mol de resina y se emplea el HATU como agente activante. Se pesa el aminoácido en un vial de vidrio junto con una cantidad estequiométrica de HATU, sobre este sólido se adiciona 1 mL de DMF y 2.25 mL de DIEA/DMF, la mezcla se disuelve asistida por ultrasonidos durante 5 minutos. El tiempo de acoplamiento para estos aminoácidos fue de 1 hora.

Lavados: Se realizan lavados después de cada acoplamiento con DMF (2 × 5 mL, 3 min). Una vez lavada la resina se lleva a cabo el test de TNBS para comprobar si se produjo el acoplamiento. Si es negativo se puede proceder al siguiente aminoácido, en caso de dar positivo se repite el acoplamiento.

Desprotección del grupo protector temporal (Fmoc): Se lleva a cabo por tratamiento básico con 20 % piperidina en DMF durante 20 min. A continuación se lava la resina desprotegida con DMF (4 × 5 mL, 2 min).

Test TNBS: se utiliza para detectar aminas primarias libres en la resina, sirviendo para determinar el grado de incorporación de los aminoácidos acoplados. TNBS es el acrónimo de ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico y reacciona con aminas primarias formándose una sulfonamida de color rojo intenso. Hay que resaltar que la prolina es el único aminoácido natural que posee una amina secundaria y que por lo cual no daría señal positiva en el test de TNBS (*Figura 5.4*).

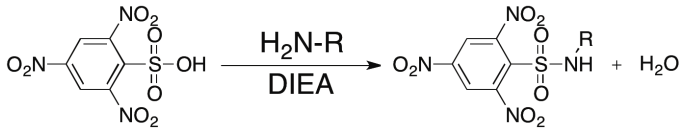


Figura 5.4: Condensación entre el TNBS y una amina primaria para formar una sulfonamida.

Para realizar el test se coge una pequeña fracción de la resina y se adiciona dos gotas de DIEA (10 % en DMF) y otra gota de una disolución de TNBS (1 % en DMF). La suspensión se deja reposar durante unos 2 min y se observa el color que adquiere la resina. Si la resina adquiere un color rojo intenso el test es positivo, lo que significa que hay aminas primarias libres en la resina. Si por el contrario la resina no se colorea, el test es negativo y es indicativo de que el acoplamiento ha sido cuantitativo. Hay que resaltar que para el caso de la prolina este test siempre va a dar negativo dado que el grupo amino de su estructura es una amina secundaria.

5.2.9.4 Rotura de la unión del péptido con la resina y desprotección total

La rotura de la unión del péptido con la resina se llevó a cabo utilizando una mezcla de TFA con reactivos secuestradores de carbocationes:

Cóctel: 25 µL TIS, 25 µL H_2O, 50 µL CH_2Cl_2, 900 µL TFA.

Para una escala de 0.1 mmol se añaden 12.5 mL (1 mL de disolución por cada 40 mg de resina) de cóctel. La mezcla resultante se agita durante 2 h y la suspensión se filtra para separar la resina de la mezcla de desprotección y se lava la resina con TFA (1 mL aproximadamente) para a continuación concentrar la disolución ácida resultante hasta un volumen máximo de 2 mL empleando corriente de N_2. Esta disolución se añade lentamente sobre Et_2O (10 mL éter por cada mL de disolución de rotura empleada) previamente enfriado con CO_2 sólido y la suspensión de péptido en Et_2O se centrifuga a 7830 r.p.m. durante 15 min. A continuación se separa el líquido sobrenadante del sólido centrifugado suspendiéndose nuevamente dicho sólido en Et_2O (10 mL) para arrastrar restos de cóctel y se centrifuga de nuevo. El sólido obtenido se seca a vacío y se procede a su análisis mediante HPLC-MS y purificación por HPLC.

Para el cálculo de los rendimientos de la SPPS no hay más que pesar el péptido desprotegido y purificado y dividir esta cantidad por la que deberíamos obtener, teniendo presente la escala a la que hemos trabajado y multiplicando los milimoles esperados de péptido por su peso molecular incluyendo los contraniones trifluoroacetato que llevarían consigo los residuos básicos.

5.2.10 CÁLCULO DE LOS COEFICIENTES DE EXTINCIÓN

Es muy importante conocer el valor del coeficiente de extinción molar de cada molécula a estudiar para calcular de forma exacta la concentración de sus disoluciones mediante espectroscopia UV/Vis y aplicando la ley de Lambert-Beer.

$$A = \varepsilon \cdot \ell \cdot \mathbb{C}$$

Donde A es la absorbancia de la muestra, ε es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$) de la muestra, ℓ es la longitud de la cubeta (cm) y $\mathbb{C}$ es la concentración de la muestra (M).

Para determinar el coeficiente de extinción de una molécula ($\boldsymbol{\varepsilon}$) se realizan tres pesadas del compuesto en cuestión en estado sólido. Las muestras se disuelven en un volumen conocido de disolvente y se realizan adiciones consecutivas sobre un blanco. Tras cada adición medimos el espectro UV/Vis de la disolución resultante.

Se representan en una gráfica los datos de absorbancia de la muestra en su/s máximo/s de absorción frente a la concentración de las muestras. El coeficiente de extinción molar de la molécula se calcula realizando un ajuste por regresión lineal de estos datos. Y = a + bX, en donde b representa la pendiente de la recta y que se corresponde con el valor del coeficiente de extinción molar (ε).

5.2.11 MICROSCOPÍA DE FUERZAS ATÓMICAS (AFM)

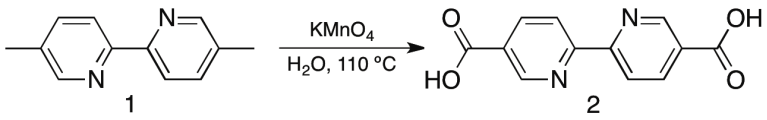
Las imágenes de AFM fueron obtenidas con un microscopio Multimode 8 AFM con una sonda Nanoscope V de Bruker AXS. Las muestras se depositaron en discos de mica (PELCO, 9.9 mm de diámetro de Ted Pella, Inc.) y se secaron previamente a su visualización. Las

muestras de complejos metálicos fueron preparadas justo antes de su utilización y filtradas a través de filtros de 0.2 nm FP030/3 (*Scheicher and Schuell*). Las muestras de complejo metálico (75 ng/mL) fueron preparadas en buffer HEPES e incubados en presencia del plásmido pBR322 (19 μg/μL) a 37 ºC durante 24 horas antes de su estudio por AFM. Para el estudio de fuerza atómica contamos con la colaboración del Dr. Patrick Gámez Enamorado del Departamento de Química Inorgánica de la Universitàt de Barcelona (ICREA).

5.3 Síntesis

5.3.1 SÍNTESIS DEL AMINOÁCIDO NO NATURAL DERIVADO DEL ÁCIDO 2,2'-BIPIRIDINA-5,5'-DICARBOXÍLICO

5.3.1.1 Ácido-2,2'-bipiridil-5,5'-dicarboxílico (2)



En un matraz de fondo redondo de 500 mL que contiene una disolución de 30 g de permanganato potásico (190 mmol, 5 equivalentes) en 250 mL de H_2O, se adicionan lentamente 7 g de 5,5´-dimetil-2,2´-bipiridina (**1**) (38.0 mmol). La mezcla resultante se calienta a 115 ºC hasta que pierde el color violeta característico del anión permanganato. A continuación se filtra en caliente sobre celita y el filtrado se enfría a 5 ºC en un baño de hielo-agua para, posteriormente, acidificar a pH = 3 con HCl concentrado. El sólido blanco resultante se separa por filtración a vacío y se lava con H_2O DI (100 mL). El sólido se seca mediante liofilización obteniéndose 8.60 g de compuesto **2** (93 %).

^{1}H–RMN (500 MHz, DMSO-d_6, δ): 13.50 (br); 9.18 (dd, ^4J = 2.15, ^5J = 0.8 Hz 2H); 8.55 (dd, ^3J= 8.3; ^5J = 0.8 Hz, 2H); 8.44 (dd, ^3J = 8.3; ^4J = 2.1 Hz, 2H).

^{13}C–RMN (125 MHz, DMSO-d_6, δ): 165.49 (C), 156.84 (C), 149.82 (CH), 137.97 (CH), 126.65 (C), 120.62 (CH).

MS-MALDI-TOF (m/z): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{12}H_9N_2O_4]^+$ 245.0; encontrado, 245.1.

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 17.9´; $[M+H]^+$ 245.1 y $[M+Na]^+$ 267.3.

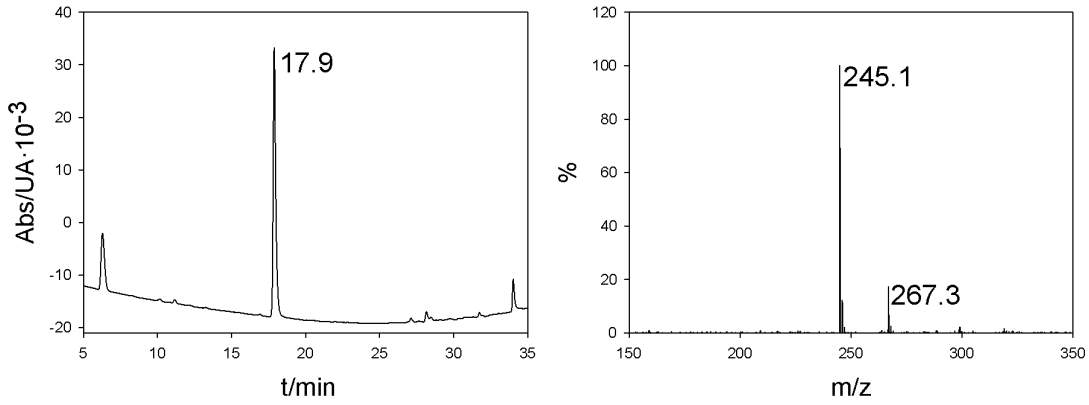


Figura 5.5: izquierda, cromatograma del compuesto **2**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 17.9´.

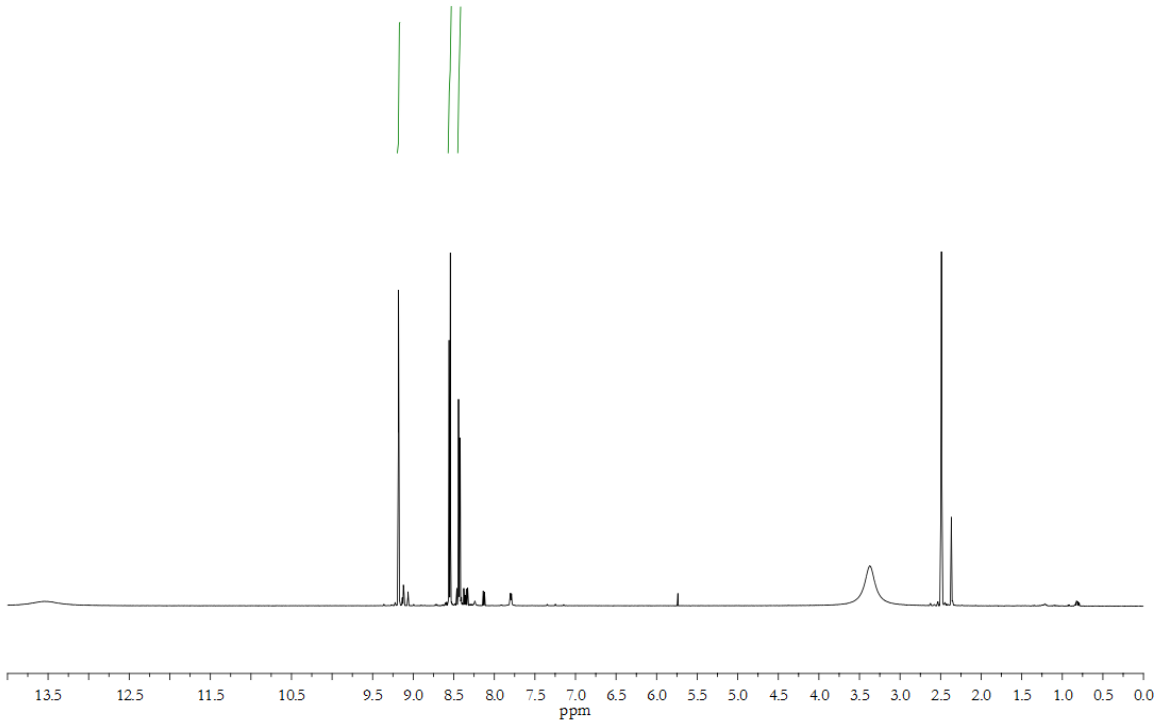


Figura 5.6: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **2**.

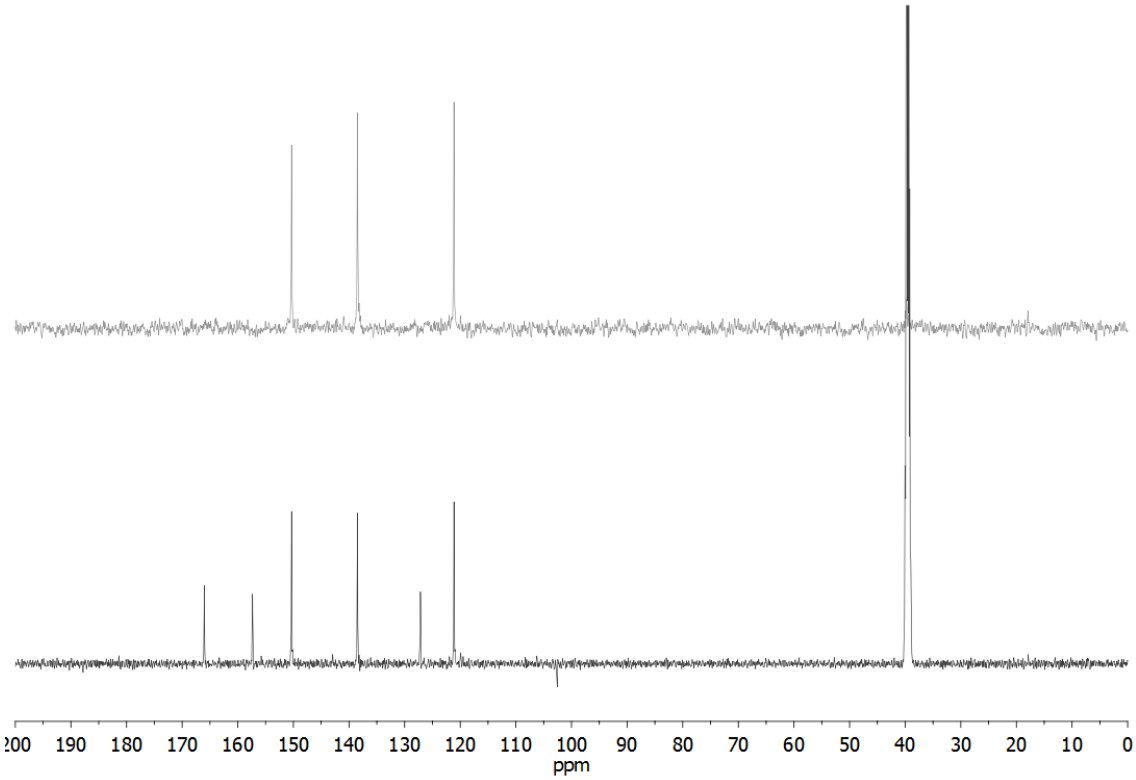
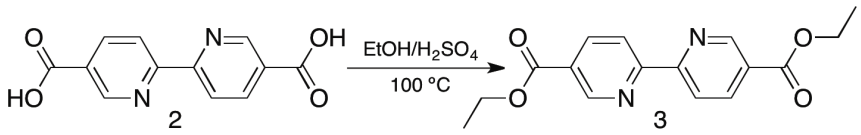


Figura 5.7: Arriba, espectro DEPT-135 del compuesto **2**; abajo, espectro de ^{13}C-RMN de la misma molécula.

5.3.1.2 2,2'-bipiridil-5,5'-dietil éster (3)



En un balón de reacción de 500 mL, que contiene una suspensión de 10 g del diácido **2** (41.0 mmol) en 150 mL de EtOH, se adicionan lentamente 20 mL de H_2SO_4 concentrado. La mezcla resultante se agita a 95 ºC durante 18 horas. Sobre la disolución incolora resultante se adicionan 400 mL de H_2O DI previamente enfriada a 5 ºC en un baño de hielo-agua. El sólido blanco obtenido se filtra a vacío, se lava con H_2O DI (80 mL) y se seca mediante liofilización. 11.5 g (93.0 %).

^{1}H–RMN (500 MHz, DMSO-d_6, δ): 9.20 (dd, ^4J = 2.15, ^5J = 0.8 Hz 2H); 8.57 (dd, ^3J = 8.3; ^5J = 0.8 Hz, 2H); 8.46 (dd, ^3J = 8.3; ^4J = 2.1 Hz, 2H); 4.33 (q, ^3J = 7.1 Hz, 4H); 1.37 (t, ^3J = 7.1 Hz, 6H).

^{13}C–RMN (125 MHz, DMSO-d_6, δ): 164.2 (C), 157.2 (C), 149.8 (C), 138.0 (CH), 126.2 (C), 121.0 (CH), 61.1 (CH_2), 13.9 (CH_3).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{16}H_{17}N_2O_4]^+$ 301.1; encontrado, 301.2.

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 21.0´; $[M+H]^+$ 301.2 y $[M+Na]^+$ 323.0.

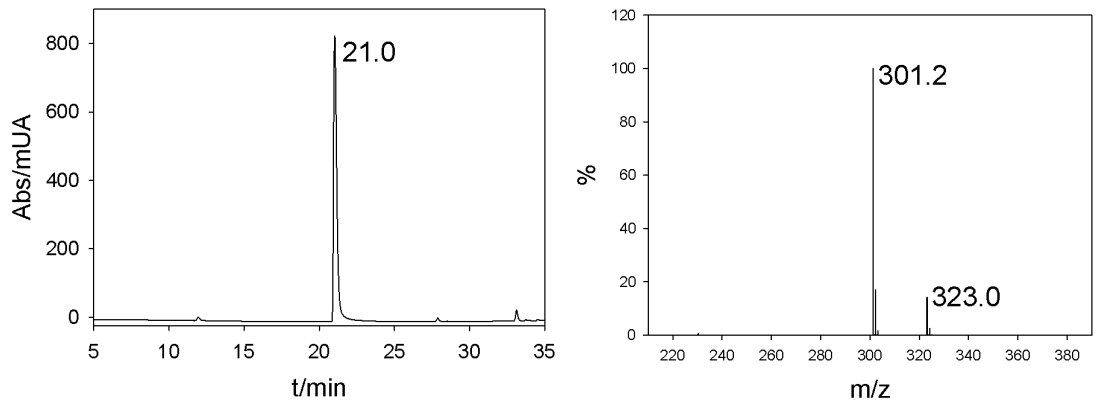


Figura 5.8: izquierda, cromatograma del compuesto **3**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 21.0´.

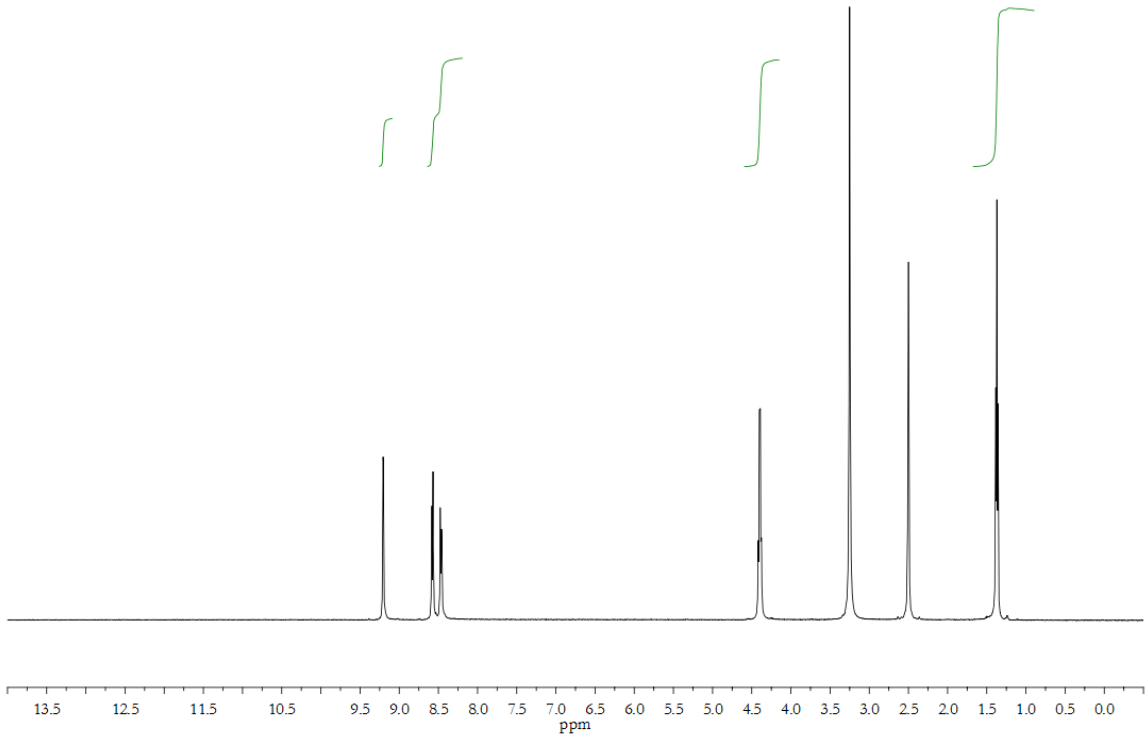


Figura 5.9: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **3**.

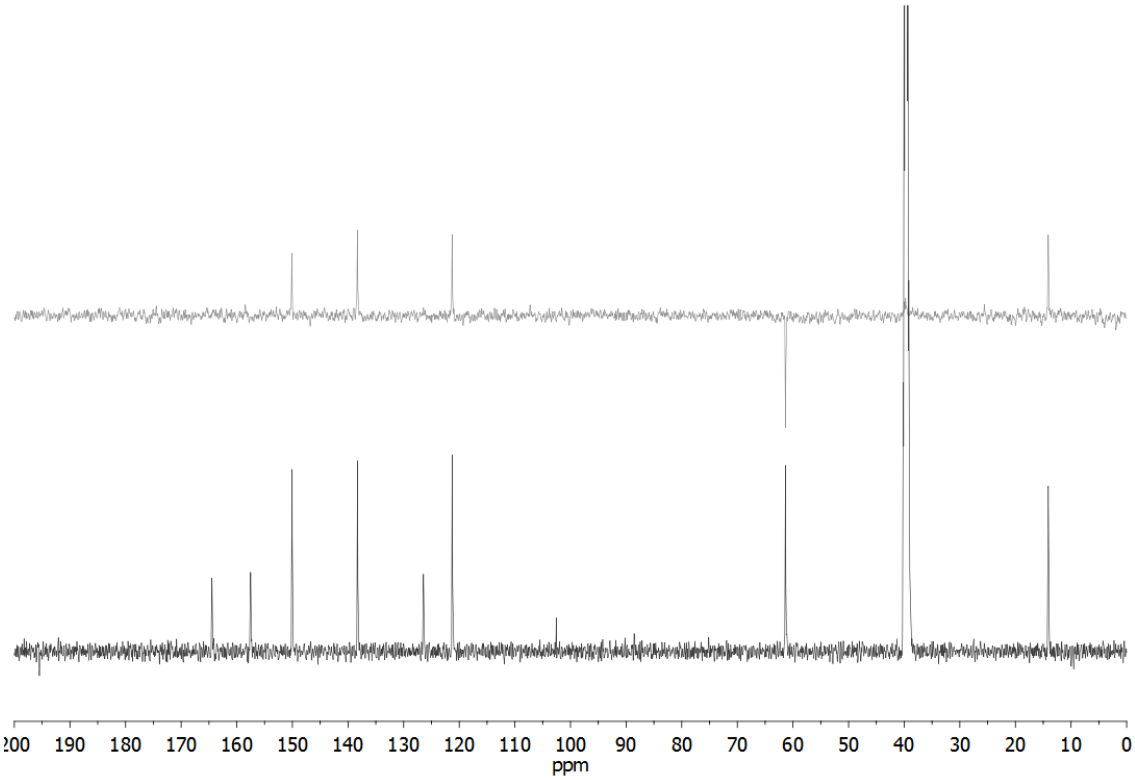
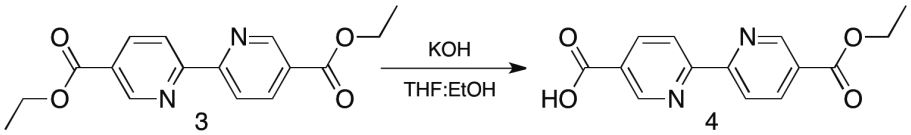


Figura 5.10: Arriba, espectro DEPT-135 del compuesto **3**; abajo, espectro de ^{13}C-RMN de la misma molécula.

5.3.1.3 Ácido 5'-(etoxicarbonil)-[2,2'-bipiridil]-5-carboxílico (4)



En un matraz de fondo redondo de 1 L, que contiene 450 mL de una mezcla de THF y EtOH 2:1, se añaden 8.0 g (26.60 mmol) del diéster **3**. Sobre la suspensión resultante se adicionan, gota a gota y durante 1 h, 90 mL de una disolución de KOH (1.3 g, 24 mmol; 0.9 equivalentes) en THF/EtOH 2:1. Una vez completada la adición se mantiene agitación magnética sobre la mezcla durante 4 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo el disolvente se elimina a presión reducida y el sólido se redisuelve en H_2O. Sobre la suspensión resultante se realizan extracciones con $CHCl_3$ (3 × 30 mL). La fase acuosa se acidifica hasta pH = 3, precipitando el monoéster **4** como un sólido blanco. El sólido se separa por filtración, se lava con H_2O (3 × 50 mL) y se seca mediante liofilización. 6.4 g (89 %).

La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a sequedad en el rotavapor, recuperándose de esta forma el diéster sin reaccionar (1.5 g).

^{1}H–RMN (500 MHz, DMSO-d_6, δ): 9.17 (2H); 8.54 (2H); 8.43 (2H); 4.37 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H); 1.34 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{14}H_{13}N_2O_4]^+$ 273.1; encontrado, 273.1.

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 23.8´; $[M+H]^+$ 273.0 y $[M+Na]^+$ 295.0.

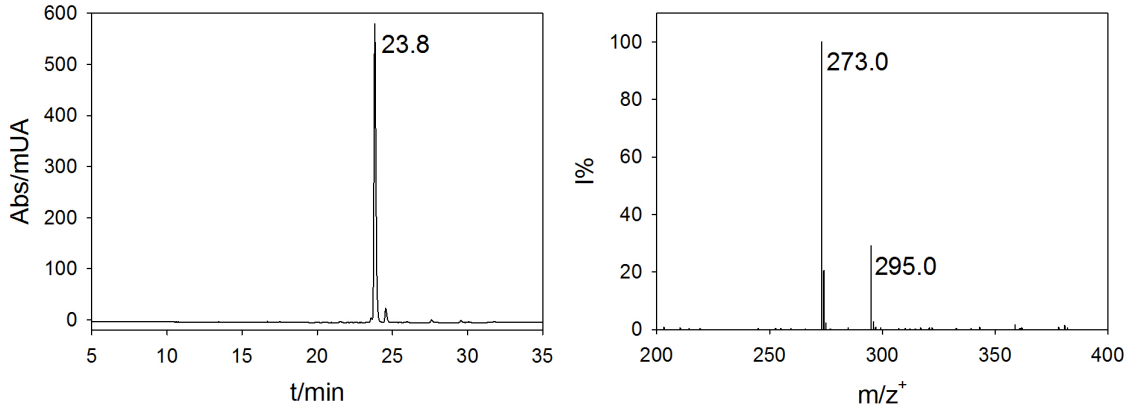


Figura 5.11: izquierda, cromatograma del compuesto **4**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 23.8´.

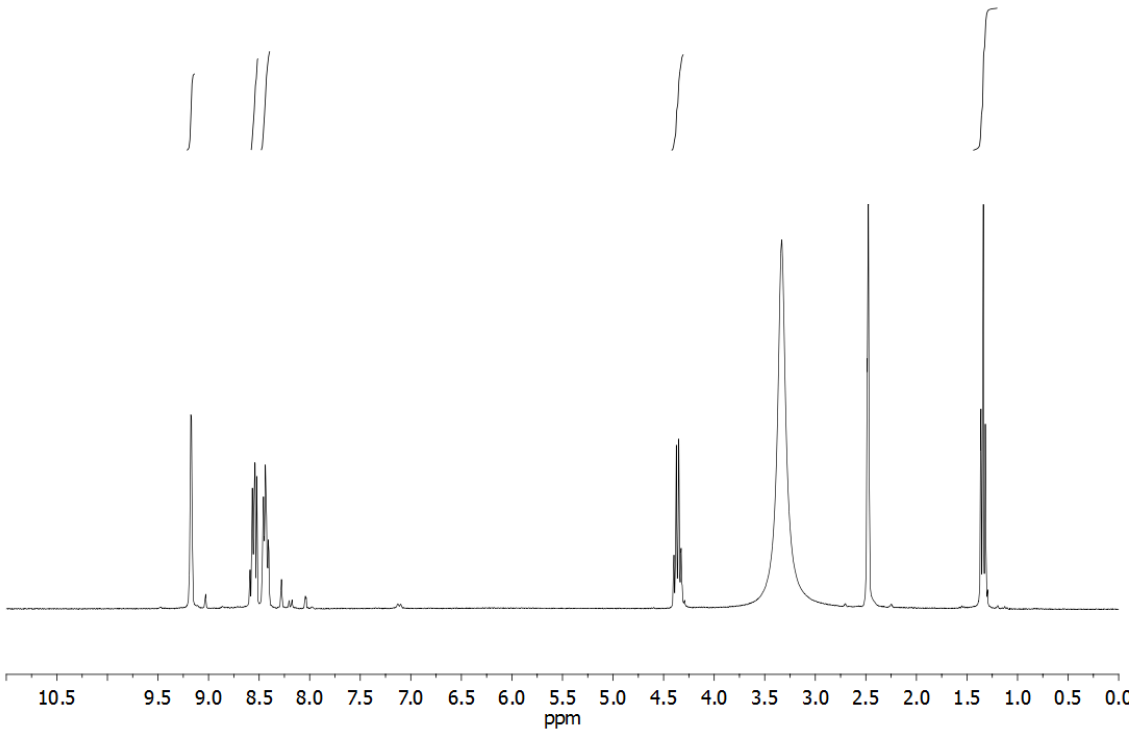
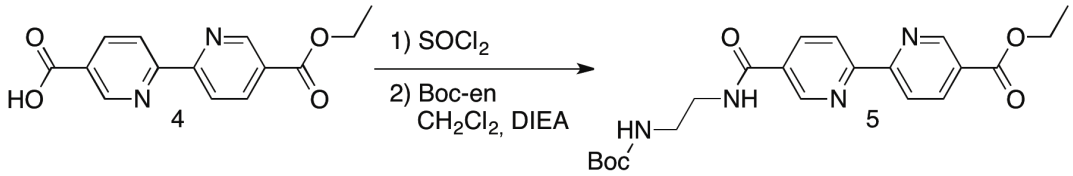


Figura 5.12: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **4**.

5.3.1.4 5'-((2-((tert-butoxicarbonil)amino)etilcarbamida)-[2,2'-bipiridil]-5-carboxilato de etilo (5)



En un balón de reacción de 100 mL se añaden 5.4 g (20 mmol) de monoéster **4**. A continuación se adicionan lentamente 50 mL de $SOCl_2$ y la mezcla se calienta a 80 ºC durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se elimina el cloruro de tionilo a presión reducida en un rotavapor y el sólido resultante se lava con CH_2Cl_2 (5 × 30 mL) para eliminar los restos de $SOCl_2$ y se seca en una bomba de vacío.

El sólido obtenido se disuelve en 75 mL de CH_2Cl_2 y sobre esta mezcla se adicionan 4.14 g (25.8 mmol, 1.3 equivalentes) de *tert*-butil (2-aminoetil)carbamato (Boc-en) y 5 mL de Et_3N. La reacción se mantiene bajo agitación magnética toda la noche. Transcurridas 15 h, el disolvente se elimina a presión reducida. El sólido resultante se suspende en 40 mL de una mezcla 1:1 CH_3CN:H_2O. A continuación la mezcla se acidifica a pH 4, precipitando un sólido blanco que se separa mediante centrifugación. Se lava con CH_3CN (2 × 30 mL) y H_2O (1 × 40 mL) y se seca mediante liofilización. 7.20 g (87 %).

^{1}H–RMN (500 MHz, DMSO-d_6, δ): 9.19 (1H); 9.11 (1H); 8.76 (1H); 8.55 (d, ^3J = 13.7, 1H); 8.53 (d, ^3J = 13.7, 1H); 8.45 (dd, ^3J = 8.5; ^4J = 2.0 Hz, 1H); 8.36 (dd, ^3J = 8.5; ^4J = 2.0 Hz, 1H); 6.93 (1H); 4.37 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H); 3.12 (m, 2H); 1.36 (s, 9H); 1.29 (t, ^3J = 7.2 Hz, 3H).

^{13}C–RMN (125 MHz, DMSO-d_6, δ): 164.9 (C), 158.2 (C), 156.3 (C), 156.2 (C), 150.4 (CH), 149.0 (CH), 138.7 (CH), 136.9 (CH), 131.1 (C), 126.5 (C), 121.3 (CH), 121.2 (CH), 78.13 (C), 61.75 (CH_2), 40.1 (CH_2), 39.8 (CH_2), 28.7 (CH_3), 14. 6 (CH_3).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{21}H_{27}N_4O_5]^+$ 415.2; encontrado, 415.2.

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 26.0´; $[M+H]^+$ 415.3.

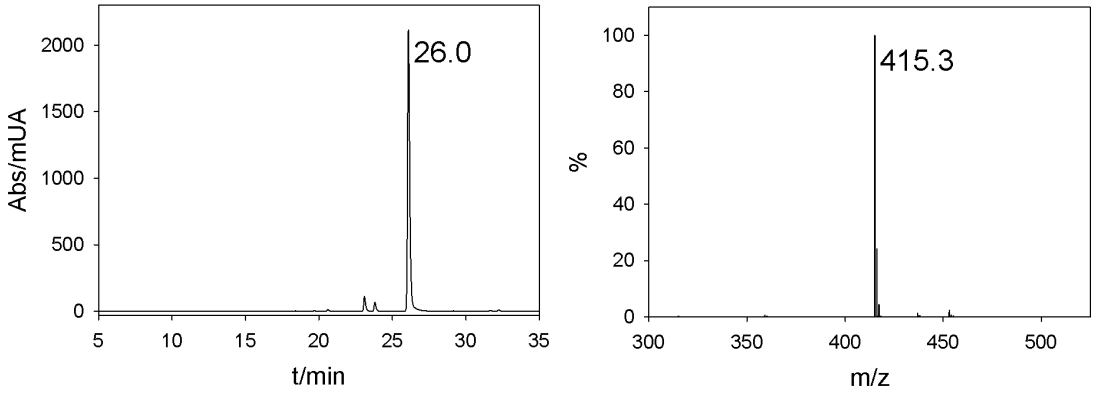


Figura 5.13: izquierda, cromatograma del compuesto **5**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 26.0´.

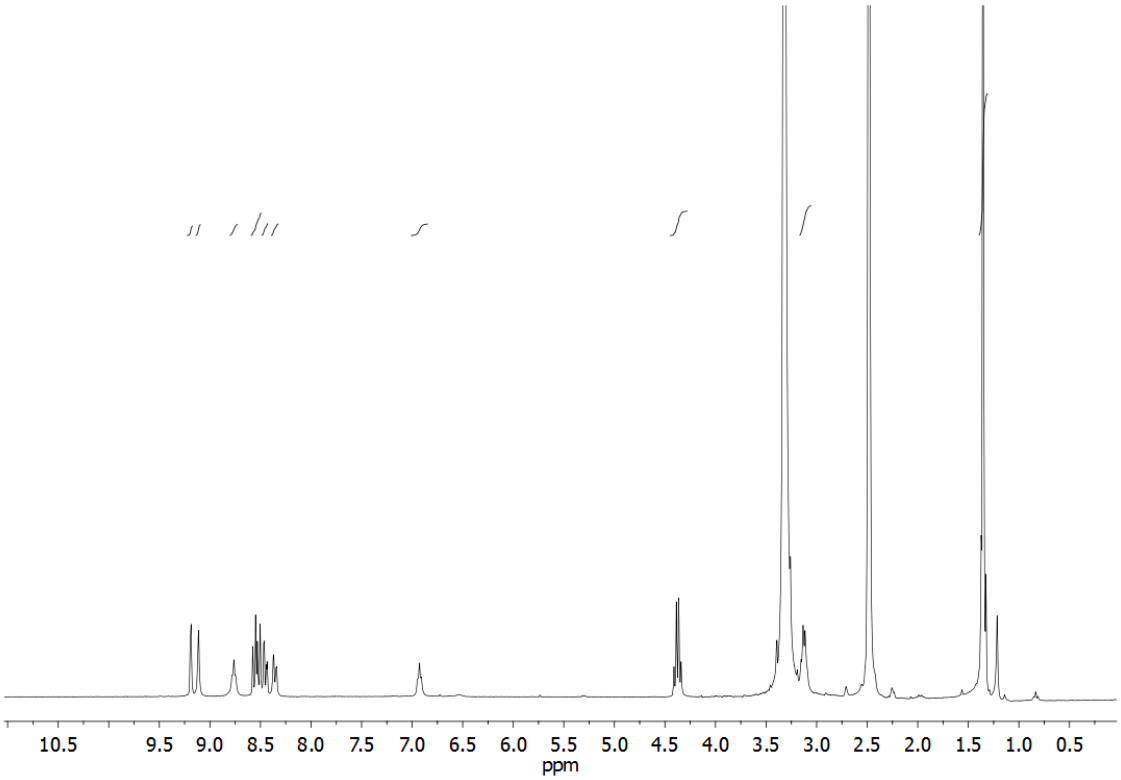


Figura 5.14: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **5**.

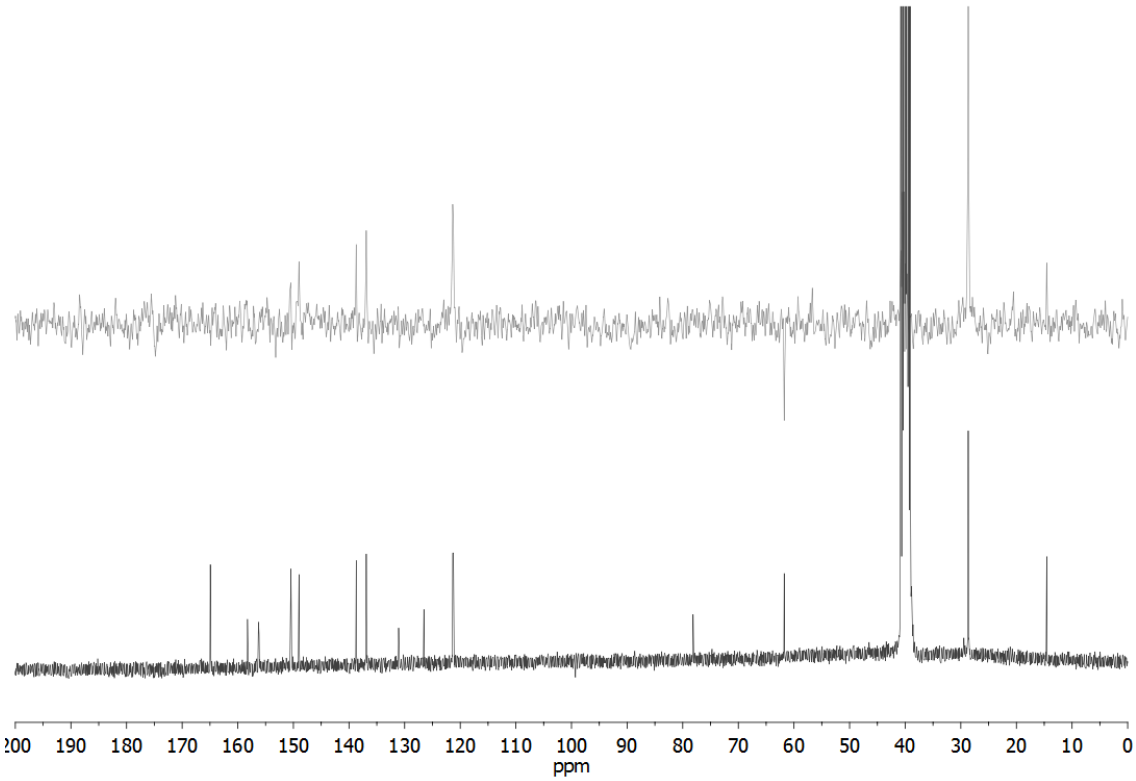
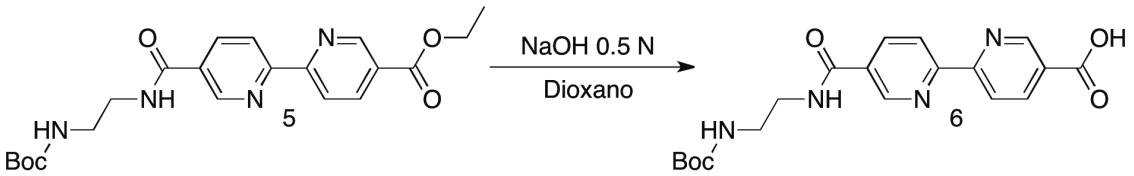


Figura 5.15: Arriba, espectro DEPT-135 del compuesto **5**; abajo, espectro de ^{13}C-RMN del mismo compuesto.

5.3.1.5 Ácido 5'-((2-((tert-butoxicarbonil)amino) etilcarbamida)-[2,2'- bipiridil]-5-carboxílico (6)



En un balón de reacción se disuelven 4.22 g de compuesto **5** (10.2 mmol) en 80 mL de dioxano y 2.8 mL de NaOH 0.5 M. La mezcla se calienta a 50 ºC durante 3 h con agitación magnética. Transcurrido ese tiempo se elimina el dioxano a presión reducida. La disolución acuosa resultante se acidificó a pH 4, con lo que precipita un sólido blanco que se filtra y seca mediante liofilización. 3.78 g (96 %).

^{1}H–RMN (500 MHz, DMSO-d_6, δ): 9.17 (d, ^{4}J = 2.2 Hz, 1H); 9.13 (d, ^{4}J = 2.0 Hz, 1H); 8.85 (t, 1H); 8.54 (d, ^3J = 8.3, 1H); 8.51 (d, ^3J = 8.6, 1H); 8.43 (dd, ^3J = 8.6; ^4J = 2.0 Hz, 1H); 8.37 (dd, ^3J = 8.3; ^4J = 2.2 Hz, 1H); 6.97 (1H); 3.32 (m, 2H); 3.13 (m, 2H); 1.35 (s, 9H).

^{13}C–RMN (125 MHz, DMSO-d_6, δ): 166.1 (C), 164. 3 (C), 157.6 (C), 155.9 (C), 150.2 (CH), 148.6 (CH), 138.5 (CH), 136.5 (CH), 130.3 (C), 126.8 (C), 126.7 (C), 120.8 (CH), 120.7 (CH), 78.13 (C), 39.7 (CH_2), 39.4 (CH_2), 28.2 (CH_3).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{19}H_{22}N_4O_5]^+$ 387.5; encontrado, 387.5.

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 20.6´; $[M+H]^+$ 387.6 y $[2M+Na]^+$ 796.2.

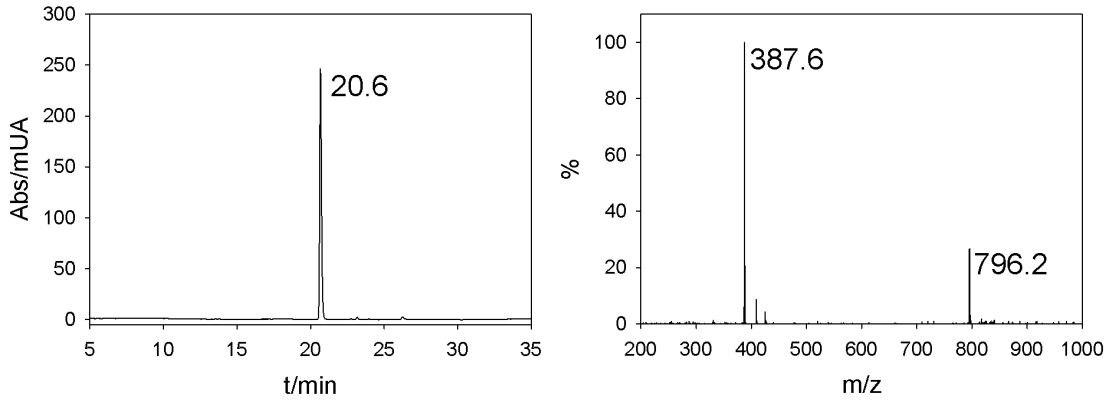


Figura 5.16: izquierda, cromatograma del compuesto **6**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 20.6´.

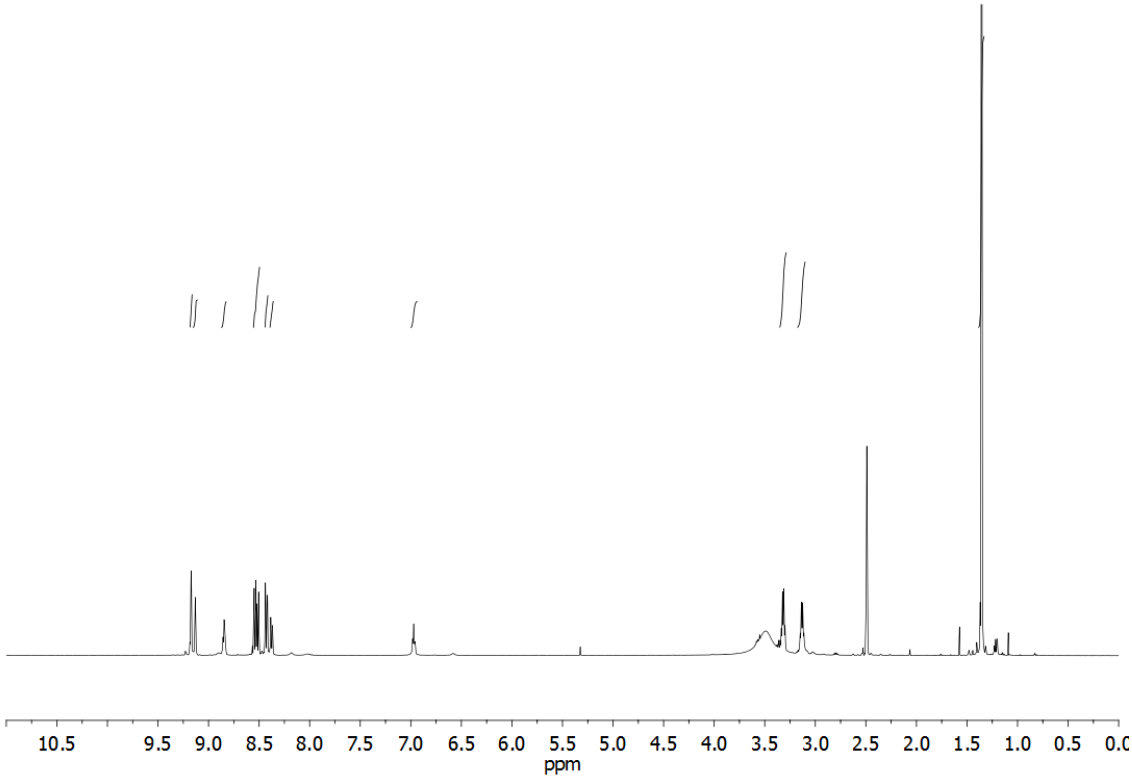


Figura 5.17: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **6**.

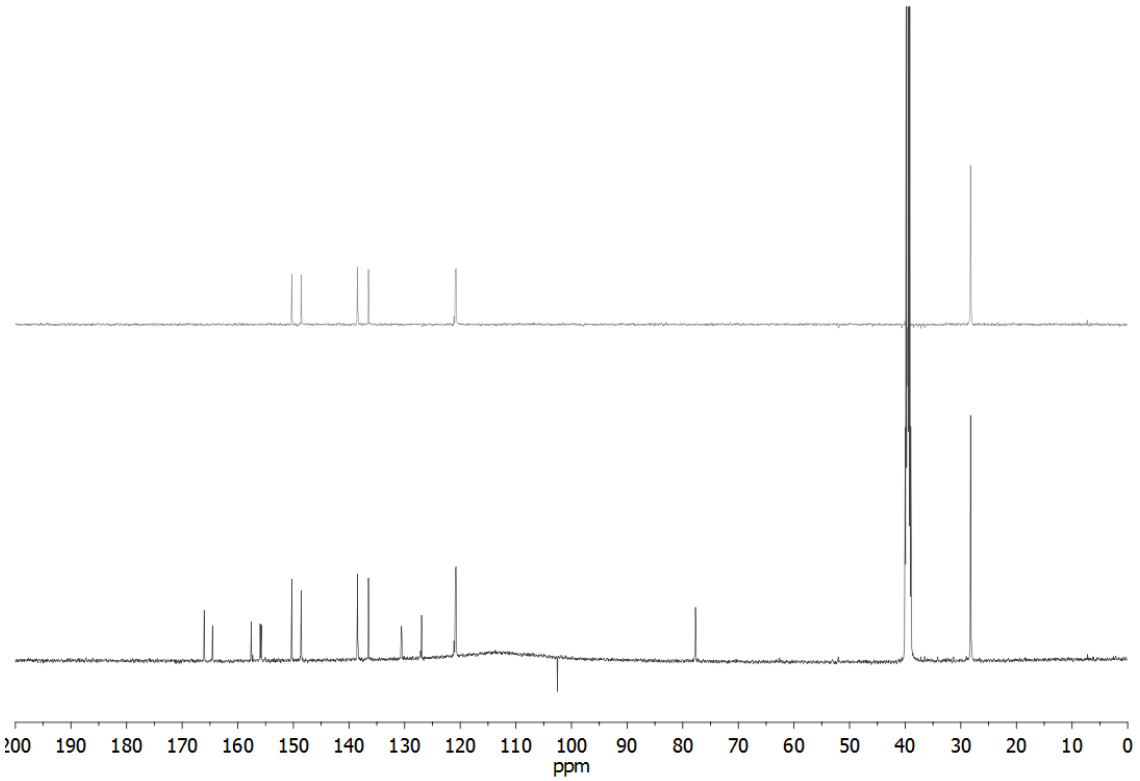
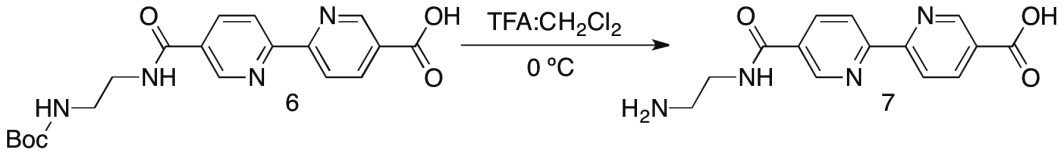


Figura 5.18: Arriba, espectro DEPT-135 del compuesto **6**; abajo, espectro de ^{13}C-RMN del mismo compuesto.

5.3.1.6 Ácido 5'-((2-aminoetil)carbamil)-[2,2'-bipiridil]-5-carboxílico (7)



En un balón de reacción de 500 mL que contiene 1.42 g (3.7 mmol) de compuesto **6** en 200 mL de CH_2Cl_2. Esta suspensión se refrigera a 0 ºC y se realiza la adición gota a gota de 200 mL de TFA durante 30 min teniendo cuidado de que la temperatura no suba de los 0 ºC. Transcurridas 4 h desde la finalización de la adición, se elimina el disolvente a presión reducida y el sólido oleaginoso violeta (**7**) resultante se lava con CH_2Cl_2 (4 × 50 mL) y se seca a vacío.

^{1}H–RMN (300 MHz, DMSO-d_6, δ): 9.31 (t, ^{3}J = 5.1 Hz, 1H); 9.24 (d, ^{4}J = 2.0 Hz, 1H); 9.14 (d, ^{4}J = 2.0 Hz, 1H); 8.55 (s, 1H); 8.52 (d, ^4J = 2.0, 2H); 8.42 (dd, ^3J = 8.0; ^4J = 2.0 Hz, 1H); 5.02 (1H); 3.60 (m, 2H); 3.04 (m, 2H).

^{13}C–RMN (75 MHz, DMSO-d_6, δ): 166.2 (C), 165.1 (C), 157.2 (C), 155.8 (C), 150.4 (CH), 148.9 (CH), 139.1 (CH), 137.6 (CH), 130.7 (C), 127.6 (C), 121.6 (CH), 121.4 (CH), 70.1 (CH_2), 36.8 (CH_2).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{14}H_{15}N_4O_3]^+$ 287.5; encontrado, 287.6.

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 13.5´; $[M+H]^+$ 287.6.

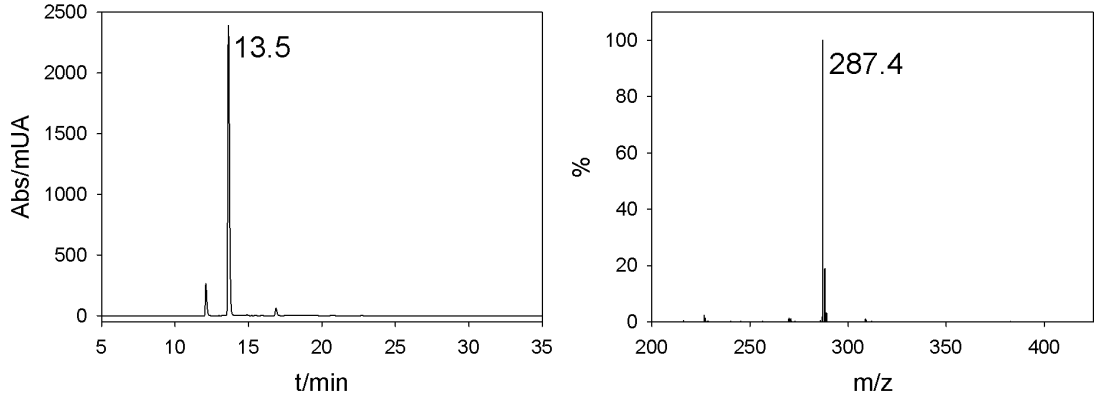


Figura 5.19: izquierda, cromatograma del compuesto **7**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 13.5´.

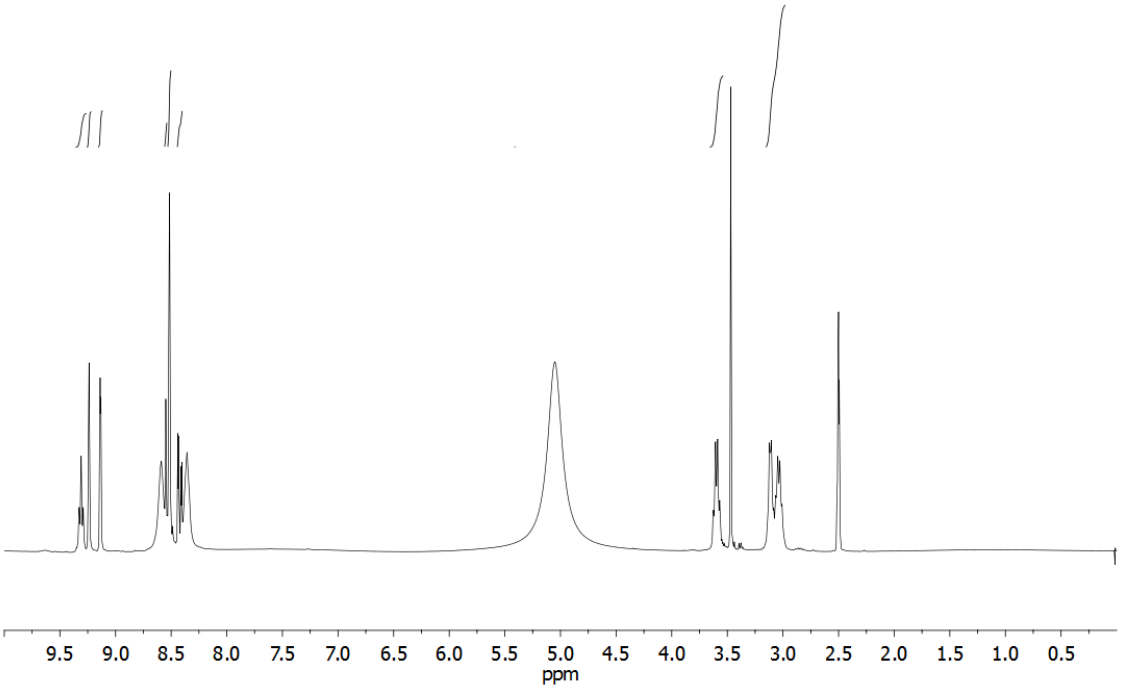


Figura 5.20: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **7**.

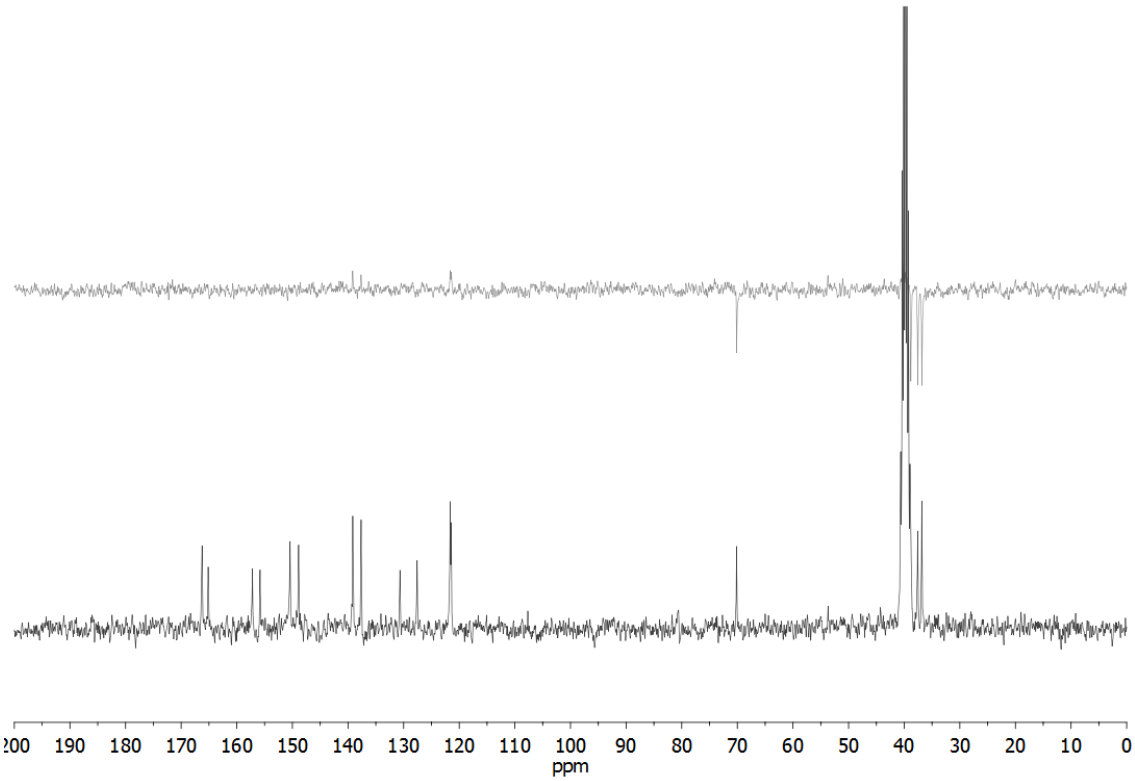
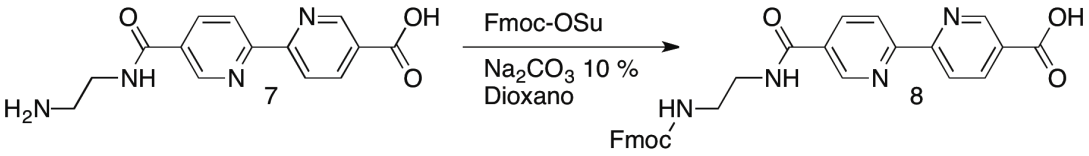


Figura 5.21: Arriba, espectro DEPT-135 del compuesto **7**; abajo, espectro de ^{13}C-RMN del mismo compuesto.

5.3.1.7 Ácido 5'-((2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil) amino)etil) carbamil)-[2,2'-bipiridil]-5-carboxílico (8)



En un balón de reacción de 100 mL que contiene 1.0 g (3.4 mmol) de compuesto **7** disueltos en una mezcla de H_2O (10 % Na_2CO_3) y dioxano (2:1), se añaden 2.25 g (5.14 mmol, 1.5 equivalentes) de Fmoc-OSu. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h, durante las cuales va apareciendo un sólido blanco, que se separa por filtración se lava con una disolución al 1 % HCl (2 × 20 mL) y con H_2O (3 × 30 mL) y se seca mediante liofilización. 1.67 g (96 %).

^{1}H–RMN (300 MHz, DMSO-d_6, δ): 9.18 (d, ^4J = 2.1 Hz, 1H); 9.14 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H); 8.86 (t, ^3J = 5.0 Hz, 1H); 8.53 (m, 2H); 8.44 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 2.1, 2H); 8.38 (dd, ^3J = 8.0; ^4J = 2.0 Hz, 1H); 7.87 (d, ^3J = 8.0 Hz, 2H); 7.67 (d, ^3J = 8.0 Hz, 2H); 7.47 (t, ^3J = 5.1 Hz, 1H); 7.40 (m, 2H); 7.31 (m, 2H); 4.31 (d, ^3J = 6.2 Hz 2H); 4.21 (t, ^3J = 6.2 Hz, 1H); 3.38 (m, 2H); 3.21 (m, 2H).

^{13}C–RMN (75 MHz, DMSO-d_6, δ): 166.0 (C), 164.6 (C), 157.6 (C), 156.3 (C), 156.0 (C), 150.3 (CH), 148.6 (CH), 145.2 (C), 143.9 (C), 140.7 (C), 138.4 (CH), 136.5 (CH), 130.7 (C), 127.0 (C), 125.2 (CH), 120.9 (CH), 120.8 (CH), 120.1 (CH), 65.4 (CH_2), 46.7 (CH), 36.8 (CH_2), 34.1 (CH_2).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{29}H_{26}N_4O_5]^+$ 509.1; encontrado, 509.2.

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 25.7´; $[M+H]^+$ 509.1.

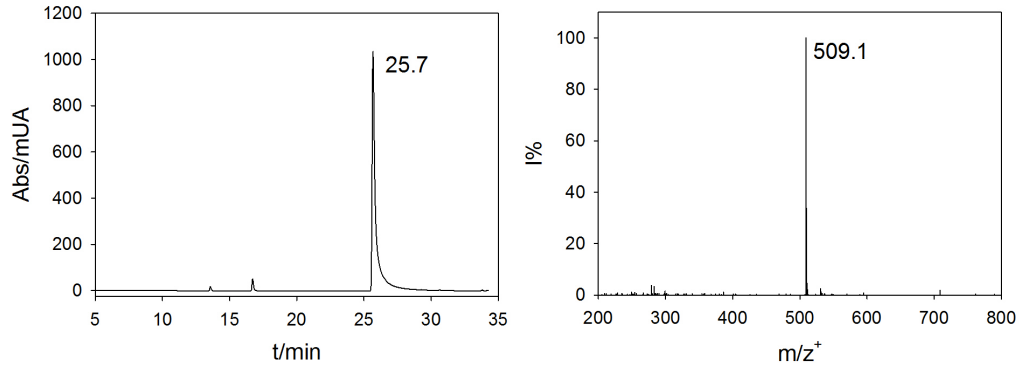


Figura 5.22: izquierda, cromatograma del compuesto **8**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 13.5´.

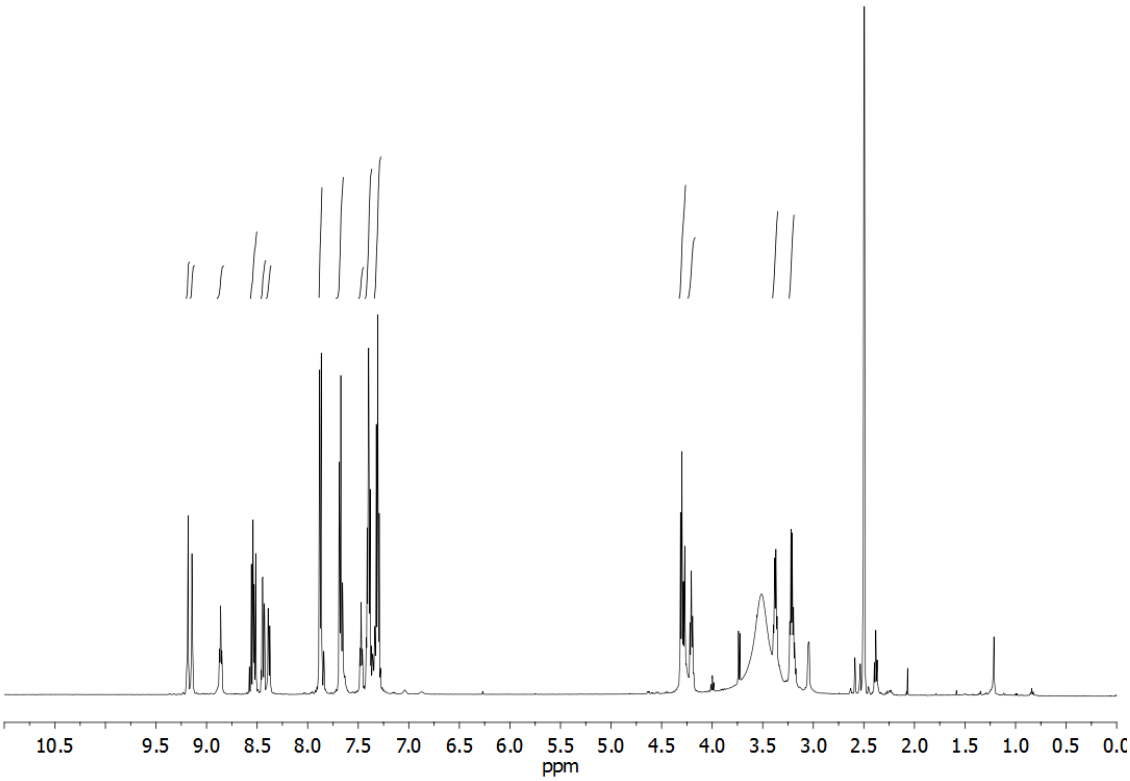


Figura 5.23: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **8**.

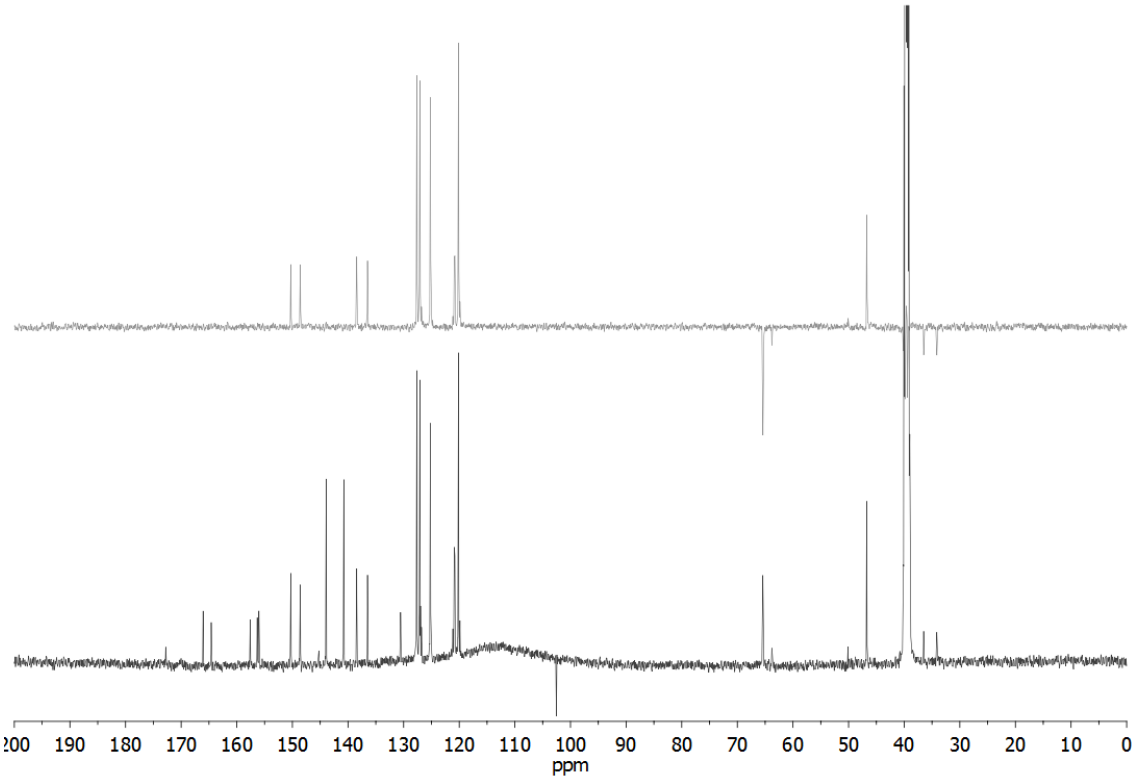
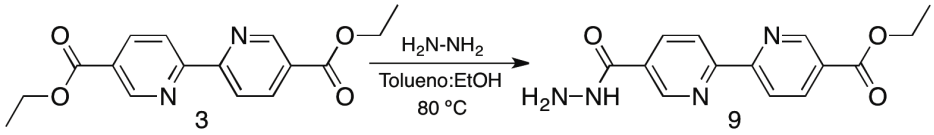


Figura 5.24: Arriba, espectro DEPT-135 del compuesto **8**; abajo, espectro de ^{13}C-RMN del mismo compuesto.

5.3.2 SÍNTESIS DE LOS AMINOÁCIDOS DERIVADOS DEL ÁCIDO 5'-AMINO-2,2'-BIPIRIDINA-5-CARBOXÍLICO

5.3.2.1 5'-(hidracinacarbonil)-2,2'-bipiridil-5-etil éster (9)



En un balón de reacción de 250 mL se disuelven 5.0 g del diéster **3** (16.7 mmol) en 14 mL de EtOH y 42 mL de tolueno. A continuación se añaden 1.25 mL de monohidrato de hidracina (25 mmol). La mezcla se calienta en un baño de silicona a 80 ºC durante 30 h. El precipitado generado se filtra a vacío, se lava con CH_2Cl_2 (15 mL) y se seca a vacío. 3.82 g (80.0 %). El filtrado se concentra y el diéster que no ha reaccionado se pone a reaccionar de nuevo en las mismas condiciones. 4.39 g (92 %).

^{1}H–RMN (500 MHz, DMSO-d_6, δ): 10.1 (br, 1H), 9.2 (d, ^{4}J = 2 Hz, 1H), 9.1 (d, ^{4}J = 2 Hz, 1H), 8.52 (d, ^{3}J = 8.4 Hz, 1H), 8.57 (d, ^{3}J = 8.4 Hz, 1H), 8.45 (dd, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J) 2 Hz, 1H), 8.35 (dd, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 2 Hz, 1H), 4.37 (q, 2H), 1.35 (t, 3H).

^{13}C–RMN (125 MHz, DMSO-d_6, δ): 164.5 (C), 163.8 (C), 157.8 (C), 155.8 (C), 150.0 (CH), 148.1 (CH), 138.2 (CH), 136.2 (CH), 129.6 (CH), 126.1 (C), 120.9 (CH), 61.3 (CH_2), 14.1 (CH_3).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{14}H_{15}N_4O_3]^+$ 287.1; encontrado, 287.1.

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 23.9´; $[M+H]^+$ 287.1 y $[M+Na]^+$ 309.0.

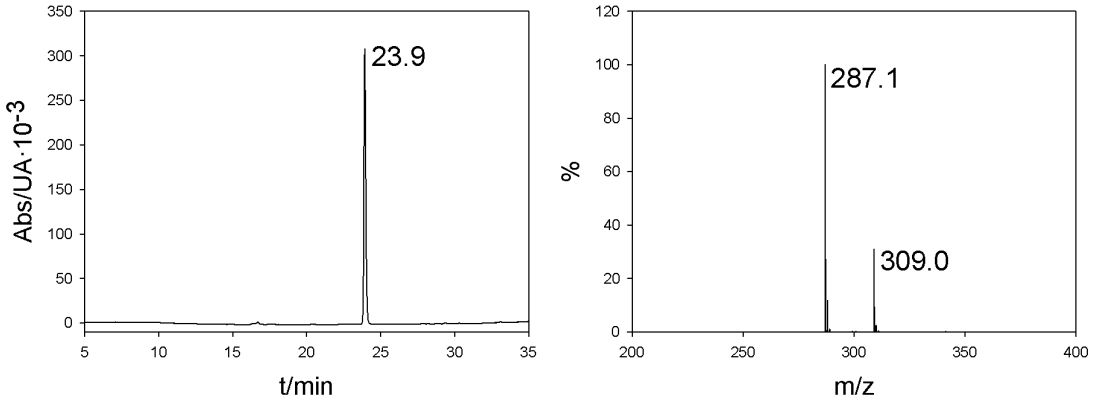


Figura 5.25: izquierda, cromatograma del compuesto **9**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 23.9´.

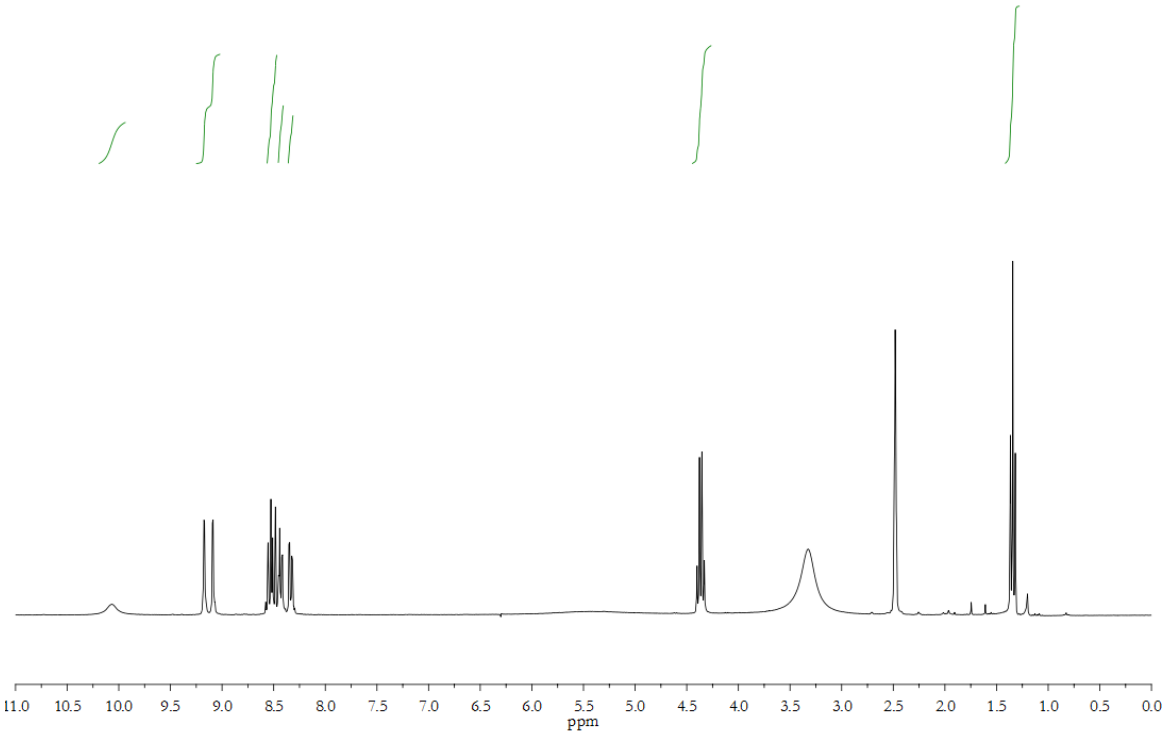


Figura 5.26: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **9**.

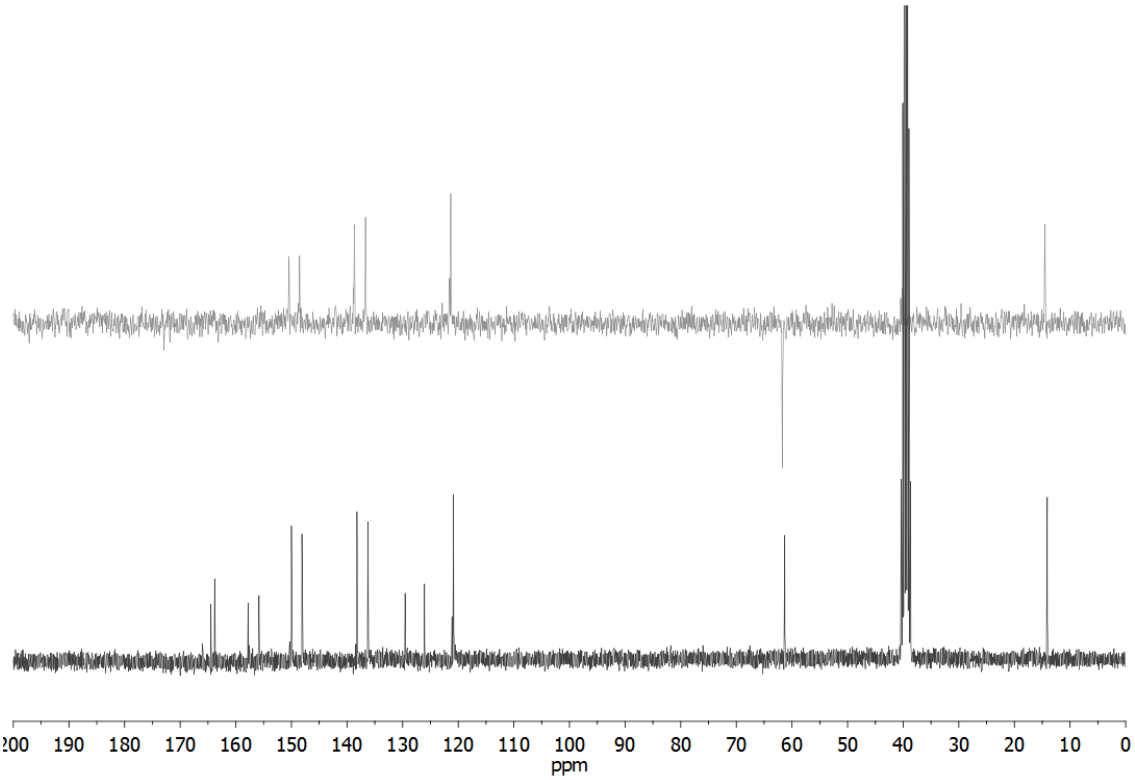
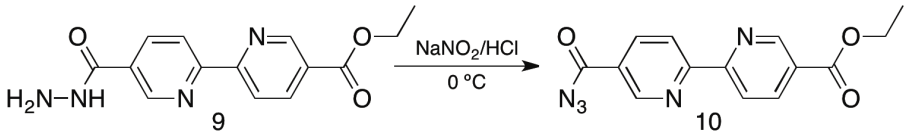


Figura 5.27: Arriba, espectro DEPT-135 del compuesto **9**; abajo, espectro de ^{13}C-RMN del mismo compuesto.

5.3.2.2 5'-(azidocarbonil)-2,2'-bipiridil-5-etil éster (10)



En un balón de reacción de 250 mL se disuelven 6.0 g (21 mmol) de la hidrazina **3** en HCl concentrado (110 mL). Sobre la disolución enfriada a 0 ºC se añade gota a gota una disolución de $NaNO_2$ (1.81 g, 26.2 mmol) en agua (15 mL) y la mezcla resultante se agita durante 1h. A continuación, se diluye la mezcla en 300 mL de agua, tras lo cual precipita un sólido blanco que se filtra a vacío, se lava con H_2O DI y se seca mediante liofilización. 5.92 g (95 %).

^{1}H-RMN (500 MHz, acetona-d_6, δ): 9.13 (d, ^4J = 1.91 Hz, 1H), 9.10 (d, ^4J = 1.91 Hz, 1H), 8.71 (d, ^3J = 12.5 Hz, 1H), 8.69 (d, ^3J = 12.5 Hz, 1H), 8.517 (m, 2H; 4.31 (q, ^3J = 7.15 Hz, 2H); 1.29 (t, ^3J= 7.15, 3H)

^{13}C-RMN (125 MHz, acetona-d_6, δ): 159.2 (C), 157.7 (C), 150.3 (CH), 150.0 (CH), 138.0 (CH), 137.9 (CH), 127.0 (C), 126.0 (C), 121.3 (CH), 61.2 (CH_2), 13.6 (CH_3).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{14}H_{11}N_5O_3]^+$ 298.1; encontrado, 298.0.

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 33.5´; $[M+H]^+$ 298.0 y $[M+Na]^+$ 320.2.

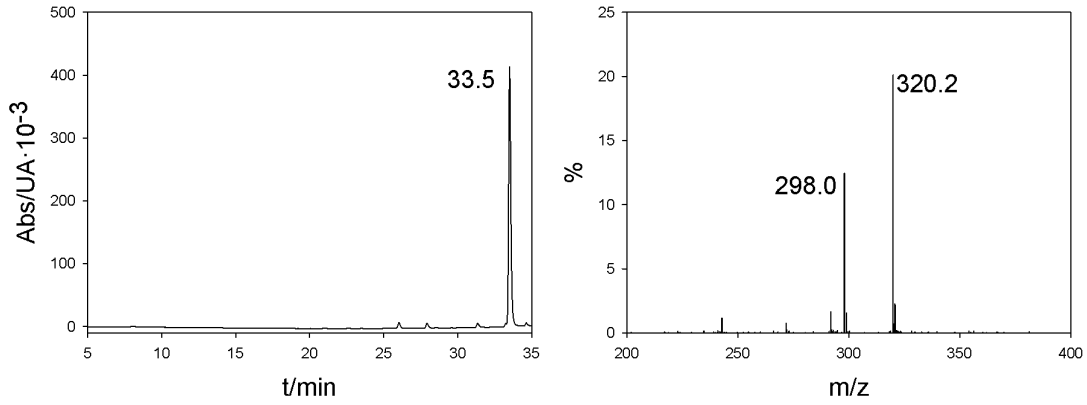


Figura 5.28: izquierda, cromatograma del compuesto **10**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 23.9´.

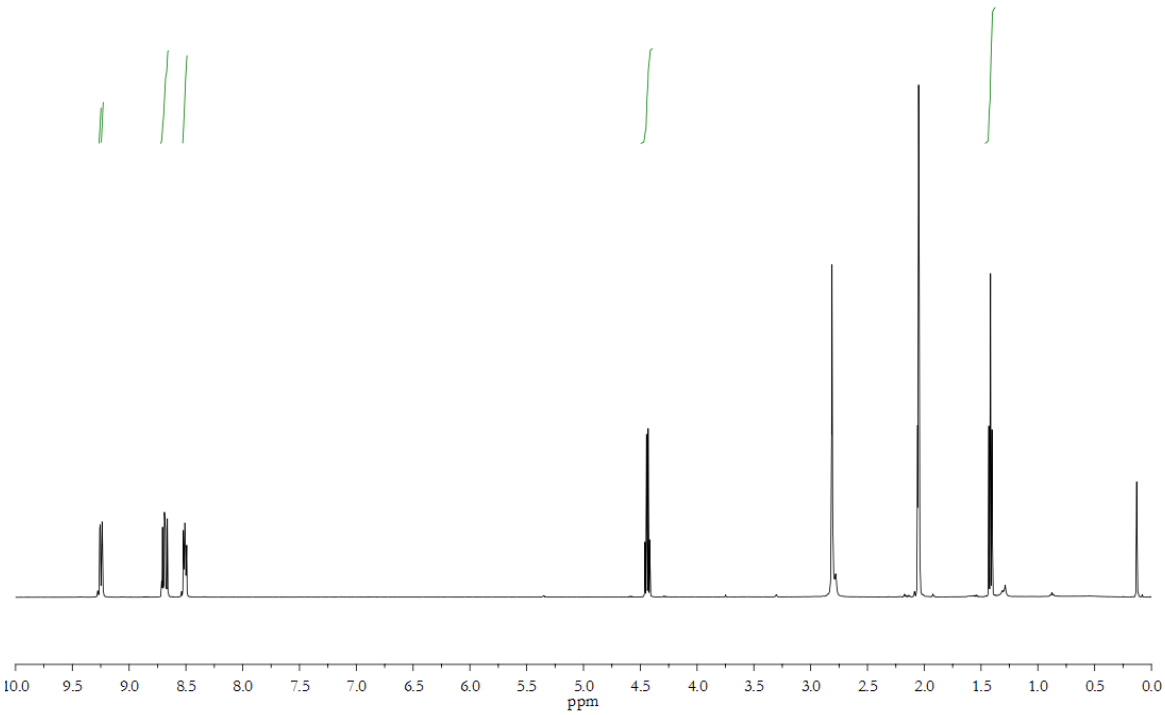


Figura 5.29 : Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **10**.

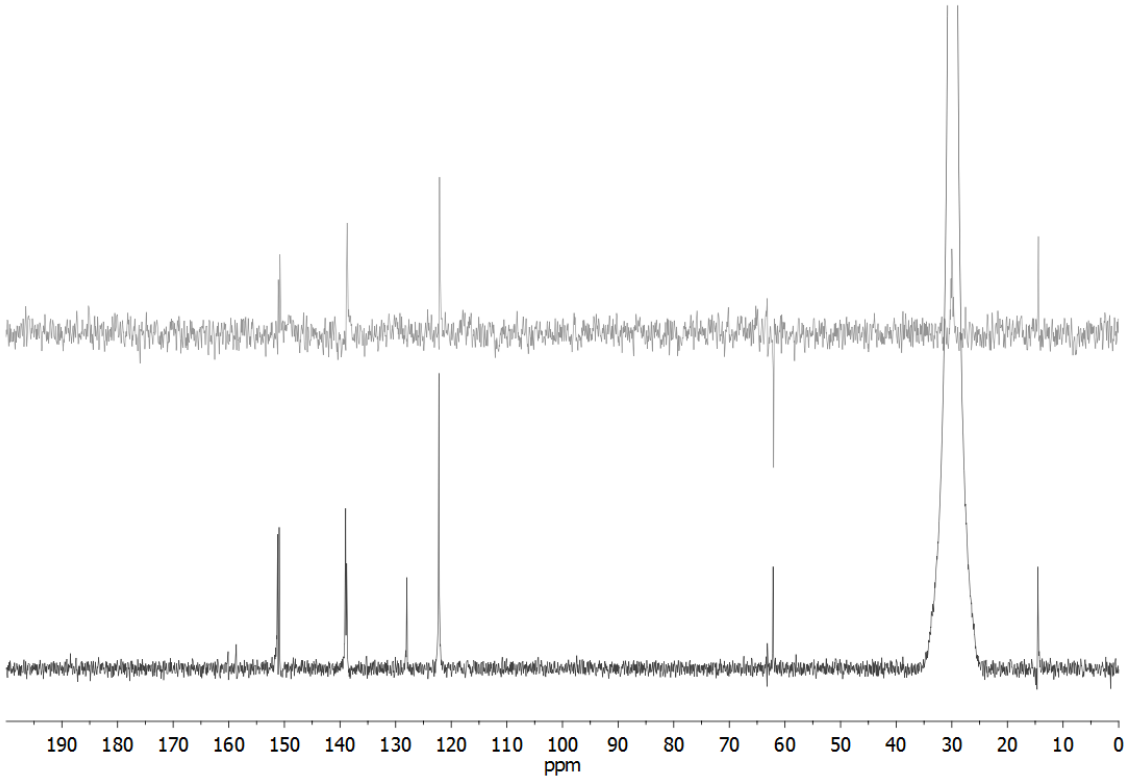
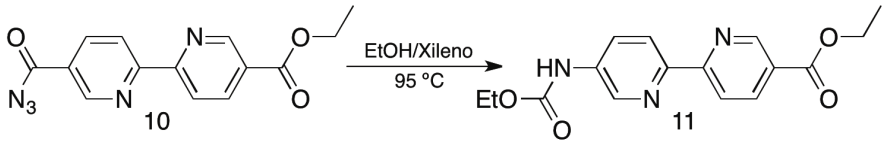


Figura 5.30: Arriba, espectro DEPT-135 del compuesto**10**; abajo, espectro de ^{13}C-RMN del mismo compuesto.

5.3.2.3 5'-(etoxicarbonilamino)-2,2'-bipiridil-5-etil éster (11)



En un balón de reacción de 250 mL se disuelven 5 g de la azida **5** en una mezcla 1:1 etanol/xileno (120 mL). La mezcla se calienta a 100 ºC durante 4 h y a continuación se concentra a sequedad a presión reducida. El sólido resultante se recristaliza de EtOH. 4.24 g (80 %).

^{1}H–RMN (300 MHz, DMSO-d_6, δ): 10.13 (s, 1H), 9.12 (d, ^4J = 2 Hz, ^5J = 1 Hz, 1H), 8.70 (d, ^4J = 2 Hz, 1H), 8.45 (d, ^3J = 8 Hz, 1H), 8.40 (dd, ^3J = 8.3Hz, ^5J = 1 Hz, 1H), 8.35 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 2 Hz, 1H), 8.08 (dd, ^3J = 8 Hz, ^4J = 2 Hz, 1H), 4.36 (q, ^3J = 7.2Hz, 2H), 4.17 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H), 1.35 (t, ^3J = 7.2 Hz, 3H), 1.27 (t, ^3J = 7.2 Hz, 3H).

^{13}C–RMN (75 MHz, DMSO-d_6, δ): 164.17 (C), 158.07 (C), 153.06 (C), 149.40 (CH), 147.44 (C), 139.05 (CH), 137.42 (CH), 136.77 (C), 124.96 (CH), 124.46 (C), 121.21 (CH), 119.11 (CH), 60.66 (CH_2), 60.32 (CH_2), 13.95 (CH_3), 13.65 (CH_3).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{16}H_{17}N_3O_4]^+$ 316.1; encontrado, 316.1

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 33.5´; $[M+H]^+$ 316.2 y $[M+Na]^+$ 337.4.

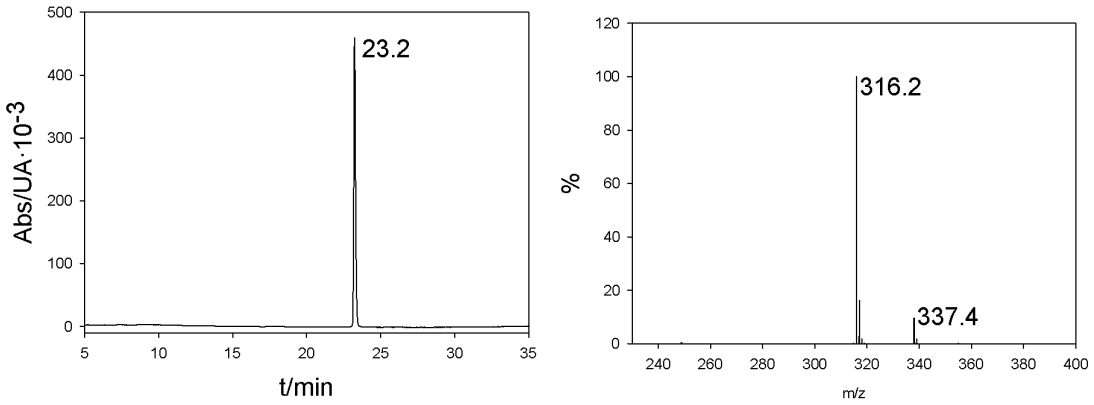


Figura 5.31: izquierda, cromatograma del compuesto **11**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 23.2´.

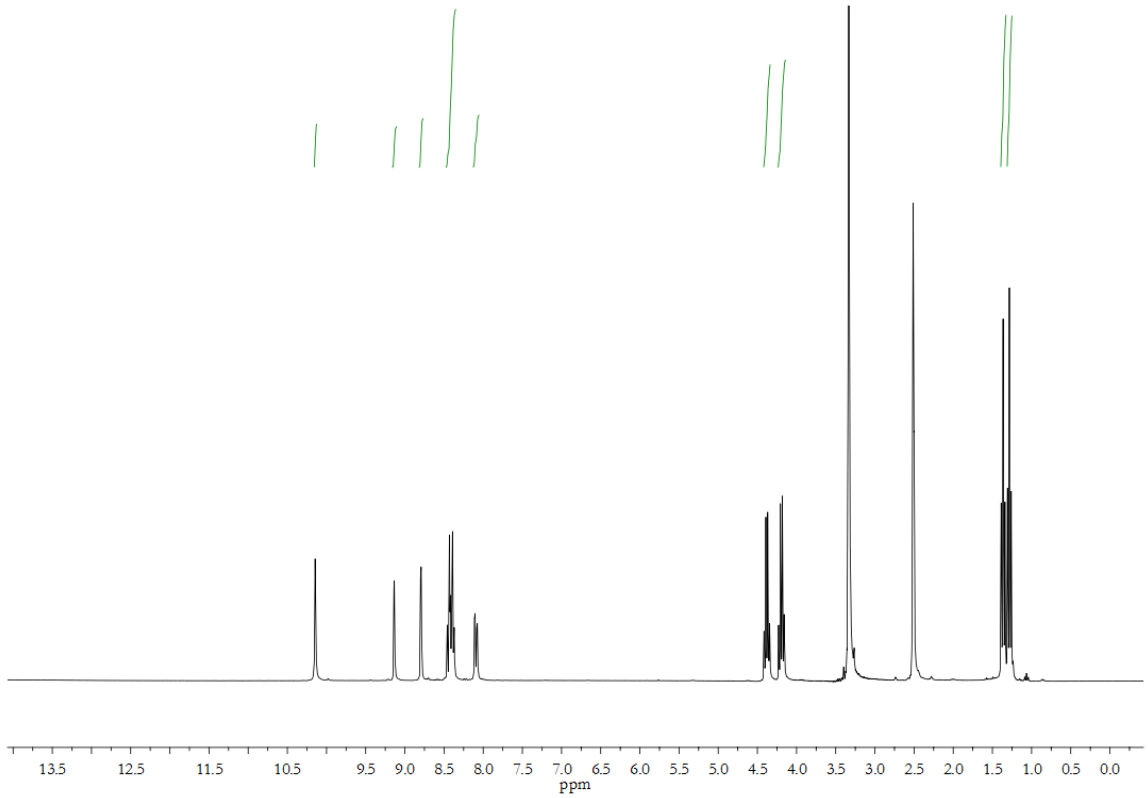


Figura 5.32: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **11**.

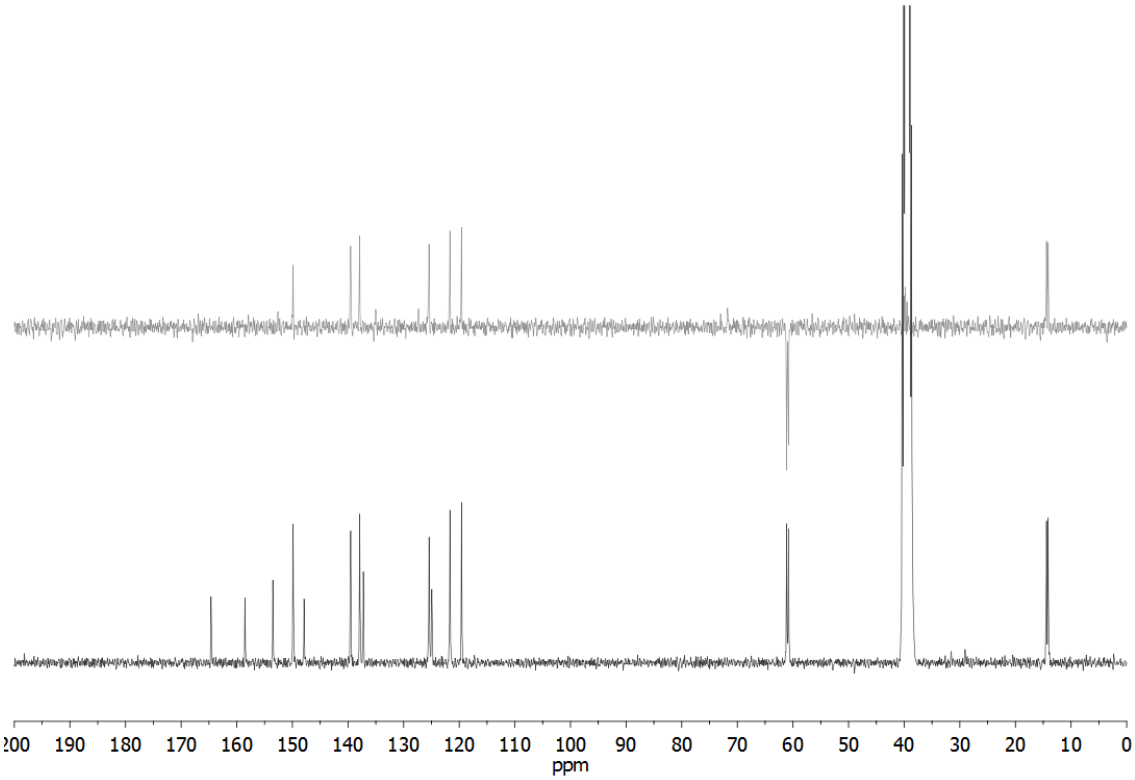
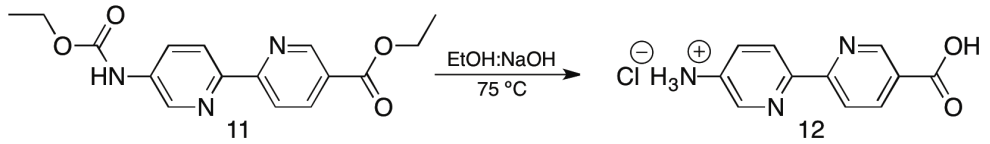


Figura 5.33: Arriba, espectro DEPT-135 del compuesto **11**; abajo, espectro de ^{13}C-RMN del mismo compuesto.

5.3.2.4 Ácido 5'-amino-2,2'-bipiridil-5-carboxílico (12)



En un balón de reacción de 250 mL se disuelven 5.1 g del carbamato **6** (15.8 mmol) en 50 mL de EtOH y 50 mL de una disolución acuosa 2.5 M de NaOH. La mezcla se calienta a 75 ºC durante 14 h. A continuación se elimina el EtOH a presión reducida, y la disolución acuosa resultante se neutraliza con HCl concentrado, con lo que precipita un sólido amarillo brillante. El precipitado se filtra a vacío, se lava con H_2O DI en frío (15 mL) y se seca mediante liofilización. 3.50 g (88 %).

^{1}H-RMN (500 MHz, D_2O-d_2, δ): 8.65 (d, ^4J = 2.8 Hz, 1H), 7.98 (dd, ^3J = 8.5 Hz, ^4J = 2.9 Hz, 1H), 7.61 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H), 7.81 (d, ^4J = 2.9 Hz, 1H), 7.55, 7.00 (dd, ^3J = 8.5 Hz, ^4J = 2.8 Hz, 1H).

^{13}C–RMN (75 MHz, DMSO-d_6, δ): 150.12 (C), 149.78 (CH), 148.04 (C), 140.29 (CH), 134.65 (C), 131.94 (C), 128.48 (CH), 128.06 (CH), 127.12 (C), 125.31 (CH), 123.22 (C), 120.47 (CH).

MS-MALDI-TOF (*m/z*) $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{11}H_9N_3O_2]$ 216.1; encontrado, 216.1

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 13.5´; $[M+H]^+$ 216.0 y $[M+Na]^+$ 238.2.

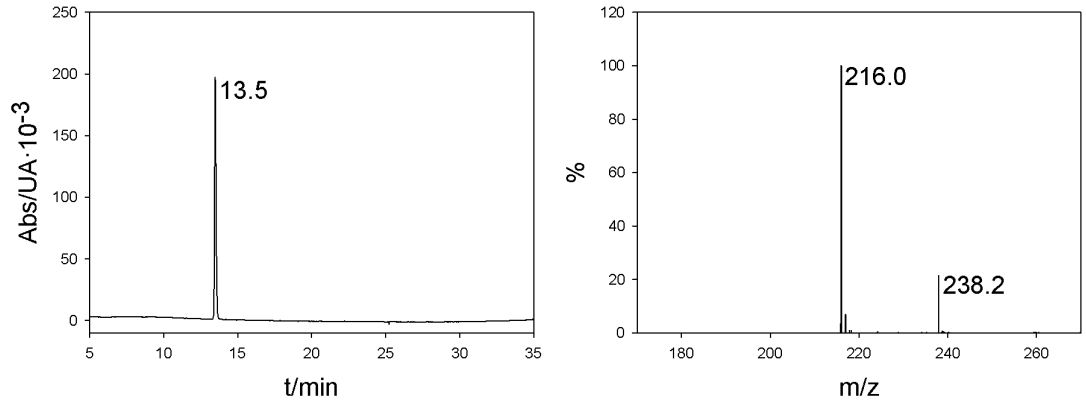


Figura 5.34: izquierda, cromatograma del compuesto **12**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 13.5´.

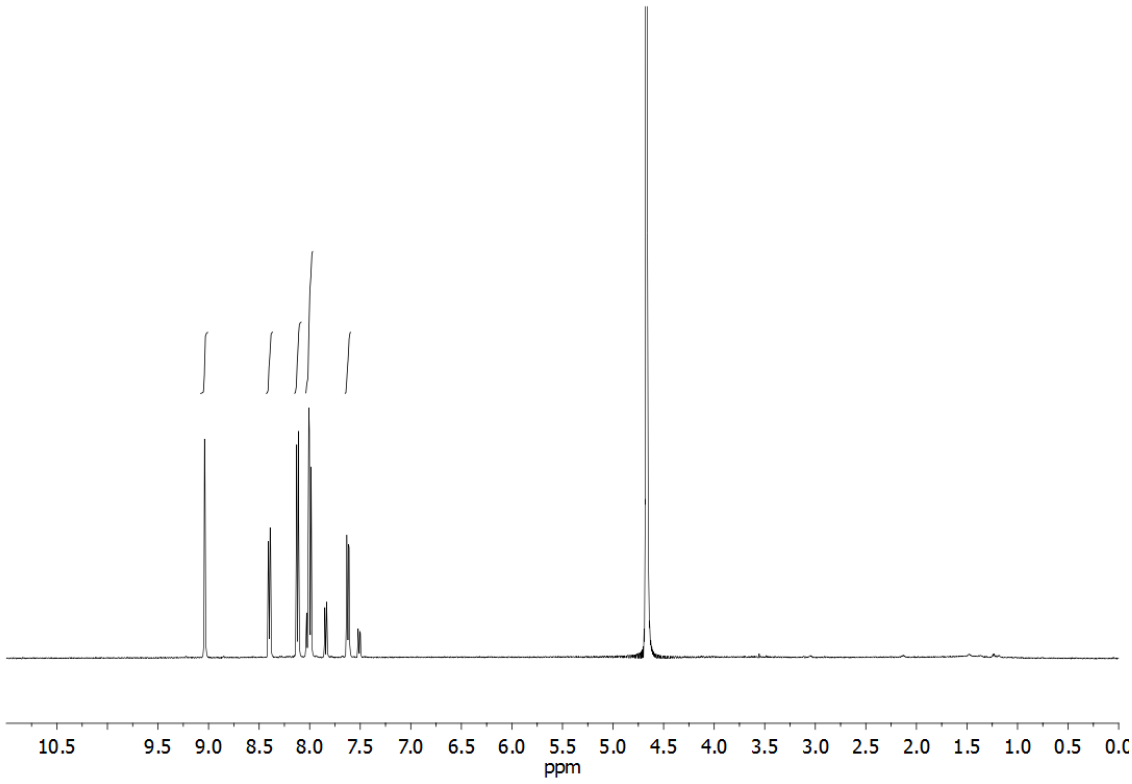


Figura 5.35: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **12**.

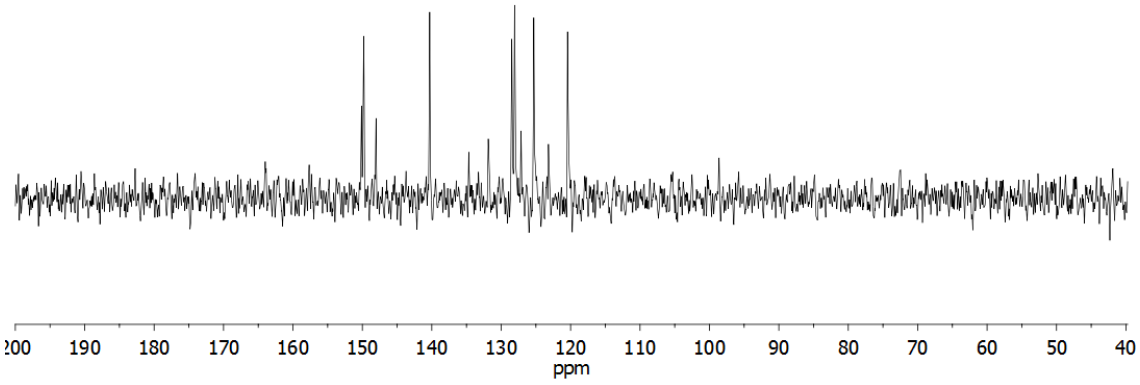


Figura 5.36: Espectro de ^{13}C-RMN del compuesto **12**.

5.3.2.5 Síntesis de los cloruros de acilo de los aminoácidos comerciales

La síntesis de los dipéptidos no quirales derivados del acoplamiento del aminoácido **12** y los aminoácidos comerciales en su forma Fmoc-protegida (Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-β-Ala-OH y Fmoc-O1Pen-OH) se realizó en disolución. El modo de activación seleccionado para los aminoácidos comerciales es la formación de cloruros de acilo.

En un balón de reacción de 100 mL que contiene 3 g de Fmoc-AA-OH, se adicionan 10 mL de $SOCl_2$. La disolución se mantiene a temperatura ambiente con agitación magnética durante 30 min. Posteriormente, se adiciona la mezcla lentamente sobre 300 mL de hexano previamente enfriado a 0 ºC, con lo que precipita el cloruro de acilo como un sólido blanco. El sólido se separa por centrifugación y se lava con hexano (2 × 30 mL). (≈ 90 %)

Para la caracterización de los cloruros de acilo se empleó la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa a escala analítica. Para ello, convertimos una pequeña fracción de cloruro de acilo en éster metílico, disolviendo una punta de espátula en un eppendorf con MeOH. La reacción es prácticamente inmediata y nos permite evaluar la formación cuantitativa del cloruro.

Fmoc-Gly-OMe

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 28.4′; $[M+H]^+$ 312.4 y $[M+Na]^+$ 334.3.

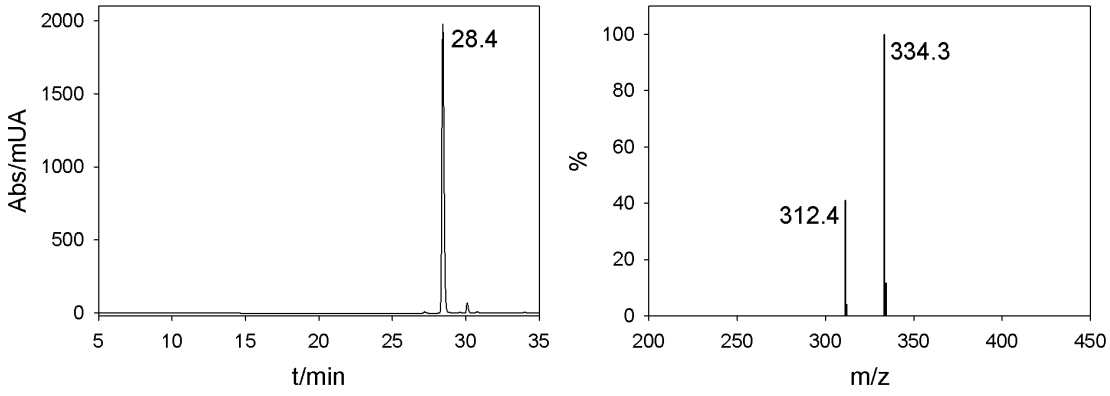


Figura 5.37: izquierda, cromatograma del compuesto Fmoc-Gly-OMe; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 28.4′.

Fmoc-Aib-OMe

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 29.9´; $[M+H]^+$ 339.3 y $[M+Na]^+$ 362.4.

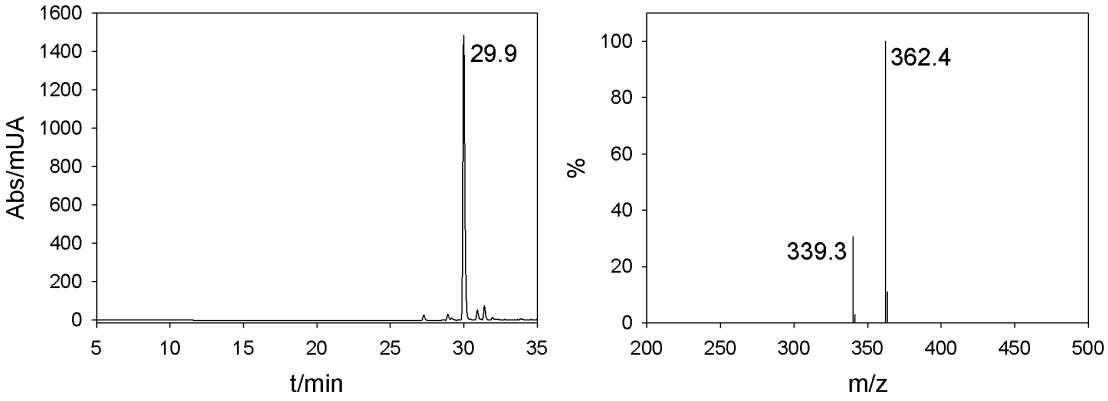


Figura 5.38: izquierda, cromatograma del compuesto Fmoc-Aib-OMe; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 29.9´.

Fmoc-β-Ala-OMe

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 28.6´; $[M+H]^+$ 326.1 y $[M+Na]^+$ 348.0.

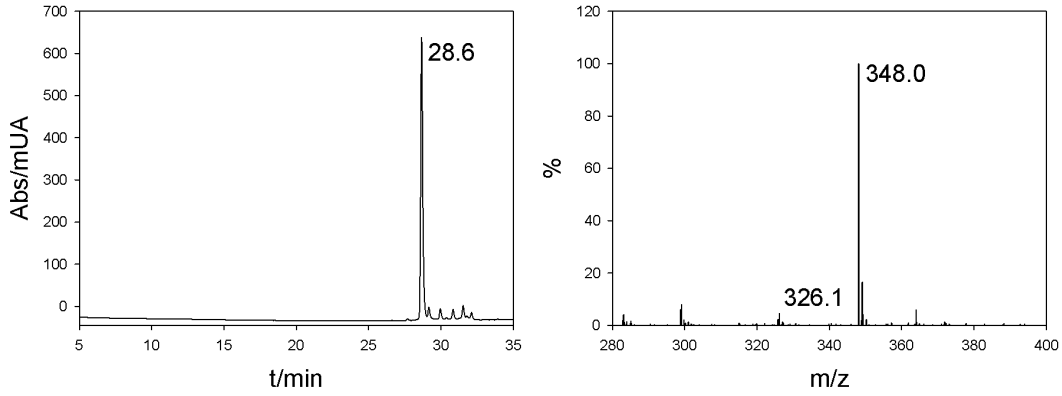


Figura 5.39: izquierda, cromatograma del compuesto Fmoc-β-Ala-OMe; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 28.6´.

Fmoc-O1Pen-OMe

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 24.5´; $[M+H]^+$ 356.1 y $[M+Na]^+$ 378.0.

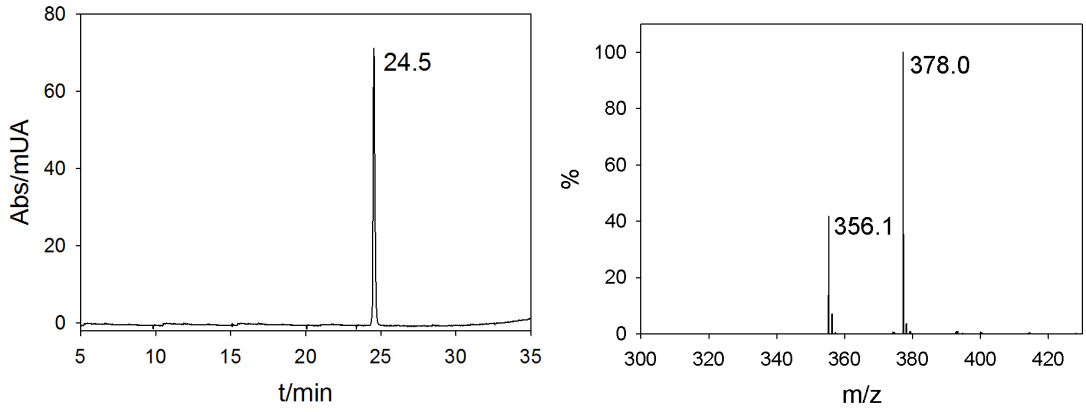
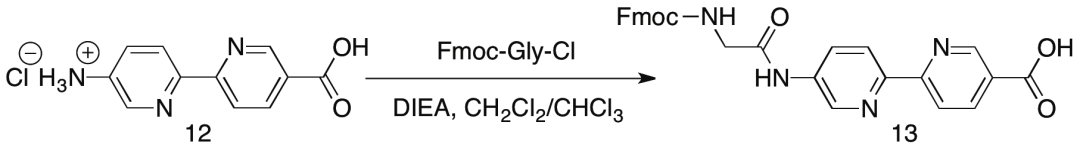


Figura 5.40: izquierda, cromatograma del compuesto Fmoc-O1Pen-OMe; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 24.5´.

5.3.2.6 Ácido 5´-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino) acetamida)-2,2`-bipiridil-5-carboxílico Fmoc-Gly-5Bpy-OH (13)



En un balón de reacción de 100 mL se disuelven 2.0 g de Fmoc-Gly-Cl (6.4 mmol) en 20 mL de CH_2Cl_2 seco. Sobre esta disolución se añaden 1.3 g (5.1 mmol, 0.8 equivalentes) de compuesto **12** y 4 mL de DIEA. La mezcla se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar durante 16 h. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se elimina a presión reducida. El sólido formado se suspende en 15 mL de MeOH. La mezcla se agita unos minutos y a continuación se elimina el disolvente a presión reducida. Posteriormente el sólido se lava con 50 mL de CH_3CN al 0.1 % de TFA. La mezcla se agita y el sólido (sólido A) se separa por centrifugación. Por otra parte, a la disolución de CH_3CN se le añaden 20 mL de H_2O MQ en pequeñas fracciones, el sólido (sólido B) formado se separa mediante centrifugación. Ambos sólidos se juntan y se le realizan lavados con una mezcla 1:1 H_2O: CH_3CN (3 × 10 mL) y un lavado final con 20 mL de H_2O MQ. El sólido se seca mediante liofilización. 1.96 g (78 %)

^{1}H–RMN (300 MHz, DMSO-d_6, δ): 10.45 (s, 1H); 9.11 (d, ^4J = 2.02 Hz, 1H); 8.88 (d, ^4J = 2.24 Hz, 1H); 8.42 (dd, 2H); 8.36 (dd, ^3J = 8.30 Hz, ^4J = 2.02 Hz, 1H); 8.23 (dd, ^3J = 8.62 Hz, ^4J = 2.24 Hz, 1H); 7.89 (d, ^3J = 7.33 Hz, 2H); 7.71 (d, ^3J = 7.60 Hz, 2H); 7.41 (t, ^3J = 6.97 Hz, 2H); 7.33 (t, ^3J = 7.51 Hz, 2H); 4.32 (d, ^3J = 6.08 Hz, 2H); 4.23 (t, ^3J = 6.08 Hz, 1H); 3.87 (d, ^2J = 5.07 Hz, 2H).

^{13}C–RMN (75 MHz, DMSO-d_6, δ): 168.79 (C), 166.05 (C), 157.99 (C), 156.54 (C), 150.02 (CH), 148.65 (C), 143.74, 140.10 (CH), 138.07 (C), 136.61 (CH), 127.55 (CH), 127.00 (CH), 126.61 (CH), 125.82 (C), 125.15 (CH), 121.60 (CH), 120.04 (CH), 119.61 (CH), 65.69 (CH_2), 46.54 (CH), 44.00 (CH_2).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{28}H_{23}N_4O_5]^+$ 495.2; encontrado, 495.2

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 24.9´; $[M+H]^+$ 495.2

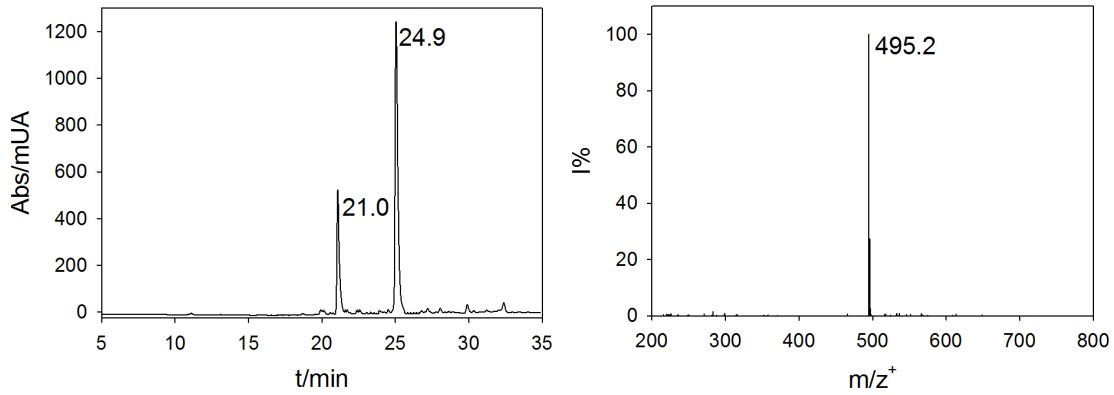


Figura 5.41: izquierda, cromatograma del compuesto **13**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 24.9´.

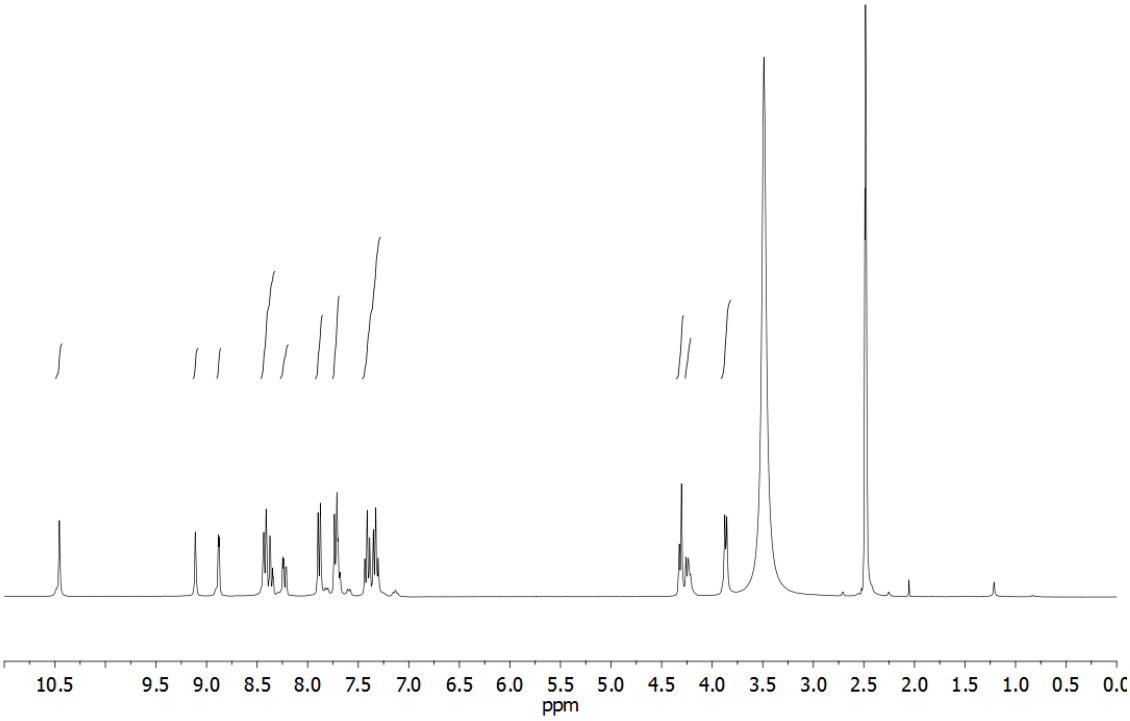


Figura 5.42: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **13**.

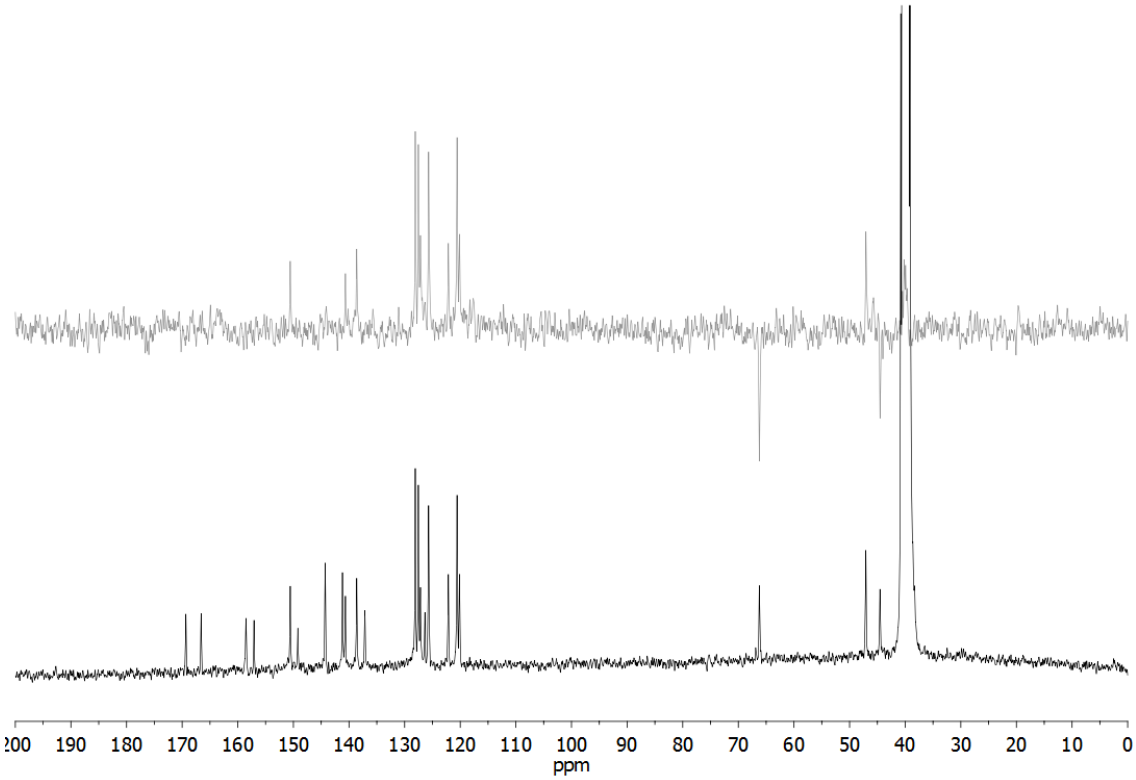
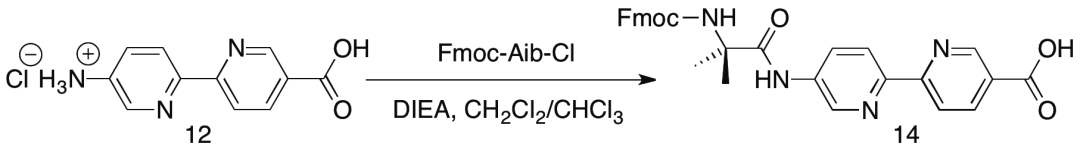


Figura 5.43: Arriba, espectro DEPT-135 del compuesto**13**; abajo, espectro de ^{13}C-RMN del mismo compuesto.

5.3.2.7 Ácido 5´-(2-(((9H-fluoren-9-il))carbonilamino)-2-metil propanamida)-2,2`-bipiridil-5-carboxílico Fmoc-Aib-5Bpy-OH (14)



En un balón de reacción de 100 mL se disuelven 2.2 g de Fmoc-Aib-Cl (6.4 mmol) en 20 mL de $CHCl_3$. Sobre esta disolución se añaden 1.3 g (5.1 mmol, 0.8 equivalentes) de compuesto **12** y 4 mL de DIEA. La mezcla se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar durante 16 h. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se elimina a presión reducida. El sólido formado se suspende en 15 mL de MeOH. La mezcla se agita unos minutos y a continuación se elimina el disolvente a presión reducida. Posteriormente el sólido se lava con 50 mL de CH_3CN al 0.1 % de TFA. La mezcla se agita y el sólido (sólido A) se separa por centrifugación. Por otra parte, a la disolución de CH_3CN se le añaden 20 mL de H_2O MQ en pequeñas fracciones, el sólido (sólido B) formado se separa mediante centrifugación. Los sólidos A y B se juntan y se le realizan lavados con una mezcla 1:1 H_2O: CH_3CN (3 × 10 mL) y un lavado final con 20 mL de H_2O MQ. El sólido se seca mediante liofilización. 2.21 g (83 %).

^{1}H–RMN (300 MHz, DMSO-d^6, δ): 10.50 (s, 1H); 9.15 (dd, ^4J = 2.1 Hz, ^5J = 0.9 Hz, 1H); 8.90 (dd, ^4J = 2.1 Hz, ^5J = 0.8 Hz 1H); 8.45 (dd, 2H); 8.37 (dd, 1H), 8.38 (dd, 1H); 8.26(dd, 2H); 7.90 (d, 2H); 7.0 (d, 2H); 7.40 (td, 2H); 7.35 (td, 2H); 4.30 (m, 4H); 1.25 (t, 3H).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{30}H_{27}N_4O_5]^+$ 523.2; encontrado, 523.2

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 34.0´; $[M+H]^+$ 523.1

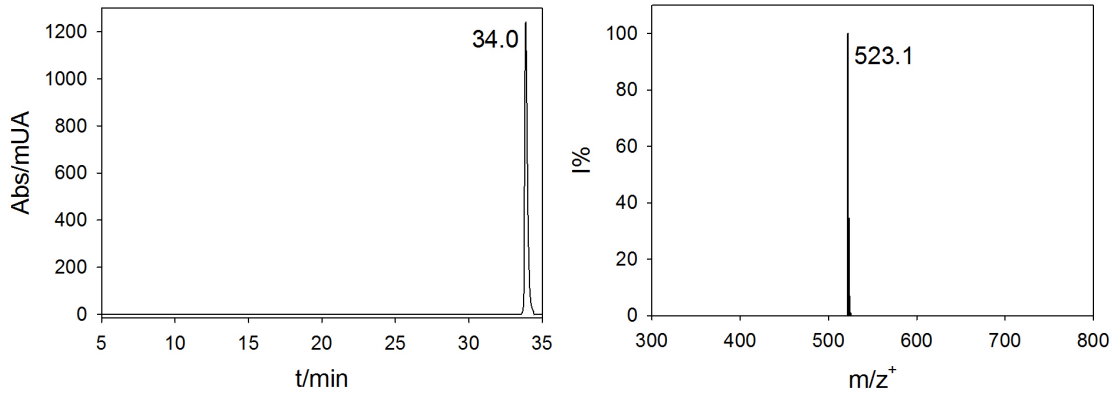
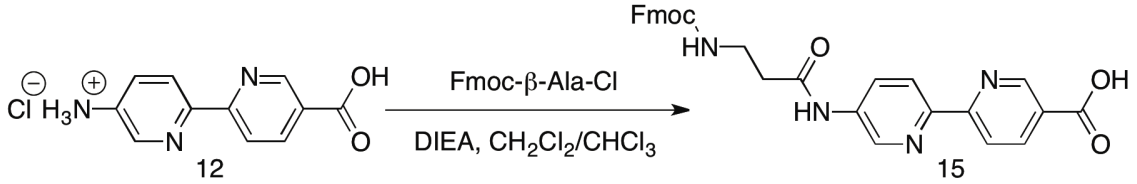


Figura 5.44: izquierda, cromatograma del compuesto **14**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 34.0´.

5.3.2.8 Ácido 5´-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino) propanamida)-2,2`-bipiridil-5-carboxílico Fmoc-β-Ala-4Bpy-OH (15)



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 2.3 g de Fmoc-β-Ala-Cl (6.4 mmol) en 20 mL de CH_2Cl_2. Sobre esta disolución se añaden 1.3 g (5.1 mmol, 0.8 equivalentes) de compuesto **12** y 4 mL de DIEA. La mezcla se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar durante 16 h. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se elimina a presión reducida. El sólido formado se suspende en 15 mL de MeOH. La mezcla se agita unos minutos y a continuación se elimina el disolvente a presión reducida. Posteriormente el sólido se lava con 50 mL de CH_3CN al 0.1 % de TFA. La mezcla se agita y el sólido (sólido A) se separa por centrifugación. Por otra parte, a la disolución de CH_3CN se le añaden 20 mL de H_2O MQ en pequeñas fracciones, el sólido (sólido B) formado se separa mediante centrifugación. Ambos sólidos se juntan y se le realizan lavados con una mezcla 1:1 H_2O: CH_3CN (3 × 10 mL) y un lavado final con 20 mL de H_2O MQ. El sólido se seca mediante liofilización. 2.31 g (89 %).

^{1}H–RMN (300 MHz, DMSO-d_6, δ): 10.44 (s, 1H); 9.13 (d, ^4J = 1.36 Hz, 1H); 8.89 (d, ^4J = 2.12 Hz, 1H); 8.42 (m, 3H); 8.25(dd, ^3J = 8.48 Hz, ^4J = 2.12 Hz, 1H); 7.88 (d, ^3J = 7.46 Hz, 2H); 7.67 (d, ^3J =

7.38 Hz, 2H); 7.49 (t, ^3J = 5.34 Hz, **NH**); 7.40 (t, ^3J = 7.21 Hz, 2H); 7.30 (t, ^3J = 7.38 Hz, 2H); 4.30 (d, ^3J = 6.95 Hz, 2H); 4.21 (t, ^3J = 6.95 Hz, 1H) 3.32 (t, ^3J = 6.70 Hz, 2H); 2.60 (t, ^3J = 6.70 Hz, 2H).

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-d_6, δ): 169.76 (C), 168.62 (C), 157.23 (C), 150.94 (C), 149.21 (C), 144.74 (C), 143.47 (C), 142.27 (C), 141.59 (C), 140.28 (CH), 138.29 (CH), 138.08 (CH), 129.73 (CH), 128.09 (CH), 125.96 (CH), 122.14 (CH), 120.87 (CH), 120.79 (CH), 118.73 (CH), 110.34 (CH), 67.38 (CH_2), 63.77 (CH_2), 47.62 (CH), 41.71 (CH_2).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{28}H_{23}N_4O_5]^+$ 509.2; encontrado, 509.2

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 26.9′; $[M+H]^+$ 509.1

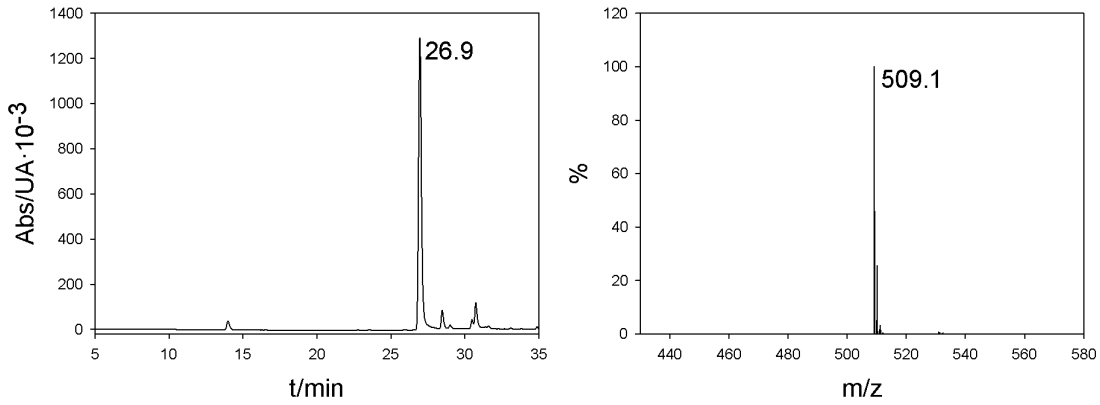


Figura 5.45: izquierda, cromatograma del compuesto **15**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 26.9′.

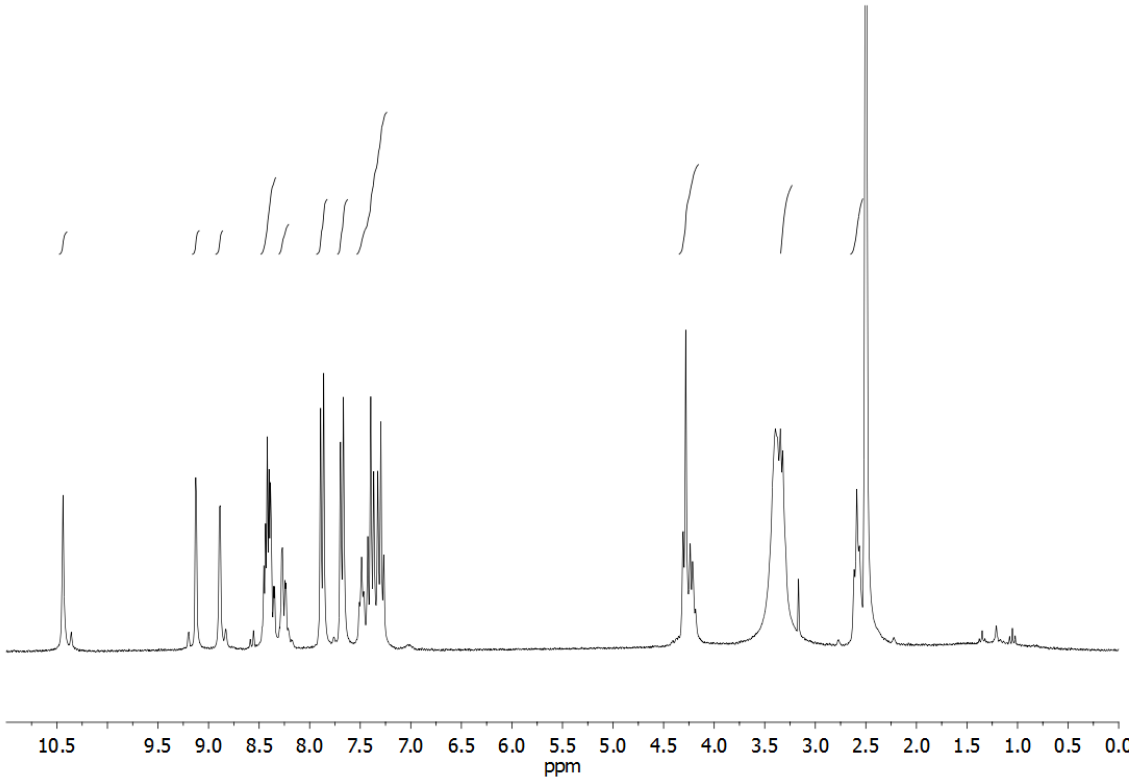


Figura 5.46: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **15**.

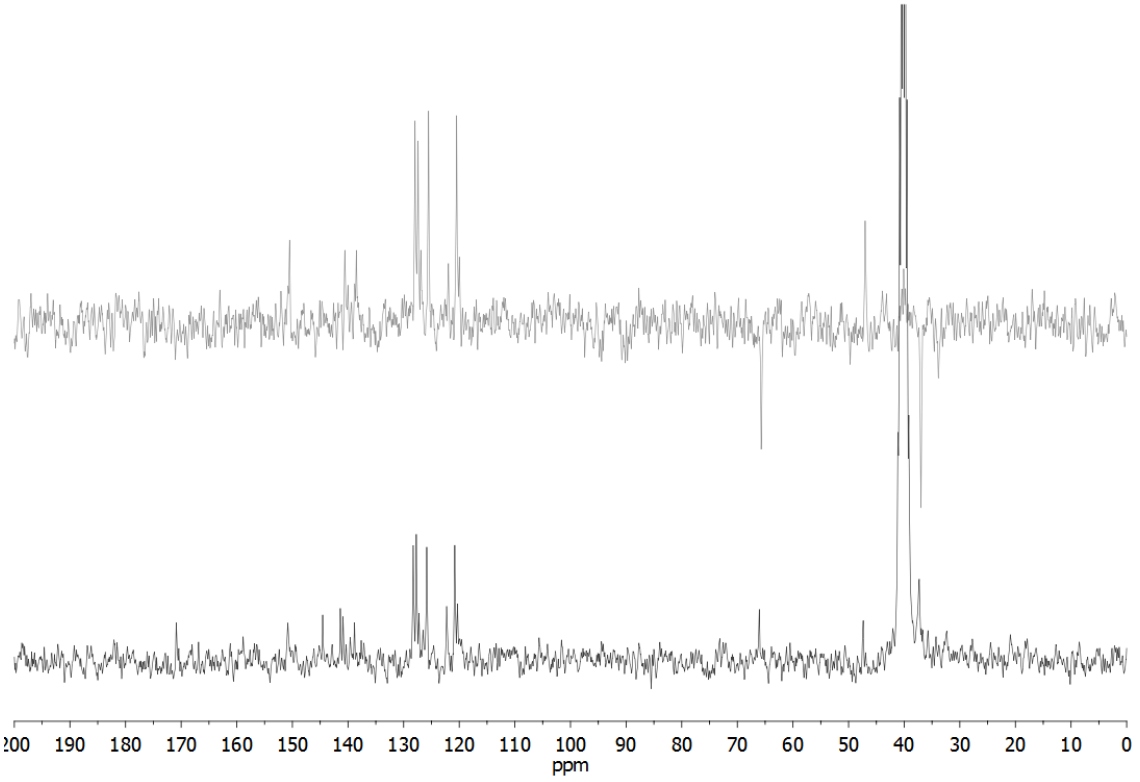
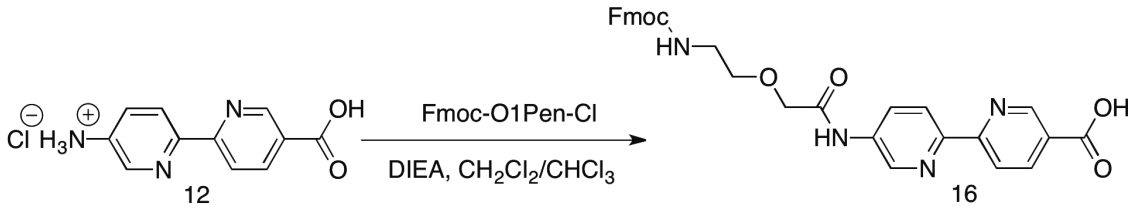


Figura 5.47: Arriba, espectro DEPT-135 del compuesto **15**; abajo, espectro de ^{13}C-RMN del mismo compuesto.

5.3.2.9 Ácido 5´-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)etoxi acetamida)-2,2`-bipiridil-5-carboxílico Fmoc-O1Pen-5Bpy-OH (16)



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disuelven 2.43 g de Fmoc-O1Pen-Cl (6.4 mmol) en 20 mL de CH_2Cl_2. Sobre esta disolución se añaden 1.95 g (5.1 mmol, 1.2 equivalentes) de compuesto **12** y 4 mL de DIEA. La mezcla se agita a temperatura ambiente ambiente bajo atmósfera de Ar durante 16 h. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se elimina a presión reducida. El sólido formado se suspende en 15 mL de MeOH. La mezcla se agita unos minutos y a continuación se elimina el disolvente a presión reducida. Posteriormente el sólido se lava con 50 mL de CH_3CN al 0.1 % de TFA. La mezcla se agita y el sólido (sólido A) se separa por centrifugación. Por otra parte, a la disolución de CH_3CN se le añaden 20 mL de H_2O MQ en pequeñas fracciones, el sólido (sólido B) formado se separa mediante centrifugación. Ambos sólidos se juntan y se le realizan lavados con una mezcla 1:1 H_2O: CH_3CN (3 × 10 mL) y un lavado final con 20 mL de H_2O MQ. El sólido se seca mediante liofilización. 2.94 g (85 %).

^{1}H–RMN (300 MHz, DMSO-d_6, δ): 10.07 (s, 1H); 9.11 (d, ^4J = 1.91 Hz, 1H); 8.95 (d, ^4J = 2.38 Hz, 1H); 8.41 (d, ^3J = 8.29 Hz, 1H); 8.40 (d, ^3J = 8.76 Hz, 1H), 8.29 (dd, ^3J = 8.29 Hz, ^5J = 1.91 Hz, 1H); 7.85(dd, ^3J = 8.76 Hz, ^5J = 2.38 Hz, 1H); 7.68 (d, ^3J = 7.88 Hz, 2H); 7.0 (d, ^3J = 6.98 Hz, 2H); 7.38 (t, ^3J = 6.98 Hz, 2H); 7.30 (t, ^3J = 7.66 Hz, 2H); 4.30 (d, ^3J = 7.21 Hz, 2H); 4.21 (t, ^3J = 7.21 Hz, 1H); 4.13 (s, 2H); 3.56 (t, ^3J = 6.14 Hz, 2H) 3.26 (t, ^3J = 6.14 Hz, 2H).

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-d_6, δ): 169.06 (C), 166.27 (C), 158.24 (C), 150.21 (C), 144.74 (C), 143.47 (C), 142.27 (C), 140.99 (CH), 140.28 (C), 138.29 (C), 138.01 (CH), 127.75 (CH), 127.59 (CH), 127.12 (CH), 125.38 (CH), 125.04 (CH), 121.37 (CH), 120.00 (CH), 119.61 (CH), 70.16 (CH_2), 70.07 (CH_2), 65.33 (CH_2), 46.73 (CH), 40.05 (CH_2).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{30}H_{27}N_4O_6]^+$ 539.2; encontrado, 539.0

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 24.5´; $[M+H]^+$ 539.0

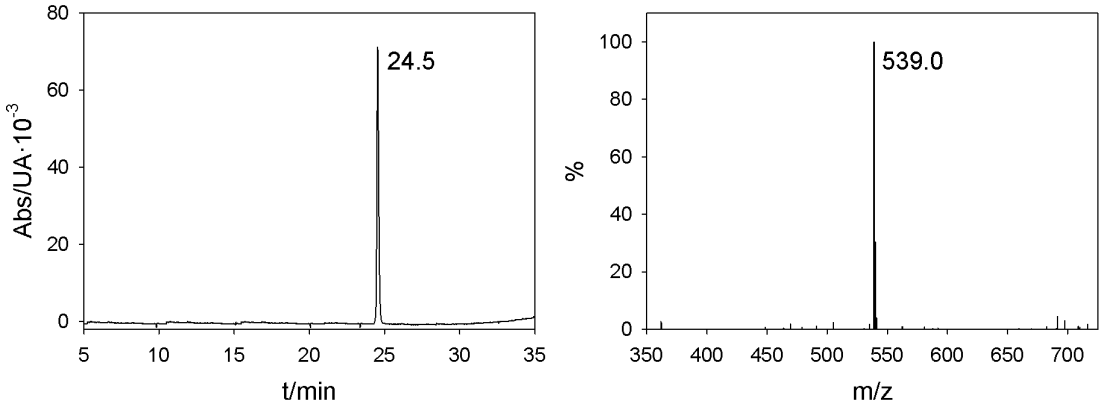


Figura 5.48: izquierda, cromatograma del compuesto **16**; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 24.5´.

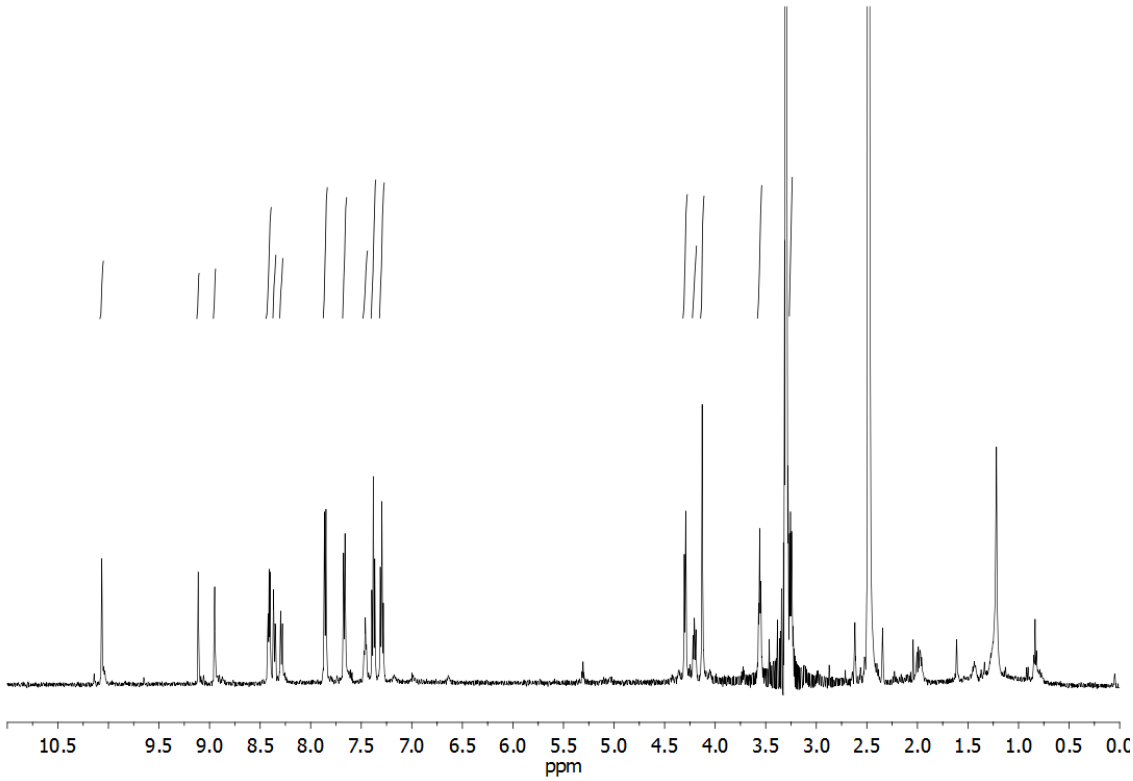


Figura 5.49: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente al compuesto **16**.

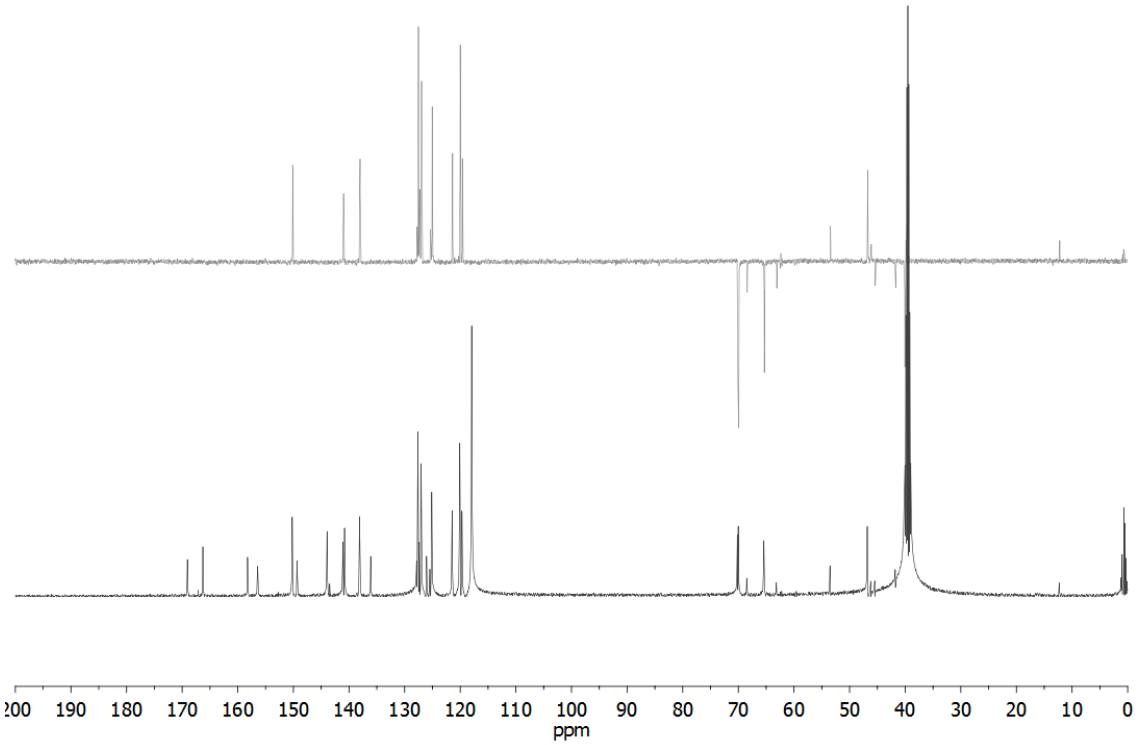
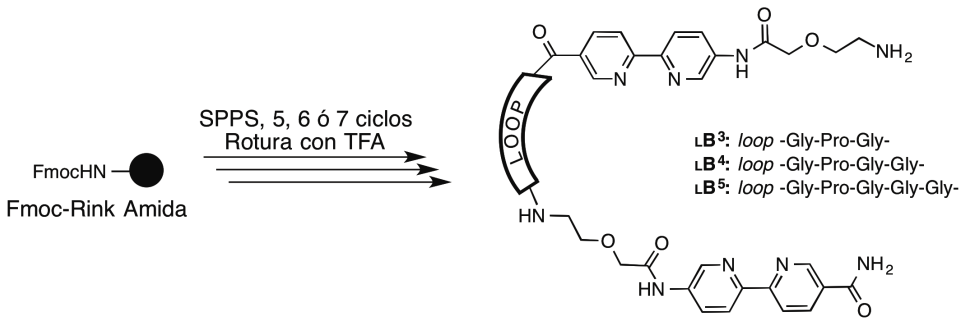


Figura 5.50: Arriba, espectro DEPT-135 del compuesto **16**; abajo, espectro de ^{13}C-RMN del mismo compuesto.

5.3.3 SÍNTESIS DE LOS PÉPTIDOS Y METALOPÉPTIDOS DERIVADOS DEL AMINOÁCIDO FMOC-O1PEN-5BPY-OH (16)

5.3.3.1 Síntesis de los ligandos bisbipiridínicos LB³, DB³, LB⁴ y LB⁵



La síntesis de los ligandos bisbipiridínicos se llevó a cabo utilizando la metodología explicada en el punto 5.2.9, siguiendo la estrategia Fmoc/^{t}Bu.

Partimos de 150 mg de resina Fmoc-Rinkamida-AM (0.54 mmol/g) (0.081 mmol) siguiendo la siguiente secuencia de acoplamientos:

LB³: *O1Pen-5Bpy, Gly$_2$, (L)-Pro, Gly, O1Pen-5Bpy*.

DB³: *O1Pen-5Bpy, Gly$_2$, (D)-Pro, Gly, O1Pen-5Bpy*.

LB⁴: *O1Pen-5Bpy, Gly$_3$, (L)-Pro, Gly$_2$, Gly$_1$, O1Pen-5Bpy*.

LB⁵: *O1Pen-5Bpy, Gly$_4$, (L)-Pro, Gly$_3$, Gly$_2$, Gly$_1$, O1Pen-5Bpy*.

Una vez realizados todos los acoplamientos desprotegemos el grupo Fmoc del último residuo de la secuencia y procedemos a la rotura de la resina se realiza con la mezcla estándar (TIS, TFA, H_2O y CH_2Cl_2). Una vez liberados de la resina los péptidos fueron precipitados en Et_2O y centrifugados. Se secaron a vacío y se purificaron mediante RP-HPLC a escala semipreparativa.

- LB⁵: 50 mg, 60 % para una escala de 0.081 mmol

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{45}H_{53}N_{15}O_{12}]^+$995.40; encontrado, 995.40

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 10.6´; $[M+H]^+$ 995.40, $[M+2H]^{2+}$ 498.10

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm ($\varepsilon/M^{-1}\ cm^{-1}$) = 309 (56566).

- **LB⁴**: 43 mg, 61 % para una escala de 0.081 mmol

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{43}H_{50}N_{14}O_{11}]^+$ 939.38; encontrado, 939.38

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 10.3´; $[M+H]^+$ 939.40, $[M+2H]^{2+}$ 470.10

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm ($\varepsilon/M^{-1}\ cm^{-1}$) = 309 (56566).

- **LB³**: 51 mg, 72 % para una escala de 0.081 mmol

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{41}H_{47}N_{13}O_{10}]^+$ 882.4; encontrado, 882.4

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 10.2´; $[M+H]^+$ 882.10, $[M+2H]^{2+}$ 441.00

CD (H_2O) λ_{max}, nm ($\theta/\ cm^2\ dmol^{-1}$) = 297.0 ($1.78e^4$), 331.0 ($-1.66e^4$).

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm ($\varepsilon/M^{-1}\ cm^{-1}$) = 309 (56566).

- **DB³**: 46 mg, 65 % para una escala de 0.081 mmol

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{41}H_{47}N_{13}O_{10}]^+$ 882.4; encontrado, 882.4

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 10.6´; $[M+H]^+$ 882.10, $[M+2H]^{2+}$ 441.00

CD (H_2O) λ_{max}, nm ($\theta/\ cm^2\ dmol^{-1}$) = 297.0 ($-1.77e^4$), 331.0 ($1.65e^4$).

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm ($\varepsilon/M^{-1}\ cm^{-1}$) = 309 (56566).

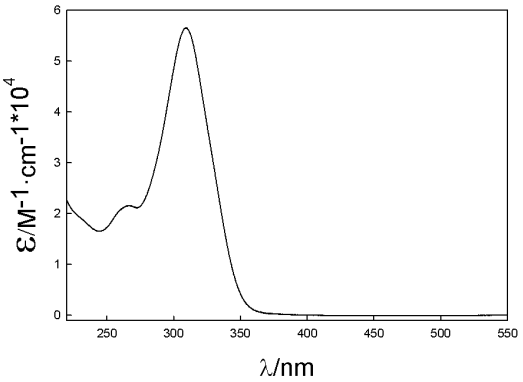


Figura 5.51: Espectro UV/Vis de los ligandos bisbipiridínicos.

5.3.3.2 Síntesis de los metalopéptidos derivados de los ligandos bisbipiridínicos LB³, DB³, LB⁴ y LB⁵

Los metalopéptidos bisbipiridínicos fueron obtenidos mediante la adición de alícuotas del correspondiente catión metálico divalente sobre una disolución de ligando LB^n tal y como se indica a continuación.

Metalopéptidos de Co^{II}

Se adicionan 1.2 equivalentes de $Co(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ en 1 mL de H_2O MQ sobre una disolución de 13 μM de ligando LB^n en PBS 10 mM pH 5.1.

- $[Co(LB^5)(H_2O)_2]^{2+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{45}H_{58}CoN_{15}O_{14}]^+$ 1090,35; encontrado, 1090.3

- $[Co(LB^4)(H_2O)_2]^{2+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{43}H_{54}CoN_{14}O_{13}]^+$ 1032.33; encontrado, 1032.3

- $[Co(LB^3)(H_2O)_2]^{2+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{41}H_{50}CoN_{13}O_{12}]^+$ 974.31; encontrado, 974.3

CD (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$) = 315.5 ($2.31e^4$), 339.6 ($-3.34e^4$).

- $[Co(DB^3)(H_2O)_2]^{2+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{41}H_{50}CoN_{13}O_{12}]^+$ 974.31; encontrado, 974.3

CD (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$) = 315.5 ($-2.27e^4$), 339.6 ($3.33e^4$).

Metalopéptidos de Ni^{II}

Se adicionan 1.2 equivalentes de $Ni(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ en 1 mL de H_2O MQ sobre una disolución de 13 μM de ligando LB^n en PBS 10 mM pH 5.1.

- $[Ni(LB^5)(H_2O)_2]^{2+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{45}H_{58}N_{15}NiO_{14}]^+$ 1089.36; encontrado, 1089.4

- $[Ni(LB^4)(H_2O)_2]^{2+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{43}H_{54}N_{14}NiO_{13}]^+$ 1031.33; encontrado, 1031.4

- $[Ni(LB^3)(H_2O)_2]^{2+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{41}H_{50}N_{13}NiO_{12}]^+$ 973.39; encontrado, 973.4

CD (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$) = 317.4 ($2.40e^4$), 341.5 ($-3.90e^4$).

- $[Ni(DB^3)(H_2O)_2]^{2+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{41}H_{50}N_{13}NiO_{12}]^+$ 973.39; encontrado, 973.4

CD (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$) = 317.4 ($-2.37e^4$), 341.5 ($3.87e^4$).

Metalopéptidos de Zn^{II}

Se adicionan 1.2 equivalentes de una disolución 0.1 M de $ZnSO_4$ sobre una disolución de 13 μM de ligando LB^n en PBS 10 mM pH 5.1.

- $[Zn(LB^5)]^{2+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{45}H_{52}N_{15}O_{12}Zn]^+$ 1059.33; encontrado, 1059.31

- $[Zn(LG^4)]^{2+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{43}H_{49}N_{14}O_{11}Zn]^+$ 1002.31; encontrado, 1002.21

- $[Zn(LB^3)]^{2+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{41}H_{46}N_{13}O_{10}Zn]^+$ 945.29; encontrado, 945.19

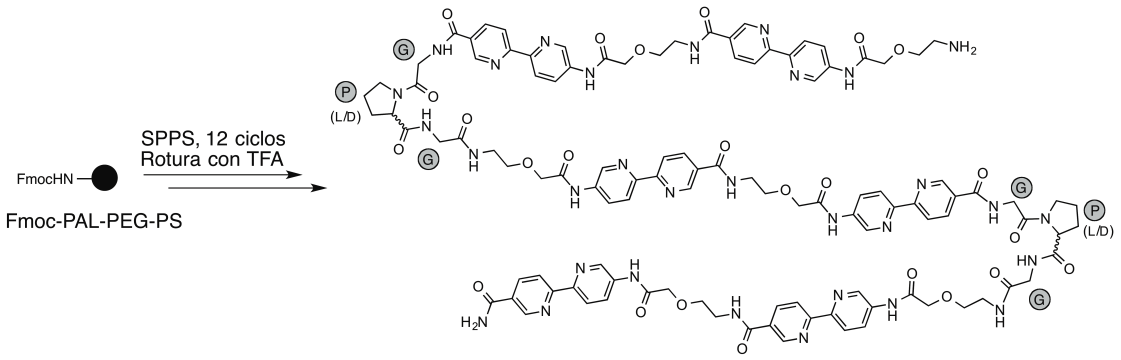
CD (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$) = 315.2 ($2.61e^4$), 339.4 ($-4.51e^4$).

- $[Zn(DB^3)]^{2+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{41}H_{46}N_{13}O_{10}Zn]^+$ 945.29; encontrado, 945.19

CD (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$) = 315.2 ($-2.62e^4$), 339.4 ($4.49e^4$).

5.3.3.3 Síntesis de los helicandos LLH y DDH



La síntesis de los helicandos peptídicos se llevó a cabo utilizando la metodología explicada en el punto 5.2.9, siguiendo la estrategia Fmoc/tBu.

Partimos de 350 mg de resina Fmoc-PAL-PEG-PS (0.22 mmol/g) (0.077 mmol) siguiendo la siguiente secuencia de acoplamientos:

LLH: *O1Pen-5Bpy, O1Pen-5Bpy, Gly$_4$, (L)-Pro, Gly$_3$, O1Pen-5Bpy, O1Pen-5Bpy, Gly$_2$, (L)-Pro, Gly$_1$, O1Pen-5Bpy, O1Pen-5Bpy*.

DDH: *O1Pen-5Bpy, O1Pen-5Bpy, Gly$_4$, (D)-Pro, Gly$_3$, O1Pen-5Bpy, O1Pen-5Bpy, Gly$_2$, (D)-Pro, Gly$_1$, O1Pen-5Bpy, O1Pen-5Bpy*.

Una vez realizados todos los acoplamientos desprotegemos el grupo Fmoc del último residuo de la secuencia y procedemos a la rotura de la resina se realiza con la mezcla (TIS, TFA, H_2O y CH_2Cl_2). Una vez liberados de la resina los péptidos fueron precipitados en Et_2O y centrifugados. Se secaron a vacío y se purificaron mediante RP-HPLC a escala semipreparativa.

- LLH: 89 mg, 52 % para una escala de 0.077 mmol

MS-ESI (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{108}H_{114}N_{31}O_{24}]^+$ 2227.86; encontrado, $[M+2H]^{2+}$1114.7; $[M+3H]^{3+}$ 743.2; $[M+4H]^{4+}$ 557.8; $[M+5H]^{5+}$ 446.6; $[M+6H]^{6+}$372.0.

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 16.6´; $[M+2H]^{2+}$ 1114.7, $[M+3H]^{3+}$ 743.2, $[M+4H]^{4+}$ 557.8, $[M+5H]^{5+}$ 446.6, $[M+6H]^{6+}$372.0

CD (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$) = 289 ($8{,}1\cdot e^5$), 320 ($-1{,}9\cdot e^6$).

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm (ε/M^{-1} cm^{-1}) = 304 (185160).

- DDH: 74 mg, 43 % para una escala de 0.077 mmol

MS-ESI (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{108}H_{114}N_{31}O_{24}]^+$ 2227.86; encontrado, $[M+2H]^{2+}$1114.7; $[M+3H]^{3+}$ 743.2; $[M+4H]^{4+}$ 557.8; $[M+5H]^{5+}$ 446.6.

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 16.7´; $[M+2H]^{2+}$ 1114.7, $[M+3H]^{3+}$ 743.2, $[M+4H]^{4+}$ 557.8, $[M+5H]^{5+}$

CD (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$) = 289 ($-8{,}6\cdot e^6$), 324 ($1{,}89\cdot e^6$).

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm ($\varepsilon/M^{-1}\ cm^{-1}$) = 304 (185160).

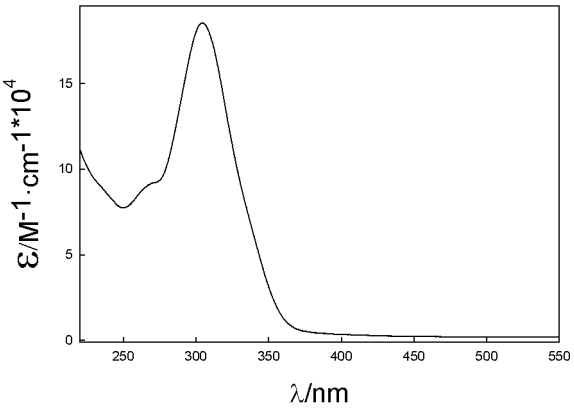


Figura 5.52: Espectro UV/Vis de los helicandos **LLH** y **DDH**.

5.3.3.4 Síntesis de los helicatos dinucleares de Fe(II) $[Fe_2(LLH)]^{4+}$ y $[Fe_2(DDH)]^{4+}$

A una disolución de 20 μM de **LLH** (o **DDH**) en agua tamponada a pH 5.6 con buffer PBS (10 mM)se le añaden 2 equivalentes de una disolución 10 mM de $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2{\cdot}6H_2O$. La disolución resultante se purifica en HPLC con disolventes H_2O y CH_3CN-0.1 %TFA con un gradiente 5-40 %B.

- $[Fe_2(LLH)]^{4+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-3H]^+$ calculado para, $[C_{108}Fe_2H_{110}N_{31}O_{24}]^+$ = 2340.47; encontrado, 2340.5

HPLC-MS (5-40 %B): t_R = 13.6´

CD (H_2O) λ_{max}, nm ($\theta/\ cm^2\ dmol^{-1}$) = 335 (-158439), 302 (112427).

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm ($\varepsilon/M^{-1}\ cm^{-1}$) = 324 (199398), 540 (12919).

- $[Fe_2(DDH)]^{4+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-3H]^+$ calculado para, $[C_{108}Fe_2H_{110}N_{31}O_{24}]^+$ = 2340.47; encontrado, 2340.3

HPLC-MS (5-40 %B): t_R = 13.6´

CD (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$) = 304 (-103328), 330 (150694).

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm (ε/M^{-1} cm^{-1}) = 324 (199398), 540 (12919).

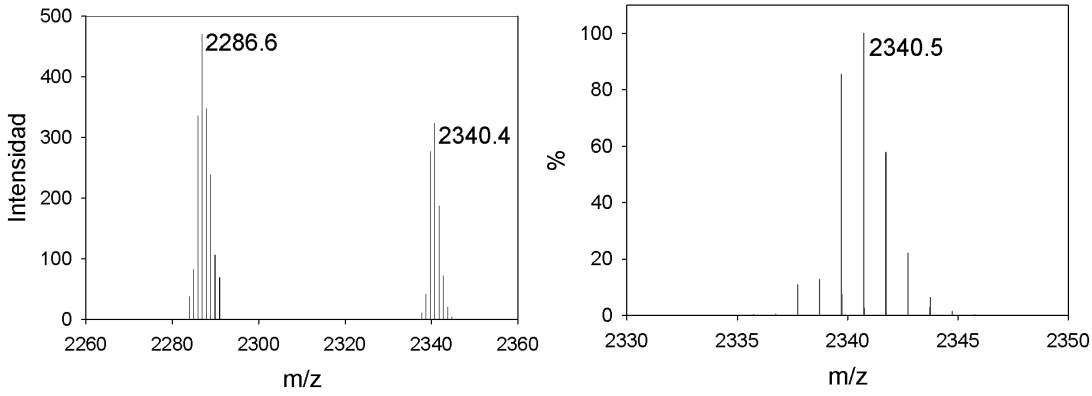


Figura 5.53: Izquierda, espectro de MALDI-TOF correspondiente al helicato dinuclear de Fe(II) $[Fe_2(\mathbf{LLH})]^{4+}$; a la derecha, simulación del perfil isotópico llevado a cabo con el programa Isopro 3.0.

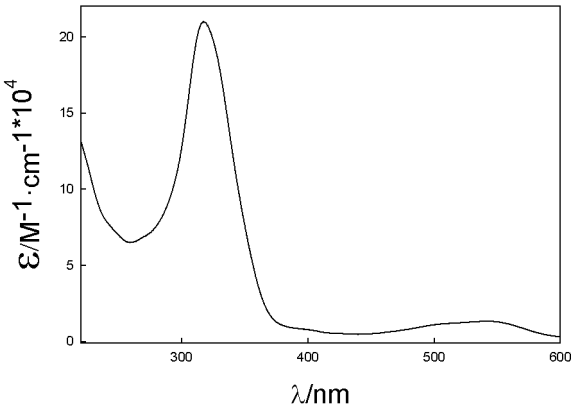


Figura 5.54: Espectro UV/Vis de los helicatos dinucleares de Fe(II).

5.3.3.5 Síntesis de los helicatos dinucleares de Co(II) $[Co_2(\mathbf{LLH})]^{4+}$ y $[Co_2(\mathbf{DDH})]^{4+}$

A una disolución de 20 μM de **LLH** (o **DDH**) en agua tamponada a pH 5.6 con buffer PBS (10 mM)se le añaden 2 equivalentes de una disolución 10 mM de $Co(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$. La disolución resultante se purifica en HPLC con disolventes H_2O y CH_3CN-0.1 %TFA con un gradiente 5-40 %.

- $[Co_2(LLH)]^{4+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-3H]^+$ calculado para, $[C_{108}Co_2H_{110}N_{31}O_{24}]^+$ 2346.72; encontrado, 2346.6

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm ($\varepsilon/M^{-1}\,cm^{-1}$) = 324 (189960).

- $[Co_2(DDH)]^{4+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-3H]^+$ calculado para, $[C_{108}Co_2H_{110}N_{31}O_{24}]^+$ 2346.72; encontrado, 2346.4

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm ($\varepsilon/M^{-1}\,cm^{-1}$) = 324 (189960).

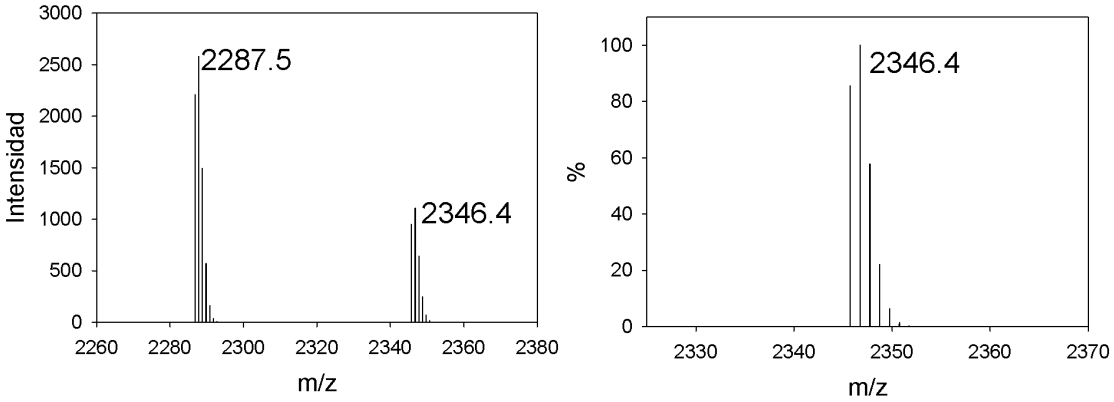


Figura 5.55: Izquierda, espectro de MALDI-TOF correspondiente al helicato dinuclear de Co(II) $[Co_2(LLH)]^{4+}$; a la derecha, simulación del perfil isotópico llevado a cabo con el programa Isopro 3.0.

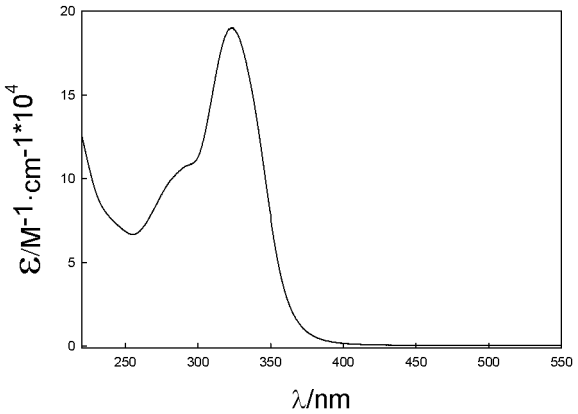
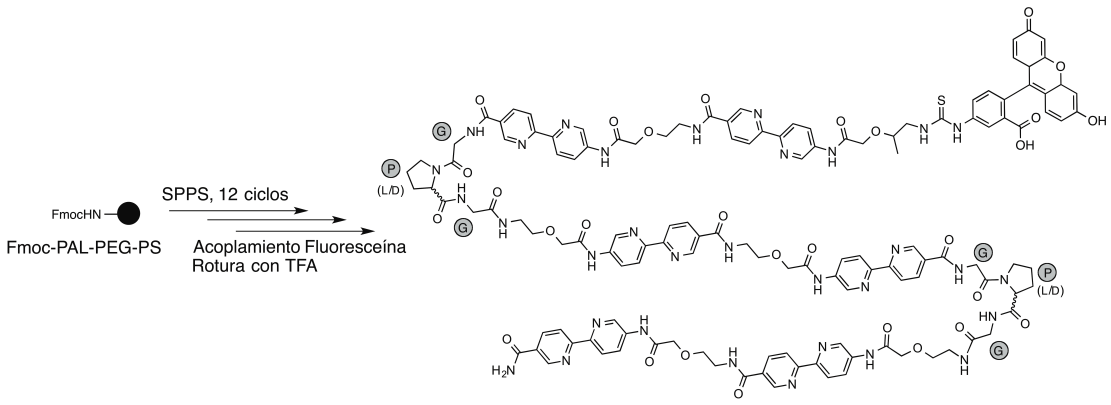


Figura 5.56: Espectro UV/Vis de los helicatos dinucleares de Co(II).

5.3.3.6 Síntesis de los helicandos LLH-F y DDH-F



La síntesis de los helicandos peptídicos se llevó a cabo utilizando la metodología explicada en el punto 5.2.9, siguiendo la estrategia Fmoc/tBu.

Partimos de 350 mg de resina Fmoc-PAL-PEG-PS (0.22 mmol/g) (0.077 mmol) siguiendo la siguiente secuencia de acoplamientos:

LLH: *O1Pen-5Bpy, O1Pen-5Bpy, Gly, (L)-Pro, Gly, O1Pen-5Bpy, O1Pen-5Bpy, Gly, (L)-Pro, Gly, O1Pen-5Bpy, O1Pen-5Bpy, Flureseína isotiocianato*..

DDH: *O1Pen-5Bpy, O1Pen-5Bpy, Gly, (D)-Pro, Gly, O1Pen-5Bpy, O1Pen-5Bpy, Gly, (D)-Pro, Gly, O1Pen-5Bpy, O1Pen-5Bpy, Flureseína isotiocianato*.

Una vez realizados todos los acoplamientos de los aminoácidos acomplamos el fluoróforo funcionalizado en su posición 5 con un grupo isotiocianato que permite su unión covalente mediante la formación de un grupo tiourea (5.7 mg, 9.6 μmol) en 1.5 mL de DIEA/DMF 0.19 M. Posteriormente procedemos a la rotura de la resina se realiza con la mezcla (TIS, TFA, H_2O y CH_2Cl_2). Una vez liberados de la resina los péptidos fueron precipitados en Et_2O y centrifugados. Se secaron a vacío y se purificaron mediante RP-HPLC a escala semipreparativa.

- LLH-F: 49 mg, 57 % para una escala de 0.047 mmol

MS-ESI (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{129}H_{126}N_{32}O_{29}S]^+$ 2618,91; encontrado, $[M+2H]^{2+}$1310,5; $[M+3H]^{3+}$ 873.9; $[M+4H]^{4+}$ 655.7

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 22.1´; $[M+2H]^{2+}$1310,5; $[M+3H]^{3+}$ 873.9; $[M+4H]^{4+}$ 655.7

- **DDH-F:** 54 mg, 53 % para una escala de 0.047 mmol

MS-ESI (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{129}H_{126}N_{32}O_{29}S]^+$ 2618,91; encontrado, $[M+2H]^{2+}$1310,5; $[M+3H]^{3+}$ 873.9; $[M+4H]^{4+}$ 655.7

HPLC-MS (5-75 %B): t_R = 22.1´; $[M+2H]^{2+}$1310,5; $[M+3H]^{3+}$ 873.9; $[M+4H]^{4+}$ 655.7

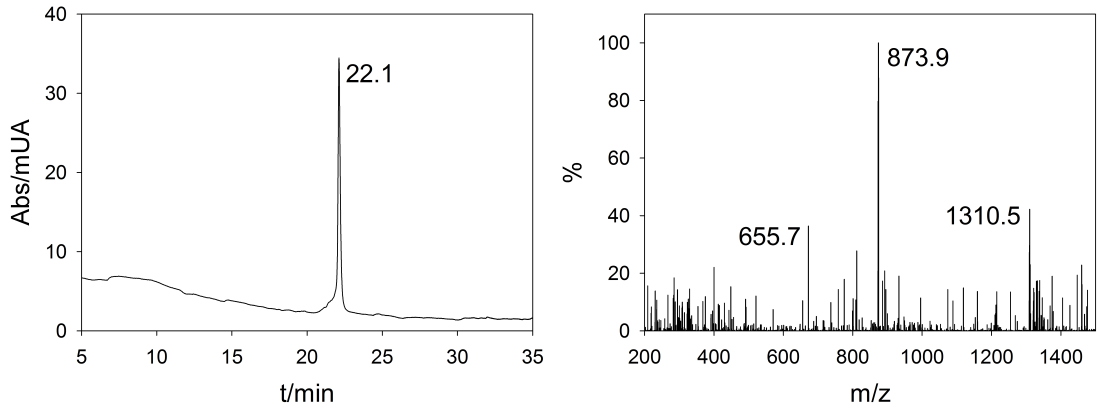


Figura 5.57: izquierda, cromatograma del compuesto helicando **LLH**-F; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 22.1´.

5.3.3.7 Síntesis de los helicatos dinucleares de Fe(II) $[Fe_2(LLH\text{-}F)]^{4+}$ y $[Fe_2(DDH\text{-}F)]^{4+}$

A una disolución de 20 μM de **LLH**-F (o **DDH**-F) en agua tamponada a pH 7.2 con buffer PBS (10 mM) se le añaden 2 equivalentes de una disolución 10 mM de $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2{\cdot}6H_2O$.

- $[Fe_2(LLH\text{-}F)]^{4+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-3H]^+$ calculado para, $[C_{129}H_{123}Fe_2N_{32}O_{29}S]^+$ = 2727,78; encontrado, 2327.5

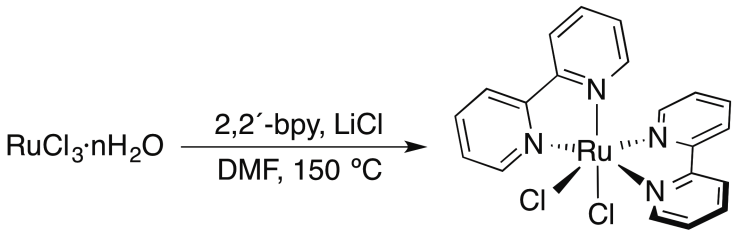
- $[Fe_2(DDH\text{-}F)]^{4+}$

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-3H]^+$ calculado para, $[C_{129}H_{123}Fe_2N_{32}O_{29}S]^+$ = 2727,78; encontrado, 2327.5

5.3.4 SÍNTESIS DE LOS PRECURSORES DE RUTENIO(II)

La síntesis de los precursores de rutenio se llevó a cabo siguiendo las referencias bibliográficas indicadas con modificaciones puntuales

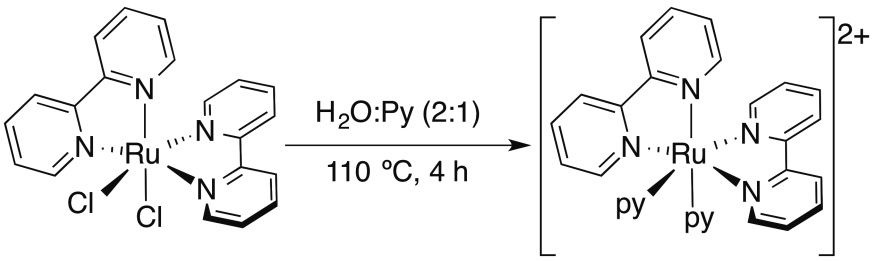
5.3.4.1 Síntesis de $[Ru(bpy)_2Cl_2]$



Un balón de reacción de 100 mL que contiene 2.12 g de $RuCl_3 \cdot 3H_2O$ (8.05 mmol), 2.54 g de 2,2´-bipiridina (16.2 mmol, 2.02 equiv) y 2.20 g de LiCl (0.54 mmol) disueltos en 50 mL de DMF, se calienta a 150 ºC durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, se deja enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se enfría a 0 ºC durante 24 h. La mezcla resultante se filtra y el sólido microcristalino verde oscuro se lava con H_2O MQ (3 × 30 mL) y EtOH (2 × 10 mL). El sólido se seca a vacío.[336] 2.53 g (65 %)

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M\text{-}Cl+H_2O]^+$ calculado para, $[C_{20}H_{18}ClN_4ORu]^+$ 466.9; encontrado, 466.6

5.3.4.2 Síntesis de $[Ru(bpy)_2(py)_2]Cl_2$



En un balón de reacción de 100 mL que contiene 1.12 g de [Ru(bpy)2Cl2], se adicionan 60 mL una mezcla H_2O:Py (2:1). La mezcla se calienta a 110 ºC durante 4 h. Posteriormente, el disolvente se elimina a presión reducida y el sólido resultante se disuelve en 20 mL de MeOH, sobre esta disolución de adicionan 50 mL de éter etílico precipitando un

sólido rojo brillante. La mezcla se enfría a 0 ºC durante 1 h y se filtra a presión reducida. El sólido obtenido se seca a vacío. 1.10 g, 98 %

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{30}H_{25}N_6Ru]^+$ 571.13; encontrado, 571.2

5.3.4.3 Separación quiral

La separación quiral se realiza mediante cristalización, en un vial ámbar se disuelven 1.10 g de $[Ru(bpy)_2(py)_2]Cl_2$ en 15 mL de H_2O MQ. Para la obtención del isómero Δ-$[Ru(bpy)_2(py)_2]$ sobre esta disolución se adicionan 10 mL de (+)-*O,O´*-dibenzoil-D-tartrato sódico 0.5 M. La mezcla se agita durante 10 min y se deja cristalizar en una vitrina con presión negativa. Transcurridos siete días los cristales de color granate formados se separan por filtración, se lavan con H_2O MQ y se secan a presión reducida. 2.0 g (74 %).[337]

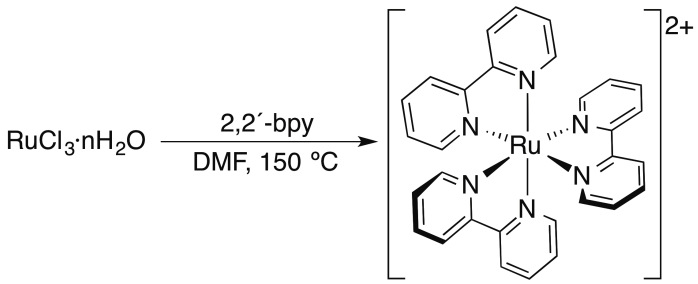
Para la obtención del isómero Λ se emplea la misma estrategia pero el anión empleado es el (-)-*O,O´*-dibenzoil-L-tartrato sódico. 2.12 g (75 %).

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{30}H_{25}N_6Ru]^+$ 571.1; encontrado, 571.0

CD Δ-$[Ru(bpy)_2(py)_2]^{2+}$ (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$) = 335 (-158439), 302 (112427).

CD Λ-$[Ru(bpy)_2(py)_2]^{2+}$ (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$) = 335 (158440), 302 (112402).

Síntesis de $[Ru(bpy)_3]\ Cl_2$



Un balón de reacción de 25 mL que contiene 1.06 g $RuCl_3 \cdot 3H_2O$ (4.02 mmol) y 2.50 g 2,2´-bipiridina (16.1 mmol) disueltos en 15 mL de DMF, se calienta a 150 ºC durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, la disolución rojiza se filtra a presión reducida y sobre la disolución se adicionan 40 mL de acetona. La mezcla se enfría a -20 ºC durante 12 h, el sólido rojo formado se filtra a presión reducida y se seca a vacío. 2.13 g (83 %)

^{1}H–RMN (500 MHz, D_2O-d_2, δ): 8.52 (d, ^3J = 8.27 Hz, 6H); 8.05 (dd, ^3J = 8.27 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 6H); 7.76 (d, ^3J = 8.0 Hz, 6H); 7.41 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 6H)

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-H]^+$ calculado para, $[C_{30}H_{23}N_6Ru]$ 569.9; encontrado, 569.2

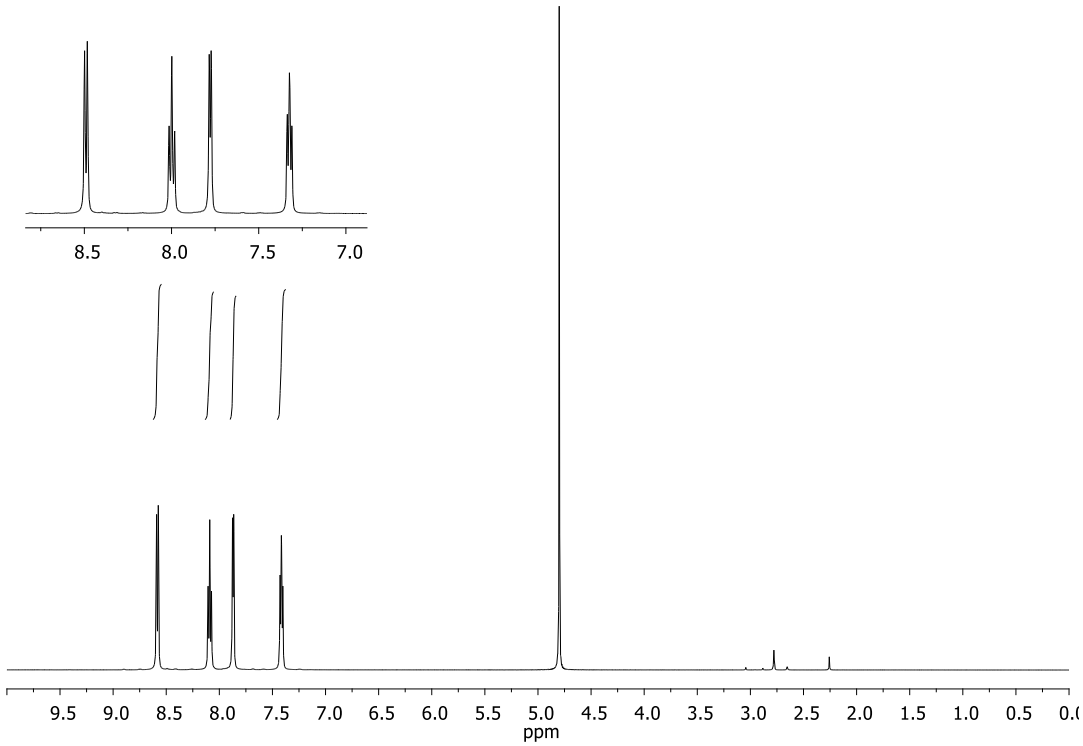
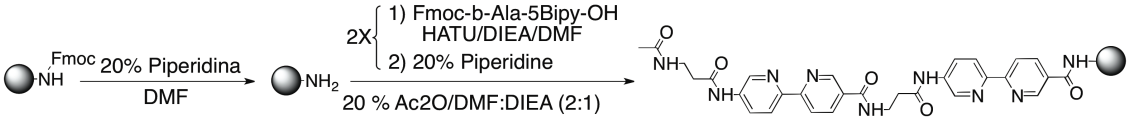


Figura 5.58: Espectro de ^{1}H-RMN del compuesto de coordinación $[Ru(bpy)_3]^{2+}$.

5.3.5 SÍNTESIS DE LOS PÉPTIDOS Y METALOPÉPTIDOS DERIVADOS DEL AMINOÁCIDO FMOC-β-ALA-5BPY-OH (15)

5.3.5.1 Síntesis del péptido AcNH-{β-Ala-5Bpy}$_2$-CONH$_2$



La síntesis de los péptidos se llevó a cabo utilizando la metodología explicada en el punto 5.2.9, siguiendo la estrategia Fmoc/tBu.

Partimos de 550 mg de resina Fmoc-PAL-PEG-PS (0.18 mmol/g) (0.1 mmol) acoplando dos residuos de Fmoc-β-Ala-5Bpy-OH consecutivamente. Una vez completada la síntesis se eliminó el grupo protector Fmoc del último residuo y se acetiló el extremo N-terminal con una disolución al 20 % de anhídrido acético en DMF con DIEA como base.

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para, $[C_{30}H_{29}N_9O_5]^+$ 596.23; encontrado, 596.2

HPLC-MS (5-95 %B): t_R = 17.4´; $[M+H]^+$ 596.3 y $[M+2H]^{2+}$ 298.6.

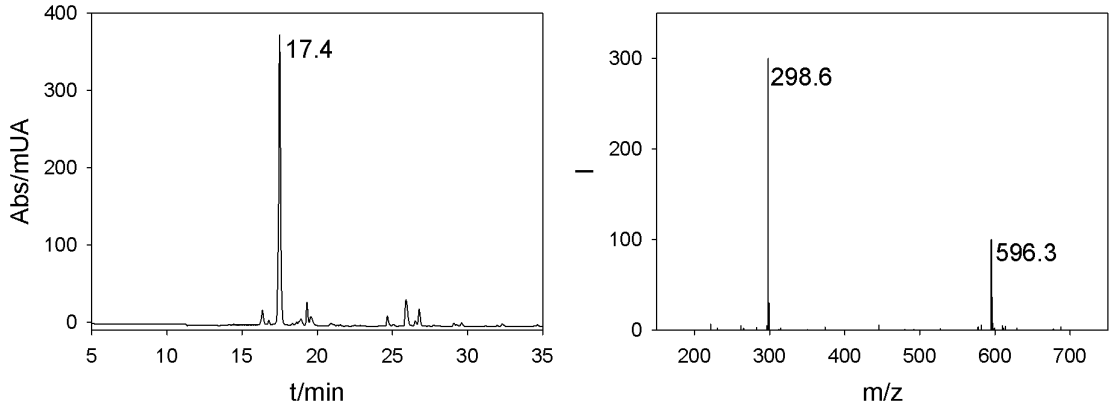


Figura 5.59: izquierda, cromatograma del péptido dinucleante; derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 17.4´.

5.3.5.2 Síntesis de los metalopéptidos enantiopuros derivados de AcNH-{β-Ala-5Bpy}$_2$-CONH$_2$

En un balón de reacción ámbar de 25 mL, 200 mg de resina con péptido anclado se suspenden en 3 mL de DMF previamente purgada con Ar durante 15 min. Una vez desoxigenada se adicionan 110 mg (0.15 mmol, 5 equivalentes) de Δ- o Λ-[Ru(bpy)$_2$(py)$_2$]DBT (DBT = dibenzoil tartrato) y la mezcla se calienta a 110 ºC durante 4 días en atmósfera de Ar. Transcurrido ese tiempo la resina se trasvasa a un reactor de síntesis en fase sólida, donde se lava con DMF (5 × 10 mL, 10 min), CH_2Cl_2 (1 × 10 mL) y se seca.

La rotura de la resina se lleva a cabo con 5 mL del coctel estándar (TIS, H_2O, CH_2Cl_2, TFA) durante 2.5 h. Transcurrido ese tiempo, la resina se filtra, se lava con TFA (1 × 2 mL) y el filtrado se concentra hasta 1 mL con una corriente de N_2. Sobre esta disolución se adicionan 4 mL de H_2O y $(NH_4)(PF_6)$, precipitando así un sólido naranja brillante el cual, se separa por centrifugación y se lava con H_2O (1 × 4 mL). Este sólido se purifica mediante RP-HPLC a escala semipreparativa para dar el producto deseado.

- **ΔΔ- Ru$_2$L**: 43 mg, 67 % para una escala de 0.051 mmol

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-3H]^+$ calculado para, $[C_{70}H_{58}N_{17}O_5Ru_2]^+$ 1420.3; encontrado, 1420.4.

MS-ESI (*m/z*): $[M + 2\ CF_3COO^-]^{2+}$calculado para, $[C_{74}F_6H_{61}N_{17}O_9Ru_2]^{2+}$ 824.3; encontrado, 824.5.

HPLC-MS (5-40 %B): t_R = 27.9´; $[M+Cl]^{3+}$ 448.10, $[M+2TFA^-]^+$ 824.3

CD ΔΔ- Ru$_2$L (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 dmol^{-1}) = 279 (44360), 301 (-56440), 423 (104827), 481 (-4480).

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm (ε/M^{-1} cm^{-1}) = 287 (96681), 312 (62197), 450 (15679).

- **ΛΛ-Ru$_2$L**: 45 mg, 64 % para una escala de 0.053 mmol

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-3H]^+$ calculado para, $[C_{70}H_{58}N_{17}O_5Ru_2]^+$ 1420.3; encontrado, 1420.4.

MS-ESI (*m/z*): $[M + 2CF_3COO^-]^{2+}$ calculado para, $[C_{74}F_6H_{61}N_{17}O_9Ru_2]^{2+}$ 824.3; encontrado, 824.5.

HPLC-MS (5-40 %B): t_R = 27.9´; $[M+Cl]^{3+}$ 448.10, $[M+2TFA^-]^+$ 824.3

CD ΛΛ-Ru_2L (H_2O) λ_{max}, nm (θ/ cm^2 $dmol^{-1}$) = 279 (-44364), 301 (56460), 423 (-104820), 481 (4480).

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm (ε/M^{-1} cm^{-1}) = 287 (96681), 312 (62197), 450 (15679).

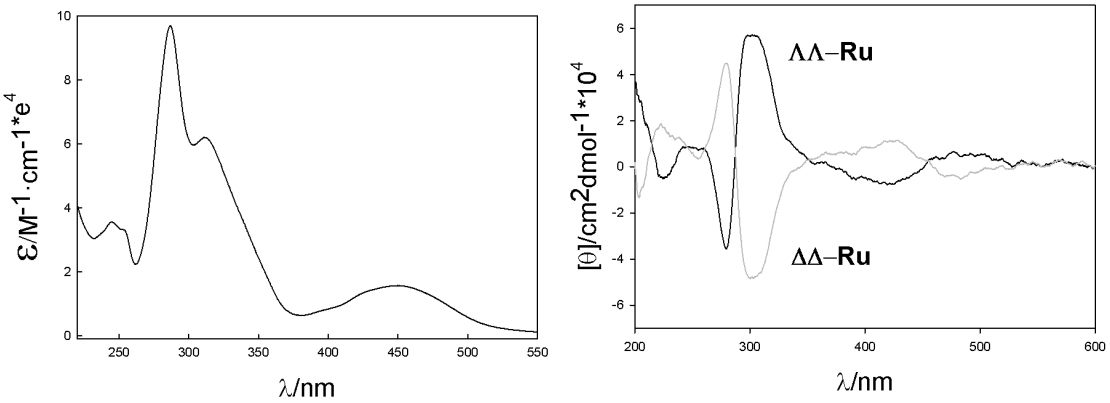


Figura 5.60: Izquierda, espectro UV/Vis de los metalopéptidos dinucleares de Ru(II); derecha, espectros de CD de los metalopéptidos ΔΔ-Ru_2L y ΛΛ-Ru_2L.

5.3.5.3 Síntesis del metalopéptido derivado de AcNH-{β-Ala-5Bpy}$_2$-CONH$_2$

En un balón de reacción ámbar de 25 mL, 200 mg de resina con péptido anclado se suspenden en 3 mL de una mezcla EtOH:DMF (1:1) previamente purgada con Ar durante 15 min. Una vez desoxigenado se adicionan 65 mg (0.15 mmol, 5 equivalentes) de [Ru(bpy)$_2$Cl$_2$] y la mezcla se calienta a 70 ºC durante 3 días en atmósfera de Ar. Transcurrido ese tiempo la resina se trasvasa a un reactor de síntesis en fase sólida, donde se lava con DMF (5 × 10 mL, 10 min), CH_2Cl_2 (1 × 10 mL) y se seca.

La rotura de la resina se lleva a cabo con 5 mL del coctel estándar (TIS, H_2O, CH_2Cl_2, TFA) durante 2.5 h. Transcurrido ese tiempo, la resina se filtra, se lava con TFA (1 × 2 mL) y el filtrado se concentra hasta 1 mL con una corriente de N_2. Sobre esta disolución se adicionan 4 mL de H_2O y $(NH_4)(PF_6)$, precipitando así un sólido naranja brillante el cual, se separa por centrifugación y se lava con H_2O (1 × 4 mL). Este sólido se purifica mediante RP-HPLC a escala semipreparativa para dar el producto deseado.

- **Ru$_2$L**: 22 mg, 72 % para una escala de 0.037 mmol.

MS-MALDI-TOF (*m/z*): $[M-3H]^+$ calculado para, $[C_{70}H_{58}N_{17}O_5Ru_2]^+$, 1420.31; encontrado, 1420.4.

MS-ESI (*m/z*): $[M+2CF_3COO^-]^{2+}$ calculado para, $[C_{74}F_6H_{61}N_{17}O_9Ru_2]^{2+}$ 824.3; encontrado, 824.5.

UV/Vis (H_2O) λ_{max}, nm ($\varepsilon/M^{-1}\ cm^{-1}$) = 287 (96681), 312 (62197), 450 (15679).

HPLC-MS (5-40 %B): t_R = 27.9´; $[M+Cl]^{3+}$ 448.10, $[M+2TFA^-]^+$ 824.3

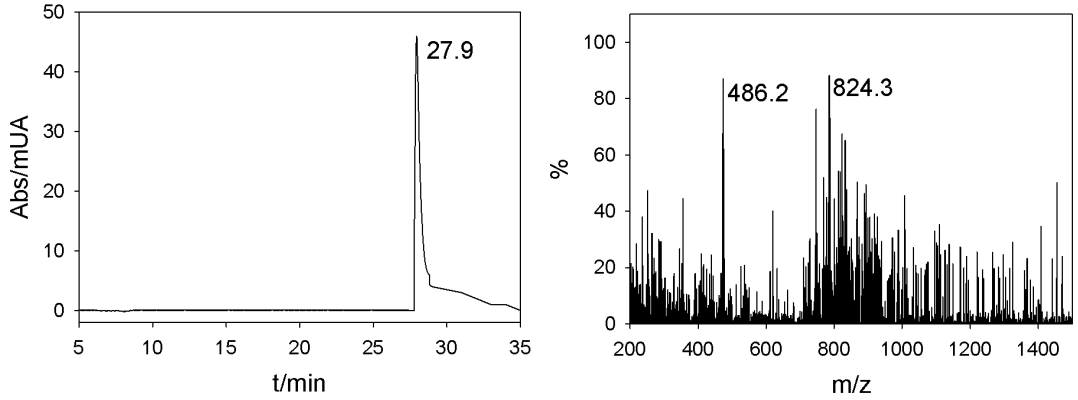


Figura 5.61: izquierda, cromatograma de los metalopéptidos dinucleares de Ru(II); derecha, espectro de masas ESI correspondiente al pico cromatográfico de t_R = 27.9´.

[334] J. A. Yergey, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*,**1983**, *52*, 337-354.

[335] a) K. C. Engman, P. Sandin, S. Osborne, T. Brown, M. Billeter, P. Lincoln, Nordén, B.; B. Albinsson, L.M. Wilhelmsson, *Nucl. Acids Res.,* **2004**, *32*, 5087-5095. b) G. Kallansrud, B. Ward, *Anal. Biochem.*, **1996**, *236*, 134-138.

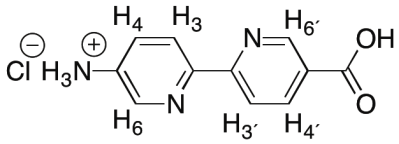
[336] R. A. Krause, *Inorg. Chim. Acta*, **1978**, *22*, 209-213.

[337] a) X. Huat, A. von Zelewsky, *Inorg. Chem.*, **1995**, *34*, 5791–5797. ; b) B. Kolp, H. Viebrock, A. von Zelewsky, D. Abeln, *Inorg. Chem.*, **2001**, *40*, 1196–1198.

6. Anexos

6.1 Anexo I: Asignaciones

6.1.1 AMINOÁCIDO (12)



^{1}H-RMN (500 MHz, D_2O-d_2, δ): 9.04 (d, ^4J = 1.5 Hz, **H6´**); 8.40 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.5 Hz, **H4´**); 8.12 (d, ^3J = 9.1 Hz, **H3**); 8.01 (d, ^4J = 2.7 Hz, **H6**); 7.99 (d, ^3J = 8.3 Hz, **H3´**); 7.63 (dd, ^3J = 9.1 Hz, ^4J = 2.7 Hz, **H4**).

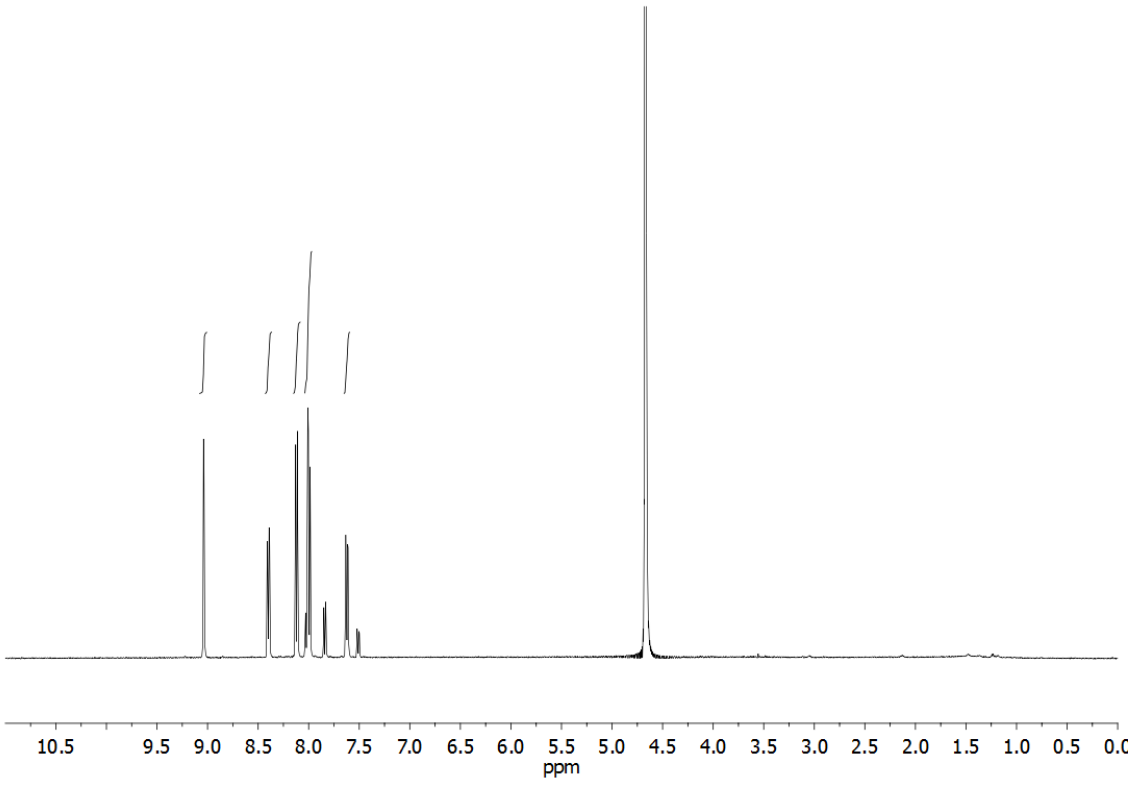


Figura 6.1: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente a la molécula **12**.

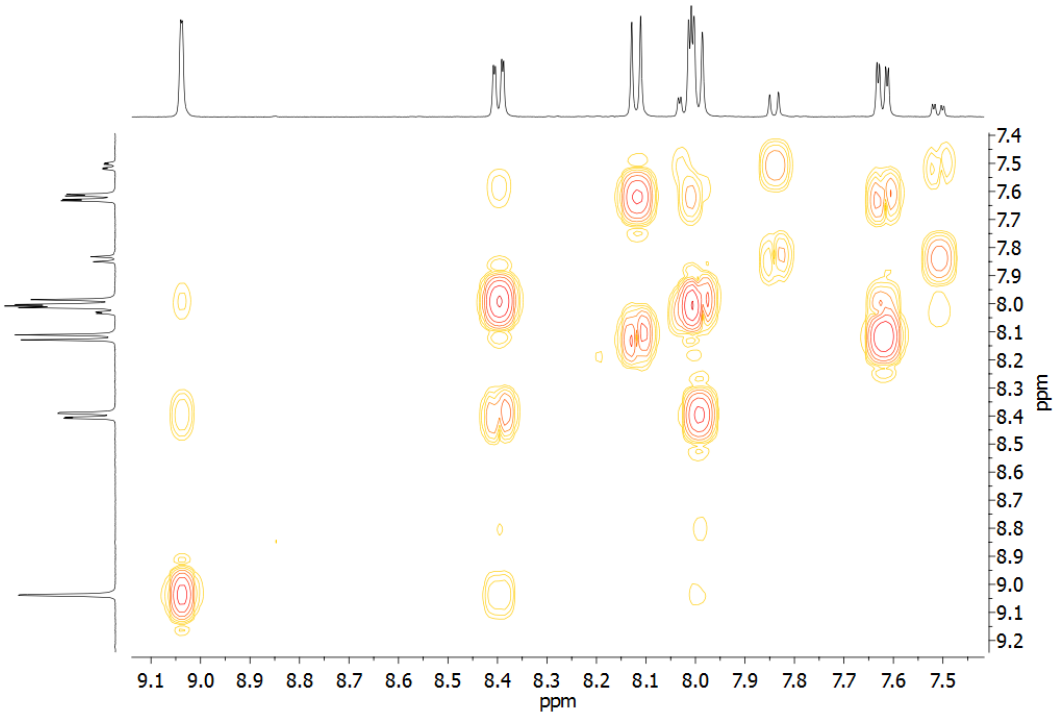
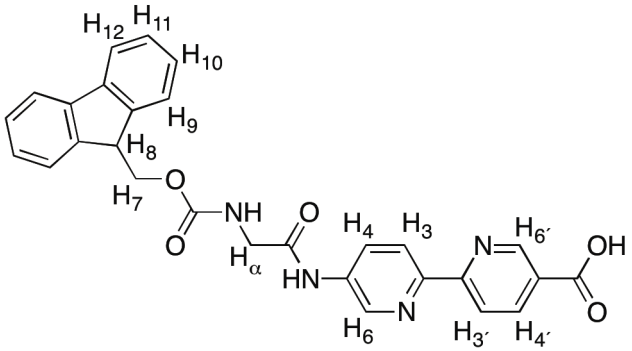


Figura 6.2: Espectro COSY de la molécula **12**.

6.1.2 AMINOÁCIDO (13)



^{1}H–RMN (300 MHz, DMSO-d$_6$, δ): 10.45 (s, COO**H**); 9.11 (d, ^4J = 2.02 Hz, **H$_{6'}$**); 8.88 (d, ^4J = 2.24 Hz, **H$_6$**); 8.42 (dd, **H$_3$**,**H$_{3'}$**); 8.36 (dd, ^3J = 8.30 Hz, ^4J = 2.02 Hz, **H$_{4'}$**); 8.23 (dd, ^3J = 8.62 Hz, ^4J = 2.24 Hz, **H$_4$**); 7.89 (d, ^3J = 7.33 Hz, **H$_{12}$**); 7.71 (d, ^3J = 7.60 Hz, **H$_9$**); 7.41 (t, ^3J = 6.97 Hz, **H$_{11}$**); 7.33 (t, ^3J = 7.51 Hz, **H$_{10}$**); 4.32 (d, ^3J = 6.08 Hz, **H$_7$**); 4.23 (t, ^3J = 6.08 Hz, **H$_8$**); 3.87 (d, ^2J = 5.07 Hz, **Hα**).

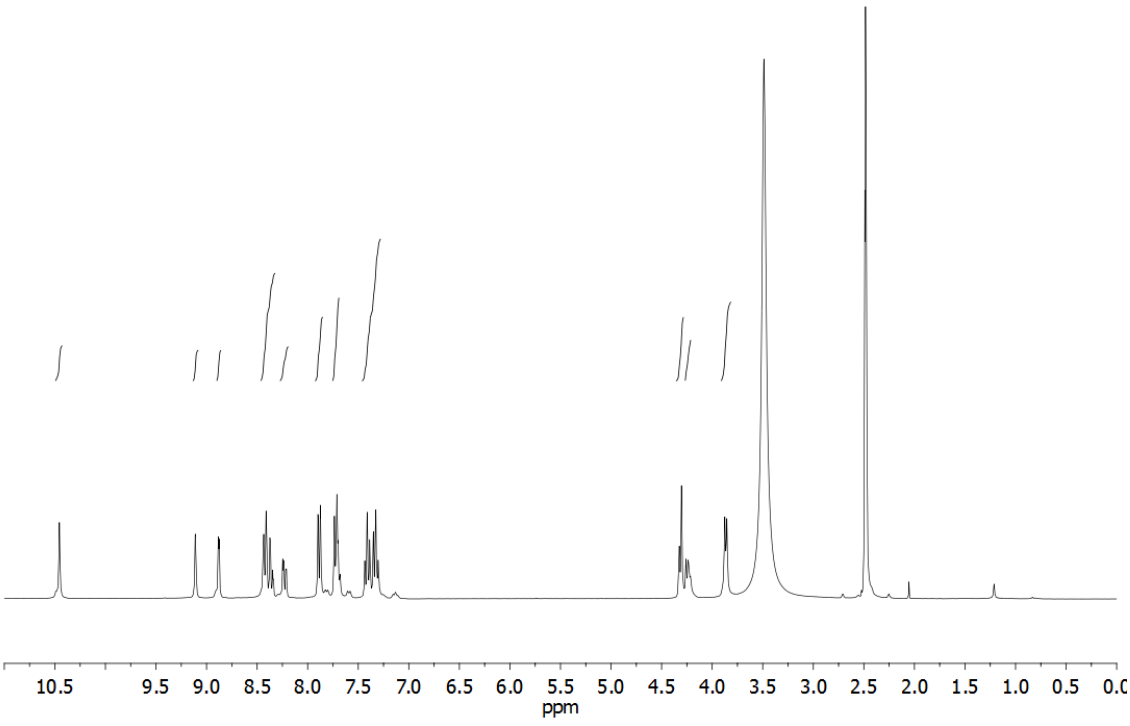
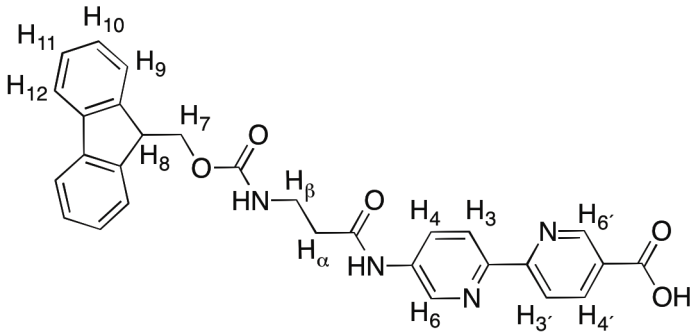


Figura.6.3: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente a la molécula **13**.

6.1.3 AMINOÁCIDO (15)



^{1}H–RMN (300 MHz, DMSO-d_6, δ): 10.44 (s, COO**H**); 9.13 (d, ^4J = 1.36 Hz, **H$_{6'}$**); 8.89 (d, ^4J = 2.12 Hz, **H$_6$**); 8.42 (m, **H$_{4'}$**, **H$_4$**, **H$_{3'}$**); 8.25(dd, ^3J = 8.48 Hz, ^4J = 2.12 Hz, **H$_4$**); 7.88 (d, ^3J = 7.46 Hz, **H$_{12}$**); 7.67 (d, ^3J = 7.38 Hz, **H$_9$**); 7.49 (t, ^3J = 5.34 Hz, **NH**); 7.40 (t, ^3J = 7.21 Hz, **H$_{11}$**); 7.30 (t, ^3J = 7.38 Hz, **H$_{10}$**); 4.30 (d, ^3J = 6.95 Hz, **H$_7$**); 4.21 (t, ^3J = 6.95 Hz, **H$_8$**) 3.32 (t, ^3J = 6.70 Hz, **Hα**); 2.60 (t, ^3J = 6.70 Hz, **Hβ**).

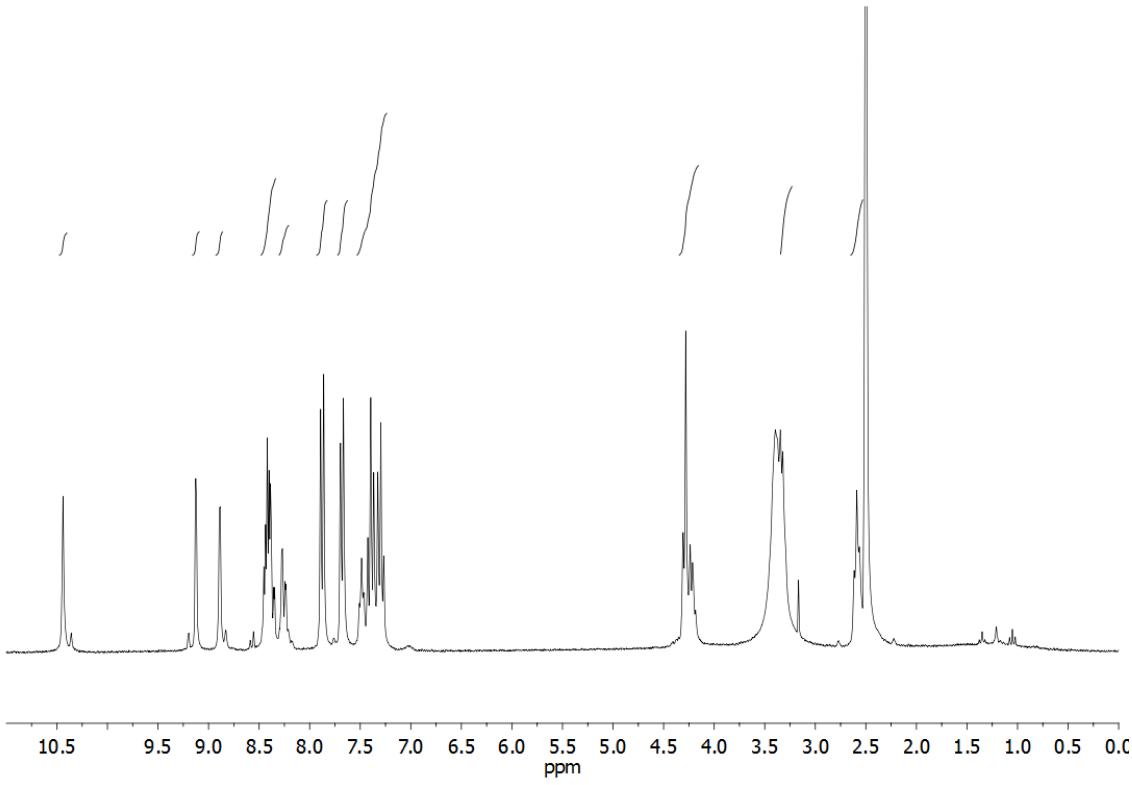
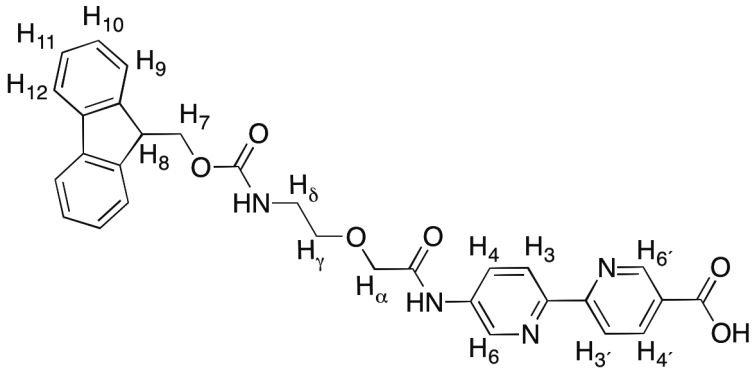


Figura 6.4: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente a la molécula **15**.

6.1.4 AMINOÁCIDO (16)



^{1}H–RMN (300 MHz, DMSO-d$_6$, δ): 10.07 (s, COO**H**); 9.11 (d, ^4J = 1.91 Hz, **H$_{6'}$**); 8.95 (d, ^4J = 2.38 Hz, **H$_6$**); 8.41 (d, ^3J = 8.29 Hz, **H$_{4'}$**); 8.40 (d, ^3J = 8.76 Hz, **H$_4$**), 8.29 (dd, ^3J = 8.29 Hz, ^5J = 1.91 Hz, **H$_{3'}$**); 7.85(dd, ^3J = 8.76 Hz, ^5J = 2.38 Hz, **H$_3$**); 7.68 (d, ^3J = 7.88 Hz, **H$_{12}$**); 7.0 (d, ^3J = 6.98 Hz, **H$_9$**); 7.38 (t, ^3J = 6.98 Hz, **H$_{11}$**); 7.30 (t, ^3J = 7.66 Hz, **H$_{10}$**); 4.30 (d, ^3J = 7.21 Hz, **H$_7$**); 4.21 (t, ^3J = 7.21 Hz, **H$_8$**); 4.13 (s, **Hα**); 3.56 (t, ^3J = 6.14 Hz, **Hγ**) 3.26 (t, ^3J = 6.14 Hz, **Hδ**).

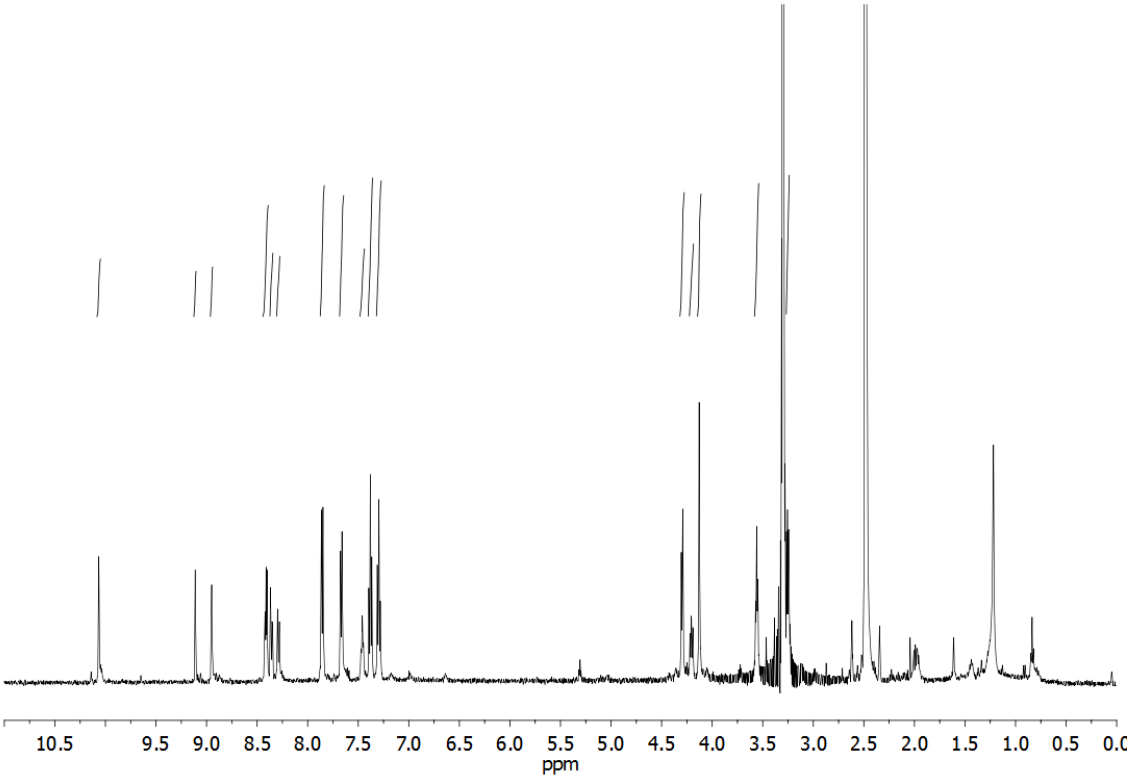
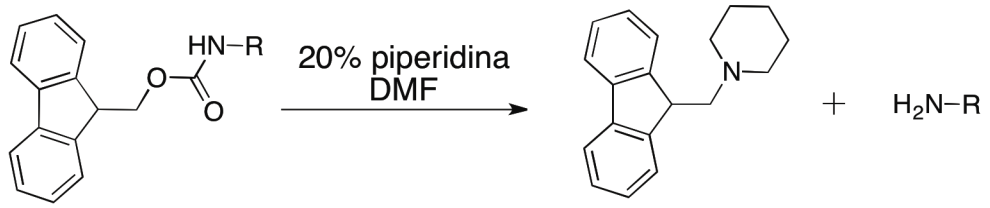


Figura 6.5: Espectro de ^{1}H-RMN correspondiente a la molécula **16**.

6.2 Anexo II: Cuantificación de la carga de la resina y del acoplamiento.



La carga de la resina se cuantifica espectroscópicamente realizando medidas de absorción UV/Vis.[338]

Una muestra de resina se lava con 4 × DMF, 2× MeOH y 1× CH_2Cl_2 y se seca a vacío. Se pesa la cantidad exacta de resina en un reactor de síntesis en fase sólida previamente tarado. Sobre la muestra de resina se añade un volumen conocido y exacto de una mezcla de piperidina al 20 % en DMF y se agita durante 30´. Transcurrido ese tiempo, la resina se filtra y se determina la absorbancia de la disolución a 301 nm. La muestra de resina se lava 6 × DMF y se realiza el primer acoplamiento siguiendo el protocolo estándar de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).

Se pesan aproximadamente 10 mg de resina en un vial de 2 mL. Sobre esta resina se adiciona 1 mL de una disolución de piperidina al 20 % en DMF. Tras 30 minutos se extraen tres alícuotas de 50 μL y se diluye a 2 mL con una disolución de piperidina al 20 % en DMF. Se determina la absorbancia a 301 nm de cada muestra en una cubeta de cuarzo 100 QS. Para determinar la carga de la resina se aplica la siguiente ecuación basada en la ley de Lambert-Beer para cada una de las alícuotas y se calcula el valor medio.

$$\frac{A_{301} \times 20}{7800 \times m} = mmol/g$$

Donde, m es la masa exacta en gramos de resina a desproteger, 7800 es el valor del coeficiente de extinción del aducto piperidina-dibenzofulveno y 20 representa un factor de dilución.

Para determinar la concentración se calcula un promedio para los tres valores $[C]_1$.

Una vez realizado el primer acoplamiento, la cuantificación del rendimiento del se lleva a cabo del mismo modo.

Una vez transcurrido el tiempo decidido para el acoplamiento, la muestra se lava 10 × DMF y 2 × CH_2Cl_2 y se seca a vacío. Sobre la muestra de resina se añade 1mL de una mezcla de piperidina al 20 % en DMF y se agita. Tras 30 minutos se extraen tres alícuotas de 50 μL y se diluye a 2 mL con una disolución de piperidina al 20 % en DMF. Se determina la absorbancia a 301 nm de cada muestra en una cubeta de cuarzo 100 QS

Para determinar el rendimiento del acoplamiento se aplica la siguiente fórmula.

$$\% = [A_{301}]_2/[A_{301}]_1 X100$$

Donde, $[A_{301}]_1$ es el valor promedio de la absorbancia a 301 nm para las alícuotas correspondientes a la desprotección del grupo Fmoc, para el cálculo de la carga de la resina; y $[A_{301}]_2$ es el valor promedio de la absorbancia a 301 nm de las alícuotas correspondientes a la desprotección del grupo Fmoc, después del primer acoplamiento.

6.3 Anexo III. Espectroscopia de dicroísmo circular

El dicroísmo Circular (CD) se define como la medida de la diferencia de absorción (ΔA) entre la luz polarizada circularmente a la izquierda (A_L) y a la derecha (A_R).[339] La adaptación de la ley de Lambert-Beer para el CD sustituye el coeficiente de extinción (ε), por la diferencia entre los coeficientes de extinción para la absorción de la luz polarizada a la izquierda y a la derecha (Δε).

$$CD = \Delta A = A_L - A_R = \Delta\varepsilon\ \ell\ C = (\varepsilon_L - \varepsilon_R)\ \ell\ C$$

En la mayor parte de los casos los espectros de CD no se expresan en unidades de absorbancia, sino que normalmente se transforman a *elipticidad*, en miligrados. La conversión entre las dos es directa:

$$\theta\ (\text{miligrados}) = 32982\ C\ \ell\ \Delta\varepsilon = 32982\ \Delta A$$

En donde C es la concentración de la muestra en mol/dm^{-3} y ℓ es el paso óptico de la celda medido en cm.

La unidad más común para los espectros de CD es la *elipticidad molar*:

$$M_\theta = [\theta]_m = 100\ \theta / C\ \ell = 3298\ \Delta\varepsilon$$

En el caso de péptidos y proteínas se suele utilizar la *elipticidad molar por residuo* (MRE), que se calcula directamente a partir de la elipticidad molar simplemente dividiendo su valor entre el número de residuos del péptido o la proteína.

El CD es especialmente útil para el estudio de moléculas quirales, entre las cuales se encuentran prácticamente todas las moléculas de interés biológico. De hecho la utilización del CD como técnica de análisis estructural está ampliamente extendida para el estudio de sistemas biológicos, a pesar de que las moléculas implicadas normalmente son muy grandes y no es posible un análisis estructural detallado de los espectros de CD obtenidos.

Las moléculas aquirales no dan señal en el CD, sin embargo su complejación con macromoléculas quirales provoca cambios conformacionales que inducen quiralidad en los ligandos, generando por lo tanto una señal inducida en CD. Dicha señal de CD puede ser

utilizada para caracterizar la interacción responsable de esa asociación. El CD normalmente se utiliza con dos fines: Para detectar cambios en la conformación de macromoléculas, y para detectar la interacción entre macromoléculas y moléculas pequeñas, especialmente moléculas aquirales, cuya señal de CD inducida se deberá exclusivamente a su interacción con la macromolécula.[340,341,342]

6.4 Anexo IV: Determinación de la constante de afinidad mediante fluorescencia

La típica ecuación para un modo de unión 1:1 en el cual un receptor no fluorescente (dsADN) se añade sobre un ligando fluorescente se describe por las siguientes ecuaciones si no se tiene en cuenta la unión no específica:

$$K_D = \frac{R \cdot L}{C} \quad (1)$$

$$R_T = R + C \quad (2)$$

$$L_T = L + C \quad (3)$$

$$F_T = F_0 + F_C \times C \quad (4)$$

Donde R es la concentración del receptor libre en el equilibrio; RT, la concentración total del receptor (se mantiene aproximadamente constante durante toda la valoración); L, es la concentración de ligando libre en el equilibrio; LT, es la concentración total de ligando añadido; K_D, es la constante de disociación de la interacción entre el receptor y el ligando; C es la concentración del complejo ligando-receptor fluorescente; FT, es la fluorescencia total observada; F0, es un parámetro ajustable que considera la fluorescencia del fondo; FC es un parámetro ajustable para la fluorescencia del complejo ligando-recetor. Resolviendo el sistema de ecuaciones para FT y eliminando R, L, y RL, se obtuvo la conocida ecuación 5:

$$F_T = \frac{1}{2}[2F_0 + F_C\sqrt{K_D^2 + (L_T - R_T)^2 + 2K_D(L_T + R_T))}] \quad (5)$$

Esta ecuación es válida cuando la contribución de la fluorescencia del ADN a la fluorescencia total es muy pequeña, despreciable. Esto sólo ocurre cuando el receptor se une a ADN diana de forma muy eficiente y consecuentemente hay una gran aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia.

Si la unión es más débil el aumento de intensidad de fluorescencia es menor y entonces la ecuación 5 no es un modelo apropiado para lo observado experimentalmente. Se necesita otra ecuación en el cual la

fluorescencia total FT, considere la fluorescencia del ligando (ADN) (FL LT).[343]

$$F_T = F_0 + F_C \cdot C + F_L \cdot L_T \qquad (6)$$

El conjunto resultante de ecuaciones se resolvió usando el programa Mathematica 6.0.1.0 para Windows 7 (Wolfram Research), dando lugar a la ecuación 7, que fue usada para el ajuste no lineal de los datos experimentales. Esta ecuación considera las pequeñas variaciones de la emisión de fluorescencia como resultado de la fluorescencia residual del ADN a una determinada longitud de onda.

$$F_T = \frac{1}{2}[2F_0 + F_C \cdot K_D + F_C \cdot L_T + 2F_L \cdot L_T + F_C \cdot R_T - F_C\sqrt{K_D^2 + (L_T - R_T)^2 + 2K_D(L_T + R_T))}]$$

[338] I. Coin, M. Beyermann, M. Bienert, *Nat. Protoc.*, **2007**.

[339] G. D. Fasman, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, 1990.

[340] C. Zimmer, G. Luck, *Advances in ADN Sequence Specific Agents*, **1992**, *1*, 51-65.

[341] H. G. Brittain, *Analytical Applications of Circular Dichroism*, **1994**, *14*, 307-327.

[342] M. Hatano, *Adv. Polym. Sci.*, **1986**, *77*, 1.

[343] M. H. A. Roehrl, J. Y Wang, G. Wagner, *Biochemistry,* **2004**, *43*, 16056–16066.